

KARINE PEDNEAULT

ÉTUDE DE COMPOSÉS EXTRACTIBLES CHEZ LES
CHAMPIGNONS INDIGÈNES DU QUÉBEC

Thèse présentée
à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Végétale
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE PHYTOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

© Karine Pedneault, 2007

RÉSUMÉ COURT

Les travaux présentés dans cette thèse ont porté sur la composition chimique des champignons indigènes du Québec. L'analyse des lipides des champignons à l'étude, dont la teneur se situait entre 3,1 et 16% du poids sec, a permis l'identification de nombreux acides gras (C_4 à C_{26}) dont certains sont rapportés pour la première fois chez les basidiomycètes soient les acides 11-hexadécénoïque ($16:1 \Delta 11$), 7,10-hexadécadiénoïque ($16:2 \Delta 7,10$), 11-heptadécénoïque ($17:1 \Delta 11$), et chez les mycètes, notamment les acides *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque ($19:0 \text{ cyc}11$) et élaïdique ($18:1 \Delta 9t$). Les principaux acides gras retrouvés étaient les acides palmitique ($16:0$), oléique ($18:1 \Delta 9c$) et linoléique ($18:2 \Delta 9c,12c$). L'analyse des profils d'acides gras a par ailleurs montré que le contenu en certains acides gras peut varier d'une espèce à l'autre. L'étude des profils d'acides gras de deux espèces de *Pleurotus* (*P. ostreatus* et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*) cultivées sous différentes conditions de température a pour sa part révélé une augmentation du niveau d'insaturation chez les acides gras des fractions polaire et non polaire des carpophores de *P. ostreatus* lorsque la température de croissance était inférieure à 17°C . Une température de croissance supérieure à 17°C a par ailleurs influencé les profils d'acides gras chez les deux champignons à l'étude. Les travaux réalisés sur le champignon *Ganoderma tsugae* ont quant à eux permis de soupçonner la présence de 16 composés ayant des structures complexes qui, à ce jour, n'ont jamais été rapportés chez cette espèce. La purification partielle de deux de ces composés ainsi que les analyses spectroscopiques effectuées ont révélé une structure compacte, probablement pentacyclique, polysubstituée et polycétonique, incluant une chaîne latérale d'une douzaine de carbones pour chaque composé. Enfin, les travaux destinés à démontrer la présence d'éritadénine et de lovastatin chez les champignons indigènes du Québec n'ont pu révéler la présence de ces molécules d'intérêt nutraceutique chez les 29 espèces de champignons analysées.

RÉSUMÉ LONG

Cette thèse, qui s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec, avait pour objectif d'avoir une meilleure connaissance de la composition chimique de la mycoflore du Québec, l'une des plus riches au monde, qui a jusqu'ici été peu étudiée dans un contexte mycochimique.

La teneur en lipides et la composition en acides gras ont d'abord été étudiées chez différentes espèces de champignons indigènes du Québec appartenant à la famille des Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae et Lycoperdaceae. L'analyse des lipides des champignons à l'étude, dont la teneur se situait entre 3,1 et 16% du poids sec, a permis l'identification de plus de 40 acides gras différents (C_4 à C_{26}) dont certains sont rapportés pour la première fois chez les basidiomycètes soient les acides 11-hexadécénoïque (16:1 $\Delta 11$), 7,10-hexadécadiénoïque (16:2 $\Delta 7,10$), 11-heptadécénoïque (17:1 $\Delta 11$), et chez les mycètes, notamment les acides *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque (19:0 *cyc*11) et élaïdique (18:1 $\Delta 9t$). Les principaux acides gras retrouvés étaient les acides palmitique (16:0), oléique (18:1 $\Delta 9c$) et linoléique (18:2 $\Delta 9c,12c$). L'analyse des profils d'acides gras a par ailleurs montré que le contenu en certains acides gras peut varier d'une espèce à l'autre.

L'étude des profils d'acides gras de deux espèces de *Pleurotus* (*P. ostreatus* et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*) cultivées sous différentes conditions de température a pour sa part révélé une augmentation du niveau d'insaturation chez les acides gras des fractions polaire et non polaire des carpophores de *P. ostreatus* lorsque la température de croissance était inférieure à 17°C. Bien que les températures de croissance supérieures à 17°C n'aient pas eu un effet clair sur le degré d'insaturation des acides gras, l'analyse des résultats obtenus révèle que la température de croissance influence les profils d'acides gras des carpophores de *P. ostreatus* et de *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*, et ce de façon différente selon l'espèce considérée. Ces travaux suggèrent qu'il pourrait être possible de moduler le degré d'insaturation des acides gras des espèces du genre *Pleurotus* en modifiant la température de croissance.

Les travaux réalisés sur le champignon *Ganoderma tsugae* ont quant à eux permis de soupçonner la présence de 16 composés ayant des structures complexes qui, à ce jour, n'ont jamais été rapportés chez cette espèce. La purification partielle de deux de ces composés, ayant des poids moléculaires respectifs de 646 (composé A) et 662 (composé B), ainsi que les analyses spectroscopiques effectuées ont permis de réduire à un nombre de formules moléculaires possibles pour chaque composé, soient $C_{40}H_{38}O_8$ pour le composé A et $C_{41}H_{42}O_8$ pour le composé B. Au niveau structural, les données obtenues suggèrent pour chaque composé une structure de base compacte, possiblement triterpénique ou stéroïdienne à cinq hexacycles accompagnée d'une chaîne latérale d'une douzaine de carbone, possiblement cyclique. Les composés pentacycliques sont fréquents chez les plantes vertes, mais demeurent peu rapportés chez les mycètes. La caractérisation des composés A et B devra être complétée afin de confirmer la présence de tels composés chez *G. tsugae*.

Enfin, les travaux destinés à démontrer la présence d'éritadénine et de lovastatin chez les champignons indigènes du Québec n'ont pu révéler la présence de ces molécules d'intérêt nutraceutique chez les 29 espèces de champignons analysées.

AVANT-PROPOS

J'aimerais exprimer mes plus sincères remerciements aux personnes qui m'ont dirigée et aidée dans la réalisation de ce projet : Dr Russell J. Tweddell, qui en a assuré la direction, pour sa disponibilité et son sens du détail ; Dr Paul Angers, qui m'a permis d'effectuer mes expériences dans son laboratoire et qui m'a toujours fourni des pistes intéressantes ; Maurice Thibault, qui s'est déplacé à travers le Québec pour constituer la collection de champignons utilisée tout au long de ce projet.

Un immense merci à Dr Carole Martinez, Dr Tyler J. Avis et Dr André Gosselin, pour leurs conseils, les corrections qu'ils m'ont apportée et, dans certains cas, pour leur soutien moral et technique. J'aimerais également remercier du fond du cœur Dr Chantal Bergeron, qui m'a donné de nombreux conseils au cours de mon apprentissage de la purification de produits naturels et qui s'est constamment montrée d'une grande disponibilité. Merci également à Dr Gaétan Caron, qui m'a lui aussi prodigué de judicieuses recommandations en purification.

J'aimerais adresser des remerciements particuliers à Dr Jacques Landry, professeur-chercheur à l'Université Laval et mycologue amateur, qui a eu l'amabilité d'autoriser l'utilisation, dans ce document, des magnifiques photos qu'il expose sur son site Internet personnel (<http://labolandry.crhdq.ulaval.ca/webchamp/index.html>).

Toute ma gratitude va vers ma famille bien-aimée : ma mère, Michèle, qui m'a toujours écoutée et encouragée ; mon père, Denis, qui a su trouvé les mots justes aux moments où il le fallait ; ma sœur, Josée, qui m'a fait rêver avec ses photos du bout du monde ; et mon autre famille, Monique et Pierre Laborde, qui m'ont apporté tout leur soutien. Et puis Joannic, mon cher amour, qui m'a accompagnée, appuyée, écoutée et conseillée, et qui continue chaque jour de me rendre heureuse.

Enfin, merci à Nadine, mon amie très chère, pour sa présence, son originalité et son sens de l'absurdité qui m'a toujours fait rire aux larmes. Merci aussi à Louise-Marie, Mélanie et Souad sans qui ces années au labo n'auraient pas été les mêmes.

En terminant, je me dois de remercier le Conseil des recherches en pêche et en agroalimentaire du Québec pour son apport financier, sans lequel ce projet n'eut pu être réalisé.

À mes parents, Michèle et Denis,
À Joannic,

TABLE DES MATIÈRES

RESUME COURT	II
RESUME LONG.....	III
AVANT-PROPOS.....	V
TABLE DES MATIERES.....	VII
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	XVII
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTERATURE	5
1.1. LES CHAMPIGNONS	6
1.1.1 Définition.....	6
1.1.2. Les basidiomycètes.....	6
1.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES CHAMPIGNONS.....	8
1.2.1. Généralités.....	8
1.2.2. Composés extractibles des mycètes.....	12
1.2.3. Composés organiques polaires présents chez les basidiomycètes.....	13
1.2.4. Composés organiques non polaires présents chez les basidiomycètes.....	15
1.3. VALEUR NUTRITIVE ET PROPRIÉTÉS NUTRACEUTIQUES DES BASIDIOMYCÈTES.....	21
1.3.1. Valeur nutritive.....	21
1.3.2. Composés polaires nutraceutiques	21
1.3.3. Composés non polaires nutraceutiques	24
1.4. FACTEURS INFLUENÇANT LA COMPOSITION CHIMIQUE DES CHAMPIGNONS	27
1.4.1. Facteurs intrinsèques	27
1.4.2. Facteurs extrinsèques.....	28
1.5. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	29

1.6. OBJECTIFS DE RECHERCHE	30
CHAPITRE 2 - RECHERCHE DE COMPOSES NUTRACEUTIQUES CHEZ LES	
CHAMPIGNONS DU QUEBEC: L'ÉRITADENINE ET LE LOVASTATIN	
31	31
SOMMAIRE.....	31
RÉSUMÉ.....	32
2.1. INTRODUCTION	33
2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
2.2.1. Matériel fongique	36
2.2.2. Extraction	36
2.2.3. Analyse par CPG-SM	36
2.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	37
2.4. RÉFÉRENCES	43
CHAPITRE 3 - FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS FROM MUSHROOMS	
BELONGING TO THE FAMILY BOLETACEAE	
45	45
SOMMAIRE.....	45
RÉSUMÉ.....	46
ABSTRACT	47
3.1. INTRODUCTION	48
3.2. MATERIALS AND METHODS.....	49
3.2.1. Organisms	49
3.2.2. Lipid extraction	50
3.2.3. Fatty acid analysis	50
3.2.4. Picolinyl ester analysis	51
3.2.5. Statistical analyses.....	51
3.3. RESULTS AND DISCUSSION	52
3.4. ACKNOWLEDGMENTS.....	56
3.5. REFERENCES	60

CHAPITRE 4 – FATTY ACID PROFILES OF POLAR AND NEUTRAL LIPIDS OF TEN SPECIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES INDIGENOUS TO EASTERN CANADA.....	63
SOMMAIRE.....	63
RÉSUMÉ.....	64
ABSTRACT.....	65
4.1. INTRODUCTION.....	66
4.2. MATERIALS AND METHODS.....	67
4.2.1. Samples.....	67
4.2.2. Lipid extraction.....	68
4.2.3. Fatty acid analysis.....	68
4.2.4. Picolinyl ester analysis.....	69
4.2.5. Quantification of FA.....	70
4.2.6. Analysis of variance.....	70
4.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	71
4.4. ACKNOWLEDGMENTS.....	76
 CHAPITRE 5 - FATTY ACID PROFILES OF POLAR AND NON-POLAR LIPIDS OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> AND <i>PLEUROTUS CORNUCOPIAE</i> VAR. <i>CITRINO-</i> <i>PILEATUS</i> GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES.....	85
SOMMAIRE.....	85
RÉSUMÉ.....	86
ABSTRACT.....	87
5.1. INTRODUCTION.....	88
5.2. MATERIALS AND METHODS.....	89
5.2.1. Organisms.....	89
5.2.2. Experimental design.....	90
5.2.3. Basidiocarp morphological characteristics.....	90
5.2.4. Lipid extraction.....	90
5.2.5. Fatty acid methyl esters analysis.....	91
5.2.6. Pyrrolidides analysis.....	92
5.2.7. Quantification of FA.....	93

5.2.8. Statistical analysis	93
5.3. RESULTS	93
5.3.1. Growth of fruiting bodies	93
5.3.2. Lipid content.....	94
5.3.3. Fatty acid content	94
5.4. DISCUSSION	97
5.5. ACKNOWLEDGMENTS	100
5.6. REFERENCES	105
CHAPITRE 6 - ANALYSE ET PURIFICATION DE COMPOSES INCONNUS CHEZ	
<i>GANODERMA TSUGAE</i>	108
SOMMAIRE.....	108
RÉSUMÉ.....	109
6.1. INTRODUCTION	110
6.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	113
6.2.1. Matériel fongique	113
6.2.2. Extraction et fractionnement primaire.....	113
6.2.3. Fragmentation et analyse de la fraction CH ₂ Cl ₂	115
6.2.4. Isolation des composés A et B par chromatographie sur couche mince	120
6.2.5. Isolation du composé B par Séphadex LH-20.....	122
6.2.6. Analyses spectroscopiques	125
6.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	127
6.3.1. Extraction et isolation.....	127
6.3.2. Hypothèses structurales sur les composés A et B	128
6.4. CONCLUSION.....	145
6.5. RÉFÉRENCES	147
CONCLUSION GENERALE	149
LISTE COMPLÈTE DES RÉFÉRENCES	154
ANNEXE A. RECHERCHE DE COMPOSES NUTRACEUTIQUES CHEZ LES	
CHAMPIGNONS DU QUEBEC: LES TRITERPENES DU GENRE <i>GANODERMA</i> ..	
	168

SOMMAIRE.....	168
RÉSUMÉ.....	169
A.1. INTRODUCTION	170
A.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	175
A.2.1 Recherche de triterpènes connus chez les spécimens québécois du genre <i>Ganoderma</i>	175
A.2.1 Localisation de composés potentiellement triterpéniques	177
A.3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	183
A.3.1. Matériel fongique	183
A.3.2. Analyse d'un extrait simple sur CLHP-SM/SM.....	183
A.3.3. Analyse d'un extrait simple sur CPG-SM.....	184
A.3.4. Analyse d'un extrait fractionné sur CPG-SM.....	185
A.3.5. Essai d'hydrolyse acide	188
A.4. CONCLUSION.....	188
A.5. RÉFÉRENCES	189
 ANNEXE B. TRITERPENES RECHERCHES CHEZ LES SPECIMENS QUEBECOIS DE <i>GANODERMA</i>	 193

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

FIGURE 1.1. MICROSCOPIE A BALAYAGE DE L'HYMENIUM DU BASIDIOMYCETE <i>COPRINUS CINEREUS</i> MONTRANT QUATRE BASIDIOSPORES PAR BASIDE. (TIREE DE McLAUGHLIN <i>ET AL.</i> , 1985).....	7
FIGURE 1.2. EXEMPLE D'ESPECES DE BASIDIOMYCETES RETROUVEES AU QUEBEC. <i>AGARICUS ARVENSIS</i> (A), <i>AMANTIA MUSCARIA</i> (B), <i>COPRINUS COMATUS</i> (C), <i>BOLETUS BICOLOR</i> (D), <i>LYCOPERDON PERLATUM</i> (E), <i>RUSSULA RUGULOSA</i> (F), <i>PIPTOPORUS BETULINUS</i> (G), <i>TRICHOLOMA EQUESTRIS</i> (H). (PHOTOS : A, D, F, G, H DE JACQUES LANDRY, AVEC SA PERMISSION ET PHOTOS B, C, E DE HIROSHI TAKAHASHI A PARTIR DU SITE INTERNET SUIVANT : HTTP://KINOKO-YA.JP/01ENG/0E_HOME.HTM) (SUITE A LA PAGE 10).....	9
FIGURE 1.3. STRUCTURES CHIMIQUES DE LA PLEUROMUTILINE (A) ET DE LA CORIOLINE (B). (TIREES DE AYER & BROWN, 1981)	19
FIGURE 1.4. STRUCTURES CHIMIQUES DE L' <i>A</i> -PINENE (A), DU CAMPHENE (B), DU <i>B</i> -PHELLANDRENE (C), DU LIMONENE (D) ET DE LINALOOL (E). (TIREES DE BRUNETON, 1999).....	20
FIGURE 1.5. STRUCTURES CHIMIQUES DE L'HISPOLON (A), L'HISPIDIN (B), L'ERITADENINE (C), DU 1- <i>B</i> -ARABINOFURANOSYL-CYTOSINE (D) ET DE LA PSILOCYBINE (E). (TIREES DE TAKAHASHI <i>ET AL.</i> , 1992 ; MIZUNO, 1995A).....	23
FIGURE 1.6. STRUCTURES CHIMIQUES DE L'ACIDE 9,10-DIHYDROXY-8-OXO-12-OCTADECENOIQUE (A), DU 5,8-EPIDIOXY-5 <i>A</i> ,8 <i>A</i> -ERGOSTA-6,22-DION-3 <i>B</i> -OL (B) ET DE L'ACIDE POLYPORENIQUE C (C). (TIREES DE MIZUNO <i>ET AL.</i> , 1995 ; KAWAGISHI <i>ET AL.</i> , 1997 ; LINDEQUIST <i>ET AL.</i> , 2005).....	26

CHAPITRE II

FIGURE 2.1. STRUCTURES MOLECULAIRES DE L'ERITADENINE (A) ET DU LOVASTATIN (B). (TIREES DE VITANYI <i>ET AL.</i> , 1998 ; LINDEQUIST <i>ET AL.</i> , 2005).....	34
FIGURE 2.2. SPECTRE DE MASSE DU DERIVE TRIMETHYLSILYLE DE L'ERITANENINE PUBLIE PAR VITANYI <i>ET AL.</i> (1998).	39
FIGURE 2.3. SPECTRE DE MASSE ET SCHEMA DE FRAGMENTATION D'UN DERIVE TRIMETHYLSILYLE DE L'ERITADENINE TIRE D'UNE ANALYSE EN CPG-SM (70 eV) D'UN EXTRAIT METHANOLIQUE DE <i>LENTINUS EDODES</i>	41
FIGURE 2.4. SPECTRE DE MASSE D'UN DERIVE TRIMETHYLSILYLE D'UN STANDARD DE LOVASTATIN ANALYSE EN CPG-SM (70 eV).....	41

CHAPITRE III

FIGURE 3.1. MASS SPECTRUM OF PICOLINYL ESTER DERIVATIVE OF <i>CIS</i> -11,12-METHYLENEOCTADECANOIC ACID FROM <i>BOLETUS SUBGLABRIPES</i> LIPID EXTRACT.....	59
---	----

CHAPITRE VI

- FIGURE 6.1. *GANODERMA TSUGAE* SE DÉVELOPPANT SUR UN CONIFÈRE DU QUÉBEC. (PHOTO: JACQUES LANDRY, AVEC SA PERMISSION) 112
- FIGURE 6.2. SCHEMA EXPERIMENTAL APPLIQUE AU DEBUT DES EXPERIENCES DE PURIFICATION. A) EXTRACTION DE *GANODERMA TSUGAE* ; B) FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BRUT AVEC DES SOLVANTS DE POLARITE CROISSANTE. 114
- FIGURE 6.3. ANALYSE EN CPG-SM DE LA FRACTION CH₂CL₂ NO 27 ISSUE DE LA PURIFICATION DE LA FRACTION DICHLOROMETHANE D'UN EXTRAIT METHANOLIQUE DE *GANODERMA TSUGAE*. LES COMPOSES A ET B SONT CEUX CIBLES POUR L'ISOLATION. 119
- FIGURE 6.4. ANALYSE EN CPG-DIF DE L'ECHANTILLON ISSU DE LA PURIFICATION SUR CCM DES FRACTIONS CH₂CL₂ NO 25 ET 27 ISSUES DU FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE L'EXTRAIT DICHLOROMETHANE DE *GANODERMA TSUGAE*. LES COMPOSES A ET B SONT CEUX CIBLES POUR LA PURIFICATION. LES PETITS PICS DE LA SECTION 1 ET PLUSIEURS PICS MINEURS DU CHROMATOGRAMME PROVIENNENT DU SOLVANT. LES PICS SITUES ENTRE 12 ET 15 MIN SONT DES IMPURETES, PRINCIPALEMENT DES HYDROCARBURES. 121
- FIGURE 6.5. ANALYSE EN CPG-SM DE LA FRACTION CH₂CL₂ NO 5 (A) ISSUE DE LA PURIFICATION D'UN EXTRAIT METHANOLIQUE DE *GANODERMA TSUGAE* ET DES FRACTIONS 3A (B), 4A (C), 4B (D) ET 4C (E) ISSUES DU FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX LH-20 DE LA FRACTION NO 5. 123
- FIGURE 6.6. SPECTRES UV-VISIBLE DU COMPOSE A EN FRACTION PARTIELLEMENT PURIFIEE (FRACTION CH₂CL₂ NO 24, 1 MG/ML HEXANE : ACETATE D'ETHYLE 30 :70, A) ET DU COMPOSE B EN FRACTION PURE (FRACTION 4C, 0,4 MG/ML CH₂CL₂, B). 126
- FIGURE 6.7. SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE A, COMPRENANT LES FRAGMENTS IDENTIFIES SUIVANTS : 646 M/Z [M]⁺, 631 M/Z [M-CH₃]⁺ (A) ET SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE B, COMPRENANT LES FRAGMENTS IDENTIFIES SUIVANTS : 662 M/Z [M]⁺, 647 M/Z [M-CH₃]⁺ (B). 130
- FIGURE 6.8. EXEMPLE D'INSERTION D'UNE DOUBLE LIAISON MODIFIANT SIGNIFICATIVEMENT L'ABSORPTION EN UV-VISIBLE D'UNE MOLECULE (VALEURS CALCULEES). 137
- FIGURE 6.9. STRUCTURE POSSIBLE POUR LE FRAGMENT 441 M/Z (C₂₉H₂₉O₄), QUI POURRAIT CORRESPONDRE A LA STRUCTURE DE BASE DES COMPOSES A ET B. LES CHROMOPHORES PRESENTS (UN A QUATRE DOUBLES LIAISONS CONJUGUEES ET DEUX A TROIS DOUBLES LIAISONS CONJUGUEES) DONNENT RESPECTIVEMENT DES ABSORBANCES CALCULEES (Λ_{CALC}) DE 370, 366 ET 321 NM..... 142
- FIGURE 6.10. STRUCTURE POSSIBLE POUR LE COMPOSE A. LES CHROMOPHORES PRESENTS (A, B, C ET D) DONNENT RESPECTIVEMENT LES ABSORBANCES CALCULEES (Λ_{CALC}) SUIVANTES : 370, 366, 321 ET 259 NM. 143
- FIGURE 6.11. STRUCTURE POSSIBLE POUR LE COMPOSE B. LES CHROMOPHORES PRESENTS (A, B, C ET D) DONNENT RESPECTIVEMENT LES ABSORBANCES CALCULEES (Λ_{CALC}) SUIVANTES : 370, 259, 244 ET 259 NM. 144

ANNEXES

- FIGURE A.1. EXEMPLES DE COMPOSES NUTRACEUTIQUES RETROUVES CHEZ LE GENRE *GANODERMA* : LA GANOMYCINE A (A), L'ACIDE GANODERIQUE A (B) ET DE L'ACIDE LUCIDENIQUE D (C). (TIREES DE LINDEQUIST *ET AL.*, 2005) 171
- FIGURE A.2. *GANODERMA APPLANATUM* SE DEVELOPPANT SUR UN ARBRE DU QUEBEC..... 174
- FIGURE A.3. SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE 10, LOCALISE CHEZ *GANODERMA TSUGAE*.
FRAGMENTS IDENTIFIES : 73 M/Z [TMS] PIC DE BASE ; 526 M/Z $[M]^+$, 511 M/Z $[M-CH_3]^+$,
495 M/Z $[M-OCH_3]^+$, 483 M/Z $[M-COCH_3]^+$, 409 M/Z $[M-COOTMS]^+$ 182

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

TABLEAU 1.1. COMPOSITION CHIMIQUE APPROXIMATIVE DES MYCÈTES ¹	11
TABLEAU 1.2. COMPOSÉS ORGANIQUES POLAIRES ISSUS DU MÉTABOLISME PRIMAIRES DES BASIDIOMYCÈTES.....	14
TABLEAU 1.3. TENEUR EN LIPIDES TOTAUX ET PROPORTION RELATIVE DES CLASSES LIPIDIQUES ISSUES DU MÉTABOLISME PRIMAIRE CHEZ QUELQUES ESPÈCES DE BASIDIOMYCÈTES ¹	17

CHAPITRE II

TABLEAU 2.1. PRESENCE (+) OU ABSENCE (-) DE LOVASTATIN ET D'ERITADENINE CHEZ <i>LENTINUS EDODES</i> , <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> ET 29 ESPÈCES DE CHAMPIGNONS INDIGÈNES DU QUÉBEC RECOLTÉES DANS LES RÉGIONS DE SHERBROOKE ET DE L'ABITIBI	42
--	----

CHAPITRE III

TABLE 3.1. NON-POLAR LIPID CONTENT OF MUSHROOMS OF THE FAMILY BOLETACEAE	57
TABLE 3.2. FATTY ACID PROFILES (% AREA) OF 11 MUSHROOM SPECIES OF THE FAMILY BOLETACEAE.....	58

CHAPITRE IV

TABLE 4.1. LIPID CONTENT OF TEN SPECIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES INDIGENOUS TO EASTERN CANADA.....	77
TABLE 4.2. FATTY ACID (FA) PROFILES OF NEUTRAL LIPIDS FROM TEN SPECIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES INDIGENOUS TO EASTERN CANADA	78
TABLE 4.3. FATTY ACIDS (FA) PROFILE OF POLAR LIPIDS FROM TEN SPECIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES INDIGENOUS TO EASTERN CANADA	80

CHAPITRE V

TABLE 5.1. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> AND <i>PLEUROTUS CORNUCOPIAE</i> VAR. <i>CITRINO-PILEATUS</i> GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES.....	101
TABLE 5.2. NON-POLAR AND POLAR LIPID CONTENT OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> AND <i>PLEUROTUS CORNUCOPIAE</i> VAR. <i>CITRINO-PILEATUS</i> GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES	102
TABLE 5.3. FATTY ACID (FA) PROFILE OF NON-POLAR EXTRACT OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> AND <i>PLEUROTUS CORNUCOPIAE</i> VAR. <i>CITRINO-PILEATUS</i> GROWN UNDER DIFFERENT TEMPERATURES	103

TABLE 5.4. FATTY ACID (FA) PROFILE OF POLAR EXTRACT OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> AND <i>PLEUROTUS CORNUCOPIAE</i> VAR. <i>CITRINO-PILEATUS</i> GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES	104
---	-----

CHAPITRE VI

TABLEAU 6.1. CONDITIONS D'ELUTION POUR LE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE GEL DE SILICE DE LA FRACTION CH ₂ CL ₂ EXTRAITE DE <i>G. TSUGAE</i>	117
TABLEAU 6.2. GROUPEMENT DES FRACTIONS ISSUES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SILICE DE LA FRACTION CH ₂ CL ₂ EXTRAITE DE <i>G. TSUGAE</i> ET MASSE DE CHAQUE EXTRAIT SEC	118
TABLEAU 6.3. RÉCAPITULATION DES ÉTAPES EFFECTUÉES AU COURS DE LA PURIFICATION DES COMPOSÉS A ET B, SUITE À LA CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SILICE DE LA FRACTION CH ₂ CL ₂ EXTRAITE DE <i>G. TSUGAE</i>	124
TABLEAU 6.4. FORMULES MOLECULAIRES POSSIBLES POUR LE COMPOSE A, INDICE DE DEFICIT EN HYDROGENE POUR CHAQUE FORMULE PROPOSEE, ET INTENSITES CALCULEES DE [M+1] ET [M+2].....	131
TABLEAU 6.5. FORMULES MOLÉCULAIRES POSSIBLES POUR LE COMPOSÉ B, INDICE DE DÉFICIT EN HYDROGÈNE POUR CHAQUE FORMULE PROPOSÉE, ET INTENSITÉS CALCULÉES DE [M+1] ET [M+2].....	132
TABLEAU 6.6. MASSE DE L'ION MOLÉCULAIRE [M] ⁺ DES COMPOSÉS A ET B ET INTENSITÉS RELATIVES DE [M+1] ET [M+2].....	133
TABLEAU 6.7. λ_{MAX} DU COMPOSÉ A SEMI-PURIFIÉ (FRACTION CH ₂ CL ₂ NO 24, 1 MG/ML HEXANE:ACÉTATE D'ÉTHYLE 30:70) ET DU COMPOSÉ B PUR (FRACTION 4C, 0,4 MG/ML CH ₂ CL ₂).....	135

ANNEXES

TABLEAU A.1. COMPOSÉS IDENTIFIÉS CHEZ LES SPECIMENS QUEBÉCOIS DU GENRE <i>GANODERMA</i>	176
TABLEAU A.2. COMPOSÉS LOCALISÉS CHEZ <i>GANODERMA TSUGAE</i> PRÉSENTANT UN POIDS MOLÉCULAIRE ET UN SPECTRE DE MASSE POUVANT CORRESPONDRE À DES TRITERPÈNES	179
TABLEAU B.1. TRITERPÈNES CONNUS AYANT ÉTÉ CHERCHÉS CHEZ LES SPÉCIMENS QUÉBÉCOIS DU GENRE <i>GANODERMA</i>	194

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

BF ₃ -MeOH	Trifluorure de bore, en solution dans le méthanol (10% p/p)
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLHP-SM/SM	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (trappe ionique permettant une analyse SM/SM)
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-DIF	Chromatographie en phase gazeuse couplée à détecteur à ionisation de flamme
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
DW	Dry weight
FA	Fatty acids/Acides gras
LS means	Least-squares means
P/P	poids/poids
PS	Poids sec
UV	Ultraviolet
RMN	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour les champignons a fait un bond considérable au Québec, comme au Canada. Fruit d'un multiculturalisme en plein essor ou d'une ouverture sur le monde (Chiu *et al.*, 2000), cette tendance continue de se dessiner, avec pour toile de fond l'arrivée sur les étals des supermarchés d'espèces exotiques comme le *shiitake* (*Lentinus edodes*), et la naissance de réseaux de cueillettes de champignons sauvages qui alimentent les épiceries spécialisées et les grands restaurants. Les champignons figurent avantageusement dans l'industrie émergente que représentent les produits forestiers non ligneux (Wills & Lipsey, 1999). Au Québec, les réseaux de cueillette sont déjà en prospection pour évaluer le potentiel commercial des champignons indigènes, principalement en régions comme c'est le cas pour la Gaspésie par exemple (Consortium en foresterie – Gaspésie-Les-Îles, 2006).

C'est que la flore mycologique du Québec est parmi les plus riches au monde (Pomerleau, 1980). Bien que l'on ignore le nombre exact d'espèces que renferment les forêts québécoises, quelques 1 500 espèces de champignons supérieurs ont jusqu'ici été répertoriées (Gouvernement du Québec, 2007). De ce nombre, la vaste majorité, soit près de 1 400 espèces dont au moins 200 espèces sont comestibles, a été décrite par le mycologue René Pomerleau dans *La flore des champignons du Québec* publiée en 1980. À ce jour, une vingtaine d'espèces humicoles ou lignicoles, présentes en abondance au Québec, sont particulièrement convoitées pour leur goût distinctif et représentent un intérêt économique. Les habitats variés, allant de la toundra arctique à la forêt boréale et de la forêt caducifolié jusqu'aux zones riveraines, formant ainsi trois zones climatiques distinctes (tempérée,

boréale, arctique), sont en partie responsables de cette grande biodiversité (Pomerleau, 1980).

Autrefois considérés comme des aliments à faible valeur nutritive, les champignons revêtent aujourd'hui un intérêt particulier. Désormais, plus de 80% des gens les considèrent comme un aliment « santé » et n'hésitent pas à les inclure dans une diète visant une bonne santé cardiovasculaire (Stanton, 2006). Les champignons ont en effet une excellente valeur nutritive, comparable à celle du lait, du soja et du haricot (Boa, 2003 ; Chang & Miles, 2004). De fait, ils sont riches en protéines et en fibres, ils contiennent des vitamines et des minéraux en quantités non négligeables, en plus de constituer une source intéressante d'acides aminés essentiels (Chang & Miles, 2004). Enfin, bien que faibles en gras, leur profil lipidique est hautement insaturé et constitue une source d'acides gras essentiels (Lösel, 1988).

À l'instar des plantes médicinales, on reconnaît aux champignons plusieurs propriétés thérapeutiques : ils sont anticancéreux, hypocholestérolémiants, immunostimulants, antioxydants, etc. (Mizuno *et al.*, 1995 ; Ferreira *et al.*, 2007). On dénombre au Québec plusieurs espèces de champignons, appartenant notamment aux genres *Pleurotus* (*P. ulmarius*, *P. ostreatus*, *P. sapidus*), *Lentinus* (*L. lepideus*, *L. triginus*), *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. tsugae*) et *Agaricus* (*A. bitorquis*, *A. vaporarius*, *A. campestris*, *A. sylvaticus*, *A. arvensis*, *A. sylvicola*), dont la valeur nutraceutique ou le contenu en composés actifs ont été rapportés dans la littérature (Breene, 1990 ; Mizuno *et al.*, 1995 ; Gunde-Cimerman, & Cimerman, 1995).

En dépit de l'intérêt que présente la mycoflore québécoise et de la place indéniable des champignons dans le domaine des nutraceutiques, aucune étude portant sur la composition chimique des champignons indigènes du Québec, n'a, à notre connaissance, été réalisée. Dans cette optique, ce projet de doctorat, qui s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec autour d'une perspective nutritionnelle et nutraceutique, avait pour objectif d'effectuer une première évaluation de la composition chimique de différents champignons basidiomycètes du Québec. Parmi les composés ciblés dans le cadre de ce projet, on retrouve des composés polaires (éritadénine, lovastatin) et des composés non polaires (acides gras, triterpènes). En outre, l'influence de la température sur la composition en acides gras des champignons a été évaluée.

Ce manuscrit décrit ce projet de recherche. Le chapitre 1 est consacré à une revue de littérature sur le sujet et traite, entre autres, des champignons supérieurs, de leur composition chimique, de leur valeur nutritive et nutraceutique et des facteurs influençant leur composition chimique. Par la suite, les hypothèses de recherche ainsi que les objectifs sont énoncés. Les chapitres 2, 3, 4, 5 et 6 sont présentés sous forme d'articles scientifiques. Le chapitre 2 décrit les travaux destinés à évaluer la présence d'éritadénine et de lovastatin chez les champignons du Québec. Suivent deux chapitres sur la caractérisation du contenu en acides gras chez les champignons du Québec (Chapitres 3 et 4), puis une étude évaluant l'effet de la température sur les acides gras de deux espèces de pleurotes ayant chacun une température optimale de croissance différente (Chapitre 5). Les travaux visant la purification de nouveaux triterpènes à partir de spécimens québécois de *Ganoderma tsugae* sont présentés au chapitre 6, puis une conclusion générale est énoncée en fin de thèse.

CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. Les champignons

1.1.1 Définition

Aussi appelés mycètes, les champignons se définissent comme des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle, ce qui les confine dans un mode de vie complètement hétérotrophe (Bouchet *et al.*, 1999). L'hyphe filamenteux, constitué d'une paroi de polysaccharides, est la structure de base de l'organisme fongique (Bouchet *et al.*, 1999). Les champignons sont répartis dans cinq classes : les oomycètes, les zygomycètes, les deutéromycètes, les ascomycètes et les basidiomycètes. Caractérisés par un hyphe pourvu de cloisons et par la présence d'une phase dicaryotique (Kendrick, 1985), les ascomycètes et les basidiomycètes représentent les « champignons supérieurs » (Kendrick, 1985).

1.1.2. Les basidiomycètes

Les basidiomycètes sont les plus évolués des mycètes (Guarro *et al.*, 1999). Ils se distinguent par un hyphe cloisonné, chaque segment d'hyphe étant séparé par un dolipore (un type de cloison particulier à ce phylum), par la production de basidiospores issus de basides portées par un basidiocarpe (Figure 1.1) et enfin, par la présence d'anses d'anastomose au cours de la phase dicaryotique (Bouchet *et al.*, 1999 ; Kendrick, 1985).

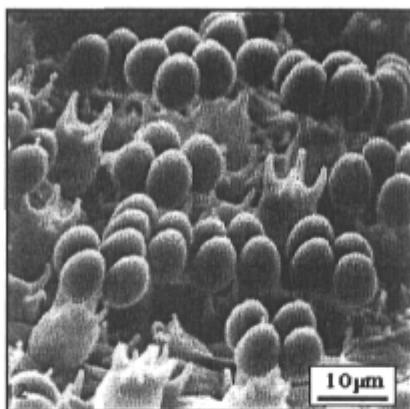


Figure 1.1. Microscopie à balayage de l'hyménium du basidiomycète *Coprinus cinereus* montrant quatre basidiospores par baside. (Tirée de McLaughlin *et al.*, 1985)

On compte environ 23 000 espèces de basidiomycètes, distribuées dans plus de 1 400 genres et 40 ordres (Guarro *et al.*, 1999). Parmi les principales familles de basidiomycètes présentes au Québec, on retrouve les Agaricaceae, les Amanitaceae, les Boletaceae, les Coprinaceae, les Lycoperdaceae, les Polyporaceae, les Russulaceae et les Tricholomataceae (Figure 1.2).

1.2. Composition chimique des champignons

1.2.1. Généralités

Au même titre que les plantes vertes, les mycètes produisent une vaste variété de molécules, très différentes les unes des autres, issues du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire de l'organisme fongique. Bien que leur composition chimique soit passablement variable, tous les mycètes contiennent des glucides (mono- et polysaccharides), des lipides, des protéines, des acides nucléiques (ADN et ARN) et des minéraux en diverses proportions (Tableau 1.1) (Griffin, 1994). Ils renferment également des acides organiques, des vitamines, de même qu'une étonnante variété de métabolites secondaires parmi lesquels on retrouve des composés azotés, des composés organohalogénés, des composés phénoliques, des lectines et des terpénoïdes (Griffin, 1994 ; Mizuno, 1995a ; Jong & Field, 1997 ; Mau *et al.*, 2002 ; Awadh Ali *et al.*, 2003).



Figure 1.2. Exemple d'espèces de basidiomycètes retrouvées au Québec. *Agaricus arvensis* (A), *Amanita muscaria* (B), *Coprinus comatus* (C), *Boletus bicolor* (D), *Lycoperdon perlatum* (E), *Russula rugulosa* (F), *Piptoporus betulinus* (G), *Tricholoma equestris* (H). (Photos : A, D, F, G, H de Jacques Landry, avec sa permission et photos B, C, E de Hiroshi Takahashi à partir du site Internet suivant : http://kinoko-ya.jp/01eng/0e_home.htm) (suite à la page 10)

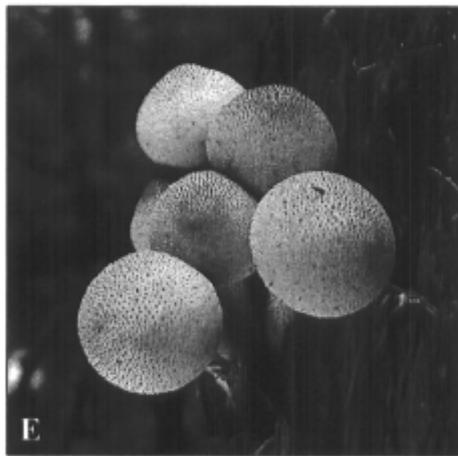


Figure 1.2. (suite). Exemple d'espèces de basidiomycètes retrouvées au Québec. *Agaricus arvensis* (A), *Amanita muscaria* (B), *Coprinus comatus* (C), *Boletus bicolor* (D), *Lycoperdon perlatum* (E), *Russula rugulosa* (F), *Piptoporus betulinus* (G), *Tricholoma equestris* (H). (Photos : A, D, F, G, H de Jacques Landry, avec sa permission et photos B, C, E de Hiroshi Takahashi à partir du site Internet suivant : http://kinoko-ya.jp/01eng/0e_home.htm)

Tableau 1.1. Composition chimique approximative des mycètes¹

Classe de composés	Contenu (% (p/p) ps)
Glucides	16 - 85
Lipides	0,2 - 87
Protéines	14 - 44
ARN	1 - 10
ADN	0,15 - 0,3
Minéraux	1 - 29

¹Données tirées de Griffin (1994).

1.2.2. Composés extractibles des mycètes

Suivant leurs propriétés physico-chimiques, on peut classer les molécules organiques extractibles des champignons en deux grandes catégories : les composés polaires et les composés lipophiles. Loin d'être catégorique, cette classification est plutôt une échelle allant de très polaire (soluble dans l'eau) à très lipophile (soluble dans l'hexane).

La polarité d'une molécule est d'abord assujettie à l'arrangement structural des atomes (structure linéaire ou cyclique), puis à la nature des groupements présents sur la structure. L'ensemble détermine l'interaction qu'aura le composé avec son entourage chimique. Les atomes fortement électronégatifs, de même que les doubles liaisons, engendrent un moment dipolaire permanent plus ou moins fort qui contribue à augmenter la polarité d'une molécule (Solomons, 1992). En chimie analytique, la polarité des composés est intrinsèquement liée aux solvants utilisés pour les extraire des matrices, qu'elles soient végétales ou animales. On décrit généralement comme polaires les composés extraits avec des solvants polaires tels que l'eau, l'éthanol et le méthanol. Au contraire, les composés non polaires et/ou lipophiles sont ceux extraits avec des solvants moins polaires tels que le chloroforme, le dichlorométhane et l'hexane. Cette catégorisation simplifiée sera utilisée pour décrire de façon générale la composition chimique des champignons.¹

¹ Certaines classes de composés pourraient appartenir aux deux catégories, principalement parce que le méthanol est un solvant quasi universel capable de solubiliser une quantité innombrable de molécules, incluant des composés très peu polaires comme les acides gras ou les triterpènes. De façon générale, les composés seront classés selon leur solvant optimal d'extraction.

1.2.3. Composés organiques polaires présents chez les basidiomycètes

La plupart des composés organiques polaires extraits des champignons appartiennent au métabolisme primaire. Parmi ceux-ci, on retrouve principalement des glucides, dont une partie non négligeable est constituée de polysaccharides non digestibles appelés fibres (Tableau 1.2). Les champignons sont constitués de différents polysaccharides et hétéropolysaccharides ayant des fonctions de structure (paroi cellulaire) et de stockage (Griffin, 1994). On retrouve entre autres de la chitine (β -1,4-*N*-acétylglucosamine), des glucans (β -1,3 et β -1,6-glucans) et du glycogène (Griffin, 1994).

Les protéines, qui représentent 4 à 35 % (p/p) du poids sec (ps) des champignons, contiennent de nombreux acides aminés essentiels (32,9 – 48,5 g/100g de protéines) tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, la lysine et la thréonine. Les basidiomycètes contiennent en outre des acides nucléiques (2,7 – 4,1 % (p/p) ps), des acides organiques (1 460 – 9 800 mg/kg ps) et des vitamines, dont plusieurs vitamines du complexe B, et de la vitamine C (17 – 25 mg/100 g ps) (Tableau 1.2).

Le métabolisme secondaire des champignons produit une grande variété de composés organiques polaires, dont plusieurs composés phénoliques comme les acides *trans*-cinnamique, *p*-hydroxybenzoïque et caféique (Mattila *et al.*, 2001). Les composés phénoliques totaux se retrouvent en concentrations variables chez les basidiomycètes : 10,8 mg/g ps chez *Tricholoma portentosum*, 17,3 mg/g ps chez *Lactarius deliciosus*, et 56,0 mg/g ps chez *Ganoderma lucidum* (Mau *et al.*, 2002 ; Ferreira *et al.*, 2007).

Tableau 1.2. Composés organiques polaires issus du métabolisme primaires des basidiomycètes

Classe de composés	Contenu dans les champignons comestibles
Glucides totaux (% (p/p) ps) ¹	50,7 – 82,8
Glucides non azotés	40 – 74,3
Fibres	3,7 – 19,8
Protéines (% (p/p) ps) ¹	4,2 – 34,8
Acides aminés essentiels (g/100 g de protéines)	32,9 – 48,5
Leucine	4,5 – 7,9
Isoleucine	3,4 – 7,8
Valine	2,5 – 9,7
Tryptophane	1,1 – 2,0
Lysine	3,9 – 9,9
Thréonine	3,5 – 6,1
Phénylalanine	2,6 – 7,0
Méthionine	0,9 – 3,0
Histidine	1,7 – 4,2
Acides nucléiques totaux (% (p/p) ps) ¹	2,7 – 4,1
ADN	0,2 – 0,4
ARN	2,4 – 3,9
Vitamines (mg ou µg /100 g ps) ²	
B ₁ (mg)	0,6 – 0,9
B ₂ (mg)	1,8 – 5,1
B ₃ (mg)	31 – 65
C (mg)	17 – 25
Acide folique (µg)	300 – 640
B ₁₂ (µg)	0,6 – 0,8
Acides organiques (mg/kg ps) ³	1 460 – 9 800
Acide oxalique	4,6 – 536
Acide malique	405 – 3 890
Acide succinique	0,04 – 8,7
Acide fumarique	11,6 – 397

¹ Données tirées de Chang & Miles (2004).² Données tirées de Mattila *et al.* (2001).³ Données tirées de Valentão *et al.* (2005).

Un large éventail de composés azotés, tels que des nucléosides (notamment l'éritadénine retrouvée chez *L. edodes* [shiitake]), des acides aminés non-protéiques, des alcaloïdes et des cyclopeptides, comptent parmi les composés organiques polaires retrouvés chez les basidiomycètes (Liu, 2005). Plusieurs de ces molécules sont à l'origine des effets toxiques de certaines espèces de champignons comme les amanites (Kendrick, 1985 ; Liu, 2005).

1.2.4. Composés organiques non polaires présents chez les basidiomycètes

Les composés organiques non polaires extraits des basidiomycètes sont généralement issus du métabolisme secondaire, à l'exception des lipides dérivés d'acides gras (hydrocarbures, acylglycérols, phospholipides, glycolipides et sphingolipides) et des stérols, qui appartiennent au métabolisme primaire fongique (Weete, 1974 ; Lösel, 1988). Ces classes de lipides sont présentes en diverses proportions chez les basidiomycètes (Tableau 1.3).

Les acides gras représentent une partie non négligeable de la fraction lipidique des champignons, laquelle forme généralement de 10 à 13% p/p ps du carpophore (Tableau 1.3). Les acides gras se retrouvent sous forme libre ou estérifiés à divers composés, laissant place à toute une gamme de lipides complexes tels que les acylglycérols (mono-, di- ou triestérification au glycérol), les phospholipides (dérivés de l'acide phosphorique), les glycolipides (estérification à un glycolglycérol) et les sphingolipides (estérification à une partie aminée elle-même glycosylée ou phosphatée) (Christie, 2006). Les acides gras sont constitués d'une chaîne aliphatique de 4 à 26 carbones, plus ou moins insaturée, terminée

par une fonction d'acide carboxylique (-COOH). Les basidiomycètes sont caractérisés par la présence d'acides gras à longues chaînes plus ou moins insaturées (C₁₂ à C₂₆), mais également par la présence d'acides gras à courtes chaînes (C₅ à C₁₁), ce qui les distingue des végétaux où prédominent les acides gras de C₁₂ à C₁₈ (Weete, 1974 ; Naudet, 1992 ; Cruz *et al.*, 1997 ; Bruneton, 1999). Les principaux acides gras retrouvés chez les basidiomycètes sont les acides palmitique (16:0), oléique (18:1 Δ⁹*c*) et linoléique (18:2 Δ⁹*c*,12*c*). En outre, contrairement à la plupart des mycètes, ils synthétisent l'isomère α de l'acide linoléique (18:2 Δ⁹*c*,12*c*,15*c*) (Weete, 1974).

Les stérols et leurs dérivés sont également des composés essentiels au métabolisme primaire des basidiomycètes. Leur structure est basée sur un squelette tétracyclique à différents niveaux d'insaturation, comptant de 27 à 29 carbones. Le γ-ergostérol est le principal stérol trouvé chez les basidiomycètes, mais de nombreux dérivés sont aussi fréquemment rencontrés (Chang & Miles, 2004).

Les composés organiques non polaires issus du métabolisme secondaire proviennent en grande partie de la voie métabolique du mévalonate qui est à l'origine des composés terpéniques (ou isoprénoïdes) (Ratledge & Wilkinson, 1988 ; Deacon, 2005). Les classes majeures de composés terpéniques soient les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les caroténoïdes, sont toutes retrouvées chez les basidiomycètes (Ayer & Browne, 1981). Ils sont présents chez la plupart des espèces, mais leur diversité étant importante, la plupart des composés connus sont spécifiques à une ou à quelques espèces. Ainsi, plusieurs sesquiterpènes et quelques diterpènes, dont la corioline

Tableau 1.3. Teneur en lipides totaux et proportion relative des classes lipidiques issues du métabolisme primaire chez quelques espèces de basidiomycètes¹

Espèce	Lipides totaux (% p/p ps)	Lipides neutres (% lipides totaux)					Lipides polaires (% lipides totaux)			
		AGL ²	TG	ST	EST	Total	PL	GL	Total	
<i>Agaricus bisporus</i>	Mycélium	5,1	10,4	13,3	3,3	1,7	54 – 79			
	Carpophore						33 – 51	2,0		20,7
<i>Armillariella mellea</i>	Carpophore	11,7	46,5							
<i>Boletus edulis</i>	Carpophore	13,4	26,3							
<i>Lactarius trivialis</i>	Carpophore	12,2	23,3							
<i>Lepista nuda</i>	Carpophore	12,2	16,2							
<i>Polyporus ovinus</i>	Carpophore	10,3	34,0							
<i>Cantherellus cibarius</i>	Carpophore						48,6	49,6	1,7	51,4

¹ Données tirées de Lösel (1988).

² AGL : acides gras libres ; TG : triacylglycérols ; ST : stérols ; EST : esters de stérols ; PL : phospholipides ; GL : glycolipides.

(un sesquiterpène isolé du champignon japonais *Coriolus consors*) et la pleuromutiline (un diterpène isolé de champignons du genre *Pleurotus*) ont été caractérisées chez les basidiomycètes (Figure 1.3) (Ayer & Brown, 1981). De la même façon, on trouve chez les espèces du genre *Ganoderma* une série de triterpènes polyoxygénés caractéristiques de ce genre où plus de 110 composés différents ont jusqu'ici été isolés (Kikuchi *et al.*, 1986 ; Nishitoba *et al.*, 1989 ; Zjawiony, 2004). Les caroténoïdes, qu'on retrouve notamment chez les rouilles et certaines espèces de chanterelles et de bolets, sont aussi relativement répandus chez les basidiomycètes (Czeczuga, 1978a et b ; Zwetko & Pfeifhofer, 1991 ; Mui *et al.*, 1998).

Les champignons sont souvent recherchés pour leur arôme particulier qui est en grande partie attribuable à la présence de certains monoterpènes aliphatiques et oxygénés, de même qu'à certains composés aromatiques dérivés de la voie de l'acide shikimique (Breheret *et al.*, 1997 ; Rapior *et al.*, 2002). Les travaux de Breheret *et al.* (1997) portant sur 82 espèces de basidiomycètes ont révélé la présence de 27 monoterpènes différents, dont les principaux étaient l' α -pinène, le camphène, le β -phellandrene, le limonène et le linalool (Figure 1.4). Notons par ailleurs que c'est le 1-octèn-3-ol, un alcool issu de la dégradation de l'acide linoléique (18:2 Δ 9,12), qui donne aux champignons leur arôme caractéristique (Rawling, 1997).

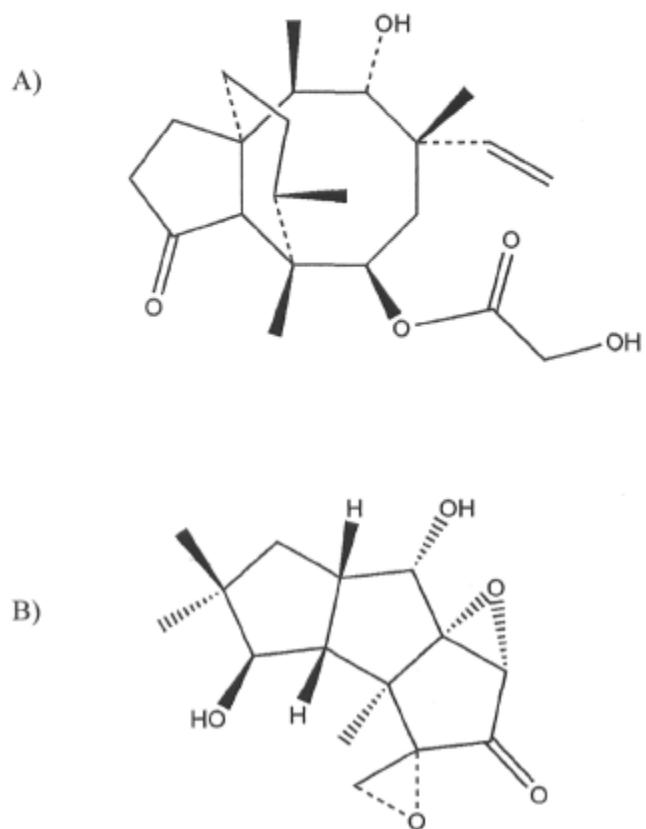


Figure 1.3. Structures chimiques de la pleuromutiline (A) et de la corioline (B). (Tirées de Ayer & Brown, 1981)

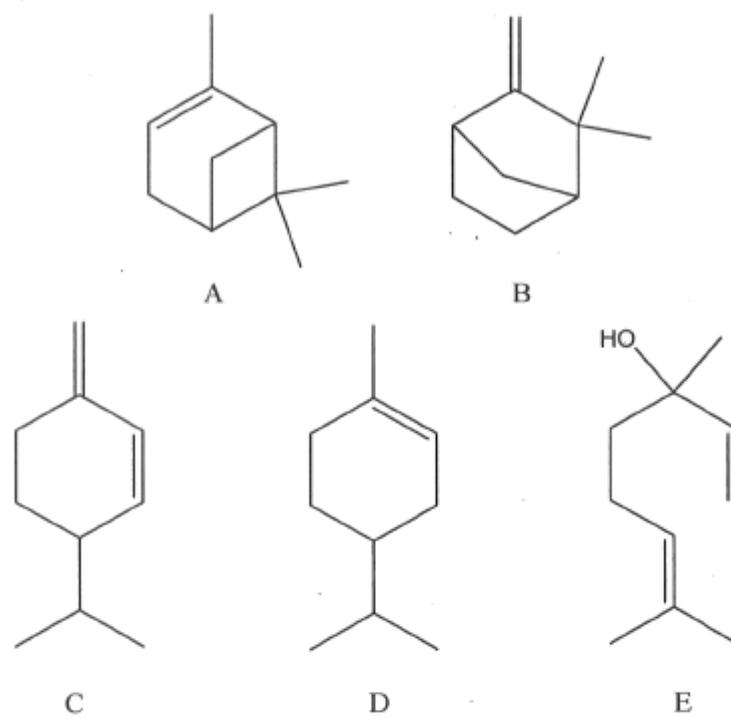


Figure 1.4. Structures chimiques de l' α -pinène (A), du camphène (B), du β -phellandrene (C), du limonène (D) et de linalool (E). (Tirées de Bruneton, 1999)

1.3. Valeur nutritive et propriétés nutraceutiques des basidiomycètes

1.3.1. Valeur nutritive

Les qualités nutritives des champignons reposent principalement sur leur teneur en protéines et en acides aminés essentiels; ce qui les rend comparables à des aliments comme le lait, le haricot, l'épinard et le soja (Chang & Miles, 2004). Leur teneur en vitamine C (17 – 25 mg/100 g ps) est en outre plus élevée que celle de la carotte, du céleri et du concombre, et se compare avantageusement à celle de l'épinard (28 mg/100 g ps) (Chu *et al.*, 2002). La teneur des champignons en riboflavine (vitamine B₂) est généralement supérieure à celle des légumes, avoisinant dans certains cas celle des œufs et du fromage; c'est le cas chez *Agaricus bisporus* par exemple (Mattila *et al.*, 2001). Leur composition minérale inclut plusieurs minéraux dont le potassium, le phosphore, le cuivre et le zinc en concentrations comparables à celles des légumes (Mattila *et al.*, 2001). Par ailleurs, leur fraction lipidique contient plusieurs acides gras essentiels (Lösel, 1988).

1.3.2. Composés polaires nutraceutiques

Les polysaccharides, particulièrement des β -glucans présentant une activité immunomodulatrice et antitumorale sont les principaux composés nutraceutiques hydrosolubles extraits des basidiomycètes. On les trouve entre autres chez *Grifola frondosa*, *Lenzites betulina*, *A. bisporus* et chez différentes espèces du genre *Ganoderma* (Mizuno, 1995a; Mizuno *et al.*, 1995). Les basidiomycètes contiennent aussi certaines protéines bioactives, comme la flammuline, extraite de *Flammulina velutipes*, et les lectines extraites de *Tricholoma mongolicum*, qui présentent une activité cytostatique chez certaines lignées

de cellules cancéreuses (Lindequist *et al.*, 2005). Ces protéines ont aussi un effet immunomodulateur (Lindequist *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont en partie responsables du potentiel antioxydant de plusieurs basidiomycètes ayant des propriétés médicinales, dont *Agaricus blazei*, *Boletus edulis*, *Hypsizigus marmoreus* et *Leucopaxillus giganteus* (Mau *et al.*, 2002 ; Tsai *et al.*, 2006 ; Barros *et al.*, 2007). Certains composés phénoliques, dont l'hispidin et l'hispolon (Figure 1.5A, B), isolés de *Inonotus hispidus*, ont des propriétés immunomodulatrices et des propriétés antivirales contre le virus de l'influenza de type A et B (Ali *et al.*, 1996 ; Awadh Ali *et al.*, 2003).

Plusieurs composés azotés isolés des basidiomycètes présentent également des propriétés biologiques. Par exemple, l'éritadénine (Figure 1.5C), un nucléoside isolé de *L. edodes*, améliore le transport du cholestérol dans les vaisseaux sanguins, contribuant ainsi à abaisser le taux de cholestérol chez l'homme (Liu, 2005). Un autre nucléoside, le 1- β -arabinofuranosyl-cytosine (Figure 1.5D), synthétisé de façon artificielle et utilisé pour le traitement du cancer, est présent naturellement chez *Xerocomus nigromaculatus* (Takahashi *et al.*, 1992). La psilocybine (Figure 1.5E), un alcaloïde responsable de l'effet psychotrope de certaines espèces de *Psilocybe*, est maintenant de plus en plus utilisée dans le traitement des troubles obsessionnels-compulsifs et de l'anxiété généralisée. Elle est en outre utilisée pour diminuer la douleur chez les patients atteints du cancer (Sessa, 2005). Enfin, certains peptides isolés de *Inonotus obliquus* et *Russula palludosa* sont respectivement inhibiteurs de

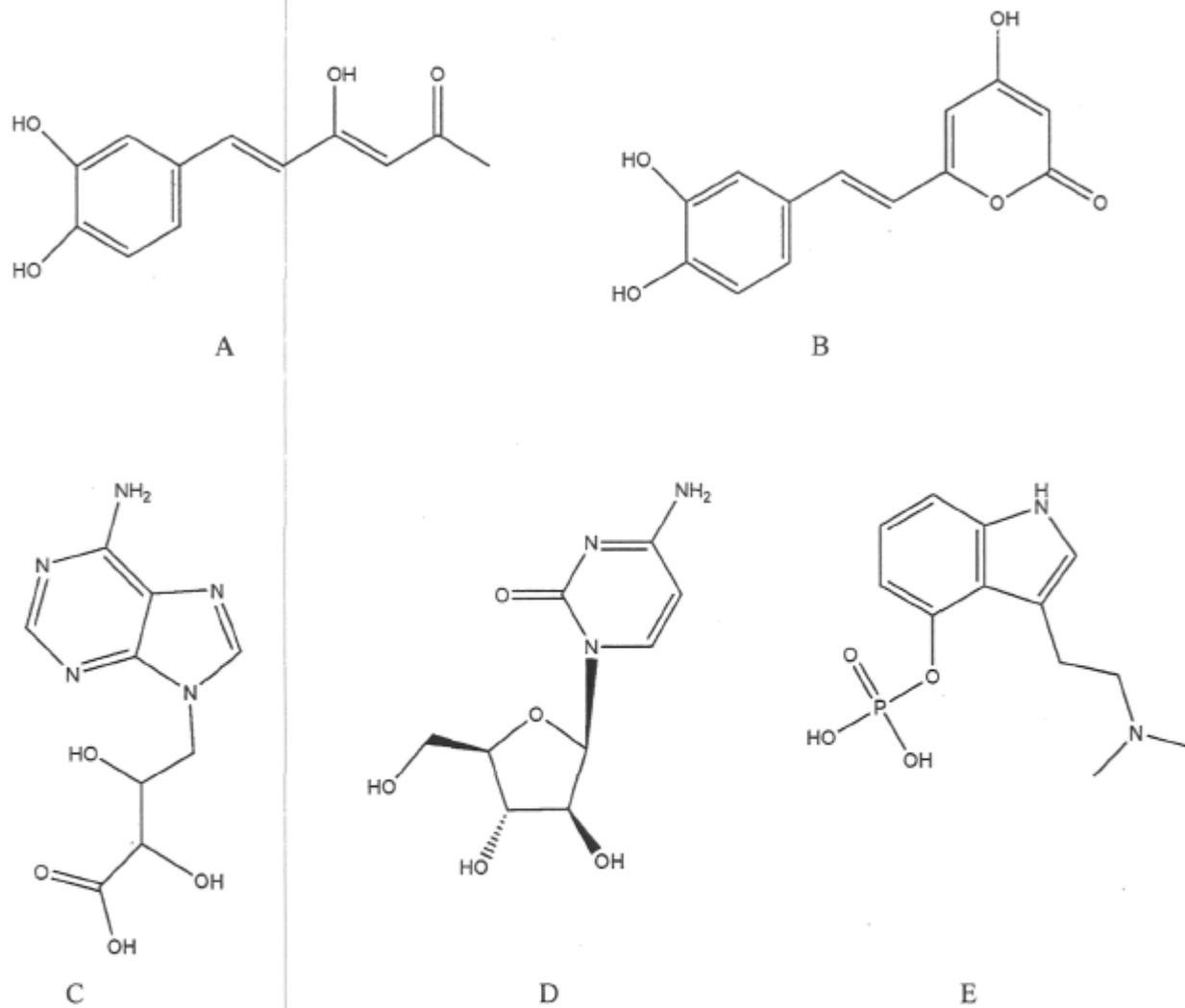


Figure 1.5. Structures chimiques de l'hispolon (A), l'hispidin (B), l'éritadénine (C), du 1-β-arabinofuranosyl-cytosine (D) et de la psilocybine (E). (Tirées de Takahashi *et al.*, 1992 ; Mizuno, 1995a)

l'agrégation plaquettaire et inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH de type I (Hyun *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006).

1.3.3. Composés non polaires nutraceutiques

Les molécules organiques non polaires présentant une activité biologique sont extrêmement répandues chez les basidiomycètes. La présence des acides linoléique et α -linoléique contribue à la valeur nutraceutique des champignons puisqu'il est connu que la consommation d'acides gras polyinsaturés contribue à une meilleure santé cardiovasculaire, un fait attribuable, entre autres, aux propriétés anti-inflammatoires, hypotensives et hypocholestérolémiantes de ces molécules (Weete, 1974 ; Lemarchal, 1992 ; Oomah & Mazza, 1999). L'acide α -linoléique, un acide gras ω_3 , possède en outre des propriétés antitumorales et immunomodulatrices (Oomah & Mazza, 1999). Pour sa part, l'acide palmitique (16:0), présent chez la majorité des champignons, a une capacité anti-inflammatoire comparable à celle de l'ibuprofen (Weete, 1974 ; Lösel, 1988 ; Zhang *et al.*, 2003). En outre, certains acides gras oxygénés, tel que l'acide 9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadécénoïque (Figure 1.6A) extrait de *Hericium erinaceum*, possèdent des propriétés cytotoxiques (Mizuno *et al.*, 1995).

Le principal stérol trouvé chez les basidiomycètes, la provitamine D₂ (γ -ergostérol), est le précurseur de la provitamine D₃ qui joue un rôle important dans la régulation de l'absorption du phosphore et du calcium (Wang *et al.*, 2001 ; Chang & Miles, 2004). La teneur en provitamine D₂ des champignons comestibles atteint 0,47% p/p ps chez *Volvariella volvacea*, 0,27 % p/p ps chez *L. edodes* et 0,23 % p/p ps chez *A. bisporus*

(Chang & Miles, 2004). Des travaux réalisés chez des souris atteintes du sarcome-180 et chez des rats soumis à des agents mutagènes ont par ailleurs montré l'activité antitumorale de l'ergostérol (Yazawa *et al.*, 2000 ; Takaku *et al.*, 2001). Certains dérivés de l'ergostérol, isolés de *A. blazei* et *Coriolus versicolor*, possèdent aussi des propriétés antitumorales (Mizuno, 1995c). En outre, un dérivé peroxydé de l'ergostérol (5,8-épidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22-dion-3 β -ol ; Figure 1.6B) est à l'origine de l'activité anti-allergène de *Tricholoma populinum* (Lindequist *et al.*, 2005). Pour sa part, l'ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol, isolé de *Tricholoma auratum*, stimule la prolifération des ostéoblastes de souris (Hata *et al.*, 2002).

D'autres composés à structure stéroïdienne, soient les nombreux triterpènes isolés des champignons du genre *Ganoderma*, sont connus pour leurs multiples activités biologiques, incluant des propriétés hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-VIH et antitumorales (Komoda *et al.*, 1989 ; Mizuno *et al.*, 1995 ; Mizuno, 1995b ; Mizuno, 1995c ; El Mekawy *et al.*, 1998 ; Patočka, 1999). Par exemple, l'acide ganodérique β inhibe une protéase du VIH de type 1, tandis que les acides ganodériques C et D ont un effet inhibiteur sur la libération d'histamines, ce qui leur confère des propriétés anti-inflammatoires (Jong & Birmingham, 1992 ; Min *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 1999). L'acide polyporénique C (Figure 1.6C), un triterpène extrait de certains polypores (*Daedalea dickensii* et *Piptoporus betulinus*) possède aussi des propriétés anti-inflammatoires et s'est montré efficace dans le traitement de l'arthrite (Kawagishi *et al.*, 1997 ; Kamo *et al.*, 2003).

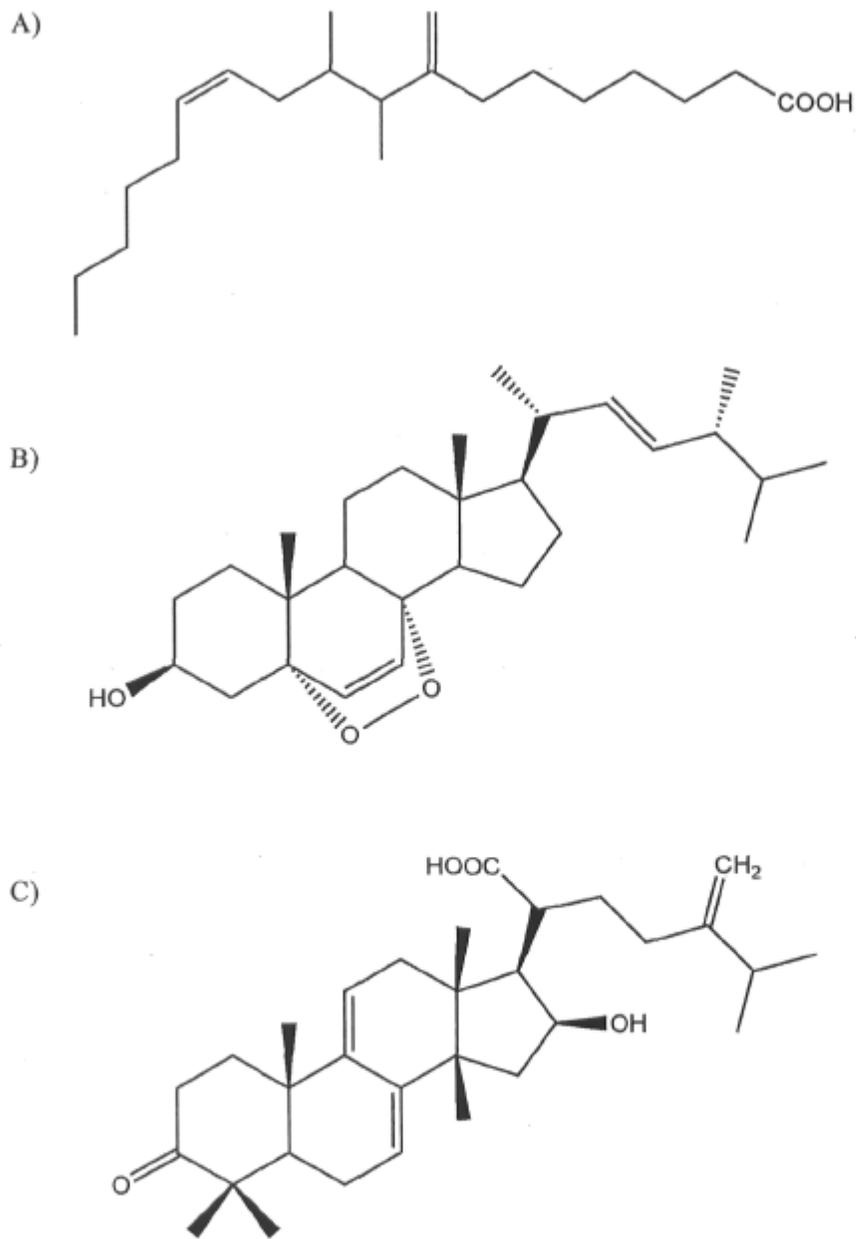


Figure 1.6. Structures chimiques de l'acide 9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadécénoïque (A), du 5,8-épidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22-dion-3 β -ol (B) et de l'acide polyporénique C (C). (Tirées de Mizuno *et al.*, 1995 ; Kawagishi *et al.*, 1997 ; Lindequist *et al.*, 2005)

La plupart des basidiomycètes contiennent des polyènes lipophiles, principalement des tocophérols (vitamine E), qui contribuent à leur potentiel antioxydant. Il est maintenant généralement admis que la consommation diététique d'antioxydants lipophiles tels que les tocophérols apporte un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires et le cancer (Singh *et al.*, 2007). Les contenus en tocophérols totaux de *G. lucidum* et de *Ganoderma tsugae* oscillent entre 1,1 et 1,2 mg/100 g ps (Mau *et al.*, 2002). L' α -tocophérol est le tocophérol le plus abondant chez *A. blazei* (3,0 mg/g ps), *Agrocybe cylindracea* (2,1 mg/g ps) et *B. edulis* (4,7 mg/g ps) (Tsai *et al.*, 2006).

1.4. Facteurs influençant la composition chimique des champignons

1.4.1. Facteurs intrinsèques

Chez les champignons, la composition chimique peut varier selon l'espèce considérée. Dans ce contexte, les profils d'acides gras peuvent être utilisés pour faire de la différenciation intragénérique d'espèces (Weete, 1974 ; Dimou *et al.*, 2002). La composition chimique d'une espèce donnée peut également varier selon la souche considérée. Par exemple, certains triterpènes synthétisés par *G. lucidum* sont spécifiques à certaines souches (Hirotsu *et al.*, 1993). Il est important de mentionner que certaines molécules spécifiques sont retrouvées chez des espèces éloignées phylogénétiquement. C'est le cas du lovastatin, une molécule retrouvée chez *Aspergillus terreus*, *A. bisporus* et *P. ostreatus* (Gundecimerman *et al.*, 1993). Ajoutons en outre qu'au sein d'un carpophore, la composition

chimique peut varier en fonction de la structure (mycélium, pied, chapeau, lamelles) et du stade de croissance considérés. Par exemple, le mycélium d'*A. bisporus* contient 49,8% d'acide linoléique (% d'acides gras totaux), tandis que le carpophore en contient 91,3% (Lösel, 1988). Pour sa part, la souche café d'*A. bisporus* montre un maximum d'acide linoléique et de 1-octèn-3-ol, le composé aromatique le plus important, au stade de croissance intermédiaire (Cruz *et al.*, 1997).

1.4.2. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales telles que la nature du substrat (composition chimique, pH, etc.), la température, la lumière, l'humidité relative peuvent affecter significativement la composition chimique des basidiomycètes. Ces facteurs modifient généralement la concentration d'une molécule déjà présente dans l'organisme fongique². Ainsi, la diminution de la température de croissance augmente le degré d'insaturation des acides gras chez certains basidiomycètes (Lösel, 1988). La teneur en protéines et en fibres chez *Pleurotus sajor-caju* est plus élevée sur un substrat à base de canne à sucre (respectivement, 23,8 et 14,2 % p/p ps) comparativement à un substrat à base de coquilles de noix de Bétel (respectivement, 18,5 et 12,4% p/p ps) (Gupta *et al.*, 2004). En biofermenteur, l'utilisation de lactose favorise la production d'acide ganodérique et de polysaccharides intracellulaires chez *G. lucidum* (Tang & Zhong, 2002). L'irradiation (UV-B et UV-C) post-récolte de carpophores d'*A. bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *V. volvacea* et *L. edodes* peut augmenter significativement leur teneur en provitamine D₂ (Mau *et al.*, 1998).

² Il n'est pas exclu que certaines conditions de croissance favorisent l'apparition d'une molécule dont la concentration était demeurée en deçà du seuil de détection pour une espèce donnée.

1.5. Hypothèses de recherche

Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec autour d'une perspective nutritionnelle et nutraceutique. L'objectif général de ce projet était de caractériser la composition chimique (composés polaires et non polaires) de spécimens de champignons retrouvés au Québec.

Les hypothèses suivantes ont été vérifiées :

- 1) Les champignons basidiomycètes du Québec contiennent de l'éritadénine et du lovastatin, deux composés polaires ayant des propriétés nutraceutiques.
- 2) Les souches québécoises du genre *Ganoderma* contiennent des triterpènes connus chez le genre *Ganoderma* pour leurs diverses propriétés thérapeutiques.
- 3) Les champignons basidiomycètes du Québec présentent différents profils d'acides gras parmi lesquels on retrouve des acides gras polyinsaturés d'intérêt nutraceutique et nutritionnel.
- 4) La température de croissance influence la proportion d'acides gras polyinsaturés chez *P. ostreatus* et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*.
- 5) Les spécimens québécois de *Ganoderma* spp. contiennent des composés (de structure triterpénique) jusqu'ici non rapportés qui sont différents de ceux trouvés chez les souches asiatiques du même genre.

1.6. Objectifs de recherche

Afin de vérifier les hypothèses posées, les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants :

- 1) Évaluer le contenu en éritadénine et lovastatin chez 29 espèces de champignons indigènes du Québec
- 2) Caractériser le contenu en triterpènes de champignons du genre *Ganoderma* récoltés au Québec
- 3) Caractériser le profil d'acides gras de plusieurs espèces de basidiomycètes retrouvées au Québec
- 4) Évaluer l'effet de la température de croissance sur le profil d'acides gras de *P. ostreatus* et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*
- 5) Isoler et caractériser partiellement un ou plusieurs nouveaux composés de structure potentiellement triterpénique chez des spécimens québécois du genre *Ganoderma*

CHAPITRE 2 - RECHERCHE DE COMPOSÉS NUTRACEUTIQUES CHEZ LES CHAMPIGNONS DU QUÉBEC: L'ÉRITADÉNINE ET LE LOVASTATIN

Sommaire

L'éritadénine et le lovastatin sont deux molécules ayant des propriétés hypocholestérolémiantes reconnues. Retrouvés chez différentes espèces de champignons, ces composés confèrent à ces dernières un intérêt particulier. L'objectif de cette étude qui s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec était d'évaluer la présence de ces composés chez 29 espèces de champignons indigènes du Québec. Parmi les espèces de champignons analysées dans le cadre de cette étude, aucune ne contenait le lovastatin ou l'éritadénine. La présence d'éritadénine a néanmoins été mise en évidence chez *L. edodes* produit commercialement.

Résumé

L'éritadénine et le lovastatin, deux molécules possédant une activité hypocholestérolémiant, ont été identifiés chez différentes espèces de macromycètes notamment *Lentinus edodes* (Shiitake), *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, *Trametes versicolor* et *Volvarellia volvacea*. Au Québec, malgré la présence de plus de 1 400 espèces de macromycètes, l'exploitation du potentiel commercial de cette ressource demeure marginale. L'objectif de cette étude qui s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec était d'effectuer le repérage de l'éritadénine et du lovastatin chez 29 espèces de champignons indigènes du Québec appartenant aux familles suivantes: Agaricaceae, Ganodermataceae, Hydangiaceae, Marasmiaceae, Pleurotaceae, Polyporaceae et Tricholomataceae. Les champignons, récoltés dans les régions de Sherbrooke et de l'Abitibi, ont été lyophilisés, homogénéisés, extraits avec du méthanol et analysés par CPG-SM. Parmi les espèces de champignons indigènes du Québec analysées dans le cadre de cette étude, aucune ne contenait les molécules recherchées. La présence d'éritadénine a néanmoins été mise en évidence chez *L. edodes* produit commercialement.

2.1. Introduction

Récemment, un intérêt croissant a été accordé à la recherche investiguant les propriétés médicinales des champignons. De nombreuses études ont montré que diverses espèces de champignons possèdent des propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Mizuno, 1995a). Certaines de ces études, portant sur la recherche d'extraits capables de moduler le métabolisme lipidique humain, ont mené à la découverte de champignons ayant des propriétés hypocholestérolémiantes comme le *Lentinus edodes* (*Shiitake*) (Sugiyama *et al.*, 1995) et *Pleurotus* spp. (pleurote) (Bobek *et al.*, 1996).

L'éritadénine [acide 2(*R*),3(*R*)-dihydroxy-4-(9-adenyl)-butyrique] (Figure 2.1A), isolée chez *L. edodes* (Rokujo *et al.*, 1970; Kamiya *et al.*, 1972), et le lovastatin [2-methylbutanoate de 8-[2-(4-hydroxy-6-oxo-tetrahydropyran-2-yl)ethyl]-3,7-diméthyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]] (Figure 2.1B), rencontré chez *Pleurotus ostreatus* (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993 ; Gunde-Cimerman & Cimerman, 1995), sont les deux molécules responsables de l'activité hypocholestérolémiante de ces champignons.

Le lovastatin a été isolé pour la première fois à partir de champignons microscopiques tel que *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces varioti* et *Pythium ultimum* (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993 ; Gunde-Cimerman & Cimerman, 1995 ; Manzoni & Rollini, 2002) avant d'être identifié chez quelques espèces de macromycètes autres que le pleurote, notamment *Agrocybe aegerita*, *Trametes versicolor* et *Volvariella volvacea* (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). D'un point de vue structural, le lovastatin fait partie de la famille

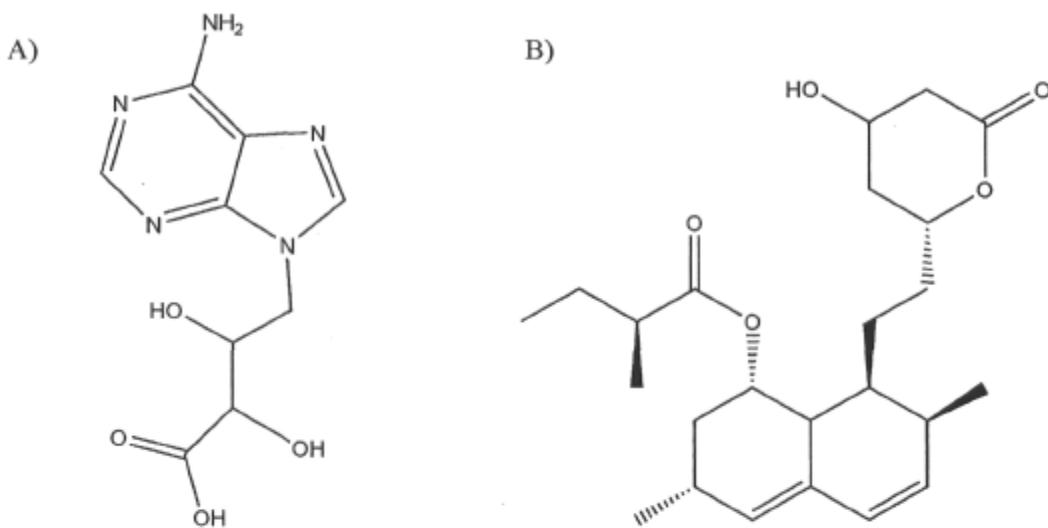


Figure 2.1. Structures moléculaires de l'éritadénine (A) et du lovastatin (B). (Tirées de Vitányi *et al.*, 1998 ; Lindequist *et al.*, 2005)

des statins, qui sont parmi les principales molécules utilisées dans la lutte aux maladies cardiovasculaires au Canada (Otten, 1998).

L'éritadénine, originellement isolée de *L. edodes*, a par la suite été identifiée chez une seule autre espèce de basidiomycète, soit *Agaricus bisporus* (Saito *et al.*, 1975 ; Arakawa *et al.*, 1977). Au contraire du lovastatin, l'éritadénine est plutôt utilisée comme supplément diététique.

L'éritadénine et le lovastatin interfèrent de façon différente dans le métabolisme lipidique humain. Alors que le lovastatin diminue la synthèse du cholestérol dans le foie, en inhibant l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (enzyme-clé de la biosynthèse du cholestérol), l'éritadénine agit plutôt en abaissant la quantité de lipoprotéines sériques ; un effet modulateur pouvant se poursuivre jusqu'à un an après que la supplémentation diététique en éritadénine ait cessée (Manzoni & Rollini, 2002 ; Breene, 1990).

Bien que plus de 1400 espèces de macromycètes soient répertoriées dans les différents écosystèmes québécois (Pomerleau, 1980) et que les conditions environnementales favorisent l'abondance de champignons dans nos forêts, l'exploitation du potentiel commercial de cette ressource est embryonnaire et demeure marginale au Québec. L'objectif de cette étude qui s'inscrit dans un programme de recherche destiné à valoriser la mycoflore du Québec était d'effectuer le repérage de l'éritadénine et du lovastatin chez 29 espèces de champignons indigènes du Québec.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Matériel fongique

Les champignons (Tableau 2.1) ont été récoltés dans les régions de Sherbrooke (45°26' N, 71°42' W) et de l'Abitibi (48°35' N, 78°80' W) (Québec, Canada) au cours de l'été 2001. Les carpophores de *L. edodes* et de *P. ostreatus* frais ont été achetés d'un supermarché local. Chaque échantillon, constitué de 3 à 7 carpophores, a été lyophilisé et homogénéisé avant l'extraction.

2.2.2. Extraction

Chaque échantillon (0,3 g) a été homogénéisé avec du méthanol (3 × 30 mL), passé au vortex jusqu'à suspension du matériel fongique, soumis à l'ultrasonification (3 × 10 minutes), centrifugé (15 minutes, 24°C) et le surnageant a été récolté. Cette extraction a été répétée trois fois sur le même matériel puis les surnageants de chaque échantillon ont été combinés. Un aliquot (2 mL) a été prélevé dans chaque extrait, puis évaporé à sec sous un flux de N₂. Les extractions ont été effectuées en duplicata pour chaque échantillon.

2.2.3. Analyse par CPG-SM

Des dérivés triméthylsilylés ont été préparés en dissolvant les échantillons secs dans le BSTFA [400 µL; N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide; Aldrich, Saint-Louis, MO] suivi d'un chauffage à 90°C pendant 30 minutes. Les dérivés triméthylsilylés ont été injectés sur une colonne capillaire ZB-5 (Phenomenex, Torrance, CA; 5%-phényl

méthylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 µm épaisseur du film) en CPG (HP 6890 Series II, Palo Alto, CA) connecté à un spectromètre de masse (SM) quadrupolaire Agilent (model 5973N, Palo Alto, CA), en mode d'ionisation électronique à 70eV, avec le logiciel HP ChemStation (Palo Alto, CA). L'injecteur, en mode de non-partage, était maintenu à 250°C. Le programme de température suivant a été appliqué : une température initiale de 80°C a été maintenue pendant une minute, augmentée à 220°C au taux de 20°C · min⁻¹, à 250°C au taux de 2°C · min⁻¹, puis à 300°C au taux de 20°C · min⁻¹, et finalement maintenue à 300°C pendant 3 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit constant de 1 mL · min⁻¹. Les masses de 50 à 600 *m/z* étaient détectées. Les analyses ont été faites en duplicata.

L'éritadénine a été identifiée par comparaison avec un spectre de masse publié par Vitányi *et al.* (1998) (Figure 2.2). Le lovastatin a été identifié par comparaison avec le spectre de masse d'un dérivé triméthylsilylé d'un standard commercial de lovastatin (Sigma, Saint-Louis, MO) dont le spectre de masse est présenté à la figure 2.3.

2.3. Résultats et discussion

L'éritadénine a été identifiée chez les spécimens commerciaux de *L. edodes* à l'aide du spectre de masse du dérivé triméthylsilylé publié par Vitányi *et al.* (1998) (Figure 2.2). Le spectre de masse du dérivé triméthylsilylé de l'éritadénine obtenu lors des essais est présenté à la figure 2.4. Ce spectre de masse a été utilisé comme contrôle positif lors de l'évaluation du contenu en éritadénine des champignons du Québec à l'étude. Bien qu'on aurait pu

s'attendre à détecter l'éritadénine chez *Lentinus lepideus* et chez les espèces d'*Agaricus* analysées (*A. bernardii*, *A. arvensis*, *A. bitorquis*, *A. campestris*), ce composé ayant précédemment été identifié chez des espèces du même genre telles que *Lentinus edodes* (Rokujo *et al.*, 1970 ; Kamiya *et al.*, 1972) et *Agaricus bisporus* (Saito *et al.*, 1975 ; Arakawa *et al.*, 1977), aucune trace de ce composé n'a été détectée chez les champignons indigènes testés (Tableau 2.1). Néanmoins, l'éritadénine a été détectée chez les carpophores commerciaux de *L. edodes*, ce qui est en accord avec des données antérieurement publiées (Rokujo *et al.*, 1970 ; Kamiya *et al.*, 1972).

Contrairement aux spécimens de *L. edodes* qui contenaient de l'éritadénine, les spécimens commerciaux de *P. ostreatus* ne contenaient pas de lovastatin (Tableau 2.1), ils n'ont donc pu servir de contrôle pour la mise au point de la méthode d'extraction. Afin de confirmer la validité de la méthode utilisée, le standard commercial de lovastatin (3 mg) a été utilisé comme standard interne dans un échantillon de *L. edodes*. Parmi les 29 espèces de champignons indigènes du Québec analysées dans le cadre de cette étude, aucune n'a montré la présence de lovastatin (Tableau 2.1). En outre, le lovastatin n'a pas été détecté chez *P. ostreatus* et *P. sapidus*, alors que certaines études avaient rapporté la présence de cette molécule chez ces espèces (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). Il semble toutefois que certains facteurs tels que les conditions environnementales et la maturité du carpophore affectent la présence du lovastatin chez *P. ostreatus* (Gunde-Cimerman & Cimerman, 1995 ; Alarcon *et al.*, 2003). On ne peut également exclure la possibilité que ce composé ne soit présent que chez certaines souches de *P. ostreatus* et *P. sapidus*.

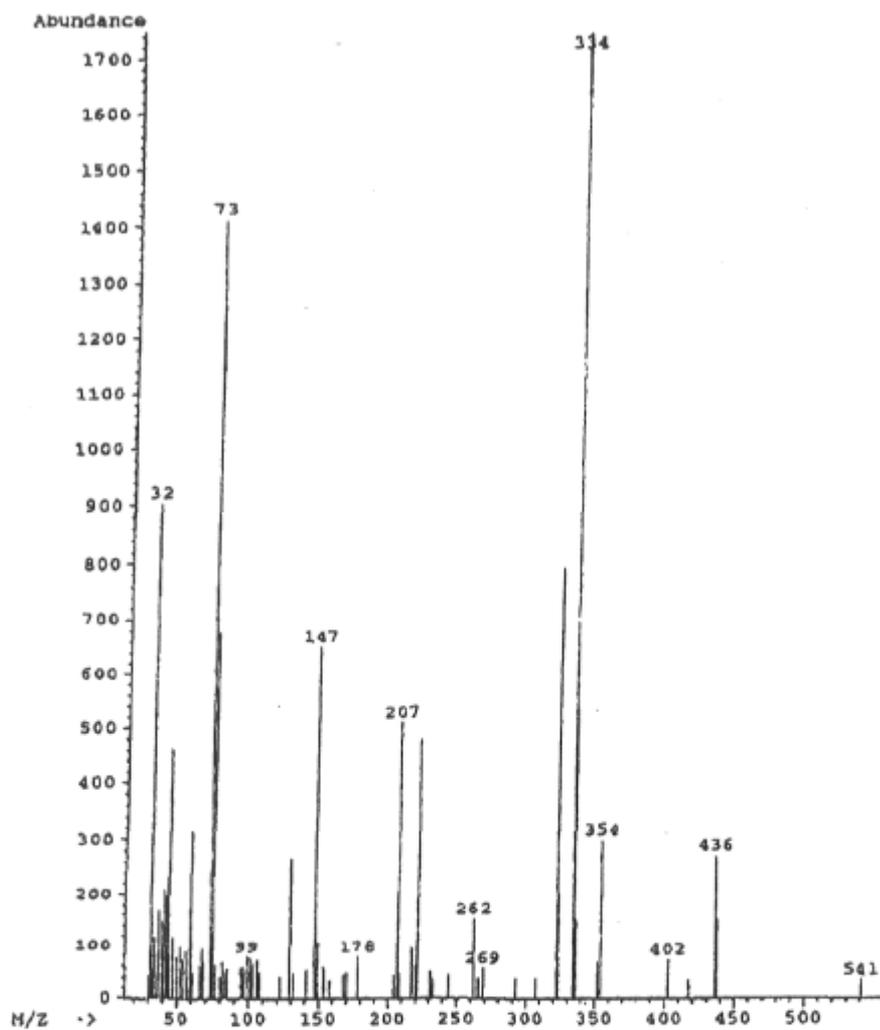


Figure 2.2. Spectre de masse du dérivé triméthylsilylé de l'éritanénine publié par Vitányi *et al.* (1998).

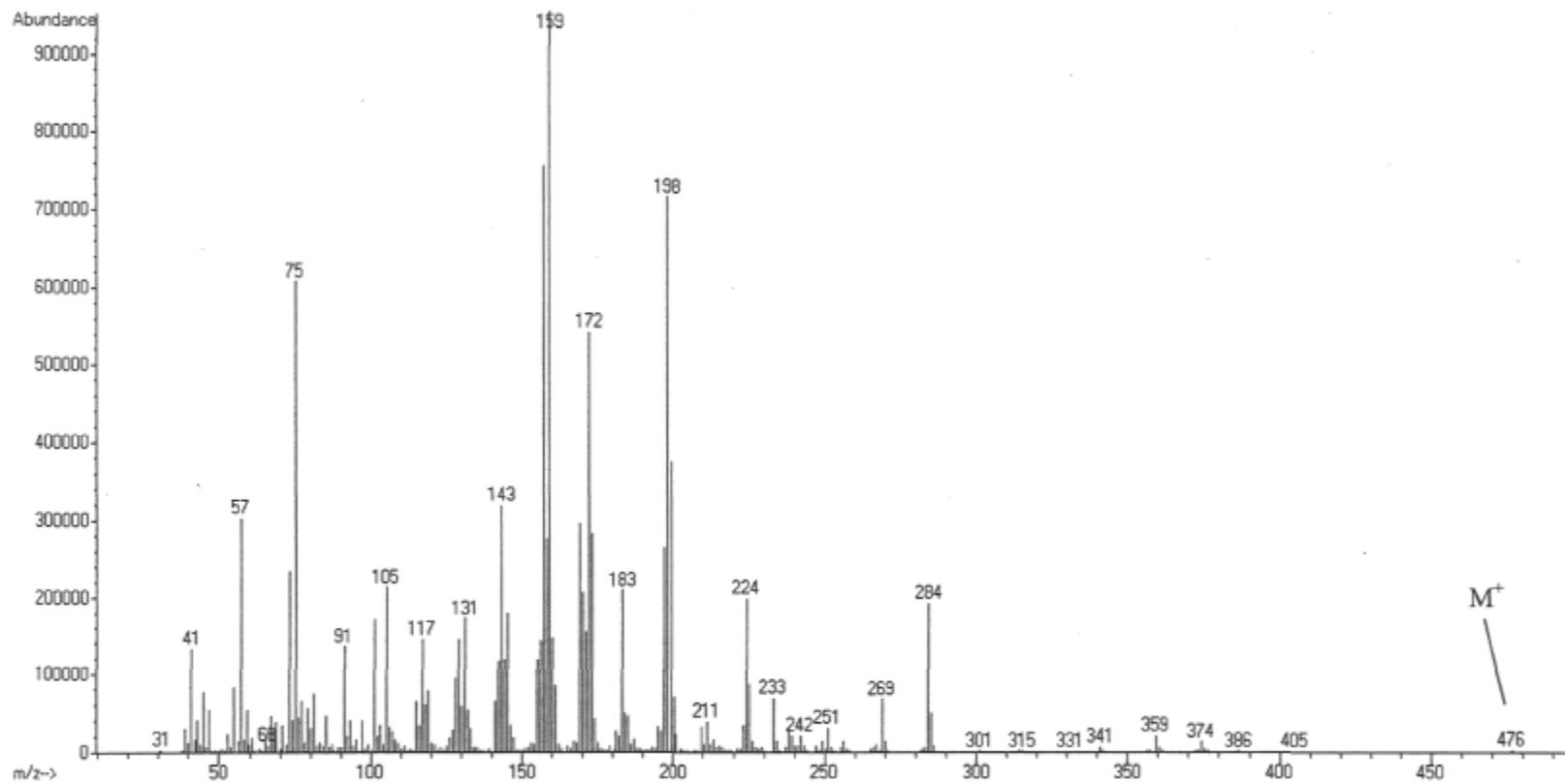


Figure 2.3. Spectre de masse d'un dérivé triméthylsilylé d'un standard de lovastatin analysé en CPG-SM (70 eV).

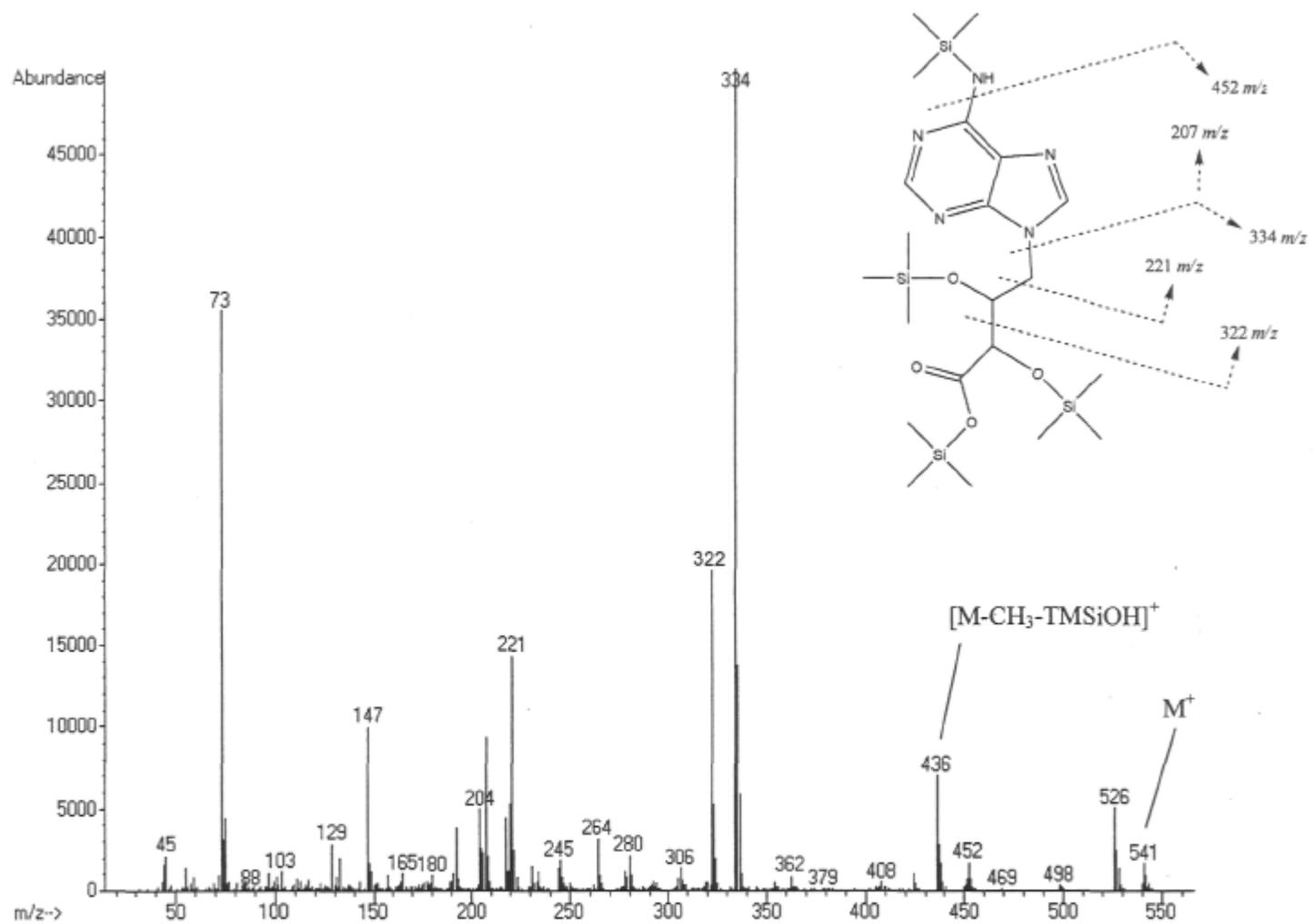


Figure 2.4. Spectre de masse et schéma de fragmentation d'un dérivé triméthylsilylé de l'éritadénine tiré d'une analyse en CPG-SM (70 eV) d'un extrait méthanolique de *Lentinus edodes*.

Tableau 2.1. Présence (+) ou absence (-) de lovastatin et d'éritadénine chez *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* et 29 espèces de champignons indigènes du Québec récoltées dans les régions de Sherbrooke et de l'Abitibi

Famille	Espèce	Lovastatin	Éritadénine
Agaricaceae	<i>Agaricus bernardii</i>	-	-
	<i>Agaricus arvensis</i>	-	-
	<i>Agaricus bitorquis</i>	-	-
	<i>Agaricus campestris</i>	-	-
	<i>Lentinus edodes</i> ¹	-	+
	<i>Lentinus lepideus</i>	-	-
	<i>Lepiota americana</i>	-	-
	<i>Lepiota naucina</i>	-	-
Ganodermataceae	<i>Ganoderma lucidum</i>	-	-
Hydnangiaceae	<i>Laccaria ochropurpurea</i>	-	-
Marasmiaceae	<i>Armillaria ostoyae</i>	-	-
	<i>Marasmius oreades</i>	-	-
	<i>Oudemansiella radicata</i>	-	-
Pleurotaceae	<i>Pleurotus ostreatus</i> ¹	-	-
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-
	<i>Pleurotus sapidus</i>	-	-
	<i>Pleurotus tessulatus</i>	-	-
Polyporaceae	<i>Lenzites betulina</i>	-	-
	<i>Polyporus radicans</i>	-	-
	<i>Polyporus squamosus</i>	-	-
	<i>Pycnoporus cinnabari</i>	-	-
	<i>Trametes suaveolens</i>	-	-
	<i>Tyromyces chioneus</i>	-	-
Tricholomataceae	<i>Collybia dryophyla</i>	-	-
	<i>Lepista sordida</i>	-	-
	<i>Panellus serotinus</i>	-	-
	<i>Panellus stipticus</i>	-	-
	<i>Phyllotopsis nidulans</i>	-	-
	<i>Tricholoma flavovirens</i>	-	-
	<i>Tricholoma vaccinum</i>	-	-
	<i>Tricholomopsis platyphylla</i>	-	-

¹ Champignons produits commercialement obtenus d'un supermarché local.

2.4. Références

Alarcon, J., Aguila, S., Arancibia-Avila, P., Fuentes, O., Zamorano-Ponce, E., Hernandez, M. (2003) Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 58: 62-64.

Arakawa, N., Mukohyama, H., Nakai, M., Nakajima, K., Tanabe, O., Inagaki, C. (1977) Separation of hypocholesterolaemic substance from *Flammulina velutipes*. *Journal of the Japanese Society of Food & Nutrition*, 30: 35-38.

Bobek, P., Ozdín, L., Kuniak, L. (1996) Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. *Nahrung*, 40: 22-224.

Breene, W.M. (1990) Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53: 883-894.

Gunde-Cimerman, N. & Cimerman, A. (1995) *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*, 19: 1-6.

Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., Benicki, N. (1993) Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Letters*, 111: 203-206.

Kamiya, T., Saito, Y., Hashimoto, M., Seki, H. (1972) Hypocholesterolemic alkaloids of *Lentinus edodes*. Structure and synthesis of eritadenine. *Tetrahedron*, 28: 899-906.

Manzoni, M. & Rollini, M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 555-564.

Mizuno, T. (1995a) Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi, Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food ad Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 7-21.

Otten, N. (1998) A Canadian perspective. *Value Health*, 1: 218-23.

Pomerleau, R. (1980) *La Flore des Champignons du Québec*. Éditions La Presse, Montréal.

Rokujo, T., Kikuchi, H., Tensho, A., Tsukitani, Y., Takenawa, T., Yoshida, K., Kamiya, T. (1970) Lentysine: A new hypolipidemic agent from a mushroom. *Life Sciences*, 9: 379-385.

Saito, M., Yamashita, T., Kaneda, T. (1975) Quantitative analysis of eritadenine in *Shiitake* mushroom and other edible fungi. *Journal of the Japanese Society of Food & Nutrition*, 28: 503-505.

Sugiyama, K., Akachi, T., Yamakawa, A. (1995) Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6: 80-87.

Vitányi, G., Lelik, L., Bihátsi-Karsai, E., Lefler, J., Nagy-Gasztonyi, M., Vereczkey, G. (1998) Detection of eritadenine in extracts from *Shiitake* mushroom by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12: 120-122.

CHAPITRE 3 - FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS FROM MUSHROOMS BELONGING TO THE FAMILY BOLETACEAE

Sommaire

Les travaux présentés au chapitre 2 avaient pour objectif de déterminer la présence de deux molécules bioactives (propriétés hypocholestérolémiantes) d'origine fongique, à savoir le lovastatin et l'éritadénine, chez différentes espèces de champignons indigènes du Québec. Les travaux du présent chapitre se sont intéressés pour leur part aux lipides fongiques, dont l'intérêt n'a cessé de croître au cours des dernières années. De façon plus spécifique, cette étude visait la caractérisation des lipides non polaires de 11 espèces de macromycètes appartenant à la famille des Boletaceae. Les résultats ont montré que le contenu en lipides non polaires des spécimens analysés variait de 2.0 (*Leccinum aurantiacum* et *Boletus erythropus*) à 5,4% p/p ps (*Boletus grevillei*). La caractérisation des profils d'acides gras a permis de trouver plus de 25 acides gras différents chez les espèces étudiées, principalement des acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide oléique. Quelques acides gras, tels que l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque et l'acide 7-*cis*,10-*cis* hexadécadiénoïque, sont rapportés pour la première fois chez les Boletaceae et chez les basidiomycètes, tandis que l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque (un acide gras cyclopropanoïque) est rapporté pour la première fois chez les mycètes. Enfin, des différences significatives ($P < 0.05$) ont été observées entre les profils d'acides gras des espèces analysées.

Résumé

Cette étude visait la caractérisation des lipides non polaires de 11 espèces de macromycètes appartenant à la famille des Boletaceae. Le contenu en lipides non polaires trouvés chez les espèces étudiées variait de 2,0 (*Leccinum aurantiacum* et *Boletus erythropus*) à 5,4% p/p PS (*Boletus grevillei*), pour une moyenne de 2,9% p/p PS. La caractérisation du contenu en acides gras a permis de trouver plus de 25 acides gras différents chez les espèces étudiées, principalement des acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide oléique, qui constituaient en moyenne 83% des acides gras totaux trouvés chez les bolets étudiés. L'acide palmitique était le principal acide gras saturé chez les espèces analysées. Quelques acides gras identifiés chez les espèces analysées, tels que l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque et l'acide 7-*cis*,10-*cis* hexadécadiénoïque, sont rapportés pour la première fois chez les Boletaceae et chez les basidiomycètes. De plus, l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque, un acide gras cyclopropanoïque, est rapporté pour la première fois chez les mycètes. Enfin, des différences significatives ($P < 0.05$) ont été observées entre les profils d'acides gras des espèces analysées.

Abstract

The non-polar lipid content and fatty acid (FA) composition of 11 mushroom species of the family Boletaceae were determined. The non-polar lipid content ranged from 2.0 (*Leccinum aurantiacum* and *Boletus erythropus*) to 5.4% wt/wt DW (*Suillus grevillei*) with an average value of 2.9%. More than twenty-five different FAs were found in the mushroom lipids. Unsaturated FAs, mainly linoleic and oleic acids, accounted for about 83% of the total FAs, while palmitic acid was the main saturated FA. Some FAs are identified for the first time in Boletaceae and in higher Basidiomycetes (*cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid, 7-*cis*,10-*cis* hexadecadienoic) or in fungi (*cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid). There were significant differences ($P < 0.05$) in the contents of specific FAs between mushroom species.

3.1. Introduction

Mushroom consumption has been on the rise in North America over the past several decades; factors such as immigration trends and changes in population tastes and preferences may contribute for this growth (Lucier *et al.*, 2003). Although button mushrooms (*Agaricus* spp.) are still the most consumed, specialty mushrooms such as Shiitake (*Lentinula edodes*), Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), and wild edible species are gaining in popularity (Chang & Miles, 2004). Boletes, which belong to the family Boletaceae (phylum Basidiomycota), can be readily recognized by their distinctive shape. They are frequently harvested for human consumption and are among the most popular wild edible mushrooms in both Europe and North America. More than 70 species of Boletaceae are indigenous to Eastern Canada, including *Boletus edulis*, a species particularly sought for its exceptional taste, giving this mushroom an excellent gastronomic value (Pomerleau, 1980).

Edible mushrooms form a low-calorie food rich in proteins (19-35 % DW), vitamins and minerals, especially potassium and phosphorus (Leon-Guzman *et al.*, 1997, Chang & Miles, 2004). Edible mushrooms, including the most cultivated species *Agaricus bisporus* and *L. edodes* (belonging to the phylum Basidiomycota), show a high proportion of unsaturated fatty acids (FAs) (Chang & Miles, 2004). Although mushrooms reveal highly variable FA profiles, palmitic (16:0), oleic (18:1 Δ^9c) and linoleic (18:2 $\Delta^9c, 12c$) acids are the main FAs found in members of the Basidiomycetes (Weete, 1974).

Interest in lipids, especially in FA composition, is currently expanding. Such data are used for physiological, chemotaxonomic and intrageneric differentiation studies of many organisms such as bacteria, algae, fungi, and higher plants (Erwin, 1973, Stahl & Klug, 1996, Dimou *et al.*, 2002, Wolff *et al.*, 2002, Bagci *et al.*, 2003). From the standpoint of human nutrition, linoleic and α -linolenic (18:3 $\Delta^9c,12c,15c$) acids are essential for basal metabolism while long-chain polyunsaturated FAs have many beneficial effects on human health (Parikh *et al.*, 2005). In this respect, knowledge of FA content in edible mushrooms is of interest.

Considering the interest for wild mushrooms for human consumption and the lack of data with regard to mushroom FAs, the objective of this study was to characterise the FA profiles of different mushrooms from Eastern Canada belonging to the family Boletaceae.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Organisms

Mushrooms belonging to different species of the family Boletaceae (Table 3.1) were harvested in the Sherbrooke (45°26' N, 71°42' W) and Abitibi (48°35' N, 78°80' W) areas of the Province of Québec (Canada) during the summer of 2001. Samples of fruit bodies (3-7 mushrooms for each species) were homogenized and lyophilized.

3.2.2. Lipid extraction

Samples (1 g) were extracted with hexane as the extraction solvent using a Soxhlet apparatus. Extracts were dried over anhydrous sodium sulphate, filtered, and concentrated (≤ 30 °C) in a rotary evaporator under vacuum.

3.2.3. Fatty acid analysis

Lipid samples in hexane (500 μL) were methylated in sealed tubes with Borontrifluoride 14 % in methanol ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$) (500 μl ; Aldrich, St. Louis, MO) at 80 °C for 1 h with occasional stirring. The hexane layer was withdrawn, washed with water, dried over anhydrous sodium sulphate and kept at -35°C until analysis. Fatty acid methyl ester (FAME) samples (1.0 μL) in hexane were analysed by gas chromatography on a Hewlett-Packard 6890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) gas chromatograph (GC), connected to a computer with a Hewlett-Packard Chemstation software. An open tubular DB-225 capillary column (50 %-cyanopropylphenyl-dimethylpolysiloxane, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.75 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA) with a split ratio of 1:25 was used for analyses. The injector and flame ionisation detector (FID) temperatures were maintained at 215 °C and 230 °C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 35 °C to 180 °C at a rate of 20 °C/min, held for 3 min, increased to 200 °C at a rate of 3 °C/min and held for 13 min. Helium was used as the carrier gas under constant flow (0.7 ml/min). FAME standards (Glc-60, Glc-76 and Glc-502; Nu-Chek-Prep, Elysian, MN) were used for confirmation of retention times. FAME were also analysed by GC-MS, on a Hewlett-Packard 6890 Series II (Hewlett-Packard), attached to a selective quadrupole mass

detector (model 5973N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and connected to a computer with Hewlett-Packard Chemstation software, under similar conditions, with helium as carrier gas and electronic impact (EI) set at 70 eV. All analyses were performed in duplicate.

3.2.4. Picolinyl ester analysis

Picolinyl ester derivatives were prepared from FAME according to the procedure of Destailats & Angers (2002). GC-MS analyses were performed on the same apparatus as above. Samples (1.0 μ l) in CH_2Cl_2 were injected on an open tubular BPX-70 capillary column (70 % cyanopropyl polysilphenylene-siloxane, 60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness; SGE, Austin, TX) in splitless mode. The injector temperature was maintained at 250 $^\circ\text{C}$ while the oven temperature was programmed as follows: 60 $^\circ\text{C}$ to 180 $^\circ\text{C}$ at a rate of 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$, held for 3 min, increased to 230 $^\circ\text{C}$ at a rate of 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ and held for 13 min, increased to 250 $^\circ\text{C}$ at a rate of 2 $^\circ\text{C}/\text{min}$, held at 250 $^\circ\text{C}$ for 20 min. Helium was used as the carrier gas under constant flow (1.4 ml/min). Interpretation of mass spectra was performed according to published guidelines (Christie, 1998). Analyses were performed in duplicate.

3.2.5. Statistical analyses

Analysis of variance was carried out with the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC) according to a completely randomised design with 2-4 replicates. Each sample was considered as an experimental unit. When significant ($P < 0.05$) means were compared using Least square (LS) means analysis.

3.3. Results and discussion

Lipid content generally shows marked variations among species belonging to the phylum Basidiomycota (Weete, 1974; Miric *et al.*, 1985). In this study, non-polar lipid contents of the 11 species of Boletaceae ranged from 2.0 (*Leccinum aurantiacum*, *Boletus erythropus*) to 5.4% (w/w) dw (*Suillus grevillei*) with an average of 2.9% (Table 3.1). This is in agreement with previous studies showing that non-polar lipid content in different species of mushrooms of the Basidiomycetes ranges from 1.4 to 12.6% (w/w) dw (Kostelc & Hendry, 1981; Sherief *et al.*, 1993).

Analysis of FA profiles show that linoleic, oleic and to a lesser extent palmitic (16:0) acids were the main FAs found in the species examined, accounting for 84.6% (*B. piperatus*) to 95.5% (*Tylopilus felleus*) of total FAs. Unsaturated FAs accounted for an average of 83.3% of total FAs resulting in ratios of unsaturated:saturated FAs (U:S) ranging from 3.5 (*B. subtomentosus*; *L. aurantiacum*) to 7.6 (*B. piperatus*) (Table 3.2). This is in agreement with previous published data that showed high proportions of unsaturated FAs in many species of higher Basidiomycetes belonging to the families Agaricaceae, Amanitaceae, Coprinaceae, and Tricholomataceae (Miric *et al.*, 1985; León-Guzmán *et al.*, 1997; Diez & Alvarez, 2001).

Thirty FAs were found in the Boletaceae species analysed (Table 3.2). Of the sixteen saturated FAs reported, six are reported for the first time in Boletaceae (C₆ to C₁₁ and C₁₃). Other saturated FA were previously found in Boletaceae and in many Basidiomycetes species such as *Suillus luteus* (C₁₂ and C₁₄ to C₂₈), *Agaricus campestris*, *Corticium solani*,

and *Collybia* sp. (C₁₀ – C₁₄ and C₁₆ – C₁₈), *Agaricus silvicola* (C₆, C₈, C₉), and *Fomes igniarius* (C₁₅, C₁₇, C₂₀, C₂₂, C₂₄) (Weete, 1974; Abdullah *et al.*, 1994; Rezanka *et al.*, 1999). Uneven chain FAs (C₉ to C₁₉) were also present in the Boletaceae species analysed. While C₁₅, C₁₇ and C₁₉ have been previously reported in *Suillus* sp. (Müller *et al.*, 1994; Rezanka *et al.*, 1999), C₉, C₁₁ and C₁₃ FAs are reported for the first time in this mushroom family. However, longer uneven chain FAs such as C₂₁ and C₂₅ were not detected in our samples but were previously found in *S. luteus* (Rezanka *et al.*, 1999).

Many monounsaturated FAs found in our samples have previously been reported both in Boletaceae and other Basidiomycetes. For example, 17:1 Δ 9c, 16:1 Δ 7c, 16:1 Δ 9c, 20:1 Δ 11c, 22:1 Δ 13c were found in *S. luteus*, *Pleurotus* sp., *Suillus variegatus*, *Termitomyces mammiformis*, and *Rhizoctonia* spp., respectively (Müller *et al.*, 1994; Rezanka *et al.*, 1999; Dimou *et al.*, 2002; Kansci *et al.*, 2003). Although isomers 9-*cis* and 11-*cis* of docosenoic acid (22:1) and tetracosenoic acid (24:1) were previously reported in *S. luteus* (Rezanka *et al.*, 1999), isomers 22:1 Δ 13c and 24:1 Δ 15c are reported for the first time in Boletaceae species. Previous work reported the presence of unspecified isomers of hexadecenoic (16:1), heptadecenoic (17:1) and eicosenoic (20:1) acids in some Basidiomycetes (Weete, 1974; Proštenik *et al.*, 1978). The 11-*cis* isomer of octadecenoic acid (18:1) was previously found in *S. luteus* (Rezanka *et al.*, 1999).

In most species analysed, over 40% of total FA was comprised of polyunsaturated FAs, including linoleic acid (18:2 Δ 9c,12c) and α -linolenic acid (18:3 Δ 9c,12c,15c). The latter, a ω ₃ FA known for its nutraceutical properties (Parikh *et al.*, 2005), was detected in all species analyzed but in low amounts when compared to linoleic acid. GC-MS analyses of

FA picolinyl esters allowed identification of two isomers of hexadecadienoic acid (16:2): 16:2 $\Delta 7c,10c$ and 16:2 $\Delta 9c,12c$. Both were slightly more abundant in *B. piperatus* and *L. aurantiacum* than in other species (Table 3.2). Although the 9-*cis*,12-*cis* isomer of hexadecadienoic acid (16:2) has been previously reported in *S. luteus* (Rezanka *et al.*, 1999), the 7-*cis*,10-*cis* isomer had not been previously found in Boletaceae, nor in Basidiomycetes. However, unspecified isomers of hexadecadienoic acid (16:2) had previously been reported in the Basidiomycetes *Exobasidium vexans* (Weete 1974), *Tricholoma terreum*, *Armillaria mellea*, *Hypholoma sublateritium*, *Polyporus ramosissimus*, and *Hydnum rufescens* (Proštenik *et al.*, 1978). 7,10-Hexadecadienoic acid (16:2 (n-6)) is a minor constituent of some seed and fish oils, and plant leaves, whereas 9,12-hexadecadienoic acid (16:2 (n-4)) has been reported in marine microorganisms, and is a biosynthetic precursor of n-4 FAs (Christie, 2005). The 11-*cis*,14-*cis* isomer of eicosadienoic acid (20:2) was also reported in *S. luteus* (Rezanka *et al.*, 1999). This FA ranged between 0.06 (*Tylopilus felleus*) and 0.50% (*B. subtomentosus*) of total FAs in the Boletaceae species analysed. As in the case of hexadecadienoic acid (16:2), unspecified eicosadienoic acid (20:2) isomers have previously been reported in *Trametes versicolor* and in some lower fungal species (Stahl & Klug, 1996; Da Silva *et al.*, 1998).

cis-11,12-Methyleneoctadecanoic acid, a cyclopropanoic acid generally occurring in bacteria (Christie, 1970) was identified. Mass spectrum of picolinyl ester derivation of this FA (Figure 3.1) shows a typical ion fragmentation pattern of saturated cyclopropyl FA structure (ion fragments at $m/z = 386, 372, 358, 344, 330, 316, 302, 288, 275, 246, 220,$ and 194). The diagnostic ion at 275 m/z and the molecular ion at $m/z = 385$, in agreement with

literature data (Christie, 1998), and confirmed the identity of this FA. *cis*-11,12-Methyleneoctadecanoic acid is also found in the seed oil of *Byrsocarpus coccineus* (Connaraceae) along with a large proportion of its biosynthetic precursor, *cis*-11-octadecenoic acid (Badami & Patil, 1981). While 11-octadecenoic acid was shown to be present in nearly all boletaceae species analysed, the presence of *cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid was atypical and was not correlated with an higher proportion of 11-octadecenoic acid.

There are differences between mushrooms in the levels of major and minor FAs (Table 3.2). With respect to the most abundant FAs, *Boletus variipes* has a significantly higher proportion of oleic acid (18:1 Δ 9c) than *B. erythropus*, *L. aurantiacum* and *T. felleus*. Significantly higher proportions of linoleic acid (18:2 Δ 9c,12c) were observed in *B. erythropus* when compared with *B. edulis*, *S. grevillei*, *B. piperatus*, *B. subglabripes*, *B. subtomentosus*, *B. variipes*, *L. aurantiacum*, *L. scabrum* and *Suillus granulatus*. The highest proportions of palmitic acid (16:0) were found in *T. felleus*, *L. aurantiacum*, *B. subtomentosus* when compared to *B. edulis*, *S. grevillei*, *B. piperatus* and *B. variipes*. Significant differences were also observed among the mushrooms with respect to minor FAs (Table 3.2). This may suggest that a particular mushroom species may intrinsically display a higher proportion of a specific FA when compared to another species but considering that FA composition of eukaryotic microorganisms, including fungi, is extremely flexible and often highly modified in response to environmental conditions such as pH, media composition, temperature, and growth stage (Erwin, 1973), further investigations are needed in order to confirm this hypothesis.

This study allowed identification of over 25 different FAs in the mushrooms species analysed; linoleic, oleic, and palmitic acids were the main FAs, representing 84.6-95.6% of total FAs. Unsaturated FAs accounted for an average of 83.3% of total FAs and largely predominated over saturated ones in all species. Among the FAs detected, some are reported for the first time in Boletaceae or in Basidiomycetes, and *cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid is reported for the first time in fungi.

3.4. Acknowledgments

This study was supported by Conseil de Recherche en Agriculture, Pêche et Alimentation du Québec (CORPAQ). We thank Maurice Thibault for collecting the wild mushrooms and Dr Carole Martinez, Claude Gosselin, Cam Chi Ngo Duy and Véronique Scott for technical assistance.

Table 3.1. Non-polar lipid content of mushrooms of the family Boletaceae

Mushroom	Non-polar lipid content [% (w/w) dw] ^a
<i>Boletus edulis</i>	2.6 ± 0.9
<i>B. erythropus</i>	2.0 ± 0.7
<i>B. piperatus</i>	2.5 ± 0.4
<i>B. subglabripes</i>	3.3 ± 0.005
<i>B. subtomentosus</i>	2.2 ± 0.008
<i>B. variipes</i>	3.1 ± 0.5
<i>Leccinum aurantiacum</i>	2.0 ± 1.2
<i>L. scabrum</i>	3.1 ± 0.3
<i>Suillus granulatus</i>	3.2 ± 2.1
<i>S. grevillei</i>	5.4 ± 0.9
<i>Tylopilus felleus</i>	2.4 ± 0.3

^a Each value represents the mean of three replicates ± standard error.

Table 3.2. Fatty acid profiles of 11 mushroom species of the family Boletaceae

FA	Species										
	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus erythropus</i>	<i>Suillus grevillei</i>	<i>Boletus piperatus</i>	<i>Boletus subglabripes</i>	<i>Boletus subtomentosus</i>	<i>Boletus varipes</i>	<i>Leccinum aurantiacum</i>	<i>Leccinum scabrum</i>	<i>Suillus granulatus</i>	<i>Tylopilus feliteus</i>
6:0*	0.07 ab ^a	0.03 ab	0.05 ab	0.02 ab	0.12 b	0.03 ab	0.02 ab	0.09 ab	0.02 a	0.01 a	0.01 a
8:0*	0.06 ab	0.03 ab	0.03 ab	0.04 ab	0.07 b	0.04 ab	0.02 ab	0.04 ab	0.01 a	0.01 a	0.01 a
9:0*	0.07 ab	0.03 ab	0.03 ab	0.03 ab	0.11 b	0.03 ab	0.03 ab	0.04 ab	0.02 a	0.02 a	0.02 ab
10:0*	0.07 abc	0.03 abc	0.03 abc	0.13 c	0.12 bc	0.05 abc	0.04 abc	0.03 abc	0.02 ab	0.01 ab	0.01 a
11:0*	0.05 ab	0.01 ab	0.05 ab	- ^b	0.08 b	0.02 ab	0.03 ab	0.03 ab	0.01 a	-	-
12:0	0.10 ab	0.05 ab	0.04 ab	0.22 b	0.15 ab	0.16 ab	0.13 ab	0.08 ab	0.03 a	0.03 a	0.03 a
13:0*	0.06 ab	0.03 ab	0.02 ab	0.01 a	0.06 b	0.03 ab	0.03 ab	0.04 ab	0.02 ab	0.01 a	0.02 ab
14:0	0.18 a	0.29 ab	0.18 a	0.68 c	0.35 abc	0.42 abc	0.21 abc	0.65 c	0.53 bc	0.21 a	0.15 a
15:0	0.23 a	1.10 bc	0.66 abc	0.48 abc	0.54 abc	1.10 abc	0.11 ab	2.53 d	1.35 c	0.85 abc	0.57 abc
16:0	9.84 ab	11.2 abc	8.90 ab	7.37 a	12.6 bcde	16.3 cde	7.62 ab	16.5 e	13.8 cde	12.0 bcd	16.0 de
16:1 ^c	2.08 bc	1.74 abc	1.01 abc	2.34 c	1.19 abc	1.83 abc	0.88 abc	2.01 abc	1.17 abc	0.72 ab	0.44 a
16:2 ^{d*†}	0.20 ab	0.35 bcd	0.11 a	0.53 e	0.24 ab	0.20 abc	0.10 ab	0.53 de	0.44 cde	0.15 a	0.12 a
17:0	0.31 ab	0.08 a	0.17 ab	0.18 ab	0.30 b	0.42 b	0.17 ab	0.12 ab	0.11 ab	0.12 ab	0.11 ab
17:1 Δ9	0.14 ab	0.16 ab	0.12 ab	0.17 ab	0.12 ab	0.14 ab	0.12 ab	0.21 b	0.17 ab	0.12 ab	0.10 a
18:0	2.72 bc	1.29 a	1.49 ab	1.78 abc	2.97 c	1.68 abc	2.72 abc	0.90 a	1.11 a	3.25 c	1.72 ab
18:1 Δ9c	36.1 cd	18.0 a	43.9 d	29.8 bcd	35.0 cd	31.7 abcd	49.2 d	21.1 ab	37.8 cd	34.2 bcd	25.2 abc
18:1 Δ11	2.2 c	0.74 ab	0.81 ab	7.29 d	1.0 b	0.06 ab	2.41 c	-	0.10 a	0.13 ab	0.26 ab
18:2 Δ9c,12c	42.2 abc	63.0 f	40.1 ab	47.4 cde	42.2 abc	42.2 abcd	34.2 a	52.9 de	42.3 abc	46.6 bcde	54.4 ef
18:3 Δ9c,12c,15c	0.17 a	0.20 a	0.63 b	0.25 a	0.27 a	0.29 a	0.05 a	0.16 a	0.13 a	0.22 a	0.08 a
18:0 11,12-methylene* [†]	0.47 d	-	0.22 bc	0.05 a	0.11 ab	0.10 ab	0.38 cd	-	-	-	-
19:0	0.12 a	0.09 a	0.16 a	0.05 a	0.22 a	0.74 b	0.09 a	0.20 a	0.12 a	0.11 a	0.17 a
20:0	0.34 cd	0.10 a	0.18 ab	0.25 bcd	0.39 d	0.30 bcd	0.42 d	0.13 ab	0.13 ab	0.24 bc	0.15 ab
20:1 Δ11c	0.68 e	0.25 bc	0.21 abc	0.31 cde	0.37 cd	0.17 abc	0.75 de	0.19 abc	0.07 a	0.22 abc	0.08 ab
20:2 Δ11c,14c	0.45 b	0.22 ab	0.16 ab	0.13 ab	0.40 b	0.50 ab	0.07 ab	0.18 ab	0.19 ab	0.15 ab	0.06 a
22:0	0.54 c	0.25 abc	0.21 abc	0.23 abc	0.46 bc	0.21 abc	0.08 abc	0.25 abc	0.15 ab	0.21 abc	0.09 a
22:1 Δ13c*	0.21 ab	0.30 b	0.26 ab	0.08 ab	0.23 ab	0.25 ab	0.10 ab	0.22 ab	0.07 a	0.22 ab	0.07 ab
24:0	0.24 a	0.30 a	0.16 a	0.11 a	0.17 a	0.75 b	0.04 a	0.36 ab	0.08 a	0.15 a	0.11 a
24:1 Δ15c*	0.15 ab	0.06 a	0.10 ab	0.08 ab	0.15 ab	0.23 ab	0.04 a	0.25 b	0.06 ab	0.08 ab	0.07 ab
Total short chains ^e	0.53 ab	0.26 ab	0.29 ab	0.49 ab	0.77 b	0.42 ab	0.32 ab	0.43 ab	0.13 a	0.11 a	0.12 a
Odd-numbered chains	0.98 a	1.51 ab	1.17 ab	0.97 ab	1.43 ab	2.47 bc	0.57 a	3.17 c	1.80 ab	1.23 ab	0.99 ab
Total polyunsaturated	43.8 abc	64.2 e	41.9 ab	52.1 cd	43.6 abc	43.2 abcd	35.2 d	53.7 d	43.1 abc	47.1 bcd	54.8 d
Total unsaturated	84.5 bcde	85.0 cde	87.4 de	88.4 e	81.2 abc	77.6 ab	87.8 de	77.8 a	82.5 abcd	82.8 abcd	80.8 abc
Ratio U:S ^f	5.6 abc	5.7 abc	7.1 c	7.6 c	4.3 a	3.5 a	7.5 c	3.5 a	4.7 ab	4.8 ab	4.2 ab

^a Values on the same line followed by a same letter are not significantly different according to LS Means test ($P < 0.05$).

^b Less than 0.01% of total FAs.

^c Sum of 16:1 Δ7c and 16:1 Δ9c FAs.

^d Sum of 16:2 Δ7,10 and 16:2 Δ9,12 FAs.

^e Sum of C₆ to C₁₂ FAs.

^f Ratio of unsaturated:saturated FAs.

*FAs identified for the first time in Boletaceae. Note that isomer 7-*cis*,10-*cis* of hexadecadienoic acid (16:2) is reported for the first time while 9-*cis*,12-*cis* 16:2 was previously reported in *Suillus luteus* (Rezanka *et al.*, 1999).

[†] FAs identified for the first time in Basidiomycetes.

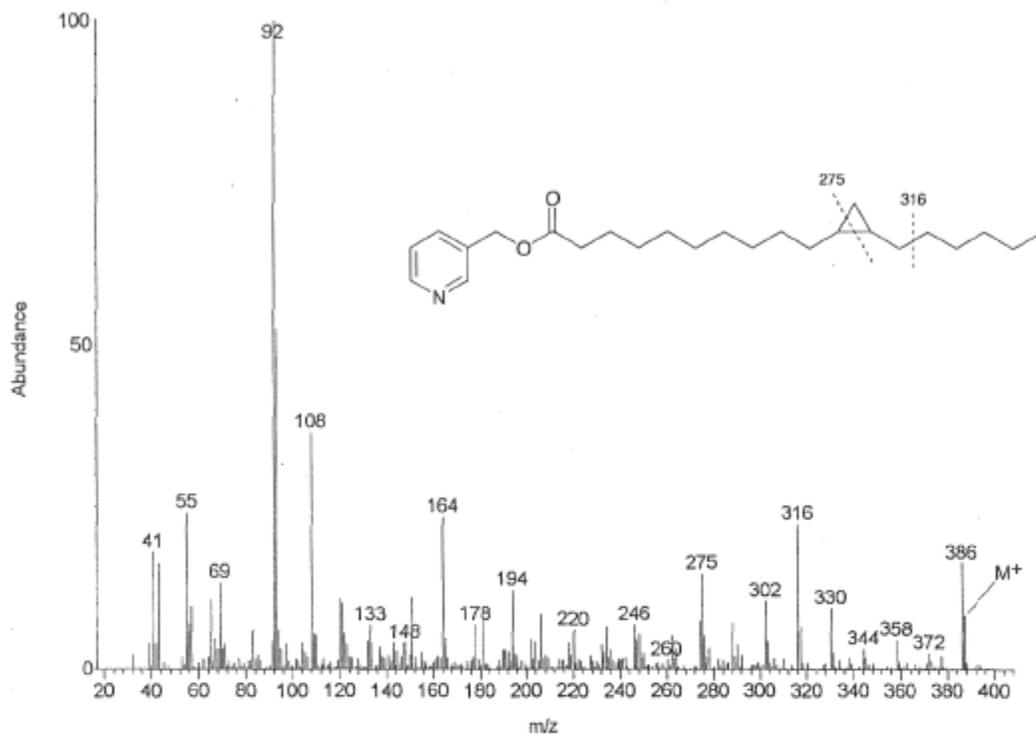


Figure 3.1. Mass spectrum of picolinyl ester derivative of *cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid from *Boletus subglabripes* lipid extract.

3.5. References

- Abdullah, M.I., Young, J.C., Games, D.E. (1994) Supercritical fluid extraction of carboxylic and fatty acids from *Agaricus* spp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 718-722.
- Badami, R.C. & Patil, K.B. (1981) Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Progress in Lipid Research*, 19: 119-153.
- Bagci, E., Bruehl, L., Aitzetmuller, K., Altan, Y. (2003) A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 27: 141-147.
- Chang, S.T. & Miles, P.G. (2004) The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact, Second edition*. CRC Press, New York: 27-37.
- Christie, W.W. (1970) Cyclopropane and cyclopropene fatty acids. Dans: Gunstone, F.D. (ed.), *Topics in Lipid Chemistry, Volume 1*. Logos Press, London: 1-49.
- Christie, W.W. (1998) Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33: 343-353.
- Christie, W.W. (2005) Fatty acids: methylene-interrupted double bonds: <http://www.lipidlibrary.co.uk/lipids.html>.
- Da Silva, M., Manfio, G.P., Canhos, V.P. (1998) Characterization of selected strains of Mucorales using fatty acid profiles. *Revista de Microbiologica*, 29: 276-281.
- Destailats, F. & Angers, P. (2002) One-step methodology for the synthesis of fatty acid picolinyl esters from intact lipids. *Journal of American Oil Chemist Society*, 79: 253-256.
- Diez, V.A. & Alvarez, A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from Northwest Spain. *Food Chemistry*, 75: 417-422.
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M., Aggelis, G. (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106: 925-929.
- Erwin, J.A. (1973) Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. Dans: Erwin, J.A. (ed.), *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. Academic Press, New York: 41-143.

- Kansci, G., Mossebo, D.C., Selatsa, A.B., Fotso, M. (2003) Nutrient content of some mushroom species of the genus *Termitomyces* consumed in Cameroon. *Nahrung/Food*, 47: 213-216.
- Kostelc, J.G. & Hendry, L.B. (1981) Hydrocarbon constituents from white strains of the mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Singer. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 29: 185-186.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., Lopez, M.G. (1997) Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, Mexico. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45: 4329-4332.
- Lucier, G., Allshouse, J., Lin, B.H. (2003) Factors affecting U.S. mushroom consumption. *Electronic Outlook Report from the Economic Research Service - USDA*: <http://www.ers.usda.gov/publications/VGS/mar03/vgs29501/vgs29501.pdf>.
- Miric, O., Lalic, V.Z., Miletic, D.I. (1985) The composition of some lipid fractions (phospholipids, triglycerides, free fatty acids, sterols) of wild growing edible mushrooms. *Hrana Ishrana (Yugoslavia)*, 26: 123-128.
- Müller, M.M., Kantola, R., Kitunen, V. (1994) Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycological Research*, 98: 593-603.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005) Diets and cardiovascular disease an evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45: 1379-1387.
- Pomerleau, R. (1980) *La Flore des Champignons du Québec*. Éditions La Presse, Montréal.
- Proštenik, M., Burcar, I., Castek, A., Cosovic, C., Golem, J., Jandric, Z., Kliaic, K., Ondrusek, V. (1978) Lipids of higher fungi, III : The fatty acids and 2-hydroxy fatty acids in some species of Basidiomycetes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 22: 97-103.
- Rezanka, T., Rozentsvet, O.A., Dembitsky, V.M. (1999) Characterization of the hydroxy fatty acid content of Basidiomycotina. *Folia Microbiologica*, 44: 635-641.
- Sherief, A.A., Abd El Naby, M.A., Mansour, F.A., El Sawah, M.A. (1993) On the Egyptian mushrooms. *Pakistan Journal of Biochemistry*, 26: 69-75.
- Stahl, P.D. & Klug, M.J. (1996) Characterization and differentiation of filamentous fungi based on the fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4136-4146.

Weete, J.D. (1974) *Fungal Lipid Biochemistry: Distribution and Metabolism*. Monographs in lipid research, Volume 1. Plenum Press, New York, 393 p.

Wolff, R.L., Lavialle, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Destailats, F., Marpeau, A.M., Angers, P., Aitzetmüller, K. (2002) Abietoid seed fatty acid composition – A review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of Pinaceae. *Lipids*, 37: 17-26.

CHAPITRE 4 – FATTY ACID PROFILES OF POLAR AND NEUTRAL LIPIDS OF TEN SPECIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES INDIGENOUS TO EASTERN CANADA

Sommaire

Les travaux présentés au chapitre 3 ayant mené à l'observation de différences majeures entre les profils en acides gras de différentes espèces de champignons appartenant à la famille des Boletaceae, cette étude proposait la caractérisation des lipides polaires et neutres de champignons comestibles indigènes de l'Est du Canada appartenant à six familles différentes (Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae, Lycoperdaceae). Dix espèces de champignons (*Agaricus arvensis*, *Agaricus campestris*, *Amanita rubescens*, *Amanita vaginata*, *Boletus edulis*, *Boletus subglabripes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma applanatum*, *Lycoperdon pyriforme*, *Suillus granulatus*) ont donc été analysées. Les contenus en lipides totaux des espèces étudiées variaient de 3,1 (*G. applanatum*) à 16% p/p ps (*A. vaginata*), pour une moyenne de 8,6% p/p ps. Les contenus en lipides neutres, polaires et totaux étaient significativement différents chez les espèces analysées, les lipides polaires formant plus de 50% du contenu en lipides chez la majorité des espèces. Les lipides polaires et les lipides neutres étaient constitués d'une forte proportion d'acides gras insaturés, allant de 62,7 à 82,3% des acides gras totaux (lipides polaires) et de 59,8 à 82,5% des acides gras totaux (lipides neutres). Les profils en acides gras des lipides neutres et polaires montraient une forte proportion d'acides linoléique, oléique et palmitique. Les profils des espèces analysées ont montré des différences significatives ($P < 0.05$) dans leur contenu en acides gras. Parmi les 44 acides gras trouvés chez les espèces étudiées, les acides *cis*-11-hexadécénoïque et *cis*-11-heptadécénoïque sont rapportés pour la première fois chez les basidiomycètes, tandis que l'acide élaïdique est rapporté pour la première fois chez les mycètes.

Ce chapitre a été soumis pour publication à la revue *Mycological Research*.

Résumé

Cette étude visait la caractérisation des lipides neutres et polaires de dix espèces de champignons comestibles indigènes de l'Est du Canada. Les contenus en lipides totaux des espèces étudiées variaient de 3,1 (*Ganoderma applanatum*) à 16% p/p ps (*Amanita vaginata*), pour une moyenne de 8,6% p/p ps. Les contenus en lipides neutres, polaires et totaux étaient significativement différents chez les espèces analysées, et les lipides polaires constituaient plus de 50% du contenu en lipides chez la majorité des espèces. Les lipides polaires et les lipides neutres étaient constitués d'une forte proportion d'acides gras insaturés, allant de 62,7 à 82,3% des acides gras totaux (lipides polaires) et de 59,8 à 82,5% des acides gras totaux (lipides neutres). Les profils en acides gras des lipides neutres et polaires montraient une forte proportion d'acides linoléique, oléique et palmitique. Les profils des espèces analysées ont montré des différences significatives ($P < 0.05$) dans leur contenu en acides gras. Parmi les 44 acides gras trouvés chez les espèces étudiées, les acides *cis*-11-hexadécénoïque et *cis*-11-heptadécénoïque sont rapportés pour la première fois chez les basidiomycètes, tandis que l'acide élaïdique est rapporté pour la première fois chez les mycètes.

Abstract

Neutral and polar lipid contents of ten species of edible mushrooms indigenous to Eastern Canada belonging to the families Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae and Lycoperdaceae were analysed. Total lipid content of the species analysed ranged from 3.1% (*Ganoderma applanatum*) to 16.0% w/w dw (*Amanita vaginata*) and averaged 8.6% w/w dw. Polar lipids accounted for more than 50% of total lipids in most species and differences were observed between neutral and polar lipid contents according to the species analysed. In both lipid fractions, high proportions of unsaturated fatty acids (FAs) ranging from 62.7% to 82.3% (polar lipids) and 59.8 % to 82.5% (neutral lipids) of total FAs were observed. Analysis of FA profiles showed that both neutral and polar lipids were mainly composed of linoleic (18:2 $\Delta^9c,12c$), oleic (18:1 Δ^9c), and palmitic (16:0) acids. Significant differences ($P < 0.05$) in the contents of specific FAs were observed between mushroom species. Among the 44 FAs detected in the species analysed, occurrence of *cis*-11-hexadecenoic (16:1 Δ^{11c}) and *cis*-11-heptadecenoic (17:1 Δ^{11c}) acids is reported for the first time in Basidiomycetes, while elaidic acid (18:1 Δ^9t) is reported for the first time in fungi.

4.1. Introduction

Interest in the consumption of speciality mushrooms has risen considerably during the last decades. Trends like human mass migration and cultural exchanges have contributed to increase mushroom consumption and favoured the expansion of the specialty mushroom market worldwide (Chiu *et al.*, 2000). Currently, many wild edible mushroom species are harvested in the forests of North America for human consumption including some species of commercial importance: *Cantharellus cibarius*, *Morchella esculenta*, *Armillaria ponderosa*, and *Boletus edulis* (Thomas & Schumann, 1993; Ehlers *et al.*, 2004).

Mushrooms have many characteristics that give them excellent nutritional value. They are rich in proteins (19-35% dw) including all the essential amino acids, vitamins (thiamine, riboflavin, ascorbic acid, vitamin D₂), minerals (especially potassium and phosphorous), and contain appreciable amounts of dietary fibres (León-Guzmán *et al.*, 1997; Mattila *et al.*, 2001; Chang & Miles, 2004; Valentão *et al.*, 2005). Mushrooms not only present excellent nutritional value, but some species also contain bioactive compounds with medicinal properties (Chiu *et al.*, 2000; Chang & Miles, 2004).

With regard to lipids, the total lipid content of higher Basidiomycetes varies according to species, ranging between 0.6% and 18.4% w/w dw (Miric *et al.*, 1985; Lösel, 1988; Chang & Miles, 2004) and the proportion of unsaturated fatty acids (FAs) is generally high (Chang & Miles, 2004; Pedneault *et al.*, 2006). Although mushrooms reveal highly variable FA profiles, palmitic (16:0), oleic (18:1 Δ^9c) and linoleic (18:2 $\Delta^9c,12c$) acids are generally the main FAs found in members of the Basidiomycetes (Weete, 1974; Pedneault *et*

et al., 2006). With their use for physiological, chemotaxonomic and intrageneric differentiation studies of many organisms (algae, bacteria, fungi, and higher plants), lipids, particularly composition of FAs, are presently receiving increasing interest (Stahl & Klug, 1996; Dimou *et al.*, 2002; Bagci *et al.*, 2003; Wolff, 2002). From the standpoint of human nutrition, long-chain polyunsaturated linoleic and α -linolenic (18:3 $\Delta^9c,12c,15c$) acids are essential for human basal metabolism, and have many beneficial effects on human health (Parikh *et al.*, 2005). In this respect, knowledge of FA contents in edible mushrooms takes on additional value.

Considering the increasing interest for both FAs and wild mushrooms for human consumption, and the lack of data with regard to mushroom FAs, the objective of this study was to characterise the FA profiles of different edible mushrooms indigenous to Eastern Canada belonging to the families Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae and Lycoperdaceae.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Samples

Mushrooms belonging to the families Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae and Lycoperdaceae (Table 1) were harvested in the areas of Sherbrooke (45°26' N, 71°42' W) and Abitibi (47°20' N, 79°26' W) in the Province of

Québec (Canada) during July and September 2001. Samples (3-7 mushrooms) were lyophilised and homogenised.

4.2.2. Lipid extraction

Samples (1 g) were extracted for 2 h (room temperature) in a Soxhlet apparatus, using hexane as the extraction solvent. Extracts were dried over anhydrous sodium sulphate, concentrated ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) in a rotary evaporator under vacuum, weighed and identified as the neutral lipid extracts. For each sample, the residual mushroom material was extracted for 2 h (room temperature) with occasional stirring, using $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) as the extraction solvent. The extract was centrifuged. The supernatant was filtered, dried over anhydrous sodium sulphate, concentrated ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) in a rotary evaporator under vacuum, weighed and identified as the polar lipid extract.

4.2.3. Fatty acid analysis

Neutral lipid extracts in hexane (500 μl) were methylated in sealed tubes with borontrifluoride 14% in methanol ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$) (500 μl ; Aldrich, St. Louis, MO) at 70°C for 45 min with occasional stirring. The hexane layer was withdrawn, partitioned against water, and dried over anhydrous sodium sulphate. Fatty acid methyl ester (FAME) samples were kept at -35°C until further analysis. Polar lipid extracts in 1 ml of $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) were evaporated to dryness and methylated in sealed tubes with $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (1 ml) at 70°C for 45 min with occasional stirring. FAME samples were extracted with hexane (1 ml). The hexane layer was withdrawn, partitioned against water, dried over anhydrous sodium sulphate and kept at -35°C until further analysis.

FAME samples (1.0 μl) in hexane were analysed by gas chromatography (GC) on a Hewlett-Packard 6890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) gas chromatograph, connected to a computer with Hewlett-Packard Chemstation software. An open tubular BPX-70 capillary column (70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane, 60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness; SGE, Austin, TX) in splitless mode was used. The injector and flame ionization detector temperatures were both maintained at 250°C. The oven temperature was programmed as follows: 35°C to 180°C at a rate of 20°C min^{-1} , held for 3 min, increased to 230°C at a rate of 3°C min^{-1} and held for 13 min. Hydrogen was used as the carrier gas under constant flow (1.4 ml min^{-1}). FAME standards (Glc-60, Glc-76 and Glc-502; Nu-Chek-Prep, Elysian, MN) were used as references. Analyses were performed in duplicate.

4.2.4. Picolinyl ester analysis

Picolinyl ester derivatives were prepared from FAMES according to the procedure of Destailats & Angers (2002). GC-mass spectrometry (MS) analyses were performed on a Hewlett-Packard 6890 Series II, coupled to a selective quadrupole mass detector (Model 5973N; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) with electronic impact (EI) set at 70 eV and connected to a computer with a Hewlett-Packard Chemstation software. Samples (1.0 μl) in CH_2Cl_2 were injected on an open tubular BPX-70 capillary column in splitless mode. The injector temperature was maintained at 250°C while the oven temperature was programmed as follows: 60°C to 180°C at a rate of 20°C min^{-1} , held for 3 min, increased to 230°C at a rate of 10°C min^{-1} and held for 13 min, increased to 250°C at a rate of 2°C min^{-1} , held for 20 min. Helium was used as the carrier gas under constant flow (1.4 ml min^{-1}). Interpretation of

mass spectra was performed according to published guidelines (Christie 1998). Analyses were performed in duplicate.

Picolinyl esters were also analysed on a GC-MS (Hewlett-Packard 6890 Series II) attached to a time-of-flight detector (Pegasus HT TOFMS; Leco, St. Joseph, MI) and connected to a computer with Leco Pegasus software (Leco), under the analytical conditions previously described for GC-MS quadrupole analysis.

4.2.5. Quantification of FA

Quantification of FAs was carried out according to response factor and a calibration table based on FAME standards. The degree of unsaturation for C₁₈ FA ($\Delta/\text{mol C}_{18}$) was calculated with the following formula: $\Delta/\text{mol C}_{18} = [(1 \times 18:1) + (2 \times 18:2) + (3 \times 18:3)] / \Sigma$ (C₁₈ FA).

4.2.6. Analysis of variance

Analysis of variance was carried out with the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC) according to a completely randomized design with 3 replicates. Each sample was considered as an experimental unit. When significant ($P < 0.05$), means were compared using Least square (LS) means analysis.

4.3. Results and discussion

Species belonging to the phylum Basidiomycota generally show marked differences in lipid content (Weete, 1974; Miric *et al.*, 1985). In this study, total lipid content of the species analysed ranged between 3.1% and 16.0% w/w dw and averaged 8.6% w/w dw (Table 4.1), which is in line with previously reported data on sporocarps of higher Basidiomycetes showing a total lipid content varying between 0.6% and 18.4% w/w dw (Miric *et al.*, 1985; Lösel, 1988; Chang & Miles, 2004). The total lipid contents of *Coprinus comatus* (4.4% w/w dw) and *Lycoperdon pyriforme* (4.8% w/w dw) were comparable with values ranging between 4.0% and 5.0% w/w dw, while the total lipid contents of *Amanita rubescens* (10.6% w/w dw), *Boletus subglabripes* (10.8% w/w dw), and *Suillus granulatus* (9.9% w/w dw) were two-fold higher. *Ganoderma applanatum* (3.1% w/w dw) and *Amanita vaginata* (16.0% w/w dw) showed the lowest and the highest total lipid content, respectively (Table 4.1).

Significant differences were observed between the lipid contents of these species, for both neutral and polar lipids. Neutral lipid contents ranged from 0.7% (*G. applanatum*) to 9.4% w/w dw (*A. vaginata*), and polar lipid contents from 2.4% (*G. applanatum*) to 11.8% w/w dw (*Agaricus campestris*). Neutral lipid content in species belonging to Boletaceae (*B. edulis*, *B. subglabripes*, *S. granulatus*) and *G. applanatum* are comparable with previously published data on Boletaceae (Pedneault *et al.*, 2006) and woody-mushroom species (Yokokawa, 1980).

Polar lipids generally accounted for more than 50% of total lipids. Proportions of polar lipids were particularly important in *Agaricus arvensis* (79.0% of total lipids), *A. campestris* (86.8% of total lipids), *G. applanatum* (77.4% of total lipids) and *L. pyriforme* (85.4% of total lipids) (Table 4.1). Previous work showed that polar lipids may account for an important proportion of total lipids in some mushrooms. *Agaricus bisporus*, *C. cibarius*, *Daedaleopsis confragora* var. *tricolor* are reported to have a polar lipid content accounting for 49.0% to 67.0% of total lipids (Lösel, 1988; Dembitsky *et al.*, 1992).

Palmitic, oleic and linoleic acids were the main FAs present among the 44 FAs identified in the neutral lipids of the analysed species, which is in agreement with previous data regarding Basidiomycetes (Weete, 1974; Lösel, 1988). Unsaturated FAs accounted for an average of 74.4% of total FAs, resulting in ratios of unsaturated to saturated FAs (U:S) ranging from 1.61 (*L. pyriforme*) to 5.36 (*B. edulis*) (Table 4.2). U:S ratios of all tested species, but *G. applanatum*, *L. pyriforme*, and *A. arvensis*, were higher than 3.0, which is in agreement with previous studies that showed high proportions of unsaturated FAs in lipids of higher Basidiomycetes (Lösel, 1988).

Similarly to neutral lipids, palmitic, oleic and linoleic acids were the main FAs identified among the 35 different FAs detected in polar lipids. Saturated FAs contents ranged from 17.0% (*B. edulis*) to 37.6% (*G. applanatum*) of total FAs, and total unsaturated FAs contents ranged from 62.7% (*G. applanatum*) to 82.3% (*B. edulis*) of total FAs, resulting in U:S ratios ranging from 1.74 (*G. applanatum*) to 4.89 (*B. edulis*) (Table 4.3).

Some unusual FAs were detected among the species analysed such as the cyclopropane FA 11,12-methyleneoctadecanoic acid, which was found in both the neutral and polar fractions of *B. edulis*, *B. subglabripes* and *S. granulatus*. Pedneault *et al.* (2006) have previously reported the presence of this FA in the non-polar lipid fraction of *B. edulis* and *B. subglabripes*. Presence of cyclic FAs, namely 9,10-epoxyoctadecanoic acid, has been previously reported in spores of rust fungi (order Uredinales, Basidiomycota) (Weete, 1974). The occurrence of *cis*-7,10-hexadecenoic acid (16:2 Δ 7c,10c) was observed in the polar fraction of *B. edulis*, *B. subglabripes*, and *S. granulatus* as well as in the neutral fraction of all the tested mushrooms, where the highest amounts were detected in *G. applanatum* (0.25% of total FAs) and *L. pyriforme* (0.43% of total FAs). This FA was recently reported for the first time in higher Basidiomycetes namely in the non-polar lipid fraction of *B. edulis*, *B. subglabripes* and *S. granulatus* (Pedneault *et al.*, 2006). To the best of our knowledge, the occurrence of isomers *cis*-11 of hexadecenoic acid (16:1 Δ 11c) and *cis*-11 of heptadecenoic acid (17:1 Δ 11c), which were previously identified in slime moulds (Davidoff & Korn, 1963; Dembitsky *et al.*, 2005), are reported here for the first time in Basidiomycetes. Isomer *cis*-11 of hexadecenoic acid was present in both neutral and polar lipid fractions of all species analysed, but isomer *cis*-11 of heptadecenoic acid was detected only in *G. applanatum* (0.39% of total FAs in the polar lipids and 0.07% of total FAs in the neutral lipids). Other isomers of hexadecenoic and heptadecenoic acids detected in the mushrooms tested, such as *cis*-7-hexadecenoic (16:1 Δ 7c), *cis*-9-hexadecenoic (16:1 Δ 9c), *cis*-8-heptadecenoic (17:1 Δ 8c) and *cis*-9-heptadecenoic (17:1 Δ 9c), were previously reported in higher fungi (Rezanka & Mares, 1987; Pedneault *et al.*, 2006). Among the FAs detected in the mushrooms tested, claidic acid (18:1 Δ 9t), a FA commonly found in milk fat,

in tissues of ruminant animals, and occasionally in seed oils (Pfeuffer & Schrezenmeir, 2006; Christie, 2007) is reported here for the first time in fungi.

There are differences between mushrooms in the levels of major and minor FAs (Tables 4.2 and 4.3). With respect to the most abundant FAs, *L. pyriforme* had a significantly higher proportion of palmitic acid than *A. rubescens*, *A. vaginata*, *B. edulis* and *S. granulatus* in both neutral and polar lipids. Significantly higher proportions of linoleic acid in both neutral and polar lipids were observed in *A. campestris* when compared to *B. subglabripes*, *A. rubescens*, *A. vaginata*, *G. applanatum*, *L. pyriforme*, and *S. granulatus*. The highest proportions of oleic acid in neutral lipids were found in *A. rubescens*, *A. vaginata*, *B. edulis*, *B. subglabripes*, *G. applanatum* and *S. granulatus*. *Amanita vaginata* showed a significantly higher proportion of oleic acid in polar lipids than other tested mushrooms. Significant differences were also observed among the mushrooms with respect to minor FAs (Tables 4.2 and 4.3). This may suggest that a particular mushroom species may intrinsically display a higher proportion of a specific FA when compared to another species (Pedneault *et al.*, 2006) but considering that FAs composition of eukaryotic microorganisms, including fungi, is extremely flexible and often highly modified in response to environmental conditions such as pH, media composition, temperature, and aeration (Erwin, 1973), further investigations are needed in order to confirm this hypothesis.

Comparison of FA profiles of neutral and polar lipids showed the absence of short chain (C₄ to C₉) FAs in polar lipids while these FAs were detected in the neutral lipids of all the mushrooms tested. For both neutral and polar lipids, unsaturated FAs were predominant representing 59.8% to 82.5% (neutral lipids) and 62.7% to 82.3% (polar lipids) of total FAs

resulting in U:S ratios ranging between 1.61 to 5.36 (neutral lipids) and 1.74 to 4.89 (polar lipids). The degree of unsaturation for C₁₈ FA (Δ /mol C₁₈) of neutral (1.17-1.86) and polar (1.21-1.89) lipids was similar. With the exception of *A. arvensis* and *L. pyriforme* showing a marked higher proportion of total unsaturated FAs in the polar fraction, total unsaturated FAs contents of the mushrooms tested were quite similar between neutral and polar lipids. With regard to the most abundant FAs, comparable proportions of palmitic acid (average: 16.2% of total FAs) were observed in neutral and polar lipids. Polar lipids showed a higher proportion of linoleic acid when compared to neutral lipids, with an average proportion of 50.2% of total FAs in polar lipids and 42.3% of total FAs in neutral lipids. Conversely, neutral lipids showed a higher proportion of oleic acid as compared to polar lipids with an average proportion of 28.5% and 21.5% of total FAs in neutral and polar lipids, respectively.

This study identified over 40 FAs in the mushroom species analysed. Palmitic, oleic, and linoleic acids were the most abundant FAs in both neutral and polar lipids. The cyclopropane FA 11,12-methyleneoctadecanoic acid, previously reported in Boletaceae species (Pedneault *et al.*, 2006), was only detected in mushrooms belonging to this family (*B. edulis*, *B. subglabripes* and *S. granulatus*). Among the FAs detected, *cis*-11-hexadecenoic and *cis*-11-heptadecenoic acids are reported for the first time in Basidiomycetes, while elaidic acid is reported for the first time in fungi.

4.4. Acknowledgments

This study was supported by the Conseil des recherches en pêche et en agroalimentaire du Québec (CORPAQ). We thank Maurice Thibault for collecting the wild mushrooms and Dr. Tyler Avis for critical review of the manuscript.

Table 4.1. Lipid content of ten species of higher Basidiomycetes indigenous to Eastern Canada

Species	Neutral lipid content [% (w/w) dw]	Polar lipid content [% (w/w) dw]	Total lipid content [% (w/w) dw]
<i>Agaricus arvensis</i>	1.4 a	4.9 abc	6.2 a
<i>Agaricus campestris</i>	1.8 ab	11.8 d	13.6 de
<i>Amanita rubescens</i>	7.1 d	3.4 abc	10.6 cd
<i>Amanita vaginata</i>	9.4 d	6.5 bc	16.0 e
<i>Boletus edulis</i>	3.3 c	3.1 ab	6.4 ab
<i>Boletus subglabripes</i>	3.4 c	7.4 c	10.8 cd
<i>Coprinus comatus</i>	1.5 a	2.8 a	4.4 a
<i>Ganoderma applanatum</i>	0.7 a	2.4 a	3.1 a
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0.8 a	4.1 abc	4.8 a
<i>Suillus granulatus</i>	3.2 bc	6.7 bc	9.9 bc

Each value represents the mean of 3 replicates. Values on the same column followed by a same letter are not significantly different according to Least square (LS) means test ($P < 0.05$).

Table 4.2. Fatty acid (FA) profiles of neutral lipids from ten species of higher Basidiomycetes indigenous to Eastern Canada

FA	Species									
	<i>Agaricus arvensis</i>	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus subglabripes</i>	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	<i>Suillus granulatus</i>
4:0	0.02 a ^a	0.02 a	0.02 a	0.03 a	0.04 a	0.04 a	0.02 a	0.03 a	0.03 a	0.03 a
5:0	0.02 abc	0.02 abc	0.02 abc	0.04 c	0.01 a	0.02 abc	0.02 abc	0.04 bc	0.03 abc	0.01 ab
6:0	0.03 a	0.03 a	0.03 a	0.03 a	0.05 a	0.07 a	0.03 a	0.06 a	0.06 a	0.02 a
7:0	0.03 abc	0.02 a	0.03 abc	0.03 abc	0.01 a	0.01 a	0.03 ab	0.05 bc	0.05 c	0.02 a
8:0	0.02 a	0.02 a	0.02 a	0.03 a	0.04 ab	0.04 ab	0.02 a	0.07 c	0.06 bc	0.02 a
9:0	0.04 a	0.02 a	0.02 a	0.05 a	0.06 a	0.06 a	0.04 a	0.05 a	0.04 a	0.03 a
10:0	0.03 ab	0.02 ab	0.02 ab	0.02 ab	0.05 ab	0.07 bc	0.02 a	0.11 c	0.05 ab	0.02 ab
11:0	0.05 ab	0.02 a	0.02 ab	0.02 ab	0.04 ab	0.03 ab	0.05 ab	0.06 b	0.04 ab	0.03 ab
12:0	0.13 a	0.12 a	0.09 a	0.13 a	0.08 a	0.13 a	0.13 a	0.40 b	0.31 b	0.08 a
13:0	0.04 ab	0.02 a	0.03 ab	0.03 ab	0.04 ab	0.03 ab	0.03 ab	0.06 b	0.06 ab	0.03 ab
14:0	0.75 bc	0.54 ab	0.17 a	0.31 ab	0.60 ab	0.29 ab	0.57 ab	2.51 d	1.21 c	0.23 ab
14:1 Δ9c	0.02 a	- ^b	-	0.02 a	-	-	0.03 a	0.11 b	0.03 a	-
15:0	0.54 bc	0.47 abc	0.33 ab	0.22 ab	0.20 a	0.44 ab	0.37 ab	3.51 d	5.25 e	0.88 c
16:0	20.2 cd	16.5 bc	14.5 abc	15.2 abc	10.5 a	12.5 ab	18.9 cd	19.0 cd	22.6 d	13.0 ab
16:1 Δ7c	-	-	0.08 a	0.08 a	0.30 b	0.28 b	0.09 a	-	-	0.53 c
16:1 Δ9c	0.99 cd	0.87 bcd	0.42 a	0.49 ab	0.54 ab	0.60 abc	0.87 bcd	1.03 d	0.57 ab	0.38 a
16:1 Δ11c	0.20 bc	0.25 c	0.05 ab	0.05 a	0.16 abc	0.17 abc	0.70 d	3.77 e	0.20 abc	0.04 a
16:2 Δ7c,10c	0.09 a	0.09 a	0.06 a	0.06 a	0.08 a	0.10 ab	0.07 a	0.25 bc	0.43 c	0.13 ab
16:2 Δ9c,12c	0.08 a	0.09 a	0.05 a	0.07 a	0.11 a	0.07 a	0.07 a	0.13 a	0.11 a	0.05 a
17:0	0.58 c	0.40 bc	0.16 ab	0.07 a	0.21 ab	0.22 ab	0.08 a	1.61 d	0.48 c	0.35 bc
17:1 Δ8c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
17:1 Δ9c	0.10 c	0.09 bc	0.08 abc	0.05 a	0.12 c	0.11 c	0.05 ab	0.31 d	0.11 c	0.12 c
17:1 Δ11c	-	-	-	-	-	-	-	0.07	-	-
18:0	5.50 cd	3.04 ab	4.47 bc	3.72 abc	3.17 ab	3.65 abc	1.84 a	4.60 bc	7.27 d	3.03 ab
18:1 Δ9t	0.12 abc	0.15 abc	0.10 ab	0.17 abc	0.07 a	0.09 a	0.12 abc	0.32 cd	0.48 d	0.32 bcd
18:1 Δ9c	4.48 a	3.99 a	58.0 cd	60.3 d	36.2 c	39.2 cd	7.45 b	37.4 c	5.12 ab	33.7 c
18:1 Δ11c	0.98 b	0.38 a	-	-	1.08 b	-	0.65 ab	2.30 c	1.07 b	-
18:2 Δ9c,12c	58.7 de	68.8 e	19.0 a	16.9 a	42.7 bc	39.4 b	64.5 e	17.9 a	50.7 cd	44.6 bc

Table 4.2. (continued) Fatty acids (FA) profile of neutral lipids from ten species of higher Basidiomycetes indigenous to Eastern Canada

FA	Species									
	<i>Agaricus arvensis</i>	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus subglabripes</i>	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	<i>Suillus granulatus</i>
18:3 Δ 6c,9c,12c	0.12 a	-	0.01 a	-	-	-	-	-	-	-
18:3 Δ 9c,12c,15c	0.13 ab	0.17 ab	0.09 a	0.14 ab	0.18 ab	0.22 ab	0.47 c	0.27 b	0.19 ab	0.28 b
18:0 11,12-methylene	-	-	-	-	0.47 a	0.08 b	-	-	-	0.04 b
20:0	3.54 c	1.57 b	0.33 a	0.41 a	0.34 a	0.40 a	0.13 a	0.34 a	0.22 a	0.44 a
20:1 Δ 9c	0.09 ab	0.09 ab	0.06 a	-	-	0.02 a	0.04 a	0.15 b	0.05 a	-
20:1 Δ 11c	0.19 a	0.19 a	0.15 a	0.17 a	0.68 b	0.45 ab	0.18 a	0.23 a	0.23 a	0.16 a
20:2 Δ 11c,14c	0.17 b	0.29 bc	0.04 a	0.05 a	0.32 bc	0.31 bc	0.35 c	-	-	0.13 ab
21:0	0.34 b	0.19 a	-	0.08 a	-	-	0.08 a	0.19 a	0.33 b	0.20 ab
22:0	0.51 ab	0.31 a	0.12 a	0.42 a	0.34 a	0.31 a	0.33 a	0.54 ab	1.05 b	0.23 a
22:1 Δ 13c	0.05 abc	0.05 ab	0.04 ab	0.03 a	0.11 abc	0.09 abc	0.05 abc	0.24 bc	0.31 c	0.15 abc
23:0	0.07 a	0.12 a	0.05 a	0.05 a	0.04 a	0.03 a	0.14 a	0.13 a	0.33 b	0.07 a
23:1 Δ 14c	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-
24:0	0.83 bc	0.94 c	0.45 ab	0.29 a	0.18 a	0.18 a	0.89 bc	0.87 bc	1.14 c	0.20 a
24:1 Δ 15c	0.08 ab	0.07 ab	0.03 a	0.15 ab	0.13 ab	0.15 ab	0.17 b	0.49 d	0.14 ab	0.34 c
25:0	0.06 ab	0.05 a	0.03 a	0.04 a	0.02 a	0.01 a	0.06 ab	0.25 b	0.31 b	0.11 ab
26:0	0.06 ab	0.04 a	0.03 a	0.04 a	0.01 a	0.07 ab	0.04 a	0.14 b	0.08 ab	0.08 ab
Saturated FA	33.4 c	24.5 b	21.8 ab	21.3 ab	16.4 a	18.8 ab	23.8 b	34.6 c	39.2 c	19.2 ab
Monounsaturated FA	7.27 a	6.12 a	59.0 c	61.5 c	39.2 b	41.2 b	10.4 a	46.1 b	8.33 a	35.9 b
Polyunsaturated FA	59.3 de	69.4 f	19.3 a	17.3 a	43.3 bc	40.0 b	65.3 ef	18.4 a	51.4 cd	45.2 bc
Total unsaturated FA	66.6 a	75.5 b	78.3 b	78.7 b	82.5 b	81.2 b	75.7 b	64.6 a	59.8 a	81.0 b
Ratio U:S ^c	2.02 abc	3.10 bcd	3.60 de	3.72 de	5.36 f	4.39 ef	3.22 cde	1.89 ab	1.61 a	4.25 def
Δ /mol C ₁₈ ^d	1.77 cd	1.86 e	1.18 a	1.17 a	1.49 b	1.44 b	1.85 de	1.22 a	1.67 c	1.51 b

FA profiles are presented in percent area (% of total area).

^a Each value represents the mean of 3 replicates. Values on the same row followed by a same letter are not significantly different according to Least square (LS) means test ($P < 0.05$).

^b Less than 0.01% of total FAs.

^c Ratio of unsaturated:saturated FAs.

^d Δ /mol C₁₈ = [(1 × 18:1) + (2 × 18:2) + (3 × 18:3)] / Σ (C₁₈ FA).

Table 4.3. Fatty acids (FA) profile of polar lipids from ten species of higher Basidiomycetes indigenous to Eastern Canada

FA	Species									
	<i>Agaricus arvensis</i>	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus subglabripes</i>	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	<i>Suillus granulatus</i>
10:0	0.04 bc ^a	0.02 a	0.02 ab	0.02 a	0.02 a	0.03 ab	0.04 c	0.14 e	0.07 d	0.02 a
11:0	0.03 a	0.01 a	0.01 a	0.01 a	0.02 a	0.02 a	0.02 a	0.04 a	0.03 a	0.02 a
12:0	0.05 a	0.07 a	0.07 a	0.05 a	0.08 a	0.11 ab	0.12 ab	0.32 c	0.21 b	0.10 a
13:0	0.04 a	0.03 a	0.03 a	0.03 a	0.02 a	0.02 a	0.04 a	0.14 b	0.03 a	0.02 a
14:0	0.79 bc	0.44 ab	0.23 a	0.24 a	0.37 ab	0.21 a	0.78 bc	2.11 d	1.25 c	0.33 ab
14:1 Δ 9c	0.03 a	- ^b	0.03 a	-	0.02 a	-	0.04 a	-	0.03 a	-
15:0	0.52 c	0.44 bc	0.36 abc	0.19 a	0.21 ab	0.55 c	0.44 bc	5.61 f	4.04 e	0.91 d
16:0	16.1 abc	16.0 abc	13.6 a	13.7 a	13.9 a	15.3 abc	20.4 d	18.3 bcd	18.6 cd	14.5 ab
16:1 Δ 7c	0.17 a	0.19 a	0.08 a	0.10 a	0.18 a	0.12 a	0.30 a	-	-	0.25 a
16:1 Δ 9c	0.40 a	0.51 abc	0.43 ab	0.55 abc	0.96 abc	0.73 abc	1.14 bc	2.70 d	1.24 c	0.88 abc
16:1 Δ 11c	0.22 cd	0.13 bcd	0.02 a	0.04 ab	0.29 de	0.14 abcd	0.56 e	1.47 f	0.23 cd	0.10 abc
16:2 Δ 7c,10c	-	-	-	-	0.04 a	0.04 a	-	-	-	0.06 a
16:2 Δ 9c,12c	0.07 a	0.02 a	-	-	0.05 a	0.06 a	0.07 a	-	-	0.05 a
17:0	0.72 a	0.22 a	0.15 a	0.41 a	0.07 a	0.31 a	0.32 a	3.97 b	0.57 a	0.21 a
17:1 Δ 9c	0.06 a	0.05 a	0.03 a	0.02 a	0.09 a	0.06 a	0.04 a	0.39 b	0.13 a	0.14 a
17:1 Δ 11c	-	-	-	-	-	-	-	0.39	-	-
18:0	4.21 b	2.95 ab	4.61 b	3.11 ab	1.73 a	2.63 ab	1.98 a	3.31 ab	4.46 b	2.21 a
18:1 Δ 9t	0.06 a	0.07 a	0.09 a	0.10 a	0.07 a	0.08 a	0.10 a	-	0.16 a	0.16 a
18:1 Δ 9c	3.47 a	2.72 a	50.2 d	59.4 c	11.8 b	29.2 c	5.88 ab	22.5 c	6.10 ab	23.7 c
18:1 Δ 11c	0.99 bc	0.22 ab	-	-	2.42 d	-	0.71 abc	3.39 e	1.18 c	0.20 ab
18:2 Δ 9c,12c	65.1 bc	71.0 d	28.0 a	20.3 a	65.4 cd	48.2 b	63.7 bcd	28.8 a	58.0 bcd	53.9 bc
18:3 Δ 9c,12c,15c	0.25 a	0.18 a	-	-	0.24 a	0.30 a	1.07 b	0.40 a	0.38 a	0.31 a
18:0 11,12-methylene	-	-	-	-	0.63 b	0.08 a	-	-	-	0.09 a
20:0	2.77 f	1.89 e	0.36 d	0.31 cd	0.11 a	0.29 cd	0.15 ab	0.26 bcd	0.21 abc	0.21 abc
20:1 Δ 9c	0.14 a	0.07 a	-	-	-	-	-	-	-	-
20:1 Δ 11c	0.57 ab	0.22 a	0.24 a	0.28 a	0.34 ab	0.35 ab	0.43 ab	1.09 b	1.14 b	0.29 a
20:2 Δ 11c,14c	0.20 bc	0.25 c	0.05 a	0.09 a	0.15 abc	0.10 ab	0.25 c	0.22 c	0.09 a	0.12 ab

Table 4.3. (continued) Fatty acids (FA) profile of polar lipids from ten species of higher Basidiomycetes indigenous to Eastern Canada

FA	Species									
	<i>Agaricus arvensis</i>	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus subglabripes</i>	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	<i>Suillus granulatus</i>
21:0	0.20 b ^a	0.16 ab	0.03 ab	0.07 ab	0.02 a	0.03 ab	0.08 ab	0.09 ab	0.13 ab	0.05 ab
22:0	1.15 b	0.49 ab	0.08 a	0.22 a	0.17 a	0.17 a	0.18 a	0.78 ab	0.73 ab	0.20 a
22:1 Δ13c	0.15 a	0.15 a	0.08 a	0.04 a	0.10 a	0.06 a	0.07 a	0.81 b	0.11 a	0.07 a
23:0	0.23 b	0.06 abc	0.10 ab	0.03 a	0.07 ab	0.05 ab	0.08 ab	0.13 ab	0.15 b	0.06 ab
24:0	0.99 bc	1.28 c	0.75 abc	0.40 ab	0.16 a	0.26 a	0.75 abc	1.09 c	0.97 bc	0.31 ab
24:1 Δ15c	0.07 a	0.09 ab	0.06 a	0.22 bc	0.16 ab	0.20 abc	0.13 ab	0.48 d	0.16 ab	0.40 cd
25:0	0.10 ab	0.02 a	0.09 ab	0.03 a	0.08 ab	0.17 b	0.05 a	0.70 c	0.06 a	0.08 ab
26:0	0.09 a	0.05 a	0.06 a	0.07 a	0.04 a	0.05 a	0.06 a	0.55 b	0.11 a	0.07 a
Saturated FA	28.1 d	24.2 bcd	20.6 abc	18.9 ab	17.0 a	20.2 abc	25.5 cd	37.6 e	30.2 d	19.0 ab
Monounsaturated FA	6.33 a	4.41 a	51.1 d	60.7 e	16.4 b	31.0 c	9.40 ab	33.2 c	10.5 ab	24.9 c
Polyunsaturated FA	65.6 de	71.4 e	28.0 a	20.4 a	65.9 cde	48.7 b	65.1 cde	29.5 a	58.5 bcd	56.0 bc
Total unsaturated FA	72.0 bc	75.9 cde	79.1 de	81.1 e	82.3 e	79.7 de	74.5 bcd	62.7 a	69.0 ab	80.9 de
Ratio U:S ^c	2.60 ab	3.14 bcd	3.85 cde	4.30 ef	4.89 f	3.99 def	2.97 bc	1.74 a	2.32 ab	4.26 ef
Δ/mol C ₁₈ ^d	1.83 f	1.89 f	1.28 ab	1.21 a	1.79 ef	1.58 cd	1.87 f	1.43 bc	1.77 ef	1.65 de

FA profiles are presented in percent area (% of total area).

^a Each value represents the mean of 3 replicates. Values on the same row followed by a same letter are not significantly different according to Least square (LS) means test ($P < 0.05$).

^b Less than 0.01% of total FAs.

^c Ratio of unsaturated:saturated FAs.

^d $\Delta/\text{mol C}_{18} = [(1 \times 18:1) + (2 \times 18:2) + (3 \times 18:3)] / \Sigma (\text{C}_{18} \text{ FA})$.

4.5. References

- Bagci, E., Bruehl, L., Aitzetmuller, K., Altan, Y. (2003) A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 27: 141-147.
- Chang, S.T. & Miles, P.G. (2004) The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact, Second edition*. CRC Press, Boca Raton: 27-37.
- Chiu, S.W., Law, S.C., Ching, M.L., Cheung, K.W., Chen, M.J. (2000) Themes for mushroom exploitation in the 21st century: Sustainability, waste management, and conservation. *Journal of General and Applied Microbiology*, 46: 269-282.
- Christie, W.W. (1998) Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33: 343-353.
- Christie, W.W. (2007) Fatty acids: Straight-Chain Monoenoic, Structure, Occurrence and Biochemistry: http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/fa_mono/index.htm. Accessed April 2007.
- Davidoff, F. & Korn, E.D. (1962) Fatty acid and phospholipid composition of the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*: The occurrence of previously undescribed fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 238: 3199-3209.
- Dembitsky, V.M., Shubina, E.E., Kashin, A.G. (1992) Phospholipid and fatty acid composition of some Basidiomycetes. *Phytochemistry*, 31: 845-849.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Spizek, J., Hanus, L.O. (2005) Secondary metabolites of slime molds (Myxomycetes). *Phytochemistry*, 66: 747-769.
- Destailats, F. & Angers, P. (2002) One-step methodology for the synthesis of fatty acid picolinyl esters from intact lipids. *Journal of American Oil Chemist Society*, 79: 253-256.
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M., Aggelis, G. (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106: 925-929.
- Ehlers, T., Berch, S.M., MacKinnon, A. (2004) Inventory of non-timber forest product plant and fungal species in the Robson Valley BC. *Journal of Ecosystems and Management*, 4: 38-52.

- Erwin, J.A. (1973) Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. Dans: Erwin, J.A. (ed.), *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. Academic Press, New York: 41-143.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., Lopez, M.G. (1997) Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, Mexico. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45: 4329-4332.
- Lösel, D.M. (1988) Fungal lipids. Dans: Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (eds), *Microbial Lipids, Volume 1*. Academic Press, London: 699-805.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.
- Miric, O., Lalic, V.Z., Miletic, D.I. (1985) The composition of some lipid fractions (phospholipids, triglycerides, free fatty acids, sterols) of wild growing edible mushrooms. *Hrana Ishrana (Yugoslavia)*, 26: 123-128.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005) Diets and cardiovascular disease an evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45: 1379-1387.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R.J. (2006) Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological Research*, 110: 1179-1183.
- Pfeuffer, M. & Schrezenmeir, J. (2006) Impact of *trans* fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal*, 16: 1383-1388.
- Rezanka, T. & Mare, P. (1987) Unusual and very long-chain fatty acids produced by Basidiomycetes. *Journal of Chromatography A*, 409: 390-395.
- Stahl, P.D. & Klug, M.J. (1996) Characterization and differentiation of filamentous fungi based on the fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4136-4146.
- Thomas, M.G. & Schumann, D.R. (1993) Income Opportunities in Special Forest Products Self-Help Suggestions for Rural Entrepreneurs. Agriculture Information Bulletin AIB-666, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.

Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2005) Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3626-3630.

Weete, J.D. (1974) *Fungal Lipid Biochemistry: Distribution and Metabolism*. Monographs in lipid research, Volume 1. Plenum Press, New York, 393 p.

Wolff, R.L., Lavialle, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Destailats, F., Marpeau, A.M., Angers, P., Aitzetmüller, K. (2002) Abietoid seed fatty acid composition – A review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of Pinaceae. *Lipids*, 37: 17-26.

Yokokawa, H. (1980) Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of ten species of Polyporaceae. *Phytochemistry*, 19: 2615-2618.

CHAPITRE 5 - FATTY ACID PROFILES OF POLAR AND NON-POLAR LIPIDS OF *PLEUROTUS OSTREATUS* AND *PLEUROTUS CORNUCOPIAE* VAR. *CITRINO-PILEATUS* GROWN AT DIFFERENT TEMPERATURES

Sommaire

La température est un facteur affectant le profil en acides gras chez de nombreux organismes vivants. Considérant l'intérêt croissant accordé aux acides gras, notamment dans les études chemotaxonomiques réalisées chez les bactéries, les algues, les champignons et les plantes supérieures, les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectif d'évaluer l'effet de la température de croissance sur le contenu en lipides et le profil d'acides gras chez deux espèces de *Pleurotus*, soient *P. ostreatus*, une espèce tempérée indigène au Québec et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*, une espèce tropicale. Les résultats obtenus ont montré une augmentation du niveau d'insaturation chez les acides gras des fractions polaire et non polaire des carpophores de *P. ostreatus* lorsque la température de croissance était inférieure à 17°C. Une température de croissance supérieure à 17°C a pour sa part influencé les profils d'acides gras chez les deux champignons à l'étude.

Ce chapitre a été publié dans la revue *Mycological Research*, 111 (2007) : 1228-1234.

Résumé

La composition en acides gras des organismes vivants touche plusieurs domaines d'étude tels que la physiologie, la chemotaxonomie et la différenciation intragénérique, de même que la nutrition humaine. Certains facteurs environnementaux tels que la nutrition, le taux d'oxygène et la température peuvent modifier le contenu et la composition des lipides chez les organismes vivants comme les champignons. Afin d'évaluer l'effet de la température sur la composition lipidique des basidiomycètes, cette étude proposait l'analyse de la teneur en lipides polaires et non polaires des carpophores de *Pleurotus ostreatus* et *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus* cultivés à des températures allant de 12 à 27°C. Les résultats ont montré une augmentation prévisible des acides gras insaturés dans les lipides polaires et non polaires lorsque la température de croissance était inférieure à 17°C. Par ailleurs, si l'augmentation de la température de croissance au-dessus de 17°C n'a pas montré une tendance nette au niveau de l'insaturation des acides gras, elle a tout de même révélé que la température de croissance a un effet différent sur les profils d'acides gras des carpophores de *P. ostreatus* et de *P. cornucopiae*. Cette étude suggère donc que l'utilisation de profils d'acides gras et de niveaux d'insaturation des acides gras à des fins de différenciations physiologiques, chemotaxonomiques et intragénériques doit se faire avec précaution. En outre, selon cette étude, il apparaît possible de manipuler le niveau d'insaturation des lipides chez les espèces du genre *Pleurotus* via une modification de la température de croissance.

Abstract

The application of fatty acid (FA) composition data has now extended to studies of physiology, chemotaxonomy, and intrageneric differentiation, as well as to studies of human nutrition. Environmental factors such as nutritional components, oxygen, and temperature are known to affect lipid content and composition in living organisms, including fungi. In the present study, the polar and non-polar lipid content of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* fruiting bodies produced at temperatures ranging from 12–27°C and from 17–27°C, respectively, were analysed to evaluate the effect of temperature on lipid composition in these mushrooms. Results showed that lowering the growth temperature below 17°C generally provided an expected increase in FA unsaturation in polar and non-polar lipids of *P. ostreatus*. Although raising the temperature above 17°C did not show any clear-cut tendency in FA unsaturation, it did reveal that growth temperature had a differential effect on the FA profiles in fruiting bodies of *P. ostreatus* and *P. cornucopiae*. This study suggests that care should be taken when using FA content and unsaturation data for physiological, chemotaxonomic, and intrageneric differentiation studies, and that it may be possible to manipulate lipid unsaturation in *Pleurotus* spp. through modified growth temperatures.

5.1. Introduction

Fatty acids (FAs) are important constituents of fungal cells with recognized roles as storage material and as components of plasmalemma and cell organelle membranes. In fungi, the major FAs that typically occur in membrane phospholipids and storage triacylglycerols are palmitic and stearic acids and their unsaturated derivatives palmitoleic, oleic, linoleic and linolenic acids (Suutari 1995).

Many environmental factors may affect lipid content in living organisms including fungi (Lösel 1988). Indeed, the composition of mycelial FAs varies greatly depending on growth conditions such as nutritional factors, oxygen, and temperature (Suutari 1995). With regard to temperature, it is generally recognized that FA unsaturation increases as temperature decreases, although reports to the contrary exist (Chavant *et al.* 1981; Lösel 1988; Sumner *et al.* 1969; Suutari 1995; Suutari & Laakso 1994; Suutari *et al.* 1990; Wilson & Miller 1978).

Interest for lipids, especially for FA composition, is currently expanding. Such data are used for physiological, chemotaxonomic and intrageneric differentiation studies of many organisms such as bacteria, algae, fungi and higher plants (Bagci *et al.* 2003; Dimou *et al.* 2002; Erwin 1973; Stahl & Klug 1996; Wolff *et al.* 2002). From the standpoint of human nutrition, linoleic (18:2 Δ 9,12) and α -linolenic (18:3 Δ 9,12,15) acids are essential for basal metabolism while long-chain polyunsaturated FAs are now believed to have many beneficial effects on human health (Parikh *et al.* 2005). Therefore, knowledge of FA content of edible mushrooms is of interest.

Pleurotus ostreatus and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* are two edible mushroom species grown commercially in many countries (Royse *et al.* 2004). Interest for these species has increased considerably in the last decade because of their gastronomic value and their nutraceutical properties (Bao *et al.* 2004; Chang & Miles 2004). Although FA profiles of different *Pleurotus* species including *P. ostreatus* and *P. cornucopiae* have been characterized (Dimou *et al.* 2002), little is known about the effect of temperature on lipid content of these mushrooms.

The present study analyzed the polar and non-polar lipid content of *P. ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* fruiting bodies produced at temperatures ranging from 12 to 27°C and from 17 to 27°C, respectively in order to evaluate the effect of temperature on FA composition of these mushrooms.

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Organisms

Pleurotus ostreatus (strain #123) and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* (strain #140) pre-spawned bags (fully colonized by the mycelium and ready to fruit) were used in this study and were purchased from Lambert Spawn Company (Coatesville, PA). The bags contained cottonseed hulls (average weight 22 pounds) spawned (15% w/w dw) with either *P. ostreatus* or *P. cornucopiae* that were incubated under stringently controlled conditions to obtain a full colonization of cottonseed hulls.

5.2.2. Experimental design

In order to evaluate the effect of temperature on *P. ostreatus* and *P. cornucopiae* morphology and FA profiles, the pre-spawned bags were placed in growth chambers (90% relative humidity) at the following temperatures: 12, 17, 21, 27°C (*P. ostreatus*) and 17, 21, 27°C (*P. cornucopiae*). Experiments were performed independently according to a completely randomized design with 5 replicates. Each spawn bag was considered as an experimental unit. Samples (4 to 10 basidiocarps with a pileus diameter averaging 2 to 3.5 cm) were collected from each spawn bag after appropriate periods of incubation in the growth chambers. Basidiocarp morphological characteristics were determined and the samples were then lyophilized and homogenized for further analyses.

5.2.3. Basidiocarp morphological characteristics

Stipe length and pileus diameter were measured with a ruler. The stipe length/pileus diameter ratio was then calculated.

5.2.4. Lipid extraction

Lyophilized samples (0.5 g) were extracted for 2 h, at room temperature and protected from light, using hexane as the extraction solvent. Extracts were centrifuged, the supernatants were filtered, dried over anhydrous sodium sulfate, concentrated ($\leq 30^\circ\text{C}$) in a rotary evaporator under vacuum, weighed and identified as the non-polar lipid extracts. The residual mushroom materials were extracted for 2 h, at room temperature, using chloroform(CHCl₃):methanol(MeOH) (2:1) as the extraction solvent. as the extraction

solvent. Extracts were centrifuged, the supernatants were filtered, dried over anhydrous sodium sulfate, concentrated ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) in a rotary evaporator under vacuum, weighed and identified as the polar lipid extracts.

5.2.5. Fatty acid methyl esters analysis

Non-polar lipid extracts (in 500 μL hexane) were methylated in sealed tubes with $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (500 μL ; Aldrich, St. Louis, MO) at 70°C for 45 min with occasional stirring. The hexane layer was withdrawn, partitioned against water, dried over anhydrous sodium sulfate and kept at -35°C until analysis. Polar lipid extracts (1 mL, in $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 2:1), were evaporated to dryness and methylated in sealed tubes with $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (1 mL) at 70°C for 45 min with occasional stirring. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with hexane (1 mL). The hexane layer was withdrawn, partitioned against water, dried over anhydrous sodium sulfate and kept at -35°C until analysis.

FAME samples (1.0 μL) were analyzed by gas chromatography on a Hewlett-Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) gas chromatograph connected to a flame ionization detector (FID) and to a computer with Hewlett-Packard Chemstation software. Samples were injected into an open tubular BPX-70 capillary column (70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane, 60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness; SGE, Austin, TX), in splitless mode. The injector and FID temperatures were maintained at 215°C and 230°C , respectively. The oven temperature program was as follows: 35°C to 180°C at a rate of $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held for 3 min, increased to 230°C at a rate of $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held for 13 min. Hydrogen was used as the carrier gas under constant flow (1.4 mL/min).

FAME standards (Glc-60, Glc-76 and Glc-502; Nu-Chek-Prep, Elysian, MN) were used for confirmation of retention time. FAMES were also analyzed by GC-MS on a Hewlett-Packard 6890 Series II with a selective quadrupole mass detector (model 5973N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and connected to a computer with Hewlett-Packard Chemstation software, with the previous column and under conditions previously described, with helium as carrier gas and electron impact (EI) set at 70 eV.

5.2.6. Pyrrolidides analysis

In order to confirm FA structure, pyrrolidine derivatives of FAs were prepared from FAMES according to the following procedure. FAMES were evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Freshly distilled pyrrolidine (500 μ L; Aldrich) and glacial acetic acid (50 μ L) were added to the dried samples. The mixture was heated at 100°C for 1 h with occasional stirring. Excess of pyrrolidine was evaporated under a stream of nitrogen, hexane:diethyl ether (3 mL; 1:1) was added and the mixture was vortexed. The top layer was withdrawn, partitioned against water (3 \times 1 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and kept at -35°C until analysis.

Pyrrolidides were analyzed by GC-MS on a Hewlett-Packard 6890 Series II with a selective quadrupole mass detector (model 5973N), and connected to a computer with Hewlett-Packard Chemstation software, with EI set at 70 eV. Pyrrolidides (1.0 μ L) were injected into an open tubular BPX-70 capillary column in splitless mode. The injector temperature was maintained at 250°C and the oven temperature program was as follows: 60°C to 180°C at a rate of 10°C/min, held for 3 min, increased to 220°C at a rate of 3°C/min

and held for 13 min, increased to 250°C at a rate of 20°C/min, held at 250°C for 20 min. Hydrogen was used as the carrier gas under constant flow (1.4 mL/min). Interpretation of mass spectra was performed according to the literature (Christie, 1998).

5.2.7. Quantification of FA

FA peak identity was confirmed by GC-MS with both FAMES and pyrrolidides. FA quantification was carried out according to response factor and calibration table based on FAME standards. The degree of unsaturation for C₁₈ FAs (Δ /mol C₁₈) was calculated with the following formula:

$$\Delta/\text{mol C}_{18} = [(1 \times 18:1) + (2 \times 18:2) + (3 \times 18:3)] / \Sigma (\text{C}_{18} \text{ FAs})$$

5.2.8. Statistical analysis

Analysis of variance was carried out with the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC). When significant ($P < 0.05$), means were compared using Least-Squares means (LS means) analysis.

5.3. Results

5.3.1. Growth of fruiting bodies

For both species, fructification was delayed by incubation at a lower temperature. Fructification at 27°C happened 4 to 5 days earlier than at 12°C for *P. ostreatus* and 3 to 5

days earlier than at 17°C for *P. cornucopiae*. Temperature was shown to significantly influence basidiocarp morphological characteristics for both species (Table 5.1). *Pleurotus ostreatus* basidiocarps produced at 12 and 21°C showed a significantly smaller pileus diameter, a significantly longer stipe, and a significantly higher stipe length/pileus diameter ratio (Table 5.1). *Pleurotus cornucopiae* basidiocarps produced at 21°C displayed a significantly longer stipe (32.8 mm) and a significantly higher stipe length/pileus diameter ratio (1.3).

5.3.2. Lipid content

Total lipid content of *P. ostreatus* and *P. cornucopiae* averaged 4.3% w/w dw and 4.2% w/w dw, respectively (Table 5.2). In both species, polar lipids represented more than 85% of total lipids analyzed while non-polar lipids ranged between 4 and 16% of total lipids. Total lipid and polar lipid levels in *P. ostreatus* basidiocarps were not significantly affected by the temperature of growth (Table 5.2) and non-polar lipid content of basidiocarps produced at 21°C was significantly lower than those produced at 17°C. In *P. cornucopiae*, total lipid and polar lipid contents were significantly lower in basidiocarps produced at 27°C.

5.3.3. Fatty acid content

Analysis of FA profiles showed that linoleic (18:2 Δ 9,12), palmitic (16:0) and oleic (18:1 Δ 9) acids were the main FAs found in both polar and non-polar extracts of *P. ostreatus* and *P. cornucopiae*, accounting for 83.1 to 95.9% of total FAs (Tables 5.3 and 5.4). Saturated palmitic and stearic (18:0) acids as well as monounsaturated oleic acid were

more abundant in non-polar extracts than in polar extracts while the polyunsaturated linoleic acid was found in higher proportions in the polar extract of both species. Ratios of unsaturated to saturated FAs (U:S), polyunsaturated to monounsaturated (P:M) and degree of unsaturation of C₁₈ FAs were also higher in polar extracts than in non-polar extracts, averaging 5.1, 11.2 and 1.9, respectively (in polar extract), and 2.9, 4.1 and 1.7 (in non-polar extract), respectively (Tables 5.3 and 5.4). Minor FAs detected in both extracts were generally the same except for lauric (12:0) and tridecanoic (13:0) acids that were not detected or only in trace amounts in the polar extracts (Table 5.4).

Analysis of non-polar extract of *P. ostreatus* showed a significantly lower content in saturated (18.8% of total FAs) and monounsaturated (10.1%) FAs, and a significantly higher proportion of polyunsaturated FAs (71.0%) and total unsaturated FAs (81.1%) in basidiocarps produced at 12°C (Table 5.3). U:S (4.3) and P:M (7.1) ratios and the degree of unsaturation of C₁₈ FAs (1.85) were significantly higher in *P. ostreatus* basidiocarps grown at 12°C. Basidiocarps produced at 12°C showed significantly lower levels of 18:0 (2.01%) and 18:1 Δ⁹ (8.75%) and a significantly higher level of 18:2 Δ^{9,12} (70.5%). Basidiocarps produced at 17°C showed a significantly lower level of 18:2 Δ^{9,12} (53.8%) and a significantly higher level of 18:1 Δ⁹ (21.1%). The temperature also significantly influenced the content of FAs present in small proportions (Table 5.3). Indeed, *P. ostreatus* basidiocarps produced at higher temperatures (21 or 27°C) showed a significantly higher content of the following FAs: 12:0, 13:0, 14:0, 16:1 Δ⁷, 16:1 Δ⁹, 16:1 Δ¹¹, 17:0, 18:1 Δ¹¹, 18:3 Δ^{9,12,15}, 20:0, 20:1 Δ¹¹, 20:2 Δ^{11,14}, 22:0, 22:1 Δ¹³, and 24:0.

Non-polar extracts of *P. cornucopiae* basidiocarps grown at 17, 21 and 27°C showed no significant differences in percentage of saturated, monounsaturated, polyunsaturated and total unsaturated FAs, in U:S and P:M ratios and degree of unsaturation of C₁₈ FAs. With regard to specific FAs, basidiocarps produced at 17°C showed a significant lower level of 18:0 (5.26%) and significant higher levels of 14:0 (1.42%) and 18:1 Δ11 (0.86%).

Polar extract of *P. ostreatus* basidiocarps grown at 12°C showed significantly higher contents in polyunsaturated FAs (79.7%), total unsaturated FAs (86.2%) and 18:2 Δ9,12 (78.9%), significantly higher U:S and P:M ratios and degree of unsaturation of C₁₈ FAs, and a significantly lower level of 16:0 (Table 5.4). Basidiocarps produced at 17°C showed significantly higher levels of monounsaturated FAs (11.0%), 15:0 (0.70%), 16:1 Δ11 (0.16%), 18:1 Δ9 (10.1%) and 24:1 Δ15 (0.20%) while basidiocarps produced at 27°C displayed significantly higher levels of 18:0 (2.63%), 18:1 Δ11 (0.69%) and 24:0 (0.41%). Tridecanoic acid was detected only in basidiocarps produced at 12°C while 22:1 Δ13 was only detected in those produced at 21 and 27°C.

FA profile of polar extract of *P. cornucopiae* showed a significant increase in saturated FA (18.2 to 19.7%), monounsaturated FA (5.17 to 6.36%), 18:0 (1.89 to 3.59%), and 18:1 Δ9 (3.30 to 4.53%) contents of fruiting bodies with a temperature increase from 17 to 27°C. This increase was also observed in FAs present in smaller proportions such as 15:0, 16:1 Δ11, 17:0, 20:0, and 24:0. Lauric acid (12:0) was detected only in fruiting bodies produced at 27°C. A significant decrease in polyunsaturated FAs (76.6 to 73.9%), total unsaturated FAs (81.7 to 80.3%), 18:2 Δ9,12 content (76.0 to 73.3%), U:S ratio (4.5 to 4.1), P:M ratio

(14.8 to 11.7) and in the unsaturation level of C₁₈ FAs (1.91 to 1.85) was observed in the fruiting bodies when the temperature was increased from 17 to 27°C (Table 5.4).

5.4. Discussion

Environmental factors such as nutritional components, oxygen, and temperature (Suutari, 1995) are known to affect lipid content and composition in living organisms including fungi (Lösel, 1988). With regard to temperature, it is generally recognized that FA unsaturation increases as temperature decreases. Indeed colder temperatures generally cause an elevation in unsaturation in cells (Los & Murata, 1998; McDonough & Roth, 2004), mainly in the polar FA fraction. Modulation of FA unsaturation in polar lipids (major components of the cell membrane) is an adaptive response in cells to temperature fluctuations allowing optimal membrane fluidity for correct function of membrane-anchored enzymes and proteins (Avis & Bélanger, 2001; Lundbæk, 2006). The non-polar FA fraction mainly serves as energy reserves and does not play a central role in temperature adaptation (Suutari *et al.*, 1997). This study reports for the first time the effect of temperature on polar and non-polar FA content of fruiting bodies of *P. ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus*. *P. ostreatus* is generally considered a temperate species producing basidiocarps in a temperature range of 10 to 17°C, whereas *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* can easily produce basidiocarps between 20 and 30°C (Kong, 2004).

The results obtained showed that, at a growing temperature of 17°C, *P. ostreatus* fruiting bodies revealed a relatively low FA unsaturation in both non-polar and polar FAs.

This was the result of high 18:1 $\Delta 9$ and low 18:2 $\Delta 9,12$ percentage in both lipid fractions. When grown at 12°C, the overall unsaturation in *P. ostreatus* basidiocarps significantly increased for both non-polar and polar lipids as measured by the percentage of total unsaturated and polyunsaturated FAs, degree of unsaturation of C₁₈ FAs, and U:S and P:M ratios. This is in line with the generally recognized effect of lower temperatures on FA unsaturation as reported previously (McDonough & Roth, 2004). In particular, C₁₈ FAs are extensively implicated in adaptation to temperature stress, especially in cold temperature stress, in plants and fungi (Hasan & Ahmad, 2003; Lösel, 1988). This would be related to the activation of the gene coding for $\Delta 9$ -desaturase and $\Delta 12$ -desaturase, which preferentially unsaturate 18:0 to 18:1 $\Delta 9$ and 18:1 $\Delta 9$ to 18:2 $\Delta 9,12$, respectively, when temperature decreases (Sakai & Kajawari, 2003; Sakai & Kajawari, 2005). However, when the growth temperature was raised to 21 and 27°C, the expected FA saturation was not observed. Rather, either an increase or the absence of clear-cut tendency in FA unsaturation was observed in non-polar and polar lipid fractions. Previous work reported that fungal FA unsaturation does not necessarily follow the classic higher temperature-lower unsaturation scenario in Mucorales (Sumner *et al.*, 1969), *Fusarium oxysporum* (Wilson & Miller, 1978), *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, and *Achlya bisexualis* (Chavant *et al.*, 1981), yeasts (Suutari *et al.*, 1990), and *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei* (Suutari, 1995).

In *P. cornucopiae*, the effect of temperature varies according to the lipid fraction analyzed. FA unsaturation in non-polar lipids was not affected by temperature in *P. cornucopiae*. Conversely, the overall unsaturation of the FAs significantly decreased with

increasing temperature for polar lipids as measured by the percentage of total unsaturated and polyunsaturated FAs, degree of unsaturation of C₁₈ FAs, and U:S and P:M ratios. This indicates that FA response to temperature could be species dependent as the response in *P. cornucopiae* was different than what was observed in *P. ostreatus*.

With regard to morphology, *P. ostreatus* fruiting bodies produced at 12°C generally displayed a longer stipe and a smaller pileus diameter while *P. cornucopiae* fruiting bodies produced at 17°C showed a slightly decreased stipe/pileus ratio. Dutta & Chakravarty (1989) previously reported that temperature affects *Pleurotus* spp. carpophore morphology. They observed an increased (*P. sajor-caju* and *P. flabellatus*) or a decreased (*P. florida*) pileus diameter/stipe length ratio with an increase in temperature from 25 to 30°C.

Overall, the present work revealed that varying growth temperature influenced FA profiles in *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus*. This suggests that care should be taken when using FA content and unsaturation data for physiological, chemotaxonomic and intrageneric differentiation studies of basidiomycetous mushrooms. Moreover, these results suggest that it may be possible to environmentally manipulate lipid unsaturation in *Pleurotus* spp. through modified growth temperature and therefore may have an influence on the nutritional value of these mushrooms.

5.5. Acknowledgments

This study was supported by Conseil de Recherche en Agriculture, Pêche et Alimentation du Québec (CORPAQ). We wish to thank Mélanie Michaud for technical assistance.

Table 5.1. Morphological characteristics of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures

Species	Growth temperature (°C)	Pileus diameter (mm)	Stipe length (mm)	Stipe length/Pileus diameter
<i>P. ostreatus</i>	12	18.8 a	46.1 c	2.5 c
	17	27.0 b	26.2 a	1.0 a
	21	19.1 a	37.9 bc	2.0 bc
	27	25.8 b	30.5 ab	1.2 ab
<i>P. cornucopiae</i> var.	17	24.7 a	23.1 a	0.9 a
<i>citrino-pileatus</i>	21	26.0 a	32.8 b	1.3 b
	27	22.8 a	24.1 a	1.1 ab

For each species, values in the same column followed by a same letter are not significantly different according to Least-Squares means (LS means) comparison test ($P < 0.05$).

Table 5.2. Non-polar and polar lipid content of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures

Species	Growth temperature (°C)	Total lipid content (% w/w dw)	Polar lipid content (% w/w dw)	Non-polar lipid content (% w/w dw)
<i>P. ostreatus</i>	12	4.5 a	4.0 a	0.5 ab
	17	4.5 a	3.8 a	0.7 b
	21	3.9 a	3.5 a	0.4 a
	27	4.2 a	3.7 a	0.4 ab
<i>P. cornucopiae</i> var.	17	4.8 b	4.2 b	0.5 a
<i>citrino-pileatus</i>	21	4.5 ab	4.3 b	0.2 a
	27	3.4 a	3.0 a	0.5 a

For each species, values in the same column followed by a same letter are not significantly different according to Least-Squares means (LS means) comparison test ($P < 0.05$).

Table 5.3. Fatty acid (FA) profile of non-polar extract of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown under different temperatures

FA	<i>P. ostreatus</i>				<i>P. cornucopiae</i> var. <i>citrino-pileatus</i>		
	Growth temperature (°C)				Growth temperature (°C)		
	12	17	21	27	17	21	27
12:0	0.17 a	0.14 a	0.36 b	0.23 a	0.47 a	0.29 a	0.33 a
13:0	0.15 a	0.15 a	0.33 b	0.27 ab	0.48 a	0.42 a	0.49 a
14:0	0.34 a	0.39 a	0.82 b	0.29 a	1.42 b	1.06 ab	0.82 a
15:0	0.60 a	1.49 b	0.80 a	0.93 a	1.32 a	1.14 a	1.20 a
16:0	14.2 a	16.3 b	15.1 ab	14.6 ab	22.3 a	23.6 a	22.4 a
16:1 Δ7	0.18 a	0.12 a	0.45 b	0.43 b	0.37 a	0.36 a	0.31 a
16:1 Δ9	0.40 a	0.48 a	1.05 b	0.69 ab	0.68 a	0.71 a	0.67 a
16:1 Δ11	0.16 a	0.12 a	0.39 b	0.33 b	0.39 a	0.58 a	0.44 a
17:0	0.77 ab	0.49 a	1.30 b	1.30 b	0.63 a	0.61 a	0.57 a
18:0	2.01 a	3.11 b	3.92 b	4.08 b	5.26 a	7.93 b	7.23 b
18:1 Δ9	8.75 a	21.1 b	11.3 a	11.4 a	10.5 a	11.1 a	13.0 a
18:1 Δ11	0.20 a	0.30 a	0.49 b	0.68 c	0.86 b	0.73 ab	0.67 a
18:2 Δ9,12	70.5 c	53.8 a	60.2 b	61.6 b	51.5 a	48.4 a	49.3 a
18:3 Δ9,12,15	0.29 a	0.37 a	0.70 b	0.81 b	0.70 a	0.36 a	0.41 a
20:0	0.14 a	0.19 a	0.36 b	0.35 b	0.61 a	0.41 a	0.36 a
20:1 Δ11	0.16 a	0.20 a	0.46 b	0.28 ab	0.50 a	0.41 a	0.36 a
20:2 Δ11,14	0.15 a	0.15 a	0.33 b	0.34 b	0.37 a	0.35 a	0.28 a
22:0	0.26 a	0.24 a	0.49 b	0.34 a	0.31 a	0.31 a	0.36 a
22:1 Δ13	0.12 a	0.12 a	0.28 b	0.26 b	0.28 a	0.28 a	0.31 a
24:0	0.16 a	0.23 a	0.51 b	0.46 b	0.67 a	0.58 a	0.42 a
24:1 Δ15	0.13 a	0.34 b	0.38 b	0.21 ab	0.44 a	0.33 a	0.26 a
Saturated	18.8 a	22.8 b	24.0 b	22.9 b	33.4 a	36.4 a	34.2 a
Monounsaturated	10.1 a	22.8 c	14.8 b	14.3 b	14.0 a	14.5 a	15.9 a
Polyunsaturated	71.0 c	54.3 a	61.2 b	62.8 b	52.5 a	49.1 a	50.0 a
Total unsaturated	81.1 b	77.2 a	76.0 a	77.1 a	66.6 a	63.6 a	65.9 a
Degree of unsaturation (Δ/mol C ₁₈) ^a	1.85 c	1.65 a	1.75 b	1.75 b	1.69 a	1.60 a	1.61 a
U:S ratio ^b	4.3 b	3.4 a	3.3 a	3.5 a	2.0 a	1.8 a	2.0 a
P:M ratio ^c	7.1 c	2.4 a	4.3 b	4.5 b	3.8 a	3.4 a	3.5 a

FA profiles are presented in percent area (% of total area). For the same species, values on the same row followed by a same letter are not significantly different according to Least-Squares means (LS means) test ($P < 0.05$).

^aΔ/mol C₁₈ = [(1 × 18:1) + (2 × 18:2) + (3 × 18:3)] / Σ (C₁₈ FAs)

^bRatio of unsaturated/saturated FAs

^cRatio of polyunsaturated/monounsaturated FAs

Table 5.4. Fatty acid (FA) profile of polar extract of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures

FA	<i>Pleurotus ostreatus</i>				<i>Pleurotus cornucopiae</i> var. <i>citrino-pileatus</i>		
	Growing temperature (°C)				Growing temperature (°C)		
	12	17	21	27	17	21	27
12:0	- ^a	-	-	-	-	-	0.01
13:0	0.01	-	-	-	-	-	-
14:0	0.09 a ^b	0.13 a	0.10 a	0.10 a	0.36 a	0.46 a	0.40 a
15:0	0.31 a	0.70 b	0.27 a	0.30 a	0.25 a	0.29 a	0.42 b
16:0	11.3 a	12.2 b	12.0 b	12.1 b	15.3 a	14.9 a	14.5 a
16:1 Δ7	0.05 a	0.06 a	0.06 a	0.05 a	0.09 a	0.13 a	0.14 a
16:1 Δ9	0.18 b	0.17 ab	0.16 ab	0.13 a	0.24 a	0.18 a	0.21 a
16:1 Δ11	0.14 c	0.16 d	0.10 a	0.11 b	0.18 a	0.22 ab	0.27 b
17:0	0.11 a	0.12 a	0.09 a	0.11 a	0.13 a	0.19 ab	0.19 b
18:0	1.72 a	1.91 a	1.85 a	2.63 b	1.89 a	2.62 b	3.59 c
18:1 Δ9	5.69 a	10.1 b	7.54 a	7.59 a	3.30 a	3.75 a	4.53 b
18:1 Δ11	0.17 a	0.21 a	0.24 a	0.69 b	1.07 ab	1.23 b	0.82 a
18:2 Δ9, 12	78.9 c	72.5 a	76.4 bc	74.3 ab	76.0 b	74.5 ab	73.3 a
18:3 Δ 9, 12, 15	0.75 a	0.78 a	0.68 a	0.82 a	0.44 a	0.55 a	0.51 a
20:0	0.10 a	0.08 a	0.07 a	0.11 a	0.09 a	0.14 ab	0.18 b
20:1 Δ11	0.11 ab	0.10 a	0.12 b	0.10 a	0.09 a	0.14 a	0.11 a
20:2 Δ11,14	0.08 a	0.09 a	0.10 a	0.09 a	0.09 a	0.19 a	0.15 a
22:0	0.10 a	0.08 a	0.05 a	0.10 a	0.11 a	0.12 a	0.17 a
22:1 Δ13	-	-	0.02 a	0.12 b	0.11 ab	0.08 a	0.15 b
24:0	0.12 a	0.19 a	0.14 a	0.41 b	0.11 a	0.15 ab	0.20 b
24:1 Δ15	0.13 b	0.20 c	0.08 a	0.06 a	0.10 a	0.09 a	0.13 a
Saturated	13.8 a	15.3 bc	14.6 ab	15.8 c	18.2 a	18.9 ab	19.7 b
Monounsaturated	6.47 a	11.0 c	8.30 b	8.07 ab	5.17 a	5.82 ab	6.36 b
Polyunsaturated	79.7 c	73.4 a	77.1 b	76.1 b	76.6 b	75.3 ab	73.9 a
Total unsaturated	86.2 b	84.4 a	85.4 b	84.2 a	81.7 b	81.1 ab	80.3 a
Degree of unsaturation (Δ/mol C ₁₈) ^c	1.90 c	1.84 a	1.88 b	1.84 a	1.91 b	1.88 b	1.85 a
Ratio U:S ^d	6.25 c	5.40 a	5.87 b	5.36 a	4.50 b	4.29 ab	4.09 a
Ratio P:M ^e	12.3 c	6.78 a	9.35 b	9.89 b	14.8 b	13.3 ab	11.7 a

FA profiles are presented in percent area (% of total area). For the same species, values on the same row followed by a same letter are not significantly different according to Least-Squares means (LS means) test ($P < 0.05$).

^aΔ/mol C₁₈ = [(1 × 18:1) + (2 × 18:2) + (3 × 18:3)] / Σ (C₁₈ FAs)

^bRatio of unsaturated/saturated FAs

^cRatio of polyunsaturated/monounsaturated FAs

5.6. References

Avis, T.J. & Bélanger, R.R. (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 956-960.

Bagci, E., Bruehl, L., Aitzetmuller, K., Altan, Y. (2003) A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocochromanol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 27: 141-147.

Bao, Y.Y., Zhang Y., Tolgor, L.Y. (2004) Chemical components of *Pleurotus citrinopileatus* Singer. *Mycosystema*, 23: 262-269.

Chang, S.T. & Miles, P.G. (2004) The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton: 27-37.

Chavant, L., Wolf, C., Fonvieille, J.L., Dargent, R. (1981) Deviation from the usual relationship between temperature, the growth rate, the fatty acid composition and the lipid microviscosity of four different fungi (*Mucor mucedo*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Achlya bisexualis*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101: 912-920.

Christie, W.W. (1998) Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33: 343-353.

Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M., Aggelis, G. (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106: 925-929.

Dutta, M.K. & Chakravarty, D.K. (1989) Behaviour of different species of *Pleurotus* in cultivation and culture. *Indian Journal of Mycological Research*, 27: 143-147.

Erwin, J.A. (1973) Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. Dans: Erwin, J.A. (ed.), *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. Academic Press, New York: 41-143.

Hasan, F. & Ahamad, R.A. (2003) Effects of seasonal variations on oil and fatty acid profile of sunflower. *Helia*, 26: 159-166.

Kong, W.S. (2004) Descriptions of commercially important *Pleurotus* species. Dans: *Mushroom Growers' Handbook: Oyster Mushroom Cultivation*. Heinhart, Seoul: 54-61.

Los, D.A. & Murata, N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394: 3-15.

Lösel, D.M. (1988) Fungal lipids. Dans: Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (eds), *Microbial Lipids, Volume 1*. Academic Press, London: 699-805.

Lundbæk, J.A. (2006) Regulation of membrane protein function by lipid bilayer elasticity—a single molecule technology to measure the bilayer properties experienced by an embedded protein. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18: S1305-S1344.

McDonough, V. & Roth, T.M. (2004) Growth temperature affects accumulation of exogenous fatty acids and fatty acid composition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 349-354.

Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005) Diets and cardiovascular disease an evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45: 1379-1387.

Royse, D.J., Rhodes, T.W., Ohga, S., Sanchez, J.E. (2004) Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (Oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. *Bioresource Technology*, 91: 85-91.

Sakai, H. & Kajiwara, S. (2003) A stearyl-CoA-specific $\Delta 9$ fatty acid desaturase from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 2431-2437.

Sakai, H. & Kajiwara, S. (2005) Cloning and functional characterization of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Molecular Genetic and Genomics*, 273: 336-341.

Stahl, P.D. & Klug, M.J. (1996) Characterization and differentiation of filamentous fungi based on the fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4136-4146.

Sumner, J.L., Morgan, E.D., Evans, H.C. (1969) The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales. *Canadian Journal of Microbiology*, 15: 515-520.

Suutari, M. & Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20: 285-328.

Suutari, M., Liukkonen, K., Laakso, S. (1990) Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of General Microbiology*, 136: 1469-1474.

Suutari, M., Rintamäki, A., Laakso, S. (1997) Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: alterations in fatty acid chain length and unsaturation. *Journal of Lipid Research*, 38: 790–794.

Suukari, M. (1995) Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*, 164: 212-216.

Wilson, A.C. & Miller, R.W. (1978) Growth temperature-dependent stearyl coenzyme A desaturase activity in *Fusarium oxysporum* microsomes. *Canadian Journal of Biochemistry*, 56: 1109-1114.

Wolff, R.L., Lavialle, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Destailats, F., Marpeau, A.M., Angers, P., Aitzetmüller, K. (2002) Abietoid seed fatty acid composition – A review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of Pinaceae. *Lipids*, 37: 17-26.

CHAPITRE 6 - ANALYSE ET PURIFICATION DE COMPOSÉS INCONNUS CHEZ *GANODERMA TSUGAE*

Sommaire

On reconnaît aux champignons du genre *Ganoderma* de nombreuses propriétés médicinales qui sont principalement attribuables à la présence d'acides triterpéniques et dérivés. Des travaux préliminaires effectués sur les souches québécoises de *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum* et *G. tsugae* n'ont pu démontrer la présence chez ces dernières de triterpènes retrouvés chez les souches asiatiques de *Ganoderma* et reconnus pour leurs propriétés thérapeutiques; par contre ils ont permis de soupçonner la présence de 16 composés ayant potentiellement des structures triterpéniques (Annexes A et B). Afin d'approfondir la caractérisation de ces composés potentiellement bioactifs chez *G. tsugae*, deux d'entre eux, soient les composés A et B, avec un poids moléculaire respectif de 646 et 662 *m/z*, ont été partiellement purifiés et caractérisés. Les travaux menés ont permis l'isolation des composés A et B en mélange, et du composé B pur. Les analyses spectroscopiques indiquent qu'il s'agit probablement d'un composé triterpénique à cinq cycles à six membres fonctionnalisé d'une chaîne latérale constituée de quelques insaturations tel qu'une fonction carbonyle α , β -insaturée. Ces résultats suggèrent la présence de composés à cinq hexacycles chez les souches québécoises de *Ganoderma tsugae*. Ce type de composé est peu rapporté chez les mycètes, mais des études récentes tendent à démontrer que les champignons peuvent synthétiser des composés ayant un squelette pentacyclique, ce qu'on croyait jusqu'à tout récemment réservé aux plantes vertes.

Résumé

Les espèces du genre *Ganoderma* sont à l'origine d'un marché extrêmement lucratif, principalement en Asie où l'on attribue à ces champignons de nombreuses propriétés médicinales. L'espèce *Ganoderma tsugae*, communément rencontrée dans les forêts de conifères du Québec, possède plusieurs propriétés nutraceutiques attribuables entre autres à la présence de nombreux triterpènes. Des travaux préliminaires menés sur les spécimens québécois du genre *Ganoderma* ont suggéré que les ganodermes récoltés au Québec possèdent des triterpènes qui leur sont spécifiques (Annexes A et B). Dans cette optique, cette étude visait la purification et la caractérisation de composés ayant une structure potentiellement triterpénique chez *G. tsugae*. Le fractionnement primaire d'un extrait méthanolique concentré de *G. tsugae* a permis soupçonner la présence de deux composés majeurs, les composés A et B, ayant des poids moléculaires respectifs de 646 et 662. L'isolation des composés A et B en mélange, et du composé B pur a été réalisée. L'analyse des spectres de masse et des spectres UV-visible des composés A et B a permis de déterminer deux formules moléculaires possibles pour chaque composé, soient $C_{40}H_{38}O_8$ et $C_{41}H_{42}O_7$ pour le composé A, et $C_{40}H_{38}O_9$ et $C_{41}H_{42}O_8$ pour le composé B. Au niveau structural, les données obtenues suggèrent qu'il s'agit probablement d'un composé triterpénique à cinq cycles à six membres fonctionnalisé d'une chaîne latérale constituée de quelques insaturations tel qu'une fonction carbonyle α , β -insaturée. L'analyse structurale n'a toutefois pas pu être complétée. Les composés à cinq hexacycles sont peu rapportés chez les mycètes, mais de récentes études tendent à démontrer que les champignons peuvent synthétiser des composés ayant un squelette pentacyclique, ce qu'on croyait jusqu'à tout récemment réservé aux plantes vertes. D'autres investigations sont nécessaires afin de confirmer la présence de tels composés chez le genre *Ganoderma*.

6.1. Introduction

Les espèces du genre *Ganoderma* sont à l'origine d'un marché vaste et extrêmement lucratif, principalement en Asie où on attribue à ce champignon de nombreuses propriétés médicinales. Sur le plan mondial, on estime que les ventes de *Ganoderma* et des produits qui en sont dérivés augmentent annuellement de 18%, si bien qu'en 2002, près de 4 900 à 5 000 tonnes de ganodermes ont été produites et vendues sous une centaine de marques de commerce différentes, totalisant un chiffre d'affaire de 2.16 milliards de dollars américains (Lai *et al.*, 2004).

L'espèce *Ganoderma tsugae* (Figure 6.1) figure, avec *G. lucidum* et *G. applanatum*, parmi les espèces de ganodermes communément rencontrées dans les forêts de conifères du Québec (Boulet, 2003). Il s'agit d'un saprophyte qui se développe avant tout sur les vieilles souches, au pied des chicots ou sur les arbres morts, principalement sur la pruche, qui est son hôte habituel (Boulet, 2003). Au contraire de *G. applanatum*, qui peut vivre plus de 40 ans accroché au même arbre, *G. tsugae* produit des carpophores annuels dont la croissance s'amorce au printemps pour se terminer à l'automne (Boulet, 2003). D'abord jaune rougeâtre, le carpophore de *G. tsugae* devient brun rougeâtre avec l'âge ; sa chair est généralement blanche et molle, mais un peu plus foncée et fibreuse près des pores (Boulet, 2003).

Comme la plupart des espèces du genre *Ganoderma*, on attribue à *G. tsugae* plusieurs propriétés nutraceutiques : antitumoral, immunomodulant, antioxydant et anti-allergies (Yen & Wu, 1999 ; Wasser, 2002 ; Gao *et al.*, 2004 ; Paterson, 2006). Certaines de

ces propriétés sont attribuables à la présence de triterpènes (Paterson, 2006) qui peuvent entre autres inhiber la prolifération cellulaire de certaines lignées de cellules cancéreuses et même en provoquer la mort par apoptose (Gan *et al.*, 1998). D'autres triterpènes connus pour être anticancéreux, antioxydants et hépatoprotecteurs, soient les acides ganodériques A, B, C, D, E, C5, C6, et G, d'abord isolés chez *G. lucidum*, ont ensuite été identifiés chez *G. tsugae* (Chen & Chen, 2003).

Les premiers travaux effectués sur les spécimens québécois du genre *Ganoderma* (Annexe A) ont suggéré que les ganodermes récoltés au Québec possèdent des triterpènes qui leur sont spécifiques. Afin de poursuivre ce travail, entamé précédemment sur l'espèce *Ganoderma tsugae*, et d'identifier des triterpènes spécifiques aux spécimens québécois du genre *Ganoderma*, cette étude visait la purification et la caractérisation de quelques-unes de ces molécules.



Figure 6.1. *Ganoderma tsugae* se développant sur un conifère du Québec. (Photo: Jacques Landry, avec sa permission)

6.2. Matériel et méthode

6.2.1. Matériel fongique

Les carpophores de *G. tsugae*, analysés dans le cadre de cette étude provenaient de du Bois Becket, situé dans la région de Sherbrooke. Tous les spécimens ont été récoltés et identifiés par le mycologue Maurice Thibault³. Ils ont par la suite été lyophilisés, pulvérisés, homogénéisés et conservés à -35°C jusqu'à l'analyse.

6.2.2. Extraction et fractionnement primaire

Un échantillon de *Ganoderma tsugae* (200 g) a été extrait avec du méthanol (4 L) chauffé à 60°C puis laissé à 20°C pendant 72 h, avec agitation magnétique constante (Figure 6.2A). Le solvant a ensuite été évaporé sous vide, jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (14,9 g). L'extrait sec a été resuspendu dans le méthanol 25% (150 mL), acidifié jusqu'à pH 4 avec HCl 1N puis, selon un protocole inspiré de Shim *et al.* (2004) extrait successivement avec de l'hexane (3×100 mL), du dichlorométhane (CH_2Cl_2) (3×100 mL), de l'acétate d'éthyle (EtOAc) (3×100 mL) et du butanol (BuOH) (3×100 mL) (Figure 6.2B). Chaque fraction a ensuite été séchée sur Na_2SO_4 anhydre, concentrée sous vide à ($\geq 35^{\circ}\text{C}$ ⁴) et pesée.

³ Maurice Thibault est mycologue et auteur du livre « 250 champignons du Québec et de l'Est du Canada », publié aux Éditions du Trécarré (1989).

⁴ Sauf pour le butanol. Puisque ce solvant a un point d'ébullition de 117°C , la température du bain a dû être augmentée pour arriver à évaporer le solvant.

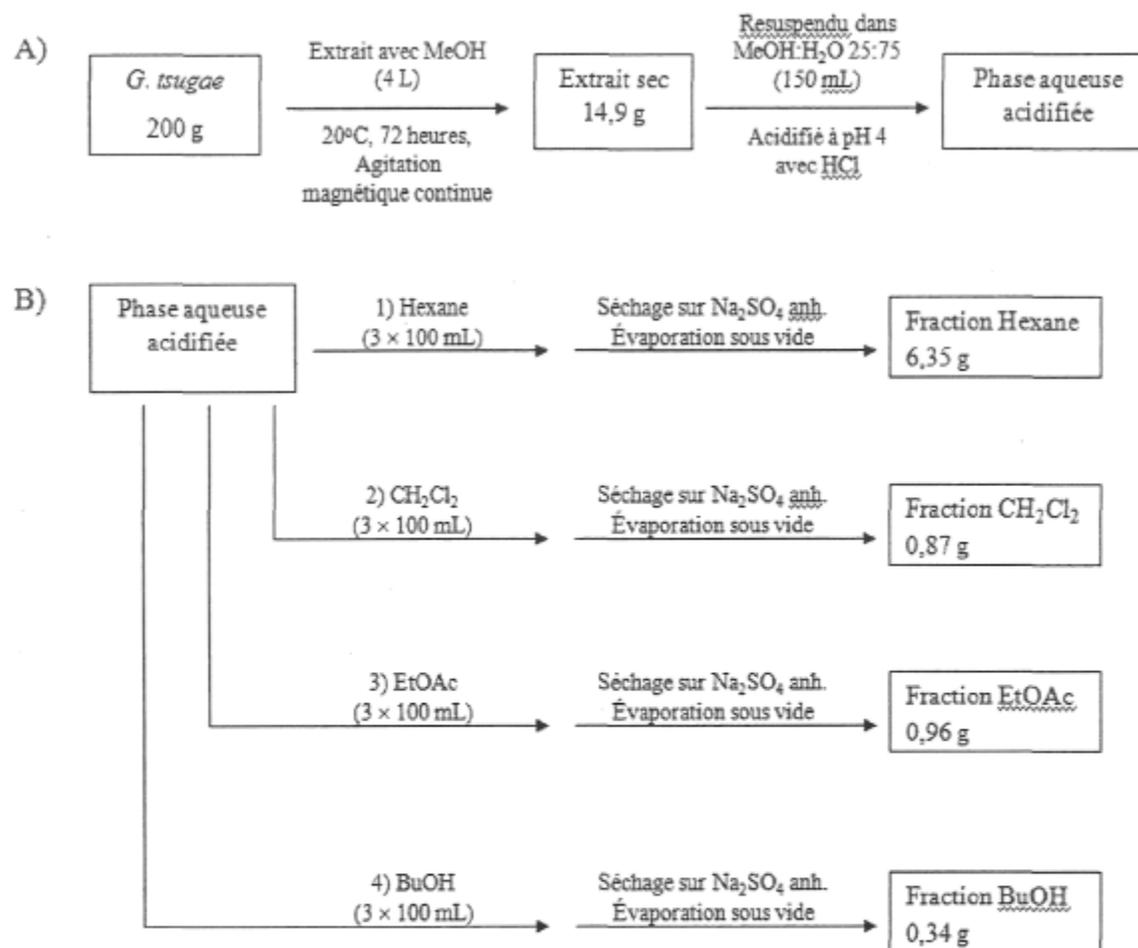


Figure 6.2. Schéma expérimental appliqué au début des expériences de purification. A) Extraction de *Ganoderma tsugae* ; B) Fractionnement de l'extrait brut avec des solvants de polarité croissante.

6.2.3. Fragmentation et analyse de la fraction CH_2Cl_2

La fraction CH_2Cl_2 (0,96 g) a été resuspendue dans 2 mL de dichlorométhane puis fractionnée sur une colonne de silice (gel de silice 60, 30 g, 20 mm diam. \times 250 mm) conditionnée avec de l'hexane. L'échantillon a été déposé sur la colonne puis un gradient de polarité (Tableau 6.1) a été appliqué. Un total de 76 fractions d'environ 40 mL chacune a été récolté, concentré sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) et conservé à -35°C jusqu'à l'analyse.

Les fractions ont été analysées par CCM (Silica Gel 60 F₂₅₄, 20 \times 20 cm, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) avec différentes phases mobiles, selon leur polarité : les fractions no 1 à 30 ont été analysées sur Hexane:EtOAc:HCOOH 80:20:1, les fractions 31 à 49 ont été analysées avec Hexane:EtOAc:HCOOH 60:40:1 et les fractions 50 à 76 ont été analysées avec Hexane:EtOAc:HCOOH 50:50:1. Toutes les CCM ont été révélées d'abord à l'UV puis avec le réactif suivant : $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (40 g) dissous dans H_2SO_4 (40 mL) et H_2O (360 mL), qui nécessitait un chauffage jusqu'à l'apparition de taches bleues. Les fractions ont ensuite été groupées selon leur composition (Tableau 6.2). Les extraits ont été évaporés à sec sous N_2 , pesés et conservés à -35°C jusqu'à l'analyse.

Les fractions ont été dissoutes dans différents volumes et solvants, selon leur masse et leur polarité, puis analysées en CPG-SM sur une colonne capillaire ZB-5 (5%-phényl méthylpolysiloxane, 30 m \times 0.25 mm d.i. \times 0.25 μm épaisseur du film, Phenomenex, Torrance, CA), installée dans un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 Series II (Agilent, Palo Alto, CA) connecté à un spectromètre de masse quadrupolaire Agilent model

5973N utilisé en ionisation électronique (70 eV), avec le logiciel HP ChemStation. L'injecteur, en mode de non partage, était maintenu à une température de 300°C. Le programme de température suivant a été appliqué : température initiale de 50°C, maintenue pendant une minute, augmentée à 100°C à un taux de 20°C · min⁻¹ puis à 325°C à un taux de 10°C · min⁻¹ puis maintenue à 325°C pour 15 min. L'hélium était le gaz porteur utilisé, sous débit constant (1 mL · min⁻¹). Les masses étaient balayées dans un intervalle de 50 à 800 *m/z*.

Deux composés majeurs, nommés A ($M^+ = 646 \text{ } m/z$) et B ($M^+ = 662 \text{ } m/z$) ont été localisés dans les fractions 3-4 à 47-48 (en différentes proportions) (Figure 6.3). Les étapes subséquentes de purification visent l'isolation de ces composés.

Tableau 6.1. Conditions d'élution pour le fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction CH₂Cl₂ extraite de *G. tsugae*

Solvant	Proportions	Volume utilisé (mL)
Hexane	100%	300 ¹
Hexane : EtOAc	9:10	200
Hexane : EtOAc	8:2	250
Hexane : EtOAc	7:3	250
Hexane : EtOAc	6:4	250
Hexane : EtOAc	1:1	200
Hexane : EtOAc	4:6	200
Hexane : EtOAc	3:7	250
Hexane : EtOAc	2:8	250
Hexane : EtOAc	1:9	200
EtOAc	100%	250
EtOAc : MeOH	7:3	250
EtOAc : MeOH	1:1	250
EtOAc : MeOH	3:7	500
MeOH	100%	500

¹Inclut le volume mort de la colonne, récolté après le dépôt de l'échantillon.

Tableau 6.2. Groupement des fractions issues de la chromatographie sur gel de silice de la fraction CH₂Cl₂ extraite de *G. tsugae* et masse de chaque extrait sec

Fraction (no)	Masse de l'extrait sec (mg)	Fraction (no)	Masse de l'extrait sec (mg)
1-2	189	31-34	135
3-4	205	35-36	69
5	126	37-38	65
6-7	159	39-40	56
8-9	146	41	26
10	24	42-43	39
11-13	122	44-46	29
14-16	66	47-48	7
17-19	30	49	18
20	23	50-53	238
21	29	54-55	21
22	18	56-57	81
23	15	58-59	15
24	7	60-62	7
25	10	63-65	9
26	10	66-68	4
27	9	69-71	7
28	18	72-74	5
29	21	75-76	3
30	24	-	-

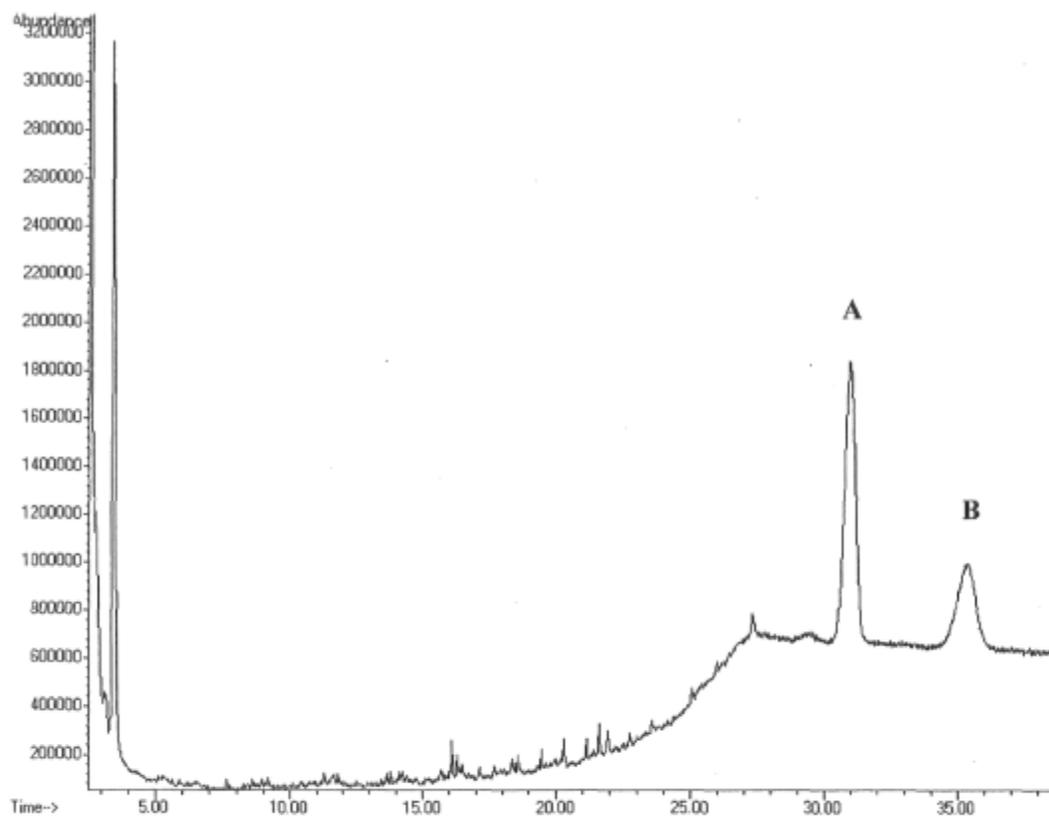


Figure 6.3. Analyse en CPG-SM de la fraction CH_2Cl_2 no 27 issue de la purification de la fraction dichlorométhane d'un extrait méthanolique de *Ganoderma tsugae*. Les composés A et B sont ceux ciblés pour l'isolation.

6.2.4. Isolation des composés A et B par chromatographie sur couche mince

Un échantillon provenant de la fraction CH_2Cl_2 no 27 (4.5 mg, Tableau 6.2, Figure 6.3) a été fractionné par chromatographie sur couche mince (CCM) (Silica Gel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) avec la phase mobile suivante : CHCl_3 :MeOH 95:5. La plaque a été révélée à l'UV puis un dépôt en marge de la plaque a été révélé avec le réactif décrit à la section 6.2.3. La fraction CH_2Cl_2 no 25 (10 mg, Tableau 6.2) a été traitée de la même façon.

Les bandes (six pour la fraction CH_2Cl_2 no 27 et quatre pour la fraction CH_2Cl_2 no 25) ont été grattées, resuspendues dans une solution CHCl_3 :MeOH 2:1, filtrées et analysées en CPG-DIF⁵ sur une colonne capillaire ZB-5 (Phenomenex, Torrance, CA, 5%-phényl méthylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 µm épaisseur du film), installée dans un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 Series II (Agilent, Palo Alto, CA) connecté à un détecteur à ionisation de flamme, maintenu à 300°C, avec le logiciel HP ChemStation. L'injecteur, en mode de non partage, était maintenu à une température de 300°C. Le programme de température décrit à la section 6.2.3 a été appliqué. L'hydrogène était le gaz porteur utilisé, sous débit constant (1 mL · min⁻¹).

Les bandes no 5 et 6 de la fraction CH_2Cl_2 no 27 et les bandes no 1, 2 et 4 de la fraction CH_2Cl_2 no 25 ont été mélangées pour donner un échantillon de 5 mg contenant le composé B majoritaire et le composé A (Figure 6.4).

⁵ Le passage de la CPG-SM à la CPG-DIF était seulement dû à la disponibilité des appareils.

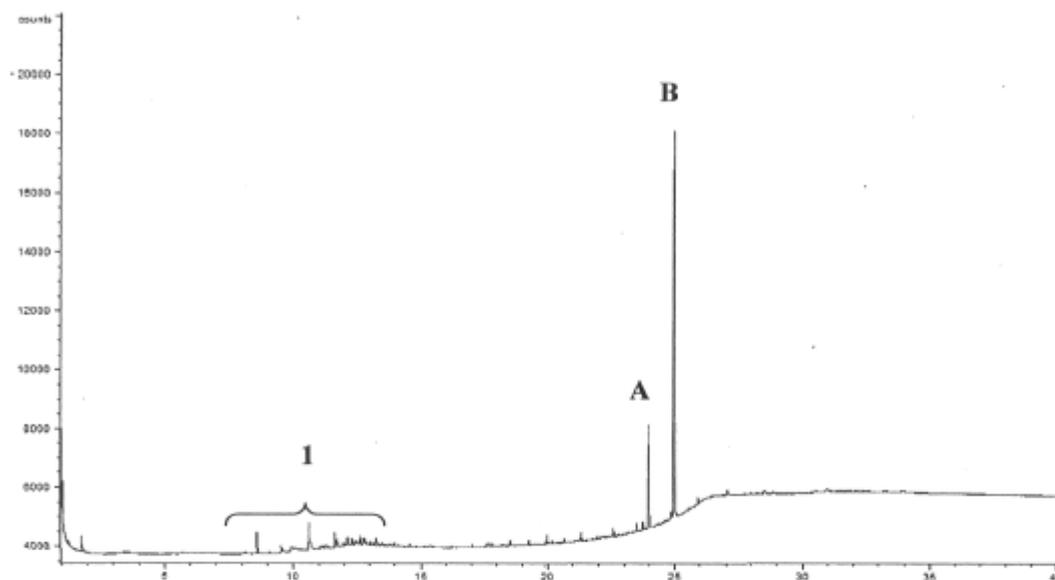


Figure 6.4. Analyse en CPG-DIF de l'échantillon issu de la purification sur CCM des fractions CH_2Cl_2 no 25 et 27 issues du fractionnement sur colonne de l'extrait dichlorométhane de *Ganoderma tsugae*. Les composés A et B sont ceux ciblés pour la purification. Les petits pics de la section 1 et plusieurs pics mineurs du chromatogramme proviennent du solvant. Les pics situés entre 12 et 15 min sont des impuretés, principalement des hydrocarbures.

6.2.5. Isolation du composé B par Séphadex LH-20.

Un échantillon (75 mg dans 1,5 mL CH_2Cl_2) de la fraction CH_2Cl_2 no 5 (Figure 6.5A) a été fractionné sur une colonne de gel Sephadex LH-20. Pour la préparation de la colonne, 8 g de poudre de gel ont été suspendus pendant 3 heures, à 4°C, dans une solution de dichlorométhane contenant 1% de tétrahydrofurane, donnant un volume d'environ 50 mL de gel. Le gel a été transféré dans une colonne donnant un volume final de 85 × 10 mm diam. La colonne a été conditionnée avec la même solution. L'échantillon a été déposé sur la colonne puis élué en phase isocratique avec une solution de dichlorométhane contenant 1% de THF, à un débit de 1 mL · min⁻¹. 13 fractions (1A à 13A, 2 mL par fraction) ont été récoltées, concentrées sous N₂ et analysées en CPG-SM selon la méthode décrite à la section 6.2.3.

La fraction 3A (Figure 6.5B, 3,1 mg) a été refractionnée dans les mêmes conditions. Dix fractions (1B à 10B, 1,5 ml par fraction) ont été récoltées, concentrées sous N₂ et analysées en CPG-SM dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 6.2.3. La fraction 4B (Figure 6.5D) a été conservée (0,3 mg) pour analyse.

La fraction 4A (Figure 6.5C) a été refractionnée sur Séphadex LH-20 dans des conditions similaires à la fraction 3A. Dix fractions (1C à 10C, 1,5 mL par fraction) ont été récoltées, concentrées sous N₂ et analysées en CPG-SM dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 6.2.3. La fraction 4C (Figure 6.5E) a été conservée (0,4 mg) pour analyse. Une récapitulation des étapes de purification est présentée au tableau 6.3.

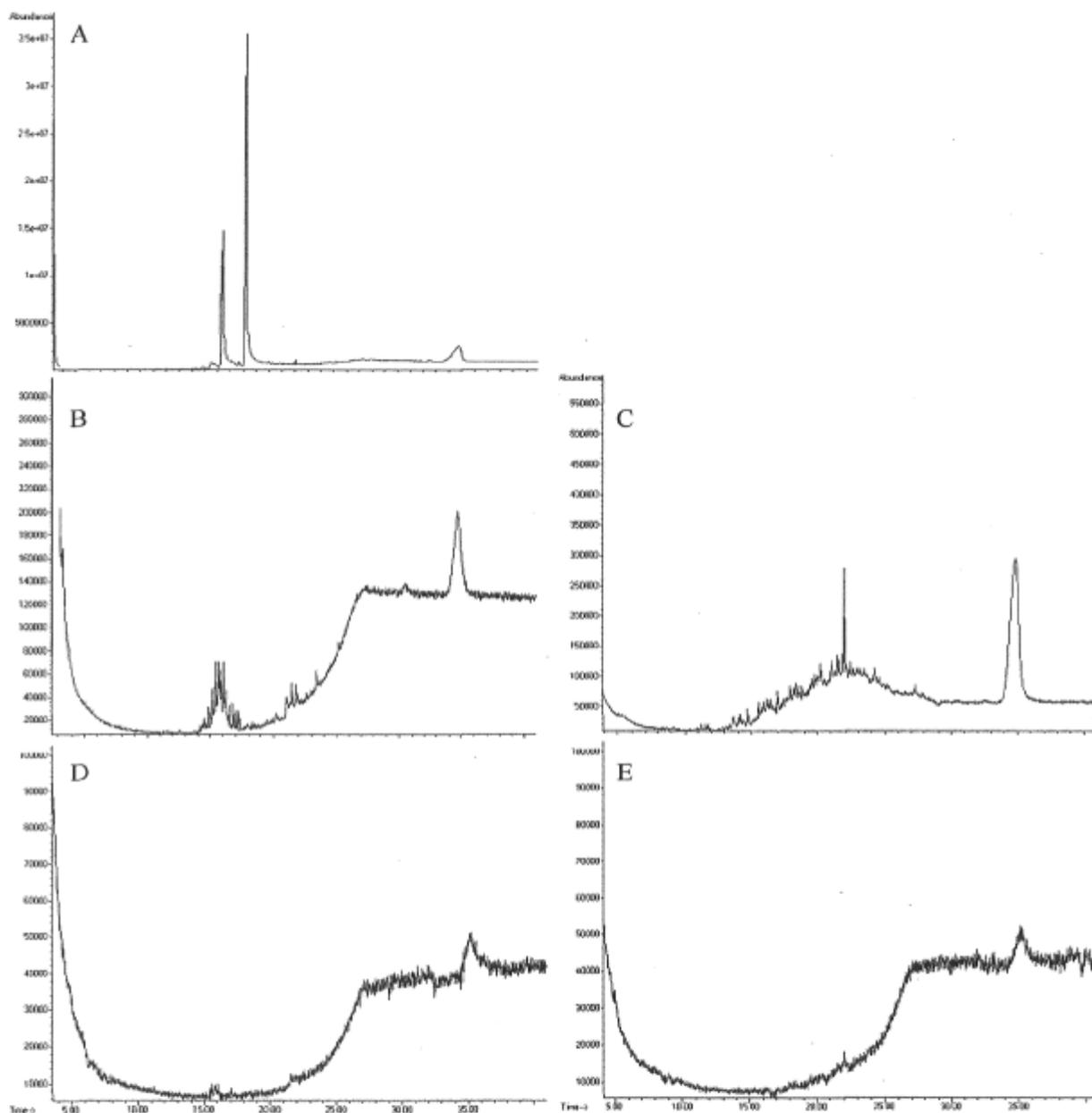


Figure 6.5. Analyse en CPG-SM de la fraction CH_2Cl_2 no 5 (A) issue de la purification d'un extrait méthanolique de *Ganoderma tsugae* et des fractions 3A (B), 4A (C), 4B (D) et 4C (E) issues du fractionnement sur Séphadex LH-20 de la fraction no 5.

Les pics entre 12 et 25 min sont des acides gras, les pics mineurs sont principalement des hydrocarbures divers (NIST 98 Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, 2000). Le composé B est ciblé pour l'isolation.

Tableau 6.3. Récapitulation des étapes effectuées au cours de la purification des composés A et B, suite à la chromatographie sur gel de silice de la fraction CH₂Cl₂ extraite de *G. tsugae*

Technique de purification utilisée	Fraction CH ₂ Cl ₂ (no)	Sous-fractions ¹	Fractions obtenues	Composés présents dans les fractions	Analyse effectuée
CCM	25, 27		5 bandes récupérées et mélangées	A et B ²	RMN
	5		1 à 13A		
		3A	1 à 10B		
Séphadex LH-20		4B	-	B	Spectroscopie UV
		4A	1 à 10C		
		4C	-	B	Spectroscopie UV

¹ Fractions obtenues à partir de la fraction CH₂Cl₂ no 5 et repurifiées avec la même technique.

² En gras, composé majoritaire dans la fraction.

6.2.6. Analyses spectroscopiques

L'échantillon (5 mg) obtenu de la purification par CCM des fractions CH_2Cl_2 no 25 et 27 (Section 6.2.4) a été envoyé dans un laboratoire universitaire⁶ pour être analysé en RMN.

Les spectres UV-visible de la fraction CH_2Cl_2 no 24 (1 mg/mL Hexane:Acétate d'éthyle 30:70, Figure 6.6A), contenant majoritairement le composé A, et des fractions 4B et 4C (0,4 mg/mL CH_2Cl_2 , Figure 6.6B), contenant le composé B pur, ont été mesurés de 200 à 900 nm sur un spectrophotomètre (Agilent, Palo Alto, CA) connecté à un ordinateur avec le logiciel HP ChemStation, utilisé en mode balayage. Une solution d'hexane:acétate d'éthyle 30:70, et du dichlorométhane pur ont respectivement été utilisés comme blancs.

⁶ Dr Françoise Sauriol, Département de Chimie, Queen's University, Kingston (Ontario), Canada.

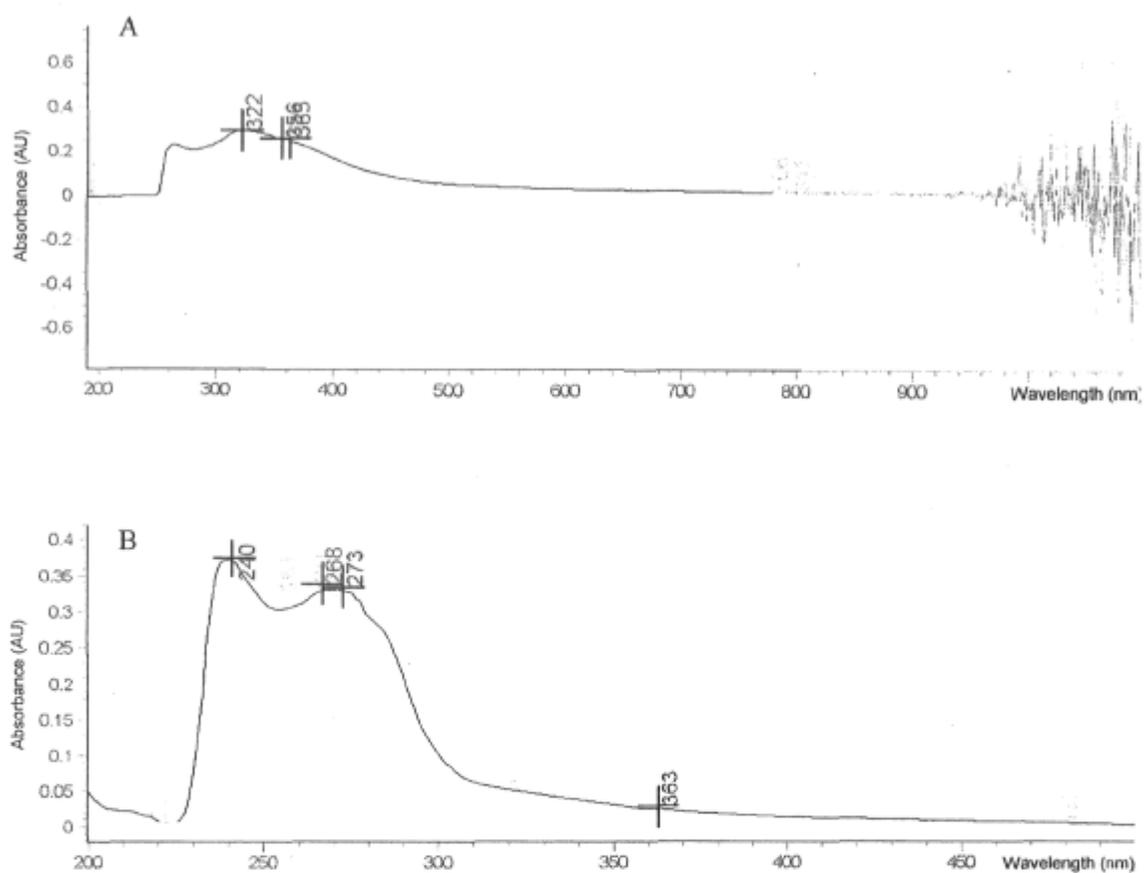


Figure 6.6. Spectres UV-visible du composé A en fraction partiellement purifiée (fraction CH_2Cl_2 no 24, 1 mg/mL Hexane : Acétate d'éthyle 30 :70, A) et du composé B en fraction pure (fraction 4C, 0,4 mg/mL CH_2Cl_2 , B).

6.3. Résultats et discussion

6.3.1. Extraction et isolation

La présence des composés A et B a été remarquée lors des premières expériences visant l'analyse de triterpènes connus chez le genre *Ganoderma* (Annexe A). Dans le présent chapitre, les analyses visant la purification de triterpènes inconnus chez les spécimens québécois de *Ganoderma tsugae* ont révélé que les composés A et B étaient majeurs dans les fractions issues du fractionnement d'un extrait dichlorométhane sur colonne de silice (Figures 6.3). C'est pourquoi ces molécules ont de prime abord été ciblées pour l'isolation.

Une des premières complications rencontrées lors des essais de purification de ces composés fut leur comportement incohérent sur les supports traditionnels de chromatographie tels que la silice, l'alumine et certaines phases moins polaires (phényle-hexyle)⁷. De fait, malgré le gradient de polarité appliqué lors de la chromatographie sur silice de l'extrait dichlorométhane, les deux molécules ont été trouvées dans les fractions no 6 à 46, en différentes proportions⁸. La seconde complication rencontrée a été la difficile séparation des composés A et B l'un de l'autre : en dépit de l'utilisation, sous différentes conditions, de techniques offrant une bonne résolution, comme la CLHP semi-préparative (non décrit dans la section 6.2), cette séparation n'a pu être effectuée de manière satisfaisante. En outre, l'hypothèse que ces composés soient des contaminants provenant du

⁷ Des essais sur alumine basique et en CLHP semi-préparatif sur une colonne phényle-hexyle ont été effectués mais ne sont pas décrits dans la section 6.2.

⁸ La diminution de l'un n'était toutefois pas proportionnelle à l'apparition de l'autre.

solvant a été écartée suite à l'analyse des solvants utilisés. Il est en effet connu que le méthanol et le chloroforme contiennent habituellement du dioctylphtalate et que ce composé est souvent isolé au cours d'investigations phytochimiques (Silva *et al.*, 1998).

La fraction CH₂Cl₂ no 5 (Tableau 6.2), qui contenait majoritairement le composé B, a permis l'isolation de celui-ci sur gel Sephadex LH-20. La quantité obtenue, insuffisante pour une analyse RMN, a toutefois permis d'obtenir le spectre UV-visible du composé B.

Un échantillon contenant majoritairement le composé B en mélange avec le composé A (Figure 6.4) a été analysé en RMN. Les structures n'ont toutefois pas pu être élucidées car l'échantillon s'est décomposé au cours de l'analyse, ce qui a par la suite été confirmé lors du contrôle du même échantillon en CPG-SM. Il est possible que cette décomposition ait été causée par le chloroforme deutéré utilisé en RMN qui contient la plupart du temps des traces d'acides (Silva *et al.*, 1998), mais dont le pH peut descendre davantage s'il est exposé à l'air ou à la lumière. Des essais sur l'alumine basique (non décrits dans la section 6.2) ont confirmé que ces composés avaient une certaine sensibilité au pH.

6.3.2. Hypothèses structurales sur les composés A et B

Les essais de silylation et d'hydrolyse effectués au cours de travaux préliminaires sur *G. tsugae* (Annexe A) ont montré que ces composés n'avaient pas de fonction hydroxyle, ni de fonction acide carboxylique, et qu'elles n'étaient pas glycosylées. L'hypothèse d'une parenté structurale entre les composés A et B a par ailleurs été avancée à cause de leur comportement similaire lors des essais de séparation et leur concomitance dans plusieurs fractions. Leurs formules chimiques pourraient donc être apparentées.

Les spectres de masses des composés A et B (Figures 6.7A et B), obtenus par CPG-SM, montrent un poids moléculaire respectif de 646 m/z et de 662 m/z . L'analyse du poids moléculaire a permis d'obtenir plusieurs formules moléculaires pour les composés A (Tableau 6.4) et B (Tableau 6.5). Les formules contenant de l'azote ont été éliminées d'emblée puisque la méthodologie incluait une acidification de la phase aqueuse à pH 4 (Section 6.2.2), ce qui a eu pour effet de protonner les composés azotés et de les laisser dans la phase aqueuse. Les formules saturées, peu saturées (indice de déficit en hydrogène entre 1 et 8) ou sursaturées (indice de déficit en hydrogène de plus de 28) ont aussi été rejetées afin d'accommoder les résultats obtenus en spectrophotométrie UV, qui seront discutés plus loin. Plus de cinquante formules moléculaires chimiquement plausibles ont été calculées pour les composés A et B, selon la méthode décrite par Lederberg (1964).

L'analyse des motifs isotopiques de M^+ (Tableau 6.6) a tout d'abord permis de confirmer l'absence d'halogènes dans la formule moléculaire puisque ces atomes donnent habituellement un pic $[M+2]$ plus intense que le pic $[M+1]$ (Silverstein, 1991). L'étude détaillée de l'abondance relative des fragments $[M+1]$ et $[M+2]$, qui est proportionnelle à l'abondance des isotopes du carbone (^{13}C , ^{14}C) et de l'oxygène (^{17}O , ^{18}O) (Silverstein, 1991), a permis de retenir quatre formules pour chaque composé, soient $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{O}_8$, $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_7$, $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{O}_7$ et $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{O}_6$, pour le composé A, et $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{O}_9$, $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_8$, $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{O}_8$ et $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{O}_7$ pour le composé B. La comparaison de chaque formule générale a permis de déduire que les deux composés pouvaient différer l'un de l'autre soit par un atome d'oxygène, soit par un groupement CH_2 supplémentaire et une double liaison ou un branchement cyclique en moins pour le composé B.

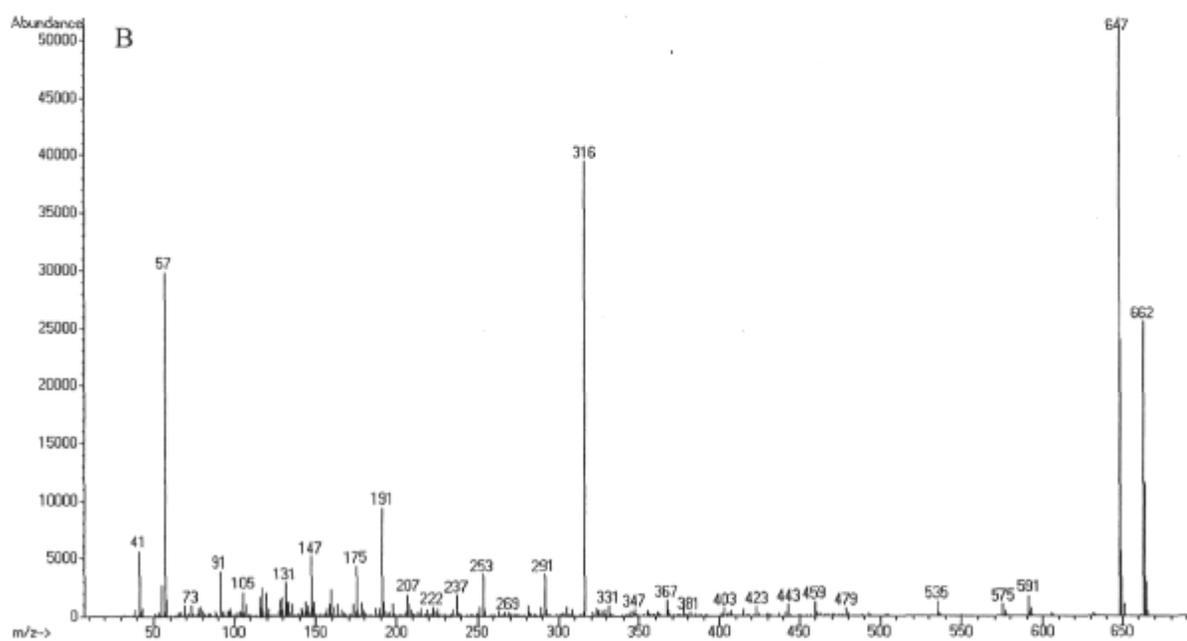
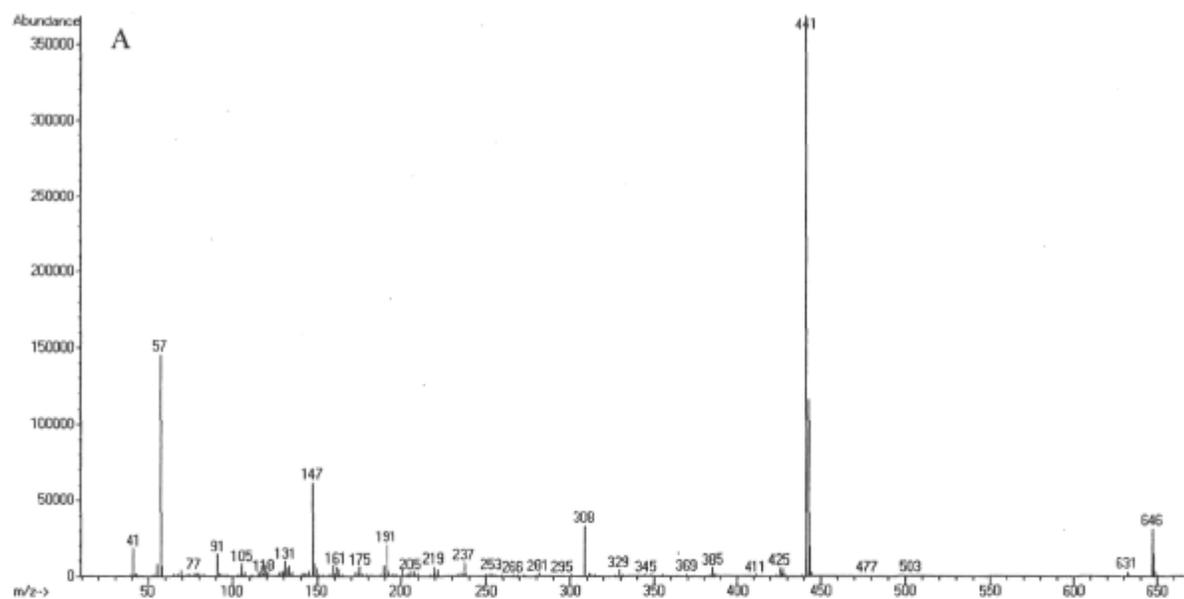


Figure 6.7. Spectre de masse du composé A, comprenant les fragments identifiés suivants : $646\ m/z\ [M]^+$, $631\ m/z\ [M-CH_3]^+$ (A) et spectre de masse du composé B, comprenant les fragments identifiés suivants : $662\ m/z\ [M]^+$, $647\ m/z\ [M-CH_3]^+$ (B).

Tableau 6.4. Formules moléculaires possibles pour le composé A, indice de déficit en hydrogène pour chaque formule proposée, et intensités calculées de [M+1] et [M+2]

Formule	IDH ¹	Intensité calculée de [M+1] ²	Intensité calculée de [M+2] ³
C ₃₅ H ₆₂ O ₁₁	4	38,18	9,32
C ₃₇ H ₂₆ O ₁₁	25	41,51	10,63
C ₃₇ H ₄₂ O ₁₀	17	41,47	10,43
C ₃₇ H ₅₈ O ₉	9	41,43	10,23
C ₃₇ H ₇₄ O ₈	1	41,39	10,03
C ₃₈ H ₁₄ O ₁₁	32	42,62	11,10
C ₃₈ H ₃₀ O ₁₀	24	42,58	10,90
C ₃₈ H ₄₆ O ₉	16	42,54	10,70
C ₃₈ H ₆₂ O ₈	8	42,50	10,50
C ₃₉ H ₁₈ O ₁₀	31	43,69	11,37
C ₃₉ H ₃₄ O ₉	23	43,65	11,17
C ₃₉ H ₅₀ O ₈	15	43,61	10,97
C ₃₉ H ₆₆ O ₇	7	43,57	10,77
C ₄₀ H ₂₂ O ₉	30	44,76	11,66
C₄₀H₃₈O₈⁴	22	44,72	11,46
C₄₀H₅₄O₇	14	44,68	11,26
C ₄₀ H ₇₀ O ₆	6	44,64	11,06
C ₄₁ H ₂₆ O ₈	29	45,83	11,96
C₄₁H₄₂O₇	21	45,79	11,76
C₄₁H₅₈O₆	13	45,75	11,56
C ₄₁ H ₇₄ O ₅	5	45,71	11,36
C ₄₂ H ₁₄ O ₈	36	46,94	12,47
C ₄₂ H ₃₀ O ₇	28	46,90	12,27
C ₄₂ H ₄₆ O ₆	20	46,86	12,07
C ₄₂ H ₆₂ O ₅	12	46,82	11,87
C ₄₂ H ₇₈ O ₄	4	46,78	11,67
C ₄₃ H ₁₈ O ₇	35	48,01	12,79

¹ Indice de déficit en hydrogène = $C - H/2 + N/2 + 1$ où C, H et N correspondent respectivement aux nombres d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'azote.

² Intensité de [M+1] = (Nbr C * 1,11) + (Nbr N * 0,38) + (Nbr O * 0,04) (abondances isotopiques : Silverstein, 1991).

³ Intensité de [M+2] = [(Nbr C * 1,11)²/200] + (Nbr O * 0,2) (abondances isotopiques : Silverstein, 1991).

⁴ Formules moléculaires les plus plausibles pour le composé A.

Tableau 6.5. Formules moléculaires possibles pour le composé B, indice de déficit en hydrogène pour chaque formule proposée, et intensités calculées de [M+1] et [M+2]

Formule	IDH ¹	Intensité calculée de [M+1] ²	Intensité calculée de [M+2] ³
C ₃₉ H ₁₈ O ₁₁	31	43,73	11,57
C ₃₉ H ₃₄ O ₁₀	23	43,69	11,37
C ₃₉ H ₅₀ O ₉	15	43,65	11,17
C ₃₉ H ₆₆ O ₈	7	43,61	10,97
C ₄₀ H ₂₂ O ₁₀	30	44,80	11,86
C₄₀H₃₈O₉⁴	22	44,76	11,66
C₄₀H₅₄O₈	14	44,72	11,46
C ₄₀ H ₇₀ O ₇	6	44,68	11,26
C ₄₁ H ₂₆ O ₉	29	45,87	12,16
C₄₁H₄₂O₈	21	45,83	11,96
C₄₁H₅₈O₇	13	45,79	11,76
C ₄₁ H ₇₄ O ₆	5	45,75	11,56
C ₄₂ H ₁₄ O ₉	36	46,98	12,67
C ₄₂ H ₃₀ O ₈	28	46,94	12,47
C ₄₂ H ₄₆ O ₇	20	46,90	12,27
C ₄₂ H ₆₂ O ₆	12	46,86	12,07
C ₄₂ H ₇₈ O ₅	4	46,82	11,87
C ₄₃ H ₁₈ O ₈	35	48,05	12,99
C ₄₃ H ₃₄ O ₇	27	48,01	12,79
C ₄₃ H ₅₀ O ₆	19	47,97	12,59
C ₄₃ H ₆₆ O ₅	11	47,93	12,39
C ₄₄ H ₂₂ O ₇	34	49,12	13,33
C ₄₄ H ₃₈ O ₆	26	49,08	13,13
C ₄₄ H ₅₄ O ₅	18	49,04	12,93
C ₄₄ H ₇₀ O ₄	10	49,00	12,73
C ₄₅ H ₂₆ O ₆	33	50,19	13,68
C ₄₅ H ₄₂ O ₅	25	50,15	13,48

¹ Indice de déficit en hydrogène = $C - H/2 + N/2 + 1$ où C, H et N correspondent respectivement aux nombres d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'azote.

² Intensité de [M+1] = (Nbr C * 1,11) + (Nbr N * 0,38) + (Nbr O * 0,04) (abondances isotopiques : Silverstein, 1991).

³ Intensité de [M+2] = [(Nbr C * 1,11)²/200] + (Nbr O * 0,2) (abondances isotopiques : Silverstein, 1991).

⁴ Formules moléculaires les plus plausibles pour le composé B.

Tableau 6.6. Masse de l'ion moléculaire $[M]^+$ des composés A et B et intensités relatives de $[M+1]$ et $[M+2]$

Composé	$[M]^+$ (m/z)	Intensité calculée de $[M+1]$ (%) ¹	Intensité calculée de $[M+2]$ (%) ²
A	$646 \pm 0,5$	$45,7 \pm 0,9$	$11,2 \pm 0,1$
B	$662 \pm 0,5$	$45,1 \pm 0,6$	$11,5 \pm 0,2$

¹ Intensité (%) = (Intensité de $[M+1]$ (tabulation) / Intensité de $[M]^+$ (tabulation)) * 100

² Intensité (%) = (Intensité de $[M+2]$ (tabulation) / Intensité de $[M]^+$ (tabulation)) * 100

Les données spectroscopiques du composé B montrent un fort pic d'absorption à 245 nm, deux pics autour à 273 et 278 nm et un pic de faible intensité à 368 nm (Tableau 6.7). Selon ces données, il est peu probable que les composés A et B soient formés d'un squelette lanostane puisque ce type de structure présente normalement 3 bandes dans un intervalle relativement rapproché, à 236, 243 et 251 nm (Scott, 1964). Le pic à 245 nm suggère la présence d'un groupement carbonyle α,β -insaturé et correspond aux valeurs observées pour les acides ganodéréniques, se situant généralement entre 240 et 250 nm (Boh *et al.*, 2000). Un pic d'absorption autour de 244-248 nm, couplé à une absorption entre 268-280 nm a aussi été observés pour certains triterpènes trouvés chez le genre *Ganoderma* comme les ganodérénates de méthyle H et I (Nishitoba *et al.*, 1989). Enfin, d'autres triterpènes du genre *Ganoderma* présentent plutôt un pic d'absorption dans la région de 273-289 nm (Kikuchi *et al.*, 1986 ; González *et al.*, 2002).

Les données spectrophotométrique pour le composé A montrent un fort pic d'absorption à 327 nm et des pics d'intensité moyenne à 361 et 368 nm (Tableau 6.7). Ces résultats, donnant un λ_{\max} à 327 nm plutôt qu'à 245 nm, comme ce qui est observé pour le composé B, renforcent l'hypothèse qu'une double liaison supplémentaire est présente dans le composé A, suggérant qu'il diffère du composé B par un groupement CH_2 en moins et une double liaison ou un branchement cyclique en plus, plutôt que par un atome d'oxygène en moins. La différence entre les valeurs λ_{\max} pourrait signifier que cette double liaison s'ajoute à un système de conjugaison existant (augmentation de 30 nm du λ_{\max}), couplé à une composante homodiène (augmentation de 39 nm λ_{\max}), ce qui

Tableau 6.7. λ_{\max} du composé A semi-purifié (fraction CH_2Cl_2 no 24, 1 mg/mL Hexane:Acétate d'éthyle 30:70) et du composé B pur (fraction 4C, 0,4 mg/mL CH_2Cl_2)

Molécule	λ_{\max} (nm)	Absorbance (AU)	λ_{\max} corrigé ¹ (nm)
Composé A ²	322	0,30	327
	356	0,26	361
	363	0,26	368
Composé B ^{3,4}	240	0,37	245
	268	0,33	273
	273	0,33	278
	363	0,03	368

¹ Valeurs d'absorbance corrigées (pour fin de comparaison avec les données existantes enregistrées avec de l'éthanol) avec la valeur de correction du dioxane (qui ajoute 5 nm à la valeur observée), après comparaison des propriétés de ce solvant (moment dipolaire) avec celles du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle.

² Solvant utilisé pour le blanc : Hexane : Acétate d'éthyle, 30:70.

³ Pur dans la fraction 4C (Figure 6.5E).

⁴ Solvant utilisé pour le blanc : Dichlorométhane.

pourrait modifier suffisamment ses valeurs d'absorption en UV. Un exemple est présenté à la figure 6.8 (Silverstein, 1991 ; Scott, 1964).

La bande d'absorption à 368 nm, qui est commune aux deux composés, suggère la présence d'un chromophore très insaturé commun aux deux molécules et pourrait être responsable de la coloration jaunâtre trouvée dans les échantillons. De telles bandes d'absorption sont habituellement observées chez des composés polyaromatiques le plus souvent polyhydroxylés comme les coumarines, les flavonoïdes et les anthocyanes (Scott, 1964). Il est néanmoins peu probable que les composés A et B appartiennent à ces classes structurales car ils ont été isolés dans des conditions trop lipophiles pour ce type de composé. Par contre, certaines structures stéroïdiennes ayant des cycles A et B aromatiques conjugués peuvent présenter des bandes d'absorption dans les mêmes intervalles que ce qui est observé pour le composé B (240-273 nm), tout en présentant des pics d'absorption autour de 340 à 360 nm (Scott, 1964). Le nombre de bandes, de même que les longueurs d'ondes d'absorption variant dans une certaine mesure pour ce type de composé, une telle structure ne serait pas exclue pour les composés A et B.

La comparaison de la partie comprise entre 40 et 250 m/z des spectres de masse des composés A et B (Figure 6.7A, B) appuie l'hypothèse d'une parenté structurale entre ces molécules puisque les ions qui s'y retrouvent se ressemblent généralement. La faible intensité des masses présentes dans cette partie du spectre suggère une structure de base probablement stabilisée par la présence de plusieurs doubles liaisons conjuguées, ce qui accommoderait aussi les résultats obtenus en spectrophotométrie UV-visible pour les deux composés. Dans cette optique, une structure linéaire est écartée d'emblée au profit

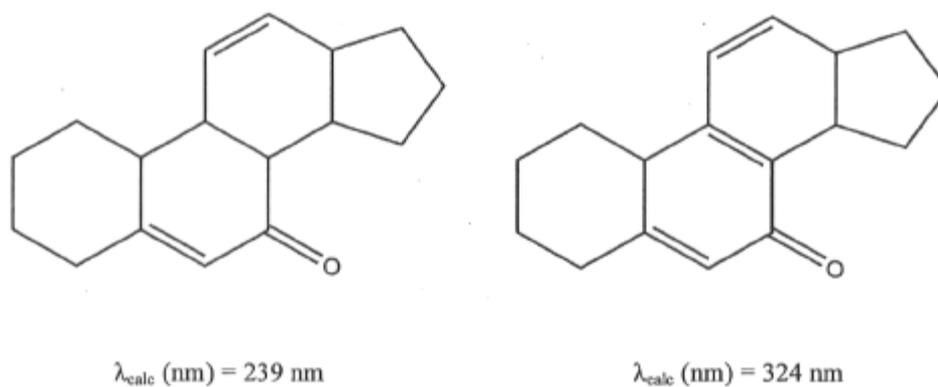


Figure 6.8. Exemple d'insertion d'une double liaison modifiant significativement l'absorption en UV-visible d'une molécule (valeurs calculées).

d'une structure polycyclique et ce, en dépit du fait que les spectres ne présentent pas tout à fait les fragments typiques d'une génine stéroïdienne (NIST/EPA/NIH, 1998). Les quelques intervalles de 16 amu entre les masses présentes entre 40 et 250 m/z , pourraient signifier la présence d'oxygène sur la structure de base de la molécule, peut-être sous forme de cétone ou d'hétérocycle. D'autre part, les fragments à 91 et 105 m/z , qui sont habituellement liés à la formation de l'ion tropylium (Silverstein, 1991), suggèrent une certaine aromaticité. L'analyse RMN des composés A et B en mélange a aussi révélé la présence de groupements aromatiques substitués ainsi que la présence d'hydrocarbures, mais ces fragments, qui proviennent de la décomposition des composés A et B, sont difficilement utilisables dans la présente analyse.

À l'exception de la perte d'un groupement méthyle visible directement après l'ion moléculaire sur les deux spectres (à 631 et 647 m/z , respectivement pour les composés A et B), peu de groupements substituants sont identifiables sur les spectres de masse des composés A et B. Dans le composé B un fragment à $[M-31]^+$ pourrait correspondre à la perte d'un groupement méthoxyle, mais l'intensité de ce pic est très faible pour un groupement aussi labile, ce qui laisse un certain doute. Par ailleurs, les deux spectres ont un pic très fort à 57 m/z , qui pourrait correspondre à la perte d'un groupement tert-butyle $[C(CH_3)_3]^+$, mais il est plus probable qu'il représente la perte d'un groupement $[CH_3-CH_2-C=O]^+$, même si le fragment $[M-57]^+$ n'est pas observé. Ce pic semble en effet être assez fréquent chez les composés portant une fonction cétone ou ester, sans que le pic correspondant à $[M-57]^+$ ne soit nécessairement très intense (NIST/EPA/NIH, 1998). Les composés A et B montrent respectivement un fragment à 308 et 316 m/z d'une intensité

relativement forte. Ces fragments de nombres pairs proviennent de la coupure de deux liaisons impliquant possiblement un réarrangement (Silverstein, 1991).

Le pic de base du composé A, à 441 m/z , présente un intérêt particulier dans l'analyse en parallèle des deux spectres de masses. Ce pic correspond à la perte d'une partie importante de la molécule $[M^+-CH_3-190]^+$, et souligne la différence entre les composés A et B. Laquelle pourrait résider dans l'emplacement, à l'intérieur de la structure, d'un groupement ou d'une structure qui permettrait l'obtention d'un pic de base d'une masse aussi importante pour le composé A. Considérant les résultats obtenus en spectroscopie UV-visible, qui suggéraient la présence d'une double liaison supplémentaire dans le composé A, le pic à 441 m/z , impair et donc issu de la coupure d'une seule liaison, pourrait correspondre à la perte d'une chaîne latérale et donc possiblement déterminer la structure de base de la molécule. De fait, l'analyse du motif isotopique de ce fragment montre une abondance de $31,2\% \pm 0,2$ pour la masse 442 m/z $[M+1]$ et $5,0\% \pm 0,2$ pour la masse 443 m/z $[M+2]$ par rapport à l'ion 441 m/z , ce qui correspond à une formule de $[C_{28}H_{25}O_5]^+$ selon la méthode de Lederberg (1964). Structuralement, cela signifie possiblement une génine à cinq hexacycles, ou une structure à quatre hexacycles et un pentacycle, comprenant dans les deux cas plusieurs insaturations et/ou un ou deux cycles aromatiques, et incluant entre cinq et huit carbones situés dans des groupements substituants (méthyle ou méthoxyle) (Figure 6.9). En raison de la parenté structurale possible des composés A et B, cette structure pourrait aussi correspondre partiellement au composé B (à la différence d'un groupement CH_2 et d'une double liaison ou d'un branchement). Étant donné le poids moléculaire relativement élevé des composés A et B, et considérant le motif général de leurs spectres de masse

respectifs, une structure à cinq cycles accompagnée d'une chaîne latérale d'une dizaine de carbone et d'atomes d'oxygène serait davantage plausible qu'une structure à quatre cycles accompagnée d'une chaîne latérale de vingt carbones dont la fragmentation serait apparente dans le spectre de masse.

L'analyse du motif isotopique du fragment 441 m/z permet en outre de préciser la formule moléculaire des composés A et B puisque suivant l'indice de déficit en hydrogène élevé du fragment 441 m/z , les formules moléculaires ayant un indice inférieur à 16 peuvent être éliminées, ce qui porte à deux le nombre de formules moléculaires possible pour chaque composé, soient $C_{40}H_{38}O_8$ et $C_{41}H_{42}O_7$ pour le composé A, et $C_{40}H_{38}O_9$ et $C_{41}H_{42}O_8$ pour le composé B. Aussi, suivant les résultats obtenus en UV, qui suggèrent une structure davantage saturée pour le composé B, l'ajout d'un groupement méthylène et le retrait d'une double liaison sur le fragment 441 m/z permet de déduire la formule de ce qui pourrait constituer la structure pentacyclique partielle du composé B, soit $[C_{29}H_{29}O_5]^+$, dont la masse est de 457. Ces déductions laissent en chaîne latérale un fragment 205 m/z correspondant à la formule $[C_{12}H_{13}O_3]^+$, et portent au nombre d'une les formules moléculaires possibles pour chaque composé, soient $C_{40}H_{38}O_8$ pour le composé A et $C_{41}H_{42}O_8$ pour le composé B. Étant donné l'indice de déficit en hydrogène élevé de la formule du fragment $[C_{12}H_{13}O_3]^+$ (6,5), une chaîne latérale aliphatique est peu probable. Il pourrait par contre s'agir d'un résidu cyclique, portant quelques groupements cétones formant un chromophore présentant une absorption en UV autour de 260 nm. De plus, la présence de groupements carbonyles, dont un en bout de chaîne, pourrait accommoder la présence du fragment 57 m/z , correspondant possiblement au groupement

$[\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-C=O}]^+$, dans les spectres de masse des deux composés. Des structures possibles pour les composés A et B sont présentées aux figures 6.10 et 6.11.

Les renseignements recueillis au cours des analyses spectroscopiques en UV-visible et CPG-SM permettent de déduire que les composés A et B possèdent certainement une structure polycyclique, possiblement pentacyclique, de forme stéroïdienne ou triterpénique, incluant plusieurs insaturations, possiblement occupées par des groupements cétone, créant ainsi une structure relativement conjuguée. Les résultats ont en effet montré qu'il est peu probable que les atomes d'oxygène présents sur la structure de base soient intégrés à des groupements labiles comme des groupements acétoxyles ou méthoxyles. Il est également peu probable que les composés A et B soient semblables aux triterpènes polyoxygénés jusqu'ici caractérisés chez le genre *Ganoderma*, principalement à cause de leur poids moléculaire relativement élevé par rapport aux triterpènes connus chez le genre *Ganoderma*.

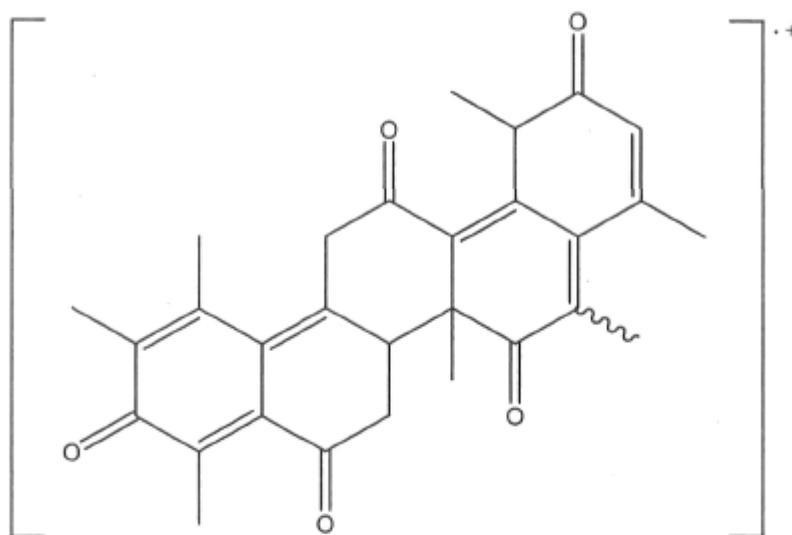
441 m/z

Figure 6.9. Structure possible pour le fragment 441 m/z ($C_{29}H_{29}O_4$), qui pourrait correspondre à la structure de base des composés A et B. Les chromophores présents (un à quatre doubles liaisons conjuguées et deux à trois doubles liaisons conjuguées) donnent respectivement des absorbances calculées (λ_{calc}) de 370, 366 et 321 nm.

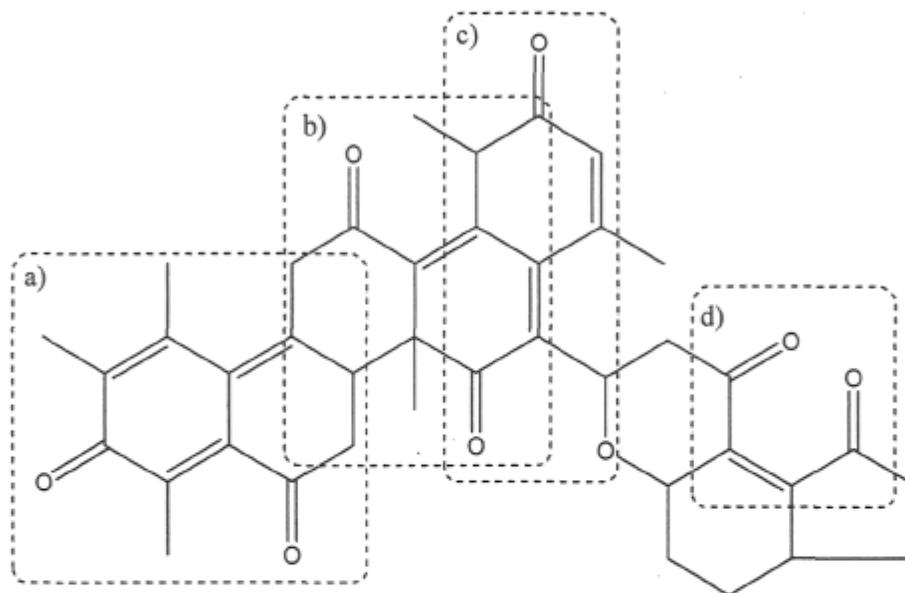


Figure 6.10. Structure possible pour le composé A. Les chromophores présents (a, b, c et d) donnent respectivement les absorbances calculées (λ_{calc}) suivantes : 370, 366, 321 et 259 nm.

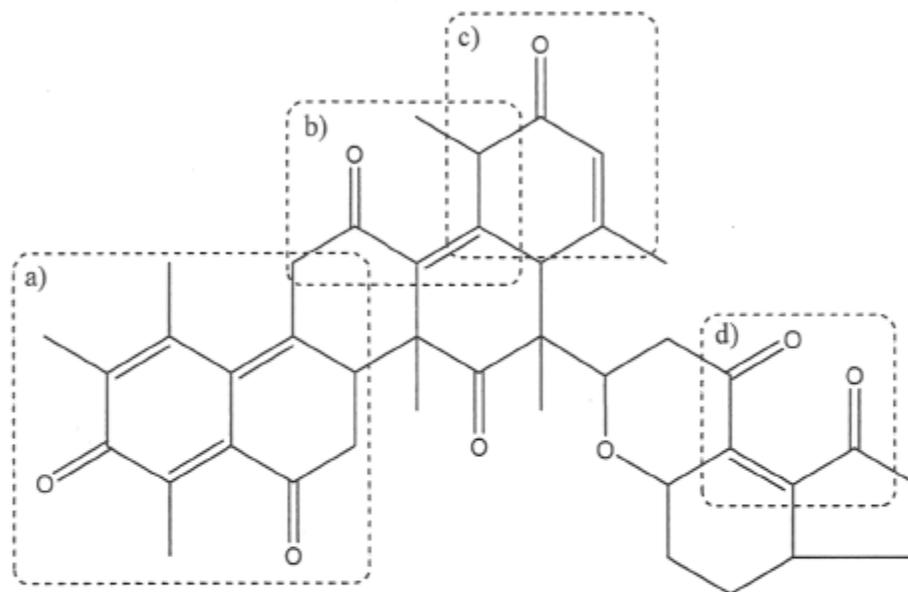


Figure 6.11. Structure possible pour le composé B. Les chromophores présents (a, b, c et d) donnent respectivement les absorbances calculées (λ_{calc}) suivantes : 370, 259, 244 et 259 nm.

Chez les mycètes, peu de composés connus présentent des caractéristiques semblables à celles trouvées chez les composés A et B. Les molécules ayant une structure fortement insaturée ont été peu rapportées, et peu de composés basés sur une génine stéroïdienne ou triterpénique montrent un tel niveau d'insaturation. Les composés à cinq hexacycles sont peu courants chez les mycètes. Ces structures sont le plus souvent assimilées aux saponines, trouvées exclusivement chez les plantes. Toutefois, certains composés à cinq cycles tels que l' α -amyrine et la β -amyrine ont été identifiés chez des champignons mycorrhiziens de l'ordre des Glomales de même que chez certaines espèces de champignons marins (Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999; Volkman, 2005). Bien que ces conclusions ne soient pas encore solidement établies, de récentes études tendent à démontrer que les champignons peuvent synthétiser des composés ayant un squelette pentacyclique, ce qu'on croyait jusqu'à tout récemment exclusif aux plantes vertes (Volkman, 2005). D'autres investigations sont nécessaires afin de confirmer la présence de tels composés chez le genre *Ganoderma*.

6.4. Conclusion

Les différentes techniques de purification appliquées à *Ganoderma tsugae* ont mené à l'isolation complète ou partielle des composés A et B, qui sont des molécules probablement inconnues chez les champignons du genre *Ganoderma*, et possiblement chez les champignons supérieurs. Bien que ces molécules aient pu être relativement bien isolées du reste des molécules présentes dans les extraits fractionnés de *G. tsugae*, la séparation

l'une de l'autre s'est avérée très problématique, principalement à cause du comportement inégal de ces composés sur les supports de chromatographie traditionnels. Des données spectroscopiques recueillies en spectrophotométrie UV-visible et en CPG-SM sur des fractions pures ou semi-purifiées ont révélé la possibilité d'une structure polycyclique, probablement pentacyclique, stéroïdienne ou triterpénique, portant une chaîne latérale possiblement cyclique d'une douzaine de carbones. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'aller plus loin dans la caractérisation structurale des composés A et B. Toutefois, si les conclusions présentées dans ce chapitre étaient confirmées, elles constitueraient un nouvel appui à l'évidence grandissante selon laquelle la biosynthèse de composés pentacycliques est possible chez les champignons supérieurs et n'est pas exclusive aux plantes vertes.

6.5. Références

- Boh, B., Hodzar, D., Dolnicar, D., Berovic, M., Pohleven, F. (2000) Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. *Food Technology and Biotechnology*, 38: 11-18.
- Boulet, B. (2003) *Les Champignons des Arbres de l'Est de l'Amérique du Nord*. Publications du Québec, Sainte-Foy, 748 p.
- Chen, D.H. & Chen, W.K.D. (2003) Determination of ganoderic acids in triterpenoid constituents of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11: 195-201.
- Gan, K.H., Fann, Y.F., Hsu, S.H., Kuo, K.W., Lin, C.N. (1998) Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*, 61: 485-487.
- Gao, Y., Chan, E., Zhou, S. (2004) Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International*, 20: 123-161.
- González, A.G., León, F., Rivera, A., Padrón, J.I., González-Plata, J., Zuluaga, J.C., Quintana, J., Estévez, F., Bermejo, F. (2002) New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products*, 65: 417-421.
- Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F., Sancholle, M. (1999) Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*, 50: 1027-1031.
- Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Murai, Y., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. Structure of ganoderic acids C2, E, I, and K, lucidenic acid F and related compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3695-3712.
- Lai, T., Gao, Y., Zhou, S. (2004) Global marketing of medicinal *Ling Zhi* mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) products and safety concerns. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6: 189-194.
- Lederberg, J. (1964) Calculation of molecular formulas in high-resolution mass spectroscopy. Dans: Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. (eds), *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volume II: Steroids, Terpenoids, Sugars, and Miscellaneous Classes*. Holden-Day, San Francisco: 279-297.
- Ness, A.T., Pastewka, J.V., Peacock, A.C. (1964) Evaluation of a recently reported stable Liebermann-Burchard reagent and its use for the direct determination of serum total cholesterol. *Clinica Chimica Acta*, 10: 229-237.

- NIST/EPA/NIH (1998) *Mass Spectral Library*. National Institute of Standards and Technology, John Wiley & Sons, Version 1.7a.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H., Sakamura, S. (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28: 193-197.
- Oomah, B.D. & Mazza, G. (1999) Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 193-198.
- Paterson, R. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001.
- Scott, A.I. (1964) *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products*. Pergamon Press, Oxford, 443 p.
- Shim, S.H., Ryu, J., Kim, J.S., Kang, S.S., Xu, Y., Jung, S.H., Lee, Y.S., Lee, S., Shin, K.H. (2004) New lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma applanatum*. *Journal of Natural Product*, 67: 1110-1113.
- Silva, G.L., Lee, I.S., Kinghorn, A.D. (1998) Special problems with the extraction of plants. Dans: Cannell, R.J.P. (ed.) *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa: 343-363.
- Silverstein, R.M., Clayton Bassler, G., Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Fifth edition*. John Wiley & Sons, New York, 512 p.
- Volkman, J.K. (2005) Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry*, 36: 139–159.
- Wasser, S.P. (2003) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258-274.
- Yen, G.C. & Wu, J.Y. (1999) Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65: 375-379.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les recherches menées dans le cadre de ce projet de doctorat ont permis d'obtenir quelques-unes des premières données portant sur la composition chimique des champignons indigènes du Québec. Les travaux effectués ont d'abord porté sur l'analyse de composés nutraceutiques, comme l'éritadénine et le lovastatin, chez 29 espèces de champignons indigènes du Québec. Par la suite, la teneur en lipides et les profils d'acides gras ont été évalués chez une vingtaine d'espèces, puis l'effet de la température sur le profil d'acides gras de deux espèces de *Pleurotus* a été évalué. Enfin, la purification partielle de nouvelles molécules chez *G. tsugae* suggère la présence de composés pentacycliques chez cette espèce.

Parmi les 29 espèces de champignons indigènes analysées dans le cadre de cette étude pour leur contenu en lovastatin et éritadénine, aucune ne contenait l'une ou l'autre de ces molécules d'intérêt nutraceutique ; la présence d'éritadénine a néanmoins été mise en évidence chez *L. edodes* produit commercialement. Ces résultats s'accordent avec plusieurs études phytochimiques sur les plantes et les champignons qui suggèrent que de nombreuses molécules puissent être spécifiques à certaines espèces, variétés ou souches (Bruneton, 1999).

L'analyse de la teneur en lipides chez les champignons indigènes du Québec à l'étude a permis de démontrer que celle-ci varie d'une espèce à l'autre, atteignant jusqu'à 16% du poids sec chez certaines espèces comme l'*Amanita vaginata*. En outre, selon les résultats obtenus, les lipides polaires constituent plus de 50% des lipides totaux chez la plupart des espèces, ce qui concorde avec certaines données précédemment publiées (Lösel,

1988 ; Dembitsky *et al.*, 1992). Malgré le rôle reconnu des lipides polaires dans la fluidité des membranes cellulaires (Avis & Bélanger, 2001 ; Lundbæk, 2006), les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la température sur les lipides de deux espèces de *Pleurotus* ont montré que ce pourcentage n'est pas forcément modifié de manière significative par la température.

L'analyse du contenu en acides gras des champignons indigènes du Québec de la famille des Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae et des Lycoperdaceae a montré que les principaux acides gras présents chez ces basidiomycètes étaient les acides palmitique, oléique et linoléique, ce dernier étant le principal acide gras retrouvé chez plus de 50% des espèces étudiées. La plupart des espèces contenaient par ailleurs l'isomère α de l'acide linoléique, un acide gras ω_3 ayant de nombreuses propriétés nutraceutiques (Vardavas *et al.*, 2006). L'acide linoléique était particulièrement abondant chez les espèces du genre *Agaricus* et *Coprinus*, qui ont généralement montré des profils plutôt insaturés ; le champignon *C. comatus* contenait en outre significativement plus d'acide α -linoléique que toutes les autres espèces analysées. L'analyse des profils d'acides gras a mené à l'identification de plus de 40 acides gras différents chez les espèces étudiées, dont trois, nommément les acides 11-hexadécénoïque (16:1 $\Delta 11$), 7,10-hexadécadiénoïque (16:2 $\Delta 7,10$), 11-heptadécénoïque (17:1 $\Delta 11$) ont été identifiés pour la première fois chez les basidiomycètes. En outre, deux acides gras, l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque (19:0 cyc11), un acide gras cyclopropylique, et l'acide élaïdique (18:1 $\Delta 9t$) ont été identifiés pour la première fois chez les mycètes.

La comparaison des profils d'acides gras des champignons du Québec avec ceux antérieurement publiés dans la littérature d'espèces similaires mais d'origine européenne (Dembitsky *et al.*, 1993a ; 1993b) suggère que certaines espèces de champignons du Québec aient un profil davantage insaturé que leurs équivalents européens. L'étude du profil d'acides gras de deux espèces du genre *Pleurotus*, soient *P. ostreatus* (une espèce tempérée indigène au Québec) et *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* (une espèce tropicale), cultivées dans des conditions contrôlées a permis d'observer une modification des profils d'acides gras selon la température de croissance. Les résultats obtenus ont montré une augmentation du niveau d'insaturation chez les acides gras des fractions polaire et non polaire des carpophores de *P. ostreatus* lorsque la température de croissance était inférieure à 17°C, une modification qui touchait principalement les acides gras C₁₈. Bien que cette étude n'ait pas permis d'établir une relation claire entre la température et le profil d'acides gras, elle a toutefois montré que la température de croissance influence le profil d'acides gras des espèces du genre *Pleurotus* et ce, de façon différente selon l'espèce. Si les données recueillies au cours de cette étude incitent à une certaine prudence quant à l'utilisation des profils d'acides gras dans un but chemotaxonomique ou de différenciation intergénérique, elles suggèrent aussi qu'il est possible de manipuler le degré d'insaturation des acides gras d'espèces telles que *P. ostreatus*. Ceci pourrait par exemple trouver application dans la production de carpophores contenant davantage de gras insaturés.

Les travaux réalisés sur le champignon *G. tsugae* ont mené à la localisation de 16 composés qui, à ce jour, n'ont jamais été rapportés chez cette espèce. Parmi ces 16 composés, deux ayant une masse molaire respective de 646 et 662, ont été partiellement

purifiés et caractérisés. Les analyses spectroscopiques ont suggéré une structure polycyclique, probablement pentacyclique et polyoxygénée, portant de nombreuses doubles liaisons ainsi qu'une chaîne latérale d'une douzaine de carbones. À l'exception de certains composés tels que l' α -amyrine et la β -amyrine, identifiés chez des champignons mycorrhiziens de l'ordre des Glomales, de même que chez certaines espèces de champignons marins, la présence de composés pentacycliques demeure peu rapportée chez les mycètes (Volkman, 2005). Au contraire, de nombreuses molécules présentant ce type de structure sont connues chez les plantes (Bruneton, 1999). Les travaux menés dans le cadre de cette thèse suggèrent la présence de tels composés pentacycliques chez les champignons du genre *Ganoderma*. D'autres investigations sont néanmoins nécessaires afin de confirmer la présence de ce type de composés chez les spécimens québécois de *G. tsugae*.

Les travaux réalisés au cours de ce projet de doctorat contribuent à la caractérisation chimique des champignons indigènes du Québec qui, jusqu'à présent, a été peu étudiée. Des études additionnelles sont évidemment nécessaires afin d'approfondir davantage les connaissances relatives à la composition chimique de la mycoflore québécoise. De telles recherches permettront une mise en valeur éclairée des macromycètes qui constituent une ressource encore relativement peu exploitée au Québec.

LISTE COMPLÈTE DES RÉFÉRENCES

- Abdullah, M.I., Young, J.C., Games, D.E. (1994) Supercritical fluid extraction of carboxylic and fatty acids from *Agaricus* spp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 718-722.
- Alarcon, J., Aguila, S., Arancibia-Avila, P., Fuentes, O., Zamorano-Ponce, E., Hernandez, M. (2003) Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 58: 62-64.
- Ali, N.A.A., Jansen, R., Pilgrim, H., Liberra, K., Lindequist, U. (1996) Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*. *Phytochemistry*, 41: 927-929.
- Arakawa, N., Mukohyama, H., Nakai, M., Nakajima, K., Tanabe, O., Inagaki, C. (1977) Separation of hypocholesterolaemic substance from *Flammulina velutipes*. *Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition*, 30: 35-38.
- Avis, T.J. & Bélanger, R.R. (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 956-960.
- Awadh Ali, N.A., Mothana, R.A.A., Lesnau, A., Pilgrim, H., Lindequist, U. (2003) Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia*, 74: 483-485.
- Ayer, W. & Brown, L.S. (1981) Terpenoid metabolites of mushrooms and related basidiomycetes. *Tetrahedron*, 37: 2199-2248.
- Badami, R.C. & Patil, K.B. (1981) Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Progress in Lipid Research*, 19: 119-153.
- Bagci, E., Bruehl, L., Aitzetmuller, K., Altan, Y. (2003) A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocochromanol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 27: 141-147.
- Bao, Y.Y., Zhang Y., Tolgor, L.Y. (2004) Chemical components of *Pleurotus citrinopileatus* Singer. *Mycosystema*, 23: 262-269.
- Barros, L., Ferreira, M.A., Queirós, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P. (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103: 413-419.

Boa, E. (2003) Wild edible fungi a global overview of their use and importance to people. FAO Corporate Document Repository: <http://www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.HTM>.

Bobek, P., Ozdín, L., Kuniak, L. (1996) Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. *Nahrung*, 40: 22-224.

Boh, B., Hodzar, D., Dolnicar, D., Berovic, M., Pohleven, F. (2000) Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. *Food Technology and Biotechnology*, 38: 11-18.

Bouchet, P., Guignard, J.L., Villard, J. (1999) *Les Champignons : Mycologie Fondamentale et Appliquée*. Masson, Paris, 194 p.

Boulet, B. (2003) *Les Champignons des Arbres de l'Est de l'Amérique du Nord*. Publications du Québec, Sainte-Foy, 748 p.

Breene, W.M. (1990) Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53: 883-894.

Breheret, S., Talou, T., Rapior, S., Bessière, J.M. (1997) Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 831-836.

Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes Médicinales*. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 930 p.

Gouvernement du Québec (2007) *La flore*, Portail Québec: <http://www.gouv.qc.ca/portail/quebec/pgs/commun/portrait?lang=fr&id=pgs.portrait.geographie.climat.flore&location=pgs%2Fportrait%2Fgeographie%2Fclimat%2Fflore>.

Chang, S.T. & Miles, P.G. (2004) The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact, Second edition*. CRC Press, Boca Raton: 27-37.

Chavant, L., Wolf, C., Fonvieille, J.L., Dargent, R. (1981) Deviation from the usual relationship between temperature, the growth rate, the fatty acid composition and the lipid microviscosity of four different fungi (*Mucor mucedo*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Achlya bisexualis*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101: 912-920.

Chen, D.H. & Chen, W.K.D. (2003) Determination of ganoderic acids in triterpenoid constituents of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11: 195-201.

Chiu, S.W., Law, S.C., Ching, M.L., Cheung, K.W., Chen, M.J. (2000) Themes for mushroom exploitation in the 21st century: Sustainability, waste management, and conservation. *Journal of General and Applied Microbiology*, 46: 269-282.

Christie, W.W. (1970) Cyclopropane and cyclopropene fatty acids. Dans: Gunstone, F.D. (ed.), *Topics in Lipid Chemistry, Volume 1*. Logos Press, London: 1-49.

Christie, W.W. (1998) Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33: 343-353.

Christie, W.W. (2005) Fatty Acids: Methylene-Interrupted Double Bonds: <http://www.lipidlibrary.co.uk/lipids.html>.

Christie, W.W. (2006) What is a lipid?: <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/whatlip/index.htm>.

Christie, W.W. (2007) Fatty acids: Straight-Chain Monoenoic, Structure, Occurrence and Biochemistry: http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/fa_mono/index.htm. Accessed April 2007.

Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X., Hai Liu, R. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6910-6916.

Consortium en foresterie – Gaspésie-Les-Îles (2006) Rapport d'activité 2005-2006: http://www.foretgaspesie-les-iles.ca/fichiersclient/Accueil/Rapport_d_activites.pdf.

Cruz, C., Noël-Suberville, C., Montury, M. (1997) Fatty acid content and some flavor compound release in two strains of *Agaricus bisporus*, according to three stages of development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 64-67.

Czeczuga, B. (1978a) Investigations on carotenoids in fungi. IV. Members of the *Boletus* genus. *Qualitas Plantarum*, 28: 37-43.

Czeczuga, B. (1978b) Investigations on carotenoids in fungi. V. Representatives of the *Leccinum* genus. *Qualitas Plantarum*, 28: 197-201.

Da Silva, M., Manfio, G.P., Canhos, V.P. (1998) Characterization of selected strains of Mucorales using fatty acid profiles. *Revista de Microbiologica*, 29: 276-281.

Davidoff, F. & Korn, E.D. (1962) Fatty acid and phospholipid composition of the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*: The occurrence of previously undescribed fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 238: 3199-3209.

Deacon, J.W. (2005) *Fungal Biology, Fourth edition*. Blackwell Publishing, Malden, 400 p.

- Dembitsky, V.M., Shubina, E.E., Kashin, A.G. (1992) Phospholipid and fatty acid composition of some Basidiomycetes. *Phytochemistry*, 31: 845-849.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. (1993a) Chemical composition of fatty acids from some higher fungi: I- Fatty acid and phospholipid compositions of Basidiomycetes, *Cryptogamic Botany*, 3: 373-377.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Shubina, E.E. (1993b) Chemical composition of fatty acids from some fungi. *Cryptogamic Botany*, 3: 383-386.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T., Spizek, J., Hanus, L.O. (2005) Secondary metabolites of slime molds (Myxomycetes). *Phytochemistry*, 66: 747-769.
- Destailhats, F. & Angers, P. (2002) One-step methodology for the synthesis of fatty acid picolinyl esters from intact lipids. *Journal of American Oil Chemist Society*, 79: 253-256.
- Diez, V.A. & Alvarez, A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from Northwest Spain. *Food Chemistry*, 75: 417-422.
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M., Aggelis, G. (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106: 925-929.
- Dutta, M.K. & Chakravarty, D.K. (1989) Behaviour of different species of *Pleurotus* in cultivation and culture. *Indian Journal of Mycological Research*, 27: 143-147.
- Ehlers, T., Berch, S.M., MacKinnon, A. (2004) Inventory of non-timber forest product plant and fungal species in the Robson Valley. *BC Journal of Ecosystems and Management*, 4: 38-52.
- El Mekkawy, S., Meselhy, M.R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T., Otake, T. (1998) Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49: 1651-1657.
- Erwin, J.A. (1973) Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. Dans: Erwin, J.A. (ed.), *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. Academic Press, New York: 41-143.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100: 1511-1516.

- Gan, K.H., Fann, Y.F., Hsu, S.H., Kuo, K.W., Lin, C.N. (1998) Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*, 61: 485-487.
- Gao, Y., Chan, E., Zhou, S. (2004) Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International*, 20: 123-161.
- González, A.G., León, F., Rivera, A., Padrón, J.I., González-Plata, J., Zuluaga, J.C., Quintana, J., Estévez, F., Bermejo, F. (2002) New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *Journal of Natural Products*, 65: 417-421.
- Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F., Sancholle, M. (1999) Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*, 50: 1027-1031.
- Griffin, D.H. (1994) *Fungal Physiology, Second edition*. Wiley-Liss, New York.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 454-500.
- Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., Benicki, N. (1993) Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Letters*, 111: 203-206.
- Gunde-Cimerman, N. & Cimerman, A. (1995) *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*, 19: 1-6.
- Gupta, M., Sarmah, R., Gupta, S. (2004) Nutrient composition of *Pleurotus sajor-caju* grown on different substrates. *Journal of Food Science and Technology*, 41: 584-586.
- Hasan, F. & Ahamad, R.A. (2003) Effects of seasonal variations on oil and fatty acid profile of sunflower. *Helia*, 26: 159-166.
- Hata, K., Sugawara, F., Ohisa, N., Takahashi, S., Hori, K. (2002) Stimulative effects of (22E, 24R)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol from fruiting bodies of *Tricholoma auratum*, on a mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 1040-1044.
- Hirotoni, M., Ino, C., Furuya, T. (1993) Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 33: 379-382.
- Hyun, K.W., Jeong, S.C., Lee, D.H., Park, J.S., Lee, J.S. (2006) Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides*, 27: 1173-1178.

- Jong, E. & Field, J.A. (1997) Sulfur tuft and turkey tail: biosynthesis and biodegradation of organohalogens by Basidiomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 51: 375-414.
- Jong, S.C. & Birmingham, J.M. (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology*, 37: 101-135.
- Kamiya, T., Saito, Y., Hashimoto, M., Seki, H. (1972) Hypocholesterolemic alkaloids of *Lentinus edodes*: Structure and synthesis of eritadenine. *Tetrahedron*, 28: 899-906.
- Kamo, T., Asanoma, M., Shibata, H., Hirota, M. (2003) Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. *Journal of Natural Products*, 66: 1104-1106.
- Kansci, G., Mossebo, D.C., Selatsa, A.B., Fotso, M. (2003) Nutrient content of some mushroom species of the genus *Termitomyces* consumed in Cameroon. *Nahrung/Food*, 47: 213-216.
- Kawagishi, H., Li, H., Tanno, O., Inoue, S., Ikeda, S., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T. (1997) A lanostane-type triterpene from a mushroom *Daedalea dickinsii*. *Phytochemistry*, 46: 959-961.
- Kendrick, B. (1985) *The Fifth Kingdom*. Mycologue Publications, Waterloo, 386 p.
- Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Murai, Y., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. Structure of ganoderic acids C2, E, I, and K, lucidenic acid F and related compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3695-3712.
- Kikuchi, T., Kanomi, S., Murai, Y., Katoda, S., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. III. Structures of ganolucidic acids A and B, new lanostane-type triterpenoids. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 4030-4036.
- Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y., Sato, Y. (1989) Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37: 531-533.
- Kong, W.S. (2004) Descriptions of commercially important *Pleurotus* species. Dans: *Mushroom Growers' Handbook: Oyster Mushroom Cultivation*. Heinhart, Seoul: 54-61.
- Kostelc, J.G. & Hendry, L.B. (1981) Hydrocarbon constituents from white strains of the mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Singer. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 29: 185-186.
- Lai, T., Gao, Y., Zhou, S. (2004) Global marketing of medicinal *Ling Zhi* mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetideae) products and safety concerns. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6: 189-194.

- Lederberg, J. (1964) Calculation of molecular formulas in high-resolution mass spectroscopy. Dans: Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. (eds), *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volume II: Steroids, Terpenoids, Sugars, and Miscellaneous Classes*. Holden-Day, San Francisco: 279-297.
- Lemarchal, P. (1992) Besoins en acides gras, en vitamines et en stérols. Dans: Karleskind, A. (ed.), *Le Manuel des Corps Gras*. Lavoisier (Tec & Doc), Paris: 561-576.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., Lopez, M.G. (1997) Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, Mexico. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45: 4329-4332.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.I., Jülich, W.D. (2005) The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-299.
- Liu, J.K. (2005) N-containing compounds of macromycetes. *Chemical Reviews*, 105: 2723-2744.
- Los, D.A. & Murata, N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394: 3-15.
- Lösel, D.M. (1988) Fungal lipids. Dans: Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (eds), *Microbial Lipids, Volume 1*. Academic Press, London: 699-805.
- Lucier, G., Allshouse, J., Lin, B.H. (2003) Factors affecting U.S. mushroom consumption. *Electronic Outlook Report from the Economic Research Service - USDA*: <http://www.ers.usda.gov/publications/VGS/mar03/vgs29501/vgs29501.pdf>.
- Lundbæk, J.A. (2006) Regulation of membrane protein function by lipid bilayer elasticity—a single molecule technology to measure the bilayer properties experienced by an embedded protein. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18: S1305-S1344.
- Manzoni, M. & Rollini, M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 555-564.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.
- Mau, J.L., Chen, P.R., Yang, J.H. (1998) Ultraviolet irradiation increased vitamin D₂ content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5269-5272.

- Mau, J.L., Lin, H.C., Chen, C.C. (2002) Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6072-6077.
- McDonough, V. & Roth, T.M. (2004) Growth temperature affects accumulation of exogenous fatty acids and fatty acid composition in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 349-354.
- McLaughlin, D.M., Beckett, A., Yoon, K.S. (1985) Ultrastructure and evolution of ballistospore basidiospores. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91: 253-271.
- Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W., Hattori, M. (1998) Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1-protease. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 46: 1607-1612.
- Miric, O., Lalic, V.Z., Miletic, D.I. (1985) The composition of some lipid fractions (phospholipids, triglycerides, free fatty acids, sterols) of wild growing edible mushrooms. *Hrana Ishrana (Yugoslavia)*, 26: 123-128.
- Mizuno, T. (1995a) Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi, Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food and Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 7-21.
- Mizuno, T. (1995b) *Kawariharatake, Agaricus blazei* Murill: Medicinal and dietary effects. Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food and Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 167-172.
- Mizuno, T. (1995c) Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: bioactive substances and medicinal utilization. Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food and Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 173-178.
- Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., Li, J. (1995) *Reishi, Ganoderma lucidum* and *Ganoderma Tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food and Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 151-166.
- Mui, D., Feibelman, T., Bennett, J.W. (1998) Preliminary study of the carotenoids of some North American species of *Cantharellus*. *International Journal of Plant Sciences*, 159: 244-248.

- Müller, M.M., Kantola, R., Kitunen, V. (1994) Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycological Research*, 98: 593-603.
- Naudet, M. (1992) Acides gras. Dans: Karleskind, A. (ed.), *Le Manuel des Corps Gras*. Lavoisier (Tec & Doc), Paris: 561-576.
- Ness, A.T., Pastewka, J.V., Peacock, A.C. (1964) Evaluation of a recently reported stable Liebermann-Burchard reagent and its use for the direct determination of serum total cholesterol. *Clinica Chimica Acta*, 10: 229-237.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H., Sakamura, S. (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28: 193-197.
- NIST/EPA/NIH (1998) *Mass Spectral Library*. National Institute of Standards and Technology, John Wiley & Sons, Version 1.7a.
- Oomah, B.D. & Mazza, G. (1999) Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 193-198.
- Otten, N. (1998) A canadian perspective. *Value Health*, 1: 218-23.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005) Diets and cardiovascular disease an evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45: 1379-1387.
- Paterson, R. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001.
- Patočka, J. (1999) Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine. *Acta Medica*, 42: 123-125.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R.J. (2006) Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological Research*, 110: 1179-1183.
- Pfeuffer, M. & Schrezenmeir, J. (2006) Impact of *trans* fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal*, 16: 1383-1388.
- Pomerleau, R. (1947) A pathological survey of the deciduous forest at the Forestry Experimental Station, Duchesnay, Quebec. *Quebec Society for the Protection of Plants Report*: 69-79.

- Pomerleau, R. (1980) *La Flore des Champignons du Québec*. Éditions La Presse, Montréal, 652 p.
- Proštenik, M., Burcar, I., Castek, A., Cosovic, C., Golem, J., Jandric, Z., Kliaic, K., Ondrusek, V. (1978) Lipids of higher fungi, III: The fatty acids and 2-hydroxy fatty acids in some species of Basidiomycetes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 22: 97-103.
- Rapier, S., Breheret, S., Talou, T., Pélissier, Y., Bessière, J.M. (2002) The anise-like odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia*, 94: 373-376.
- Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (1988) Fatty acids, related and derived lipids. Dans: Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (eds), *Microbial Lipids, Volume 1*. Academic Press, London: 23-52.
- Rawlings, B. J. (1998) Biosynthesis of fatty acids and related metabolites. *Natural Products Reports*, 15: 275-308.
- Rezanka, T. & Mare, P. (1987) Unusual and very long-chain fatty acids produced by Basidiomycetes. *Journal of Chromatography A*, 409: 390-395.
- Rezanka, T., Rozentsvet, O.A., Dembitsky, V.M. (1999) Characterization of the hydroxy fatty acid content of Basidiomycotina. *Folia Microbiologica*, 44: 635-641.
- Rokujo, T., Kikuchi, H., Tensho, A., Tsukitani, Y., Takenawa, T., Yoshida, K., Kamiya, T. (1970) Lentysine: A new hypolipidemic agent from a mushroom. *Life Sciences*, 9: 379-385.
- Royse, D.J., Rhodes, T.W., Ohga, S., Sanchez, J.E. (2004) Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (Oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. *Bioresource Technology*, 91: 85-91.
- Saito, M., Yamashita, T., Kaneda, T. (1975) Quantitative analysis of eritadenine in *Shiitake* mushroom and other edible fungi. *Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition*, 28: 503-505.
- Sakai, H. & Kajiwara, S. (2003) A stearyl-CoA-specific Δ^9 fatty acid desaturase from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 2431-2437.
- Sakai, H. & Kajiwara, S. (2005) Cloning and functional characterization of a Δ^{12} fatty acid desaturase gene from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Molecular Genetic and Genomics*, 273: 336-341.
- Scott, A.I. (1964) *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products*. Pergamon Press, Oxford, 443 p.

- Sessa, B. (2005) Can psychedelics have a role in psychiatry once again? *British Journal of Psychiatry*, 18: 457-458.
- Sherief, A.A., Abd El Naby, M.A., Mansour, F.A., El Sawah, M.A. (1993) On the Egyptian mushrooms. *Pakistan Journal of Biochemistry*, 26: 69-75.
- Shim, S.H., Ryu, J., Kim, J.S., Kang, S.S., Xu, Y., Jung, S.H., Lee, Y.S., Lee, S., Shin, K.H. (2004) New lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma applanatum*. *Journal of Natural Product*, 67: 1110-1113.
- Silva, G.L., Lee, I.S., Kinghorn, A.D. (1998) Special problems with the extraction of plants. Dans: Cannell, R.J.P. (ed.) *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa: 343-363.
- Silverstein, R.M., Clayton Bassler, G., Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Fifth edition*. John Wiley & Sons, New York, 512 p.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M. (2007) Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 106-112.
- Solomons, T.W.G. (1992) *Organic Chemistry, Fifth edition*. John Wiley & Sons, New York, 1218 p.
- Stahl, P.D. & Klug, M.J. (1996) Characterization and differentiation of filamentous fungi based on the fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4136-4146.
- Stanton, J.L. (2006) Annual report on the bi-monthly mushroom tracking report: http://www.mushroomcouncil.org/docs/2006_01+Annual+tracking+Report+.pdf.
- Sugiyama, K., Akachi, T., Yamakawa, A. (1995) Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6: 80-87.
- Sumner, J.L., Morgan, E.D., Evans, H.C. (1969) The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales. *Canadian Journal of Microbiology*, 15: 515-520.
- Suukari, M. (1995) Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*, 164: 212-216.
- Suutari, M. & Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20: 285-328.

- Suutari, M., Liukkonen, K., Laakso, S. (1990) Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of General Microbiology*, 136: 1469-1474.
- Takahashi, A., Nunozawa, T., Endo, T., Nozoe, S. (1992) Isolation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine from the mushroom *Xerocomus nigromaculatus* Hongo. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40: 1313-1314.
- Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H. (2001) Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 131: 1409-1413.
- Tang, Y.J. & Zhong, J.J. (2002) Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 20-28.
- Thomas, M.G. & Schumann, D.R. (1993) Income Opportunities in Special Forest Products Self-Help Suggestions for Rural Entrepreneurs. Agriculture Information Bulletin AIB-666, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Tsai, S.Y., Tsai, H.L., Mau, J.L. (2006) Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Food Science and Technology*, 40: 1392-1402.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2005) Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3626-3630.
- Vardavas, C.I., Majchrzak, D., Wagner, K.H., Elmadfa, I., Kafatos, A. (2006) Lipid concentrations of wild edible greens in Crete. *Food Chemistry*, 99: 822-834.
- Vitányi, G., Lelik, L., Bihátsi-Karsai, E., Lefler, J., Nagy-Gasztonyi, M., Vereczkey, G. (1998) Detection of eritadenine in extracts from *Shiitake* mushroom by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12: 120-122.
- Volkman, J.K. (2005) Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry*, 36: 139-159.
- Wang, J., Wang, H.X., Ng, T.B. (2006) A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. *Peptides*, 28: 560-565.
- Wang, T., Bengtsson, G., Kärnefelt, I., Björn, L.O. (2001) Provitamins and vitamins D₂ and D₃ in *Cladina* spp. over a latitudinal gradient: possible correlation with UV levels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62: 118-122.

- Wasser, S.P. (2003) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258-274.
- Weete, J.D. (1974) *Fungal Lipid Biochemistry: Distribution and Metabolism*. Monographs in lipid research, Volume 1, Plenum Press, New York, 393 p.
- Wills, R.M. & Lipsey, R.G. (1999) An economic strategy to develop non-timber forest products and services in British Columbia: Forest Renewal BC Project No. PA97538-ORE: <http://www.sfu.ca/~rlipsey/FRBC.PDF>.
- Wilson, A.C. & Miller, R.W. (1978) Growth temperature-dependent stearyl coenzyme A desaturase activity in *Fusarium oxysporum* microsomes. *Canadian Journal of Biochemistry*, 56: 1109-1114.
- Wolff, R.L., Lavialle, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Destailats, F., Marpeau, A.M., Angers, P., Aitzetmüller, K. (2002) Abietoid seed fatty acid composition – A review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of Pinaceae. *Lipids*, 37: 17-26.
- Yazawa, Y., Yokota, M., Sugiyama, K. (2000) Antitumor promoting effect of an active component of polyporus, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23: 1298-1302.
- Yen, G.C. & Wu, J.Y. (1999) Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65: 375-379.
- Yokokawa, H. (1980) Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of ten species of Polyporaceae. *Phytochemistry*, 19: 2615-2618.
- Zhang, Y., Mills, G.L., Nair, M.G. (2003) Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 10: 386-390.
- Zhu, M., Chang, Q., Wong, L.K., Chong, F.S., Li, R.C. (1999) Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research*, 13: 529-531.
- Zjawiony, J.K. (2004) Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67: 300-310.
- Zwetko, P. & Pfeifhofer, H.W. (1991) Investigation of carotenes of rust spores: Significance for physiology and taxonomy. *Nova Hedwigia*, 52: 251-266.

ANNEXE A. RECHERCHE DE COMPOSÉS NUTRACEUTIQUES CHEZ LES CHAMPIGNONS DU QUÉBEC: LES TRITERPÈNES DU GENRE *GANODERMA*

Sommaire

Les champignons du genre *Ganoderma* sont considérés comme la panacée de la médecine traditionnelle asiatique et leurs propriétés biologiques font l'objet de nombreuses études, lesquelles ont permis de reconnaître aux espèces du genre *Ganoderma* plusieurs propriétés médicinales attribuables entre autres à la présence d'acides triterpéniques et dérivés. On trouve au Québec au moins trois espèces du genre *Ganoderma* ; afin de leur reconnaître une valeur nutraceutique, cette étude visait la caractérisation du contenu en triterpènes bioactifs chez des spécimens québécois de *Ganoderma*. Les résultats obtenus n'ont pas permis de détecter, chez les ganodermes du Québec, les triterpènes connus chez les souches asiatiques de *Ganoderma*. Néanmoins, les analyses en CPG-SM ont permis de localiser 16 composés dont le poids moléculaire et le spectre de masse pourraient correspondre à des structures triterpéniques. Il semble donc que les souches québécoises de *Ganoderma* aient des triterpènes qui leur sont spécifiques. L'isolation et la caractérisation de ces composés est toutefois nécessaire à la confirmation de cette hypothèse.

Résumé

Les champignons du genre *Ganoderma* sont considérés comme l'un des fleurons de la médecine traditionnelle asiatique et font l'objet d'un commerce des plus lucratifs à travers le monde. On estime en effet que les ventes des champignons du genre *Ganoderma* augmentent annuellement de 18%, totalisant, en 2002, un chiffre d'affaire de 2,16 milliards de dollars américains. On reconnaît maintenant aux espèces du genre *Ganoderma* plusieurs propriétés médicinales attribuables entre autres à la présence d'acides triterpéniques et dérivés, dont plus d'une centaine ont été isolés et caractérisés, principalement chez les souches asiatiques de *Ganoderma*. On trouve au Québec au moins trois espèces du genre *Ganoderma* : *G. applanatum*, *G. lucidum* et *G. tsugae*. Afin de reconnaître une valeur nutraceutique aux espèces de *Ganoderma* du Québec, cette étude visait la caractérisation du contenu en triterpènes bioactifs chez des spécimens québécois de *G. applanatum*, de *G. lucidum* et de *G. tsugae*. Les champignons, cueillis dans les régions de Sherbrooke et de l'Abitibi, ont été analysés de diverses façons sans que les triterpènes connus chez les souches asiatiques de *Ganoderma* n'aient pu être détectés, aussi a-t-on conclu qu'ils étaient probablement absents des spécimens québécois. Néanmoins, les analyses en CPG-SM ont permis de localiser 16 composés dont le poids moléculaire et le spectre de masse pourraient correspondre à des structures triterpéniques, suggérant que les souches québécoises de *Ganoderma* aient des triterpènes spécifiques. L'isolation et la caractérisation de ces molécule est toutefois nécessaire à la confirmation de cette hypothèse.

A.1. Introduction

Reishi, *Mannentake* et *Lingzhi*, qui signifient respectivement « champignon divin », « champignon de 10 000 ans » et « champignon de l'immortalité », sont les noms évocateurs que les Asiatiques donnent aux champignons du genre *Ganoderma* (Pegler, 2002). Ils reflètent bien l'importance qu'occupe ce mycète dans ces pays où il est considéré comme l'un des fleurons de la médecine traditionnelle. On estime en effet que les ventes des espèces du genre *Ganoderma* augmentent annuellement de 18%, si bien qu'en 2002, près de 4 900 à 5 000 tonnes de ganodermes ont été produites et vendues sous une centaine de marques de commerce différentes, totalisant un chiffre d'affaire de 2,16 milliards de dollars américains (Lai *et al.*, 2004).

Bien que la réputation du ganoderme soit ancestrale pour les Asiatiques, la science moderne a entériné à plus d'un égard les usages traditionnels de ce champignon. On lui reconnaît maintenant des propriétés antibactériennes, antivirales, antitumorales, immunostimulantes, antioxydantes, hypocholestérolémiantes et anti-inflammatoires (Kandfer-Szerszen *et al.*, 1979 ; Zhu *et al.*, 1999 ; Gao *et al.*, 2004 ; Lindequist *et al.*, 2005). Si certaines des propriétés de *Ganoderma* sont reliées à la présence d'hydroquinones sesquiterpéniques (ganomycine, Figure A.1A) et de polysaccharides de type β -1,3-glucan, une large proportion des effets physiologiques de ce champignon est également attribuable aux triterpènes qu'il contient (Lindequist *et al.*, 2005).

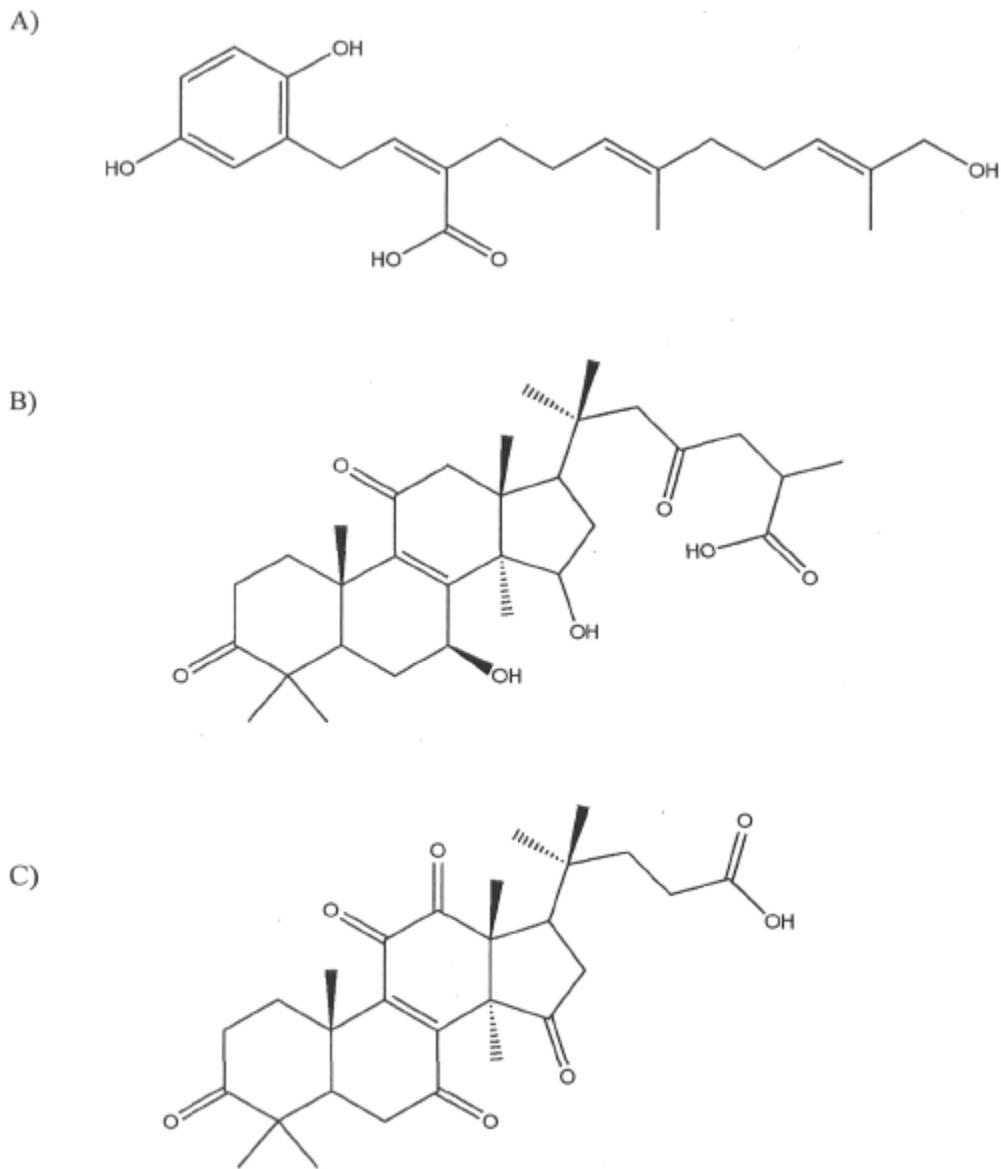


Figure A.1. Exemples de composés nutraceutiques retrouvés chez le genre *Ganoderma*: la ganomycine A (A), l'acide ganoderique A (B) et de l'acide lucidénique D (C). (Tirées de Lindequist *et al.*, 2005)

Un groupe de plus de 4 000 structures construites sur 40 squelettes différents constitue la famille des triterpènes, des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3-dihydrosqualène (Bruneton, 1999). Ils se distinguent des stéroïdes par leur conformation tridimensionnelle : les triterpènes présentant conformation chaise-chaise-chaise-bateau, alors que les stéroïdes présentent plutôt une conformation chaise-bateau-chaise-bateau (Bruneton, 1999). Comme les stérols, les triterpènes possèdent souvent une chaîne latérale (squelette dammarane) pouvant se cycliser et former une structure pentacyclique (squelettes lupane, oléanane, friedelanes, taraxastanes et ursanes) (Bruneton, 1999). Enfin, la structure peut porter des groupements hydroxyles, des insaturations, des méthyles, des cétones et des lactones, en plus d'être potentiellement estérifiées à des sucres ou à des alcaloïdes par exemple (Bruneton, 1999 ; Chappell, 2002), favorisant ainsi une immense variété structurale.

Les triterpènes connus chez *Ganoderma*, sont principalement des acides triterpéniques, parfois estérifiés à un groupement méthyle, pourvus d'un squelette lanostane souvent polyoxygéné par la présence de fonctions hydroxy, cétones (jusqu'à cinq sur la même molécule) ou acétates (Kikuchi *et al.*, 1986 ; Mizuno *et al.*, 1995 ; Lindequist *et al.*, 2005). À ce jour, plus de 100 composés correspondant à des acides triterpéniques et dérivés, tels que les acides applanoxidiques, ganodériques, ganodéréniques, ganodermiques, lucidéniques et leurs dérivés (Figure A.1A et B), ont été caractérisés, principalement chez les souches asiatiques de *Ganoderma* (Jong & Birmingham, 1992 ; Shiao, 2003). L'éventail d'activités biologiques lié aux triterpènes de *Ganoderma* est impressionnant. Par exemple, l'acide ganodérique β inhibe une protéase du HIV de type 1, les acides ganodériques A

(figure A.1B), B, C et D ainsi que l'acide lucidénique B sont antioxydants, l'acide ganodérique F a un effet antihypertenseur, les acides ganodermiques R, S, O et Q ont des propriétés hypocholestérolémiantes alors que les acides ganodériques C et D sont anti-histaminiques (Jong & Birmingham, 1992 ; Min *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 1999).

On retrouve au Québec trois espèces du genre *Ganoderma* : *G. applanatum* (Figure A.2), *G. lucidum* et *G. tsugae* (Boulet, 2003). L'espèce *G. applanatum* est largement répandue dans les forêts de feuillus jusqu'à la forêt boréale, tandis que *G. tsugae* est commun dans les vieilles forêts de conifères, sa distribution rejoignant celle de la pruche du Canada, son hôte de prédilection (Pomerleau, 1947 ; Boulet, 2003 ; Direction de la conservation des forêts, 2006). La distribution de l'espèce *G. lucidum* est moins bien répertoriée, mais il semble que ce champignon soit occasionnel dans les vieilles forêts de feuillus, la vallée du St-Laurent constituant probablement la limite nordique de sa distribution (Boulet, 2003). Afin de reconnaître une valeur nutraceutique aux espèces de *Ganoderma* du Québec, cette étude visait la caractérisation du contenu en triterpènes bioactifs chez des échantillons de *G. applanatum*, de *G. tsugae* et de *G. lucidum* provenant dans les forêts du Québec.



Figure A.2. *Ganoderma applanatum* se développant sur un arbre du Québec.
(Photo: Jacques Landry, avec sa permission)

A.2. Résultats et discussion

A.2.1 Recherche de triterpènes connus chez les spécimens québécois du genre Ganoderma

Les essais effectués dans le but d'identifier des triterpènes connus du genre *Ganoderma* (Section A.3) sont demeurés infructueux, malgré que plus de 130 molécules connues (Annexe B) aient été recherchées dans les champignons analysés. Ces analyses ont toutefois permis l'identification, chez les spécimens québécois du genre *Ganoderma*, de différentes classes de composés telles que des monosaccharides, des acides aminés, des acides organiques, des acides gras, des stérols et des hydrocarbures (Tableaux A.1). La plupart de ces composés ont précédemment été rapportés chez *Ganoderma* (Mau *et al.*, 2001) ou encore chez d'autres espèces de basidiomycètes (Chang & Miles, 2004 ; Diez & Alvarez, 2001 ; Mattila *et al.*, 2001 ; Valentão *et al.*, 2005). Une extraction pratiquée sur l'espèce *G. tsugae* suivie d'un fractionnement selon la polarité et le pH a permis de séparer grossièrement les molécules d'un extrait méthanolique et de les concentrer (Section A.3.4) sans néanmoins permettre la localisation des triterpènes recherchés. Une hydrolyse acide, pratiquée sur différentes fractions (Section A.3.5) a permis d'éliminer l'hypothèse selon laquelle ces molécules auraient pu être glycosylées. Les protocoles d'extraction et d'analyse utilisés étant inspirés de la littérature existante (Morigiwa *et al.*, 1986 ; Nishitoba *et al.*, 1987a ; Nishitoba *et al.*, 1987b ; Nishitoba *et al.*, 1989 ; Hirotsu et Furuya, 1990 ; Hirotsu *et al.*, 1993 ; Rösecke & König, 2000 ; Hajjaj *et al.*, 2005), la méthodologie n'explique pas l'absence de ces molécules chez les spécimens de *Ganoderma* du Québec.

Tableau A.1. Composés identifiés chez les spécimens québécois du genre *Ganoderma*

Classe de composés	Composés identifiés
Acides aminés	Alanine ^{1,*}
	Acide aspartique*
	Acide glutamique*
	Glycine*
	Valine*
Acides gras	14:0*
	15:0*
	16:0*
	16:1*
	17:0*
	18:0*
	18:1*
	18:2*
	20:0*
	22:0*
24:0*	
26:0*	
Acides organiques	Acide malique
Hydrocarbures divers	Aliphatiques, cycliques et branchés
Monosaccharides	Fructose ¹
	Glucose*
	Myo-inositol*
	Sorbitol
	Xylitol
Stérols	Ergostérol*
	Ergosta-7, 22-dièn-3-ol*
	Ergosta-8 (14)-èn-3-ol

¹ Tous les composés ont été identifiés avec la banque de spectres de masse Nist 98 (National Institute of Standards and Technology, 2000) sous forme de dérivés silylés.

* Précédemment rapporté chez *Ganoderma* (Protiva *et al.*, 1980 ; Lin *et al.*, 1997 ; Rezanka *et al.*, 1999 ; Mau *et al.*, 2001)

Les résultats obtenus ne sont pas forcément étonnants car malgré la vaste quantité de triterpènes connus chez *Ganoderma*, leur distribution à travers les espèces du genre et à l'intérieur même des souches d'une même espèce est passablement variable (Yokoyama *et al.*, 1975 ; Hirotsu & Furuya, 1993 ; Paterson, 2006). Il est donc possible que les espèces québécoises du genre *Ganoderma* contiennent des triterpènes différents de ceux des souches asiatiques. En outre, la concentration, aussi bien que la nature des triterpènes trouvés chez *Ganoderma* sont influencées par le degré de maturité des carpophores et sont différentes selon les parties du champignon (mycélium, carpophore, spores, etc.), de sorte que les triterpènes isolés du carpophore sont souvent distincts de ceux isolés du mycélium ou des spores (Nishitoba *et al.*, 1987a ; Nishitoba *et al.*, 1987b ; Shiao *et al.*, 1988 ; Hirotsu & Furuya, 1990 ; Min *et al.*, 1998).

A.2.1 Localisation de composés potentiellement triterpéniques

En dépit de l'absence de triterpènes connus, l'analyse par spectrométrie de masse (CPG-SM) des fractions acides silylées issues de *G. tsugae* (Section A.3.4) a permis de soupçonner la présence de 16 composés de nature triterpénique (Tableau A.2). Ils sont caractérisés par un poids moléculaire compris entre 500 et 662 m/z , et présentent tous un spectre de masse différent du spectre montré par les molécules habituellement présentes chez les champignons ayant un poids moléculaire dans cet intervalle, comme les hydrocarbures ou les stérols par exemple. De plus, pour la plupart de ces composés, le poids moléculaire calculé de la molécule non silylée est généralement plus élevée que celle de l'ergostérol (400 m/z) écartant ainsi la possibilité qu'il s'agisse de dérivés de l'ergostérol.

Les spectres de masse des composés grossièrement identifiés contiennent les pics correspondants aux fragments suivants : $[M-CH_3]^+$, $[M-silanol]^+$ et $[M-silanol-CH_3]^+$, qui sont des pics majeurs dans les spectres de masse des dérivés silylés de triterpènes de *Ganoderma*, où ils indiquent la présence de groupements hydroxyles⁹ (Morigiwa *et al.*, 1986 ; Hajjaj *et al.*, 2005). Le fait que ces ions, qui correspondent à la perte de groupements très labiles, soient la plupart du temps assez intenses chez la plupart des composés analysés renforce l'idée qu'il s'agit de molécules ayant un noyau passablement stable, qui pourrait être stéroïdien ou triterpénique. En effet, l'étude de la fragmentation de molécules stéroïdiennes portant une fonction cétone et peu de groupements labiles (Djerassi *et al.*, 1965 ; Brown & Djerassi, 1981) a montré que celles-ci laissent habituellement voir un ion moléculaire relativement intense. Toutefois, la position de la cétone sur le noyau stéroïdien influence la fragmentation et peut contribuer à déstabiliser le noyau suffisamment pour en précipiter la fragmentation, diminuant ainsi l'intensité du pic correspondant (Budzikiewicz *et al.*, 1964), ce qui pourrait expliquer les différences d'intensité de l'ion correspondant à la perte des groupements labiles majeurs ($[M-silanol]^+$ et $[M-silanol-CH_3]^+$) dans les spectres des composés analysés. Ces données suggèrent qu'une structure de base constituée d'un noyau stéroïdien, possiblement lanostane, avec au moins une fonction cétone, serait possible pour plusieurs des composés extraits de *G. tsugae*.

⁹ Le BSTFA peut aussi être utilisé pour silyler des groupements carbonyles (Chambaz *et al.*, 1973). Les conditions utilisées dans cette étude ne permettaient que la dérivation des groupements hydroxy (-OH ; -COOH).

Tableau A.2. Composés localisés chez *Ganoderma tsugae* présentant un poids moléculaire et un spectre de masse pouvant correspondre à des triterpènes

Composé	Temps de rétention ¹ (min)	Fraction	M ⁺	Fragments (m/z)											Nbr de OH	PM suggéré	Formule moléculaire suggérée
				M ⁺ - CH ₃	M ⁺ - OCH ₃	M ⁺ - COCH ₃	M ⁺ - TMS	M ⁺ - silanol	M ⁺ - silanol - CH ₃	M ⁺ - COOTMS	M ⁺ - silanol - 2 CH ₃	M ⁺ - 2 TMS	M ⁺ - 2 TMS - CH ₃	M ⁺ - 2 TMS - silanol			
1	10.21	EtOAc/MeOH	520	505	-	477	-	430	415	403	-	-	-	1	448	C ₂₆ H ₄₀ O ₆	
2	10.90	MeOH	518	502	-	-	-	429	412	-	397 (100)	-	-	1	446	C ₂₈ H ₃₀ O ₅	
3	11.22	MeOH	566	-	-	-	-	476	-	-	-	-	-	1	494	C ₂₉ H ₃₄ O ₇	
4	13.02	EtOAc	500	485	469	457	-	-	395	383 (100)	-	-	-	1	428	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	
5	13.20	MeOH	506	491	475	-	433	416	401	-	-	-	-	1	434	C ₂₇ H ₃₀ O ₅	
6	14.66	EtOAc	514	499	483	471	-	-	409	397 (100)	-	-	-	1	442	C ₂₈ H ₄₂ O ₄	
7	15.42	MeOH	608	593	-	565	-	521	-	-	-	-	-	1	536	C ₃₃ H ₄₄ O ₆	
8	15.83	MeOH	666	-	-	-	-	-	-	-	-	520	505	430	3	450	C ₂₇ H ₃₀ O ₆
9	16.00	MeOH	592	-	-	-	-	502	487	-	-	-	-	1	520	C ₃₃ H ₄₄ O ₅	
10	16.14	CHCl ₃	526	511	495	483	-	-	-	409	-	-	-	1	454	C ₂₈ H ₃₈ O ₅	

¹ Temps de rétention correspondants à la méthode d'analyse présentée à la section A.3.4.

Tableau A.2. (Suite) Composés localisés chez *Ganoderma tsugae* présentant un poids moléculaire et un spectre de masse pouvant correspondre à des triterpènes

Composé	Temps de rétention ¹ (min)	Fraction	M ⁺	Fragments (m/z)										Nbr de OH	PM suggéré	Formule moléculaire suggérée	
				M ⁺ - CH ₃	M ⁺ - OCH ₃	M ⁺ - COCH ₃	M ⁺ - TMS	M ⁺ - silanol	M ⁺ - silanol - CH ₃	M ⁺ - COOTMS	M ⁺ - silanol - 2 CH ₃	M ⁺ - 2 TMS	M ⁺ - 2 TMS - CH ₃				M ⁺ - 2 TMS - silanol
11	16.46	CHCl ₃ /EtOAc/ MeOH	528	513	497	485	-	-	-	411 (100)	-	-	-	-	1	456	C ₂₈ H ₄₀ O ₅
12	18.42	EtOAc/MeOH	542	527	511	499	-	-	437	425 (100)	-	-	-	-	1	470	C ₂₉ H ₄₂ O ₅
13	26.25	CHCl ₃	646	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	646	C ₃₉ H ₅₀ O ₈
14	30.50	CHCl ₃	662	647	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	662	C ₄₀ H ₅₄ O ₈	
15	33.28	CHCl ₃	548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
16	35.83	CHCl ₃	546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	546	C ₃₅ H ₄₆ O ₅	

¹ Temps de rétention correspondants à la méthode d'analyse présentée à la section A.3.4.

Alors que le pic de base de la plupart des composés repérés est le fragment triméthylsilyle ($73\ m/z$), les composés 4, 6, 11 et 13 ont plutôt un pic de base à $[M-117]^+$, correspondant à la perte du groupement $[COOTMS]$, ce qui suggère la présence d'une fonction acide (silylée dans ce cas-ci) sur ces molécules. Au contraire, les composés 1, 2, 5 et 9 n'ont pas ce fragment et présentent plutôt deux fragments correspondant à $[M-silanol]^+$ et à $[M-silanol-CH_3]^+$, ce qui suggère que le groupement hydroxyle n'est pas attaché au groupement carbonyle d'une fonction acide mais qu'il est plutôt situé sur la squelette lanostane ou sur la chaîne latérale, comme c'est le cas pour plusieurs triterpènes extraits de *Ganoderma* (Kikuchi *et al.*, 1986 ; Chairul *et al.*, 1991). Quelques composés (13, 14, 16) n'avaient pas de fragments issus de la silylation, et n'avaient pas la masse $73\ m/z$ correspondant au TMS, indiquant que ces molécules ne portent probablement pas de fonction hydroxyle. Enfin, seul le composé 8 a présenté un spectre suggérant une molécule polyhydroxylée avec possiblement trois fonctions hydroxy. En outre, chez les composés 1, 4, 5, 6, 7, 10 (Figure A.3), 11 et 12, la perte des fragments $[M-31]^+$ et $[M-43]^+$ suggère la présence de fonctions méthoxy (OCH_3) ou acétate ($COCH_3$). Si les groupements méthoxy sont relativement peu fréquents chez les triterpènes du genre *Ganoderma*, les groupements acétates sont assez souvent rencontrés chez ces molécules (Kikuchi *et al.*, 1986).

Bien que les données obtenues soit insuffisantes à l'identification des molécules analysées, les spectres de masse de ces composés suggèrent que des molécules polyoxygénées, pouvant correspondre à des triterpènes semblables à ceux retrouvés chez les souches asiatiques du genre *Ganoderma*, sont présentes dans les spécimens québécois de *G.*

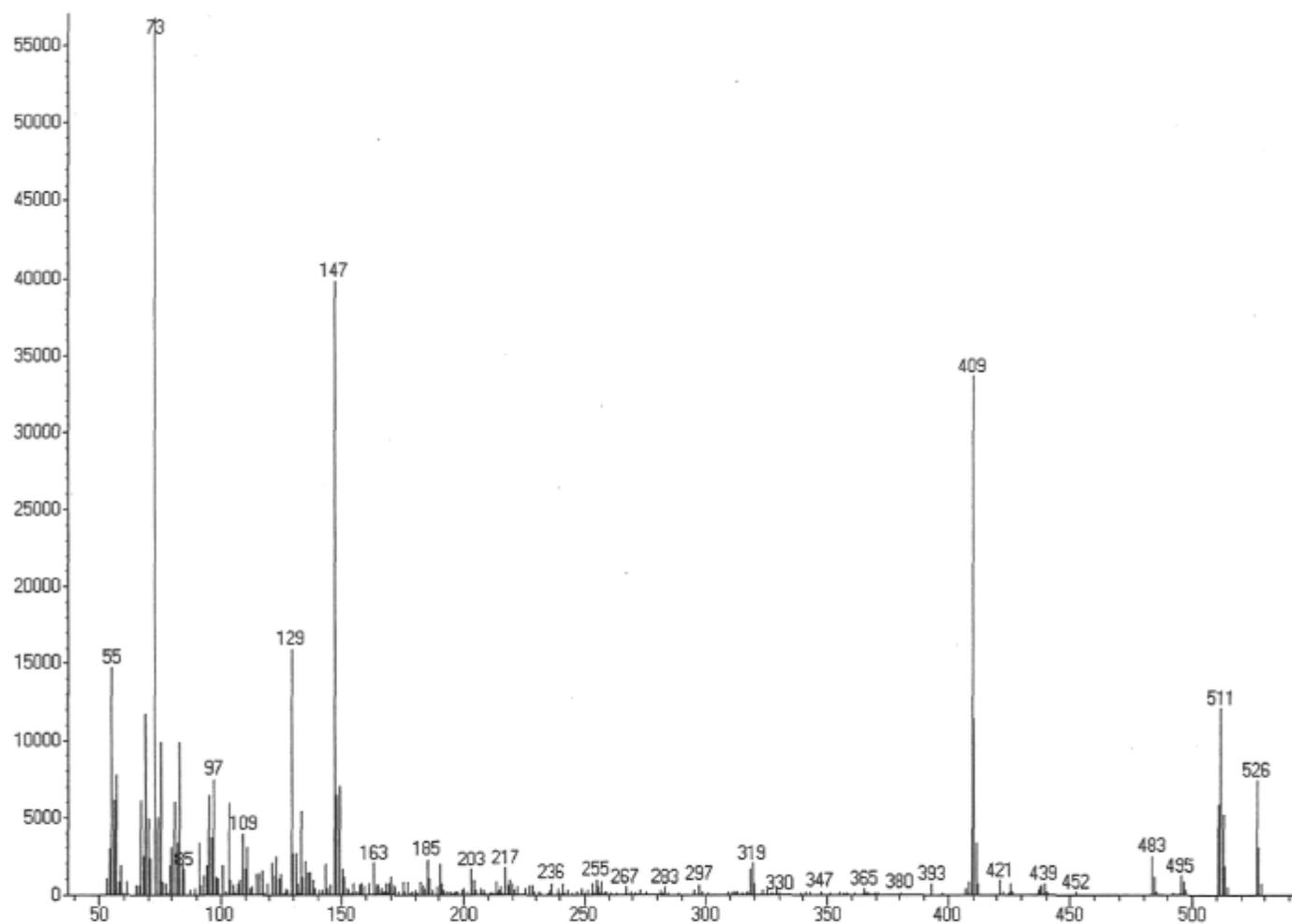


Figure A.3. Spectre de masse du composé 10, localisé chez *Ganoderma tsugae*. Fragments identifiés : 73 m/z [TMS] pic de base ; 526 m/z $[M]^+$, 511 m/z $[M-CH_3]^+$, 495 m/z $[M-OCH_3]^+$, 483 m/z $[M-COCH_3]^+$, 409 m/z $[M-COOTMS]^+$.

tsugae. La spectroscopie de masse étant insuffisante à l'analyse structurale de ces molécules complexes, elles devront être isolées afin de compléter l'élucidation structurale. Laquelle permettra possiblement de confirmer la présence de nouveaux triterpènes chez les spécimens québécois de *Ganoderma*.

A.3. Matériel et méthodes

A.3.1. Matériel fongique

Les champignons *G. applanatum*, *G. tsugae* et *G. lucidum* analysés dans le cadre de cette étude provenaient de différentes forêts du Québec, principalement situées dans les régions de Sherbrooke et de l'Abitibi. Tous les spécimens ont été récoltés et identifiés par le mycologue Maurice Thibault¹⁰. Ils ont par la suite été lyophilisés, pulvérisés, homogénéisés et conservés à -35°C jusqu'à l'analyse.

A.3.2. Analyse d'un extrait simple sur CLHP-SM/SM

Un échantillon de *G. lucidum* (1 g) a été extrait avec de l'éthanol (100 mL) à la température de pièce, pour une nuit, avec agitation magnétique. Un aliquot (5 mL) a ensuite été prélevé dans l'extrait initial, concentré d'environ 50% sous N_2 , puis filtré sur 2 μm . Un échantillon de *G. applanatum* (1 g) a été extrait de la même façon mais en utilisant du méthanol. Les deux échantillons ont été conservés à -35°C jusqu'à l'analyse.

¹⁰ Maurice Thibault est mycologue et auteur du livre « 250 champignons du Québec et de l'Est du Canada », publié aux Éditions du Trécarré en 1989.

Les échantillons (20 μL) ont été analysés sur un appareil CLHP (modèle 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) couplé à un détecteur UV et un spectromètre de masse SM/SM de type trappe ionique (modèle 6300, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilisant une ionisation à électrovaporisation (*electrospray*). Les échantillons ont été injectés sur une pré-colonne LiChrospher 100 RP-18 (4×4 mm, Merck, Darmstadt, Allemagne) connectée à une colonne LiChrospher 100 RP-18 *endcapped* (250 mm \times 4 mm \times 5 μm , Merck, Darmstadt, Allemagne), maintenue à une température de 35°C . Les phases mobiles étaient : A : Acide acétique 2% v/v dans H_2O , et B : Acétonitrile 100%. La méthode suivante (Hirotani & Furuya, 1990) a été appliquée : 43% B et 57% A, en mode isocratique, pendant 40 min. Le débit a été ajusté à une vitesse de 0.6 mL \cdot min $^{-1}$. Le détecteur UV était ajusté à 254 nm (Hirotani & Furuya, 1990 ; Rösecke & König, 2000). Les masses ciblées par le spectromètre de masse étaient les suivantes : 510, 512, 514, 526 et 528 *m/z*.

A.3.3. Analyse d'un extrait simple sur CPG-SM

Un échantillon de *G. applanatum* (0,3 g) a été extrait avec du méthanol (2×25 mL) (Hirotani et Furuya, 1990) avec l'aide d'ultrasons (2×10 min). Un aliquot (2 mL) a été prélevé sur chaque échantillon, filtrés sur 2 μm , évaporés à sec sous N_2 et conservés à -35°C jusqu'à l'analyse.

Des dérivés triméthylsilylés ont été préparés en dissolvant les échantillons secs dans le BSTFA (400 μL , Aldrich, Saint-Louis, MO) suivi d'un chauffage à 90°C , 30 min. Les dérivés triméthylsilylés ont été injectés sur une colonne capillaire ZB-5 (Phenomenex, Torrance, CA ; 5%-phényl méthylpolysiloxane, 30 m \times 0.25 mm d.i. \times 0.25 μm épaisseur du

film) installée sur un chromatographe en phase gazeuse (HP 6890 Series II, Agilent, Palo Alto, CA), connecté à un spectromètre de masse quadrupolaire (5973N, Agilent, Palo Alto, CA) utilisé en mode d'ionisation électronique (70 eV), avec le logiciel HP ChemStation. L'injecteur, en mode de non-partage, était maintenu à une température de 300°C. Le programme de température suivant a été appliqué : température initiale de 80°C, maintenue pendant une minute, augmentée à 220°C au taux de 20°C · min⁻¹ puis à 325°C au taux de 3°C · min⁻¹. L'hélium était le gaz porteur utilisé, sous débit constant (1 mL · min⁻¹). Les masses étaient balayées dans un intervalle de 50 à 800 *m/z*. L'analyse des chromatogrammes a été faite pic par pic, en soustrayant la ligne de base du chromatogramme. Des masses comprises entre 400 et 800 *m/z* ont été recherchées, et les masses pouvant correspondre à des triterpènes ont été comparées avec celles de 139 triterpènes connus chez le genre *Ganoderma* (Annexe B, Tableau B.1.).

A.3.4. Analyse d'un extrait fractionné sur CPG-SM

Un échantillon de *G. tsugae* (60 g) a été extrait successivement avec de l'hexane (760 mL), du chloroforme (760 mL), de l'acétate d'éthyle (760 mL), et du méthanol (760 mL) à la température de la pièce, pendant 2 heures pour chaque solvant, avec agitation magnétique constante (Figure A.4). Chaque extrait a été filtré puis concentré sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) jusqu'à un volume d'environ 50 mL. Les extraits hydrophobes (hexane, chloroforme et acétate d'éthyle) ont par la suite été fractionnés en composés neutres, acides et basiques à l'aide d'extractions liquides-liquides successives, couplées à des modifications du pH de la phase aqueuse (pH 2 et pH 12), ce qui a permis d'obtenir 9 extraits (3 solvants ×

neutres, acides, bases). Chaque extrait a ensuite été séché sur Na_2SO_4 anhydre, filtré, concentré sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) jusqu'à un volume de 5 mL. Le pH de l'extrait méthanolique (phase aqueuse) a été alcalinisé avec une solution de NaOH 1N (pH 12) puis extrait avec CHCl_3 (3×15 mL). La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 anhydre, filtrée puis concentrée sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) jusqu'à un volume de 5 mL. La phase méthanolique résiduelle a ensuite été acidifiée avec HCl 1N (pH 2), extraite avec du chloroforme (3×15 mL), séchée sur Na_2SO_4 anhydre, filtrée puis concentrée sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) jusqu'à un volume de 5 mL. La phase méthanolique résiduelle a été ajustée à un pH neutre puis extraite avec CHCl_3 (3×15 mL), séchée sur Na_2SO_4 anhydre, filtrée puis concentrée sous vide ($\geq 35^\circ\text{C}$) jusqu'à un volume de 5 mL. Des échantillons (3×1 mL) ont été prélevés de chaque extrait acide/neutre/basique obtenus puis dérivés : 1) avec du BSTFA (500 μL , Aldrich, St-Louis, MO) à 90°C , 30 min ; 2) avec du $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (500 μL ; Aldrich, St-Louis, MO) pendant 20 min, à 70°C ; 3) successivement avec du $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ puis avec du BSTFA, selon les mêmes méthodes que celles décrites en 1) et 2). Les échantillons ont été conservés à -35°C jusqu'à l'analyse en CPG-SM.

Les échantillons ont été analysés en CPG-SM dans les mêmes conditions que celles décrites à la section A.3.3, avec les modifications suivantes : l'injecteur était maintenu à une température de 310°C , et le programme de température suivant a été appliqué : température initiale de 100°C , augmentée de 100 à 250°C à $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, de 250 à 310°C à $2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, puis de 310 à 325°C à $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, et maintenue à 325°C pendant 2 minutes.

A.3.5. Essai d'hydrolyse acide

Des échantillons (1 mL chacun : CHCl₃-acides, CHCl₃-neutres, EtOAc-acides, EtOAc-neutres, MeOH-acides, et MeOH-neutres ; section A.3.4) mais non dérivés ont été hydrolysés avec H₂SO₄ 8N, à 60°C, pour 20 min. Chaque phase organique a ensuite été neutralisée avec NaOH 8N, séchée sur Na₂SO₄ anhydre, dérivée avec BSTFA (500 µL, St-Louis, MO) à 90°C, 30 min. Les échantillons ont été conservés à -35°C jusqu'à l'analyse. Ils ont été analysés en CPG-SM selon la méthode décrite à la section A.4.3.

A.4. Conclusion

Cette étude a permis d'identifier plusieurs composés primaires chez les spécimens québécois du genre *Ganoderma*. La recherche de composés de nature triterpénique connus a été infructueuse, ce qui est probablement dû à la différence entre les souches japonaises et québécoises du genre *Ganoderma*. Toutefois, les analyses ont permis de caractériser grossièrement 16 composés issus d'un extrait de *G. tsugae* qui pourraient éventuellement être de nouveaux triterpènes spécifiques aux souches québécoises de *Ganoderma*. Dans cette optique, un travail de purification sur les espèces québécoises du genre *Ganoderma* a été entrepris (Chapitre 6).

A.5. Références

Boulet, B. (2003) *Les Champignons des Arbres de l'Est de l'Amérique du Nord*. Publications du Québec, Sainte-Foy, 748 p.

Brown, F.J. & Djerassi, C. (1981) Effect of additional double bonds on the mass spectrometric fragmentations of Δ^4 -3-keto steroids. *Journal of Organic Chemistry*, 46: 954-963.

Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes Médicinales*. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 930 p.

Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. (1964) *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volume II: Steroids, Terpenoids, Sugars, and Miscellaneous Classes*. Holden-Day, San Francisco, 306 p.

Chairul, T.T., Hayashi, Y., Nishizawa, M., Chairul, S.M., Hayashi, Y. (1991) Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 30: 4105-4109.

Chang, S.T. & Miles, P.G. (2004) The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact, Second edition*. CRC Press, New York: 27-37.

Chappell, J. (2002) The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 151-157.

Diez, V.A. & Alvarez, A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from Northwest Spain. *Food Chemistry*, 75: 417-422.

Direction de la conservation des forêts (2006) Insectes, maladies et feux dans les forêts québécoises en 2005. Publication du Ministère des Ressources Naturelles, Gouvernement du Québec: www.mmf.gouv.qc.ca/publications/forets/fimaq/insectes/bilan2005.pdf.

Djerassi, C., Shapiro, R.H., Vandewalle, M. (1965) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXI.: Stereospecificity in a hydrogen-transfer reaction characteristic of 6-keto steroids. *Journal of the American Chemical Society*, 87: 4892-4902.

Gao, Y., Chan, E., Zhou, S. (2004) Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International*, 20: 123-161.

- Hajjaj, H., Macé, C., Roberts, M., Niederberger, P., Fay, L.B. (2005) Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3653-3658.
- Hirotsani, M. & Furuya, T. (1990) Changes of the triterpenoid patterns during the formation of the fruit body in *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 29: 12, 3767-3771.
- Hirotsani, M., Ino, C., Furuya, T. (1993) Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 33: 379-382.
- Jong, S.C. & Birmingham, J.M. (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology*, 37: 101-135.
- Kandfer-Szerszen, M., Kawecki, Z., Guz, M. (1979) Fungal nucleic acids as interferon inducers. *Acta Microbiologica Polonica*, 28: 277-291.
- Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Murai, Y., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.: I. Structure of ganoderic acids C2, E, I, and K, lucidenic acid F and related compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3695-3712.
- Lai, T., Gao, Y., Zhou, S. (2004) Global marketing of medicinal *Ling Zhi* mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) products and safety concerns. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6: 189-194.
- Lin, C.N., Ann, Y.F., Chung, M.I. (1997) Steroids of formosan *Ganoderma tsugea*. *Phytochemistry*, 46: 1143-1146.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.I., Jülich, W.D. (2005) The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-299.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Chen, C.C. (2001) Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34: 521-526.
- Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W., Hattori, M. (1998) Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1-protease. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 46: 1607-1612.

- Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., Li, J. (1995) *Reishi, Ganoderma lucidum* and *Ganoderma Tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. Dans: Mizuno, T. (ed.), Special Issue on Mushrooms: The Versatile Fungus – Food and Medicinal Properties, Chemistry, Biochemistry, Biotechnology, and Utilization. *Food Reviews International*, 11: 151-166.
- Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y., Ikekawa, N. (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3025-3028.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H., Sakamura, S. (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28: 193-197.
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1987a) Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 26: 1777-1784.
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1987b) Novel mycelial components, ganoderic acid Mg, Mh, Mi, Mj and Mk, from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 1149-1153.
- Paterson, R. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001.
- Pegler, D.N. (2002) Useful fungi of the world: the *Ling-zhi* – The mushroom of immortality. *Mycologist*, 16: 100-101.
- Pomerleau, R. (1947) A pathological survey of the deciduous forest at the Forestry Experimental Station, Duchesnay, Quebec. *Quebec Society for the Protection of Plants Report*: 69-79.
- Protiva, J., Skorkovska, H., Urban, J., Vystroil, A. (1980) Triterpenes and steroids from *Ganoderma applanatum*. *Czechoslovak Chemical Communication*, 45: 2710-2713.
- Rezanka, T., Rozentsvet, O.A., Dembitsky, V.M. (1999) Characterization of the hydroxy fatty acid content of Basidiomycotina. *Folia Microbiologica*, 44: 635-641.
- Rösecke, J. & König, W.A. (2000) Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, 54: 603-616.
- Shiao, M.S., Lin L.J., Yeh, S.F. (1988) Triterpenes in *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 27: 873-875.

Shiao, M.S. (2003) Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 3: 172-180.

Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2005) Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3626-3630.

Yokoyama, A., Natori, S., Aoshima, K. (1975) Distribution of tetracyclic triterpenoids of lanostane group and sterols in the higher fungi especially of the Polyporaceae and related families. *Phytochemistry*, 14: 487-497.

Zhu, M., Chang, Q., Wong, L.K., Chong, F.S., Li, R.C. (1999) Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research*, 13: 529-531.

ANNEXE B. TRITERPÈNES RECHERCHÉS CHEZ LES
SPÉCIMENS QUÉBÉCOIS DE *GANODERMA*

Tableau B.1. Triterpènes connus ayant été cherchés chez les spécimens québécois du genre *Ganoderma*

Triterpène		Poids moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence
Ac. applanoxydique	A	512	656	<i>G. annulare, G. applanatum</i>	3, 31
	B	512	656	<i>G. applanatum</i>	3
	C	528	672	<i>G. annulare, G. applanatum</i>	3, 31
	D	528	744	<i>G. applanatum</i>	3
	E	512	656	<i>G. applanatum</i>	2
	F	510	582	<i>G. annulare, G. applanatum</i>	2, 31
	G	530	746	<i>G. annulare, G. applanatum, G. pfeifferi</i>	2, 19, 31
	H	532	820	<i>G. annulare, G. applanatum</i>	2, 31
Ac. furanoganodérique	-	510	654	<i>G. applanatum</i>	28
Ac. ganodérénique	A	514	730	<i>G. lucidum, G. applanatum</i>	13, 17
	B	514	730	<i>G. lucidum</i>	13
	C	516	804	<i>G. lucidum</i>	13
	D	512	656	<i>G. lucidum, G. applanatum</i>	13
	E	528	744	<i>G. lucidum</i>	26
	F	510	582	<i>G. applanatum</i>	28
	G	512	656	<i>G. applanatum</i>	28
Ac. ganodérique	β	500	644	<i>G. lucidum</i>	13
	A	516	732	<i>G. lucidum</i>	13
	B	516	732	<i>G. lucidum</i>	21
	C	514	658	<i>G. lucidum</i>	7
	C1	514	658	<i>G. lucidum</i>	7

Triterpène	Poids moléculaire - moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence
C2	518	806	<i>G. lucidum</i>	7
D	530	674	<i>G. lucidum</i>	20
E	512	584	<i>G. lucidum</i>	7
F	570	642	<i>G. lucidum</i>	10
G	532	820	<i>G. lucidum</i>	10
H	572	716	<i>G. lucidum</i>	10
I	532	748	<i>G. lucidum</i>	10
J	514	658	<i>G. lucidum</i>	22
K	574	790	<i>G. lucidum</i>	26
M	530	746	<i>G. lucidum</i>	26
N	530	746	<i>G. lucidum</i>	26
O	630	774	<i>G. lucidum</i>	7
P	570	714	<i>G. lucidum</i>	7
Q	570	714	<i>G. lucidum</i>	7
R	554	626	<i>G. lucidum</i>	7
S	512	656	<i>G. lucidum</i>	7
T	612	684	<i>G. lucidum</i>	7
U	472	688	<i>G. lucidum</i>	33
V	528	672	<i>G. lucidum</i>	33
V1	514	730	<i>G. lucidum</i>	8
W	572	716	<i>G. lucidum</i>	33
X	512	656	<i>G. lucidum</i>	30
Y	454	598	<i>G. lucidum</i>	33
Z	456	600	<i>G. lucidum</i>	33
M-A	572	716	<i>G. lucidum</i>	24
M-B	630	774	<i>G. lucidum</i>	24
M-C	630	774	<i>G. lucidum</i>	24

Ac. ganodérique

Triterpène	Poids moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence	
Ac. ganodermique	M-D	586	<i>G. lucidum</i>	24	
	M-E	554	<i>G. lucidum</i>	30	
	M-F	512	<i>G. lucidum</i>	30	
	M-G	602	<i>G. lucidum</i>	7	
	M-H	588	<i>G. lucidum</i>	7	
	M-I	544	<i>G. lucidum</i>	25	
	M-J	544	<i>G. lucidum</i>	25	
	M-K	570	<i>G. lucidum</i>	25	
	R	554	<i>G. lucidum</i>	30	
	Ac. ganolucidique	A	500	<i>G. lucidum</i>	12
		B	502	<i>G. lucidum</i>	12
C		518	<i>G. lucidum</i>	22	
D		500	<i>G. lucidum</i>	23	
E		484	<i>G. lucidum</i>	27	
Ac. lucidénique		A	458	<i>G. lucidum</i>	21
	B	474	<i>G. lucidum</i>	21	
	C	476	<i>G. lucidum</i>	21	
	D-2	514	<i>G. lucidum</i>	11	
	D	514	<i>G. lucidum</i>	11	
	E1	474	<i>G. lucidum</i>	20	
	E2	516	<i>G. lucidum</i>	11	
	F	456	<i>G. lucidum</i>	11	
	H	476	<i>G. lucidum</i>	26	
	I	474	<i>G. lucidum</i>	26	
	J	490	<i>G. lucidum</i>	26	
	K	474	<i>G. lucidum</i>	26	

Triterpène		Poids moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence
Ac. lucidénique	M	462	750	<i>G. lucidum</i>	26
Ac. 7- <i>o</i> -méthylganodérique	O	644	644	<i>G. lucidum</i>	7
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-15 α -acetoxy-3 β -hydroxy-26-oïque	-	512	656	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 α -acetoxy-26-oïque	-	496	568	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. Lanosta-7,9(11),24-trien-3 α ,15 α -diacetoxy-26-oïque	-	554	626	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 α ,22 β -diacetoxy-15 α -hydroxy-26-oïque	-	570	642	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-15 α ,22 β -diacetoxy-3 α -hydroxy-26-oïque	-	570	642	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 α -hydroxy-26-oïque	-	454	598	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 β -acetoxy-15 α -hydroxy-26-oïque	-	512	656	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 α ,15 α -dihydroxy-26-oïque	-	470	686	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. lanosta-7,9(11),24-trien-3 α ,15 α ,22 β -triacetoxy-26-oïque	-	612	612	<i>G. lucidum</i>	16
Ac. tsugarique	A	498	570	<i>G. tsugea</i>	15
	B	528	672	<i>G. tsugea</i>	15
	C	514	658	<i>G. tsugea</i>	32
Ganodérate de méthyle	A	530	674	<i>G. lucidum</i>	5
	B	530	674	<i>G. lucidum</i>	5

Triterpène	Poids moléculaire - moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence	
Ganodérate de méthyle	C	586	<i>G. lucidum</i>	5	
	C-1	528	<i>G. lucidum</i>	11	
	C-2	532	<i>G. lucidum</i>	11	
	D	532	<i>G. lucidum</i>	10	
	E	526	<i>G. lucidum</i>	11	
	F	584	<i>G. lucidum</i>	10	
	H	586	<i>G. lucidum</i>	10	
	I	546	<i>G. lucidum</i>	10	
	J	528	<i>G. lucidum</i>	11	
	K	530	<i>G. lucidum</i>	11	
	L	548	<i>G. lucidum</i>	23	
	M	544	<i>G. lucidum</i>	26	
	N	544	<i>G. lucidum</i>	10	
	AP	560	<i>G. applanatum</i>	28	
	Ganodérénate de méthyle	H	526	<i>G. applanatum</i>	28
		I	528	<i>G. applanatum</i>	28
Ganolucidate de méthyle	A	514	<i>G. lucidum</i>	10	
	B	516	<i>G. lucidum</i>	10	
Lucidénate de méthyle	A	472	<i>G. lucidum</i>	11	
	C	490	<i>G. lucidum</i>	11	
	C	490	<i>G. lucidum</i>	11	
	D2	528	<i>G. lucidum</i>	10	
	E2	530	<i>G. lucidum</i>	10	
	F	470	<i>G. lucidum</i>	11	
	H	490	<i>G. lucidum</i>	26	
	I	488	<i>G. lucidum</i>	26	
	J	504	<i>G. lucidum</i>	26	

Triterpène		Poids moléculaire	Poids moléculaire - dérivé BSTFA	Espèce	Référence
Lucidénate de méthyle	K	486	558	<i>G. lucidum</i>	26.
	L	488	632	<i>G. lucidum</i>	26
	M	476	692	<i>G. lucidum</i>	26
Ganodériol	A	457	745	<i>G. lucidum</i>	4
	B	470	686	<i>G. lucidum</i>	29
	C	518	734	<i>G. lucidum</i>	27
	D	488	704	<i>G. lucidum</i>	27
	E	472	688	<i>G. lucidum</i>	27
	F	454	598	<i>G. lucidum</i>	27
	G	504	720	<i>G. lucidum</i>	27
	H	490	778	<i>G. lucidum</i>	27
	I	502	718	<i>G. lucidum</i>	27
Ganodérol	A	438	510	<i>G. lucidum</i>	1
	B	440	584	<i>G. lucidum</i>	1
Ganodermatriol		456	672	<i>G. lucidum</i>	1
Ganodermandiol		456	600	<i>G. lucidum</i>	4
Ganodermanontriol		472	688	<i>G. lucidum</i>	4
Ganodéral	A	436.684	436.684	<i>G. lucidum</i>	18
Ganodermadiol tricetate	-	582	582	<i>G. lucidum</i>	1
Lucidone	A	402	546	<i>G. amboinense; G. lucidum</i>	20
	B	400	472	<i>G. lucidum</i>	20
	C	404	620	<i>G. lucidum</i>	23
Lanosta-7,9(11),24-trien-26, 27-dihydroxy-3,16-dione	-	450	594	<i>G. carnosum</i>	9

B.1. Références

- 1) Arisawa, M., Fujita, A., Saga, M., Fukumura, H., Hayashi, T., Shimizu, M., Morita, N. (1986) Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*, 49: 621-625.
- 2) Chairul, S.M. & Hayashi, Y. (1994) Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 35: 1305-1308.
- 3) Chairul, T.T., Hayashi, Y., Nishizawa, M., Chairul, S.M., Hayashi, Y. (1991) Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 30: 4105-4109.
- 4) Fujita, A., Risa, M., Saga, M., Hayashi, T., Rita, N. (1986) Two new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*, 49: 1122-1125.
- 5) Hirotani, M., Furuya, T., Shiro, M. (1985) A ganoderic acid derivative, a highly oxygenated lanostanetype triterpenoid from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 24: 2055-2061.
- 6) Hirotani, M. & Furuya, T. (1986) Ganoderic acid derivatives, highly oxygenated lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 25: 1189-1193.
- 7) Hirotani, M., Asaka, I., Ino, C., Furuya, T., Shiro, M. (1987) Ganoderic acid derivatives and ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 26: 2797-2803.
- 8) Hirotani, M., Ino, C., Furuya, T. (1993) Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 33: 379-382.
- 9) Keller, A.C., Keller, J., Maillard, M.P., Hostettmann, K. (1997) A lanostane-type steroid from the fungus *Ganoderma carnosum*. *Phytochemistry*, 46: 963-965.
- 10) Kikuchi, T., Matsuda, S., Kadota, S., Murai, Y., Ogita, Z. (1985) Ganoderic acid D, E, F and H and lucidenic acid D, E and F, new triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 33: 2624-2627.
- 11) Kikuchi, T., Kanomi, S., Kadota, S., Murai, Y., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. I. Structure of ganoderic acids C2, E, I, and K, lucidenic acid F and related compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3695-3712.
- 12) Kikuchi, T., Kanomi, S., Murai, Y., Katoda, S., Tsubono, K., Ogita, Z.I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. III. Structures of ganolucidic

- acids A and B, new lanostane-type triterpenoids. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 4030-4036.
- 13) Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M., Khoda, H., Yamasaki, K. (1985) Structures of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst (Polyporaceae). *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 33: 4829-4835.
 - 14) Lin, C.H., Huo, S.H., Won, S.J. (1993) Steroids of formosan *Ganoderma amboinense*. *Phytochemistry*, 32: 1549-1551.
 - 15) Lin, C.N., Ann, Y.F., Chung, M.I. (1997) Steroids of formosan *Ganoderma tsugea*. *Phytochemistry*, 46: 1143-1146.
 - 16) Lin, L.J. & Sjiiao, M.S. (1987) Separation of oxygenated triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 410: 195-200.
 - 17) Ming, D.S., Chilton, J., Fogarty, F., Towers, G.H.N. (2002) Chemical constituents of *Ganoderma applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*, 73: 147-152.
 - 18) Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y., Ikekawa, N. (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3025-3028.
 - 19) Mothana, R.A.A., Awadh Ali, N.A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. (2003) Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia*, 74: 177-180.
 - 20) Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1985) New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 1547-1549.
 - 21) Nishitoba, T., Sato, H., Kasai, T., Kawagishi, H., Sakamura, S. (1985) New bitter C27 and C30 terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 1793-1798.
 - 22) Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1985) New terpenoids, ganoderic acid J and ganolucidic acid C, from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 3637-3638.
 - 23) Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1986) New terpenoids, ganolucidic acid D, ganoderic acid L, lucidone C and lucidenic acid G, from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 809-811.

- 24) Nishitoba, T., Sato, H., Shirasu, S., Sakamura, S. (1987) Novel triterpenoids from the mycelial mat at the previous stage of fruiting of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 619-621.
- 25) Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1987) Novel mycelial components, ganoderic acid Mg, Mh, Mi, Mj and Mk, from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 1149-1153.
- 26) Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1987) Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 26: 1777-1784.
- 27) Nishitoba, T., Oda, K., Sato, H., Sakamura, S. (1988) Novel triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52: 367-372.
- 28) Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H., Sakamura, S. (1989) Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 28: 193-197.
- 29) Sato, H. (1986) Ganoderiol A and B, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 2887-2890.
- 30) Shiao, M.S., Lin, L.J., Yeh, S.F., Chou, C.S. (1987) Two new triterpenes of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*, 50: 886-890.
- 31) Smania, E.F.A., Delle Monache, F., Smania Jr, A., Yunes, R.A., Cuneo, R.S. (2003) Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, 74: 375-377.
- 32) Su, H.J., Fann, Y.F., Chung, M.I., Won, S.J., Lin, C.N. (2000) New Lanostanoids of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Natural Products*, 63: 514-516.
- 33) Toth, J.O., Luu, B., Ourisson, G. (1983) Les acides ganodériques T à Z: triterpènes cytotoxiques de *Ganoderma Lucidum* (Polyporaceae). *Tetrahedron Letters*, 24: 1081-1084.