



HAL
open science

La chaga : un champignon aux propriétés anticancéreuses : étude bibliographique et approche expérimentale

Antoine Géry

► **To cite this version:**

Antoine Géry. La chaga : un champignon aux propriétés anticancéreuses : étude bibliographique et approche expérimentale. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03956573

HAL Id: dumas-03956573

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03956573>

Submitted on 25 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

(Spécialité DES Innovation Pharmaceutique et Recherche)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Le Chaga : un champignon aux propriétés anticancéreuses.

Étude bibliographique et approche expérimentale.

Présentée par

Antoine GÉRY

Soutenue publiquement le (date de soutenance)

devant le jury composé de

M. David Garon	Professeur des Universités	Président du jury / Directeur de thèse
M. Jean-Philippe Rioult	Maître de Conférences des Universités	Co-directeur de thèse
Mme Véronique André	Maître de Conférences des Universités - HDR	Examineur
M. Frédéric Disson	Docteur en Pharmacie	Examineur
M. Jérôme Quintin	Maître de Conférences des Universités	Examineur

Thèse codirigée par MM. David GARON et Jean-Philippe RIOULT

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Pascal SCHUMANN-BARD

Assesseurs

Professeur Aurélie MALZERT-FREON
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale
KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SAINT-LORANT Guillaume (Praticien hospitalier)	Pharmacie clinique
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SEDILLO PatrickPharmacie officinale

SEGONZAC VirginiePharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Madame Véronique André et Messieurs Frédéric Disson, David Garon, Jérôme Quintin et Jean-Philippe Rioult pour avoir pris de leur temps pour évaluer mes travaux et accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je tiens aussi à exprimer ma plus sincère reconnaissance à toutes celles et ceux ayant contribué de près ou de loin à ces travaux :

À **Monsieur David Garon**, mon encadrant et double directeur de thèse. Travailler et apprendre à vos côtés est, et a toujours été, un véritable honneur. Merci pour tous vos enseignements et pour votre investissement sans faille qui sont de réelles sources d'inspiration.

À **Monsieur Jean-Philippe Rioult**, mon co-directeur pour cette thèse qui, le premier, a réalisé la diagnose d'*Inonotus obliquus* sur le sol (bas-)normand et sans lequel ces travaux n'auraient pu voir le jour. Votre connaissance du terrain n'a d'égale que votre pédagogie.

À **Madame Véronique André** pour son encadrement et ses précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer et de gagner en autonomie. Un grand merci pour le temps que vous avez su m'accorder, pour votre patience et votre bienveillance à mon égard.

À **Monsieur Jérôme Quintin** qui m'a initié aux arcanes de l'extraction solide-liquide fongique. Merci pour vos nombreux « trucs et astuces » dont je saurai me souvenir. Une pensée amusée à nos échanges sur les sujets que vous savez en attendant la filtration de nos extraits.

À **Madame Natacha Heutte** qui s'est occupée du traitement de l'ensemble des données obtenues au cours de cette étude. Au travers de vos enseignements, vous avez réalisé l'exploit de raviver en moi une flamme pour les statistiques que je croyais éteinte depuis bien longtemps !

À **Madame Christelle Dubreule et son équipe du laboratoire LABÉO** pour leur appui logistique et leur expertise apportés au volet mycochimique de ces travaux.

À **Madame Marilyne Guillamin** qui m'a formé à la cytométrie en flux, ce qui m'a permis de compléter le versant biologie cellulaire par une étude du cycle cellulaire.

À **Monsieur Philippe Eldin de Pécoulas** et, à nouveau, à **Monsieur David Garon** et à **Madame Natacha Heutte** pour m'avoir « adopté » ces quelques mois dans leur bureau. Merci à vous pour tous nos échanges et pour votre accueil chaleureux.

À **Monsieur François Sichel** et à l'ensemble de l'équipe d'accueil ToxEMAC qui m'ont permis et me permettent encore de travailler au sein de leurs locaux. Votre bonne humeur

et votre sympathie m'ont permis de m'intégrer aisément et m'offrent un cadre propice à mon développement tant personnel qu'intellectuel.

Aux naturalistes et mycologues qui ont permis la découverte de nouvelles stations de Chaga : **Dave Shorten** (Saint-Sever et Grimbosq - 14) et **Yannick Tanneau** (Saint-Léonard-des-Bois - 61).

Je n'oublie pas mes ami(e)s et ma famille qui ont toujours été là. Ainsi, je remercie tout particulièrement :

Mon père, à qui je dois absolument tout. En trente ans, personne d'autre n'a jamais autant suscité mon admiration. Tu m'as appris à être curieux de tout, à écouter, à observer, à partager et à toujours m'investir corps et âme dans mes projets. Merci de toujours être présent pour nous et pour tout ce que tu es. Prends soin de toi.

Ma sœur et mon frère à qui je souhaite le meilleur et de s'épanouir aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Je suis fier, et vous pouvez également l'être, des personnes que vous êtes devenues.

Audrey, mon infirmière à bien des égards, tu es rentrée petit à petit dans ma vie à un moment où j'avais le sentiment de m'être égaré. T'avoir à mes côtés est aujourd'hui tout ce qui compte à mes yeux. Merci pour ta douceur, merci pour ta joie de vivre et pour tout le bonheur que tu mets dans ma vie. Merci d'être là à chaque instant, de me comprendre, de me soutenir et de tant partager avec moi.

À la meilleure fratrie falucharde que la faculté ait connue ces dernières années (**Crémette/EMDL/IDV/Starla/XIII ans**), merci pour tous ces moments... indescriptibles et (im)mémorables ! Spéciale dédicace à ma sœurette : ces années de fac n'auraient clairement jamais eu la même saveur sans toi. Merci pour ton soutien indéfectible, reste comme tu es !

À tous mes collègues associatifs de l'ASMEPC (Guigui, Quentin mon bro', Bibi, Mathieu, Mimiche, Iker, José, Marcousam, Tonio, Damien, Cassandre, Hugo, Noémie, Flora, Martin, QQ, Vincent, Panthou, Alex, Nanart, Camille, Isidore...), **de l'ACEPC** (Colon, Géo, IDV, Thomas, Juju, Gathou, Popo, Manue, Lily, Valou, Tim, Poulpy, Arthur, Paul-Louis...), **de l'AGDC2017** (Juju, Gathou, Popo, Alexis, José...) **de l'AIPBMC** (notamment Charlie), **de la FNSIP-BM** (Lulu, Aurélie, Clémence, Anaïs, Guillaume dit « La cigale », Max, Mathieu, Alysssssia, Gaëlle, Audrey, Laïly, Nina et Hugo) et **élus** (tout particulièrement Louis-Paul et Florent) avec lesquels j'ai eu la chance d'accomplir de beaux projets. J'ai découvert au travers

de ces mandats des personnes toutes aussi différentes qu'incroyables. Travailler avec chacun d'entre vous m'a rendu très fier et m'a beaucoup appris.

À tous mes proches (familles et ami(e)s) que je n'ai pas pris le temps de citer ici, vous avez tous, à un moment ou à un autre, été présents pour me soutenir et c'est là le plus important à mes yeux.

Enfin, et tout simplement, je remercie ma faculté. Bien que tu aies beaucoup évolué au cours de mes années d'étude, franchir tes portes me rends et m'a toujours rendu heureux. Tu m'as beaucoup offert, bien plus que je ne saurai jamais te rendre. Merci à tous ceux qui la font vivre et contribuent à lui donner l'âme qui l'habite.

Je dédie ce travail à David dit « Dave » Shorten qui nous a quitté le 10 septembre 2018 après avoir consacré sa vie à la mycologie et qui m'a énormément appris au cours de nos excursions. Encore merci à lui.



Récolte de Chaga en Forêt d'Écouves (proche de Saint-Léonard-des-Bois, 61) – 24 novembre 2014.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
I. INTRODUCTION.....	1
1. Choix du sujet.....	1
2. Unité de Recherche (1).....	1
3. Équipe d'accueil (2)	2
4. Généralités sur le Chaga.....	3
a) Présentation	3
b) Anatomie	6
i. Rappels sur la structure d'un tronc d'arbre	6
ii. Description morphologique du Chaga.....	8
c) Cycle de vie	9
d) Répartition géographique	10
e) Ethnomycologie.....	11
f) Mycochimie	13
g) Activités biologiques	14
i. De la bétuline et de l'acide bétulinique	14
ii. Du Chaga.....	15
5. Objectifs de l'étude	16
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
1. Collecte de Chaga.....	19
a) Récolte en Normandie occidentale	19
b) Obtention de Chaga d'autres origines géographiques	20
2. Approche mycochimique	21
a) Extractions.....	21
i. Extrait au cyclohexane	21
ii. Extrait d'acétate d'éthyle.....	21
iii. Extrait aqueux.....	21
iv. Décoction par la méthode Khanty (22)	22
v. Infusion selon Gaspésie Sauvage Produits Forestiers Inc	22

b)	Identification et quantification des métabolites fongiques	22
i.	Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (HPLC-ESI-QTOF MS/MS) (88,89).....	22
ii.	Matériel et réactifs	24
iii.	Solutions standard et préparation des échantillons.....	25
iv.	Analyse en HPLC-ESI-QTOF MS/MS	25
v.	Validation de la méthode.....	26
3.	Tests de cytotoxicité sur microplaques	27
a)	Culture des lignées cellulaires A549 et BEAS-2B	27
b)	Coloration des microplaques	28
c)	Lecture d'absorbance par spectrophotométrie.....	29
4.	Cytométrie en flux.....	30
a)	Principe de la cytométrie en flux (105)	30
b)	Rappels sur le cycle cellulaire (106).....	30
c)	Culture cellulaire	33
d)	Analyse du cycle cellulaire.....	33
5.	Statistiques	34
III.	RÉSULTATS	35
1.	Écologie fongique	35
a)	Étude des arbres hôtes	35
b)	Étude du liquide prélevé au niveau de la cavité de <i>Quercus robur</i>	36
i.	Diagnose des arthropodes (111,112)	36
ii.	Mise en culture	37
c)	Culture des moisissures présentes à la surface du Chaga prélevé sur <i>Quercus robur</i> 38	
2.	Quantification des métabolites fongiques par HPLC-ESI QTOF MS/MS	40
3.	Analyse de l'activité des extraits sur les cellules de la lignée A549.....	42
a)	Extrait aqueux.....	42
b)	Extrait à l'acétate d'éthyle	43
4.	Analyse de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules de la lignée BEAS-2B.....	44
5.	Analyse comparative de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules des lignées A549 et BEAS-2B	45
6.	Cytométrie en flux.....	48

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	51
V. VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	53
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55
ANNEXES	65
ANNEXE I – Proposition de voie de biosynthèse des lanostérols (38).....	65
ANNEXE II (85) – Spectrogrammes et chromatogrammes obtenus par HPLC-ESI-QTOF MS/MS	66
ANNEXE III – Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules A549 exposées à l’extrait aqueux	69
ANNEXE IV – Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules A549 exposées à l’extrait à l’acétate d’éthyle	74
ANNEXE V - Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules BEAS-2B exposées à l’extrait aqueux.....	79
Annexe VI – Article publié dans la revue <i>Integrative Cancer Therapies</i> – décembre 2017 ...	82

ABRÉVIATIONS

ABTE : Aliments Bioprocédés, Toxicologie, Environnements

ATCC : American Type Culture Collection

ATUn : Autorisation Temporaire d'Utilisation nominative

BEBM : *Bronchial Epithelial cell Basal Medium*

BEGM : *Bronchial Epithelial cell Growth Medium*

C : Extrait au Cyclohexane

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI₅₀ : Concentration Inhibant la pousse cellulaire de 50%

CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer

CMF : Cytométrie de Flux

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DO : Densité Optique

EcoTEA : Écoprocédés, Transferts vers l'Environnement et les Aliments

EI MYTX : Étalon Interne Mycotoxine

EREM : Expertise, Reconnaissance et Études en Mycologie

EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESI : Ionisation par Electronébuliseur (*Electrospray ionization*)

EtOAc : Extrait à l'acétate d'éthyle

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

IBFA : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

LDH : Lactate Déshydrogénase

M : Extrait au Méthanol

MALIM : Matrices ALimentaires et Microbiotes

MEA : Malt Extract Agar

MS/MS : Spectromètre de Masse en tandem

MTT : Methyl Thiazolyl Tetrazolium

NU : Normandie Université

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PVDF : PolyVinylidene Fluoride

PES : PolyEtherSulfone

PRISMM : Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique

QTOF : *Qadрупole Time Of Flight*

SRB : SulfoRhodamine B

SREBP : *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*

STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TA : *Transit Amplifying cells*

TCA : Acide Trichloracétique

ToxEMAC : Toxicologie de l'Environnement : Milieux Aériens et Cancers

Tr/min : Tour par minute

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

UNICAEN : Université de Caen Normandie

UR : Unité de Recherche

UR : Université de Rouen

XTT : 4-Methoxy-5-[3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonatophenyl)-5-(phenylcarbamoyl)tetrazol-3-ium-2-yl]-2-nitrobenzenesulfonate

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure interne d'un arbre (source : site internet : www.planeteliege.com).....	8
Figure 2. Forme asexuée d' <i>Inonotus obliquus</i> sur bouleau (photo prise en forêt de Grimbosq le 2 juin 2015).	8
Figure 3. Forme sexuée d' <i>Inonotus obliquus</i> (source : EREM).....	9
Figure 4. Croissance de la forme asexuée du Chaga (source : site internet https://i1.wp.com/www.oriveda.com/images-newsletter/Chaga-development.png)	9
Figure 5. Distribution mondiale d' <i>Inonotus obliquus</i>	10
Figure 6. Distribution nationale actuelle d' <i>Inonotus obliquus</i>	10
Figure 7. Conditionnement du Befungin® (source : site internet https://www.stronghealthnaturally.com/).....	12
Figure 8. Capture d'écran (20/04/2020) du nombre de résultats obtenus pour la requête " <i>buy chaga mushroom</i> ".....	13
Figure 9. Formules topologiques de la bétuline (ou bétulinol) (à gauche), de l'acide bétulinique (au centre) et de l'inotodiol (à droite).	13
Figure 11. Récolte de Chaga en Forêt de Grimbosq le 2 juin 2015 (face interne de l'anamorphe et arbre hôte).	19
Figure 11. Zones de récolte du Chaga sur bouleau.	19
Figure 12. Cavité présente sur le chêne où a été récolté le Chaga.	20
Figure 13. Schéma d'une HPLC-ESI-QTOF MS/MS (source : site internet https://biotechlink.org/).....	24
Figure 14. Microplaque 96 puits colorée à la SulfoRhodamine B.	29
Figure 15. Schéma du cycle cellulaire (source : site internet : https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction).....	32
Figure 16. Les différentes phases du cycle cellulaire observées par cytométrie en flux (zone Sub-G ₁ en rouge, zone G ₀ /G ₁ en vert, zone S en bleu et zone G ₂ /M en jaune) (source : Géry A., laboratoire ABTE-ToxEMAC).....	32
Figure 17. Tronc mort de bouleau couvert de trous de pics observé le 2 juin 2015 en forêt de Grimbosq.....	35

Figure 18. Photo de <i>Nosodendron fasciculare</i> (source : site internet https://www.naturamediterraneo.com/).....	37
Figure 19. Aspect macroscopique (à gauche) et microscopique $\times 100$ (à droite) de la culture de <i>Humicola fuscoatra</i>	39
Figure 20. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux.	42
Figure 21. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules A549 à l'extrait à l'acétate d'éthyle.	44
Figure 22. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules BEAS-2B à l'extrait aqueux.	45
Figure 23. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 24 heures d'exposition à l'extrait aqueux.....	46
Figure 24. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux.....	46
Figure 25. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 72 heures d'exposition à l'extrait aqueux.....	47
Figure 26. Impact de l'exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux sur le cycle cellulaire.	49
Figure 26. Impact de l'exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux sur le cycle cellulaire.	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. <i>Multiple Reaction Monitoring Transitions</i> utilisées pour les trois analytes cibles et l'étalon interne (atrazine D5).	26
Tableau II. Limites de détection (LOD), limites de quantification (LOQ), équations de régression et coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage (R^2) obtenus pour chaque métabolite.	26
Tableau III. Quantification de la bétuline, de l'acide bétulinique et de l'inotodiol dans les différents extraits et préparations de Chaga.	40

I. INTRODUCTION

1. Choix du sujet

J'ai toujours été passionné par l'apprentissage de la botanique, de la zoologie et bien sûr de la mycologie appliquée (notamment aux campagnes et forêts de la Suisse normande). Au cours du lycée et de mes années de premier cycle d'études de Pharmacie c'est tout naturellement que j'ai développé une affection prononcée pour les sciences du vivant (sans pour autant n'avoir aucune appétence pour les autres enseignements).

C'est donc dès la deuxième année que j'ai entrepris d'effectuer un Stage d'Initiation à la Recherche (SIR). Compte tenu de mes centres d'intérêt et de mes disciplines de prédilection, je me suis spontanément tourné vers le Professeur David Garon. Ce dernier m'a incité à échanger avec le Docteur Jean-Philippe Rioult avec qui il proposait un sujet portant sur le Chaga proposant une approche multidisciplinaire combinant mycologie de terrain, pharmacognosie et toxicologie. J'ai d'emblée été séduit par cette thématique transversale qui m'a ouvert les portes de la recherche et a tracé la voie que j'allais suivre les dix années suivantes. Je suis par la suite retourné au laboratoire poursuivre mes travaux sur le Chaga à deux reprises :

- Dans le cadre de la validation de mon Master 1 de Microbiologie
- En stage libre avant le passage du concours de l'internat pour terminer mes essais

Ce travail original mêlant étude de terrain et travaux au laboratoire m'a réellement permis de m'épanouir et de décloisonner ces approches qui me semblent à l'heure actuelle indissociables.

2. Unité de Recherche (1)

L'unité de recherche Aliments, Bioprocédés, Toxicologie, Environnements (UR ABTE) a été créée en 2012 sous la double tutelle des universités de Caen et de Rouen. Son programme scientifique porte sur la qualité des aliments et des environnements et leurs impacts sur la santé humaine :

- Qualité des aliments : étude des écosystèmes alimentaires (notamment produits laitiers et cidricoles) par une approche pluridisciplinaire pour comprendre le développement de fonctionnalités positives et négatives qui en déterminent la qualité.
- Qualité des environnements aquatiques et aériens : caractérisations physico-chimique et microbiologique, transfert des polluants, synthèse et/ou valorisation d'écomatériaux.

- Toxicologie de l'environnement : toxicité cardio-respiratoire et cutanée, cancérogène, biomarqueurs d'exposition et impacts sanitaires.

L'UR ABTE est structurée en trois équipes internes :

- Écoprocédés, Transferts vers l'Environnement et les Aliments (EcoTEA)
- Matrices ALimentaires et Microbiotes (MALIM)
- Toxicologie de l'Environnement. Milieux Aériens et Cancers (ToxEMAC)

3. Équipe d'accueil (2)

L'équipe ToxEMAC s'intéresse à l'impact des polluants aériens sur la santé humaine. La pollution de l'air est un problème de santé publique majeur et serait responsable, au niveau mondial, de sept millions de décès prématurés par an. Ces dernières estimations de l'OMS placent la pollution de l'air comme risque environnemental principal pour la santé, responsable de l'apparition de pathologies respiratoires, du développement de pathologies cardiovasculaires et de cancers. Dans ce contexte, les objectifs scientifiques de l'équipe visent à :

- Investiguer les mécanismes de toxicité induits lors de l'inhalation de polluants gazeux et particulaires, aux niveaux respiratoire et cardiovasculaire. L'équipe s'intéresse plus spécifiquement aux mécanismes de génotoxicité, de toxicité mitochondriale et de stress oxydant ;
- Identifier et caractériser du point de vue physico-chimique et microbiologique des contaminants aériens émergents, notamment micro- et nanoparticulaires, et des bioaérosols issus des pollutions d'origines anthropiques ou naturelles.

Ces objectifs sont déclinés en deux axes selon la nature des polluants :

- Axe 1 : Polluants Chimiques et Particulaires (responsables : Cécile Corbière & Véronique André)
- Axe 2 : Bioaérosols. Biodiversité fongique et Santé (responsable : David Garon)

L'expertise de l'équipe dans l'étude des mécanismes de génotoxicité, de toxicité mitochondriale et de stress oxydant est mise au service de l'étude de la toxicité induite sur les tissus sains par un traitement innovant de certains cancers, l'hadronthérapie. Cet objectif se décline en un axe supplémentaire :

- Axe 3 : Toxicité de l'hadronthérapie (responsable : Carine Laurent)

L'équipe ToxEMAC est localisée à Caen dans le bâtiment recherche du Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC) François Baclesse et à Rouen dans le bâtiment recherche de l'UFR de Médecine et de Pharmacie. Elle héberge la cellule expertise, reconnaissance et études en mycologie (EREM).

Au sein de l'équipe ToxEMAC l'axe « Bioaérosols. Biodiversité fongique et Santé », coordonné par le Professeur David Garon, met en place des études visant à évaluer l'exposition aux moisissures et mycotoxines en milieu professionnel (milieu agricole par exemple) et en milieu intérieur comme dans les habitations humides.

Les domaines de compétences des membres de cet axe de recherche sur le site caennais (P. Eldin de Pécoulas, D. Garon, J-Ph. Rioult, V. Séguin) sont les prélèvements et l'analyse de champignons (macromycètes et micromycètes), bioaérosols, matrices végétales et matériaux contaminés. Leur démarche pluridisciplinaire associe des travaux de terrain et de laboratoire : isolement et identification de moisissures et de champignons lignivores, recherche de métabolites fongiques toxiques (mycotoxines), évaluation du potentiel toxigène et génotoxique des bioaérosols et des espèces fongiques collectées en mobilisant des outils analytiques, toxicologiques et microbiologiques. Ces travaux ont pour objectif une meilleure caractérisation et évaluation du risque fongique en santé humaine. L'équipe développe également des travaux dans le domaine de la mycochimie avec l'extraction, l'identification et la recherche d'activités biologiques de métabolites secondaires issus de champignons. Les mycotoxines et les métabolites d'intérêt pharmaceutique (activité antimicrobienne, activité anticancéreuse...) sont recherchés à partir de champignons (macromycètes et micromycètes) collectés sur le terrain.

4. Généralités sur le Chaga

a) Présentation

Inonotus obliquus (Ach. ex Pers.) Pilát, de son nom vernaculaire français « Chaga », est un macromycète parasite dont la position systématique dans la classification du Vivant est la suivante (3) :

- Domaine - *Eukaryota*
- Sous-domaine - *Unikonta*
- (Anc. Super-règne) - *Opisthokonta*
- Super-règne - *Holomycota*
- Règne – *Fungi*

- Sous-règne : *Dikarya*
- Embranchement : *Basidiomycota*
- Classe : *Agaricomycetes*
- Ordre : *Hymenochaetales*
- Famille : *Hymenochaetaceae*
- Genre : *Inonotus*
- Espèce : *obliquus*

Ce dernier infeste préférentiellement les arbres dits « à bois tendre » (arbres à croissance rapide, plus légers et dont l'abattage a lieu au bout de 30 à 50 ans) : principalement les arbres du genre *Betula* (Bouleau) et, dans une moindre mesure, ceux des genres *Populus* (Peuplier), *Alnus* (Aulne) et *Acer* (Érable). Il a également été retrouvé de manière plus sporadique sur des spécimens des genre *Fagus* (Hêtre), *Fraxinus* (Frêne), *Quercus* (Chêne) et *Ulmus* (Orme), qui sont des arbres avec davantage de tanins et dits « à bois dur » (dont le bois est lourd, le développement plus lent et dont l'abattage a lieu, normalement, après 100 à 250 ans de développement) (4).

Au cours de l'Histoire, de nombreuses dénominations ont été utilisées pour désigner ce champignon (3). Il a été identifié et décrit la première fois par Persoon (5) (éminent mycologue néerlandais, d'origine sud-africaine, et vivant à Paris) qui l'a nommé *Boletus obliquus*. Puis, il a été successivement renommé par différents mycologues pensant découvrir une nouvelle espèce ou trouvant certaines appellations plus appropriées pour le caractériser :

- Persoon (1801) - *Boletus obliquus*,
- Fries (1821) - *Polyporus obliquus*,
- Chevallier (1826) - *Physisporus obliquus*,
- Karst (1881) - *Poria obliqua*
- Cooke (1885) - *Fomes obliquus*,
- Schröeter (1888) - *Phaeoporus obliquus*,
- Ellis et Everheart (1889) - *Mucronoporus obliquus*,
- Kuntze (1898) - *Scindalma obliquus*,
- Patouillard (1900) - *Phellinus obliquus*,
- Bourdot et Galzin (1928) - *Xanthochrous obliquus*,

- Pilât (1942) - *Inonotus obliquus*,
- Aoshima (1951) - *Fuscosporia obliqua*.

Il est particulièrement intéressant de se pencher sur l'étymologie et sur le sens de ces noms de genres et d'espèces qui renseignent de nombreuses caractéristiques du Chaga.

En effet, le nom de genre « *Boletus* » provient du terme latin « *bōlētus* » dérivant lui-même du grec « βωλίτης (*bōlītēs*) », vocable utilisé pour désigner le « champignon terrestre ». Le nom binominal initial *Boletus obliquus* signifie donc littéralement le « champignon oblique » en référence au mode d'organisation de ses pores. Le nom de genre *Boletus* a été autrefois souvent employé pour les polypores (ex : *Boletus sulphureus*, ancienne dénomination du Polypore soufré (*Laetiporus sulphureus*)). Le terme « *Polyporus* » est un nom de genre composé des racines « πολύς (*polus*) » : beaucoup et « πόρος (*póros*) » : pores, trous ; renseignant sur la multitude de pores que l'on retrouve au niveau de la surface fertile des Polypores auquel appartient *Inonotus obliquus*. Avec les noms de genre « *Phaeoporus* » et « *Xanthochrous* », on obtient de nouvelles informations sur ces mêmes pores, caractérisés par différents affixes : d'une part « φαεο (*phaeo*) » : sombre et, d'autre part, « ξανθός (*xanthós*) » : jaune et « χροός (*khroós*) » : couleur. Patouillard et Pilât, quant à eux, renseignent davantage sur les structures interne et externe du champignon avec respectivement « *Phellinus* » « φέλλινος » : fait de liège/ligneux et « *Inonotus* » « inos » : fibreux et « otos » : oreille.

Tous ces éléments descriptifs correspondent globalement à l'aspect des polypores : des champignons ligneux et fibreux, avec un aspect « d'oreille » se développant obliquement sur le tronc d'un arbre hôte et portant de nombreux pores, obliques eux aussi, et dont la couleur varie du jaune au brun sombre. Le Chaga comporte en outre la particularité de se présenter sous forme d'excroissance noirâtre comme du bois calciné avec un sporophore très discret.

À travers le monde, beaucoup de noms vernaculaires différents sont utilisés pour le désigner :

- « Chaga » dans les pays d'Europe occidentale et anglophones qui dérive du mot « *Tchaga* » utilisé en Sibérie, qui sont des latinisations du terme originel « чага » (6) désignant les champignons en général dans la langue Komi-Permyak, population native de l'Oural occidental et proche du bassin de la rivière Kama (affluent gauche de la Volga) (7) ;
- « *Kreftkjuke* » en norvégien qui signifie « Polypore du Cancer » (8) ;
- « *Kaba No Ana Take* » en japonais qui peut être traduit par le « Champignon du Trou du Bouleau » (6) ;

- « *Bài Huà Róng* » en chinois qui, littéralement, veut dire « Poudre Sèche du Champignon du Bouleau » (6) ;
- « 자작나무시루뻐버섯 » (*JaJakNaMu SiRuBbeon BeoSeot*) en coréen signifiant « Soupe au Champignon du Bouleau » (6) ;
- « *Sprängticka* » en suédois, mot à mot « Le polypore qui explose » (9), de fait l'écorce éclate sous la pression du champignon ;
- « *Berkenweerschijnzwam* » en néerlandais (10) : « Le champignon qui apparaît sur le Bouleau » ;
- « *Saagaategan* » en oji-cri (6) (langue de l'ethnie éponyme nord-amérindienne) traduisible par « dans la lumière » ;
- « *Schiefer Schillerporling* » en allemand (11) pour « Le polypore en ardoise ».

On trouve également des termes n'étant pas des mots-valises tels que « *pakurikäpä* » en finnois (6).

En Pologne, ce ne sont pas moins de six binômes différents qui servent à désigner le Chaga : « *blyskoporek podkorowy* » (« qui jaillit de sous l'écorce »), « *blyskoporek ukośny* » (« qui jaillit oblique »), « *czarna huba* » (« aux pores noirs »), « *huba ukośna* » (« aux pores obliques »), « *huba skośnorurkowa* » (« aux pores en tubes ») et « *włóknuszek ukośny* » (« aux tubes obliques ») (10).

Il est à noter que, peu importe la langue, les mots-valises font généralement référence à l'écologie, aux formes utilisées en mycothérapie ou aux propriétés biologiques de ce champignon.

b) Anatomie

i. Rappels sur la structure d'un tronc d'arbre

Comme le montre la Figure 1, le liège (aussi appelé suber) est la partie la plus externe de l'arbre. Cette enveloppe est constituée de cellules mortes recouvertes de subérine (polymère lipidique), qui assure la protection et l'imperméabilité de l'arbre et est parsemée de lenticelles (pores) permettant les échanges gazeux.

L'assise subéro-phellodermique est un méristème (tissu spécialisé dans la croissance cellulaire) produisant le liège par différenciation centrifuge et le phelloderme par différenciation

centripète. Il assure la croissance de l'écorce qui suit celle du bois. Le phelloderme, quant à lui, est un parenchyme cortical assurant un rôle de réserve et d'assimilation des nutriments.

Le liber est une zone comprenant des fibres, du parenchyme et des tubes criblés auxquels sont associées des cellules compagnes, remplissant de grandes fonctions métaboliques (apport énergétique, synthèse protéique, transport des produits de la photosynthèse...). Ces tubes criblés assurent le transport de la sève élaborée.

L'assise libéro-ligneuse (aussi appelée cambium) est un second méristème, qui produit le liber par différenciation centrifuge et le bois (cellules lignifiées) à proprement parler par différenciation centripète. À la reprise de la végétation, les tubes criblés synthétisés par le cambium ont un diamètre plus important pour acheminer davantage de sève élaborée et permettre le développement du feuillage. Le diamètre des tubes criblés diminue au fur et à mesure de l'année jusqu'à l'entrée de l'hiver où l'activité du cambium cesse. C'est ce phénomène qui explique pourquoi les cernes de croissance annuelles semblent de couleurs différentes : le bois de printemps contient de larges tubes criblés qui donnent un aspect clair au bois tandis que celui d'été/automne présente de nombreux tubes criblés de plus petites tailles qui confèrent au bois un aspect plus foncé.

Le bois se distingue de l'extérieur vers l'intérieur en trois zones différentes : l'aubier, le duramen et, enfin, la moelle. L'aubier est aussi appelé « bois vivant », car il assure des fonctions physiologiques dont la principale est le transport de la sève brute. Le duramen est la partie la plus centrale du fût et constitue le « bois dur », il est plus dense, compact et sec que l'aubier. Il correspond aux zones d'accroissement les plus anciennes qui ont subi le phénomène de duraminisation : les cellules du parenchyme de l'aubier perdent leurs fonctions physiologiques et s'enrichissent en tanin et en lignine, ce qui donne au fût une grande solidité et résistance mécanique (12).

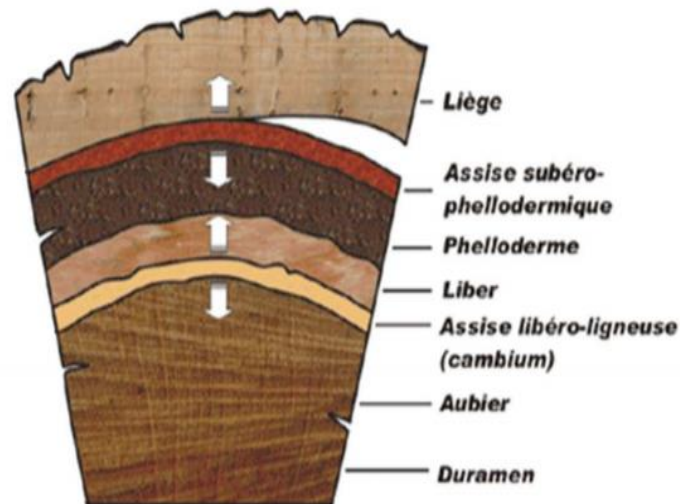


Figure 1. Structure interne d'un arbre (source : site internet www.planeteliege.com)

ii. Description morphologique du Chaga

Le Chaga présente deux formes distinctes : une forme asexuée et une forme sexuée (4).

La forme asexuée (aussi appelée anamorphe, forme « végétative » ou forme « imparfaite ») est la plus commune et se présente sous forme d'excroissances facilement repérables à la surface des troncs infestés puisqu'elles émergent de l'aubier jusqu'à fendre l'écorce. Ces excroissances se présentent sous forme de masses noduleuses fissurées de couleur noir-brunâtre avec un aspect proche de celui du charbon. Elles peuvent atteindre 10 à 40 cm de diamètre pour 4 à 10 cm d'épaisseur (Figure 2) (5).



Figure 2. Forme asexuée d'*Inonotus obliquus* sur bouleau (photo prise en forêt de Grimbosq le 2 juin 2015).

La forme sexuée (aussi appelée téléomorphe ou forme « parfaite ») est plus difficile et rare à observer car elle se développe entre l'écorce et l'aubier de l'arbre parasité. Elle a un aspect de croûte jaunâtre qui vire au brun avec le temps, présente des pores anguleux et allongés et un hyménium à basides bi- à tétrasporiques sans boucle basale. La forme sexuée libère des basidiospores elliptiques, hyalines de 8-10 μm x 5-7,5 μm (13) (Figure 3).



Figure 3. Forme sexuée d'*Inonotus obliquus* (source : EREM).

c) Cycle de vie

L'infestation de l'arbre hôte se fait par la germination de basidiospores qui s'infiltrèrent jusqu'au niveau du duramen par des blessures non cicatrisées rendant cette zone du fût accessible. Pendant 10 à 80 ans, le champignon se développe de manière centrifuge dans l'aubier pour donner des consoles (généralement une à trois par tronc). La forme asexuée croît année après année tant que l'arbre infesté reste en vie (environ 20 ans) (14) (Figure 4).

Deux à douze ans après la mort de l'arbre hôte (15,16), la forme sexuée apparaît entre l'écorce et l'aubier. Celle-ci libère des basidiospores qui assurent la dissémination du champignon.



Figure 4. Croissance de la forme asexuée du Chaga (source : site internet <https://il.wp.com/www.oriveda.com/images-newsletter/Chaga-development.png>)

d) Répartition géographique

Actuellement, cette espèce de champignon n'a été décrite que dans l'hémisphère nord. On la retrouve en Russie, au Canada, dans le Nord des États-Unis, au Kazakhstan, en Sibérie, au Japon, en Corée du Sud, en Chine ainsi qu'en Europe (principalement au Nord et à l'Est de celle-ci) (7) (Figure 5).

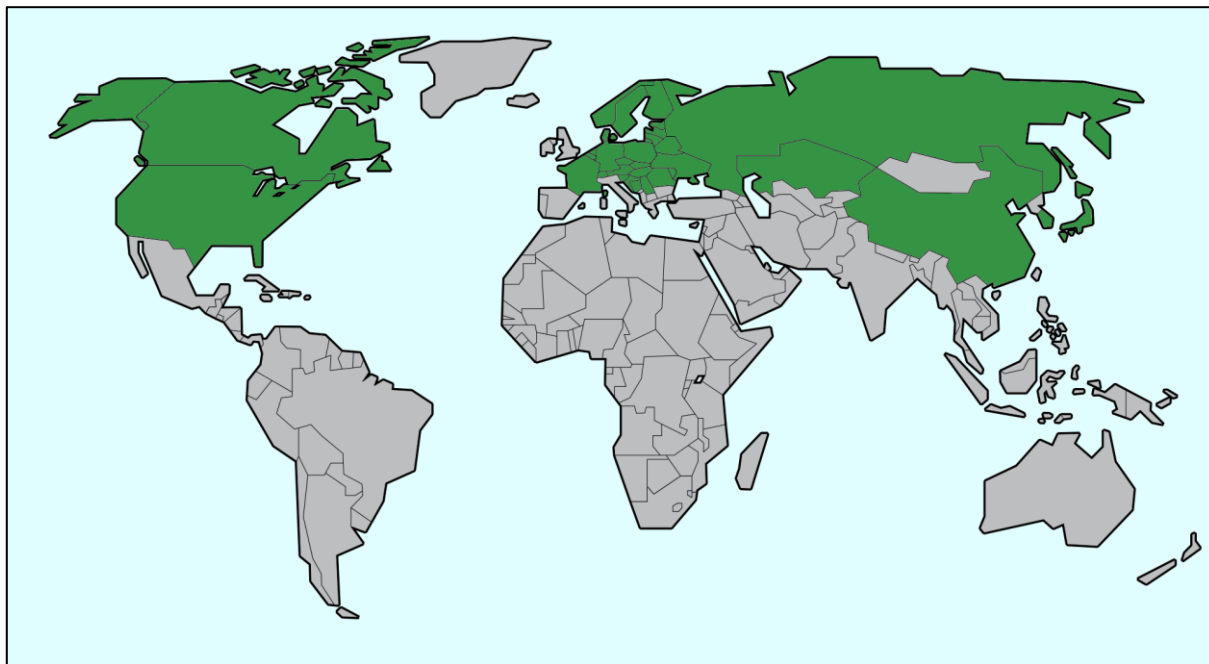


Figure 5. Distribution mondiale d'*Inonotus obliquus*.

Sa description en France est plus récente : dans le Calvados (1999) (17), en Seine-et-Marne signalée sous le nom de *Xanthochrous obliquus* (2003) (18), dans les Yvelines (2007) (18), dans la Creuse (2015) (19) et dans l'Orne (2017) (17) (Figure 6).

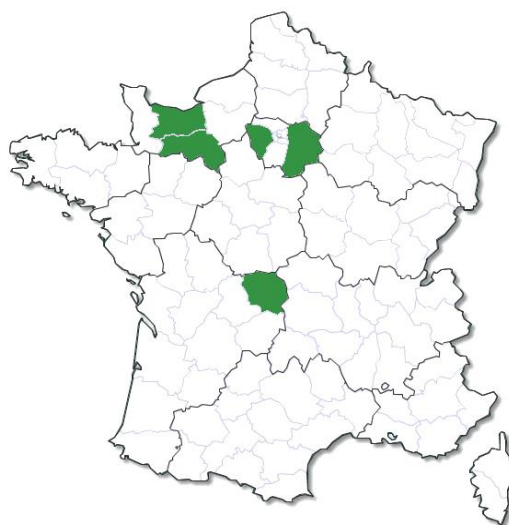


Figure 6. Distribution nationale actuelle d'*Inonotus obliquus*.

e) Ethnomycologie

Les premières notions d'utilisation du Chaga comme champignon médicinal remonteraient au 12^{ème} siècle, époque à laquelle Vladimir Vsevolodovitch (dit Vladimir II Monomaque), l'un des Grand-princes du Rus' de Kiev aurait été soigné d'une tumeur labiale par une teinture d'herbes et de Chaga (20).

Toutefois, les premières traces factuelles relatant l'utilisation du Chaga, datent du 16^{ème} siècle et nous viennent des Khantys, un peuple de Sibérie anciennement appelés Ostiaks (21). Ces derniers utilisent, encore aujourd'hui, ce champignon en médecine traditionnelle dans différentes indications : comme anthelminthique, antituberculeux, dans les pathologies cardiaques ou encore hépatiques. La forme asexuée du Chaga est utilisée de différentes manières après broyage : en infusion, en décoction, en inhalation (Chaga fumé) ou après calcination et macération du charbon obtenu dans de l'eau, comme « savon » pour le corps (22).

Les Aïnous, un groupe ethnique originaire de Hokkaido, des îles Kuri et des Sakhalins buvaient également une infusion de Chaga pour traiter les gastralgies et les inflammations. Une autre utilisation rituelle consistait à remplir une pipe avec du Chaga en poudre, à l'allumer et à le fumer lors de cérémonies religieuses. L'officiant inhalait la fumée, puis faisait circuler la pipe dans l'assemblée jusqu'à ce que tous les participants l'aient fumée. Bien que les effets médicaux de cette fumée soient méconnus, cette tradition montre que le Chaga était hautement considéré (23).

Plusieurs tribus autochtones d'Amérique du Nord et du Canada (les Cris des bois, les Gitksan, les Wet'suwet'en et les Tenaina, par exemple) connaissaient et utilisaient également le Chaga. Chaque tribu avait plusieurs noms pour ce champignon. Les Cris des bois, par exemple, l'appelaient « *Wisakechak omik h* » (mot à mot « croûte de *Wisakechak*) ; nom dérivé de la légende de « *Wisakechak* » (une figure mythologique masculine) qui aurait confondu le champignon avec de la viande séchée. Pris de dégoût, il aurait alors « lancé cette « croûte » (« *omik h* ») contre un bouleau, où il est resté fiché jusqu'à ce jour pour que l'humanité puisse en bénéficier ». Les Cris utilisaient l'intérieur tendre de couleur jaune-brun du Chaga pour allumer leurs feux de camp (utilisation similaire à celle de l'amadou) (24).

Il est tout particulièrement intéressant de relever que toutes ces ethnies attribuent un certain caractère mystique voire même mythologique à ce champignon. Ceci peut s'expliquer par son apparition presque « magique » puisque rien ne laisse présager de l'infestation de l'arbre hôte tant que l'anamorphe n'en a pas fendu l'écorce.

Durant le 20^{ème} siècle, sa consommation s'est étendue de la Sibérie au reste du territoire russe où les agriculteurs et ouvriers, trop pauvres pour s'acheter du thé, le broyaient pour le boire en infusion. Les autorités de santé soviétiques observèrent une incidence moindre des cas de cancers dans cette population et supposèrent alors que la consommation de cette infusion en était un facteur protecteur. Cette utilisation du Chaga, au sein des goulags sibériens, est mentionnée dans l'ouvrage « *Le Pavillon des cancéreux* » d'Alexandre Solženicyn (25). En 1955, les vertus d'*Inonotus obliquus*, broyé grossièrement et utilisé en infusion, sont officiellement reconnues par l'Académie de Médecine de l'URSS (1955) ce qui lui vaut d'entrer dans la Pharmacopée soviétique. Plusieurs autres formulations sont ensuite proposées par l'Institut botanique de Léninegrad, la plus remarquable étant le *Befunginum*. La spécialité Befungin® en Figure 7 (teinture de Chaga enrichie de chlorure de cobalt (CoCl₂) à 0,175% (m/v) et de sulfate de cobalt (CoSO₄) à 0,2% (m/v)) reste encore aujourd'hui, utilisée comme adjuvant, indiquée dans le traitement du psoriasis, de l'eczéma, des ulcères et des gastrites et en prévention de certains cancers et pour lutter contre les effets secondaires des traitements anticancéreux conventionnels (26).



Figure 7. Conditionnement du Befungin® (source : site internet <https://www.stronghealthnaturally.com/>).

Avec l'explosion de la consommation des « alicaments » aussi appelés « nutraceutiques » (27) - termes utilisés dans le langage courant, mais n'ayant actuellement pas de définition réglementaire (28) - les bienfaits du Chaga sont très largement mis en avant et diffusés par internet. En effet, il est de plus en plus simple de s'en procurer et ce ne sont pas moins de 4 500 000 résultats de recherche que nous retournent les moteurs de recherche classiques pour la requête « *buy chaga mushroom* » (Figure 8).

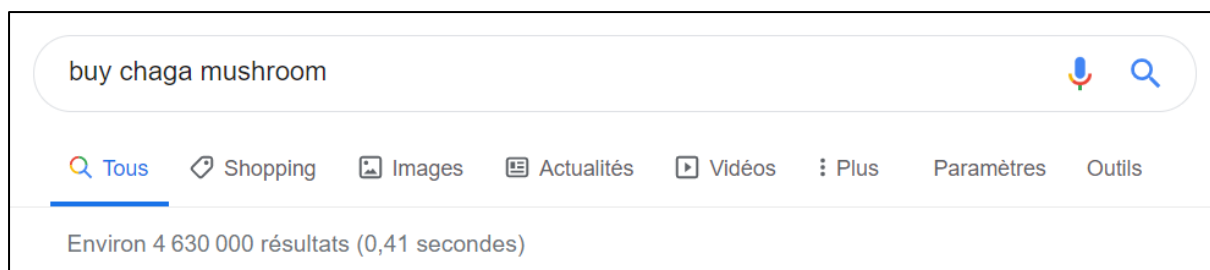


Figure 8. Capture d'écran (20/04/2020) du nombre de résultats obtenus pour la requête "buy chaga mushroom".

Ce constat montre bien que l'intérêt suscité par le Chaga et ses propriétés est toujours d'actualité et que sa vente représente un véritable commerce de par le monde.

f) Mycochimie

De nombreuses études portent sur la variété des composés retrouvés dans les extraits réalisés à partir de Chaga. Parmi ceux-ci, on retrouve des métabolites appartenant à différentes familles de molécules organiques (polysaccharides, (di- ; tri-) terpènes, polyphénols, mélanine...), qui seraient responsables de la plupart des activités biologiques de ce champignon (29–34). Nous nous sommes intéressés tout particulièrement à un triterpène tétracyclique signature appelé « inotodiol » produit par la voie de biosynthèse des lanostérols (Annexe I) et qui suscite depuis maintenant plus de 30 ans l'intérêt de la communauté scientifique internationale (35). Cette grande diversité de molécules peut en partie s'expliquer par le mode de vie parasite du champignon : on retrouve chez *Inonotus obliquus* de la bétuline (aussi appelée bétulinol) (36–38) et de l'acide bétulinique (36,37) (Figure 9) qui sont des métabolites ayant la particularité d'être à la fois présents chez le bouleau mais semblent aussi synthétisés par le Chaga (Annexe I).

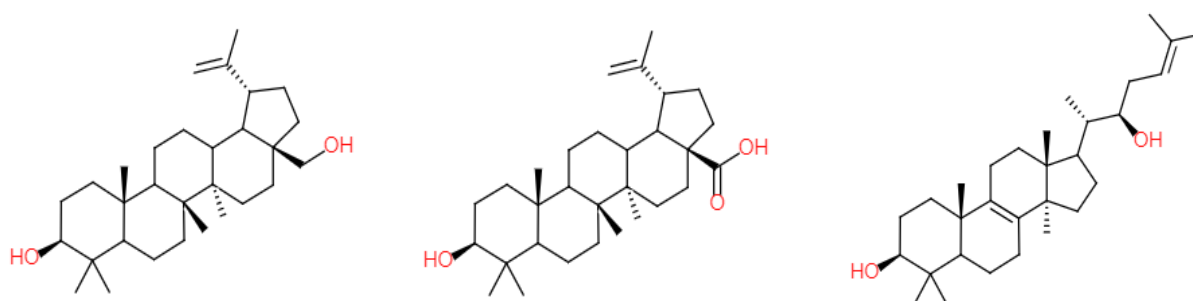


Figure 9. Formules topologiques de la bétuline (ou bétulinol) (à gauche), de l'acide bétulinique (au centre) et de l'inotodiol (à droite).

Ces trois molécules présentent à elles seules un grand nombre de propriétés qui corroborent les utilisations empiriques en médecine traditionnelle.

g) Activités biologiques

i. De la bétuline et de l'acide bétulinique

La bétuline et l'acide bétulinique, métabolites présents aussi bien dans le bouleau que dans le Chaga, ont de multiples activités biologiques d'intérêt.

Ceux-ci présentent un effet hypolipémiant par inhibition des SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*) (41) qui sont des facteurs de transcription des gènes codants, entre autres, pour l'HMG-CoA réductase (enzyme cible des molécules de la famille des statines) et pour l'HMG-CoA synthase (enzymes clés de la synthèse du cholestérol par la voie du mévalonate) (42).

De plus en plus de recherches indiquent que ces composés possèdent non seulement des propriétés antidiabétiques mais aussi des effets protecteurs contre les comorbidités du diabète (43,44). L'acide bétulinique exerce ses effets par différents modes d'action et notamment :

- En inhibant l'activité enzymatique de l' α -amylase et de l' α -glucosidase pancréatiques et plasmatiques dans des modèles animaux diabétiques (45,46) ;
- En inhibant la glycogénolyse et en induisant la glycogénogenèse par inhibition de la glycogène phosphorylase (47).

Ces métabolites ont montré une légère activité antibiotique sur différentes bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. (48,49).

Il est également fait mention dans la littérature scientifique d'une activité antivirale contre le virus de l'hépatite C (50), le virus respiratoire syncytial (51), le virus de la grippe (influenza A) (52), le cytomégalovirus (53), les virus de l'herpès de type 1 et 2 (54–56), le papillomavirus (57) et l'ECHOvirus 6 (58).

Ces métabolites sont reconnus pour leur activité pro-apoptotique (59) et/ou antiproliférative sur de nombreux modèles cellulaires *in vitro* (59–74).

Il a, par ailleurs, été démontré qu'ils favorisent la cicatrisation des plaies en stimulant la migration des kératinocytes par action directe sur le cytosquelette (75–77).

Le gel Oleogel-S10 qui contient de l'extrait sec raffiné d'écorce de bouleau actuellement en Autorisation Temporaire d'Utilisation nominative (ATUn) est d'ailleurs utilisé dans la prise en charge des brûlures superficielles (78) et de l'épidermolyse bulleuse (79).

Ces données scientifiques peuvent en partie expliquer pourquoi certaines espèces de bouleaux sont utilisées en médecine traditionnelle dans différents pays du monde (80). À titre d'exemple, la décoction contre les rhumatismes préparée à partir de feuilles de bouleaux (*Betula pendula*) est utilisée aussi bien en Bosnie-Herzégovine (81) qu'au Liban (82).

ii. Du Chaga

L'étude des différentes utilisations de ce champignon montre que ce dernier est le plus souvent utilisé dans son entièreté sans identification ni purification préalable de molécules déterminées. En effet, contrairement au dogme de nos contrées européennes visant à administrer des molécules toujours plus pures (seules ou en association) à nos patients, le Chaga, lui, est utilisé traditionnellement sous forme d'extraits complexes obtenus à partir de ce que l'on appelle le *totum* (le champignon dans sa totalité).

Parmi les propriétés de ces mélanges complexes qui ont valu au Chaga d'être inscrit dans les pharmacopées russe, polonaise et asiatiques, beaucoup ont été étudiées scientifiquement et sont aujourd'hui bien documentées.

Pour la plupart des extraits, on retrouve une activité antiproliférative sur de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* telles que la lignée A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines issues d'un adénocarcinome) (83–85), la lignée HeLa (cellules cancéreuses provenant d'un cancer du col de l'utérus) (86), la lignée sarcoma-80 (cellules de sarcome) (75,76) la lignée PC3 (cellules humaines de cancer de la prostate) (89), la lignée MDA-MB-231 (cellules humaines de cancer du sein) (89) ou encore la lignée B16-F10 (cellules murines de mélanome) (90).

L'extrait à l'acétate d'éthyle présente une activité hypoglycémique *in vitro* par inhibition de l'activité de l' α -amylase chez la souris (91).

Plusieurs de ses composés sont reconnus pour leurs effets anti-inflammatoires notamment par inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO), de la prostaglandine E2 (PGE2), du *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), de l'interféron gamma (IFN- γ), des interleukines IL-6, IL-1 β et IL-17A et des protéines STAT-1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription-1*) (92–94).

Certains métabolites extraits à partir de la forme sexuée ont également montré une capacité à augmenter le pouvoir phagocytaire des macrophages (modèle cellulaire RAW264.7) et à favoriser leur prolifération (95).

Ses polysaccharides, quant à eux, exercent une action antioxydante en réduisant significativement la libération de lactate déshydrogénase et l'accumulation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) (83,84). Ces effets ont un intérêt tout particulier dans la prise en charge de la pancréatite (chez la souris) (98) et dans la prévention de l'hépatotoxicité induite par la tacrine – Cognex® (médicament retiré du marché, anciennement indiqué dans le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer) sur modèle cellulaire HepG2 (lignée cellulaire de cancer du foie humain) (99).

Enfin, l'administration prolongée (huit semaines) de ces mêmes polysaccharides présente un intérêt potentiel dans la prise en charge précoce de la maladie d'Alzheimer. Celle-ci permet de réduire le dépôt de peptides β -amyloïdes et l'enchevêtrement des fibres neuronales induit par l'augmentation de la protéine-Tau dans le cerveau des souris APP/PS1 (modèle murin de la maladie d'Alzheimer) (100).

Ses effets antiprolifératifs, anti-inflammatoires et antioxydants en font un soin de support en oncologie, tout particulièrement comme adjuvant des chimiothérapies anticancéreuses conventionnelles (101).

5. Objectifs de l'étude

Entre croyances mystiques, médecine traditionnelle et activités biologiques avérées, la découverte en Normandie (1999) de ce macromycète, que certains sites web n'hésitent pas à appeler « *The Mushroom of Immortality* » (102), a vivement suscité notre intérêt. Cette curiosité nous a motivé à utiliser les compétences et matériels présents au laboratoire ToxEMAC afin d'en apprendre davantage sur ce champignon. À cette fin, nous avons décliné notre étude en quatre volets différents.

Un premier volet écologique, visant à rechercher des spécimens d'*Inonotus obliquus* dans d'autres zones forestières normandes, sur d'autres essences que sur *Betula* sp. et à étudier son biotope et sa biocénose.

Un deuxième volet mycochimique, incluant des analyses d'extraits fongiques réalisés à partir de Chaga d'origines géographiques différentes et comprenant la détection et la quantification de l'inotodiol, de la bétuline et de l'acide bétulinique.

Un troisième volet porté sur la recherche d'activité antiproliférative d'extraits réalisés à partir du Chaga normand. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence par méthode colorimétrique (spectrophotométrie UV-visible) que nos extraits avaient bien une activité antiproliférative sur les cellules épithéliales alvéolaires de carcinome humain (lignée

cellulaire A549) déjà documentée dans la littérature scientifique (83,84). Puis, nous avons exposé des cellules saines immortalisées d'épithélium alvéolaire pulmonaire (lignée cellulaire BEAS-2B) à l'extrait aqueux et comparés les activités observées sur les deux modèles cellulaires pour cet extrait.

Un quatrième volet axé sur l'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux du modèle A549 afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette activité antiproliférative.

L'originalité de notre travail réside dans cette approche transversale pluridisciplinaire mêlant étude de terrain et essais en laboratoire.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Collecte de Chaga

Chaque prélèvement a été réalisé soit à l'aide d'une machette frappée par un maillet en bois, soit à la hachette en prenant garde de ne pas prélever du bois de bouleau. Les excroissances prélevées ont été conservées à température ambiante, après séchage, dans des sacs zippés différents (selon la date, le lieu de récolte et l'essence de l'arbre hôte) jusqu'à leur utilisation.

a) Récolte en Normandie occidentale

Toutes les récoltes ayant eu lieu en Forêt de Grimbosq ont été réalisées dans les zones cerclées de rouge sur la Figure 10.

Nous avons effectué personnellement une première récolte le 2 juin 2015 en Forêt de Grimbosq. Huit prélèvements ont été réalisés exclusivement sur des individus de *Betula pendula* âgés d'au moins dix ans et mesurant une dizaine de mètres (Figure 11). Cette excursion a permis de recueillir environ 700 g de matière fongique.

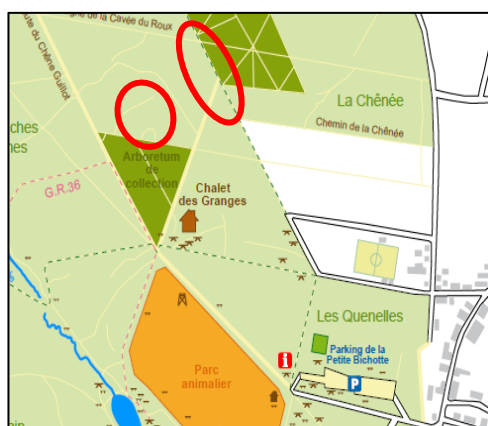


Figure 11. Zones de récolte du Chaga sur bouleau.



Figure 11. Récolte de Chaga en Forêt de Grimbosq le 2 juin 2015 (face interne de l'anamorphe et arbre hôte).

Au cours de cette première récolte, nous avons repéré une cavité ornée d'une excroissance sur un chêne. N'étant alors pas équipés pour prélever cette excroissance compte tenu de sa hauteur, nous sommes revenus munis d'une échelle et en avons profité pour effectuer une seconde récolte.

Celle-ci a eu lieu le 4 juin 2015 en Forêt de Grimbosq au niveau d'une cavité présente sur un individu de *Quercus robur* (Figure 12) et nous a permis de collecter un spécimen de 28 g. Cette cavité était tapie d'un liquide brun foncé (semblant constitué d'un mélange d'eau, de sève et de matière organique en décomposition) dans lequel vivaient de petits insectes. La substance a été

prélevée pour mise en culture sur milieu gélosé et les insectes ont été rapportés au laboratoire pour diagnose. Cet anamorphe d'*Inonotus obliquus* était par ailleurs moucheté de points blancs semblant être des moisissures que nous avons également mises en culture.

La mise en culture des moisissures présentes sur le Chaga et du liquide brun foncé recouvrant la cavité où se développait le champignon s'est faite à 25°C sur milieu *Malt Extract Agar* (MEA, Merck, Germany) contenant du chloramphénicol (0,02 g/l).



Figure 12. Cavité présente sur le chêne où a été récolté le Chaga.

Nous nous sommes également rendus en Forêt d'Écouves dans l'Orne le 24 novembre 2014 où nous avons également découvert et pu ramasser des consoles poussant sur *Betula pendula* représentant environ 780 g de matière fongique.

Par ailleurs, le 24 septembre 2015 nous avons observé des consoles se développant sur bouleau dans le bois de Saint-André (près de Falaise) sans pouvoir les prélever (bois privé).

b) Obtention de Chaga d'autres origines géographiques

Des formes asexuées d'*Inonotus obliquus* ont, par ailleurs, été achetées au Canada (Gaspésie Sauvage Produits Forestiers Inc) par Monsieur Philippe Eldin de Pécoulas et d'autres échantillons récoltés en Ukraine (Parc national Karpatsky, région d'Ivano-Frankivsk) par Madame Tetyana Krivomaz.

2. Approche mycochimique

a) Extractions

Les extractions sont réalisées à partir soit d'anamorphes d'*Inonotus obliquus* achetés au Canada, soit récoltés en Forêt de Grimbosq ou dans le Parc National des Carpates en Ukraine.

Trois solvants de polarités différentes sont utilisés pour réaliser les extraits : le cyclohexane, apolaire (indice de polarité de Snyder $P' = 0,2$), l'acétate d'éthyle, de polarité intermédiaire ($P' = 4,3$) et l'eau, polaire ($P' = 9$).

Avant extraction, le Chaga est séché dans un dessiccateur (Dönex SIGG AG 1978) pendant cinq jours à 35°C. La matière fongique sèche est broyée puis pulvérisée au blender (Waring BB90E) avant d'être passée sur tamis inox de maillage 2 mm afin d'obtenir une poudre fine et homogène. Les extractions sont effectuées dans l'obscurité à température ambiante (20°C).

i. Extrait au cyclohexane

La poudre (180 g) est d'abord laissée à agiter au contact du cyclohexane (1 L) pendant 90 minutes sur un agitateur orbital à 180 tr/min. Après filtration sur papier Whatman n°3, le marc est à nouveau extrait avec du cyclohexane (500 mL) pendant deux heures avec le même système d'agitation, puis filtré sur papier filtre Whatman n°3. Les deux fractions sont regroupées et évaporées au Rotavapor à 40°C jusqu'à l'obtention de résidus secs jaunes de 2,6294, 2,4744 et 2,5166 g, respectivement, pour le Chaga canadien, français et ukrainien.

ii. Extrait d'acétate d'éthyle

Une fois sec, le marc est mis en contact avec de l'acétate d'éthyle (1 L) pendant quatre jours sur un agitateur orbital à 180 tr/min. Au terme de ces quatre jours, la filtration est réalisée en trois étapes : sur coton cardé, sur Büchner, puis sur papier filtre Whatman n°3.

De la même manière, les extraits obtenus sont évaporés au Rotavapor à 40°C jusqu'à l'obtention de résidus pulvérulents jaunes de 0,9837, 0,9248 et 0,9315 g, respectivement, pour le Chaga canadien, français et ukrainien.

iii. Extrait aqueux

La poudre (100 g) est agitée au contact d'eau ultrapure (500 mL) pendant 22 heures à température ambiante (20°C) sur un agitateur orbital à 180 tr/min. Une filtration est ensuite effectuée sur papier Whatman n°3 afin d'obtenir 250 mL d'extrait aqueux. Un aliquot de 100

mL de cet extrait est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40°C jusqu'à ce qu'un volume résiduel de 40 mL soit obtenu.

iv. Décoction par la méthode Khanty (22)

La forme asexuée est coupée en petits morceaux de 5 à 10 g introduits dans de l'eau bouillante pendant 15 minutes. Du coton cardé et du papier filtre Whatman n°3 sont utilisés pour la filtration.

v. Infusion selon Gaspésie Sauvage Produits Forestiers Inc

Trois morceaux (de 5 à 10 g) sont introduits dans 1 L d'eau froide et laissés à reposer 30 minutes, puis celle-ci est chauffée sans la faire bouillir pendant 30 minutes supplémentaires. Du coton cardé et du papier filtre Whatman n°3 sont utilisés pour la filtration.

Avant leur utilisation, tous les extraits obtenus sont conservés au réfrigérateur à + 4°C et à l'abri de la lumière.

b) Identification et quantification des métabolites fongiques

i. Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (HPLC-ESI-QTOF MS/MS) (88,89)

La Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (HPLC-ESI-QTOF MS/MS) est une technique d'analyse physico-chimique associant le pouvoir de séparation de la chromatographie à la capacité d'analyse hautement sensible et sélective de la spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol (QTOF). Un échantillon de la solution à analyser est injecté dans une colonne greffée d'une phase stationnaire au sein de laquelle il est véhiculé par une phase mobile s'écoulant à haute pression. L'interaction chimique entre les composants de l'échantillon, la phase stationnaire et la phase mobile affecte différentes vitesses de migration à travers la colonne et donc différents temps de rétention, ce qui permet leur séparation. La grande diversité de combinaisons de phase stationnaire et de phase mobile permet d'assurer la séparation des analytes même au sein de mélanges complexes ce qui permet l'élution des molécules d'intérêt une à une jusqu'au spectromètre de masse.

Le spectromètre de masse pour un système HPLC-ESI-QTOF MS/MS a une source d'ionisation dite ESI (*ElectroSpray Ionization*) où chaque effluent est nébulisé, désolvaté et ionisé, créant

ainsi des gouttelettes de particules chargées. Les ions obtenus migrent sous vide et sont poussés à travers une série d'analyseurs de masse.

Ils passent tout d'abord par un premier quadripôle permettant le refroidissement et la focalisation des ions entrant dans l'instrument. Le second quadripôle produit un champ électrostatique servant à stabiliser la trajectoire du (ou des) ion(s) d'intérêt possédant un rapport masse/charge (m/z) précis. Ceux ayant un rapport m/z différent sont déstabilisés et éjectés hors du quadripôle.

Les ions ainsi « sélectionnés » entrent ensuite dans une cellule à collisions où ils sont bombardés par un gaz inerte comme l'azote (N_2) (gaz utilisé dans le cadre de notre étude) ou l'argon (Ar), ce qui provoque leur dissociation. Les ions « fils » obtenus et les ions « parents » non fractionnés sont accélérés à nouveau (généralement plusieurs dizaines d'électronvolts (eV) par unité de charge), et focalisés par une lentille ionique en un faisceau parallèle qui pénètre en continu dans l'analyseur temps de vol (TOF – *Time Of Flight*).

Dans cet analyseur, un champ électrique pulsé est appliqué à une fréquence de plusieurs kilohertz (kHz), poussant les ions dans une direction perpendiculaire à leur trajectoire d'origine dans une colonne d'accélération. Les ions arrivent alors dans une zone où ils dérivent car ils ne sont plus soumis à aucun champ électrique : c'est à ce moment que la séparation par temps de vol a lieu.

Les ions atteignent ensuite un miroir à ions aussi appelé « réflectron » composé d'anneaux appliquant des voltages croissants. Son rôle est de corriger les différences de temps de vol d'ions de même rapport m/z qui pourraient être provoquées par des variations d'énergie cinétique. De cette manière, on diminue la dispersion temporelle du temps de vol des ions de même rapport m/z ce qui assure une bonne résolution du spectre obtenu.

Enfin, les ions arrivent au détecteur qui, lorsque les ions viennent frapper sa surface, génère un signal électrique. Ce signal est ensuite amplifié, traité et finalement envoyé à un ordinateur pour affichage et traitement des données (Figure 13).

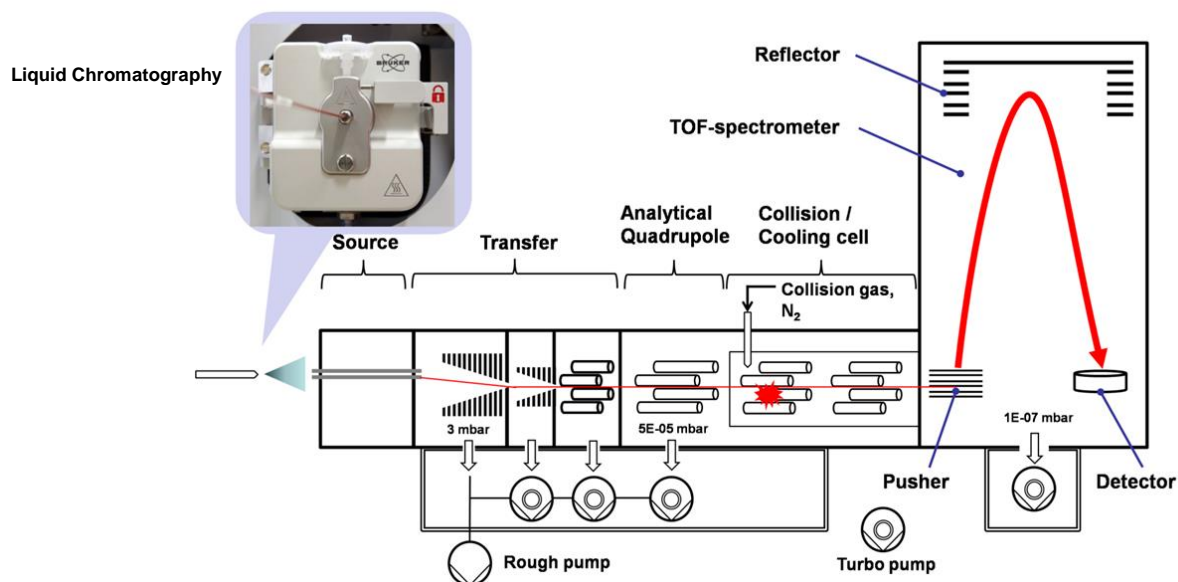


Figure 13. Schéma d'une HPLC-ESI-QTOF MS/MS (source : site internet <https://biotechlink.org/>).

La force de cette technique réside donc dans le pouvoir de séparation de la chromatographie liquide haute performance pour une large gamme de composés, combiné à la capacité de la spectrométrie de masse à quantifier les composés avec un degré élevé de sensibilité et de sélectivité, en fonction des rapports uniques m/z de chaque composé d'intérêt.

ii. Matériel et réactifs

L'acétonitrile (*ULC-MS grade*) et l'acétone (*pesticides grade*) ont été achetés chez Biosolve Chimie (Dieuze, France), tandis que l'acide formique (98% de pureté) et l'acétate d'éthyle (HPLC HiPerSolv Chromanorm grade) ont été achetés auprès de VWR (Radnor, PA). Les préparations ont été réalisées à partir d'eau (qualité HPLC) traitée par un système de purification d'eau Millipore par osmose inverse.

L'étalon interne (atrazine D5 ; pureté de 99%) a été obtenu auprès du Dr Ehrenstörfer. La bétuline (pureté $\geq 97,5\%$) et l'acide bétulinique ($\geq 97,5\%$ de pureté) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO), tandis que l'étalon d'inotodiol ($\geq 95\%$ pureté) a été acheté auprès de Chemfaces (Hubei, Chine). Toutes les solutions ont été filtrées à travers un filtre PVDF Millipore Millex HV de porosité $0,45 \mu\text{m}$ (Merck-Millipore, Billerica, MA) avant utilisation.

iii. Solutions standard et préparation des échantillons

Les solutions mère des standards d'atrazine D5, de bétuline, d'acide bétulinique et d'inotodiol à une concentration de 1000 mg/L sont préparées dans de l'acétate d'éthyle (2 mg de poudre dans 2 mL d'acétate d'éthyle). Des solutions de travail contenant de l'inotodiol, de la bétuline, de l'acide bétulinique et les étalons à une concentration de 10 mg/ml sont préparées dans de l'acétone (50 µL de chaque solution mère qsp 5 mL d'acétone). Une solution de travail de notre étalon interne (atrazine D5) à une concentration de 500 µg/L dans l'acétonitrile (5 µL de solution mère dans 10 mL d'acétonitrile) est également préparée. Notre gamme étalon est préparée à partir des solutions de travail avec des points de concentration allant de 0,001 à 5 mg/L.

Les extraits secs d'acétate d'éthyle et de cyclohexane sont repris dans 10 mL (pour le Chaga français) ou 30 mL d'acétonitrile (pour les Chagas canadien et ukrainien), passés aux ultrasons pendant 15 minutes, puis filtrés sur filtres PVDF de porosité 0,45 µm. L'extrait de cyclohexane est ensuite dilué à 10% et l'extrait d'acétate d'éthyle à 20% (pour le Chaga français) ou à 1% (pour les Chagas canadien et ukrainien) dans une solution contenant de l'acétonitrile, de l'eau distillée et l'étalon interne (atrazine D5).

L'extrait aqueux, l'infusion et la décoction sont filtrés à travers des filtres PVDF de porosité 0,45 µm puis dilués à 20% (pour l'extrait aqueux et l'infusion) ou à 50% (pour la décoction) dans une solution contenant de l'acétonitrile, de l'eau distillée et l'étalon interne (atrazine D5).

iv. Analyse en HPLC-ESI-QTOF MS/MS

L'analyse HPLC est réalisée sur un automate Agilent 1290 Infinity LC (Agilent, Santa Clara, CA) composé d'une pompe binaire, d'un échantillonneur automatique thermostaté et d'un compartiment de colonne. La colonne utilisée pour l'identification et la quantification des composés des échantillons est une colonne Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm (Waters, Milford, MA). La phase mobile consiste en un gradient progressif d'eau (contenant 0,01% d'acide formique, v/v) et d'acétonitrile (contenant 0,01% acide formique, v/v) : 0 min, 97:3 ; 4 min, 70:30 ; 12 min, 30:70 ; 15 min, 5:95 ; 17 min, 5:95 ; et 20 min, 97:3). La température de la colonne est réglée à 40°C et le débit à 0,45 mL/min.

Le système HPLC est connecté à un triple quadripôle Agilent 6470 MS-MS (Santa Clara, CA) équipé d'une interface ESI utilisant les paramètres de fonctionnement suivants : tension capillaire, 3,5 kV ((+) ESI mode) ; nébuliseur, 40 psi ; débit de gaz de séchage (azote), 10,0 L/min ; débit de gaz de gaine, 10,0 L/min ; température du gaz, 350 °C ; température du gaz de

gaine, 350°C ; et charge V, 500 V. Les transitions MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) utilisées pour les trois analytes cibles et l'étalon interne sont indiquées dans le Tableau I.

Tableau I. *Multiple Reaction Monitoring Transitions* utilisées pour les trois analytes cibles et l'étalon interne (atrazine D5).

Compound Name	Precollision Ion Mass	Produced Ions	Frag (V)	Collision Energy (V)	Polarity	Retention Time (min)
Acide bétulinique	439.3	95.0	100	48	Positive	14.545
		81.1	100	48	Positive	
Atrazine D5	221.1	179.1	115	16	Positive	7.419
		69.1	115	40	Positive	
Bétuline	425.3	95.0	100	48	Positive	14.781
		81.0	100	48	Positive	
Inotodiol	425.3	246.9	100	12	Positive	15.660

Les données de quantification sont traitées avec le logiciel Agilent Mass Hunter Quantitative Workstation version B.07.01 (Agilent Technologies).

v. Validation de la méthode

Les limites de détection (LOD), les limites de quantification (LOQ), les équations de régression et les coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage (R^2) pour chaque métabolite sont indiqués dans le Tableau II.

Tableau II. Limites de détection (LOD), limites de quantification (LOQ), équations de régression et coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage (R^2) obtenus pour chaque métabolite.

Compound		Cyclohexane Extract	Ethyl Acetate Extract	Aqueous Extract	Infusion	Decoction
Acide bétulinique	LOD ($\mu\text{g/L}$)	0.3	0.3	0.3	1.7	0.7
	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	1	1	1	5	2
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 8, 2016), dilution range = 1-1000 $\mu\text{g/L}$: $y = (-6.09 \times 10^{-8}) \times x^2 + (2.52 \times 10^{-4}) \times x + (6.58 \times 10^{-4})/R^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 1-500 $\mu\text{g/L}$: $y = (-2.19 \times 10^{-7}) \times x^2 + (4.55 \times 10^{-4}) \times x + (3.61 \times 10^{-5})/R^2 = 0.9994$				
Bétuline	LOD ($\mu\text{g/L}$)	0.3	0.3	0.3	1.7	0.7
	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	1	1	1	5	2
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 2, 2016), dilution range = 1-5000 $\mu\text{g/L}$: $y = (-3.44 \times 10^{-9}) \times x^2 + (6.56 \times 10^{-5}) \times x + (3.62 \times 10^{-4})/R^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 1-1000 $\mu\text{g/L}$: $y = (-3.55 \times 10^{-8}) \times x^2 + (1.77 \times 10^{-4}) \times x + (5.11 \times 10^{-5})/R^2 = 0.9989$				
Inotodiol	LOD ($\mu\text{g/L}$)	1.7	1.7	1.7	8.3	3
	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	5	5	5	25	10
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 2, 2016), dilution range = 10-5000 $\mu\text{g/L}$: $y = (-1.52 \times 10^{-10}) \times x^2 + (1.30 \times 10^{-5}) \times x + (2.53 \times 10^{-4})/R^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 10-5000 $\mu\text{g/L}$: $y = (-6.63 \times 10^{-10}) \times x^2 + (2.51 \times 10^{-5}) \times x + (5.60 \times 10^{-4})/R^2 = 0.9992$				

3. Tests de cytotoxicité sur microplaques

a) Culture des lignées cellulaires A549 et BEAS-2B

Les cellules A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines issues d'un adénocarcinome) cultivées dans un milieu DMEM additionné de 1% de bicarbonate à 7,5% et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (pour éviter des réactions immunitaires parasites liées au système du complément). Leur temps de doublement est estimé à 24 heures.

Les cellules BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées) ont un temps de doublement de 26 heures et sont cultivées dans un mélange qsp 500 mL de milieu BEBM (*Bronchial Epithelial cell Basal Medium*) (Gibco) additionné de 2 mL d'extrait hypophysaire bovin, de 0,5 mL d'hydrocortisone, de 0,5 mL de facteur de croissance épidermique humain, de 0,5 mL d'épinéphrine, de 0,5 mL de transferrine, de 0,5 mL d'insuline, de 0,5 mL d'acide rétinolique et de 0,5 mL de triiodothyronine. Ce milieu reconstitué est appelé milieu BEGM (*Bronchial Epithelial cell Growth Medium*).

Avant ensemencement sur les microplaques, les cellules sont décollées de leur support par l'action de trypsine (0,25%) que l'on laisse agir 5 min à l'étuve. La suspension cellulaire ainsi obtenue fait l'objet d'un comptage sur cellules de Malassez qui nous permet d'estimer la quantité totale de cellules dans notre flacon de culture.

Chaque puits estensemencé 24 heures avant l'exposition (compte tenu du temps de doublement) avec 10 000 cellules pour la lignée A549 et 15 000 cellules pour la lignée BEAS-2B dans 200 µL de milieu. Les microplaques sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ de manière à ce que les cellules de chaque lignée soient à confluence au moment de l'ajout des extraits.

Pour chaque lignée cellulaire, les extraits testés et les durées d'exposition sont dans le Tableau III (ci-dessous).

Tableau III. Extraits testés et durées d'exposition appliquées pour chaque lignée cellulaire.

Lignée cellulaire	Extrait testé	Temps d'exposition – R+/R-*		
		24 heures	48 heures	72 heures
A549	Extrait aqueux	Oui - R+/R-	Oui - R+/R-	Oui - R-
	Extrait à l'acétate d'éthyle	Oui - R+/R-	Oui - R+/R-	Oui - R-
BEAS-2B	Extrait aqueux	Oui - R-	Oui - R-	Oui - R-

*R+/R- : respectivement avec ou sans appliquer un temps de récupération de 24 heures après exposition à l'extrait testé.

Avant dilution, l'extrait aqueux est passé sur un filtre hydrophile à membrane PolyEtherSulfone (PES) de porosité 0,22 µm. Les cellules sont ensuite exposées à six concentrations différentes d'extrait aqueux (exprimées en %, v/v) : 25%, 10%, 5%, 2%, 1% et 0,5%.

L'extrait sec à l'acétate d'éthyle est repris dans du DMSO, celui-ci est donc stérile et n'a pas à faire l'objet d'une filtration. Les cellules sont exposées à six concentrations différentes d'extrait à l'acétate d'éthyle (inférieures à celles pour lesquelles le DMSO a une activité cytotoxique exprimées en % v/v) : 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1% et 0,05%. Par ailleurs, afin de s'assurer que les effets observés soient bien liés à l'activité intrinsèque de l'extrait et non au DMSO, on prépare une gamme de dilution identique mais avec le DMSO seul.

Six réplicats sont effectués pour chaque condition expérimentale à raison de deux essais indépendants permettant une meilleure appréciation des résultats obtenus et rendant compte de la reproductibilité des effets des extraits sur les lignées cellulaires.

Dès l'ajout des extraits, les microplaques sont remises à incuber en étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ pendant le temps d'exposition souhaité.

Pour les cellules de la lignée A549, au terme du temps d'exposition souhaité et si l'on souhaite appliquer un temps de récupération, on aspire le milieu contenant notre extrait et on réintroduit 250 µL de milieu de culture pur DMEM. On remet les microplaques à l'étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ pendant 24 heures avant coloration et lecture des microplaques.

b) Coloration des microplaques

Après la fin du temps d'exposition les cellules sont colorées à la SulfoRhodamine B (SRB).

On ajoute 50 µL d'acide trichloracétique froid (TCA) à 50% dans chaque puits et la plaque est laissée à incuber une heure au réfrigérateur (+4°C) afin de faire précipiter les protéines. Les puits sont vidés et rincés à l'eau ultrapure avant de laisser sécher la microplaque une demi-heure à l'air libre.

On pipette 50 µL d'une solution de SRB à 0,4% dans de l'acide acétique 1% que l'on introduit dans chaque puits pour colorer les protéines qui ont précipité. La plaque est laissée 30 minutes à température ambiante.

Les puits sont rincés avec de l'acide acétique 1% et séchés jusqu'à disparition de toute trace d'humidité.

Enfin, le colorant fixé aux protéines est resolubilisé en introduisant dans chaque puits 100 μ L de Trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) base 10 mM tamponné à pH 10,5 et en agitant la microplaque au vortex pendant quelques minutes (Figure 14).

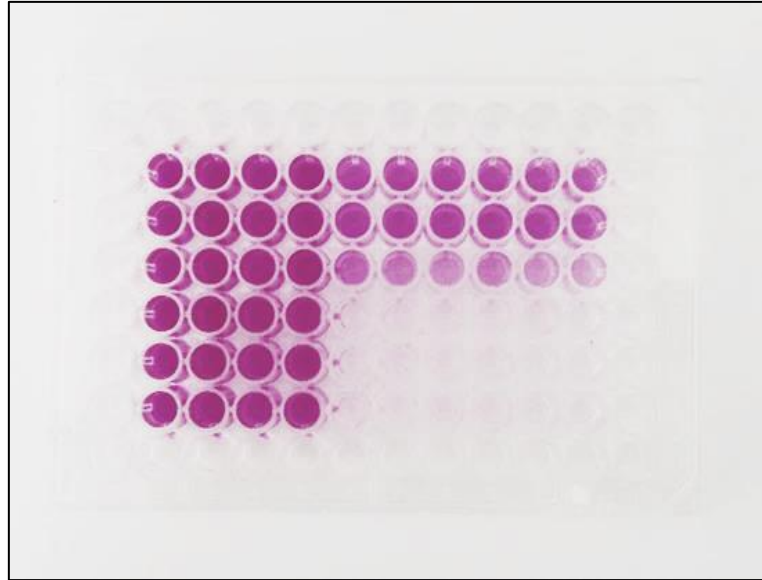


Figure 14. Microplaque 96 puits colorée à la SulfoRhodamine B.

c) Lecture d'absorbance par spectrophotométrie

Afin d'obtenir l'absorbance (densité optique) de chaque puits, la microplaque est passée dans un spectrophotomètre adapté en *dual mode* qui mesure la densité optique (DO) de chaque puits à 570 et à 655 nm. Étant donné que la SRB se fixe aux protéines, l'absorbance est donc le reflet de l'activité cellulaire et donne une approximation du nombre de cellules présentes dans le puits.

À partir des valeurs d'absorbance obtenues, les valeurs calculées sont :

- La moyenne des absorbances des puits témoins,
- La moyenne des absorbances pour les puits ayant été exposés à une même concentration d'extrait ou de solvant,
- Le pourcentage d'inhibition de pousse cellulaire pour chaque dilution. D'après la formule : $\% \text{ d'inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{DO moyenne des puits exposés}}{\text{DO moyenne des puits témoins}} \times 100 \right)$
- Pour les essais avec l'extrait à l'acétate d'éthyle, la concentration inhibant la pousse cellulaire à hauteur de 50% (CI₅₀) qui correspond à la concentration d'extrait pour laquelle on a une absorbance (et donc une pousse cellulaire) deux fois moindre à celle obtenue dans les puits témoins.

4. Cytométrie en flux

a) Principe de la cytométrie en flux (105)

La cytométrie en flux est une technique permettant d'apprécier les caractéristiques individuelles (taille, forme, granularité) de particules présentes dans une suspension (de billes, bactérienne, cellulaire...) et de détecter n'importe quel composant ou fonction pouvant être marqué par un fluorochrome.

Les éléments en suspension passent les uns après les autres devant un ou plusieurs faisceau(x) laser puis les détecteurs captent des signaux (aussi appelés « événements ») émis par chaque élément tels que :

- La lumière dispersée de face (Forward Scatter, FSC) qui donne des informations sur la taille de l'élément,
- La lumière dispersée sur les côtés à 90° (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.

Les signaux de fluorescence peuvent être émis directement par la particule elle-même, c'est ce que l'on appelle l'autofluorescence (présente chez les pollens, les mitochondries...) ou par un fluorochrome (ex : iodure de propidium, fluorochrome couplé à un anticorps...) marquant spécifiquement l'élément d'intérêt (protéine, ADN...).

Les données obtenues se présentent sous forme de nuages de points, de graphiques ou d'histogrammes que l'on peut compléter de statistiques concernant les populations particulières définies. Le principal avantage de la cytométrie en flux est de permettre l'acquisition rapide de données sur de nombreuses particules tout en permettant l'analyse de sous-populations complexes et/ou rares.

b) Rappels sur le cycle cellulaire (106)

L'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux permet de distinguer cinq grandes phases distinctes (G_0 , G_1 , S, G_2 et M (Figure 15)) et les cellules en cours d'endoréplication. Les phases G_0/G_1 , S et G_2 constituent l'interphase qui correspond au laps de temps entre deux mitoses (notées M).

La phase G_0 (pour « *Gap 0* ») correspond en réalité à un stade en dehors du cycle de réplication cellulaire. La cellule entre dans un état dit de quiescence. C'est notamment le cas des neurones qui comptent parmi les cellules les plus actives d'un point de vue métabolique mais qui sont

totalemment différenciées et ne prolifèrent plus. Toutefois, il est possible pour ces cellules de se réengager dans le cycle cellulaire sous l'impulsion de stimuli extrinsèques.

La phase G_1 (pour « *Gap 1* ») correspond au premier stade l'interphase où la cellule grandit et synthétise l'ARNm et les histones nécessaires à la synthèse de l'ADN. La durée de la phase G_1 varie en fonction du type cellulaire et des facteurs limitant la croissance cellulaire (apport en nutriments, température, matrice extra-cellulaire...). Il est également indispensable que les nucléotides et les acides aminés soient présents en quantités suffisantes pour synthétiser l'ARNm et les protéines. Cette phase tient un rôle très important dans le cycle cellulaire car elle comporte un point de restriction. La cellule va soit le franchir et s'engager dans le processus de division cellulaire en entrant en phase S, soit entrer en quiescence (phase G_0). Une fois engagée dans la phase S, la cellule poursuivra son cycle même si les conditions deviennent défavorables.

La phase S (pour « Synthèse ») se produit entre G_1 et G_2 . C'est la phase du cycle cellulaire au cours de laquelle l'ADN est répliqué.

La phase G_2 (pour « *Gap 2* ») est la phase précédant la mitose. Celle-ci s'achève avec l'entrée en première phase de la mitose (prophase) au cours de laquelle la chromatine cellulaire se condense en chromosomes. Cette phase comporte une croissance cellulaire rapide et une synthèse abondante de protéines en préparation de la mitose. Il est à noter que cette phase n'est pas indispensable. En effet, certaines cellules cancéreuses passent directement de la phase S à la mitose (M).

La phase M (pour « Mitose ») correspond à la phase de division cellulaire et est composée de quatre sous-phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et enfin la télophase. Durant la prophase, la chromatine se condense et la membrane nucléaire disparaît. S'en suit la métaphase, où les chromosomes s'alignent à l'équateur de la cellule. Puis, vient l'anaphase où les chromatides des chromosomes se séparent et migrent aux pôles opposés de la cellule mère. C'est à ce stade que les chromosomes atteignent leur degré maximal de condensation de manière à favoriser la séparation des chromosomes et la reformation du noyau. Enfin, la mitose s'achève avec la télophase où une nouvelle enveloppe nucléaire vient s'assembler à chaque pôle autour des ensembles de chromatides. Les nucléoles se reforment et les chromosomes se décondensent pour revenir à l'état de chromatine observé pendant l'interphase. Le fuseau mitotique se désassemble et les restes de microtubules sont dépolymérisés. On obtient donc deux cellules filles à partir d'une cellule mère : c'est la cytotérièse. À l'issue de la mitose, les deux cellules filles s'engagent à nouveau dans l'interphase.

L'endoréplication consiste en la réplication du génome nucléaire sans entrer dans le processus mitotique. De ce fait, les cellules ont un contenu génétique nucléaire élevé et une polyploïdie. Elle correspond à une variante du cycle cellulaire dans lequel la mitose est entièrement contournée.

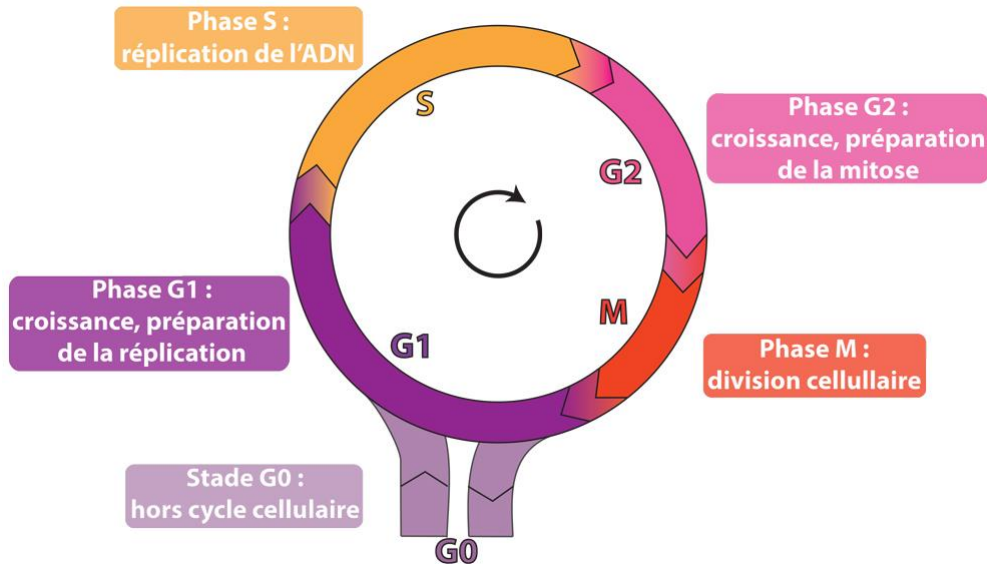


Figure 15. Schéma du cycle cellulaire (source : site internet : https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction).

L'utilisation du cytomètre dans l'étude du cycle cellulaire (Figure 16) permet également de définir une zone nommée « Sub-G₁ » correspondant aux cellules en souffrance (débris cellulaires, cellules avec noyau altéré...). C'est cette zone qui nous intéresse tout particulièrement car il indique si nos extraits sont cytotoxiques. On peut également observer un effet antiprolifératif correspondant à une stagnation des cellules en phase G₀/G₁.

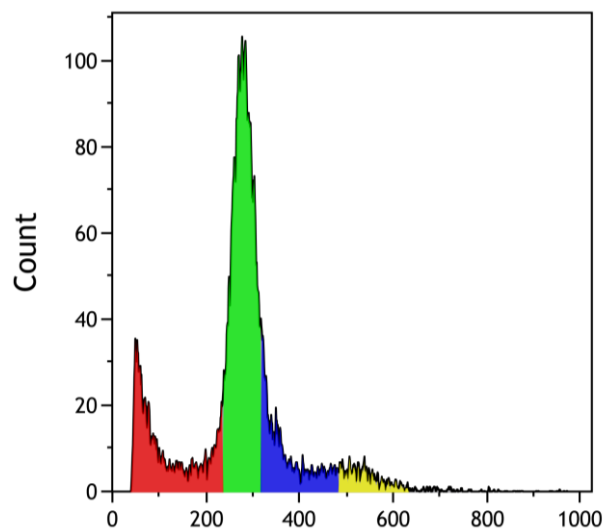


Figure 16. Les différentes phases du cycle cellulaire observées par cytométrie en flux (zone Sub-G₁ en rouge, zone G₀/G₁ en vert, zone S en bleu et zone G₂/M en jaune) (source : Géry A., laboratoire ABTE-ToxEMAC).

c) Culture cellulaire

La culture cellulaire est réalisée sur des plaques six puitsensemencées de cellules de la lignée A549. Pour chaque condition expérimentale (temps d'exposition, concentration en extrait et pour le témoin), deux puits sontensemencés avec 60 000 cellules chacun dans 2 mL de milieu DMEM additionné de 1% de bicarbonate à 7,5% et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté. Après 24 heures d'incubation en étuve à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂, les cellules sont exposées à l'extrait aqueux dilué dans le milieu de culture à des concentrations (% v/v) de 0,25% et à 2,5%.

Les temps d'exposition sont les mêmes que pour les tests de cytotoxicité sur microplaques à savoir : 24 heures, 48 heures, 72 heures, 24 heures suivies de 24 heures de récupération et 48 heures suivies de 24 heures de récupération.

Après exposition, les suspensions cellulaires présentes dans les deux puits soumis aux mêmes conditions expérimentales sont regroupées. Chaque suspension cellulaire est centrifugée à 1 000 tr/min pendant 5 minutes.

Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 5 mL d'éthanol à 70% puis stocké au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation.

d) Analyse du cycle cellulaire

Nous avons utilisé le cytomètre de flux Gallios (Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis) afin d'observer l'effet de l'extrait aqueux sur le cycle cellulaire des cellules A549 et de le comparer avec celui observé sur des cellules HT-29 (cellules cancéreuses humaine du côlon) déjà décrit pour un extrait à l'éthanol (107). La coloration des noyaux cellulaires est réalisée grâce au DNA-Prep Reagent Kit (Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis).

On fixe les cellules à l'éthanol et chaque tube est centrifugé pendant 5 minutes à 4 000 tr/min. Puis, on aspire l'éthanol et on gratte le culot afin de décoller les cellules. On ajoute 5 mL de Phosphate Buffered Saline 1X (PBS 1X) conservé à 37°C puis les tubes sont laissés à incuber pendant 30 minutes à 37°C.

Ensuite, les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 5 minutes à 4 000 tr/min avant d'aspirer le PBS 1X. Enfin, le culot cellulaire est égoutté puis gratté avant d'ajouter 100 µL de perméabilisant et 500 µL d'iodure de propidium et de RNase. Après homogénéisation, les tubes restent à incuber 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'iodure de propidium permet de distinguer cinq sous-populations cellulaires en fonction de la phase du cycle dans

laquelle elles sont engagées ou de leur état métabolique, à savoir : Sub-G₁, G₀/G₁, S, G₂/M ou en endoréplication.

Les culots passent un à un au cytomètre en flux piloté par un programme propre aux cellules de la lignée A549, l'automate s'arrête dès lors que 10 000 cellules ont été analysées.

Les données du cytomètre sont traitées avec le logiciel Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, Brea, Californie, États-Unis).

5. Statistiques

L'ensemble des statistiques obtenues sur les données de spectrophotométrie UV-visible et de cytométrie en flux ont été effectuées sur le logiciel SAS version 9.4.

Le test t de Student a été utilisé pour comparer la cytotoxicité des cellules A549 et BEAS-2B, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

III. RÉSULTATS

1. Écologie fongique

a) Étude des arbres hôtes

Lors des excursions effectuées en forêt de Grimbosq, nous avons pu constater que tous les bouleaux sur lesquels ont eu lieu les prélèvements d'excroissances étaient marqués par des trous de pics (Figure 17). Sous nos latitudes, on retrouve principalement des couples de pic épeiche (*Dendrocopos major*), mais aussi de pic épeichette (*Dendrocopos minor*), de pic noir (*Dryocopus martius*) ou de pic vert (*Picus viridis*) régulièrement observés dans le secteur de nos récoltes d'après les données du GONm (Groupe Ornithologique Normand) (108).



Figure 17. Tronc mort de bouleau couvert de trous de pics observé le 2 juin 2015 en forêt de Grimbosq.

À l'inverse, nous n'avons pas remarqué de trou de pics sur chêne. À noter néanmoins, que l'anamorphe prélevé se situait au niveau d'une cavité creusée à-même le tronc. La présence récurrente de trous de pics sur les bouleaux infectés par le Chaga laisse penser qu'il y a vraisemblablement une relation entre ces deux éléments (109).

Les pics possèdent à la base de leur bec des plumes tectrices ainsi que des plumes sensibles. Notre hypothèse est la suivante : lors de l'impact du bec contre un arbre déjà infesté et couvert du téléomorphe les spores sont prises au piège des barbules de ces plumes. Ainsi, lorsque ce même pic va tambouriner du bec sur un arbre sain, il pourrait y inoculer les spores d'*Inonotus obliquus*, tout en créant une brèche au sein du duramen favorisant l'implantation et la germination des spores.

Nous pensons que la raison pour laquelle les pics ne s'attaquent pas aux chênes en forêt de Grimbosq est justement liée à la forte population de bouleaux. En effet, le bouleau est un arbre dit à « bois blanc » (léger et peu solide) dans lequel les arthropodes dont se nourrit le pic ont

beaucoup moins de mal à creuser et qui facilite la nidification alors que le chêne est un arbre dit à « bois dur » (très résistant et très dur).

La nature du bois expliquerait pourquoi les troncs de *Betula* sont très souvent parsemés de nombreux trous de pics et pas ceux de *Quercus*. Ce qui, mis en lien avec notre hypothèse, nous donnerait la raison pour laquelle nous n'avons retrouvé qu'un seul spécimen de Chaga sur chêne (néanmoins présent au niveau d'une cavité).

Bien que les pics puissent occuper des territoires d'une superficie allant de 43 ha (en période de nidification) à 742 ha (en période hivernale), ils n'en restent pas moins des oiseaux sédentaires (110). Ils peuvent, certes, voler quelques kilomètres à quelques dizaines de kilomètres s'ils sont délogés de leur habitat, mais pas sur des distances de plusieurs centaines de kilomètres qui expliqueraient la dissémination d'*Inonotus obliquus* depuis les pays d'Europe de l'est vers la France. Le mode de vie des Picipes suggère davantage l'importation du Chaga depuis un pays limitrophe de proche en proche puis sa dissémination à une échelle locale.

b) Étude du liquide prélevé au niveau de la cavité de *Quercus robur*

L'étude et la culture du liquide prélevé au niveau de la cavité du chêne ornée d'un spécimen d'*Inonotus obliquus* a révélé la présence d'arthropodes et de moisissures qui ont fait l'objet d'une identification.

i. Diagnose des arthropodes (111,112)

Dans ce liquide sont retrouvés de petits invertébrés possédant des appendices articulés et un corps segmenté recouvert d'une carapace de chitine nous confirmant qu'il s'agit bien d'organismes de l'embranchement des Arthropodes. Ces derniers possèdent trois paires de pattes ce qui a permis de les classer parmi les Hexapodes. Leur tête est dotée d'une paire d'antennes et de pièces buccales visibles, des ailes sont insérées au niveau thoracique ce qui nous permet d'affirmer qu'ils appartiennent à la classe des Insectes. Au repos, les ailes métathoraciques ne sont pas visibles car recouvertes d'une paire d'ailes antérieures sclérifiées (appelées élytres) insérées sur le mésothorax. Ces insectes ont une forme ovale, sont de couleur noire, brillants avec une cuticule coriace lisse sur la tête et le corselet et sont dotés d'un appareil buccal de type broyeur, ce qui nous indique qu'ils appartiennent à l'ordre des Coléoptères.

Leur corps est convexe, court et mesure 4 à 5 mm. La tête, inclinée, est allongée en un museau aplati sans rostre ni labre. Elle est dotée de deux yeux composés sans ocelle (œil simple) et de deux antennes claviformes à onze articles dont les trois derniers forment une massue. Du thorax,

partent de longs élytres (ailes sclérifiées) portant chacun cinq faisceaux de touffes de poils roux et recouvrant entièrement l'abdomen. Les coxa (1^{er} article des pattes) antérieures sont transverses et laissent visible le trochanter (2^{ème} article des pattes). Le fémur (3^{ème} article des pattes) est dilaté antérieurement en une lame fémorale, ventrale au repos. Les tibias (5^{ème} article des pattes) sont élargis et ornés d'une gouttière tarsale dans laquelle s'insère un tarse (6^{ème} article des pattes) dépourvu de pièce accessoire, dilaté et membraneux sur sa face inférieure.

Ces éléments anatomiques nous orientent vers *Nosodendron fasciculare* (Figure 18) que l'on retrouve d'ordinaire dans les ulcères des ormes, des marronniers et des aulnes au printemps (113).

Sa présence en forêt de Grimbosq est intéressante car elle n'avait, à notre connaissance, jamais été établie dans les trois départements de l'ancienne région Basse-Normandie (114).



Figure 18. Photo de *Nosodendron fasciculare* (source : site internet <https://www.naturamediterraneo.com/>).

ii. Mise en culture

Avant de mettre en culture le liquide épais brun foncé, récolté dans la cavité du chêne, nous avons évalué son pH à l'aide d'un papier pH nous indiquant que cette substance était de pH neutre.

Après douze jours de culture, nous avons pu identifier deux sortes de colonies. L'une étant d'aspect gris, duveteuse et très proliférante ; l'autre d'aspect gris-vert. L'aspect macroscopique ainsi que l'examen microscopique (par microscopie optique aux grossissements $\times 400$ puis $\times 1000$) nous a permis d'identifier la colonie grise comme étant un *Mucor hiemalis* et la colonie gris-verdâtre comme étant un *Trichoderma viride*.

Mucor hiemalis est un Mucoromycète de l'ordre des Mucorales (115). Cette espèce présente dans le liquide prélevé dans la cavité du chêne est également cosmopolite. C'est un contaminant des végétaux, des fruits et des graines dont il est un saprophyte. Sa découverte n'est donc pas surprenante puisque le milieu prélevé était composé de sève et de matière végétale en décomposition. Cette moisissure est, par ailleurs, un pathogène opportuniste capable de provoquer des mycoses respiratoires, digestives ou cutanées appelées mucormycoses (116).

Trichoderma viride est un Sordariomycète de l'ordre des Hypocréales (117). C'est une moisissure cosmopolite et saprophyte appréciant les milieux humides. Elle participe à la cellulolyse des végétaux et il est fréquent de l'isoler à partir de bois en décomposition. De même que pour *Mucor hiemalis*, la découverte de cette moisissure dans ce liquide n'a rien d'anormal. En effet, le liquide prélevé dans cette cavité semble être un milieu idéal pour le développement de *Trichoderma viride* puisque l'on y retrouve de l'humidité (mélange d'eau et de sève) et de la matière végétale en décomposition. Cette moisissure est également un pathogène opportuniste (avec un tropisme pulmonaire) (118) et une espèce d'intérêt dans le secteur industriel pour son importante activité cellulolytique (119).

c) Culture des moisissures présentes à la surface du Chaga prélevé sur *Quercus robur*

Après sept jours de culture sur milieu MEA, nous avons noté la pousse de spots de différents aspects :

- Un spot brun olive bien délimité d'aspect velouté (1)
- Un spot en pousse concentrique duveteux blanc (2)
- Un spot diffus duveteux brun-noir (3)

Avant de purifier les différentes souches présentes, nous avons tenté une première identification au microscope optique ($\times 1000$). Celle-ci nous a permis d'identifier le spot (1) comme étant un spécimen de *Cladosporium cladosporioides*.

Cladosporium cladosporioides est un Dothidéomycète de l'ordre des Cladosporiales (120). Cette moisissure que nous avons retrouvée à la surface du Chaga prélevé sur chêne est une espèce cosmopolite et très fréquente dans le sol des zones tempérées où elle est saprophyte. On peut l'isoler à partir d'échantillons d'air (121) mais elle peut également se développer sur les plantes et les arbres dont elle est un parasite (122). De par sa répartition ubiquiste et la variété de ses substrats, nous n'avons pas pu établir de lien spécifique entre *Cladosporium cladosporioides* et

Inonotus obliquus. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de document citant cette moisissure comme étant susceptible de se développer sur un macromycète.

Dans un premier temps, nous n'avons pas pu identifier les spots (2) et (3). En revanche, nous avons noté la présence de filaments blancs sans fructification pour le spot (2) ainsi que l'existence de pycnides noirâtres d'environ 100 µm de diamètre laissant s'échapper quelques conidies pour le spot (3).

Nous avons donc émis l'hypothèse que le spot (3) pouvait correspondre au spot (2) ayant réalisé sa fructification et que ceux-ci n'étaient en fait que deux aspects différents d'une même moisissure. De ce fait, nous avons décidé de n'isoler que le spot (3) et le laisser en culture plus longtemps pour vérifier notre hypothèse. Après purification et mise en culture pendant 15 jours du spot (3), nous avons pu observer le développement d'une moisissure en pousse concentrique, duveteuse brune en son centre et blanchâtre en périphérie (Figure 19).

L'examen microscopique d'un prélèvement effectué à la limite entre la partie blanche et la partie plus foncée de la colonie montre des pycnides accrochées à des filaments sur toute leur hauteur. L'aspect macroscopique ainsi que les observations microscopiques (Figure 18) nous ont permis d'établir que les spots (2) et (3) étaient bien les deux aspects de *Humicola fuscoatra*.

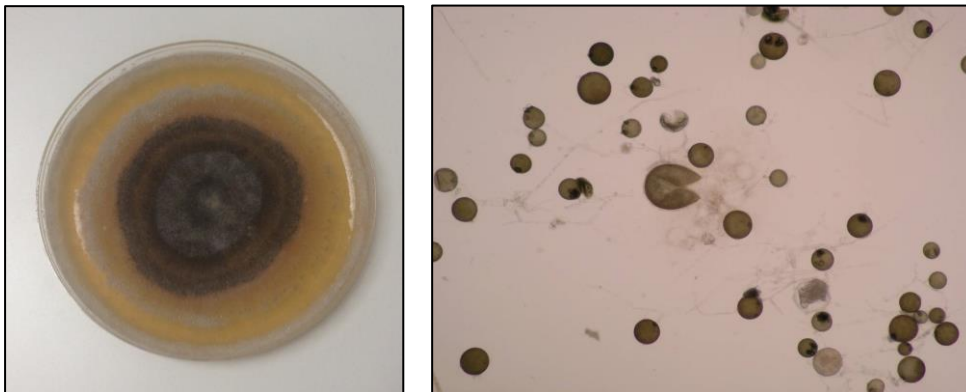


Figure 19. Aspect macroscopique (à gauche) et microscopique $\times 100$ (à droite) de la culture de *Humicola fuscoatra*.

Humicola fuscoatra est un Sordariomycète de l'ordre des Sordariales (123). C'est une moisissure elle-même mycoparasite (124) présente dans le sol et qui a la particularité de produire du monordène, de la monocilline et des cérébrosides qui sont des métabolites antifongiques (125). Sa présence à la surface du Chaga récolté sur chêne est intéressante car c'est une moisissure peu courante.

2. Quantification des métabolites fongiques par HPLC-ESI QTOF MS/MS

Nous avons d'abord utilisé les extraits de Chaga français pour développer la méthode de détection et de quantification des trois métabolites d'intérêt (bétuline, acide bétulinique, et inotodiol).

Une analyse des chromatogrammes par extraction de chromatogrammes d'ions a permis de démontrer la présence de bétuline, d'acide bétulinique et d'inotodiol en recherchant leurs masses dans les extraits au cyclohexane et à l'acétate d'éthyle. L'Annexe II montre les spectres de masse et les chromatogrammes obtenus pour ces trois métabolites dans les différents extraits organiques.

Nous avons ensuite appliqué cette méthode de détection et de quantification à l'extrait aqueux, à l'infusion et à la décoction réalisées à partir de Chaga français. Nous avons détecté de la bétuline, de l'acide bétulinique et de l'inotodiol dans l'extrait aqueux (dans une moindre mesure que dans les extraits organiques), mais pas dans l'infusion ni dans la décoction (Tableau IV).

Tableau III. Quantification de la bétuline, de l'acide bétulinique et de l'inotodiol dans les différents extraits et préparations de Chaga.

		Bétuline (mg/L)	Acide bétulinique (mg/L)	Inotodiol (mg/L)
Canadian Chaga	Cyclohexane extract	0,15	0,12	8,27
	Ethyl acetate extract	13,45	5,12	464,86
Ukrainian Chaga	Cyclohexane extract	0,78	0,14	41,37
	Ethyl acetate extract	0,88	1,12	147,56
French Chaga	Cyclohexane extract	6,48	0,37	52,70
	Ethyl acetate extract	1100	52,92	373,02
	Aqueous extract	0,23	0,16	11,70
	Infusion	<0,005 ^a	<0,005 ^a	<0,005 ^a
	Decoction	<0,002 ^a	<0,002 ^a	<0,002 ^a

^a Valeurs inférieures à la limite de quantification

Nous avons également recherché ces trois métabolites dans des extraits préparés à partir des Chagas canadiens et ukrainiens pour comparer leur concentration en fonction de l'origine

géographique des échantillons. Les résultats présentés dans le Tableau III montrent que les concentrations en bétuline et en acide bétulinique sont plus importantes dans le Chaga français tandis que les plus fortes concentrations en inotodiol sont retrouvées dans le Chaga canadien.

Cependant, il est important de noter que la différence en concentrations de ces métabolites peut être due non seulement à l'origine géographique du champignon mais aussi aux facteurs environnementaux (climat/arbre hôte), à la technique de conservation et au laps de temps entre la récolte et la réalisation des extraits.

L'identification de la bétuline et de l'acide bétulinique dans tous les extraits fongiques peut être considérée comme une signature du lien entre le champignon parasite et son hôte végétal. Cette observation a précédemment été faite avec d'autres associations entre champignons et végétaux telles que *Fomitopsis pinicola* (Swartz) P. Karsten (1881) (anciennement *Polyporus pinicola*) et le pin (34).

Notre étude confirme la présence de l'inotodiol dans le Chaga récolté en France. Ce métabolite secondaire a précédemment été identifié dans des extraits obtenus à partir d'échantillons de Chaga de Chine, de Finlande, de Thaïlande et de Russie (39,89,126). Plus généralement, *Inonotus obliquus* se caractérise par la présence de plusieurs triterpènes de type lanostane, en particulier les inonotsuoxides A et B (127), l'inotodiol, l'acide traméténolique (128) et le lanostérol (129).

L'absence apparente des métabolites d'intérêt dans l'infusion et dans la décoction peut s'expliquer :

- soit par un manque de sensibilité de notre méthode : les composés sont bien présents mais à des concentrations inférieures aux limites de détection,
- soit par une incapacité des techniques d'infusion et de décoction à extraire ces métabolites.

Ce constat peut donc laisser penser que les propriétés attribuées aux décoctions et infusions d'*Inonotus obliquus* ne sont pas dues aux métabolites que nous avons recherchés, mais à des molécules plus polaires et/ou ayant des masses moléculaires plus faibles également présentes dans le Chaga.

En effet, plusieurs études ont déjà démontré l'existence d'autres familles de molécules telles que les polysaccharides (130), les complexes de mélanine (131), les dérivés de la lignine (132) ou les polyphénols tels que l'acide gallique (97) dans des extraits aqueux de Chaga.

3. Analyse de l'activité des extraits sur les cellules de la lignée A549

a) Extrait aqueux

Les valeurs d'absorbance (données brutes) utilisées pour effectuer les tests statistiques ainsi que les graphiques correspondants sont consultables en ANNEXE III. La Figure 20 comporte un graphique et un tableau. Le graphique présente les courbes obtenues pour les différents temps d'exposition avec en abscisse la concentration en extrait aqueux dilué dans du milieu DMEM (% ; v/v) et en ordonnées les pourcentages d'inhibition de pousse calculés à partir des densités optiques mesurées par spectrophotométrie. Le tableau donne les valeurs des pourcentages maximaux d'inhibition obtenus pour les différents temps d'exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux.

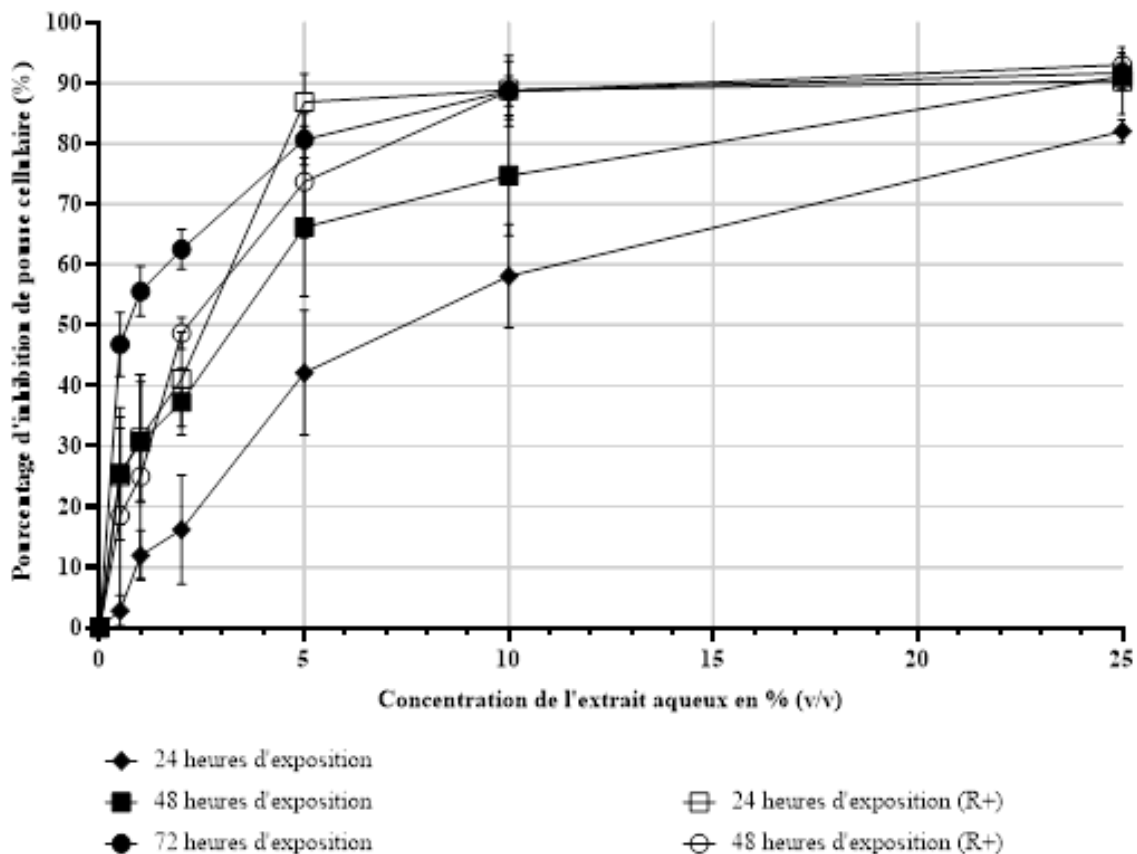


Figure 20. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux.

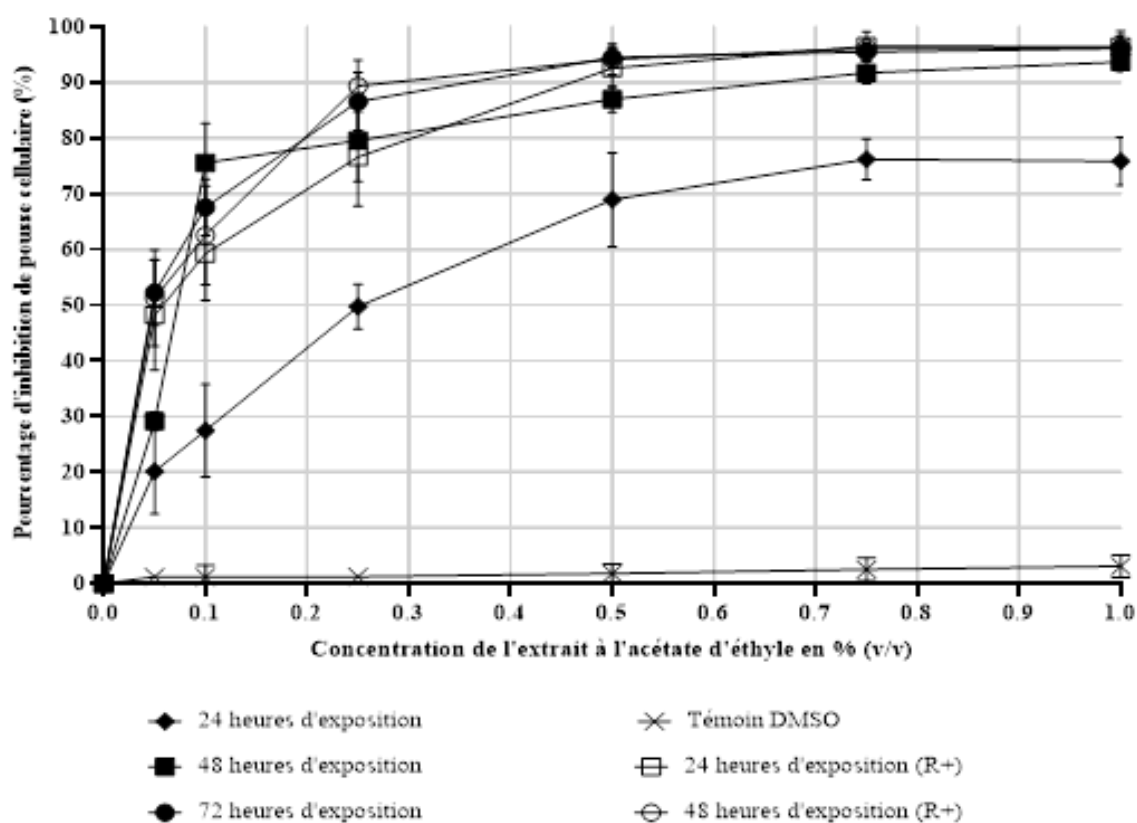
Pour chaque temps d'exposition, on constate une inhibition de la pousse cellulaire avec un effet dose-dépendant : plus on augmente la quantité d'extrait aqueux en présence dans le milieu, plus le pourcentage d'inhibition de la pousse cellulaire augmente. On constate que l'ajout d'un temps de récupération de 24 heures après exposition a tendance à renforcer l'activité cytotoxique : on retrouve des pourcentages maximaux d'inhibition proches après 48 heures d'exposition continues et 24 heures d'exposition suivies de 24 heures de récupération (respectivement 90,1% et 90,4%) d'une part et après 72 heures d'exposition continues et 48 heures d'expositions suivies de 24 heures de récupération (respectivement 93,6% et 93,1%) d'autre part.

b) Extrait à l'acétate d'éthyle

La Figure 21 présente les informations de la même manière que la Figure 19 mais avec les données obtenues après exposition des cellules A549 à l'extrait à l'acétate d'éthyle. La courbe notée « témoin DMSO » sur le graphique présenté en Figure 20 permet d'évaluer l'effet cytotoxique de ce solvant utilisé pour solubiliser l'extrait sec à l'acétate d'éthyle et donc de déduire l'activité propre aux métabolites du Chaga. En effet, le DMSO (généralement utilisé comme solvant ou comme cryopréservant) est connu pour avoir une activité cytotoxique à des concentrations $\geq 10\%$ (v/v).

L'aspect des courbes ainsi que les paramètres calculés indiquent également une cytotoxicité avec un effet dose-dépendant croissant. Pour les temps d'exposition R- de 24, 48 et 72 heures, on note une hausse du pourcentage maximal d'inhibition corrélée à l'augmentation du temps d'exposition. Ceci nous permet d'affirmer que la cytotoxicité est liée à au moins deux paramètres que sont la durée d'exposition et la dose d'extrait aqueux à laquelle sont exposées les cellules de la lignée A549.

Par ailleurs, en comparant les résultats obtenus avec et sans temps de récupération pour des temps d'exposition de 24 et 48 heures, on observe une hausse du pourcentage d'inhibition maximal. Ceci nous indique que l'effet toxique est prolongé au-delà de la seule période d'exposition et est lié à une accumulation intracellulaire des métabolites fongiques et/ou à des mécanismes de mort cellulaire différés (apoptose par exemple).



Temps d'exposition (en heures)	Récupération de 24 heures (R)	Pourcentage maximal d'inhibition
24 h	Non (R-)	75.1%
48 h	Non (R-)	93.7%
72 h	Non (R-)	96.8%
24 h	Oui (R+)	96.5%
48 h	Oui (R+)	95.7%

Figure 21. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules A549 à l'extrait à l'acétate d'éthyle.

4. Analyse de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules de la lignée BEAS-2B

La Figure 22 présente les pourcentages d'inhibition de pousse cellulaire après 24, 48 et 72 heures d'exposition des cellules BEAS-2B à l'extrait aqueux.

Bien que les pourcentages maximaux d'inhibition de pousse cellulaire atteints soient bien inférieurs à ceux obtenus après exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux, on note un effet dose-dépendant et un effet temps-dépendant : l'augmentation du pourcentage maximal d'inhibition est proportionnelle au temps d'exposition et aux concentrations en extrait aqueux utilisées.

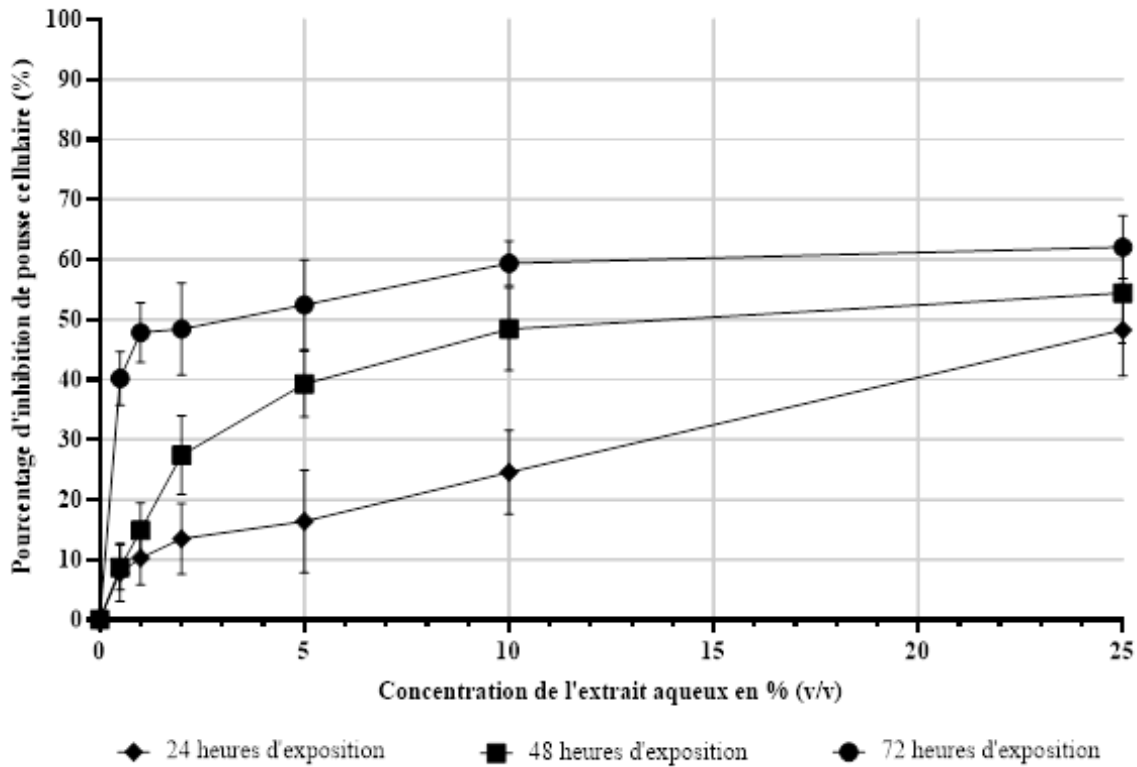


Figure 22. Inhibition de la pousse cellulaire après exposition des cellules BEAS-2B à l'extrait aqueux.

5. Analyse comparative de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules des lignées A549 et BEAS-2B

Pour ces essais de cytotoxicité, nous avons choisi d'utiliser l'extrait aqueux, pour les raisons suivantes :

- La présence de composés connus pour leur activité cytotoxique : l'inotodiol, la bétuline et l'acide bétulinique (74,86,133),
- La présence de composés hydrosolubles à l'origine de propriétés reconnues en médecine traditionnelle,
- L'innocuité de l'eau utilisée en culture cellulaire.

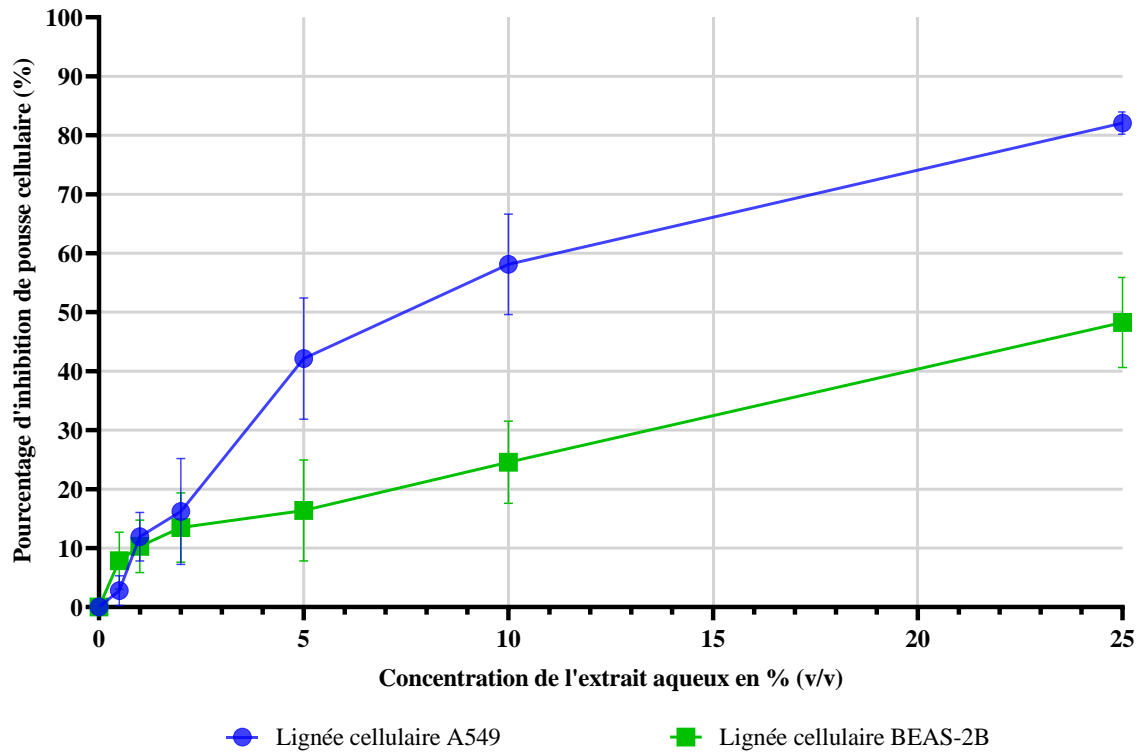


Figure 23. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 24 heures d'exposition à l'extrait aqueux.

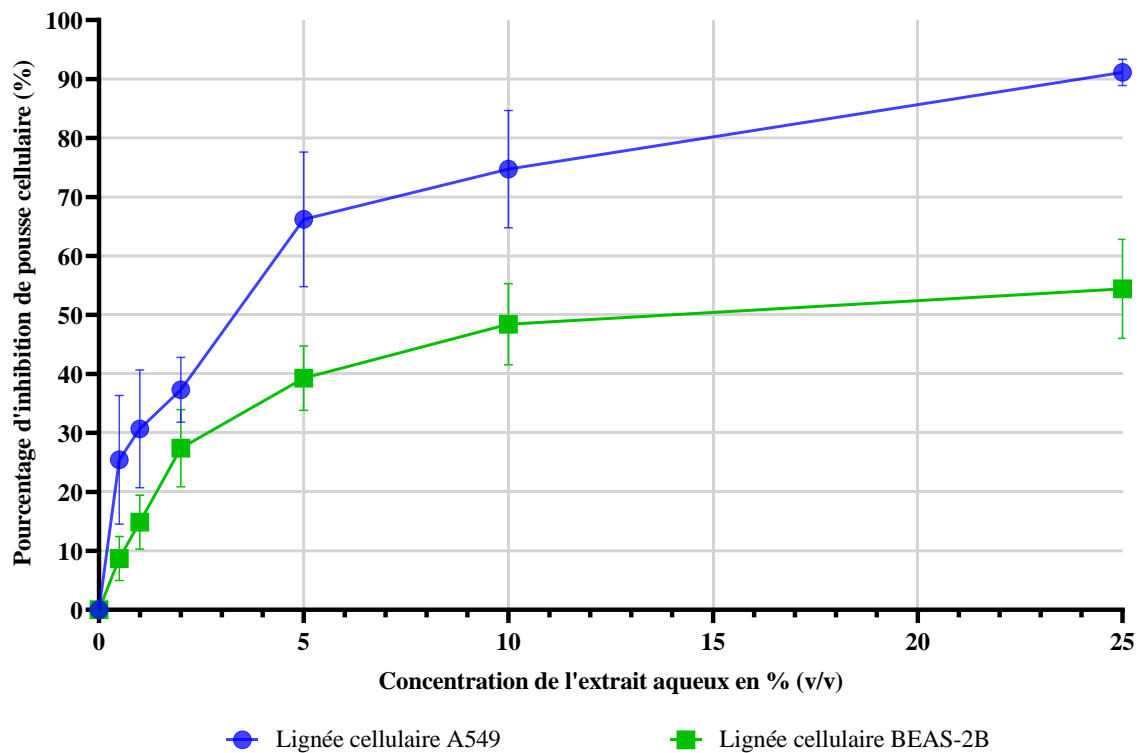


Figure 24. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux.

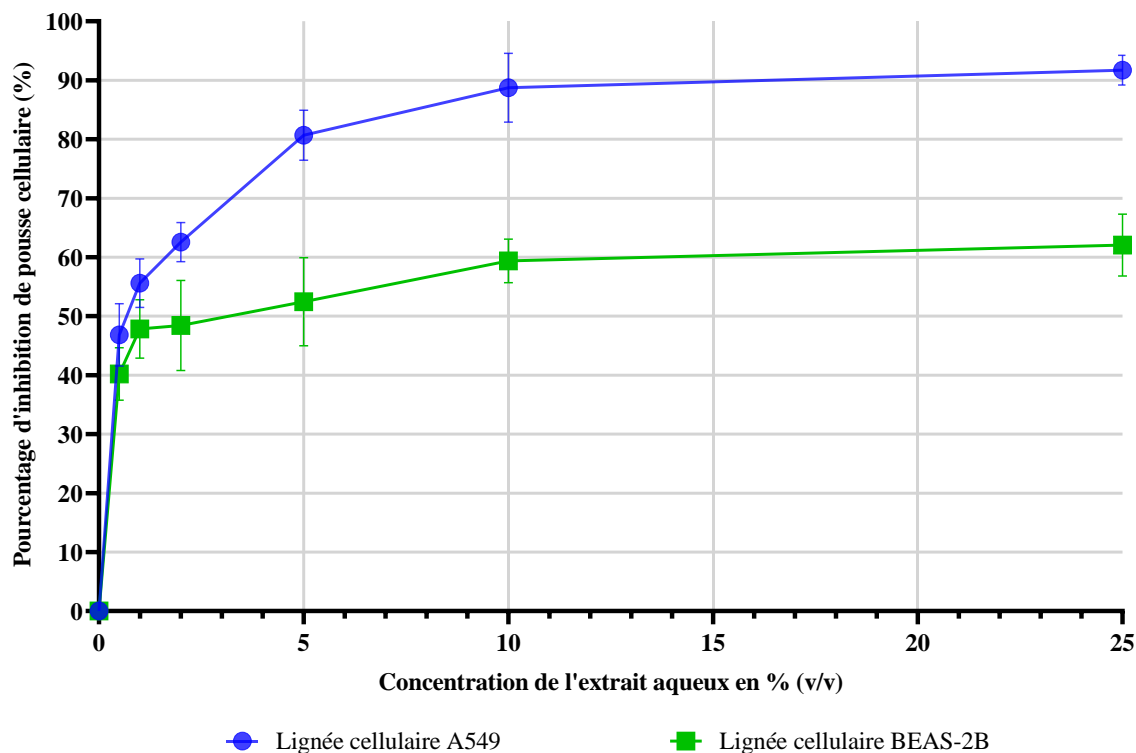


Figure 25. Inhibition de la pousse cellulaire des cellules A549 et BEAS-2B après 72 heures d'exposition à l'extrait aqueux.

La cytotoxicité sur les cellules A549 et BEAS-2B (Figures 23-25) est caractérisée par un effet dose-dépendant et un effet temps-dépendant. Nos résultats ont montré qu'après 48 et 72 heures d'exposition, l'activité cytotoxique était significativement moindre sur les cellules BEAS-2B que sur les cellules A549 ($p = 0,025$ après 48 heures d'exposition et $p = 0,004$ après 72 heures d'exposition). Ces observations soulignent la plus grande sensibilité des cellules hautement prolifératives par rapport aux cellules normales, ce qui pourrait être pris en compte pour des utilisations thérapeutiques.

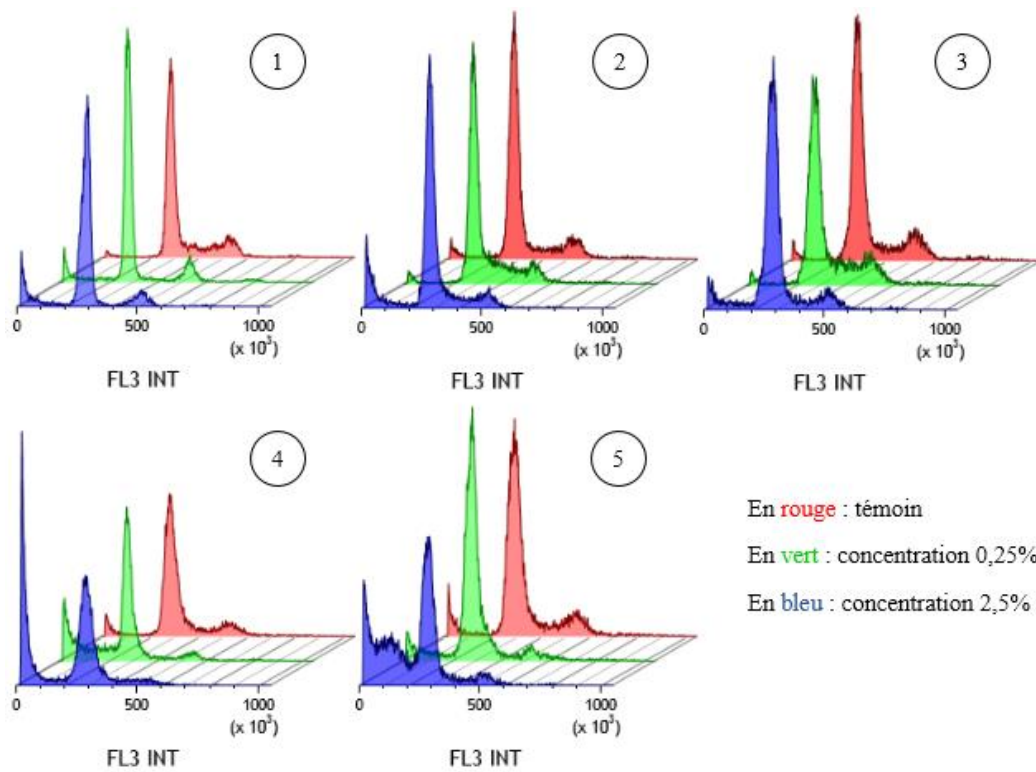
L'activité cytotoxique des extraits de Chaga semble être liée à la diversité de ses métabolites secondaires actifs. Des composés tels que la bétuline et l'acide bétulinique sont connus pour leur activité anticancéreuse (62). Des lanostanes tels que l'inotodiol sont également étudiés pour leurs effets cytotoxiques (134). Ainsi, les composés présents dans l'extrait aqueux pourraient expliquer, du moins en partie, ces effets.

L'extrait aqueux de Chaga a montré une activité antiproliférative sur différents modèles cellulaires. Par exemple, Mazurkiewicz *et al.* (83) ont démontré l'action d'un extrait de Chaga polonais sur des cellules pulmonaires A549 comme dans notre étude. Chung *et al.* (87) ont montré que différentes fractions d'extraits de Chaga russe présentaient une cytotoxicité sur différents modèles cellulaires dont les cellules A549. Ces fractions correspondaient à des

lanostanes dont l'inotodiol. L'étude de Zhao *et al.* (39) montre également l'efficacité de certains lanostanes comme l'inonotsutriol contre les cellules cancéreuses A549.

6. Cytométrie en flux

La Figure 26 donne la répartition des cellules A549 en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent d'une part sous forme de graphe et d'autre part avec les données chiffrées dans le tableau. Les analyses par cytométrie en flux sur le modèle cellulaire A549 ont permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant et temps-dépendant. L'augmentation du pourcentage de cellules dans la zone « Sub-G₁ » en amont de la zone « G₀/G₁ » indique une forte accumulation de débris cellulaires qui signe une activité cytotoxique par altération des cellules. On observe également une diminution marquée du pourcentage de cellules en phase G₂/M ce qui signifie que les cellules qui ne meurent pas stoppent leur cycle cellulaire en phase G₀/G₁. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ a également été rapporté pour l'extrait à l'éthanol sur le modèle cellulaire HT-29 (cellules de cancer du côlon) (107), pour des polysaccharides extraits puis isolés à partir d'une infusion sur des embryons de *Danio rerio* (135) et a été confirmé pour l'extrait aqueux sur les modèles cellulaires HepG2, Hep3B (lignées cellulaires de cancer du foie humain) (136) et B16-F10 (cellules murines de mélanome) (90). De plus, on remarque que l'ajout d'un temps de 24 heures de récupération après exposition à l'extrait diminue la cytotoxicité.



Graphe	Concentration	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ -M	Endoréplication
1	Témoin	2,40%	72,02%	15,02%	8,83%	1,73%
	0,25%	10,73%	72,42%	7,63%	7,20%	2,02%
	2,50%	24,85%	68,85%	3,40%	1,45%	1,45%
2	Témoin	3,40%	65,52%	18,38%	9,88%	2,82%
	0,25%	12,26%	66,12%	14,08%	4,37%	3,17%
	2,50%	25,09%	63,12%	7,50%	3,13%	1,16%
3	Témoin	8,29%	65,83%	15,29%	7,99%	2,60%
	0,25%	17,45%	66,11%	10,33%	4,09%	2,02%
	2,50%	42,38%	46,23%	7,23%	3,09%	1,07%
4	Témoin	5,08%	64,33%	16,30%	11,10%	3,19%
	0,25%	5,20%	66,42%	14,14%	11,06%	3,18%
	2,50%	17,04%	65,38%	10,41%	6,08%	1,09%
5	Témoin	3,60%	66,52%	17,41%	10,04%	2,43%
	0,25%	6,34%	68,34%	13,44%	9,14%	2,74%
	2,50%	15,76%	63,93%	12,92%	6,11%	1,28%

① Temps d'exposition de 24 h ; ② Temps d'exposition de 48 h ; ③ Temps d'exposition de 72 h ; ④ Temps d'exposition de 24 h + 24 h de récupération ; ⑤ Temps d'exposition de 48 h + 24 h de récupération

Figure 26. Impact de l'exposition des cellules A549 à l'extrait aqueux sur le cycle cellulaire.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De par son mode de vie tout à fait singulier et ses nombreuses activités biologiques, *Inonotus obliquus* mérite sa place parmi les champignons remarquables de nos forêts.

Toutefois, son qualificatif « d'or noir » qui lui était autrefois attribué en raison de ses nombreuses indications, semble malheureusement avoir été détourné au profit de sa signification littérale. En effet, comme nous l'avons évoqué, une multitude de sites d'achat en ligne proposent la vente libre de Chaga en profitant de l'engouement de nos populations pour les « alicaments » et autres « nutraceutiques ». Ces sites n'hésitent pas à proposer du Chaga à l'état brut à des prix exorbitants (difficile d'en trouver à moins de 100€ le kilogramme !) et à vanter ses bienfaits à coups d'hyperboles et de références bibliographiques détournées voire inexistantes.

La plupart des sites web faisant la promotion et de la vente de Chaga présentent fréquemment celui-ci avec des phrases telles que : « *Ce champignon millénaire...* » ou encore « *Il y a déjà 4600 ans...* » (137). Or, aucune source à ce jour n'a établi l'utilisation de ce champignon en des temps aussi lointains ; d'autant plus qu'aucun écrit aussi ancien ne nous est parvenu (hormis d'Égypte ou de Mésopotamie, là où le Chaga n'a, encore aujourd'hui, jamais été décrit). Il est probable que le Chaga ait été connu et utilisé dans l'Antiquité, mais aucun document ne relate son utilisation à cette époque.

Ainsi, l'on peut également lire que des morceaux de Chaga auraient été retrouvés sur Ötzi (138), une momie découverte en 1991 dans le glacier Hauslabjoch du massif de l'Ötztal (vallée du Tyrol autrichien). Or, *Inonotus obliquus* n'a jamais été identifié par biologie moléculaire parmi les restes de champignons retrouvés sur cette momie. Seuls les macromycètes *Piptoporus betulinus* (connu pour ses propriétés antibactériennes) et *Fomes fomentarius* (utilisé comme allume-feu) ont pu être clairement identifiés (139).

Il en serait aussi fait mention dans le *Shennong bencao jing* (140), (le plus ancien des textes chinois recensant les drogues animales, végétales et minérales), or *Inonotus obliquus* ne semble pas faire partie des champignons médicinaux y figurant.

Au cours de ces travaux, nous avons même visité certains sites web n'hésitant pas à mettre en avant des propriétés biologiques réelles du Chaga, mais en citant des références d'articles scientifiques traitant d'une parasitose qui n'a pourtant rien à voir : la trypanosomiase américaine aussi appelée maladie de... Chagas (141) !

Malgré toutes les propriétés de ce champignon mises en évidence depuis maintenant plus de 50 ans, il est important de garder l'esprit critique, de savoir raison garder et de distinguer les activités réelles prouvées scientifiquement des arguments de vente fallacieux mis en avant par les revendeurs de produits dérivés d'*Inonotus obliquus*.

Au travers de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le Chaga - découvert en 1999 dans les forêts de Normandie - contient bien de l'inotodiol, de la bétuline et de l'acide bétulinique, tout comme ceux collectés au Canada et en Ukraine, mais notre méthode de quantification a montré qu'outre les aléas liés à son stockage, son conditionnement et sa date de récolte, l'origine géographique du champignon semble bien avoir un impact sur la concentration de ces métabolites.

Les résultats biologiques confirment une activité cytotoxique de l'extrait aqueux du Chaga français sur les cellules de la lignée BEAS-2B mais dans une bien moindre mesure que sur celles de la lignée A549. Ces observations permettent de souligner l'intérêt thérapeutique du Chaga, sa complexité chimique, et la nécessité de poursuivre des études associant les approches chimiques et biologiques pour valoriser son utilisation en mycothérapie. Il semblerait également pertinent de consolider ces résultats en évaluant la cytotoxicité des extraits par d'autres essais (MTT, XTT, dosage de la LDH...) et d'approfondir les mécanismes de cytotoxicité au-delà de la simple étude du cycle cellulaire effectuée ici.

Parmi les pistes intéressantes à explorer, une étude menée suite à nos travaux (Géry F., SIDR) a cherché à comparer les effets cytotoxiques obtenus avec l'extrait aqueux à partir du *totum* et ceux observés avec cinq métabolites fongiques purifiés (acide bétulinique, bétuline, inotodiol, acide traméténolique et lanostérol). Ces travaux ont montré que les composés purifiés avaient des CI_{50} 100 à 1 000 fois supérieures à celles calculées pour l'extrait indiquant donc la présence d'autres molécules ayant une activité cytotoxique majeure ou l'existence de potentiels effets synergiques (addition ou potentialisation) au sein de l'extrait aqueux. Ces observations semblent donc justifier de l'utilisation du Chaga dans son entièreté.

Malgré son utilisation en soin de support dans les traitements anticancéreux conventionnels dans certains pays, aucune étude clinique ne s'est encore intéressée à la rémission ou à la tolérance à ces traitements avec ou sans administration de Chaga (sous quelque forme que ce soit). De tels travaux permettraient de mieux comprendre si ce champignon mérite d'être davantage utilisé dans cette indication ou si les activités décrites chez les patients relèvent de l'effet placebo car la pharmacodynamie et la pharmacocinétique *in vivo* empêchent l'observation des effets observés *in vitro*.

V. VALORISATION SCIENTIFIQUE

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet :

- D'un article publié dans la revue de la Société Française d'Ethnopharmacologie *Ethnopharmacologia* n° 57 - mars 2017
- D'un article publié dans la revue *Integrative Cancer Therapies* - décembre 2017 (Annexe VI)
- D'une conférence auprès de la Société Linnéenne de Normandie aux Archives Départementales de Normandie le mardi 5 juin 2018
- D'un poster présenté lors des Journées Normandes de la Recherche Biomédicale - 20 septembre 2018

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Présentation – ABTE EA4651 [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <http://abte.eu/index.php/presentation/>
2. ToxEMAC – ABTE EA4651 [Internet]. [cité 7 nov 2019]. Disponible sur: <http://abte.eu/index.php/toxemac/>
3. *Inonotus obliquus* [Internet]. [cité 5 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/MB/315905>
4. Ryvarden L, Gilbertson RL. European polypores: Part 1: Abortiporus - Lindtneria. Eur Polypores Part 1 Abort - Lindtneria [Internet]. 1993 [cité 7 nov 2019]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19952305306>
5. Persoon CH. Synopsis methodica fungorum [...] Pars secunda [Internet]. Biodiversity Heritage Library. 1801. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/73611>
6. *Inonotus obliquus* — Wikipédia [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Inonotus_obliquus#Noms_vernaculaires
7. Lee M-W, Hur H, Chang K-C, Lee T-S, Ka K-H, Jankovsky L. Introduction to Distribution and Ecology of Sterile Conks of *Inonotus obliquus*. Mycobiology. déc 2008;36(4):199-202.
8. Blogglistene [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.blogglistene.no/blog/blogger-com/blobthescientist/>
9. JNS_1_2018_svanberg.pdf [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: http://www.jns.org.umu.se/articles/JNS_1_2018_svanberg.pdf
10. Blogglistene [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.blogglistene.no/blog/blogger-com/blobthescientist/>
11. Krieglsteiner GJ, éditeur. Die Großpilze Baden-Württembergs. 1: Allgemeiner Teil, Ständerpilze: Gallert-, Rinden-, Stachel- und Porenpilze / Autor des Bandes 1: German J. Krieglsteiner unter Mitarb. von Armin Kaiser. Stuttgart: Ulmer; 2000. 629 p.
12. Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biologie végétale. Bruxelles: De Boeck; 2014.
13. Reid DA. *Inonotus obliquus* (Pers. ex Fr.) Pilát in Britain. Trans Br Mycol Soc. janv 1976;67(2):329-32.
14. Cha JY, Lee SY, Lee SY, Chun KW. Basidiocarp formation by *Inonotus obliquus* on a living paper birch tree. For Pathol. avr 2011;41(2):163-4.
15. Campbell WA, Davidson RW. A Poria as the Fruiting Stage of the Fungus Causing the Sterile Conks on Birch. Mycologia. sept 1938;30(5):553-60.
16. Zabel RA. Basidiocarp Development in *Inonotus obliquus* and its Inhibition by Stem Treatments. For Sci. 1 déc 1976;22(4):431-7.

17. Rioult J-P. Notes de terrain inédites. 1999.
18. Visualisateur Cartographique [Internet]. [cité 17 févr 2020]. Disponible sur: <https://inpn.mnhn.fr/viewer-carto/especes/43113>
19. Quélet, L. 1888. Flore mycologique de la France et des pays limitrophes. :1-492 [Internet]. [cité 17 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=3497&Fields=All>
20. Артемова А. Береза исцеляющая и омолаживающая. Dilya.
21. (De) La Harpe JF. Abrégé de l'histoire générale des voyages. tome 1. Place of publication not identified: HACHETTE LIVRE BNF; 1825.
22. Saar M. Fungi in Khanty folk medicine. J Ethnopharmacol. févr 1991;31(2):175-9.
23. Sekiba F. A Collection of historical Materials on the Ainu. 1896;3:1-227.
24. Hutchens AR. Indian herbarology of North America. 1st paperback ed. Boston : [New York]: Shambhala ; Distributed in the United States by Random House; 1991. 382 p.
25. Solženicyñ AI, Aucouturier A, Aucouturier M. Le pavillon des cancéreux. Paris: Presses pocket; 2010.
26. Befungin - mode d'emploi, doses, analogues [Internet]. [cité 27 févr 2020]. Disponible sur: <http://fr.remedy-info.com/befungin.html>
27. Global Nutraceuticals Market - Growth, Trends, and Forecast (2017-2022). Mordor Intelligence; 2016 août p. 156.
28. Othman Z. Les compléments alimentaires et allégations de santé, cas particulier des Plantes : études du projet d'arrêté relatif à l'emploi de plantes autres que les champignons dans les compléments alimentaires. Université de Lorraine; 2012.
29. Zou C, Zhang Y-Y, Bai M, Huang X-X, Wang X-B, Song S-J. Aromatic compounds from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. Nat Prod Res. 15 oct 2019;1-4.
30. Zou C-X, Wang X-B, Lv T-M, Hou Z-L, Lin B, Huang X-X, et al. Flavan derivative enantiomers and drimane sesquiterpene lactones from the *Inonotus obliquus* with neuroprotective effects. Bioorganic Chem. mars 2020;96:103588.
31. Alzand KI, Ünal S, Boufaris MSM. Lanostane-Type Triterpenes and Abietane-Type Diterpene from the Sclerotia of Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), and Their Biological Activities. Int J Med Mushrooms. 2018;20(6):507-16.
32. Wold CW, Kjeldsen C, Corthay A, Rise F, Christensen BE, Duus JØ, et al. Structural characterization of bioactive heteropolysaccharides from the medicinal fungus *Inonotus obliquus* (Chaga). Carbohydr Polym. avr 2018;185:27-40.
33. Handa N, Yamada T, Tanaka R. Four new lanostane-type triterpenoids from *Inonotus obliquus*. Phytochem Lett. sept 2012;5(3):480-5.

34. Cole RJ, Schweikert MA, Jarvis BB. Handbook of secondary fungal metabolites. Amsterdam ; Boston: Academic; 2003. 3 p.
35. Kahlos K, Hiltunen R, v. Schantz M. 3 β -Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al, a New Triterpene from *Inonotus obliquus*. Planta Med. avr 1984;50(02):197-8.
36. Bai Y-H, Feng Y-Q, Mao D-B, Xu C-P. Optimization for betulin production from mycelial culture of *Inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity. J Taiwan Inst Chem Eng. sept 2012;43(5):663-9.
37. Yin Y, Cui Y, Ding H. Optimization of betulin extraction process from *Inonotus obliquus* with pulsed electric fields. Innov Food Sci Emerg Technol. juill 2008;9(3):306-10.
38. Fradj, Gonçalves dos Santos, de Montigny, Awwad, Boumghar, Germain, et al. RNA-Seq de Novo Assembly and Differential Transcriptome Analysis of Chaga (*Inonotus obliquus*) Cultured with Different Betulin Sources and the Regulation of Genes Involved in Terpenoid Biosynthesis. Int J Mol Sci. 4 sept 2019;20(18):4334.
39. Zhao F, Mai Q, Ma J, Xu M, Wang X, Cui T, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. Fitoterapia. mars 2015;101:34-40.
40. Chen H-J, Chen Y-S, Liu S-L, Liou B-K, Chen C-S. The Influence of Submerged Fermentation of *Inonotus obliquus* with Control Atmosphere Treatment on Enhancing Bioactive Ingredient Contents. Appl Biochem Biotechnol [Internet]. 25 févr 2020 [cité 27 févr 2020]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-020-03273-2>
41. Crunkhorn S. Birch bark compound combats metabolic syndrome. Nat Rev Drug Discov. mars 2011;10(3):175-175.
42. Radhakrishnan A, Sun L-P, Espenshade PJ, Goldstein JL, Brown MS. The SREBP Pathway. In: Handbook of Cell Signaling [Internet]. Elsevier; 2010 [cité 27 févr 2020]. p. 2505-10. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741455002989>
43. Silva FSG, Oliveira PJ, Duarte MF. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? J Agric Food Chem. 20 avr 2016;64(15):2991-3008.
44. Vinayagam R, Xiao J, Xu B. An insight into anti-diabetic properties of dietary phytochemicals. Phytochem Rev. juin 2017;16(3):535-53.
45. Birgani GA, Ahangarpour A, Khorsandi L, Moghaddam HF. Anti-diabetic effect of betulinic acid on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic male mouse model. Braz J Pharm Sci [Internet]. 26 juill 2018 [cité 9 déc 2021];54(2). Disponible sur: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000200621&lng=en&tlng=en
46. Ding H, Wu X, Pan J, Hu X, Gong D, Zhang G. New Insights into the Inhibition Mechanism of Betulinic Acid on α -Glucosidase. J Agric Food Chem. 11 juill 2018;66(27):7065-75.
47. Wen X, Sun H, Liu J, Cheng K, Zhang P, Zhang L, et al. Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Synthesis, Structure–Activity

- Relationships, and X-ray Crystallographic Studies. *J Med Chem.* 1 juin 2008;51(12):3540-54.
48. Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol.* nov 2008;120(2):272-6.
 49. Kuete V, Wabo GF, Ngameni B, Mbaveng AT, Metuno R, Etoa F-X, et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *J Ethnopharmacol.* oct 2007;114(1):54-60.
 50. Shikov AN, Djachuk GI, Sergeev DV, Pozharitskaya ON, Esaulenko EV, Kosman VM, et al. Birch bark extract as therapy for chronic hepatitis C – A pilot study. *Phytomedicine.* juill 2011;18(10):807-10.
 51. Santos da Silva GN, Monti Atik D, Antunes Fernandes JL, de Freitas do Nascimento D, Fazolo T, Duarte de Souza AP, et al. Synthesis of three triterpene series and their activity against respiratory syncytial virus. *Arch Pharm (Weinheim).* août 2018;351(8):1800108.
 52. Hong E-H, Song JH, Kang KB, Sung SH, Ko H-J, Yang H. Anti-Influenza Activity of Betulinic Acid from *Zizyphus jujuba* on Influenza A/PR/8 Virus. *Biomol Ther.* 31 juill 2015;23(4):345-9.
 53. Karagöz AÇ, Leidenberger M, Hahn F, Hampel F, Friedrich O, Marschall M, et al. Synthesis of new betulinic acid/betulin-derived dimers and hybrids with potent antimalarial and antiviral activities. *Bioorg Med Chem.* janv 2019;27(1):110-5.
 54. Heidary Navid M, Laszczyk-Lauer MN, Reichling J, Schnitzler P. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. *Phytomedicine.* sept 2014;21(11):1273-80.
 55. Baltina LA, Flekhter OB, Nigmatullina LR, Boreko EI, Pavlova NI, Nikolaeva SN, et al. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 20 oct 2003;13(20):3549-52.
 56. Gong Y, Raj K, Luscombe C, Gadawski I, Tam T, Chu J, et al. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.* nov 2004;64(2):127-30.
 57. Schettino MT, Ammaturo FP, Labriola D, De Franciscis P, Colacurci N, Torella M. Betulinic acid and possible influence on the clearance of Human Papilloma Virus: cytological and virological follow-up. *Minerva Ginecol.* déc 2013;65(6):661-8.
 58. Pavlova NI, Savinova OV, Nikolaeva SN, Boreko EI, Flekhter OB. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia.* juill 2003;74(5):489-92.
 59. Li Y, He K, Huang Y, Zheng D, Gao C, Cui L, et al. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinog.* 2010;n/a-n/a.

60. Boryczka S, Bębenek E, Wietrzyk J, Kempieńska K, Jastrzębska M, Kusz J, et al. Synthesis, Structure and Cytotoxic Activity of New Acetylenic Derivatives of Betulin. *Molecules*. 17 avr 2013;18(4):4526-43.
61. Dehelean CA, Feflea S, Molnár J, Zupko I, Soica C. Betulin as an Antitumor Agent Tested *in vitro* on A431, HeLa and MCF7, and as an Angiogenic Inhibitor *in vivo* in the CAM Assay. *Nat Prod Commun*. août 2012;7(8):1934578X1200700.
62. Fulda S, Jeremias I, Debatin K-M. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. oct 2004;23(46):7611-20.
63. Gauthier C, Legault J, Lavoie S, Rondeau S, Tremblay S, Pichette A. Synthesis and Cytotoxicity of Bidesmosidic Betulin and Betulinic Acid Saponins. *J Nat Prod*. 23 janv 2009;72(1):72-81.
64. Gauthier C, Legault J, Lebrun M, Dufour P, Pichette A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem*. oct 2006;14(19):6713-25.
65. Hata K. Anti-leukemia activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene. *Toxicol Lett*. 5 juin 2003;143(1):1-7.
66. Hwang B. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry*. janv 2003;62(2):197-201.
67. Król SK, Kielbus M, Rivero-Müller A, Stepulak A. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1-11.
68. Liu W-K, Ho JCK, Cheung FWK, Liu BPL, Ye W-C, Che C-T. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur J Pharmacol*. sept 2004;498(1-3):71-8.
69. Prakash Chaturvedula VS, Schilling JK, Johnson RK, Kingston DGI. New Cytotoxic Lupane Triterpenoids from the Twigs of *Coussarea paniculata*. *J Nat Prod*. mars 2003;66(3):419-22.
70. Pyo J, Roh S, Kim D, Lee J, Lee Y, Hong S, et al. Anti-Cancer Effect of Betulin on a Human Lung Cancer Cell Line: A Pharmacoproteomic Approach Using 2 D SDS PAGE Coupled with Nano-HPLC Tandem Mass Spectrometry. *Planta Med*. févr 2009;75(02):127-31.
71. Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Juszcak M, Grabarska A, Sifringer M, et al. Betulin Elicits Anti-Cancer Effects in Tumour Primary Cultures and Cell Lines *In Vitro*: ANTI-CANCER EFFECTS OF BETULIN. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. déc 2009;105(6):425-32.
72. Sarek J, Kvasnica M, Urban M, Klinot J, Hajduch M. Correlation of cytotoxic activity of betulinines and their hydroxy analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. oct 2005;15(19):4196-200.
73. Drag M, Surowiak P, Drag-Zalesinska M, Dietel M, Lage H, Oleksyszyn J. Comparison of the Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract, Betulin and Betulinic Acid Towards

- Human Gastric Carcinoma and Pancreatic Carcinoma Drug-sensitive and Drug-Resistant Cell Lines. *Molecules*. 24 avr 2009;14(4):1639-51.
74. Yim N-H, Jung YP, Kim A, Kim T, Ma JY. Induction of apoptotic cell death by betulin in multidrug-resistant human renal carcinoma cells. *Oncol Rep*. août 2015;34(2):1058-64.
 75. Ebeling S, Naumann K, Pollok S, Wardecki T, Vidal-y-Sy S, Nascimento JM, et al. From a Traditional Medicinal Plant to a Rational Drug: Understanding the Clinically Proven Wound Healing Efficacy of Birch Bark Extract. Simon M, éditeur. *PLoS ONE*. 22 janv 2014;9(1):e86147.
 76. Schwieger-Briel A, Kiritsi D, Schempp C, Has C, Schumann H. Betulin-Based Oleogel to Improve Wound Healing in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Prospective Controlled Proof-of-Concept Study. *Dermatol Res Pract*. 2017;2017:1-10.
 77. Scheffler A. The Wound Healing Properties of Betulin from Birch Bark from Bench to Bedside. *Planta Med*. mai 2019;85(07):524-7.
 78. Frew Q, Rennekampff H-O, Dziwulski P, Moiemmen N, Zahn T, Hartmann B. Betulin wound gel accelerated healing of superficial partial thickness burns: Results of a randomized, intra-individually controlled, phase III trial with 12-months follow-up. *Burns*. juin 2019;45(4):876-90.
 79. Kern JS, Schwieger-Briel A, Löwe S, Sumeray M, Davis C, Martinez AE. Oleogel-S10 Phase 3 study “EASE” for epidermolysis bullosa: study design and rationale. *Trials*. déc 2019;20(1):350.
 80. Rastogi S, Pandey MM, Kumar Singh Rawat A. Medicinal plants of the genus *Betula*—Traditional uses and a phytochemical–pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. janv 2015;159:62-83.
 81. Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klätte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol*. août 2010;131(1):33-55.
 82. Marc EB, Nelly A, Annick D-D, Frederic D. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol*. déc 2008;120(3):315-34.
 83. Mazurkiewicz W, Rydel K, Pogocki D, Lemieszek MK, Langner E, Rzeski W. Separation of an aqueous extract *Inonotus obliquus* (Chaga). A novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells. *Acta Pol Pharm*. août 2010;67(4):397-406.
 84. Zhong X, Wang L, Sun D. Effects of inotodiol extracts from *Inonotus obliquus* on proliferation cycle and apoptotic gene of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Chin J Integr Med*. mars 2011;17(3):218-23.
 85. Géry A, Dubreule C, André V, Rioult J-P, Bouchart V, Heutte N, et al. Chaga (*Inonotus obliquus*), a Future Potential Medicinal Fungus in Oncology? A Chemical Study and a Comparison of the Cytotoxicity Against Human Lung Adenocarcinoma Cells (A549)

- and Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Integr Cancer Ther.* sept 2018;17(3):832-43.
86. Zhao L-W, Zhong X-H, Yang S-Y, Zhang Y-Z, Yang N-J. Inotodiol inhibits proliferation and induces apoptosis through modulating expression of cyclinE, p27, bcl-2, and bax in human cervical cancer HeLa cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2014;15(7):3195-9.
 87. Chung MJ, Chung C-K, Jeong Y, Ham S-S. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. *Nutr Res Pract.* 2010;4(3):177.
 88. Chen C, Zheng W, Gao X, Xiang X, Sun D, Wei J, et al. Aqueous Extract of *Inonotus bliquus* (Fr.) Pilat (Hymenochaetaceae) Significantly Inhibits the Growth of Sarcoma 180 by Inducing Apoptosis. *Am J Pharmacol Toxicol.* 1 janv 2007;2(1):10-7.
 89. Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem.* août 2013;139(1-4):503-8.
 90. Youn M-J, Kim J-K, Park S, Kim Y, Park C, Kim ES, et al. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *J Ethnopharmacol.* janv 2009;121(2):221-8.
 91. Lu X, Chen H, Dong P, Fu L, Zhang X. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus*. *J Sci Food Agric.* 30 janv 2010;90(2):276-80.
 92. Choi SY, Hur SJ, An CS, Jeon YH, Jeoung YJ, Bak JP, et al. Anti-Inflammatory Effects of *Inonotus obliquus* in Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1-5.
 93. Xu L, Yu Y, Sang R, Ge B, Wang M, Zhou H, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharide protects against adverse pregnancy caused by *Toxoplasma gondii* infection through regulating Th17/Treg balance via TLR4/NF- κ B pathway. *Int J Biol Macromol.* mars 2020;146:832-40.
 94. Park Y-M, Won J-H, Kim Y-H, Choi J-W, Park H-J, Lee K-T. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol.* 3 oct 2005;101(1-3):120-8.
 95. Won DP, Lee JS, Kwon DS, Lee KE, Shin WC, Hong EK. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*. *Mol Cells.* févr 2011;31(2):165-73.
 96. Burmasova MA, Utebaeva AA, Sysoeva EV, Sysoeva MA. Melanins of *Inonotus obliquus*: Bifidogenic and Antioxidant Properties. *Biomolecules.* 24 juin 2019;9(6):248.
 97. Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Fernandes Â, Barros L, Calhelha RC, et al. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom”. *J Ethnopharmacol.* mars 2015;162:323-32.

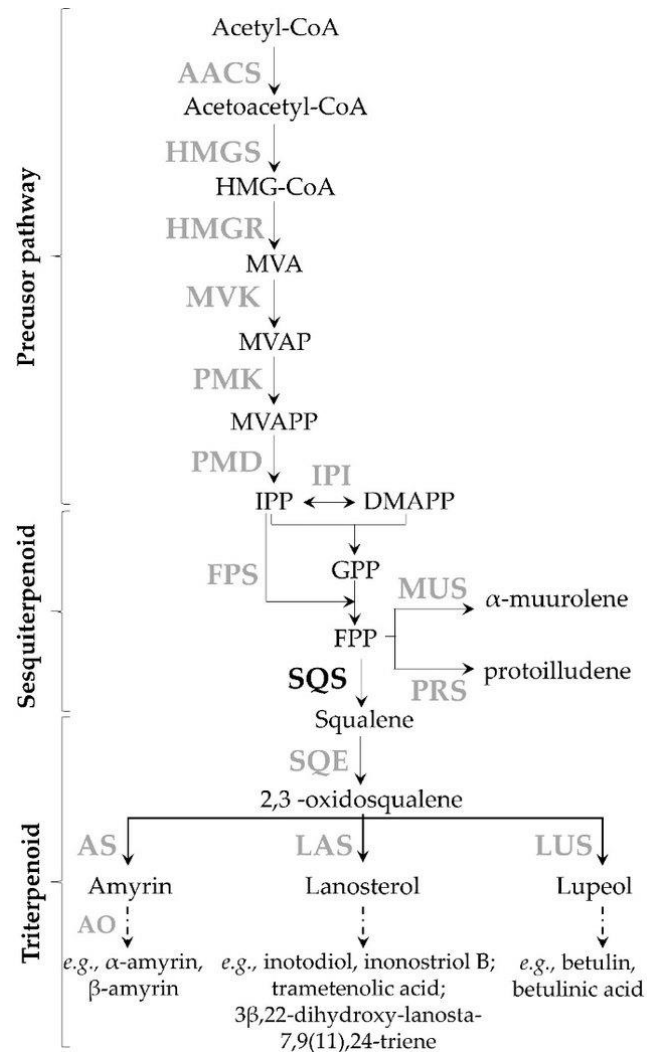
98. Hu Y, Sheng Y, Yu M, Li K, Ren G, Xu X, et al. Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice. *Int J Biol Macromol.* juin 2016;87:348-56.
99. Li Z, Mei J, Jiang L, Geng C, Li Q, Yao X, et al. Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes) Polysaccharides Suppress Tacrine-induced Apoptosis by ROS-scavenging and Mitochondrial Pathway in HepG2 Cells. *Int J Med Mushrooms.* 2019;21(6):583-93.
100. Han Y, Nan S, Fan J, Chen Q, Zhang Y. *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer's disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects. *Int J Biol Macromol.* juin 2019;131:769-78.
101. Gil Y-G, Kang S, Chae A, Kim Y-K, Min D-H, Jang H. Synthesis of porous Pd nanoparticles by therapeutic chaga extract for highly efficient tri-modal cancer treatment. *Nanoscale.* 2018;10(42):19810-7.
102. Ketler A. This Fungus Is Known As “The Mushroom Of Immortality” & “The King Of All Herbs” [Internet]. [cité 1 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.collective-evolution.com/2014/11/18/could-this-fungus-hold-the-key-to-health-longevity-cures/>
103. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* août 2001;36(8):849-65.
104. Mass spectrometry: a textbook. 3rd edition. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
105. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol.* 18 juin 2019;7:147.
106. Morgan DO. Le cycle cellulaire. Bruxelles: De Boeck; 2010.
107. Lee HS, Kim EJ, Kim SH. Ethanol extract of *Innotus obliquus* (Chaga mushroom) induces G₁ cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *Nutr Res Pract.* 2015;9(2):111.
108. Visualisateur Cartographique [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <https://inpn.mnhn.fr/viewer-carto/especes/3611>
109. Rioult J-P. Appel à contribution sur la répartition géographique d'un polypore lié aux nids de pics : *Inonotus obliquus* (Forme imparfaite). févr 2015;206(5).
110. Wiktander U, Olsson O, Nilsson SG. Seasonal variation in home-range size, and habitat area requirement of the lesser spotted woodpecker (*Dendrocopos minor*) in southern Sweden. *Biol Conserv.* août 2001;100(3):387-95.
111. Nowak J. Clé d'identification : Les classes d'hexapodes et les ordres d'insectes.
112. FERRET-BOUIN P. Clé illustrée des Familles de Coléoptères de France. Tome 50.
113. D.-H.-L. F. Faune de la Moselle. Vol. 2.

114. Visualisateur Cartographique [Internet]. [cité 27 mars 2020]. Disponible sur: <https://inpn.mnhn.fr/viewer-carto/especes/224047>
115. *Mucor hiemalis* [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/mb/249401>
116. Jin H, Cho H-H, Kim W-J, Song M, Kim H-S, Ko H-C, et al. Cutaneous *Mucor hiemalis* infection diagnosed by molecular methods. *Int J Dermatol.* déc 2015;54(12):e546-8.
117. *Trichoderma viride* [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/MB/181950>
118. De Miguel D, Gómez P, González R, García-Suárez J, Cuadros JA, Bañas MH, et al. Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 2005;53(1):33-7.
119. Mutschlechner M, Illmer P, Wagner AO. Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*. *Waste Manag.* sept 2015;43:98-107.
120. *Cladosporium cladosporioides* [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/mb/294915>
121. Delanoë A, Heutte N, Gente S, Séguin V, Garon D. Relationships between Exposure to Bioaerosols, Moldy Surface and Symptoms in French Mold-Damaged Homes. *Atmosphere.* 25 févr 2020;11(3):223.
122. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of soil fungi.* London ; New York: Academic Press; 1980. 2 p.
123. *Humicola fuscoatra* [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.mycobank.org/mb/188714>
124. Sutherland ED, Baker KK, Lockwood JL. Ultrastructure of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* oospores parasitized by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra*. *Trans Br Mycol Soc.* juin 1984;82(4):726-9.
125. Wicklow DT, Joshi BK, Gamble WR, Gloer JB, Dowd PF. Antifungal metabolites (monorden, monocillin IV, and cerebrosides) from *Humicola fuscoatra* traanen NRRL 22980, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia. *Appl Environ Microbiol.* nov 1998;64(11):4482-4.
126. Liu C, Zhao C, Pan H-H, Kang J, Yu X-T, Wang H-Q, et al. Chemical Constituents from *Inonotus obliquus* and Their Biological Activities. *J Nat Prod.* 24 janv 2014;77(1):35-41.
127. Nakata T, Yamada T, Taji S, Ohishi H, Wada S-I, Tokuda H, et al. Structure determination of inonotsuoxides A and B and in vivo anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Bioorg Med Chem.* 1 janv 2007;15(1):257-64.
128. Du D, Zhu F, Chen X, Ju X, Feng Y, Qi L-W, et al. Rapid Isolation and Purification of Inotodiol and Trametenolic Acid from *Inonotus obliquus* by High-speed Counter-current

- Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection: Rapid Isolation and Purification of Inotodiol and Trametenolic Acid. *Phytochem Anal.* sept 2011;22(5):419-23.
129. Ríos J-L, Andújar I, Recio M-C, Giner R-M. Lanostanoids from Fungi: A Group of Potential Anticancer Compounds. *J Nat Prod.* 26 nov 2012;75(11):2016-44.
 130. Fan L, Ding S, Ai L, Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydr Polym.* oct 2012;90(2):870-4.
 131. Mazurkiewicz W. Analysis of aqueous extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pol Pharm.* déc 2006;63(6):497-501.
 132. Wang Q, Mu H, Zhang L, Dong D, Zhang W, Duan J. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. *Int J Biol Macromol.* mars 2015;74:507-14.
 133. Foo JB, Saiful Yazan L, Tor YS, Wibowo A, Ismail N, How CW, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. *J Ethnopharmacol.* mai 2015;166:270-8.
 134. Ríos J-L, Andújar I, Recio M-C, Giner R-M. Lanostanoids from Fungi: A Group of Potential Anticancer Compounds. *J Nat Prod.* 26 nov 2012;75(11):2016-44.
 135. Eid JI, Das B. Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to Chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom polysaccharides in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Rep.* déc 2020;10(1):7406.
 136. Youn M-J, Kim J-K, Park S-Y, Kim Y, Kim S-J, Lee J-S, et al. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol.* 28 janv 2008;14(4):511-7.
 137. Morceaux de Chaga sauvage [Internet]. Sunday Natural Products. [cité 7 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.sunday.fr/champignon-chaga-morceau-sauvage-cru.html>
 138. Chaga : quelles sont ses propriétés ? | Hn Lab - Le spécialiste de la Sève de Bouleau [Internet]. [cité 7 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.hn-lab.com/chaga-proprietes/>
 139. Peintner U, Pöder R, Pümpel T. The iceman's fungi. *Mycol Res.* oct 1998;102(10):1153-62.
 140. Berevolk T. L'Histoire du Chaga [Internet]. Berevolk. 2017 [cité 7 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.berevolk.com/news/lhistoire-du-chaga/>
 141. Mosca W, Castés M, Ojeda A, El Homsí A. Evaluation of the interaction of leucocytes from Chagas disease patients with trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* janv 1986;80(6):975-7.

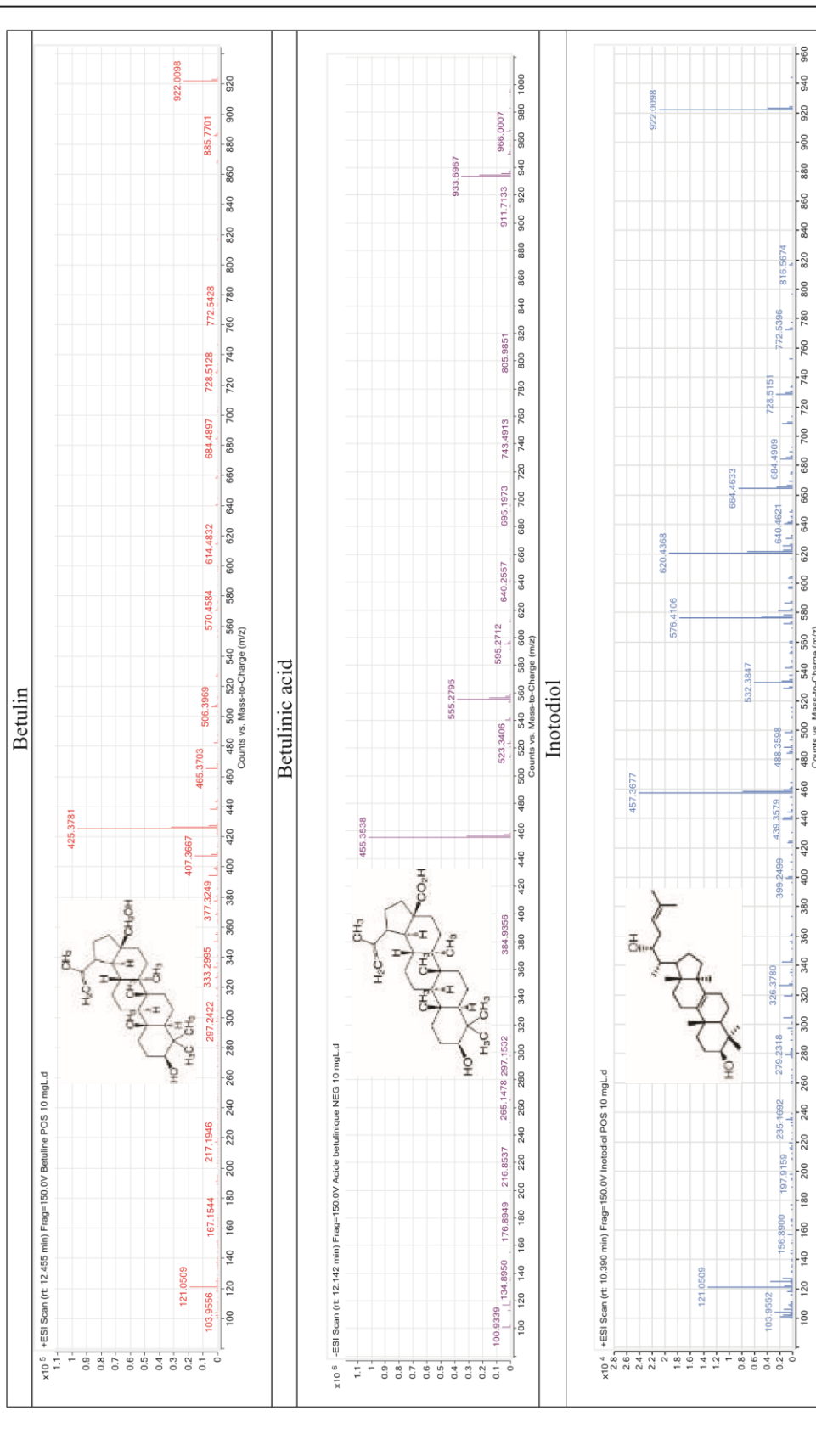
ANNEXES

ANNEXE I – Proposition de voie de biosynthèse des lanostérols (38)



ANNEXE II (85) – Spectrogrammes et chromatogrammes obtenus par HPLC-ESI-QTOF MS/MS

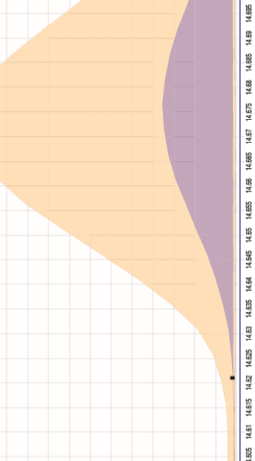
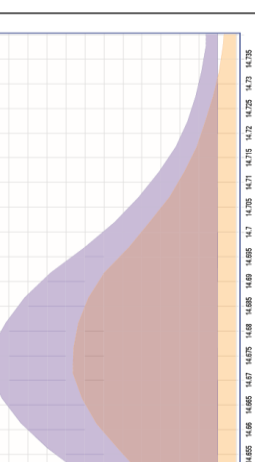
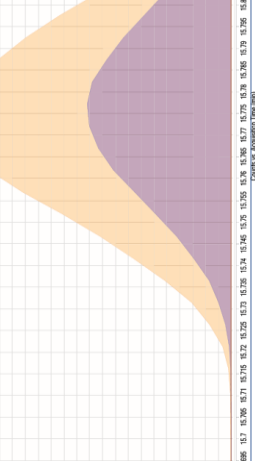
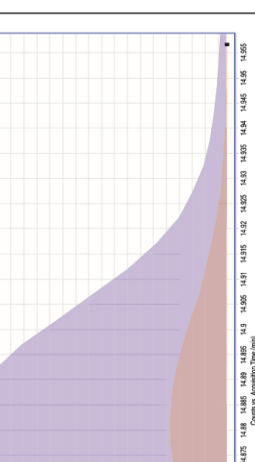


A



(continued)

	Cyclohexane extract	Ethyl acetate extract
Betulin		
Betulinic acid		
Inotodiol		

(continued)

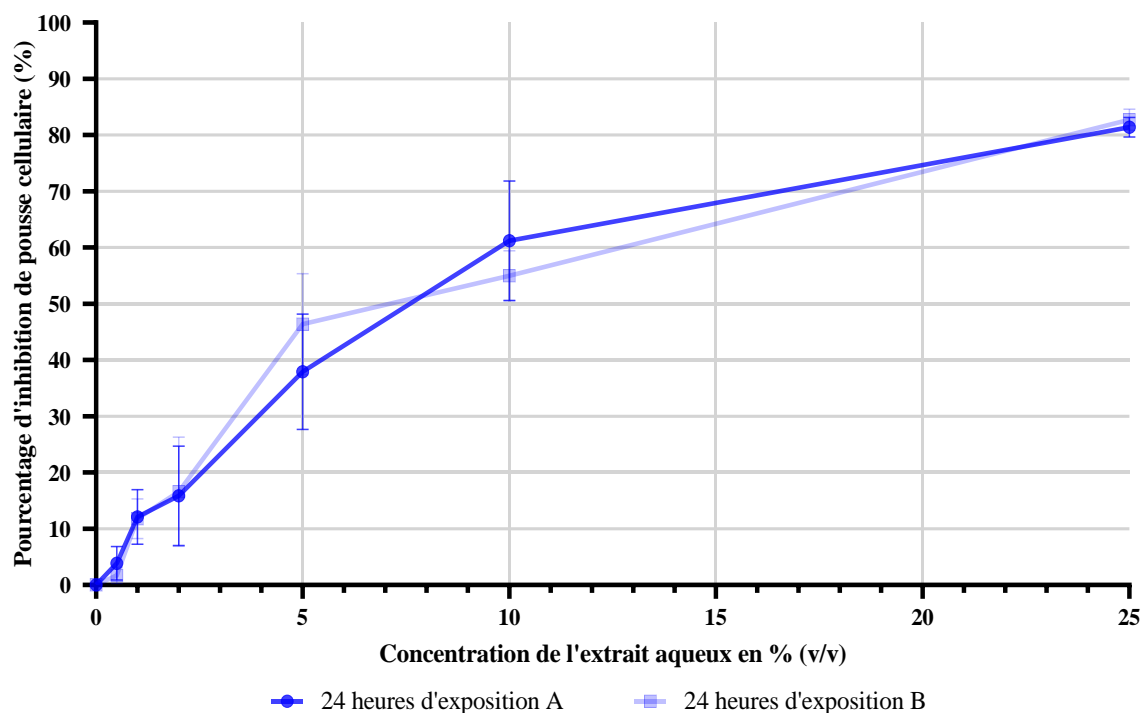
	Cyclohexane extract	Ethyl acetate extract
Betulin	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>
Betulinic acid	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>
Inotodiol	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>	 <p>Top 3 peaks: 14.85 min (99.99%), 14.86 min (0.01%), 14.87 min (0.00%)</p>

ANNEXE III – Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules A549 exposées à l'extrait aqueux

24h d'exposition (A)										
Témoin		Concentration	Extrait							
0.298	0.311	0.50%	0.315	0.338	0.328	0.311	0.339	0.335	0.328	0.327
0.409	0.322	1%	0.279	0.333	0.305	0.294	0.292	0.311	0.291	0.292
0.215	0.451	2%	0.339	0.283	0.272	0.322	0.256	0.283	0.287	0.252
0.384	0.566	5%	0.218	0.216	0.215	0.174	0.236	0.194	0.275	0.165
0.218	0.339	10%	0.199	0.126	0.105	0.177	0.100	0.114	0.108	0.128
0.308	0.269	25%	0.065	0.068	0.053	0.069	0.068	0.067	0.060	0.057

24h d'exposition (B)										
Témoin		Concentration	Extrait							
1.607	1.793	0.50%	1.705	1.662	1.664	1.706	1.712	1.693	1.715	1.656
1.707	1.729	1%	1.484	1.655	1.515	1.503	1.520	1.497	1.449	1.504
1.758	1.741	2%	1.218	1.329	1.669	1.439	1.301	1.514	1.340	1.656
1.635	1.647	5%	0.786	0.983	0.852	0.988	0.934	0.653	1.023	1.152
1.728	1.891	10%	0.874	0.724	0.679	0.662	0.789	0.836	0.799	0.822
1.647	1.737	25%	0.282	0.270	0.364	0.267	0.307	0.304	0.312	0.272

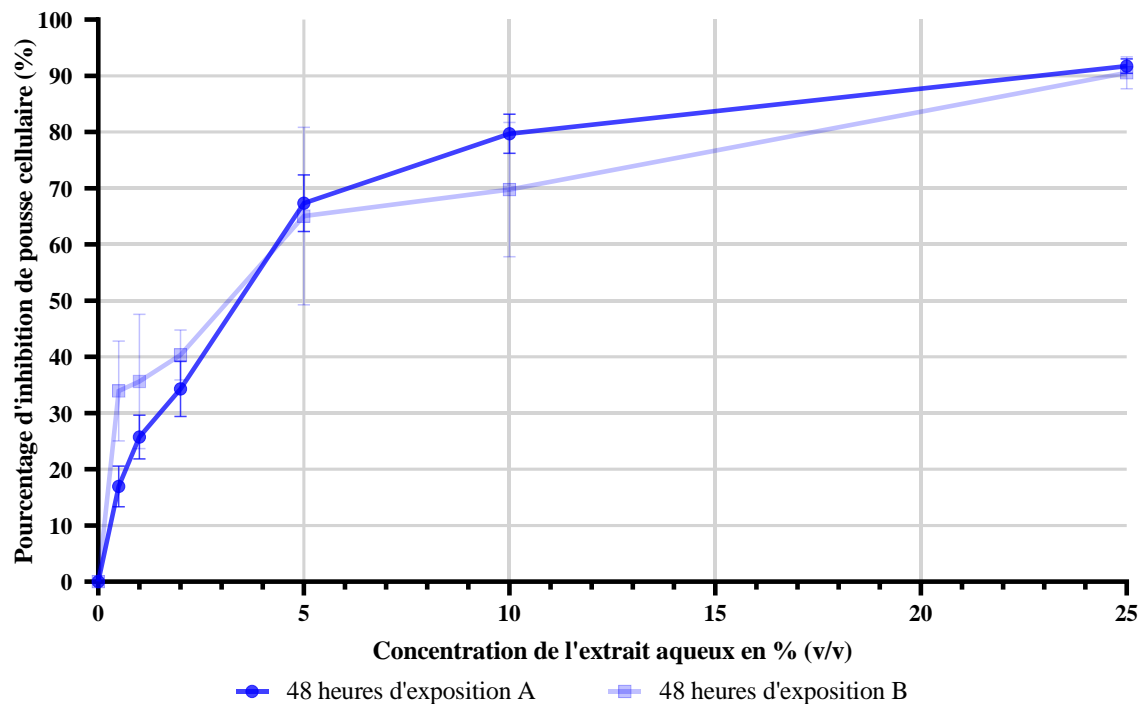
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 24 heures d'exposition à l'extrait aqueux



48h d'exposition (A)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
0.894	0.926	0.50%	0.731	0.728	0.702	0.752	0.716	0.765	0.681	0.677
0.852	0.871	1%	0.679	0.678	0.603	0.683	0.652	0.619	0.607	0.625
0.899	0.824	2%	0.574	0.521	0.525	0.535	0.594	0.622	0.550	0.629
0.831	0.901	5%	0.272	0.297	0.243	0.365	0.233	0.251	0.282	0.318
0.932	0.847	10%	0.168	0.159	0.192	0.111	0.202	0.200	0.191	0.184
0.764	0.851	25%	0.088	0.087	0.070	0.065	0.057	0.071	0.061	0.074

48h d'exposition (B)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
2.045	1.988	0.50%	1.378	1.111	1.280	1.113	1.614	1.431	1.498	1.253
2.008	2.008	1%	1.334	0.881	1.036	1.270	1.588	1.557	1.329	1.409
2.102	2.048	2%	1.217	1.136	1.131	1.179	1.201	1.132	1.246	1.403
1.939	1.985	5%	0.721	0.470	0.643	0.616	0.521	0.573	0.626	1.474
2.001	2.063	10%	0.470	0.397	0.435	0.591	0.701	0.571	0.559	1.159
2.089	1.968	25%	0.184	0.283	0.205	0.125	0.244	0.150	0.215	0.120

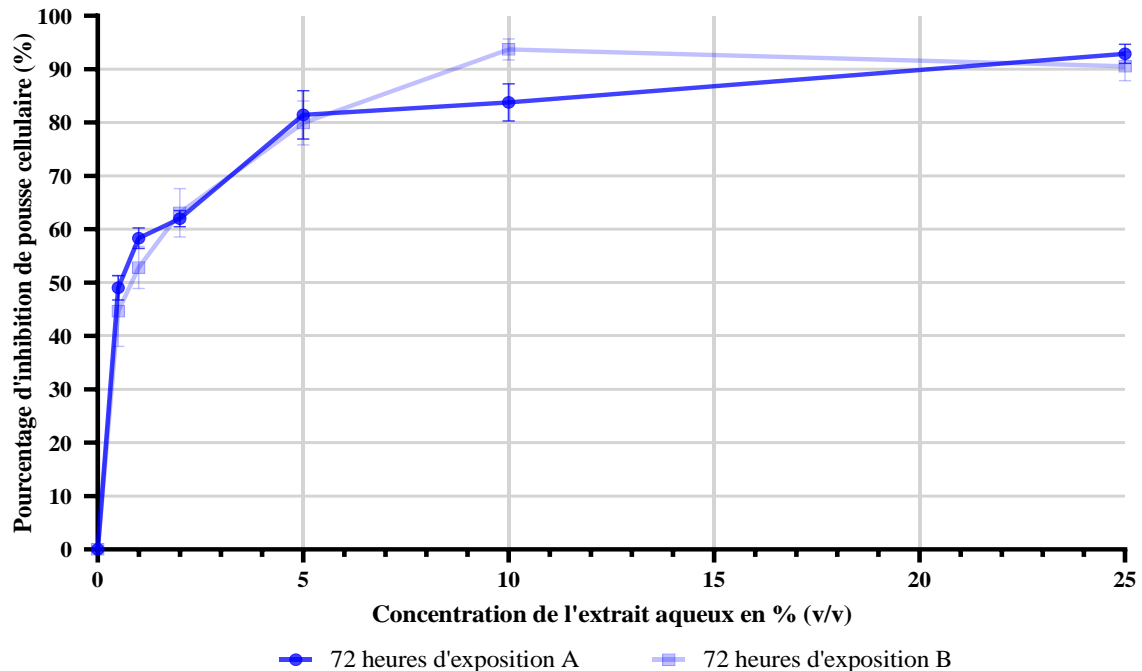
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux



72h d'exposition (A)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
2.427	2.376		0.50%	1.218	1.300	1.195	1.258	1.186	1.178	1.118
2.390	2.381	1%	0.975	0.987	1.047	1.005	1.011	0.918	1.032	0.933
2.381	2.412	2%	0.929	0.917	0.907	0.893	0.921	0.937	0.884	0.824
2.311	2.342	5%	0.287	0.423	0.343	0.360	0.483	0.598	0.555	0.472
2.347	2.379	10%	0.448	0.468	0.200	0.406	0.399	0.424	0.388	0.349
2.343	2.378	25%	0.120	0.184	0.179	0.118	0.229	0.124	0.193	0.204

72h d'exposition (B)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
2.291	2.280		0.50%	1.219	1.359	0.968	1.124	1.381	1.339	1.374
2.289	2.292	1%	0.952	1.038	1.161	1.166	1.152	1.160	0.981	1.018
2.294	2.281	2%	0.944	0.965	0.828	0.788	0.785	0.976	0.764	0.703
2.275	2.278	5%	0.365	0.438	0.279	0.477	0.519	0.520	0.526	0.548
2.281	2.290	10%	0.136	0.117	0.126	0.121	0.175	0.244	0.115	0.119
2.292	2.304	25%	0.206	0.250	0.109	0.226	0.301	0.202	0.274	0.159

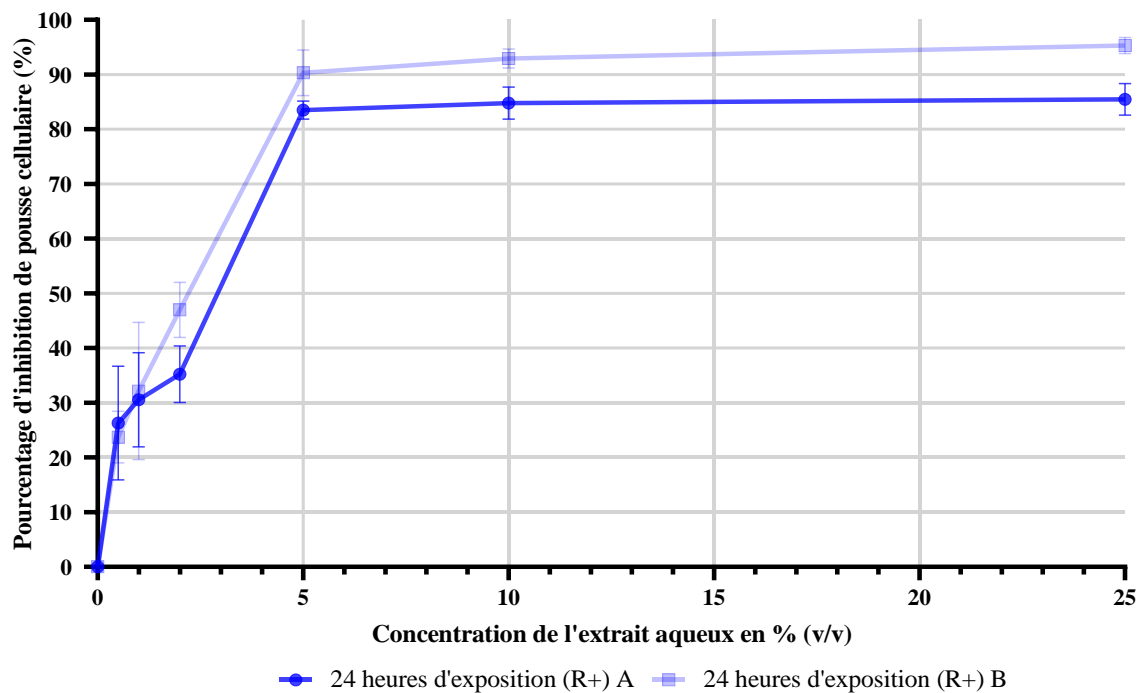
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549
après 72 heures d'exposition à l'extrait aqueux



24h d'exposition + 24h de récupération (A)											
Témoïn		Concentration	Extrait								
1.640	1.636	0.50%	1.223	1.106	1.046	1.134	1.098	1.485	1.401	1.445	
1.684	1.717	1%	1.245	1.012	1.013	1.043	1.110	1.368	1.343	1.232	
1.797	1.738	2%	1.066	0.962	1.075	1.001	1.085	1.215	1.184	1.147	
1.526	1.396	5%	0.254	0.313	0.244	0.324	0.263	0.282	0.279	0.268	
1.668	1.771	10%	0.356	0.267	0.228	0.286	0.273	0.207	0.218	0.219	
1.856	1.796	25%	0.244	0.178	0.276	0.343	0.242	0.217	0.245	0.216	

24h d'exposition + 24h de récupération (B)											
Témoïn		Concentration	Extrait								
0.937	1.134	0.50%	0.686	0.662	0.728	0.782	0.759	0.760	0.781	0.779	
1.024	1.064	1%	0.614	0.608	0.878	0.705	0.745	0.690	0.478	0.565	
1.048	1.000	2%	0.626	0.500	0.463	0.536	0.512	0.508	0.489	0.495	
0.757	0.794	5%	0.153	0.086	0.086	0.106	0.153	0.054	0.053	0.063	
1.313	0.895	10%	0.064	0.053	0.065	0.061	0.059	0.071	0.108	0.070	
0.809	0.904	25%	0.046	0.044	0.043	0.048	0.075	0.047	0.023	0.038	

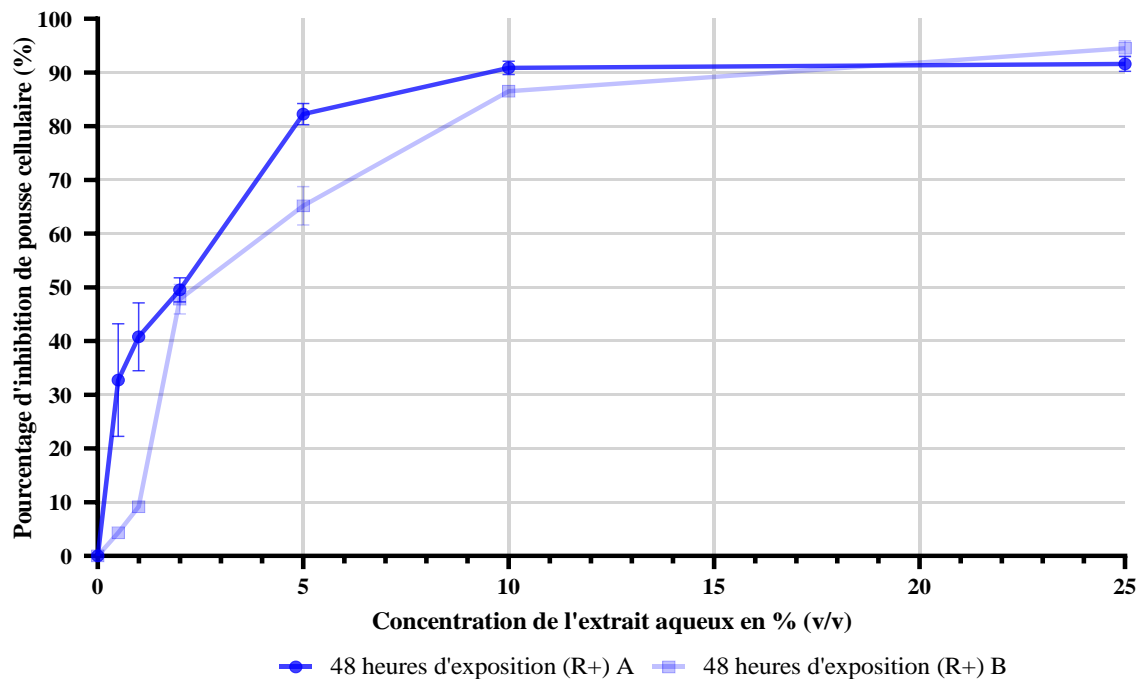
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 24 heures d'exposition à l'extrait aqueux puis 24 heures de récupération



48h d'exposition + 24h de récupération (A)											
Témoins		Concentration	Extrait								
1.817	1.829	0.50%	0.923	1.135	1.305	1.349	1.496	1.346	1.480	1.537	
1.824	1.832	1%	0.928	1.071	1.163	1.098	1.262	1.276	1.230	1.278	
1.951	1.906	2%	0.949	1.017	0.944	1.008	0.950	0.980	1.014	1.070	
2.098	2.097	5%	0.341	0.345	0.357	0.301	0.409	0.388	0.358	0.292	
2.076	2.081	10%	0.148	0.199	0.164	0.171	0.161	0.172	0.202	0.218	
1.981	2.090	25%	0.187	0.207	0.151	0.133	0.179	0.180	0.137	0.146	

48h d'exposition + 24h de récupération (B)											
Témoins		Concentration	Extrait								
2.711	2.696	0.50%	2.575	2.599	2.588	2.567	2.587	2.591	2.572	2.577	
2.698	2.711	1%	2.468	2.472	2.451	2.441	2.449	2.452	2.431	2.442	
2.667	2.699	2%	1.404	1.584	1.416	1.396	1.400	1.364	1.365	1.343	
2.691	2.690	5%	1.069	0.976	0.864	1.084	0.912	0.860	0.928	0.825	
2.693	2.702	10%	0.406	0.396	0.368	0.333	0.360	0.366	0.342	0.342	
2.719	2.705	25%	0.136	0.131	0.145	0.206	0.137	0.201	0.100	0.127	

Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux puis 24 heures de récupération

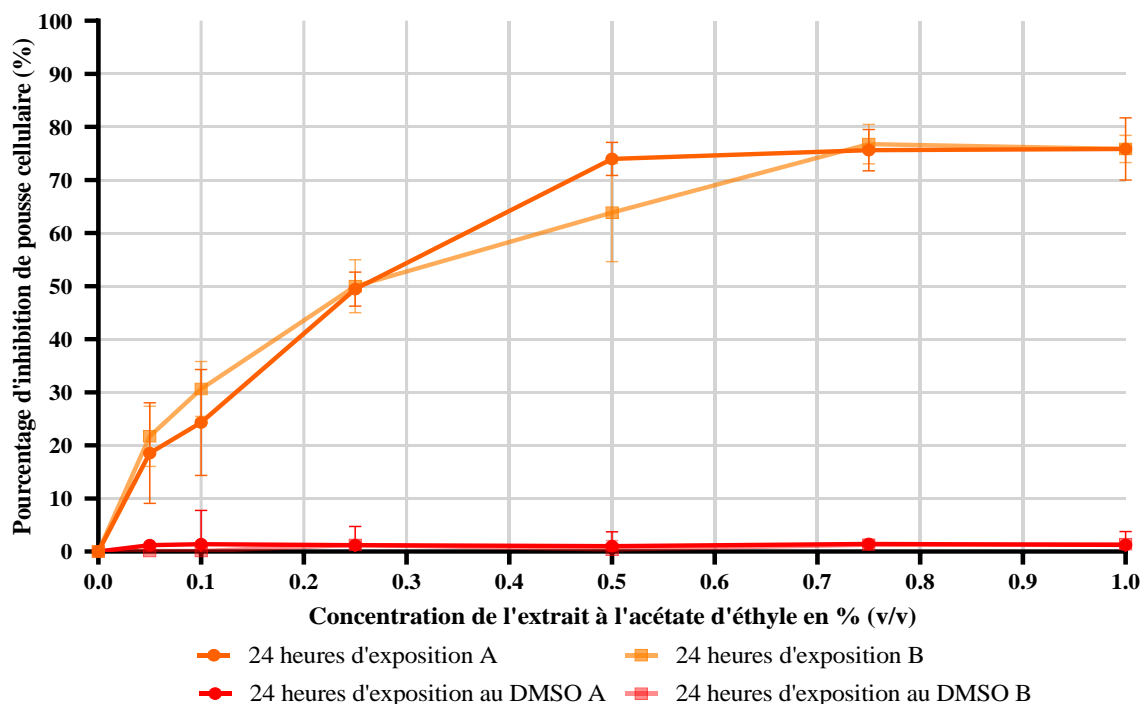


ANNEXE IV – Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules A549 exposées à l'extrait à l'acétate d'éthyle

24h d'exposition (A)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.820	1.773	1.752	1.761	0.05% (22.5 µg/mL)		1.326	1.320	1.716	1.478	1.560	1.287
1.706	1.763	1.833	1.673	0.1% (45 µg/mL)		1.231	1.165	1.407	1.604	1.477	1.190
1.853	1.796	1.801	1.712	0.25% (112.5 µg/mL)		0.820	0.858	0.985	0.925	0.888	0.916
1.819	1.590	1.794	1.726	0.5% (225 µg/mL)		0.400	0.410	0.480	0.545	0.444	0.496
1.779	1.771	1.758	1.747	0.75% (337.5 µg/mL)		0.439	0.335	0.487	0.530	0.388	0.422
1.926	1.739	1.787	1.724	1% (450 µg/mL)		0.369	0.371	0.314	0.571	0.405	0.544

24h d'exposition (B)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
0.715	0.733	0.706	0.711	0.05% (22.5 µg/mL)		0.582	0.540	0.605	0.532	0.495	0.579
0.729	0.775	0.707	0.710	0.1% (45 µg/mL)		0.533	0.450	0.492	0.453	0.534	0.490
0.735	0.744	0.697	0.704	0.25% (112.5 µg/mL)		0.356	0.310	0.341	0.409	0.332	0.380
0.745	0.704	0.715	0.698	0.5% (225 µg/mL)		0.157	0.227	0.237	0.260	0.324	0.333
0.616	0.656	0.697	0.703	0.75% (337.5 µg/mL)		0.177	0.157	0.178	0.203	0.131	0.142
0.697	0.664	0.704	0.695	1% (450 µg/mL)		0.198	0.164	0.161	0.190	0.153	0.162

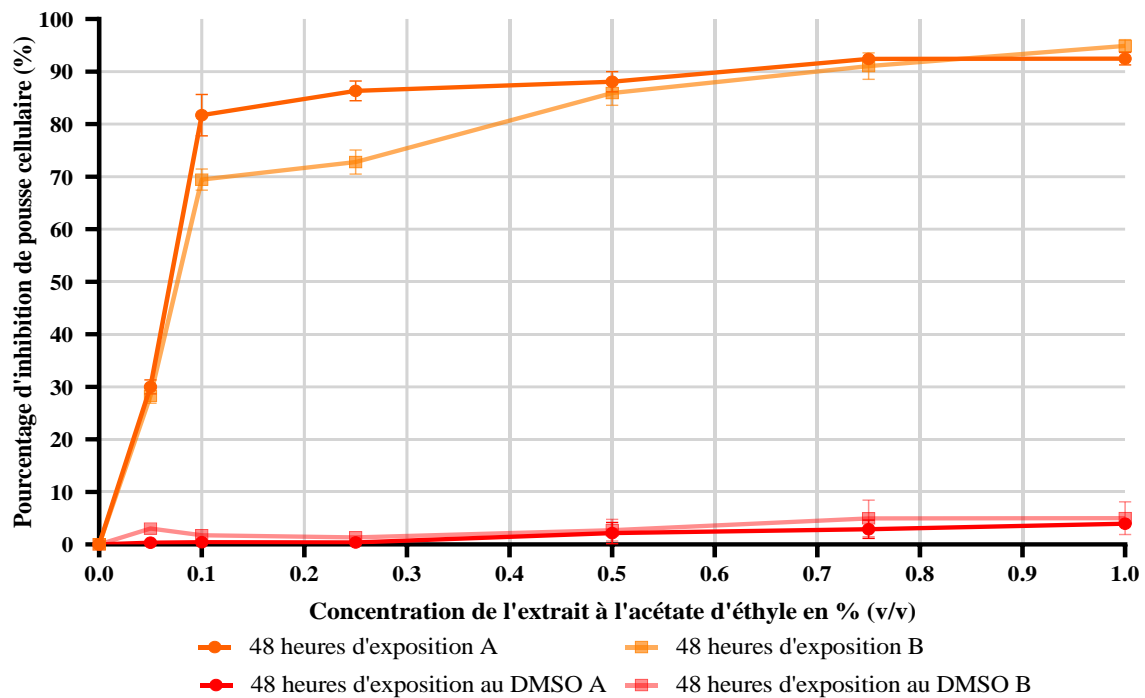
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 24 heures d'exposition à l'extrait à l'acétate d'éthyle



48h d'exposition (A)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.053	1.048	1.006	1.017	0.05% (22.5 µg/mL)		0.720	0.698	0.730	0.717	0.694	0.709
1.023	1.036	1.008	1.012	0.1% (45 µg/mL)		0.218	0.152	0.207	0.239	0.155	0.145
1.013	1.046	1.002	1.013	0.25% (112.5 µg/mL)		0.147	0.142	0.137	0.168	0.110	0.128
1.041	1.006	1.004	1.007	0.5% (225 µg/mL)		0.133	0.088	0.144	0.123	0.127	0.112
0.928	0.960	1.016	1.006	0.75% (337.5 µg/mL)		0.083	0.068	0.083	0.092	0.069	0.067
1.007	1.037	0.993	0.996	1% (450 µg/mL)		0.074	0.061	0.093	0.088	0.066	0.077

48h d'exposition (B)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
2.545	2.511	2.456	2.493	0.05% (22.5 µg/mL)		1.847	1.764	1.829	1.763	1.836	1.810
2.526	2.524	2.484	2.437	0.1% (45 µg/mL)		0.741	0.776	0.842	0.813	0.753	0.699
2.525	2.517	2.489	2.434	0.25% (112.5 µg/mL)		0.634	0.712	0.709	0.601	0.703	0.758
2.509	2.500	2.435	2.435	0.5% (225 µg/mL)		0.453	0.365	0.306	0.380	0.338	0.289
2.513	2.502	2.410	2.429	0.75% (337.5 µg/mL)		0.303	0.181	0.200	0.292	0.239	0.140
2.551	2.534	2.402	2.401	1% (450 µg/mL)		0.186	0.103	0.117	0.117	0.113	0.134

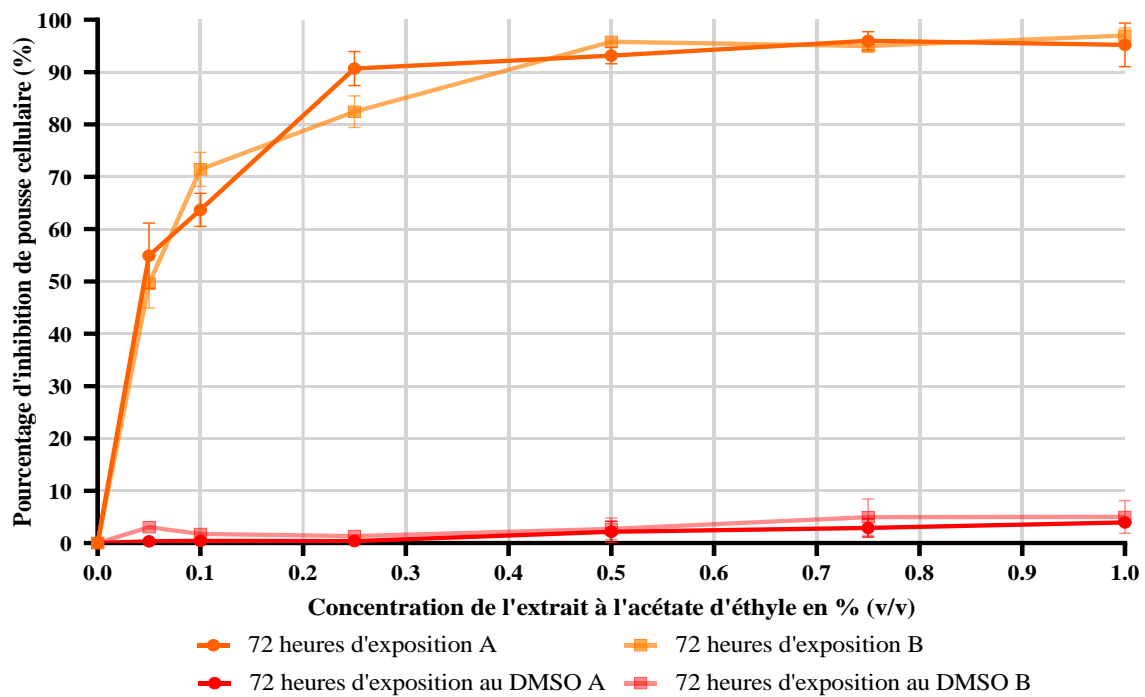
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 48 heures d'exposition à l'extrait à l'acétate d'éthyle



72h d'exposition (A)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.994	2.008	1.996	1.987	0.05% (22.5 µg/mL)		1.046	0.828	0.701	0.894	0.937	0.999
2.003	2.016	1.988	1.992	0.1% (45 µg/mL)		0.807	0.646	0.737	0.769	0.655	0.743
1.973	2.046	1.989	1.993	0.25% (112.5 µg/mL)		0.117	0.156	0.129	0.248	0.190	0.278
1.981	2.004	1.984	1.927	0.5% (225 µg/mL)		0.102	0.185	0.104	0.143	0.137	0.152
2.038	1.960	1.966	1.916	0.75% (337.5 µg/mL)		0.114	0.059	0.067	0.125	0.083	0.033
1.977	1.985	1.933	1.906	1% (450 µg/mL)		0.253	0.022	0.064	0.102	0.096	0.034

72h d'exposition (B)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
2.449	2.401	2.302	2.299	0.05% (22.5 µg/mL)		1.002	1.248	1.166	1.323	1.254	1.184
2.297	2.405	2.315	2.348	0.1% (45 µg/mL)		0.724	0.621	0.624	0.691	0.805	0.603
2.315	2.437	2.351	2.331	0.25% (112.5 µg/mL)		0.548	0.328	0.402	0.386	0.427	0.411
2.301	2.359	2.273	2.343	0.5% (225 µg/mL)		0.106	0.098	0.092	0.080	0.078	0.139
2.371	2.321	2.314	2.197	0.75% (337.5 µg/mL)		0.131	0.095	0.167	0.104	0.093	0.126
2.450	2.368	2.202	2.306	1% (450 µg/mL)		0.041	0.072	0.068	0.062	0.047	0.139

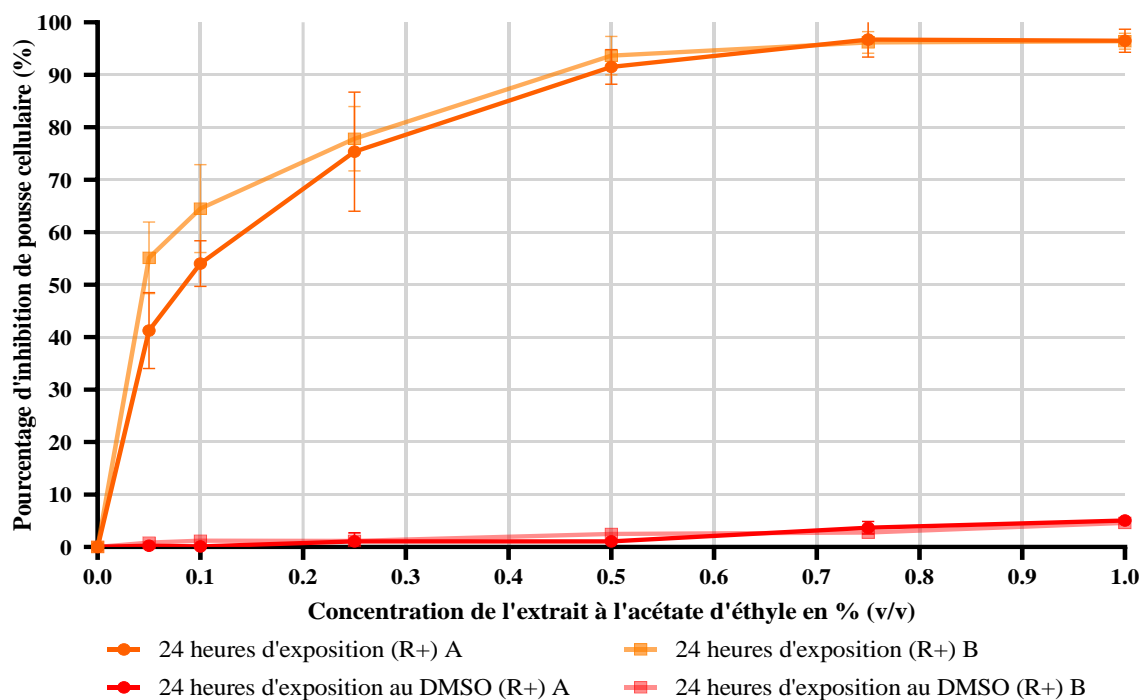
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 72 heures d'exposition à l'extrait à l'acétate d'éthyle



24h d'exposition + 24h de récupération (A)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.662	1.707	1.602	1.586	0.05% (22.5 µg/mL)		1.024	0.903	1.101	0.972	0.836	0.799
1.582	1.656	1.599	1.594	0.1% (45 µg/mL)		0.743	0.615	0.698	0.752	0.797	0.802
1.467	1.495	1.600	1.562	0.25% (112.5 µg/mL)		0.683	0.197	0.457	0.210	0.358	0.456
1.692	1.703	1.585	1.577	0.5% (225 µg/mL)		0.097	0.106	0.203	0.086	0.122	0.201
1.538	1.479	1.553	1.526	0.75% (337.5 µg/mL)		0.019	0.082	0.053	0.144	0.005	0.010
1.571	1.624	1.522	1.513	1% (450 µg/mL)		0.051	0.073	0.092	0.013	0.016	0.092

24h d'exposition + 24h de récupération (B)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
2.106	2.304	2.186	2.201	0.05% (22.5 µg/mL)		0.998	1.001	0.856	0.792	1.201	1.105
2.346	2.229	2.196	2.175	0.1% (45 µg/mL)		0.447	0.941	0.816	0.897	0.903	0.706
2.003	2.211	2.208	2.164	0.25% (112.5 µg/mL)		0.669	0.440	0.605	0.329	0.539	0.361
2.215	2.269	2.160	2.153	0.5% (225 µg/mL)		0.141	0.068	0.021	0.180	0.205	0.226
2.253	2.146	2.157	2.145	0.75% (337.5 µg/mL)		0.096	0.047	0.142	0.063	0.028	0.130
2.214	2.247	2.109	2.111	1% (450 µg/mL)		0.116	0.027	0.068	0.109	0.065	0.093

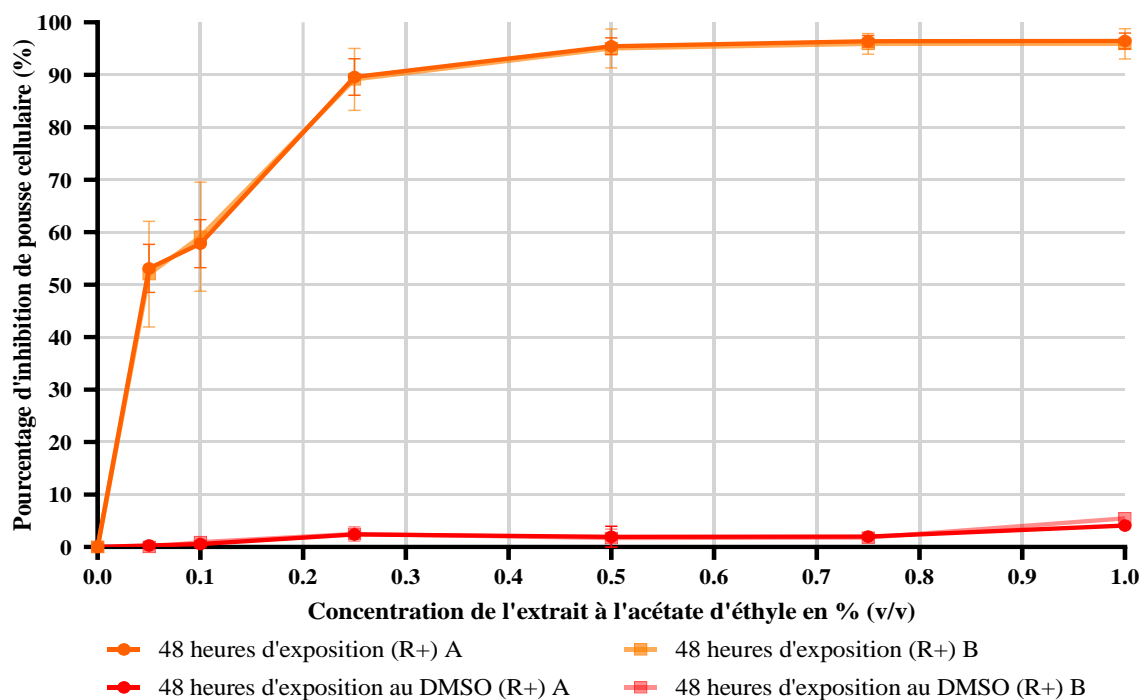
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 24 heures d'exposition à l'extrait à l'acétate d'éthyle puis 24 heures de récupération



48h d'exposition + 24h de récupération (A)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.612	1.992	1.848	1.863	0.05% (22.5 µg/mL)		0.982	0.943	0.917	0.775	0.808	0.811
2.071	1.601	1.854	1.847	0.1% (45 µg/mL)		0.665	0.866	0.832	0.797	0.854	0.693
1.579	1.655	1.812	1.821	0.25% (112.5 µg/mL)		0.186	0.141	0.253	0.143	0.146	0.292
2.048	1.918	1.798	1.851	0.5% (225 µg/mL)		0.073	0.094	0.036	0.125	0.102	0.076
1.915	1.959	1.835	1.812	0.75% (337.5 µg/mL)		0.094	0.037	0.073	0.059	0.081	0.057
2.057	1.924	1.774	1.795	1% (450 µg/mL)		0.091	0.078	0.038	0.023	0.087	0.078

48h d'exposition + 24h de récupération (B)											
Témoin		Témoin DMSO		Concentration		Extrait					
1.856	1.830	1.823	1.835	0.05% (22.5 µg/mL)		1.031	0.768	1.050	0.604	1.026	0.787
1.778	1.979	1.807	1.818	0.1% (45 µg/mL)		0.739	0.660	0.700	0.722	0.552	1.112
1.946	2.130	1.766	1.802	0.25% (112.5 µg/mL)		0.104	0.098	0.153	0.226	0.225	0.389
1.721	1.835	1.776	1.820	0.5% (225 µg/mL)		0.028	0.035	0.067	0.064	0.161	0.189
1.642	1.941	1.793	1.799	0.75% (337.5 µg/mL)		0.082	0.094	0.117	0.057	0.088	0.013
1.605	1.688	1.719	1.740	1% (450 µg/mL)		0.038	0.069	0.051	0.180	0.066	0.044

Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée A549 après 48 heures d'exposition à l'extrait à l'acétate d'éthyle puis 24 heures de récupération

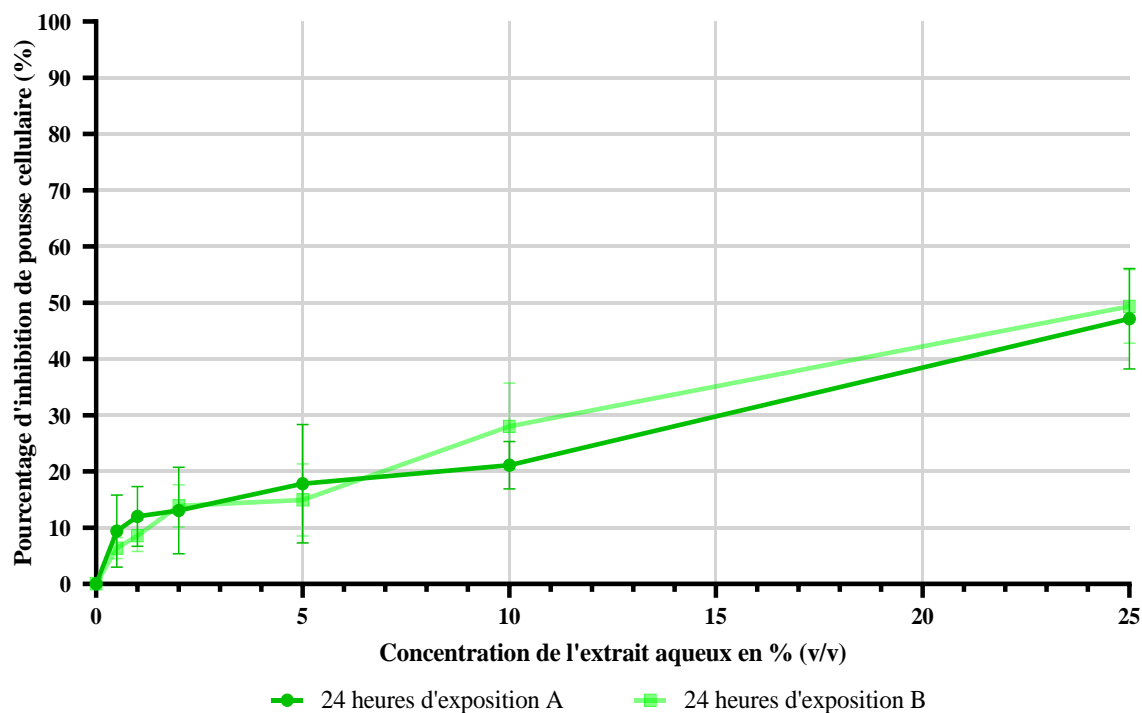


ANNEXE V - Résultats bruts (densités optiques) et graphiques obtenus pour les tests de cytotoxicité sur microplaque des cellules BEAS-2B exposées à l'extrait aqueux

24h d'exposition (A)										
Témoin		Concentration	Extrait							
1.203	1.231		0.50%	1.127	1.228	0.993	1.192	1.129	1.041	1.087
1.486	1.238	1%	1.031	1.041	1.038	1.214	1.110	1.140	1.109	1.036
1.220	1.224	2%	1.156	1.213	1.070	1.009	0.923	1.162	1.063	1.020
1.210	1.278	5%	1.069	0.980	0.857	0.991	1.112	0.820	1.189	1.123
1.206	1.206	10%	0.996	0.971	0.994	0.930	0.931	0.912	1.068	1.014
1.264	1.098	25%	0.538	0.659	0.561	0.797	0.784	0.743	0.519	0.634

24h d'exposition (B)										
Témoin		Concentration	Extrait							
1.766	1.764		0.50%	1.726	1.647	1.665	1.706	1.682	1.698	1.745
1.578	1.997	1%	1.625	1.644	1.668	1.577	1.677	1.742	1.664	1.606
1.936	1.829	2%	1.565	1.444	1.551	1.567	1.671	1.485	1.561	1.591
1.933	1.751	5%	1.655	1.483	1.574	1.547	1.419	1.334	1.623	1.651
1.774	1.769	10%	1.106	1.451	1.469	1.258	1.303	1.102	1.349	1.359
1.882	1.687	25%	0.730	0.952	0.954	0.767	0.995	0.875	0.953	1.087

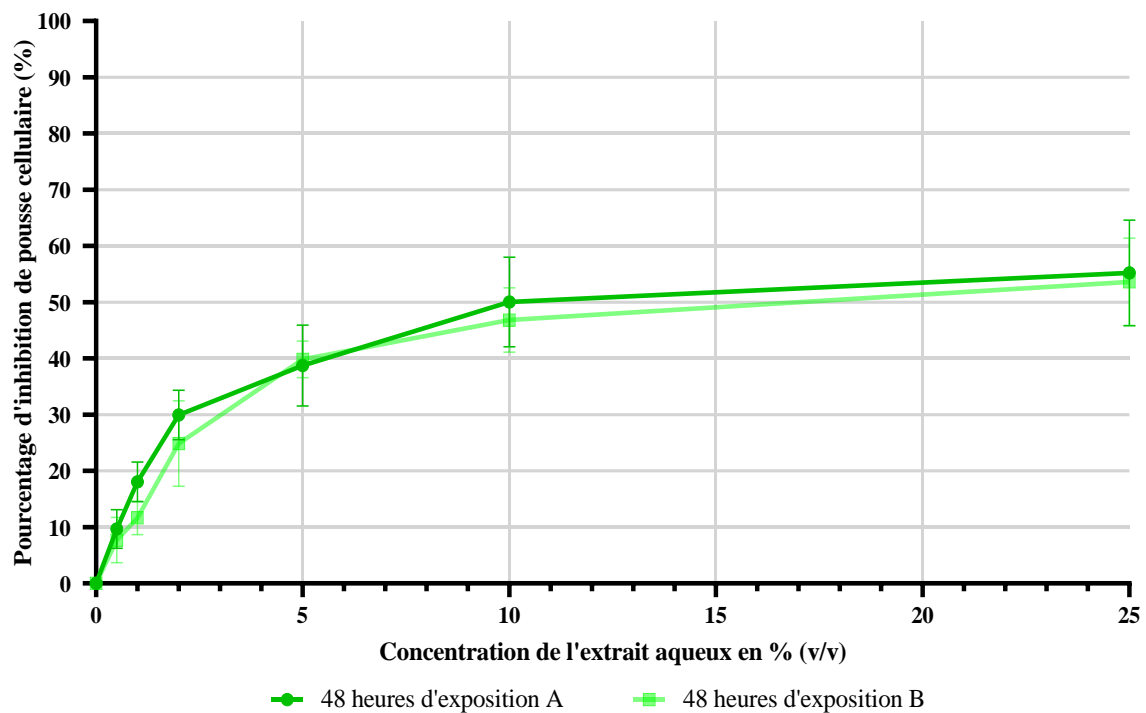
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée BEAS-2B après 24 heures d'exposition à l'extrait aqueux



48h d'exposition (A)											
Témoins		Concentration	Extrait								
1.726	1.647		0.50%	1.142	1.162	1.178	1.145	1.090	1.197	1.099	1.079
1.625	1.644	1%	0.999	1.079	0.982	1.041	1.065	0.961	1.070	1.051	
1.565	1.444	2%	0.878	0.886	0.835	0.900	0.902	0.993	0.846	0.812	
1.655	1.483	5%	0.667	0.783	0.735	0.680	0.871	0.928	0.780	0.721	
1.106	1.451	10%	0.774	0.775	0.570	0.573	0.568	0.647	0.498	0.623	
0.730	0.952	25%	0.453	0.441	0.649	0.749	0.591	0.600	0.408	0.615	

48h d'exposition (B)											
Témoins		Concentration	Extrait								
1.795	1.847		0.50%	1.446	1.475	1.570	1.591	1.477	1.429	1.599	1.511
1.707	1.728	1%	1.501	1.473	1.388	1.418	1.401	1.418	1.522	1.459	
1.299	1.636	2%	1.117	1.353	1.369	1.342	1.107	1.318	1.157	1.084	
1.795	1.238	5%	0.962	1.067	0.961	0.972	0.949	0.911	1.053	1.011	
1.880	1.301	10%	0.832	0.950	0.842	0.994	0.729	0.801	0.979	0.840	
1.736	1.697	25%	0.709	0.652	0.968	0.584	0.875	0.693	0.752	0.847	

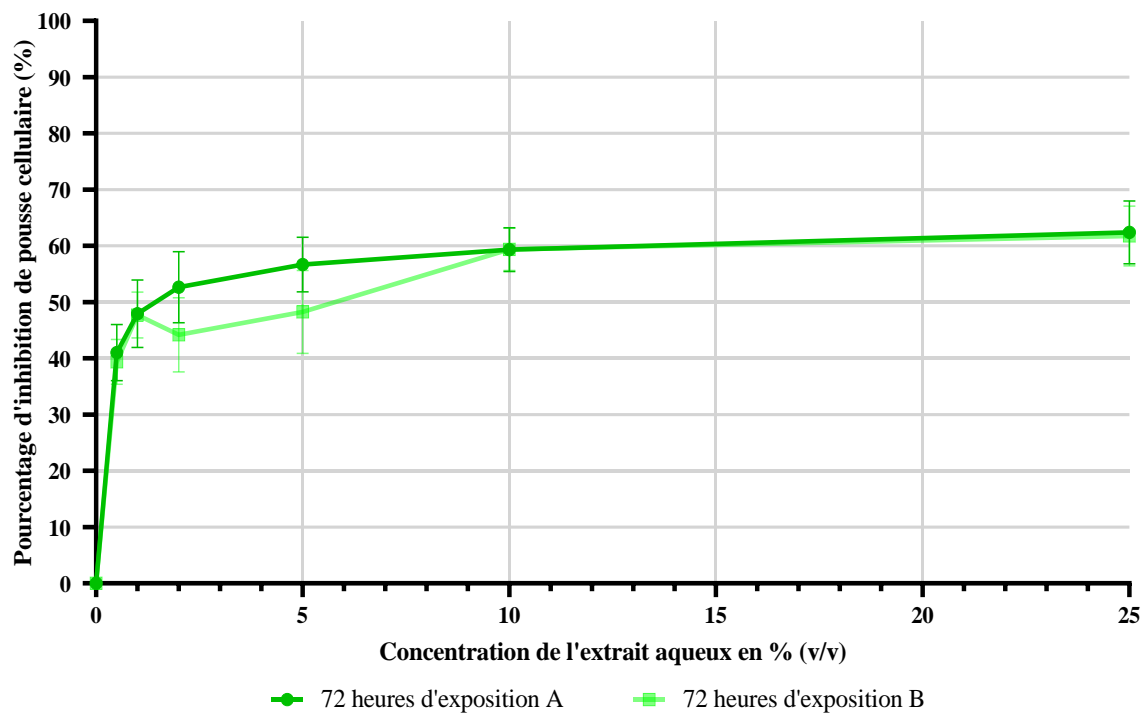
Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée BEAS-2B après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux



72h d'exposition (A)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
1.537	1.471	0.50%	0.868	0.925	0.769	0.959	0.801	0.909	0.908	0.991
1.438	1.500	1%	0.759	0.779	0.746	0.984	0.691	0.844	0.738	0.749
1.560	1.636	2%	0.612	0.845	0.854	0.739	0.728	0.607	0.657	0.680
1.491	1.401	5%	0.575	0.589	0.651	0.736	0.610	0.744	0.738	0.595
1.663	1.494	10%	0.618	0.545	0.588	0.585	0.709	0.665	0.659	0.547
1.486	1.454	25%	0.572	0.620	0.640	0.497	0.522	0.489	0.717	0.489

72h d'exposition (B)										
Témoïn		Concentration	Extrait							
2.088	2.004	0.50%	1.137	1.223	1.267	1.079	1.266	1.084	1.189	1.117
1.963	1.748	1%	0.978	0.988	1.046	1.051	0.976	0.909	1.170	0.962
1.879	1.952	2%	1.053	1.157	1.095	0.976	0.965	1.216	0.902	1.261
1.828	2.011	5%	0.898	1.139	1.114	1.084	0.842	1.180	0.842	0.897
2.043	1.809	10%	0.735	0.738	0.740	0.846	0.906	0.831	0.685	0.791
2.099	1.749	25%	0.652	0.806	0.784	0.643	0.587	0.877	0.831	0.727

Inhibition de la pousse cellulaire de cellules de la lignée BEAS-2B après 72 heures d'exposition à l'extrait aqueux





Research Article

Chaga (*Inonotus obliquus*), a Future Potential Medicinal Fungus in Oncology? A Chemical Study and a Comparison of the Cytotoxicity Against Human Lung Adenocarcinoma Cells (A549) and Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B)

Integrative Cancer Therapies
1–12
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1534735418757912
journals.sagepub.com/home/ict

Antoine Géry, PharmD¹, Christelle Dubreule, MSc²,
Véronique André, PharmD, PhD¹, Jean-Philippe Rioult, PharmD, PhD¹,
Valérie Bouchart, PhD², Natacha Heutte, PhD³,
Philippe Eldin de Pécoulas, PharmD, PhD¹,
Tetyana Krivomaz, PhD⁴, and David Garon, PharmD, PhD¹

Abstract

Background: *Inonotus obliquus*, also known as Chaga, is a parasitic fungus growing on birches and used in traditional medicine (especially by Khanty people) to treat various health problems. In this study, we aimed to quantify the 3 metabolites frequently cited in literature, that is, betulin, betulinic acid, and inotodiol in the Chaga recently discovered in forests located in Normandy (France), and to compare their concentrations with Ukrainian and Canadian Chaga. This study also explores the cytotoxicity of the French Chaga against cancer-derived cells and transformed cells. **Methods:** A quantification method by HPLC-MS-MS (high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry) of betulin, betulinic acid, and inotodiol was developed to study the French Chaga and compare the concentration of these metabolites with extracts provided from Chaga growing in Canada and Ukraine. This method was also used to identify and quantify those 3 compounds in other traditional preparations of Chaga (aqueous extract, infusion, and decoction). Among these preparations, the aqueous extract that contains betulin, betulinic acid, and inotodiol was chosen to evaluate and compare its cytotoxic activity toward human lung adenocarcinoma cells (A549 line) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B line). **Results:** French Chaga contains betulin and betulinic acid at higher levels than in other Chaga, whereas the concentration of inotodiol is greater in the Canadian Chaga. Moreover, the results highlighted a cytotoxic activity of the Chaga's aqueous extract after 48 and 72 hours of exposure with a higher effect on cancer-derived cells A549 than on normal transformed cells BEAS-2B ($P = 0.025$ after 48 hours of exposure and $P = 0.004$ after 72 hours of exposure).

Keywords

Inonotus obliquus, cytotoxicity, cancer, chromatography, betulin, betulinic acid, inotodiol, quantification, traditional medicine

Submitted August 23, 2017; revised November 8, 2017; accepted December 18, 2017

Introduction

Inonotus obliquus is a parasitic *Polyporus* from the Hymenochetaceae family. This fungus infects hardwood trees, mostly those from the genus *Betula* (birches), and to a lesser extent, those from the genera *Quercus* (oaks), *Populus* (poplars), *Alnus* (alders), *Fagus* (ashes), and *Acer* (maples).¹

It was first identified and described by Persoon² (1801), who named it *Boletus obliquus*. Then, it was renamed

¹Normandie University, UNICAEN, Centre F. Baclesse, Caen, France

²Labéo Frank Duncombe, Saint-Contest, France

³Normandie University, UNIROUEN, France

⁴National University of Architecture and Construction, Kyiv, Ukraine

Corresponding Author:

David Garon, UR ABTE EA4651, Cancer Treatment Center F. Baclesse, Avenue Général Harris, BP 5026, I4076 Caen Cedex 05, France.
Email: david.garon@unicaen.fr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Polyporus obliquus by Fries³ (1830), followed by Quélet⁴ (1888), who called it *Poria obliqua* (under the bark of dry *Fagus*). In 1927, Bourdot and Galzin⁵ called it *Xanthochrous obliquus*, and its current name, *Inonotus obliquus*, was given by Pilát^{6,7} (1936, 1942), who studied it thoroughly. Chaga has oblique pores—the origin of its species name *obliquus*.

Currently, this fungal species has only been described in the northern hemisphere. We can particularly find it in Canada, in the north of the United States of America, in Kazakhstan, in Siberia, in Ukraine, in Japan, in South Korea, in China, as well as in Europe (mostly in the northern and eastern parts of the continent). Its description in France is more recent, the first one dating from 1953 in Seine-et-Marne under the name of *Xanthochrous obliquus*⁸; it has also been found and described even more recently in Normandy. Chaga has been used since the 12th century in Eastern Europe. From historical chronicles, it is known that Kiev Prince (Knyaz) Vladimir Monomakh had a lip tumor and got rid of the disease thanks to treatment with Chaga mushroom.⁹ The Khanty people, an ethnic group from Siberia formerly called the Ostyaks,¹⁰ also used it in traditional medicine for different therapeutic indications: as an anthelmintic, as an antitubercular, to cure digestive disorders (gastritis, ulcers, etc), or even to prevent cardiac or hepatic illnesses. They used the crushed asexual form of the Chaga in several ways: by infusion, inhalation, or maceration in water of the charcoal obtained after burning to make body soap, which was used as an antiseptic.¹¹

In the middle of the 20th century, it was still used in Siberia for its properties by Russian farmers and workers too poor to buy tea: they crushed it and drank it as an infusion.

This use of the Chaga in Siberian gulags is mentioned in Alexandre Soljénitsyne's book *Le Pavillon des cancéreux (Cancer Ward)*.¹² Soviet health authorities noticed a decrease of the incidence of cancer cases in this population and assumed that the consumption of this infusion was a protective factor against cancer. In 1955, the USSR Ministry of Health recognized the therapeutic interest of *I obliquus* used as a decoction and wrote it down in the Soviet Pharmacopeia under the name of *Befunginum*.

The extracts of *I obliquus* have been used in China, Korea, Japan, Russia, and the Baltics for their favorable effects on lipid metabolism and cardiac function, as well as for antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor activities.¹³

Inonotus obliquus extracts were found to inhibit hepatitis C virus¹⁴ and human immunodeficiency virus¹⁵ and demonstrated strong antioxidant and immunostimulatory activities in vitro.^{16,17} At the same time, animal studies revealed that aqueous extracts of *I. obliquus* exhibited anti-inflammatory effects in experimental colitis¹⁸⁻²¹ and promoted lipid metabolism.²² The mushroom has the ability to increase peroxisome proliferator-activated receptors γ

transcriptional activities, which are expected to be therapeutic targets for dyslipidemia and type 2 diabetes.²³

Its biological activities explain why it is used as an adjuvant in oncology, especially in anticancer chemotherapies in Asian pharmacopoeias.

The chemical analysis of Chaga in scientific literature revealed several compounds such as polysaccharides, triterpenes, and polyphenols, which might be responsible for most of the therapeutic effects previously mentioned.²⁴ A tetracyclic triterpene called inotodiol produced following the lanosterols biosynthetic pathway elicited the interest of the international scientific community.²⁵⁻²⁹ Inotodiol has antiproliferative properties, demonstrated in vitro with human lung adenocarcinoma cells (A549) cancer-derived cells or HeLa.^{30,31}

In addition, 2 other components derived from birch are frequently described in Chaga: betulin (or betulinol) and betulinic acid.³² Several species of birch are, indeed, used in traditional medicine with a very wide geographical distribution. The spectrum of pharmacological properties associated with their uses is important: antimicrobial, antidiabetic, hepatoprotective, antiarthritic, and anticancer activities.³² These last 2 activities were the most studied, especially from betulin and betulinic acid. In traditional medicine, the use of birch against rheumatism is reported, for example, in Bosnia-Herzegovina and Lebanon.^{33,34} From an experimental point of view, the study by Gründemann et al³⁵ confirms the anti-inflammatory effect of the extract of *Betula pendula* by its action on the lymphocytes. Different species belonging to the genus *Betula* have also been tested to evaluate their anticancer potential. The compounds betulin and betulinic acid were tested in vitro on different models of cancer cells (cutaneous, ovarian, and pulmonary) demonstrating their antiproliferative potential.³⁶⁻³⁸

Our work is the first experimental approach on Chaga collected in France. This contribution aims, on the one hand, to develop a quantification method of betulin, betulinic acid, and inotodiol in Chaga extracts, and on the other hand, to evaluate and compare the biological activity of these extracts toward A549 line and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B line).

Materials and Methods

Collection and Identification of Chaga (*Inonotus obliquus*)

Chaga can be described as an irregular cracked, black-brownish, hard, brittle fungus, looking like charcoal on the outside, with a diameter ranging from 10 to 20 cm; inside it is brown in color. The microscopic examination shows a monomitic structure with brown hyphae and a thick partition with a diameter from 2.5 to 6-7 μm . These hyphae are however separated but without loops.^{39,40}



Figure 1. Asexual form of *Inonotus obliquus* (Chaga) on birch trunk.

The fungal infestation results from a contamination of the duramen of the host trees by basidiospores via unhealed injuries, which have left this matrix uncovered. The asexual form grows as long as the tree lives and causes a fibrous white rot of the central cylinder of the tree, degrading the cellulose, hemicellulose, and lignin. The sexual form (fruiting body) appears between the bark and the sapwood as a yellowish crust turning brown 2 to 12 years after the death of the host tree.^{41,42} It shows oblique and elongated pores upholstered by a hymenium with bi- to tetrasporic basidium without basal loop. It is this sexual form that releases elliptic to globular, smooth, yellowish basidiospores measuring from 8 to 10 μm \times 5 to 7.5 μm ensuring the dissemination of the fungus.⁴³

Asexual forms of *I. obliquus* were respectively purchased in Canada (Gaspésie Sauvage Produits Forestiers Inc), harvested in Ukraine (the Karpatsky National Park, Ivano-Frankivsk region), and in France (the Forest of Grimboisq, Normandy, France). These forms resembling blackish growths (Figure 1), with a circumference from 15 to 28 cm and measuring about 10 m, were harvested to a height from 0.8 to 2.5 m on trunks of birch (*Betula pendula*).

Preparation of the Extracts

Chaga was dried in a desiccator (Drying Device Döner SIGG AG 1978) for 5 days at 35°C. The dry fungal material

was crushed and then sprayed with Blender BB90E (Waring) before sieving to 2 mm to prepare aqueous, cyclohexane, and ethyl acetate extracts. The extractions were performed in the darkness at room temperature (20°C).

Cyclohexane Extract. The powder (180 g) was first stirred in contact with cyclohexane (1 L) for 90 minutes on an orbital agitator at 180 rpm. After filtration on Whatman No. 3 paper the recovered solid residue was extracted again with cyclohexane (500 mL) for 2 hours with the same stirring system and then filtered on Whatman No. 3 filter paper. The 2 cyclohexanic extracts were pooled and evaporated with Rotavapor at 40°C until the obtainment of a yellow residue of 2.6294, 2.4744, and 2.5166 g, respectively, for the Canadian, French, and Ukrainian Chaga.

Ethyl Acetate Extract. The dried solid residue was then contacted with ethyl acetate (1 L) for 4 days on an orbital agitator at 180 rpm. At the end of these 4 days, filtration was carried out in 3 steps: on carded cotton, on Büchner, and on filter paper Whatman No. 3.

Extracts were evaporated with Rotavapor at 40°C until the obtainment of a yellow powdery residue of 0.9837, 0.9248, and 0.9315 g, respectively, for the Canadian, French, and Ukrainian Chaga.

Aqueous Extract. The powder (100 g) was stirred on contact with ultrapure water (500 mL) for 22 hours at room temperature (20°C) on an orbital agitator at 180 rpm. Filtration was then carried out on Whatman No. 3 paper in order to obtain 250 mL of aqueous extract. A 100 mL aliquot of this extract was concentrated with Rotavapor at 40°C until a volume of 40 mL was obtained.

Decoction by Khanty Method.¹¹ The asexual form was cut in small pieces from 5 to 10 g then put in boiling water for 15 minutes. We used carded cotton and filter paper Whatman No. 3 for filtration.

Infusion According to the Canadian Method (Gaspésie Sauvage Produits Forestiers Inc). We put 3 chunks (from 5 to 10 g) in 1 L of cold water and let it rest for 30 minutes, then we heated it without boiling it for 30 additional minutes. We used carded cotton and filter paper Whatman No. 3 for filtration.

Before their use, all extracts obtained were stored in the refrigerator at +4°C and protected from light.

Quantification by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to a Mass Spectrometer (HPLC-ESI-QTOF MS/MS)

Reagents and Materials. Acetonitrile (ULC-MS grade) and acetone (pesticides grade) were purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France), while formic acid (98% purity)

Table 1. Multiple Reaction Monitoring Transitions Used for the 3 Target Analytes and Internal Standards.

Compound Name	Precollision Ion Mass	MS1	Produced Ions	MS2 Res	Dwell	Frag (V)	Collision Energy (V)	Cell Acc (V)	Polarity	Retention Time
Betulinic acid	439.3	Unit	95	Unit	20	100	48	7	Positive	14.545 minutes
			81.1			100			Positive	
Atrazine D5: ISTD	221.1	Unit	179.1	Unit	20	115	16		Positive	7.419 minutes
			69.1			115			Positive	
Betulin	425.3	Unit	95	Unit	20	100	48		Positive	14.781 minutes
			81			100			Positive	
Inotodiol	425.3	Unit	246.9	Unit	20	100	12		Positive	15.66 minutes

Abbreviation: MS, mass spectrometer.

and ethyl acetate (HPLC HiPerSolv Chromanorm grade) were purchased from VWR (Radnor, PA). Reverse osmosis water (HPLC grade) prepared using a Millipore water purification system was used for all the preparations. The internal standard (Atrazine D5; 99% purity) was obtained from Dr Ehrenstorfer. Betulin ($\geq 97.5\%$ purity) and betulinic acid ($\geq 97.5\%$ purity) standards were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO), while inotodiol standard ($\geq 95\%$ purity) was purchased from Chemfaces (Hubei, China). All the solutions were filtered through a 0.45 μm PVDF Millipore Millex HV (Merck-Millipore, Billerica, MA).

Standard Solutions and Samples Preparation. Standard stock solutions of atrazine D5, betulin, betulinic acid, and inotodiol at a concentration of 1000 mg/L were prepared in ethyl acetate (2 mg of powder in 2 mL of ethyl acetate). A working solution containing inotodiol, betulin, betulinic acid standards at a concentration of 10 mg/mL was prepared in acetone (50 μL of each stock solution *qs* 5 mL of acetone). We also prepared a working solution of our internal standard (atrazine D5) at a concentration of 500 $\mu\text{g/L}$ in acetonitrile (5 μL of stock solution in 10 mL of acetonitrile). The range calibration made with these working solutions was from 0.001 to 5 mg/L.

Ethyl acetate and cyclohexane dry extracts were taken up in 10 mL (for the French Chaga) or 30 mL of acetonitrile (for the Canadian and Ukrainian Chagas), passed through ultrasound for 15 minutes, and then filtered through PVDF 0.45 μm filters. The cyclohexane extract was then diluted to 10% and the ethyl acetate extract to 20% (for the French Chaga) or to 1% (for the Canadian and Ukrainian Chagas) in a solution containing acetonitrile, distilled water, and the internal standard (atrazine D5). The water extract, infusion, and decoction were filtered through PVDF 0.45 μm filters and then diluted to 20% (water extract and infusion) or 50% (decoction) in a solution containing acetonitrile, distilled water, and the internal standard (atrazine D5).

HPLC-ESI-QTOF MS/MS Analysis. A HPLC analysis was applied on an Agilent 1290 Infinity LC instrument (Agilent,

Santa Clara, CA) consisting of a binary pump, a thermostated autosampler, and a column compartment. The samples were separated on Waters Acquity UPLC BEH C18 15 μm \times 2.1 mm \times 1.7 μm (Waters, Milford, MA). The mobile phase was a stepwise gradient of water (containing 0.01% formic acid, v/v) and acetonitrile (containing 0.01% formic acid, v/v; 0 minute, 97:3; 4 minutes, 70:30; 12 minutes, 30:70; 15 minutes, 5:95; 17 minutes, 5:95; and 20 minutes, 97:3). The column temperature was set at 40°C and the flow rate was 0.45 mL/min. The HPLC system was connected to an Agilent 6470 MS-MS triple quadrupole (Santa Clara, CA) equipped with an ESI interface using the following operation parameters: capillary voltage, 3.5 kV ((+) ESI mode); nebulizer, 40 psig; drying gas (nitrogen) flow rate, 10.0 L/min; sheath gas flow rate, 10.0 L/min; gas temperature, 350°C; sheath gas temperature, 350°C; and V charging, 500 V. The multiple reaction monitoring transitions used for the 3 target analytes and internal standards are shown in Table 1. The quantification data were processed with Agilent Mass Hunter Quantitative Workstation Software Version B.07.01 (Agilent Technologies).

Method Validation. The limits of detection, limits of quantification, regression equation, and correlation coefficient of calibration curves (r^2) for each standard are reported in Table 2.

Cytotoxicity Assay

The A549 cells (human alveolar epithelial cells derived from an adenocarcinoma) having a doubling time of 24 hours were cultured in 96-well microplates (BD Falcon) in a DMEM medium (Gibco) supplemented with 1% bicarbonate solution at 7.5% (Gibco) and 10% decomplemented fetal calf serum.

The BEAS-2B cells (immortalized human bronchial epithelial cells) having a doubling time of 26 hours were cultured in 96-well microplates (BD Falcon) in 500 mL of BEBM medium (Gibco) supplemented with 2 mL bovine pituitary extract, 0.5 mL of hydrocortisone, 0.5 mL of

Table 2. LOD, LOQ, Regression Equation, and Correlation Coefficient of Calibration Curves.

		Cyclohexane Extract	Ethyl Acetate Extract	Aqueous Extract	Infusion	Decoction
Betulinic acid	LOD (µg/L)	0.3	0.3	0.3	1.7	0.7
	LOQ (µg/L)	1	1	1	5	2
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 8, 2016), dilution range = 1-1000 µg/L: $y = (-6.09 \times 10^{-8}) \times x^2 + (2.52 \times 10^{-4}) \times x + (6.58 \times 10^{-4})/r^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 1-500 µg/L: $y = (-2.19 \times 10^{-7}) \times x^2 + (4.55 \times 10^{-4}) \times x + (3.61 \times 10^{-5})/r^2 = 0.9994$				
Betulin	LOD (µg/L)	0.3	0.3	0.3	1.7	0.7
	LOQ (µg/L)	1	1	1	5	2
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 2, 2016), dilution range = 1-5000 µg/L: $y = (-3.44 \times 10^{-9}) \times x^2 + (6.56 \times 10^{-5}) \times x + (3.62 \times 10^{-4})/r^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 1-1000 µg/L: $y = (-3.55 \times 10^{-8}) \times x^2 + (1.77 \times 10^{-4}) \times x + (5.11 \times 10^{-5})/r^2 = 0.9989$				
Inotodiol	LOD (µg/L)	1.7	1.7	1.7	8.3	3
	LOQ (µg/L)	5	5	5	25	10
	Regression equation/ correlation coefficient	French Chaga (February 2, 2016), dilution range = 10-5000 µg/L: $y = (-1.52 \times 10^{-10}) \times x^2 + (1.30 \times 10^{-5}) \times x + (2.53 \times 10^{-4})/r^2 = 0.9998$ Canadian/Ukrainian Chaga (December 23, 2016), dilution range = 10-5000 µg/L: $y = (-6.63 \times 10^{-10}) \times x^2 + (2.51 \times 10^{-5}) \times x + (5.60 \times 10^{-4})/r^2 = 0.9992$				

Abbreviations: LOD, limits of detection; LOQ, limits of quantification.

human epidermal growth factor, 0.5 mL of epinephrine, 0.5 mL of transferrin, 0.5 mL of insulin, 0.5 mL of retinoic acid, and 0.5 mL of triiodothyronine to obtain BEGM medium.

Each well was seeded 24 hours before exposure with 10 000 cells for A549 cells line and 15 000 cells for BEAS-2B cells line suspended in 200 µL of medium, and then the microplates are incubated in a stove at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Before dilution, the aqueous extract was passed over a hydrophilic filter with a PES membrane with a porosity of 0.22 µm. The cells were then exposed to 6 different dilutions of aqueous extract (expressed in %, vol/vol): 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, and 0.5%. Eight replicates were made by dilution and exposure duration: 24, 48, and 72 hours.

After the end of the exposure time, the cells were stained with sulforhodamine B and the absorbance reading was performed by spectrophotometry at 570 and 655 nm. From the obtained absorbance means, the percentage of cell growth inhibition was calculated for each concentration.

Statistical Analysis

Student's *t* test was used to compare cytotoxicity on A549 and BEAS-2B cells. *P* < 0.05 was considered as statistically significant. Analyses were conducted using the SAS version 9.4.

Results

Quantification of Metabolites by HPLC-ESI-QTOF MS/MS

We first used organic extracts made from French Chaga to develop the method of detection and quantification of the 3

metabolites searched in this study (betulin, betulinic acid, and inotodiol).

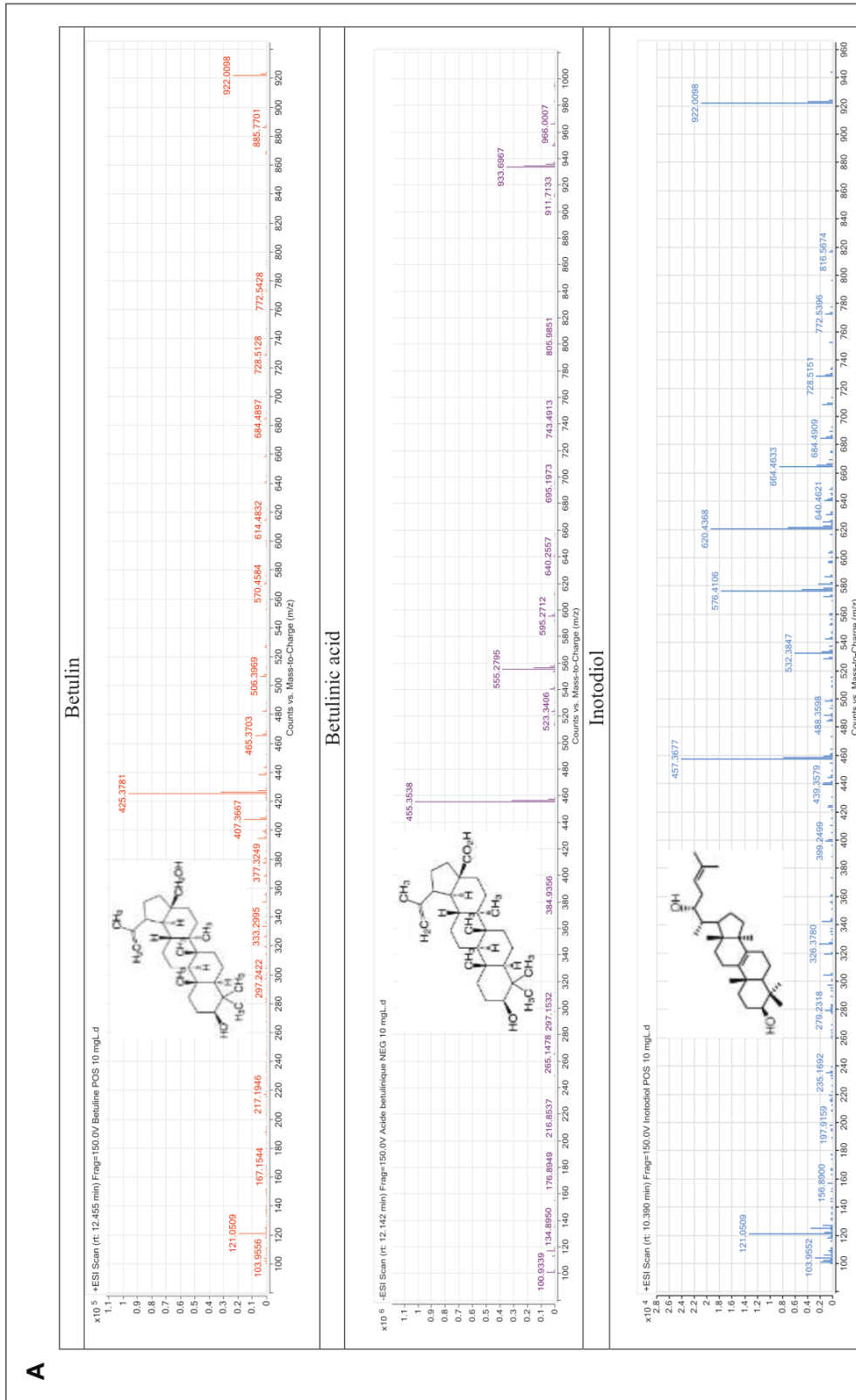
An analysis of the chromatograms by extracted ion chromatograms allowed to demonstrate the presence of betulin, betulinic acid, and inotodiol by searching for their masses in cyclohexane and ethyl acetate extracts. Figure 2A to C shows the mass spectra and the chromatograms obtained for these 3 metabolites in the different organic extracts.

Then, we applied this method of detection and quantification to other preparations of French Chaga, that is, an aqueous extract, an infusion, and a decoction. Betulin, betulinic acid, and inotodiol were found (to a lesser extent than in organic extracts) in the aqueous extract, but not in the infusion or in the decoction (Table 3).

We also searched for these 3 metabolites in organic extracts prepared from the Canadian and Ukrainian Chaga to compare their concentration depending on the geographical origin of the samples. The results presented in Table 3 show that there are greater concentrations of birch metabolites in French Chaga and more inotodiol in Canadian Chaga. It is important to note, however, that the difference in concentration of these metabolites may be due not only to environmental factors (climate, host tree, etc) but also to the conservation technique and the lapse of time between harvesting and the production of the extracts.

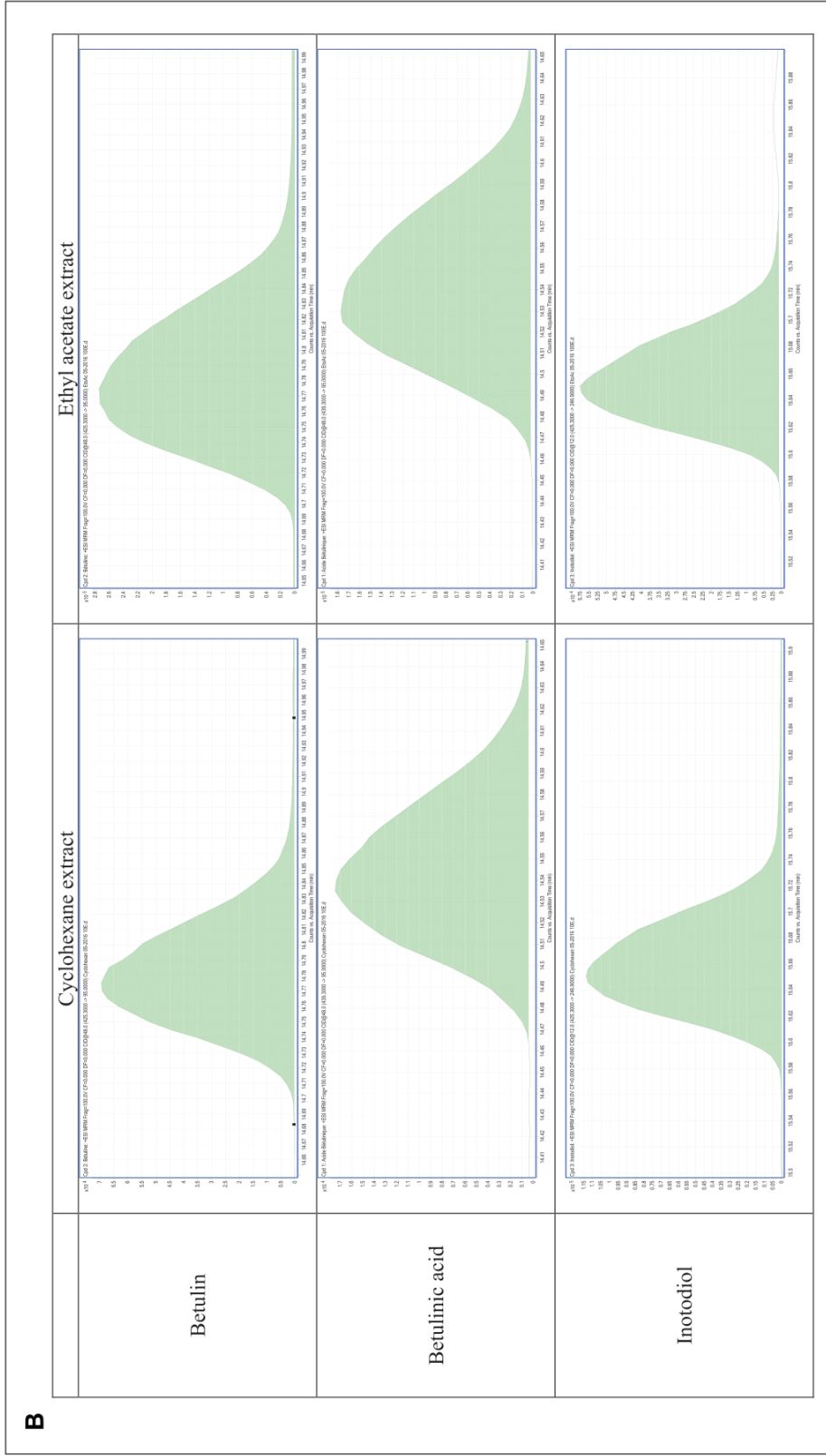
Biological Activity of the Aqueous Extract From French Chaga

Figure 3A to C shows that cytotoxic activity exists for aqueous extract and was greater on cancerous cells than on normal transformed cells.



(continued)

Figure 2. (continued)



(continued)

Table 3. Quantification of Betulin, Betulinic Acid, and Inotodiol in Different Preparations of Chaga.

	Preparations	Betulin (mg/L)	Betulinic Acid (mg/L)	Inotodiol (mg/L)
Canadian Chaga	Cyclohexane extract	0.15	0.12	8.27
	Ethyl acetate extract	13.45	5.12	464.86
Ukrainian Chaga	Cyclohexane extract	0.78	0.14	41.37
	Ethyl acetate extract	0.88	1.12	147.56
French Chaga	Cyclohexane extract	6.48	0.37	52.70
	Ethyl acetate extract	1100	52.92	373.02
	Aqueous extract	0.23	0.16	11.70
	Infusion	<0.005 ^a	<0.005 ^a	<0.005 ^a
	Decoction	<0.002 ^a	<0.002 ^a	<0.002 ^a

^aThe values are less than limits of quantification.

The cytotoxicity on A549 and BEAS-2B cells was characterized by a dose-dependent and time-dependent effect. Our results showed that after 48 and 72 hours of exposure, the cytotoxic activity was significantly reduced or lesser on the BEAS-2B cells than on the A549 cells ($P = 0.025$ after 48 hours of exposure and $P = 0.004$ after 72 hours of exposure). These observations underline the greater sensibility of highly proliferative cells compared with normal ones, which could be kept in mind for therapeutic uses.

Discussion and Conclusions

The identification of betulin and betulinic acid in all fungal extracts can be considered as a signature of the link between the parasitic fungus and its plant host. Indeed, these 2 metabolites, known to be present in the birch bark, are also concentrated in the Chaga. This observation has previously been made with other plant-fungus associations such as pine and *Polyporus pinicola*.^{44,45}

Our study confirms the presence of inotodiol in the French Chaga. This secondary metabolite has previously been identified in extracts obtained from Chaga samples from China, Finland, Thailand, and Russia.^{24,46,47} More generally, *I. obliquus* is characterized by the presence of several lanostane-type triterpenes, in particular inonotsuoxide A, inotodiol, trametenolic acid, and lanostérol.⁴⁸

The absence of inotodiol in infusion and decoction could be because of the concentrations below the limits of quantification of our method. This could also suggest that the properties attributed to this fungus in traditional medicine are not because of the metabolites we have sought to assay, but rather to the more polar molecules and/or lower molecular masses found in Chaga. Indeed, several studies have already demonstrated other types of molecules such as polysaccharides,⁴⁹ melanin complexes,⁵⁰ lignin derivatives,⁵¹ or polyphenols such as gallic acid⁵² in aqueous extracts.

For the cytotoxicity tests, we have chosen to use the aqueous extract, because of the following:

- The presence of compounds known for their cytotoxic activity: inotodiol, betulin, and betulinic acid.^{31,53,54}
- The presence of water-soluble compounds at the origin of properties recognized in traditional medicine.
- The safety of water used as a solvent in cell culture.

The cytotoxic activity of Chaga extracts appears to be related to its diversity of active secondary metabolites. Compounds such as betulin and betulinic acid are known for their anticancer activity.³⁸ Lanostanes such as inotodiol are also studied for their cytotoxic effects.⁴⁸ Thus, compounds present in the aqueous extract could explain or at least partly account for these effects.

The aqueous extract of Chaga showed antiproliferative activity on different cellular models. For example, Mazurkiewicz et al⁵⁵ demonstrated the action of an extract of Polish Chaga on A549 lung cells as in our study. Antiproliferative activity has also been demonstrated in melanoma cells,⁵⁶ hepatic cancer cells,⁵⁷ as well as in sarcoma cells.⁵⁸

Chung et al⁵⁹ showed that different fractions from extracts of Russian Chaga showed cytotoxicity on various cellular models including A549 cells. These fractions corresponded to lanostanes including inotodiol. The study by Zhao et al⁴⁶ also shows the efficacy of certain lanostanes such as inonotsutriol against A549 cancer cells.

In conclusion, the analysis of the organic extracts of Chaga revealed birch compounds such as betulin, betulinic acid, and a characteristic fungal molecule inotodiol. The Chaga recently discovered in the forests of Normandy contains inotodiol as do those collected in Canada and Ukraine, but our quantification method showed that the geographical origin of the fungus has an impact on the concentration of these metabolites. The biological results confirm a cytotoxic activity of the French Chaga on normal transformed BEAS-2B cells but to a far lesser extent than on lung cancer cells (A549). These observations allow us to consider the therapeutic interest of the Chaga, its chemical complexity,

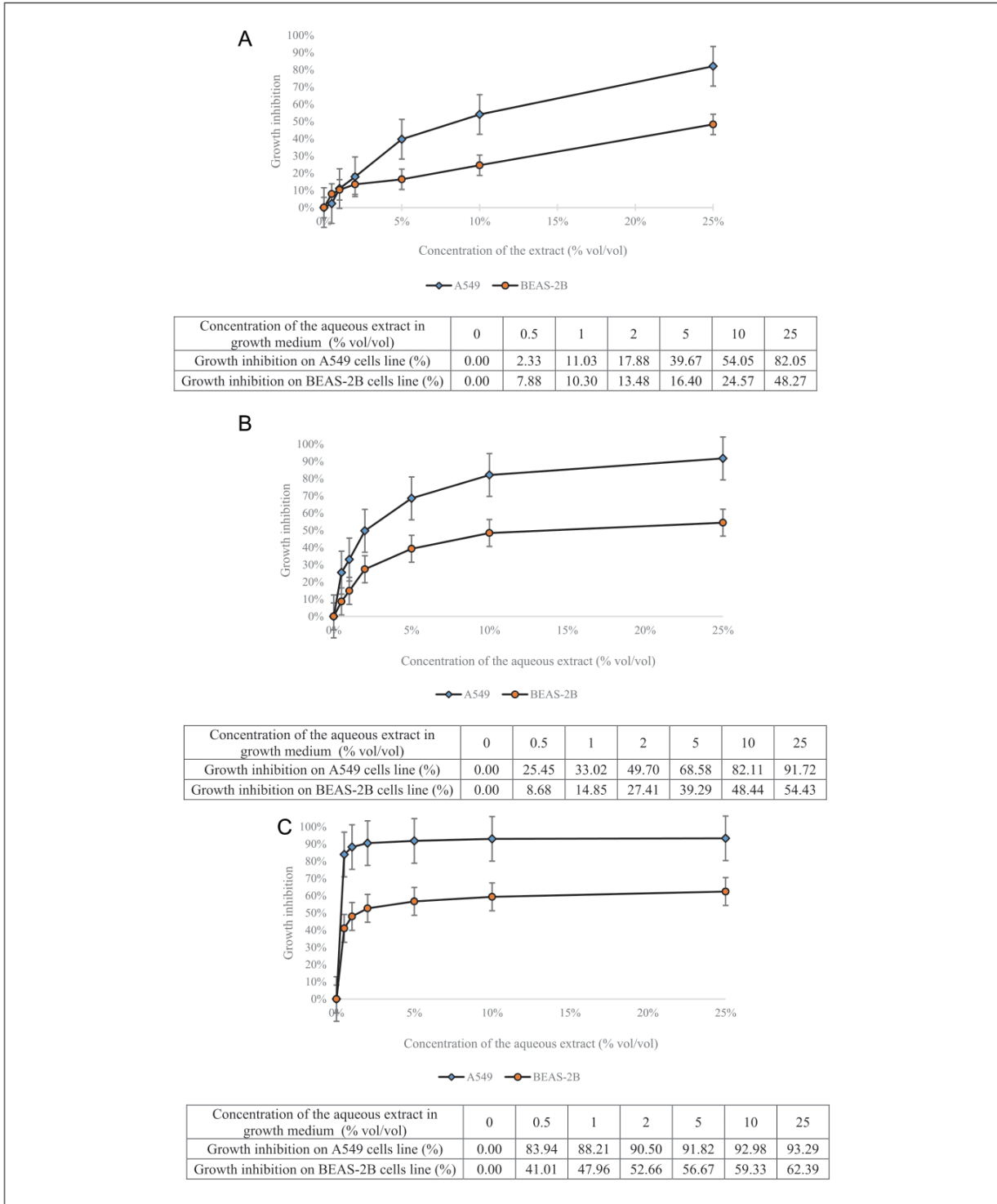


Figure 3. (A) Cytotoxicity of the aqueous extract from French Chaga on A549 and BEAS-2B cells lines after 24 hours of exposure. (B) Cytotoxicity of the aqueous extract from French Chaga on A549 and BEAS-2B cells lines after 48 hours of exposure. (C) Cytotoxicity of the aqueous extract from French Chaga on A549 and BEAS-2B cells lines after 72 hours of exposure.

and to emphasize the interest of continuing to investigate mycotherapy potential by associating both chemical and biological approaches.

Acknowledgments

We would like to thank Pr Boris Czerny (ERLIS EA4254, UNICAEN) for his help in the collection of Chaga. We would also like to acknowledge Margaret Dearing for improving the English of the article.


Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Manche).

ORCID iD

David Garon  <https://orcid.org/0000-0003-3545-6641>

References

- Ryvarden L, Gilbertson RL. *European Polypores. Part 1 Abortiporus-Lindtneria*. Oslo, Norway: Fungiflora; 1993.
- Persoon CH. *Synopsis Methodica Fungorum. Pars Secunda*. Göttingen, German: Henricum Dieterich; 1801.
- Fries EM. *Systema mycologicum, sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis*. Gryphiswaldae: Sumptibus Ernesti Mauriti; 1821.
- Quélet L. *Flore Mycologique de la France et des Pays Limitrophes*. Paris, France: Octave Doin; 1888.
- Bourdot H (Abbé), Galzin A. *Hyménomycètes de France (Hétérobasidés-Homobasidiés gymnocarpes)*. Paris, France: Société Mycologique de France; 1927.
- Kavina K, Pilát A. *Atlas des Champignons d'Europe Tome III Polyporaceae 1*. Praha, Slovakia: Pilát & Kavina; 1936.
- Pilát A. *Atlas des champignons d'Europe III Polyporaceae 2*. Praha, Slovakia: Pilát & Kavina; 1942.
- Doignon P. Les polypores du massif de Fontainebleau, Bulletin de la Société des Naturalistes Parisiens. *Cahiers des Naturalistes*. 1953;53-57.
- Perevedentseva L. Use of wild-growing mushrooms for therapeutic purposes in the Perm Territory, Russia. *J Environ Sci Eng*. 2013;2:236-242.
- de La Harpe JF. *Abrégé de l'histoire générale des voyages, tome onzième*. Paris, France: Ménard et Desenne, fils; 1825.
- Saar M. Fungi in Khanty folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 1991;31:175-179.
- Soljenitsyne AI. *Le Pavillon des Cancéreux. Cartonnettes*. Paris, France: Presses Pocket; 1980.
- Shashkina MY, Shashkin PN, Sergeev AV. Chemical and medicobiological properties of chaga (review). *Pharmaceut Chem J*. 2006;40:560-568.
- Shibnev VA, Mishin DV, Garaev TM, Finogenova NP, Botikov AG, Deryabin PG. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures. *Bull Exp Biol Med*. 2011;151:612-614.
- Shibnev VA, Garaev TM, Finogenova MP, Kalnina LB, Nosik DN. Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus [in Russian]. *Vopr Virusol*. 2015;60:35-38.
- Kim YO, Han SB, Lee HW, et al. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci*. 2005;77:2438-2456.
- Won DP, Lee JS, Kwon DS, Lee KE, Shin WC, Hong EK. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*. *Mol Cells*. 2011;31:165-173.
- Choi SY, Hur SJ, An CS, et al. Anti-inflammatory effects of *Inonotus obliquus* in colitis induced by dextran sodium sulfate. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:943516. doi:10.1155/2010/943516.
- Kim HG, Yoon DH, Kim CH, et al. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food*. 2007;10:80-89.
- Mishra SK, Kang JH, Kim DK, Oh SH, Kim MK. Orally administered aqueous extract of *Inonotus obliquus* ameliorates acute inflammation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *J Ethnopharmacol*. 2012;143:524-532.
- Park YM, Won JH, Kim YH, Choi JW, Park HJ, Lee KT. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol*. 2005;101:120-128.
- Lee JH, Hyun CK. Insulin-sensitizing and beneficial lipid-metabolic effects of the water-soluble melanin complex extracted from *Inonotus obliquus*. *Phytother Res*. 2014;28:1320-1328.
- Joo JI, Kim DH, Yun JW. Extract of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) stimulates 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Phytother Res*. 2010;24:1592-1599.
- Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anti-cancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem*. 2013;139:503-508.
- Kahlos K, Hiltunen R. Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharma Fennica*. 1983;92:220.
- Kahlos K, Kahlos L, Hiltunen R. Antitumor tests of inotodiol from the fungus *Inonotus obliquus*. *Acta Pharma Fennica*. 1986;95:173-177.
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus* in vitro. *Acta Pharma Fennica*. 1987;96:33-40.
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Antitumor activity of triterpenes in *Inonotus obliquus*. *Planta Med*. 1986;6:554.
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R, Schantz MV. The antitumor activity of some extracts and compound isolated from *Inonotus obliquus*. *Farmaceutisch tijdschrift voor België*. 1984;61:305-306.
- Zhong XH, Wang LB, Sun DZ. Effects of inotodiol extracts from *Inonotus obliquus* on proliferation cycle and apoptotic gene of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Chin J Integr Med*. 2011;17:218-223.

31. Zhao LW, Zhong XH, Yang SY, Zhang YZ, Yang NJ. Inotodiol inhibits proliferation and induces apoptosis through modulating expression of cyclinE, p27, bcl-2, and bax in human cervical cancer HeLa cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:3195-3199.
32. Rastogi S, Pandey MM, Rawat KSA. Medicinal plants of the genus *Betula*—traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. 2015;159:62-83.
33. Broza SK, Dobeš C, Klatter-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol*. 2010;131:33-55.
34. El Beyrouthy M, Arnold N, Delelis-Dusollier A, Dupont F. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol*. 2008;120:315-334.
35. Gründemann C, Gruber CW, Hertrampf A, Zehl M, Kopp B, Huber R. An aqueous birch leaf extract of *Betula pendula* inhibits the growth and cell division of inflammatory lymphocytes. *J Ethnopharmacol*. 2011;136:444-451.
36. Dehelean CA, Soica C, Ledeti I, et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chem Cent J*. 2012;6:137.
37. Drag M, Surowiak P, Drag-Zalesinska M, Dietel M, Lage H, Oleksyszyn J. Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. *Molecules*. 2009;14:1639-1651.
38. Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *Int J Mol Sci*. 2008;9:1096-1107.
39. Bernicchia A. *Polyporaceae s.l. Fungi europaei, 10*. Aalassio, Italy: Candusso; 2005.
40. Breitenbach J, Kränzlin F. *Champignons de Suisse. Tome 2: Champignons sans lames (Hétérobasidiomycètes; Aphyllophorales; Gastéromycètes)*. Lucerne, Switzerland: Mycologia; 1996.
41. Campbell WA, Davidson RW. A *Poria* as the fruiting stage of the fungus causing the sterile conks on Birch. *Mycologia*. 1938;30:553-560.
42. Zabel RA. Basidiocarp development in *Inonotus obliquus* and its inhibition by stem treatments. *Forest Sci*. 1976;22:431-437.
43. Lee MW, Hur H, Chang KC, Lee TS, Ka KH, Jankovsky L. Introduction to distribution and ecology of sterile conks of *Inonotus obliquus*. *Mycobiology*. 2008;36:199-202.
44. Cambie RC. Betulin from *Polyporus pinicola*. *N Z J Sci*. 1978;21:565-567.
45. Cole RJ, Schweikert MA. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Vol 2. London, England: Academic Press; 2003.
46. Zhao F, Mai Q, Ma J, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. *Fitoterapia*. 2015;101:34-40.
47. Liu C, Zhao C, Pan HH, et al. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities. *J Nat Prod*. 2014;77:35-41.
48. Ríos JL, Andújar I, Recio MC, Giner RM. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. *J Nat Prod*. 2012;75:2016-2044.
49. Fan L, Ding S, Ai L, Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydr Polym*. 2012;90:870-874.
50. Mazurkiewicz W. Analysis of aqueous extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pol Pharm*. 2006;63:497-501.
51. Wang Q, Mu H, Zhang L, Dong D, Zhang W, Duan J. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. *Int J Biol Macromol*. 2015;74:507-514.
52. Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, et al. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom.” *J Ethnopharmacol*. 2015;162:323-332.
53. Foo JB, Yazan SL, Tor YS, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2015;166:270-278.
54. Yim NH, Jung YP, Kim A, Kim T, Ma JY. Induction of apoptotic cell death by betulin in multidrug-resistant human renal carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2015;34:1058-1064.
55. Mazurkiewicz W, Rydel K, Pogoćki D, Lemieszek MK, Langner E, Rzeski W. Separation of an aqueous extract *Inonotus obliquus* (Chaga). A novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells. *Acta Pol Pharm*. 2010;67:397-406.
56. Youn MJ, Kim JK, Park SY, et al. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *J Ethnopharmacol*. 2009;121:221-228.
57. Youn MJ, Kim JK, Park SY, et al. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. 2008;14:511-517.
58. Chen C, Zheng W, Gao X, et al. Aqueous extract of *Inonotus obliquus* (Fr) pilat (hymenochaetaceae) significantly inhibits the growth of sarcoma 180 by inducing apoptosis. *Am J Pharmacol Toxicol*. 2007;2:10-17.
59. Chung MJ, Chung CK, Jeong Y, Ham SS. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balb/c mice bearing sarcoma-180 cells. *Nutr Res Pract*. 2010;4:177-182.



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

Le Chaga : un champignon aux propriétés anticancéreuses. Étude bibliographique et approche expérimentale.

Résumé

Inonotus obliquus (Chaga), est un champignon parasite du bois utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies. Nous avons développé une méthode de quantification par CLHP-SM-SM pour quantifier la bétuline, l'acide bétulinique et l'inotodiol et comparer leurs concentrations dans des extraits de Chaga français (récemment découvert en Normandie), ukrainien et canadien. Parmi ces préparations, l'extrait aqueux contenant ces trois molécules a été choisi pour évaluer son activité cytotoxique sur des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (lignée A549) et des cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée BEAS-2B). Le Chaga français contient le plus de bétuline et d'acide bétulinique, alors que la concentration d'inotodiol est supérieure dans le Chaga canadien. Nos résultats ont montré une cytotoxicité de l'extrait aqueux du Chaga après 48 et 72 heures d'exposition avec un effet plus important sur les cellules A549 que sur les cellules BEAS-2B ($p=0,025$ après 48 heures d'exposition et $p=0,004$ après 72 heures d'exposition).

TITLE

Chaga: a mushroom with anticancer properties. Bibliographic study and experimental approach.

Summary

Inonotus obliquus (Chaga), is a wood-parasitic fungus used in traditional medicine to treat various diseases. We have developed an HPLC-MS-MS method to quantify betulin, betulinic acid and inotodiol and to compare their concentrations in extracts of French (recently discovered in Normandy), Ukrainian and Canadian Chaga. Among these preparations, the aqueous extract containing these three molecules was chosen to evaluate its cytotoxic activity on human lung adenocarcinoma cells (A549) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). French Chaga contains the most betulin and betulinic acid, while the concentration of inotodiol is higher in Canadian Chaga. Our results showed a cytotoxicity of the aqueous extract of Chaga after 48 and 72 hours of exposure with a greater effect on A549 cells than on BEAS-2B cells ($p = 0.025$ after 48 hours of exposure and $p = 0.004$ after 72 hours of exposure).

Mots-clés

Inonotus obliquus, cytotoxicité, cancer, mycochimie, bétuline, acide bétulinique, inotodiol, ethnopharmacologie, médecine traditionnelle
