

**« BASIDIOMYCÈTES COMESTIBLES DE
MADAGASCAR – MISE EN ÉVIDENCE DES
ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE DEUX
ESPÈCES : *Russula cf. pseudovesca* et *Lactarius*
sp (RUSSULACEAE). »**

Par

***RANDRIANJOHANY Emile, **RAMAHAVORY
Hanitriniony L. et *RAKOTOARIMANGA Nirina**

**(* : Centre National de Recherches sur l'Environnement, B.P. 1739
Antananarivo MADAGASCAR)**

(: Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales.
Faculté des sciences de l'Université d'Antananarivo-MADAGASCAR)**

INTRODUCTION

► Constituants majeurs des parois cellulaires des champignons Basidiomycètes

chitine et des glucanes : β -1,3/ β -1,6-glucane et d' α -1,3-glucane (Janszen & Wessels, 1970; Müller et al. 1998a, 2000a).

► Rôles des Glucanes (composés de base de nombreux *polysaccharides naturels*)

- augmentation de la résistance du corps aux tumeurs,
 - induction de la production d'interféron,
 - renforcement du système immunitaire,
 - suppression des cellules tumorales au sein du corps.
- (Wainwright, 1992).

► Contexte scientifique actuel

- énorme potentiel pharmacologique de ces microorganismes
- mais recherches insuffisantes par rapport à l'étendue de leurs implications dans le domaine médical
- faible avancée de la mycologie tropicale : voies vers la découverte de nouvelles substances actives d'origine fongique

OBJECTIFS DES ETUDES:

- ▶ évaluer l'importance de la biodiversité des basidiomycètes comestibles de Madagascar,
- ▶ déterminer les propriétés toxicologiques et immunomodulatrices de deux espèces assez consommées dans la région centrale du Pays

PLAN GENERAL

- INTRODUCTION
- Partie 1 : Présentation générale des Basidiomycètes comestibles malgaches
 - ❖ Sites d'étude
 - ❖ Détermination taxonomique
 - ❖ Résultats d'inventaire
 - ❖ Illustration de quelques espèces intéressantes
- Partie 2 : Etudes biologiques de deux espèces comestibles malgaches
 - ❖ Estimation de la toxicité sur souris
 - ❖ Etudes des activités immunomodulatrices
 - ❖ Discussion et conclusion générale

Partie 1 : Présentation générale des Basidiomycètes comestibles malgaches

MATERIEL ET METHODE

- Sites d'inventaire et prospection

- Domaine du centre : Manjakandriana, Arivonimamo, Ambositra, Fianarantsoa (forêts de Reboisement, forêts sclérophylles à « Tapia »)
- Domaine oriental : Moramanga, littoral est (forêts denses humides de moyennes altitudes 400 -1000m, et forêts littorales)

- Détermination taxonomique

- Descriptions morphologiques
- Utilisation de divers clés et ouvrages de références

(Courtecuisse R. et Duhem B., 2000 ; Hagara L., Antonin V., et Baier J., 1999)

RESULTATS

Diversité et importance des basidiomycètes comestibles malgaches :

Sous-classes	Ordres	Familles (genres)	Nb.esp. comestibles
AGARICOMYCETIDAE	Trichomatales	Pleurotaceae (Pleurotus, Lentinus)	6
		Tricholomataceae (Tricholoma, Lyophyllum, Laccaria, Lepista, Armillaria)	5
		Marasmiaceae (Marasmius, Marasmiellus, Lentinula, Collybia)	5
		Dermolomataceae (Oudemansiella, Flamulina)	2
	Agaricales	Agaricaceae (Agaricus, Leucoagaricus, Macrolepiota,Chlorophyllum, Sericeomyces)	8
		Coprinaceae (Coprinus,Psathyrella)	2
	Amanitales	Amanitaceae (Amanita,Limacella)	2
	Pluteales	Pluteaceae (Volvariella)	1
	Russulales	Russulaceae (Russula, Lactarius)	8
	Boletales	Boletaceae (Boletus,Sciullus,Xerocomus,Tylopilus,Gyroporus)	8
		Strobilomycetaceae (Strobilomyces)	1
GASTEROMYCETIDAE	Lycoperdales	Lycoperdaceae (Lycoperdon, Bovista)	2
		Rhizopogonaceae (Rhizopogon)	1
APHYLLOPHOROMYCETIDAE	Polyporales	Laetiporaceae (Laetiporus)	1
		Schizophyllaceae (Schizophyllum)	1
	Clavariales	Clavariaceae (Clavaria)	1
		Ramariaceae (Ramaria)	1
	Cantharellales	Cantharellaceae (Cantharellus)	13
		Gomphaceae (Gomphus)	1
		Hydnaceae (Hydnum)	1
PHRAGMOBASIDIOMYCETES	Auriculariales	Auriculariaceae (Auricularium)	2
	Tremellales	Tremellaceae (Tremella)	1
		Total nombre d’espèces comestibles	74

Sous-classes	Ordres	Familles (genres)	Nb.esp. comestibles
AGARICOMYCETIDAE ▶ 74 espèces comestibles : ◦ 44 genres ◦ 23 familles ◦ 13 ordres	Trichomatales	Pleurotaceae (Pleurotus, Lentinus)	6
		Tricholomataceae (Tricholoma, Lyophyllum, Laccaria, Lepista, Armillaria)	5
		Marasmiaceae (Marasmius, Marasmiellus, Lentinula, Collybia)	5
		Dermolomataceae (Oudemansiella, Flamulina)	2
	Agaricales	Agaricaceae (Agaricus, Leucoagaricus, Macrolepiota, Chlorophyllum, Sericeomyces)	8
		Coprinaceae (Coprinus, Psathyrella)	2
	Amanitales	Amanitaceae (Amanita, Limacella)	2
	Pluteales	Pluteaceae (Volvariella)	1
	Russulales	Russulaceae (Russula, Lactarius)	8
	Boletales	Boletaceae (Boletus, Sciullus, Xerocomus, Tylopilus, Gyroporus)	8
		Strobilomycetaceae (Strobilomyces)	1
GASTEROMYCETIDAE	Lycoperdales	Lycoperdaceae (Lycoperdon, Bovista)	2
		Rhizopogonaceae (Rhizopogon)	1
APHYLLOPHOROMYCETIDAE	Polyporales	Laetiporaceae (Laetiporus)	1
		Schizophyllaceae (Schizophyllum)	1
	Clavariales	Clavariaceae (Clavaria)	1
		Ramariaceae (Ramaria)	1
	Cantharellales	Cantharellaceae (Cantharellus)	13
		Gomphaceae (Gomphus)	1
		Hydnaceae (Hydnum)	1
PHRAGMOBASIDIOMYCETES	Auriculariales	Auriculariaceae (Auricularium)	2
	Tremellales	Tremellaceae (Tremella)	1
		Total nombre d'espèces comestibles	74

Sous-classes	Ordres	Familles (genres)	Nb.esp. comestibles
AGARICOMYCETIDAE ▶ Les 7 familles : ◦ Pleurotaceae, ◦ Tricholomataceae ◦ Marasmiaceae ◦ Agaricaceae ◦ Boletaceae ◦ Russulaceae ◦ Cantharellaceae 53 comestibles (32%)	Trichomatales	Pleurotaceae (Pleurotus, Lentinus)	6
		Tricholomataceae (Tricholoma, Lyophyllum, Laccaria, Lepista, Armillaria)	5
		Marasmiaceae (Marasmius, Marasmiellus, Lentinula, Collybia)	5
		Dermolomataceae (Oudemansiella, Flamulina)	2
	Agaricales	Agaricaceae (Agaricus, Leucoagaricus, Macrolepiota, Chlorophyllum, Sericeomyces)	8
		Coprinaceae (Coprinus, Psathyrella)	2
	Amanitales	Amanitaceae (Amanita, Limacella)	2
	Pluteales	Pluteaceae (Volvariella)	1
	Russulales	Russulaceae (Russula, Lactarius)	8
	Boletales	Boletaceae (Boletus, Sciellus, Xerocomus, Tylopilus, Gyroporus)	8
		Strobilomycetaceae (Strobilomyces)	1
GASTEROMYCETIDAE	Lycoperdales	Lycoperdaceae (Lycoperdon, Bovista)	2
		Rhizopogonaceae (Rhizopogon)	1
APHYLLOPHOROMYCETIDAE	Polyporales	Laetiporaceae (Laetiporus)	1
		Schizophyllaceae (Schizophyllum)	1
	Clavariales	Clavariaceae (Clavaria)	1
		Ramariaceae (Ramaria)	1
	Cantharellales	Cantharellaceae (Cantharellus)	13
		Gomphaceae (Gomphus)	1
		Hydnaceae (Hydnum)	1
PHRAGMOBASIDIOMYCETES	Auriculariales	Auriculariaceae (Auricularium)	2
	Tremellales	Tremellaceae (Tremella)	1
		Total nombre d'espèces comestibles	74

Sous-classes	Ordres	Familles (genres)	Nb.esp. comestibles
AGARICOMYCETIDAE ▶ Ordres non représentés : ◦ Entolomatales ◦ Cortinariales	Trichomatales	Pleurotaceae (Pleurotus, Lentinus)	6
		Tricholomataceae (Tricholoma, Lyophyllum, Laccaria, Lepista, Armillaria)	5
		Marasmiaceae (Marasmius, Marasmiellus, Lentinula, Collybia)	5
		Dermolomataceae (Oudemansiella, Flamulina)	2
	Agaricales	Agaricaceae (Agaricus, Leucoagaricus, Macrolepiota, Chlorophyllum, Sericeomyces)	8
		Coprinaceae (Coprinus, Psathyrella)	2
	Amanitales	Amanitaceae (Amanita, Limacella)	2
	Pluteales	Pluteaceae (Volvariella)	1
	Russulales	Russulaceae (Russula, Lactarius)	8
	Boletales	Boletaceae (Boletus, Sciullus, Xerocomus, Tylopilus, Gyroporus)	8
		Strobilomycetaceae (Strobilomyces)	1
GASTEROMYCETIDAE	Lycoperdales	Lycoperdaceae (Lycoperdon, Bovista)	2
		Rhizopogonaceae (Rhizopogon)	1
APHYLLOPHOROMYCETIDAE	Polyporales	Laetiporaceae (Laetiporus)	1
		Schizophyllaceae (Schizophyllum)	1
	Clavariales	Clavariaceae (Clavaria)	1
		Ramariaceae (Ramaria)	1
	Cantharellales	Cantharellaceae (Cantharellus)	13
		Gomphaceae (Gomphus)	1
		Hydnaceae (Hydnum)	1
PHRAGMOBASIDIOMYCETES	Auriculariales	Auriculariaceae (Auricularium)	2
	Tremellales	Tremellaceae (Tremella)	1
		Total nombre d'espèces comestibles	74

Intérêts pharmacologiques de certains taxons

- ▶ *Schizophyllum commune* (Schizophyllaceae) ⇒ la schizophyllane
- ▶ *Lentinula edodes* (Marasmiaceae) ou Shiitaké ⇒ la lentinane
- ▶ des polysaccharides vulgarisés en médecine largement utilisés en Chine et au Japon pour traiter les cancers d'estomac
- ▶ *Pleurotus spp*, en majorité comestibles ⇒ de nombreuses activités citées : antitumorale, antioxydant, anti-hyperglycémique, Immunomodulatrice, hypocholestérolémique, antiviral (Gregori et coll., 2007).



Pleurotus sp 1



Pleurotus sp 2



Pleurotus sajor-caju



Pleurotus pulmonarius



Pleurotus ostreatus



Schizophyllum commune



Lentinula edodes

Partie2 : Etudes biologiques de deux espèces comestibles malgaches



Figure 1: *Russula cf. pseudovesca*



Figure 2 : *Lactarius sp.*

– Matériels d'étude :

Extraits hydroalcooliques à chaud

- Extrait R : Extraits de *Russula cf. pseudovesca*
- Extrait L : Extraits de *Lactarius sp.*

– Matériels d'étude :

Extraits hydroalcooliques à chaud

- Extrait R : Extraits de *Russula cf. pseudovesca*
- Extrait L : Extraits de *Lactarius sp.*

1. Estimation de la toxicité sur souris

2. Etudes des activités immunomodulatrices

1. Estimation de la toxicité sur souris

1. Estimation de la toxicité sur souris

► Effets de l'administration intrapéritonéale des extraits aux souris

➤ déterminer la présence ou non de substances toxiques actives sur les animaux à sang chaud

- 0,3ml d'extrait pour 25g de souris
- Lot de 2 souris pour chaque concentration d'extrait
- Observation des comportements et des symptômes manifestés pendant 24h

1. Estimation de la toxicité sur souris

► Effets de l'administration intrapéritonéale des extraits aux souris

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

1. Estimation de la toxicité sur souris

► Effets de l'administration intrapéritonéale des extraits aux souris

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1536	7680
Symptôme	–	+	M

- 
- hypoactivité
 - piloérection
 - diarrhée
 - Rétablissement après 3 heures

1. Estimation de la toxicité sur souris

► Effets de l'administration intrapéritonéale des extraits aux souris

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

- hypoactivité
- paralysie des membres postérieurs
- mort des souris après 40min

→ **RELATION DOSE -EFFET**

1. Estimation de la toxicité sur souris

► Effets de l'administration intrapéritonéale des extraits aux souris

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

Activité de l'extrait de *Lactarius sp.*

Extraits	L1	L2	L3
Doses (mg/kg)	276	552	2760
Symptôme	–	–	–

PPRINCIPES TOXICOLOGIQUES :

- existence de dose toxique pour toute substance chimique
- DT min plus faible : substance la plus toxique

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

Activité de l'extrait de *Lactarius sp.*

Extraits	L1	L2	L3
Doses (mg/kg)	276	552	2760
Symptôme	–	–	–

→ Administration par voie intrapéritonéale :

l'extrait R est moins toxique que l'extrait L

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

Activité de l'extrait de *Lactarius sp.*

Extraits	L1	L2	L3
Doses (mg/kg)	276	552	2760
Symptôme	–	–	–

→ DL 50 largement supérieure à 25 mg/kg

~ principes actifs des deux extraits non toxiques

Activité de l'extrait de *Russula cf pseudovesca*

Extraits	R1	R2	R3
Doses (mg/kg)	768	1 536	7680
Symptôme	–	+	M

Activité de l'extrait de *Lactarius sp.*

Extraits	L1	L2	L3
Doses (mg/kg)	276	552	2760
Symptôme	–	–	–

2. Etudes des activités immunomodulatrices

- ▶ Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains
 - effectuer de tests de transformation lymphoblastique (TTL)
 - déterminer les effets des extraits en présence et en absence de mitogène
- Isolement des lymphocytes par gradient de densité dans du Ficoll
- Mitogène de référence : lectine de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L)
- Tests en triplicate à trois concentrations différentes

CONCENTRATIONS (µg/ml)	EXTRAITS
50	L4 et R4
5	L5 et R5
0.5	L6 et R6

2. Etudes des activités immunomodulatrices

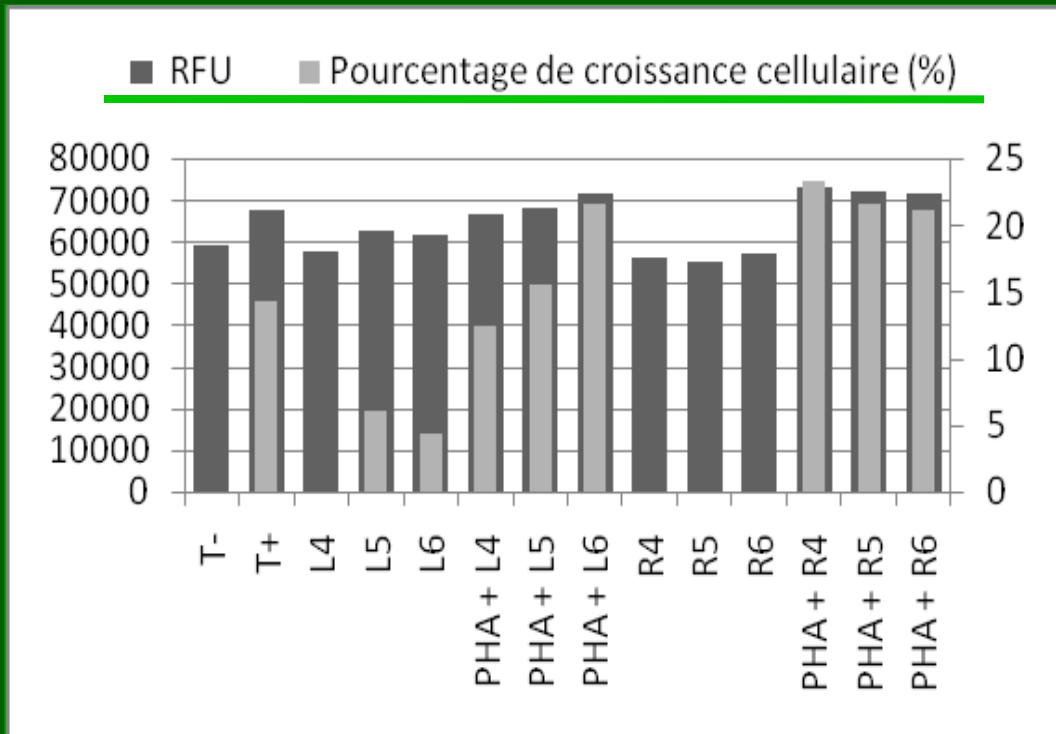
Schéma expérimental	Valeur moyenne de RFU	Pourcentage de croissance cellulaire (%)
Témoin négatif (Lymphocyte seul)	59037,1667	0
Témoin positif (Lymphocyte + PHA)	67503,83	14,3
Lymphocyte + L4	57797,00	0
Lymphocyte + L5	62662,00	6,1
Lymphocyte + L6	61573,00	4,3
Lymphocyte + PHA + L4	66370,33	12,4
Lymphocyte + PHA + L5	68167,67	15,5
Lymphocyte + PHA + L6	71787,00	21,6
Lymphocyte + R4	56168,00	0
Lymphocyte + R5	55191,50	0
Lymphocyte + R6	57061,00	0
Lymphocyte + PHA + R4	72931,00	23,3
Lymphocyte + PHA + R5	71807,33	21,6
Lymphocyte + PHA + R6	71483,67	21,1

RFU (Rate Fluorescence Unit): directement proportionnelle
à la quantité de dsDNA présent dans le milieu

Schéma expérimental	Valeur moyenne de RFU	Pourcentage de croissance cellulaire (%)
Témoin négatif (Lymphocyte seul)	59037,1667	0
Témoin positif (Lymphocyte + PHA)	67503,83	14,3
Lymphocyte + L4	57797,00	0
Lymphocyte + L5	62662,00	6,1
Lymphocyte + L6	61573,00	4,3
Lymphocyte + PHA + L4	66370,33	12,4
Lymphocyte + PHA + L5	68167,67	15,5
Lymphocyte + PHA + L6	71787,00	21,6
Lymphocyte + R4	56168,00	0
Lymphocyte + R5	55191,50	0
Lymphocyte + R6	57061,00	0
Lymphocyte + PHA + R4	72931,00	23,3
Lymphocyte + PHA + R5	71807,33	21,6
Lymphocyte + PHA + R6	71483,67	21,1

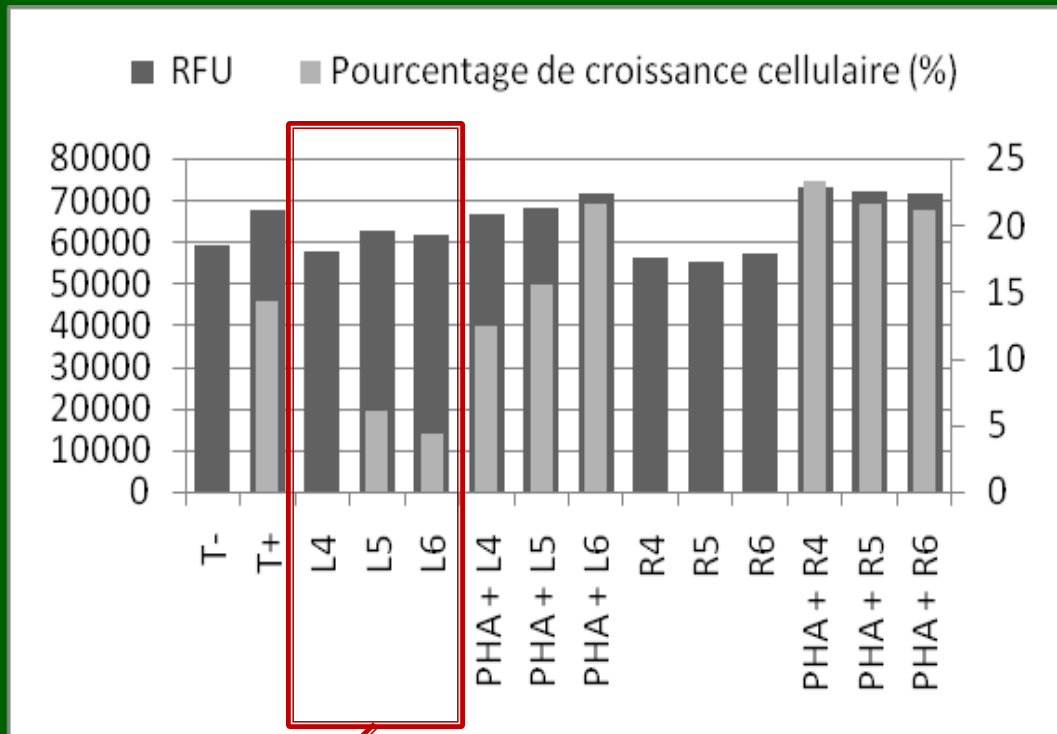
2. Etudes des activités immunomodulatrices

- Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains



2. Etudes des activités immunomodulatrices

- Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains

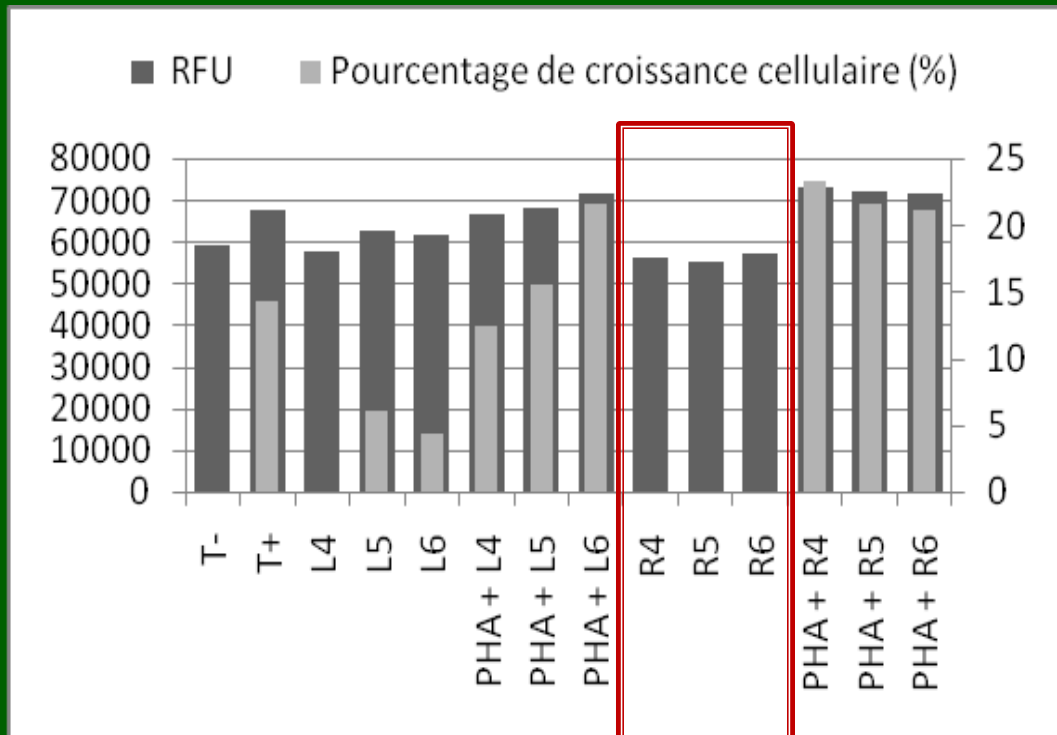


- Sans le PHA:
 - ❖ Extraits L : activité proliférative propre

Relation
dose/effet
sauf L4

2. Etudes des activités immunomodulatrices

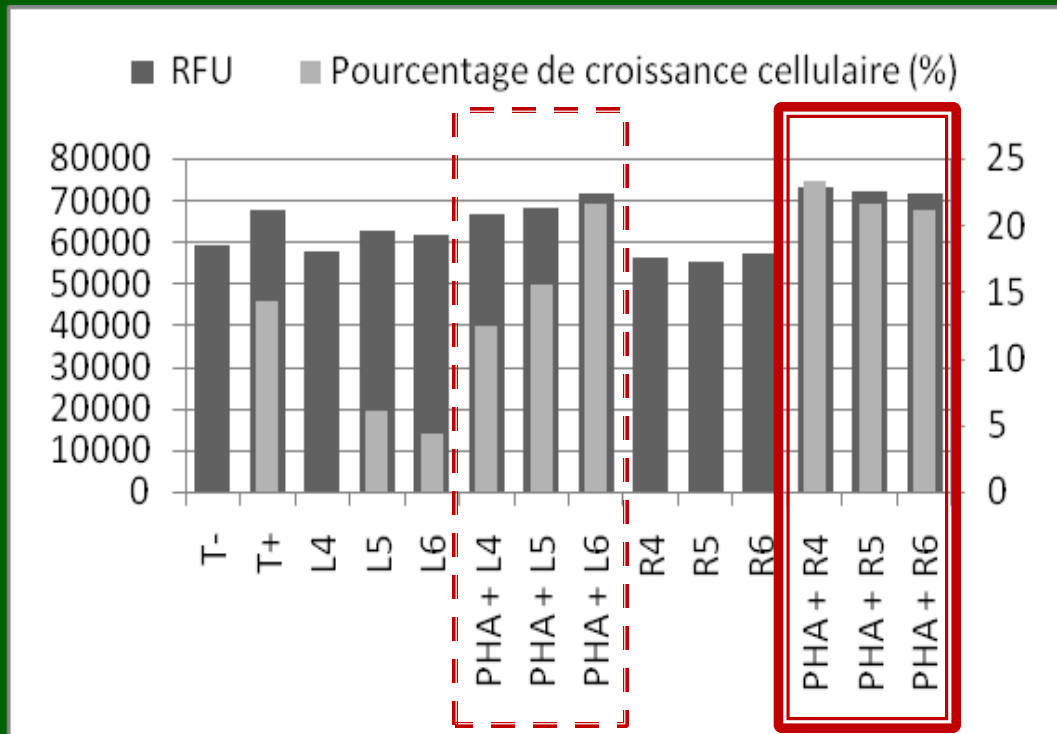
► Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains



- Sans le PHA:
 - ❖ Extraits *L* : activité proliférative propre
 - ❖ Extraits *R* : pas d'activité prolifération cellulaire

2. Etudes des activités immunomodulatrices

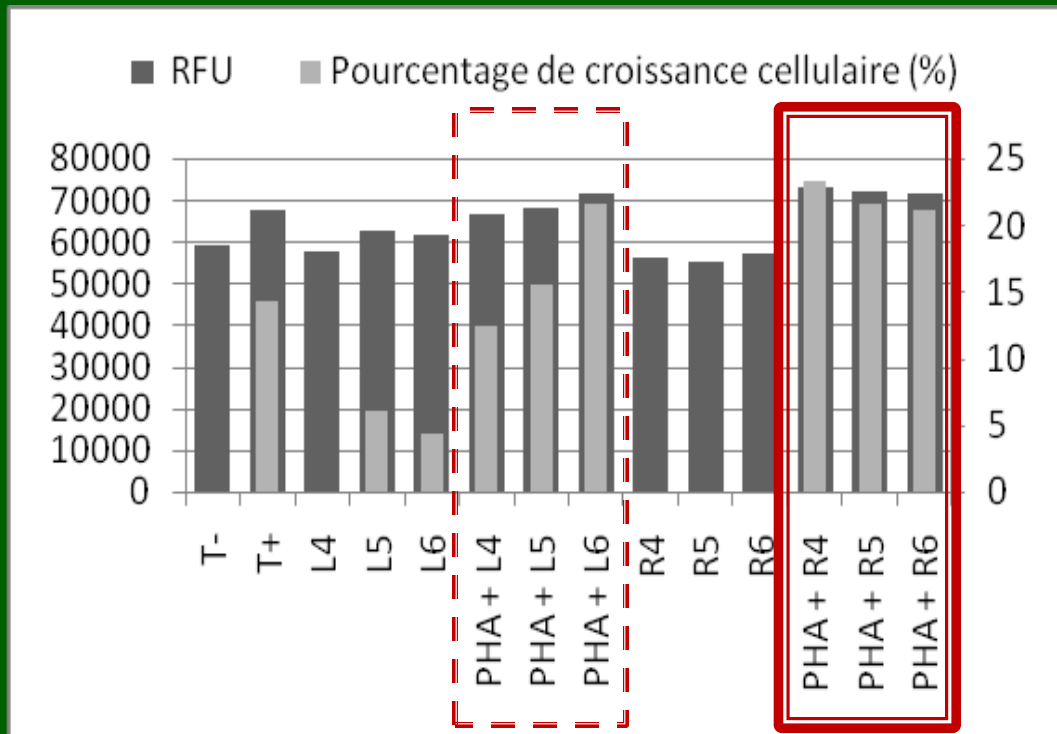
- Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains



- Avec le PHA :
 - ❖ Stimulation de la transformation lymphoblastique
 - ❖ effet plus accentué pour l'extrait R

2. Etudes des activités immunomodulatrices

► Effets des extraits sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes humains



- Avec le PHA :
 - ❖ Stimulation de la transformation lymphoblastique
 - ❖ effet plus accentué pour l'extrait R

Présence de substances à activité immunostimulatrice dans les deux extraits de champignon

Conclusion

- ▶ extraits hydroalcooliques administrés par voie intrapéritonéale de *Russula cf. pseudovesca* et de *Lactarius sp* ne sont que très peu toxiques sur les souris
 - ▶ Évaluation de la toxicité des extraits : utilisation d'autres voies d'administration
 - ▶ Activité immunomodulatrice :
 - présence de substances immunostimulatrices dans les deux extraits
 - activité proliférative propre de l'extrait de *Lactarius sp*
 - Relation avec les vertus anticancéreuses et antibactériennes des champignons
- ⇒ élargissement de la liste des champignons nutraceutiques et celle des molécules anticancéreuses

Merci de votre aimable attention