

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار – عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En MICROBIOLOGIE
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Production de métabolites secondaires et d'enzymes par les champignons *Ganoderma* spp. et *Fomes fomentarius* L. de la région d'El-Kala, Algérie

Présentée par : M^{me} MELOUKA Hadda.

Directeur de thèse : M CHEKIREB Djamel

Professeur, Université d'Annaba.

Membres de Jury :

Présidente : M^{me} GACEMI-KIRANE Djamila

Professeur, Université d'Annaba.

Examineur : M AOUADI Saoudi

Professeur, Université d'Annaba.

Examinatrice : M^{me} AOUN Leila

Professeur, Université d'El-Taref.

Examinatrice : M^{me} BENDJEDDOU Amel

MCA, Université de Souk Ahras.

Année universitaire : 2017/2018.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce modeste travail.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur *CHEKIREB Djamel*, Professeur de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir dirigé cette thèse de doctorat. Je lui adresse ma plus sincère reconnaissance pour son aide, ses conseils avisés, sa grande disponibilité, sa bienveillance, sa confiance et ses qualités humaines et scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je sais infiniment gré à madame *GACEMI-KIRANE Djamila*, Professeur de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir accepté de présider ce jury de thèse, je la remercie aussi pour son soutien tout au long de mon cursus universitaire et en tant que responsable de la formation doctorale.

Mes remerciements vont particulièrement à monsieur *AOUADI Saoudi*, Professeur de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, pour avoir accepté consacrer de son temps pour examiner et juger ce travail.

Je souhaiterais également exprimer ma vive reconnaissance à madame *AOUN Leila*, professeur de l'Université Chadli Bendjedid d'El-Taref, pour avoir accepté de participer au jury et contribuer à l'examen de ce travail.

Je tiens à remercier madame *BENDJEDDOU Amel*, Maître de Conférences de l'Université Mohamed-Chérif Messaadia de Souk Ahras, qui me fait l'honneur d'assister à cette soutenance de thèse et de prendre part à ce jury.

Un grand merci ne serait certainement pas suffisant pour exprimer toute ma gratitude à madame *OUARTSI Akila*, Maître de Conférences de l'Université Badji Mokhtar, Annaba ; pour les nombreux conseils qu'elle a pu me donner, notamment au niveau de la réflexion scientifique et des manipulations pratiques. Je suis extrêmement contente de travailler avec elle.

J'adresse également mes remerciements au Professeur, *LADJAMA Ali* pour avoir accueilli ce travail de recherche et de thèse au Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées (LBMA).

Je tiens à présenter mes vifs remerciements à monsieur *BRANES Zidane*, Professeur et chef de département de Biochimie à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, pour sa bienveillance et son aide précieuse.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble du personnel ; évidemment *Adra, Mouna, Sakina, Nadjoua* et *Lazhar...* et aux collègues chercheurs de laboratoires qui permettent un formidable environnement de travail que ce soit scientifique ou humain.

Je remercie toutes mes amies ; *Zineb, Saida, Badra, Amina, Souad, Samia, Zahra, Sarah* et *Hanene* ; il est difficile de décrire en quelques lignes à quel point je suis reconnaissante pour tous les bons moments partagés lors de toutes ces années d'études et pour ceux à venir.

Je vais maintenant adresser quelques lignes à ma famille et ceux que j'aime, à savoir ma chère mère à laquelle j'exprime toute ma reconnaissance éternelle et mon amour profond pour tout ce qu'elle m'a fait et m'a offert ; je t'aime *Oummi*.

Je remercie chaleureusement tous mes frères et sœurs ; *Didine, Radhia, Kader* et *Hamidou*, pour leur soutien moral et affectif sans faille.

Une pensée particulière pour ma sœur *Thouria*, merci pour ta présence qui me donne la force de me relever et d'avancer.

Je remercie un grand homme, celui qui m'a fait ce qu'humblement j'en suis aujourd'hui, *Redha...* le frère, le père et l'idole. Merci et mille mercis.

Merci à mon mari *Mohcen* pour son soutien dans les moments difficiles, pour sa patience et ses encouragements.

A ma fille ; mon aimée *Zineb* ; celle qui illumine ma vie et dont le seul sourire m'a permis d'arriver au bout de ce manuscrit, je te dédie ce travail pour qu'un jour tu sois fière de ta Mamam.

Enfin, je dédie ce travail à la mémoire de mon père.

REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	i
GLOSSAIRE	iv
LISTE D'ABREVIATIONS	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
RESUMES	x

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE.1. Les polypores <i>Ganoderma</i> spp. et <i>Fomes fomentarius</i>	5
1.1. Historique	5
1.2. Taxonomie et systématique des <i>Fomes</i> et <i>Ganoderma</i>	5
1.2.1. Taxonomie classique	5
1.2.2. Taxonomie moléculaire	7
1.3. Morphologie des champignons	10
1.3.1. <i>Ganoderma</i> spp.	10
1.3.2. <i>Fomes fomentarius</i>	11
1.4. Biologie des champignons	12
1.4.1. Ultrastructure des <i>Ganoderma</i> et <i>F. fomentarius</i>	12
1.4.2. Croissance et Cycle de vie	13
1.5. Physiologie des champignons	14
1.6. Ecologie des champignons de pourritures blanches	15
CHAPITRE.2. Métabolites fongiques	18
2.1. Production de métabolites primaires	18
2.1.1. Les polysaccharides	18
2.1.2. Les protéines	19
2.1.3. Les enzymes	20
2.2. Production de métabolites secondaires	23
2.3. Applications biotechnologiques	23
2.3.1. La fermentation en milieu solide	23
2.3.2. La culture submergée	24
2.3.3. La bioremédiation	26
CHAPITRE.3. Les triterpénoïdes et les stéroïdes fongiques	28
3.1. Introduction	28
3.2. Chimie des terpénoïdes et voie de biosynthèse	32
3.3. Classification des triterpènes tétracycliques de type lanostane et les stérols	33
II. MATERIELS ET METHODES	
1. Les champignons	36
1.1. Caractérisation et identification des spécimens récoltés	36
1.1.1. Structures macroscopiques	36
1.1.2. Observations microscopiques	37

1.2. Culture et purification des mycéliums de <i>Ganoderma</i> et <i>Fomes</i>	38
1.2.1. La préparation des suspensions sporales	38
1.2.2. La mise en culture	38
1.2.3. Le repiquage et la purification	38
1.2.4. Calcul de taux de croissance	38
1.3. Conservation des souches	39
1.3.1. Conservation sur gélose inclinée	39
1.3.2. Conservation sous huile	39
1.3.3. Cryoconservation	39
2. Milieux de cultures	40
2.1. Milieux solides	40
2.2. Milieux liquides	40
2.3. Mesure de pH	41
2.4. Stérilisation	41
3. Culture submergée et essais de production de triterpénoïdes	42
3.1. La pré-culture	42
3.2. La culture	42
3.3. La détermination de la biomasse	43
3.4. La détermination du pH	43
4. L'extraction des triterpénoïdes	44
5. Méthodes chromatographiques pour visualiser et identifier les métabolites produits	45
5.1. Chromatographie sur couche mince	45
5.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de spectrométrie de masse à temps de vol (LC-Q-TOF-MS)	45
5.2.1. Principe général	45
5.2.2. Conditions de chromatographie liquide	46
5.2.3. Conditions de spectrométrie de masse	47
6. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits fongiques	48
6.1. L'étude de la sensibilité aux extraits fongiques de quelques souches bactériennes pathogènes	48
6.2. Les antibiotiques	48
6.3. Les extraits chloroformiques et préparation des disques	49
6.4. Mode opératoire de la méthode de diffusion en disque	50
7. Mise en évidence des différentes activités enzymatiques	51
7.1. Production de cellulases	51
7.1.1. Hydrolyse qualitative de la cellulose en milieux gélosés	51
7.1.2. Production de cellulase en milieu liquide	52
7.2. Production de laccases	52
7.3. Production de xylanases	53
7.4. Production de pectinases	53
7.5. Détection de l'activité protéolytique	53
7.6. Détection de l'activité d'amylases	54

III. RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Caractérisation et identification des polypores	56
1.1. Description de spécimens de <i>Ganoderma</i>	56
1.2. Description des spécimens de <i>Fomes</i>	58
1.3. Mise en culture des sporées de <i>Ganoderma</i> et <i>Fomes</i>	59
1.4. Aspects cultureux des isolats fongiques	59
Discussion	62
2. Culture en milieu liquide des isolats de <i>F. fomentarius</i> et <i>G. resinaceum</i>	63
2.1. La biomasse	63
2.2. Evolution de pH durant la croissance	63
2.3. Le rendement en biomasse Y_x	67
Discussion	69
3. Détecter et caractériser les métabolites secondaires produits	71
3.1. Extraits chloroformiques	71
3.2. Chromatographie sur couche mince	72
Discussion	78
3.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	80
3.3.1. La chromatographie liquide	80
Discussion	83
3.3.2. La Q-TOF-MS	84
Discussion	95
4. Evaluation de l'activité antibactérienne	98
Discussion	102
5. Mise en évidence des différentes activités enzymatiques	104
5.1. Détection de cellulases	104
5.1.1. Hydrolyses de celluloses insolubles	104
5.1.2. L'hydrolyse de CMC	105
Discussion	108
5.2. Détection de laccases	110
5.3. Détection de xylanases	110
5.4. Détection de pectinases	110
Discussion	113
5.5. Détection de l'activité protéolytique	115
5.6. Détection de la production d'amylases	115
Discussion	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
ARTICLES	

Glossaire

Basidiocarpe : synonyme de carpophore, basidiome ou organe de fructification, c'est la partie visible des champignons à basides.

Cellulose : un β -D-glucane ; polymère constitué d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose.

Chlamydospore : spore à paroi épaisse et mélanisée formée lors des conditions défavorables où un ou plusieurs compartiments d'hyphe qui sont scellés près des septa.

Hémicelluloses : polymères hétérogènes de D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-glucose, D-galactose et l'acide D-glucuronique linéaires et ramifiés.

Hyphe : structure constituée d'une succession d'unités cellulaires tubulaires (cylindriques) contenant du protoplasme avec des organelles et un noyau ou plusieurs noyaux.

Lignine : polymère amorphe tridimensionnel composé d'unités phénylparanoïdes.

Mycélium : ensemble des hyphes forment le mycélium.

Saprotrophe : du grec *sapros* = mort ; *trophy* = nourriture ; un organisme qui peut se nourrir par dégradation de matières organiques mortes.

Septum : (plur. septa) ; parois transversales qui compartimentent les hyphes de la majorité des champignons supérieurs, les septa contiennent des perforations dites pores septaux.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
CPB	champignons de pourriture blanche
CCM	chromatographie sur couche mince
CMC	carboxyméthylcellulose
HPLC	pour « <i>High Performance Liquid Chromatography</i> » ; la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)
PNEK	Parc National d'El-Kala
Q-TOF-MS	pour « <i>Quadrupole-Time Of Flight Mass spectrometry</i> » ; la spectrométrie de masse quadripolaire et à temps de vol.
rpm	pour « <i>rounds per minute</i> » ; tours par minute

Liste des figures

Figure.I.1. La basidiospore de <i>G. applanatum</i> . L'aspect à double paroi typique des spores de <i>Ganoderma</i> avec apex tronqué.	6
Figure.I.2. Arbre phylogénique des <i>Ganoderma</i> dérivé des séquences de la petite sous-unité de l'ADN ribosomique mitochondrial (<i>mt-SSU rDNA</i>).	9
Figure.I.3. Basidiomes de <i>G. lucidum</i> .	10
Figure.I.4. Basidiomes de <i>G. applanatum</i> .	10
Figure.I.5. Basidiomes de <i>G. resinaceum</i> .	11
Figure.I.6. Basidiocarpe de <i>F. fomentarius in situ</i> .	12
Figure.I.7. La formation des clamps de connexion dans les hyphes dicaryon de Basidiomycètes.	13
Figure.I.8. Cycle de vie de <i>F. fomentarius</i> (L.: Fr.) Kickx et <i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.: Fr.) P. Karst.	14
Figure.1.9. Structure typique de β -(1-3)D-glucane avec ramification β -(1-6)-monoglucosyl.	19
Figure.I.10. La voie du mévalonate et biosynthèse du squelette terpénoïde.	33
Figure.I.11. Des exemples de structures chimiques des triterpènes de <i>Ganoderma</i> .	34
Figure. II.1. Situation géographique du Parc National d'El Kala.	37
Figure. II.2. Chambre de culture.	43
Figure. II.3. Schéma modifié du protocole d'extraction des triterpénoïdes.	44
Figure.II.4. Structure d'un spectromètre hybride quadripolaire et à temps de vol Q-TOF-MS.	46
Figure.II.5. Structure d'acide fusidique.	49

Figure.III.1. Basidiocarpe de <i>G. resinaceum</i> .	57
Figure.III.2. Aspect microscopique des spores de <i>G. resinaceum</i> des isolats récoltés.	57
Figure.III.3. Basidiocarpe de <i>F. fomentarius</i> .	58
Figure.III.4. : Aspects microscopiques de quelques souches fongiques étudiés.	61
Figure.III.5. : Aspects cultureux de quelques souches fongiques étudiés en culture liquide (différentes tailles de <i>pellets</i>).	64
Figure.III.6. Courbes présentant la production de biomasse et le pH pour les isolats de <i>G. resinaceum</i> .	66
Figure.III.7. La séparation des extraits avec chromatographie sur couche en gel de silice.	75
Figure.III.7. La séparation des extraits avec chromatographie sur couche en gel de silice. (<i>suite</i>)	76
Figure.III.8. LC/DAD-UV chromatogrammes à 252 nm des quatre extraits élués par l'eau avec 0.2% d'acide formique (A) d'acétonitrile (B).	81
Figure.III.8. LC/DAD-UV chromatogrammes à 252 nm des quatre extraits élués par l'eau avec 0.2% d'acide formique (A) d'acétonitrile (B). (<i>Suite</i>)	88
Figure.III.9. Les différents composés triterpéniques extraits de <i>G. resinaceum</i> putativement annotés.	90
Figure.III.9. Les différents composés triterpéniques extraits de <i>G. resinaceum</i> putativement annotés. (<i>suite</i>)	91
Figure.III.10. Différence entre la révélation de dégradation de xylane avec rouge Congo (A) et le Lugol (B).	110
Figure.III.11. Différence entre la de dégradation de l'amidon de maïs (A) et l'amidon soluble (B).	115

Liste des tableaux

Tableau.I.1. Ordre taxonomique des espèces de <i>Ganoderma</i> et <i>F. fomentarius</i>	8
Tableau.I.2. Des activités enzymatiques des <i>Ganoderma</i> et <i>F. fomentarius</i> citées dans la littérature	22
Tableau.I.3. Activités biologiques des stérols et triterpénoïdes des <i>F. fomentarius</i> et des espèces de <i>Ganoderma</i> .	30
Tableau.I.3. Activités biologiques des stérols et triterpénoïdes des <i>F. fomentarius</i> et des espèces de <i>Ganoderma</i> (<i>suite</i>).	31
Tableau.II.1. les antibiotiques utilisés.	49
Tableau.III.1 : caractères des isolats <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> .	60
Tableau.III.2. Les quantités de biomasses et les valeurs de pH obtenues en culture submergée par ordre décroissant en fonction de la biomasse.	65
Tableau.III.3. Les rendements en biomasse par rapport aux sources de carbone et d'azote.	68
Tableau.III.4. Aspects des extraits chloroformiques.	60
Tableau.III.5. Nombre de composés obtenus avec la phase mobile Q1.	73
Tableau.III.6. Nombre de composés obtenus avec la phase mobile Q2.	74
Tableau.III.7. Alignement des spectres Q-TOF-MS des 3 échantillons analysés de <i>G. resinaceum</i> .	86
Tableau.III.7. Alignement des spectres Q-TOF-MS des 3 échantillons analysés de <i>G. resinaceum</i> . (<i>suite</i>)	87
Tableau.III.7. Alignement des spectres Q-TOF-MS des 3 échantillons analysés de <i>G. resinaceum</i> . (<i>suite 2</i>)	88
Tableau.III.8. Interprétation des spectres MS obtenus de l'analyse de <i>F. fomentarius</i> .	93
Tableau.III.8. Interprétation des spectres MS obtenus de l'analyse de <i>F. fomentarius</i> . (<i>suite</i>)	94
Tableau.III.9. L'activité antibactérienne des extraits chloroformiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> vis-à-vis les souches bactériennes testées.	100

Tableau.III.9. L'activité antibactérienne des extraits chloroformiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> vis-à-vis les souches bactériennes testées. (suite)	101
Tableau.III.10. Résultats des tests qualitatifs des différentes activités cellulolytiques des isolats fongiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> .	106
Tableau.III.10. Résultats des tests qualitatifs des différentes activités cellulolytiques des isolats fongiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> . (suite)	107
Tableau.III.11. : Résultats des tests qualitatifs des différentes activités de laccase, xylanase et pectinase des souches fongiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> .	111
Tableau.III.11. : Résultats des tests qualitatifs des différentes activités de laccase, xylanase et pectinase des souches fongiques de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> . (suite)	112
Tableau.III.12. Résultats des tests qualitatifs d'activité protéolytique et amylolytique des souches de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> .	116
Tableau.III.12. Résultats des tests qualitatifs d'activité protéolytique et amylolytique des souches de <i>G. resinaceum</i> et <i>F. fomentarius</i> . (suite)	117



Résumés

Résumé

Fomes fomentarius et *Ganoderma resinaceum* sont des champignons lignicoles saprophytes endémiques des subéraies du nord-est de l'Algérie entraînant la pourriture blanche des feuillus tels que les chênes lièges et les faux-poivriers. La présente étude a été effectuée dans le but de valoriser ces champignons par l'étude de production de métabolites secondaires et d'enzymes extracellulaires.

Dans un premier temps nous avons étudié une production de métabolites secondaires de type triterpènes et stérols dans des cultures submergées en deux étapes. Les extraits de biomasses sont analysés par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse LC/Q-TOF-MS pour la recherche des métabolites bioactifs. La production de plusieurs composés à potentiel thérapeutique est mise en évidence tels que les acides ganodériques theta, Am1, A, C2, DM, E, H, K, R, S, T, T-Q, Y et X, l'acide ganolucidique E, les fomentarols A, B, C et D et d'autres stérols. Les extraits chloroformiques ont aussi exhibé une activité antibactérienne intéressante sur des bactéries pathogènes notamment deux souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM).

Pour la suite du travail, les activités enzymatiques des isolats fongiques sont étudiées qualitativement, ces champignons ont montré leur aptitude à produire différents types d'enzymes extracellulaires d'intérêts biotechnologiques et qui sont les cellulases, laccases, xylanases, pectinases, protéases et amylases.

Mots clés : *Fomes fomentarius* ; *Ganoderma resinaceum* ; culture submergée ; LC/Q-TOF-MS ; triterpénoïdes ; stérols ; activité antibactérienne ; enzymes extracellulaires.

Abstract

Fomes fomentarius and *Ganoderma resinaceum* are endemic saprophytic fungi of the cork oak forests in northern-east of Algeria causing white rot in hardwoods such as cork oaks and peruvian pepper trees. The present study was conducted to valorise these fungi by studying their production of secondary metabolites and extracellular enzymes.

First, we studied the production of triterpenoids and sterols by two-stage submerged fermentations. Biomass extracts were analysed using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry LC/Q-TOF-MS to investigate these bioactive metabolites. The production of several compounds with therapeutic potential has been proven, such as ganoderic acids theta, Am1, A, C2, DM, E, H, K, R, S, T, T-Q, Y and X, ganolucidic acid E, fomentarols A, B, C and D and other sterols. The chloroform extracts exhibited also an interesting antibacterial activity against pathogenic bacteria, especially two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA).

For the rest of the work, different enzymatic activities of the fungal isolates were studied, these fungi showed their ability to produce different types of extracellular enzymes of biotechnological interest which are cellulases, laccases, xylanases, pectinases, proteases and amylases.

Key-words: *Fomes fomentarius* ; *Ganoderma resinaceum* ; submerged fermentation; LC/Q-TOF-MS ; triterpenoids ; sterols ; antibacterial activity; extracellular enzymes.

الملخص

فوماس فومنتاريوس (*Fomes fomentarius*) وغانوديرما ريزيناسيوم (*Ganoderma resinaceum*) هما من الفطريات الرمامة المنتشرة في غابات السنديان في شمال شرق الجزائر و المسببة للعفن الأبيض في الأشجار المورقة كأشجار السنديان الفليني و الفلفل البيروفي. تم إجراء هذه الدراسة بهدف تعزيز هذه الفطريات من خلال دراسة قدرتها على إنتاج مركبات أيضية ثانوية وإفرازها للإنزيمات الخارجية.

في البداية قمنا بدراسة إنتاج التريترينينات والستيروولات باستعمال التخمر المغمر على مرحلتين. لاحقا تم تحليل مستخلصات الكلوروفورم من هذه الفطريات بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الدقة مصحوبة بتحليل مطيافية الكتلة (LC/Q-TOF-MS) من اجل فصل وكشف هذه المركبات العضوية الفعالة. بفضل هذه التقنية عالية الدقة يتجلى إنتاج عدة مركبات ذات الخصائص العلاجية المهمة كالأحماض الغانوديرية θ ، AM1، A، C₂H، K، E، R، DM، Q-T، S، T، Y و X، وحامض الغانوليسيديك E و مركبات الفومونتارول A، B، C و D و عدة مركبات ستيروولية أخرى.

مستخلصات الكلوروفورم من هذه الفطريات أظهرت كذلك نشاطا مهما مضادا للبكتيريا على بكتيريا المسببة للأمراض خصوصا على سلالات بكتيريا المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA)

بالنسبة لبقية البحث، فقد تمت دراسة الأنشطة الأنزيمية المختلفة للعزلات الفطرية، حيث أظهرت هذه الفطريات قدرتها على إفراز أنواع مختلفة من الإنزيمات خارج الخلية ذات أهمية في مجالات التكنولوجيا الحيوية وهي cellulases، amylases و proteases، pectinases، xylanases، laccases

كلمات البحث: *Fomes fomentarius*، *Ganoderma resinaceum*، التخمر المغمر، تريترينينات.

ستيروولات، LC / Q-TOF-MS، النشاط المضاد للبكتيريا، إنزيمات خارجية



Introduction générale

Introduction générale

Les basidiomycètes et plus particulièrement les polypores, sont des organismes uniques en raison de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques. Ils sont capables de coloniser différentes matrices dans les milieux naturels et ils jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre écologique (Lutzoni *et al.*, 2004 ; Anastasi *et al.*, 2013).

Les polypores appartiennent à l'ordre des Aphyllophorales, et comme certaines plantes médicinales, ils possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques aptes à soulager ou à traiter certaines pathologies (Zjawiony, 2004 ; Bishop *et al.*, 2015).

Les polypores sont utilisés comme remède depuis très longtemps en Extrême Orient (Chine, Corée et Japon) et leur usage s'est aussi répandu en Europe de l'Est, aux Etats-Unis et au Canada (Wachtel-Galor *et al.*, 2011 ; Grienke *et al.*, 2014). Ces vertus thérapeutiques demeurent méconnues en Afrique du Nord.

La richesse de la mycoflore en Algérie est indéniable, parmi les polypores médicinaux répandus dans les subéraies du Nord-Est algérien nous pouvons citer le *Fomes fomentarius*, les *Ganoderma* (*G. applanatum*, *G. resinaceum*...) et d'autres espèces.

Le champignon polypore *Ganoderma lucidum* ; appelé Lingzhi est le « leader » des champignons médicinaux en pharmacopée orientale. Ce champignon est consommé depuis des millénaires en infusion, en macérât ou plus récemment sous forme de gélules pour ses actions tonifiante, stimulante du système immunitaire, anti-oxydante et anti-cancéreuse (Zjawiony, 2004 ; Lindequist *et al.*, 2005 ; Halpern, 2007 ; Wachtel-Galor *et al.*, 2011). D'autres espèces du genre *Ganoderma* sont aussi connues pour avoir des propriétés médicinales intéressantes (Zjawiony, 2004 ; Halpern, 2007).

Un autre polypore connu pour ses vertus et dont l'usage date à l'ère préhistorique ; le *Fomes fomentarius* ou amadouvier ; ce dernier possède des propriétés antimicrobiennes et hémostatiques utilisées pour cautériser les plaies (Roussel *et al.*, 2002a ; Papp *et al.*, 2017).

La pharmacopée moderne porte un intérêt croissant aux molécules d'origines biologiques pour les traitements des différentes pathologies. L'utilisation des *Ganoderma* et du *F. fomentarius* en ethnomédecine, la large gamme de métabolites primaires et secondaires qu'ils

produisent font que ces champignons sont de nos jours l'objet de nombreux programmes de recherches scientifiques et sont devenus une source d'innovation biotechnologique dans différents domaines (Wachtel-Galor & Benzie, 2011 ; Zhang *et al.*, 2016).

La culture des basidiomycètes en fermentations submergées dans le but de produire des métabolites à potentiel thérapeutique ou à intérêts industriels est relativement récente. Toutefois les travaux de recherche basés sur ce mode de culture ont rendu possible l'obtention de métabolites bioactifs plus facilement qu'avec les procédés de fermentations en milieux solides (Wagner *et al.*, 2003 ; Zhong & Xiao, 2009).

Pour ouvrir les perspectives de bio-production à grande échelle, diverses études se sont portées sur les *Ganoderma* et le *F. fomentarius* pour discriminer leurs principes actifs, elles ont permis d'isoler et d'étudier de nombreux composés bioactifs et d'enzymes présentant à la fois une diversité et une complexité structurale et fonctionnelle. Les percées spectaculaires des techniques physicochimiques de screening et d'élucidation structurale ont aidé à mettre en évidence de nouveaux métabolites (Huie & Di, 2004 ; Wang *et al.*, 2007 ; Zang *et al.*, 2013).

Une attention particulière est accordée aux triterpénoïdes produits par *Ganoderma* auxquels plusieurs effets thérapeutiques sont attribués (Wu *et al.*, 2013). De très nombreuses publications établissent des actions antidiabétique et hypoglycémiant (De Silva *et al.*, 2012b), hypocholestérolémiant (Hajjaj *et al.*, 2005), anti-oxydante, anti-tumorale, neuro-protective, antibactérienne et antivirale y compris anti-HIV (Zjawiony, 2004 ; Bishop *et al.*, 2015 ; Kang *et al.*, 2015).

Bien que les métabolites secondaires de ces polypores ont montré des succès potentiels dans le traitement préventif, curatif et supportif de cancer (Chen *et al.*, 2008a ; Boh, 2013 ; Ferreira *et al.*, 2015), leur usage reste cependant restreint à quelques essais cliniques et peu de molécules sont produites et commercialisées comme médicaments (Ng, 2004 ; Wachtel-Galor *et al.*, 2004).

L'utilisation de ces champignons est plutôt répandue comme adjuvant aux chimiothérapies pour stimuler le système immunitaire et aussi réduire les effets secondaires (Ng, 2004 ; Patel & Goyal, 2012 ; Ferreira *et al.*, 2010).

Dans ce travail nous nous sommes fixés comme objectifs :

- La mise en culture des polypores médicinaux affiliés aux genres *Fomes* et *Ganoderma* et dont les spécimens sont récoltés des subéraies du Park National d'El-Kala. Des cultures sur milieux solides et en fermentation submergée (milieux liquides) pour la production de métabolites secondaires et principalement les triterpénoïdes et les stérols ;
- La caractérisation et l'identification de ces métabolites par une approche analytique de Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/Q-TOF-MS) ;
- L'étude du pouvoir antibactérien des extraits des *Fomes* et *Ganoderma* sur des bactéries pathogènes multi-résistantes ;
- L'évaluation par une étude qualitative de leur aptitude à produire des enzymes extracellulaires à intérêts biotechnologiques.



I Revue bibliographique

1.1. Historique

En 1991 dans les Alpes tyroliennes entre l'Italie et l'Autriche, des morceaux d'amadouvier sont trouvés attachés à la ceinture d'un homme de l'âge de cuivre dont le corps revient à 5300 ans à peu près ; cette découverte confirme l'utilisation de ce champignon depuis la néolithique soit comme amadou ou probablement pour des fins médicinales (Peintner *et al.*, 1998 ; Grienke *et al.* 2014 ; Papp *et al.*, 2017).

L'utilisation de *F. fomentarius* en médecine date du Vème siècle avant JC, il a été mentionné pour la première fois dans les textes d'Hippocrate, il a été utilisé pour cautériser des plaies en plaçant des morceaux incandescents de carpophore de *F. fomentarius* sur la peau à côté des parties à soigner (Roussel *et al.*, 2002a ; Gaudreau *et al.*, 2005). En fait, le *F. fomentarius* est connu par le nom amadouvier ou dit amadou en se référant à sa combustibilité (Roussel *et al.*, 2002b ; Gaudreau *et al.*, 2005).

Le nom chinois de *Ganoderma lucidum* est Lingzhi ; il signifie « le champignon d'immortalité ». Ce champignon est sans doute le plus populaire en médecines traditionnelles asiatiques ; son utilisation date à plus de 4000 ans (Wasser, 2005 ; Sanodiya *et al.*, 2009). Le nom Lingzhi censé désigner plusieurs espèces du genre *Ganoderma* autres que *G. lucidum* ayant aussi des propriétés médicinales tels que *G. applanatum*, *G. sinense*, *G. tsugae*, *G. oregonense*, *G. boninense*, *G. tropicum*, *G. curtisii*, *G. lipsiense*... etc., mais ce nom est devenu conventionnellement synonyme de *G. lucidum* vu son important potentiel thérapeutique (Huie & Di, 2004 ; Wasser, 2005 ; Paterson, 2006 ; Halpern, 2007). Au Japon les membres de la famille de *Ganodermtaceae* sont connus par le nom Reishi ou Mannetake qui signifie « le champignon de 10 000 ans » (Wasser, 2005 ; Wachtel-Galor *et al.*, 2011).

1.2. Taxonomie et systématique des *Fomes* et *Ganoderma*

1.2.1. Taxonomie classique

L'espèce *Fomes fomentarius* a été décrite par Carl Linné, sa classification a été ensuite reprise et corrigée par Elias Magnus Fries, puis par le Danois Jacques Kickx en 1867. Ce qui

explique la mention *Fomes fomentarius* (Linnaeus ex. Fries.) Kickx. dans les ouvrages mycologiques (Gaudreau *et al.*, 2005).

Classiquement, la systématique des polypores a été souvent basée sur des critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) (Judova *et al.*, 2012 ; McCormick *et al.*, 2013).

La famille de *Ganodermataceae* Donk a été créée pour inclure les polypores caractérisés par les basidiospores à double paroi. De grandes variations morphologiques de la famille ont donné lieu à la description d'environ 400 espèces, dont environ les deux tiers sont classées dans le genre *Ganoderma* Karst. (Seo & Kirk, 2000). Ce genre a été établi par Karsten en 1881 dont l'espèce type est *G. lucidum* (Adaskaveg & Gilbertson, 1986). (**Tab.I.1**)

Les basidiospores à double paroi avec des ornements interpariétaux est la caractéristique clé d'identification du genre ; elles ont une forme ovoïde à ellipsoïde avec un sommet tronqué et un pore germinal apical (**Fig.I.1**) (Webster & Weber, 2007 ; Seo & Kirk, 2000).

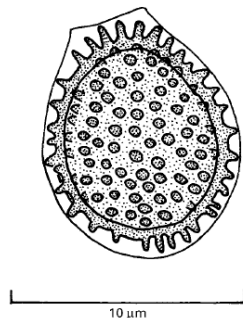


Figure.I.1. La basidiospore de *G. applanatum*. L'aspect à double parois typique des spores de *Ganoderma* avec apex tronqué (Webster & Weber, 2007).

Au cours des années plus de 290 espèces ont été décrites dans le monde, indiquant que le genre *Ganoderma* est probablement le genre des polypores le plus complexe sur le plan morphologique (Ryvarden, 2000). Compte tenu de la considérable hétérogénéité morphologique des *Ganoderma* due aux conditions environnementales durant la croissance, de nombreux synonymes taxonomiques ont apparu et sa classification alors est devenue ambiguë (Moncalvo *et al.* 1995a ; Seo & Kirk, 2000).

Ce genre a été divisé en deux sous-genres distincts ;

- ***Ganoderma* (i)** qui englobe les espèces ayant des basidiocarpes annuels avec un pileus laqué de couleur orange-rouge au brun une cuticule brillante, stipités ou

sessiles et représentant le taxon du « **complexe *G. lucidum*** » (Moncalvo *et al.*, 1995b ; Gottlieb & Wright 1999b) ;

- et le sous-genre *Elfvigia* (ii) regroupant les espèces à basidiocarpes pérennes à pileus non-laqué de couleur brun-noire avec un aspect terne ; ce taxon réfère au « **complexe *G. applanatum*** » typifié par l'espèce *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1887 (Gottlieb & Wright 1999a).

Les critères morphologiques ; la macro-morphologie et la structure et la forme de spore ne sont pas des critères fiables pour la distinction des espèces car elles dépendent de l'hôte et de la distribution géographique (Gottlieb & Wright 1999b ; Hong & Jung 2004).

1.2.2. Taxonomie moléculaire

L'étude moléculaire des séquences de *Internal Transcribed Spacers* (ITS ; espaceurs internes transcrits) d'ADN ribosomique de *F. fomentarius* isolés d'Europe ont montré que la phylogénie de cette espèce est plutôt complexe (Judova *et al.*, 2012 ; Pristas *et al.*, 2013). Dresch *et al.*, (2015) ont analysé les séquences ITS d'ADN ribosomique des différents isolats de *F. fomentarius* dont un est issu de région subméditerranéenne développé sur chêne pubescent (*Quercus pubescens*), celui-ci a montré une divergence de séquences relativement importante à toutes les souches étudiées des zones tempérées, d'où ils considèrent la souche *F. fomentarius* méditerranéenne comme un taxon distinct (Dresch *et al.*, 2015).

Les approches taxonomiques alternatives proposées pour résoudre les confusions de la classification des *Ganoderma* comprennent principalement les méthodes moléculaires ; analyses de séquences de ITS1 et ITS2, séquençage de ARN ribosomique et de ADN ribosomique nucléaire ou mitochondrial (Hong & Jung, 2004 ; Moncalvo *et al.*, 1995a, 1995b ; Glen *et al.*, 2009), la mise en évidence des isoenzymes par électrophorèse (Smith & Sivasithamparam, 2000 ; Gottlieb *et al.*, 1998), et des tests biochimiques (chimiotaxonomie) (Richter *et al.*, 2015).

Ces études ont permis de clarifier la répartition des différents complexes d'espèces et de résoudre les problèmes d'identification de plusieurs espèces comme le *G. lucidum*, *G. tsugae* et *G. resinaceum* (Yang & Feng, 2013 ; Richter *et al.*, 2015). L'espèce *G. resinaceum* est établie par Boudier en 1889 (Ryvarden, 2000). Cette espèce est classée dans un groupe à part avec les

espèces alliées ; *G. pfeifferi*, *G. subamboinence* et *G. weberianum* (**Fig.I.2**) (Hong & Jung, 2004 ; Richter *et al.*, 2015).

Tableau.I.1 : Ordre taxonomique des espèces de *Ganoderma* et *F. fomentarius* inspiré des travaux de Gottlieb *et al.* (2000) ; Hibbet & Thorn (2001) et Hibbet *et al.* (2007).

Règne	<i>Eumycota</i>	
Sous-règne	<i>Dikarya</i>	
Division	<i>Basidiomycota</i>	
Classe	<i>Agaricomycotina</i>	
Ordre	Aphyllophorales	
Famille	<i>Polyporaceae</i>	<i>Ganodermataceae</i>
Genre	<i>Fomes</i>	<i>Ganoderma</i>
Espèce	<i>F. fomentarius</i>	<i>G. lucidum</i> , <i>G. resinaseum</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. adspersum</i> , <i>G. australe</i> , <i>G. tsugae</i> , <i>G. multipileum</i> , <i>G. oregonense</i> , <i>G. purpurea</i> , <i>G. pfeifferi</i> , <i>G. lipsiense</i> , <i>G. parvulum</i> , <i>G.</i> <i>sinense</i> , <i>G. annularis</i> , <i>G. curtisii</i> , <i>G. multiplicatum</i> .

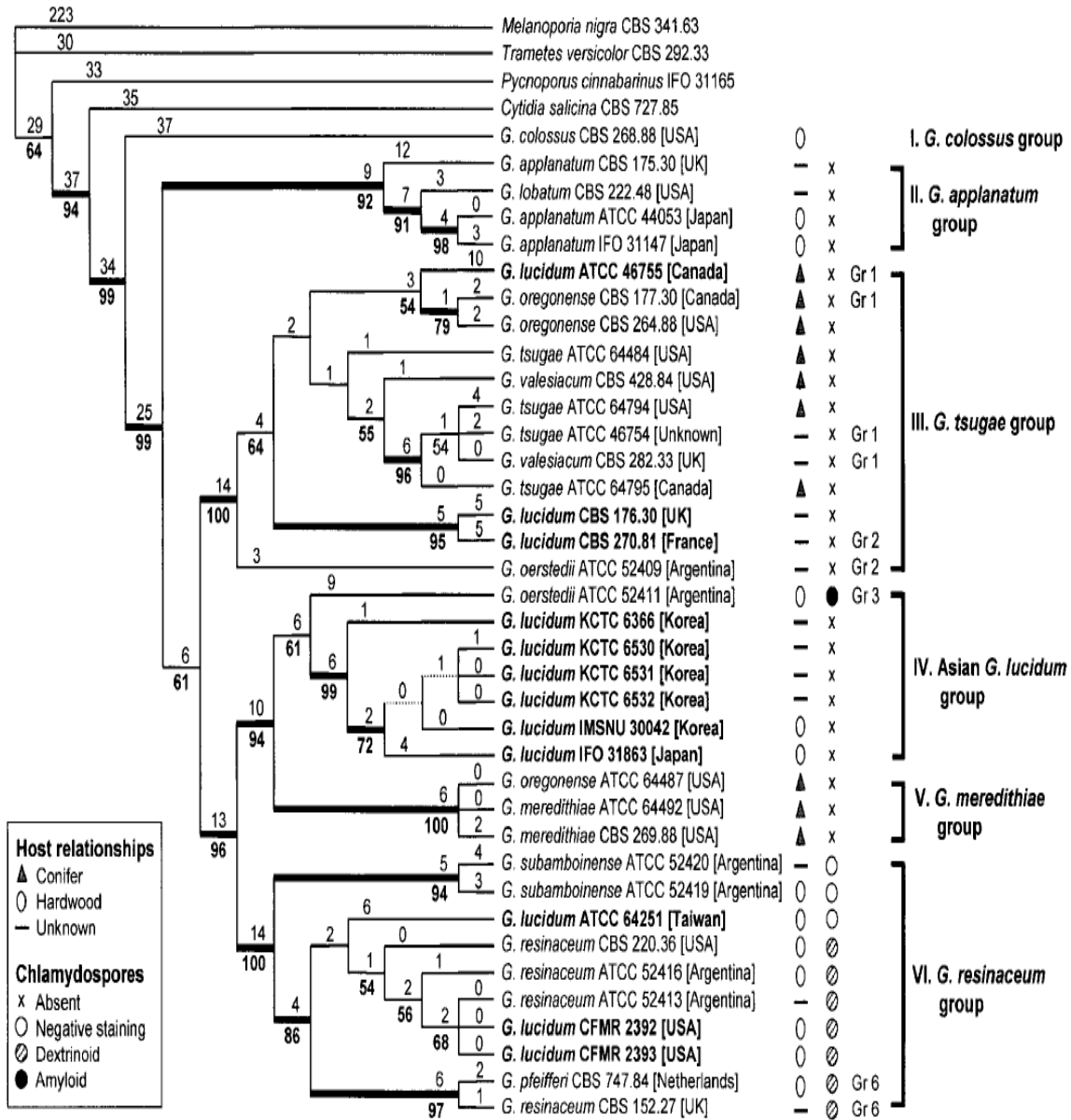


Figure.I.2. Arbre phylogénique des *Ganoderma* dérivé des séquences de la petite sous-unité de l'ADN ribosomique mitochondrial (*mt-SSU rDNA*) (Hong & Jung, 2004).

1.3. Morphologie des champignons

1.3.1. *Ganoderma* spp.

D'après Ryvarden (2000) ; Deconchat & Polèse (2002) ; Chang & Miles (2004) ; Welti (2009).

Ce genre présente une grande hétérogénéité morphologique. Les basidiocarpes des espèces de *Ganoderma* sont généralement réniformes, semi-circulaires ou flabelliformes. Ils peuvent être laqués « le complexe *G. lucidum* » ou ternes « le complexe *G. applanatum* », stipités à insertion latérale (ex. ; *G. lucidum*, *G. resinaceum*), ou sessiles (ex. ; *G. applanatum*, *G. adpersum*, *G. australe*...), de couleur unie ou zonée rouge à violacée ou brune noirâtre,

La chair peut être subéreuse ou fibreuse à liégeuse. La trame a un système d'hyphes trimitique, alors que certaines espèces ont un système dimitique.

Les pores sont réguliers dont le nombre varie de 4 - 7 pores par millimètre.



Figure.I.3. Basidiomes de *Ganoderma lucidum*. Photo prise par Thomas Læssøe au Danemark, 2006 (Richter *et al.*, 2015).

Figure.I.4. Basidiomes de *G. applanatum*. Photo prise par H. Petersen en Suède, 2002 (Richter *et al.*, 2015).





Figure.I.5. Basidiomes de *G. resinaceum in situ* (Zhou *et al.*, 2015).

1.3.2. *Fomes fomentarius*

D'après Schwarze (1994) ; Gaudreau *et al.* (2005) ; Schmidt (2006) ; et McCormick *et al.* (2013).

Le *F. fomentarius* a un aspect assez caractéristique ; il a la forme d'une console ou d'un sabot (**Fig.I.6**), les basidiocarpes sont vivaces, sessiles et fermement attachés à l'écorce, coriaces, ongulés, souvent solitaires, rarement en groupe et avec des renflements concentriquement zonés.

Ce champignon, très léger malgré sa taille qui peut atteindre jusqu'à 50 cm de largeur.

Le sporophore est plat à concave, hyménium de couleur crème brunâtre avec marge blanche ; les pores sont ronds (4-5 par mm). La trame est liégeuse à système d'hyphes trimitique de 1 à 2 mm d'épaisseur.

Les basidiospores : longue-ellipsoïdes, lisses, hyalines de 15-22 x 5-7 μm .

L'aspect de ce champignon peut considérablement varier selon la distribution géographique et selon l'hôte (Schwarze, 1994 ; Judova *et al.*, 2012), aux Etats Unis le *F. fomentarius* est difficilement différencié du *F. fasciatus* (McCormick *et al.*, 2013).



Figure.I.6. Basidiocarpe de *F. fomentarius* *in situ*. Photo prise par Christian Lambert (www.mycoquebec.org).

1.4. Biologie des champignons

1.4.1. Ultrastructure des *Ganoderma* et *F. fomentarius*

Le mycélium des basidiomycètes est constitué d'hyphes séptées (cloisonnées) (Chang & Miles 2004 ; Carlile, 1995), ces hyphes ne poussent qu'en extrémité ou à des régions spécialisées où les ramifications peuvent naître (Deacon, 2005 ; Carlile, 1995).

Les septa (cloisons) contiennent des perforations dites pores septaux qui assurent principalement la migration des noyaux lors de dicaryotisation de mycélium (Chang & Miles, 2004 ; Money, 2016), ainsi la communication et la continuité du flux proplasmique entre les compartiments d'hyphes (Deacon, 2005) ; la structure des pores septaux des Basidiomycètes est très caractéristique est dite le **dolipore septum** (Money, 2016).

Les basidiomycètes de pourriture de bois sont généralement aptes de se disperser et de survivre des conditions de stress nutritif, thermal ou hydrique sans former des spores méiotiques sexuées ; mais en différenciant un autre type de spores somatiques dit les **chlamydospores** (Burnett, 2003 ; Deacon, 2005 ; Schmidt, 2006). Le *F. fomentarius* est capable de produire des chlamydospores de différentes formes (Schwarze *et al.*, 2013).

1.4.2. Croissance et Cycle de vie

Le cycle de vie des espèces de *Ganoderma* et *F. fomentarius* est une alternance entre deux phases, une est haploïde où le mycélium est dit primaire et issu d'une spore méiotique haploïde, et la deuxième phase est diploïde caractérisée par la formation de mycélium secondaire (Carlile, 1995 ; Burnett, 2003).

Leurs cycle de vie se résume en trois étapes principales ; la **plasmogamie (i)** qui consiste à la fusion de deux cellules haploïdes sexuellement compatibles, après une division nucléaire, ces noyaux migrent via les dolipores septa vers les compartiments cellulaires qui ne contiennent qu'un seul type de noyaux conduisant à la conversion du mycélium monocaryon (**n**) (homocaryon) en mycélium dicaryon (**n+n**) (ou hétérocaryon) (Deacon, 2005 ; Money, 2016).

L'état dirocaryon est maintenu dans le mycélium en croissance apicale grâce aux clamps de connexion (Carlile, 1995 ; Deacon, 2005 ; Money, 2016). Un noyau migre latéralement et l'autre emprunte un autre trajet en anse qui va fusionner avec la paroi d'hyphe en amont du point de sa formation pour transporter le deuxième noyau (**Fig.I.7**), en même temps un septum se forme pour fragmenter la cellule en ex-croissance donnant naissance à une nouvelle cellule dicaryotique à l'apex, les clamps de connexion sont une autre caractéristique du mycélium secondaire des *Basidiomycota* (Chang & Miles, 2004 ; Money, 2016).

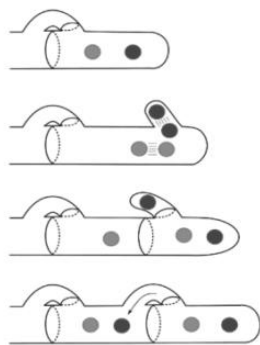
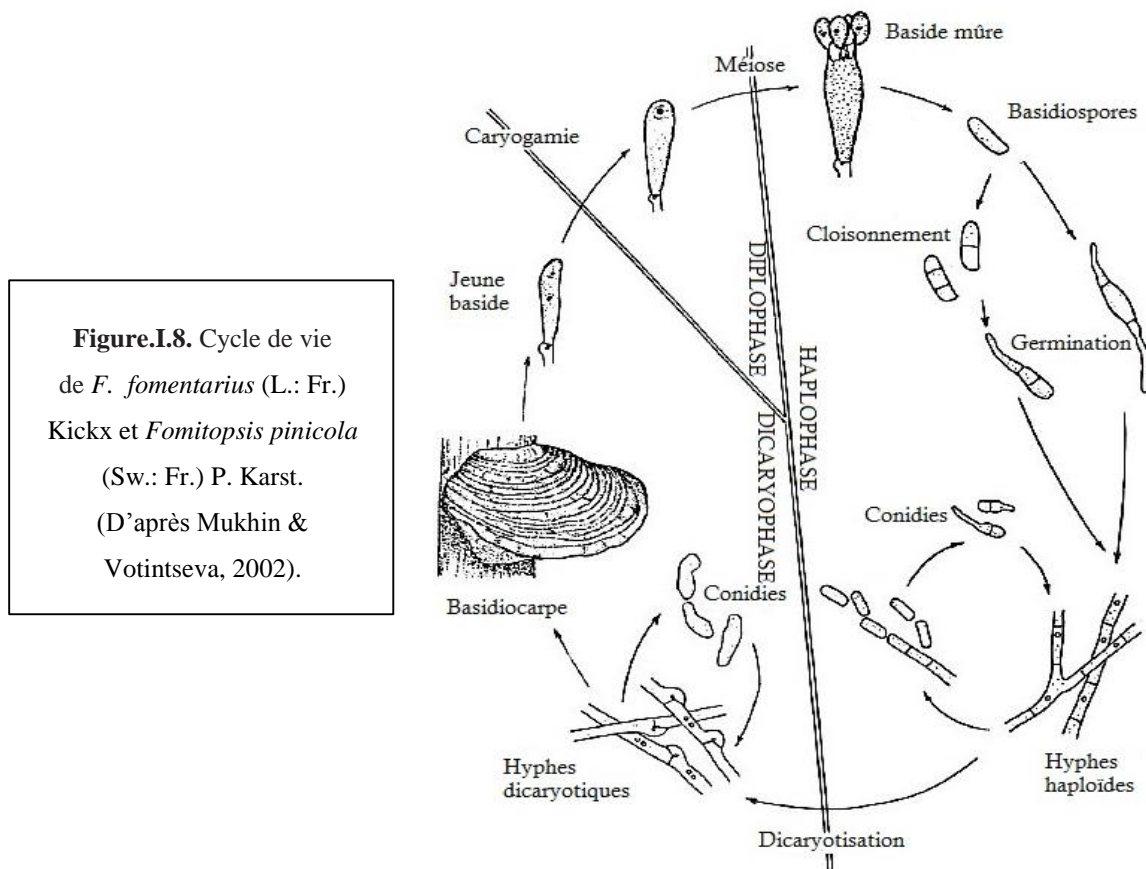


Figure.I.7. La formation des clamps de connexion dans les hyphes dicaryon de Basidiomycètes (Money, 2016).

Dans les conditions environnementales et nutritionnelles optimales, le basidiocarpe se forme à partir du mycélium dicaryon, et après formation des basides qui sont des cellules spécialisées caractéristiques des *Basidiomycota*, les deux noyaux haploïdes fusionnent formant un noyau diploïde (**2n**); ce phénomène est dit la **caryogamie (ii)** (Carlile, 1995 ; Chang & Miles, 2004). *Fomes* et de *Ganoderma* étant des homobasidiomycètes, leur basides sont

unicellulaires, sans cloisons, ils sont dit des holobasides (Webster & Weber, 2007). Enfin le processus de formation des basidiospores commence juste après par la **méiose (iii)** qui conduit à la formation d'une tétrade de spores méiotiques sexuées. A la fin de sporogénèse les spores sont libérées dans le milieu environnant (Chang & Miles, 2004 ; Burnett, 2003 ; Money, 2016).

La figure.I.8 schématise le cycle de vie typique de deux basidiomycètes *F. fomentarius* et *Fomitopsis pinicola*.



1.5. Physiologie des champignons de pourriture blanche

La majorité des polypores produisent des fructifications sur les bois et sont généralement des saprophytes (Lutzoni *et al.*, 2004 ; Schmidt, 2006) bien que d'autres sont lignicoles parasites (Schmidt, 2006). Du point de vue biochimique ils sont des organismes chimio-organotrophes ; ils utilisent le carbone de matériaux organiques issus des arbres autotrophes pour se procurer de molécules et énergie nécessaires pour leur propre croissance (Horgan & Murphy, 2011 ; Walker & White, 2005 ; Schmidt, 2006).

Les exigences chimiques de la croissance fongique sont relativement simples ; ils ont besoin de macronutriments comprenant une source de carbone et d'azote qui sont des facteurs clés de croissance et des oligoéléments dont des vitamines et des éléments minéraux (Deacon, 2005 ; Walker & White, 2005). Le carbone peut être approvisionné à partir de simple composés organiques (ex. ; simples hexoses) ou de polymères complexes tels que les amidons, cellulose, hémicelluloses ou lignine... etc. qui nécessitent une digestion enzymatique préalable (Deacon, 2005 ; Walker & White, 2005 ; Zabel & Morell 2012).

Les champignons sont incapables de fixer l'azote atmosphérique (Walker & White, 2005), donc une source d'azote assimilable est nécessaire pour la synthèse de protéines, des constituants et des produits cellulaires (Walker & White, 2005 ; Zabel & Morell, 2012). En effet le ratio C : N est important pour la formation d'organes de fructification des Basidiomycètes, une forte concentration d'azote favorise la croissance végétative et diminue la sporulation par conséquent la formation de basidiocarpes (Chang & Miles, 2004 ; Noll *et al.*, 2016).

L'eau constitue 90 % des hyphes, elle est nécessaire pour l'absorption de nutriments, leur transport à l'intérieur du mycélium et principalement pour les enzymes hydrolytiques libérées qui ne sont actives qu'en environnement aqueux (Schmidt, 2006 ; Zabel & Morell, 2012). Sans eau le métabolisme fongique entre en repos, dans cette phase le mycélium forme des chlamydospores (Schmidt, 2006).

Les sels minéraux nécessaires sont principalement le phosphore, le potassium, le soufre et le magnésium (Walker & White, 2005 ; Deacon, 2005), d'autres ne doivent être présents qu'en état de trace ; mais ils jouent des rôles clé en tant que cofacteurs d'enzymes impliquées dans le métabolisme et dans la dégradation de bois (Schmidt, 2006 ; Zabel & Morell, 2012) ; comme le fer (lignine-peroxydase, manganèse-peroxydase, cellobiose dehydrogénases), le cuivre (laccase), le zinc, le calcium et le manganèse (Schmidt, 2006).

1.6. Ecologie des *Fomes* et *Ganoderma*

Les *Ganoderma* sont des champignons distribués dans tout le monde spécifiquement dans les régions tropicales mais aussi les régions tempérées (Schwarze & Ferner, 2003 ; Schmidt, 2006). Ils ont le pouvoir de dégrader la lignine des bois ; l'élimination de la lignine donne un aspect blanchi aux substrats attaqués d'où dérive leur nom les champignons de

pourritures blanches (CPB) (Schmidt, 2006 ; Korcan *et al.*, 2013). Ils forment des basidiocarpes pérennes (*G. adspersum*, *G. lipsiense* et *G. pfeifferi* ...) ou annuels (*G. lucidum*, *G. resinaceum* et *G. neo-japonicum*...) (Schwarze & Ferner, 2003 ; Chang & Miles, 2004 ; Webster & Weber, 2007).

Le *F. fomentarius* est un champignon parasite lignicole, parfois saprophyte, il est réparti dans l'hémisphère nord ; en Amérique du Nord, Afrique du Nord, en Asie et dans toute l'Europe sur une grande variété d'arbres feuillus comme les chênes, le hêtre et le bouleau (Schwarze, 1994 ; Sieber, 2007 ; McCormick *et al.*, 2013). Krimi et Mehdid en 2001 ont trouvé que le *F. fomentarius* est le polypore le plus fréquent dans une subéraie (forêt de *Quercus suber*) à Tlemcen (Krimi & Mehdid, 2001). Ce champignon peut être endophyte ; il colonise le xylème du bois sain et il reste latent pendant des années voire des décennies (Baum *et al.*, 2003 ; Sieber, 2007).

Les espèces de *Ganoderma* sont majoritairement saprophytes (Schwarze & Ferner, 2003 ; Schmidt, 2006), elles poussent sur les parties hypogées des arbres à feuilles caduques (racines, base des troncs) comme le *G. lucidum*, *G. resinaceum* et *G. adspersum*, ce dernier peut se trouver sur les parties épigées aussi comme *G. applanatum* (Webster & Weber, 2007 ; Schwarze & Ferner, 2003).

La persistance du basidiocarpe joue un rôle important pour la dispersion des spores, mais la période de production active des spores est plus importante (Moore *et al.*, 2008). Les spores méiotiques sont libérées des tubes du sporophore poreux positivement géotropique dans le milieu environnant assurent la dispersion et la survie de ce champignon pendant des décennies (Moore, 1991 ; Carlile, 1995).

La pourriture blanche dégrade les trois constituants majeurs du bois ; la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, mais l'évolution et le taux de décomposition des constituants diffèrent d'un champignon à un autre ; sur cette base on distingue deux types de pourritures blanches ;

- la **pourriture simultanée (i)** (délignification simultanée ou pourriture corrosive) où la lignine, l'hémicellulose et la cellulose sont dégradées presque en même temps et en parts égales ;

- la **pourriture sélective (ii)** (délignification sélective ou successive) dans laquelle la lignine et les hémicelluloses sont dégradées préférentiellement avant la cellulose qui reste inaltérée aux premiers stades de décomposition ; mais à la fin la cellulose est aussi digérée (Schmidt, 2006 ; Schwarze, 2007).

Les espèces de *Ganoderma* sont connues par la délignification sélective citons à titre d'exemple le *G. adpersum* et *G. australe* (Schwarze & Ferner, 2003 ; Schwarse, 2007 ; Baldrian, 2008 ; Ericksson *et al.*, 1990), cependant le *F. fomentarius* engendre une pourriture blanche simultanée (Schmidt, 2006 ; Schwarze, 2007), avec des lignes de démarcation noires donnant un aspect marbré à la pourriture (Schmidt, 2006 ; Schwarze *et al.*, 2013).

2

Métabolites fongiques**2.1. Production de métabolites primaires**

Ces composés sont des produits intermédiaires ou finaux des voies métaboliques communes entre plusieurs organismes (Bérdy, 2005 ; Deacon, 2005), et généralement produits pendant la phase exponentielle de croissance mycélienne et surtout à la fin (Horgan & Murphy, 2011). Ils ont des rôles bien définis dans le métabolisme ; la constitution et la reproduction de la cellule (Bérdy, 2005 ; Deacon, 2005 ; Horgan & Murphy, 2011), et comprennent des sucres, acides aminés, peptides, protéines, lipides, vitamines, acides nucléiques et des enzymes (Deacon, 2005 ; Horgan & Murphy, 2011). Les métabolites primaires les plus étudiés de ces champignons médicinaux sont les polysaccharides, les protéines et les enzymes.

2.1.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides fongiques sont des métabolites à hauts poids moléculaires, ils peuvent être classés en α -glucanes (ex. : amidon, cellulose ou chitine), et en β -glucanes ; les α -glucanes ont une bioactivité faible ou nulle (Jiang *et al.*, 2010 ; Grienke *et al.*, 2014) ; alors que les β -glucanes et leurs dérivés sont responsables d'importantes activités immunomodulatrices et anti-tumorales (Moradali *et al.*, 2007 ; Grienke *et al.*, 2014).

Les polysaccharides bioactifs sont isolés de carpophores, spores, mycélium ou des bouillons de culture (Wasser, 2005 ; Chen *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011). Sur le plan structural ils présentent une classe très diversifiée de biomolécules, ils sont divisés en β -glucanes, hétéro- β -glucanes et le groupe des glycoprotéines (sont les complexes : β -glucane-protéine, α -glucane-protéine et hétéroglycane-protéine) (Wasser, 2002 ; Moradali *et al.*, 2007 ; Ferreira *et al.*, 2010).

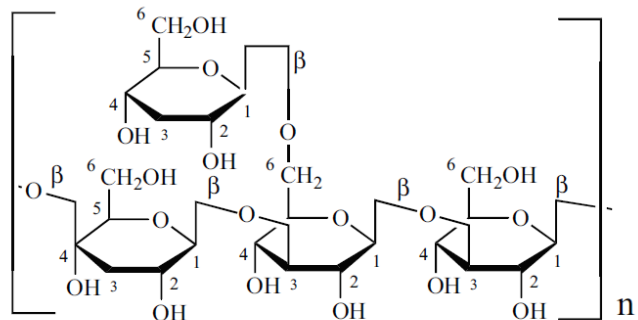
Les β -glucanes sont les polysaccharides les plus importants à activité immunomodulatrice et anti-tumorale, ils sont constitués du β -(1-3)-D-glucanes (1-15 unités) avec différents degrés de ramifications β -(1-6)-D-glucoopyranosyl (Wasser, 2002 ; Paterson, 2006 ; Moradali *et al.*, 2007). (**Fig.I.9**)

Les hétéro- β -glucanes avec des ramifications de monosaccharide (acide glucuronique, xylose, galactose, mannose, arabinose ou glucose) ou de combinaisons ; ces composés sont aussi liés aux fortes activités anti-tumorales (Wasser, 2002 ; Moradali *et al.*, 2007).

Les glycoprotéines sont des composés anti-tumoraux alternatifs prometteurs (Paterson, 2006 ; Grienke *et al.*, 2014). Plus de 100 types de polysaccharides bioactifs ont été isolés de *G. lucidum* (Wasser, 2005 ; Moradali *et al.*, 2007) ; dont des β -glucanes typiques qui sont les Ganoderanes A, B et C (Paterson, 2006 ; Zhou *et al.*, 2007). Plusieurs glycanes-protéines à activité anti-tumorale ont été isolés de *G. tsugae* (Ng, 2003 ; Wasser, 2002), des exopolysaccharides anti-oxydatifs sont produits par *G. resinaceum* (Kim *et al.*, 2006a), et d'autres à effet immunomodulateur de *G. formosanum* (Wang *et al.*, 2011).

Des études menées sur des polysaccharides extracellulaires et intracellulaires produits par *F. fomentarius* en culture submergée ont montré *in vitro* un effet antiprolifératif sur les lignées cellulaires MKN45 et SGC7901 de cancer gastrique humain sans être cytotoxique (Chen *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011) et d'autres à effet immunostimulateur (Gao *et al.*, 2009).

Figure.1.9. Structure typique de β -(1-3)D-glucane avec ramification β -(1-6)-monoglucosyl (D'après Boh, 2013).



2.1.2. Les protéines

Les champignons produisent de nombreuses protéines et peptides bioactifs ; principalement des lectines, des protéines immunomodulatrices fongiques (FIP), des protéines inactivant les ribosomes (RIP) et des protéines antimicrobiennes ou antifongiques (Xu *et al.*, 2011). Les protéines fongiques immunomodulatrices (FIP ; pour *Fungal Immunomodulatory Protein*) constituent une nouvelle classe de protéines bioactives ayant la capacité de cibler des cellules immunitaires et un rôle important dans l'activité antitumorale (Moradali *et al.*, 2007 ; Chang & Miles, 2004 ; De Silva *et al.*, 2012a). Plusieurs protéines sont produites par les espèces de *Ganoderma* (Paterson, 2006 ; Boh *et al.*, 2007), telle que la FIP-gts de *G. tsugae*, la FIP-

gsi de *G. sinence* et la FIP-LZ-8 de *G. lucidum* (De Silva *et al.*, 2012a ; Chang & Miles, 2004 ; Sanodiya *et al.*, 2009) ; la LZ-8 a une activité mitogénitique, elle est un activateur puissant des lymphocytes T, et un médiateur par la régulation des cytokines de l'expression des intégrines. Elle augmente la synthèse de l'IFN- γ , le TNF- α et d'IL-1 β (Sanodiya *et al.*, 2009 ; Ferreira *et al.*, 2010 ; Moradali *et al.*, 2007). Le gène lz-8 a été cloné sur le génome de *G. resinaceum* afin de produire la LZ-8 par cette espèce (Chen *et al.*, 2017). Une autre protéine de 15 kDa a été extraite du carpophore de *G. lucidum* nommée la ganodérmine et qui possède des propriétés antifongiques (Wang & Ng, 2006).

2.1.3. Les enzymes

Les champignons produisent une variété d'enzymes pour se maintenir en vie, ces enzymes ouvrant d'énormes possibilités devant leurs utilisations industrielles et écologiques (Hanson, 2008 ; Horgan & Murphy, 2011). La production d'exoenzymes est soumise à plusieurs mécanismes de régulations, dont l'induction enzymatique par un substrat approprié et aussi la répression par les produits cataboliques finaux (Archer & Wood, 1995 ; Kobakhidze *et al.*, 2016).

2.1.3.1. Les cellulases

Les champignons de pourritures blanches sont capables de produire au moins trois classes d'activités cellulolytiques pendant leur croissance sur substrat cellulosique (Archer & Wood, 1995 ; Schmidt, 2006 ; Baldrian & Valášková, 2008) ;

- **Endo β (1-4) glucanases (β -endoglucanases)** ; hydrolysent aléatoirement les liaisons β (1-4) glucosidiques et ouvrent des extrémités pour une action continue de exo-enzymes (Archer & Wood, 1995 ; Schmidt, 2006), elles sont généralement testées *in vitro* sur la carboxyméthyl-cellulose (CMC) qui est un substrat soluble (Schmidt, 2006 ; Pointing, 1999), elles sont inactives sur celluloses cristallines (Eriksson *et al.*, 1990 ; Archer & Wood, 1995).
- **Exo β (1-4) glucanases (cellobiohydrolases, CBH)** ; hydrolysent la cellulose cristalline à partir des extrémités réductrices et non-réductrices générant des polysaccharides dits les cellobioses (Archer & Wood, 1995 ; Větrovský *et al.*, 2013), ces enzymes ont peu ou aucune activité sur CMC (Eriksson *et al.*, 1990 ; Archer & Wood, 1995).

- **$\beta(1-4)$ glucosidases** ; dépolymérisent la cellobioses pour libérer le glucose (Eriksson *et al.*, 1990 ; Baldrian & Valášková, 2008), la CMC peut être un substrat de ces enzymes (Pointing, 1999).

2.1.3.2. Ligninases

La lignine est un polymère tridimensionnel constitué principalement d'unités de phénylpropanes qui incruste avec les hémicelluloses les microfibrilles cellulosiques (Eriksson *et al.*, 1990 ; Baldrian, 2008 ; Doohan, 2011). Les CPB sont les meilleurs décomposeurs de lignines (Eriksson *et al.*, 1990 ; Doohan, 2011), ils produisent une gamme d'enzymes extracellulaires non-spécifiques qui oxydent les liaisons inter-unités de lignine et qui sont principalement des phénol-oxydases (Eriksson *et al.*, 1990 ; Schmidt, 2006). La production des ligninases n'est induite qu'en présence de lignine et dans des conditions d'épuisement de nutriments et spécifiquement l'azote (Eriksson *et al.*, 1990 ; Archer & Wood, 1995).

2.1.3.3. Les hémicellulases

Les CPB produisent une gamme d'enzymes nécessaires pour l'hydrolyse complète des hémicelluloses ; les plus fréquentes sont des endo β -(1-4)-xylanases, endo β -(1-4)-mannosidase, β -xylosidase α -glucuronidase (Eriksson *et al.*, 1990 ; Schmidt, 2006 ; Větrovský *et al.*, 2013).

2.1.3.4. Protéases

Les protéases fongiques sont de plus en plus recherchées et étudiées, mais les connaissances sur celles produites par les basidiomycètes sont encore limitées (Venables & Watkinson, 1989 ; Sabotič *et al.*, 2007). Ces protéases ont des propriétés uniques, plusieurs études intéressantes ont été faites (Sabotič *et al.*, 2007 ; Inácio *et al.*, 2015).

Des protéases isolées des *Ganoderma* sont déjà étudiées (Sabotič *et al.*, 2007 ; Kudryavtseva *et al.*, 2008). Ces enzymes dégradent les protéines en peptides et en acides aminés et elles sont divisées en exopeptidases et endopeptidases (Kudryavtseva *et al.*, 2008). Toutefois, peu de d'études scientifiques sont réalisées sur les protéases produites par *F. fomentarius*.

2.1.3.5. Amylases

Les amylases hydrolysent les liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ et $\alpha(1-6)$ à partir de l'extrémité non-réductrice et libèrent des molécules de glucose (Archer & Wood, 1995 ; Horgan & Murphy, 2011). Toutefois les α -amylases fongiques dégradent principalement les liaisons $\alpha(1-4)$ et ont une faible activité sur les liaisons $\alpha(1-6)$ (Archer et Wood, 1995 ; Tawil *et al.*, 2012). Lacerda *et al.* (2008) ont étudié l'hydrolyse des particules d'amidon de féculs de maïs avec une α -amylase fongique, celle-ci, agit préférentiellement sur les régions amorphes de granules, les parties cristallines relatives à la fraction d'amylopectine sont moins altérées par l'attaque enzymatique (Lacerda *et al.*, 2008).

Le tableau I.2 résume des activités enzymatiques des espèces de *Ganoderma* et de *F. fomentarius* citées dans la littérature.

Tableau.I.2. Activités enzymatiques des *Ganoderma* et de *F. fomentarius*

Espèce	Activité enzymatique	Source
<i>G. lucidum</i>	Endoglucanases	Liu <i>et al.</i> , 2016, Manavalan <i>et al.</i> , 2015
	Laccase	Fang <i>et al.</i> , 2015 Revanker <i>et al.</i> , 2007 Wang & Ng, 2006
	Métallo-protéase	Choi & Sa, 2000
	Aspartyl-protéinase	Kudryavtseva <i>et al.</i> , 2008
	α -Amylase	Han <i>et al.</i> , 2005
<i>G. applanatum</i>	Sérine protéase	Sabotič <i>et al.</i> , 2007
	β -gluconosidases	Chouiter <i>et al.</i> , 2008
<i>G. resinaceum</i>	Laccase	Pinto <i>et al.</i> , 2012
<i>G. tsugae</i>	α -Amylase	Irshad <i>et al.</i> , 2012
<i>G. neo-japonicum</i>	$\beta(1-4)$ glucosidases , Cellulase, Avicelase, Xylanase, Ligninase, Protéase, Amylase	Jo <i>et al.</i> , 2011
<i>F. fomentarius</i>	$\beta(1-4)$ glucosidases	Větrovský <i>et al.</i> , 2013
	Cellulases	Kobakhidze <i>et al.</i> , 2016
	Xylanases	
	Laccase	Větrovský <i>et al.</i> , 2013 ; Neifar <i>et al.</i> , 2011, 2010, 2009 ; Pinto <i>et al.</i> , 2012
	Ligninases	Ishikawa <i>et al.</i> , 1962 ; 1963
	Protéase	Ro, 1984

2.2. Production des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires au contraire de métabolites primaires ne sont pas directement essentiels pour la croissance (Deacon, 2005 ; Bérdy, 2005). Leur rôle réel est ambigu, il a été largement débattu au cours des dernières années. Ils sont produits généralement au cours de la phase stationnaire de croissance et parfois associés à la différenciation et la sporulation, d'où le consensus qu'ils peuvent avoir des rôles liés aux fonctions biologiques profondes comme la survie (Demain & Fang, 2000 ; Horgan & Murphy, 2011). Ils tendent d'être spécifiques au genre ou l'espèce voire à la souche (Deacon, 2005 ; Bérdy, 2005).

Les champignons supérieurs produisent presque 2000 composés bioactifs présentant une grande versatilité structurale et bioactive (Bérdy, 2005). Les champignons de pourritures blanches *Ganoderma* et *F. fomentarius* sont deux polypores médicinaux ; leurs effets pharmacologiques ont attiré l'attention de la communauté scientifique pour dévoiler leurs principes actifs (Wasser, 2005 ; Boh *et al.*, 2013 ; Grienke *et al.*, 2014 ; Grienke *et al.*, 2015).

Plus de 431 composés secondaires sont isolés des différentes espèces de *Ganoderma* au cours des quarante dernières années, dont 240 sont produits par *G. lucidum* (Baby *et al.*, 2015). Ils appartiennent majoritairement à la classe de triterpénoïdes de type lanostane dont le précurseur est le lanostérol, en deuxième lieu se trouvent les stéroïdes de type ergostane (Bishop *et al.*, 2015 ; Richter *et al.*, 2015), les stéroïdes sont aussi produits par le *F. fomentarius* (Rösecke & König, 2000 ; Ziegenbein *et al.*, 2006 ; Zang *et al.*, 2013). Les triterpénoïdes et les stéroïdes seront traités en détail dans le Chapitre 3.

2.3. Applications biotechnologiques

2.3.1. La fermentation en milieu solide

Les procédés de fermentation en milieu solide sont appliqués pour la production d'antibiotiques, de métabolites secondaires, d'enzymes industrielles, de produits alimentaires enrichis, de biocarburants, d'acides organiques, d'hormones végétales, pour la culture de champignons dépollueurs ou comestibles (Krishna, 2005 ; Durand, 1998).

La culture des champignons comestibles ou pharmaceutiques s'effectue suivant deux méthodes différentes ; la première est traditionnelle qui consiste à la **culture sur bûches (i)**, la deuxième est la **culture sur substrats synthétiques (ii)** ; cette technique connaît un regain

d'intérêt, elle est devenue la plus utilisée grâce à ses avantages (Wada *et al.*, 1984 ; Chang & Miles, 2004 ; Walker & White, 2005). Différents substrats peuvent être utilisés selon la disponibilité régionale (Walker & White, 2005). Les champignons *G. lucidum*, *G. curtisii* et *G. tsugae* sont généralement cultivés sur une gamme de substrats lignocellulosiques et sur des bûches de bois (Wada *et al.*, 1984 ; Chang & Miles, 2004 ; Zhou *et al.*, 2012 ; Roy *et al.*, 2015).

Une étude a été menée afin d'évaluer la relation entre les enzymes lignolytiques (lignine peroxydase, la peroxydase dépendante au manganèse et laccase) et l'augmentation de saccharification de paille, qui est un sous-produit d'agriculture, après un prétraitement par une co-culture de basidiomycètes dont le *F. fomentarius* et le *G. resinaceum*, les résultats ont montré que la présence de lignine peroxydase augmente significativement le rendement de la saccharification (Pinto *et al.*, 2012).

Han *et al.* (2005) ont étudié la capacité du *G. lucidum* à dégrader l'amidon et d'améliorer la valeur nutritionnelle de semoule de maïs au cours de fermentation en milieu solide ; la teneur en amidon est fortement réduite dont une partie de l'amidon est convertie en dextrans et en sucres réducteurs grâce aux α -amylases de *G. lucidum* (Han *et al.*, 2005).

Dans d'autres essais de valorisation des sous-produits, une bioconversion par culture de *F. fomentarius* sur des grignons d'olive pour améliorer leurs valeurs nutritionnelles et leur digestibilité mettant en œuvre l'ensemble des enzymes lignocellulolytiques de ce champignon (Neifar *et al.*, 2013).

2.3.2. La culture submergée

La culture submergée des champignons est une technologie bien exploitée pour la bio-production d'antibiotiques, d'enzymes, d'acides organiques (Horgan & Murphy, 2011). Le criblage des isolats microbiens producteurs et le maintien de leurs caractéristiques génétiques et biosynthétiques est l'un des enjeux dans la maîtrise des procédés de fermentation liquide (Bérdy, 2005).

La culture submergée des basidiomycètes médicinaux dans le but de produire des composés bioactifs est une avancée biotechnologique (Wagner *et al.*, 2003, Tang *et al.*, 2007) ; elle rend possible la production de biomasse et de biomolécules dans un espace limité, en réduisant les risques de contamination et dans un temps relativement court (Xu *et al.*, 2008 ; Saltarelli *et al.*, 2009 ; Zhong et Xiao, 2009 ; Zhou *et al.*, 2012). Par ailleurs ; l'utilisation des

milieux complexes à base de substrats peu chers et des sous-produits de l'industrie agroalimentaire peut réduire sensiblement le coût (Xu *et al.*, 2008 ; Upadhyay *et al.*, 2014 ; Tan *et al.*, 2015).

Plusieurs travaux de recherche ont porté sur la production de métabolites bioactifs (principalement triterpénoïdes, stérols, polysaccharides) par différentes espèces de *Ganoderma* et le *F. fomentarius* en culture submergée (Kim *et al.*, 2006a, 2006b ; Chen *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2012a ; Cui *et al.*, 2015) ou la production des enzymes (Elissetche *et al.*, 2006 ; Chouiter *et al.*, 2008).

La plupart des études réalisées sur les paramètres qui influencent la production de biomasse et de métabolites est faite sur l'espèce type *G. lucidum* (Tang *et al.*, 2007 ; Sanodiya *et al.*, 2009). Fang et Zhong (2002a) ont étudié l'effet de la source d'azote et la concentration initiale de glucose dans le milieu de culture sur la production des polysaccharides et d'acides ganodériques ; il ressort de leur étude que la combinaison de peptone et d'extrait de levure améliore la production de métabolites bioactifs (acides ganodériques et polysaccharides). Le maximum de production d'acides ganodériques est obtenu avec une concentration initiale de 50 g/l de glucose (Fang & Zhong, 2002a). Toutefois, le lactose a été trouvé meilleur comme source de carbone pour la croissance cellulaire ainsi la production d'acides ganodériques (Tang & Zhong, 2002).

Le contrôle des conditions physico-chimiques des cultures submergées qui à leur tour affectent la croissance et la production de métabolites est aussi important, tel que le pH initial de cultures (Fang & Zhong 2002c ; Paninutti *et al.*, 2010), l'agitation et l'aération (Tang & Zhong, 2003 ; Kim *et al.*, 2006a ; Zhang *et al.*, 2010) et aussi la lumière (Zhu *et al.* 2010). Chen *et al.* (2017) ont trouvé que la température optimale pour la croissance mycélienne de *G. resinaceum* est de 30° C alors que celle de *G. lucidum* est de 25° C (Chen *et al.*, 2017).

La densité de l'inoculum est un autre paramètre important qui influence la morphologie cellulaire et la production de métabolites ; un inoculum important conduit à des *pellets* de petite taille avec un contenu relativement élevé en intra-polysaccharides. En outre, une faible inoculation favorise la formation de grands *pellets* avec un contenu plus important en acides ganodériques (Fang & Zhong, 2002b).

L'étude des voies de biosynthèse et la régulation de l'expression de gènes ont aussi pris assez d'attention (Liang *et al.*, 2010 ; Ren *et al.*, 2013 ; Shi *et al.*, 2010). Dans le but d'améliorer la production des acides ganodériques, différents stimuli sont étudiés ; Na⁺ ayant un effet dans la régulation de biosynthèse des acides ganodériques (Xu *et al.*, 2013) ; l'addition de Cu⁺² affecte positivement la production des triterpénoïdes (Tang *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2010). Aussi l'ajout de cellulase en culture submergé élicite l'accumulation des acides ganodériques (Zhang *et al.*, 2014).

En fait, la majorité des produits bioactifs commercialisés issus de basidiomycètes médicinaux sont obtenus traditionnellement par culture en champs ou en fermentation en milieu solide (Tang *et al.*, 2007 ; Zhong & Tang, 2004), cette dernière semble bien reproductible et peu coûteuse ; en outre elle est extrêmement laborieuse et fastidieuse (Tang *et al.*, 2007 ; Saltarelli *et al.*, 2009).

2.3.3. La bioremédiation

L'utilisation de champignons en bioremédiation est le plus souvent un des aspects de fermentation en milieu solide pour dégrader différents types de déchets et de polluants (Krishna, 2005). Les agents de la pourriture blanche présentent une polyvalence enzymatique suffisante pour être capables d'éliminer une variété des polluants organiques (Krishna, 2005 ; Korcan *et al.*, 2013).

Les CPB sont les principaux producteurs de ligninases responsables de la dégradation de la majeure partie de lignine sur terre (Doohan, 2011), en fait ces enzymes sont non-spécifiques et non-stéréosélectives, et efficace contre un large spectre de composés aromatiques (Anastasi *et al.*, 2013) ; ces champignons peuvent alors être utilisés pour détoxifier ou dégrader divers polluants aromatiques et voire xénobiotiques (Anastasi *et al.*, 2013 ; Korcan *et al.*, 2013).

Plusieurs applications biotechnologiques se sont développées sur les possibles exploitations des enzymes lignocellulotiques de *F. fomentarius* et de *Ganoderma* (Rodrigues *et al.*, 2008 ; Větrovský *et al.*, 2011 ; Łebkowska & Załęska-Radziwiłł, 2014).

Les laccases fongiques nécessitent seulement l'oxygène moléculaire pour leur catalyse ce qui leur rend adéquates aux applications biotechnologiques pour la transformation ou l'immobilisation des polluants et des composés xénobiotiques (Baldrian, 2006).

Une mention déjà faite ; la production de bioéthanol par la dégradation des déchets celluloses ; une activité de laccase isolée et caractérisée de *G. lucidum* a été trouvée potentiellement intéressante dans l'industrie de bioéthanol (Fang *et al.*, 2015). Murugesan *et al.* (2007) ont montré l'efficacité d'une laccase hautement thermostable produite aussi par *G. lucidum* en fermentation en milieu solide pour la dégradation des colorants textiles récalcitrants (Murugesan *et al.*, 2007). Ce champignon a montré aussi un potentiel intéressant dans la biodégradation du phénanthrène et du pyrène qui sont deux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Ting *et al.*, 2011).

3.1. Introduction

Les triterpénoïdes constituent un groupe majeur de métabolites secondaires trouvés dans la faune et la flore terrestres et marines (Hill & Connolly, 2013). Il a été montré que les stérols et les triterpènes polyoxydés sont des produits à large spectre d'activités biologiques susceptibles d'éventuelles applications biomédicales (Luu & Ourisson, 1989 ; Chudzik *et al.*, 2015).

Les triterpénoïdes et les stéroïdes sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire qui peuvent cibler des processus cellulaires tels que l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et de l'angiogenèse par interaction directe avec des cibles moléculaires (Lindequist *et al.*, 2005 ; Ferreira *et al.*, 2010 ; Bishop *et al.*, 2015).

Plus de 140 composés triterpéniques sont au moins isolés et caractérisés de *G. lucidum* ; des carpophores, mycélia en culture submergée et des spores ; ce sont principalement des triterpénoïdes de type lanostane (Huie & Di, 2004 ; Sanodiya *et al.*, 2009), les acides ganodériques (triterpénoïdes de type lanostane fortement oxydés) sont les représentants les plus étudiés des triterpénoïdes (Huie & Di, 2004 ; Boh *et al.*, 2007).

Il est par ailleurs considéré comme le seul capable à produire des acides ganodériques (Huie & Di, 2004). Toutefois le décrit de pharmacopée chinoise (2005) précise que *G. lucidum* et *G. sinense* sont qualifiés d'avoir les mêmes propriétés médicinales (Paterson, 2006 ; Zhou *et al.*, 2007), tout en notant que le contenu en triterpénoïdes totaux dans *G. lucidum* est 10 fois supérieur que leur contenu dans *G. sinense* (Paterson, 2006).

Grâce aux études physico-chimiques extensives réalisées au cours des dernières décennies, des centaines d'acides ganodériques, stérols et triterpénoïdes sont isolés et caractérisés de différentes espèces de *Ganoderma* (Baby *et al.*, 2015).

Plusieurs composés stéroïdiques et triterpéniques sont isolés et identifiés des espèces de *G. tsugae* et *G. lucidum* (Ko *et al.*, 2008), de *G. applanatum* (Boh *et al.*, 2000 ; Wang & Liu,

2008), de *G. annulare* (Smania *et al.*, 2003), de *G. resinaceum* (Peng *et al.*, 2013), et de *G. hainanense* (Li *et al.*, 2016).

Mis à part les triterpénoïdes, Zang et ses collaborateurs (2013) ont isolé 11 stérols de basidiocarpe de *F. fomentarius* dont 4 sont des nouvelles molécules appelées Fomentarols A-D (Zang *et al.*, 2013). Seo *et al.* (2009) ont rapporté aussi l'isolement et la caractérisation de 3 stérols avec 5 triterpénoïdes du basidiocarpe de *G. lucidum* (Seo *et al.*, 2009). D'autres stéroïdes (principalement des ergostérols) ont été obtenus et caractérisés de *G. applanatum*, *G. lucidum* et *F. fomentarius* (Rösecke & König, 2000 ; Huie & Di, 2004 ; Hajjaj *et al.*, 2005 ; Ziegenbein *et al.*, 2006).

Dans le tableau **I.3** des composés triterpéniques et stéroïdiens avec leurs activités biologiques sont récapitulés.

Tableau.I.3. Activités biologiques des stérols et triterpénoïdes de *F. fomentarius* et des espèces de *Ganoderma*.

Composés	Espèces	Activités biologiques	Sources
Ganoderiol F et Ganodermanontriol	<i>G. lucidum</i>	Agents actifs anti-HIV-1	El-Mekkawi <i>et al.</i> , 1998
Acide lucideniques (A, C, D2, E2, P, Q) acide ganodériques (E, F, T-Q) et Q, méthyl lucidenates (A, D2, E2, F, L, P)	<i>G. lucidum</i>	Effet inhibiteur de l'activation du virus Epstein-Barr	Iwatsuki <i>et al.</i> , 2003
Ganoderol A, ganoderol B, ganoderol A, et acide ganodérique Y	<i>G. lucidum</i>	Effet hypocholestérolémiant	Hajjaj <i>et al.</i> , 2005
Acide 7-oxo-ganodérique Z et acide 15-hydroxy-ganodérique S	<i>G. lucidum</i>	Activités inhibitrices contre le HMG-CoA réductase et acyl CoA acyltransférase.	Li <i>et al.</i> , 2006
Ganoderol B	<i>G. lucidum</i>	effet anti-androgénique	Liu <i>et al.</i> , 2007
Acide ganodérique A et H	<i>G. lucidum</i>	Suppression de prolifération des cellules tumorales du cancer du sein	Jiang <i>et al.</i> 2008
Acide ganodérique DM	<i>G. lucidum</i>	Activités anti-androgénique et inhibitrice d'ostéoclastogénèse	Liu <i>et al.</i> 2009
Ergosterol, acide ganodérique Sz	<i>G. lucidum</i>	Activité anti-complément	Seo <i>et al.</i> , 2009
15 α ,26-dihydroxy-5 α -lanosta-7,9,24(E)-trien-3-one ; lucidadiol ; ganoderiol F et autres Triterpénoïdes type lanostane	<i>G. lucidum</i>	Une activité cytotoxique sur la lignée cancéreuse du cancer cervical humain HeLa.	Cheng <i>et al.</i> , 2010
Acide ganodérique Df	<i>G. lucidum</i>	Inhibition d'aldose réductase incluse dans les complications de diabète.	Fatmawati <i>et al.</i> , 2010
Ganoderol B	<i>G. lucidum</i>	Inhibiteur de α -Glucosidase ; potentiel thérapeutique de diabète <i>mellitus</i> type II	Fatmawati <i>et al.</i> , 2011
Triterpénoïdes totaux	<i>G. lucidum</i>	Activités anti-cancer du poumon par l'amélioration de l'immunomodulation et induction de l'apoptose	Feng <i>et al.</i> , 2013
2 Triterpénoïdes type lanostane	<i>G. lucidum</i>	Contre l'infection de l'entérovirus 71 (Anti-EV71)	Zhang <i>et al.</i> , 2014

Tableau.I.3. (suite)

Composés	Espèces	Activités biologiques	Sources
Triterpénoïdes totaux	<i>G. lucidum</i>	Suppression de prolifération des cellules tumorales du cancer de prostate par induction d'arrêt de croissance et d'apoptose	Wang <i>et al.</i> , 2015
Deux triterpénoïdes de type lanostane	<i>Ganoderma Lingzhi</i>	Une activité cytotoxique sur la lignée cancéreuse MCF-7	Amen <i>et al.</i> , 2016
Triterpénoïde type lanostane	<i>G. resinaceum</i>	Une activité cytotoxique sur la lignée cancéreuse Hep-2	Niu <i>et al.</i> , 2007
Ganoderesin B , ganodérol B et lucidone A	<i>G. resinaceum</i>	Effets anti-oxidant et hépatoprotecteur significatifs contre la toxicité induite par H ₂ O ₂ dans les cellules HepG2	Peng <i>et al.</i> , 2013
Acide tsugarique, et Acide 3-oxo-5a-lanosta-8,24-dien-21-oïque	<i>G. tsugae</i>	Effet anti-inflammatoire et un effet protecteur sur les kératinocytes contre le photovieillissement induit par le rayonnement ultraviolet B (UV-B)	Ko <i>et al.</i> , 2008
Ganodermadiol, lucidadiol et acide applanoxidique	<i>G. pfeifferi</i>	Activité antiviral contre les virus influenza de type A et l'herpès simplex HSV de type 1	Mothana <i>et al.</i> , 2003
triterpénoïdes de type lanostane	<i>G. curtisii</i>	Effet anti-inflammatoire dans les cellules microgliales BV-2 activées par le LPS	Jiao <i>et al.</i> , 2016
Acide ganodérique X	<i>G. amboinense</i>	Inhibition de la topoisomérases et induction d'apoptose de cellules cancéreuses	Li <i>et al.</i> , 2005
Ganoderiol F	<i>G. amboinense</i>	Induction de sénescence dans les cellules d'hépatome HepG2.	Chang <i>et al.</i> , 2006
Acides applanoxidiques A, C et F	<i>G. annulare</i>	Activité antifongique vis-à-vis <i>Microsporium cannis</i> et <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Smania <i>et al.</i> , 2003
6 Triterpénoïdes type lanostane	<i>G. theaecolum</i>	Effet hépatoprotecteur	Liu <i>et al.</i> , 2014
Fomentarol A, C	<i>F. fomentarius</i>	Cytotoxicité légère sur la lignée cancéreuse du colon HCT116	Zang <i>et al.</i> , 2013

3.2. Chimie des terpénoïdes et voie de biosynthèse

Les terpénoïdes, également dits les isoprénoïdes, constituent une famille vaste de produits naturels ayant d'importantes propriétés biologiques (Hanson, 2008 ; Hill & Connolly, 2013) et qui sont formés par cyclisation d'unité à 5 carbone de type isoprène (C₅H₈).

La formule de base de toutes molécules terpéniques est (C₅H₈)_n (Brown, 1998 ; Paduch *et al.*, 2007 ; Hanson, 2008) et selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpénoïdes sont divisés en monoterpénoïdes (C₁₀) sesquiterpénoïdes (C₁₅), diterpénoïdes (C₂₀), sesterterpénoïdes (C₂₅), triterpénoïdes (C₃₀) et les caroténoïdes (C₄₀).

Les terpénoïdes constituent un ensemble d'hydrocarbures cycliques ou à chaînes ouvertes, les unités d'isoprène sont normalement reliées entre elles d'une manière linéaire (tête-à-queue) (Paduch *et al.*, 2007 ; Hanson, 2008).

La formation de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et son isomère diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) est la première étape de leur biosynthèse de l'unité d'isoprène des terpénoïdes et des stéroïdes (**Fig.I.10**). La voie métabolique qui fournit l'IPP et DMAPP dans tous les animaux et les champignons est la **voie de mévalonate** dont le précurseur d'IPP est l'acétyl-CoA (Hanson, 2008 ; Inouye *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2010). Elle commence par ;

- la condensation de deux molécules d'acétyl CoA ; l'enzyme 3-hydroxy-3-méthyl glutanyl-CoA réductase (HMGR) catalyse l'étape spécifique dans la synthèse d'isoprénoïde (Xu *et al.*, 2010) ;
- la synthèse du squalène époxydé (2,3-oxidosqualène : SO) à partir des unités IPP et DMAPP est la deuxième étape de la biogénèse des stéroïdes et des triterpènes de type lanostane catalysée par la squalène synthase (SQS) (Brown, 1998 ; Xu *et al.*, 2010) ;
- ensuite, lors de la 3^{ème} étape, le SO est métabolisé par l'oxidosqualène-lanostérol cyclase (OSC) en lanostérol (C₂₇) (Brown, 1998 ; Shi *et al.*, 2010).

Le lanostérol est considéré le composé intermédiaire dans la synthèse des triterpénoïdes et des stéroïdes chez les *Ganoderma* (Baby *et al.*, 2015).

Les triterpénoïdes du *G. lucidum* étant les plus recherchés vu leurs activités biologiques, de nombreux travaux scientifiques se sont intéressés pour comprendre leur biosynthèse. Les gènes codant pour les trois enzymes clés dans la voie de mévalonate, HMGR, SQS et OSC, ont

été étudiés minutieusement pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent la production élevée des acides ganodériques par induction enzymatique (Xu *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2012 ; Ren *et al.*, 2010 ; Ren *et al.*, 2013).

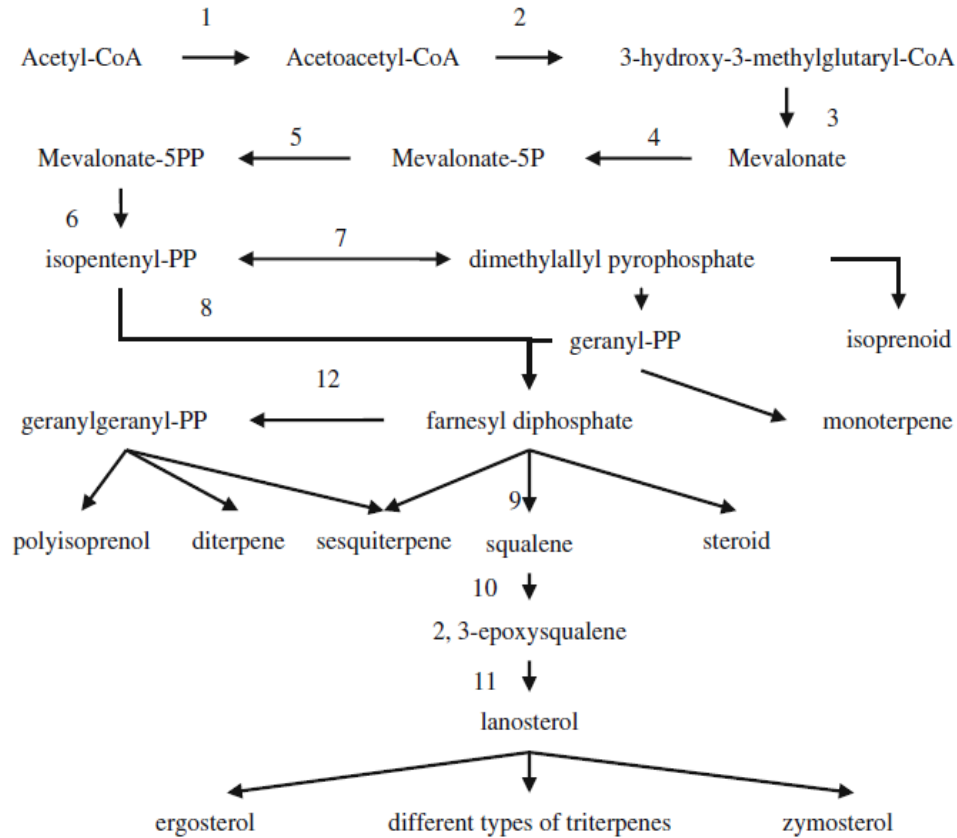


Figure.I.10 : La voie du mévalonate et biosynthèse du squelette terpénoïde (D'après Shi *et al.* 2010).

Le schéma montre la voie du mévalonate pour la génération des terpénoïdes et les enzymes impliquées (1) acétyl-CoA acétyl transférase, **AACT**; (2) 3-hydroxy-3- méthylglutaryl-CoA synthase **HMGS**; (3) 3-hydroxy-3- méthylglutaryl-CoA réductase, **HMGR**; (4) mévalonate kinase, **MK**; (5) phosphomévalonate kinase, **MPK**; (6) pyrophosphomévalonate decarboxylase, **MVD**; (7) isopentenyl diphosphate isomérase, **IDI**; (8) farnésyl diphosphate synthase, **FPPs**; (9) squalène synthase, **SQS**; (10) squalène monooxygénase, **SE**; (11) 2, 3- oxidosqualène-lanostérol cyclase, **OSC**; (12) géranylgéranyl-PP synthase, **FPPs**.

3.3. Classification des triterpénoïdes de type lanostane et les stérols

Les triterpènes tétracycliques et les stérols ne présentent pas de différences structurales importantes. Ce sont des composés à 30 carbones issus de la cyclisation du 2,3-époxy-2,3-squalène. Ils présentent presque toujours une hydroxylation en C-3 du fait de l'ouverture de

l'époxyde. Les stérols peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu trois méthyles (2 en C-4 et 1 en C-14) (Welti, 2009).

Les triterpénoïdes isolés de *Ganoderma* sont classés suivant le nombre d'atomes de carbone en trois principaux groupes ;

Le groupe A : sont les triterpénoïdes à **C30** de type lanostane fortement oxydés. Les composés appartenant à ce groupe sont les acides ganodériques (GA) A, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et O (Zhou *et al.*, 2006 ; Boh, 2013 ; Baby *et al.*, 2015).

Le groupe B : sont les triterpénoïdes à **C27** de type lanostane. On retrouve dans ce groupe les acides lucidéniques (Zhou *et al.*, 2006 ; Boh, 2013 ; Baby *et al.*, 2015).

Le groupe C : sont les triterpénoïdes à **C24** de type lanostane ; ils comportent les lucidones (Boh, 2013 ; Baby *et al.*, 2015).

D'autres composés triterpéniques à 30 carbones sont isolés de différentes espèces de *Ganoderma* tels que les acides ganodermiques, acides ganodéréniques, acides applanoxidique ganodériols, ganodermanondiols, ganodermanontriols et Ganoderals (Paterson, 2006 ; Boh 2013, Zhou *et al.*, 2006). En effet, le nombre des triterpénoïdes obtenus de ce genre est supérieur à 350 composés ce qui rend leur classification assez difficile (Baby *et al.*, 2015).

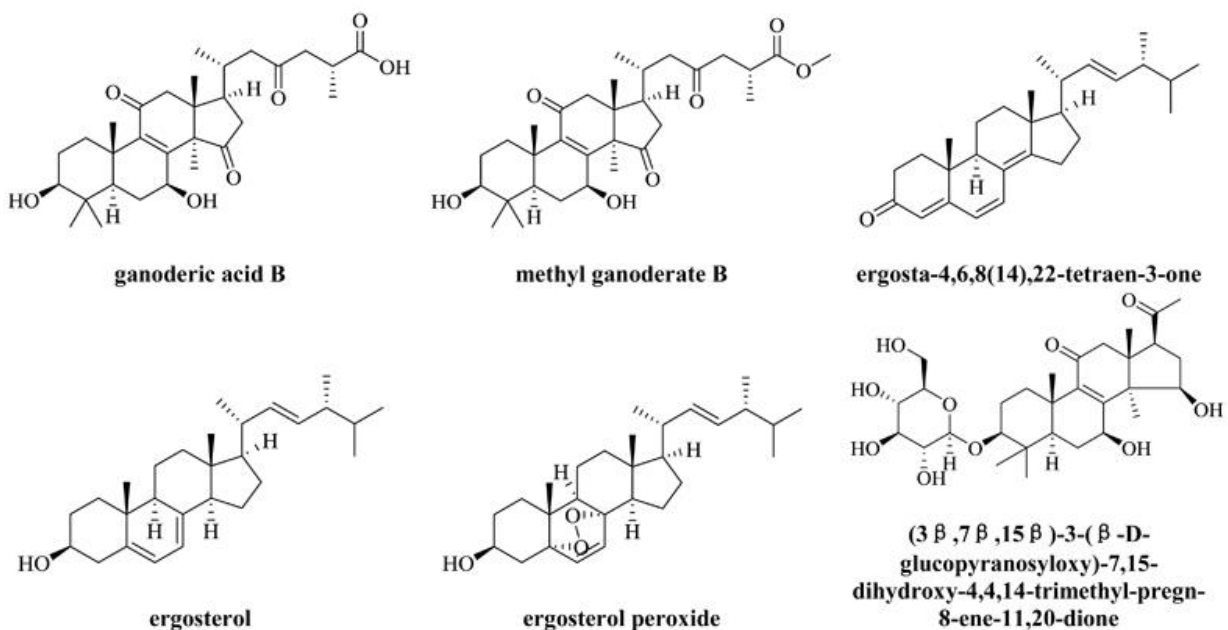


Figure.I.11. Des exemples de structures chimiques des triterpènes de *Ganoderma*, y compris un acide, un ester, une cétone, un alcool, le peroxyde, et les constituants glycosidiques (adopté de Grienke *et al.*, 2015).



II Matériels et méthodes

1

Les champignons

Les souches de champignons utilisées dans cette étude sont isolées à partir des carpophores de *Ganoderma* et de *Fomes* récoltés de la forêt de Brabtia dans le Parc National d'El-Kala (PNEK) wilaya d'El-Tarf. Cette région érigée en Parc National sous le décret n° 83-462 du 23 juillet 1983, elle est en outre classée dans la catégorie du patrimoine naturel et culturel mondial et comme réserve de la biosphère par l'UNESCO depuis 1990 (Benyacoub *et al.*, 1998).

Le territoire du PNEK, à l'instar des zones telliennes littorales, se caractérise par un relief et une géologie relativement complexes, il est composé d'une mosaïque d'écosystème particulière caractérisée par sa grande biodiversité (faune et flore) (Benyacoub *et al.*, 1998 ; Benyacoub & Chabi, 2000).

Les carpophores de *Ganoderma* sont récoltés à partir de différentes plantes hôtes ; de chêne-liège (*Quercus suber*), d'eucalyptus commun (*Eucalyptus globulus*) et de faux-poivrier (*Schinus molle*), ceux de *Fomes* sont récoltés de l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) au lac Tonga (**Fig.II.1**).

L'ensemble des caractéristiques morphologiques des carpophores sont enregistrées pour la détermination de l'espèce fongique. Ces carpophores sont séchés et conservés dans des sacs en plastique étiquetés jusqu'à leurs utilisations.

1.1. Caractérisation et identification des spécimens récoltés

L'identification est réalisée en se basant sur les critères macroscopiques et microscopiques de différents spécimens selon les clés de déterminations des basidiomycètes (Courtcuise & Duhem, 2000 ; Ryvardeen, 2000 ; Schmidt, 2006 ; Bhosle *et al.*, 2010)

1.1.1. Structures macroscopiques

Certaines caractéristiques morphologiques sont singulières ; pour cela elles font référence pour la détermination des genres voire des espèces ; plusieurs critères sont à examiner ;

- Aspect de fructifications (taille, couleur, texture de croûte et de chair...);
- Présence ou absence de pieds (insertion, taille...);
- Présence d'exsudats.

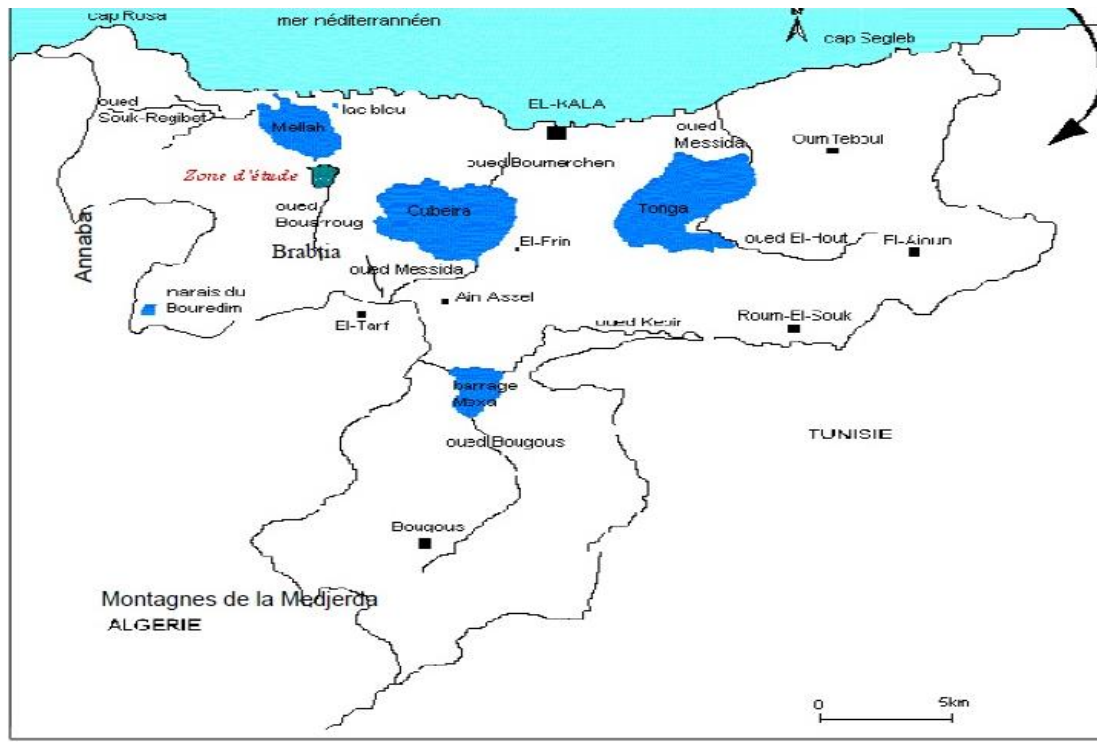


Figure. II.1. Situation géographique du Parc National d'El Kala (Benyacoub *et al.*, 1998).

1.1.2. Observations microscopiques

Des préparations microscopiques humides entre lame et lamelle à l'état frais sont observées au grossissement x600 ou x1000, parfois l'ajout d'une goutte de Lugol, bleu de méthyle ou de fuchsine au liquide de montage déposé sur la lame peut améliorer la qualité du contraste ou mettre en relief certains détails de la structure (ornementation des spores, septa des hyphes, etc.) (Lachapelle, 2004), les critères à observer sont ;

- Aspect de spores ;
- Aspect de mycéliums ; couleur, transparence, diamètre des hyphes...
- Présence de ramification, des cloisons et des clamps de connexion ;
- Présence de chlamydo-spores.

1.2. Culture et purification des mycéliums de *Ganoderma* et *Fomes*

1.2.1. La préparation des suspensions sporales

A partir des différentes sporées de *Ganoderma* spp. et *F. fomentarius* obtenues en grattant minutieusement les faces inférieures des carpophores, des suspensions de 2 à 3 ml ont été préparées avec l'eau distillée stérile. Des observations microscopiques ont été réalisées afin de vérifier la présence de spores.

1.2.2. La mise en culture

Une ou deux gouttes de chaque suspension ont été déposées et étalées sur milieu gélosé en boîte par striation et cette procédure fut répétée trois fois, puis incubées à 30° C pendant 48 heures à une semaine. Le développement et la croissance se traduisent par l'apparition du mycélium.

1.2.3. Le repiquage et la purification

Seules les colonies mycéliennes de couleur blanche et d'aspect cotonneux caractéristiques des basidiomycètes font l'objet de repiquage en transférant un fragment mycélien sur un milieu frais, pour purifier les souches de toute contamination le repiquage doit être fait plusieurs fois et sur des milieux plus sélectifs.

1.2.4. Le calcul de taux de croissance

Le taux de croissance mycélienne est calculé par mesure de la zone de croissance radiale, cette dernière consiste à enregistrer les diamètres des zones de croissance radiale (\emptyset en mm) sur milieu PDA en boîte de Pétri (chaque essai est réalisé en triple exemplaire). Les mesures sont effectuées à intervalle de 24 heures sur une période de 6 jours. Le taux de croissance (mm/jr) alors est défini par la formule suivante :

$$\{[(\emptyset 6) - (\emptyset 5)] + [(\emptyset 5) - (\emptyset 4)] + [(\emptyset 4) - (\emptyset 3)] + [(\emptyset 3) - (\emptyset 2)]\} \div 4$$

Si la croissance mycélienne atteint le périmètre de la boîte de Pétri avant le 6ème jour, le 5ème jour est considéré comme le point de départ pour le calcul (Roberts, 2004).

1.3. Conservation des souches

1.3.1. La conservation sur gélose inclinée

Les isolats sont repiqués en tube sur géloses inclinées. Après incubation de 5 à 6 jours à 28° C, les cultures sont conservées à l'abri de la lumière à 4° C (Botton *et al.*, 1990 ; Roberts, 2004). Les repiquages sont refaits toutes les 8 semaines pour favoriser la viabilité et la stabilité des souches (Roberts, 2004).

1.3.2. La conservation sous huile

Des cultures sur géloses inclinées sont recouvertes d'huile de paraffine stérile, d'environ 1 cm de la partie supérieure de la pente, les tubes sont maintenus en position verticale à la température ambiante (Botton *et al.*, 1990 ; Nakasone *et al.*, 2004).

1.3.3. La cryoconservation

La congélation consiste à transférer aseptiquement 5 à 10 disques (6 mm de diamètre) coupés de gélose à partir de culture jeunes de mycéliums en boîte de Pétri à des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de mélange d'eau contenant 10 % de glycérol ; ce dernier est utilisé comme agent cryoprotecteur (Nagai *et al.*, 2005). Les tubes sont conservés à -18° C.

2

Milieux de cultures**2.1. Milieux solides**

Les différents mycéliums de *Fomes* et *Ganoderma* sont isolées, purifiés et conservés en utilisant le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) et le milieu MEA (*Malt Extract Agar*). Pour faciliter la purification des isolats ; le milieu PDA est parfois additionné de Rose Bengale ; un agent sélectif inhibant la croissance des bactéries vu ses propriétés bactériostatiques (Ottow, 1972) et limitant la croissance mycélienne étendue des champignons (Jarvis, 1973 ; King *et al.*, 1979). Le milieu RBCA (*Rose Bengal Chloramphenicol Agar*) a été utilisé aussi au cours de purification, ce milieu contient un antibiotique à large spectre. L'activité antibactérienne des extraits fongiques a été évaluée en utilisant le milieu LB liquide et solide (*Lysogeny Broth*).

Les compositions de ces milieux sont fournies à l'annexe 1. Les autres milieux utilisés pour l'étude des activités enzymatiques seront détaillés au fur et à mesure.

2.2. Milieux de culture liquides

Les compositions des milieux de culture liquides utilisés dans le processus de fermentation submergée pour les isolats fongiques de *Ganoderma* spp. et *F. fomentarius* sont ceux proposées par Xu *et al.* (2008) pour l'hyperproduction des métabolites secondaires de type triterpènes.

Le milieu de pré-culture utilisé pour les isolats de *Ganoderma* spp. dans cette étude est composé de (g/l) ;

- glucose 40 ;
- peptone 4 ;
- KH_2PO_4 1,5 ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 ;
- vitamine B1 0,01.

Les isolats de *F. fomentarius* sont pré-cultivés sur le milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*) (**Annexe.1**).

Le milieu de production de triterpénoïdes proprement dite est un milieu complexe formulé comme suit (g/l) ;

- glucose 16 ;
- peptone 2,93 ;
- farine de maïs 20,93 ;
- farine de soja 6,44.

Le pH est ajusté à 5,5 avant la stérilisation du milieu (Tang & Zhong, 2004).

2.3. Mesure de pH

La mesure du pH des milieux et des échantillons est réalisée à l'aide d'un pH-mètre digital HANNA®. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampons Prolabo® de pH 4 et 7. L'ajustement du pH initial est réalisé à l'aide d'une solution de HCl à 1M et de NaOH à 2M.

2.4. Stérilisation

Les milieux de cultures sont stérilisés par autoclavage à 121° C pendant 15 min. La verrerie utilisée au cours de cette étude est stérilisée au four Pasteur à 170-180° C pendant 1 heure.

3

Culture submergée et essais de production de triterpénoïdes

Les cultures submergées utilisées dans cette étude sont des cultures en deux étapes « *two stage culture* » en Erlenmeyer de 250 ml selon la méthode décrite par Xu *et al.* (2008) avec de légères modifications ; la première étape est une pré-culture afin de produire la biomasse pour initier la deuxième étape qui la culture dont le but est la production de métabolites.

Toutes les cultures ont été réalisées en double pour chaque isolat pour assurer la reproductibilité des résultats.

3.1. La pré-culture

L'inoculation du milieu se fait en transférant aseptiquement trois disques de gélose d'environ 5 mm de diamètre à partir d'une culture jeune de mycélium de 3-5 jours dans 50 ml du milieu de pré-culture, les cultures sont par la suite incubées à 30° C sous agitation (150 rpm) pendant 7 jours (**Fig. II.2**).

3.2. La culture

Le milieu de pré-culture est éliminé, en conditions stériles, tout en gardant la biomasse dans les Erlenmeyers, ensuite il est remplacé par 100 ml du milieu complexe de production de triterpénoïdes. L'incubation se fait à 30° C pendant 4 jours avec une agitation de 125 rpm.



Figure. II.2. Chambre de culture.

3.3. La détermination de la biomasse

La biomasse est estimée par la détermination du poids sec. Les mycéliums sont récupérés par filtration à l'aide de gaze stérile et après un lavage à l'eau distillée, ils sont séchés à 50° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant puis pesés.

La biomasse sèche est broyée à l'aide d'un mortier et un pilon puis conservée à -18°C. Les filtrats des cultures sont utilisés pour le test qualitatif de production de cellulase (voir section 7.1.2)

3.4. La détermination du pH

La détermination du pH est effectuée directement sur des échantillons prélevés à partir des différentes cultures liquides.

4

Extraction des triterpénoïdes

L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Wang *et al.*, (2006). Un gramme de poudre de biomasse (préalablement séchée et broyée) a été traité avec 20 ml de chloroforme (CHCl_3) pendant 20 min avec une agitation discontinue au Vortex. Cette étape a été répétée deux fois. La solution extraite est récupérée et mélangée puis filtrée à travers du papier filtre Whatman N°1. Le filtrat est par la suite évaporé à l'étuve à 50° C jusqu'à siccité (Wang *et al.*, 2006).

Les différents extraits secs obtenus sont conservés à -18 °C pour les dosages ultérieurs. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure .II.3.

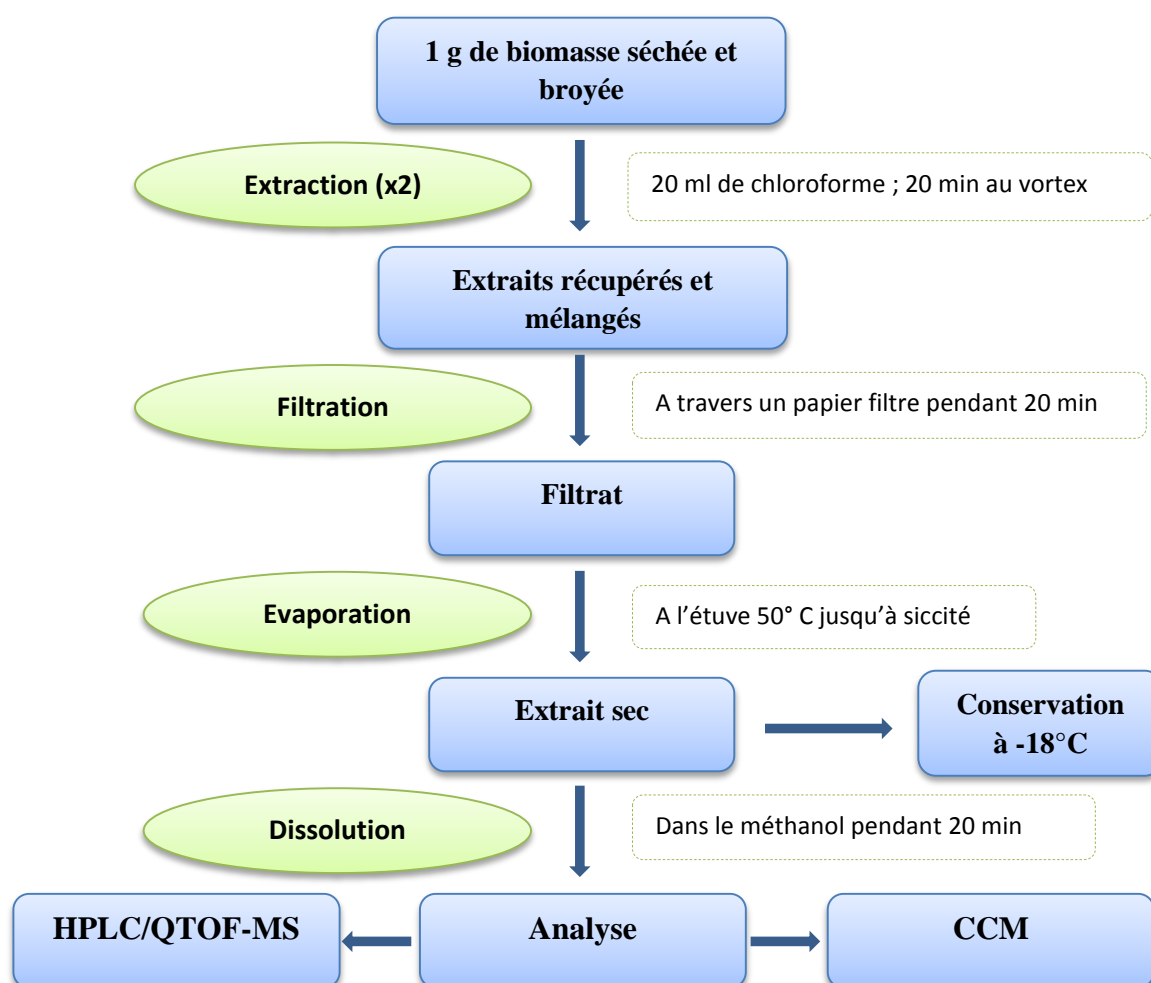


Figure. II.3. : Schéma modifié du protocole d'extraction des triterpénoïdes (Wang *et al.*, 2006).

5

Méthodes chromatographiques pour visualiser et identifier les métabolites produits

5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont réalisées sur des plaques de gel de silice en verre (20cm x 10cm) ou des feuilles d'aluminium (20cm x 20cm) 60 F254 (Merck®). Le développement des plaques s'est effectué dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

Dans notre étude, deux phases mobiles sont testées ;

- La première est constituée des mélanges tertiaires de solvants (Q1) : hexane/éther diéthylique /acide acétique (75 : 25 :1, vol/vol) (Berger *et al.*, 2004).
- La deuxième (Q2) est un mélange d'hexane/l'acétate d'éthyl/éther diéthylique (1 : 1 : 1, vol/vol) (Huie & Di, 2004).

L'observation des plaques CCM s'effectue sous lumière UV à 254 et à 365 nm (Roberts, 2004). Une révélation est réalisée par l'acide sulfurique à 10 % dans l'éthanol, cette application est suivie d'un chauffage à 110° C pendant 5 à 10 min (Rösecke & König, 2000 ; Huie & Di, 2004).

5.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse quadripolaire et à temps de vol « *Quadrupole-Time Of Flight* » (LC/Q-TOF-MS)

5.2.1. Principe général

Le couplage de la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC/MS) présente l'un des outils d'analyse les plus résolutifs. La LC/MS permet à la fois la séparation des différents composés de matrices complexes et l'analyse de molécules après leur ionisation pour offrir de données sur la structure et la formule brute des composés séparés voire la détermination formelle de la molécule.

La Q-TOF-MS est une méthode de spectrométrie utilisant un analyseur hybride quadripolaire « *Quadrupole ; Q* » et à temps de vol « *Time Of Flight ; TOF* » qui permet de séparer aisément les composés isobares et d'accéder aux rapports m/z précis des ions pour la

détermination des formules brutes. Cette méthode permet également de faire la recherche de molécules inconnues (Cotton, 2015 ; Menet, 2011).

Dans le présent travail, nous avons utilisé une chromatographie liquide couplée à la Q-TOF-MS pour la recherche des molécules produites par les polypores isolés.

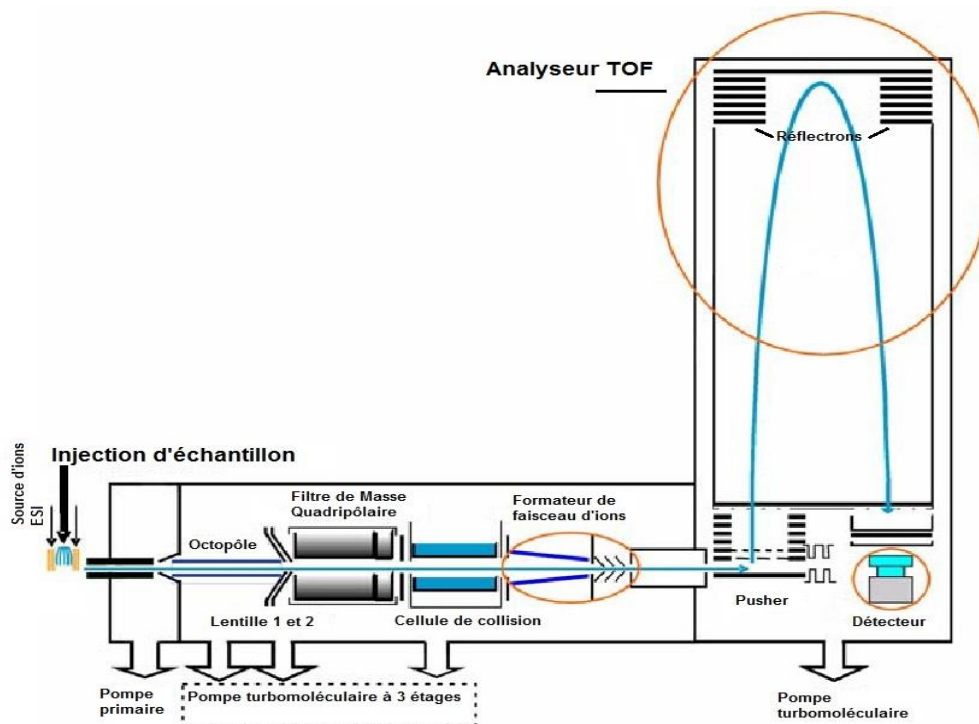


Figure.II.4. : Structure d'un spectromètre hybride quadripolaire et à temps de vol Q-TOF-MS (D'après Agilent, 2012).

5.2.2. Conditions de chromatographie liquide

Un protocole de séparation des extraits chloroformiques par chromatographie à haute performance a été choisi (Liu *et al.*, 2012b), la HPLC est effectuée sur un système Agilent 1290 Infinity équipé d'une pompe binaire, d'un auto-échantillonneur, d'un four à colonnes et d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes (*Diode Array Detector* ; DAD).

Une aliquote de chaque résidu sec est dissoute dans 400 μl de méthanol dans un bain ultrason pendant 5 minutes, après 400 μl d'eau Milli-Q sont ajoutés, puis le mélange est filtré à travers un filtre Millipore à 0,45 μm . 20 μl de chaque échantillon est élué sur colonne Phenomenex Luna C18 (2) 100 Å (3 μm , 150 mm x 4,6 mm i.d.).

La phase mobile est constituée d'un gradient d'eau contenant 0,2 % d'acide formique (A) et d'acétonitrile (B). L'élution chromatographique a été réalisée selon les conditions de gradient indiqué comme suit ; l'élution débute avec une étape isocratique de 15 min à 32 % de phase B, suivie d'un accroissement linéaire de 32 à 82 % de proportion de phase B entre 15 - 40 min, puis de 82 à 100 % entre 40 - 42,5 min. La proportion de 100 % de phase B est maintenue constante jusqu'à 48 min. Le débit est de 0,85 ml/min et la température de la colonne est réglée à 20° C.

Le détecteur DAD est contrôlé à 220 nm, 252 nm et 280 nm pour l'acquisition des chromatogrammes ; l'enregistrement des spectres UV-visibles en temps réel « *Online* » est fait dans une gamme de longueur d'onde de 190 à 600 nm.

L'analyse est réalisée dans l'Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, Plateforme Spectrométrie de Masse ; par le Responsable Franck Merlier à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) en France (voir **Annexe.1**).

5.2.3. Conditions de spectrométrie de masse

La LC est couplée à un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol Q-TOF ; Agilent 6538 Q-TOF équipé d'une double source d'ionisation par électro-nébulisation (*dual Electrospray Ionisation* ; ESI). Les spectres ESI-MS sont acquis en mode positif et négatif. Les conditions d'ionisation de la source ESI sont les suivantes ;

- Débit de gaz de séchage est de 12 l/min ;
- Température du gaz de séchage à 350° C ;
- Pression de nébulisation 45 psi ;
- Valeur du fragmenteur à 180 V ;
- Tension capillaire à 3,8 kV (ESI positive ou négative) ;
- Fréquence d'acquisition à 4 ghz ;
- Gamme de masse m/z 50-1700 ;
- Précision en masse < 5 ppm ;
- Vitesse de balayage 1,5 spectre/sec.

6

Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits fongiques

La méthode de diffusion en disque a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques *in vitro* et qui se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu gélosé ensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure ; elle est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque (Bauer *et al.*, 1966).

6.1. L'étude de la sensibilité aux extraits fongiques de quelques souches bactériennes pathogènes

Le pouvoir antibactérien a été testé sur 6 souches bactériennes multi-résistantes d'origine clinique isolées des hôpitaux de l'Est algérien à partir des produits pathologiques (urines et pus des plaies post-opératoires).

Deux souches à Gram positif de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et 4 souches à Gram négatif *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ; ces souches ont été fournies aimablement par Bouguenoun *et al.* (2016).

D'après Bouguenoun *et al.* (2016), la détection des phénotypes de résistance est étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du Comité Européen de l'Antibiogramme EUCAST (2013) (EUCAST pour *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Bouguenoun *et al.*, 2016).

Les profils de résistance des souches bactériennes testées par rapport aux antibiotiques commercialisés et utilisés en médecine humaine sont détaillés dans l'annexe 1.

6.2. Les antibiotiques

Trois antibiotiques ont été utilisés dans notre étude comme antibiotiques de référence et qui sont ; l'amoxicilline, la vancomycine et l'acide fusidique (**Tab.II.1**). L'amoxicilline et la vancomycine sont des antibiotiques à large spectre d'action contre des germes à Gram+ et

Gram-, ce choix repose sur les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2012).

Cependant l'acide fusidique a été sélectionné pour ses propriétés bactériostatiques contre les bactéries à Gram + y compris les SARM, mais aussi pour sa nature ; c'est un triterpénoïde de type lanostane dont la formule brute est $C_{31}H_{48}O_6$ (Turnidge, 1999 ; Hanson, 2008).

Figure.II.5. Structure d'acide fusidique (Hanson, 2008)

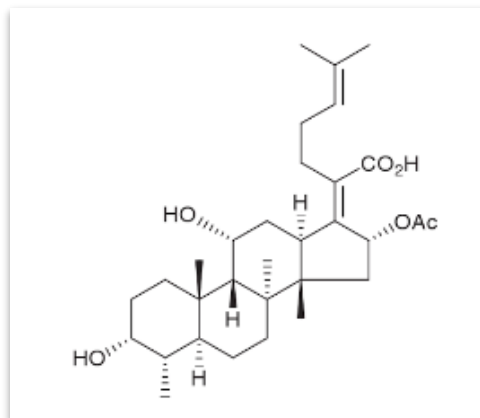


Tableau.II.1 : les antibiotiques utilisés (CA-SFM, 2012)

Antibiotiques	Famille	Charge de disque	Diamètres critiques (mm)	
			Résistants (R)	Sensibles (S)
Amoxicilline (Amx)	Pénicillines	25 µg	≤ 16	≥ 23
Vancomycine (VA)	Glycopeptides	30 µg	-	≥ 17
Acide fusidique (FC)	Fusidanines	10 µg	≤ 15	≥ 22

6.3. Les extraits chloroformiques et préparation des disques

Les extraits chloroformiques conservés à $-18^{\circ}C$ sont repris dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 2 mg pour 200 µl pour une concentration finale de 10 mg/ml. Des disques de papier filtre Whatman N°1 de 6 mm de diamètre sont préparés et stérilisés puis imprégnés de 30 µl de solutions d'extraits dissouts dans le DMSO pour une charge finale de 300 µg d'extrait par disque.

D'autres disques imprégnés de 30 µl de DMSO seul sont préparés aussi pour servir de contrôle négatif. Finalement ces deux catégories de disques sont séchées dans l'étuve à $50^{\circ}C$.

6.4. Mode opératoire de la méthode de diffusion en disque

Le protocole est inspiré des travaux de Dugler et Gonuz (2004) et de Quereshi *et al.* (2010). L'activité antibactérienne des différents extraits fongiques est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

A partir de cultures bactériennes pures de 18-24 h sur le milieu LB gélosé, une colonie est prélevée pour ensemercer 2 ml du bouillon LB en tube. Après incubation de 3-5 h à 37° C, une dilution avec l'eau physiologique stérile (0.9 % NaCl) est réalisée jusqu'à atteindre la turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland afin d'obtenir un inoculum estimé à 10⁸ unités formant colonies par millilitre (UFC/ml) (CA-SFM, 2012). Cet inoculum est ensemercé par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri contenant la gélose LB.

Les disques du papier filtre imprégnés d'extraits chloroformiques de biomasse des *G. resinaceum* et *F. fomentarius* sont déposés à la surface de gélose LB à l'aide d'une pince stérile. Sur des boîtes contrôles (géloses LB ensemençées par les bactéries à tester) ; des disques d'amoxicilline (25 µg), de vancomycine (30 µg) et d'acide fusidique (10 µg) sont posés comme contrôles positifs, ainsi que des disques de contrôle négatif (disques imprégnés de DMSO seul).

Toutes les boîtes sont maintenues à l'endroit pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion où les disques s'humidifient progressivement et les substances diffusent radialement dans la gélose en formant un gradient de concentration avant d'être incubées à 37°C pendant 24h. La lecture se fait par la mesure en millimètres des diamètres de zone d'inhibition autour de chaque disque ; toutes zones d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif (Cock, 2008).

Toutes les manipulations sont réalisées en triplicata pour s'assurer de la fiabilité de la méthode.

7

Mise en évidence de production d'enzymes extracellulaires

La production de six enzymes a été testée qualitativement pour l'ensemble des 45 isolats fongiques de notre collection par l'hydrolyse des substrats dissous dans différents milieux de cultures en boîte de Pétri.

7.1. Production de cellulases

7.1.1. Hydrolyse qualitative de la cellulose en milieux gélosés

Pour la mise en évidence de la production de cellulases extracellulaires trois techniques qualitatives sont utilisées, dont deux méthodes sont proposées par Pointing *et al.*, (1998) et de Pointing (1999), et qui consistent à utiliser un milieu de base (CBM ; *Cellulolysis Basal Medium*) composé de (g/l) ;

- $C_4H_{12}N_2O_6$ 5 ;
- KH_2PO_4 1 ;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 ;
- extrait de levure 0,1 ;
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001.

Afin d'évaluer le pouvoir cellulolytique, ce milieu est additionné de celluloses insolubles ou de cellulose soluble qui sont les seules sources de carbone et d'énergie.

7.1.1.1. Action de cellulases sur celluloses insolubles

Le milieu CBM est préparé en incorporant 2 % de cellulose (cellulose insoluble de Sigma® (C6288) ou du papier filtre finement broyé qui est presque 100 % de cellulose pure) et 1,6 % d'agar. Les isolats fongiques sont ensemencés par touches centrales, puis incubés à 30°C et examinés quotidiennement pendant 10 jours. La dégradation des celluloses est estimée par l'apparition de zone claire autour des colonies dans la gélose opaque, indiquant une action simultanée de toutes les enzymes cellulolytiques. Un milieu CBM additionné seulement de 1,6% d'agar est utilisé comme témoin négatif. Les boîtes inoculées sont maintenues dans les mêmes conditions des milieux d'essai.

7.1.1.2. Action de cellulases sur cellulose soluble

La carboxyméthyl-cellulose (CMC) ; une cellulose soluble ; est un substrat pour endoglucanases (Archer & Wood, 1995 ; Pointing, 1999), le milieu CBM est supplémenté par 2 % de CMC de basse viscosité et 1,6 % d'agar. Après ensemencement et incubation de 3 jours à 30° C ; les boîtes de Pétri sont inondées par une solution aqueuse de rouge Congo à 2 % p/v pendant 15 minutes. Le colorant est versé, les surfaces des géloses sont rincées avec de l'eau distillée, puis remplies par une solution de NaCl à 1M pendant 15 minutes qui permet d'éliminer le rouge Congo fixé de façon non spécifique sur le milieu gélosé. L'activité d'endoglucanases se traduit par l'apparition d'une zone claire dans la gélose rouge (Pointing, 1999).

7.1.2. Production de cellulases en milieu liquide de production de triterpénoïdes

La présence de cellulases extracellulaires dans les filtrats récupérés à la fin du procédé de culture submergée de production de triterpénoïdes a été testée par une technique de routine qui consiste à préparer une gélose à 0,5 % de CMC et 1,7 % d'agar.

Après stérilisation le milieu est réparti en boîte de Pétri, une fois solidifié trois puits de 5 mm de diamètre sont réalisés aseptiquement dans chaque boîte ; 0,1 ml de chaque filtrat de bouillon de culture est placé dans les puits, puis les boîtes sont incubées à 30° C pendant 24h. Ensuite elles sont rincées à l'eau distillée puis de la même façon que précédemment elles sont remplies par une solution du rouge Congo à 0,2 % p/v pendant 15 minutes.

L'excès du colorant est éliminé, les géloses sont à nouveau rincées à l'eau distillée, puis remplies par une solution de NaCl à 1M pendant 15 minutes. L'activité d'endoglucanases se traduit par l'apparition d'auréole claire autour des puits (Burianovà *et al.*, 1991 ; Hassan *et al.*, 2011).

7.2. Production de laccases

La méthode choisie repose sur la capacité des laccases à dégrader des composés phénoliques. Pour dépister l'activité de laccase, les isolats ont été ensemencés sur le milieu Czapek-Dox (**Annexe.1**) additionné de 0,2 g/l de bleu de bromophénol. Les boîtes sont incubées à 30° C pendant 3-7 jours.

La lecture se fait directement sans nécessiter l'utilisation de réactifs de révélation, l'action de laccases se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies dans le milieu de culture bleu-pourpre (Tekere *et al.*, 2001).

7.3. Production de xylanases

Le test de dégradation de xylane a été réalisé sur le milieu Czapek-Dox dont la composition est modifiée en remplaçant le saccharose par 10 g de xylane qui est donc la seule source de carbone dans le milieu. Après ensemencement et incubation de 3 à 4 jours à 30° C.

La visualisation de la dégradation est réalisée par une solution aqueuse du rouge Congo à 0,2 % p/v pendant 15 minutes, le colorant est versé, les surfaces des géloses sont rincées avec de l'eau distillée, puis remplies par une solution de NaCl à 1M pendant 15 minutes, ou simplement par l'application de solution de Lugol. Des zones claires d'hydrolyse apparaissent autour des colonies fongiques (Robledo *et al.*, 2016).

7.4. Production de pectinases

Afin de mettre en évidence la production de pectinases ; le saccharose dans la composition du milieu Czapek-Dox a été également substitué par 10 g de pectine de *Citrus* pour qu'elle soit la seule source de carbone dans le milieu. Après ensemencement des boîtes par touches centrales, elles sont incubées à 30° C jusqu'à avoir des colonies de 3 à 4 cm de diamètre (de 3 à 6 jours).

La révélation a été faite par inondation de boîte par une solution iodée (5 g de KI et 1 g de I₂ dans 330 ml d'eau distillée). La pectinolyse se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Okafor *et al.*, 2010 ; Adeleke *et al.*, 2012).

7.5. Détection de l'activité protéolytique

Le pouvoir protéolytique des champignons est généralement détecté sur des milieux dépourvus d'azote assimilable et contenant des protéines pour induire la production de protéases. Un milieu composé seulement de lait écrémé et d'agar à 1 % est préparé pour révéler cette activité.

Le milieu est réparti sur des boîtes de Pétri puisensemencé par la collection des isolats fongiques et incubé à 30°C pendant 10 jours (Cruz da Silva *et al.*, 2011).

La formation d'une auréole claire autour la croissance mycélienne indique l'hydrolyse des caséines du lait ; les diamètres de la zone d'hydrolyse sont mesurés et enregistrés quotidiennement (Paterson & Bridge, 1994, Cruz da Silva *et al.*, 2011).

7.6. Détection de l'activité amylolytique

La production d'amylase est révélée sur une gélose d'amidon composé de (g/l) ;

- extrait de levure 1,5 ;
- peptone 0,5 ;
- NaCl 1,5 ;
- amidon 10 ;
- agar 15,

Le pH du milieu est ajusté 5,6 avant stérilisation (Khan & Yadav, 2011).

Dans ce travail, deux types d'amidons sont testés ; l'amidon soluble (Sigma®) et la féculé de maïs commerciale. Les boîtes de Pétri sontensemencées et incubées à 30° C pendant 3 jours. Après incubation, une solution de Lugol diluée est vaporisée sur la surface des géloses afin de mettre en évidence l'hydrolyse de l'amidon.

Les zones d'hydrolyse apparaissent claires et incolores ou de couleur brune cependant les zones contenant l'amidon non dégradé se colorent en bleu-noir. (Paterson & Bridge, 1994 ; Khan & Yadav, 2011).



III Résultats et discussion

Caractérisation et identification des polypores

Les carpophores des polypores récoltés de la région d'El-Kala (PNEK) sont examinés pour leur caractérisation phénotypique. La classification systématique des champignons basée sur des caractères morphologiques et microscopiques nous a permis de classer nos spécimens récoltés au genre *Ganoderma* et au genre *Fomes* en s'aidant des données de littérature sur les critères macroscopiques et microscopiques.

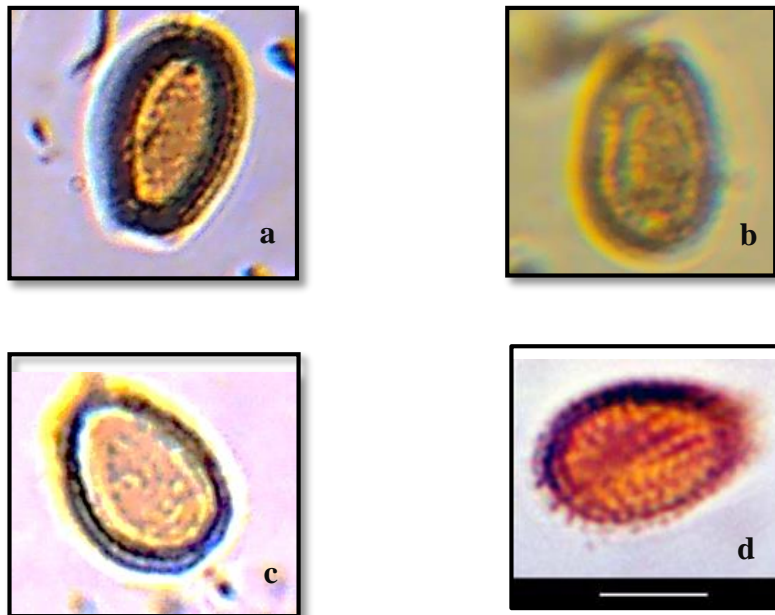
1.1. Description de spécimens de *Ganoderma*

- Chapeaux ; de tailles variables, ils atteignent jusqu'à 30 x 15 cm, et jusqu'à 8 cm d'épaisseur, aplani, subéreux à ligneux et légers. La face supérieure est zonée et sillonnée concentriquement orange brun à cuivré rougeâtre luisant, puis brun rougeâtre à noirâtre terne, avec une croûte de la surface résineuse à marge jaune à crème. Quelques carpophores sont pseudostipités dont le pied est court et élargi vers l'apex (**Figs.III.1**).
- L'hyménium est poroïde blanchâtre à crème, d'environ 3 à 4 pores par millimètre.
- Sporée de couleur brun-rosâtre.
- Les observations microscopiques des suspensions sporales ont montré des spores avec des ornements internes donnant un aspect de double paroi typique des membres de *Ganodermataceae*, elles sont ellipsoïdales, tronquées au bout distal, de couleur brune et translucide au centre (**Figs.III.2**).

Selon les clés de détermination des polypores de Courtecuisse et Duhem (2000), Ryvarden (2000) et de Bhosle *et al.* (2010) ; ces carpophores s'apparentent à l'espèce *G. resinaceum*.



Figures.III.1. Basidiocarpe de *G. resinaceum*. (a) carpophore pseudostipité ;
(b) les pores du sporophore

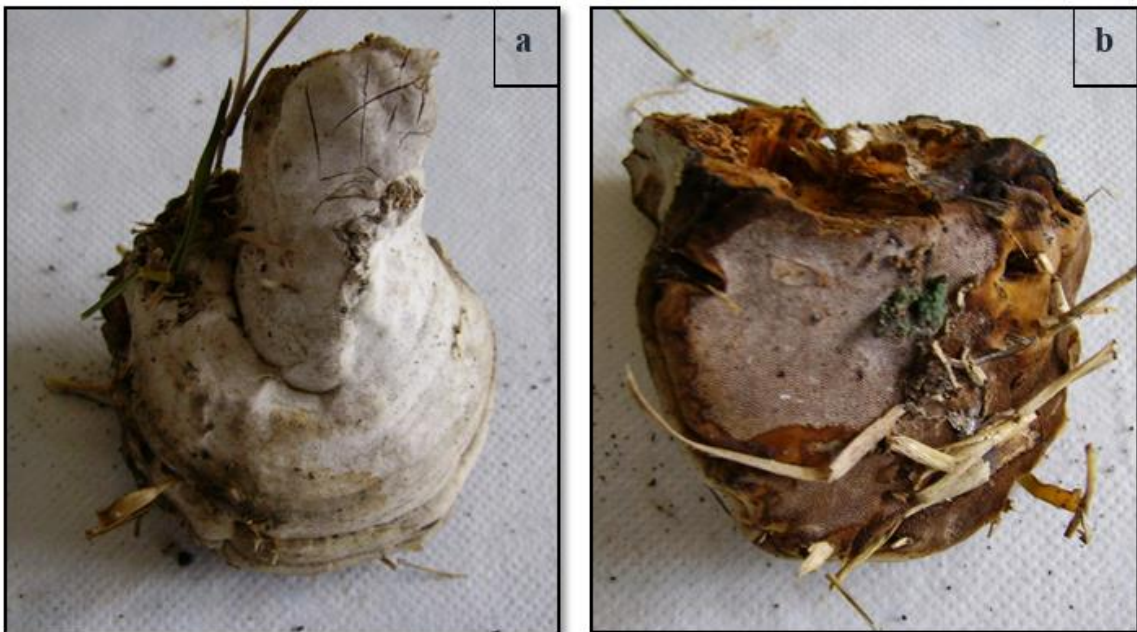


Figures.III.2. Aspect microscopique des spores de *G. resinaceum* des isolats récoltés
(a, b et c) comparativement à celles décrites par Bhsole *et al.* (2010) (d)

1.2. Description des spécimens de *Fomes*

- Chapeaux ; de 15-25 cm et de 15 cm de largeur en sabot de cheval, onglé, dure et coriace. Sa face supérieure est zonée concentriquement de couleur brun grisâtre et la zone marginale de couleur brun pâle (**Figs.III.3.**)
- La face poroïde est concave, brun pâle avec des pores ronds d'environ 4-5 par millimètre.
- Sporée ; de couleur blanchâtre à jaune pâle
- Spores ; (sous microscope) sont cylindriques, lisses, hyalines et de couleur jaune brune.

Selon les données de littérature sur les critères macroscopiques et microscopiques (Schwarze, 1994 ; Mukhin & Votintseva, 2002 ; Schmidt, 2006), ces spécimens s'apparentent à l'espèce *Fomes fomentarius*.



Figures.III.3. Basidiocarpe de *F. fomentarius*. (a) carpophore, (b) la face inférieure ; sporophore

1.3. Mise en culture des sporées de *Ganoderma* et *Fomes*

Après mise en culture des suspensions sporales des polypores, une collection de 45 isolats est obtenue dont 2 sont de *F. fomentarius* et 43 sont des *G. resinaceum* en utilisant le milieu MEA, le milieu PDA et le milieu PDA supplémenté du rose Bengale.

Les isolats ont donné une meilleure croissance sur le milieu PDA par rapport au milieu MEA, ceci pourrait s'expliquer par sa composition très riche en amidon.

Le rose Bengale a un rôle important pour réduire la propagation des hyphes mycéliennes et facilitant alors la purification et le repiquage des colonies caractéristique de basidiomycètes, alors que son effet est limité sur les contaminants d'origine bactérienne contrairement aux données de littérature (Ottow & Glathe, 1968 ; Ottow, 1972). Il est à noter que certains isolats fongiques ont la capacité à dégrader le rose Bengale. Ce pouvoir est attribué au système d'enzymes lignocellulolytiques des polypores de pourritures blanches (Gogna *et al.*, 1992).

Cependant l'élimination des germes bactériens est plus efficace sur le milieu RBCA grâce à l'effet bactériostatique à large spectre du chloramphénicol. Après vérification de la pureté des cultures fongiques, elles sont conservées pour leur utilisation ultérieure.

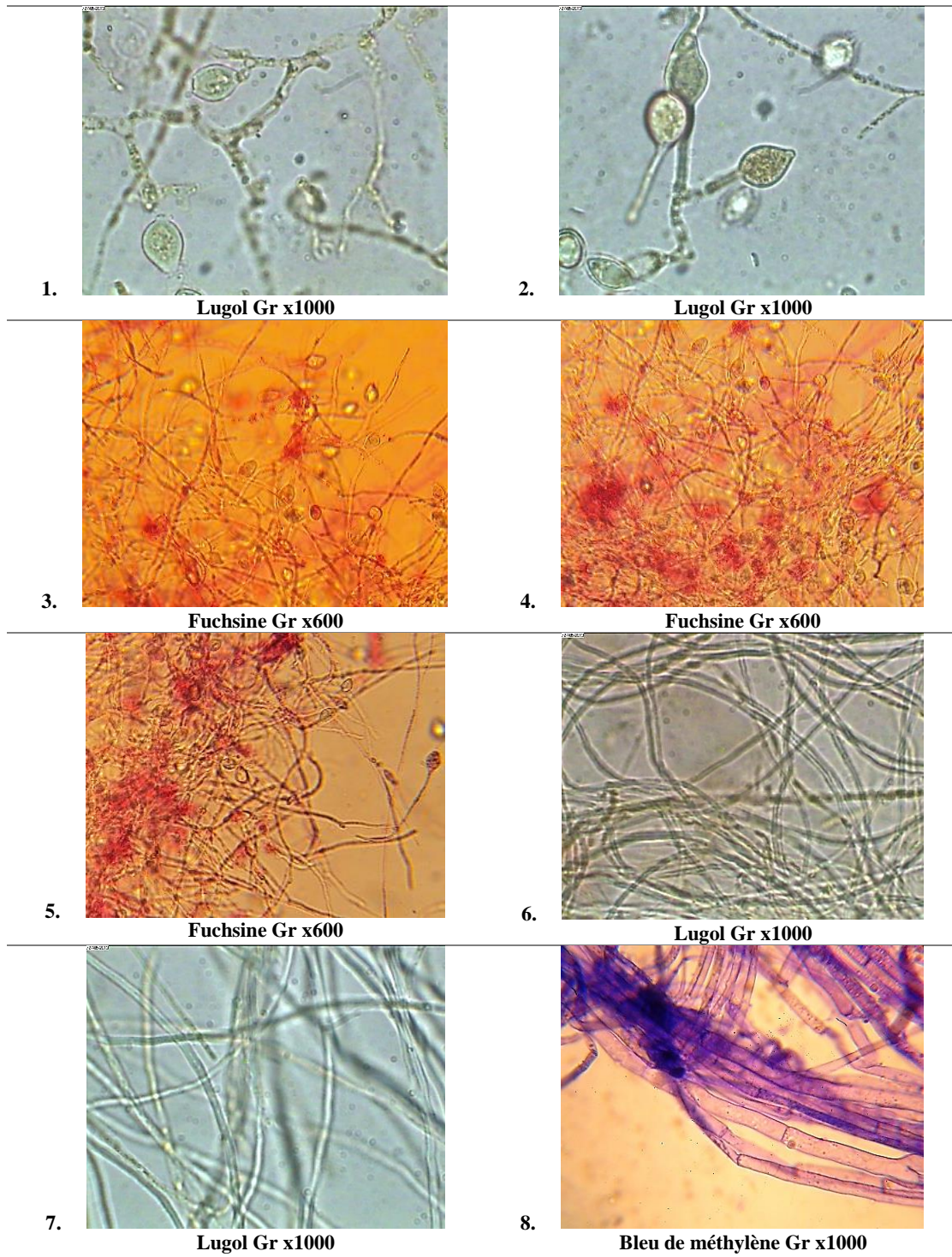
1.4. Aspects cultureux des isolats fongiques

Nous avons constaté qu'il y a peu de différence dans l'aspect macroscopique des colonies des 43 isolats de *G. resinaceum* et des 2 isolats *F. fomentarius*. Afin de compléter la description macroscopique, des observations microscopiques ont été réalisées (**Figs.III.4.**).

Le tableau **III.1** résume quelques aspects morpho-cultureux et microscopiques de différents isolats.

Tableau.III.1 : caractères des isolats de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*

Isolats	Caractères macroscopiques et cultureux	et	Caractères microscopiques	Caractères particuliers
Gr01	Croissance rapide. Mycélium blanc cotonneux		Hyphes translucides cloisonnées, non ramifiées Présence de clamps de connexion	/
Gr09	Croissance relativement lente. Mycélium blanc velu		Hyphes translucides cloisonnées, relativement fines. Présence de clamps de connexion	Dégrade le rose Bengale
Gr10	Croissance rapide. Aspect blanc cotonneux dense Pigmentation jaunâtre au revers		Hyphes septées et peu ramifiées, Présence de clamps de connexion Présence de chlamydospores	Présence d'exsudat (culture de 10 jours)
Gr24	Croissance rapide. Aspect blanc cotonneux légèrement humide		Mycélium septés et ramifiés Présence de clamps de connexion Présence de chlamydospores	/
Gr39	Croissance rapide. Aspect blanc cotonneux Croissance radiale zonée		Mycéliums fins séptés à extrémités arrondies Présence de clamps de connexion Présence de chlamydospores	/
Gr41	Croissance rapide. Mycélium blanc cotonneux Croissance radiale zonée		Hyphes +/- épaisses, cloisonnées et ramifiées Présence de clamps de connexion Présence de chlamydospores abondantes (culture de 7 jours)	/
Ff01	Croissance plus ou moins rapide. Croissance radiale parfois irrégulière Mycélium blanc velu à cotonneux		Hyphes translucides cloisonnées, Paroi hyaline épaisse Présence de clamps de connexion	Dégrade le rose Bengale
Ff02	Croissance rapide. Mycélium blanc duveteux et sec		Hyphes translucides non septées Présence de clamps de connexion	/



Figures.III.4. Aspects microscopiques des isolats fongiques étudiés avec différents colorants ; *G. resinaceum* (1 à 5) (a) septa, (b) ramification, (c) clamps de connexion, (d) chlamydospores.; *F. fomentarius* (6 à 8)

Discussion

Les études sur la diversité taxinomique de la mycoflore d'Afrique du Nord sont peu nombreuses, cette zone n'est renseignée que par des catalogues et quelques travaux descriptifs relativement anciens réalisés par Patouillard (1897), Maire (1914) ; et qui doivent être repensés à la lumière des approches modernes d'identification notamment les techniques de biologie moléculaire (Chekireb *et al.*, 2013).

La détermination phénotypique du *F. fomentarius* est relativement facile (Schwarze, 1994 ; Schmidt, 2006), cependant le genre *Ganoderma* ; comprenant plus de 290 espèces dont certaines peuvent être confondues les unes aux autres ; présente un des genres les plus challengers en terme d'identification (Moncalvo *et al.*, 1995a ; Ayissi & Mossebo, 2014).

Les basidiospores ovoïdes à double paroi avec des ornements interpariétaux est la caractéristique clé d'identification du genre *Ganoderma* (Webster & Weber, 2007 ; Seo & Kirk, 2000).

La morphologie des carpophores de *Ganoderma* récoltés de la forêt de Brabtia dans le PNEK semble se rapprocher de celle de *G. resinaceum* décrite par différents auteurs (Courtecuisse & Duhem, 2000 ; Bhsale *et al.*, 2010 ; Ayissi & Mossebo, 2014).

Les observations microscopiques des mycélia de *G. resinaceum* nous montrent des hyphes septées avec des clamps de connexion assez caractéristiques de mycélium secondaire des basidiomycètes (état dicaryon), les chlamydospores sont abondantes, elles sont iodo-négatives et certains auteurs trouvent les chlamydospores de *G. resinaceum* parfois dextrinoïdes (Hong & Jung, 2004 ; Balaeş & Tănase, 2012).

2

Culture en milieu liquide des isolats de *F. fomentarius* et *G. resinaceum*

2.1. La biomasse

Dans la première étape de culture, les différents isolats fongiques ont donné une bonne croissance sur le milieu de pré-culture choisi dans cette étude à l'exception des deux isolats de *F. fomentarius* qui ont montré une croissance faible sur ce milieu et sous les conditions choisies.

Du fait, le PDB était utilisé comme milieu de pré-culture pour la FF01 et la FF02 afin d'obtenir une quantité suffisante d'inoculum pour initier l'essai de production de métabolites, ceci a donné de meilleurs résultats.

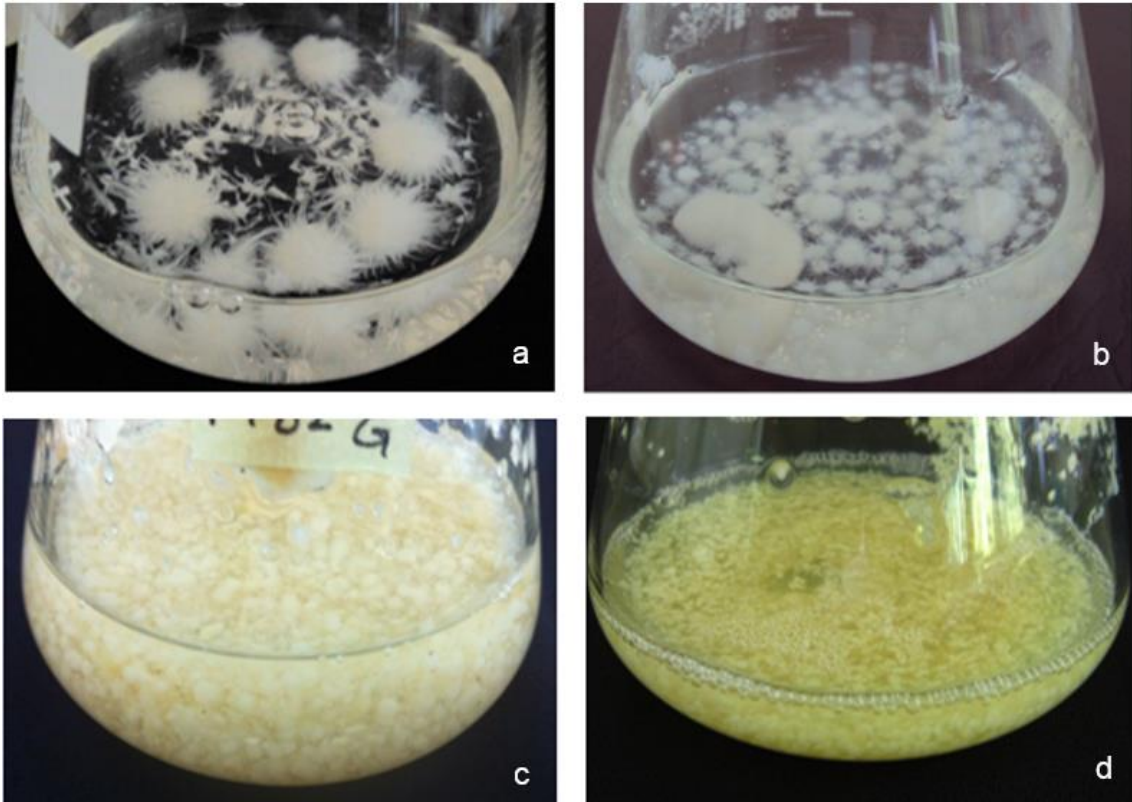
Sur le milieu complexe de production de métabolites développé par Xu *et al.* (2008), les 45 isolats ont montré une croissance abondante, nous avons remarqué qu'en fin de culture l'aspect initial trouble du milieu complexe de production change et devient plus clair ou complètement transparent.

Bien que l'aspect de biomasse est assez différent entre isolats ; nous avons obtenu des agglomérats d'hyphes mycéliennes « *pellets* » blanches, enchevêtrées et entrelacées visibles macroscopiquement, de taille et de forme variable sphérique ou ellipsoïdale ; et de structure compacte et lisse à surface velue ou bien lâche et poilue (**Figs.III.5**). La biomasse récupérée a été séchée et pesée.

2.2. Evolution de pH durant la croissance

Les valeurs finales de pH obtenues montrent que la majorité des isolats fongiques ont un pouvoir acidifiant mais variable d'un isolat à l'autre (**Tab.III.2**).

Les isolats ; Gr31, Gr32 et Gr33 sont les moins acidifiants par rapport au reste des isolats de *G. resinaceum* cependant la Gr19 a alcalinisé légèrement le milieu de culture dont le pH initial est de 5,5, de même que les deux isolats de *F. fomentarius* Ff01 et Ff02.



Figures.III.5. : Différents aspects cultureux des isolats fongiques étudiés en culture submergée (différentes tailles de *pellets*)

- (a) Grands agglomérats lâches et poilus ;
- (b) Agglomérats de taille moyenne plus ou moins lâches ;
- (c) Agglomérats plus denses ;
- (d) Agglomérats compacts de taille fine.

Dans le tableau **III.2** les quantités de biomasses (poids secs) sont organisées par ordre décroissant de l'isolat qui a produit le plus de biomasse à celui qui a produit la faible quantité ; accompagnées des valeurs de pH finales.

Tableau.III.2. Les quantités de biomasses et les valeurs de pH obtenues en culture submergée par ordre décroissant en fonction de la biomasse.

Isolats	Biomasses (g)	pH finaux
Gr40	3,7	3,71
Gr15	3,26	3,67
Gr41	3,1	3,6
Gr42	3,04	3,79
Gr09	3,02	3,67
Gr14	3	3,68
Gr39	2,99	3,9
Gr29	2,88	4,18
Gr43	2,82	4,1
Gr34	2,77	<u>4,28</u>
Gr22	2,63	3,55
Gr23	2,6	3,61
Gr38	2,58	3,7
Gr28	2,57	3,67
Gr26	2,41	3,71
Gr36	2,35	3,64
Gr32	2,34	<u>4,65</u>
Gr01	2,31	3,61
Gr11	2,31	3,7
Gr37	2,31	3,88
Gr24	2,29	3,7
Gr05	2,25	3,7
Gr08	2,24	3,63
Gr02	2,2	3,37
Gr12	2,2	3,4
Gr33	2,16	<u>4,83</u>
Gr20	2,11	3,76
Gr16	2,09	3,35
Gr04	2,03	3,95
Gr10	2,02	3,71
Gr25	2	4
Gr35	2	4,21
Gr31	1,93	3,63
Gr30	1,92	4,26
Gr03	1,9	3,47
Gr21	1,85	3,71
Gr13	1,84	3,93
Gr19	1,82	5,58
Gr07	1,67	3,88
Gr27	1,66	3,27
Gr18	1,6	3,4
Gr17	1,49	3,72
Gr06	1,38	4,16
Ff01	3,44	5,99
Ff02	3,01	5,69

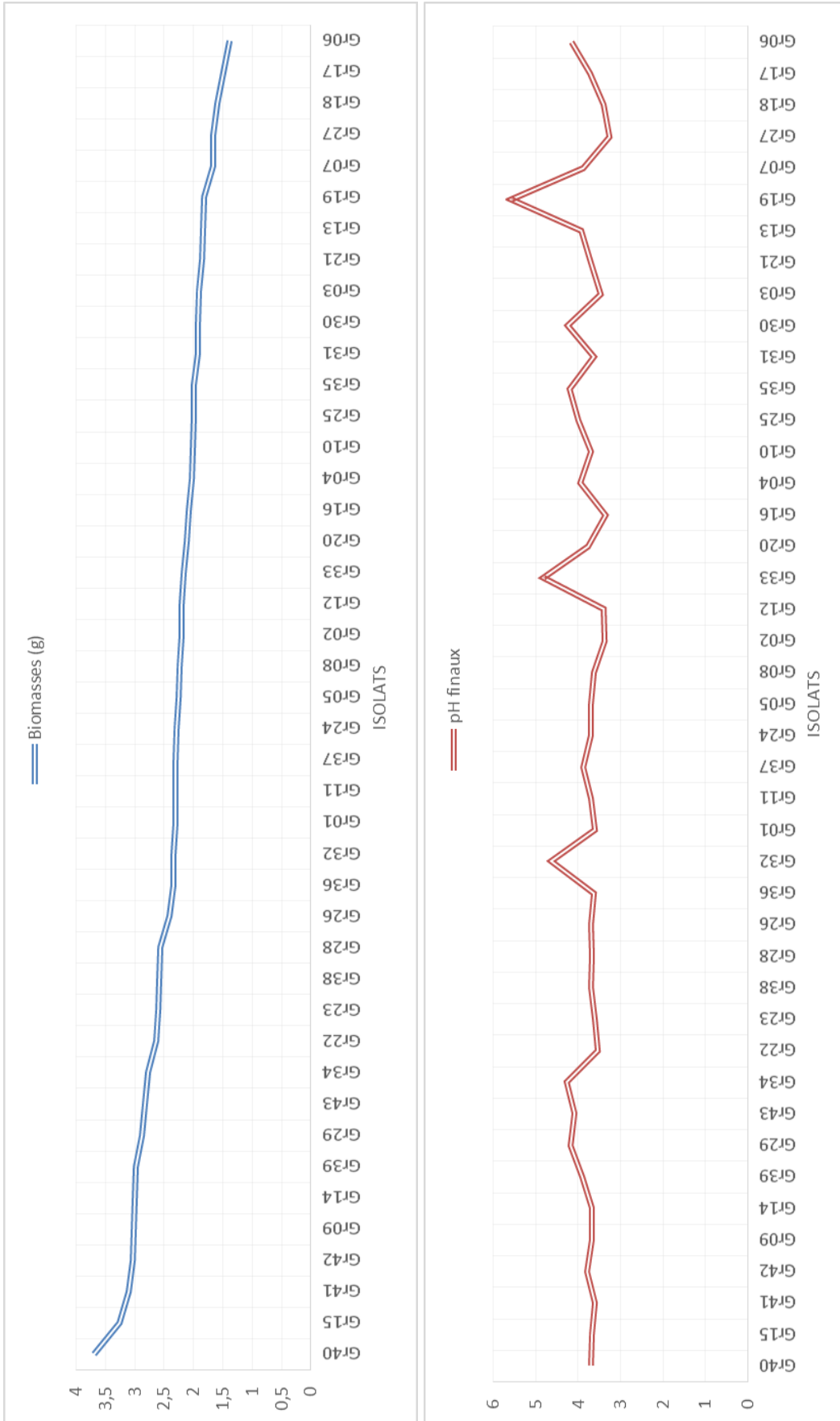


Figure.III.6. Courbes présentant la production de biomasse et le pH pour les isolats de *G. resinaceum*

Aucune corrélation n'est observée entre l'évolution du pH et la production de biomasse.

2.3. Le rendement en biomasse Y_x

Dans le milieu de production de triterpénoïdes utilisé dans cette étude, nous avons deux sources de carbone ; le glucose (16 g/l) et la farine de maïs (20,93 g/l), et deux sources d'azote ; la peptone (2,93 g/l) et la farine de soja (6,44 g/l). Considérons que les quantités de glucose et de peptone ne sont suffisantes que pour initier la croissance dans le milieu de production ; les rendements en biomasse Y_x sont calculés par rapport aux quantités et de farine de maïs et de farine de soja.

$$Y_{x/C} = \frac{\Delta x}{\Delta C} = \frac{\Delta x}{20,93}$$

$$Y_{x/N} = \frac{\Delta x}{\Delta N} = \frac{\Delta x}{6,44}$$

Les concentrations de biomasse produites varient significativement d'un isolat fongique à l'autre, elles sont comprises entre 37 g/l et 13,8 g/l. Les coefficients de rendement en biomasse par rapport à la source de carbone varient de 1,76 à 0,65, dont 29 isolats ont des coefficients supérieurs à 1. Alors que les coefficients de rendement biomasse par rapport à la source d'azote varient de 5,74 à 2,14 où 34 isolats ont des coefficients supérieurs à 2.

Les concentrations de biomasse (g/l) et les coefficients de rendement en biomasse par rapport aux sources de carbone et d'azote sont détaillés dans le tableau **III.3**.

Tableau.III.3. Les rendements en biomasse par rapport aux sources de carbone et d'azote

Isolats	Concentration en Biomasses (g/l)	$Y_{x/C}$	$Y_{x/N}$
Gr40	37	1,76	5,74
Gr15	32,6	1,55	5,06
Gr41	31	1,48	4,81
Gr42	30,4	1,45	4,72
Gr09	30,2	1,44	4,68
Gr14	30	1,43	4,65
Gr39	29,9	1,42	4,64
Gr29	28,8	1,37	4,47
Gr43	28,2	1,34	4,37
Gr34	27,7	1,32	4,30
Gr22	26,3	1,25	4,08
Gr23	26	1,24	4,03
Gr38	25,8	1,23	4,00
Gr28	25,7	1,22	3,99
Gr26	24,1	1,15	3,74
Gr36	23,5	1,12	3,64
Gr32	23,4	1,11	3,63
Gr01	23,1	1,10	3,58
Gr11	23,1	1,10	3,58
Gr37	23,1	1,10	3,58
Gr24	22,9	1,09	3,55
Gr05	22,5	1,07	3,49
Gr08	22,4	1,07	3,47
Gr02	22	1,05	3,41
Gr12	22	1,05	3,41
Gr33	21,6	1,03	3,35
Gr20	21,1	1,00	3,27
Gr16	20,9	0,99	3,24
Gr04	20,3	0,96	3,15
Gr10	20,2	0,96	3,13
Gr25	20	0,95	3,10
Gr35	20	0,95	3,10
Gr31	19,3	0,92	2,99
Gr30	19,2	0,91	2,98
Gr03	19	0,90	2,95
Gr21	18,5	0,88	2,87
Gr13	18,4	0,87	2,85
Gr19	18,2	0,86	2,82
Gr07	16,7	0,79	2,59
Gr27	16,6	0,79	2,57
Gr18	16	0,76	2,48
Gr17	14,9	0,71	2,31
Gr06	13,8	0,65	2,14
Ff01	34,4	1,64	5,34
Ff02	30,1	1,43	4,67

Discussion

Le processus de culture submergée utilisé dans ce travail a pris ; 3 jours pour préparer l'inoculum sur gélose, 7 jours pour la pré-culture et 4 jours pour la production de triterpénoïdes *stricto sensu* qui est un temps relativement court, et d'ailleurs c'est l'avantage de la culture submergée par rapport aux procédés de fermentation en milieu solide dont l'obtention de triterpénoïdes prend minimum 3 à 5 mois (Zhong & Xiao, 2009 ; Wagner *et al.*, 2003).

Les isolats de *G. resinaceum* ont montré une bonne croissance dans les deux étapes de ce processus de fermentation, au contraire des 2 isolats de *F. fomentarius* dont la croissance dans la première étape (pré-culture) est faible à absente.

Le processus de culture submergée suivi dans cette étude est adapté à l'espèce *G. lucidum*, une espèce proche à *G. resinaceum* (Xu *et al.*, 2008). Le polypore *F. fomentarius* n'est pas adapté à se développer dans ce milieu qui ne répond pas à ses exigences nutritionnelles.

Par ailleurs, le FF01 et le FF02 ont montré une bonne croissance dans le milieu complexe PDB ainsi que dans le milieu complexe de production dans la deuxième étape de culture en ayant produit des quantités importantes de biomasses (voir **Tab.III.3**).

Aucune étude dans la littérature, à nos connaissances, n'est réalisée sur la production de triterpénoïdes et des stérols en fermentation liquide par *F. fomentarius*. Cependant ; Chen *et al.* (2008) et Chen *et al.* (2011) ont mis le *F. fomentarius* en culture liquide dans le but de produire des exopolysaccharides.

L'aptitude de ces deux espèces à croître sur le milieu complexe et à dégrader les farines qui conduit à la clarification du milieu donne une idée sur leur bagage enzymatique important.

Les mesures de pH montrent que la plupart des isolats sont acidifiants à l'exception de 3 isolats (Gr19, Ff01 et Ff02) où l'on a observé une augmentation de pH. L'augmentation du pH pourrait être attribuée à la dégradation des protéines et la libération du NH₃ dans le milieu.

L'effet de pH en culture submergée dans des erlenmeyers sur la production de métabolites est toujours difficile à comprendre car il ne peut pas être contrôlé (Wagner *et al.*, 2003).

La majorité des isolats ont donné des agglomérats « *pellets* » de taille moyenne ; seulement peu d'entre eux ont donné des *pellets* de grande taille. En effet, la taille de *pellets* dépend de plusieurs facteurs ; elle est influencée principalement par l'agitation et la viscosité du milieu (Wagner *et al.*, 2003 ; Zhong & Tang, 2004). Fang et Zhong (2002a) montrent que la taille de *pellets* est aussi affectée par la concentration initiale de glucose dans le milieu de culture, plus la concentration est élevée plus les *pellets* sont petits et *vice versa*, alors ils supposent que leur taille est affectée par la pression osmotique (Fang & Zhong, 2002a).

Toutefois, le rendement en acides ganodériques est plus élevé dans les *pellets* à grande dimension ; la limitation en nutriments et en oxygène dans le centre des agglomérats conduit probablement à l'accumulation de métabolites secondaires mais le contenu en intrapolsaccharides se trouve plus bas (Fang & Zhong, 2002b ; Wagner *et al.*, 2003). La relation entre la morphologie de la biomasse et la production de métabolites reste encore mal comprise (Wagner *et al.*, 2004)

La limitation en oxygène est alors corrélée avec l'hyperproduction de triterpénoïdes, certains auteurs ont amélioré des procédés de fermentation de deux étapes l'une est agité (pré-culture), l'autre est statique (la production) (Tang & Zhong, 2003 ; Zhong & Tang, 2004).

Nos résultats montrent une production de biomasse élevée qui peut atteindre 37 g/l pour l'isolat de *G. resinaceum* Gr40 avec des rapports biomasse/substrat ($Y_{x/C}$ et $Y_{x/N}$) importants ; cela indique que le milieu complexe ; contenant les farines de maïs et de soja comme source de carbone et d'azote respectivement ; est favorable pour la croissance et le développement de ces polypores.

3

Détecter et caractériser les métabolites secondaires produits

3.1. Extraits chloroformiques

Les extraits secs obtenus après l'extraction par le chloroforme sont pesés et conservés à -18° C. Les quantités d'extraits sont comprises entre 3 et 5 mg, leurs aspects, odeurs et consistances varient considérablement d'un extrait à un autre.

Dans le tableau.III.4 la description des extraits est détaillée.

Tableau.III.4. Aspects des extraits chloroformiques.

Isolat	Texture/Couleur	Isolat	Texture/Couleur
Gr01	Jaune-orange	Gr24	Brun/ collant
Gr02	Jaune clair	Gr25	Brun/ pâteux
Gr03	Jaune foncé	Gr26	Brun/ pâteux
Gr04	Jaune clair / collant	Gr27	Jaune/ collant
Gr05	Jaune-orange/ collant	Gr28	Orange/ collant
Gr06	Jaune/ pâteux	Gr29	Jaune-orange/ collant
Gr07	Jaune clair	Gr30	Brun/ collant
Gr08	Jaune/ collant	Gr31	Orange/ collant
Gr09	Jaune foncé/ collant	Gr32	Jaune foncé/ collant
Gr10	Jaune clair	Gr33	Brun/ collant
Gr11	Jaune foncé/ pâteux	Gr34	Brun/ collant
Gr12	Brun / pâteux	Gr35	Orange/ collant
Gr13	Jaune-orange/ collant	Gr36	Orange/ pâteux
Gr14	Jaune foncé/ pâteux	Gr37	Brun/ collant
Gr15	Jaune-orange/ collant	Gr38	Orange/ collant
Gr16	Jaune-clair/ collant	Gr39	Brun/ pâteux
Gr17	Jaune clair	Gr40	Brun/ collant
Gr18	Jaune clair	Gr41	Orange/ collant
Gr19	Jaune foncé	Gr42	Jaune foncé/ collant
Gr20	Brun foncé/ très collant	Gr43	Jaune-orange/ collant
Gr21	Jaune/ pâteux	Ff01	Brun/ collant
Gr22	Jaune foncé/ pâteux	Ff02	Brun/ collant
Gr23	brun/ pâteux		

3.2. Chromatographie sur couche mince

Les extraits secs obtenus sont dissouts dans le méthanol et soumis à une séparation par CCM. Après développement des plaques, elles sont séchées puis visualisées sous lumière UV à 254 et 360 nm avant l'ajout du révélateur.

L'observation à une longueur d'onde de 254 nm montre des tâches « *spots* » brunes sombres sur un fond vert fluorescent. Quelques composés prennent une fluorescence bleu pâle à 365 nm (**Figs.III.7**).

Après la révélation des tâches, les profils de séparation chromatographiques sur plaques sont comparés entre isolats et les rapports frontaux sont calculés pour chaque composé comme suit ;

$$Rf = \frac{h \text{ (la hauteur de la tâche depuis la ligne de dépôt d'extrait)}}{H \text{ (hauteur entre la ligne de dépôt et le front du solvant)}}$$

Le nombre de composés séparés est déterminé pour chacun des extraits afin de comparer les deux phases mobiles utilisées et aussi pour pouvoir cribler et sélectionner les isolats hyper-producteurs de métabolites secondaires.

Selon leur profil chromatographique en CCM, nous remarquons que les échantillons sont composés d'un nombre important de molécules.

Les résultats obtenus montrent aussi que les profils de séparations par CCM sont différents en comparant l'éluant Q1 et l'éluant Q2 pour les mêmes extraits.

Au cours des essais, la phase mobile Q2 constituée d'hexane/acétate d'éthyle/éther diéthylique (1 : 1 : 1) a été additionnée d'acide acétique à raison de 1 ml par 100 ml de Q2, ce qui a amélioré la séparation.

Le nombre de *spots* obtenus pour chaque extrait avec les deux éluants Q1 et Q2 est présenté sur les tableaux **III.5** et **III.6** respectivement.

Tableau.III.5. Nombre de composés obtenus avec la phase mobile Q1.

Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>
Gr01	1	Gr10	8	Gr19	12	Gr28	6	Gr37	6
Gr02	6	Gr11	8	Gr20	10	Gr29	3	Gr38	4
Gr03	10	Gr12	5	Gr21	5	Gr30	10	Gr39	10
Gr04	7	Gr13	8	Gr22	6	Gr31	1	Gr40	6
Gr05	5	Gr14	9	Gr23	5	Gr32	5	Gr41	7
Gr06	4	Gr15	11	Gr24	5	Gr33	5	Gr42	11
Gr07	8	Gr16	6	Gr25	6	Gr34	9	Gr43	7
Gr08	7	Gr17	5	Gr26	7	Gr35	12	Ff01	4
Gr09	5	Gr18	7	Gr27	14	Gr36	4	Ff02	8

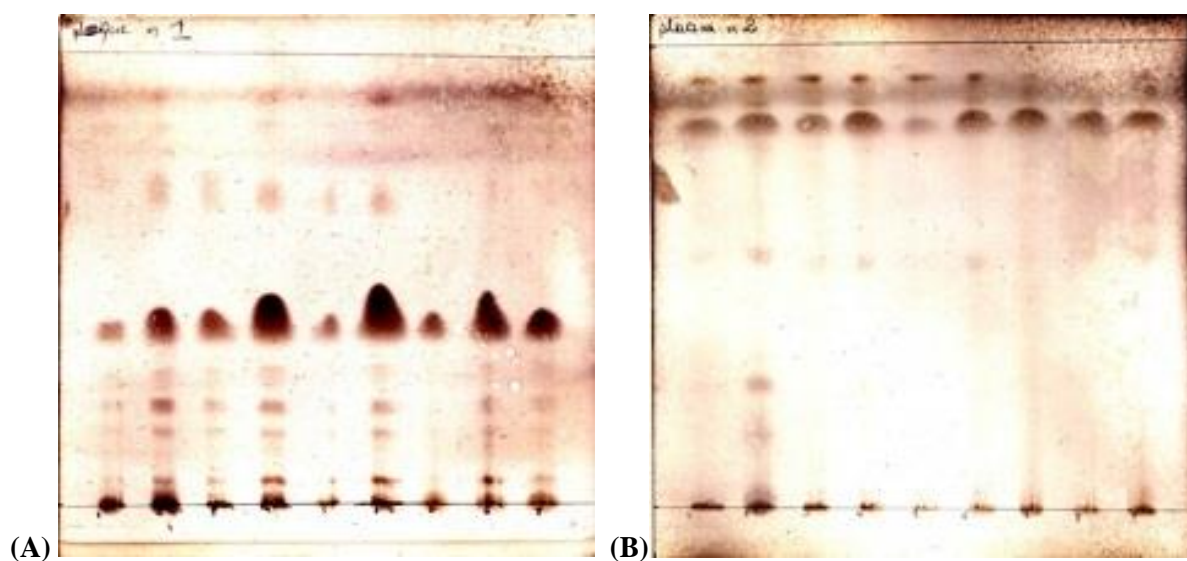
Tableau.III.6. Nombre de composés obtenus avec la phase mobile Q2.

Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>	Extrait	<i>spot</i>
Gr01	3	Gr10	10	Gr19	12	Gr28	5	Gr37	9
Gr02	4	Gr11	7	Gr20	12	Gr29	7	Gr38	9
Gr03	9	Gr12	7	Gr21	5	Gr30	11	Gr39	12
Gr04	7	Gr13	9	Gr22	6	Gr31	3	Gr40	6
Gr05	11	Gr14	10	Gr23	6	Gr32	6	Gr41	11
Gr06	4	Gr15	14	Gr24	2	Gr33	5	Gr42	21
Gr07	8	Gr16	6	Gr25	6	Gr34	10	Gr43	3
Gr08	6	Gr17	6	Gr26	5	Gr35	10	Ff01	3
Gr09	7	Gr18	6	Gr27	18	Gr36	8	Ff02	8

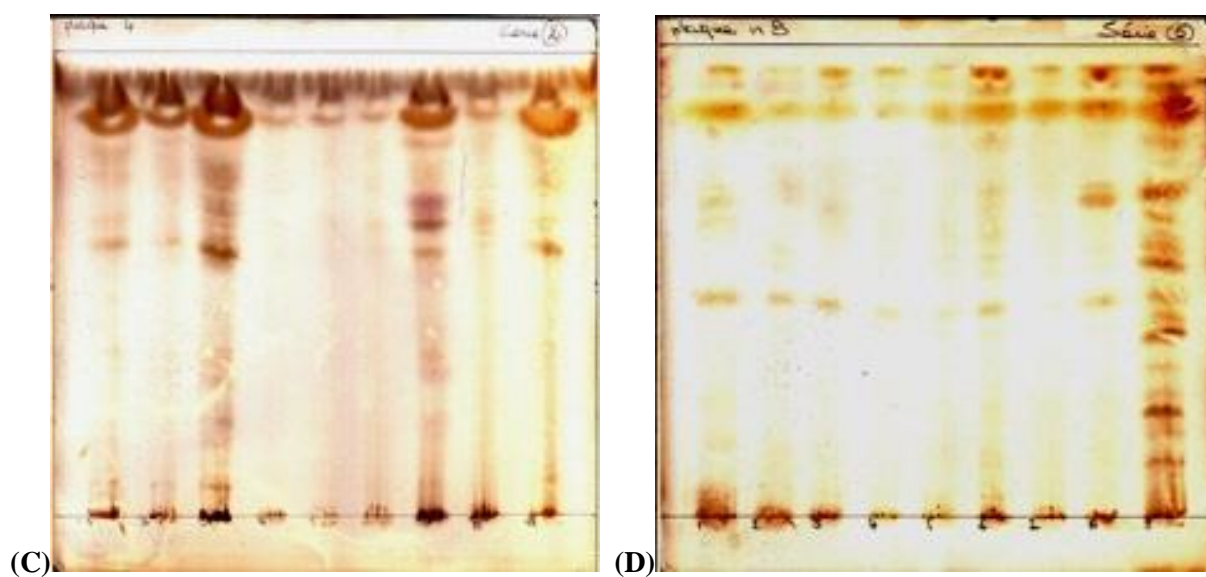
Selon le nombre de taches obtenues et la séparation des composés (distance parcourue par les composés) ; il ressort que la phase Q2 donne de meilleures séparations.

Les profils chromatographiques des extraits fongiques obtenus avec la phase Q2 sont alors comparés ; plusieurs composés semblent être communs comme montrent les figures **III.7**.

Les différents composés et leurs valeurs Rf sont détaillés dans le tableau 4 à l'annexe 1.

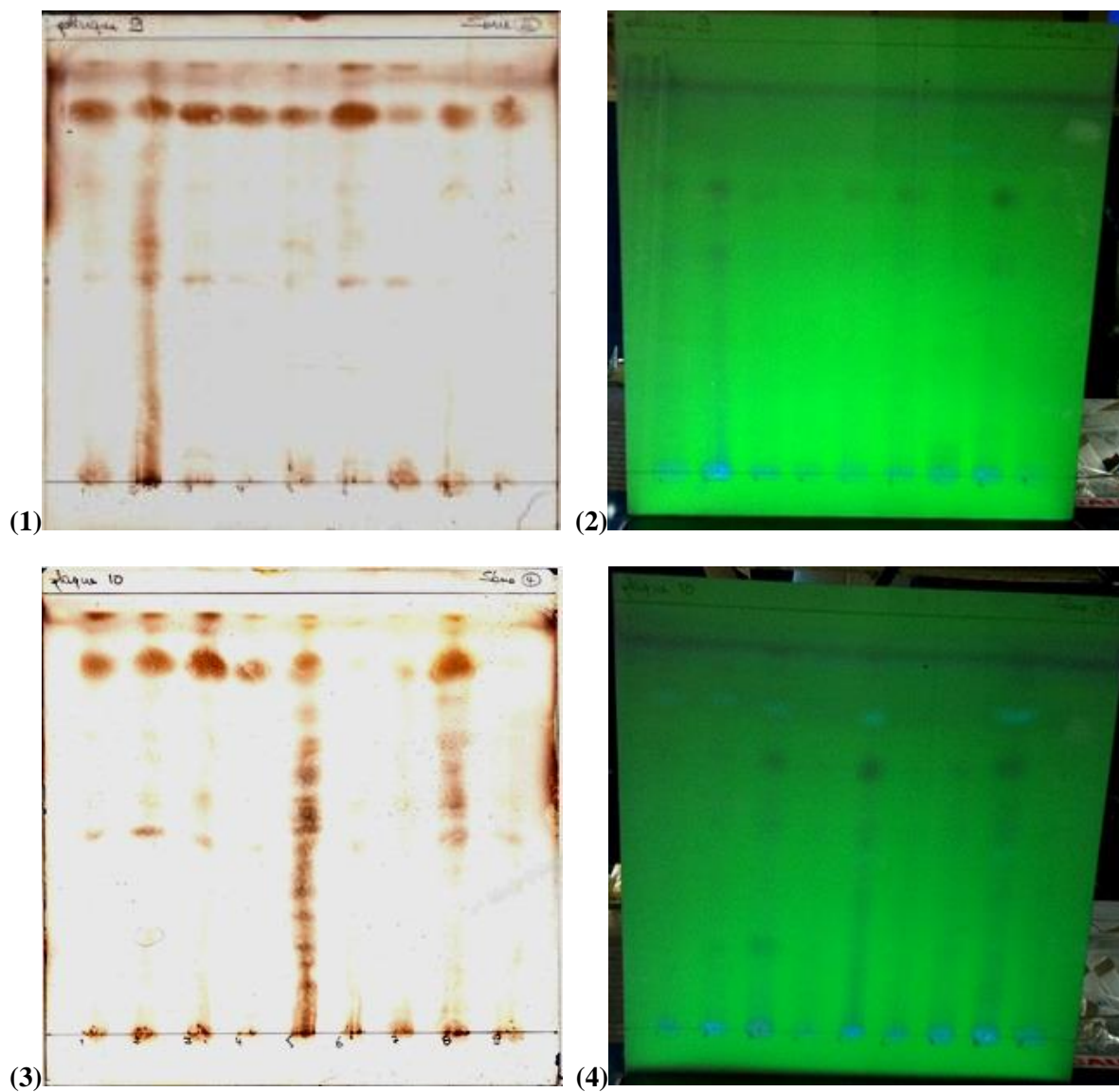


(A-B) Séparation par CCM des extraits chloroformiques par les phases Q1 (A) et Q2 (B) (les mêmes extraits).



(C et D) CCM après révélation acide sulfurique à 10% dans l'éthanol (phase Q2).

Figures.III.7. La séparation des extraits avec chromatographie sur couche en gel de silice.



(1 et 2) (3 et 4) ; visualisation des plaques de CCM sous UV à 256 nm et après révélation avec acide sulfurique à 10% dans l'éthanol.

Figures.III.7. La séparation des extraits avec chromatographie sur couche en gel de silice (*suite*).

Après calcul des Rf et analyse de données nous avons remarqué que les composés 40(Rf= 0,665), 51(Rf= 0,853), 52(Rf= 0,912) et 53(Rf= 0,947) sont les composés qu'on retrouve le plus dans les différents extraits (**Tableau.4** en **Annexe.1**).

Pour poursuivre l'identification des métabolites de types triterpenoïdes et stéroïdes, nous avons choisi les échantillons contenant le nombre de composés le plus élevé. Cette analyse préliminaire nous a permis de cribler les isolats hyper-producteurs dont leurs extraits seraient sujets d'analyse par LC/MS.

Trois isolats de *G. resinaceum* sont choisis ; Gr15, Gr27 et Gr42 et un de *F. fomentarius* qui est le Ff02.

Discussion

La séparation par CCM des extraits chloroformiques reste l'étude préliminaire indispensable pour la mise en évidence de la production de métabolites secondaires.

En effet, les triterpénoïdes plus spécifiquement les acides ganodériques ont des groupements carbonyles α , β -insaturés qui ont une absorbance UV maximale comprise entre 230 et 260 nm (Tang & Zhong, 2003) ce qui permet leur mise en évidence.

Les triterpénoïdes et les stérols apparaissent sous forme de taches sombres à l'observation des plaques à 254 et à 362 nm, car ils désactivent la fluorescence du fluorochrome contenu dans le gel de silice ce phénomène est dit « *quenching effect* » (Sherma & Fried, 2003 ; Oleszek *et al.*, 2008).

Les taches à fluorescence bleue pâle ; fluorescentes à 362 nm peuvent correspondre à des composés terpéniques, composés phénoliques ou autres composés organiques produits par ces champignons (Ziegenbein *et al.*, 2006 ; Karaman *et al.*, 2009).

L'ajout de 1 ml d'acide acétique au mélange de solvant a amélioré la séparation des composés en augmentant la polarité de la phase mobile Q2 qui entraîne les acides triterpéniques et les stérols, ce qui a amélioré la séparation des composés.

L'absence d'étalons limite l'identification précise des composés séparés par CCM ; cependant il reste toujours utile de comparer entre les échantillons et avoir une idée sur les métabolites produits par les différents isolats.

D'après ces premiers résultats de comparaison des profils chromatographiques nous avons constaté que les *G. resinaceum* et les *F. fomentarius* produisent une large gamme de métabolites secondaires, et beaucoup de composés sont communs entre les différents isolats de *G. resinaceum* et même *F. fomentarius* dont les valeurs Rfs sont identiques, compte tenu des variations génétiques entre les champignons mais leurs métabolomes semblent avoir quelques similarités.

Le dépistage ainsi fait par CCM révèle que les isolats fongiques qui ont produit beaucoup de biomasse ne sont pas ceux qui ont produit le plus de métabolites secondaires. Par exemple ; l'isolat Gr40 qui a produit une quantité de biomasse de 37 g/l, son extrait

chloroformique ne contient que 6 composés détectables dans nos conditions analytiques. En outre, l'isolat Gr27 montre un profil chromatographique important de 14 composés avec la phase mobile Q1 et de 18 composés avec la phase mobile Q2 ; en ayant produit seulement 16,6 g/l de biomasse.

De même que, l'isolat de *F. fomentarius* FF02 a produit moins de biomasse par rapport à l'isolat FF01 mais qui est qualitativement plus intéressante ; elle comporte plus de métabolites secondaires.

Ce screening nous a permis donc de sélectionner 4 isolats ayant des profils chromatographiques intéressants. Les extraits chloroformiques des isolats Gr15, Gr27, Gr42 et Ff02 seraient étudiés par LC/Q-TOF-MS afin d'approfondir notre étude et explorer les métabolites secondaires.

3.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

3.3.1. La chromatographie liquide

Les chromatogrammes obtenus par détection UV-DAD à 256 nm montrent des composés très diversifiés, le nombre de pics obtenus pour les extraits des isolats de *G. resinaceum* ; Gr15, Gr27 et Gr42 est clairement plus important par rapport au nombre de pics sur le chromatogramme de Ff02 comme montre les figures **III.8**.

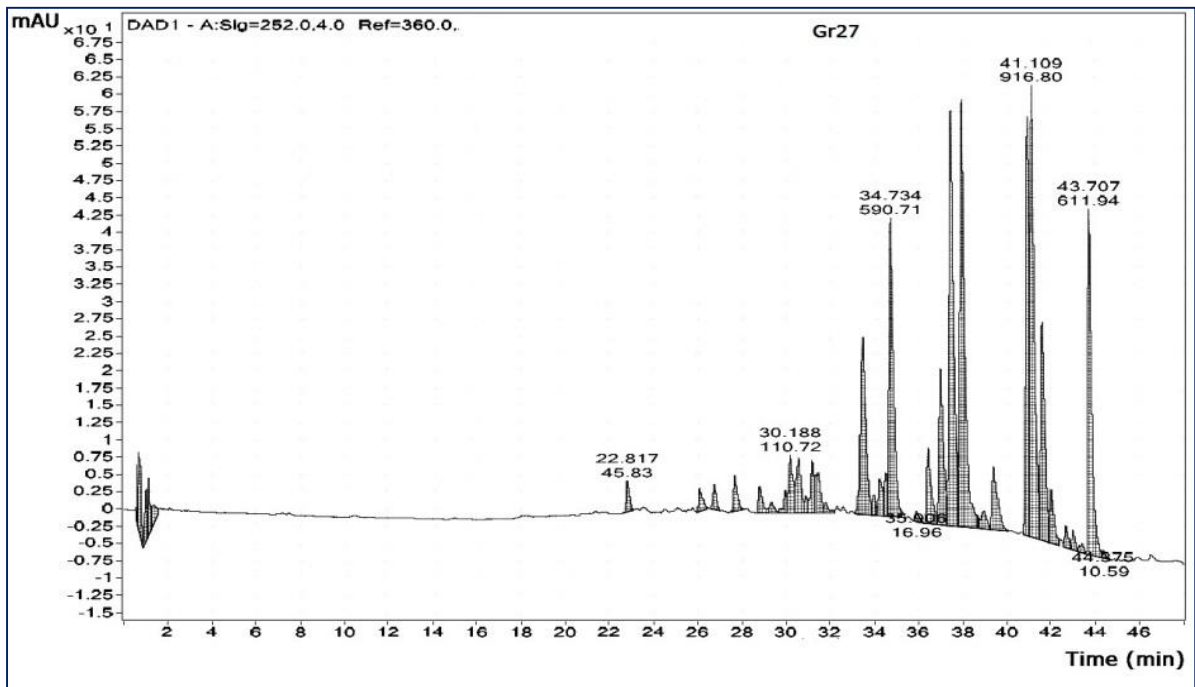
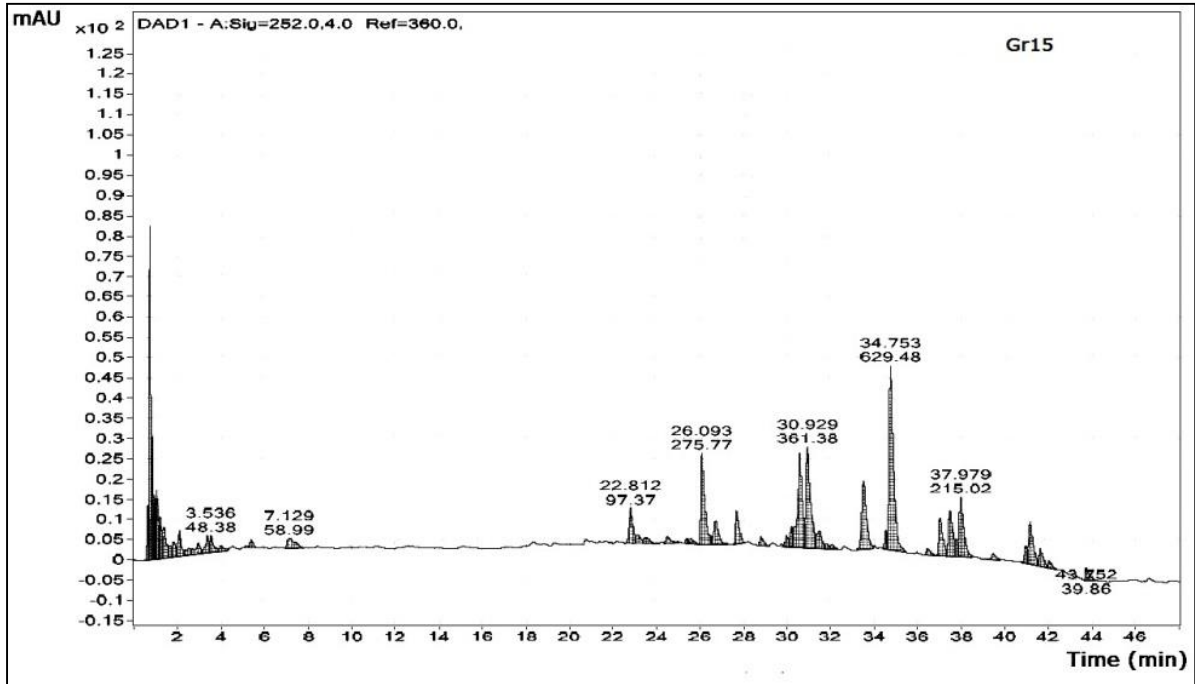
Pour les trois isolats de *G. resinaceum*, la séparation est bonne, nous constatons que dans les 2 premières minutes la sortie de plusieurs composés où les pics sont rapprochés ; après des pics bien séparés dont certains apparaissent dans les chromatogrammes des trois échantillons presque aux mêmes temps de rétention et qui correspondent éventuellement aux mêmes composés produits par les 3 isolats de *G. resinaceum* ;

A $R_t = 22,8$ min un pic est observé dans les deux chromatogrammes de Gr15 et de Gr27 ; un autre pic est observé à $R_t = 34,7$ des pics à un autre composé commun entre les isolats Gr15 et Gr27 et également à $R_t = 43,7$ quoique les intensités des pics sont assez différentes ;

A $R_t = 41,1$ un composé commun apparaît sur les chromatogrammes de Gr27 et Gr42.

Toutefois le chromatogramme obtenu de la séparation de l'extrait de *F. fomentarius* nous montre des pics trop chevauchés qui sortent de la colonne de séparation au bout des trois premières minutes, après aucun pic n'est observé jusqu'à la fin de l'élution.

Ces résultats ne nous informent pas sur la nature chimique des extraits analysés ; d'un côté les pics sont chevauchés de façon sévère, d'un autre côté l'absence des molécules de référence (témoins) rend les résultats difficiles à interpréter. Dans ce genre d'analyse de matrice complexe, la spectrométrie de masse est plus avantageuse et offre plus d'information.



Figures.III.8. LC/DAD-UV chromatogrammes à 252 nm des quatre extraits élués par l'eau avec 0.2% d'acide formique (A) d'acétonitrile (B).

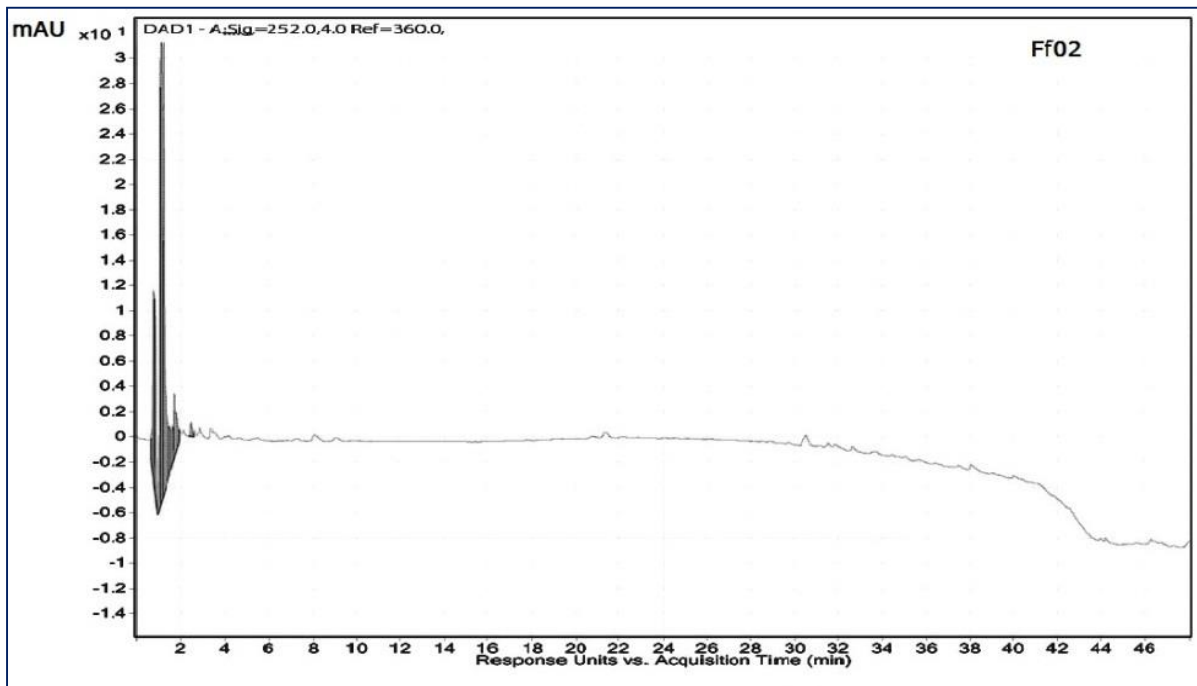
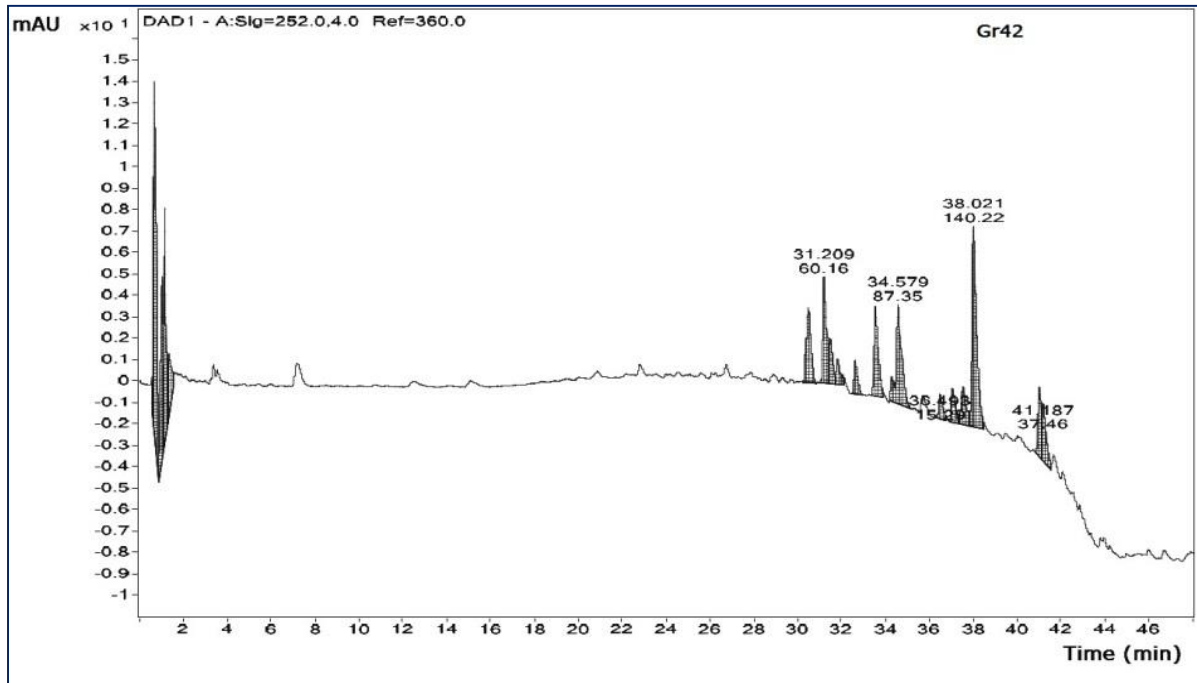


Figure.III.8. LC/DAD-UV chromatogrammes à 252 nm des quatre extraits élués par l'eau avec 0.2% d'acide formique (A) d'acétonitrile (B). (suite)

Discussion

Dans nos conditions opératoires et contrairement à nos prévisions, les chromatogrammes obtenus de LC/DAD-UV apportaient peu d'informations sur les molécules, les pics chromatographiques sont mal formés particulièrement pour le Gr42 et le Ff02.

Deux difficultés majeures entravent cette analyse ;

- Premièrement la composition de ces extraits de mélanges complexes de produits naturels ayant les structures chimiques très proches générant des pics chromatographiques extrêmement entrelacés dont chacun est constitué de plusieurs pics correspondant à des composés à temps de rétention (Rt) très proches, ces composés sont parfois présents à l'état de traces (Tang *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2011 ; Gao *et al.*, 2004) ; dans ce cas il faut opter à un programme d'élution plus long pour une meilleure séparation ;
- Deuxièmement le manque des standards pour les matrices complexes ce qui réduit l'efficacité de la l'analyse (Liu *et al.*, 2011 ; Gao *et al.*, 2004).

Chen *et al.* (2017) ont fait une étude comparative entre les triterpénoïdes totaux de carpophores de souches de *G. lucidum* et de *G. resinaceum* en utilisant le même protocole de HPLC adopté dans cette étude, celui de Liu *et al.* (2012b), il ressort de leur étude que le profil chromatographique de *G. resinaceum* est moins complexe de celui de *G. lucidum* ; ce qui indique que leur production de triterpènes est assez différente (Chen *et al.*, 2017).

Les métabolites produits par *F. fomentarius* détectés dans cette recherche sont clairement moins nombreux par rapport à ceux produits par *G. resinaceum* ; cela n'est pas forcément expliqué par l'inanité de ce champignon mais plutôt par le processus de fermentation adopté dans notre étude adapté beaucoup plus aux *Ganoderma*.

3.3.2. La Q-TOF-MS

A la sortie de la colonne de chromatographie, les molécules sont nébulisées puis ionisées, le faisceau d'ions traverse l'analyseur de masse ; les ions générés sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), le détecteur collecte les impacts ioniques et les convertit en signaux utilisables. Ces signaux détectés au cours du scan sont traités et interprétés par un logiciel d'intégration informatisé ; **MassHunter 5.00**.

Le taux de ressemblance « *the match score* » et la précision de masse (Δm ppm) sont calculés pour chaque formule chimique détectée dans les différents échantillons lors du scan. Cette étape est fastidieuse surtout avec des échantillons de matrice complexe contenant des composés à l'état de traces.

L'annotation putative des spectres Q-TOF-MS récupérés est basée sur la comparaison à +/- 10 ppm de leur masse précise avec les masses théoriques des molécules connues de triterpénoïdes et des stérols déjà isolés des *Ganoderma* et *F. fomentarius* répertoriées dans une bibliothèque spectrale créée *in situ* et dans les bases de données publiques telle que PubChem.

L'analyse des extraits par Q-TOF-MS a révélé la présence de plus de 50 composés de type triterpénoïdes et stérols pour les *G. resinaceum* ; et plus de 30 composés pour les *F. fomentarius*. La recherche de structures plausibles avec cette approche comparative entre la masse exacte mesurée et la masse théorique calculée nous a conduit aux résultats suivants :

Les *G. resinaceum*

Après l'alignement internes des pics selon leurs temps de rétention (Rts) et qui a pour but de regrouper les signaux identiques entre les trois échantillons de *G. resinaceum*, malgré de faibles décalages en temps de rétention ou en rapport m/z qui peuvent exister, de nombreux pics communs inter-échantillons sont détectés dans les trois extraits de *G. resinaceum* analysés. L'ensemble des pics générés et alignés selon le Rts sont détaillés dans le tableau **III.7**.

En sommes, 9 pics communs entre les trois *G. resinaceum* sont observés ;

Les pics d'ions détectés dans les trois extraits *G. resinaceum* à $R_t = 18,8$ min (Gr27 à $m/z = 515,2999$ $[M+H]^+$, Gr42 à $m/z = 515,2996$ $[M+H]^+$ et Gr15 à $m/z = 515,3007$ $[M+H]^+$)

qui correspondant au composé (7) qui nous oriente vers la formule brute $C_{30}H_{42}O_7$, qui est annoté comme acide ganodérique Am1.

A $R_t = 31,1$ min, le composé **33** a donné naissance aux ions quasi-moléculaires suivants $[M+H]^+$ à $m/z = 454,3447$ (G27), $m/z = 454,3454$ (G15) et $m/z = 454,3445$ (G42), la formule brute est établie à $C_{30}H_{46}O_3$ qui est annoté comme acide ganodérique Y. Le composé **42** détecté à $R_t = 35,6$ min dans les trois échantillons est un isomère du composé **33**, et qui est également caractérisé putativement comme acide ganodérique Y.

Le composé **39** est aussi produit par les trois extraits de *G. resinaceum* et qui est détecté à des R_t s légèrement différents (G15 et G42 à $R_t = 33,604$ min, G27 à $R_t = 34,055$ min), ce composé est annoté comme acide ganodérique T-Q ($C_{32}H_{46}O_5$). De surcroît, un autre élément commun (**48**) détecté à $R_t = 38,0$ min dont la formule moléculaire calculée est $C_{36}H_{52}O_8$, ce composé est conventionnellement identifié comme GA T.

Tableau.III.7. Alignement des spectres Q-TOF-MS des 3 échantillons analysés de *G. resinaceum* selon le temps de rétention (Rt).

Cp	Rt	Extrait	Meilleure Formule Possible	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)	Δm (ppm)	Molécule annotée
1	0,668	Gr27	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,3603	456,3590	2,80	Inconnu
	0,752	Gr42		456,3601	0,45		
2	0,764	Gr42	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3417	-4,77	Inconnu
	0,817	Gr15			446,3445	-10,87	
3	1,088	Gr15	C ₂₈ H ₄₄ O ₄	444,3240	444,3249	-1,93	Inconnu
4	1,164	Gr27	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530,288	530,286	-3,7	Acide ganodérique theta
	1,228	Gr42			530,2867	-2,54	
5	6,111	Gr15	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3371	5,28	Inconnu
6	7,653	Gr15	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530,288	530,2877	-0,65	Acide ganodérique theta
7	18,869	Gr27	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,2931	514,2923	1,55	Acide ganodérique AmI
	18,897	Gr42			514,2921	1,88	
	18,927	Gr15			514,2931	0,02	
8	18,882	Gr27	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	572,2985	572,2996	1,88	Acide ganodérique H
9	19,343	Gr15	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516,3087	516,309	0,55	Acide ganodérique A
10	20,584	Gr15	C ₃₂ H ₄₆ O ₉	574,3142	574,3139	-0,49	Acide ganodérique K
11	21,563	Gr27	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512,2774	512,275	-4,63	Acide ganodérique E
12	21,595	Gr27	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512,2774	512,2744	5,86	Inconnu
13	22,854	Gr42	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468,324	468,3238	-0,38	Acide ganodérique DM
	23,228	Gr27			468,3249	1,94	
14	23,467	Gr42	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3551	-0,54	Inconnu
	23,588	Gr15			398,3512	-6,37	
15	23,781	Gr42	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516,3087	516,3102	2,97	Acide ganodérique A
16	23,836	Gr27	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	518,3244	518,3234	-2	Acide ganodérique C2
17	24,522	Gr15	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484,3189	484,3199	2,01	Acide ganolucidique E
	24,522	Gr27			484,3204	3,15	
18	26,144	Gr15	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3338	13,08	Inconnu
	26,713	Gr42			446,3421	-5,52	
	26,889	Gr27			446,3459	-14,13	
19	26,156	Gr15	C ₃₁ H ₄₆ O ₃	466,3447	466,3386	12,98	Inconnu
	26,159	Gr42			466,3490	-9,14	
20	26,159	Gr42	C ₂₈ H ₄₄ O ₄	444,3240	444,3258	-4,02	Inconnu
	26,425	Gr27			444,3223	3,72	
21	26,725	Gr27	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468,324	468,3254	2,96	Acide ganodérique DM
	26,746	Gr15			468,3255	3,26	

Tableau.III.7. (suite)

Cp	Rt	Extrait	Meilleure Formule Possible	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)	Δm (ppm)	Molécule annotée
22	26,749	Gr27	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516,3087	516,3073	-2,64	Acide ganodérique A
23	26,766	Gr15	C ₃₁ H ₄₆ O ₃	466,3447	466,3484	-7,87	Inconnu
24	26,787	Gr42	C ₃₂ H ₄₆ O ₅	510,3345	510,3339	-1,22	Acide ganodérique T-Q
25	28,167	Gr42	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	572,2985	572,2977	-1,46	Acide ganodérique H
	28,2	Gr15		572,2972	-2,23		
27	28,588	Gr15	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3504	9,39	Inconnu
28	30,197	Gr42	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,2931	514,2915	3,10	Inconnu
29	30,276	Gr42	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,3603	456,3593	9,93	Inconnu
	30,305	Gr27		456,3605	2,23	Inconnu	
30	30,554	Gr27	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3796	-4,69	Inconnu
	30,59	Gr15		606,3802	-5,54		
31	30,655	Gr15	C ₃₂ H ₄₆ O ₅	510,3345	510,3356	2,1	Acide ganodérique T-Q
32	30,658	Gr15	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488,3502	488,3528	-5,40	Inconnu
	30,661	Gr42		488,3521	-3,82		
	30,667	Gr27		488,3550	-9,88		
33	31,112	Gr27	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454,3447	454,3447	-0,04	Acide ganodérique Y
	31,122	Gr15		454,3454	1,48		
	31,129	Gr42		454,3445	-0,35		
34	31,272	Gr42	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3690	12,94	Inconnu
35	31,321	Gr15	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454,3447	454,3449	0,49	Acide ganodérique Y
36	33,497	Gr15	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	452,329	452,3303	2,8	Acide ganodérique S
	34,359	Gr42		452,3294	0,86		
37	33,563	Gr27	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3774	-1,00	Inconnu
	33,647	Gr42		606,3701	11,13		
38	33,575	Gr27	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,3290	428,3283	1,60	Inconnu
	33,576	Gr15		428,3323	-7,71		
	33,591	Gr42		428,3318	-6,55		
39	33,604	Gr15	C ₃₂ H ₄₆ O ₅	510,3345	510,3359	2,71	Acide ganodérique T-Q
	33,604	Gr42		510,3356	2,2		
	34,055	Gr27		510,3366	4,04		
40	34,832	Gr15	C ₃₃ H ₄₆ O ₈	570,3193	570,3142	9,02	Inconnu
	35,695	Gr42		570,3203	-1,81		
41	34,875	Gr27	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3547	0,47	Inconnu
42	35,595	Gr27	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454,3447	454,3452	1,04	Acide ganodérique Y
	35,635	Gr15		454,3449	0,38		
	35,654	Gr42		454,3446	-0,31		

Tableau.III.7. (suite 2)

Cp	Rt	Extrait	Meilleure Formule Possible	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)	Δm (ppm)	Molécule annotée
43	35,939	Gr27	C ₃₆ H ₅₂ O ₈	612,3662	612,3657	-0,83	Acide ganodérique T
	36,028	Gr15			612,3662	0,01	
44	36,528	Gr15	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	452,329	452,3308	4,07	Acide ganodérique S
	36,558	Gr42			452,33	2,32	
45	37,076	Gr15	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	512,3502	512,351	1,54	Acide ganodérique X
	37,123	Gr42			512,3515	2,61	
46	37,476	Gr42	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512,2774	512,2799	4,84	Acide ganodérique E
47	38,009	Gr27	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470,3396	470,3432	-7,63	Acide 16 α -hydroxy-3-oxolanosta-8,24-dien-21-oïque
	38,044	Gr15			470,3428	-6,73	
	38,093	Gr42			470,3420	-5,15	
48	38,028	Gr27	C ₃₆ H ₅₂ O ₈	612,3662	612,367	1,37	Acide ganodérique T
	38,029	Gr42			612,3668	1,04	
	38,052	Gr15			612,3655	-1,21	
50	38,507	Gr27	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458,3760	458,3786	-5,57	Inconnu
	38,576	Gr15			458,3784	-5,22	
51	39,038	Gr27	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3725	7,17	Inconnu
52	41,113	Gr42	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,3290	428,3288	0,56	Inconnu
53	40,859	Gr27	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3384	2,01	Inconnu
54	40,963	Gr27	C ₃₄ H ₅₀ O ₆	554,3607	554,3622	2,68	Acide ganodérique R
55	41,979	Gr27	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3418	-6,56	Inconnu
56	42,561	Gr42	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458,3760	458,3777	-3,75	Inconnu

Cette approche analytique a permis également d'annoter davantage des composés ciblés produits par les isolats de *G. resinaceum* mais de façon individualisée.

Dans l'extrait de G15, le composé **6** a montré une masse précise de [M+H]⁺ ion à m/z 531,2978, et qui correspond à la formule moléculaire C₃₀H₄₂O₈, le composé **6** est assigné à l'acide ganodérique théta.

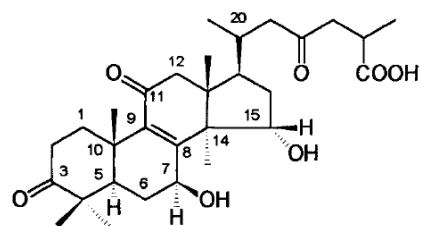
Un autre composé **10** a donné lieu à un pic d'ions à $[M+H]^+$ m/z 575,3208, la formule moléculaire a été définie comme $C_{32}H_{46}O_9$, ce composé **10** est putativement annoté comme acide ganodérique K.

Le spectre de masse du composé **9** présente un pic d'ion moléculaire à m/z 517,3165 $[M+H]^+$, et dont la formule moléculaire a été définie $C_{30}H_{44}O_7$. En outre, le composé **9** ($R_t=19,343$ min) est un isomère du composé **15** détectée dans l'échantillon Gr42 ($R_t=23,781$ min) et du composé **22** en Gr27 ($R_t=26,749$ min), ces trois composants ont été annotés comme étant l'acide ganodérique A.

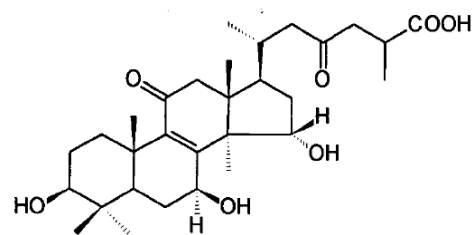
Les composés **8**, **11** et **16** détectés dans l'extrait de G27 ont été annotés de manière plausible respectivement comme étant l'acide ganodérique H, l'acide ganodérique E et l'acide ganodérique C2 (**8**) à $m/z=573,305$ $[M+H]^+$ calc. $C_{32}H_{44}O_9$, (**11**) à $m/z=513,2834$ $[M+H]^+$ calc. $C_{30}H_{40}O_7$, et (**16**) à $m/z=519,3309$ $[M+H]^+$ calc. $C_{30}H_{46}O_7$.

Les formules moléculaires de composés **24** et **46** sont déterminées comme suit ; $C_{32}H_{46}O_5$ (à $m/z=510,3339$ $[M+H]^+$) et $C_{30}H_{40}O_7$ (à $m/z=512,2799$ $[M+H]^+$) qui sont annotées l'acide ganodérique T-Q et l'acide ganodérique E respectivement.

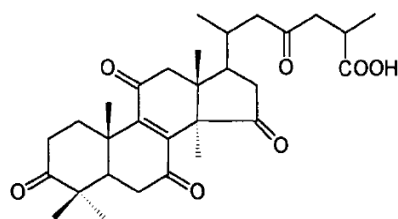
Le composé **53** apparu en G27 à $R_t=40,859$ min dont la formule brute est $C_{28}H_{44}O$ (calc ; 396,3392, $\Delta m=2,01$ ppm) est un isomère de l'ergostérol. Des composés à la même formule brute apparus dans l'échantillon Ff02 à **f10** à $R_t=32,038$, **f11** à $R_t=33,361$ et **f23** à $R_t=40,906$ (voir **Tab.III.8**).



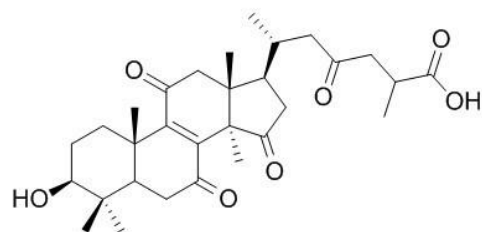
Acide ganodérique A



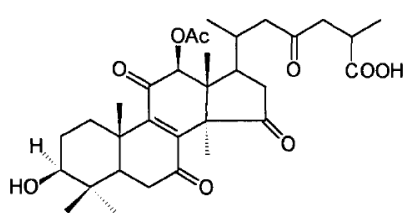
Acide ganodérique C2



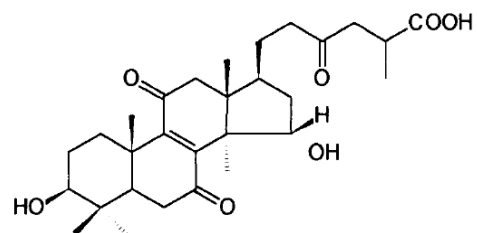
Acide ganodérique E



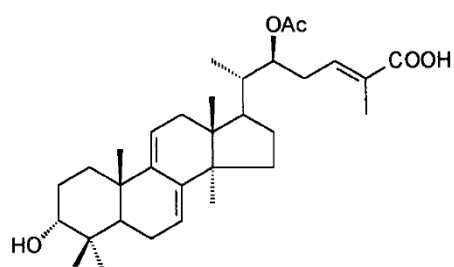
Acide ganodérique Am1



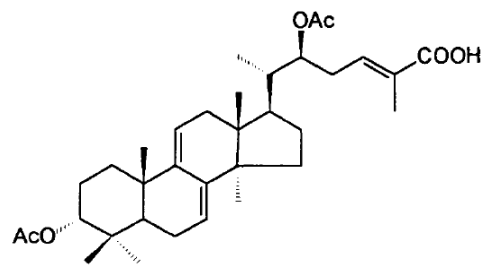
Acide ganodérique H



Acide ganodérique K

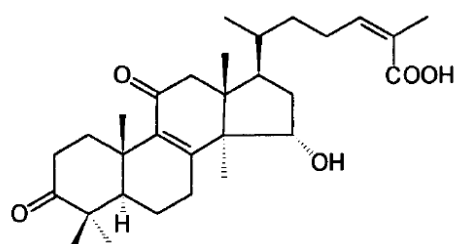


Acide ganodérique S

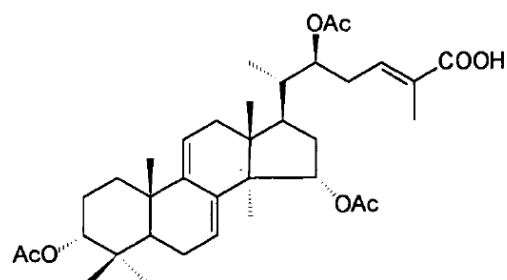


Acide ganodérique R

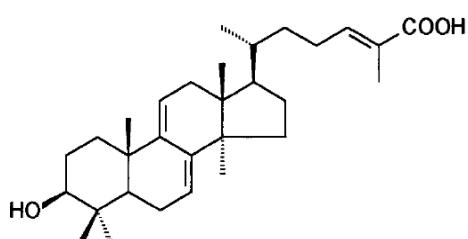
Figure.III.9. Les différents composés triterpéniques extraits de *G. resinaceum* annotés de façon putative.



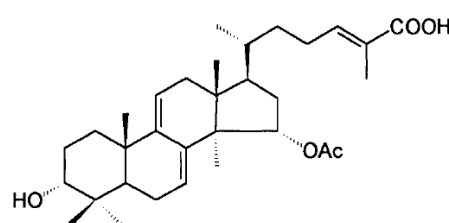
Acide ganolucidique E



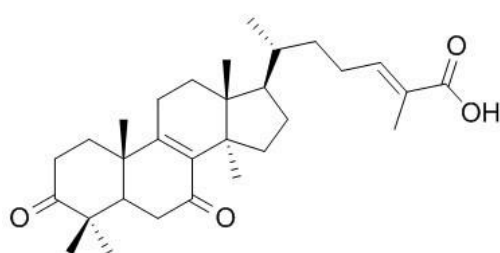
Acide ganodérique T



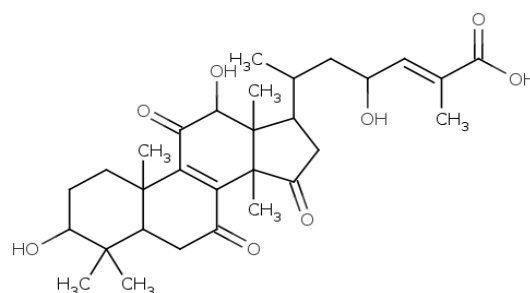
Acide ganodérique Y



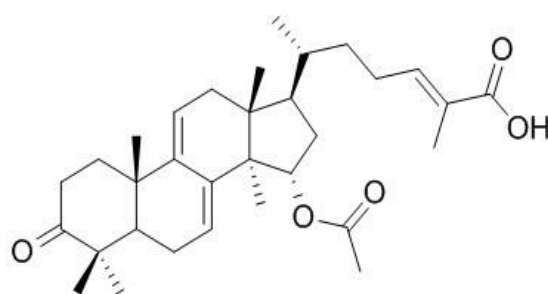
Acide ganodérique X



Acide ganodérique DM



Acide ganodérique théta



Acide ganodérique T-Q

Figure.III.9. Les différents composés triterpéniques extraits de *G. resinaceum* annotés de façon putative. (suite)

Le *F. fomentarius*

Les spectres Q-TOF-MS générés de l'analyse de l'extrait de Ff02 montrent aussi des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ à $m/z= 447,3513$, $[M+H+Na]^+$ à $m/z= 468,3124$, $[M+Na]^+$ à $m/z= 482,3821$ qui correspondent respectivement aux formules brutes $C_{28} H_{46} O_4$ (**f1**), $C_{28} H_{44} O_4$ (**f5**) et $C_{30} H_{50} O_3$ (**f26**). Ces stérols **f1**, **f5** et **f26** sont tentativement annotés comme étant le fomentarol B, le fomentarol A et le fomentarol C respectivement. Aussi un fragment d'ion majoritaire à $m/z= 326.1759$ caractérisé d'être le fomentarol D (**f17** $R_t= 38,112$, calc. $C_{34} H_{54} O_9$, $\Delta m= 6,19$ ppm).

Grace à cette approche, plusieurs molécules inconnues sont détectées ainsi que plusieurs métabolites ont été plausiblement annotés, mais cette identification est conventionnelle en absence d'étalons internes (**Tab.III.8**).

Tableau.III.8. Interprétation des spectres Q-TOF-MS obtenus de l'analyse de *F. fomentarius*

Cp	Rt	Formules des composés	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)	Δm (ppm)	Pics moléculaires et pseudo-moléculaires m/z	Molécules annotées
f1	1,088	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3410	-3,10	[M+H] ⁺ à m/z= 447,3513	Fomentarol B
f2	1,190	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488,3502	488,3507	-1,00	Fragment d'ion [A+2H] ⁺ à m/z= 245,1829	Inconnu
f3	1,247	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3442	-10,27	[M+H] ⁺ à m/z= 447,3514	Fomentarol B
f4	1,428	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,3290	428,3311	-4,94	Fragment d'ion [A+2H] ⁺ à m/z= 215,1724	Inconnu
f5	1,631	C ₂₈ H ₄₄ O ₄	444,3240	444,3225	3,37	[M+H+Na] ⁺ à m/z= 468,3124	Fomentarol A
f6	26,879	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	662,6002	662,6016	-2,04	Fragment d'ion [A+2Na+H] ⁺ à m/z= 354,2894	Inconnu
f7	28,056	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,2931	514,2927	0,80	[M+H] ⁺ à m/z= 515,2997	Inconnu
f8	28,599	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3506	10,75	[M+Na] ⁺ à m/z= 421,3406	Inconnu
f9	30,239	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,3603	456,3558	9,93	[M+Na+H] ⁺ à m/z= 480,3482	Inconnu
f10	32,038	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3371	5,33	Fragment d'ion [A+2H] ⁺ à m/z= 199,1787	Inconnu
f11	33,361	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3417	-6,18	[M+H] ⁺ à m/z= 397,3479	Inconnu
f12	34,515	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,3603	456,3662	-12,85	[M+H] ⁺ à m/z= 457,3742	Inconnu
f13	34,526	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3598	-12,24	[M+Na] ⁺ à m/z= 421,3490	Inconnu
f14	34,820	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	662,6002	662,6065	-9,56	Fragment d'ion [A+2H] ⁺ à m/z= 332,3157	Inconnu
f15	37,671	C ₂₈ H ₄₆ O	466,3447	398,3516	8,18	[M+Na] ⁺ à m/z= 421,3447	Inconnu
f16	37,671	C ₃₁ H ₄₆ O ₃	398,3549	466,3397	10,81	[M+H] ⁺ à m/z= 467,3461	Inconnu
f17	38,112	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3730	6,19	Fragment d'ion à m/z= 326,1759	Fomentarol D
f18	38,666	C ₃₃ H ₄₆ O ₈	570,3193	570,3227	-5,95	[M+Na] ⁺ à m/z= 593,3195	Inconnu
f19	39,368	C ₄₆ H ₇₆ O ₂	660,5845	660,5920	-11,30	[M+Na] ⁺ à m/z= 683,5885	Inconnu
f20	40,137	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,3290	428,3264	5,98	[M+Na] ⁺ à m/z= 451,3160	Inconnu
f21	40,770	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	662,6002	662,5949	7,98	Fragment d'ion [A+2H] ⁺ à m/z= 332,3119	Inconnu
f22	40,804	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428,3290	428,3264	6,15	[M+Na] ⁺ à m/z= 451,3202	Inconnu
f23	40,906	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392	396,3352	10,01	[M+2H] ⁺ à m/z= 399,3581	Inconnu
f24	41,675	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458,3760	458,3707	11,59	[M+Na] ⁺ à m/z= 482,3745	Fomentarol C
f25	41,924	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	662,6002	662,6041	-5,84	[M+Na+H] ⁺ à m/z= 686,5895	Inconnu

Tableau.III.8. (suite)

Cp	Rt	Formules des composés	Masse calculée (Da)	Masse mesurée (Da)	Δm (ppm)	Pics moléculaires et pseudo-moléculaires m/z	Molécules annotées
f26	42,060	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458,3760	458,3784	-5,14	[M+Na] ⁺ à m/z= 482,3821	Fomentarol C
f27	42,207	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3379	3,78	[M+Na+H] ⁺ à m/z= 470,3243	Fomentarol B
f28	42,218	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	662,6002	662,5978	3,68	Fragment d'ion [A+2Na] ⁺ à m/z= 354.2887	Inconnu
f29	42,252	C ₃₄ H ₅₄ O ₉	606,3768	606,3697	11,65	Fragment d'ion à m/z= 305,1959	Fomentarol D
f30	42,320	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549	398,3534	3,80	[M+2H] ⁺ à m/z= 400,3785	Inconnu
f31	42,637	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	446,3396	446,3359	8,33	[M+2Na] ⁺ à m/z= 246,1560	Fomentarol B
f32	42,648	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,2931	514,2890	8,06	[M+2H] ⁺ à m/z= 516,2948	Inconnu

Discussion

L'analyse des résultats de spectrométrie de masse nous conduit à déduire que la production de métabolites diffère significativement d'un isolat à l'autre ; qui est expliquée par l'individualisme de métabolisme secondaire qui varie entre les espèces voire entre les souches appartenant à la même espèce, étant donné qu'ils avaient les mêmes conditions de culture et d'extraction (Hanson, 2008 ; Bérdy, 2005 ; Wang *et al.*, 2006).

Néanmoins l'alignement inter-échantillons des pics métaboliques selon leurs temps de rétention montre la présence de plusieurs molécules similaires qui sont produites par les isolats de *G. resinaceum*, ce qui confirme les résultats obtenus par CCM.

La procédure d'analyse ciblée nous a permis de détecter plusieurs molécules triterpéniques et stéroïdiques, dont certaines ont été putativement annotées avec une précision de 10 ppm par rapport à la masse théorique ce qui illustre la haute résolution de la Q-TOF-MS qui permet un screening d'échantillon le plus exhaustif ; et fait d'elle la technique de choix pour l'étude des matrices complexes (Klitgaard *et al.*, 2014, Cheng *et al.*, 2013).

Le composé **16** de l'extrait Gr27 ; annoté comme acide ganodérique C2 ; d'après des données antérieures ce triterpénoïde a été déjà isolé de basidiocarpes de *G. resinaceum* (Su *et al.*, 2001, Ding *et al.*, 2010).

Les composés **9** de Gr15, **15** de Gr42 et **22** de Gr27 sont annotés putativement comme acide ganodérique A, le composé **11** de Gr27 et le composé **46** de Gr42 sont annotés en acide ganodérique E putatif. Ding *et al.* (2010) aussi ont rapportés la caractérisation de ces deux composés (GA A et GA E) de l'extrait chloroformique du carpophore de *G. resinaceum* (Ding *et al.*, 2010).

Les fomentarols (A, B, C et D) ont été détectés et annotés en utilisant cette approche analytique, ces quatre stérols ont été déjà isolés de carpophores de *F. fomentarius* par Zang *et al.* (2013).

D'autres molécules ciblées sont annotées avec succès comme détaillé précédemment. De nombreux composés stéroïdiens et triterpéniques non-ciblés sont détectés lors du scan, dont les données spectroscopiques ne correspondent à aucune molécule répertoriée dans la base de

données spectrale ; tels que les composés **1**, **2**, **3**, **19**, **20**, **51** et **52** des *G. resinaceum*, et les composés **f2**, **f4**, **f8** et **f32** dans l'extrait de *F. fomentarius*.

Certains de ces composés inconnus ont des formules brutes qui correspondent à des molécules déjà caractérisées chez ces champignons, citons les composés **53** et **55** ; deux composés de *G. resinaceum* et les composés **f10**, **f11** et **f23** de *F. fomentarius* dont la formule brute correspond à des ergostérols ($C_{28}H_{44}O$). Plusieurs auteurs ont caractérisé des ergostérols isolés des espèces de *Ganoderma* ; de *G. lucidum* (Seo *et al.*, 2009), de *G. resinaceum* (Ding *et al.*, 2010), et autres composés stéroïdiques tels que (24S)24-méthyl-5 α -cholesta-7,16-dien-3 β -ol de *G. applanatum* (Cole & Schweikert, 2003), une ergostérolone de (24S)24-méthylcholesta-7,22-dien-3-one (Ergosta-7,22-dien-3-one) isolé de *F. fomentarius* (Cole & Schweikert, 2003).

L'ergostérol est un composant chimique important dans l'industrie pharmaceutique et chimique. C'est le précurseur de la vitamine D (ergocalciférol) par exposition aux rayons ultraviolets, il peut être converti en cortisone et en progestatif (Tang *et al.*, 2007).

Les composés **38**, **52**, **f4** et le **f22** sont des peroxydes d'ergostérol avec des formules brutes de $C_{28}H_{44}O_3$. Seo *et al.* (2009) ont caractérisé un peroxyde d'ergostérol isolé de *G. lucidum* et qui a une activité anti-complément modérée. Un peroxyde d'ergostérol est aussi isolé et caractérisé de *F. fomentarius* avec une ergostérolone ; Ergost-7-en-3-one ($C_{28}H_{46}O$) (Rösecke & König, 2000) et dont la formule brute est celle des composés **14**, **27** et **41** et aussi **f8**, **f15** et **f30**.

Il est à noter que différentes molécules triterpéniques et stéroïdiennes de formules isomériques sont détectées entre les *G. resinaceum* et le *F. fomentarius*.

Au cours des dernières décennies, les triterpénoïdes de *G. lucidum* ont été les plus étudiés, mais les chercheurs sont de plus en plus attirés par d'autres espèces de Lingzhi comme *G. tsugae* (Ko *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2016), *G. tropicum* (Aryantha *et al.*, 2002) et *G. applanatum* (Nishitoba *et al.*, 1989 ; Boh *et al.*, 2000).

Nos résultats établissent clairement que les *G. resinaceum* et le *F. fomentarius* étudiés produisent ces métabolites en question. Nous avons particulièrement mis en évidence la production de triterpénoïdes et des stérols en culture submergée.

Les acides ganodériques T et Y sont produits par les trois isolats de *G. resinaceum* (Gr15, Gr 27 et Gr42), alors que l'acide ganodérique X est produit par le Gr15 et le Gr42 ; ces trois composés sont connus par leur cytotoxicité *in vitro* vis-à-vis les cellules cancéreuses de l'hépatome (Chang & Miles, 2004). L'acide ganodérique T isolé du mycélium de *G. lucidum* induit *in vitro* l'apoptose dans les cellules cancéreuses du cancer du poumon (Tang *et al.*, 2006).

Le *G. resinaceum* est connu pour produire les acides ganodériques B et C2 (Su *et al.*, 2001), les acides ganodériques A et E (Ding *et al.*, 2010) et d'autres triterpénoïdes de type lanostane (Niu *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2013).

Nous rapportons pour la première fois la production d'acide ganodérique theta, Am1, H, K, DM, T-Q, R, S, T, Y et X, l'acide ganolucidique E et un acide 16 α -hydroxy-3-oxolanosta-8,24-dien-21-oïque par *G. resinaceum* récoltés du PNEK en Algérie.

Comme on le voit, ces triterpènes sont produits par *G. resinaceum*. Il était admis pour longtemps que seul *G. lucidum* produisant les acides ganodériques (triterpénoïdes de type lanostane fortement oxydés) (Huie & Di, 2004), il se trouve que ces molécules sont aussi produites par d'autres espèces du genre *Ganoderma* (Baby *et al.*, 2015).

La chimiotaxonomie est basée sur la spécificité de métabolites à l'espèce, il semble difficile de l'appliquer avec les acides ganodériques. Toutefois, elle est probablement utile pour résoudre la détermination du genre (Richter *et al.*, 2015).

L'identification des molécules trouvées par cette approche analytique est conventionnelle. Afin d'établir une certitude pour les molécules trouvées ce travail de recherche doit être continué, l'identification formelle de molécules reste comparative avec les composés de référence ou par méthodes analytiques complémentaires (MS/MS ou RMN...).

4

L'évaluation de l'activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien des extraits chloroformiques de biomasses de *G. resinaceum* et *F. fomentarius* vis-à-vis des bactéries pathogènes responsables d'infections nosocomiales et communautaires est évalué qualitativement par la méthode de diffusion en disque. Les diamètres d'inhibition (DI) générés autour des disques chargés de 300 µg d'extrait sont enregistrés ; pour l'analyse des résultats nous avons suivi la méthode décrite par Djabou *et al.* (2013) où la sensibilité des souches bactériennes est appréciée comme suit ;

- Non-sensibles (-) pour des DI inférieurs ou égaux 8.0 mm ;
- Moyennement sensibles (+) pour des DI compris entre 8.0 et 14.0 mm ;
- Sensibles (++) pour des DI compris entre 14.0 et 20.0 mm ;
- Extrêmement sensibles (+++) pour des DI supérieurs ou égaux à 20.0 mm.

Les résultats obtenus montrent un effet antibactérien notamment sur les deux souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline. Selon les diamètres d'inhibition produits (DI) ; la souche *S. aureus* (1) semble plus affectée par les extraits chloroformiques, elle est sensible (++) à 10 extraits et présente une sensibilité moyenne (+) pour le reste des extraits, elle est également sensible à la vancomycine et l'acide fusidique.

La souche *S. aureus* (2) est moyennement sensible (+) à 44 extraits, seul l'extrait de Ff01 ne présente pas d'effet inhibiteur sur la *S. aureus* (2). Cette souche montre une sensibilité intermédiaire à l'acide fusidique et sensible à la vancomycine

La souche de *A. baumannii* est résistante aux antibiotiques de référence utilisés, cependant elle est moyennement sensible vis-à-vis de 6 extraits dont les DI enregistrés varient entre 8 et 11 mm.

Quinze extraits chloroformiques exhibent une action inhibitrice sur la souche de *E. coli* ; cette dernière est sensible (++) aux extraits de Gr24, Gr25 et Gr26. La souche *E. coli* présente une résistance aux 3 antibiotiques testés.

La souche de *P. aeruginosa* montre une résistance à tous les extraits à l'exception de l'extrait de Gr02 générant une zone d'inhibition de 9 mm. Cette souche présente une sensibilité intermédiaire vis-à-vis l'amoxicilline.

Une résistance absolue est observée chez *K. pneumoniae* pour tous les extraits fongiques et les antibiotiques testés.

Les disques de contrôle négatif imbibés de DMSO ne produisent aucune zone d'inhibition de croissance bactérienne.

Les photographies illustrant les diamètres d'inhibition sont présentées en annexe **2**.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus dans l'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits fongiques vis-à-vis les bactéries pathogènes testées sont enregistrés et détaillés dans le tableau **III.9**.

Tableau.III.9. L'activité antibactérienne des extraits chloroformiques de *G. resinaceum* et *F. fomentarius* vis-à-vis les souches bactériennes testées.

Extraits chloroformiques	Diamètres d'inhibition DI (mm)					
	<i>S. aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (2)	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Gr01	13(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr02	12(+)	12(+)	(-)	(-)	(-)	9(+)
Gr03	14(+)	11(+)	(-)	(-)	12(+)	(-)
Gr04	12(+)	11(+)	(-)	(-)	12(+)	(-)
Gr05	8(+)	8(+)	(-)	(-)	9(+)	(-)
Gr06	13(+)	13(+)	(-)	(-)	14(+)	(-)
Gr07	10(+)	8(+)	(-)	(-)	10(+)	(-)
Gr08	17(++)	12(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr09	16(++)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr10	15(++)	8(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr11	11(+)	8(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr12	13(+)	13(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr13	14(+)	12,5(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr14	13(+)	12,5(+)	8(+)	(-)	(-)	(-)
Gr15	9(+)	8(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr16	15(++)	10(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr17	11(+)	8(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr18	12(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr19	12(+)	12(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr20	14(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr21	10(+)	8(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr22	14(+)	10(+)	(-)	(-)	14(+)	(-)
Gr23	15(++)	10(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr24	13(+)	11(+)	(-)	(-)	15(++)	(-)
Gr25	13(+)	11(+)	(-)	(-)	16(++)	(-)

R= résistant I= intermédiaire S= sensible (-)=Non-sensibles (+)= Moyennement sensibles
(++)= Sensibles

Tableau.III.9. (suite)

Extraits chloroformiques	Diamètres d'inhibition DI (mm)					
	<i>S. aureus 1</i>	<i>S. aureus 2</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Gr26	14(+)	11(+)	(-)	(-)	16(++)	(-)
Gr27	12(+)	9(+)	8(+)	(-)	10(+)	(-)
Gr28	14(+)	10(+)	10(+)	(-)	11(+)	(-)
Gr29	14(+)	9(+)	10(+)	(-)	12(+)	(-)
Gr30	13(+)	10(+)	9(+)	(-)	13(+)	(-)
Gr31	13(+)	10(+)	11(+)	(-)	13(+)	(-)
Gr32	15(++)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr33	14(+)	12(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr34	15(++)	9(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr35	13(+)	9(+)	(-)	(-)	14(+)	(-)
Gr36	11(+)	12(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr37	12(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr38	15(++)	10(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr39	11(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr40	12(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr41	13(+)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr42	13(+)	12(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gr43	15(++)	11(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ff01	10(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ff02	15(++)	10(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
T+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Amx (25)	10 (R)	9 (R)	R	R	R	17 (I)
VA (30)	47 (S)	19 (S)	R	9 (R)	R	R
FC (10)	30 (S)	21 (I)	R	R	R	R

R= résistant I= intermédiaire S= sensible (-)=Non-sensibles (+)= Moyennement sensibles
(++)= Sensibles

Discussion

Dans cette étude le DMSO a été choisi comme solvant pour dissoudre les extraits. Ce solvant organique polaire a un pouvoir dissolutif très puissant sur une large gamme de molécules organiques, il dissout les extraits chloroformiques sans les cristalliser ou les décomposer, et d'après les résultats obtenus il n'interfère pas sur la croissance des souches pathogènes testées.

Notons que la charge des extraits contenue dans chaque disque est de 300 µg/disque cette charge est relativement réduite pour des extraits bruts. En effet, l'activité antimicrobienne dépend non seulement du champignons mais aussi du solvant, de la méthode d'extraction, des concentrations de l'extrait contenues dans le disque et de leurs diffusibilités (Djide *et al.*, 2014).

Les résultats des tests de sensibilités des germes pathogènes multi-résistants Gram + et Gram – indiquent clairement la présence d'activité antibactérienne ; cela démontre la présence de substances antibactériennes dans ces extraits.

Les propriétés antibactériennes de *Ganoderma* sont généralement liées à différentes classes de molécules ; flavonoïdes, coumarines, quinones, caroténoïdes, acides aminés, composés phénoliques et triterpénoïdes (Roberts, 2004 ; Keypour *et al.*, 2008 ; Karaman *et al.*, 2012).

Cette bioactivité pourrait être due à la fraction triterpénique et stéroïdienne présente dans les extraits chloroformiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* ; ces résultats sont en accord avec ceux observés par Smania *et al.* (1999) et Djide *et al.* (2014) qui confirment l'attribution du pouvoir antibactérien aux triterpénoïdes et aux stérols.

Certains extraits de *G. resinaceum* ont exhibé une activité antibactérienne sur les souches de *P. aeruginosa* et de *E. coli*, ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées sur les extraits de *G. lucidum* et *G. australe* (Smania *et al.*, 2007 ; Quereshi *et al.*, 2010).

Nos résultats indiquent que les souches de Gram + sont plus sensibles au pouvoir antibactérien des extraits chloroformiques de *G. resinaceum* ; les bactéries Gram + cibles dans notre étude sont deux isolats de SARM. Ces résultats sont conformes à ceux résultats obtenus par Keypour *et al.* (2008) sur les extraits chloroformiques de *G. lucidum* récolté d'Iran exhibant une activité antibactérienne plus importante sur les bactéries à Gram + (Keypour *et al.*, 2008).

L'activité antibactérienne des *Ganoderma* a été étudiée par plusieurs chercheurs (Quereshi *et al.*, 2010 ; Ameri *et al.*, 2011 ; Singh *et al.*, 2014)

Les extraits de *F. fomentarius* n'ont montré une activité antibactérienne que sur les isolats de *S. aureus*, cette activité a été démontré par d'autres auteurs (Dresch *et al.*, 2015 ; Kolundžič *et al.*, 2016).

Par ailleurs Dharmaraj *et al.* (2015) rapporte un effet antibactérien d'extraits de *F. fomentarius* plus élevé par rapports aux extraits de *G. tsugae* et *G. lucidum*.

Les souches bactériennes testées à Gram - ont montré une résistance à plusieurs extraits en particulier la souche de *K. pneumoniae* qui semble résistante à tous les extraits ; cela n'est pas surprenant en tant que bactéries pathogènes multi-résistantes en particulier celles responsables des infections nosocomiales et qui sont traitées par des antibiothérapies à large spectre pour lesquelles, ces bactéries acquièrent une résistance.

Notre travail se singularise par le fait d'étudier l'activité antibactérienne des extraits fongiques issus de cultures submergées. Peu d'études sont réalisées sur l'effet microbien des extraits des mycéliums (Stamets, 2014), la majorité des travaux visent les extraits des carpophores (Quereshi *et al.*, 2010 ; Ameri *et al.*, 2011 ; Djide *et al.*, 2014 ; Dresch *et al.*, 2015 ; Kolundžič *et al.*, 2016)

5

Mise en évidence des différentes activités enzymatiques

Les tests qualitatifs permettant de dépister la production d'enzymes extracellulaires des isolats de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius*.

5.1. Production de cellulases**5.1.1. Hydrolyses de celluloses insolubles**

Pour la totalité des isolats testés sur les milieux à base de celluloses insolubles (papier filtre et cellulose cristalline) ; aucune croissance n'est observée après incubation durant les premières 24 heures. A partir du 2^{ème} jour d'incubation le développement fongique est visible ; et la plupart des isolats envahissent les boîtes de Pétri au bout de 6 à 7 jours ; alors que les aspects des colonies sont très divers ; certaines avaient un mycélium dense cotonneux et d'autres des hyphes fines.

En comparant les deux milieux ; de meilleures croissances sont observées dans le milieu contenant le papier filtre broyé par rapport le milieu préparé avec la cellulose cristalline pour la plupart des isolats, cependant les hyphes mycéliennes sur CBM additionné de papier filtre sont plus fines pour la majorité des isolats.

Les isolats *G. resinaceum* ; Gr22, Gr05, Gr42, Gr38, Gr34, Gr9 et Gr37 avaient visiblement une croissance rapide (5 jours).

L'hydrolyse des celluloses traduite par l'éclaircissement du milieu est difficilement détectée dans les deux milieux, seulement 3 isolats ont montré une réaction positive évidente sur le milieu CBM additionné de cellulose cristalline pure ; Gr22, Ff01 et Ff02, alors que la dégradation du papier filtre est visible pour les isolats Gr03, Gr22 et Gr38.

Peu ou aucune croissance n'est observée sur le milieu CBM solidifié (le témoin négatif) pour l'ensemble des isolats fongiques testés. Ces résultats confirment que la croissance dans les milieux à base de celluloses insolubles est due à leur capacité à produire des enzymes cellulolytiques.

5.1.2. L'hydrolyse de CMC

La CMC est un substrat des endoglucanases (Archer & Wood, 1995), et qui peut être aussi un substrat des $\beta(1-4)$ glucosidases (Pointing, 1999). Les résultats obtenus ont démontré que sur gélose contenant la CMC comme seule source de carbone, tous les isolats ont manifesté une réaction positive (une zone d'hydrolyse), bien que l'intensité de réaction soit différente d'un isolat à l'autre. La plus forte activité est observée avec les isolats Gr21, Gr22, Gr24 et Gr38. L'hydrolyse enzymatique de CMC est facilement détectée contrairement au test précédent.

La recherche de l'excrétion d'endoglucanases extracellulaires produites dans le milieu complexe de production de triterpénoïdes par la méthode de diffusion en puits nous a montré que tous les isolats ont produit des endoglucanases dans le milieu de culture liquide, l'intensité est aussi bien variable (**Annexe.2**).

Les résultats obtenus des tests de production de cellulases sont résumés dans le tableau **III.10**.

Tableau.III.10. Résultats des tests qualitatifs des différentes activités cellulolytiques des isolats fongiques de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*

<i>isolat</i>	<i>cellulases</i>			
	Hydrolyse de cellulose cristalline	Hydrolyse de papier filtre	Hydrolyse de CMC	Hydrolyse de CMC (diffusion en gel)
Gr01	+	+	+	+
Gr02	+	+	+++	+++
Gr03	+	++	++	++
Gr04	+/-	+/-	++	+
Gr05	+	+	++	+
Gr06	+	+	++	+
Gr07	+	+/-	+++	++
Gr08	+	+	++	++
Gr09	+	+	++	++
Gr10	+	+	+++	+
Gr11	+	+	+	++
Gr12	+	+	++	+++
Gr13	+	+	++	+
Gr14	+	+	+	++
Gr15	+/-	+	+	+
Gr16	+	+	++	+
Gr17	+/-	+	+	+
Gr18	+/-	+/-	++	+
Gr19	+	+	+	++
Gr20	+	+	++	+
Gr21	+	+	+++	+

+++réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible

Tableau.III.10. (suite)

<i>Isolat</i>	<i>cellulases</i>			
	Hydrolyse de cellulose cristalline	Hydrolyse de papier filtre	Hydrolyse de CMC	Hydrolyse de CMC (diffusion en gel)
Gr22	++	++	+++	+
Gr23	+	+/-	+++	++
Gr24	+	+	+++	+
Gr25	+	+	++	+
Gr26	+/-	+	+	++
Gr27	+	+	+	+
Gr28	+	+	++	+
Gr29	+	++	++	+
Gr30	+	+	++	+
Gr31	+	+	+	+
Gr32	+	+	+++	+
Gr33	+	+	++	++
Gr34	+	+	+	+
Gr35	+	+	++	+
Gr36	+	+	++	+++
Gr37	+	+	++	++
Gr38	+	++	+++	++
Gr39	+	+	+	+
Gr40	+	+	++	+
Gr41	+	+	+	+
Gr42	+	+	+++	+
Gr43	+	+	++	+
Ff01	++	++	++	+++
Ff02	++	++	++	++

+++ réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible,

Discussion

Parallèlement à l'essai de production de métabolites secondaires et leur caractérisation, nous avons réalisé une étude qualitative sur la production des enzymes extracellulaires par les isolats de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*, les résultats de ces tests nous ont révélé la présence de différentes activités enzymatiques.

En général, la cellulose insoluble pure est attaquée lentement par les enzymes cellulolytiques (Pointing, 1999, Schmidt, 2006) ; ce qui explique l'absence de croissance le premier jour, c'est le temps requis pour l'induction enzymatique. En fait, l'hydrolyse de substrats cellulosiques hétérogènes tels que le papier filtre et la cellulose cristalline implique l'action simultanée de toutes les enzymes cellulolytiques (Teeri, 1997, Pointing, 1999), mais l'observation de zones d'hydrolyse de cellulose reste difficile à évaluer en présence de croissance fongique en particulier avec des hyphes denses ; cela constitue un problème inhérent à cette méthode (Pointing, 1999).

La capacité de solubiliser la cellulose cristalline entièrement est limitée à peu de champignons (Archer & Wood, 1995) ; les champignons de pourriture blanche en général sont les organismes les plus efficaces pour solubiliser entièrement des matières cellulosiques cristallines pures en déployant efficacement le système endo / exoglucanases synergique (Archer & Wood, 1995 ; Teeri, 1997 ; Schmidt, 2006).

La production des exoglucanases et des β -glucosidases incluses dans la dégradation de cellulose insoluble par les espèces de *Ganoderma* et le *F. fomentarius* ; a été explorée et étudiée par plusieurs chercheurs (Větrovský *et al.*, 2011 ; Shahzadi *et al.*, 2014) et certaines de ces enzymes ont été purifiées et caractérisées (Větrovský *et al.*, 2013).

Nos résultats confirment la production d'endoglucanases sur milieu solide et en milieu complexe de culture submergée. L'hydrolyse du CMC semble un bon indicateur du pouvoir cellulolytique ; les réactions positives sont faciles à détecter et évaluer, de ce fait elle est fréquemment utilisée (Jo *et al.*, 2011 ; Kamsani *et al.*, 2016).

Les champignons sont généralement capables de produire des endoglucanases (Cai *et al.*, 1994, Buswell *et al.*, 1996 ; Pointing *et al.*, 1999, Ahlawat *et al.*, 2008).

Des endoglucanases fongiques purifiées n'ont pas une action significative sur la cellulose cristalline (Archer & Wood, 1995), toutefois beaucoup de champignons dégradent efficacement la cellulose de bois sans produire des exoglucanases détectables (Pointing, 1999).

La production d'endoglucanases par le *F. fomentarius* et d'autres espèces de *Ganoderma* est déjà démontrée. Ces enzymes sont étudiées profondément vu leur importance biotechnologique (Manavalan *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016 ; Kobakhidze *et al.*, 2016).

5.2. Détection de l'activité de laccase

La majorité des isolats de *Ganoderma* montrent une activité de laccase importante, sauf le Gr19, Gr33 et Gr36. Les deux isolats de *F. fomentarius* présentent une activité faible ; le changement de couleur du milieu n'est aperçu qu'après 5 jours d'incubation.

5.3. Détection de l'activité de xylanase

Les isolats fongiques dégradent clairement le xylane à l'exception de six isolats de *G. resinaceum* donnant un résultat négatif pour ce test ; Gr7, Gr12, Gr19, Gr24, Gr28 et Gr36. Les isolats Gr20, Gr29 et Ff02 donnent des zones d'hydrolyse du xylane très difficiles à voir.

L'utilisation de Lugol pour la révélation donne des zones de dégradation beaucoup plus visibles qu'avec la solution du rouge Congo à 0.2 % (**Fig.III.10**).

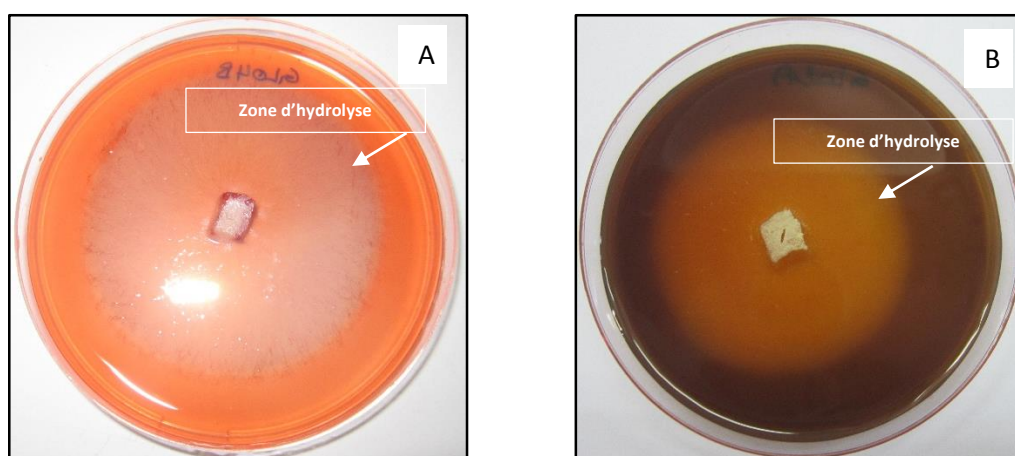


Figure.III.10. Dégradation de xylane avec rouge Congo (A) et le Lugol (B).

5.4. Détection de l'activité pectinolytique

La croissance sur le milieu à base de pectine de Citrus était très lente ; 5 à 7 jours pour avoir des colonies de 3 cm de diamètre approximativement.

La visualisation de la dégradation de pectine avec la solution I₂-KI montre que tous les isolats dégradent la pectine, des zones légèrement claires au-dessous de colonie par rapport au reste de la boîte qui se colore avec le brun-rouge foncé sont observées (**Annexe.2**) ; à l'exception de l'isolat Gr33 donnant un résultat négatif.

Le tableau suivant (III.11) présente les résultats des tests de laccases, xylanases et pectinases pour les différents isolats fongiques de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*.

Tableau.III.11. Résultats des tests qualitatifs des différentes activités de laccases, xylanases et pectinases des isolats fongiques de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*

Isolats	Production d'enzymes		
	Laccases	Xylanases	Pectinases
Gr01	+	+++*	++
Gr02	+++	+++	++
Gr03	+++	++*	++
Gr04	+++	++*	++
Gr05	+++	++*	++
Gr06	+++	++*	++
Gr07	++	-	+++
Gr08	+++	+++*	++
Gr09	+++	++*	+++
Gr10	+++	++*	++
Gr11	+++	+++	++
Gr12	++	-	++
Gr13	++	+	++
Gr14	++	+*	++
Gr15	+	+*	++
Gr16	+++	+*	++
Gr17	++	++*	++
Gr18	++	+*	+++
Gr19	-	-	+++
Gr20	+++	+/-	+++
Gr21	+++	+++*	+++
Gr22	+++	+++*	+++
Gr23	+++	++*	++
Gr24	+++	-	++

+++ réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible, +/- réaction très faible, * halo noirâtre

Tableau.III.11. (suite)

Isolats	Production d'enzymes		
	Laccases	Xylanases	Pectinases
Gr25	+++	++	+
Gr26	++	++*	++
Gr27	++	+	+++
Gr28	++	-	++
Gr29	+++	+/-	++
Gr30	++	+*	+++
Gr31	++	+++	+
Gr32	+++	++	++
Gr33	-	++	-
Gr34	+++	++	+++
Gr35	+++	++	+++
Gr36	-	-	++
Gr37	+++	+++	+++
Gr38	+++	++*	+++
Gr39	+++	++*	+++
Gr40	+++	+++*	++
Gr41	+++	+++*	+++
Gr42	+++	++	++
Gr43	+++	++	+++
Ff01	+/-	+	++
Ff02	+	+/-	++

+++ réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible, +/- réaction très faible, * halo noirâtre

Discussion

Détection de l'activité de laccases

Les laccases fongiques sont connues d'avoir une activité phénol oxydase (Copete *et al.*, 2015), les isolats testés montrent leur aptitude à décomposer le bleu de bromophénol à l'exception des isolats Gr19, Gr33 et Gr36. Les champignons de pourritures blanches possèdent trois types d'enzymes assurant la dépolymérisation de lignine ; laccases, lignine peroxydases et peroxydases à manganèse (Schmidt, 2006 ; Eriksson *et al.*, 1999) ; ces deux derniers sont exclusivement extracellulaires mais l'activité de laccase peut être intracellulaire ou extracellulaire (Baldrian, 2006) ; ce qui explique son absence pour certains isolats testés. Les deux isolats de *F. fomentarius* ont montré une activité faible ; notons que plusieurs isoenzymes de laccases ont été rapportées produites par des isolats de *F. fomentarius* (Baldrian, 2006 ; Neifar *et al.*, 2010). La présente étude a porté seulement sur la production de la laccase sans explorer les autres classes d'enzymes dégradant la lignine (lignine peroxydase et peroxydase à manganèse).

Détection de l'activité de xylanase

Le milieu choisi pour ce test a été adéquat pour tester le pouvoir de ces champignons à dégrader le xylane qui est un des composants de l'hémicellulose. Singh *et al.*, (2013) ont utilisé un milieu minimum composé seulement de xylane de bouleau à 1% et d'agar à 2% pour induire la production de xylanases fongiques et une incubation de 6 jours (Singh *et al.*, 2013), l'incubation dans notre étude a pris seulement 3 jours. La visualisation des zones de dégradation était plus facile avec le Lugol étant que l'iode a aussi la capacité de se fixer sur les molécules de glucose des dextrines (oligosaccharides), en fait ; la solution de Lugol a été trouvée meilleure pour révéler la dégradation de CMC (Kasana *et al.*, 2008). Cette activité enzymatique est à fort intérêt biotechnologique, l'utilisation de xylanases fongiques dans le bio-blanchiment en industrie papetière, peut réduire le taux de chlore utilisé à 50 % (Assamoi *et al.*, 2009).

Détection de l'activité pectinolytique

Les pectines sont des composants mineurs des bois (< 4%), qui sont des polysaccharides caractérisés par un squelette linéaire d'unités d'acide β -D-galacturonique et de faibles quantités de α -L-rhamnose plus ou moins ramifiés, elles sont dégradées principalement par les polygalacturonases et les rhamnogalacturonases (Schwarze, 2007 ; Rytioja *et al.*, 2014).

Quarante-quatre isolats fongiques d'origine 45 ont dégradé la pectine de Citrus malgré la croissance lente sur ce milieu attribuée certainement à la complexité du substrat.

5.5. Détection de l'activité protéolytique

Les isolats cultivés sur gélose au lait ont montré différents degrés de protéolyse ainsi que différentes vitesses de croissance. Les isolats présentant les activités protéolytiques les plus élevées sont Gr36 et Gr22, suivis par Gr12, Ff01 qui montraient aussi une réaction protéolytique significative. Cependant le reste a montré une faible activité protéolytique en formant des zones d'hydrolyse réduites (< de 2.0 mm) ou sans halos, mais avec zones d'hydrolyse observées à l'intérieurs de colonies fongiques (**Tab.III.12**).

5.6. La détection de la production d'amylase

La recherche d'activité amylolytique réalisée montre que ces champignons possèdent des réactions faibles. Après traitement de surfaces des géloses par la solution de Lugol diluée aucune zone claire n'est formée sur le pourtour des colonies, seulement une coloration brunâtre ou des zones incolores apparaissent en dessous des mycéliums, les zones de dégradations sur milieu à base d'amidon de maïs ne sont pas homogène, certaines parties restent colorées en bleu ce qui reflète la dégradation non complète d'amidon. (**Fig.III.11**).

Dans le tableau **III.12**, nous résumons toutes les données relatives aux activités enzymatiques des isolats de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*.

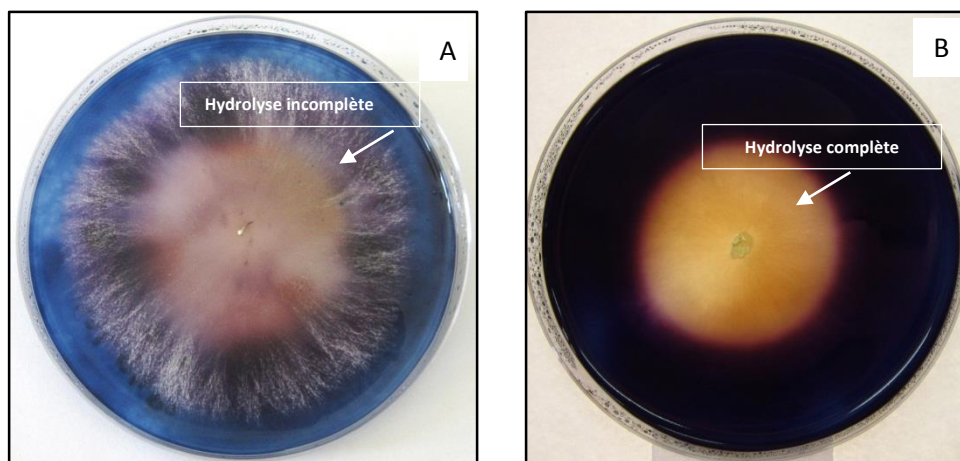


Figure.III.11. Différence entre la de dégradation d'amidon de maïs (A) et l'amidon soluble (B).

Tableau.III.12. Résultats des tests qualitatifs d'activité protéolytique et amylolytique des isolats de *G. resinaceum* et *F. fomentarius*

isolats	production d'enzymes		
	Protéases	Amylases	
		Amidon de maïs	Amidon soluble
Gr01	+	- (*)	- (*)
Gr02	+++	- (*)	- (*)
Gr03	++	- (*)	- (*)
Gr04	+	- (*)	- (*)
Gr05	+	- (*)	- (*)
Gr06	+	- (*)	- (*)
Gr07	+	- (*)	- (*)
Gr08	+	- (*)	- (*)
Gr09	++	- (*)	- (*)
Gr10	+	- (*)	- (*)
Gr11	++	- (*)	- (*)
Gr12	+++	- (*)	- (*)
Gr13	- (*)	- (*)	- (*)
Gr14	- (*)	- (*)	- (*)
Gr15	- (*)	- (*)	- (*)
Gr16	+	- (*)	- (*)
Gr17	+	- (*)	- (*)
Gr18	+	- (*)	- (*)
Gr19	- (*)	- (*)	- (*)
Gr20	+	- (*)	- (*)
Gr21	- (*)	- (*)	- (*)
Gr22	+	- (*)	- (*)
Gr23	++	- (*)	- (*)
Gr24	+	- (*)	- (*)

+++réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible, +/- réaction suspicieuse,
 - (*) absence d'halo autour de colonies avec zone interne d'hydrolyse

Tableau.III.12. (suite)

isolats	production d'enzymes		
	Protéases	Amylases	
		Amidon de maïs	Amidon soluble
Gr25	+	- (*)	- (*)
Gr26	++	- (*)	- (*)
Gr27	+	- (*)	- (*)
Gr28	+	- (*)	- (*)
Gr29	+	- (*)	- (*)
Gr35	+	- (*)	- (*)
Gr36	+++	- (*)	- (*)
Gr37	- (*)	- (*)	- (*)
Gr38	+	- (*)	- (*)
Gr39	- (*)	- (*)	- (*)
Gr40	+	- (*)	- (*)
Gr41	+	- (*)	- (*)
Gr42	+	- (*)	- (*)
Gr43	+	- (*)	- (*)
Ff01	+++	- (*)	- (*)
Ff02	- (*)	- (*)	- (*)

+++réaction forte, ++ réaction modérée, + réaction faible, +/- réaction suspicieuse,
 - (*) absence d'halo autour de colonies avec zone interne d'hydrolyse

Discussion

Détection de l'activité protéolytique

Les caséines sont le substrat classique pour détecter le pouvoir protéolytique des basidiomycètes, l'ensemble des isolats testés ont hydrolysé ce substrat, quoique certains isolats ont montré une faible activité protéolytique ; des résultats analogues avec des espèces du genre *Ganoderma* sont rapporté par Jo *et al.* (2011). La croissance de ces champignons dans ce milieu pauvre en acides aminés libres et riche en protéines (principalement des caséines) qui présente pratiquement la seule source d'azote, montre leur aptitude à produire des protéases et dégrader les protéines en azote assimilable. C'est grâce à ces enzymes que les champignons puissent se développer dans des milieux complexes à base de lait, de gélatine ou de soja dont les graines ont une haute teneur en protéine (Inácio *et al.*, 2015) ; tel que le milieu complexe utilisé dans notre étude pour la production de métabolites secondaires.

Détection de la production d'amylase

Les zones de dégradation dans le milieu de la féculé de maïs sont irrégulières et non homogènes avec des taches bleu-violette qui reviennent à la présence d'un amidon non dégradé sous les hyphes. La nature hétérogène de granules d'amidon est probablement à l'origine de cette réaction ; il est constitué de deux fraction; l'amylose et l'amylopectine dont le rapport amylose/amylopectine varie selon la source botanique (French, 1984 ; Tester *et al.*, 2004) ; donc la partie d'amylopectine dans les féculés de maïs utilisées dans ce test reste non-dégradée étant donné que les amylases fongiques sont moins actives sur les liaisons glucosidiques $\alpha(1-6)$ (Murphy & Horgan, 2011; Lacerda *et al.*, 2008.). La production de α -amylases par les *Ganoderma* a été recherchée et détectée par plusieurs auteurs (Flood *et al.*, 2000 ; Jo *et al.*, 2011), alors que d'autre ont l'étudiée plus extensivement (Han *et al.*, 2005 ; Irshad *et al.*, 2012).



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel et spécialement mycologique de l'Algérie et à la lumière des travaux récents sur l'utilisation ethno-pharmacologique des champignons et particulièrement les polypores médicinaux et la nature chimique des composés bioactifs identifiés nous ont orientés vers l'étude de deux polypores répandus dans les subéraies du Parc National d'El-Kala (PNEK) en Algérie, et qui sont le *Ganoderma resinaceum* et le *Fomes fomentarius*.

En effet, les champignons affiliés aux genres *Ganoderma* et *Fomes* sont une source de métabolites primaires et secondaires dont les vertus sont indéniables.

Notre choix s'est porté sur la production des métabolites secondaires de type triterpénoïdes et stérols produits par ces polypores et en mettant en œuvre un procédé de production biotechnologique qui est la culture submergée.

La culture de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* s'est faite à partir des spores des carpophores (champignon entier) récoltés des subéraies d'El-Kala. Quarante-trois isolats de *G. resinaceum* et deux isolats de *F. fomentarius* sont purifiés en milieu solide.

La culture submergée a été choisie comme procédé biotechnologique car elle nous a permis de produire, *in vitro* et en milieu liquide, une biomasse mycélienne quantitativement et qualitativement intéressante. Elle permet aussi un gain de temps, si on la compare avec la culture de basidiomes entiers qui reste un procédé fastidieux.

Des cultures submergées en deux étapes ; une pré-culture **(i)** pour préparer l'inoculum et une culture pour la production des métabolites recherchés **(ii)** en utilisant un milieu complexe ; ont été réalisées pour les 45 isolats fongiques.

L'extraction des triterpénoïdes à partir de la biomasse mycélienne obtenue a été effectuée par le chloroforme. Les extraits ont été criblés par une Chromatographie sur Couche Mince (CCM) afin de sélectionner les isolats hyperproducteurs de métabolites triterpéniques et stéroïdiques.

Après le screening par CCM ; quatre extraits sont sélectionnés pour être analysés par Chromatographie Liquide Couplée à un Spectromètre de Masse Quadripolaire à temps de vol (LC/Q-TOF-MS) et qui sont la Gr15, Gr27, Gr42 et la Ff02. La spectrométrie de masse nous a

permis d'identifier les molécules produites, la technique Q-TOF permet le criblage d'échantillons le plus exhaustif grâce aux techniques de séparation LC.

L'approche analytique utilisée a révélé des différences significatives entre les métabolomes des isolats testés. Elle a permis également d'annoter et de caractériser avec précision un grand nombre des triterpénoïdes et des stéroïdes produits par les champignons en culture submergée et qui sont ; les acides ganodériques theta, Am1, A, C2, DM, E, H, K, R, S, T, T-Q, Y et X, l'acide ganolucidique E et ainsi qu'autres composés stéroïdiens tels que les fomentarols A, B, C et D, des ergostérols et des peroxydes d'ergostérol.

Ces métabolites à potentiel thérapeutique intéressant sont annotés ou caractérisés de façon putative ; l'identification formelle de ces composés reste liée à la présence de standards internes ou aux techniques d'illustration de structures chimiques plus performantes.

Les propriétés antibactériennes des extraits chloroformiques ont été évaluées par méthode qualitative de diffusion en disque en milieu gélosé sur six bactéries pathogènes multi-résistantes responsables d'infections nosocomiales et communautaires ; *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et deux souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline.

Au total 45 extraits chloroformiques ont été testés, une quinzaine d'extraits exercent un pouvoir inhibiteur sur *E. coli*, alors que seulement 6 extraits ont un effet sur *A. baumannii* et 1 seul extrait sur *P. aeruginosa*. La *K. pneumoniae* a montré une résistance absolue à tous les extraits. Cette étude a montré également que les souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline sont plus affectées par le pouvoir antibactérien des extraits chloroformiques de biomasses ; la *S. aureus* (1) présente des degrés de sensibilité variables vis-à-vis les 45 extraits testés, alors que la *S. aureus* (2) est moyennement sensible à 44 extraits.

D'autre part, les activités enzymatiques de ces polypores ont motivé notre intérêt, *G. resinaceum* et *F. fomentarius* possèdent un arsenal important d'enzymes extracellulaires qui jouent un rôle clé dans leur mode de vie en tant qu'organismes décomposeurs.

Pour résumer, les 45 isolats fongiques ont majoritairement montré, via des tests qualitatifs *in vitro*, des activités enzymatiques de cellulases, laccases et xylanases. D'autres enzymes à fort intérêt industriel sont également produites par ces champignons comme les amylases, protéases et pectinases.

En perspectives nous pouvons proposer ;

Une identification moléculaire des isolats fongiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* pour confirmer notre identification phénotypique. Le séquençage partiel des gènes encodant l'ARN ribosomal de la petite sous-unité nuc-SSU et la grande sous-unité du ribosome nuc-LSU (pour *nuclear-Small SubUnit* et *nuclear-Large SubUnit*) ; fréquemment utilisé pour caractériser les genres observés. Une analyse phylogénique des espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*), ces marqueurs moléculaires ont un haut degré de variation et sont très utiles pour déterminer les espèces fongiques.

Les caractéristiques phénotypiques constituent, sans doute, un outil incontournable dans la caractérisation des spécimens examinés sur terrain ; mais l'approche phylogénique est certainement privilégiée pour affiner la classification systématique des isolats ainsi d'enrichir nos connaissances sur les génotypes existant en Algérie.

La LC/MS a permis de mettre en évidence des molécules triterpéniques et stéroïdiques connues. Les composés inconnus détectés lors de l'analyse spectrométrique suggèrent ainsi la présence de nouvelles molécules. Il serait intéressant alors de procéder à une analyse structurale complémentaire par la méthode spectroscopique RMN pour identifier ces composés.

Ces métabolites secondaires (triterpénoïdes et stérols) présentent une vaste classe de composés naturels qui peuvent être dotés de propriétés pharmacologiques marquées et qui méritent d'être étudiés de façon approfondie afin de caractériser les activités biologiques des molécules trouvées.

Une autre perspective envisagée pour cette étude est de poursuivre l'étude de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques, vu que le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques se pose de plus en plus, et pourquoi pas établir le lien entre le pouvoir antibactérien des extraits chloroformiques et les métabolites secondaires produits.

Le *F. fomentarius* et *G. resinaceum* possèdent un bagage enzymatique conséquent comprenant les amylases, protéases et pectinases ; ces enzymes sont recherchées par différents secteurs industriels. Ainsi que les enzymes lignocellulolytiques ; laccases, cellulases et xylanases. Du point de vue biotechnologique, ces enzymes peuvent trouver leurs applications dans divers domaines notamment la biodégradation des déchets lignocellulosiques, la bio-remédiation des polluants récalcitrants, le bio-blanchiment et beaucoup d'autres applications biotechnologiques.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adaskaveg, J. E. & R. L. Gilbertson (1986) Cultural Studies and Genetics of Sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in Relation to the Taxonomy of the *G. lucidum* Complex. *Mycologia*, 78, 694-705.
- Adeleke, A. J., S. A. Odunfa, A. Olanbiwonninu & M. C. Owoseni (2012) Production of cellulase and pectinase from orange peels by fungi. *Nat Sci*, 10, 107-112.
- Agilent (2012) Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System Concepts Guide. *Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA.*, G3335-90142
- Ahlawat, O. P., P. Gupta, B. L. Dhar, T. G. Sagar, R. Rajendranath & K. Rathnam (2008) Profile of the extracellular lignocellulolytic enzymes activities as a tool to select the promising strains of *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) sing. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 389-396.
- Amen, Y. M., Q. Zhu, M. S. Afifi, A. F. Halim, A. Ashour & K. Shimizu (2016) New cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lingzhi*. *Phytochemistry Letters*, 17, 64-70.
- Ameri, A., J. G. Vaidya & S. S. Deokule (2011) In vitro evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 328-333.
- Anastasi, A., V. Tigini & G. C. Varese. 2013. The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. In *Fungi as Bioremediators*, eds. M. E. Goltapeh, R. Y. Danesh & A. Varma, 29-49. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Archer, D. B. & D. A. Wood. 1995. Fungal Exoenzymes. In *The Growing Fungus*, eds. N. R. Gow & G. Gadd, 137-162. Springer Netherlands.
- Aryantha, I. N. P., A. Adinda & S. Kusmaningati (2002) Occurrence of triterpenoids and polysaccharides on *Ganoderma tropicum* with *Ganoderma lucidum* as reference. *Aust Mycol*, 20, 123-129.
- Assamoi, A., J. Destain & P. Thonart (2009) Aspects microbiologiques de la production par la fermentation solide des endo- β -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13, 271-280.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*. CRC Press.
- Ayissi, B. M. K. & D. C. Mossebo (2014) Some noteworthy taxonomic variations in the complex wood-decayer *Ganoderma resinaceum* (Basidiomycota) with reference to collections from tropical Africa. *Kew Bulletin*, 69, 1-14.
- Baby, S., A. J. Johnson & B. Govindan (2015) Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114, 66-101.
- Balaş, T. & C. Tănase (2012) Description of in vitro cultures for some spontaneous lignicolous basidiomycetes species. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi*, 58, 19.
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-242.
- . 2008. Chapter 2 Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. In *British Mycological Society Symposia Series*, eds. J. C. F. Lynne Boddy & W. Pieter van, 19-41. Academic Press.
- Baldrian, P. & V. Valášková (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32, 501-521.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris & M. Turck (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-6.
- Baum, S., T. Sieber, F. M. R. Schwarze & S. Fink (2003) Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). *Mycological Progress*, 2, 141-148.

Références bibliographiques

- Benyacoub, S. & Y. Chabi (2000) Diagnose écologique de l'avifaune du Parc National d'El-Kala. *Synthèse*, 7, 3-98.
- Benyacoub, S., M. Louanchi, R. Baba Ahmed, S. Benhouhou, B. Chalabi, F. Haou, N. Ziane & R. Rouag (1998) Plan directeur de gestion du Parc National d'El Kala et du complexe des zones humides. *Projet GEF (Global Environment Facility)-Banque Mondiale*, 220.
- Bérdy, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot*, 58, 1-26.
- Berger, A., D. Rein, E. Kratky, I. Monnard, H. Hajjaj, I. Meirim, C. Piguet-Welsch, J. Hauser, K. Mace & P. Niederberger (2004) Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs. *Lipids Health Dis*, 3, 2.
- Bhosle, S., K. Ranadive, G. Bapat, S. Garad, G. Deshpande & J. Vaidya (2010) Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere*, 1, 249-262.
- Bishop, K. S., C. H. J. Kao, Y. Xu, M. P. Glucina, R. R. M. Paterson & L. R. Ferguson (2015) From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56-65.
- Boh, B. (2013) *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 8, 255-287.
- Boh, B., M. Berovic, J. Zhang & L. Zhi-Bin. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. In *Biotechnology Annual Review*, ed. M. R. El-Gewely, 265-301. Elsevier.
- Boh, B., D. Hodzar, D. Dolničar, M. Berovič & F. Pohleven (2000) Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 11-18.
- Bonnet, R., F. Caron, J. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Courvalin, H. Drugeon, L. Dubreuil, V. Jarlier & F. Jehl (2012) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2012*.
- Botton, B., A. Breton, M. Fèvre, P. Guy, J. Larpent & P. Veau (1990) Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
- Bouguenoun, W., A. A. Bentorki, I. Bouguenoun & T. Merad (2016) Nosocomial infection caused by multidrug resistant Enterobacteriaceae and their spread in inanimate surfaces in East-Algerian hospitals. *African Journal of Microbiology Research*, 10, 1286-1291.
- Brown, G. D. (1998) The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports*, 15, 653-696.
- Burianová, T., J. Kopečný, J. Sajdok & J. Káš (1991) Assay of very low cellulolytic activity in fodder supplemented with enzyme preparation. *Animal feed science and technology*, 33, 41-48.
- Burnett, J. H. 2003. *Fungal Populations and Species*. Oxford University Press.
- Buswell, J. A., Y. J. Cai & S.-T. Chang (1996) Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. *Mushroom Biology and Mushroom Products, Penn State University, Pennsylvania*.
- Cai, Y. J., J. A. Buswell & S. T. Chang (1994) Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycological Research*, 98, 1019-1024.
- Carlile, M. 1995. The success of the hypha and mycelium. In *The growing fungus*, 3-19. Springer.
- Chang, S.-T. & P. G. Miles. 2004. *Ganoderma lucidum* - A Leader of Medicinal Mushrooms. In *MUSHROOMS*, 375-369. CRC Press.
- Chang, U.-M., C.-H. Li, L.-I. Lin, C.-P. Huang, L.-S. Kan & S.-B. Lin (2006) Ganoderiol F, a *ganoderma* triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*, 79, 1129-1139.
- Chekireb, D., P.-A. Moreau & R. Courtecuisse (2013) Les russules des subéraies d'Algérie. *Documents Mycologiques*, 35, 325-347.
- Chen, W., Z. Zhao, S.-F. Chen & Y.-Q. Li (2008a) Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, 99, 3187-3194.

Références bibliographiques

- Chen, W., Z. Zhao & Y. Li (2011) Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention. *Carbohydrate Polymers*, 85, 369-375.
- Chen, X., L. Chen, S. Li & J. Zhao (2017) Meroterpenoids from the fruiting bodies of higher fungus *Ganoderma resinaceum*. *Phytochemistry Letters*, 22, 214-218.
- Chen, Y., M.-Y. Xie, S.-P. Nie, C. Li & Y.-X. Wang (2008b) Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*, 107, 231-241.
- Cheng, C.-R., M. Yang, K. Yu, S.-H. Guan, X.-H. Wu, W.-Y. Wu, Y. Sun, C. Li, J. Ding & D.-A. Guo (2013) Metabolite identification of crude extract from *Ganoderma lucidum* in rats using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 941, 90-99.
- Cheng, C. R., Q. X. Yue, Z. Y. Wu, X. Y. Song, S. J. Tao, X. H. Wu, P. P. Xu, X. Liu, S. H. Guan & D. A. Guo (2010) Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 71, 1579-85.
- Choi, H.-S. & Y.-S. Sa (2000) Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*, 545-552.
- Chouiter, R., I. Roy & C. Bucke (2008) Optimisation of β -glucuronidase production from a newly isolated *Ganoderma applanatum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50, 114-120.
- Chudzik, M., I. Korzonek-Szlacheta & W. Król (2015) Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules*, 20, 1610-1625.
- Cock, I. E. (2008) Antimicrobial activity of *Aloe barbadensis* Miller leaf gel components. *The Internet Journal of Microbiology*, 4, 17.
- Cole, R. J., M. A. Schweikert & B. B. Jarvis. 2003. *Handbook of secondary fungal metabolites, 3-volume set*. Academic Press.
- Copete, L. S., X. Chanagá, J. Barriuso, M. F. López-Lucendo, M. J. Martínez & S. Camarero (2015) Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology*, 15, 74.
- Cotton, J. r. m. 2015. Application de l'analyse métabolomique à la détection ciblée et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Courtecuisse, R. 2000. *Photo-guide des champignons d'Europe*. Paris: Delachaux et Niestlé.
- Cruz da Silva, L. R., O. Camilo de Souza, M. J. Dos Santos Fernandes, D. M. Massa Lima, R. R. Rodrigues Coelho & C. M. Souza-Motta (2011) Culturable fungal diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei* boone from breeding farms in Brazil. *Braz J Microbiol*, 42, 49-56.
- Cui, M.-l., H.-y. Yang & G.-q. He (2015) Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16, 998-1010.
- De Silva, D. D., S. Rapior, F. Fons, A. H. Bahkali & K. D. Hyde (2012a) Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55, 1-35.
- De Silva, D. D., S. Rapior, K. D. Hyde & A. H. Bahkali (2012b) Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56, 1-29.
- Deacon, J. W. 2005. *Fungal Biology*. Wiley.
- Deconchat, C. & J. M. Polèse. 2002. *Champignons: l'encyclopédie*. Editions Artémis.
- Demain, A. L. & A. Fang (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 69, 1-39.
- Dharmaraj, K., T. Kuberan & R. Sivasankari (2015) Studies on antimicrobial activities in *Ganoderma lucidum*, *Fomes fomentarius* and *Ganoderma tsugae*. *Journal of Science*, 5, 116-123.

Références bibliographiques

- Ding, P., J. Qiu & Y. Liang (2010) Chemical constituents of *Ganoderma resinaceum*. *Chinese Herbal Medicines*, 2, 65-67.
- Djabou, N., V. Lorenzi, E. Guinoiseau, S. Andreani, M.-C. Giuliani, J.-M. Desjobert, J.-M. Bolla, J. Costa, L. Berti & A. Luciani (2013) Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control*, 30, 354-363.
- Djide, M. N., L. Rahman & N. Hasyim (2014) Antibacterial activity of various extracts from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* growing at samanea saman (jacq.) Merr) trunk. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3, 15-16.
- Doohan, F. 2011. Fungal Pathogens of Plants. In *Fungi*, 313-344. John Wiley & Sons, Ltd.
- Dresch, P., M. N. D'Aguanno, K. Rosam, U. Grienke, J. M. Rollinger & U. Peintner (2015) Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express*, 5, 4.
- Dulger, B. & A. Gonuz (2004) Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J. Plant Sci*, 3, 104-107.
- Durand, A. (1998) La fermentation en milieu solide. *Biofutur*, 1998, 41-43.
- El-Mekkawy, S., M. R. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezuka, M. Hattori, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, T. Kawahata & T. Otake (1998) Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49, 1651-1657.
- Elissetche, J.-P., A. Ferraz, J. Freer & J. Rodríguez (2006) Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 429-434.
- Eriksson, K. E. L., R. A. Blanchette & P. Ander. 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin: Springer-Verlag.
- Fang, Q.-H. & J.-J. Zhong (2002a) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37, 769-774.
- (2002b) Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 61-65.
- Fang, Q. H. & J. J. Zhong (2002c) Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Prog*, 18, 51-4.
- Fang, Z., X. Liu, L. Chen, Y. Shen, X. Zhang, W. Fang, X. Wang, X. Bao & Y. Xiao (2015) Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnol Biofuels*, 8, 54.
- Fatmawati, S., K. Shimizu & R. Kondo (2010) Ganoderic acid Df, a new triterpenoid with aldose reductase inhibitory activity from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Fitoterapia*, 81, 1033-1036.
- (2011) Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*, 18, 1053-1055.
- Feng, L., L. Yuan, M. Du, Y. Chen, M. H. Zhang, J. F. Gu, J. J. He, Y. Wang & W. Cao (2013) Anti-Lung Cancer Activity through Enhancement of Immunomodulation and Induction of Cell Apoptosis of Total Triterpenes Extracted from *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. *Molecules*, 18, 9966-81.
- Ferreira, I. C., J. A. Vaz, M. H. Vasconcelos & A. Martins (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents Med Chem*, 10, 424-36.
- Ferreira, I. C. F. R., S. A. Heleno, F. S. Reis, D. Stojkovic, M. J. R. P. Queiroz, M. H. Vasconcelos & M. Sokovic (2015) Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, 114, 38-55.
- Flood, J., P. Bridge & M. Holderness. 2000. *Ganoderma diseases of perennial crops*. CABI.
- French, D. 1984. CHAPTER VII - ORGANIZATION OF STARCH GRANULES. In *Starch: Chemistry and Technology (Second Edition)*, eds. L. W. Roy, N. B. James, J. N. B. Eugene F. PaschallA2 - Roy L. Whistler & F. P. Eugene, 183-247. San Diego: Academic Press.

Références bibliographiques

- Gao, H., L. Lei, C. Yu, Z. Zhu, N. Chen & S. Wu (2009) Immunomodulatory effects of *Fomes fomentarius* polysaccharides: an experimental study in mice. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 29, 458-461.
- Gao, J.-J., N. Nakamura, B.-S. Min, A. Hirakawa, F. Zuo & M. Hattori (2004) Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52, 688-695.
- Gaudreau, G., A. Ribordy, F.-X. Ribordy, M. Tremblay & A. des mycologues de Sudbury (2005) *Fomes fomentarius*.
- Glen, M., N. L. Bougher, A. A. Francis, S. Q. Nigg, S. S. Lee, R. Irianto, K. M. Barry, C. L. Beadle & C. L. Mohammed (2009) *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australasian Plant Pathology*, 38, 345-356.
- Gogna, E., R. Vohra & P. Sharma (1992) Biodegradation of rose bengal by *Phanerochaete chrysosporium*. *Letters in applied Microbiology*, 14, 58-60.
- Gottlieb, A. M., E. Ferrer & J. E. Wright (2000) rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research*, 104, 1033-1045.
- Gottlieb, A. M., B. O. Saidman & J. E. Wright (1998) Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research*, 102, 415-426.
- Gottlieb, A. M. & J. E. Wright (1999a) Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvigia*. *Mycological Research*, 103, 1289-1298.
- (1999b) Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research*, 103, 661-673.
- Grienke, U., T. Kaserer, F. Pfluger, C. E. Mair, T. Langer, D. Schuster & J. M. Rollinger (2015) Accessing biological actions of *Ganoderma* secondary metabolites by in silico profiling. *Phytochemistry*, 114, 114-124.
- Grienke, U., M. Zöll, U. Peintner & J. M. Rollinger (2014) European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 564-583.
- Hajjaj, H., C. Mace, M. Roberts, P. Niederberger & L. B. Fay (2005) Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3653-8.
- Halpern, G. M. 2007. Reishi. In *Healing Mushrooms*, 55-64. Square One Publishers.
- Han, J., C. An & J. Yuan (2005) Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *Journal of applied microbiology*, 99, 910-915.
- Hanson, J. R. 2008. *Chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry.
- Hassan, M. & M. El-Awady (2011) Isolation and molecular characterization of some *Trichoderma* spp. with high cellulase enzyme activities. *Arab J. Biotech*, 14, 155-166.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk & R. Lücking (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111, 509-547.
- Hibbett, D. S. & R. G. Thorn. 2001. Basidiomycota: Homobasidiomycetes. In *Systematics and Evolution*, eds. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke, 121-168. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hill, R. A. & J. D. Connolly (2013) Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 30, 1028-1065.
- Hong, S. G. & H. S. Jung (2004) Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 96, 742-55.
- Horgan, K. A. & R. A. Murphy. 2011. Pharmaceutical and Chemical Commodities from Fungi. In *Fungi*, 147-178. John Wiley & Sons, Ltd.
- Huie, C. W. & X. Di (2004) Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812, 241-257.

Références bibliographiques

- Inácio, F. D., R. O. Ferreira, C. A. V. de Araujo, T. Brugnari, R. Castoldi, R. M. Peralta & C. G. M. de Souza (2015) Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, 2015, 290161.
- Inouye, S., S. Abe & H. Yamaguchi (2004) Fungal terpenoid antibiotics and enzyme inhibitors. *Handbook of Fungal Biotechnology*, 379.
- Irshad, M., Z. Anwar, M. Gulfraz, H. I. Butt, A. Ejaz & H. Nawaz (2012) Purification and characterization of α -amylase from *Ganoderma tsuaga* growing in waste bread medium. *Afr. J. Biotechnol.*, 11.
- Ishikawa, H., W. J. Schubert & F. F. Nord (1962) On the enzymic degradation of isolated soft-wood lignin by *Fomes fomentarius*. *Life Sciences*, 1, 365-371.
- (1963) Investigations on lignins and lignification: XXVIII. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 100, 140-149.
- Iwatsuki, K., T. Akihisa, H. Tokuda, M. Ukiya, M. Oshikubo, Y. Kimura, T. Asano, A. Nomura & H. Nishino (2003) Lucidenic acids P and Q, methyl lucidenate P, and other triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod*, 66, 1582-5.
- Jarvis, B. (1973) Comparison of an Improved Rose Bengal-Chlortetracycline Agar with Other Media for the Selective Isolation and Enumeration of Moulds and Yeasts in Foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 723-727.
- Jiang, J., B. Grieb, A. Thyagarajan & D. Sliva (2008) Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappa B signaling. *International journal of molecular medicine*, 21, 577.
- Jiang, M. H., L. Zhu & J. G. Jiang (2010) Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 1367-402.
- Jiao, Y., T. Xie, L.-H. Zou, Q. Wei, L. Qiu & L.-X. Chen (2016) Lanostane triterpenoids from *Ganoderma curtisii* and their NO production inhibitory activities of LPS-induced microglia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3556-3561.
- Jo, W. S., H. N. Park, D. H. Cho, Y. B. Yoo & S. C. Park (2011) Detection of Extracellular Enzyme Activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 39, 118-20.
- Judova, J., K. Dubikova, S. Gaperova, J. Gaper & P. Pristas (2012) The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. *Fungal Biology*, 116, 155-160.
- Kamsani, N., M. M. Salleh, A. Yahya & C. S. Chong (2016) Production of Lignocellulolytic Enzymes by Microorganisms Isolated from *Bulbitermes* sp. Termite Gut in Solid-State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 357-371.
- Kang, D., M. Mutakin & J. Levita (2015) Computational Study of Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* with Aspartic Protease Enzymes for Discovering HIV-1 and Plasmeprin Inhibitors. *International Journal of Chemistry*, 7, 62.
- Karaman, M., M. Matavulj & L. Janjic. 2012. Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. In *Antimicrobial Agents*. InTech.
- Karaman, M., N. Mimica-Dukic & M. Matavuly (2009) Lignicolous fungi from northern Serbia as natural sources of antioxidants. *Open Life Sciences*, 4, 387-396.
- Kasana, R. C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt & A. Gulati (2008) A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*, 57, 503-507.
- Keypour, S., H. Riahi, M.-F. Moradali & H. Rafati (2008) Investigation of the Antibacterial Activity of a Chloroform Extract of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae), from Iran. 10, 345-349.
- Khan, J. A. & S. K. Yadav (2011) Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1, 100-108.

Références bibliographiques

- Kim, H. M., S. W. Kim, H. J. Hwang, M. K. Park, Y. Mahmoud, J. W. Choi & J. W. Yun (2006a) Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16, 1240.
- Kim, H. M., S. Paik, K. S. Ra, K. B. Koo, J. W. Yun & J. W. Choi (2006b) Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL*, 44, 233.
- King, A. D., Jr., A. D. Hocking & J. I. Pitt (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol*, 37, 959-64.
- Klitgaard, A., A. Iversen, M. R. Andersen, T. O. Larsen, J. C. Frisvad & K. F. Nielsen (2014) Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 1933-1943.
- Ko, H.-H., C.-F. Hung, J.-P. Wang & C.-N. Lin (2008) Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69, 234-239.
- Kobakhidze, A., M. Asatiani, E. Kachlishvili & V. Elisashvili (2016) Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Science*, 14, 169-176.
- Kolundžić, M., N. Đ. Grozdanić, M. Dodevska, M. Milenković, F. Sisto, A. Miani, G. Farronato & T. Kundaković (2016) Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae. *Industrial Crops and Products*, 79, 110-115.
- Korcan, S. E., İ. H. Ciğerci & M. Konuk. 2013. White-Rot Fungi in Bioremediation. In *Fungi as Bioremediators*, eds. M. E. Goltapeh, R. Y. Danesh & A. Varma, 371-390. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Krimi, Z. & S. Mehdid (2001) Identification of wood-decay fungi infecting various forest trees. *EPPO Bulletin*, 31, 114-115.
- Krishna, C. (2005) Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 1-30.
- Kudryavtseva, O. A., Y. E. Dunaevsky, O. V. Kamzolkina & M. A. Belozersky (2008) Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes. *Microbiology*, 77, 643-653.
- Lacerda, L. G., M. A. Silva Carvalho Filho, I. M. Demiate, G. Bannach, M. Ionashiro & E. Schnitzler (2008) Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal α -amylase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93, 445-449.
- Lachapelle, J. (2004) Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, 4, 35-71.
- Łebkowska, M. & M. Załęska-Radziwiłł (2014) Application of white-rot fungi for biodegradation of refractory organic compounds—a review. *Desalination and Water Treatment*, 52, 3708-3713.
- Li, C.-H., P.-Y. Chen, U.-M. Chang, L.-S. Kan, W.-H. Fang, K.-S. Tsai & S.-B. Lin (2005) Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sciences*, 77, 252-265.
- Li, C., Y. Li & H. H. Sun (2006) New ganoderic acids, bioactive triterpenoid metabolites from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Prod Res*, 20, 985-91.
- Li, W., L.-L. Lou, J.-Y. Zhu, J.-S. Zhang, A.-A. Liang, J.-M. Bao, G.-H. Tang & S. Yin (2016) New lanostane-type triterpenoids from the fruiting body of *Ganoderma hainanense*. *Fitoterapia*, 115, 24-30.
- Liang, C.-X., Y.-B. Li, J.-W. Xu, J.-L. Wang, X.-L. Miao, Y.-J. Tang, T. Gu & J.-J. Zhong (2010) Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1367-1374.
- Lin, K.-W., D. Maitraie, A. M. Huang, J.-P. Wang & C.-N. Lin (2016) Triterpenoids and an alkamide from *Ganoderma tsugae*. *Fitoterapia*, 108, 73-80.
- Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer & W.-D. Jülich (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 285-299.

Références bibliographiques

- Liu, G.-Q., X.-L. Wang, W.-J. Han & Q.-L. Lin (2012a) Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acid Me by the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *Molecules*, 17, 12575-12586.
- Liu, G., Q. Li, N. Shang, J.-W. Huang, T.-P. Ko, W. Liu, Y. Zheng, X. Han, Y. Chen, C.-C. Chen, J. Jin & R.-T. Guo (2016) Functional and structural analyses of a 1,4- β -endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 67-74.
- Liu, J., K. Kurashiki, A. Fukuta, S. Kaneko, Y. Suimi, K. Shimizu & R. Kondo (2012b) Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of *Ganoderma lucidum* with different growth stages using high-performance liquid chromatography for evaluation of their 5 α -reductase inhibitory properties. *Food Chemistry*, 133, 1034-1038.
- Liu, J., K. Shimizu, F. Konishi, S. Kumamoto & R. Kondo (2007) The anti-androgen effect of ganoderol B isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 4966-4972.
- Liu, J., J. Shiono, K. Shimizu, A. Kukita, T. Kukita & R. Kondo (2009) Ganoderic acid DM: Anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 2154-2157.
- Liu, L.-Y., H. Chen, C. Liu, H.-Q. Wang, J. Kang, Y. Li & R.-Y. Chen (2014) Triterpenoids of *Ganoderma theaeacolum* and their hepatoprotective activities. *Fitoterapia*, 98, 254-259.
- Liu, Y., Y. Liu, F. Qiu & X. Di (2011) Sensitive and selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* and its related species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 717-721.
- Lutzoni, F., F. Kauff, C. J. Cox, D. McLaughlin, G. Celio, B. Dentinger, M. Padamsee, D. Hibbett, T. Y. James, E. Baloch, M. Grube, V. Reeb, V. Hofstetter, C. Schoch, A. E. Arnold, J. Miadlikowska, J. Spatafora, D. Johnson, S. Hambleton, M. Crockett, R. Shoemaker, G. H. Sung, R. Lucking, T. Lumbsch, K. O'Donnell, M. Binder, P. Diederich, D. Ertz, C. Gueidan, K. Hansen, R. C. Harris, K. Hosaka, Y. W. Lim, B. Matheny, H. Nishida, D. Pfister, J. Rogers, A. Rossman, I. Schmitt, H. Sipman, J. Stone, J. Sugiyama, R. Yahr & R. Vilgalys (2004) Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am J Bot*, 91, 1446-80.
- Luu, B. & G. Ourisson (1989) Stérols et triterpènes polyoxygénés: une famille de produits à large spectre d'activités biologiques. *Médecine/Sciences*, 6, 403-407.
- Maire, R. 1914. *La flore mycologique des forêts de cèdres de l'atlas*. Société mycologique de France.
- Manavalan, T., A. Manavalan, K. P. Thangavelu & K. Heese (2015) Characterization of a novel endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Basic Microbiology*, 55, 761-771.
- McCormick, M. A., L. F. Grand, J. B. Post & M. A. Cubeta (2013) Phylogenetic and phenotypic characterization of *Fomes fasciatus* and *Fomes fomentarius* in the United States. *Mycologia*.
- Menet, M.-C. (2011) Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011, 41-53.
- Moncalvo, J.-M., H.-H. Wang & R.-S. Hseu (1995a) Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 223-238.
- Moncalvo, J.-M., H.-F. Wang & R.-S. Hseu (1995b) Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research*, 99, 1489-1499.
- Moncalvo, J. (2000) Systematics of *Ganoderma* 2. *Ganoderma diseases of perennial crops. USA: CBAI Publishing*, 23.
- Money, N. P. 2016. Chapter 1 - Fungal Diversity. In *The Fungi (Third Edition)*, 1-36. Boston: Academic Press.
- Moore, D. (1991) Perception and response to gravity in higher fungi—a critical appraisal. *New Phytologist*, 117, 3-23.
- Moore, D., A. C. Gange, E. G. Gange & L. Boddy. 2008. Chapter 5 Fruit bodies: Their production and development in relation to environment. In *British Mycological Society Symposia Series*, eds. J. C. F. Lynne Boddy & W. Pieter van, 79-103. Academic Press.

Références bibliographiques

- Moradali, M.-F., H. Mostafavi, S. Ghods & G.-A. Hedjaroude (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7, 701-724.
- Mothana, R. A., N. A. Awadh Ali, R. Jansen, U. Wegner, R. Mentel & U. Lindequist (2003) Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia*, 74, 177-80.
- Mukhin, V. A. & A. A. Votintseva (2002) Basidiospore germination and conidial stages in the life cycles of *Fomes fomentarius* and *Fomitopsis pinicola* (Fungi, Polyporales). *Polish Botanical Journal*, 47, 265-272.
- Murugesan, K., I.-H. Nam, Y.-M. Kim & Y.-S. Chang (2007) Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1662-1672.
- Nagai, T., K. Tomioka, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada & T. Sato (2005) Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the maff genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 39, 19-27.
- Nakasone, K. K., S. W. Peterson & S.-C. Jong (2004) Preservation and distribution of fungal cultures.
- Neifar, M., A. Jaouani, A. Ayari, O. Abid, H. B. Salem, A. Boudabous, T. Najjar & R. E. Ghorbel (2013) Improving the nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*. *Chemosphere*, 91, 110-114.
- Neifar, M., A. Jaouani, R. Ellouze-Ghorbel & S. Ellouze-Chaabouni (2010) Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 68-74.
- Neifar, M., A. Jaouani, R. Ellouze-Ghorbel, S. Ellouze-Chaabouni & M. J. Penninckx (2009) Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. *Lett Appl Microbiol*, 49, 73-8.
- Neifar, M., A. Kamoun, A. Jaouani, R. Ellouze-Ghorbel & S. Ellouze-Chaabouni (2011) Application of Asymmetrical and Hoke Designs for Optimization of Laccase Production by the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* in Solid-State Fermentation. *Enzyme Res*, 2011, 368525.
- Ng, T. (2003) Bioactive fungal polysaccharides and polysaccharopeptides. *Handbook of Fungal Biotechnology*, 331.
- (2004) Antitumor and immunomodulatory compounds from fungi. *Handbook of Fungal Biotechnology*, 469-477.
- Nishitoba, T., S. Goto, H. Sato & S. Sakamura (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28, 193-197.
- Niu, X.-M., S.-H. Li, W.-L. Xiao, H.-D. Sun & C.-T. Che (2007) Two new lanostanoids from *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Asian natural products research*, 9, 659-664.
- Noll, L., S. Leonhardt, T. Arnstadt, B. Hoppe, C. Poll, E. Matzner, M. Hofrichter & H. Kellner (2016) Fungal biomass and extracellular enzyme activities in coarse woody debris of 13 tree species in the early phase of decomposition. *Forest Ecology and Management*, 378, 181-192.
- Okafor, U., V. Okochi, S. N. Chinedu, O. Ebuehi & B. Onyeme-Okerenta (2010) Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-wastes. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2729-2734.
- Oleszek, W., I. Kapusta & A. Stochmal (2008) TLC of triterpenes (including saponins). *CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES*, 99, 519.
- Ottow, J. C. (1972) Rose bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. *Mycologia*, 64, 304-15.
- Ottow, J. C. & H. Glathe (1968) Rose bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*, 16, 170-1.
- Paduch, R., M. Kandefers-Szerszeń, M. Trytek & J. Fiedurek (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55, 315-327.
- Papinutti, L. (2010) Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresour Technol*, 101, 1941-6.

Références bibliographiques

- Papp, N., K. Rudolf, T. Bencsik & D. Czégényi (2017) Ethnomycological use of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. in Transylvania, Romania. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64, 101-111.
- Patel, S. & A. Goyal (2012) Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2, 1-15.
- Paterson, R. R. M. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67, 1985-2001.
- Paterson, R. R. M. & P. D. Bridge. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. Wallingford. UK: CAB International.
- Patouillard, N. 1897. *Catalogue raisonné des plantes cellulaires de la Tunisie*. Imprimerie nationale.
- Peintner, U., R. Pöder & T. Pümpel (1998) The iceman's fungi. *Mycological Research*, 102, 1153-1162.
- Peng, X.-R., J.-Q. Liu, Z.-H. Han, X.-X. Yuan, H.-R. Luo & M.-H. Qiu (2013) Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chemistry*, 141, 920-926.
- Pinto, P. A., A. A. Dias, I. Fraga, G. Marques, M. A. M. Rodrigues, J. Colaço, A. Sampaio & R. M. F. Bezerra (2012) Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. *Bioresource Technology*, 111, 261-267.
- Pointing, S. B. (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2, 17-33.
- Pointing, S. B., J. A. Buswell, E. B. G. Jones & L. L. P. Vrijmoed (1999) Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. *Mycological Research*, 103, 696-700.
- Pointing, S. B., L. L. P. Vrijmoed & E. B. G. Jones. 1998. A Qualitative Assessment of Lignocellulose Degrading Enzyme Activity in Marine Fungi. In *Botanica Marina*, 293.
- Pristas, P., S. Gaperova, J. Gaper & J. Judova (2013) Genetic variability in *Fomes fomentarius* reconfirmed by translation elongation factor 1- α DNA sequences and 25S LSU rRNA sequences. *Biologia*, 68, 816-820.
- Quereshi, S., A. Pandey & S. Sandhu (2010) Evaluation of antibacterial activity of different *ganoderma lucidum* extracts.
- Ren, A., X. Ouyang, L. Shi, A.-L. Jiang, D.-S. Mu, M.-J. Li, Q. Han & M.-W. Zhao (2013) Molecular characterization and expression analysis of GHMGS, a gene encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase from *Ganoderma lucidum* (Ling-zhi) in ganoderic acid biosynthesis pathway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 523-531.
- Ren, A., L. Qin, L. Shi, X. Dong, D. S. Mu, Y. X. Li & M. W. Zhao (2010) Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 101, 6785-6790.
- Revankar, M. S., K. M. Desai & S. S. Lele (2007) Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. *Appl Biochem Biotechnol*, 143, 16-26.
- Richter, C., K. Wittstein, P. M. Kirk & M. Stadler (2015) An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity*, 71, 1-15.
- Ro, I. H. (1984) Studies on protease activity of *Fomes fermentarius* (Fr.) Kicky. *Theses Collect Sookmyoung Univ Sci*. 25: 475-478.
- Roberts, L. M. (2004) Australian *Ganoderma*: Identification, growth and antibacterial properties. *School of Engineering and Science, Swinburne University of Technology*.
- Robledo, A., C. N. Aguilar, R. E. Belmares-Cerda, A. C. Flores-Gallegos, J. C. Contreras-Esquivel, J. C. Montañez & S. I. Mussatto (2016) Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. *CyTA - Journal of Food*, 14, 302-308.
- Rodrigues, M., P. Pinto, R. Bezerra, A. Dias, C. Guedes, V. Cardoso, J. Cone, L. Ferreira, J. Colaco & C. Sequeira (2008) Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 326-338.

Références bibliographiques

- Rösecke, J. & W. A. König (2000) Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, 54, 603-610.
- Roussel, B., S. Rapior, C. Charlot, C.-L. Masson & P. Boutié (2002a) Histoire des utilisations thérapeutiques de l'amadouvier [*Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr.]. *Revue d'histoire de la pharmacie*, 90, 599-614.
- Roussel, B., S. Rapior, C.-L. Masson & P. Boutie (2002b) *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr.: un champignon aux multiples usages. *Cryptogamie. Mycologie*, 23, 349-366.
- Roy, S., M. A. A. Jahan, K. K. Das, S. K. Munshi & R. Noor (2015) Artificial Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Reishi Medicinal Mushroom) Using Different Sawdusts as Substrates. *American Journal of BioScience*, 3, 178-182.
- Rytioja, J., K. Hildén, J. Yuzon, A. Hatakka, R. P. de Vries & M. R. Mäkelä (2014) Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 78, 614-649.
- Ryvarden, L. (2000) Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, 180-191.
- Sabotič, J., T. Trček, T. Popovič & J. Brzin (2007) Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128, 297-307.
- Saltarelli, R., P. Ceccaroli, M. Iotti, A. Zambonelli, M. Buffalini, L. Casadei, L. Vallorani & V. Stocchi (2009) Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry*, 116, 143-151.
- Sanodiya, B. S., G. S. Thakur, R. K. Baghel, G. B. Prasad & P. S. Bisen (2009) *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol*, 10, 717-42.
- Schmidt, O. 2006. *Wood and tree fungi*. Springer.
- Schwarze, F. (1994) Wood rotting fungi: *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr.: Hoof or tinder fungus. *Mycologist*, 8, 32-34.
- Schwarze, F. & D. Ferner (2003) *Ganoderma* on trees—differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal*, 27, 59-77.
- Schwarze, F. W., J. Engels & C. Mattheck. 2013. *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer Science & Business Media.
- Schwarze, F. W. M. R. (2007) Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, 21, 133-170.
- Seo, G. & P. Kirk. 2000. *Ganodermataceae: nomenclature and classification*. In *Ganoderma diseases of perennial crops*, eds. J. Flood, P. Bridge & M. Holderness, 3-22. CABI Publishing.
- Seo, H., T. Hung, M. Na, H. Jung, J. Kim, J. Choi, J. Kim, H.-K. Lee, I. Lee, K. Bae, M. Hattori & B. Min (2009) Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32, 1573-1579.
- Shahzadi, T., Z. Anwar, Z. Iqbal, A. Anjum, T. Aqil, A. Afzal, M. Kamran, S. Mehmood & M. Irshad (2014) Induced Production of Exoglucanase, and [Beta]-Glucosidase from Fungal Co-Culture of *T. viride* and *G. lucidum*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 426.
- Sherma, J. & B. Fried. 2003. *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.
- Shi, L., L. Qin, Y. Xu, A. Ren, X. Fang, D. Mu, Q. Tan & M. Zhao (2012) Molecular cloning, characterization, and function analysis of a mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene from *Ganoderma lucidum*. *Mol Biol Rep*, 39, 6149-59.
- Shi, L., A. Ren, D. Mu & M. Zhao (2010) Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 1243-1251.
- Sieber, T. N. (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21, 75-89.
- Singh, J., S. Gupta, S. Malviya & B. Ahrwar (2014) In-vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Advanced Research*, 2, 460-466.

Références bibliographiques

- Singh, S., D. Dutt & C. Tyagi (2013) Screening of xylanases from indigenously isolated white rot fungal strains for possible application in pulp biobleaching. *Open Access Sci. Rep.*, 2, 262.
- Smania, E. d. F. A., F. Delle Monache, R. A. Yunes, R. Paulert & A. Smania Junior (2007) Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 14-16.
- Smania, E. F. A., F. Delle Monache, A. Smania Jr, R. A. Yunes & R. S. Cuneo (2003) Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, 74, 375-377.
- Smania, J., Artur, F. D. Monache, E. d. F. A. Smania & R. S. Cuneo (1999) Antibacterial Activity of Steroidal Compounds Isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) Fruit Body. 1, 325-330.
- Smith, B. J. & K. Sivasithamparam (2000) Isozymes of *Ganoderma* species from Australia. *Mycological Research*, 104, 952-961.
- Stamets, P. E. 2014. Antiviral and antibacterial activity from medicinal mushrooms. Google Patents.
- Su, C.-H., Y.-Z. Yang, H.-O. Ho, C.-H. Hu & M.-T. Sheu (2001) High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *Journal of chromatographic science*, 39, 93-100.
- Tan, W.-C., U. R. Kuppasamy, C.-W. Phan, Y.-S. Tan, J. Raman, A. M. Anuar & V. Sabaratnam (2015) *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki revisited: Domestication study and antioxidant properties of its basidiocarps and mycelia. *Scientific reports*, 5.
- Tang, W., T. Gu & J.-J. Zhong (2006) Separation of targeted ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* by reversed phase liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometry detections. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 205-210.
- Tang, Y.-J. & J.-J. Zhong (2002) Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 20-28.
- (2003) Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 478-484.
- Tang, Y. J. & L. W. Zhu (2010) Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu²⁺. *Biotechnology progress*, 26, 417-423.
- Tang, Y. J., L. W. Zhu, H. M. Li & D. S. Li (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors - Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 221-229.
- Tawil, G., A. Viksø-Nielsen, A. Rolland-Sabaté, P. Colonna & A. Buléon (2012) Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 87, 46-52.
- Teeri, T. T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15, 160-167.
- Tekere, M., A. Mswaka, R. Zvauya & J. Read (2001) Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 420-426.
- Tester, R. F., J. Karkalas & X. Qi (2004) Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.
- Ting, W., S. Yuan, S. Wu & B. Chang (2011) Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 238-242.
- Turnidge, J. (1999) Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents*, 12 Suppl 2, S23-34.
- Upadhyay, M., B. Shrivastava, A. Jain, M. Kidwai, S. Kumar, J. Gomes, D. G. Goswami, A. K. Panda & R. C. Kuhad (2014) Production of ganoderic acid by *Ganoderma lucidum* RCKB-2010 and its therapeutic potential. *Annals of Microbiology*, 64, 839-846.
- Venables, C. & S. Watkinson (1989) Production and localization of proteinases in colonies of timber-decaying basidiomycete fungi. *Microbiology*, 135, 1369-1374.

Références bibliographiques

- Větrovský, T., P. Baldrian & J. Gabriel (2013) Extracellular enzymes of the white-rot fungus *Fomes fomentarius* and purification of 1,4-beta-glucosidase. *Appl Biochem Biotechnol*, 169, 100-9.
- Větrovský, T., J. Voříšková, J. Šnajdr, J. Gabriel & P. Baldrian (2011) Ecology of coarse wood decomposition by the saprotrophic fungus *Fomes fomentarius*. *Biodegradation*, 22, 709-718.
- Wachtel-Galor, S. & I. F. F. Benzie. 2011. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, eds. nd, I. F. F. Benzie & S. Wachtel-Galor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Llc.
- Wachtel-Galor, S., B. Tomlinson & I. F. Benzie (2004) *Ganoderma lucidum* ("Lingzhi"), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *Br J Nutr*, 91, 263-9.
- Wachtel-Galor, S., J. Yuen, J. A. Buswell & I. F. Benzie (2011) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi).
- Wada, T., A. Nakashima, A. Okubo, Y. Ohmura & C. Yoshikumi. 1984. Method of cultivating *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Google Patents.
- Wagner, R., D. A. Mitchell, G. Lanzi Sasaki, M. A. Lopes de Almeida Amazonas & M. Berovič (2003) Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food technology and biotechnology*, 41, 371-382.
- Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sasaki & M. A. L. d. A. Amazonas (2004) Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology*, 114, 153-164.
- Walker, G. M. & N. A. White. 2005. *Introduction to fungal physiology*. Wiley.
- Wang, C.-L., C.-C. Pi, C.-W. Kuo, Y.-J. Zhuang, K.-H. Khoo, W.-H. Liu & C.-J. Chen (2011) Polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage activation and protect mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Biotechnology letters*, 33, 2271.
- Wang, F. & J.-K. Liu (2008) Highly oxygenated lanostane triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 1035-1037.
- Wang, H. X. & T. B. Ng (2006) A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 508-513.
- Wang, T., Z.-p. Xie, Z.-s. Huang, H. Li, A.-y. Wei, J.-m. Di, H.-j. Xiao, Z.-g. Zhang, L.-h. Cai, X. Tao, T. Qi, D.-l. Chen & J. Chen (2015) Total triterpenoids from *Ganoderma Lucidum* suppresses prostate cancer cell growth by inducing growth arrest and apoptosis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 35, 736-741.
- Wang, X.-M., S.-H. Guan, R.-X. Liu, J.-H. Sun, Y. Liang, M. Yang, W. Wang, K.-S. Bi & D.-A. Guo (2007) HPLC determination of four triterpenoids in rat urine after oral administration of total triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1185-1190.
- Wang, X.-M., M. Yang, S.-H. Guan, R.-X. Liu, J.-M. Xia, K.-S. Bi & D.-A. Guo (2006) Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 838-844.
- Wasser, S. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60, 258-274.
- Wasser, S. P. (2005) Reishi or Ling zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 1, 603-622.
- Webster, J. & R. W. S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
- Welti, S. 2009. Recherches de substances antitumorales à partir de ganodermes et autres polypores récoltés dans les îles françaises des petites Antilles et contribution à l'inventaire des *Ganodermataceae* de Martinique, Guadeloupe et dépendances. Université du Droit et de la Santé-Lille II.
- Wu, G. S., J. J. Guo, J. L. Bao, X. W. Li, X. P. Chen, J. J. Lu & Y. T. Wang (2013) Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* - a review. *Expert Opin Investig Drugs*, 22, 981-92.

Références bibliographiques

- Xu, J.-W., Y.-N. Xu & J.-J. Zhong (2010) Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 941-948.
- Xu, P., Z.-Y. Ding, Z. Qian, C.-X. Zhao & K.-C. Zhang (2008) Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 325-331.
- Xu, X., H. Yan, J. Chen & X. Zhang (2011) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29, 667-674.
- Xu, Y. N., X. X. Xia & J. J. Zhong (2013) Induced effect of Na⁺ on ganoderic acid biosynthesis in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* via calcineurin signal transduction. *Biotechnology and bioengineering*, 110, 1913-1923.
- Yang, Z. L. & B. Feng (2013) What is the Chinese “Lingzhi”?—a taxonomic mini-review. *Mycology*, 4, 1-4.
- Zabel, R. A. & J. J. Morrell. 2012. *Wood microbiology: decay and its prevention*. Academic press.
- Zang, Y., J. Xiong, W.-Z. Zhai, L. Cao, S.-P. Zhang, Y. Tang, J. Wang, J.-J. Su, G.-X. Yang, Y. Zhao, H. Fan, G. Xia, C.-G. Wang & J.-F. Hu (2013) Fomentarols A–D, sterols from the polypore macrofungus *Fomes fomentarius*. *Phytochemistry*, 92, 137-145.
- Zhang, J.-J., Y. Li, T. Zhou, D.-P. Xu, P. Zhang, S. Li & H.-B. Li (2016) Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. *Molecules*, 21, 938.
- Zhang, J., J.-J. Zhong & A. Geng (2014) Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry*, 49, 1580-1586.
- Zhang, W. X., Y. J. Tang & J. J. Zhong (2010) Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 33, 683-90.
- Zhong, J.-J. & Y.-J. Tang. 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. In *Biomanufacturing*, 25-59. Springer.
- Zhong, J.-J. & J.-H. Xiao. 2009. Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction. In *Biotechnology in China I*, eds. J.-J. Zhong, F.-W. Bai & W. Zhang, 79-150. Springer Berlin Heidelberg.
- Zhou, L.-W., Y. Cao, S.-H. Wu, J. Vlasák, D.-W. Li, M.-J. Li & Y.-C. Dai (2015) Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry*, 114, 7-15.
- Zhou, X.-W., K.-Q. Su & Y.-M. Zhang (2012) Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 941-963.
- Zhou, X., J. Lin, Y. Yin, J. Zhao, X. Sun & K. Tang (2007) *Ganodermataceae*: natural products and their related pharmacological functions. *Am J Chin Med*, 35, 559-74.
- Zhou, Y., X. Yang & Q. Yang (2006) Recent advances on triterpenes from *Ganoderma* mushroom. *Food reviews international*, 22, 259-273.
- Zhu, L.-W., J.-J. Zhong & Y.-J. Tang (2010) Multi-fed batch culture integrated with three-stage light irradiation and multiple additions of copper ions for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 45, 1904-1911.
- Ziegenbein, F. C., H.-P. Hanssen & W. A. König (2006) Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. *Phytochemistry*, 67, 202-211.
- Zjawiony, J. K. (2004) Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *J Nat Prod*, 67, 300-10.



Annexes

1. Milieux de culture (composition pour 1 l)

1.1. Le bouillon aux pommes de terre (*Potato Dextrose Broth ; PDB*)

D'après Botton *et al.* (1990) ;

- Pomme de terre 200 g ;
- Glucose 20 g ;
 - Bouillir la pomme de terre dans de l'eau distillée pendant 15-20 min,
 - Après filtration, compléter le volume du filtrat à 1 litre,
 - Ajouter le glucose, agiter puis stériliser à 121°C pendant 15 min.

1.2. La gélose aux pommes de terre (*Potato Dextrose Agar ; PDA*)

D'après Botton *et al.* (1990) ;

- Pomme de terre 200 g ;
- Glucose 20 g ;
- Agar 15 g ;
 - Bouillir la pomme de terre dans de l'eau distillée pendant 15-20 min.
 - Après filtration, compléter le volume du filtrat à 1 litre,
 - Ajouter le glucose et l'agar, agiter puis stériliser à 121°C pendant 15 min.

1.3. La gélose à l'extrait de malt (*Malt Extract Agar ; MEA*)

D'après Botton *et al.* (1990) ;

- Extrait de malt 20 g ;
- Glucose 20 g ;
- Peptone 1 g ;
- Agar 15 g.

1.4. Le milieu au rose Bengale et chloramphénicol (*Rose Bengal Chloramphenicol Agar ;*

RBCA) D'après Corry *et al.* (2003) ;

- Peptone 5 g ;
- Glucose 10 g ;
- K₂HPO₄ 1 g ;
- MgSO₄.7H₂O 0.5 g ;
- Rose Bengale 0.05 g ;
- Chloramphénicol 0.1 g.
- Agar 15 g.

1.5. Le milieu Czapek-Dox

D'après Atlas (2010) ;

- Na NO₃ 3 g ;
- K₂ HPO₄ 1 g ;
- Mg SO₄.H₂O 0,5 g ;
- KCl 0,5 g ;
- Sucrose 30 g ;
- Fe SO₄ 0,01 g ;
- Agar 15 g.

1.6. Le milieu LB (*Lysogeny broth* ou *Luria-Bertani Broth*)

D'après Atlas (2010) ;

- Tryptone 10 g ;
- Extrait de levure 5 g ;
- NaCl 10 g ;
- Agar 15 g (pour le milieu LB solidifié).

Le pH ajusté à 7.0

2. Produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés lors de la réalisation des travaux de thèse sont de qualité « réactif analytique » (AR) voir mieux, l'agar est de Fluka®, le chloroforme R.P. Normapur® (AR) (Prolabo®, Fontenay-sous-Bois, France), acide formique (AR) de Merck® (Darmstadt, Germany). L'acétonitrile et le méthanol absolu sont de qualité LC-MS de Biosolve® (Valkenswaard, The Netherlands). L'eau pure est préparée avec le système de purification d'eau Milli-Q integral®.

3. Tableau : Profils de résistance des souches bactériennes testées et leurs sources (Bouguenou *et al.*, 2016)

Type de prélèvement		Les antibiotiques																													
		Oxacilline (OX)	Acide fusidique (FC)	Kanamycine (K)	Benzylpénicilline	Lincomycine (L)	Ofloxacin (OFX)	Tobramycine (TM)	Ceftazidime (CAZ)	Vancomycine (VA)	Pristinamycine (PT)	Tétracycline (TE)	Colistine (CT)	Rifampicine (RIF)	Fosfomycine (FOS)	Ciproflaxacine (CIP)	Gentamicine (GEN)	Amikacine (AK)	Triméthoprime+ Sulfaméthoxazol (SXT)	Erythromycine (ER)	Imipénème (IMP)	Céftriaxone (CRO)	Céfotaxime (CTX)	Azteonam (ATM)	Céfoxitine (FOX)	Ticarciline+ acide clavulanique (TTC)	Amoxicilline + acide clavulanique (AMC)	Amoxicilline (AMX)	Ticarciline (TIC)		
<i>S. aureus 1</i>	Pus	R	S	R	R	S	S		S	S	S								S	I											
<i>S. aureus 2</i>	Pus	R	S	R	R	S	S		S	S	R								S	I											
<i>A. baumannii</i>	Pus											S		S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	Pus											S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	ECBU																			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	ECBU																			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

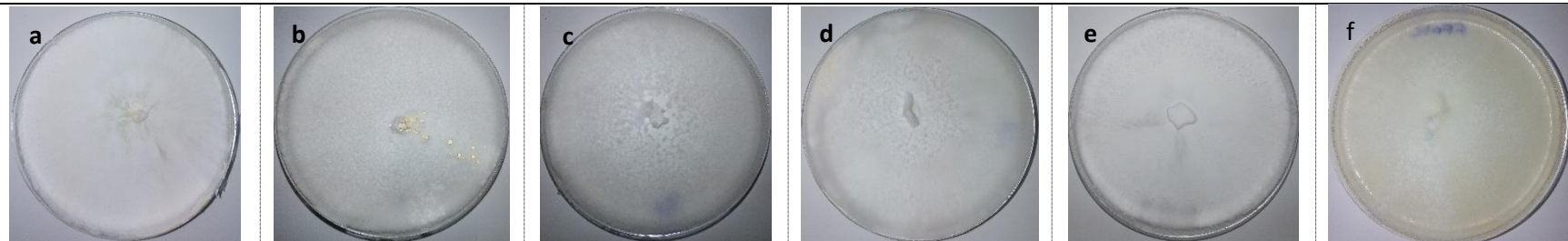
R= Résistant S= sensible I= intermédiaire

4. Tableau. Composés obtenus et leurs rapports frontaux après CCM avec l'éluant Q2

Cp	Rf	Gr1	Gr2	Gr3	Gr4	Gr5	Gr6	Gr7	Gr8	Gr9	10	11	12	13	14	15
1	0,041	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
2	0,047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,071	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
4	0,106	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
9	0,176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
12	0,212	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
13	0,218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,253	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
16	0,259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
18	0,312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,335	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
20	0,359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	0,365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0,382	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	0,406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	0,418	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	0,441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	0,459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	0,465	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
29	0,494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	0,512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	0,524	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
32	0,535	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)
33	0,547	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
34	0,559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
35	0,571	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
36	0,588	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
37	0,606	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)
38	0,618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	0,635	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
40	0,665	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)
41	0,676	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
42	0,694	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
43	0,706	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	0,729	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	0,747	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
48	0,788	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-
49	0,800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	0,824	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	0,853	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
52	0,912	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
53	0,947	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-

Tableau. 4. (suite)

C	Rf	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	0,041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,047	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,071	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
5	0,118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,141	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
7	0,147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
11	0,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0,218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0,259	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
17	0,276	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0,312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,335	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,359	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
21	0,365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0,382	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
23	0,406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	0,418	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
25	0,441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	0,453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	0,459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	0,465	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
29	0,494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
30	0,512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)
31	0,524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	0,535	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
33	0,547	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
34	0,559	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	0,571	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	0,588	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	0,606	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)
38	0,618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	0,635	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
40	0,665	-	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
41	0,676	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	0,694	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	0,706	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	0,729	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
45	0,747	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
48	0,788	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	0,800	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	0,824	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-
51	0,853	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
52	0,912	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
53	0,947	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)



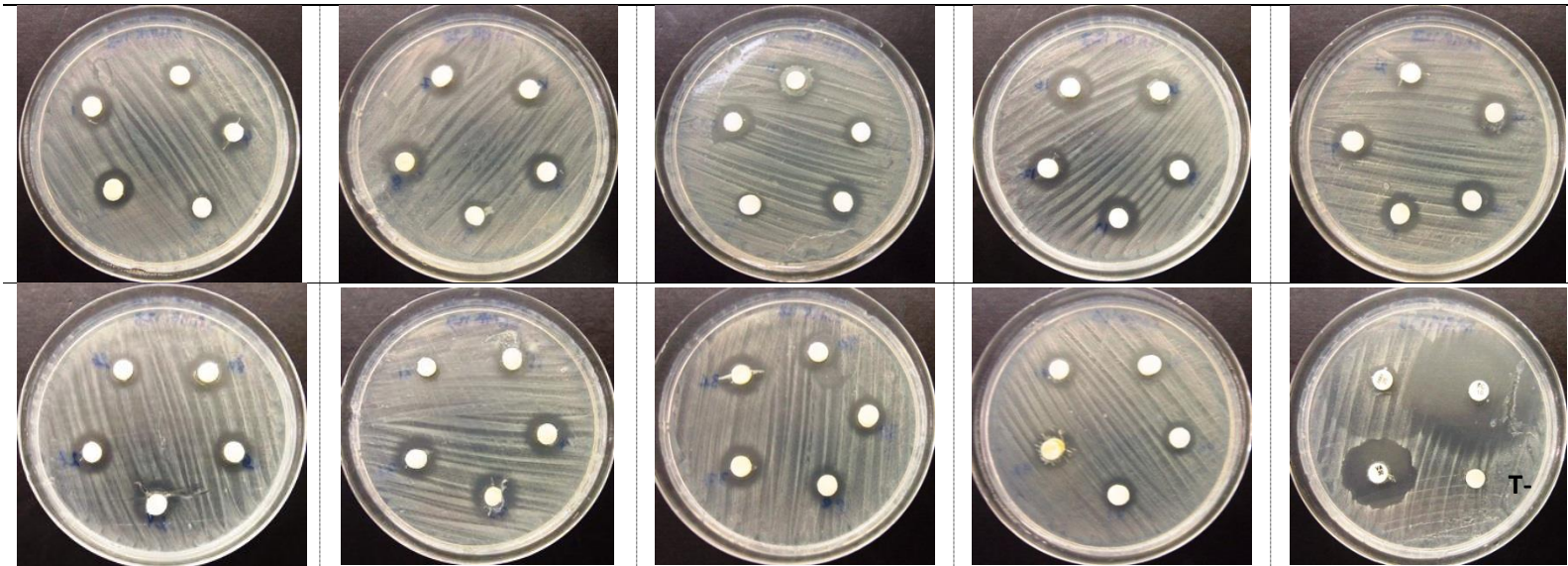
1) Exemples des aspects cultureux des isolats fongiques en boîtes de Pétri



2) Exemples de croissance sur géloses inclinées

- 1) Figs. (1a, 1b, 1c, 1d et 1e); *G. resinaceum*. Fig. 1f; *F. fomentarius*
2) Figs. (2a, 2b, 2c, 2d et 2e); *G. resinaceum*. Fig. 2f; *F. fomentarius*

Figures A : Aspects cultureux des isolats de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* sur le milieu PDA en boîtes et en tubes.

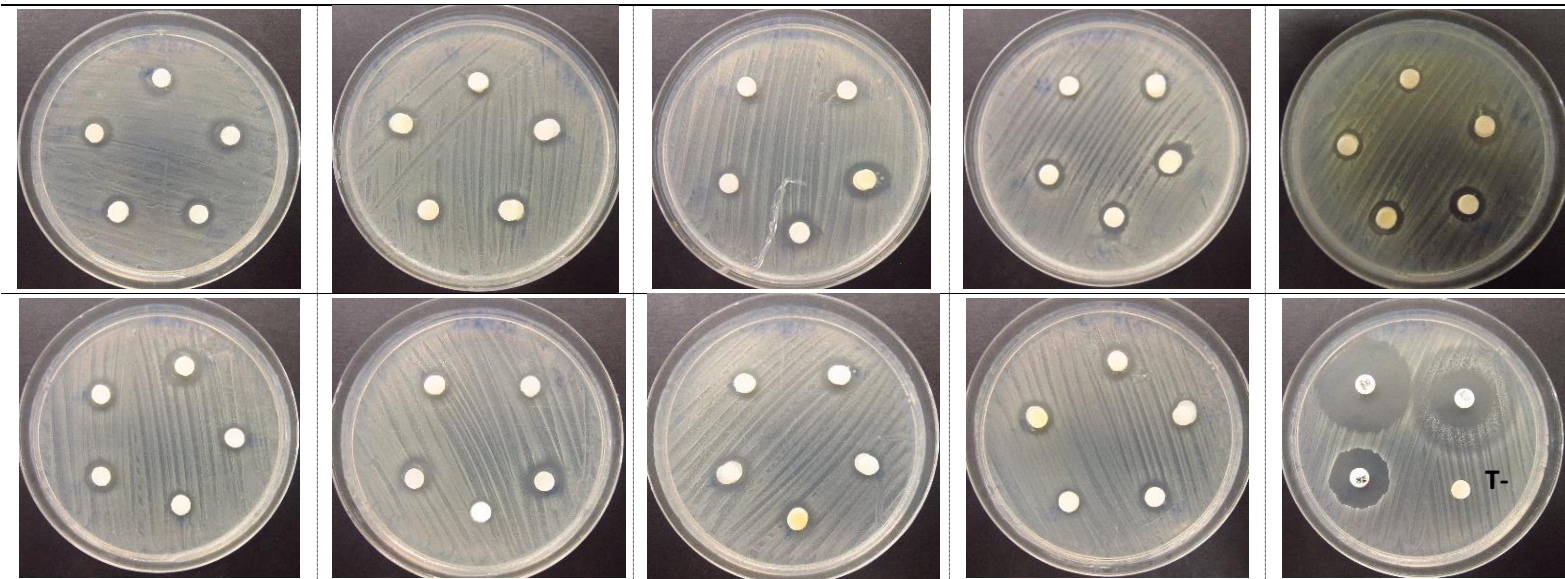


1) Résultats de test du pouvoir antibactérien vis-à-vis SARM 1

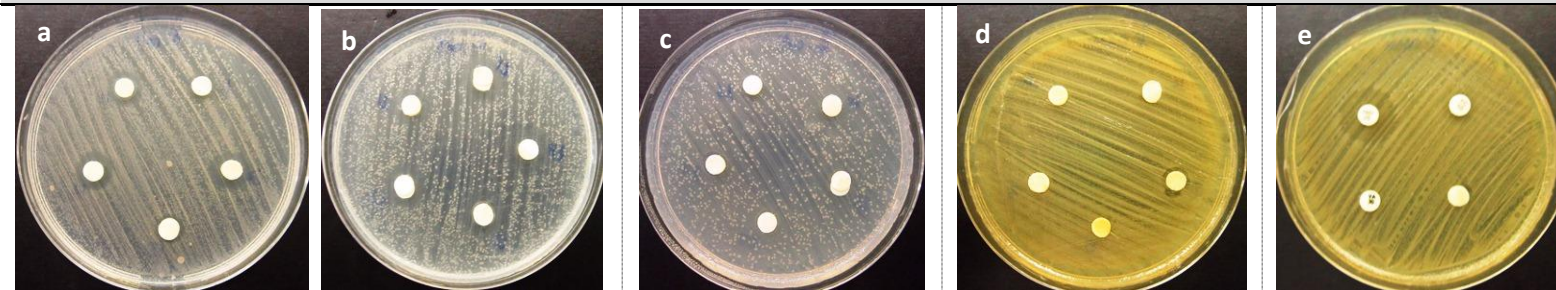


2) Résultats de test du pouvoir antibactérien vis-à-vis *A. baumannii*

Figures B : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activité antibactérienne des extraits chloroformiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* vis-à-vis des bactéries pathogènes.

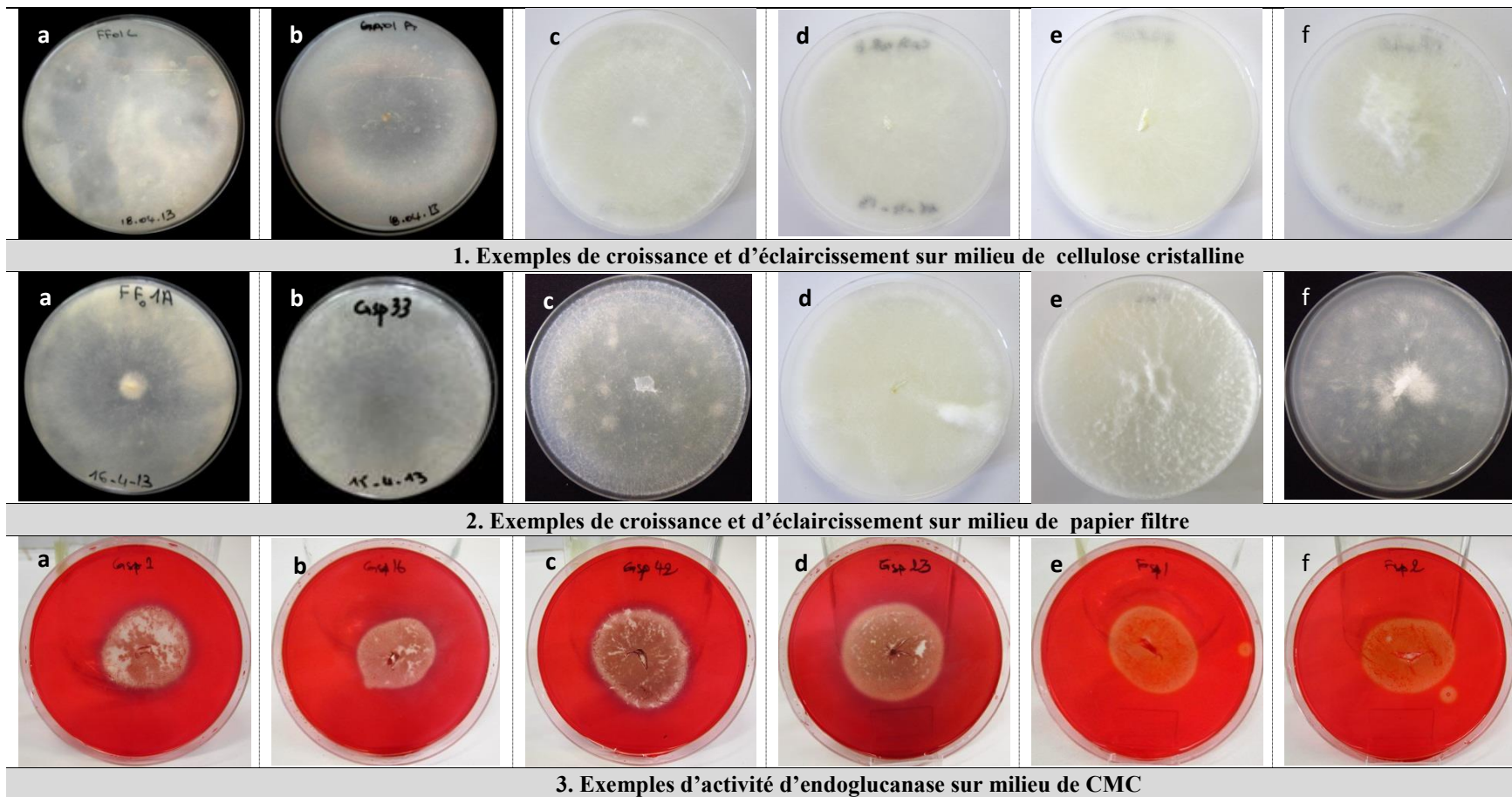


1) Résultats de test du pouvoir antibactérien vis-à-vis SARM 2



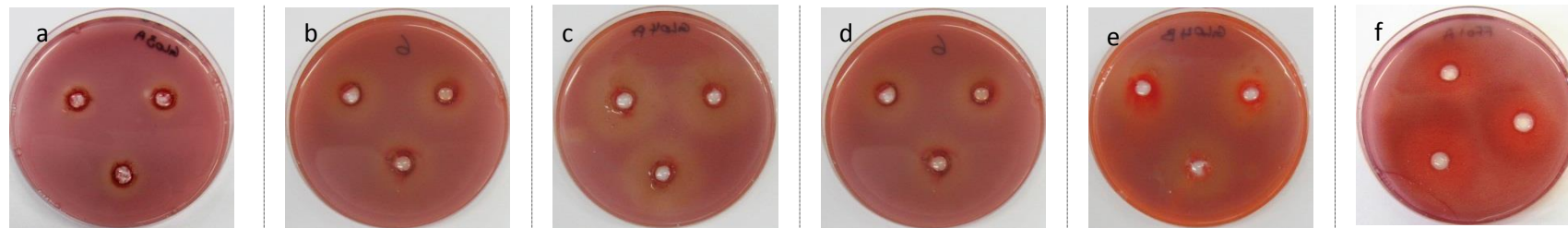
2) Résultats de test du pouvoir antibactérien vis-à-vis
4a, 4b, 4c, *E. coli* 4d, 4e, *P. aeruginosa*

Figures B : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activité antibactérienne des extraits de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius* vis-à-vis des bactéries pathogènes

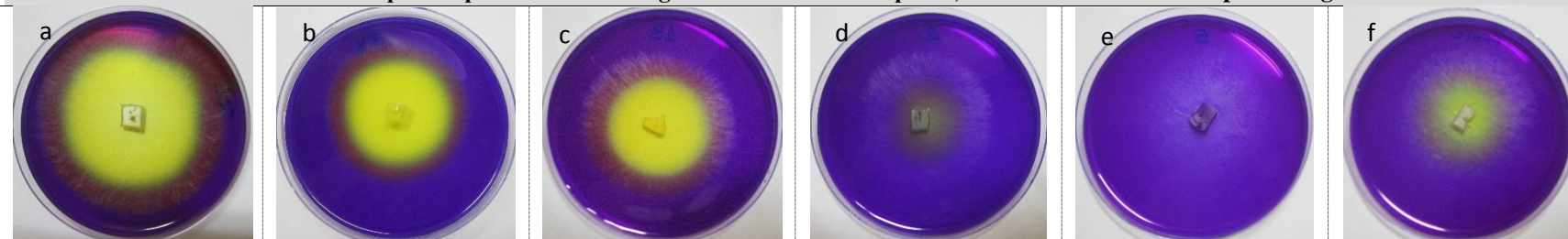


1. Figs. 1a; Ff01 et. Fig. (1b, 1c, 1d, 1e et 1f) ; *G. resinaceum*
2. Fig. 2a ; Ff02. Fig. 2b; Ff02. Fig. 2c; Gr33. Figs. (2d and 2e) ; *G. resinaceum*
3. Figs. (3a, 3b, 3c et 3d); *G. resinaceum*. Figs. (3e and 3f) ; *F. fomentarius*.

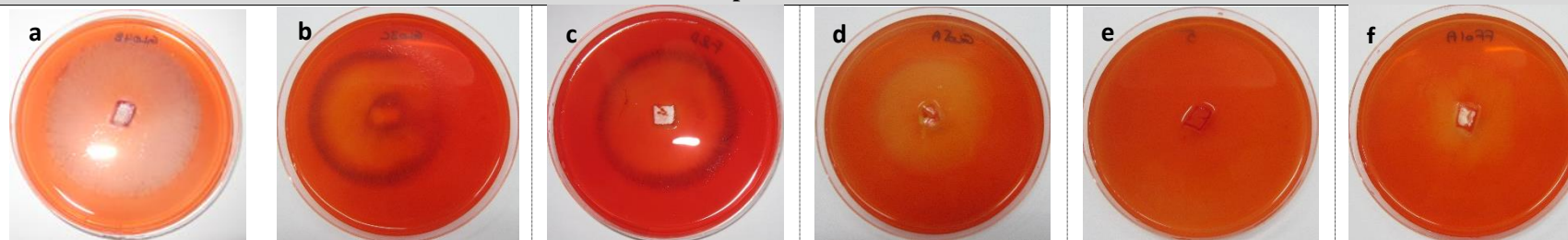
Figures C : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activités enzymatiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius*.



4. Exemples de production d'endoglucanase en milieu liquide ; méthode de diffusion en puits sur gélose de CMC



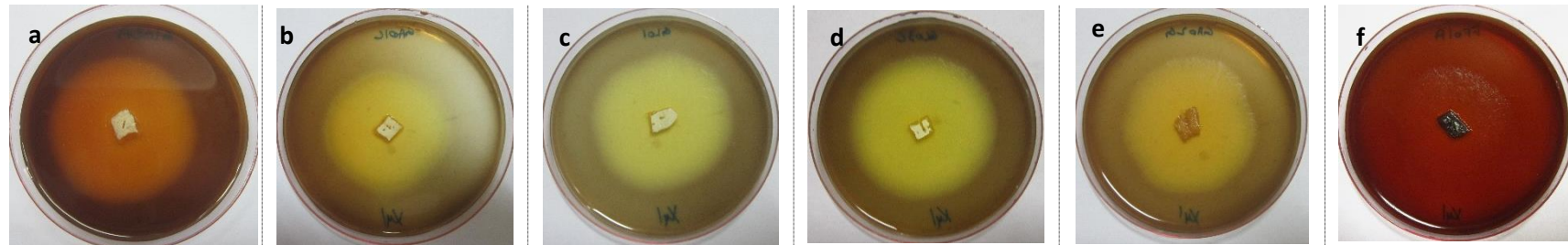
5. Exemples de résultats d'activité de laccases



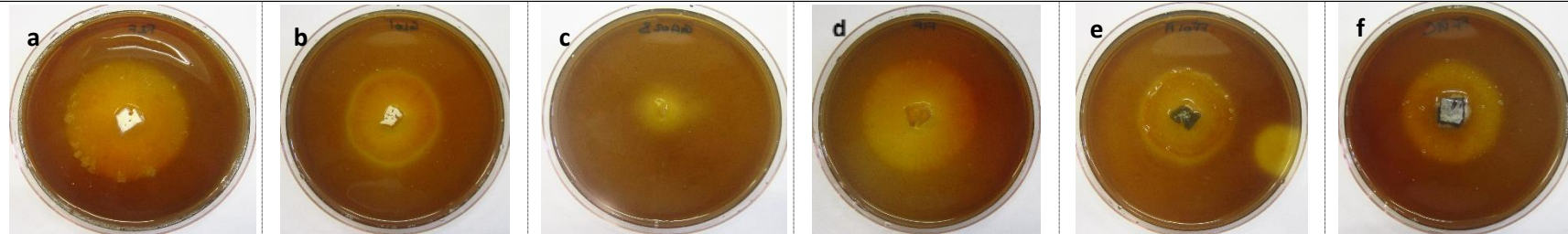
6. Exemples d'activité xylano avec le rouge Congo

4. Figs. (4a, 4b, 4c, 4d et 4e); *G. resinaceum*. Fig. 4f; *F. fomentarius*
 5. Figs. (5a, 5b, 5c, 5d et 5e); *G. resinaceum*. Fig. 5f; *F. fomentarius*
 6. Figs. (6a, 6b, 6c, 6d et 6e); *G. resinaceum*. Fig. 6f; *F. fomentarius*

Figures C : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activités enzymatiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius*.



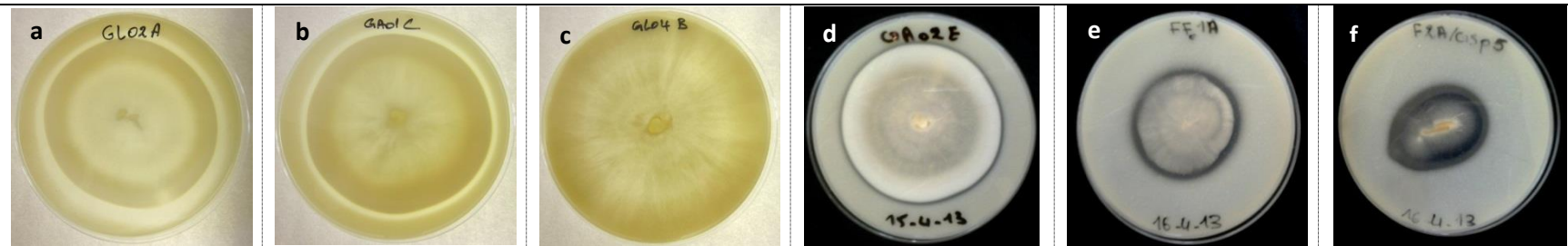
7. Exemples d'activité xylanolytique révélés avec le lugol



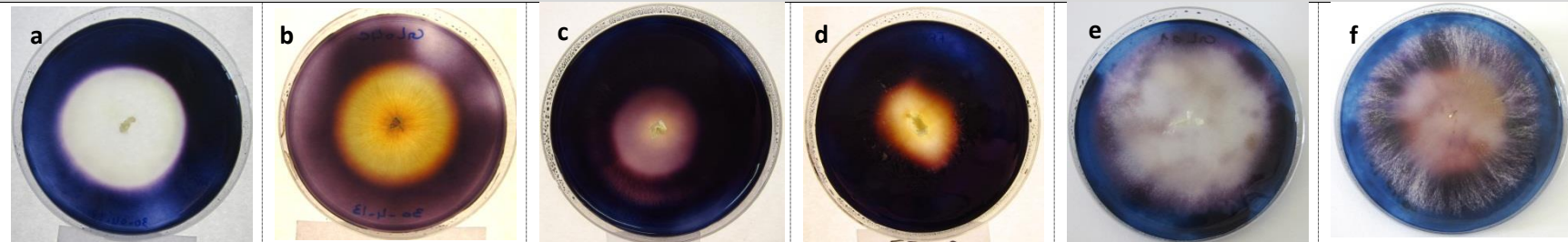
8. Exemples d'activité de pectinases, révélation avec solution d'iode

7. Figs. (7a, 7b, 7c, 7d et 7e); *G. resinaceum*. Fig. 7f ; *F. fomentarius*
8. Figs. (8a, 8b, 8c et 8d); *G. resinaceum*. Figs. (8e et 8f) ; *F. fomentarius*.

Figures C : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activités enzymatiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius*.



9. Exemples d'activité protéolytique sur gélose au lait



10. Exemples de production d'amylase sur milieux d'amidon soluble et de fécules de maïs

9. Figs. (9a, 9b, 9c et 9d); *G. resinaceum*. Figs. (9e et 9f); *F. fomentarius*

10. Figs. (10a, 10b et 10c) ; *G. resinaceum*. Fig.10d ; Ff01 sur milieu d'amidon soluble. Figs. (10e et 10f); *G. resinaceum* sur amidon de maïs

Figures C : Résultats des tests qualitatifs pour la mise en évidence d'activités enzymatiques de *G. resinaceum* et de *F. fomentarius*.



Publications scientifiques



Research Journal of **Microbiology**

ISSN 1816-4935



Academic
Journals Inc.

www.academicjournals.com

Production and Qualitative Analysis of Triterpenoids and Steroids of *Ganoderma* Species Harvested from Cork Oak Forest of North-Eastern Algeria

Melouka Hadda, Chekireb Djamel and Ouartsy Akila

Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar Annaba, BP 12, Annaba, 23000, Algeria

Corresponding Author: Hadda Melouka, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar Annaba, Algeria

ABSTRACT

Submerged fermentation of higher fungi *Ganoderma* is increasingly, studied for its potential advantages particularly, improving the production biomass and bioactive metabolites. The present study mainly focuses on the qualitative assessment of triterpenoids and steroids in chloroform extracts of harvested mycelia from submerged cultures of three different strains of *Ganoderma* sp. by using a low cost complex medium. For the screening of these bioactive substances we employed a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system based on a gradient of acetonitrile acidified with formic acid, coupled to a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer (QToF-MS) for a tentative determination of Ganoderic Acids (GA) and sterols. The LC-QToF-MS approach was successfully, used in the qualitative analysis of bioactive metabolites. The results show a considerable diversity of produced metabolites in the three samples and indicate the presence of putative target components, such as; GAA, GAH, GA theta, GA beta, GAK, GAE, GAC2, GAR, GAX and ergosterol. The comparison of the compounds according to their retention time and QToF-MS spectra reveals nine shared metabolites produced by the three different strains of *Ganoderma* sp., GAAm1, GAY, GAS, GAT-Q and GAT.

Key words: Secondary metabolites, ganoderic acids, submerged fermentation, *Ganoderma* sp., LC-QToF-MS

INTRODUCTION

Higher fungi represent an immense source of a huge range of structurally diverse compounds with health promoting properties. *Ganoderma* a well-known genus of the Ganodermataceae (Basidiomycetes) (Schmidt, 2006). The species of *Ganoderma* have been currently used for medicinal purposes for thousands years. Over the last decades, the bioactive compounds of these mushrooms were increasingly studied and several pharmacological affects have been revealed. The bioactive properties of *Ganoderma*, such as; antiviral and antibacterial (El-Mekkawy *et al.*, 1998; Zjawiony, 2004), anti-androgenic (Liu *et al.*, 2010), anti-inflammatory (Ko *et al.*, 2008), lowering cholesterol (Berger *et al.*, 2004; Hajjaj *et al.*, 2005), anti-oxidant (Saltarelli *et al.*, 2009), immuno-modulatory (Chen *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2006) and anti-tumor activities (Calvino *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2013; De Silva *et al.*, 2012) are mainly due to triterpenoids and polysaccharides and sterols (Boh *et al.*, 2007; Petrova *et al.*, 2008).

The bio-valuable metabolites have been widely isolated from fruiting bodies and spores (Keypour *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2009), whilst the field cultivation and the solid state fermentation are laborious, time-consuming and expensive processes. Therefore, submerged fermentation has gained plentiful attention as a promising alternative for producing high biomass yield and bioactive compounds in a compact space, in relatively short time and with lesser chance for contamination (Saltarelli *et al.*, 2009; Zhong and Xiao, 2009). Now-a-days, serious efforts are being made to enhance the production of metabolites in submerged fermentation by optimizing the composition of culture media (Fang and Zhong, 2002b; Xu *et al.*, 2008; Tang and Zhong, 2002), physicochemical conditions (Fang and Zhong, 2002a; Tang and Zhong, 2003; Zhang *et al.*, 2010) and studying biosynthesis pathways and regulation of genes expression (Liang *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010).

Moreover, investigators have successfully extracted and characterized GA and sterols from *Ganoderma* species (Hirotani *et al.*, 1987; Seo *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2007). The use of powerful methods of analysis is crucial to obtain reliable results. Hence, several researches were carried out for developing the analysis techniques of the bioactive components. Liquid Chromatography Combined with Mass Spectrometry (LC-MS) has become the method of choice for screening and characterizing complex mixtures (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009, 2007). However, providing the internal standards for such analysis still being a challenging obstacle to identify all the constituents of complex mixtures (Gao *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011).

In this present study, an investigation was carried out on the production of triterpenoids and sterols by *Ganoderma* isolates collected from Kala National Park, El Tarf (Algeria) and grown in submerged fermentation, using a low-cost complex media. The metabolites were assessed with Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Coupled to Electro-Spray Ionization Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry (RP-HPLC-ESI-QToF-MS).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: Chloroform R.P. Normapur analysis grade was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Formic acid (analytical reagent grade) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile LC/MS grade and methanol absolute LC/MS grade were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Pure water was prepared from a Milli-Q SP Regent Water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Fungal isolates: Three *Ganoderma* sp. strains were isolated from *Ganoderma* basidiocarps harvested from different host trees from El Kala National Park, El Tarf (Algeria). Small pieces from each fruiting body were suspended in sterile distilled water, after shaking (2 min), 0.1 mL of suspension was aseptically transferred into Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA), or PDA supplemented with Rose Bengal (50 mg L⁻¹). The incorporation of Rose Bengal in the medium was to inhibit the rapidly spreading of fungal colonies (Jarvis, 1973; King *et al.*, 1979) to suppress most of bacteria (Ottow, 1972). The plates were incubated at 30°C until fungal growth. Then the three isolates of *Ganoderma* sp. designated G1, G2 and G3 were identified on the basis of their macroscopic and microscopic features.

Maintenance of fungi and media: The stock cultures were maintained on a PDA slants and routinely subcultured every month and the slants were incubated at 30°C for a week and then

stored at 4°C. The submerged cultivation process was performed as described by Xu *et al.* (2008). The seed medium consisted of the following components, glucose 40 g L⁻¹, peptone 4 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1.0 g L⁻¹ and vitamin B1 0.01 g L⁻¹. The fermentation medium contained, glucose 16 g L⁻¹, peptone 2.93 g L⁻¹, corn flour 20.93 g L⁻¹ and soybean powder 6.44 g L⁻¹. Corn and soybean were purchased from a local market then ground to fine powders.

Inoculum and liquid shake cultivation: Actively growing mycelia obtained from a newly prepared agar-plate culture, after it was incubated for 5-7 days at 30°C, around 5-6 of 0.5 mm diameter disks were punched out and then transferred into a 250 mL Erlenmeyer flask with 50 mL of the seed medium. Cultures were incubated at 30°C for 7 days with shaking at 150 rpm. The seed medium in pre-culture flasks was poured carefully, while keeping most of pellets and then it was replaced by 100 mL of the fermentation medium, the culture flasks were maintained at 30°C and 125 rpm for 4 days. All experiments were carried out at least in duplicate to ensure reproducibility.

Sample extraction and preparation: The fermented broths were filtered through layers of sterile gauze. Then the pellets were dried at 50°C to a constant weight after repeated washing with distilled water. The amount of formed mycelia was determined by measuring the dry weight. Previous method reported by many authors (Keypour *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), which was modified and used for extraction of triterpenoids and sterols from the three samples (G1, G2 and G3). Two grams of powdered dried mycelia was extracted with 40 mL of chloroform with shaking for 20 min. The extraction process was repeated twice. The extracts were filtered, combined and evaporated to dryness at room temperature. A small amount of each dry residue was dissolved in 400 µL methanol in an ultrasonic bath for 5 min, after addition of 400 µL of Milli-Q water, the mixture was filtered through a 0.45 µm Millipore filter unit. A 20 µL aliquot of each sample was analyzed by LC-QToF-MS.

LC-QToF-MS conditions: Chromatographic analysis were performed on the agilent 1290 Infinity LC system equipped with a binary pump, an autosampler, a column oven and a Diode-Array Detector (DAD) coupled to an Agilent 6538 QToF mass spectrometer equipped with a dual Electro-spray Ionization (ESI) source. Twenty microliter of each sample was separated on Phenomenex Luna C18(2) 100 Å column (3 µm, 150×4.6 mm i.d.). The mobile phase consisted of 0.2% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) using, a linear gradient program of 32% B over the first 15 min, 32-82% B in 15-40 min, 82-100% B in 40-42.50 min and held at 100% B in 42.50-48 min. The flow rate was 0.85 mL min⁻¹ and column temperature was set at 20°C. The DAD was monitored at 220, 252 and 280 nm for acquiring chromatograms, the on-line UV spectra were recorded in the range of 190-400 nm.

The ESI MS spectra were acquired in both positive and negative ion modes, the conditions for ESI operation were as follows: Drying gas flow, 12 L min⁻¹; nebulizing pressure, 45 psi; drying gas temperature, 350°C; capillary voltage, 3.8 kV and fragment or voltage, 180 V. Mass spectra were collected at a frequency of 4 GHz and scanned over a mass range of m/z 50-1700 with a scan rate of 1.5 spectra sec⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Submerged fermentation of fungi: The growth of *Ganoderma* isolates in the seed medium was important. The fungal isolates have grown vigorously in the production complex medium and in the end of the fermentation process, the turbid broth culture became more and less clear, with quite similar amount of biomass.

RP-HPLC analysis: Obtained chromatograms showed a very different composition among the three extracts, The peaks were severely overlapping, by other means, each peak included several compounds with close retention times (Rt) on the analytical chromatography (Tang *et al.*, 2006) (Fig. 1). This usually occurs in separation of complex mixture of natural products with very similar chemical structure, which require a longer elution time to achieve better separation (Gao *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011). In such cases, the ESI-MS spectra provide additional information on the chromatographic peaks.

QToF-MS data analysis: The separated ions were detected and reported from accurate-mass scan data using, Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software. The putative assignment of acquired QToF-MS spectra was based on matching between the accurate measured and the theoretical masses using in-house molecular formula database of known triterpenoids and sterols previously isolated from *Ganoderma*. The match score and the mass accuracy (Δm) were calculated for each retrieved chemical formula in different samples. The identification of detected peaks could not be confirmed owing to the unavailability of standard compounds. For more credibility, the tentative assignments were compared by published data (Chen *et al.*, 2008; Keypour *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2007).

Numerous target compounds were identified with very narrow mass tolerance (<10 ppm) and several unknown compounds were detected in the survey scan in the extracts of the *Ganoderma* samples.

In G1 extract, the compound 6 showed an accurate mass of [M+H]⁺ ion at m/z 530,2877, corresponding to the molecular formula C₃₀H₄₂O₈, compound 6 was tentatively assigned to be GA theta. Another compound 10 gave rise to a quasi-molecular ions [M+H]⁺ at m/z 574,3139, the molecular formula was defined as, C₃₂H₄₆O₉, compound 10 was tentatively identified to GAK.

The mass spectrum of compound 9 had a molecular ion peak at m/z 517,3165 [M+H]⁺, the molecular formula was defined as, C₃₀H₄₄O₇. However, compound 9 (Rt = 19,343 min) is an isomer of compound 15 detected in extract G3 (Rt = 23,781 min) and compound 22 in G2 (Rt = 26,749 min), the three components were assigned to GAA.

The compounds 8,11 and 16 detected in G2 extract, were plausibly identified to be GAH, GAE and GAC2, respectively (8 at m/z 572,2996 [M+H]⁺ calcd. C₃₂H₄₄O₉, 11 at m/z 512,275 [M+H]⁺ calcd, C₃₀H₄₀O₇ and 16 at m/z 518,3234[M+H]⁺ calcd. C₃₀H₄₆O₇).

Compound 53 appeared in G2 at Rt = 40,859 min, has a molecular formula of C₂₈H₄₄O, which is an ergosterol isomer.

The molecular formula of compounds 24 and 46 was determined to be C₃₂H₄₆O₅ (m/z 510,3339 [M+H]⁺) and C₃₀H₄₀O₇ (m/z 512,2799 [M+H]⁺), which were tentatively assigned to be GAT-Q and GAE, respectively.

Unfortunately, the identification based on chemical formula or accurate mass alone is insufficient, even for components expected to be present.

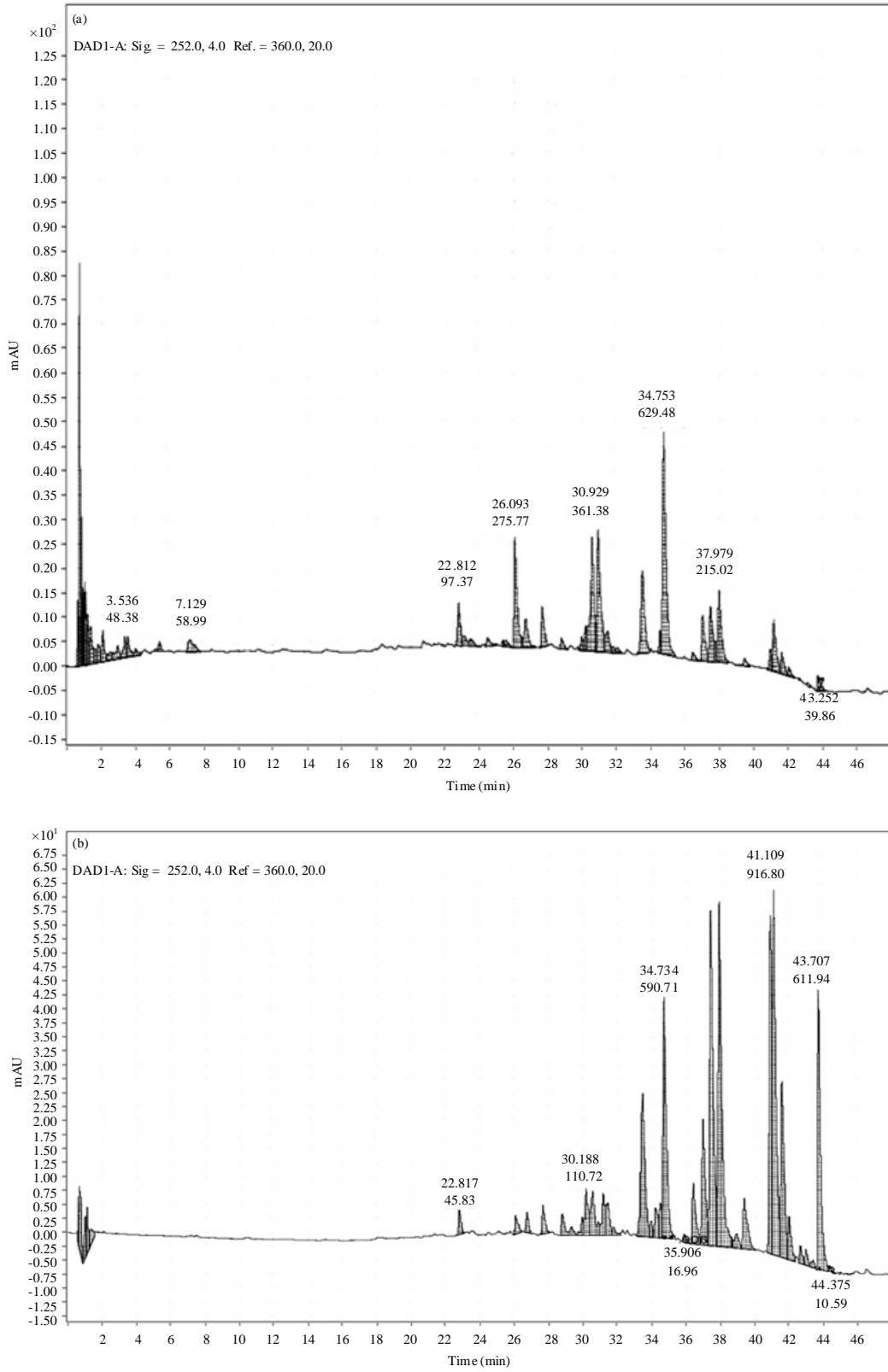


Fig. 1(a-c): Continue

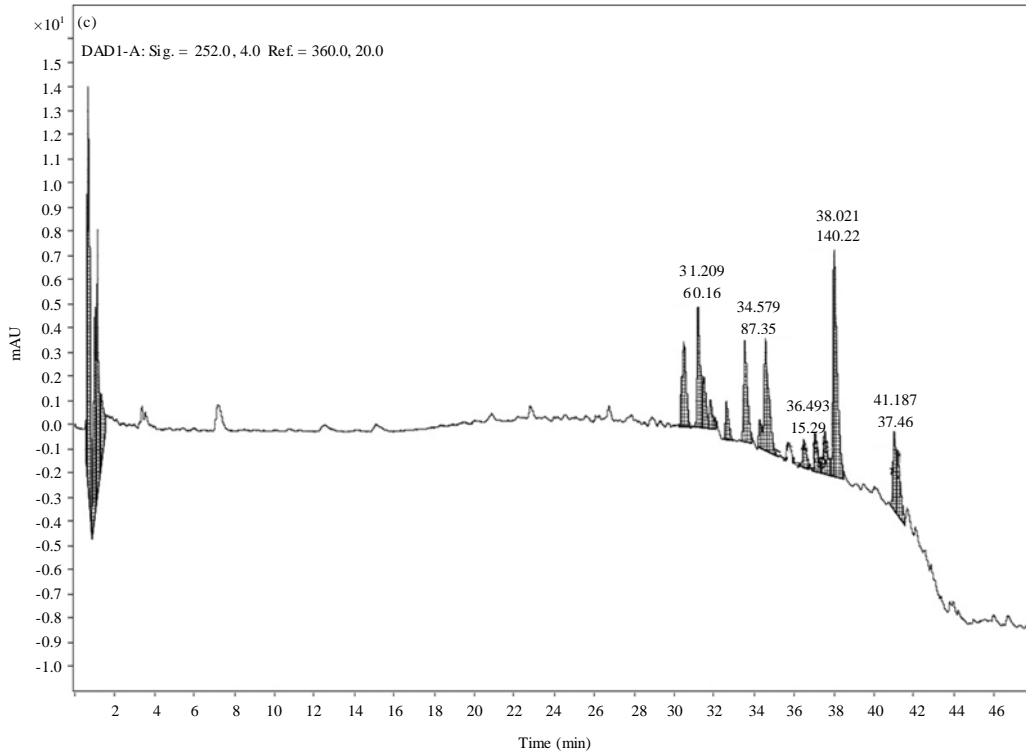


Fig. 1(a-c): LC-DAD-QToF-MS chromatograms at 252 nm of the three extracts (a) G1, (b) G2 and (c) G3, eluted with water with 0.2% of formic acid (A) and acetonitrile (B). The gradient and ESI parameters are described in materials and methods

The MS data matching and the manual retention time alignment allowed the comparison of same metabolites across the different samples (Table 1). Overall, nine common peaks were observed among the three *Ganoderma* samples.

The detected ion peaks in the three *Ganoderma* extracts at Rt = 18.8 min corresponding to the same metabolite compound 7 have a molecular formula of $C_{30}H_{42}O_7$, which was assigned as, GAAM1.

At Rt = 31,1 min, compound 33 gave rise to the following ion peaks [M+H]⁺ at m/z 454.3447 (G2), m/z 454.3454 (G1) and m/z 454.3445 (G3), the molecular formula was established to be $C_{30}H_{46}O_3$ which was tentatively identified as GAY. The compound 42 observed at Rt = 35.6 min in the three *Ganoderma* extracts is an isomer of compound 33 and it was also assigned to be GAY.

The component 39 is produced by the three *Ganoderma* samples at slightly different retention times (G1 and G3 at Rt = 33.604 min, G2 at Rt = 34.055 min), this compound was assigned to be GAT-Q.

Similarly, another common component 48 between the three *Ganoderma* samples (Rt = 38.0 min) with the chemical formula of $C_{36}H_{52}O_8$ was tentatively identified as GAT.

From the above results, the production of metabolites differed significantly from a strain to another, which is almost explained by the genetic differences between these fungi isolates, considering that they had the same cultivation conditions (Wang *et al.*, 2006). The screening revealed the presence of similar components in the analyzed extracts.

Table 1: Interpretation of acquired QToF-MS data of the three analyzed extracts

Cpd	Rt	Extract	Best possible formula	Calculated mass (Da)	Measured mass (Da)	Δm (ppm)	Assigned molecule
1	0.668	G2	$C_{30}H_{48}O_3$	456.3603	456.3590	2.80	Unknown
	0.752	G3			456.3601	0.45	
2	0.764	G3	$C_{28}H_{46}O_4$	446.3396	446.3417	-4.77	Unknown
	0.817	G1			446.3445	-10.87	
3	1.088	G1	$C_{28}H_{44}O_4$	444.3240	444.3249	-1.93	Unknown
4	1.164	G2	$C_{30}H_{42}O_8$	530.288	530.286	-3.70	Ganoderic acid theta
	1.228	G3			530.2867	-2.54	
5	6.111	G1	$C_{28}H_{44}O$	396.3392	396.3371	5.28	Unknown
6	7.653	G1	$C_{30}H_{42}O_8$	530.288	530.2877	-0.65	Ganoderic acid theta
7	18.869	G2	$C_{30}H_{42}O_7$	514.2931	514.2923	1.55	Ganoderic acid Am1
	18.897	G3			514.2921	1.88	
	18.927	G1			514.2931	0.02	
8	18.882	G2	$C_{32}H_{44}O_9$	572.2985	572.2996	1.88	Ganoderic acid H
9	19.343	G1	$C_{30}H_{44}O_7$	516.3087	516.309	0.55	Ganoderic acid A
10	20.584	G1	$C_{32}H_{46}O_9$	574.3142	574.3139	-0.49	Ganoderic acid K
11	21.563	G2	$C_{30}H_{40}O_7$	512.2774	512.275	-4.63	Ganoderic acid E
12	21.595	G2	$C_{30}H_{40}O_7$	512.2774	512.2744	5.86	Unknown
	22.854	G3			468.324	-0.38	
13	23.228	G2	$C_{30}H_{44}O_4$	468.324	468.3249	1.94	Ganoderic acid DM
	23.467	G3			398.3549	-0.54	
14	23.588	G1	$C_{28}H_{46}O$	398.3549	398.3512	-6.37	Unknown
	23.781	G3			398.3512	-6.37	
15	23.781	G3	$C_{30}H_{44}O_7$	516.3087	516.3102	2.97	Ganoderic acid A
16	23.836	G2	$C_{30}H_{46}O_7$	518.3244	518.3234	-2.00	Ganoderic acid C2
17	24.522	G1	$C_{30}H_{44}O_5$	484.3189	484.3199	2.01	Ganoderic acid beta
	24.522	G2			484.3204	3.15	
18	26.144	G1	$C_{28}H_{46}O_4$	446.3396	446.3338	13.08	Unknown
	26.713	G3			446.3421	-5.52	
	26.889	G2			446.3459	-14.13	
19	26.156	G1	$C_{31}H_{46}O_3$	466.3447	466.3386	12.98	Unknown
	26.159	G3			466.3490	-9.14	
20	26.159	G3	$C_{28}H_{44}O_4$	444.3240	444.3258	-4.02	Unknown
	26.425	G2			444.3223	3.72	
21	26.725	G2	$C_{30}H_{44}O_4$	468.324	468.3254	2.96	Ganoderic acid DM
	26.746	G1			468.3255	3.26	
22	26.749	G2	$C_{30}H_{44}O_7$	516.3087	516.3073	-2.64	Ganoderic acid A
23	26.766	G1	$C_{31}H_{46}O_3$	466.3447	466.3484	-7.87	Unknown
24	26.787	G3	$C_{32}H_{46}O_5$	510.3345	510.3339	-1.22	ganoderic acid T-Q
25	28.167	G3	$C_{32}H_{44}O_9$	572.2985	572.2977	-1.46	Ganoderic acid H
	28.2	G1			572.2972	-2.23	
27	28.588	G1	$C_{28}H_{46}O$	398.3549	398.3504	9.39	Unknown
28	30.197	G3	$C_{30}H_{42}O_7$	514.2931	514.2915	3.10	Unknown
29	30.276	G3	$C_{30}H_{48}O_3$	456.3603	456.3593	2.23	Unknown
	30.305	G2			456.3605	-0.54	
30	30.554	G2	$C_{34}H_{54}O_9$	606.3768	606.3796	-4.69	Unknown
	30.59	G1			606.3802	-5.54	
31	30.655	G1	$C_{32}H_{46}O_5$	510.3345	510.3356	2.10	Ganoderic acid T-Q
32	30.658	G1	$C_{30}H_{48}O_5$	488.3502	488.3528	-5.40	Unknown
	30.661	G3			488.3521	-3.82	
	30.667	G2			488.3550	-9.88	
33	31.112	G2	$C_{30}H_{46}O_3$	454.3447	454.3447	-0.04	Ganoderic acid Y
	31.122	G1			454.3454	1.48	
	31.129	G3			454.3445	-0.35	
34	31.272	G3	$C_{34}H_{54}O_9$	606.3768	606.3690	12.94	Unknown
35	31.321	G1	$C_{30}H_{46}O_3$	454.3447	454.3449	0.49	Ganoderic acid Y
36	33.497	G1	$C_{30}H_{44}O_3$	452.329	452.3303	2.80	Ganoderic acid S
	34.359	G3			452.3294	0.86	
37	33.563	G2	$C_{34}H_{54}O_9$	606.3768	606.3774	-1.00	Unknown
	33.647	G3			606.3701	11.13	
38	33.575	G2	$C_{28}H_{44}O_3$	428.3290	428.3283	1.60	Unknown
	33.576	G1			428.3323	-7.71	
	33.591	G3			428.3318	-6.55	

Table 1: Continue

Cpd	Rt	Extract	Best possible formula	Calculated mass (Da)	Measured mass (Da)	Δm (ppm)	Assigned molecule
39	33.604	G1	$C_{32}H_{46}O_5$	510.3345	510.3359	2.71	Ganoderic acid T-Q
	33.604	G3			510.3356	2.20	
	34.055	G2			510.3366	4.04	
40	34.832	G1	$C_{33}H_{46}O_8$	570.3193	570.3142	9.02	Unknown
	35.695	G3			570.3203	-1.81	
41	34.875	G2	$C_{28}H_{46}O$	398.3549	398.3547	0.47	Unknown
42	35.595	G2	$C_{30}H_{46}O_3$	454.3447	454.3452	1.04	Ganoderic acid Y
	35.635	G1			454.3449	0.38	
	35.654	G3			454.3446	-0.31	
43	35.939	G2	$C_{36}H_{52}O_8$	612.3662	612.3657	-0.83	Ganoderic acid T
	36.028	G1			612.3662	0.01	
44	36.528	G1	$C_{30}H_{44}O_3$	452.329	452.3308	4.07	Ganoderic acid S
	36.558	G3			452.33	2.32	
45	37.076	G1	$C_{32}H_{48}O_5$	512.3502	512.351	1.54	Ganoderic acid X
	37.123	G3			512.3515	2.61	
46	37.476	G3	$C_{30}H_{40}O_7$	512.2774	512.2799	4.84	Ganoderic acid E
47	38.009	G2	$C_{30}H_{46}O_4$	470.3396	470.3432	-7.63	Unknown
	38.044	G1			470.3428	-6.73	
	38.093	G3			470.3420	-5.15	
48	38.028	G2	$C_{36}H_{52}O_8$	612.3662	612.367	1.37	Ganoderic acid T
	38.029	G3			612.3668	1.04	
	38.052	G1			612.3655	-1.21	
50	38.507	G2	$C_{30}H_{50}O_3$	458.3760	458.3786	-5.57	Unknown
	38.576	G1			458.3784	-5.22	
51	39.038	G2	$C_{34}H_{54}O_9$	606.3768	606.3725	7.17	Unknown
52	41.113	G3	$C_{28}H_{44}O_3$	428.3290	428.3288	0.56	Unknown
53	40.859	G2	$C_{28}H_{44}O$	396.3392	396.3384	2.01	Unknown
54	40.963	G2	$C_{34}H_{50}O_6$	554.3607	554.3622	2.68	Ganoderic acid R
55	41.979	G2	$C_{28}H_{44}O$	396.3392	396.3418	-6.56	Unknown
56	42.561	G3	$C_{30}H_{50}O_3$	458.3760	458.3777	-3.75	Unknown

CONCLUSION

Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of higher fungi has gained popularity over the past years and many papers about optimization of the fermentation process for more efficient production have been published. Besides, relevant researches have been made in isolation and structural elucidation of active constituents.

This study reports for the first time the production of triterpenoids and sterols by Algerian *Ganoderma* sp. strains. The used culture medium was suitable for mycelial growth and many compounds were produced in the submerged fermentation process. In the attempt to screen triterpenoids and sterols by using a LC-QToF-MS method, many targeted compounds were successfully assigned. Conclusive identification of targeted compounds was constrained by the unavailability of authentic standards. Besides unknown compounds that could not be identified through database searching or the literature. The obtained results highlight a varied production of metabolites, however, few compounds are commonly produced by the three strains.

These findings show the need that future studies in screening approaches of bioactive metabolites require complementary analytical techniques to improve accuracy and confidence in compound identification.

REFERENCES

- Berger, A., D. Rein, E. Kratky, I. Monnard and H. Hajjaj *et al.*, 2004. Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum in vitro, ex vivo* and in hamsters and minipigs. *Lipids Health Dis.*, Vol. 3.

- Boh, B., M. Berovic, J. Zhang and L. Zhi-Bin, 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 13: 265-301.
- Calvino, E., J.L. Manjon, P. Sancho, M.C. Tejedor, A. Herraiez and J.C. Diez, 2010. *Ganoderma lucidum* induced apoptosis in NB4 human leukemia cells: Involvement of Akt and Erk. *J. Ethnopharmacol.*, 128: 71-78.
- Chen, H.S., Y.F. Tsai, S. Lin, C.C. Lin, K.H. Khoo, C.H. Lin and C.H. Wong, 2004. Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorganic Med. Chem.*, 12: 5595-5601.
- Chen, Y., Y. Yan, M.Y. Xie, S.P. Nie, W. Liu, X.F. Gong and Y.X. Wang, 2008. Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47: 469-477.
- De Silva, D.D., S. Rapior, F. Fons, A.H. Bahkali and K.D. Hyde, 2012. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: An approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55: 1-35.
- El-Mekkawy, S., M.R. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezuka and M. Hattori *et al.*, 1998. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49: 1651-1657.
- Fang, Q.H. and J.J. Zhong, 2002a. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.*, 37: 769-774.
- Fang, Q.H. and J.J. Zhong, 2002b. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem. Eng. J.*, 10: 61-65.
- Gao, J.J., N. Nakamura, B.S. Min, A. Hirakawa, F. Zuo and M. Hattori, 2004. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of Ganoderma products. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 688-695.
- Gao, J.J., A. Hirakawa, B.S. Min, N. Nakamura and M. Hattori, 2006. *In vivo* antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Med.*, 60: 42-48.
- Hajjaj, H., C. Mace, M. Roberts, P. Niederberger and L.B. Fay, 2005. Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Applied Environ. Microbiol.*, 71: 3653-3658.
- Hirotsu, M., I. Asaka, C. Ino, T. Furuya and M. Shiro, 1987. Ganoderic acid derivatives and ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 26: 2797-2803.
- Jarvis, B., 1973. Comparison of an improved rose Bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. *J. Applied Bacteriol.*, 36: 723-727.
- Keypour, S., H. Rafati, H. Riahi, F. Mirzajani and M.F. Moradali, 2010. Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chem.*, 119: 1704-1708.
- King, D.A.Jr., A.D. Hocking and J.I. Pitt, 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied Environ. Microbiol.*, 37: 959-964.
- Ko, H.H., C.F. Hung, J.P. Wang and C.N. Lin, 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69: 234-239.

- Kuo, M.C., C.Y. Weng, C.L. Ha and M.J. Wu, 2006. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- κ B. *J. Ethnopharmacol.*, 103: 217-222.
- Liang, C.X., Y.B. Li, J.W. Xu, J.L. Wang and X.L. Miao *et al.*, 2010. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 86: 1367-1374.
- Liu, J., K. Shimizu and R. Kondo, 2010. The effects of ganoderma alcohols isolated from *Ganoderma lucidum* on the androgen receptor binding and the growth of LNCaP cells. *Fitoterapia*, 81: 1067-1072.
- Liu, Y., Y. Liu, F. Qiu and X. Di, 2011. Sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* and its related species. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 54: 717-721.
- Ma, Q.Y., Y. Luo, S.Z. Huang, Z.K. Guo, H.F. Dai and Y.X. Zhao, 2013. Lanostane triterpenoids with cytotoxic activities from the fruiting bodies of *Ganoderma hainanense*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 15: 1214-1219.
- Ottow, J.C.G., 1972. Rose Bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. *Mycologia*, 64: 304-315.
- Petrova, R.D., A.Z. Reznick, S.P. Wasser, C.M. Denchev, E. Nevo and J. Mahajna, 2008. Fungal metabolites modulating NF- κ B activity: An approach to cancer therapy and chemoprevention (Review). *Oncol. Rep.*, 19: 299-308.
- Ren, A., X. Ouyang, L. Shi, A.L. Jiang and D.S. Mu *et al.*, 2013. Molecular characterization and expression analysis of GIHMGS, a gene encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase from *Ganoderma lucidum* (Ling-zhi) in ganoderic acid biosynthesis pathway. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 523-531.
- Saltarelli, R., P. Ceccaroli, M. Iotti, A. Zambonelli and M. Buffalini *et al.*, 2009. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chem.*, 116: 143-151.
- Schmidt, O., 2006. Biology. In: Wood and Tree Fungi, Schmidt, O. (Ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, ISBN: 978-3-540-32138-5, pp: 3-52.
- Seo, H.W., T.M. Hung, M. Na, H.J. Jung and J.C. Kim *et al.*, 2009. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Arch. Pharm. Res.*, 32: 1573-1579.
- Shi, L., A. Ren, D. Mu and M. Zhao, 2010. Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 88: 1243-1251.
- Tang, Y.J. and J.J. Zhong, 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzym. Microb. Technol.*, 31: 20-28.
- Tang, Y.J. and J.J. Zhong, 2003. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 478-484.
- Tang, W., T. Gu and J.J. Zhong, 2006. Separation of targeted ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* by reversed phase liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometry detections. *Biochem. Eng. J.*, 32: 205-210.
- Wang, X.M., M. Yang, S.H. Guan, R.X. Liu, J.M. Xia, K.S. Bi and D.A. Guo, 2006. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed Anal.*, 41: 838-844.

- Xu, P., Z.Y. Ding, Z. Qian, C.X. Zhao and K.C. Zhang, 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme Microb. Technol.*, 42: 325-331.
- Yang, M., X. Wang, S. Guan, J. Xia, J. Sun, H. Guo and D.A. Guo, 2007. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 18: 927-939.
- Yang, M., J. Sun, Z. Lu, G. Chen and S. Guan *et al.*, 2009. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216: 2045-2062.
- Yuan, J.P., J.H. Wang and X. Liu, 2007. Distribution of free and esterified ergosterols in the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 77: 159-165.
- Zhang, W.X., Y.J. Tang and J.J. Zhong, 2010. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33: 683-690.
- Zhong, J.J. and J.H. Xiao, 2009. Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity and Bioproduction. In: *Biotechnology in China I*, Zhong, J.J., F.W. Bai and W. Zhang (Eds.). Springer, Berlin, ISBN: 978-3-540-88414-9, pp: 79-150.
- Zjawiony, J.K., 2004. Biologically active compounds from aphyllophorales (Polypore) fungi. *J. Nat. Prod.*, 67: 300-310.

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

Screening of Extracellular Enzyme Activities of *Ganoderma* and *Fomes* Species Collected from North East Algeria.

Melouka Hadda*, Chekireb Djamel, and Ouarts Akila.

Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba BP 12, Annaba 23000 Algeria.

ABSTRACT

White rot fungi are capable to degrade efficiently a wide range of complex substrates due to their ability to produce highly specific extracellular enzymes. Forty five fungal strains of *Ganoderma* sp. and *Fomes* sp. isolated from basidiocarps harvested from different host trees from El Kala National Park, El Tarf (Algeria) were qualitatively screened for extracellular enzymes such as amylase, cellulases and protease. The results revealed that most of fungal isolates produced extracellular enzyme activities with quite different intensity. All the isolates were positive for cellulases, with an important production of endo glucanases on medium with soluble cellulose (carboxymethyl cellulose), moderate exoglucanase activities were observed on media with insoluble celluloses. The production of protease was different among the isolates, a significant protease activity were recorded in only four fungal isolates. Whereas, all the strains showed weak amylase activity in media supplemented with soluble starch or corn starch.

Keywords: white rot fungi, extracellular enzymes, cellulases, protease, amylase.

*Corresponding author

INTRODUCTION

Ganoderma and *Fomes* are Basidiomycetes which belong to the Polyporaceae of the order Aphyllophorales [1-3]. These mushrooms have been currently used for medicinal purposes for centuries [4, 5]. For the last decades, *Ganoderma* and *Fomes* were intensively studied for their active compounds, several compounds were elucidated and many of valuable biological activities were revealed [6-9]. *Ganoderma* and *Fomes* species, commonly known as wood decaying fungi, cause white rot on wide variety of trees, mainly hardwoods [1, 2, 10].

Indeed, for surviving; fungi secrete a wide range of enzymes to digest complex materials in the environment into solubilized breakdown products that can be up taken into the hyphae and used as nutrients [11]. Wherefore the white rot fungi are able to degrade efficiently the major components of plant cell walls mainly composed of cellulose, lignin and hemicellulose. These fungi possess hydrolytic enzymes like cellulases, pectinases and xylanases, which typically are induced by their sub strates [12-14]. Some lignocellulose-degrading enzymes have been studied and isolated by many relevant researches [13, 15-19].

Some researchers have investigated production of other extracellular enzymes by these fungi; Ro [20] produced and purified a protease from *F. fomentarius* (Fr.) Kicky (as cited in Jo, Park [21]), Choi and Sa [22] and Kumaran, Palani [23] isolated proteases with fibrinolytic activity from *G. lucidum*. Amylase activity of *Ganoderma* species has been also studied [24, 25].

Fungal enzymes have been extensively exploited for industrial applications for many years, they show also a promising potential for biotechnological and bioremediation applications [12, 16, 26, 27], therefore considerable research efforts are focused on characterizing newer enzymes and selecting hyper-producing strains.

This work was aimed to screen extracellular enzymes produced by *Ganoderma* and *Fomes* isolates collected from Kala National Park, El Tarf (ALGERIA), hence qualitative methods were chosen to assess different enzyme activities. Such tests give a positive or negative indication of enzyme production. Qualitative tests are powerful tools and particularly useful in screening large numbers of fungal isolates for several classes of enzyme, where definitive quantitative data are not required [28].

MATERIALS AND METHODS

Isolation of fungi

The fungi used in qualitative tests were isolated from basidiocarps of *Ganoderma* and *Fomes* harvested from different host trees from El Kala National Park, El Tarf (Algeria). Small pieces of fruiting body were suspended in sterile distilled water, after shaking (two minutes), 0.1 ml of suspension was aseptically transferred into Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA), or PDA supplemented with Rose Bengal (50mg.l⁻¹). The incorporation of Rose Bengal in the medium was to inhibit the rapidly spreading of fungal colonies [29, 30] and to suppress most of bacteria [31]. The plates were incubated at 30°C until fungal growth. After confirmation of purity, the isolates were routinely maintained on PDA slants at 4°C. Then the isolates were identified on the basis of their macroscopic and microscopic features.

Qualitative detection of Cellulase Enzymes

In the order to investigate extracellular cellulases production, two different methods proposed by Pointing, Vrijmoed [32] and Pointing [28] were chosen, therefore a cellulolytic basal medium (CBM) was prepared and containing the following compounds (g.l⁻¹): C₄H₁₂N₂O₆5, KH₂PO₄1, MgSO₄·7H₂O 0.5, Yeast Extract 0.1, CaCl₂·2H₂O 0.001.

Cellulose agar clearance (cellulose agar)

This assay is based on the insolubility of the cellulose. Clearance indicates cellulolysis, although rates of clearance vary according to substrate. CBM medium was prepared by incorporating 2% w/v cellulose and 1.6% w/v agar. In this survey; insoluble cellulose from Sigma® (C6288) and fine-milled filter paper (almost

100% cellulose) were used. The test fungi were seeded by streaking centrally on the surface of sterile solidified medium using a fine needle. The plates were incubated at 30°C and examined daily for 10 days. Cellulolysis assessment is based on clearance zones of the opaque agar around growing colonies. A CBM medium supplemented only with 1.6% w/v agar was used as negative control. Inoculated dishes were kept in the same conditions of the test medium.

Dye staining of Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar)

Carboxymethyl cellulose (CMC) is soluble cellulose and a substrate for endoglucanase [12, 28], The CBM medium was supplemented with 2% w/v viscosity CMC and 1.6% w/v agar. Subsequently the medium was inoculated with test fungi then incubated at 30°C for 3 days; the agar plates were stained by flooding with 2% w/v aqueous Congo red and left for 15 minutes. The stain was poured and the agar surface was washed with distilled water, the plates were flooded again with 1M NaCl solution to destain and left for another 15 minutes. The activity was observed as yellow opaque area against a red color of undegraded CMC.

Detection of proteolytic activity

Protease production was detected in skimmed milk agar prepared as described by Cruz da Silva, Camilo de Souza [33] with a little modification. Commercial liquid skimmed milk (Candia®) was solidified with 1% w/v agar. The plates were inoculated, and then incubated at 30°C for 10 days. The formation of transparent zone around the growth was used as criterion of protease production. Diameters of hydrolysis zone were daily measured and recorded [33, 34].

Detection of Amylase production

Screening for amylase production efficiency was carried out on starch agar medium composed of (g.l⁻¹); yeast extract 1.5, peptone 0.5, sodium chloride 1.5, starch 10, agar 15, pH 5.6 [35]. In this work, two starches were tested; soluble starch (Sigma®) and commercial cornstarch. Seeded plates were incubated at 30°C for 3 days, and then flooded with a dilute iodine solution (Lugol's iodine). After flooding with iodine, the starch stains blue-black and the zone of degradation around the colonies is either stained brown or remains colorless [34, 35].

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of fungi

45 basidiomycete strains were collected by using PDA and PDA supplemented with rose Bengal. The addition of Rose Bengal in PDA medium was suitable and reduced the overgrowth of fungi, which aided to select the wanted colonies. However, the rose Bengal was not effective against bacterial development as described by Ottow and Glathe [36] and Ottow [31]. The 45 obtained isolates were identified as *Ganoderma* sp. and *Fomes* sp., *Ganoderma* was the most predominated genus. The test results are presented in Table.1.

Qualitative detection of Cellulase Enzymes

Cellulose agar clearance (cellulose agar)

All the 45 isolates grew in medium test with different growth rates and quite diverse colony aspects; from very thin to fluffy and dense hyphae, although; better growth rates were observed in medium with milled filter paper than medium with crystalline cellulose for most of strains. Generally, insoluble cellulose is attacked slowly by cellulolytic enzymes [1, 28].

The clearance of media was not easy to assess in both of medium, only 3 isolates showed an obvious positive reaction; Gsp22, Fsp1 and Fsp2, whereas Gsp3, Gsp29 and Gsp38 exhibited positive reaction in only filter paper medium. In fact, cellulolysis of heterogeneous cellulose substrates like filter paper and crystalline cellulose is due to simultaneous action of all cellulolytic enzymes [28, 37], but recording clearance of cellulose within the growth medium can be difficult to assess, particularly with dense or dark hyphal growth [28].

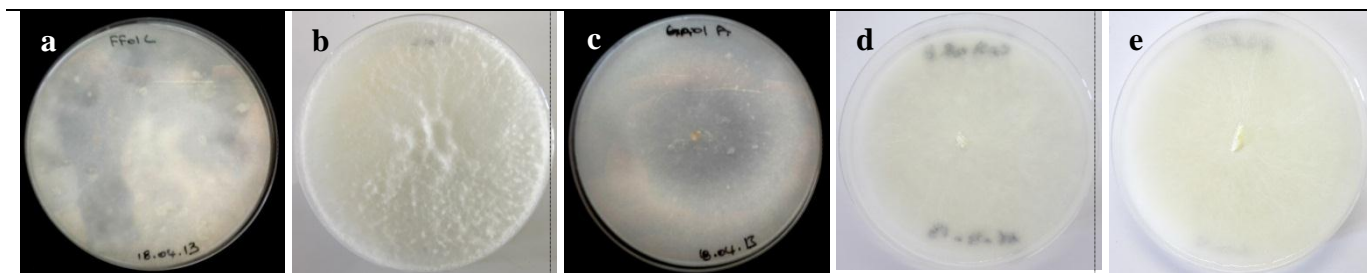
White rot fungi are able to fully solubilize pure crystalline cellulose substrates, because they possess the synergistic endo/exoglucanases system [1, 12, 37].

Little or no growth was observed when the fungi were grown on solidified CBM (negative control medium). These results confirm that the growth in cellulose media implies the production of cellulolytic enzymes. Thus, the difficult assessment of cellulolysis is an inherent problem in this method.

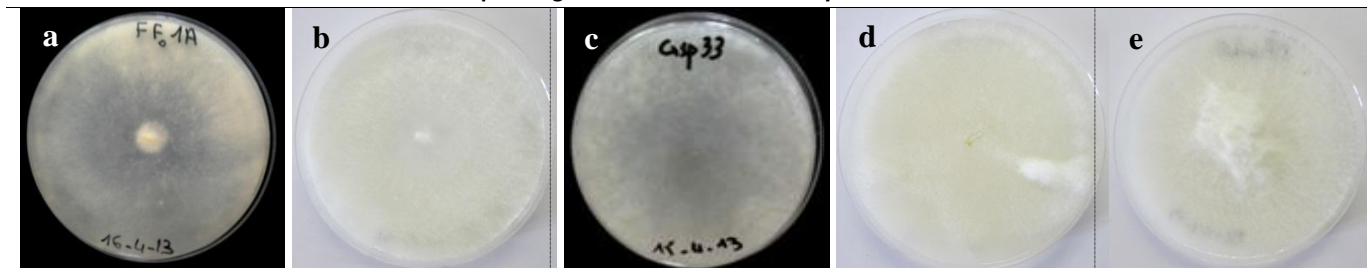
Table 1: Detection of extracellular enzyme activities in *Ganoderma* and *Fomes* species

Strain	Enzymatic activity					
	Cellulases			Proteases	Amylases	
	Crystalline Cellulose	Filter paper	CMC	Milk agar	Cornstarch	Soluble starch
Gsp01	+	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp02	+	+	+++	+++	- (*)	- (*)
Gsp03	+	++	++	++	- (*)	- (*)
Gsp04	+/-	+/-	++	+	- (*)	- (*)
Gsp05	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp06	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp07	+	+/-	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp08	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp09	+	+	++	++	- (*)	- (*)
Gsp10	+	+	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp11	+	+	+	++	- (*)	- (*)
Gsp12	+	+	++	+++	- (*)	- (*)
Gsp13	+	+	++	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp14	+	+	+	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp15	+/-	+	+	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp16	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp17	+/-	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp18	+/-	+/-	++	+	- (*)	- (*)
Gsp19	+	+	+	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp20	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp21	+	+	+++	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp22	++	++	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp23	+	+/-	+++	++	- (*)	- (*)
Gsp24	+	+	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp25	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp26	+/-	+	+	++	- (*)	- (*)
Gsp27	+	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp28	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp29	+	++	++	+	- (*)	- (*)
Gsp30	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp31	+	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp32	+	+	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp33	+	+	++	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp34	+	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp35	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp36	+	+	++	+++	- (*)	- (*)
Gsp37	+	+	++	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp38	+	++	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp39	+	+	+	- (*)	- (*)	- (*)
Gsp40	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Gsp41	+	+	+	+	- (*)	- (*)
Gsp42	+	+	+++	+	- (*)	- (*)
Gsp43	+	+	++	+	- (*)	- (*)
Fsp01	++	++	++	+++	- (*)	- (*)
Fsp02	++	++	++	- (*)	- (*)	- (*)

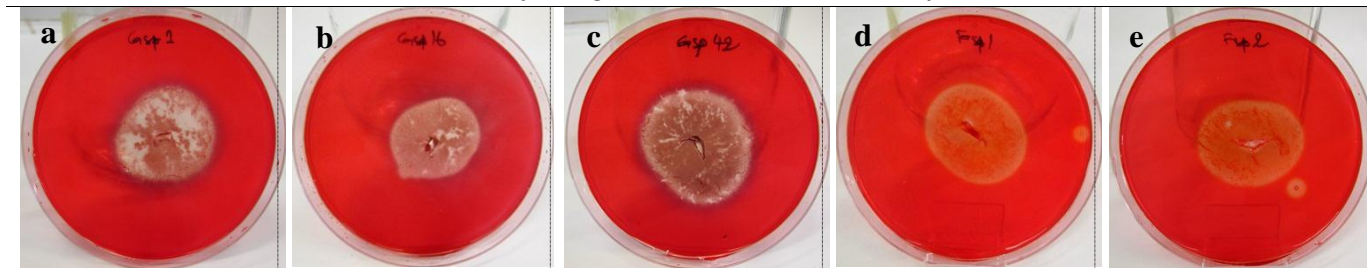
+++ Strong reaction, ++ moderate reaction, + weak reaction, +/- suspicious reaction, - (*) no halo around the growth with hydrolysis inner zone.



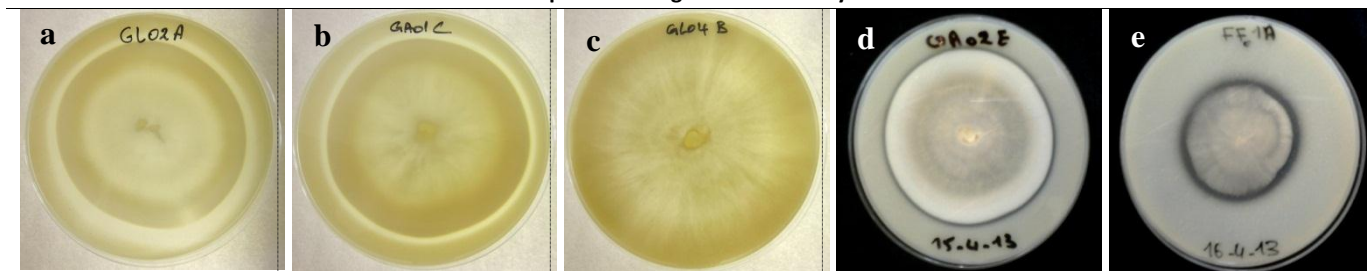
1. Examples of growth and clearance on crystalline cellulose medium



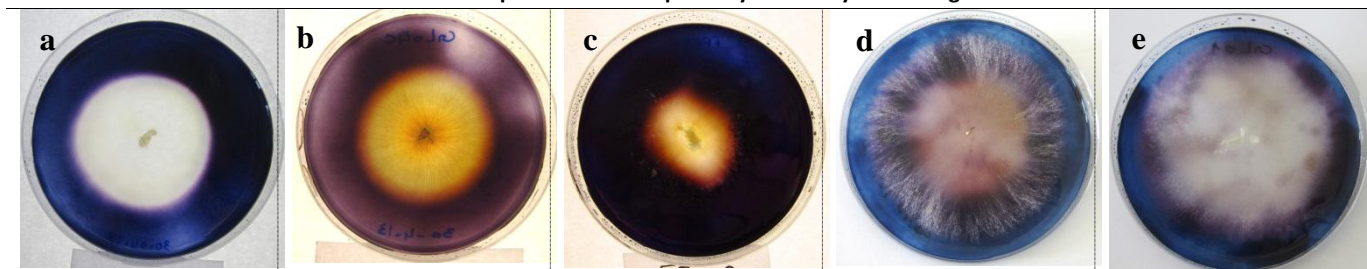
2. Examples of growth and clearance on Filter Paper medium



3. Examples of Endoglucanase activity on CMC medium



4. Examples of different proteolytic activity on milk agar medium



5. Examples of Amylase activity on Starch medium and Cornstarch medium

Figures: Enzyme Activities of *Ganoderma* and *Fomes* species.

Figs (1a and 1b): Fsp2; Fig 1c: Gsp22: Figs. (1d and 1e); *Ganoderma* sp.

Fig2a: Fsp1; Fig 2b: Fsp2; Fig 2c: Gsp33; Figs (2d and 2e): *Ganoderma* sp.

Figs (3a, 3b and 3c): *Ganoderma* sp., Figs (3e and 3d): *Fomes* sp.

Figs (4a, 4b, 4c and 4d): *Ganoderma* sp., Fig4e: Fsp1.

Figs (5a and 5b): *Ganoderma* sp. and Fig 5c: Fsp1 on soluble starch medium,

Figs (5d and 5e): *Ganoderma* sp. on cornstarch medium

Dye staining of Carboxy methylcellulose agar (CMC agar)

All tested fungi exhibited a positive reaction in this assay, with slight different intensities between strains. Highest activity was observed with Gsp21, Gsp22, Gsp24 and Gsp38. Many fungi have been shown to produce endoglucanase activities [38-41], thus; many of them degrade successfully cellulose in wood produce no detectable exoglucanases (Eaton and Hale [42] as cited in Pointing [28]). Although, purified endoglucanases do not show significant activity on crystalline cellulose [12]. This assay is a good indicator of cellulolytic ability, positive reactions are easy to assess.

Detection of proteolytic activity

The 45 isolates grown on skimmed milk agar showed different reactions with different growth rates. Strains exhibited the highest protease activity are Gsp36, Gsp2 and, followed by Gps12, Fsp1 exhibited a significant proteolytic reaction. Most of isolates showed weak proteolytic activity; by forming reduced hydrolysis zones (< 0.2cm) or without halos, but with clearance zone within the colony. Jo, Park [21] reported weak protease production of *Ganoderma* species. The inner clearance zone indicates proteolysis, because milk proteins (mainly caseins) in this medium are the sole source of nitrogen; therefore the growth itself involves the ability of fungi to digest caseins by producing proteolytic enzymes.

Detection of Amylase production

In this test, *Ganoderma* sp. and *Fomes* sp. showed weak reactions. No clear zone around the colonies, just limited brownish or colorless zone below the colony. Choi, Hodgkiss [43] considered this kind of reaction an indicative of intracellular amylase production. Hydrolysis zones in cornstarch medium were mostly irregular and spotted with blue-purple, which indicating the presence of an undegraded starch under the growing hyphae. That could be explained by the heterogeneous nature of starch granules, which composed of two constituents; amylose and amylopectin. The ratio of amylose/amylopectin contents in starch varies depending on botanical source, Amylose is a relatively long, linear α -glucan containing around 99% $\alpha(1\rightarrow4)$ and $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages, whereas amylopectin has a heavily branched structure built from about 95% $\alpha(1\rightarrow4)$ and 5% $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages [44-46], α -amylases degrade mainly $\alpha(1\rightarrow4)$ links bonds, the enzymes have a weak $\alpha(1\rightarrow6)$ hydrolyzing activity [12, 47]. Lacerda, Silva Carvalho Filho [48] have investigated the hydrolysis of cornstarch granules with fungal α -amylase, this latter; acts preferentially at the amorphous regions of granules, the crystalline parts were less altered by the enzymatic attack. The crystallinity of the starch is related to amylopectin fraction [44, 45, 49]. Therefore, high amylopectin content cornstarch can explain the obtained results.

REFERENCES

- [1] Schmidt, O., Wood Cell Wall Degradation, in Wood and Tree Fungi. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 87-107.
- [2] Chang, S.-T. and P.G. Miles, *Ganoderma lucidum* - A Leader of Medicinal Mushrooms, in MUSHROOMS. 2004, CRC Press. p. 375-369.
- [3] Judova, J., et al., The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. *Fungal Biology*, 2012. 116(1): p. 155-160.
- [4] Chen, W., et al., Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, 2008. 99(8): p. 3187-3194.
- [5] Paterson, R.R.M., *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 2006. 67(18): p. 1985-2001.
- [6] Halpern, G.M., Reishi, in *Healing Mushrooms*. 2007, Square One Publishers. p. 55-64.
- [7] Jong, S.C. and J.M. Birmingham, Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*, in *Advances in Applied Microbiology*, L.N. Saul and I.L. Allen, Editors. 1992, Academic Press. p. 101-134.
- [8] Petrova, R.D., et al., Fungal metabolites modulating NF-kappaB activity: an approach to cancer therapy and chemoprevention (review). *Oncol Rep*, 2008. 19(2): p. 299-308.
- [9] Zjawiony, J.K., Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *J Nat Prod*, 2004. 67(2): p. 300-10.

- [10] Gottlieb, A.M., B.O. Saidman, and J.E. Wright, Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research*, 1998. 102(4): p. 415-426.
- [11] Webster, J. and R.W.S. Weber, *Introduction to fungi*. 3rd ed. 2007: Cambridge University Press. 875
- [12] Archer, D.B. and D.A. Wood, Fungal Exoenzymes, in *The Growing Fungus*, N.R. Gow and G. Gadd, Editors. 1995, Springer Netherlands. p. 137-162.
- [13] Papinutti, V.L. and F. Forchiassin, Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 2007. 81(1): p. 54-59.
- [14] Schwarze, F.W.M.R., Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, 2007. 21(4): p. 133-170.
- [15] Elisashvili, V., et al., Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009. 25(2): p. 331-339.
- [16] Murugesan, K., et al., Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007. 40(7): p. 1662-1672.
- [17] Neifar, M., et al., Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes fomentarius* laccase produced in solid medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010. 64(1-2): p. 68-74.
- [18] Vetrovsky, T., P. Baldrian, and J. Gabriel, Extracellular enzymes of the white-rot fungus *Fomes fomentarius* and purification of 1,4-beta-glucosidase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013. 169(1): p. 100-9.
- [19] Revankar, M.S., K.M. Desai, and S.S. Lele, Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007. 143(1): p. 16-26.
- [20] Ro, I.H., Studies on protease activity of *Fomes fermentarius* (Fr.) Kicky. *Theses Collect Sookmyoung Univ Sci*. 25: 475-478,1984.
- [21] Jo, W.S., et al., Detection of Extracellular Enzyme Activities in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 2011. 39(2): p. 118-20.
- [22] Choi, H.S. and Y.S. Sa, Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*, 2000. 92(3): p. 545-552.
- [23] Kumaran, S., et al., Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an isolate (VK12) of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its antithrombotic activity. *Med Mycol J*, 2011. 52(2): p. 153-62.
- [24] Han, J.R., C.H. An, and J.M. Yuan, Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *J Appl Microbiol*, 2005. 99(4): p. 910-5.
- [25] Irshad, M., et al., Purification and characterization of α -amylase from *Ganoderma tsuaga* growing in waste bread medium. *Afr. J. Biotechnol*, 2012. 11(33).
- [26] Canam, T., et al., Biological pretreatment with a cellobiose dehydrogenase-deficient strain of *Trametes versicolor* enhances the biofuel potential of canola straw. *Bioresource Technology*, 2011. 102(21): p. 10020-10027.
- [27] Zhang, X., et al., Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007. 60(3): p. 159-164.
- [28] Pointing, S.B., Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 1999. 2: p. 17-33.
- [29] Jarvis, B., Comparison of an Improved Rose Bengal-Chlortetracycline Agar with Other Media for the Selective Isolation and Enumeration of Moulds and Yeasts in Foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 1973. 36(4): p. 723-727.
- [30] King, A.D., Jr., A.D. Hocking, and J.I. Pitt, Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol*, 1979. 37(5): p. 959-64.
- [31] Ottow, J.C., Rose bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. *Mycologia*, 1972. 64(2): p. 304-15.
- [32] Pointing, S.B., L.L.P. Vrijmoed, and E.B.G. Jones, A Qualitative Assessment of Lignocellulose Degrading Enzyme Activity in Marine Fungi, in *Botanica Marina*. 1998. p. 293.
- [33] Cruz da Silva, L.R., et al., Culturable fungal diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei* boone from breeding farms in Brazil. *Braz J Microbiol*, 2011. 42(1): p. 49-56.

- [34] Paterson, R.R.M. and P.D. Bridge, *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. 1994, Wallingford. UK: CAB International.
- [35] Khan, J.A. and S.K. Yadav, Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 2011. 1(3): p. 100-108.
- [36] Ottow, J.C. and H. Glathe, Rose bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*, 1968. 16(1): p. 170-1.
- [37] Teeri, T.T., Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 1997. 15(5): p. 160-167.
- [38] Ahlawat, O.P., et al., Profile of the extracellular lignocellulolytic enzymes activities as a tool to select the promising strains of *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) sing. *Indian Journal of Microbiology*, 2008. 48(3): p. 389-396.
- [39] Buswell, J.A., et al., Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996. 12(5): p. 537-542.
- [40] Cai, Y.J., J.A. Buswell, and S.T. Chang, Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycological Research*, 1994. 98(9): p. 1019-1024.
- [41] Pointing, S.B., et al., Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. *Mycological Research*, 1999. 103(6): p. 696-700.
- [42] Eaton, R.A. and M.D.C. Hale, *Wood: Decay, Pests and Protection*. Chapman & Hall, London, UK ed. 1993.
- [43] Choi, Y.W., I.J. Hodgkiss, and K.D. Hyde, Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*, 2005. 1: p. 55-66.
- [44] French, D., CHAPTER VII - ORGANIZATION OF STARCH GRANULES, in *Starch: Chemistry and Technology (Second Edition)*, L.W. Roy, et al., Editors. 1984, Academic Press: San Diego. p. 183-247.
- [45] Tester, R.F., J. Karkalas, and X. Qi, Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 2004. 39(2): p. 151-165.
- [46] Cai, L. and Y.-C. Shi, Structure and digestibility of crystalline short-chain amylose from debranched waxy wheat, waxy maize, and waxy potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 2010. 79(4): p. 1117-1123.
- [47] Tawil, G., et al., Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. 87(1): p. 46-52.
- [48] Lacerda, L.G., et al., Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal α -amylase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008. 93(2): p. 445-449.
- [49] Xie, F., et al., Rheological properties of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 2009. 49(3): p. 371-377.