Thèse de doctorat

Université de Limoges

École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles – EA1069

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Chimie appliquée / Chimie des substances naturelles

Présentée et soutenue par

Aurélie LAGARDE

Le 20 décembre 2017

Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms.

Thèse dirigée par Pr. Lengo MAMBU et Dr. Marion MILLOT

JURY :

Président du jury

M. Thierry HENNEBELLE, Professeur, Université de Lille 2

Rapporteurs

Mme Soizic PRADO, Professeur, MNHN, Paris
M. Olivier GROVEL, Professeur, Université de Nantes

Examinateurs

M. Vincent SOL, Professeur, Université de Limoges
Mme Patricia JARGEAT, Maître de conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse 3
Mme Lengo MAMBU, Professeur, Université de Limoges
M. Marion MILLOT, Maître de conférences, Université de Limoges

Je suis reconnaissant envers ceux qui m'ont répondu «Non»; Grâce à eux, je l'ai fait moi-même

Albert Einstein

Ne laissez pas le comportement des autres détruire votre paix intérieure.

Dalaï Lama

Remerciements

Je remercie le Professeur **Vincent SOL**, directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et d'avoir accepté de faire partie du jury et de juger ce travail. Merci pour les discussions et les conseils que vous avez pu me donner tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier mes deux directrices de thèse, le Professeur **Angèle Lengo MAMBU** et le Docteur **Marion MILLOT**, de m'avoir confiée ce sujet de thèse pluridisciplinaire entre chimie et biologie. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissée une grande autonomie lors de mes travaux.

Je tiens également à remercier le Professeur **Olivier GROVEL** et le Professeur **Soizic PRADO** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur **Thierry HENNEBELLE** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de faire partie de ce jury.

Je tiens à également remercier le Docteur **Patricia JARGEAT**, d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger ce travail. Merci de m'avoir enseignée l'extraction d'ADN fongique. Merci de votre disponibilité, de vos précieux conseils sur l'identification des souches fongiques et de vos réponses à mes nombreuses questions.

Je remercie la **Région Limousin** pour le soutien financier accordé durant les deux premières années de ces travaux de recherche, et **l'Université de Limoges** pour le financement de la 3ème année.

Merci au Professeur **Jean-Luc DUROUX**, doyen de la Faculté de Pharmacie, de m'avoir accueillie au sein de son établissement.

Merci au Professeur **Rachida ZERROUKI**, de m'avoir écoutée et soutenue durant ces trois années de thèse.

Je remercie le Docteur **Sabine LHERNOULD** d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique lors de mes enseignements dans le cadre de mon poste de DCACE. Enseigner à vos côtés a été un réel plaisir. Merci, de votre disponibilité et de m'avoir fait confiance lors des différents enseignements. Je remercie par la même occasion **Christelle** et **Florence**.

Je remercie également le Docteur **Sylvie DELEBASSÉE** de m'avoir initiée à la culture des cellules cancéreuses et au test MTT. Je remercie le Docteur **Benjamin RIOUX**, de m'avoir

proposée, par la suite, d'entretenir les différentes lignées cellulaires, ce qui m'a permis de réaliser les tests MTT dans de bonnes conditions. Je remercie **Aline PINON** et **Frédérique MARTIN**, de leur aide pour la réalisation des Western blot (même si nous n'avons pas toujours eu les résultats attendus), de leur discussion et leur écoute au détour d'un couloir ou lors des différentes manips, de leur gentillesse. Merci Aline pour tes conseils en bio et tes réponses à mes nombreuses questions qui m'ont permis d'avancer sur cette thèse.

Je remercie le Professeur **Bertrand LIAGRE** pour sa disponibilité, son aide et ses conseils pour la partie biologie de ma thèse. Soyez assuré, de ma profonde reconnaissance pour votre aide de dernière minute qui m'a permis d'avancer.

Je remercie également le Professeur **Catherine FAGNÈRE** et le Docteur **Christelle POUGET** pour leurs gentillesses et pour toutes les discussions au détour d'un couloir.

Je remercie le Docteur **David LÉGER** pour vos réponses à mes nombreuses questions sur la partie bio. Merci pour vos conseils et vos idées de manip.

Je remercie le Docteur **Tan-Sothéa OUK** de m'avoir enseignée les tests anti-biofilm bactérien. Merci pour ta disponibilité, tes réponses à mes questions et pour ta sympathie. C'était un plaisir de travailler avec toi.

Je remercie également le Professeur **Gilles DREYFUSS**, pour ses conseils en mycologie notamment lors de ma première observation au microscope de mes différents champignons.

Mes remerciements chaleureux à **Roselyne MOUZET** qui m'a permis au début de ma thèse d'avoir une hotte à flux laminaire pour la culture de mes champignons. Pas toujours évident surtout lorsqu'il y avait TP dans la salle. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et vos réponses à mes questions sur la culture des champignons.

Je remercie **Émilie PINAULT** pour la réalisation des analyses HRMS et LC-MS/MS (basse résolution). Merci de ta disponibilité et de tes conseils.

Un grand merci à **Aurélien BOISSOU** pour ton aide technique lors de l'installation des différents logiciels. Merci de ta disponibilité. Merci d'avoir résolu plus d'une fois mes différents problèmes informatiques et de m'avoir facilitée le travail avec tous tes conseils, merci de ta gentillesse.

Je remercie également le Docteur **Aurélien MERCIER** pour vos conseils et différentes idées de manips, même si la collaboration prévue n'a finalement pas été réalisée.

Je tiens à remercier le Professeur **Pierre CHAMPY** de m'avoir permis d'initier un contact au sein du laboratoire BioCIS de Paris. Un grand merci au Docteur **Mehdi BENIDDIR** avec qui j'ai découvert les joies de la réalisation des réseaux moléculaires et de toute l'étendu que pouvait offrir cette nouvelle technique. Après avoir passé une semaine à comprendre pourquoi l'émodine était réfractaire à l'analyse LC-MS/MS, je ne la regarderai plus de la même manière maintenant. J'ai aussi durant ce court séjour rencontré des personnes formidables qui m'ont tout de suite intégré à leur groupe. Merci à **Charlotte**, **Alexander**, **Gaëla** et **Elvis**.

Je remercie également **Céline ALAMICHEL**, ma stagiaire de M1 pour qui la purification des composés lichénique n'est plus un secret.

Je tiens à remercie le Docteur **Claude CALLISTE** pour l'évaluation de la production de EROs par RPE et pour tes différents conseils.

Je ne pourrais pas oublier de remercier, le Docteur **Yves CHAMPAVIER** pour la réalisation de tous mes spectres RMN. Un grand merci pour ta disponibilité, pour tout le temps que tu as pris pour m'aider lors de l'interprétation des spectres et de ta patience lors de tes explications. Merci pour toutes les discussions scientifiques ou non et de ton soutien durant ces trois années de thèse. Merci beaucoup.

Un grand merci à **Laetitia VIGNAUD**, collègue de bureau, de m'avoir aidée lors de mes débuts, pour ses conseils en phytochimie. Merci pour ta gentillesse, ton enthousiasme et toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci de ton soutien durant cette période qui n'a pas non plus été facile pour toi. Je suis contente pour toi que ta nouvelle équipe te convienne. Merci d'avoir été là durant mes deux premières années de thèse.

Je remercie également le Docteur **Caroline ROUGER**, qui a su lors de son passage en tant ATER, mettre une bonne ambiance dans le laboratoire. Toujours à l'écoute et toujours de bons conseils notamment pour la culture des champignons. Merci Caroline.

Je tiens à remercier **Caroline MITATY** pour la bonne humeur qu'elle a pu communiquer lors de son passage. Des longues discussions dans le bureau ou lors des manips. Même si tu n'as pas réussi à isoler des composés purs (en même temps tu as eu quelques difficultés indépendantes de ta volonté que tu as dû corriger), tu as su garder le sourire et ton enthousiasme malgré toutes les péripéties.

Merci à **Anne-Lise RIOUX** pour ta présence et ton aide pour les manips complémentaires de dernières minutes, permettant de compléter les résultats.

Je remercie également le Docteur **Henri MBAKIDI-NGOUABY**, doctorant dans le même service que moi durant mes deux premières années de thèse. Merci d'avoir partagé avec moi le laboratoire de pharmacognosie, cette cohabition a été agréable de part ta discrétion et ta gentillesse.

Je remercie le Docteur **Marion GIRARDOT** pour la réalisation des tests anti-biofilm fongiques, et pour les réponses à mes questions.

Un grand merci à **Sylvie LAVAL** pour toutes les discussions lors de mes différentes demandes de Congrès. Merci pour tout ce travail administratif qui m'a permis entre autre de voyager jusqu'au Danemark.

Je souhaite également remercier tous les membres du LCSN que j'ai pu rencontrer et qui de près ou de loin se sont intéressés à ce travail.

Un grand merci aux Docteurs **Olivier REZAZGUI**, **Florent LE GUERN** et **Idelette PLAZANET**, pour toutes les discussions et votre soutien durant cette thèse.

Merci également aux collègues du labo : **Ludovic BRETIN, Docteur Chloë FIDANZI-DUGAS, Docteur Gabin FABRE, Tom BOUCHERLE, Amaury LEPETIT, Guillaume MARCHAND, Zineb KHALDI, Docteur Mark-Arthur NDONG NTOUTOUME,** Docteur **Shihong QIU, Docteur Amandine BONNET** et Docteur **Amandine DIEU** et tous ceux que j'aurais pu oublier.

Je remercie ma famille et tout particulièrement **mes parents** sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci pour votre soutien indéfectible durant mes longues années d'études qui n'ont pas toujours été faciles (surtout les derniers temps). Merci de m'avoir soutenue dans mes choix et encouragé à donner le meilleur de moi même. Un grand merci à ma sœur **Fanny** et à **Gaëtan** pour votre soutien et leur encouragement tout au long de cette thèse. Je remercie **Lyla** qui de part sa présence m'a permis d'avancer dans la bonne direction.

Enfin, un grand merci à **Jérémy**. Ton soutien sans faille m'a permis d'en être là aujourd'hui, même si durant mes trois années de thèse, la distance n'a pas toujours été facile. Je te remercie de m'avoir supportée durant mes doutes, mes remises en questions et mes découragements. Je te remercie pour ta présence dans mon quotidien et d'être toujours là à mes côtés. Merci de partager ma vie depuis maintenant presque 10 ans, tout simplement merci d'être là, je t'aime.

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

Table des matières

INTRODUCTION 19

PARTIE A – Lichens et métabolites secondaires 23

Chapitre I. Les lichens 25

I.1. Qu'est-ce qu'un lichen ? 25
I.2. Répartition, écologie et diversité 25
I.3. Morphologies et anatomies des lichens 26
I.4. Échanges nutritionnels entre mycobionte et photobionte 28
I.5. Les différents types de reproduction chez les lichens 29
I.5.1. Reproduction végétative 29
I.5.2. Reproduction sexuée 30
I.6. Utilisation des lichens 31
I.7. Le genre Nephroma 32
I.7.1. Écologie et répartition géographique 33
I.7.2. Structure et morphologie 33
I.7.3. Composition chimique 34
I.7.4. Description botanique de *Nephroma laevigatum* 34

Chapitre II. Métabolites lichéniques 37

II.1. Voies de biosynthèse 38
II.2. Composés isolés de *Nephroma laevigatum* 41
II.3. Activités biologiques 42

Chapitre III. Résultats et discussion 43

III.1. Récolte et identification de *Nephroma laevigatum* 43
III.2. Extractions successives 44
III.3. Profilage chimique des extraits lichéniques 44
III.3.1. Chromatographies sur couches minces (CCM) et CLHP-DAD 44
III.3.2. Réseaux moléculaires 47
III.4. Évaluation des activités biologiques des extraits lichéniques 58
III.4.1. Activités antiprolifératives 58
III.4.2. Activité anti-biofilm fongique 59
III.4.3. Activité anti-biofilm bactérien 60
III.5. Étude phytochimique de *Nephroma laevigatum* 60
III.5.1. Fractionnement et purification 60
III.5.2. Détermination structurale des composés isolés 61
III.5.2.1. Composé DCM 1 61
III.5.2.2. Composé DCM 2 62
III.5.2.3. Composé DCM 3 64
III.5.2.4. Composé DCM 4 65
III.6. Activités antiprolifératives des composés isolés 66
III.7. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) 68

PARTIE B – Champignons endolichéniques, source de molécules actives 71

Chapitre I. Les champignons endolichéniques 73

I.1. Origine et évolution 73
I.2. Classification et diversité 74
I.3. Culture et identification 77
I.4. Métabolites fongiques : principales structures 77
I.4.1. Alcaloïdes 78
I.4.2. Terpénoïdes 79
I.4.3. Stéroïdes 81
I.4.4. Composés phénoliques et polycétides 82
I.4.5. Peptides 84

Chapitre II. Résultats et discussions 85

II.1. Isolement et identification des champignons endolichéniques de *N. laevigatum* 85
II.2. Description morphologique 90
II.3. Tests préliminaires de production de métabolites 96
II.3.1. Essais d'optimisation de culture 96
II.3.2. Sélection des souches 97
II.4. Culture à petite échelle 97
II.5. Profilage chimique des extraits fongiques des souches sélectionnées 98
II.5.1. CCM et CLHP-DAD 98
II.5.2. Réseaux moléculaires 100
II.6. Évaluation des activités biologiques des extraits fongiques 102
II.6.1. Activités antiprolifératives 102
II.6.2. Effets des extraits bruts sélectionnés sur les lignées HT-29 et PC-3 106
II.6.2.1. Observations microscopiques 106
II.6.2.2. Analyse de l'expression protéique 107
II.6.2.3. Induction de la fragmentation de l'ADN 109
II.6.3. Activité anti-biofilm fongique 110
II.6.4. Activité anti-biofilm bactérien 111
II.7. Production à grande échelle 112
II.8. Étude phytochimique de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (génotype 1 ; Gir_20) 114
II.8.1. Fractionnement et purification 114
II.8.2. Détermination structurale des composés isolés 115
II.8.2.1. Composés G1 et G2 115
II.8.2.2. Composé G3 123
II.8.2.3. Composé G4 123
II.8.2.4. Composé G5 124
II.8.2.5. Composé G6 126
II.9. Étude phytochimique de la souche Cor_08 : *Nemania serpens* 127
II.9.1. Fractionnement et purification 127
II.9.2. Détermination structurale des composés isolés 128
II.9.2.1. Composé C1 128
II.9.2.2. Composé C2 129
II.9.2.3. Composé C3 131
II.9.3. Réseaux moléculaires 132
II.10. Activités antiprolifératives des composés isolés 135

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 137

PARTIE C – Matériels et Méthodes 141

Chapitre I. Récolte et identification de *Nephroma laevigatum* 143

I.1. Observation à la loupe binoculaire et microscope optique 143
I.2. Réactions thallines 143

Chapitre II. Isolement, identification et caractérisation des champignons endolichéniques ... 144

II.1. Milieux de culture 144
II.2. Isolement des champignons endolichéniques 145
II.3. Culture des souches sélectionnées 145
II.3.1. Détermination des paramètres de culture 145
II.3.2. Culture à petite échelle 146
II.3.3. Culture à grande échelle 146
II.4. Identification des champignons endolichéniques 146
II.4.1. Observation à la loupe binoculaire et microscope optique 146
II.4.2. Caractérisation moléculaire des champignons isolés 147
II.4.2.1. Extraction d'ADN 147
II.4.2.2. Amplification par Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) 147
II.4.2.3. Analyses des séquences 148

Chapitre III. Procédés d'extractions 149

III.1. Extractions des thalles lichéniques 149
III.2. Extractions des champignons endolichéniques cultivés sur milieu solide 149

Chapitre IV. Méthodes analytiques et appareillages 150

IV.1. Réactifs et solvants 150
IV.2. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM) 150
IV.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) analytique 150
IV.4. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses basses résolutions 151
IV.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses hautes résolutions 151
IV.6. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 152
IV.7. Spectre de masse haute résolution (SMHR) 153

Chapitre V. Méthodes de séparation 154

V.1. Chromatographie sur couche mince préparative (CCM prép) 154
V.2. Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP) 154
V.3. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte 154
V.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) semi-préparative 154

Chapitre VI. Réalisation de réseaux moléculaires 155

Chapitre VII. Techniques de fractionnements 157

VII.1. Purifications des fractions lichéniques 157
VII.2. Purifications des fractions issues de Gir_20 158
VII.3. Purifications des fractions issues de Cor_08 159

Chapitre VIII. Évaluation des activités biologiques 160

VIII.1. Activités antiprolifératives 160
VIII.1.1. Lignées cellulaires 160
VIII.1.2. Test de viabilité cellulaire 160
VIII.1.3. Effets des extraits sélectionnés sur les lignées cancéreuses HT-29 et PC-3 161
VIII.1.3.1. Observations microscopiques 161
VIII.1.3.2. Analyse de l'expression des protéines 161
VIII.1.3.2.1. Extraction des protéines totales 161
VIII.1.3.2.2. Expression des protéines par analyse en Western blot 162
VIII.1.3.3. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN 163
VIII.2. Activité anti-biofilm fongique 164
VIII.3. Activité anti-biofilm bactérien 165
VIII.3.1. Estimation de la concentration d'une suspension bactérienne 166
VIII.3.2. Étude de la formation de biofilm par la méthode au cristal violet et détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm 167
VIII.3.3. Dénombrement bactérien 168
VIII.3.4. Antibiogramme : Pseudomonas aeruginosa 168
VIII.4. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) 169

Chapitre IX. Résumé des données chromatographiques et RMN 170

IX.1. Molécules isolées de *Nephroma laevigatum* 170
IX.1.1. Composé DCM 1 : Trilinoléine 170
IX.1.2. Composé DCM 2 : Émodine 171
IX.1.3. Composé DCM 3 : 7-chloroémodine 172
IX.1.4. Composé DCM 4 : 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine 173
IX.2. Molécules isolées de *Nemania aenea* var. *aureolatum* 174
IX.2.1. Composés G1 et G2 : Nordammaranes triterpènes 174
IX.2.2. Composé G4 : Acide palmitique 177
IX.2.3. Composé G5 : Daidzéine 178
IX.2.4. Composé G6 : Adénosine 179
IX.3. Molécules isolées de *Nemania serpens* 180
IX.3.1. Composé C1 : 5-carboxymélléine 180
IX.3.2. Composé C2 : Eugénitine 181
IX.3.3. Composé C3 : Acide *para*-hydroxyphénylacétique 182

Références bibliographiques 183

Annexes 197

Liste des abréviations

1D : une dimension
2D : deux dimensions

ABTS : 2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
ADN : acide désoxyribonucléique
AF : acide formique
AFL : association française de lichénologie
ANS : anisaldéhyde sulfurique

Bax : Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 protein
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
br : élargi
BSA : albumine sérique bovine

C_6H_{12} ou CycloH : cyclohexane
Caspases : Cysteinyl-aspartate-cleaving proteases
CCM prép : Chromatographie sur Couche Mince préparative
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CD_3OD : méthanol-d_4
$CDCl_3$: Chloroforme
$CDCl_3$: chloroforme-d_1
CH_2Cl_2 : dichlorométhane
CI_{50} : concentration inhibitrice à 50%
CLHP-DAD : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes
CLHP-MS : Chromatographie Liquide haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse
CLMP : Chromatographie liquide moyenne pression
CMB : concentration minimale bactéricide
CMI : concentration minimale inhibitrice
Cor : Corrèze
COSY : COrrelated SpectroscopY

d : doublet
DCM : dichlorométhane
dd : double doublet

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMPO : 5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide
DMSO : diméthylsulfoxide
dNTP : mélange de plusieurs désoxyribonucléotides

EROs : espèces réactives de l'oxygène
ESI : Electrospray ionisation
Extrait AC : extrait acétonique
Extrait DCM : extrait dichlorométhanique

Gir : Gironde
GNPS : Global Natural Products Social Molecular Networking

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz : Hertz

ITS : Internal Transcribed Spacer

J : constantes de couplage

LC-MS : Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

m : multiplet
m/z : rapport masse sur charge
MB : mycobank
MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0
MeOH : méthanol
MGY Malt, Glucose, Yeast
Milieu MEA : gélose à base d'extrait de malt
Milieu PDA : potato dextrose agar
Milieu TS : milieu Tryptone-Soja
min : minutes
MRM : Monitoring reaction multiple
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium

NaOCl : hypochlorite de sodium
nd : non déterminé
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

$O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde
OA : milieu à base d'avoine (oatmeal agar)
OSMAC : One Strain Many Compounds

PACT : photochimiothérapie antibactérienne
PBS : phosphate-buffered saline
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
PDB Potato Dextrose Broth
PDT : photothérapie dynamique
ppm : partie par million

R_f : rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPE : Résonance Paramagnétique Électronique
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

s : singulet
SVF : sérum de veau fœtal

t : triplet
TA : température ambiante
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TMS : tétraméthylsilane
T_R : temps de rétention

UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra-violet

XTT : sel de tétrazolium

YNB-Glc : Yeast Nitrogen Base complémenté en glucose

ZNIEFF : Zone Naturelle d'Intérêt Écologique, Faunistique et Floristique

δ : déplacements chimiques

INTRODUCTION

Les lichens sont des organismes singuliers résultant d'une symbiose unique dans le monde vivant entre deux entités biologiques que tout sépare sur le papier, et formant pourtant, un seul et même être vivant, confirmant le vieil adage « l'union fait la force ».

Les lichens produisent des métabolites secondaires spécifiques avec un large éventail de structure possédant de multiples activités biologiques, compte tenu de la grande diversité de leur écosystème et de leur capacité à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes. Cette capacité exceptionnelle de résistance en fait des espèces pionnières.

Toutefois, il reste encore des zones dans le monde ayant sans aucun doute des richesses lichénologiques pas encore découvertes, comme en témoigne, par exemple, la découverte sur un seul arbre de pas moins de 173 espèces de lichens en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Aptroot, 2001).

Cependant, les lichens sont des organismes à croissance lente (Nash III, 2008). L'accès à leurs métabolites peut s'avérer difficile lorsque le thalle est peu développé (ex. espèces du genre *Lepraria*) ou peu abondant (ex. *Cladonia incrassata*). Ainsi, dans un contexte de protection des ressources naturelles, la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir d'organismes cultivables s'avère être une voie prometteuse.

De plus, le thalle lichénique constitue une niche écologique de choix pour d'autres microorganismes. En effet, des champignons et des bactéries épi- et endolichéniques ou encore des champignons lichénicoles peuvent coloniser les lichens (Biosca et *al.,* 2016; Honegger et *al.,* 2013; Honegger, 2012; Arnold et *al.,* 2009; Grube et *al.,* 2009). Au sein de ce microcosme, ces microorganismes produisent des métabolites secondaires leur permettant d'interagir ou de survivre dans cet environnement.

Afin de mettre en évidence de nouvelles potentialités thérapeutiques, et de préserver l'équilibre écologique des milieux propices au développement des lichens, nous nous sommes intéressés aux communautés fongiques associées aux lichens, et plus particulièrement aux champignons endolichéniques. Leurs métabolites ont été décrits pour la première fois, il y a dix ans (Paranagama et *al.,* 2007), et depuis la recherche consacrée aux composés endolichéniques d'origine fongique s'est régulièrement intensifiée. Leur culture au cours des dernières années a conduit à la caractérisation chimique de plus d'une

BY-NC-ND

centaine de nouveaux produits naturels, dont beaucoup ont montré de multiples activités biologiques. Ils représentent donc une source prometteuse de produits naturels originaux pour la recherche de nouvelles molécules bioactives ayant un intérêt pharmaceutique (Singh et *al.,* 2017). Seule une petite partie des 18 500 espèces de lichen a été étudiée pour leurs champignons endolichéniques. Les informations concernant ce groupe de champignons sont donc limitées.

Dans ce contexte de recherche de molécules ayant un effet thérapeutique, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux problèmes de santé publique majeure, que sont les biofilms et les cancers.

Le premier concerne, les résistances aux traitements antifongiques ou antibactériens, qui n'ont de cesse d'augmenter. Ces résistances peuvent être dues à l'adaptation de certains champignons ou bactéries pathogènes aux différentes molécules actuellement disponibles sur le marché ou à la formation de biofilm (structures complexes constituées par des populations de microorganismes englobées dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles). Le biofilm protège les microorganismes et leur permet de survivre dans des conditions hostiles. Ils peuvent ainsi résister à de nombreux traitements tels que des antibiotiques ou des désinfectants. De nouvelles approches consistant à empêcher la formation de biofilms notamment en inhibant les étapes d'adhérence ou de maturation sont l'un des enjeux développés au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges (Millot et *al.,* 2017).

Le second concerne, la lutte contre le cancer qui est devenue lors des dernières décennies un enjeu majeur de santé publique. En 2011, le cancer de la prostate était le plus fréquent chez l'homme (environ 54 000 nouveaux cas) suivi par le cancer des poumons et le cancer colorectal. Chez la femme, le cancer colorectal est le deuxième cancer incident, après le cancer du sein. Il constitue la deuxième cause de décès par cancer en France. Il représente près de 12 % de l'ensemble des décès par cancers (respectivement 11,1 % et 13,0 % chez l'homme et la femme), d'où l'importance de trouver de nouveaux composés bioactifs (Institut national du cancer, 2017). Ainsi, la recherche de nouvelles molécules actives d'origine naturelle ou synthétique capables de cibler spécifiquement les cellules tumorales est une autre thématique développée au sein du LCSN de Limoges (Delebassée et *al.,* 2017).

BY-NC-ND

Le choix du lichen d'étude a été effectué sur la base des résultats d'un criblage biologique d'une trentaine d'espèces récoltée en Limousin, précédemment réalisés au laboratoire, afin de valoriser les ressources naturelles locales et d'exploiter leurs potentialités thérapeutiques. Les activités antiprolifératives sur la lignée cellulaire HT-29 (cancer colorectale) et anti-biofilm fongique des extraits acétoniques bruts ont été évaluées. Ainsi, les résultats de ce criblage biologique ont permis de mettre en évidence plusieurs lichens ayant des activités biologiques intéressantes. Le genre *Nephroma* s'est démarqué tant pour son potentiel antiproliférative que pour sa capacité à inhiber la formation et la maturation de biofilm à *Candida albicans* (Delebassée et *al.,* 2017; Millot et *al.,* 2017).

Ces différents résultats préliminaires ont permis de sélectionner *Nephroma laevigatum*.

Le premier objectif de ce travail a été de mener une investigation phytochimique de *Nephroma laevigatum*. Le second objectif a été d'étudier la diversité des champignons associés à ce lichen puis de réaliser une étude phytochimique plus approfondie de deux souches fongiques sélectionnées pour leurs activités antiprolifératives et anti-biofilms.

Ce manuscrit est divisé en trois parties, la première est axée sur les lichens, dont le premier chapitre, les présentes de manière générale en détaillant brièvement leur répartition et leur morphologie. La description du genre *Nephroma* et de ses métabolites font l'objet d'une présentation plus détaillée. Le second chapitre est consacré aux métabolites secondaires lichéniques en précisant leurs voies de biosynthèse et leurs propriétés biologiques. Le troisième et dernier chapitre de cette partie, présente les résultats obtenus sur l'étude phytochimique de *Nephroma laevigatum* et l'évaluation biologique de ces extraits et métabolites isolés.

La deuxième partie traite des champignons endolichéniques isolés de *Nephroma laevigatum*. Le premier chapitre de cette partie présente les données bibliographiques disponibles sur les champignons endolichéniques, de leurs origines à leurs métabolites. Le second chapitre présente les résultats obtenus de l'isolement et de l'identification des champignons endolichéniques de *N. laevigatum*, le criblage biologique des extraits obtenus à partir de souches sélectionnées et l'étude phytochimique de deux souches sélectionnées.

La troisième partie regroupe l'ensemble des différents matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail.

BY-NC-ND

PARTIE A

Lichens et métabolites secondaires

I.1. Qu'est-ce qu'un lichen ?

Souvent considéré comme des parasites des arbres, les lichens n'ont pas une bonne réputation. Cependant, cette croyance populaire est fausse. En effet, bien que ces organismes soient ancrés sur leur support, ils n'ont pas de racine ni de suçoir permettant de puiser les ressources du substrat.

L'étymologie du mot « Lichen » vient du grec *leikhên* (lécher), se référant à la manière qu'ont les lichens de se fixer au substrat. En effet, ils semblent « lécher » le support sur lequel ils se développent.

Les lichens résultent d'une association symbiotique entre un champignon (mycobionte) et une algue et/ou une cyanobactérie (photobionte). Environ 85% des photobiontes sont des algues vertes et 10% sont des cyanobactéries (Honegger, 2012). Une toute petite partie des lichens (5%) associent deux photobiontes, la symbiose est alors dite en tripartite (Nash III, 2008). En 2016, une étude publiée dans la revue Science a révélé qu'en plus du mycobionte et du photobionte, des basidiomycètes spécifiques sont systématiquement retrouvées en tant que troisième ou quatrième (pour les lichens tripartites) partenaire. (Spribille et *al*., 2016).

Il existe environ 18 500 espèces de lichens (Boustie et Grube, 2005; Feuerer et Hawksworth, 2007; Molnár et Farkas, 2010) couvrant approximativement 8% de la surface terrestre (Ahmadjian, 1995). Les lichens sont nommés à partir du nom du partenaire symbiotique qui assure la reproduction sexuée à savoir le champignon. Dans 99% des cas, le mycobionte appartient aux Ascomycètes (Boustie et Grube, 2005; Honegger, 2012). Pour les 1% restant, les mycobiontes sont des Basidiomycètes. Les lichens sont respectivement qualifiés d'ascolichens et de basidiolichens.

I.2. Répartition, écologie et diversité

Les plus anciens fossiles de lichens découverts datent d'environ 600 millions d'années. Ces fossiles indiquent que les champignons ont développés des partenariats symbiotiques avec des photoautotrophes avant l'évolution des plantes vasculaires (Yuan et *al.*, 2005).

Les lichens colonisent presque toute la surface de la Terre. Ils sont retrouvés dans la plupart des écosystèmes terrestres et aquatiques (ex. *Bacidina inundata*), souvent dans des environnements extrêmes inaccessibles pour la plupart des autres formes de vie (régions

BY-NC-ND

polaires, arides et tropicales) (Seaward, 2008). En effet, les lichens peuvent entrer dans un mode de vie ralenti où leur activité métabolique est en pause ou à l'arrêt, pour survivre à de longues périodes de sécheresse. Les lichens sortent de cette dormance (état sec) dès que les conditions environnementales sont favorables (humidité suffisante). Dès lors, ils reprennent ensuite leur activité métabolique, c'est le phénomène de reviviscence (Aubert et *al.*, 2007). Cette capacité a été observée chez des lichens envoyés dans l'espace en 2005. En effet, après deux semaines d'exposition aux conditions spatiales (rayonnements UV et cosmiques massifs ; conditions létales pour les bactéries et autres organismes) et une déshydratation extrême engendrée par le vide, aucunes dégradations physiologiques ou structurelles n'ont été observées. Les lichens se sont révélés être capables de récupérer en totalité leur activité métabolique dans les 24 heures (Sancho et *al.*, 2007).

Ils peuvent également être très sensibles aux perturbations, en particulier celles générées par l'activité humaine telle que la pollution (ex. *Nephroma laevigatum*).

Les lichens sont capables de coloniser une large gamme de substrats, non seulement des surfaces naturelles (Figure 1) comme les roches (saxicoles), le sol (terricoles), l'écorce (corticoles), le bois mort (lignicoles), les feuilles (foliicoles), les mousses (muscicoles), mais aussi des matériaux artificiels tels que le plastique, le caoutchouc, les métaux ou le verre (Brodo, 1973).

Figure 1 : Quelques exemples de lichens sur différents types de substrats
Source : http://www.waysofenlichenment.net/lichens/alphabetic_index.html

I.3. Morphologies et anatomies des lichens

Le lichen possède un appareil végétatif rudimentaire : le thalle (ne possède ni feuilles, ni tiges, ni racines). L'étendue et la variété des terrains accessibles aux lichens ont entrainés au niveau du thalle, une grande diversité de formes et de couleurs (Van Haluwyn et *al.*, 2009 ; Figure 2).

BY-NC-ND

Les différents types de thalles sont :

- Les thalles **crustacés** : sous forme d'une croûte qui adhère plus ou moins profondément au substrat (90% des lichens sont à thalles crustacés).
- Les thalles **foliacés** : sous forme de lames ou de feuilles plus ou moins lobées. Ils se détachent facilement du substrat bien qu'ils puissent être fixés par des rhizines.
- Les thalles **lépreux** : pulvérulents, formés de minuscules granules. Ils se détachent facilement du substrat.
- Les thalles **squamuleux** : sous forme de petites squamules (ou écailles) dispersées, contiguës ou imbriquées.
- Les thalles **fruticuleux** : sous forme de lanières plates ou de tiges plus ou moins ramifiés à buissonnants, dressés ou pendants. Le thalle adhère à son substrat par une surface réduite.
- Les thalles **gélatineux** : leur aspect varie selon l'humidité. A l'état sec, ils sont noirs et cassants. A l'état humide, ils ont une consistance gélatineuse-pulpeuse. Ils peuvent être crustacés, foliacés, squamuleux ou fruticuleux. Les filaments mycéliens sont associés à des cyanobactéries (cyanolichens).
- Les thalles **composites** ou **complexes** : formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé, crustacé ou squamuleux, adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé plus ou moins ramifié ou en forme de trompette (podétion chez les *Cladonia* ou pseudo-podétion chez les *Stereocaulon*).

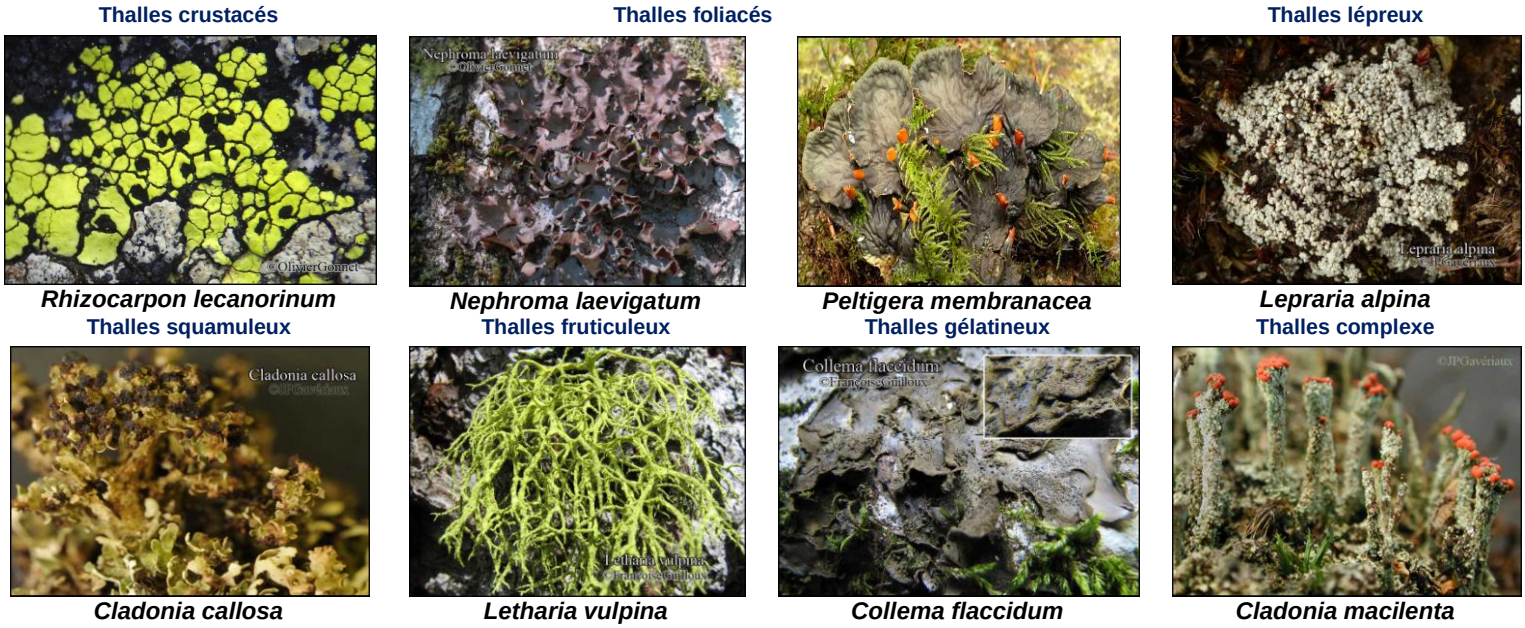


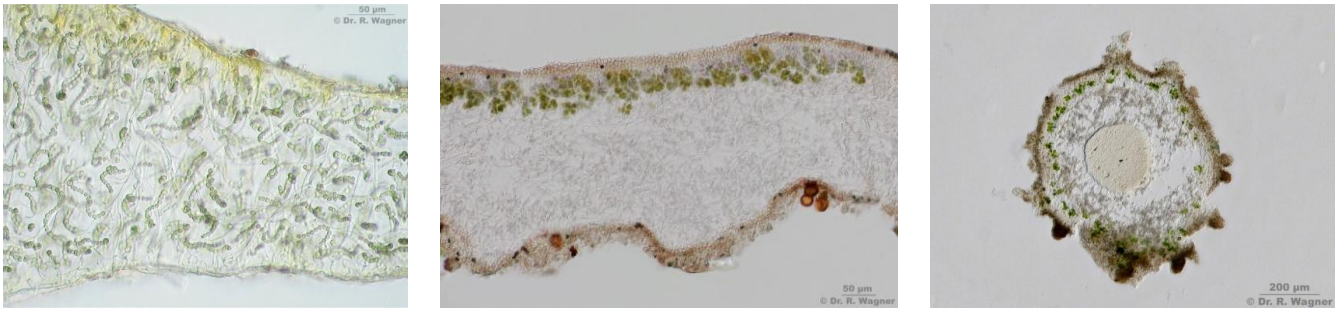
Figure 2 : Principaux types de thalles lichéniques.
Source : http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm

BY-NC-ND

Le champignon est responsable de la structuration du thalle. En effet, l'anatomie des lichens se distingue par deux types de structures :

- Structure **homéomère** : les hyphes et les cellules algales ou cyanobactéries sont répartis de façon homogène dans toute l'épaisseur du thalle (Figure 3).
- Structure **hétéromère** : disposition par couches. Deux types de structures sont observés :
  1. *Structure stratifiée* composée de différentes couches organisées (Figure 3) :
     - un cortex supérieur formé de filaments mycéliens jointifs ;
     - une couche algale, algues enserrées d'hyphes mycéliens ;
     - une couche médullaire ou médulle formée par des hyphes très lâches ;
     - un cortex inférieur, filaments mycéliens très denses parfois muni de rhizines pour la fixation du thalle au substrat.
  2. *Structure radiée* : mêmes couches que la structure stratifiée mais disposées de façon concentrique (symétrie centrale ; Figure 3).

Structure homéomère | **Structure hétéromère stratifiée** | **Structure hétéromère radiée**



Collema auriforme | ***Nephroma laevigatum*** | ***Usnea intermedia***

Figure 3 : Coupes transversales de lichens observés au microscope optique (x 400).
Source : http://www.dr-ralf-wagner.de

I.4. Échanges nutritionnels entre mycobionte et photobionte

Les différents partenaires symbiotiques assurent des rôles bien distincts au sein du lichen permettant des échanges nutritionnels et ainsi contribuant à son développement.

En effet, le mycobionte a un rôle dans la fixation du lichen (grâce notamment aux rhizines) et joue un rôle dans la protection de l'ensemble. Il fournit au photobionte l'eau et les sels minéraux (puisés dans l'environnement extérieur tel que le substrat) ainsi que des vitamines comme par exemple la vitamine C. Le photobionte quant à lui réalise la photosynthèse (organisme autotrophe pour le carbone) et apporte au mycobionte des vitamines (notamment la vitamine B).

BY-NC-ND

Dans le cas d'une algue verte, le carbone est fourni au mycobionte sous forme de polyols tandis que pour les cyanobactéries, il est fourni sous forme de glucose. Les cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique, transféré au mycobionte sous forme d'ammonium. Ainsi ces échanges nutritionnels permettent la synthèse de composés spécifiques originaux appelés substances lichéniques (Figure 4 ; Van Haluwyn et *al.*, 2009).

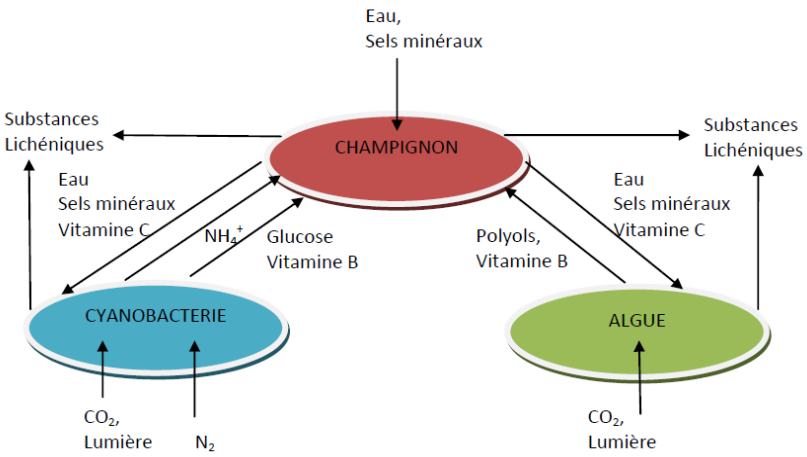


Figure 4 : Échanges nutritionnels entre les partenaires des lichens.

I.5. Les différents types de reproduction chez les lichens

Deux modes de reproduction peuvent être utilisés par les lichens : une dite végétative et l'autre dite sexuée.

I.5.1. Reproduction végétative

La reproduction végétative ou asexuée est assurée par des propagules végétatives symbiotiques. Les propagules végétatives les plus importantes sont les isidies et les sorédies. Bien qu'elles soient présentes sur de nombreux lichens, il existe aussi beaucoup d'espèces qui n'en possèdent pas. De plus, certaines espèces peuvent avoir à la fois des isidies et sorédies alors que d'autres ne produiront qu'un seul type de propagule.

- Les **sorédies** ressemblent à de petits granulés poudrés situés sur le bord du thalle. Chez certaines espèces, ils peuvent apparaître n'importe où sur le thalle ou se localiser à des zones délimitées appelées soralies et peuvent prendre diverses formes. Chaque sorédie se compose de quelques cellules algales entourées d'hyphes fongiques (Figure 5). Certaines soralies peuvent donner naissance à des isidies, appelés soralies isidifères.
- Les **isidies** sont des petites excroissances (bourgeons) formées d'algues et d'hyphes protégées par le cortex. Elles varient en fonction de l'espèce, de bulbaire à

BY-NC-ND

cylindrique ou ramifiée, parfois coralloïde (Figure 5). Certaines isidies peuvent donner naissance à des soralies, appelés isidies soralifères.

Imshaugia aleurites ***Parmelia saxatilis***

Figure 5 : Propagules de dissémination symbiotique.
Source : http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm

Légères, les isidies et les sorédies peuvent être transportées par le vent, l'eau ou les animaux. Une fois déposée sur un substrat approprié, elles peuvent générer de nouveaux thalles.

I.5.2. Reproduction sexuée

Seul le mycobionte assure la reproduction sexuée (le photobionte ne se divise que par mitose). L'organe reproducteur est nommé ascome chez les ascolichens et basidiome pour les basidiolichens. La reproduction sexuée implique la rencontre entre les spores issues du mycobionte et un photobionte. Elle est majoritairement retrouvée chez les lichens.

Les apothécies (Figure 6) sont des structures de reproduction principalement rencontrées chez les ascolichens. Celles-ci sont typiquement circulaires et semblables à un disque ou une coupe. Il existe également des espèces dans lesquelles la surface de l'apothécie s'élargit vers l'extérieur. Elles peuvent être de la même couleur que le thalle ou différentes. Leur diamètre peut varier de moins d'un millimètre à plus de deux centimètres, selon les espèces. Les apothécies se trouvent presque toujours sur la surface supérieure du thalle (le genre *Nephroma* est une exception ; Figure 6).

Apothécies **Apothécies faces inférieures** **Périthèces** **Lirelles**

Teloschistes chrysophthalmus ***Nephroma laevigatum*** ***Acrocordia conoidea*** ***Graphis scripta***

Figure 6 : Organes de reproduction sexuée chez les ascolichens
Source : http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm

BY-NC-ND

Lorsque les apothécies sont allongées ressemblant à de petites fentes droites ou sinueuses, celles-ci prennent alors le nom de lirelles (Figure 6).

Un autre type d'organe reproducteur retrouvé chez les lichens est le périthèce (Figure 6). A l'œil nu, il ressemble à de petits boutons sphériques, généralement noir dont le diamètre varie entre un à deux millimètres environ. Il s'ouvre par un pore (ou ostiole) dans sa partie supérieure et ainsi permet l'expulsion des spores. En fonction de l'espèce, le périthèce peut se développer totalement sur le thalle ou être incorporé dans celui-ci.

Chez les basidiolichens, les spores se forment à l'extérieur de cellules fertiles, les basides. Les basidiomes sont de petits champignons à lames, qui ressemblent à ceux des basidiomycètes non lichénisés (Figure 7).

Figure 7 : Basidiomes de *Lichenomphalia umbellifera*
Source : http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm

I.6. Utilisation des lichens

Les lichens trouvent des applications dans différents domaines. Ils ont été utilisés à travers le monde pour de nombreux usages. En médecine traditionnelle, pour traiter les plaies, les troubles de la peau ou les problèmes respiratoires et digestifs. Le genre *Usnea* est le plus communément employé, cependant d'autres genres comme *Thamanolia* ou *Lethariella* sont respectivement utilisés en Asie ou en Chine (Crawford, 2015).

De plus, comme les colorants synthétiques ont un impact environnemental important en raison de leur nature toxique, cancérogène et non biodégradable, la demande de teinture et de colorants pour le textile, l'alimentation et les cosmétiques provenant de sources naturelles a augmenté ces dernières années (Shukla et Upreti, 2015). Par exemple, l'orseille (colorant pourpre) a été le premier colorant documenté produit par le genre *Roccella* (Shukla et Upreti, 2015).

Certains lichens comme *Cladonia rangiferina* sont la base de la nourriture hivernale des rennes et caribous au Canada ou en Alaska.

BY-NC-ND

D’autre part, certains lichens sont récoltés de nos jours pour la parfumerie. Les deux principales espèces utilisées sont *Pseudevernia furfuracea* appelé « mousse d’arbre » et *Evernia prunastri* appelé « mousse de chêne » (Joulain et Tabacchi, 2009). Leur fragrance est à la fois, forte, terreuse, humide, moisie, boisée voire légèrement fumée. Elle a été la base au parfum « Chypre » créé par la famille Guerlain en 1840, puis pour le parfum du même nom créé en 1917 par François Coty. Ce parfum va donner son nom à une nouvelle famille olfactive : les Chyprés. Cependant, leurs extraits sont entrés dans la « Liste des substances que les produits cosmétiques ne peuvent contenir en dehors des restrictions prévues » (Règlement (CE) n°1223/2009) du fait de la présence d’allergènes, comme par exemple, l’atranorine, l’acide usnique et l’acide évernique (Johansen, 2002).

Les lichens fournissent aussi des informations sur les changements environnementaux et sont des bio-indicateurs précieux de la pollution atmosphérique et de l'intensité de l'utilisation des terres (altération de leur habitat, utiles pour la gestion des ressources naturelles ; Zedda et Rambold, 2015). En effet, certaines espèces de lichens peuvent tolérer des niveaux de pollution assez élevés, quand d’autres disparaissent au moindre changement d’environnement. Les métabolites lichéniques contrôlent l'homéostasie des métaux en favorisant l'absorption de certains cations métalliques et en réduisant l'adsorption des autres. Ils favorisent donc la tolérance des lichens aux métaux lourds dans les zones polluées (Molnár et Farkas, 2010). Ainsi, la sensibilité des lichens aux métaux lourds est spécifique de l'espèce.

I.7. Le genre Nephroma

Nephroma vient du grec *nephrós* (rein), faisant référence à la forme de l'apothécie. Le genre *Nephroma* (anciennement inclus dans les *Peltigeracées*) est actuellement placé dans sa propre famille, les *Nephromatacées* (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification du genre *Nephroma*

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycètes
Classe	Lecanoromycètes
Ordre	Peltigerales
Famille	*Nephromatacées*
Genre	*Nephroma*

BY-NC-ND

I.7.1. Écologie et répartition géographique

Les lichens du genre *Nephroma* sont des cyanolichens répartis dans le monde entier (Figure 8) avec une très faible présence en zone tropicale. Le genre compte environ 40 espèces.

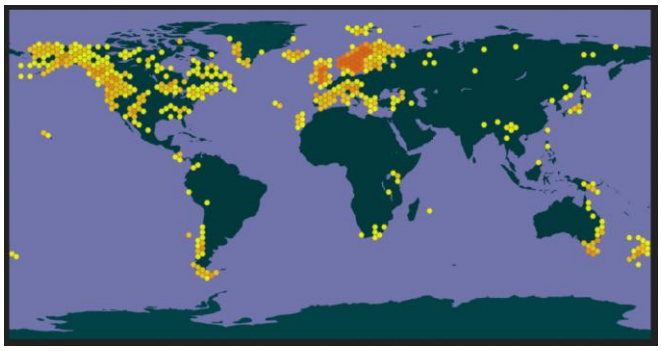


Figure 8 : Répartition du genre *Nephroma* Ach.
49 107 enregistrements géo-référencés
Source : https://www.gbif.org/species/2601179

Toutes les espèces du genre forment un groupe monophylétique (Lohtander et *al.*, 2002). Elles affectionnent plus particulièrement les milieux forestiers montagneux humides. Ce sont des espèces réputées indicatrices de vieilles forêts dont certaines espèces sont utilisées pour le calcul d'un indice de continuité écologique en milieu forestier (ex. *N. laevigatum* ; *N. parile*).

Les espèces retrouvées en France sont : *N. laevigatum* ; *N. parile ; N. bellum ; N. resupinatum* et *N. tangeriense* (Roux et coll., 2017; Van Haluwyn et *al.*, 2009).

I.7.2. Structure et morphologie

Les espèces du genre *Nephroma* ont toutes un thalle foliacé stratifié avec un cortex bien développé sur les deux surfaces. L'apothécie est formée sur la surface inférieure, qui est plus tard redressée pour exposer l'hyménium vers le haut. L'ascome est initialement interne avec une couverture végétative qui s'ouvre par une fente à la face inférieure du thalle. Les ascospores sont allongées, transversalement septées et brunes. Les sorédies (ex. *N. parile*) ou les isidies (ex. *N. resupinatum*) sont présents dans la plupart des espèces de *Nephroma*.

La majorité de ces espèces est bipartite toutefois certaines sont tripartites (Lohtander et *al.*, 2002). Le terme bipartite désigne les espèces qui ne possèdent qu'une seule composante photosynthétique, les cyanobactéries (*Nostoc*), qui forment une couche de photobiontes plus ou moins continue sous le cortex supérieur. À l'inverse, chez les espèces tripartites, deux composants photosynthétiques sont présents. Les algues vertes (*Coccomyxa*) forment la couche de photobiontes sous le cortex supérieur et les cyanobactéries sont confinées dans

BY-NC-ND

des structures spécialisées appelées céphalodies (structures de formes variées), elles peuvent être internes dans la médulle (ex. *N. arcticum,* Figure 9) ou externes sur la surface inférieure (ex. *N. australe*) (Lohtander et *al.*, 2002).

Nephroma arcticum

Figure 9 : Céphalodies internes à la médulle

Source : http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm

I.7.3. Composition chimique

Dans leurs travaux, James et White ont divisé le genre *Nephroma* en sept groupes fondés sur les métabolites biosynthétisés par ces espèces (James et White, 1987; White et James, 1988). Trois groupes ont été identifiés chez les espèces françaises (groupes 1, 3 et 4). En effet, certaines espèces produisent une large gamme d'anthraquinones (G3 ex. *N. laevigatum* et *N. tangeriense*), de triterpénoïdes (G4 ex. *N. parile, N. bellum* et *N. helveticum*) tandis que d'autres ne produisent aucunes substances lichéniques visibles par chromatographie sur couche mince classique (G1 ex. *N. resupinatum*) (James et White, 1987).

I.7.4. Description botanique de *Nephroma laevigatum*

Le lichen *Nephroma laevigatum* Ach. est une espèce de la famille des *Nephromatacées*, dont le photobionte est une cyanobactérie du genre *Nostoc*.

Ce lichen peut se trouver sur des troncs recouverts de mousses dans des forêts humides, également sur des murs et des roches particulièrement en situation océanique. C'est une espèce indicatrice de vieilles forêts.

La face supérieure du thalle est gris-brun à brun-rouge plus ou moins foncé à l'état sec et brun verdâtre très foncé à l'état humide. Les lobes sont arrondis de 0,2 à 1 cm de large, plus ou moins imbriqués, ascendants sur les bords. La face inférieure du thalle est plus ou moins ridée ou sillonnée, brun-roux, noirâtre au centre. La médulle est de couleur jaune clair à ocre. Les apothécies, sous formes de disques bruns, sont presque toujours présentes naissant à la face inférieure de l'extrémité des lobes qui se retourne ensuite (Figure 10).

BY-NC-ND

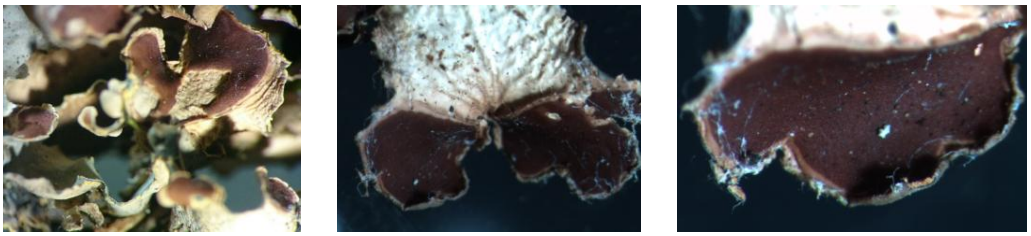


Figure 10 : Observation à la loupe binoculaire des apothécies de *Nephroma laevigatum* Ach.

Son thalle est de type foliacé de structure hétéromère (Figure 11), sans sorédies et pouvant atteindre jusqu'à 10 cm de diamètre. Les réactions thallines spécifiques de cette espèce sont la coloration rouge carmin de la médulle avec quelques gouttes de potasse (réactif K) et orange avec le réactif P (*para*-phényldiamine).

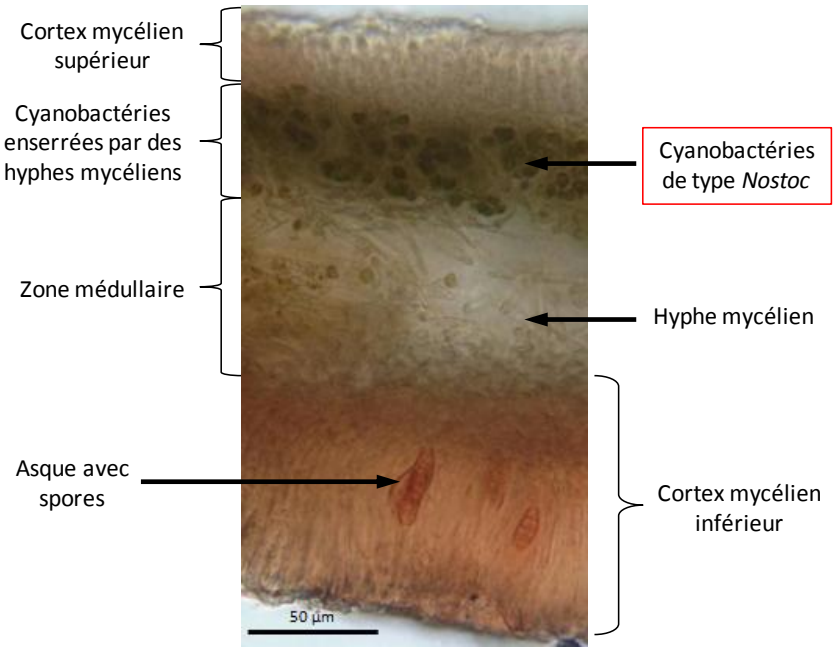


Figure 11 : Coupe transversale de *Nephroma laevigatum* observée au microscope optique (grossissement x400)

Les ascospores sont incolores à brunâtres à 3 cloisons elliptiques, 17-20 x 5-7 µm (Figure 12).

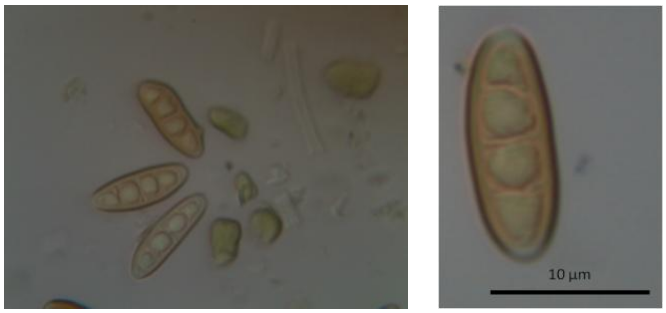


Figure 12 : Ascospores de *Nephroma laevigatum* observées au microscope optique (grossissement x400 et x1000)

L'espèce la plus proche de *N. laevigatum* est *N. bellum*. C'est une espèce surtout retrouvé en montagne (nord-boréale à continentale) alors que *N. laevigatum* est beaucoup plus océanique (Van Haluwyn et *al.*, 2009). Cette espèce se différencie par une médulle

BY-NC-ND

blanche (jaune clair à ocre pour *N. laevigatum*) et une réaction négative au réactif K (potasse). Toutefois, ces deux lichens peuvent être confondus avec deux espèces voisines, à savoir, *N. helveticum* et *N. resupinatum* (Figure 13). La principale différence étant que *N. laevigatum* et *N. bellum* ont leurs faces inférieures glabres.

Nephroma laevigatum ***Nephroma bellum*** ***Nephroma helveticum*** ***Nephroma resupinatum***

Figure 13 : Photos des différentes espèces pouvant être confondues avec *Nephroma laevigatum*.
Source : https://www.gbif.org/species/2601179

De plus, l'étude des champignons endolichéniques associés à *N. laevigatum* n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune publication, d'où notre intérêt plus particulier pour cette espèce (cf. Partie B). En effet, seul l'étude des champignons endolichéniques de *N. articum* a été publiée (Arnold et al., 2009).

BY-NC-ND

Le point de départ de la lichénologie a été établi avec les travaux de Zopf et Hesse. En 1907, Zopf publie ses travaux sur 150 composés lichéniques (Zopf, 1907). En 1912, environ 180 substances ont été décrites chez les lichens (Hesse, 1912). En 1954, Asahina et Shibata, ont publié leurs travaux dans le livre « *Chemistry of Lichen Substances* » contenant des structures de nombreux composés, des méthodes d'isolement, de purification et d'identification de substances lichéniques notamment des méthodes de micro-cristallisation. L'utilisation de la chromatographie sur couche mince a été ajouté par Culberson et Elix dans les années 70 en recensant plus de 430 molécules lichéniques (Culberson et Elix, 1989). L'ouvrage de référence des substances lichéniques a été publié par Huneck et Yoshimura en 1996 (Huneck et Yoshimura, 1996). En 2008, environ 1050 métabolites spécialisés ont été identifiés (Stocker-Wörgötter, 2008). Une troisième édition du catalogue des substances lichéniques a été publié par la suite en 2014 (Elix, 2014).

Les lichens produisent une grande variété de métabolites primaires et spécialisés (ou secondaires). Les métabolites primaires (protéines, acides aminés, polyols, polysaccharides et vitamines) sont produits à la fois par le photobionte et le mycobionte. Ils ne sont pas spécifiques des lichens (Stocker-Wörgötter, 2008). Les métabolites spécialisés sont produits par le mycobionte et s'accumulent dans le cortex (comme la pariétine, l'acide usnique,…) ou dans la couche médullaire.

Le photobionte peut également avoir une influence sur le métabolisme secondaire du mycobionte (Molnár et Farkas, 2010). Chez certaines espèces de lichens, les composés spécialisés sont en concentration plus élevées dans les structures reproductrices que dans les parties végétatives du thalle (Delebassée et *al.*, 2017; Le Pogam et *al.*, 2016; Hyvärinen et *al.*, 2000). En plus de ces différences au sein du thalle lichénique, les métabolites présents chez les individus d'une même espèce peuvent également différer selon les conditions environnementales (Boustie et Grube, 2005; Delebassée et *al.*, 2017). Ainsi, les lichens offrent une grande diversité de métabolites avec une large gamme de structures et d'activités biologiques.

BY-NC-ND

II.1. Voies de biosynthèse

La voie des acétates polymalonates est la plus représentée par rapport à celles de l'acide mévalonique et de l'acide shikimique chez les lichens (Figure 14).

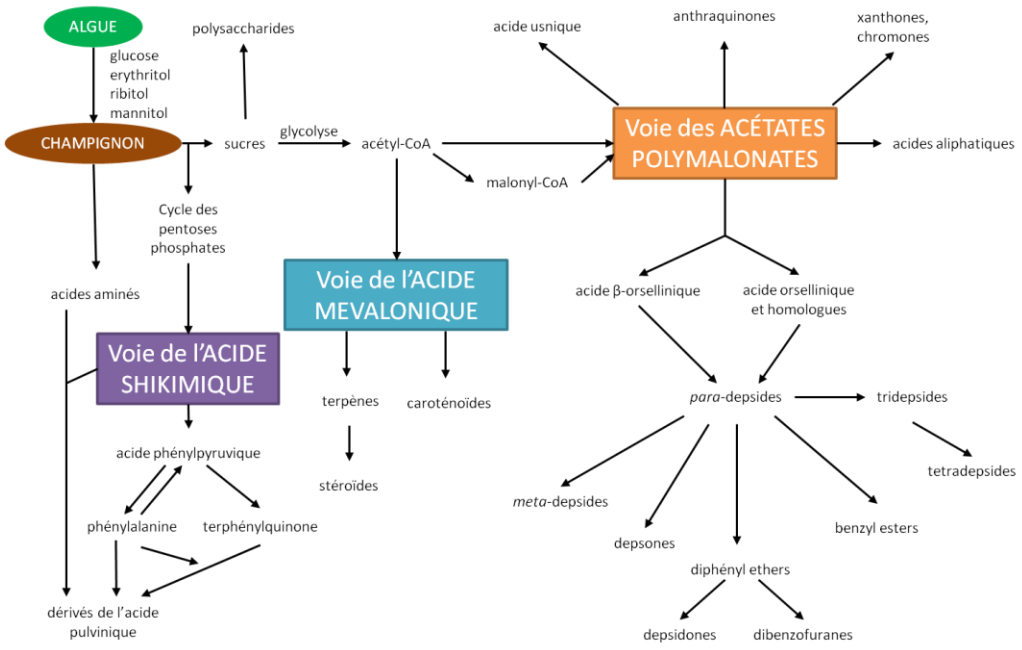


Figure 14 : Voies de biosynthèse probables menant aux principaux groupes de métabolites spécialisés du lichen (adapté de Elix and Stocker-Wörgötter, 2008)

- La **voie des acétates polymalonates**, permet la synthèse d'une multitude de composés et dérivés formant une large famille, structurellement diversifiée de produits naturels spécifiques ou non des lichens (Elix et Stocker-Wörgötter, 2008 ; Figure 15).

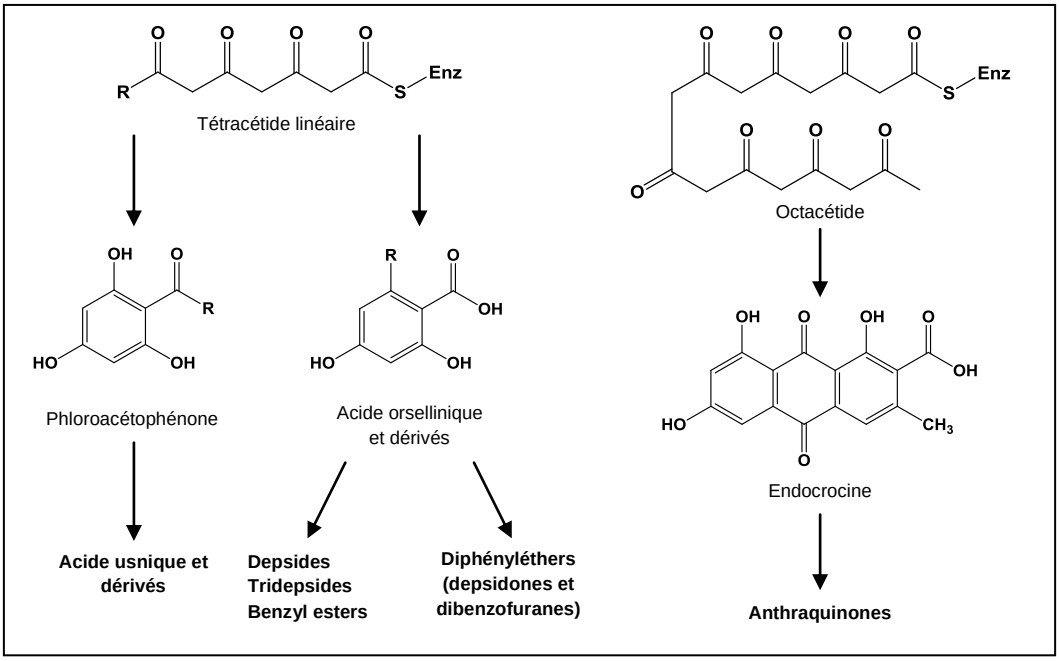


Figure 15 : Structures de quelques précurseurs des polycétides aromatiques

BY-NC-ND

Ces métabolites appartiennent à la famille :

- Des polycétides aromatiques (Figure 16) : depsides, depsidones, depsones et diphényléthers, dibenzofuranes tel que l'acide usnique, anthraquinones, naphtoquinones, xanthones, chromones, …

  De plus, les diphényléthers sont relativement rares chez les lichens par rapport aux depsides et depsidones. Plus récemment, les xanthones d'origine lichénique ont fait l'objet d'une revue (Le Pogam et Boustie, 2016) ainsi que les dibenzofuranes et leurs dérivés (Millot et *al.*, 2016).

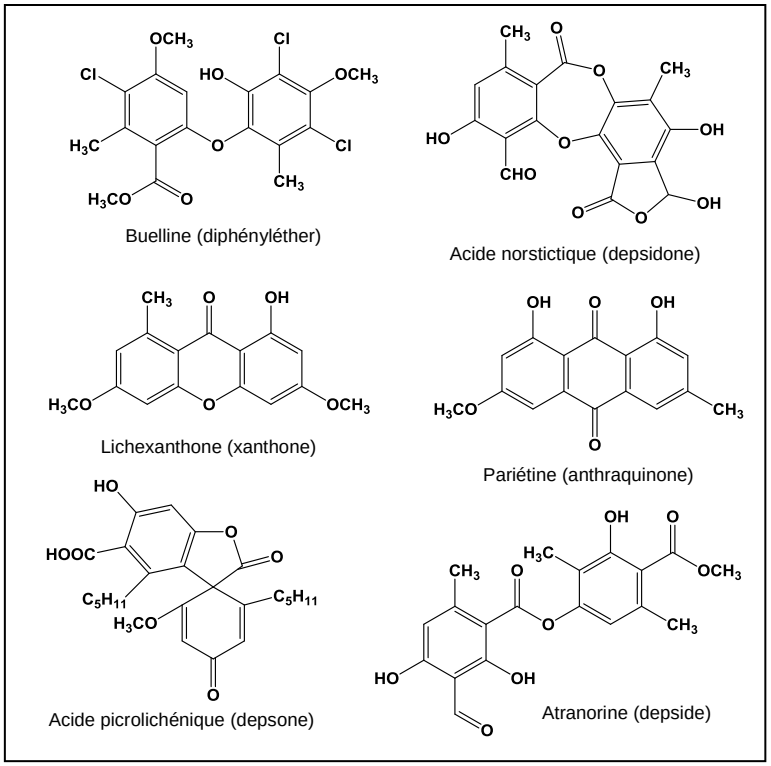


Figure 16 : Structures de quelques polycétides aromatiques

- Des acides aliphatiques (Figure 17) : di- et triacides gras et γ-lactones.

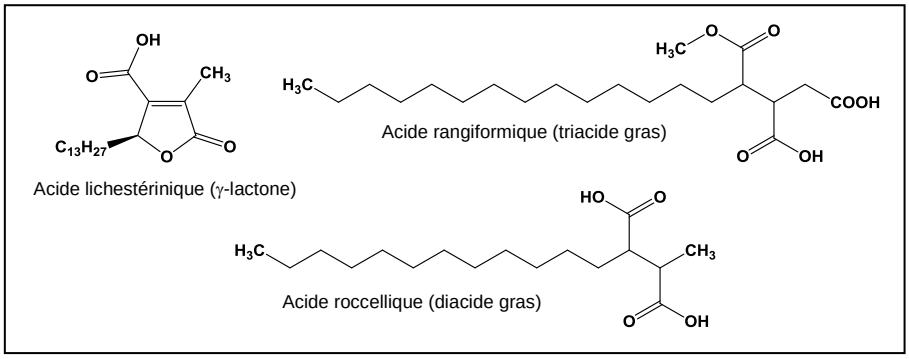


Figure 17 : Structures de quelques acides aliphatiques

BY-NC-ND

- La **voie de l'acide shikimique**, permet la biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) et de quelques substances azotées. Cette voie est principalement utilisée pour la synthèse des dérivés de l'acide pulvinique (Figure 18) ou des mycosporines (Favre-Bonvin et *al.*, 1987) chez les lichens.

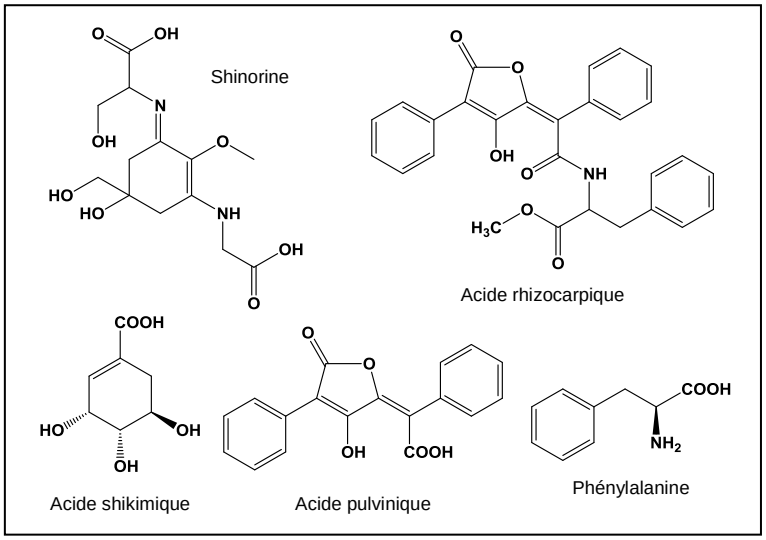


Figure 18 : Structures chimiques de l'acide shikimique, de la phénylalanine et des composés dérivés de l'acide pulvinique

Des études sur la biosynthèse des métabolites des lichens *Letharia vulpina* (Mosbach, 1964) et *Pseudocyphellaria crocata* (Maass et *al.*, 1964), produisant des pigments jaunes, l'acide vulpinique (substance toxique) et la calycine, ont montré que la phénylalanine et l'acide shikimique (Figure 18) sont des précurseurs de ces métabolites (Stocker-Wörgötter, 2008). Un autre composé typique synthétisé par des espèces du genre *Rhizocarpon*, est l'acide rhizocarpique (Figure 18) (Stocker-Wörgötter, 2008). Ce type de composé n'est pas spécifique des lichens car des dérivés de l'acide pulvinique sont également retrouvés chez des Basidiomycètes (Gill, 2003; Kanokmedhakul et *al.*, 2003; Velíšek et Cejpek, 2011).

- La **voie de l'acide mévalonique**, permet la synthèse de terpenoïdes et stéroïdes. Ces composés ne sont pas spécifiques des lichens, ils sont communs à d'autres organismes. Ces dérivés forment une famille de produits naturels à partir d'unités isopréniques (Figure 19).

Des monoterpènes (chez *Evernia punastri*), quelques diterpènes, sesquiterpènes et sesterterpènes ont été isolés des lichens (Huneck et Yoshimura, 1996; Joulain et Tabacchi, 2009). Les triterpènes constituent la famille la plus importante répertorié chez les lichens avec plusieurs squelettes (dammaranes, hopanes, stictanes, oléananes, lupanes, taraxastanes, …) (Joulain et Tabacchi, 2009).

BY-NC-ND

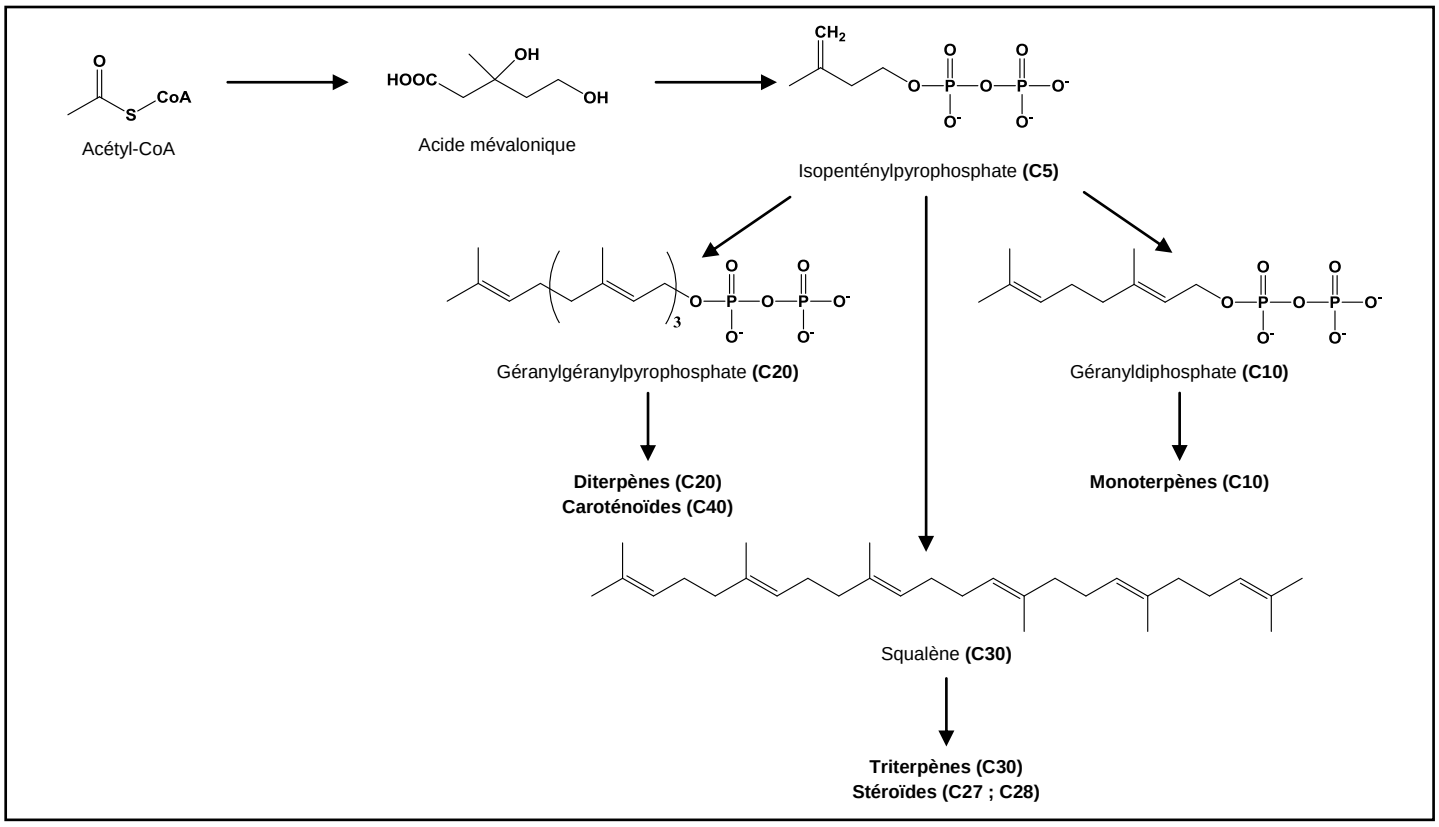


Figure 19 : Structures des précurseurs des composés de la voie de l'acide mévalonique.

L'ergostérol (stéroïde) ou la zéaxanthine (caroténoïde) sont des métabolites (Figure 20) biosynthétisés respectivement par *Cladonia rangiferina* et *Pleurosticta acetabulum* (Huneck et Yoshimura, 1996), mais également chez les basidiomycètes. La zéorine quant-à elle est spécifique du métabolisme fongique et lichénique (ex. *Leprocaulon microscopicum*). Plusieurs types de stérols ont été isolés, les cholestanes étant majoritaires (Joulain et Tabacchi, 2009).

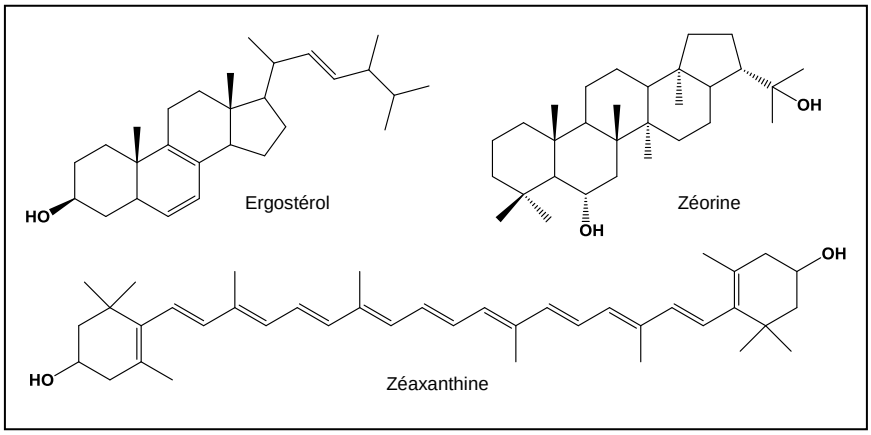


Figure 20 : Structures de produits dérivés de la voie de l'acide mévalonique

II.2. Composés isolés de *Nephroma laevigatum*

Les métabolites isolés de *Nephroma laevigatum* sont relativement peu nombreux (Figure 21). Parmi ces composés, plusieurs anthraquinones comme l'émodine ainsi que ses

BY-NC-ND

dérivés chlorés ont été isolés (Cohen et Towers, 1995, 1996). La présence de l'hopane-6α,7β,22-triol (ou 6α,7β,22-trihydroxyhopane), molécule triterpènique a également été décrite dans la littérature (Wilkins, 1980) ou encore, plus récemment une mycosporine hydroxyglutamicol (Figure 21) (Roullier et *al.*, 2011).

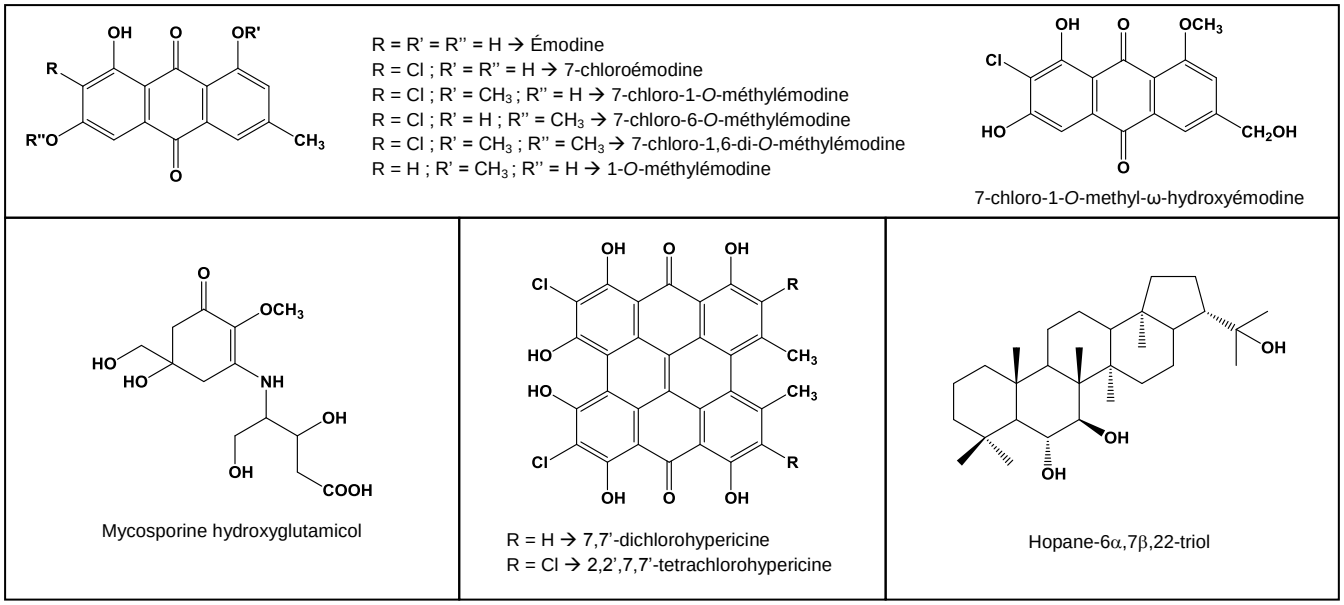


Figure 21 : Structures des métabolites isolés chez *Nephroma laevigatum*

II.3. Activités biologiques

Le rôle des métabolites secondaires lichéniques est encore peu connu. Cependant, ils joueraient probablement un rôle de protection contre les attaques environnementales (herbivores, pathogènes, irradiation UV, …). De ce fait, beaucoup de métabolites isolés des lichens présentent de multiples activités biologiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples de métabolites secondaires lichéniques et leurs activités biologiques associées

Métabolites secondaires lichéniques	Lichens	Activités biologiques	Références
Acide stictique	*Usnea articulata*	*Activités antioxydantes et photoprotectrices*	Lohézic-Le Dévéhat et *al.*, 2007
Méthyl haematommate	*Stereocaulon ramulosum*	*Activités antifongiques, antibiotiques*	Hickey et *al.*, 1990
5,7-dichloroémodine	*Nephroma laevigatum* et *Heterodermia obscurata*	*Activités anti-HSV, antivirales*	Cohen et *al.*, 1996
Acide lobarique	*Stereocaulon alpinum*	*Activités antiprolifératives, cytotoxiques*	Ögmundsdóttir et *al.*, 1998
Atranorine	*Physcia aipolia*	*Activités antimicrobiennes*	Molnár et Farkas, 2010

A l'heure actuelle, plusieurs travaux montrent le fort potentiel des métabolites secondaires lichéniques dans la recherche de composés bioactifs (Boustie et Grube, 2005; Molnár et Farkas, 2010; Shrestha et St. Clair, 2013; Shukla et *al.*, 2010).

BY-NC-ND

III.1. Récolte et identification de *Nephroma laevigatum*

Le choix des sites de récolte a été effectué selon les données de l'AFL (Association Française de Lichénologie) et des fiches issues de l'inventaire ZNIEFF (Zone Naturelle d'Intérêt Écologique, Faunistique et Floristique). La Région Nouvelle Aquitaine (résultant de la fusion des anciennes régions Aquitaine, Limousin et Poitou-Charentes) a été privilégiée offrant une multitude de lieux propices au développement des lichens. De ce fait, trois sites de récoltes ont été sélectionnés : un en Corrèze, un autre en Gironde et un dernier en Charente.

Des travaux de collectes ont été organisés sur les différents sites (Figure 22). Cinquante grammes de lichen ont été récoltés sur les troncs d'arbres feuillus en Corrèze en vue d'une étude phytochimique du lichen et de la mise en culture des champignons endolichéniques. Pour le site de Gironde, seule la mise en culture des champignons endolichéniques a été entreprise. Une faible quantité de lichen a ainsi été récolté également sur les troncs d'arbres feuillus, afin de préserver l'équilibre écologique du lieu de récolte. Cependant, ce lichen n'a pas été retrouvé sur le site de Charente bien qu'il ait été répertorié en 1998 par l'Association Française de Lichénologie (Bull. d'inform. AFL, 1998). Cette absence serait probablement due aux changements environnementaux du lieu de récolte (construction d'une route à proximité du site).

L'identification du lichen a été réalisée dans un premier temps par observation macroscopique. Les critères spécifiques de ce lichen ont tous été retrouvés (cf. I.7.4). Notamment la présence d'apothécies (disque brun) naissant sur la face inférieure de l'extrémité des lobes. De plus, cette caractérisation a aussi été confirmée par l'utilisation de clés de détermination des lichens (cf. Annexe 1).

Corrèze **Gironde**

03-10-2014 16-05-2015

Figure 22 : *Nephroma laevigatum* sur son substrat avant récolte

BY-NC-ND

Au niveau chimique, la médulle de *Nephroma laevigatum* se colore en rouge carmin avec quelques gouttes de potasse (K+) et en orange avec le *para*-phényldiamine (P+).

III.2. Extractions successives

Après récolte, le lichen a été trié minutieusement afin d'enlever les éléments étrangers tels que la mousse, l'écorce, la terre,… puis séché à l'air libre et broyé. Une masse de 50 g de lichen a ainsi été obtenue.

L'extraction séquentielle a été privilégié par rapport à une extraction classique (une seule étape d'extraction), dans le but d'optimiser les rendements et d'extraire le plus grand nombre de métabolites lichéniques. Les extractions successives par macération ont ensuite été mises en œuvre avec des solvants de polarités croissantes (dichlorométhane et acétone) (Figure 23). La macération est réalisée à température ambiante (TA) afin d'éviter la dégradation de certains composés (notamment les depsides, sensibles à la chaleur) et sous agitation, jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore. Après évaporation à sec des extraits, les rendements massiques des différentes extractions ont été calculés. L'extrait dichlorométhanique (DCM) et l'extrait acétonique (AC) ont obtenus un rendement massique de 5,86% et 1,26% soit une masse de 2,92 g et 0,63 g respectivement.

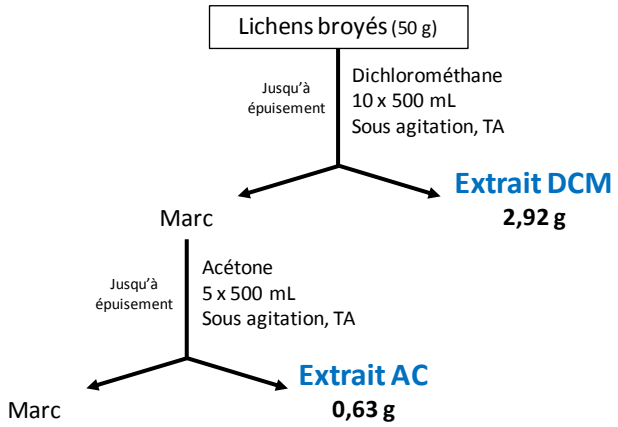


Figure 23 : Schéma général d'extractions de *Nephroma laevigatum*.

III.3. Profilage chimique des extraits lichéniques

III.3.1. Chromatographies sur couches minces (CCM) et CLHP-DAD

Les profils chimiques des deux extraits ont été analysés par CCM (Figure 24) et CLHP-DAD (Figure 25). Les extraits sont repris dans l'acétone à une concentration de 1 mg/mL et un dépôt de 10 µL est ensuite réalisé sur les plaques CCM. L'utilisation de plusieurs systèmes d'éluants a permis de mettre en évidence la complexité des deux extraits. Les plaques CCM ont été observées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde

BY-NC-ND

sulfurique (ANS) (Figure 24). Ce révélateur permet de mettre en évidence différentes familles de molécules (ex. triterpènes, dibenzofuranes, depsides, …).

L'extrait DCM est notamment riche en anthraquinones. En effet, elles sont caractérisées, avant coloration par l'anisaldéhyde sulfurique, par des tâches jaune-orange sur les plaques CCM (Figure 24).

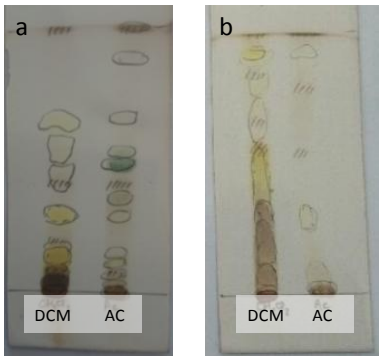


Figure 24 : Analyse par CCM des extraits DCM et AC
Éluant a : C_6H_{12}/AcOEt 80/20 (v/v) ; et éluant b : n-C_6H_{14}/AcOEt 40/60 (v/v).
Observation sous UV (254 et 365 nm) puis révélation par l'anisaldéhyde sulfurique.

L'analyse par CLHP-DAD (Figure 25) met en évidence les composés majoritaires, absorbants sous UV, des extraits lichéniques. Les profils UV et les temps de rétention des différents signaux observés ont été comparés aux données de la littérature.

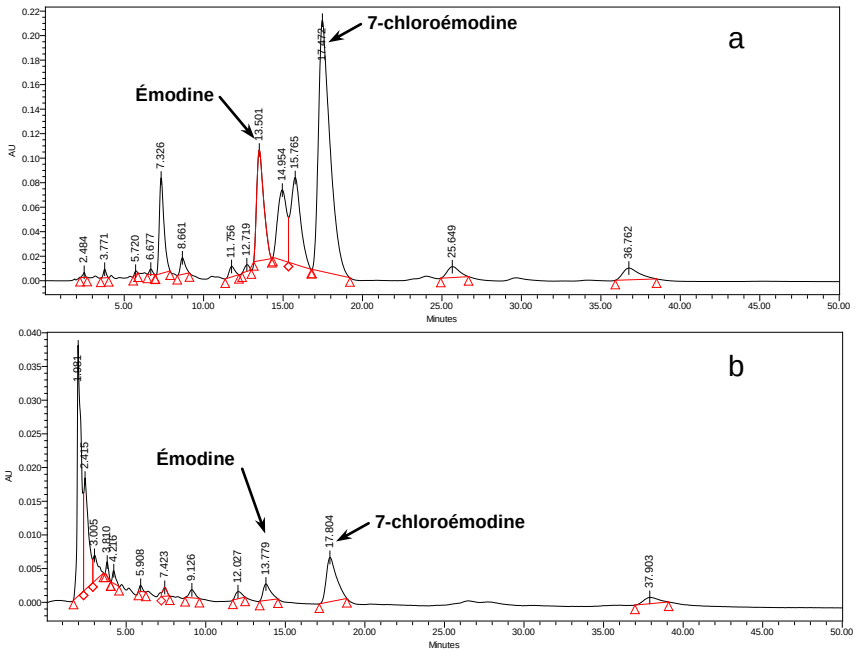


Figure 25 : Profils phytochimiques des extraits DCM (a) et AC (b) obtenus par analyse CLHP-DAD (à 254 nm)

Ainsi, la présence de l'émodine a été confirmée dans les extraits DCM et AC avec un temps de rétention de 13,5 et 13,8 min respectivement (Figure 25) et des λ_{max} à 221 ; 253 ; 266 ; 281 et 442 nm (Figure 26). La présence de la 7-chloroémodine a aussi été détectée

BY-NC-ND

dans les deux extraits lichéniques avec un temps de rétention de 17,4 et 17,8 min respectivement (Figure 25) et des λ_{max} à 222 ; 271 et 434 nm (Figure 26).

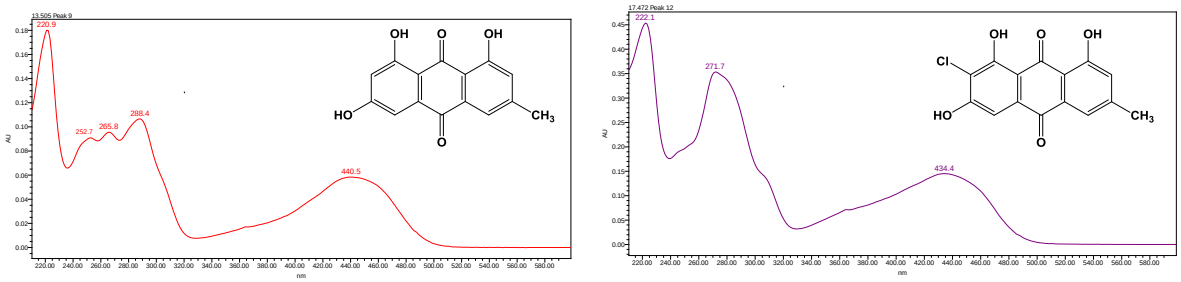


Figure 26 : Spectre UV de l'émodine et de la 7-chloroémodine de l'extrait DCM

De plus, les profils UV de certains signaux laissent supposer que ces composés appartiennent à la même famille que l'émodine et la 7-chloroémodine ou possédant des structures voisines (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des différents signaux observés dans l'extrait DCM

Pics	Temps de rétention en min	Absorbances (nm)	Spectre UV
1	2,49	269	
2	3,77	218 ; 281 ; 421	
3	5,72	219 ; 251 ; 286	
4	6,67	223 ; 271 ; 433	
5	7,32	221 ; 279 ; 422	
6	8,66	222 ; 252 ; 288 ; 445	
7	11,76	239 ; 252 ; 294 ; 305 ; 515	
8	12,72	278 ; 360	
10	14,96	278 ; 359	
11	15,77	280 ; 359	
12	25,66	280 ; 356	
13	36,76	223 ; 271 ; 310 ; 436	

Les signaux 2 ; 4 ; 5 et 13 présentent un profil UV similaire à la 7-chloroémodine. Les signaux 2 et 5 pourraient correspondre à la 8-*O*-méthylfragiline ou la 1-*O*-méthyl-7-chloroémodine (composés déjà isolés de *Nephroma laevigatum*).

BY-NC-ND

Les signaux 3 et 6 ont quant-à eux un profil UV proche de celui de l'émodine. Les signaux 8 ; 10 ; 11 et 12 possèdent des temps de rétention différents mais leurs profils UV sont quasi identiques. Ces quatre composés seraient probablement de la même famille dont les structures sont proches. Par contre, les signaux 1 et 7 sont complètement différents et ne correspondent pas à des composés déjà isolés de *Nephroma laevigatum*.

La comparaison des profils UV de l'extrait AC avec la littérature (Cohen et Towers, 1995; Roullier et *al.,* 2011) n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'autres composés lichéniques déjà répertoriés dans ce lichen.

III.3.2. Réseaux moléculaires

Afin d'appréhender la diversité chimique de *Nephroma laevigatum*, des réseaux moléculaires ont été réalisés sur l'ensemble des données LC-MS/MS (haute résolution ; cf. Partie C § IV.5) des deux extraits lichéniques à l'aide de la plateforme GNPS (http://gnps.ucsd.edu) et visualisés par l'utilisation du logiciel Cytoscape (Figure 27).

Cette représentation a pour but d'ordonner, de visualiser et de mettre en évidence les interconnexions des différents composés présents dans les extraits par l'utilisation de leurs données LC-MS/MS. Les composés sont alors représentés sous forme de nœud. Leurs connexions tiennent compte des voies de fragmentation des composés. Elles sont symbolisées par des liaisons plus ou moins épaisses, en fonction de la similarité des spectres MS/MS.

Après analyse du réseau moléculaire, plusieurs composés déjà isolés de *Nephroma laevigatum* ont pu être positionné dans le réseau (Cohen et Towers, 1995). Ainsi, la présence de l'émodine, de la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine, de l'hopane-6α,7β,22-triol et de la 7-chloro-1-O-méthyl-ω-hydroxyémodine a pu être constatée (Figure 27 ; cercles rouges). Cependant la 7-chloroémodine isolée lors de l'étude phytochimique n'apparait pas dans le réseau. Ceci s'explique notamment par une non fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire à *m/z* 305 $[M+H]^+$ (présent dans le spectre de masse) dans les conditions utilisées.

BY-NC-ND

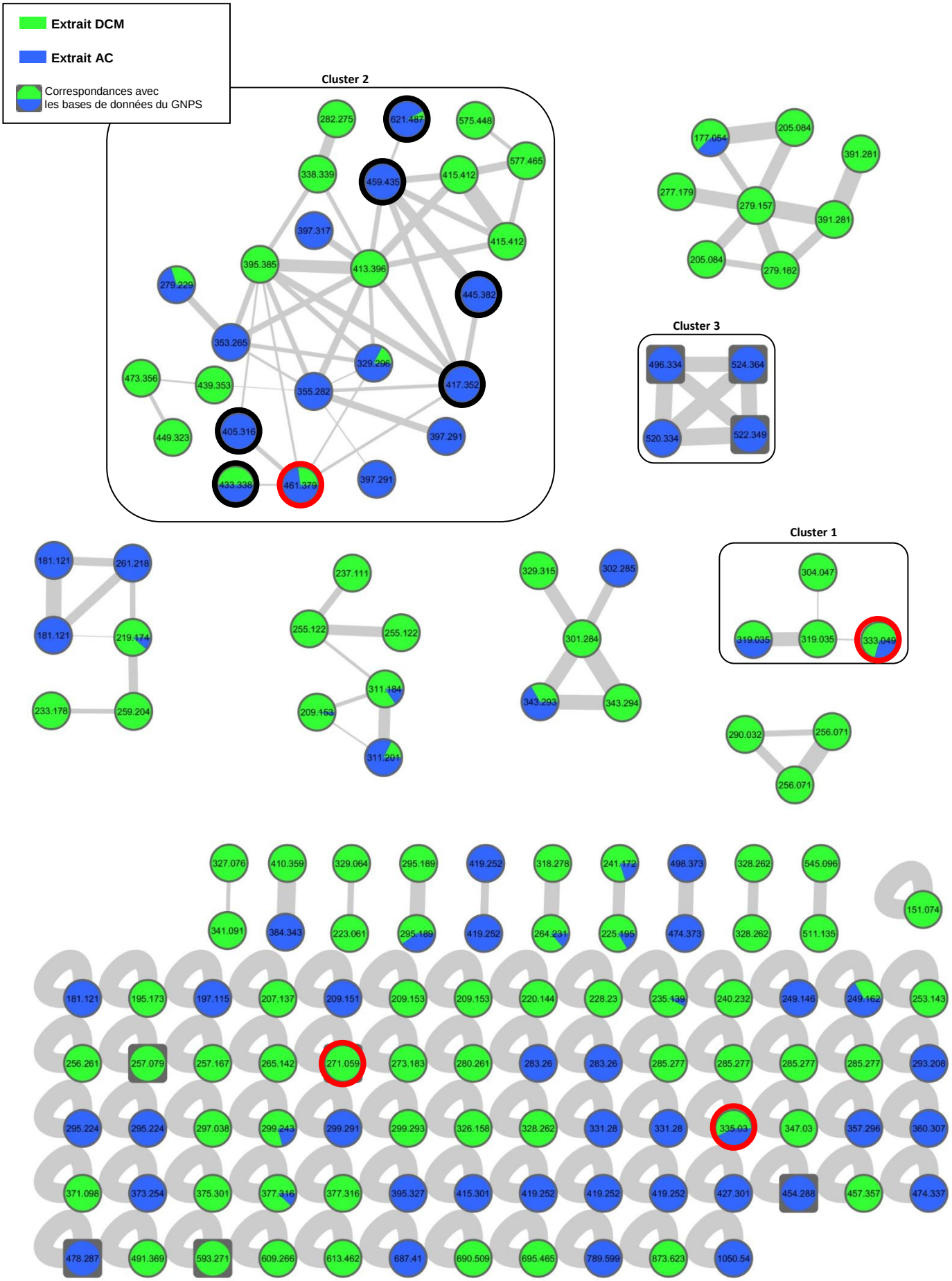


Figure 27 : Réseau moléculaire obtenu après visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres MS/MS des différents extraits lichéniques

Les cercles rouges correspondent aux molécules connues et isolées de *Nephroma laevigatum* et les cercles noirs aux composés étudiés proche de l'hopane-6α,7β,22-triol (*m/z* 461 $[M+H]^+$)

BY-NC-ND

Le cluster [1] est constitué de quatre anthraquinones structuralement proches. Le spectre MS/MS de l'ion pseudo-moléculaire à T_R = 22,7 min, montre la présence d'un ion précurseur à *m/z* 319 $[M+H]^+$, un pic intense à *m/z* 304 $[M+H-CH_4]^+$, un pic à *m/z* 276 $[M+H-CH_4-CO]^+$ et un pic à *m/z* 289 correspondant à l'ion $[M+H-CH_2O]^+$. Cependant, après analyse d'un autre spectre MS/MS à T_R = 23,4 min, des fragments similaires ont été obtenus (cf. Annexe 3 et figure 29). Ainsi, la comparaison de ces deux spectres MS/MS n'a pas permis de différencier deux composés souvent rencontré chez les lichens à savoir, la fragiline et la 1-*O*-méthyl-7-chloroémodine (*m/z* 319 $[M+H]^+$) (Figure 28), de formule brute $C_{16}H_{11}ClO_5$, confirmé par la présence sur le spectre de masse, d'un amas isotopique en accord avec les atomes de ^{35}Cl et ^{37}Cl (cf. Annexe 3).

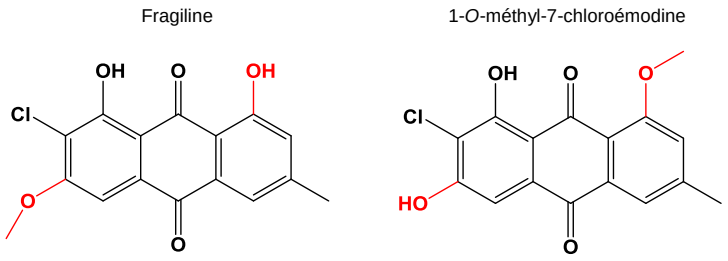


Figure 28 : Structures planes de la fragiline et de la 1-*O*-méthyl-7-chloroémodine du composé à *m/z* 319 $[M+H]^+$

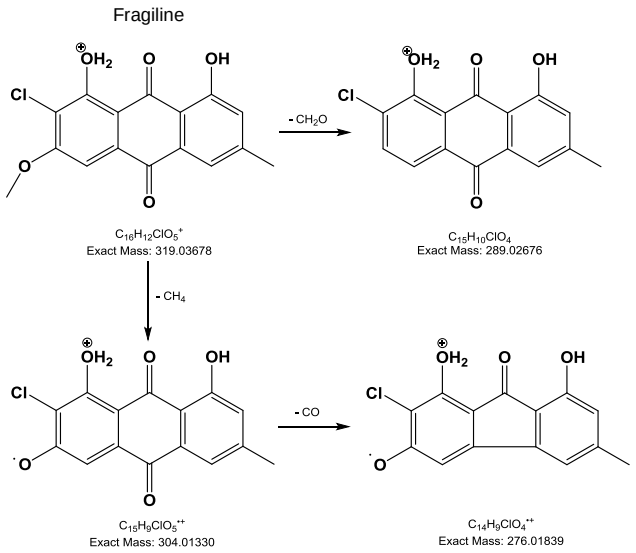


Figure 29 : Schéma de fragmentation de la fragiline

Le composé à *m/z* 333 $[M+H]^+$ présente les fragmentations caractéristiques des anthraquinones (cf. Annexe 4) et similaires à la fragiline. Il a été identifié comme étant la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine (Figure 30). Cette molécule a été isolée lors de l'étude phytochimique de l'extrait DCM. Ainsi, lors de l'analyse LC-MS/MS, elle a été injectée dans les mêmes conditions que les extraits bruts et révélée sur le réseau moléculaire.

BY-NC-ND

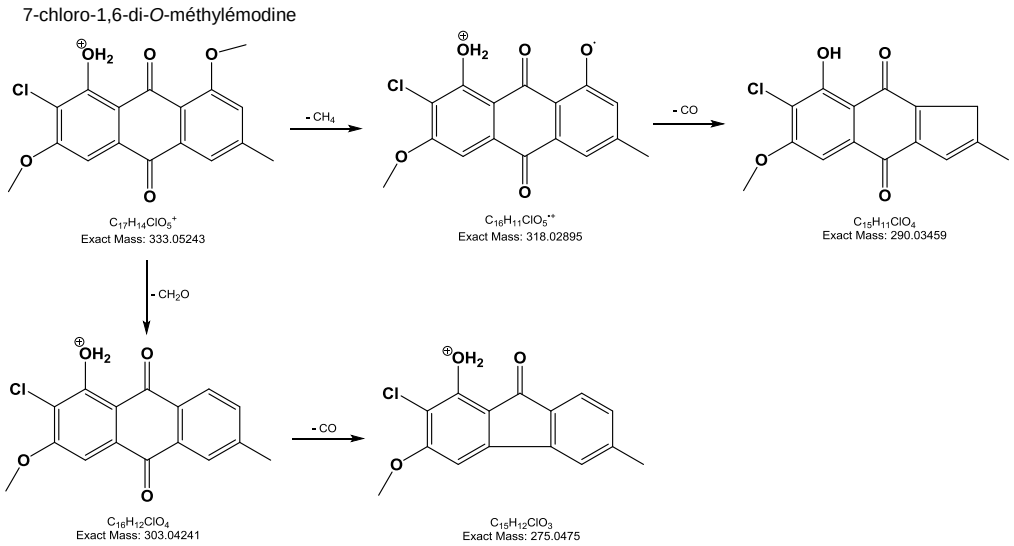


Figure 30 : Schéma de fragmentation de la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine

Le cluster [1] a aussi permis de mettre en évidence un composé à *m/z* 304 $[M+H]^+$ structuralement proche de la fragiline et la 1-*O*-méthyl-7-chloroémodine. Cependant, aucune correspondance avec des molécules connues de *Nephroma laevigatum* a été trouvée. Ainsi, une proposition de structure a été faite accompagnée d'un schéma de fragmentation (Figure 31) en accord avec sa formule brute ($C_{14}H_{10}ClN_3O_3$). L'ion précurseur à *m/z* 304 $[M+H]^+$ (cf. Annexe 4) de ce composé étant de masse paire, la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote est compatible avec sa formule brute.

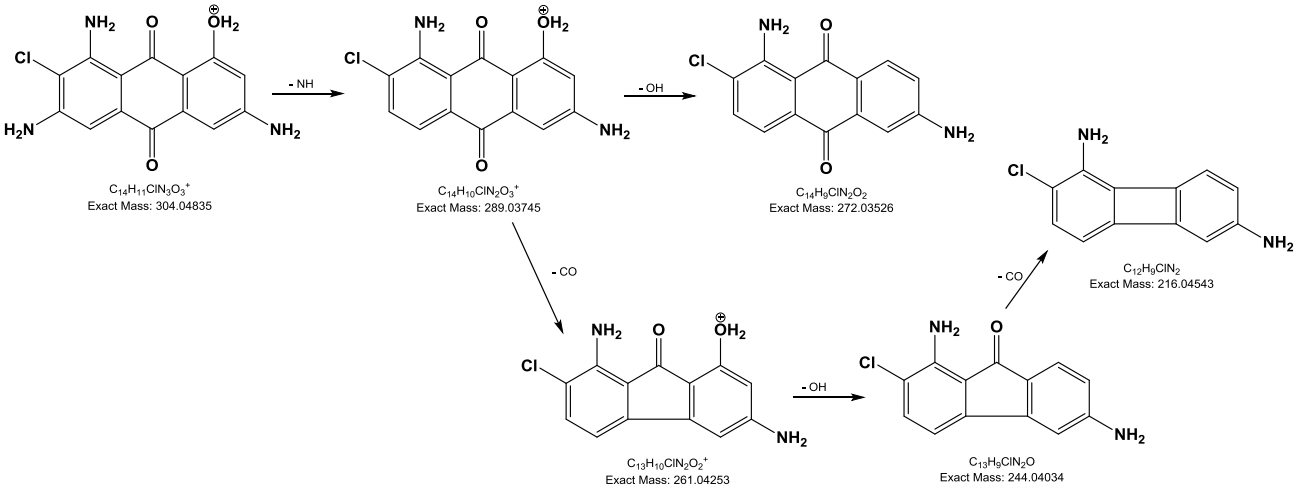


Figure 31 : Schéma de fragmentation du composé inconnu cluster [1] (*m/z* 304 $[M+H]^+$).

De plus, l'émodine présente dans le réseau n'a pas été relié à un cluster. En effet, elle se retrouve dans la zone des composés reliés à eux-mêmes (spectre de fragmentation avec aucunes correspondances avec d'autres spectres). Son spectre MS/MS (cf. Annexe 4) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire *m/z* 271 $[M+H]^+$ très intense ainsi deux autres ions

BY-NC-ND

fragments intenses à *m/z* 225 et 197 correspondant respectivement à $[M+H-H_2O-CO]^+$ et $[M+H-H_2O-2CO]^+$. Les ions fragments à *m/z* 252 $[M+H-H_2O]^+$; *m/z* 243 $[M+H-CO]^+$ et *m/z* 169 $[M+H-H_2O-3CO]^+$ sont peu intenses. Les fragmentations sont caractéristiques des anthraquinones (Figure 32 ; Wu et *al.,* 2001). De plus, l'émodine n'est pas une anthraquinone chlorée contrairement aux composés du cluster [1]. Ainsi, la présence de l'atome de chlore en α du groupement OH empêche la perte d'H_2O contrairement au cas de l'émodine, ce qui explique son absence dans ce cluster.

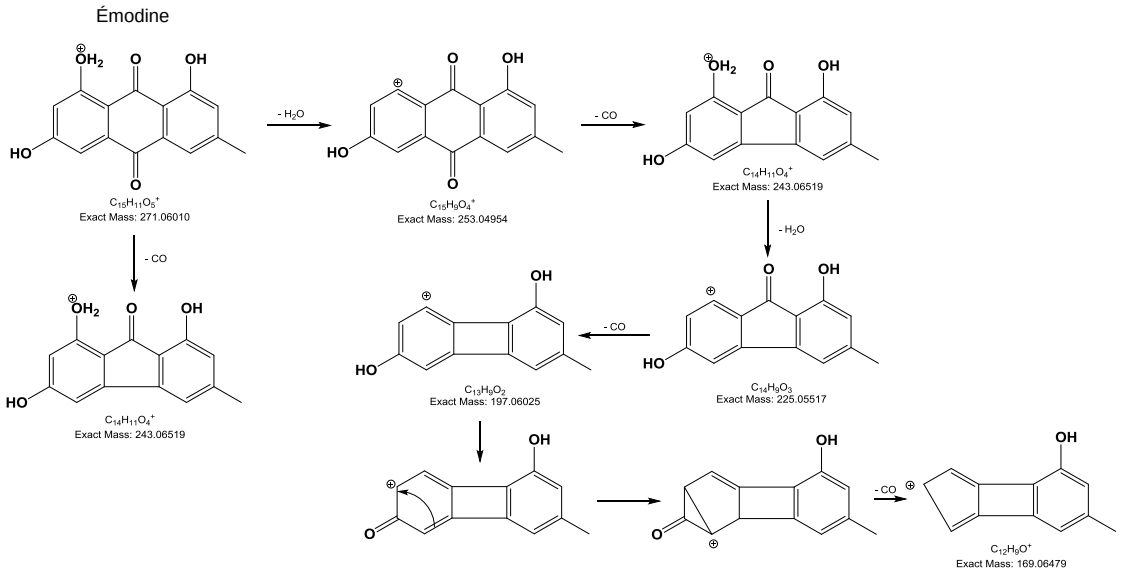


Figure 32 : Schéma de fragmentation de l'émodine

L'analyse de ce réseau moléculaire a permis de mettre en évidence un autre cluster [2] constitué de terpènes structuralement proches de l'hopane-6,7,22-triol (ou 6,7,22-trihydroxyhopane). Ce composé a déjà été isolé de *Nephroma laevigatum* (Huneck et Yoshimura, 1996). Cette molécule a été précédemment isolée au laboratoire. Ainsi, lors de l'analyse LC-MS/MS, elle a été injectée dans les mêmes conditions que les extraits bruts et révélé sur le réseau moléculaire. Sur son spectre MS/MS, l'ion précurseur $[M+H]^+$ à *m/z* 461 n'est pas observé. Le composé étant hydroxylé, la perte de groupements hydroxylés sont favorisés par déshydratation au niveau de la source et fournit les ions à *m/z* 407 $[M+H-3H_2O]^+$; 389 $[M+H-H_2O-C_4H_9]^+$ et à *m/z* 372 $[M+H-H_2O-C_4H_9-CHO]^+$. La rupture de la liaison C8–C4 est favorisée et conduit après transformation aux différents fragments de faibles masses mais intenses (Shiojima et *al.,* 1992). L'ion à *m/z* 221 est généré par la rupture de la liaison C8–C4 et C11–C12. A partir de cet ion, la perte de C_4H_4 produit l'ion à *m/z* 167 et la perte d'H_2O fournit l'ion à *m/z* 149. La formation des ions fragments les plus intenses à *m/z* 107 ; 109 ; 121 et 135 sont présentés Figure 33.

BY-NC-ND

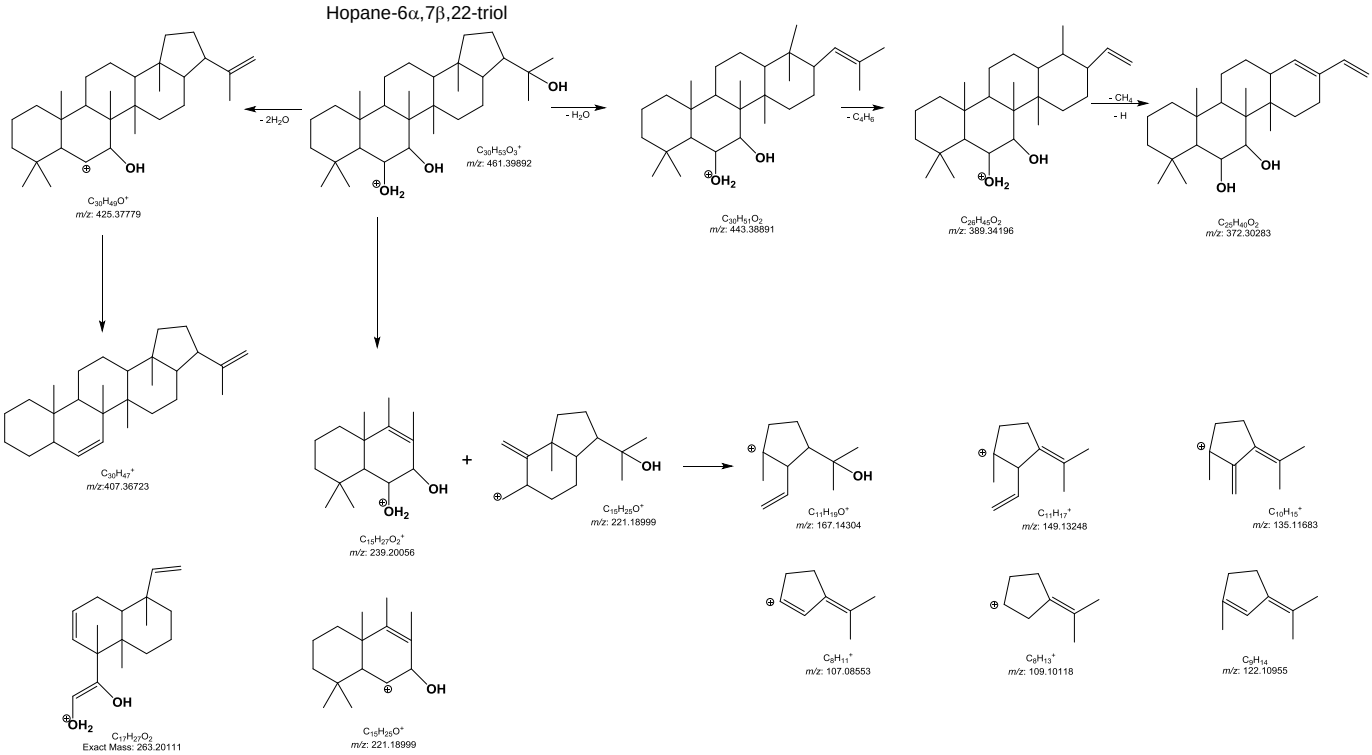


Figure 33 : Schéma de fragmentation de l'hopane-6,7,22-triol

Les autres composés de ce cluster ont été identifiés d'après les fragmentations caractéristiques des triterpènes ayant un squelette hopane et schématisé pour plusieurs composés sélectionnés dans pour une première analyse par rapport à leur connexion avec l'hopane-6,7,22-triol.

Le composé à *m/z* 433 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la 29,30-nor-6,7,22-trihydroxyhopane de formule brute $C_{28}H_{48}O_3$ (Figure 34).

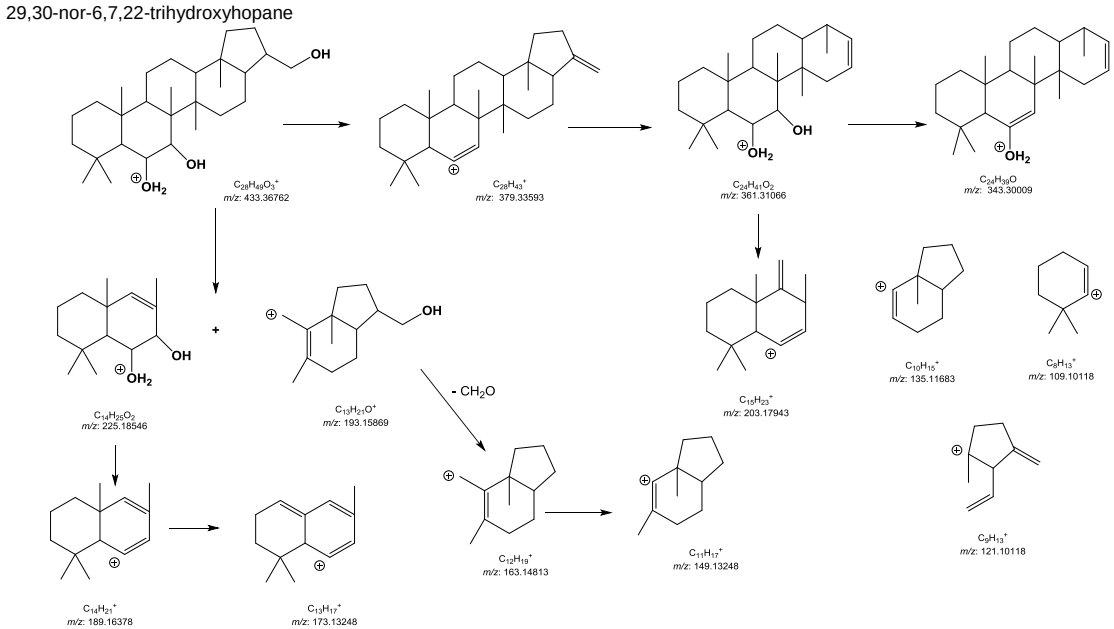


Figure 34 : Schéma de fragmentation de la 29,30-nor-6,7,22-trihydroxyhopane

BY-NC-ND

Le composé à *m/z* 405 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la 23,24,29,30-tétranor-6,7,22-trihydroxyhopane de formule brute $C_{26}H_{44}O_3$ (Figure 35), d'après les fragmentations observées sur le spectre MS/MS.

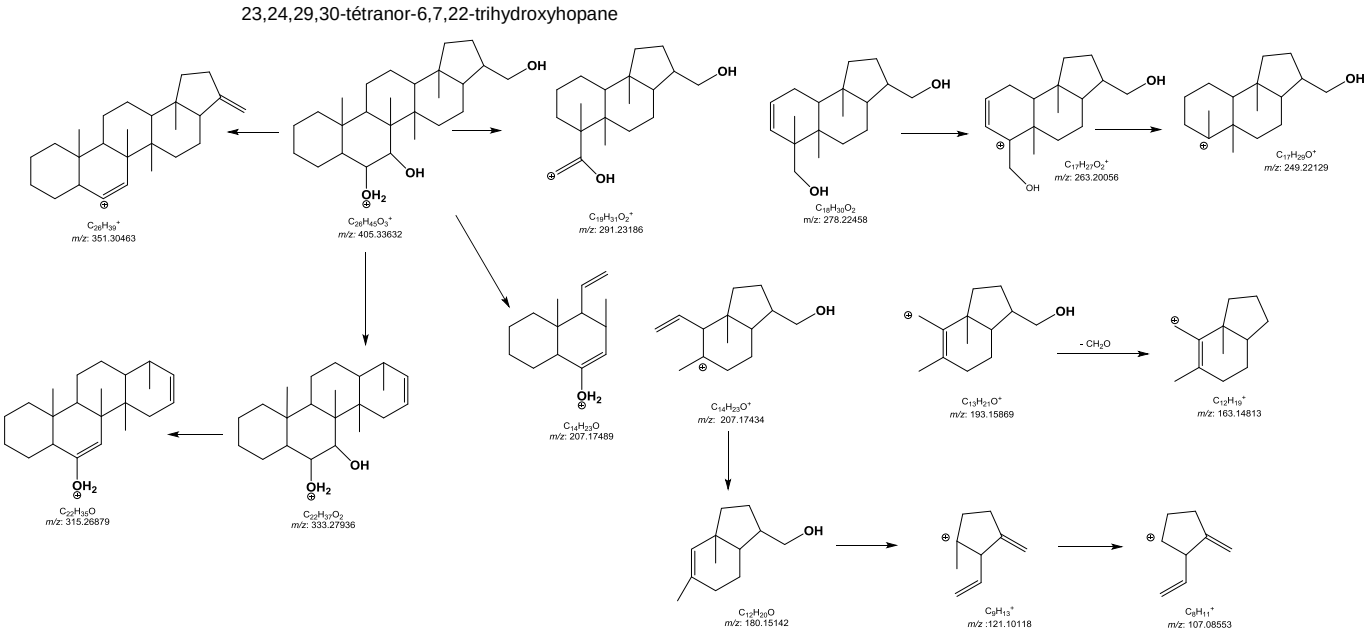


Figure 35 : Schéma de fragmentation de la 23,24,29,30-tétranor-6,7,22-trihydroxyhopane

Le composé à *m/z* 417 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la 23,29,30-trinor-6,7,22-trihydroxyhopane de formule brute $C_{30}H_{42}O_2$ (Figure 36).

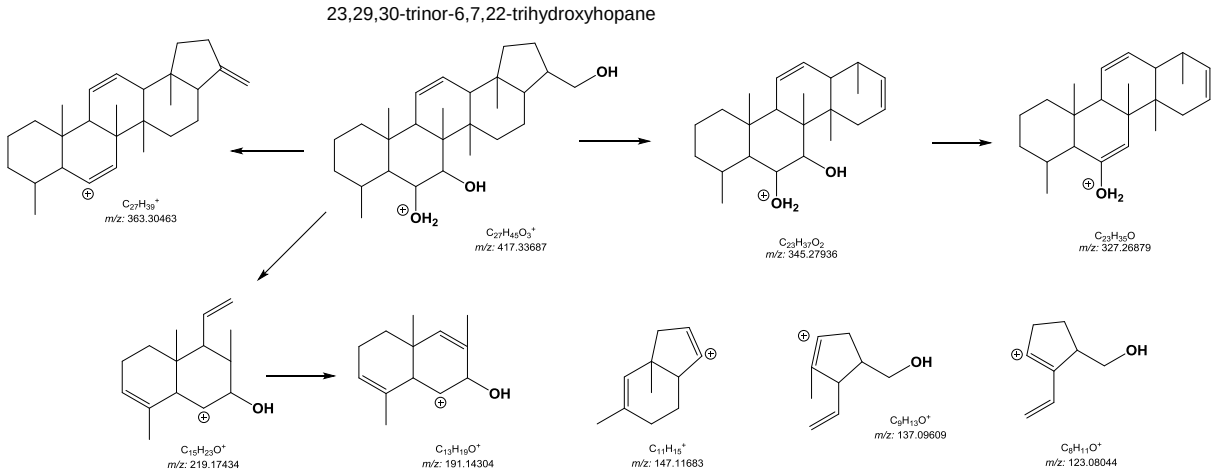


Figure 36 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 417 $[M+H]^+$

Le composé à $[M+H]^+$ *m/z* 445 semble correspondre à la zéorine ou aussi appelée hopane-6α,22-diol de formule brute $C_{30}H_{42}O_2$ (Figure 37), composé connu comme étant présent chez certains lichens. Cependant, la zéorine de structure proche de la 6,7,22-trihydroxyhopane n'a pas montré de lien direct avec ce dernier. Ainsi, une autre possibilité de structure, en corrélation avec la formule brute, a été proposée (Figure 38).

BY-NC-ND

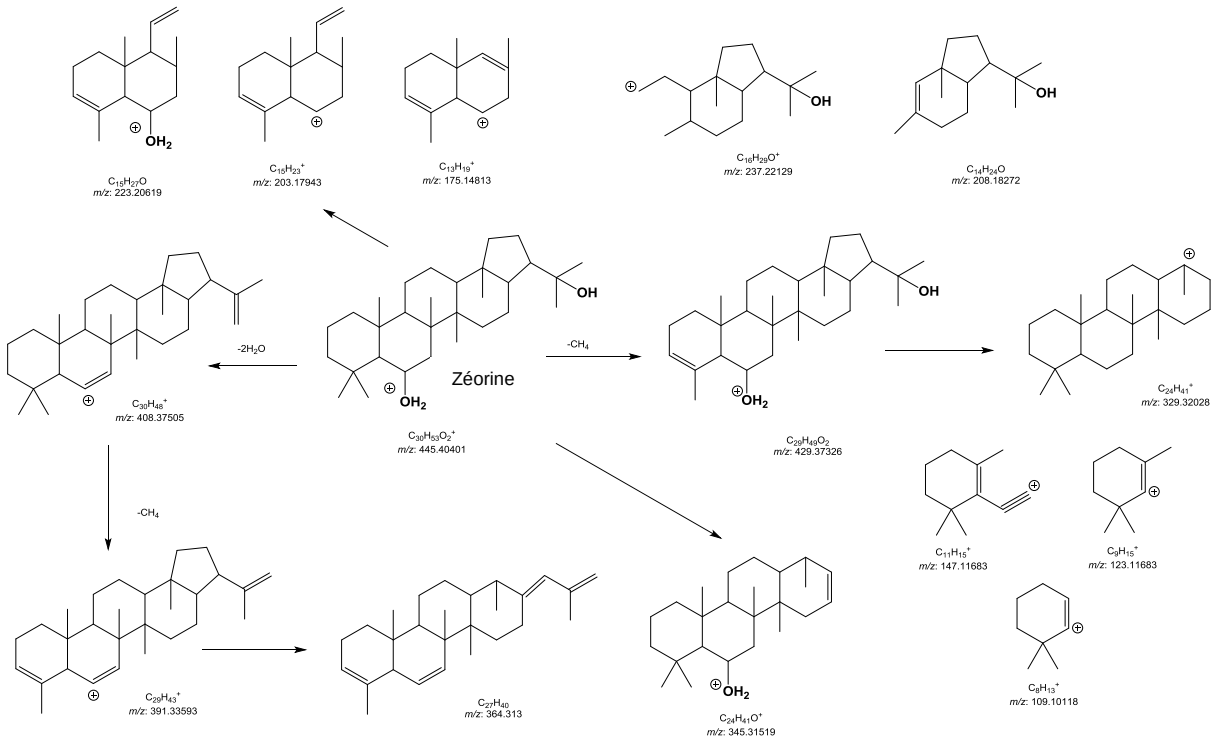


Figure 37 : Schéma de fragmentation de l'hopane-6α,22-diol

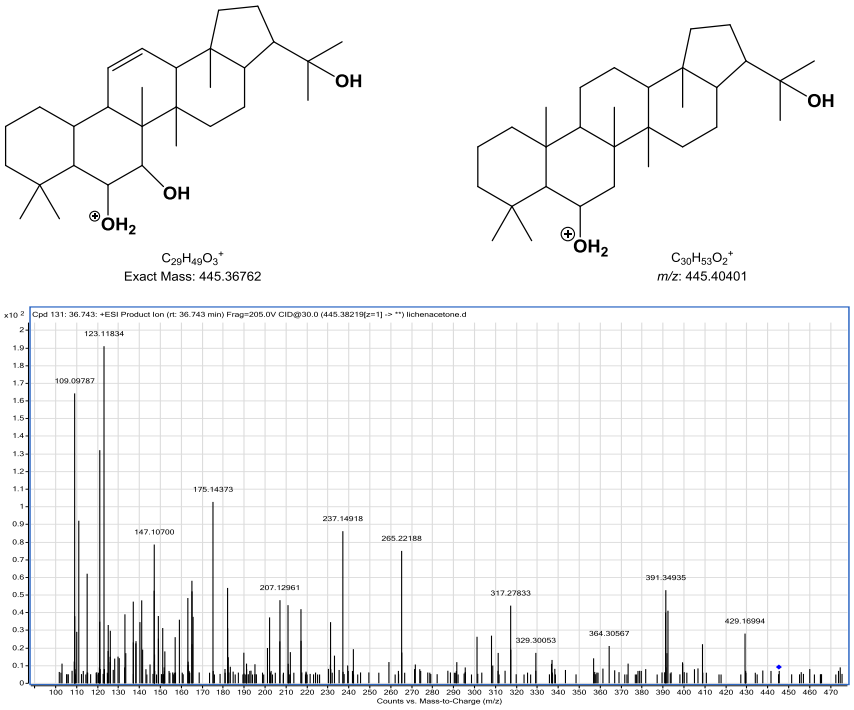


Figure 38 : Structures possibles et spectre de fragmentation du composé à *m/z* 445 $[M+H]^+$ du cluster [2]

Afin de confirmer la présence de la zéorine, une LC-MS/MS d'un témoin pur (disponible au laboratoire) sera réalisé afin de comparer les spectres de fragmentation. De plus, une CCM a été réalisée avec différentes fractions de l'extrait dichlorométhanique. L'hypothèse de la présence de la zéorine dans cet extrait semble toute à fait possible. Ainsi, la purification de ce composé sera réalisée pour confirmer la structure de ce composé par RMN.

BY-NC-ND

Le composé à *m/z* 459 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la 6,7,22-trihydroxy-hop-12(13)-ene de formule brute $C_{30}H_{50}O_3$ (Figure 39).

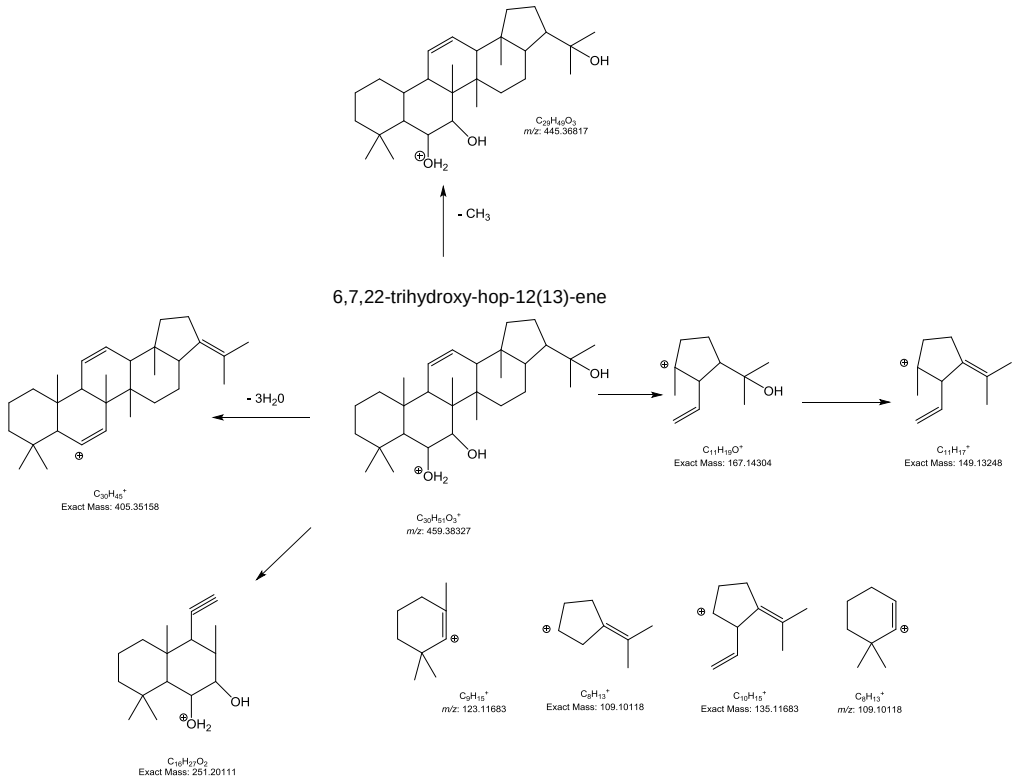


Figure 39 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 459 $[M+H]^+$

Bien que les terpènes glycosylés soient peu fréquents chez les lichens, le génine (*m/z* 459 $[M+H]^+$) dont l'hétéroside correspond au composé à *m/z* 621 $[M+H]^+$ de formule brute $C_{36}H_{60}O_8$ a été identifié (Figure 40).

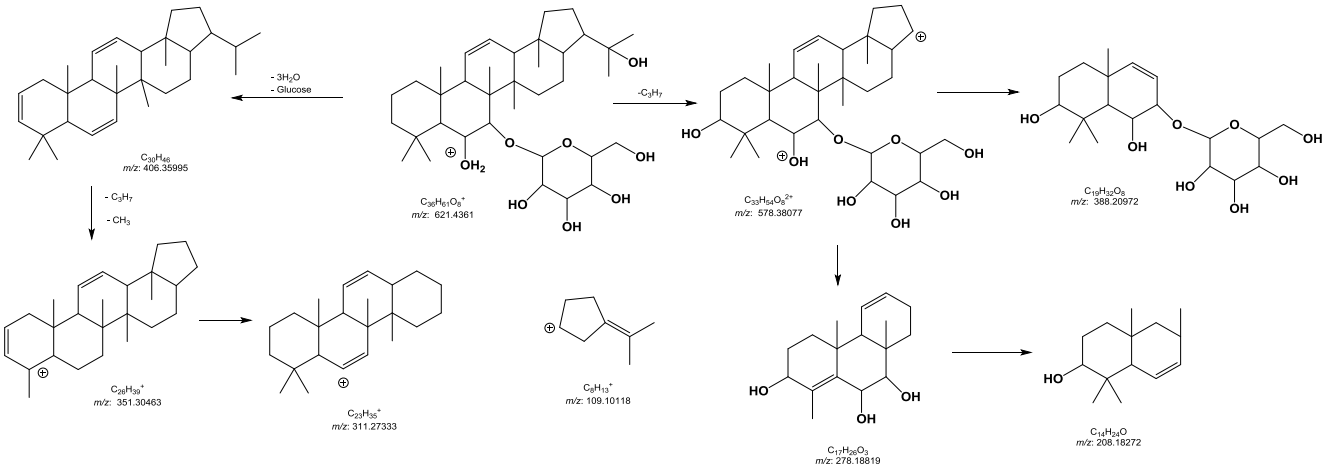


Figure 40 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 621 $[M+H]^+$

La présence des dérivés de type nor-hopanes n'est pas surprenante, des composés proches ont été isolés d'*Evernia punastri* (Joulain et Tabacchi, 2009).

BY-NC-ND

Un autre cluster [3] constitué de phospholipides structuralement proches avec des masses comprises entre à *m/z* 496 $[M+H]^+$ et 524 $[M+H]^+$a été identifié (Figure 41). Trois des quatre composés constituants le cluster ont été identifié par la base de données du GNPS comme étant des lysophospholipides.

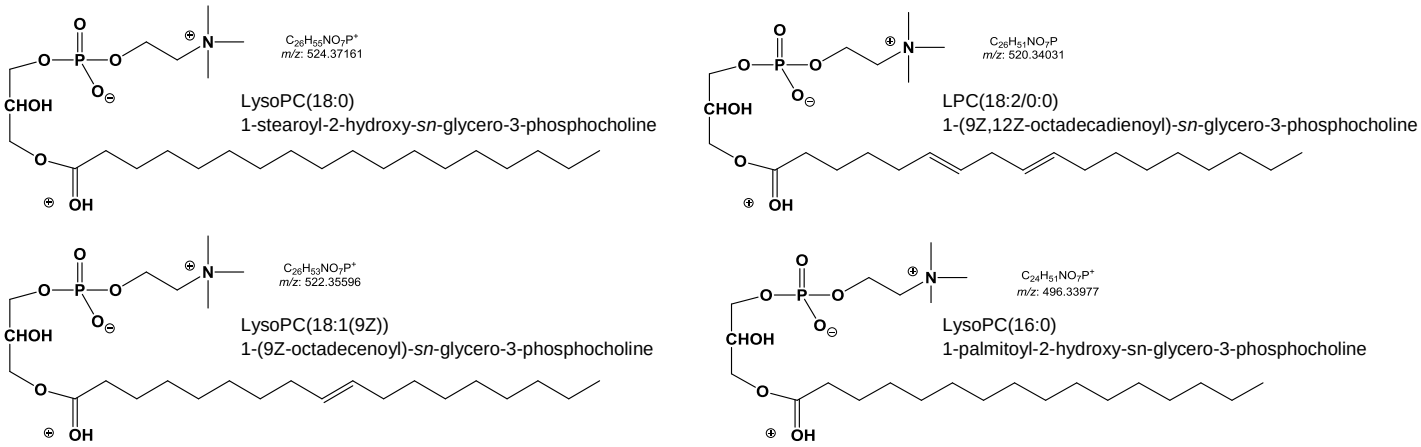


Figure 41 : Composés identifiés du cluster [3]

En effet, le composé à *m/z* 496 $[M+H]^+$ correspond à la 1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Lyso-PC(16:0) ; $C_{24}H_{50}NO_7P$), celui à *m/z* 522 $[M+H]^+$ correspond à la 1-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LysoPC(18:1(9Z)) ; $C_{26}H_{52}NO_7P$) et le composé à *m/z* 524 $[M+H]^+$ correspond à la 1-stéaryle-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LysoPC(18:0) ; $C_{26}H_{54}NO_7P$). Ainsi par comparaison avec les spectres de ces trois métabolites, le composé à *m/z* 520 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LPC(18:2/0:0) ; $C_{26}H_{50}NO_7P$). Ces composés sont trouvés dans les membranes des différentes cellules.

Le composé à *m/z* 478 $[M+H]^+$ a été identifié par la base de donnée du GNPS comme correspondant à l'acide 4-[5-[[4-[5-[acetyl(hydroxy)amino]pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentyl amino]-4-oxobutanoïque, un dérivé de la desferrioxamine de formule brute $C_{20}H_{36}N_4O_8$ (Figure 42).

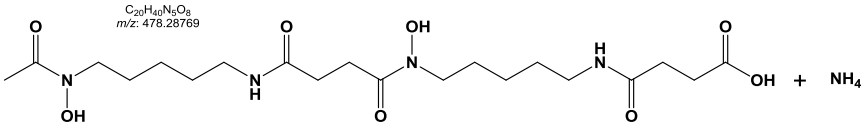


Figure 42 : Structure du composé à *m/z* 478 $[M+H]^+$

Les composés à *m/z* 257 ; 594 et 454 $[M+H]^+$ ont été aussi identifiés par la base de donnée du GNPS correspondant respectivement à la 8-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydroisochromen-1-one (ou hydrangénol), à la phéophorbide A (intermédiaire de la

BY-NC-ND

dégradation de la chlorophylle) et à la 1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine (Figure 43).

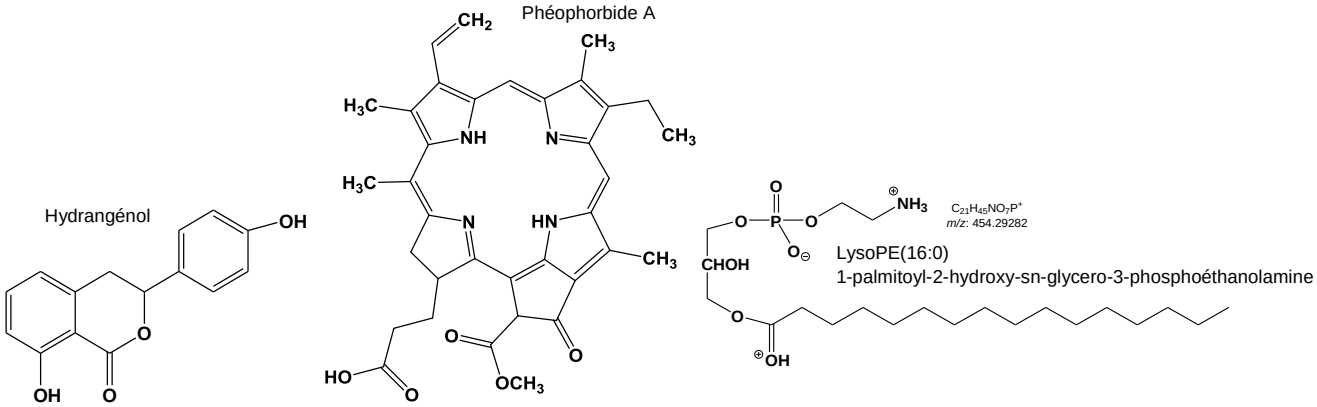


Figure 43 : Autres structures des composés identifiés par les bases de données du GNPS

D'autres clusters des composés communs ou non à l'un ou l'autre de ces deux extraits lichéniques ont été mis en évidence, néanmoins ces métabolites n'ont pas encore été identifiés.

De plus, la présence de phtalates dans le réseau a aussi été mise en évidence, probablement due, aux différents matériels et solvants utilisés lors de l'obtention des deux extraits lichéniques.

L'absence de molécules de type mycosporine ou mycosporine-like (molécules isolées et identifiées de *Nephroma laevigatum* ; Roullier et *al.,* 2011) est due aux solvants utilisés lors de l'extraction. En effet, ces composés sont majoritairement extraits dans un mélange de solvant de type eau-méthanol.

Différents composés connus de *Nephroma laevigatum* ont ainsi pu être mis en évidence au sein du réseau moléculaire. Néanmoins, cette technique est dépendante de l'ionisation des composés et de leur séparation lors de l'analyse LC-MS/MS (haute ou basse résolution). De plus, les bases de données et le manque d'information concernant ce type de lichen (cyanolichens) sont encore limités, ne facilitant pas l'identification des métabolites lors de l'analyse du réseau moléculaire. Ainsi, beaucoup de composés restent encore à identifier. Il serait important d'isoler les composés dans le but de confirmer leurs structures par d'autres méthodes spectroscopiques permettant ainsi d'enrichir les bases de données et les connaissances sur la composition chimique de *Nephroma laevigatum*.

BY-NC-ND

III.4. Évaluation des activités biologiques des extraits lichéniques

III.4.1. Activités antiprolifératives

L'activité antiproliférative a été évaluée sur une lignée cellulaire cancéreuse colorectale humaine (HT-29). La viabilité des cellules traitées par les extraits lichéniques DCM et AC est déterminée par un test au MTT (Freimoser et *al.,* 1999) pendant 24, 48 et 72h, puis rapportée à la viabilité des cellules témoins évaluée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées. Les CI_{50} (concentration d'extrait nécessaire permettant d'inhiber 50% de la viabilité cellulaire) sont ensuite calculées.

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes CI_{50} (en µg/mL) obtenues pour les deux extraits lichéniques sur la lignée cellulaire HT-29 (n=3)

	24h	48h	72h
Extrait DCM	> 100	22,9 ± 1,7	17,3 ± 3,1
Extrait AC	> 100	> 100	≈ 100

Ces premiers résultats montrent que, l'extrait lichénique AC a moins d'effet sur la viabilité cellulaire que l'extrait DCM. En effet, pour l'extrait AC, la CI_{50} est atteinte seulement après 72h de traitement à une concentration de 100 µg/mL, contrairement à l'extrait DCM qui montre un effet antiprolifératif avec une CI_{50} de 22,9 ± 1,7 µg/mL à 48h et de 17,3 ± 3,1 µg/mL à 72h (Figure 44 et Tableau 4).

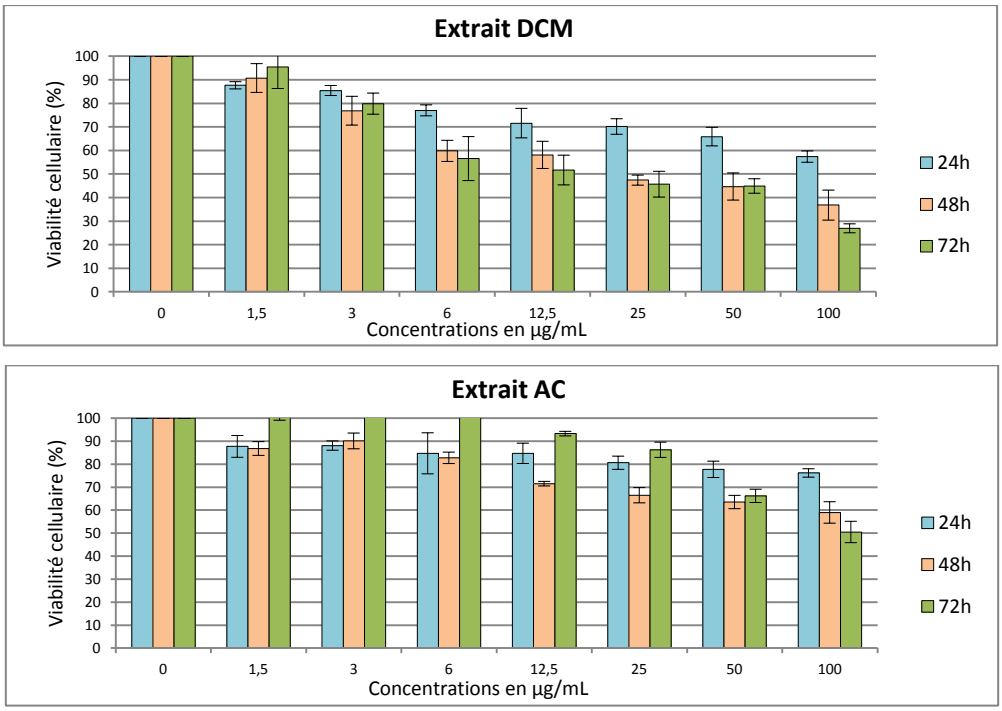


Figure 44 : Effets antiprolifératifs des deux extraits lichéniques sur la lignée HT-29

BY-NC-ND

III.4.2. Activité anti-biofilm fongique

Un test d'activité contre la phase de maturation (Figure 45) du biofilm de *Candida albicans* (traitement initié après 2h d'adhérence et d'une durée de 24 ou 48h) a été réalisé en présence des extraits lichéniques dichlorométhanique (DCM) et acétonique (AC).

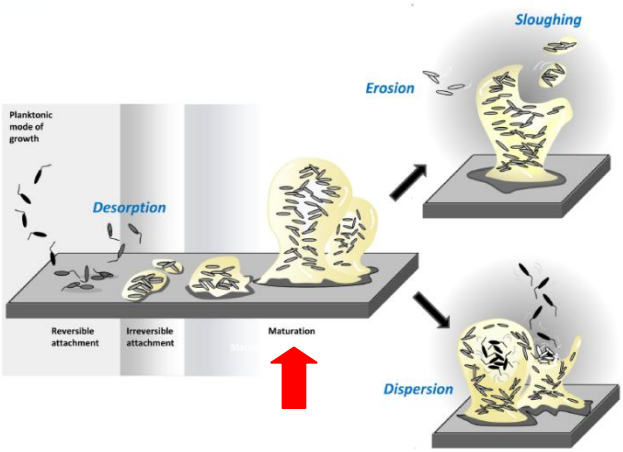


Figure 45 : Modèle de développement du biofilm (Petrova et Sauer, 2016)

Pour chaque extrait testé, les absorbances à 450 nm ont été mesurées et les moyennes ont été statistiquement comparées à celles du témoin négatif (Test de Kruskal-wallis, $p<0,01$). Les concentrations inhibant 50% du développement du biofilm (CI_{50}) ont ensuite été calculées.

Tableau 5 : Concentrations inhibant 50% du développement du biofilm des deux extraits lichéniques (CI_{50} en µg/mL) (n=2)

	24h	48h
Extrait DCM	6,25	6,25
Extrait AC	50	12,5

Les extraits lichéniques DCM et AC ont montré un effet anti-biofilm sur la phase de maturation, à faible concentrations dès 24h de traitement, effet persistant voir s'améliorant après 48h de traitement (Tableau 5). En effet, les valeurs de CI_{50} sont de 6,25 µg/mL à 24 et 48h et de 50 puis 12,5 µg/mL pour les extraits DCM et AC respectivement. L'extrait DCM possédant la CI_{50} la plus importante et une activité dès 24h persistant dans le temps. Il est donc le plus efficace contre la maturation du biofilm à *Candida albicans*.

Les résultats des tests sur le biofilm fongique montrent que les extraits lichéniques semblent être une source prometteuse d'agents anti-biofilm de *Candida albicans*. En particulier, l'extrait DCM présente une activité à très faible concentration persistant dans le temps. Ainsi, une purification des molécules responsables de l'activité anti-biofilm sur la phase de maturation va être réalisée par fractionnement bioguidé.

BY-NC-ND

III.4.3. Activité anti-biofilm bactérien

La formation de biofilm bactérien (*Staphylococcus aureus* ; Gram positif) a été évalué par la méthode au cristal violet en présence des deux extraits lichéniques DCM et AC.

Ces premiers résultats montrent que, l'extrait lichénique AC n'a pas d'effet sur la formation de biofilm à *Staphylococcus aureus* dans la gamme de concentrations testées (3 à 100 µg/mL), tandis que l'extrait lichénique DCM montre un faible effet avec une concentration minimale d'éradication du biofilm de 55,43 ± 6,4 µg/mL.

III.5. Étude phytochimique de *Nephroma laevigatum*

III.5.1. Fractionnement et purification

Le fractionnement de l'extrait lichénique dichlorométhanique (DCM) a été réalisé par CLMP et a conduit à l'obtention de dix-huit fractions (Figure 46).

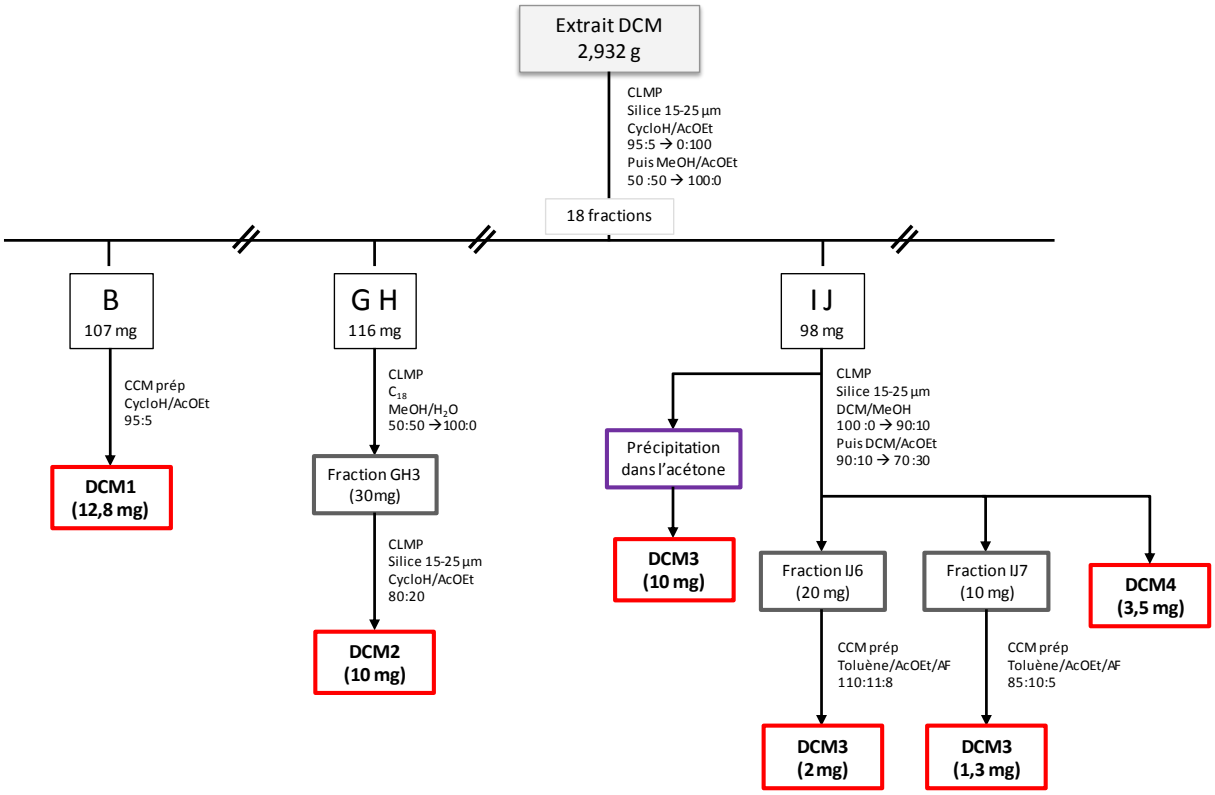


Figure 46 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait DCM de *Nephroma laevigatum*.

Les fractions obtenues ont été analysées par CCM et regroupées en fonction de leur profil chromatographique c'est-à-dire présentant une même composition chimique.

Les purifications des composés sont détaillées dans la partie expérimentale de ce manuscrit (cf. Partie C § VII.1).

BY-NC-ND

Quatre métabolites ont été isolés de l'extrait lichénique DCM :

- **DCM 1** = Trilinoléine
- **DCM 2** = Émodine
- **DCM 3** = 7-chloroémodine
- **DCM 4** = 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine.

L'identification structurale de ces composés est détaillée dans le paragraphe suivant.

III.5.2. Détermination structurale des composés isolés

III.5.2.1. Composé DCM 1

Le composé **DCM 1** (12,8 mg) a été isolé sous la forme d'un liquide visqueux et incolore. Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode positif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 879,7430 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{57}H_{98}O_6$.

L'analyse CCM de ce composé peu polaire ainsi que ses spectres protons et carbones présentent les caractéristiques d'un triglycéride.

L'analyse RMN ^1H ($CDCl_3$, 400MHz ; cf. Annexe 5) de ce composé de poids moléculaire élevé montre la présence de signaux qui résonnent entre 0,89 à 5,38 ppm correspondant à un composé très fonctionnalisé. Quatre signaux déblindés sous forme d'un multiplet à 5,38 – 5,30 ppm intégrant pour 12H correspondent à l'ensemble des hydrogènes des doubles liaisons présentes. Ces informations indiquent donc la présence de deux insaturations par chaine aliphatique. Deux doubles doublets à 4,29 et 4,14 ppm intégrant chacun pour 2H, traduisent la présence des deux CH_2–O de la partie glycérol (H-1 et H-3). Un multiplet à 5,26 ppm intégrant pour 1H correspond à l'hydrogène sous forme CH–O de la partie glycérol (H-2). Un triplet élargi à 2,77 ppm intégrant pour 6H correspond aux hydrogènes des CH_2 positionnés entre les doubles liaisons (H-11'). Un multiplet à 2,31 ppm intégrant pour 6H correspond aux hydrogènes des CH_2 en α des fonctions esters (H-2). Un multiplet à 2,05 ppm intégrant pour 12H correspond aux hydrogènes des CH_2 en α des doubles liaisons (H-8' et H-14'). Un multiplet à 1,61 ppm intégrant pour 6H correspond aux hydrogènes des CH_2 en β des fonctions esters (H-3'). Un multiplet à 1,24 – 1,37 ppm intégrant pour 42H correspond aux autres hydrogènes des CH_2 restants (H-4', H-5', H-6', H-7', H-15', H-16' et H-17'). Et pour finir, un triplet à 0,89 ppm intégrant pour 9H traduit la présence des méthyles terminaux (H-18'). La longueur de la chaîne a été confirmée par les données du spectre de masse.

BY-NC-ND

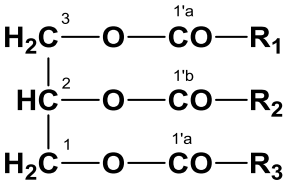


Figure 47 : Structure générale des triglycérides
où R_1, R_2 et R_3 sont des chaînes carbonées d'acides gras

La partie glycérol est confirmée par la RMN ^{13}C (cf. Annexe 5) par la présence de trois carbones déblindés à 68,9 ppm (CH–O) et à 62,1 ppm (2 x CH_2–O). Trois carbonyles à 173,3 ppm (2 x C1'a) et 172,8 ppm (C1'b) sont caractéristiques des fonctions esters présentes sur un triglycéride (Figure 47).

Tableau 6 : Données spectrales RMN (400 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 1

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	α 4,29 dd (4,3 ; 11,9) β 4,14 dd (6,0 ; 11,9)	62,1	H1β ; H2 H1α ; H2	C2 ; C3 ; C1'a
2	5,26 m	68,9	H1α ; H1β	C1'b ; C1 ; C3
3	α 4,29 dd (4,3 ; 11,9) β 4,14 dd (6,0 ; 11,9)	62,1	H1β ; H2 H1α ; H2	C1'a ; C1'b ; C2 ; C3
1'a **1'b**	-	173,3 (2C) 172,8 (1C)	-	-
2'a **2'b**	2,31 t (7,5) (4H) 2,32 t (7,5) (2H)	34,0 (2C) 34,2 (1C)	H3'	C1a' ; C1b' ; C3' ; C4' – C7'
3'	1,61 m	24,9	H2' ; H4' – H7'	C1'a ; C2'a ; C2'b ; C4' – C7'
4' – 7'	1,24 – 1,37 m	29,1 – 29,7	H3' ; H8' ; H18'	C2'a ; C4' – C7' ; C3' ; C8'
8'	2,05 br q (6,8)	27,2	H10' ; H11' ; 1,24 – 1,37	C7' ; C9' ; C10'
9'	5,30 – 5,38 m	130,0	2,27 ; H8'	C10' ; C11' ; C12' ; C14'
10'	5,30 – 5,38 m	128,1	2,27 ; H8'	C11' ; C12' ; C14'
11'	2,77 br t (6,4)	25,6	5,30 – 5,38 ; H8'	C9' ; C10' ; C12' ; C13'
12'	5,30 – 5,38 m	127,9	H8' ; H11'	C10' ; C11' ; C14'
13'	5,30 – 5,38 m	130,2	H8' ; H11'	C10' ; C11' ; C12' ; C14'
14'	2,05 br q (6,8)	27,2	H11' ; H12' ; H15'	C13' ; C12' ; C15' ; C16'
15'	1,24 – 1,37 m	29,1 – 29,7	H14' ; H18'	C16' ; C14' ; C17' ; C18'
16'	1,24 – 1,37 m	31,5	H14' ; H18'	C15' ; C14' ; C17' ; C18'
17'	1,24 – 1,37 m	22,6	H14' ; 1,61 ; H18'	C16' ; C15' ; C14' ; C17' ; C18'
18'	0,89 t (6,9)	14,1	H17'	C16' ; C17'

Ainsi, par comparaison avec les données de la littérature (Vlahov, 1999), ce triglycéride a été identifié comme étant la trilinoléine (Figure 46).

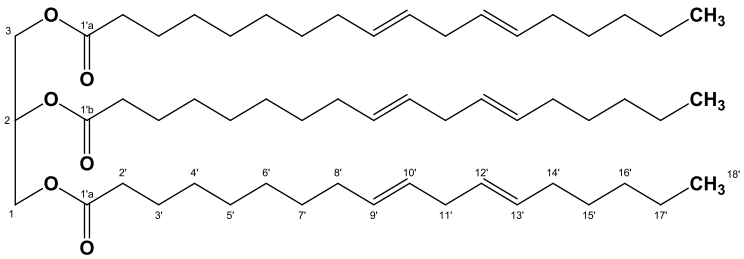


Figure 48 : Structure du composé DCM1 : la trilinoléine

III.5.2.2. Composé DCM 2

Le composé **DCM 2** (10 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre amorphe jaune.

BY-NC-ND

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF), en mode négatif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 269,0457 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_5$.

Son spectre RMN ^{1}H (acétone-*d6*, 400 MHz ; cf. Annexe 6) laisse apparaitre un singulet très élargi vers 12,15 ppm intégrant pour 3H caractéristique de fonctions hydroxyles ; deux doublets à 7,25 et 6,63 ppm (H-5 et H-7) intégrant chacun pour 1H, indiquent la présence de deux protons aromatiques positionnés en *méta* l'un de l'autre (*J* = 2,3 Hz). Deux autres signaux à 7,56 et 7,12 ppm sous forme de singulet élargi mettent en évidence la présence de deux autres protons aromatiques portés par un second cycle (H-2 et H-4). L'élargissement de ces singulets s'explique par la présence d'un groupement méthyle à 2,46 ppm se trouvant en position centrale entre ces deux protons aromatiques et d'une faible constante de couplage, ainsi les doublets *méta* sont remplacés par des singulets élargis.

Tableau 7 : Données spectrales RMN (400 MHz, Acétone-d_6) du composé DCM 2

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)
1	-	163,2
2	7,12 br s	124,9
3	-	149,4
4	7,56 br s	121,5
5	7,25 d (2,3)	110,5
6	-	167,9
7	6,63 d (2,3)	108,9
8	-	166,4
9	-	182,5
10	-	191,4
4'	-	134,4
8'	-	109,9
9'	-	136,6
10'	-	114,7
OH-1	12,15 br s	-
OH-6	12,15 br s	-
OH-8	12,15 br s	-
3-CH_3	2,46 s	22,1

Le spectre carbone (cf. Annexe 6) montre la présence de quinze atomes de carbones. Il confirme la présence des quatre carbones aromatiques tertiaires (124,9 ; 121,5 ; 109,9 et 108,9 ppm), du groupement méthyle à 22,1 ppm et de dix carbones aromatiques quaternaires, dont deux fonctions carbonyles (191,4 et 182,5 ppm) caractéristiques d'une anthraquinone et trois carbones oxygénés du fait de leur déblindage par effet inducteur attracteur (167,9 ; 166,2 ; 163,2 ppm) confirment la présence de trois hydroxyles sur les deux cycles aromatiques. Les données RMN sont en accord avec la structure de l'émodine, une anthraquinone très fréquemment isolées des lichens et déjà identifiée et isolée de *N. laevigatum* (Cohen et Towers, 1995 ; Figure 49).

BY-NC-ND

Par conséquent, le composé **DCM 2** a pu être identifié sans ambiguïté comme étant l'émodine.

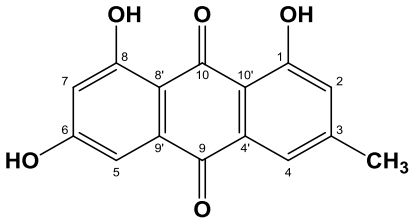


Figure 49 : Structure du composé DCM 2 : l'émodine

III.5.2.3. Composé DCM 3

Le composé **DCM 3** (13,3 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre amorphe jaune.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF), en mode négatif du composé **DCM 3** présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 303,0068 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_9ClO_5$, ainsi qu'un amas isotopique caractéristique d'une molécule mono-chlorée.

Les signaux RMN ^1H (CD_3OD ; 400 MHz ; cf. Annexe 7) de ce composé sont similaires à ceux de l'émodine, à deux exceptions près. En effet, la disparition du proton H-7 est observée et le proton H-5 résonne sous forme d'un singulet à 7,18 ppm et non plus sous forme d'un doublet *méta*-couplé caractérisé par une faible constante de couplage. Ainsi, la seule différence entre l'émodine et le composé **DCM 3** se situe au niveau de la position 7 où un hydrogène a été remplacé par un atome d'halogène (le chlore).

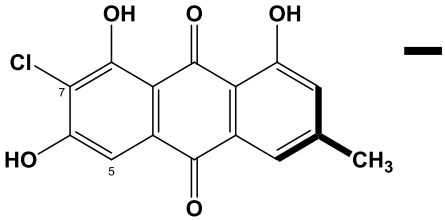


Figure 50 : Structure du composé DCM 3 : la 7-chloroémodine

La comparaison des spectres carbones (cf. Annexe 6 et 7) de ces deux composés bien qu'ils aient été réalisés dans des solvants différents montre un blindage au niveau du carbone en position 7 qui résonne à 115,5 ppm au lieu de 108,9 ppm. Les corrélations longues distances observées sur le spectre HMBC entre le proton à 7,18 ppm (H-5) et les carbones à 115,2 (C7) ; 188,6 (C9) ; 108,3 (C8') et 133,9 (C9') ppm confirment la présence de l'hétéroatome en position 7. Par conséquent, l'hydrogène en position 7 de l'émodine a donc été remplacé par un atome de chlore. Sa formule brute et les données de RMN sont en accord avec la 7-chloroémodine, composé déjà identifié et isolé de *N. laevigatum* (Cohen et Towers, 1995 ; Figure 50).

BY-NC-ND

Tableau 8 : Données spectrales RMN (400 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 3

Position	δH	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	163,5	-	-
2	7,06 br s	125,2	H4 ; 3-CH_3	C1 ; C4 ; C10' ; 3-CH_3
3	-	149,2	-	-
4	7,53 br s	121,6	H2 ; 3-CH_3	C2 ; C9 ; C10' ; 3-CH_3
5	7,18 s	112,7	-	C7 ; C9 ; C8' ; C9'
6	-	168,5	-	-
7	-	115,5	-	-
8	-	162,2	-	-
9	-	183,8	-	-
10	-	190,4	-	-
4'	-	134,8	-	-
8'	-	108,3	-	-
9'	-	133,9	-	-
10'	-	115,3	-	-
3-CH_3	2,42 s	22,1	H2 ; H4	C2 ; C3 ; C4

III.5.2.4. Composé DCM 4

Le composé **DCM 4** (3,5 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre amorphe jaune.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF), en mode positif du composé **DCM 4** présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 333,0523 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{17}H_{15}ClO_5$.

Les spectres ^1H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz ; cf. Annexe 8) de ce composé montrent des similitudes avec ceux de la 7-chloroémodine en dehors de l'apparition en proton de deux singulets à 4,08 et 4,06 ppm intégrants chacun pour 3H et de la présence en carbone de deux signaux supplémentaires à 56,9 et 56,6 ppm. Ces différences suggèrent que le composé **DCM 4** correspond à une 7-chloroémodine di-méthoxylée. La position de ces deux groupements méthoxyles est démontrée par les corrélations longues distances ^1H-^{13}C observées sur le spectre HMBC. Les protons à 4,06 ppm portés par le carbone à 56,6 ppm corrèlent avec le carbone qui résonne à 161,1 (C1) tandis que ceux à 4,08 ppm corrèlent avec le carbone à 160,5 ppm permettant ainsi de placer ces deux méthoxyl en position 1 et 6 (Figure 51).

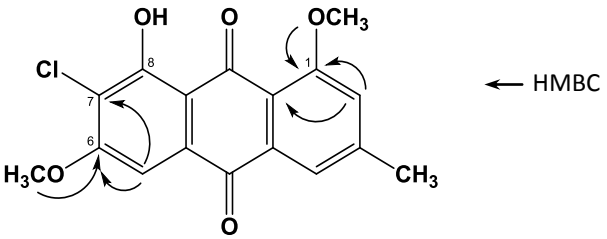


Figure 51 : Structure du composé DCM 4 : la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine
Les flèches indiquent les principales corrélations HMBC

BY-NC-ND

La formule brute ainsi que les données RMN sont en accord avec ceux de la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine (= 1-*O*-méthylfragiline ou 7-chloro-1,6-diméthoxy-émodine ; Figure 51) décrits dans la littérature (Cohen et Towers, 1995 ; Huneck et Yoshimura, 1996).

Tableau 9 : Données spectrales RMN (400 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 4

Position	δH	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	161,1	-	-
2	7,16 br s	119,0	H4 ; 3-CH_3	C1 ; C3 ; C4 ; C10' ; 3-CH_3
3	-	147,5	-	-
4	7,76 br s	121,2	H2 ; 3-CH_3	C2 ; C9 ; C10' ; 3-CH_3
5	7,38 s	101,8	-	C6 ; C7 ; C9 ; C10 ; C8' ; C9'
6	-	160,5	-	-
7	-	116,4	-	-
8	-	159,9	-	-
9	-	182,5	-	-
10	-	187,4	-	-
4'	-	135,1	-	-
8'	-	112,4	-	-
9'	-	131,6	-	-
10'	-	118,1	-	-
OH-8	13,77 s	-	-	C7 ; C8 ; C8'
1-OCH_3	4,06 s	56,6	-	C1
6-OCH_3	4,08 s	56,9	-	C6
3-CH_3	2,52 s	22,4	H2 ; H4	C2 ; C3 ; C4

L'étude phytochimique réalisée sur *Nephroma laevigatum* a permis d'isoler et de déterminer la structure de quatre composés. L'émodine est un composé classiquement retrouvé chez les lichens. De plus, ces différents dérivés chlorés tels que la 7-chloroémodine et la 7-chloro-1,6-di-O-méthylémodine ont déjà été isolées de *Nephroma laevigatum* (Cohen et Towers, 1995). Cependant, à notre connaissance, la trilinoléine n'a jamais été identifiée chez *N. laevigatum* dont 12,8 mg ont pu être isolés, soit 0,44 % de la masse sèche de l'extrait dichlorométhanique. Ce composé est ici décrit pour la première fois dans cette espèce bien que ce triglycéride ait déjà été identifié dans d'autres espèces de lichens notamment chez *Cetraria nivalis* (Bruun, 1976).

III.6. Activités antiprolifératives des composés isolés

Pour les anthraquinones isolées de *Nephroma laevigatum*, les premiers résultats montrent que, ces trois molécules ont des activités antiprolifératives modérées sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales (HT-29 et HCT116) et prostatiques (PC-3 et DU145) (Tableau 9). Ainsi, la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine est le composé le plus actif sur les lignées cellulaires HT-29, HCT116 et PC-3 avec des CI_{50} de 48,9 ; 62,8 et 75,2 µM, respectivement. Pour la lignée cellulaire DU145, l'émodine est la molécule la plus active avec une CI_{50} de 56,2 µM.

BY-NC-ND

Tableau 10 : Récapitulatif des différentes CI_{50} (en µM) obtenues pour les trois anthraquinones isolées de *Nephroma laevigatum* sur les lignées cellulaires HT-29, HCT116, PC-3 et DU145 (48h ; n=1)

	HT-29	HCT116	PC-3	DU145
Émodine	126,7	63,0	78,3	56,2
7-chloroémodine	107,5	72,5	98,6	66,8
7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine	48,9	62,8	75,2	64,9

La CI_{50} de la trilinoléine n'a pas pu être déterminée sur la lignée cellulaire HT-29 dans la gamme de doses testées (1 – 100 µM). Cependant, Chou et *al.,* (2011) ont montré que la trilinoléine inhibait la prolifération des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549, induisait l'apoptose et une augmentation au début du traitement de la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ainsi, d'autres cibles vont être explorées.

Les deux fonctions –OH méthoxylées de la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine en comparaison avec l'émodine jouent probablement un rôle sur l'activité antiproliférative de ce composé, en augmentant notamment sa lipophilie. Ainsi, des investigations supplémentaires seront réalisées dans le but de déterminer le rôle de la présence de ces deux groupements lors de son action dans les cellules cancéreuses.

Même si l'activité antiproliférative de l'émodine sur les cibles testées se révèle modérée (CI_{50} > 50 µM), l'effet de celle-ci sur les cellules cancéreuses a largement été étudié dans la littérature. Des études menées ces dernières années indiquent que l'émodine a un effet anticancéreux dans plusieurs types de cancer notamment les cancers du système digestif (Kanokmedhakul et *al.,* 2003; Wei et *al.,* 2013). Ainsi, Lu et *al.,* (2008) ont démontré que l'émodine provoque une inhibition dose-dépendante (traitement à 40 µM) de la croissance des cellules cancéreuses en bloquant la signalisation du récepteur du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et indique que l'émodine pourrait être utilisée comme inhibiteur potentiel de l'angiogenèse tumorale. De plus, Ma et *al.,* (2012) ont montré que l'émodine induisait l'apoptose des cellules cancéreuses du colon humain (LS1034) *in vitro* et inhibait les xénogreffes tumorales dérivées des cellules (LS1034) *in vivo*. L'apoptose déclenchée par l'émodine s'est également avérée être dépendante de la concentration. Yu et *al.,* (2008) ont montré que l'émodine provoquait une induction de l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire dans les cellules LNCaP du cancer de la prostate humain. Cependant, d'autres investigations concernant les mécanismes d'apoptose mis en

BY-NC-ND

jeu en présence de l'émodine sont nécessaires pour confirmer l'efficacité anti-tumorale de cette molécule sur d'autres cibles.

De plus, Huang et *al.,* (2008) ont trouvé que le co-traitement émodine/cisplatine augmentait nettement les taux d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) ainsi que la chimiosensibilité de la lignée cellulaire DU145, comparativement au traitement de le cisplatine seul, mais n'exerçait qu'un faible effet sur les cellules non tumorales. Ainsi, la 7-chloroémodine ayant une activité antiproliférative modérée (CI_{50} > 70 µM) sur les différentes lignées cancéreuses testées, une évaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène a été réalisé dans le but d'une utilisation en thérapie photodynamique, une des thématiques du LCSN de Limoges.

III.7. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

L'évaluation de la capacité de la 7-chloroémodine (molécule isolée de *Nephroma laevigatum*) à générer des EROs, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), a été réalisée par RPE. Les EROs étant des espèces très réactives et instables, leurs durées de vie sont extrêmement courtes et une observation directe est impossible. Pour pallier à ce problème, un piégeur de radicaux, le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide), a été utilisé. Afin de générer les EROs désirées, 100 µL d'un mélange de 7-chloroémodine à 50 µM (50 µL) et de DMPO à 225 mM (50 µL) ont été irradiés à l'aide d'une lumière blanche produite par une lampe halogène (20 mW, 5 000 lux) à température ambiante. Les résultats obtenus sont présentés Figure 52.

Ainsi, la 7-chloroémodine en présence d'une irradiation lumineuse produit des anions superoxydes. Cette particularité pourrait être valorisée dans le cadre d'un traitement photo-activé, un des axes majeurs de recherche du LCSN de Limoges. Cependant, pour certaines utilisations principalement oncologiques, la photothérapie dynamique (ou PDT) est limitée par la capacité de l'irradiation lumineuse à traverser en profondeur la peau. Ainsi, la 7-chloroémodine étant une molécule absorbant dans la zone des 400 nm, sa capacité d'action reste donc limitée aux traitements utilisant la lumière bleue. Toutefois, d'autres applications non oncologiques de la PDT peuvent être envisagées, en particulier la photochimiothérapie antibactérienne (PACT) pour laquelle cette limitation n'a pas lieu (Wainwright, 1998; Hamblin et Hasan, 2004; Baltazar et *al.,* 2015). A cette fin, des

BY-NC-ND

investigations supplémentaires vont être réalisées notamment l'évaluation de la production d'une autre espèce d'EROs, l'oxygène singulet (Dzwigaj et Pezerat, 1995).

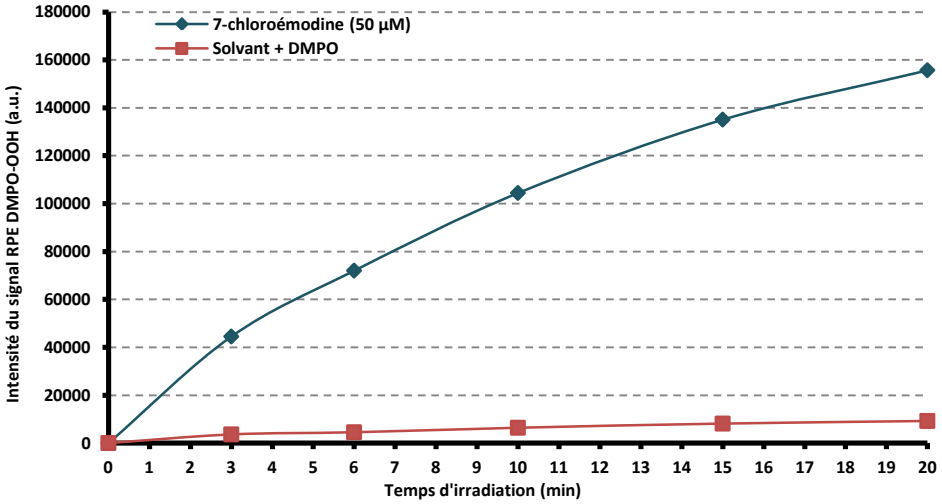


Figure 52 : Signal RPE de DMPO-OOH généré par irradiation de la 7-chloroémodine (n=1)

BY-NC-ND

PARTIE B

Champignons endolichéniques, source de molécules actives

Chapitre I. Les champignons endolichéniques

I.1. Origine et évolution

Les champignons sont des organismes hétérotrophes vis-à-vis du carbone, ils ont donc besoin de se procurer des sources de carbone organique dans leur environnement (terrestre, marin et eau douce). Par conséquent, ils ont développé différentes stratégies comme le saprophytisme, le parasitisme (agents pathogènes ; parasites) ou le mutualisme.

La première analyse des communautés fongiques isolées à partir de lichen a été entreprise par Petrini et *al.* en 1990. Des champignons filamenteux ont été isolés à partir de lichens fruticuleux appartenant aux genres *Cladonia* et *Stereocaulon*. Au total, 506 souches fongiques ont été isolés : 340 n'ont été observés qu'une seule fois et 166 ont été isolés plus d'une fois (Petrini et *al.,* 1990).

Ainsi, divers champignons principalement filamenteux retrouvés à l'intérieur du thalle lichénique sont alors qualifiés de « *Champignons endolichéniques* ». Ils sont asymptomatiques c'est-à-dire qu'ils ne produisent aucun symptôme de maladie (Arnold et *al.*, 2009; Kannangara et *al.*, 2009; U'Ren et *al.*, 2012).

De plus, ils ne produisent pas de structures de reproduction sur leur hôte. Par conséquent, leur temps de génération est directement lié à la durée de vie du substrat qu'ils colonisent (Arnold et *al.*, 2009). D'autres champignons endolichéniques ont été découvertes lors de différents essais d'isolement du mycobionte en culture pure (Crittenden et *al.*, 1995; McDonald et *al.*, 2013).

Comme les endophytes fongiques, l'origine évolutive des champignons endolichéniques (ou endolichénisme) n'est pas bien connue. Cependant, des informations sur les origines de l'endophytisme et l'endolichénisme ont récemment fait l'objet d'une étude (Arnold et *al.*, 2009). L'utilisation d'analyses phylogénétiques intégrant ces différents champignons et des reconstructions de l'état ancestral (qui prennent en compte l'incertitude phylogénétique) a montré que l'endolichénisme a joué un rôle dans l'évolution de l'endophytisme. Ces résultats fournissent donc un premier ensemble d'hypothèses concernant l'évolution du mutualisme et du saprophytisme chez les Ascomycètes (Arnold et *al.*, 2009).

BY-NC-ND

I.2. Classification et diversité

Les champignons endolichéniques sont riches et variés, composés majoritairement d'Ascomycètes, parfois de Basidiomycètes (Zhang et *al.*, 2015 ; Tripathi et Joshi, 2015).

Ils sont taxonomiquement et écologiquement distincts des champignons lichénicoles ainsi que des 13 500 espèces de mycobiontes (Arnold et *al.*, 2009 ; Lutzoni et Miadlikowska, 2009). La plupart des champignons endolichéniques appartenant aux Ascomycètes sont des représentants des Pezizomycotina avec la plupart des taxons liés phylogénétiquement à sept ordres (Figure 53) appartenant majoritairement aux différentes classes : Eurotiomycètes, Dothideomycètes, Leotiomycètes, Pezizomycètes ou Sordariomycètes (Figure 55) (Arnold et *al.*, 2009; Girlanda et *al.*, 1997; Li et *al.*, 2007; Tripathi et Joshi, 2015; U'Ren et *al.*, 2010, 2012; Zhang et *al.*, 2015).

Les champignons endolichéniques appartenant aux Basidiomycètes sont majoritairement retrouvés chez les Agaricomycètes et les Tremellomycètes (Tripathi et Joshi, 2015 ; Figure 55).

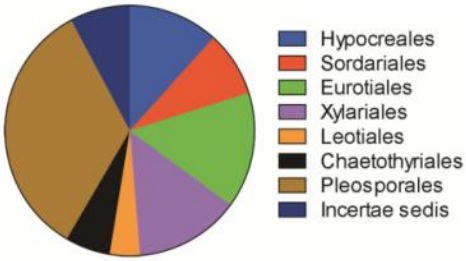


Figure 53 : Distribution phylogénétique (ordinal) des champignons endolichéniques, qui ont été criblés pour leurs métabolites secondaires bioactifs (Kellogg et Raja, 2016)

Une étude moléculaire réalisée par U'Ren et *al.*, confirme que les champignons endolichéniques appartiennent à un groupe écologique distinct (U'Ren et *al.,* 2010).

De plus, ils n'ont trouvé aucune preuve que les champignons endolichéniques soient des champignons saprophytes qui ont été "piégés" par le thalle. Au lieu de cela, leur étude révèle la spécificité des champignons endolichéniques par rapport aux tissus végétaux vivants et morts.

Peu de lichens ont été étudiés pour leurs champignons endolichéniques (Suryanarayanan et Thirunavukkarasu, 2017). Parmi les genres de lichens étudiées, les genres *Cladonia*, *Peltigera*, *Parmelia*, *Ramalina*, ou encore *Nephroma* peuvent être cités (Petrini et *al.,* 1990; Girlanda et *al.,* 1997; Li et *al.,* 2007; Arnold et *al.,* 2009; U'Ren et *al.,* 2010; Zhang et *al.,* 2015; Padhi et Tayung, 2015).

Les lichens abritent des communautés fongiques abondantes et diverses dont l'incidence, la diversité et la composition reflètent l'interaction des modèles climatiques, la

BY-NC-ND

séparation géographique, le type et la lignée de l'hôte (U'Ren et *al.*, 2012). En effet, des lichens provenant de sites de récolte distincts mais appartenant à la même espèce peuvent abriter différents types de champignons endolichéniques (Arnold, 2007; Girlanda et *al.*, 1997; Li et *al.*, 2007).

Pour comprendre le rôle des lichens comme niche écologique pour les champignons endolichéniques, Suryanarayanan et *al.,* (2005) ont comparé les associations fongiques de cinq espèces de lichens avec les endophytes qui se développent sous l'écorce (phellophytes) et ceux qui se trouvent sur les feuilles de leur hôte. Dans la plupart des cas, la diversité des champignons endolichéniques était supérieure à celle des endophytes de l'hôte. Bien qu'ils soient tous à proximité les uns des autres au sein de l'hôte et donc potentiellement exposés au même inoculum, la ressemblance globale entre les associations fongiques des trois entités reste faible (2 à 28%) (Suryanarayanan et *al.*, 2005).

Il est probable que des facteurs tels que le support ainsi que la concurrence potentielle des champignons sur leur substrat respectif jouent un rôle dans le développement des communautés fongiques dans les différents tissus (Suryanarayanan et *al.*, 2005). Ils ont également observé que les principaux champignons endolichéniques et endophytes isolés étaient majoritairement différents. Ainsi, il semblerait que les champignons endolichéniques ne soient pas des contaminants ou des résidents occasionnels du thalle (Suryanarayanan et *al.,* 2005; U'Ren et *al.,* 2010).

Les champignons endolichéniques sont invisibles à l'œil nu et difficilement reconnaissable par microscopie optique mais ils peuvent être détectés en microscopie électronique à balayage (Honegger, 2012; Honegger et *al.*, 2013 ; Figure 54).

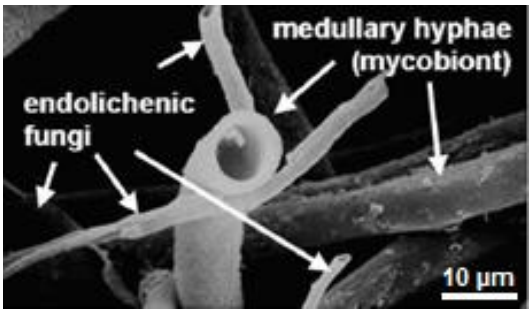


Figure 54 : Microscopie électronique à balayage de thalles (Honegger et *al.*, 2013)
Détail de la couche médullaire de *Peltigera leucophlebia* en coupe transversale.

BY-NC-ND

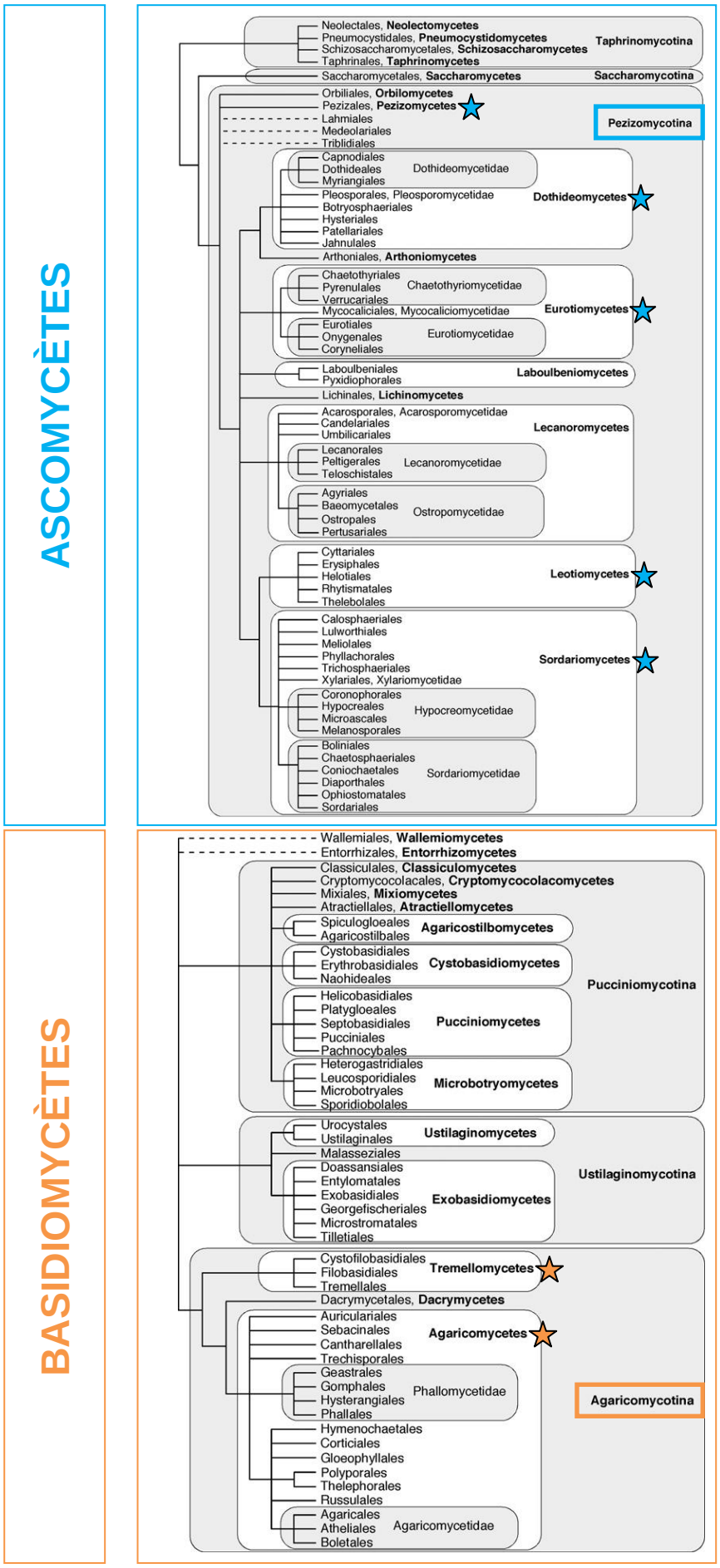


Figure 55 : Phylogénie et classification des champignons appartenant à l'embranchement des Ascomycètes et des Basidiomycètes (Hibbett et *al.*, 2007).

Les lignes ne représentent pas la distance phylogénétique réelle.

Différentes classes de champignons endolichéniques

BY-NC-ND

I.3. Culture et identification

Les méthodes d'isolement des champignons endolichéniques sont très similaires à celles des champignons endophytes. Le lichen doit être transporté au laboratoire et traité dans les 24 à 48 h (parfois jusqu'à 96h), après la récolte (Arnold et Lutzoni, 2007; U'Ren et *al.*, 2010, 2012). Les thalles lichéniques sont lavés avec de l'eau du robinet qui permet d'enlever les débris.

Ils sont ensuite stérilisés en surface par des bains successifs d'éthanol (entre 70 et 95%), suivi d'un bain d'hypochlorite de sodium (0,5% NaOCl) et d'éthanol à 70%. Les thalles sont ensuite séchés en conditions stériles. Après stérilisation, les thalles sont découpés en petits morceaux (entre 2 et 5 mm^2). Les fragments sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant une gélose à base d'extrait de malt (MEA, 2%) puis scellées avec du Parafilm® et incubés à température ambiante (environ 21,5°C) ou à 25°C, en cycle jour/nuit pendant 1 mois à 1 an et examiné périodiquement (Li et *al.*, 2007; U'Ren et *al.*, 2010, 2012). Le milieu MEA est complémenté avec des antibiotiques, tels que la pénicilline G ou la streptomycine (50 mg/L), afin d'éviter le développement des bactéries et parfois du rose Bengale (30 mg/L) permettant de ralentir la croissance fongique, peut être ajouté (Li et *al.*, 2007).

Plus récemment, l'influence de différents milieux de cultures sur la croissance de ces champignons a été étudiée. La supplémentation en fer, en glucose, en magnésium et en potassium est essentielle pour le développement et l'isolement de plusieurs groupes taxonomiques (Vinayaka et *al.*, 2016; Muggia et *al.*, 2017).

Les champignons émergents des fragments de thalle sont ensuite isolés en culture pure par repiquages successifs dans de nouvelles boîtes de Pétri contenant généralement un milieu PDA (potato dextrose agar) à 2% (Petrini et *al.*, 1990; Girlanda et *al.*, 1997; Suryanarayanan et *al.*, 2005; Li et *al.*, 2007; Paranagama et *al.*, 2007 ; Arnold et *al.*, 2009; U'Ren et *al.*, 2012).

I.4. Métabolites fongiques : principales structures

Les champignons endolichéniques colonisent les tissus internes du thalle, vivant de manière asymptomatique, s'associant préférentiellement au photobionte (Arnold et *al.*, 2009) en se nourrissant et se réfugiant dans l'hôte. En retour, ils peuvent conférer une multitude d'avantages au lichen en produisant différents types de métabolites secondaires,

BY-NC-ND

jouant probablement un rôle de défense contre les attaques des facteurs biotiques et abiotiques.

Ces champignons produisent donc une large gamme de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des terpénoïdes, des stéroïdes, des composés phénoliques et des peptides. Les métabolites des champignons endolichéniques ont été décrits par Paranagama et *al.,* pour la première foir en 2007 et depuis la recherche consacrée aux composés endolichéniques d'origine fongique a progressivement augmentée.

Pour illustrer la diversité des métabolites secondaires issus des champignons endolichéniques, quelques exemples de composés ainsi que leurs activités biologiques ont été répertoriés ci-dessous (liste non exhaustive).

I.4.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont définis comme des substances d'origine naturelle azotées, basiques et généralement hétérocycliques. Les variécolortides et les cytochalasanes sont les principaux alcaloïdes biosynthétisés par les champignons endolichéniques.

La variécolortide B (Figure 56), une variécolortide rare, a été isolé d'*Eurotium* sp. (No.17-11-8-1), un champignon endolichénique du lichen *Cladina grisea*. Elle a notamment montré des effets inhibiteurs sur la caspase-3 (protéase à cystéine (enzyme), joue un rôle centrale dans l'apoptose) avec une CI_{50} de 0,8 µM (Chen et *al.*, 2014).

Les cytochalasanes sont un grand groupe d'alcaloïdes fongiques caractérisés par une fonction perhydroisoindolone très substituée à laquelle un cycle macrocyclique –soit un carbocycle, une lactone ou un carbonate cyclique– est fusionné (Scherlach et *al.*, 2010). La chaetoglobosine Y (Figure 56) a été isolée de *Chaetomium globosum*, un champignon endolichénique du lichen *Everniastrum nepalense*, ainsi que d'autres chaetoglobosines déjà connus, les chaetoglobosines E-G (Zheng et *al.*, 2014). Certains de ces composés ont notamment montré des effets cytotoxiques sur la lignée cellulaire HCT116 avec une CI_{50} comprise entre 11,32 et 21,89 µM (Zheng et *al.*, 2014).

BY-NC-ND

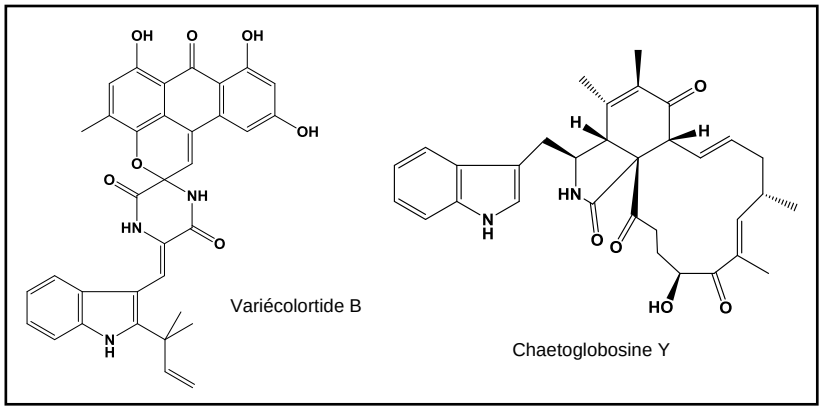


Figure 56 : Exemples d'alcaloïdes isolés de champignons endolichéniques

I.4.2. Terpénoïdes

Les tricycloalternarènes, les sesquiterpénoïdes, les diterpénoïdes *ent*-kaurane et les sesterterpènes (ophioboline) sont les principaux terpénoïdes isolés des champignons endolichéniques.

Les tricycloalternarènes F à H (terpénoïdes non mixtes), ainsi que dix tricycloalternarènes (TCA) connus ont été isolés d'un champignon endolichénique *Ulocladium* sp. du lichen *Everniastrum* sp. Le TCA 1b (Figure 57) a montré une faible activité contre la souche *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) avec une CMI de 125 µg/mL. Le TCA 9b a montré une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire de Hela avec CI_{50} de 8,58 µM (Wang et *al.*, 2013a).

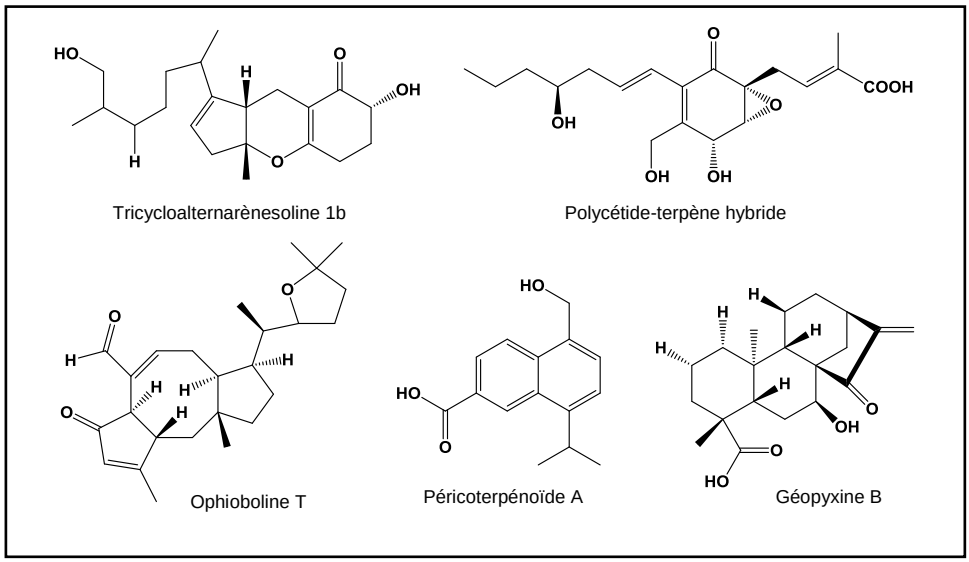


Figure 57 : Exemples de terpénoïdes isolés de champignons endolichéniques

Les diterpénoïdes *ent*-kaurane d'origine fongique sont rares, bien qu'elles soient souvent présentes dans plusieurs familles de plantes (García et *al.*, 2007). La culture de deux champignons endolichéniques (*Geopyxis* aff. *Majalis* et *Geopyxis* sp. AZ0066) du lichen *Pseudevernia intensa*, a conduit à l'isolement de nouveaux diterpènes *ent*-kaurane, les

BY-NC-ND

géopyxines A-F. La géopyxine B (Figure 57) était la seule géopyxine naturelle à démontrer une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses NCI-H460, SF-268, MCF-7, PC-3M et MDA-MB-231 avec une CI_{50} comprise entre 2,25 et 5,41 µM. De plus, son dérivé méthylester, la méthylgeopyxine B s'est révélée plus active sur ces mêmes lignées cellulaires avec une CI_{50} comprise entre 0,63 et 1,48 µM (Wijeratne et *al.*, 2012).

La péricoterpénoïde A (Figure 57), un sesquiterpène de type cadinane, a été isolé d'un champignon endolichénique *Periconia* sp. (N° 19-4-2-1) du lichen *Parmelia* sp. (Wu et *al.*, 2015). Cette molécule a montré une activité antimicrobienne contre *Aspergillus niger* avec une CMI de 31 $\mu g.mL^{-1}$ et une faible activité contre *Candida albicans* avec une CMI de 500 $\mu g.mL^{-1}$ (Wu et *al.*, 2015).

Un sesterterpène, l'ophioboline T (Figure 57) a été isolé du champignon endolichénique *Ulocladium* sp. du lichen *Everniastrum* sp. Ce composé a montré une forte activité cytotoxique contre deux lignées cellulaires KB et HepG2 par rapport à l'étoposide (témoin positif) avec des valeurs de CI_{50} de 3,01 et 0,24 µM respectivement. Il a aussi montré une activité antibactérienne modérée contre *Staphylococcus aureus* méticillin-résistant (MRSA), contre *Bacillus subtilis* et également contre la souche *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) avec des valeurs de CMI comprise entre 15,6 et 31,3 µM. Il est intéressant de noter que ce composé a montré des activités cytotoxiques et antibactériennes, ce qui suggère que le cycle furane formé dans la chaîne latérale en C-15 influence de manière significative l'activité biologique de cette molécule (Wang et *al.*, 2013b).

Un polycétide-terpène hybride (Figure 57) avec des groupes hautement fonctionnalisés a été isolé de *Pestalotiopsis* sp, un champignon endolichénique du lichen *Cetraria islanddica.* Ce composé a montré une bonne efficacité antifongique contre *Fusarium oxysporum* et *Fusarium gramineum* avec une CMI de 8 µg/mL. Les auteurs ont suggéré que leurs résultats pourraient révéler le rôle écologique possible du champignon endolichénique dans la protection chimique des plantes hôtes dans la relation champignon-plante (Yuan et *al.*, 2017).

BY-NC-ND

I.4.3. Stéroïdes

Les viridines représentent une classe unique de produits naturels dérivés de stérols, possédant une caractéristique structurale inhabituelle, un cycle furane fusionné à un noyau pregnane ou d'androstane aux positions 4 et 6.

Les nodulisporistéroïdes A à L (Figure 58) et la déméthoxyviridine ont été isolés de *Nodulisporium* sp. (N° 65-17-2-1), un champignon endolichénique du lichen *Everniastrum* sp. Les nodulisporistéroïdes A (Figure 58) et B possèdent un nouveau squelette carboné représentant le premier cas d'ouverture entre les positions 3 et 4 chez les 4-méthylprogestéroïdes. La deméthoxyviridine (Figure 58) a montré une activité d'agrégation anti-Aβ_{42} (peptide β-amyloïde 1-42) avec une CI_{50} de 13,4 µM (Zhao et *al.*, 2015a; Zheng et *al.*, 2013). Huit viridines, les nodulisporiviridines A à H, ont été isolées du même champignon endolichénique que précédemment. Les nodulisporiviridines A à D sont des viridines uniques avec un cycle A ouvert. Les huit nodulisporiviridines ont montré une activité inhibitrice d'agrégation anti-Aβ_{42}. La plus forte activité a été observée pour la nodulisporiviridine G (Figure 58) avec une CI_{50} de 1,2 µM. Le test de mémoire à court terme sur un modèle de drosophile transgénique Aβ_{42}-humain (modèle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer) a montré que les huit composés amélioraient la capacité de mémoire à court terme, avec des activités proches de celles du témoin positif (mémantine) (Zhao et *al.*, 2015b). Cependant aucun composé isolé n'a montré d'activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 et SW480 (Zhao et *al.*, 2015a).

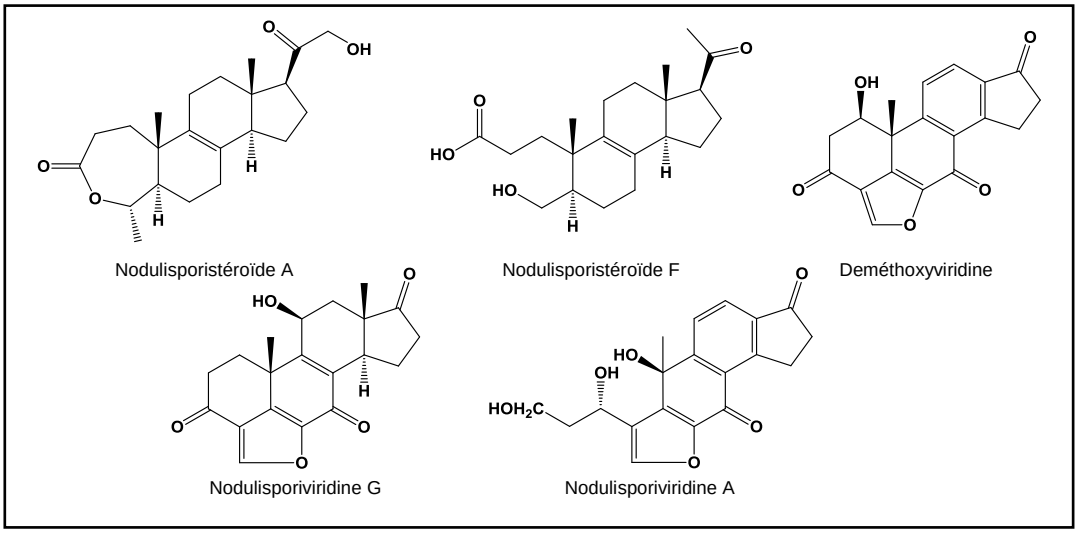


Figure 58 : Exemples de stéroïdes isolés de champignons endolichéniques

BY-NC-ND

I.4.4. Composés phénoliques et polycétides

Les quinones, les furanones, les pyrones, les anthraquinones, les xanthones et les benzopyranoïdes sont les principaux composés phénoliques rencontrés chez les champignons endolichéniques.

Sept mono- et bis-furanones, les pézizolides A à G (Figure 59), ont été isolées à partir de *Peziza* sp., un champignon endolichénique du lichen *Xanthoparmelia* sp. Tous ces composés n'ont montré aucune activité cytotoxique détectable et d'activité antimicrobienne à 20 µg/mL sur cinq lignées cellulaires cancéreuses humaines (HeLa ; A549 ; MCF-7 ; HCT116 et T24) et contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (CGMCC 1.2465) et *Candida albicans* (CGMCC 2.2086) (Zhang et *al.,* 2014).

Cinq dérivés d'α-pyrone, les necpyrones A à E (Figure 59), ont été isolées à partir de *Nectria* sp., un champignon endolichénique du lichen *Parmelia* sp. Tous ces composés ont été testés pour leur activité cytotoxique contre six lignées cellulaires cancéreuses humaines (K562 ; MDA-MB-231 ; MCF-7 ; SW620 ; HT29 et Hela). Cependant, aucun composé n'a montré de cytotoxicité (CI_{50}> 120 µM), ni d''activité inhibitrice de la croissance de *Candida albicans* (CMI > 280 µM) (Li et *al.*, 2015).

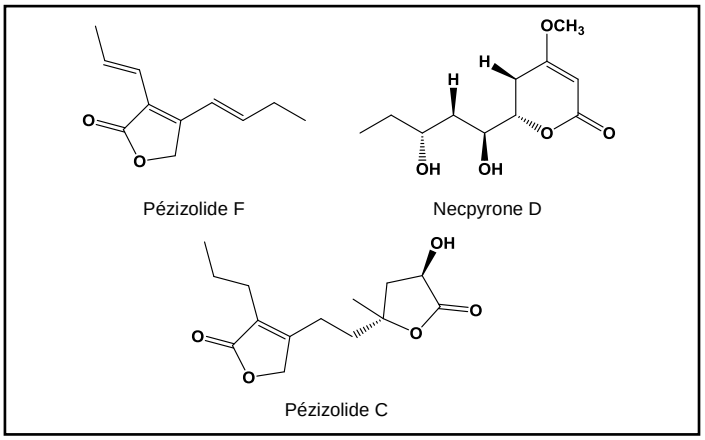


Figure 59 : Exemples de polycétides isolés de champignons endolichéniques.

Deux anthraquinones, la 8-*O*-méthylversicolorine A et B (Figure 60), ont été isolés d'*Aspergillus versicolor*, un champignon endolichénique du lichen *Loboria retigera.* Ces deux molécules ont présentés des activités cytotoxiques modérées avec des CI_{50} comprises entre 12,6 et 27,2 µM sur la lignée cellulaire PC-3 et H460 (Dou et *al.*, 2014).

La xanthoquinodine A6 (Figure 60) a été isolé de *Chaetomium elatuma* (No. 63-10-3-1), un champignon endolichénique du lichen *Everniastrum cirrhatum.* Cette molécule a montré

BY-NC-ND

une cytotoxicité sur les lignées cellulaires cancéreuses HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 et SW480 avec des CI_{50} comprises entre 2,04 et 6,44 µM (Chen et *al.*, 2013).

Une naphthalènone, la (*R*)-4,6,8-trihydroxy-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalènone (Figure 60) et une isocoumarine, la 6,8-dihydroxy-(3R)-(2-oxopropyl)-3,4-dihydroisocoumarine (Figure 60) ont été isolés du champignon endolichénique *Xylariaceae* sp. (CR1546C) du lichen costaricien *Sticta fuliginosa*. Ces composés ont présentés une faible activité antifongique contre *Candida albicans* avec des CI_{50} d'environ 75 µg.mL^{-1} et des CMF de 100 et 150 µg.mL^{-1}. De plus, aucune activité n'a été observée contre *Escherichia coli* (CMI > 200 µg.mL^{-1}), et une faible activité antimicrobienne avec des CI_{50} d'environ 105 µg.mL^{-1} et une CMI de 150 µg.mL^{-1} contre *Bacillus subtilis* (Kim et *al.*, 2014).

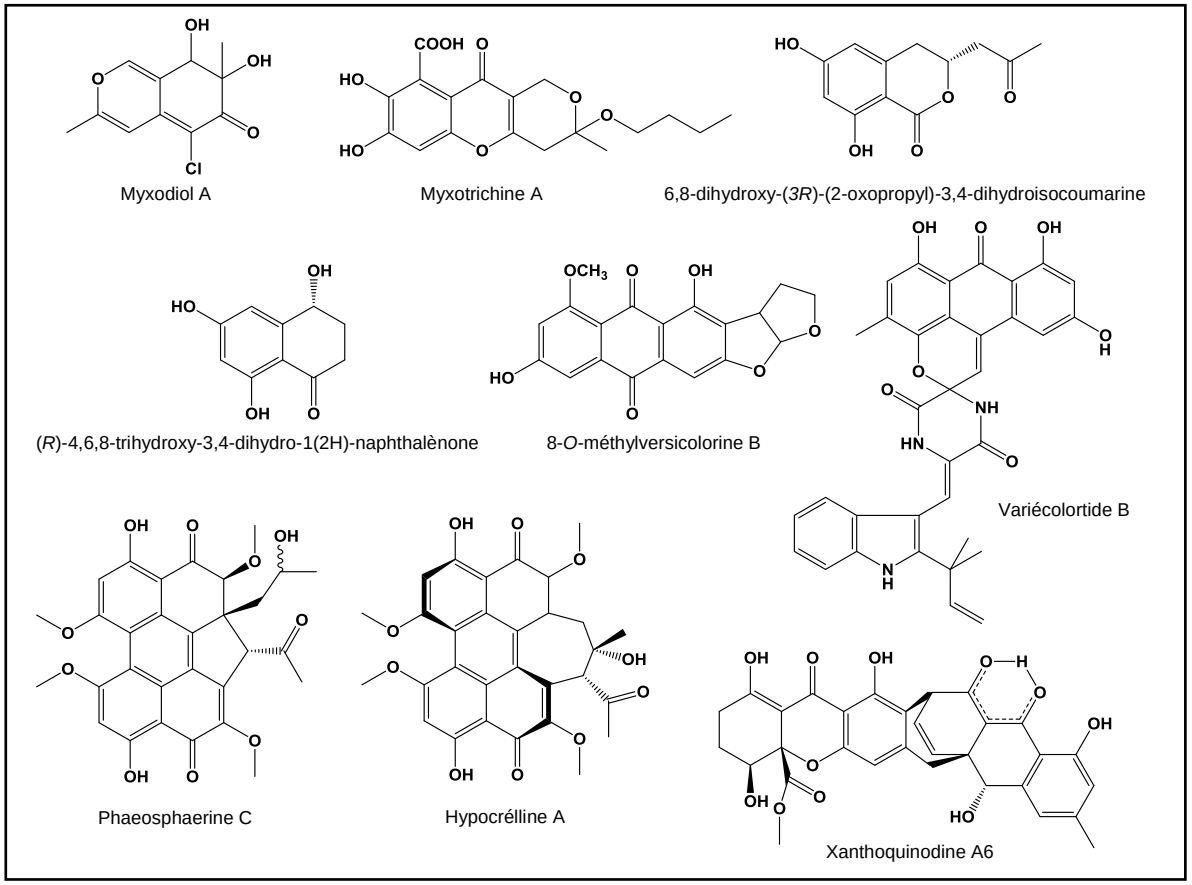


Figure 60 : Exemples de composés phénoliques isolés de champignons endolichéniques.

Six phototoxines, les phaeosphaerines A à F, ainsi que six perylène-quinones connues, ont été isolées à partir de *Phaeosphaeria* sp., un champignon endolichénique du lichen *Heterodermia obscurata*. Les différents composés ont montré une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses PC-3, DU145 et LNCaP avec des CI_{50} comprise entre 2,42 et 24,92 µM. Des observations en microscopie confocale ont montrées que la

BY-NC-ND

phaeosphaerine C (Figure 60) et l'hypocrélline A (Figure 60) s'accumulaient dans les lysosomes des cellules tumorales (K562 humaines) et que lors d'irradiation lumineuse, leur activité phototoxique étaient plus importante (CI_{50} de 19,49 et 7,47 µM sans lumière contre 7,08 et 0,55 µM en présence de lumière) (Li et *al.*, 2012).

Un analogue de l'austdiol, le myxodiol A (Figure 60) a été isolé du champignon endolichénique *Myxotrichum* sp. du lichen *Cetraria islandica*. Ce composé a montré une faible activité antifongique contre *Candida albicans* (sc5314) avec une CMI de 128 µg/mL (Yuan et *al.*, 2013). De plus, deux xanthones ont été isolés du même champignon, la myxotrichine A (Figure 60) et D. Ces deux composés ont montrés une activité cytotoxique modérée sur la lignée cellulaire K562, avec des CI_{50} de 32,2 et 20,0 µM, respectivement (Yuan et *al.*, 2013).

I.4.5. Peptides

Seulement deux peptides ont été isolés de champignons endolichéniques à l'heure actuelle. Deux pentapeptides cycliques, la cyclo(N-méthyl-L-Phe-L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro) et la cyclo(L-Val-D-Ile-L-Leu-L-pro-D-Leu) (Figure 61) ont été isolés de *Xylaria* sp. un champignon endolichénique du lichen *Leptogium saturninum*. La cyclo(N-methyl-L-Phe-L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro) a montré une forte activité antifongique synergique (FICI < 0,3125) contre *Candida albicans* à 6,25 µg/mL avec 0,004 µg/mL de kétoconazole. L'activité antifongique synergique de la cyclo(N-méthyl-L-Phe-L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro) est relativement plus faible que celle de témoin positif, la beauvéricine (Wu et *al.*, 2011).

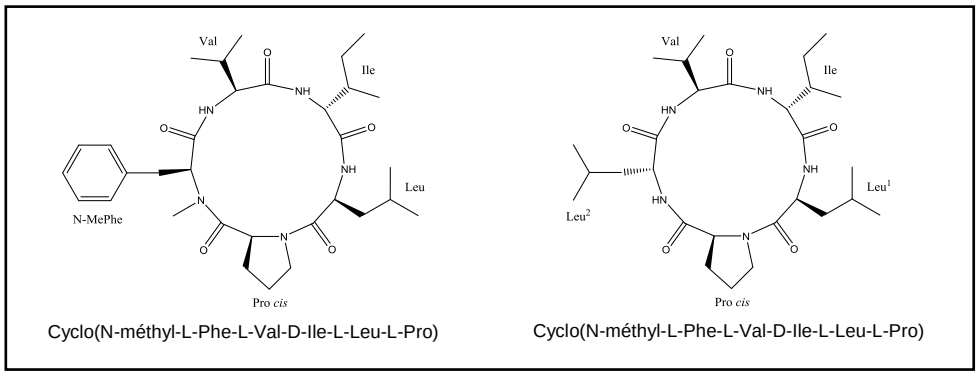


Figure 61 : Exemples de peptides isolés de champignons endolichéniques

BY-NC-ND

II.1. Isolement et identification des champignons endolichéniques de *N. laevigatum*

Les lichens ont été récoltés comme décrit dans la Partie C (cf. § I). Les thalles lichéniques ont été stérilisés en surface par des bains successifs d'éthanol à 70% et d'hypochlorite de sodium à 0,5% seulement quelques heures après la récolte. Des morceaux de 0,5 cm^2 ont été découpés puis déposés sur un milieu MEA seul et sur un milieu MEA supplémenté en rose Bengale (Figure 62).

Les champignons endolichéniques ont été isolés par repiquage sur un milieu PDA au fur et à mesure de la croissance des différentes souches (visible à l'œil nu ; Figure 62) environ 1 mois ou plus en fonction de la vitesse de croissance des champignons.

Figure 62 : Exemples de boîte de Pétri avec morceaux de lichen au début de la croissance fongique

A partir des différents thalles récoltés en Corrèze et en Gironde, 46 souches ont été isolées, 22 sur milieu MEA et 24 sur milieu MEA + rose Bengale (Tableau 11). Pour le site de Corrèze, 18 souches ont été isolées à partir de 12 fragments et 28 souches pour le site de Gironde, à partir de 32 fragments (Tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et lieux de récolté

Origine du lichen	Milieu de culture	Nombre total de fragments incubés	Nombre total de fragments infectés	Nombre d'isolats
CORRÈZE	MEA	6	3	6
	MEA + rose Bengale	6	6	12
GIRONDE	MEA	16	13	16
	MEA + rose Bengale	16	7	12

L'identification moléculaire des souches fongiques isolées a été réalisée *via* le séquençage de la région ITS (Internal Transcribed Spacer : espaceurs transcrits internes) de l'ADN ribosomique en utilisant les amorces ITS4 et ITS5 (White et *al.,* 1990).

L'ADN a été extrait et l'ITS a été amplifié et séquencé avec succès pour 44 isolats. Les deux isolats restant n'ont quant-à eux pas pu être identifiés (Gir_21 et Gir_23). Les

BY-NC-ND

séquences obtenues n’ont pas pu être exploitées, sans doute à cause d’un mélange d’ADN (plusieurs mycéliums présents dans l’échantillon) rendant l’interprétation de la séquence impossible.

Une comparaison avec la base de données GenBank (Tableau 12) suivie d'une analyse phylogénétique (Figure 63) a permis d'identifier 8 taxons, appartenant tous aux Ascomycètes, répartis dans deux classes (Sordariomycètes et Pezizomycètes) et trois familles (Xylariacées, Coniochaetacées et Pezizacées). Une majorité des souches (36 soit 78%) ont été assignées au genre *Nemania* (Xylariacées).

Quarante-trois souches différentes ont été identifiées jusqu'à l'espèce, voir jusqu'à la variété (Tableau 12) avec un pourcentage de similarité supérieur à 99% par rapport aux séquences de référence (GenBank ; Collections CBS et ATCC). Toutefois, la séquence de la souche Gir_24 ne présente que 97,3% de similarité avec une séquence identifiée comme étant *Nemania serpens.* Cependant, les observations macroscopiques et microscopiques ainsi que sa position dans l’arbre phylogénétique (Figure 63) laissent supposer que cette souche appartiendrait au genre *Nemania*.

BY-NC-ND

Tableau 12 : Désignation taxonomique des souches et pourcentage de similarité

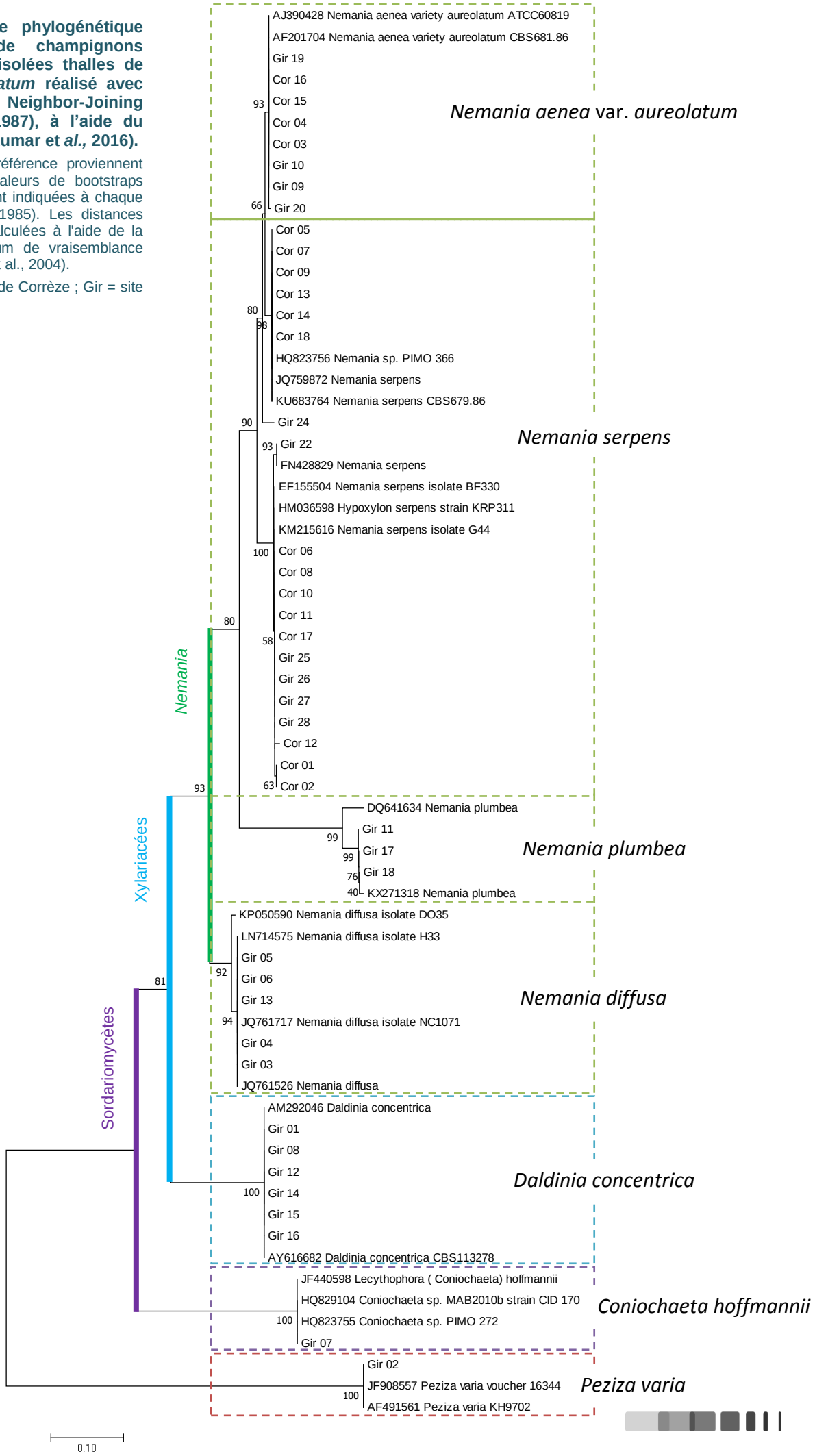
Code d'identification	Espèces	Division	Classe	Famille	Numéro d'accession GenBank	Code spécimen	Similarité (%)	Références
Gir_20	*Nemania aenea* var. *aureolatum*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	AF201704 AJ390428	CBS 681.86 ATCC 60819	99,791%	Peláez et *al.*, 2008 Tang et *al.*, 2009
Gir_09 ; Gir_10 ; Gir_19 Cor_03 ; Cor_04 ; Cor_15 ; Cor_16	*Nemania aenea* var. *aureolatum*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	AF201704 AJ390428	CBS 681.86 ATCC 60819	100%	Peláez et *al.*, 2008 Tang et *al.*, 2009
Gir_25 ; Gir_26 ; Gir_27 ; Gir_28 Cor_06 ; Cor_08 ; Cor_10 ; Cor_11 ; Cor_17	*Nemania serpens* *Génotype 1*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KM215616	-	100%	Raja et *al.*, 2015
Gir_22	*Nemania serpens* *Génotype 2*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	FN428829 KM215616	-	100% 99,374%	Stadler et *al.*, 2010 Raja et *al.*, 2015
Cor_12	*Nemania serpens* *Génotype 3*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KM215616	-	99,374%	Raja et *al.*, 2015
Cor_01 ; Cor_02	*Nemania serpens* *Génotype 4*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KM215616	-	99,791%	Raja et *al.*, 2015
Cor_05 ; Cor_07 ; Cor_09 ; Cor_13 ; Cor_14 ; Cor_18	*Nemania serpens* *Génotype 5*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	JQ759872	-	100%	U'Ren et *al.*, 2012
	Hypoxylon atropurpureum var. *brevistipitatum* = *Nemania serpens*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KU683765	CBS 679.86	100%	U'Ren et *al.*, 2016
Gir_24	*Nemania serpens* var. *serpens*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KF573986	CBS 241.65 MB 416870	97,292%	-
	Nemania serpens *Génotype 6*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	GU292820	-	97,292%	Hsieh et *al.*, 2010
Gir_11 ; Gir_17 ; Gir_18	*Nemania plumbea*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	KX271318	-	99,583%	Christian et *al.*, 2016
Gir_03 ; Gir_04 ; Gir_05 ; Gir_06 ; Gir_13	*Nemania diffusa*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	LN714575 JQ761717	-	100%	Větrovský et *al.*, 2016 U'Ren et *al.*, 2012
Gir_01 ; Gir_08 ; Gir_12 ; Gir_14 ; Gir_15 ; Gir_16	*Daldinia concentrica*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Xylariacées	AM292046 AY616682	- CBS 113278	100%	Šrůtka et *al.*, 2007 Triebel et *al.*, 2005
Gir_07	*Coniochaeta hoffmannii*	Ascomycètes	Sordariomycètes	Coniochaetacées	JF440598	-	100%	Lygis et *al.*, 2014
Gir_02	*Peziza varia*	Ascomycètes	Pezizomycètes	Pezizacées	AF491561 JF908557	-	100%	Hansen et *al.*, 2002 Osmundson et *al.*, 2013

BY-NC-ND

Figure 63 : Arbre phylogénétique des souches de champignons endolichéniques isolées thalles de *Nephroma laevigatum* réalisé avec la méthode du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987), à l'aide du logiciel MEGA7 (Kumar et *al.*, 2016).

Les séquences de référence proviennent de GenBank. Les valeurs de bootstraps (500 réplications) sont indiquées à chaque nœud (Felsenstein, 1985). Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance composite (Tamura et al., 2004).

Légende : Cor = site de Corrèze ; Gir = site de Gironde



BY-NC-ND

La plus grande variabilité intra-spécifique a été observée chez *Nemania serpens* (Tableau 12 et Figure 63). En effet, 19 isolats ont été identifiés comme appartenant à cette espèce constituant alors six génotypes différents. De même pour *Nemania aenea* var. *aureolatum* où huit isolats sont répartis dans deux génotypes (Tableau 12 et Figure 63).

La présence de Rose Bengale (permet de ralentir de la croissance fongique) n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre et la diversité d'isolats (Tableau 13). Cependant, plusieurs espèces ont été isolés seulement à partir d'un ou de l'autre milieu de culture. La plus grande diversité d'isolats a été observée pour le milieu MEA seul.

Tableau 13 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et milieux de culture.

	Milieu de culture	
	MEA	**MEA + rose Bengale**
Nemania aenea* var. *aureolatum	2	6
Nemania serpens	6	13
Nemania sp.	-	1
Nemania plumbea	1	2
Nemania diffusa	5	-
Coniochaeta hoffmannii	1	-
Daldinia concentrica	6	-
Peziza varia	1	-
nd	-	2
Total	**22**	**24**

Une plus grande diversité a été observée sur le site de Gironde (8 taxons) où deux taxons (*N. aenea* var. *aureolatum* et *N. serpens*) sont dominants (47,8% des isolats) et sont communs aux deux lieux de récoltes (Figure 64).

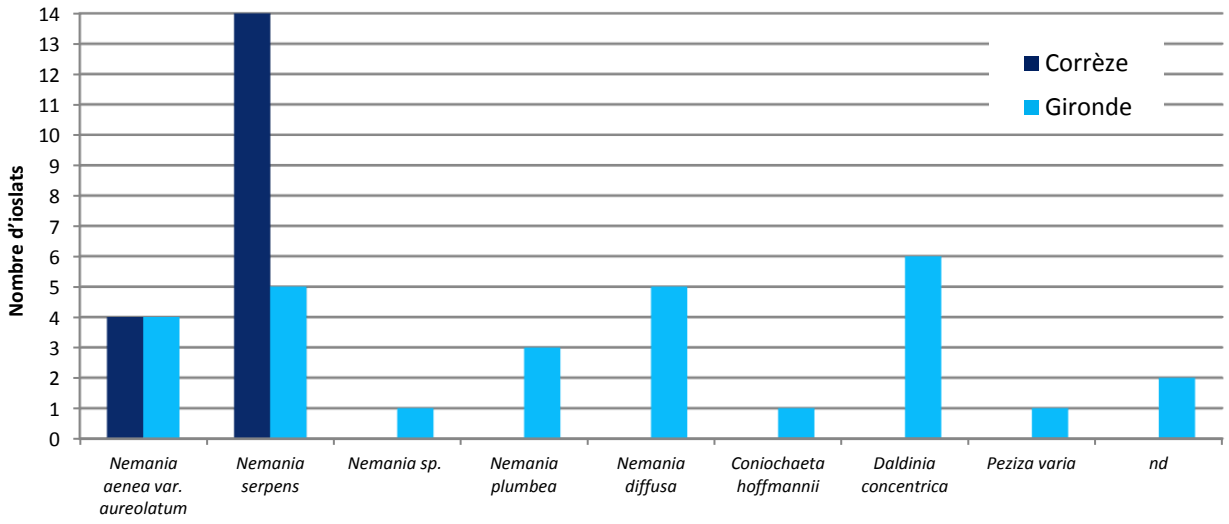


Figure 64 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et lieux de récolte

BY-NC-ND

Le nombre de taxons isolés au sein de *Nephroma laevigatum* n'est pas très élevé (Girlanda et *al.*, 1997; Li et *al.*, 2007; Arnold et *al.*, 2009; U'Ren et *al.*, 2010). La petite quantité de fragments déposés (6 et 16) et le nombre d'individus étudiés ont pu jouer un rôle sur la faible diversité fongique, en particulier pour le lichen issu du site de Corrèze (deux taxons).

L'absence de croissance des champignons endolichéniques au niveau de certains fragments ne signifie pas forcément qu'il n'y en a pas. En effet, les champignons endolichéniques ont pu être éliminés lors de la stérilisation (plus sensible ou plus exposé) ou alors ils ne sont tout simplement pas cultivables sur le milieu utilisé.

Les isolats appartiennent à des espèces connues et communes sur bois mort (*Nemania*, *Daldinia* et *Coniochaeta*). Leur présence dans des lichens récoltés sur les troncs d'arbres feuillus n'est pas surprenante. D'un point de vue écologique, les lichens pourraient constituer un "réservoir" pour des champignons qui se développeront après la mort de l'arbre et contribueront ainsi au recyclage de la matière organique.

La variabilité intra-spécifique dans le taxon *Nemania serpens* est élevée puisque six génotypes ont été caractérisés. Une étude taxonomique et phylogénétique plus poussée pourrait révéler la présence d'espèces cryptiques, non encore décrites (par exemple Gir_24).

Ce résultat confirme que les lichens représentent bien une source de biodiversité et abritent de nouvelles espèces (Girlanda et *al.*, 1997; Li et *al.*, 2007; Arnold et *al.*, 2009; U'Ren et *al.*, 2010) et ceux même en France.

Les deux taxons dominants *Nemania serpens* et *N. aenea* var. *aureolatum* avec 50% des isolats et communs aux deux sites de récoltes ont été sélectionnés pour la suite des investigations.

II.2. Description morphologique

Des observations des caractères macroscopiques et microscopiques de chaque espèce isolée et identifiée ont été réalisées (récapitulatif : cf. Annexe 2). La présence ou non de spores a été répertoriée ainsi que la vitesse de croissance des différentes espèces.

Lors de l'analyse macroscopique, plusieurs critères sont observés tels que l'aspect (duveteux, cotonneux, poudreux, granuleux, glabre…), le relief (plat, plissé…), la taille (petite, étendue…), la couleur (blanche, crème ou colorée…). La présence d'un pigment diffusant

BY-NC-ND

dans la gélose ainsi que certains paramètres tels que la vitesse de croissance des colonies ont aussi été observés.

- ***Coniochaeta hoffmannii***

Cette espèce a été isolée du lichen récolté en Gironde. Le recto de la colonie est bicolore, brun, lisse, humide et gélatineux sur les bords avec un centre blanc (Figure 65). Le verso de la colonie est blanc (jaune clair dû au milieu de culture).

La gélose s'est colorée en brun au fur et à mesure du développement du champignon.

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La croissance de ce champignon est rapide (en 21 jours la boite de Pétri (90 mm) était envahie).

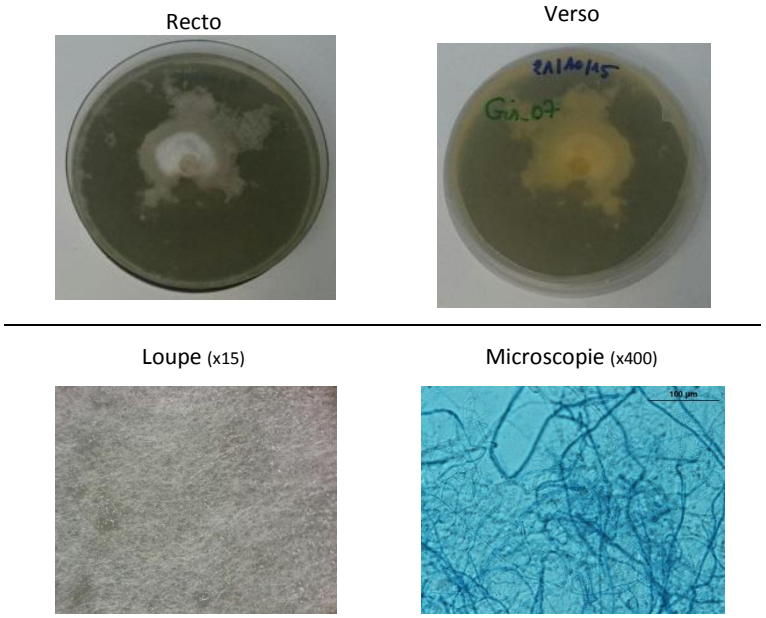


Figure 65 : Aspect morphologique de *Coniochaeta hoffmannii*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

- ***Daldinia concentrica***

Cette espèce a été isolée du lichen récolté en Gironde.

Le resto de la colonie est blanc, duveteux voire granuleux avec des petits amas de mycélium disposés de manière homogène à la surface du champignon et des plus sombres au niveau du dépôt (Figure 66). Le verso de la colonie est blanc avec un centre brun à contours jaunâtres.

La présence de spores a été observée lors de l'observation au microscope (x 450) (Figure 66).

La croissance de ce champignon est rapide (en 21 jours la boite de Pétri (90 mm) était envahie).

BY-NC-ND

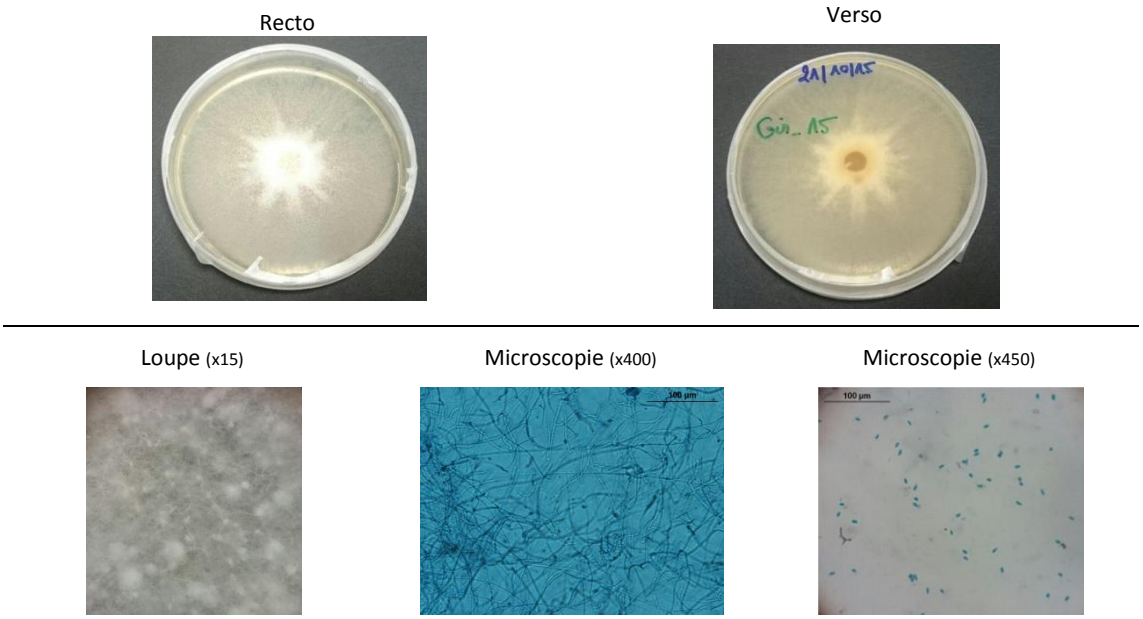


Figure 66 : Aspect morphologique de *Daldinia concentrica*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

- ***Peziza varia***

Cette espèce a été isolée du lichen récolté en Gironde.

Le resto de la colonie est jaune et gélatineux humide. Le verso est de la même couleur (Figure 67).

La présence de spores a été observée lors de l'observation au microscope (x 400) (Figure 67).

La croissance de ce champignon est lente (de 2,3 cm à 2 cm de diamètre en 7 jours).

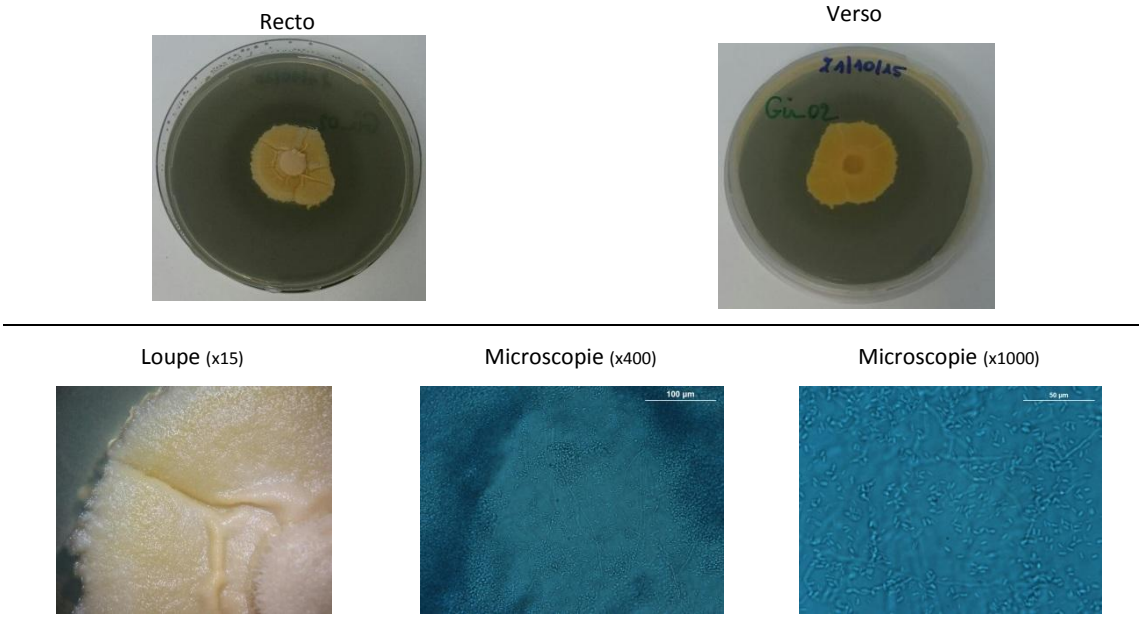


Figure 67 : Aspect morphologique de *Peziza varia*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

BY-NC-ND

- ***Nemania aenea* var. *aureolatum***

Cette espèce a été isolée des lichens récolés en Corrèze et en Gironde.

Le resto de la colonie est blanc et duveteux. Le verso de la colonie est de couleur orange (Figure 68).

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La croissance de ce champignon est assez lente (de 1,5 cm à 3 cm de diamètre en 7 jours).

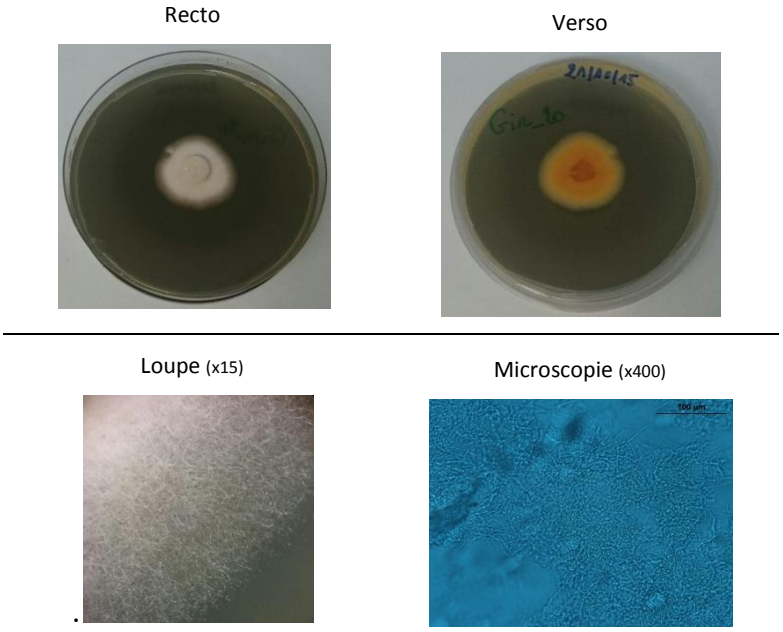


Figure 68 : Aspect morphologique de *Nemania aenea* var. *aureolatum*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

- ***Nemania diffusa***

Cette espèce a été isolée du lichen récolé en Gironde.

Le resto de la colonie est blanc et duveteux voire cotonneux. Le verso de la colonie est de couleur jaune clair (Figure 69).

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La croissance de ce champignon est moyenne (de 3,5 cm à 7 cm de diamètre en 7 jours).

- ***Nemania serpens***

Cette espèce a été isolée des lichens récoltés en Corrèze et en Gironde.

Le resto de la colonie est blanc et duveteux avec des cercles de croissance superposés de couleur brune au contour irrégulier (vagues). Le verso de la colonie est de couleur orange-jaune clair (Figure 70).

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La croissance de ce champignon est moyenne (de 1,7 cm à 4,5 cm de diamètre en 7 jours).

BY-NC-ND

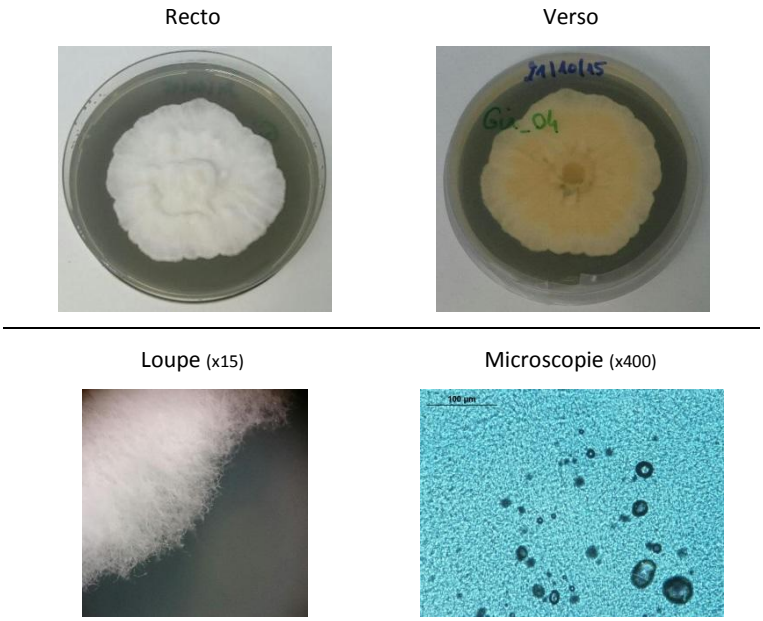


Figure 69 : Aspect morphologique de *Nemania diffusa*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

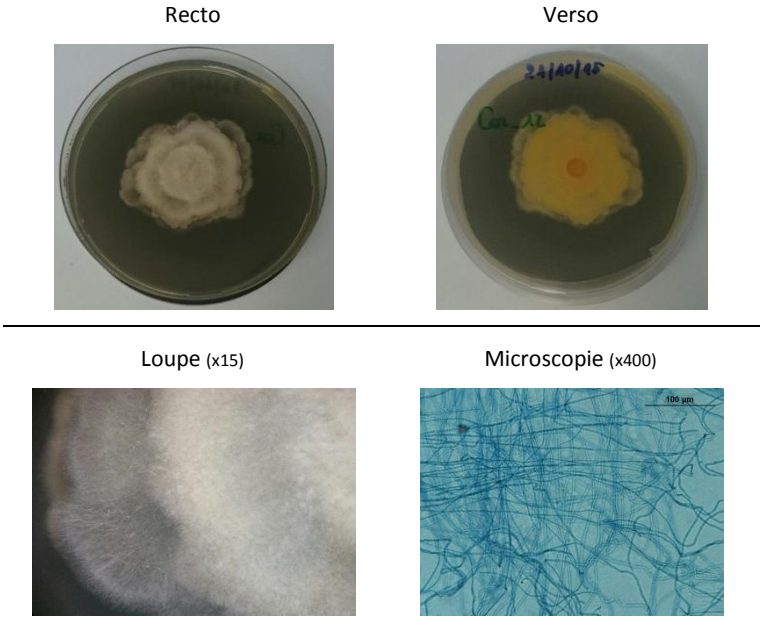


Figure 70 : Aspect morphologique de *Nemania serpens*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

- ***Nemania sp.***

Cette espèce a été isolée du lichen récolté en Gironde.

Le resto de la colonie est marron-gris et duveteux avec une superposition de cercles de croissance bruns et blancs. Le verso de la colonie est orange-brun (Figure 71).

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La présence de bourgeons végétatifs en chapelet a été observée.

La croissance de ce champignon est moyenne (de 1,7 cm à 4,5 cm de diamètre en 7 jours).

BY-NC-ND

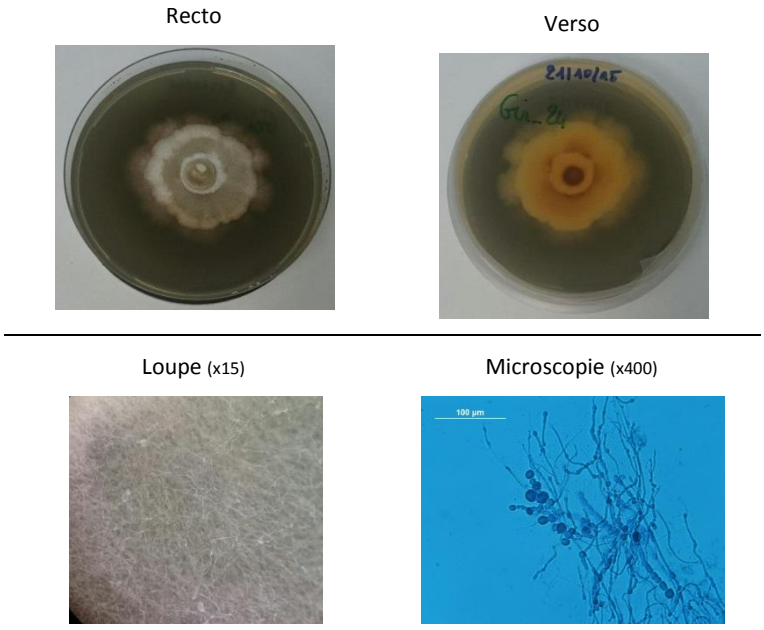


Figure 71 : Aspect morphologique de *Nemania sp.*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

- ***Nemania plumbea***

Cette espèce a été isolée du lichen récolté en Gironde.

Le resto de la colonie est brun, duveteux voir cotonneux et au milieu blanc avec des cercles de croissance bruns. Le verso de la colonie est de couleur marron-brun (Figure 72).

La présence de spores n'a pas été observée lors de l'observation au microscope (x 400).

La présence de bourgeons végétatifs latéraux en chapelet et des filaments en forme de vrilles ont été observés.

La croissance de ce champignon est moyenne (de 3 cm à 8 cm de diamètre en 7 jours).

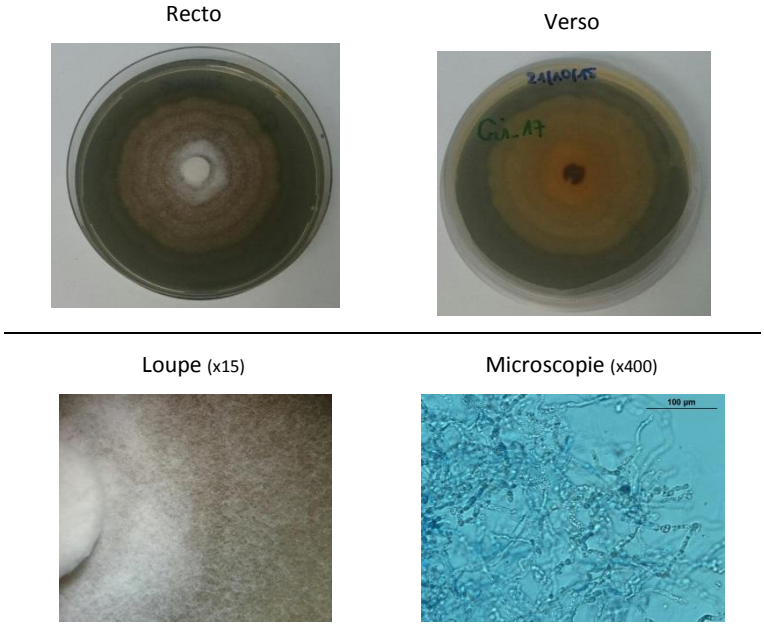


Figure 72 : Aspect morphologique de *Nemania plumbea*
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture sur milieu PDA.
Observations microscopiques (coloration au bleu lactique)

II.3. Tests préliminaires de production de métabolites

II.3.1. Essais d'optimisation de culture

Deux souches ont été sélectionnées : *Nemania serpens* et *N. aenea* var. *aureolatum*, dans le but de déterminer les paramètres de culture de ces champignons permettant d'obtenir le meilleur rendement en métabolites.

Trois milieux de culture ont été utilisés pour ces tests d'optimisation :

- un milieu PDA (potato dextrose agar),
- un milieu à base d'avoine (OA : oatmeal agar)
- un milieu PDA carencé (dilué 4 fois).

Après un mois d'incubation à température ambiante à la lumière naturelle avec des extractions toutes les semaines (3 boîtes de Pétri par semaine), les conditions optimales de culture ont été déterminées par comparaison des profils CCM (témoin milieu seul par rapport aux extraits fongiques) et des rendements massiques obtenus.

Dans un premier temps, l'impact du milieu carencé a été visible sur la production de métabolites. En effet, par comparaison des différents profils CCM, notamment pour *Nemania serpens*, la diversité en composés a beaucoup diminué (Figure 73).

Les deux champignons sélectionnés n'ont pas produit de métabolites supplémentaires pour pallier au manque de nutriments du milieu carencé.

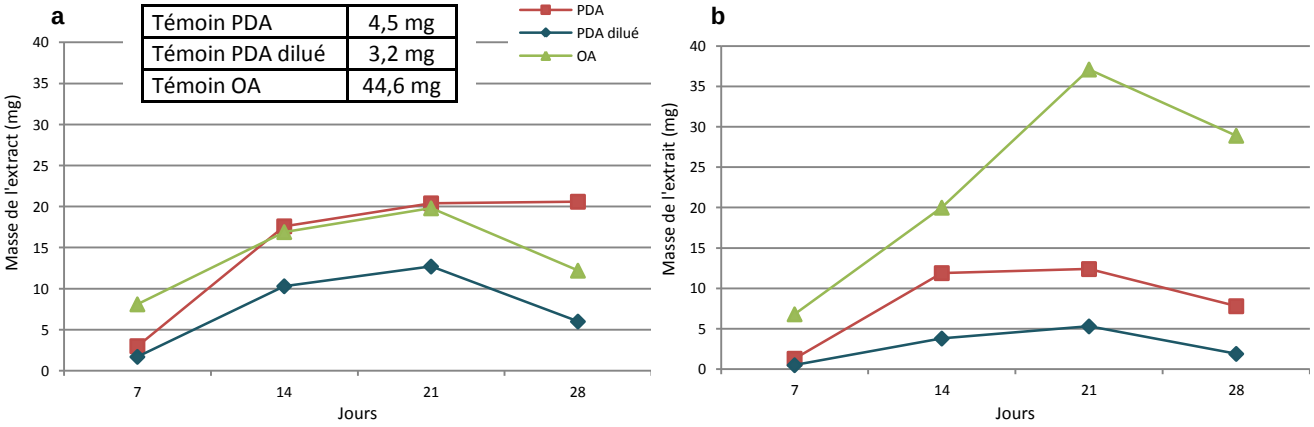


Figure 73 : Récapitulatif des masses (rectifiées par rapport au témoin) des différents extraits *Nemania aenea* var. *aureolatum* (a) et *Nemania serpens* (b)

De plus, pour le milieu OA, un rendement massique relativement élevé a été obtenu (Figure 73). Cependant, l'extraction du milieu seul montre la présence d'une multitude de composés également retrouvés dans les extraits fongiques. Contrairement au milieu PDA, où un nombre négligeable de métabolites ont été extraits (Figure 74).

BY-NC-ND

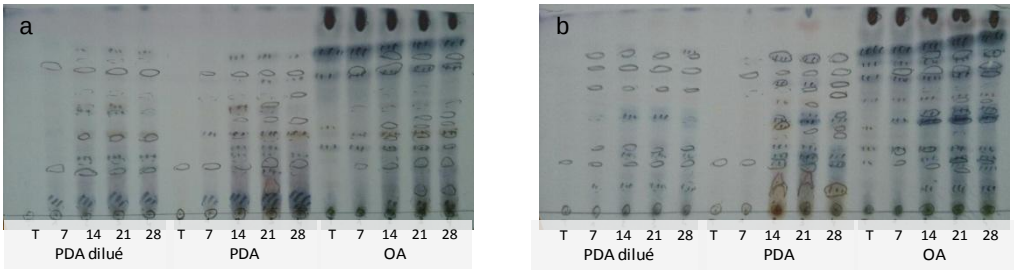


Figure 74 : Récapitulatif des profils CCM des différents extraits *Nemania aenea* var. *aureolatum* (a) et *Nemania serpens* (b)
Éluant : Toluène/AcOEt/acide formique 70:20:5 et T = Témoin milieu seul
Observation sous UV (254 et 365 nm) et révélation par l'anisaldéhyde sulfurique.

Ainsi, les conditions optimales de culture ont été déterminées comme étant : 21 jours de culture dans le milieu PDA.

Ces différents résultats mettent en évidence l'importance du milieu nutritif utilisé lors de la culture des champignons. Cette particularité est notamment mise à profit avec la méthode OSMAC (One Strain Many Compounds) qui conduit à la surexpression ou sous expression de certains métabolites en milieu approprié.

II.3.2. Sélection des souches

À la suite de la détermination des conditions de cultures, six souches ont été sélectionnées pour des investigations chimiques et biologiques. Ces différentes souches ont été choisies du fait d'être isolées à la fois des lichens récoltés en Corrèze et en Gironde. Cependant, les souches de *Nemania aenea* var. *aureolatum* provenant de Corrèze n'ont pas pu être utilisées, compte tenu de l'absence de croissance lors du repiquage. Ainsi, seulement deux souches de génotypes différents ont été sélectionnées pour *N. aenea* var. *aureolatum*. En ce qui concerne *N. serpens*, deux souches provenant du lichen de Corrèze et deux autres issues du lichen récolté en Gironde ont été choisies (Tableau 14).

Tableau 14 : Récapitulatif des souches sélectionnées

Espèces fongiques	Génotypes	Corrèze	Gironde
Nemania aenea* var. *aureolatum	1	-	Gir_20
	2	-	Gir_10
Nemania serpens	1	Cor_08	Gir_26
	2	Cor_12	-
	3	-	Gir_22

II.4. Culture à petite échelle

La culture à petite échelle a été réalisée principalement dans le but d'effectuer des tests d'activités biologiques afin de cibler plus facilement les souches pouvant contenir des métabolites secondaires bioactifs.

BY-NC-ND

Les six souches sélectionnées ont été mise en culture en boîtes de Pétri (4 par champignon) contenant 20 mL de milieu PDA. Ces cultures ont été incubées à température ambiante exposées à la lumière naturelle, puis extraites avec 100% d'acétate d'éthyle (cf. Partie C § III.2).

Après filtration et évaporation à sec, les différents extraits obtenus ont été pesés (Tableau 15) et analysés par CCM et CLHP (cf. § II.5.1).

Tableau 15 : Récapitulatif des masses d'extraits pour les six extraits fongiques

Espèces fongiques	Génotypes	Codes d'identification	Masse (mg)
Nemania aenea* var. *aureolatum	1	Gir_10	37,0
	2	Gir_20	46,5
Nemania serpens	1	Cor_08	50,8
	1	Gir_26	77,7
	2	Cor_12	58,9
	3	Gir_22	59,9
Témoin milieu seul			8,2

Des petites cultures en milieu liquide ont aussi été réalisées par ensemencement de morceaux de mycélium. Cependant, dans ces conditions de culture, les champignons ne se sont pas développés. Ceci peut s'expliquer par l'absence d'appareils reproducteurs sexués tels que des spores lors des observations microscopiques. En effet, pour l'ensemencement des milieux liquides, il est convenu de réaliser des solutions de spores, qui n'ont pas pu être réalisés dans ce cas précis. Ainsi, la culture en milieu liquide a été abandonnée au profit de la culture sur milieu solide.

II.5. Profilage chimique des extraits fongiques des souches sélectionnées

II.5.1. CCM et CLHP-DAD

Les profils chimiques des six extraits ont été analysés par CCM (Figure 75) et CLHP-DAD (Figure 76). Les extraits sont repris dans l'acétone à une concentration de 1 mg/mL et un dépôt de 5 µL est ensuite réalisé sur les plaques CCM. Les plaques CCM ont été observées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'anisaldéhyde sulfurique (ANS) (Figure 75). La révélation par l'ANS permet de mettre en évidence différentes familles de molécules (ex. triterpènes, stérols, …).

BY-NC-ND

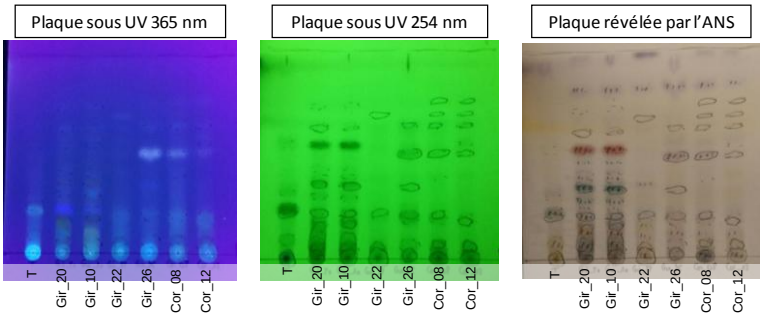


Figure 75 : Analyse par CCM des six extraits fongiques sélectionnés
Éluant : Toluène/Acétate d'éthyle/Acide formique 70: 20: 5 (v/v/v). (T : témoin milieu seul)
Observation sous UV (365 et 254 nm) puis révélation par l'anisaldéhyde sulfurique.

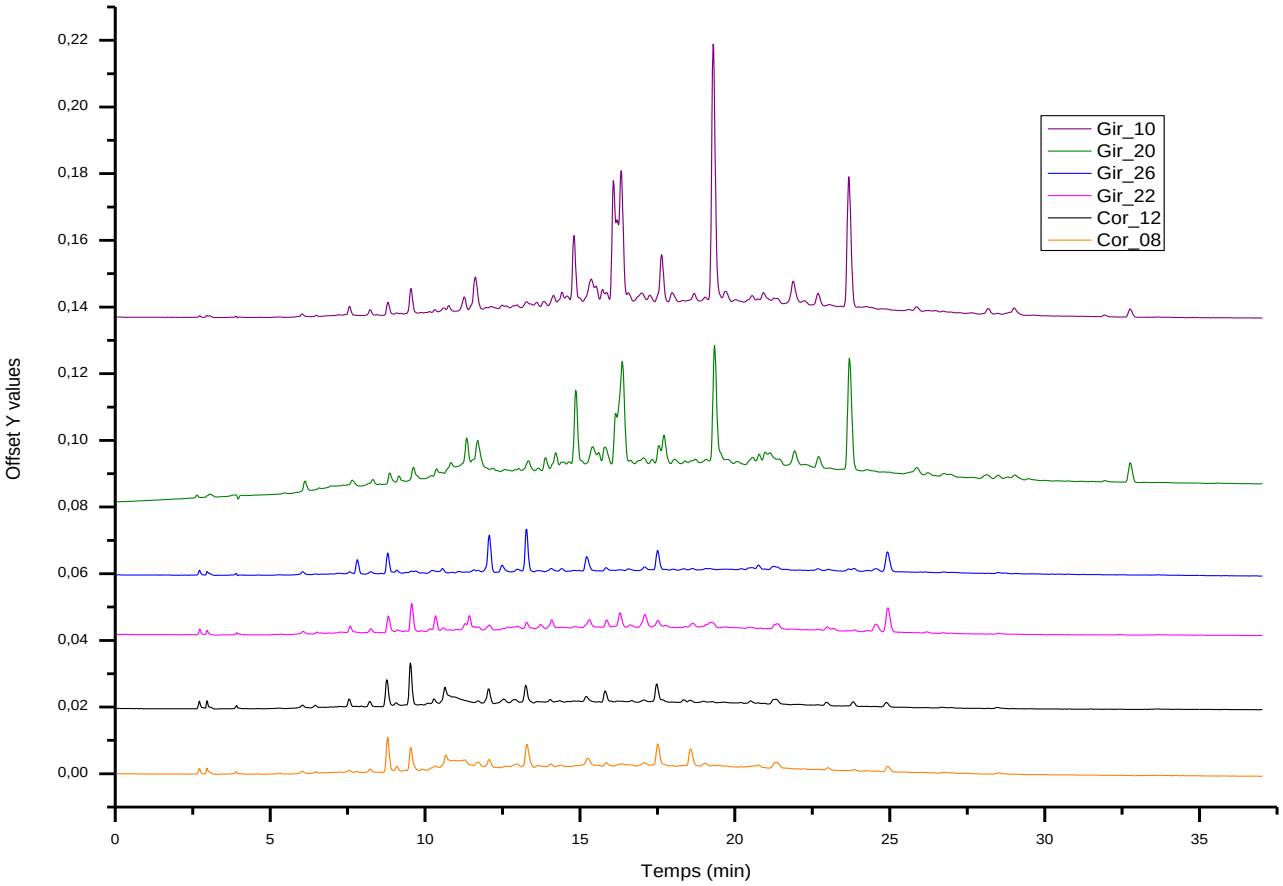


Figure 76 : Superposition des profils CLHP des six extraits fongiques sélectionnés (à 300 nm)

Les profils CCM et CLHP des extraits obtenus à partir des deux génotypes de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (Gir_20 et Gir_10) sont relativement proches, de même pour Cor_12 et Cor_08, contrairement aux profils des extraits Gir_22 et Gir_26 où plusieurs signaux sont présents ou absents en comparaison avec les autres profils de la même espèce (Figure 76).

Ces résultats montrent une influence minime du génotype sur la production de métabolites mais une variabilité en fonction du biotope et des conditions environnementales auxquelles les lichens ont été soumis au cours de leur croissance. En effet, dans la nature, les souches fongiques les mieux adaptées aux conditions

BY-NC-ND

environnementales se sont développées au détriment des autres. Ainsi, ces différentes souches ont gardés en mémoire l'expression de leurs gènes, d'où la variabilité observée entre deux souches provenant chacune d'un lichen différent.

II.5.2. Réseaux moléculaires

Les six souches sélectionnées ont fait l'objet d'une étude de profilage chimique par réseau moléculaire (Figure 79).

De plus, lors de l'analyse, plusieurs correspondances ont permis d'identifier les composés du cluster [1] avec des masses comprises entre *m/z* 261 et 311 $[M+H]^+$ appartenant à la famille structurale des dicétopipérazines (cyclopeptides). En effet, le composé à *m/z* 261 $[M+H]^+$ a été identifié comme étant la cyclo(L-Pro-L-Tyr) de formule brute $C_{14}H_{16}N_2O_3$, celui à *m/z* 277 $[M+H]^+$ correspond à la cyclo(Tyr-Leu) de formule brute $C_{15}H_{20}N_2O_3$ et le composé à *m/z* 311 $[M+H]^+$ correspond à la cyclo(Phe-Tyr) de formule brute $C_{18}H_{18}N_2O_3$ (Figure 77). La cyclo(L-Pro-L-Tyr) a été retrouvée dans les extraits de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (Gir_20 et Gir_10) et *N. serpens* (Gir_22 et Gir_26). La cyclo(Tyr-Leu) a quant-à elle été identifiée uniquement dans les extraits Gir_20 et Gir_10 et la cyclo(Phe-Tyr) seulement dans les extraits de Gir_20 ; Gir_10 et Gir_26

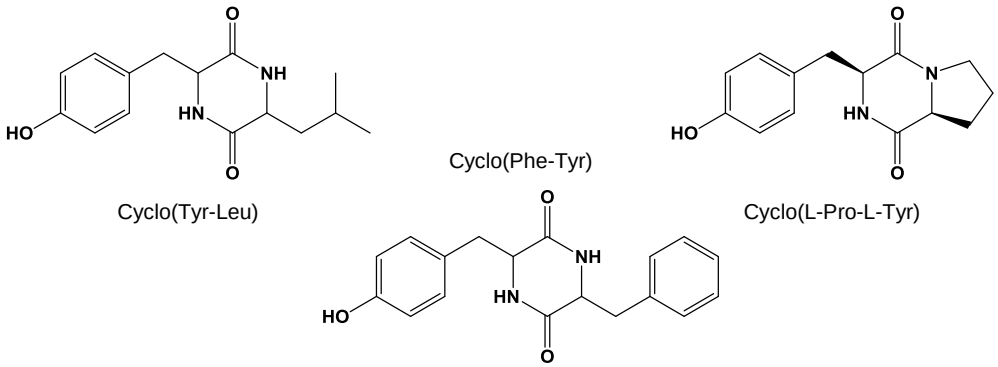


Figure 77 : Structures des composés identifiés appartenant à la famille des cyclopeptides

Le composé à *m/z* 255 $[M+H]^+$ du cluster [2], celui à *m/z* 245 $[M+H]^+$ du cluster [4] ont été respectivement identifiés par la base de donnée du GNPS comme étant la daidzéine, de formule brute $C_{15}H_{10}O_4$ et la phénylalanine, de formule brute $C_{14}H_{18}N_2O_3$ (Figure 78).

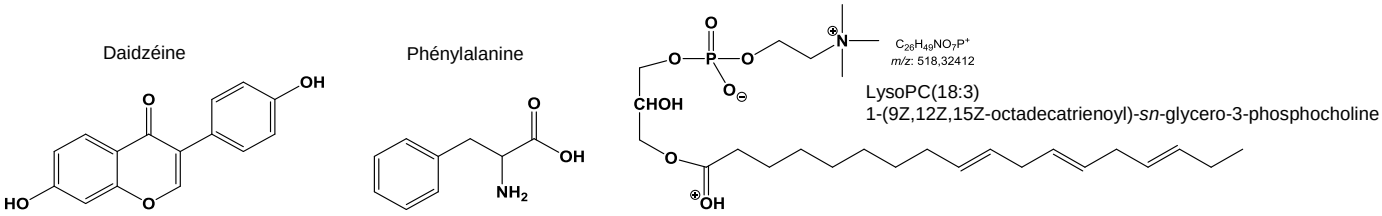


Figure 78 : Structures des composés identifiés des clusters [2] ; [3] et [4]

BY-NC-ND

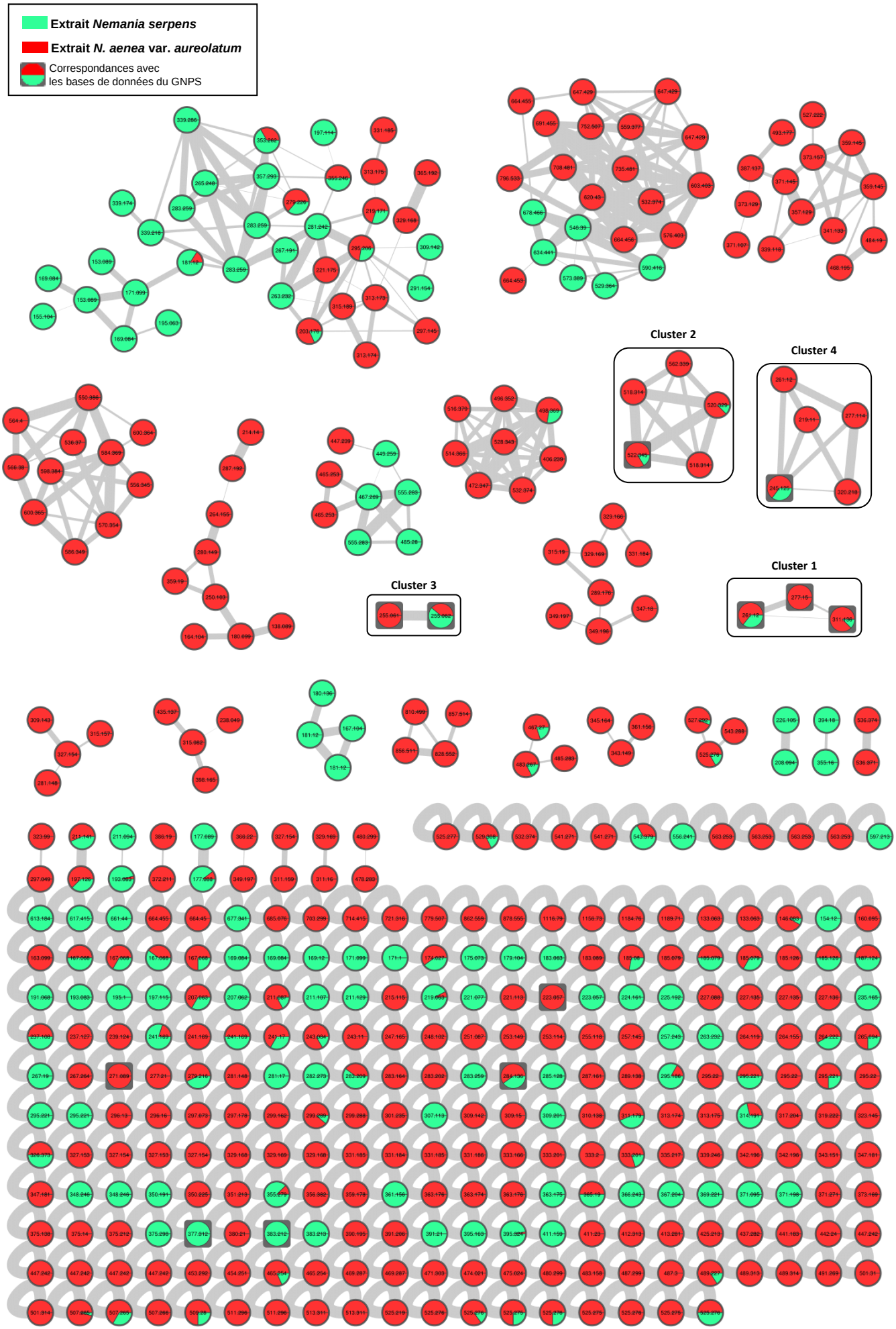


Figure 79 : Réseaux moléculaires obtenus après visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres MS/MS des différents extraits fongiques.

BY-NC-ND

Un autre cluster [3] constitué de métabolites structuralement proches avec des masses compris entre *m/z* 518 et 562 $[M+H]^+$ a été identifié. Un des quatre composés constituants le cluster a été identifié par la base de données du GNPS comme étant un lysophospholipide. En effet, le composé à *m/z* 522 $[M+H]^+$ correspond à la 1-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LysoPC(18:1(9Z)) ; $C_{26}H_{52}NO_7P$). Ainsi par comparaison avec les spectres de ce métabolite, les composés à *m/z* 520 $[M+H]^+$ et 518 $[M+H]^+$ ont été identifiés comme étant respectivement la 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LPC(18:2/0:0) ; $C_{26}H_{50}NO_7P$) et la 1-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (LysoPC(18:3) ; $C_{26}H_{48}NO_7P$). Cependant, le composé à *m/z* 562 $[M+H]^+$ n'a pas pu être identifié. Les composés à *m/z* 520 $[M+H]^+$ et 522 $[M+H]^+$ ont déjà été identifiés dans le réseau de *Nephroma laevigatum* vu précédemment (cf. Partie A § III.2.2.2).

Néanmoins, l'efficacité de cette technique repose sur l'ionisation et la fragmentation des composés et des paramètres utilisés. De plus, les bases de données contenues dans le GNPS permettant lors de l'analyse, l'identification directe par correspondance des spectres MS/MS entre eux, restent, à l'heure actuelle, encore limitées. Cependant, bien que cette méthode de déréplication apporte des informations complémentaires à une analyse phytochimique classique, celle-ci n'a pas pu être utilisée en tant que telle, faute de temps. En effet, la collaboration en vue des analyses LC-MS/MS hautes résolutions et l'utilisation de la plateforme GNPS ont été réalisées pour les différents extraits seulement au mois de juin 2017. Cette nouvelle approche aurait peut-être permis de mettre en évidence, les molécules déjà isolées et identifiées de champignons endolichéniques et donc concentrer les recherches sur la purification et l'identification de nouveaux métabolites potentiellement bioactifs.

II.6. Évaluation des activités biologiques des extraits fongiques

II.6.1. Activités antiprolifératives

L'activité antiproliférative de chaque extrait fongique a été évaluée sur quatre lignées cellulaires cancéreuses, deux colorectales (HT-29 et HCT116) et deux prostatiques (PC-3 et DU145). La viabilité des cellules traitées par les extraits fongiques est déterminée après 48h de traitement par un test au MTT (Freimoser et *al.,* 1999) puis rapportée à la viabilité des cellules témoins évaluée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en

BY-NC-ND

pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées (Figure 81 et 82). Les CI_{50} sont ensuite calculées.

Nemania aenea var. *aureolatum* montre une activité antiproliférative sur toutes les lignées cellulaires avec des CI_{50} comprises entre 13,6 et 38,3 µg/mL (Figure 81 et Tableau 16) contrairement à *Nemania serpens*, où plusieurs variations d'activités ont été observées en fonction du génotype, de l'origine géographique des souches fongiques et des lignées cellulaires utilisées (Figure 82 et Tableau 16).

En effet, les souches Cor_08 et Gir_26 ont été identifié comme étant des *Nemania serpens* issues du même génotype. Cependant, elles n'ont pas la même origine géographique (Corrèze et Gironde). Ainsi, les variations d'activités peuvent être dues aux facteurs environnementaux du lieu d'origine du champignon, qui de fait a produit différents métabolites pour se protéger et se développer dans cet environnement. L'influence génétique joue un rôle important dans ce cas précis (mémoire de l'expression des gènes ; diffusion dans la gélose de métabolite pour Cor_08 (halo orange ; Figure 80) et une différence de quelques métabolites observée lors de l'analyse CLHP ; cf. § II.5.1). Pour l'extrait Gir_26, la CI_{50} est atteinte seulement avec la lignée cellulaire DU145 (89,3 ± 1,7 µg/mL), contrairement à l'extrait Cor_08 qui montre un effet antiprolifératif pour toutes les lignées cellulaires avec une CI_{50} comprise entre 13,3 µg/mL et 33,7 µg/mL (Tableau 16).

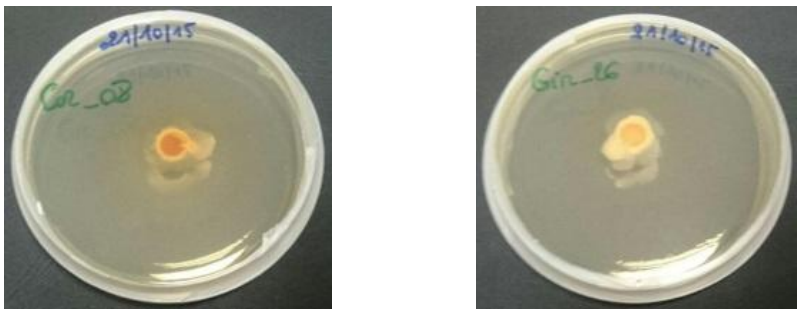
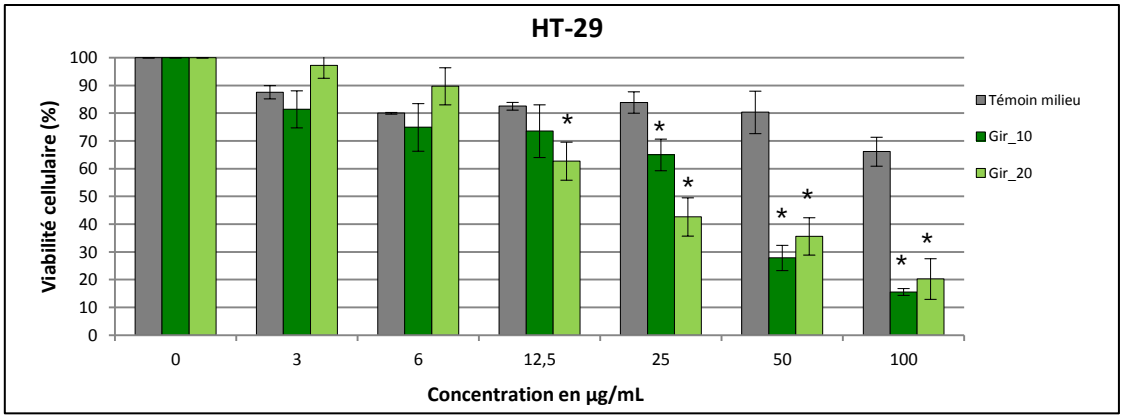
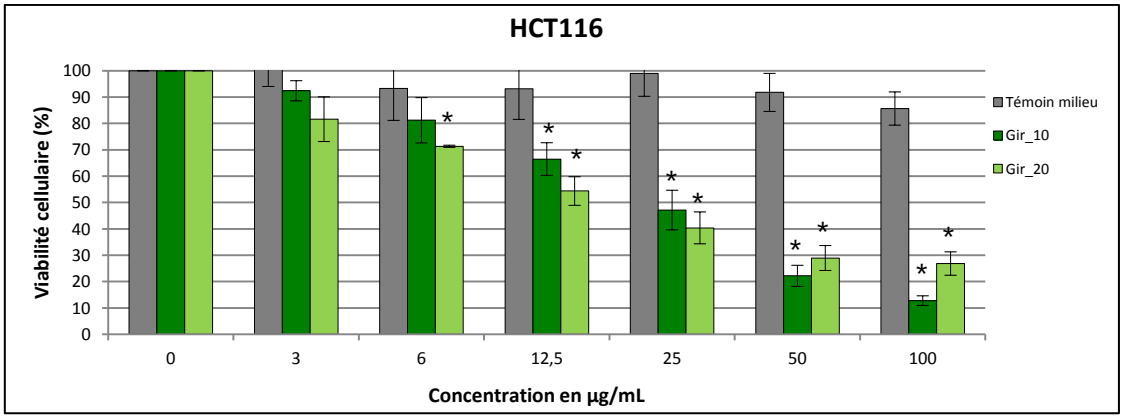


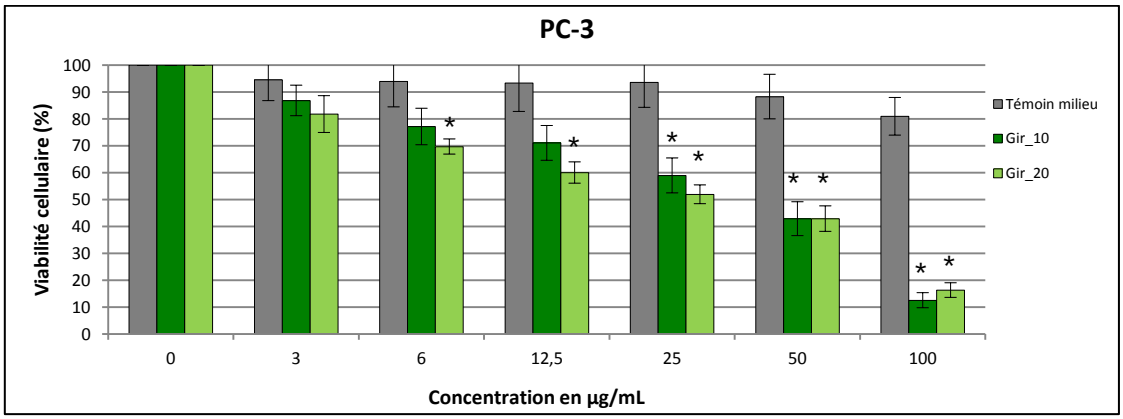
Figure 80 : Observation macroscopique des souches Cor_08 et Gir_26

L'extrait Cor_12 montre une activité proche de celle de Cor_08 pour les lignées cellulaires HCT116 et DU145 avec des CI_{50} de 28,1 et 18,9 µg/mL. Cependant, pour la lignée HT-29, cet extrait s'est révélé moins actif que l'extrait Cor_08 (CI_{50} = 60,7 µg/mL contre 30,5 µg/mL). Pour la lignée PC-3, cet extrait a présenté une faible activité puisque la CI_{50} n'est pas atteinte à 100 µg/mL. L'extrait Gir_22 a montré une activité principalement sur les lignées cellulaires HCT116 et DU145, toutefois plus faible que celle de l'extrait Cor_08 (CI_{50} = 44,6 et 28,5 µg/mL contre 23,9 et 13,3 µg/mL).

BY-NC-ND







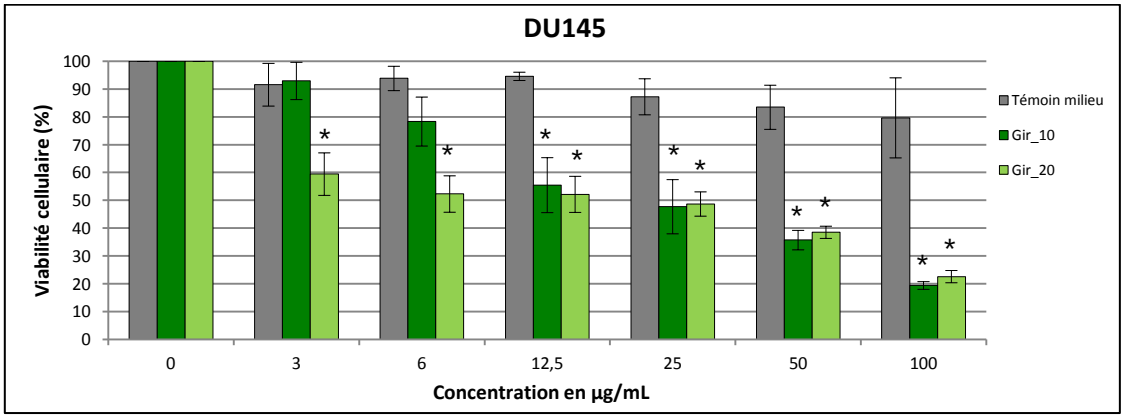


Figure 81 : Effets antiprolifératifs à 48h des extraits fongiques de *Nemania aenea* var. *aureolatum* sélectionnés sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales HT-29 et HCT116 et prostatiques PC-3 et DU145 (n=3, * p<0,05).

BY-NC-ND

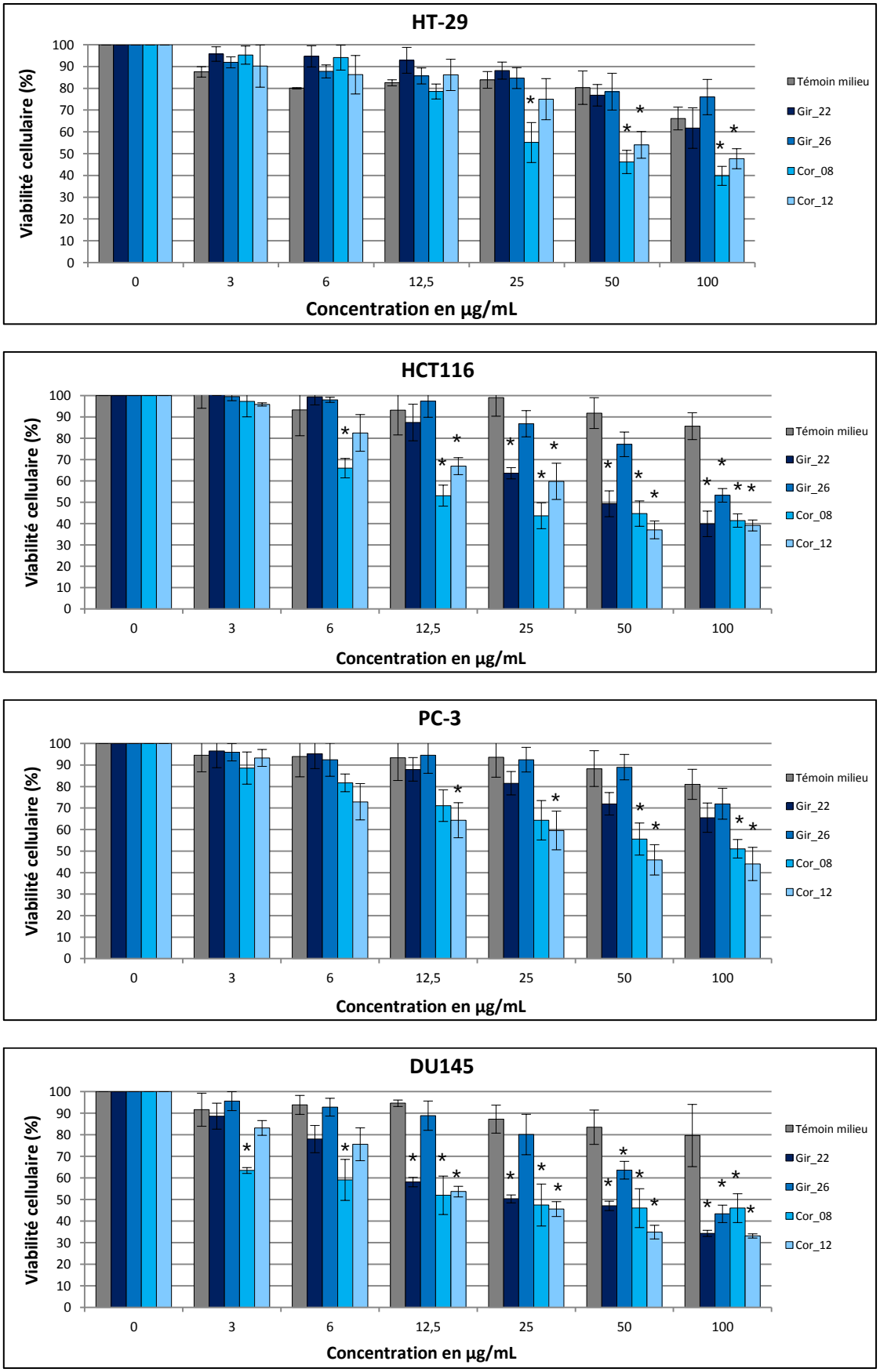


Figure 82 : Effets antiprolifératifs à 48h des extraits fongiques de *Nemania serpens* sélectionnés sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales HT-29 et HCT116 et prostatiques PC-3 et DU145 (n=3, * p<0,05).

BY-NC-ND

Par conséquent, les extraits les plus actifs sont Gir_20 pour *Nemania aenea* var. *aureolatum* et Cor_08 pour *N. serpens*.

Tableau 16 : Récapitulatif des différentes CI_{50} (en µg/mL) obtenues pour les six extraits fongiques testés. Test antiprolifératif à 48h (n=3)

Espèces fongiques	Génotypes	Codes d'identification	HT-29	HCT116	PC-3	DU145
Nemania aenea* var. *aureolatum	1	Gir_10	34,8 ± 5,8	22,8 ± 2,6	38,3 ± 5,3	24,2 ± 4,6
	2	Gir_20	24,5 ± 2,3	13,6 ± 1,6	30,0 ± 3,7	14,1 ± 4,1
Nemania serpens	1	Cor_08	30,5 ± 4,8	23,9 ± 2,3	33,7 ± 3,4	13,3 ± 3,7
	1	Gir_26	> 100	> 100	> 100	89,3 ± 1,7
	2	Cor_12	60,7 ± 2,1	28,1 ± 1,6	> 100	18,9 ± 1,5
	3	Gir_22	> 100	44,6 ± 4,9	> 100	28,5 ± 1,7

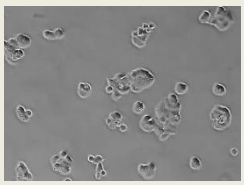
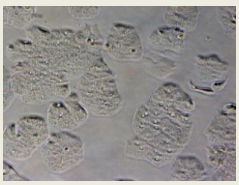
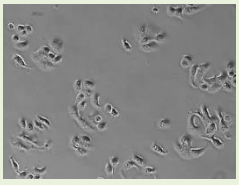
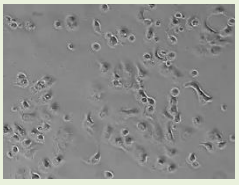
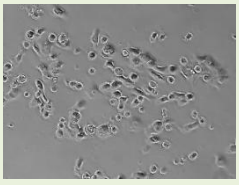
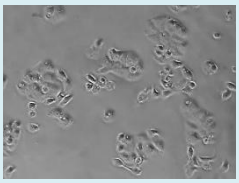
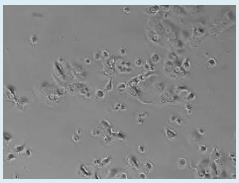
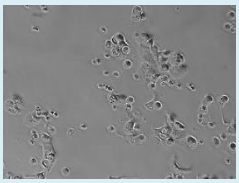
Les deux souches les plus actives (Gir_20 et Cor_08) ont été sélectionnées pour une investigation plus approfondie de leur effet au niveau cellulaire et appréhender leur mécanisme d'action.

II.6.2. Effets des extraits bruts sélectionnés sur les lignées HT-29 et PC-3

II.6.2.1. Observations microscopiques

Afin de vérifier l'effet des extraits Gir_20 et Cor_08 sur les lignées cellulaires HT-29 et PC-3, des observations microscopiques ont été effectuées (Tableau 17 et 18).

Tableau 17 : Observations microscopiques de la lignée cellulaire HT-29 après traitement à 24, 48 et 72h.

	Concentration testée	24h	48h	72h
Témoin	-			
Gir_20	25 µg/mL			
Cor_08	30 µg/mL			

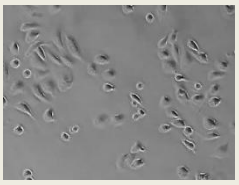
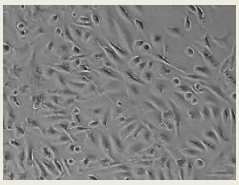
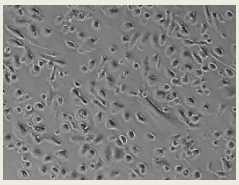
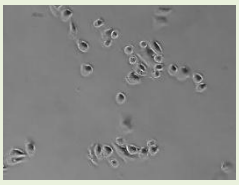
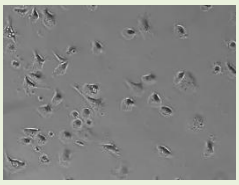
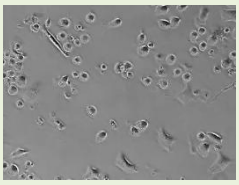
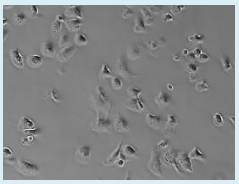
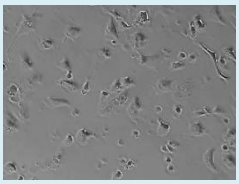
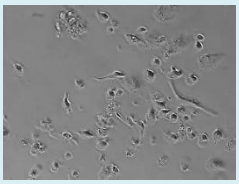
Au niveau cellulaire, des changements morphologiques ont été observés chez les deux lignées traitées avec les deux extraits fongiques. En effet, une diminution de la prolifération

BY-NC-ND

cellulaire, visible notamment par l'absence d'îlots cellulaires pour la lignée cellulaire HT-29, ainsi que la présence de cellules flottantes ont été observées (Tableau 17 et 18).

Ces changements morphologiques peuvent être dus à un mécanisme d'apoptose. Le processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose, est généralement caractérisé par des caractéristiques morphologiques distinctes et des mécanismes biochimiques spécifiques. L'apoptose est considérée comme une composante essentielle de nombreux processus en éliminant notamment les cellules endommagées ou infectées. Les voies extrinsèque et intrinsèque représentent les deux principaux processus apoptotiques (Elmore, 2007; Ouyang et *al.,* 2012). Ainsi, l'effet de ces deux extraits sur l'apoptose et ses mécanismes d'action par l'analyse de l'expression de marqueurs protéiques pro- et anti-apoptotiques ainsi que la fragmentation de l'ADN ont été étudiés.

Tableau 18 : Observations microscopiques de la lignée cellulaire PC-3 après traitement à 24, 48 et 72h.

	Concentration testée	24h	48h	72h
Témoin	-			
Gir_20	30 µg/mL			
Cor_08	35 µg/mL			

II.6.2.2. Analyse de l'expression protéique

Pour les deux lignées cancéreuses HT-29 et PC-3 traitées par les deux extraits bruts, l'activation des pro-caspases-8 et 3 ainsi que le clivage de la PARP ont été observés par Western blot après 24 et 48h de traitement.

BY-NC-ND

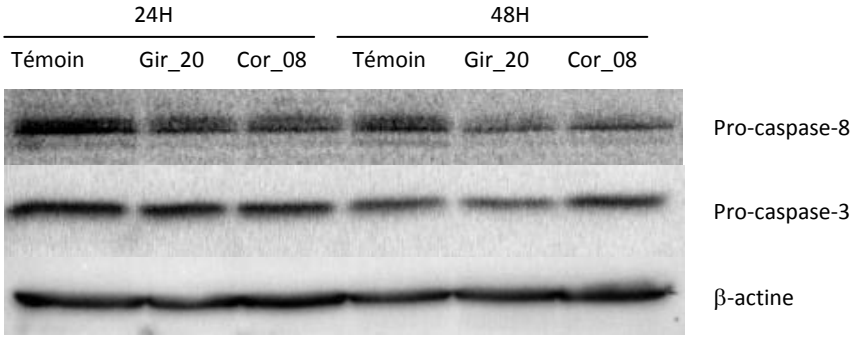


Figure 83 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur l'expression des pro-caspase-8 et -3 dans la lignée cellulaire HT-29

L'analyse par Western blot a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de la pro-caspase-8 par rapport au témoin sur les deux lignées cellulaires HT-29 et PC-3, après 48h de traitement en présence des extraits bruts. Par ailleurs, les résultats ne montrent pas de variation significative de l'expression de la pro-caspase-3 après traitement (Figure 83 et 84).

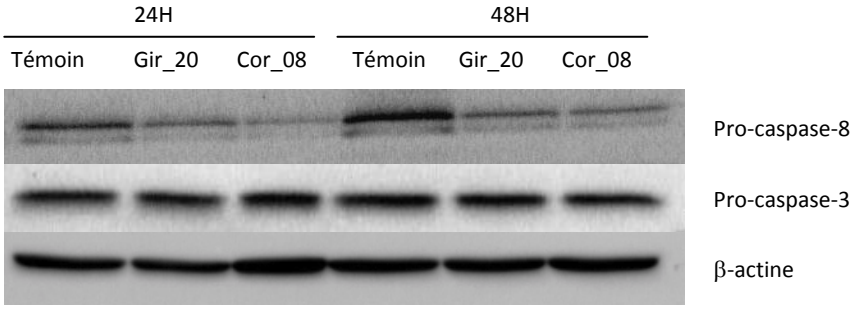


Figure 84 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur l'expression des pro-caspase-8 et -3 dans la lignée cellulaire PC-3

La protéine PARP (poly-ADP-ribose polymérase) est une enzyme de réparation de l'ADN, c'est aussi un des substrats de la caspase-3. En effet, au cours du processus d'apoptose, la PARP (116 kDa : forme native) est clivée par la caspase-3 générant deux fragments dont un de 89 kDa. Une fois clivée, la PAPR est inactive et ne peut donc plus réparer l'ADN lorsque celui-ci est endommagé.

Pour la lignée cellulaire HT-29 après 48h de traitement, une diminution de l'expression de la forme native de la protéine PARP n'a été observée que pour l'extrait Gir_20. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de la forme clivée est détectée pour les deux extraits (Figure 85).

BY-NC-ND

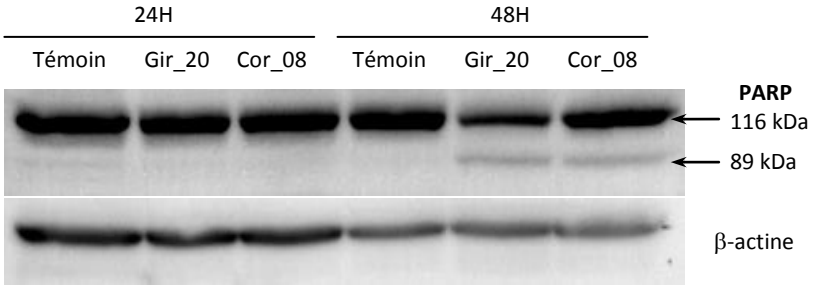


Figure 85 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur le clivage de la PARP dans la lignée cellulaire HT-29

Pour la lignée cellulaire PC-3, le traitement par les deux extraits induit à 48h, une diminution de l'expression de la forme native corrélée à une augmentation d'expression de la forme clivée (Figure 86).

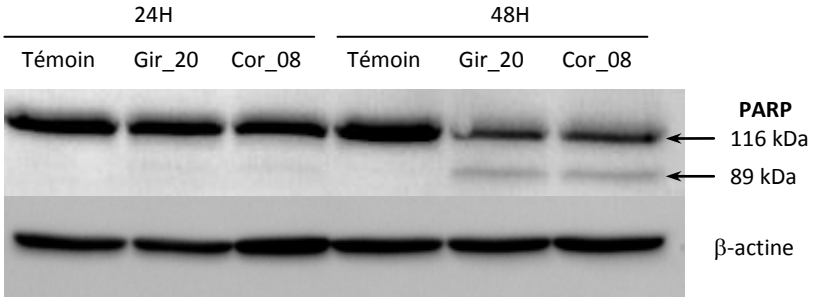


Figure 86 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur le clivage de la PARP dans la lignée cellulaire PC-3

II.6.2.3. Induction de la fragmentation de l'ADN

Le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » permet la quantification des fragments oligonucléosomiques (environs 180 – 200 paires de bases) dans une condition traitée en fonction du témoin. Le taux de fragmentation de l'ADN a été quantifié après 24 et 48h de traitement par les deux extraits bruts sur les lignées cellulaires HT-29 et PC-3.

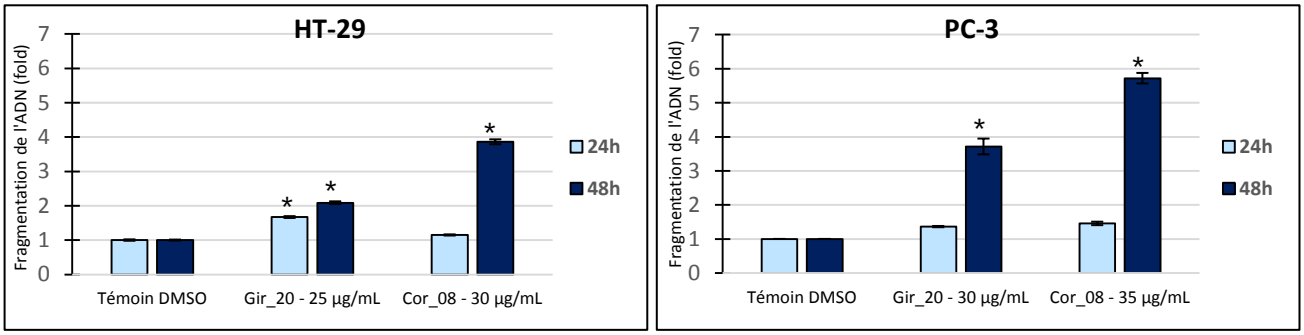


Figure 87 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur la fragmentation de l'ADN sur les lignées cellulaires HT-29 et PC-3 (n = 3, * P < 0.05)

Dans les cellules de la lignée HT-29 traitées avec les deux extraits bruts, le taux de fragmentation de l'ADN est de 1,67 et 2,09 à 24h et de 1,15 et 3,86 à 48h pour Gir_20 et Cor_08 respectivement (Figure 87).

BY-NC-ND

Pour les cellules PC-3, le taux de fragmentation d'ADN est de 1,36 et 3,72 à 24h et de 1,46 et 5,72 à 48h pour Gir_20 et Cor_08 respectivement (Figure 87).

La diminution de l'expression de la pro-caspase-8 au profit de sa forme clivée (caspase-8) donc active a été mise en évidence en présence des deux extraits fongiques. Le clivage de la PARP et l'augmentation de la fragmentation de l'ADN mettent en évidence l'induction de l'apoptose probablement par la voie extrinsèque du fait de la diminution de l'expression de la pro-caspase-8 lors des traitements des cellules avec les deux extraits bruts sur les lignées HT-29 et PC-3. De plus, le ratio entre la protéine pro-apoptotique Bax et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'a montré aucune modulation par Western blot suite aux traitements, ce qui semblerait ne pas impliquer la voie intrinsèque mitochondriale. Afin de confirmer cette hypothèse, d'autres investigations seront réalisées par l'utilisation d'autres marqueurs mitochondriaux (dosage de la caspase-3 (kit ELISA), membres de la famille Bcl-2, activation de la pro-caspase-9, …).

Ces espèces n'étant pas décrites, à notre connaissance, dans la littérature pour leur effet antiprolifératif, d'autres investigations plus poussées vont être réalisées afin de déterminer les mécanismes d'actions mis en jeu lors de l'apoptose ainsi que la suite des investigations phytochimique afin d'isoler et d'identifier la ou les molécules responsables de l'activité antiproliférative observée.

II.6.3. Activité anti-biofilm fongique

Un test d'activité contre la phase de maturation du biofilm (Figure 88) de *Candida albicans* (traitement initié après 2h d'adhérence et d'une durée de 24 ou 48h) a été réalisé en présence des six extraits fongiques.

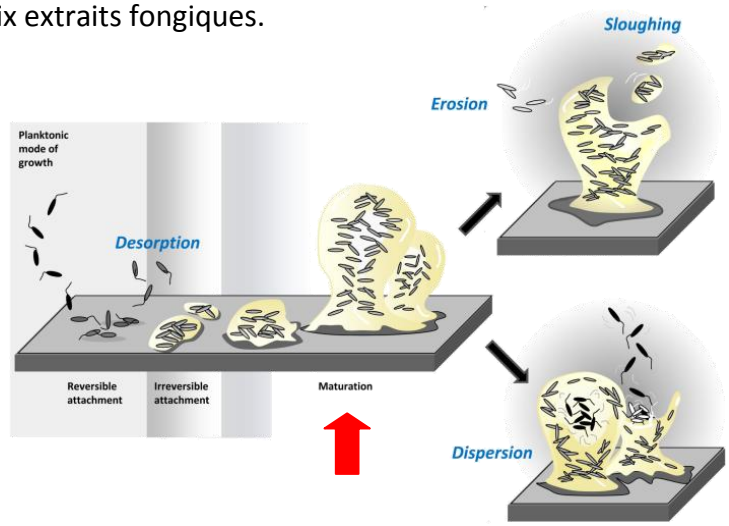


Figure 88 : Modèle de développement du biofilm (Petrova et Sauer, 2016)

BY-NC-ND

Pour chaque extrait testé, les absorbances à 450 nm ont été mesurées et les moyennes ont été statistiquement comparées à celles du témoin négatif (Test de Kruskal-wallis, $p<0,05$). Les concentrations inhibant 50% du développement du biofilm (CI_{50}) ont ensuite été calculées.

Tableau 19 : Concentrations inhibant 50% du développement du biofilm des six extraits fongiques (CI_{50} en µg/mL) (n=2)

Espèces fongiques	Génotypes	Codes d'identification	24h	48h
Nemania aenea* var. *aureolatum	1	Gir_10	200	25
	2	Gir_20	50	50
Nemania serpens	1	Cor_08	100	25
	1	Gir_26	> 200	25
	2	Cor_12	100	100
	3	Gir_22	> 200	200

Deux extraits (Gir_22 et Cor_12) n'ont pas montrés d'activité anti-biofilm sur la phase de maturation quel que soit la durée du traitement ($CI_{50} \geq 200$ µg/mL et $CI_{50} = 100$ µg/mL à 24 et 48h, pour les extraits Gir_22 et Cor_12 respectivement).

Trois extraits (Gir_10 ; Cor_08 et Gir_26) ont montré un effet anti-biofilm modéré ($CI_{50} = 25$ µg/mL) seulement après 48h de traitement (Tableau 19).

La souche Gir_20 a quant-à elle, un effet anti-biofilm modéré ($CI_{50} = 50$ µg/mL), dès 24h de traitement, effet persistant après 48h.

Les résultats des tests sur le biofilm fongique suggèrent un potentiel anti-biofilm sur *Candida albicans* des extraits de *Nemania aenea* var. *aureolatum*. Les chromatogrammes des deux génotypes (Gir_10 et Gir_20) étant similaire, les activités biologiques attendues devraient être comparables. Ainsi, il serait pertinent de réaliser un deuxième test sur un second alicot.

II.6.4. Activité anti-biofilm bactérien

La formation de biofilm bactérien (*Staphylococcus aureus* ; Gram positif) été évaluée par la méthode au cristal violet en présence des six extraits fongiques accompagnés d'un dénombrement bactériens et d'un antibiogramme à 100 µg/mL de chaque extrait sur *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif).

Tous les extraits fongiques n'ont montré aucune d'activité anti-biofilm bactérien sur *Staphylococcus aureus* dans la gamme de concentrations testées (3 à 100 µg/mL). De plus, le dénombrement bactérien réalisé en parallèle des tests au cristal violet, n'a montré aucune

BY-NC-ND

différence significative avec les témoins. Par ailleurs, aucune zone d'inhibition n'a été observée sur les antibiogrammes à *Pseudomonas aeruginosa* en présence des extraits fongiques.

II.7. Production à grande échelle

La culture à grande échelle a été réalisée dans le but d'isoler et d'identifier les molécules pouvant être responsables de l'activité antiproliférative de l'extrait brut de départ.

Les souches Gir_20 (*Nemania aenea* var. *aureolatum*) et Cor_08 (*Nemania serpens*) ont été mises en culture sur 240 boîtes de Pétri chacune contenant 20 mL de milieu PDA. Ces cultures ont été incubées à température ambiante à la lumière naturelle, puis extraites par 100% d'acétate d'éthyle (cf. Partie C § III.2) après 21 jours d'incubation.

Après filtration et évaporation à sec, les deux extraits obtenus ont été pesés. Ainsi, 1,062 g et 1,212 g d'extraits bruts de Gir_20 et de Cor_08 ont été obtenus respectivement.

La comparaison des profils CLHP des extraits brut de Gir_20 confirme la modification de la composition en métabolites de ces deux extraits (Figure 89).

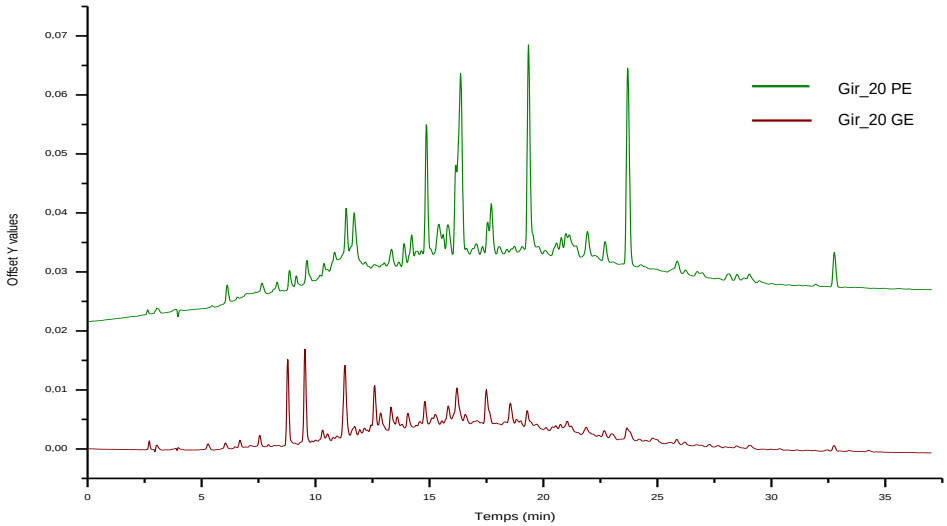


Figure 89 : Comparaison des profils CLHP des cultures de Gir_20 à grande (GE) et petite (PE) échelle

L'extrait brut de Cor_08 a quant à lui des CI_{50} proche de celle de l'extrait de la culture à petite échelle (Tableau 20). En effet, un intervalle de température équivalent a été mesuré lors de la réalisation de la production à grande échelle par rapport à la culture à petite échelle.

La comparaison des profils CLHP des extraits brut de Cor_08 permet de visualiser les métabolites (absorbant sous UV) susceptible d'être responsable de l'activité antiproliférative des deux extraits (Figure 90). En effet, dans les deux cas des métabolites actifs sont présent.

BY-NC-ND

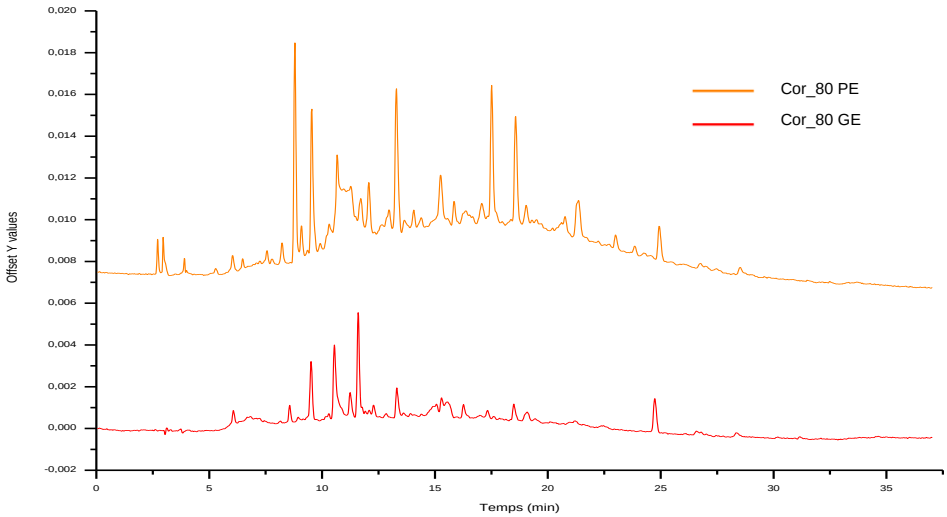


Figure 90 : Comparaison des profils CLHP des cultures de Cor_08 à grande (GE) et petite (PE) échelle

L'activité antiproliférative a été évaluée pour ces deux extraits. Cependant, pour l'extrait brut de Gir_20, les CI_{50} observées pour la culture à petite échelle n'ont pas été retrouvées (Tableau 20). En effet, cet extrait n'a montré aucune activité antiproliférative dans la gamme de doses testées pour les lignées cellulaires HT-29 et PC-3.

Pour les lignées cellulaires HCT116 et DU145, il s'est révélé moins actif que l'extrait de la culture à petite échelle (99,3 ± 4,3 contre 13,6 ± 1,6 µg/mL et 72,3 ± 2,0 contre 14,1 ± 4,1 µg/mL respectivement).

Ce changement d'activité peut être dû à une modification des paramètres de culture, notamment la température ou la lumière. En effet, les cultures étant réalisées à température ambiante et à la lumière naturelle, ces paramètres ne peuvent donc pas être contrôlés. Un changement de température entre les deux cultures a été observé (diminution de 2 à 4°C) et n'ont pas été réalisé au même moment (lumière variable). Afin de déterminer le paramètre influant sur l'activité de ces extraits fongiques, une culture en atmosphère contrôlé sera réalisée.

Tableau 20 : Récapitulatif des différentes CI_{50} (en µg/mL) obtenues pour les extraits fongiques en production à grande échelle. Test antiprolifératif à 48h (n=3 ; * n=1)
(PE = petite échelle ; GE = grande échelle)

Espèces fongiques		HT-29	HCT116	PC-3	DU145
Gir_20	PE	24,5 ± 2,3	13,6 ± 1,6	30,0 ± 3,7	14,1 ± 4,1
	GE	> 100	99,3 ± 4,3	> 100	72,3 ± 2,0
Cor_08	PE	30,5 ± 4,8	23,9 ± 2,3	33,7 ± 3,4	13,3 ± 3,7
	GE	45,9*	18,6 ± 2,3	34,4*	11,7 ± 4,7

Les données de la littérature sur l'étude phytochimique des champignons appartenant au genre *Nemania* ne sont pas nombreuses d'où notre intérêt plus particulier pour les

BY-NC-ND

espèces appartenant à ce genre. La composition chimique de *Nemania serpens* a récemment fait l'objet d'une étude (Ibrahim et al., 2017). Plusieurs polycétides comme l'époxynemanione A, les nemanifuranes A à F et les nemanilactones A à C ont été isolés, ainsi qu'un nordammarane triterpène, une coumarine (5-méthylmélléine), une quinone époxydée (phyllostine) et l'acide 2-(hydroxyméthyl)-3-méthoxybenzoïque (Figure 91).

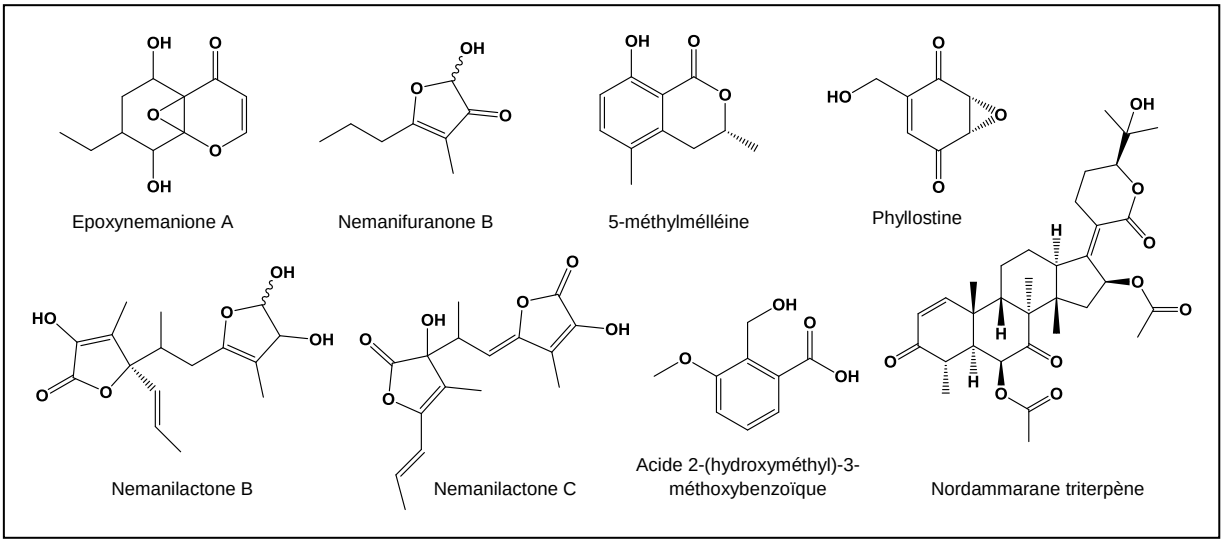


Figure 91 : Quelques exemples de composés isolés de *Nemania serpens*

II.8. Étude phytochimique de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (génotype 1 ; Gir_20)

II.8.1. Fractionnement et purification

Un fractionnement de l'extrait Gir_20 a été réalisé sur colonne de Sephadex® LH-20 conduisant à l'obtention de dix-sept fractions (Figure 92).

Pour la purification des fractions obtenues, plusieurs étapes de séparation ont été nécessaires *via* l'utilisation de différentes techniques de chromatographies (CCM préparative, CLMP). A la fin de chaque étape de séparation, le profil chromatographique des fractions obtenues sont analysées par CCM.

La purification des composés est détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Six métabolites ont été isolés de l'extrait fongique Gir_20 :

- **G1** = nordammarane triterpène
- **G2** = stéréoisomère de **G1**
- **G4** = acide palmitique
- **G5** = daidzéine
- **G6** = adénosine
- **G3** = nordammarane triterpène proche de **G1** et **G4**.

BY-NC-ND

L'identification structurale de ces composés est détaillée dans le paragraphe suivant.

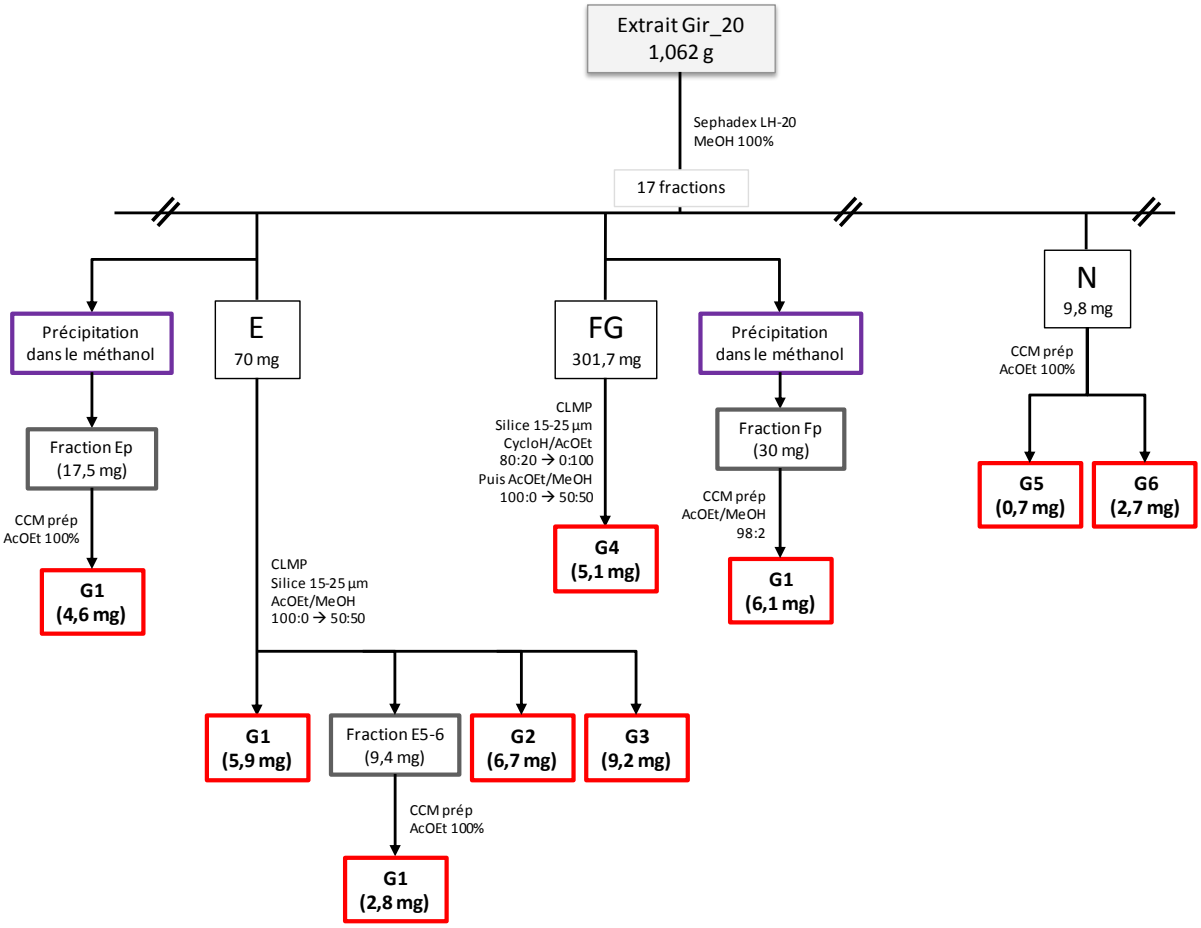


Figure 92 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait Gir_20 (*Nemania aenea var. aureolatum*)

II.8.2. Détermination structurale des composés isolés

II.8.2.1. Composés G1 et G2

Les composés **G1** (13,3 mg) et **G2** (6,7 mg) ont été isolés sous la forme d'une poudre amorphe blanche.

Les spectres ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz ; cf. Annexes 9 et 12) de ces deux composés sont presque identiques, indiquant alors la possibilité d'être en présence d'isomères. Les spectres de masse haute résolution (ESI-qTOF), en mode négatif des deux composés présentent tous les deux un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 583,2844 $[M-H]^-$ correspondant à la même formule brute $C_{33}H_{44}O_9$ qui impliquent douze insaturations confirmant ainsi l'hypothèse précédente.

Le spectre ^{1}H (cf. Annexe 9) du composé **G1** est caractérisé par la présence des sept méthyles sous forme de singulets à 0,96 ; 1,19 ; 1,25 ; 1,29 ; 1,44 ; 1,96 et 2,11 ppm, d'un méthyle sous forme de doublets à 1,29 ppm, de plusieurs signaux correspondant aux

BY-NC-ND

protons aliphatiques entre 1,61 et 2,95 ppm, d'un double de doublet à 3,92 ppm et de doublets à 5,25 ; 5,87 ; 6,00 et 7,29 ppm.

Son spectre ^{13}C (cf. Annexe 9) contient trente-trois atomes de carbone et montre la présence de cinq carbonyles à 208,5 ; 201,1 ; 169,8 ; 168,7 et 167,8 ppm, de quatre carbones éthyléniques, de trois carbones porteurs d'un groupement hydroxyle à 83,6 ; 73,8 ; 72,7 ppm et de plusieurs carbones entre 13,1 et 52,7 ppm. L'attribution complète des protons et des carbones a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de RMN 2D (cf. Annexes 10 et 11).

Les carbones protonés ont été identifiés et corrélés aux protons auxquels ils sont liés grâce au spectre HSQC (cf. Annexe 10). Il a permis de déduire la présence de onze carbones quaternaires dont les cinq carbonyles ainsi que les carbones à 151,5 ; 123,8 ppm, d'un carbone porteur de groupement hydroxyle à 71,0 ppm et de plusieurs carbones à 52,7 ; 46,5 et 38,2 ppm.

L'examen du spectre ^{1}H-^{1}H COSY (cf. Annexe 10) a permis de mettre en évidence les enchaînements H-1/H-2 ; H-4/CH_3-28 ; H-5/H-6 ; H-9/H-11/H-12 et H-22/H-23/H-24 (Figure 93).

Les différentes corrélations longues distances observées sur le spectre HMBC (cf. Annexe 11) ont permis de relier entre elles ces différentes sous-structures. Le proton H-1 à 7,29 ppm corrèle avec les carbones à 201,2 (C3), 47,3 (C5) et 38,2 (C10) ppm. Tandis que le proton H-5 à 2,28 ppm porté par le carbone à 47,3 ppm corrèle avec les carbones à 40,4 (C4) et 208,5 (C7) ppm conduisant à la construction du cycle A. Les corrélations de H-6 à 5,25 ppm avec les carbones à 208,5 (C7) ; 168,7 (6-CO) ; 52,7 (C8) et 38,2 (C10) ppm ainsi que celles des protons CH_3 (C19) à 1,44 ppm avec les carbones à 156,9 (C1) ; 40,4 (C5) ; 41,8 (C9) et 38,2 (C10) ppm permettent de relier le cycle A au cycle B. Les corrélations des protons CH_3 (C29) à 1,19 ppm avec 52,7 (C8) ; 46,5 (C14) et 208,5 (C7) ppm, et du proton H-13 à 2,65 ppm avec 25,8 (C12) ; 52,7 (C8) et 18,2 (C18) ppm relient le cycle C au cycle B. Celles des protons du méthyle à 2,11 ppm avec le carbone à 168,7 ppm (6-CO) et des protons du méthyle à 1,96 ppm avec le carbone à 169,8 ppm (16-CO) confirment la présence des groupements acétyles en position 6 sur le cycle B et en 16 sur le cycle C. Les protons du méthyle à 0,96 ppm (18-CH_3) corrèle avec les carbones C8, C14 et C15 tandis H-16 qui est couplé avec H-15 corrèle avec les carbones à 169,8 (16-CO) ; 151,5 (C17) ; 123,8 (C20) et 46,5 (C14) ppm. Ces corrélations permettent de relier le cycle D au cycle C.

BY-NC-ND

Tableau 21 : Données spectrales RMN ^{1}H et ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY ; HMBC et NOESY du composé G1

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	7,29 d (10,0)	156,9	H2	C3 ; C5 ; C10	H2 ; H11a ; H11b ; CH_3-19 ; CH_3-29
2	5,87 d (10,0)	127,9	H1	C10	H1
3	-	201,2	-	-	-
4	2,77 dq (6,8 ; 12,2)	40,4	H5 ; CH_3-28	C3 ; C5 ; C6 ; C10 ; C28	CH_3-19 ; CH_3-26
5	2,28 br d (12,2)	47,3	H4 ; H6	C1 ; C3 ; C4 ; C7 ; C10 ; C19	H6 ; CH_3-29
6	5,25 br s	73,8	H5	C7 ; C8 ; C10 ; C30	H5 ; CH_3-28 ; CH_3-29
7	-	208,5	-	-	-
8	-	52,7	-	-	-
9	2,62 br dd (2,5 ; 13,1)	41,8	H11a	C1 ; C8 ; C10 ; C29	H11a ; CH_3-18 ; CH_3-19 ; CH_3-29
10	-	38,2	-	-	
11b	1,98 m	24,0	H11a	C13	H1 ; H22b ; CH_3-18 ; CH_3-19
11a	1,61 br ddd (3,5 ; 13,0 ; 25,6)	24,0	H9 ; H12a ; H12b ; H11b	C13	H1 ; H9; H12b ; H22b ; H23b
12b	2,45 dd (3,1 ; 12,6)	25,8	H11a ; H12a	-	H11a ; H12a
12a	1,86 ddd (3,5 ; 12,4 ; 25,0)	25,8	H11b ; H12b ; H13	-	H22b ; H12b
13	2,65 m	50,2	H12b	C8 ; C12; C18	H23b ; CH_3-29
14	-	46,5	-	-	-
15b	2,26 m	40,6	H15a ; H16	C14 ; C16 ; C18	H6 ; H16 ; CH_3-29
15a	1,97 m	40,6	H15b	C13 ; C14 ; C16 ; C17; C18	H13 ; H16 ; CH_3-18
16	6,00 br d (8,3)	72,7	H15b	C14 ; C17 ; C20 ; C31	H15b ; H15a ou 16-CH_3CO
17	-	151,5	-	-	-
18	0,96 s	18,2	-	C8 ; C14 ; C15	H9 ; 6-CH_3CO; 16-CH_3CO
19	1,44 s	27,6	-	C1 ; C5 ; C9 ; C10	H1 ; H4 ; H9 ; H23b
20	-	123,8	-	-	-
21	-	167,8	-	-	-
22b	2,95 br dd (9,1 ; 16,9)	22,8	H22a ; H23a; H23b	C17 ; C20 ; C21 ; C23	H11a ; H12a ; H23b ; H24
22a	2,58 m	22,8	H22b ; H23a		H16
23b	1,98 m	23,4	H22a ; H23b	C20 ; C24	H24
23a	1,75 ddd (9,7 ; 11,7 ; 21,7)	23,4	H22a ; H22b ; H23 ; H24	C20 ; C24	H22b ; H24
24	3,92 dd (1,9 ; 11,5)	83,7	H23b	C22 ; C25	H13 ; H22b; H23b; H23a; CH_3-26; CH_3-27
25	-	71,0	-	-	-
26	1,29 s	25,6	-	C24 ; C25 ; C27	H24
27	1,25 s	24,6	-	C24 ; C25 ; C26	H24
28	1,29 br d (6,8)	13,1	H4	C3 ; C4 ; C5	H6 ; H4
29	1,19 s	18,3	-	C7 ; C8 ; C9 ; C14	H1 ; H6 ; H13 ; H5
6-CO	-	168,7	-	-	-
6-CH_3CO	2,11 s	20,7	-	6-CO	H6
16-CO	-	169,8	-	-	-
16-CH_3CO	1,96 s	20,3	-	16-CO	CH_3-18

BY-NC-ND

Tableau 22 : Données spectrales RMN ^{1}H et ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY ; HMBC et NOESY du composé G2

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	7,29 d (10,0)	156,9	H2	C3 ; C5 ; C9 ; C10, C19	H-2 ; H-11a ; CH_3-19
2	5,87 d (10,0)	127,9	H1	C4 ; C10	H-1
3	-	201,2	-	-	-
4	2,77 dq (6,8 ; 12,4)	40,4	H5; CH_3-28	C3 ; C5 ; C6 ; C10 ; C28	H-6 ; CH_3-19
5	2,29 dd (0,8 ; 12,4)	47,3	H4 ; H6	C1 ; C3 ; C4 ; C7 ; C10 ; C19 ; C28	H-6 ; CH_3-28; CH_3-29
6	5,25 br s	73,7	H5	C5 ; C7 ; C8 ; C10 ; 6-C0	H-4 ; H-5 ; CH_3-28 ; 6-CH_3CO
7	-	208,5	-	-	-
8	-	52,7	-	-	-
9	2,65 dd (2,6 ; 12,9)	41,6	H11a	C1 ; C8 ; C10 ; C11 ; C29	CH_3-18 ; CH_3-19 ; CH_3-29
10	-	38,1	-	-	-
11b	2,07 m	24,0	H12b	C13	-
11a	1,62 ddd (3,5 ; 12,8 ; 25,8)	24,0	H9 ; H12b	C8	H-1
12b	2,50 dd (2,8 ; 12,5)	26,5	H11a; H11b ; H12a	C14	H-22b ; H-12a
12a	1,85 ddd (3,4 ; 12,5 ; 25,0)	26,5	H12b ; H13	C13	H-12b ; CH_3-18
13	2,64 m	51,4	H12a	C15 ; C17 ; C18 ; C20	CH_3-29 ; CH_3-18
14	-	46,9	-	-	-
15b	2,18 dd (8,3 ; 14,2)	40,9	H15a; H16	C8 ; C14 ; C18	H-16
15a	2,06 m	40,9	H15b	C13 ; C14 ; C16 ; C17 ; C18	H-16 ; CH_3-18
16	5,98 br d (7,8)	73,5	H15b	C13 ; C14 ; C17 ; C20 ; 16-CO	H-15b ; H-15a ; 16-CO
17	-	154,5	-	-	-
18	1,00 s	18,5	-	C8 ; C14 ; C15	H-9 ; H-13 ; H-12a ; H-15a
19	1,45 s	27,6	-	C1 ; C5 ; C9 ; C10	H-1 ; H-4 ; H-9
20	-	125,3	-	-	-
21	-	164,8	-	-	-
22b	3,11 m	24,6	H22a ; H23a	C17 ; C20 ; C21 ; C24	H-12b ; H-22a
22a	2,44 m	24,6	H22b ; H23b	-	H-24 ; H-22b
23b	1,98 m	23,9	H22a	-	-
23a	1,75 ddd (4,5 ; 13,1 ; 24,2)	23,9	H22b ; H24	C20 ; C22 ; C24 ; C25	-
24	4,10 dd (3,9 ; 10,9)	85,2	H23a	C22 ; C25	H22a ; CH_3-26 ; CH_3-27
25	-	71,8	-	-	-
26	1,28 s	25,7	-	C24 ; C25 ; C27	H-24
27	1,22 s	24,2	-	C24 ; C25 ; C26	H-24
28	1,29 d (6,8)	13,1	H4	C3 ; C4 ; C5	H-4 ; H-5 ; H-6
29	1,18 s	18,2	-	C7 ; C8 ; C9 ; C14	H-5; H-9 ; H-13
6-CO	-	168,8	-	-	-
6-CH_3CO	2,12 s	20,8	-	6-CO	H-6
16-CO	-	169,7	-	-	-
16-CH_3CO	1,99 s	20,7	-	16-CO	H-16

BY-NC-ND

Ces différentes informations nous ont permis de construire le squelette de base d'un nortriterpène ayant vingt-neuf atomes de carbone (hormis les 2 groupements acétyles). Les corrélations du proton H-22 à 2,95 ppm avec les carbones C17 ; C20 ; C21 et C23, du proton H-24 avec carbones C25 et C22 ainsi que celles des protons du méthyle (26-CH_3) avec C24 ; C25 et C27 complètent la chaîne latérale qui est liée au cycle D par une double liaison. De plus, elle est cyclisée sous forme de δ-lactone en accord avec la formule brute.

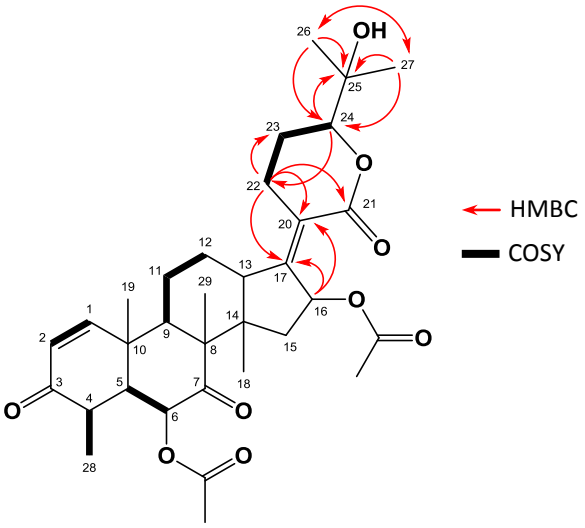


Figure 93 : Structure plane du composé G1
Principales corrélations COSY observées et HMBC de la chaine latérale

La structure plane du composé **G1** est proche de celle de l'acide hélvolique (Lee et *al.*, 2008; Zhang et *al.*, 2008), qui est un triterpène antibiotique de type fusidane isolée de plusieurs champignons (Zhao et *al.*, 2013). La différence entre les deux composés se situe au niveau de la chaîne latérale. (Figure 94).

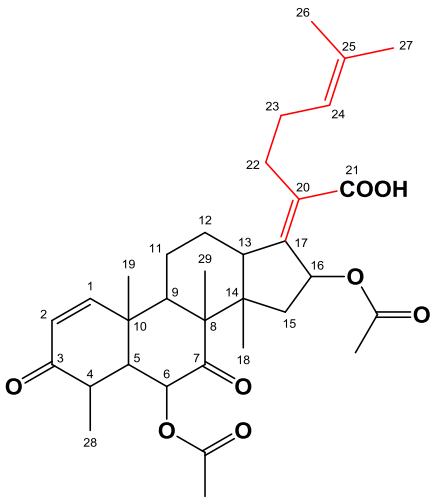


Figure 94 : Structure de l'acide hélvolique

BY-NC-ND

Le composé **G1** serait issu de l'époxydation au niveau de la chaine latérale de l'acide hélvolique suivi d'une attaque nucléophile de l'hydroxyle de l'acide conduisant à l'ouverture de l'époxyde (Figure 95).

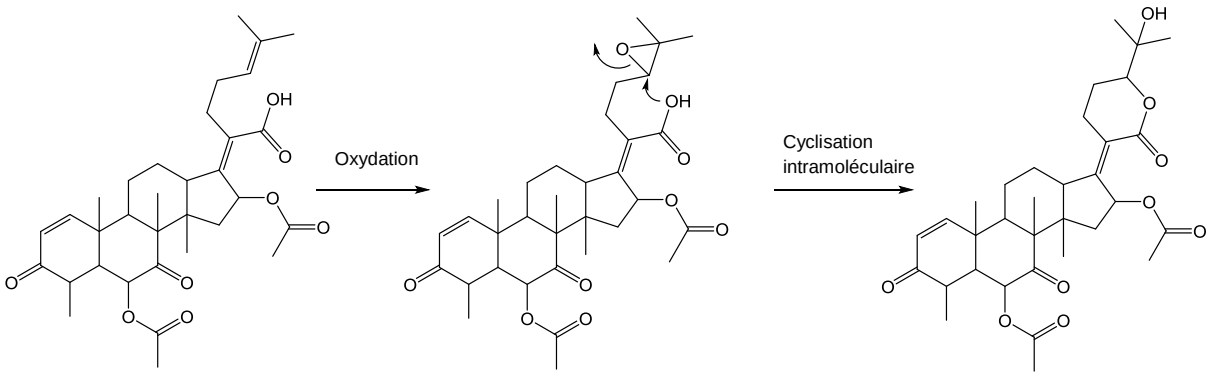


Figure 95 : Hypothèse de biosynthèse du composé G1 à partir de l'acide hélvolique

Sa configuration relative a été déduite par l'analyse de son spectre NOESY (cf. Annexe 11). La constante de couplage de H-4 avec H-5 (J = 12,2 Hz), est en faveur d'une configuration relative *trans*-diaxiale. Les protons H-5 et H-6 présentent une faible constante de couplage, ce qui suggère que le proton H-6 est en position équatoriale. Les corrélations NOEs observées entre le proton H-4 et CH_3-19 montrent qu'ils sont situés du même coté du plan et en position β. Les protons du méthyle CH_3-19 corrèlent aussi avec H-9 et H-23b et ceux du CH_3-18 corrèlent avec H-9, 6-CH_3CO et 16-CH_3CO. Ils sont tous situés en position β. Le proton H-5 corrèle avec H-6 et CH_3-29 tandis que H-6 corrèle avec CH_3-28. De plus, H-13 corrèle avec H-23b et CH_3-29. Ils sont situés du même coté du plan et en position α. Le proton H-24 corrèle avec H-13 ; H-22b ; H-23a et H-23b. Il est donc orienté en α (Figure 96).

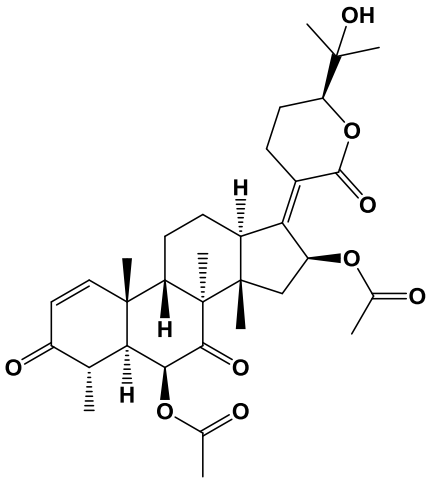


Figure 96 : Structure du composé G1

La configuration relative des centres asymétriques des cycles A, B, C et D c'est-à-dire la partie tétracyclique de ce nordammarane triterpène est la même que celle de l'acide

BY-NC-ND

hélvolique dont la configuration absolue a été déterminée par dichroïsme circulaire (Okuda et *al.,* 1967).

Le composé **G1** a déjà été isolé d'un champignon d'origine marine, *Aspergillus fumigatus* KMM 4631 (isolé du corail mou *Sinularia* sp. ; Afiyatullov et *al.*, 2012). Les données spectrales (RMN ^{1}H et ^{13}C ; cf. Annexe 9) sont en accord avec ceux décrit par Afiyatullov et *al.*, (2012). Par ailleurs, le composé **G1** a aussi été isolé de *Nemania serpens*, un champignon endophyte de vigne (cépage Riesling) (Ibrahim et *al.*, 2017). Cette équipe a ainsi déterminée la configuration absolue de ce composé par rayons X, ce qui est en accord avec la configuration relative proposée.

Le composé **G2** présente des caractéristiques spectrales protons et carbones (cf. Annexe 12) similaires à celles du composé **G1** (Figure 97). Les principales différences observées entre les composés **G1** et **G2** se situent au niveau des carbones C22 (22,8 contre 24,6 ppm), C24 (83,7 contre 85,2 ppm) et C21 (167,8 contre 164,8 ppm) et des protons de ces mêmes carbones H-22a (2,95 contre 3,11 ppm) ; H-22b (2,58 contre 2,44 ppm) et H-24 (3,92 contre 4,10 ppm).

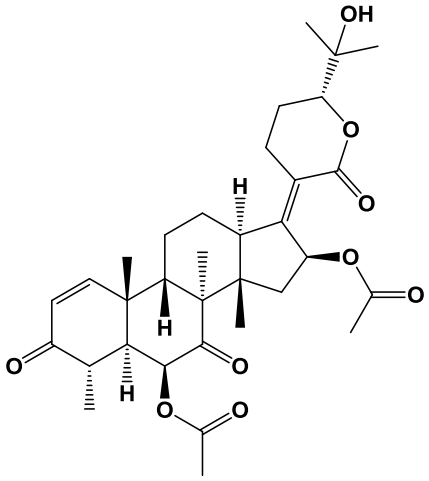


Figure 97 : Structure du composé G2

Cependant, la principale différence entre ces deux composés a été observée au niveau des corrélations NOESY (Figure 98 ; cf. Annexes 11 et 14).

En effet, pour le composé **G1,** des corrélations NOESY (cf. Annexes 11) sont observées entre les protons H-22a, H-23a et H-24 indiquant alors que ces protons sont du même côté de la molécule. Pour le composé **G2,** des corrélations NOESY (cf. Annexes 14) sont observées entre les protons H-22b et H-24, de ce fait le proton H-24 se situe de l'autre côté de la

BY-NC-ND

molécule c'est-à-dire en position β confirmant ainsi que ces deux composés sont bien des stéréoisomères (Figure 98 et 99).

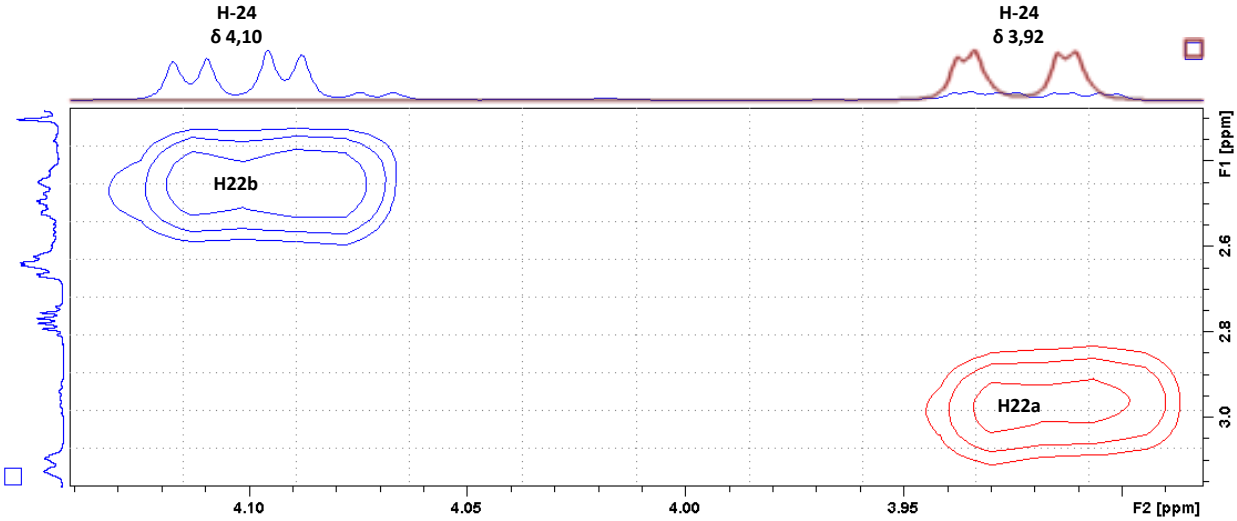


Figure 98 : Corrélations NOESY observées entre les protons H-24 et les protons H22a ou H22b pour les composés G1 (rouge) et G2 (bleu)

Le composé **G2** n'est pas décrit dans la littérature et la présence de ces deux stéréoisomères s'explique par une différence au moment l'ouverture de l'époxyde sur le composé intermédiaire dans la voie de biosynthèse (Figure 95).

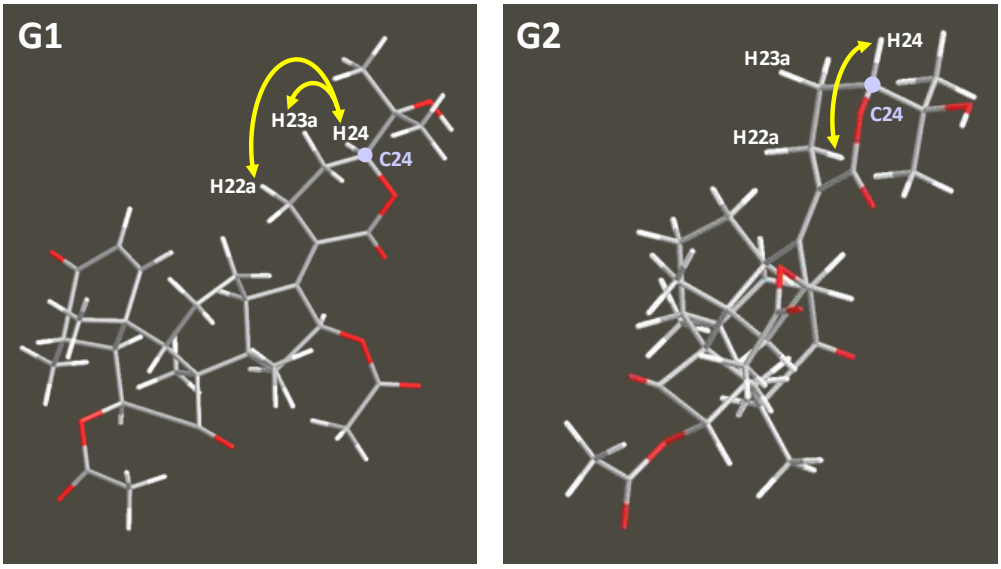


Figure 99 : Structures des composés G1 et G2 en 3 dimensions
Les flèches indiquent les corrélations NOESY déterminantes

Les composés **G1** et **G2** ont pu être identifié comme étant des nordammaranes triterpénoïdes (Afiyatullov et *al.*, 2012).

Le composé **G2** a ici été, à notre connaissance, décrit pour la première fois dans cette espèce de champignon.

BY-NC-ND

II.8.2.2. Composé G3

Le composé **G3** (9,2 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre amorphe blanche.

La structure de ce composé n'est pas totalement élucidée. Néanmoins, l'analyse de ces spectres RMN (cf. Annexe 15) permet de le caractériser comme un nordammarane triterpène. Son spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF), en mode négatif présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 601,2931 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{33}H_{46}O_{10}$. Ce composé serait donc structurellement proche de l'acide hélvolique et des composés **G1** et **G2**.

II.8.2.3. Composé G4

Le composé **G4** (5,1 mg) a été isolé sous la forme d'un liquide visqueux jaune pâle.

L'analyse RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz ; cf. Annexe 16) indique la présence d'un triplet à 2,35 ppm (*J* = 7,5 Hz) intégrant pour 2H caractéristique d'un méthylène positionné en α d'une fonction acide. Un multiplet à 1,63 ppm intégrant pour 2H correspond à un méthylène positionné en β d'une fonction acide. Un massif entre 1,34 et 1,26 ppm confirme la présence de 12 méthylènes. Et enfin, un triplet à 0,88 ppm (*J* = 7,1 Hz) caractéristique d'un groupement méthyle terminal d'une chaine aliphatique.

L'analyse RMN ^{13}C (cf. Annexe 16)présente 16 carbones : un carbone fortement déblindé à 178,8 ppm correspondant à une fonction acide, 14 carbones entre 34,0 et 22,7 ppm confirmant la présence des méthylènes de la chaine aliphatique et un carbone à 14,1 ppm caractéristique d'un groupement méthyle terminal d'une chaine aliphatique.

Tableau 23 : Données spectrales RMN (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé G4

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY
1	-	178,8	
2	2,35 t (7,5)	33,8	H3
3	1,63 m	24,7	H2 ; H4– H13
4 – 13	1,26 – 1,34m	29,7 – 29,1	H3 ; H14
14	1,27 m	31,9	H4– H13 ; H15
15	1,29 m	22,7	H14 ; H16
16	0,88 t (7,1)	14,1	H15

Le composé **G4** correspond à un acide gras saturé identifié comme étant l'acide palmitique (Figure 100). Cette structure est confirmée par l'analyse du spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode négatif (ion pseudo-moléculaire à *m/z* 255,2381 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{16}H_{32}O_2$) et par les données de la littérature (Bulama et *al.*, 2015).

BY-NC-ND

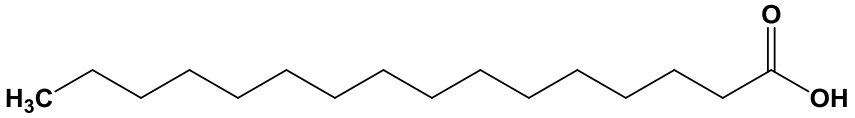


Figure 100 : Structure du composé G4 : l'acide palmitique.

L'activité antifongique de ce composé a été décrite par Liu et *al.,* (2008). Ainsi, des cultures des champignons endolichéniques en présence de l'acide palmitique sont envisagées afin d'appréhender les mécanismes d'action de cet acides gras sur les champignons pathogènes.

II.8.2.4. Composé G5

Le composé **G5** (0,72 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre amorphe blanche.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode positif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 253,0394 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_4$.

Le spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500MHz ; cf. Annexe 17) présente un singulet à 8,12 ppm intégrant pour 1H caractéristique du proton en position 2 d'une isoflavone. Deux doublets à 7,37 et 6,85 ppm intégrant chacun pour 2H et *ortho*-couplés entre eux (*J* = 8,8 Hz) correspondent respectivement aux 4 protons aromatiques du cycle B (Figure 101). Un double doublet à 6,93 ppm (1H, *J* = 8,8 et 2,3 Hz) *ortho*-couplé avec un doublet à 8,05 ppm (1H, *J* = 8,8 Hz) et *méta*-couplé avec un doublet à 6,84 ppm (1H, *J* = 2,3 Hz) correspondent aux trois protons aromatiques situés sur le cycle A (Figure 100). La présence des groupements hydroxyles en position 7 et 4' est démontrée par un effet mésomère blindant des protons en 6 et 8 sur le cycle A et des protons 3' et 5' sur le cycle B, respectivement.

Le spectre RMN ^{13}C (cf. Annexe 17) montre la présence de treize carbones dont deux intenses à 131,6 et 116,4 ppm suggérant la présence de quatre carbones aromatiques ayant un même environnement chimique. La présence de la fonction cétone est clairement démontrée par la valeur de carbone à 178,4 ppm. Cette fonction justifie l'effet mésomère déblindant sur le proton H-5 (8,05 ppm). L'analyse du spectre HSQC a permis de déduire la présence des quatre autres carbones quaternaires à 160,0 ; 126,1 ; 124,5 et 118,2 ppm. Les corrélations HMBC confirment la position des différents éléments précédemment décrit. Le proton à 8,12 ppm (H-2) corrèle avec les carbones à 178,4 (C3), 160,0 (C8a) et 126,1 (C2) ppm. Les connections longues distances du proton à 6,93 ppm (H-6) couplé avec le proton

BY-NC-ND

H-5 avec les carbones à 103,4 (C8) et 118,2 (C4a) ppm et celle du proton H-8 avec le carbone C7 permettent ainsi de construire le noyau A et C.

Le proton H-2' couplé avec H-3' corrèle avec les carbones C3, C4' et C6' tandis que le proton H-6' couplé avec H-5' corrèle avec C3 ; C2' et C4'. Ces différentes informations aboutissent à la structure d'une isoflavone.

Tableau 24 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations HMBC du composé G5

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	HMBC
2	8,12 s	154,8	C3 ; C4 ; C8a
3	-	126,1	-
4	-	178,4	-
5	8,05 d (8,8)	128,6	C4 ; C7 ; C8a
6	6,93 dd (8,8 ; 2,3)	116,8	C8 ; C4a
7	-	165,2	-
8	6,84 d (2,3)	103,4	C7
8a	-	160,0	-
4a	-	118,2	-
1'	-	124,5	-
2'	7,37 d (8,8)	131,6	C3 ; C4' ; C6'
3'	6,85 d (8,8)	116,4	C1' ; C4' ; C6'
4'	-	158,8	-
5'	6,85 d (8,8)	116,4	C1' ; C3' ; C4'
6'	7,37 d (8,8)	131,6	C3 ; C2' ; C4'

Ainsi, en comparaison avec la littérature (Azimova et Vinogradova, 2013), le composé **G5** a pu être identifié comme étant la 4',7-dihydroxyisoflavone ou daidzéine (Figure 101).

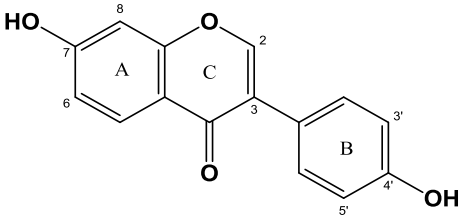


Figure 101 : Structure du composé G5 : la daidzéine

Les isoflavones sont généralement trouvés dans de nombreuses plantes (Liggins et *al.*, 2000), en particulier chez les fabacées (soja, pois, …). Cependant, une étude récente a révélé que certains microorganismes peuvent également produire des flavones et des isoflavones par biosynthèse *de novo* (Maskey et *al.*, 2003), même si trouver une isoflavone dans une souche fongique est assez peu commun. Afin de lever toute ambiguïté quant-à la provenance de cette molécule (milieu ou champignon) une analyse en réseaux moléculaires de l'extrait fongique et de l'extrait du milieu a été effectuée. Cette analyse a révélé que les deux extraits contenaient la daidzéine. Pour compléter la réponse à cette question, une extraction du mycélium seul (sans milieu de culture) pourrait être envisagé et ainsi confirmer

BY-NC-ND

la présence ou non de cette molécule dans l'extrait fongique *via* l'utilisation de la méthode OSMAC (Bode et *al.*, 2002) et par analyses MRM (Monitoring reaction multiple).

Le milieu de culture étant principalement composé d'infusion de pomme de terre, sa composition en métabolites ne semble pas faire mention de la présence d'isoflavones (Parr et *al.,* 2005; Yang et Bernards, 2007), ce qui irai dans le sens de la provenance fongique.

II.8.2.5. Composé G6

Le composé **G6** (2,7 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre blanche.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode positif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 268,1059 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{10}H_{13}N_5O_4$.

L'analyse RMN ^1H (CD_3OD, 500MHz ; cf. Annexe 18) indique la présence de deux singulets élargis à 8,18 et 8,31 ppm intégrant chacun pour 1H pouvant être caractéristique de deux protons fortement déblindés (par effet inducteur de l'ensemble des atomes d'azote), d'un doublet à 5,97 ppm et de plusieurs signaux entre 3,75 et 4,74 ppm. De plus, un ensemble de signaux déblindés entre 5,97 et 3,75 ppm sont tous « liés » entre eux d'après le spectre COSY (Figure 102), ce qui est caractéristique de sucres et semble correspondre à une unité pentose telle que le ribofuranose.

Le spectre RMN ^{13}C (cf. Annexe 18) montre la présence de huit atomes de carbone dont celui à 142,2 ppm qui résonne faiblement. Cependant, l'analyse du spectre HSQC montre que ce carbone est un carbone protoné car celui-ci corrèle directement avec le proton à 8,31 ppm. Les corrélations longues distances entre le proton H-2 à 8,12 ppm porté par le carbone à 153,7 ppm et les carbones à 157,8 (C6) et 150,4 (C4) sont les seules observées sur le noyau purine. La liaison entre la partie adénine et le ribofuranose est observée par les corrélations longues distances (HMBC) entre le proton H-1' du ribofuranose et les carbones C4 et C8 de l'adénine (Figure 102).

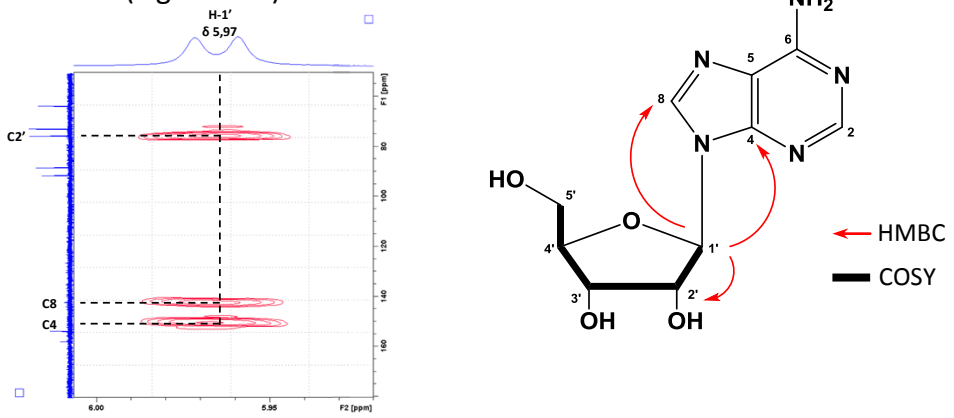


Figure 102 : Principales corrélations HMBC et COSY observées pour l'adénosine

BY-NC-ND

Ainsi, le composé **G6** a été identifié comme étant l'adénosine. Cette structure est confirmée par le nombre et les déplacements chimiques des différents carbones et par les données de la littérature (Ciuffreda et *al.*, 2007).

Tableau 25 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé G6

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
2	8,18 br s	153,7	-	C4 ; C6
4	-	150,4	-	-
5	-	116,0	-	-
6	-	157,8	-	-
8	8,31 s	142,2	-	-
1'	5,97 d (6,2)	91,4	H2'	C4 ; C8 ; C4'
2'	4,74 br t (5,6)	75,6	H1' ; H3'	C1'
3'	4,33 dd (2,5 ; 4,9)	72,8	H2' ; H4'	C1' ; C5'
4'	4,17 br d (2,3)	88,3	H3' ; H5'α ; H5'β	C3'
5'	α 3,88 dd (2,3 ; 12,5) β 3,75 dd (2,3 ; 12,5)	63,6	H4' ; H5'β H3' ; H5'α	C4' ; C3'

L'adénosine, est un nucléoside habituellement retrouvé dans les cellules animales et végétales.

II.9. Étude phytochimique de la souche Cor_08 : *Nemania serpens*

II.9.1. Fractionnement et purification

L'extrait Cor_08 a été fractionné sur colonne Sephadex® LH-20, ce qui a conduit à l'obtention de treize fractions.

L'activité antiproliférative des différentes fractions a été évaluée et seule la fraction la plus active a été purifiée dans un premier temps par CLHP semi-préparative (Figure 104).

Après la mise au point des conditions optimales de séparation en CLHP analytique, le système d'élution H_2O/ACN 80:20 (v/v) a été choisi et transposé à l'échelle semi-préparative. Les résultats de ce fractionnement sont présentés dans la Figure 103.

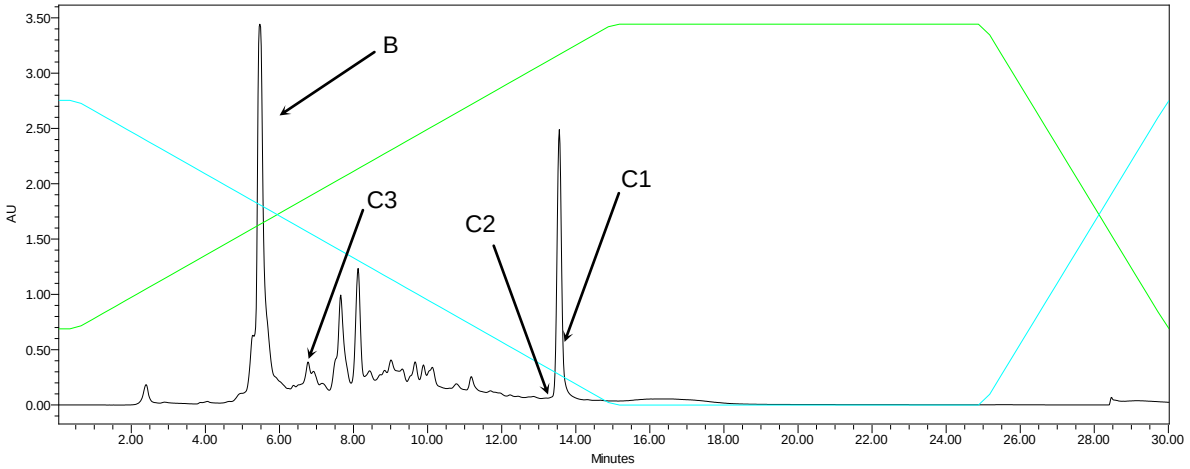


Figure 103 : Fractionnement CLHP semi-préparative de la fraction I (300 nm)

BY-NC-ND

La purification des composés est détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Trois métabolites ont été isolés de l'extrait fongique Cor_08 :

- **C1** = 5-carboxymélléine
- **C2** = eugénitine
- **C3** = acide *para*-hydroxyphénylacétique.

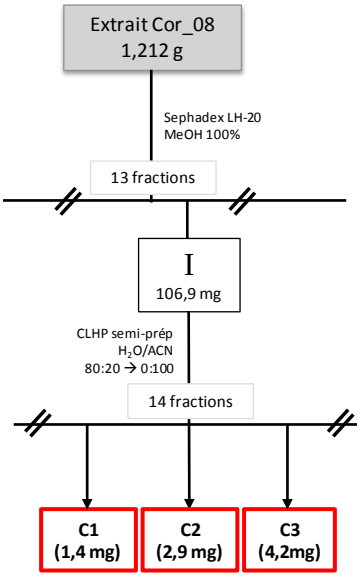


Figure 104 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait Cor_08 (*Nemania serpens*)

L'identification structurale de ces composés est détaillée dans le paragraphe suivant.

II.9.2. Détermination structurale des composés isolés

II.9.2.1. Composé C1

Le composé **C1** (1,4 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre marron clair.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode négatif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 221,0368 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{11}H_{10}O_5$.

Les spectres RMN ^1H (CD_3OD, 500MHz ; cf. Annexe 19) mettent en évidence la présence de deux protons aromatiques *ortho*-couplé à 8,09 et 6,91 ppm (H-6 et H-7), d'un groupement méthyle à 1,51 ppm (J = 6,3 Hz) ainsi que d'un CH_2 inéquivalent et intracyclique qui résonne sous forme de doubles doublets à 3,86 et 3,02 ppm.

De plus, l'analyse du spectre RMN ^{13}C (cf. Annexe 19) révèle la présence de deux fonctions carbonyle à 170,5 ppm (C10) et 171,8 ppm (C1). Le proton à 4,70 ppm porté par le carbone à 77,3 ppm (C3) correspond à un groupement CH aliphatique *O*-lié. Ce proton (H-3)

BY-NC-ND

corrèle en COSY avec le groupement méthyle et les deux protons du CH_2 en position 4 (Figure 105).

Tableau 26 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C1

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	171,8	-	-
3	4,70 m	77,3	H4β ; H4α ; 3-CH_3	-
4	α 3,86 dd (3,0 ; 17,7) β 3,02 dd (11,7 ; 17,7)	34,0	H3 ; H4β H3 ; H4α	C4a ; C5 ; C8a C4a ; C5 ; C8a ; C3 ; C9
5	-	110,0	-	-
6	6,91 d (8,8)	116,7	H7	C5 ; C8 ; C8a
7	8,09 d (8,8)	139,7	H6	C9 ; C8 ; C4a
8	-	166,0	-	-
9	-	170,5	-	-
4a	-	144,2	-	-
8a	-	123,2	-	-
3-CH_3	1,51 d (6,3)	21,1	H3	C3 ; C4

Les corrélations longues distances du proton H-6 avec les carbones C8 (166,0 ppm), C10 (170,5 ppm) et C4a (144,2 ppm), du proton H-7 avec C5 (110,0 ppm), C8 (166,0 ppm) et C8a (123,2 ppm) ainsi que celles des protons du méthylène CH_2-4 avec C3 (77,3 ppm), C5 (110,0 ppm), C9 (21,1 ppm), C4a (144,2 ppm) et C8a (123,2 ppm) conduisent à la structure de **C1** correspondant à une dihydroisocoumarine.

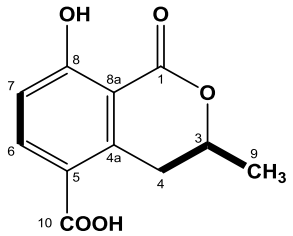


Figure 105 : Corrélations observées en COSY pour la 5-carboxyméllèine

Par comparaison avec les données de la littérature (De Alvarenga et *al.*, 1978; Yan et *al.*, 2011), le composé **C1** a été identifié comme étant la 5-carboxyméllèine (Figure 105).

De plus, certains dérivés de la méllèine sont produits en quantités importantes dans les champignons de la famille des Xylariacées facilitant leur utilisation à des fins chimiotaxonomiques (Krohn et *al.,* 1997).

II.9.2.2. Composé C2

Le composé **C2** (2,9 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre incolore.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode positif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 221,0840 $[M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{12}H_{12}O_4$.

BY-NC-ND

Les spectres RMN ^{1}H (CD_3OD, 500MHz ; cf. Annexe 20) met en évidence la présence d'un singulet à 6,58 ppm intégrant pour 1H (H-8 ; proton aromatique fortement blindé certainement par effets mésomères cumulatifs en *ortho* et *para* de groupements O–R), d'un doublet à 6,11 ppm couplé (J = 0,6 Hz) avec un méthyle à 2,39 ppm (présence d'une double liaison porteuse d'un CH_3), d'un autre groupement méthyle à 2,04 ppm et d'un groupement méthoxyle à 3,91 ppm. L'analyse RMN ^{13}C (cf. Annexe 20) confirme la présence de 12 carbones dont deux groupements méthyles à 20,4 et 7,4 ppm, d'un groupement méthoxy à 56,7 ppm et d'une fonction cétone à 184,3 ppm. Les informations recueillies sur le spectre HSQC montrent que cette molécule contient quatre carbones protonés et huit carbones quaternaires déduits par comparaison avec le spectre ^{13}C.

L'analyse du spectre HMBC permet de situer le groupement méthoxyle en position 7, le groupement méthyle à 7,4 ppm en position 6 et celui à 20,4 ppm en position 2 (Figure 105). En effet, les protons CH_3–O à 3,91 ppm corrèlent avec C7 (165,3 ppm) et C8 (90,8 ppm), ceux du 6-CH_3 à 2,04 ppm corrèlent avec C5 (159,3 ppm), C6 (109,9 ppm), C7 (165,3 ppm) et C8 (90,8 ppm) tandis que CH_3-2 à 2,39 ppm corrèle avec C2 (169,5 ppm) et C3 (109,4 ppm). D'autre part, les corrélations du proton H-3 avec C2, C4, C4a et 2-CH_3 et celles de H-8 avec C4 (184,3 ppm), C6 (109,9 ppm), C7 (165,3 ppm), C4a (105,8 ppm), C8a (158,2 ppm) et 6-CH_3 (7,4 ppm) ont ainsi permis de construire la structure de **C2** correspondant à une chromone.

Tableau 27 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C2

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
2	-	169,5	-	-
3	6,11 d (0,6)	109,4	2-CH_3	C2 ; C4 ; C4a ; 2-CH_3
4	-	184,3	-	-
5	-	159,3	-	-
6	-	109,9	-	-
7	-	165,3	-	-
8	6,58 s	90,8	-	C4 ; C6 ; C7 ; C8a ; C4a ; 6-CH_3
4a	-	105,8	-	-
8a	-	158,2	-	-
2-CH_3	2,39 d (0,6)	20,4	H3	C2 ; C3
6-CH_3	2,04 s	7,4	-	C7 ; C5 ; C6 ; C8
7-OCH_3	3,91 s	56,7	-	C7 ; C8

Ainsi, par comparaison avec les données de la littérature (Fox et Huneck, 1969), le composé **C2** a été identifié comme étant l'eugénitine (Figure 106).

BY-NC-ND

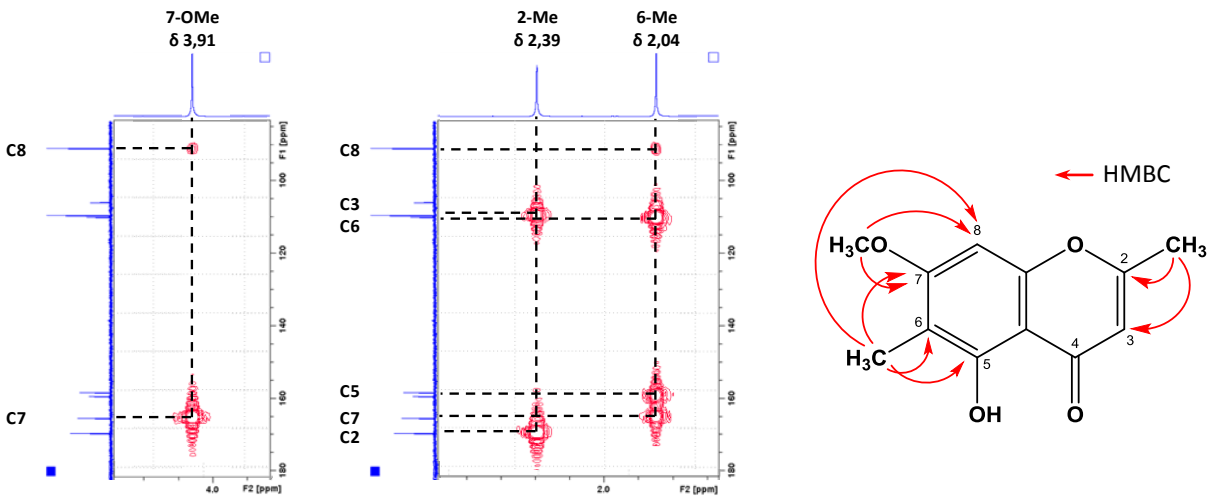


Figure 106 : Principales corrélations HMBC observées pour l'eugénitine

L'eugénitine a déjà été isolé à partir du mycobionte de *Lecanora rupicola* (Fox et Huneck, 1969).

II.9.2.3. Composé C3

Le composé **C3** (4,2 mg) a été isolé sous la forme d'une poudre orange-marron.

Le spectre de masse haute résolution (ESI-qTOF) en mode négatif, présente un ion pseudo-moléculaire à *m/z* 151,0322 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_8H_8O_3$.

Le spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500MHz ; cf. Annexe 21) met en évidence la présence de deux doublets à 7,09 et 6,72 ppm intégrant chacun pour 2H et *ortho*-couplés entre eux (*J* = 8,5 Hz) correspondant à 4 protons aromatiques. Un singulet à 3,47 ppm intégrant pour 2H corrèle en HSQC avec un carbone à 41,7 ppm (C7) indiquant un enchainement de type : $–CH_2–CO–R$. L'analyse RMN ^{13}C (cf. Annexe 21) confirme la présence d'un CH_2 (C7) à 116,7 ppm, d'un cycle aromatique et d'une fonction acide (C8) à 176,8 ppm (R = OH).

Tableau 28 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C3

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	157,5	-	-
2	6,72 d (8,5)	116,3	H3	C1 ; C4 ; C6
3	7,09 d (8,4)	131,4	H2	C1 ; C5 ; C7
4	-	127,3	-	-
5	7,09 d (8,4)	131,4	H6	C1 ; C3 ; C7
6	6,72 d (8,5)	116,3	H5	C1 ; C2 ; C4
7	3,47 s	41,7	-	C4 ; C5 ; C8
8	-	176,8	-	-

Par comparaison avec les données de la littérature (Gracin et Fischer, 2005; Sajid et *al.*, 2011), le composé **C3** a été identifié comme étant l'acide *para*-hydroxyphénylacétique (Figure 107).

BY-NC-ND

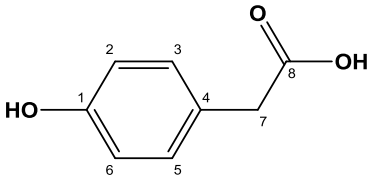


Figure 107 : Structure du composé C3 : l'acide *para*-hydroxyphénylacétique

II.9.3. Réseaux moléculaires

Les treize fractions issues du fractionnement de Cor_08 ont fait l'objet d'une étude de profilage chimique par réseaux moléculaire (Figure 109). Les activités antiprolifératives des différentes fractions a été pris en compte lors de la réalisation de ces réseaux moléculaires.

Après analyses du réseau moléculaire, plusieurs clusters se dégagent du fait d'être issu d'une fraction ayant une activité antiproliférative significative et contenant potentiellement des composés bioactifs.

Les composés du cluster [1] ont des masses comprises entre *m/z* 241 $[M+H]^+$ et 476 $[M+H]^+$ contenant les mêmes cyclopeptides identifiés lors de l'analyse des extraits fongiques, à savoir, la cyclo(L-Pro-L-Tyr), la cyclo(Tyr-Leu) et la cyclo(Phe-Tyr). Ces composés ont déjà été identifiés dans le réseau des extraits fongique vu précédemment (cf. Partie B § II.5.2).

Les composés à *m/z* 522 et 520 $[M+H]^+$ du cluster [6] ont déjà été identifié dans les réseaux moléculaires précédent comme étant la 1-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LysoPC(18:1(9Z)) ; $C_{26}H_{52}NO_7P$) et la 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LPC(18:2/0:0) ; $C_{26}H_{50}NO_7P$).

Trois autres molécules ont été identifiées par la base de données du GNPS, une à *m/z* 336 $[M+H]^+$, la N^6-cyclopentyladénosine (cluster [1]), une autre à *m/z* 271 $[M+H]^+$, l'émodine et la dernière à *m/z* 183 $[M+H]^+$, l'harmane (Figure 108).

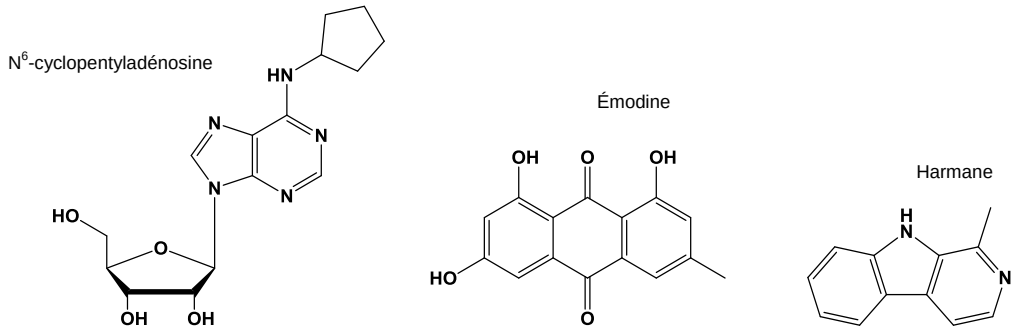


Figure 108 : Structures des composés identifiés par la base de données du GNPS

BY-NC-ND

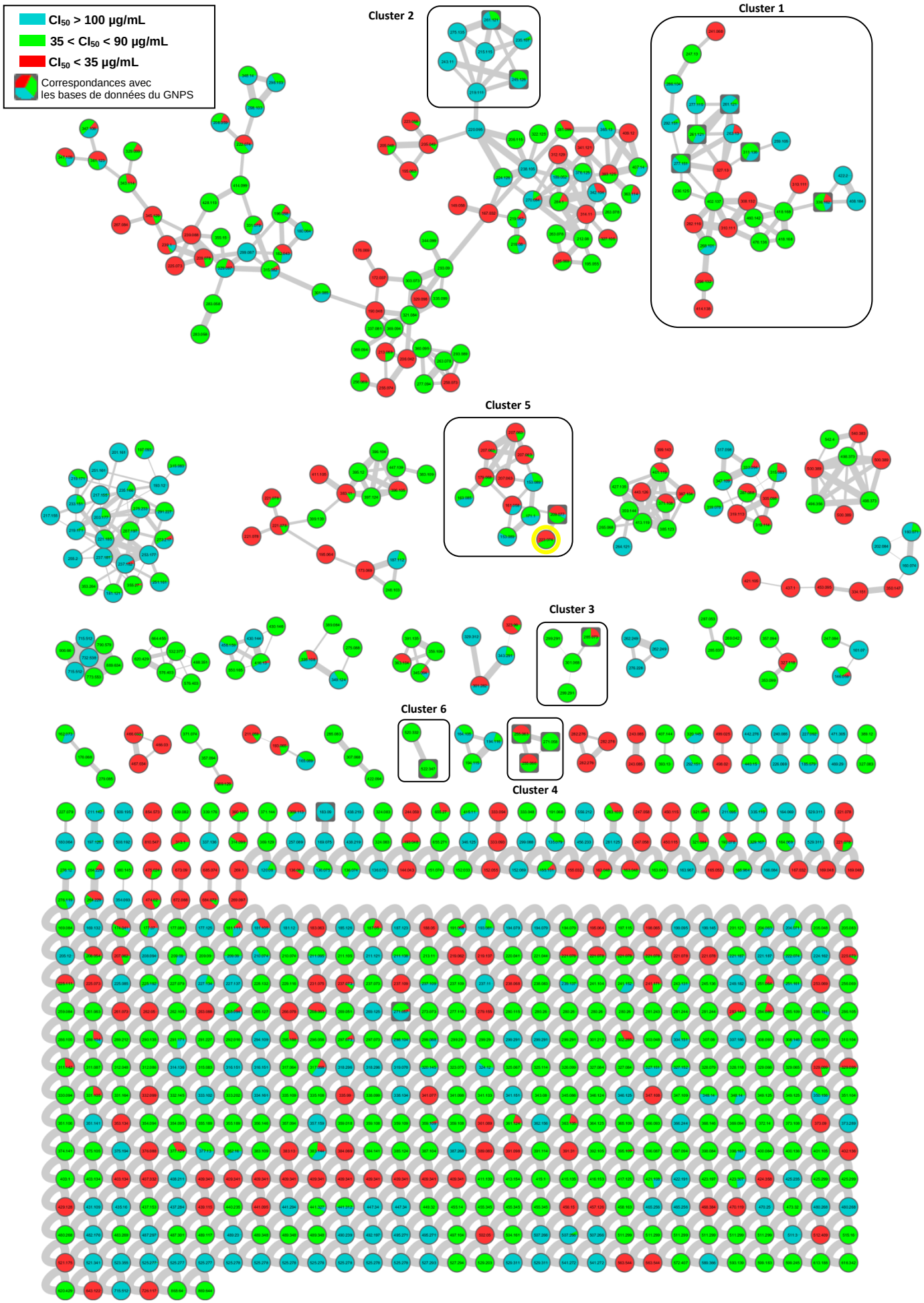


Figure 109 : Réseau moléculaire obtenu après visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres MS/MS des différentes fractions de Cor_08. Cercle jaune = composés isolés lors de l'étude phytochimique

BY-NC-ND

Le composé à *m/z* 285 $[M+H]^+$ du cluster [3] a quant-à lui été identifié comme étant la glycitéine (Figure 110).

Le cluster [4] correspond à la daidzéine et à la génistéine à *m/z* 255 $[M+H]^+$ et 271 $[M+H]^+$ respectivement (Figure 110).

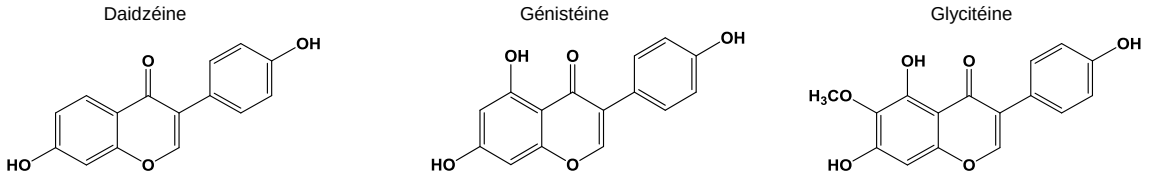


Figure 110 : Isoflavones identifiées dans le réseau moléculaire à partir des bases de données du GNPS

Lors de l'isolement de la daidzéine durant l'étude phytochimique, la provenance ce composé n'était pas certain. Cependant, après analyse de ce réseau moléculaire et de l'identification d'autres isoflavones permettent d'aller dans le sens de la provenance fongique de ces composés. De plus, Huang et *al.,* (2012) ont aussi isolé une nouvelle isoflavone d'un champignon endophyte de mangrove, *Fusarium* sp. (ZZF60). Ainsi, l'isolement de ces composés est envisagé afin d'étudier la biosynthèse de ces composés au sein du champignon.

De plus, dans le grand cluster [2], la phénylalanine et la cyclo(L-Phe-L-4-Hyp) ont aussi été identifiés avec des masses de *m/z* 245 $[M+H]^+$ et 261 $[M+H]^+$ respectivement (Figure 111).

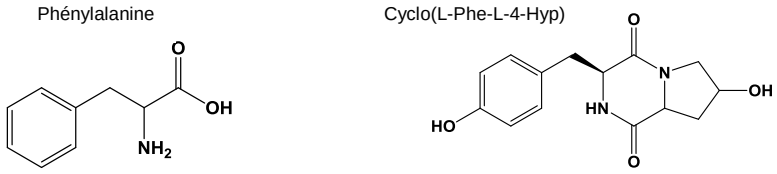


Figure 111 : Structures des composés identifiés du cluster [2]

Une correspondance à *m/z* 219 $[M+H]^+$ avec la 6-méthoxymélléine au niveau du cluster [5] a été mise en évidence. Ainsi, par comparaison des profils LC-MS/MS, le composé à *m/z* 223 $[M+H]^+$correspond à la 5-carboxymélléine (Figure 112).

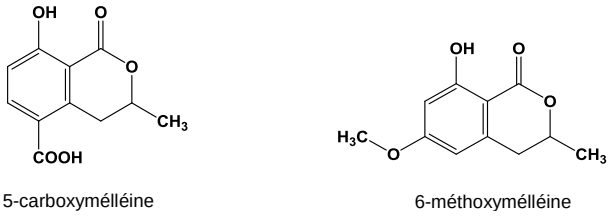


Figure 112 : Structures des composés identifiés du cluster [5]

BY-NC-ND

Cette méthode permet de se focaliser sur les composés potentiellement responsables de l'activité antiproliférative de l'extrait de Cor_08, en ciblant les composés exclusivement contenus dans les fractions actives.

II.10. Activités antiprolifératives des composés isolés

Les CI_{50} de la 5-carboxyméllèine, de l'eugénitine et de l'acide *para*-hydroxyphénylacétique n'ont pas pu être déterminées sur les lignées cellulaires HT-29 et PC-3 dans la gamme de doses testées (1 – 50 µM).

Cependant des dérivés de la mélléine, notamment la 5-méthylmélléine ont été décrits comme composé antibactérien et antifongique contre différents organismes (Kokubun et *al.,* 2003; Silva-Hughes et *al.,* 2015). Ainsi, la purification de la 6-méthoxymélléine (identifiée par réseau moléculaire) est envisagée.

Les résultats antiprolifératifs concernant l'acide *para*-hydroxyphénylacétique sont en accord avec la littérature (Gao et *al.,* 2006).

Ainsi, ces trois molécules isolées par CLHP semi-préparative ne semblent pas être responsable de l'activité antiproliférative de la fraction. Cependant, le pic B (Figure 103) observés lors de la CLHP contient deux composés qui sont en cours de purification et d'isolement.

Pour les deux stéréoisomères **G1** et **G2** isolées de *Nemania aenea* var. *aureolatum*, les premiers résultats montrent que, ces deux molécules ont des activités antiproliférative modérées et différentes sur les lignées cancéreuses colorectal (HT-29 et HCT116) et prostatique (PC-3 et DU145) (Tableau 29). Ainsi, **G2** est le composé le plus actif sur les lignées cellulaires HCT116, PC-3 et DU145 avec des CI_{50} de 135,7 ; 87,3 et 81,1 µM, respectivement et pour la lignée cellulaire HT-29, la CI_{50} des deux molécules est supérieure à 200 µM, montrant une légère influence de la stéréochimie sur l'activité.

Tableau 29 : Récapitulatif des différentes CI50 (en µM) obtenues pour les deux stéréoisomères isolés de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (n=1)

	HT-29	HCT116	PC-3	DU145
G1	> 200	> 200	113,5	> 200
G2	> 200	135,7	87,3	81,1

L'acide hélvolique est connu dans la littérature pour son activité antibactérienne (Ratnaweera et *al.,* 2014; Zhao et *al.,* 2010). Cependant, Afiyatullov et *al.,* (2012) ont montré

BY-NC-ND

que le composé **G1** n'avait aucune activité sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Bacillus cereus*. De plus, un test sur l'activité anti-biofilm fongique (*Candida albicans*) ou bactérien (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) sera réalisé, en vue de confirmer ce résultat.

De plus, dans la littérature (Wattana-Amorn et *al.,* 2016), la cyclo(L-Pro-L-Tyr), un dipeptide cyclique retrouvé (*via* l'analyse des réseaux moléculaires) dans les extraits de Gir_20; Gir_10 ; Gir_22 et Gir_26, a montré une activité antibactérienne contre *Xanthomonas axonopodis pv. citri* et *Ralstonia solanacearum* avec une CMI de 31,25 µg/mL. Cependant, aucune activité n'a été observée contre *Clavibacter michiganensis* (pathogènes des végétaux). Cette molécule semble être espèce dépendante vis-à-vis de son activité antibactérienne. Ainsi, la purification de cette molécule permettrait de confirmer cette hypothèse.

BY-NC-ND

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les lichens sont donc des organismes uniques possédant une remarquable capacité d'adaptation aux conditions environnementales extrêmes en produisant une multitude de métabolites secondaires spécifiques. Cependant, la disponibilité de la ressource lichénique pose un problème d'apport en matières premières, compte tenu de la croissance lente de ces derniers.

Ainsi, ce projet de thèse s'est divisé en deux parties interconnectées.

Dans un premier temps, l'étude phytochimique de *Nephroma laevigatum* a été effectuée à travers la réalisation d'extraits dichlorométhanique (DCM) et acétonique (AC). Le profilage chimique des extraits par CLHP-DAD et *via* la réalisation des réseaux moléculaires établis sur l'ensemble des données LC-MS/MS à l'aide de la plateforme GNPS, a permis de mettre en évidence la diversité chimique des extraits lichéniques (anthraquinones chlorées et triterpénoïdes). Ainsi, quatre anthraquinones chlorées dérivant de l'émodine ont été identifiées dont une non encore décrite dans la littérature. Des triterpènes de type hopane ainsi que des phospholipides ont aussi été identifiés.

L'activité antiproliférative des extraits DCM et AC a été évaluée sur la ligne cellulaire cancéreuse colorectale humaine HT-29. L'extrait AC s'est révélé moins actif que l'extrait DCM qui possède une CI_{50} de l'ordre de 20 µg/mL après seulement 48h de traitement.

La purification de l'extrait dichlorométhane, plus riche en anthraquinones chlorées, a conduit à l'isolement et l'identification de quatre composés connus dont un triglycéride (isolé pour la première fois de *Nephroma laevigatum*) et trois anthraquinones (**DCM 1** à **4**).

Le composé **DCM 1** n'a pas montré d'activité antiproliférative dans la gamme de doses testées. Les composés **DCM 2** à **4** ont montrés une faible activité antiproliférative sur les quatre lignées cancéreuses testées. Cependant, le composé **DCM 4** a montré une meilleure activité avec des CI_{50} comprises entre 48,9 et 75,2 µM. Cette différence d'activité peut être due à la présence de groupement *O*-méthyle ce qui augmenterai la lipophilie de la molécule. D'autres investigations seront réalisées dans le but de définir la relation structure-activité entre les différentes anthraquinones testées.

De plus, certaines anthraquinones (émodine, aloe-émodine, …) ont été étudiées dans le but de leur utilisation en photothérapie dynamique (PDT). Ainsi, la 7-chloroémodine en

BY-NC-ND

présence d'une irradiation lumineuse a produit des anions superoxydes. Cette capacité pourrait être utilisée lors des traitements photo-activés. Cependant, d'autres investigations vont être réalisées notamment l'évaluation de la production d'une autre espèce d'EROs, l'oxygène singulet, dans le but de préciser son avenir en tant que photosensibilisateur.

De plus, les extraits DCM et AC ont démontrés leur capacité à inhiber la phase de maturation du biofilm de *Candida albicans* à 48h avec des CI_{50} de 6,25 et 12,5 µg/mL, respectivement. Une investigation phytochimique plus approfondie par fractionnement bioguidé, de ces deux extraits permettant d'accéder aux composés actifs sera réalisée.

Concernant l'activité anti-biofilm bactérien (*Staphylococcus aureus*), seul l'extrait DCM a montré un faible effet avec une concentration minimale d'éradication du biofilm de 55,43 ± 6,4 µg/mL.

Dans un deuxième temps, la plus grande partie du projet a été consacrée à l'étude des champignons endolichéniques associés à *N. laevigatum*. La culture sur milieu MEA de morceaux de thalles lichéniques collectés sur deux sites distincts (Corrèze et Gironde) a conduit à l'isolement de 46 souches. Huit taxons appartenant aux Ascomycètes répartis dans trois familles (*Coniochaetacées*, *Xylariacées* et *Pezizacées*) ont été identifiés. Le genre *Nemania* avec 36 isolats et 5 taxons est le plus représenté (78%). Une variabilité intra-spécifique a été observée chez *Nemania serpens* avec six génotypes différents identifiés. La diversité fongique demeure relativement faible pour *N. laevigatum*, lichen à cyanobactéries, par rapport à ce qui est observé pour les lichens dont le photobionte est une algue verte. L'étude des champignons endolichéniques d'un autre échantillon récolté sur un troisième site permettrait de conforter cette observation concernant la composition de la flore endolichénique de *N. laevigatum*.

L'optimisation des conditions de culture de deux espèces fongiques (*Nemania serpens* et *N. aenea* var. *aureolatum*) a été effectuée sur trois milieux différents. Ainsi, les conditions optimales de culture ont été déterminées. La réalisation d'une culture à petite échelle a ensuite pu être réalisée sur quatre souches de *N. serpens* et deux de *N. aenea* var. *aureolatum* sur milieu PDA. Après 21 jours de culture à température ambiante, l'extraction par l'acétate d'éthyle a conduit à l'obtention de six extraits. L'évaluation des activités antiproliférives de ces extraits a été réalisée dans le but de focaliser la suite des investigations sur les souches les plus actives.

BY-NC-ND

La diversité chimique des métabolites fongiques des extraits obtenus a été étudiée par CLHP-DAD et *via* l'exploitation de réseau moléculaire. Ainsi, trois cyclopeptides dont deux communs aux deux espèces étudiées, un acide aminé et plusieurs isoflavones ont été identifiés.

Les activités antiprolifératives des six extraits ont été réalisées sur deux lignées colorectales (HT-29 et HCT116) et deux lignées prostatiques (PC-3 et DU145). Les extraits issus des souches de *Nemania aenea* var. *aureolatum* ont montré une activité antiproliférative avec des CI_{50} comprises entre 13,6 et 38,3 µg/mL. Des variations d'activité ont été observées au sein des souches de *Nemania serpens*. En effet, une seule souche (Cor_08) s'est révélée active sur les quatre lignées cellulaires (CI_{50} < 33,7 µg/mL), contrairement à la souche de même génotype (Gir_26) qui a montré une activité seulement pour la lignée cellulaire DU145 (CI_{50} de 89,3 µg/mL). Ainsi, afin de confirmer cette variabilité intra-espèce, une investigation phytochimique à grande échelle sera envisagée pour Gir_26 dans le but d'étudier la diversité chimique de cette espèce.

Une investigation au niveau cellulaire a été effectuée sur les extraits les plus actifs de chaque espèce (Gir_20 et Cor_08) dans le but d'appréhender le mécanisme d'action sur les lignées cellulaires HT-29 et PC-3. Des changements morphologiques ont été observés supposant alors un mécanisme d'apoptose. La diminution de l'expression de la pro-caspase 8, le clivage de la PARP et l'augmentation de la fragmentation de l'ADN mettent en évidence une induction de l'apoptose, probablement par voie extrinsèque. Afin de confirmer cette hypothèse, d'autres investigations seront réalisés par l'utilisation d'autres marqueurs mitochondriaux (dosage de la caspase-3 (kit ELISA), membres de la famille Bcl-2, activation de la pro-caspase-9, …).

La production à grande échelle a été effectuée sur les deux souches les plus actives (Gir_20 et Cor_08) sur milieu PDA pendant 21 jours à température ambiante. Cependant, une modification du profil chimique de l'extrait de *N. aenea* var. *aureolatum* (Gir_20) a été observée, entraînant une perte de l'activité antiproliférative de l'extrait, contrairement à l'extrait de Cor_08, où l'activité a été retrouvée.

L'étude phytochimique de cet extrait a conduit à l'isolement et l'identification de six composés (**G1** à **G6**) dont deux nordammarane triterpènes, un acide gras, une isoflavone et un nucléoside. Le produit **G2** est nouvellement décrit et correspond à un stéréoisomère de

BY-NC-ND

G1. Les composés ainsi obtenus ont été testés pour leur activité antiproliférative. Ainsi, les composés **G1** et **G2** présentent pas ou peu d'activités sur les quatre lignées cellulaires cancéreuses aux concentrations testées. Cependant, ces deux stéréoisomères ne présentent pas la même activité antiproliférative. En effet, **G2** présente une meilleure activité sur les lignées cellulaires HCT116, PC-3 et DU145 avec des CI_{50} comprises entre de 81 et 135 µM.

L'étude phytochimique de l'extrait de *N. serpens* a conduit à l'obtention de treize fractions. L'analyse de ces fractions par LC-MS/MS, l'établissement des réseaux moléculaires et la corrélation avec les activités antiprolifératives, a permis de cibler la fraction la plus active. Ainsi, la purification de cette fraction par CLHP semi-préparative a conduit à l'isolement de trois composés (**C1** à **C3**). Cependant ces composés ne semblent pas être responsables de l'activité antiprolifératives de cette fraction (CI_{50} > 50 µM). Ainsi, cette purification n'ayant pas permis l'isolement des composés actifs, l'isolement et l'identification des composés responsables de l'activité devra être poursuivie.

Les extraits de *N. aenea* var. *aureolatum* et certains extraits de *N. serpens* (Cor_08 et Gir_26) ont montrés des effets anti-biofilm après 48h de contact avec des CI_{50} de 25 et 50 µg/mL. Les deux autres souches de *N. serpens* n'ont pas montrés d'activité anti-biofilm fongique aux concentrations testées. Cependant, tous les extraits fongiques n'ont montré aucune activité sur les biofilms bactériens dans la gamme de doses testées (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Ce travail a permis de mettre en évidence les potentialités antiproliférative et anti-biofilm à *Candida albicans* des extraits lichéniques et fongiques. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre l'étude phytochimique de ces extraits par l'utilisation de différents réseaux moléculaires permettant ainsi d'effectuer une première déréplication, suivi par fractionnement bioguidé afin de se focaliser sur l'identification de nouveaux métabolites potentiellement bioactifs.

La diversité des métabolites fongiques n'a été abordée que pour deux champignons endolichéniques isolés de ce lichen. Des études phytochimiques et biologiques plus approfondies des autres champignons sont envisagées.

BY-NC-ND

PARTIE C

Matériels et Méthodes

Nephroma laevigatum a été récolté dans un premier temps en Corrèze par L. Mambu, M. Millot et A. Lagarde, au niveau des Cascades du Deiro à Soudeilles (le 03 octobre 2014, temps sec et ensoleillé ; coordonnées GPS (DMS) 45°26'53.102 N 2°2'43.717'' E). Un échantillon a été déposé dans l'herbier du laboratoire de Pharmacognosie de Limoges sous la référence HL-L1014-01. Le lichen a été trouvé sur les troncs d'arbres feuillus enchevêtrés dans de la mousse à l'abri de la lumière dans la forêt proche d'un cours d'eau.

La deuxième récolte a été effectuée en Gironde par A. Lagarde, dans la commune de Bommes à côté de l'acrobranche « Au fil du Ciron » (le 16 mai 2015, temps sec et ensoleillé ; coordonnées GPS (DMS) 44°32'52.483'' N 0°21'39.42'' O). Le lichen a été trouvé sur le tronc d'un arbre feuillu enchevêtré dans de la mousse proche d'une rivière. Un échantillon a été déposé dans l'herbier du laboratoire de Pharmacognosie de Limoges sous la référence HL-L0515-01.

Après la récolte, le lichen a été minutieusement débarrassé de la mousse (bien enchevêtré autour du lichen), d'autres espèces lichéniques et de débris tels que cailloux, écorce, …

I.1. Observation à la loupe binoculaire et microscope optique

Les thalles lichéniques ont été observés à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un transformateur Nikon (modèle XN) et d'un microscope optique (Leica).

I.2. Réactions thallines

Certains acides lichéniques présents dans les lichens peuvent réagir au contact avec différents réactifs. Les dépôts de réactifs se fait en fonction de la localisation de ces composés dans le thalle (cortex, médulle, apothécies,…). Les réactifs utilisés sont :

- Réactif K : potasse (solution de KOH à 10% dans de l'eau)
- Réactif P : *para*-phénylènediamine (1% de *p*-phénylène-diamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse 10%)

BY-NC-ND

II.1. Milieux de culture

Pour la culture des champignons endolichéniques, plusieurs milieux solides ou liquides ont été utilisés (Tableau 30). Ils ont été fournis par Carl ROTH, à l'exception du bouillon de culture Czapek-DOX fournis par Difco™. La farine d'avoine utilisée est une farine biologique de la marque Celnat.

Tableau 30 : Composition des milieux de culture utilisés
a : mélange commercial ; b : préparé au laboratoire

		Composition	
Milieux solides	MEA[a] Malt Extract Agar	Extrait de malt	12,75 g/L
		Peptone de gélatine	0,78 g/L
		Glycérol	2,35 g/L
		Dextrine	2,75 g/L
		Agar	15 g/L
		pH	4,7 ± 0,2
	PDA[a] Potato Dextrose Agar	Infusion de pommes de terre	4 g/L
		Glucose	20 g/L
		Agar	15 g/L
		pH	5,6 ± 0,2
	OA[b] Oatmeal Agar	Farine d'avoine	60 g/L
		Agar	12 g/L
Milieux liquides	PDB[a] Potato Dextrose Broth	Infusion de pommes de terre	6,5 g/L
		Glucose	20 g/L
		pH	5,6 ± 0,2
	Czapek-DOX Broth[a]	Saccharose	30 g/L
		$NaNO_3$	3 g/L
		K_2HPO_4	1 g/L
		$MgSO_4$	0,5 g/L
		KCl	0,5 g/L
		$FeSO_4$	0,01 g/L
	MGY[b] Malt, Glucose, Yeast	Extrait de malt	10 g/L
		Extrait de levure	4 g/L
		Glucose	4 g/L

Les milieux de culture solides ou liquides sont préalablement dissous à chaud dans de l'eau distillée avant d'être passés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. Les milieux solides sont ensuite coulés dans les boîtes de Pétri sous hotte à flux laminaire stérile (50 mL pour les boîtes de Pétri de 120 mm et 20 mL pour celles de 90 mm). Le même mode opératoire a été utilisé pour les milieux liquides. Néanmoins, avant de passer à l'autoclave, 100 mL de milieux sont réparti dans des erlenmeyers (250 mL) soigneusement fermés avec du coton cardé recouvert d'aluminium.

BY-NC-ND

II.2. Isolement des champignons endolichéniques

La stérilisation en surface des thalles lichéniques a été effectuée selon Guo et *al.*, (2000) avec quelques modifications. L'opération nécessite plusieurs bains successifs de 2 minutes chacun (1er bain : éthanol à 70% ; 2ème bain : solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% et 3ème bain : éthanol à 70%). Le thalle est ensuite rincé dans de l'eau distillée stérile afin d'enlever les résidus d'éthanol. Les thalles stérilisés sont alors coupés en morceaux de 0,5 x 0,5 cm environ, à l'aide d'un scalpel stérile et transférés sur du papier stérile. Deux à quatre morceaux de thalle sont placés dans des boîtes de Pétri (120 mm) contenant du milieu MEA seul ou du milieu MEA supplémenté en Rose Bengale (30 mg/L). Le Rose Bengale permet de ralentir la croissance des champignons (Guo et *al.*, 2003). Un antibiotique a été rajouté dans les deux milieux afin d'inhiber la croissance bactérienne (streptomycine à 50 mg/L). De l'eau de rinçage (1 mL) a été ensemencée dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA permettant de vérifier l'efficacité de la stérilisation. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du Parafilm® et incubées à température ambiante à la lumière naturelle jusqu'à que des colonies fongiques apparaissent autour des segments de thalle, pendant environ un mois. Elles sont ensuite transférées dans de nouvelles boîtes de Pétri (90 mm) contenant du milieu PDA. Leur isolement se fait par repiquages successifs jusqu'à obtention d'une colonie pure.

Chaque souche fongique isolée a été annotée puis stockée soit directement en boîte de Pétri (milieu PDA) à 4°C, soit en cryotubes contenant une solution de glycérol 15% (v/v) à - 20°C et - 80°C (Kusari et *al.*, 2009) ou dans de l'eau stérile à température ambiante à l'abri de la lumière.

II.3. Culture des souches sélectionnées

II.3.1. Détermination des paramètres de culture

Deux souches ont été cultivées en boites de Pétri contenant différents milieux de culture (PDA, PDA dilué 4 fois (milieu carencé) et OA ; 12 boîtes par milieux) pendant 1 mois à température ambiante et à la lumière naturelle. Une extraction à l'acétate d'éthyle (protocole, cf. § III.2) a été réalisée toutes les semaines (3 boîtes de Pétri par semaine) pendant un mois. Après filtration et évaporation à sec, les différents extraits obtenus ont été pesés et analysés par CCM afin de déterminer le temps optimal ainsi que le milieu de culture les plus adaptés à la production de métabolites secondaires.

BY-NC-ND

II.3.2. Culture à petite échelle

Les souches fongiques sélectionnées ont été cultivées en milieu solide PDA et sur milieux liquides (PDB, Czapek-COX et MGY).

Les milieux liquides ont été ensemencés par trois morceaux (5 mm de diamètre) de mycélium+agar d'une pré-culture (deux semaines sur PDA à température ambiante et à la lumière naturelle) par erlenmeyer contenant 100 mL de milieu (1 erlenmeyer par milieu). Les cultures ont été incubées selon deux conditions, la première à température ambiante sous agitation (170 rpm) et la seconde à 27°C sous agitation (170 rpm) pendant 21 jours. L'ensemencement de quatre boîtes de Pétri par champignons a été effectué par dépôt de trois morceaux de mycélium+agar (5 mm de diamètre ; même culture que pour les milieux liquides) par boite de Pétri (contenant 20 mL de milieu). Les cultures ont été incubées à température ambiante pendant 21 jours, puis extraites par 100% d'acétate d'éthyle (cf. § III.2).

Après filtration et évaporation à sec, les différents extraits obtenus ont été pesés. Tous les extraits bruts ont été analysés par CCM, CLHP et LC-MS/MS. Une masse de 5 mg de chaque extrait brut a été dilué dans du DMSO pour obtenir une concentration finale de 20 mg/mL, en vue des tests biologiques.

II.3.3. Culture à grande échelle

Deux souches fongiques sélectionnées ont été cultivées sur 240 boîtes de Pétri chacune (20 mL de milieu par boîtes de Pétri) à température ambiante pendant 21 jours, puis extraites par 100% d'acétate d'éthyle (cf. § III.2).

Après filtration et évaporation à sec, les différents extraits obtenus ont été traités dans les mêmes conditions que pour la culture à petite échelle (cf. § II.3.2).

II.4. Identification des champignons endolichéniques

II.4.1. Observation à la loupe binoculaire et microscope optique

Les boites de pétri contenant les champignons sont directement (sans traitement préalable) observés à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un transformateur Nikon (modèle XN). Les champignons sont prélevés avec une anse, déposés sur une lame puis colorés avec du bleu lactique et recouvert d'une lamelle avant l'observation au microscope optique.

BY-NC-ND

II.4.2. Caractérisation moléculaire des champignons isolés

Collaboration avec le Dr. Patricia Jargeat, Laboratoire Évolution et Diversité Biologique, UMR 5174, Univ. Paul Sabatier, Toulouse.

Les souches fongiques ont été identifiées par séquençage des régions ITS (Internal Transcribed Spacer : espaceurs transcrits internes) de l'ADN ribosomique. Le marqueur ITS correspond aux régions non-codantes séparant les sous-unités 18S ; 5,8S et 28S (Figure 113). Ces sous-unités sont très conservées chez les espèces fongiques contrairement aux régions ITS qui engendre ainsi des différences permettant l'identification des champignons. Par conséquent, ce sont des régions de référence pour les études taxonomiques et pour d'identification des espèces fongiques en écologie moléculaire (Horton et Bruns, 2001 ; Nilsson et *al.*, 2008).

II.4.2.1. Extraction d'ADN

Un fragment de mycélium des souches isolées est prélevé en conditions stériles, broyé à l'aide d'un piston en Téflon dans 300 µL de tampon « Nuclei Lysis Solution » (WIZARD Genomic DNA Extraction kit®, Promega®) et agité à l'aide d'un vortex. Après incubation 15 min à 65°C, 100 µL de tampon « Protein Precipitation Solution » (WIZARD Genomic DNA Extraction kit®, Promega) sont ajoutés. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min, le surnageant est prélevé puis mis dans un nouveau tube contenant 300 µL d'isopropanol. Le surnageant est éliminé par retournement après 10 min de centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. L'ADN est ensuite lavé avec 300 µL d'éthanol à 70% puis centrifugé 10 min à 13 000 rpm. L'éthanol est alors éliminé et le culot contenant l'ADN est séché à l'air libre. Le culot sec est re-suspendu dans 40 µL d'eau milliQ stérile. L'ADN est dilué au 1/10ème en vue de la réalisation de la PCR. Après utilisation, l'ADN total et les dilutions sont stockés - 20°C.

II.4.2.2. Amplification par Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)

Les amplifications ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant 2 µL d'ADN dilué au 1/10ème, 1 µM de l'amorce forward ITS5 (White et *al.*, 1990 ; Figure 113), 1µM de l'amorce reverse ITS4 (White et *al.*, 1990 ; Figure 113), 2 mM de dNTP, 1 unité de GoTaq DNA polymérase (Promega) et 1X de tampon préconisé par le fournisseur (Promega). La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler Pro S avec le programme suivant : 3 minutes à 94°C (dénaturation initiale), puis pour 35 cycles :

BY-NC-ND

45 secondes à 94°C (dénaturation), 45 secondes à 55°C (hybridation des amorces) et 1 minute à 72°C (élongation), et pour finir 10 minutes à 72 °C (élongation finale).

ITS 4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS 5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

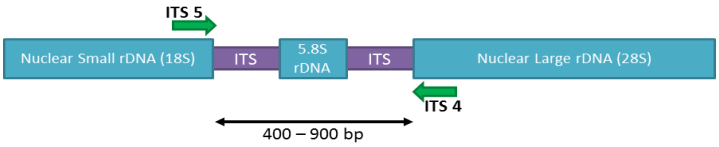


Figure 113 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées et leurs positions sur l'ADN ribosomique.

L'amplification est contrôlée sur un gel d'agarose 1,5% dans du TAE 0.5X contenant un intercalant de l'ADN (SYBR Green). Après migration à 100 Volt pendant 10 à 30 minutes, les gels sont observés sous UV. Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite envoyés à Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) pour séquençage avec l'amorce ITS5.

II.4.2.3. Analyses des séquences

Après séquençage, les chromatogrammes bruts obtenus ont été édités et vérifiés un par un puis corrigés manuellement si nécessaire avec le logiciel BioEdit. Chaque séquence a été utilisée comme séquence requête (ou « query ») pour la recherche de séquences similaires dans GenBank en utilisant l'outil BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool ; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi ; Altschul et *al.*, 1990).

Les souches ont été identifiées sur la base de la similarité des séquences (c'est-à-dire l'évaluation du pourcentage d'identité nucléotidique avec les séquences de référence) et de leur position dans l'arbre phylogénétique permettant ainsi de définir l'espèce, voir la variété de la souche fongique lorsque celle-ci est répertoriée. Les seuils de similarités suivants ont été utilisés pour identifier les souches fongiques : lorsque l'identité de séquences ITS ≥ 99%, les espèces fongiques ont été acceptées ; entre 97 et 99% d'homologie, seul le genre a été accepté. Les séquences des souches identifiées et celles de référence taxonomiques (= espèces issues de la base de données GenBank) ont été alignées à l'aide de l'outil ClustalW (Thompson et *al.*, 1994) ou MUSCLE disponibles dans le logiciel MEGA7 (Kumar et *al.*, 2016).

Les arbres phylogénétiques ont ensuite été construits avec le logiciel MEGA7 en utilisant la méthode du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987).

BY-NC-ND

III.1. Extractions des thalles lichéniques

Après séchage, 50 g de thalle lichénique (issu de la récolte de Corrèze) ont été broyés puis extraits dans un premier temps au dichlorométhane, à température ambiante et sous agitation (10 x 500 mL) jusqu'à épuisement. Après filtration et évaporation à sec, une masse de 2,932 g d'extrait a été obtenu (extrait DCM). Le marc est ensuite séché puis réutilisé pour une seconde extraction à l'acétone (5 x 500 mL) dans les mêmes conditions que précédemment. Après filtration et évaporation à sec, 632,3 mg d'extrait a été obtenu (extrait AC). Les pourcentages massiques d'extraction obtenus ainsi que les profils chimiques des deux extraits ont été comparés.

III.2. Extractions des champignons endolichéniques cultivés sur milieu solide

Après incubation, le mycélium ainsi que la gélose ont été coupés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel afin d'optimiser la surface de contact avec le solvant d'extraction. Le broyat ainsi obtenu est mis en contact avec l'acétate d'éthyle dans des erlenmeyers. Le mélange broyat + solvant subit ensuite 30 minutes de sonication à température ambiante, permettant la destruction de la paroi des cellules fongiques et leur éclatement facilitant la diffusion des métabolites secondaires internes dans le solvant. Les erlenmeyers sont ensuite agités 1H à 210 rpm à température ambiante. Afin d'enlever les résidus de cultures (biomasse fongique, la gélose, …) plusieurs étapes de filtration ont été nécessaires. Ainsi, une première filtration sur papier filtre standard (grade 122) a été réalisé permettant de récupérer la biomasse fongique de la culture. L'ajout de sulfate de sodium permet d'enlever les résidus d'eau présents dans le filtrat. La deuxième filtration a été effectuée sur du papier filtre standard (grade 122) pour enlever le Na_2SO_4 anhydre et pour finir la dernière filtration a été réalisé sur une membrane PTFE (0,45 µm). Une seconde étape d'extraction à l'acétate d'éthyle, a été effectuée sur la biomasse fongique (gélose + mycélium) issue de la première filtration. Après macération une nuit à 4°C, les mêmes étapes de filtration précédemment décrites ont été réalisées.

BY-NC-ND

IV.1. Réactifs et solvants

Les différents fournisseurs des solvants et réactifs sont Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France), Carl ROTH (Lauterbourg, France). Les solvants utilisés pour la CLHP et la LC-MS sont de qualité CLHP, préalablement filtrés sur un filtre de porosité (0,45 µm) puis dégazés aux ultrasons.

IV.2. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (SiO_2) avec indicateur de fluorescence (ALUGRAM® SIL G/UV_{254} ; 0,20 mm, Macherey-Nagel). Après migration des phases mobiles appropriées, les plaques CCM sont ensuite observées sous UV à 254 et 365 nm, avant révélation par une solution d'anisaldéhyde sulfurique (5 mL d'une solution d'anisaldéhyde concentrée sont additionné à 895 mL de méthanol et 100 mL d'acide acétique glacial, puis 2% d'acide sulfurique concentré sont ajoutés extemporanément). Après pulvérisation des plaques CCM, un chauffage à 100°C pendant 1 minute est réalisé.

IV.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) analytique

Les chromatographies liquides hautes performances ont été réalisées sur un appareil Alliance (Waters 2690) couplé à un détecteur à barrette de diodes (Waters 996).

Pour les extraits et composés lichéniques, une colonne de silice greffée C18 (Hibar® LiChrospher® 100, 250 x 4 mm, 5 µm, Merck) a été utilisée. Après solubilisation des échantillons dans 100% de méthanol, une injection de 10 µL à une concentration de 5 mg/mL a été réalisée. L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min selon la méthode décrite par Yoshimura et *al.* en 1994 (mode isocratique : A (MeOH) ; B (H_2O + 0,9% H_3PO_4) à 80:20), durant 50 min.

Pour les extraits et composés fongiques, une colonne de silice greffée C18ec (Nucleodur® 100, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) a été utilisée. Après solubilisation des échantillons dans MeOH/H_2O 50:50, une injection de 10 µL à une concentration de 2,5 mg/mL a été réalisée. L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min à l'aide d'un gradient A (H_2O + 0,1% HCOOH) et B (ACN + 0,1% HCOOH) selon les conditions suivantes :

BY-NC-ND

équilibration à 5% de B, augmentation progressive à 95% de B en 30 min puis maintient à 95% de B pendant 5 min, retour aux conditions initiales en 2 min suivi d'un rééquilibrage de la colonne pendant 8 min.

Les données sont acquises et traitées à l'aide du logiciel Empower™ 3 (Waters).

IV.4. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses basses résolutions

Réalisé par Émilie Pinault, Institut GEIST, BISCEm – Plateforme de spectrométrie de masse, Université de Limoges.

Le système CLHP est équipé d'une pompe Shimadzu LC 10 ADvp (Japon) avec un auto-injecteur SIL-Ht et un four CTO-10ASvp. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Atlantis T3 (100 Å, 5 µm, 2,1 mm x 100 mm) (Waters) à un débit de 0,2 mL/min. Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre de masse hybride triple quadripôle/trappe d'ions linéaire 4000 Q-TRAP® (Sciex) équipé d'une source d'ionisation ESI (Electrospray turbo Ion Spray) et contrôlé par le logiciel Analyst 1.6.2. La méthode IDA (Independent Data Acquisition) correspondant à la sélection des deux ions les plus intenses, a été utilisée avec une exclusion de 30 sec après deux occurrences de façon à pouvoir fragmenter des ions de moins en moins intenses.

Après solubilisation des échantillons dans 50:50 MeOH/H_2O + 0,1% HCOOH (v/v), 10 µL a été injecté à une concentration de 1 mg/mL. L'élution est réalisé à l'aide d'un gradient A (H_2O + 0,1% HCOOH) et B (ACN + 0,1% HCOOH) selon les conditions suivantes : équilibration à 5% de B, augmentation progressive à 95% de B en 30 min puis maintient à 95% de B pendant 5 min, puis retour aux conditions initiales en 2 min suivi par la rééquilibration de la colonne pendant 8 min.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel PeakView® version 1.2 (AB Sciex™).

IV.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses hautes résolutions

Collaboration avec le Dr. Mehdi Beniddir, BioCIS, Univ. Paris-Sud, UMR CNRS 8076, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry.

Les analyses ont été réalisées sur un appareil constitué d'une chaîne analytique (1260 Infinity, Agilent Technologies) munie d'un détecteur à barrette de diode (DAD). Les

BY-NC-ND

spectres de masse ont été réalisés sur un Q-TOF 6530 Accrute (Quadripole-Time OF Flight) équipé d'une source ESI et d'une colonne Sunfin® C18 (150 mm x 2.1 mm, 3,5 µm, Waters).

Après solubilisation des échantillons dans 100% de méthanol (pour les composés purs ajout de quelques microlitres de dichlorométhane), 10 µL ont été injectés à une concentration de 1 mg/mL. Les analyses sont effectuées à un débit de 0,25 mL/min. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient : A (H_2O + 0,1% HCOOH) et B (ACN + 0,1% HCOOH) selon les conditions suivantes : équilibration à 5% de B, augmentation progressive jusqu'à 100% de B en 30 min à puis maintient à 100% de B pendant 10 min, suivi par la rééquilibration de la colonne dans les conditions initiales.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel MassHunter version B.07.00 (Agilent Technologies).

IV.6. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Réalisé par le Dr. Yves Champavier, Institut GEIST, BISCEm – Plateforme RMN, Université de Limoges.

Les acquisitions des spectres 1D (^{1}H ; ^{13}C et ^{13}C Jmod) et 2D ont été effectuées sur deux types d'appareils :

- un spectromètre Bruker 400 MHz Avance DPX (400,13 MHz pour les spectres ^{1}H et 100,62 MHz pour les spectres ^{13}C).
- un spectromètre Bruker 500 MHz Avance III HD (500,15 MHz pour les spectres ^{1}H et 125,78 MHz pour les spectres ^{13}C).

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés : chloroforme-d_1 ($CDCl_3$), acétone-d_6 (CD_3COCD_3), méthanol-d_4 (CD_3OD) et diméthylsulfoxide_d_6 (DMSO-d_6). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS ; 0 ppm), utilisé comme standard interne. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en Hertz (Hz) et calculées d'après la multiplicité du signal.

La RMN 2D regroupe les spectres HSQC, HMQC, COSY, HMBC et NOESY.

- ❖ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) montrent le couplage direct ^{1}J entre un proton et le carbone qui le porte.

BY-NC-ND

- COSY (COrrelated SpectroscopY) permet de mettre en évidence les couplages homonucléaires ^{2}J (parfois ^{3}J) entre protons géminés et vicinaux.
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet d'établir les corrélations longues distances protons/carbones à travers 2, 3 et parfois jusqu'à 4 liaisons (^{2}J, ^{3}J et ^{4}J).
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) indique les interactions dipolaires homonucléaires (2 à 5 Å). Les spectres NOESY ont été enregistrés avec un temps de mélange de 600 ms pour les composés **G1** et **G2**.

La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet) et br (élargi).

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel TopSpin version 3.5 (Bruker).

IV.7. Spectre de masse haute résolution (SMHR)

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés sur 2 types d'appareils :

- un spectromètre Bruker maXis II™ UHR-qTOF MS au sein de l'ICOA, UMR CNRS 7311 de l'Université d'Orléans par le Dr. Cyril Colas.
- un spectromètre de masse Triple TOF 5600+ (AB Sciex™) équipé d'une source d'ionisation ESI contrôlé par le logiciel Analyst TF 1.7 (AB Sciex™). Réalisée par Émilie Pinault, Institut GEIST, BISCEm – Plateforme spectrométrie de masse, Université de Limoges.

BY-NC-ND

Chapitre V. Méthodes de séparation

V.1. Chromatographie sur couche mince préparative (CCM prép)

Les chromatographies préparatives sur couche mince ont été réalisées sur des plaques en verre 20 x 20 cm commerciales (60G F_{254} ; 0,25 mm, Merck Millipore ou SIL G-25 UV_{254} ; 0,25 mm, Macherey-Nagel).

V.2. Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP)

Les chromatographies liquides moyenne pression ont été réalisées sur gel de silice (15-25 µm, Macherey-Nagel) ou de silice greffée C18 (LiChroprep® 15-25 µm, Merck) avec une pompe Büchi (C-605, C-615).

V.3. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte

Les chromatographies liquides d'exclusion stérique ont été effectuées sur colonne ouverte à pression atmosphérique sur gel de Sephadex® LH-20 (Sigma Aldrich).

V.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) semi-préparative

La CLHP semi-préparatives a été réalisées sur un appareil Waters 600, couplé à un détecteur à barrette de diodes (Waters 996), une colonne de silice greffée C18 HTec (Nucleodur®, 250 x 21 mm, 10 µm, Macherey-Nagel). Après la mise au point des conditions optimales de séparation en CLHP analytique, les conditions ont été transposées à l'échelle semi-préparative.

Les échantillons sont alors solubilisés dans 100% de méthanol. Des injections successives de 20 mg ont été réalisées. Les analyses sont effectuées à un débit de 20 mL/min avec une détection UV à 300 nm. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient : A (H_2O) et B (ACN) selon les conditions suivantes : équilibration à 20% de B, augmentation progressive jusqu'à 100% de B en 15 min puis maintient à 100% de B pendant 10 min, suivi par la rééquilibration de la colonne dans les conditions initiales.

BY-NC-ND

Collaboration avec le Dr. Mehdi Beniddir, BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry.

Des réseaux moléculaires ont été générés afin de visualiser la diversité chimique de familles de molécules des différents extraits lichéniques et fongiques. Mais aussi pour cibler plus facilement les molécules pouvant être responsables de l'activité antiproliférative des différents extraits fongiques. Les réseaux moléculaires sont générés à l'aide d'une plateforme web appelée GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). Les réseaux moléculaires sont construits à partir de l'alignement des spectres MS/MS entre eux (Figure 114).

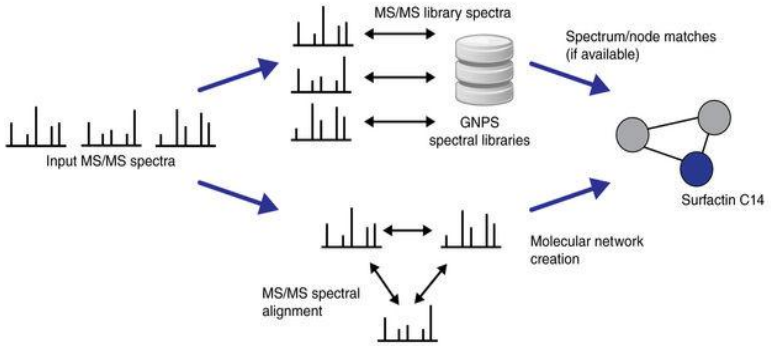


Figure 114 : Schéma représentant les principales étapes de création des réseaux moléculaires par le GNPS (Wang et *al.*, 2016)

Pour ce faire une analyse LC-MS/MS (cf. § IV.5) a d'abord été réalisée afin de collecter les données de spectrométrie de masse nécessaire à la réalisation des réseaux moléculaires. Ces données ainsi obtenues ne sont pas compatibles (extension « .d ») pour l'analyse par le GNPS. En effet, toutes les données de spectrométrie de masse doivent être dans un format universel (mzXML, mzML ou mgf) (Yang et *al.*, 2013). La première étape consiste en la conversion de l'extension « .d » en « .mzXML » par le logiciel MSConvert ou en « .mgf » par le logiciel MassHunter. Une fois la conversion réalisée, ces fichiers peuvent être transférés directement sur le GNPS ou accessible sur le GNPS *via* le logiciel « FileZilla ». Un « group mapping » peut être utilisé lorsque le nombre de fichiers à analyser est supérieur à six. Pour cela, un fichier texte doit être édité contenant les différents groupes déterminés pour l'analyse. Les paramètres par défaut du GNPS restent inchangés, à l'exception des paramètres « Tolérance de masse des ions précurseurs » (Precursor Ion Mass Tolerance) et « Tolérance de masse des ions fragments » (Fragment Ion Mass Tolerance) qui sont abaissés à 0,2 Da. Une fois tous les paramètres modifiés et les fichiers transférés, le GNPS génère une

BY-NC-ND

multitude de fichiers permettant la visualisation du réseau moléculaire produit. Les réseaux moléculaires peuvent être visualisés en ligne directement sur le site du GNPS (http://gnps.ucsd.edu) ou exportés dans un logiciel de visualisation tel que Cytoscape (version 3.5.1 ; Shannon et *al.*, 2003).

Dans Cytoscape, chaque spectre est représenté par un nœud connecté par une liaison plus ou moins épaisse dépendant de la similitude des deux spectres MS/MS entre eux suivant un score « cosine » allant de 0 (totalement différent : liaison fine) à 1 (complètement identique : liaison épaisse). La valeur du rapport *m/z* de l'ion pseudo-moléculaire du composé est indiquée à l'intérieur de chaque nœud. Les spectres n'ayant aucunes correspondances avec d'autres spectres sont représentés par des nœuds reliés à eux-mêmes.

Lors de la réalisation des réseaux moléculaires, une comparaison avec la base de données spectrale du GNPS est réalisée. Ainsi, plusieurs correspondances peuvent être identifiées permettant par la suite une première approche structurale du cluster dans lequel la molécule a été identifiée.

BY-NC-ND

VII.1. Purifications des fractions lichéniques

L'extrait DCM (2,9 g) a été fractionné par Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP) sur colonne de silice. Un dépôt à sec de l'extrait a été réalisé. Une élution par un gradient de C_6H_{12}/AcOEt 95:5 à 0:100 puis MeOH/AcOEt 50:50 à 100:0 a été effectuée. Les différentes fractions obtenues sont rassemblées suivant leur profil sur CCM. Ainsi, dix-huit fractions ont été obtenues (Figure 115).

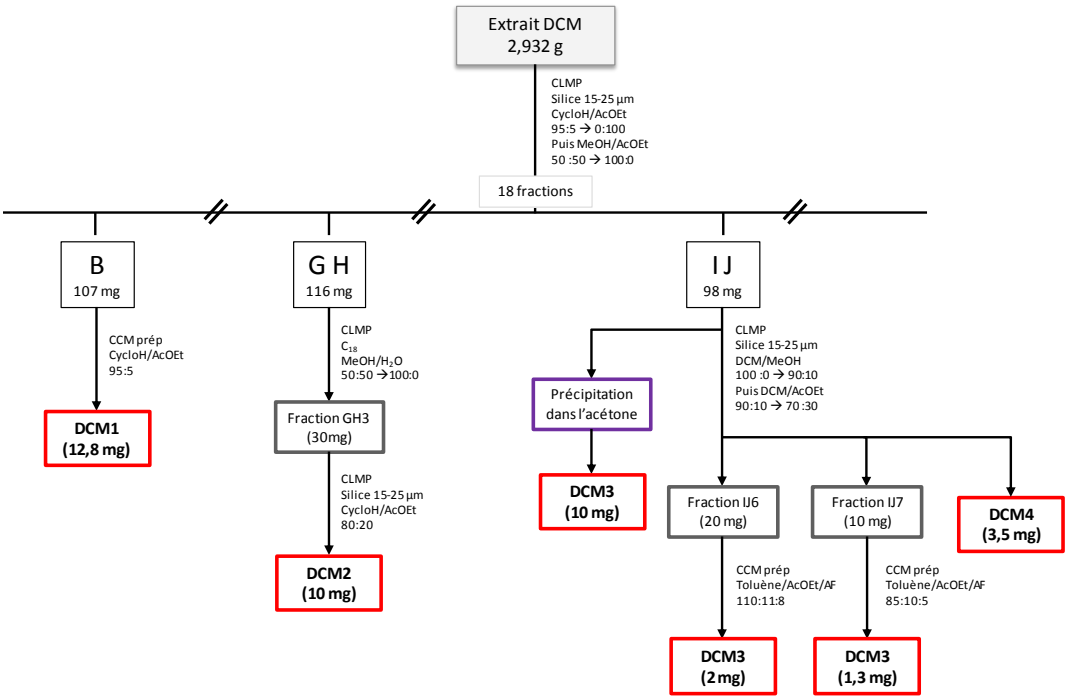


Figure 115 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DCM

La fraction B (107 mg) a été fractionnée par CCM préparative avec un mélange éluant C_6H_{12}/AcOEt 95:5. Ainsi, 7 sous-fractions ont été obtenues dont l'une a permis d'obtenir un produit pur, le composé **DCM 1** (12,8 mg).

La fraction GH (116 mg) a été fractionnée par CLMP sur silice avec un gradient MeOH/H_2O 50:50 à 100:0. Des 12 sous-fractions, la purification de GH3 par CLMP sur silice avec un mélange C_6H_{12}/AcOEt 80:20 a conduit à l'isolement d'un produit pur, le composé **DCM 2** (10 mg).

La reprise de la fraction IJ (98 mg) par l'acétone a conduit à la formation d'un précipité nommé **DCM 3** (10 mg). La partie soluble de fraction IJ (88 mg) a été fractionnée par CLMP sur silice avec un gradient CH_2Cl_2/MeOH 100:0 à 90:10 puis CH_2Cl_2/AcOEt 90:10 à 70:30. Vingt sous-fractions ont été obtenues dont une correspondant à un composé pur noté

BY-NC-ND

DCM 4 (3,5 mg). Les purifications des sous-fractions IJ6 (20 mg) et IJ7 (10 mg) par CCM préparative avec un mélange éluant Toluène/AcOEt/Acide formique 110:11:8 et Toluène/AcOEt/Acide formique 85:10: 5 respectivement ont permis l'obtention à nouveau du produit **DCM 3** (2 et 1,3 mg, respectivement).

VII.2. Purifications des fractions issues de Gir_20

L'extrait Gir_20 (1,1 g) (*Nemania aenea* var. *aureolatum*) a été fractionné sur colonne Sephadex®LH-20 et élués avec du MeOH. Après rassemblement, dix-sept sous-fractions ont été obtenues (Figure 116).

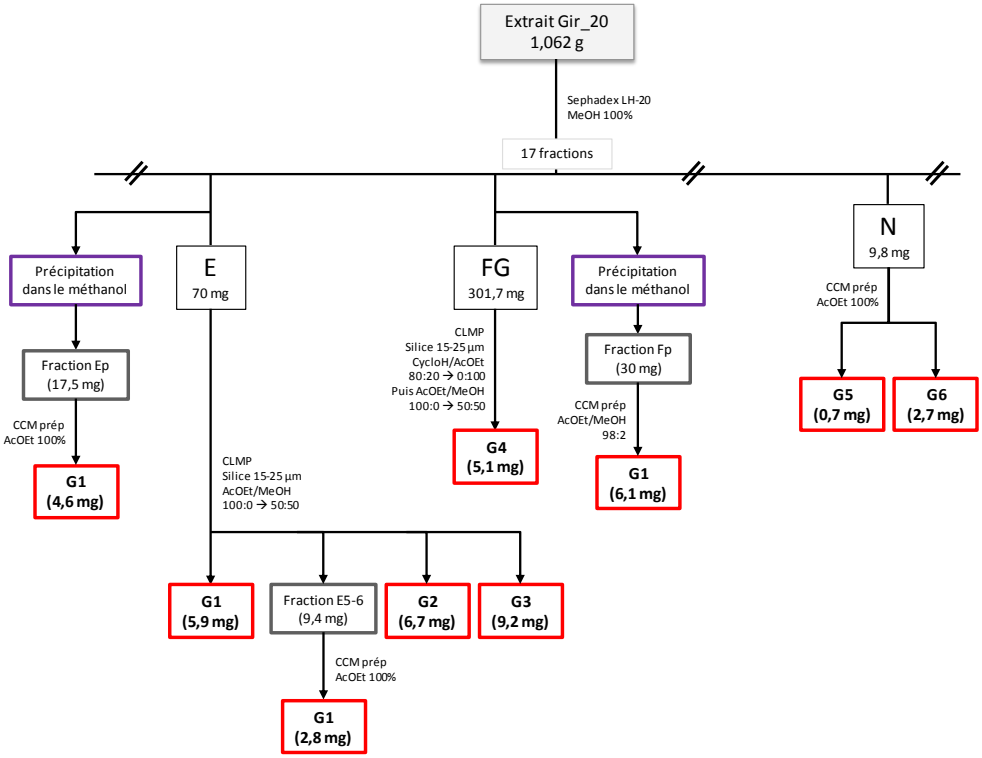


Figure 116 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait Gir_20

La reprise de la fraction E (70 mg) dans du méthanol a conduit à la formation d'un précipité. La purification de ce précipité par CCM préparative dans 100% d'acétate d'éthyle a permis l'obtention du produit **G1** (4,6 mg). La partie soluble de la fraction E (65,4 mg) a été purifiée par CLMP sur silice avec un gradient AcOEt/MeOH 100:0 à 50:50 ce qui a conduit à l'obtention de seize sous-fractions dont trois correspondant aux composés purs noté **G1** (5,9 mg) ; **G2** (6,7 mg) et **G3** (9,2 mg). La sous-fraction E5-6 a été purifiée par CCM préparative dans 100% d'acétate d'éthyle. Ainsi, quatre sous-fractions ont été obtenues dont l'une a permis d'obtenir un produit pur, le composé **G1** (2,8 mg).

BY-NC-ND

Un précipité (30 mg) s'est formé lors de la reprise de la fraction FG (301,7 mg) dans du méthanol. La purification de ce précipité par CCM préparative avec un mélange éluant AcOEt/MeOH 98:2 a permis d'isoler à nouveau le composé **G1** (6,1 mg). La partie soluble de la fraction FG (295,6 mg) a été purifiée par CLMP sur silice avec un gradient C_6H_{12}/AcOEt 80:20 à 0:100 puis AcOEt/MeOH 100:0 à 50:50 permettant ainsi l'isolement du produit pur **G4** (5,1 mg).

Les composés **G5** (0,7 mg) et **G6** (2,7 mg) ont été obtenus après CCM préparative dans 100% d'acétate d'éthyle.

VII.3. Purifications des fractions issues de Cor_08

L'extrait Cor_ 08 (*Nemania serpens*) a été fractionné sur colonne Sephadex®LH-20 et élués avec du MeOH. Après rassemblement, treize sous-fractions ont été obtenues.

L'évaluation de l'activité antiproliférative sur la lignée cellulaire HCT116 des fractions issues du fractionnement de l'extrait Cor_08 a été réalisée.

La fraction la plus active, à savoir la fraction I (106,9 mg) a été purifiée par CLHP semi-préparative (Figure 117) en phase inverse avec un gradient H_2O/ACN de 80:20 à 0:100 et un débit de 20 mL/min, permettant ainsi l'isolement des produits purs **C1** (1,4mg) ; **C2** (2,9 mg) et **C3** (4,2 mg).

Ce mode de purification a été choisi du fait de la présence de différents composés absorbant, et de la bonne séparation des composés lors de l'analyse LC-MS/MS.

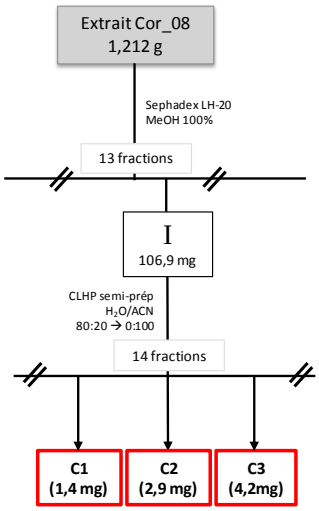


Figure 117 : Schéma récapitulatif de l'isolement des composés purs C1 ; C2 et C3 issus du fractionnement de l'extrait Cor_08

BY-NC-ND

VIII.1. Activités antiprolifératives

VIII.1.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines HT-29 et HCT116 et prostatiques humaines PC-3 et DU145 proviennent de l'American Culture Type Collection (ATCC LGC Standards, Middlesex, Royaume-Uni). Les milieux de culture utilisés sont le DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium ») et le RPMI-1640 (« Roswell Park Memorial Institute Medium ») (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL), une solution de pénicilline/streptomycine (100 U/mL et 100 µg/mL ; Gibco BRL) et d'une solution de L-glutamine à 2 mM (Gibco, BRL). Le DMEM est utilisé pour la lignée HT-29 et le RPMI-1640 pour les lignées HCT116, PC-3 et DU145. Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide avec 5% de CO_2 dans une étuve thermostatée à 37°C.

VIII.1.2. Test de viabilité cellulaire

Le test MTT est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité cellulaire. Le principe du test repose sur la transformation du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium) en cristaux de formazan (bleu-violets) par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Ce test permet de comparer la croissance cellulaire entre les cellules témoins et les cellules traitées par un extrait ou une molécule pure.

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits dans 100 µL de milieu selon une densité de 8 000 ou 5 000 cellules par puits respectivement pour les lignées cellulaires HT-29 ; HCT116 et DU145 ou PC-3. Les extraits et les molécules pures sont solubilisés dans du DMSO respectivement à 20 mg/mL et à une concentration de 1.10^{-2}M et dilués dans le milieu de culture appropriés. Après 24h de croissance cellulaire (adhésion), les cellules sont traitées suivant les gammes de concentrations finales de 3,125 à 100 µg/mL pour les extraits et de 1 µM à 50 µM pour les molécules pures. Du milieu contenant 0,5% de DMSO (correspondant à la concentration la plus élevée) est ajouté aux cellules témoins. Après 48h de traitement, 10 µL de MTT (Sigma ; 5 mg/mL dans du tampon PBS) est ajouté dans chaque puits. Après 4h d'incubation à 37°C (avec 5% de CO_2), le milieu est enlevé et la dissolution

BY-NC-ND

des cristaux de formazan est réalisée par l'ajout de 100 µL de DMSO. Une lecture de l'absorbance à 550 nm est ensuite effectuée (blanc de lecture : 100% DMSO).

Les CI_{50} (concentration qui inhibe 50% de la viabilité cellulaire) de chaque extrait ou molécule pure sont déterminées par l'équation suivante :

$$\frac{\text{DO moyenne des cellules traitées}}{\text{DO moyenne des cellules témoins}} \times 100 \ \pm \text{SEM}$$

L'analyse statistique a été réalisée grâce au test de test de Student qui permet de déterminer les différences entre les cellules traitées et les cellules témoins. Une valeur de P inférieure à 0,05 ($P < 0,05$) est considérée comme significative. Chaque condition est répétée 6 fois (réplicats techniques) par manipulation et ceci est réalisé en triplicats biologiques (n=3).

VIII.1.3. Effets des extraits sélectionnés sur les lignées cancéreuses HT-29 et PC-3

VIII.1.3.1. Observations microscopiques

Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits dans 2 mL de milieu correspondant (densité de 215 000 cellules par puits pour la lignée cellulaire HT-29 et 145 000 pour PC-3). Après 24h de croissance cellulaire (adhésion), les cellules sont traitées avec les extraits (concentrations déterminées précédemment correspondant aux CI_{50} pour chaque extrait fongique).

Après 24, 48 et 72h de traitement, les cellules ont été observées avec un microscope à contraste de phase et les images ont été prises avec un système d'acquisition d'image (Nikon, Champigny sur Marne, France).

VIII.1.3.2. Analyse de l'expression des protéines

VIII.1.3.2.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de 75 cm^2 (600 000 cellules par T75 pour PC-3 et $1,2.10^6$ cellules par T75 pour HT-29) dans les milieux correspondants. Après 24h de croissance cellulaire (adhésion), les cellules sont traitées avec les extraits Cor_08 et Gir_20 (CI_{50}). Les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées avec un tampon PBS 1X, après 24 et 48h de traitement. Les culots cellulaires peuvent alors être congelés à - 80°C si nécessaire.

BY-NC-ND

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM, pH 7,5 ; Déoxycholate de sodium 1% ; Nonidet P-40 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150 mM ; Aprotinine 20 mg/mL) contenant une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete™ Mini, Roche Diagnostics) à raison de 30 µL de RIPA complet pour 1.10^6 cellules. Après centrifugation (13 000 rpm, 20 min à 4°C), les surnageants des lysats obtenus sont récupérés et placés dans la glace ou à - 80°C avant de déterminer la concentration en protéines totales par la technique colorimétrique de Bradford (colorant : bleu de Coomassie, BioRad).

La lecture au spectrophotomètre se fait à une longueur d'onde de 595 nm couplée à celle d'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/mL).

VIII.1.3.2.2. Expression des protéines par analyse en Western blot

Une concentration en protéines préalablement déterminée (60 µg ou 80 µg) est mélangée avec de l'eau milliQ et un volume de tampon de charge 2X équivalent (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; dodécylsulfate de sodium SDS 2% ; glycérol 10% ; dithiothréitole 100 mM ; bleu de bromophénol 0,1%). Ce mélange protéique est ensuite dénaturé à 95°C pendant 5 min.

Les protéines sont séparées sur un gel d'électrophorèse à 12,5% d'acrylamide (SDS-PAGE) dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8,5 ; glycine 250 mM ; SDS 0,1%). La migration s'effectue pendant 2h à 90 V. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène fluoride ; Amersham, GE Healthcare Life sciences) préalablement trempée dans du méthanol (1 min ; sous agitation) puis rincées dans de l'eau milliQ (1 min ; sous agitation). La membrane est ensuite équilibrée dans le tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM ; Glycine 39 mM ; Méthanol 20% ; SDS 0,0037% ; pH 8,1-8,5) ainsi que le gel d'acrylamide contenant les protéines, en attendant le transfert.

Le gel d'acrylamide est ensuite mis en contact avec la membrane selon le protocole « Western Blot Xcell II™ ». Le transfert s'effectue pendant 1h30 à 100 mA constant.

Une fois le transfert réalisé, la membrane est incubée avec du tampon de saturation (TBST 0,1% (TBS 10X ; 0,1% Tween 20) ; Lait 4%) à température ambiante pendant 1h sous agitation lente afin de saturer les sites non spécifiques. Elle est ensuite mise à incuber avec les anticorps primaires dilués (selon les recommandations du fabricant ; Tableau 31) dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C sous agitation lente.

BY-NC-ND

Tableau 31 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés

Protéines	Références	Fournisseurs
Bax	sc-23959	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Bcl-2	sc-7382	Santa Cruz Biotechnology, INC.
PARP	sc-8007	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Caspase-8	#9746	Cell Signaling
Caspase-9	#9508	Cell Signaling
Caspase-3	#9668	Cell Signaling
β-actine	A1978	Sigma-Aldrich

Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon TBST avant d'être incubées 1h sous agitation lente avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG conjugués à une peroxydase. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon TBST afin d'éliminer les anticorps secondaires non fixés. La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système Immobilon (Substrat HRP Immobilon Western, Merck Millipore) et le système G:BOX (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France).

La migration d'un marqueur de poids moléculaire connu (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) permet d'estimer le poids moléculaire des protéines recherchées.

VIII.1.3.3. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de 75 cm^2 (600 000 cellules par T75 pour PC-3 et $1,2.10^6$ cellules par T75 pour HT-29) dans les milieux correspondants. Après 24h de croissance cellulaire (adhésion), les cellules sont traitées avec les extraits Cor_08 et Gir_20 (CI_{50}). Après 24 et 48h de traitement, les cellules sont récupérées, lavées au PBS 1X et un culot de 100 000 cellules par condition est récupéré puis centrifugé à 1 600 rpm pendant 5 min. Le surnageant est soigneusement enlevé, les culots cellulaires ainsi obtenus sont ensuite stockés à -20°C si nécessaire.

La fragmentation de l'ADN est quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics). Brièvement, le culot cellulaire obtenu précédemment est re-suspendu dans du tampon de lyse et incubé 30 min à température ambiante. Après centrifugation (10 min à 200 g), le surnageant est transféré dans les puits d'une plaque recouverts de stréptavidine. Un mélange d'anticorps anti-histone-biotine et d'anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase (DNA-POD) (mix immunoreagent) préparé extemporanément est ensuite ajouté dans les puits. Après incubation 2h sous agitation (300 rpm) à température ambiante, à l'abri de la lumière, plusieurs lavages sont réalisés avec le tampon d'incubation.

BY-NC-ND

Le substrat de la peroxydase : l'ABTS (2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]) permettant la réaction colorimétrique est ensuite ajoutée dans les puits. Après une incubation de 10 à 20 min à température ambiante sous agitation (250 rpm), une solution d'ABTS stop est ajoutée. La quantité d'ABTS oxydé correspond à la quantité d'ADN fragmenté. Une mesure de l'absorbance à 405 nm est réalisée contre une solution d'ABTS à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. La solution d'ABTS stop est utilisée comme blanc de lecture (longueur d'onde de référence 490 nm). Les valeurs d'absorbance de chaque extrait sont déterminées par l'équation suivante :

$$A_{extrait} = \frac{\mathrm{DO}_{405\ \mathrm{extrait}} - \mathrm{DO}_{490\ \mathrm{extrait}}}{\mathrm{DO}_{405\ \mathrm{blanc}} - \mathrm{DO}_{490\ \mathrm{blanc}}}$$

Chaque condition est réalisée en duplicats techniques et triplicats biologiques (n=3).

VIII.2. Activité anti-biofilm fongique

Ces tests ont été réalisés par le Dr. Marion Girardot, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, Équipe Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 7267 – Université de Poitiers.

Des levures (*Candida albicans* ; ATCC 36801) ont été ensemencées sur milieu Sabouraud enrichi en chloramphénicol (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) puis incubées pendant 24h à 37°C. Quelques colonies de cette culture ont ensuite été transférées dans 30 mL de milieu Yeast Nitrogen Base (Difco, Détroit, MI, USA) complémenté en glucose 50 mM (Sigma, St. Louis, MO, États Unis) noté YNB-Glc et incubées une nuit à 37°C sans agitation. Après centrifugation (10 min à 2000 rpm), le culot a été lavé avec du PBS (phosphate-buffered saline ; 0,1 M, pH 7,2) puis repris dans du milieu YNB-Glc et ajusté à une concentration de 1.10^7 blastospores/mL après dénombrement sur cellules de Kova.

Un pool de fluide buccal humain (douze volontaires sains) a été traité par le Dithiothreitol (Sigma, St. Louis, MO, USA ; 2,5 mM), agité dans la glace pendant 10 min et centrifugé 20 min à 3 000 g à 4°C (Cr3i centrifuge Jouan). Le surnageant a été dilué par trois volume d'eau distillée puis l'ensemble a été stérilisé par filtration. Cette solution stock stérile de fluide buccal à 25%, a été conservée à – 80°C. Un prétraitement des plaques 96 puits a été réalisé par l'ajout de 200 µL de fluide buccal humaine à 2% stérile, obtenues par dilution de la solution stock à 25% dans de l'eau distillée stérile. Les plaques ont alors été incubées 1h à 37°C. Ce prétraitement permet un dépôt protéique favorisant l'adhérence et la formation du biofilm. Le fluide buccal a ensuite été aspiré puis remplacé par la suspension

BY-NC-ND

de levures précédemment décrite (200 µL par puits). Les plaques ont alors été incubées 2h à 37°C (début de la phase d'adhérence des levures au support : première étape de la formation du biofilm). Les levures non adhérentes ont ensuite été éliminées par lavages successifs au PBS. Ensuite, 250 µL de YNB-Glc ainsi que 50 µL des différentes dilutions d'extraits (solution mère à 10 mg/mL solubilisée dans du DMSO ; gamme de concentrations finales de 200 à 0,09 µg/mL obtenue par dilution en cascade au demi de la solution mère dans du YNB-Glc ; les concentrations finales en DMSO n'excédaient pas 2% du volume total dans les puits) ont été ajoutés dans chaque puits. Certains puits ont été utilisés comme puits témoins (levures non traitées (témoin négatif) ou traitées avec 2% de DMSO (témoins de son innocuité)). Après 24 ou 48h d'incubation à 37°C, le milieu de culture et les levures non adhérentes ont été éliminés par aspiration et les puits ont été lavés deux fois au PBS. Ensuite, 200 µL de PBS ont été ajoutés dans chaque puits ainsi que 50 µL du réactif XTT/ménadione (Sigma ; 300 mg/L de XTT (sel de tétrazolium) et 0,13 mM de ménadione). Les plaques ont ensuite été incubées 3h à 37°C. Le principe de ce test repose sur la transformation du XTT (sel de tétrazolium) en formazan (cristaux orange) par une enzyme mitochondriale des levures. La quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de levures métaboliquement actives. De plus, le XTT a été couplé à la ménadione permettant d'accélérer la réaction et d'avoir une coloration orange plus intense.

Une lecture de l'absorbance à 450 nm (lecteur de microplaque LP400, Sanofi Diagnostics Pasteur) a ensuite été réalisée afin de déterminer les concentrations inhibant 50% du développement du biofilm (CI_{50}).

L'analyse statistique a été réalisée grâce au test de Kruskal-Wallis qui permet de déterminer les différences entre les groupes de test. Une valeur de P inférieure à 0,01 ($p < 0,01$) est considérée comme significative. Tous les tests anti-biofilm sur la phase de maturation ont été réalisés en duplicate et lors de deux expériences séparées (n=2).

VIII.3. Activité anti-biofilm bactérien

Les souches bactériennes Gram positif *Staphylococcus aureus* (CIP7625) et Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (CIP76110) sont issues de la Collection de l'Institut Pasteur de Paris (Institut Pasteur, Paris). Ces souches sont cultivées dans un milieu de culture nutritif non-sélectif (bouillon de culture TS, Tryptone-Soja, Difco) composé d'extrait de caséine pancréatique 17 g/L ; farine de soja clivée par papaïnes 3 g/L ; dextrose 2,5 g/L ; chlorure de

BY-NC-ND

sodium 5 g/L et 2,5 g/L d'hydrogénophosphate de potassium. Avant utilisation, le milieu de culture TS est stérilisé par autoclave pendant 15 min à 121°C. Les cultures bactériennes sont préparées à partir d'un inoculum à raison de 1% (v/v) de pré-culture puis incubées 24h à 37°C sous agitation orbitale à 110 rpm en condition aérobie.

VIII.3.1. Estimation de la concentration d'une suspension bactérienne

L'absorbance de la suspension bactérienne après 24h de culture à 37°C à une longueur d'onde de 600 nm a été mesurée afin d'estimer la concentration bactérienne en UFC/mL grâce à la loi de Beer-Lambert ($DO = \varepsilon \times l \times C$). Cependant, la valeur ε étant spécifique d'une souche bactérienne et du milieu de culture utilisé, celle-ci a été déterminée au préalable par corrélation indirecte entre absorbances et dilutions.

La première étape correspond à la détermination de la concentration bactérienne de la suspension après 24h de culture à 37°C. Pour cela, des dilutions en série au 1/10ème (de 10^{-1} à 10^{-4}) de la suspension bactérienne sont réalisées dans de l'eau physiologique. Deux ensemencements par dilution sont effectués à l'aide d'un ensemenceur automatique de boîtes de Pétri (easySpiral®, Interscience) sur des géloses TS Agar (Tryptic Soy à 30 g/L et 17 g/L d'agar), puis mises à incuber 24h à 37°C. Le dénombrement des colonies après incubation est réalisé grâce à une grille de comptage (Interscience). La concentration de la suspension bactérienne initiale est alors déterminée par l'équation suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies comptées}}{\text{Volume ensemencé} \times \text{facteur de dilution}} = \mathbf{C}\ (\text{en UFC.mL}^{-1})$$

La seconde étape dans la détermination de la valeur ε est l'estimation de la valeur DO_{600nm} théorique. Cette valeur est calculée grâce à la réalisation de dilutions dans le milieu de culture de la suspension bactérienne (Tableau 32) après 24h de culture à 37°C. Leurs absorbances sont ensuite lues à 600nm (le milieu de culture seul est utilisé comme blanc).

Tableau 32 : Récapitulatif des différentes dilutions utilisées pour la détermination de la valeur ε

Dilutions	1/30	1/20	1/15	1/10	1/5	3/10	2/5	1/2	3/5	4/5	1
Volume milieu (µL)	1450	950	1400	900	800	700	600	500	400	200	0
Volume suspension bactérienne (µL)	50	50	100	100	200	300	400	500	600	800	1000
Volume total (µL)	1500	1000	1500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

La courbe de corrélation DO_{600nm} mesurée = f (dilutions) est ensuite tracée (Figure 118). La DO_{600nm} théorique de la suspension bactérienne est définie par la formule suivante :

BY-NC-ND

$$\mathrm{DO}_{600\,nm}\ \text{théorique} = \frac{\mathrm{DO}_{600\,nm}\ \text{mesurée}}{\text{Dilution}}$$

Cette formule s'applique uniquement au niveau de la partie linéaire de la courbe.

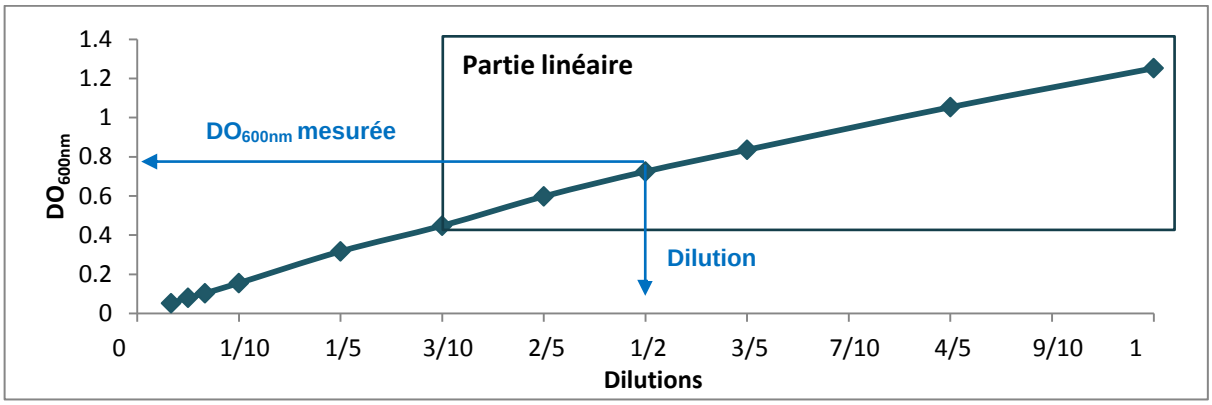


Figure 118 : Courbe de corrélation DO_{600nm} mesurée = f (dilutions) obtenue permettant la détermination de la valeur ε.

Ainsi, connaissant la concentration C de la suspension initiale (déterminée à l'étape 1) et la DO_{600nm} théorique, la valeur ε peut être déterminée par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert :

$$\varepsilon = \frac{DO_{600\,nm}\ \text{théorique}}{l \times C}$$

Ainsi déterminée, la valeur ε est utilisée pour la détermination de la concentration bactérienne de la pré-culture.

VIII.3.2. Étude de la formation de biofilm par la méthode au cristal violet et détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm

Des dilutions ont été réalisées dans le milieu de culture TS à partir de solution-mère à 20 mg/mL solubilisée dans du DMSO pour chaque extrait. La gamme de concentration finale s'étend de 3,125 à 100 µg/mL. Les différentes dilutions sont ensuite ajoutées dans les puits de plaques 96 puits à fond rond non-traité (NUNC). Les bactéries sont ensuite ensemencées par ajout de 100 µL de la pré-culture à 5.10^3 UFC/mL de *S. aureus*. Les puits témoins ont, quant à eux, été remplis soit par des bactéries non traitées, soit par du milieu de culture TS seul.

Avant incubation des plaques à 37°C, le contenu d'un puits de chaque condition expérimentale (bactéries traitées, non traitées et milieu TS seul) est prélevé en vue d'un dénombrement bactérien (temps T0 ; cf. § VIII.3.3). Après 24h d'incubation à 37°C, le contenu d'un second puits est prélevé en vue d'un dénombrement (temps T24H ; cf. § VIII.3.3).

BY-NC-ND

Les autres puits ont été rincés avec de l'eau physiologique (0,9 g de NaCl qsp 100 mL d'eau distillée) afin d'enlever les bactéries non adhérentes. Les plaques sont ensuite séchées dans une étuve à 60°C pendant 1h pour permettre la fixation des bactéries. Après fixation, 100 µL d'une solution de cristal violet 0,1% sont ajoutés dans chaque puits. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés trois fois avec de l'eau physiologique. Les plaques sont mises à sécher pendant 4h à 60°C. Le cristal violet résiduel est fixé au biofilm est solubilisé par l'ajout de 200 µL d'acide acétique 33% dans chaque puits. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante sous agitation (600 rpm) à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 595 nm avec un lecteur de microplaques.

Chaque condition est répétée 4 fois (réplicats techniques) par manipulations et ceci a été réalisé en triplicats biologiques sur des cultures bactériennes indépendantes (n=3).

VIII.3.3. Dénombrement bactérien

Des dilutions en série au 1/10ème des extraits fongiques sélectionnés sont réalisées à partir des conditions T0 et T24H (cf. § VIII.3.2). Ces différentes dilutions sont ensuite ensemencées sur milieu TS supplémenté d'agar (15 g/L) à l'aide d'un ensemenceur automatique de colonies (easySpiral®, Interscience). Après 24h d'incubation à 37°C, le comptage des colonies bactériennes est réalisé. Ainsi, la concentration minimale bactéricide (CMB) a pu être déterminée.

Chaque ensemencement a été réalisé en duplicats techniques et en triplicats biologiques sur des cultures bactériennes indépendantes (n=3).

VIII.3.4. Antibiogramme : Pseudomonas aeruginosa

Une culture de *P. aeruginosa* a été réalisée dans un milieu de culture TS après ensemencement d'un inoculum de 1% (v/v). Après 24h à 37°C sous agitation (110 rpm), une suspension bactérienne à 1.10^6 UFC/mL a été préparée puis ensemencée (1 mL) sur boîte de Pétri (milieu TS + 15 g/L d'agar). Des disques de gélose de 8 mm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce. Dans chaque puits, 50 µL de chaque extrait fongique sélectionné (100 µg/mL) sont déposés. Les témoins ont, quant à eux, été remplis par du milieu TS contenant 0,5% de DMSO. La présence d'une zone d'inhibition autour des puits permet une estimation de la CMI (concentration minimale inhibitrice) ce qui témoigne d'une activité antimicrobienne des extraits.

BY-NC-ND

VIII.4. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

Il existe de nombreuses méthodes pour observer les EROs, en fonction de leur nature. Parmi ces dernières, la RPE est régulièrement décrite dans la littérature pour l'évaluation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Clément et *al.,* 2005; Villamena et *al.,* 2008; Riou et *al.,* 2014). Les EROs étant des espèces très réactives et instables, leurs durées de vie sont extrêmement courtes et une observation directe est impossible. L'intensité lumineuse a été mesurée à l'aide d'un luxmètre (Digital Lux Tester YF-1065). Les spectres RPE ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Model ESP300E, opérant à température ambiante. De part sa forte réactivité et sa très faible durée de vie, l'anion superoxyde ne peut être mesuré directement ainsi le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide) a été utilisé comme piégeur de radicaux. En présence d'$O_2^{\cdot-}$, il va être immédiatement transformé en DMPO-OOH, molécule qui possède un signal caractéristique en RPE (Figure 119 ; Clément et *al.,* 2005).

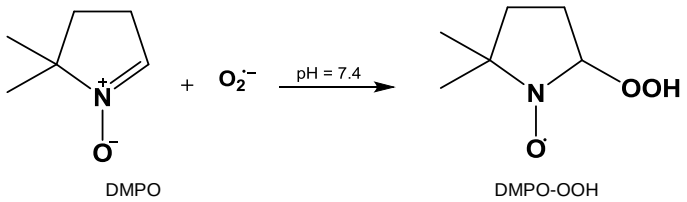


Figure 119 : Détection de l'anion superoxyde *via* le DMPO

Les différentes solutions utilisées pour la détection des anions superoxydes sont préparées extemporanément : une solution à 225 mM de DMPO dans du DMSO et une autre à 50 µM pour la molécule à tester dans un mélange DMSO/H_2O 90:10 (v/v). Ainsi, 50 µL de chaque solution sont mélangés et aussitôt transférés dans des capillaires en quartz (100 µL) et placée à 39,5 cm de la source d'irradiation, émettant une intensité lumineuse de 5 000 lux.

Les spectres RPE ont été réalisés dans les conditions suivantes :

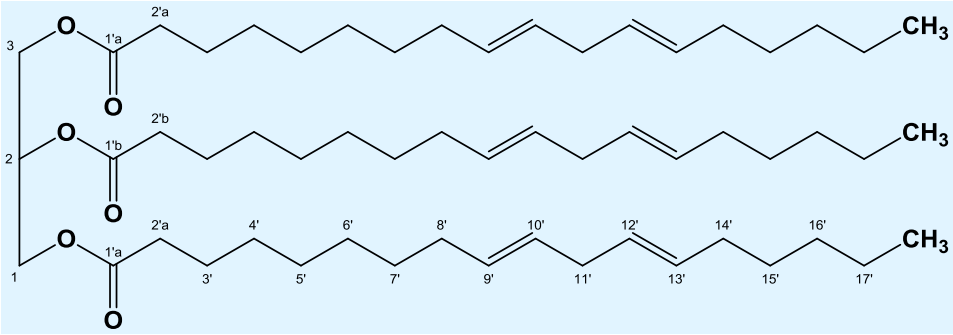
- Modulation de fréquence : 100 kHz ;
- Fréquence micro-ondes : 9,78 GHz ;
- Puissance micro-ondes : 20 mW ;
- Modulation d'amplitude : 0,987 ;
- Constante de temps : 10,24 ms ;
- Nombre de scans : 2

Pour chaque analyse, le spectre obtenu est le résultat de la somme de deux balayages successifs, afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

BY-NC-ND

IX.1. Molécules isolées de *Nephroma laevigatum*

IX.1.1. Composé DCM 1 : Trilinoléine



CCM : R_f = 0,64 (C_6H_{14}/AcOEt 90:10)
R_f = 0,17 (C_6H_{12}/AcOEt 95:5)

Coloration après révélation à l'ANS : Brun-marron

Quantité : 12,8 mg

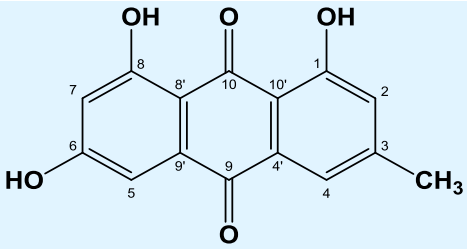
HRESIMS : *m/z* $[M+H]^+$: 879,74302 Formule brute : $C_{57}H_{98}O_6$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	α 4,29 dd (4,3 ; 11,9) β 4,14 dd (6,0 ; 11,9)	62,1	H1β ; H2 H1α ; H2	C2 ; C3 ; C1'a
2	5,26 m	68,9	H1α ; H1β	C1'b ; C1 ; C3
3	α 4,29 dd (4,3 ; 11,9) β 4,14 dd (6,0 ; 11,9)	62,1	H1β ; H2 H1α ; H2	C1'a ; C1'b ; C2 ; C3
1'a **1'b**	-	173,3 (2C) 172,8 (1C)	-	-
2'a **2'b**	2,31 t (7,5) (4H) 2,32 t (7,5) (2H)	34,0 (2C) 34,2 (1C)	H3'	C1a' ; C1b' ; C3' ; C4' – C7'
3'	1,61 m	24,9	H2' ; H4' – H7'	C1'a ; C2'a ; C2'b ; C4' – C7'
4' – 7'	1,24 – 1,37 m	29,1 – 29,7	H3' ; H8' ; H18'	C2'a ; C4' – C7' ; C3' ; C8'
8'	2,05 br q (6,8)	27,2	H10' ; H11' ; 1,24 – 1,37	C7' ; C9' ; C10'
9'	5,30 – 5,38 m	130,0	2,27 ; H8'	C10' ; C11' ; C12' ; C14'
10'	5,30 – 5,38 m	128,1	2,27 ; H8'	C11' ; C12' ; C14'
11'	2,77 br t (6,4)	25,6	5,30 – 5,38 ; H8'	C9' ; C10' ; C12' ; C13'
12'	5,30 – 5,38 m	127,9	H8' ; H11'	C10' ; C11' ; C14'
13'	5,30 – 5,38 m	130,2	H8' ; H11'	C10' ; C11' ; C12' ; C14'
14'	2,05 br q (6,8)	27,2	H11' ; H12' ; H15'	C13' ; C12' ; C15' ; C16'
15'	1,24 – 1,37 m	29,1 – 29,7	H14' ; H18'	C16' ; C14' ; C17' ; C18'
16'	1,24 – 1,37 m	31,5	H14' ; H18'	C15' ; C14' ; C17' ; C18'
17'	1,24 – 1,37 m	22,6	H14' ; 1,61 ; H18'	C16' ; C15' ; C14' ; C17' ; C18'
18'	0,89 t (6,9)	14,1	H17'	C16' ; C17'

BY-NC-ND

IX.1.2. Composé DCM 2 : Émodine



CCM : R_f = 0,68 (Toluène/AcOEt/Acide formique 70:20:5)
R_f = 0,27 (C_6H_{12}/AcOEt 80:20)

Coloration : Jaune dans le visible

Quantité : 10 mg

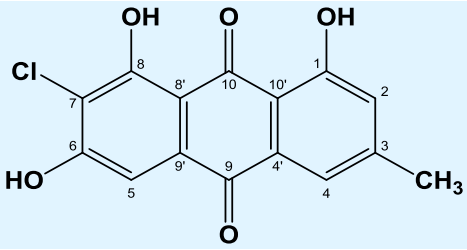
HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 269,04571 Formule brute : $C_{15}H_{10}O_5$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-d_6) et RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone-d_6).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)
1	-	163,2
2	7,12 br s	124,9
3	-	149,4
4	7,56 br s	121,5
5	7,25 d (2,3)	110,5
6	-	167,9
7	6,63 d (2,3)	108,9
8	-	166,4
9	-	182,5
10	-	191,4
4'	-	134,4
8'	-	109,9
9'	-	136,6
10'	-	114,7
OH-1	12,15 br s	-
OH-6	12,15 br s	-
OH-8	12,15 br s	-
3-CH_3	2,46 s	22,1

BY-NC-ND

IX.1.3. Composé DCM 3 : 7-chloroémodine



CCM : R_f = 0,70 (Toluène/AcOEt/Acide formique 70:20:5)
R_f = 0,66 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5)

Coloration : Jaune dans le visible

Quantité : 13,3 mg

HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 303,00676 Formule brute : $C_{15}H_9ClO_5$

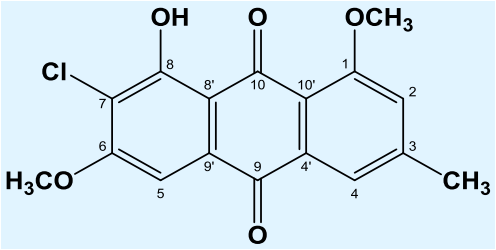
RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (COSY et HMBC).

Position	δH	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	163,5	-	-
2	7,06 br s	125,2	H4 ; 3-CH_3	C1 ; C4 ; C10' ; 3-CH_3
3	-	149,2	-	-
4	7,53 br s	121,6	H2 ; 3-CH_3	C2 ; C9 ; C10' ; 3-CH_3
5	7,18 s	112,7	-	C7 ; C9 ; C8' ; C9'
6	-	168,5	-	-
7	-	115,5	-	-
8	-	162,2	-	-
9	-	183,8	-	-
10	-	190,4	-	-
4'	-	134,8	-	-
8'	-	108,3	-	-
9'	-	133,9	-	-
10'	-	115,3	-	-
3-CH_3	2,42 s	22,1	H2 ; H4	C2 ; C3 ; C4

BY-NC-ND

IX.1.4. Composé DCM 4 : 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine

Aussi appelé 1-*O*-méthylfragiline ou 7-chloro-1,6-diméthoxy-émodine



CCM : R_f = 0,66 (Toluène/AcOEt/Acide formique 70:20:5)
R_f = 0,38 (CH_2Cl_2/MeOH 99:1)

Coloration : Jaune pale dans le visible

Quantité : 3,5 mg

HRESIMS : *m/z* $[M+H]^+$: 333,05233 Formule brute : $C_{17}H_{13}ClO_5$

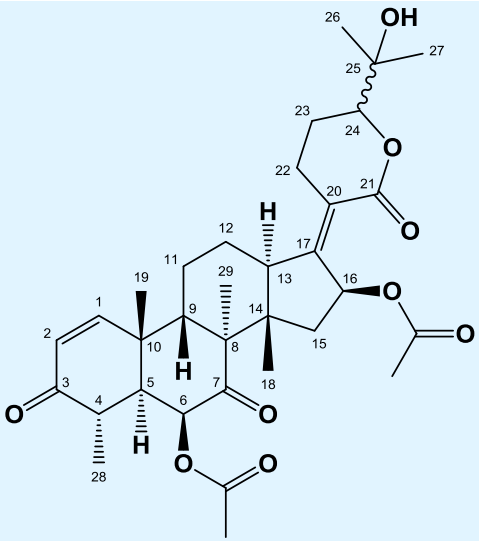
RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) et RMN 2D (COSY et HMBC).

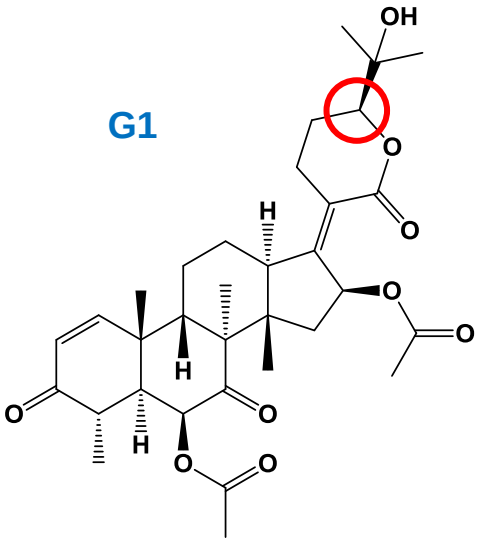
Position	δH	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	161,1	-	-
2	7,16 br s	119,0	H4 ; 3-CH_3	C1 ; C3 ; C4 ; C10' ; 3-CH_3
3	-	147,5	-	-
4	7,76 br s	121,2	H2 ; 3-CH_3	C2 ; C9 ; C10' ; 3-CH_3
5	7,38 s	101,8	-	C6 ; C7 ; C9 ; C10 ; C8' ; C9'
6	-	160,5	-	-
7	-	116,4	-	-
8	-	159,9	-	-
9	-	182,5	-	-
10	-	187,4	-	-
4'	-	135,1	-	-
8'	-	112,4	-	-
9'	-	131,6	-	-
10'	-	118,1	-	-
OH-8	13,77 s	-	-	C7 ; C8 ; C8'
1-OCH_3	4,06 s	56,6	-	C1
6-OCH_3	4,08 s	56,9	-	C6
3-CH_3	2,52 s	22,4	H2 ; H4	C2 ; C3 ; C4

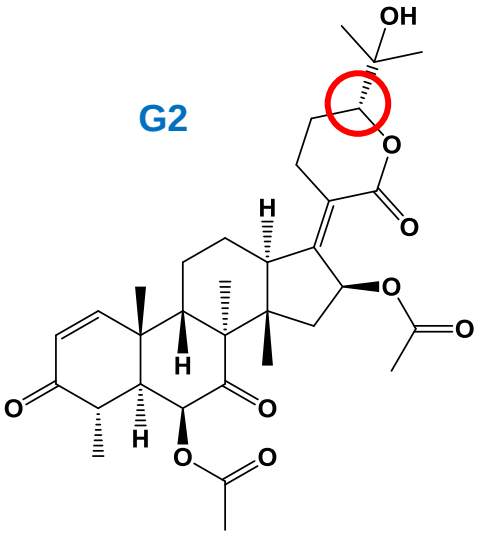
BY-NC-ND

IX.2. Molécules isolées de *Nemania aenea* var. *aureolatum*

IX.2.1. Composés G1 et G2 : Nordammaranes triterpènes







CCM :

Valeurs des R_f	AcOEt 100%	AcOEt/MeOH 98:2
G1	0,48	0,50
G2	0,36	0,40

Coloration après révélation à l'ANS : Bleu

Quantité : **G1** = 19,4 mg

G2 = 6,7 mg

HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 583,2844 Formule brute : $C_{33}H_{44}O_9$

BY-NC-ND

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) et RMN 2D (COSY ; HMBC et NOESY) du composé G1

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	7,29 d (10,0)	156,9	H2	C3 ; C5 ; C10	H2 ; H11a ; H11b ; CH_3-19 ; CH_3-29
2	5,87 d (10,0)	127,9	H1	C10	H1
3	-	201,2	-	-	-
4	2,77 dq (6,8 ; 12,2)	40,4	H5 ; CH_3-28	C3 ; C5 ; C6 ; C10 ; C28	CH_3-19 ; CH_3-26
5	2,28 br d (12,2)	47,3	H4 ; H6	C1 ; C3 ; C4 ; C7 ; C10 ; C19	H6 ; CH_3-29
6	5,25 br s	73,8	H5	C7 ; C8 ; C10 ; C30	H5 ; CH_3-28 ; CH_3-29
7	-	208,5	-	-	-
8	-	52,7	-	-	-
9	2,62 br dd (2,5 ; 13,1)	41,8	H11a	C1 ; C8 ; C10 ; C29	H11a ; CH_3-18 ; CH_3-19 ; CH_3-29
10	-	38,2	-	-	
11b	1,98 m	24,0	H11a	C13	H1 ; H22b ; CH_3-18 ; CH_3-19
11a	1,61 br ddd (3,5 ; 13,0 ; 25,6)	24,0	H9 ; H12a ; H12b ; H11b	C13	H1 ; H9; H12b ; H22b ; H23b
12b	2,45 dd (3,1 ; 12,6)	25,8	H11a ; H12a	-	H11a ; H12a
12a	1,86 ddd (3,5 ; 12,4 ; 25,0)	25,8	H11b ; H12b ; H13	-	H22b ; H12b
13	2,65 m	50,2	H12b	C8 ; C12; C18	H23b ; CH_3-29
14	-	46,5	-	-	-
15b	2,26 m	40,6	H15a ; H16	C14 ; C16 ; C18	H6 ; H16 ; CH_3-29
15a	1,97 m	40,6	H15b	C13 ; C14 ; C16 ; C17; C18	H13 ; H16 ; CH_3-18
16	6,00 br d (8,3)	72,7	H15b	C14 ; C17 ; C20 ; C31	H15b ; H15a ou 16-CH_3CO
17	-	151,5	-	-	-
18	0,96 s	18,2	-	C8 ; C14 ; C15	H9 ; 6-CH_3CO; 16-CH_3CO
19	1,44 s	27,6	-	C1 ; C5 ; C9 ; C10	H1 ; H4 ; H9 ; H23b
20	-	123,8	-	-	-
21	-	167,8	-	-	-
22b	2,95 br dd (9,1 ; 16,9)	22,8	H22a ; H23a; H23b	C17 ; C20 ; C21 ; C23	H11a ; H12a ; H23b ; H24
22a	2,58 m	22,8	H22b ; H23a		H16
23b	1,98 m	23,4	H22a ; H23b	C20 ; C24	H24
23a	1,75 ddd (9,7 ; 11,7 ; 21,7)	23,4	H22a ; H22b ; H23 ; H24	C20 ; C24	H22b ; H24
24	3,92 dd (1,9 ; 11,5)	83,7	H23b	C22 ; C25	H13 ; H22b; H23b; H23a; CH_3-26; CH_3-27
25	-	71,0	-	-	-
26	1,29 s	25,6	-	C24 ; C25 ; C27	H24
27	1,25 s	24,6	-	C24 ; C25 ; C26	H24
28	1,29 br d (6,8)	13,1	H4	C3 ; C4 ; C5	H6 ; H4
29	1,19 s	18,3	-	C7 ; C8 ; C9 ; C14	H1 ; H6 ; H13 ; H5
6-CO	-	168,7	-	-	-
6-CH_3CO	2,11 s	20,7	-	6-CO	H6
16-CO	-	169,8	-	-	-
16-CH_3CO	1,96 s	20,3	-	16-CO	CH_3-18

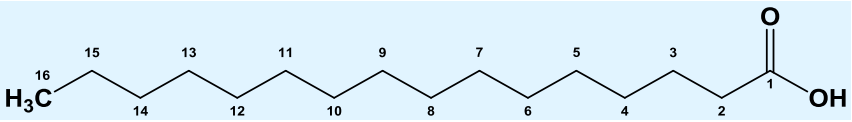
BY-NC-ND

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) et RMN 2D (COSY ; HMBC et NOESY) du composé G2

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	7,29 d (10,0)	156,9	H2	C3 ; C5 ; C9 ; C10, C19	H-2 ; H-11a ; CH_3-19
2	5,87 d (10,0)	127,9	H1	C4 ; C10	H-1
3	-	201,2	-	-	-
4	2,77 dq (6,8 ; 12,4)	40,4	H5; CH_3-28	C3 ; C5 ; C6 ; C10 ; C28	H-6 ; CH_3-19
5	2,29 dd (0,8 ; 12,4)	47,3	H4 ; H6	C1 ; C3 ; C4 ; C7 ; C10 ; C19 ; C28	H-6 ; CH_3-28; CH_3-29
6	5,25 br s	73,7	H5	C5 ; C7 ; C8 ; C10 ; 6-C0	H-4 ; H-5 ; CH_3-28 ; 6-CH_3CO
7	-	208,5	-	-	-
8	-	52,7	-	-	-
9	2,65 dd (2,6 ; 12,9)	41,6	H11a	C1 ; C8 ; C10 ; C11 ; C29	CH_3-18 ; CH_3-19 ; CH_3-29
10	-	38,1	-	-	-
11b	2,07 m	24,0	H12b	C13	-
11a	1,62 ddd (3,5 ; 12,8 ; 25,8)	24,0	H9 ; H12b	C8	H-1
12b	2,50 dd (2,8 ; 12,5)	26,5	H11a; H11b ; H12a	C14	H-22b ; H-12a
12a	1,85 ddd (3,4 ; 12,5 ; 25,0)	26,5	H12b ; H13	C13	H-12b ; CH_3-18
13	2,64 m	51,4	H12a	C15 ; C17 ; C18 ; C20	CH_3-29 ; CH_3-18
14	-	46,9	-	-	-
15b	2,18 dd (8,3 ; 14,2)	40,9	H15a; H16	C8 ; C14 ; C18	H-16
15a	2,06 m	40,9	H15b	C13 ; C14 ; C16 ; C17 ; C18	H-16 ; CH_3-18
16	5,98 br d (7,8)	73,5	H15b	C13 ; C14 ; C17 ; C20 ; 16-CO	H-15b ; H-15a ; 16-CO
17	-	154,5	-	-	-
18	1,00 s	18,5	-	C8 ; C14 ; C15	H-9 ; H-13 ; H-12a ; H-15a
19	1,45 s	27,6	-	C1 ; C5 ; C9 ; C10	H-1 ; H-4 ; H-9
20	-	125,3	-	-	-
21	-	164,8	-	-	-
22b	3,11 m	24,6	H22a ; H23a	C17 ; C20 ; C21 ; C24	H-12b ; H-22a
22a	2,44 m	24,6	H22b ; H23b	-	H-24 ; H-22b
23b	1,98 m	23,9	H22a	-	-
23a	1,75 ddd (4,5 ; 13,1 ; 24,2)	23,9	H22b ; H24	C20 ; C22 ; C24 ; C25	-
24	4,10 dd (3,9 ; 10,9)	85,2	H23a	C22 ; C25	H22a ; CH_3-26 ; CH_3-27
25	-	71,8	-	-	-
26	1,28 s	25,7	-	C24 ; C25 ; C27	H-24
27	1,22 s	24,2	-	C24 ; C25 ; C26	H-24
28	1,29 d (6,8)	13,1	H4	C3 ; C4 ; C5	H-4 ; H-5 ; H-6
29	1,18 s	18,2	-	C7 ; C8 ; C9 ; C14	H-5; H-9 ; H-13
6-CO	-	168,8	-	-	-
6-CH_3CO	2,12 s	20,8	-	6-CO	H-6
16-CO	-	169,7	-	-	-
16-CH_3CO	1,99 s	20,7	-	16-CO	H-16

BY-NC-ND

IX.2.2. Composé G4 : Acide palmitique



Coloration après révélation à l'ANS : brun-marron

Quantité : 5,1 mg

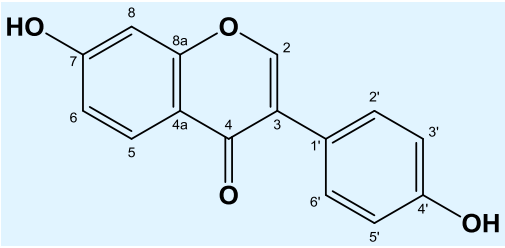
HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 255,2381 Formule brute : $C_{16}H_{32}O_2$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY
1	-	178,8	
2	2,35 t (7,5)	33,8	H3
3	1,63 m	24,7	H2 ; H4– H13
4 – 13	1,26 – 1,34m	29,7 – 29,1	H3 ; H14
14	1,27 m	31,9	H4– H13 ; H15
15	1,29 m	22,7	H14 ; H16
16	0,88 t (7,1)	14,1	H15

BY-NC-ND

IX.2.3. Composé G5 : Daidzéine



CCM : R_f = 0,72 (AcOEt 100%)

R_f = 0,29 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5)

Coloration après révélation à l'ANS : incolore

Quantité : 0,7 mg

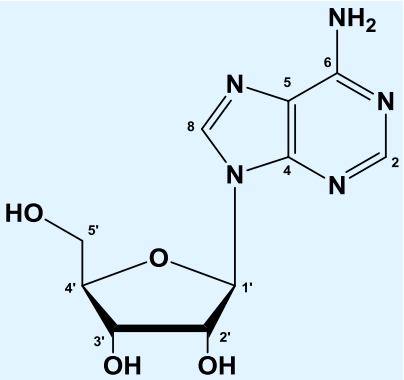
HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 253,0394 Formule brute : $C_{15}H_{10}O_4$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (HMBC).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	HMBC
2	8,12 s	154,8	C3 ; C4 ; C8a
3	-	126,1	-
4	-	178,4	-
5	8,05 d (8,8)	128,6	C4 ; C7 ; C8a
6	6,93 dd (8,8 ; 2,3)	116,8	C8 ; C4a
7	-	165,2	-
8	6,84 d (2,3)	103,4	C7
8a	-	160,0	-
4a	-	118,2	-
1'	-	124,5	-
2'	7,37 d (8,8)	131,6	C3 ; C4' ; C6'
3'	6,85 d (8,8)	116,4	C1' ; C4' ; C6'
4'	-	158,8	-
5'	6,85 d (8,8)	116,4	C1' ; C3' ; C4'
6'	7,37 d (8,8)	131,6	C3 ; C2' ; C4'

BY-NC-ND

IX.2.4. Composé G6 : Adénosine



Quantité : 2,7 mg

HRESIMS : *m/z* $[M+H]^+$: 268,1059 Formule brute : $C_{10}H_{13}N_5O_4$

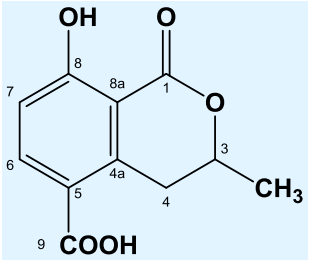
RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (COSY et HMBC).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
2	8,18 br s	153,7	-	C4 ; C6
4	-	150,4	-	-
5	-	116,0	-	-
6	-	157,8	-	-
8	8,31 s	142,2	-	-
1'	5,97 d (6,2)	91,4	H2'	C4 ; C8 ; C4'
2'	4,74 br t (5,6)	75,6	H1' ; H3'	C1'
3'	4,33 dd (2,5 ; 4,9)	72,8	H2' ; H4'	C1' ; C5'
4'	4,17 br d (2,3)	88,3	H3' ; H5'α ; H5'β	C3'
5'	α 3,88 dd (2,3 ; 12,5) β 3,75 dd (2,3 ; 12,5)	63,6	H4' ; H5'β H3' ; H5'α	C4' ; C3'

BY-NC-ND

IX.3. Molécules isolées de *Nemania serpens*

IX.3.1. Composé C1 : 5-carboxyméllèine



CCM : R_f = 0,41 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10)

R_f = 0,52 (Toluène/AcOEt/Acide formique 70:20:5)

Coloration après révélation à l'ANS : incolore

Quantité : 1,4 mg

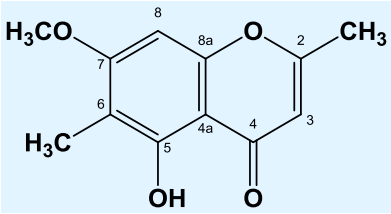
HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 221,0368 Formule brute : $C_{11}H_{10}O_5$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (COSY et HMBC).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	171,8	-	-
3	4,70 m	77,3	H4β ; H4α ; 3-CH_3	-
4	α 3,86 dd (3,0 ; 17,7) β 3,02 dd (11,7 ; 17,7)	34,0	H3 ; H4β H3 ; H4α	C4a ; C5 ; C8a C4a ; C5 ; C8a ; C3 ; C9
5	-	110,0	-	-
6	6,91 d (8,8)	116,7	H7	C5 ; C8 ; C8a
7	8,09 d (8,8)	139,7	H6	C9 ; C8 ; C4a
8	-	166,0	-	-
9	-	170,5	-	-
4a	-	144,2	-	-
8a	-	123,2	-	-
3-CH_3	1,51 d (6,3)	21,1	H3	C3 ; C4

BY-NC-ND

IX.3.2. Composé C2 : Eugénitine



CCM : R_f = 0,87 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10)

R_f = 0,59 (Toluène/AcOEt/Acide formique 70:20:5)

Coloration après révélation à l'ANS : incolore

Quantité : 2,9 mg

HRESIMS : *m/z* $[M+H]^+$: 221,0840 Formule brute : $C_{12}H_{12}O_4$

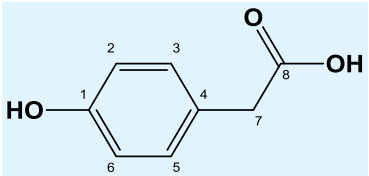
RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (COSY et HMBC).

Position	δH (J en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
2	-	169,5	-	-
3	6,11 d (0,6)	109,4	2-CH_3	C2 ; C4 ; C4a ; 2-CH_3
4	-	184,3	-	-
5	-	159,3	-	-
6	-	109,9	-	-
7	-	165,3	-	-
8	6,58 s	90,8	-	C4 ; C6 ; C7 ; C8a ; C4a ; 6-CH_3
4a	-	105,8	-	-
8a	-	158,2	-	-
2-CH_3	2,39 d (0,6)	20,4	H3	C2 ; C3
6-CH_3	2,04 s	7,4	-	C7 ; C5 ; C6 ; C8
7-OCH_3	3,91 s	56,7	-	C7 ; C8

BY-NC-ND

IX.3.3. Composé C3 : Acide *para*-hydroxyphénylacétique

Acide 4-hydroxyphénylacétique



Quantité : 4,2 mg

HRESIMS : *m/z* $[M-H]^-$: 151,0322 Formule brute : $C_8H_8O_3$

RMN : Déplacements chimiques RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) et RMN 2D (COSY et HMBC).

Position	δH (*J* en Hz)	δC (ppm)	COSY	HMBC
1	-	157,5	-	-
2	6,72 d (8,5)	116,3	H3	C1 ; C4 ; C6
3	7,09 d (8,4)	131,4	H2	C1 ; C5 ; C7
4	-	127,3	-	-
5	7,09 d (8,4)	131,4	H6	C1 ; C3 ; C7
6	6,72 d (8,5)	116,3	H5	C1 ; C2 ; C4
7	3,47 s	41,7	-	C4 ; C5 ; C8
8	-	176,8	-	-

BY-NC-ND

Références bibliographiques

A

Afiyatullov, S.S., Zhuravleva, O.I., Antonov, A.S., Kalinovsky, A.I., Pivkin, M.V., Menchinskaya, E.S., and Aminin, D.L. (2012). New metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus*. Nat. Prod. Commun. *7*, 497–500.

Ahmadjian, V. (1995). Lichens are more important than you think. BioScience *45*, 124–124.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. *215*, 403–410.

Aptroot, A. (2001). Lichenized and saprobic fungal biodiversity of a single *Elaeocarpus* tree in Papua New Guinea, with the report of 200 species of ascomycetes associated with one tree. Fungal Divers. *6*, 1–11.

Arnold, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biol. Rev. *21*, 51–66.

Arnold, A.E., and Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology *88*, 541–549.

Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Higgins, K.L., Sarvate, S.D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V., Kauff, F., and Lutzoni, F. (2009). A phylogenetic estimation of trophic transition networks for Ascomycetous fungi: Are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? Syst. Biol. *58*, 283–297.

Asahina, Y., and Shibata, S. (1954). Chemistry of lichen substances. Jpn. Soc. Promot. Sci.

Aubert, S., Juge, C., Boisson, A.-M., Gout, E., and Bligny, R. (2007). Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. Planta *226*, 1287–1297.

Azimova, S.S., and Vinogradova, V.I. (2013). Natural compounds: Flavonoids plant sources, structure and properties (New York, NY: Springer).

B

Baltazar, L.M., Ray, A., Santos, D.A., Cisalpino, P.S., Friedman, A.J., and Nosanchuk, J.D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. Front. Microbiol. *6*.

Biosca, E.G., Flores, R., Santander, R.D., Díez-Gil, J.L., and Barreno, E. (2016). Innovation approaches using lichen enriched media to improve isolation and culturability of lichen associated bacteria. PLoSOne *11*, e0160328.

Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. Chem Bio Chem *3*, 619–627.

Boustie, J., and Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genet. Resour. Charact. Util. *3*, 273–287.

BY-NC-ND

Brodo, I.M. (1973). 12 - Substrate Ecology. In The Lichens, V. Ahmadjian, and M.E. Hale, eds. (New York: Academic Press), pp. 401–441.

Bruun, T. (1976). Aliphatic compounds in some lichens. Phytochemistry *15*, 1261–1263.

Bulama, J.S., Dangoggo, S.M., and Mathias, S.N. (2015). Isolation and characterization of beta-sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of Terminalia glaucescens. Inter J Sc Res Pub *5*, 1–3.

Bull. d'inform. AFL, 1998 Bulletin d'information de l'Association Française de Lichénologie - 1998 - 23(1) Paris ISSN 0150-0171.

C

Chen, G.-D., Chen, Y., Gao, H., Shen, L.-Q., Wu, Y., Li, X.-X., Li, Y., Guo, L.-D., Cen, Y.-Z., and Yao, X.-S. (2013). Xanthoquinodins from the endolichenic fungal strain *Chaetomium elatum*. J. Nat. Prod. *76*, 702–709.

Chen, G.-D., Bao, Y.-R., Huang, Y.-F., Hu, D., Li, X.-X., Guo, L.-D., Li, J., Yao, X.-S., and Gao, H. (2014). Three pairs of variecolortide enantiomers from *Eurotium* sp. with caspase-3 inhibitory activity. Fitoterapia *92*, 252–259.

Chou, P.-Y., Huang, G.-J., Pan, C.-H., Chien, Y.-C., Chen, Y.-Y., Wu, C.-H., Sheu, M.-J., and Cheng, H.-C. (2011). Trilinolein inhibits proliferation of human non-small cell lung carcinoma A549 through the modulation of PI3K/Akt pathway. Am. J. Chin. Med. *39*, 803–815.

Christian, N., Sullivan, C., Visser, N.D., and Clay, K. (2016). Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. Microb. Ecol. *72*, 621–632.

Ciuffreda, P., Casati, S., and Manzocchi, A. (2007). Complete ^{1}H and ^{13}C NMR spectral assignment of *α*- and *β*-adenosine, 2′-deoxyadenosine and their acetate derivatives. Magn. Reson. Chem. *45*, 781–784.

Clément, J.-L., Ferré, N., Siri, D., Karoui, H., Rockenbauer, A., and Tordo, P. (2005). Assignment of the EPR spectrum of 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N* -oxide (DMPO) superoxide spin adduct †. J. Org. Chem. *70*, 1198–1203.

Cohen, P.A., and Towers, G.H.N. (1995). Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. J. Nat. Prod. *58*, 520–526.

Cohen, P.A., and Towers, G.H.N. (1996). Biosynthetic studies on chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*. Phytochemistry *42*, 1325–1329.

Cohen, P.A., Hudson, J.B., and Towers, G.H.N. (1996). Antiviral activities of anthraquinones, bianthrones and hypericin derivatives from lichens. Cell. Mol. Life Sci. *52*, 180–183.

Crawford, S.D. (2015). 2 - Lichens used in traditional medicine. In Lichen Secondary Metabolites, B. Ranković, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 27–80.

Crittenden, P.D., David, J.C., Hawksworth, D.L., and Campbell, F.S. (1995). Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. New Phytol. *130*, 267–297.

Culberson, C.F., and Elix, J.A. (1989). Lichen substances. In Methods in Plant Biochemistry, (Academic Press, London: Dly, P. M.; Harbourne, J. A.), pp. 509–535.

BY-NC-ND

D

De Alvarenga, M.A., Braz Fo, R., Gottlieb, O.R., De P. Dias, J.P., Magalhães, A.F., Magalhães, E.G., De Magalhães, G.C., Magalhães, M.T., Maia, J.G.S., Marques, R., et al. (1978). Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi*. Phytochemistry *17*, 511–516.

Delebassée, S., Mambu, L., Pinault, E., Champavier, Y., Liagre, B., and Millot, M. (2017). Cytochalasin E in the lichen *Pleurosticta acetabulum*. Anti-proliferative activity against human HT-29 colorectal cancer cells and quantitative variability. Fitoterapia *121*, 146–151.

Dou, Y., Wang, X., Jiang, D., Wang, H., Jiao, Y., Lou, H., and Wang, X. (2014). Metabolites from *Aspergillus versicolor*, an endolichenic fungus from the lichen *Lobaria retigera*. Drug Discov. Ther. *8*, 84–88.

Dzwigaj, S., and Pezerat, H. (1995). Singlet oxygen-trapping reaction as a method of $^1O_2$ detection: role of some reducing agents. Free Radic. Res. *23*, 103–115.

E

Elix, J.A. (2014). A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. Canberra 3rd Ed. Publ. Author.

Elix, J.A., and Stocker-Wörgötter, E. (2008). 7 - Biochemistry and secondary metabolites. In Lichen Biology Second Edition, T.H. Nash, ed. (Cambridge University Press), pp. 104–133.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. *35*, 495–516.

F

Favre-Bonvin, J., Bernillon, J., Salin, N., and Arpin, N. (1987). Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. Phytochemistry *26*, 2509–2514.

Feuerer, T., and Hawksworth, D.L. (2007). Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. Biodivers. Conserv. *16*, 85–98.

Fox, C.H., and Huneck, S. (1969). The formation of roccellic acid, eugenitol, eugenetin, and rupicolon by the mycobiont *Lecanora rupicola*. Phytochemistry *8*, 1301–1304.

Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., and Tuor, U. (1999). The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 3727–3729.

G

Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N.P., and Heber, D. (2006). Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. J. Nutr. *136*, 52–57.

García, P.A., De Oliveira, A.B., and Batista, R. (2007). Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. Molecules *12*, 455–483.

BY-NC-ND

Gill, M. (2003). Pigments of fungi (Macromycetes). Nat. Prod. Rep. *20*, 615.

Girlanda, M., Isocrono, D., Bianco, C., and Luppi-Mosca, A.M. (1997). Two foliose lichens as microfungal ecological niches. Mycologia *89*, 531.

Gracin, S., and Fischer, A. (2005). 4-Hydroxyphenylacetic acid. Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online *61*, o1919–o1920.

Grube, M., Cardinale, M., de Castro Jr, J.V., Müller, H., and Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. ISME J. *3*, 1105.

Guo, L.D., Hyde, K.D., and Liew, E.C.Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New Phytol. *147*, 617–630.

Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y., He, W.H., Zheng, W.H., and Hyde, K.D. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. Mycol. Res. *107*, 680–688.

H

Hamblin, M.R., and Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem. Photobiol. Sci. *3*, 436.

Hansen, K., Læssøe, T., and Pfister, D.H. (2002). Phylogenetic diversity in the core group of *Peziza* inferred from ITS sequences and morphology. Mycol. Res. *106*, 879–902.

Hesse, O. (1912). Die Flechtenstoffe. In Biochemisches Handlexikon, (New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GMBH), pp. 32–144.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. *111*, 509–547.

Hickey, B.J., Lumsden, A.J., Cole, A.L.J., and Walker, J.R.L. (1990). Antibiotic compounds from New Zealand plants: methyl haematommate, an anti-fungal agent from *Stereocaulon ramulosum*. N. Z. Nat Sci *17*, 49–53.

Honegger, R. (2012). 15 - The symbiotic phenotype of lichen-forming Ascomycetes and their endo- and epibionts. In Fungal Associations, B. Hock, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 287–339.

Honegger, R., Axe, L., and Edwards, D. (2013). Bacterial epibionts and endolichenic actinobacteria and fungi in the Lower Devonian lichen *Chlorolichenomycites salopensis*. Fungal Biol. *117*, 512–518.

Horton, T.R., and Bruns, T.D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Mol. Ecol. *10*, 1855–1871.

Hsieh, H.-M., Lin, C.-R., Fang, M.-J., Rogers, J.D., Fournier, J., Lechat, C., and Ju, Y.-M. (2010). Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and phylogeny of the taxa involved in the subfamily. Mol. Phylogenet. Evol. *54*, 957–969.

BY-NC-ND

Huang, X., Wang, J., Huang, C., Chen, Y., Shi, G., Hu, Q., and Yi, J. (2008). Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells: the mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1. Cancer Biol. Ther. *7*, 468–475.

Huang, Z., Yang, J., She, Z., and Lin, Y. (2012). A new isoflavone from the mangrove endophytic fungus *Fusarium* sp. (ZZF60). Nat. Prod. Res. *26*, 11–15.

Huneck, S., and Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances (Berlin, Heidelberg: Springer).

Hyvärinen, M., Koopmann, R., Hormi, O., and Tuomi, J. (2000). Phenols in reproductive and somatic structures of lichens: a case of optimal defence? Oikos *91*, 371–375.

I

Ibrahim, A., Sørensen, D., Jenkins, H.A., Ejim, L., Capretta, A., and Sumarah, M.W. (2017). Epoxynemanione A, nemanifuranones A–F, and nemanilactones A–C, from *Nemania serpens* , an endophytic fungus isolated from Riesling grapevines. Phytochemistry *140*, 16–26.

Institut national du cancer (2017). Les cancers en France en 2016 - L'essentiel des faits et chiffres.

J

James, P.W., and White, F.J. (1987). Studies on the genus *Nephroma* I. The European and Macaronesian species. The Lichenologist *19*, 215–268.

Johansen, J.D. (2002). Contact allergy to fragrances: clinical and experimental investigations of all the fragrance mix and its ingredients. Contact Dermatitis *46*, 4–31.

Joulain, D., and Tabacchi, R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. Flavour Fragr. J. *24*, 49–61.

K

Kannangara, B.T.S.D.P., Rajapaksha, R.S.C.G., and Paranagama, P.A. (2009). Nature and bioactivities of endolichenic fungi in *Pseudocyphellaria* sp. *, Parmotrema* sp. and *Usnea* sp. at Hakgala montane forest in Sri Lanka. Lett. Appl. Microbiol. *48*, 203–209.

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Prajuabsuk, T., Soytong, K., Kongsaeree, P., and Suksamrarn, A. (2003). A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. Planta Med. *69*, 568–571.

Kellogg, J.J., and Raja, H.A. (2016). Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. Phytochem. Rev. *16*, 271–293.

Kim, K.H., Beemelmanns, C., Murillo, C., Guillén, A., Umaña, L., Tamayo-Castillo, G., Kim, S.-N., Clardy, J., and Cao, S. (2014). Naphthalenones and isocoumarins from a Costa Rican fungus *Xylariaceae* sp. CR1546C. J. Chem. Res. *38*, 722–725.

Kokubun, T., Veitch, N.C., Bridge, P.D., and Simmonds, M.S. (2003). Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. Phytochemistry *62*, 779–782.

BY-NC-ND

Krohn, K., Baharamsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B., and Antus, S. (1997). Dihydroisocoumarin from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. Phytochemistry *45*, 313–320.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. *33*, 1870–1874.

Kusari, S., Lamshöft, M., and Spiteller, M. (2009). *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. J. Appl. Microbiol. *107*, 1019–1030.

L

Le Pogam, P., and Boustie, J. (2016). Xanthones of lichen source: a 2016 update. Molecules *21*, 294.

Le Pogam, P., Le Lamer, A.-C., Siva, B., Legouin, B., Bondon, A., Graton, J., Jacquemin, D., Rouaud, I., Ferron, S., Obermayer, W., et al. (2016). Minor pyranonaphthoquinones from the apothecia of the lichen *Ophioparma ventosa*. J. Nat. Prod. *79*, 1005–1011.

Lee, S.-Y., Kinoshita, H., Ihara, F., Igarashi, Y., and Nihira, T. (2008). Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* grown in medium with insect component. J. Biosci. Bioeng. *105*, 476–480.

Li, G., Wang, H., Zhu, R., Sun, L., Wang, L., Li, M., Li, Y., Liu, Y., Zhao, Z., and Lou, H. (2012). Phaeosphaerins A–F, Cytotoxic Perylenequinones from an Endolichenic Fungus, *Phaeosphaeria* sp. J. Nat. Prod. *75*, 142–147.

Li, W., Li, X.-B., Li, L., Li, R.-J., and Lou, H.-X. (2015). α-Pyrone derivatives from the endolichenic fungus *Nectria* sp. Phytochem. Lett. *12*, 22–26.

Li, W.-C., Zhou, J., Guo, S.-Y., and Guo, L.-D. (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Divers *25*, 69–80.

Liggins, J., Bluck, L.J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A., and Bingham, S.A. (2000). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. J. Nutr. Biochem. *11*, 326–331.

Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., and Wang, J. (2008). Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. Mycopathologia *166*, 93–102.

Lohézic-Le Dévéhat, F., Tomasi, S., Elix, J.A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac, P., and Boustie, J. (2007). Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. J. Nat. Prod. *70*, 1218–1220.

Lohtander, K., Oksanen, I., and Rikkinen, J. (2002). A phylogenetic study of *Nephroma* (lichen-forming Ascomycota). Mycol. Res. *106*, 777–787.

Lu, Y., Zhang, J., and Qian, J. (2008). The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells. Cancer Biother. Radiopharm. *23*, 222–228.

Lutzoni, F., and Miadlikowska, J. (2009). Lichens. Curr. Biol. *19*, R502–R503.

Lygis, V., Vasiliauskaite, I., Matelis, A., Pliūra, A., and Vasaitis, R. (2014). Fungi in living and dead stems and stumps of *Pinus mugo* on coastal dunes of the Baltic Sea. Plant Prot. Sci. *50*, 221–226.

BY-NC-ND

M

Ma, Y.-S., Weng, S.-W., Lin, M.-W., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Yang, J.-S., Lai, K.-C., Lin, J.-P., Tang, N.-Y., Lin, J.-G., et al. (2012). Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*: Roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xenografts model. Food Chem. Toxicol. *50*, 1271–1278.

Maass, W.S.G., Towers, G.H.N., and Neish, A.C. (1964). Flechtenstoffe: I. Untersuchungen zur biogenese des pulvinsaureanhydrids. Berichte Dtsch. Bot. Ges. *77*, 157–161.

Maskey, R.P., Asolkar, R.N., Speitling, M., Hoffmann, V., Grün-Wollny, I., Fleck, W.F., and Laatsch, H. (2003). Flavones and new isoflavone derivatives from microorganisms: Isolation and structure elucidation. Z. Für Naturforschung B J. Chem. Sci. *58*, 686–691.

McDonald, T.R., Gaya, E., and Lutzoni, F. (2013). Twenty-five cultures of lichenizing fungi available for experimental studies on symbiotic systems. Symbiosis *59*, 165–171.

Millot, M., Dieu, A., and Tomasi, S. (2016). Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes. Nat Prod Rep *33*, 801–811.

Millot, M., Girardot, M., Dutreix, L., Mambu, L., and Imbert, C. (2017). Antifungal and anti-biofilm activities of acetone lichen extracts against *Candida albicans*. Molecules *22*, 651.

Molnár, K., and Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z. Naturforschung C J. Biosci. *65*, 157–173.

Mosbach, K. (1964). On the biosynthesis of lichen substances Part 2. The pulvic acid derivative vulpinic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. *17*, 363–367.

Muggia, L., Kopun, T., and Grube, M. (2017). Effects of growth media on the diversity of culturable fungi from lichens. Molecules *22*, 824.

N

Nash III, T.H. (2008). 1 - Introduction. In Lichen Biology, T.H. Nash III, ed. (Cambridge University Press), pp. 1–8.

Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., and Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evol. Bioinforma. Online *4*, 193.

O

Ögmundsdóttir, H.M., Zoëga, G.M., Gissurarson, S.R., and Ingólfsdóttir, K. (1998). Anti-proliferative effects of lichen-derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. J. Pharm. Pharmacol. *50*, 107–115.

Okuda, S., Iwasaki, S., Sair, M.I., Machida, Y., Inoue, A., Tsuda, K., and Nakayama, Y. (1967). Stereochemistry of helvolic acid. Tetrahedron Lett. *8*, 2295–2302.

Osmundson, T.W., Robert, V.A., Schoch, C.L., Baker, L.J., Smith, A., Robich, G., Mizzan, L., and Garbelotto, M.M. (2013). Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project. PLoS ONE *8*, e62419.

BY-NC-ND

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., and Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif. *45*, 487–498.

P

Padhi, S., and Tayung, K. (2015). *In vitro* antimicrobial potentials of endolichenic fungi isolated from thalli of *Parmelia* lichen against some human pathogens. Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci. *4*, 299–306.

Paranagama, P.A., Wijeratne, E.M.K., Burns, A.M., Marron, M.T., Gunatilaka, M.K., Arnold, A.E., and Gunatilaka, A.A.L. (2007). Heptaketides from *Corynespora* sp. inhabiting the cavern beard Lichen, *Usnea cavernosa* : First report of metabolites of an endolichenic fungus[(1)]. J. Nat. Prod. *70*, 1700–1705.

Parr, A.J., Mellon, F.A., Colquhoun, I.J., and Davies, H.V. (2005). Dihydrocaffeoyl polyamines (Kukoamine and Allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. J. Agric. Food Chem. *53*, 5461–5466.

Peláez, F., González, V., Platas, G., Sánchez-Ballesteros, J., and Rubio, V. (2008). Molecular phylogenetic studies within the *Xylariaceae* based on ribosomal DNA sequences. Fungal Divers *31*, 111–134.

Petrini, O., Hake, U., and Dreyfuss, M.M. (1990). An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. Mycologia *82*, 444.

Petrova, O.E., and Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. Curr. Opin. Microbiol. *30*, 67–78.

R

Raja, H.A., Kaur, A., El-Elimat, T., Figueroa, M., Kumar, R., Deep, G., Agarwal, R., Faeth, S.H., Cech, N.B., and Oberlies, N.H. (2015). Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn. (milk thistle). Mycology *6*, 8–27.

Ratnaweera, P.B., Williams, D.E., de Silva, E.D., Wijesundera, R.L.C., Dalisay, D.S., and Andersen, R.J. (2014). Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. Mycology *5*, 23–28.

Règlement (CE) n°1223/2009 (2009). Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. J. Off. Union Eur.

Riou, C., Calliste, C.A., Da Silva, A., Guillaumot, D., Rezazgui, O., Sol, V., and Leroy-Lhez, S. (2014). Anionic porphyrin as a new powerful cell death inducer of Tobacco Bright Yellow-2 cells. Photochem. Photobiol. Sci. *13*, 621.

Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Pferschy-Wenzig, E.-M., Maillard, A., Rechberger, G.N., Legouin-Gargadennec, B., Bauer, R., and Boustie, J. (2011). Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. Phytochemistry *72*, 1348–1357.

Roux, C., and coll. (2017). Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine (Association française de lichénologie).

BY-NC-ND

S

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. *4*, 406–425.

Sajid, I., Shaaban, K.A., and Hasnain, S. (2011). Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces Malachitofuscus* ctf9. Braz. J. Microbiol. *42*, 592–604.

Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., and Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. Astrobiology *7*, 443–454.

Scherlach, K., Boettger, D., Remme, N., and Hertweck, C. (2010). The chemistry and biology of cytochalasans. Nat. Prod. Rep. *27*, 869.

Seaward, M.R.D. (2008). 14 - Environmental role of lichens. In Lichen Biology, T.H. Nash III, ed. (Cambridge University Press), pp. 274–298.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. *13*, 2498–2504.

Shiojima, K., Arai, Y., Masuda, K., Ageta, T., and Ageta, H. (1992). Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) *40*, 1683–1690.

Shrestha, G., and St. Clair, L.L. (2013). Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. Phytochem. Rev. *12*, 229–244.

Shukla, P., and Upreti, D.K. (2015). 12 - Lichen dyes: current scenario and future prospects. In Recent Advances in Lichenology, D.K. Upreti, P.K. Divakar, V. Shukla, and R. Bajpai, eds. (New Delhi: Springer India), p.

Shukla, V., Joshi, G.P., and Rawat, M.S.M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. Phytochem. Rev. *9*, 303–314.

Silva-Hughes, A.F., Wedge, D.E., Cantrell, C.L., Carvalho, C.R., Pan, Z., Moraes, R.M., Madoxx, V.L., and Rosa, L.H. (2015). Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (*Cactaceae*) from the United States. Microbiol. Res. *175*, 67–77.

Singh, B.N., Upreti, D.K., Gupta, V.K., Dai, X.-F., and Jiang, Y. (2017). Endolichenic fungi: a hidden reservoir of next generation biopharmaceuticals. Trends Biotechnol. *35*, 808–813.

Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., et al. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. Science *353*, 488–492.

Šrůtka, P., Pažoutová, S., and Kolařík, M. (2007). *Daldinia decipiens* and *Entonaema cinnabarina* as fungal symbionts of *Xiphydria* wood wasps. Mycol. Res. *111*, 224–231.

Stadler, M., Flessa, F., Rambold, G., Peršoh, D., Stadler, M., Fournier, J., Læssøe, T., Chlebicki, A., Lechat, C., and Peršoh, D. (2010). Chemotaxonomic and phylogenetic studies of *Thamnomyces* (Xylariaceae). Mycoscience *51*, 189–207.

BY-NC-ND

Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimatemetabolite production, and PKS genes. Nat Prod Rep *25*, 188–200.

Suryanarayanan, T.S., and Thirunavukkarasu, N. (2017). Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens. Mycology 1–8.

Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Hariharan, G.N., and Balaji, P. (2005). Occurrence of non-obligate microfungi inside lichen thalli. Sydowia *57*, 120–130.

T

Tang, A.M.C., Jeewon, R., and Hyde, K.D. (2009). A re-evaluation of the evolutionary relationships within the *Xylariaceae* based on ribosomal and protein-coding gene sequences. Fungal Divers. *34*, 127.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. *22*, 4673–4680.

Tievant, P. (2001). Guide des lichens (Lausanne: Delachaux et niestlé).

Triebel, D., Peršoh, D., Wollweber, H., and Stadler, M. (2005). Phylogenetic relationships among *Daldinia*, *Entonaema*, and *Hypoxylon* as inferred from ITS nrDNA analyses of Xylariales. Nova Hedwig. *80*, 25–43.

Tripathi, M., and Joshi, Y. (2015). 6 - Endolichenic fungi in Kumaun Himalaya: a case study. In Recent Advances in Lichenology, D.K. Upreti, P.K. Divakar, V. Shukla, and R. Bajpai, eds. (New Delhi: Springer India), pp. 111–120.

U

U'Ren, J.M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., and Arnold, A.E. (2010). Community analysis reveals close affinities Between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. Microb. Ecol. *60*, 340–353.

U'Ren, J.M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Laetsch, A.D., and Arnold, A.E. (2012). Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. Am. J. Bot. *99*, 898–914.

U'Ren, J.M., Miadlikowska, J., Zimmerman, N.B., Lutzoni, F., Stajich, J.E., and Arnold, A.E. (2016). Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae (Sordariomycetes, Ascomycota). Mol. Phylogenet. Evol. *98*, 210–232.

V

Van Haluwyn, C., Asta, J., and Gavériaux, J.-P. (2009). Guide des lichens de France - Lichens des arbres (Belin).

Velíšek, J., and Cejpek, K. (2011). Pigments of higher fungi: A review. Czech J Food Sci *29*, 87–102.

BY-NC-ND

Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., and Baldrian, P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. Mol. Ecol. Resour. *16*, 388–401.

Villamena, F.A., Liu, Y., and Zweier, J.L. (2008). Superoxide radical anion adduct of 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N* -oxide. 4. Conformational effects on the EPR hyperfine splitting constants. J. Phys. Chem. A *112*, 12607–12615.

Vinayaka, K.S., Krishnamurthy, Y.L., Banakar, S., and Prashith Kekuda, T.R. (2016). Association and variation of endophytic fungi among some macrolichens in Central Western Ghats, Southern India. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. *5*, 115–124.

Vlahov, G. (1999). Application of NMR to the study of olive oils. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. *35*, 341–357.

W

Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J. Antimicrob. Chemother. *42*, 13–28.

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social molecular networking. Nat. Biotechnol. *34*, 828–837.

Wang, Q.-X., Bao, L., Yang, X.-L., Guo, H., Ren, B., Guo, L.-D., Song, F.-H., Wang, W.-Z., Liu, H.-W., and Zhang, L.-X. (2013a). Tricycloalternarenes F–H: Three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method. Fitoterapia *85*, 8–13.

Wang, Q.-X., Bao, L., Yang, X.-L., Liu, D.-L., Guo, H., Dai, H.-Q., Song, F.-H., Zhang, L.-X., Guo, L.-D., Li, S.-J., et al. (2013b). Ophiobolins P–T, five new cytotoxic and antibacterial sesterterpenes from the endolichenic fungus *Ulocladium* sp. Fitoterapia *90*, 220–227.

Wattana-Amorn, P., Charoenwongsa, W., Williams, C., Crump, M.P., and Apichaisataienchote, B. (2016). Antibacterial activity of cyclo(L -Pro- L -Tyr) and cyclo(D -Pro- L -Tyr) from *Streptomyces* sp *.* strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. Nat. Prod. Res. *30*, 1980–1983.

Wei, W.-T., Lin, S.-Z., Liu, D.-L., and Wang, Z.-H. (2013). The distinct mechanisms of the antitumor activity of emodin in different types of cancer (Review). Oncol. Rep. *30*, 2555–2562.

White, F.J., and James, P.W. (1988). Studies on the Genus *Nephroma* II. The southern temperate species. The Lichenologist *20*, 103–166.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protoc. Guide Methods Appications *Academics Press*, *New York*, 315–322.

Wijeratne, E.M.K., Bashyal, B.P., Liu, M.X., Rocha, D.D., Gunaherath, G.M.K.B., U'Ren, J.M., Gunatilaka, M.K., Arnold, A.E., Whitesell, L., and Gunatilaka, A.A.L. (2012). Geopyxins A–E, *ent* -Kaurane diterpenoids from endolichenic fungal strains *Geopyxis* aff. *majalis* and *Geopyxis* sp. AZ0066: Structure–activity relationships of Geopyxins and their analogues[(1)]. J. Nat. Prod. *75*, 361–369.

BY-NC-ND

Wilkins, A.L. (1980). Nephrin: Structure and occurrence in< i> Nephroma</i> species. Phytochemistry *19*, 696–697.

Wu, H.-F., Chen, L.-W., and Chen, C.-H. (2001). Probing reactive sites for ion-molecule reactions of anthraquinones with dimethyl ether using an external source ion trap tandem mass spectrometer and computational chemistry. Rapid Commun. Mass Spectrom. *15*, 1977–1987.

Wu, W., Dai, H., Bao, L., Ren, B., Lu, J., Luo, Y., Guo, L., Zhang, L., and Liu, H. (2011). Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. J. Nat. Prod. *74*, 1303–1308.

Wu, Y.-H., Chen, G.-D., Wang, C.-X., Hu, D., Li, X.-X., Lian, Y.-Y., Lin, F., Guo, L.-D., and Gao, H. (2015). Pericoterpenoid A, a new bioactive cadinane-type sesquiterpene from *Periconia* sp. J. Asian Nat. Prod. Res. *17*, 671–675.

Y

Yan, S., Li, S., Wu, W., Zhao, F., Bao, L., Ding, R., Gao, H., Wen, H.-A., Song, F., and Liu, H.-W. (2011). Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests. Chem. Biodivers. *8*, 1689–1700.

Yang, W.-L., and Bernards, M.A. (2007). Metabolite profiling of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during wound-induced suberization. Metabolomics *3*, 147–159.

Yang, J.Y., Sanchez, L.M., Rath, C.M., Liu, X., Boudreau, P.D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., de Felicio, R., Fenner, A., et al. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. J. Nat. Prod. *76*, 1686–1699.

Yoshimura, I., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Huneck, S., and Yamada, Y. (1994). Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. Phytochem. Anal. *5*, 197–205.

Yu, C.-X., Zhang, X.-Q., Kang, L.-D., Zhang, P.-J., Chen, W.-W., Liu, W.-W., Liu, Q.-W., and Zhang, J.-Y. (2008). Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP. Asian J. Androl. *10*, 625–634.

Yuan, C., Wang, H.-Y., Wu, C.-S., Jiao, Y., Li, M., Wang, Y.-Y., Wang, S.-Q., Zhao, Z.-T., and Lou, H.-X. (2013). Austdiol, fulvic acid and citromycetin derivatives from an endolichenic fungus, *Myxotrichum* sp. Phytochem. Lett. *6*, 662–666.

Yuan, C., Ding, G., Wang, H.-Y., Guo, Y.-H., Shang, H., Ma, X.-J., and Zou, Z.-M. (2017). Polyketide-terpene hybrid mtabolites from an endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. BioMed Res. Int. *2017*, 1–10.

Yuan, X., Xiao, S., and Taylor, T.N. (2005). Lichen-like symbiosis 600 million years ago. Science *308*, 1017–1020.

Z

Zedda, L., and Rambold, G. (2015). 7 - The diversity of lichenised fungi: Ecosystem functions and ecosystem services. In Recent Advances in Lichenology, D.K. Upreti, P.K. Divakar, V. Shukla, and R. Bajpai, eds. (New Delhi: Springer India), pp. 121–145.

BY-NC-ND

Zhang, K., Ren, J., Ge, M., Li, L., Guo, L., Chen, D., and Che, Y. (2014). Mono- and bis-furanone derivatives from the endolichenic fungus *Peziza* sp. Fitoterapia *92*, 79–84.

Zhang, M., Wang, W.-L., Fang, Y.-C., Zhu, T.-J., Gu, Q.-Q., and Zhu, W.-M. (2008). Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. J. Nat. Prod. *71*, 985–989.

Zhang, T., Wei, X.-L., Zhang, Y.-Q., Liu, H.-Y., and Yu, L.-Y. (2015). Diversity and distribution of lichen-associated fungi in the Ny-Ålesund Region (Svalbard, High Arctic) as revealed by 454 pyrosequencing. Sci. Rep. *5*, 14850.

Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., Wang, M., and Wang, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Molecules *15*, 7961–7970.

Zhao, M., Gödecke, T., Gunn, J., Duan, J.-A., and Che, C.-T. (2013). Protostane and fusidane triterpenes: a mini-review. Molecules *18*, 4054–4080.

Zhao, Q., Wang, G.-Q., Chen, G.-D., Hu, D., Li, X.-X., Guo, L.-D., Li, Y., Yao, X.-S., and Gao, H. (2015a). Nodulisporisteroids C–L, new 4-methyl-progesteroid derivatives from *Nodulisporium* sp. Steroids *102*, 101–109.

Zhao, Q., Chen, G.-D., Feng, X.-L., Yu, Y., He, R.-R., Li, X.-X., Huang, Y., Zhou, W.-X., Guo, L.-D., Zheng, Y.-Z., et al. (2015b). Nodulisporiviridins A–H, bioactive viridins from *Nodulisporium* sp. J. Nat. Prod. *78*, 1221–1230.

Zheng, Q.-C., Chen, G.-D., Kong, M.-Z., Li, G.-Q., Cui, J.-Y., Li, X.-X., Wu, Z.-Y., Guo, L.-D., Cen, Y.-Z., Zheng, Y.-Z., et al. (2013). Nodulisporisteriods A and B, the first 3,4-seco-4-methyl-progesteroids from *Nodulisporium* sp. Steroids *78*, 896–901.

Zheng, Q.-C., Kong, M.-Z., Zhao, Q., Chen, G.-D., Tian, H.-Y., Li, X.-X., Guo, L.-D., Li, J., Zheng, Y.-Z., and Gao, H. (2014). Chaetoglobosin Y, a new cytochalasan from *Chaetomium globosum*. Fitoterapia *93*, 126–131.

Zopf, W.F. (1907). Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer beziehung (Jena : G. Fischer).

BY-NC-ND

Annexes

Annexe 1. Clés de détermination des lichens (Tievant, 2001) 199
Annexe 2. Aspect morphologique des champignons endolichéniques isolés de *Nephroma laevigatum* 200
Annexe 3. Massifs isotopiques et spectres de fragmentations des composés à *m/z* 319 $[M+H]^+$ 201
Annexe 4. Spectres de fragmentations des composés à *m/z* 333 ; 304 et 271 $[M+H]^+$ 202
Annexe 5. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) du composé DCM1 203
Annexe 6. RMN ^1H (400 MHz, Acétone-*d6*) et RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone-*d6*) du composé DCM2 204
Annexe 7. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé DCM3 ... 205
Annexe 8. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) du composé DCM4 206
Annexe 9. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G1 207
Annexe 10. HSQC et COSY du composé G1 208
Annexe 11. HMBC et NOESY du composé G1 209
Annexe 12. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G2 210
Annexe 13. HSQC et COSY du composé G2 211
Annexe 14. HMBC et NOESY du composé G2 212
Annexe 15. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G3 213
Annexe 16. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G4 214
Annexe 17. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé G5 215
Annexe 18. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé G6 216
Annexe 19. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C1..... 217
Annexe 20. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C2..... 218
Annexe 21. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C3..... 219

BY-NC-ND

Annexe 1. Clés de détermination des lichens (Tievant, 2001)

Clés de détermination

Clé générale

- Thalle en croûte, fin, continu, fendu, aréolé, verruqueux, granuleux ou lépreux ..... **Thalles crustacés non lobés** Clé n° 1
- Thalle en croûte, fin, mais avec des lobes au pourtour ..... **Thalles crustacés lobés** Clé n° 2
- Thalle constitué de petites squamules ou écailles ..... **Thalles squamuleux** Clé n° 3
- Thalle en feuilles ou en lames ..... **Thalles foliacés** Clé n° 4
- Thalle en lanières ou en tiges, simples ou ramifiées, fixé au substrat par une surface réduite ..... **Thalles fruticuleux** Clé n° 5
- Thalle formé de 2 parties distinctes : un thalle primaire sur le substrat et un thalle secondaire, dressé (podétions ou pseudopodétions) ..... **Thalles complexes** Clé n° 6
- Thalle noir ou grisâtre, rigide et cassant à l'état sec, mou et gélatineux à l'état humide, de formes diverses ..... **Thalles gélatineux** Clé n° 7

Clé n° 1 : Thalles crustacés non lobés

Synopsis :

1 Thalle et/ou apothécies K+ pourpre, et/ou spores polariloculaires et incolores ..... **Section 1**
Thalle et/ou apothécies K-, spores non polariloculaires et incolores 2

2 (1) Fructifications présentes 3
Fructifications absentes 10

3 (2) Spores par plus de 100 dans les asques ..... **Section 2**
Spores par 1 à 8 (48) dans les asques 4

4 (3) Fructifications punctiformes dans des verrues du thalle, ou/et spores > 50 µm de long ..... **Section 3**
Lichen n'ayant pas ces caractères 5

5 (4) Fructifications pédicellées et/ou avec mazédium ..... **Section 4**
Fructifications non pédicellées et/ ou sans mazédium 6

6 (5) Fructifications de type périthèces ..... **Section 5**
Fructifications autres 7

7 (6) Fructifications de type lirelles ..... **Section 6**
Apothécies types (+ ou - rondes) 8

8 Thalle à algues Cyanophytes ou *Trentepohlia* ..... **Section 7**
Thalle à algues Chlorophycées 9

9 (8) Apothécies à rebord de même couleur que le disque : apothécies lecidéines ..... **Section 8**
Apothécies à bord thallin : apothécies lécanorines ..... **Section 9**

10 (9) Thalle sans fructifications, à algues *Trentepohlia* ..... **Section 10**
Thalle sans fructifications, à autres Chlorophycées ..... **Section 11**

Section 1 : Thalle et/ou apothécies K+ pourpre, et/ou spores polariloculaires et incolores

1 Apothécies noires, thalle K-, spores polariloculaires ..... ***Caloplaca*** (*C. chalybaea*)
Apothécies rouges, orange ou jaunes 2

2 (1) Apothécies rouge sang, spores à 3-7 cloisons ..... ***Ophiorparma***
Apothécies jaune, oranges ou rouge rouille 3

3 (2) Spores polariloculaires ..... ***Caloplaca***
Spores simples ou à 1 cloison 4

4 (3) Thalle K-, grisâtre, lin à peu distinct. Apothécies K+ rouge ..... ***Fulgensia***
Thalle K+ pourpre, jaune clair ..... ***Protoblastenia***

Section 2 : Spores par plus de 100 dans les asques

Apothécies lecidéines, à rebord propre distinct et durable ..... ***Sarcogyne***
Apothécies lécanorines, à bord thallin pas toujours distinct ..... ***Acarospora***

11 (2) Squamules roses, brun-rose à brun foncé, jamais vert à l'état sec ..... ***Psora***
Squamules gris-vert, blanc-vert ou vertes 12

12 (11) Squamules éparses. Sur mousse ..... ***Normandina***
Squamules contiguës 13

13 (12) Squamules couchées, celles du pourtour, rayonnantes ..... ***Squamarina***
Squamules imbriquées aux bords relevés ..... ***Cladonia*** (thalle primaire)

Clé n° 4 : Thalles foliacés

1 Thalle ombiliqué, à point d'attache unique, souvent central 2
Thalle non ombiliqué 4

2 (1) Thalle à pustules ovales ..... ***Lasallia***
Thalle sans pustules 3

3 (2) Apothécies lecidéines ..... ***Umbilicaria***
Périthèces ..... ***Dermatocarpon***

4 (1) Thalle jaune ou orange 5
Thalle d'autres couleurs 7

5 (4) Thalle K+ pourpre ..... ***Xanthoria***
Thalle K- 6

6 (5) Apothécies à disque jaune ..... ***Candelaria***
Apothécies à disque brun ..... ***Cetraria***

7 (4) Thalle en petites feuilles dressées, gris-vert dessus, blanc dessous ..... ***Cladonia*** (thalle primaire)
Thalle à lobes + ou - rayonnants, couchés sur le substrat 8

8 (7) Thalle pas très adhérant au substrat, souvent sans rhizines 9
Thalle bien adhérant au substrat, avec des rhizines 12

9 (8) Thalle < 5 cm de Ø ..... ***Hypogymnia***
Thalle >10 cm de Ø 10

10 (9) Dessous du thalle sans rhizines visibles à l'œil nu ..... ***Nephroma***
Dessous du thalle parsemé de rhizines brunes ou noires 11

11 (10) Thalle parsemé de cyphelles ou de pseudocyphelles (0,2 à 2 mm de Ø) ..... ***Sticta***
Thalle sans cyphelles ni pseudocyphelles ..... ***Lobaria***

12 (8) Thalle < 5 cm de Ø 13
Thalle > 5 cm de Ø 24

13 (12) Thalle noircissant à l'état humide 14
Thalle verdissant à l'état humide 15

14 (13) Apothécies lécanorines ..... ***Pannaria***
Apothécies lecidéines ..... ***Parmeliella***

15 (13) Thalle jaunâtre ou blanc-vert 16
Thalle brun ou gris 17

16 (15) Thalle : cortex K+ jaune puis rouge, médulle P+ orange ..... ***Parmelia***
Thalle : cortex et médulle K-, P- ..... ***Parmeliopsis***

17 (15) Thalle brun clair à brun très foncé 18
Thalle gris, gris-vert, gris-brun ou gris foncé 20

18 (17) Thalle mat, parfois pruineux, sans soralies 19
Thalle plus ou moins brillant, non pruineux, parfois sorédié ..... ***Parmelia***

19 (18) Lobes couverts de macules blanches ou pruineux sur les bords ..... ***Physconia***
Lobes non pruineux, sans macules blanches ..... ***Anaptychia***

20 (17) Thalle : cortex et médulle P-, K+ jaune 21
Thalle : cortex et médulle P-, K-, C- 22

21 (20) Spores incolores, simples ..... ***Parmelia***
Spores brunes, à 1 cloison ..... ***Physcia***

22 (20) Thalle parsemé de minuscules macules blanches (loupe) ..... ***Physconia***
Thalle sans macules blanches 23

23 (22) Lobes nettement allongés, de 1 à 2 mm de large. Thalle parfois > 5 cm ..... ***Anaptychia***
Lobes non nettement allongés. Thalle < 4 cm ..... ***Phacophyscia***

24 (12) Dessous du thalle parsemé de rhizines bien visibles 25
Dessous du thalle sans rhizines ou couvert de rhizines très fines et denses 27

25 (24) Dessous du thalle nettement sillonné de veines 26
Dessous du thalle sans veines ..... ***Solorina***

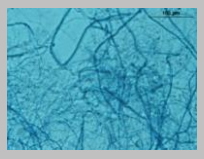
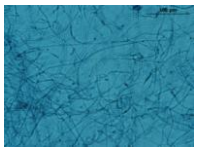
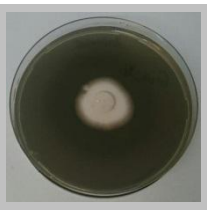
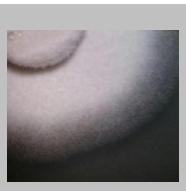
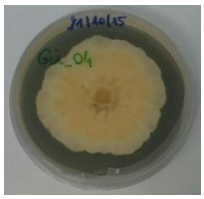
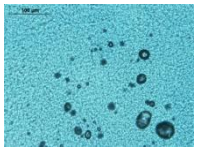
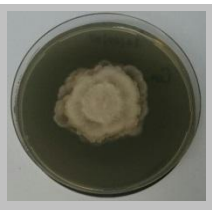
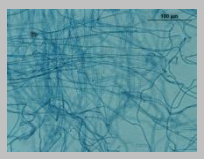
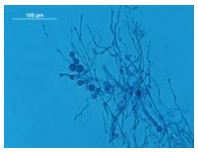
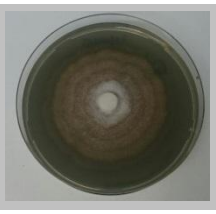
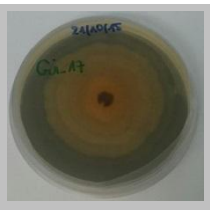
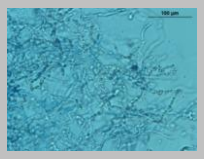
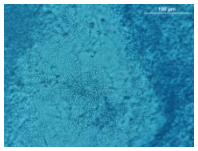
26 (25) Dessous blanc sur les bords ..... ***Peltigera***
Dessous rouge orangé ..... ***Solorina***

27 (25) Spores incolores, simples ..... ***Parmelia***
Spores à 1-3 cloisons ..... ***Nephroma***

BY-NC-ND

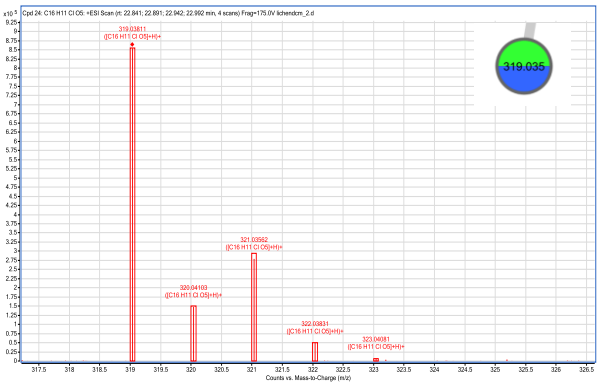
Annexe 2. Aspect morphologique des champignons endolichéniques isolés de *Nephroma laevigatum*.

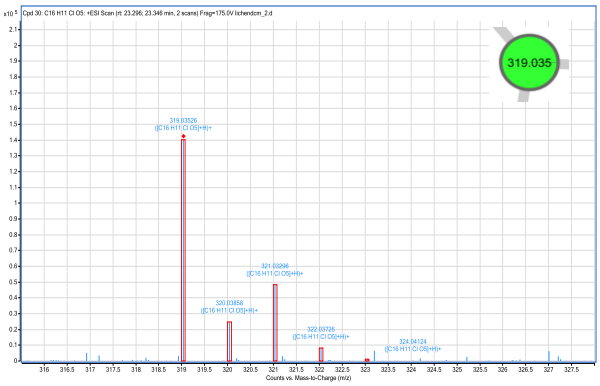
Observations macroscopiques effectuées après 21 jours de mise en culture.
Observations microscopiques (grossissement x400, coloration au bleu lactique

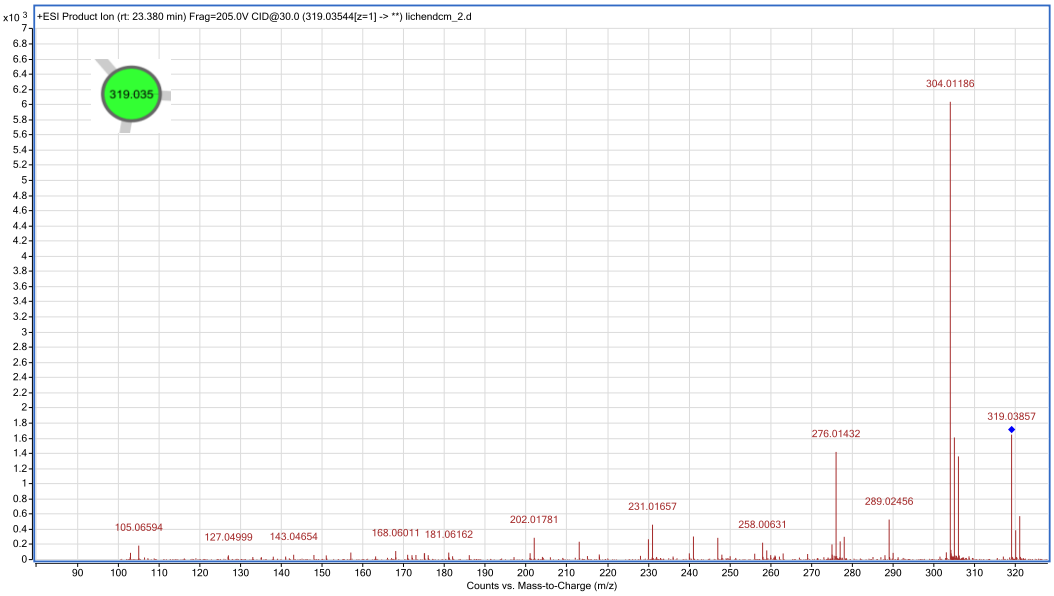
Souches fongiques	Recto	Verso	Microscopie (x400)	Loupe (x15)	Sporulation	Vitesse de croissance
Coniochaeta hoffmannii					**NON**	**Rapide**
Daldinia concentrica					**OUI**	**Rapide**
Nemania aenea var. *aureolatum*					**NON**	**Lente**
Nemania diffusa					**NON**	**Moyenne**
Nemania serpens					**NON**	**Moyenne**
Nemania serpens var. serpens					**NON**	**Moyenne**
Nemania plumbea					**NON**	**Moyenne**
Peziza varia					**OUI**	**Lente**

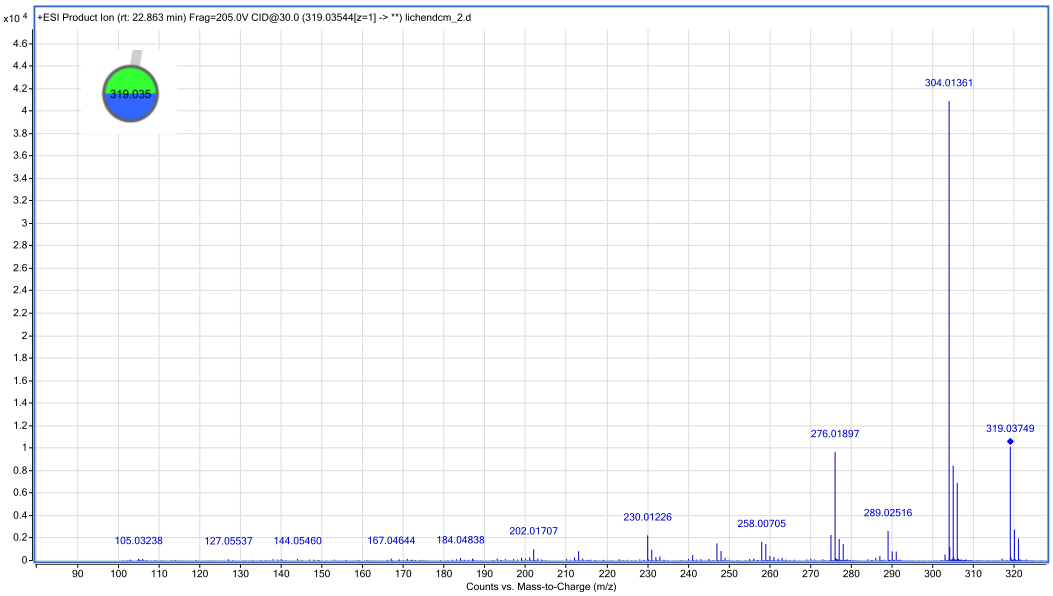
BY-NC-ND

Annexe 3. Massifs isotopiques et spectres de fragmentations des composés à *m/z* 319 $[M+H]^+$



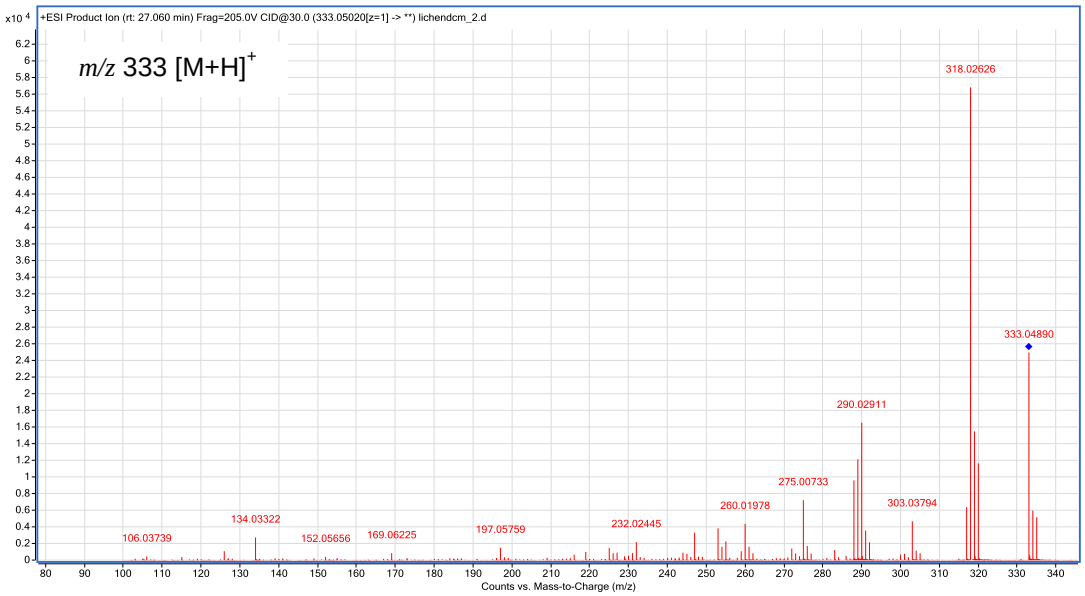


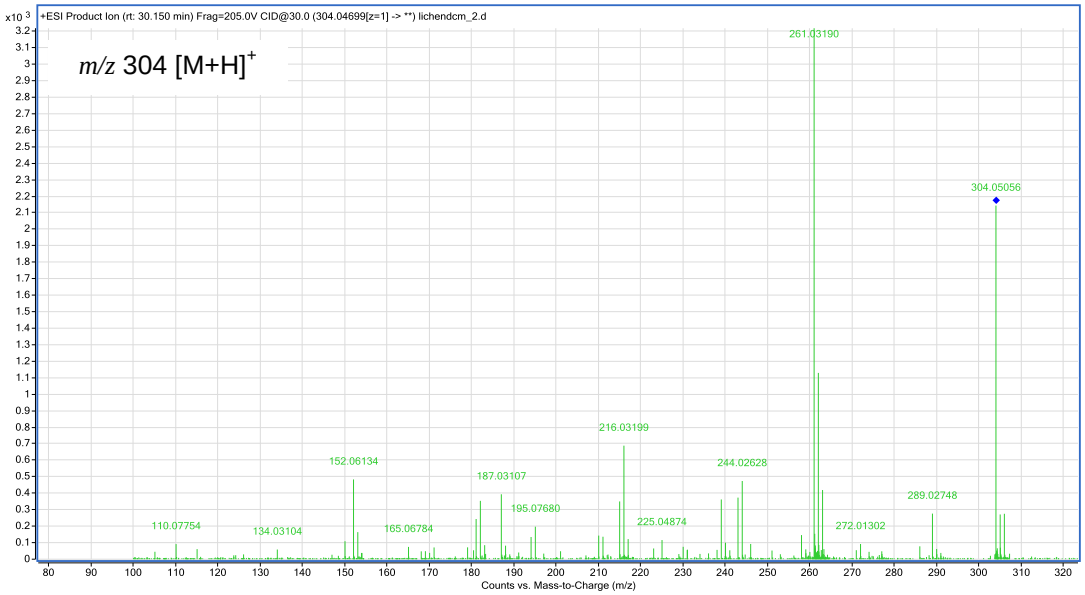


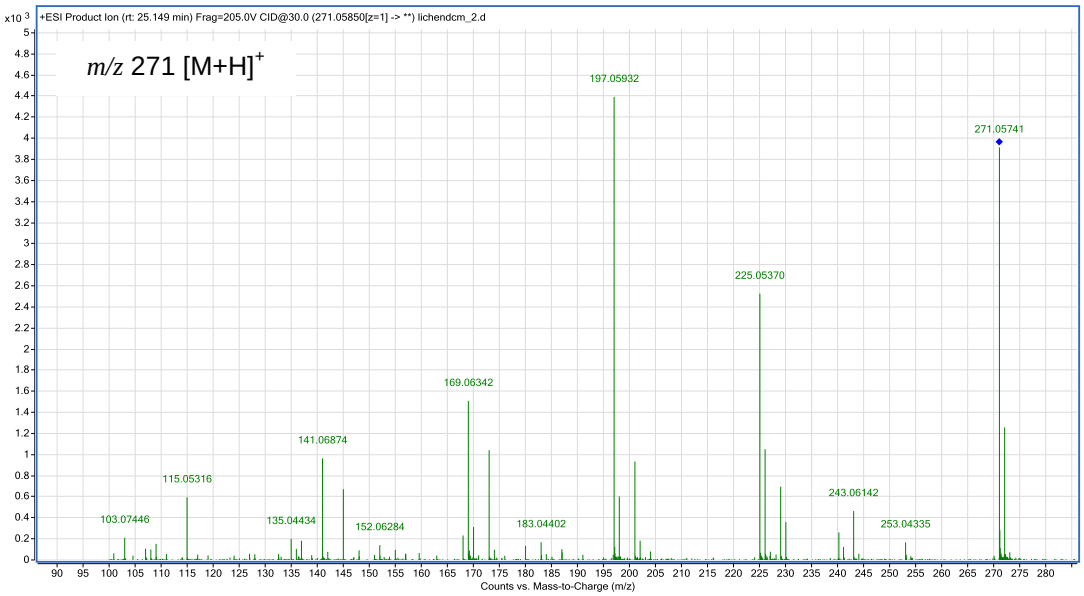


BY-NC-ND

Annexe 4. Spectres de fragmentations des composés à *m/z* 333 ; 304 et 271 $[M+H]^+$

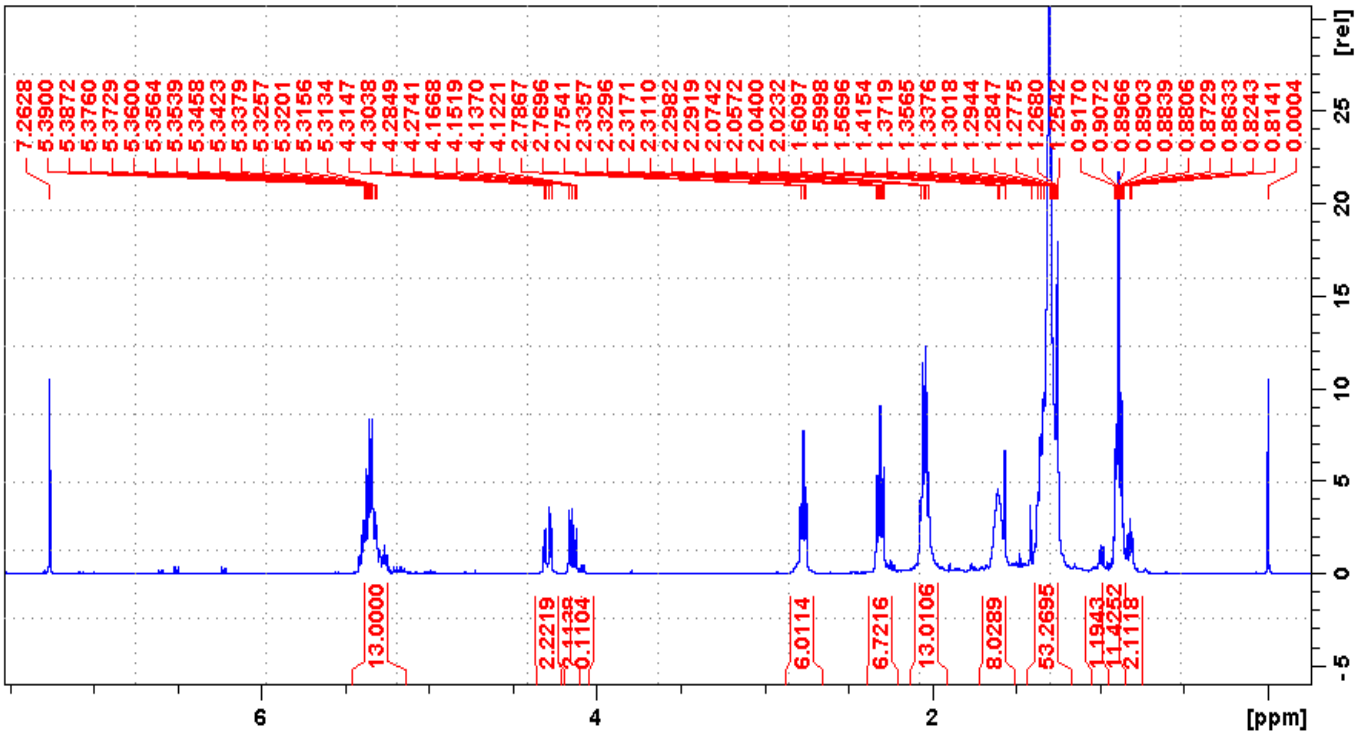


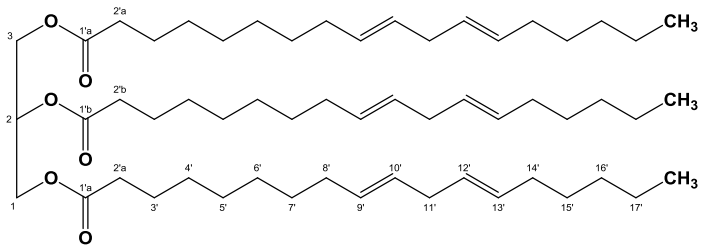


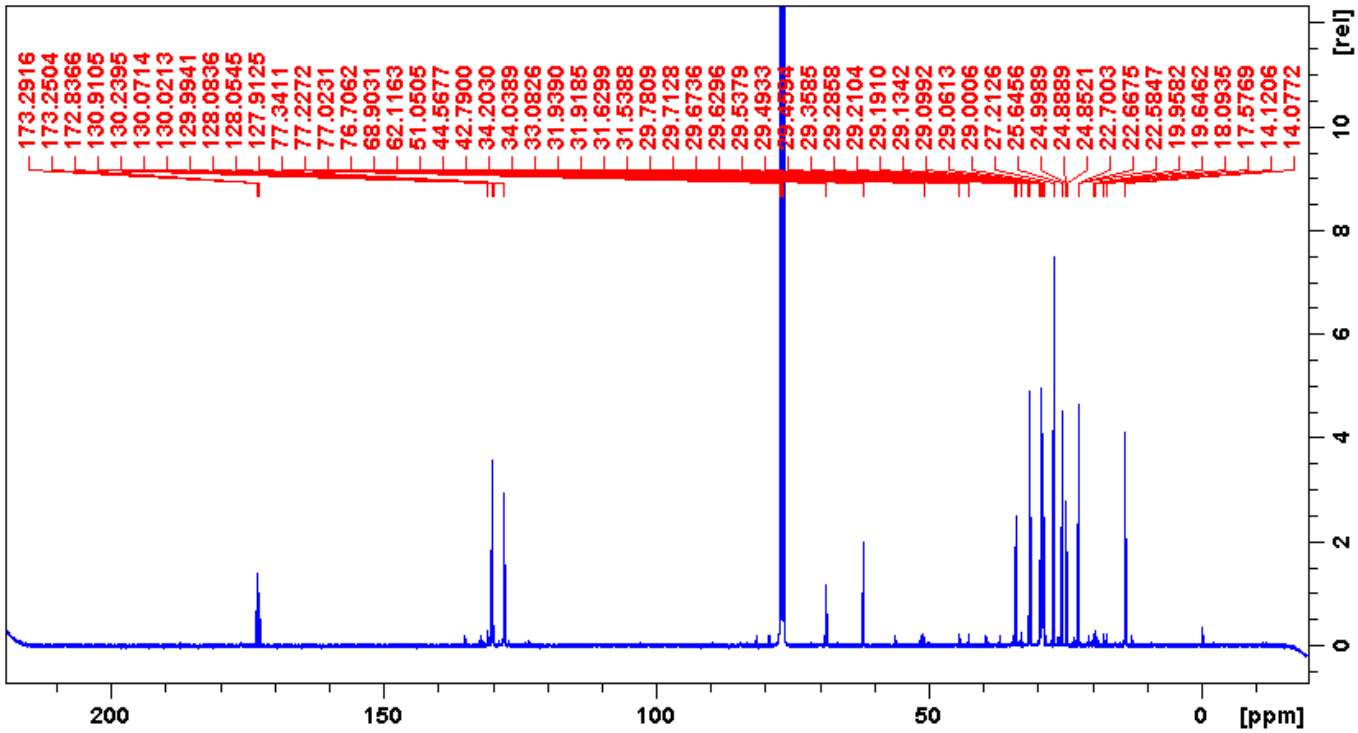


BY-NC-ND

Annexe 5. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) du composé DCM1

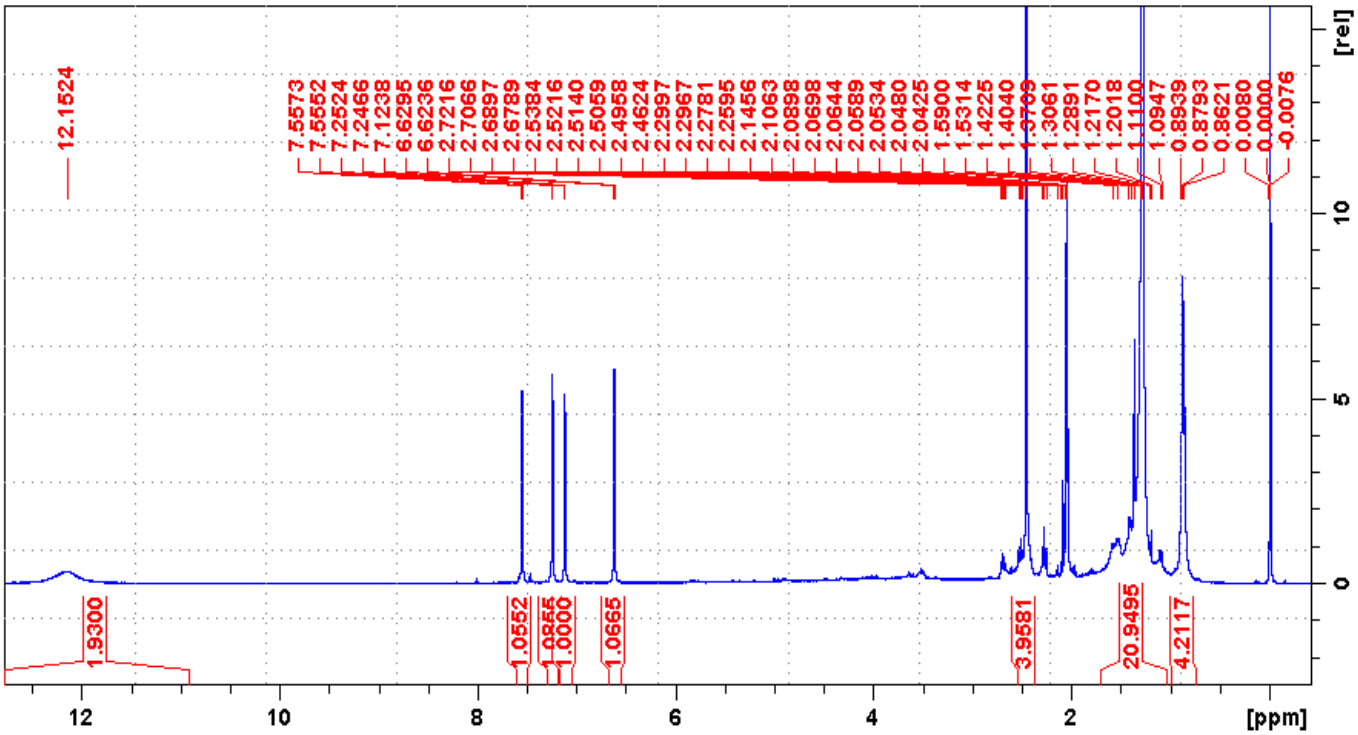


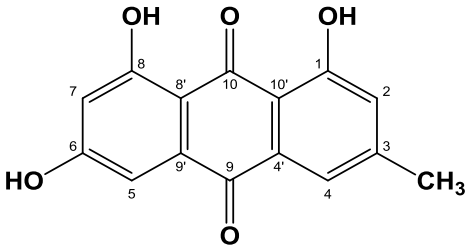


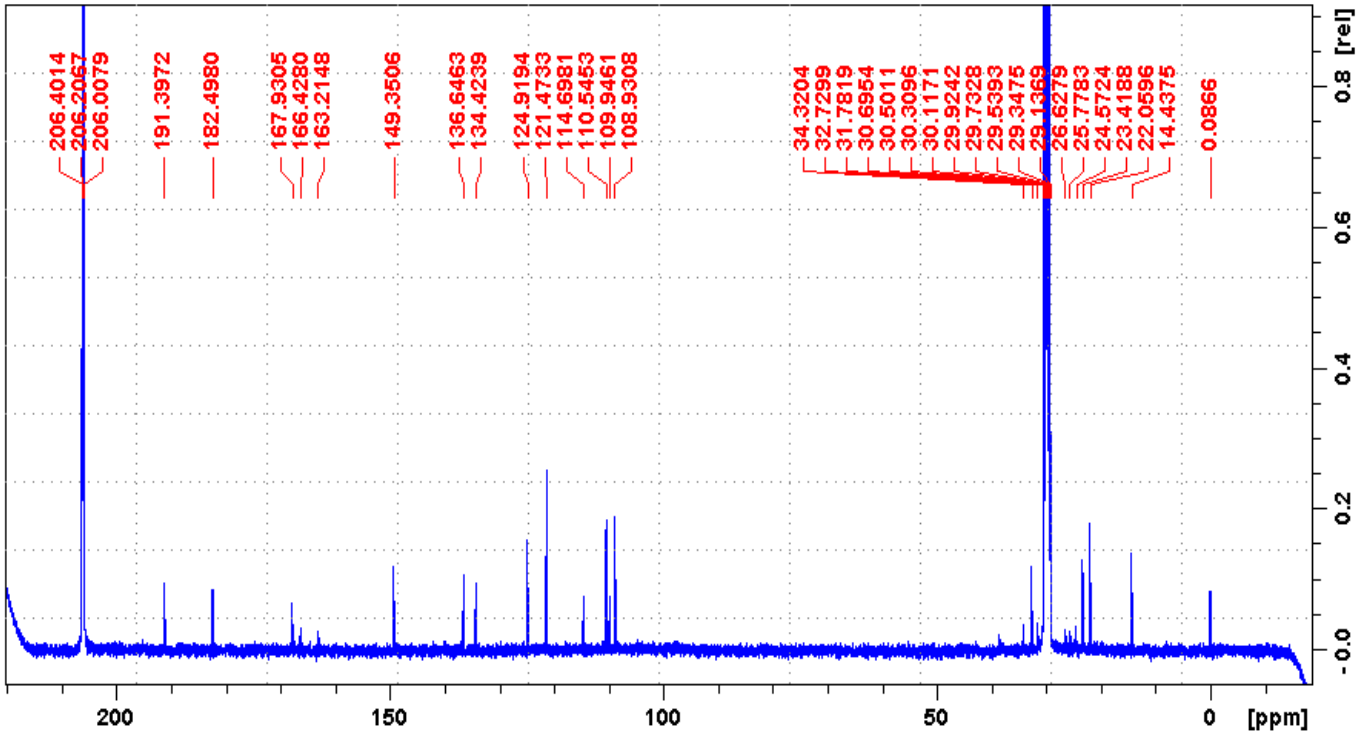


BY-NC-ND

Annexe 6. RMN ^{1}H (400 MHz, Acétone-*d6*) et RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone-*d6*) du composé DCM2

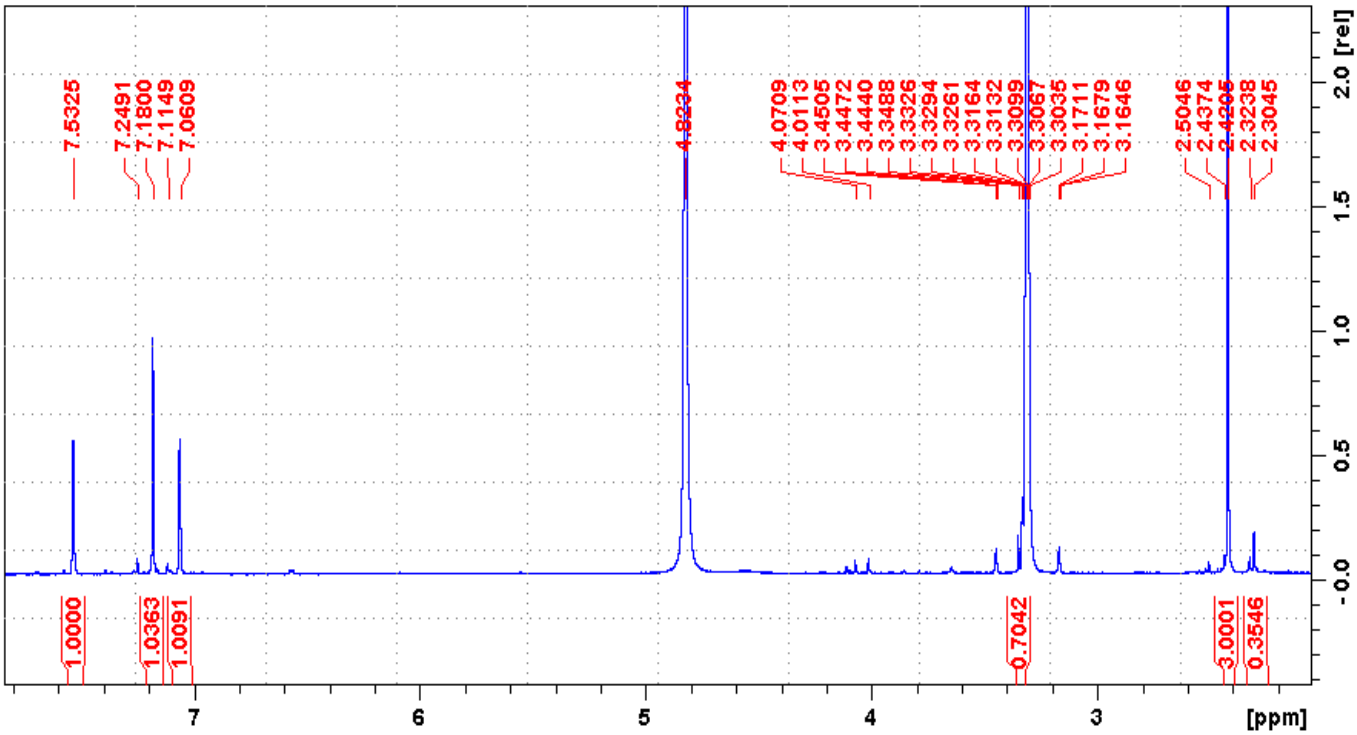


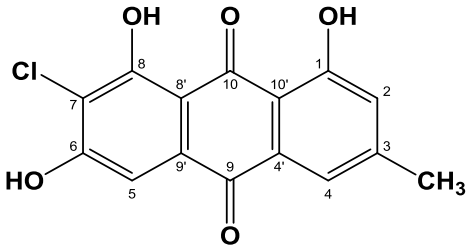


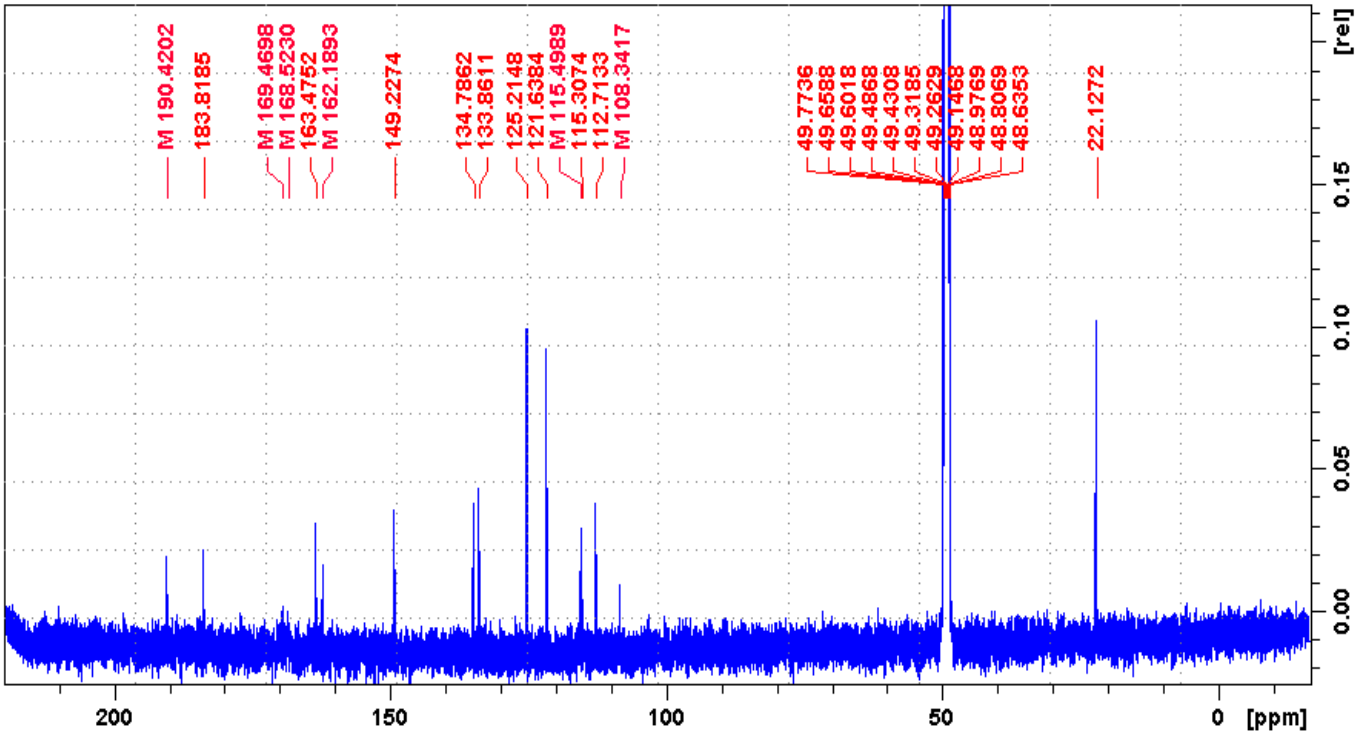


BY-NC-ND

Annexe 7. RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé DCM3

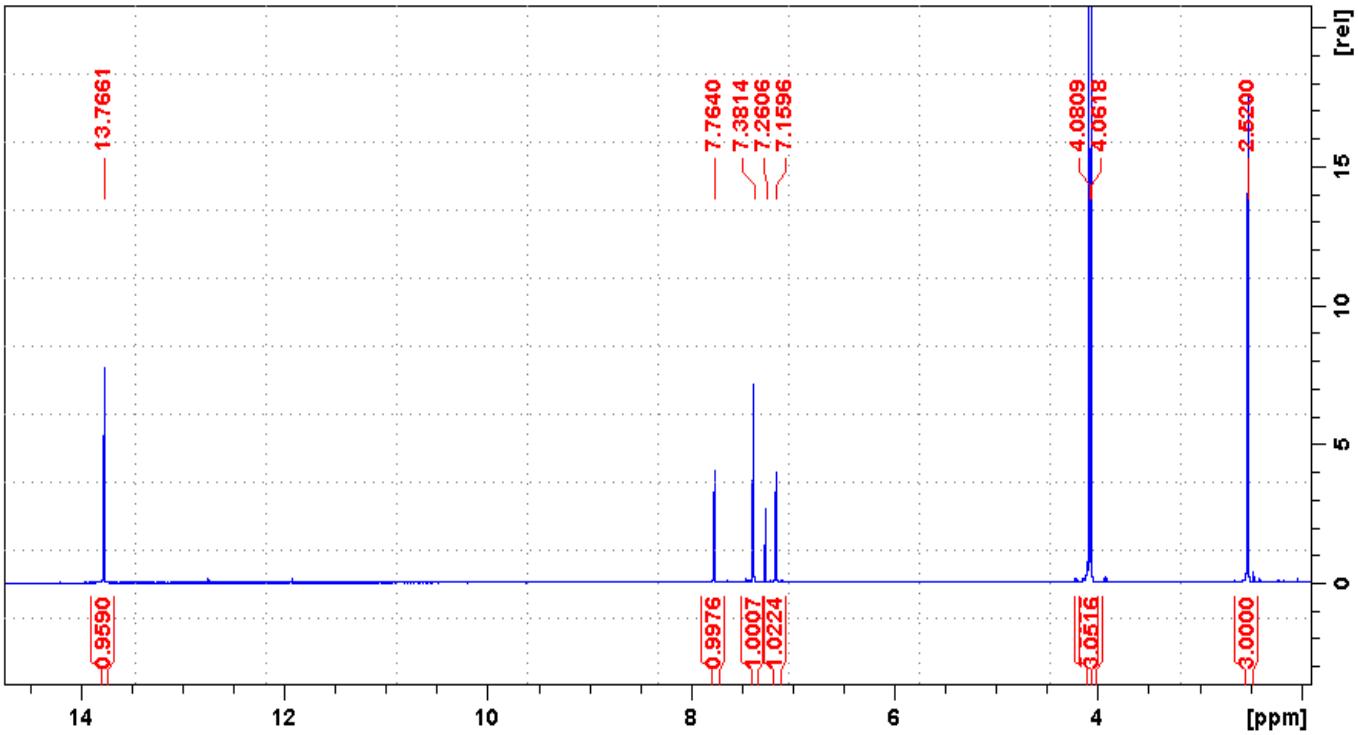


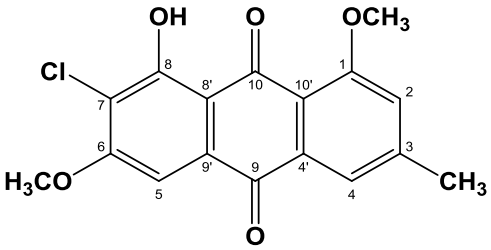


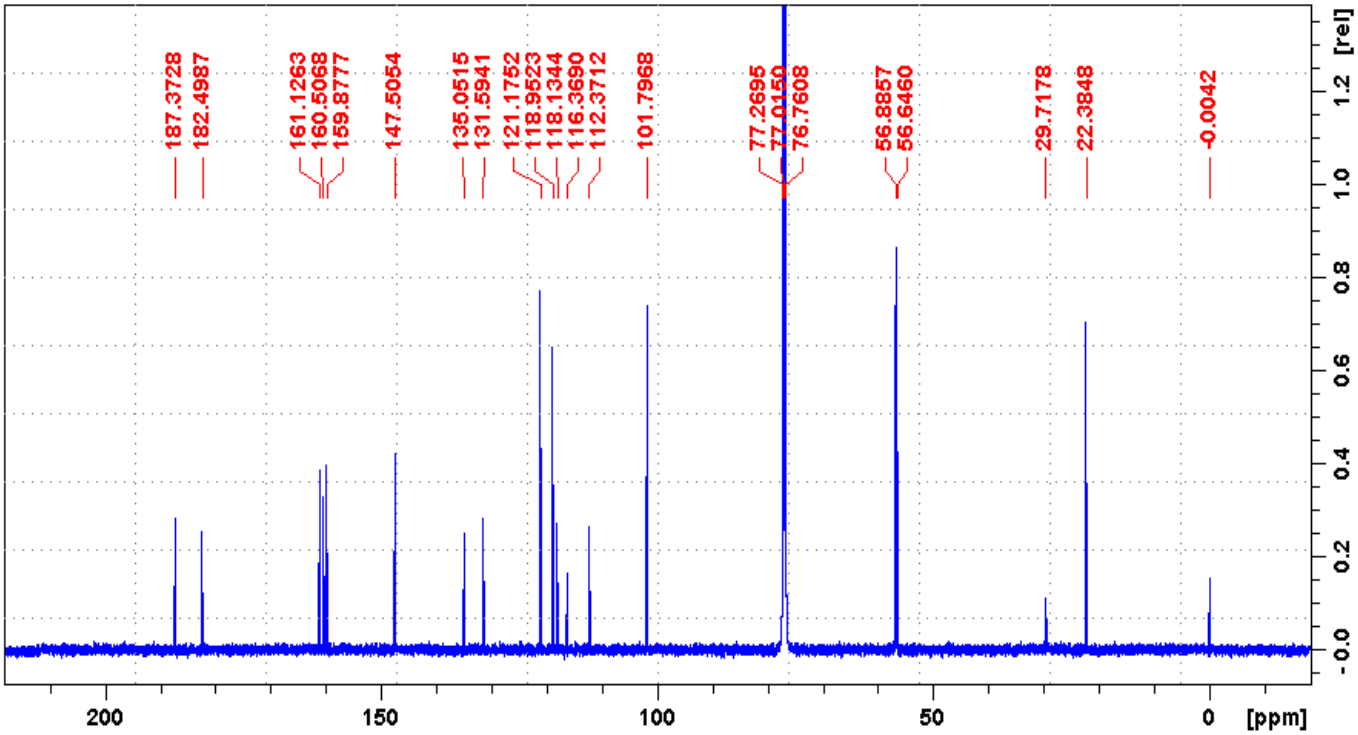


BY-NC-ND

Annexe 8. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) du composé DCM4

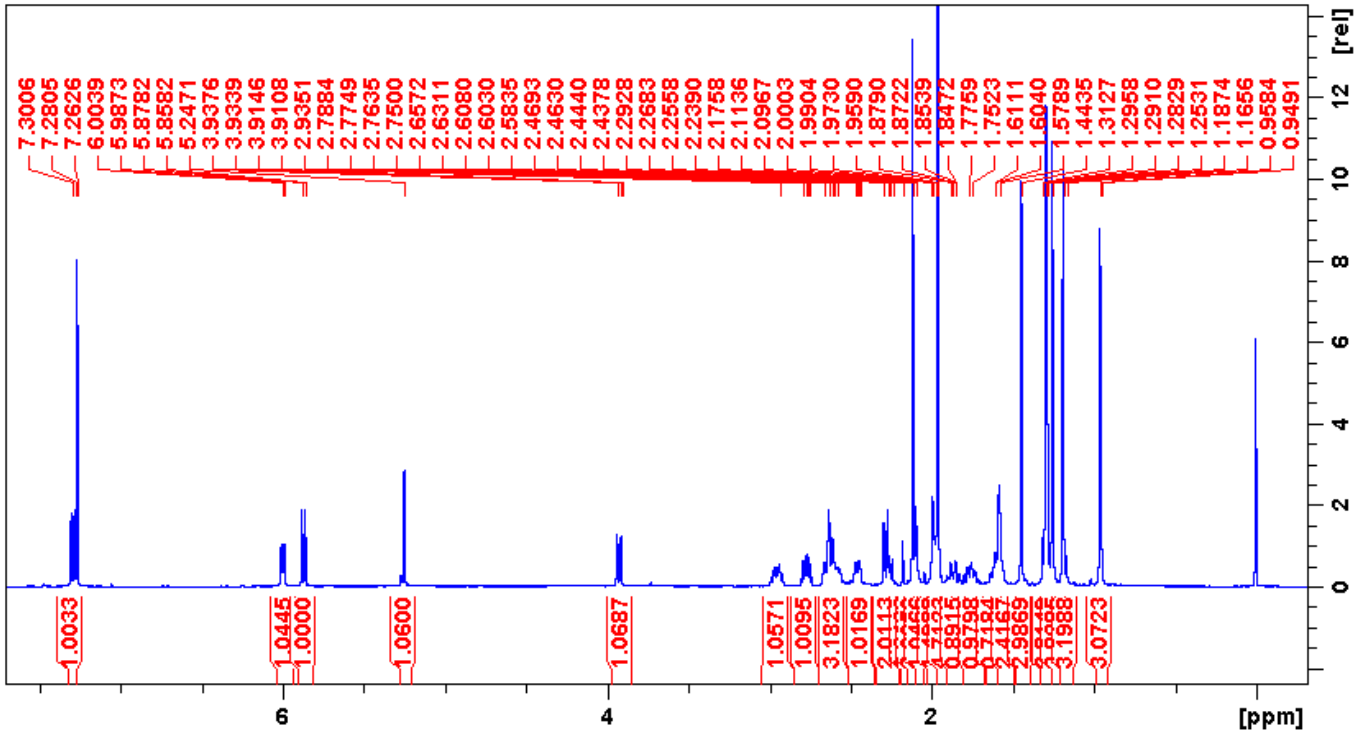


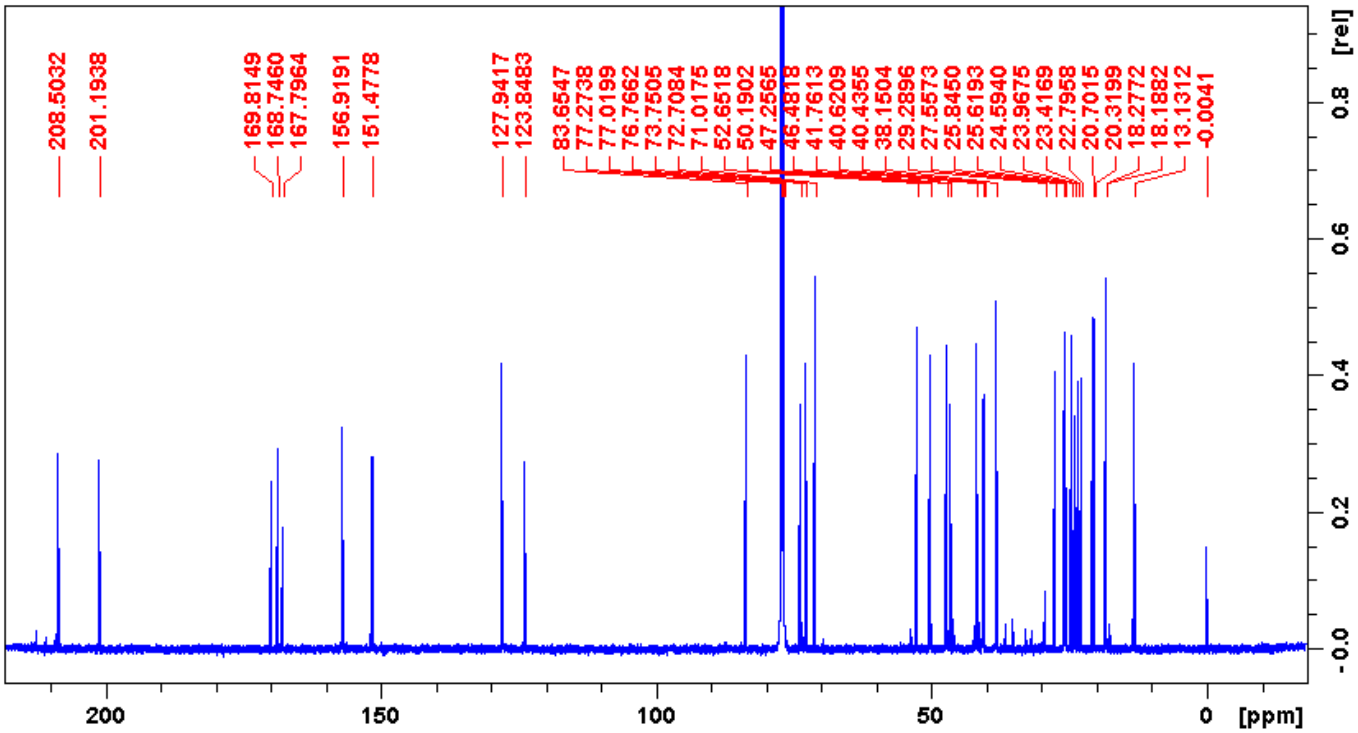




BY-NC-ND

Annexe 9. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G1

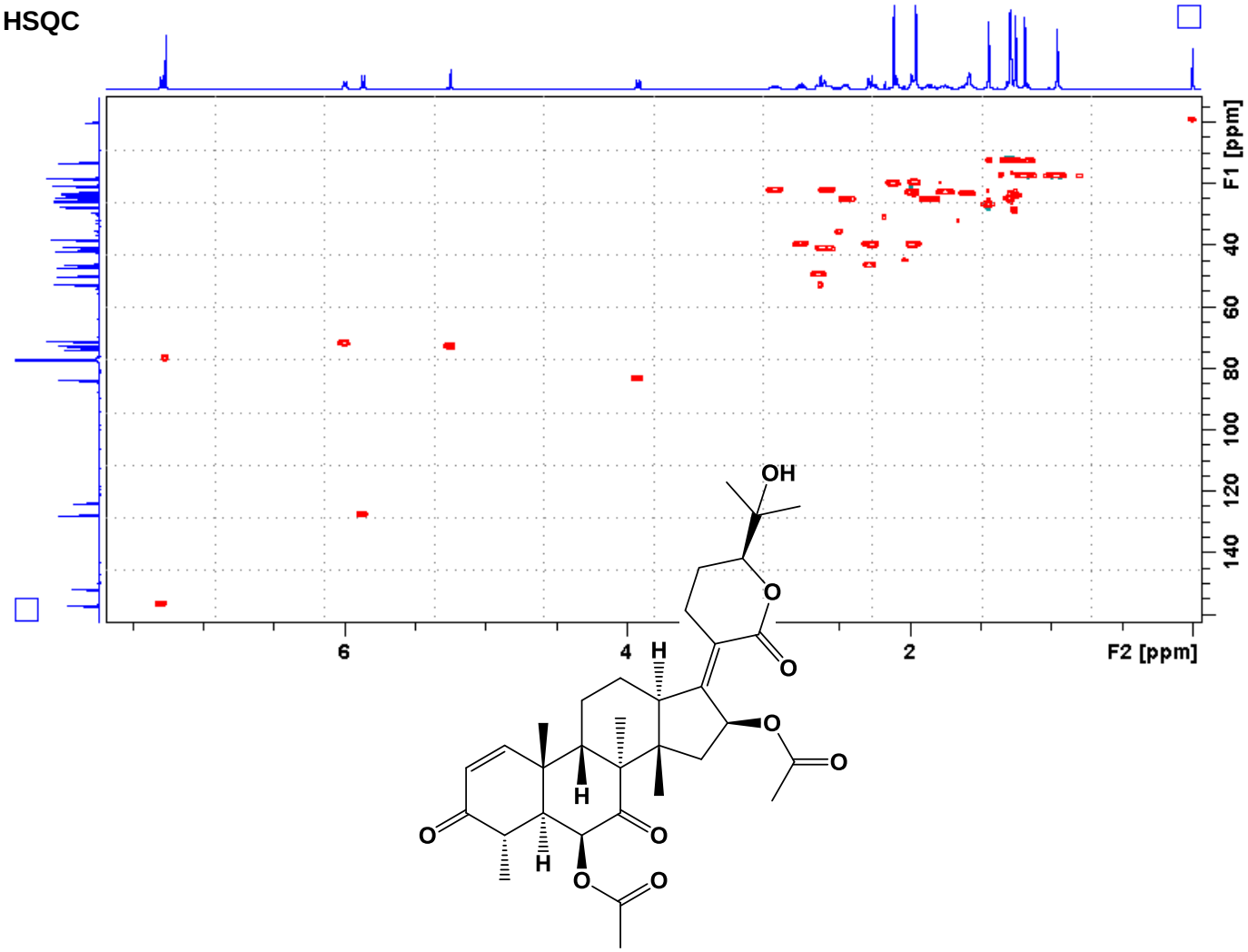




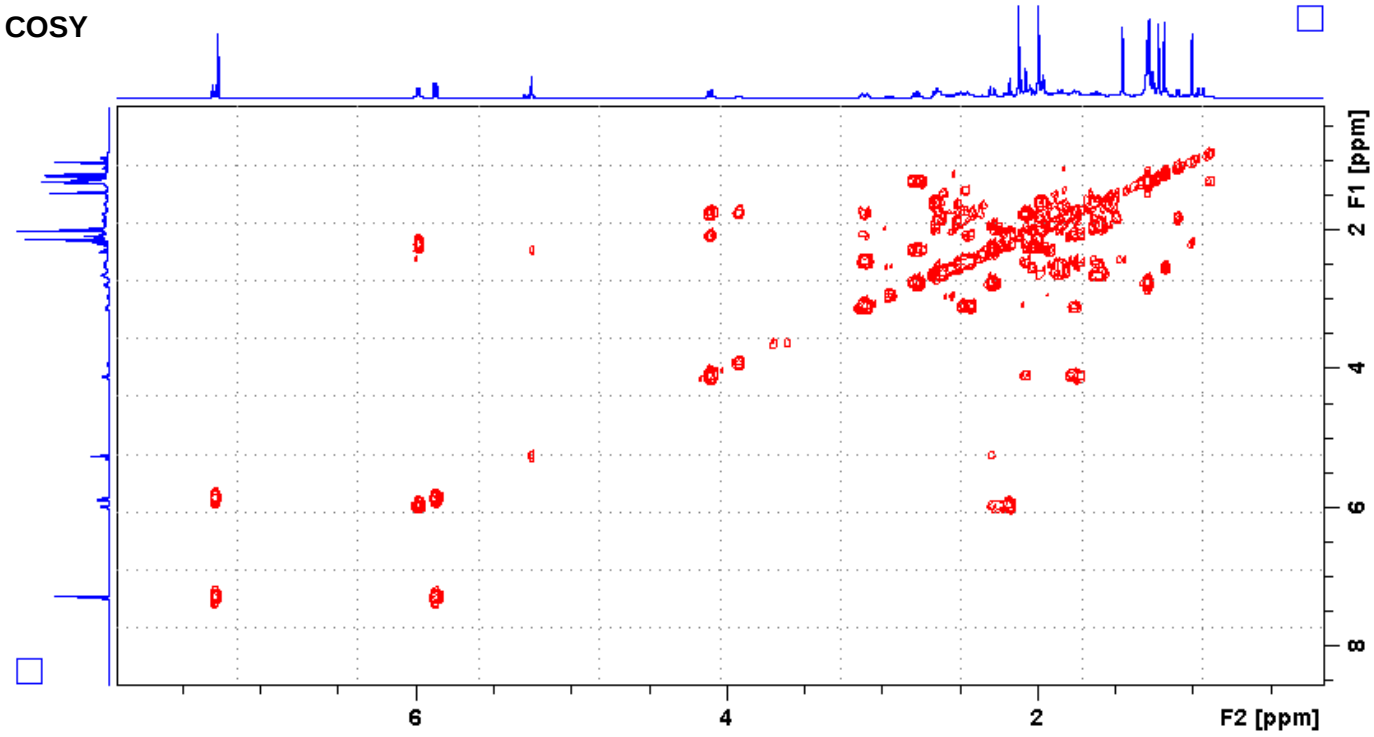
BY-NC-ND

Annexe 10. HSQC et COSY du composé G1

HSQC



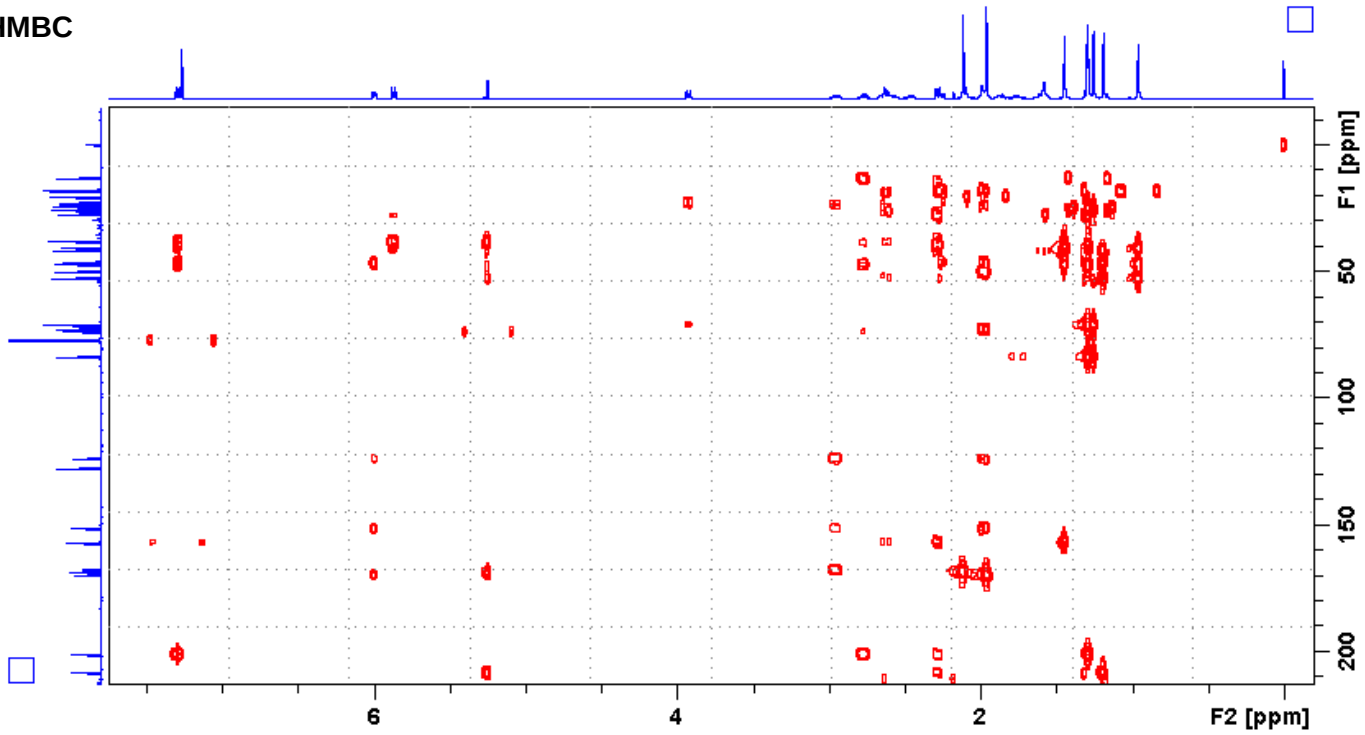
COSY



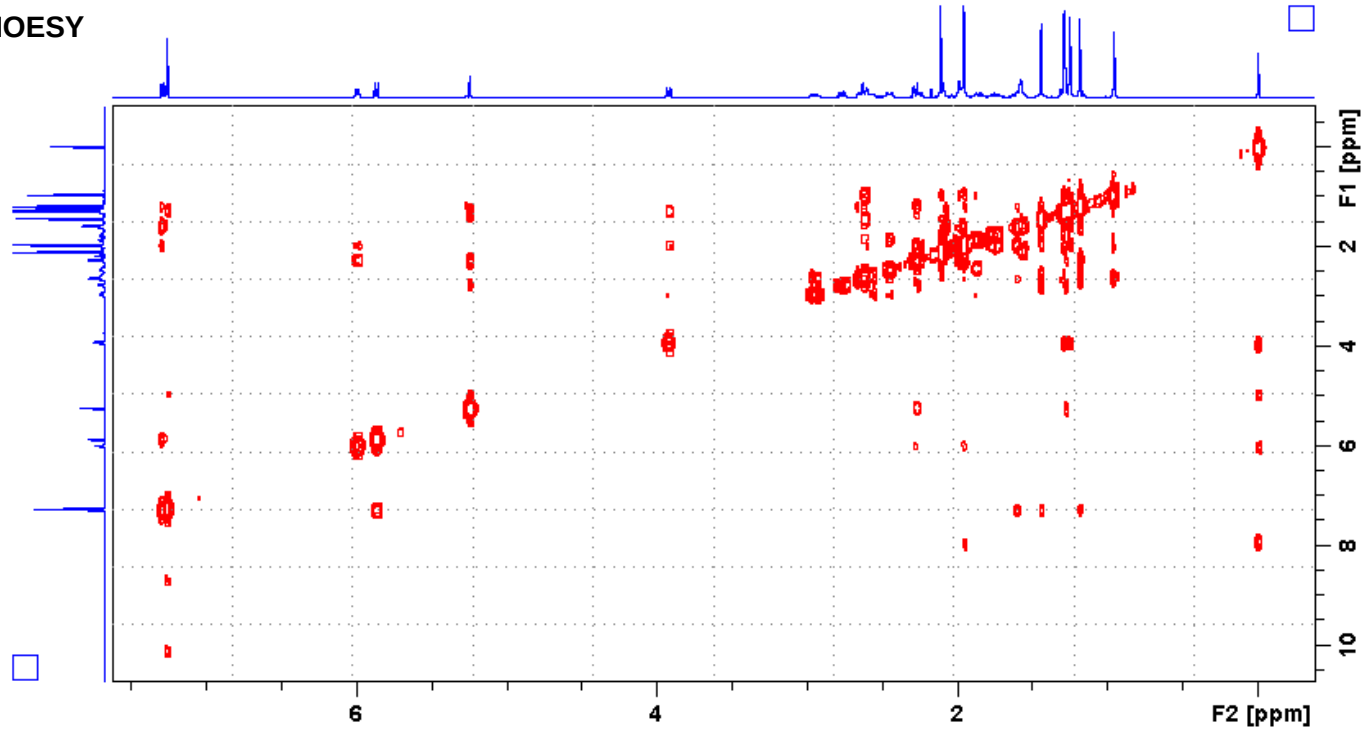
BY-NC-ND

Annexe 11. HMBC et NOESY du composé G1

HMBC

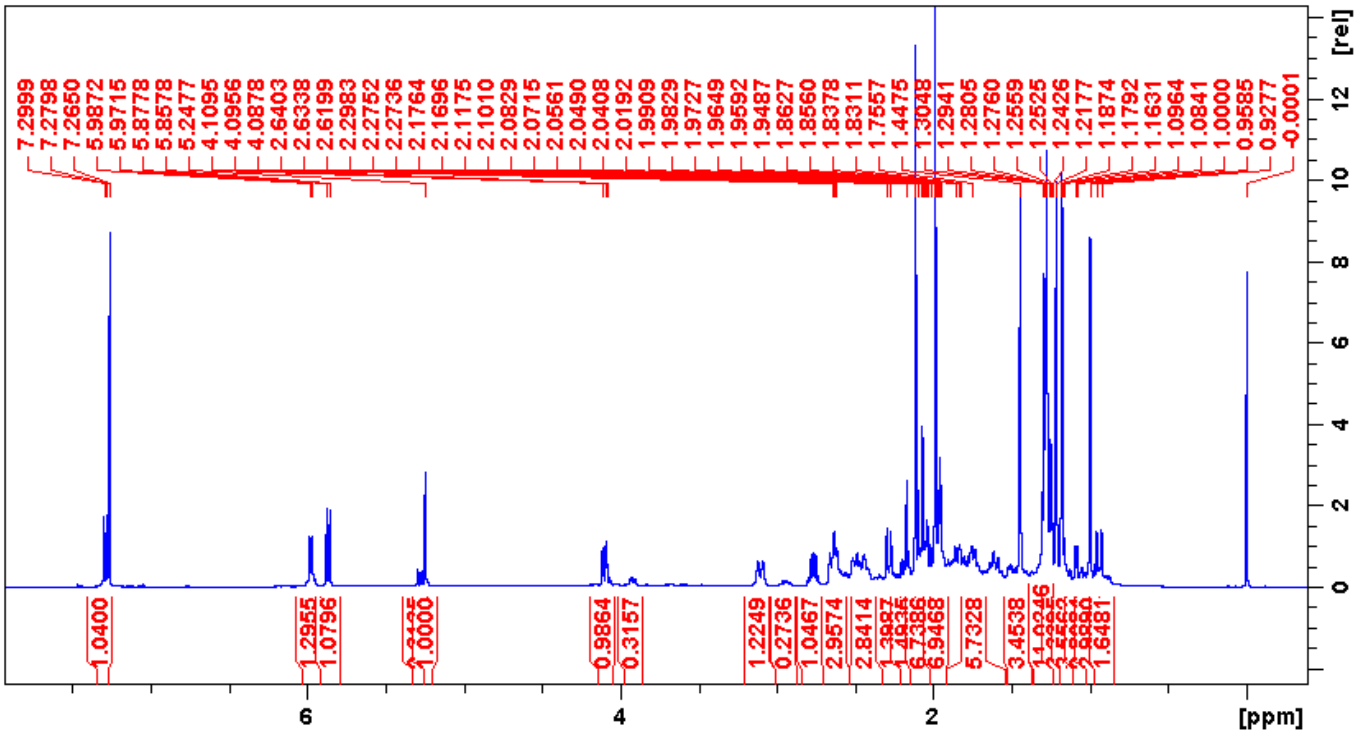


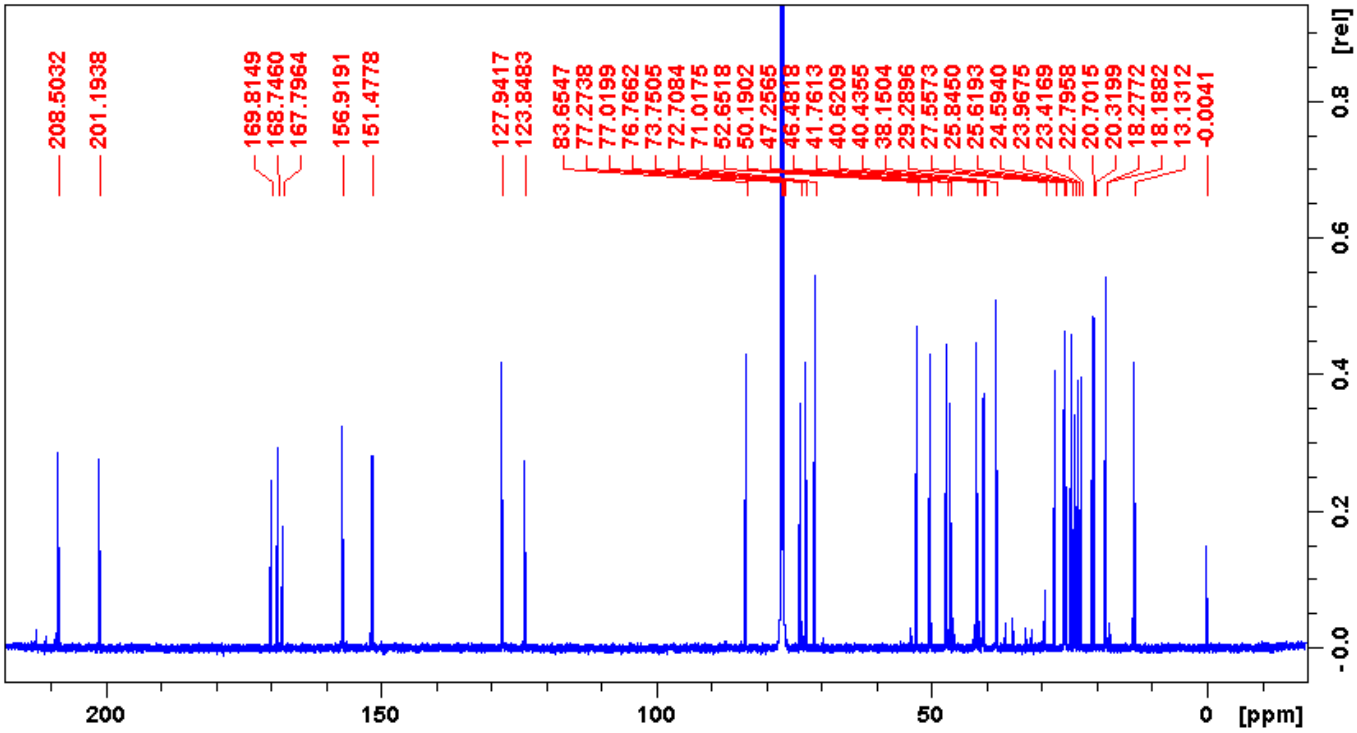
NOESY



BY-NC-ND

Annexe 12. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G2

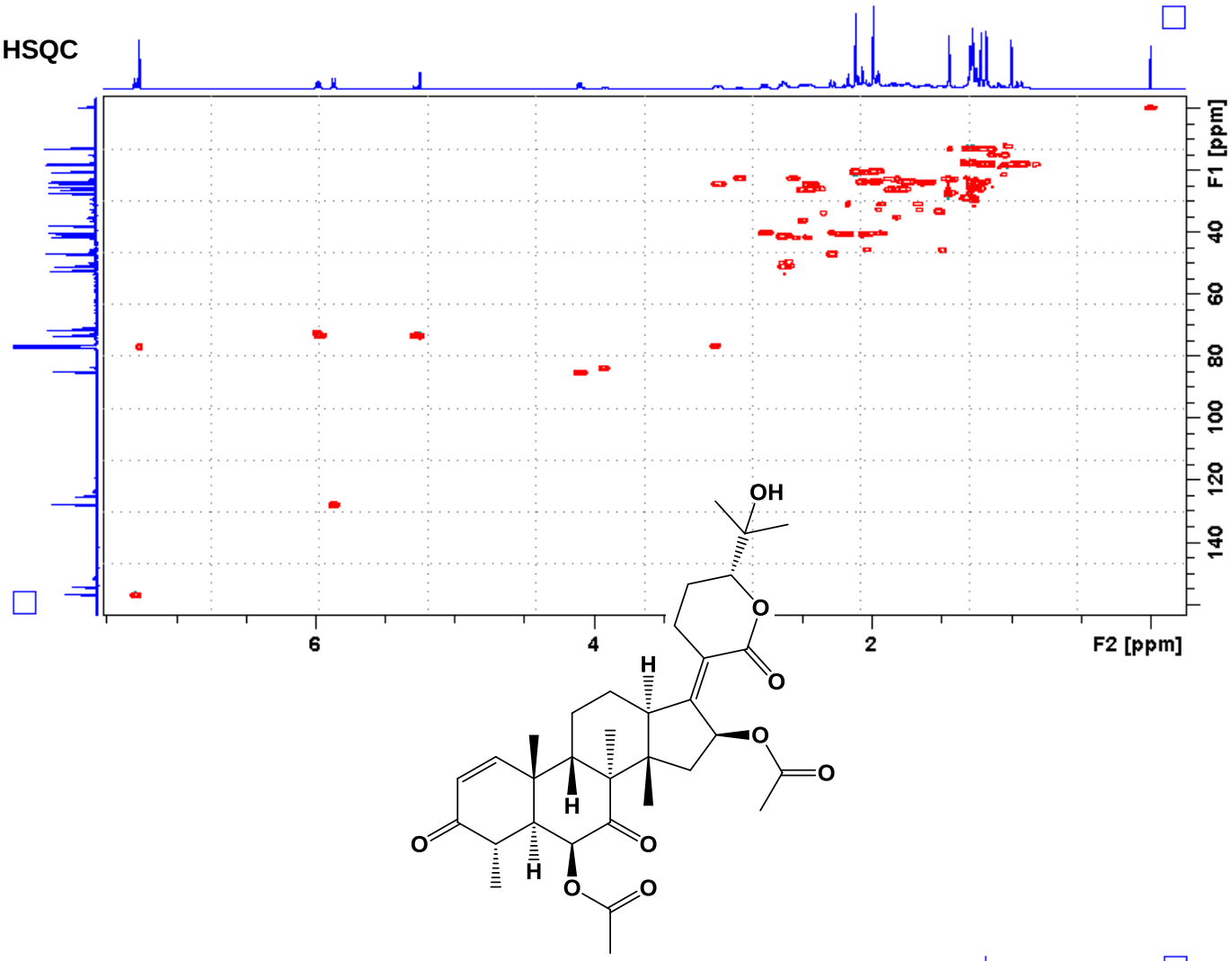




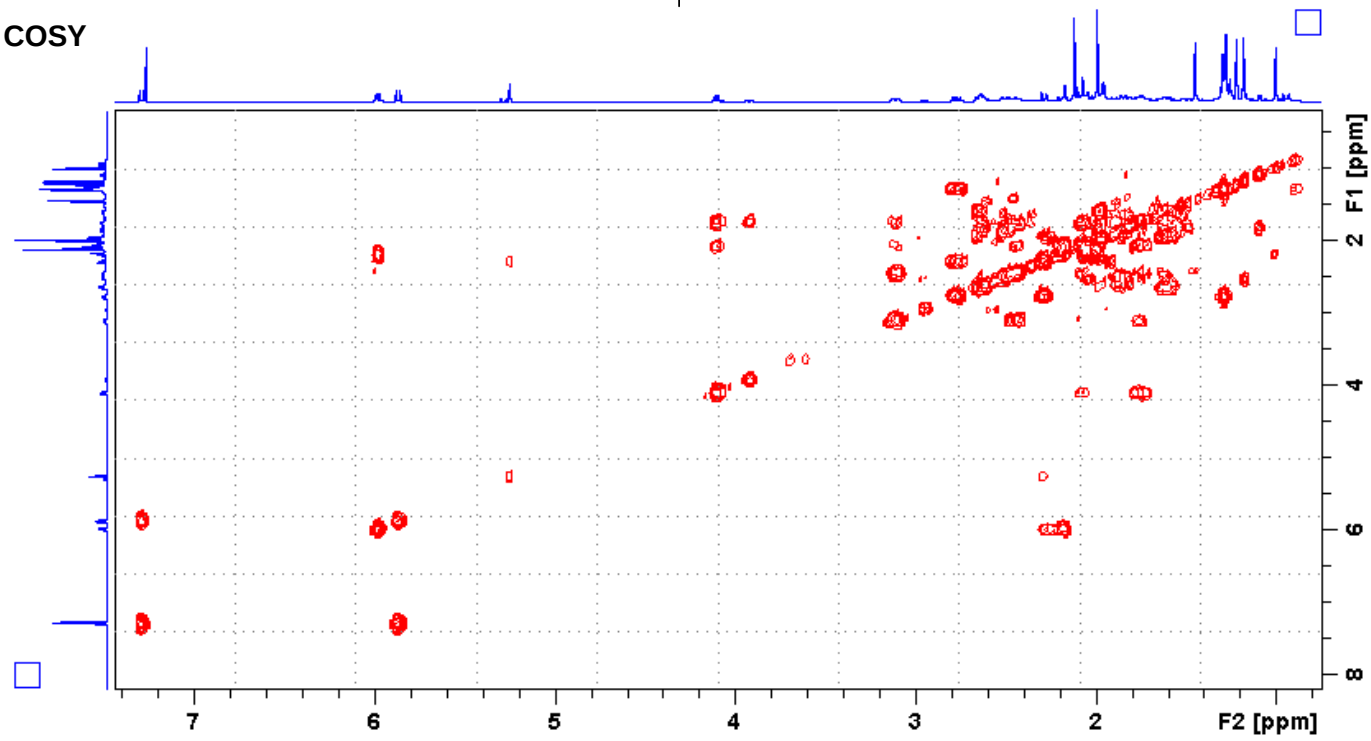
BY-NC-ND

Annexe 13. HSQC et COSY du composé G2

HSQC



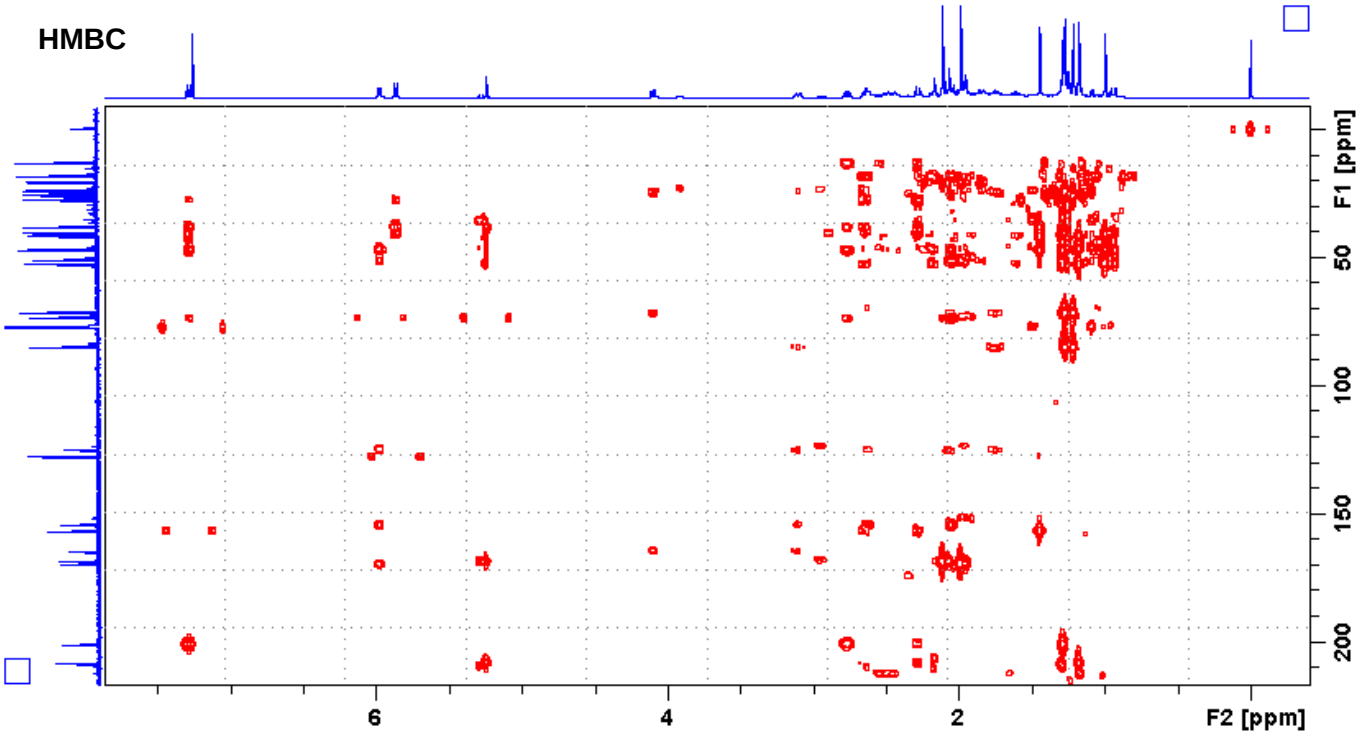
COSY



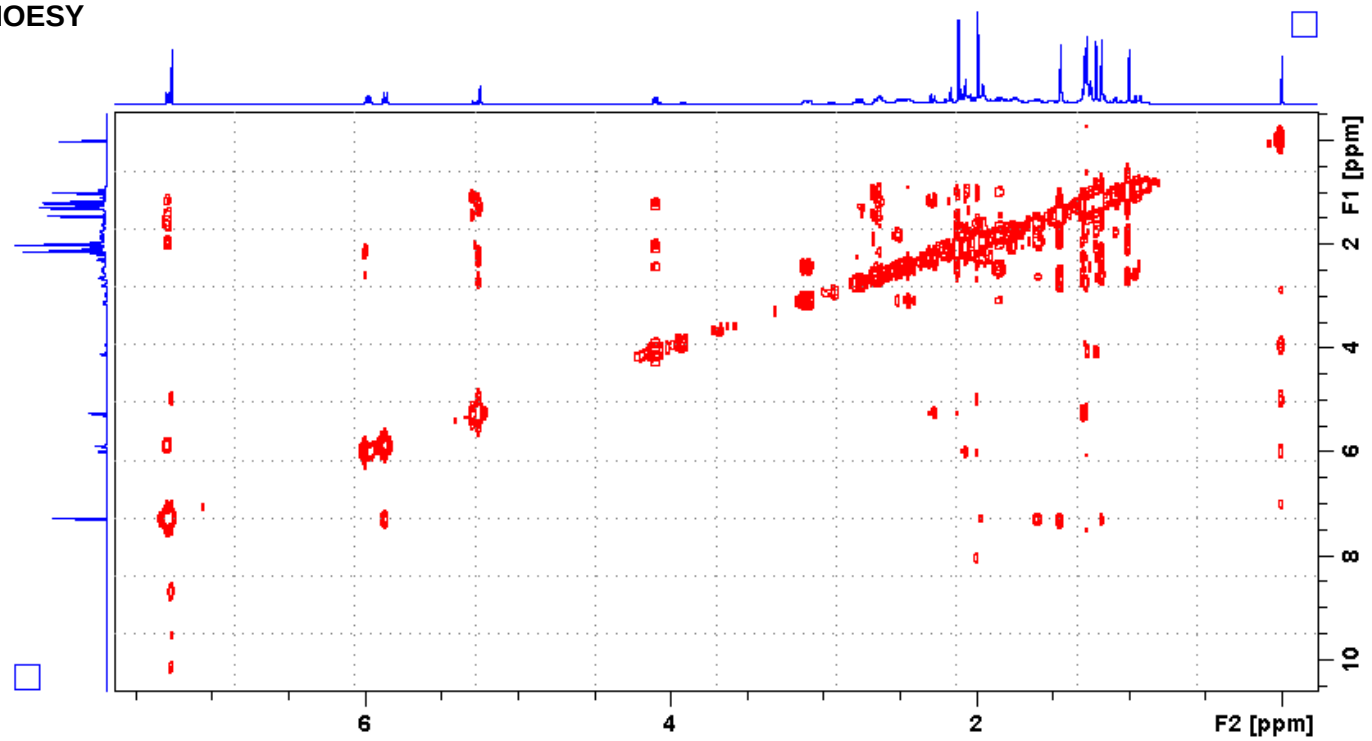
BY-NC-ND

Annexe 14. HMBC et NOESY du composé G2

HMBC

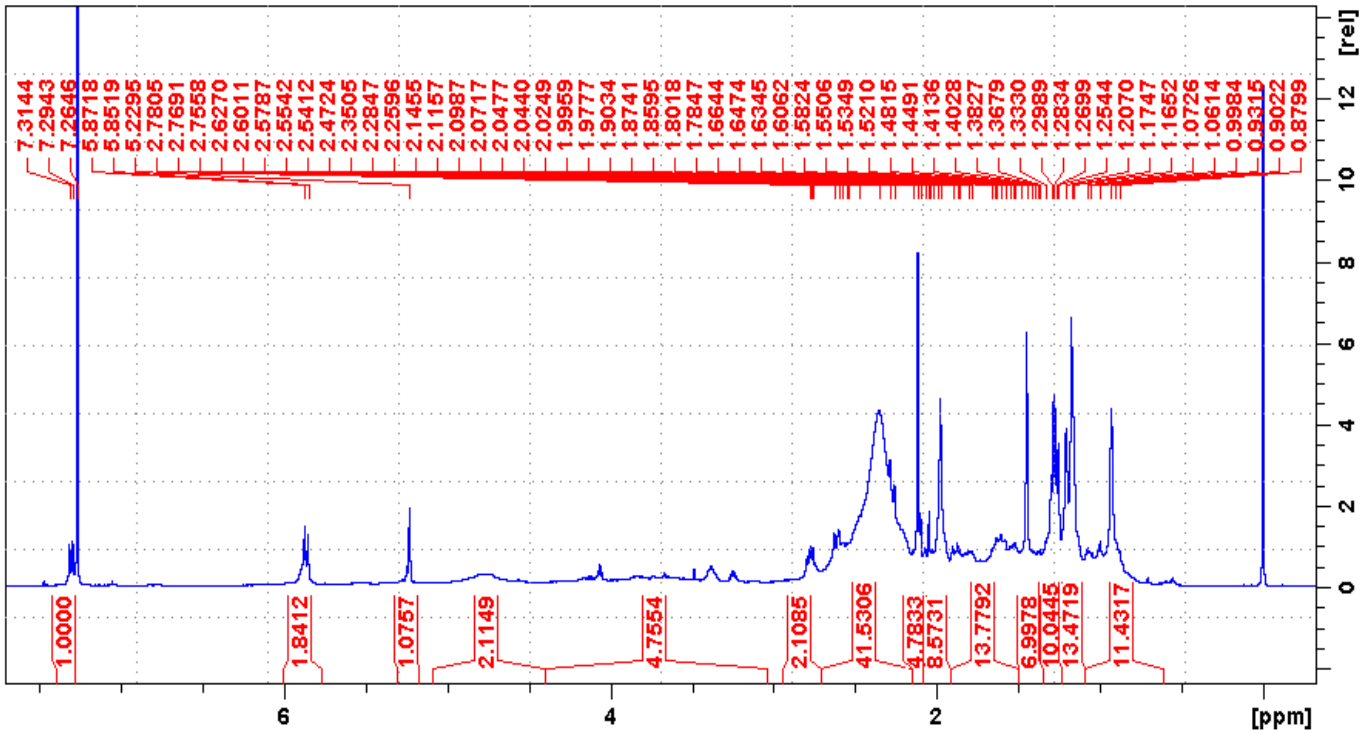


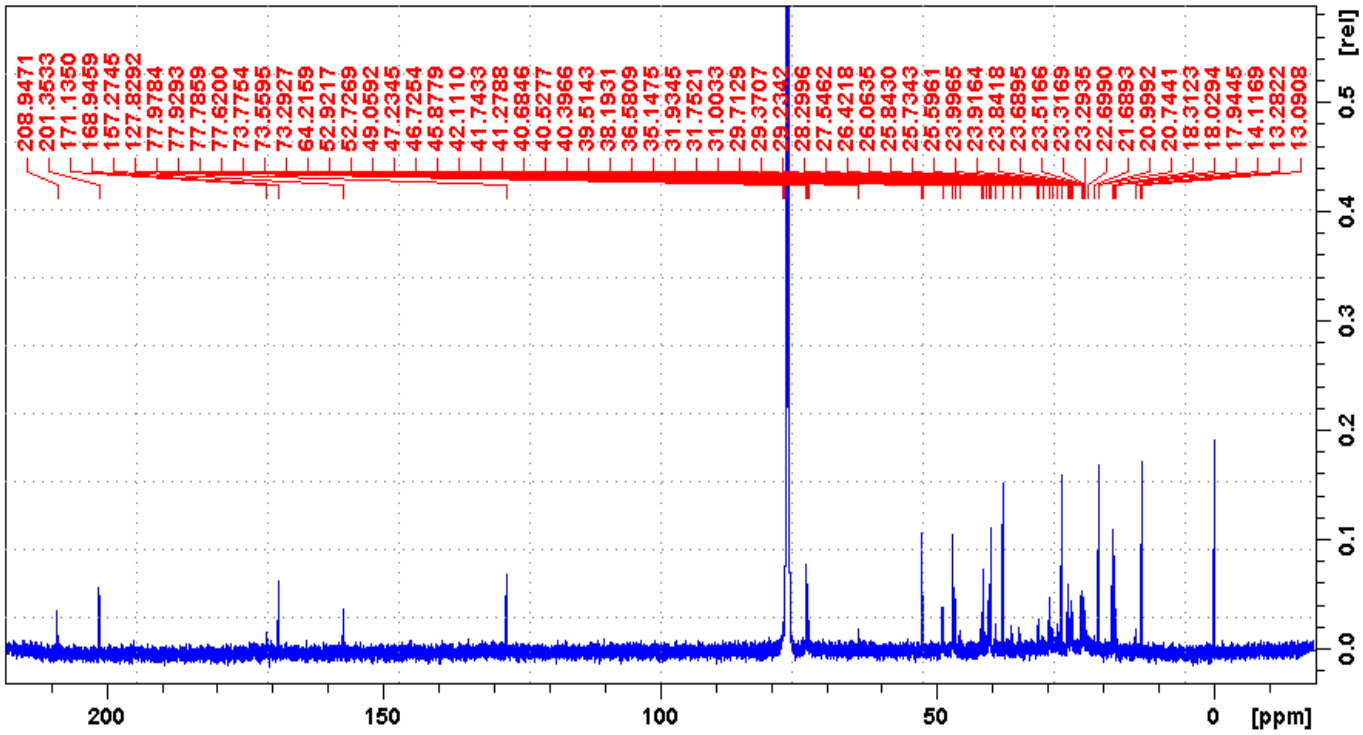
NOESY



BY-NC-ND

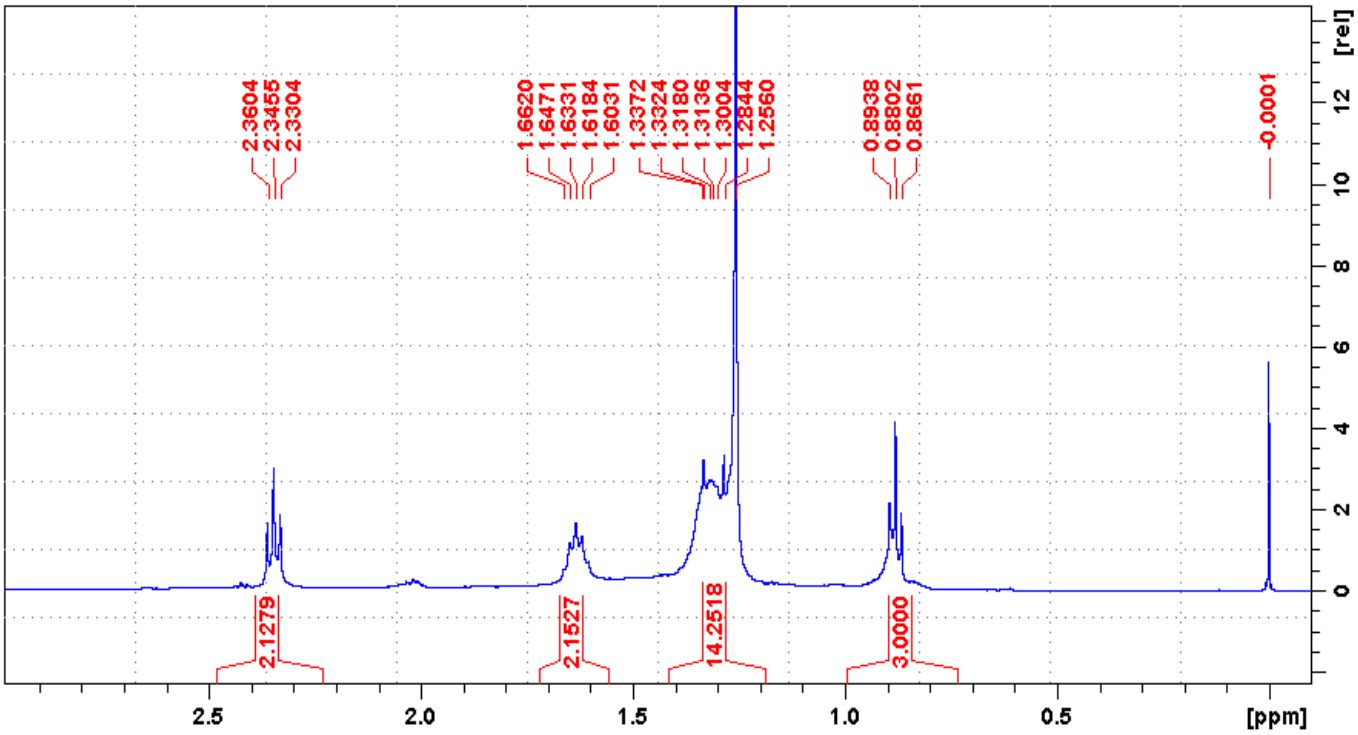
Annexe 15. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G3

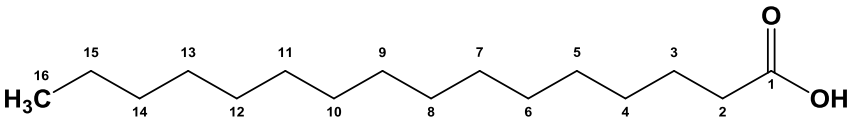


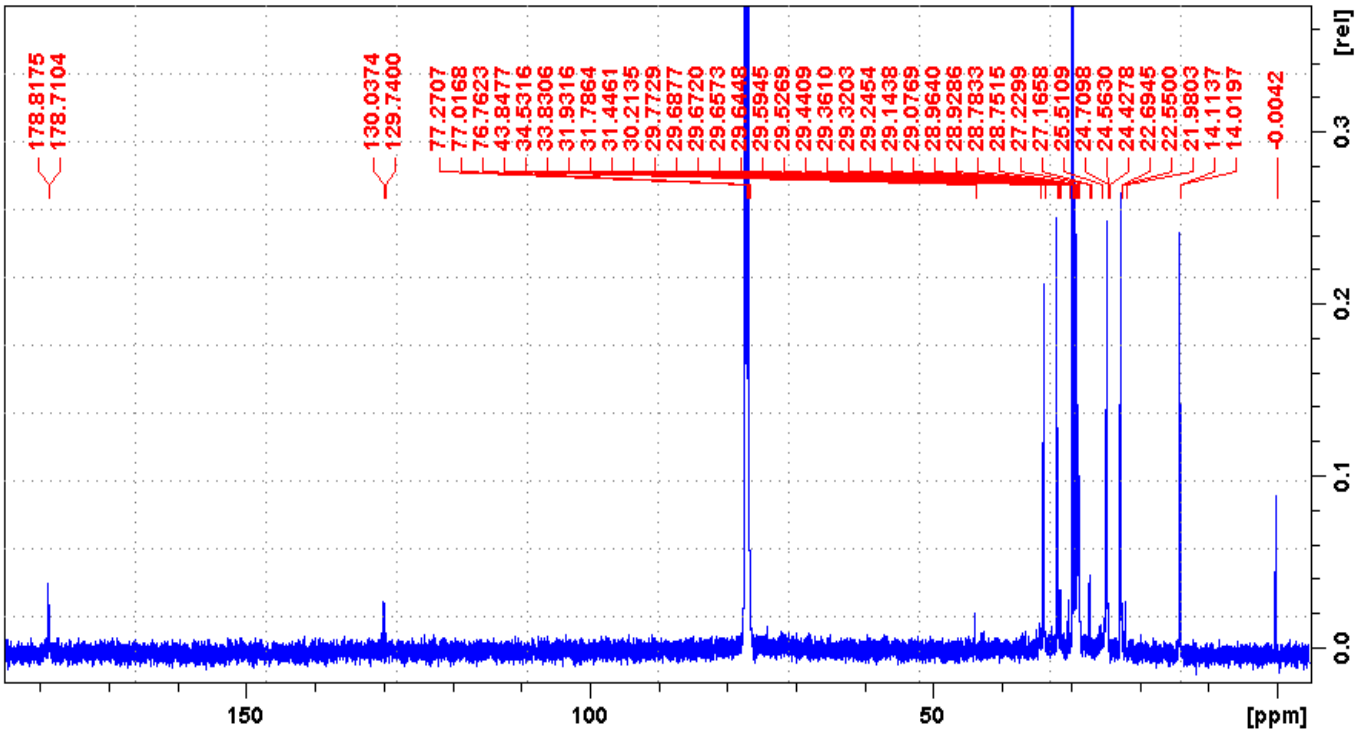


BY-NC-ND

Annexe 16. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) et RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé G4

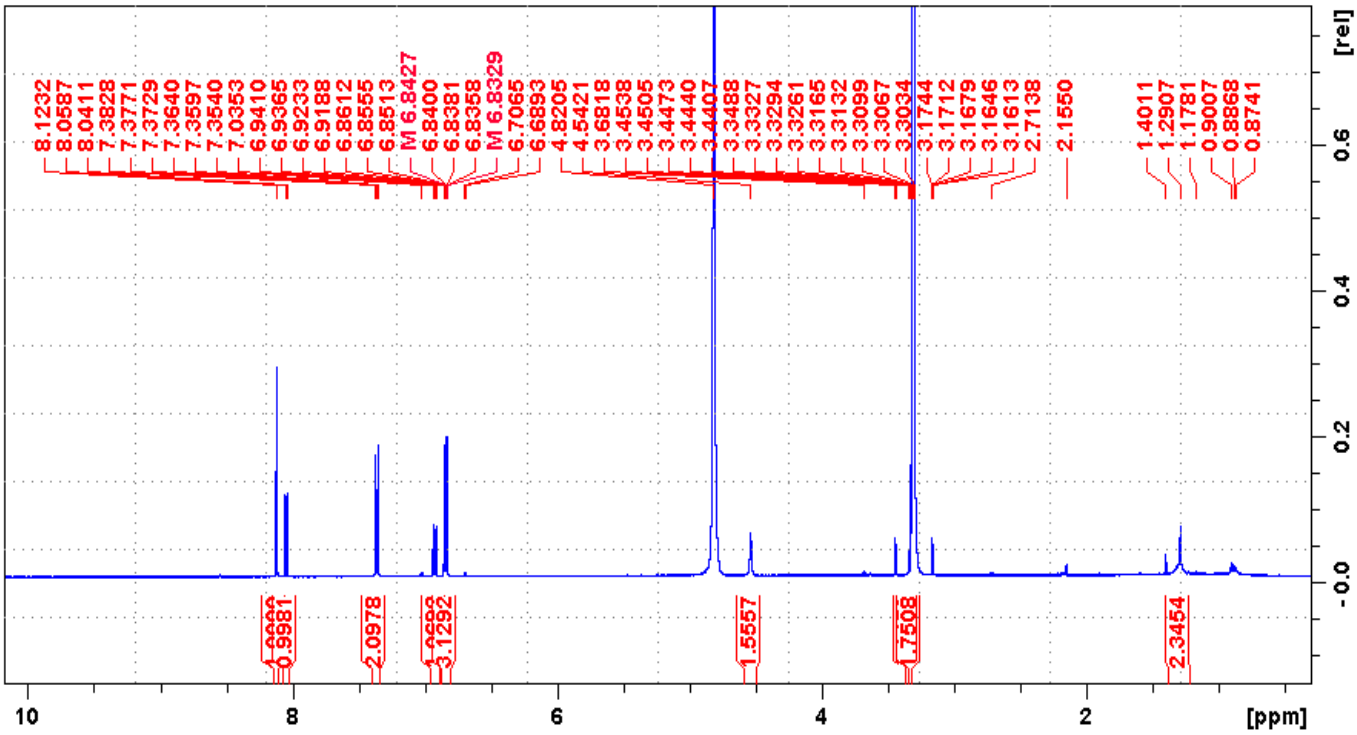


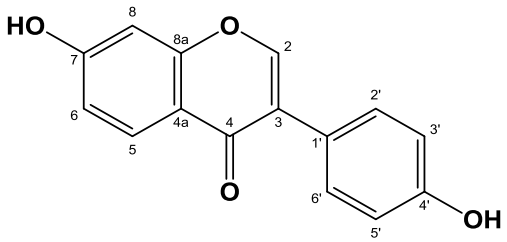


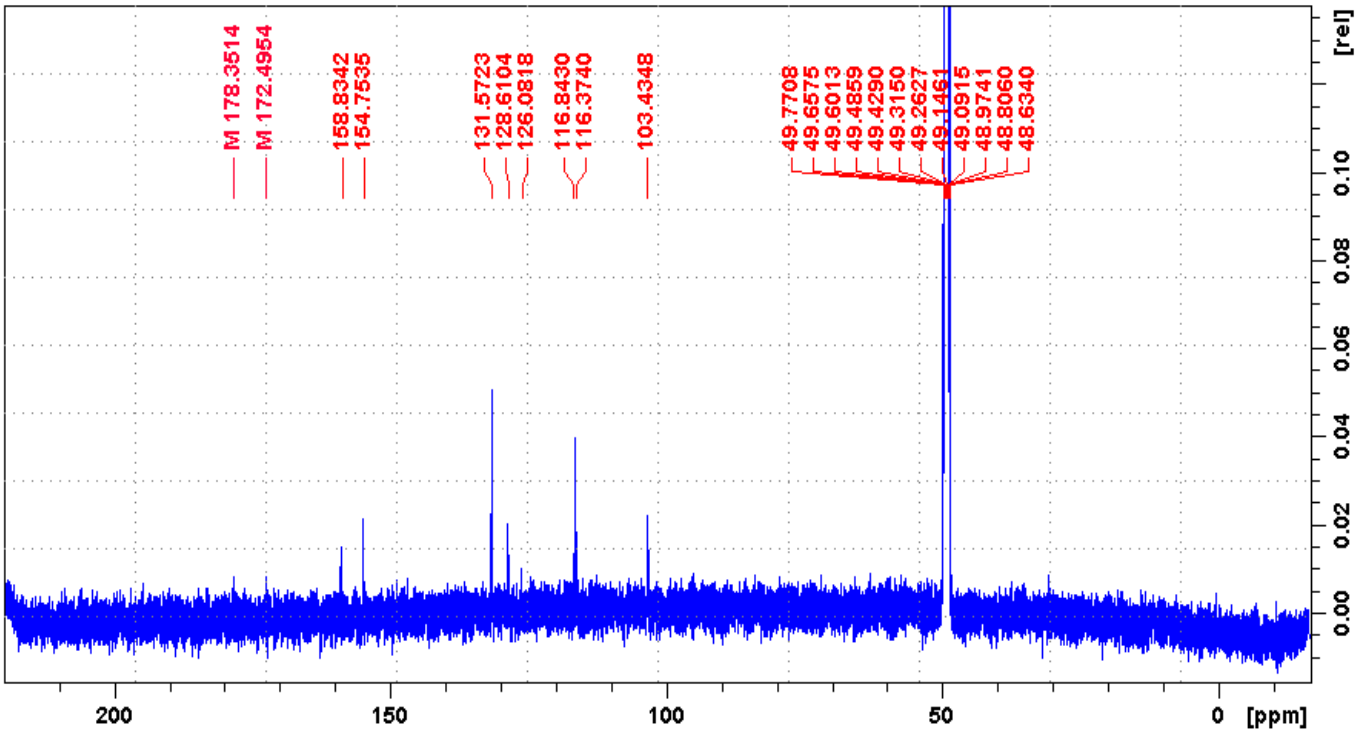


BY-NC-ND

Annexe 17. RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé G5

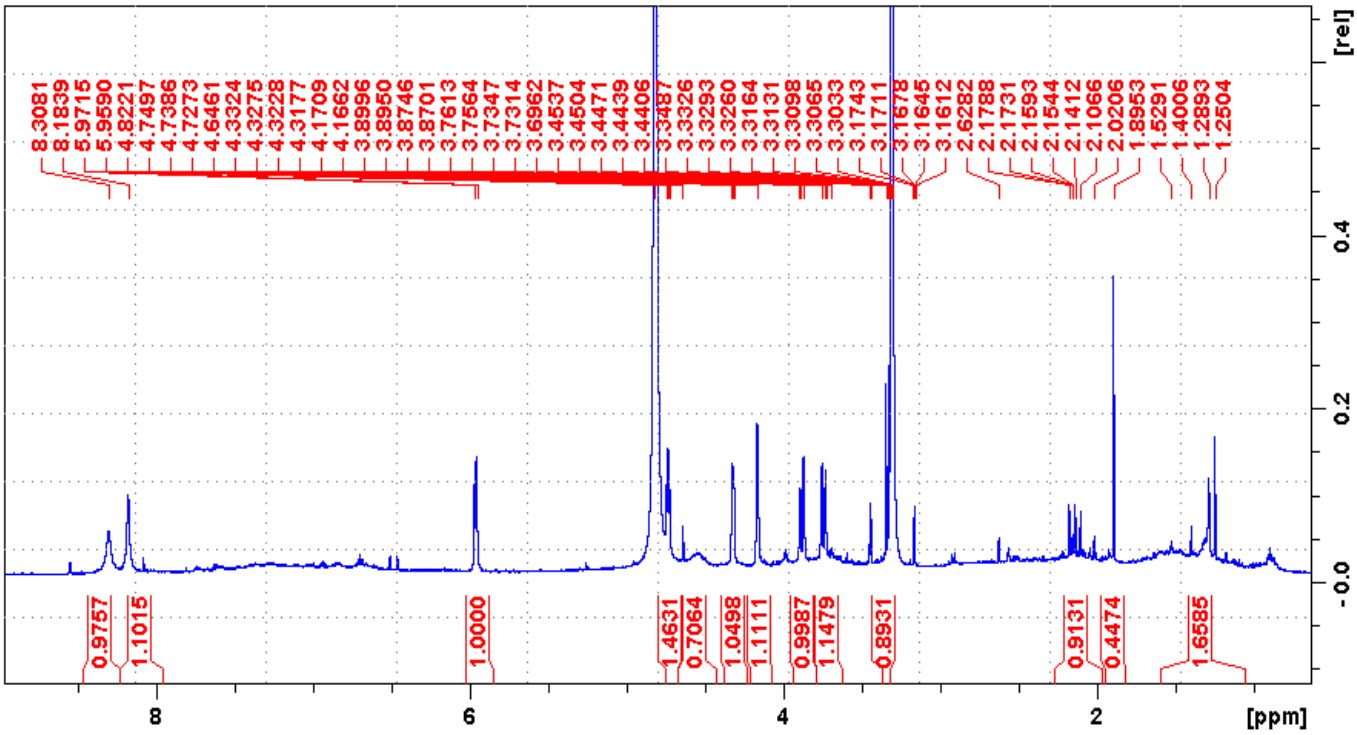


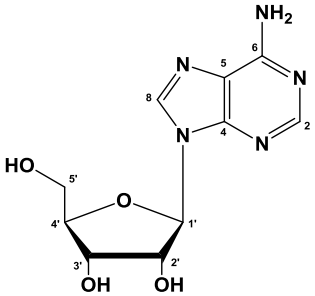


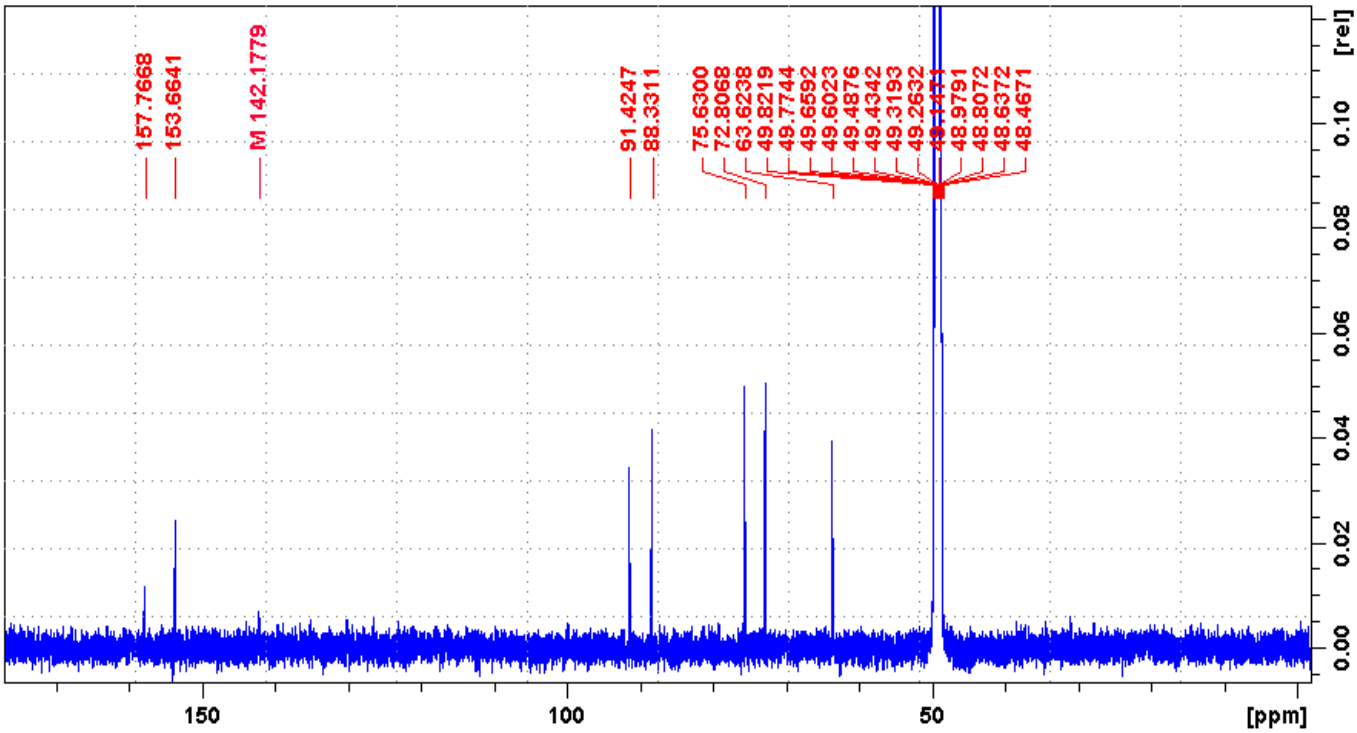


BY-NC-ND

Annexe 18. RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé G6

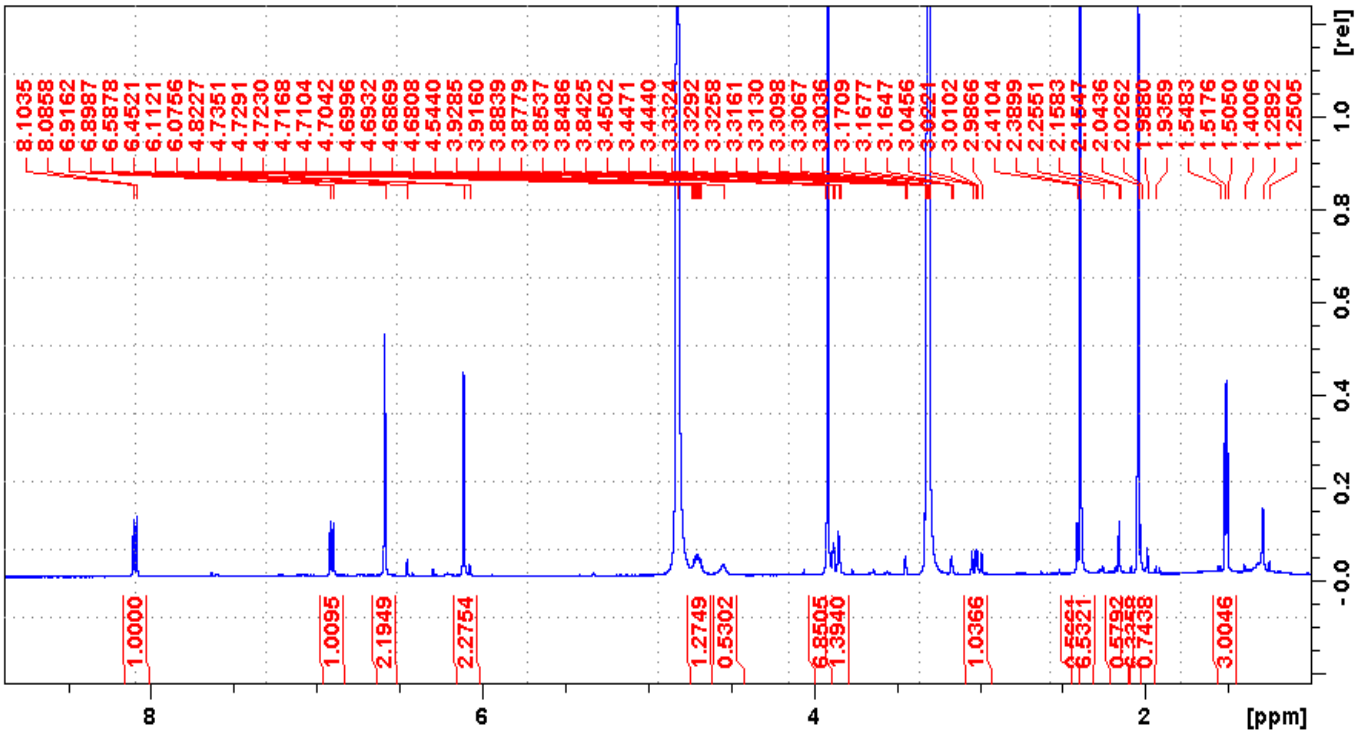


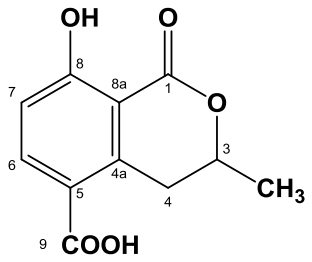


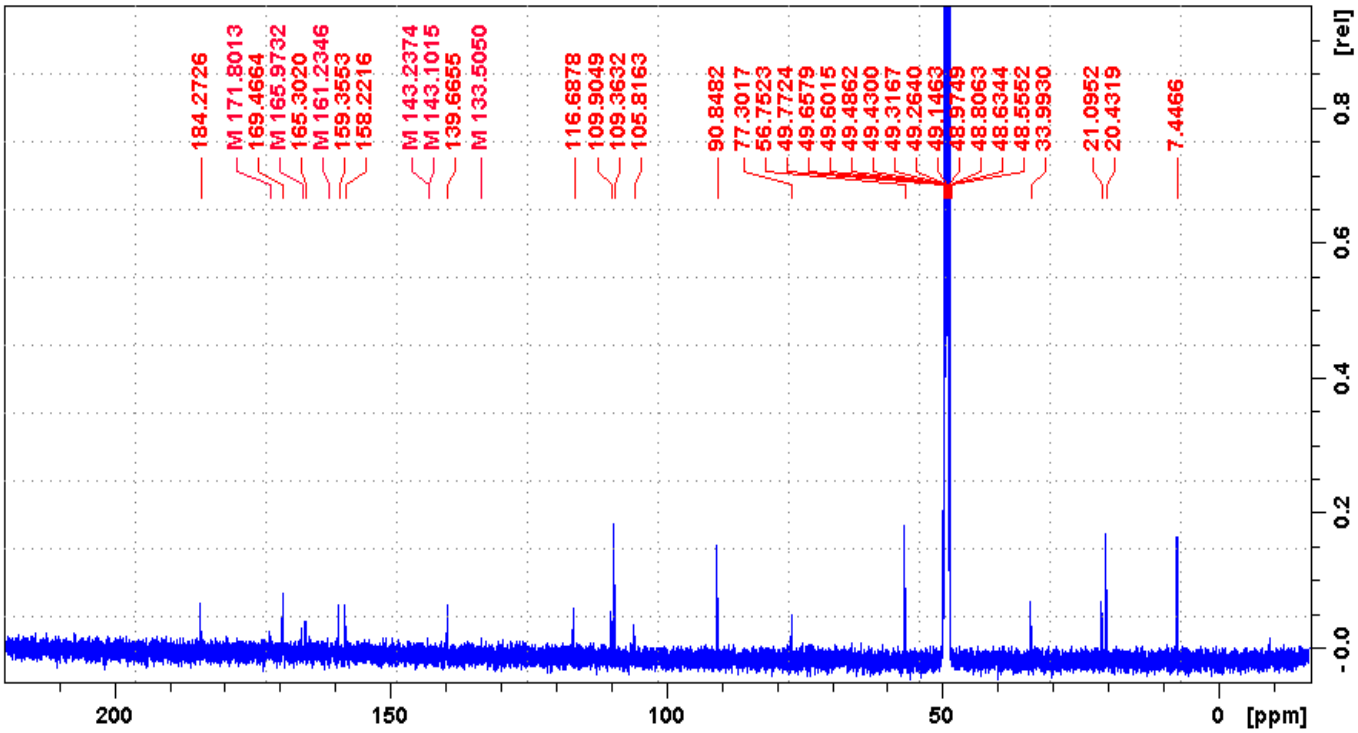


BY-NC-ND

Annexe 19. RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C1

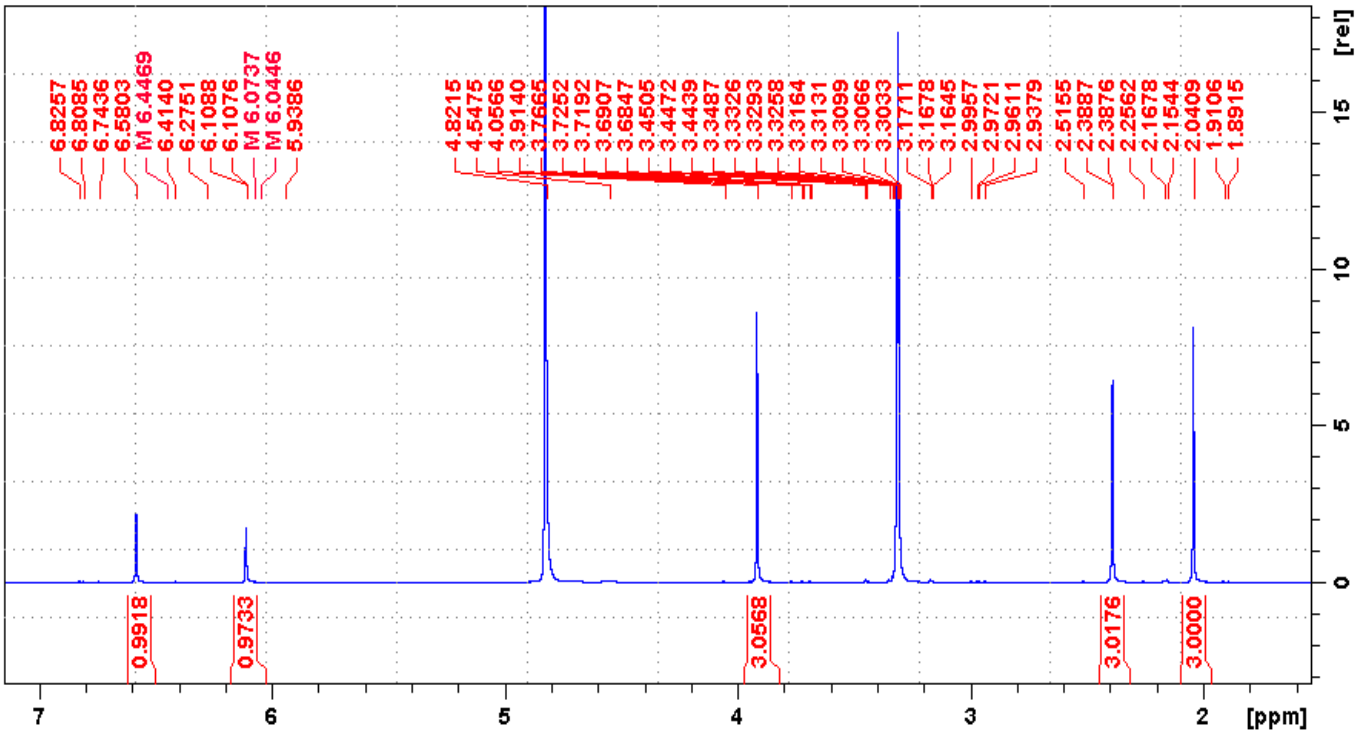


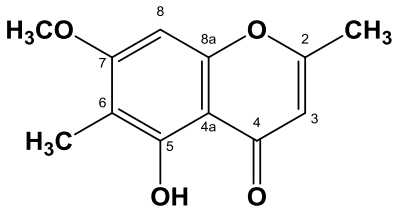


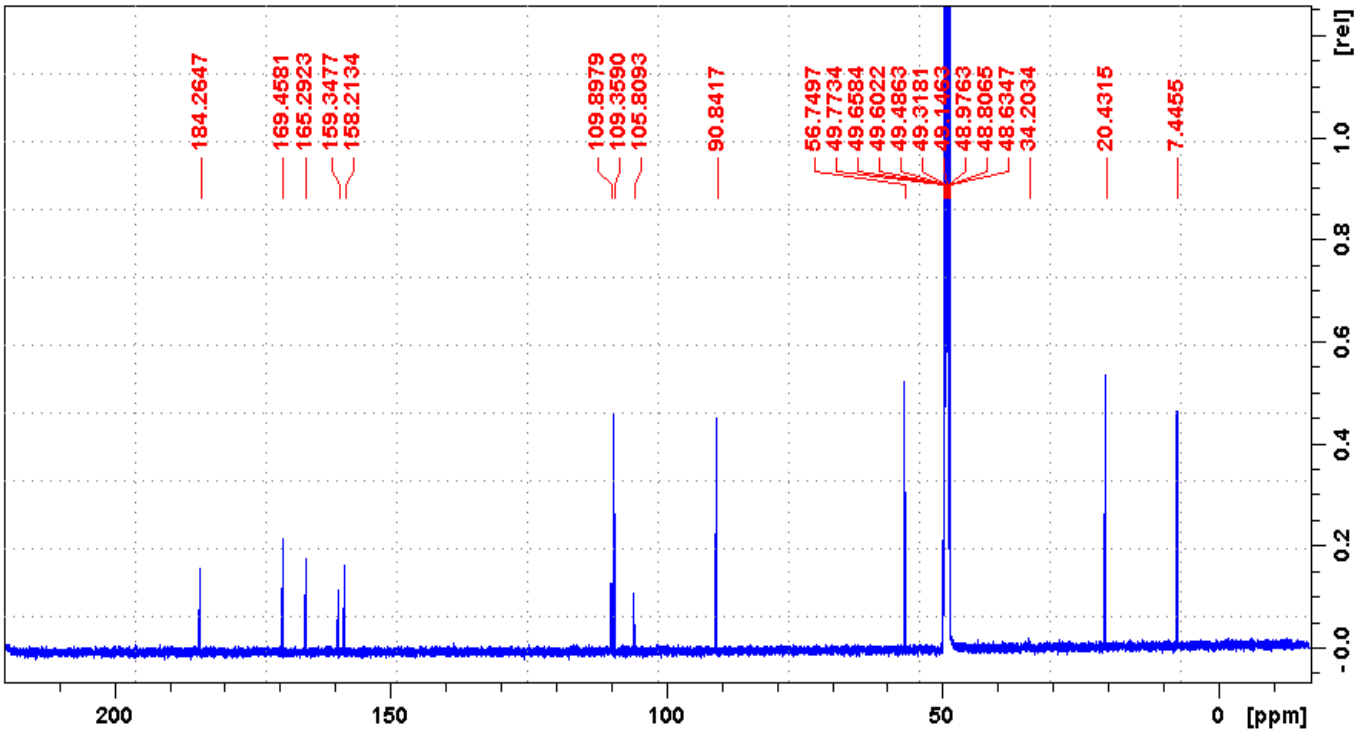


BY-NC-ND

Annexe 20. RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C2

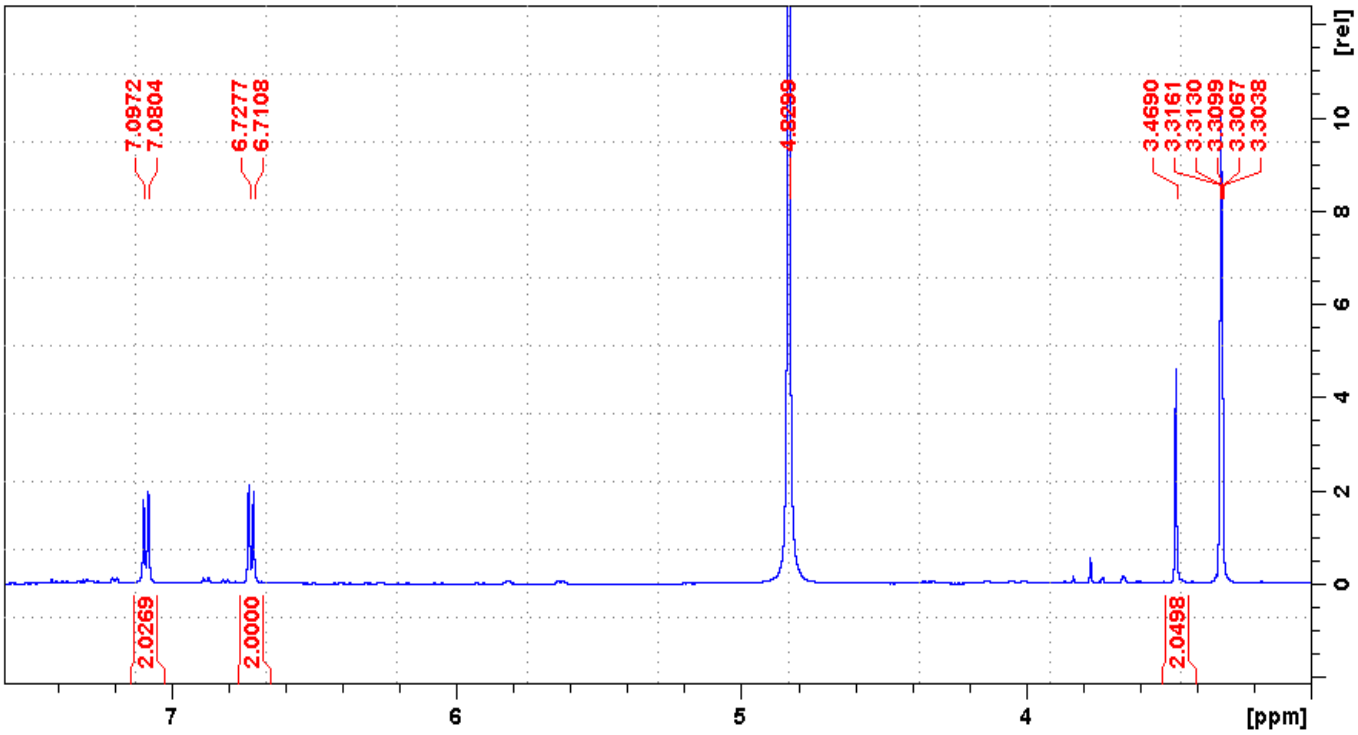


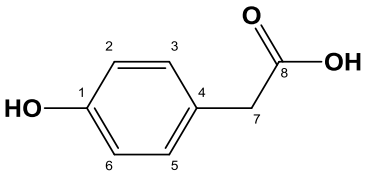


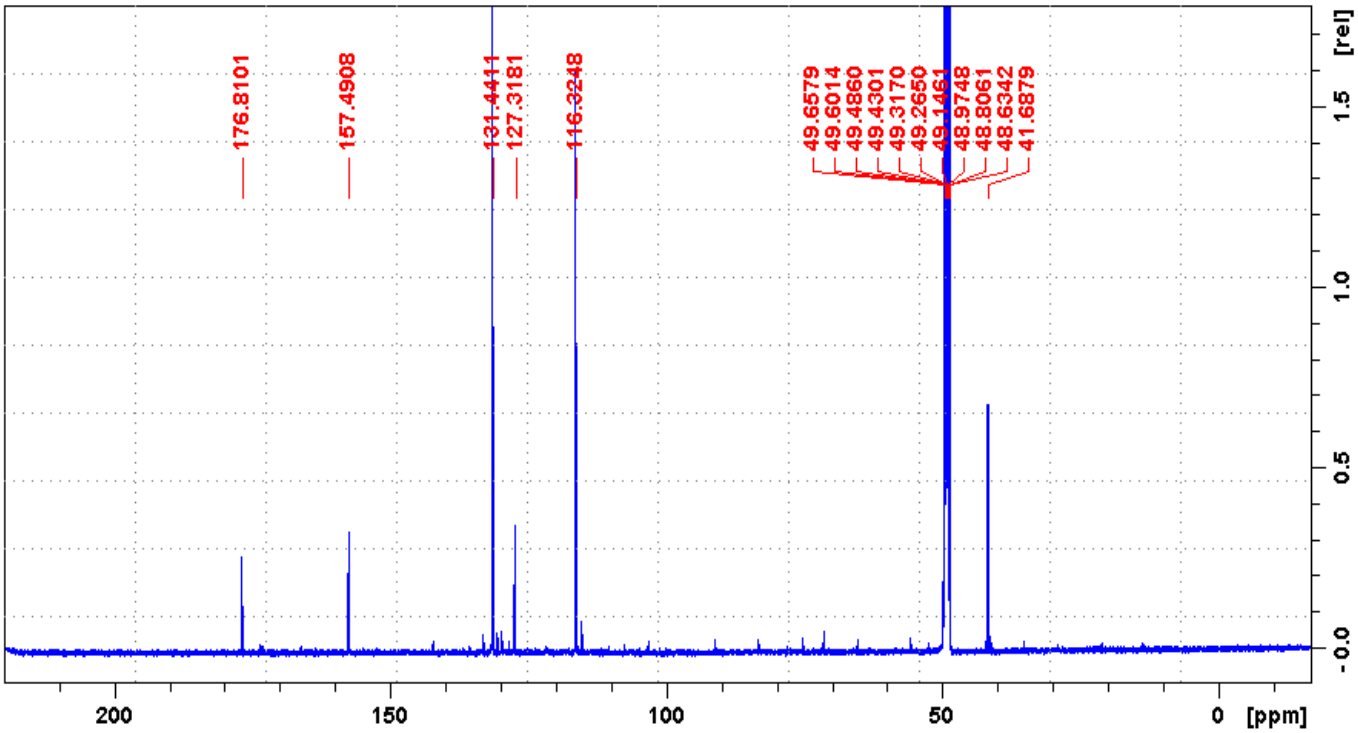


BY-NC-ND

Annexe 21. RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) et RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé C3







BY-NC-ND

BY-NC-ND

Table des illustrations

Figure 1 : Quelques exemples de lichens sur différents types de substrats 26
Figure 2 : Principaux types de thalles lichéniques. 27
Figure 3 : Coupes transversales de lichens observés au microscope optique (x 400). 28
Figure 4 : Échanges nutritionnels entre les partenaires des lichens. 29
Figure 5 : Propagules de dissémination symbiotique. 30
Figure 6 : Organes de reproduction sexuée chez les ascolichens 30
Figure 7 : Basidiomes de *Lichenomphalia umbellifera* 31
Figure 8 : Répartition du genre *Nephroma* Ach. 33
Figure 9 : Céphalodies internes à la médulle 34
Figure 10 : Observation à la loupe binoculaire des apothécies de *Nephroma laevigatum* 35
Figure 11 : Coupe transversale de *Nephroma laevigatum* observé au microscope optique 35
Figure 12 : Ascospores de *Nephroma laevigatum* observé au microscope optique. 35
Figure 13 : Photos des différentes espèces pouvant être confondu avec *Nephroma laevigatum*. 36
Figure 14 : Voies de biosynthèse probables menant aux principaux groupes de métabolites spécifiques du lichen 38
Figure 15 : Structures de quelques précurseurs des polycétides aromatiques 38
Figure 16 : Structures de quelques polycétides aromatiques 39
Figure 17 : Structures de quelques acides aliphatiques 39
Figure 18 : Structures chimiques de l'acide shikimique, de la phénylalanine et des composés dérivés de l'acide pulvinique 40
Figure 19 : Structures des précurseurs des composés de la voie de l'acide mévalonique. 41
Figure 20 : Structures de produits dérivés de la voie de l'acide mévalonique 41
Figure 21 : Structures des métabolites isolés chez *Nephroma laevigatum* 42
Figure 22 : *Nephroma laevigatum* sur son substrat avant récolte 43
Figure 23 : Schéma général d'extractions de *Nephroma laevigatum*. 44
Figure 24 : Analyse par CCM des extraits DCM et AC 45
Figure 25 : Profils phytochimiques des extraits DCM et AC obtenus par CLHP-DAD 45
Figure 26 : Spectre UV de l'émodine et de la 7-chloroémodine de l'extrait DCM 46
Figure 27 : Réseau moléculaire obtenu après visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres MS/MS des différents extratis lichéniques 48
Figure 28 : Structures planes de la fragiline et de la 1-*O*-méthyl-7-chloroémodine et massif isotopique du composé à *m/z* 319 $[M+H]^+$ 49
Figure 29 : Spectres et schéma de fragmentation de la fragiline 49
Figure 30 : Spectre et schéma de fragmentation de la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine 50
Figure 31 : Spectre et schéma de fragmentation du composé inconnu cluster [1] (*m/z* 304 $[M+H]^+$). 50
Figure 32 : Spectre et schéma de fragmentation de l'émodine 51
Figure 34 : Schéma de fragmentation de la 29,30-nor-6,7,22-trihydroxyhopane 52

BY-NC-ND

Figure 35 : Schéma de fragmentation de la 23,24,29,30-tétranor-6,7,22-trihydroxyhopane 53
Figure 36 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 417 $[M+H]^+$..... 53
Figure 37 : Schéma de fragmentation de l'hopane-6α,22-diol 54
Figure 38 : Structures possibles et spectre de fragmentation du composé à m/z 445 [M+H]+ 54
Figure 39 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 459 [M+H]+..... 55
Figure 40 : Schéma de fragmentation de du composé à *m/z* 621 [M+H]+..... 55
Figure 41 : Composés identifiés du cluster [3]..... 56
Figure 42 : Structure du composé à *m/z* 478 [M+H]+..... 56
Figure 43 : Autres structures des composés identifiés par les bases de données du GNPS..... 57
Figure 44 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait DCM de *Nephroma laevigatum* 60
Figure 45 : Structure générale des triglycérides 62
Figure 46 : Structure du composé DCM1 : la trilinoléine 62
Figure 47 : Structure du composé DCM 2 : l'émodine..... 64
Figure 48 : Structure du composé DCM 3 : la 7-chloroémodine 64
Figure 49 : Structure du composé DCM 4 : la 7-chloro-1,6-di-*O*-méthylémodine 65
Figure 50 : Effets antiprolifératifs des deux extraits lichéniques sur la lignée HT-29..... 58
Figure 51 : Signal RPE de DMPO-OOH généré par irradiation de la 7-chloroémodine (n=1)..... 69
Figure 52 : Modèle de développement du biofilm..... 59
Figure 53 : Distribution phylogénétique (ordinal) des champignons endolichéniques 74
Figure 54 : Microscopie électronique à balayage de thalles..... 75
Figure 55 : Phylogénie et classification des champignons appartenant à l'embranchement des Ascomyètes et des Basidiomycètes..... 76
Figure 56 : Exemples d'alcaloïdes isolés de champignons endolichéniques..... 79
Figure 57 : Exemples de terpénoïdes isolés de champignons endolichéniques..... 79
Figure 58 : Exemples de stéroïdes isolés de champignons endolichéniques..... 81
Figure 59 : Exemples de polycétides isolés de champignons endolichéniques..... 82
Figure 60 : Exemples de composés phénoliques isolés de champignons endolichéniques..... 83
Figure 61 : Exemples de peptides isolés de champignons endolichéniques 84
Figure 62 : Exemples de boîte de Pétri avec morceaux de lichen au début de la croissance fongique..... 85
Figure 63 : Arbre phylogénétique des souches de champignons endolichéniques isolées thalles de *Nephroma laevigatum*. 88
Figure 64 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et lieux de récolte 89
Figure 65 : Aspect morphologique de *Coniochaeta hoffmannii*..... 91
Figure 66 : Aspect morphologique de *Daldinia concentrica* 92
Figure 67 : Aspect morphologique de *Peziza varia* 93
Figure 68 : Aspect morphologique de *Nemania aenea* var. *aureolatum* 94
Figure 69 : Aspect morphologique de *Nemania diffusa*..... 92

BY-NC-ND

Figure 70 : Aspect morphologique de *Nemania serpens*..... 94

Figure 71 : Aspect morphologique de *Nemania sp.*..... 95

Figure 72 : Aspect morphologique de *Nemania plumbea*..... 95

Figure 73 : Récapitulatif des masses (rectifiées par rapport au témoin) des différents extraits ... 96

Figure 74 : Récapitulatif des profils CCM des différents extraits *Nemania aenea* var. *aureolatum* et *N. serpens* 97

Figure 75 : Analyse par CCM des six extraits fongiques sélectionnés..... 99

Figure 76 : Superposition des profils CLHP des six extraits fongiques sélectionnés..... 99

Figure 77 : Structures des composés identifiés appartenant à la famille des cyclopeptides..... 100

Figure 78 : Réseaux moléculaires obtenus après visualisation par Cytoscape des interconnexions des spectres MS/MS des différents extratis fongiques..... 101

Figure 79 : Structures des composés identifiés des clusters [2] ; [3] et [4] 100

Figure 80 : Observation macroscopique des souches Cor_08 et Gir_26..... 103

Figure 81 : Effets antiprolifératifs à 48h des extraits fongiques de *Nemania aenea* var. *aureolatum* sélectionnés sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales HT-29 et HCT116 et prostatiques PC-3 et DU145 104

Figure 82 : Effets antiprolifératifs à 48h des extraits fongiques de *Nemania serpens* sélectionnés sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales HT-29 et HCT116 et prostatiques PC-3 et DU145..... 105

Figure 83 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur l'expression des pro-caspase-8 et -3 sur la lignée cellulaire HT-29..... 108

Figure 84 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur l'expression des pro-caspase-8 et -3 sur la lignée cellulaire PC-3 108

Figure 85 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur le clivage de la PARP dans la lignée cellulaire HT-29 109

Figure 86 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur le clivage de la PARP dans la lignée cellulaire PC-3 109

Figure 87 : Effets des extraits Gir_20 et Cor_08 sur la fragmentation de l'ADN..... 109

Figure 88 : Modèle de développement du biofilm..... 110

Figure 89 : Comparaison des profils CLHP des cultures de Gir_20 à grande (GE) et petite (PE) échelle 112

Figure 90 : Comparaison des profils CLHP des cultures de Cor_08 à grande (GE) et petite (PE) échelle 113

Figure 91 : Quelques exemples de composés isolés de Nemania serpens..... 115

Figure 92 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait Gri_20 (*N. aenea var. aureolatum)* 115

Figure 93 : Structure plane du composé G1..... 119

Figure 94 : Structure de l'acide hélvolique..... 119

Figure 95 : Hypothèse de biosynthèse du composé G1 à partir de l'acide hélvolique..... 120

Figure 96 : Structure du composé G1..... 120

Figure 97 : Structure du composé G2..... 121

Figure 98 : Corrélations NOESY observées entre les protons H-24 et les protons H22a ou H22b pour les composés G1 (rouge) et G2 (bleu) 122

BY-NC-ND

Figure 99 : Structures des composés G1 et G2 en 3 dimensions 122
Figure 100 : Structure du composé G4 : l'acide palmitique. 124
Figure 101 : Structure du composé G5 : la daidzéine 125
Figure 102 : Principales corrélations HMBC et COSY observées pour l'adénosine 126
Figure 103 : Fractionnement CLHP semi-préparative de la fraction I (300 nm) 127
Figure 104 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de l'extrait Gri_20 (*N. serpens)* 128
Figure 105 : Corrélations observées en COSY pour la 5-carboxyméllèine 129
Figure 106 : Principales corrélations HMBC observées pour l'eugénitine 131
Figure 107 : Structure du composé C3 : l'acide *para*-hydroxyphénylacétique 132
Figure 108 : Structures des composés identifiés par la base de données du GNPS 132
Figure 109 : Réseau moléculaire obtenu après visualisation par Cytoscape des inteconnexions des spectres MS/MS des différentes fractions de Cor_08 133
Figure 110 : Isoflavones identifiées dans le réseau moléculaire à paretir des bases de données du GNPS 134
Figure 111 : Structures des composés identifiés du cluster [2] 134
Figure 112 : Structures des composés identifiés du cluster [5] 134
Figure 113 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées et leurs positions sur l'ADN ribosomique. 148
Figure 114 : Schéma représentant les principales étapes de création des réseaux moléculaires par le GNPS 155
Figure 115 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DCM 157
Figure 116 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait Gir_20 158
Figure 117 : Schéma récapitulatif de l'isolement des composés purs C1, C2 et C3 issus du fractionnement de l'extrait Cor_08 159
Figure 118 : Courbe de corrélation DO_{600nm} mesurée = f (dilutions) obtenue permettant la détermination de la valeur ε. 167
Figure 119 : Détection de l'anion superoxyde *via* le DMPO 169

BY-NC-ND

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification du genre *Nephroma* 32

Tableau 2 : Quelques exemples de métabolites secondaires lichéniques et leurs activités biologiques associées 42

Tableau 3 : Récapitulatif des différents signaux observés dans l'extrait DCM..... 46

Tableau 4 : Données spectrales RMN (400 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 1..... 62

Tableau 5 : Données spectrales RMN (400 MHz, Acétone-d_6) du composé DCM 2..... 63

Tableau 6 : Données spectrales RMN (400 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 3..... 65

Tableau 7 : Données spectrales RMN (400 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé DCM 4..... 66

Tableau 8 : Récapitulatif des différentes CI_{50} obtenues pour les deux extraits lichéniques sur la lignée cellulaire HT-29..... 58

Tableau 9 : Récapitulatif des différentes CI_{50} obtenues pour les trois anthraquinones isolées de *Nephroma laevigatum* sur les lignées cellulaires HT-29, HCT116, PC-3 et DU145 67

Tableau 10 : Concentrations inhibant 50% du développement du biofilm des deux extraits lichéniques..... 59

Tableau 11 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et lieux de récolté 85

Tableau 12 : Désignation taxonomique des souches et pourcentage de similarité 87

Tableau 13 : Répartition des souches de champignons endolichéniques isolées par espèces et milieux de culture..... 89

Tableau 14 : Récapitulatif des souches sélectionnées..... 97

Tableau 15 : Récapitulatif des masses d'extraits pour les six extraits fongiques 98

Tableau 16 : Récapitulatif des différentes CI_{50} obtenues pour les six extraits fongiques testés 106

Tableau 17 : Observations microscopiques de la lignée cellulaire HT-29 après traitement à 24, 48 et 72h..... 106

Tableau 18 : Observations microscopiques de la lignée cellulaire PC-3 après traitement à 24, 48 et 72h..... 107

Tableau 19 : Concentrations inhibant 50% du développement du biofilm des six extraits fongiques 111

Tableau 20 : Récapitulatif des différentes CI_{50} obtenues pour les extraits fongiques en production à grande échelle. 113

Tableau 21 : Données spectrales RMN (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY ; HMBC et NOESY du composé G1 117

Tableau 22 : Données spectrales RMN (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY ; HMBC et NOESY du composé G2 118

Tableau 23 : Données spectrales RMN (500 MHz, $CDCl_3$) et corrélations COSY et HMBC du composé G4 123

Tableau 24 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations HMBC du composé G5 125

BY-NC-ND

Tableau 25 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé G6 127

Tableau 26 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C1 129

Tableau 27 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C2 130

Tableau 28 : Données spectrales RMN (500 MHz, CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC du composé C3 131

Tableau 29 : Récapitulatif des différentes CI50 obtenues pour les deux stéréoisomères isolés de *Nemania aenea* var. *aureolatum* 135

Tableau 30 : Composition des milieux de culture utilisés 144

Tableau 31 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés 163

Tableau 32 : Récapitulatif des différentes dilutions utilisées pour la détermination de la valeur ε 166

BY-NC-ND

Sommaire

INTRODUCTION 19

PARTIE A – Lichens et métabolites secondaires 23

Chapitre I. Les lichens 25
I.1. Qu'est-ce qu'un lichen ? 25
I.2. Répartition, écologie et diversité 25
I.3. Morphologies et anatomies des lichens 26
I.4. Échanges nutritionnels entre mycobionte et photobionte 28
I.5. Les différents types de reproduction chez les lichens 29
I.6. Utilisation des lichens 31
I.7. Le genre Nephroma 32

Chapitre II. Métabolites lichéniques 37
II.1. Voies de biosynthèse 38
II.2. Composés isolés de *Nephroma laevigatum* 41
II.3. Activités biologiques 42

Chapitre III. Résultats et discussion 43
III.1. Récolte et identification de *Nephroma laevigatum* 43
III.2. Extractions successives 44
III.3. Profilage chimique des extraits lichéniques 44
III.4. Évaluation des activités biologiques des extraits lichéniques 58
III.5. Étude phytochimique de *Nephroma laevigatum* 60
III.6. Activités antiprolifératives des composés isolés 66
III.7. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) 68

PARTIE B – Champignons endolichéniques, source de molécules actives 71

Chapitre I. Les champignons endolichéniques 73
I.1. Origine et évolution 73
I.2. Classification et diversité 74
I.3. Culture et identification 77
I.4. Métabolites fongiques : principales structures 77

Chapitre II. Résultats et discussions 85
II.1. Isolement et identification des champignons endolichéniques de *N. laevigatum* 85
II.2. Description morphologique 90
II.3. Tests préliminaires de production de métabolites 96
II.4. Culture à petite échelle 97
II.5. Profilage chimique des extraits fongiques des souches sélectionnées 98
II.6. Évaluation des activités biologiques des extraits fongiques 102
II.7. Production à grande échelle 112
II.8. Étude phytochimique de *Nemania aenea* var. *aureolatum* (génotype 1 ; Gir_20) 114
II.9. Étude phytochimique de la souche Cor_08 : *Nemania serpens* 127
II.10. Activités antiprolifératives des composés isolés 135

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 137

BY-NC-ND

PARTIE C – Matériels et Méthodes 141

Chapitre I. Récolte et identification de *Nephroma laevigatum* 143
I.1. Observation à la loupe binoculaire et microscope optique 143
I.2. Réactions thallines 143

Chapitre II. Isolement, identification et caractérisation des champignons endolichéniques ... 144
II.1. Milieux de culture 144
II.2. Isolement des champignons endolichéniques 145
II.3. Culture des souches sélectionnées 145
II.4. Identification des champignons endolichéniques 146

Chapitre III. Procédés d'extractions 149
III.1. Extractions des thalles lichéniques 149
III.2. Extractions des champignons endolichéniques cultivés sur milieu solide 149

Chapitre IV. Méthodes analytiques et appareillages 150
IV.1. Réactifs et solvants 150
IV.2. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM) 150
IV.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) analytique 150
IV.4. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses basses résolutions 151
IV.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) – Analyses hautes résolutions 151
IV.6. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 152
IV.7. Spectre de masse haute résolution (SMHR) 153

Chapitre V. Méthodes de séparation 154
V.1. Chromatographie sur couche mince préparative (CCM prép) 154
V.2. Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP) 154
V.3. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte 154
V.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) semi-préparative 154

Chapitre VI. Réalisation de réseaux moléculaires 155

Chapitre VII. Techniques de fractionnements 157
VII.1. Purifications des fractions lichéniques 157
VII.2. Purifications des fractions issues de Gir_20 158
VII.3. Purifications des fractions issues de Cor_08 159

Chapitre VIII. Évaluation des activités biologiques 160
VIII.1. Activités antiprolifératives 160
VIII.2. Activité anti-biofilm fongique 164
VIII.3. Activité anti-biofilm bactérien 165
VIII.4. Évaluation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) 169

Chapitre IX. Résumé des données chromatographiques et RMN 170
IX.1. Molécules isolées de *Nephroma laevigatum* 170
IX.2. Molécules isolées de *Nemania aenea* var. *aureolatum* 174
IX.3. Molécules isolées de *Nemania serpens* 180

Références bibliographiques 183

Annexes 197

BY-NC-ND

Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms.

La résistance aux antibiotiques ou la difficulté de plus en plus croissante à traiter les maladies actuelles avec les composés disponibles sur le marché ont contraint les chercheurs à trouver de nouvelles sources de molécules actives. Les lichens produisent divers composés biologiquement actifs en raison de la grande diversité de leur écosystème. Ils représentent ainsi une source prometteuse de composés bioactifs. Le profilage chimique de *Nephroma laevigatum* a été effectué. Une analyse LC-MS/MS avec des approches en réseaux moléculaires ont permis d'appréhender la diversité chimique de ce lichen et quatre composés différents ont été isolés et identifiés par RMN puis testés pour leur activité antiproliférative. Cependant, les ressources en lichens sont limitées, ce qui restreint leur utilisation. De plus, le thalle lichénique constitue une niche écologique de choix pour d'autres microorganismes, ce qui en fait une source potentielle de nouvelles molécules d'intérêts. La culture de champignons endolichéniques a été entreprise. Ainsi, 46 souches ont été isolées et identifiées par DNA barcoding (amorces ITS4 et ITS5). Les souches identifiées appartiennent au genre *Nemania*, *Daldinia*, *Peziza* et *Coniochaeta*. Une investigation biologique a été réalisée sur six souches sélectionnées appartenant à deux espèces (*Nemania aenea* var. *aureolatum* et *N. serpens*). Ainsi, deux souches se sont démarquées par leurs activités antiprolifératives et anti-biofilms. Des études chimiques et biologiques plus approfondies de ces dernières (Gir_20 *N. aenea* var. *aureolatum* et Cor_08 *N. serpens*) ont été par la suite effectuées et huit composés différents ont été isolés et identifiés par RMN 1D et 2D. L'étude de l'effet des extraits sur les lignées cancéreuses humaines HT-29, HCT116, PC-3 et DU145 a permis de mettre en évidence des changements morphologiques au niveau cellulaire. L'analyse de l'expression de marqueurs protéiques pro- et anti-apoptotiques ainsi que la fragmentation de l'ADN mettent en évidence l'induction de l'apoptose. Le profilage chimique par LC-MS/MS de ces souches a ensuite été réalisé et comparé par des approches en réseaux moléculaires permettant ainsi de visualiser la diversité chimique entre les deux espèces de champignons endolichéniques.

Mots-clés : *Nephroma laevigatum*, Champignons endolichéniques, Métabolites secondaires, Activités biologiques, Diversité fongique

Phytochemical studies of lichen *Nephroma laevigatum* and its endolichenic fungi. Evaluation of antiproliferative and anti-biofilm activities.

Antibiotics resistance or increase of difficulty to treat for current diseases with commercially available compounds has obligated researchers to find new sources of active molecules. Lichens produce various biologically active compounds due to the great diversity of their ecosystem. Thus, they represent a promising source of bioactive compounds. Chemical profiling of *Nephroma laevigatum* was performed. LC-MS/MS analysis with molecular network approach allowed understanding chemical diversity of this lichen and four different compounds were isolated and identified by NMR and tested for their antiproliferative activity. However, lichen resources are limited, which limits their use. In addition, lichen thalli are an ecological niche for other microorganisms and a wide reservoir for access to bioactive molecules. Cultivation of endolichenic fungi was undertaken. Thus, 46 strains were isolated and identified by DNA barcoding (primers ITS4 and ITS5). The isolated fungi belong to genus *Nemania*, *Daldinia*, *Peziza* and *Coniochaeta*. Biological investigation was carried out on six selected strains belonging to two species (*Nemania aenea* var. *aureolatum* and *N. serpens*). So, two strains distinguished by their antiproliferative and anti-biofilm activities. Further chemical and biological studies of these strains (Gir_20 *N. aenea* var. *aureolatum* and Cor_08 *N. serpens*) were subsequently performed and eight different compounds were isolated and identified by 1D and 2D NMR. Study of effect of the extracts on the human cancer lines HT-29, HCT116, PC-3 and DU145 made it possible to highlight morphological changes at the cellular level. Analyses of the expression of pro- and anti-apoptotic protein markers as well as DNA fragmentation demonstrate the induction of apoptosis. LC-MS/MS chemical profiling of these strains was performed and compared with molecular network approach, to visualize chemical diversity between the two species of endolichenic fungi.

Keywords: *Nephroma laevigatum*, Endolichenic fungi, Secondary metabolites, Biological activities, Fungal diversity