

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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEEN

**Faculté des sciences de la nature et de la vie,
Des sciences de la terre et de l'univers**

Département de biologie



Mémoire

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
Option : Biologie de la Nutrition**

Présenté par :

M^{elle} SENOUSSAOUI Rahima

Thème

*Etude de l'activité hémolytique et anti-hémolytique des extraits de
quelques champignons – synthèse des travaux –*

Encadré par :

Promoteur M^r TEFIANI . C Maître de conférence A Université Tlemcen, Algérie

Année universitaire : 2020/2021

Dédicaces

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant pour son aide et sa grâce infinie.

A celle qui m'a soutenue et encouragée durant toute ma vie. A celle qui m'a laissée manquer de rien. A elle qui avec son sourire, sa générosité et son énorme bon cœur, m'a toujours aidé à avancer vers le droit chemin.

Nulle dédicace ne peut exprimer mon amour pour elle, ma maman chérie.

A ma chère sœur HANANE, tout spécialement, qui sans elle je ne serais pas arrivée aussi loin dans mes études, Pour son immense générosité, son aide, ses conseils...Un grand merci.

A mon grand frère MOUFFOK ;

A ma sœur chérie NISRINE ;

A ma douce sœur CHAHINEZ ;

A mon petit frère ABD ENOUR ;

A tous ceux qui ont une place dans mon cœur ;

C'est à vous tous, mes chers, que je dédie ce travail.

Rahima

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord, le bon DIEU, le tout puissant, qui m'a donné la force et le courage afin de parvenir à élaborer ce modeste travail.

Ce mémoire a été réalisé sous la direction de Monsieur TEFIANI. C, Maître de Conférence (A) à l'université de Tlemcen. Je tiens à le remercier pour m'avoir encadré et guidé, merci pour la liberté qu'il m'a laissé ainsi que la confiance dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude ainsi que ma réelle reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à ce travail de près ou de loin, et cela par un simple mot mais qui porte un large sens « merci ».

Je remercie les enseignants qui ont contribué à ma formation au cours de mon parcours universitaire.

Un grand merci

Rahima

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- **ARN** : Acide ribonucléique.
- **C** : Carbone.
- **CCM** : chromatographie sur couche mince.
- **CO₂** : dioxyde de Carbone.
- **COVID-19** : Corona Virus Disease-19.
- **EDTA** : l'acide éthylènediaminetétraacétique.
- **ELL** : Extraction Liquide-Liquide.
- **EPMA** : Electron Probe Micro Analysis.
- **ESI-MS** : Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry.
- **ESL** : Extraction Solide-Liquide.
- **G** : Gramme.
- **KDa** : Kilo- Dalton.
- **mg/g** : milligramme par gramme.
- **ml** : millilitre.
- **mM** : Mili mol.
- **Mn** : minute.
- **nm** : nanomètre.
- **NOESY** : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.
- **OMS** : Organisation Mondiale de Santé.
- **PBS** : Phosphate-Buffered Saline.
- **PFNL** : Produit Forestier Non-Ligneux.
- **pH** : potentiel Hydrogène.

- **PLE** : Extraction Liquide sous Pression.
- **PMSF** : Phénylméthylsulfonyle.
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.
- **SFME** : Solvent Free Microwave Extraction.
- **TLC** : Thin-Layer Chromatography.
- **tr/min** : tour/minute.
- **U.V** : Ultra-Violet.
- **v/v** : volume par volume.
- **°C** : Degré Celsius.
- **3D** : 3 dimension.
- **µg/mL** : microgramme par millilitre.
- **µm** : Micromètre.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Classification des champignons supérieurs.....	7
Figure 2. Cycle de vie d'un champignon sauvage.....	8
Figure 3. Anatomie du champignon.....	9
Figure 4. Forme du chapeau.....	10
Figure 5. Les différentes ornementation des spores fongiques.....	11
Figure 6. Mode de vie des champignons sauvages.....	13
Figure 7. Structure chimique de lectine.....	18
Figure 8. Structure chimique des laccases trouvées dans les champignons.....	18
Figure 9. Structure chimique des lipides fongiques.....	20
Figure 10. Structure de base d'un polysaccharide de champignon typique.....	21
Figure 11. Exemples de certains composés terpéniques isolés des champignons comestibles.....	25
Figure 12. Diagramme schématique illustrant les propriétés bénéfiques pour la santé et médicinales des composés bioactifs des champignons.....	29
Figure 13. Schéma de principe d'extraction par macération.....	34
Figure 14. Illustration schématique de la méthode d'extraction au Soxhlet.....	36
Figure 15. Schéma de principe d'extraction par micro-ondes sans solvant (SFME) (Aslam M et al, 2018).....	38
Figure 16. Schéma de principe du système d'extraction de liquide sous pression (PLE) (Umar I et al, 2021).....	40
Figure 17. Effet du pH sur l'exposition de l'activité hémolytique et la turbidité d'un extrait de fructifications de <i>H. marmoreus</i> . (Saito et al., 2018).....	47

Figure 18. (A). Effet du traitement thermique sur l'activité hémolytique des extraits avant ou après abaissement du pH. (B). Les échantillons ont été soumis à un dosage hémolytique. Les témoins ont été produits en omettant l'ébullition	48
Figure 19. Effet des inhibiteurs de l'activité hémolytique sur des extraits à faible pH	49
Figure 20. Fractionnement de l'activité hémolytique à l'aide d'une méthode modifiée de Bligh et Dyer et d'une CCM. (A). Une fraction de précipité fractionnée en utilisant une méthode modifiée de Bligh et Dyer. (B). La fraction de couche inférieure développée sur des plaques TLC en utilisant un système de solvant de chloroforme/méthanol/eau (60:35:6, v/v)	50
Figure 21. Purification d'un composé hémolytique par chromatographie en phase inversée et sur colonne de silice. (A). Chromatogramme lors de l'utilisation de la colonne de cartouche Strata C18-E. (B). Chromatogramme lors de l'utilisation de la colonne Wakogel C-200. (C). Analyse CCM d'un composé hémolytique purifié par rechromatographie avec une colonne de gel de silice	51
Figure 22. Spectres NOESY. Le panneau : (A). montre l'ensemble du spectre et la zone indiquée est agrandie dans le panneau. (B). Les flèches a-d indiquent les interactions NOE à longue portée entre H-4 et H-6, H-8 et H-10, H-7 et H-9, et H-5 et H-7, respectivement	52
Figure 23. Structure déduite du composé hémolytique purifié à partir d'un extrait traité à faible pH de fructifications de <i>H. marmoreus</i> . Interaction NOE ; a (H-4 et H-6), b (H-8 et H-10), c (H-7 et H 9), d (H-5 et H-7)	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Trois composés odorants d'acide phénolique trouvés dans les champignons..... 23

SOMMAIRE

Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Généralités sur les champignons	
1. Biologie des champignons	4
2. Les champignons sauvages forestiers	4
2.1. Les champignons supérieurs	5
2.1.1. Les Basidiomycota	5
2.1.2. Les Ascomycota	6
3. Croissance et cycle de vie des champignons sauvages forestiers	7
4. Critères morphologiques	9
5. Mode de vie	11
5.1. Les champignons saprophytes	11
5.2. Les champignons parasites	12
5.3. Les champignons symbiotiques	12
6. Classification des champignons sauvages forestiers	13
6.1. Champignons comestibles	14
6.2. Champignons vénéneux	15
7. Composition chimiques des champignons	17
7.1. Les métabolites primaires	17
7.1.1. Les protéines	17
7.1.1.1. Les lectines	17
7.1.1.2. Les enzymes, protéines fongiques immunomodulatrices et les acides aminés	18
7.1.2. Les lipides	19
7.1.3. Les polysaccharides	20
7.2. Les métabolites secondaires	21
7.2.1. Les composés phénoliques	22
7.2.1.1. Les acides phénoliques	22
7.2.1.2. Les flavonoïdes	23
7.2.2. Les composés terpéniques	24
8. Intérêt médical et nutritionnel des champignons	25
8.1. Intérêt médical	25
8.2. Intérêt nutritionnel	27

Chapitre II : Extraction

1. définition de l'extraction	30
2. But de l'extraction	30
3. Techniques d'extraction	31
3.1. Techniques conventionnelles	31
3.1.1. Extraction liquide-liquide	31
3.1.2. Extraction solide-liquide	32
3.1.2.1. La macération	33
3.1.2.2. Extraction à chaud en continu (Soxhlet)	35
3.2. Techniques non conventionnelles	36
3.2.1-Extraction assistée par micro-ondes	37
3.2.2. Extraction avec liquide sous pression	38

Matériels et Méthodes

1. Fructifications et réactifs	42
2. Préparation de l'extrait et ajustement de son pH	42
3. Activité hémolytique	43
4. Génération et préparation d'un composé hémolytique brut	43
5. Purification du composé hémolytique par chromatographie sur colonne	44
6. Chromatographie sur couche mince (CCM)	44
7. Analyses structurales du composé hémolytique	44

Résultats et Discussion

1. Activité hémolytique	47
2. Analyses structurales et détermination de la nature du composé hémolytique	49
Conclusion	56
Références bibliographiques	58

Introduction



INTRODUCTION

Il est entendu que les êtres humains sont constamment à la recherche de nouvelles substances qui peuvent améliorer les fonctions biologiques et rendre les gens plus en forme et en meilleure santé. Récemment, la société s'est tournée vers les plantes, les herbes et la nourriture comme sources de ces exhausteurs. Ces produits ont été appelés diversement vitamines, compléments alimentaires, aliments fonctionnels, nutraceutiques... Les champignons, à cet égard, commencent maintenant à recevoir une attention bien méritée pour leurs véritables qualités bénéfiques pour la santé (**Rahi et Malik, 2016**). Au fil des siècles, ils ont évolué de la nourriture des pauvres à un met délicat, à la position où ils sont maintenant principalement devenus un complément nutritionnel, souvent avec des effets curatifs. La cueillette des champignons a augmenté dans le monde entier et a évolué depuis les années 1980 devenant ainsi une activité récréative avec des spécificités régionales à locales (**Olah et al., 2020**).

Les champignons sont cruciaux pour le fonctionnement de la plupart des écosystèmes forestiers sur terre. Ils forment généralement des communautés riches en espèces dans leurs divers habitats (**Guerreiro et al., 2018**). En tant que décomposeurs, ils sont les organismes les plus importants pour la dégradation de la matière organique jouant un rôle clé dans le cycle des nutriments (**Ruiz-Almenara et al., 2019**). Cependant, les champignons, en plus de l'alimentation de la faune, peuvent être utilisés comme agents de gestion environnementale dans les processus de contrôle des mauvaises herbes ou d'amélioration de l'environnement en tant que services de régulation et d'entretien tels que la biorestauration, la filtration ou les processus de décomposition, de fixation et leur effet sur la qualité du sol (**Olah et al., 2020**).

L'appréciation scientifique de leurs attributs nutritionnels et médicinaux est un phénomène récent. Le champignon est peut-être le seul consommé délibérément et sciemment par les êtres humains et il complète l'alimentation humaine avec divers ingrédients non rencontrés ou défectueux dans les aliments d'origine végétale et animale faisant de ce dernier un produit précieux en raison de sa texture attrayante et de son goût unique (**Rahi et Malik, 2016 ; Kosanic et al., 2019**).

D'autre part, dans les anciens livres de médecines traditionnelles, les champignons médicinaux faisaient la une des journaux et les principaux sujets confirmaient leurs pouvoirs thérapeutiques miraculeux: la présence de divers composés phénoliques, polysaccharides, terpénoïdes et autres composés a attiré l'attention en tant que mine de nouveaux composés dotés



de nouveaux mécanismes d'action ou d'activités biologiques comme produit anticancéreux, antioxydant, antimicrobien, anti-vieillessement, protecteur hépatique, hypoglycémiant, hypocholestérolémiant, hémolytique et bien d'autres activités biologiques sont découvertes chaque jour (Elkhateeb et al., 2019 ; Saito et al., 2018).

De ce fait, cette composition chimique unique les rend adaptés à des groupes spécifiques souffrant de certains troubles ou affections physiologiques. Cela fait des champignons un aliment santé ultime (Mleczek et al., 2021).

En prenant compte le fait que les champignons sont largement utilisés et consommés dans le monde entier et vu le peu des travaux se rapportant sur l'activité hémolytique et anti-hémolytique de plusieurs espèces fongiques, on s'est fixé pour objectif de mettre en œuvre ces activités afin de valoriser cette ressource naturelle.

Mon manuscrit est structuré en 2 parties :

1- La première partie porte sur une mise au point bibliographique, abordant le sujet étudié, divisé en 2 chapitres :

- Le 1^{er} chapitre met en revue les connaissances actuelles concernant le règne fongique, le mode de vie, le cycle de développement, la classification ainsi que la teneur en molécules bioactives des différents champignons sauvages forestiers et leur impact sur la santé humaine.

-Le 2^{ème} chapitre met en œuvre les différentes techniques conventionnelles et non conventionnelles les plus utilisées pour l'extraction des métabolites secondaires tout en valorisant le respect environnemental en utilisant la technologie d'extraction verte.

2- La seconde partie traite le travail expérimental de 2 travaux scientifiques comprenant l'étude de l'activité hémolytique, la purification et l'identification chimique du composé hémolytique extrait des fructifications du champignon comestible *H. marmoreus*. Cette partie expose le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude ainsi la discussion et les résultats phytochimiques et biologiques obtenus.

Enfin, une conclusion vient résumer l'ensemble de l'étude en soulignant les résultats intéressants tirés des travaux scientifiques.

*Synthèse
Bibliographique*



1. Biologie des champignons :

Dans les temps historiques, les champignons étaient considérés comme faisant partie du règne végétal, mais la taxonomie actuelle reconnaît les champignons comme un groupe indépendant d'organismes sous le règne Mycota, généralement en raison de la présence de chitine à l'intérieur de leurs parois cellulaires (**Sharifi-Rad et al., 2020**).

Les champignons sont des organismes eucaryotes possédant donc de véritables noyaux. Ils sont hétérotrophes (vis-à-vis du carbone), c'est-à-dire incapables, contrairement aux plantes, de synthétiser par la photosynthèse des composés organiques (comme les glucides) à partir du CO₂ atmosphérique. Ils doivent donc trouver du carbone organique dans leur environnement. Ce sont des organismes absorbotrophes car ils sont capables d'absorber les substances nutritives par absorption. Les champignons sont généralement constitués d'un appareil végétatif ramifié, diffus, non différencié et tubulaire appelé thalle. Ce thalle, non cloisonné chez les champignons inférieurs (Zygomycota, Glomeromycota), est appelé siphon alors qu'il est cloisonné ou septé chez les champignons dits supérieurs (Ascomycota et Basidiomycota). Plus rarement, certains champignons peuvent rester sous forme unicellulaire : il s'agit des levures. Chez les champignons, la reproduction s'effectue par moyen de spores non flagellées de façon sexuée ou asexuée (**Fons et al., 2018**).

Bien que les champignons sauvages soient saisonniers et puissent être récoltés et utilisés, ils peuvent être domestiqués grâce à la culture de spores (**Sharifi-Rad et al., 2020**).

2. Les champignons sauvages forestiers :

Les champignons occupent une place de choix au nombre des produits forestiers non-ligneux PFNL (**Yian et al., 2020**).

Les champignons forestiers ont été définis comme des macromycètes avec un corps de fructification distinctif qui est assez grand pour être vu à l'œil nu et être ramassé par la main. Selon cette définition, les champignons peuvent être soit des champignons supérieurs ou épigés (poussant au-dessus du sol), soit des champignons inférieurs ou hypogéaux (champignons souterrains) (**Niazi et Ghafoor, 2021**).

D'après la **FAO 2020**, 5% des espèces de champignons se trouvent dans les écosystèmes forestiers, soit environ 1 500 000 espèces estimées dans le monde (**Putra, 2020**) dont seulement 10% environ sont classées taxonomiquement (**Okigbo et Okigbo, 2018**). Cette diversité fongique est liée à la diversité des habitats et microhabitats que la forêt génère (**Ana et al., 2014**) ; La fertilité de la terre forestière confère une grande concentration de matière organique

à ces organismes hétérotrophes, qui ont besoin de puiser directement dans leur environnement immédiat des substances organiques pour se nourrir (Ana et al., 2014). Ainsi, plusieurs études ont suggéré que l'humidité, les précipitations et la température sont les principaux facteurs affectant la fructification et la diversité des macromycètes dans les forêts tempérées et tropicales et que la température et l'humidité sont les meilleurs prédicteurs de la richesse fongique. Outre les conditions microclimatiques, de nombreuses variables environnementales ont été liées à la diversité macrofongique et à la production de fructifications, telles que la pente, l'aspect, la surface terrière, la présence de roches, la densité et l'espèce d'arbres ; la possibilité de spécialisation des macromycètes augmente en raison de la forte abondance de quelques espèces d'arbres (Ruiz-Almenara et al., 2019).

Notre étude mycologique expérimentale est consacrée spécialement aux macromycètes supérieurs (champignons aériens).

2.1. Les champignons supérieurs :

Les champignons supérieurs ou macromycètes sont un groupe d'organismes appartenant au règne Fungi généralement regroupés en familles: Ascomycota et Basidiomycota, qui, dans des conditions spéciales développent un corps fructifère de taille suffisante pour être vu à l'œil nu ou pour être touché, poussant sur le sol et sont appelés épigés (Rathore et al., 2019; Singh et Passari, 2018). Dans le règne Fungi, les phyla Ascomycota et Basidiomycota couvrent environ 97% de toutes les espèces fongiques (Willis, 2018). Ces macromycètes sont de grands champignons avec de grandes structures porteuses de spores observables sans l'aide de microscope (Kinge et al., 2017). La production de spores sexuelles constitue l'un des critères les plus importants pour différencier les groupes des champignons supérieurs. Ces derniers sont produits dans des asques et des basides, ce qui permet de distinguer les deux groupes de champignons, Ascomycota et Basidiomycota (Ana et al., 2014).

2.1.1. Les Basidiomycota :

Les Basidiomycota constituent un phylum majeur du royaume des champignons et sont le deuxième en nombre d'espèces après les Ascomycota (Wijayawardene et al., 2017; Wijayawardene, 2018). Ils contiennent au moins 30000 espèces différentes dans le monde et comprend bon nombre de champignons vénéneux, champignons de support, puffballs, boules de terre, étoiles de terre, stinkhorns, fausses truffes, champignons de gelée, charbons, rouilles

et quelques formes moins familières (Elnaiem et al., 2017). Il a été estimé qu'environ 32% des taxons fongiques décrits appartiennent à ce phylum (Dai et al., 2015).

Actuellement, les Basidiomycota comprennent trois sous-phylum majeurs: Pucciniomycotina, Agaricomycotina et Ustilaginomycotina (He et al., 2019). Tous produisent leurs spores sur la surface externe de cellules microscopiques appelées basides (Deepak et Deepika, 2016). L'ensemble des basides formant le basidiome, représente la structure macroscopique et est produite par les Basidiomycota pour leur reproduction sexuée, pouvant être au-dessus du sol ou séquestrer. Cette reproduction concerne les Agaricomycotina qui sont des champignons typiques tels que des bolets, des boules de bouffées, des étoiles de la terre ou d'autres structures. Certains taxons ne semblent pas former de basidiome mais sont néanmoins membres du Basidiomycota. Ces taxons comprennent les rouilles et les charbons, qui font partie de Pucciniomycotina et Ustilaginomycotina. Les taxons formant des levures, qui se trouvent généralement dans leur mode de vie asexué, sont également membres de Basidiomycota et peuvent être trouvés dans ces trois sous-phylums (He et al., 2019).

2.1.2. Les Ascomycota :

L'Ascomycota est le plus grand phylum des champignons, contenant 94 000 des 150 000 espèces décrites soit 63% du règne fongique, publié dans Species Fungorum en janvier 2021 (Hill et al., 2021). Ce dernier comprend plusieurs groupes familiaux y compris des moisissures, des levures ou des sporocarpes (Sanchez et al., 2021).

Les caractéristiques les plus communes de ce phylum sont la production de spores sexuelles "les ascospores" qui sont développées dans des cellules reproductrices spécialisées en forme de sac appelées asques (Denchev et al., 2013), varient en forme et en taille et pouvant être libres sur le thalle ou contenus dans des ascocarpes ainsi que la présence de parois hyphales lamellaires avec une couche externe mince dense aux électrons et une couche interne relativement épaisse, transparente aux électrons (Nasraoui, 2015). Le terme ascome est généralement utilisé pour décrire leur organe de fructification «charnu» (Wijayawardene et al., 2017; Jaklitsch et al., 2016) et peut se trouver sous plusieurs formes à savoir rond à ovale, bol, éponge spongieuse et corail (Putra, 2021). Les Ascomycota sont abondants dans le sol, mais peuvent aussi être trouvés dans les milieux aquatiques et dans les plantes car plusieurs d'entre eux sont des phytopathogènes (Vera et al., 2017; Egidi et al., 2019).

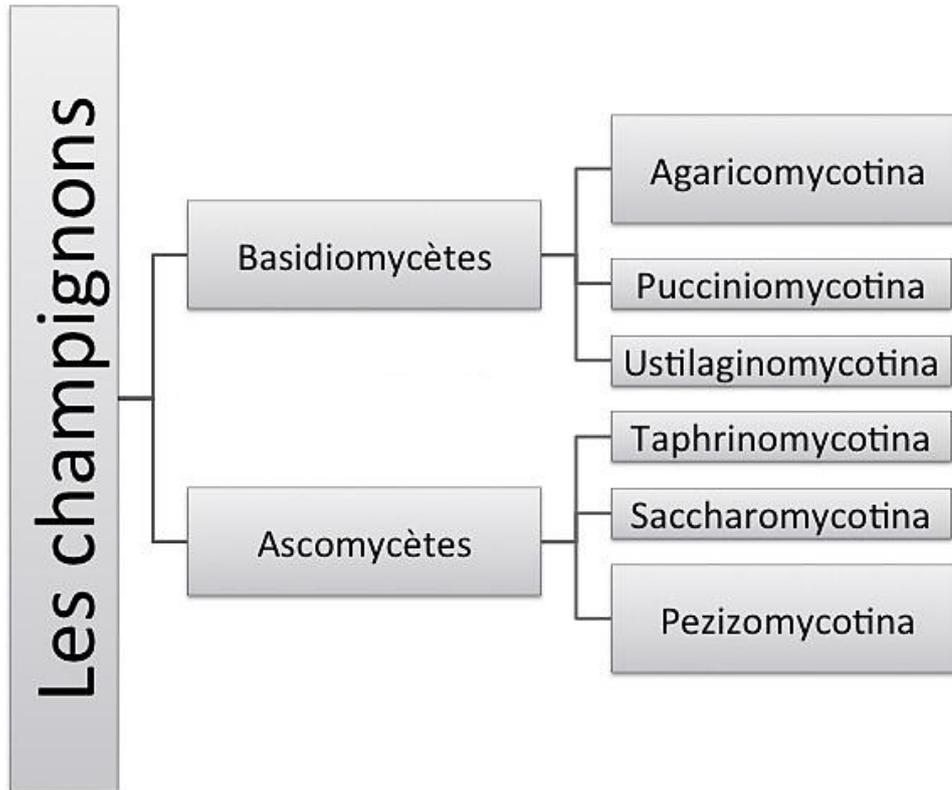


Figure 1. classification des champignons supérieurs.

3. Croissance et cycle de vie des champignons sauvages forestiers :

La croissance d'un champignon comprend deux phases de croissance : la phase de reproduction (corps fruitier) et la phase végétative (mycélium) (Sánchez, 2017).

La vie d'un champignon forestier commence généralement par une spore, qui a un diamètre de seulement quelques microns (μm). La spore commence à gonfler dans un environnement humide et riche en nutriments et germe. Il se forme un tube germinatif qui s'allonge pour finalement former une cellule filiforme et filamenteuse, appelée hyphe. Après la croissance et l'allongement de l'hyphe pendant un certain temps, il forme un réseau de fils hyphes interconnectés appelé mycélium. Lorsque les nutriments deviennent limités dans le substrat dans lequel vit le mycélium, ce dernier commence à explorer l'air et l'espace afin de former des structures de reproduction.

Les Ascomycota (moisissures) peuvent former des conidiophores qui produisent des spores asexuées à leurs extrémités et/ou des fructifications qui produisent des spores sexuées à l'intérieur. Les Basidiomycota sont connus pour leur capacité à former des fructifications pour

générer des spores sexuelles. Certains de ces organes de fructification sont familièrement appelés champignons. Ces fructifications sont constituées de mycéliums plus denses et de composition différente par rapport aux mycéliums de substrat plutôt lâches, qui forment des structures tridimensionnelles.

Les champignons peuvent être à la fois invisibles et visibles. Le diamètre des hyphes fongiques varie de 2 à 10 μm , et un mycélium fongique est constitué d'un réseau d'hyphes de quelques mm à quelques cm de long. Le mycélium des champignons peut coloniser de grandes surfaces pouvant aller jusqu'à 1000 hectares du sol forestier ; l'efficacité de la colonisation et de la formation de cette biomasse est déterminée par la composition et les propriétés physiques du substrat, les conditions environnementales de croissance (température, humidité et pH) et la constitution génétique du champignon (Meyer et al., 2020).

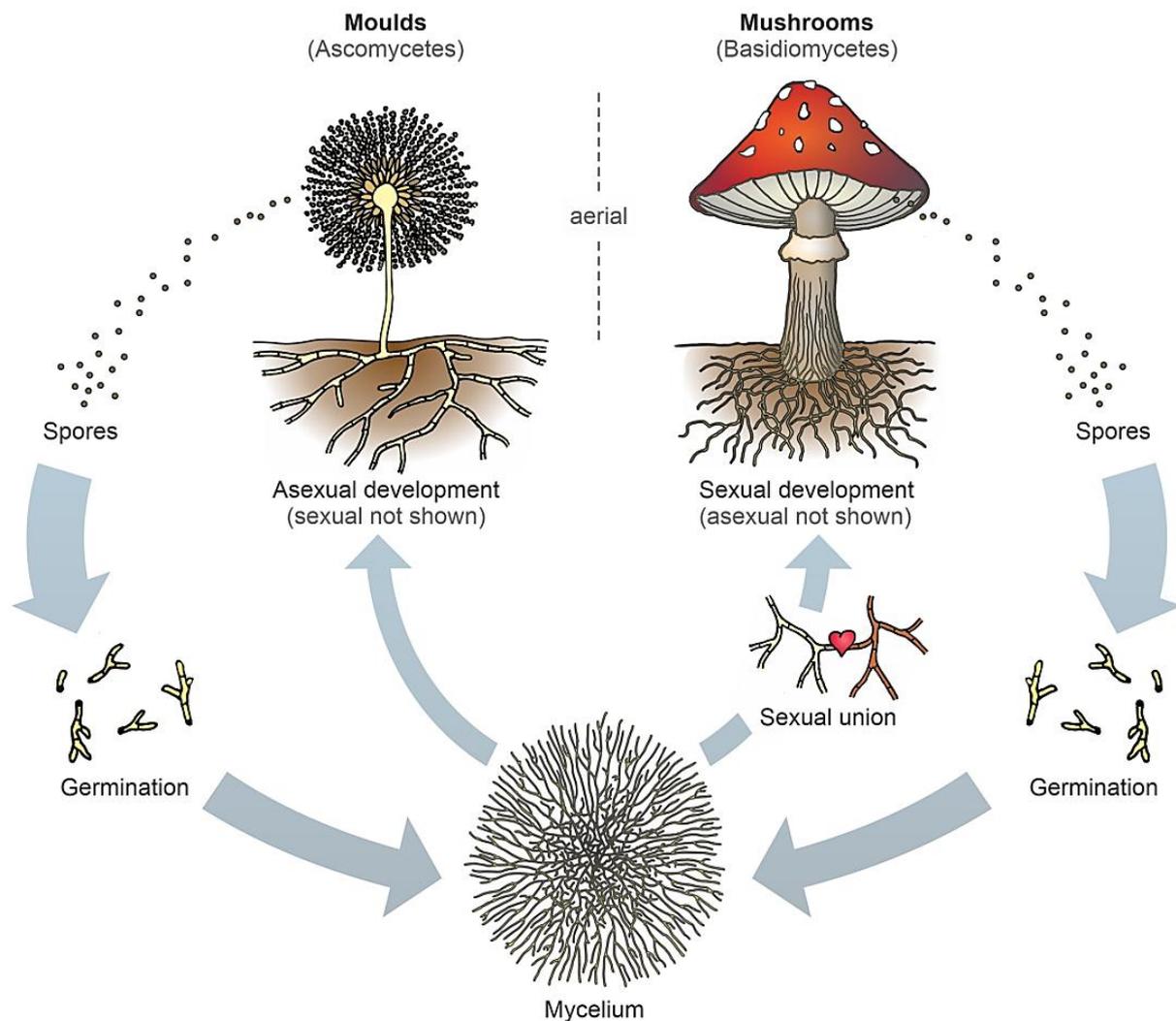


Figure 2. Cycle de vie d'un champignon sauvage. (Meyer et al., 2020)

4. Critères morphologiques :

D'après des études menées par **Akhter et al.** en **2017** sur la biodiversité, l'habitat et la morphologie de 11 espèces fongiques cultivées dans différentes forêts des régions de Bangladesh, il s'avère que toutes les espèces de champignons présentent une grande diversité dans leurs caractères morphologiques. Ils varient beaucoup en forme, taille et couleur ; un champignon est composé d'un chapeau (pileus) porté sur une tige (stipe) et des branchies (lamelles) ou des spores sur la face inférieure du chapeau. L'ensemble formant l'organe de fructification, charnus chez certains Ascomycota et ligneux ou coriaces chez certains Basidiomycota.

Les champignons colonisent leur substrat à travers des cellules filamenteuses allongées appelées hyphes, qui se développent et forment un réseau filamenteux entrelacé tridimensionnel (3D), connu sous le nom de mycélium à travers lequel le champignon tire ses nutriments (**Sehrish et al., 2021**).

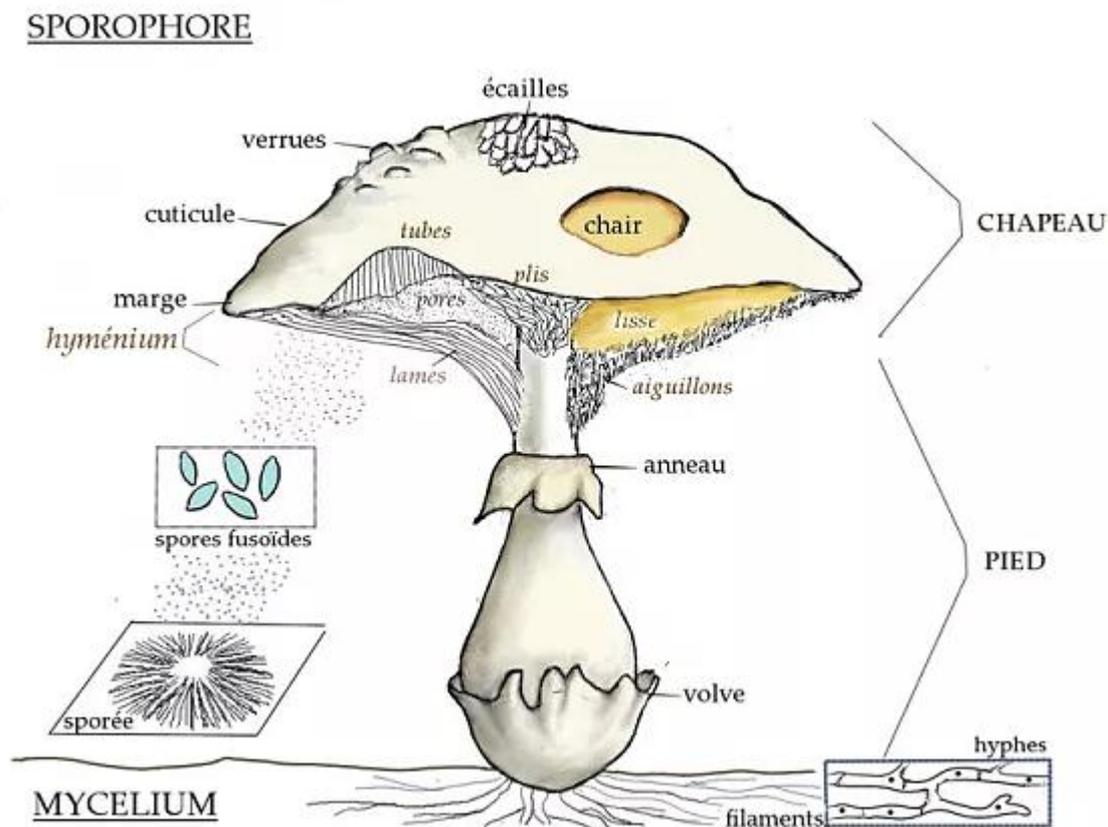


Figure 3. Anatomie du champignon.

Chaque partie du corps fongique est caractérisée par différents traits morphologiques, à savoir la forme, le bord, ou la longueur du chapeau ; le plus connu est hémisphérique ou convexe, déprimé, décalé, ombonate, umblicate, infundibiliforme, dont beaucoup deviennent plats à mesure qu'il mûrit. Le bord du capuchon peut être rainuré, plissé et fendu (**Akhter et al., 2017**).

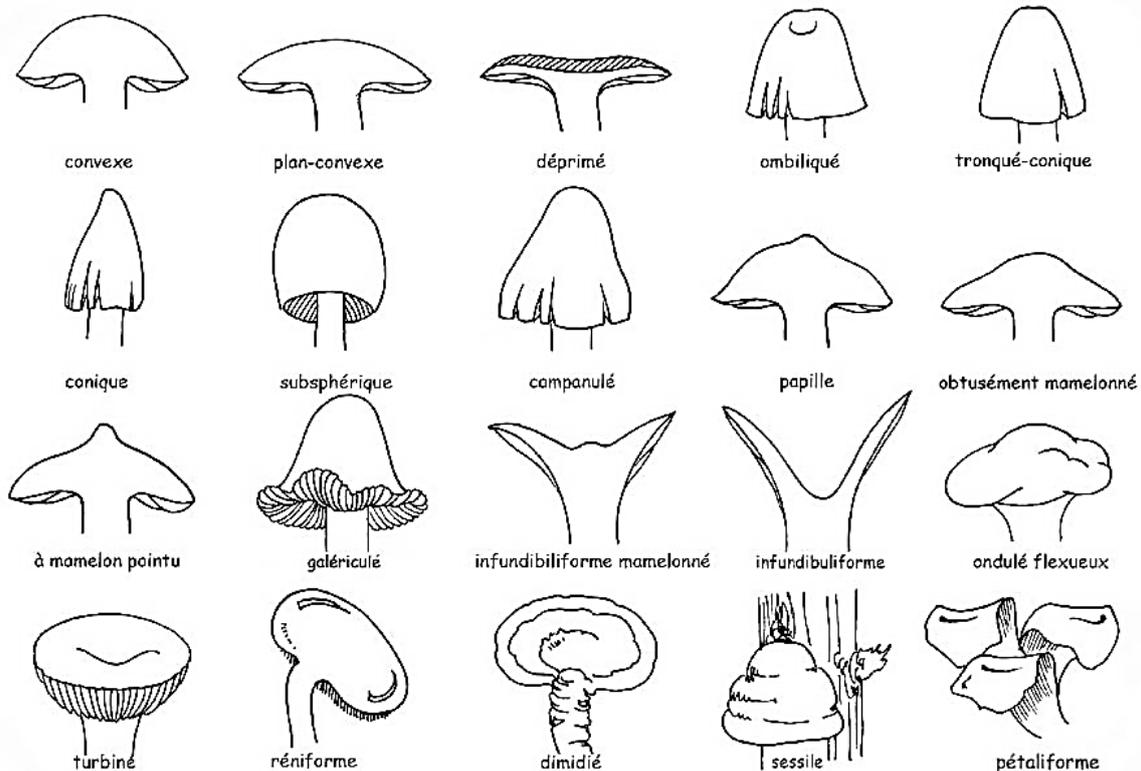


Figure 4. Forme du chapeau.

La taille de la fructification, la longueur du stipe, la marge du corps fructifère, les branchies, les écailles, l'anneau, la volve ainsi que l'empreinte, la couleur, la structure ou l'ornementation de spores sont des critères qui permettent de distinguer entre les différentes espèces de champignons ; il existe différents types de couleurs et d'ornementations de spores telles que globuleuses ou subglobuleuses, cylindriques, fusiformes, filiformes, anguleuses, échinulées, verruqueuses, tuberculées, obtusément fusiformes, ovoïdes et ellipsoïdes (**Akhter et al., 2017**).

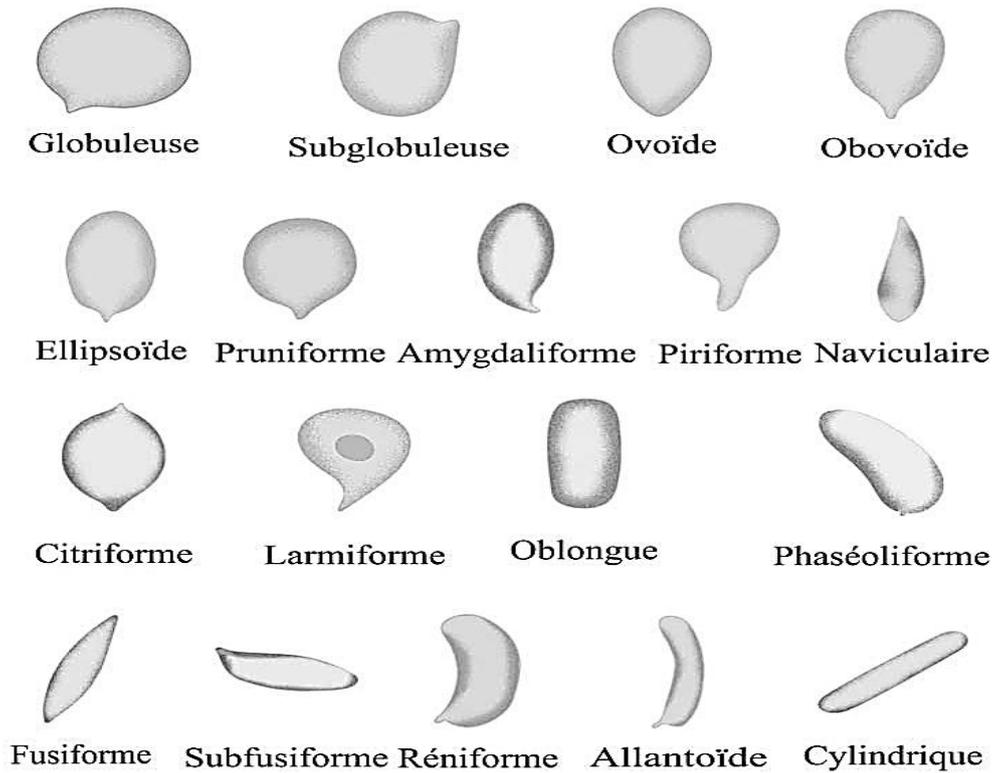


Figure 5. Les différentes ornementsations des spores fongiques.

5. Mode de vie :

Les champignons peuvent vivre dans trois conditions différentes à savoir saprophytes, parasitaires et symbiotiques (Ezzudin et al., 2019).

5.1. Les champignons saprophytes :

Les saprotrophes fongiques sont les décomposeurs les plus efficaces de la matière végétale morte dans le sol, l'eau et les sédiments. Dans ce contexte, les champignons saprophytes utiliseront leurs enzymes pour décomposer la matière organique à l'intérieur des champignons (Ezzudin et al., 2019). La décomposition physique des tissus végétaux est effectuée par des métazoaires, tels que les vers de terre et les acariens après quoi les champignons saprophytes effectuent les premières étapes de la décomposition de la cellulose, de la lignine et d'autres macromolécules complexes. Les composés résultants seront ensuite traités par des bactéries. Par conséquent, les champignons saprophytes sont généralement considérés comme un moteur principal du processus de décomposition.

Dans les écosystèmes des prairies, la communauté saprophyte est entraînée par la quantité de racines mourantes et en décomposition, qui constituent plus de la moitié de la biomasse végétale et sont un organisme majeur à l'apport de matière organique dans les sols. Il est bien connu, des études de biodiversité dans les prairies, que la biomasse des racines et la teneur en matière organique du sol augmentent avec la richesse en espèces végétales. Cette quantité accrue de substrat peut affecter la communauté fongique. A côté d'une quantité accrue de substrat, la communauté saprophyte est animée par la qualité du substrat. Les espèces végétales varient dans leurs traits chimiques racinaires, tels que la teneur en carbone, en azote et en lignine. Des communautés végétales très diversifiées peuvent abriter davantage de niches écologiques à occuper par des champignons saprotrophes en raison d'une diversité accrue de substrats organiques entrant dans les sols (**Francioli et al., 2021**).

5.2. Les champignons parasites :

Les champignons parasites sont des champignons qui poussent sur les arbres et absorbent les nutriments des arbres (**Ezzudin et al., 2019**). Les parasites vont vivre aux dépens d'organismes vivants (champignons, plantes, insectes, animaux, homme). Certains parasites sont dits obligatoires alors que d'autres sont facultatifs ou opportunistes. Ils pénètrent chez l'hôte par des voies naturelles (stomates) ou occasionnelles (blessures) voire par effraction en synthétisant des enzymes (**Fons et al., 2018**).

5.3. Les champignons symbiotiques :

La symbiose mutuelle est définie comme, celle dans laquelle, les partenaires interagissent physiquement et métaboliquement de manière mutuellement bénéfique (**Du et al., 2019**).

L'association ectomycorhizienne décrit une structure qui résulte d'une symbiose mutualiste entre les racines des plantes supérieures et les champignons racinaires. Dans cette relation symbiotique, le rôle des champignons est d'aider les plantes hôtes à absorber l'eau et les nutriments, recevant en retour des glucides dérivés de la photosynthèse. On estime qu'environ 6000 espèces végétales possèdent des partenaires fongiques symbiotiques ectomycorhiziens.

L'association ectomycorhizienne aide à la fois les champignons et leurs plantes hôtes à surmonter les stress environnementaux causés par les faibles nutriments, la sécheresse, les maladies, les températures extrêmes et la contamination par les métaux lourds. De plus, les ectomycorhizes peuvent améliorer la structure et les nutriments du sol, protéger les plantes

contre les agents pathogènes des racines, favoriser la croissance des plantes en produisant des phytohormones et augmenter le taux de photosynthèse des plantes. Les ectomycorhizes sont dominés par des membres des Basidiomycota et quelques Ascomycota. Généralement, les ectomycorhizes produisent des organes de fructification reproducteurs apparaissant au-dessus ou en dessous du sol qui sont essentiels aux réseaux trophiques des écosystèmes forestiers et à la dispersion de leurs spores.

Par conséquent, le rôle des ectomycorhizes dans l'établissement et le rétablissement des forêts est bien établi : ils augmentent la croissance et la productivité des plantes et d'arbres économiquement importants et améliorent la viabilité et l'établissement des semis dans le cadre de programmes de restauration forestière (D. Hyde *et al.*, 2019).

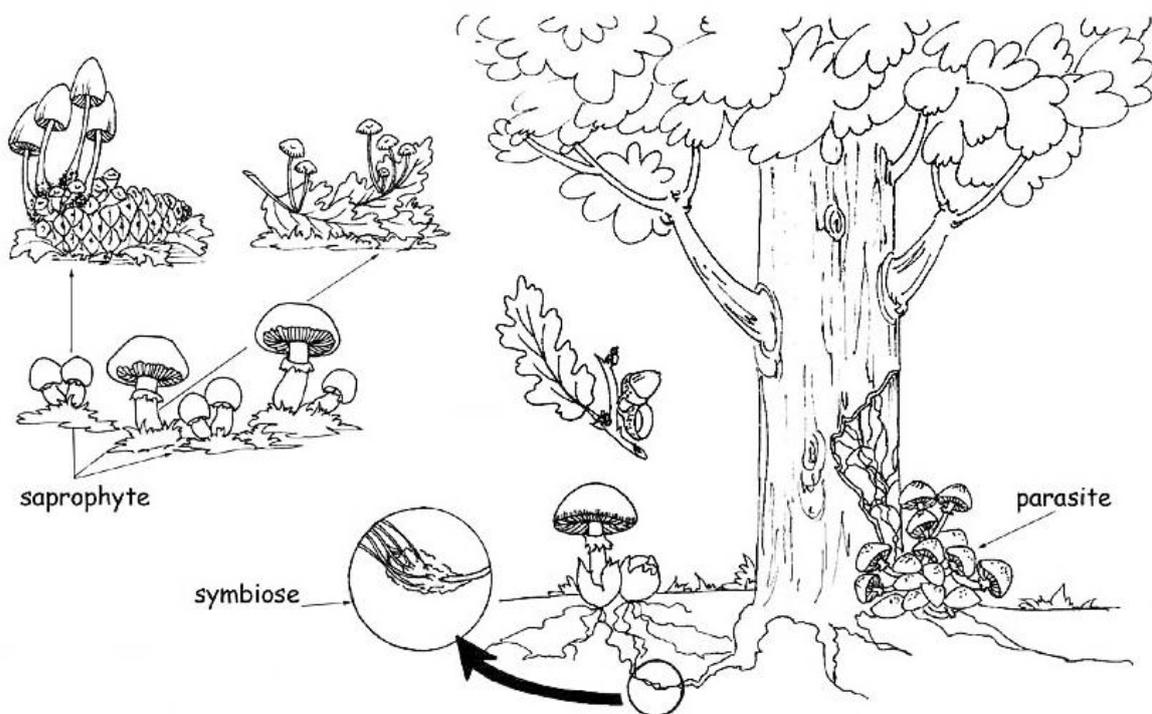


Figure 6. Mode de vie des champignons sauvages.

6. Classification des champignons sauvages forestiers :

Les champignons sont regroupés en deux catégories : comestibles et non comestibles, Parmi ces espèces, environ 50 % possèdent des degrés variables de comestibles tandis que moins de 1% sont vénéneuses (Qwarse *et al.*, 2021).

6.1. Champignons comestibles :

Les champignons comestibles sont un groupe important et fascinant de champignons. Selon une étude récente, 3283 espèces de champignons ont été confirmées comme comestibles ou comestibles sous condition, représentant environ 20% de tous les taxons de champignons enregistrés dans les sources mondiales (**Li et al., 2021**).

Ces champignons comestibles comprennent des mycorhizes, des agents pathogènes des plantes et des saprotrophes. Ils produisent un large éventail de fructifications de différentes tailles, couleurs et formes. Certains des champignons comestibles courants comprennent les bolets, les girolles, les truffes, les polypores, les matsutake, les champignons corail, le soufre champignon, champignons chenilles, morilles, puffballs, champignon de César. Ces champignons comestibles sont consommés par l'homme pour leurs valeurs nutritionnelles et médicinales (**Zhang et al., 2021**).

Le processus exact par lequel les premiers humains ont identifié les espèces de champignons comestibles - celles qui étaient sûres et propres à la consommation - n'est pas clair, mais il ne fait aucun doute que c'était par essais et erreurs, une approche courante utilisée pour les plantes sauvages et autres êtres vivants qui ont été chassés ou rassemblés pour la nourriture ; de petites quantités ont été provisoirement goûtées, avant que l'odeur, la texture et l'absence de toute réaction indésirable ne décident quels champignons pourraient être consommés. «La seule façon de déterminer le caractère comestible d'un champignon est de le manger» réclame Arora (1986) (**Li et al., 2020**). L'introduction de la cuisine par **Mingyi et al.** en **2019** ont élargi le nombre de plantes et de champignons qu'il était « sûr et approprié » de consommer, en ramollissant les tissus et en se détoxifiant.

Les champignons qui sont mangés par les insectes et les animaux sauvages sont reconnus comme des champignons sauvages comestibles ; ce critère est utilisé pour l'identification de la comestibilité d'un champignon. D'autres pays déterminent le caractère comestible des champignons sauvages par des chartes morphologiques ou les habitats de croissance ; les champignons sauvages au goût doux, à la chair épaisse sont comestibles (**Qwarse et al., 2021**).

Les champignons sauvages récoltés sont utilisés comme nourriture pendant environ 2 à 3 semaines, après quoi la plupart de ces tribus conservent les champignons sauvages pour se nourrir. La conservation des champignons sauvages pour une utilisation à long terme se fait par séchage au soleil, fumage et salage ; les champignons sauvages sont également bouillis puis séchés au soleil comme méthode de conservation alternative (**Qwarse et al., 2021**).

6.2. Champignons vénéneux :

L'empoisonnement aux champignons est également appelé 'mycétisme' (**Pandita et al., 2021**). C'est un problème mondial de sécurité alimentaire et il a été l'une des principales causes de décès par intoxication alimentaire. Ces dernières années, plus de 100 sortes de champignons vénéneux ont été trouvées, dont plus de 30 ont une toxicité mortelle. Une intoxication accidentelle par des champignons fourragers peut affecter la santé ou même entraîner la mort dans certains cas (**Patocka et al., 2021**).

L'incidence de l'empoisonnement aux champignons varie d'une région à l'autre, d'une saison à l'autre et en fonction de la météo. Les champignons vénéneux sont consommés par les chasseurs de champignons par ignorance, après identification erronée comme champignons comestibles ou comme drogue psychoactive. L'empoisonnement aux champignons conduit généralement à une consultation avec un centre d'information antipoison et à une hospitalisation (**Wennig et al., 2020**).

Les humains et les animaux peuvent présenter des symptômes toxiques après avoir ingéré ces champignons. Selon les espèces, la consommation de champignons vénéneux peut provoquer divers signes et symptômes cliniques, allant de troubles légers, principalement gastro-intestinaux, à une défaillance organique et à la mort (**A. Keller et al., 2018**). Les champignons vénéneux contiennent une variété de toxines différentes dont la puissance est influencée par de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques présents autour du champignon (**Ukwuru et al., 2018**). Les principales catégories de toxines fongiques comprennent les poisons protoplasmiques qui entraînent une destruction généralisée des cellules suivie d'une défaillance d'un organe, les neurotoxines qui provoquent des symptômes neurologiques tels que le coma, des convulsions et des hallucinations et les irritants gastro-intestinaux produisant des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et de la diarrhée (**A. Keller et al., 2018**). Les principales substances toxiques de ces champignons sont la muscarine, la psilocybine et la psilocine. Ils agissent principalement sur le système nerveux central et peuvent provoquer une série de symptômes neurologiques: la muscarine augmente le tonus parasympathique par le type M des récepteurs parasympathiques post-ganglionnaires situés dans les muscles et les glandes, et elle provoque une excitation nerveuse parasympathique, un ralentissement et un affaiblissement de la fréquence cardiaque, des contractions musculaires, une augmentation de la sécrétion des glandes et un rétrécissement des pupilles. De plus, il peut agir sur le système nerveux central et provoquer une excitation nerveuse. La muscarine est mortelle pour les êtres humains si elle est trop ingérée à la fois.

Selon les données disponibles, la dose mortelle humaine de muscarine dans les champignons susmentionnés est d'environ 500 g de champignon cru. Cependant, 10 à 20 g de champignon cru suffisent pour provoquer une intoxication. Ainsi, manger un petit nombre de champignons vénéneux par erreur est très susceptible d'être mortel. La psilocybine et la psilocine sont des toxines neurohallucinogènes et elles provoquent des hallucinations, des rires incontrôlables, une excitation extrême et d'autres sensations étranges après ingestion. Par conséquent, ils sont également connus sous le nom de « champignons rieurs » et sont interdits dans de nombreux pays occidentaux en tant que médicaments en raison de ces étranges symptômes neurologiques. Bien que ces toxines aient des effets toxiques et puissent menacer la vie et la santé humaines, elles ont été appliquées à la recherche scientifique et à la biomédecine avec le développement et la maturité de la recherche scientifique (**Patocka et al., 2021**).

Les patients présentant des symptômes précoces (généralement entre trente minutes et six heures) ont souvent une évolution favorable, tandis que les symptômes tardifs (c'est-à-dire après six heures) sont associés à un risque plus élevé de complications graves. Bien que les intoxications aux champignons ne représentent qu'une petite fraction du nombre total de consultations d'urgence pour intoxication, cela pose un problème saisonnier et régional important pour la santé publique, avec des taux de mortalité signalés de 8 à 12 % et jusqu'à 15 à 30% avec des champignons contenant de l'anatoxine (**A. Keller et al., 2018**). Les symptômes de nombreuses intoxications aux champignons disparaissent souvent spontanément au bout de 2 à 3 jours au plus. Bien qu'une intoxication aux champignons avec une courte période de latence ne soit généralement pas mortelle, elle ne doit néanmoins pas être sous-estimée, car souvent, seuls les signes d'intoxication se produisant rapidement sont pris en compte au début. Une courte période de latence n'exclut pas toujours un empoisonnement à l'anatoxine présente sur les plats de champignons mélangés. Pour cette raison, les patients présentant des symptômes ou ayant mangé ce qui était probablement des champignons vénéneux doivent généralement être maintenus en observation à l'hôpital pendant au moins 36 heures (**Wennig et al., 2020**).

7. Composition chimiques des champignons :

Le métabolisme est un mécanisme biochimique par lequel tous les processus vitaux sont accomplis et c'est un processus fondamental pour toute forme de vie cellulaire (**Thirumurugan et al., 2018**).

Les champignons sont l'un des organismes les plus bénéfiques sur terre en raison de leur capacité à synthétiser de nombreux métabolites bioactifs comme d'autres organismes; la

structure mycélienne et les organes de fructification produisent un grand nombre de métabolites ayant des propriétés et des fonctions biologiques uniques qui les aident à survivre dans la nature. Leurs métabolites peuvent être classés en deux catégories : primaires et secondaires (**Kundu, 2021**). Ces métabolites peuvent être extraits des fructifications, des mycéliums ou des spores, pouvant ainsi être appliqués dans les industries alimentaires et cosmétiques (**Quintero-Cabello et al., 2021**).

7.1. Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires des champignons sont produits par différents métabolismes cellulaires au cours de la phase de croissance et de développement. Les produits des métabolismes primaires sont utilisés comme blocs de construction pour la production de biomolécules potentielles et sont des acides aminés et des peptides, des glucides et des polysaccharides, des nucléotides, des acides organiques, des enzymes, des vitamines ... (**Kundu, 2021**).

7.1.1. Les protéines :

La valeur nutritionnelle du champignon réside principalement dans la teneur en protéines qui constituent 5% du poids du champignon frais, ce qui équivaut à 35 à 40% du poids de la matière sèche et est caractérisé par une haute qualité de ces protéines, car les acides aminés constituant ces derniers sont très similaires à ceux des protéines animales de la viande, du lait, des œufs, et peuvent compenser les protéines animales de 100% (**AL-Hussainy et Al-Fadhly, 2019**).

Les protéines des champignons sont des composants macromoléculaires, qui sont décrits sous la forme de biopolymères d'acides aminés en tant que bloc de construction et sont constitués d'une série de composés azotés qui confèrent une gamme de propriétés physiques, chimiques et biologiques à ces biomolécules. Les protéines liées aux champignons sont principalement des lectines et certaines enzymes que l'on peut trouver sous forme d'enzyme ribosomale inactivée ou de laccase, ainsi que des protéines fongiques immunomodulatrices (**A. Martínez-Medina et al., 2021**).

7.1.1.1. Les lectines :

Les lectines des champignons sont des protéines glyquées qui pourraient être couplées avec une haute spécificité, sous une forme réversible aux glucides ne représentant ni source

immunologique ni activité catalytique (Mishra *et al.*, 2019). Néanmoins, ces derniers sont faiblement liés aux glucides. Chez les champignons, on les trouve dans les organes de fructification mais rarement dans le mycélium et la tige. Leur fonction biologique chez les champignons est associée à la reconnaissance de structures clés relatives aux interactions champignon-hôte, aux processus pathogènes fongiques et mycorhiziens, au système de protection virale et des insectes. Les champignons constituent au moins 82 % des lectines dont le poids moléculaire varie entre 12 et 68 kDa (A. Martinez-Medina *et al.*, 2021).

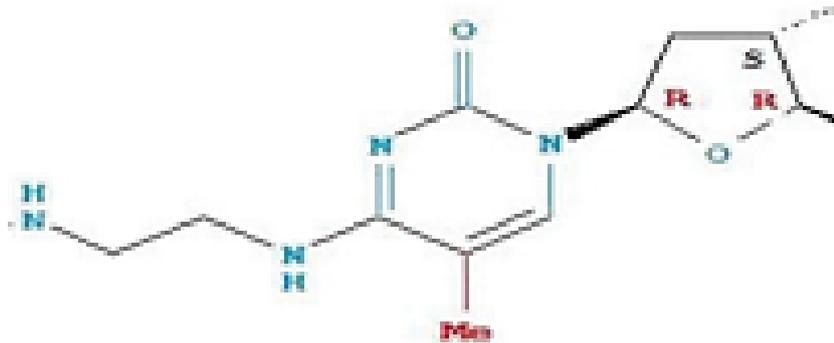


Figure 7. Structure chimique de lectine. (Chatterjee *et al.*, 2021)

7.1.1.2. Les enzymes, protéines fongiques immunomodulatrices et les acides aminés :

Au cours du développement normal des champignons, différentes enzymes agissent comme inactivant les protéines ribosomiques dont la fonctionnalité est irréversiblement liée aux structures ribosomiques, favorisant l'élimination de l'adénine dans l'ARN et évitant ainsi la synthèse des protéines. De plus, ces enzymes ont également un effet défensif sur différentes espèces végétales. Les laccases sont un groupe d'enzymes présents dans les champignons. Cette classe d'enzymes favorise l'oxydation de différents composés phénoliques et inorganiques associés à divers facteurs tels que les interactions champignons-agent pathogène-hôte, la dégradation de la lignine, la dégradation des pigments, la rectification et la réponse au stress.

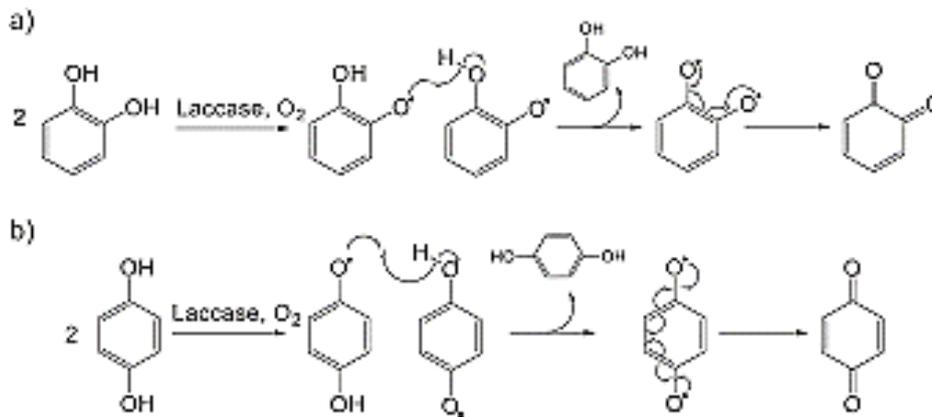


Figure 8. Structure chimique des laccases trouvées dans les champignons.

Cependant, certaines protéines immunomodulatrices fongiques ont également été rapportées dans des champignons correspondant à un groupe de protéines avec 111 à 114 acides aminés avec des concentrations élevées d'asparagine et de valines extrêmes acétylées (**A. Martinez-Medina et al., 2021**). Ces protéines immunomodulatrices sont considérées comme une nouvelle classe de protéines fongiques bioactives et ont montré une utilisation potentielle comme adjuvant pour l'immunothérapie tumorale (**Chatterjee et al., 2021**).

Les champignons contiennent également des acides aminés libres qui contribuent normalement à leur saveur avec une concentration comprise entre 7,14 et 12,3 mg/g sur une base sèche (**A. Martinez-Medina et al., 2021**). La composition en acides aminés des champignons dépend de l'espèce mais est généralement riche en thréonine et en valine, tandis que les acides aminés contenant du soufre tels que la méthionine et la cystéine font généralement défaut (**Gupta et al., 2019**).

7.1.2. Les lipides :

Les lipides des champignons sont un groupe très diversifié de molécules dont les principales caractéristiques sont la solubilité dans les solvants organiques mais pas dans l'eau.

Les champignons ont des composés à base de lipides au pourcentage compris entre 1,18 et 8,39% sur la base du poids sec. Dans les mécanismes de croissance et de reproduction, la présence de ces composés à base de lipides est couramment utilisée sous forme d'acides gras, de stérols et de phospholipides (**A. Martinez-Medina et al., 2021**) ; le stérol important présent dans les champignons comestibles qui pourrait également être responsable de l'activité antioxydante est «l'ergostérol» (**Chatterjee et al., 2021**). Ce dernier a pour fonctionnalité dans la croissance fongique, la formation d'hyphes et la sporulation (**A. Martinez-Medina et al.,**

2021). De plus, L'acide linoléique, également présenté comme une fraction importante d'acides gras pour l'homme, a également été isolé des champignons, présentant une grande variété de fonctions physiologiques telles que la réduction des taux de triglycérides, la pression artérielle, les maladies cardiovasculaires et l'arthrite (Chatterjee et al., 2021). Les phospholipides des champignons sont d'autres molécules formées d'acides gras, ou de certains composés organiques complexes, liés au groupe phosphate et hydroxyle, qui ont une nature amphipathique et font généralement partie de la membrane biologique, fournissant ainsi une barrière entre le milieu et la cellule (A. Martinez-Medina et al., 2021).

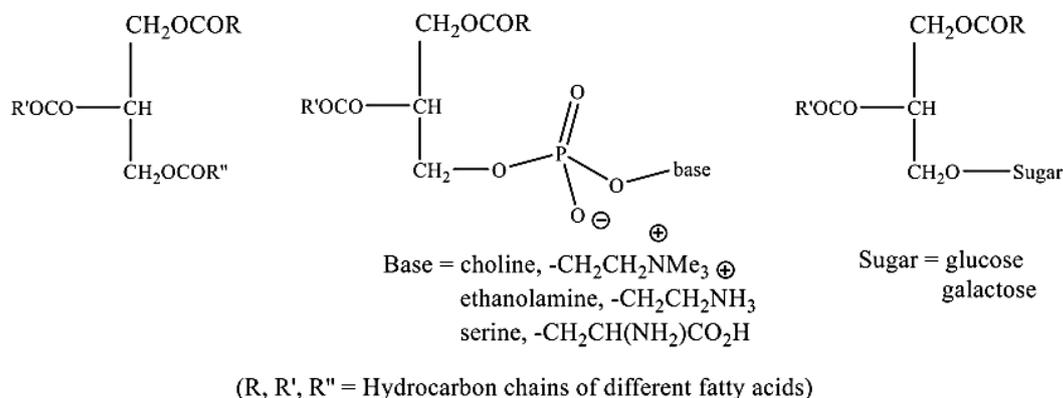


Figure 9. Structure chimique des lipides fongiques. (Cateni et al., 2021)

7.1.3. Les polysaccharides :

Les polysaccharides représentent un composant important, dans les constituants des champignons, et leur potentiel biologique a déjà été démontré, parmi lesquels il est possible d'agir en tant que fibres alimentaires, composants, qui ne peuvent pas être hydrolysés ou absorbés pendant le processus digestif humain, montrant ainsi un effet prébiotique (A. Martinez-Medina et al., 2021) et par conséquent, ayant un impact direct sur la régulation du microbiote intestinal, ainsi que sur la fonction gastro-intestinale de l'hôte (Maa et al., 2018).

Les glucides courants de divers champignons présentant des activités biologiques importantes sont : la xylose, le rhamnose, le fucose, le fructose, le glucose, le mannose, le mannitol, le saccharose, le maltose et le tréhalose (Chatterjee et al., 2021) mais aussi, les champignons sont source de chitines ou de glucanes ainsi que de mannanes : ce sont des aldéhydes ou cétones polyhydroxylés et leurs dérivés qui, selon leurs degrés de polymérisation, peuvent être divisés en mono, di, oligo ou polysaccharide (A. Martinez-Medina et al., 2021). Ils sont considérés comme l'un des principaux composants des champignons supérieurs

(**Rathore et al., 2017**) et sont généralement compris entre 46,6 et 81,1% (**Reddy, 2016**). Ces classes de glucides complexes pourraient être présentes à divers stades du développement des champignons comme le mycélium, les fructifications, le sclérote ou encore dans les bouillons de culture, et leurs caractéristiques et propriétés biologiques sont liées à leurs caractéristiques structurales : poids moléculaire, ramification grade, composition en monosaccharides et conformation spatiale (**A. Martinez-Medina et al., 2021**).

Les champignons de la famille des Ascomycota sont constitués de chitine-mannane- β -glucanes, tandis que la famille des Basidiomycota est constituée de chitine- β -glucanes (**Ghormade et al., 2017**). Cette chitine est un polymère N-acétyl-glucosamine lié (1-4), ajoute fonctionnellement de la rigidité à la cellule fongique mûre et contribue également à l'intégrité osmotique (**A. Martinez-Medina et al., 2021**).

Malgré son rôle fonctionnel dans le développement des champignons, ou leur potentiel prébiotique après consommation humaine (**Yin et al., 2020**), les polysaccharides des champignons sont également reconnus par leur effets immunomodulateurs et antitumoraux potentiels : les polysaccharides fongiques présentant une activité antitumorale sont acides ou neutres à savoir les glycanes tels que les homopolymères ou les hétéropolymères extrêmement complexes, modulent la réponse immunitaire de l'hôte en l'activant et ils ne tuent pas directement les cellules tumorales. Ces composés réduisent le stress sur le corps humain et montrent une réduction de la taille de la tumeur d'environ 50 % (**Chatterjee et al., 2021**). Une autre fonctionnalité attribuée aux polysaccharides consiste en leur potentiel antioxydant, qui pourrait également contribuer indirectement à leur potentiel anticancéreux (**Mingyi et al., 2019**). Les propriétés antioxydantes pourraient également être liées au fait que les quantités de sélénium présentes dans la fraction polysaccharidique du champignon agit comme cofacteur dans les enzymes liées au contrôle du stress oxydatif (**Li et al., 2019**).

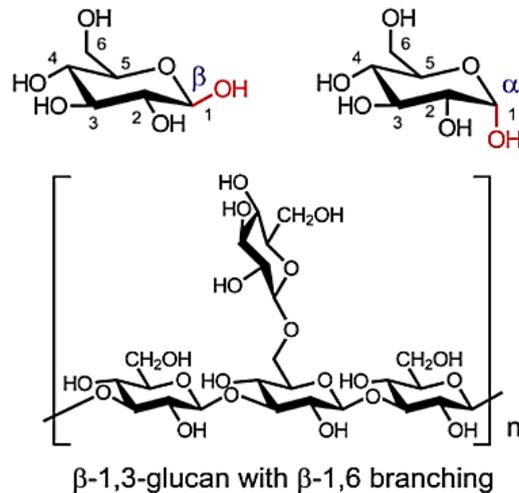


Figure 10. Structure de base d'un polysaccharide de champignon typique. (Friedman, 2016)

7.2. Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont produits en utilisant les produits intermédiaires ou sous-produits des métabolismes primaires au cours de certaines périodes de croissance. Les métabolites secondaires ne sont pas très essentiels à la croissance et au développement, mais ils possèdent différentes propriétés biologiques telles que des propriétés antimicrobiennes, antiparasitaires, insecticides, des molécules de signalisation dans les interactions microbiennes, telles que la compétition et la symbiose car elles sont de nature saprophyte (Kundu, 2021).

Les métabolites secondaires les plus courants dans les champignons comprennent les polyphénols, les acides phénoliques, les quinones, les coumarines, les groupes de flavonoïdes, les stilbènes, les tanins hydrolysables et condensés, les terpènes et les terpénoïdes, les alcaloïdes, les stérols, les lactones, les antibiotiques et les agents chélateurs de métaux, qui peuvent tous activer l'immunité cellulaire et humorale, augmentant ainsi la résistance aux maladies (Fernandes *et al.*, 2021).

7.2.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont un groupe hétérogène de métabolites végétaux et fongiques (Podkowa *et al.*, 2021). Ce sont des métabolites secondaires formés par des cycles aromatiques et des groupes hydroxyle, reconnus comme de puissants antioxydants chez les plantes et les champignons ; ces molécules sont produites comme méthode de défense contre les U.V. lumière, insectes, virus et bactéries. Ils constituent un groupe varié avec de grandes

structures telles que les tanins et de petites structures telles que les acides phénoliques... (Quintero-Cabello et al., 2021).

7.2.1.1. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques (acides phénolcarboxyliques) sont des substances contenant un cycle aromatique substitué par au moins un groupe hydroxyle et un groupe carboxyle. Les acides phénoliques se trouvent dans la nature à la fois sous forme libre et sous forme de glycosides et d'esters. Dans les fructifications des champignons supérieurs appartenant aux Basidiomycota, les acides phénoliques libres sont généralement présents en petites quantités. Leur teneur dépend de l'espèce et du degré de maturité des fructifications. Il a été démontré qu'à haute température, ainsi qu'après hydrolyse acide, les liaisons ester sont rompues et des acides phénoliques libres sont libérés. Les acides phénoliques les plus courants dans les organes de fructification des champignons supérieurs sont l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide p-coumarique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide gentsique, l'acide caféïque et un composé avec une structure similaire aux acides phénoliques, l'acide t-cinnamique. Moins fréquents dans les organes de fructification sont l'acide syringique, l'acide chlorogénique, l'acide ellagique et l'acide vératric. L'acide protocatéchique et l'acide gallique sont les plus abondants chez les espèces arboricoles de Basidiomycota (Balik et al., 2020).

La synthèse des acides phénoliques est activée par la voie du shikimate, où les molécules précurseurs sont les acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine. L'ajout de ces derniers dans les champignons cultivés a induit une augmentation de la teneur en phénol (Quintero-Cabello et al., 2021).

La présence des acides phénoliques dans les champignons sont importants pour la survie des sporocarpes, comme en témoignant les différentes voies biogénétiques conduisant à leur synthèse. Un autre rôle des acides phénoliques dans les espèces arboricoles de champignons est lié à la production des enzymes nécessaires au cours des processus de décomposition du bois (Balik et al., 2020).

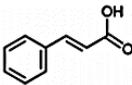
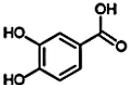
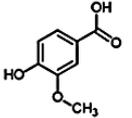
IUPAC name and synonym	Structure	Odor	Associated AMM
Phenolic acids (E)-3-Phenylprop-2-enoic acid <u>Cinnamic acid</u>		Honey-like	<i>Ganoderma lucidum</i> [17] <i>Lentinula edodes</i> [18] <i>Pleurotus eryngii</i> [18] <i>Pleurotus ostreatus</i> [18]
3,4-Dihydroxybenzoic acid <u>Protocatechuic acid</u>		Phenolic	<i>Agaricus blazei</i> [19] <i>Flammulina velutipes</i> [19, 20] <i>G. lucidum</i> [19, 21] <i>Inonotus obliquus</i> [19] <i>L. edodes</i> [19] <i>Ophiocordyceps sinensis</i> [21] <i>Phellinus linteus</i> [19] <i>P. eryngii</i> [19] <i>P. ostreatus</i> [19, 20] <i>Trametes versicolor</i> [20] <i>Sparassis crispa</i> [19]
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid <u>Vanillic acid</u>		Vanilla-like	<i>S. crispa</i> [19]

Tableau 1. Trois composés odorants d'acides phénoliques trouvés dans les champignons. (Guohu et al., 2015)

7.2.1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont les principaux polyphénols de l'alimentation humaine. Structurellement, les flavonoïdes sont composés d'un noyau flavane avec 15 atomes de carbone disposés en 3 anneaux tels que C6-C3-C6. Il existe six sous-groupes de flavonoïdes, ce sont les flavones, les flavanones, les flavonols, les flavanols, les anthocyanes, et les isoflavones. Les flavonoïdes les plus courants sont la quercétine, la catéchine, la naringénine, le cyanidinglycoside et la daidzéine (Alara et al., 2021). Ces flavonoïdes exercent une activité antioxydante en raison de la présence de groupes hydroxyle. Les anthocyanidines appartiennent également à ce groupe d'antioxydants (Podkowa et al., 2021). Certains auteurs classent les flavonoïdes comme un représentant des composés phénoliques (Tungmannithum et al., 2018).

Il existe des rapports contradictoires concernant la présence de flavonoïdes dans les organes de fructification des champignons. De nombreux auteurs ont confirmé la présence de composés flavonoïdes et déterminé leur teneur dans les champignons mais dans des travaux menés par d'autres auteurs, ils ont considérés que la présence de flavonoïdes dans les champignons est niée. Cependant, comme une multitude d'études ont été menés sur la présence de ces composés dans la fructification des champignons et ont déterminé leur contenu, il faut supposer que les flavonoïdes se produisent dans de nombreux représentants du règne fongique.

Dans les travaux récents rédigés par **Shao et al.** en **2019**, sept gènes centraux impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes chez une espèce fongique ont été trouvés. Dans un de leurs travaux, (**Butkhup et al., 2017**) ont analysé la teneur en flavonoïdes de diverses espèces de champignons provenant du Nord-Est de la Thaïlande. La teneur de ces composés, exprimée en catéchine, s'est avérée la plus élevée chez plusieurs espèces étudiées.

7.2.2. Les composés terpéniques :

Les terpénoïdes sont un terme général pour une classe de composés constitués de plusieurs unités structurales d'isoprène. Sur la base du nombre d'unités d'isoprène, celles-ci ont principalement été classées en monoterpène (C10), sesquiterpène (C15), diterpène (C20), triterpène (C30), tétraterpène (C40) et polyterpène (C > 40)... En plus d'être sous la forme d'hydrocarbures terpéniques, les terpénoïdes sont principalement présents sous la forme de divers dérivés contenant de l'oxygène, notamment des alcools, des aldéhydes, des acides carboxyliques, des cétones, des esters et des glycosides (**Yang et al., 2020**).

Les Basidiomycota supérieurs ou les champignons médicinaux sont considérés comme les sources les plus importantes de terpénoïdes bioactifs dans la nature, démontrant un large éventail de propriétés thérapeutiques et curatives. Les triterpènes et les triterpénoïdes constituant la plus grande sous-classe de terpénoïdes naturels, représentent certains des composés bioactifs les plus puissants qui contribuent aux activités anticancéreuses de divers champignons médicinaux ; structurellement, les triterpènes de sources naturelles ont une grande variété de squelettes différents, largement divisés en fonction du nombre d'anneaux présentés. Plus d'une centaine de types de triterpénoïdes auraient été identifiés chez le champignon *G. lucidum*. Parmi eux, des dizaines d'acides ganodériques ont été isolés, caractérisés et classés structurellement sous les triterpènes de type lanostane. En plus des acides ganodériques, une série d'alcools ganoderma ont été détectés dans une large gamme de triterpénoïdes isolés du champignon. Les mécanismes anticancéreux des triterpénoïdes et des extraits enrichis en triterpénoïdes de *G. lucidum* ont été bien résumés ailleurs. De même, les acides triterpéniques de type lanostane ont également été suggérés comme étant des composants médicinaux majeurs du champignon *Poria cocos*, censés être des agents potentiels de chimioprévention du cancer. Les sesquiterpènes sont une autre classe majeure de terpènes extraits d'agents mycomédicinaux, démontrant généralement des structures de squelette à 15 carbones construites avec trois unités d'isoprène (**Rongchen et al., 2021**).

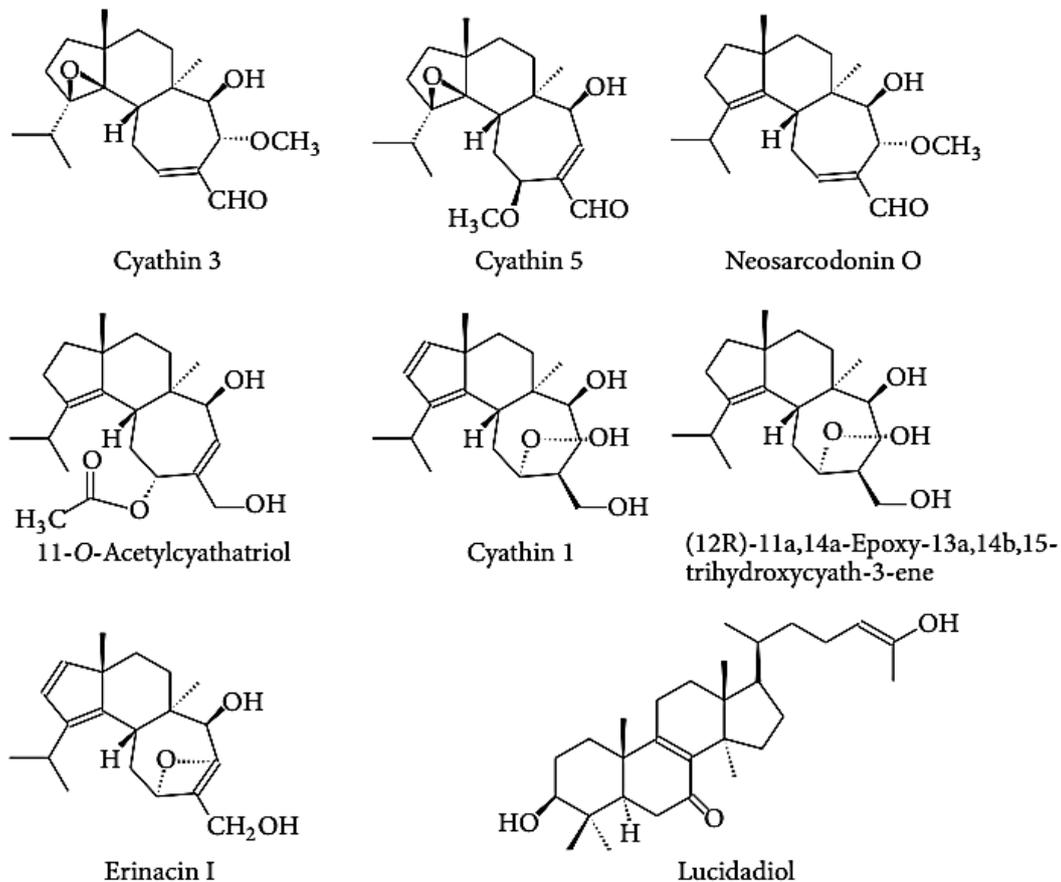


Figure 11. Exemples de certains composés terpéniques isolés des champignons comestibles.

(A. Elsayed et al., 2014)

8. Intérêt médical et nutritionnel des champignons :

8.1. Intérêt médical :

Les champignons ont une longue histoire d'utilisation médicinale dans diverses cultures à travers le monde. Il a acquis le statut médicinal il y a longtemps en Chine et dans d'autres régions d'Asie, notamment au Japon et en Corée. La portée des champignons médicinaux s'est étendue à d'autres pays tels que les États-Unis et les pays d'Europe de l'Est tels que la Russie. Plus tard, les scientifiques se sont intéressés à trouver les preuves derrière le potentiel bioactif diversifié contenu dans les champignons. Cela a conduit à l'exploration de ressources de champignons inexploitées pour leurs bienfaits médicinaux potentiels et les composés bioactifs qui confèrent ces propriétés (Zeb et Lee, 2021).

Les propriétés médicinales des champignons sont étroitement liées à leur teneur en composés bioactifs, qui comprenaient principalement des polysaccharides, des terpénoïdes, des glucanes, des composés phénoliques, des statines, des lectines, entre autres. Les pigments

mécaniques, la chitine et le chitosane qui se trouvent dans leur paroi cellulaire ainsi que les enzymes extracellulaires sont d'autres molécules efficaces (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

(Ahmed Saleh Al-Faqeeh *et al.*, 2021) ont considérés les champignons comme aliments fonctionnels ayant des effets antidiabétiques ; de nombreuses espèces de champignons semblent être efficaces pour contrôler la glycémie et modifier l'évolution des complications diabétiques en raison de leurs faibles niveaux de calories, glucides, de très faibles quantités de graisses et de cholestérol et par conséquent, les champignons constitueront une excellente source alimentaire intégrée dans les régimes des patients diabétiques.

D'autres études menées par Seo et Choi. en 2021, ont révélés que les composés bioactifs d'un champignon réduisent l'infection virale en ciblant principalement l'entrée virale, la réplication du génome, les enzymes virales, les protéines virales et les protéines cellulaires et influencent la modulation immunitaire. Les protéases virales sont importantes pour la réplication et la production de particules virales infectieuses induites par le clivage protéolytique. Différents inhibiteurs de protéase ont été isolés à partir de champignons comestibles et médicinaux servant dans la fabrication et le développement de médicaments antiviraux. De plus, leur rôle inhibiteur de la synthèse de l'ARN viral a été impliqué dans la multiplication du virus de la grippe ainsi que le virus de la COVID-19. Les patients atteints de COVID-19 et de comorbidités ont besoin d'une supplémentation nutritionnelle pour soutenir leur lutte contre ce virus. En tant qu'aliment fonctionnel, les champignons comestibles et médicinaux sont très efficaces pour compléter la privation nutritionnelle. Les polysaccharides (en particulier β -D-glucane), les polyphénols, les triterpènes, les protéines, les vitamines et les minéraux présents dans les champignons soutiendraient le traitement des patients atteints de COVID-19 et de comorbidités. Étant donné que la préparation de la poudre de champignon est simple et ne nécessite pas de processus de manipulation et de conservation sophistiqués, fournir de la poudre de champignon aux patients atteints de COVID-19 et de comorbidités dans différentes parties du monde serait également moins encombrant pour les agences d'aide. Ainsi, une recommandation des actions rapides dans la préparation d'aliments à base de champignons pour les personnes souffrant de COVID-19 et une demande afin que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et d'autres organismes de soins de santé et aux autres agences de gestion des soins de santé prennent les mesures nécessaires pour diffuser une approche thérapeutique et préventive à base de champignons contre la COVID-19 (Rahman *et al.*, 2021).

Les polysaccharides de la paroi cellulaire fongique à bioactivité, sont potentiellement utiles pour la prévention et le traitement de diverses maladies ; ces derniers ont une forte capacité à véhiculer des informations biologiques. Plus précisément, ils ont une activité

immunomodulatrice en raison de leur capacité à se lier à des récepteurs spécifiques de la paroi cellulaire et à stimuler des réponses immunitaires spécifiques. En réalité, le type et la modulation de cette activité sont influencés par les caractéristiques structurales spécifiques de la molécule, telles que le degré pondéré de ramification, la liaison au squelette, les unités de chaîne latérale et le type de monosaccharides constitutifs (Venturella et al., 2021).

La thérapie anticancéreuse peut inclure l'utilisation de médicaments naturels extraits de champignons, en particulier ceux qui ont des propriétés cytotoxiques avec des effets secondaires minimes. Les composés bioactifs des champignons comprenant les protéoglycanes, les polysaccharides, le β -glucane, la lectine, les composés phénoliques, les flavonoïdes, les saponines, les triterpénoïdes..., aident à moduler le système immunitaire pour lutter contre les cancers en :

- Augmentant le système immunitaire par stimulation des lymphocytes, les cellules tueuses naturelles, les macrophages et en améliorant la production de cytokines ;
- Favorisant l'apoptose ;
- Inhibant la prolifération des cellules cancéreuses ;
- Bloquant de l'angiogénèse. (Al-Faqeeh Ahmed Saleh et al., 2021)

Dans d'autres études récentes, il a été rapporté que les champignons avaient d'autres effets bénéfiques sur la santé à savoir antioxydants, antibactériens, antigénotoxiques, anti-inflammatoires, antifongiques, protecteurs de l'ADN importants... (Sevindik, 2021).

8.2. Intérêt nutritionnel :

Les champignons sont appréciés dans le monde entier comme des délices culinaires et sont communément appelés « viande végétale » dans de nombreuses cultures. Ils sont utilisés comme complément alimentaire et souvent considérés comme une source alternative de viande, de poisson, de légumes, de fruits... De plus, les champignons sont une source de protéines de haute qualité produites en grande quantité à partir du recyclage des agro-déchets sans valeur, y compris les déchets agro-industriels par unité de surface et de temps. Par conséquent, enrichir ou fortifier les régimes ou les produits alimentaires avec une si bonne source de protéines contenant tous les acides aminés essentiels peut aider à réduire les incidences de malnutrition protéino-énergétique chez l'homme.

Les champignons ont un goût salé particulièrement agréable appelé umami, en raison de la présence de sels sodium d'acides aminés libres tels que les acides aminés glutamiques et aspartiques et de 50 nucléotides, ce qui fait des champignons un aliment préférable et adaptable

dans la plupart des formulations alimentaires en raison de cette saveur unique et de sa texture fibreuse semblable à celle de la viande.

Sur le plan nutritionnel, les champignons, qui appartiennent aux champignons supérieurs filamenteux, sont connus pour leur richesse alimentaire, leur faible valeur calorique, leur goût et leurs propriétés nutraceutiques : ils présentent d'excellentes sources de fibres alimentaires, riches en protéines possédant les neuf acides aminés essentiels pour l'homme mais faibles en gras et en calories. En général, les corps fruitiers des champignons contiennent 5 à 15 % de matière sèche, 19 à 35 % de protéines et une faible teneur en matières grasses. Les pileus et les tiges fongiques sont une excellente source de fibres alimentaires principalement en raison de la présence de polysaccharides non amylacés. Les tiges de champignon sont principalement composées de fibres alimentaires insolubles et de glucanes. Par conséquent, la tige pourrait être utilisée pour la préparation de complexes de polysaccharides biologiquement actifs en tant que complément alimentaire. Encore une fois, les champignons sont également des sources saines d'acides gras essentiels (52 à 87 % d'acides gras insaturés), principalement sous forme d'acide linoléique, qui ne peut pas être directement synthétisé dans le corps humain mais qui est nécessaire à la santé. Ils sont également riches en glucides non digestibles, ce qui en fait des sources prometteuses de nouveaux composants prébiotiques. Les champignons ont également une faible teneur en sodium et contiennent une gamme variée de micronutriments, tels que les vitamines B1, B2, B12, C, E, la niacine et le folate. Bien qu'ils soient cultivés dans l'obscurité et qu'ils soient une source de nourriture non animale, les champignons contiennent des niveaux importants de vitamine D, souvent appelée «vitamine du soleil» : lors de l'exposition au soleil ou à la lumière ultraviolette (UV)-B, la teneur en vitamine D des champignons augmente considérablement, ce qui peut jouer un rôle important dans la santé des os et du cartilage des végétaliens et des végétariens. De plus, les champignons sont une riche source de minéraux essentiels comme le fer, le cuivre, le manganèse et le zinc ayant un impact direct sur le bon fonctionnement des différentes voies métaboliques. En effet, les niveaux de certains oligo-éléments importants (tels que le potassium et le phosphore) sont considérablement plus élevés dans les champignons que dans la plupart des légumes. Les champignons comestibles peuvent également produire une gamme de flavonoïdes, qui peuvent présenter des avantages pour la santé.

Il convient de noter que la composition nutritionnelle des champignons varie considérablement en fonction de plusieurs facteurs, tels que l'espèce, la variabilité génétique intra-espèce, la maturité, les conditions de croissance, la situation géographique, les conditions environnementales et les conditions post-récolte (**Das et al., 2021**).

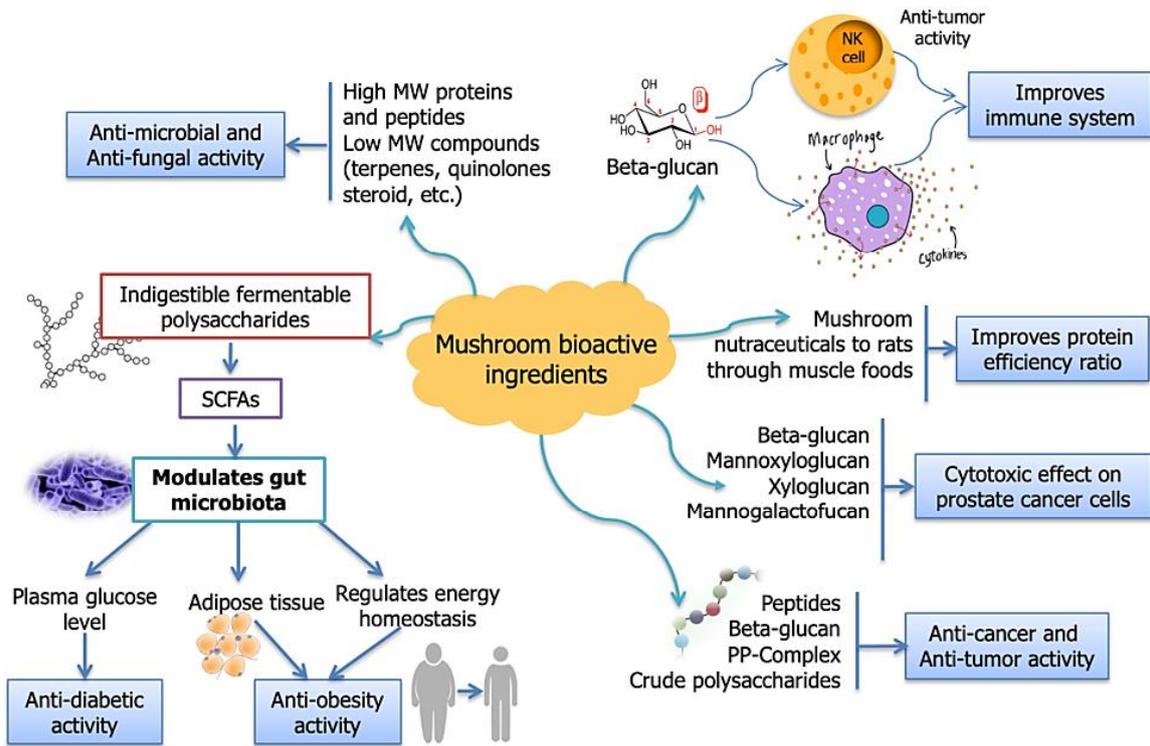


Figure 12. Diagramme schématique illustrant les propriétés bénéfiques pour la santé et médicinales des composés bioactifs des champignons. (K. Das et al., 2021)

1. Définition de l'extraction :

L'extraction est un processus dans lequel certaines substances d'un mélange solide ou liquide sont dissoutes, lavées ou lessivées à l'aide d'un solvant liquide. La phase de réception ou d'extraction est constituée du solvant et des substances clés transférées par le solvant à partir de la phase d'alimentation ou de raffinat.

L'extraction se produit sous l'effet de la sélectivité du solvant sur le soluté soluble. Néanmoins, la conception et le fonctionnement du processus d'extraction qui sera appliqué et la méthode relative avec l'équipement impliqué qui va être sélectionné, sont critiques pour un processus d'extraction rentable : par rapport à d'autres procédés de séparation, la régénération du solvant et la purification des substances précieuses sont nécessaires (Chanioti *et al.*, 2014).

2. But de l'extraction :

L'extraction est un procédé de séparation largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour diverses applications, dont le but consiste à améliorer la qualité des produits alimentaires : l'extraction peut être une étape de base dans la transformation de nombreux produits alimentaires, c'est-à-dire le sucre, les huiles comestibles, etc., ou elle est utilisée pour la récupération des constituants actifs ou pour l'élimination des constituants indésirables des matières premières ainsi, des composants importants peuvent être séparés des produits naturels avec de nombreuses applications dans les industries alimentaires (arômes, antioxydants, etc.).

Le but d'un processus d'extraction est donc lié à la séparation de l'utilité et non des substances solutées. Ainsi, dans un tel procédé, le soluté peut être formé de composants nutritifs qui peuvent être séparés des sources alimentaires et après purification ou raffinage sont, en outre, utilisés pour des désires comestibles.

En particulier, des composants bioactifs ou fonctionnels sont contenus dans des sources végétales ou animales qui sont séparées par extraction et ont trouvé des applications utiles dans la production d'aliments enrichis et nutraceutiques. Par conséquent, le soluté peut être constitué de substances indésirables ou d'empoisonnement qui sont éliminées par extraction : dans ce cas, l'extraction aboutira à un aliment souhaitable ou sûr (Chanioti *et al.*, 2014).

3. Techniques d'extraction :

L'extraction des composés bioactifs dépend de plusieurs facteurs, tels que la technique d'extraction, les matières premières et le solvant d'extraction qui sont utilisés. Les techniques peuvent être classées en conventionnelles ou non conventionnelles (**Bromberger et al., 2018**).

3.1. Techniques conventionnelles :

Les techniques conventionnelles nécessitent l'utilisation de solvants organiques, la température et l'agitation. Les principales techniques d'extraction conventionnelles liées aux composés bioactifs sont le Soxhlet, la macération et l'hydrodistillation. Néanmoins, ces techniques présentent des risques pour la sécurité, tels que la toxicité des solvants, la présence de résidus de solvants dans les extraits ainsi que le faible rendement (**Bromberger et al., 2018**).

Les extractions conventionnelles sont utilisées depuis de nombreuses années, bien qu'elles présentent de nombreux inconvénients: elles nécessitent l'utilisation de grandes quantités de solvants coûteux et purs, car au cours du processus elles en consomment une quantité élevée; ils ont une faible sélectivité d'extraction; ils ont un taux d'évaporation de solvant élevé pendant le processus; et ils sont généralement caractérisés par de longs temps d'extraction et par la décomposition thermique des composés thermolabiles (**Naviglio et al., 2019**).

3.1.1. Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide (ELL) appelée aussi extraction par solvant est un procédé qui consiste à réaliser un transfert de soluté entre deux liquides non miscibles : l'un étant une solution aqueuse électrolytique chargée en cations métalliques et l'autre, une solution organique (solvant) composé d'un diluant non miscible à l'eau contenant en général un ou plusieurs extractants (**Laouali et al., 2020**). La technologie d'extraction liquide-liquide est la méthode la plus largement utilisée pour le moment et les échantillons peuvent obtenir un bon taux de récupération (75% à 103%) (**Yue et al., 2021**).

Les agents d'extraction organiques utilisés dans l'extraction liquide-liquide comprennent les liquides ioniques, qui ont suscité un intérêt supplémentaire en raison de leurs propriétés inhérentes (**Billard, 2019; K. Singh et W. Savoy, 2020**), notamment une sélectivité et une conductivité élevées (**Zhang et al., 2017**), une pression de vapeur négligeable et une faible volatilité (**Ahrenberg et al., 2016**), une inflammabilité ou une faible inflammabilité (**Wu et al., 2020**), stabilité thermique élevée (**Mezzetta et al., 2019**), indice de réfraction élevé (**Chiappe**

et al., 2017) et pouvoir de solvation des composés organiques et inorganiques (**Becherini et al.**, 2019; **Karmakar et al.**, 2019) . En raison de ces propriétés, ces liquides sont considérés comme des solvants verts. Les liquides ioniques sont utilisés dans plusieurs domaines, à savoir, la biochimie (**Claus et al.**, 2018) l'électrochimie (**L. Martins et M. Torresi**, 2018), la pharmacie (**Tampucci et al.**, 2020; **M. Santos et al.**, 2020), la chimie analytique (**J. Trujillo-Rodríguez et al.**, 2018) et dans la récupération des métaux (**Belhadj et al.**, 2020; **Zante et al.**, 2020).

Les avantages de l'extraction liquide-liquide par rapport aux autres technologies de séparation (c.-à-d. Membranes liquides, adsorption, échange d'ions) reposent sur ses caractéristiques opérationnelles, c.-à-d. périodes de fonctionnement courtes (souvent de l'ordre de quelques minutes), possibilité de traiter une alimentation élevée, volumes de solution pendant ces courtes périodes et sélectivité envers les composés désirés extraire en solution (**Alguacil et Lopez**, 2021).

Cependant, cette technologie d'extraction utilisera une quantité énorme de phase organique de consommation de solvant d'extraction et le temps d'extraction sera plus long (18 à 24 heures) et le processus de chauffage des pièces d'extraction entraînera la dégradation des composés organiques volatils (**Yue et al.**, 2021).

3.1.2. Extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide (ESL) est l'un des processus les plus cruciaux dans les industries phytochimiques : elle est considérée comme le cœur du traitement phytochimique car une fois mis en péril, l'ensemble de l'industrie sera affecté. L'ESL est le processus de lessivage des composants solubles à partir d'un mélange solide à plusieurs composants par mise en contact avec un solvant approprié qui dissout sélectivement certains des composants du solide, mais pas tous (**Umar et al.**, 2021).

De nombreuses variables de processus telles que le rapport solide/liquide, le solvant, le degré d'agitation, la taille des particules, le temps et la température peuvent considérablement affecter les différentes étapes d'extraction (**Umar et al.**, 2021) : la sélectivité, la solubilité, le coût et la sécurité doivent être pris en compte dans le choix des solvants. Les solvants avec une valeur de polarité proche de la polarité des solutés, ont de meilleures performances et vice versa. De plus, L'efficacité d'extraction sera améliorée par la petite taille des particules due à la pénétration accrue des solvants et à la diffusion des solutés. Par conséquent, plus la taille des

particules est élevée, meilleur est le résultat obtenu par l'extraction. Une taille de particule trop fine coûtera une absorption excessive du soluté dans le solide et des difficultés lors de la filtration ultérieure. Les températures élevées augmentent la solubilité et la diffusion. Cependant, des températures trop élevées peuvent entraîner une perte de solvants, conduisant à des extraits d'impuretés indésirables et à la décomposition des molécules thermolabiles. L'efficacité d'extraction augmente avec l'augmentation de la durée d'extraction dans un certain laps de temps. La prolongation du temps n'affectera pas l'extraction une fois que l'équilibre du soluté est atteint à l'intérieur et à l'extérieur du matériau solide. Enfin, plus le rapport solvant / solide est élevé, plus le rendement d'extraction est élevé; cependant, un rapport solvant / solide trop élevé entraînera un excès de solvant d'extraction et nécessitera une longue période de concentration (**Zhang et al., 2018**).

Le processus d'extraction solide-liquide comprend trois étapes:

- 1- Perméation du solvant à travers la matrice ;
- 2- solubilisation du soluté ;
- 3- Diffusion du soluté à travers le solvant.

Des scientifiques ont émis l'hypothèse que l'étape limitée de l'extraction solide-liquide est la diffusion du soluté dissout. La diffusion du soluté est régie par les lois de Fick (**Fick, 1855**). La première loi de Fick considère que le flux du gradient de concentration en soluté va des régions de forte concentration vers les régions de faible concentration avec une grandeur proportionnelle au gradient de concentration (**Vandepoosele et al., 2021**).

Dans le domaine des techniques d'extraction solide-liquide, il est possible de distinguer les techniques d'extraction conventionnelles et non conventionnelles à savoir, la macération, l'hydrodistillation, l'extraction au Soxhlet, l'extraction assistée aux micro-ondes, l'extraction assistée aux ultrasons, l'extraction avec liquide sous pression... (**Naviglio et al., 2019**)

3.1.2.1. La macération :

La macération est une technique de séparation simple et économique réalisée dans des conteneurs en acier pouvant avoir à la fois des capacités petites et grandes (de quelques litres à des quantités de niveau industriel) et un matériau inerte à la fois vers la matrice solide et le solvant d'extraction. Cette technique d'extraction Solide-Liquide est la première et la plus ancienne basée sur la diffusion et l'osmose et, pour cette raison, est considérée comme la

technique de référence pour de nombreuses applications impliquant l'extraction de principes actifs à partir de plantes officinales (Naviglio et al., 2019).

Le solide à extraire est introduit dans le récipient inerte et entièrement recouvert par le solvant. Afin d'obtenir l'extraction la plus complète possible, le récipient doit être fermé hermétiquement, et une agitation du lot est nécessaire afin de permettre la diffusion des composés extraits dans le liquide et ainsi éviter l'équilibre de substances extraites. Le processus d'extraction est généralement assez long et nécessite des jours, voire des semaines mais il peut être accéléré avec l'augmentation de la température (loi de Fick) (Fick, 1855) ou, plus récemment, avec l'utilisation d'ultrasons ou de micro-ondes qui augmentent l'énergie cinétique des molécules présentes dans la matrice solide et potentiellement extractibles. Cette technique est recommandée pour l'extraction de principes actifs solubles ou thermolabiles et pour les matrices qui, à chaud, peuvent perdre des substances d'intérêt thérapeutique (principes actifs).

Il est utile de souligner qu'il est nécessaire de réaliser une macération avec des quantités limitées de solvant en plusieurs cycles et de soumettre le matériau extrait à un écrasement, afin d'éviter une forte perte de principes actifs (Naviglio et al., 2019).

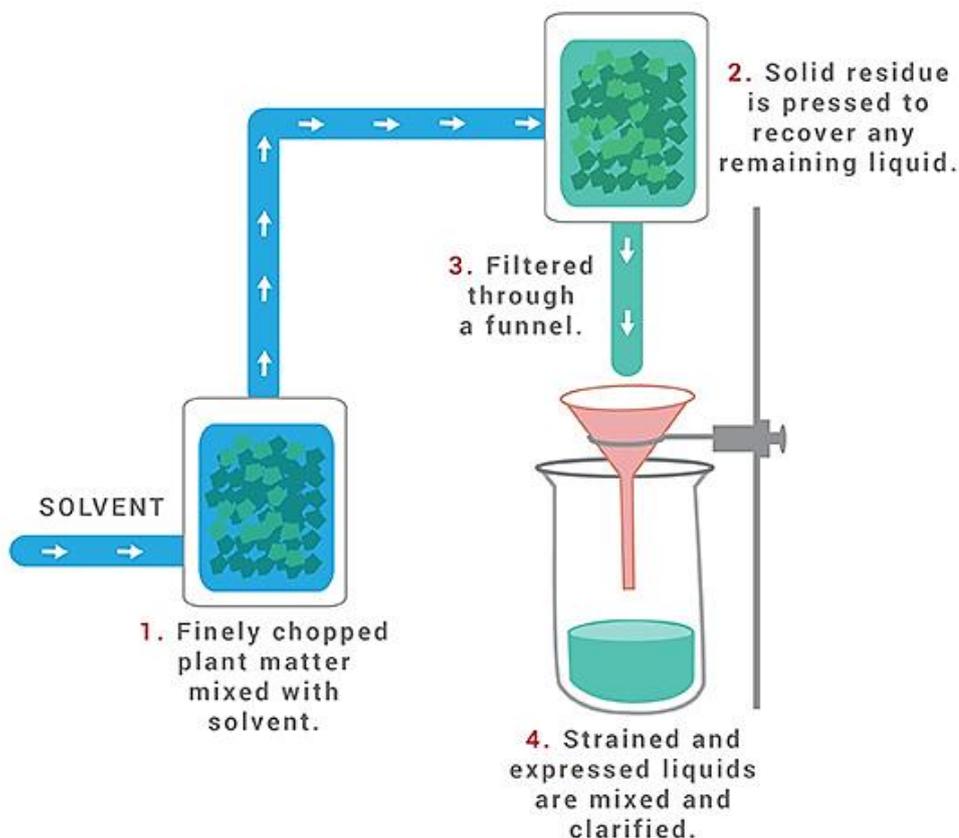


Figure 13. Schéma de principe d'extraction par macération.

3.1.2.2. Extraction à chaud en continu (Soxhlet) :

L'extraction au Soxhlet est une technique utilisée pour obtenir des composés semi-volatils et non volatils à partir d'un échantillon (Naviglio et al., 2019).

Un extracteur Soxhlet est un appareil de laboratoire conçu en 1879 par Franz Von Soxhlet. La configuration de l'extracteur de Soxhlet se compose d'un ballon à fond rond, d'un tube de siphon, d'un chemin de distillation, d'un adaptateur d'expansion, d'un condenseur, d'une entrée d'eau de refroidissement, d'une sortie d'eau de refroidissement, d'une source de chaleur et d'un dé à coudre. Dans ce procédé, l'échantillon en poudre est enfermé dans un sac poreux ou «dé à coudre» fabriqué à partir d'un papier filtre résistant ou de la cellulose, qui est placée dans la chambre à dé de l'appareil Soxhlet. Le solvant d'extraction est pris dans le ballon à fond rond et chauffé en utilisant une source de chauffage comme un manteau chauffant. La température de chauffage est basée sur le solvant utilisé pour l'extraction. En raison de la chaleur, le solvant dans le ballon inférieur se vaporise dans le condenseur, puis s'égoutte dans le dé à échantillon. Lorsque le contenu liquide atteint le bras de siphon, ce dernier se vide à nouveau dans le ballon inférieur. Ce cycle se poursuit pendant plusieurs heures et la fin du processus est indiquée par une solution claire dans le tube de siphon (Gopalsatheeskumar, 2019). Le mélange de solvants est ensuite concentré par un évaporateur rotatif. Étant donné que l'échantillon est fréquemment exposé au solvant et que la température d'extraction est supérieure à la température ambiante, les molécules d'intérêt peuvent ainsi être extraites de l'échantillon (Naviglio et al., 2019).

L'avantage de ce système est possible qu'au lieu de faire passer de nombreuses portions de solvant chaud à travers l'échantillon, un seul lot de solvant est recyclé (Gopalsatheeskumar, 2019). Cependant, l'extraction au Soxhlet présente des inconvénients du fait qu'elle implique une longue durée d'extraction et qu'une grande quantité de solvant est consommée, ce qui est coûteux et peut entraîner une pollution de l'environnement. Le long temps d'extraction et la température élevée augmentent la probabilité de dégradation des substances thermolabiles (Naviglio et al., 2019).

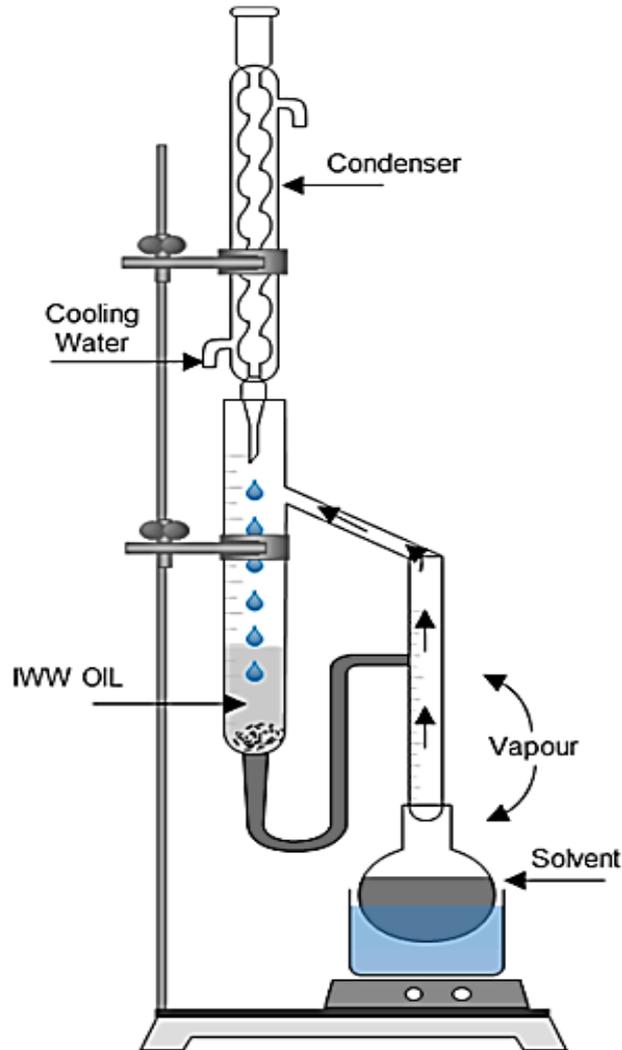


Figure 14. Illustration schématique de la méthode d'extraction au Soxhlet. (Mendoza et al., 2019)

3.2. Techniques non conventionnelles :

Les techniques modernes, ou techniques non conventionnelles, sont des techniques vertes ou propres dues à une consommation d'énergie réduite et à la mise en œuvre de solvants organiques, bénéfiques pour l'environnement telles que les technologies propres ou vertes, qui peuvent minimiser ou éliminer l'utilisation de solvants organiques.

Ces techniques sont également connues sous le nom de techniques d'extraction à froid, dans lesquelles la stabilité des composés extraits n'est pas affectée et l'énergie requise pour l'extraction est réduite : cela comprend l'extraction supercritique, le liquide sous pression, les ultrasons assistés, les micro-ondes, le champ électrique pulsé, les décharges électriques à haute tension et la pression hydrostatique élevée.

L'objectif de ces procédés d'extraction écologiques est d'atteindre un taux d'extraction plus rapide, une utilisation plus efficace de l'énergie, une augmentation du transfert de masse et de chaleur, une taille d'équipement réduite et une réduction du nombre d'étapes de traitement. L'application de ces technologies vise également à préserver l'environnement naturel et ses ressources (**Bromberger et al., 2018**).

3.2.1-Extraction assistée par micro-ondes :

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et incrémenter le rendement. La distillation assistée par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées. L'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. A titre d'exemple, La SFME (Solvent Free Microwave Extraction) est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche: elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant. Le chauffage interne de l'eau contenue dans l'échantillon permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des réceptacles oléifères. L'extrait ainsi libéré est évaporé avec l'eau de l'échantillon.

Comparée à l'hydrodistillation traditionnelle, la SFME se caractérise par une diminution de la consommation énergétique et des rejets en CO₂ mais, surtout, par un temps d'extraction de l'ordre de 9 fois plus rapide. Les extraits issus de ce procédé sont composés d'un taux plus important en composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives, alors que les mono-terpènes sont présents en moindre quantité.

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) s'articule autour de trois points importants :

- La quantité d'échantillon a été fixée de manière à obtenir une quantité d'extrait suffisante pour une séparation par simple décantation : le but de ce protocole étant d'éviter l'usage de solvant organique afin d'obtenir un produit le plus « propre » possible ;
- La puissance micro-ondes appliquée (300- 450 Watts) lors de l'extraction SFME est obligatoirement fonction de la quantité de l'échantillon à traiter: cette grandeur représente la quantité de puissance appliquée en Watts par kilogramme de l'échantillon traité ;

- Le temps total de l'extraction est composé du temps de chauffage (première étape = 10 mn) et du temps d'extraction (seconde étape = 10 mn): La capacité de chauffage des micro-ondes étant nettement supérieure à un chauffage traditionnel. La durée de l'extraction sous micro-ondes sera considérablement réduite par rapport à une hydrodistillation classique (**Boukhatem et al., 2019**).

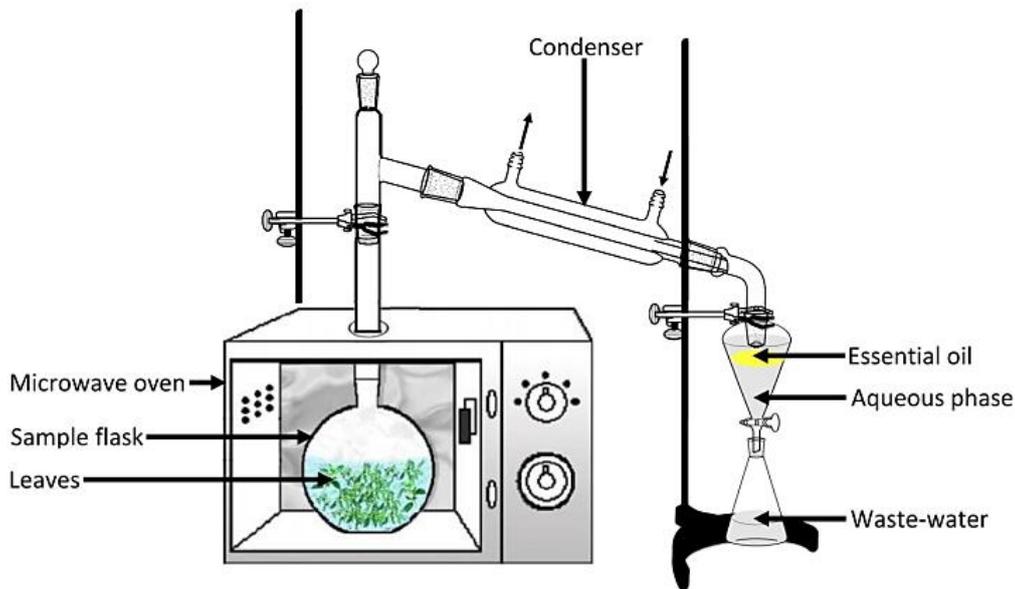


Figure 15. Schéma de principe d'extraction par micro-ondes sans solvant (SFME). (**Aslam et al., 2018**)

3.2.2. Extraction avec liquide sous pression :

L'extraction liquide sous pression (PLE) est considérée comme une technique d'extraction avancée, en raison des avantages qu'elle présente par rapport aux procédés d'extraction traditionnels. La PLE utilise l'extraction par solvant à des températures et des pressions élevées, toujours au-dessus de leurs points d'ébullition et en dessous de leurs points critiques respectifs, de sorte que le solvant est maintenu à l'état liquide pendant toute la procédure d'extraction.

En conséquence de l'utilisation de ces conditions particulières de pression et de température, un changement des propriétés physico-chimiques du solvant se produit : les taux de transfert de masse sont améliorés, tandis qu'en même temps, la tension superficielle et la viscosité du solvant sont diminuées et la solubilité des analytes est augmentée. Cela permet au solvant de pénétrer plus facilement et plus profondément dans la matrice solide extraite. En

conséquence, des rendements d'extraction significativement plus élevés sont obtenus par rapport aux extractions conventionnelles. La possibilité de choisir une large gamme de solvants fait de la PLE une technique polyvalente. Un solvant doit être choisi en tenant compte de la nature des composés à extraire. L'utilisation de solvants généralement reconnus comme sûrs, tels que l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le lactate d'éthyle ou le D-limonène, est préférée comme respectueuse de l'environnement. Parmi eux, la possibilité la plus verte implique l'utilisation de l'eau.

Les exigences instrumentales nécessaires pour mener à bien un processus PLE sont relativement simples : fondamentalement, l'instrumentation se compose d'un réservoir de solvant, d'une pompe, d'un four contenant la cellule d'extraction, de différentes vannes et restricteurs, et d'un flacon de collecte. Tout d'abord, le réservoir de solvant est couplé à la pompe haute pression. La pompe introduit le solvant dans le système et aide à expulser l'extrait une fois le processus terminé. Le processus d'extraction a lieu à l'intérieur de la cellule d'extraction. Un papier filtre est inséré dans la cellule d'extraction en acier inoxydable suivi de l'échantillon, parfois mélangé avec un agent dispersant, si nécessaire. Ensuite, la cellule est automatiquement ou manuellement placée dans le four. Différentes vannes et restricteurs sont essentiels pour contrôler la pression d'extraction. Enfin, le flacon de collecte est placé à l'extrémité du système d'extraction. L'instrumentation peut être plus ou moins sophistiquée, en fonction des exigences du processus. Quoi qu'il en soit, il faut tenir compte du fait que, compte tenu des pressions élevées (réglées entre 35 et 200 bars) et des températures (de la température ambiante à 200 ° C) doivent généralement être employées.

L'efficacité d'extraction PLE dépend à la fois des paramètres cinétiques et thermodynamiques. Par conséquent, elle est influencée par trois aspects interdépendants: l'effet de matrice, le transfert de masse et la solubilité. Ces différentes caractéristiques de la PLE sont limitées par différentes considérations, telles que la sélection du débit, de la pression, de la température et du temps utilisé dans l'extraction.

L'extraction PLE se traduit non seulement par des processus d'extraction plus rapides, mais également par une consommation de solvant plus faible pour la préparation d'échantillons de solides. De plus, la plupart des instruments utilisés pour la PLE sont automatisés, ce qui permet le développement de méthodes nécessitant moins de main-d'œuvre et améliorant la reproductibilité (Alvarez-Rivera *et al.*, 2020).

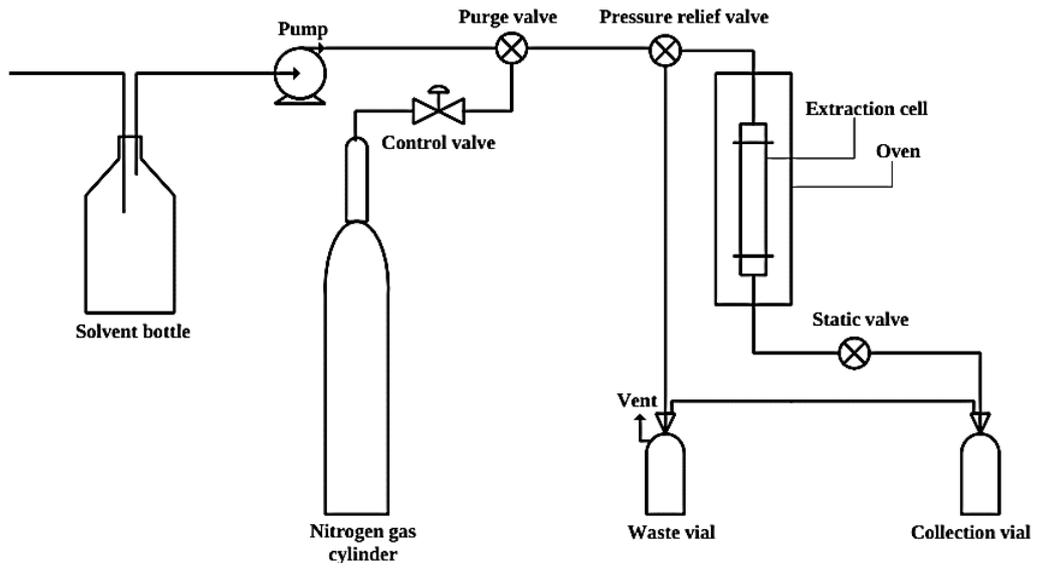


Figure 16. Schéma de principe du système d'extraction de liquide sous pression (PLE).

(Umar *et al.*, 2021)

*Matériels
et Méthodes*



1. Fructifications et réactifs :

Les fructifications de *H. marmoreus* sur lesquelles ont travaillé **Saito et al. (2018)** ; **Oda et al. (2019)** ont été achetées sur un marché local. Les fructifications excisées ont été lyophilisées et conservées à -30°C jusqu'à leur utilisation. Le sang de mouton a été obtenu auprès du « Nippon Bio-Supp Center, Tokyo, Japon ». Le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et la leupeptine provenaient de « MP Bio Japan, Tokyo, Japon » et l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) provenait de « Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japon ». D'après **Saito et al. (2018)** et **Oda et al. (2019)**, tous les produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique.

2. Préparation de l'extrait et ajustement de son pH :

La préparation de l'extrait par **Saito et al. (2018)** était comme suit :

Des morceaux de fructifications lyophilisées de *H. marmoreus* ont été broyés et soniqués 10 fois pendant 2 secondes dans du tampon phosphate 10 mM (pH 7,3).

L'homogénat a été centrifugé à 12000 tr/min pendant 30 min. Le surnageant obtenu a été utilisé comme extrait.

Ensuite, l'extrait a été mélangé avec un volume égal d'un tampon 0,1 M à une plage de pH de 3,0 à 10,0 et incubé à 37°C pendant 30 min. Les 4 tampons suivants ont été utilisés :

- un tampon citrate avec un pH de 3,0 ou 4,0 ;
- un tampon acétate avec un pH de 5,0 ou 5,5 ;
- un tampon phosphate avec un pH de 6,0, 7,0 ou 8 ;
- un tampon carbonate avec un pH de 9,0 ou 10,0.

La turbidité du mélange a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (UVmini 1240 ; Shimadzu, Kyoto, Japon). L'inhibition de l'activité hémolytique d'un extrait a été examinée en abaissant son pH en présence de 10 mM d'EDTA, de PMSF ou de 20 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptine. Les effets des ions métalliques divalents ont également été examinés en utilisant divers chlorures métalliques à une concentration de 20 mM en présence de 10 mM d'EDTA.

3. Activité hémolytique :

Saito et al. (2018) ont utilisés des globules rouges de mouton afin de déterminer l'activité hémolytique. Les cellules ont été lavées trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Une suspension de globules rouges de mouton (0,1 ml) a été mélangée à 1,9 ml d'eau distillée afin de provoquer une lyse osmotique, et l'absorbance a été mesurée à 541 nm.

Du PBS a été ajouté à la suspension de sorte que l'absorbance à 541 nm soit de 0,500. Un mélange réactionnel (2 ml) contenant 0,1 ml de globules rouges de mouton en suspension préparés comme décrit ci-dessus, du PBS et un échantillon a été incubé à 37°C pendant 10 min. Un contrôle positif a été préparé en mélangeant 0,1 ml de globules rouges de mouton en suspension avec 1,9 ml d'eau distillée et un contrôle négatif a été préparé en mélangeant de manière similaire les globules rouges de mouton avec du PBS. Après centrifugation à 2200 tr/min pendant 5 min à 4°C, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 541 nm. Une lyse à cent pour cent a été définie comme l'absorbance du surnageant obtenu à partir de cellules lysées par osmose (le contrôle positif). Une unité a été définie comme la quantité de composé hémolytique provoquant 50 % d'hémolyse.

Le même protocole a été suivi par **Oda et al. (2019)** pour déterminer l'activité hémolytique des fructifications de *H. marmoreus*.

4. Génération et préparation d'un composé hémolytique brut :

Afin de générer le composé hémolytique du champignon *H. marmoreus*, **Saito et al. (2018)** ont utilisés 54g des morceaux de fructifications lyophilisées de *H. marmoreus*. Un extrait préparé comme décrit ci-dessus a été traité avec du tampon acétate 0,1 M (pH 5,5) et incubé à 37°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12 000 tr/min pendant 20 min, le précipité a été dissous dans de l'éthanol. Une fraction liposoluble a été obtenue avec un système de solvant modifié en utilisant la méthode de **Bligh et Dyer. (1959)** avec de l'éthanol au lieu du méthanol. L'échantillon dissous dans l'éthanol a été mélangé avec une partie de chloroforme et 0,9 partie d'eau distillée. Après un vortex vigoureux, le mélange a été centrifugé. La couche inférieure a été mélangée avec la couche supérieure d'un mélange de chloroforme/éthanol/eau (1:1:0,9, v/v) suivi d'un vortex et d'une nouvelle centrifugation. La couche inférieure résultante a été évaporée sous pression réduite et le résidu résultant a été dissous dans de l'éthanol.

Le même protocole a été suivi par **Oda et al. (2019)** mis à part la fraction liposoluble résultante a été séchée sous vide et dissoute dans 50 % d'éthanol.

5. Purification du composé hémolytique par chromatographie sur colonne :

L'échantillon dissous dans 50 % d'éthanol des travaux d'**Oda et al. (2019)** a été chargé sur une colonne à cartouche Strata C18-E (500 mg/6 ml ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) équilibrée avec le même solvant. La colonne a été lavée avec de l'éthanol à 50 %, puis une élution par étapes a été réalisée avec de l'éthanol à 75 et 100 %. L'élution a été contrôlée à 210 nm. La taille des fractions était de 4 ml. Les fractions ayant une activité hémolytique ont été regroupées et séchées sous vide. L'échantillon a ensuite été dissous dans du n-hexane/éther diéthylique/acide acétique (80:30:1, v/v) et passé à travers une colonne Wakogel C-200 (ϕ 1,2 × 46 cm ; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japon) équilibré avec le même système de solvant à un débit de 0,6 mL/min. Les fractions (1 ml chacune) ont été recueillies et l'absorbance à 210 nm a été mesurée. Les fractions actives hémolytiques ont été regroupées et soumises à une rechromatographie dans les mêmes conditions.

6. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée par **Oda et al. (2019)** avec 60 plaques de gel de silice CCM haute performance (Merck, Kenilworth, NJ, USA) et chloroforme/méthanol/eau (60 : 35 : 6, v/v) ou n-hexane/éther diéthylique/acide acétique (80:30:1, v/v) comme solvant de développement. Les lipides ont été détectés par coloration à la primuline, à l'acide phosphomolybdique et à la vapeur d'iode. Les plaques TLC ont également été soumises à un test d'hémolyse pour détecter les composés hémolytiques.

7. Analyses structurales du composé hémolytique :

Afin de réaliser l'analyse structurale du composé hémolytique, **Oda et al. (2019)** ont utilisés un spectromètre de masse à ionisation par électronébulisation JMN-T100LP (JEOL, Tokyo, Japon).

Une microanalyse à sonde électronique (EPMA) pour détecter le carbone et le calcium a été réalisée sur une plaquette de silicium en utilisant un microanalyseur à sonde électronique EPMA-1610 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Les échantillons ont été dissous dans 0,1-0,2 ml d'éthanol et soumis aux analyses. La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été analysée à l'aide d'un spectromètre RMN 500 MHz Avance III HD (Bruker, Brême, Allemagne) à 300 K. Les spectres ont été obtenus à partir de 6 mg du composé hémolytique purifié dans des tubes de 5 mm (Kusanokagaku, Tokyo, Japon). L'échantillon a été dissous dans 0,45 ml de méthanol deutéré (99,8 %, Acros Organics, Geel, Belgique) contenant du tétraméthylsilane ($\delta H = 0,00$)

comme référence interne. Données provenant d'homonucléaires unidimensionnels (proton, carbone, DEPT135 ; rehaussement sans distorsion par transfert de polarisation) et bidimensionnels (spectroscopie de corrélation (COSY ; spectroscopie à effet Overhauser nucléaire (NOESY)) et hétéronucléaire détecté par H (cohérence quantique multiple hétéronucléaire (HMQC); les expériences de cohérence de liaisons multiples hétéronucléaires (HMBC) ont été enregistrées et traitées à l'aide du logiciel TopSpin 3.5 pl 5 (Bruker).

*Résultats
et Discussion*



1. Activité hémolytique :

Dans les expériences préliminaires de Saito *et al.* (2018), une activité hémolytique a été détectée dans un extrait traité à l'acide de fructifications de *H. marmoreus* mais pas dans un extrait neutre (données non présentées). Par conséquent, la relation entre l'exposition de l'activité hémolytique et le pH de l'extrait a été examinée : lorsque le pH de l'extrait a été ajusté à 37°C pendant 30 min, une activité hémolytique a été notée dans les extraits acides mais pas dans les extraits neutres ou basiques (Figure 17). L'activité hémolytique maximale a été présentée par un extrait avec un pH de 5,5. Les extraits à faible pH présentaient une activité hémolytique et présentaient également une turbidité accrue (Figure 17).

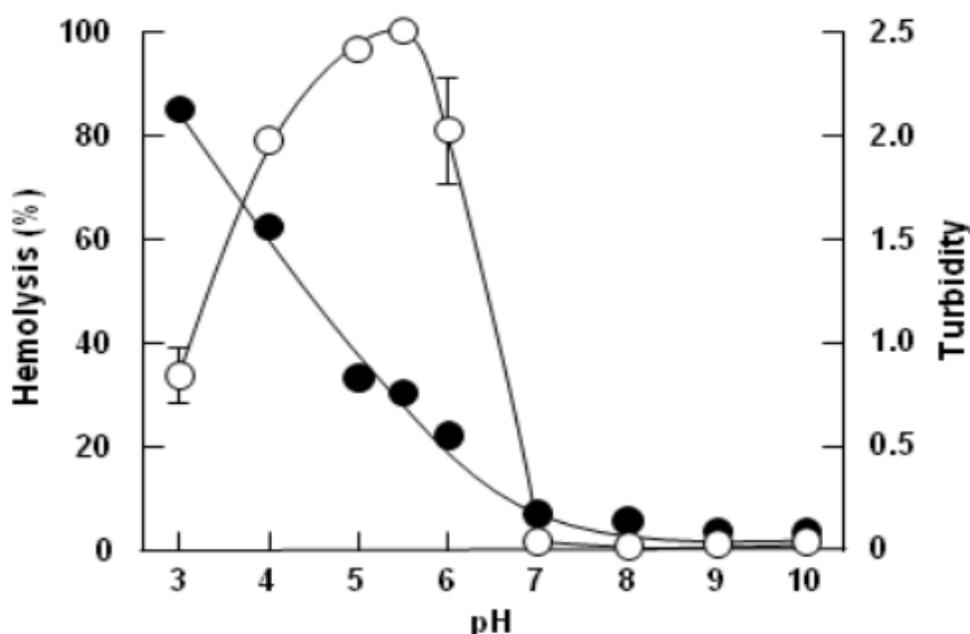


Figure 17. Effet du pH sur l'exposition de l'activité hémolytique et la turbidité d'un extrait de fructifications de *H. marmoreus*. (Saito *et al.*, 2018)

Un extrait trouble de pH 5,5 a été centrifugé à 12 000 tr/min pendant 20 min afin de séparer les fractions surnageantes et précipitées. Une activité hémolytique puissante a été présentée par la fraction de précipité qui a été dissoute dans l'éthanol (données non présentées). En revanche, l'activité hémolytique n'a pas été détectée dans la fraction surnageante alors qu'une puissante activité hémagglutinante a été notée (données non présentées). Cela peut être causé par la lectine de *H. marmoreus*. Cette découverte suggère qu'un composé hémolytique insoluble dans l'eau est présent dans l'extrait pendant son incubation à un pH bas. L'effet de la chaleur sur

l'exposition de l'activité hémolytique a été examinée. Un extrait bouilli n'a pas présenté d'activité hémolytique ou d'augmentation de la turbidité lorsque son pH était de 5,5 (**Figure 18 (A)**). En revanche, la fraction précipitée qui a été obtenue à partir d'un extrait avec un pH de 5,5 a conservé une activité hémolytique suffisante même si la fraction a été traitée thermiquement (**Figure 18 (B)**). Ces résultats suggèrent que le composé hémolytique est thermostable et que le métabolisme thermolabile peut expliquer l'activité hémolytique présentée par le composé.

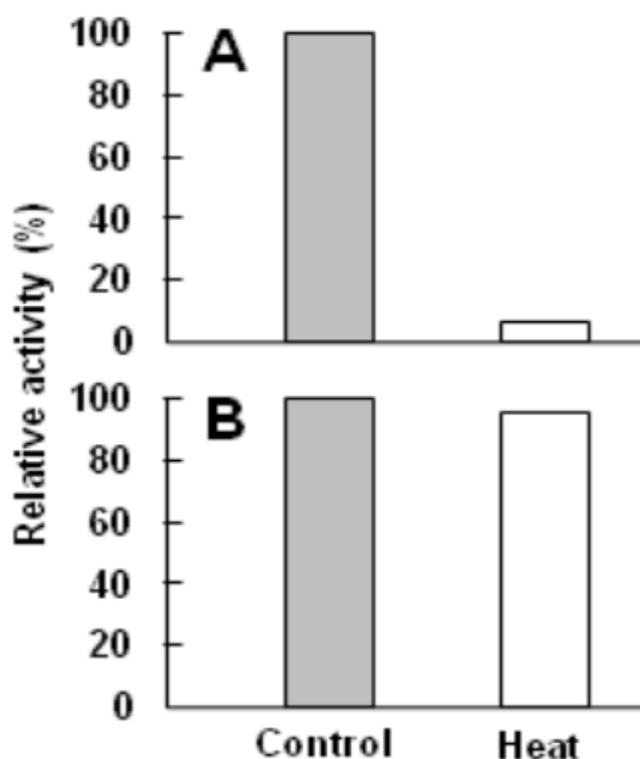


Figure 18. (A). Effet du traitement thermique sur l'activité hémolytique des extraits avant ou après abaissement du pH. (B). Les échantillons ont été soumis à un dosage hémolytique. Les témoins ont été produits en omettant l'ébullition. (Saito *et al.*, 2018)

L'effet des inhibiteurs sur la génération du composé hémolytique a été examiné. Des extraits ont été préparés avec un pH neutre en présence d'inhibiteurs puis leur pH a été abaissé à 5,5. Comme le montre la (**Figure 19**), l'activité hémolytique pendant l'abaissement du pH a été empêchée par le PMSF et le chélateur de cations divalents EDTA mais pas par la leupeptine. L'activité hémolytique inhibée par l'EDTA est nettement revenue en présence de Ca^{2+} , bien que d'autres cations n'aient pas réussi à restaurer suffisamment cette activité.

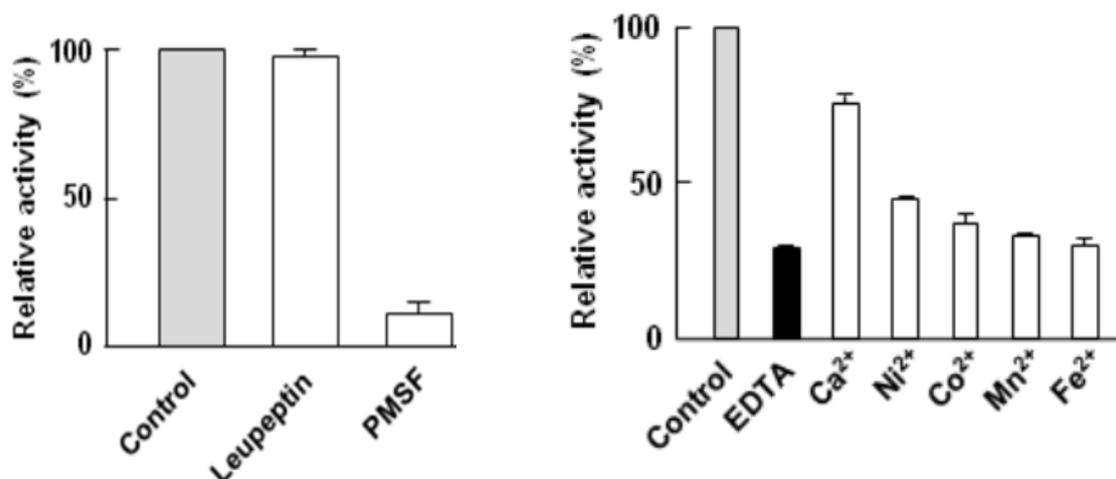


Figure 19. Effet des inhibiteurs de l'activité hémolytique sur des extraits à faible pH. (Saito et *al.*, 2018)

2. Analyses structurales et détermination de la nature du composé hémolytique :

Pour caractériser la nature du composé hémolytique, la fraction de précipité obtenue par (Oda et *al.*, 2019) à partir d'un extrait avec un pH de 5,5, a été encore fractionnée à l'aide de la méthode de (Bligh et Dyer, 1959) exercée et modifiée par (Saito et *al.*, 2018) comme décrit dans le matériel et méthodes. Comme le montre la (Figure 20 (A)), une activité hémolytique puissante a été détectée dans la couche inférieure (fraction lipidique) mais pas dans la couche supérieure (fraction aqueuse). La coloration à la primuline après le développement par CCM a révélé que la fraction de couche inférieure contenait divers composants (Figure 20 (B), piste a). Ces résultats suggèrent que le composé hémolytique dans un extrait de fructifications de *H. marmoreus* à faible pH peut être une substance de type lipide.

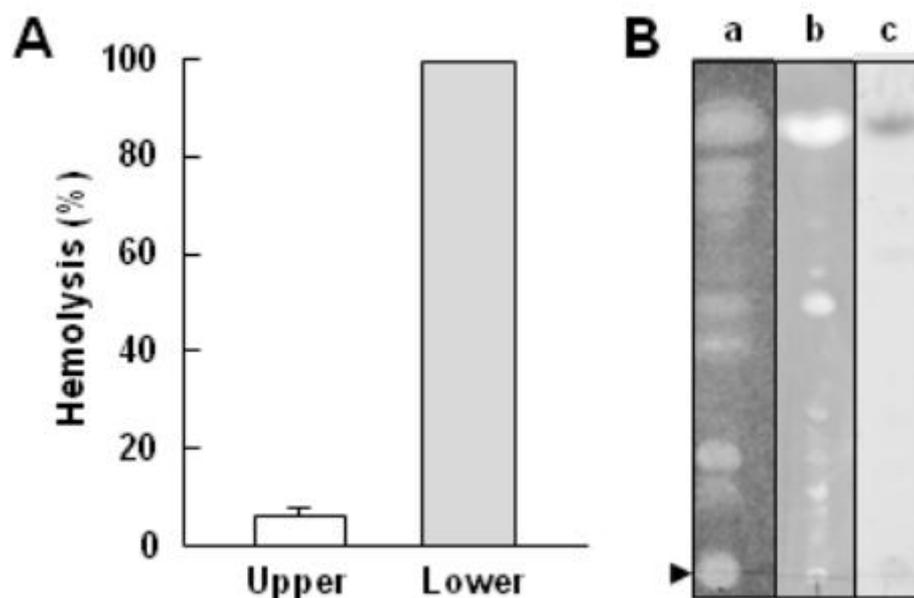


Figure 20. Fractionnement de l'activité hémolytique à l'aide d'une méthode modifiée de Bligh et Dyer et d'une CCM. (A) Une fraction de précipité fractionnée en utilisant une méthode modifiée de Bligh et Dyer. (B) La fraction de couche inférieure développée sur des plaques TLC en utilisant un système de solvant de chloroforme/méthanol/eau (60:35:6, v/v). (Saito et al., 2018)

D'une autre part, la purification du composé hémolytique de la fraction par chromatographie sur colonne sur cartouche C18 réalisée par (Oda et al., 2019) comme décrit dans le matériel et méthodes a abouti aux résultats suivants :

Comme le montre la (Figure 21 (A)), les substances détectées à 210 nm ont été éluées avec 50 % d'éthanol, et une forte activité hémolytique était évidente avec 75 % d'éthanol. Une faible activité a également été notée dans l'éluant avec 100 % d'éthanol. La fraction active principale a ensuite été soumise à une Chromatographie sur colonne de gel de silice comme décrit dans le matériel et méthodes. Comme le montre la (Figure 21 (B)), l'activité hémolytique a été détectée sous la forme d'un pic unique. La fraction active a été soumise à une rechromatographie pour une purification supplémentaire. L'analyse par CCM a indiqué que la fraction active finale produisait une seule tache détectée avec une coloration à l'acide phosphomolybdique et de la vapeur d'iode (Figure 21 (C)). Au cours de cette purification, 8,8

mg du composé hémolytique purifié ont été obtenus à partir de 1360 mg de la substance liposoluble (données non présentées). L'EPMA a détecté qualitativement le calcium dans l'échantillon hémolytique purifié par EPMA (données non présentées). L'ESI-MS a indiqué un m/z de 710,5.

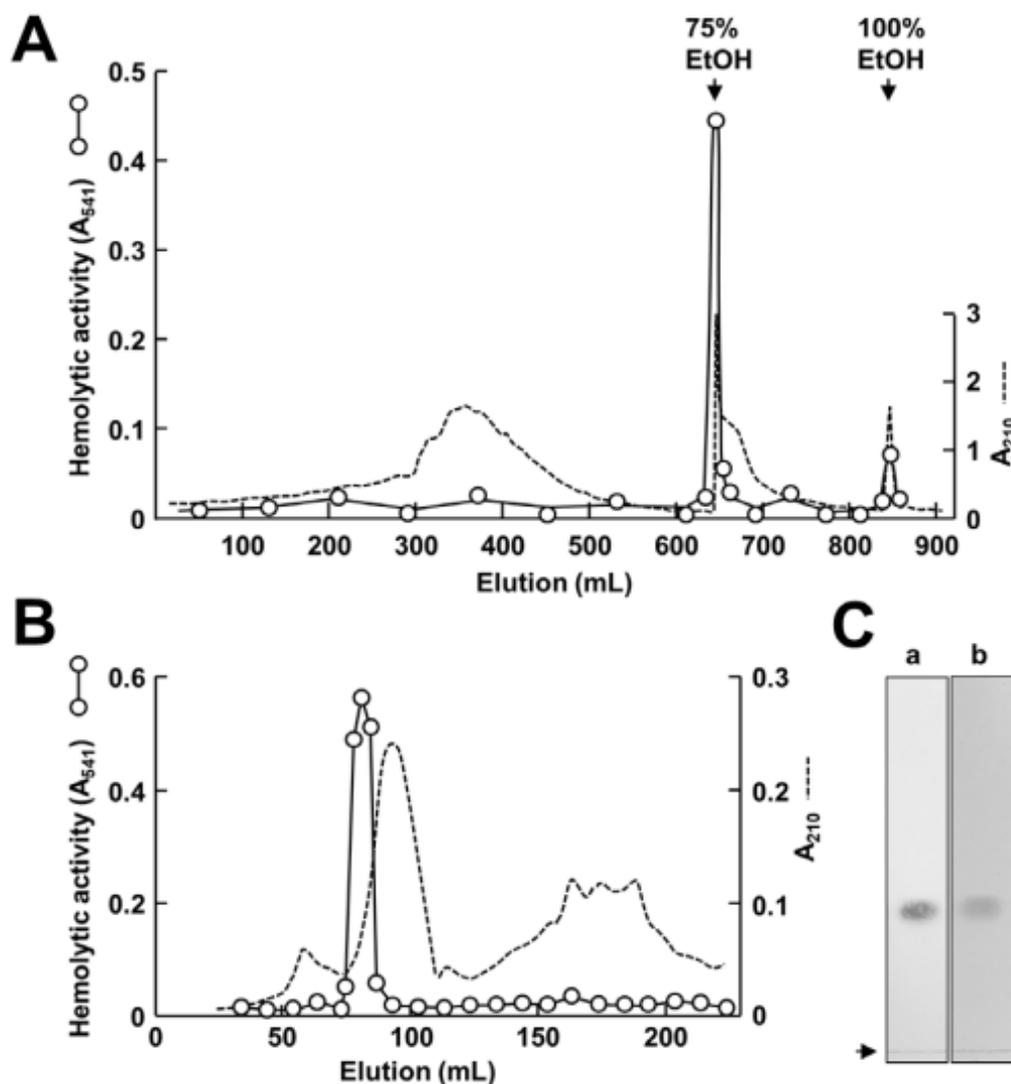


Figure 21. Purification d'un composé hémolytique par chromatographie en phase inversée et sur colonne de silice. **(A)** Chromatogramme lors de l'utilisation de la colonne de cartouche Strata C18-E. **(B)** Chromatogramme lors de l'utilisation de la colonne Wakogel C-200. **(C)** Analyse CCM d'un composé hémolytique purifié par rechromatographie avec une colonne de gel de silice. (Oda et al., 2019)

Le composé hémolytique a été soumis à des analyses RMN pour déterminer sa structure. La configuration relative du composé hémolytique a été déterminée en utilisant la RMN NOESY. Des interactions NOE à longue distance entre H-4 et H-6, H-8 et H-10, H-7 et H-9, H-5 et H-7 ont été observées (**Figure 22**).

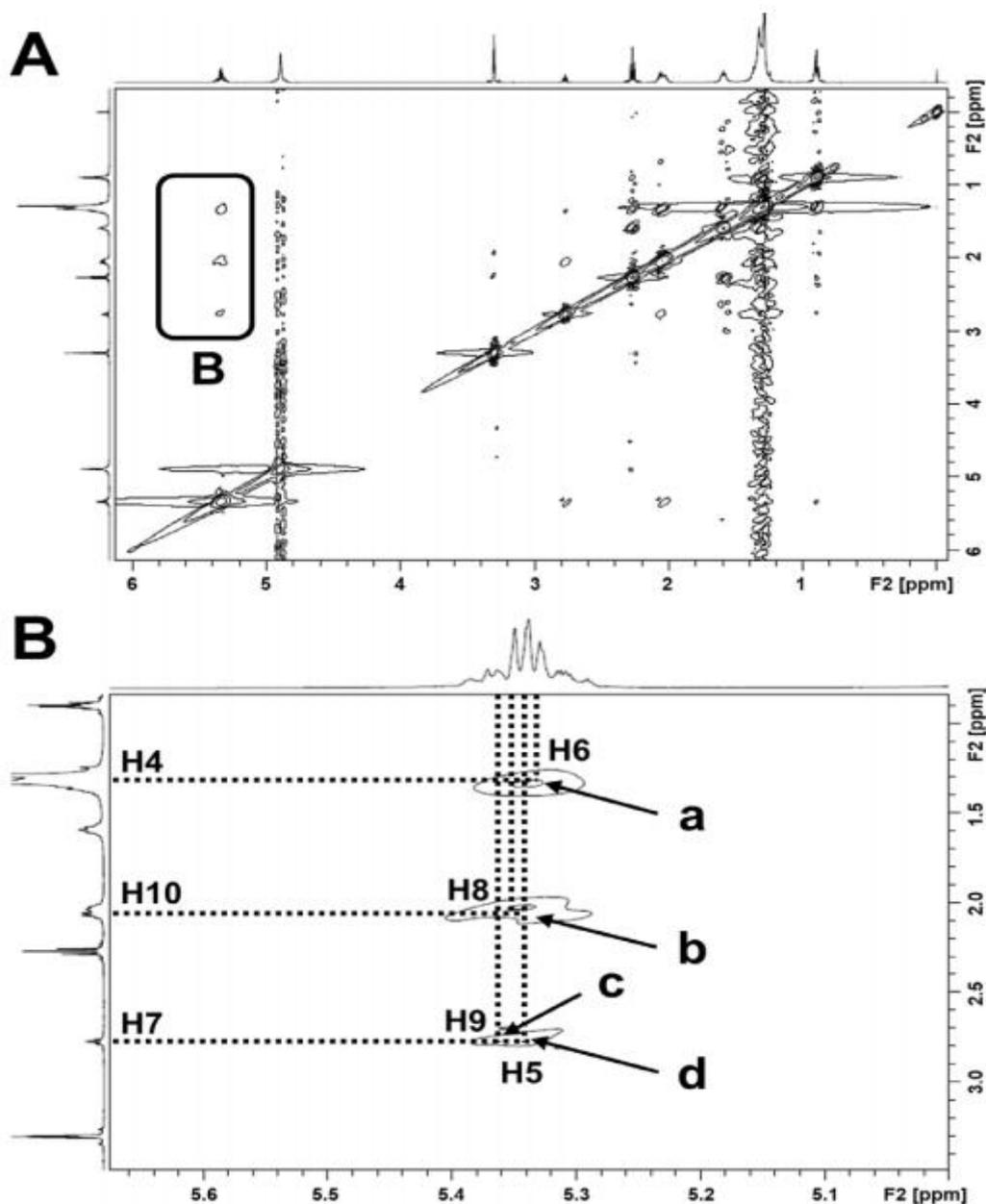


Figure 22. Spectres NOESY. Le panneau A montre l'ensemble du spectre et la zone indiquée est agrandie dans le panneau B. Les flèches a-d indiquent les interactions NOE à longue portée entre H-4 et H-6, H-8 et H-10, H-7 et H-9, et H-5 et H-7, respectivement. (Oda et al., 2019)

La structure déduite du composé hémolytique a indiqué un sel de calcium de l'acide trans,trans-5,8-docosadiénoïque (**Figure 23**).

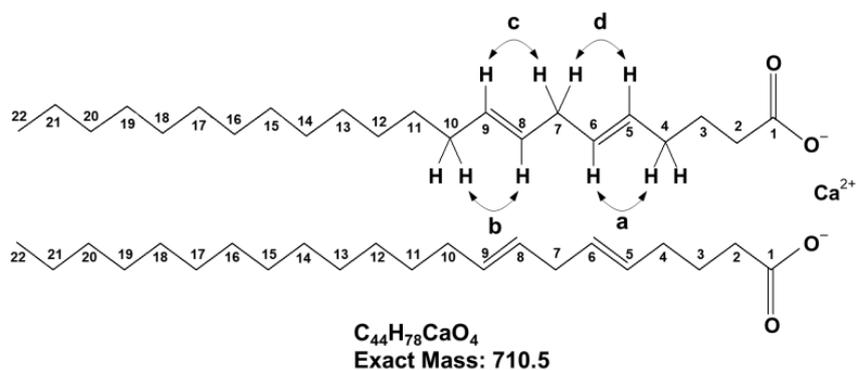


Figure 23. Structure déduite du composé hémolytique purifié à partir d'un extrait traité à faible pH de fructifications de *H. marmoreus*. Interaction NOE ; a (H-4 et H-6), b (H-8 et H-10), c (H-7 et H-9), d (H-5 et H-7). (Oda et al., 2019)

L'étude actuelle a révélé que le composé hémolytique trouvé dans un extrait à faible pH des fructifications de *H. marmoreus* était un acide trans,trans-5,8-docosadiénoïque.

En revanche, le composé hémolytique de *H. marmoreus* était un type d'acide gras identifié lorsque l'extrait de champignon avait un pH bas d'après (Saito et al., 2018). Il s'agit peut-être du premier composé de faible poids moléculaire trouvé au moyen de l'analyse de l'activité hémolytique des composants du champignon. Bien que les acides gras soient connus pour potentiellement provoquer une hémolyse en perturbant la structure de la membrane cellulaire, l'acide gras hémolytique de *H. marmoreus* a été trouvé uniquement dans un extrait de fructification.

De nombreux types d'acides gras, dont une petite quantité d'acide docosadiénoïque (C22:2), ont été trouvés dans divers champignons (Pedneault et al., 2006 ; Doğan et Akbaş, 2013).

Curieusement, seul l'acide trans,trans-5,8-docosadiénoïque a été identifié comme un composé hémolytique majeur dans l'étude de (Oda et al., 2019) du champignon *H. marmoreus*. Bien que d'autres substances hémolytiques aient été détectées dans la fraction liposoluble selon l'analyse CCM et la chromatographie sur colonne en phase inverse, l'acide docosadiénoïque était un composant majeur purifié en tant que composé hémolytique. Une possibilité est que les

fructifications de *H. marmoreus* pourraient contenir ce type d'acide gras en abondance. Une autre possibilité est que les enzymes agissant pour libérer les acides gras hémolytiques pourraient être spécifiques à ce type d'acide gras.

Oda et al. (2019) ne savent toujours pas pourquoi le sel de calcium d'acide gras a été obtenu en tant que composé hémolytique dans leur étude. Les ions hydrogène dans l'acide gras peuvent être échangés contre des ions calcium dans l'extrait lorsque son pH est abaissé.

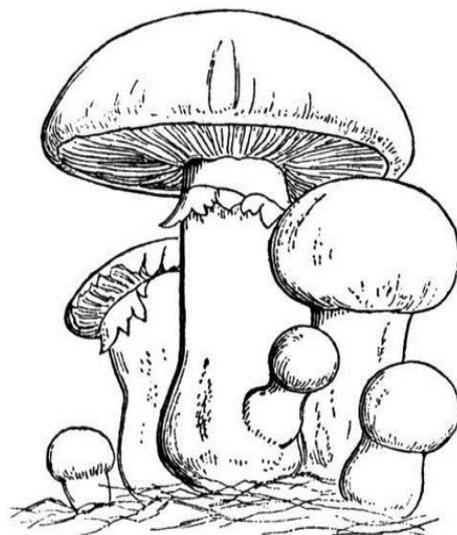
Des hémolysines protéiques ont été trouvées dans divers champignons, notamment l'aégérolysine chez *Agrocybe aegerita* (**Berne et al., 2002**), la flammutoxine chez *Flammulina velutipes* (**Bernheimer et Oppenheim, 1987**), la pleurotolysine et l'ostréolysine chez *Pleurotus ostreatus* (**Tomita et al., 2004; Sepčić et al., 2003**), les érylysines chez *P. eryngii* (**Shibata et al., 2010**), la nébrodéolysine chez *P. nebrodensis* (**Lv et al., 2009**), la schizolysine chez *Schizophyllum commune* (**Han et al., 2010**) et la volvatoxine chez *Volvarilla volvacea* (**Weng et al., 2004**). Ces hémolysines étaient actives lorsque le premier extrait a été ajusté à un pH neutre avec des tampons. Cependant, une hémolysine protéique de *H. marmoreus* n'a pas encore été décrite. L'abaissement du pH d'un extrait de *H. marmoreus* était essentiel pour qu'il présente une activité hémolytique (**Figure 17**), ce qui explique probablement pourquoi cette activité n'a pas été notée jusqu'à présent. Cela dit, le composé hémolytique trouvé dans l'étude de (**Saito et al., 2018**) peut être une substance lipidique mais pas une hémolysine protéique comme cela a été trouvé dans divers champignons.

Certains lipides tels que les acides gras sont connus pour endommager les cellules de manière non spécifique en perturbant leur structure membranaire. En fait, le composé trouvé dans l'étude de (**Saito et al., 2018**) a provoqué une hémolyse non spécifique des globules rouges de lapin et de cheval ainsi que des globules rouges de mouton (données non présentées). L'activité hémolytique n'a pas été détectée dans un extrait chauffé avant que son pH ne soit abaissé, mais une activité a été détectée dans un extrait thermostable après que son pH ait été abaissé (**Figure 18**). Par conséquent, une ou plusieurs substances précurseurs non actives peuvent être présentes dans les fructifications et une ou des enzymes thermolabiles peuvent amener ces précurseurs à libérer un composé hémolytique thermostable. Puisque l'activité hémolytique a été inhibée en présence d'EDTA et que l'activité a repris avec l'ajout de Ca^{2+} (**Figure 19(B)**), l'action enzymatique est vraisemblablement Ca^{2+} -dépendante selon **Saito et al. 2018**. De plus, le PMSF (un inhibiteur connu de la protéase à sérine) était un inhibiteur efficace de l'activité hémolytique lors de l'abaissement du pH de l'extrait (**Figure 19(A)**). Cependant, la leupeptine (un inhibiteur compétitif de la sérine protéase) n'a pas inhibé l'activité

hémolytique (**Figure 19 (A)**). Par conséquent, une métalloenzyme possédant un résidu sérine catalytiquement actif dans son site actif, mais pas une sérine protéase, pourrait être responsable de la formation d'un composé hémolytique. La structure du ou des composés lipidiques hémolytiques et du ou des précurseurs et des enzymes dans les fructifications de *H. marmoreus* ont été étudiés plus après par (**Oda et al., 2019**) aboutissant à la découverte de l'acide trans,trans-5,8-docosadiénoïque responsable de l'activité hémolytique des fructifications de *H. marmoreus*.

Saito et al., (2018) et **Oda et al., (2019)** pensent que les hémolysines d'un champignon protègent ces derniers des facteurs extérieurs ou participent à la fusion des mycéliums dans le cycle de vie des basidiomycètes ainsi que l'influence de la structure de la membrane cellulaire et la lyse des cellules.

Conclusion

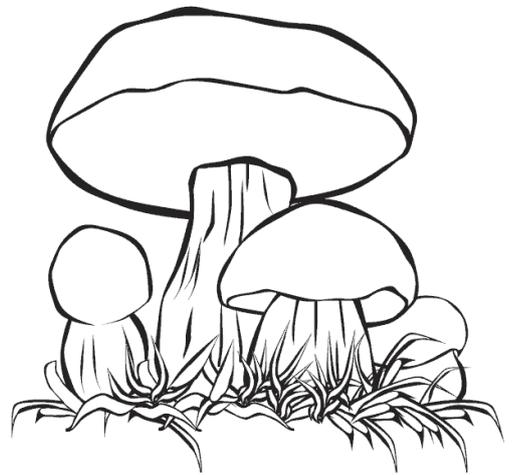


CONCLUSION

Dans l'étude menée par (Saito et al., 2018) sur l'activité hémolytique du champignon comestible *Hypsizygus marmoreus* a révélée qu'un extrait des organes de fructification de ce dernier présentait une activité hémolytique contre les globules rouges de mouton lorsque son pH était abaissé. Bien que l'activité hémolytique n'ait pas été détectée lorsqu'un extrait avait un pH neutre, un extrait avec un pH faible présentait une puissante activité hémolytique. L'activité hémolytique maximale a été présentée par un extrait avec un pH de 5,5. Un extrait traité thermiquement n'a pas présenté d'activité hémolytique avant que son pH ne soit abaissé, et cette activité a été inhibée en présence de PMSF et d'EDTA. La turbidité de l'extrait a augmenté pendant l'abaissement de son pH et la fraction précipitée a présenté une activité hémolytique. Le fractionnement par une méthode modifiée de (Bligh et Dyer, 1959) et des analyses TLC ont suggéré qu'un composé hémolytique dans l'extrait pourrait être un type de lipide. Ces résultats suggèrent qu'un composé hémolytique de type lipide dans un extrait de fructifications de *H. marmoreus* peut être libéré par une ou plusieurs substances précurseurs non actives par l'intermédiaire de métalloenzymes alors que l'extrait a un pH bas.

Dans les travaux récents réalisés par (Oda et al., 2019) sur les analyses structurales d'un composé hémolytique trouvé dans un extrait de fructification du même champignon comestible *Hypsizygus marmoreus* à un pH bas. La détermination du composé hémolytique dans l'extrait de fructification de *Hypsizygus marmoreus* a été réalisée par la purification de ce dernier en utilisant la méthode modifiée de (Bligh et Dyer, 1959) suivie d'une Chromatographie en utilisant des colonnes en phase inversée et de gel de silice. Des analyses structurales du composé hémolytique purifié ont été effectuées en utilisant la RMN et l'ESI-MS. La structure déduite indique un sel de calcium de l'acide trans, trans-5,8-docosadiénoïque. Bien que de nombreuses hémolysines protéiques de divers champignons aient été décrites, cette étude est la première à rendre compte d'un composé hémolytique de faible poids moléculaire dérivé d'un extrait de *H. marmoreus* et par conséquent l'hypothèse émise par (Saito et al., 2018) que le composé hémolytique trouvé dans l'organe de fructification de *H. marmoreus* est de type lipide est véridique et théorème grâce aux travaux de (Oda et al., 2019).

*Références
Bibliographiques*



- 1- **A. ELKHATEEB W, M. DABA G, W. THOMAS P AND WEN T (2019).** Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. Article doi:10.4103/epj.epj_17_19.
- 2- **A. ELSAYED E, EL ENSHASY H, A. M. WADAAN M AND AZIZ R (2014).** Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediators of Inflammation*. **15**, 805841. Article doi:10.1155/2014/805841.
- 3- **AHRENBORG M, BECK M, NEISE C, KEßLER O, KRAGL U, VEREVKIN S.P AND SCHICK C (2016).** Vapor pressure of ionic liquids at low temperatures from AC-chip-calorimetry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 2138. Article doi: 10.1039/c6cp01948j.
- 3- **A. KELLER S, KLUKOWSKA-RÖTZLER J, M. SCHENK-JAEGER K, KUPFERSCHMIDT H, K. EXADAKTYLOS A, LEHMANN B AND LIAKONI E (2018).** Mushroom poisoning—a 17 year retrospective study at a level I university emergency department in Switzerland. *International journal of environmental research and public health*. **15**, 2855. Article doi:10.3390/ijerph15122855.
- 4- **ALARA O.R, ABDURAHMAN N.H AND UKAEGBU C.I (2021).** Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. **4**, 200-2014. Article doi:10.1016/j.crfs.2021.03.011.
- 5- **AL-FAQEEH L.A.S, RAFIUDDIN N, KAGNE S.R AND KHAN S.W (2021).** Review on anticancer and antimicrobial activities of mushrooms. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **10(2)**, 1922-1936. Article doi:10.17605/OSF.IO/67CNG.
- 6- **ALGUACIL F.J AND LOPEZ F.A (2021).** Insight into the Liquid–Liquid Extraction System AuCl₄⁻/HCl/A327H⁺Cl⁻. Ionic Liquid/Toluene. *Processes*. **9**, 608. Article doi:10.3390/pr9040608.
- 7- **AL-HUSSAINY K.S.J AND AL-FADHLY N.K.Z (2019).** Comparison between protein and amino acids of mushroom *Agaricus bisporus* with some kinds of meat and meat's products. *International Conference on Agricultural Sciences*. **388**, 012059. Article doi:10.1088/1755-1315/388/1/012059.

- 8- ALVAREZ-RIVERA G, BUENO M, BALLESTEROS-VIVAS D, MENDIOLA J.A AND IBANˆEZ E (2020).** Pressurized liquid extraction. *Handbooks in Separation Science*. 375-398. Article doi:10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X.
- 9- A. MARTINEZ-MEDINA G, L. CHAVEZ-GONZALEZ M, VERMA D.K, PRADO-BARRAGAN L, L. MARTÍNEZ-HERNANDEZ J, C. FLORES-GALLEGOS A, THAKUR M, SRIVASTAV P.P AND N. AGUILAR C (2021).** Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacohe as recent trends. *Journal of functional foods*. **77**, 104326. Article doi:10.1016/j.jff.2020.104326.
- 10- ASLAM M.S, AHMAD M.S AND RAJA S.A (2018).** Solventless Extraction of Essential Oil. *Green Chemistry*. Article doi :10.5772/intechopen.72401.
- 11- BALIK M, SUŁKOWSKA– ZIAJA K, ZIAJA M AND MUSZYŃSKA B (2020).** Phenolic acids – occurrence and significance in the world of higher fungi. *MIR N-ro*. **29(2)**, 115.
- 12- BECHERINI S, MEZZETTA A, CHIAPPEA C AND GUAZZELLI L (2019).** Levulinate amidinium protic ionic liquids (PILs) as suitable media for the dissolution and levulination of cellulose. *New Journal of Chemistry*. **43**, 4554-4561.
- 13- BERNE S, KRIZAJ I, POHLEVEN F, TURK T, MACEK P AND SEPCIĆ K (2002).** Pleurotus and Agrocybe hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochim Biophys Acta*. **1570**, 153-159.
- 14- BERNHEIMER A.W AND OPPENHEIM J.D (1987).** Some properties of flammutoxin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*. **25**, 1145-1152.
- 15- BILLARD I (2019).** Green solvents in urban mining. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. **18**, 37-41. Article doi:10.1016/j.cogsc.2018.11.013.
- 16- BLIGH E.G AND DYER W.J (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. **37**, 911-917.
- 17- BOUKHATEM M.N, FERHAT A AND KAMELI A (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Revue Agrobiologia*. **9(2)**, 1653-1659.

- 18- BUTKHUP L, SAMAPPITO W AND JORJONG S (2017).** Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. *Food Sci Biotechnol.* **27**, 193-202. Article doi:10.1007/s10068-017-0237-5.
- 19- CATENI F, GARGANO M.L, PROCIDA G, VENTURELLA G, CIRLINCIONE F AND FERRARO F (2021).** Mycochemicals in wild and cultivated mushrooms: nutrition and health. *Phytochem Rev.* Article doi:10.1007/s11101-021-09748-2.
- 20- CHANIOTI S, LIADAKIS G AND TZIA C (2014).** Solid–liquid extraction. *Food engineering handbook.* Article doi:10.1201/b17803-7.
- 21- CHATTERJEE D, HALDER D AND DAS S (2021).** Varieties of Mushrooms and their Nutraceutical Importance: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* **15(3)**, 01-06. Article doi:10.7860/JCDR/2021/47240.14660.
- 22- CHIAPPE C, MARGARI P, MEZZETT A.A, POMELLI C.S, KOUTSOUMPOS S, PAPAMICHAEL M, GIANNIOS P AND MOUTZOURIS K (2017).** Temperature effects on the viscosity and the wavelength-dependent refractive index of imidazolium-based ionic liquids with a phosphorus containing anion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19(12)**, 8201-8209. Article doi:10.1039/C6CP08910K.
- 23- CLAUS J, SOMMER F.O AND KRAGL U (2018).** Ionic liquids in biotechnology and beyond. *Solid State Ionics.* **314**, 119-128. Article doi:10.1016/j.ssi.2017.11.012.
- 18- DAI R, LIU M, NIK NABIL W.N, XI Z AND XU H (2021).** Mycomedicine: a unique class of natural products with potent anti-tumour bioactivities. *Molecules.* **26**, 1113. Article doi:10.3390/molecules26041113.
- 19- DAI Y, CUI B, SI J, HE S, D. HYDE K, YUAN H, LIU X AND ZHOU L (2015).** Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China. *Mycol Progress.* **14(8)**, 62. Article doi: 10.1007/s11557-015-1084-5.
- 20- DAS A.K, NANDA P.K, DANDAPAT P, BANDYOPADHYAY S, GULLÓN P, SIVARAMAN G.K, MCCLEMENTS D.J, GULLÓN B AND LORENZO J.M (2021).** Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A Flexitarian Approach. *Molecules.* **26**, 2463. Article doi: 10.3390/molecules26092463.

21-DEEPAK K.R AND DEEPIKA M (2016). Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. *Journal of Mycology*. **18**, 7654123. Article doi:10.1155/2016/7654123.

22- DENCHEV C.M, DENCHEV T.T, POLEMIS E, VENTURELLA G, GARGANO M.L AND ZERVAKIS G.I (2013). General Aspects of Mushroom Fungi. *Identification and sustainable exploitation of wild edible mushrooms in rural areas*. pp 4-15.

23- D. HYDE K, XU J, RAPIOR J, JEEWON R, LUMYONG S, T. NIEGO A.G, D. ABEYWICKRAMA P, V.S. ALUTHMUHANDIRAM J, S. BRAHAMANAGE R, BROOKS S, CHAIYASEN A, CHETHANA K.W, CHOMNUNTI P, CHEPKIRUI C, CHUANKID B, I. DE SILVA N, DOILOM M, FAULDS C, GENTEKAKI E, GOPALAN V, KAKUMYAN P, HARISHCHANDRA D, HEMACHANDRAN H, HONGSANAN S, KARUNARATHNA A, C. KARUNARATHNA S, KHAN S, KUMLA J, S. JAYAWARDENA R, LIU J, LIU N, LUANGHARN T, G. MACABEO A.P, S. MARASINGHE D, MEEKS D, E. MORTIMER P, MUELLER P, NADIR S, N. NATARAJA K, NONTACHAIYAPOOM S, O'BRIEN M, PENKHRUE W, PHUKHAMSAKDA C, RAMANAN U.S, R. RATHNAYAKA A, B. SADABA R, SANDARGO B, C. SAMARAKOON B, S. TENNAKOON D, SIVA R, SRIPROM W, S. SURYANARAYANAN T, SUJARIT K, SUWANNARACH N, SUWUNWONG T, THONGBAI B, THONGKLANG N, WE D, WIJESINGHE S, WINISKI J, YAN J, YASANTHIKA E AND STADLER M (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*. Article doi:10.1007/s13225-019-00430-9.

24- DOĞAN H.H AND AKBAŞ G (2013). Biological activity and fatty acid composition of Caesar's mushroom. *Pharm Biol*. **51**, 863-871.

25- DU Z, ZIENKIEWICZ K, POL N.V, OSTROM N.E, BENNING C AND BONITO G.M (2019). Algal-fungal symbiosis leads to photosynthetic mycelium. *ELife*. **8**, e47815. Article doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.47815>.

26- EGIDI E, DELGADO-BAQUERIZO M, M. PLETTJWANG J, J. ELDRIDGE D, D. BARDGETT R, T. MAESTRE F AND K. SINGH B (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*.**10**, 2369. Article doi:10.1038/s41467-019-10373-z.

27- ELNAIEM M.H.E, MAHDI A.A, BADAWI G.H AND ATTITALLA I.H (2017). Morphological and molecular characterization of wild mushrooms in Khartoum North, Sudan. **Research Article. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 8(3), 187-194. Article doi:10.7897/2277-4343.083197.**

28- FAO (2020). Situation des forêts du monde 2020. Messages clés. *Comité des forêts.* pp 4.

29- FERNANDES T, GARRINE C, FERRÃO J, BELL V AND VARZAKAS T (2021).

Mushroom Nutrition as Preventative Healthcare in Sub-Saharan Africa. *Appl. Sci.* **11**, 4221. **Article doi:10.3390/app11094221.**

30- FICK A.V (1855). On liquid diffusion. Lond. Edinb. Dublin Philos. *Mag. J. Sci.* **10**, 30-39.

31-FONS F, MOREL S AND RAPIOR S (2018). L'importance des champignons pour l'homme : intérêts, dangers et perspectives. *Annales de la société d'horticulture et d'histoire naturelle de l'Hérault.* **157.**

32- FRANCIOLI D, Q. VAN RIJSEL S, RUIJVEN J, J. TERMORSHUIZEN A, ANNE COTTON T.E, J. DUMBRELL A, M. RAAIJMAKERS J, WEIGELT A AND MOMMER L (2021). Plant functional group drives the community structure of saprophytic fungi in a grassland biodiversity experiment. *Plant soil.* **461**, 91-105. **Article doi:10.1007/s11104-020-04454-y.**

33- FRIEDMAN M (2016). Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods.* **5**, 80. **Article doi:10.3390/foods5040080.**

119- G. GUGGENHEIM A, M. WRIGHT K AND L. ZWICKEY H (2014). Immune Modulation From Five Major Mushrooms: Application to Integrative Oncology. *Guggenheim—Mushrooms and Integrative Oncology.* **13(1)**, 32–44.

31- GHORMADE V, PATHAN E.K AND DESHPANDE M.V (2017). Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International Journal of Biological Macromolecules.* **104**, 1415-1421. **Article doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112 0141-8130.**

32- GOPALASATHEESKUMAR K (2019). Significant role of Soxhlet extraction process in phytochemical research. *Mintage journal of pharmaceutical & medical sciences*. **7(1)**, 2320-3315.

33- GUERREIRO M.A, WIJAYAWARDENE N.N, HYDE K.D AND PERŠOH D (2018). Ecology of Ascomycete genera – A searchable compilation of “Notes on genera: Ascomycota.” *Journal of Mycology*. **1(1)**, 146–150. Article doi:10.5943/ajom/1/1/12.

34- GUOHUA K. PENNERMAN K, YIN G AND BENNETT J.W (2015). Health Effects of Small Volatile Compounds from East Asian Medicinal Mushrooms. *Microbiology*. **43(1)**, 9-13. Article doi:10.5941/MYCO.2015.43.1.9.

35- GUPTA S, SUMMUNA B, GUPTA M AND K. ANNEPU S (2019). Edible mushrooms: Cultivation, bioactive molecules, and health benefits. *Bioactive molecules in food*. 1815–1847. Article doi:10.1007/978-3-319-54528-8_86-1.

115- HAN C.H, ZHANG G.Q, WANG H.X AND NG T.B (2010). Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Lett*. **309**, 115-121.

36- HE M, ZHAO R, D. HYDE K, BEGEROW D, KEMLER M, YURKOV A, H.C. MCKENZIE E, RASPY O, KAKISHIMA M, SA ´NCHEZ-RAMI ´REZ S, C. VELLINGA E, HALLING R, PAPP V, V. ZMITROVICH I, BUYCK B, ERTZ D, N. WIJAYAWARDENE N, CUI B, SCHOUTTETEN N, LIU X, LI T, YAO Y, ZHU X, LIU A, LI G, ZHANG M, LING Z, CAO B, ANTONI ´N V, BOEKHOUT T, BARBOSA DA SILVA B.D, CROP E.D, DECOCK C, DIMA B, DUTTA A.K, W. FELL J, GEML J, GHOBAD-NEJHAD M, J. GIACHINI A, B. GIBERTONI T, P. GORJO ´N S, HAELEWATERS D, HE S, P. HODKINSON B, HORAK E, HOSHINO T, JUSTO A, LIM Y.W, JR N.M, MES ´IC A, MONCALVO J, M. MUELLER G, G. NAGY L, NILSSON R, NOORDELOOS M, NUYTINCK J, ORIHARA T, RATCHADAWAN C, RAJCHENBERG M, G.S. SILVA-FILHO A, SULZBACHER M.A, TKALC ´EC Z, VALENZUELA R, VERBEKEN A, VIZZINI A, WARTCHOW F, WEI T, WEIB M, ZHAO C AND M. KIRK P (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*. **99**, 105-367. Article doi:10.1007/s13225-019-004354.

37- HILL R, J. LEITCH I AND ESTER G (2021). Targeting Ascomycota genomes: what and how big? *Fungal biology reviews*. **36**, 52-59. Article doi:10.1016/j.fbr.2021.03.003.

- 38- JAKLITSCH W, LUCKING B.O.R AND LUMBSCH T (2016).** Syllabus of Plant Families.Part2: Ascomycota. **13**, 9783443010898.
- 39- J. TRUJILLO-RODRÍGUEZ M, NAN H, VARONA M, N. EMAUS M, D. SOUZA I AND L. ANDERSON J (2019).** Advances of ionic liquids in analytical chemistry. *Anal. Chem.* **91**, 505–531. Article doi:10.1021/acs.analchem.8b04710.
- 37- KARMAKAR A, MUKUNDAN R, YANG P AND R. BATISTA E (2019).** Solubility model of metal complex in ionic liquids from first principle calculation. *RSC Adv.* **9**, 18506-18526. Article doi:10.1039/C9RA04042K.
- 38- K. DAS A, K. NANDA P, DANDAPAT P, BANDYOPADHYAY S, GULLON P, SIVARAMAN G.K, MCCLEMENTS D.J, GULLON B AND M. LORENZO J (2021).** Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A Flexitarian Approach. *Molecules.* **26**, 2463. Article doi :10.3390/molecules26092463.
- 39- KINGE T.R, APALAH N.A, NJI T.M, ACHA A.N AND MIH A.M (2017).** Species richness and traditional knowledge of macrofungi (mushrooms) in the awing forest reserve and communities, northwest region, Cameroon. *Journal of Mycology.* **9**, 2809239. Article doi: 10.1155/2017/2809239.
- 40- KOSANIC M, RANKOVIC B, STANOJKOVIC T, RADOVIC-JAKOVLJEVIC M, ĆIRIC A, GRUJICIC D AND MILOSEVIC-DJORDJEVIC O (2019).** *Craterellus cornucopioides* Edible Mushroom as Source of Biologically Active Compounds. *Natural Product Communications.* 1-6. Article doi:10.1177/1934578X19843610.
- 41- K. RAHI D AND MALIK D (2016).** Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance. *Journal of Mycology.* **18**, 7654123. Article doi:10.1155/2016/7654123.
- 42- K. SINGH S AND W. SAVOY A (2020).** Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *Journal of molecular liquids.* **297**, 112038. Article doi:10.1016/j.molliq.2019.112038.
- 43- KUNDU S (2021).** Study of secondary metabolites produced by white rot fungi for knowing their antimicrobial properties. *Journal of emerging technologies and innovative research (JETIR).* **8(2)**, 2349-5162. Article doi:10.1729/Journal.25841.

40- LAOUALI I.S, CHAIBOU Y.A, ZANGUIN A AND NATATOU I (2020). Extraction par solvant de l'or par l'Aliquat 336 et par le TOPO dans des solvants apolaires. *European scientific journal*. **16(3)**, 1857-7881. Article doi:10.19044/esj.v16n3p378.

41- LI H, TIAN Y, JR N.M, YE L, C. KARUNARATHNA S, PEREZ-MORENO J, RAHMAN M.M, RASHID M.H, PHENGSIKHAM P, RIZAL L, KASUYA T, LIM Y.W, DUTTA A.K, KHALID A.N, HUYEN L.T, BALOLONG M.P, BARUAH G, MADAWALA S, THONGKLANG N, D. HYDE K, M. KIRK P, XU J, SHENG J, BOA E AND E. MORTIMER P (2021). Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence—Based classification system. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **20**, 1982-2014. Article doi:10.1111/1541-4337.12708.

42- LI J, SHEN B, NIE S, DUAN Z, AND CHEN K (2019). A combination of selenium and polysaccharides: Promising therapeutic potential. *Carbohydrate Polymers*. **206**, 163-173. Article doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.088.

43- L. MARTINS V AND M. TORRESI R (2018). Ionic liquids in electrochemical energy storage. *Current Opinion in Electrochemistry*. **9**, 26-32. Article doi:10.1016/j.coelec.2018.03.005.

44- LV H, KONG Y, YAO Q, ZHANG B, LENG F.W, BIAN H.J, BALZARINI J, VAN DAMME E AND BAO J.K (2009). Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. *Phytomedicine*. **16**, 198-205.

45- MAA G, YANG W, ZHAOA L, PEI F, FANGA D AND HU Q (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food science and human wellness*. **7**, 125-133. Article doi:10.1016/j.fshw.2018.05.002.

46- MENDOZA S.M.V, MORENO E.A, FAJARDO C.A.G AND MEDINA R.F (2019). Liquid–Liquid Continuous Extraction and Fractional Distillation for the Removal of Organic Compounds from the Wastewater of the Oil Industry. *Water*. **11**, 1452. Article doi:10.3390/w11071452.

47- MEYER V, Y. BASENKO E, BENZ J, H. BRAUS G, X. CADDICK M, CSUKAI M, P DE VRIES R, ENDY D, C. FRISVAD J, GUNDE-CIMERMAN N, HAARMANN T, HADAR Y, HANSEN K, I. JOHNSON R, P. KELLER N, KRAŠEVEC N, H.

MORTENSEN U, PEREZ R, F.J RAM A, RECORD E, ROSS P, SHAPAVAL V, STEINIGER C, BRINK H, MUNSTER J, YARDEN O AND A.B. WÖSTEN H. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*. **7**, 5. Article doi:10.1186/s40694-020-00095-z.

48- MEZZETTA A, PERILLO V, GUAZZELLI L AND CHIAPPE C (2019). Thermal behavior analysis as a valuable tool for comparing ionic liquids of different classes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **38**, 3335-3345. Article doi:10.1007/s10973-019-08951-w.

49- MIGUEL A, MARTINS- JEAN A, GARBAYE-INRA N, CORRIOL-LAURENT G.L AND ABOUROUH M (2014). La Mycosylviculture, Chapitre 1 : les champignons dans les écosystèmes forestiers: Généralités. pp 13.

50- MINGYI Y, BELWAL T, DEVKOTA H.P, LI L AND LUO Z (2019). Trends of utilizing mushroom polysaccharides (MPs) as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*. **92**, 94-110. Article doi:10.1016/j.tifs.2019.08.009.

51- MISHRA A, BEHURA A, MAWATWAL S, KUMAR A, NAIK L, MOHANTY S.S, MANNA D, DOKANIA P, MISHRA A, K. PATRA S AND DHIMAN R (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*. **134**, 110827. Article doi:10.1016/j.fct.2019.110827.

52- MLECZEK M, GASECKA M, BUDKA A, SIWULSKI M, MLECZEK P, MAGDZIAK Z, BUDZYNSKA S AND NIEDZIELSKI P (2021). Mineral composition of elements in wood-growing mushroom species collected from of two regions of Poland. *Environmental Science and Pollution Research*. **28**, 4430-4442. Article doi:10.1007/s11356-020-10788-y.

53- M. SANTOS M, ALVES C, SILVA J, FLORINDO C, COSTA A, PETROVSKI Z, M. MARRUCHO I, PEDROSA R AND C. BRANCO L (2020). Antimicrobial activities of highly bioavailable organic salts and ionic liquids from fluoroquinolones. *Pharmaceutics*. **12**, 694. Article doi:10.3390/pharmaceutics12080694.

54- MUHAMMAD EZZUDIN R, RABETA M.S, SHAIDA FARIZA S, LEONG OOI K AND NURUL SHAFIQAH H (2019). Primary and secondary antioxidant activities of nine

edible mushrooms species. *Food Research*. **3** (1), 14-20. **Article doi:10.26656/fr.2017.3(1).077.**

55- NASRAOUI B (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées. Biologie, Nouvelle Systématique, Interaction Pathologique. *Publication de l'INAT*. pp 63.

56- NAVIGLIO D, SCARANO P, MARTINA CIARAVOLO M AND GALLO M (2019). Rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE): a powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques. *Foods*. **8**, 245. **Article doi:10.3390/foods8070245.**

57- NIAZI A AND GHAFOOR A (2021). Different ways to exploit mushrooms: A review. *ALL LIFE*. **14(1)**, 450-460. **Article doi:10.1080/26895293.2021.1919570.**

58- ODA Y, SAITO K AND NAKATA M (2019). Structural analyses of a hemolytic compound found in an extract of *Hypsizygus marmoreus* fruiting bodies at a low pH. *BioScience Trends Advance Publication*. **Article doi:10.5582/bst.2019.01008.**

59- OKIGBO R.N AND OKIGBO J.E (2018). Ethnostudy of mushrooms and establishment of pure culture of *Cantharellus* species (ero umunwene) a newly discovered mushroom found in UkwaEast, Abia State, Nigeria. *International Journal of Agricultural Technology*. **14(4)**, 571-596.

60- OLAH B, KUNCA V AND GALLAY I (2020). Assessing the Potential of Forest Stands for Ectomycorrhizal Mushrooms as a Subsistence Ecosystem Service for Socially Disadvantaged People: A Case Study from Central Slovakia. *Forests*. **11**, 282. **Article doi :10.3390/f11030282.**

61- PANDITA K.K, TOPNO N AND THAPPA D.M (2021). Mushroom poisoning and outcome of patients admitted in a tertiary care hospital in North East India. *Journal of Medicine in the Tropics*. **23(1)**, 29-34. **Article doi:10.4103/jomt.jomt_53_20.**

62- PATOCKA J, WU R, NEPOVIMOVA E, VALIS M, WU W AND KUCA K (2021). Chemistry and Toxicology of Major Bioactive Substances in *Inocybe* Mushrooms. *Int. J. Mol. Sci*. **22**, 2218. **Article doi:10.3390/ijms22042218.**

- 63- PEDNEAULT K, ANGERS P, GOSSELIN A AND TWEDDELL R.J (2006).** Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycol Res.* **110**, 1179-1183.
- 64- PODKOWA A, KRYCZYK-POPRAWA A, OPOKA W AND MUSZYŃSKA B (2021).** Culinary–medicinal mushrooms: a review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. *European food research and technology.* **247**, 513-533. **Article doi:10.1007/s00217-020-03646-1.**
- 65- PUTRA I.P (2021).** Catatan kelompok Ascomycota makroskopik di Indonesia. *Journal Pro-Life.* **8(1)**, 2579-7557.
- 66- PUTRA I.P (2020).** Record on macroscopic fungi at IPB university campus. Forest: description and potential utilization. *Indonesian Journal of Science and Education.* **4(1)**, 1-11. **Article doi: 10.31003/ijose.v4i1.2180.**
- 67- QUINTERO-CABELLO K.P, LUGO-FLORES M.A, RIVERA-PALAFOX P, SILVA-ESPINOZA B.A, GONZÁLEZ-AGUILAR G.A, ESQUEDA M, GAITÁN-HERNÁNDEZ R AND AYALA-ZAVALA J.F (2021).** Antioxidant properties and industrial uses of edible polyporales. *J. Fungi.* **7**, 196. **Article doi:10.3390/jof703019.**
- 68- QWARSE M, MOSHI M, MIHALE M.J, MAREALLE A.I, SEMPOMBE J AND MUGOYELA V (2021).** Knowledge on utilization of wild mushrooms by the local communities in the Selous-Niassa Corridor in Ruvuma Region, Tanzania. *Journal of Yeast and Fungal Research.* **12(1)**, 8-19. **Article doi:10.5897/JYFR2020.0203.**
- 69- RAHMAN M.Z, RAHMAN M.S, BIN BASHIR N.M, MIA R, HOSSAIN A, SAHA S.K, KAKON A.J AND SARKER N.C (2021).** Rationalization of mushroom-based preventive and therapeutic approaches to covid-19: review. *International journal of medicinal mushrooms.* **23(5)**, 1-11. **Article doi:10.1615/2021038285.**
- 70- RASHID M.H, AKHTER K, CHOWDHURY M.S.M. AND AMINUZZAMAN F.M (2017).** Biodiversity, habitat and morphology of mushroom of different forest regions of Bangladesh. *International journal of advanced research (IJAR).* **5(9)**, 945-957. **Article doi:10.21474/IJAR01/5408.**

- 71- RATHORE H, PRASAD S AND SHARMA S (2017).** Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*. **5**, 35-46. **Article doi: 10.1016/j.phanu.2017.02.001.**
- 72- RATHORE H, PRASAD S, KAPRI M, TIWARI A AND SHARMA S (2019).** Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. *Journal of Functional Foods*. **56**, 182-193. **Article doi:10.1016/j.jff.2019.03.016.**
- 73- REDDY S.M (2016).** Diversity and applications of mushrooms. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. Krishnamurthy (Eds.), *Plant biology and biotechnology*. pp. 231–261.
- 74- RUIZ-ALMENARA C, GÁNDARA E AND GÓMEZ-HERNÁNDEZ M (2019).** Comparison of diversity and composition of macrofungal species between intensive mushroom harvesting and non-harvesting areas in Oaxaca, Mexico. *PeerJ*. **7**, e8325. **Article doi:10.7717/peerj.**
- 107- SAITO K, HAZAMA S, ODA Y AND NAKATA M (2018).** PH-Dependent exhibition of hemolytic activity by an extract of *Hypsizygus marmoreus* fruiting bodies. *BioScience Trends Advance Publication*. **Article doi:10.5582/bst.2018.01108.**
- 69- SANCHES M.A, LUZEIRO I.G, CORTEZ A.C.A, SIMPLÍCIO DE SOUZA E, ALBUQUERQUE P.M, CHOPRA H.K AND BRAGA DE SOUZA J.V (2021).** Production of biosurfactants by Ascomycetes. *International Journal of Microbiology*. **11**, 6669263. **Article doi:10.1155/2021/6669263.**
- 70- SÁNCHEZ C (2017).** Bioactives from mushroom and their application. *Food Bioactives*. **Article doi:10.1007/978-3-319-51639-4_2.**
- 72- SEHRISH M, ULLAHA M.W, UL-ISLAMB M, ATTAA O.M AND YANGA G (2021).** Contents lists available at sciencedirect journal of bioresources and bioproducts. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jobab. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. **6(1)**, 1-10.
- 73- SEO D.J AND CHOI C (2021).** Antiviral bioactive compounds of m antiviral mechanisms: A Review. *Viruses*. **13**, 350. **Article doi:10.3390/v13020350.**

- 74- SEPCIĆ K, BERNE S, POTRICH C, TURK T, MACEK P AND MENESTRINA G (2003).** Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur J Biochem.* **270**, 1199-1210.
- 75- SEVINDIK M (2021).** Phenolic content, antioxidant and antimicrobial potential of *Melanoleuca Melaleuca* edible mushroom. *The journal of animal & plant sciences.* **31(3)**, 824-830. **Article doi:10.36899/JAPS.2021.3.0272.**
- 76- SHAO Y, GUO H, ZHANG J, LIU H, WANG K, ZUO S, XU P, XIA Z, ZHOU Q, ZHANG H, WANG X, CHEN A AND WANG Y (2019).** The genome of the medicinal macrofungus *Sanghuang* provides insights into the synthesis of diverse secondary metabolites. *Front Microbiol.* **10**, 3035. **Article doi:10.3389/fmicb.2019.03035.**
- 77- SHARIFI-RAD J, BUTNARIU M, EZZAT S.M, ADETUNJI C.O, IMRAN M, SOBHANI S.R, TUFAIL T, HOSSEINABADI T, RAMIREZ-ALARCO K, MARTORELL M, MAROYI A AND MARTINS N (2020).** Mushrooms-rich preparations on wound healing: from nutritional to medicinal attributes. *Front. Pharmacol.* **11**, 567518. **Article doi:10.3389/fphar.2020.567518.**
- 78- SHIBATA T, KUDOU M, HOSHI Y, KUDO A, NANASHIMA N AND MIYAIRI K (2010).** Isolation and characterization of a novel twocomponent hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon.* **56**, 1436- 1442.
- 79-SINGH B.P AND PASSARI A.K (2018).** Biology of Macrofungi. *Cham: Springer.*
- 80- SOQUETTA M.B, TERRA L AND BASTOS C.P (2018).** Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *Cyta - journal of food.* **16(1)**, 400-412. **Article doi:10.1080/19476337.2017.1411978.**
- 81- TAMPUCCI S, GUAZZELLI L, BURGALASSI S, CARPI S, CHETONI P, MEZZETTA A, NIERI P, POLINI B, POMELLI C.S, TERRENI E AND MONTI D (2020).** PH-responsive nanostructures based on surface active fatty acid-protic ionic liquids for imiquimod delivery in skin cancer topical therapy. *Pharmaceutics.* **12**, 1078. **Article doi:10.3390/pharmaceutics12111078.**

82- THIRUMURUGAN D, CHOLARAJAN A, S.S. RAJA S AND VIJAYAKUMAR R (2018). An introductory chapter: secondary metabolites. *Itechopen*.1-21. **Article doi:10.5772/intechopen.79766.**

83- TOMITA T, NOGUCHI K, MIMURO H, UKAJI F, ITO K, SUGAWARA-TOMITA N AND HASHIMOTO Y (2004). Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *J Biol Chem.* **279**, 26975-26982.

84- TUNGMUNNITHUM D, THONGBOONYOU A, PHOLBOON A AND YANGSABAI A (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines.* **5**, 93. **Article doi:10.3390/medicines5030093.**

85- UKWURU M, MURITALA A AND LU E (2018). Edible and non-edible wild mushrooms: Nutrition, toxicity and strategies for recognition. *Journal of Clinical Nutrition and Metabolism.* **2**, 2.

86- UMAR I.A, CHUA L.S, MUSA N.F, NGADIRAN S AND RAMLAN A (2021). Influence of process variables for green solid-liquid extraction of andrographolide from *Andrographis Paniculata*. *Journal of materials and environmental sciences.* **12(1)**, 137-152.

87- VANDEPONSEELE A, DRAYE M, PIOT C AND CHATEL G (2021). Study of influential parameters of the caffeine extraction from spent coffee grounds: from brewing coffee method to the waste treatment conditions. *Clean technologies.* **3**, 335-350. **Article doi:10.3390/cleantechnol3020019.**

88- VENTURELLA G, FERRARO V, CIRLINCIONE F AND GARGANO M.L (2021). Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences.* **22**, 634. **Article doi:10.3390/ijms22020634.**

89- VERA J, H. GUTIERREZ M, PALFNER G AND PANTOJA S (2017). Diversity of culturable filamentous ascomycetes in the eastern South Pacific Ocean off Chile. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **33**, 157. **Article doi:10.1007/s11274-017-2321-7.**

90- WENG Y.P, LIN Y.P, HSU C.I AND LIN J.Y (2004). Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein, volvatoxin A2. *J Biol Chem.* **279**, 6805-6814.

- 91- WENNIG R, EYER F, SCHAPER A, ZILKER T AND ANDRESEN-STREICHERT H (2020).** Mushroom poisoning. *Dtsch Arztebl Int.* **117**, 701-8. **Article doi:10.3238/arztebl.2020.0701.**
- 92- WIJAYAWARDENE N (2018).** Notes for genera: “Ascomycota”. *Fungal Divers.* **86**, 1-594.
- 93-WIJAYAWARDENE N.N, HYDE K.D, TIBPROMMA S, WANASINGHE D.N, THAMBUGALA K.M, TIAN Q, WANG Y AND FU L (2017).** Towards incorporating asexual fungi in a natural classification: checklist and notes 2012–2016. *Mycosphere.* **8(9)**, 1457-1555. **Article doi:10.5943/mycosphere/8/9/10.**
- 94- WILLIS K (2018).** Royal Botanic Gardens, Kew. *State of the World’s fungi 2018 report.*
- 95- WU H.B, ZHANG B, LIU S AND CHEN C (2020).** Flammability estimation of 1-hexyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide. *Journal of loss prevention in the process industries.* **66**, 104196. **Article doi:10.1016/j.jlp.2020.104196.**
- 96- YANG W, CHEN X, LI Y, GUO S, WANG Z AND YU X (2020).** Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural product communications.* **15(3)**, 1-13. **Article doi: 10.1177/1934578X20903555.**
- 97- YIAN G.C, PITTA B.M.S AND TIEBRE M.S (2020).** Champignons sauvages comestibles et pharmacopée traditionnelle en zone forestière de la côte d’Ivoire. *OSR Journal of pharmacy and biological sciences (IOSR-JPBS).* **15(2)**, 35-45. **Article doi:10.9790/3008-1502023545.**
- 98- YIN C, D. NORATTO G, FAN X, CHEN Z, YAO F, SHI D AND GAO H (2020).** The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial effects to host: A review. *Carbohydrate Polymers.* **250**, 116942. **Article doi:10.1016/j.carbpol.2020.116942.**
- 99- YUE Z, SHI Q, AI J, PENG S, MIAO X AND WANG Z (2021).** A review on analytical methods of petroleum hydrocarbons in water and sediment of aquatic systems. *Earth and Environmental Science.* **621**, 012011. **Article doi:10.1088/1755-1315/621/1/012011.**
- 100- ZEB M AND LEE C.H (2021).** Medicinal Properties and Bioactive Compounds from Wild Mushrooms Native to North America. *Molecules.* **26**, 251. **Article doi :10.3390/molecules26020251.**

101- ZHANG Q, CAI S, ZHANG W, LAN Y AND ZHANG X (2017). Density, viscosity, conductivity, refractive index and interaction study of binary mixtures of the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate with methyldiethanolamine. *Journal of molecular liquids*. **233**, 471-478. **Article doi:10.1016/j.molliq.2017.03.036.**

102- ZHANG Q, LIN L AND YE W (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*. **13**, 20. **Article doi:10.1186/s13020-018-0177-x.**

103- ZHANG Y, MO M, YANG L, MI F, CAO Y, LIU C, TANG X, WANG P AND XU J (2021). Exploring the Species Diversity of Edible Mushrooms in Yunnan, Southwestern China, by DNA Barcoding. *Journal of Fungi*. **7**, 310. **Article doi:10.3390/jof7040310.**

Résumé

En biologie, le champignon a réussi à intriguer les chercheurs scientifiques à plus d'un titre. Bien qu'il puisse être dans certains cas toxique voire mortel, le champignon occupe une place de choix dans la pharmacologie actuelle grâce à sa capacité à synthétiser des molécules bioactives ayant souvent un aspect curatif. De plus, ces dernières présentent un intérêt nutritionnel et gustatif apprécié.

Ces métabolites surprennent en nombre d'activités biologiques qu'ils peuvent offrir à la recherche biologique.

Ce mémoire a été consacré à la synthèse de deux travaux scientifiques menés par **Saito et al. 2018** et **Oda et al. 2019** sur l'étude de l'activité hémolytique des extraits des fructifications du champignon comestible *Hypsizygus marmoreus* à un pH abaissé ainsi que l'analyse structurale et chimique du composé hémolytique.

Les résultats obtenus confirment la présence d'un composé hémolytique de nature lipidique extrait à faible pH des fructifications de *H. marmoreus* nommé acide trans,trans-5,8-docosadiénoïque en adoptant la technique de chromatographie sur couche mince (CCM).

Mots clés : champignon, molécules bioactives, extrait, activité hémolytique.

Summary

In biology, the fungus has succeeded in intriguing scientific researchers in more ways than one. Although in some cases it can be toxic or even fatal, the fungus occupies a prominent place in current pharmacology thanks to its ability to synthesize bioactive molecules often having a curative aspect. In addition, these latter have an appreciated nutritional and taste interest.

These metabolites are surprising in the number of biological activities they can offer to biological research.

This thesis was devoted to the synthesis of two scientific works carried out by **Saito and al. 2018** and **Oda and al. 2019** on the study of the hemolytic activity of extracts from the fruiting bodies of the edible fungus *Hypsizygus marmoreus* at a lowered pH as well as the structural and chemical analysis of the hemolytic compound.

The results obtained confirm the presence of a hemolytic compound of lipid nature extracted at low pH from the fruiting bodies of *H. marmoreus* called trans, trans-5,8-docosadienoic acid by adopting the technique of thin layer chromatography (TLC).

Keywords: fungus, bioactive compounds, extract, hemolytic activity.

ملخص

نجح الفطر في علم الأحياء في إثارة فضول الباحثين العلميين بأكثر من طريقة. على الرغم من أنه في بعض الحالات يمكن أن يكون سامًا أو حتى قاتلاً، إلا أن الفطر يحتل مكانًا بارزًا في علم الأدوية الحالي بفضل قدرته على تصنيع الجزيئات النشطة بيولوجيًا التي غالبًا ما يكون لها جانب علاجي. بالإضافة إلى ذلك، فإن هذا الأخير يتمتع باهتمام بالغ في التغذية والتذوق.

هذه المستقلبات مدهشة في عدد الأنشطة البيولوجية التي يمكن أن تقدمها للبحوث البيولوجية. تم تخصيص هذه الأطروحة لتحليل عمليين علميين قام بهما سايتو وآخرون في 2018 واودا وآخرون في 2019 بشأن دراسة النشاط الانحلالي للمستخلصات من الأجسام الثمرية للفطر الصالح للأكل *Hypsizygus marmoreus* عند درجة حموضة منخفضة بالإضافة إلى التحليل البنوي والكيميائي للمركب الانحلالي.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها وجود مركب انحلاي ذو طبيعة دهنية مستخلص عند درجة حموضة منخفضة من الأجسام الثمرية من *H. marmoreus*، يسمى trans,trans,5-8-docosadienoic acid باعتماد تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

الكلمات المفتاحية: الفطريات، الجزيئات النشطة بيولوجيًا، المستخلص، النشاط الانحلالي.