UNIVERSITE DE NANTES

UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE VENAM

Année 2014

N° 11

Métabolites fongiques d'une nouvelle espèce de *Penicillium* marin : déréplication, isolement, caractérisation, hémisynthèse et évaluation pharmacologique sur ostéosarcomes

Volume I

THESE DE DOCTORAT

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline Sciences pharmaceutiques

Spécialité Pharmacochimie des Substances Naturelles

présentée

et soutenue publiquement par

Elodie BLANCHET

Le8 juillet 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	**M. BOUSTIE Joël, Professeur, Université de Rennes I**
	M. FABRE Nicolas, Professeur, Université Paul Sabatier de Toulouse
Examinateurs	**M. BARBIER Georges, Professeur, Université de Bretagne occidentale**
	M. RICHOMME Pascal, Professeur, Université d'Angers
Directeur de thèse	**M. POUCHUS Y. F., Professeur, Université de Nantes**
Encadrants de thèse	**M. GROVEL O., Maître de conférences, Université de Nantes**
	M. LE BOT R., Président de la société Atlantic Bone Screen, Nantes

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée sur une petite planète noyée dans les confins de l'univers. La planète dont il est question se nomme Terre, gravite autour du soleil à une distance de 150 millions de km et se déplace à la vitesse de 107 460 km/h. Elle est composée d'un bouclier magnétique nous protégeant des rayonnements solaires, d'une atmosphère, d'eau et de terre. La magie de cette planète est qu'elle abrite la Vie, foisonnante et extrêmement diversifiée. Mon premier remerciement revient donc à cette planète qui nous abrite des dangers cosmiques et à son étoile qui nous réchauffe. Il faut aussi remercier dame Nature pour la beauté, l'originalité et la complémentarité des êtres peuplant ce monde. En effet, c'est cette diversité d'êtres vivants qui a permis la réalisation demon travail de thèse : la diversité des micromycètes marins, sujets de mon étudemais aussi la diversité humaine se reflétant à travers les nombreuses qualités et compétences des personnes ayant de près ou de loin contribuées à ce projet de recherche.

Mon premier remerciement reviendra à M. Yves François Pouchus, directeur du laboratoire MMS mais aussi mon directeur de thèse. En effet, vous m'avez permis d'évoluer au long de ces trois années d'études à l'aide de précieux conseils. Avec votre vision analytique globale étayée par une culture scientifique extrêmement large permettant d'analyser une myriade de résultats pour en dégager une tendance globale, vous m'avez été d'une grande aide.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à M. Ronan Le Bot pour m'avoir accueillie au sein de la société Atlantic Bone Screen. Je vous remercie pour votre encadrement et pour m'avoir éclairée de votre expertise concernant l'évaluation pharmacologique de molécules antiprolifératives sur ostéosarcomes.

Je tiens sincèrement à remercier M. Olivier Grovel pour avoir co-encadré ce travail de thèse. Merci de m'avoir guidée, soutenue et encouragée dans mon parcours de pharmacognoste. Ta rigueur scientifique et tes conseils avisés m'ont permis d'avancer chaque jour un peu plus.

M. Nicolas Fabre, Professeur de pharmacognosie à l'Université de Paul Sabatier de Toulouse, et M. Joël Boustie, Professeur de pharmacognosie à l'Université de Rennes 1, je vous remercie de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

M. Georges Barbier, Professeur à l'Université de Brest et M. Pascal Richomme, Professeur de pharmacognosie à l'Université d'Angers, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

M. Pascal Richomme, je vous remercie également pour avoir rendu, avec M. Frédéric Lézot, les comités de thèse extrêmement pertinents et productifs.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe de la société Atlantic Bone Screen m'ayant épaulée. Merci à Maxime, chimiste hors pair m'ayant avisé de précieux conseils en chimie de synthèse et pour les ananlyses RMN. Je remercie également David, tout comme moi doctorant CIFRE au sein de la société. J'adresse avec un grand plaisir mes remerciements à Cécile et Elisabeth mais aussi à Hélène, Tiphaine, Marie, Alexandrine, Véronique, Florence, Amélie et Fabien ayant réalisé ou m'ayant secondée lors des études *in vitro* et *in vivo* des produits anti-ostéosarcomes. Il me faut donc aussi remercier les animaux que l'on a sacrifiés au nom de la Science pour faire avancer nos connaissances sur le cancer osseux et la mise au point de nouveaux traitements.

De nombreuses équipes ont aussi gravité autour de ce travail. Il me faut saluer l'expertise et le professionnalisme de M. Arnaud Bondon et de Mme Sandrine Pottier de la plateforme PRISM de l'Université de Rennes 1 ayant réalisé les analyses RMN. Merci à M. Cédric Logé, du laboratoire IIciMed pour les études de docking moléculaire. Merci également à M. Frisvad, de l'institut DTU du Danemark, spécialiste des *Penicillium* qui nous a apporté son expertise concernant l'identification des espèces fongiques étudiées.

Une pensée accompagne alors aussi les machines sur lesquelles j'ai travaillé, donc un merci particulier pour l'IT-TOF, la flash, l'HPLC et surtout le LCQ qui semble actuellement agoniser mais je divague un peu.

Plus sérieusement, un énorme merci à M. Yann Guitton, bio-informaticien pour qui les langages cryptés n'ont aucun secret. Il m'a donc créé sur mesure une quantité indénombrable d'outils extrêmement puissants permettant l'analyse efficace des données analytiques accumulées au cours de ce travail et rendant la pêche à la molécule beaucoup plus sympathique. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien, tes conseils pour faire fonctionner Titeuf…

Merci aussi à M. Nicolas Ruiz pour sa disponibilité et sa bienveillance, qui entre autres assumait le rôle de gardien et expert sur le LCQ ainsi que pour les nombreux conseils prodigués à propos d'End Note et pour les expériences de microscopie électronique. Ces dernières ont été réalisées à l'institut des matériaux de Nantes dans le service de microscopie avec l'aide de M. Nicolas Stephant que je remercie également.

Je tiens à dire un grand merci à Mme Catherine Roullier pour son aide lors des élucidations structurales mais aussi pour sa sympathie. T'épauler lors des TP de pharmacognosie de 2ème année de pharmacie, a été pour moi une expérience des plus enrichissantes.

Merci à M. Thibaut Robiou, parfait gardien de la mycothèque et Mme Yolaine Joubert, qui ont permis la réalisation des études de caractérisation génétique.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement Mme Marie Claude Boumard pour son accueil chaleureux dans le laboratoire de chimie, ainsi que pour ses nombreux conseils de chimiste hors pair des produits naturels.

Merci à Mme Karina Petit pour ton soutien et ta gentillesse. Merci aussi pour tes potions pour soigner les plantes.

Ce travail de thèse a été la suite d'un précédent projet de thèse réalisé par Marieke Vansteelandt. Elle a produit un travail titanesque et d'une qualité certaine.Elle a toujours été présente et bienveillante à mon égard lorsque je la sollicitais. Travailler à ses côtés sur une thématique qu'elle avait initiée a été un véritable plaisir. Merci pour ton amitié, ta gentillesse et les bons moments passés à Nantes puis à Toulouse.

Je tiens à présent à remercier tout spécialement Marie qui a été ma voisine de paillasse et une très bonne conseillère qui m'a notamment aiguillée lors de la réalisation de tests d'activité biologique.. De nombreux post-it commencent à s'entasser et nos longues discussions commencent à sérieusement me manquer.

Merci à Mickaël, dernier jedi de la guerre des étoiles. Merci de n'avoir jamais lâché la corde à l'escalade. Merci pour ton soutien, tes histoires en tous genres et tes bonnes inventions.

Merci aux anciens doctorants Pierre-Emmanuel, Olivia ainsi qu'aux futurs docteurs Anne-Isaline, Camilla qui ont su faire et font du bureau des doctorants un endroit agréable, conviviale et plein d'entrain pour faire avancer la recherche. Merci aussi à Guillaume et Jérémie pour leur bonne humeur et leur contribution à la bonne ambiance générale. Un grand merci à Madeleine, Fadila et Thuy, stagiaires qui m'ont accompagnées dans ce travail et se sont montrées à la hauteur de la tâche qui leur incombait.

Merci aux 20 minutes pour l'horoscope donnant un sens à nos journées et pour les mots fléchés rituellement résolus à la pause de midi. Merci à toutes les personnes avec qui du bon temps a été partagé, entre crises de rire et discussions animées. Merci à Mme Aurélie Couzinet-Mossion, à Mme VonyRabesaotra, à Mme GaétaneWielgosz-Collin,Mme Laurence Poirier, Mme Aurore Zalouk-Vergnoux et M Samuel Bertrand.

Un avant dernier remerciement s'adresse à ma petite saxo, compagnon de route m'ayant menée quotidiennement avec sécurité au laboratoire, ainsi qu'à mon ancien ordinateur (actuellement en convalescence) et à mon nouvel ordinateur, thèse oblige !

Je souhaiterais remercier mes amis et plus particulièrement les petites pintades rencontrées en Master à Strasbourg. Votre amitié m'est inestimable. Enfin, je n'aurais jamais pu en arriver là sans l'aide, les encouragements et l'amour de ma petite famille et de Thomas que je remercie du fond du cœur.

A tous MERCI.

Je vais maintenant vous révéler les secrets d'une nouvelle espèce de champignon marin qui s'appelle *Penicillium ligerum*. Il vivait discrètement le long des côtes de Loire Atlantique jusqu'au jour où il en fut délogé. Il fait depuis lors l'objet de toutes les attentions…

Sommaire

INTRODUCTION 1

PARTIE I LES *PENICILLIUM* SPP. MARINS SOURCES DE METABOLITES CYTOTOXIQUES ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 3

CHAPITRE I. LES CHAMPIGNONS DU GENRE *PENICILLIUM* 4

1. Description 4

2. Intérêts industriels 7

CHAPITRE II. LES *PENICILLIUM* EN MILIEU MARIN : IMPORTANCE ET INTERET 8

1. Importance des *Penicillium* en milieu marin 8

2. Intérêt des *Penicillium* marins 9

CHAPITRE III. METABOLITES CYTOTOXIQUES DE *PENICILLIUM* MARINS 12

1. Revue des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins 12

1.1. D'où proviennent les souches marines de *Penicillium* productrices de métabolites cytotoxiques ? 13

1.2. Quelles sont les espèces cytotoxiques chez les *Penicillium* marins ? 13

1.3. Quels sont les molécules prometteuses provenant de souches marines de *Penicillium* ? 16

1.3.1. Répartition des molécules selon leur classe chimique 16

1.3.2. Répartition des molécules selon leur poids moléculaire 17

1.3.3. Molécules halogénées 18

1.4. Conclusion de l'étude des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins 18

2. MMS351-*Penicillium* nov. sp. et ligérine 19

PARTIE II LA LIGERINE ET SES ANALOGUES : HEMISYNTHESE ET ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE SUR OSTEOSARCOMES 20

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - FUMAGILLINE & CO : LA COURSE A LA MOLECULE ACTIVE 24

1. Les molécules naturelles et synthétiques 24

1.1. Les analogues naturels 24

1.2. La biosynthèse 29

1.3. Les dérivés synthétiques 30

2. Activités biologiques/Mécanisme d'action 31

2.1. Propriétés antifongiques 31

2.2. Propriétés antiparasitaires 32

2.3. Propriétés antivirales 32

2.4. Propriétés immunosuppressives 32

2.5. Traitement des pathologies articulaires 33

2.6. Propriétés anticancéreuses 33

2.7. La cible : la méthionine aminopetidase 2 (MetAP2) 35

2.7.1. Implications de la MetAP2 dans les différents processus biologiques 36

2.7.2. Interactions molécules-cible 37

3. Relations structure-activité 39

3.1. Changement du noyau cyclohexane 40

3.2. Modulations des positions C1 et C2 du cycle cyclohexane 40
3.3. Modulations du méthoxyle en C5 41
3.4. Modulations de la chaîne latérale en C4 41
3.5. Modulations du spiro-époxyde en C3 43
3.6. Modulations de la chaîne en C6 45
3.7. Importance de la conformation 47
3.8. Conclusions sur les relations structure-activité 48
4. Les drug-leads, analogues en développement clinique 49
4.1. Le TNP-470 49
4.1.1. Une première molécule prometteuse 49
4.1.2. Thérapies combinées 49
4.1.3. Biodisponibilité et métabolisation 50
4.1.4. Toxicité et effets indésirables 51
4.1.5. Formulations 52
4.2. Les CKD 55
4.3. Le PPI-2458 56
5. Conclusion 56
CHAPITRE II. LES OSTEOSARCOMES 58
1. Définition et mécanisme 58
2. Epidémiologie 59
3. Traitements 60
4. Thérapies émergentes et nouvelles cibles thérapeutiques 62
4.1. Immunomodulateurs 63
4.1.1. Le muramyl tripeptide-phosphatidyl-éthanolamine (MTP-PE) 63
4.1.2. Les interférons 63
4.2. Inhibiteurs de la résorption osseuse : les biphosphonates 64
4.3. Inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases 64
5. Conclusion 65
CHAPITRE III. LA LIGERINE ET SES ANALOGUES HEMISYNTHETIQUES 66
1. Hémisynthèse de la ligérine et d'analogues structuraux 66
1.1. Hémisynthèse de la ligérine 66
1.2. Hémisynthèse d'analogues structuraux de la ligérine 70
1.2.1. Schémas réactionnels 70
1.2.2. Analyse structurale des composés synthétisés 71
1.3. Hémisynthèse du TNP-470 et du 7-chloro-TNP-470 73
1.3.1. Hémisynthèse du TNP-470 73
1.3.2. Hémisynthèse du 7-chloro-TNP-470 74
2. Evaluation pharmacologique de la ligérine et de ses analogues hémisynthétiques pour le traitement des ostéosarcomes 75
2.1. Evaluation de l'activité antiprolifération *in vitro* sur modèles d'ostéosarcomes 75
2.1.1. Lignées cellulaires 75
2.1.1.1. Lignées cellulaires tumorales 75
2.1.1.2. Lignées cellulaires non tumorales 75
2.1.2. Evaluation de l'activité antiprolifération *in vitro* des analogues hémisynthétiques 76
2.1.2.1. Evaluation sur des lignées murines d'ostéosarcome 77
2.1.2.2. Evaluation sur des lignées humaines d'ostéosarcome 78

2.1.2.3. Evaluation de l'activité antiproliférative sur cellules non tumorales 78

2.1.2.4. Bilan de l'évaluation de l'activité antiproliférative des analogues hémisynthétiques de la ligérine 79

2.1.3. Etude des relations structure-activité : Impact de la substitution halogénée en C7 .. 80

2.1.4. Evaluation de la ligérine face au TNP-470 85

2.2. Evaluation de l'activité biologique *in vivo* sur modèle d'ostéosarcome 87

2.3. Evaluation de l'activité de la ligérine sur l'ostéoclastogenèse 92

3. Conclusion générale et perspectives 94

4. Le brevet ligérine : développement et devenir 95

5. Epilogue 96

PARTIE III *PENICILLIUM LIGERUM* : UNE NOUVELLE ESPECE FONGIQUE MARINE 100

CHAPITRE I. ETUDE PHENOTYPIQUE 104

1. Observations macroscopiques 104

1.1. Caractéristiques morphologiques comparées des colonies des quatre souches (MMS351, MMS388, MMS399 et MMS747) 104

1.2. Comparaison de la croissance des souches MMS351 et MMS388 105

1.3. Variabilité de la morphologie des colonies sur différents milieux (MMS351) 107

2. Observations microscopiques 107

3. Conclusion 109

CHAPITRE II. ETUDE GENOTYPIQUE 110

1. Séquençage de la région ITS-1 112

1.1. Comparaison de la région ITS-1 des quatre souches 112

1.2. Positionnement dans le genre *Penicillium* 113

2. Gène de la β-tubuline 115

2.1. Comparaison des séquences du gène de la β-tubuline des quatre souches 115

2.2. Positionnement dans le genre *Penicillium* 116

3. Conclusion 117

CHAPITRE III. ETUDE CHIMIOTYPIQUE : METABOLOME DE *PENICILLIUM LIGERUM* 118

1. Recherche d'analogues naturels de la ligérine 118

1.1. Développement d'un modèle de fragmentation en spectrométrie de masse de la série chimique de la ligérine 118

1.1.1. Analyse des fragmentations de la ligérine 118

1.1.2. Comparaison de la fragmentation HRMS/MS de la ligérine et de la fumagilline . 120

1.1.3. Mise en place de la démarche de recherche d'analogues naturels de ligérine au sein d'un extrait brut fongique 123

1.1.4. Illustration détaillée de la démarche de recherche des analogues : Identification du composé LIG-494 124

1.2. Recherche de dérivés naturels de la ligérine dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 127

1.2.1. Analogues naturels identifiés 127

1.2.2. Analogues naturels dont la structure reste non totalement élucidée 131

1.3. Validation de la méthode de recherche et d'identification de dérivés naturels de la ligérine 134

1.4. Automatisation de la méthode de recherche 134

1.5. Application : Recherche des analogues naturels de la ligérine dans les extraits des souches de *P. ligerum* 136
1.6. Réflexion sur la biosynthèse de la ligérine et des analogues naturels 137
1.7. Conclusion 139
2. Purification et identification de métabolites de la souche MMS351 140
2.1. Contexte 140
2.2. Purification de molécules de la fraction 7a 143
2.2.1. Purification du composé 351-N1 143
2.2.1.1. Fractionnement par chromatographie flash 143
2.2.1.2. Analyse structurale du composé 351-N1 143
2.2.1.3. Evaluation biologique de l'émodine 147
2.2.1.4. Etude bibliographique : discussion 147
2.2.1.5. Purification de molécules de la fraction 7ab : Conclusion 149
2.3. Purification de molécules de la fraction 7h 149
2.3.1. Isolement et identification du composé 351-N2 150
2.3.1.1. Purification du composé 351-N2 150
2.3.1.2. Elucidation structurale du composé 351-N2 151
2.3.1.3. Evaluation biologique du FD-838 158
2.3.1.4. Etude bibliographique : discussion 158
2.3.2. Isolement et identification du composé 351-N3 161
2.3.2.1. Purification du composé 351-N3 161
2.3.2.2. Elucidation structurale du composé 351-N3 162
2.3.2.3. Evaluation biologique de la norlichéxanthone 166
2.3.2.4. Etude bibliographique : discussion 166
2.3.3. Isolement et identification du composé 351-N4 168
2.3.3.1. Purification du composé 351-N4 168
2.3.3.2. Elucidation structurale du composé 351-N4 168
2.3.3.3. Etude bibliographique : discussion 169
2.3.4. Purification de molécules de la fraction 7h : Conclusion 170
2.4. Purification de molécules de la fraction 8a 171
2.4.1. Purification du composé 351-N5 171
2.4.1.1. 1ère étape de fractionnement : Chromatographie flash 171
2.4.1.2. 2ème étape de fractionnement : CLV 172
2.4.2. Analyse structurale du composé 351-N5 172
2.4.2.1. Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS 172
2.4.2.2. Analyse RMN 174
2.4.3. Evaluation biologique de l'alternariol 175
2.4.4. Etude bibliographique : discussion 176
2.4.5. Purification de molécules de la fraction 8a : Conclusion 177
2.5. Purification de molécules de la fraction 9abc 178
2.5.1. Purification des composés 351-N6 et 351-N7 178
2.5.1.1. 1ère étape de fractionnement : Chromatographie flash 178
2.5.2. Etude du composé 351-N6 178
2.5.2.1. Analyse structurale du composé 351-N6 178
2.5.2.2. Evaluation biologique du physcion 181
2.5.2.3. Etude bibliographique : discussion 182

2.5.3. Etude du composé 351-N7 182
2.5.3.1. Analyse structurale du composé 351-N7 182
2.5.3.2. Evaluation biologique de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique 185
2.5.3.3. Etude bibliographique : discussion 185
2.5.4. Purification de molécules de la fraction 9abc : Conclusion 185
2.6. Bilan des purifications réalisées sur la souche MMS351 186
3. Etude déréplicative du métabolome de *P. ligerum* 188
3.1. Procédure déréplicative 188
3.2. Annotation d'un pic chromatographique : exemple de la griséofulvine 188
3.3. Les molécules dérépliquées dans les extraits des quatre souches de *P. ligerum* 190
3.3.1. Les polycétides 191
3.3.2. Les alcaloïdes indoliques 192
3.3.3. Les composés précédemment isolés 194
3.4. Application : étude du métabolome des quatre souches fongiques 197
3.4.1. Comparaison des métabolomes des quatre souches fongiques cultivées sur milieu YES 197
3.4.2. Comparaison du métabolome des quatre souches cultivées sur différents milieux de culture 198
3.5. Activité cytotoxique des souches fongiques 203
4. Conclusion générale de la partie III : Description de *Penicillium ligerum* 207

CONCLUSION GENERALE 208

BIBLIOGRAPHIE 212

Liste des Figures

Figure I-1 : Morphologie d'un *Penicillium* 5
Figure I-2 : Structure des différents types d'appareils de reproduction asexuée des *Penicillium* 5
Figure I-3 : Variabilité phénotypique des *Penicillia* : exemple de morphologie macroscopique de colonies d'une souche de *P. antarcticum* sur 6 milieux de culture différents 6
Figure I-4 : Métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins décrits durant les années 1991 à 2013 12
Figure I-5 : Répartition des origines des souches marines de *Penicillium* cytotoxiques.....13
Figure I-6: Répartition des métabolites cytotoxiques isolés de *Penicillium* marin.....16
Figure I-7 : Répartition des molécules selon leur poids moléculaire 17
Figure I-8 : Répartition des métabolites chlorés ou non produits par des *Penicillium* 18
Figure I-9 : *Penicillium* nov. sp. producteur de ligérine et structure de cette molécule 19
Figure II-1 : Structure et configuration de la fumagilline.....24
Figure II-2 : Structures de la 5-déméthoxy-fumagilline, la fumagiringilline, le Sch-528647, le fumagillol, le FR-65814 et le cordycol 25
Figure II-3 : Structure du RK-805 et de l'ovalicine.....26
Figure II-4 : Structures de la 5-déméthyl-ovalicine, de deux dérivés cyclisés de l'ovalicine, de l'ovalicine, de la chlovalicine et de l'hydroxy-ovalicine (Merf3) 26
Figure II-5 : Structures du RK-95113 et du FR-111142 27
Figure II-6 : Voies biosynthétiques hypothétiques de la fumagilline et de la pseurotine A.....30
Figure II-7 : Pharmacomodulations apportées à la fumagilline : exemples d'analogues de synthèse 31
Figure II-8 : Angiogenèse tumorale 34
Figure II-9 : Modèle présenté par Datta *et al.* indiquant l'implication de la MetAP2 dans la croissance cellulaire et la synthèse protéique 36
Figure II-10 : Structure 3D et schéma de la fumagilline liée au site actif de la MetAP2 37
Figure II-11 : Modèle de modifications entraînant la liaison covalente des dérivés de la fumagilline avec le site actif de la MetAP2.....38
Figure II-12 : Exemples d'inhibiteurs irréversibles et réversibles.....39
Figure II-13 : Pharmacomodulations apportées à la fumagilline.....39
Figure II-14 : Structure du TNP-470 et du composé A.....40
Figure II-15 : Pharmacomodulation de la fumagilline : en position C1 et C2 40
Figure II-16 : Pharmacomodulation de la fumagilline : position C5 41
Figure II-17 : Pharmacomodulation de la fumagilline : chaîne en C4.....41
Figure II-18 : Pharmacomodulation de la fumagilline : spiro-époxyde en C3 43
Figure II-19 : Structure du TNP-470 et des composés V-X.....43
Figure II-20 : Structure du Sch528647 et de la fumagilline 44
Figure II-21 : Structure de la chlovalicine, de l'ovalicine, du fumagalone, du PPI-2458,.....45
Figure II-22 : Pharmacomodulation de la fumagilline : chaîne en C6.....45
Figure II-23 : Structure du TNP-470.....45
Figure II-24 : Les deux conformères stables du cycle cyclohexane de la fumagilline.....47
Figure II-25 : Bilan des relations structure-activité des analogues de fumagilline 48
Figure II-26 : Strucuture chimique du TNP-470.....49
Figure II-27 : Métabolisation du TNP-470.....51
Figure II-28 : Structure chimique de la caplostatine 53
Figure II-29 : Structure de la lodamine 54

Figure II-30 : Structures chimiques des CKD-731 et 732 55
Figure II-31 : Structure du PPI-2458 et des composés A et B 56
Figure II-32 : Cercle vicieux mis en place suite aux interactions entre la tumeur et son microenvironnement 59
Figure II-33 : Structure et classe pharmacologique des molécules utilisées en chimiothérapie pour le traitement des ostéosarcomes 61
Figure II-34 : Cibles et thérapies en essais précliniques et cliniques pour le traitement des ostéosarcomes de l'enfant et de l'adolescent 62
Figure II-35 : Structure du MTP-PE 63
Figure II-36 : Structure des biphosphonates : exemple de l'alendronate et du zolédronate 64
Figure II-37 : Protocole d'obtention du fumagillol à partir de la spécialité Fumidil B® 67
Figure II-38 : Protocole après optimisation d'obtention du fumagillol à partir de la spécialité Fumidil B® .67
Figure II-39 : Protocole d'hémisynthèse de la ligérine à partir de la fumagilline 69
Figure II-40 : Schéma réactionnel de l'hémisynthèse d'analogues structuraux de la ligérine à partir de la fumagilline 71
Figure II-41 : Spectre ^{1}H-RMN du composé S4 72
Figure II-42 : Spectre ^{13}C-RMN du composé S4 73
Figure II-43 : Protocole d'hémisynthèse du TNP-470 à partir de la fumagilline 74
Figure II-44 : Protocole d'hémisynthèse du 7-chloro-TNP-470 à partir du TNP-470 74
Figure II-45 : Structure de la ligérine et de trois analogues hémisynthétiques 77
Figure II-46 : Viabilité des cellules tumorales POS-1 et OSRGa en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine 77
Figure II-47 : Viabilité des cellules tumorales MG63 et SaOS2 en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine 78
Figure II-48 : Viabilité des cellules non tumorales L929 et HFF2 en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine 79
Figure II-49 : Structure des composés hémisynthétiques époxydés en C3 et leur analogue chlorohydrine .. 81
Figure II-50 : Evaluation de l'activité antiprolifération d'analogues de la fumagilline sur deux lignées tumorales POS-1 et SaOS2 et sur la lignée non tumorale L929 82
Figure II-51 : Structure de la ligérine et de son analogue bromé S4 83
Figure II-52 : Docking moléculaire des complexes fumagilline, ligérine ou 7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol/MetAP2 85
Figure II-53 : Classification hiérarchique ascendante appliquée aux volumes tumoraux 89
Figure II-54 : Représentation « box plot » des volumes tumoraux 90
Figure II-55 : Suivi pondéral des souris des 3 groupes de l'essai. 91
Figure II-56 : Morphologie des cellules CD14 après coloration TRAP 93
Figure II-57 : Evaluation de la ligérine et du TNP-470 sur l'ostéoclastogénèse humaine *in vitro* 93
Figure II-58 : Schéma des biotransformations du PPI-2458 en conditions aqueuses acides et activités inhibitrices de la MetAP2 96
Figure II-59 : Abondances relatives de la ligérine et du 6-O-succinylfumagillol dans les conditions expérimentales (témoins, milieu de culture cellulaire RPMI, solution aqueuse) 98
Figure III-1 : Répartition géographique des prélèvements 102
Figure III-2 : Morphologie macroscopique de *Penicillium ligerum* 104
Figure III-3 : Colonies des souches cultivées 18 jours sur milieu YES 105
Figure III-4 : Comparaison du diamètre des colonies des souches MMS351 et MMS388 106
Figure III-5 : La souche MMS351 inhibant la pousse des colonies autour d'elle 106

Figure III-6 : Variations phénotypiques de la souche MMS351 107
Figure III-7 : Observation microscopique de *P. ligerum.* 108
Figure III-8 : Observations microscopiques de *P. ligerum* en MEB. 108
Figure III-9 : Alignement des séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum* 112
Figure III-10 : Arbre construit à partir des analyses phylogénétiques des séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum* et d'au moins une espèce de chaque section au sein du sous genre *Penicillium* 114
Figure III-11 : Alignement des séquences de la β-tubuline des quatre souches de *P. ligerum* 115
Figure III-12 : Arbre construit à partir des analyses phylogénétiques des séquences ITS1 des quatre souches de *P. ligerum* et d'au moins une espèce de chaque section au sein du sous genre *Penicillium* 116
Figure III-13 : Spectre de masse haute résolution de la ligérine en LC-MS. 118
Figure III-14 : Profil isotopique de l'ion $[M+H]^+$ de la ligérine 119
Figure III-15 : Spectre de masse MS^2 de la ligérine $[M+H]^+$ en HRMS 119
Figure III-16 : Spectre de masse MS^2 de la ligérine $[M+Na]^+$ en HRMS 119
Figure III-17 : Spectres de masse HRMS/MS de la ligérine et de la fumagilline sous les formes ioniques $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$ 121
Figure III-18 : Exemple de deux ions fils de *m/z* très proches 122
Figure III-19 : Pertes de neutre observées séparément ou en combinaison 123
Figure III-20 : Démarche permettant la recherche des analogues de la série ligérine-fumagillol 124
Figure III-21 : Données HRMS du composé LIG-494. 125
Figure III-22 : Spectres de fragmentation HRMS/MS du composé LIG-494 125
Figure III-23 : Spectre UV-visible comparatif de la fumagilline et du composé FUM-494 126
Figure III-24 : Spectre HRMS/MS du composé LIG-494 pour lequel la fragmentation est expliquée 127
Figure III-25 : Chromatogramme LC-HRMS de l'extrait EB-351-YES ainsi que les chromatogrammes extraits des ions $[M+Na]^+$ de la ligérine et de ses analogues 131
Figure III-26 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R 134
Figure III-27 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R 135
Figure III-28 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R 135
Figure III-29 : Schéma décisionnel de la recherche automatisée d'analogues de ligérine 136
Figure III-30 : Chromatogramme LC-HRMS de l'extrait de la souche MMS 747 137
Figure III-31: Analogues connus et précurseurs hypothétiques autour de la biosynthèse de la ligérine 137
Figure III-32 : Profils CCM des fractions issues de la CLBP1 de l'extrait brut 351-YES 141
Figure III-33 : CCM bilan du fractionnement de 7h 143
Figure III-34 : Spectre de masse du composé 351-N1 en mode d'ionisation négative 144
Figure III-35 : Spectre de masse du composé 351-N1 en mode d'ionisation positive 144
Figure III-36 : Spectre UV-visible du composé 351-N1 144
Figure III-37 : Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N1 145
Figure III-38 : Composé 351-N1 : émodine 146
Figure III-39 : Corrélations ^{1}H-^{1}H COSY observées pour le composé 351-N1 146
Figure III-40 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N1 146
Figure III-41 : Biosynthèse de l'émodine et de trois de ces analogues : le physcion, l'aloe-émodine et la rhéine 148
Figure III-42 : Schéma de purification des molécules de la fraction 7h 149
Figure III-43 : Chromatographie flash de la fraction 7h 150
Figure III-44 : Chromatogramme UV et gradient binaire de la phase éluante 151
Figure III-45 : Spectre de masse haute résolution du composé 351-N2 151
Figure III-46 : Spectre de fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 412,1368 152

Figure III-47 : Spectre UV-visible du composé 351-N2 152
Figure III-48: Spectre ^{13}C-RMN du composé 351-N2 153
Figure III-49 : Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N2 154
Figure III-50 : Corrélations ^{1}H-^{1}H COSY et ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N2 155
Figure III-51 : Structure de la molécule FD-838 et de ses diastéroisomères : les céphalimysines B-D. 156
Figure III-52 : Evaluation de l'activité cytotoxique du FD-838 sur la lignée cellulaire KB 158
Figure III-53: Structure des molécules à noyau spirofuranone lactame : la molécule FD-838, la pseurotine A, le synerazol, l'azaspirene et les céphalimysines A-D 159
Figure III-54 : Hypothèse de biosynthèse de la Pseurotine A 160
Figure III-55 : Hypothèse de biosynthèse du FD-838 160
Figure III-56: CCM bilan du fractionnement B de la fraction 7h 162
Figure III-57: Spectre de masse du composé 7h-B8 en ionisation négative et spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 257,0446 162
Figure III-58: Spectre de masse du composé 7h-B8 en ionisation positive et spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 259,0563 162
Figure III-59 : Spectre UV-visible du composé 351-N3 et comparaison des λ_{max} avec ceux de l'alternariol et de la norlichéxnthone 163
Figure III-60: Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N3 164
Figure III-61 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N3 165
Figure III-62 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N3 165
Figure III-63 : Biosynthèse hypothétique de la norlichéxanthone et de la griséofulvine 167
Figure III-64 : CCM bilan du fractionnement C de la fraction 7h 168
Figure III-65 : Chromatogrammes LC-UV/DAD 169
Figure III-66 : Voie biosynthétique de l'acide pénicillique 169
Figure III-67 : Chromatogramme UV à 254 nm et CCM de la fraction 7h 170
Figure III-68 : Chromatogramme UV à 254 nm de la fraction 8a 171
Figure III-69 : Chromatographie flash de la fraction 8a : Chromatogramme UV et gradient binaire de la phase éluante 172
Figure III-70 : Spectre UV-visible du composé 351-N5 173
Figure III-71 : Spectre de masse du composé 351-N5 en ionisation positive et spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 259,0572 173
Figure III-72 : Composé 351-N5 : alternariol 174
Figure III-73 : Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N5 174
Figure III-74 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N5 175
Figure III-75 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N5 175
Figure III-76 : Biosynthèse hypothétique de l'alternariol via la norlichéxanthone 176
Figure III-77 : Biosynthèses hypothétiques de l'alternariol 177
Figure III-78 : Structure de l'alternariol et de deux analogues 177
Figure III-79: Spectre UV-visible du composé 351-N6 179
Figure III-80 : Spectre de masse du composé 351-N6 en ionisation positive et spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 285,0714 179
Figure III-81 : Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N6 180
Figure III-82 : Composé 351-N6 : physcion 180
Figure III-83 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N6 181
Figure III-84 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N6 181
Figure III-85 : Spectre UV-visible du composé 351-N7 182

Figure III-86 : Spectre de masse du composé 351-N7 en ionisation positive et spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 225,0729 183
Figure III-87 : Spectre ^{1}H-RMN du composé 351-N7 183
Figure III-88 : Composé 351-N7 : acide 3-O-methyl-curvulinique 184
Figure III-89 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N7 184
Figure III-90 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N7 184
Figure III-91 : Structure de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique et de quatre analogues 185
Figure III-92 : Bilan des purifications 186
Figure III-93 : Exemple de l'identification de la griséofulvine lors de la déréplication assistée par le logiciel MetID® d'un extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 189
Figure III-94 : Suite de l'exemple de l'identification de la griséofulvine lors de la déréplication assistée par le logiciel MetID® d'un extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 190
Figure III-95 : Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des polycétides observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 191
Figure III-96 : Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des clavines observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 192
Figure III-97 : Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des tryptoquivalines observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES 193
Figure III-98 : Structure des métabolites identifiés au sein du métabolome de la souche fongique MMS351 196
Figure III-99 : Profil métabolique obtenu en HPLC-HRMS/MS des quatre souches de *P. ligerum* 197
Figure III-100 : Chromatogrammes LC-MS basse résolution des extraits bruts de la souche MMS747 198

Liste des Tableaux

Tableau I-1 : Exemples de métabolites bioactifs produits par des *Penicillium* marins 10
Tableau I-2 : Espèces de *Penicillium* marins décrites comme productrices de métabolites cytotoxiques 15
Tableau II-1 : Dérivés naturels de la fumagilline classés par espèces productrices 28
Tableau II-2 : Activité antiprolifératives *in vitro* du TNP-470 33
Tableau II-3 : Activité antiproliférative sur cellules HUVEC 35
Tableau II-4 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés B-F 40
Tableau II-5 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés G-M 42
Tableau II-6 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés N-R 42
Tableau II-7 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par le fumarranol et les composés S-U 43
Tableau II-8 : Activité antiproliférative in vitro de dérivés de la fumagilline 46
Tableau II-9 : Observation au microscope inversé 76
Tableau II-10 : CI_{50} obtenues lors de l'évaluation de l'activité antiproliférative de la ligérine et de trois analogues hémisynthétiques sur les lignées tumorales et non tumorales 79
Tableau II-11 : Indice de sélectivité de la ligérine et des analogues structuraux hémisynthétiques 80
Tableau II-12 : Viabilité des cellules MG63, SaOS2, HFF2, OSRGa, POS-1 et L929 en fonction de la concentration en 7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol et ligérine 83
Tableau II-13 : Comparaison de l'activité antiproliférative de la ligérine et du TNP-470 86
Tableau II-14 : Activités comparées de la ligérine et du TNP-470 sur lignées cellulaires humaines (tumorales MG3 et SaOS2, saine HFF2). Pourcentages d'inhibition de la viabilité cellulaire 87
Tableau II-15 : Volumes tumoraux à J18 89
Tableau III-1 : Origines des souches MMS351, MMS388, MMS399 et MMS747 102
Tableau III-2 : Comparaison morphologique des quatre souches fongiques cultivées sur milieu DCA 105
Tableau III-3 : Code d'accession GenBank® des séquences ITS 110
Tableau III-4 : Distance entre les séquences de la β-tubuline des quatre souches 115
Tableau III-5 : Ions fils communs observés dans les spectres MS/MSdes ions $[M+Na]^+$ de la ligérine et de la fumagilline 121
Tableau III-6 : Ions fils communs observés dans les spectres MS/MSdes ions $[M+H]^+$ de la ligérine et de la fumagilline 121
Tableau III-7 : Ions voisins distinguant les analogues chlorés en C7 des analogues spiro-epoxydés en C3 122
Tableau III-8 : Prédiction de la formule brute du composé LIG-494 126
Tableau III-9 : Données LC-HRMS/MS des analogues de la série ligérine identifiés dans l'extrait EB-351-YES 129
Tableau III-10 : Données LC-HRMS/MS des analogues de la série ligérine identifiés dans l'extrait EB-351-YES (suite) 130
Tableau III-11 : Données LC-HRMS/MS des analogues détectés dont la structure reste non totalement élucidée 132
Tableau III-12 : Données LC-HRMS/MS des analogues détectés dont la structure reste non totalement élucidée (suite) 133
Tableau III-13 : Activité cytotoxique ou antiproliférative des fractions issues de la CLBP1 de l'extrait brut 351-YES sur les lignées cellulaires POS-1, AT6-1 et L929 142
Tableau III-14 : Données RMN 1Det corrélation RMN 2D du composé 351-N1 146
Tableau III-15 : Prédiction de la formule brute du composé 351-N2 152
Tableau III-16 : Données RMN 1D et corrélations RMN 2Ddu composé 351-N2 155
Tableau III-17 : Pouvoir rotatoire des analogues de FD-838 156

Tableau III-18 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C de la molécule 351-N2, ... 157
Tableau III-19 : Données RMN 1D et corrélation RMN 2D du composé 351-N3 165
Tableau III-20 : Données RMN 1D et corrélation RMN 2D du composé 351-N5 175
Tableau III-21 : Données RMN 1D et corrélation RMN 2D du composé 351-N6 181
Tableau III-22 : Données RMN 1D et corrélation RMN 2D du composé 351-N7 184
Tableau III-23 : Caractéristiques des métabolites dérépliqués 195
Tableau III-24 : Déréplication des quatre souches de *P. ligerum* cultivées sur cinq milieux différents 200
Tableau III-25 : Bilan du nombre d'extraits de chaque souche fongique de *P. ligerum* 202
Tableau III-26 : Position taxonomique et origine des souches étudiées 203
Tableau III-27 : Activité cytotoxique d'extraits bruts de souches de *Penicillium* sp. cultivées sur 5 milieux différents 204
Tableau III-28 : Corrélations entre les activités cytotoxiques des extraits des quatre souches de *P. ligerum* et la présence ou l'absence des composés dérépliqués dans ces extraits 206

Liste des Abréviations

αD : pouvoir rotatoire
α-MEM : Minimum Essential Medium Eagle (Gibco®), milieu de culture cellulaire
δ: déplacement chimique
λ: longueur d'onde (en nm)
A2058 : mélanomes
A2780 : cellules humaines de cancer de l'ovaire
A2780CisR : cellules humaines de cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine
ABS : société Atlantic Bone Screen
AcOEt : acétate d'éthyle
AcOH : acide acétique
ADN : acide désoxyribonucléique
ALC : alcaloïdes
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APT : Attached Proton Test (RMN)
AT6-1 : cellules de carcinome prostatique de rat
ATCC : American Type Culture Collection
BAEC : cellules endothéliales d'aorte bovine (Bovine Aortic Endothelial Cells)
BME : milieu de culture pour la lignée cellulaire (Basal Medium Eagle)
BPC : Base Pic Chromatogramme
C3H/HeN : lignée murine immunocompétente
CBS : Mycobank, base de données fongiques
CCA : cellules de cholangiocarcinome
CCM : chromatographie sur couche mince
CD14 : cellules ostéoclastique humaine
$CDCl_3$: chloroforme deuthéré
CH_2Cl_2 : dichlorométhane
CI_{50} : concentration inhibitrice médiane
CLBP : chromatographie liquide basse pression
CLV : chromatographie liquide sous vide
COG : Children's Oncology group
COLO-205 : carcinomes du colon
COSY : corrélations en RMN 2D entre des protons couplés de façon scalaire ($^2J_{HH}$, $^3J_{HH}$ protons portés par des carbones voisins) (COrrelation SpectrometrY)
CPAE : cellules endothéliales d'artère pulmonaire de veau (Calf Pulmonary Artery Endothelial)
CYA : Czapek Yeast Agar (concentré de czapek-extrait de levure-agar ; milieu de culture fongique)
DAD : détecteur à barrette d'iode (Diode Array Detector)
DCA : Dextrose - extrait de caséine - agar (milieu de culture fongique)
DCP : dicétopipérazines
DHFR : dihydrofolate reductase (enzyme)
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMEM : milieu de culture pour les lignées cellulaires (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNP : Dictionnary of Natural Product, base de données de produits naturels
dNTPs : déoxynucléotide triphosphates
DTU : Laboratoire Danmarks Tekniske Universitet
EFSA : agence européenne de la sécurité alimentaire (European Food Safety Authority)
EH : époxyde hydrolase
eIF2 : facteur d'initiation eucaryotique 2
EOMA : modèle d'hémangioendothéliome murin
EPR : Enhanced Permeability and Retention
EtOH : éthanol
Et_2O : éther diéthylique
ERK1/2 : extra-cellular signal-regulated kinase
ESI : ionisation par électrospray (Electrospray Ionization)
Euramos I : EURopean and AMerican Osteosarcoma Study group (Etude multi-institutionnellle)
FPP : farnesyl pyrophosphate
H226Br : modèle de métastases cérébrales murine obtenues à partir d'un carcinome pulmonaire
HDMS : héxaméthyldisilazane
HER2 : human epidermal growth factor
HFF2 : cellules fibroblastique humaine (Human Foreskin Fibroblast)
HL-60 : cellules de promyéloblaste humain
HMBC : en RMN 2D intéraction longue distance ^1H-^{13}C ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ voire $^4J_{CH}$) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
hMCSF : facteur de prolifération
HPLC : chromatographie liquide à haute performance (high performance liquide chromatography)
HPMA : N-(2-Hydroxypropyl)méthacrylamide
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution (high resolution mass spectrometry)
HRMS/MS : spectrométrie de masse haute résolution avec fragmentation
HSQC : met en évidence en RMN 2D les interactions ^1H-^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HUVEC : cellules endothéliales humaines différenciées isolées à partir de la veine de cordon ombilical (human umbilical vein endothelial cells)
IFN : interféron
IgE : immunoglobine E
IGF : Insulin-Like Growth factor, facteur de croissance
IL-6 : Interleukine 6
INPI : Institut National de la Propriété Industrielle
IS : Indice de Sélectivité
IT : Trappe Ionique (Ionic trap)
ITS : régions non-codantes espaçant les gènes ribosomaux (Internal Transcribed Spacer)
ISOS-1 : modèle d'angiosarcome murin (murine-phenotypic angiosarcoma cell line)
K652 : cellules humaines de leucémie myéloïde chronique
KB : lignée cellulaire issues du carcinome oral humain
L1210 : Cellules issues de lymphocytes de leucémie de souris
L5178Y : cellules murines de lymphome
L929 : cellules fibroblastiques murines saines

LC : chromatographie liquide (Liquid Chromatography)
LCMS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
LiBr : bromure de lithium
LiCl : chlorure de lithium
LLC : carcinome pulmonaire de Lewis
LPRO : Laboratoire de la Physiopathologie de la Résorption Osseuse
M5076 : cellules de réticulosarcome
m/z : rapport masse sur charge d'un composé ionisé en MS
MAP : Multi-Agent Chemotherapy
MDA-MB-231 : lignée cellulaire issue d'une tumeur mammaire humaine
MDP : muramyl dipeptide
MEA : Malt Extract Agar (extrait de malt - agar ; milieu de culture fongique)
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MeOH : Méthanol
MetAP2 : méthionine aminopeptidase 2
MG-63 : cellules d'ostéosarcome humain
$MgCl_2$: Chlorure de magnésium
MH60 : cellules interleukines-6 dépendantes
MLR : Mixed Lymphocyte reaction
MS : spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS : MS^2
MS^n : fragmentation en spectrométrie de masse, avec n caractérisant le nombre de fois où le composé ciblé a été successivement fragmenté (fragmentations successives multi-étages)
MMS : laboratoire Mer, Molécules, Santé
mPEG : monométhoxy-polyèneglycol
MTP-PE : muramyl tripeptide-phosphatidyl-éthanolamine
MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH : soude (hydroxyle de sodium)
$NaHCO_3$: Bicarbonate de sodium
NaH_2PO_4 : Dihydrogénophosphate de sodium
Na_2SO_4anh : Sulfate de sodium anhydre
NL : Neutral Loss
NOESY : en RMN 2D, interaction dipolaire (spatiale) entre deux protons (^1H-^1H) (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)
NRPS : enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (Non-Ribosomal Peptides Synthetase)
NT : non testé
OC : ostéoclaste mature
OSMAC : culture d'une souche fongique sur différent milieux (One Strain-Many Compounds)
OSRGa : cellules d'ostéosarcome murin
P388 : lignées cellulaires de lymphome murin
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)
PC3 : carcinomes prostatiques humains
PCT : Patent Cooperation Treaty
PCT : polycétides
PCR : réaction en chaîne de prolifération de l'ADN (polymerase chain reaction)
PDA : Potato Dextrose Agar (Extrait de pomme de terre - agar ; milieu de culture)
PDB : Protein data Bank
PDT : thérapie photodynamique (PhotoDynamic Therapy)
PDGF : platelet-derived growth factor
PFS : Progression free survival
PKS : polycétide synthase
PHTrP : facteur de résorption osseuse
PLA : acide polylactique
POS-1 : cellules d'ostéosarcome murin
PP : pyrophosphate
PPi : pyrophosphate endogène
ppm : partie par million
PPTP : Pediatric Preclinical Testing Program
Py : pyridine
QC : contrôle qualité (Quality Control)
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RFLP : restriction fragment length polymorphism
RMN : résonnance magnétique nucléaire
RMN 1D : résonnance magnétique nucléaire à une dimension
RMN 2D : résonnance magnétique nucléaire à deux dimensions
rpm : tour par minute (round per minute)
RPMI : milieu de culture cellulaire (Roswell Park Memorial Institute medium)
SaOS2 : cellules d'ostéosarcome humain
SCCVII : carcinomes spinocellulaires murins
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SKMEL-5 : cellule de mélanome
SC : injection sous cutanée
SNC : système nerveux central
STE : stéroïdes
SVF : sérum de veau fœtal
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TIC : courant ionique total
TNF : Tumor necrosis factor
TOCSY : met en évidence des interactions entre protons appartenant à un même système de spins en RMN 2D (J_{HH})
TOF : temps de vol (Time Of Flying)
T_R : temps de rétention
TRAP : coloration enzymatique : détermination de l'activité de la phosphatase acide tartrate résistante
TRP : terpènes
U87 : cellules de glioblastome
UV_λ : ultra violet avec λ pour la longueur d'onde (en nm)
v/v : volume pour volume
VEGF : Vascular Endothelial Growth Facteur
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VT : volume tumoral
XTT : 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YES : milieu Yeast Extract Sucrose (milieu de culture fongique)

Liste des travaux réalisés au cours de cette thèse

✓ PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE

Blanchet E., Vansteelandt M., Le Bot R., Egorov M., Guitton Y., Pouchus Y.F. and Grovel O.
Synthesis and antiproliferative activity of ligerin and new fumagillin analogs against osteosarcoma.
European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 79C, 244–250

Geiger M., Guitton Y., Vansteelandt M., Kerzaon I., Blanchet E., Robiou du Pont T., Frisvad J., Hess P., Pouchus Y.F., Grovel O.
Cytotoxicity and mycotoxin production of shellfish-derived *Penicillium*spp., a risk for shellfish consumers
Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 385-392

Vansteelandt M., Blanchet E., Egorov M., Petit F., Toupet L., Bondon A., Monteau F., Le Bizec B., Pouchus Y.F., Le Bot R., Grovel O.
Ligerin, an Antiproliferative Chlorinated Sesquiterpenoid from a Marine-Derived *Penicillium* Strain
Journal of Natural Products 2013, 76 (2), 297–301

Vansteelandt M., Kerzaon I., Blanchet E., Tankoua O. F., Robiou Du Pont T., Joubert Y., Monteau F., Le Bizec B., Frisvad J.C., Pouchus Y.F., Grovel O.
Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains,
Fungal Biology, September 2012, 116 (9), 954–96

✓ PUBLICATION DANS UN OUVRAGE SCIENTIFIQUE

Vansteelandt M., Roullier C., Blanchet E., Guitton Y., Pouchus Y.F., Ruiz N., and Grovel O.,

Impact of marine-derived *Penicillium* species in the discovery of new potential antitumor drugs,

p45-86, Chapitre 3 *in* Kornprobst J.M. et Labarre S., Outstanding Marine Molecules and New Trends in Analytical Methods. 2014, Wiley-Blackwel, 536p

✓ PARTICIPATIONS A DES CONGRES

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX

Grovel O., Vansteelandt M., Blanchet E., Petit K.E., Le Bot R., Egorov M., Pouchus Y.F.
New terpenoids from marine-derived *Penicillium* with potent anticancer activity in osteosarcoma models
International Congress on Natural Products Research 2012 (ICNPR 2012), New-York (USA), July 28-August 1 2012.

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Egorov M., Petit K.E., Pouchus Y.F., Grovel O.
Natural and semisynthetic fumagillin derivatives as anti-osteosarcoma agents.
Natural Anticancer Drugs 2012, Olomouc (Czech Rep.), June 30-July 4 2012.

Vansteelandt M., Blanchet E., Petit K.E., Egorov M., Le Bot R., Pouchus Y.F., Grovel O.
Fungal anticancer drugs from the sea: new sesquiterpenoids from a marine-derived strain of *Penicillium* nov. sp. for osteosarcoma treatment.
Natural Anticancer Drugs 2012, Olomouc (Czech Rep.), June 30-July 4 2012.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES NATIONAUX

Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus Y.F., Grovel O.
Towards the development of metabolomics for marine micro-organisms compounds discovery.
7e Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Amiens, 10-12 juin 2013

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Egorov M., Petit K.E., Pouchus Y.F., Grovel O.
Sesquiterpènes des *Penicillium* marins: la marche sur le métabolome.
GDR BioChiMar, Gif-sur-Yvette, Décembre 2012

COMMUNICATIONS AFFICHEES DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX

Grovel O., Blanchet E., Guitton Y., Vansteelandt M., Roullier C., Pouchus Y.F.
Exploring the secondary metabolites and the dynamics of their biosynthesis in marine-derived fungi.
14th International Symposium on Marine Natural Products and the 8th European Congress on Marine Natural Products 2013, September 15th-20th, 2013

Roullier C., Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Pouchus Y.F., Grovel O.
Toward the targeted isolation of marine halogenated compounds using the mehalocoa metabolomic tool.
14th International Symposium on Marine Natural Products and the 8th European Congress on Marine Natural Products 2013, September 15th-20th, 2013

Blanchet E., Guitton Y., Vansteelandt M., Le Bot R., Pouchus Y.F., Grovel O.
LC-HRMS/MS investigation of a new marine-derived *Penicillium* species for the rapid detection of original bioactive compounds.
AFERP & STOLON International Symposium, Brussels, May 22nd-24th 2013

COMMUNICATIONS AFFICHEES DANS DES CONGRES NATIONAUX

Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus Y.F., Grovel O.
MeHaloCoA project (MarinE HALOgenated COmpounds Analysis)
7e Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Amiens, 10-12 juin 2013

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Pouchus Y.F., Grovel O.
LC-HRMS/MS investigation of a new marine-derived *Penicillium* species for the rapid detection of original bioactive compounds.
Journées VENAM, Oniris Nantes, 25&26 octobre 2012.

Introduction

Malgré sa faible incidence (300 nouveaux cas uniquement chaque année en Europe), l'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes. Il représente 8,9% des décès liés à un cancer chez les enfants (Ottaviani et Jaffe, 2009). Aucun traitement satisfaisant n'est aujourd'hui disponible et aucun progrès en termes de pronostic n'est noté depuis les traitements combinés de chimiothérapie dans les années 90. Le taux de survie à 5 ans chez les patients présentant une tumeur osseuse localisée sans métastase et suivant un traitement associant chirurgie et chimiothérapie s'élève de 60 à 70% (Broadhead *et al.*, 2011). Les agents de chimiothérapie sont principalement la méthotrexate, l'ifosfamide, la doxorubicine et le cisplatine. Cependant, tous ces composés induisent des effets secondaires importants mettant en exergue la nécessité de développer de nouveaux traitements.

Deux voies principales peuvent conduire à l'obtention de nouvelles molécules utilisables en chimiothérapie : la synthèse chimique et l'extraction de molécules naturelles. La première pouvant d'ailleurs se faire à partir de modèles obtenus par la seconde.

Dans le cas de la recherche de nouveaux principes actifs d'origine naturelle, le premier choix à réaliser est celui de la source à étudier c'est-à-dire du type d'organismes et de leur origine. La forte biodiversité des micromycètes marins associée aux conditions de vie particulières en milieu hypersalin, font de ces micro-organismes une ressource prometteuse pour la découverte de molécules originales bioactives (Bhadury *et al.*, 2006; Tohme *et al.*, 2011; Gerwick et Moore, 2012).Ainsi, actuellement, la plinabuline, un composé de synthèse inspiré de l'halimide, une dicétopiperazine isolée d'une souche marine d'*Aspergillus ustus*, est en phase II d'essai clinique pour le traitement du cancer des poumons en combinaison avec du docetaxel (Nereus Pharmaceuticals®, Mita *et al.*, 2010).

Dans le cadre de la recherche de nouveaux agents actifs contre les ostéosarcomes, des travaux réalisés au laboratoire Mer Molécules Santé de l'université de Nantes en association avec la société Atlantic Bone Screen (spécialisée dans l'évaluation préclinique de candidats médicaments pour le traitement de pathologies osseuses) ont permis d'isoler et d'identifier une molécule originale, la ligérine, à partir d'une nouvelle espèce de *Penicillium* isolée du milieu marin. Le travail présenté dans cette thèse correspond à la suite de cette découverte avec d'une part une meilleure connaissance de l'activité de la ligérine et de ses analogues hémisynthétiques vis-à-vis des ostéosarcomes, et d'autre part une meilleure connaissance des champignons qui la produisent avec une étude génétique et chimique devant conduire à la description d'une nouvelle espèce qui sera baptisée *Penicillium ligerum*.

Pour cela le manuscrit a été articulé en trois parties :

- une partie introductive bibliographique resituant l'intérêt des *Penicillium* en général et marins en particulier pour la recherche de nouveaux agents thérapeutiques

- une partie pharmacochimique sur l'hémisynthèse de la ligérine et de ses analogues et leur activité vis-à-vis des ostéosarcomes tant en *in vitro* qu'en *in vivo*

- une dernière partie mycologique et mycochimique sur la description phénotypique, génotypique et métabolomique de la nouvelle espèce *P. ligerum*.

L'ensemble de ces travaux a été soutenu par un contrat CIFRE engageant le laboratoire Mer Molécules Santé de l'Université de Nantes et l'entreprise Atlantic Bone Screen.

PARTIE I
Les *Penicillium* spp. marins sources de métabolites cytotoxiques
Etudebibliographique

Les organismes marins constituent un champ immense d'investigations pour les chimistes des substances naturelles (Blunt *et al.*, 2011; Montaser et Luesch, 2011). Parmi ceux-ci : les micromycètes représentent une source inépuisable de métabolites bioactifs du fait de leur grande capacité métabolique (Bhatnagar et Kim, 2010). Les champignons du genre *Penicillium* sont les plus fréquents dans l'environnement marin. En milieu terrestre, ils sont connus pour produire de nombreux composés bioactifs comme la pénicilline, la griséofulvine ou encore les statines. Leur abondance dans le milieu marin laisse espérer la découverte de nouveaux agents thérapeutiques (Kozlovskii *et al.*, 2013).

Ainsi, cette première partieintroduira tout d'abord l'importance des micromycètes du genre *Penicillium* puis plus particulièrement ceux issus du milieu marin avant de s'intéresser aux métabolites cytotoxiques qu'ils produisent.

CHAPITRE I.
Les champignons du genre *Penicillium*

1. Description

Le genre *Penicillium* a été décrit pour la première fois par Link en 1809. Les *Penicillium* spp. sontdes ascomycètes filamenteux polyphages ubiquistes. En effet, ils sont omniprésents dansles sols, l'air ou encore les débris végétaux et jouent un rôle écologique clé puisqu'ils interviennent dans les processus naturels de recyclage de la matière organique morte (Pitt *et al.*, 2000). Certaines espèces parasitent des végétaux ou des animaux mais aucune de ces espèces n'est un parasite obligatoire (Pitt, 2002).

Les *Penicillium* spp. sontdotés d'un appareil végétatif constitué d'hyphes septés hyalins ou peu colorés et d'un appareil reproductif sporifère qui présente une forme comparable à celle d'un pinceau (en latin, pinceau = *penicillus* expliquant ainsi leur dénomination). Le genre *Penicillium* est un genre asexué dit anamorphe qui regroupe des champignons se reproduisant grâce à une production importante de conidies. La forme de reproduction sexuée associée correspond quant à elle aux genres téléomorphes : *Talaromyces* et *EuPenicillium* présentant des différences dans la production de leur ascocarpes (gymnothèque ou cleistothèque, respectivement pour *Talaromyces* et *EuPenicillium*) (Pitt, 1979). Néanmoins depuis l'accord d'Amsterdam 2011, seul le nom de genre *Penicillium* est aujourd'hui retenu pour décrire l'ensemble des espèces qu'elles soient anamorphes ou téléomorphes (Hawksworth *et al.*, 2011).

La reproduction asexuée des *Penicillium* est assurée par un appareil sporifère constitué de conidiophores qui se développent perpendiculairement au mycélium et qui sont ramifiés à leurs extrémités en phialides qui elles-mêmes bourgeonnent les nombreuses conidies (Figure I-1).

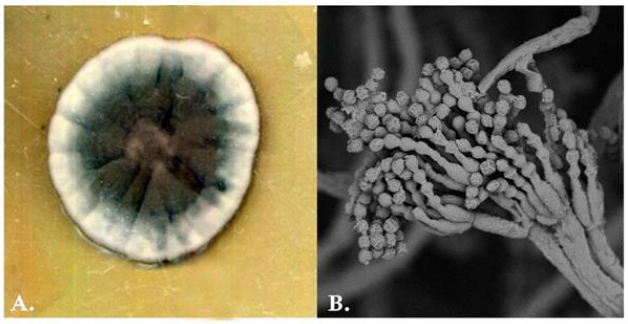


Figure I-1 : Morphologie d'un *Penicillium*
A. macroscopique. B. microscopique (microscopie électronique à balayage Gx2700)

L'aspect des pinceaux constitue le premier critère permettant la classification des *Penicillium*. On distingue alors les espèces mono-, bi-, tri- ou quadriverticillées (Figure I-2).

Les espèces monoverticillées : les pénicilles sont constitués d'un simple verticille de phialides

Les espèces biverticillées : les phialides sont disposées selon deux verticilles et les ramifications sont symétriques. Les métules portent les phialides.

Les espèces tri- ou quadriverticillées : les pénicilles sont composés de plusieurs verticilles successifs eux-mêmes ramifiés et porteurs de métules et de phialides.

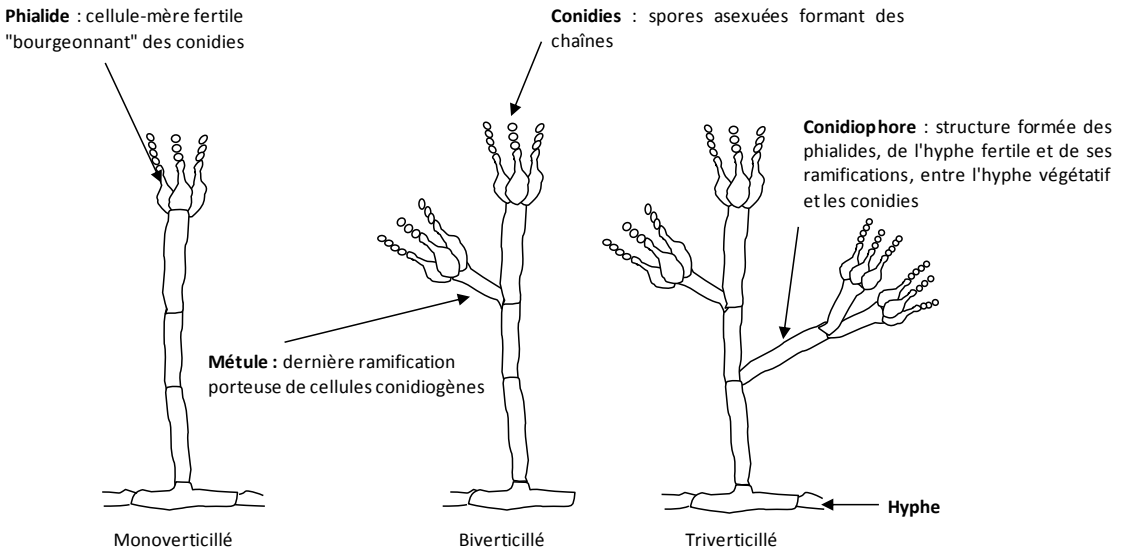


Figure I-2 : Structure des différents types d'appareils de reproduction asexuée des *Penicillium*(Pitt, 1988)

Au bout des phialides se rattachent des chaînes de spores nommées conidies. Celles-ci sont en général vertes et deviennent brunes à maturité. Leurs caractéristiques (forme, couleur, ornementation) constituent des critères supplémentaires d'identification (Pitt, 1979; Botton *et al.*, 1990).

La classification globale du genre *Penicilliumest* la suivante :

Règne : Mycota,
Embranchement : Eumycota,
Sous-embranchement : Ascomycotina,
Classe : Euascomycètes,
Ordre : Eurotiales,
Famille : Trichocomaceae,
Genre : *Penicillium*

Le genre *Penicilliumest* très étendu. On estime actuellement que le genre *Penicillium* regroupe plus de 250 espèces(Houbraken et Samson, 2011).La classification de ces espèces basée sur des critères de description macro- ou microscopique est assez complexedu fait de l'importante variabilité phénotypique de ces champignons. En effet, leur phénotype dépend des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement. La Figure I-3 illustre ces variations phénotypiques. Une même souche de *P. antarcticum* a été cultivée sur six milieux de culture différents et présente des colonies d'aspects eux aussi différents.

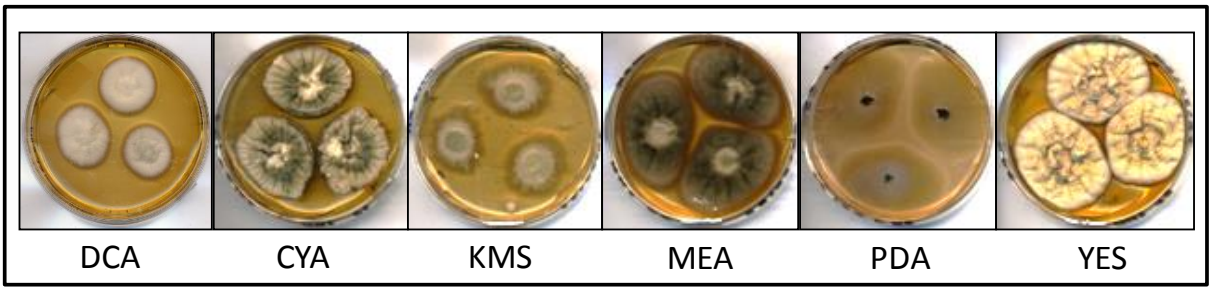


Figure I-3 : Variabilité phénotypique des *Penicillia* : exemple de morphologie macroscopique de colonies d'une souche de *P. antarcticum* sur 6 milieux de culture différents (Annexe II, p13)

C'est pourquoi la classificationactuelle se base, en plus des critères microscopiques et morphologiques, sur des données métaboliques et surtout génétiques (Pitt *et al.*, 2000). Ainsi, au cours de ces dernières années, la caractérisation des souches fongiques par biologie moléculaire s'est généralisée. Elle s'est vueensuite compléter par la chimiotaxonomie développée par Frisvad et Samson (2004) qui ont observé que les profils métaboliques des *Penicillium* étaient spécifiques et constants (Frisvad *et al.*, 2004).

La dernière classification établie par Houbraken et Samson distingue essentiellement deux sous-genres : *Penicilliumet Aspergilloïdes*,qui sont divisés en 25 sections (clades), 14 pour les *Aspergilloïdes* et 11 pour les *Penicillium*(Houbraken et Samson, 2011).

Au sein du sous-genre *Penicillium*, nous avons porté notre attention sur la section*Canescentia* à laquelle appartiennent les souches fongiques de notre étude. Cette section est composée de micromycètes biverticillés symétriques avec parfois une branche additionnelle. Les phialides sont simples et petites (7-9µm) avec une forme cylindrique plus ou moins large. La section *Canescentia* compte actuellement neuf espèces(Houbraken et Samson, 2011).

Section *Canescentia*

*P. murcianum*C. Ramírez & A.T. Martínez
P. yarmokense Baghdadi
*P. jensensii*Zaleski
*P. janczewskii*Zaleski
*P. antarcticum*Hocking & McRae
*P. atrovenetum*Smith
P. novae-zeelandiae van Beyma
*P. coralligerum*Nicot & Pionnat
*P. canescens*Sopp

2. Intérêtsindustriels

Les *Penicillium* représentent tout d'abord un genre fongique particulièrement connu de l'industrie agroalimentaire. Ils sont nécessaires à la fabrication de fromages (*P. roqueforti, P. camembertii*…) mais ils produisent également des mycotoxines responsables de contaminations de produits agroalimentaires (citrioviridine, patuline, roquefortine...).

L'industrie pharmaceutique s'intéresse aussi à eux au travers de métabolites qui ont prouvé leur efficacité thérapeutique. La pénicilline est l'un des plus connus puisqu'elle a complètement révolutionné l'arsenal thérapeutique des médecins avec la découverte des antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes. La découverte est attribuée à Alexander Fleming qui décrivit en 1929 les effets de la pénicilline produite par *P. notatum* sur des bactéries, bien qu'il n'ait pas isolée la molécule (Fleming, 1929).*P. notatum*a été renommé en 1977 *P. chrysogenum* mais serait en fait un *P. rubens* selon Houbraken (Houbraken *et al.*, 2011). Howard Florey et Ernst Chain ont finalement isolé et identifié la pénicilline en 1939. C'est pourtant l'acide mycophénolique qui a été le premier antibiotique d'origine microbienne décrit mais avec beaucoup moins de succès que la pénicillicine. C'est un métabolite produit par *P. brevicompactum* qui a été isolé pour la première fois en 1893 (Gosio et Ferrati, 1893). L'acide mycophénolique présente un large panel d'activités et est surtout utilisé en thérapeutique pour ses propriétés immunosuppressives pour limiter les rejets après une greffe d'organe. La mévastatine ou compactine est une molécule qui a quant à elle été simultanément isolée de *P. brevicompactum* et *P. citrinum* par deux groupes de recherche différents en 1976 au Royaume-Uni (Brown *et al.*, 1976) et au Japon (Endo *et al.*, 1976). Cette molécule est devenue la molécule leader parmi les molécules de la classe médicamenteuse des statines qui sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse du cholestérol et sont utilisées dans la prévention des maladies coronariennes. A côté de ces molécules qui ont permis le développement de médicaments, beaucoup de composés isolés de *Penicillium* ont aussi été évalués pour leurs activités antitumorales (Nicoletti *et al.*, 2008) confirmant l'intérêt de l'étude des champignons de ce genre pour la recherche de nouveaux candidats médicaments.

CHAPITRE II.
Les *Penicillium* en milieu marin : importance et intérêt

Bien que les premières descriptions de champignons marins datent des années 1840 à 1880, c'est seulement lors des trois dernières décennies que de considérables progrès peuvent être notés, documentant ainsi leur apparition, leur distribution et leurs potentielles applications biotechnologiques. Durant la période de 1980 à 1999, on commence de plus en plus à s'intéresser à eux et 300 espèces de champignons marins sont alors recensées. Néanmoins, la définition du terme de « champignon marin » est variable suivant les auteurs (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Hyde *et al.*, 1998). Kolhmeyer *et al.*considèrent que parmi les champignons vivant dans le milieu marin, doivent être distingués les champignons marins obligatoires et les facultatifs. Les champignons marins obligatoires se développent et sporulent exclusivement dans un habitat marin ou estuarien et les champignons marins facultatifs sont eux présents dans les zones d'eau douce ou terrestres mais sont aussi capables de se développer dans l'environnement marin (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). N'ayant pas étudié les questions écologiques dans ce travail, nous utiliserons dans la suite du texte les mots « champignons marins » pour désigner les souches isolées à partir du milieu marin, bien que ceci puisse être considéré comme un abus de langage.

Les champignons marins isolés se révèlent être présent dans un large éventail de substrats et de zones géographiques (Jones *et al.*, 2009). Cette période coïncide avec leur découverte en milieu tropical et notamment dans les mangroves (Kohlmeyer, 1984).Jones *et al.* estiment en 2011 qu'il existerait en fait au moins 10 000 champignons marins et que pour les recenser il faudrait entre autres s'intéresser d'avantage aux espèces non identifiées ou mal identifiées, aux espèces non cultivables, il faudrait élargir les zones géographiques explorées (Jones, 2011).

Les champignons marins sont les décomposeurs majeurs du bois et des végétaux de l'écosystème marin grâce à leur capacité à dégrader la lignocellulose. Ils jouent aussi un rôle important dans la dégradation des animaux marins morts. Certains champignons marins sont la cause de maladies d'animaux ou de végétaux, alors que d'autres vivent en symbiose avec d'autres organismes marins.

1. Importance des *Penicillium* en milieu marin

Parmi les champignons marins, ceux du genre *Penicillium* sont largement présents dans l'environnement marin. Ils prédominent par exemple, dans les zones conchylicoles de Loire-Atlantique. Ainsi, lors d'une étude précédente, douze genres ont été identifiés avec 47% de *Penicillium* spp. sur un total de 456 souches fongiques isolées de cette zone (Sallenave-Namont *et al.*, 2000). D'autres études mettent en évidence l'importance de la colonisation des habitats marins par des champignons de ce genre. Matallah-Boutiba *et al.*indiquent que parmi les 251 champignons filamenteux qu'ils ont isolés suite aux prélèvements d'eau de mer, de moules et de sédiments effectués le long de la côte algérienne, 131 appartiennent au genre *Penicillium* soit 52% de la totalité des souches isolées (Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). L'étude bibliographique réalisée par les mêmes auteurs met en

exergue la dominance des genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans le milieu marin. Les *Penicillium* spp. peuvent être observés dans divers échantillons marins provenant de zones géographiques variées : sédiments des côtes du japon (Khudyakova *et al.*, 2000), des eaux profondes du bassin indien central (Damare *et al.*, 2006), des côtes de la Mer rouge en Egypte (Abd-Elaah, 1998), sable des plages de Rio de Janeiro (De Moura Sarquis et De Oliveira, 1996) ou de dunes du Danemark (Rees *et al.*, 1979) mais aussi dans des échantillons d'eau de mer du nord de la cote grecque (Arvanitidou *et al.*, 2002).

Les *Penicillium* marins ont aussi été isolés à partir d'animaux marins : des mollusques bivalves (Sallenave-Namont *et al.*, 2000), de cnidaires (Da Silva *et al.*, 2008), d'éponges (Ding *et al.*, 2011), de poissons (Shigemori *et al.*, 1991)) ou à partir de végétaux marins (des algues vertes (Son *et al.*, 1999), rouges (Tsuda *et al.*, 2004) ou brunes (Amagata *et al.*, 1998))

Les *Pencillium* sont aussi présents dans des milieux marins extrêmes. Ainsi, on peut les observer dans l'eau hyper-salée de la Mer morte (Buchalo *et al.*, 1998)dans des marais salants le long de la mer Adriatique (Gunde-Cimerman *et al.*, 2001) oudans la glace de l'arctique (Sonjak *et al.*, 2006).

2. Intérêt des *Penicillium* marins

Les *Penicillium* marins vivant dans des habitats particuliers et extrêmes peuvent être considérés comme une riche source de composés d'intérêt. Selon Jensen et Fenical, la production de métabolites secondaires originaux serait expliquée par la nécessité pour ces organismes de s'adapter à un ensemble très varié de pressions environnementales (Jensen et Fenical, 2002). Entre les années 2000 et 2005, approximativement 100 métabolites secondaires produits par des champignons marins ont été décrits et entre 2006 et 2010, plus de 690 composés ont été publiés, illustrant ici l'intérêt croissant des chimistes des produits naturels pour cette source marine. En 2011, on compte 201 métabolites décrits comme produits par des *Penicillium* marins (Antibase, 2011, (Laatsch, 2011)) ce qui démontre l'importance du genre *Penicillium* parmi les champignons marins comme source de métabolites.

Toutes les classes chimiques sont représentées : polycétides, alcaloïdes, terpènes, peptides ou de biosynthèse mixte. Les métabolites secondaires isolés peuvent posséder des activités biologiques intéressantes. Le panel d'activités est large : antibactériennes, antivirales, antifongiques, antiparasitaires, anti-inflammatoires, anticancéreuses,… A titre d'exemple, le Tableau I-1 recense quelques métabolites bioactifs produits par des *Penicillium* marins.

Tableau I-1 : Exemples de métabolites bioactifs produits par des *Penicillium* marins

			l'île Jeju, Corée du Sud	et de la prostaglandine E2	
Immunosuppressive	Pénicacides B	*P. sp.*	Sédiments de la mer de Chine méridionale	activité inhibitrice de l'enzyme inosine-monophosphate dehydrogenase qui joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des purines (IC_{50} = 6,43 µM)	(Chen *et al.* , 2012)
Neurotoxicité	Patuline	*P. antarcticum*	Moules de la côte Atlantique, France	neurotoxicité sur larves de diptère (ED_{50} = 3,9 µg/mg)	(Vansteelandt *et al.* , 2012)

La recherche de la bioactivité des composés est aujourd'hui de plus en plus focalisée sur les propriétés anticancéreuses que nous n'avons pas illustrées dans leTableau I-1 mais qui fait l'objet du chapitre qui suit.

CHAPITRE III.
Métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins

Un travail bibliographique collaboratif effectué au laboratoire nous a permis de réaliser un recensement des composés isolés de *Penicillium* marins présentant une activité cytotoxique. Ce travail a fait l'objet d'un chapitre de livre intitulé : « *Impact of marine-derived Penicillium species in the discovery of new potential antitumor drugs* » publié dans le livre « *Outstanding Marine Molecules and New Trends in Analytical Methods* » (Kornprobst et Labarre, Whiley, 2014). Nous commenterons ici les données bibliographiques regroupées dans ce chapitre d'ouvrage.

1. Revue des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins

L'ensemble des composés cytotoxiques isolés à partir de *Penicillium* marins répertorié par classes chimiques est détaillé dans le tableau de l'Annexe I. Seuls les composés avec un fort potentiel cytotoxique ont été recensés dans le but de concentrer l'attention sur les molécules prometteuses pour des traitements anticancéreux. Ce tableau inclut donc uniquement les composés présentant une cytotoxicité ou une activité antiprolifératives sur cellules de mammifères avec une CI_{50} inférieure à 30 µM. Les composés présentant une cytotoxicité plus faible n'ont pas été inclus.

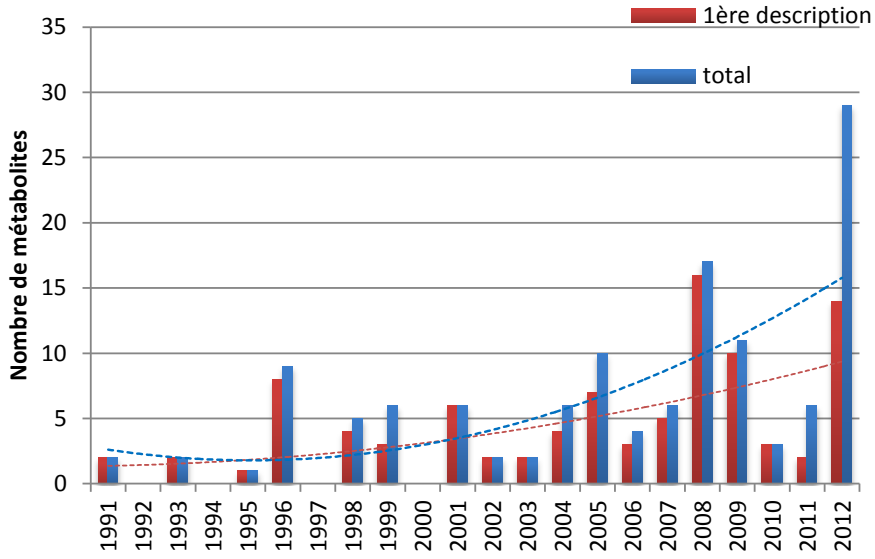


Figure I-4 : Métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins décrits durant les années 1991 à 2013
(**en bleu** : total des composés ; **en rouge** : ceux qui constituent une première description,
les courbes en pointillées correspondent aux courbes de tendance polynomiales)

Le nombre de métabolites cytotoxiques publiés ces dernières années est croissant aussi bien pour les composés nouveaux que pour les ré-isolés (Figure I-4). Cela confirme l'intérêt grandissant que l'on porte aux *Penicillium* issus du milieu marin et à la recherche de composés anticancéreux, recherche soutenue par des techniques et des équipements de plus en plus performants.

Il est difficile de publier l'isolement de composés déjà connus et pour qu'ils apparaissent au sein de publications, il faut que l'activité de ces composés soit nouvelle ou que ceux-ci constituent une information annexe à l'isolement d'un composé original. Pourtant ces dernières années au moins la moitié des composés cytotoxiques de *Penicillium* marins publiés constituent des ré-isolement. Cela s'explique entre autre par la place importante que prend la recherche de composés anticancéreux qui constitue la cible visée par de plus en plus de laboratoires.

1.1. D'où proviennent les souches marines de *Penicillium* productrices de métabolites cytotoxiques ?

Même lorsque l'espèce de la souche de *Penicillium* n'est pas donnée (*P.* sp.), la plupart des articles relatant un isolement de composés cytotoxiques décrivent la nature des échantillons ayant permis d'isoler le micromycète. Les origines sont très variables comme le présente laFigure I-5. Il est intéressant de constater que les souches issues de l'eau de mer n'ont donné que 5% de molécules cytotoxiques contre 36% pour celles issues de sédiments et 43% pour celles isolées d'organismes vivants (végétaux et animaux). Il est difficile d'en tirer des conclusions car ces résultats peuvent être biaisés par le fait que plus de travaux aient été réalisés sur des échantillons solides (sédiments) que liquides (eau de mer) par exemple.

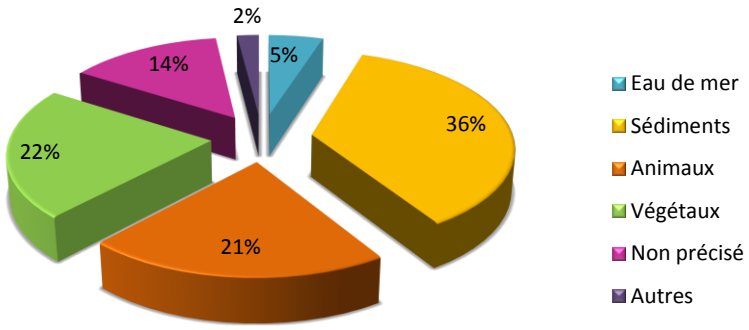


Figure I-5 : Répartition des origines des souches marines de *Penicillium* cytotoxiques

1.2. Quelles sont les espèces cytotoxiques chez les*Penicillium*marins ?

La majorité des articles présentant l'isolement de composés produits par des souches marines de *Penicillium* ne donne pas le nom de l'espèce étudiée et ne cite simplement que le genre du micromycète. On voit ainsi beaucoup d'auteur parler de "*Penicillium* sp." ce qui n'est que très peu informatif. Cela s'explique du fait que l'identification de ces micromycètes reste difficile même avec l'avènement de la biologie moléculaire. Lors de notre étude, nous n'avons donc recensé que 26 espèces fongiques marines productrices de composés cytotoxiques nommément citées dans les articles (Tableau I-2). Deux d'entre elles sont identifiées comme *P. purpurogenum* et *P. rugulosum* qui

appartiennent au genre *Talaromyces* correspondant à des formes téléomorphiques de divers *Penicillium* spp. Les espèces citées sont réparties entre les deux sous-genres et les 25 sections. Aucune section ne semble donc particulièrement liée à l'environnement marin. Par contre, certaines espèces sont largement représentées dans l'environnement marin et ont été isolées et étudiées à plusieurs reprises par des équipes différentes. C'est le cas des espèces *P. citrinum*, *P. crustosum* (= *P. terrestre*), *P. expansum*, *P. chrysogenum* et *P. mononematosum* que l'on peut donc considérer comme particulièrement acclimatées à l'environnement marin.

Tableau I-2 : Espèces de *Penicillium* marins décrites comme productrices de métabolites cytotoxiques

Sous-genre	Section	Espèces	Référence
Aspergilloides	*Aspecrgilloides*	***P. thomii***Maire	(Chen *et al.*, 2007)
		P. flavidorsum = ***P. glabrum*** *Westling*	(Ren *et al.*, 2007)
	Charlesii	***P. fellutanum***Biourge	(Shigemori *et al.*, 1991)
	Sclerotoria	***P. bilaiae***Chalab.	(Capon *et al.*, 2007)
	Exilicaulis	*P. obscurum* = ***P. corylophilum*** *Dierckx*	(Gautschi *et al.*, 2004)
	Lanata-divaricata	***P. janthinellum***Biourge	(Smetanina *et al.*, 2007)
		P. oxalicumCurrie & Thom	(Liu *et al.*, 2007) (Sun *et al.*, 2012)
		P. simplicissimum (Oudem.) Thom	(Pivkin *et al.*, 2011)
	Citrina	***P. citrinum***Thom	(Tsuda *et al.*, 2004); (Sasaki *et al.*, 2005); (Chen *et al.*, 2011) ; (Khamthong *et al.*, 2012) ; (Yurchenko *et al.*, 2013);
		P. paxilli Bainier	(Kossuga *et al.*, 2012)
		P. waksmanii Zaleski	(Amagata *et al.*, 1998)
Penicillium	*Fasciculata*	***P. aurantiogriseum*** Dierckx	(Xin *et al.*, 2005); (Song *et al.*, 2012)
		P. communeRaper & Thom	(Gao *et al.*, 2011b) ; (Shang *et al.*, 2012b)
		P. polonicum Zaleski	(Indriani, 2009)
		P. terrestre = ***P. crustosom*** *Thom*	(Liu *et al.*, 2005b); (Liu *et al.*, 2005a) ; (Chen *et al.*, 2008); (Li *et al.*, 2011b)
	Penicillium	***P. expansum***Link	(Kerzaon *et al.*, 2009) ; (Lu *et al.*, 2010); (Wang *et al.*, 2012a)
	Roquefortorum	***P. paneum*** Frisvad	(Li *et al.*, 2011a)
	Chrysogena	***P. chrysogenum***Thom	(Bringmann *et al.*, 2003) ; (Bringmann *et al.*, 2005) ; (Ma *et al.*, 2011b); (Ma *et al.*, 2011a)
		P. mononematosum Frisvad	(Cui *et al.*, 1996) ; (Numata *et al.*, 1991) ; (Frisvad *et al.*, 2004)
	Brevicompacta	***P. brevicompactum***Dierckx	(Bringmann *et al.*, 2004)
	Ramosa	***P. raistrickii*** Smith	(Ma *et al.*, 2012)
	Canescentia	***P. janczewskii*** Zaleski	(He *et al.*, 2005)
		P. ligerum	En cours de description-Sujet principal de cette thèse
	Eladia	***P. sacculum*** Dale	(Liu *et al.*, 2012)
Non attribué		***P. fructigenum*** Takeuchi	(Xin *et al.*, 2005)
Genre *Talaromyces*		*P. purpurogenum* = ***Talaromyces purpurogenus*** (Stoll) Samson, Yilmaz, Frisvad and Seifert	(Chai *et al.*, 2011); (Chai *et al.*, 2012); (Fang *et al.*, 2012)
		P. rugulosum = ***Talaromyces rugulosus*** *(Thom) Samson, Yilmaz, Frisvad and Seifert*	(Kozlovsky *et al.*, 2001)

1.3. Quels sont les molécules prometteuses provenant de souches marines de *Penicillium*?

Dans le tableau de cette étude bibliographique (cfAnnexe I), les molécules écrites en caractères gras correspondent à celles dont la première description a été faite à partir d'un *Penicillium* marin. Elles représentent 73% de l'ensemble des molécules cytotoxiques observées dans cette source, ce qui démontre l'intérêt des recherches dans les souches marines de *Penicillium*.

1.3.1. Répartition des molécules selon leur classe chimique

Les micromycètes sont dotés de capacités métaboliques importantes du fait de leur arsenal enzymatique très développé. Les métabolites secondaires qu'ils produisent sont très variés d'un point de vue chimique. Nous nous sommes donc intéressés à la répartition des molécules recensées selon leur classe chimique. Pour cela, nous avons regroupé les métabolites identifiés dans les grandes classes chimiques classiques pour les produits naturels, classes qui dérivent des différentes voies de biosynthèse : alcaloïdique, terpénique, peptidique ou encore la voie des polycétides ou celle des dicétopipérazines. Cependant, du fait de la complexité de certaines structures et d'une méconnaissance de certaines voies biosynthétiques, la classe chimique des molécules reste parfois difficile à définir avec certitude. Par ailleurs, certains métabolites proviennent de différentes voies de biosynthèse comme par exemple, les penicillenols qui sont à la fois issus de la voie des alcaloïdes et de celle des polycétides. Nous avons donc ajouté quatre classes regroupant chacune deux voies biosynthétiques (alcaloïdes/polycétides ; polycétides/terpènes ; alcaloïdes/dicétopipérazines et alcaloïdes/terpènes).Les résultats sont présentés dans la Figure I-6.

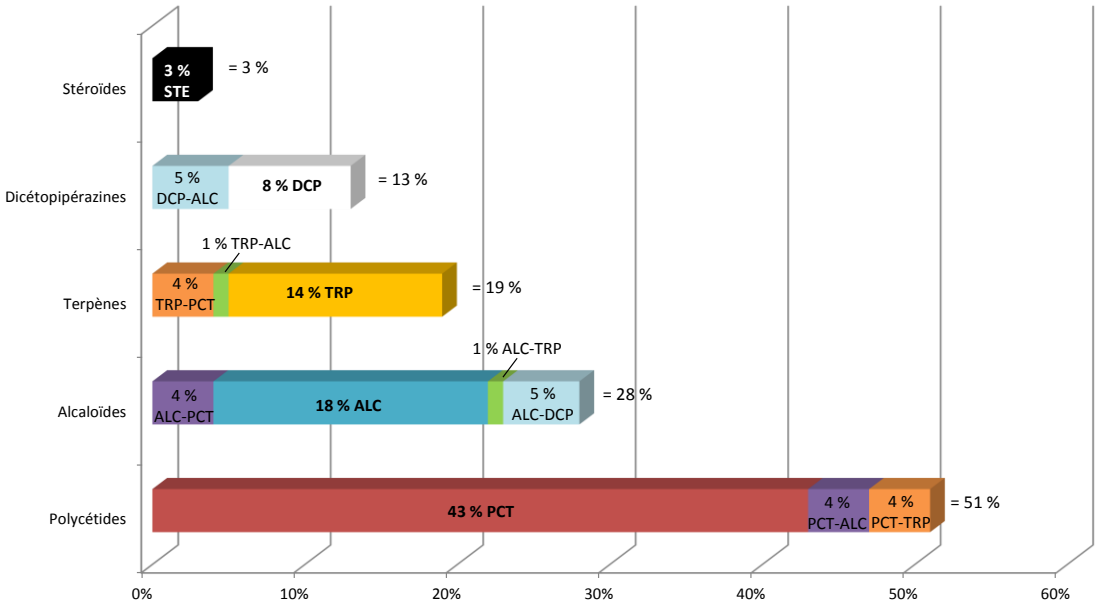


Figure I-6 : Répartition des métabolites cytotoxiques isolés de *Penicillium* marin en fonction des classes chimiques auxquelles ils appartiennent (PCT : polycétides, ALC : alcaloïdes, DCP : dicétopipérazines, TRP : terpènes, STE : stéroïdes)

Les différents composés relevés sont distribués dans presque toutes les classes chimiques (Figure I-6). Seuls les peptides n'ont pas présentés d'activités cytotoxiques suffisantes et ont été exclus de la sélection. Les polycétides constituent la classe majoritaire (51% avec 43% des composés provenant uniquement de la voie biosynthétique des polycétides et 8% provenant de biosynthèses mixtes avec les alcaloïdes et les terpènes) et sont suivis par les alcaloïdes (28% avec 18% + 10% provenant de voies biosynthétiques mixtes). Les composés terpèniques et les stérols représentant respectivement 19 et 13% des composés recensés. Peu de stérols de *Penicillium* marins ont été décrits comme cytotoxiques (3%).

1.3.2. Répartition des molécules selon leur poids moléculaire

Lipinski a défini 5 règles auxquelles répondent la plupart des médicaments actifs par voie orale (Lipinski *et al.*, 1997). Ces règles indiquent que la molécule doit avoir :
-un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol, un poids moléculaire important représentant une limite à la perméabilité intestinale et au passage de la barrière hémato-encéphalique
-un logP (reflétant la lipophilie de la molécule) inférieur à 5
-moins de 5 possibilités de donner une liaison hydrogène
-moins de 10 possibilités d'accepter une liaison hydrogène.

La cinquième règle indique que la molécule ne doit pas déroger à ces quatre règles plus d'une fois.

Nous avons donc cherché à savoir si les molécules cytotoxiques recensées répondaient aux deux premiers critères.

La Figure I-7 classe les composés cytotoxiques en fonction de leur poids moléculaire. La majorité des métabolites recensés (82%) présentent un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol et répondent donc à la première règle de Lipinski. Concernant la lipophilie des molécules, 90% des composés ont un clogP inférieur à 5. Seulement 2 molécules (la méléagrine B et la pénochalasine D) sont exclues par ces deux critères (poids moléculaire et clogP). Les métabolites cytotoxiques des *Pencillium* marins semblent donc posséder des qualités requises pour être utilisables en thérapeutique.

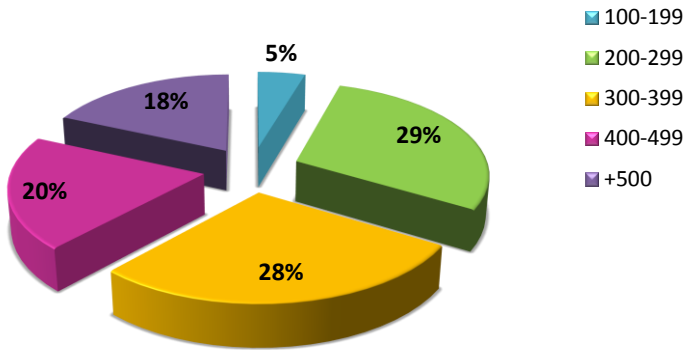


Figure I-7 : Répartition des molécules selon leur poids moléculaire (en g/mol)

1.3.3. Molécules halogénées

Le milieu marin étant très riche en chlorure de sodium (moyenne de 33 g/L d'eau de mer) et le sujet principal de cette thèse étant comme nous le verrons par la suite, une molécule cytotoxique chlorée, nous nous sommes demandés si le milieu marin conduisait à une production plus importante de molécules chlorées que le milieu terrestre. En 2011, on comptait 1667 métabolites identifiés produits par des micromycètes du genre *Penicillium* dont seulement 201 étaient des métabolites produits par des *Penicillium* marins (12%). Parmi ces 201 métabolites, 4% étaient chlorés. Si l'on considère maintenant les métabolites produits par les *Penicillium* terrestres (1466), le pourcentage de composés chlorés est de 6% (85 métabolites). Parmi les 135 composés cytotoxiques relevés, seulement 4% sont des composés chlorés ce qui correspond bien à la répartition globale. La ligérine est la seule molécule chlorée décrite au sein des terpènoïdes cytotoxiques sélectionnés pour cette étude. Les six autres composés chlorés sont des polycétides (4 analogues de terrestrol : terrestrol B, D, F et G, le 2-chloro-6-(methoxymethyl)-1,4-benzenediol et chloctanspirone A). Ces constations montrent que la présence en abondance de NaCl dans le milieu où se développent les *Penicillium* marins ne semble en fait pas avoir d'influence sur la production de molécules chlorées qui ne sont pas produites de manière plus abondantes qu'en milieu terrestre non salé.

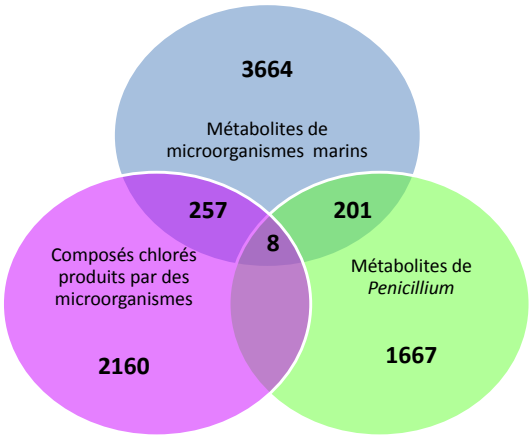


Figure I-8 : Répartition des métabolites chlorés ou non produits par des *Penicillium* ou des microorganismes marins ou terrestres (Antibase 2011(Laatsch, 2011))

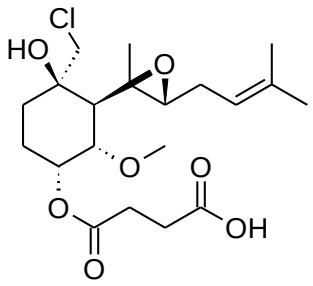
1.4. Conclusion de l'étude des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins

En conclusion, la diversité moléculaire des métabolites cytotoxiques issus de *Penicillium* marins décrits dans cette revue est assez importante. Les constructions structurales sont très variées et plusieurs d'entre elles ont été découvertes dans des espèces marines de *Penicillium*, soulignant l'importance de l'investigation de l'environnement marin pour poursuivre la découverte de la biodiversité chimique et ses potentiels thérapeutiques. Le faible nombre de métabolites chlorés décrits met en évidence un champ intéressant d'investigation pour la recherche de métabolites originaux bioactifs issus des *Penicillium* marins.

2. MMS351-*Penicillium*nov. sp. et ligérine

Parmi les métabolites cytotoxiques de cette étude bibliographique, la ligérine, mérosesquiterpène chloré possèdant une activité cytostatique intéressante *in vitro* sur cellules d'ostéosarcomes, a été découverte au sein du laboratoire (cf Annexe XX, Vansteelandt *et al.*, 2013). Suite à un screening concernant la cytotoxicité d'extraits fongiques, une nouvelle espèce de *Penicillium* marin (souche MMS351) avait été sélectionnée pour son activité sur cellules cancéreuses et son absence de toxicité sur cellules non tumorales. Un fractionnement de l'extrait guidé par biosuivi avait permis d'isoler la ligérine (Figure I-9). Ce composé possédant une activité prometteuse pour le traitement des tumeurs osseuses a mené au dépôt d'un brevet entre l'Université de Nantes et la société Atlantic Bone Screen™,positionnée dans l'évaluation préclinique de candidats médicamenteux dans le traitement des pathologies osseuses. La suite de ce manuscrit s'intéresse principalement à l'évaluation pharmacologique de la ligérine, à l'étude de la nouvelle espèce fongique qui la produit et à ses analogues tant synthétiques que naturels.

Penicillium producteur de ligérine
(souche MMS351)



Ligérine

Figure I-9 : *Penicillium*nov. sp. producteur de ligérine et structure de cette molécule

PARTIE II
La ligérine et ses analogues : hémisynthèse et activité antiproliférative sur ostéosarcomes

La ligérine est un mérosesquiterpène qui appartient à une série chimique dont le premier représentant décrit fut la fumagilline. Cette dernière a été isolée en 1949 par Eble et Hanson à partir d'un extrait d'une souche du micromycète *Aspergillus fumigatus* (Hanson et Eble, 1949; Eble et Hanson, 1951). La fumagilline avait alors été décrite pour ses propriétés antibactériennes. A une époque synonyme de ruée pour trouver des nouveaux antibiotiques pouvant remplacer ou concurrencer la pénicilline, la compagnie pharmaceutique Upjohn®aalors déposé le premier brevet sur cette molécule protégeant ainsi sa production par deux souches d'*A. fumigatus*(Hanson, 1953). Néanmoins, les tests cliniques n'ont pas montré d'activité antibiotique évidente de la fumagilline pour un traitement chez l'Homme. En 1957, la société Abbott®a déposé un brevet protégeant la spécialité Fumidil B®pour une utilisation à des fins vétérinaires notamment pour le traitement des parasitoses des abeilles infectées par les microsporidies *Nosema apis* et *Nosema ceranae*(champignons microscopiques unicellulaires) (Katznelson et Jamieson, 1952). Dans le même temps, une compagnie hongroise appelée Chinoin™, a enfreint les droits couverts par ce brevet et a commencé la commercialisation en Europe de l'est. La fumagilline étant un produit mineur du large panel de produits pharmaceutiques de la société Abbott™, aucune poursuite nefut engagée concernant la violation de propriété. A ce jour, de nombreux composés ont été testés pour le traitement des nosémoses mais aucun traitement ne s'est révélé être plus efficace que la fumagilline. De plus, aucune résistance de *Nosema apis* n'a été rapportée face à ce traitement. Cependant, le Fumidil B®est aujourd'hui interdit de vente et d'utilisation en France et dans la plupart des pays membres de l'Union Européenne du fait de sa rémanence dans le miel et de sa toxicité, et plus précisément de ses effets potentiellement génotoxiques vis-à-vis des consommateurs de miel.

Dans les années 90,cette molécule aconnu un regain d'intérêt au vu de son activité anti-angiogénique (Folkman *et al.*, 1989). C'est la contamination fongique accidentelle de flasques de cultures de cellules endothéliales qui a permis à Ingber, un collègue de Folkman de découvrir l'activité anti-angiogénique de la fumagilline, du fait de l'arrondissement anormal des cellules. Le champignon incriminé avait alors été isolé et identifié comme étant une souche *d'Aspergillus fumigatus* Fres.. L'activité observée sur les cellules endothéliales fut alors attribuée à la fumagilline. Cette molécule a ensuite largement démontré son activité inhibitrice de la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et inhibitrice de la croissance des vaisseaux sanguins *in vivo*(Ingber *et al.*, 1990). Cette découverte a grandement contribué à initier la recherche et le développement d'une nouvelle classe pharmacothérapeutique dans le traitement des cancers : les anti-angiogéniques. Dernier rebondissement en date, les propriétés antiparasitaires de la fumagilline initialement mais brièvement employée dans les années 50 pour le traitement des amibiases intestinales, ont été redécouvertes. Elle est depuis 2007 utilisée pour le traitement des microsporidioses chez les patients atteints du SIDA (Molina *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2000).Cependant, étant donné l'importante toxicité de ce composé, notamment sa toxicité sur les lignées hématopoïétiques, de nombreux dérivés ont été synthétisés afin d'augmenter son efficacité tout en diminuant ses effets secondaires. Par ailleurs, la recherche d'analogues naturels de cette série chimique a aussi intéressé les chimistes des produits naturels qui ont pu découvrir des composés originaux aux activités biologiques intéressantes.

Le premier chapitre de cette partie II recense les analogues naturels décrits dans cette série chimique ainsi que les composés de synthèses les plus connus. Nous nous intéresserons également à leurs activités biologiques et aux mécanismes d'action associés, pour enfin, apporter des éléments de réponse concernant les relations structure-activités et présenter les *drug-leads* actuellement en développement. Néanmoins, aucun des dérivés de la fumagilline, qu'il soit d'origine naturelle,

hémisynthétique ou synthétique n'a fait l'objet d'une évaluation pharmacologique pour le traitement des cancers osseux primitifs, pathologies qui seront présentées dans le chapitre II.C'est ce constat qui a motivé les travaux présentés dans le troisième chapitre, et qui ont consisté à étudier l'activité anti-ostéosarcome de la ligérine et de divers dérivés hémisynthétiques.

CHAPITRE I.
Etude bibliographique - Fumagilline & co : la course à la molécule active

1. Les molécules naturelles et synthétiques

1.1. Les analogues naturels

La **fumagilline** a été le premier composé identifié dans cette série de mérosesquiterpènes à partir d'un *Aspergillus fumigatus*(Hanson et Eble, 1949; Eble et Hanson, 1951). L'étude par dégradation chimique avait alors permis d'en définir une structure hypothétique (Figure II-1) (Tarbell *et al.*, 1961). La conformation de la molécule a été établie en deux temps : en 1961 grâce à l'analyse cristallographique du fumagillol (McCorkindale et Sime, 1961; Turner et Tarbell, 1962) et en 2000 avec la fumagilline (Halász *et al.*, 2000). Ainsi, la conformation de la fumagilline est la suivante (Figure II-1) :
-le cyclohexane est sous la forme chaise,
-le spiro-époxyde en C3 est quasi-axial,
-la chaîne en C4 et le méthoxyle en C5 sont en position équatoriale,
-la chaîne décatétraènedioyle en C6 est axiale et ses quatre liaisons conjuguées sont de configuration *trans*. Il est à noter qu'une C2''-3'' *cis*-fumagilline existe très probablement puisque Kwon *et al.*décrivent en 2000 l'isolement d'un ester méthylique de la *cis*-fumagilline après traitement au diazométhane de leur extrait de *P. janczewskii*(Kwon *et al.*, 2000).

La configuration absolue de la fumagilline est la suivante : 3R, 4S, 5S, 6R, 1'R, 2'R.

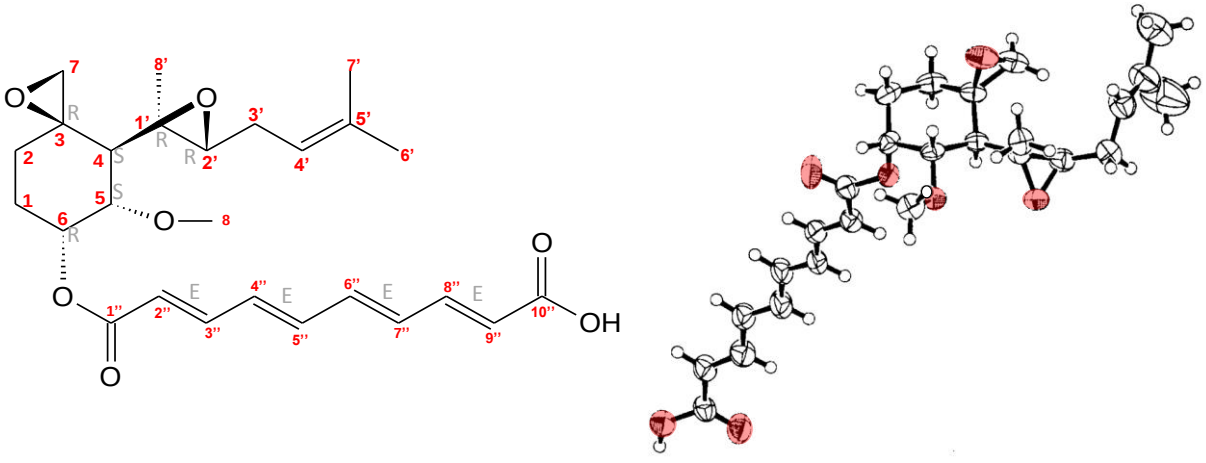


Figure II-1 : Structure et configuration de la fumagilline

Trois analogues présentant la même chaîne *trans* aliphatique insaturée que la fumagilline ont été décrits :

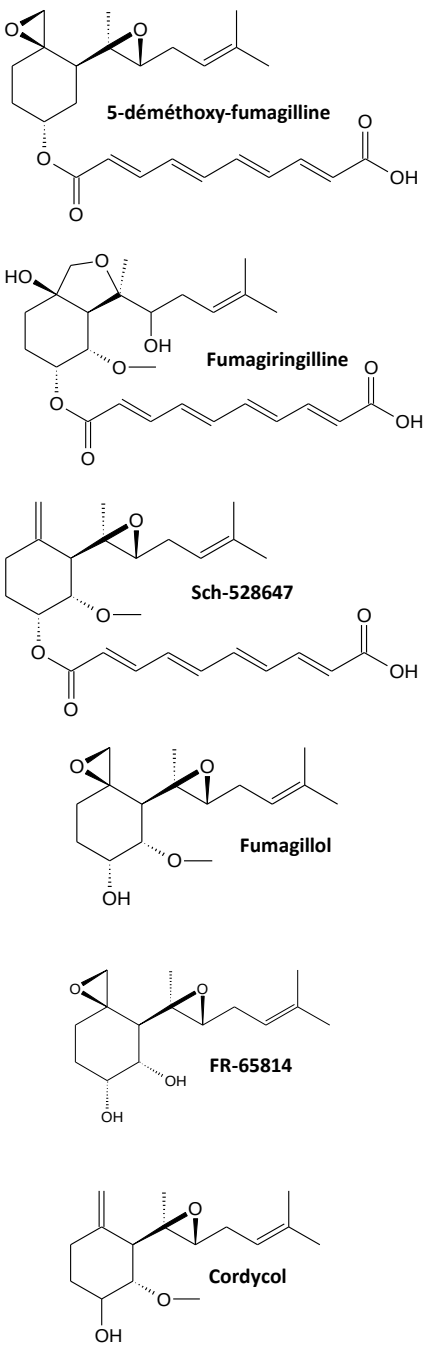


Figure II-2 : Structures de la 5-déméthoxy-fumagilline, la fumagiringilline, le Sch-528647, le fumagillol, le FR-65814 et le cordycol

La **5-déméthoxy-fumagilline** qui a été isolé en 1998 par Hong *et al.* ne diffère de la fumagilline que par l'absence dans sa structure chimique du groupement méthoxyle en C5. Ce composé a aussi été isolé à partir d'un extrait d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* tout comme plusieurs des analogues naturels de cette série chimique (Hong *et al.*, 1999).

La **fumagiringilline** fait partie des analogues produits par *Aspergillus fumigatus*.Cet analogue de la fumagilline dont les deux époxydes sont ouverts et cyclisés pour former un cycle tétrahydrofurane supplémentaire, a été isolée en 2004 (Jiao *et al.*, 2004).

Le **Sch-528647**aussi produit par *A. fumigatus*,a quant à lui été découvert en 2001 par Chu *et al.* appartenant au groupe de recherche Schering-Plough™. Sa structure chimique correspond à celle de la fumagilline à l'exception du spiro-époxide en C3 qui est remplacé par un groupement méthylène.

Le **fumagillol**, version non estérifiée de la fumagilline, présente ainsi un hydroxyle en C6. Il a été isolé pour la première fois d'une souche de *Penicillium jensenii* en 1988 (Hatanaka *et al.*, 1988), mais est facilement obtenu par saponification de la fumagilline. Cette série compte deux autres molécules : le **FR-65814** et le **cordycol**.

Le **FR-65814** aété isolé en 1988 d'une culture de *Penicillium jensenii* F-2883 cultivée sur milieu MEA (Malt extract agar) par une équipe japonaise appartenant à la Fujisawa Pharmaceutical Company®qui après fusion en 2005 avec la société Yamanouchi Pharmaceutical Company®a donné le groupe Astellas Pharma™, qui fait partie des 20 plus importantes entreprises pharmaceutiques dans le monde (Hatanaka *et al.*, 1988).

Plus récemment, en 2013, le **cordycol**, analogue du fumagillol dont le spiro-époxide est remplacé par un groupement méthylène,a été isolé d'un extrait du macromycète *Cordyceps ophioglossoides*.

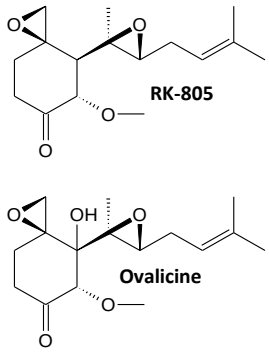


Figure II-3 : Structure du RK-805 et de l'ovalicine

Analogue oxydé en C6 du fumagillol, le composé nommé **RK-805** a été isolé d'un extrait d'une souche de *Neosartorya sp.*(Asami *et al.*, 2004). La synthèse totale de ce composé a été publiée en 2006 par Yamaguchi *et al.* qui décrivent par la même occasion une manière de synthétiser le fumagillol, le FR65814, l'ovalicine et la 5-déméthyl-ovalicine (Yamaguchi *et al.*, 2006).

L'**ovalicine** produite par *Pseudorotium ovalis* fut le deuxième composé découvert dans cette série chimique, isolé pour la première fois en 1968 par *Sigg et al. (Sigg et Weber, 1968)*. Elle présente la particularité de posséder un carbone quaternaire supplémentaire par rapport au RK-805, le C4 du cyclohexane étant substitué par un hydroxyle.

De nombreux analogues de l'ovalicine ont été décrits de genres variés de micromycètes :

- la **5-déméthylovalicine**,
- trois analogues pour lesquels le spiro-époxyde n'est pas observé : la chlorohydrine **chlovalicine**, seul composé halogéné décrit avant la ligérine et deux dérivés cyclisés, et
- le **Merf3,** l'hydroxy-ovalicine.

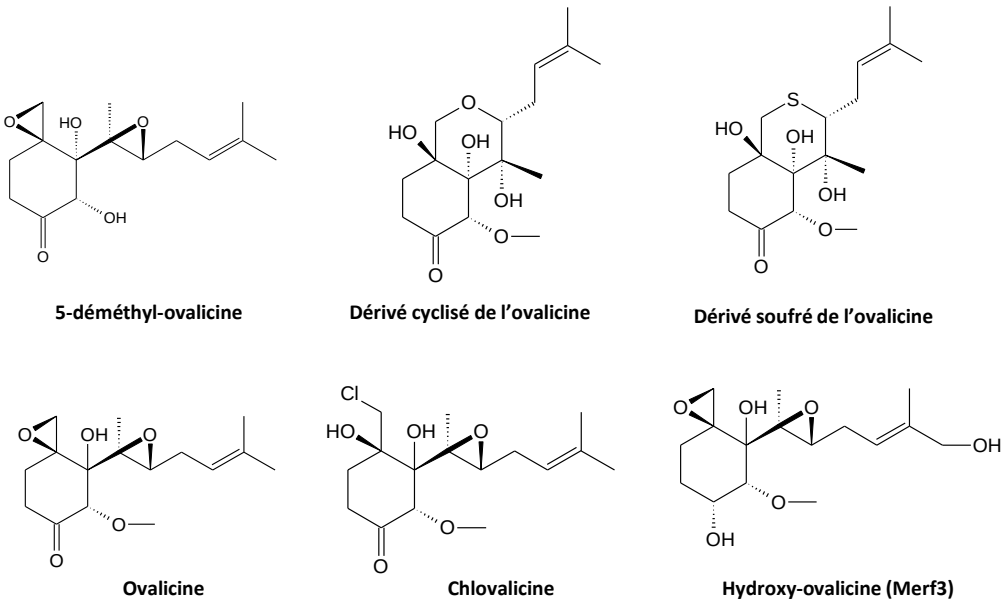


Figure II-4 : Structures de la 5-déméthyl-ovalicine, de deux dérivés cyclisés de l'ovalicine, de l'ovalicine, de la chlovalicine et de l'hydroxy-ovalicine (Merf3)

La **5-déméthylovalicine**a été isolée en 2002 à partir d'un extrait d'une souche de *Chrysosporium lucknowense* (Son *et al.*, 2002).

La **chlovalicine**, analogue chloré de l'ovalicine, a été découvert en 1996 par Hayashi *et al.* d'un extrait d'une souche de *Sporothrix sp*. FO-4669 (Hayashi *et al.*, 1996). La même année, cette équipe découvrait aussi, **deux dérivés cyclisés,** l'un des deux présentant la particularité d'être soufré (Takamatsu *et al.*, 1996).

Le composé **Merf3** correspond quant à lui à la **6'-hydroxy-ovalicine** eta été isolé en 1999 d'un filtrat de culture de *Metarrhyzium sp.*provenantd'un échantillon de terreprélevé dans la préfecture de Kanagawa au Japon (Kuboki *et al.*, 1999).

Enfin, des composé possédant le noyau sesquiterpène du fumagillol intact, mais dont la chaîne ester est modifiée ont également été décrits : le **RK-95113** et le **FR-111142**.

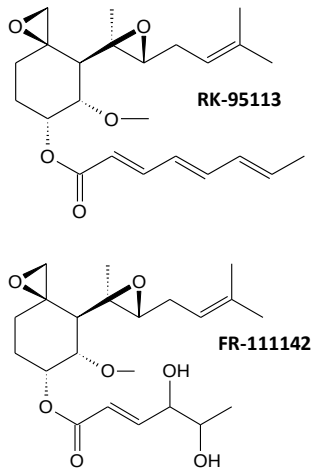


Figure II-5 : Structures du RK-95113 et du FR-111142

L'équipe japonaise ayant purifiée le RK-805, a purifié deux ans plus tard le **RK-95113**.Cet analogue décarboxylé de la fumagilline est aussi un métabolite produit par *Aspergillus fumigatus* (Asami *et al.*, 2006).

Le groupe de recherche Fujisawa ayant décrit le composé FR-65814 est aussi à l'origine de la découverte en 1991du composé **FR-111142**dont la chaîne acide gras en C6 est dihydroxylée (Otsuka *et al.*, 1991). L'organisme producteur était le champignon *Scolecobasidium arenarium* isolé de morceaux de bois en décomposition collectés sur une plage du Japon.

Tableau II-1 : Dérivés naturels de la fumagilline classés par espèces productrices (origine du premier isolement, formule brute, masse moléculaire et référence)

Espèce productrice	Métabolite	Formule brute	Masse moléculaire	Référence bibliographique
Aspergillus fumigatus	Fumagilline	$C_{26}H_{34}O_7$	458,2304	(Hanson et Eble, 1949)
	5-Déméthoxy-fumagilline	$C_{25}H_{32}O_6$	428,2199	(Hong *et al.*, 1999)
	Sch-528647	$C_{26}H_{34}O_6$	442,2355	(Chu *et al.*, 2003)
	Fumagiringilline	$C_{26}H_{36}O_8$	476,2410	(Jiao *et al.*, 2004)
	RK-95113	$C_{24}H_{34}O_5$	402,2406	(Asami *et al.*, 2006)
Chrysosporium lucknowense	5-Déméthyl-ovalicine	$C_{15}H_{22}O_5$	282,1467	(Son *et al.*, 2002)
Cordyceps ophioglossoides	Cordycol	$C_{15}H_{24}O_2$	236,1776	(Sun *et al.*, 2013)
Metarrhizium sp. F3	Hydroxyovalicine (Mer-f 3)	$C_{16}H_{24}O_6$	312,1573	(Kuboki *et al.*, 1999)
Neosartorya sp.	RK-805	$C_{16}H_{24}O_4$	280,1675	(Asami *et al.*, 2004)
Penicillium jensenii	FR-65814	$C_{15}H_{24}O_4$	268,1675	(Hatanaka *et al.*, 1988)
	Fumagillol	$C_{16}H_{26}O_4$	282,1831	(Hatanaka *et al.*, 1988)
Penicillium ligerum	Ligérine	$C_{20}H_{31}ClO_7$	418,1758	(Vansteelandt *et al.*, 2013)
Pseudorotium ovalis Sporothrix sp.	Ovalicine (graphinone)	$C_{16}H_{24}O_5$	296,1624	(Sigg et Weber, 1968)
Scolecobasidium arenarium	FR-111142	$C_{22}H_{34}O_7$	410,2305	(Otsuka *et al.*, 1992)
Sporothrix sp	Chlovalicine	$C_{16}H_{25}ClO_5$	332,1391	(Hayashi *et al.*, 1996)
	Dérivé cyclisé de l'ovalicine	$C_{16}H_{26}O_6$	314,1729	(Takamatsu *et al.*, 1996)
	Dérivé soufré de l'ovalicine	$C_{16}H_{26}O_5S$	330,1501	(Takamatsu *et al.*, 1996)

Ainsi quinze analogues naturels ont été décrits depuis la découverte de la fumagilline en 1949 et la ligérine constitue le dix-septième dérivé observé. D'un point de vue taxonomique, on remarque que la distribution des genres capables de produire ces molécules est éclatée au sein des Ascomycètes. Les micromycètes producteurs sont de genres très différents tels qu'*Aspergillus, Sporothrix, Chrysosporium, Penicillium*mais appartiennent curieusement à seulement une ou deux espèces au sein de ces genres. Ceci est particulièrement notable pour le genre *Aspergillus* représenté par la seule espèce : *Aspergillus fumigatus*. C'est l'espèce la plus étudiée et citée dans les travaux sur ces sesquiterpènes et à partir de laquelle la fumagilline et quatre de ses analogues ont été initialement isolés. Au sein du genre *Penicillium*, la distribution semble plus homogène puisque les trois espèces recensées font toutes parties de la section *Canescentia* :

- *Penicillium jensenii*,espèce ayant permis l'isolement du fumagillol et du FR-65814 et qui a étésélectionnée pour la production de fumagilline d'après un brevet de la Fujisawa Pharmaceutical Company®(Fujisawa Pharmaceutical Co., 1986)
- *Penicillium janczewki,* espèce productrice de fumagilline(Kwon *et al.*, 2000; Bunger *et al.*, 2004),
- *Penicillium ligerum,* espèce productrice de ligérine.

Si certains analogues n'ont été décrits que chez une seule espèce, la fumagilline et le fumagillol ont été identifiés dans des extraits de culture de souches appartenant à des genres variés (*Aspergillus, Penicillium, Neosartorya, Metharhizium*…). Il semblerait donc que le fumagillol puisse jouer un rôle de précurseur dans la biosynthèse des composés de cette série chimique.

1.2. La biosynthèse

Malgré le séquençage du génome d'*Aspergillus fumigatus(Nierman et al., 2005)*, la voie biosynthétique de la fumagilline n'est que partiellement connue. Les premières études menées par Cane *et al.* à l'aide d'isotopes radiomarqués ont mis en évidence que le précurseur de l'ovalicine serait le β-trans-bergamotène, sesquiterpène isolable à partir de cultures d'*A. fumigatus*(Cane et King, 1976; Cane et Levin, 1976; Cane et Buchwald, 1977).

Plus récemment, la compréhension de la biosynthèse a été complétée par l'étude du cluster de gènes responsable de la biosynthèse de la fumagilline. Lin *et al.*ont confirmé les conclusions de Cane *et al.*en mettant en évidence chez *A. fumigatus* la présence d'une β-trans-bergamotène synthase, cyclase responsable de la formation du β-trans-bergamotène à partir du farnesyl-PP (FPP, (Lin *et al.*, 2013)). Ils ont également montré que la délétion du gène FmaA codant pour cette terpène cyclase entraînait l'inhibition de la production de fumagilline, faisant le lien entre le précurseur sesquiterpénique linéaire et celle-ci. Ces résultats ont été confirmés et complétés par Wiemann *et al.*qui ont montré que le fumagillol est le précurseur déacylé de la fumagilline : l'enzyme FmaC estérifie l'hydroxyle du fumagillol en C6 par un acide gras, l'acide dodécapentanéique, lui-même synthétisé par la PKS FmaB(Wiemann *et al.*, 2013). Par contre, les processus intervenant entre le β-trans-bergamotène et la formation du fumagillol (réarrangement et fonctionnalisation du cyclohexane et formation des époxydes) ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, les travaux réalisés sur la biosynthèse de la fumagilline ont permis de décrire pour la première fois l'organisation extrêmement complexe des gènes du métabolisme secondaire fongique, avec la démonstration de la présence chez *A. fumigatus, N. fisheri* et *M. anisoplae*d'un « supercluster » entremêlant les gènes de la biosynthèse de la fumagilline et ceux de la biosynthèse des pseurotines, polycétides de structure azaspirofuranelactone.

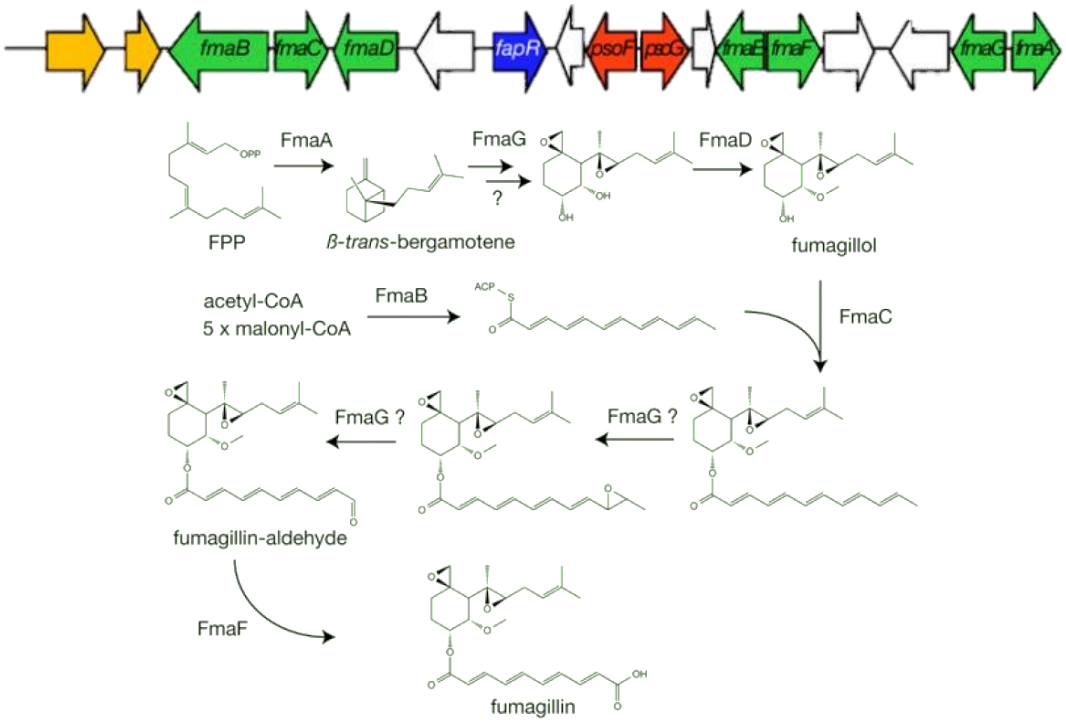


Figure II-6 : Voies biosynthétiques hypothétiques de la fumagilline et de la pseurotine A (d'après Wiemann *et al.*, 2013)

Les flèches vertes correspondent aux gènes responsables de la biosynthèse de la fumagilline **FmaA**, terpène cyclase, enzyme impliquée dans la production de β-trans-bergamotène ; **FmaG**, P450 monooxygènase impliquée dans le réarrangement oxydatif du β-trans-bergamotène; **FmaD**, O-méthyltransférase : enzyme impliquée dans la méthylation de l'hydroxyle en C5; **FmaB**, PKS impliquée dans la production de la chaîne pentaènique et **FmaC**, enzyme responsable de l'estérification du fumagillol; **FmaF**, phytanoyl-CoA oxidase, enzyme impliquée dans l'oxydation de la fumagilline aldéhyde; **FPP**, farnesyl-pyrophosphate

1.3. Les dérivés synthétiques

La première synthèse totale de la fumagilline sous sa forme racémique a été décrite en 1972 par Corey et Snider(Corey et Snider, 1972) suivievingt-cinq ans après, par la première synthèse totale du (-)-fumagillol (Kim *et al.*, 1997). En effet, c'est dans les années 90, suite à la découverte des propriétés anti-angiogéniques de la fumagilline, que cette famille chimique a réellement suscité l'intérêt des chimistes de synthèse qui ont alors synthétisé de nombreux dérivés. Les premières études décrivant la synthèse d'une grande variété d'analogues de cette série chimique ont été réalisées en 1992 par Marui et son équipe et ont fait l'objet de trois publications (Marui *et al.*, 1992; Marui et Kishimoto, 1992; Marui *et al.*, 1995). Les auteurs ont alors obtenu différentes séries de composés en modulant les chaînes en C4 et C6, en ouvrant le spiro-époxyde en C3 et/ou modifiant les substituants présents sur le cyclohexane. Un panel de composés de synthèse illustrant ces modulations est présenté dans la Figure II-13.L'impact de ces modifications structurales sur l'activité des composés sera détaillé par la suite dans la partie relations structure-activité de ce chapitre.

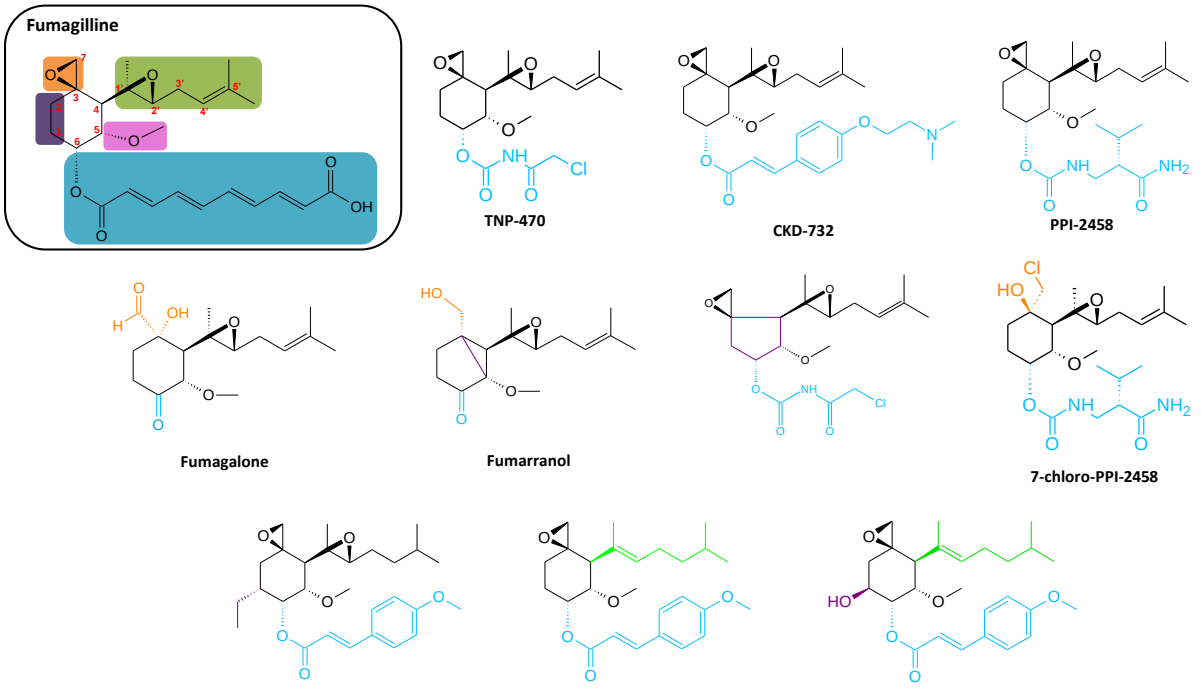


Figure II-7 : Pharmacomodulations apportées à la fumagilline : exemples d'analogues de synthèse

2. Activités biologiques/Mécanisme d'action

2.1. Propriétés antifongiques

Si la fumagilline a initialement été décrite pour ses propriétés antibactériennes (Hanson et Eble, 1949),elle a surtout été employée pour ses propriétés antifongiques, mises à profit pour le traitement de parasitoses des abeilles par *Nosema apis* et *Nosema ceranae*sous le nom de spécialité Fumidil B®. Dans le domaine vétérinaire, d'autres études ont montré un effet significatif contre les parasites du genre *Myxozoan* infectant les poissons (Molnar *et al.*, 1987; Hedrick *et al.*, 1988).

La fumagilline présente également une activité contre diverses microsporidies et cryptosporidies. Elle a notamment été étudiée pour le traitement de microsporiodioses oculaires dans le cas de kérato-conjonctivites (Diesenhouse *et al.*, 1993). Plus récemment, l'équipe du Dr Molina a démontré l'efficacité de la fumagilline dans le traitement des microsporidioses chez des patients atteints du SIDA (Molina *et al.*, 2002). La fumagilline est d'ailleurs la seule moléculeutilisée pour le traitement des diarrhées sévères dues à une microsporidiose intestinale à *Enterocytozoon bieneusi* dans le cas de patients adultes, infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), sévèrement immunodéprimés après échec d'une restauration immunitaire par traitement antirétroviral (Molina *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2000).Une préparation pharmaceutique commercialisée sous le nom de Flisint® (FLISINT 20 mg Gél Fl/42 AMM 340095676653)est utilisé dans cette indication. Ce médicament classé dans les antiparasitaires systémiques se présente sous la forme de gélules contenant 20 mg de fumagilline et est uniquement réservé à un usage hospitalier.

2.2. Propriétés antiparasitaires

Des propriétés contre les amibes *Entamoeba histolytica*ont aussi été décrites (McCowen *et al.*, 1951) et la fumagilline a pu être utilisée dans le cas d'amibiases chez l'Homme (Killough *et al.*, 1952). Cette indication est aujourd'hui abandonnée.

La fumagilline ainsi que deux dérivés d'hémisynthèse, le TNP-470 et le fumarranol, ont été décrits pour leurs propriétés antiplasmodiales. Ceux-ci ont présenté une activité contre 4 souches de *P.falciparum* incluant des souches chloroquino-résistantes (Arico-Muendel *et al.*, 2009a). Ces sesquiterpènes sont capables de bloquer le développement de la malaria *in vitro* et *in vivo*. Parmi les composés testés le fumarranol possédait l'activité la plus intéressante.

Une activité anti-leishmania a également été démontrée (Zhang *et al.*, 2002). Enfin, Hua et al. ont évalué les propriétés anti-trypanosomiales de l'ovalicine et d'une série de dérivés, montrant leur utilisation potentielle contre le parasite *Trypanoma brucei* responsable de la trypanosomiase humaine africaine : la maladie du sommeil (Hua *et al.*, 2008).

2.3. Propriétés antivirales

Des études récentes ont démontré que la fumagilline pouvait servir de molécule lead pour le développement de nouveaux agents ciblant la protéine Vpr du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Watanabe *et al.*, 2006). Cette protéine Vpr est impliquée dans la réplication virale et joue un rôle essentiel dans la pathogénèse du virus. Néanmoins, aucun traitement efficace ciblant cette protéine n'a pour l'instant été développé pour le traitement du SIDA.

2.4. Propriétés immunosuppressives

Lors de l'isolement du fumagillol et de son analogue déméthylé, le FR-65814, les auteurs avaient pu observer l'activité immunosuppressive des deux composés grâce au test MLR (Mixed Lymphocyte reaction). Le FR-65814 posséde une activité immunosuppressive plus importante que le fumagillol avec des CI_{50} respectives de 34 nM et de 250 nM (Hatanaka *et al.*, 1988). L'ovalicine présente aussi ce type d'activité (Arrenbrecht et Lazary, 1970).

D'une façon plus précise, l'ovalicine et la chlovalicine ont montré une activité inhibitrice de l'interleukine 6 (IL-6) (Hayashi *et al.*, 1996). L'IL-6 estune cytokine multifonctionnelle qui est produite par de nombreuses cellules provenant de lignées lymphoïdes ou non-lymphoïdes et qui intervient dans la réponse immunitaire, dans l'hématopoïèse, dans les réactions de phases aigües et au sein du système nerveux (Yamasaki *et al.*, 1988). L'IL-6 joue un rôle central de régulation dans les mécanismes de défenses. Il a été notamment démontré qu'un dérèglement de l'expression de l'IL-6 était impliqué dans la pathogenèse de maladies auto-immune et dans la cachexie lié aux pathologies malignes lymphoïdes. L'inhibition de l'activité de l'IL-6 soulagerait notamment la cachexie (Weidle *et al.*, 2010). Yamakasi *et al.* avaient avancé que la chlovalicine pourrait être un nouveau type de médicament anti-allergique puisqu'elle possèdeà la fois des propriétés inhibitrices de l'activité de l'IL-6 et de la production d'immunoglobine E (IgE) (Yamasaki *et al.*, 1988).

2.5. Traitement des pathologies articulaires

Un des analogues de synthèse, le PPI-2458 a démontré son potentiel d'inhibition de la prolifération des synoviocytes fibroblastes-like provenant de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (les cellules synoviales jouant un rôle crucial dans le développement de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde) (Bernier *et al.*, 2004). De plus, ce composé a prouvé son efficacité dans l'inhibition de la différenciation des ostéoclastes et de la résorption osseuse dans des modèles*in vitro* et *in vivo* chez le rat, diminuant l'inflammation et la destruction de l'articulation. Sur des modèles d'arthrites aigües et chroniques induites par le collagène, cette molécule a permis également de réduire les signes cliniques. Ces résultats suggèrent que les dérivés de la fumagilline sont de potentiels agents thérapeutiques de l'arthrite rhumatoïde (Hannig *et al.*, 2007).

2.6. Propriétés anticancéreuses

- ✓ **Activité antiproliférative**

Lors d'études *in vitro*les sesquiterpènes de la série fumagilline ont révélé une activité cytostatique sur des cellules tumorales humaines et non humaines. Le TNP-470 étant le plus étudié, les CI_{50} associées aux activités antiprolifératives sur différents types de cellules tumorales sont recensées dans leTableau II-2.

Tableau II-2 : Activité antiproliférative *in vitro* du TNP-470

Type de cellules tumorales	CI_{50} (en µM)	Référence
Humaines		
carcinome épidermoïde A-431	5,3	(Perron-Sierra *et al.*, 2002)
carcinome prostatique PC-3	12	(Yamaoka *et al.*, 1993)
carcinome mammaire MDA-MB-231	11	(Yamaoka *et al.*, 1993)
choriocarcinome GCH-1(m)	0,012	(Yanase *et al.*, 1993)
carcinome ovarien Nakajima	5,7	(Yanase *et al.*, 1993)
glioblastome U-87 MG	0,00014	(Takamiya *et al.*, 1994)
carcinome pulmonaire A549	50	(Liu *et al.*, 2010)
carcinome hepatocellulaire HepG2	0,86	(Hou *et al.*, 2011)
adenocarcinome du col de l'utérus HeLa	2	(Hou *et al.*, 2011)
carcinome colorectal SW1116	5,5	(Hou *et al.*, 2011)
adénocarcinome gastrique BGC823	1,5	(Hou *et al.*, 2011)
Murines		
lymphome P388	0,025	(Han *et al.*, 2000)
lymphome EL4	0,00007	(Han *et al.*, 2000)
carcinome rénal Renca	1,5	(Morita *et al.*, 1994)

- ✓ **Activité anti-angiogénique**

L'angiogenèse est le processus de création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation originelle via la prolifération des cellules endothéliales. C'est donc un processus nécessaire à une bonne irrigation sanguine des organes. Dans les années 1970, Folkman a été le premier à suggérer que l'angiogenèse générant une hypervascularisation locale jouait un rôle fondamental dans la croissance tumorale et la propagation des métastases(Folkman, 1971; Folkman, 1974). Depuis, de très nombreuses études cliniques ont démontré cela, indiquant alors que l'inhibition de l'angiogenèse permettait d'endiguer la croissance des tumeurs et l'évolution métastatique (Figure II-8). L'angiogenèse est aujourd'hui considérée comme une cible de choix pour le traitement des cancers mais aussi des maladies cardiovasculaires, de rétinopathies diabétiques et d'hémangiomes.

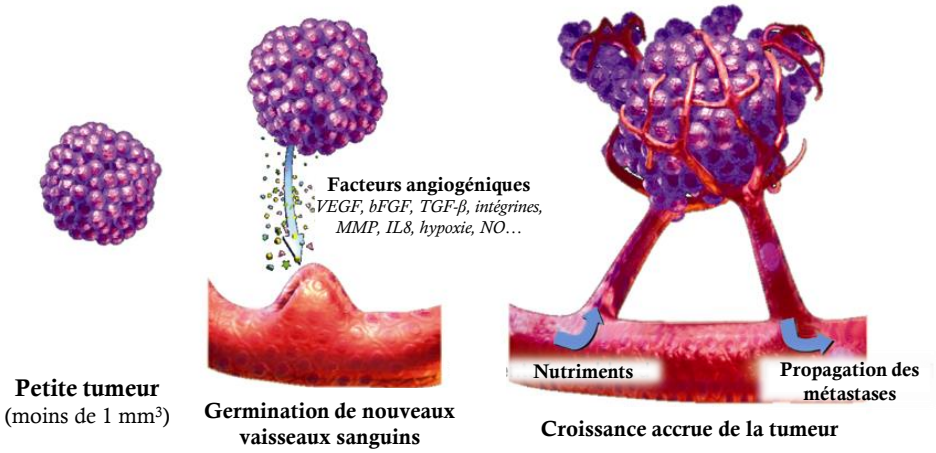


Figure II-8 : Angiogenèse tumorale (d'après Siemann, 2002)

La fumagilline et ses analogues ont montré une activité antiproliférative des cellules endothéliales *in vitro* et une inhibition de l'angiogenèse induite par les tumeurs *in vivo*. De très nombreuses études ont rapporté les tests de ces composés sur des lignées de cellules endothéliales, comprenant notamment les cellules endothéliales humaines différenciées isolées à partir de la veine de cordon ombilical (HUVEC : human umbilical vein endothelial cells), les cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC : bovine aortic endothelial cells) et les cellules endothéliales d'artère pulmonaire de veau (CPAE : calf pulmonary artery endothelial). A titre d'exemple, le TNP-470 inhibe de manière dose dépendante, la prolifération des cellules HUVEC stimulées par des facteurs de croissance, avec une CI_{50} de 15 pg/mL (Kusaka *et al.*, 1994). Un effet cytostatique pleinement réversible est observé à faibles doses (<30 µg/mL) alors qu'à plus fortes doses, l'effetest cytotoxique et irréversible.

En outre, l'effet antiprolifératif du TNP-470 s'exerçant à des concentrations environ 3 fois supérieures sur cellules tumorales par rapport aux cellules endothéliales. Ceci suggère que l'activité antitumorale et inhibitrice du développement de métastases observée *in vivo* est sûrement due à une inhibition de l'angiogenèse plutôt qu'à une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Yamaoka *et al.*, 1993; Kudelka *et al.*, 1998; Bergers *et al.*, 1999). Le TNP-470 est d'ailleurs la première molécule de faible poids moléculaire à avoir été évaluée comme anti-angiogénique lors de recherches cliniques étudiant le traitement de cancer.

Le Tableau II-3 présente l'activité sur cellules HUVEC de différents analogues de la fumagilline. On remarque que le fumagillol et la fumagilline présentent les activités les plus faibles.

Tableau II-3 : Activité antiproliférative sur cellules HUVEC

Composé	CI_{50} (en nM)	Référence
Fumagilline	8,9	(Wang *et al.*, 2011)
	8.9	(Cheng *et al.*, 2010)
	0,82	(Fardis *et al.*, 2003)
	1,1	(Asami *et al.*, 2006)
TNP-470	3,16	(Galal *et al.*, 2009)
	0,76	(Wang *et al.*, 2011)
	8,9	(Liu *et al.*, 2010)
	0,52	(Fardis *et al.*, 2003)
	0,01	(Marui *et al.*, 1992)
	0,15	(Asami *et al.*, 2004)
	0,15	(Asami *et al.*, 2006)
CKD-731	2,6	(Fardis *et al.*, 2003)
PPI-2458	0,095	(Arico-Muendel *et al.*, 2009b)
	0,2	(Bernier *et al.*, 2004)
RK-95113	0,25	(Asami *et al.*, 2006)
Fumagillol	49	(Fardis *et al.*, 2003)
Ovalicine	0,07	(Asami *et al.*, 2004)
RK-805	0,11	(Asami *et al.*, 2004)

2.7. La cible : la méthionine aminopetidase 2 (MetAP2)

En 1997, deux équipes identifièrent simultanément mais de manières différentes la principale cible moléculaire de cette série chimique comme étant la méthionine aminopeptidase 2 (MetAP2)(Griffith *et al.*, 1997; Sin *et al.*, 1997). Cette enzyme ainsi que la MetAP1 sont des métalloprotéases intracellulaires. Elles ont été initiallement décrites comme responsablesdu clivage de la méthionine C-terminaleprésente sur les polypeptides nouvellement synthétisés. Ce clivage autorise alors la réalisation des modifications post-traductionnelles qui sont requises pour la stabilité, l'activité et la localisation intracellulaire des protéines matures. Chez certains procaryotes comme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou encore *Salmonella typhimurium*, seul le gène codant pour la MetAP1 a été identifié et sa délétion est létale pour ces bactéries (Arfin *et al.*, 1995). A l'inverse, chez les archées comme *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Sulfolobus solfataricus* et *Pyrococcus furiosis*, seule la MetAP2 est présente. Les eucaryotes possèdent quant à eux deux métalloprotéases proches, également nommées MetAP1 et 2, mais de structures protéiques légèrement différentes de celles des procaryotes. Chez les levures, l'extinction de l'un des deux gènes codant pour les MetAP entraîne une diminution de la croissance cellulaire, tandis que la délétion des deux est létale indiquant le rôle essentiel de ces deux enzymes (Li et Chang, 1995).Il existe aussi des différences structurales entre les MetAP2 présentes chez les eucaryotes : la séquence du gène de la MetAP2 chez *Plasmodium falciparum*ne possède que 40% d'homologie avec la séquence de l'enzyme chez la souris ou l'Homme(Datta, 2009).Ces différences ont des répercussions sur les fonctions biologiques de ces protéines, y compris sur la façon dont de petites molécules exogènes peuvent intéragir avec elles : alors que la fumagilline se fixe de

manière irréversible à la MetAP2 humaine, il a été montré que des analogues pouvaient se lier de manière réversible à la MetAP2 de *P. falciparum* (*Pf*MetaP2) (Chen *et al.*, 2009). Ces résultats mettent à jour que la MetAP2 peut être considérée comme une cible pour le développement de traitements antipaludiques et de manière plus générale pour la recherche de médicaments antiparasitaires.

2.7.1. Implications de la MetAP2 dans les différents processus biologiques

Les rôles de la MetAP2 sont complexes et encore incomplètement élucidés, les données de la littérature étant d'ailleurs parfois contradictoires. Ainsi, d'un point de vue mécanistique, contrairement à ce qui avait été décrit initialement lors de sa découverte et qui est bien démontré *in vitro*, la MetAP2 n'aurait pas d'activité aminopeptidaseintrinsèque *in vivo* (à l'inverse de la MetAP1). De même, si des concentrations supérieures en MetAP2 ont été détectées dans la plupart des cellules tumorales par rapport aux autres types cellulaires, ainsi que dans des cellules de cholangiocarcinome (CCA) bien différenciées par rapport aux mêmes cellules non différenciées, son expression *in vivo* serait néanmoins dépendante du micro-environnement tumoral (Datta, 2009).

Par contre, il a été clairement établi qu'elle possède une activité autoprotéolytique, et qu'elle agit sur la régulation du cycle cellulaire et de la synthèse protéique, par au moins deux voies. Ainsi, elle est impliquée dans le contrôle des niveaux de phosphorylation du facteur d'initiation eucaryotique 2 (eIF2) : liée à sa sous-unité alpha (eIF2α), elle empêche l'action de la eIF2α-specific kinase, qui par phosphorylation désactiverait l'eIF2 et empêcherait sa liaison à l'ARNt. Ainsi, un haut niveau d'expression de MetAP2 permet une traduction importante de l'ARNm en protéines. Elle inhibe également l'activation et l'activité des kinases ERK1/2 : la MetAP2 libre, c'est-à-dire non liée à eIF2, se lie à ERK1/2 et entraîne alors leur déphosphorylation. La voie de signalisation médiée par les ERK1/2 MAP kinase est alors bloquée, engendrant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et donc l'arrêt de la prolifération cellulaire (Figure II-9).

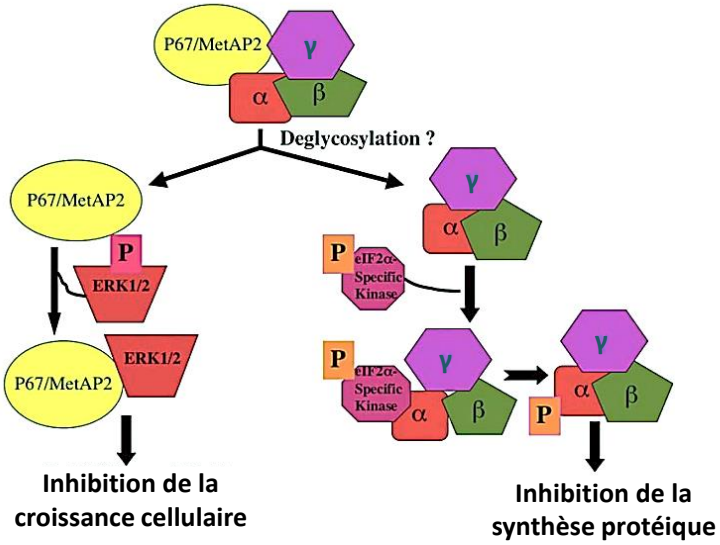


Figure II-9 : Modèle présenté par Datta *et al.*indiquant l'implication de la MetAP2 dans la croissance cellulaire et la synthèse protéique

Les mécanismes par lesquels les inhibiteurs de la MetAP2 ont un effet sur l'induction de l'apoptose ou de la nécrose cellulaire sont également non totalement élucidés. Les inhibiteurs de la MetAP2

n'empêchent pas sa fixation au facteur eIF2α. En effet, ces molécules ne se fixent pas au fragment p26 de l'enzyme, fragment par lequel elle se lie à eIF2α, mais elles se lient au site autoprotéolytique p52 de l'enzyme. Ainsi, la fixation d'un inhibiteur à la MetAP2 entraînerait son accumulation par diminution de son turnover, induisant une augmentation de son effet sur ERK1/2 et donc la mort cellulaire.

Bien décrit sur cellules tumorales, le rôle de la MetAP2 dans la régulation de la prolifération des cellules endothéliales est aussi fondamental, expliquant son implication dans la néovascularisation (Griffith *et al.*, 1997). Ainsi, l'activité anticancéreuse des inhibiteurs de la MetAP2 serait le résultat de la combinaison de leurs effets sur les cellules cancéreuses et sur les cellules endothéliales.

La fumagilline et ses analogues anti-angiogéniques inhibant de manière sélective la MetAP2 chez l'homme, celle-ci est devenue une cible importante pour le développement de nouveaux traitements contre différents types de cancer tout comme dans le traitement de maladies liées à un disfonctionnement de l'angiogenèse.

2.7.2. Interactions molécules-cible

Les études cristallographiques du complexe fumagilline/MetAP2 ont visé à comprendre les interactions de la fumagilline avec le site actif de l'enzyme (Figure II-10).

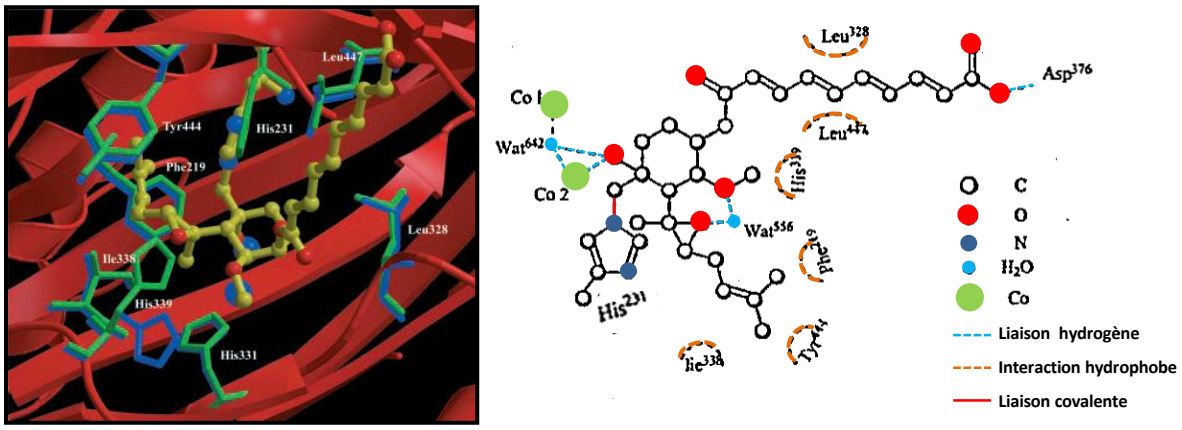


Figure II-10 : Structure 3D et schéma de la fumagilline liée au site actif de la MetAP2 (Liu *et al.*, 1998; Gamba-Sanchez, 2012)

La fumagilline interagit avec la MetAP2 de manière compétitive par rapport à ses substrats endogènes (néopeptides) avec lesquels elle ne partage néanmoins aucune similitude structurale. En effet, la chaîne en C4 s'insère dans la poche active de l'enzyme en lieu et place du résidu méthionine N-terminal des peptides natifs, position qui est stabilisée par la formation d'une liaison covalente entre le méthylène en C7 du spiroepoxyde et une autre partie de cette poche.

La MetAP2 est connue pour utiliser deux atomes de cobalt au sein de son site actif. En l'absence de substrat, ils sont coordonnés par les acides aminés : Asp251, Asp262, His331, Glu364, Glu459 et une molécule d'eau (Liu *et al.*, 1998). Cependant, de récentes études ont indiqué que l'implication d'atomes de manganèse serait plus probable car physiologiquement plus appropriée(Wang *et al.*,

2003). En présence de fumagilline, ces atomes métalliques activent la molécule d'eau qui devient nucléophile et vient attaquer le spiro-époxyde, provoquant son ouverture. Une liaison covalente se forme alors entre le méthylène du spiro-époxyde et un azote de l'histidine 231 de la MetAP2.Ce modèle expliquant la formation de cette liaison covalente est présenté dans la figureIV-10 (Drahl *et al.*, 2005).

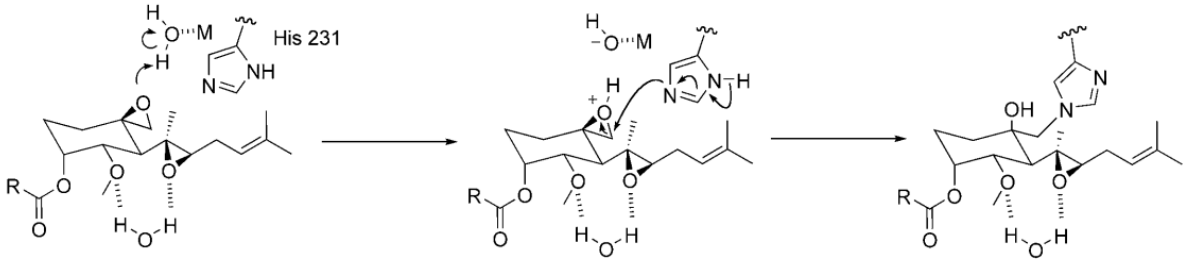


Figure II-11 : Modèle de modifications entraînant la liaison covalente des dérivés de la fumagilline avec le site actif de la MetAP2 (Drahl *et al.*, 2005)

Une deuxième molécule d'eau entre en jeu dans la formation de deux liaisons hydrogènes avec l'oxygène du méthoxyle en C5 et l'époxyde de la chaîne latérale en C4 (Figure II-11). Les études cristallographiques ont aussi montré que l'interaction de la chaine en C4 portant cet époxyde moins réactif jouait un rôle dans le positionnement précis du spiro-époxyde à proximité de l'histidine 231 permettant leur liaison. La chaine en C6 quant à elle s'étend relativement librement en dehors du site actif (Griffith *et al.*, 1997). Dans le cas de la fumagilline, la longue chaîne décatétraènoïque forme des interactions hydrophobes avec deux leucines, les Leu328 et Leu447. Enfin, le groupement carboxylique de cette chaîne latérale interagit avec l'aspartate Asp376 par une liaison hydrogène.

Si la plupart des sesquiterpènes analogues de la fumagilline sont donc des inhibiteurs irréversibles de la MetAP2, il semble exister quelques inhibiteurs réversibles. Ceci a notamment été décrit pour des analogues ne possédant pas le spiro-époxyde en C3. Néanmoins, sur ce point les données de la littérature ne sont pas concordantes (Figure II-12).

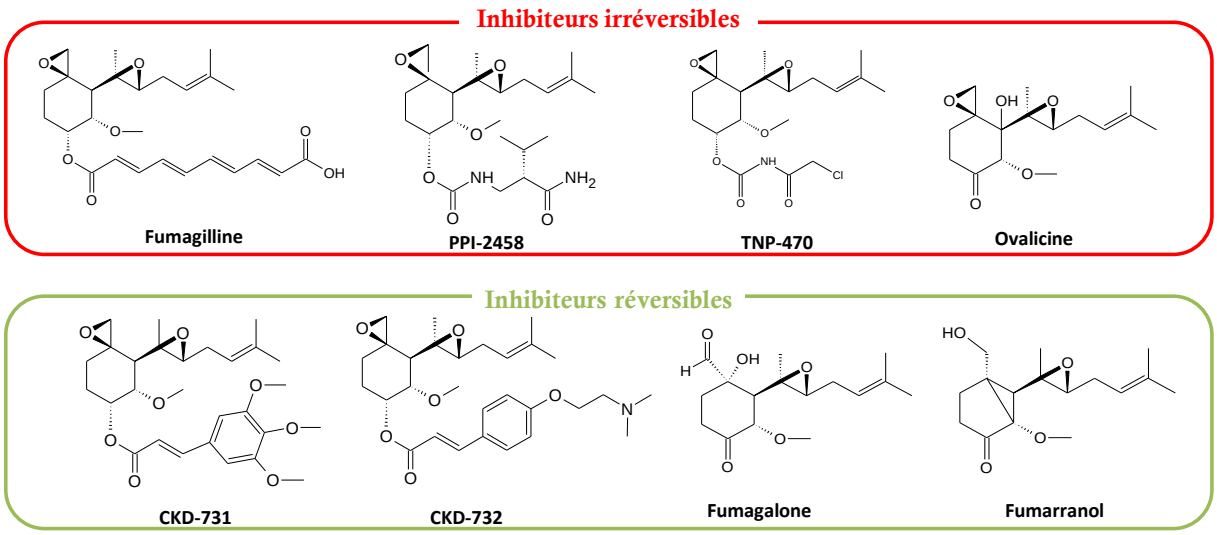


Figure II-12 : Exemples d'inhibiteurs irréversibles et réversibles

3. Relations structure-activité

Depuis les années 90, et dans le but d'améliorer l'activité de la fumagilline, tous les substituants présents sur le cyclohexane ont été modulés, ce qui a permis de comprendre leurs rôles dans l'effet antiprolifératif de ces molécules, et dans les intéractions avec la MetAP2.

Les différentes études réalisées ont principalement consisté en :
- la modification du noyau cyclohexane
- l'ajout de substituants en C1 et C2 du cyclohexane
- la supression du groupement méthoxyle en C5
- la modification structurale de la chaîne en C4 influant sur l'orientation des molécules dans la poche active de la MetAP2
- l'ouverture du spiro-époxyde en C3 dont le méthylène est impliqué dans la liaison covalente avec l'His231
- ou encore, la modulation de la chaîne en C6 qui prend place à l'extérieur du site actif.

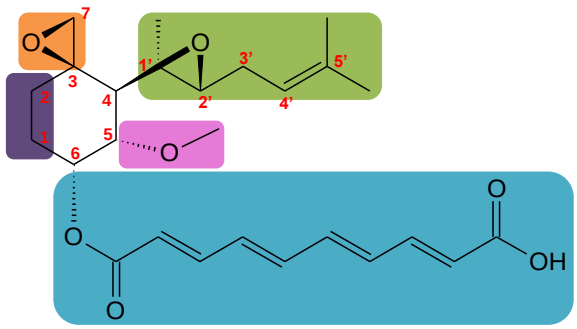


Figure II-13 : Pharmacomodulations apportées à la fumagilline

3.1. Changement du noyau cyclohexane

Un remplacement du noyau cyclohexane par un autre type de cycle entraîne une diminution de l'activité. Par exemple,le composé A (Figure II-14) présentant un noyau cyclopentane a été testé pour son activité antiproliférative sur les cellules CPAE (calf pulmonary artery endothelial), les cellules de lymphome EL-4 et les cellules leucémiques murines P388 et s'est révéléêtre 100 à 1000 fois moins efficace que la fumagilline ou le TNP-470 (Jeong *et al.*, 2005) (Figure II-14).

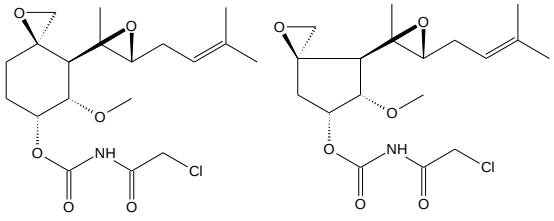


Figure II-14 : Structure du TNP-470 et du composé A synthétisé par Jeong *et al.*,2005

3.2. Modulations des positions C1 et C2 du cycle cyclohexane

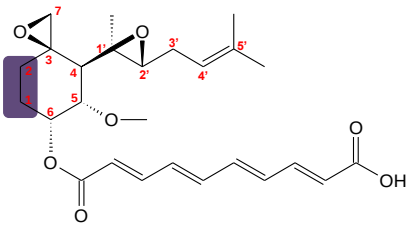
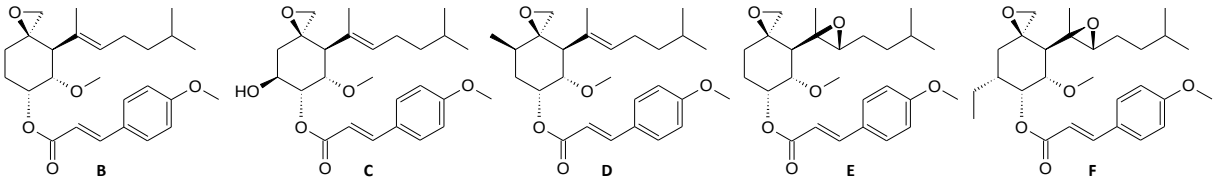


Figure II-15 : Pharmacomodulation de la fumagilline : en position C1 et C2

Les modulations des positions C1 et C2 ont montré que les modifications ne présentaient pas d'intérêt pour augmenter l'activité biologique, mais qu'elles étaient possibles si limitées à l'ajout de petits substituants. Ainsi, si la présence de substitants tels que des hydroxyles n'entraîne que peu de modification de l'activité (voir Tableau II-4, composé C*vs* composé B, CI_{50}respectives de 35 nM *vs* 15 nM), la présence d'un méthyle en C2 (composé D) ou d'un éthyle en C1 (composé F) induit une perte de l'activité inhibitrice de la MetAP2 (CI_{50} respectives de 70 nM et >2500 nM).

Tableau II-4 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés B-F(Rodeschini *et al.*, 2004)

	B	C	D	E	F
CI_{50} (nM)	15	35	70	17	>2500



3.3. Modulations du méthoxyle en C5

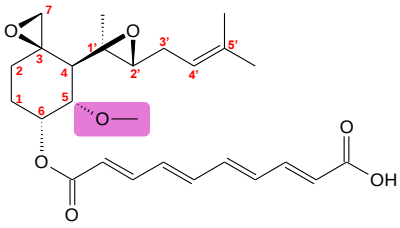


Figure II-16 : Pharmacomodulation de la fumagilline : position C5

La plupart des dérivés naturels ou de synthèse possèdent un groupement méthoxyle en C5 mais quelques auteurs ont tout de même exploré les effets d'un changement de substituant sur cette position.

Son *et al.* montrèrent en 2002 que la 5-déméthyl-ovalicine possédait une activité inhibitrice de la MetAP2 similaire à l'ovalicine (Son *et al.*, 2002), concluant donc de l'absence d'implication de ce groupement dans l'activité.

Kim *et al.* se sont également intéressés aux composés déméthoxylés. Ils ont isolé en 2004 la 5-déméthoxy-fumagilline et ont aussi pu par saponification obtenir le 5-démethoxy-fumagillol (Kim *et al.*, 2004). Dans le cas de composés ne possédant pas de chaîne en C6 comme c'est le cas pour le fumagillol et le 5-déméthoxy-fumagillol, l'activité antiproliférative sur cellules CPAE est équivalente entre les deux composés. Cependant, la synthèse de 5-déméthoxy-TNP-470 et la comparaison de son activité anti-angiogénique par rapport au TNP-470 a mené à la conclusion que le méthoxyle était important puisque l'activité du 5-déméthoxy-TNP-470 était 1000 fois moins importante que celle du TNP-470. Ainsi, le méthoxyle en C5 semblejouer un rôle important pour l'effet antiprolifératif dans le cas de composés présentant une chaîne latérale en C6.

3.4. Modulations de la chaîne latérale en C4

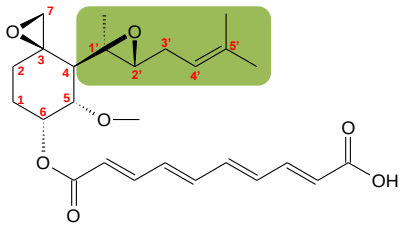
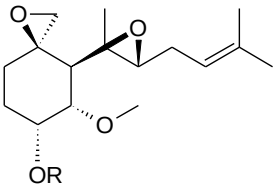


Figure II-17 : Pharmacomodulation de la fumagilline : chaîne en C4

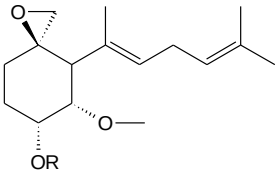
Pyun *et al.* ont expérimenté les conséquences d'une modulation de la chaîne terpénique en C4 (Pyun *et al.*, 2004). L'évaluation des molécules synthétisées comme inhibiteurs de la MetAP2 a permis d'observer une activité amoindrie pour les composés I et J présentant une chaîne diène en C4 (Tableau II-5). Des composés présentant une chaîne éther oxime benzylique (composés K-M) ont montré des activités d'un niveau équivalent aux composés non modifiés(époxyde en C1'-C2', composés G et H).Parcontre, l'orientation spatiale de cette chaîne est importante, puisqueles composés de configuration *E*étaientplus actifs que ceux de configuration *Z,* avec des CI_{50}respectives d'environ1 nM et à 25-57 nM.

Tableau II-5 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés G-M synthétisés par Pyun *et al.*, 2004

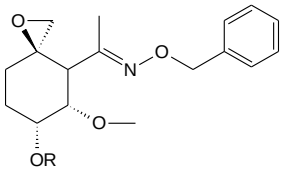
	G	H	I	J	K	L	M
CI_{50} (nM)	0,51	0,39	*(E)* 8,9 ±2,2	*(E)* 1,7 ±0,5	*(E)* 1,2 ±0,32 *(Z)* 25 ±2	*(E)* 1,2 ±0,17 *(Z)* 57 ±22	*(E)* 0,8 ±0,08



G. R=Ac
H. R=$CONH_2$



I. R=Ac
J. R=$CONH_2$

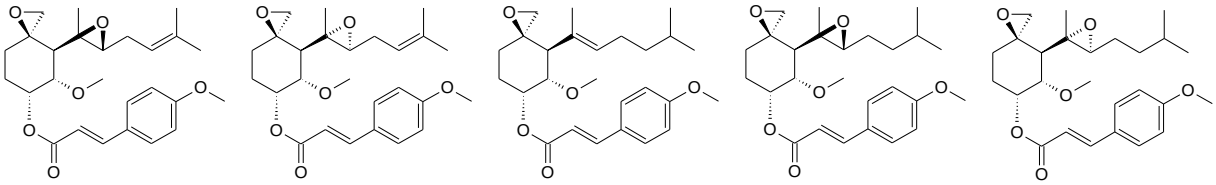


K. R=Ac
L. R=$CONH_2$
M. R=$CON(CH_2CH_2)_2NEt$

Rodeschini *et al.* onteux aussi exploré les modifications de cette chaîne latérale(Rodeschini *et al.*, 2004) (Tableau II-6) :ils ont pu observer que le composé N qui possède la configuration naturelle de l'époxyde C1'-C2' présentait une activité inhibitrice de la MetAP2 importante avec une CI_{50} de 35 nM alors que le composé O présentant une configuration inverse de cet époxyde était inactif (IC_{50}>>2500nM). La perte de la double liaison en C4'-C5' avec ou non le remplacement de l'époxyde en C1'-C2' par une insaturation était bien tolérée puisque les composé P et Q présentaient la même activité que le composé N (15 nM et 17 nM vs 35 nM). La perte de la double liaison en C4'-C5' couplée à une configuration inverse de l'epoxyde en C1'-C2' (composé R) entraînait une perte de l'activité (CI_{50}>>2500 nM).

Tableau II-6 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par les composés N-R synthétisés par Rodeschini *et al.*, 2004

	N	O	P	Q	R
CI_{50} (nM)	35 ±10	>>2500	15 ±5	17 ±3	>>2500

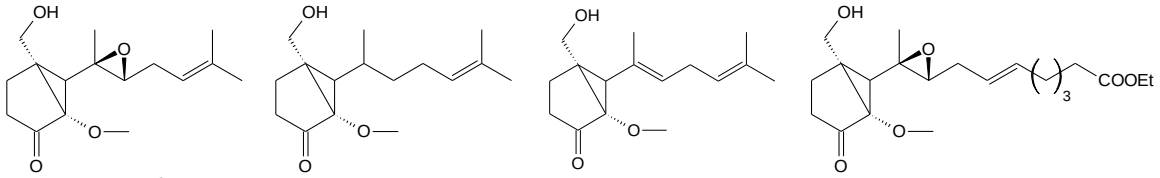


N O P Q R

De leur côté, Lu *et al.* ont aussi tenté de moduler la structure de cette chaîne latérale dans une série d'analogues bicycliques (Lu *et al.*, 2006) (Tableau II-7). Par rapport au fumarranol, composé synthétique comportant une chaîne C4 identique à celle des composés naturels, ceux ne présentant soit pas d'époxyde en C1'-C2' (composé S) soit une insaturation à la place (composé T) ont montré une diminution d'efficacité d'inhibition de la MetAP2 et d'inhibition de la croissance des cellules BAEC. Lors de la même étude, ils ont aussi pu observer que l'allongement de la chaîne latérale en C4 (composé U) n'était pas intéressante, rendant le composé inactif.

Tableau II-7 : Evaluation de l'inhibition de la MetAP2 par le fumarranol et les composés S-U synthétisés par Lu *et al.*, 2006

	Fumarranol	S	T	U
CI_{50} (nM)	0,034	4	1,78	inactive



Fumarranol S T U

En conclusion, il semble donc délicat de moduler cette chaîne latérale en C4, ce qui n'est pas étonnant étant donné son rôle d'interaction directe avec le site actif de l'enzyme cible.

3.5. Modulations du spiro-époxyde en C3

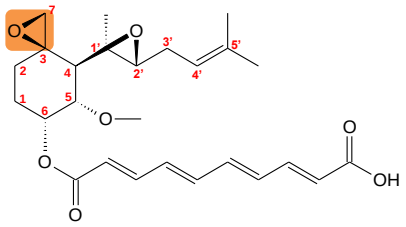
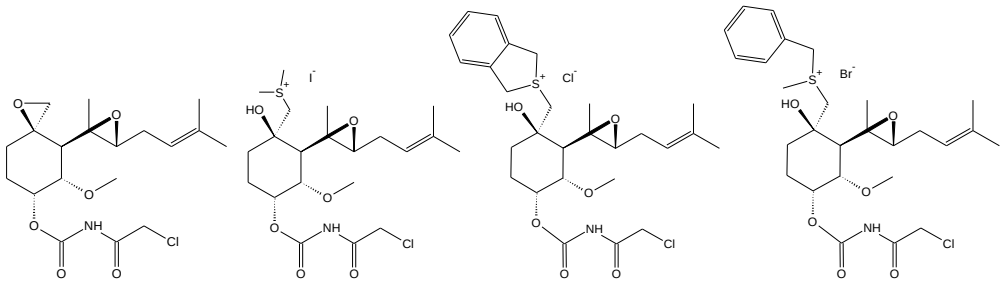


Figure II-18 : Pharmacomodulation de la fumagilline : spiro-époxyde en C3

Marui *et al.* ont été les premiers à explorer les effets de modifications du spiro-époxyde : son ouverture et l'obtention de sels de sulfonium a été envisagée d'en améliorer l'hydrophilievoir Figure II-19 (Marui*et al.*, 1995).



TNP-470 V W X

Figure II-19 : Structure du TNP-470 et des composés V-X synthétisés par Marui*et al.*, 1995

L'effet sur la croissance des cellules M5076 dans un modèle *in vivo* chez la souris a été évalué et les auteurs ont observé une efficacité des dérivés sulfonium similaire à celle du TNP-470. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antitumorale *in vivo* de ces composés a révélé une activité équivalente pour une toxicité réduite du composé W par rapport au TNP-470. En effet, la toxicité du TNP-470 observée lors des études précédentes se manifestait par une importante perte de poids des souris traitées : cela n'a pas été observé pour les souris traitées par le composé W, leur poids augmentant de manière similaire aux souris du groupe contrôledurant l'étude. De plus, les composés sulfonium étaient

effectivement plus hydrosolubles que TNP-470.Les sels de sulfoniumsynthétisés présentent donc des profils de solubilité, distribution et toxicité plus favorables que le TNP-470.

En 2005, Rodeshini *et al.* ont défini le rôle critique conjoint des deux époxydes dans la liaison des analogues de la fumagilline avec la MetAP2(Rodeschini *et al.*, 2005). Griffith *et al.* ontégalement pu mesurer l'importance du spiro-époxyde sous sa forme intacte (Griffith *et al.*, 1997 ; Griffith *et al.*, 1998) : ils ont démontré que l'activité de dérivés du fumagillol comportant soit un résidu méthyl-thio-méthylesoit un méthylène était moindre, et que la liaison des dérivés non-époxydés à la MetAP2 serait réversible. Une autre étude a montré que la molécule Sch528647 différant de la fumagilline par la présence d'un méthylène à la place du spiro-époxyde en C3 (Figure II-20) présentait une activité *in vitro* beaucoup plus faible que la fumagilline sur les cellules SKMEL-5 de mélanome : la fumagilline présentait une activité plus de 31 fois plus importante (IC_{50}= 8 nM) face à la Sch528647 (IC_{50}= 250 nM) (Chu *et al.*, 2003).

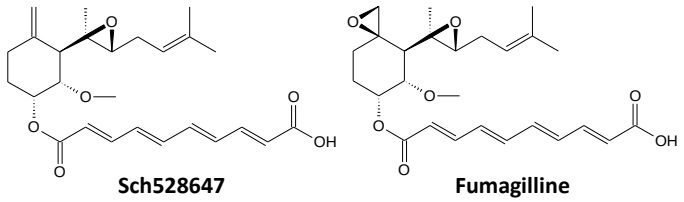


Figure II-20 : Structure du Sch528647 et de la fumagilline

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une activité identique ou supérieure des composés ne présentant pas de spiro-époxyde en C3. Ainsi, Hayashi *et al.* ontmontré que la chlovalicine, molécule portant un hydroxyle et un résidu chlorométhylène en C7, était trois fois plus active sur les cellules MH60 interleukines-6 dépendantes que son analogue époxydé, l'ovalicine (Hayashi *et al.*, 1996). Plus récemment, Arico-Muendel *et al.* ont mis en évidence que le PPI-2458 et son analogue chlorohydrine étaient aussi efficaces lors des tests d'inhibition de la MetAP2 et de la prolifération des cellules HUVEC (Arico-Muendel *et al.*, 2013). Lors d'une étude de métabolisation, ils ont également montré que des composés dont les deux époxydes étaient cyclisés entre eux étaient inactifs. Ces résultats semblent logiques, puisque la formation de la liaison covalente entre ces molécules et l'His231 nécessite la présence d'un méthylène réactif en C7.A l'inverse, la fumagalone et le fumarranol sont quant à eux des composés de synthèse qui ont prouvé leur efficacité d'inhibition de la MetAP2 et de la croissance des cellules BAEC bien qu'ils ne possèdent pas de spiro-époxyde en C3 (Lu *et al.*, 2006). Ainsi, du fait de résultats parfois contradictoires, l'impact de la suppression du spiro-époxyde sur l'activité antiproliférative des analogues de cette série reste à ce jour assez égnimatique.

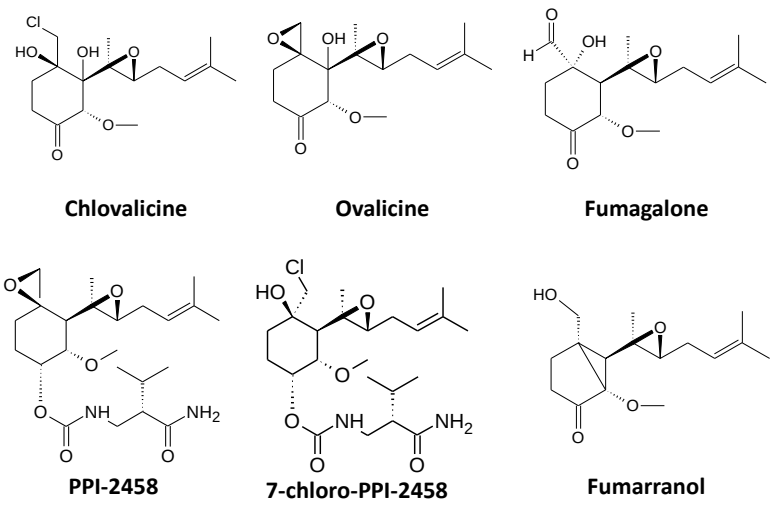


Figure II-21 : Structure de la chlovalicine, de l'ovalicine, du fumagalone, du PPI-2458, du 7-chloro-PPI-2458 et du fumarranol

3.6. Modulations de la chaîne en C6

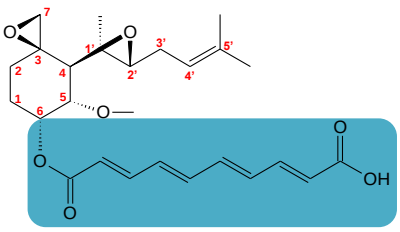


Figure II-22 : Pharmacomodulation de la fumagilline : chaîne en C6

D'après les analyses de radiocristallographie de la structure du complexe fumagilline-MetAP2, Liu *et al.* pensaient que la chaine latérale en C6 n'avait pas d'impact significatif sur l'activité. En effet, les analyses montraient que la chaîne latérale se positionnait à l'extérieur de la poche active de l'enzyme (Liu *et al.*, 1998). Dans leur première publication, Marui *et al.* ont détaillé les modulations qu'ils ont appliquées à cette position en partant du fumagillol et les activités antiprolifératives associées à ces composés. Un certain nombre d'esters et plus particulièrement d'esters sulfoniques mais aussi de carbonates et de carbamates ont été synthétisés :tous les composés testés ont présenté des activités inhibitrices de la prolifération des cellules endothéliales humaines HUVEC. Leurs résultats ont ainsi montré que la structure de la chaîne en C6 pouvait être modulée sans perte d'activité et même avec un gain d'activité. Parmi les molécules testées, le 6-O-chloroacetylcarbamoyl-fumagillol (TNP-470) était le composé le plus actif (Ingber *et al.*, 1990).

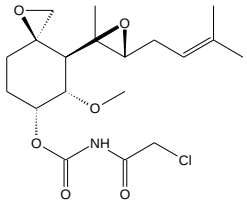
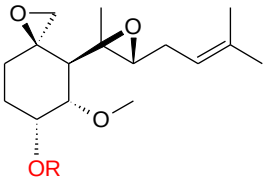
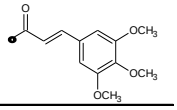
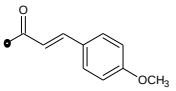
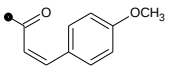
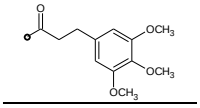
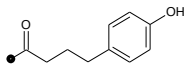
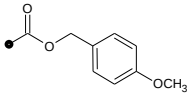


Figure II-23 : Structure du TNP-470

Comme il avait été observé que la chaîne en C6 de la fumagilline n'était engagée que dans de très faibles interactions hydrophobes avec la MetAP2, le développement de substituants plus hydrophobes pour remplacer la chaîne polyène a été exploité. Ainsi, l'équipe coréenne de Han a pu synthétiser des analogues de la fumagilline particulièrement efficaces en se basant sur leurs analyses par docking moléculaire avec la MetAP2 (Han *et al.*, 2000). Ils ont développé leurs composés de synthèse en introduisant notamment un cycle aromatique qui peut engager des interactions hydrophobes avec la Leu447 de la MetAP2 humaine (Tableau IV-8). Leurs synthèses les ont notamment menées à la production de dérivés esters de l'acide cinnamique tel que le CKD-731 qui présentait une activité antiproliférative sur cellules endothéliales 1000 fois supérieure à celle du TNP-470. La présence de l'insaturation de la chaîne carbonyle reliant le noyau sesquiterpène au cycle aromatique de la chaîne en C6 semble jouer un rôle important dans l'activité puisque l'absence de cette double liaison (composé AA et AB) ou l'introduction d'un hétéroatome (oxygène, composé AC) induisaient une forte diminution de l'activité. De plus, les auteurs précisaient que la configuration de l'insaturation de la chaîne en C6 est importante et doit être *trans* (CKD-731 et composé Y) plutôt que *cis* (composé Z) pour maintenir les interactions hydrophobes avec la Leu447 et maintenir l'importante activité de la molécule.

Tableau II-8 : Activité antiproliférative in vitro de dérivés de la fumagilline contre les cellules de lymphome (EL-4) et les cellules de l'artère pulmonaire de veau (CPAE : calf pulmonary artery endothelial) (Han *et al.*, 2000)



Composé	Substituant R	IC_{50} (en ng/mL)	
		EL-4	CPAE
CKD-731		0,00015	0,00003
Y		0,00019	0,00006
Z		12	24
AA		36	44
AB		83	125
AC		42	18

Par ailleurs, en 2005, Rodeschini *et al.* ontà leur tour défini le rôle modulateur de la chaîne en C6 de ces sesquiterpènes (Rodeschini *et al.*, 2005). Leurs travaux ont permis de conclure qu'une large variété de chaînes en C6 était tolérée mais celles dont l'encombrement stérique était important n'étaient pas recommandées.

Ainsi, le substituant en C6 étant à l'extérieur de la poche active de l'enzyme, il peut être modifié afin de renforcer l'affinité pour la MetAP2 et de moduler les propriétés pharmacocinétiques. Il est alors intéressant de chercher à minimiser le passage de la barrière hémato-encéphalique afin de réduire les effets secondaires sur le système nerveux central observés pour certains des analogues.

3.7. Importance de la conformation

Marui *et al.* en 1992 ont observé que certains substituants en C6 pouvaient induire une modification de la conformation du cyclohexane : une conformation en chaise inverse entraînele changement du positionnement spatial des deux époxydes, et donc une diminution de l'activité biologique (Marui et Kishimoto, 1992).

Halàsz et son équipe ont confirmé cette observation en étudiant l'activité inhibitrice de la MetAP2 de deux conformères stables de la fumagilline (Figure II-24) :la conformation chaise (I) est nécessaire à l'activité anti-angiogénique, les analogues sous la conformation chaise inverse (II) sont beaucoup moins actifs.La conformation chaise – naturelle – de la molécule serait donc primordiale à l'expression de son activité.

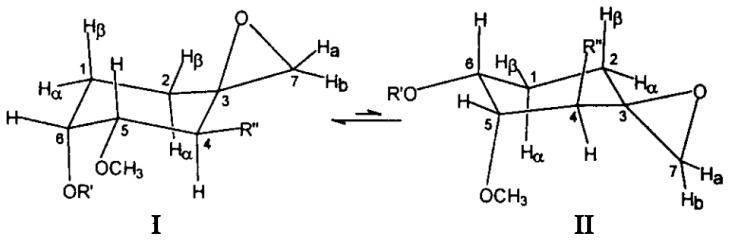


Figure II-24 : Les deux conformères stables du cycle cyclohexane de la fumagilline (R'=CO(CH)$_8$COOH)

3.8. Conclusions sur les relations structure-activité

Cette étude bibliographique nous a permis de conclure sur certains aspects des relations structure-activité des composés de cette série chimique : ils sont présentés sous forme synthétique dans la Figure IV-22.

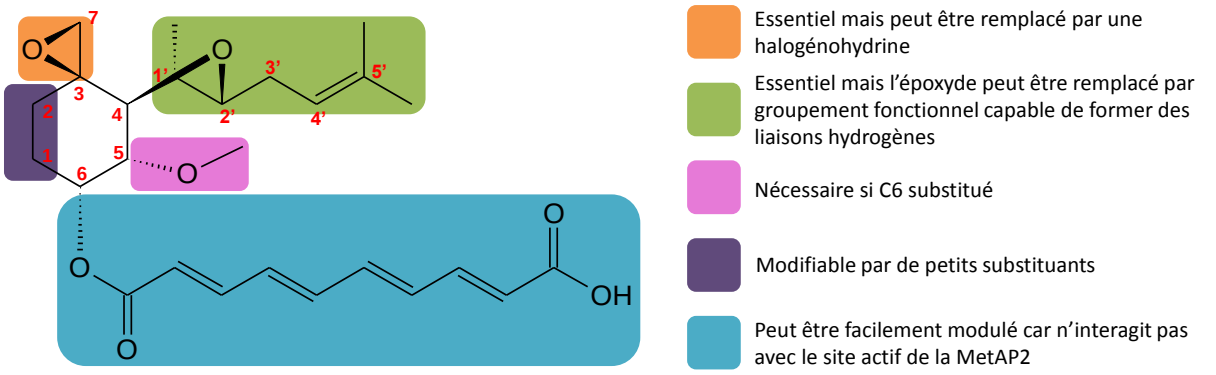


Figure II-25 : Bilan des relations structure-activité des analogues de fumagilline

Nombre de travaux visant à modifier les substituants de la fumagilline ont été entrepris avant d'en connaître la cible, et la façon dont elle interagit avec les acides aminés de son site actif. A la lumière de cette connaissance, les relations structure-activité s'éclairent :

- la chaîne en C4 joue un rôle fondamental dans l'insertion de la molécule dans le site actif de l'enzyme cible, puisqu'elle prend la place du substrat endogène ; sa présence ainsi que celle de son époxyde sont donc essentielles. Néanmoins, cet époxyde peut éventuellement être remplacé par un groupement fonctionnel capable de former des liaisons hydrogènes.
- le substituant en position C3 joue quant à lui un rôle clé dans l'interaction directe avec la MetAP2, puisque dans le cas de la présence d'un spiro-époxyde sur cette position, le méthylène en C7 se lie de manière covalente avec l'His231 du site actif. Cependant, il semblerait que le substituant de cette position puisse être modulé, par exemple pour former des halogénohydrines. Une ombre subsiste quand même puisque certaines molécules non époxydées ont été décrites comme fortement actives. On peut également se poser des questions sur l'implication des groupements en C3 dans la réversibilité/irréversibilité de l'action de ces composés.
- le noyau cyclohexane doit être conservé ; les positions C1 et C2 de celui-ci peuvent présenter de petits substituants, mais sans intérêt notable pour l'amélioration de l'activité.
- le groupement méthoxyle présent en C5 semble nécessaire.
- la chaîne en C6 est le principal site de pharmacomodulation, et a été l'objet de la majorité des travaux d'optimisation réalisés dans cette série chimique.

4. Les drug-leads, analogues en développement clinique

Depuis les premiers travaux, plus de 200 brevets ont été déposés autour de la série chimique de la fumagilline, faisant état de la synthèse de plus de 100 analogues, dont quatre d'entre eux, le TNP-470, les CKD-731 et 732 et le PPI-2458 ont fait l'objet ou sont en cours d'un développement clinique par 3 groupes pharmaceutiques.

4.1. Le TNP-470

4.1.1. Une première molécule prometteuse

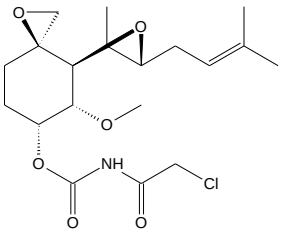


Figure II-26 : Strucuture chimique du TNP-470

La première molécule développée fut le TNP-470 (pour Takeda Neoplastic Product-470), aussi retrouvé sous le nom d'AGM-1470 (pour AngioGenesis Modulator) (Figure II-32). Cette molécule correspond au 6-O-chloroacetylcarbamoyl-fumagillol, pour laquelle la chaîne décatetraénoylique de la fumagilline a été remplacée par une chaîne chloroacétyle carbamoyle. Synthétisé par le groupe pharmaceutique Takeda (Osaka, Japon (Marui *et al.*, 1992)), le TNP-470 est un des analogues de la fumagilline les plus actifs sur de nombreuses lignées cellulaires tumorales (cf p33) et a prouvé son efficacité*in vivo*- seul ou en traitement combiné - contre différents types de cancers, tels que les sarcome de Kaposi, cancer du col de l'utérus, cancer du sein, du poumon et du rein (Stadler *et al.*, 1999; Zgodzinski *et al.*, 1999; Kruger et Figg, 2000; Moore *et al.*, 2000). Tout comme la fumagilline, il présente une activité anti-angiogénique. Son action d'inhibition de la croissance des cellules endothéliales est 50 fois supérieure à celle de la fumagilline (Kusaka *et al.*, 1991; Yanase *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994). Au début des années 2000, le TNP-470 est entré en essais cliniques de phase II pour le traitement de carcinomes du rein, du sein, du col de l'utérus et du pancréas ainsi que de glioblastomes (Stadler *et al.*, 1999; Zgodzinski *et al.*, 1999; Kruger et Figg, 2000; Moore *et al.*, 2000).

4.1.2. Thérapies combinées

Le potentiel thérapeutique du TNP-470 a été évalué en combinaison avec différents agents anti-cancéreux incluant des agents chimiothérapeutiques, des cytokines ou la radiothérapie. Dans la plupart des cas, le TNP-470 agit en synergie avec les agents cytotoxiques permettant l'augmentation du potentiel antitumoral avec une diminution accrue du volume tumoral et l'inhibition du développement de métastases. Ainsi, le TNP-470 a pu être évalué en traitement combiné avec :

- ✓ **des agents anti-angiogéniques**

Dans un modèle de cancer des îlots pancréatiqueschez la souris, une combinaison de TNP-470 avec des inhibiteurs de l'angiogenèse comme la minocycline ou l'interféron alpha/bêta (IFN α/β) a montré un fort potentiel antitumoral(Parangi *et al.*, 1996).

- ✓ **des agents antiprolifératifs ou cytotoxiques**

La combinaison avec la cisplatine (alkylant, à la dose de 5 mg/kg toutes les semaines) augmentait l'effet antitumoral du TNP-470 dans le cas de carcinomes prostatiques humains (PC3) (Yamaoka *et al.*, 1993). Par contre,l'association à la doxorubicine (intercalant de l'ADN et de l'ARN et inhibiteur de la topoisomérase II) et au 5-fluorouracil (antimétabolite), n'induisait pas d'augmentation d'efficacité du traitement par le TNP-470 sur les carcinomes mammaires humains (MDA-MB-231) (Yamaoka *et al.*, 1993).

- ✓ **d'autres traitements**

L'effet antitumoral du TNP-470 dans le cas de cancers humains de l'œsophage et de l'estomac était augmenté si on induisait une hyperthermie (43°C pendant 30 min) (Yano *et al.*, 1995). Une hyperthermie de 44°C pendant 30 min augmentait aussi l'effet anti-angiogénique et antitumoral du TNP-470 dans le cas de carcinomes spinocellulaires murins (SCCVII) (Nishimura *et al.*, 1996).

Dans le cas de tumeurs pituitaires induites par les œstrogènes chez le rat, le traitement combiné de TNP-470 et de bromocriptine (agoniste dopaminergique) était plus efficace que le traitement par le TNP-470 seul (Takechi, 1994; Takechi *et al.*, 1994).

- ✓ **la radiothérapie**

La combinaison d'un traitement au TNP-470 à la radiothérapie a été étudiée, révélant un effet synergique des deux traitements. Teicher *et al.* ont montré que l'application d'une radiothérapie fractionnée couplée au traitement par le TNP-470 entraînait un retard significatif de croissance tumorale par rapport à une irradiation seule dans le cas de carcinomes pulmonaire de Lewis (Teicher *et al.*, 1994).

- ✓ **la thérapie photodynamique**

La thérapie photodynamique (PDT pour PhotoDynamic Therapy) consiste en l'administration systémique ou locale d'un photosensibilisant qui rend les cellules sensibles à la lumière. Kosharkyy *et al.* ont démontré que le traitement combinant la PDT et le TNP-470 entraînait une diminution de la croissance tumorale, une diminution des métastases dans les ganglions lymphatiques et une diminution de la toxicité liée à la maladie dans le cas d'un modèle orthotopique de cancer de la prostate (Kosharskyy *et al.*, 2006)

4.1.3. <u>Biodisponibilité et métabolisation</u>

Les études préliminaires de pharmacocinétique ont mis en évidence que la demi-vie plasmatique du TNP-470 est très courte, de 5-10 min. Pour examiner le devenir métabolique du TNP-470, ses biotransformations ont été étudiées dans des cultures primaires d'hépatocytes humains et dans les fractions microsomales de plusieurs tissus humains (Placidi *et al.*, 1995). Le TNP-470 subit une rapide et forte transformation donnant six métabolites. Les deux métabolites extracellulaires qui prédominent sont les métabolites M-IV et M-II (Figure II-27).Le TNP-470 est rapidement hydrolysé dans le plasma en un carbamate non substitué (M-IV) qui à son tour est dégradé par uneépoxyde hydrolase (EH) pour donner le métabolite M-II(Moore *et al.*, 2000).

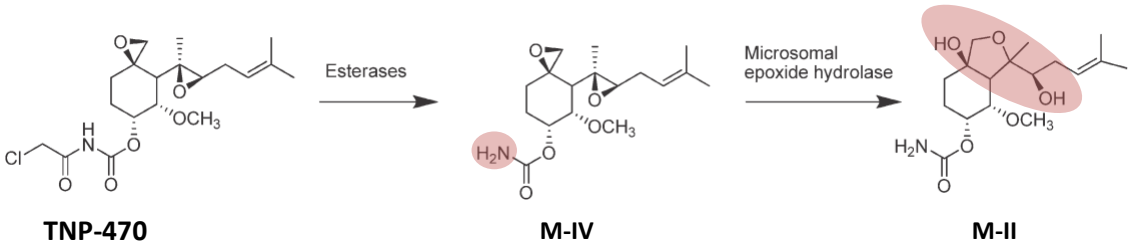


Figure II-27 : Métabolisation du TNP-470 (d'après Arico-Muendel *et al.*, 2009b)

Lors de l'étude clinique de phase I menée par l'équipe de Bhargava sur des patients atteints de cancer à un stade avancé, la pharmacocinétique du TNP-470 et de ses métabolites M-II et MIV a pu être examinée (Bhargava *et al.*, 1999), confirmant queles demi-vies du TNP-470 et du métabolite M-IV sont très courtes (2 min et 6 min respectivement). Pour les patients recevant une dose de 235 mg/m^2, la concentration diminuait de 405 ng/mL à la fin de l'injection à 51 ng/mL 5 min après l'arrêt de l'injection. La concentration plasmatique du TNP-470 était relativement importante pendant les 4 h de perfusion intraveineuse mais déclinait rapidement dès que l'injection était stoppée. Le TNP-470 et le métabolite M-IV n'étaient généralement pas détectables à partir de 60 min après l'injection.La concentration de M-IV était plus faible que celle du TNP-470 (moins de 10 ng/mL pendant l'injection). La concentration plasmatique du métabolite M-IIatteignait un maximum 4h après le début de l'injection ; sa demi-vie était beaucoup plus longue (environ 2,6 h). Il était également observé qu'aucune accumulation plasmatique du TNP-470 ou de ses métabolites ne s'exerçait, la pharmacocinétique étudiée le premier jour du traitement étant identique à celle du 22ème jour. Enfin, une très grande variabilité inter-individuelle a pu être observée sur tous les paramètres pharmacocinétiques (Moore *et al.*, 2000).

Ainsi, ces études ont fait apparaître que le TNP-470 est très fortement et très rapidement métabolisé après administration, et que la molécule interagissant avec la MetAP2 est alors peut-être un de ses métabolites.

4.1.4. Toxicité et effets indésirables

Dès le début des études cliniques, des effets secondaires importants sur le système nerveux centralsont apparus, ce qui, associé à une pharmacocinétique défavorable, amené la société Takeda à arrêterle développement du TNP-470 seul (Castronovo et Belotti, 1996; Bhargava *et al.*, 1999; Herbst *et al.*, 2002).

Déjà, lors des études cliniques de la fumagilline, l'importante toxicité que pouvait présenter les composés de cette série chimiqueavait été mise en évidence. Ainsi, les premières études sur la fumagilline administrée par voie orale rapportaient les effets négatifs principaux suivants : nausées, vomissements, anorexie et crampes abdominales (Schindel, 1954; Garvey *et al.*, 1995,Molina*et al.*, 1997). Une toxicité sur la moelle épinière était aussi observée, incluant une neutropénie et une thrombopénie réversible à l'arrêt du traitement (Malewitz, 1953 ; Molina *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2002). Cette thrombopénie constituait l'effet secondaire majoritaire qui a limité l'utilisation clinique de la fumagilline. Des vertiges et étourdissements avaient aussi été rapportés par un petit nombre de patients.

La toxicité du TNP-470 a également été étudiée du fait des études cliniques menées sur la molécule. L'étude clinique de phase I menée par Bhargava et son équipe en 1999 concernait l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'angiogenèse du TNP-470 administré en intraveineux à des patients atteints de cancers avancés (Bhargava *et al.*, 1999). Les symptômes prédominants induits par le TNP-470 étaient directement liés à un dysfonctionnement cérébral :

- malaises, asthénie,vertiges,étourdissements
- rares crises d'épilepsie
- ataxie
- pertes de la concentration,confusions,pertes de mémoire à court-terme
- dysphorie, anxiété, dépression, insomnie
- nausées
- anorexie

Ces effets indésirables, dose-dépendants, se présentaient sous la forme de manifestations totalement réversibles après arrêt du traitement.

Des symptômes relativement semblables ont aussi été rapportés par Logothetis *et al.* en 2001 lors de leur étude clinique de phase I évaluant le TNP-470 administré en intraveineux comme inhibiteur de l'angiogenèse dans le cas de cancer de la prostate androgèno-indépendant (Logothetis *et al.*, 2001).

4.1.5. Formulations

Aujourd'hui, de nouvelles formes conjuguées ainsi que de nouvelles formulations galéniques sont en cours de développement pour pallier aux problèmes de toxicité et de pharmacocinétique.

La plupart des agents anti-angiogéniques et chimiothérapeutiques sont des composés de faibles poids moléculaires. Ils sont administrés de manière systémique et présentent des profils de biodistribution non spécifiques, une faible accumulation dans les sites tumoraux et une élimination systémique rapide. Par conséquent, seulement une faible quantité du traitement administré arrive sur le site visé et la thérapie présente des effets indésirables et une efficacité amoindrie. Ainsi, pour améliorer l'index thérapeutique des agents de chimiothérapie, une approche est de concevoir des macromolécules, chimères entre un composé anticancéreux de faible poids moléculaire et des polymères hydrosolubles améliorant la spécificité d'action sur les tissus tumoraux via l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (Maeda, 1994). Ce phénomène rend possible l'accumulation passive des macromolécules dans les tumeurs solides.

Ainsi, l'activité antitumorale, la biodisponibilité et la toxicité du TNP-470 sous les formes conjuguées des copolymères caplostatine et lodamine ont pu être évaluées.

- ✓ **Caplostatine**

Ainsi, Satchi-Fainaro *et al.* ont synthétisé et caractérisé la caplostatine, un conjugué composé du TNP-470 lié à un polymère hydrosoluble, non dégradable et biocompatible, le N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) par l'intermédiaire d'un tétrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly (Figure II-28, (Satchi-Fainaro *et al.*, 2004)).

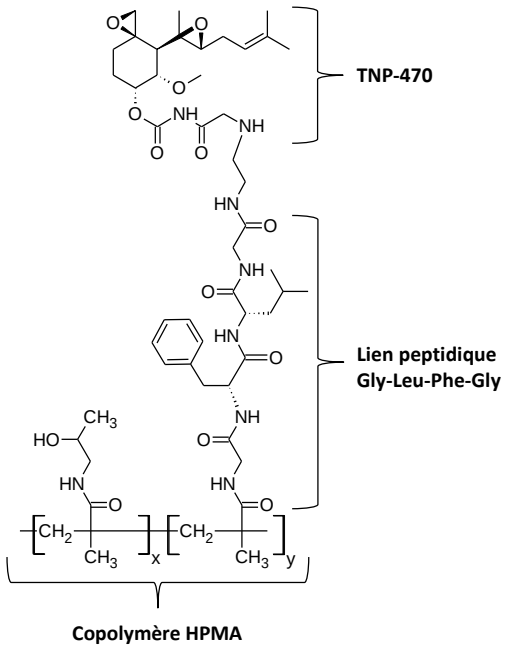


Figure II-28 : Structure chimique de la caplostatine

In vivo, ce conjugué HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-TNP-470 de 30 kDa induit une augmentation et une prolongation de l'activité du TNP-470. Diverses études ont montré qu'il inhibait significativement la croissance des carcinomes pulmonaires de Lewis, des glioblastomes (U87), des mélanomes (A2058), des carcinomes prostatiques (PC3), des carcinomes du colon (COLO-205) et des neuroblastomes murins (Satchi-Fainaro *et al.*, 2004; Satchi-Fainaro *et al.*, 2005; Chesler *et al.*, 2007). La caplostatine est sélectivement accumulée dans le système micro-vasculaire tumoral.Le tétrapeptide (Gly-Phe-Leu-Gly) conjuguant le TPN-470 et le copolymère HPMA est stable dans la circulation sanguine.Par contre, il est sensible au clivage par les protéases lysosomales thiol-dépendantes, particulièrement la cathepsine B qui est surexprimée dans beaucoup de cellules tumorales et dans les cellules endothéliales des zones tumorales.Le TNP-470 est ainsi libéré de manière ciblée. Par ailleurs, cette conjugaison du TNP-470 défavorise le passage de la barrière hémato-encéphalique amoindrissant ainsi la neurotoxicité du traitement (Satchi-Fainaro et Folkman, 2003; Segal *et al.*, 2011). Ainsi, le traitement peut être administré à une dose 10 fois supérieure à celle du TNP-470 seul sans aucune toxicité observée.Pour le moment, aucun essai clinique n'a été mené avec ce composé.

✓ Lodamine

En 2008, Benny *et al.* ont développé un copolymère conjugué au TNP-470, constitué de deux blocs : un bloc monométhoxy-polyèneglycol (mPEG) et un bloc acide polylactique (PLA) (Figure II-29) (Benny *et al.*, 2008). Dans ce copolymère, nommé Lodamine, le TNP-470 se retrouve encapsulé dans le noyau des micelles qui forment une protection contre les conditions acides subies lors d'une administration orale.

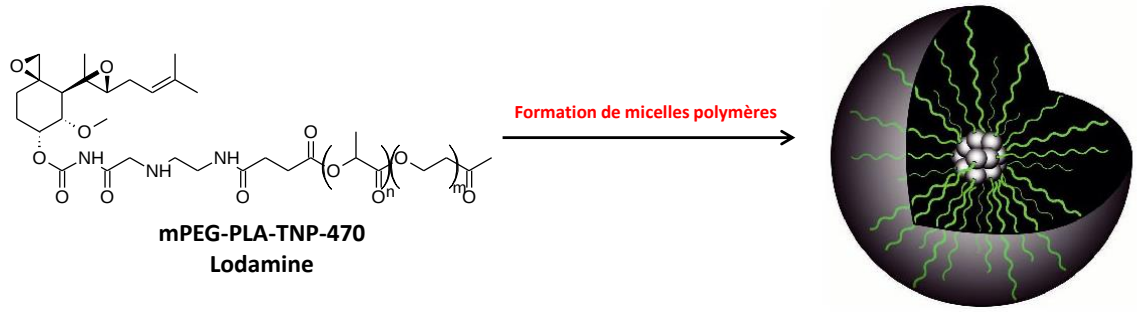


Figure II-29 : Structure de la lodamine (source : Science Daily, Université de Toronto http://www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080630114209.htm)

Pour étudier l'absorption intestinale de ces micelles polymériques, des souris ont reçu un traitement oral de micelles couplées à un marqueur fluorescent. Une heure après l'administration, la fluorescence était observée dans le plasma et continuait d'être observable jusqu'à 72 h après le traitement. Trois jours après l'ingestion, la fluorescence était détectée dans l'estomac, les intestins, le foie mais pas dans le cerveau. Les micelles marquées étaient très fortement présentes à l'intérieur des tumeurs développées par les souris. L'effet d'inhibition de la croissance tumorale d'un traitement oral par la lodamine a ensuite été évalué et comparé au TNP-470 seul. Il a été observé qu'une administration orale de lodamine inhibait la croissance du carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) chez environ 87% des souris pour une dose de 15 mg/kg tous les jours, 77% pour une dose de 30 mg/kg administrée tous les deux jours et 74% pour une dose de 15 mg/kg administrée tous les deux jours. Cette inhibition était observée à partir de 12 jours de traitement. Par contre, l'administration orale de TNP-470 seul (30 mg/kg tous les deux jours) n'entraînait aucune inhibition de la croissance tumorale(Benny *et al.*, 2008).

Dans une autre étude, réalisée sur un modèle tumoral entraînant des métastases hépatiques, modèle tumoral pour lequel des cellules B16/F10 sont injectées dans la rate, le TNP-470 entraînait l'apparition d'une ascite (un épanchement liquidien intra-abdominal), de nodules malins et d'une cirrhose : 40% des souris mouraient avant 20 jours. Au contraire, avec un traitement à la lodamine, ces problèmes n'étaient pas observés et toutes les souris survivaient. De plus, la lodamine n'a montré aucun des signes de neurotoxicité observés avec le principe actif seul, ce qui est surement dû au fait que les micelles ne passent pas la barrière hémato-encéphalique et préviennent donc du passage du TNP-470 vers le cerveau.

Du fait des ses propriétés anti-angiogéniques et d'une toxicité réduite, la lodamine a par la suite également été évaluée pour le traitement de pathologies occulaires liées à l'age dues à une néovascularisation anormale de la cornée ou de la rétine. Benny *et al.*ont alors pu montrer l'efficacité

de la lodamine pour cette nouvelle indication et encore une fois sa faible toxicité comparée au TNP-470 seul (Benny *et al.*, 2010a).

La lodamine constitue le premier agent anti-angiogénique et antiprolifératif de cette série chimique développé pour une administration orale etfait donc l'objet d'un brevet publié en 2010 (Benny-Ratsaby *et al.*, 2010b).

4.2. Les CKD

Le laboratoire CKD pharmaceuticals (Chong Kun Dang Pharmaceuticals, Corée du Sud) est à l'origine de la découverte de deux nouveaux chefs de file : le CKD-731 et le CKD-732.

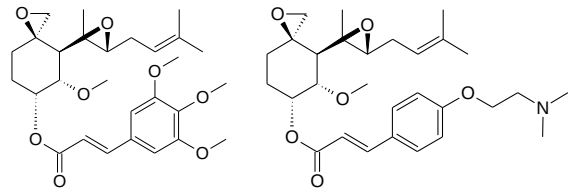


Figure II-30 : Structures chimiques des CKD-731 et 732

En se basant sur des études de modélisation moléculaire basées sur le modèle cristallin dela MetAP2, des dérivés esters d'acide cinnamique de la fumagilline ont été synthétisés menant en premier lieuau composé**CKD-731**. Celui-cia présenté une activité inhibitrice de la prolifération des cellules endothéliales 1000 fois plus importante que le TNP-470 (Han *et al.*, 2000).

Le **CKD-732** présentant une meilleure solubilité que le CKD-731, il a été sélectionné pour poursuivre l'évaluation en tant qu'agent anti-angiogénique. Par la suite, ce composéest entré en essais cliniques de phase I et a montré une meilleure efficacité pour une plus faible toxicité par rapport au TNP-470. Le CKD-732 a été étudié seul pour le traitement des tumeurs solides réfractaires (Shin *et al.*, 2010) et en combinaison avec la capécitabine et l'oxaliplatine pour le traitement de cancers colorectaux métastatiques chez des patients sensibles à une chimiothérapie basée sur un traitement par l'irinotécan (Shin *et al.*, 2012). L'étude clinique menée par Shin et son équipe sur le traitement de cancers solides réfractaires par administration IV du CKD-732 a mis en évidence l'apparition d'effets secondaires tels qu'une asthénie et des problèmes d'insomnie et de confusion mentale (Shin *et al.*, 2010). Cependant, le CKD-732 semble présenter une neurotoxicité moins sévère que le TNP-470. De plus, aucune complication hémorragique n'a été observée contrairement à ce qui avait pu être constaté lors d'un traitement par le TNP-470.

Parallèlement, un des effets secondaires de cette molécule (la perte de poids observée sur les modèles animaux) a incité le laboratoire CKD pharmaceuticals à pousser des recherches pour le développement du CKD-732 sous la forme d'un médicament expérimental utilisé comme traitement contre l'obésité, utilisé alors à posologie infracytotoxique. Ces investigations sont menées par la société Zafgen®qui a acquis les droits d'exploitation de cette molécule (nom de la spécialité Beloranib®). Le potentiel anti-obésité serait lié lui aussi à l'inhibition de la MetAP2 et les premiers essais cliniques pour cette indication auraient montré des résultats encourageants (Zahler et Vath, 2013).

4.3. Le PPI-2458

Toujours dans le but de surmonter les problèmes d'instabilité, de métabolisation et de toxicité du TNP-470, la société Praecis Pharmaceuticals® a développé des analogues pour lesquels la chaîne chloroacétyle a été remplacée par un substituant plus stable et plus polaire (Bernier *et al.*, 2004). Ainsi, le PPI-2458 et 2 autres composés ont démontré leur efficacité d'inhibition totale de la MetAP2 tout comme une inhibition de la prolifération des cellules HUVEC à une concentration infra-nanomolaire (CI_{50} de 0,095 nM, 0,2 nM et 0,6 nM pour le PPI-2458 et les composés A et B respectivement) (Figure II-31). De plus, pour ces trois composés le temps de demi-vie a été augmenté de manière significative par rapport au TNP-470 (>100 min contre 2 min) ainsi que la biodisponibilité orale bien que de manière plus modeste (18% contre 9%). Par ailleurs, ces composés n'atteignent pas le système nerveux central du fait de leur plus grande polarité limitant ainsi les possibilités d'effets neurotoxiques(Arico-Muendel *et al.*, 2009b).

Le PPI-2458 est actuellement évalué pour le traitement des lymphomes non Hodykiniens et des tumeurs solides (Arico-Muendel *et al.*, 2013).

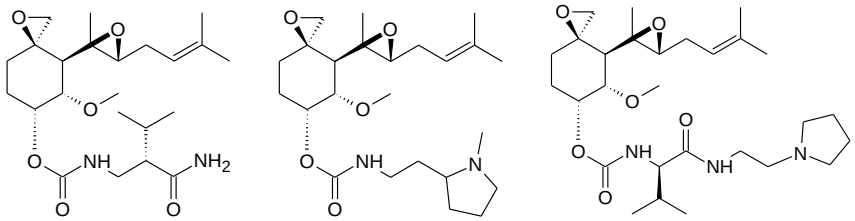


Figure II-31 : Structure du PPI-2458 et des composés A et B synthétisés par Arico-Muendel *et al.*, 2009b

5. Conclusion

Les sesquiterpènes analogues de la fumagilline constituent une famille chimique bioactive intéressante. Depuis la découverte de la fumagilline et de ses propriétés anti-angiogéniques, de nombreuses molécules ont été synthétisées et évaluées pour leurs activités antiprolifératives sur les cellules endothéliales mais aussi sur différents types de cellules tumorales.

La découverte de la cible moléculaire, la MetAP2 a permis de booster les recherches dès lors soutenues par la modélisation moléculaire. Si l'activité physiologique de la MetAP2 n'est aujourd'hui que partiellement comprise, l'inhibition de la MetAP2 et l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales et tumorales semblent directement corrélées, mais par des mécanismes qui ne sont pas clairement établis. Néanmoins, la MetAP2 est aujourd'hui considérée comme une cible de choix pour le développement de traitements anti-angiogéniques, anti-cancéreux mais aussi antiparasitaires.

La synthèse d'une très grande variété d'analogues de la fumagilline a permis de commencer à comprendre les relations structure-activité de ses composés se liant de manière covalente ou non à la MetAP2. Si le substituant en position C3 joue un rôle clé dans l'interaction directe avec la MetAP2, il

constitue avec la chaîne en C6 un des deux sites principaux de pharmacomodulation.

Bien que l'activité importante de ces composés apermis l'entrée de quatre d'entre eux en essais cliniques, leur toxicité reste aujourd'hui le principal frein à leur développement. Néanmoins, lesdrug-leadsactuellement en développement corroborent l'intérêt des molécules de cette série chimique pour la recherche de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de cancers. C'est pourquoi la découverte de l'activité anti-ostéosarcome de la ligérine a motivé les travaux de cette thèse ciblés sur ce type de cancers.

CHAPITRE II.
Les ostéosarcomes

1. Définition et mécanisme

L'ostéosarcome est une tumeur osseuse primitive, caractérisée par la synthèse d'un tissu osseux ou d'une substance de soutien des cellules osseuses (dite ostéoïde) par des cellules tumorales issues des tissus de soutien. Il peut toucher tous les os du squelette mais se développe le plus souvent à proximité du genou sur le fémur distal (43%) et sur le tibia proximal (23%). L'humérus proximal est aussi un site de développement de tumeur dans environ 10% des cas (Bielack *et al.*, 2002). L'ostéosarcome prend place le plus souvent dans les régions métaphysaires à proximité de la plaque de croissance de l'os. Les métastases les plus fréquentes sont les métastases pulmonaires, comme pour 85% des pathologies métastatiques (Bielack *et al.*, 2002). Avant l'ère de la chimiothérapie moderne, plus de 80% des patients traités uniquement par une amputation développaient des métastases qui se déclaraient dans l'année suivant le diagnostic (Marcove *et al.*, 1970). Considérant cela, il semble en fait que 80% des patients diagnostiqués présentent des micro-métastases pulmonaires non détectables avec les techniques d'imagerie.Les métastases osseuses constituent le second type de tumeur osseuse le plus important, mais sont cette fois des cancers secondaires. Cependant, cette donnée est limitée par les technologies disponibles pour détecter les métastases.

Dans le cas de tumeurs primitives osseuses, on observe aussi l'apparition de lésions osseuses localisées appelées ostéolyses. L'invasion du tissu osseux par une cellule tumorale primitive ou métastatique entraîne une dérégulation du couple ostéoclastes-ostéoblastes.

En situation physiologique, les ostéoclastes et les ostéoblastes sont responsables des remaniements permanents du tissu osseux, importants et nécessaires à la croissance du squelette ou au remodelage osseux permettant un renouvellement continu de la matrice osseuse. Ces deux populations de cellules osseuses ont des activités opposées :
- les ostéoclastes, cellules plurinucléés différenciées formées lors de l'ostéoclastogenèse, sont responsables de la résorption osseuse,
- les ostéoblastes sont, eux, responsable de la formation d'une nouvelle matrice osseuse.

Dans le cas de déséquilibres entre la formation et la résorption osseuse, des pathologies apparaissent comme l'ostéoporose. Cette affection, qui est principalement liée au vieillissement, est liée à une induction anormale de l'ostéoclastogenèse. Une importante diminution de la masse osseuse est alors observée pouvant de ce fait entraîner de nombreuses fractures chez les personnes atteintes.

Dans le cas des tumeurs primitives osseuses, la dérégulation du couplage ostéoclastes-ostéoblastes induit la libération de facteurs initialement piégés dans la matrice osseuse qui en retour favorisent la prolifération tumorale. Un cercle vicieux s'établit alors entre la prolifération cellulaire tumorale et la résorption osseuse (Figure II-32).

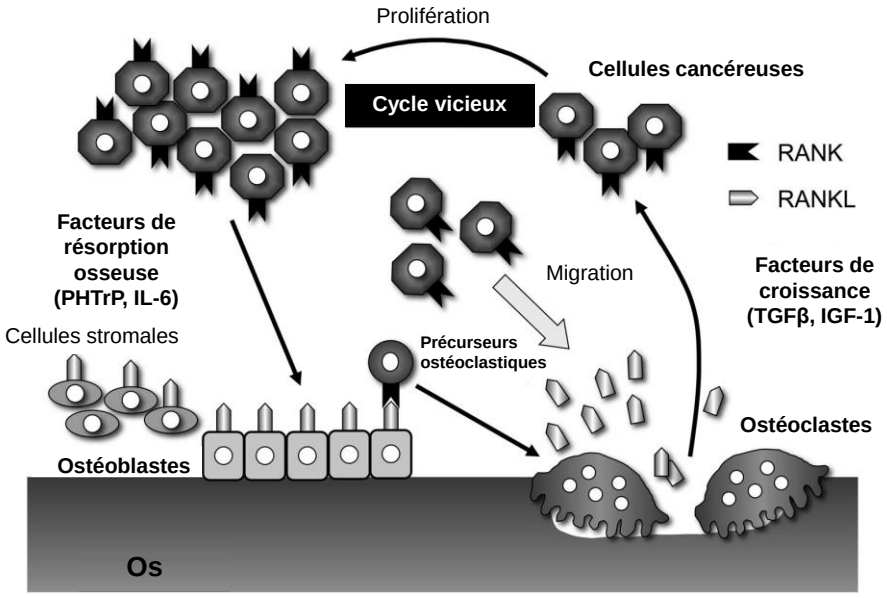


Figure II-32 : Cercle vicieux mis en place suite aux interactions entre la tumeur et son microenvironnement(d'après Jimi *et al.*)

Les cellules tumorales sécrètent notamment des cytokines (Interleukine 6 : IL6) qui jouent le rôle de messager. L'IL6 stimule l'expression du facteur RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) par les cellules ostéoblastiques. Ce facteur se fixe ensuite sur son récepteur RANK présent sur les précurseurs ostéoclastiques, déclenchant alors la différenciation et la prolifération des ostéoclastes. Ces derniers en plus d'être responsables de la résorption osseuse, sécrètent à leur tour des facteurs de croissance. Ces facteurs favorisent alors la prolifération des cellules tumorales qui elles aussi sécrètent directement le facteur RANKL. Le cercle vicieux est instauré et le microenvironnement tumoral osseux contrôle ainsi en grande partie la croissance de la tumeur et son devenir.

2. Epidémiologie

Les tumeurs osseuses représentent entre 6 et 10% des tumeurs de l'enfant et de l'adolescent, et on estime que, chaque annéeen France, le nombre de nouveaux cas de tumeurs osseuses s'élève à environ 5,5 par million d'habitants de moins de 15 ans. Deux principaux types peuvent être distingués, que sont les ostéosarcomes et les sarcomes d'Ewing, et qui constituent 90% de l'ensemble des tumeurs osseuses primitives malignes.

L'ostéosarcome, bien qu'étant rare, est la tumeur primitive osseuse la plus fréquente, avec uneprévalence de 4,8 par million d'enfants de moins de 15 ans. Son incidence est bimodale. Soixante pour cent des ostéosarcomes surviennent chez des enfants âgés de 10 à 20 ans. Chez les jeunes adultes,la fréquence de ces tumeurs est plus faible alors qu'elle augmente à nouveau pour une population située entre 60 et 80 ans.Les garçons sont 40% fois plus touchés que les filles.

Dans la première moitié du 20ème siècle, le traitement des ostéosarcomes consistait principalement en l'amputation du membre atteint ; le taux de survie à 5 ans était de moins de 20%, la plupart des malades mourant à cause des métastases pulmonaires. Depuis les années 1970, la survie à long terme des patients atteints d'ostéosarcome localisé a augmenté : elle a atteint environ 60% grâce à la

polychimiothérapie et à l'arrivée de nouvelles techniques chirurgicales, mais peu d'amélioration a été observée depuis. Aujourd'hui, la plupart des patients dont on diagnostique pour la première fois un ostéosarcome présente une pathologie localisée alors que les patients ayant des métastases représentent 15 à 20% des cas. Ceux-ci sont à très mauvais pronostic, et la survie à long terme de ces patients reste faible (environ 25-30%) étant donné que le traitement de ces cancers est resté inchangé depuis les 30 dernières années.

3. Traitements

De nos jours, la prise en charge la plus courante des ostéosarcomes consiste en une chimiothérapie néoadjuvante, mise en place avant l'exérèse chirurgicale de la tumeur, qui est alors suivie par une chimiothérapie adjuvante post chirurgicale.

La chimiothérapie néoadjuvante a pour but de diminuer la taille de la tumeur pour en faciliter la résection chirurgicale conservatrice, d'évaluer la réponse histologique de la tumeur à la chimiothérapie, et de prévenir l'apparition et la dissémination de métastases.

Aujourd'hui, la chirurgie évite l'amputation. Avant les années 1970, l'amputation était l'option thérapeutique standard et le taux de survie à 5 ans des patients ayant été traités par amputation seule était de 5-23%(Friedman et Carter, 1972; Patel *et al.*, 2002). Lors de l'exérèse chirurgicale, seule la tumeur ainsi que les tissus adjacents sont retirés. Néanmoins, dans certain cas, une amputation peut s'avérer nécessaire, notamment si la tumeur est infectée, si l'envahissement du tissu sain est trop important ou si l'envahissement nerveux est tel que l'on suspecte de graves séquelles fonctionnelles.

La chirurgie est suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Le bénéfice de la chimiothérapie a été validé par l'étude clinique randomisée MIOS (Multi-Institutional Osteosarcoma Study), conduite dans les années 1980, et lors de laquelle des patients atteints d'ostéosarcome localisé avaient reçu un traitement par chirurgie seule ou suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Les patients ayant reçu en plus de la chirurgie une chimiothérapie avaient alors présenté une amélioration significative de la survie à deux ans sans rechute (66%*vs* 17%)(Link *et al.*, 1986). Le traitement est administré en fonction de l'importance de la nécrose de la tumeur observée suite à la chimiothérapie néoadjuvante. Quatre degrés de nécrose sont alors distingués : degré I, pas de nécrose ; degré II, 50 à 95% ; degré III, plus de 95% mais moins de 100% et degré IV, 100% de nécrose (Rosen *et al.*, 1982). La détermination de ce degré de nécrose de la tumeur suite à la chimiothérapie néoadjuvante permet de déterminer a priori l'efficacité du traitement chimiothérapeutique qui sera administré et de sélectionner au mieux les agents de la chimiothérapie post-chirugicale. Les patients présentant une nécrose tumorale supérieure à 90% sont considérés comme bons répondeurs à la chimiothérapie, alors que ceux dont moins de 90% de la tumeur est nécrosée sont des mauvais répondeurs.

Historiquement, de nombreux agents chimiothérapeutiques ont été évalués lors d'études cliniques, ce qui a permis de sélectionner trois molécules qui constituent le traitement de base des ostéosarcomes ou MAP (Multi-Agent Chemotherapy). Régulièrement évalué depuis les années 1990, il consiste en l'association du méthotréxate avec la doxorubicine et le cisplatine, avec l'addition possible d'ifosfamide et d'étoposide ou encore de cyclophosphamide ou de carboplatine (Figure II-33).

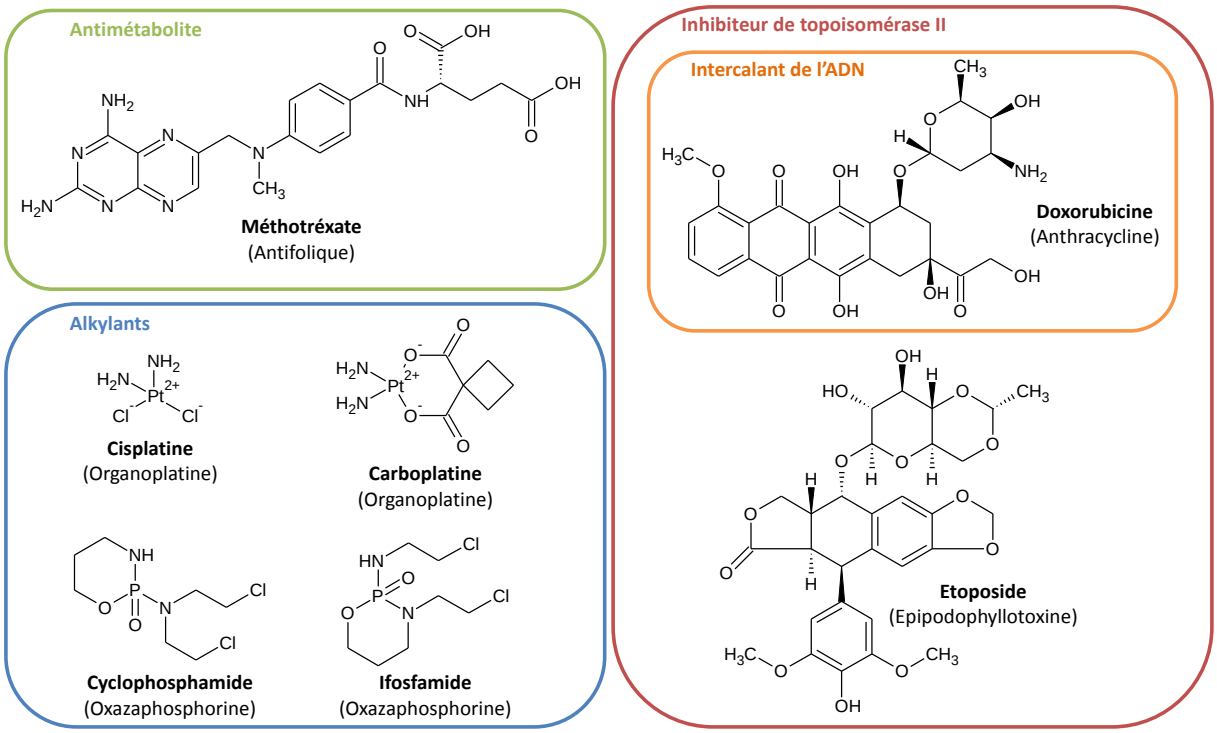


Figure II-33 : Structure et classe pharmacologique des molécules utilisées en chimiothérapiepour le traitement des ostéosarcomes (la classe chimique du composé apparait entre parenthèses)

Le **méthotrexate** est un analogue de l'acide folique. C'est l'antimétabolite le plus utilisé en chimiothérapie anticancéreuse. Il est utilisé pour le traitement des ostéosarcomes depuis le début des années 1970 (Jaffe *et al.*, 1974). Sa cible intracellulaire est l'enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) responsable de la conversion du dihydrofolate en tetrahydrofolate. Le méthotrexate en inhibant cette enzyme, inhibe la biosynthèse des acides nucléiques.

La **doxorubicine** est également utilisée pour le traitement des ostéosarcomes depuis les années 1970 (Cortes *et al.*, 1972). Cette molécule appartenant à la famille des anthracyclines est notamment produite par des bactéries du genre *Streptomyces*. La doxorubicine est non seulement un agent intercalant de l'ADNmais des études ont montré que son activité principale est due à son interaction avec l'ADN topoisomérase-II, par stabilisationdu complexe topoisomérase-II/ADN, produisant la rupture de la chaîne d'ADN et empêchant donc sa réplication.

Le **cisplatine** est un complexe à base de platine. Son mécanisme d'action implique directement sa liaison à l'ADN inhibant ainsi la réplication. Cet agent alkylant a été introduit à la fin des années 1970.

Plusieurs autres agents thérapeutiques utilisés en traitement combiné sont considérés comme efficaces pour le traitement des ostéosarcomes : l'ifosfamide (oxazaphosphorine), le cyclophosphamide (oxazaphosphorine), le carboplatine (organoplatine) et l'étoposide (epipodophyllotoxine). Parmi ces composés de synthèse ou d'hémisynthèse, les trois premiers sont des alkylants de l'ADN tandis que l'étoposide est un inhibiteur de l'ADN topoisomérase-II.

Cependant, malgré les essais de protocoles utilisant des combinaisons de traitements MAP durant ces vingt dernières années, peu d'amélioration de la survie à long terme des patients a été observée

(Smith*et al.*, 2010). Pour les patients atteints d'ostéosarcome non métastatique, elle est aujourd'hui d'environ 65%(Meyers *et al.*, 2008) et n'atteint seulement que 30 à 35% pour les patients pour lesquels des métastases ont été détectées (Chou *et al.*, 2009). De plus, les agents chimiothérapeutiques employés induisent des effets secondaires significatifs, et on observe fréquemment des phénotypes résistants à la chimiothérapie. De nouveaux agents anticancéreux et une approche thérapeutique innovante sont donc nécessaires pour améliorer l'efficacité des traitements contre les ostéosarcomes.

4. Thérapies émergentes et nouvelles cibles thérapeutiques

Afin de développer de nouvelles thérapies, toutes les anormalités moléculaires engendrées par un ostéosarcome doivent être étudiées permettant ainsi de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles. La Figure II-34 recense les mécanismes biologiques et moléculaires ciblés par les médicaments en cours de développements précliniques et cliniques pour le traitement des ostéosarcomes.

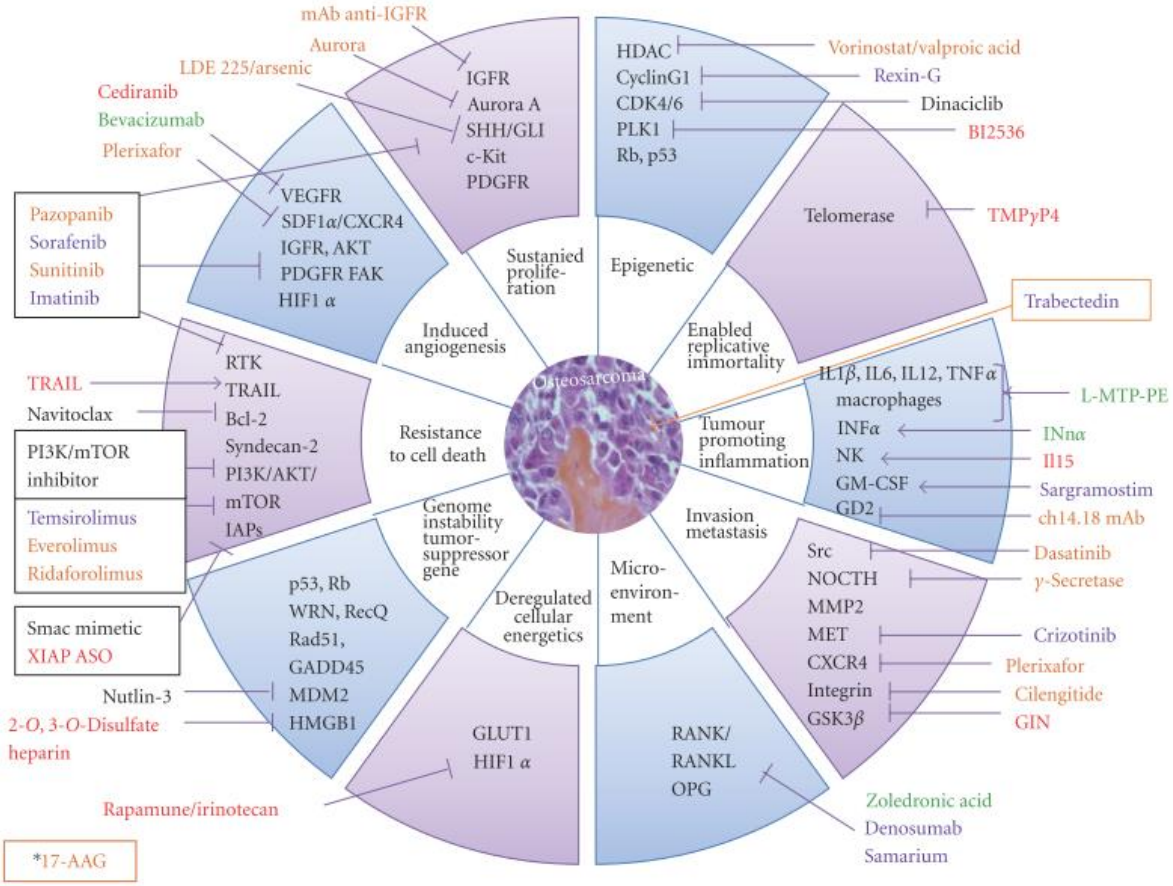


Figure II-34 : Cibles et thérapies en essais précliniques et cliniques pour le traitement des ostéosarcomes de l'enfant et de l'adolescent
Les différentes couleurs décrivent le stade de développement clinique des médicaments : **Rouge** : préclinique (ostéosarcome et sarcome d'Ewing), **orange** : phase I (toutes les études pédiatriques), **bleu** ; phase II (ostéosarcome, sarcome d'Ewing et autres tumeurs osseuses), **vert** : phase III (ostéosarcome et sarcome d'Ewing), **noir** : phase I ou II (tumeurs solides de l'adulte) (Gaspar *et al.*, 2012)

Quelques exemples prometteurs d'agents chimiothérapeutiques en cours d'étude sont présentés ci-dessous.

4.1. Immunomodulateurs

4.1.1. Le muramyl tripeptide-phosphatidyl-éthanolamine (MTP-PE)

Le MTP-PE, ou muramyl tripeptide-phosphatidyl-éthanolamine (Figure II-35),est un analogue de synthèse du muramyl dipeptide (MDP) qui est un composant de la paroi cellulaire de bactéries à Gram positif et négatif. L'administration de MTP-PE simule une infection bactérienne et active les monocytes et les macrophages qui sécrètent alors des cytotokines et des facteurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β …) et s'attaquent aux cellules cancéreuses. Une étude clinique de phase II conduite chez des patients en rechute d'ostéosarcome, a démontré qu'un traitement par le MTP-PE administré pendant 24 semaines permettait de retarder la rechute à 9 mois (alors que d'après la littérature la rechute apparaissait en moyenne après 4,5 moissans traitement) (Kleinerman *et al.*, 1995). Une étude clinique multi-institutionnelle de phase III, conduite sur des patients nouvellement diagnostiqués comme atteints d'ostéosarcome, a permis de comparer les traitements additionnant le MTP-PE et/ou l'ifosfamide et le traitement chimiothérapeutique standard MAP (méthotréxate, doxorubicine et cisplatine)(Meyers *et al.*, 2008). Les premiers résultats ont montré que l'ajout de MTP-PE au traitement permettait d'augmenter la survie à six ans de 70 à 78%. Grâce à ce même traitement, la survie des patients présentant des métastases passe de 40 à 53%(Chou *et al.*, 2009).

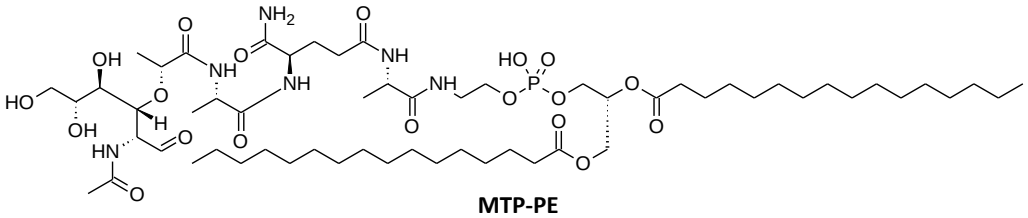


Figure II-35 : Structure du MTP-PE

Ces études cliniques ont mené à la mise sur le marché en Europe depuis mars 2009 du médicament MEPACT® commercialisé par la société Takeda™. Ce médicament est indiqué chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes dans le traitement de l'ostéosarcome non métastatique de haut grade résécable après une exérèse chirurgicale macroscopiquement complète. Ce nouveau médicament constitue le premier nouveau traitement en 20 ans qui permet d'améliorer la survie des patients atteints d'ostéosarcome.

4.1.2. Les interférons

Les interféronssont également étudiés pour leur rôle immunomodulateur et évalués pour le traitement des ostéosarcomes. Ce sont des glycoprotéines et plus particulièrement des cytokines. L'interféron α-2b inhibe la croissance *in vitro* des cellules d'ostéosarcomes et le développement tumoral *in vivo* sur des modèles animaux (Strander et Einhorn, 1977). Suite à une étude clinique pilote avec des patients atteints d'ostéosarcome non métastatique traités avec l'interféron α pendant 3-5 ans, les auteurs indiquent que 63% des patients n'ont pas présenté de rechute jusqu'à 5 ans plus tard(Strander *et al.*, 1995). L'interféron α a été évalué récemment lors de l'étude multi-institutionnellle Euramos I (EURopean and AMerican Osteosarcoma Study groupCOG-AOST0331) regroupant le Children's

Oncology group (COG) et différents groupes européens, mais dont les résultats n'ont pas encore été publiés. Suite à la réponse des patients au traitement préopératoire,la chimiothérapie MAP a été poursuivie en postopératoire avec ou non de l'interféron α -2b pegylé ou de l'etoposide/ifosfamide.

4.2. Inhibiteurs de la résorption osseuse : les biphosphonates

Les biphosphonates sont des analogues synthétiques stables du pyrophosphate endogène (PPi) auquel on greffe au carbone central des chaînes variées. Puissants inhibiteurs de la résorption osseuse, ils ont notamment été évalués lors d'essais cliniques pour le traitement des métastases osseuses. Différents types de biphosphonates ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* dans de multiples modèles d'ostéosarcome (Figure II-36). Sur des lignées cellulaires d'ostéosarcome, l'alendronate, le midronate, l'incadronate, le risedronate et le zolédronate inhibent la croissance cellulaire (Cheng *et al.*, 2004; Kubista *et al.*, 2006; Kubo *et al.*, 2006; Murayama *et al.*, 2008). *In vivo*, le zolédronate inhibe la croissance de la tumeur primaire, diminue l'ostéolyse et réduit la formation de métastases pulmonaires dans le cas de modèles d'ostéosarcomes induits par les cellules SaOS2 ou POS-1 chez la souris (Ory *et al.*, 2005; Dass et Choong, 2007).

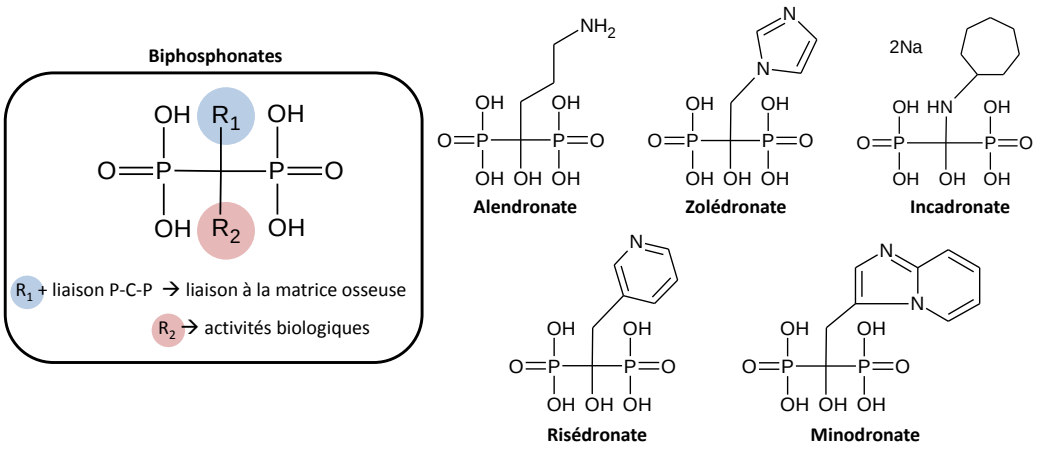


Figure II-36 : Structure des biphosphonates : exemple de l'alendronate et du zolédronate

4.3. Inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases

Dans le cas d'ostéosarcomes, des quantités anormales de récepteurs transmembranaires à la surface des cellules sont à noter. Ces récepteurs incluent les facteurs VEGF (vascular endothelial growth facteur), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF (insulin-like growth factor), HER2 (human epidermal growth factor)… Ceux-ci partagent la caractéristique d'être des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, activité jouant un rôle clé dans différentes cascades signalétiques impliquées dans l'oncogenèse.

Dans la famille des récepteurs VEGF, il a notamment été démontré que le facteur VEGF-3 était surexprimé dans les cellules d'ostéosarcome. Les inhibiteurs des récepteurs VEGF étudiés dans le traitement des ostéosarcomes ciblent l'inhibition de l'activité tyrosine kinase. Ainsi, différents inhibiteurs des tyrosine-kinases ont été évalués : le sorafenib, le sunitinib, le cediranib et le pazopanib.

Le PPTP, Pediatric Preclinical Testing Program, impliquant plusieurs institutions a évalué ces agents qui ont démontré leur activité inhibitrice de la croissance dans des modèles d'ostéosarcome. Lors d'une étude clinique de phase II, le sorafenib a alors été administré à des patients en rechute ou avec un ostéosarcome non résécable et après l'échec du traitement standard par polychimiothérapie. Les résultats ont montré une amélioration à 4 mois de la survie des patients sans dégradation de leur état de santé (PFS, progression free survival) avec 14% de bon-répondeurs, 49% si l'on inclut les patients dont la maladie est stable (Grignani *et al.*, 2012).

Contrairement aux résultats sur les inhibiteurs des VEGF, les résultats sur les inhibiteurs des récepteurs PDGFR et HER2 sont moins prometteurs et plus controversés. En effet, lors d'une étude clinique de phase II, l'imatinib, inhibiteur de PDGF-A, a été évalué chez des enfants présentant une rechute ou une tumeur solide réfractaire et parmi les 10 patients atteints d'ostéosarcome, aucune réponse au traitement par l'imatinib n'a été observée. De même, les résultats récents d'une autre étude clinique de phase II n'ont démontré aucune différence statistique concernant la survenue de complications et la survie globale entre des patients surexprimant HER2 traités par le trastuzumab (inhibiteur de HER2) et des patients ne surexprimant pas ce récepteur et traités par une chimiothérapie cytotoxique seule (Ebb *et al.*, 2012).

Parmi les récepteurs aux IGF, deux sous-types sont connus : IGF-1R et IGF-2R. Dans le cas d'ostéosarcome, l'expression des IGF-2R est importante (Hassan *et al.*, 2012) tandis que celle des IGF-1R est plus variable mais la surexpression de ce facteur semble être corrélée à la présence de métastases (Wang *et al.*, 2012b). Les inhibiteurs de ce récepteur ont donc été évalués pour le traitement des ostéosarcomes. Par exemple, le composé SCH 717454, un anticorps des récepteurs IGF-1 qui a démontré son activité lors d'études précliniques, a fait l'objet d'une étude clinique de phase II notamment chez des patients en rechute d'un ostéosarcome. Les résultats préliminaires ont montré la stabilisation de la maladie chez certains patients (Anderson *et al.*, 2008).

5. Conclusion

Malgré sa faible incidence, l'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez l'enfant et l'adolescent. Avec les avancées chirurgicales et chimiothérapeutiques des années 1970, le taux de survie des patients atteints d'ostéosarcome non métastatique a grandement été amélioré avant de se stabiliser il y a déjà plus de vingt ans. De nouveaux agents chimiothérapeutiques et des thérapies innovantes sont néanmoins en cours d'étude, soutenus par la connaissance grandissante des mécanismes impliqués dans le développement de ce type de cancer. Ces recherches sont aujourd'hui en cours d'aboutissement par le développement clinique de traitements prometteurs.

La découverte de nouvelles cibles moléculaires permet également d'envisager des thérapies alternatives. La MetAP2 comme nous l'avons vu précédemment joue un rôle dans la prolifération des cellules tumorales mais aussi endothéliales faisant de cette enzyme une cible d'intérêt pour la recherche de nouveaux anticancéreux. A notre connaissance, cette piste n'a pas encore été étudiée pour le développement de molécules contre les tumeurs osseuses primitives.

C'est dans ce contexte que s'est positionnée notre étude de recherche de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des ostéosarcomes.

CHAPITRE III.
La ligérine et ses analogues hémisynthétiques

La ligérine est un sesquiterpène chloré dérivé du fumagillol qui fut isolée de cultures d'une souche marine de *Penicillium*sp..Les premiers travaux réalisés sur son activité biologique avaient montré qu'elle possédaitune activité cytostatiquesélectivedes lignées cellulaires d'ostéosarcomes(Vansteelandt, 2011).La CI_{50} observée sur lignée murine d'ostéosarcome POS-1 était de 117 nM, alors qu'un maximum de 40% d'inhibition de la prolifération cellulaire était obtenu pour une concentration maximale testée de 2,3 µM sur la lignée fibroblastique saine L929. Cette découverte avait mené à une demande de dépôt d'un brevet engageantconjointement l'université de Nantes et la société Atlantic Bone Screen®(Egorov *et al.*, 2012).

La ligérine est le premier analogue de la fumagilline testé pour une activité anti-ostéosarcome. Une étude approfondie de son activité biologique permettra l'évaluation de son potentiel pharmacologique. Une série d'analogues de la ligérine a été synthétisée et évaluée afin :

1- de trouver un dérivé hémisynthétique qui présenterait une activité et/ou une sélectivité améliorée (en effet, malgré une sélectivité importante pour les lignées d'ostéosarcomes, la ligérine présente une certaine cytotoxicité sur la lignée saine L929),

2- d'étudier les relations structure-activité de cette molécule. Pour cela, les deux positions représentant des originalités structurales par rapport aux composés décrits dans la littérature (chlore en C7 et ester succinique en C6), ont été modulées.

Enfin, les activités biologiques de la ligérine ont été comparées *in vitro* avec une des molécules lead, le TNP-470. Ce dernier a également servi de référence pour les essais réalisés *in vivo* sur un modèle de tumeur osseuse chez la souris.

1. Hémisynthèse de la ligérine et d'analogues structuraux

1.1. Hémisynthèse de la ligérine

Pour l'ensemble de ces travaux (*in vitro* et *in vivo*), les quantités de produit requises étaient importantes, de l'ordre de plusieurs centaines de milligrammes. Etant donné les faibles quantités de ligérine qui pouvaient être obtenues à partir de cultures de la souche MMS351, la synthèse de cette molécule s'est révélée nécessaire. Une méthoded'hémisynthèse avait déjà pu être testée lors de la thèse de M. Vansteelandt, mais sans optimisation(Vansteelandt, 2011). Elle comportait 4 étapes dont la première consistait en l'obtention dela molécule de départ, à savoir la **fumagilline** (Figure II-37). Celle -ci est disponible commercialement à coût raisonnable sous la forme d'une spécialité vétérinaireutilisée dans le traitement de parasitoses des abeilles, le Fumidil B® (distribué par la société Ceva Santé Animale, Libourne, France), composée de sels de dicyclohexylamine fumagillineà 2%. La purification de la fumagilline était tout d'abord réalisée par chromatographie liquide basse pression

sur gel de silice (élution par CH_2Cl_2 puis CH_2Cl_2/MeOH 10 :1 (v/v)). Après cette purification, une deuxième étape d'hydrolyse alcaline de la fumagilline en fumagillol (2) était nécessaire afin d'ôter la chaîne acide en position 6 de la fumagilline. Les deux dernières étapes consistaient en l'hémisynthèse à proprement parler : esterification en C6 puis halogenation en C7.

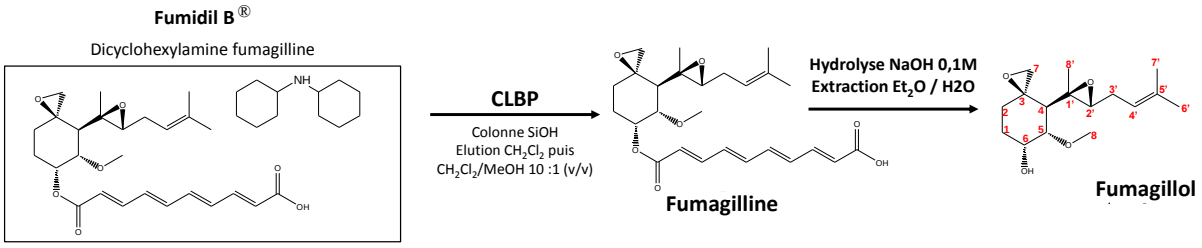


Figure II-37 : Protocole d'obtention du fumagillol à partir de la spécialité Fumidil B®
(d'après Vansteelandt, 2011)

Afin de réduire le nombre d'étapes et de simplifier les méthodes de purification des intermédiaires, pour *in fine* augmenter les rendements de ce protocole, il a été nécessaire de l'améliorerétape par étape.

a) Etape 1 : obtention du fumagillol par hydrolyse alcaline de la fumagilline présente dans le Fumidil B®

La première optimisation a consisté en l'amélioration du rendement et de l'efficacité de l'obtention du fumagillol. Les deux étapes de purification de la fumagilline présente dans le Fumidil B® et d'hydrolyse de la fumagilline en fumagillol ont pu être fusionnées en une seule manipulation. En effet, il s'est avéré qu'il n'était pas nécessaire de purifier la fumagilline avant hydrolyse en fumagillol : cela peut s'effectuer directement à partir du Fumidil B® à condition que le milieu réactionnel soit suffisamment alcalin (solution de NaOH 0,5 M pendant 18 h). L'élimination des impuretés majoritaires de la spécialité de départ (dicyclohexylamine) est alors réalisée après réaction grâce à un partage liquide/liquide : de l'acide citrique (5%) est ajouté au mélange réactionnel avant de l'extraire par l'éther diéthylique, ce qui diminue la solubilité de la dicyclohexylamine dans le solvant organique (Arico-Muendel *et al.*, 2009b) et permet d'obtenir le **fumagillol** (Figure II-38).

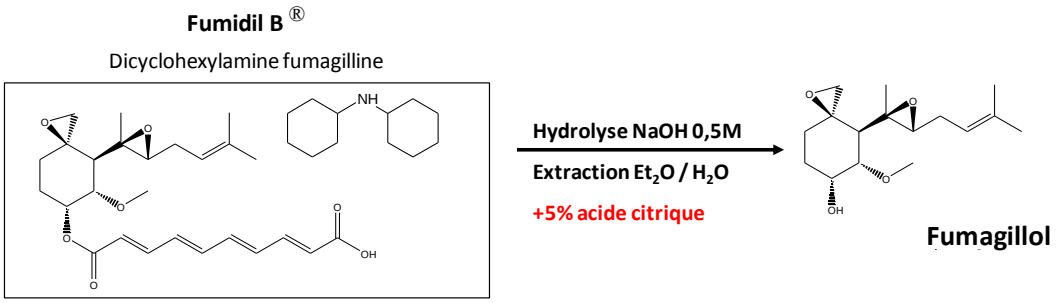


Figure II-38 : Protocole après optimisation d'obtention du fumagillol à partir de la spécialité Fumidil B®

b) Etape 2 : obtentiondu 6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol par estérification de l'alcool secondaire du fumagillol

La suite de la synthèse a consisté en l'estérification de l'alcool secondaire du fumagillol pour obtenir le 6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillolque nous appelerons ici **6-O-succinyl-fumagillol**, du fait de l'utilisation de l'anhydride succinique pour cette étape. La synthèse s'effectue par réaction entre le fumagillol et l'anhydride succinique en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) et de pyridine anhydre (sous agitation à température ambiantependant 24h). La purification du produit final a été optimisée pour enrayer les problèmes de purification par colonne de silice et augmenter les rendements : elle a consisté en trois extractions liquide/liquide successives par changement de pH, permettant d'atteindre un rendement de 66% et une meilleure pureté du produit final que dans le protocole initial.

c) Etape 3 : halogénation en C7du 6-O-succinyl-fumagillol : ligérine

La dernière étape a consisté à ouvrir le spiro-époxyde en position 3 afin d'ajouter un chlore en C7 du 6-O-succinyl-fumagillol. Ceci a été réalisé par action duchlorure de lithium (LiCl), en milieu acide acétique dans letétrahydrofurane (THF). La purification a été améliorée grâce à la mise au point d'un protocole de chromatographie liquide réalisée par chromatographie flash(Puriflash 430evo Interchim, colonne Interchim Si-OH 4g 15 µm), sur colonne de silice avec une élution par un gradient de polarité croissante allant du CH_2CL_2 pur au mélange CH_2CL_2/MeOH 10:1 (v/v), et permettant l'obtention de la **ligérine** avec un rendement de 67%.

d) Protocole final - Conclusion

Ainsi, après optimisation du protocole d'hémisynthèse,l'obtention de la ligérine à partir de la fumagilline a été réalisée avec un rendement global de 46% (Figure II-39). Les données structurales de la ligérine (spectres ^{1}H et ^{13}C) sont présentées en Annexe IX. L'étude cristallographique par diffraction aux rayons X de la ligérine d'hémisynthèse a permis de montrer que le protocole permettait de conserver la stéréochimie 1S,2S,3R,6R,13R,14R de la ligérine naturelle, partagée par tous les autres dérivés naturels. Lors de ces travaux, les deux composés intermédiaires fumagillol et 6-O-succinyl-fumagillol ont également été conservés afin de les inclure dans les études de relations structure-activité (p80). Enfin, l'étape d'halogénation a également été réalisée sur le fumagillol, permettant d'obtenir le **7-chloro-fumagillol** (données structurales en Annexe X, XI etXII).

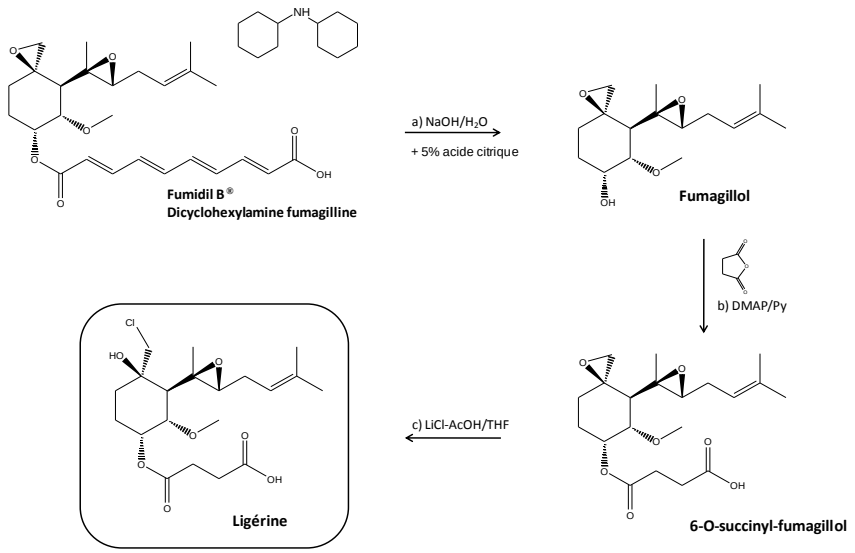


Figure II-39: Protocole d'hémisynthèse de la ligérine à partir de la fumagilline

✓ **<u>Protocole d'hémisynthèse de la ligérine à partir du Fumidil B® *</u>**

a) Obtention du fumagillol par hydrolyse alcaline de la fumagilline présente dans le Fumidil B®

Le Fumidil B® (50g) a été mis en solution dans 1L de NaOH 0,5 N sous agitation à température ambiante pendant 18 h. De l'acide citrique (5% v/v) a été ajouté au mélange réactionnel avant d'extraire la solution par de l'éther diéthylique à trois reprises. La phase organique récupérée a ensuite été séchée par du Na_2SO_4 anh.puis concentrée sous vide. Le fumagillol a été obtenu sous la forme d'une huile jaune (609 mg, rendement = 90%).

b) Obtention du 6-O-succinyl-fumagillol par estérification de l'alcool secondaire du fumagillol

Le fumagillol (600 mg, 2,12 mmol, 1 eq), a été mis en contact avec de la dimethylaminopyridine (DMAP, 330 mg, 2,75 mmol, 1,30 eq) et de l'anhydride succinique (827 mg, 8,28 mmol, 3,9 eq) dans 4mL de pyridine anhydre, pendant 24h et sous agitation à température ambiante. Le mélange réactionnel a été concentré à l'évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu a ensuite été repris avec de l'AcOEt puis lavé à l'eau. La phase organique a été extraite avec une solution saturée de $NaHCO_3$: la phase $NaHCO_3$ a ensuite été acidifiée jusqu'à pH4 avec du NaH_2PO_4. Le mélange a ensuite été extrait avec de l'AcOEt avant d'être séché par du Na_2SO_4anh puis concentré sous vide. Afin d'ôter les traces de solvants résiduels, une coévaporation avec du toluène a été effectuée à plusieurs reprises à l'évaporateur rotatif (40°C). Le 6-O-succinyl-fumagillol a ainsi été obtenu sous forme d'une huile jaune (6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol,620 mg, rendement = 76%).

c) Halogénation en C7du 6-O-succinyl-fumagillol : ligérine

Le 6-O-succinyl-fumagilllol (600 mg, 1,56 mmol, 1 eq) a alors été mis en contact avec du LiCl (285 mg, 6,80 mmol, 4,35 eq) dans 4,8 mL de THF, en présenced'acide acétique (450 µL, 8,1 mmol, 5,2 eq) à 0°C. Le mélange réactionnel a été réchauffé progressivement jusqu'à température ambiante, puis mis sous agitation pendant 24 h. Le mélange a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (élution par le CH_2Cl_2 puis par un mélange CH_2Cl_2/MeOH 10 :1 (v/v)). La ligérine a été obtenue sous la forme d'une huile incolore(7-chloro-6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol, 401 mg, rendement = 67%).

* l'ensemble des réactifs utilisés proviennent de la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et les solvants de Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France).

1.2. Hémisynthèse d'analogues structuraux de la ligérine

1.2.1. Schémas réactionnels

Quatre analogues structuraux ont été synthétisés afin d'évaluer l'impact sur l'activité antiproliférative de l'allongement, l'introduction d'un cycle ou d'un hétéroatome dans la chaîne acide en C6 ou encore de la substitution du chlore en C7 par un brome.

Les hémisynthèses ont suivi le même schéma réactionnel que celui utilisé pour la synthèse de la ligérine. Ainsi, la première étape consistait en l'hydrolyse alcaline de la fumagilline contenu dans la spécialité Fumidil B® menant ainsi à l'obtention directe du fumagillol. Pour les étapes d'estérification en C6 (étape b) et d'halogénation en C7 (étape c), les conditions expérimentales étaient identiques à celles décrites ci-dessus pour la ligérine, à l'exception de l'anhydride et du sel d'halogénure utilisésqui différaient d'un composé à un autre. Ainsi, quatre produits ont été synthétisés et nommés S1 à S4 :

- **S1** :le **7-chloro-6-O-glutaryl-fumagillol**(7-chloro-6-(4-carboxy-1-oxobutoxy)-fumagillol),

- **S2** : le **7-chloro-6-O-diglycolyl-fumagillol**(7-chloro-6-[[2-carboxymethoxy)acétyl]oxy]-fumagillol),

-**S3** : le **7-chloro-6-O-phtalyl-fumagillol**(7-chloro-6-[(2-carboxybenzoyl)oxy]-fumagillol) et,

- **S4** : le **7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol**(7-bromo-6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol).

Leurstructure ainsi que les réactifs utilisés pour leur synthèse sont présentés dans laFigure II-40.

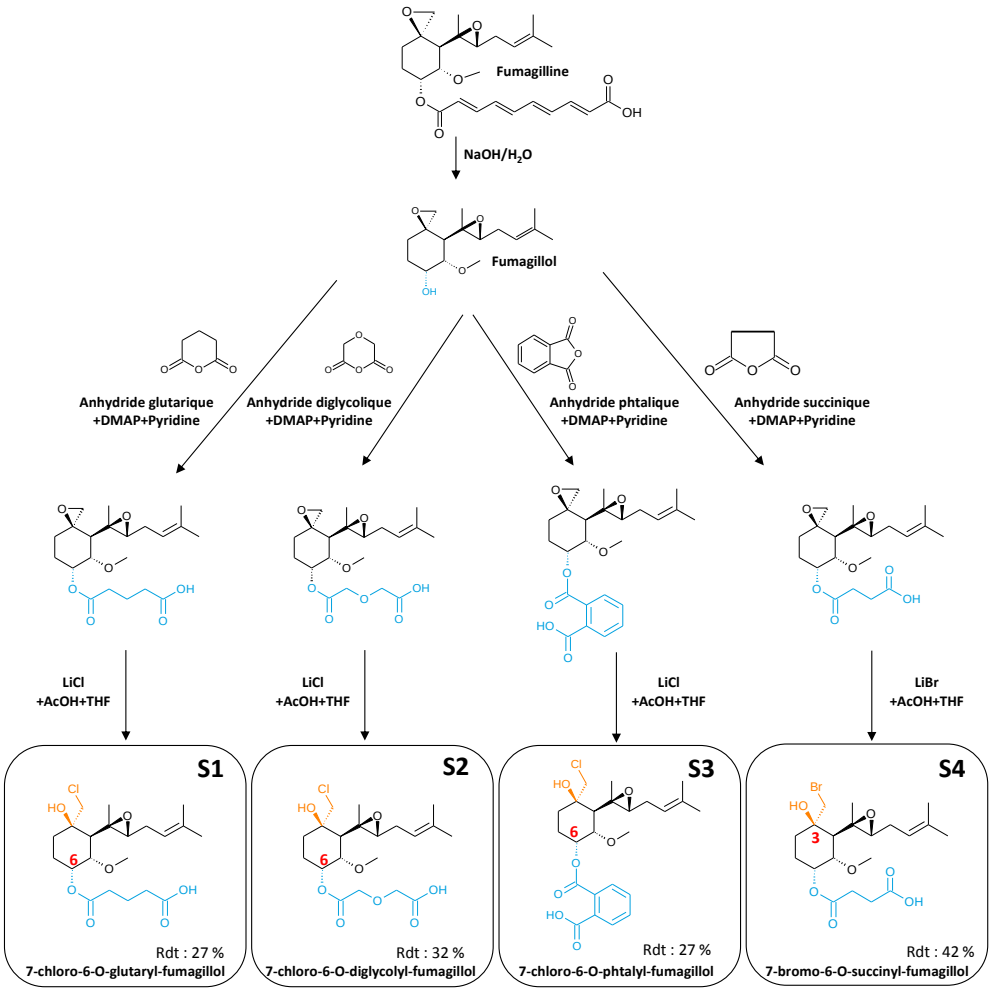


Figure II-40: Schéma réactionnel del'hémisynthèse d'analogues structuraux de la ligérine à partir de la fumagilline

1.2.2. Analyse structurale des composés synthétisés

Les composés synthétisés ont fait l'objet d'analyses HRMS/MS et RMN 1D afin d'en valider la structure (interprétation des spectres et comparaison avec les données de la ligérine et de la littérature) et la pureté. Les données structurales sont détaillées dans les Annexes XV, XVI, XVII et XVIII. Ici aussi, la stéréochimie a été conservée, identique aux produits naturels.

A titre d'exemple, les résultats de RMN obtenus pour le composé S4 (7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol) solubilisé dans le $CDCl_3$ sont présentés dans les figures II-41 et II-42.

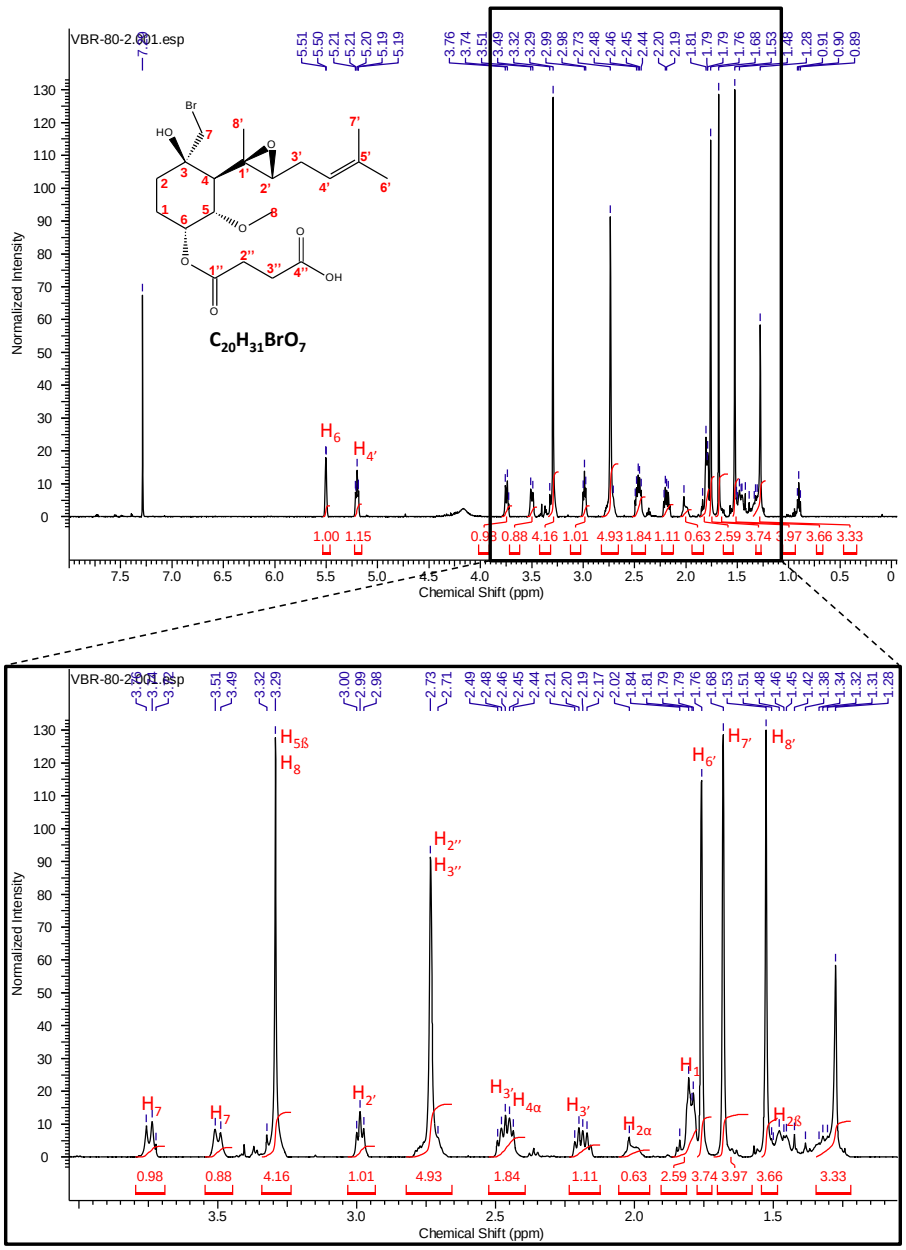


Figure II-41 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CDCl3) du composé S4

Le spectre du ^{1}H (Figure II-41), a révélé la présence de 30 protons (qui avec le proton acide de la chaîne en C6 nous donne un total de 31 protons) et a permis au passage de valider la pureté du produit. Ainsi, on observe :

- un hydroxyle à un δ H de 4,15 ppm
- trois groupements méthyles, dont les protons résonnent à des δ H de 1,51 ppm, 1,68 ppm et 1,76 ppm sous forme de singulets,
- deux protons éthyléniques à δ H=5,20 ppm (triplet, J=7,3 Hz) et δ H=5,51 ppm (singulet),
- quatre protons méthyléniques équivalents à δ H=2,74 ppm.
- sept protons qui présentent des déplacements chimiques suggérant leur proximité avec un hétéroatome : δ H de 2,99 ppm, 3,29 ppm, 3,29 ppm, 3,50 ppm et 3,75 ppm

-et sept autres protons avec des déplacements chimiques de 1,48 ppm, 1,81 ppm (2H), 1,99 ppm, 2,19 ppm et 2,48 ppm (2H).

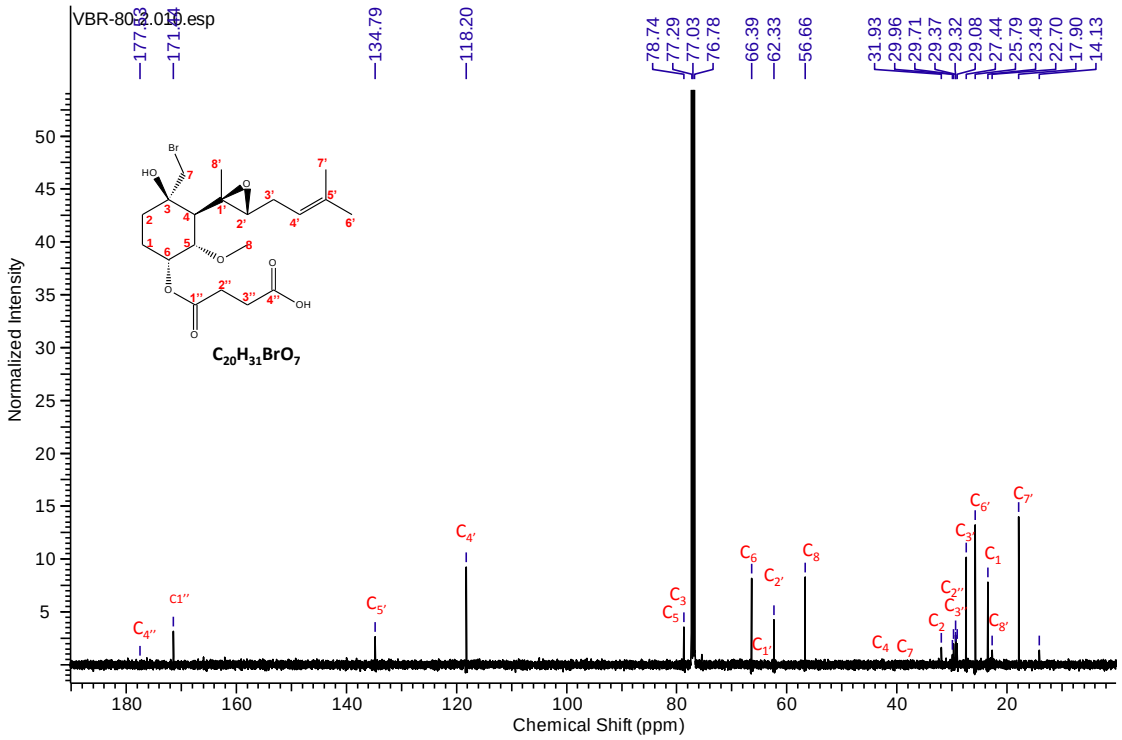


Figure II-42 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé S4

L'analyse du spectre ^{13}C (Figure II-42) concorde avec la présence du composé S4 puisque l'on observe bien :

- quatre carbones méthyliques à des δ C de 17,6 ppm, 22,0 ppm, 25,5 ppm et 56,7 ppm, ce dernier caractéristique d'un méthoxyle,
- six carbones méthyléniques à des δ C de 23,3 ppm, 27,0 ppm, 28,8 ppm(deux carbones), 29,9 ppm et 39,9 ppm,
- cinq carbones méthines dont 1 hybridé sp2 à un δ C de 118,2 ppm et 4 hybridés sp3 à 43,7 ppm, 62,3 ppm, 66,1 ppm et 78,7 ppm,
- cinq carbones quaternaires dont 2 carbonyles de fonction ester ou acide à des δ C de 171,4 ppm et 177,5 ppm, 1 éthylénique à 135,4 ppm et 2 autres carbones quaternaires à des déplacements de 76,7 ppm et 64,0 ppm.

1.3. Hémisynthèse du TNP-470 et du 7-chloro-TNP-470

1.3.1. Hémisynthèse du TNP-470

Afin de comparer l'activité *in vitro* et *in vivo* de la ligérine avec celle du **TNP-470**, des quantités importantes de ce produit étaient nécessaires. Ce composé n'étant pas disponible dans le commerce, son hémisynthèse a été réalisée en suivant les données de la littérature, par estérification de l'alcool en C6 du fumagillol par le chloroacétyl-isocyanate (Figure II-43) (Marui *et al.*, 1992).

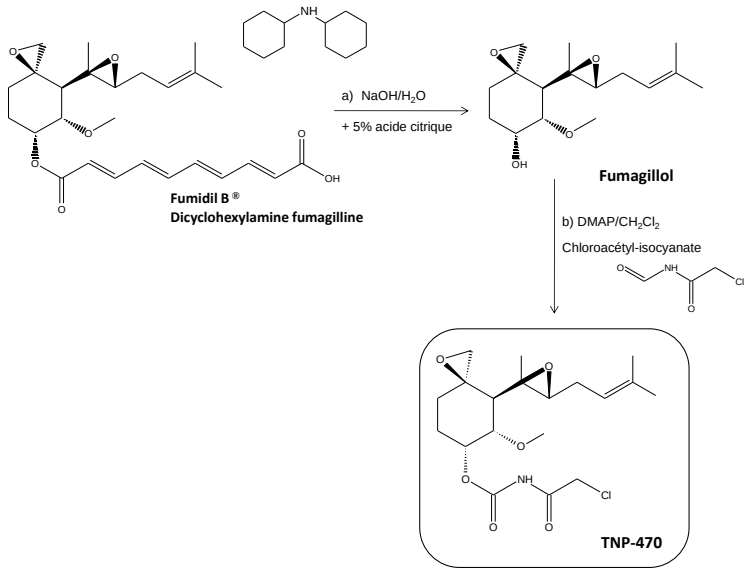


Figure II-43: Protocole d'hémisynthèse du TNP-470 à partir de la fumagilline

✓ **<u>Protocole d'hémisynthèse du TNP-470 à partir du fumagillol</u>**

Le fumagillol (569 mg, 2,014 mmol, 1 eq) a été mis en contact avec du chloroacétyl-isocyanate (509 µL, 714 mg, 6 mmol, 3 eq) en présence de DMAP(239 mg, 1,95 mmol, 0,97 eq) dans 14mL de dichlorométhane pendant 4h et sous agitation à 0°C. Le mélange réactionnel a ensuite été lavé à l'eau puis avec une solution saturée en NaCl. Après trois lavages, la phase organique a été récupérée et concentrée à l'évaporateur rotatif à 40°C. Le mélange a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (injection liquide du mélange repris par 3mL d'hexane/CH_2Cl_2 (70:30 (v/v)), élution par l'hexane 100% puis par un gradienthexane/AcOEt jusqu'à AcOEt100%). Deux fractions contenant le TNP-470 ont été récupérées : une fraction TNP-470 pur (277mg, pureté vérifiée par RMN), la deuxième contenant le TNP-470 à 70% (229mg). Cette seconde fraction a été purifiéeà nouveau par chromatographie flash sur gel de silice avec un gradient Hexane/AcOEt 80 :20 à 50/50 (v/v). 165 mg de TNP-470 ont ainsi été obtenu, accompagnés de 68 mg d'un co-produitnon identifié.Après regroupement des deux lots, 394 mg de TNP-470 ont été obtenus sous la forme d'une huile incolore (6-O-chloroacétylcarbamoylfumagillol, rendement = 49%). Les spectres ^{1}H et ^{13}C sont présentés en Annexe XIII.

1.3.2. <u>Hémisynthèse du 7-chloro-TNP-470</u>

L'hémisynthèse du **7-chloro-TNP-470** a été effectuée par halogénation en C7 du TNP-470, de façon identique à l'obtention des halogénohydrines décrites précédemment (p68). A partir de 24 mg de TNP-470, 13 mg de son dérivé chloré ont été obtenus (rendement = 51%). Les spectres ^{1}H et ^{13}C sont présentés en Annexe XIV.

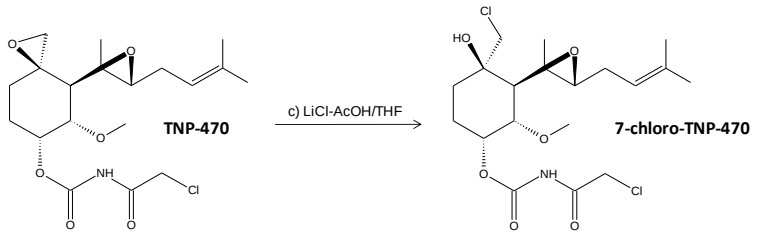


Figure II-44: Protocole d'hémisynthèse du 7-chloro-TNP-470 à partir du TNP-470

2. Evaluation pharmacologique de la ligérine et de ses analogues hémisynthétiques pour le traitement des ostéosarcomes

2.1. Evaluation de l'activité antiproliférative *in vitro*sur modèles d'ostéosarcomes

2.1.1. Lignées cellulaires

L'activité cytotoxique ou antiproliférative des différents composés a été évaluée sur une à six lignées cellulaires : quatre lignées tumoralespour en évaluer le potentiel anticancéreux et deux lignées saines afin d'en déterminer la sélectivité et la toxicité.Le Tableau II-9 présente la morphologie de ces six lignées cellulaires *in vitro* (Gx400).Les tests utilisés afin d'évaluer l'activité cytotoxique ou antiproliférative des composés synthétisés ont été basés sur la mesure spectrophotométrique de l'activité enzymatique mitochondriale des cellules vivantes grâce au réactif XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide). Le protocole complet est présenté dans l'Annexe II.

2.1.1.1. Lignées cellulaires tumorales

Parmi les lignées d'ostéosarcomes, deux étaient d'origine murine, et deux d'origine humaine :

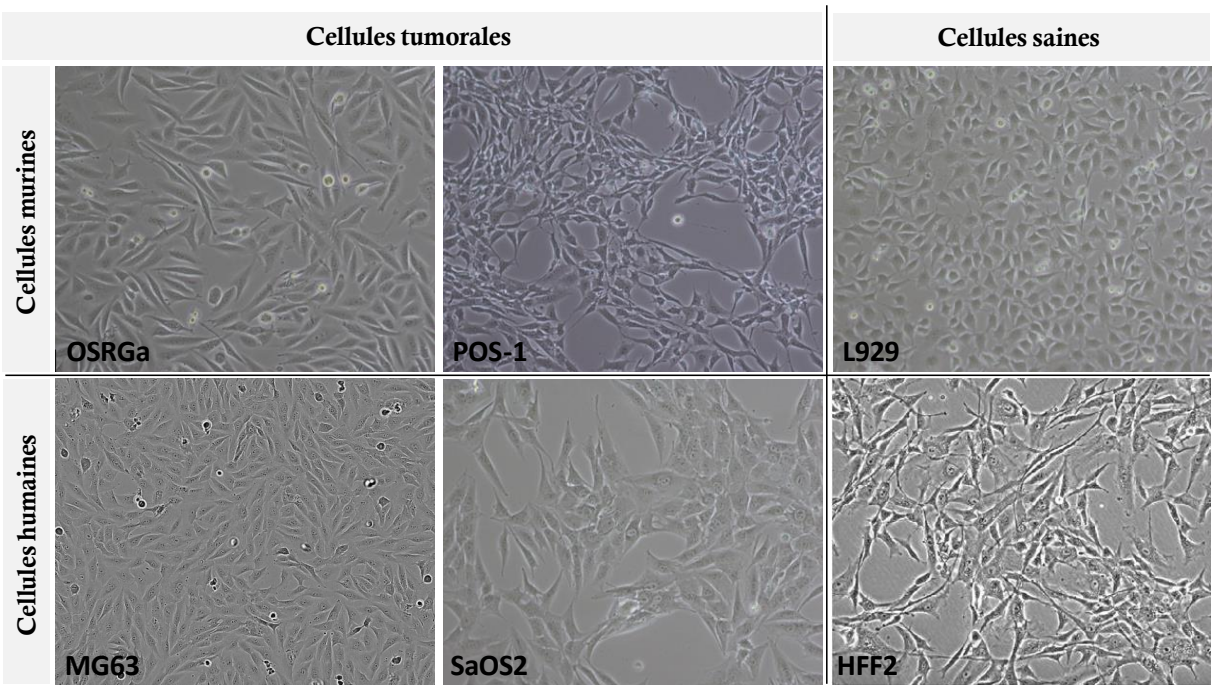
- la lignée POS-1 est une lignée tumorale provenant d'un ostéosarcome spontané de souris C3H (Kamijo *et al.*, 2002; Ory *et al.*, 2005).
- la lignée OSRGa est une lignée tumorale issue d'ostéosarcome de rat. Cette lignée a été initialement établie à partir d'ostéosarcome radio-induit sur des rats Sprague-Dawley (Klein *et al.*, 1977; Jasmin *et al.*, 1982).
- la lignée SaOS2 répertoriée à l'ATCC sous le numéro HTB-85™ est une lignée tumorale provenant d'un ostéosarcome humain, isolée et caractérisée par J.Fogh et G. Trempe en 1977 (Fogh *et al.*, 1977a; Fogh *et al.*, 1977b).
- la lignée MG-63 est une lignée de cellules d'ostéosarcome humain (ATCC® CRL-1427™) isolée et caractérisée par Billau *et al.* en1977.

2.1.1.2. Lignées cellulaires non tumorales

Deux origines différentes ont également été utilisées pour les lignées cellulaires non tumorales :

- la lignée L929 répertoriée à l'ATCC sous le numéro CCL-1™, est une lignée saine de fibroblastes murins. Cette lignée a été isolée en 1948. Le clone 929 de la souche parente a été établi à partir de la 95ème génération cellulaire (Sanford *et al.*, 1948).
- la lignée HFF2 (Human Foreskin Fibroblast) est une lignée saine de fibroblastes humains.

Tableau II-9 : Observation au microscope inversé (Nikon Eclipse TS100, Gx400) des lignées cellulaires utilisées (OSRGa,POS-1, L929, MG63, SaOS2, HFF2)



2.1.2. Evaluation de l'activité antiproliférative *in vitro* des analogues hémisynthétiques

L'étude bibliographique sur les dérivés de la fumagilline a révélé l'existence de plus de 100 structuresdifférentes, dontune vingtaine de type chlorohydrine : une molécule d'origine naturelle, la chlovalicine, les autres étant synthétiques. La présence d'un spiro-époxyde en C3 étantd'une façon générale considérée comme nécessaire à l'activité inhibitrice de la MetAP2, ces halogénohydrines ont été l'objet de peu d'investigationspour leur activité anticancéreuse, et aucune sur ostéasorcomes. Ainsi, dans le but de concevoir des dérivés de la ligérine pour trouver des analogues dont le profil pharmacologique serait amélioré, il a été décidé de conserver le groupement chlorométhylène et d'en moduler la chaîne ester.

L'importance de cette chaîne ester avait d'ailleurs pu être constatée lors de la thèse de Marieke Vansteelandt qui avait pu comparer les activités de couples d'analogues possédant ou non ce substituant. Il apparaissait clairement que les composés présentant une chaîne ester en C6 (6-O-succinyl-fumagillolet ligérine) étaient plus actifs et plus sélectifs des lignées tumorales que les composés présentant un hydroxyle sur cette position (fumagillol et 7-chloro-fumagillol) et ce, indépendamment du substituant en C3. Ce résultat confirmait d'ailleurs ceux de la littérature indiquant que la chaîne latéraleen C6 joue un rôle important dans l'activité antiproliférative de ces molécules bien que celle-ci prenne place à l'extérieur du site actif de la MetAP2 (Liu *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2000).

Ainsi, trois analogues structuraux modulant cette chaîne ester ont été synthétisés permettant d'évaluer l'impact sur l'activité antiproliférative d'un allongementde la chaîne acide (substitution du résidu succinyle de la ligérine par un groupement glutaryle, composé **S1**), ou de l'introduction d'un hétéroatome (résidu diglycolyle, composé **S2**) ou d'un cycle aromatique (résidu phtalyle, composé **S3**)

dans cette chaîne. Les structures des trois analogues obtenus sont rappelées dans la Figure II-45.

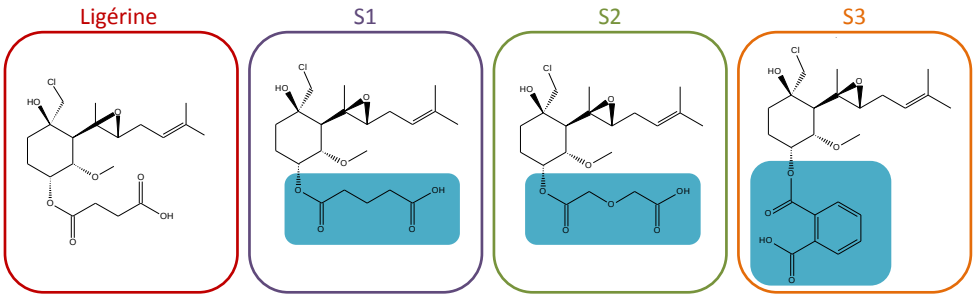


Figure II-45 : Structure de la ligérine et de trois analogues hémisynthétiques

2.1.2.1. Evaluation sur des lignées murines d'ostéosarcome

Comme pour la ligérine, les trois molécules d'hémisynthèse ont présenté une activité antiproliférative sur les lignées d'ostéosarcome de souris POS-1 et de rat OSRGa aux concentrations testées (Figure II-46). Sur la lignée POS-1, toutes les molécules ont entraîné une diminution de la viabilité cellulaire d'environ 50% à partir de 200 nM et un maximum de 54%à 60% d'inhibition de la prolifération a été obtenuaux concentrationsles plus fortes (1 µg/mL, soit environ 2 µM). Bien que les différences d'activité des analogues semblent peu significatives, le composé **S1** et la ligérine étaient les molécules les plus actives sur ces cellules avec une diminution de 45% de la viabilité dès la concentration de 30 nM alors qu'à cette concentration les trois autres analogues n'ont inhibé que de 25% la viabilité des cellules POS-1. Ainsi, les CI_{50}calculées ont été de 117 nM pour la ligérine, 303 nM pour lecomposé **S1**,367 nM pour **S3** et 1041 nM pour**S2**.

Sur les cellules OSRGa, la ligérine a induit une diminution de la viabilité cellulaire autour de 20% quelle que soit la concentration dans la gamme 15 à 2000 nM. Les analogues hémisynthétiques ont présenté la même activité que la ligérine sur ce type cellulaire.

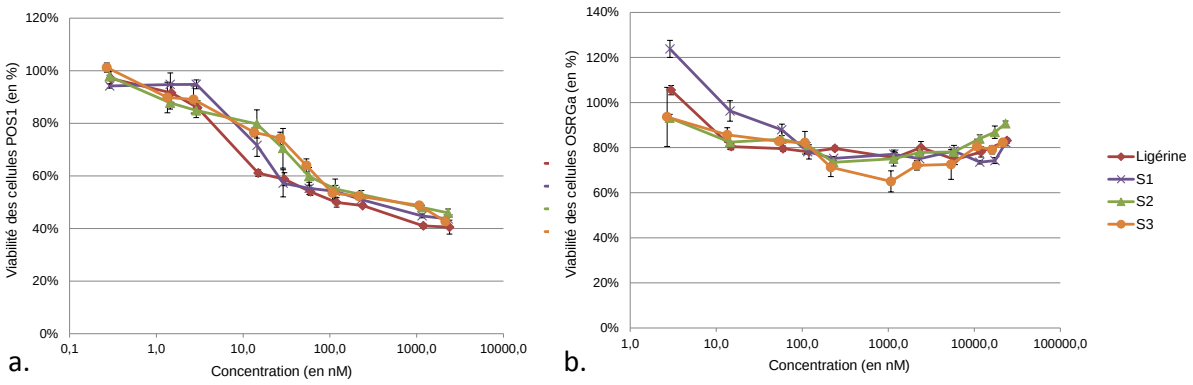


Figure II-46 : Viabilité des cellules tumorales POS-1 (a) et OSRGa (b) en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine (échelle semi-logarithmique)

Ainsi, la ligérine etses trois analogues hémisynthétiques ne présentent qu'une faible activité sur les cellules OSRGa (diminution maximale de 20%) mais induisent une forte inhibition de la prolifération des cellules POS-1.

2.1.2.2. Evaluation sur des lignées humaines d'ostéosarcome

Comme sur la lignée POS-1, les quatre molécules testées ont présenté une activité antiproliférative dose dépendante sur les deux lignées d'ostéosarcome humain (MG63 et SaOS2) aux concentrations testées (Figure II-47). Sur cellules MG63, on observe une diminution maximale de la viabilité cellulaire de 60% pour la ligérine face à une diminution de 48% pour le composé **S2**, 44% pour **S1** et 42% pour **S3**. Une CI_{50} n'est ainsi calculable que pour la ligérine avec une valeur de 1459 nM.

Sur la lignée SaOS2, les activités sont similaires à celles observées pour la lignée MG63 :à la concentration maximale testée, un maximum de 55 à 58% d'inhibitionde la prolifération cellulaire a été atteint pour la ligérine et les dérivés hémisynthétiques, à l'exception du composé **S3**(maximum de 46%). Cependant, l'activité des dérivés hémisynthétiques semble moindreque celle de la ligérine aux faibles concentrations : le seuil d'activité détectable (diminution de la viabilité de 11 à 24%) pour ces dérivés n'a été détecté qu'à partir de 30 nM,tandis qu'à cette concentration la ligérine a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire de 40%. Les CI_{50}ont été calculées de137 nM pour la ligérine,629 nM pour lecomposé **S2** et 863 nM pour **S1**.

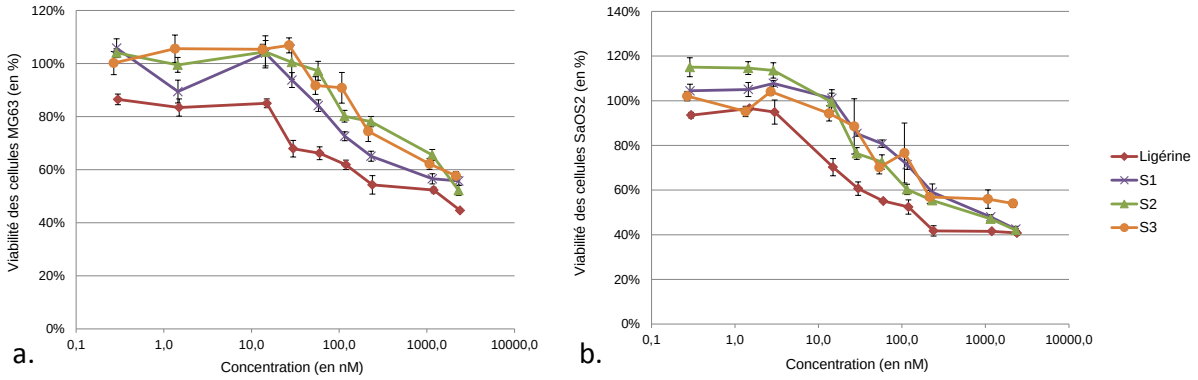


Figure II-47: Viabilité des cellules tumorales MG63 (a) et SaOS2 (b) en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine (échelle semi-logarithmique)

2.1.2.3. Evaluation de l'activité antiproliférative sur cellules non tumorales

Les quatre molécules testées ont présenté une activité antiproliférative sur les lignées fibroblastiques saines L929 et HFF2 avec un effet dose dépendant (Figure II-48). Sur les cellules murines L929, la ligérine s'est avérée être légèrement plus toxique que les analogues hémisynthétiques avec une diminution de la viabilité de 12% à 3 nM. Pour les molécules **S1**et **S2**,une diminution de la viabilité cellulaire de respectivement 18% et 12%a été observéeà partir de 15 nM, et de 30 nM pour la molécule**S3** (diminution de la viabilité cellulaire de 12%). Un même plateau maximal d'activité (40% d'inhibition) a été induit par les composés testés à partir d'une concentration de 60 nM pour la ligérine, et de 100 nM pour les trois analogues.

Sur la lignée de fibroblastes humains HFF2, les courbes d'inhibition des quatre molécules sont superposées, jusqu'à une concentration de 230 nM. Au-delà de cette dose, le composé **S3** est le moins actif (inhibition maximale de 28%), alors que la ligérine et la molécule **S1** induisent le plus d'inhibition de la prolifération (45%). Aucune CI_{50} n'a pu être calculée puisque la toxicité des composés n'atteint jamais les 50%.

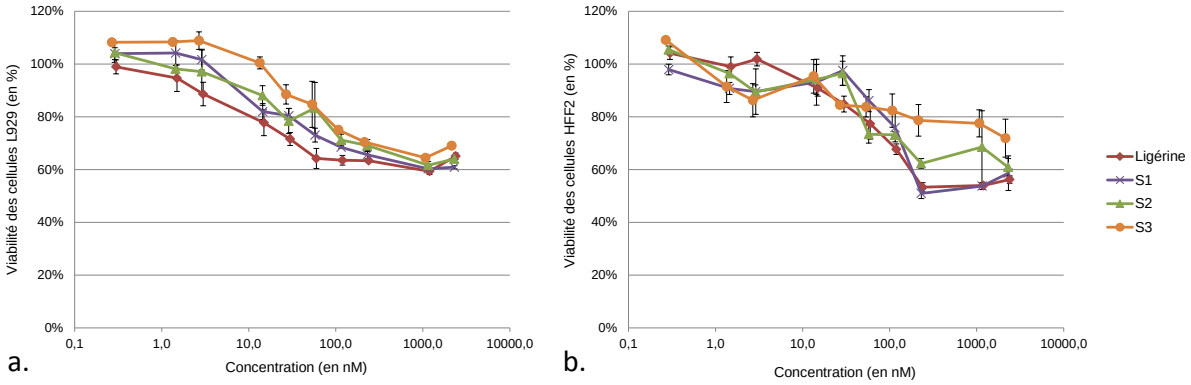


Figure II-48: Viabilité des cellules non tumorales L929 (a) et HFF2 (b) en fonction de la concentration en analogues structuraux hémisynthétiques de la ligérine (échelle semi-logarithmique)

2.1.2.4. Bilan de l'évaluation de l'activité antiproliférative des analogues hémisynthétiques de la ligérine

Les trois dérivés hémisynthétiques évalués face à la ligérine ont tous présenté une activité antiproliférative associée à un effet dose sur l'ensembledes lignées cellulaires. Cependant, si aucun des trois dérivés hémisynthétiques **S1** à **S3**testés n'a présenté d'activité supérieure à celle de la ligérine sur les cellules tumorales, leur toxicité sur fibroblastes humains ou murins s'est avérée inférieure ou égale à celle de la ligérine.

L'ensemble des tests a été réitéré, des résultats identiques aux premiers ont été obtenus. Le Tableau II-10présente les moyennes des CI_{50} obtenues lors des deux études.

Tableau II-10 : CI_{50} obtenues lors de l'évaluation de l'activité antiproliférative de la ligérine et de trois analogues hémisynthétiques sur les lignées tumorales et non tumorales (en nM)

	Cellules tumorales				Cellules non tumorales	
	POS-1	OSRGa	SaOS2	MG63	L929	HFF2
Ligérine	78	>2300	137	1459	>2300	>2300
S1	234	>2300	863	>2300	>2300	>2300
S2	1394	>2300	629	>2300	>2300	>2300
S3	230	>2100	>2100	>2100	>2100	>2100

Ainsi, la ligérine présente clairement l'activité la plus importante sur les cellules tumorales. Sa CI_{50} est de 78 nM sur la lignée POS-1, soit une activité 3 à 17 fois plus importante que les analogues synthétisés. De même, l'activité de la ligérine sur lignée tumorale humaine SaOS2 est alors 5 à 15 fois plus importante que celle des analogues.

Cependant, tous ces composés présentant des toxicités sur cellules saines, un indice de sélectivité (IS) a été déterminé (Tableau II-11). Celui-ci correspond, pour chaque composé et pour chaque origine cellulaire (humaine ou murine), au ratio entre sa CI_{50} sur cellules saines par rapport à cellesur lignée tumorale.Ces calculs montrent que, quelle que ce soit l'origine cellulaire, la ligérine présente les meilleurs indices de sélectivité. Sur cellules murines par exemple la ligérine est de 3 à 15 fois plus sélective que les autres dérivés testés.

Tableau II-11: Indice de sélectivité de la ligérine et des analogues structuraux hémisynthétiques

	$IS_{(L929/POS1)}$	$IS_{(HFF2/SaOS2)}$
Ligérine	*>29*	*>17*
S1	*>10*	*>3*
S2	*>2*	*>4*
S3	*>9*	*/*

En conclusion, aucun des composés synthétisés au cours de ce travail n'a permis d'augmenter ni d'améliorerde façon significative l'activitéde la ligérine. Ni l'allongement d'un méthylène de la chaîne succinique, ni l'introduction d'un hétéroatome ou d'un cycle aromatique dans cette chaîne acide ne semblent entraînerde changementnotable dans l'activité antiproliférative.

Ainsi, après ces essais de pharmacomodulations, la ligérine restait le meilleur candidat pour la suite des études.

2.1.3. Etude des relations structure-activité: Impact de la substitution halogénée en C7

Au vu des résultats précédents, il a semblé pertinent d'évaluer l'implication dans l'activité biologique de la présence d'un atome de chlore en C7, ce substituant constituant une originalité par rapport aux autres molécules investiguées dans la littérature.

Les activités antiprolifératives de troishalogénohydrines ont été comparées à celles de leurs analogues spiro-époxydes. Pour cela, trois couples de molécules présentant le même substituant en C6 ont été testés sur deux lignées tumorales (POS-1 et SaOS2) et la lignée L929 : ligérine*vs*6-O-succinyl-fumagillol, 7-chloro-fumagillol *vs* fumagillol, et 7-chloro-TNP-470 *vs* TNP-470.Les structures de ces six composés sont rappelées dans la Figure II-49.

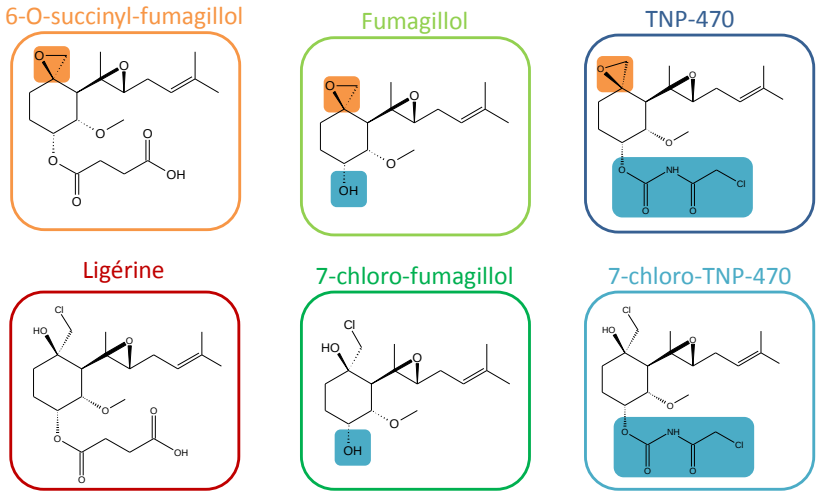


Figure II-49 : Structure des composés hémisynthétiques époxydés en C3 et leur analogue chlorohydrine

Sur chacune des lignées cellulaires, les chlorhydrines ont montré une activité équivalente à celle de leurs analogues époxydés, indiquant alors que l'ouverture du spiro-époxyde et l'insertion d'un atome de chlore n'a pas d'impact sur l'activité (Figure II-50). Dans la littérature, il a souvent été décrit que les deux époxydes de ces composés jouaient un rôle essentiel dans les interactions avec la MetAP2, et nous avons vu précédemment que les données bibliographiques sur l'impact de l'ouverture du spiro-époxyde sont contradictoires (cf. partie bibliographique sur les relations structure-activité, p43). Les résultats obtenus ici sont concordants avec les études les plus récentes publiées par le laboratoire Praecis Pharmaceuticals® (Arico-Muendel *et al.*, 2013), qui ont montré que le PPI-2458 et son analogue chlorohydrine présentaient la même efficacité d'inhibition de l'activité de la MetAP2 et de la prolifération des cellules HUVEC.

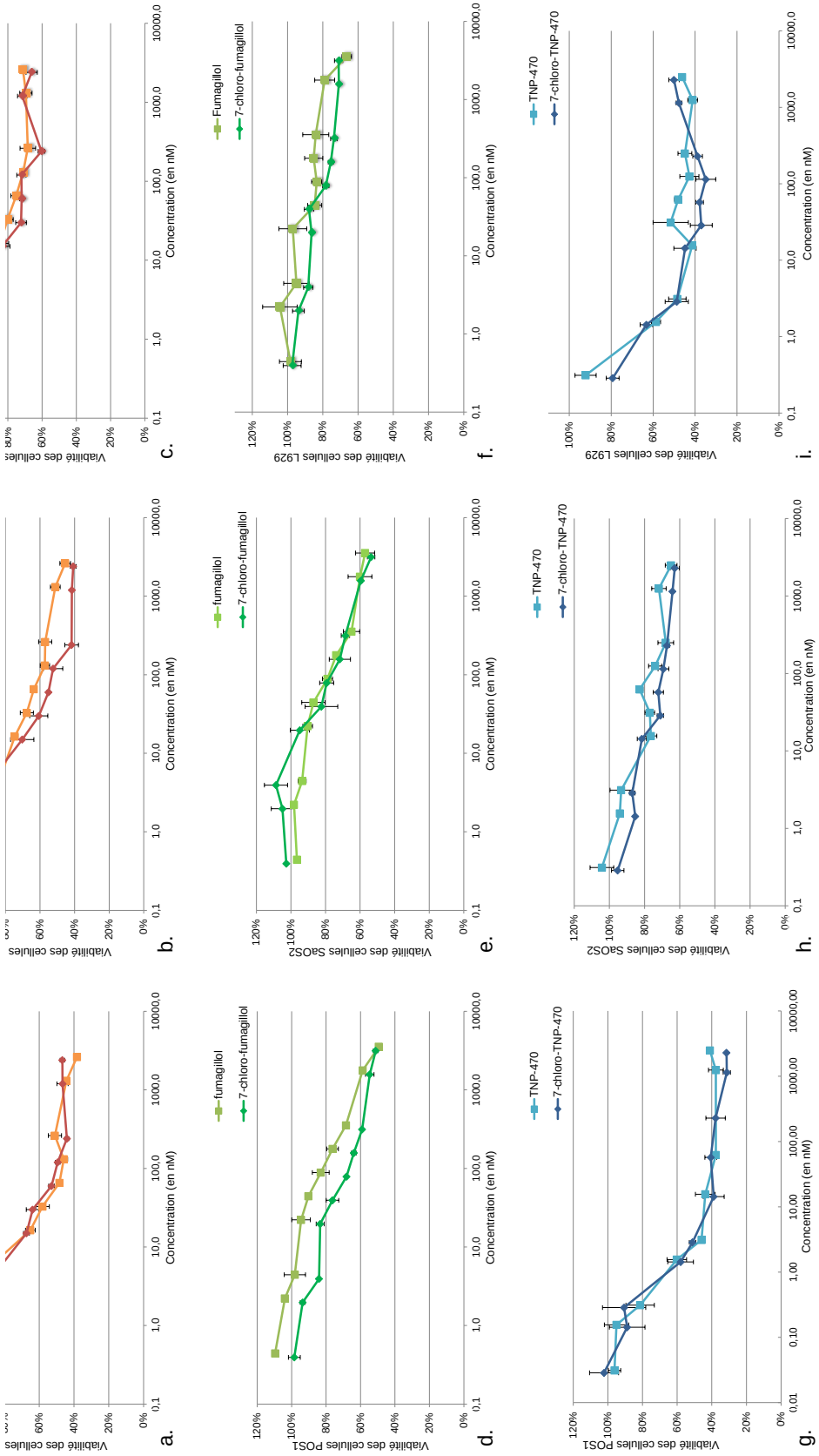


Figure II-50 : Evaluation de l'activité antiproliférative d'analogues de la fumagilline sur deux lignées tumorales POS-1 (a, d, g) et SaOS2 (b, e, h) et sur la lignée non tumorale L929 (c, f, i)

La forme bromohydrine de la ligérine (composé **S4**, Figure II-51) a alors été évaluée et a été comparée à la ligérine sur un panel de quatre lignées tumorales et deux non tumorales (Tableau II-12).

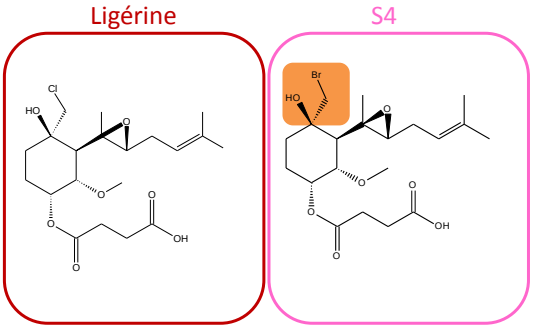
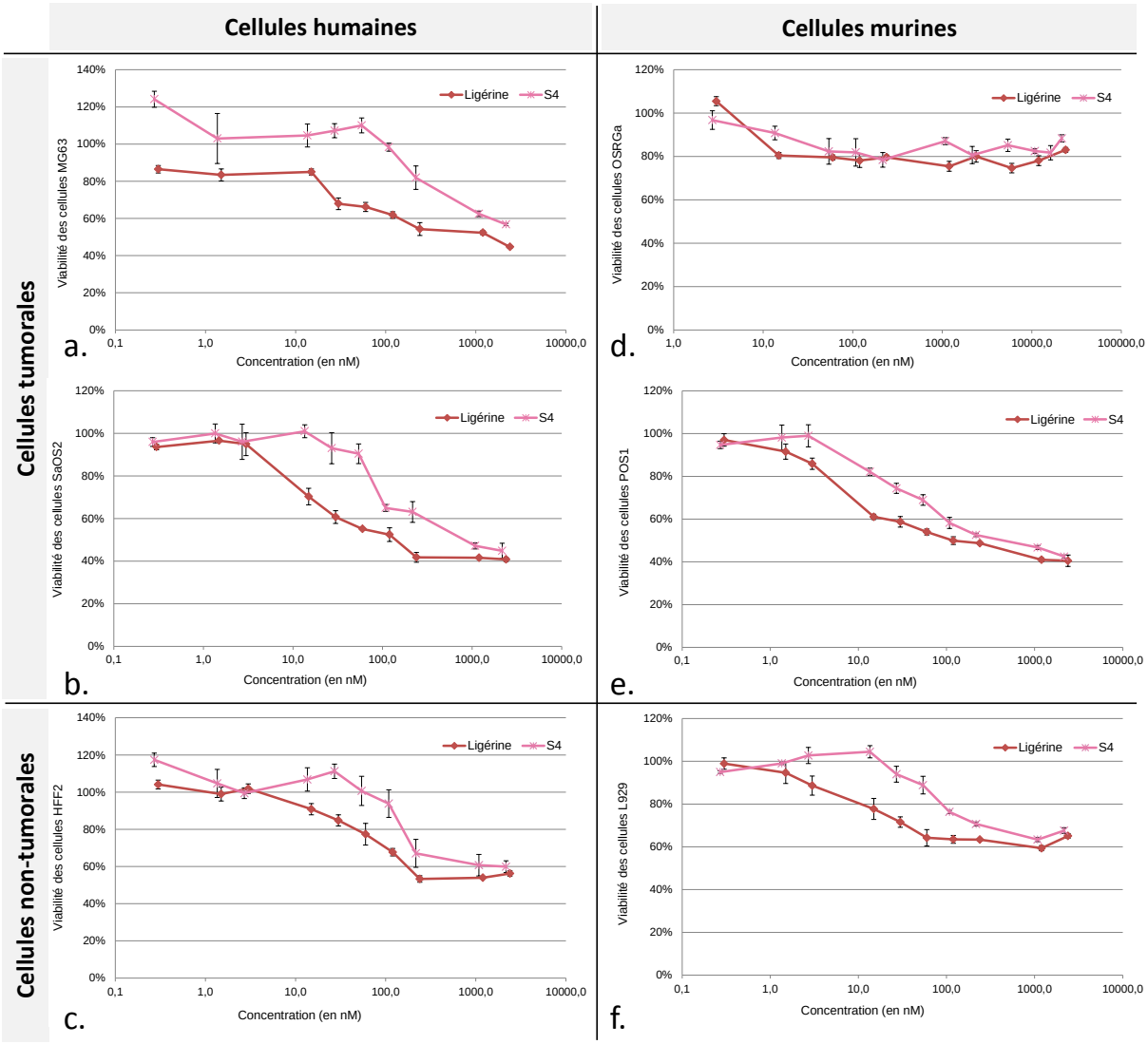


Figure II-51 : Structure de la ligérine et de son analogue bromé S4

Tableau II-12 : Viabilité des cellules MG63 (a), SaOS2 (b), HFF2 (c), OSRGa (d), POS-1 (e) et L929 (f) en fonction de la concentration du composé S4 et de la ligérine (échelle semi-logarithmique)



Il apparaît que, quelle que soit la lignée cellulaire, le composé S4possède une activité antiproliférative moindre par rapport à celle de la ligérine. Concernant les lignées tumorales humaines, on observe une diminution maximale de la viabilité des cellules MG63de 43% pour le composé S4 face à 55% pour la ligérine, etsur lignée SaOS2la CI_{50} ducomposé S4 est environ 6 fois inférieure àcelle de la ligérine (respectivement 801 nM et 137 nM). Sur lignées tumorales murines, les deux composés ont présenté soit la même activité, faible (maximum de 20% d'inhibition de la viabilité cellulaire sur OSRGa), soit un effet moins importantpour le composé S4 (CI_{50} respectives de 485 nM et 117 nM sur POS-1).

Ainsi, l'activité des halogénohydrines est fonction du type d'atome présent sur le méthylène en C7. Un atome de brome présente un encombrement stérique supérieur à celui d'un chlore (1,14 Å contre 0,99 Å). Or, l'activité des dérivés de la fumagilline est supposée être en relation directe avec leur capacité à former une liaison covalente entre ce carbone C7 et un des azotes du cycle imidazole de l'His-231 de la MetAP2. Nous avons alors cherché à voir d'un point de vue moléculaire théorique si la présence d'un chlore ou d'un brome pouvait avoir un impact sur la possibilité de formation de cette liaison. Pour cela une étude par modélisation moléculaire (docking) des complexes MetAP2-ligérine et MetAP2-7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol a été conduite par le Dr Cédric Logé au laboratoire IICiMed-EA1155 de la Faculté de Pharmacie de Nantes. Ceci a été réalisé à partirdes données cristallographiques de l'enzyme MetAP2 co-cristallisée avec la fumagilline, disponibles dans la base de données PDB (Protein data Bank, code 1Boa, http://www.rcsb.org, (Liu *et al.*, 1998)). Pour cette étude, les cofacteurs physiologiquement nécessaires pour l'activité de la metalloprotéase ont été conservés (deux ions cobalt et une molécule d'H_2O). Le modèle construit (Figure II-52) a montré que la position de la ligérine dans la poche active de la MetAP2 pouvait parfaitement se superposer à celle de la fumagilline : la proximité spatiale (distance inférieure à 3 Å) entre le carbone C7 du méthylène de la ligérine et l'azote de l'amine de l'His-231 de la MetAP2 rend théoriquement possible la formation d'une liaison covalente. Les autres liaisons observées au sein du complexe fumagilline-site actif de la MetAP2 (liaison hydrogène entre l'hydroxyle en C3 après ouverture du spiro-époxyde et une molécule d'eau voisine) ont aussi été observées dans le modèle construit. Enfin, le chlore n'empêche pas le positionnement du reste du pharmacophore, c'est-à-dire du groupement isopropylidène de la chaîne en C4.

Concernant le composé bromé S4, le même constat a été fait : la présence de l'atome de brome ne contrarie pas l'insertion de la molécule dans le site actif de l'enzyme, et la superposition obtenue avec la fumagilline est présentée dans la Figure II-52.

En conclusion, la présence d'atomes d'halogènes ne semble pas avoir d'influence directe sur l'interaction moléculaire entre ces sesquiterpènes et leur cible. Cependant il serait intéressant de comparer la réactivité du carbone méthylénique lorsqu'il porte l'un ou l'autre des halogènes. Toutefois, au vu des différences d'activité observées entre les analogues chloré, bromé et spiro-époxyde, cette influence est bien réelle mais reste à expliquer. Des tests d'inhibition de la MetAP2 ont été envisagés afin de comparer les résultats obtenus avec les différences d'activité observées sur cultures cellulaires, mais n'ont pas pu être réalisés. Cela permettrait de déterminer si la MetAP2 est la cible unique de ces composés ou s'ils agissent par un mécanisme différent ou complémentaire dans les cellules d'ostéosarcome.

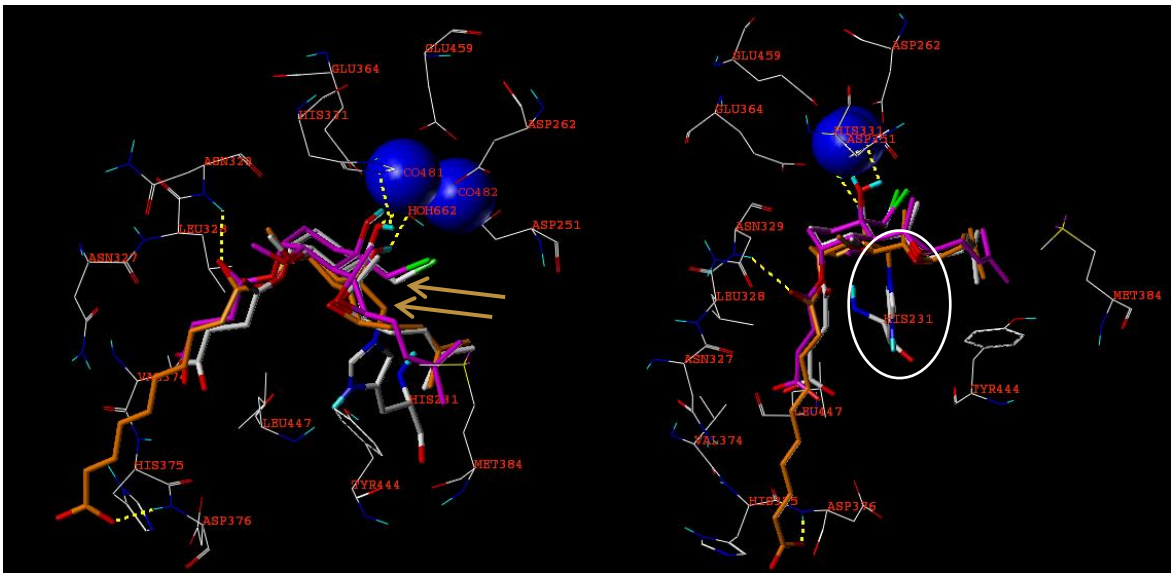


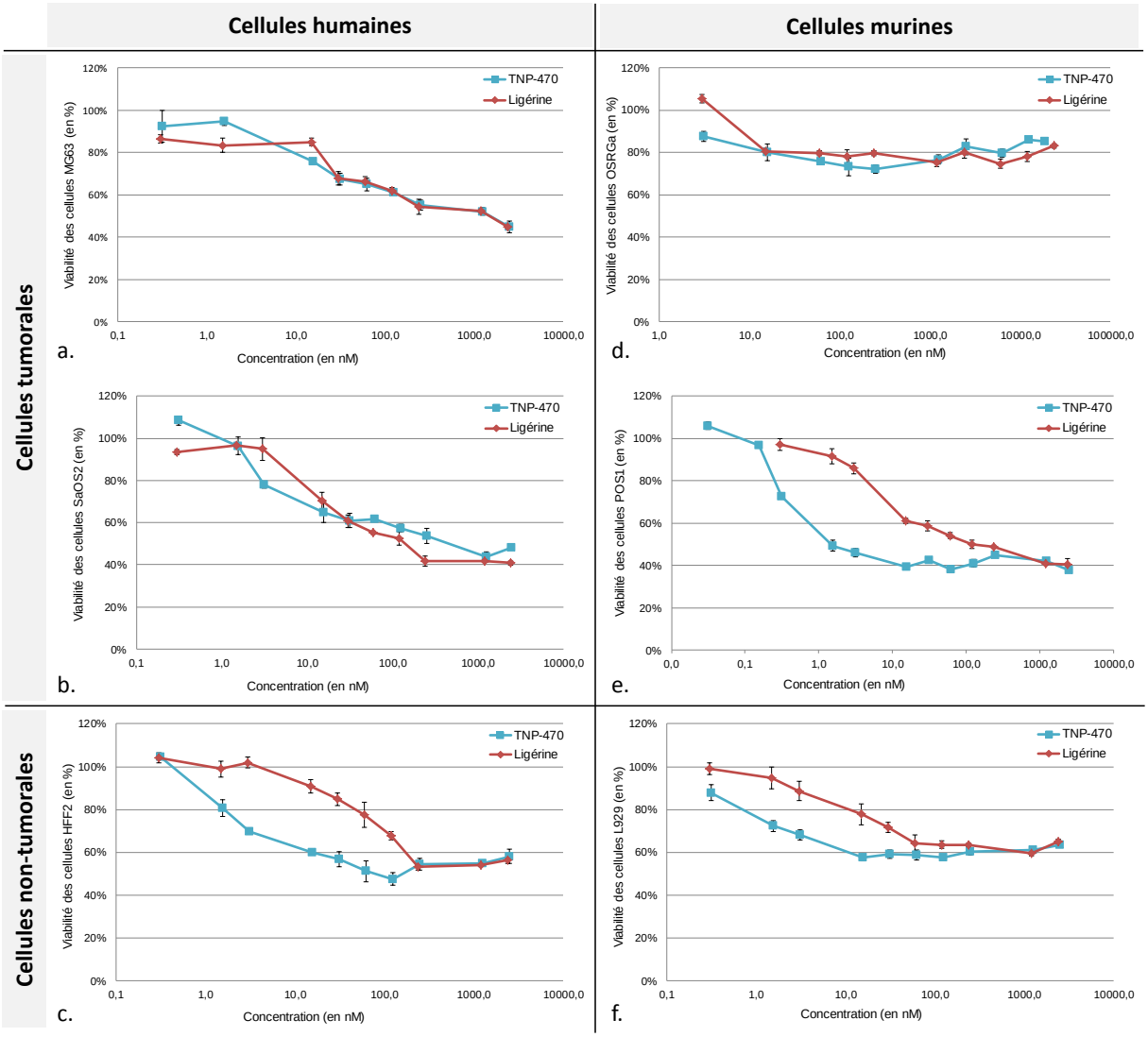
Figure II-52 : Docking moléculaire des complexes fumagilline, ligérine ou 7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol/MetAP2 : la fumagilline apparait en orange, la ligérine en blanc et le 7-bromo-6-O-succinyl-fumagillol en magenta
Les flèches marrons sur la représentation à gauche indiquent les carbones C7 des trois molécules. La liaison covalente de la fumagilline avec l'His231 est entourée sur la représentation à droite. Les liaisons hydrogènes apparaissent en traits pointillés jaune

2.1.4. Evaluation de la ligérine face au TNP-470

Lors de la thèse de Marieke Vansteelandt, l'activité de la ligérine avait été comparée à celle d'un panel de molécules commercialisées comme anticancéreux cytotoxiques. Il avait été montré que la ligérine présentait une activité antiproliférative 70 fois plus importante que l'irinotécan et la fludarabine sur les cellules POS-1 et une activité équivalente à la vincristine et au paclitaxel(Vansteelandt, 2011). Son index de sélectivité $IS_{POS\text{-}1/L929}$ était 7 fois supérieur à celui de la doxorubicine, montrant ainsi que la ligérine pourrait être un bon candidat thérapeutique.

Dans la série chimique des sesquiterpènes analogues de la fumagilline, le TNP-470 a été pendant de nombreuses années considéré comme chef de file puisque, malgré sa neurotoxicité, c'est le seul à avoir atteint la phase II d'essai clinique, entre autres pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas avancés non métastatiques. Nous avons donc comparé l'effet antiprolifératif de la ligérine face à ce composé de référence sur les quatre lignées tumorales d'ostéosarcome et les deux lignées non tumorales fibroblastiques.Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau II-13.

Tableau II-13 : Comparaison de l'activité antiproliférative de la ligérine et du TNP-470 sur les lignées cellulaires : MG63 (a), SaOS2 (b), HFF2 (c), OSRGa (d), POS-1 (e) et L929 (f) (échelle semi-logarithmique)



Les résultats montrent que -dans la gamme de concentrations testées- le TNP-470 agit comme la ligérine par un mécanisme cytostatique, aucune inhibition totale de la prolifération cellulaire n'ayant été observée sur les six lignées. Sur la lignée murine POS-1, le TNP-470 est apparu nettement plus actif que la ligérine avec des CI_{50} respectives de 3 et 117 nM. Cependant, sur la lignée OSRGa et sur les lignées tumorales humaines, l'effet des deux composés est identiquevoire légèrement plus important pour la ligérine sur SaOS2. Sur cette dernière lignée, sa CI_{50} est de 137 nM alors qu'elle n'est que de 508 nM pour le TNP-470.

Sur les deux lignées de cellules non tumorales,la ligérine a présenté une toxicité moins importante que le TNP-470 pour des concentrationsinférieures à 230 nM.

Le Tableau II-14 montre ainsi que, pour une même efficacité des deux molécules sur cellules tumorales humaines, la toxicité observée sur cellules saines humaines est inférieure pour la ligérine ce qui constitue un avantage intéressant dans l'efficacité pharmacologique.

Tableau II-14 : Activités comparées de la ligérine et du TNP-470 sur lignées cellulaires humaines (tumorales MG3 et SaOS2, saine HFF2).
Pourcentages d'inhibition de la viabilité cellulaire à la concentration de 30 nM

	MG63	SaOS2	HFF2
Ligérine	32 %	30 %	15 %
TNP-470	33 %	35 %	43 %

2.2. Evaluation de l'activité biologique *in vivo* sur modèle d'ostéosarcome

Au vu du profil d'activité de la ligérine sur modèles d'ostéosarcomes *in vitro*, une étude sur l'animal était nécessaire afin de confirmer l'intérêt potentiel de cette molécule pour le traitement des cancers osseux. De grandes quantités de ligérine ayant pu être synthétisées, elle a pu être testée*in vivo*sur un modèle d'ostéosarcome chez la souris immunocompétente, le TNP-470 étant ici encore utilisé comme référence. Une première étude réalisée à l'aide d'un modèle de tumeur osseuse transplantée n'avait pas permis de dégager un effet significatif de la ligérine sur le développement tumoral, mais semblait mettre en évidence une diminution de la mortalité des animaux traités par rapport à un groupe contrôle. L'agressivité de ce modèle de tumorigénèse avait été avancée comme explication à cette absence de résultats, les nodules cancéreux se développant très rapidement et de façon très importante (Vansteelandt, 2011).

Le modèle employé ici a consisté en l'induction d'une tumeur osseuse primitive par l'injection de cellules tumorales murines (POS-1) à proximité des tibias de souris C3H/HeN. La tumeur se développe environ 7 jours après l'injection et croit rapidement. Le choix de la dose de ligérine pour le traitement s'est fait après étude de la littérature :aucunemolécule de cette famille chimique n'ayant été testée sur des modèles d'ostéosarcomes, nous nous sommes intéressés aux protocoles concernant l'évaluation de l'activité antitumorale du TNP-470 sur d'autres modèles murins de cancers. Plusieurs publications ont rapporté une dose efficacede TNP-470 de l'ordre 30 mg/kg. Indépendamment du protocole d'administration, à cette dose le TNP-470 a entraîné une diminutiondu volume tumoral dans un modèle d'angiosarcome ISOS-1 et dans un modèle d'hémangioendothéliome EOMA (O'Reilly *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2000). Toujours à cette dose, la vascularisation des tumeurs induites par une lignée tumorale prostatique PC-3a été inhibée (toutefois sans significativité des résultats)(Arisawa *et al.*, 2002) ; sur un autre modèle murin, la néoangiogénèse a été ralentie et le volume tumoral de métastases cérébrales H226Br a été significativement réduit (lignée établie à partir de lésions métastatiques obtenues à partir d'un carcinome pulmonaire) (Mori *et al.*, 2000). Une autre étude, la plus intéressante dans le contexte de notre travail, menée par Sasaki *et al.* a consisté en la première description de l'activité du TNP-470 sur la résorption osseuse (Sasaki *et al.*, 1998). Cette étude a été réalisée sur un modèle murin de métastases osseuses ostéolytiques de cancer du sein (tumeur osseuse secondaire) : après injection de cellules MDA-MB-231 en intracardiaque, les souris ont présenté des métastases osseuses. L'activité préventive et curative du TNP-470 a alors été évaluée,

en réalisant des injections sous-cutanées à la dose de 30 mg/kg, trois fois par semaine pendant 4 semaines. Les résultats présentés dans la publication indiquent que le TNP-470 a inhibé les métastases osseuses non seulement *via* son activité antitumorale due à ses propriétés anti-angiogéniques mais également par inhibition de la résorption osseuse ostéoclastique, faisant de lui un candidat potentiel pour le traitement des métastases ostéolytiques. Il a ainsi été choisi de s'inspirer de ce protocole pour l'évaluation *in vivo* de l'activité antitumorale de la ligérine.

- ✓ **Protocole**

Les composés ont été testés *in vivo*sur un modèle d'ostéosarcome chez la souris immunocompétente selon le protocole décrit par Wittrant *et al.* en 2006.

Les souris C3H/HeN, mâles, âgées de 4 semaines à réception, ont été fournies par le centre d'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, Mayenne, France). Elles ont été stabulées dans des cages en polypropylène translucide de dimension standard avec un maximum de 8 animaux par cage, ceci une semaine avant le début de l'étude dans des pièces climatisées (18-21°C) avec une humidité relative de 40% à 70%. Les animaux ont eu un accès libre et à volonté à l'alimentation et à l'eau de boisson, en pièce d'hébergement de l'animalerie de la Faculté de Médecine de Nantes (animalerie agréée par les services vétérinaires départementaux ; n° d'agrément : C44015).

Injection des cellules tumorales : Après identification des animaux et une semaine d'acclimatation, les souris ont reçu une injection de cellules POS-1 dans le coussinet plantaire (4106 cellules dans 50 µL de NaCl 0,9%). Les souris ont préalablement été anesthésiées à l'isoflurane et une injection de buprénorphine (SC) a été réalisée le jour de l'injection (½ heure avant l'induction) et le lendemain.

Traitement : La ligérine et le TNP-470 ont été administrés en traitement préventif de l'induction tumorale dès l'injection des cellules POS1. Le traitementadonc commencé à J0 puis a été poursuiviun jour sur deux jusqu'à dix-huit jours. Pour cela, les composés ont été injectés par voie sous-cutanée, en solution dans un solvant constitué de NaCl à 0,9% + EtOH 20%, et à la posologie de 30 mg/kg (10 mL/kg). Un groupe contrôle négatif a été constitué par des souris recevant des injections du véhicule seul.

Au début de l'expérimentation, les groupes traités étaient constitués de 10 animaux chacun etle groupe contrôlede 6 animaux.

Suivis : Le suivi clinique (évolution pondérale, état général de l'animal, mesure du volume tumoral et réaction à la chirurgie et au traitement) a été effectué deux fois par semaine.

Le volume tumoral (VT) a été calculé de la façon suivante :

$$\text{volume} = (l^2 \times L)/2$$, avec l la petite longueur et L la grande longueur de la tumeur

Les animaux ont été euthanasiés si l'une des conditions suivantes était observée :

- le volume de la tumeur est supérieur à 1000 mm^3,
- la tumeur nécrose,
- la perte pondérale de l'animal est supérieure à 20% de son poids initial.

✓ Résultats

A l'issue de l'étude (J18),deux animaux du groupe « contrôle » ont dû être exclus, aucune tumeur ne s'étant développée (échec de l'induction tumorale). Les quatre autres animaux ont présenté un volume tumoral moyen de 839 ± 204 mm^3.

Le Tableau II-15présente les résultats des mesures des VT pour les deux groupes traités.

Tableau II-15 : Volumes tumoraux à J18 (VT en mm^3)

TNP 470		Ligérine	
Animaux N°	VT (mm^3)	Animaux N°	VT (mm^3)
1616	0,0	1606	1124,6
1617	0,0	1607	0,0
1619	455,6	1609	443,5
1620	251,2	1610	748,5
1621	0,0	1611	461,4
1622	228,0	1612	479,0
1623	0,0	1613	1075,2
1624	138,8	1614	133,3
1625	0,0	1615	371,4

Au sein du groupe ayant reçu la ligérine, la mesure des VTa montré une grande hétérogénéité entre animaux. Deux sous-groupes ont pu être différenciés (méthodologie : classification hiérarchiqueascendante, Figure II-53) et déterminés comme statiquement différents (p value<0,05, test de Mann-Whitney) : des animaux « bons répondeurs » (6 souris dont le VT<480 mm^3) et des animaux « mauvais répondeurs » (3 sourisdont le VT>748 mm^3). Dans ce deuxième groupe un animal a été exclu car décédé à J18.

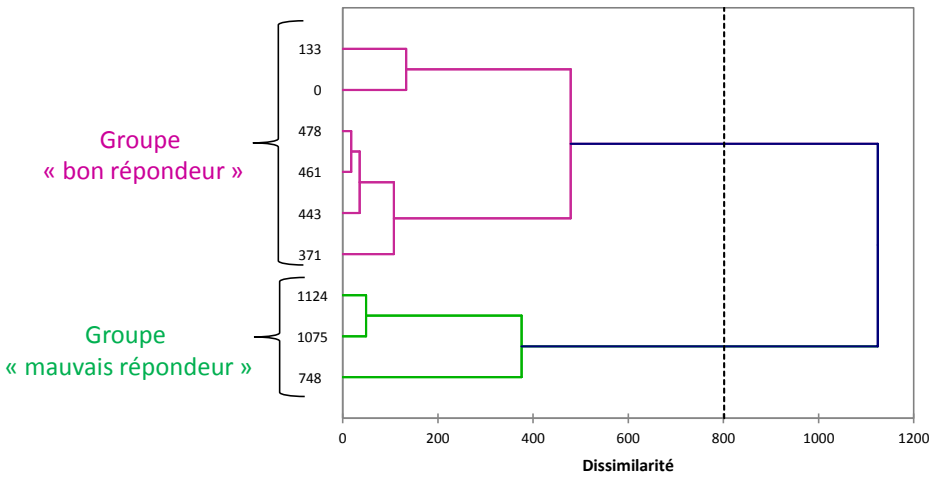


Figure II-53 : Classification hiérarchique ascendante appliquée aux volumes tumoraux des animaux traités par la ligérine différenciant la population en deux sous-groupes
(distance euclidienne, méthode d'agrégation par lien complet)

La Figure II-54 montre la comparaison des résultats, en prenant en compte la scission des animaux « ligérine » en deux sous-groupes.Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le groupe « ligérine-bons répondeurs », c'est-à-dire pour 60% des souris ayant reçu la ligérine et celui traité par le TNP-470 (p value >0,05 test de Kruskal-Wallis; neuf animaux pris en compte, une souris ayant dû être euthanasiée en cours d'étude).Ainsi, à posologies identiques, la ligérine présente une activité antitumorale comparable à celle du TNP-470 pour 60% des souris traitées.

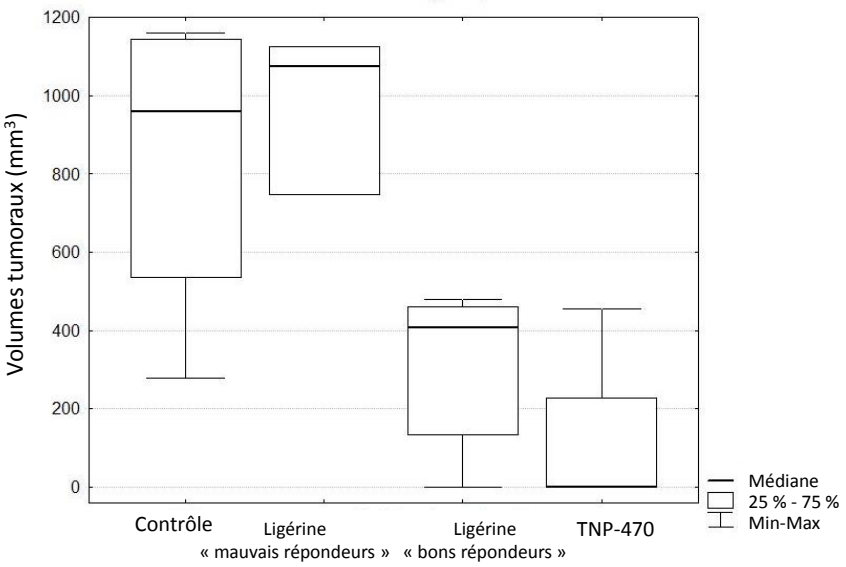


Figure II-54 : Représentation « box plot » des volumes tumoraux des animaux des groupes « contrôle », « ligérine mauvais répondeurs », « ligérine bons répondeurs » et « TNP-470 »

Lors de cette étude, le poids de chaque animal a été déterminé deux fois par semaine pendant toute la durée de l'étude. Cette mesure est considérée comme un reflet des effets toxiques potentiels des traitements administrés. La Figure II-55 présente les évolutions pondérales des animaux.

L'observation du groupe contrôle montre que l'induction tumorale et son développement n'ont pas eu d'incidence négative sur la prise de poids physiologique, celui-ci croissant régulièrement. On observe également une prise de poids pour les animaux traités avec la ligérinequi, même si elle est moins importante que pour le groupe contrôle, n'est pas significativement différente(p value>0,1 quel que soit le jour, test de Kruskal-Wallis).

A l'inverse, les souris traitées avec le TNP-470 ont présenté une perte de poids tout au long de l'étude, significative dès J4 par rapport au groupe contrôle(p value< 0,001 quel que soit le jour, test de Kruskal-Wallis). Pour un des animaux, cette diminution pondérale a atteint le seuil de 20% défini comme critique dans les critères d'éthique de ce type d'étude : cette souris a dû être euthanasiée à J11. Ces observations confirment la toxicité importante du TNP-470 décrite dans la littérature.

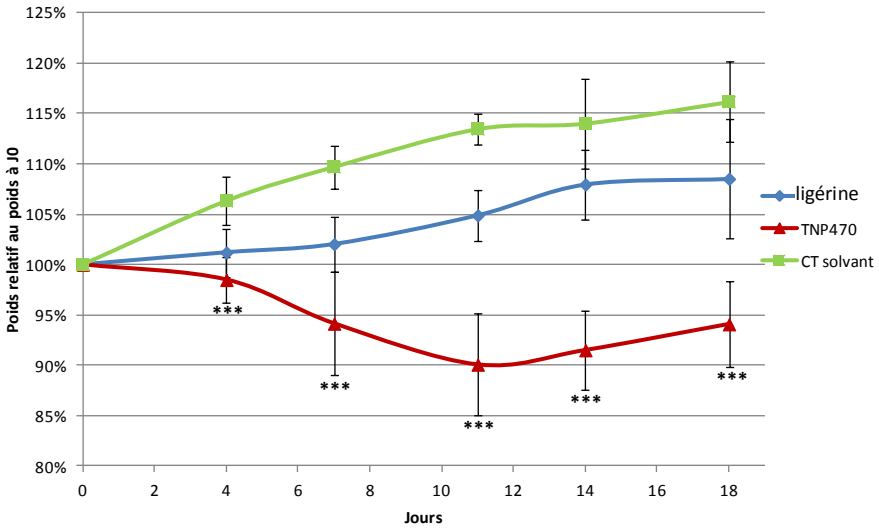


Figure II-55 : Suivi pondéral des souris des 3 groupes de l'essai.
Calcul du poids relatif au poids initial : Poids Jx/Poids J0
*** : significativité par rapport au contrôle solvant (p value<0,001, test de Kruskal-Wallis)

Ainsi, à posologies identiques, la ligérine présente une activité antitumorale comparable à celle du TNP-470 pour 60% des souris traitées, sans effet sur le poids des animaux donc avec une toxicité moindre. Ces résultats sont concordants avec les données observées *in vitro* : l'activité du TNP-470 est nettement supérieure à celle de la ligérine sur la lignée POS-1 et il présente une toxicité plus importante sur lignées saines.

Néanmoins, cette étude présente un biais majeur, défavorable à une interprétation définitive des données, et lié au modèle biologique. En effet, nous avons vu que les tumeurs ne se sont pas systématiquement développées dans le groupe contrôle. Il est de ce fait difficile d'interpréter l'absence de tumeur dans les groupes traités comme résultant de l'efficacité des traitements préventifs, ou comme un échec de l'induction cancéreuse. Afin de confirmer ces résultats, d'autres études devront être réalisées, soit en utilisant d'autres types de modèles (autres lignées cellulaires injectées[1], dont lignées humaines), soit en incluant un plus grand nombre d'animaux. Un premier essai a été réalisé en ce sens, mais sans résultat. Il sera également important de réaliser des essais de détermination de la dose maximale de ligérine tolérée, afin d'adapter la posologie à l'obtention d'une efficacité sur 100% des animaux.

[1] Un autre modèle de tumeurs murines était disponible au sein de la société ABS, utilisant la lignée cellulaire

2.3. Evaluation de l'activitéde la ligérine sur l'ostéoclastogenèse

L'étude *in vivo* précédente n'ayant pas inclus d'étude histologique, elle n'a pas permis d'observer si la ligérine pouvait présenter un effet protecteur contre l'ostéolyse, phénomène généralement associé aux ostéosarcomes. L'étude de Sazaki *et al*. avait montré que le TNP-470 inhibait la résorption osseuse par les ostéoclastes (Sasaki *et al.*, 1998). Nous avons donc envisagé d'évaluer l'effet *in vitro* de la ligérine sur le mécanisme d'ostéoclastogénèse. Pour cela, des précurseurs ostéoclastiques humains CD14 ont été cultivés dans un milieu favorisant leur différenciation, en présence ou non de ligérine oude TNP-470.

- ✓ **Protocole**

Les précurseurs ostéoclastiques utilisés sont des cellules CD14 d'origine humaine récupérées par FICOLL et tri magnétique.

A J0, 45 000 cellules par puits ont été ensemencées en plaques 96 puits dans le milieu α-MEM (Gibco®) avec RP additionné de 10% (v/v) de SVF complémenté en hMCSF (facteur de prolifération).

A J4, le milieu a été renouvelé en ajoutant du RANKL (facteur de différenciation) et les molécules à tester à différentes concentrations (10^{-4} ng/mL à 10 ng/mL). Les molécules ont été solubilisées dans de l'EtOH absolu puis des dilutions ont été effectuées avec un mélange PBS-2% EtOH. Le pourcentage d'EtOH est resté constant dans tous les puits. Le milieu de culture a ensuite été renouvelé deux fois par semaine.

Plusieurs contrôles ont été réalisés :

- un contrôle négatif : milieu de culture avec MCSF sans RANKL
- un contrôle milieu : milieu de culture avec MCSF et RANKL
- un contrôle solvant : milieu de culture avec MCSF, RANKL et 5% de PBS-2% d'EtOH
- un contrôle positif : de l'alendronate à 5 µM et 25 µM (biphosphonate cytotoxique)

Lorsque des cellules plurinucléées contenant au moins trois noyaux ont été observées au microscope inverse, une coloration TRAP est effectuée afin de révéler les ostéoclastes matures exprimant laphosphatase acide tartrate résistante (enzyme TRAP). Un kit Acid Phosphatase leukocytes (Sigma, référence 387A-1kt) a été utilisé. Les cellules plurinucléés ont ensuite été observées sous microscope et comptées dans chaque puits.

- ✓ **Résultats**

La Figure II-56 présente la morphologie des cellules selon qu'elles se sont différenciées ou non en ostéoclastes matures. Les résultats de comptage des cellules différenciéesaprès fixation etcoloration TRAPsontprésentés dans la Figure II-57.En l'absence de RANKL (« contrôle négatif »), seules des précurseurs CD14 ont été observés. En présence de RANKL, les contrôles ont montré la présence d'ostéoclastes matures, avec une moyenne de 298 et 359 cellules plurinucléées comptées, en l'absence (« contrôle milieu ») ou en présence de solvant (« contrôle solvant »). Enfin, en présence d'alendronate (« contrôle positif »), aucune cellule CD14 ne s'est différenciée en ostéoclaste mature. Ces résultats ont permis de valider les conditions expérimentales.

L'observation microscopique des cellules a montré que la ligérine et le TNP-470 ont induit une diminution du nombre d'ostéoclastes formés aux concentrations les plus fortes, sans modifier la morphologie des cellules précurseurs. Ceci indique clairement que ces molécules n'agissent pas par cytotoxicitésur les cellules CD14, mais par une inhibition de leur différenciationen ostéoclastes(Figure II-56).

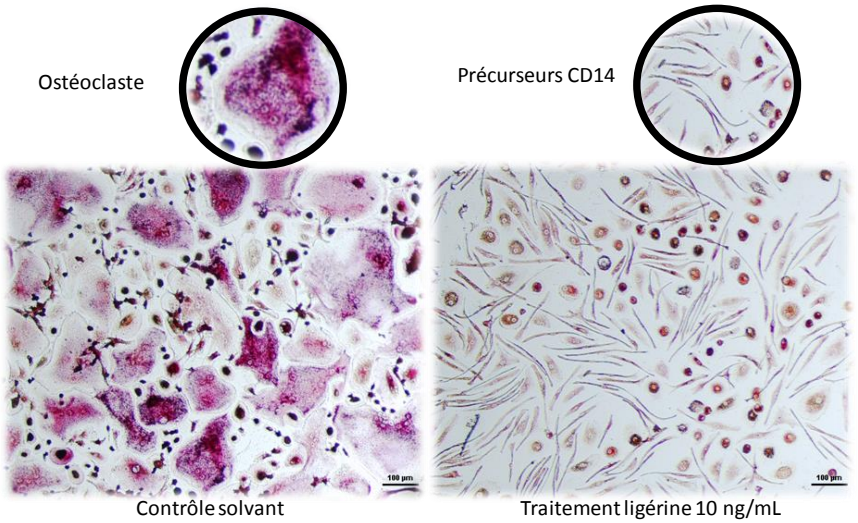


Figure II-56 : Morphologie des cellules CD14 après coloration TRAP
Cellules différenciées en ostéoclastes dans le cas du contrôle solvant,
Cellules CD14 non différenciées dans le cas du traitement à la ligérine (10 ng/mL)

Concernant la ligérine, la différenciation en ostéoclastes a été inhibée à partir d'une concentration de 1 ng/mL,induisant une diminution de 50%du nombre de cellules plurinuclées observables ; à une concentration de 10 ng/mL, la formation d'ostéoclastes matures était négligeable (en moyenne 3 par puits). Le TNP-470 a également montré une activité, mais significativement ($p \leq 0{,}001$) plus faible que celle de la ligérine : à 1 ng/mL, la différenciation n'a été diminuée que de 29%.

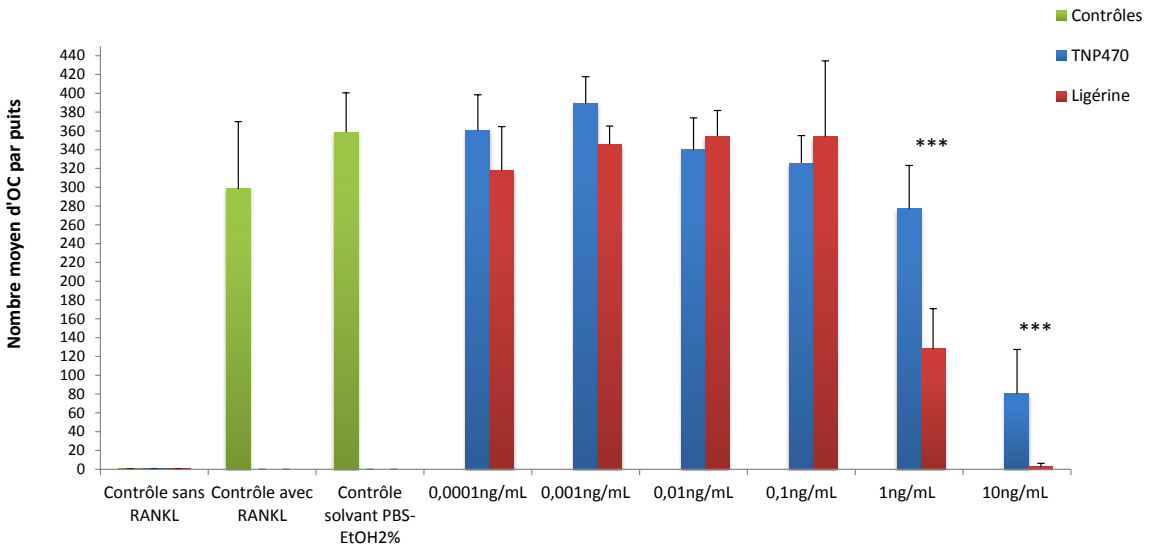


Figure II-57 : Evaluation de la ligérine et du TNP-470 sur l'ostéoclastogénèse humaine *in vitro* : comptage des ostéoclastes matures (OC) par puits *(***significativité* $p \leq 0{,}001$)

Ainsi, la ligérine semble présenter une activité particulièrement intéressante comme inhibiteur de l'ostéoclastogenèse puisque active à dose nanomolaire (CI_{50} de 1 ng/mL soit 2,4 nM), concentration qui a été montrée non cytotoxique sur les lignées fibroblastiques HFF2. Des essais complémentaires

devront être engagés afin de déterminer si elle peut présenter un intérêt en thérapeutique, seule ou en association, lorsqu'une ostéolyse est la cause d'une pathologie (ostéoporose) ou lui est associée (cancers osseux primitifs et métastases osseuses).

3. Conclusion générale et perspectives

La ligérine et autres dérivés hémisynthétiques du fumagillol sont donc des composés cytostatiques à activité sélective sur cellules d'ostéosarcomes. Les données concernant l'évaluation pharmacologique *in vitro* de ces composés ont fait l'objet d'une publication (Annexe XXI). Parmi l'ensemble des molécules testées au cours de cette thèse, la ligérine reste la substance pour laquelle le potentiel de développement est le plus prometteur. Plusieurs raisons justifient ce choix :

1. Elle présente une activité supérieure ou égale aux autres dérivés synthétisés quelle que soit la lignée tumorale employée, murine ou humaine.
2. Son indice de sélectivité est supérieur à celui du TNP-470 sur lignées humaines avec une toxicité moindre
3. Les essais préliminaires *in vivo* semblent encourageants. De futures études sur modèles d'ostéosarcomes permettront de confirmer ces résultats. Plusieurs paramètres supplémentaires seront à prendre en compte, tels que la dose maximale tolérée, la toxicité systémique, plus particulièrement la neurotoxicité, et l'effet sur l'apparition d'une ostéolyse.
4. Les analyses sur l'ostéoclastogenèse ont montré que la ligérine inhibe l'ostéoclastogenèse sans effet cytotoxique, avec une activité supérieureà celle du TNP-470. Cette dernière piste thérapeutique pouvant cibler par exemple la réduction des phénomènes d'ostéolyses liés aux tumeurs osseuses (dans le cadre d'un traitement adjuvant en chimiothérapie cancéreuse) ou encore le traitement préventif de l'ostéoporose, est un nouvel axe de développement de ce composé.
5. Si comme les molécules de cette série chimique, la ligérine inhibe la MetAP2 et vu l'implication de cette enzyme dans les processus de régulation de la biologie cellulaire, l'activité de la ligérine pourrait faire l'objet d'étude sur d'autres modèles de pathologies (paludisme, leishmaniose…). Néanmoins, il apparaît avant tout que le mécanisme d'action de la ligérine devrait être investigué et cela, dans un premier temps, avec des tests d'inhibition de la MetAP2.
6. Par la présence conjointe de son chlorométhylène et de son groupement ester succinique, cette molécule naturelle originale se distingue des analogues de la fumagilline ayant fait l'objet d'une publication soit dans la littérature scientifique, soit sous la forme de brevets. C'est ce qui a permis la protection de la ligérine sous la forme d'une demande de brevet.

4. Le brevet ligérine : développement et devenir

La demande de brevet concernant la ligérine et son activité antiproliférative sur ostéosarcome a été déposée en mars 2011 et s'intitulait « DERIVES UTILES DANS LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DE TUMEURS OSSEUSES ». L'opinion écrite[2] délivrée par l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI) suite à la demande de dépôt de brevet mettait en avant la nouveauté des composés bioactifs : « *Aucun des documents de la littérature ne divulgue de composés spécifiques dans la zone de recoupement et la présence systématique du substituant de type « -O-C(O)-A1-A2 » est considéré comme un nouvel élément structural qui distingue l'objet revendiqué de l'état de la technique au sens d'une sélection nouvelle* ». Le critère de nouveauté étant le seul examiné sur le sol français, le brevet a pu être déposé en France : il a été publié en septembre 2012 (Egorov *et al.*, 2012).

Néanmoins, le rapport de recherche préliminaire établi par l'INPI faisait état d'un certain nombre de documents antérieurs[3] dont deux étaient considérés comme opposables à la revendication d'inventivité du brevet car décrivant l'utilisation comme antitumoraux de certains analogues de la fumagilline. L'INPI indiquait : « *l'homme du métier confronté au problème technique posé considérerait la modification des substituants comme une procédure de développement ordinaire* ». Il était ainsi reproché l'absence de propriétés inattendues par rapport aux composés de l'art antérieur, et l'absence de comparatif par rapport au chef de file de la classe chimique, le TNP-470.

En effet, il était nécessaire de tester en parallèle les deux composés, de déterminer quel motif était responsable de leurs différences d'activité/toxicité, et de synthétiser des dérivés de la ligérine pour étayer les revendications et exemples du brevet par la présentation d'un panel de composés dérivés de celle-ci. L'obtention de ces résultats a permis d'engager le brevet dans une procédure internationale par une demande PCT (Patent Cooperation Treaty) faite en mars 2012[4].

La demande PCT a par la suite été examinée par l'INPI. Le rapport de recherche international qui en a résulté a alors remis en question le caractère persuasif des tests comparatifs entre la ligérine et le TNP-470. La raison évoquée portait sur le fait que les deux composés testés et comparés présentaient plusieurs différences structurales (en positions C6 et C7) et qu'il n'était donc pas possible de savoir laquelle de ces différences était à l'origine de la moindre toxicité de la ligérine. Afin de lever cette objection, les tests sur l'analogue chloré en C7 du TNP-470 ontmis en évidence que la chaîne succinyle était responsable de ce phénomène.

Cependant, étant donné le manque d'éléments pour supporter le niveau d'inventivité revendiqué (au sens de l'office international des brevets) dans la demande de PCT, celle-ci a été stoppée (elle a été rendue publique en octobre 2012 sous le numéro d'enregistrement WO2012130906 A1). Lesrésultats des nouvelles études qui seront réalisées suite à ce travail permettront de définir la suite à donner à cette démarche.

[2] En réponse à un dépôt de brevet, l'INPI délivre un rapport de recherche préliminaire citant tous les documents de l'art antérieur permettant de juger de la nouveauté et du caractère inventif du brevet ; ce rapport est accompagné d'une opinion écrite expliquant les conclusions obtenues suite à l'étude de ces critères.
[3] Documents antérieurs de catégorie X : document qui s'oppose à lui seul à ce qu'une invention revendiquée puisse être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive.
[4] Le texte de la demande PCT figure en Annexe XXII.

5. Epilogue

Très récemment, les résultats décrits en 2013 par l'équipe de Christopher Arico-Muendel du laboratoire Praecis Pharmaceuticals®(Arico-Muendel *et al.*, 2013), ont apporté des éléments nouveaux sur les relations structure-activité dans cette série chimique, et particulièrement sur les chlorohydrines, jusqu'alors peu investiguées. En effet, dans cette publication les auteurs s'intéressaient à la métabolisation du PPI-2458, leur candidat médicament, et ont proposé un schéma général présentant deux voies principales de formation des métabolites in vivo, l'une détoxifiante, l'autre activatrice (Figure II-58). Ils ont montré en utilisant un modèle synthétique se rapprochant du suc gastrique, que suite à l'administration orale du PPI-2458, certains de ses métabolites, formés dans l'environnement stomacal acide par ouverture du spiro-époxyde, étaient des analogues de type chlorohydrines (composés M-I et M-II). Les auteurs ont alors évalué l'activité inhibitrice de ces métabolites sur la MetAP2 : contrairement aux métabolites de type diols (composés D-I et D-II), les chlorohydrines se sont révélées aussi actives que la molécule originelle, à condition toutefois que le pH du milieu dans lequel le test est fait soit faiblement basique. Ceci suggérant une reformation de l'époxyde par perte de l'halogène après réduction (composé M-III), les dosages du PPI-2458 et de son métabolite chloré M-I après incubation dans du plasma murin ont montré que la recyclisation après déhalogénation est bien effective et est un processus immédiat. Les auteurs en déduisaient que les composés de type chlorohydrines n'auraient pas d'activité intrinsèque et que les métabolites époxydés seraient en fait les seules formes actives et interagissant avec la cible.

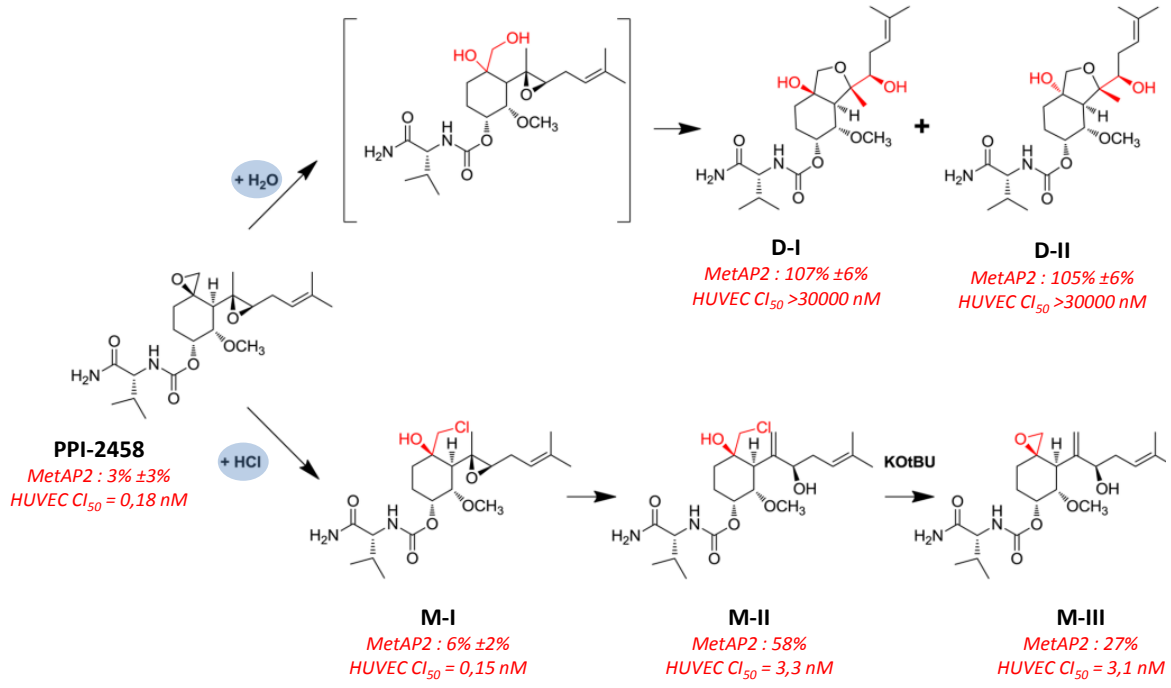


Figure II-58 : Schéma des biotransformations du PPI-2458 en conditions aqueuses acides et activités inhibitrices de la MetAP2 (activité résiduelle après 8h de traitement, en%) et de la prolifération des cellules HUVEC (CI_{50} en nM) des différents métabolites
KOtBU : Potassium tert-butoxide (base forte), (Arico-Muendel *et al.*, 2013)

Ceci suggère donc que les chlorohydrines n'atteignent jamais leur cible et qu'elles sont des prodrogues. Afin de vérifier cette hypothèse avec la ligérine, nous avons donc réalisé une étude de stabilité qui devait permettre d'évaluer si, dans les conditions de culture cellulaire employées tout au long des tests réalisés au cours de cette thèse (milieu RPMI + 5 % SVF dont le pH mesuré est légèrement alcalin (7,9)), celle-ci se dés-halogénait spontanément pour former le 6-O-succinylfumagillol. Pour cela, ces deux molécules ont été dosées semi-quantitativement par couplage LC-HRMS/MS après incubation en présence ou non de milieu de culture.

- ✓ **Protocole**

La stabilité de la ligérine a été évaluée dans le milieu de culture cellulaire RPMI + 5 % SVF (pH 7,9). Un témoin négatif a été réalisé dans l'eau distillée (pH 6,8). Deux témoins « milieux » (RPMI et eau distillée) ont été réalisés afin de soustraire le bruit de fond des analyses par spectrométrie de masse.
Ainsi, les quatre conditions expérimentales ont été :
- 100 µL RPMI + 5 % SVF + 10 µL H_2O/EtOH 89:11
- 100 µL RPMI + 5 % SVF + 10 µL ligérine (0,11 µg/mL dans H_2O/EtOH 89:11 (v/v))
- 100 µL H2O + 10 µL ligérine (0,11 µg/mL dans H_2O/EtOH 89:11 (v/v))
- 100 µL H2O + 10 µL H_2O/EtOH 89:11 (v/v)

Les préparations réalisées en triplicat ont été incubées pendant 24 h à 37°C sous une atmosphère enrichie en 5 % CO2. De l'acétonitrile (400 µL) a ensuite été ajouté dans les tubes qui ont alors été centrifugés à 3500 tr pendant 3 min. Un prélèvement de 450 µL a été effectué dans chaque tube et séché à 40°C sous flux d'azote avant d'être repris par 100 µL de MeOH (qualité ULC/MS, Biosolve Chimie SARL, 57260 Dieuzé, France) et filtré sur membrane de cellulose régénérée (porosité 0,45 µm, Sartorius StedimBiotech, Goettingen, Germany). La méthode d'analyse par couplage HPLC-HRMS permettant l'identification et la semi-quantification de la ligérine et du 6-O-succinylfumagillol est présentée en Annexe II (méthode analytique B). Deux contrôles supplémentaires ont été réalisés pour écarter tout risque d'artéfact dû au solvant et à l'analyse par spectrométrie de masse elle-même (dégradation dans la source,…), par analyse de solutions extamporanées de ligérine (0,11 µg/mL) dans l'EtOH pur ou dans le mélange H_2O/EtOH 89:11 (v/v).

La Figure II-59 présente les abondances relatives de la ligérine et du 6-O-succinylfumagillol mesurées par LC-HRMS dans les différentes conditions expérimentales. Après 24 h d'incubation dans le milieu RPMI, il apparaît que 97 % de la ligérine se ré-époxyde en C3 pour donner le 6-O-succinyl-fumagillol. En solution aqueuse, moins basique, le même phénomène est observé pour 86 % de la ligérine. De la même façon, les contrôles montrent que ce phénomène est instantané puisque, si elle est stable en solution éthanolique (on la retrouve à 99 % sous forme inchangée), 14 % de la ligérine est retrouvée sous forme spiro-époxyde lorsqu'elle est analysée directement après sa mise en solution fortement aqueuse (H_2O/EtOH 89:11 (v/v)).

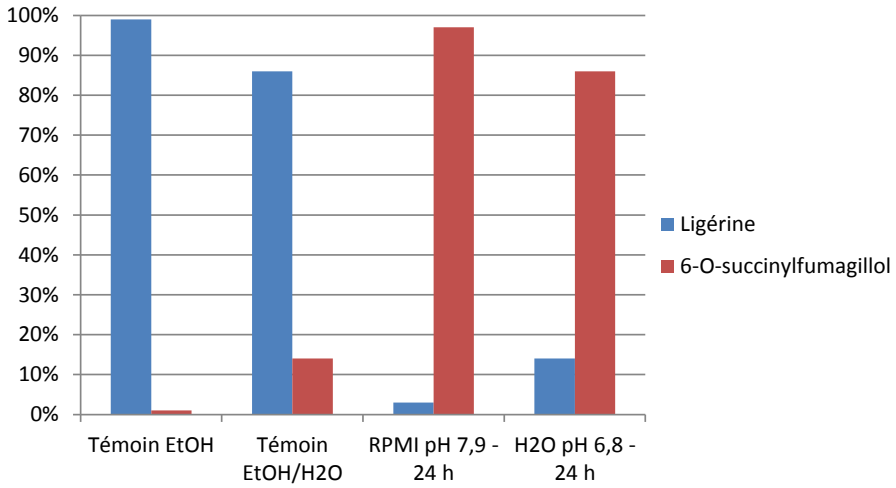


Figure II-59 : Abondances relatives de la ligérine et du 6-O-succinylfumagillol dans les conditions expérimentales (témoins, milieu de culture cellulaire RPMI, solution aqueuse)

Ainsi, la ligérine est une molécule peu stable en conditions aqueuses ou faiblement basiques, et on peut donc supposer que lors des tests réalisés sur cette molécule, ce soit toujours son métabolite qui ait été réellement évalué. Ceci peut être une des hypothèses permettant d'expliquer la similitude des activités antiprolifératives observés pour les composés chlorés et leurs analogues spiro-époxydés. Cependant, un doute persiste : en effet, ce phénomène n'expliquerait pas pourquoi l'analogue bromé de la ligérine est systématiquement moins actif, quelles que soient les lignées cellulaires. Il serait donc intéressant de chercher la raison de cette différence d'activités, sachant que, d'un point de vue théorique, les trois analogues peuvent d'une même façon s'ancrer dans la poche active de la MetAP2. Ainsi, une première étude devrait être réalisée pour définir les différences de réactivité du carbone méthylénique en C7 selon ses substituants. Solubilités et stabilités devront également être comparées.

PARTIE III
Penicillium ligerum : une nouvelle espèce fongique marine

La souche MMS351 productrice de la ligérine s'est avérée ne correspondre à aucune espèce connue de *Penicillium*. Des échanges avec le Pr Frisvad (DTU, Copenhague) spécialiste international reconnu de ce genre, nous ont confirmé qu'il s'agissait sans doute d'une nouvelle espèce. Dans le but de décrire cette nouvelle espèce, nous avons recherché dans la mycothèque du laboratoire d'autres souches de *Penicillium* qui en étaient proches tant d'un point de vue phénotypique que génotypique. Trois autres souches ont ainsi été retenues (MMS388, MMS399 et MMS747) et étudiées sur différents critères afin d'établir le profil de cette nouvelle espèce.

✓ **Les souches étudiées**

Les quatre souches étudiées proviennent toutes du littoral de la Loire Atlantique à l'ouest de la France. Trois d'entre elles proviennent de l'estuaire de la Loire et une de la baie de Bourgneuf. Le Tableau III-1et la Figure III-1 donnent les origines exactes des prélèvements dont sont issues ces souches.

Tableau III-1 : Origines des souches MMS351, MMS388, MMS399et MMS747

Souche	Type d'échantillon	Lieu d'origine	Date de prélèvement
MMS351	Eau de mer	Estuaire de la Loire (La Prée)	janvier 1997
MMS388	Moules (*Mytilus edulis*)	Estuaire de la Loire (La Prée)	janvier 1997
MMS399	Moules (*Mytilus edulis*)	Estuaire de la Loire (La Prée)	janvier 1997
MMS747	Sédiments	Baie de Bourgneuf (La Couplasse)	juin 2001

Figure III-1 : Répartition géographique des prélèvements

Les souches MMS388 et MMS399 proviennent du même prélèvement, mais ont été isolées séparément. Néanmoins, on peut penser qu'il s'agit d'un double isolement d'une même souche.

Si ces quatre souches correspondent bien à la même espèce, on peut affirmer que celle-ci semble ubiquiste puisqu'elle a été isolée dans différents écosystèmes (vaseux ou rocheux) et différents types de substrats (eau de mer, bivalves, sédiments).

Si les trois premières souches ont été toutes isolées en janvier 1997 à la Prée, c'est quatre ans après que la dernière a été isolée dans un lieu différent. Ceci démontre la pérennité de cette espèce dans la zone considérée.

Considérant que ces souches peuvent correspondre à une nouvelle espèce de *Penicillium*, peut-être spécifique du milieu marin, et étant donnée la zone géographique d'où elles proviennent, à savoir l'estuaire de la Loire (au sens large), nous avons choisi de la nommer *Penicillium ligerum*, l'adjectif *ligerum* se rapportant au nom latin de la Loire « *Liger* ».

De la même façon, la molécule bioactive isolée de la souche MMS351 a été appelée ligérine puisqu'elle provenait de *Penicillium ligerum* nov. sp.

Les micromycètes en général et ceux appartenant au genre *Penicillium* en particulier, sont très difficiles à identifier du fait de leur grande variabilité. Les critères utilisables pour les décrire et les classer sont de plusieurs ordres. Classiquement deux ont été utilisés :

- les caractères morphologiques macro- et microscopiques
- les caractères génotypiques basés sur la comparaison de séquences de certains gènes choisis

Depuis quelques années un autre critère a fait son apparition : l'étude du métabolome et la chimiotaxonomie.

Les deux premiers critères pour décrire les souches étudiées, c'est à dire les aspects phénotypiques et génotypiques, font l'objet du premier et du deuxième chapitre de cette troisième partie. La description est ensuite complétée dans le dernierchapitre de ce mémoire par l'étude du métabolome des souches. Cette étude s'intéressera tout d'abord aux analogues naturels de la ligérine dont les détections et identifications furent permises grâce à la mise en évidence en spectrométrie de masse du schéma de fragmentation des composés de cette série chimique. L'isolement et la caractérisation structurale d'autres métabolites venant compléter la connaissance du métabolome de l'espèce seront ensuite présentés. Enfin, l'étude déréplicative des extraits des quatre souches de *P. ligerum* viendra apporter une vision plus globale à la connaissance du métabolome de cette nouvelle espèce en cours de description.

CHAPITRE I. Etude phénotypique

1. Observations macroscopiques

1.1. Caractéristiques morphologiques comparées des colonies des quatre souches (MMS351, MMS388, MMS399 et MMS747)

La morphologie macroscopique des souches fongiques cultivées sur le milieu DCA (Annexe II) a été observée après 11 jours d'incubation à 27°C sous lumière naturelle. Dans ces conditions, le mycélium des quatre souches est bien développé. Les colonies sont compactes et épaisses (forme de « galette ») avec un mycélium de couleur blanchâtre et légèrement rosé sur le pourtour (Figure III-2A.). Les spores sont de couleur vertebleutée et la sporulation commence au centre et s'étend vers la périphérie de la colonie (Figure III-2B.). On note également la présence sur le mycélium de gouttelettes d'exsudats de couleur orange (Figure III-2C.) et une coloration rouge plus ou moins foncée du milieu de culture et du verso de la souche (Figure III-2D).

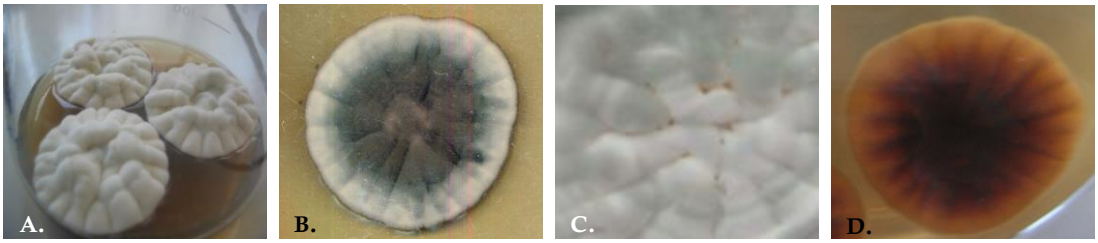
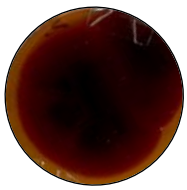
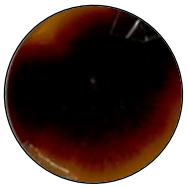


Figure III-2 : Morphologie macroscopique de *Penicillium ligerum*
A. Colonies, B.Sporulation, C. Gouttelettes d'exsudat, D. Verso

Le Tableau III-2 donne la comparaison morphologique des quatre souches étudiées. On constate que les colonies se ressemblent avec quelques différences en particulier sur la production d'une ou des substances qui colorent en rouge le verso de la colonie et la gélose, qui est beaucoup plus importante pour les souches MMS388 et MMS399. Les souches MMS351 et MMS747 sont elles-mêmes très proches.

Tableau III-2 : Comparaison morphologique des quatre souches fongiques cultivées sur milieu DCA

Caractère	MMS351	MMS388	MMS399	MMS747
Recto				
Mycélium	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre
Exsudats	Gouttelettes orangées	Gouttelettes orangées	Gouttelettes orangées	Gouttelettes orangées
Sporulation	vert bleuté	vert bleuté	vert bleuté	vert bleuté
Verso				
	Rougeâtre au centre	**Très sombre**	**Très sombre**	**Rougeâtre au centre**

1.2. Comparaison de la croissance des souches MMS351 et MMS388

La similitude constatée au niveau morphologique des souches MMS351 et 747 d'une part, et MMS388 et MMS399 d'autre part se retrouve si on effectue une comparaison de la croissance des quatre souches. On constate que le développement des colonies des souches MMS388 et 399 est beaucoup plus rapide que celui des souches MMS351 et MMS747. Pour les comparer, nous avons relevé les diamètres des colonies au cours de leur croissance pour les souches MMS351 et MMS388 cultivées pendant 18 jours sur le milieu YES (Yeast Extract Saccharose). Pour la souche MMS351, le diamètre moyen des colonies augmente progressivement, pour atteindre un maximum de 4,7 cm à J18 (Figure III-3A.). Les colonies ne sont alors pas confluentes. Pour la souche MMS388, le développement des colonies est plus rapide et plus important, le diamètre moyen atteint ainsi 6,8 cm à J18 (Figure III-3B).

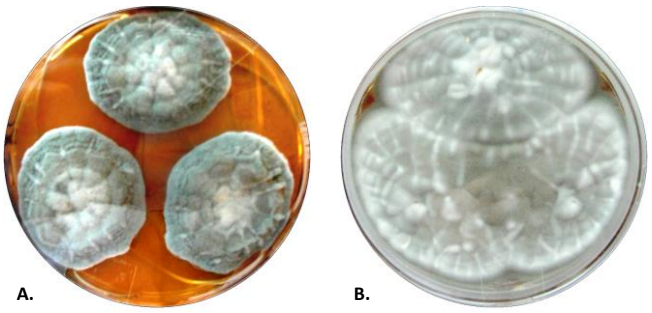


Figure III-3 : Colonies des souches cultivées 18 jours sur milieu YES
A. MMS351 et B. MMS388

La Figure III-4donne les courbes de croissance correspondantes.

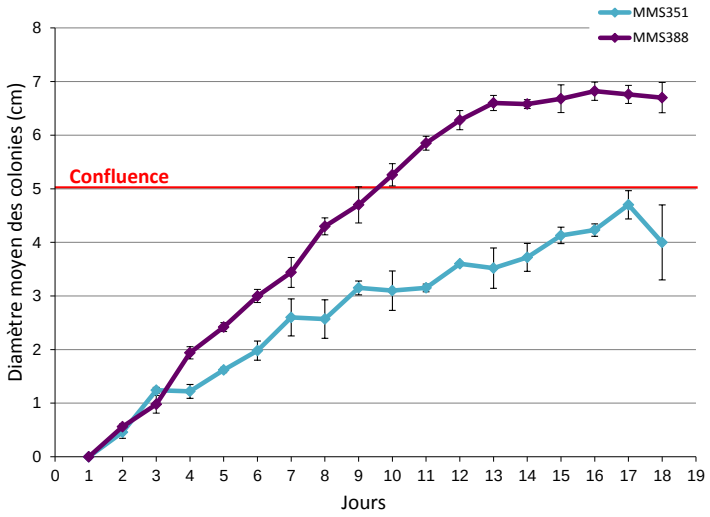


Figure III-4 : Comparaison du diamètre des colonies des souches MMS351 et MMS388 cultivées pendant 18 jours

Il est intéressant de constater que la courbe de MMS351 semble asymptotique par rapport au diamètre de confluence des colonies qui est d'environ 5 cm. Cela laisserait penser que les colonies de cette souche s'inhiberaient dans leur croissance, ce qui les empêcherait d'arriver à confluence dans des conditions normales de culture. Ce n'est pas le cas de la souche MMS388. Il pourrait donc exister une différence de production d'un ou plusieurs métabolites possédant des propriétés inhibitrices. D'ailleurs, lors des opérations d'isolement des souches fongiques à partir des échantillons marins, la souche MMS351 avait été particulièrement choisie car elle inhibait la pousse des autres colonies autour d'elle (Figure III-5).

Figure III-5 : La souche MMS351 inhibant la pousse des colonies autour d'elle

1.3. Variabilité de la morphologie des colonies sur différents milieux (MMS351)

Les champignons ont un métabolisme secondaire dépendant des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement. Ainsi, en laboratoire, lorsque les souches fongiques sont cultivées sur des milieux solides ou liquides de composition différente, une importante variabilité phénotypique est observée. Les quatre souches de *P. ligerum* ont donc été cultivées sur cinq milieux de culture différents. La Figure III-6 illustre les variations phénotypiques observées à J11 pour la souche MMS351 cultivée.

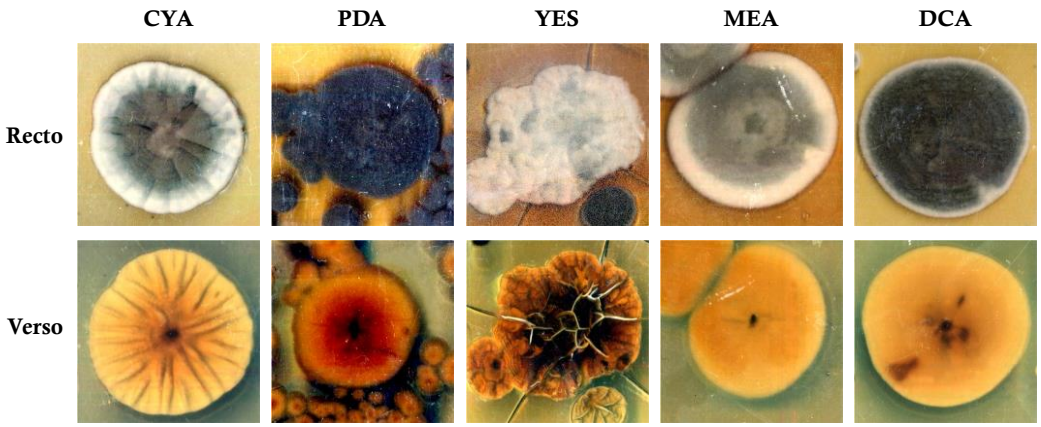


Figure III-6 : Variations phénotypiques de la souche MMS351 cultivée en boîtes de Pétri sur 5 milieux différents. Observations macroscopiques du recto et du verso des colonies

Ce phénomène montre clairement les limites de l'utilisation de la description macroscopique simple pour décrire une souche. C'est pourquoi on utilise conjointement d'autres techniques (observation microscopique, génétique et métabolomique) pour décrire les espèces.

2. Observations microscopiques

✓ **Protocole de la microscopie électronique à balayage**

L'ensemencement des souches fongiques est réalisé à l'aide d'une suspension de conidies que l'on répartit sur des grilles métalliques. Ces grilles sont ensuite déposées sur la surface des milieux gélosés (DCA). Après 3 jours de croissance du champignon, les grilles sont récupérées. Les échantillons sont fixés pendant 24 h au glutaraldéhyde 2,5% en solution tampon cacodylate 0,1 M puis déshydratés dans une série de bain d'éthanol de concentration croissante 30, 50, 70, 80, 90, 100, 100% (v/v) de 30 minutes chacun. L'éthanol est ensuite substitué par del'héxaméthyldisilazane (HDMS) pendant 12 h avant le montage des échantillons sur plot. Enfin, on réalise une métallisation des échantillons à l'or-palladium (3 min) avant de les observer sous microscope électronique à balayage (JEOL JSM 7600F scanning electron microscope with field emission gun).

✓ **Résultats : comparaison microscopique de la morphologie des souches**

Pour cette étude microscopique, seules les morphologies des souches MMS351 et MM388 ont été étudiées ; ces deux souches constituant un exemple dans chacun des deux groupes distingués par l'étude phénotypique macroscopique.

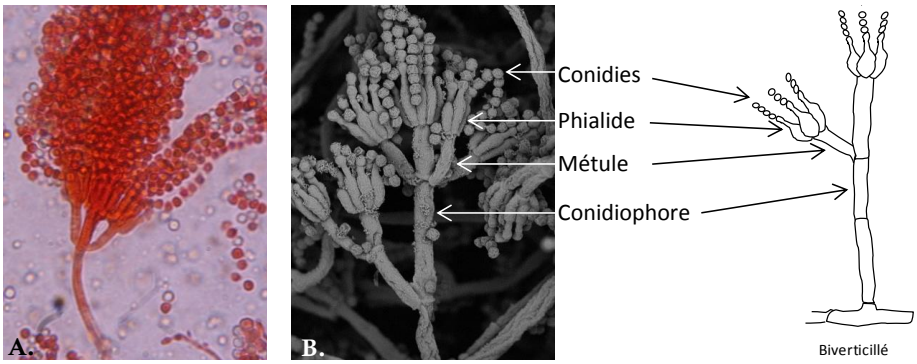


Figure III-7 : Observation microscopique de *P. ligerum*.
A. Microscopie optique coloration rouge congo (Gx400), B. Microscopie électronique à balayage (Gx2500)

Les deux souches étudiées présentent une analogie de structure lorsqu'elles sont observées à l'aide de microscopes optique et électronique. Les pénicilles sont biverticillés, symétriques et avec parfois des branches additionnelles (Figure III-7). Les phialides mesurent 4 à 5 µm de long. Elles sont cylindriques et resserrées au niveau du cou sous les conidies.

Les ornementations des conidies évoluent durant leur développement jusqu'à la formation de la conidie mature. L'ornementation des conidies matures est constante pour une même espèce sujette à différents stress physiologiques ou environnementaux et peut donc servir comme critère de reconnaissance chez les *Aspergillu*s et les *Penicillium(Simões et al., 2013)*. Les conidies peuvent être globuleuses, ellipsoïdes ou fusoïdes et ornementées : échinulées, tuberculées, striées, réticulées, verruqueuses…

Il est parfois difficile d'observer la forme et l'ornementation des conidies étant donné que le protocole de déshydratation et de fixation nécessaire pour leur observation en microscopie à balayage électronique, peut induire une distorsion de celles-ci et une variation de leur taille. Dans notre cas, le protocole permet de conserver et d'observer la forme et l'ornementation des conidies matures. Les souches étudiées présentent des conidies matures richement ornementées (Figure III-8). Les conidies mesurent environ 1 µM, sont globuleuses et réticulées (« pelote de laine »).

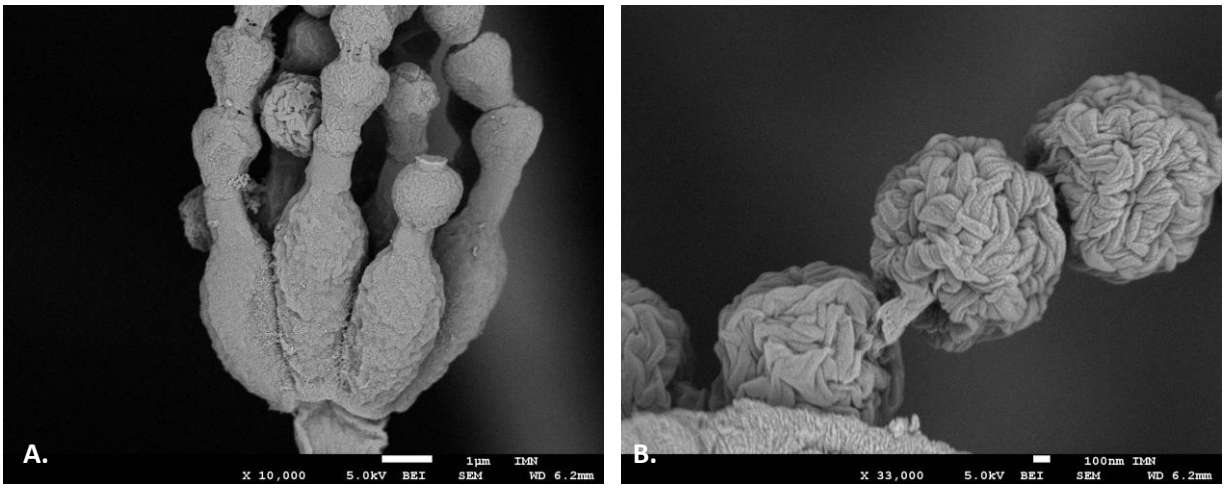


Figure III-8 : Observations microscopiques de *P. ligerum*en MEB.
A. phialides (Gx10 000) et B.conidies (Gx33 000)

3. Conclusion

Les quatre souches fongiques ont présenté des similitudes morphologiques certaines tant d'un point de vue macroscopique que microscopique. Néanmoins, deux groupes de deux souches peuvent être distinguées au vue des comparaisons phénotypiques regroupant ainsi MMS351 et MMS747 d'une part et MMS388 et MMS399 d'autre part.

Bien que les champignons ont été historiquement identifiés et classés grâce à des critères morphologiques, les mycologues emploient aujourd'hui en plus des outils de biologie moléculaire pour mieux identifier les champignons et organiser leur systématique.

CHAPITRE II. Etude génotypique

Des données complémentaires étant nécessaires pour mener à bien la description de la nouvelle espèce *P. ligerum*, nous avons basé la suite de notre travail descriptif d'un point de vue génotypique.L'utilisation des empreintes génétiques générées grâce à l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (random amplified polymorphic DNA), de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP restriction fragment length polymorphism) et l'utilisation de différentes séquences d'ADN sont maintenant des techniques communes que l'on combine à l'interrogation de base de données en ligne (MycoBank® (CBS, http://fr.mycobank.org), GenBank®, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). L'analyse des séquences d'ADN ribosomal est devenue la méthode la plus utilisée.

Notre étude génotypique a été réalisée tout d'abord par séquençage des espaceurs transcrits internes de l'ADN ribosomal, ITS-1 et -2 (Internal Transcribed Spacer, régions non-codantes espaçant les gènes ribosomaux et très conservées au sein des espèces). Cependant le séquençage des régions ITS est considéré comme insuffisamment discriminant au niveau espèce chez *Penicillium*(Skouboe *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 1999). Ainsi, afin de déterminer l'espèce avec plus de précision, une deuxième étude de biologie moléculaire s'est intéressée aux séquences du gène de la β-tubuline.

Les séquences ont été enregistrées dans la banque de données GenBank® sous les codes d'accession indiqués dans le Tableau III-3.

Tableau III-3 : Code d'accession GenBank® des séquences ITS et β-tubuline des quatre souches fongiques

Souches	ITS	β-tubuline
MMS351	JN676192	JN794530
MMS388	KF953979	KF953982
MMS399	KF953980	KF953981
MMS747	JN794528	KF953978

Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel MEGA 5®(Tamura *et al.*, 2011).

- ✓ **Protocole d'extraction, d'amplification et de purification de l'ADN**

a) Extraction de l'ADN à partir du matériel fongique

Une partie d'un champignon cultivé à 27°C en boîte de pétri est prélevée avant sporulation et déposée dans un microtube. Le prélèvement est ensuite lysé grâce à un tampon de lyse (50 µL) avant d'être broyé au Potter électrique pendant quelques minutes. Le tampon de lyse est constitué de tampon Tris HCl 100 mM pH8,0, de NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, de SDS 10%, de Sarcosyl 10% et de protéinase K 20 mg/mL. Du tampon de lyse (1 mL) est ajouté avant homogénéisation et incubation 2 h à 55°C. Une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (1 mL, pH 8,2) est ajoutée et permet la précipitation des protéines. La mixture est agitée avant d'être centrifugée à 13000 rpm pendant 30 min. Le surnageant est ensuite récupéré. De l'isopropanol froid est ajouté (-24°C) pour la précipitation de l'ADN avant de mélanger par retournement et de laisser reposer 30 min au congélateur.La préparation est centrifugée pendant 30 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est jeté avant de reprendre le culot d'ADN par 500 µL d'éthanol 70° froid (-24°C). Le culot d'ADN est ensuite décollé puis centrifugépendant 10 min à 13 000 rpm à 0°C. Le surnageant est alors jeté avant de réitérer une fois l'étape de lavage par l'éthanol froid. Le culot est ensuite séché puis repris par 10 µL d'eau à 65°C et enfin stocké au congélateur -24°C. La quantité d'ADN est déterminée au Nanodrop™.

b) Amplification de l'ADN

Une solution mix PCR est tout d'abord préparée avec 5 µL de tampon pH8,5 (Promega® GoTaq flexibuffer), 2 µL de $MgCl_2$ (Promega®), 0,5 µL de dNTPs (Promega®), 0,8µL d'amorce 1 (Sigma) (ITS1, bt2a,…), 0,8µL d'amorce 2 (Sigma®) (ITS2, bt2a,…), 11,8 µL d'eauet 0,1µL de Taq polymérase (Promega®). L'ADN (4 µL, 100 ng) est ajouté dans le mix terminé. La préparation est centrifugée avant de l'insérer dans le thermocycleur (Applied Biosystems®) pour 39 cycles d'amplification (dénaturation de l'ADN 3 min 95°C, dénaturation de l'ADN 1 min 95°C, hybridation des amorces 1 min 55°C = Tm, élongation 1 min 72°C, finalisation des élongations 7 min 72°C).

c) Purification de l'ADN

La purification de l'ADN est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel®). Dans un microtube, 200 µL de solution NT sont ajoutés à 100 µL d'ADN. La solution est placée sur le filtre du kit et centrifugée 1 min à 11 000 g. Une solution NT3 (600 µL) est ensuite placée sur le filtre avant d'être à nouveau centrifugée 3 min à 11 000 g. Le filtre est ensuite placé sur un nouveau microtube et séché 10 min à l'étuve (70°C). Sur le filtre, du tampon NE amené à 50°C (Tris/HCL, 15 à 50 µL, 5 mM pH8,5) est déposé. Après 1 min de mise en contact, une centrifugation d'1min à 11 000g est réalisée avant de jeter le filtre.

Enfin ; l'ADN est dosé au nanodrop®pour permettre de préparer une solution à 25 ng/µL qui est envoyée pour séquençage auprès de la société Genoscreen® (http://www.genoscreen.fr/fr/genomique/sequencage-sanger).

1. Séquençage de la région ITS-1

1.1. Comparaison de la région ITS-1 des quatre souches

Le séquençage de la région ITS-1 des quatre souches a donc été réalisé et l'alignement des séquences obtenues estprésenté dans la Figure III-9.

```
MMS351          TCTGATTCACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACG 60
MMS388          TCTGATTCACCTCCCNCCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACG 60
MMS399          TCTGATTCACCTCCCNCCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACG 60
MMS747          TCTGATTCACCTCCCNCCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACG 60
                ********** ************************************************

MMS351          GCCGCCGGGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACTCTGTAT 120
MMS388          GCCGCCGGGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACTCTGTAT 120
MMS399          GCCGCCGGGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACTCTGTAT 120
MMS747          GCCGCCGGGGGGCATCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTTGAACTCTGTAT 120
                ************************************************************

MMS351          GAAAATTGCAGTCTGAGTCTAAATATAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 180
MMS388          GAAAATTGCAGTCTGAGTCTAAATATAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 180
MMS399          GAAAATTGCAGTCTGAGTCTAAATATAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 180
MMS747          GAAAATTGCAGTCTGAGTCTAAATATAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 180
                ************************************************************

MMS351          GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 240
MMS388          GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 240
MMS399          GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 240
MMS747          GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCA 240
                ************************************************************

MMS351          GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG 300
MMS388          GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG 300
MMS399          GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG 300
MMS747          GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG 300
                ************************************************************

MMS351          TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCCCCTTCCCG 360
MMS388          TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCCCCTTCCCG 360
MMS399          TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCCCCTTCCCG 360
MMS747          TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCCCCTTCCCG 360
                ************************************************************

MMS351          GGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTT 420
MMS388          GGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTT 420
MMS399          GGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTT 420
MMS747          GGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTT 420
                ************************************************************

MMS351          TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAAACTTTTTTCCAGGT 480
MMS388          TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAAACTTTTTTCCAGGT 480
MMS399          TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAAACTTTTTTCCAGGT 480
MMS747          TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAAACTTTTTTCCAGGT 480
                ************************************************************

MMS351          TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA 529
MMS388          TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC----- 524
MMS399          TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT------ 523
MMS747          TGACCTCNGATCANGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC----- 524
                *******.******.****************************
```

Figure III-9 : Alignement des séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum*

Après alignement des séquences de la région ITS-1 des quatre souches, aucune différence n'est apparue.

1.2. Positionnement dans le genre *Penicillium*

L'alignement des séquences ITS avec celles des souches référencées dans la base de données GenBank® (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/) permet d'évaluer la proximité génétique des souches par rapport aux espèces déjà identifiées. Les séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum* et d'au moins une espèce par section du sous-genre *Penicillium*ont été alignées.

Les séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum* sont proches de celles d'espèces de la section *Canescentia* telle que *P. atrovenetum*, *P. coraligerum*, *P. canescens,P. jensenii* et *P. jansczewskii*(Figure III-10).

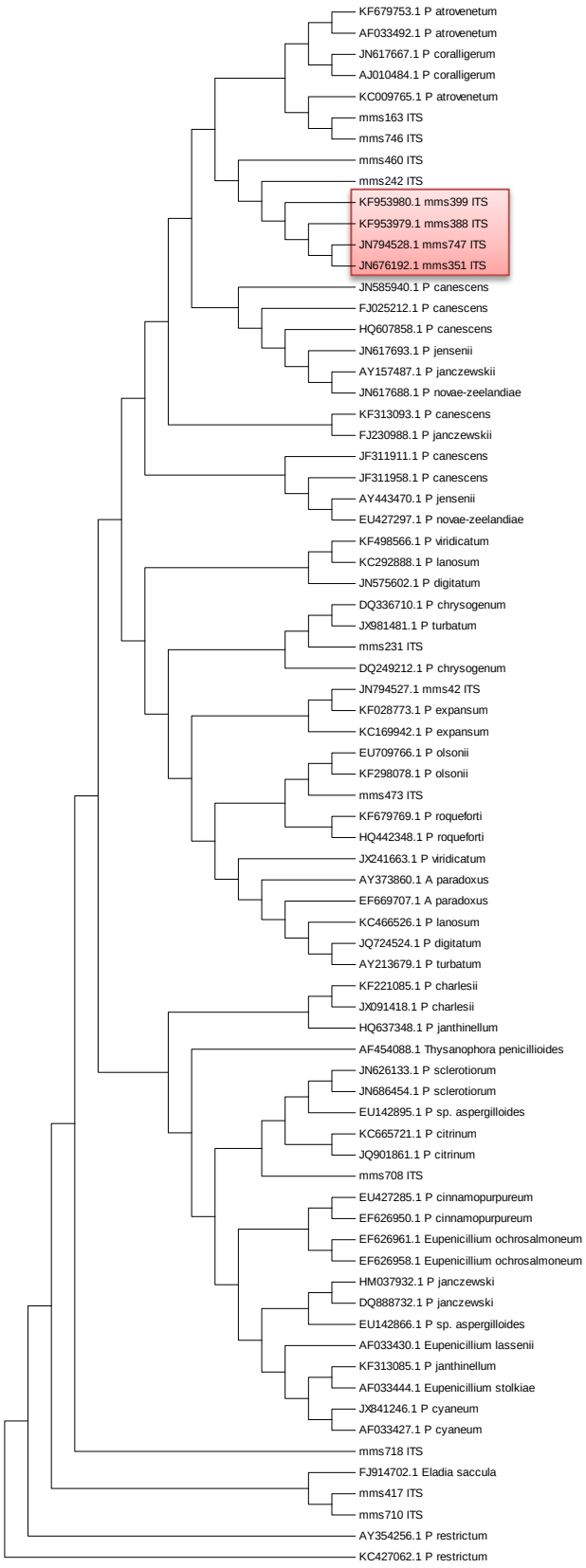


Figure III-10 :Arbre construit à partir des analyses phylogénétiques des séquences ITS-1 des quatre souches de *P. ligerum* et d'au moins une espèce de chaque section au sein du sous genre *Penicillium*

2. Gène de la β-tubuline

2.1. Comparaison des séquences du gène de la β-tubuline des quatre souches

Le séquençage du gène de la β-tubuline des quatre souches de *P. ligerum* et l'alignement des séquences obtenues ont été réalisés (Figure III-11).

```
MMS351TTTTTTCGCGTCATTGGTTCACAATTTTCTGACTGGATTACAGGCAAACCATCTCCG 57
MMS388          TTTTTTCGCGTCATTGGTTCACAATTTTCTGACTGGATTACAGGCAAACCATCTCCG 57
MMS399          TTTTTTCGCGTCATTGGTTCACAATTTTCTGACTGGATTACAGGCAAACCATCTCCG 57
MMS747          TTTTTTCGCGTCATTGGTTCACAATTTTCTGACTGGATTACAGGCAAACCATCTCCG 57
************************************************************

MMS351          GTGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTCAAAGTAGGATTTCTTGTGGTGGAT 117
MMS388          GTGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTCAATGTGGGATTTCTTGTGGTGGAT 117
MMS399          GTGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTCAATGTGGGATTTCTTGTGGTGGAT 117
MMS747          GTGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTCAAAGTAGGATTTCTTGTGGTGGAT 117
                ************************************:**.******************

MMS351          TGGGCAGCTGATATCTTGTTAGGTACAACGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGA 177
MMS388          TGGGCAGCTGATATCTTGTTAGGTACAACGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGA 177
MMS399          TGGGCAGCTGATATCTTGTTAGGTACAACGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGA 177
MMS747          TGGGCAGCTGATATCTTGTTAGGTACAACGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGA 177
                ************************************************** ****

MMS351          ACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAATATGTTGTAATTGGCTGCTTAAGCATTATCTGA 237
MMS388          ACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAATATGTTGTAATTGGCTACTTAAGCATTATCTGA 237
MMS399          ACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAATATGTTGTAATTGGCTACTTAAGCATTATCTGA 237
MMS747          ACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAATATGTTGTAATTGGCTGCTTAAGCATTATCTGA 237
                ******************************************.***************

MMS351          CTAGTATGTTTTGACCCCTCAGGCCCACGGTGACAAGTATGTTCCCCGTGCCGTTCTCGT 397
MMS388          CTAGTATGTTTTGACCCCTCAGGCCCACGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTTGT 297
MMS399          CTAGCATGTTTTGACCCCTCAGGCCCACGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTTGT 297
MMS747          CTAGTATGTTTTGACCCCTCAGGCCCACGGTGACAAGTATGTTCCCCGTGCCGTTCTCGT 297
                **** ********************************** ********************

MMS351          CGACTTGGAGCCCGGCACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAAGCTTTTCCG 357
MMS388          CGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAAGCTTTTCCG 357
MMS399          CGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAAGCTTTTCCG 357
MMS747          CGACTTGGAGCCCGGCACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTTTCGGCAAGCTTTTCCG 357
                ************** ******************************************

MMS351          CCCCGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACT- 416
MMS388          CCCCGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCA--- 414
MMS399          CCCCGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTA 417
MMS747          CCCCGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC-- 415
                ************************************************************
```

Figure III-11 : Alignement des séquences de la β-tubulinedes quatre souches de *P. ligerum*

Quelques différences sont à noter entre les séquences des β-tubulinesdes souches MMS351 et MMS747 d'une part et des souches MMS388 et MM399 d'autre part (distances calculées par le logiciel MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) et présentées dans le Tableau III-4. Cependant, la distance entre ces deux groupes de deux souches reste très faible et s'élève à 0,02.

Tableau III-4 : Distance entre les séquences de la β-tubuline des quatre souches

	MMS351	MMS747	MMS388	MMS399
MMS351				
MMS747	0,000			
MMS388	0,017	0,017		
MMS399	0,020	0,020	0,002	

2.2. Positionnement dans le genre *Penicillium*

Tout comme pour les analyses phylogénétiques réalisées avec les séquences ITS1, des tests d'alignement des séquences du gène de la β-tubuline des quatre souches avec les séquences d'au moins une espèce de chaque section du sous genre *Penicillium* (données GenBank®) ont été réalisés.Un arbre phylogénique a pu être obtenu (Figure III-12).Les résultats indiquent que cette espèce appartient certainement à la section *Canescentia* du sous-genre *Penicillium.*

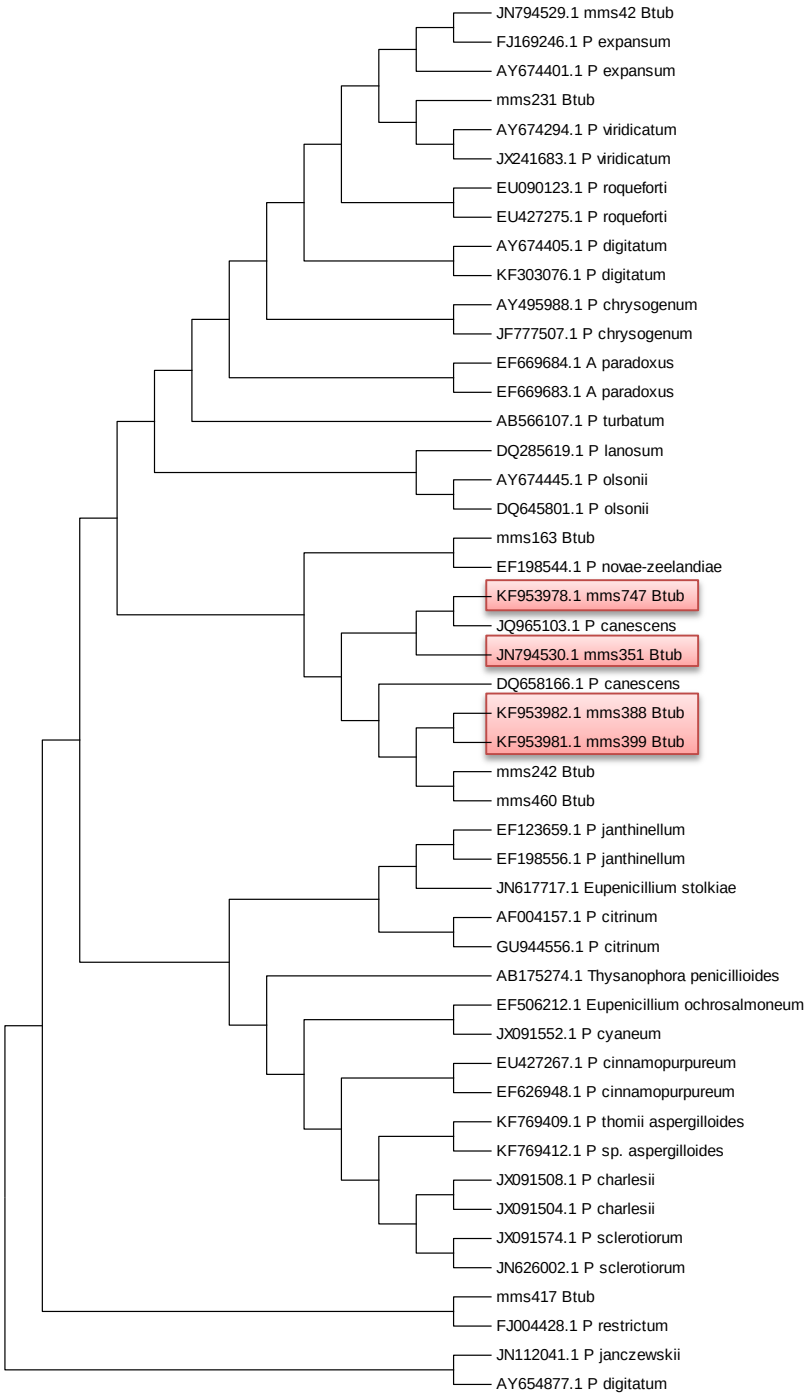


Figure III-12 : Arbre construit à partir des analyses phylogénétiques des séquences de la β-tubuline des quatre souches de *P. ligerum* et d'au moins une espèce de chaque section au sein du sous genre *Penicillium*

3. Conclusion

Les études génotypiques réalisées suite aux séquençages des régions ITS1 et du gène de la β-tubuline ont tout d'abord permis de démontrer la proximité génétique certaine des quatre souches étudiées même si comme observé lors de l'étude phénotypique : deux couples de souches sont distingués : MMS351 et MMS747 d'une part et MMS388 et MMS399 d'autre part.

D'un point de vue taxonomique, il apparait clairement que cette espèce appartiendrait à la section *Canescentia* du sous genre *Penicillium* et serait proche des espèces *P. canescens*et*P. janszewskii.*

Un dernier critère descriptif faisant appel à l'étude du métabolome et à la chimiotaxonomie a ensuite été sollicité pour pousuivrela description decette nouvelle espèce fongique. Cette espèce étant tout d'abord connue comme productrice de ligérine, la recherche d'analogues naturels de ce mérosesquiterpène sera tout d'abord présentée avant de s'intéresser à la purification et à l'identification de métabolites majoritaires et enfin à la description globale du métabolome secondaire grâce à l'étude déréplicative des extraits fongiques des quatre souches appartenant à cette nouvelle espèce.

CHAPITRE III. Etude chimiotypique : Métabolome de *Penicillium ligerum*

1. Recherche d'analogues naturels de la ligérine

Afin d'initier l'étude du métabolome de cette nouvelle espèce et étant donné que la ligérine est le composé lead à l'origine du travail de cette thèse, nous nous sommes en premier lieu interrogés sur la production par *Penicillium ligerum* d'analogues naturels de ce composé. Afin de rechercher ces composés, différentes méthodes ont été envisagées, dans un but de simplification des manipulations, d'efficacité et de rapidité. Ainsi, la déréplication par HPLC-HRMS/MS des extraits de cultures devrait permettre, sur la base de la modélisation des fragmentations de la ligérine et de ses analogues connus, de détecter précocement des analogues structuraux nouveaux.

1.1. Développement d'un modèle de fragmentation en spectrométrie de masse de la série chimique de la ligérine

1.1.1. Analyse des fragmentations de la ligérine

La ligérine a été analysée de plusieurs manières afin d'en obtenir un profil MS complet : par injection directe dans le spectromètre (perfusion) ou par couplage HPLC-MS. Ces analyses ont été réalisées en haute résolution sur un spectromètre de masse hybride constitué d'une source ESI, d'une trappe ionique et d'un détecteur à temps de vol (IT-TOF, Shimadzu). En HPLC-HRMS en mode d'ionisation positive, la ligérine est observable sous trois formes ioniques en équilibre : les ions $[M+Na]^+$ (*m/z* 441,1661), $[M+H]^+$ (*m/z* 419,1859) et l'ion déshydraté $[M-H_2O+H]^+$ (*m/z* 401,1751) (Figure III-13).

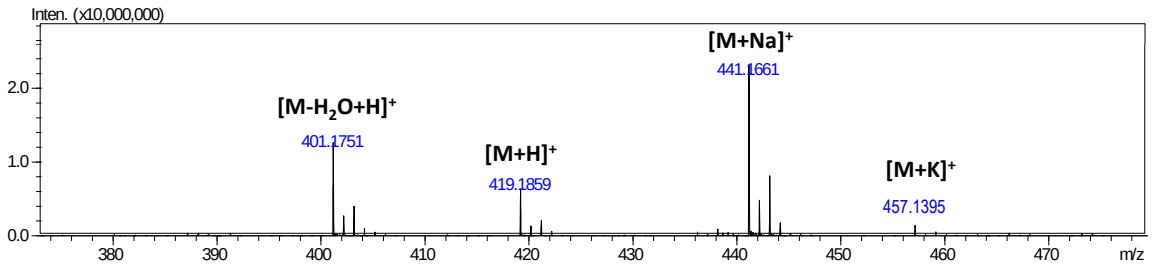


Figure III-13 : Spectre de masse haute résolution de la ligérine en LC-MS.

Le profil isotopique est caractéristique de la présence d'un atome de chlore (Figure III-14). En effet, on observe une abondance relative de l'isotope M+2, 1/3 plus importante que l'abondance de l'isotope M. Ceci s'explique du fait de l'abondance terrestre du ^{37}Cl qui est de 24,22% face au ^{35}Cl dont l'abondance est de 75,7%.

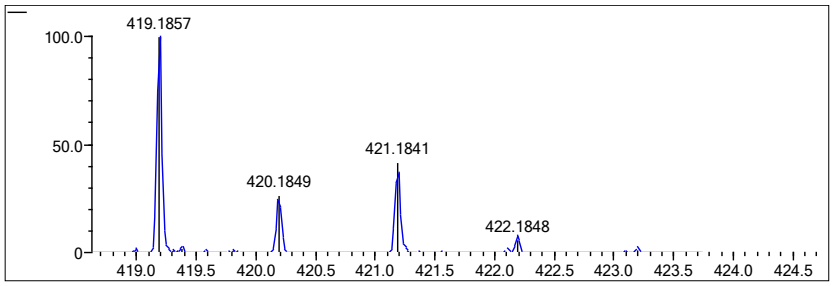


Figure III-14 : Profil isotopique de l'ion $[M+H]^+$ de la ligérine

Les fragmentationsMS²des ions $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de la ligérine conduisent à des résultats différents (Figure III-15 et Figure III-16).

La fragmentation de l'ion $[M+H]^+$ est expliquée par quatre pertes possibles observées séparément ou en combinaison : $-H_2O$ (18,0106 u), $-HOCH_3$ (32,0262 u), $-C_4H_6O_4$ (118,0266 u) et -HCl (35,9767 u). Dans ce cas la perte de l'atome de chlore n'intervient que dans les fragments les plus petits où elle accompagne la perte des autres groupements (Figure III-15).

La fragmentation de l'ion $[M+Na]^+$ diffère par une perte quasi-systématique du chlore dans tous les fragments et la coupure possible de la fonction ester du succinyle ($-C_4H_4O_3$).

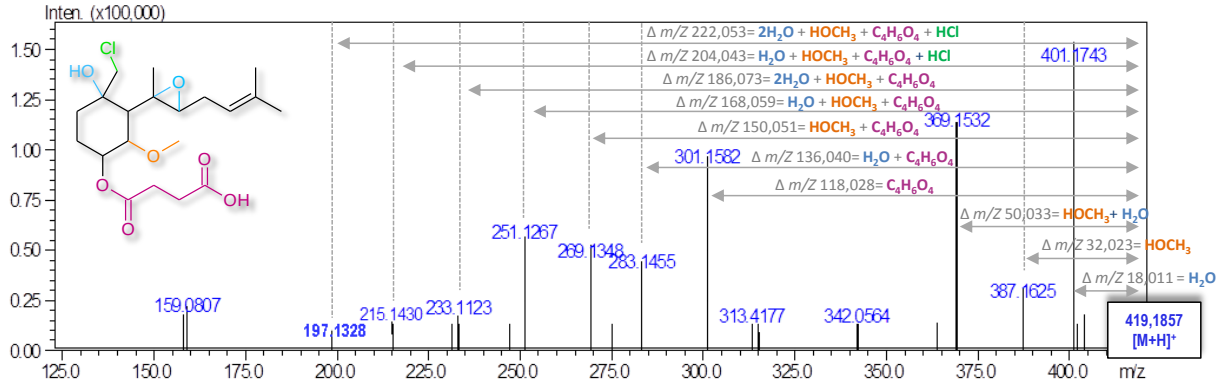


Figure III-15 : Spectre de masse MS^2 de la ligérine $[M+H]^+$ en HRMS

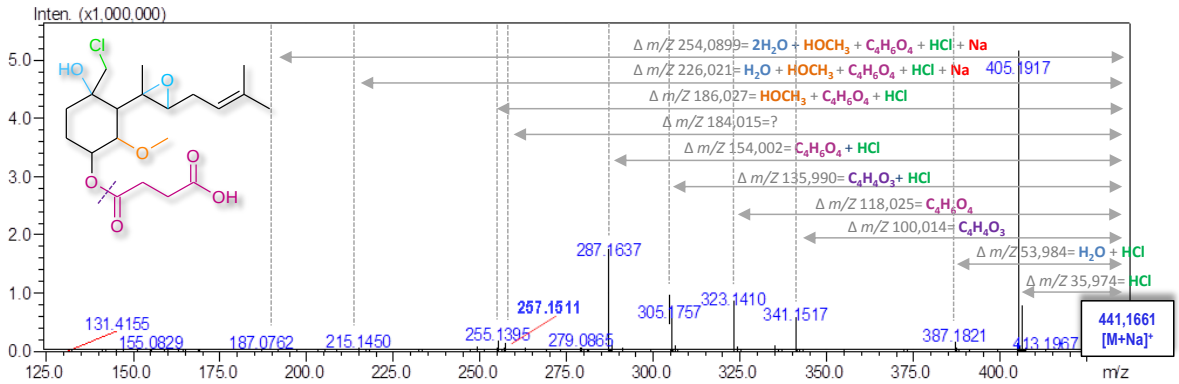


Figure III-16 : Spectre de masse MS^2 de la ligérine $[M+Na]^+$ en HRMS

1.1.2. Comparaison de la fragmentation HRMS/MS de la ligérine et de la fumagilline

Une analyse HRMS/MS comparativede la fragmentation des ions $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$de la ligérine et de la fumagilline a été réalisée(Figure III-17). Celle-ci a permis de distinguer un certain nombre de fragments communs correspondant au noyau sesquiterpénique des deux molécules.

Lorsque ces molécules sont sous la forme $[M+Na]^+$, les ions fils communs sont ceux qui ont un *m/z* de 255,1361 $[C_{15}H_{20}O_2+Na]^+$, 257,1518 $[C_{16}H_{24}O_3+Na]^+$, 287,1634 $[C_{16}H_{24}O_3+Na]^+$ et de *m/z* 305,1745 $[C_{16}H_{26}O_4+Na]^+$.Lorsque ces molécules sont sous la forme $[M+H]^+$, les ions fils communs sont ceux qui ont un *m/z* de 187,1487 $[C_{14}H_{18}+H]^+$, 197,1330 $[C_{15}H_{16}+H]^+$et 215,1436 $[C_{15}H_{18}O+H]^+$. Ces ions fils sont aussi parfois observés dans la fragmentation des ions parents $[M+Na]^+$, mais de manière non systématique.

Les deux pools d'ions fils constituent des fragments caractéristiques du squelette de base de la série chimique étudiée et leurs structures théoriques sont présentées dans le Tableau III-5 et le Tableau III-6. L'ensemble de ces sept ions correspondent aux ions diagnostiques pour la recherche du noyau de base des analogues de la ligérine.

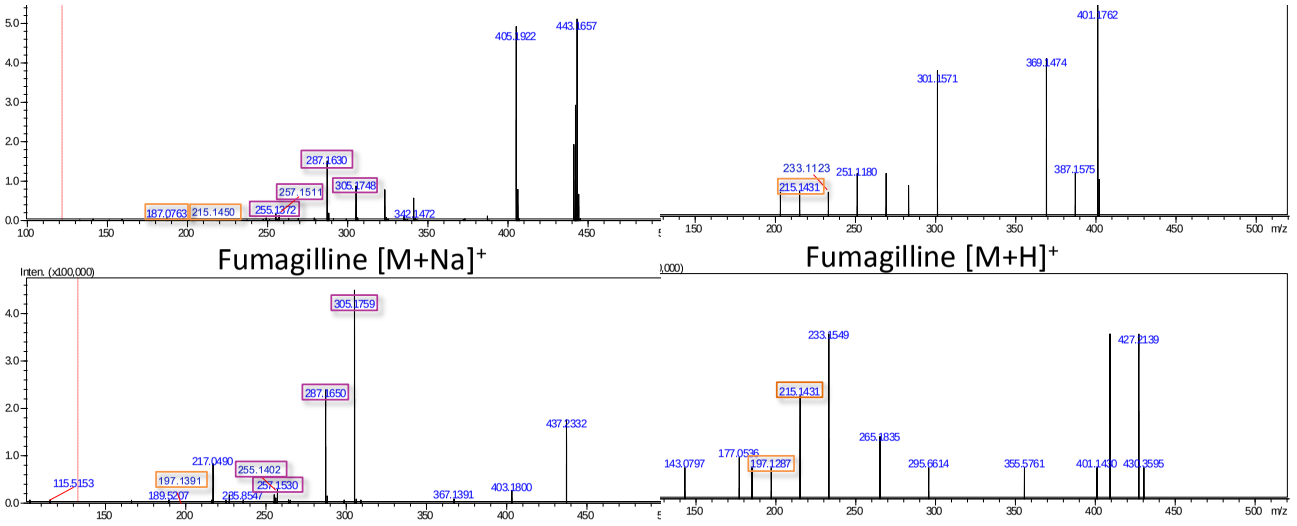


Figure III-17 : Spectres de masse HRMS/MS de la ligérine et de la fumagilline sous les formes ioniques $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$

le trait rouge sur la gauche des spectres correspond au « cut-off », seuil de détection pour les molécules de faible poids moléculaire, les ions communs aux deux molécules provenant de la fragmentation des ions $[M+Na]^+$sont entourés en rose et ceux communs aux deux types d'adduits en orange

Tableau III-5 : Ions fils communs observés dans les spectres MS/MS des ions $[M+Na]^+$de la ligérine et de la fumagilline
(R_1 :$C_4H_3O_3$ etR_2 :$C_{10}H_7O_3$)

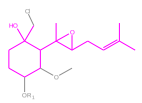
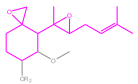
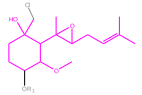
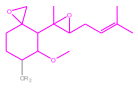
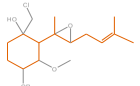
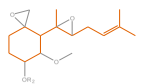
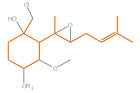
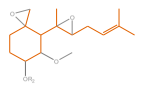
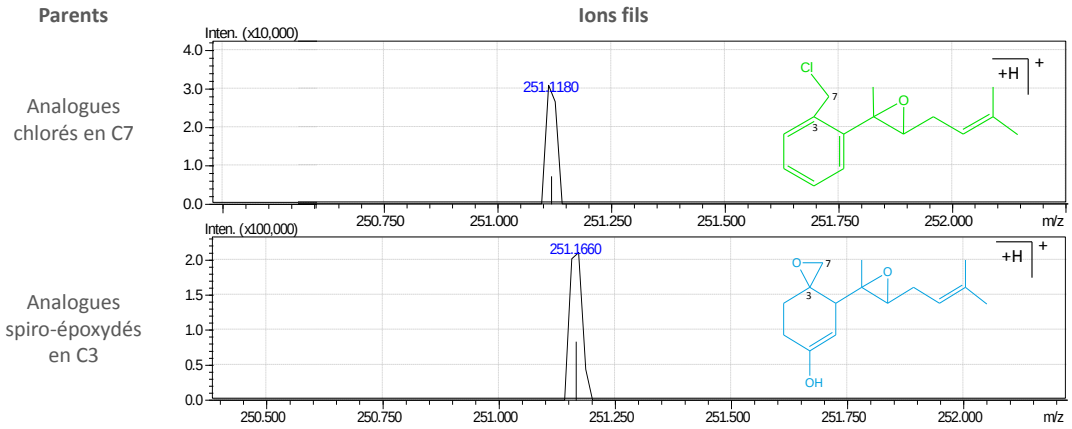
Ligérine	Fumagilline	Ion fils
		*m/z* 257.1518 $[C_{15}H_{22}O_2+Na]^+$ *m/z* 255.1361 $[C_{15}H_{20}O_2+Na]^+$
		*m/z* 287.1634 $[C_{16}H_{24}O_3+Na]^+$

Tableau III-6 : Ions fils communs observés dans les spectres MS/MS des ions $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$ de la ligérine et de la fumagilline
(R_1 :$C_4H_3O_3$ etR_2 :$C_{10}H_7O_3$)

Ligérine	Fumagilline	Ion fils
		*m/z* 187,1487 $[C_{14}H_{18}+H]^+$
		*m/z* 197,1330 $[C_{15}H_{16}+H]^+$

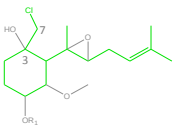
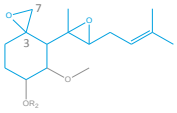
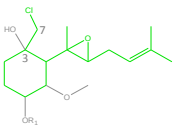
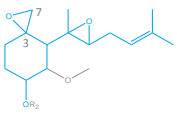
L'analyse a aussi mis en exergue la présence d'ions fils de *m/z* très proches (FigureIII-18). La ligérine sous la forme ionique $[M+H]^+$ présente un fragment avec un *m/z*251,1180 correspondant à l'ion $[C_{15}H_{19}OCl+H]^+$ tandis que pour l'ion $[M+H]^+$ de la fumagilline, l'ion fils observé présente un*m/z*de251,1642 correspondant à l'ion $[C_{15}H_{22}O_3+H]^+$. Cette différence très faible s'explique par la perte de 2 molécules d'eau correspondant précisément à une perte de 36,0212 u dans un cas et par la perte d'HCl (35,9767 u) dans l'autre cas. Ainsi, ces ions voisins sont distinctifs de la présence d'analogues chlorés en C7 par rapport aux analogues époxydés en C3. L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution prend alors ici tout son sens.



FigureIII-18 : Exemple de deux ions fils de *m/z* très proches

Un deuxième couple d'ions fils voisins est observé avec les ions de *m/z* de 233,1092 ($[C_{15}H_{17}Cl+H]^+$, ion fils de la ligérine) et 233,1536 ($[C_{15}H_{20}O_2+H]^+$, ion fils de la fumagilline) (Tableau III-7).

Tableau III-7 : Ions voisins distinguant les analogues chlorés en C7 des analogues spiro-epoxydés en C3

Analogues chlorés en C7		**Analogues spiro-époxydés en C3**	
Ligérine	Ion fils	Fumagilline	Ion fils
	*m/z* 233,1092 $[C_{15}H_{17}Cl+H]^+$		*m/z* 233,1536 $[C_{15}H_{20}O_2+H]^+$
	*m/z* 251,1197 $[C_{15}H_{19}OCl+H]^+$		*m/z* 251,1642 $[C_{15}H_{22}O_3+H]^+$

Ces quatre ions caractéristiques de la présence d'un chlore en position 7 ou un spiro-époxyde en position 3 seront utilisés comme des ions diagnostiques pour cette partie de la molécule.

A l'aide de ces données, la recherche dans les extraits fongiques de la présence de molécules présentant ce squelette peut être envisagée.L'analyse métabolomique se base alors sur la recherche dans les extraits bruts en LC-ESI-HRMS/MS des ions diagnostiques. Les substituants sont ensuite déduits des observations des pertes de neutre (Figure III-19).

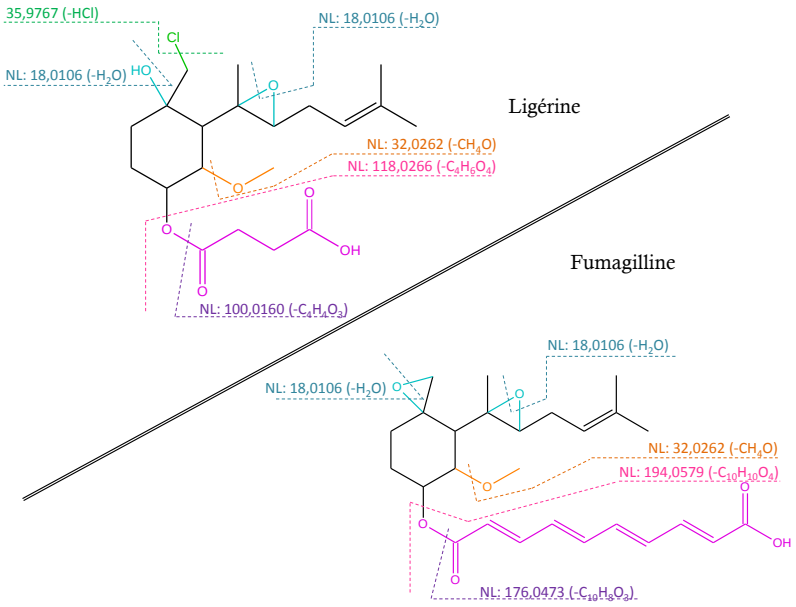


Figure III-19 : Pertes de neutre (NL : neutral loss) observées séparément ou en combinaison dans les spectres MS/MS de la ligérine et de la fumagilline

1.1.3. Mise en place de la démarche de recherche d'analogues naturels de ligérine au sein d'un extrait brut fongique

La démarche permettant la recherche des analogues de cette série est présentée dans laFigure III-20. L'extrait fongique est dans un premier temps soumis à une analyse LC-UV/DAD-HRMS/MS (Annexe II) permettant d'obtenir un chromatogramme enrichi des données spectrales UV, HRMS et MS/MS. Les données de fragmentations sont alors analysées *via* les outils du logiciel LabSolution® (Shimadzu®). La première étape consiste à rechercher les ions diagnostiques dans les profils MS/MS des ions fragmentés au cours de l'analyse. La présence de plusieurs des ions diagnostiques dans le profil de fragmentation d'une même molécule sous ses formes ioniques $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$, permet de repérer les molécules appartenant à la série ligérine. Etant donné que les fragmentations diffèrent en fonction de la forme ionique de l'ion parent, il est aisé d'en déduire de manière certaine la nature de son adduit et donc, la masse exacte de l'analogue en cours d'identification. L'utilisation de l'outil Formula Predictor® (Shimadzu®) prenant en compte la masse exacte, le profil isotopique et les ions fils majoritaires, permet ensuite de prédire la ou les formules brutes les plus probables. L'observation du profil isotopique et la détection dans le profil MS/MS, des ions diagnostiques distinctifs des molécules chlorées ou spiro-époxydées, permet de statuer sur la nature du substituant en C3. L'interrogation en parallèle de la base de données contenant les masses exactes et les formules brutes des analogues naturels connus (présentée dans le Tableau II-1 de la partie bibliographique sur la fumagillineet ses analogues, p28) peut permettre de formuler une hypothèse structurale. Dans le cas de molécules non présentes dans cette liste de molécules, l'outil Formula Predictor est appliqué pour obtenir les formules brutes des pertes de neutre observées afin d'en déduire la nature des substituants du noyau sesquiterpène. Les données UV quant à elles ne sont pas à négliger puisque bien que la ligérine ne présente pas de chromophore suffisamment important pour permettre l'observation d'un spectre UV-visible, la fumagilline par contre possède une chaîne latérale suffisamment insaturée pour

absorber dans l'UV-visible. Il faut remarquer que cette méthode ne permet pas de finaliser l'identification puisque la structure exacte des substituants et leur positionnement sur le cycle cyclohexane peut s'avérer difficile à déterminer. Seul un isolement de la molécule suivi d'une étude structurale complète pourra donner la formule développée finale et sa stéréochimie.

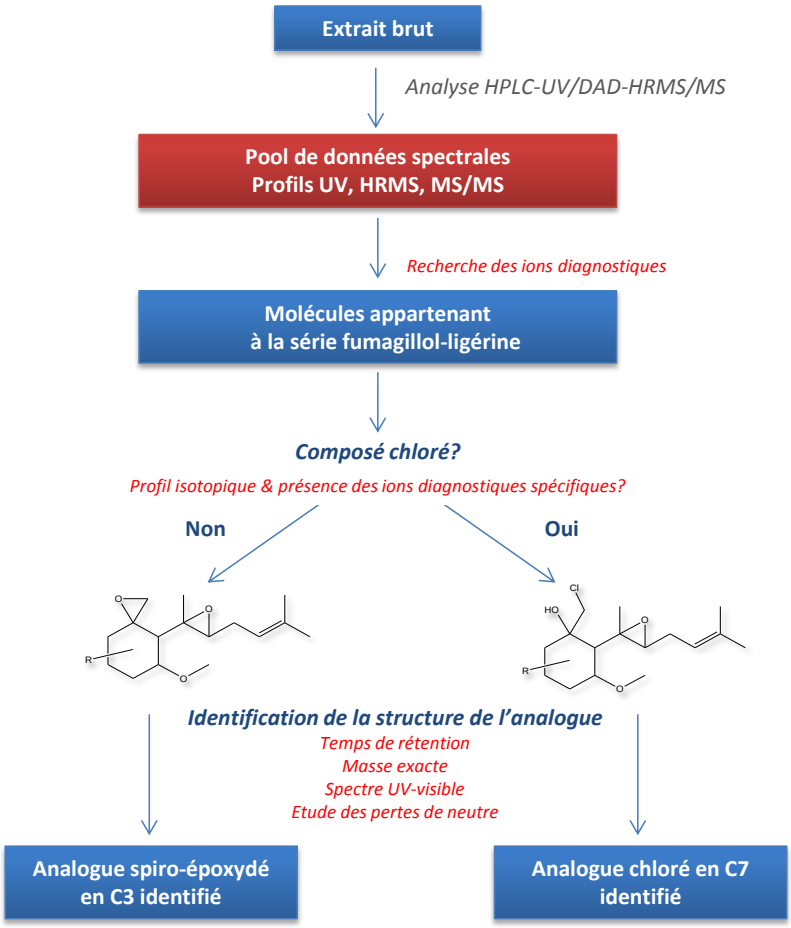


Figure III-20 : Démarche permettant la recherche des analogues de la série ligérine-fumagillol

1.1.4. Illustration détaillée de la démarche de recherche des analogues : Identification du composé LIG-494

Pour illustrer la démarche de recherche des analogues de la ligérine au sein d'un mélange complexe tel qu'un extrait brut ou une fraction, nous détaillons ici l'identification de l'analogue LIG-494. Ce composé est présent dans une fraction (8a) obtenue précédemment par Marieke Vansteelandt lors du fractionnement chromatographique d'un extrait massif de la souche MMS351. Les identifications des autres analogues ne seront pas détaillées mais ont suivi le même protocole expérimental.

Suite à l'analyse LC-UV/DAD-HRMS/MS de la fraction 8a, la recherche de chacun des ions diagnostiques a été effectuée. Le groupement d'ions présent au temps de rétention de 27,9 min a été sélectionné et a fait l'objet d'une étude plus approfondie. En effet, à ce temps de rétention, on observe un pic moléculaire contenant trois ions majoritaires de *m/z* 477,2076, 495,2173 et 517,1983 dont les fragmentations engendrent la formation de plusieurs de nos ions diagnostiques (Figure III-21A.). La

fragmentation de l'ion parent 495,2173 génère les ions diagnostiques 197,1349 et 215,1435 et l'ion parent 517,1983 se fragmente entre autre en quatre ions de *m/z* de 255,1369, 257,1511, 287,1639 et 305,1759 caractéristiques du noyau sesquiterpène des analogues sous la forme $[M+Na]^+$ (Figure III-22). On constate donc en observant les fragmentationset en calculant l'écart entre les *m/z* que les trois ions observés correspondent à une seule molécule sous les formes ioniques $[M-H_2O+H]^+$ pour l'ion de *m/z* 477,2076, $[M+H]^+$ pour l'ion de *m/z* 495,2173 et $[M+Na]^+$ pour l'ion de *m/z* 517,1983. Le profil isotopique interpelle puisqu'il semble caractéristique de la présence d'un atome de chlore (Figure III-21B.). De plus, parmi les fragments de l'ion $[M+H]^+$, on repère les ions spécifiques des analogues chlorés avec les ions de *m/z* de 233,1071 et 251,1214. Nous avons donc à ce temps de rétention, la présence d'une molécule appartenant à la série chlorée des analogues sesquiterpéniques de la ligérine. Comme la masse moléculaire de cette molécule est d'environ 494 Da, dans la suite nous le nommerons LIG-494.

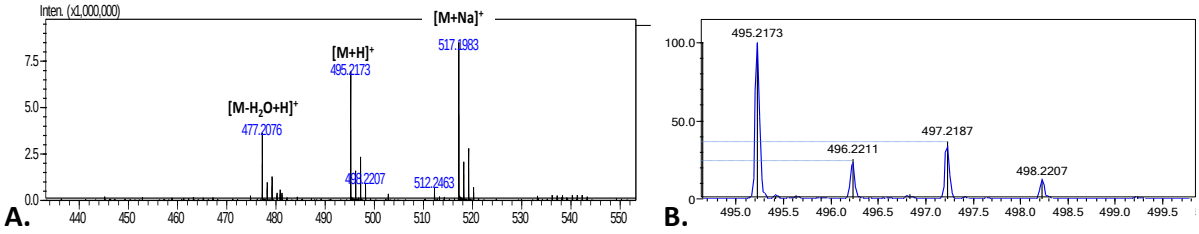


Figure III-21 : Données HRMS du composé LIG-494.
A. Spectre HRMS. B. Profil isotopique de l'ion $[M+H]^+$

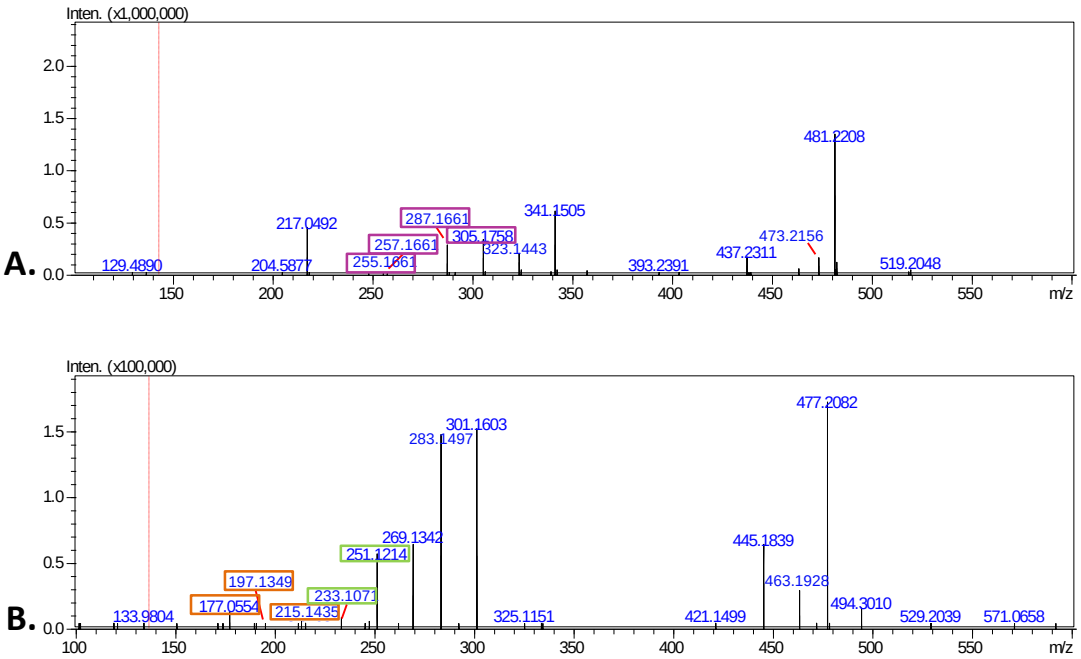


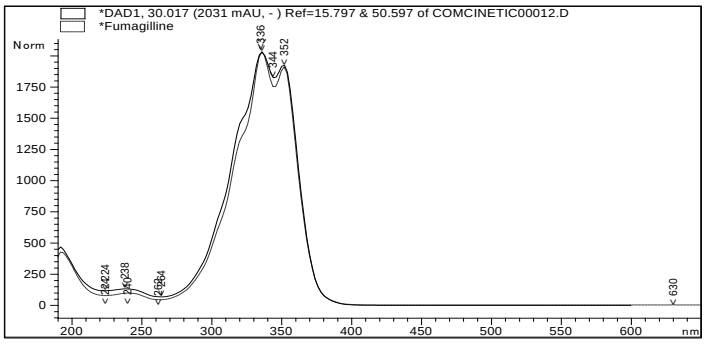
Figure III-22 : Spectres de fragmentation HRMS/MS du composé LIG-494
A. l'ion parent est sous la forme $[M+Na]^+$ B. l'ion parent est sous la forme $[M+H]^+$
les ions entourés en rose et en orange sont les ions fils diagnostiques du noyau
et ceux en vert sont spécifiques de la série chimique chlorée

A ce stade, les analysesmènent à la prédiction de deux formules brutes les plus probables : $C_{19}H_{39}O_{12}Cl$ et $C_{26}H_{35}O_7Cl$ pour lesquels les résultats sont présentés dans leTableau III-8. Pour chaque formule brute, sont données les valeurs de *m/z* mesurées et théoriques pour chaque forme ionique étudiée ainsi que la différence (Δppm) entre ces valeurs mesurées et calculées. L'Iso Score correspond quant à lui au pourcentage de similitude entre le profil isotopique observé pour un ion donné et celui calculé à partir de la formule brute correspondante.

Tableau III-8 : Prédiction de la formule brute du composé LIG-494

Formule brute	Ion	*m/z* mesuré	*m/z* théorique	Δppm	Iso Score
$C_{19}H_{39}O_{12}Cl$	$[M+Na]^+$	517,1983	517,2022	-7,54	80,8
$C_{19}H_{39}O_{12}Cl$	$[M+H]^+$	495,2173	495,2203	-6,06	80,37
$C_{19}H_{37}O_{11}Cl$	$[M-H_2O+H]^+$	477,2076	477,2097	-4,4	52,87
$C_{26}H_{35}O_7Cl$	$[M+Na]^+$	517,1983	517,1964	3,67	87,33
$C_{26}H_{35}O_7Cl$	$[M+H]^+$	495,2173	495,2144	5,86	64,8
$C_{26}H_{33}O_6Cl$	$[M-H_2O+H]^+$	477,2076	477,2038	7,96	43,55

Par ailleurs, le spectre UV de cette molécule est similaire à celui de la fumagilline (FigureIII-23).



FigureIII-23 : Spectre UV-visible comparatif de la fumagilline (trait pointillé) et du composé FUM-494 (trait plein)

Si l'on s'intéresse à la fragmentation de l'ion protoné de *m/z* 495,2173 et notamment aux pertes de neutre, nous repérons aussi la perte de neutre de 194,057 u qui correspond à la chaîne acide 2.4.6.8-decatetraenedioïque de la fumagilline (Figure III-24). A partir de là, les autres pertes de neutre s'expliquent facilement par les pertes uniques ou combinées de l'époxyde et/ou de l'hydroxyle ainsi que du méthoxyle, du chlore et de la chaîne acide de la molécule. En conclusion, la synthèse de ces données nous mène à l'identification probable du composé LIG-494 comme étant la 7-chloro-fumagilline dont la formule brute $C_{26}H_{35}O_7Cl$ faisait bien partie des prédictions.

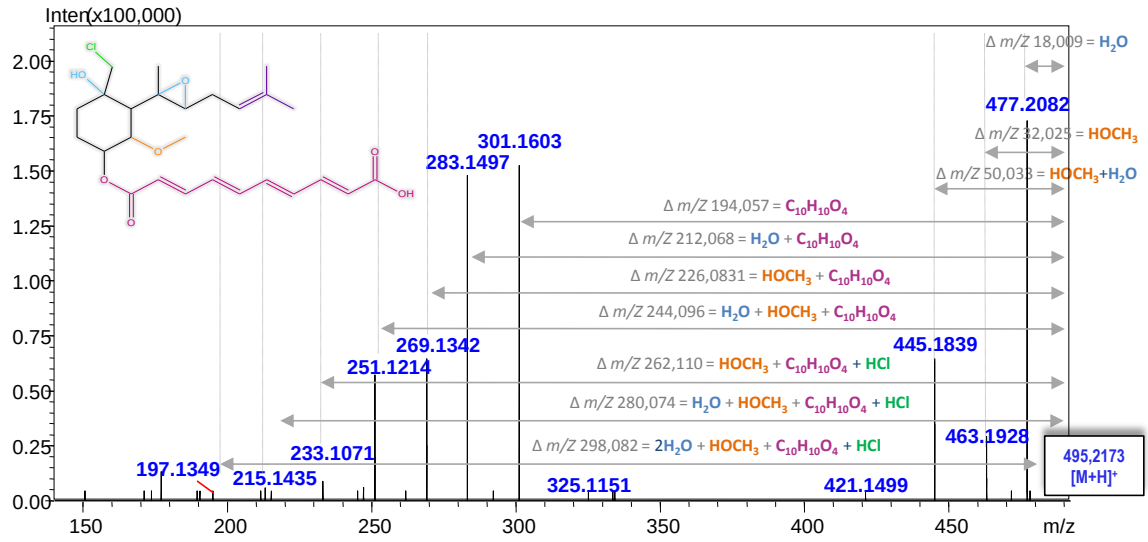


Figure III-24 : Spectre HRMS/MS du composé LIG-494 pour lequel la fragmentation est expliquée

1.2. Recherche de dérivés naturels de la ligérinedans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

Grâce à l'établissement du modèle de fragmentation de la série ligérine, on peut à présent rechercher de manière efficace ses analogues présents dans les extraits brutsde *Penicillium ligerum*et tout d'abord sur la souche initiale ayant permis l'isolement de la ligérine : MMS351.L'extrait EB-351-YES obtenu après culture de la souche MMS351 a fait l'objet d'une analyse standard LC-UV/DAD-HRMS/MS. Le traitement des données a été réalisé selon le protocole décrit précédemment pour LIG-494.

1.2.1. Analogues naturels identifiés

L'étude des données obtenues en LC-HRMS/MS de l'extrait EB-351-YES a confirmé la présence d'un ensemble d'analogues de cette série de sesquiterpène (Tableau III-10). Ainsi, la ligérine a tout d'abord été repérée sous la forme $[M+H]^+$ de *m/z*419,1856 (Δppm=5,96) et $[M+Na]^+$ de *m/z* 441,1694 (Δppm=9,75)au temps de rétention (t_R) de 22,2 min. On détecte ensuite aisément la présence de trois des analogues naturels déjà décrits dans la littérature : la fumagilline, le fumagillol et le composé RK-95113. La fumagilline est observée à un temps de rétention de 26,3 min sous la forme $[M+H]^+$ de *m/z* 459,2402(Δppm=5,44) et $[M+Na]^+$ avec l'ion *m/z* 481,2247 (Δppm=10,39). Le spectre MS/MS de la molécule ainsi que son spectre UV-visible correspondent à ceux observés auparavant. Le fumagillol est détecté à 19,3 min sous les formes ioniques $[M+H]^+$pour l'ion de *m/z* 283,1904 (Δppm=0) et $[M+Na]^+$avec un *m/z* de 305,1758 (Δppm=11,47). Le RK-95113 quant à lui est observable à 31,2 min avec les ions 425,2319 ((Δppm=4,94), $[M+Na]^+$) et 403,2506 ((Δppm=6,70), $[M+H]^+$). Trois autres analogues ont ensuite été identifiés comme correspondant aux analogues chlorés de ces trois composés. La présence du 7-chloro-fumagillol, de la 7-chloro-fumagilline et du 7-chloro-RK-95113 a été détectée respectivement aux $t_R$de 20,9 min, 28,1 min et 33,5 min. Enfin, la souche MMS351 semble produire du 6-O-succinyl-fumagillol, l'analogue 3,7-epoxy de la ligérine qui a été mise en évidence au $t_R$de 20,6 min sous la forme $[M+H]^+$pour l'ion de *m/z* 383,2066 (Δppm=0,52) et $[M+Na]^+$pour un*m/z*de 405,1896 (Δppm=2,96).

On constate que la plupart des analogues s'ionisent préférablement sous la forme $[M+Na]^+$ et que des couples d'analogues chlorés et non chlorés sont systématiquement présents. Il est intéressant de noter qu'un écart constant d'environ 1,8 min est observé entre la molécule chlorée et son analogue présentant le spiro-époxyde, ce dernier étant moins retenu sur la colonne (Figure III-25). Cette différence constante pourrait être un critère supplémentaire utilisable dans la recherche des couples chlorés/non chlorés et est un argument pour la confirmation des hypothèses structurales émises pour les nouveaux analogues.

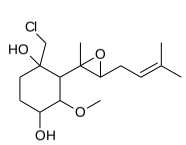
Tableau III-9 : Données LC-HRMS/MS des analogues de la série ligérine identifiés dans l'extrait EB-351-YES

(les ions caractéristiques du noyau sesquiterpénique sont entourés en rose et en orange, les ions de la série chlorée en vert et ceux de la série spiro-époxydée en bleu)

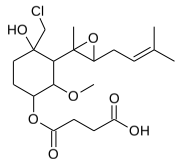
$[M+Na]^+$	405,1896	$C_{20}H_{30}O_7Na$	405,1884	2,96							9	6	**89**	**100**	233,0808 (8)	405,192 (28)	
Analogue 3	**t_R = 26,3 min**																**Fumagilline**
$[M+H]^+$	459,2402	$C_{26}H_{35}O_7$	459,2377	5,44	6	**21**	**43**		**61**						177,0589 (9)	265,1829 (31)	409,2051 (91)	427,2129 (100)	441,2287 (68)
$[M+Na]^+$	481,2247	$C_{26}H_{34}O_7Na$	481,2197	10,39							2	4	**54**	**100**	217,049 (15)	227,1235 (2)	403,18 (5)	437,2332 (38)	
Analogue 4	**t_R = 31,2 min**																**RK-95113**
$[M+H]^+$	403,2506	$C_{24}H_{35}O_4$	403,2479	6,70		**24**	**94**		**32**						258,1263 (12)	265,1826 (100)	353,2143 (52)	371,2225 (92)	385,2478 (57)
$[M+Na]^+$	425,2319	$C_{24}H_{34}O_5Na$	425,2298	4,94							8	10	**100**		253,1235 (8)	271,1342 (10)	284,1418 (7)		

Tableau III-10 : Données LC-HRMS/MS des analogues de la série ligérine identifiés dans l'extrait EB-351-YES (suite)

(les ions caractéristiques du noyau sesquiterpénique sont entourés en rose et en orange, les ions de la série chlorée en vert et ceux de la série spiro-époxydée en bleu)

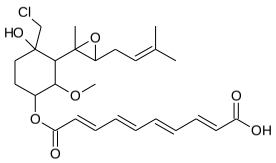


7-chloro-fumagillol

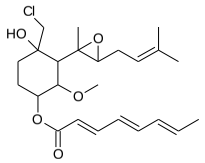


Ligérine

(7-chloro-6-O-succinyl-fumagillol)



7-chloro-fumagilline



7-chloro-RK-95113

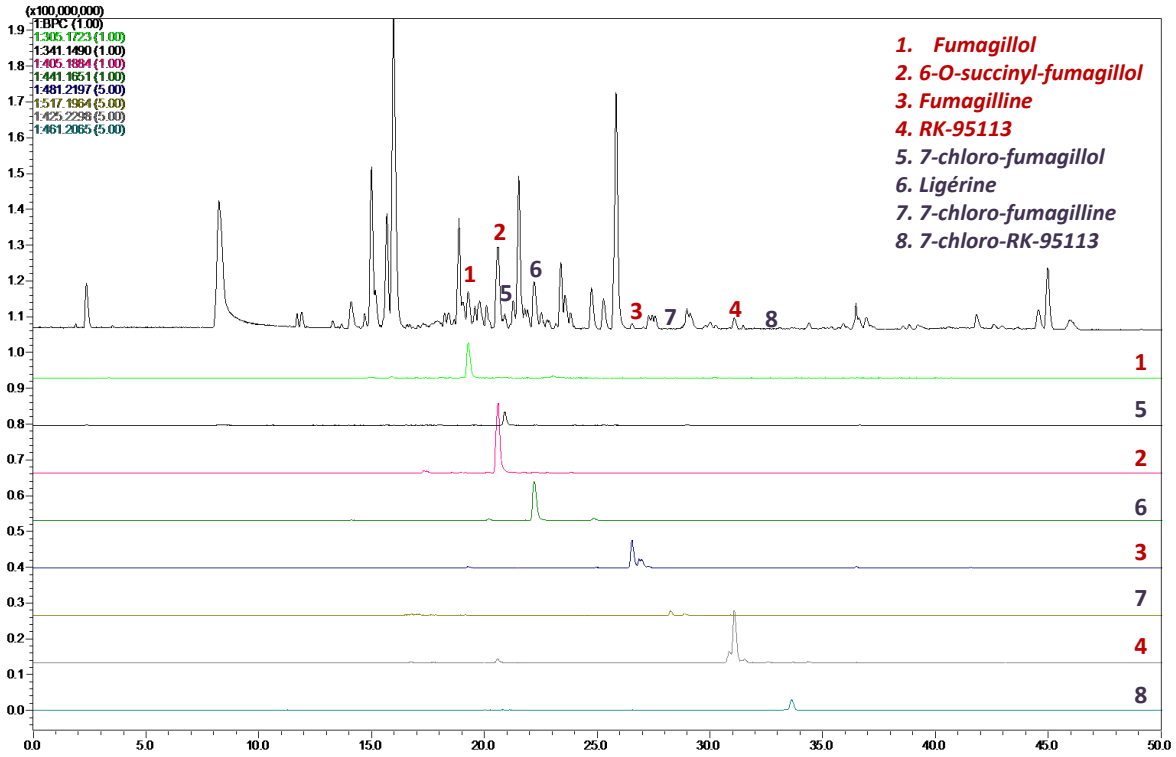


Figure III-25 : Chromatogramme LC-HRMS de l'extrait EB-351-YES (BPC) ainsi que les chromatogrammes extraits des ions $[M+Na]^+$de la ligérine et de ses analogues
(avec un facteur 5 pour les chromatogrammes des composés 3, 4, 5 et 7)

Parmi les molécules observées, le fumagillol, la fumagilline et le RK-95113 sont des molécules naturelles connues qui ont été isolées de divers micromycètes. La fumagilline a été la première isolée dans cette série, en 1949, d'un extrait d'*Aspergillus fumigatus (Hanson et Eble, 1949)*. Beaucoup d'analogues naturels de cette série sont décrits comme produits par *Aspergillus fumigatus* comme par exemple le RK-95113 (Asami *et al.*, 2006). Le fumagillol a quant à lui été décrit pour la première fois en 1988 comme produit par *Penicillium jensenii (Hatanaka et al., 1988)*. Les synthèses du 6-O-succinyl-fumagillol ainsi que du 7-chloro-fumagillol sont décrits dans la littérature mais l'observation de ces composés dans le métabolome d'un organisme vivant constitue une première description. Les molécules 7-chloro-RK-95113 et 7-chloro-fumagilline sont quant à elles des molécules originales dont la purification pourrait être envisagée.

1.2.2. Analogues naturels dont la structure reste non totalement élucidée

Treize autres composés appartenant à cette famille de sesquiterpène (6 pour la série époxydée et 5 de leurs analogues appartenant à la série chlorée) ont également été détectés mais leur identification n'a pas pu être finalisée (Tableau III-11). En effet les données de fragmentation MS/MS permettent de déduire la formule brute des substituants du noyau sesquiterpène, mais pas d'accéder à leur structure exacte ni à leur positionnement sur le cycle cyclohexane. Leur purification est nécessaire afin de les décrire avec précision.

Tableau III-11 : Données LC-HRMS/MS des analogues détectés dont la structure reste non totalement élucidée

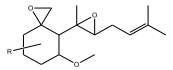
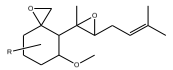
	$m/z_{mesuré}$	Formule brute	$m/z_{théorique}$	Erreur (ppm)	Ions diagnostiques											Autres ions fils majoritaires m/z (Abondance relative)			
					187,149	197,133	215,143	233,112	233,156	251,118	251,166	255,140	257,153	287,164	305,176				
Analogues non chlorés																			
Analogue 9	**t_R = 16,6 min**																		**LIG-400**
$[M+H]^+$	401,2198	$C_{20}H_{32}O_8$	401,2170	6,98					**30**		5					269,1412 (5)	351,1767 (7)	383,2096 (100)	
$[M+Na]^+$	423,2019		423,1989	7,09										8	**100**	306,1757 (13)	323,1853 (72)	353,1247 (29)	R=$C_4H_7O_5$
Analogue 10	**t_R = 17,5 min**																		**LIG-546**
$[M+H]^+$	547,2777	$C_{26}H_{42}O_{12}$	547,2749	5,12												/			
$[M+Na]^+$	569,2577		569,2568	1,58										**34**	**100**	205,0688 (6)	397,1429 (8)	405,1906 (33)	R=$C_{10}H_{17}O_9$
Analogue 11	**t_R = 18,4 min**																		**LIG-486**
[M+H]$^+$	487,2598		487,2538	12,31					**100**							451,225			

Tableau III-12 : Données LC-HRMS/MS des analogues détectés dont la structure reste non totalement élucidée (suite)

				Ions diagnostiques											Autres ions fils majoritaires m/z (Abondance relative)
	$m/z_{mesuré}$	Formule brute	$m/z_{théorique}$	Erreur (ppm)	187,149	197,133	215,143	233,112	233,156	251,118	251,166	255,140	257,153	287,164	305,176	
Analogues chlorés																

1.3. Validation de la méthode de recherche et d'identification de dérivés naturels de la ligérine

La ligérine et quatre analogues ayant pu être synthétisés (cf. p66-75), nous les avons analysés en HPLC-UV/DAD-MS/MS afin de confirmer leur identification au sein du métabolome de la souche MMS351 et ainsi, valider notre méthode de recherche de ces composés. Les composés : fumagillol, 6-O-succinyl-fumagillol, 7-chloro-fumagillol, ligérine et fumagilline (10 µg/mL dans du MeOH) ont été mélangés et analysés (Annexe II, méthode analytique A).Les données analytiques recueillies (t_R, profil isotopique, spectres UV, MS, MS/MS) sont similaires à celles observées auparavant, confirmant les résultats d'identification de ces composés au sein du métabolome de la souche MMS351. Cette analyse valide donc la robustesse de notre modèle de recherche d'analogues de la ligérine.

1.4. Automatisation de la méthode de recherche

La procédure de recherche manuelle des ions diagnostiques étant chronophage, son automatisation a été développée grâce à des outils utilisantdes scripts dans le langage R (Team, 2013). Suite à l'analyse LC-HRMS/MS d'un extrait, la recherche des ions diagnostiques se fait alors en mode automatique. L'algorithme comprend les étapes suivantes :

1. Regroupement des différents adduits d'une même molécule dans une liste appelée pcgroup avec R xcms et camera (Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn *et al.*, 2008; Benton *et al.*, 2010; Kuhl *et al.*, 2011) (Figure III-26).

mzmed	rtmed (s)	Intensity
319,1197	1164	999 361
341,1027	1164	299 518
383,2066	1236	738 812
405,1896	1236	1 148 171
365,1961	1236	558 616
353,0804	1272	1 762 146
375,0634	1272	736 621
391,0343	1272	378 214
419,1856	1332	416 732
441,1686	1332	1 546 746
401,1751	1332	257 711
457,1395	1332	203 553
459,2411	1578	623 656
481,2266	1578	946 746

Données brutes

Annotation R CAMERA

mzmed	rtmed (s)	Intensity	adduct
319,1197	1164	999 361	$[M+H]^+$
341,1027	1164	299 518	$[M+Na]^+$
383,2066	1236	738 812	$[M+H]^+$
405,1896	1236	1 148 171	$[M+Na]^+$
365,1961	1236	558 616	$[M+H-H_2O]^+$
353,0804	1272	1 762 146	$[M+H]^+$
375,0634	1272	736 621	$[M+Na]^+$
391,0343	1272	378 214	$[M+K]^+$
419,1856	1332	416 732	$[M+H]^+$
441,1686	1332	1 546 746	$[M+Na]^+$
401,1751	1332	257 711	$[M+H-H_2O]+$
457,1395	1332	203 553	$[M+K]^+$
459,2411	1578	623 656	$[M+H]^+$
481,2266	1578	946 746	$[M+Na]^+$

Ions annotés

Regroupement R CAMERA

mzmed	rtmed (s)	Intensity	adduct	pcgroup
319,1197	1164	999 361	$[M+H]^+$	1
341,1027	1164	299 518	$[M+Na]^+$	1
365,1961	1236	558 616	$[M+H-H_2O]^+$	2
383,2066	1236	738 812	$[M+H]^+$	2
405,1896	1236	1 148 171	$[M+Na]^+$	2
353,0804	1272	1 762 146	$[M+H]^+$	3
375,0634	1272	736 621	$[M+Na]^+$	3
391,0343	1272	378 214	$[M+K]^+$	3
401,1751	1332	257 711	$[M+H-H_2O]^+$	4
419,1856	1332	416 732	$[M+H]^+$	4
441,1686	1332	1 546 746	$[M+Na]^+$	4
457,1395	1332	203 553	$[M+K]^+$	4
459,2411	1578	623 656	$[M+H]^+$	5
481,2266	1578	946 746	$[M+Na]^+$	5

Ions annotés d'une même molécule regroupés

Figure III-26 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R (étape 1)

2. Calcul du spectre de masse MS/MS moyen pour l'ion le plus intense de chaque pcgroup à partir de toutes les acquisitions lui correspondant.

3. Recherche dans ces spectres MS/MS, des ions diagnostiques sur la base de leur m/z

4. Création d'une liste des pcgroup comprenant cet ion fils d'intérêt

5. Création d'un chromatogramme filtré ne contenant que les chromatogrammes extraits de l'ion majoritaire des pcgroup sélectionnés (Figure III-27).

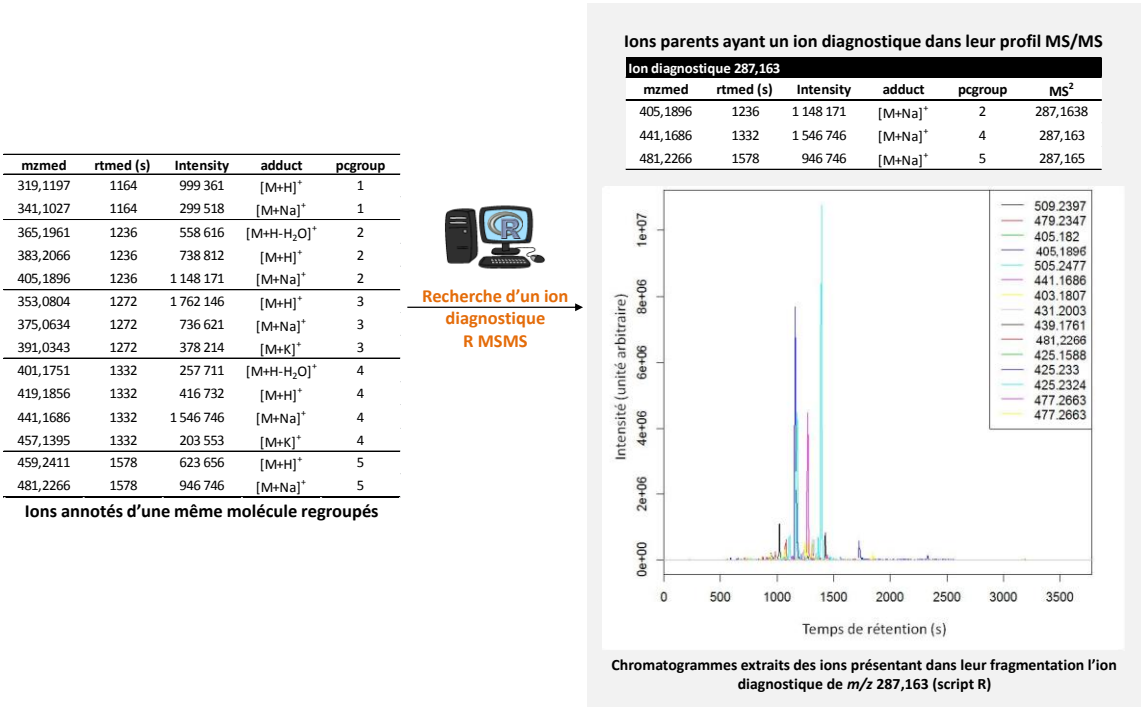


Figure III-27 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R (étapes 3, 4 et 5)

Les étapes 3 et 4 sont itérées pour chaque ion diagnostique. Les molécules ayant dans leurs fragments MS/MS au moins deux ions diagnostiques sont considérées comme pouvant appartenir à la série fumagillol-ligérine. Les analogues sont ensuite identifiés en considérant leur masse exacte, leur formule brute, leur profil isotopique, leur temps de rétention, leur spectre UV et les pertes de neutre engendrées lors de la fragmentation MS/MS (Figure III-28).

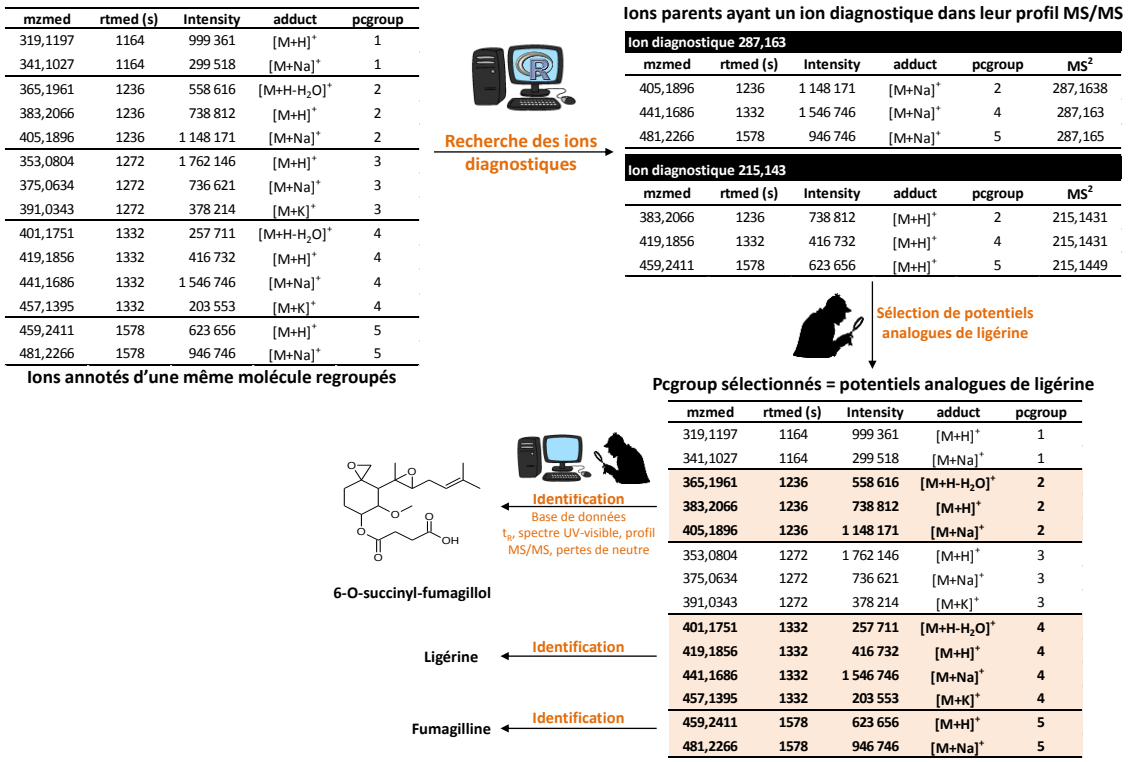


Figure III-28 : Exemple de traitement de données LC-MS avec R (étapes 3 et 4 réitérées et finalisation de l'identification)

Les composés qui ont déjà fait l'objet d'analyse LC-UV/DAD-HRMS/MS sont facilement identifiables grâce à l'interrogation de la base de donnée générée au laboratoire et pris en charge par le logiciel LabSolution (Shimadzu®, Kyoto, Japon). Par ailleurs l'utilisation du logiciel MetID (Shimadzu®, Kyoto, Japon) permet aussi de rechercher rapidement au sein d'une analyse LC-HRMS d'un extrait brut, les ions pouvant correspondre à une molécule dont on a enregistré la formule brute. Ainsi, la création d'une base de données comprenant les noms et les formules brutes des analogues de ligérine détectés, identifiés ou non, a été créée. Elle permet de rechercher grâce au logiciel MetID la présence potentielle de ces analogues au sein d'extraits fongiques. Cependant, n'étant basé que sur la formule brute et donc la masse exacte des molécules, cette recherche ne permet que d'effectuer une première sélection. La comparaison des temps de rétention et des spectres de fragmentation MS/MS permet de valider l'identification des ions extraits.

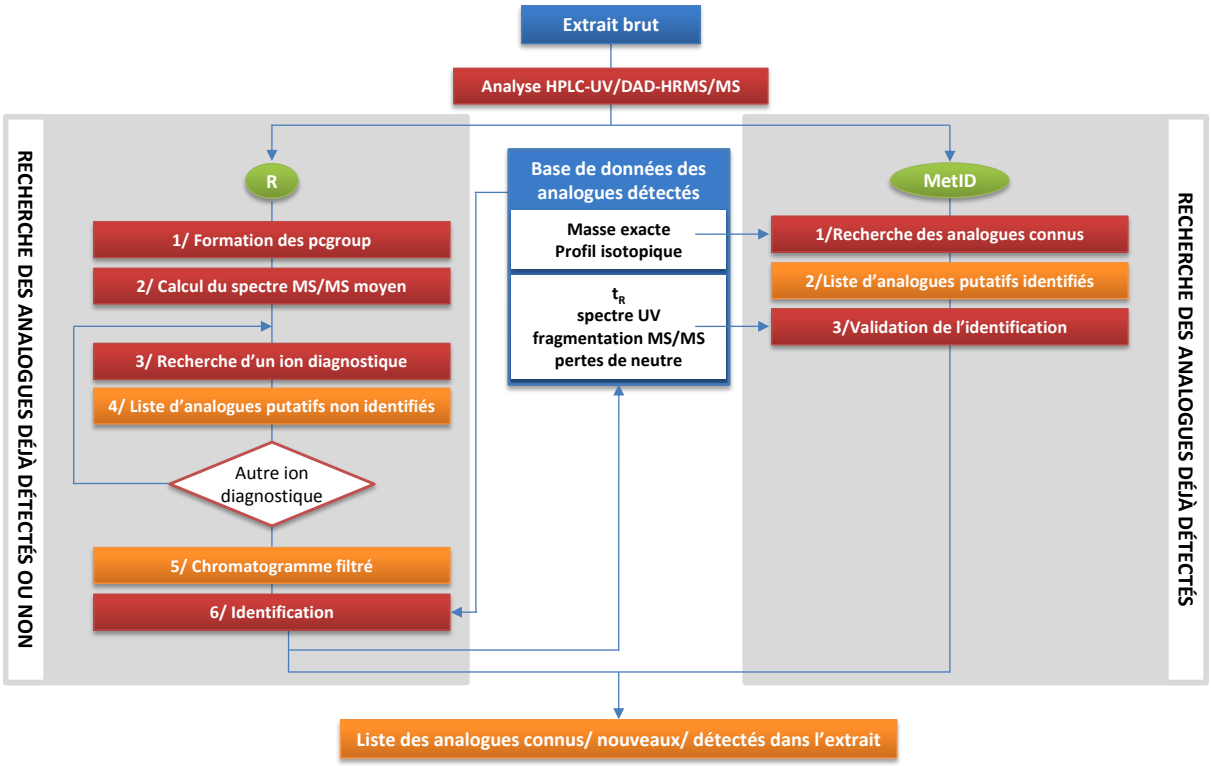


Figure III-29 : Schéma décisionnel de la recherche automatisée d'analogues de ligérine

1.5. Application : Recherche des analogues naturels de la ligérine dans les extraits des souches de *P. ligerum*

Le protocole et les modèles développés ont été appliqués à la recherche d'analogues de la ligérine dans les extraits de différentes souches de *P. ligerum* disponibles dans la mycothèque du laboratoire.

La souche MMS747 produit de la ligérine et 18 de ses analogues, tous décrits auparavant au sein de l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES. On retrouve alors les 7 analogues totalement identifiés (Figure III-30) ainsi que les 11 analogues LIG-XXX dont les structures ne sont pas élucidées.

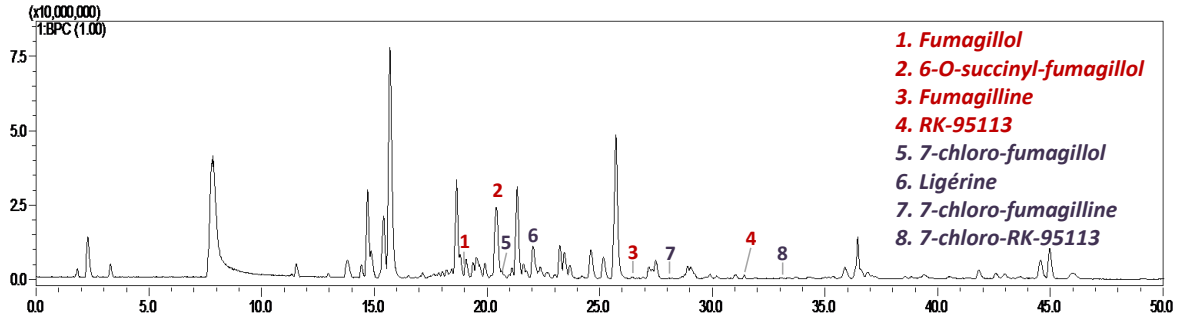


Figure III-30 : Chromatogramme LC-HRMS de l'extrait de la souche MMS 747 (BPC)
En rouge sont indiqués les analogues de la série époxydée et en violet ceux de la série chlorée.

Dans les extraits des souches MMS388 et MMS399, ni la ligérine ni aucun de ses analogues n'ont été détectés, ce qui montre selon ce critère, la répartition en 2 groupes des quatre souches étudiées.

1.6. Réflexion sur la biosynthèse de la ligérine et des analogues naturels

La voie biosynthétique de la fumagilline ne restant que partiellement élucidée (cf. partie bilbiographie de la fumagilline et de ses analogues, p29) et le nombre d'analogues naturels de la ligérine détecté au sein de nos extraits fongique étant important, il nous est apparu pertinent de replacer ces résultats dans un contexte biosynthètique. Néanmoins, Lin *et al.*ainsi que Wiemann *et al.*ont montré que le fumagillol était estérifié avec un acide gras dodécapentanoïque donnant un intemédiaire à chaîne C6non acide avant de former la fumagilline (Lin *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2013). Ainsi, d'après ces données, des hypothèses concernant la biosynthèse de la ligérine et des analogues naturels observés ont pu être formulées et sont présentées dans la Figure III-31.

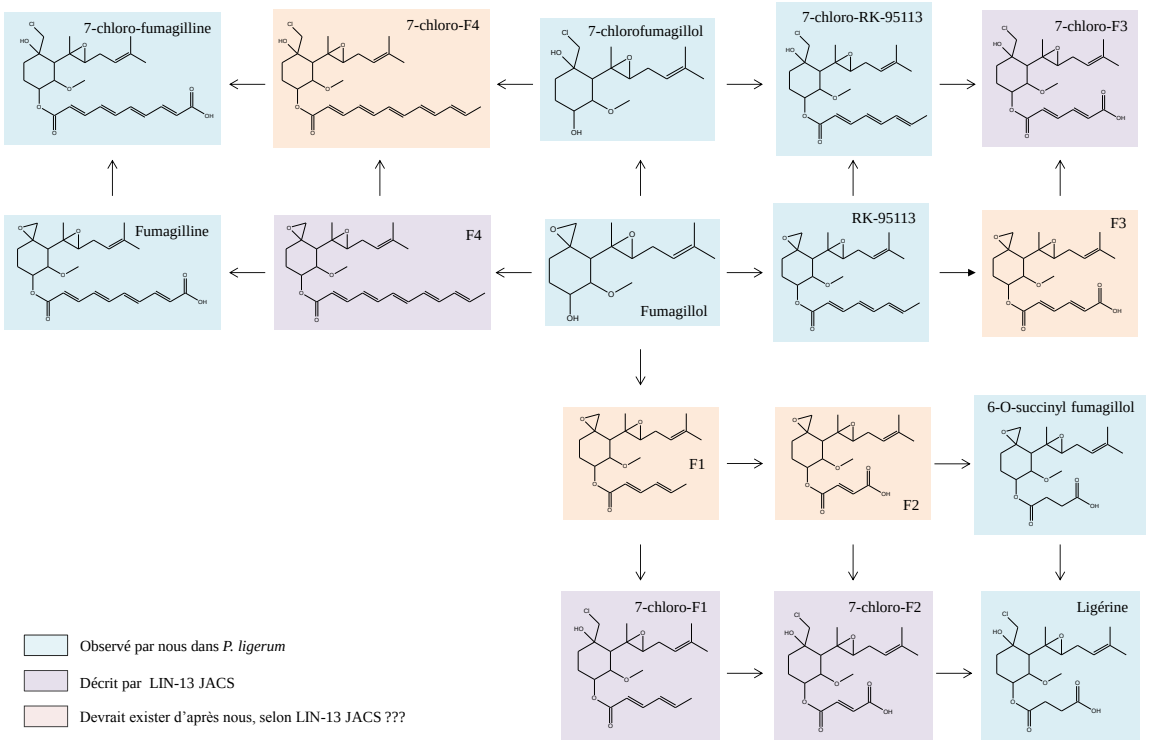


Figure III-31: Analogues connus et précurseurs hypothétiques autour de la biosynthèse de la ligérine

Sur cette figure, le composé F4 correspond à l'un des précurseurs biosynthétiques de la fumagillinedéterminé par Lin *et al.* (Lin *et al.*, 2013) et les molécules F1 à F3 constituent les composés que l'on pourrait observer si l'on considère que la biosynthèse de la ligérine et du RK-95113 suit le même schéma biosynthétique que celui décrit par Lin *et al.* pour la fumagilline.

Afin d'acquérir des données concernant la biosynthèse de ces sesquiterpènes, une étude cinétique de la production de la ligérine et de ses analogues a été réalisée. La souche MMS351 a été cultivée sur milieu YES pendant 18 jours et soumise à une extraction journalière. Les extraits obtenus ont ensuite été analysés par LC-UV/DAD-HRMS/MS afin d'identifier et de quantifier les molécules d'intérêt.

- ✓ **Protocole**

✓ **Culture de *P. ligerum***

La souche MMS351 a été cultivée sur milieu gélosé YES. Le milieu de culture (composition dans l'Annexe II) a été stérilisé pendant 20 minutes à 120°C à l'autoclave et a été réparti à raison de 25 mL par boite de pétri. Après refroidissement et solidification du milieu de culture, l'ensemencement des champignons a été effectué en conditions stériles par dépôts de spores fongiques sur la gélose en 3 points équidistants. Le nombre de boites à ensemencer a été défini de manière à pouvoir examiner 5 boites par jour,pendant 18 jours. Les boites ont été incubées à 27°C sous lumière naturelle. Tous les jours avant chaque extraction, la morphologie et la croissance du champignon ont été observés. Ainsi la couleur et la taille des colonies, la couleur du milieu de culture et la présence d'exsudats et/ou de spores ont été notées. De plus, toutes les boites ont été systématiquementphotographiées (recto et verso) avant d'être extraites.

✓ **Extraction**

Une micro-extraction a été réalisée chaque jour sur les quintuplât biologique pendant 18 jours. Trois prélèvements par boite ont été réalisés à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre. Chaque pool de trois prélèvements ont été extraits aux ultrasons pendant 1h dans 1mL d'un mélange de solvants CH_2Cl_2/AcOEt 50:50 (v/v). Le surnageant a ensuite été prélevé, et le matériel biologique a de nouveau été soumis aux ultrasons pendant 30 minutes avec 1 mL de solvant. Le deuxième surnageant a ensuite été récupéré et adjoint au premier avant filtration sur membrane de cellulose régénérée afin d'éliminer les spores fongiques (membrane d'une porosité de 0,2 µm ou 0,45 µm selon le développement du champignon (filtres Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). L'extrait a enfin été évaporé à siccité.

✓ **Analyses**

Les extraits obtenus ont ensuite été analysés par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS selon la méthode analytique B (Annexe II). Les extraits ont été mis en solution dans du MeOH (J. T. Baker®) à 1 mg/mL, filtrés sur filtre de cellulose régénérée (porosité 0,45 µm, Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). 5 µL d'une solution méthanolique de caféine à une concentration de 100 µg/mL ont ensuite été adjoint à 45 µL de chaque extrait afin d'évaluer la reproductibilité des analyses. De plus pour chaque souche, des contrôles qualité ont aussi été réalisés grâce à l'analyse à plusieurs reprises d'un mélange de tous les extraits étudiés. Un blanc a consisté en l'injection de 1 µL de MeOH. Les molécules d'intérêt ont été recherchées dans les extraits en se basant sur la méthode de recherche des analogues de ligérine exposée dans ce chapitre.

Les molécules pour lesquelles des hypothèses avaient été émises quant à leur implication dans la biosynthèse de cette classe chimique (F1, F2, F3 et F4 et leur analogue chloré) ont été recherchées. Parmi celles-ci, le composé F4 a été détecté soutenant ainsi son implication comme précurseur dans la biosynthèse de la fumagilline décrite par Lin *et al.*.

Aucune information supplémentaire n'a malheureusement pu être extraite de cette étude. En effet, les résultats obtenus étant non quantitatifs du fait d'un mauvais réglage des paramètres MS, les analyses LC-HRMS-MS devront être réitérées afin d'obtenir des profils cinétiques quantitatifs. Il sera alors intéressant d'étudier les cinétiques d'apparition des différents métabolites analogues de la ligérine afin d'acquérir une meilleure connaissance de cette voie métabolique.

En plus de l'acquisition de données concernant la biosynthèse de ces sesquiterpènes, ces analyses devraient permettre de définir la durée de culture optimale pour une production maximale des analogues originaux de la ligérine dont les isolements voudraient être effectués.

Remarque : la question chronologique du positionnement dans la biosynthèse de l'étape d'halogénation se pose : Est-ce que les dérivés chlorés sont des produits finaux ? Si la réponse est positive, une halogénase en bout de chaîne enzymatique devrait alors être observée et cette enzyme serait spécifique à l'espèce *P. ligerum*, aucun analogue halogéné n'ayant été décrit chez *Aspergillus fumigatus*. Il semblerait donc intéressant de décrire le cluster de gènes responsable de la synthèse de la ligérine chez *P. ligerum*.

1.7. Conclusion

Cette étude du métabolome de *Penicillium ligerum*a mis en évidence l'importante capacité métabolique des souches MMS351 et MMS747 pour la production de sesquiterpènes de la famille de la fumagilline : dix-huit analogues naturels de la la ligérine ont pu être détectés au sein des extraits. Parmi eux, la structure hypothétique de sept des composés a pu être déterminée et celle des onze autres analogues reste à définir. Parmi les composés suspectés, deux seraient des molécules originales : le 7-chloro-RK-95113 et la 7-chloro-fumagilline. Le 6-O-succinyl-fumagillol et le 7-chloro-fumagillol sont quant eux, des composés de synthèse dont l'observation dans le métabolome d'un organisme vivant constitue une découverte. La purification et l'analyse spectrale complète de ces composés sont néanmoins nécessaires pour confirmer leur structure et leur stéréochimie.

La méthodologie appliquée à l'étude de la famille chimique de la ligérine est une approche efficace pour la recherche d'une série d'analogues d'intérêt au sein de fractions ou d'extraits bruts.Soutenue par des outils bioinformatiques, cette méthode peut être appliquée de manière systématique sur chaque nouveau extrait brut fongique étudié. Elle peut cependant aussi être appliquée à l'étude de métabolites appartenant à d'autres familles chimiques d'intérêt.

L'exploration du métabolome secondaire de la nouvelle espèce fongique *Penicillium ligerum* ne s'est pas arrêtée à l'étude des sesquiterpènes de la famille de la ligérine. Plusieurs métabolites produits par la souche MMS351 et appartenant à des classes chimiques différentes ont pu être isolées et caractérisées.

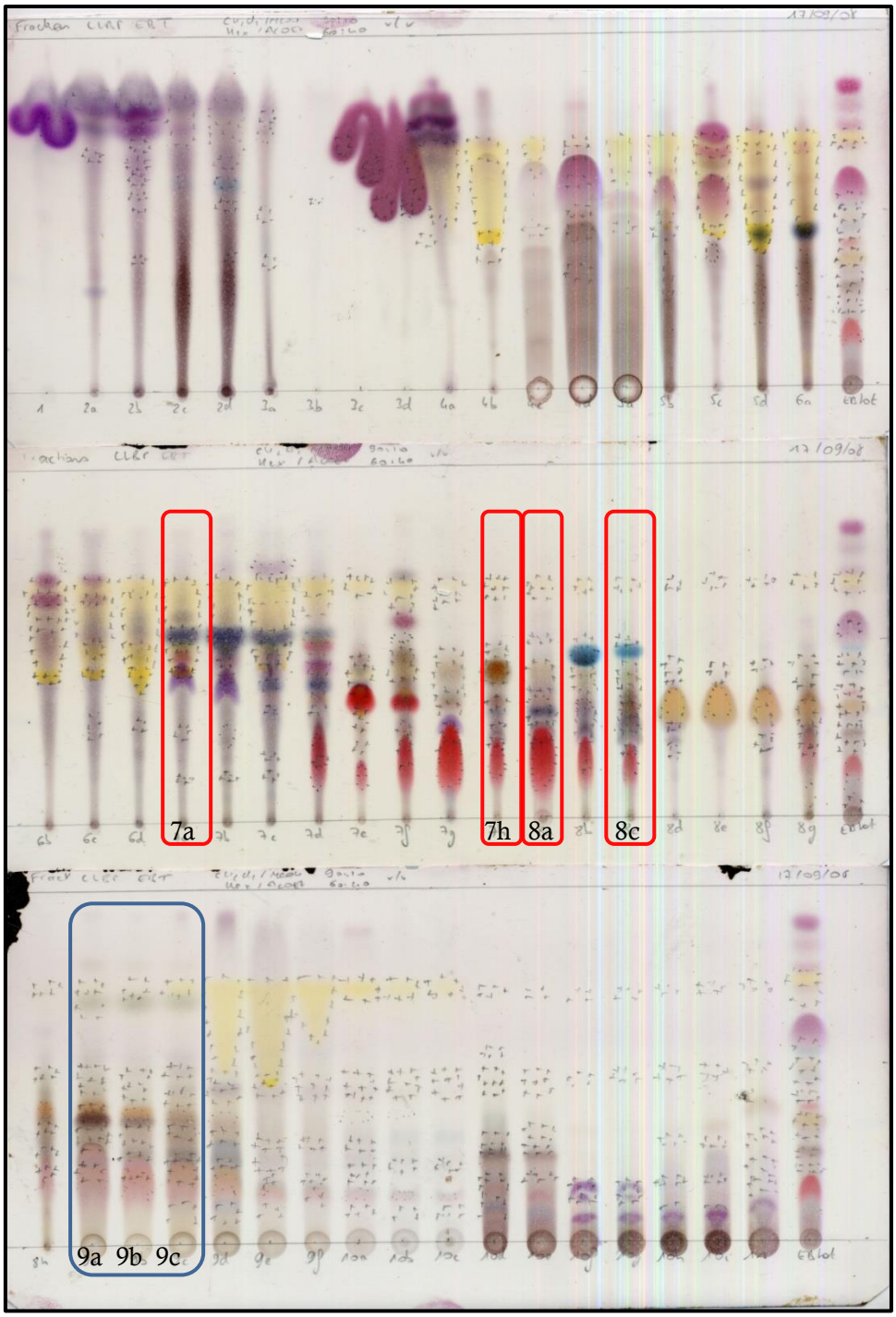
2. Purification et identification de métabolites de la souche MMS351

Dans un contexte visant une meilleure connaissance du métabolome de *P. ligerum* mais aussi dans un souci de recherche de composés originaux bioactifs, la caractérisation chimique de plusieurs fractions d'un extrait massif de la souche MMS351 a pu être entreprise. Les travaux de purification et l'élucidation structurale des métabolites secondaires isolés font l'objet de ce chapitre.

2.1. Contexte

Lors de sa thèse Marieke Vansteelandt avait fractionné 33 g d'un extrait brut de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES. Cette étape de purification avait consisté en une chromatographie liquide en colonne ouverte avec 1,5kg de silice conditionnée dans l'hexane (colonne de verre de 9,4cm de diamètre). Un dépôt sec avait été réalisé avec 30g de silice. L'élution avaitconsisté en un gradient discontinu de polarités croissantes hexane/acétate d'éthyle (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 et 50% d'AcOEt en volume) puis CH_2Cl_2/MeOH (0, 30 et 100% de MeOH en volume). Cinquante-trois fractions de 1L avaient été récupérées (FigureIII-32) et leurs activités antiprolifératives ou cytotoxiques évaluées sur quatre lignées cellulaires (Tableau III-13). Seules 4 fractions, éluées par les mélanges hexane/AcOEt 70 :30 (v/v) et 60:40 (v/v), avaient présenté une activité cytotoxique ou antiproliférative intéressante associée à un effet-dose sur la lignée tumorale d'ostéosarcome de souris POS-1 (7a, 7h, 8a, 8c entourées en rouge dans la FigureIII-32), tout en étant moins ou non actives sur la lignée non tumorale de fibroblastes murins L929. Ces fractions n'avaient par contre pas présenté d'activité sur la lignée AT6-1. L'étude chimique de la fraction active 8c avait mené à la purification et l'identification de la ligérine. La composition chimique des trois autres fractions actives (7a, 7h, 8a) correspond à l'étude présentée ici.

Par ailleurs, les fractions 9a, 9b et 9c de compositions moléculaires prochesentre elles mais éloignées des autres fractions étudiées, ont été rassemblées pour former la fraction 9abc dont l'étude chimique a aussi été réalisée.



FigureIII-32 : Profils CCM des fractions issues de la chromatographie en colonne ouverte de l'extrait brut 351-YES(Vansteelandt, 2011), silice, éluant : CH_2Cl_2/MeOH 90:10 (v/v) puis hexane/acétate d'éthyle 60:40 (v/v),révélation : vanilline sulfurique.
Les fractions entourées correspondent aux fractions dont l'étude chimique approfondie a été réalisée ; celles entourées en rouge correspondent aux fractions actives sur la lignée POS-1.

Tableau III-13 : Activité cytotoxique ou antiproliférative des fractions issues de la chromatographie en colonne ouverte de l'extrait brut 351-YES sur les lignées cellulaires POS-1, AT6-1 et L929
(Vansteelandt, 2011 ; - = pas d'activité observée à la concentration testée, NT = non testé)

				Diminution de la viabilité cellulaire à 100 ng/mL		
Fraction	**Solvants éluants (v/v)**	**Quantité (en mg)**	**Cl_{50} KB (µg/mL)**	**POS1**	**AT6-1**	**L929**
1	Hexane/AcOEt 100:0	62,6	NT	NT	NT	NT
2a	Hexane/AcOEt 95:5	9,7	NT	NT	NT	NT
2b	Hexane/AcOEt 95:5	10,1	NT	NT	NT	NT
2c	Hexane/AcOEt 95:5	4,1	NT	NT	NT	NT
2d	Hexane/AcOEt 95:5	0,8	NT	NT	NT	NT
3a	Hexane/AcOEt 90:10	-	NT	-	-	1%
3b	Hexane/AcOEt 90:10	-	NT	-	-	-
3c	Hexane/AcOEt 90:10	-	NT	NT	NT	NT
3d	Hexane/AcOEt 90:10	-	NT	NT	NT	NT
4a	Hexane/AcOEt 85:15	82,9	29,4	-	-	-
4b	Hexane/AcOEt 85:15	440,8	> 30	-	-	-
4c	Hexane/AcOEt 85:15	3679,3	> 30	-	-	-
4d	Hexane/AcOEt 85:15	2890,6	> 30	-	-	-
5a	Hexane/AcOEt 80:20	1446,7	> 30	-	2%	5%
5b	Hexane/AcOEt 80:20	544,1	> 30	-	-	-
5c	Hexane/AcOEt 80:20	587,3	> 30	-	-	-
5d	Hexane/AcOEt 80:20	167,2	> 30	-	-	-
6a	Hexane/AcOEt 70:30	476,6	29,2	-	-	-
6b	Hexane/AcOEt 70:30	97,7	> 30	-	-	-
6c	Hexane/AcOEt 70:30	80,7	> 30	-	-	-
6d	Hexane/AcOEt 70:30	58,7	> 30	-	-	-
7a	Hexane/AcOEt 60:40	112,1	19,1	38%	4%	8%
7b	Hexane/AcOEt 60:40	92,3	15,3	-	-	-
7c	Hexane/AcOEt 60:40	93,8	15,6	-	-	5%
7d	Hexane/AcOEt 60:40	168,5	> 30	-	3%	6%
7e	Hexane/AcOEt 60:40	535	> 30	-	-	-
7f	Hexane/AcOEt 60:40	332,4	> 30	4%	-	-
7g	Hexane/AcOEt 60:40	266,6	> 30	1%	-	2%
7h	Hexane/AcOEt 60:40	357,8	> 30	25%	-	2%
8a	Hexane/AcOEt 50:50	144	> 30	28%	-	5%
8b	Hexane/AcOEt 50:50	227,5	> 30	-	-	9%
8c	Hexane/AcOEt 50:50	310,6	> 30	62%	10%	17%
8d	Hexane/AcOEt 50:50	2142,6	15,3	-	3%	-
8e	Hexane/AcOEt 50:50	1920,2	17,2	-	-	-
8f	Hexane/AcOEt 50:50	474,6	> 30	-	4%	-
8g	Hexane/AcOEt 50:50	184	> 30	8%	8%	6%
8h	Hexane/AcOEt 50:50	191,6	> 30	-	-	-
9a	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	234,8	> 30	-	-	-
9b	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	180	> 30	-	8%	-
9c	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	215,8	> 30	-	8%	-
9d	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	16,3	> 30	5%	-	-
9e	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	4,6	> 30	-	-	-
9f	CH_2Cl_2/MeOH 100:0	3,1	> 30	-	-	-
10a	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	> 30	2%	-	-
10b	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	> 30	-	-	-
10c	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	NT	-	-	-
10d	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	NT	-	-	-
10e	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	NT	-	-	-
10f	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	> 30	-	1%	2%
10g	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	-	NT	-	-	8%
10h	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	528,6	NT	-	-	2%
10i	CH_2Cl_2/MeOH 70:30	268,5	NT	-	-	-
11	CH_2Cl_2/MeOH 0:100	1487,3	NT	-	-	-

L'isolement de la ligérine à partir de la fraction 8c de l'extrait de MMS351 a été effectué par fractionnement accompagné d'un biosuivi. Une autre approche peut être suivie, il s'agit de l'isolement de composés majoritaires, l'activité de ces composés étant recherchée après purification et identification. C'est la démarche que nous avons adoptée pour l'étude des fractions retenues.

2.2. Purification de molécules de la fraction 7a

Du fait de leur similarité en CCM (FigureIII-32) et afin d'avoir une masse de départ plus importante, les fractions 7a et 7b ont été rassemblées.

2.2.1. Purification du composé 351-N1

2.2.1.1. Fractionnement par chromatographie flash

La fraction 7ab (186mg) a été fractionnée par chromatographie flash en phase normale (Puriflash 430evo Interchim, colonne Interchim Si-OH 4g 50µm). La fraction a été adsorbée sur silice pour constituer le dépôt sec. Le système d'élution était composé d'un gradient binaire allant de 100% CH_2Cl_2 à 100% EtOH en 60min à un débit de 7mL/min. Les fractions qui ont été constituées en fonction des profils CCM sont au nombre de six. Par évaporation lente, un composé de la fraction 3 a cristallisé. Nous avons obtenu 1,1 mg de cette molécule que nous avons nommée 351-N1.

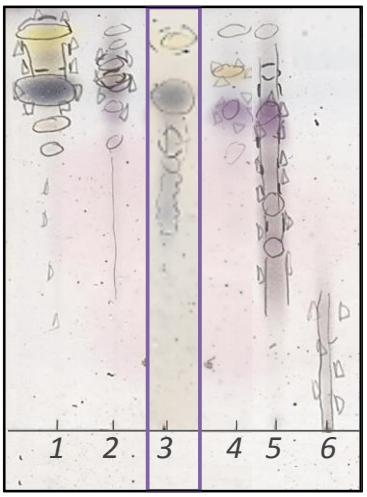
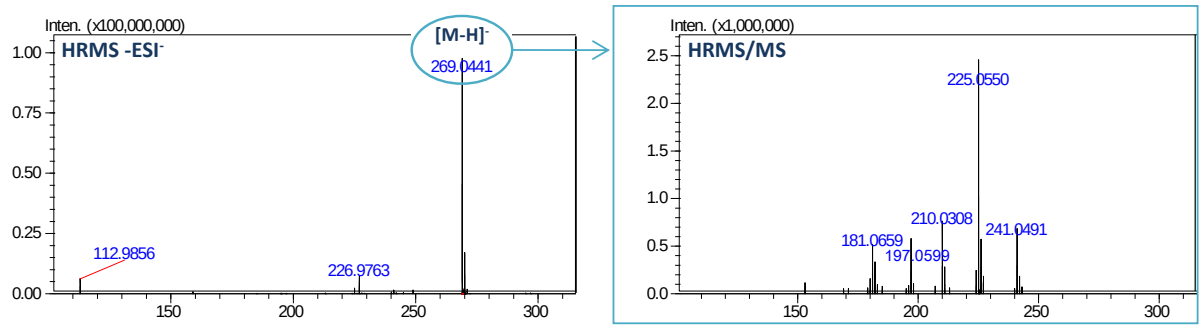


Figure III-33 : CCM bilan du fractionnement de 7h
(silice, éluant : CH_2Cl_2/MeOH 90 :10 (v/v) puis hexane/acétate d'éthyle 60 :40 (v/v),
révélation : vanilline sulfurique, trait plein observation à 365 nm et pointillés à 254 nm)

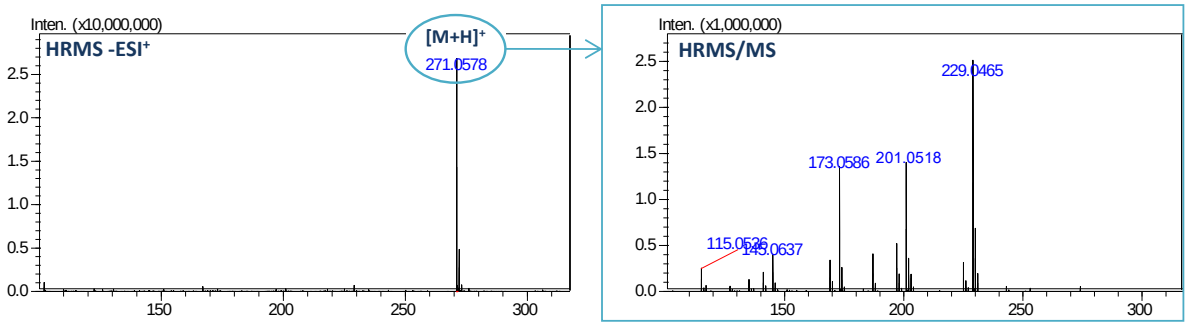
2.2.1.2. Analyse structurale du composé351-N1

- ✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS**

Le composé 351-N1 a été analysé par couplage HPLC-UV/DAD-HRMS/MS (selon la méthode analytique B, Annexe II). La spectrométrie de masse haute résolution ESI-SM$^{+/-}$ a révélé la présence d'un ion majoritaire en mode négatif sous la forme $[M-H]^-$correspondant aum/z 269,0441 (FigureIII-34) et en mode positif sous la forme $[M+H]^+$ de m/z 271,0578 (FigureIII-35).La formule brute calculée la plus probable semble alors être $C_{15}H_{10}O_5$ ($[M+H]^+ m/z_{théo}$ 271,0601 Δ 8,48 ppm et $[M-H]^- m/z_{théo}$ 269,0455 Δ 5,36 ppm).

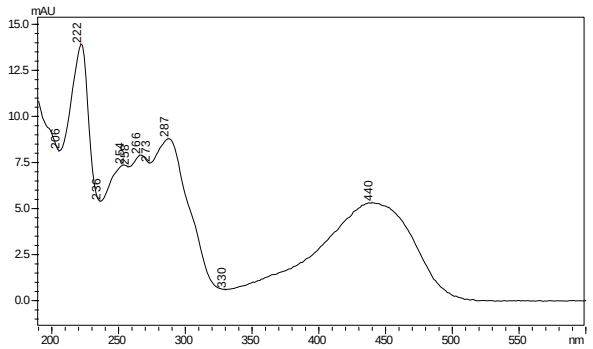


FigureIII-34 : Spectre de masse du composé 351-N1 en moded'ionisation négative et spectre MS/MS de l'ion [M-H]⁻ de *m/z* 269,0441(énergie de collision 8%)



FigureIII-35 : Spectre de masse du composé 351-N1 en mode d'ionisation positive et spectre MS/MS de l'ion [M+H]⁺de *m/z* 271,0578(énergie de collision 8%)

A ce stade, il est difficile d'interpréter les spectres de fragmentation. Le spectre UV-visible (FigureIII-36) a été mesuré et a révélé la présence de bandes d'absorbance à des λ_{max} de 222, 254, 267, 288 et 440 nm qui indiquent la présence de chromophores conjugués dans la molécule. Ce spectre est proche de celui des anthraquinones (Xu *et al.*, 2012).



FigureIII-36: Spectre UV-visible du composé 351-N1 (λ_{max} 222, 254, 267, 288, 440 nm)

✓ Analyses RMN

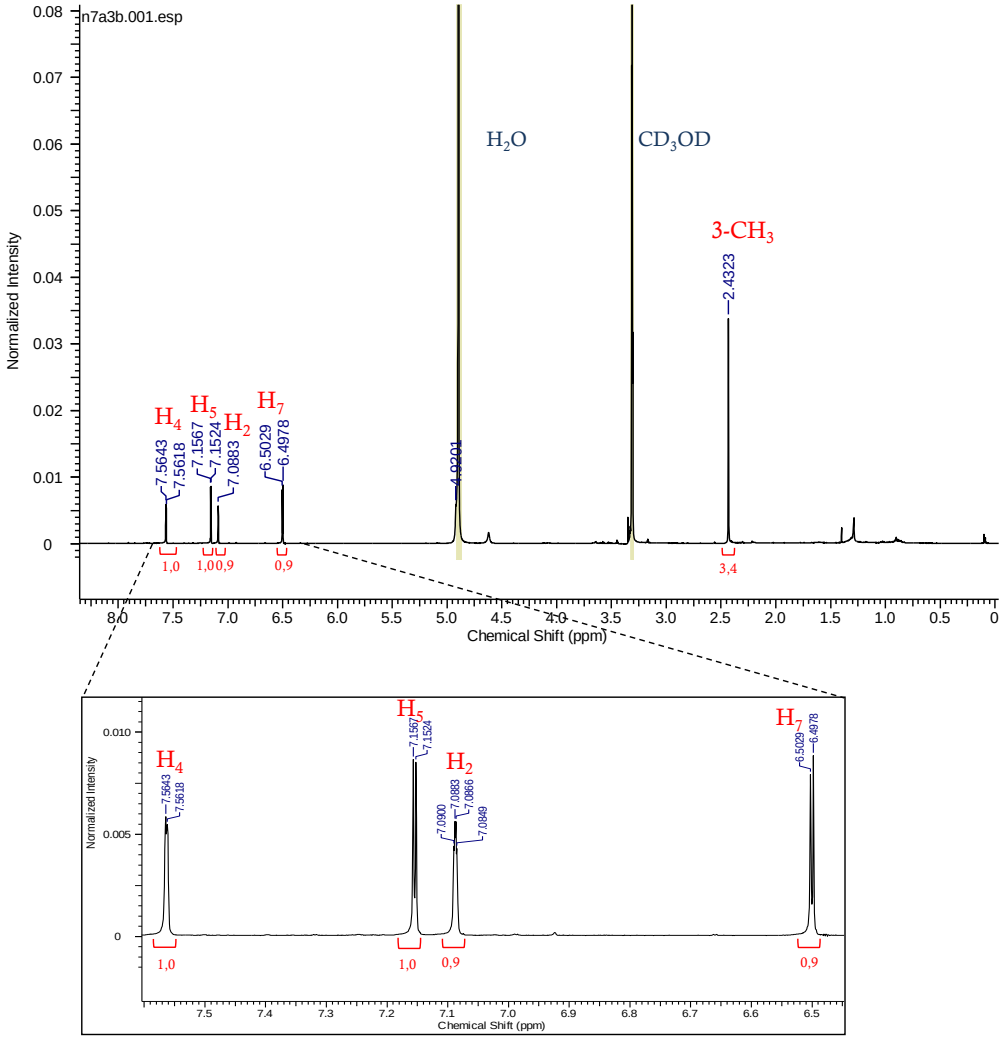
Les analyses en RMN 1D et 2D ont aussi pu être réalisées afin de poursuivre l'élucidation structurale du composé 351-N1.

L'analyse des données RMN-^{1}H (FigureIII-37) révèle la présence d'un méthyle (δH = 2,43 ppm) et de deux couples de protons :

-deux doublets avec une constante de couplage de 2,4 Hz correspondant à un couplage de deux protons en position en méta sur un cycle aromatique (δH = 6,50 ppm et δH = 7,15 ppm)

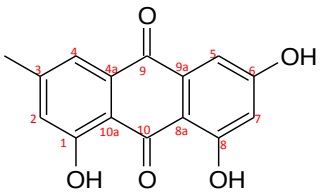
-deux doublets avec une constante de couplage d'environ 1 Hz correspondant à un deuxième couplage en méta de deux protons présents sur un cycle aromatique (δH = 7,09 ppm et δH = 7,56 ppm).

Ceci met en évidence la présence de deux cycles aromatiques dans la molécule avec seulement 2 CH chacun. Ceci conforte la ressemblance avec une anthraquinone.



FigureIII-37 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du composé 351-N1

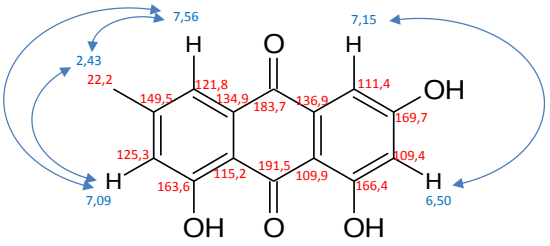
Les analyses en RMN 1D et 2D ont permis de finaliser l'identification structurale du composé 351-N1 qui correspond à l'émodine (Figure III-38, II-39 et III-40 et leTableau III-14). L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé sont présentés dans l'Annexe III.



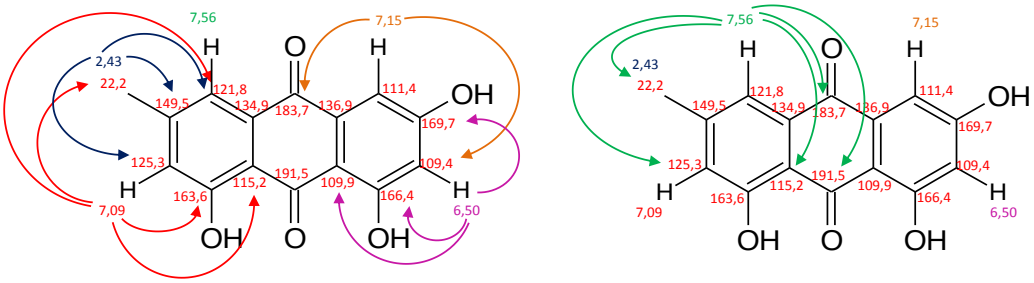
FigureIII-38 : Composé 351-N1 : émodine

Tableau III-14 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélation RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N1

position	13C, δC (ppm)	HSQC 1H-13C (1J) 1H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY 1H-1H 1H, δH (ppm)	HMBC 1H-13C (2J, 3J, 4J) 13C, δC (ppm)
1	163,6			
2	125,3	7,09 (1H, d, 0,8Hz)	2,43 ; 7,56	22,2 ; 115,2 ; 121,8 ; 163,6
3	149,5			
4	121,8	7,56 (1H, d, 1,1Hz)	2,43 ; 7,09	22,2 ; 115,2 ; 125,3; 183,7 ; 191,5
4a	134,9			
5	111,4	7,15 (1H, d, 2,4Hz)	6,50	109,4 ; 183,7
6	169,7			
7	109,4	6,50 (1H, d, 2,4Hz)	7,15	109,9 ; 166,4 ; 169,7
8	166,4			
8a	109,9			
9	183,7			
9a	136,9			
10	191,5			
10a	115,2			
3-CH3	22,2	2,43 (3H, s)	7,09 ; 7,56	121,8 ; 125,3 ; 149,5



FigureIII-39 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N1



FigureIII-40 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N1

2.2.1.3. Evaluation biologique de l'émodine

L'activité cytotoxique de l'émodine a été évaluée sur la lignée cellulaire KB pour des concentrations de 0,625 µM à 20 µM. Aucune activité cytotoxique n'a été détectée. Ce composé ne semble donc pas être responsable de l'activité observée pour la fraction 7ab (CI_{50} sur cellules KB de 19,1 µg/mL pour la fraction 7a et 15,3 µg/mL pour 7b). Il conviendra de purifier les autres molécules présentes dans les autres fractions obtenues en chromatographie flash sur la fraction 7ab afin de purifier la ou les molécules actives.

2.2.1.4. Etude bibliographique : discussion

L'émodine qui est la 1,6,8-trihydroxy-3-méthylanthraquinone, est une anthraquinone bien connue décrite comme produite par les plantes des genres *Rheum* (ex : rhizome de la rhubarbe,*Rheum palmatum*, plante qui outre son utilisation culinaire, est aussi d'après la médecine traditionnelle chinoise utilisée comme laxative) et *Rhamnus* (ex : bourdaine : *Rhamnus frangula*) mais aussi chez certains champignons et lichens appartenant à la famille des Teloschistaceae (Manojlovic *et al.*, 2010). Parmi les champignons, Li *et al.* rapportent notamment en 2012 la présence d'émodine dans le métabolome d'une espèce de *Penicillium* endophyte (Li *et al.*, 2012).

- ✓ **Biosynthèse**

L'émodine est un polycétide qui est probablement formé à partir d'endocrocine par une simple réaction de décarboxylation qui est facilitée par la présence de la fonction hydroxyle adjacente (Figure III-41). L'endocrocine est quant à elle, surement biosynthétisée suite au repliement d'un polycétide contenant 8 unités C2, permettant alors la formation du squelette carboné. Trois condensations aldol pourraient ensuite donner l'intermédiaire hypothétique 1. La formation de l'endocrocine résulte ensuite de réactions d'énolisation, excepté pour un des carbonyles cruciaux du cycle au centre de la molécule pour lequel le processus oxydatif mis en jeu n'est pas encore décrit.

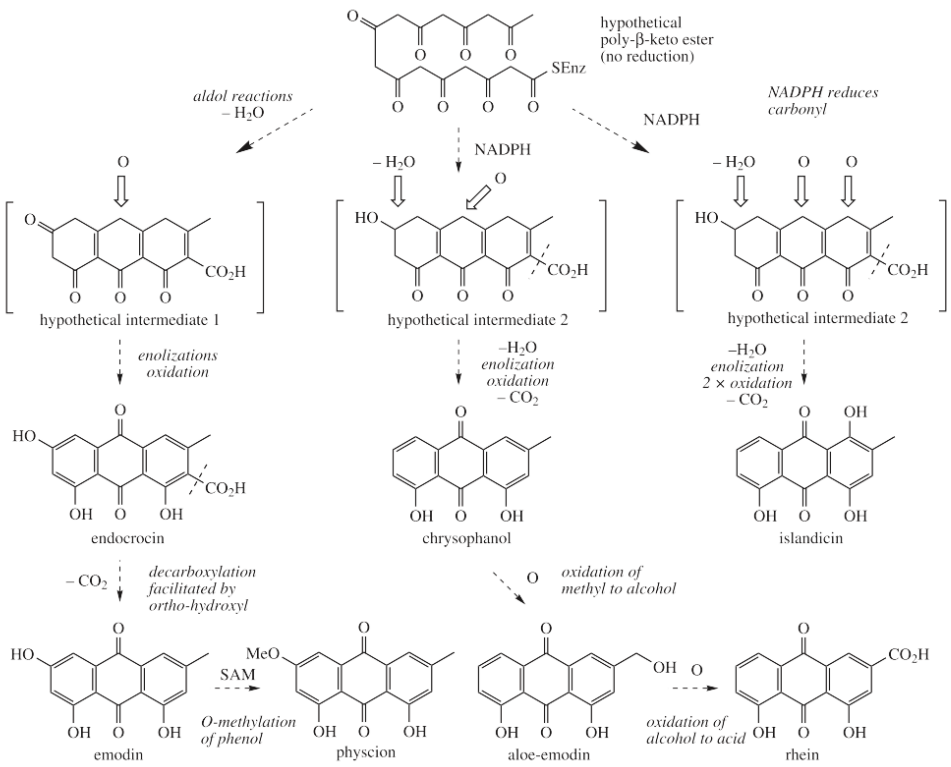


Figure III-41 : Biosynthèse de l'émodine et de trois de ces analogues : le physcion, l'aloe-émodine et la rhéine (Dewick, 2011)

✓ Analogues

Parmi les nombreuses anthraquinones décrites, on peut citer ici celles proches de l'émodine et souvent observées simultanément lors des études phytochimiques : le chrysophanol qui correspond au 6 déhydroxy-émodine, le physcion (6-O-méthyl-émodine), l'islandicine, la rhéine, l'aloe-émodine… Ces anthraquinones sont aussi observées sous des formes halogénées (ex : 7-chloro-émodine), glycosylées (ex : la franguline A qui correspond à l'émodine-6-O-rhamnoside) ou en dimère (ex : la skyrine qui correspond à l'homodimère d'émodine).

✓ Synthèse chimique

La synthèse de cette molécules a quant à elle été décrite dans les années 1920(Eder et Widmer, 1923; Jacobson et Adams, 1924).

✓ Activités biologiques

La communauté scientifique alloue à l'émodine de nombreuses activités biologiques diverses telles que antibactériennes, anti-inflammatoires, immunosuppressives. Récemment, de nouvelles études démontrent son activité anticancéreuse (Huang *et al.*, 2007) avec des effets antiprolifératifs et inducteurs de l'apoptose notamment dans le cas des cancers du poumon (Ko *et al.*, 2010) ou de l'ovaire (Li *et al.*, 2009) et dans le cas de leucémies (Wang *et al.*, 2008). Liu *et al.* en 2011 décrivent aussi par exemple une activité antiproliférative et des effets antimétastatiques de l'émodine dans le cas de cancers pancréatiques invasifs (Liu *et al.*, 2011).

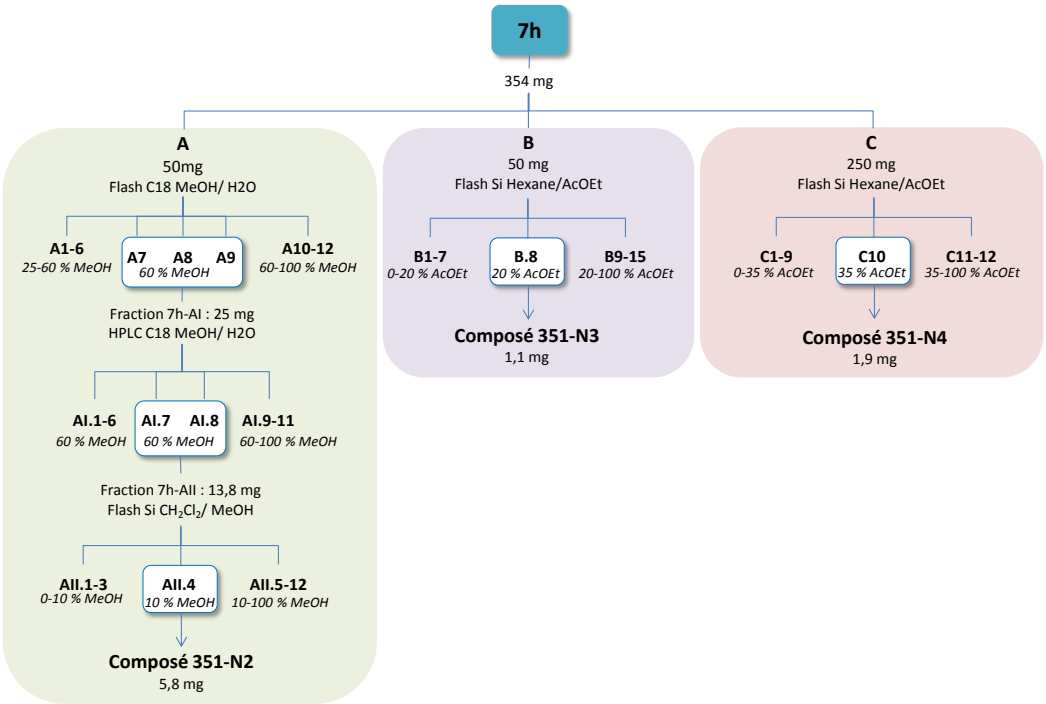
2.2.1.5. Purification de molécules de la fraction 7ab : Conclusion

L'étude chimique de la fraction 7ab a mené à l'isolement et à la caractérisation de l'émodine. Cette anthraquinone n'a pas présenté d'activité biologique sur les cellules tumorales KB. La fraction mère présentait une activité cytotoxique sur cette lignée cellulaire. Il serait donc intéressant de poursuivre la purification des métabolites de la fraction 7ab afin d'isoler la ou les molécules actives.

Des analyses HPLC-UV/DAD effectuées sur cette fraction ont permis de montrer, d'après l'observation des spectres UV-visible, la présence de plusieurs autres anthraquinones et de cinq composés majoritaires devant être purifiés.

2.3. Purification de molécules de la fraction 7h

La fraction 7h a été fractionnée à plusieurs reprises grâce à des techniques chromatographiques en phase normale et phase inverse. A titre de comparaison, trois protocoles de fractionnement différents ont été appliqués en parallèle sur la fraction. Deux protocoles ont engagé 50 mg dans un fractionnement en chromatographie flash : l'un en phase inverse (Fractionnement A) et l'autre en phase normale (Fractionnement B). Finalement, les 250 mg restant de la fraction 7h ont fait l'objet d'un fractionnement (Fractionnement C) adapté du protocole appliqué lors du fractionnement B. Le fractionnement A suivi de deux étapes de séparation par chromatographie liquide a permis l'isolement du composé M-7h.AII.4. Les fractionnements B et C ont quant à eux, permis l'isolement des molécules M-7h.B8 et M-7h.C10. L'arbre de purification est présenté dans la FigureIII-42. L'isolement de ces trois composés ainsi que leur élucidation structurale sont détaillés dans cette partie.



FigureIII-42 : Schéma de purification des molécules de la fraction 7h

2.3.1. Isolement et identification du composé 351-N2

2.3.1.1. Purification du composé 351-N2

✓ **1ère étape de fractionnement A : Chromatographie flash**

La fraction 7h (50 mg) a été engagé dansun fractionnement par chromatographie flash en phase inverse (colonne Interchim C18 6 g, 50µm) (Fractionnement A). L'échantillon a au préalable été dissout dans 1mL d'un mélange MeOH/H_2O pour l'injection liquide. Le système d'élution était composé d'un gradient binaire :

- MeOH/H_2O25:75 (v/v) appliqué à un débit de 3 mL/min pendant 6 min puis,
- MeOH/H_2O de 25:75 à 60 :40 (v/v) en 7 min puis,
- MeOH/H_2O 60:40 (v/v) pendant 12 min puis,
- MeOH/H_2O 60:40à 100:0 (v/v) en15 min à 6 mL/min (Figure III-43).

Suite à ce protocole, 12 fractions ont été obtenues. Les fractions 7, 8 et 9 ont pu être regroupées suite aux analyses par CCM pour former la fraction 7h-AI de 25 mg.

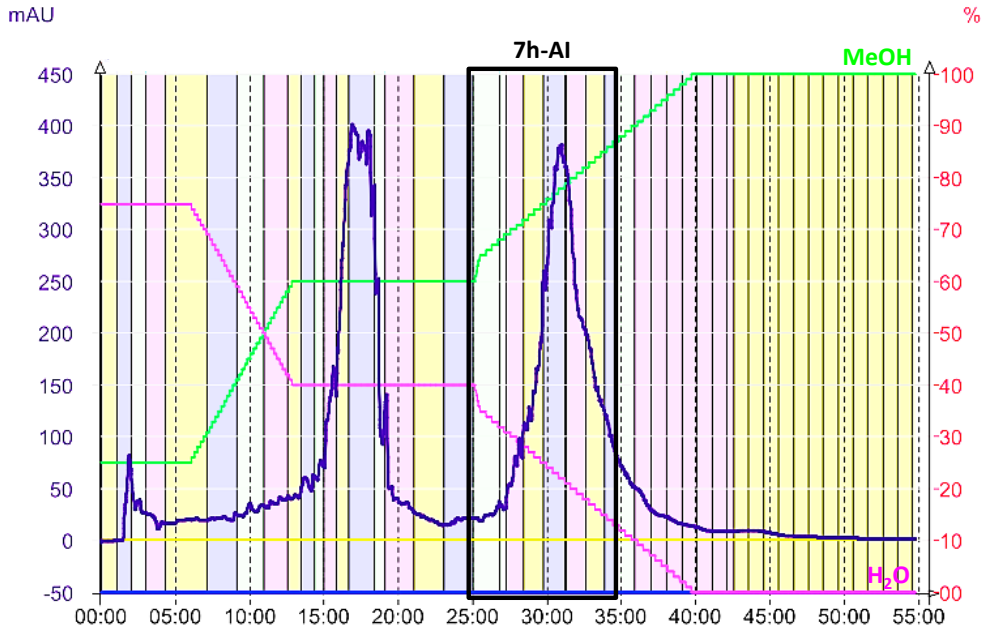


Figure III-43 : Chromatographie flash de la fraction 7h :
Chromatogramme UV (200-400 nm) et gradient binaire de la phase éluante (MeOH/H2O)

✓ **2ème étape de fractionnement : HPLC**

La fraction 7h-AI a fait l'objet d'une deuxième étape de purification qui a consisté en un fractionnement par HPLC avec une colonne silice greffée C18 (colonne Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18, Analytical, 150 x 4,6 mm). La phase mobile a été appliquée de manière isocratique MeOH/H_2O 60:40 (v/v) pendant 20 min puis en un gradient allant jusqu'à 100% de MeOH en 5 min. Des injections de 0,5 mg ont été réalisées à partir de solutions méthanoliques à 10 mg/mL (débit de 0,5 mL/min) et l'éluat a été collecté automatiquement toutes les minutes aboutissant à l'obtention de 16 fractions. Les fractions AI.11 et AI.12 ont ensuite été regroupées pour former la fraction AII (13,8 mg).

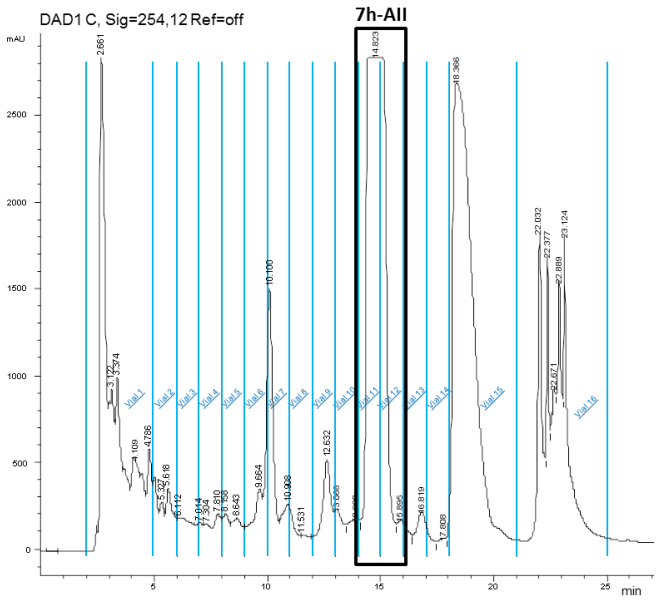


Figure III-44 : Chromatogramme UV (200-400 nm) et gradient binaire de la phase éluante (MeOH/H_2O)

- ✓ **3ème étape de fractionnement : Chromatographie flash**

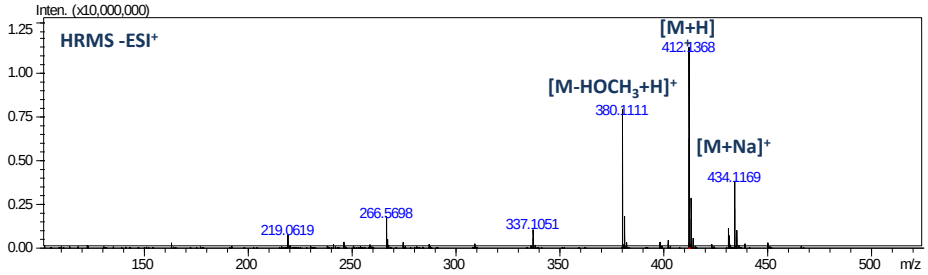
La fraction AII (13,8 mg) a fait l'objet d'une troisième étape de purification parchromatographie flash en phase normale (colonne Interchim Si-OH 4g 15µm). L'échantillon a au préalable été adsorbé sur de la silice puis conditionné dans une cartouche d'injection. Le système d'élution était composé d'un gradient binaire allant de 100% CH_2Cl_2 à 100% d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 95:5 (v/v) en 25min à un débit de 5mL/min.

Cette purification a mené à l'isolement du composé 351-N2 (5,8mg).

2.3.1.2. Elucidation structurale du composé 351-N2

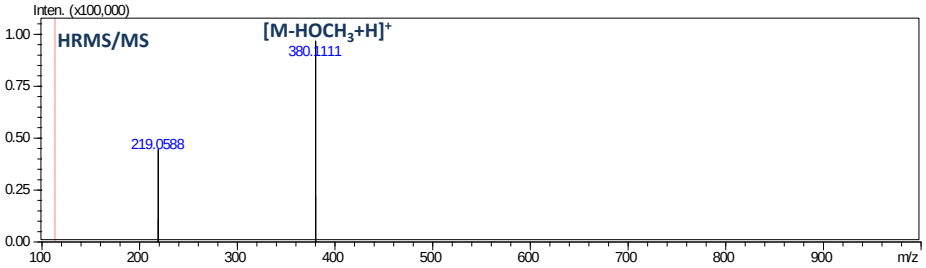
- ✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS**

Le composé 351-N2 a été analysé par couplage HPLC-UV/DAD-HRMS/MS(selon la méthode analytique B, Annexe II). Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées en mode d'ionisation positive et négativemais la molécule 351-N2n'est détectée qu'en mode positif. Ainsi, à un temps de rétention de 11,52 min, on observe le composé 351-N2 sous la forme d'un ion $[M+H]^+$de *m/z* de 412,1368 et sous la forme $[M+Na]^+$ avec l'ion de *m/z* 434,1169 (FigureIII-45).



FigureIII-45 : Spectre de masse haute résolution du composé 351-N2

L'ion de *m/z* de 380,1111 correspond quant à lui probablement à un fragment généré dans la source de l'appareil. En effet, cet ion fils est observé lors de la fragmentation MS/MS de l'ion parent de *m/z*412,1368 (FigureIII-46). La perte de neutre s'élève à 32,0257 u, nous indiquant alors la perte probable d'un méthanol. L'ion généré serait donc la forme $[M\text{-}HOCH_3+H]^+$. Un deuxième fragment est observé avec un *m/z* de 219,0588 correspondant à une perte de neutre de 193,078 u difficile à caractériser.



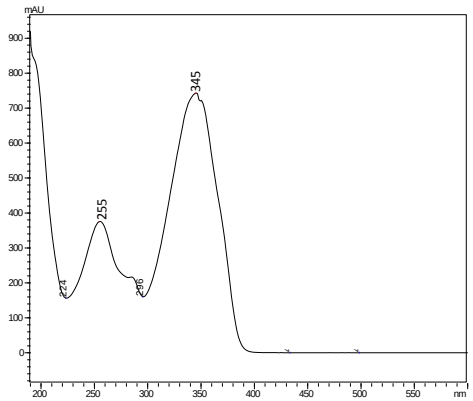
FigureIII-46 : Spectre de fragmentation MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 412,1368

Le profil isotopique permet d'exclure la présence d'un halogène tel que par exemple le chlore ou encore le brome. Les résultats de prédiction sont présentés dans le Tableau III-15et définissent les deux formules brutes les plus probables comme $C_{17}H_{21}N_3O_9$ et $C_{22}H_{21}NO_7$.

Tableau III-15 : Prédiction de la formule brute du composé 351-N2

Formule brute	Ion	m/z mesuré	m/z théorique	ΔmDa	Δppm	Iso Score
$C_{17}H_{21}N_3O_9$	$[M+Na]^+$	434,1169	434,117	0,1	0,23	98,21
	$[M+H]^+$	412,1368	412,1351	-1,7	-3,91	85,95
	$[M\text{-}OCH_3+H]^+$	380,1111	380,1088	-2,3	-5,29	83,83
$C_{22}H_{21}NO_7$	$[M+Na]^+$	434,1169	434,121	4,1	9,43	71,82
	$[M+H]^+$	412,1368	412,1391	2,3	5,29	91,96
	$[M\text{-}OCH_3+H]^+$	380,1111	380,1129	1,8	4,14	84,62

Le composé 7h-AII.4 présente un spectre UV-visible avec deux bandes d'absorption dont les λ_{max} sont à 255, 285 et 345 nm (FigureIII-47).

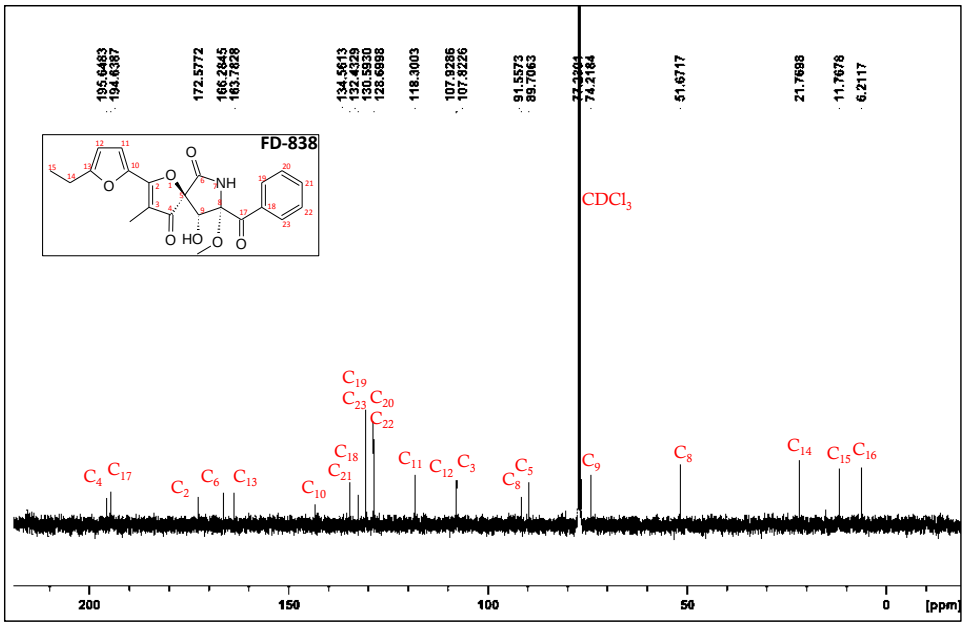


FigureIII-47 : Spectre UV-visible du composé 351-N2(λ_{max} 255, 285 et 345 nm)

✓ Analyses RMN

Les analyses RMN 1D (^{1}H et ^{13}C) et 2D (HSQC, HMBC, COSY) du composé 351-N2 ont été réalisées pour l'élucidation structurale.

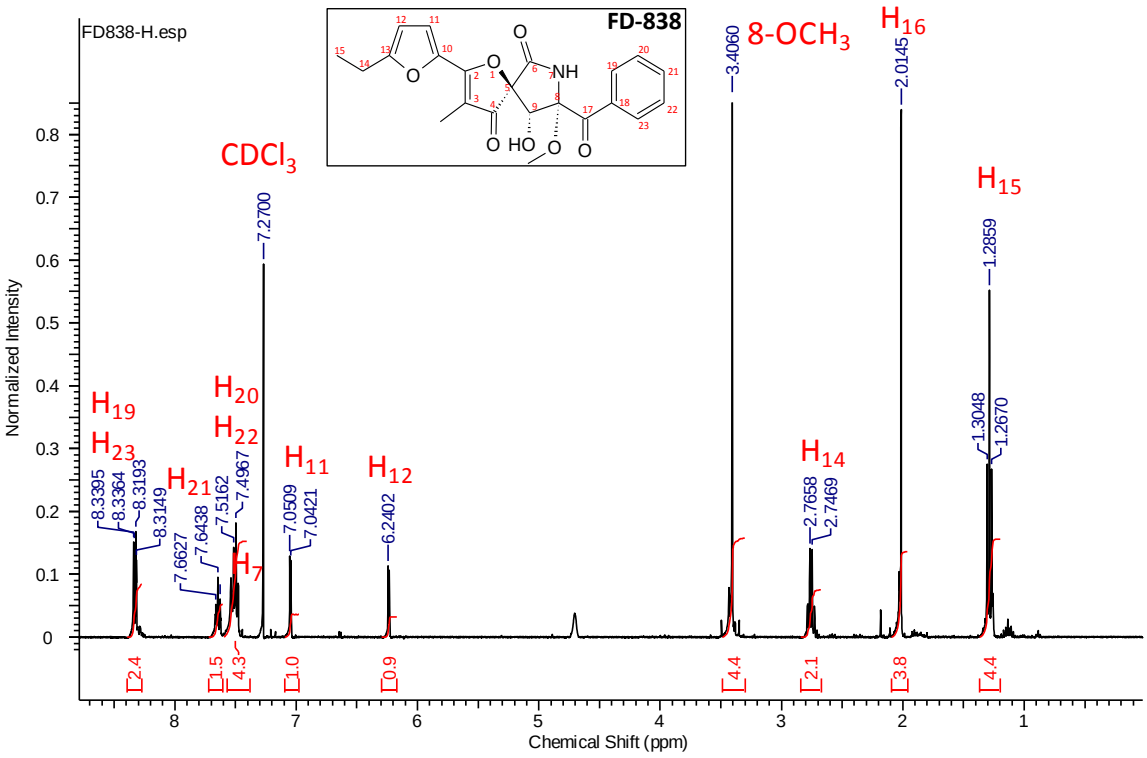
Les données RMN ^{13}C (FigureIII-48) révèle la présence d'au moins une vingtaine de carbone indiquant alors que la formule brute du composé 351-N2 pourrait plutôt être $C_{22}H_{21}NO_7$ d'après les prédictionsobtenues suite aux analyses de spectrométrie de masse haute résolution.



FigureIII-48: Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé 351-N2

Le spectre RMN ^{1}H (FigureIII-49) a révélé la présence :

- d'un méthyle de déplacement chimique δH = 2,01 ppm apparaissant sous la forme d'un singulet
- d'un méthyle de δH = 1,30 ppm présent sous la forme d'un triplet avec une constante de couplage de J = 8 Hz.
- d'un méthylène de δH = 2,77 sous la forme d'un quintuplet avec une constante de couplage de J = 8 Hz qui pourrait donc être proche du méthyle à 1.30 ppm.
- de trois protons sous la forme d'un singulet résonnant à δH = 3,42 ppm correspondant à un méthoxyle au vue du déblindage relativement important
- deux couples de proton résonnant à δH = 6,24 et 7,05 ppm sous forme de doublet présentent la même constante de couplage J = 4 Hz suggérant leur proximité
- cinq protons apparaissant sous la forme de deux triplet (un triplet à δH = 7,66 ppm correspondant à 1H et un triplet à δH = 7,51 ppm correspondant à 2H) et d'un doublet de deux protons à δH = 8,34 ppm, possèdent la même constante de couplage de J = 8 Hz qui pourrait correspondre au couplage de protons en position ortho sur un cycle aromatique
- un dernier proton apparait sous forme d'un singulet à δH = 7,46 ppm.

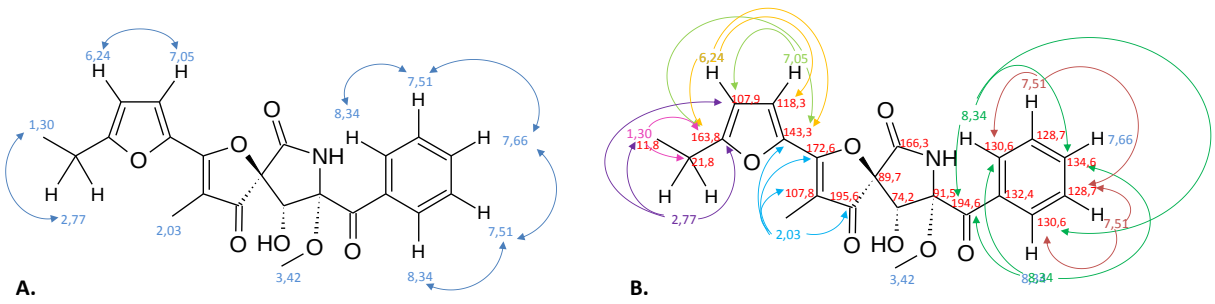


FigureIII-49 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé 351-N2

Les analyses RMN 2D et les données de la littérature ont ensuite permis de finaliser l'identification du composé 351-N2 comme correspondant alors à la molécule FD-838. Les attributions et les corrélations ^{1}H-^{1}H COSY et ^{1}H-^{13}C HMBC sont présentées dans le Tableau III-16 et laFigureIII-50. L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé font l'objet de l'Annexe IV.

Tableau III-16 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélations RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N2

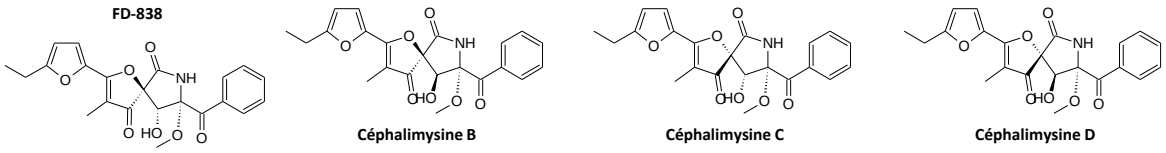
position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1				
2	172,6 (s)			
3	107,8 (s)			
4	195,6 (s)			
5	89,7 (s)			
6	166,3 (s)			
7		7,46 (s : 1)		
8	91,5 (s)			
9	74,2 (d)	4,71 (d : 1 : 12 Hz)		
10	143,3 (s)			
11	118,3 (d)	7,05 (d : 1 : 4 Hz)	6,24	107,9 ; 143,3 ; 163,8
12	107,9 (d)	6,24 (d : 1 : 4 Hz)	7,05	118,3 ; 143,3 ; 163,8
13	163,8 (s)			
14	21,8 (t)	2,77 (q : 2 : 8 Hz)	1,30	11,8 ; 107,9 ; 163,8
15	11,8 (q)	1,30 (t : 3 :8 Hz)	2,77	21,8 ; 163,8
16	6,2 (q)	2,03 (s : 3)		107,8 ; 143,3 ; 172,6 ; 195,6
17	194,6 (s)			
18	132,4 (s)			
19	130,6 (d)	8,34 (d : 1 : 8 Hz)	7,51	130,6 ; 134,6 ; 194,6
20	128,7 (d)	7,51 (t : 1 : 8 Hz)	8,34	128,7 ; 130,6
21	134,6 (d)	7,66 (t : 1 : 8 Hz)	7,51	130,6
22	128,7 (d)	7,51 (t : 1 : 8 Hz)	8,34	128,7 ; 130,6
23	130,6 (d)	8,34 (d : 1 : 8 Hz)	7,51	130,6 ; 134,6 ; 194,6
8-OCH3	51,7 (q)	3,42 (s : 3)		
9-OH		4,14 (d : 1 : 12 Hz)		



FigureIII-50 : Corrélations ^{1}H-^{1}H COSY (A) et ^{1}H-^{13}C HMBC (B) observées pour le composé 351-N2

✓ Conclusion sur l'identification du composé 351-N2

La molécule FD-838 ou azaspirofurane A possède un noyau azaspirobicyclique avec3 carbones asymétriques. De ce fait, de nombreux stéréoisomères de ce composé existent et ont notamment été décrit par Yamada *et al.* en 2010 (Yamada *et al.*, 2010). Ces diastéroisomères sont les céphalimysines B, C et D (FigureIII-51). Ces molécules ont été isolées d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée d'un poisson marin *Mugil cephalus* (mulet cabot).



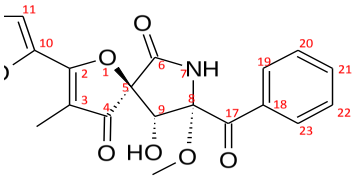
FigureIII-51 : Structure de la molécule FD-838et de ses diastéroisomères : les céphalimysines B-D.

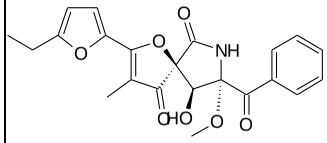
La stéréochimie du composé 351-N2a donc dû être examinée. La mesure du pouvoir rotatoire de ce composé a été effectuée afin de valider l'identification du FD-838. Un αD de -12,2° a été mesuré dans l'EtOH pour une concentration de 0,35 g/100 mL et a une température de 20°C. Cependant, déterminer la stéréochimie de cette molécule semble complexe du fait de la présence de ses 3 carbones asymétriques et de données divergentes recensées dans la littérature (Tableau III-17).

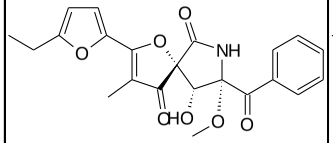
Néanmoins, des différences entre les données RMN ^{1}H du FD-838 et de chacune des céphalimysine sont notables comme le décrivent Yamada *et al.* (Yamada *et al.*, 2010). La comparaison des données RMN ^{1}H du composé 351-N2 avec les données de cette publicationa donc été réalisée et a mené à la validation de l'identification du FD-838. Ces résultats pourront être complétés par des analyses de dichroïsme circulaire.

Tableau III-17 : Pouvoir rotatoire des analogues de FD-838

Molécule	Conformation	αD	Concentration (en g/100mL)	Solvant	Température	Références
FD-838	5S, 8S, 9R	+40,5°	0,1	EtOH	22°C	(Yamada *et al.*, 2010)
		-41,9°	0,36	$CHCl_3$	26°C	(Ren *et al.*, 2010)
		-19,7°	0,295	$CHCl_3$	20°C	(Hayashi *et al.*, 2009)
Cephalimysine B	5S, 8S, 9S	+129,7°	0,09	EtOH	22°C	(Yamada *et al.*, 2010)
Cephalimysine C	5R, 8S, 9R	-209,2°	0,09	EtOH	22°C	(Yamada *et al.*, 2010)
Céphalimysine D	5R, 8S, 9S	-236,6°	0,11	EtOH	22°C	(Yamada *et al.*, 2010)



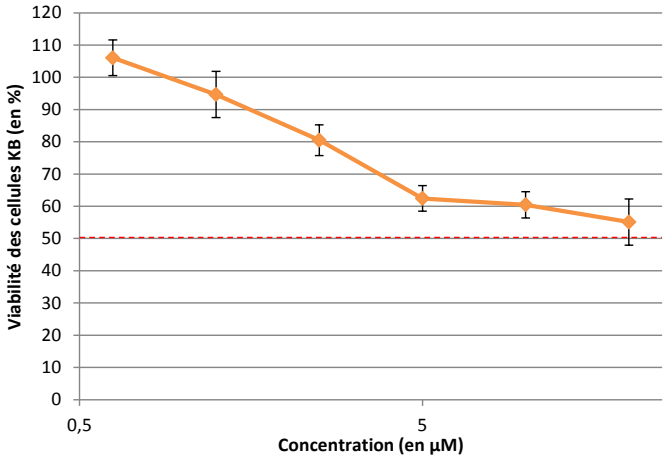




	FD-838		Céphalimysine B		Céphalimysine C	
δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
172,6		172.5		170.1		171.2
107,8		107.8		108.1		109.3
195,6		195.6		195.8		198.1
89,7		89.6		87.9		86.6
166,3		166.2		168.0		167.1
	7.44 (s : 1)		7.57 (s : 1)		7.42 (s : 1)	
91,5		91.5		94.9		92.4
74,2	**4.69 (d : 1: 12,7 Hz)**	74.2	4.87 (d : 1 : 3,9 Hz)	77.0	4.59 (d : 1 : 12,4 Hz)	73.4
143,3		143.3		143.1		143.4
118,3	7.04 (d : 1 : 3,4 Hz)	118.3	7.02 (d : 1 :3,4 Hz)	117.9	7.10 (d : 1 : 3,4 Hz)	117.7
107,9	6.23 (d : 1 : 3,4 Hz)	107.9	6.19 (d : 1 : 3,4 Hz)	107.7	6.26 (d : 1 : 3,4 Hz)	107.6
163,8		163.7		163.8		163.8
21,8	2.75 (q : 2 : 7.6 Hz)	21.8	2.74 (q : 2 : 7.6 Hz)	21.8	2.79 (q : 2 : 7.6 Hz)	21.8
11,8	1.28 (t : 3 : 7.6 Hz)	11.8	1.28 (t : 3: 7.6 Hz)	11.7	1.32 (t : 3 : 7.6 Hz)	11.7
6,2	2.01 (s : 3)	6.2	2.03 (s : 3)	6.2	2.02 (s : 3)	6.2
194,6		194.6		193.3		193.8
132,4		132.4		133.9		133.0
130,6	**8.32 (d : 1 : 8.5 Hz)**	130.6	8.26 (d : 1 : 8.7 Hz)	129.8	8.32 (d : 1 : 8.5 Hz)	130.6
128,7	7.49 (t : 1 : 7.6 Hz)	128.7	7.48 (t : 1 : 7.6 Hz)	128.6	7.48 (t : 1 : 7.7 Hz)	128.6
134,6	7.64 (t : 1 : 7.6 Hz)	134.5	7.61 (t : 1 : 7.6 Hz)	134.0	7.63 (t : 1 : 7.7 Hz)	134.5
128,7	7.49 (t : 1 : 7.6 Hz)	128.7	7.48 (t :1 : 7.6 Hz)	128.6	7.48 (t : 1 : 7.7 Hz)	128.6
130,6	**8.32 (d : 1 : 8.5 Hz)**	130.6	8.26 (d : 1 : 8.7 Hz)	129.7	8.32 (d : 1 : 8.5 Hz)	130.6
51,7	3.40 (s :3)	51.6	3.35 (s :3)	51.4	3.37 (s :3)	51.7
	4.13 d 12.7		2.98 (d : 1 : 3,9 Hz)		3.37 d 12.4	

2.3.1.3. Evaluation biologique du FD-838

Le composé FD-838 purifié a pu faire l'objet d'une évaluation préliminaire de son activité cytotoxique sur la lignée cellulaire KB. Les tests ont été réalisés en triplicata, à 6 concentrations : 0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM. La FigureIII-52 présente les résultats obtenus.



FigureIII-52 : Evaluation de l'activité cytotoxique du FD-838 sur la lignée cellulaire KB (échelle semi-logarithmique)

Le composé présente une activité antiproliférative ou cytotoxique dose dépendante pour des concentrations testées entre 0,625 et 20 µM. La diminution de la viabilité cellulaire s'élève à 55% à la concentration maximale testée, le composé présente donc une activité faible ne permettant pas de calculer une CI_{50} dans la gamme de concentrations testées.

2.3.1.4. Etude bibliographique : discussion

Le FD-838 a été isolée pour la première fois en 1985 par Mizoue *et al.* à partir d'un extrait *d'Aspergillus fumigatus* Fresenius (Mizoue *et al.*, 1987). Seules huit références concernant cette molécule sont indexées dans la base de données SciFinder. Après sa découverte en 1985 et la parution en 1987 du brevet de la société Taisho Pharmaceutical®, aucune donnée sur cette molécule n'apparait dans la littérature avant 2008 et la mise au point de sa synthèse.

- ✓ **Organismes producteurs**

Aucun autre organisme que le micromycète *Aspergillus fumigatus* n'a été rapporté comme producteur de FD-838. La présence de cette molécule dans le métabolome d'un *Penicillium* constitue donc une découverte intéressante.

- ✓ **Synthèse**

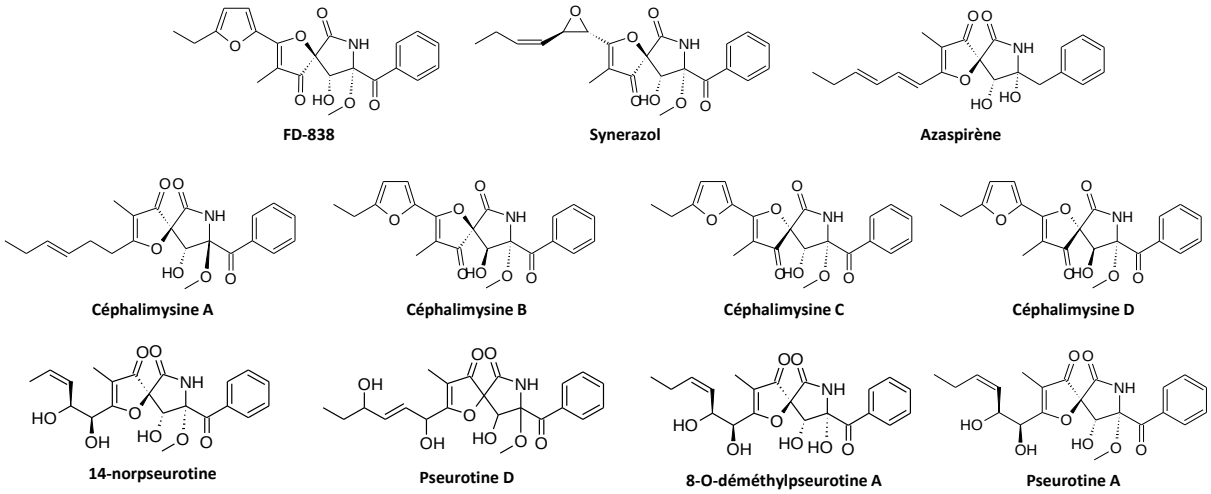
La synthèse du noyau azaspirobicyclique via des réactions asymétriques de Stetter a été publiée en 2008 par (Orellana et Rovis, 2008). Hayashi *et al.* publient en 2009 quant à eux la synthèse totale du FD-838 (Hayashi *et al.*, 2009).

✓ Analogues structuraux

La céphalimysine A a été décrite pour la première fois en 2007 comme produite par une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée d'un poisson marin *Mugil cephalus* (mulet cabot) (Yamada *et al.*, 2007). Yamada *et al.* en 2010 isolèrent ensuite du même organisme fongique trois diastéréoisomères du FD-838 les céphalimysines B, C et D.

En 2012, Martinez-Luiz *et al.* présentent l'isolement de quatre composés de cette série chimique produits par une souche d'*Aspergillus* endophyte : la pseurotine A, la 14-norpseurotine A, le FD-838 et la pseurotine D (Martinez-Luis *et al.*, 2012).

Bien que le genre *Aspergillus* semble être le producteur majeur de ces composés, il n'est pas le seul puisque le genre *Neosartorya* a été rapporté comme producteur de l'azaspirène (Asami *et al.*, 2002). La pseurotine A a été isolée pour la première fois d'un extrait d'une souche de *Pseudeurotium ovalis* Stolk en 1976 par Bloch *et al.* (Bloch *et al.*, 1976). Enfin, la pseurotine A a aussi été rapportée comme produite par *Aspergillus fumigatus* avec son dérivé 8-O-déméthylpseurotine A (Wenke *et al.*, 1993). Les structures de ces analogues sont présentées dans la FigureIII-53.



FigureIII-53: Structure des molécules à noyau spirofuranone lactame : la molécule FD-838, la pseurotine A, le synerazol, l'azaspirene et les céphalimysines A-D

✓ Biosynthèse du FD-838

La biosynthèse de ces composés au squelette rare reste peu élucidée, bien que deux études aient montré, par incorporation de précurseurs contenant des isotopes stables, que la pseurotine A est un métabolite à biosynthèse mixte PKS/NRPS assemblé à partir d'un méthylmalonate, de quatre malonates, d'une phénylalanine et de deux methionines (Mohr et Tamm, 1981). Le squelette carboné du synerazol étant identique à celui de la pseurotine A, il a été supposé que le synerazol soit vraisemblablement biosynthétisé à partir des mêmes précurseurs que la pseurotine (Maiya *et al.*, 2007). Dans une étude récente, la compréhension de la biosynthèse de la pseurotine A a été complétée par Wiemman *et al.*Figure III-54.

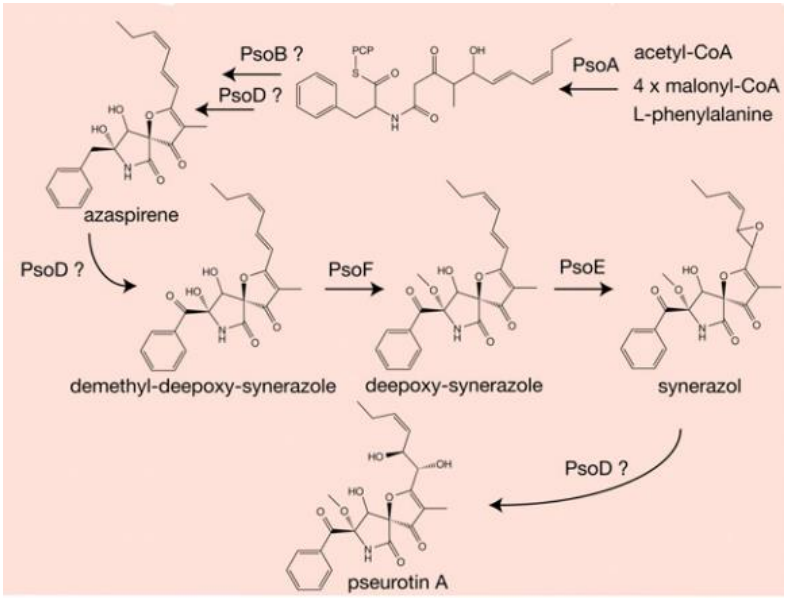


Figure III-54 : Hypothèse de biosynthèse de la pseurotine A (Wiemann *et al.*, 2013)
PKS/NRPS hybride catalysant la formation du squelette de la pseurotine A ; **PsoF, O-methyltransferase** impliquée dans la méthylation de l'hydroxyle en C8 de l'azaspirène ; **PsoE, GST** participant à l'oxydation de la chaîne dièniques. Les points d'interrogation indiquent les enzymes étant hypothétiques.

Concernant le FD-838, il n'existe aucune étude biosynthétique. Néanmoins, du point de vue de leur structure, on peut remarquer que le cycle furane substitué par un groupement éthyle du FD-838 comporte le même nombre de carbone que la chaîne alkyle latérale du synérazol et de la pseurotine A. De plus, ces trois molécules présentent la même stéréochimie. Si l'on se réfère à ce qui est décrit dans la littérature, la formation du noyau furane est faite classiquement par une cytochrome P450 oxydase via une cyclisation oxydative post-PKS d'un β-cétoisoprène (Dewick, 2011). La Figure III-55 propose ainsi une hypothèse de biosynthèse du FD-838.

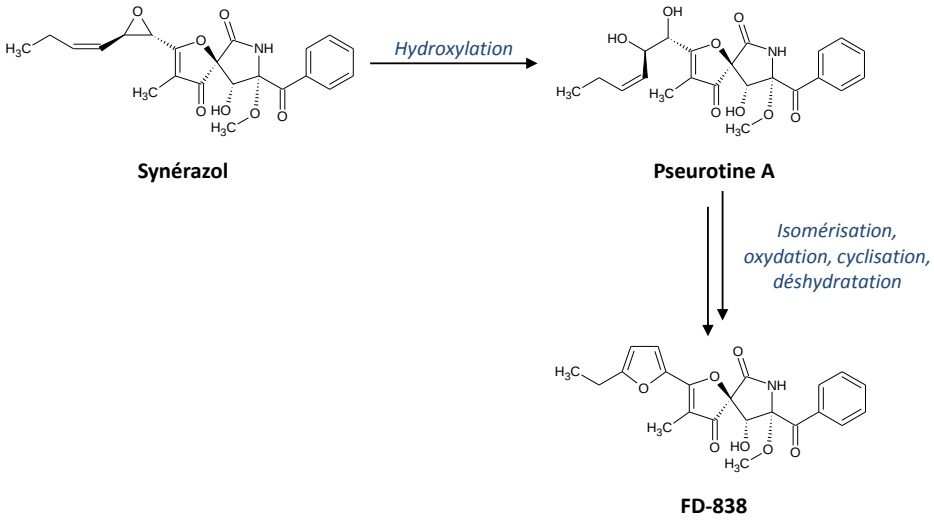


Figure III-55 : Hypothèse de biosynthèse du FD-838

- ✓ **Activités biologiques**

Le FD-838 a fait notamment l'objet d'un brevet de la société Taisho Pharmaceutical publié en 1987 et intitulé : « Physiologically active substance FD-838 and process for preparing the same ». (Mizoue *et al.*, 1987). Cette molécule aurait une activité inhibitrice *in vitro* de la différenciation des cellules leucémiques. Parmi les diastéréoisomères du FD-838, la céphalimysine A présente une activité cytotoxique contre des lignées cellulaires de lymphome murin P388 et de promyéloblaste humain HL-60 avec des CI_{50} de 15 nM sur cellules P388 et 9,5 nM sur cellules HL-60 (Yamada *et al.*, 2007). La céphalimysine B ne présente pas d'activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses testées : P388, HL-60, L1210 et KB. Une seconde étude réalisée par Yamada *et al.* en 2010 révèle que les céphalimysines A, C et D présentent toute la même activité modérée sur les cellules P388 et HL-60 (CI_{50} autour de 55µM) (Yamada *et al.*, 2010). Asami *et al.* révèlent aussi une activité anti-angiogénique de l'azaspirène (Asami *et al.*, 2002) ; (Asami *et al.*, 2008). Martinez-Luiz *et al.* rapportent des activités anticancéreuses modérées et d'importantes activités antileishmaniennes de la pseurotine A, de la 14-norpseurotine A, du FD-838, de la pseurotin D, et de la fumoquinone B (Martinez-Luis *et al.*, 2012).

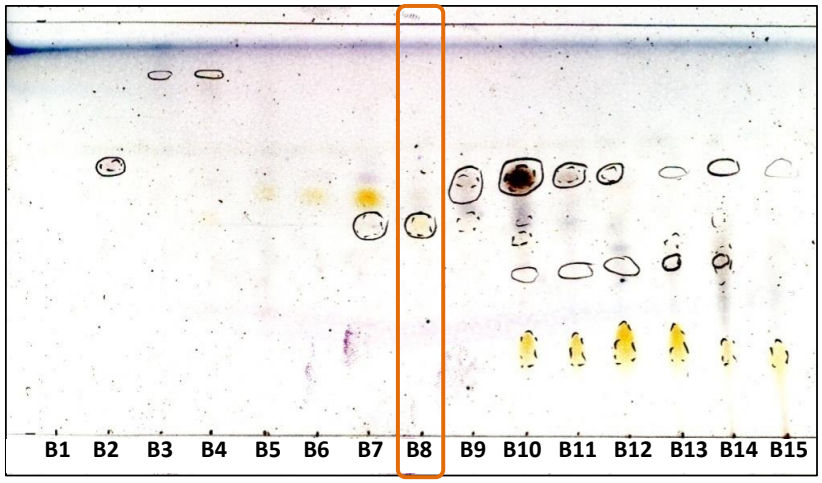
D'autres activités biologiques ont été décrites ; le FD-838 serait aussi antifongique et inhiberait la croissance de certaines bactéries Gram+. Des modifications mineures des substituants du noyau spirofuranone lactame entraîneraient de grandes modifications des activités biologiques. Par exemple, l'azaspirène possède des propriétés anti-angiogéniques et le synerazol plutôt une activité antifongique et antibactérienne (Ando *et al.*, 1991).

2.3.2. Isolement et identification du composé 351-N3

2.3.2.1. Purification du composé 351-N3

- ✓ **1ère étape de fractionnement B : Chromatographie flash**

Une partie de la fraction 7h (50mg) a en parallèle fait l'objet d'un fractionnement par chromatographie flash en phase normale (colonne Interchim Si-OH 4 g 50 µm). L'échantillon a d'abord été adsorbé sur de la silice puis conditionné dans une cartouche d'injection. Le système d'élution était composé d'un gradient binaire allant de 100% d'hexane à 100% d'AcOEt en 80 min à 7 mL/min. Quinze fractions ont été obtenues. Leur profil CCM est présenté dans la FigureIII-56. La fraction 7h-B8 contenant un produit majoritaire (351-N3 ; 1,1 mg), nous avons cherché à l'identifier.

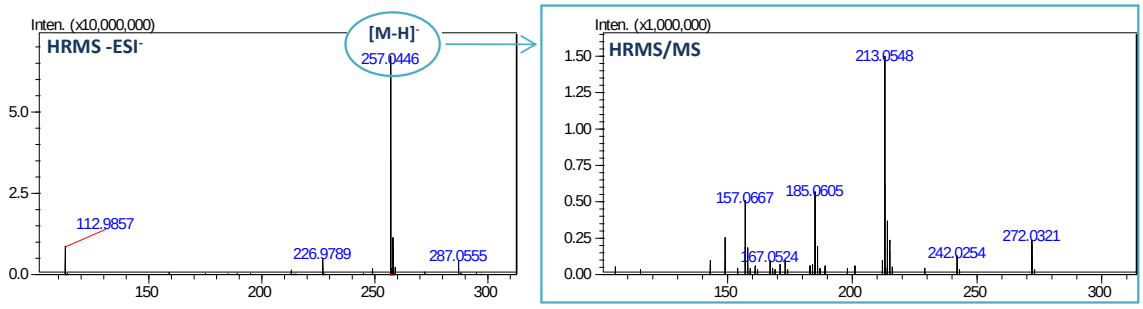


FigureIII-56: CCM bilan du fractionnement B de la fraction 7h (silice, éluant : CH_2Cl_2/MeOH 90 :10 (v/v) puis hexane/acétate d'éthyle 60 :40 (v/v), révélation : vanilline sulfurique, trait plein observation à 365 nm et pointillés à 254 nm)

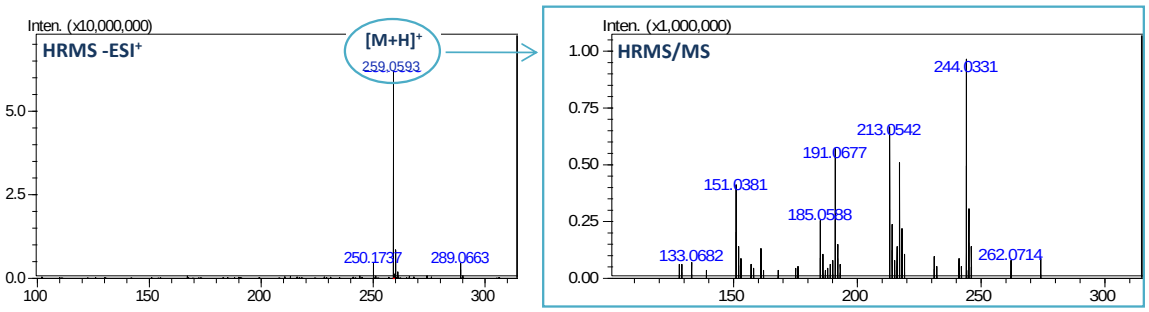
2.3.2.2. Elucidation structurale du composé 351-N3

✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS**

Le composé 351-N3 a été analysé par couplage HPLC-UV/DAD-HRMS/MS(selon la méthode analytique B, Annexe II).La spectrométrie de masse haute résolution ESI-$SM^{+/-}$ a révélé la présence d'un ion majoritaire en mode négatif sous la forme $[M-H]^-$ de *m/z*257,0446 et en mode positif sous la forme $[M+H]^+$ de *m/z* 259,0593 (FigureIII-57 et FigureIII-58).



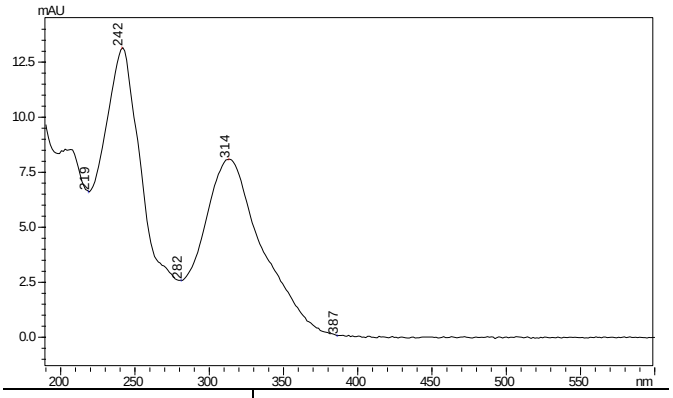
FigureIII-57: Spectre de masse du composé 7h-B8 en ionisation négative et spectre MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 257,0446



FigureIII-58: Spectre de masse du composé 7h-B8 en ionisation positive et spectre MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 259,0563

Grâce au logiciel Formula predictor qui prend en compte le *m/z*de l'ion, le profil isotopique et les fragments MS/MS du composé, on peut émettre l'hypothèse d'une molécule ayant la formule brute suivante : $C_{14}H_{10}O_5$([M+H]$^+$ $m/z_{théo}$ 259,0601, Δppm 3,10 et [M-H]$^-$ $m/z_{théo}$ 257,0, Δppm 0,59). Après interrogation des bases de données (Nielsen 474 composés (Nielsen *et al.*, 2011), Antibase 2011(Laatsch, 2011)) 2 hits majoritaires ont pu être identifiés. Le produit 351-N3 pourrait correspondre à l'alternariol (une dibenzo-α-pyrone) ou à la norlichéxanthone (1,3,6-trihydroxy-8-méthylxanthone), toutes les deux de formule brute $C_{14}H_{10}O_5$.

Ces molécules absorbent toutes les deux dans les UV mais possèdent des chromophores différents. La comparaison des λ_{max} avec celles des 2 molécules possibles va dans le sens de l'hypothèse norlichéxanthone (Nielsen *et al.*, 2011) (FigureIII-59).



Molécule	Spectre UV, λ_{max} en nm
Alternariol	204(50) 256(100) 288(20) 300(20) 340(23)
Norlichéxanthone	204(65) 242(100) 267sh 312(60) 346sh
Molécule 351-N3	204(60) 242(100) 267sh 314(60) 350sh

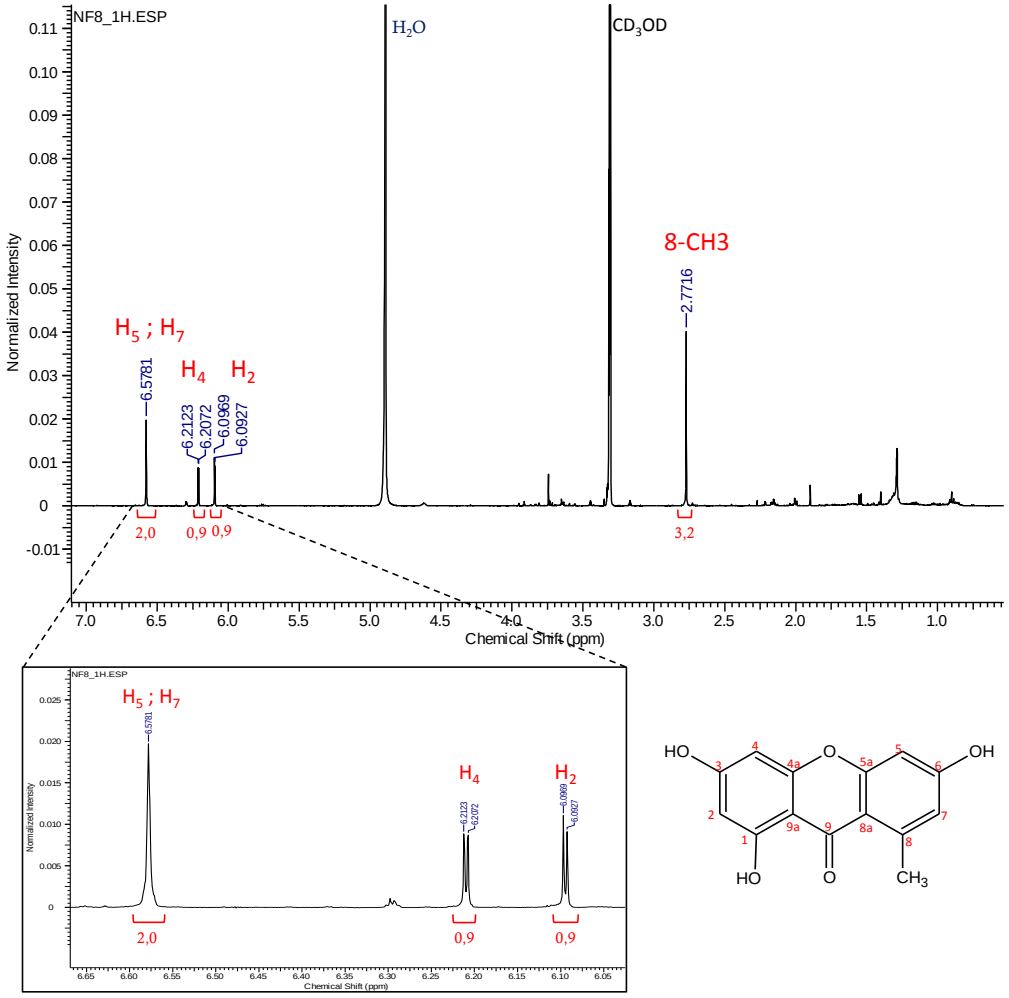
FigureIII-59 : Spectre UV-visible du composé 351-N3et comparaison des λ_{max} avec ceux de l'alternariol et de la norlichéxnthone décrits par Nielsen *et al.*(Nielsen *et al.*, 2011)

✓ Analyses RMN

Les analyses en RMN 1D et 2D ont pu être réalisées afin de valider l'identification du composé 351-N3. Le spectre RMN-^{1}H (FigureIII-60) révèle la présence :

- d'un méthyle (δH = 2,77 ppm),
- d'un couple de protons avec une constante de couplage de 2,4 Hz correspondant à un couplage de deux protons positionnés en méta sur un cycle aromatique (δH = 6,09 ppm et δH = 6,21 ppm)
- de deux protons équivalents (δH = 6,58 ppm).

Ces données recueillies pour le composé 351-N3 concordent avec l'identification de la norlichéxanthone. L'équivalence des déplacements chimiques des protons H5 et H7 est fortuite étant donné l'environnement différent de ces deux protons mais ceci avait également été observé par Mutanyatta (Mutanyatta *et al.*, 2003).

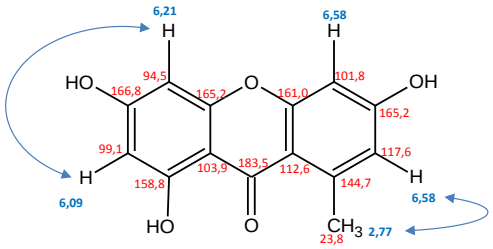


FigureIII-60: Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du composé 351-N3

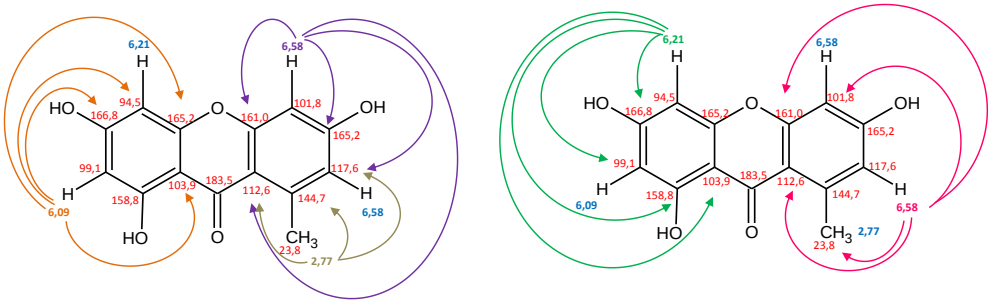
L'analyse des données de RMN-^{13}C ainsi que les données de RMN-2D viennent conforter l'identification du composé 351-N3 qui correspond donc bienà la norlichéxanthone (Tableau III-19, FigureIII-61 et FigureIII-62).L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé sont présentés dans l'Annexe V.

Tableau III-19 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélation RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N3

position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	158,8			
2	99,1	6,09 (1H, d, 2,1Hz)	6,21	94,5; 103,9; 165,2; 166,8
3	166,8			
4	94,5	6,21 (1H, d, 2,6Hz)	6,09	99,1; 103,9; 158,8; 166,8
4a	165,2			
5	101,8	6,58 (1H, s)		23,8; 101,8; 112,6; 117,6; 161,0; 165,2
5a	161,0			
6	165,2			
7	117,6	6,58 (1H, s)	2,77	23,8; 101,8; 112,6; 117,6; 161,0; 165,2
8	144,7			
8a	112,6			
9	183,5			
9a	103,9			
8-CH3	23,8	2,77 (3H , s)	6,58	112,6; 117,6; 144,7



FigureIII-61 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N3



FigureIII-62 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N3

2.3.2.3. Evaluation biologique de la norlichéxanthone

L'activité cytotoxique du composé 351-N3 a pu être évaluée sur la lignée cellulaire KB pour des concentrations de norlichéxanthone comprise entre 0,625 µM et 20 µM. Ce composé ne présente pas de cytotoxicité notable sur les cellules KB aux concentrations testées.

2.3.2.4. Etude bibliographique : discussion

La norlichéxanthone autrement dénommée 1,6,8-Trihydroxy-3-méthylxanthone ou encore fusarindine a été isolé en 1968 d'un lichen (*Leucanora reuteri*) (Santesson, 1968). Avant son isolement, ce composé était connu comme un intermédiaire dans la synthèse de la lichexanthone (Asahina et Nogami, 1942).

- ✓ **Organismes producteurs**

La norlichéxanthone est une molécule particulièrement retrouvée chez les lichens (*Laurera benguelensis*(Manojlovic *et al.*, 2010),au sein de plusieurs espèces de *Lecanora*(Huneck *et al.*, 1996). Parmi les champignons, cette molécule est produite par divers genres de micromycètes :
- pour le genre *Penicillium* chez une espèce marine de *Penicillium sacculum*(Liu *et al.*, 2012) et chez *Penicillium patulum*(Broadbent *et al.*, 1975).
- pour le genre *Fusarium*chez *Fusarium sp.* (ZZF60) champignon endophyte prélevé dans la mangrove de la mer du sud de la Chine (Huang *et al.*, 2012)
- pour le genre *Phomopsis*chez un *Phomopsis* marin (*Phomopsis sp.*) (Yang *et al.*, 2013),
- pour le genre *Nigrospora*chez une espèce endophyte de la plante *Pongamia pinnata* retouvée dans une mangrove : *Nigrospora sp.* MA75, (Shang *et al.*, 2012a)
- pour le genre *Arthriniu*mchez *Arthrinium sp.*isolé d'une éponge de la mer Méditerranée, *Geodia cydonium*(Ebada *et al.*, 2011).

Cette xanthone est aussi produite par quelques plantes supérieures appartenant à la famille des *Guttiferae* et des *Gentianaceae*.

- ✓ **Biosynthèse de la norlichéxanthone**

La biosynthèse de la norlichéxanthone résulte de la cyclisation d'un heptacétide pour laquelle entre en jeu un domaine NR-PKS typique (Non-Reducing Polyketide Synthase : complexe enzymatique polycétide synthase GsfA) (Figure III-63). Le précurseur de la norlichéxanthone peut aussi être engagé dans la biosynthèse de la déhydrogriséofulvine et de la griséofulvine, composés aussi présents au sein du métabolome de *P. ligerum*comme nous le verrons ultérieurement (p188).

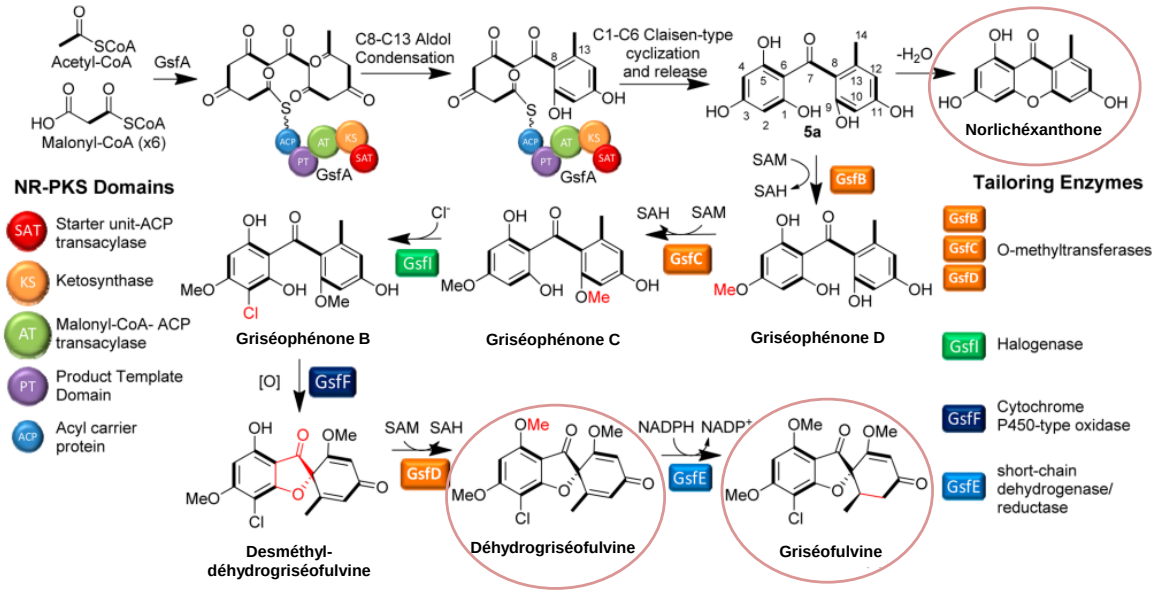


Figure III-63 : Biosynthèse hypothétique de la norlichéxanthone et de la griséofulvine (Cacho *et al.*, 2013)
les molécules entourées en rose sont celles observées dans le métabolome de *P. ligerum*

✓ Synthèse

La synthèse de la norlichéxanthone a été décrite par Sandifer *et al.* en 1981 (Sandifer *et al.*, 1981) et Sundholm en 1978 (Sundholm, 1978).

✓ Activités biologiques

En 2011,Ebada *et al.* ont évalué l'activité antiproliférative de la norlichéxanthone et de son dérivé déoxy-, l'anomaline A surquatre lignées cellulaires tumorales (L5178Y (cellules murines de lymphome), K652 (cellules humaines de leucémie myéloïde chronique), A2780 (cellules humaines de cancer de l'ovaire) et A2780CisR (cellules humaines de cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine)(Ebada *et al.*, 2011). Les deux molécules présentent des activités antiprolifératives sur la lignée L5178Y avec des CI_{50} de 2,74 µM pour la norlichéxanthone et 0,40 µM pour l'anomaline A. Les auteurs ont ensuite testé l'activité inhibitrice de protéines kinases de ces composés et ont montré que l'inhibition de protéines kinases semble être le mécanisme majeur contribuant à l'activité antiproliférative de ces composés.

Fotie *et al.* ont quant à eux attribué à la norlichéxanthoneune activité contre le paludisme lors de tests *in vivo* avec une dose de 20 mg/kg,réduisant de 44,3% le pourcentage d'érythrocytes infectés.Dans cette série chimique, la molécule 1,3,6,8-tétrahydroxyxanthone est présentée comme la meilleure candidate pour le traitement du paludisme avec 70,5% de diminution d'érythrocytes infectés (Fotie *et al.*, 2003).

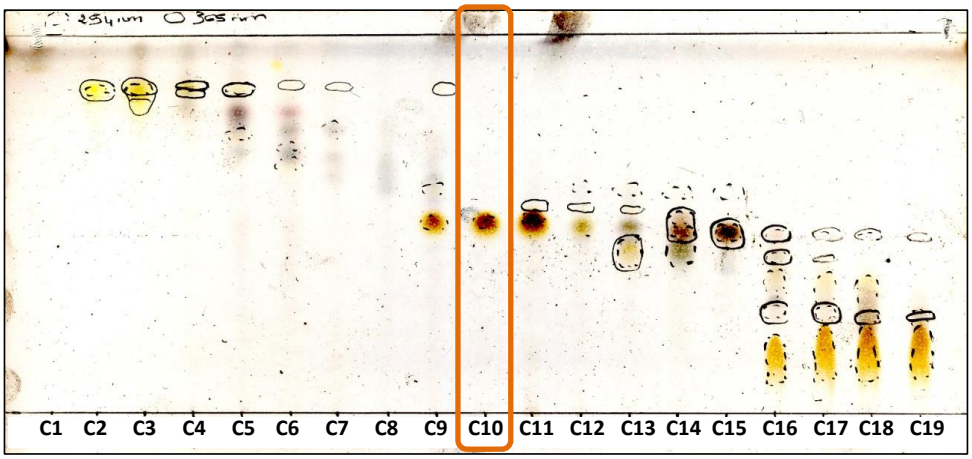
La norlichéxanthone possède aussi une légère activité antimicrobienne contre *Staphylococcus. aureus*(CI_{50} = 20,9 µM) mais est inactive contre *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

2.3.3. Isolement et identification du composé 351-N4

2.3.3.1. Purification du composé 351-N4

✓ **1ère étape de fractionnement C : Chromatographie flash**

Le même fractionnement par chromatographie flash que l'étape B a été renouvelé mais cette fois-ci avec les 250 mg restant de la fraction 7h sur une colonne de silice de 25 g avec un débit de 20 mL/min (fractionnement C). La composition des fractions a été évaluée par CCM phase normale (FigureIII-64). La fraction C10 (1,9 mg) contenait un produit très majoritaire que nous avons nommé 351-N4. Nous avons procédé à son identification.

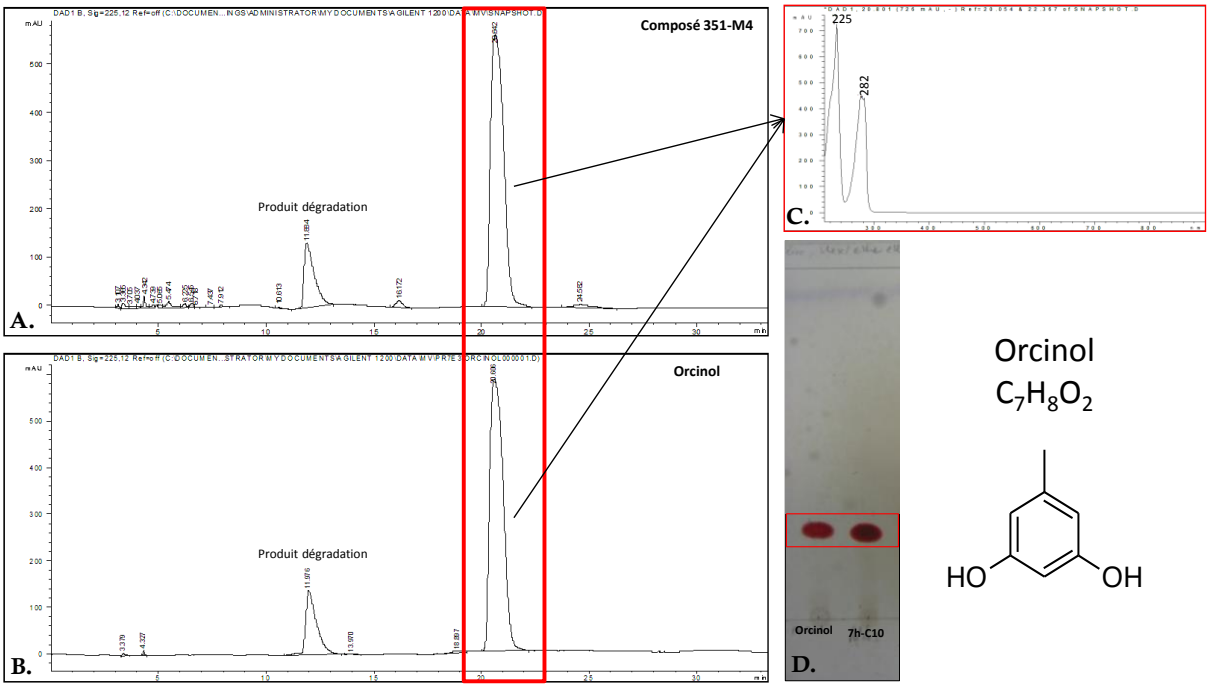


FigureIII-64 : CCM bilan du fractionnement C de la fraction 7h
(silice, éluant : CH_2Cl_2/MeOH 90 :10 (v/v) puis hexane/acétate d'éthyle 60 :40 (v/v), révélation : vanilline sulfurique trait plein observation à 365 nm et pointillés à 254 nm)

2.3.3.2. Elucidation structurale du composé 351-N4

✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD**

Le composé 7h-C10 a facilement pu être identifiégrâce à son pectre UV et par comparaison à un standard sur CCM puis en HPLC-UV/DAD (FigureIII-65). Il s'agit de l'orcinol.



FigureIII-65 : Chromatogrammes LC-UV/DAD
A. du produit 351-N4, B. de l'orcinol, C. Spectre UV visible de l'orcinol
(silice, élution en isochratique hexane/éther diéthylique/acide formique 62:37:1 (v/v/v), débit 1 mL/min)
A. CCM comparative des deux produits (D)
(silice, éluant : hexane/éther diéthylique/acide formique 61:36:3 (v/v/v), révélation : vanilline sulfurique)

2.3.3.3. Etude bibliographique : discussion

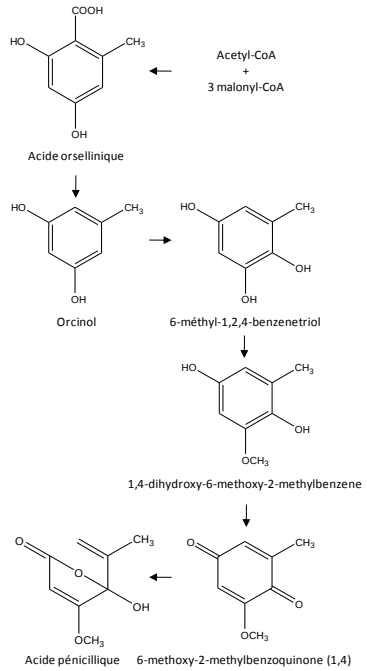


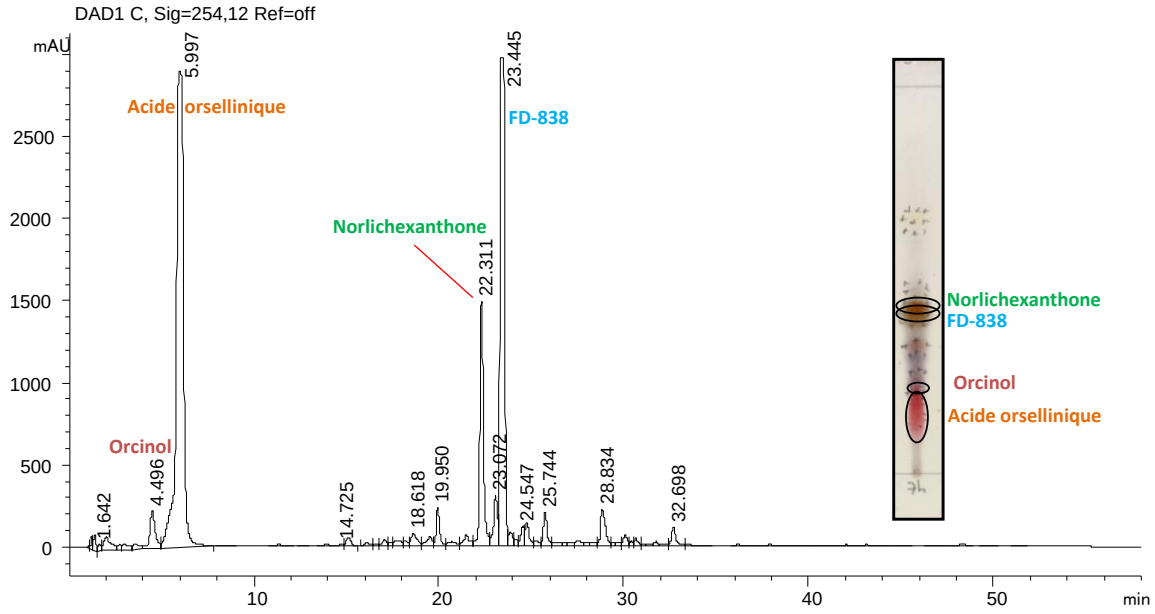
Figure III-66 : Voie biosynthétique de l'acide pénicillique (Sekiguchi *et al.*, 1987)

La présence de cette molécule n'est pas étonnante. En effet, la déréplication de l'extrait MMS351YES réalisée lors de la thèse de Marieke Vansteelandt, avait mené à l'identification de deux polycétides : l'acide penicillique et l'acide orsellinique. La présence concomitante de ces deux molécules s'explique par leur voie de biosynthèse, puisque la biosynthèse de l'acide pénicillique se fait par l'intermédiaire de l'acide orsellinique (Figure III-66). L'orcinol est quant à lui le premier métabolite de l'acide orsellinique dans cette voie biosynthétique. L'acide orsellinique formé par condensation des unités acétyl-CoA et malonyl-CoA subit une décarboxylation pour former l'orcinol.

Cette molécule étant très connue, nous n'avons pas continué plus en détails son étude.

2.3.4. Purification de molécules de la fraction 7h : Conclusion

L'isolement des composés majoritaires de la fraction 7h a pu être réalisée en parallèle avec trois protocoles de purification par chromatographie flash.L'étude chimique de cette fraction a montré la présence de 4 composés majoritaires (FigureIII-67) dont trois ont pu être isolés (l'orcinol, le FD-838 et la norlichéxanthone).



FigureIII-67 : Chromatogramme UV à 254 nm et CCM de la fraction 7h
silice, éluant : CH_2Cl_2/MeOH 90 :10 (v/v) puis hexane/acétate d'éthyle 60 :40 (v/v), révélation : vanilline sulfurique

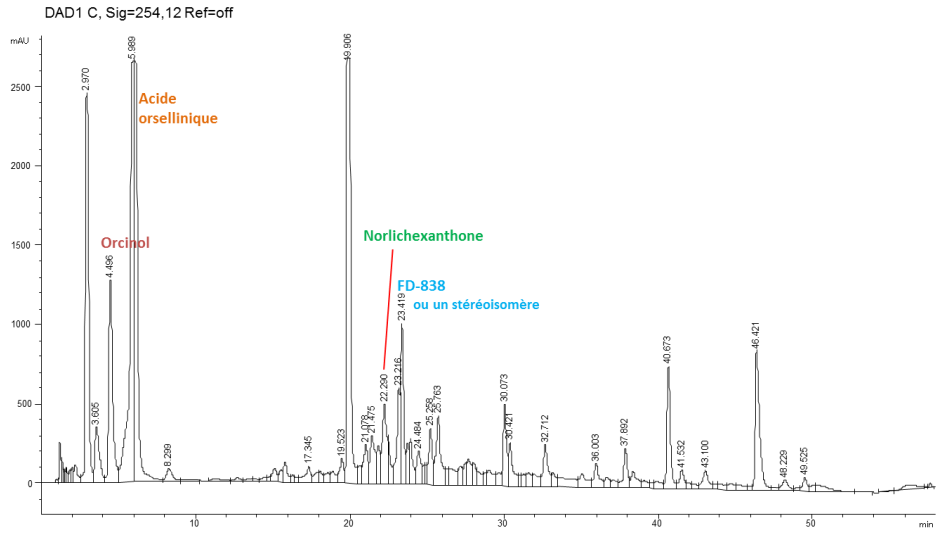
Seul l'acide orsellinique présent en grande quantité dans la fraction n'a pas été purifié mais il avait pu être identifié avec certitude par déréplication de la fraction et comparaison à la base de données interne contenant le spectre UV-visible et le temps de rétention standard des composés isolés au sein du laboratoire. Par ailleurs, il n'est pas étonnant de retrouver ce composé ainsi que l'orcinol puisque ces métabolites de la classe des polycétides sont très fréquemment retrouvés dans les extraits de micromycètes, du fait de leur position de précurseurs dans la biosynthèse de nombreux métabolites aromatiques (phénoliques, phénones, …). Ils sont notamment impliqués dans la biosynthèse de l'acide pénicillique, molécule produite en très grande quantité par la souche MMS351 (production estimée à environ 10% de la masse de l'extrait brut).

Parmi les molécules à noyau azaspirofurane, le FD-838 est celui qui semble avoir été purifié mais la présence de diastéréoisomères de cette molécule telles que les céphalimysines ont aussi pu être détectées par les analyses LC-UV/DAD-HRMS-MS.

Le FD-838 devra faire l'objet d'une évaluation d'activité antiproliférative sur cellules d'ostéosarcomes afin de savoir si l'activité de la fraction mère 7h sur les cellules POS-1 peut lui être imputée. Dans le cas contraire, la purification des composés minoritaires de cette fraction pourrait être envisagée.

2.4. Purification de molécules de la fraction 8a

La fraction 8a qui suit la fraction 7h préalablement étudiée, possède de nombreux points communs avec celle-ci comme le montre la CCM (FigureIII-32, p141). En particulier, le grand spot rouge qui correspond à l'acide orsellinique et à l'orcinol. Lors de l'analyse en HPLC-UV/DADréalisée dans les mêmes conditions que pour la fraction 7h (FigureIII-67), on a pu détecter en plus de l'orcinol et de l'acide orsellinique, la norlichéxanthone et le FD-838 ou l'un de ses stéréoisomères. La molécule correspondant au pic important de t_R de 19,9 min, a été purifiée.



FigureIII-68 : Chromatogramme UV à 254 nm de la fraction 8a

2.4.1. <u>Purification du composé 351-N5</u>

2.4.1.1. <u>1ère étape de fractionnement : Chromatographie flash</u>

La première étape de fractionnement de la fraction 8a a été effectuée par chromatographie flash en phase normale (colonne Interchim de 4g silice standard 50 µm). La fraction (144 mg)a été adsorbéau préalable sur silice afin d'effectuer un dépôt sec. Le système d'élution consistait en un gradient hexane/acétone 100:0 à 0:100 (v/v) appliqué à un débit de 7 ml par minute. Quatorze fractions ont ensuite été constituées en fonction des profils CCM obtenus.

La fraction 8a-11 a été sélectionnée pour la suite de l'étude puisque sa masse était la plus importante des 14 fractions (50,7 mg, soit 35% de la masse de la fraction 8a d'origine), mais aussi parce que son analyse HPLC-UV/DAD-HRMS/MS a révélé une composition moléculaire relativement simple excluant les composés préalablement isolés (Figure III-69).

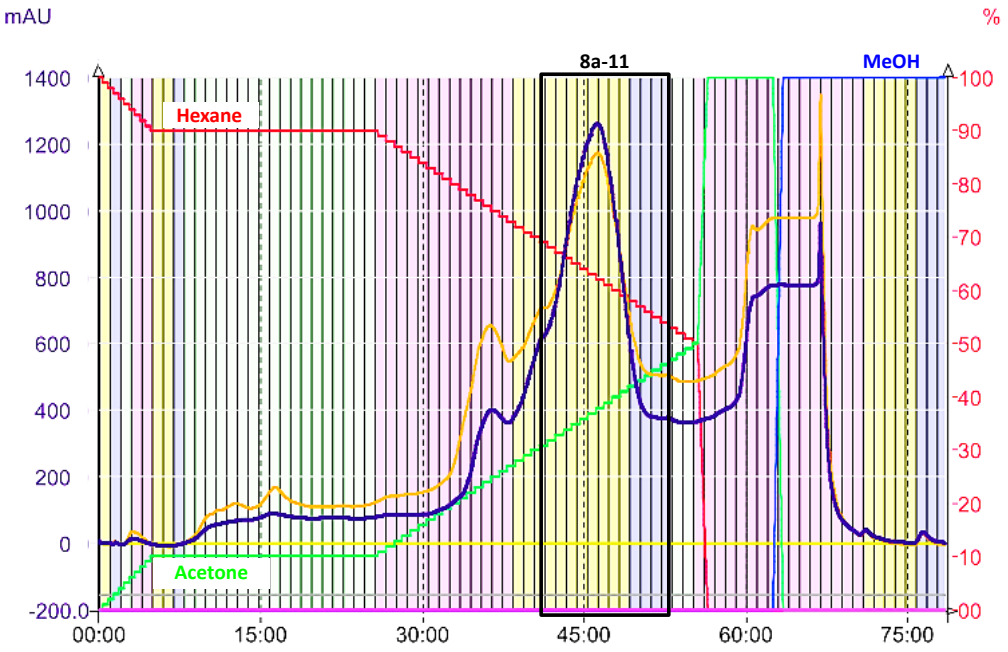


Figure III-69 : Chromatographie flash de la fraction 8a : Chromatogramme UV (200-400 nm) et gradient binaire de la phase éluante (Hexane/Acétone)

2.4.1.2. 2ème étape de fractionnement : CLV

Une deuxième étape de fractionnement a donc été réalisée à partir de la fraction 8a-11 par chromatographie liquide sous vide sur une colonne de silice greffée C18 (50-60 µm, SDS, Chromagel). La fraction 8a-11 (15,9 mg) a été adsorbée sur 50 mg de C18 pour le dépôt sec. L'élution a été réalisée grâce à l'application de mélanges de solvant de polarité croissante H_2O/Acétonitrile (v/v) de 100:0 (v/v) à 0:100 (v/v). Les 7 fractions obtenuesont été analysées par couplage HPLC-HR-MS/MS-UV/DAD, en mode positif. Il est apparu que les fractions 8a-11-a3 et 8a-11-a5 avaient la même composition, avec la présence d'un seul composé nommé 351-N5.

2.4.2. Analyse structurale du composé 351-N5

2.4.2.1. Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS

Le composé isolé a été analysé par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS (selon la méthode analytique B, Annexe II).Au t_R de 8,6 min, un pic unique est observé pour un ion pseudo-moléculaire de *m/z*259.0592 correspondant à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule dont la formule brute la plus probable prédite par le logiciel Formula Predictor® était $C_{14}H_{10}O_5$($[M+H]^+$ $m/z_{théo}$ 259,0601, Δppm 3,49)(Figure III-71). Cette masse exacte et cette formule brute associée sont similaires à celles observées pour le composé 351-N3 identifié comme la norlichéxanthone.

Lors de l'élucidation structurale du composé 351-N3, deux hypothèses d'identification avaient été formulées : l'isolement de la norlichéxanthone ou de l'alternariol, ces composés ayant la même formule brute. Il est important de noter que le t_R de 351-N5 est différent du t_R de la norlichéxanthone.

Les molécules possèdent des chromophores différents et il est donc aisé de les distinguer avec des

analyses LC-UV/DAD. Ainsi, le composé 351-N4 présente un spectre UV visible similaire à celui de l'alternariol, avec cinq bandes d'absorption caractéristique à 202, 254, 288, 299 et 338 nm (Figure III-70).

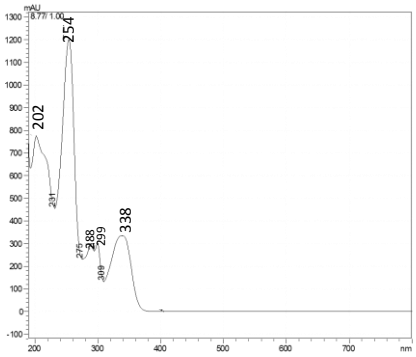


Figure III-70 : Spectre UV-visible du composé 351-N5

De plus, l'analyse des fragmentations obtenues par MS/MS permet d'étayer cette hypothèse d'identification avec l'observation d'un fragment de *m/z* 213,0525, $[M\text{-}HCOOH+H]^+$ qui pourrait être généré par l'ouverture du cycle lactonique et la perte du groupement carboxyle. Néanmoins, ce fragment étant peu caractéristique, l'identification du composé 351-N5 devait être confirmée par des analyses RMN 1D et 2D.

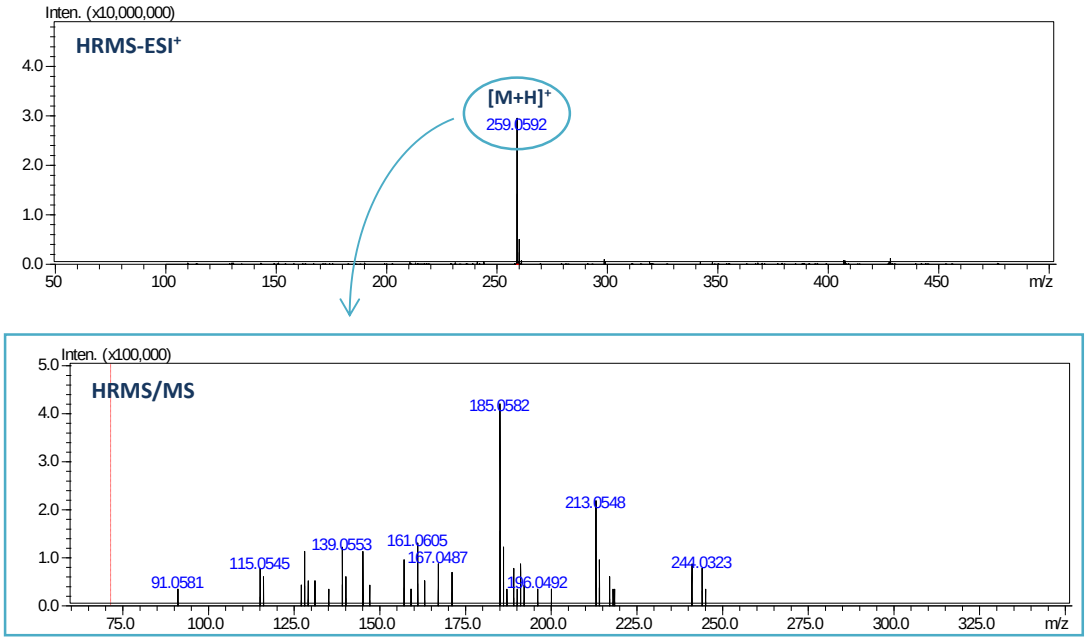
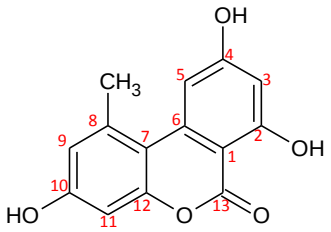


Figure III-71 : Spectre de masse du composé 351-N5 en ionisation positive (A) et spectre MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 259,0572 (B)

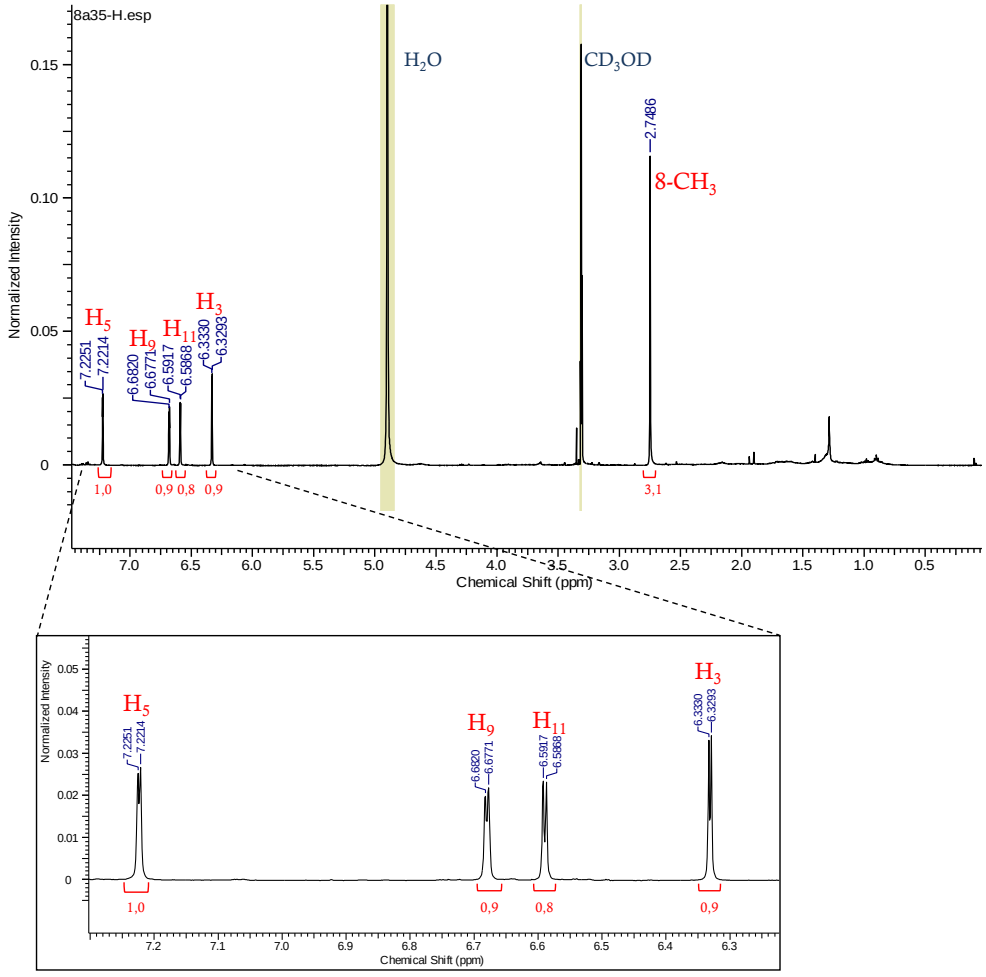
2.4.2.2. Analyse RMN

Les analyses RMN 1D et 2D du composé 351-N5 dans le méthanol deutéré ont pu être effectuées. L'analyse des données RMN-^{1}H révèle la présence d'un méthyle (δH = 2,75 ppm) et de quatre doublets avec une constante de couplage de 2,5 Hz correspondant à des couplages en méta de deux protons présents sur un cycle aromatique (FigureIII-73).

Les analyses en RMN 1D et 2D ont permis de valider l'identification du composé 351-N5qui correspond à de l'alternariol (FigureIII-72, Tableau III-20, FigureIII-74 et FigureIII-75). L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé sont présentés dans l'Annexe VI.



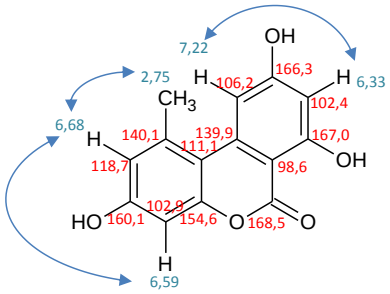
FigureIII-72 : Composé 351-N5 : alternariol



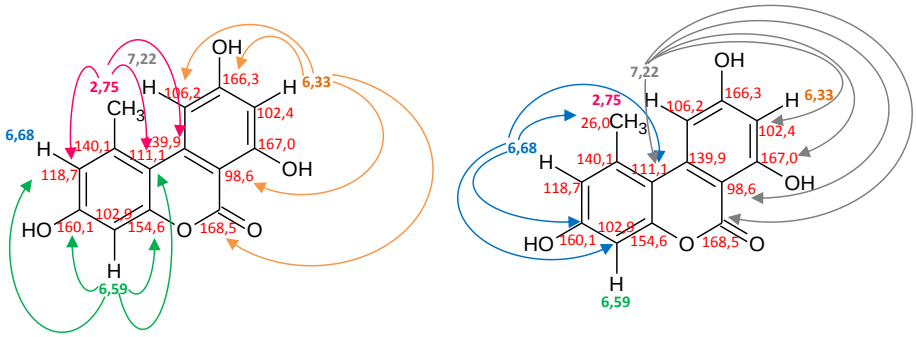
FigureIII-73 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du composé 351-N5

Tableau III-20 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélation RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N5

position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	98,6			
2	167,0			
3	102,4	6,33 (1H, d ,1,9 Hz)	7,22	98,6; 106,2 ; 166,3 ; 168,5
4	166,3			
5	106,2	7,22 (1H, d, 1,9 Hz)	6,33	98,6 ; 102,4 ; 111,1 ; 167,0 ; 168,5
6	139,9			
7	111,1			
8	140,1			
9	118,7	6,68 (1H, d, 2,5Hz)	2,75 ; 6,59	26,0 ; 102,9 ; 111,1 ; 160,1
10	160,1			
11	102,9	6,59 (1H, d, 2,5Hz)	6,68	111,1 ; 118,7 ; 154,6 ; 160,1
12	154,6			
13	168,5			
8-CH3	26,0	2,75 (3H, s)	6,68	106,2 ; 111,1 ; 118,7 ; 139,9



FigureIII-74 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N5



FigureIII-75 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N5

2.4.3. Evaluation biologique de l'alternariol

L'activité cytotoxique de l'alternariol a pu être évaluée sur la lignée cellulaire KB et aucune activité cytotoxique n'a été observéepour des concentrations testées de 0,625 µM à 20 µM.

2.4.4. Etude bibliographique : discussion

L'alternariol est une dibenzopyrone caractéristique du genre *Alternaria* qui a été isolée pour la première fois en 1953 d'un *Alternaria tenuis* (Raistrick *et al.*, 1953). Cette molécule est décrite par Holker *et al.* en 1983 comme aussi produite par des *Penicillium* (*Penicillium diversum*) (Holker *et al.*, 1983).

- ✓ **Biosynthèse de l'alternariol**

En 1986, Stinson *et al.* posent l'hypothèse que l'alternariol serait produit suite à l'ouverture du cycle de la norlichéxanthone (Figure III-76) (Stinson *et al.*, 1986), hypothèse appuyée par la présence conjointe de ces deux produits au sein du métabolome de notre souche MMS351.

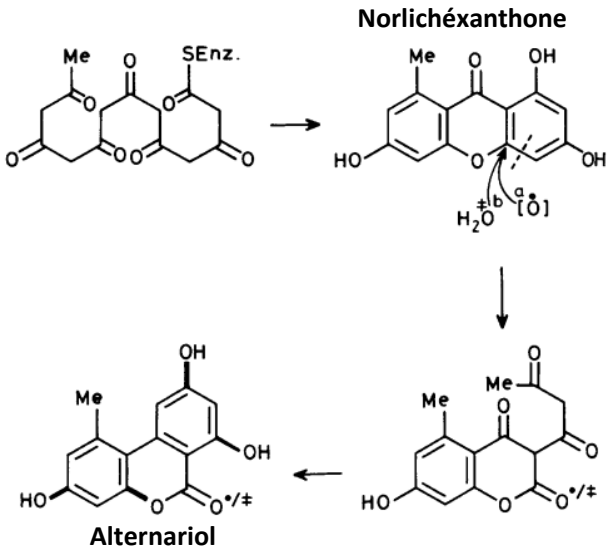


Figure III-76 : Biosynthèse hypothétique de l'alternariol via la norlichéxanthone (Stinson *et al.*, 1986)

Cependant, une seconde étude des voies de biosynthèse de l'alternariol est venue un an après réfuter l'hypothèse précédente (Dasenbrock et Simpson, 1987). En effet, cette étude chez *Alternaria tenuis*, a montré l'incorporation d'acétate marqué au ^{14}C dans la structure de l'alternariol qui dérive alors d'une chaine polycétide de 14 carbones qui se cyclise (Figure III-77). Deux aldolisations suivies de l'énolisation des cycles permettent d'obtenir une structure biphényl qui après lactonisation mène à la formation de l'alternariol (Dewick, 2011).

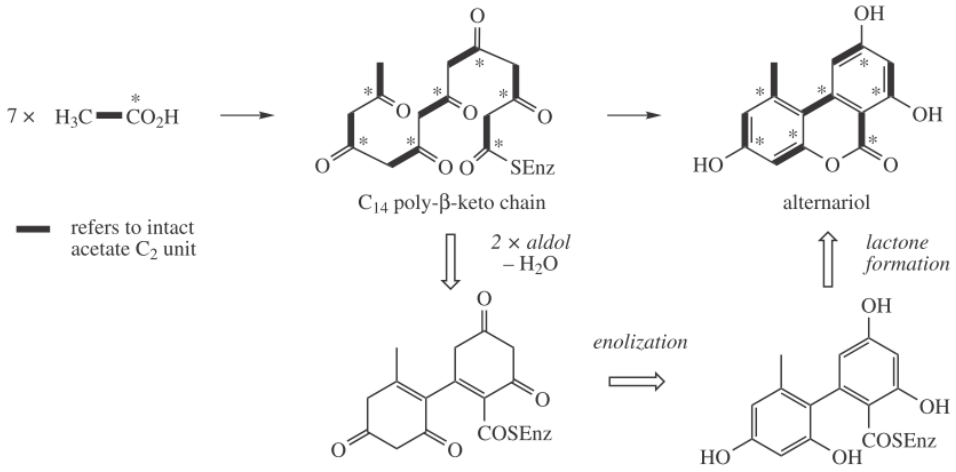


Figure III-77 : Biosynthèses hypothétiques de l'alternariol (Dewick, 2011)

✓ Activités biologiques

Concernant les activités biologiques, des propriétés mutagènes ont été reportées (Brugger *et al.*, 2006; Schrader *et al.*, 2006). L'alternariol est d'ailleurs considéré comme une mycotoxine. Celle-ci n'est cependant pas encore réglementée mais sera contrôlée prochainement par l'Union Européenne dès que les taux maximums admis dans les produits alimentaires auront été définis par l'EFSA (European Food Safety Authority). Ainsi, Prelle *et al.* décrivent en 2013 une méthode de détection et de quantification rapide par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à triple quadrupole et source APCI (atmospheric pressure chemical ionisation)(Prelle *et al.*, 2013). En plus de l'alternariol, deux de ses analogues sont aussi recherchés, le 5-O-méthyl-alternariol et l'alténuène. Plusieurs autres équipes proposent aussi des méthodes UHPLC-MS/MS pour la détection rapide de ces mycotoxines dans les denrées alimentaires (Vaclavik *et al.*, 2013; Yogendrarajah *et al.*, 2013).

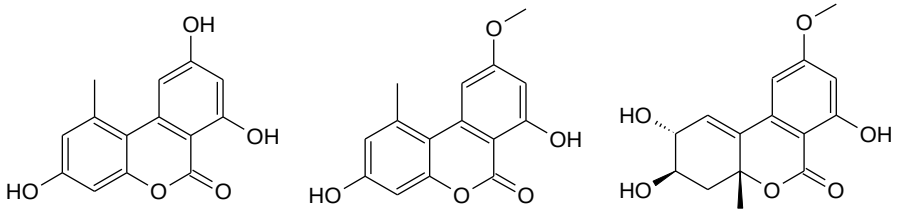


Figure III-78 : Structure de l'alternariol et de deux analogues

2.4.5. <u>Purification de molécules de la fraction 8a : Conclusion</u>

Les purifications effectuées à partir de la fraction 8a ont menées à l'isolement de l'alternariol. L'analyse déréplicative de cette fraction révèle la présence d'acide orsellinique ainsi que d'un analogue de ligérine : la 7-chloro-fumagilline qui bien que facilement synthétisable serait intéressante à purifier du fait de l'originalité de ce métabolite. Ce dernier composé est peut-être d'ailleurs le composé responsable de l'activité antiproliférative observée pour la fraction 8a sur les cellules POS-1.

2.5. Purification de molécules de la fraction 9abc

Les fractions 9a, 9b et 9c initiales ont été rassemblées. Elles présentent un profil chimique différent des fractions étudiées auparavant. Deux composés ont été isolés à partir de cette fraction : les composés 351-N6 et 351-N7.

2.5.1. Purification des composés351-N6 et 351-N7

2.5.1.1. 1ère étape de fractionnement : Chromatographie flash

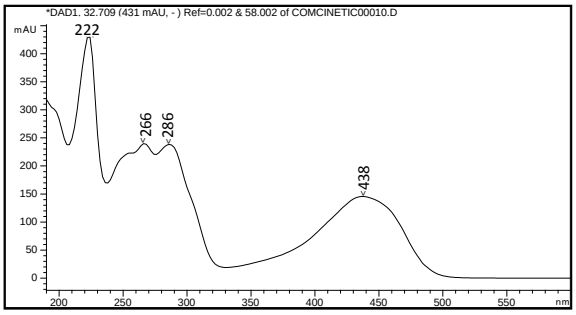
La première étape de fractionnement de la fraction 9abc (600 mg) a été effectuée par chromatographie flash en phase normale avec un système d'élution en gradient allant de 100% de CH_2Cl_2/ à 100% de MeOH. Quatorze fractions ont ainsi pu être obtenues. Dans un des tubes de collecte, une molécule a cristallisé et les cristaux ont donc été récupérés par filtration sur Büchner. Ce composé a été nommé 351-N6 (24,5 mg). Les analyses HPLC-UV/DAD-HRMS/MS des fractions obtenues ont révélé la présence d'un deuxième composé pur correspondant à la fraction 2. Ce composé a été nommé 351-N7 (3,4 mg).

2.5.2. Etude du composé 351-N6

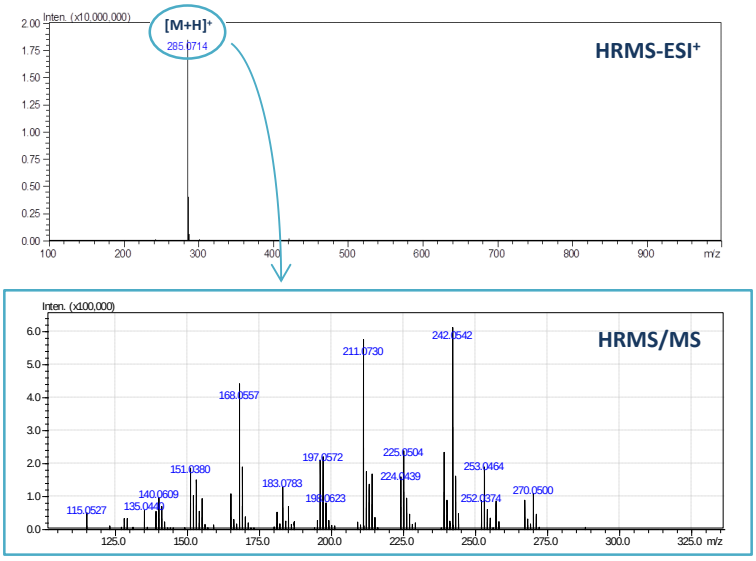
2.5.2.1. Analyse structurale du composé 351-N6

- ✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS**

Le composé 351-N6 a été analysé par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS (selon la méthode analytique B, Annexe II). Ce composé présente un spectre UV-visible caractéristique identique à celui de l'émodine avec cinq bandes d'absorption à 222, 254, 267, 288, 440nm (FigureIII-79) indiquant que nous devons sans doute être en présence d'une anthraquinone. Les analyses de spectrométrie de masse nous ont permis de réfuter la purification de l'émodine puisque l'ion pseudo-moléculaire observé présente un *m/z*de 285.0714dans le cas d'une ionisation positive. A priori cette molécule correspond à l'adduit $[M+H]^+$ d'un composé dont la formule brute la plus probable serait $C_{16}H_{12}O_5$ (FigureIII-80). L'analyse de la fragmentation MS/MS révèle la présence de nombreux ions fils ne correspondant pas à des pertes de neutre facilement interprétables. Des analyses de RMN ont alors été entreprises afin d'élucider la structure de ce composé.



FigureIII-79: Spectre UV-visible du composé 351-N6 (λ_{max} 222, 254sh, 267, 288, 440 nm)



FigureIII-80 : Spectre de masse du composé 351-N6 en ionisation positive et spectre MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 285,0714

✓ Analyse RMN

L'analyse des données RMN-1H (Figure III-81) révèle la présence d'un méthyle (δ_H = 2,46 ppm) et de deux couples de protons :

- deux doublets avec une constante de couplage de 2,4 Hz correspondant à un couplage en méta de deux protons présents sur un cycle aromatique (δ_H = 6,69 ppm et δ_H = 7,37 ppm)
- deux doublets avec une constante de couplage d'environ 1 Hz correspondant àun autre couplage en méta de deux protons présents sur un cycle aromatique (δ_H = 7,09 ppm et δ_H = 7,63 ppm).

Ce spectre RMN 1H est très proche de celui de l'émodine avec néanmoins la présence d'un signal supplémentaire correspondant à trois protons sous la forme d'un singulet de déplacement chimique 3,95 ppm, laissant supposer la présence d'un méthoxyle.

L'étude complète des analyses en RMN 1D et 2D ont permis de finaliser l'élucidation structurale du composé 351-N6 qui correspond au physcion : une anthraquinone. L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé sont présentés dans l'Annexe VII.

Au regard du spectre RMN ^{1}H, la molécule ne semble pas complètement pure puisque un signal à un δ_H de 1,26 ppm est observé.

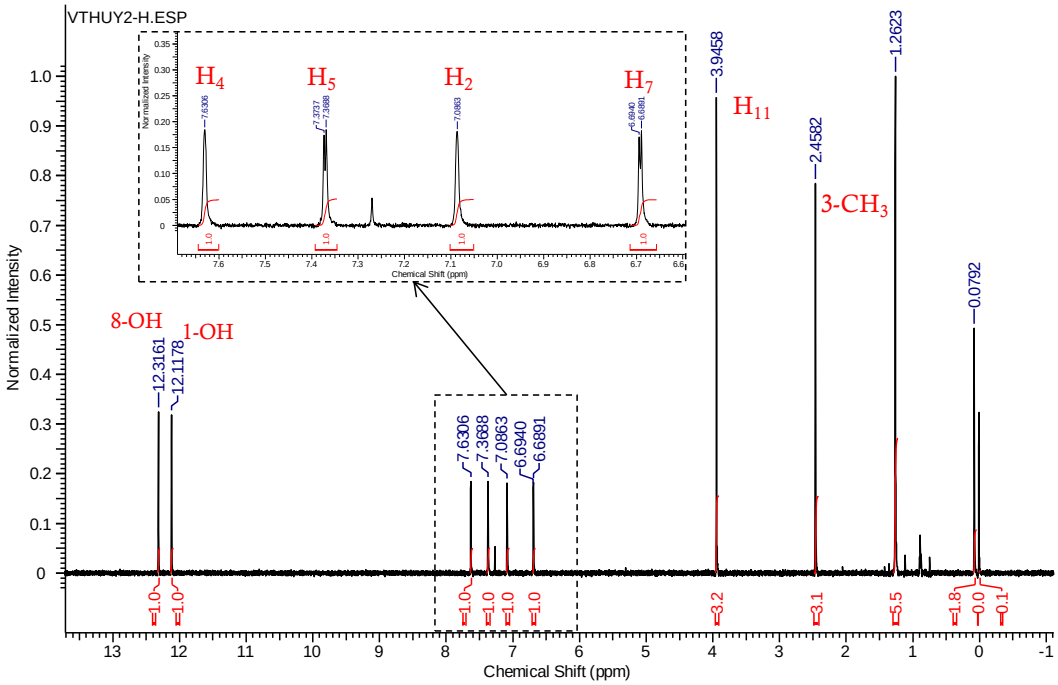
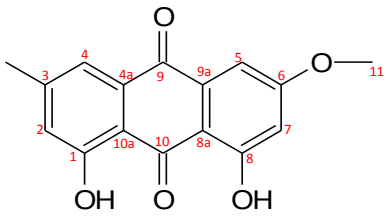


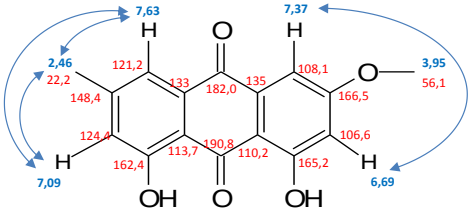
Figure III-81 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé 351-N6



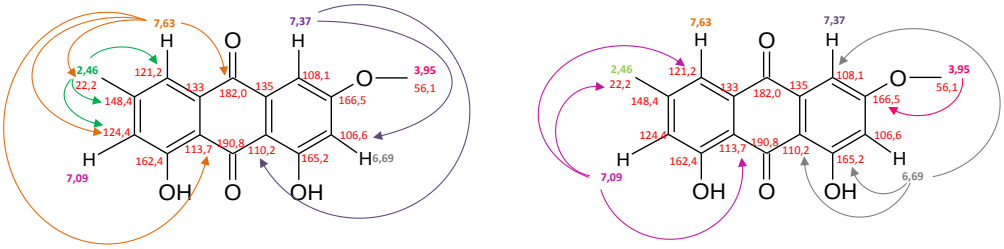
FigureIII-82 : Composé 351-N6 : physcion

Tableau III-21 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélation RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N6

position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	162,4			
2	124,4	7,09 (1H ; s)	2,46 ; 7,63	22,2 ; 113,7 ; 121,2
3	148,4			
4	121,2	7,63 (1H ; s)	2,46 ; 7,08	22,2 ; 113,7 ; 124,4 ; 182,0
4a	133			
5	108,1	7,37 (1H ; d ; 2,4Hz)	6,69	106,6 ; 110,2 ; 182,0
6	166,5			
7	106,6	6,69 (1H ; d ; 2,4Hz)	7,37	108,1 ; 110,2 ; 165,2
8	165,2			
8a	110,2			
9	182,0			
9a	135			
10	190,8			
10a	113,7			
11	56,1	3,95 (3H ; s)		166,5
3-CH_3	22,2	2,46 (3H ; s)	7,09 ; 7,63	121,2 ; 124,4 ; 148,4
1-OH		12,12 (s)		113,7 ;124,4 ; 162,4
8-OH		12,32 (s)		106,6 ; 110,9 ; 165,



FigureIII-83 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N6



FigureIII-84 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N6

2.5.2.2. Evaluation biologique du physcion

L'activité cytotoxique du composé 351-N6 a pu être évaluée sur la lignée cellulaire KB avec des concentrations de 0,625 µM à 20 µM. Le physcion ne semble pas présenter d'activité notable sur ce modèle cellulaire.

2.5.2.3. Etude bibliographique : discussion

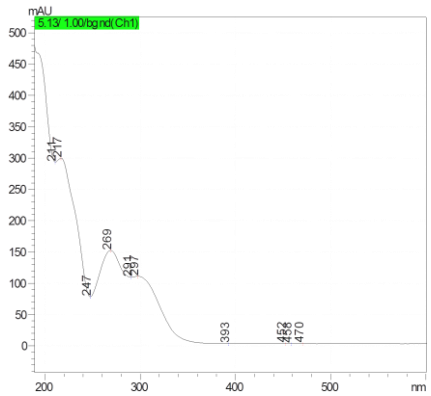
Le physcion(1,8-dihydroxy-6-méthoxy-3-méthylanthraquinone) est aussi dénommé pariétine, 6-O-méthyl-émodine, ou rhéochrysidine. C'est une anthraquinone qui diffère de l'émodine par la présence d'un méthyle supplémentaire sur le carbone 3. Elle est donc tout comme l'émodine couramment observée chez les lichens de la famille des *Teloschistaceae*. Elle a aussi été isolée de plantes des genres *Rhamnus* et *Rheum.* Le physcion a déjà été observé comme produit avec l'émodine par des champignons du genre *Penicillium*comme par exemple chez *Penicilliummegasporum*(Nozawa *et al.*, 1989 ; Wang *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2012). Le physcion possède des activités biologiques incluant des activités antibactériennes et antifongiques (Agarwal *et al.*, 2000; Manojlovic *et al.*, 2000). La biosynthèse de ce composé est présentée dans la partie bibliographique relative à l'émodine (p147).

2.5.3. Etude du composé 351-N7

2.5.3.1. Analyse structurale du composé 351-N7

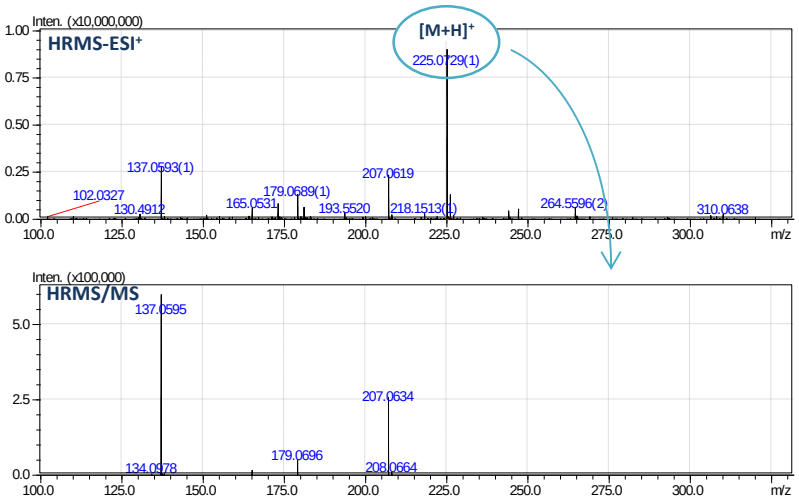
- ✓ **Analyse par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS**

Le composé isolé a été analysé par HPLC-UV/DAD-HRMS/MS. Le composé 351-N7 présente un spectre UV visible avec trois bandes d'absorption caractéristique à : 217, 269 et 297 nm (FigureIII-85).



FigureIII-85 : Spectre UV-visible du composé 351-N7 (λ_{max} 217, 269, 297 nm)

L'ion pseudo-moléculaire observé en spectrométrie de masse correspond à un *m/z* de 225,0729 pour une ionisation positive. A priori cetion correspond à l'adduit [M+H] d'un composé dont la formule brute la plus probable serait$C_{11}H_{12}O_5$ (FigureIII-86). L'ion fragmentde *m/z* 207,0634 indique la perte caractéristique d'H_2O. Deux autres ions fragments sont présents : les ions de *m/z* 179,0696 et 137,0595 mais il est difficile d'interpréter leur formation à ce stade.

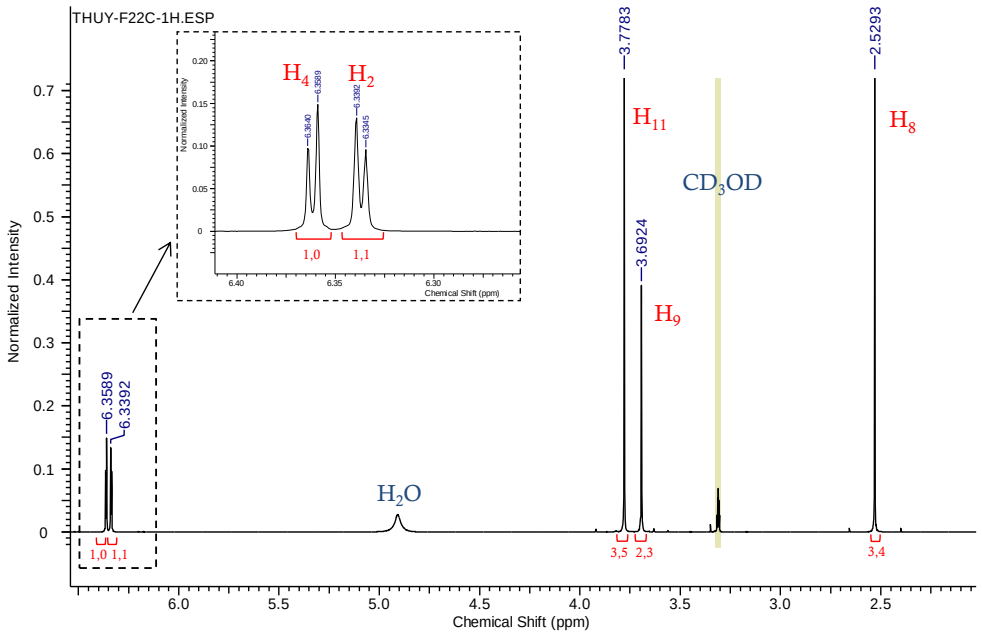


FigureIII-86 : Spectre de masse du composé 351-N7 en ionisation positive et spectre MS/MS (énergie de collision 8%) de l'ion de *m/z* 225,0729

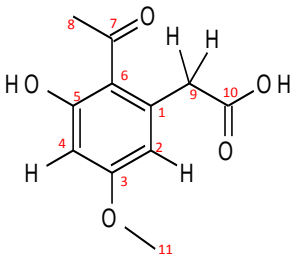
✓ Analyse RMN

Les analyses RMN 1D et 2D du composé 351-N7 dans le méthanol deutéré ont pu être effectuées. L'analyse des données RMN-1H révèle la présence d'un méthyle (δ_H = 2,53 ppm), du fait du déblindage plus important des protons apparaissant au déplacement chimique de 3,78 ppm, la présence d'un méthoxyle est fortement supposée, deux protons méthyléniques apparaissent aussi avec un déplacement chimique assez déblindé de 3,69 ppm. Enfin, la présence de deux doublets avec une constante de couplage de 2,4 Hz correspondant à des couplages en méta de deux protons présents sur un cycle aromatique (FigureIII-87).

L'étude complète des analyses en RMN 1D et 2D a permis de finaliser l'élucidation structurale du composé 351-N7 qui correspond à l'acide 3-O-méthyl-curvulinique. L'ensemble des spectres RMN et des données physico-chimiques de ce composé sont présentés dans l'Annexe VIII.



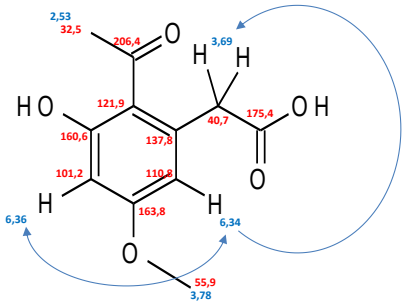
FigureIII-87 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du composé 351-N7



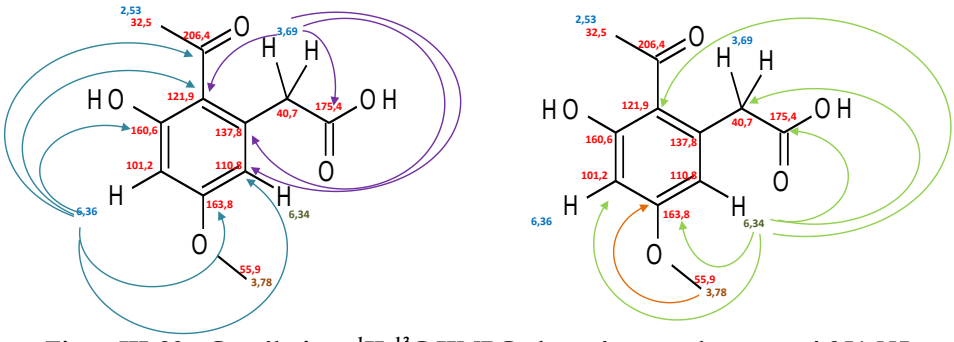
FigureIII-88 : Composé 351-N7 :
acide 3-O-methyl-curvulinique

Tableau III-22 : Données RMN 1D (^{13}C et ^{1}H) et corrélation RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) du composé 351-N7

position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité : intégration : couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	137,8			
2	110,8	6,34 (d : 1 : 2,4Hz)	3,69 ; 6,36	40,7 ; 101,2 ; 121,9 ; 163,8 ; 175,4
3	163,8			
4	101,2	6,36 (d : 1 : 2,4Hz)	6,34	110,8 ; 121,9 ; 160,6 ; 163,8 ; 206,4
5	160,6			
6	121,9			
7	206,4			
8	32,5	2,53 (s : 3)		121,9 ; 206,4
9	40,7	3,69 (s : 2)		110,8 ; 121,9 ; 137,8 ; 175,4
10	175,4			
11	55,9	3,78 (s : 3)		163,8



FigureIII-89 : Corrélations ^{1}H-^{1}HCOSY observées pour le composé 351-N7



FigureIII-90 : Corrélations ^{1}H-^{13}C HMBC observées pour le composé 351-N7

2.5.3.2. Evaluation biologique de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique

L'activité cytotoxique de l'acide 3-O-methyl-curvulinique a pu être évaluée sur la lignée cellulaire KB pour des concentrations de 0,625 µM à 20 µM. Le composé ne présente pas d'activité cytotoxique sur les cellules KB aux concentrations testées.

2.5.3.3. Etude bibliographique : discussion

L'acide 3-O-méthyl-curvulinique appartient à la famille des polycétides. Il a été isolé pour la première fois en 1989 par Kenfield *et al.* à partir du champignon *Drechlera indica* (Kenfield *et al.*, 1989). Parmi les analogues structuraux de l'acide O-méthyl-curvulinique, on peut citer l'acide curvulinique, l'acide curvulique, la curvuline et le curvulol dont les structures sont présentées dans la Figure III-91. Le premier isolement de ces deux composés et de la curvuline date de 1962 par Kamal *et al.* à partir d'un extrait de *Curvularia siddiqui* (aussi nommé *Drechlera papendorfii*) (Kamal *et al.*, 1962; Kamal *et al.*, 1963). Les mêmes auteurs avaient d'ailleurs procédé à des méthylations de ces composés menant entre autre à l'obtention de l'acide 3-O-methyl-curvulinique. L'acide curvulinique et l'acide curvulique ont déjà été observés chez des *Penicillium* respectivement chez *Penicillium canescens*(Nakakita *et al.*, 1984) et *Penicillium janthinellum*(Nicoletti *et al.*, 2007).

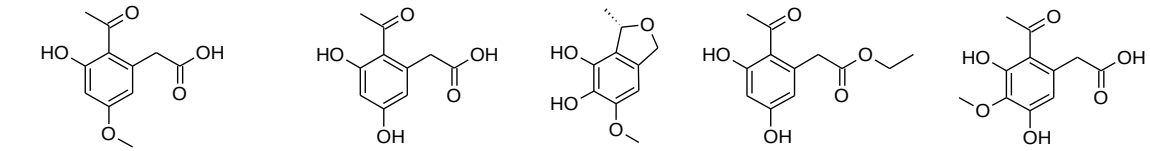


Figure III-91 : Structure de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique et de quatre analogues

Concernant les activités biologiques de ces composés, Kenfiel *et al.* ont rapporté dans le cadre de la recherche de nouveaux herbicides, des propriétés phytotoxiques de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique et de la curvuline (Kenfield *et al.*, 1989). Des propriétés antibactériennes ont aussi été observées pour l'acide curvulinique testé sur des bactéries des genres *Proteus*, *Bacillus, Xanthomonas et Micrococcus.* La concentration minimale d'inhibition (CMI) du développement de ces bactéries est la plus faible et égale à 26 µM sur *Proteus vulgaris* alors qu'elle est de 208 µM pour *Proteus rettgeri, Xanthomonas oryzae, Bacillus subtilis, Bacillus brevis,* et *Micrococcus lysodeikticus* (Nakakita *et al.*, 1984).Le curvulol isolé à partir d'un extrait brut de *P. sacculum* a quant à lui présenté une activité cytotoxique sur les cellules tumorales HL-60 avec une CI_{50} de 8,5 µM.

2.5.4. Purification de molécules de la fraction 9abc : Conclusion

Le fractionnement par chromatographie flash de la fraction 9abc amené à l'isolement de deux molécules : le physcion et l'acide 3-O-méthyl-curvulinique. La présence du physcion dans le métabolome de MMS351 n'est pas étonnante puisque cette anthraquinone est communément observée dans le métabolome de micromycètes du genre *Penicillium*. De plus, nous avions déjà pu lors de la purification de la fraction 7ab3 isoler l'émodine : analogue déméthylé du physcion. La présence de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique est également logique, puisque bien que d'abord associé au

métabolome de micromycètes du genre *Curvularia,* son analogue déméthylé, l'acide curvulinique a déjà été observé chez *P. canescens* appartenant comme la souche MMS351 à la section *Canescentia* du sous genre *Penicillium*.

Les analyses déréplicatives de cette fraction ont par ailleurs aussi révélé la présence de FD-38 ou d'un de ses stéréoisomères.

2.6. Bilan des purifications réalisées sur la souche MMS351

Ainsi, les purifications ont mené à l'isolement de 7 composés :deux anthraquinones : l'émodine et le physcion, une xanthone : la norlichéxanthone, trois autres polycétides : l'alternariol, l'orcinol et l'acide 3-O-méthyl-curvulinique et enfin une molécule à noyau γ-lactame spiro-hétérocyclique, le FD838.

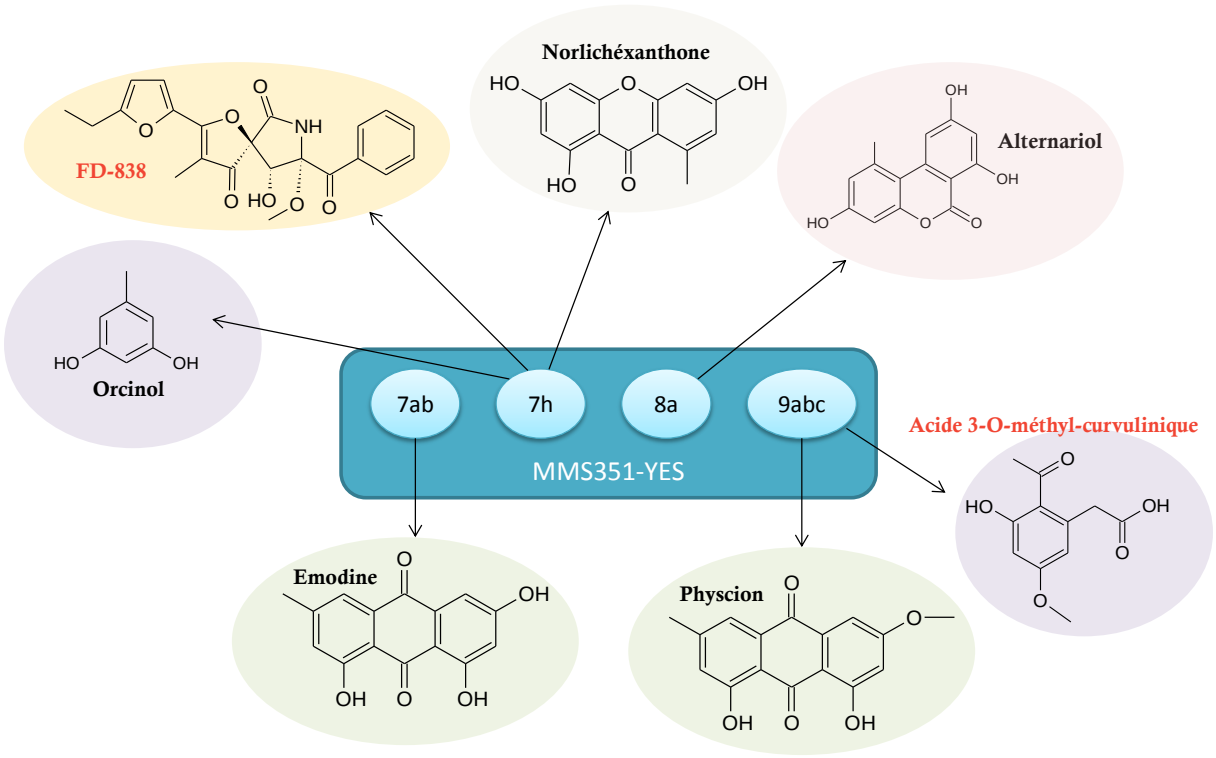


Figure III-92 : Bilan des purifications (les composés en rouge n'ont jamais été observés chez les *Penicillium*)

Parmi ces composés, l'acide 3-O-curvulinique n'a jamais été observé au sein du métabolome d'un *Penicillium* mais sa présence n'est pas singulière puisque son analogue déméthylé, l'acide curvulinique a été observé chez un *P. canescens*. Par contre, la production par un *Penicillium* de la molécule FD-838 constitue une découverte originale puisque cette molécule est essentiellement connue comme produite par des micromycètes du genre *Aspergillus*. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'avec le FD-838, la fumagilline et ses analogues ont tous été décrits initialement comme produits par *Aspergillus fumigatus*. Retrouver ces composés dans le métabolome d'une souche de *Penicillium* est donc très intéressant d'un point de vue taxonomique et montre la proximité de ces deux genres d'Ascomycètes.

D'un point de vue biosynthétique, la présence concomittante de fumagilline et de FD-838 (analogue des pseurotines) va dans le sens de l'hypothèse de Wieman *et al.*décrivant la présence d'un supercluster entremêlant les voies de biosynthèses de ces deux types de molécules (Wiemann *et al.*, 2013 ; cf. bibliographie sur la biosynthèse de la fumagilline, p29).

L'ensemble des molécules isolées s'ajoutent aux composés précédemment purifiés et caractérisés lors de la thèse de Marieke Vansteelandt (l'acide pénicillique et la ligérine) et permettent de compléter la chimiothèque du laboratoire constituant entre autres, une source intéressante de molécules pour de futurs criblages d'activités biologiques. Ces composés viennent également enrichir la connaissance du métabolome de la nouvelle espèce : *P. ligerum* qui est en cours de description. La suite de l'étude du métabolome tendra à avoir une vision plus globale et complètesdes métabolites secondaires produits par les quatre souches de *P. ligerum*.

3. Etude déréplicative du métabolome de *P.ligerum*

Les profils métaboliques des *Penicillium* étant relativement spécifiques, ils sont venus s'ajouter aux descriptions phénotypiques et génotypiques pour la taxonomie du genre(Frisvadet *al.*, 2004). C'est pourquoi, afin de compléter les études chimiques précédentes, le métabolome secondaire des quatre souches (MMS351, 388, 399 et 747) a été étudié par des techniques déréplicatives.

La déréplication consiste en l'identification de molécules connues au sein d'un mélange complexe, sans isolement complet au préalable. Pour réaliser la déréplication d'un extrait, celui-ci est soumis à une séparation chromatographique à haute performance, dans des conditions analytiques bien définies. Ainsi, pour chaque pic observé un ensemble de données physicochimiques est enregistré (temps de rétention, absorbance UV-visible, fragmentation en spectrométrie de masse,…). Ces données sont ensuite comparées à des bases de données regroupant ces valeurs pour un ensemble de composés déjà décrits, comme :

- la base de données de Nielsen *et al.* (métabolites fongiques,Nielsen *et al.*, 2011)
- le Dictionnary of natural product (DNP, http://dnp.chemnetbase.com)
- Antibase2011(Laatsch, 2011).

Les publications concernant les espèces étudiées ou les molécules suspectées sont aussi utilisées pour compléter les analyses déréplicatives. Enfin, les données acquises au laboratoire sur des molécules isolées/et, ou identifiées sont également pris en compte. La déréplication permet alors d'affirmer avec une plus ou moins grande certitude, la présence de tel ou tel composé dans le mélange étudié.

3.1. Procédure déréplicative

La procédure de déréplication développée au laboratoire dérive de la méthode décrite par Nielsen et Smedsgaard ((Nielsen et Smedsgaard, 2003), protocole présenté dans l'Annexe II). Les extraits fongiques sont analysés par couplages HPLC-UV/DAD et HPLC-MS/MS basse ou haute résolution. Pour chaque pic visualisé sont recueillis manuellement le t_R, le spectre UV-visible et les données spectrales MS/MS (ion pseudomoléculaire, profil isotopique et fragmentation). Ces données sont ensuite comparées à celles de la littérature et tout d'abord aux bases de données précédemment citées.

Par ailleurs, les données de spectrométrie de masse haute résolution peuvent être traitées par le logiciel MetID (Shimadzu®). Ce logiciel permet comme nous l'avons vu précédemment (p134) de rechercher rapidement au sein d'une analyse LC-HRMS, les ions pouvant correspondre aux différentes molécules connues. Après cette première sélection par le logiciel, la comparaison manuelle des données analytiques et spectrales acquises par rapport à celles de la littérature permet de confirmer ou non l'identification des ions sélectionnés.

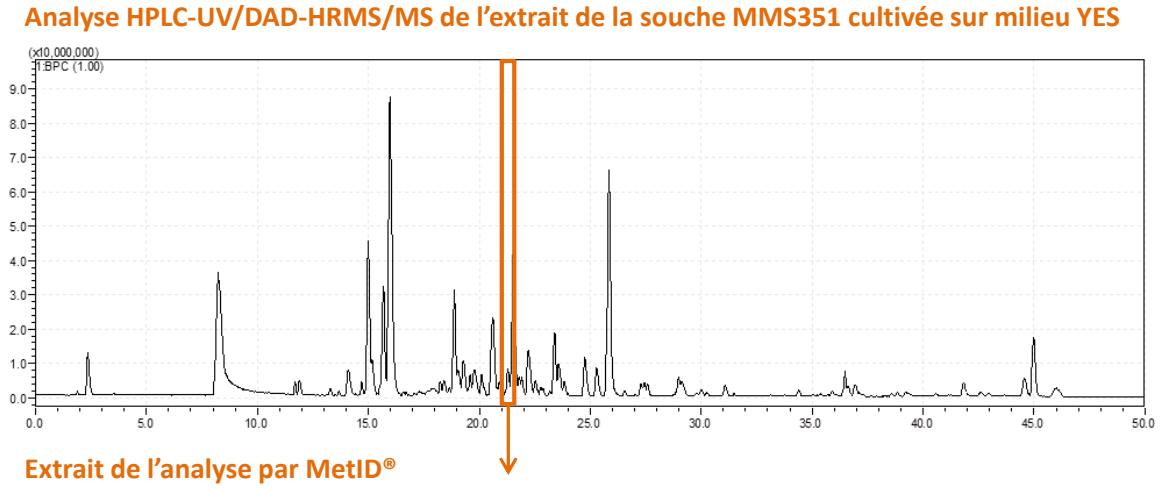
3.2. Annotation d'un pic chromatographique : exemple de la griséofulvine

Afin d'expliciter au mieux la démarche de déréplication, nous allons détailler l'exemple de l'identification de la griséofulvine (polycétide chloré) au sein d'un extrait du champignon étudié.

Suite à l'analyse HPLC-UV/DAD-HRMS/MS de l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES suivie du traitement des données acquises par le logiciel MetID®, on peut s'interroger sur la

présence de griséofulvine au sein du métabolome de cette souche fongique (Figure III-93).

En effet, les ions de *m/z* 353,0804 et 375,0655 détectés au t_R 21,3 min peuvent correspondre aux ions $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ de la griséofulvine ($m/z_{théo}$353,0786 pour $[C_{17}H_{17}O_6Cl+H]^+$; Δ 5,54 ppm et $m/z_{théo}$375,0606 pour $[C_{17}H_{17}O_6Cl+Na]^+$; Δ 13,1 ppm). De plus, le profil isotopique mesuré pour l'ion $[M+H]^+$semble correspondre à 87% (Iso Score) avec le profil isotopique théorique d'une molécule de formule brute $C_{17}H_{17}O_6Cl$.

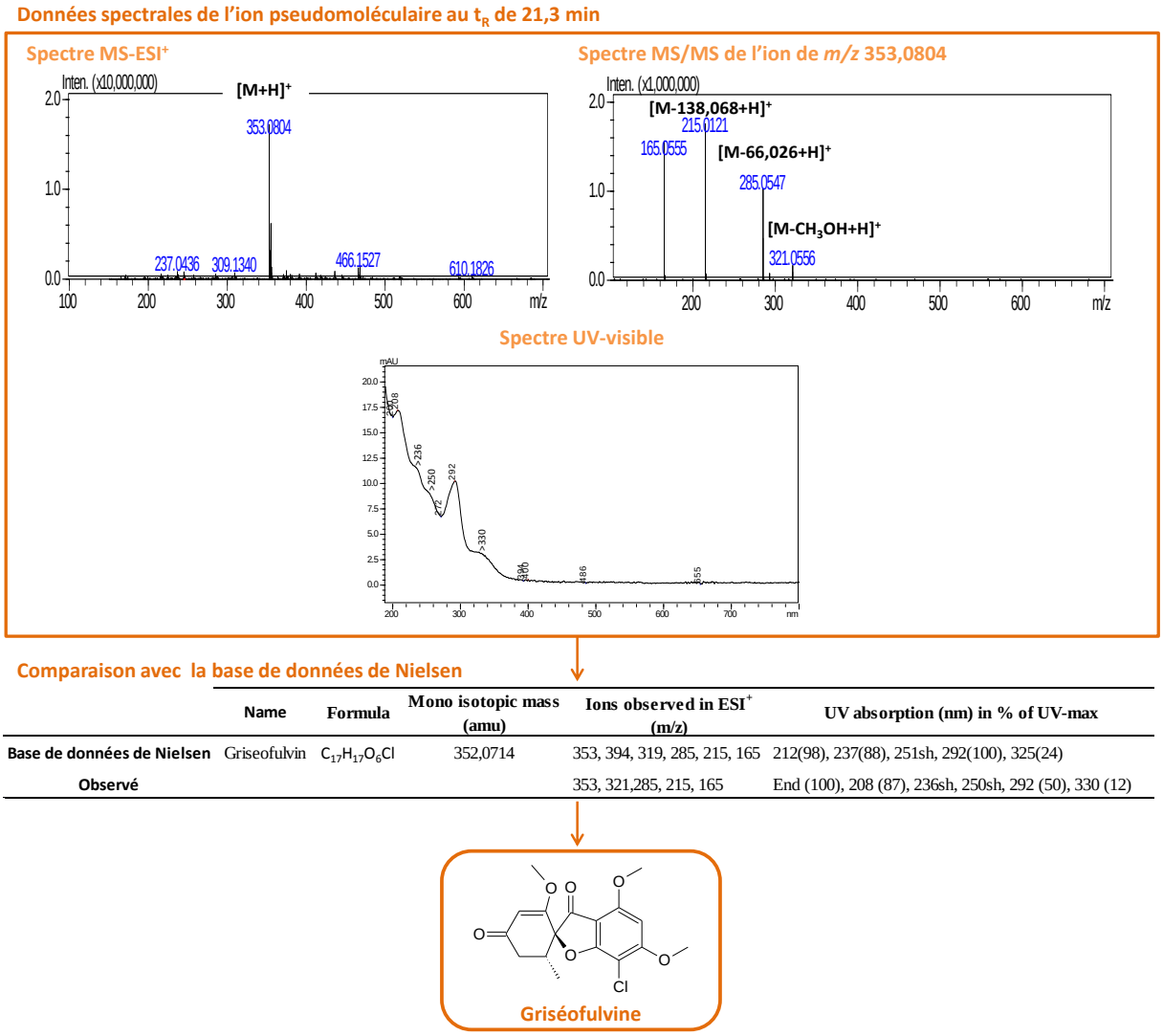


RT	Area	Meas, m/z	Pred, m/z	Iso Score	Déréplication	Formula (M)	Ion	Diff (mDa)	Diff (ppm)
21,29	37559478	353,0806	353,0786	87,07	Griseofulvin	$C_{17}H_{17}O_6Cl$	[M+H] +	2	5,54
21,294	1831254	375,0655	375,0606	63,63	Griseofulvin	$C_{17}H_{17}O_6Cl$	[M+Na] +	4,9	13,1

Figure III-93 : Exemple de l'identification de la griséofulvine lors de la déréplication assistée par le logiciel MetID® d'un extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

Si l'on compare à présent les données spectrales UV-visible et MS/MS de cette molécule (Figure III-94) par rapport aux données présentes dans la base de données de Nielsen *et al.*, on constate certaines similitudes :

- présence des ions fils de *m/z* 285, 215 et 165 dans les spectres MS/MS en ESI^+
- spectres UV-visible proches.



	Name	Formula	Mono isotopic mass (amu)	Ions observed in ESI+ (m/z)	UV absorption (nm) in % of UV-max
Base de données de Nielsen	Griseofulvin	$C_{17}H_{17}O_6Cl$	352,0714	353, 394, 319, 285, 215, 165	212(98), 237(88), 251sh, 292(100), 325(24)
Observé				353, 321,285, 215, 165	End (100), 208 (87), 236sh, 250sh, 292 (50), 330 (12)

Figure III-94 : Suite de l'exemple de l'identification de la griséofulvine lors de la déréplication assistée par le logiciel MetID® d'un extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

Ainsi, l'ensemble des données semblent bien indiquer la présence de griséofulvine au sein du métabolome de la souche MMS351.

Cette démarche déréplicative nous a permis d'étudier et de comparer les métabolomes des quatre souches fongiques MMS351, MMS388, MMS399 et MMS747.

3.3. Les molécules dérépliquées dans les extraits des quatre souches de *P. ligerum*

Afin de comparer les souches, leurs extraits ont été dérépliqués selon la méthode décrite précédemment et un ensemble de 27 composés ont pu être annotés dans les différents chromatogrammes. Ainsi en plus de la griséofulvine, de la ligérine et de ses analogues et des produits précédemment isolés et identifiés, 13 autres composés ont été détectés au sein des chromatogrammes, parmi lesquels quatre polycétides et neuf alcaloïdes indoliques. Avant de comparer les résultats obtenus pour les quatre souches, nous allons décrire les caractéristiques physicochimiques des 13 autres métabolites dérépliqués.

3.3.1. Les polycétides

Cinq polycétides ont été identifiésgriséofulvine et deux de ses analogues, l'acide pénicillique et son précurseur l'acide orsellinique :

- la griséofulvine, heptacétide chloré (t_R 21,2 min, m/z_{mes}353,0804 et $m/z_{théo}$353,0786 pour $[C_{17}H_{17}ClO_6+H]^+$; Δ 5,10 ppm),
- la dé- ou épidéchlorogriséofulvine (t_R 19,4 min m/z_{mes}319,1200 et $m/z_{théo}$319,1176 pour $[C_{17}H_{18}O_6+H]^+$; Δ 7,8 ppm),
- la 5',6'-didéhydrogriséofulvine (t_R 21,7 min m/z_{mes}351,0647 et $m/z_{théo}$351,0630 pour $[C_{17}H_{15}ClO_6+H]^+$; Δ 4,8 ppm),
- l'acide pénicillique (t_R 8,2 minm/z_{mes}171,0668 et $m/z_{théo}$171,0652 pour $[C_8H_{10}O_4+H]^+$; Δ 9,35 ppm),
- l'acide orsellinique (t_R 11,5 min, observé seulement grâce à l'analyse LC-UV/DAD) (Figure III-95).

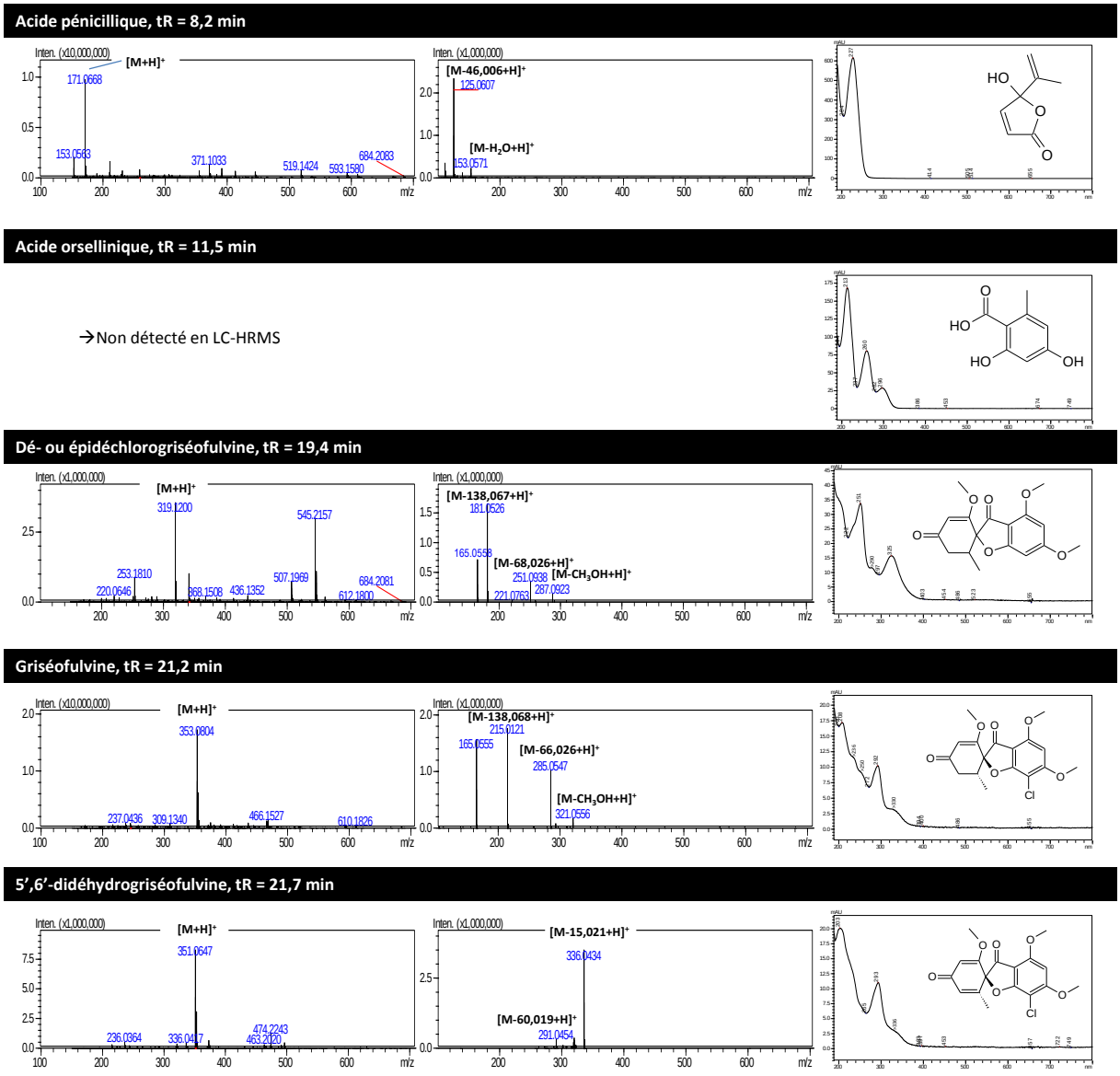


Figure III-95 :Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des polycétides observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

3.3.2. Les alcaloïdes indoliques

✓ Les clavines

Deux alcaloïdes indoliques ont été identifiés comme étant deux dérivés de clavines : l'agroclavine et la festuclavine. Ils ont respectivement été observés aux t_R de 15,0 et 16,0 min sous forme d'adduits protons de m/z 239,1563 ($m/z_{théo}$ 239,1543 pour $[C_{16}H_{18}N_2+H]^+$; Δ 8,36 ppm) et 241,1722 ($m/z_{théo}$241,1699 pour $[C_{16}H_{20}N_2+H]^+$; Δ 9,54 ppm). Leurs fragmentations MS/MS correspondent à celles décrites par Frisvad *et al.* (Nielsen *et al.*, 2011) avec des ions fils de m/z 208,1145 et 183,0943 pour l'agroclavine et de m/z210,1303, 182,0993, 168,0836, 154,0673, 130,0668 pour la festuclavine. Les spectres UV-visible correspondent à ceux de dérivés de la clavine (Figure III-96).

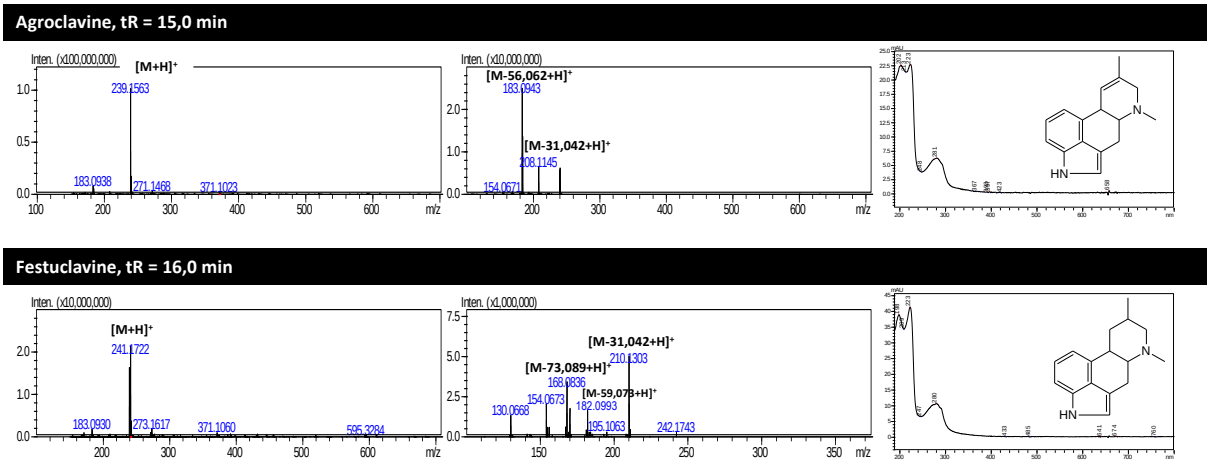


Figure III-96 :Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des clavines observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

✓ Les tryptoquivalines

La nortryptoquivaline, un autre alcaloïde indolique a, été détectée sous sa forme protonnée à un t_R de 25,9 min (m/z_{mes} 533,2057 et $m/z_{théo}$ 533,2031 pour $[C_{28}H_{28}N_4O_7+H]^+$; Δ 4,8 ppm). Sa fragmentation (ions fils de m/z 515,1968 ; 471,2061 ; 411,1889 ; 261,1269 ; 201,1056) et son spectre UV-visible (λ_{max}de 210 nm, 228 nm et 307 nm et épaulements à 250 nm, 278 nm et 318 nm) correspondent à ceux décrits par Nielsen (Nielsen *et al.*, 2011).

La présence au sein de cet extrait de composés présentant un spectre UV proche de la nortryptoquivaline, nous a encouragés à développer la recherche d'analogues. Parmi les nombreux produits naturels composant cette famille chimique (Annexe XIX), six, en plus de la nortryptoquivaline, ont été retrouvés dans le métabolome de la souche MMS351 (Figure III-97) :

- deux molécules de m/z 474,215 et de t_R 19,6 et 21,5 min pouvant correspondre à la fiscaline A et/ou à ses analogues de même masse moléculaire : l'épi-fiscaline A, la néofiscaline A ou l'épi-néofiscaline A,

-une molécule de m/z 387,1841 au t_R22,8, la fiscaline B,

-deux molécules de m/z 488,2317 et 488,2350 aux t_R respectifs de 22,6 min et 23,2 min : la fiscaline C et l'épi-fiscaline C et,

- la tryptoquivalone de m/z_{mes}489,1807 au t_R 27,5 min,.

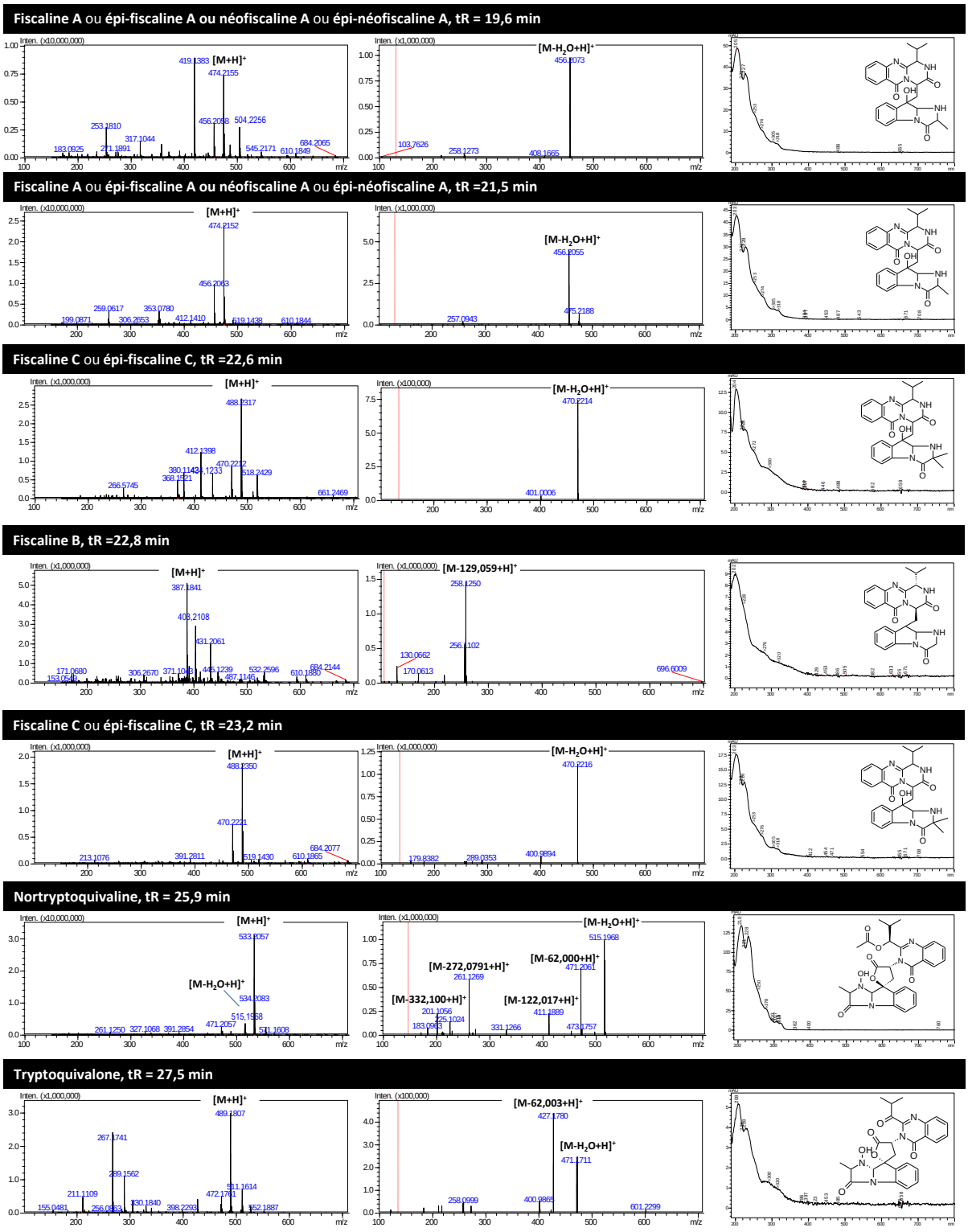


Figure III-97 :Spectres HRMS, HRMS/MS et UV-visible des tryptoquivalines observées dans l'extrait de la souche MMS351 cultivée sur milieu YES

3.3.3. Les composés précédemment isolés

Les sept composés isolés auparavant ont pu être recherchés au sein de cet extrait.

L'émodine, et l'orcinol n'ont pas été détectés avec cette analyse tandis que les cinq composés suivants ontété observés :
- l'acide 3-O-méthyl-curvuliniqueau t_R de 11,9 min (m/z_{mes} 225,0757 et $m/z_{théo}$ 225,0758 pour $[C_{11}H_{12}O_5+H]^+$; Δ 0,44 ppm)
- l'alternariol au t_R 19,9 min (m/z_{mes} 259,0619 et $m/z_{théo}$ 259,0601 pour $[C_{14}H_{10}O_5+H]^+$; Δ 6,81 ppm),
- le FD-838 au t_R de 21 min (m/z_{mes} 412,1358 et $m/z_{théo}$ 412,1351 pour $[C_{22}H_{21}NO_7+H]^+$; Δ 2,70 ppm)
- la norlichéxanthone au t_R de 21,9 min (m/z_{mes} 259,0622 et $m/z_{théo}$ 259,0601 pour $[C_{14}H_{10}O_5+H]^+$; Δ 8,11 ppm)et,
- le physcion au t_R de 31,4 min (m/z_{mes} 285,0774 et $m/z_{théo}$ 285,0758 pour $[C_{16}H_{12}O_5+H]^+$; Δ 5,61 ppm).

Afin d'explorer plus en détail le métabolome de *P. ligerum*, nous avons aussi recherché par déréplication la présence des précurseurs biosynthétiques ou des analogues structuraux de ces molécules. Aucun composé supplémentaire n'a clairement été identifié mais la présence de stéréoisomères du FD-838 et donc de céphalimysines est fortement suspectée tout comme celle de leurs hypothétiques précurseurs biosynthétiques, les pseurotines.

L'ensemble des métabolites identifiés ainsi que leurs caractéristiques sont repris dans le Tableau III-23et la Figure III-98.

Tableau III-23 : Caractéristiques des métabolites dérépliqués

Métabolites	Classe chimique	Formule brute	Masse monoisotopique (Da)	t_R (min)	Ion observé	Ions fils majoritaires MS/MS (m/z)				UV (λ_{max})
Acide pénicillique	polycétide	$C_8H_{10}O_4$	170,0579	8,2	171,0668 $[M+H]^+$	153,0571 (12)	125,0607 (100)	111,0448 (15)		190 (70), 226 (100)
Acide orsellinique	polycétide	$C_8H_8O_4$	168,0423	11,5	169,0498 $[M+H]^+$	ND				213 (100), 260 (50), 297 (12)
Acide 3-O-methyl-curvulinique	polycétide	$C_{11}H_{12}O_5$	224,0685	11,9	225,0757 $[M+H]^+$	207,0683 (48)	165,0582 (14)	137,0623 (100)		217 (100), 269 (50), 297 (33)
Agroclavine	alcaloide indolique	$C_{16}H_{18}N_2$	238,1470	15,0	239,1563 $[M+H]^+$	208,1145 (30)	183,0943 (100)			202 (100), 223 (100), 281 (30)
Festuclavine	alcaloide indolique	$C_{16}H_{20}N_2$	240,1626	16,0	241,1722$[M+H]^+$	210,1303 (100)	182,0993 (34)	170,0974 (36)	168,0836 (64)	198 (91), 223 (100), 280 (30)
						154,0673 (46)	130,0668 (30)			
Dé- ou épidéchlorogriséofulvine	polycétide	$C_{17}H_{18}O_6$	318,1103	19,4	319,1200 $[M+H]^+$	287,0923 (12)	251,0938 (23)	181,0526 (100)	165,0558 (39)	End (100), 210 (87), 251 (86), 290 (31), 325 (37)
Fiscaline A ou Epi-fiscaline A ou Néofiscaline A ou Epi-néofiscaline A	alcaloide indolique	$C_{26}H_{27}N_5O_4$	473,2063	19,6	474,2155 $[M+H]^+$	456,2073 (100)	258,1273 (3)			205 (100), 227 (80), 253sh, 274sh, 305 (12), 318sh
Alternariol	polycétide	$C_{14}H_{10}O_5$	258,0528	19,9	259,0619 $[M+H]^+$	244,0323 (18)	241,0538 (18)	213,0548 (50)	185,0582 (100)	202(50), 254(100), 288(20), 299(20), 338(23)
						161,0605 (32)	139,0553 (30)	115,0545 (16)		
FD-838	mixte	$C_{22}H_{21}NO_7$	411,1318	21	412,1358 $[M+H]^+$	380,1111 (100)	219,0588 (50)			End(100), 255(44), 285(24), 345(85)
Griséofulvine	polycétide	$C_{17}H_{17}ClO_6$	352,0714	21,2	353,0804 $[M+H]^+$	321,0556 (10)	285,0547 (55)	215,0121 (100)	165,0555 (78)	End (100), 208 (87), 236sh, 250sh, 292 (50), 330 (12)
Fiscaline A ou Epi-fiscaline A ou Néofiscaline A ou Epi-néofiscaline A	alcaloide indolique	$C_{26}H_{27}N_5O_4$	473,2063	21,5	474,2152 $[M+H]^+$	456,2055 (100)	257,0943 (3)			203 (100), 228 (70), 253sh, 274sh, 305 (12), 318sh
5',6'-Didéhydro-griséofulvine	polycétide	$C_{17}H_{15}ClO_6$	350,0557	21,7	351,0647 $[M+H]^+$	336,0434 (100)	321,0307 (12)	291,0454 (12)		203 (100), 250sh, 293 (60), 330 (12)
Norlichexanthone	polycétide	$C_{14}H_{10}O_5$	258,0528	21,9	259,0622 $[M+H]^+$	244,0341 (100)	217,0484 (60)	213,0516 (62)	191,0700 (47)	204(65), 242(100), 267sh, 314(60)
						185,0575 (18)	151,0384 (37)			
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	alcaloide indolique	$C_{27}H_{29}N_5O_4$	487,2220	22,6	488,2317 $[M+H]^+$	470,2214 (100)	401,0006 (2)			204 (100), 228 (60), 254sh, 300sh
Fiscaline B	alcaloide indolique	$C_{23}H_{22}N_4O_2$	386,1743	22,8	387,1841 $[M+H]^+$	258,1250 (100)	256.1102 (40)	218,1328 (6)		202 (100), 228sh, 276sh, 320sh
						170,0613 (13)	130,0662 (17)			
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	alcaloide indolique	$C_{27}H_{29}N_5O_4$	487,2220	23,2	488,2350 $[M+H]^+$	470,2216 (100)	400,9894 (3)			203 (100), 226 (74), 253sh, 276sh, 305 (11), 318sh
Nortryptoquivaline	alcaloide indolique	$C_{28}H_{28}N_4O_7$	532,1958	25,9	533,2057$[M+H]^+$	515,1968 (100)	471,2061 (69)	411,1889 (22)	261,1269 (60)	210 (100), 228 (95), 250sh, 278sh, 307 (5), 318sh
						201,1056 (16)				
Tryptoquivalone	alcaloide indolique	$C_{26}H_{24}N_4O_6$	488,1696	27,5	489,1807 $[M+H]^+$	471,1711 (61)	427,1780 (100)	400,9865 (13)	258,0999 (13)	208(100), 228 (80), 300sh, 320sh
Physcion	polycétide	$C_{16}H_{12}O_5$	284,0685	31,4	285,0774 $[M+H]^+$	253,0464 (33)	242,0542 (100)	225,0504 (40)	211,0730 (95)	222(100), 254sh, 267(54),288(55), 440(36)
						197,0572 (35)	168,0557 (73)	151,0380 (33)		

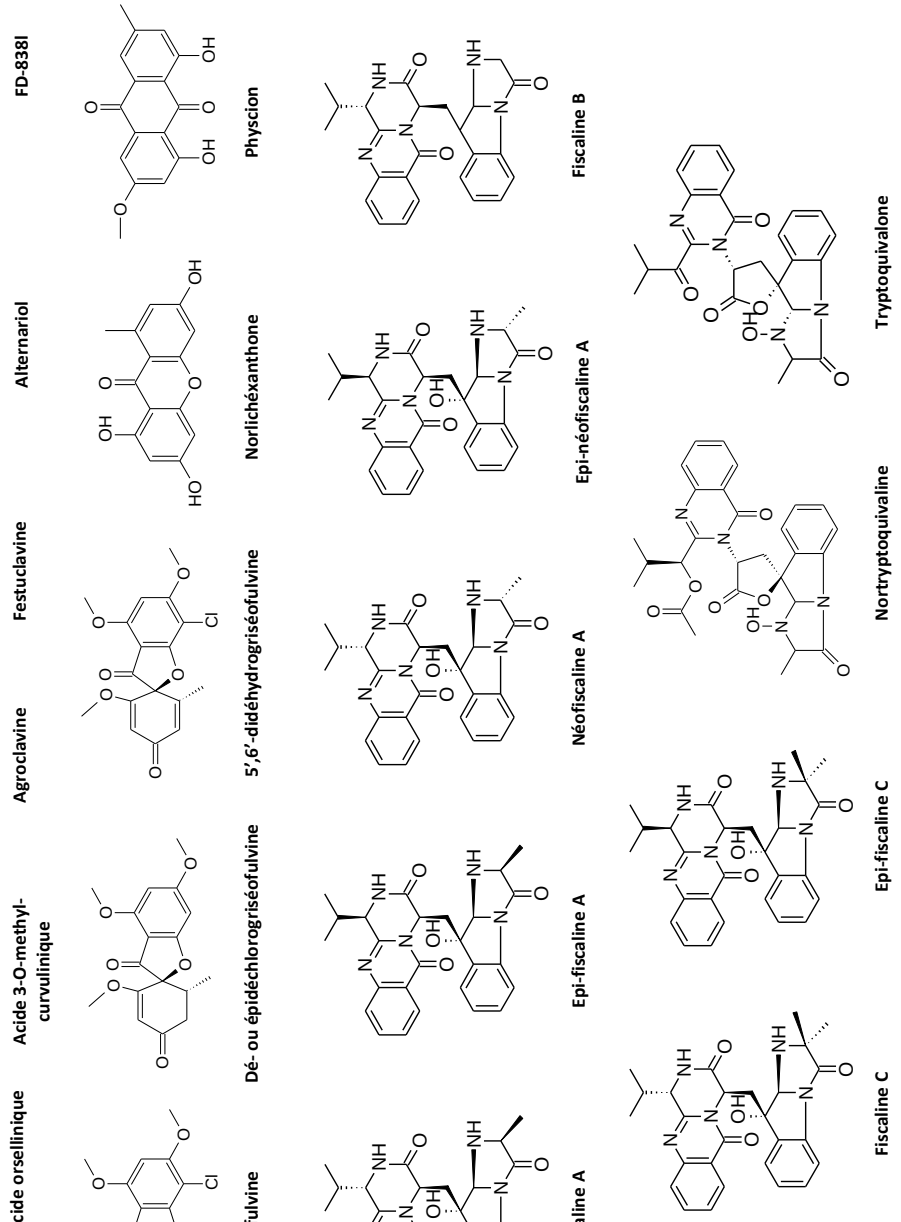
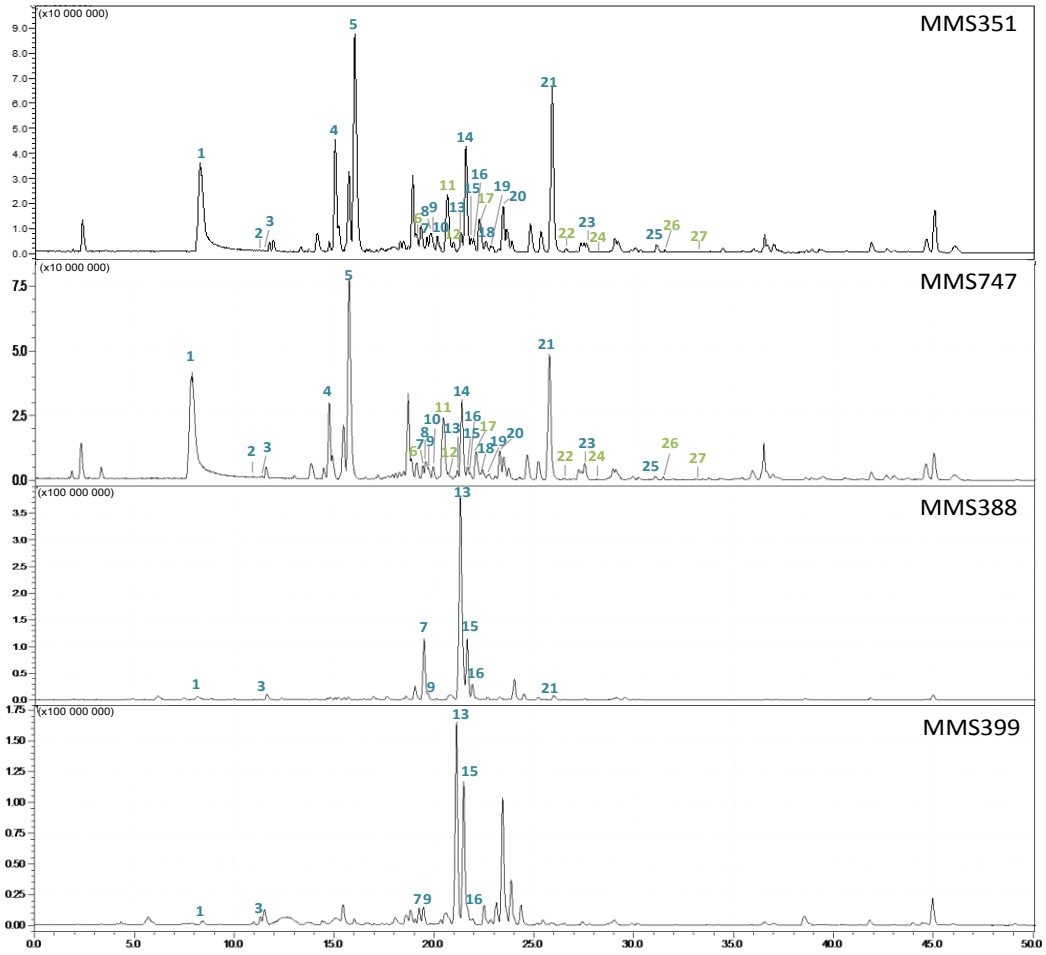


Figure III-98 : Structure des métabolites identifiés au sein du métabolome de la souche fongique MMS351

3.4. Application : étude du métabolome des quatre souches fongiques

3.4.1. Comparaison des métabolomes des quatre souches fongiques cultivées sur milieu YES

Les chromatogrammes annotés obtenus suite aux analyses HPLC-HRMS/MS des extraits des quatre souches cultivées sur le milieu YES sont présentés à titre d'exemple dans la Figure III-99.



1. Acide pénicillique
2. Acide orsellinique
3. Acide 3-O-methyl-curvulinique
4. Agroclavine
5. Festuclavine
6. Fumagillol
7. Dé ou épidéchloro-griséofulvine
8. Fiscaline A ou un de ses stéréosisomère
9. Alternariol
10. FD-838
11. 6-O-succinyl-fumagillol
12. 7-chloro-fumagillol
13. Griséofulvine
14. Fiscaline A ou un de ses stéréosisomère
15. 5',6'-Didéhydro-griséofulvine
16. Norlichéxanthone
17. Ligerine
18. Fiscaline C ou Epifiscaline C
19. Fiscaline B
20. Fiscaline C ou Epifiscaline C
21. Nortryptoquivaline
22. Fumagilline
23. Tryptoquivalone
24. 7-chloro-fumagilline
25. Physcion
26. RK-95113
27. 7-chloro-RK-95113

Figure III-99 : Profil métabolique obtenu en HPLC-HRMS/MS (*base peak*) des quatre souches de *P. ligerum* cultivées sur milieu YES

La totalité des molécules dérépliquées a pu être observée au sein des extraits des souches MMS351 et MMS747 cultivée sur le milieu de culture YES. Les profils obtenus pour les souches MMS388 et MMS399 diffèrent de ceux des deux autres souches. Ainsi, seulement huit des vingt-sept composés identifiés au sein du métabolome secondaire des souches MMS351 et MMS747 ont été détectés dans les extraits des souches MMS388 et MMS399. Il est à noter que ces deux souches produisent de très grandes quantités de griséofulvine ainsi que deux de ses analogues (la dé- ou épidéchlorogriséofulvine et la 5',6'-didéhydrogriséofulvine), limitant ainsi sans doute l'observation des autres métabolites dans les analyses chromatographiques.

3.4.2. Comparaison du métabolome des quatre souches cultivées sur différents milieux de culture

Les champignons ont un métabolisme secondaire dépendant des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement. Ainsi, leur profil métabolique peut fortement varier en fonction de la composition du milieu sur lequel ils sont mis en culture. L'approche « OSMAC » (One Strain-Many Compounds) consiste alors à cultiver une même souche fongique sur des milieux de culture différents afin de mieux appréhender les capacités métaboliques d'une souche(Bode *et al.*, 2002).

Les quatre souches de *P. ligerum* ont donc été cultivées sur cinq milieux de culture différents (Annexe II). Les extraits obtenus ont fait l'objet d'analyses HPLC-UV/DAD-MS/MS basse résolution. A titre d'exemple, la Figure III-100 présente les chromatogrammes LC-MS des extraits de la souche MMS747. En fonction du milieu de culture, les profils chromatographiques sont très différents et sont le reflet de variations quantitatives et qualitatives dela production métabolique. Par exemple, l'important pic chromatographique observé à un t_R d'environ 4 min sur milieux PDA, YES et MEA n'est pas retrouvé dans les extraits de cette souche cultivée sur milieu DCA et CYA.

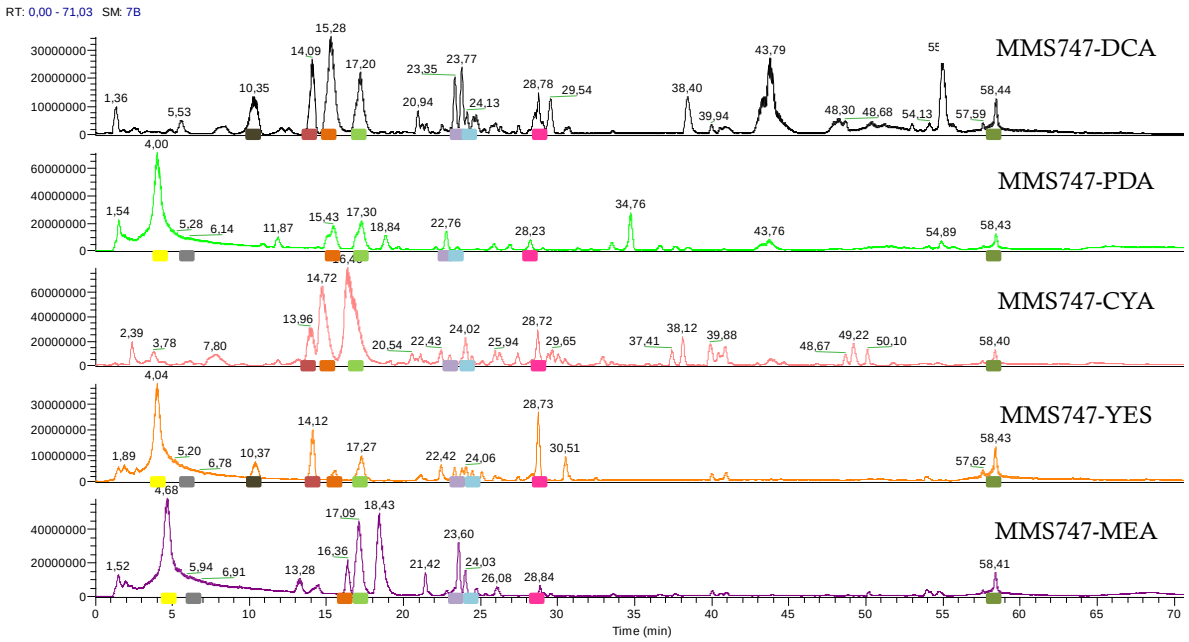


Figure III-100 : Chromatogrammes LC-MS basse résolution des extraits bruts de la souche MMS747 cultivée sur cinq milieux de culture différents. Les pics majoritaires communs à plusieurs extraits sont symbolisés par les pastilles de couleur

Les 20 extraits obtenus (4 souches cultivées sur 5 milieux) ont ensuite été dérépliquésafin d'avoir la vision la plus précise possible du métabolome secondaire de *P. ligerum*.

Les résultats de déréplication des cinq extraits de chaque souche sont présentés dans le Tableau III-24.

Remarque : Ces dernières analyses ayant été faîtes en spectrométrie de masse basse résolution, certaines molécules visualisables en MS haute résolution sont restés inobservables du fait de la moins grande sensibilité de l'appareil utilisé.

Tableau III-24 : Déréplication des quatre souches de *P. ligerum* cultivées sur cinq milieux différents

Souches fongiques / Métabolites	YES				CYA				DCA				MEA				PDA				Total
	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	20
Griseofulvine	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18
5',6'-Didéhydro-griséofulvine	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18
De or épidechlorogriseofulvine	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	14
Acide pénicillique	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	11
Nortryptoquivaline	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	10
Fiscaline A ou un isomère (t_R 19,5 min)	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	10
Fiscaline A ou un isomère (t_R 21,5 min)	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	10
Agroclavine	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	9
Festuclavine	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	9
Ligérine	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	9
6-o-succinyl-fumagillol	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	9
Fiscaline B	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	8
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	8
Fumagillol	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	8
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	6
7-chloro-fumagillol	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	6
Acide orsellinique	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	5
Tryptoquivalone	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	5
Fumagilline	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	5
7-chloro-fumagilline	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	5

Si l'ensemble des molécules dérépliquées ont été observé dans les extraits des souches MMS351 et MMS747 cultivées sur milieu YES, elles n'ont par contre été détectées que de manière sporadique dans les autres extraits. Le milieu YES est connu pour être un milieu riche et propice à la production d'une biomasse importante du fait de l'important apport carbonné (saccharose) qu'il confère.

Unepartie des molécules présentes sont communes aux extraits des quatre souches, c'est le cas notamment de l'acide pénicillique (retrouvé dans 11 des 20 extraits) mais également de la griséofulvine (retrouvée dans 18 des 20 extraits analysés) et de deux de ses analogues, à savoir la dé- ou épidéchlorogriséofulvine et la 5',6'-didéhydrogriséofulvine (retrouvées dans respectivement 14 et 18 des 20 extraits). La griséofulvine et la déchlorogriséofulvine sont des composés décrits chez *P. canescens*, espèce proche de *P. ligerum* puisqu'elles appartiennent toutes les deux à la section *Canescentia* du sous genre *Penicillium*(Nicoletti *et al.*, 2007). La griséofulvine est connue pour être produite par différentes espèces terrestres et marines de *Penicillium*, comme par exemple *P. aetiopicum, P. coprophilum, P. griseofulvum, P. dipodomyicola, P. persicinum*et *P. sclerotigenum* appartenant au sous-genre *Penicillium*(Oxford *et al.*, 1939; Clarke et McKenzie, 1967; Frisvad et Thrane, 1987; Frisvad et Filtenborg, 1989).

La nortryptoquivaline est observée au sein du métabolome de trois des quatre souches (MMS351, MMS388 et MMS747). Ce composé qui appartient à la famille des tryptoquivalines, est peu décrit dans la littérature. Les tryptoquivalines sont des alcaloïdes quinazolino-indoliques tripeptidiques formés à partir du tryptophane, de l'acide anthranilique et de la valine. La nortryptoquivaline a jusqu'alors uniquement été rapportée comme métabolite secondaire produit par les espèces *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus et Penicillium digitatum* (Buechi *et al.*, 1977; Fischer *et al.*, 2000; Ariza *et al.*, 2002). Les autres alcaloïdes quinazolino-indolique (fiscalines et tryptoquivalone) ne sont détectés que dans les extraits des souches MMS351 et MMS747. La littérature ne rapporte pas la production ni des fiscalines (A, B et C) ni de la tryptoquivalone par des micromycètes du genre *Penicillium*. Ces molécules ainsi que la plupart des composés de cette famille chimique sont essentiellement décrits chez les genres *Aspergillus* et *Neosartorya*. Leur observation dans cette étude constitue donc une première descriptiondans le métabolome de souches du genre *Penicillium*. Néanmoins, d'autres dérivés de la tryptoquivaline ont déjà été décrits chez des micromycètes du genre *Penicillium,* les tryptoquialanines A et Bpar exemple, produites par *P. aethiopicum et P. digitatum* appartenant au sous-genre*Penicillium*(Ariza *et al.*, 2002; Frisvad *et al.*, 2004).

Les deux clavines : l'agroclavine et la festuclavine sont également uniquement détectées dans le métabolome de ces deux souches MMS351 et MMS747. D'un point de vue structural, l'unique différence entre la festuclavine et l'agroclavine est la présence d'une double liaison en C8-C9 sur le squelette de cette dernière. La littérature indiqueque, même si elles ne sont pas produites par les mêmes genres fongiques, l'agroclavine et la festuclavine sont issues d'un même précurseur, le chanoclavine-I aldehyde, dernier intermédiaire commun dans la voie de biosynthèse menant aux différentes classes d'alcaloïdes de l'ergot (Coyle *et al.*, 2010). L'agroclavine, formée à partir du chanoclavine-I aldehyde par une réduction suivie d'une étape d'isomérisation, est le premier intermédiaire dans la biosynthèse de l'acide lysergique et de ses dérivés chez *Claviceps purpurea*. Une étude a clairement démontré que la conversion de la chanoclavine-I aldéhyde en agroclavine chez *C. purpurea* est catalysée par une oxydoréductase (OYE codée par le gène easG) en présence de NADPH (Matuschek *et al.*, 2011). En revanche, la conversion de la chanoclavine-I aldéhyde en festuclavine n'est pas observée chez les champignons du genre *Claviceps*. Les deux étapes de réduction, suivies par

une isomérisation, sont catalysées par une enzyme retrouvée chez *Aspergillus fumigatus*, codée par le gène FGAFS : la festuclavine est alors le précurseur de la famille des fumigaclavines (Wallwey *et al.*, 2010). Ainsi, nos résultats montrent que s'il est logique de retrouver de la festuclavine chez une souche du genre *Penicillium*, proche taxonomiquement du genre *Aspergillus*, en revanche il est surprenant d'observer la production d'agroclavine, métabolite qui n'est censé être produit que par les genres « clavicipiteux », c'est-à-dire proche des *Claviceps*. Cependant, ces alcaloïdes ont déjà été retrouvés au niveau d'ensilages contaminés par *P. carneum* et *P. roqueforti*(Nielsen *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2006) et ils seraient également produits par *P. sizovae*, *P. citrinum*, *P. commune* et *P. aurantiovirens*(Kozlovskii et Vepritskaia, 1987; Solov'eva *et al.*, 1995; Kozlovskii *et al.*, 2003).

Comme observé précédemment, la ligérine ainsi que ses analogues ne sont détectés qu'au sein du métabolome des souches MMS351 et MMS747. Parmi les composés de cette série chimique, la ligérine et son analogue non chloré, le 6-O-succinyl-fumagillol sont les plus fréquemment observés (dans 9 des 10 extraits des souches MMS351 et MMS747). Il faut noter que la fumagilline a été isolée pour la première fois d'*Aspergillus fumigatus* (Eble et Hanson, 1951).

Le Tableau III-25 donne la fréquence d'observation des différents composés annotés pour les quatre souches cultivées sur les cinq milieux de culture.

Tableau III-25 : Bilan du nombre d'extraits de chaque souche fongique de *P. ligerum* dans lesquels les métabolites identifiés par déréplication ont été détectés

Métabolites	Griseofulvine	5',6'-Didéhydro-griséofulvine	De or épidechlorogriseofulvine	Acide pénicillique	Nortryptoquivaline	Fiscaline A ou un isomère (tR 19,5 min)	Fiscaline A ou un isomère (tR 21,5 min)	Agroclavine	Festuclavine	Ligérine	6-o-succinyl-fumagillol	Fiscaline B	Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	Fumagillol	Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	7-chloro-fumagillol	Acide orsellinique	Tryptoquivalone	Fumagilline	7-chloro-fumagilline	RK-95113	7-chloro-RK-95113
351	3	3	1	4	4	5	5	4	4	5	5	3	3	4	1	3	2	1	3	3	1	1
747	5	5	3	3	5	5	5	5	5	4	4	5	5	4	5	3	3	4	2	2	1	1
388	5	5	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
399	5	5	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Métabolites fréquemment produits par les quatre souches fongiques

Métabolites caractéristiques du métabolome des souches MMS747 et 351

Métabolites caractéristiques du métabolome des souches MMS388 et 399

observé chez les *Penicillium*

observé chez les *Aspergillus*

observé chez *Aspergillus* et *Penicillium*

molécule naturelle nouvelle

Sur ce tableau, on peut voir apparaître plusieurs groupes de molécules :

- celles qui ont été visualisées au moins une fois dans l'ensemble des souches : ce sont principalement la griséofulvine et ses analogues ainsi que l'acide pénicillique. Ces quatre molécules comme définissant globalement l'espèce. On peut remarquer que ce sont des composés déjà observés dans d'autres *Penicillium*.

- une série de composés visualisés uniquement dans les souches MMS351 et MMS747 qui caractériseraient donc ce chimiotype. Néanmoins, si ces composés ne sont pas observés au sein des extraits des souches MMS388 et MMS399, cela pourrait être dû uniquement à la présence en très grande quantités de griséofulvine et de ses analogues. Dans cette série, on peut tout de même remarquer qu'un nombre abondant de molécules n'avaient jusqu'alors été observées que chez des *Aspergillus/Néosartorya* (genre voisin des *Penicillium*).

Cette nouvelle espèce se situerait donc au regard de son métabolome secondaire, à la frontière entre les *Penicillium* et les *Aspergillus*. Néanmoins, cette conclusion ne prend en compte que les pics annotés ce qui entraîne certainement un biais et peut-être des conclusions erronées. Un deuxième biais est aussi à noter : cette étude comparative n'étudie le métabolome secondaire qu'à un temps t de 11 jours de culture.

3.5. Activité cytotoxique des souches fongiques

Afin de terminer l'étude descriptive et comparative des quatre souches de *P. ligerum* et revenir à ce qui avait justifié l'étude de cette espèce, nous nous sommes intéressés au protentiel cytotoxique des extraits. Dans ce but, l'activité antiproliférative des extraits des quatre souches cultivées sur les cinq milieux de culture, a été évaluéesur les cellules tumorales POS-1 (ostéosarcome murin), AT6-1(carcinome protastatique murin) et KB (carcinome épidermoïde de l'oropharynx) et aussi sur la lignée cellulaire non tumorale L929 (fibroblastes murins). Les activités obtenues pour les extraits de *P. ligerum* ont ensuite été comparées avec celles d'un panel de huit souches de *Penicillium sp.*appartenant à différentes séries du sous-genre *Penicillium* ou du sous-genre *Aspergilloides* (Tableau III-26).

Tableau III-26 : Position taxonomique et origine des souches étudiées

Position taxonomique				Souche	Origine	
Genre	**Sous-genre**	**Série**	**Espèce**	**Référence**	**Echantillon**	**Localisation**
Penicillium	*Penicillium*	*Canescentia*	*antarcticum*	MMS163	moules	Estuaire de la Loire (Taraon)
		Penicillium	*marinum*	MMS266	moules	Côte Atlantique (La Baule)
		Fasciculata	*venetum*	MMS50	moules	Estuaire de la Loire (La Tara)
			polonicum	MMS231	moules	Côte Atlantique (La Baule)
		Brevicompacta	*bialowiezense*	MMS270	coques	Côte Atlantique (La Baule)
			brevicompactum	MMS404	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)
		Eladia	*restrictum*	MMS417	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)
	Aspergilloides	*Citrina*	*ubiquetum*	MMS330	moules	Estuaire de la Loire (Port Giraud)

Les résultats des activités cytotoxiques des 60 extraits obtenus sont présentés dans le Tableau III-27. Les extraits ont été testés à une concentration maximale de 1 µg/mL sur POS-1, AT6-1 et L929 pour rechercher une spécificité et à 100 µg/mL sur KB pour mettre en évidence une cytotoxicité globale.

Tableau III-27 : Activité cytotoxique d'extraits bruts de souches de *Penicillium* sp. cultivées sur 5 milieux différents sur les lignées cellulaires tumorales (POS-1, AT6-1 et KB) et saines (L929)

			POS-1 osteosarcome murin					**AT6-1** carcinome prostatique murin					**KB** carcinome épidermoïde de l'oropharynx humain					**L929** fibroblaste murin				
			CI_{50} (µg/mL)					**CI_{50} (µg/mL)**					**CI_{50} (µg/mL)**					**CI_{50} (µg/mL)**				
	Espèce	**Souche**	CYA	DCA	MEA	PDA	YES	CYA	DCA	MEA	PDA	YES	CYA	DCA	MEA	PDA	YES	CYA	DCA	MEA	PDA	YES
Nouvelle espèce	***P. ligerum***	MMS351	0,52	0,24	0,71	0,26	0,13	-	-	-	-	-	29	-	16	-	29	-	0,83	-	-	0,61
	P. ligerum	MMS388	-	-	0,50	-	0,39	-	-	-	-	-	6	13	4	3	4	-	0,88	-	0,70	0,97
	P. ligerum	MMS399	-	-	-	-	0,89	-	-	-	-	-	17	21	-	-	26	-	-	-	-	-
	P. ligerum	MMS747	0,12	0,55	-	-	0,45	0,53	-	-	-	-	12	-	8	15	26	0,45	0,89	-	-	-
Autres espèces	***P. antarcticum***	MMS163	-	-	0,32	-	0,76	-	-	0,35	-	-	-	-	9	-	17	-	-	0,32	-	0,92
	P. polonicum	MMS231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	24	-	20	-	-	-	-	-	-
	P. marinum	MMS266	-	0,24	0,32	0,23	-	-	0,75	0,75	0,61	-	-	21	15	27	-	-	0,48	0,42	0,35	-
	P. bialowiezense	MMS270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	0,75	0,71	0,71	0,79	0,79
	P. ubiquetum	MMS330	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	17	14	19	11	-	-	-	-	-
	P. brevicompactum	MMS404	0,91	-	-	-	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74	-	-	-	0,67
	P. restrictum	MMS417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	13	13	-	-	-	-	-	-
	P. venetum	MMS50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	25	-	-	-	-	-	-

CI_{50} < 0,3 µg/mL sur POS-1, AT6-1 et L929 et < 10 µg/mL sur KB

CI_{50} comprise entre 0,3 et 1 µg/mL

\- CI_{50} > 1 µg/mL pour les cellules POS-1, AT6-1 et L929 et > 30 µg/mL pour les cellules KB

Les résultats sont apparus très différents suivant les lignées cellulaires : parmi les 60 extraits testés, 57% ont présenté une activité cytotoxique sur la lignée KB, 32% sur la lignée L929, 30% sur la lignée POS-1 et seulement 8% sur la lignée AT6-1. De plus, certains extraits se sont montrés actifs sur une lignée et inactif sur les autres. Il faut souligner qu'aucun des milieux de culture ne semble induire une production accrue de composés cytotoxique par ces souches de *Penicillium.*

Les extraits des quatre souches de *P. ligerum* sont les seuls à avoir présenté une forte activité sélective envers la lignée POS-1 par rapport à la lignée saines L929. Parmi les extraits des huit autres souches évaluées seuls ceux de deux souches (MMS163et MMS266) se sont révélés être très actif sur POS-1 mais de manière non sélective puisque ces mêmes extraits sont aussi très actifs sur les autres lignées cellulaires.

Les extraits de la souche de *P. antarcticum* MMS163 cultivée sur milieu MEA et YES ont aussi montré une activité cytotoxique importante. Cette activité peut être en partie ou en totalité imputée à la patuline, mycotoxine réglementée décrite notamment pour être cytotoxique (Heussner *et al.*, 2006). En effet, cette mycotoxine a déjà été décrite comme produite par *P. antarcticum* (Vansteelandt *et al.*, 2012) et mise en évidence dans les extraits de cette souche (Geiger *et al.*, 2013).

Les extraits de la souche de *P. marinum* MMS266 cultivée sur milieu DCA, MEA et PDA présentent une activité cytotoxique importante non sélective observée pour les quatre types cellulaires (CI_{50} de 230 à 320 ng/mL sur les POS-1 pour les extraits DCA, MEA et PDA les plus actifs). Or, *P. marinum* est connu pour produire un certain nombre de métabolites secondaires cytotoxiques comme des alcaloïdes indoliques (communésines ou chaetoglobosines). Le métabolome de la souche MMS266 a été exploré mais n'a pas permis de mettre en évidence la présence de ces alcaloïdes (Geiger *et al.*, 2013). Cependant, des dérivés de pénostatines ont été identifiés, des composés déjà décrits chez *P. marinum* et présentant une activité cytotoxique sur diverses lignées cellulaires (Takahashi *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 1999). La présence de ces composés peut être responsable de l'activité observée pour les extraits de cette souche.

Les cinq extraits de la souche MMS351 ont présenté une activité sur les cellules POS-1. Avec la souche MMS747, la souche MMS351 est celle dont les extraits sont les plus actifs sur cette lignée cellulaire (CI_{50}< 300 ng/mL pour les extraits de la souche MMS747 cultivée sur milieu CYA et ceux de la souche MMS351 sur milieu DCA, PDA et YES). Sur la lignée KB, les résultats différent étonnament puisque les extraits de ces deux souches sont moins actifs que ceux de la souche MMS388 (CI_{50}< 10 µg/mL pour les extraits de la souche cultivée sur milieu CYA, MEA, PDA et YES). Peu d'activité cytotoxique est à noter sur les cellules de carcinome prostatique (AT6-1).

L'activité ciblée sur POS-1 permettant de mettre en évidence l'intérêt de l'étude de la nouvelle espèce de *P. ligerum*, nous avons voulu chercher s'il existait une corrélation entre les activités cytotoxiques des extraits des quatre souches de cette espèce et la présence ou l'absence des composés dérépliqués auparavant. Dans leTableau III-28, nous avons relevé cette présence/absence sous la forme de 1/0 et une activité notable (CI_{50}> 1 µg/mL sur POS-1, AT6-1 et L929 et une CI_{50}< 10 µg/mL pour KB) également représentée par 1/0. Pour chaque composé annoté et chaque lignée cellulaire, nous avons calculé les corrélations correspondantes. La seule lignée pour laquelle des corrélations fortes sont apparues (R>0,5) est la lignée POS-1. Le tableau final fait donc apparaître les composés dans l'ordre des conditions décroissantes pour cette lignée. Il apparaît que la plus forte corrélation (R=0,62) a été obtenu pour la ligérine et que les cinq composés annotés les plus fortement corrélés avec l'activité sont

tous des analogues de la ligérine. Ce résultat confirme l'intérêt de l'étude de cette molécule et de ses analogues comme dérivés antiprolifératifs contre les ostéosarcomes et montre l'intérêt de la déréplication associée à la recherche d'activité pour mettre en évidence les molécules à étudier en priorité dans un extrait. Néanmoins, nous n'avons ici considéré que les molécules annotées. Un travail identique soutenu par les outils bioinformatiques, devrait être réalisé sur l'ensemble des molécules observées même non identifiées et l'abondance des composés devraient être pris en compte. Ceci montre néanmoins que le protocole OSMAC préconisant l'étude d'une souche sur plusieurs milieux peut-être considérablement amélioré par l'étude en parallèle de plusieurs souches d'une même espèce sur plusieurs milieux, permettant de cumuler les données et de rendre les corrélations plus évidentes que si l'on considère qu'une seule souche à la fois.

Présence (1) ou absence (0) des composés au sein des extraits																				Corrélations entre un composé & l'activité de l'extrait	
Milieu de culture	YES				CYA				DCA				MEA				PDA				
Souches fongiques / Métabolites	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	351	388	399	747	POS-1 L929
Ligérine	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0,62 0,18
6-O-succinyl-fumagillol	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0,53 0,26
Fumagillol	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0,53 0,26
Fumagilline	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,52 0,3
7-chloro-fumagilline	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,52 0,3
Nortryptoquivaline	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,5 0,31
Fiscaline A ou un stéréoisomère (t_R 19,5 min)	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,5 0,1
Fiscaline A ou un stéréoisomère (t_R 21,5 min)	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,5 0,1
Agroclavine	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,41 0,18
Festuclavine	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,41 0,18
Acide pénicillique	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0,39 -0,39
7-chloro-fumagillol	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0,37 0,21
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0,33 0,04
Fiscaline B	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0,33 0,04
RK-95113	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3 0,1
7-chloro-RK-95113	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3 0,1
Tryptoquivalone	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0,29 0,3
Fiscaline C ou Epi-fiscaline C	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0,15 0,21
Acide orsellinique	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,06 0,06
Griséofulvine	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0,3 -0,1
5',6'-Didéhydro-griséofulvine	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0,3 -0,1
Dé ou épidéchlorogriséofulvine	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	-0,37 0,02
Présence (1) ou absence (0) d'activité des extraits																					
POS-1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
L929	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	

Tableau III-28 : Corrélations entre les activités cytotoxiques des extraits des quatre souches de *P. ligerum* et la présence ou l'absence des composés dérépliqués dans ces extraits (0 :absence, 1 : présence)

4. Conclusion générale de la partie III : Description de *Penicillium ligerum*

Pour cette étude, nous sommes partis de l'hypothèse émise par le Pr. Frisvad, spécialiste internationalement reconnu des champignons du genre Penicillium, que les quatre souches sur lesquelles nous avons travaillé, appartenaient toutes à une nouvelle espèce non encore décrite et que nous avons nommée *P. ligerum*.

Néanmoins, l'ensemble des résultats observés tant du point de vue de leur phénotype, génotype ou métabolome, nous ont montré que ces quatre souches pouvaient en fait être regroupées en deux taxons différents : le premier regroupant les souches MMS351 et MMS747 productrices de ligérine et le second les souches MMS388 et MMS399 non productrices de ce composés. Néanmoins, des points communs forts comme la production de griséofulvine rapprochent ces deux taxons.

Nous pouvons donc nous poser la question à laquelle nous ne pouvons directement pas répondre à l'issue de ce travail : s'agit-il de deux variétés d'une même nouvelle espèce ou de deux nouvelles espèces distinctes. La définition de la notion d'espèce au niveau fongique en général et des *Penicillium* en particulier reste relativement complexe et floue. Seule une discussion future menée avec les mycologues spécialistes de ce genre, au vue des résultats obtenus pourra donner une réponse à cette question.

Conclusion générale

La recherche de nouveaux médicaments est aujourd'hui développée par un nombre grandissant d'approches, dont deux principales restent la pharmacochimie des produits d'origine naturelle et la recherche de nouveaux produits naturels bioactifs. Ce sont ces deux méthodes que nous avons sollicitées dans ce travail autour d'un composé lead, la ligérine, sesquiterpène fongique à activité cytostatique sélective de lignées cellulaires d'ostéosarcomes.

Ainsi, la première approche visant la pharmacomodulation de la ligérine a permis le développement de six composés hémisynthétiques présentant tous une activité antiproliférative sur lignées d'ostéosarcome. Néanmoins, aucun des composés synthétisés n'a permis d'augmenter ni d'améliorer de façon significative l'activité de la ligérine. La ligérine restant alors le meilleur candidat thérapeutique, son évaluation pharmacologique a été approfondie et ce, en la comparant avec un composé de référence, le TNP-470. Les résultats *in vitro* comme *in vivo* ont permis de montrer que la ligérine présentait un indice de sélectivité supérieur à celui du TNP-470 sur lignées cellulaires humaines avec une toxicité moindre. De même, elle possède une activité supérieure à celle du TNP-470 sur un modèle*in vitro* d'ostéoclastogenèse, mettant en avant le potentiel de la ligérine dans l'inhibition de la différenciation ostéoclastique, sans effet cytotoxique. Cette dernière étude a ainsi révèlé un nouvel axe de développement de ces composés pour le traitement de pathologies osseuses ostéolytiques telle que l'ostéoporose.

Bien que moins actifs que la ligérine, les analogues hémisynthétiques développés ont permis, accompagnés des résultats comparants ligérine et TNP-470, d'une part de venir étayer le brevet françaispour déposer une demande PCT, et d'autre part de mieux appréhender les relations structure-activité des composés de cette série chimique.

Sur ce deuxième volet, les résultats se sont intéressés à l'impact sur l'activité antiproliférative de la présence d'un halogène en C7, originalité structurale de la ligérine. Une littérature très contradictoire résidait autour de la possibilité de moduler le substituant en C3, un spiro-époxyde étant le plus souvent présent et jouant un rôle clé dans l'interaction directe avec la MetAP2. Notre étude a permis d'éclaircir ce point indiquant tout d'abord que les chlorohydrines telles que la ligérine présentaient une activité *in vitro* équivalente à celle de leurs analogues époxydés. Ceci est apparu logique au vue des résultats de modélisation moléculaire par docking (jamais fait auparavant, ce type d'étude s'étant toujours focalisé sur les autres substituants) montrant que, comme pour la fumagilline, la formation d'un complexe ligérine-MetAP2 était tout à fait envisageable. En effetla présence d'un atome d'halogène ne perturbe aucunement la possibilité stérique de la réalisation d'une liaison covalente entre l'azote du cycle imidazole de l'His-231 et le méthylène en C7 de la ligérine. Enfin, une réponse finale à cette question a été apportée grâce à l'étude de stabilité de la ligérine qui a corroborée les résultats démontrés très récemment par Arrico Muendel et son équipe indiquant que les composés de type chlorohydrines perdaient rapidement leur chlore en milieu aqueux basique au profit de la formation d'un spiro-époxyde en C3(Arico-Muendel *et al.*, 2013). Selon ces données, les chlorohydrines sont donc des prodrogues et les résultats de leur évaluation *in vitro* doivent être attribués aux formes spiro-époxydes. Néanmoins, des questions subsistent sur le rôle effectif des halogènes en C7 dans l'activité des dérivés de la ligérine, que des investigations supplémentaires, en particulier sur les analogues bromés, pourraient permettre de résoudre.

Une deuxième approche dans la recherche de nouveaux médicaments, via l'investigation des ressources naturelles a aussi été sollicitée lors de ce travail de thèse. En effet, le métabolome de l'organisme producteur de ligérine, *Penicillium ligerum,* a pu être exploré selon deux stratégies complémentaires.

Une première méthode classique consiste en l'isolement des métabolites naturels produits par un organisme, leur caractérisationet leur évaluation biologique. Sept composés ont ainsi été isolés au cours de ce travail de thèse. Parmi eux, deux composés, le FD-838 et l'acide 3-O-méthyl-curvulinique, constituent une première description chez les micromycètes du genre *Penicillium*. Néanmoins, aucune molécule isolée n'était originale ou particulièrement cytotoxique. Ces résultats corroborent l'importance de développer de nouvelles techniques pour améliorer l'efficacité d'exploration du métabolome secondaire d'une espèce afin de cibler les isolements.

La spectrométrie de masse soutenue par des outils bioinformatiques permet aujourd'hui la déréplication rapide des métabolites connus au sein d'un mélange complexe, mettant alors à jour les composés potentiellement originaux. Néanmoins, les molécules sélectionnées, bien qu'ayant de fortes chances d'être de structure nouvelle, ne sont pas systématiquement de potentiels candidats pour un usage thérapeutique.

Afin d'augmenter les chances d'isolement de composés bioactifs, la recherche d'analogues d'un composé lead actif constitue une deuxième stratégie. Pour cela, on peut s'appuyer comme nous l'avons fait dans ce travail, sur l'étude de la fragmentation en spectrométrie de masse des composés d'une série chimique. Ainsi, l'établissement d'un modèle de fragmentation des composés de la série chimique de la ligérine, nous a permis de mettre en évidence de nombreux analogues dont certains sont originaux et dont les structures ont pu être proposées (7-chloro-fumagilline et 7-chloro-RK-95113) ou restent à caractériser. Ces composés à fort potentiel bioactif du fait de leur appartenance à une série chimique de molécules antiprolifératives, devront être isolés ou synthétisés, puis évalués pour leur activité inhibitrice de la prolifération des cellules d'ostéosarcomes.

Par ailleurs, le micromycète étudié constituant une nouvelle espèce fongique d'origine marine, l'étude de son métabolome était nécessaire afin de réaliser sa description. En effet, l'utilisation de la métabolomique et de la déréplication comme outils chimiotaxonomique se généralise aujourd'hui et complète les points de vue phénotypique et génotypique qui, classiquement, ont aussi été abordés pour cette description.

Ce travail pluridisciplinaire a donc sollicité aussi bien les stratégies de pharmacochimie que de mycochimie pour la recherche de composés antiprolifératifs sur lignées d'ostéosarcomes, mais aussi de mycologie pour la description d'une nouvelle espèce. Il illustre ainsi l'intérêt de l'étude des micromycètes isolés du milieu marin permettant de regrouper de nombreuses compétences. La mycothèque de l'équipe MMS comptant plus de 800 souches fongiques dont de nombreuses restant à décrire, constitue donc une mine presque inépuisable de travaux pour l'avenir.

Bibliographie

ABD-ELAAH G.A.,The occurrence of fungi along the Red Sea coast and variability among isolates of *Fusarium* as revealed by isozyme analysis. Journal of Basic Microbiology, 1998, **38**, 303-311.

AGARWAL S.K., SINGH S.S., VERMA S. ET KUMAR S.,Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. Journal of Ethnopharmacology, 2000, **72**, 43-46.

AMAGATA T., MINOURA K. ET NUMATA A.,Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a *Sargassum* alga. The Journal of antibiotics, 1998, **51**, 432-434.

ANDERSON P., KOPP L., ANDERSON N., CORNELIUS K., HERZOG C., HUGHES D. ET HUH W.,Novel bone cancer drugs: investigational agents and control paradigms for primary bone sarcomas (Ewing's sarcoma and osteosarcoma). Expert Opinion on Investigational Drugs, 2008,

ANDO O., SATAKE H., NAKAJIMA M., SATO A., NAKAMURA T., KINOSHITA T., FURUYA K. ET HANEISHI T.,Synerzaol, a new antifungal antibiotic. The Journal of antibiotics, 1991, **44**, 382-389.

ARFIN S.M., KENDALL R.L., HALL L., WEAVER L.H., STEWART A.E., MATTHEWS B.W. ET BRADSHAW R.A.,Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, **92**, 7714-7718.

ARICO-MUENDEL C.*, ET AL.*,Antiparasitic activities of novel, orally available fumagillin analogs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009a, **19**, 5128-5131.

ARICO-MUENDEL C.C.*, ET AL.*,Metabolites of PPI-2458, a selective, irreversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2: structure determination and *in vivo* activity. Drug Metabolism and Disposition, 2013, **41**, 814-826.

ARICO-MUENDEL C.C.*, ET AL.*,Carbamate Analogues of Fumagillin as Potent, Targeted Inhibitors of Methionine Aminopeptidase-2. Journal of Medicinal Chemistry, 2009b, **52**, 8047-8056.

ARISAWA C., KAGEYAMA Y., KAWAKAMI S. ET KIHARA K.,TNP-470 combined with nicardipine suppresses in vivo growth of PC-3, a human prostate cancer cell line. Urologic Oncology, 2002, **7**, 229-234.

ARIZA M.R., LARSEN T.O., PETERSEN B.O., DUUS J.O. ET BARRERO A.F.,*Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, **50**, 6361-6365.

ARRENBRECHT S. ET LAZARY S.,Effect of the immunosuppressive agent ovalicin on the kinetics of antibody formation. Agents and Actions, 1970, **1**, 221-226.

ARVANITIDOU M., KANELLOU K., KATSOUYANNOPOULOS V. ET TSAKRIS A.,Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators. Water Research, 2002, **36**, 5127-5131.

ASAHINA Y. ET NOGAMI H.,Lichen substances. CXVIII. Lichexanthone, a new product of a lichen. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1942, **17**, 202-207.

ASAMI Y., KAKEYA H., KOMI Y., KOJIMA S., NISHIKAWA K., BEEBE K., NECKERS L. ET OSADA H.,Azaspirene, a fungal product, inhibits angiogenesis by blocking Raf-1 activation. Cancer Science, 2008, **99**, 1853-1858.

ASAMI Y., KAKEYA H., OKADA G., TOI M. ET OSADA H.,RK-95113, a new angiogenesis inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. The Journal of antibiotics, 2006, **59**, 724-728.

ASAMI Y., KAKEYA H., ONOSE R., CHANG Y.-H., TOI M. ET OSADA H.,RK-805, an endothelial-cell-growth inhibitor produced by *Neosartorya sp*., and a docking model with methionine aminopeptidase-2. Tetrahedron, 2004, **60**, 7085–7091.

ASAMI Y., KAKEYA H., ONOSE R., YOSHIDA A., MATSUZAKI H. ET OSADA H.,Azaspirene: a novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya sp*. Organic Letters, 2002, **4**, 2845-2848.

BENNY O.*, ET AL.*,An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity. Nature Biotechnology, 2008, **26**, 799-807.

BENNY O.*, ET AL.*,Broad spectrum antiangiogenic treatment for ocular neovascular diseases. PLoS ONE, 2010a, **5**, e12515.

BENNY O., D'AMATO R. ET YOSHIMURA T.,Metap-2 inhibitor polymersomes for therapeutic administration. 2010b, Patent Children's Medical Center Corporation, PCT/US2008/068367, USA.

BENTON H.P., WANT E.J. ET EBBELS T.M.,Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics data. Bioinformatics, 2010, **26**, 2488-2489.

BERGERS G., JAVAHERIAN K., LO K.-M., FOLKMAN J. ET HANAHAN D.,Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science, 1999, **284**, 808-812.

BERNIER S.G., LAZARUS D.D., CLARK E., DOYLE B., LABENSKI M.T., THOMPSON C.D., WESTLIN W.F. ET HANNIG G.,A methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, for the treatment of rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**, 10768-10773.

BHADURY P., MOHAMMAD B.T. ET WRIGHT P.C.,The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, **33**, 325-337.

BHARGAVA P.*, ET AL.*,A Phase I and pharmacokinetic study of TNP-470 administered weekly to patients with advanced cancer. Clinical Cancer Research, 1999, **5**, 1989-1995.

BHATNAGAR I. ET KIM S.-K.,Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. Marine Drugs, 2010, **8**, 2673-2701.

BIELACK S.S.*, ET AL.*,Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. Journal of Clinical Oncology, 2002, **20**, 776-790.

BILLIAU A., EDY V.G., HEREMANS H., VAN D.J., DESMYTER J., GEORGIADES J.A. ET DE S.P.,Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1977, **12**, 11-15.

BLOCH P., TAMM C., BOLLINGER P., PETCHER T.J. ET WEBER H.P.,Pseurotin, a new metabolite of *Pseudeurotium ovalis* Stolk having an unusual hetero-spirocyclic system. (Preliminary communication). Helvetica Chimica Acta, 1976, **59**, 133-137.

BLUNT J.W., COPP B.R., MUNRO M.H.G., NORTHCOTE P.T. ET PRINSEP M.R.,Marine natural products. Natural Product Reports, 2011, **28**, 196-268.

BODE H.B., BETHE B., HOFS R. ET ZEECK A.,Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem, 2002, **3**, 619-627.

BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P., LARPENT J.P. ET VEAU P.,Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.Paris, 1990,512p.

BRIAN P.W., Biological activity of griseofulvin. Annals of botany, 1949, **13**, 59-77.

BRINGMANN G.*, ET AL.*,The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. Tetrahedron, 2005, **61**, 7252-7265.

BRINGMANN G., LANG G., MUEHLBACHER J., SCHAUMANN K., STEFFENS S., RYTIK P.G., HENTSCHEL U., MORSCHHAEUSER J. ET MUELLER W.E.G.,Sorbicillactone A: a structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus. Sponges (Porifers), 2003,231-253.

BRINGMANN G., LANG G., STEFFENS S. ET SCHAUMANN K.,Petrosifungins A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge-derived strain of *Penicillium brevicompactum*. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 311-315.

BROADBENT D., MABELIS R.P. ET SPENCER H.,3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone, an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. Phytochemistry, 1975, **14**, 2082-2083.

BROADHEAD M.L., CLARK J.C.M., MYERS D.E., DASS C.R. ET CHOONG P.F.M.,The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. Sarcoma, 2011,959248, 959212 pp.

BROWN A.G., SMALE T.C., KING T.J., HASENKAMP R. ET THOMPSON R.H.,Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, 1976,1165-1170.

BRUGGER E.-M., WAGNER J., SCHUMACHER D.M., KOCH K., PODLECH J., METZLER M. ET LEHMANN L.,Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. Toxicology Letters, 2006, **164**, 221-230.

BUCHALO A.S., NEVO E., WASSER S.P., OREN A. ET MOLITORIS H.P.,Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1998, **265**, 1461-1465.

BUECHI G., LUK K.C., KOBBE B. ET TOWNSEND J.M.,Four new mycotoxins of *Aspergillus clavatus* related to tryptoquivaline. Journal of Organic Chemistry, 1977, **42**, 244-246.

BUNGER J., WESTPHAL G., MONNICH A., HINNENDAHL B., HALLIER E. ET MULLER M.,Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology, 2004, **202**, 199-211.

CACHO R.A., CHOOI Y.-H., ZHOU H. ET TANG Y.,Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. ACS Chemical Biology, 2013, **8**, 2322-2330.

CANE D.E. ET BUCHWALD S.L.,Application of deuterium magnetic resonance to biosynthetic studies. 1. Biosynthesis of ovalicin. Journal of the American Chemical Society, 1977, **99**, 6132-6134.

CANE D.E. ET KING G.,The biosynthesis of ovalicin: Isolation of β-trans-bergamotene. Tetrahedron Letters, 1976, **17**, 4737-4740.

CANE D.E. ET LEVIN R.H.,Application of carbon-13 magnetic resonance to isoprenoid biosynthesis. II. Ovalicin and the use of doubly labeled mevalonate. Journal of the American Chemical Society, 1976, **98**, 1183-1188.

CAPON R.J., STEWART M., RATNAYAKE R., LACEY E. ET GILL J.H.,Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. Journal of Natural Products, 2007, **70**, 1746-1752.

CASTRONOVO V. ET BELOTTI D.,TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. European Journal of Cancer, 1996, **32A**, 2520-2527.

CHAI Y.-J., CUI C.-B., LI C.-W., WU C.-J., TIAN C.-K. ET HUA W.,Activation of the dormant secondary metabolite production by introducing gentamicin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. Marine Drugs, 2012, **10**, 559-582.

CHAI Y., CUI C., LI C. ET HUA W.,Antitumor metabolites newly produced by a gentamicin-resistant mutant of *Penicillium purpurogenum* G59. Guoji Yaoxue Yanjiu Zazhi, 2011, **38**, 216-222.

CHEN G., ZHU Y., WANG H.Z., WANG S.J. ET ZHANG R.Q.,The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomi*. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, **9**, 159-164.

CHEN L., FANG Y., ZHU T., GU Q. ET ZHU W.,Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. Journal of Natural Products, 2008, **71**, 66-70.

CHEN L., LIU W., HU X., HUANG K., WU J.-L. ET ZHANG Q.-Q.,Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2011, **59**, 515-517.

CHEN X., XIE S., BHAT S., KUMAR N., SHAPIRO T.A. ET LIU J.O.,Fumagillin and fumarranol interact with *P. falciparum* methionine aminopeptidase 2 and inhibit malaria parasite growth *in vitro* and *in vivo*. Chemistry & Biology, 2009, **16**, 193-202.

CHEN Z., ZHENG Z., HUANG H., SONG Y., ZHANG X., MA J., WANG B., ZHANG C. ET JU J.,Penicacids A-C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus *Penicillium sp.* SOF07. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, **22**, 3332-3335.

CHENG H., ZHANG L., LIU Y., CHEN S., CHENG H., LU X., ZHENG Z. ET ZHOU G.-C.,Design, synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, **45**, 5950-5957.

CHENG Y., HUANG L., LEE K., LI K. ET KUMTA S.,Alendronate regulates cell invasion and MMP-2 secretion in human osteosarcoma cell lines. Pediatric Blood & Cancer, 2004, **42**, 410-415.

CHESLER L.*, ET AL.*,Malignant progression and blockade of angiogenesis in a murine transgenic model of neuroblastoma. Cancer Research, 2007, **67**, 9435-9442.

CHOU A.J.*, ET AL.*,Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma. Cancer, 2009, **115**, 5339-5348.

CHU M., *ET AL.*,Isolation and structure elucidation of Sch 642305, a novel bacterial DNA primase inhibitor produced by *Penicillium verrucosum*. Journal of Natural Products, 2003, **66**, 1527-1530.

CLARKE S. ET MCKENZIE M.,*Penicillium sclerotigenum*: a new source of griseofulvin. 1967,

COREY E.J. ET SNIDER B.B.,Total synthesis of (+-)-fumagillin. Journal of the American Chemical Society, 1972, **94**, 2549-2550.

CORTES E.P., HOLLAND J.F., WANG J.J. ET SINKS L.F.,Doxorubicin in disseminated osteosarcoma. JAMA, 1972, **221**, 1132-1138.

COYLE C.M., CHENG J.Z., O'CONNOR S.E. ET PANACCIONE D.G.,An old yellow enzyme gene controls the branch point between *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea* ergot alkaloid pathways. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**, 3898-3903.

CUI C.-B., UBUKATA M., KAKEYA H., ONOSE R., OKADA G., TAKAHASHI I., ISONO K. ET OSADA H.,Acetophthalidin, a novel inhibitor of mammalian cell cycle, produced by a fungus isolated from a sea sediment. The Journal of antibiotics, 1996, **49**, 216-219.

DA SILVA M., PASSARINI M., BONUGLI R. ET SETTE L.,Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil : Isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. Environmental Technology, 2008, **29**, 1331-1339.

DAMARE S., RAGHUKUMAR C. ET RAGHUKUMAR S.,Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2006, **53**, 14-27.

DASENBROCK J. ET SIMPSON T.J.,Alternariol is not biosynthesized via norlichexanthone. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1987, **16**, 1235-1236.

DASS C.R. ET CHOONG P.F.,Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. Molecular Cancer Therapeutics, 2007, **6**, 3263-3270.

DATTA B.,Roles of P67/MetAP2 as a tumor suppressor. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, **1796**, 281-292.

DE MOURA SARQUIS M.I. ET DE OLIVEIRA P.C.,Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Basic Microbiology, 1996, **36**, 51-58.

DEWICK P.M.,Medicinal natural products: a biosynthetic approach.John Wiley & Sons, 2011,p.

DIESENHOUSE M.C., WILSON L.A., CORRENT G.F., VISVESVARA G.S., GROSSNIKLAUS H.E. ET BRYAN R.T.,Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with topical fumagillin. American Journal of Ophthalmology, 1993, **115**, 293-298.

DING B., YIN Y., ZHANG F. ET LI Z.,Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea sp.* in the South China Sea. Marine Biotechnology, 2011, **13**, 713-721.

DRAHL C., CRAVATT B.F. ET SORENSEN E.J.,Protein-reactive natural products. Angewandte Chemie International Edition, 2005, **44**, 5788-5809.

DUPONT J., MAGNIN S., MARTI A. ET BROUSSE M.,Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. International Journal of Food Microbiology, 1999 **49** 109-118.

EBADA S.S., *ET AL.*,Arthrinins A-D: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrinium sp.*Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, **19**, 4644-4651.

EBB D., *ET AL.*,Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: a report from the children's oncology group. Journal of Clinical Oncology, 2012, **30**, 2545-2551.

EBLE T.E. ET HANSON F.R.,Fumagillin, an antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. Antibiotics and Chemotherapy, 1951, **1**, 54-58.

EDER R. ET WIDMER C.,Derivatives of β-methylanthraquinone. III. Synthesis of "frangula" emodin. Helvetica Chimica Acta, 1923, **6**, 966-981.

EDRADA R.A., *ET AL.*,Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*. Journal of Natural Products, 2002, **65**, 1598-1604.

EGOROV M., LE BOT R., PETIT F., GROVEL O., POUCHUS Y.F. ET VANSTEELANDT M.,Preparation of fumagillol derivatives useful for the treatment or prevention of bone tumors. 2012, Patent FR 2973376 A1 20121005, Atlanthera, Fr.; Universite de Nantes .

ENDO A., KURODA M. ET TSUJITA Y.,ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinum*. The Journal of antibiotics, 1976, **29**, 1346-1348.

FANG S.-M., CUI C.-B., LI C.-W., WU C.-J., ZHANG Z.-J., LI L., HUANG X.-J. ET YE W.-C.,Purpurogemutantin and purpurogemutantidin, new drimenyl cyclohexenone derivatives produced by a mutant obtained by diethyl sulfate mutagenesis of a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. Marine Drugs, 2012, **10**, 1266-1287.

FARDIS M., PYUN H.-J., TARIO J., JIN H., KIM C.U., RUCKMAN J., LIN Y., GREEN L. ET HICKE B.,Design, synthesis and evaluation of a series of novel fumagillin analogues. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, **11**, 5051-5058.

FISCHER G., MULLER T., SCHWALBE R., OSTROWSKI R. ET DOTT W.,Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2000, **203**, 105-116.

FLEMING A.,The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology, 1929, **10**, 226-236.

FOGH J., FOGH J.M. ET ORFEO T.,One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. Journal of the National Cancer Institute, 1977a, **59**, 221-226.

FOGH J., WRIGHT W.C. ET LOVELESS J.D.,Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. Journal of the National Cancer Institute, 1977b, **58**, 209-214.

FOLKMAN J.,Tumor angiogenesis: therapeutic implications. The New England Journal of Medicine, 1971, **285**, 1182-1186.

FOLKMAN J.,Tumor Angiogenesis. 1974. Advances in Cancer Research,Volume 19. George Klein, S.W., Alexander, H. (Eds.). Academic Press, pp. 331-358.

FOLKMAN J., INGBER D., FUJITA T. ET KANAMARU T.,Fumagillin as angiostatic agent. 1989, Patent EP325199A2, Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan.

FOTIE J., NKENGFACK A.E., RUKUNGA G., TOLO F., PETER M.G., HEYDENREICH M. ET FOMUM Z.T.,In-vivo antimalarial activity of some oxygenated xanthones. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 2003, **97**, 683-688.

FRIEDMAN M.A. ET CARTER S.K.,The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. Journal of Surgical Oncology, 1972, **4**, 482-510.

FRISVAD J. ET THRANE U.,Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indexes and UV-VIS spectra (diode array detection). Journal of Chromatography A, 1987, **404**, 195-214.

FRISVAD J.C. ET FILTENBORG O.,Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia, 1989,837-861.

FRISVAD J.C., SMEDSGAARD J., LARSEN T.O. ET SAMSON R.A.,Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Studies in Mycology, 2004, **49,**, 201-242.

FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO. C.,Immunosuppressant manufacture by *Penicillium* species. 1986, Patent JP61257921A, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Japan.

GALAL A.M., GUL W., SLADE D., ROSS S.A., FENG S., HOLLINGSHEAD M.G., ALLEY M.C., KAUR G. ET ELSOHLY M.A.,Synthesis and evaluation of dihydroartemisinin and dihydroartemisitene acetal dimers showing anticancer and antiprotozoal activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, **17**, 741-751.

GAMBA-SANCHEZ D.,Fumagillin and structurally related molecules as source of new drugs. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2012, **9**, 126-142.

GAO S.-S., LI X.-M., DU F.-Y., LI C.-S., PROKSCH P. ET WANG B.-G.,Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. Marine Drugs, 2011a, **9**, 59-70.

GAO S.-S., LI X.-M., ZHANG Y., LI C.-S., CUI C.-M. ET WANG B.-G.,Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. Journal of Natural Products, 2011b, **74**, 256-261.

GARVEY M.J., AMBROSE P.G. ET ULMER J.L.,Topical fumagillin in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis in AIDS. Annals of Pharmacotherapy, 1995, **29**, 872-874.

GASPAR N.*, ET AL.*,Bone sarcomas: from biology to targeted therapies. Sarcoma, 2012, **2012**,

GAUTSCHI J.T., AMAGATA T., AMAGATA A., VALERIOTE F.A., MOOBERRY S.L. ET CREWS P.,Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: a chemical investigation of *Penicillium* obtained from deep water sediment. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 362-367.

GEIGER M.*, ET AL.*,Cytotoxicity and mycotoxin production of shellfish-derived *Penicillium spp*., a risk for shellfish consumers. Letters in Applied Microbiology, 2013, **57**, 385-392.

GERWICK W.H. ET MOORE B.S.,Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. Chemical Biology, 2012, **19**, 85-98.

GOSIO B. ET FERRATI E.,Contributo all'eziologia della pellagra; ricerche chimiche e batteriologiche sulle alterazioni del mais. . Giornale della R. Accademia di medicina di Torino, 1893, **61**, 484-487.

GRIFFITH E.C., SU Z., NIWAYAMA S., RAMSAY C.A., CHANG Y.-H. ET LIU J.O.,Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, **95**, 15183-15188.

GRIFFITH E.C., SU Z., TURK B.E., CHEN S., CHANG Y.-H., WU Z., BIEMANN K. ET LIU J.O.,Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. Chemistry & Biology, 1997, **4**, 461-471.

GRIGNANI G.*, ET AL.*,A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. Annals of Oncology, 2012, **23**, 508-516.

GUNDE-CIMERMAN N., CEROVAC S. ET ZALAR P.,Biodiversity of filamentous fungi in the saltpans Secovlje. Acta Biologica Slovenica, 2001,

HALÁSZ J., PODÁNYI B., VASVÁRI-DEBRECZY L., SZABÓ A., HAJDÚ F., BÖCSKEI Z., HEGEDŰS-VAJDA J., GYŐRBI´RÓ A. ET HERMECZ I.,Structure elucidation of fumagillin-related natural products. Tetrahedron, 2000, **56**, 10081-10085.

HAN C.K.*, ET AL.*,Design and synthesis of highly potent fumagillin analogues from homology modeling for a human MetAP-2. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, **10**, 39-43.

HANNIG G., BERNIER S.G., HOYT J.G., DOYLE B., CLARK E., KARP R.M., LORUSSO J. ET WESTLIN W.F.,Suppression of inflammation and structural damage in experimental arthritis through molecular targeted therapy with PPI-2458. Arthritis & Rheumatism, 2007, **56**, 850-860.

HANSON F.R. ET EBLE T.E.,An antiphage agent isolated from *Aspergillus sp*. Journal of Bacteriology, 1949, **58**, 527-529.

HANSON F.R., EBLE, THOMAS E.,Fumagillin and preparation. 1953, Patent UPJOHN CO, United States.

HASSAN S.E., BEKAREV M., KIM M.Y., LIN J., PIPERDI S., GORLICK R. ET GELLER D.S.,Cell surface receptor expression patterns in osteosarcoma. Cancer, 2012, **118**, 740-749.

HATANAKA H., KINO T., HASHIMOTO M., TSURUMI Y., KURODA A., TANAKA H., GOTO T. ET OKUHARA M.,FR65814, a novel immunosuppressant isolated from a *Penicillium* strain. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical and biological characteristics and structure assignment. The Journal of antibiotics, 1988, **41**, 999-1008.

HAWKSWORTH D.L.*, ET AL.*,The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. IMA Fungus - The global mycological journal, 2011, **2**, 105-112.

HAYASHI M., KIM Y.-P., TAKAMATSU S., PREEPRAME S., KOMIYA T., MASUMA R., TANAKA H., KOMIYAMA K. ET OMURA S.,Chlovalicin, a new cytocidal antibiotic produced by *Sporothrix* sp. FO-4649. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. The Journal of antibiotics, 1996, **49**, 631-634.

HAYASHI Y., SANKAR K., ISHIKAWA H., NOZAWA Y., MIZOUE K. ET KAKEYA H.,Total synthesis and determination of the absolute configuration of FD-838, a naturally occurring azaspirobicyclic product. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, **19**, 3863-3865.

HE J., *ET AL.*,Diastereomeric quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium janczewskii*. Journal of Natural Products, 2005, **68**, 1397-1399.

HEDRICK R.P., GROFF J.M., FOLEY P. ET MCDOWELL T.,Oral administration of fumagillin DCH protects chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha from experimentally-induced proliferative kidney disease. Diseases of Aquatic Organisms, 1988, **4**, 165-168.

HERBST R.S., *ET AL.*,Safety and pharmacokinetic effects of TNP-470, an angiogenesis inhibitor, combined with paclitaxel in patients with solid tumors: evidence for activity in non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology, 2002, **20**, 4440-4447.

HEUSSNER A.H., DIETRICH D.R. ET O'BRIEN E.,In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. Toxicology In Vitro, 2006, **20**, 332-341.

HOLKER J.S., O'BRIEN E. ET SIMPSON T.J.,The structures of some metabolites of *Penicillium diversum*: α- and β-diversonolic esters. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, 1983,1365-1368.

HONG C.I., KIM J.W., LEE S.J., AHN S.K., CHOI N.S., HONG R.K., CHUN H.S., MOON S.K. ET LEE H.W.,Preparation of 5-demethoxyfumagillol derivatives as angiogenesis inhibitors. 1999, Patent WO9959987A1, Chong Kun Dang Corporation, S., Korea.

HOU Y.-P., *ET AL.*,Synthesis and antitumor activity of 1,2,4-triazoles having 1,4-benzodioxan fragment as a novel class of potent methionine aminopeptidase type II inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, **19**, 5948-5954.

HOUBRAKEN J., FRISVAD J.C. ET SAMSON R.A.,Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. IMA Fungus: The Global Mycological Journal, 2011, **2**, 87.

HOUBRAKEN J. ET SAMSON R.A.,Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Studies in Mycology, 2011, **70**, 1-51.

HUA D.H., ZHAO H., BATTINA S.K., LOU K., JIMENEZ A.L., DESPER J., PERCHELLET E.M., PERCHELLET J.-P.H. ET CHIANG P.K.,Total syntheses of (±)-ovalicin, C4(S*)-isomer, and its C5-analogs and anti-trypanosomal activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, **16**, 5232-5246.

HUANG Q., LU G., SHEN H.-M., CHUNG M.C.M. ET ONG C.N.,Anti-cancer properties of anthraquinones from Rhubarb. Medicinal Research Reviews, 2007, **27**, 609-630.

HUANG Z., YANG J., SHE Z. ET LIN Y.,A new isoflavone from the mangrove endophytic fungus *Fusarium sp*. (ZZF60). Natural Product Research, 2012, **26**, 11-15.

HUNECK S., YOSHIMURA I. ET EDITORS,Identification of lichen substances.1996,650 pp. p.

HYDE K.D., JONES E.G., LEAÑO E., POINTING S.B., POONYTH A.D. ET VRIJMOED L.L.,Role of fungi in marine ecosystems. Biodiversity & Conservation, 1998, **7**, 1147-1161.

INDRIANI I.D.,Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites. 2009, No pp. p.

INGBER D., FUJITA T., KISHIMOTO S., SUDO K., KANAMARU T., BREM H. ET FOLKMAN J.,Synthetic analogs of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature, 1990, **348**, 555-557.

IWAMOTO C., MINOURA K., OKA T., OHTA T., HAGISHITA S. ET NUMATA A.,Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, penostatins A-E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga. Tetrahedron, 1999, **55**, 14353-14368.

JACOBSON R.A. ET ADAMS R.,Trihydroxymethylanthraquinones. III. Synthesis of emodin. Journal of the American Chemical Society, 1924, **46**, 1312-1316.

JAFFE N., FREI III E., TRAGGIS D. ET BISHOP Y.,Adjuvant methotrexate and citrovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma. The New England Journal of Medicine, 1974, **291**, 994-997.

JASMIN C., ALLOUCHE M., JUDE J.G., KLEIN B., THIERY J.P., PERDEREAU B., GONGORA R., GONGORA G. ET MAZABRAUD A.,An experimental model of osteosarcomas in rats. La semaine des hôpitaux : organe fondé par l'association d'enseignement médical des hôpitaux de Paris., 1982, **58**, 1684-1689.

JENSEN P.R. ET FENICAL W.,Fungi in marine environments. Fungal diversity, Hong Kong, 2002, **7**, 295-315.

JEONG B.-S., CHOI N.S., AHN S.K., BAE H., KIM H.S. ET KIM D.,Total synthesis and antiangiogenic activity of cyclopentane analogues of fumagillol. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, **15**, 3580-3583.

JIAO W., BLUNT J.W., COLE A.L.J. ET MUNRO M.H.G.,Fumagiringillin, a new fumagillin derivative from a strain of the fungus *Aspergillus fumigatus*. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 1434-1437.

JIMI E., SHIN M., FURUTA H., TADA Y. ET KUSUKAWA J.,The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (review). International Journal of Oncology, 2013, **42**, 803-809.

JONES E.,Are there more marine fungi to be described? Botanica Marina, 2011, **54**, 343-354.

JONES E.B.G., SAKAYAROJ J., SUETRONG S., SOMRITHIPOL S. ET PANG K.,Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. Fungal Diversity, 2009,

KAMAL A., AHMAD N., KHAN M.A. ET QURESHI I.H.,Biochemistry of microorganisms. I. Curvulin and curvulinic acid, metabolic products of *Curvalaria siddiquii*. Tetrahedron, 1962, **18**, 433-436.

KAMAL A., KHAN M.A. ET QURESHI A.A.,Biochemistry of microorganisms. II. Constitution of curvulin, curvulinic acid, and curvulol, metabolic products of *Curvularia siddiqui*. Tetrahedron, 1963, **19**, 111-115.

KAMIJO A., KOSHINO T., UESUGI M., NITTO H. ET SAITO T.,Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. Cancer Letters, 2002, **188**, 213-219.

KATZNELSON H. ET JAMIESON C.A.,Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. Science, 1952, **115**, 70-71.

KENFIELD D., HALLOCK Y., CLARDY J. ET STROBEL G.,Curvulin and o-methylcurvulinic acid: phytotoxic metabolites of *Drechslera indica* which cause necroses on purslane and spiny amaranth. Plant science, 1989, **60**, 123-127.

KERZAON I., POUCHUS Y.F., MONTEAU F., LE B.B., NOURRISSON M.-R., BIARD J.-F. ET GROVEL O.,Structural investigation and elucidation of new communesins from a marine-derived *Penicillium expansum* Link by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, **23**, 3928-3938.

KHAMTHONG N., RUKACHAISIRIKUL V., PHONGPAICHIT S., PREEDANON S. ET SAKAYAROJ J.,Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. Tetrahedron, 2012, **68**, 8245-8250.

KHUDYAKOVA Y.V., PIVKIN M., KUZNETSOVA T. ET SVETASHEV V.,Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. Microbiology, 2000, **69**, 608-611.

KILLOUGH J.H., MAGILL G.B. ET SMITH R.C.,The treatment of amebiasis with fumagillin. Science, 1952, **115**, 71-72.

KIM D., AHN S.K., BAE H., CHOI W.J. ET KIM H.S.,An asymmetric total synthesis of (-)-fumagillol. Tetrahedron Letters, 1997, **38**, 4437-4440.

KIM D., MIN J., AHN S.K., LEE H.W., CHOI N.S. ET MOON S.K.,5-demethoxyfumagillol, a potent angiogenesis inhibitor isolated from *Aspergillus fumigatus*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2004, **52**, 447-450.

KLEIN B., PALS S., MASSE R., LAFUMA J., MORIN M., BINART N., JASMIN J.R. ET JASMIN C.,Studies of bone and soft-tissue tumors induced in rats with radioactive cerium chloride. Internationnal Journal of Cancer, 1977, **20**, 112-119.

KLEINERMAN E.S., GANO J.B., JOHNSTON D.A., BENJAMIN R.S. ET JAFFE N.,Efficacy of liposomal muramyl tripeptide (CGP 19835A) in the treatment of relapsed osteosarcoma. American Journal of Clinical Oncology, 1995, **18**, 93-99.

KO J.-C., SU Y.-J., LIN S.-T., JHAN J.-Y., CIOU S.-C., CHENG C.-M. ET LIN Y.-W.,Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells. Biochemical Pharmacology, 2010, **79**, 655-664.

KOHLMEYER J.,Tropical Marine Fungi. Marine Ecology, 1984, **5**, 329-378.

KOHLMEYER J. ET KOHLMEYER E.,Marine mycology. The higher fungi.Academic Press, Inc., 1979,704p.

KOSHARSKYY B., SOLBAN N., CHANG S.K., RIZVI I., CHANG Y. ET HASAN T.,A mechanism-based combination therapy reduces local tumor growth and metastasis in an orthotopic model of prostate cancer. Cancer Research, 2006, **66**, 10953-10958.

KOSSUGA M.H.*, ET AL.*,Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012, **22**, 257-267.

KOZLOVSKII A., ZHELIFONOVA V., ADANIN V., ANTIPOVA T., OZERSKAYA S., KOCHKINA G. ET GRÄFE U.,The fungus *Penicillium citrinum* Thom 1910 VKM FW-800 isolated from ancient permafrost sediments as a producer of the ergot alkaloids agroclavine-1 and epoxyagroclavine-1. Microbiology, 2003, **72**, 723-727.

KOZLOVSKII A.G. ET VEPRITSKAIA I.G.,Effect of carbon sources on the biosynthesis of ergot alkaloids and the activity of carbon metabolism enzymes in Penicillium sizovae. Mikrobiologiia, 1987, **56**, 587-592.

KOZLOVSKII A.G., ZHELIFONOVA V.P. ET ANTIPOVA T.V.,Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, **49**, 1-10.

KOZLOVSKY A.G., ADANIN V.M., DAHSE H.M. ET GRAFE U.,Rugulosuvines A and B, diketopiperazine alkaloids of *Penicillium rugulosum* and *Penicillium piscarium* fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, 2001, **37**, 253-256.

KRUGER E.A. ET FIGG W.D.,TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000, **9**, 1383-1396.

KUBISTA B.*, ET AL.*,Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. Journal of Orthopaedic Research, 2006, **24**, 1145-1152.

KUBO T., SHIMOSE S., MATSUO T., TANAKA K., YASUNAGA Y., SAKAI A. ET OCHI M.,Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. Journal of Orthopaedic Research, 2006, **24**, 1138-1144.

KUBOKI H., TSUCHIDA T., WAKAZONO K., ISSHIKI K., KUMAGAI H. ET YOSHIOKA T.,Mer-f3, 12-hydroxy-ovalicin, produced by *Metarrhizium sp.* f3. The Journal of antibiotics, 1999, **52**, 590-593.

KUDELKA A.P., VERSCHRAEGEN C.F. ET LOYER E.,Complete remission of metastatic cervical cancer with the angiogenesis inhibitor TNP-470. The New England Journal of Medicine, 1998, **338**, 991-992.

KUHL C., TAUTENHAHN R., BÖTTCHER C., LARSON T.R. ET NEUMANN S.,CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. Analytical Chemistry, 2011, **84**, 283-289.

KUSAKA M., SUDO K., FUJITA T., MARUI S., ITOH F., INGBER D. ET FOLKMAN J.,Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to the fumagillin parent. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, **174**, 1070-1076.

KUSAKA M., SUDO K., MATSUTANI E., KOZAI Y., MARUI S., FUJITA T., INGBER D. ET FOLKMAN J.,cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). British Journal of Cancer, 1994, **69**, 212-216.

KWON J.-Y.*, ET AL.*,cis-fumagillin, a new methionine aminopeptidase (type 2) inhibitor produced by *Penicillium* sp. F2757. The Journal of antibiotics, 2000, **53**, 799-806.

LAATSCH H.,Antibase 2011: The Natural Compound Identifier.Wiley-Vch, 2011.

LEE H.W., CHO C.S., KANG S.K., YOO Y.S., SHIN J.S. ET AHN S.K.,Design, synthesis, and antiangiogenic effects of a series of potent novel fumagillin analogues. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, **55**, 1024-1029.

LEE D.-S., JANG J.-H., KO W., KIM K.-S., SOHN J.H., KANG M.-S., AHN J.S., KIM Y.-C. ET OH H., PTP1B inhibitory and anti-inflammatory effects of secondary metabolites isolated from the marine-derived fungus Penicillium sp. JF-55. Marine Drugs, 2013a, **11**, 1409-1426.

LEE D.-S., KO W., QUANG T.H., KIM K.-S., SOHN J.H., JANG J.-H., AHN J.S., KIM Y.-C. ET OH H.,Penicillinolide A: a new anti-inflammatory metabolite from the marine fungus *Penicillium sp*. SF-5292. Marine Drugs, 2013b, **11**, 4510-4526.

LI C.-S., AN C.-Y., LI X.-M., GAO S.-S., CUI C.-M., SUN H.-F. ET WANG B.-G.,Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. Journal of Natural Products, 2011a, **74**, 1331-1334.

LI D., CHEN L., ZHU T., KURTAN T., MANDI A., ZHAO Z., LI J. ET GU Q.,Chloctanspirones A and B, novel chlorinated polyketides with an unprecedented skeleton, from marine sediment derived fungus *Penicillium terrestre.*Tetrahedron, 2011b, **67**, 7913-7918.

LI J., LIU P., MAO H., WANGA A. ET ZHANG X.,Emodin sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis in vitro. Oncology Reports, 2009, **21**, 1605-1610.

LI S., WEI M., LI Z., SHE Z. ET LIN Y.,Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from Mangrove endophytic fungus *Penicillium sp*. (ZZF29). Yingyong Huaxue, 2012, **29**, 727-729.

LI X. ET CHANG Y.-H.,Amino-terminal protein processing in Saccharomyces cerevisiae is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, **92**, 12357-12361.

LI X., CHOI H.D., KANG J.S., LEE C.-O. ET SON B.W.,New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyyanuthone A and its hydro derivative from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. Journal of Natural Products, 2003, **66**, 1499-1500.

LIN H.-C., CHOOI Y.-H., DHINGRA S., XU W., CALVO A.M. ET TANG Y.,The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β-trans-bergamotene. Journal of the American Chemical Society, 2013, **135**, 4616-4619.

LINK M.P.*, ET AL.*,The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. The New England Journal of Medicine, 1986, **314**, 1600-1606.

LIPINSKI C.A., LOMBARDO F., DOMINY B.W. ET FEENEY P.J.,Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, **23**, 3-25.

LIU A., CHEN H., WEI W., YE S., LIAO W., GONG J., JIANG Z., WANG L. ET LIN S.,Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. Oncology Reports, 2011, **26**, 81-89.

LIU H.-B., GAO H., WANG N.-L., LIN H.-P., HONG K. ET YAO X.-S.,Cyclic dipeptide constituents from the mangrove fungus *Penicillium oxalicum*. Shenyang Yaoke Daxue Xuebao, 2007, **24**, 474-478.

LIU S., WIDOM J., KEMP C.W., CREWS C.M. ET CLARDY J.,Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. Science, 1998, **282**, 1324-1327.

LIU T., LI Z., WANG Y., ZHANG L., SONG J., TIAN L., PEI Y. ET HUA H.,Study on the secondary metabolites of marine-derived fungus *Penicillium sacculum.*Zhongguo Yaoxue Zazhi, 2012, **47**, 577-580.

LIU W., GU Q., ZHU W., CUI C. ET FAN G.,Dihydrotrichodimerol and tetrahydrotrichodimerol, two new bisorbicillinoids, from a marine-derived *Penicillium terrestre*. The Journal of antibiotics, 2005a, **58**, 621-624.

LIU W., GU Q., ZHU W., CUI C. ET FAN G.,Two new benzoquinone derivatives and two new bisorbicillinoids were isolated from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre.* The Journal of antibiotics, 2005b, **58**, 441-446.

LIU X., OU Y., CHEN S., LU X., CHENG H., JIA X., WANG D. ET ZHOU G.C.,Synthesis and inhibitory evaluation of cyclohexen-2-yl- and cyclohexyl-substituted phenols and quinones to endothelial cell and cancer cells. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, **45**, 2147-2153.

LOGOTHETIS C.J., WU K.K., FINN L.D., DALIANI D., FIGG W., GHADDAR H. ET GUTTERMAN J.U.,Phase I trial of the angiogenesis inhibitor TNP-470 for progressive androgen-independent prostate cancer. Clinical Cancer Research, 2001, **7**, 1198-1203.

LU J., CHONG C.R., HU X. ET LIU J.O.,Fumarranol, a rearranged fumagillin analogue that inhibits angiogenesis in vivo. Journal of Medicinal Chemistry, 2006, **49**, 5645-5648.

LU Z.*, ET AL.*,Cytotoxic polyphenols from the marine-derived Fungus *Penicillium expansum*. Journal of Natural Products, 2010, **73**, 911-914.

MA C., LI Y., NIU S.-B., ZHANG H., LIU X.-Z. ET CHE Y.-S.,N-Hydroxypyridones, phenylhydrazones, and a quinazolinone from Isaria farinosa. Journal of Natural Products, 2011a, **74**, 32-37.

MA G., MASUZAWA M., HAMADA Y., HARAGUCHI F., TAMAUCHI H., SAKURAI Y., FUJIMURA T. ET KATSUOKA K.,Treatment of murine angiosarcoma with etoposide, TNP-470 and prednisolone. Journal of Dermatological Science, 2000, **24**, 126-133.

MA H., LI D., GU Q. ET ZHU T.,Bioactive secondary metabolites produced by an Antarctic marine-derived fungus *Penicillium chrysogenum* PR4-1-3. Zhongguo Haiyang Yaowu, 2011b, **30**, 18-24.

MA L.-Y., LIU W.-Z., SHEN L., HUANG Y.-L., RONG X.-G., XU Y.-Y. ET GAO X.-D.,Spiroketals, isocoumarin, and indoleformic acid derivatives from saline soil-derived fungus *Penicillium raistrickii.*Tetrahedron, 2012, **68**, 2276-2282.

MAEDA H.,Polymer conjugated macromolecular drugs for tumor-specific targeting. In Site specific parmacotherapy. DOMB A.J. (Ed) John Wiley& Sons Ltd, 1994, pp. 95-116.

MAIYA S., GRUNDMANN A., LI X., LI S.-M. ET TURNER G.,Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. ChemBioChem, 2007, **8**, 1736-1743.

MALEWITZ E.C.,Leukopenia following fumagillin treatment for amebiasis: report of a case. Journal of the American Medical Association, 1953, **153**, 1446.

MANOJLOVIC N.T., SOLUJIC S., SUKDOLAK S. ET KRSTIC L.J.,Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus Xanthoria. Journal of the Serbian Chemical Society, 2000, **65**, 555-560.

MANOJLOVIC N.T., VASILJEVIC P.J., GRITSANAPAN W., SUPABPHOL R. ET MANOJLOVIC I.,Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. Biological Research, 2010, **43**, 169-176.

MARCOVE R.C., MIKÉ V., HAJEK J.V., LEVIN A.G. ET HUTTER R.V.,Osteogenic Sarcoma under the Age of Twenty-one : Areview of one hundred and forty-five operative cases. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1970, **52**, 411-423.

MARTINEZ-LUIS S., CHERIGO L., ARNOLD E., SPADAFORA C., GERWICK W.H. ET CUBILLA-RIOS L.,Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus sp.* strain F1544. Natural Product Communications, 2012, **7**, 165-168.

MARUI S., ITOH F., KOZAI Y., SUDO K. ET KISHIMOTO S.,Chemical modification of fumagillin. I. 6-O-acyl, 6-O-sulfonyl, 6-O-alkyl, and 6-O-(N-substituted-carbamoyl)fumagillols. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1992, **40**, 96-101.

MARUI S. ET KISHIMOTO S.,Chemical modification of fumagillin. II. 6-Amino-6-deoxyfumagillol and its derivatives. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1992, **40**, 575-579.

MARUI S., YAMAMOTO T., SUDO K., AKIMOTO H. ET KISHIMOTO S.,Chemical modification of fumagillin. III. Modification of the spiro-epoxide. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1995, **43**, 588-593.

MATALLAH-BOUTIBA A., RUIZ N., SALLENAVE-NAMONT C., GROVEL O., AMIARD J.-C., POUCHUS Y.F. ET BOUTIBA Z.,Screening for toxigenic marine-derived fungi in Algerian mussels and their immediate environment. Aquaculture, 2012, **342**, 75-79.

MATUSCHEK M., WALLWEY C., XIE X. ET LI S.-M.,New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: An agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. Organic & Biomolecular Chemistry, 2011, **9**, 4328-4335.

MCCORKINDALE N.J. ET SIME J.G.,Configuration of fumagillin. Proceedings of the Chemical Society, 1961,331.

MCCOWEN M.C., CALLENDER M.E. ET LAWLIS J.F.,Fumagillin (H-3), a New Antibiotic with Amebicidal Properties. Science, 1951, **113**, 202-203.

MEYERS P.A.*, ET AL.*,Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group. Journal of Clinical Oncology, 2008, **26**, 633-638.

MITA A., ET AL., Phase II study of docetaxel with or without plinabulin (NPI-2358) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Journal of clinical oncology, 2010, **28**, 7592.

MIZOUE K., OKAZAKI T., HANADA K., AMAMOTO T., YAMAGISHI M. ET OMURA S.,Physiologically active substance FD-838 and process for preparing the same. 1987, Patent Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Japan .

MOHR P. ET TAMM C.,Biosynthesis of pseurotin A. Tetrahedron, 1981,201-212.

MOLINA J.-M.*, ET AL.*,Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. AIDS, 1997, **11**, 1603-1610.

MOLINA J.-M.*, ET AL.*,Trial of oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection. AIDS, 2000, **14**, 1341-1348.

MOLINA J.-M.*, ET AL.*,Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. The New England Journal of Medicine, 2002, **346**, 1963-1969.

MOLNAR K., BASKA F. ET SZEKELY C.,Fumagillin, an efficacious drug against renal sphaerosporosis of the common carp *Cyprinus carpio*. Diseases of Aquatic Organisms, 1987, **2**, 187-190.

MONTASER R. ET LUESCH H.,Marine natural products: a new wave of drugs? Future Medicinal Chemistry, 2011, **3**, 1475-1489.

MOORE J.D., DEZUBE B.J., GILL P., ZHOU X.-J., ACOSTA E.P. ET SOMMADOSSI J.-P.,Phase I dose escalation pharmacokinetics of O-(chloroacetylcarbamoyl) fumagillol (TNP-470) and its metabolites in AIDS patients with Kaposi's sarcoma. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2000, **46**, 173-179.

MORI J., HAISA M., NAOMOTO Y., TAKAOKA M., KIMURA M., YAMATSUJI T., NOTOHARA K. ET TANAKA N.,Suppression of tumor growth and downregulation of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in tumor cells by angiogenesis inhibitor TNP-470. Japanese Journal of Cancer Research, 2000, **91**, 643-650.

MORITA T., SHINOHARA N. ET TOKUE A.,antitumor effect of a synthetic analog of fumagillin on murine renal carcinoma. British Journal of Urology, 1994, **74**, 416-421.

MURAYAMA T., KAWASOE Y., YAMASHITA Y., UENO Y., MINAMI S., YOKOUCHI M. ET KOMIYA S.,Efficacy of the third-generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. Anticancer Research, 2008, **28**, 2147-2154.

MUTANYATTA J., MATAPA B.G., SHUSHU D.D. ET ABEGAZ B.M.,Homoisoflavonoids and xanthones from the tubers of wild and in vitro regenerated Ledebouria graminifolia and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids. Phytochemistry, 2003, **62**, 797-804.

NAKAKITA Y., SHIMA S. ET SAKAI H.,Isolation of curvulic acid as an antimicrobial substance from *Penicillium janthinellum* C-268. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, **48**, 1899-1900.

NICOLETTI R., BUOMMINO E., FILIPPIS A., LOPEZ-GRESA M.P., MANZO E., CARELLA A., PETRAZZUOLO M. ET TUFANO M.A.,Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, **24**, 189-195.

NICOLETTI R., LOPEZ-GRESA M.P., MANZO E., CARELLA A. ET CIAVATTA M.L.,Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. Mycopathologia, 2007, **163**, 295-301.

NIELSEN K.F., MÅNSSON M., RANK C., FRISVAD J.C. ET LARSEN T.O.,Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. Journal of Natural Products, 2011, **74**, 2338-2348.

NIELSEN K.F. ET SMEDSGAARD J.,Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. Journal of Chromatography A, 2003, **1002**, 111-136.

NIELSEN K.F., SUMARAH M.W., FRISVAD J.C. ET MILLER J.D.,Production of Metabolites from the *Penicillium roqueforti* Complex. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, **54**, 3756-3763.

NIERMAN W.C.*, ET AL.*,Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus.*Nature, 2005, **438**, 1151-1156.

NISHIMURA Y., MURATA R. ET HIRAOKA M.,Combined effects of an angiogenesis inhibitor (TNP-470) and hyperthermia. British Journal of Cancer, 1996, **73**, 271-274.

NOZAWA K., UDAGAWA S., NAKAJIMA S. ET KAWAI K.,Studies on fungal products. Part 25. A dioxopiperazine derivative from *Penicillium megasporum.*Phytochemistry, 1989, **28**, 929-931.

NUMATA A.*, ET AL.*,Structures of cytotoxic substances and new quinazoline derivatives produced by a fungus from a saltwater fish. Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 1991, **33rd**, 723-730.

O'BRIEN M., NIELSEN K.F., O'KIELY P., FORRISTAL P.D., FULLER H.T. ET FRISVAD J.C.,Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, **54**, 9268-9276.

O'REILLY M.S., BREM H. ET FOLKMAN J.,Treatment of murine hemangioendotheliomas with the angiogenesis inhibitor AGM-1470. Journal of Pediatric Surgery, 1995, **30**, 325-329; discussion 329-330.

ORELLANA A. ET ROVIS T.,Towards the total synthesis of FD-838: modular enantioselective assembly of the core. Chemical Communications, 2008,730-732.

ORY B., HEYMANN M.-F., KAMIJO A., GOUIN F., HEYMANN D. ET REDINI F.,Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. Cancer, 2005, **104**, 2522-2529.

OTSUKA T., OHKAWA T., SHIBATA T., OKU T., OKUHARA M., TERANO H., KOHSAKA M. ET IMANAKA H.,A new potent angiogenesis inhibitor, FR-118487. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991, **1**, 163-168.

OTSUKA T., SHIBATA T., TSURUMI Y., TAKASE S., OKUHARA M., TERANO H., KOHSAKA M. ET IMANAKA H.,A new angiogenesis inhibitor, FR-111142. The Journal of antibiotics, 1992, **45**, 348-354.

OTTAVIANI G. ET JAFFE N.,The etiology of osteosarcoma. Cancer Treatment and Research, 2009, **152**, 15-32.

OXFORD A.E., RAISTRICK H. ET SIMONART P.,Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C17H17O6Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. Biochemical Journal, 1939, **33**, 240.

PARANGI S., O'REILLY M., CHRISTOFORI G., HOLMEGREN L., GROSFELD J., FOLKMAN J. ET HANAHAN D.,Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, **93**, 2002-2007.

PATEL S.J., LYNCH JR J.W., JOHNSON T., CARROLL R.R., SCHUMACHER C., SPANIER S. ET SCARBOROUGH M.,Dose-intense ifosfamide/doxorubicin/cisplatin based chemotherapy for osteosarcoma in adults. American Journal of Clinical Oncology, 2002, **25**, 489-495.

PERRON-SIERRA F.M., PIERRÉ A., BURBRIDGE M. ET GUILBAUD N.,Novel bicyclic oxazolone derivatives as anti-angiogenic agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, **12**, 1463-1466.

PETIT K.E., MONDEGUER F., ROQUEBERT M.F., BIARD J.F. ET POUCHUS Y.F.,Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods, 2004, **58**, 59-65.

PITT J.I.,The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.Academic Press inc., 1979,634p p.

PITT J.I.,A laboratory guide to common *Penicillium* species.Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988,p.

PITT J.I.,Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2002, **504**, 29-41.

PITT J.I., SAMSON R.A. ET FRISVAD J.C.,List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. **2000**. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification,Samson, R.A., Pitt (eds), J.I. (Eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. pp 9-49.

PIVKIN M.V., KHUDYAKOVA Y.V., SMETANINA O.F. ET KUZNETSOVA T.A.,*Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom. fungus strain as producer of shearinines. 2011, Patent Uchrezhdenie Rossiiskoi Akademii Nauk Tikhookeanskii Institut Bioorganicheskoi Khimii DVO RAN, Russia .

PLACIDI L., CRETTON-SCOTT E., DE S.G., RAHMANI R., PLACIDI M. ET SOMMADOSSI J.-P.,Disposition and metabolism of the angiogenic moderator O-(Chloroacetylcarbamoyl) fumagillol (TNP-470; AGM-1470) in human hepatocytes and tissue microsomes. Cancer Research, 1995, **55**, 3036-3042.

PRELLE A., SPADARO D., GARIBALDI A. ET GULLINO M.L.,A new method for detection of five Alternaria toxins in food matrices based on LC-APCI-MS. Food Chemistry, 2013, **140**, 161-167.

PYUN H.-J., FARDIS M., TARIO J., YANG C.Y., RUCKMAN J., HENNINGER D., JIN H. ET KIM C.U.,Investigation of novel fumagillin analogues as angiogenesis inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, **14**, 91-94.

QI J., SHAO C.-L., LI Z.-Y., GAN L.-S., FU X.-M., BIAN W.-T., ZHAO H.-Y. ET WANG C.-Y.,Isocoumarin derivatives and benzofurans from a sponge-derived Penicillium sp. fungus. Journal of Natural Products, 2013, **76**, 571-579.

RAISTRICK H., STICKINGS C.E. ET THOMAS R.,The biochemistry of micro.ovrddot.organisms. XC. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis.*Biochemical Journal, 1953, **55**, 421-433.

REES G., JOHNSON R. ET GARETH JONES E.,Lignicolous marine fungi from Danish sand dunes. Transactions of the British Mycological Society, 1979, **72**, 99-106.

REN H., GU Q. ET CUI C.,Anthraquinone derivatives produced by marine-derived *Penicillium flavidorsum* SHK1-27 and their antitumor activities. Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi, 2007, **17**, 148-154.

REN H., LIU R., CHEN L., ZHU T., ZHU W.M. ET GU Q.Q.,Two new hetero-spirocyclic γ-lactam derivatives from marine sediment-derived fungus *Aspergillus sydowi* D2-6. Archives of Pharmacal Research, 2010, **33**, 499-502.

RODESCHINI V., BOITEAU J.-G., VAN DE WEGHE P., TARNUS C. ET EUSTACHE J.,MetAP-2 Inhibitors based on the fumagillin structure. Side-chain modification and ring-substituted analogues. Journal of Organic Chemistry, 2004, **69**, 357-373.

RODESCHINI V., VAN DE WEGHE P., TARNUS C. ET EUSTACHE J.,A simple spiro epoxide as methionine aminopeptidase-2 inhibitor: synthetic problems and solutions. Tetrahedron Letters, 2005, **46**, 6691-6695.

ROSEN G.*, ET AL.*,Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. Cancer, 1982, **49**, 1221-1230.

SALLENAVE-NAMONT C., POUCHUS Y.F., ROBIOU D.P.T., LASSUS P. ET VERBIST J.F.,Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. Mycopathologia, 2000, **149**, 21-25.

SANDIFER R.M., BHATTACHARYA A.K. ET HARRIS T.M.,Acylation of multiple anions of poly-β-ketones by hydroxy- and alkoxybenzoates. Cyclization of the resultant tetraketones to benzophenones and xanthones. Journal of Organic Chemistry, 1981, **46**, 2260-2267.

SANFORD K.K., EARLE W.R. ET LIKELY G.D.,The growth in vitro of single isolated tissue cells. Journal of the National Cancer Institute, 1948, **9**, 229-246.

SANTESSON J.,Chemical studies on lichens. XII. A new lichen xanthone from *Lecanora reuteri*. Acta Chemica Scandinavica, 1968, **22**, 1698-1699.

SASAKI A., ALCALDE R.E., NISHIYAMA A., LIM D.D., MESE H., AKEDO H. ET MATSUMURA T.,Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. Cancer Research, 1998, **58**, 462-467.

SASAKI M., TSUDA M., SEKIGUCHI M., MIKAMI Y. ET KOBAYASHI J.I.,Perinadine A, a Novel Tetracyclic Alkaloid from Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. Organic Letters, 2005, **7**, 4261-4264.

SATCHI-FAINARO R. ET FOLKMAN J.,TNP-470 conjugates with HPMA copolymer as angiogenesis inhibitors. 2003, Patent Children's Medical Center Corporation, USA .

SATCHI-FAINARO R.*, ET AL.*,Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. Cancer Cell, 2005, **7**, 251-261.

SATCHI-FAINARO R., PUDER M., DAVIES J.W., TRAN H.T., SAMPSON D.A., GREENE A.K., CORFAS G. ET FOLKMAN J.,Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470. Nature Biotechnology, 2004, **10**, 255-261.

SCHINDEL L.,Treatment of amebiasis with fumagillin. Journal of the American Medical Association, 1954, **155**, 903-905.

SCHRADER T.J., CHERRY W., SOPER K. ET LANGLOIS I.,Further examination of the effects of nitrosylation on Alternaria alternata mycotoxin mutagenicity in vitro. Mutation Research - Genetic Toxicology and Evironnemental Mutagenesis, 2006, **606**, 61-71.

SEGAL E., PAN H., BENAYOUN L., KOPECKOVA P., SHAKED Y., KOPECEK J. ET SATCHI-FAINARO R.,Enhanced anti-tumor activity and safety profile of targeted nano-scaled HPMA copolymer-alendronate-TNP-470 conjugate in the treatment of bone malignances. Biomaterials, 2011, **32**, 4450-4463.

SEKIGUCHI J., KATAYAMA S. ET YAMADA Y.,6-Methyl-1,2,4-benzenetriol, a new intermediate in penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. Applied and Environmental Microbiology, 1987, **53**, 1531-1535.

SHANG Z., LI X.-M., LI C.-S. ET WANG B.-G.,Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus nigrospora sp. MA75 on various culture media. Chemistry & Biodiversity, 2012a, **9**, 1338-1348.

SHANG Z., LI X., MENG L., LI C., GAO S., HUANG C. ET WANG B.,Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012b, **30**, 305-314.

SHEN S., LI W. ET WANG J., A novel and other bioactive secondary metabolites from a marine fungus *Penicillium oxalicum* 0312F1.Natural Product Research, 2013, **27**, 2286-2291.

SHIGEMORI H., WAKURI S., YAZAWA K., NAKAMURA T., SASAKI T. ET KOBAYASHI J.,Fellutamides A and B, cytotoxic peptides from a marine fish-possessing fungus *Penicillium fellutanum*. Tetrahedron, 1991, **47**, 8529-8534.

SHIN S.J.*, ET AL.*,A Phase Ib pharmacokinetic study of the anti-angiogenic agent CKD-732 used in combination with capecitabine and oxaliplatin (XELOX) in metastatic colorectal cancer patients who progressed on irinotecan-based chemotherapy. Investigational New Drugs, 2012, **30**, 672-680.

SHIN S.J., JEUNG H.-C., AHN J.B., RHA S.Y., ROH J.K., PARK K.S., KIM D.-H., KIM C. ET CHUNG H.C.,A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of CKD-732, an antiangiogenic agent, in patients with refractory solid cancer. Investigational New Drugs, 2010, **28**, 650-658.

SIEMANN D.,Vascular targeting agents. Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside., 2002, **3**, 4-15.

SIGG H.P. ET WEBER H.P.,Isolation and structural elucidation of ovalicin. Helvetica Chimica Acta, 1968, **51**, 1395-1408.

SIMÕES M.F., PEREIRA L., SANTOS C. ET LIMA N.,Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. **2013**. Management of Microbial Resources in the Environment,Springer, pp. 91-117.

SIN N., MENG L., WANG M.Q.W., WEN J.J., BORNMANN W.G. ET CREWS C.M.,The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, **94**, 6099-6103.

SKOUBOE P., FRISVAD J.C., TAYLOR J.W., LAURITSEN D., BOYSEN M. ET ROSSEN L.,Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. Mycological Research, 1999, **103**, 873-881.

SMETANINA O.F., KALINOVSKY A.I., KHUDYAKOVA Y.V., PIVKIN M.V., DMITRENOK P.S., FEDOROV S.N., JI H., KWAK J.-Y. ET KUZNETSOVA T.A.,Indole Alkaloids Produced by a Marine Fungus Isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. Journal of Natural Products, 2007, **70**, 906-909.

SMETANINA O.F., YURCHENKO A.N., PIVKIN M.V., YURCHENKO E.A. ET AFIYATULLOV S.S.,Isochromene metabolite from the facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. Chemistry of Natural Compounds (Translation of Khimiya Prirodnykh Soedinenii), 2011, **47**, 118-119.

SMITH C.A., WANT E.J., O'MAILLE G., ABAGYAN R. ET SIUZDAK G.,XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. Analytical Chemistry, 2006, **78**, 779-787.

SMITH M.A., SEIBEL N.L., ALTEKRUSE S.F., RIES L.A., MELBERT D.L., O'LEARY M., SMITH F.O. ET REAMAN G.H.,Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. Journal of Clinical Oncology, 2010, **28**, 2625-2634.

SOHN J.H., LEE Y.-R., LEE D.-S., KIM Y.-C. ET OH H., PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *Penicillium spp*. and *Eurotium sp.*Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, **23**, 1206-1211.

SOLOV'EVA T., KUVICHKINA T., BASKUNOV B. ET KOZLOVSKII A.,Alkaloids from the fungus Penicillium aurantio-virens biourge and some aspects of their formation. Microbiology, 1995, **64**, 550-554.

SON B.W., JENSEN P.R., KAUFFMAN C.A. ET FENICAL W.,New cytotoxic epidithiodioxopiperazines related to verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. Natural Product Letters, 1999, **13**, 213-222.

SON K.H., KWON J.Y., JEONG H.W., KIM H.K. ET KIM C.J.,5-demethylovalicin, as a methionine aminopeptidase-2 inhibitor produced by *Chrysosporium*. . Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, **10**, 185-188.

SONG F.*, ET AL.*,Quinazolin-4-one coupled with pyrrolidin-2-iminium alkaloids from marine-derived fungus *Penicillium aurantiogriseum*. Marine Drugs, 2012, **10**, 1297-1306.

SONJAK S., FRISVAD J.C. ET GUNDE-CIMERMAN N.,*Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. Microbial Ecology, 2006, **52**, 207-216.

STADLER W.M., KUZEL T., SHAPIRO C., SOSMAN J., CLARK J. ET VOGELZANG N.J.,Multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in metastatic renal carcinoma. Journal of Clinical Oncology, 1999, **17**, 2541-2545.

STINSON E.E., WISE W.B., MOREAU R.A., JUREWICZ A.J. ET PFEFFER P.E.,Alternariol. Evidence for biosynthesis via norlichexanthone. Canadian Journal of Chemistry, 1986, **64**, 1590-1594.

STRANDER H., BAUER H.C., BROSJÖ O., FERNBERG J.O., KREICBERGS A., NILSONNE U., SILFVERSWÄRD C., SIGNOMKLAO T. ET SÖDERLUND V.,Long-term adjuvant interferon treatment of human osteosarcoma: a pilot study. Acta Oncologica, 1995, **34**, 877-880.

STRANDER H. ET EINHORN S.,Effect of human leukocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. International Journal of Cancer, 1977, **19**, 468-473.

SUBRAMANI R., KUMAR R., PRASAD P. ET AALBERSBERG W.,Cytotoxic and antimicrobial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium sp.*Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2013, **3**, 291-296.

SUN Y.-L., HE F., LIU K.-S., ZHANG X.-Y., BAO J., WANG Y.-F., NONG X.-H., XU X.-Y. ET QI S.-H.,Cytotoxic dihydrothiophene-condensed chromones from marine-derived fungus *Penicillium oxalicum.*Planta Medica, 2012, **78**, 1957-1961.

SUN Y., ZHAO Z., FENG Q., XU Q., LUE L., LIU J.-K., ZHANG L., WU B. ET LI Y.-Q.,Unusual spirodecane sesquiterpenes and a fumagillol analog from *Cordyceps ophioglossoides*. Helvetica Chimica Acta, 2013, **96**, 76-84.

SUNDHOLM E.G.,Chemical studies on lichens. Part 35. Carbon-13 NMR spectra of lichen xanthones. Temperature dependent collapse of long-range couplings to hydrogen-bonded hydroxyl protons. Acta Chemica Scandinavica, 1978, **B32**, 177-181.

TAKAHASHI C., NUMATA A., YAMADA T., MINOURA K., ENOMOTO S., KONISHI K., NAKAI M., MATSUDA C. ET NOMOTO K.,Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga. Tetrahedron Letters, 1996, **37**, 655-658.

TAKAMATSU S., KIM Y.-P., KOMIYA T., SUNAZUKA T., HAYASHI M., TANAKA H., KOMIYAMA K. ET OMURA S.,Chlovalicin, a new cytocidal antibiotic produced by *Sporothrix* sp. FO-4649. II. Physicochemical properties and structural elucidation. The Journal of antibiotics, 1996, **49**, 635-638.

TAKAMIYA Y., BREM H., OJEIFO J., MINETA T. ET MARTUZA R.L.,AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. Neurosurgery, 1994, **34**, 869-875; discussion 875.

TAKECHI A.,Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on vascular formation in pituitary tumors induced by estrogen in rats. Neurologia Medico-Chirurgica, 1994, **34**, 729-733.

TAKECHI A., UOZUMI T., KAWAMOTO K., ITO A., KURISU K. ET SUDO K.,Inhibitory effect of TNP-470, a new anti-angiogenic agent, on the estrogen induced rat pituitary tumors. Anticancer Research, 1994, **14**, 157-162.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. ET KUMAR S.,MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 2011, **28**, 2731-2739.

TARBELL D.S.*, ET AL.*,The chemistry of fumagillin. Journal of the American Chemical Society, 1961, **83**, 3096-l3013.

TAUTENHAHN R., BÖTTCHER C. ET NEUMANN S.,Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. BMC Bioinformatics, 2008, **9**, 504.

TEAM R.C., R: A language and environment for statistical computing. 2013, http://www.R-project.org/.

TEICHER B.A., DUPUIS N., KUSOMOTO T., ROBINSON M.F., LIU F., MENON K. ET COLEMAN C.N.,Antiangiogenic agents can increase tumor oxygenation and response to radiation therapy. Radiation Oncology Investigations, 1994, **2**, 269-276.

TOHME R., DARWICHE N. ET GALI-MUHTASIB H.,A journey under the sea: the quest for marine anti-cancer alkaloids. Molecules, 2011, **16**, 9665-9696.

TSUDA M., KASAI Y., KOMATSU K., SONE T., TANAKA M., MIKAMI Y. ET KOBAYASHI J.,Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. Organic Letters, 2004, **6**, 3087-3089.

TURNER J.R. ET TARBELL D.S.,The stereochemistry of fumagillin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1962, **48**, 733.

VACLAVIK L., VACLAVIKOVA M., BEGLEY T.H., KRYNITSKY A.J. ET RADER J.I.,Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, **61**, 4822-4830.

VANSTEELANDT M.,Métabolites fongiques d'origine marine : isolement et caractérisation de substances antiprolifératives de *Penicillium* spp. Université de Nantes Nantes 2011, 295 p. p.

VANSTEELANDT M.*, ET AL.*,Ligerin, an antiproliferative chlorinated sesquiterpenoid from a marine-derived *Penicillium*strain. . Journal of Natural Products, 2013, **76**, 297–301.

VANSTEELANDT M.*, ET AL.*,Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. Fungal Biology, 2012, **116**, 954-961.

WALLWEY C., MATUSCHEK M. ET LI S.-M.,Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. Archives of Microbiology, 2010, **192**, 127-134.

WANG F.W., HOU Z.M., WANG C.R., LI P. ET SHI D.H.,Bioactive metabolites from *Penicillium sp.,* an endophytic fungus residing in Hopea hainanensis. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, **24**, 2143-2147.

WANG J.*, ET AL.*,Identification, structural properties and chelating capacity of miltipolone as a broad-spectrum inhibitor to cancer cells. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, **46**, 1117-1121.

WANG J., LU Z., LIU P., WANG Y., LI J., HONG K. ET ZHU W.,Cytotoxic polyphenols from the fungus Penicillium expansum 091006 endogenous with the mangrove plant *Excoecaria agallocha.*Planta Medica, 2012a, **78**, 1861-1866.

WANG J.*, ET AL.*,Tumor suppression by a rationally designed reversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2. Cancer Research, 2003, **63**, 7861-7869.

WANG Y.-H.*, ET AL.*,Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma. Journal of Surgical Oncology, 2012b, **105**, 235-243.

WATANABE N., NISHIHARA Y., YAMAGUCHI T., KOITO A., MIYOSHI H., KAKEYA H. ET OSADA H.,Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of Vpr activity. FEBS Letters, 2006, **580**, 2598-2602.

WEIDLE U.H., KLOSTERMANN S., EGGLE D. ET KRUEGER A.,Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and its role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer. Cancer Genomics & Proteomics, 2010, **7**, 287-302.

WENKE J., ANKE H. ET STERNER O.,Pseurotin A and 8-O-demethylpseurotin A from Aspergillus fumigatus and their inhibitory activities on chitin synthase. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, **57**, 961-964.

WIEMANN P., GUO C.-J., PALMER J.M., SEKONYELA R., WANG C.C.C. ET KELLER N.P.,Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013,

WITTRANT Y., LAMOUREUX F., MORI K., RIET A., KAMIJO A., HEYMANN D. ET REDINI F.,RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells. International Journal of Oncology, 2006, **28**, 261-269.

XIN Z.H., ZHU W.M., GU Q.Q., FANG Y.C., DUAN L. ET CUI C.B.,A new cytotoxic compound from *Penicillium aurantiogriseum*, symbiotic or epiphytic fungus of sponge *Mycale plumose*. Chinese Chemical Letters, 2005, **16**, 1227-1229.

XU R., YE Y., ZHAO W. ET EDITORS,Introduction to Natural Products Chemistry.CRC Press, 2012,363p.

YAMADA T., IMAI E., NAKATUJI K., NUMATA A. ET TANAKA R.,Cephalimysin A, a potent cytotoxic metabolite from an *Aspergillus* species separated from a marine fish. Tetrahedron Letters, 2007, **48**, 6294-6296.

YAMADA T., KITADA H., KAJIMOTO T., NUMATA A. ET TANAKA R.,The relationship between the CD Cotton effect and the absolute configuration of FD-838 and its seven stereoisomers. Journal of Organic Chemistry, 2010, **75**, 4146-4153.

YAMAGUCHI J., TOYOSHIMA M., SHOJI M., KAKEYA H., OSADA H. ET HAYASHI Y.,Concise enantio- and diastereoselective total syntheses of fumagillol, RK-805, FR65814, ovalicin, and 5-demethylovalicin. Angewandte Chemie International Edition, 2006, **45**, 789-793.

YAMAMOTO T., SUDO K. ET FUJITA T.,Significant inhibition of endothelial cell growth in tumor vasculature by an angiogenesis inhibitor, TNP-470 (AGM-1470). Anticancer Research, 1994, **14**, 1-3.

YAMAOKA M., YAMAMOTO T., IKEYAMA S., SUDO K. ET FUJITA T.,Angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) potently inhibits the tumor growth of hormone-independent human breast and prostate carcinoma cell lines. Cancer Research, 1993, **53**, 5233-5236.

YAMASAKI K., TAGA T., HIRATA Y., YAWATA H., KAWANISHI Y., SEED B., TANIGUCHI T., HIRANO T. ET KISHIMOTO T.,Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) receptor. Science, 1988, **241**, 825-828.

YANASE T., TAMUA M., FUJITA K., KODAMA S. ET TANAKA K.,Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo. Cancer Research, 1993, **53**, 2566-2570.

YANG J.X., QIU S., SHE Z. ET LIN Y.,A new xanthone derivative from the marine fungus *Phomopsis sp*. (No. SK7RN3G1). Chemistry of Natural Compounds, 2013, **49**, 246-248.

YANO T., TANASE M., WATANABE A., SAWADA H., YAMADA Y., SHINO Y., NAKANO H. ET OHNISHI T.,Enhancement effect of an anti-angiogenic agent, TNP-470, on hyperthermia-induced growth suppression of human esophageal and gastric cancers transplantable to nude mice. Anticancer Research, 1995, **15**, 1355-1358.

YOGENDRARAJAH P., VAN P.C., DE M.B. ET DE S.S.,Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. Journal of Chromatography A, 2013, **1297**, 1-11.

YURCHENKO A.N., SMETANINA O.F., KALINOVSKII A.I., KIRICHUK N.N., YURCHENKO E.A. ET AFIYATULLOV S.S.,Biologically active metabolites of the facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. Chemistry of Natural Compounds, 2013, **48**, 996-998.

ZAHLER R. ET VATH J.F.,Preparation of fumagillol type compounds and use in treating obesity. 2013, Patent Zafgen, Inc., USA .

ZGODZINSKI W., WALLNER G. ET DABROWSKI A.,Angiogenesis inhibitors. New anticancer strategy. Polish Journal of Pharmacology, 1999, **51**, 455-462.

ZHANG L., LI D.-L., CHEN Y.-C., TAO M.-H. ET ZHANG W.-M.,Study on secondary metabolites of marine fungus *Penicillium sp.* FS60 from the South China Sea. Zhongyaocai, 2012, **35**, 1091-1094.

ZHANG P., NICHOLSON D.E., BUJNICKI J.M., SU X., BRENDLE J.J., FERDIG M., KYLE D.E., MILHOUS W.K. ET CHIANG P.K.,Angiogenesis inhibitors specific for methionine aminopeptidase 2 as drugs for malaria and leishmaniasis. Journal of Biomedical Science, 2002, **9**, 34-40.

Métabolites fongiques d'une nouvelle espèce de *Penicillium* marin : déréplication, isolement, caractérisation, hémisynthèse et évaluation pharmacologique sur ostéosarcomes

Résumé

Dans une précédente étude, la purification par biosuivi d'un extrait de *Penicillium ligerum*, une nouvelle espèce fongique d'origine marine, avait mené à l'isolement de la ligérine. Ce mérosesquiterpène chloré analogue de la fumagilline présente in vitro une activité antiproliférative sélective sur différentes lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains et murins et une activité antitumorale in vivo dans un modèle murin d'ostéosarcome. Dans ce contexte, le travail a porté sur la synthèse d'analogues de ligérine afin de trouver le meilleur candidat bioactif. Bien qu'aucun des analogues hémisynthétiques n'ait présenté une activité plus importante que la ligérine, les résultats ont permis une meilleure compréhension des relations structure-activité des composés de cette série chimique. L'évaluation pharmacologique de la ligérine a été poursuivie en comparaison avec le TNP-470, composé de référence et a montré la sélectivité supérieure de la ligérine sur lignées humaines avec une toxicité moindre. Parallèlement, afin de décrire la nouvelle espèce fongique productrice de ligérine, le phénotype, le génotype et le métabolome de quatre souches de *P. ligerum* ont été comparés. Différentes approches ont été sollicitées pour l'étude du métabolome: l'isolement et l'identification structurale de métabolites majoritaires et l'étude déréplicative par analyses LC-UV/DAD-HRMS/MS des empreintes métaboliques des quatre souches cultivées sur différents milieux. En utilisant, un modèle de fragmentation du noyau sesquiterpène, des analogues naturels de la ligérine ont aussi pu être recherchés permettant la mise en évidence de plusieurs nouveaux composés de cette série chimique.

Mots clés :micromycètes marins, ligérine, fumagilline, antiprolifératif, ostéosarcomes, hémisynthèse, déréplication, LC-HRMS/MS

Metabolites of a new species of marine-derived *Penicillium*: dereplication, isolation, structural characterization, semisynthesis and pharmacological evaluation against osteosarcoma

Summary

In a previous study, bioguided fractionation of an extract of a marine-derived strain belonging to the new species *Penicillium ligerum*, led to the isolation of ligerin. This chlorinated merosesquiterpene analog of fumagillin exhibited a specific antiproliferative activity against osteosarcoma cell lines and in vivo antitumor activity in a murine osteosarcoma model. In this context, the work first falls within a semisynthetic approach of ligerin analogs in order to develop the best anti-osteosarcoma candidate. Although none exhibits a higher activity than ligérine, the results allow a better understanding of the structure activity behaviour of compounds in this chemical series. Pharmacological investigation of ligerin was then performed in comparison to TNP-470, reference compound and underlined the better selectivity of ligerin against human cell lines with a low toxicity. At the same time, in order to describe the new species producer of ligerin, phenotype, genotype and metabolome of four strains belonging to *P. ligerum* were compared. Different approaches were used to study the metabolome: isolation and structural identification of some metabolites and LC-HRMS/MS investigation and dereplication of the metabolic fingerprints of the four strains. Using HRMS/MS modelization of the sesquiterpene core, natural analogs of ligerin were also searched, allowing the identification of several new compounds related to ligerin.

Keywords: marine derived fungi, ligerin, fumagillin, antiproliferative, osteosarcoma, semisynthesis, dereplication, LC-HRMS/MS

UNIVERSITE DE NANTES

UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE VENAM

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

Métabolites fongiques d'une nouvelle espèce de *Penicillium* marin : déréplication, isolement, caractérisation, hémisynthèse et évaluation pharmacologique sur ostéosarcomes

Volume II : Annexes

THESE DE DOCTORAT

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline Sciences pharmaceutiques

Spécialité Pharmacochimie des Substances Naturelles

présentée

et soutenue publiquement par

Elodie BLANCHET

Le8 juillet 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	**M. BOUSTIE Joël, Professeur, Université de Rennes I**
	M. FABRE Nicolas, Professeur, Université Paul Sabatier de Toulouse
Examinateurs	**M. BARBIER Georges, Professeur, Université de Bretagne occidentale**
	M. RICHOMME Pascal, Professeur, Université d'Angers
Directeur de thèse	**M. POUCHUS Y. F., Professeur, Université de Nantes**
Encadrants de thèse	**M. GROVEL O., Maître de conférences, Université de Nantes**
	M. LE BOT R., Président de la société Atlantic Bone Screen, Nantes

Sommaire

ANNEXE I : Tableau bibliographique des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins 1

ANNEXE II : Protocoles expérimentaux 13

1. Culture des souches fongiques 13
2. Extraction des cultures des souches fongiques 14
3. Méthodes analytiques pour l'étude des extraits bruts et des molécules pures 15
4. Evaluation de l'activité cytotoxique 20

ANNEXE III : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de l'émodine (351-N1).....25

1. Caractéristiques physico-chimiques 25
2. Spectres RMN 1D et 2D de l'émodine 26

ANNEXE IV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du FD-838 (351-N2).....31

1. Caractéristiques physico-chimiques 31
2. Spectres RMN 1D et 2D du FD-838 32

ANNEXE V : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de la norlichéxanthone (351-N3) 37

1. Caractéristiques physico-chimiques 37
2. Spectres RMN 1D et 2D de la norlichéxanthone 38

ANNEXE VI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN l'alternariol (351-N5).....43

1. Caractéristiques physico-chimiques 43
2. Spectres RMN 1D et 2D de l'alternariol 44

ANNEXE VII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du physcion (351-N6).....49

1. Caractéristiques physico-chimiques 49
2. Spectres RMN 1D et 2D du physcion 50

ANNEXE VIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique (351-N7) 55

1. Caractéristiques physico-chimiques 55
2. Spectres RMN 1D et 2D de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique 56

ANNEXE IX : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de la ligérine 61

1. Caractéristiques physico-chimiques 61
2. Spectres RMN 1D de la ligérine 62

ANNEXE X : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 6-O-succinyl-fumagillol.....65

1. Caractéristiques physico-chimiques 65
2. Spectres RMN 1D du 6-O-succinyl-fumagillol.....66

ANNEXE XI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du fumagillol 69

1. Caractéristiques physico-chimiques 69
2. Spectre RMN 1D du fumagillol.....70

ANNEXE XII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 7-chloro-fumagillol 71

1. Caractéristiques physico-chimiques 71
2. Spectres RMN 1D du 7-chloro-fumagillol.....72

ANNEXE XIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du TNP-470.....73

1. Caractéristiques physico-chimiques 73
2. Spectre RMN 1D du TNP-470.....74

ANNEXE XIV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 7-chloro-TNP-470.....75

1. Caractéristiques physico-chimiques 75
2. Spectre RMN 1D du 7-chloro-TNP-470.....76

ANNEXE XV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S1 77

1. Caractéristiques physico-chimiques 77
2. Spectres RMN 1D du composé S1.....78

ANNEXE XVI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S2.....81

1. Caractéristiques physico-chimiques 81
2. Spectres RMN 1D du composé S2.....82

ANNEXE XVII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S3.....85

1. Caractéristiques physico-chimiques 85
2. Spectres RMN 1D du composé S3.....86

ANNEXE XVIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S4 89

1. Caractéristiques physico-chimiques 89
2. Spectres RMN 1D du composé S4.....90

ANNEXE XIX : Alcaloïdes indoliques de la famille des tryptoquivalines.....93

ANNEXE XX : Publication relatant l'isolement de la ligerine 95

ANNEXE XXI : Publication ligérine et analogues : hémisynthèses et activités antiprolifératives sur ostéosarcomes 101

ANNEXE XXII : Brevet ligérine 109

Liste des Figures

Figure A 1 : Protocole d'extration des cultures fongiques 14
Figure A 2 : Réactions de métabolisation des sels de tetrazolium (A. MTT et B. XTT) 22
Figure A 3 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine 26
Figure A 4 : Spectre ^{13}C-RMN (APT, 500 MHz, CD_3OD) de l'émodine 27
Figure A 5 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine 28
Figure A 6 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine 29
Figure A 7 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine 30
Figure A 8 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838 32
Figure A 9 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838 32
Figure A 10 : Spectre COSY (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838 33
Figure A 11 : Spectre HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838 34
Figure A 12 : Spectre HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838 35
Figure A 13 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone 38
Figure A 14 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone 39
Figure A 15 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone 40
Figure A 16 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone 41
Figure A 17 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone 42
Figure A 18 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol 44
Figure A 19 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol 45
Figure A 20 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol 46
Figure A 21 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol 47
Figure A 22 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol 48
Figure A 23 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du physcion 50
Figure A 24 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) du physcion 50
Figure A 25 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) du physcion 51
Figure A 26 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) du physcion 52
Figure A 27 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) du physcion 53
Figure A 28 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-curvulinique 56
Figure A 29 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-curvulinique 56
Figure A 30 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique 57
Figure A 31 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique 58
Figure A 32 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique 59
Figure A 33 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) de la ligérine 62
Figure A 34 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) de la ligérine 63
Figure A 35 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 6-O-succinyl-fumagillol 66
Figure A 36 : Spectre RMN ^{13}C (APT, 500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 6-O-succinyl-fumagillol 67
Figure A 37 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du fumagillol 70
Figure A 38 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 7-chloro-fumagillol 72
Figure A 39 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 7-chloro-fumagillol 72
Figure A 40 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du TNP-470 74
Figure A 41 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S1 78
Figure A 42 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S1 79
Figure A 43 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S2 82

Figure A 44 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S2 83
Figure A 45 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S3 86
Figure A 46 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S3 87
Figure A 47 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S4 90
Figure A 48 : Spectre RMN 13C (500 MHz, cryoprobe, CDCl3) du composé S4 91

Liste des Tableaux

Tableau A 1 : Composition des 6 milieux solides utilisés pour la culture des souches fongiques (en g/L) ..13
Tableau A 2 : Paramètres d'analyse par spectrométrie de masse en mode perfusion 16
Tableau A 3 : Exemple de séquence analytique LC-UV/DAD-HRMS 18
Tableau A 4 : Gradient d'élution de la méthode de déréplication A 18
Tableau A 5 : Gradient d'élution de la méthode de déréplication B 19
Tableau A 6 : Alcaloïdes indoliques de la famille des tryptoquivalines 93

Liste des Abréviations

αD : pouvoir rotatoire
α-MEM : Minimum Essential Medium Eagle (Gibco®), milieu de culture cellulaire
δ: déplacement chimique
λ: longueur d'onde (en nm)
AcOEt : acétate d'éthyle
AcOH : acide acétique
AT6-1 : cellules de carcinome prostatique de rat
ATCC : American Type Culture Collection
BME : milieu de culture pour la lignée cellulaire (Basal Medium Eagle)
CCM : chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$: chloroforme deuthéré
CH_2Cl_2 : dichlorométhane
CI_{50} : concentration inhibitrice médiane
COSY : corrélations en RMN 2D entre des protons couplés de façon scalaire ($^2J_{HH}$, $^3J_{HH}$ protons portés par des carbones voisins) (COrrelation SpectrometrY)
CYA : Czapek Yeast Agar (concentré de czapek-extrait de levure-agar ; milieu de culture fongique)
DAD : détecteur à barrette d'iode (Diode Array Detector)
DCA : Dextrose - extrait de caséine - agar (milieu de culture fongique)
DMEM : milieu de culture pour les lignées cellulaires (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNP : Dictionnary of Natural Product, base de données de produits naturels
EtOH : éthanol
Et_2O : éther diéthylique
ESI : ionisation par électrospray (Electrospray Ionization)
HFF2 : cellules fibroblastique humaine (Human Foreskin Fibroblast)
HMBC : en RMN 2D intéraction longue distance ^1H-^{13}C ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ voire $^4J_{CH}$) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HPLC : chromatographie liquide à haute performance (high performance liquide chromatography)
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution (high resolution mass spectrometry)
HRMS/MS : spectrométrie de masse haute résolution avec fragmentation
HSQC : met en évidence en RMN 2D les interactions ^1H-^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IT : Trappe Ionique (Ionic trap)
KB : lignée cellulaire issues du carcinome oral humain
L929 : cellules fibroblastiques murines saines
LC : chromatographie liquide (Liquid Chromatography)
LCMS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
LPRO : Laboratoire de la Physiopathologie de la Résorption Osseuse
m/z : rapport masse sur charge d'un composé ionisé en MS
MEA : Malt Extract Agar (extrait de malt - agar ; milieu de culture fongique)
MeOH : Méthanol
MG-63 : cellules d'ostéosarcome humain
MS : spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MS/MS : MS^2
MS^n : fragmentation en spectrométrie de masse, avec n caractérisant le nombre de fois où le composé ciblé a été successivement fragmenté (fragmentations successives multi-étages)
MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
NOESY : en RMN 2D, interaction dipolaire (spatiale) entre deux protons (^1H-^1H) (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)
OSMAC : culture d'une souche fongique sur différent milieux (One Strain-Many Compounds)
OSRGa : cellules d'ostéosarcome murin
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)
PDA : Potato Dextrose Agar (Extrait de pomme de terre - agar ; milieu de culture)
POS-1 : cellules d'ostéosarcome murin
PPi : pyrophosphate endogène
QC : contrôle qualité (Quality Control)
RMN : résonnance magnétique nucléaire
rpm : tour par minute (round per minute)
RPMI : milieu de culture cellulaire (Roswell Park Memorial Institute medium)
SaOS2 : cellules d'ostéosarcome humain
SVF : sérum de veau fœtal
TFA : Acide trifluoroacétique
TOCSY : met en évidence des interactions entre protons appartenant à un même système de spins en RMN 2D (J_{HH})
TOF : temps de vol (Time Of Flying)
T_R : temps de rétention
v/v : volume pour volume
XTT : 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YES : milieu Yeast Extract Saccharose(milieu de culture fongique)

ANNEXE I : Tableau bibliographique des métabolites cytotoxiques de *Penicillium* marins

Tableau extrait du chapitre de livre :

MARIEKE VANSTEELANDT, CATHERINE ROULLIER, ELODIE BLANCHET, YANN GUITTON, YVES-FRANÇOIS POUCHUS, NICOLAS RUIZ AND OLIVIER GROVEL, Impact of marine-derived *Penicillium* species in the discovery of new potential antitumor drugs, p45-86, Chapitre 3 *in* KORNPROBST J.M. ET LABARRE S., Outstanding Marine Molecules and New Trends in Analytical

(MW)	Bioactivities		References	Producing fungi	Origin
	Observations	Conc. µM (Cell lines)			
(280.3)	95.6% inhib.	**10.7** (tsFT210)	Xin *et al.*, 2006	*P. aurantiogriseum* Sp19	sponge *Mycale plumose*
(252.3)	IC_{50}	**17.5** (A549); **19.8** (BEL-7402) >120 (A549)	Li C. S. *et al.*, 2011	*P. paneum* SD-44	deep-sea sedimer China Sea
			Ma *et al.*, 2011	*Isaria farinosa*	
(624.8)	IC_{50}	**9.92** (L1210); **16.0** (KB)	Tsuda *et al.*, 2004	*P. citrinum* N-059	red alga *Actinotric fragilis*
(456.6)	ED_{50}	**7.67** (P388)	Numata *et al.*, 1993	*P.* sp.	alga *Enteromorph intestinalis*
(508.7)	ED_{50}	**0.88** (P388)	Numata *et al.*, 1993	*P.* sp.	alga *Enteromorph intestinalis*
	ED_{50}	**20.4** (U-937); **22.4** (THP-1); **19.5** (NAMALWA); >39.3 (L-428); **15.9** (MOLT-3); **14.2** (SUP-B15)	Jadulco *et al.*, 2004	*P.* sp.	sponge *Axinella verrucosa*
	MIC disrupts microfilaments	**3.9** (LoVo); **8.8** (KB)	Ratnayake *et al.*, 2001	*unidentified fungus*	*Ficus microcarpa*
			Kerzaon *et al.*, 2009	*P. expansum* MMS42	marine sediment
(494.6)	ED_{50}	**22.8** (U-937); **26.5** (THP-1); **16.6** (NAMALWA); **17.3** (MOLT-3); **21.8** (SUP-B15)	Jadulco *et al.*, 2004	*P.* sp.	sponge *Axinella verrucosa*
(522.6)	ED_{50}	**25.1** (U-937); **31.0** (THP-1); **27.9** (NAMALWA); **18.9** (MOLT-3); **17.2** (SUP-B15)	Jadulco *et al.*, 2004	*P.* sp.	sponge *Axinella verrucosa*
(294.3)	92.7% inhib.	**10.2** (tsFT210)	Xin *et al.*, 2006	*P. auratiogriseum* Sp19	Sponge *Mycale plumose*
(433.5)	IC_{50}	**27.7** (HepG2); **50.7** (NCI-H460); **46.1** (HeLa); **11.5** (DU145); **25.4** (MDA-MB-231)	Shang *et al.*, 2012	*P. commune* SD-118	deep-sea sedimer
	arrests cell cycle G2/M		Du *et al.*, 2010	*P.* sp. F23-3	deep-ocean sedim
(735.9)	IC_{50}	**2.7** (A549); **6.7** (HL-60); **1.8** (BEL-7402); **2.9** (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009	*P.* sp. F23-3	deep-ocean sedim
	induces apoptosis	(HL-60)	Du *et al.*, 2010		
(531.6)	IC_{50}	**9.9** (A549); >50 (HL-60); **10.0**	Du *et al.*, 2009	*P.* sp. F23-2	deep-ocean sedim

68.3)	IC_{50}	**11.3** (HepG2)	Gao *et al.*, 2012	*P.* sp. ghq208	marine sed	
99.3)	IC_{50}	**28.4** (MCF7); 47.8 (A549)	Ma *et al.*, 2012	*P. raistrickii* JH-18	saline coas	
54.2)	IC_{50}	**13.2** (HepG2)	Gao *et al.*, 2012	*P.* sp. ghq208	marine sed	
	IC_{50}	**2.12** (95-D); **25.6** (HepG2)	Shao *et al.*, 2010	*P.* sp.	mangrove	
83.4)	cell viability **8.4**% **30.8**% **20.2**% **4.0**%	**26.1** (MDA-MB 231) **26.1** (DU-145) **26.1** (SKOV-3) **26.1** (HT-29)	He *et al.*, 2005	*P. janczewskii* KMPB H-TW5/869	surface wa	
09.6)	ED_{50}	**0.78** (P388)	Numata *et al.*, 1996	*P.* sp. OUPS-79	alga *Enterc intestinalis*	
09.6)	ED_{50}	**0.59** (P388)				
09.6)	ED_{50}	**0.98** (P388)				
11.7)	ED_{50}	**6.25** (P388)	Iwamoto *et al.*, 2001			
30.7)	ED_{50}	**3.96** (P388)				
30.7)	ED_{50}	**3.39** (P388)				
14.7)	ED_{50}	**3.69** (P388)				
30.7)	ED_{50}	**5.28** (P388)				
88.3)	IC_{50}	41.6 (MCF-7); **24.3** (HepG2); 34.7 (NCI-H460); 34.7 (Hela); **27.7** (DU145); **27.7** (MDA-MB-231)	Shang *et al.*, 2012	*P. commune* SD-118	deep-sea s	
	IC_{50} induction of autophagy	**22.9** (HepG2); >55.6 (L02) (HepG2)	Zhao *et al.*, 2012			
43.5)	IC_{50}	132 (K562)	Chai *et al.*, 2011	*P. purpurogenum* 2-5-3-1	mutants of sediment s *purpurogei*	
	IC_{50}	132 (K562)	Chai *et al.*, 2012	*P. purpurogenum* 5-1-4		
	EC_{50}	**1.19** (L-5178y)	Indriani, 2008	*P. polonicum*	sponge *Tet*	
			Xin *et al.*, 2005	*P. fructigenum*	sponge *My plumose*	

MW)	Bioactivities		References	Producing fungi	Ori
	Observations	Conc. µM (Cell lines)			
79.5)	IC_{50}	187 (tsFT210 random. cultured); **14.0** (tsFT210 synchron. cultured)	Cui *et al.*, 1996	*P. mononematosum*	marine sed
	MIC (cell cycle progression)	87.1 (tsFT210 random. cultured); **4.1** (tsFT210 synchron. cultured)			
79.5)	reverses multidrug resistance	(MCF-7/BCRP)	Rabindran *et al.*, 2000	*Aspergillus fumigatus*	
64.6)	IC_{50}	**19.6** (HepG2)	Ren and Yu, 2011	*P.* sp. WF-06	marine sed
19.5)	IC_{50}	**14.0** (A549); 33.6 (HL-60) ; **13.0** (BEL-7402) ; **21.2** (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009	*P.* sp. F23-2	deep-ocea
96.8)			Son *et al.*, 1999	*P.* sp. #CNC-350	green alga *Avrainville longicaulis*
	LD_{50}	**0.29** (HeLa)	Katagiri *et al.*, 1970	*Verticillium* sp. TM-759	basidiocarp *Coltricia ci*
64.8)	IC_{50}	**0.045** (HCT-116)	Son *et al.*, 1999	*P.* sp. #CNC-350	green alga *Avrainville longicaulis*
	IC_{50} (average)	**0.2** (four human breast tumor cell lines)	Zhang *et al.*, 2005	*Shiraia bambusicola*	bamboos p fungus
80.8)	IC_{50}	**0.044** (HCT-116)	Son *et al.*, 1999	*P.* sp. #CNC-350	green alga *Avrainville longicaulis*
30.7)	ED_{50}	**4.52** (P388)	Iwamoto *et al.*, 2001	*P.* sp. OUPS-79	alga *Enterc intestinalis*
97.4)	IC_{50}	**23.8** (A549); **13.03** (BEL-7402); **8.85** (P388); **0.76** (HL-60)	Lin, Z. J. *et al.*, 2008	*P.* sp. GQ-7	mangrove *Aegiceras corniculatu*
97.4)	IC_{50}	**16.3** (HL-60)	Lin, Z. J. *et al.*, 2008		
79.4)	IC_{50}	**3.20** (HL-60)	Lin, Z. J. *et al.*, 2008		
79.4)	IC_{50}	**7.65** (HL-60)	Lin, Z. J. *et al.*, 2008		

$_6$	(599.8)	INCC50 for EGF-induced malignant transformation 34% apoptotic cells	**13.0** (JB6 P+ Cl 41) 100 (HL-60)	Smetanina *et al.*, 2007	*P. janthinellum*	marine sediment
				Pivkin *et al.*, 2011	*P. simplicissimum*	marine sediment
$_2S_2$	(306.4)	IC_{50}	**0.058** (P388); 55 (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
$_3S$	(292.4)	IC_{50}	**3.4** (P388); >100 (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
$_2S_2$	(356.5)	IC_{50}	**0.11** (P388); >100 (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
		IC_{50}	**21.7** (MCF7); **27.4** (KB); **6.28** (NCI-H187); **28.2** (Vero)	Intaraudom *et al.*, 2013	*P.* sp. BCC16054	Poaceae
$_2S_2$	(354.4)	IC_{50}	**0.11** (P388); 58 (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
$_2S_2$	(320.4)	IC_{50}	**0.056** (P388); **2.6** (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
$_2S_2$	(326.4)	IC_{50}	**0.02** (P388); **6.4** (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
		IC_{50}	**0.83** (MCF7); **0.58** (KB); **0.33** (NCI-H187); **0.21** (Vero)	Intaraudom *et al.*, 2013	*P.* sp. BCC16054	Poaceae
		EC_{50}	**0.38** (*Tetrahymena pyriformis* = human respiratory epithelium-cell model)	Gräbsch *et al.*, 2006	purchased	
		IC_{50}	**0.3** (A549); **1.2** (Neuro2a); **0.6** (HepG2); **0.3** (L-929)	Bunger *et al.*, 2004	purchased	
		EC_{20}	**0.12** (SH-SY5Y)	Wenehed *et al.*, 2003	purchased	
		78% cell death with TNF-α (0.1 µg/mL)	**0.31** (LLC-PK1)	Zhou *et al.*, 2000	purchased	
		50% cell detachment	**0.31** (C3)	Jordan and Pedersen, 1986	purchased	
$_2S_4$	(390.5)	IC_{50}	**0.02** (P388); **2.1** (HMT G9a)	Sun, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. JMF034	deep-sea sedimen
$_8$	(571.7)	IC_{50}	**0.35** (P388)	Shigemori *et al.*, 1991	*P. fellutanum*	fish *Apogon endekataenia*
$_7$	(555.7)	IC_{50}	**0.18** (P388)	Shigemori *et al.*, 1991		
$_6$	(409.6)	ID_{50}	**0.15** (NS-1)	Canon *et al.*, 2017	*P. bilaiae* MST-	boat ramp

la	(MW)	Bioactivities		References	Producing fungi	Origin
		Observations	Conc. µM (Cell lines)			
D_3S_2	(380.5)	IC_{50}	**23.7** (Hep2); 44.7 (HepG2)	Li, C. Y. *et al.*, 2008	*P.* sp. N°2556	mangrove
V_3	(232.3)	IC_{50} 74% inhib	**11.2** (Hela) 43.0 (SW620)	Liu *et al.*, 2010	*P.* sp. CCTCC, No. M207142	marine sediment
V_4	(196.2)	IG_{50}	**8.5** (HL-60)	Liu *et al.*, 2012	*P. sacculum*	halophyte *Atriplex*
V_4	(248.3)	IC_{50}	**15.7** (P388); **5.3** (A549)	Liu *et al.*, 2005a	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment
D_3	(188.6)	IC_{50}	**6.7** (HL-60); 64.7 (MOLT-4); 56.5 (A549); 58.1 (BEL-7402)	Chen *et al.*, 2008		
V_4	(208.2)	IC_{50}	**10.5** (P388); **7.6** (A549)	Liu *et al.*, 2005a		
V_5	(304.3)	IC_{50}	**10.1** (A549) **12.2** (HepG2) **8.9** (HT29)	Chen *et al.*, 2007	*P. thomii*	mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza*
V_7	(336.3)	IC_{50}	**1.10** (mouse splenocyte T lymphocyte)	Chen *et al.*, 2012	*P.* sp. SOF07	marine sediment
V_4	(208.2)	IC_{50}	**10.7** (MDA-MB-435)	Gautschi *et al.*, 2004	*P. corylophilum* (2 strains)	deep-sea sediment
		average GI_{50}	**9.1** (NCI's 60 human tumor cell)	Wang *et al.*, 1997	*Podospora anserina*	mouse dung
V_4	(210.2)	IC_{50}	**17.1** (MDA-MB-435)	Gautschi *et al.*, 2004	*P. corylophilum* (2 strains)	deep-sea sediment
		average GI_{50}	**2.1** (NCI's 60 human tumor cell)	Wang *et al.*, 1997	*Podospora anserina*	mouse dung
V_7	(372.4)	IC_{50}	**27.7** (K-562)	Ren *et al.*, 2007	*P. flavidorsum* SHK1-27	marine sediment
D_7	(422.9)	IC_{50}	**9.2** (HL-60); 39.7 (A549)	Li, D. *et al.*, 2011	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment
V_5	(246.2)	LD_{99}	**0.10** (NS-1)	Li, D. *et al.*, 2011	*P. bilaiae* MST-MF667	boat ramp
V_8	(416.4)	IC_{50}	**26** (SW1990)	Gao *et al.*, 2011	*P. commune* QSD-17	marine sediment
V_9	(514.6)	IC_{50}	**1.7** (P388) ; **0.52** (A549)	Liu *et al.*, 2005a	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment

	(156.1)	ED_{50}	**1.28** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1999a	*P.* sp. OUPS-79	alga *Enteromorph intestinalis*
	(389.4)	promotes neurites outgrowth	**6.4-25.7** (SH-SY5Y)	Kakeya *et al.*, 1995	*P.* sp. BM1689-P	marine sediment
		arrests cell cycle at G0/G1	(SH-SY5Y)	Kakeya *et al.*, 1997		
		IC_{50}	**3.82** (BALL-1)	Nakai *et al.*, 2002	synthesis	
		IC_{50}	**3.9** (SH-SY5Y) **1.5** (Jurkat)	Nagumo *et al.*, 2004	synthesis	
		inhibits Hsp60				
	(238.2)	IC_{50}	**12.2** (MDA-MB-435)	Gautschi *et al.*, 2004	*P.* sp.	deep-sediment
	(376.4)	LC_{50}	**17.0** (A549)	Julianti *et al.*, 2013	*P.* sp.	marine sediment
	(156.1)	IC_{50}	**1.45** (A549)	Lin, Z. *et al.*, 2008	*P.* sp. JP-1	mangrove plant *Aegiceras corniculatum*
	(320.3)	IC_{50}	**0.32** (mouse splenocyte T lymphocyte)	Chen *et al.*, 2012	*P.* sp. SOF07	marine sediment
		not tested		Bringmann *et al.*, 2004	*P. brevicompactum*	sponge *Petrosia ficiformis*
	(384.1)	IC_{50}	**12.6** (K562)	Ren *et al.*, 2007	*P. flavidorsum* SHK1-27	marine sediment
		cell cycle arrest at G2/M	**5-50** (K562)	Ren and Liu, 2011	*P. oxalicum*	
	(424.4)	IC_{50}	**11.7** (A375); **22.6** (SW-620)	Sun, Y. L. *et al.*, 2012	SCSGAF 0023	gorgonian *Dichote gemmacea*
	(154.1)	ED_{50}	**0.39** (P388); **2.2** (BSY-1); **4.2** (MCF-7); **10.0** (HCC2998); **1.9** (NCI-H522); **3.7** (DMS114); **2.4** (OVCAR); **2.5** (MKN1)	Iwamoto *et al.*, 1999a	*P.* sp. OUPS-79	alga *Enteromorph intestinalis*
		ED_{90}	**1** (LLC-PK1)	Heussner *et al.*, 2006	*purchased*	
		induction of ROS lipid peroxidation down reg. ERK1/2 activation of p38 kinase	100 (HL-60) 100-200 (HL-60) 100 (HEK293) 30-50 (HEK293)	Liu, B. H. *et al.*, 2006	*purchased*	
		IC_{50}	**0.31** (MCF-7); **2.9** (A549); **2.5** (ACHN)	Yoo and Park, 1995	*P.* sp. 1649	soil, farm yard
		cytotoxicity	rat alveolar macrophages	Sorenson *et al.*, 1985	*purchased*	

a	(MW)	Bioactivities Observations	Conc. µM (Cell lines)	References	Producing fungi	Origin
	(154.1)	IC_{50}	**1.2** (pig lymphocytes)	Keblys *et al.*, 2004	*purchased*	
		IC_{50}	**0.45** (CHO); **0.07** (AWRF)	Stetina and Votava, 1986	*purchased*	
5	(280.3)	IC_{50}	**16.5** (A549); **21.1** (MCF7)	Ma *et al.*, 2012	*P. raistrickii* JH-18	saline coastal soil
5	(280.3)	IC_{50}	**18.4** (A549); **23.3** (MCF7)			
9	(398.4)	IC_{50}	**3.2** (A549); **7.6** (MCF7)			
7	(350.4)	IC_{50}	**2.46** (mouse splenocyte T lymphocyte)	Chen *et al.*, 2012	*P.* sp. SOF07	deep-sea sediment
1	(170.2)	IC_{50}	**7.8** (POS1); **29.4** (AT6-1); **12.9** (L929)	Vansteelandt *et al.*, 2013	*P.* SP MMS351	seawater
3	(344.5)	ED_{50}	**2.5** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1999a; Takahashi *et al.*, 1996a; Takahashi *et al.*, 1996b	*P.* sp. OUPS-79	alga *Enteromorpha intestinalis*
3	(344.5)	ED_{50}	**3.5** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1999a; Takahashi *et al.*, 1996a; Takahashi *et al.*, 1996b		
2	(326.5)	ED_{50}	**3.1** (P388); **6.1** (BSY-1); **4.9** (MCF-7) ; **6.1** (HCC2998); **7.7** (NCI-H522); **5.8** (DMS114); **7.4** (OVCAR-3); **5.2** (MKN1)	Iwamoto *et al.*, 1999a; Takahashi *et al.*, 1996a; Takahashi *et al.*, 1996b		
3	(344.5)	ED_{50}	**2.6** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1999a; Takahashi *et al.*, 1996b		
3	(344.5)	ED_{50}	**4.1** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1998		
5	(390.5)	ED_{50}	**1.3** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1996a		
5	(390.5)	ED_{50}	**2.0** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1998; Iwamoto *et al.*, 1999b		
3	(344.5)	ED_{50}	**3.5** (P388)	Iwamoto *et al.*, 1998		
4	(208.2)	ED_{50}	**0.8** (P388)	Amagata *et al.*, 1998	*P. waksmanii* OUPS-N133	brown alga *Sargassum ringoldianum*
				Kossuga *et al.*, 2012	*P. paxilli* Ma(G)K	sponge *Mycale angulosa*
5	(226.2)	ED_{50}	**6.2** (P388)	Amagata *et al.*, 1998	*P. waksmanii* OUPS-N133	brown alga *Sargassum ringoldianum*

(240.3)	ED_{50}	**5.4** (P388)	Amagata *et al.*, 1998	*P. waksmanii* OUPS-N133	brown alga *Sargassum ringoldianum*
(388.4)	IC_{50} DNA polym. α	**20**	Perpelescu *et al.*, 2002	*P.* sp. K036	shellfish *Mytilus coruscus*,
	IC_{50} DNA polym. β	**17**			
	IC_{50} DNA polym. γ	**25**			
(404.4)	IC_{50} DNA polym. α	**12**			
	IC_{50} DNA polym. β	90			
	IC_{50} DNA polym. γ	**18.5**			
	IC_{50} DNA polym. ε	50			
(292.3)	IC_{50}	**2.56** (HL-60)	Han *et al.*, 2009	*P.* sp. HK 13-8	mangrove plant *Rhizophora stylosa*
(638.6)	IC_{50}	**6.4** (HL60)	Li, N. *et al.*, 2012	*P.* sp. F11	deep-sea sediment
	IC_{50}	**16.6** (A549); **11.4** (SW-460); **15.8** (HL-60)	Tang *et al.*, 2012	*P.* sp. F11	deep-sea sediment
(417.4)	IC_{50}	**5.3** (L5178y); >24 (PC12); >24 (H9); >24 (HeLa S3)	Bringmann *et al.*, 2003; Bringmann *et al.*, 2005	*P. chrysogenum* DSM 16137	sponge *Ircinia fasciculata*
(398.4)	IC_{50}	33.3 (HL-60); **5.5** (MOLT-4); **23.5** (A549); 57.0 (BEL-7402)	Chen *et al.*, 2008	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment
(296.7)	IC_{50}	**6.1** (HL-60); **5.8** (MOLT-4); **18.3** (A549); 62.3 (BEL-7402)			
(262.3)	IC_{50}	**5.5** (HL-60); **5.6** (MOLT-4); **18.2** (A549); 57.3 (BEL-7402)			
(296.7)	IC_{50}	**5.3** (HL-60); **5.5** (MOLT-4); **14.3** (A549); 38.5 (BEL-7402)			
(262.3)	IC_{50}	54.7 (HL-60); **6.4** (MOLT-4); **9.6** (A549); 59.0 (BEL-7402)			
(296.7)	IC_{50}	55.0 (HL-60); 58.1 (MOLT-4); **13.8** (A549); 63.2 (BEL-7402)			
(296.7)	IC_{50}	**5.1** (HL-60); **6.5** (MOLT-4); **5.7** (A549); **6.0** (BEL-7402)			
(276.3)	IC_{50}	**6.3** (HL-60); **5.8** (MOLT-4); 33.8 (A549); 61.9 (BEL-7402)			
(516.6)	IC_{50}	>100 (P388); **16.7** (A549)	Liu *et al.*, 2005b	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment
(500.6)	IC_{50}	**8.8** (P388); **4.3** (A549)			
(496.5)	IC_{50}	**0.33** (P388); **4.7** (A549)	Liu *et al.*, 2005b	*P. terrestre* CCTCC M 204077	marine sediment
	IC_{50} of LPS-induced TNF-α	**1.2** (murine macrophages); **8.1** (human monocytes)	Warr *et al.*, 1996	*P. chrysogenum* V39673	not precised
(360.5)	ED_{50}	**21.5** (A549); **17.6** (SK-OV-3);	Li *et al.*, 2003	*P.* sp. #MFA 577	polymeric cord

ula	(MW)	Bioactivities		References	Producing fungi	Origin
		Observations	Conc. µM (Cell lines)			
O_4	(360.5)	IC_{50}	**1.48** (K562); **0.85** (HL-60)	Fang *et al.*, 2012	*P. purpurogenum* BD-1-6	mutant of marine-sediment strain *P. purpurogenum* G59
		IC_{50}	**0.83** (L-5178Y)	Sassa and Yoshikoshi, 1983	*Macrophoma* sp.	fruit rot of apple
O_4	(360.5)	IC_{50}	**0.93** (K562); **2.48** (HL-60); **16.6** (HeLa); 31.0 (BGC-823); **26.3** (MCF-7)	Fang *et al.*, 2012	*P. purpurogenum* BD-1-6	mutant of marine-sediment strain *P. purpurogenum* G59
O_6	(418.5)	IC_{50}	**13.4** (K562); **18.1** (HL-60); **18.9** (HeLa); 33.0 (BGC-823); **29.3** (MCF-7)	Fang *et al.*, 2012		
O_4	(444.6)	IC_{50}	**23.4** (HepG)	Sun *et al.*, 2006	*P.* sp.	marine environment
O_3	(442.7)	IC_{50}	**4.07** (P388)	Xin *et al.*, 2007	*P. stoloniferum* QY2-10	ascidian
O_4	(446.7)	IC_{50}	**23.3** (HepG)	Sun *et al.*, 2006	*P.* sp.	marine environment
O_3	(428.6)	ED_{50} inhibits DNA topoisomerase I	**20.0** (COLO-205) 233	Kuo *et al.*, 2005	*P. oxalicum*	not precised
		not tested		Zhang *et al.*, 2012	P. sp. F560	marine environment
O_2	(328.5)	ED_{50}	**14.4** (A549); **16.2** (SK-OV-3); **14.6** (SK-MEL-2); **18.1** (XF498); **18.6** (HCT15)	Li *et al.*, 2003	*P.* sp. #MFA 577	polymeric cord
O_4	(290.4)	IC_{50}	**0.073** (P388); **0.096** (A549); **0.065** (HL-60); **4.59** (BEL-7402)	Huang *et al.*, 2008	*P.* sp. BL27-2	sea mud
O_4	(424.6)	IC_{50}	**28.4** (MCF-7)	Li, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. MCCC3A00005	deep-sea sediment
O_5	(440.6)	IC_{50}	**7.44** (MCF-7); 32.5 (A549)	Li, Y. *et al.*, 2012	*P.* sp. MCCC3A00005	deep-sea sediment
O	(286.5)	IC_{50}	40.3 (A549); **28.2** (HL-60); >50 (BEL-7402); >50 (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009	*P.* sp. F23-2	deep-sea sediment

	IC_{50}	**9.3** (A549); **5.3** (HL-60); **11.7** (BEL-7402); **21.1** (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009
	IC_{50}	**15.1** (A549); **8.5** (HL-60); >50 (BEL-7402); **25.8** (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009
	IC_{50}	42.2 (A549); **17.8** (HL-60); **17.1** (BEL-7402); >50 (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009
	IC_{50}	**8.3** (A549); **1.1** (HL-60); 43.2 (BEL-7402); **4.7** (MOLT-4)	Du *et al.*, 2009
	ED_{50}	400 (Ehrlich carcinoma cells)	Yurchenko *et al.*, 2013
	IC_{50}	**8.71** (P388); **3.51** (A549); **7.75** (HL-60); **11.8** (BEL-7402)	Huang *et al.*, 2008
	IC_{50}	**15.7** (HL-60)	Lu *et al.*, 2010
	IC_{50}	**5.4** (HL-60); **1.9** (A549)	Lu *et al.*, 2010
	IC_{50}	**18.2** (HL-60)	Wang *et al.*, 2012
	IC_{50}	**20.8** (HL-60)	Wang *et al.*, 2012
	IC_{50}	**0.117** (POS1)	Vansteelandt *et al.*, 2013
	22% inhib.	**0.06-2.4** (OSRGa)	
	20% inhib.	**0.06-2.4** (AT6-1)	
	35% inhib.	**0.06-2.4** (L929)	
	IC_{50}	**19** (HeLa)	Motohashi *et al.*, 2009
	IC_{50}	**10.1** (P388); **8.81** (A549); **10.4** (HL-60); **5.7** (BEL-7402)	Huang *et al.*, 2008
	IC_{50}	**8.3** (HeLa)	Motohashi *et al.*, 2009
	ED_{50}	900 (Ehrlich carcinoma cells)	Yurchenko *et al.*, 2013
	IC_{50}	**18.6** (KB); 37.3 (KBv200)	Huang *et al.*, 2012

		P. sp. BL27-2	
		P. expansum 091006	
		P. SP MMS351	
		P. sp. SS080624SCf1	
		P. sp. BL27-2	
		P. sp. SS080624SCf1	
		P. citrinum	
		P. sp. ZH16	

ANNEXE II : Protocoles expérimentaux

1. Culture des souches fongiques

Les champignons ont un métabolisme secondaire dépendant des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement. Ainsi, leur profil métabolique peut varier fortement en fonction de la composition du milieu sur lequel ils sont mis en culture. Afin de mieux appréhender les capacités métaboliques d'un micromycète, les souches peuvent être cultivées sur six milieux solides semisynthétiques de composition différente (Tableau A 1). La méthodologie utilisée se nomme l'approche « OSMAC » (One Strain-Many Compounds,(Bode *et al.*, 2002)).

- ✓ **Protocole**

Les milieux de culture ont été préparés et répartis à raison de 50mL par erlenmeyer avant d'être stérilisés 20min à 120°C à l'autoclave. Après refroidissement et solidification du milieu, l'ensemencement du champignon a été effectué en conditions stériles, par dépôt de spores fongiques en trois points de la gélose. Les cultures fongiques ont été incubées à 27°C sous lumière naturelle pendant 11 jours.

Tableau A 1 : Composition des 6 milieux solides utilisés pour la culture des souches fongiques (en g/L)

		CYA	DCA	KMS	MEA	PDA	YES
		Czapek Yeast Agar	**Dextrose Casein Agar**	**Kohlmeyer Solid Medium**	**Malt Extract Agar**	**Potato Dextrose Agar**	**Yeast Sucrose Agar**
Sources minéraux (g/L)	**$CuSO_4$, $5H_2O$**	0,005	-	-	0,005	0,005	0,005
	$FeSO_4$, $7H_2O$	0,01	-	-	-	-	-
	$MgSO_4$, $7H_2O$	0,5	-	2,4	-	-	0.5
	$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,01	-	-	0,01	0,01	0,01
	KCl	0,5	-	-	-	-	-
	K_2HPO_4	1	-	-	-	-	-
	$NaNO_3$	3	-	-	-	-	-
	NH_4NO_3	-	-	2,4	-	-	-
	Tris buffer (R-NH2)	-	-	1,21	-	-	-
Sources azote-protéines (g/L)	**Peptone**	-	-	-	1	-	-
	Digestion enzymatique de caséine	-	10	-	-	-	-
	Extrait de levure	5	-	-	-	-	20
	Extrait de malt	-	-	-	20	-	-
	Extrait de pomme de terre	-	-	-	-	4	-
Sources carbone (g/L)	**Glucose**	-	40	5	20	20	-
	Saccharose	30	-	-	-	-	150
Agent gélifiant (g/L)	**Agar**	15	15	20	20	15	20
Eau de mer reconstituée	**Coral Reef (g/L)**	33	33	33	33	33	33
	Eau distillée (L)	1	1	1	1	1	1

2. Extraction des cultures des souches fongiques

L'extraction a été effectuée par deux techniques appliquées successivement : une sonication et une macération.

- ✓ **Protocole**

Après 11 jours de culture, les souches fongiques ont été extraites par de l'Acétate d'éthyle ou un mélange CH_2Cl_2/AcOEt 50:50 (v/v) (100mL par erlenmeyer). Après macération pendant 1h, l'ensemble (gélose+mycélium+solvant) a été découpé finement à l'aide d'un scalpel et le tout a été soumis à l'action des ultrasons pendant 30 minutes avant d'être mis sous agitation pendant 1 heure.

L'extrait a ensuite été filtré sur filtre papier à l'aide d'un Büchner afin d'éliminer les morceaux de gélose et mycélium. Une deuxième filtration sur filtre papier plissé a été réalisée avant de sécher la phase organique sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4anh). Après élimination du Na_2SO_4anh, l'extrait a été filtré sur membrane de cellulose régénérée (porosité 0,45 µm, SartoriusStedimBiotech, Goettingen, Germany) afin d'éliminer tout débris de spores. Le solvant a ensuite été évaporé jusqu'à siccité de l'extrait brut.

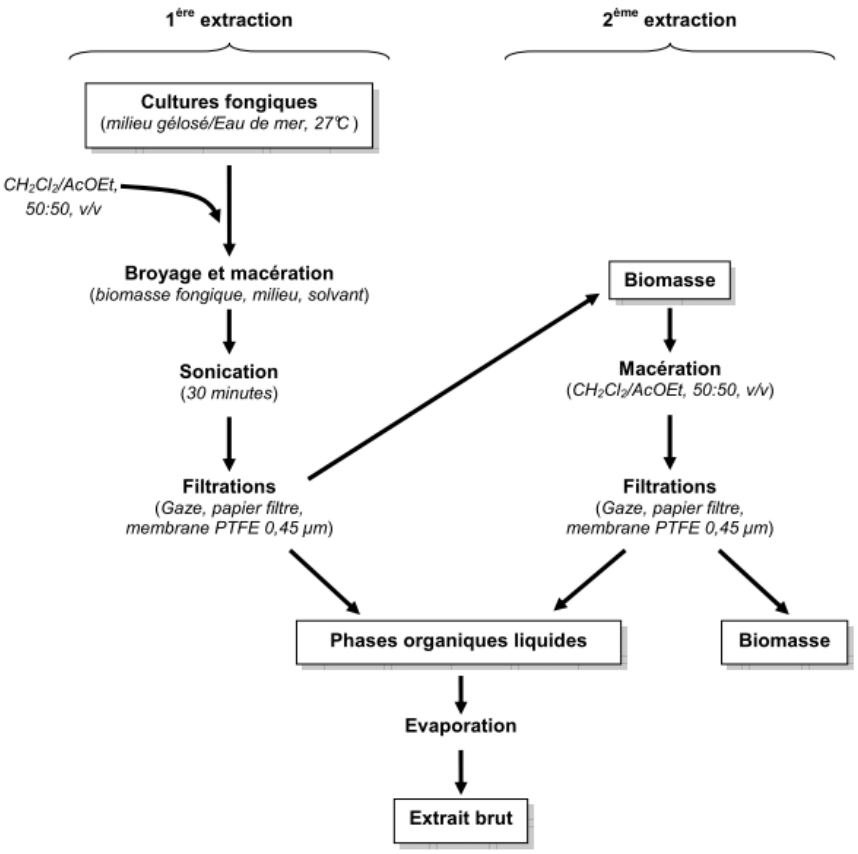


Figure A 1 : Protocole d'extration des cultures fongiques

3. Méthodes analytiques pour l'étude des extraits bruts et des molécules pures

1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a été utilisée dans un but analytique.

Les caractéristiques des plaques utilisées sont les suivantes :

- ALUGRAM® SIL G/UV_{254}, gel de silice avec indicateur de fluorescence UV_{254}, 0,2 mm, 20x20 cm, (Macherey-Nagel, Hoerdt, France)

Les révélations ont été effectuées dans le visible, dans l'UV à deux longueurs d'onde (254 nm et 365 nm) et après pulvérisation d'un révélateur chimique universel, la vanilline sulfurique.

3.1. Chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur UV-visible à barette de diode (HPLC-UV/DAD).

L'HPLC est une chaîne Agilent HP 1200 équipée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire à solvants, d'un injecteur automatique (Hewlett Packard 1100 series), d'un détecteur à barrette de diode (Agilent Technologies 1200 series) et d'un collecteur de fractions.

Le détecteur à barrette de diode a permis un balayage de toute une gamme de longueurs d'onde, de 190 à 600 nm (enregistrement toutes les 2 s, bande passante de 12 nm et résolution de 2 nm) et ainsi de détecter tous les métabolites absorbant dans cette gamme. Ce type de détecteur a permis ainsi d'accéder au spectre UV-visible de chacun des composés constituant les extraits bruts.

L'acquisition et le retraitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel AgilentChemstation B.03.01.

3.2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode largement utilisée pour l'identification de composés naturels, notamment lorsqu'elle est couplée à l'HPLC(Marston et Hostettmann, 2009). Elle peut être considérée comme l'outil analytique le plus rapide et sensible dans la découverte de nouveaux produits naturels (Bugni *et al.*, 2010). C'est une méthode destructrice mais très sensible, ne nécessitant qu'une très faible quantité de produit à analyser (quelques µg ou ng) et permettant l'accès aux données concernant la masse moléculaire d'un composé ionisé et toute ou partie de sa structure. Elle occupe une place très importante parmi les méthodes spectrométriques d'analyse moléculaire avec l'infrarouge et la RMN (Niessen, 2012).

3.2.1. Spectrométrie de masse basse résolution (MS)

Les analyses par spectrométrie de masse basse résolution ont été réalisées sur un spectromètre de masse de type LCQ® Thermo SeparationProducts, San Jose, CA, USA) avec source d'ionisation de type electrospray (ESI)et analyseur à trappe ionique (TI). L'ionisation par ESI -ou électronébullisation- est une méthode relativement douce qui permet de faire passer les molécules étudiées de solutions liquides à l'état gazeux sous forme d'ions, sans induire de fragmentation. La masse moléculaire des composés peut ainsi être déterminée après analyse des rapports masse/charge (m/z) obtenus.

L'analyseur employé a été un analyseur à trappe d'ions (IT) permettant l'isolement, l'accumulation puis la fragmentation sélective des ions formés dans la source ESI. Ceci permet d'accéder à leur masse monoisotopique, leur profil isotopique, ainsi qu'à la masse des ions-fils après fragmentations successives multi-étages (MS^n), renseignant ainsi sur la structure de la molécule, la perte de masse ente l'ion-parent et l'ion fils pouvant être caractéristique d'un groupement chimique.

Les spectres de masse des échantillons ont été obtenus à partir du courant ionique total (TIC) perfusant dans la trappe d'ions (en mode « *Fullscan* »). Les profils isotopiques des ions majoritaires ont été obtenus en mode « *Zoomscan* » sur une fenêtre d'analyse de 10 uma et ont permis d'établir l'état ionique des composés (mono- ou bichargé), aboutissant au calcul de leur masse moléculaire, après hypothèse des adduits possibles ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$...).

Les ions majoritaires ont été analysés par fragmentations successives MS/MS, MS^3 et MS^4. Ces fragmentations permettent ainsi de reconstituer progressivement la structure de la molécule après détermination des différents groupements chimiques présents, et mise en évidence du noyau central.

L'acquisition des spectres ainsi que le traitement des données ont été réalisés *via* le logiciel LCQ Xcalibur 1.3 (Thermo Fisher Scientific). Cette spectrométrie de masse de basse résolution donne une précision de mesure de 0,1 Da.

Les fractions ou composés à analyser ont été mis en solution dans du méthanol (qualité HPLC, J. T. Baker®) et perfusés dans la source à l'aide d'une seringue de 250 µL (Hamilton), à un débit constant de 3 µL/min. Ces solutions méthanoliques ont été analysées en modes d'ionisation positif et négatif en utilisant la méthode « ESI Low Flow » dont les paramètres sont indiqués dans le Tableau A 2.

Tableau A 2 : Paramètres d'analyse par spectrométrie de masse en mode perfusion (LCQ-ESI/TI), méthode « ESI Low Flow »

Paramètres	Mode positif	Mode négatif
Voltage de la source (kV)	4,55	4,55
Débit du gaz vecteur (UA)	59,57	59,57
Débit du gaz auxilliaire (UA)	0,7	0,7
Température du capillaire (°C)	160	160
Voltage du capillaire (V)	19,54	-9,96
Décharge du tube lens (V)	0	-50
Voltage de l'octapole 1 (V)	-2,49	3,14
Voltage de la lentille octapole (V)	-14,49	17,42
Voltage de l'octapole 2	-6,81	7,39

3.2.2. Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)

Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées en perfusion ou en couplage HPLC-UV/DAD-ESI-IT-TOF-MS^n. L'appareil utilisé est de type LCMS-IT-TOF,(Shimadzu, Kyoto, Japon). La chaîne HPLC est composée de deux pompes LC-20ADxr, d'un injecteur automatique SIL-20ACxr, d'un four à colonne CTO-20AC, d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M20A PDA et d'un système contrôleur CBM-20A. Les spectres UV ont été acquis entre 190 nm et 800 nm. Le spectromètre de masse haute résolution est un appareil hybride comprenant une source ESI une

trappe ionique et un détecteur à temps de vol (IT-TOF Shimadzu, Kyoto, Japon). La méthode d'analyse utilise le mode d'ionisation positif avec une acquisition MS des m/z compris entre 100 et 1000 et MS/MS entre 50 et 1000. Les paramètres d'analyses sont les suivants : le bloc de chaleur et la température de la ligne de désolvatation à 200°C avec un flux d'azote de nébulisation à un débit de 1,5 L/min, le voltage de l'interface à 4,0 kV, une tension du détecteur de 1,61 kV. Pour le mode MS, le temps d'accumulation des ions dans la trappe est fixé à 30 ms, concernant la fragmentation, elle se fait en mode automatique après accumulation des ions pendant 40 ms puis une énergie de collision de 100% avec 50% de gaz de collision (argon) est appliquée. Toutes les données ont été enregistrées et analysées avec les logiciels : Labsolution LCMS Version 3.60, MetID, Formula Predictor Version 1.2 et Mass calculator (Shimadzu, Kyoto, Japon). Une solution de sodium trifluoroacétate (2,5 mM) a été utilisée pour calibrer l'appareil pour des masses comprises entre 50 et 1000 Da.

3.2.3. Déréplication des extraits bruts

La déréplication est une méthode qui consiste à rechercher dans un mélange complexe la présence de métabolites connus, sans les isoler au préalable. Cette technique s'appuie sur l'analyse de données spectrales obtenues par couplage HPLC-UV/DAD et HPLC-MS/MS. Chaque composé est caractérisé par les informations suivantes : un temps de rétention en HPLC, une masse moléculaire, des caractéristiques spectrales et les principaux ions fils observés après fragmentation MS^n. Ces données sont comparées avec les bases de données et notamment celle publiée par Nielsen et Smedsgaard en 2011 et qui recense 719 mycotoxines et autres métabolites secondaires fongiques (Nielsen *et al.*, 2011). Chaque extrait brut peut ainsi être caractérisé par un profil chromatographique UV ou MS singulier permettant l'obtention de données sur la capacité métabolique des souches. Pour leurs analyses, les extraits ont été mis en solution dans du MeOH (qualité ULC/MS, Biosolve Chimie SARL, 57260 Dieuzé, France) à 1-10 mg/mL, filtrés sur filtre de cellulose régénérée (porosité 0,45 µm, Minisart®, SartoriusStedimBiotech, Goettingen, Germany) et injectés à raison de 1-5 µL par extrait. Les colonnes utiliséessont des phases inverses : C18 Yperspher 3 BDS (3 µ, 125x2 mm, Interchim, Modulo-cart) munie d'une pré-colonne BC18 (3 µm, 10x2 mm, Interchim, Montluçon, France) et C18 100 Å Kinetex (2,6 µm, 150 x 2,1 mm, Phenomenex, Le Pecq, France) maintenue à 25 °C. Un blanc MeOH et un contrôle qualité (QC) comprenant le mélange de l'ensemble des échantillons étudiéslors de l'analyse, sont systématiquement injectés. Les séquences d'analyse LC-UV/DAD-HRMS suivent le modèle de la séquence présentée dans le Tableau A 3.

Tableau A 3 : Exemple de séquence analytique LC-UV/DAD-HRMS

Vial#	Tray Name	Sample Name	Method File	Inj. Volume
-1	1	equilibration_date	2012-10-16-equilibration_C18_kinetex_100ACN_15ACN_20min.lcm	1
-1	1	Blc1_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
-1	1	Blc2_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_1_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_2_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
2	1	QC_1_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_3_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
3	1	échantillon-1_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
4	1	échantillon-2_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
5	1	échantillon-3_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
6	1	échantillon-4_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_4_2013-03-12	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
7	1	échantillon-5_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
8	1	échantillon-6_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
9	1	échantillon-7_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
10	1	échantillon-8_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_5_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
2	1	QC_2_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_6_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
11	1	échantillon-9_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
12	1	échantillon-10_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
13	1	échantillon-11_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
14	1	échantillon-12_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_7_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1
1	1	MeOH_8_date	LCMS2_C18_Pos_35min_03mlmin.lcm	1

Deux méthodes analytiques ont été développées :

- ✓ **Méthode A :**

Les extraits sont dilués à 10 mg/mL dans du MeOH (qualité ULC/MS, Biosolve Chimie SARL, 57260 Dieuzé, France). La phase mobile a consisté en un gradient acétonitrile/eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique avec un débit d'élution de 0,3 mL/min (Tableau A 4).

Tableau A 4 : Gradient d'élution de la méthode de déréplication A

Temps	ACN	H_2O + 0,1 % acide formique
0-5 min	15	85
45 min	100	0
50 min	100	0
58 min	15	85
63 min	15	85

- ✓ **Méthode B :**

Les extraits, les fractions ou les molécules pures sont dilués à 1 mg/mL dans du MeOH (qualité ULC/MS, Biosolve Chimie SARL, 57260 Dieuzé, France). La phase mobile a consisté en un gradient acétonitrile/eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique avec un débit d'élution de 0,3 mL/min (Tableau A 5).

Tableau A 5 : Gradient d'élution de la méthode de déréplication B

Temps	ACN	H_2O + 0,1 % acide formique
0-2 min	15	85
25 min	100	0
30 min	100	0
31 min	15	85
35 min	15	85

3.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les molécules purifiées ont été soumises à une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire. Cette méthode non destructrice permet d'accéder à la structure de la molécule via l'énergie propre aux liaisons inter-atomes au sein d'une molécule. Elle se base sur le temps de relaxation du moment magnétiques des noyaux (spin nucléaire) soumis à deux champs magnétiques orthogonaux : un premier constant orientant les spins dans une première direction, un second pulsé désorientant les spins nucléaires.

La RMN 1D (^{1}H et ^{13}C) permet de déterminer le nombre de carbones et de protons dans la molécule.

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) et reflètent l'environnement chimique des noyaux. En ce qui concerne les spectres du proton, l'intégration des pics permet de déterminer le nombre de noyaux, et la multiplicité des raies reflète l'environnement protonique.

La RMN 2D permet d'identifier les différentes parties de la molécule et de les assembler entre elles à travers les corrélations entre les atomes d'hydrogène et de carbone.

- COSY (COrrelationSpectrometrY) : met en évidence les corrélations entre protons couplés de façon scalaire ($^{2}J_{HH}$, $^{3}J_{HH}$ protons portés par des carbones voisins)
- TOCSY : met en évidence des interactions entre protons appartenant à un même système de spins (J_{HH})
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) : interaction dipolaire (spatiale) entre deux protons (^{1}H-^{1}H)
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) : met en évidence les intéractions ^{1}H-^{13}C, il aide à attribuer le spectre ^{13}C d'une molécule en faisant le lien avec le spectre ^{1}H ($^{1}J_{CH}$)
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) : interaction longue distance ^{1}H-^{13}C ($^{2}J_{CH}$, $^{3}J_{CH}$voire$^{4}J_{CH}$)

Ces analyses ont été réalisées au sein de la plate-forme PRISM par le Dr. A. Bondon (Université de Rennes 1) sur un spectromètre 500 MHz Bruker avec cryosonde TCI. La cryosonde permet d'augmenter la sensibilité de l'appareil et ainsi réduire la quantité de produit nécessaire pour l'analyse (Bugni *et al.*, 2010). Les composés ont été solubilisés dans du méthanol-d4 ou du chloroforme deutéré selon la polarité des molécules et analysés en RMN 1D (^{1}H et ^{13}C) et 2D (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY).

4. Evaluation de l'activité cytotoxique

4.1. Entretien des lignées cellulaires

Afin d'évaluer l'activité cytotoxique ou antiproliférative des molécules synthétisées, six lignées cellulaires ont été utilisées : quatre lignées cancéreuses afin de suivre et d'évaluer l'activité biologique et deux lignées saines afin de déterminer la toxicité des extraits, fractions et molécules purifiées.

Toutes les lignées cellulaires, ont été cultivées en flasques 25 cm^2 ou 75 cm^2 et incubées dans une étuve thermostatée à 37°C, sous atmosphère enrichie à 5% en CO_2. Elles ont été repiquées tous les deux jours.

Lignées tumorales

La lignée KB, répertoriée à l'ATCC sous le code CCL-17™, est une lignée tumorale humaine couramment employée dans le triage d'agents antitumoraux (Perdue, 1982). Cette lignée a été isolée pour la première fois en 1954 par H. Eagle d'un cancer du pharynx d'un adulte (Eagle, 1955). *In vitro* ce sont des cellules adhérentes qui forment une couche monocellulaire, elles sont polygonales et réfringentes. Ces cellules sont stables au cours des divers repiquages ce qui permet une reproductibilité des résultats. La culture de cette lignée se fait dans le milieu BME (Basal Medium Eagle Sigma®) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF, 5% (v/v)), en antibiotiques (mélange streptomycine/pénicilline à 10000 µg/mL 1% (v/v)) et en L-glutamine (1% (v/v)).

La lignée POS-1 est une lignée tumorale provenant d'un ostéosarcome murin spontané de souris C3H (Kamijo *et al.*, 2002; Ory *et al.*, 2005) gracieusement fournie par le Kanagawa Cancer Center (Kanagawa, Japon) au Laboratoire de la Physiopathologie de la Résorption Osseuse (LPRO, Inserm UMR-957). *In vitro,* ces cellules sont adhérentes et se développent en une couche monocellulaire. Elles sont de forme relativement allongée et semblent vouloir se diviser lorsqu'elles sont en contact avec d'autres cellules.La culture de cette lignée se fait dans le milieu RPMI 1640 (Gibco®) contenant de la L-glutamine et supplémenté en SVF (5% (v/v)).

La lignée AT6-1 est une lignée tumorale provenant d'un carcinome prostatique de rat Dunning R3327 (Lamoureux *et al.*, 2008). Cette lignée a été gracieusement fournie au LPRO par le Dr J.-P. Thiery (Villejuif, France) et provient de l'EuropeanCell Culture Collection. Ces cellules sont, *in vitro*, adhérentes et poussent en amas. Elles sont très sensibles à la confluence : en cas de confluence trop importante, elles se détachent de leur support et meurent.La culture d'AT6-1 se fait dans le milieu DMEM (Gibco®) contenant de la L-glutamine et du glucose (4,5 g/L) et supplémenté en SVF (5% (v/v)).

La lignée OSRGa est une lignée tumorale issue d'ostéosarcome de rat. Cette lignée a été initialement établie à partir d'ostéosarcome radio-induit sur des rats Sprague-Dawley(Klein *et al.*, 1977; Jasmin *et al.*, 1982). Ces cellules sont adhérentes et se développent en une monocouche cellulaire. Leur culture se fait dans le milieu DMEM (Gibco®) (contenant de la L-glutamine et du glucose) supplémenté de 5% de SVF.

La lignée SaOS2 répertoriée à l'ATCC sous le numéro HTB-85™ est une lignée tumorale provenant d'un ostéosarcome humain, isolée et caractérisée par J.Fogh et G. Trempe en 1977 (Fogh *et al.*, 1977a;

Fogh *et al.*, 1977b). Ces cellules de type épithélial sont également adhérentes et leur culture se fait dans le milieu DMEM contenant de la L-glutamine et du glucose (4,5 g/L) et supplémenté en SVF (10% (v/v)).

La lignée MG-63 est une lignée de cellules d'ostéosarcome humain (ATCC® CRL-1427™) isolée et caractérisée par Billau *et al.* 1977 (Billiau *et al.*, 1977). Ces cellules adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules SaOS2.

Lignées non tumorales

La lignée L929 répertoriée à l'ATCC sous le numéro CCL-1™, est une lignée saine de fibroblastes murins. *In vitro*, ces cellules sont adhérentes et se développent en une couche monocellulaire. Cette lignée a été isolée en 1948. Le clone 929 de la souche parente a été établi à partir de la 95èmegénération cellulaire (Sanford *et al.*, 1948).La culture de cette lignée se fait dans le milieu RPMI 1640 (Gibco®) contenant de la L-glutamine% et supplémenté en SVF (5% (v/v)).

Les cellules HFF2(Human Foreskin Fibroblast) constituaient le deuxième type cellulaire sain utilisé. *In vitro*, ces fibroblastes humains sont des cellules adhérentes qui se développent en une couche monocellulaire. Elles sont cultivées sur milieu DMEM (Gibco®) contenant de la L-glutamine% et supplémenté en SVF (10% (v/v)).

4.2. Tests d'activité cytotoxique ou antiproliférative

Deux tests différents ont été utilisés afin d'évaluer l'activité cytotoxique ou antiproliférative des extraits et molécules purifiées. Ces tests sont basés sur la mesure de l'activité enzymatique mitochondriale des cellules vivantes. Les réactifs utilisés sont des sels de tetrazolium : soit du MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) soit du XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide). En conditions normales, ces sels sont métabolisés par les enzymes mitochondriales en cristaux de formazan (Figure A 2). Ces cristaux sont soit solubles dans le milieu (XTT) soit insolubles (MTT) ce qui nécessite alors qu'ils soient solubilisés par un tampon de lyse préparé extemporanément. L'intensité de coloration proportionnelle à la viabilité cellulaire est ensuite mesurée par spectrophotométrie.

Les tests MTT ont été réalisés au sein du laboratoire MMS-EA2160 sur la lignée KB, et les tests XTT ont été réalisés au sein de la société ABS sur les autres lignées. Les protocoles utilisés étant différents, ils sont détaillés tous les deux ci-dessous.

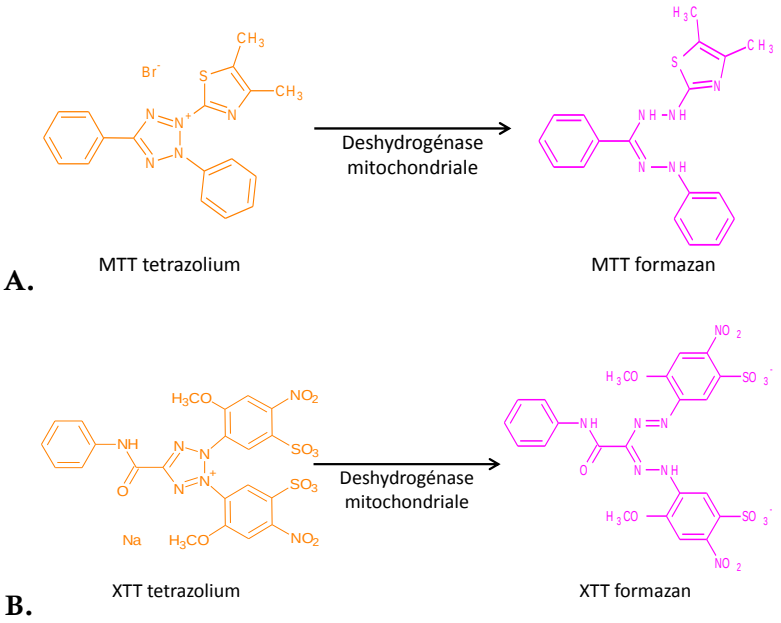


Figure A 2 : Réactions de métabolisation des sels de tetrazolium (A. MTT et B. XTT) par les déhydrogénases mitochondriales

4.2.1. Test de cytotoxicité MTT

Le test MTT se base sur le protocole établi par Mosmann en 1983 et revu par Denizot en 1986 (Mosmann, 1983; Denizot et Lang, 1986).

Ces tests ont été réalisés sur les cellules KB, en duplicata, en plaques 96 puits (Nunc™). Aucun test n'a été réalisé dans les puits périphériques au vu de l'éventuelle évaporation du milieu qui pourrait s'y produire. Seul du milieu de culture y a été introduit.

Les plaques ont été ensemencées à J0 à raison de 50 µL/puits d'une suspension cellulaire à 2.10^5 cellules KB/mL préparée après trypsination des cellules d'une flasque 75 cm^2.

A J2 les produits à tester ont été déposés dans les puits aux concentrations souhaitées, à raison de 50 µL par puits, les échantillons étant préalablement solubilisés dans du MeOH puis dilués au 1/10 dans du milieu de culture (soit 5% de MeOH dans les puits). Les dilutions ont été réalisées de demi en demi à partir de la première concentration. Un contrôle solvant a été réalisé afin de vérifier l'innocuité de 5% de MeOH sur les cellules KB.

A J5, 50 µL de réactif MTT (Sigma Aldrich®), à 5 mg/mL dans le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) et de couleur jaune, ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été mises à incuber pendant 3h à 37°C, sous atmosphère enrichie à 5% de CO_2.

Après ce délai d'incubation, le surnageant de chaque puits a été éliminé et 100 µL de tampon de lyse préparé extemporanément (isopropanol / 0,04% d'HCl 1N) ont été ajoutés dans chaque puits afin de solubiliser les cristaux de formazan formés, de couleur violette.

Après homogénéisation, les absorbances à 570 nm et 630 nm (correspondant au bruit de fond) ont été lues au spectrophotomètre (Lecteur de microplaques ELx800™, Universal Microplaque Reader, Bio-Teck® Instruments, INC).

L'absorbance relative étant proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le puits, la courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la viabilité en fonction de la concentration a été tracée et la CI_{50} calculée (concentration inhibant 50% de la prolifération cellulaire) pour chaque échantillon.

4.2.2. Test de cytotoxicité XTT

Les tests de cytotoxicité XTT ont été réalisés sur les cellules POS-1, L-929, HFF2, AT6-1, OSRGa, MG-63 et SaOS2.

Les plaques ont été ensemencées à J0 à l'aide d'une pipette multicanaux à raison de 100 µL/puits d'une suspension cellulaire, préparée après trypsination des cellules d'une flasque 75 cm^2, à 10 000 cellules/mL (lignées AT6-1, POS1, L929, HFF2), 20 000 cellules/mL (lignéesMG-63 et SaOS2) ou 25 000 cellules/mL (lignée OSRGa).Les puits périphériques ont été additionnés de 100 µL de milieu de culture. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C – 5% CO2.

Après 24h, le surnageant a été retiré à l'aide d'une pipette et 95 µL de milieu neuf ont été ajoutés dans les puits. L'élément testé a été préparé dans de l'éthanol absolu à 1mg/mL puis les dilutions ont été effectuées avec un mélange PBS-2% EtOH afin que le pourcentage d'EtOH reste constant dans tous les puits. Les éléments d'essai aux concentrations désirées ont été ajoutés à raison de 5 µL par puits (dilution au $1/20^{ème}$).

Deux types de contrôle sont réalisés :

- un contrôle milieu : cellules cultivées dans du milieu de culture seul, sans addition d'élément d'essai.
- un contrôle solvant : cellules cultivées dans du milieu de culture, sans addition d'élément d'essai, et en présence de 0,1% éthanol/puits.

Des blancs correspondants à des puits contenant du milieu de culture seul ont aussi été réalisés en triplicat.

Après 72 heures de mise en contact avec les molécules, l'effet cytotoxique ou anti prolifératif des extraits a été évalué aux différentes concentrations testées par addition du réactif XTT (dosage colorimétrique). Ainsi, 50 µL de réactif XTT (Cellproliferation kit II Roche) ont été ajoutés dans les puits. Après 4h d'incubation à l'abri de la lumière, à 37°C, sous atmosphère enrichie à 5% de CO_2, les absorbances à 450 nm ont été lues au spectrophotomètre (Lecteur de microplaques Wallac Victor2™ 1420 MultiLabelCounter Perkin Elmer®). Les cristaux de formazan orange étant directement solubilisés dans le milieu, l'étape de solubilisation par tampon de lyse n'est pas réalisée d'où un gain de temps par rapport au test MTT (Roehm *et al.*, 1991).

Tout comme le test MTT, l'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le puits. La CI_{50} est déterminée à partir de la courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration.

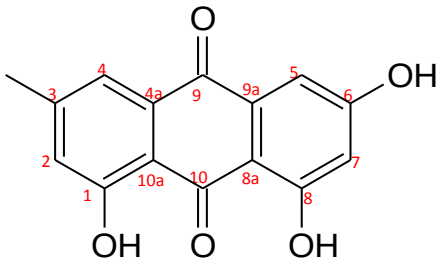
ANNEXE III : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de l'émodine (351-N1)

1. Caractéristiques physico-chimiques

Emodine (351-N1)

Formule brute : $C_{15}H_{10}O_5$
Poids moléculaire : 270,0528 Da
T_{Rb}: 13,0 min
Spectre UV-visible : λ_{max} 222(100), 254sh, 266(54), 287(60), 440(36)
HRMS/MS :
MS-ESI$^+$: m/z 271,0578 $[M+H]^+$; **MS/MS** : 229,0465 (100) ; 201,0518 (60); 173,0586 (60); 145,0637 (20)
MS-ESI$^-$: m/z 269,0441 $[M-H]^-$; **MS/MS** : 241,0491 (38) ; 225,0550 (100) ; 210,0308 (40) ; 197,0599 (35);181,0659 (35)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	163,6			
2	125,3	7,09 (d ; 1H ; 0,8Hz)	2,43 ; 7,56	22,2 ; 115,2 ; 121,8 ; 163,6
3	149,5			
4	121,8	7,56 (d ; 1H ; 1,1Hz)	2,43 ; 7,09	22,2 ; 115,2 ; 125,3; 183,7 ; 191,5
4a	134,9			
5	111,4	7,15 (d ; 1H ; 2,4Hz)	6,50	109,4 ; 183,7
6	169,7			
7	109,4	6,50 (d ; 1H ; 2,4Hz)	7,15	109,9 ; 166,4 ; 169,7
8	166,4			
8a	109,9			
9	183,7			
9a	136,9			
10	191,5			
10a	115,2			
3-CH_3	22,2	2,43 (s; 3H)	7,09 ; 7,56	121,8 ; 125,3 ; 149,5

→Spectres RMN réalisés dans le $CDOD_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D de l'émodine

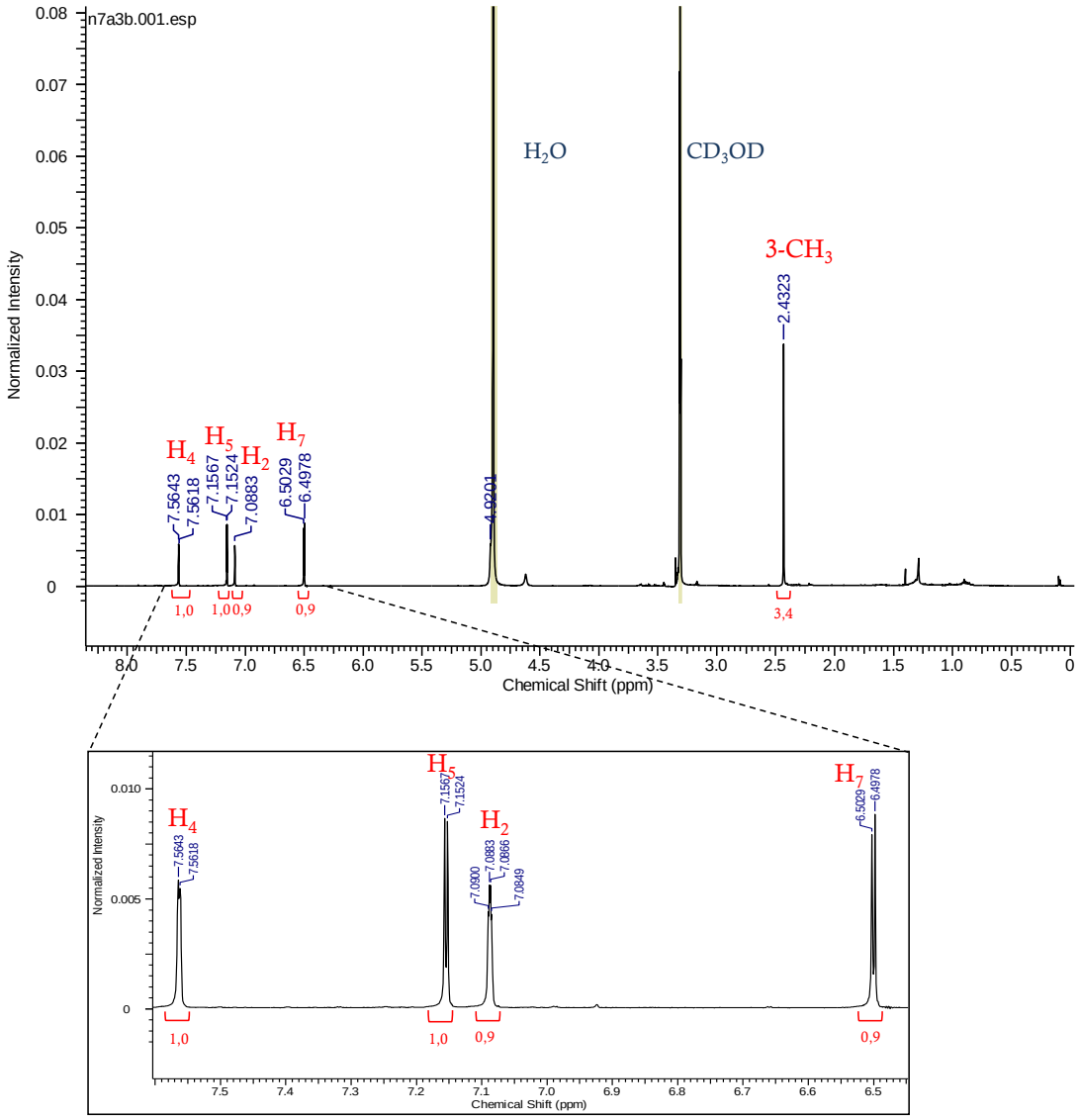


Figure A 3 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine

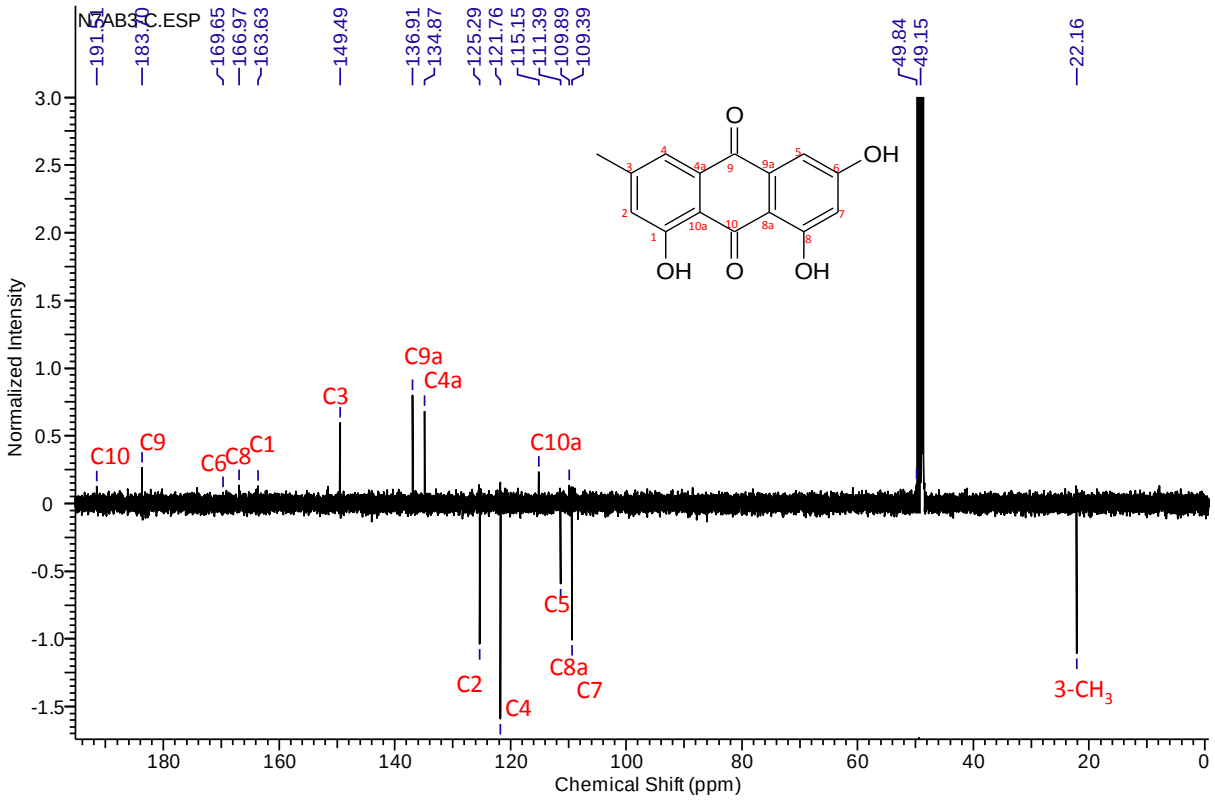


Figure A 4 : Spectre ^{13}C-RMN (APT, 500 MHz, CD_3OD) de l'émodine

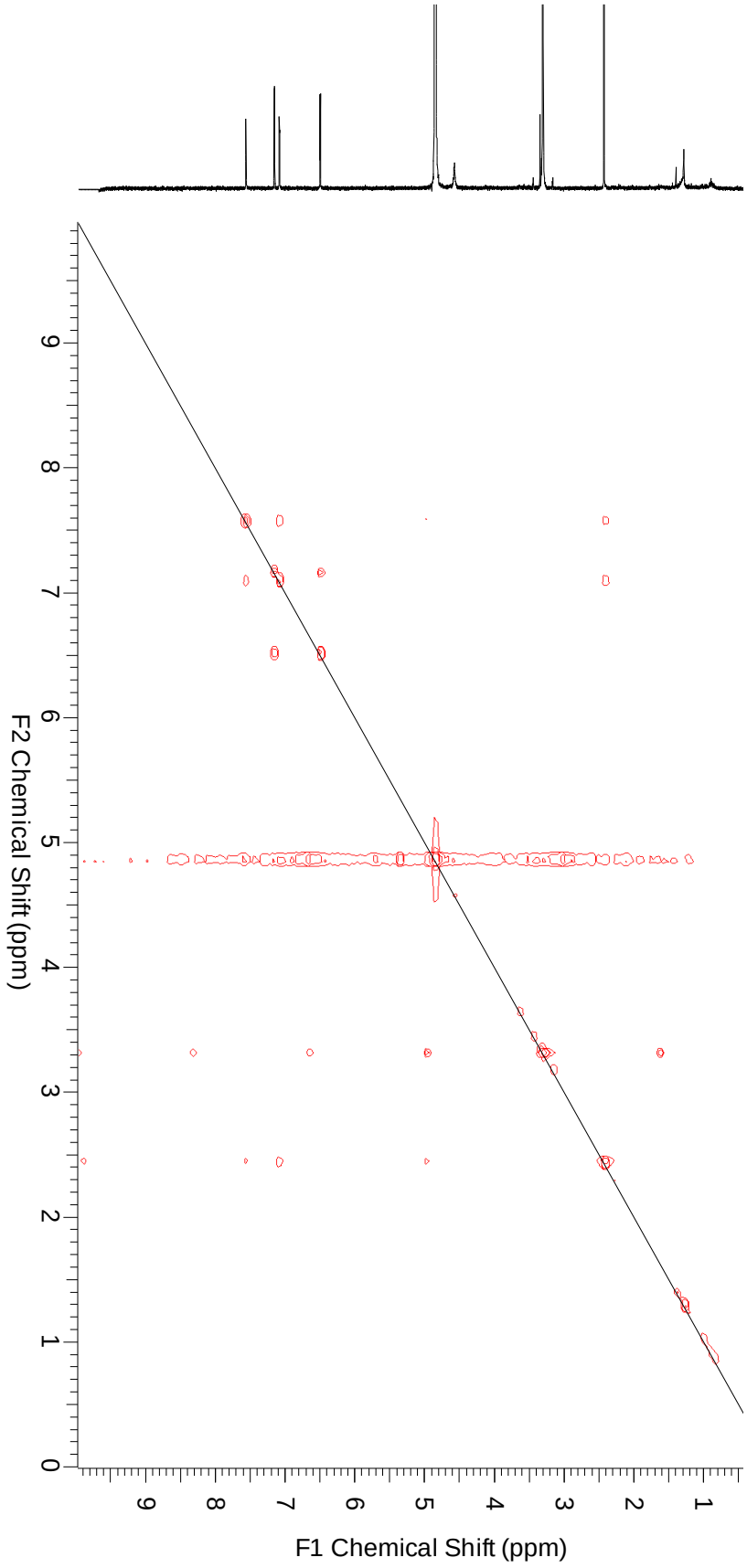


Figure A 5 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine

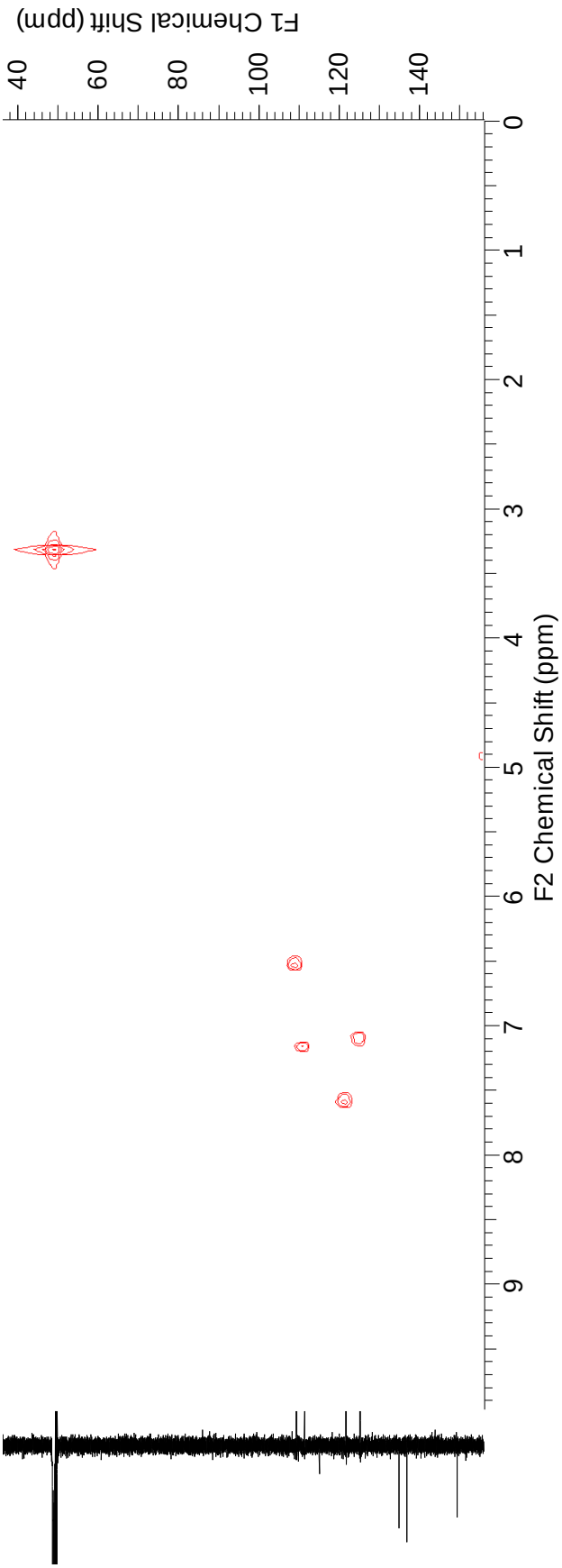


Figure A 6 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine

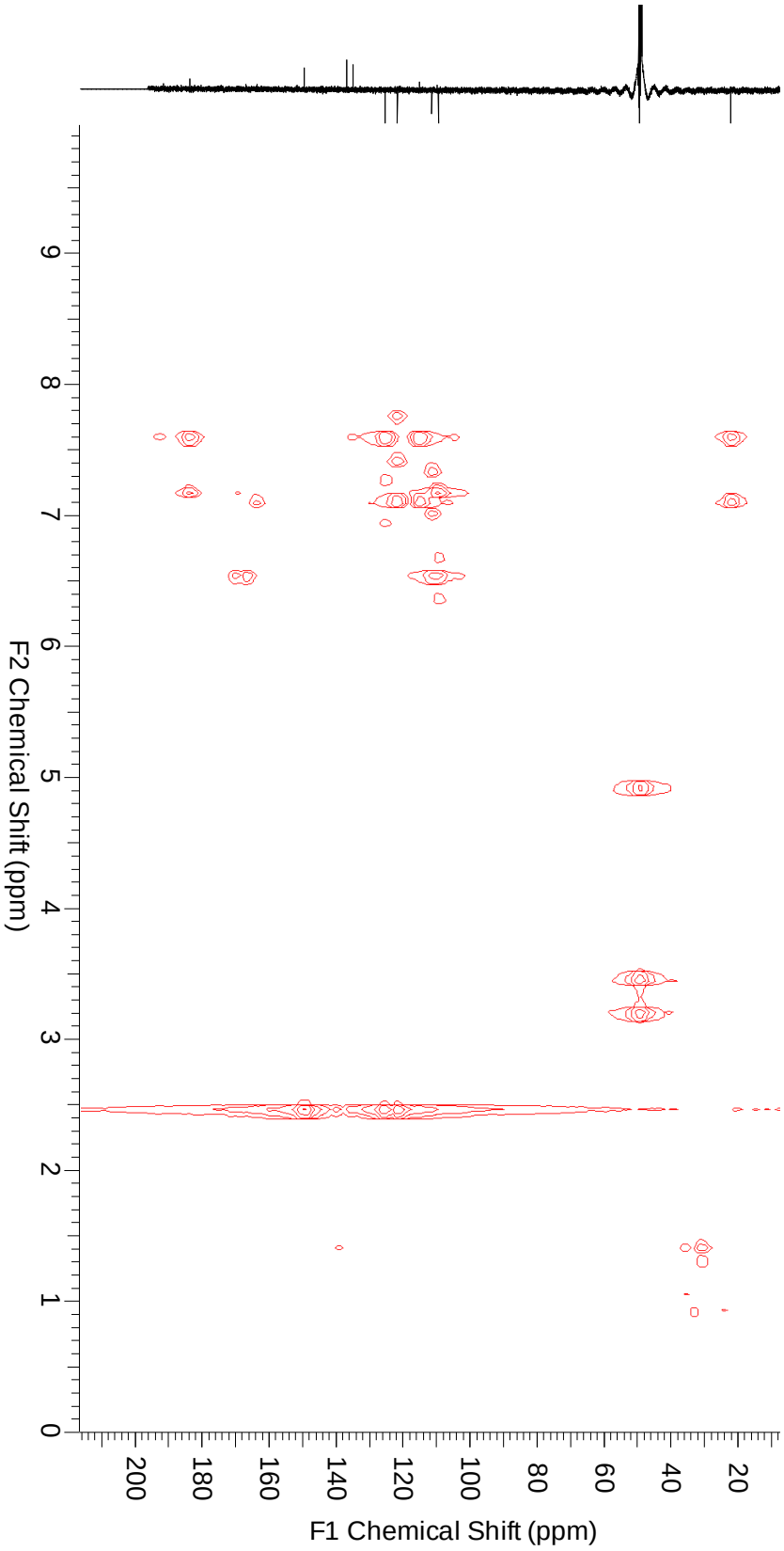


Figure A 7 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'émodine

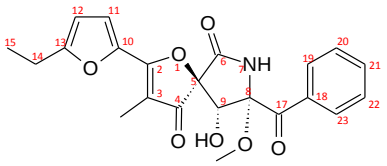
ANNEXE IV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du FD-838 (351-N2)

1. Caractéristiques physico-chimiques

FD-838 (351-N2)

Formule brute : $C_{22}H_{21}NO_7$
Pouvoir rotatoire : α_D= -12,2° (c 0,35 ; EtOH ; 20 °C)
Poids moléculaire : 411,1318 Da
T_{Ra} : 21 min ; T_{Rb} : 11,5 min
Spectre UV-visible : λ_{max} End(100), 255(44), 285(24), 345(85)
HRMS/MS : MS-ESI$^+$: *m/z*412,1368 $[M+H]^+$, *m/z*434,1169 $[M+Na]^+$; **MS/MS** : 380,1111 (100) ; 219,0588 (50)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1				
2	172,6			
3	107,8			
4	195,6			
5	89,7			
6	166,3			
7		7,46 (s ; 1H)		
8	91,5			
9	74,2	4,71 (d ; 1H ; 12 Hz)		
10	143,3			
11	118,3	7,05 (d ; 1H ; 4 Hz)	6,24	107,9 ; 143,3 ; 163,8
12	107,9	6,24 (d ; 1H ; 4 Hz)	7,05	118,3 ; 143,3 ; 163,8
13	163,8			
14	21,8	2,77 (q ; 2H ; 8 Hz)	1,30	11,8 ; 107,9 ; 163,8
15	11,8	1,30 (t ; 3H ; 8 Hz)	2,77	21,8 ; 163,8
16	6,2	2,03 (s ; 3H)		107,8 ; 143,3 ; 172,6 ; 195,6
17	194,6			
18	132,4			
19	130,6	8,34 (d ; 1H ; 8 Hz)	7,51	130,6 ; 134,6 ; 194,6
20	128,7	7,51 (t ; 1H ; 8 Hz)	8,34	128,7 ; 130,6
21	134,6	7,66 (t ; 1H ; 8 Hz)	7,51	130,6
22	128,7	7,51 (t ; 1H ; 8 Hz)	8,34	128,7 ; 130,6
23	130,6	8,34 (d ; 1H ; 8 Hz)	7,51	130,6 ; 134,6 ; 194,6
8-OCH3	51,7	3,42 (s ; 3H)		
9-OH		4,14 (d ; 1H ; 12 Hz)		

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D du FD-838

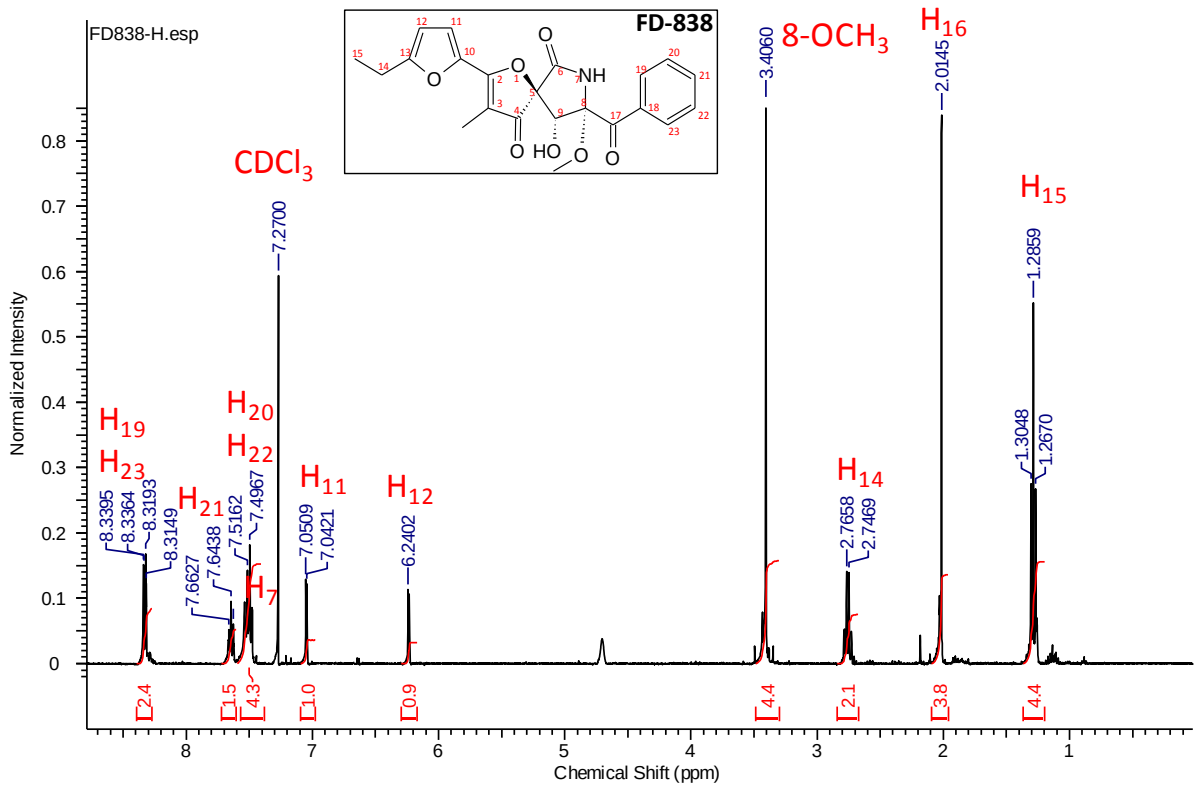


Figure A 8 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838

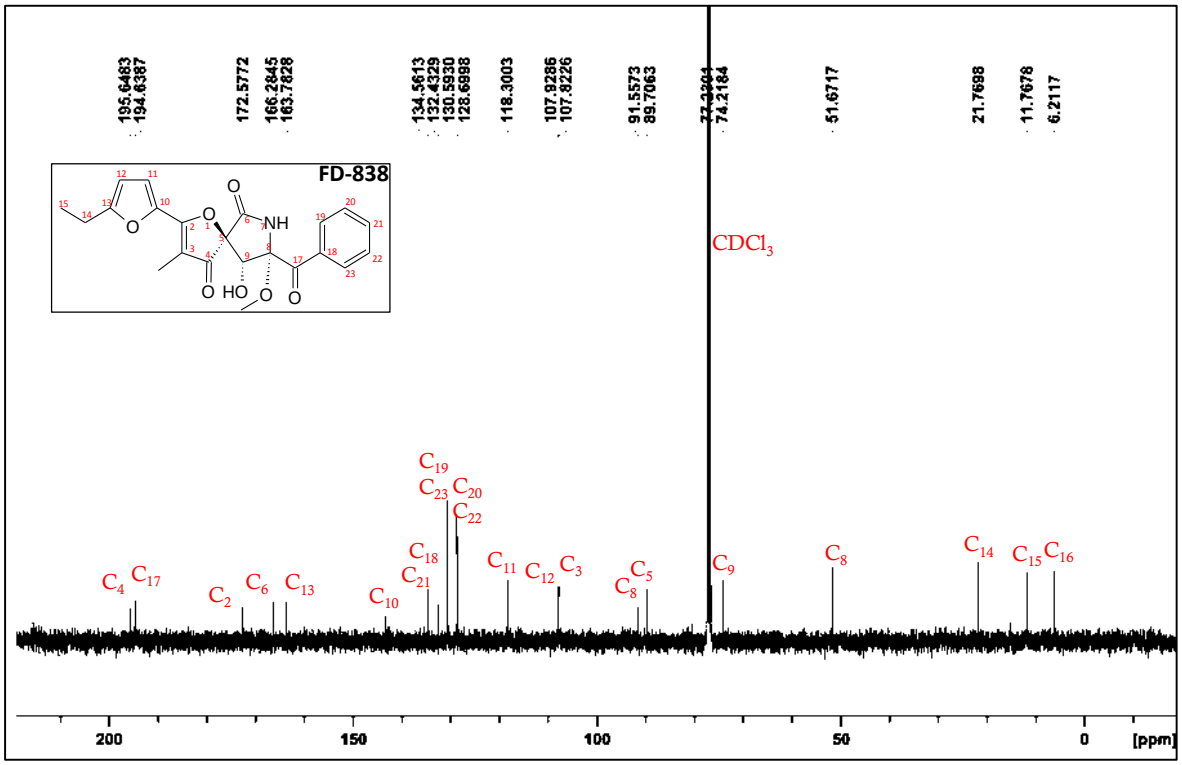


Figure A 9 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838

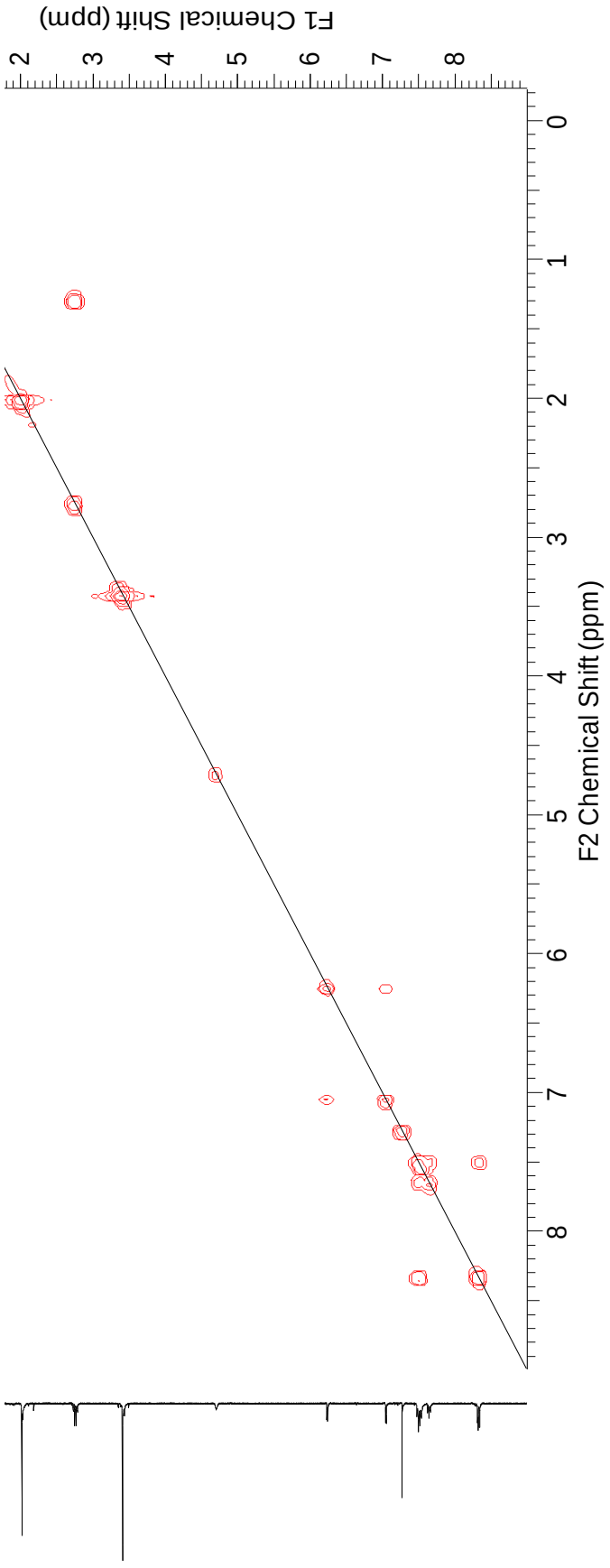


Figure A 10 : Spectre COSY (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838

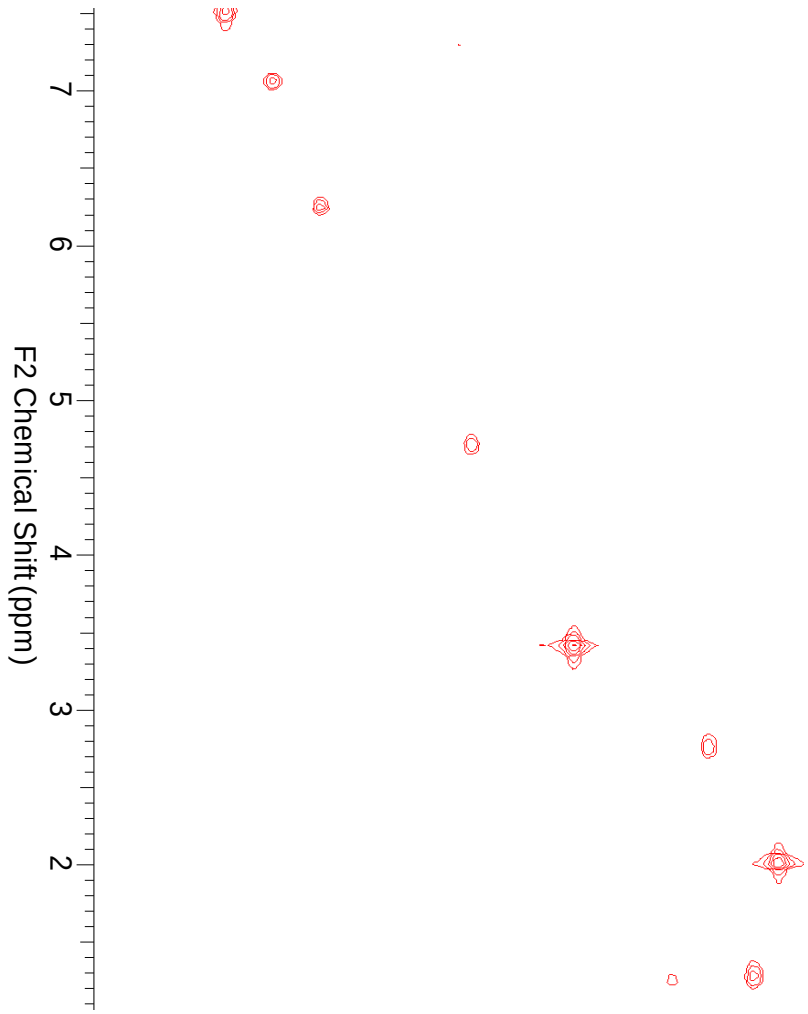


Figure A 11 : Spectre HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838

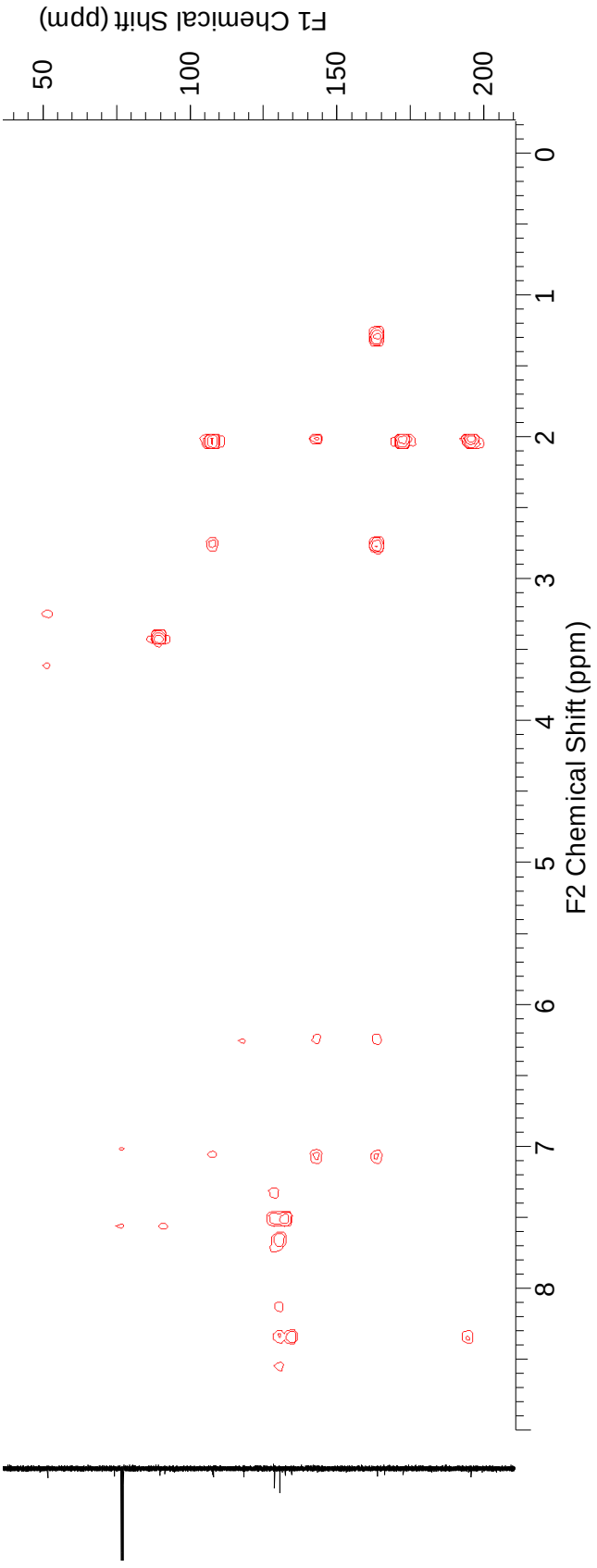


Figure A 12 : Spectre HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) du FD-838

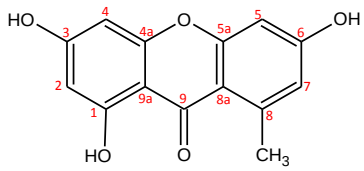
ANNEXE V : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de la norlichéxanthone (351-N3)

1. Caractéristiques physico-chimiques

Norlichéxanthone (351-N3)

Formule brute : $C_{14}H_{10}O_5$
Poids moléculaire :258,0528 Da
T_{Ra} : 21,9 min ; **T_{Rb} :** 10,2min
Spectre UV-visible : λ_{max} 204(65), 242(100), 267sh, 314(60)
HRMS/MS :
MS-ESI$^+$: *m/z* 259,0563 $[M+H]^+$; **MS/MS :** 244,0331 ; 213,0542 ; 191,0677 ; 185,0588 ; 151,0381
MS-ESI$^-$:*m/z* 257,0446 [M-H]- ; **MS/MS :** 244,0341 (100) ; 217,0484 (60); 213,0516 (62) ; 191,0700 (47) ; 185,0575 (18) ; 151,0384 (37)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	158,8			
2	99,1	6,09 (d ; 1H ; 2,1Hz)	6,21	94,5; 103,9; 165,2; 166,8
3	166,8			
4	94,5	6,21 (d ; 1H ; 2,6Hz)	6,09	99,1; 103,9; 158,8; 166,8
4a	165,2			
5	101,8	6,58 (s ; 1H)		23,8 ; 101,8 ; 112,6; 117,6; 161,0; 165,2; 183,5
5a	161,0			
6	165,2			
7	117,6	6,58 (s ; 1H)	2,77	23,8 ;101,8; 112,6; 117,6; 161,0; 165,2; 183,5
8	144,7			
8a	112,6			
9	183,5			
9a	103,9			
8-CH3	23,8	2,77 (s ; 3H)		112,6 ; 117,6 ; 144,7

→Spectres RMN réalisés dans le $CDOD_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D de la norlichéxanthone

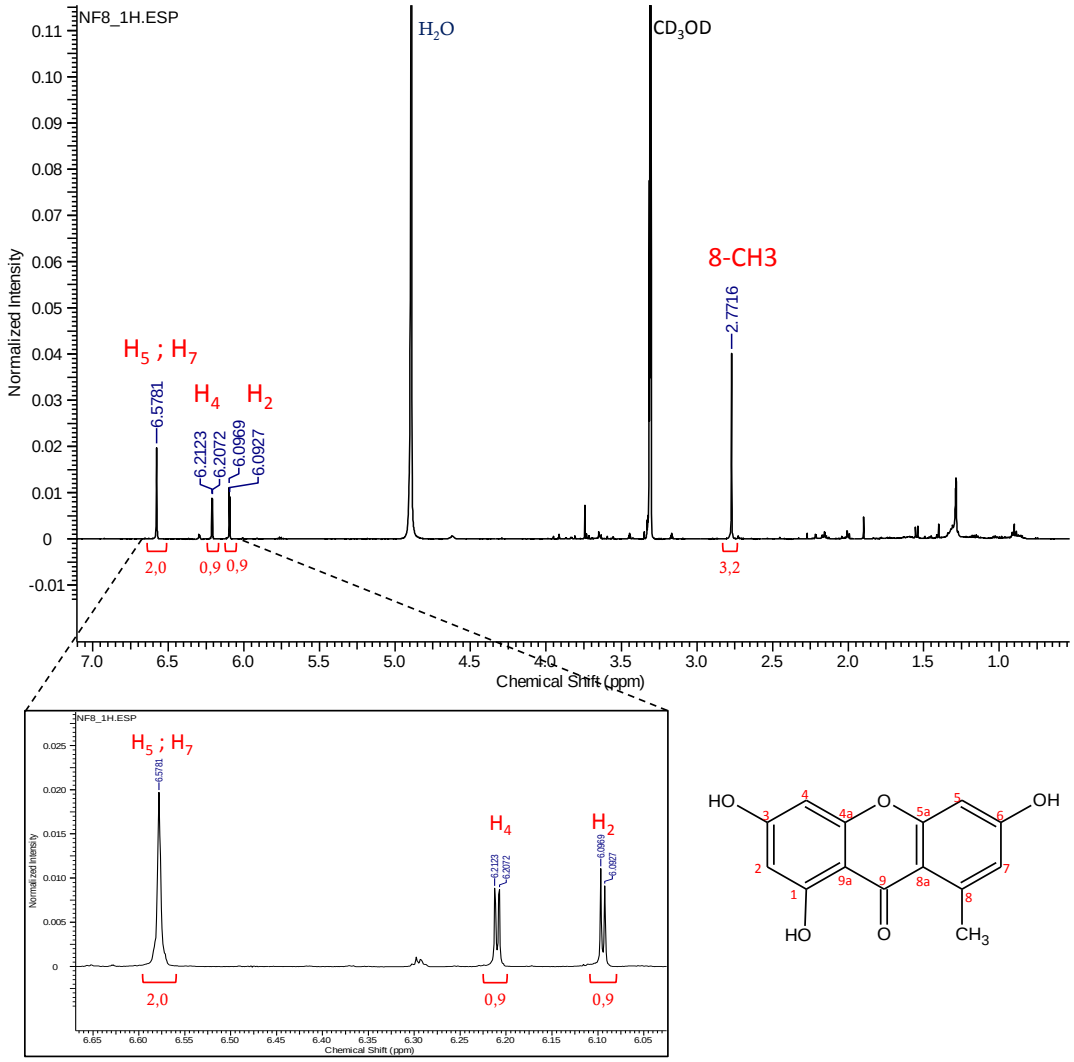


Figure A 13 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone

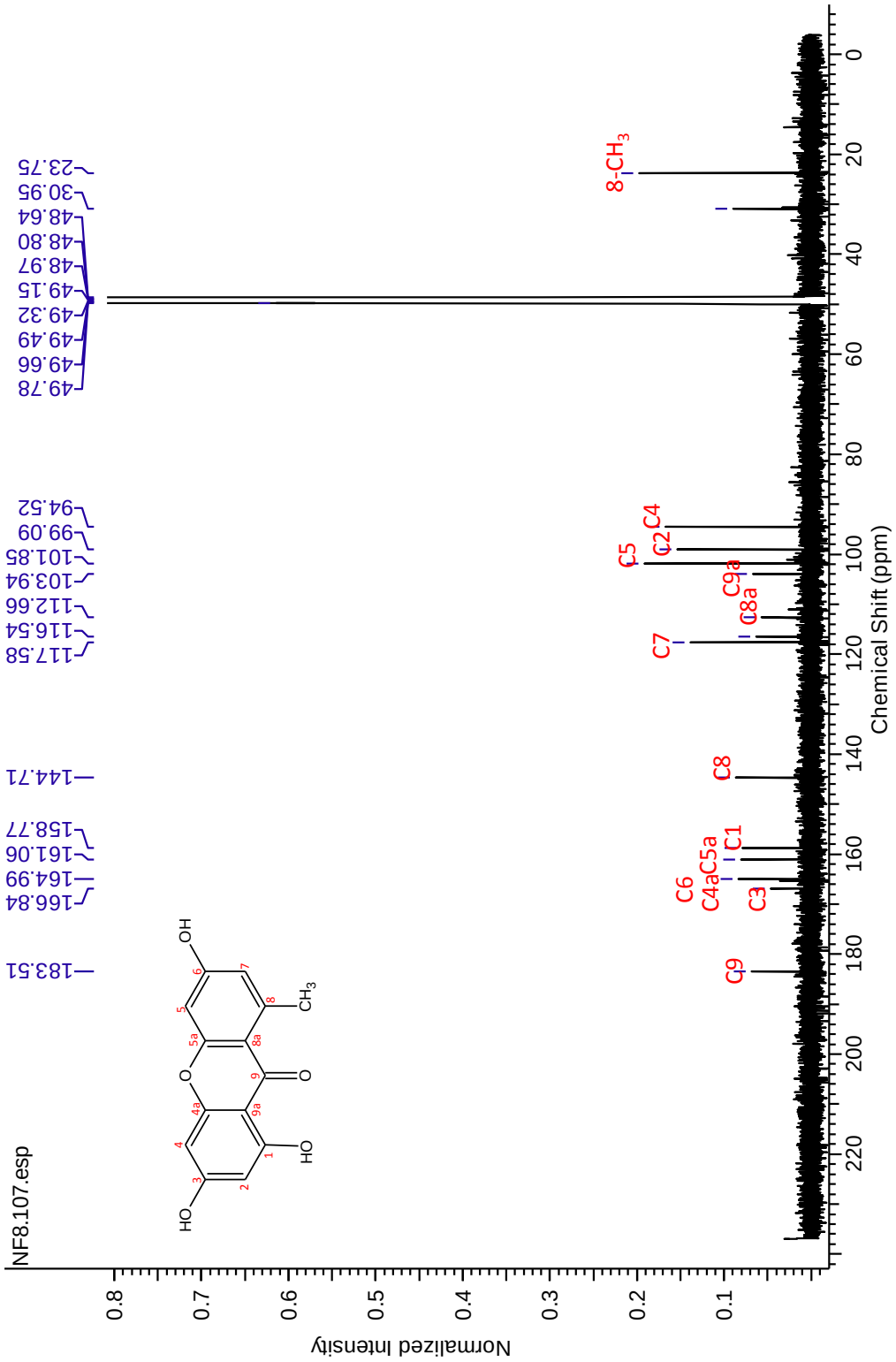


Figure A 14 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone

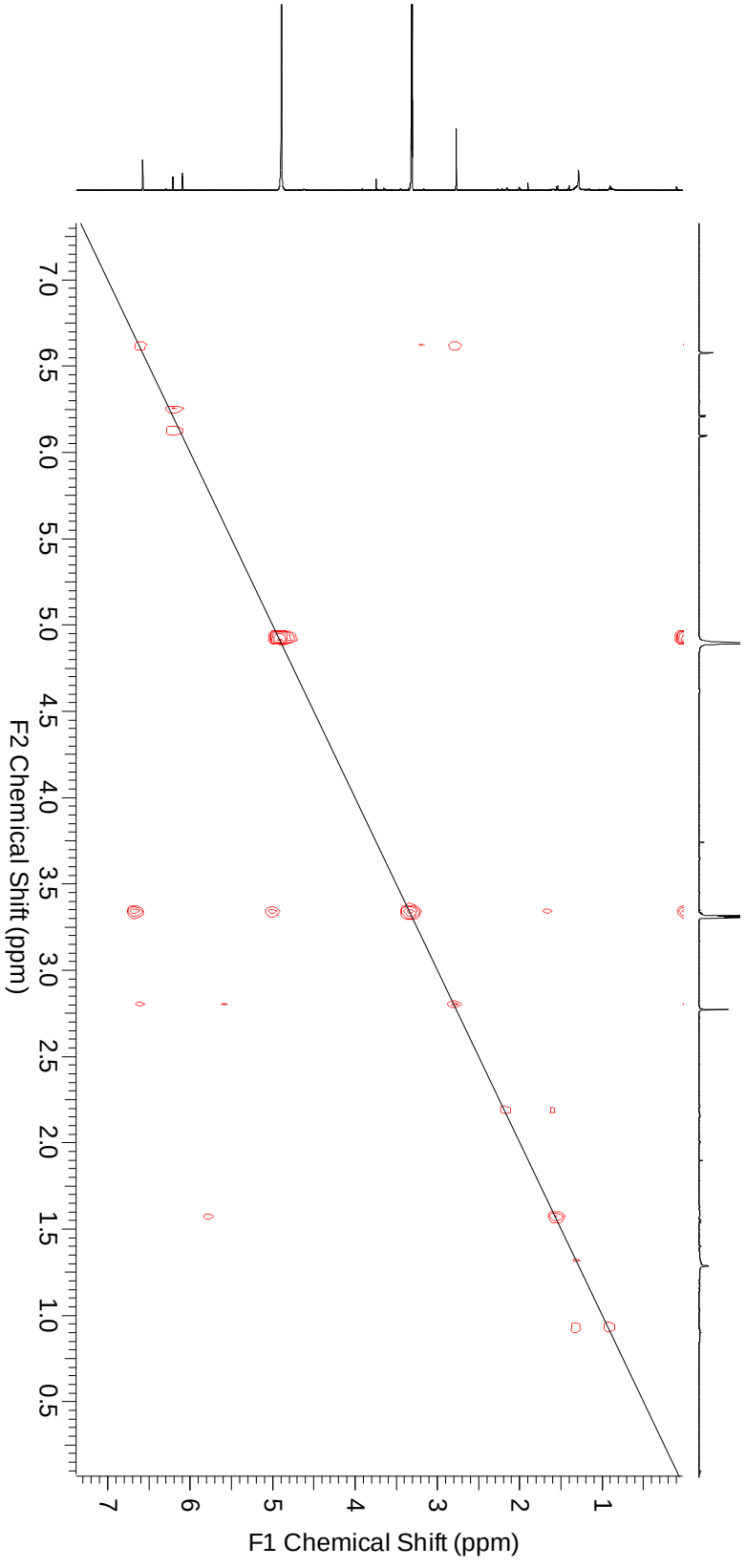


Figure A 15 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone

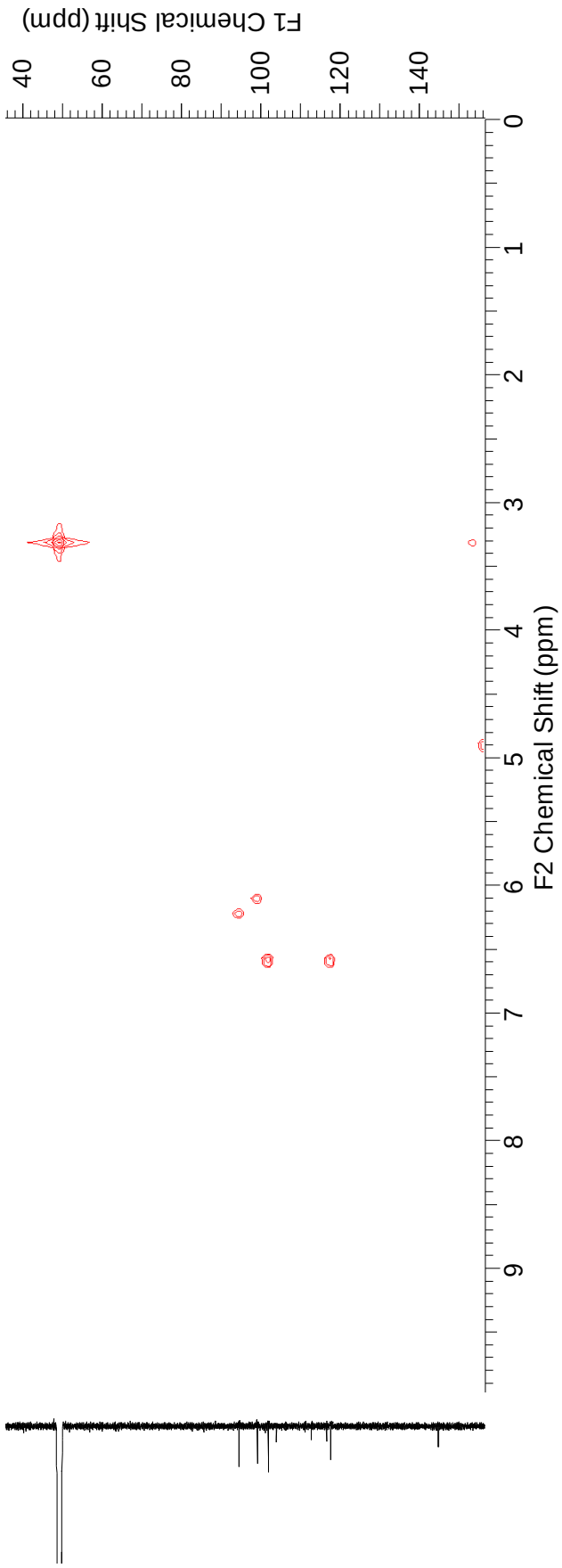


Figure A 16 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone

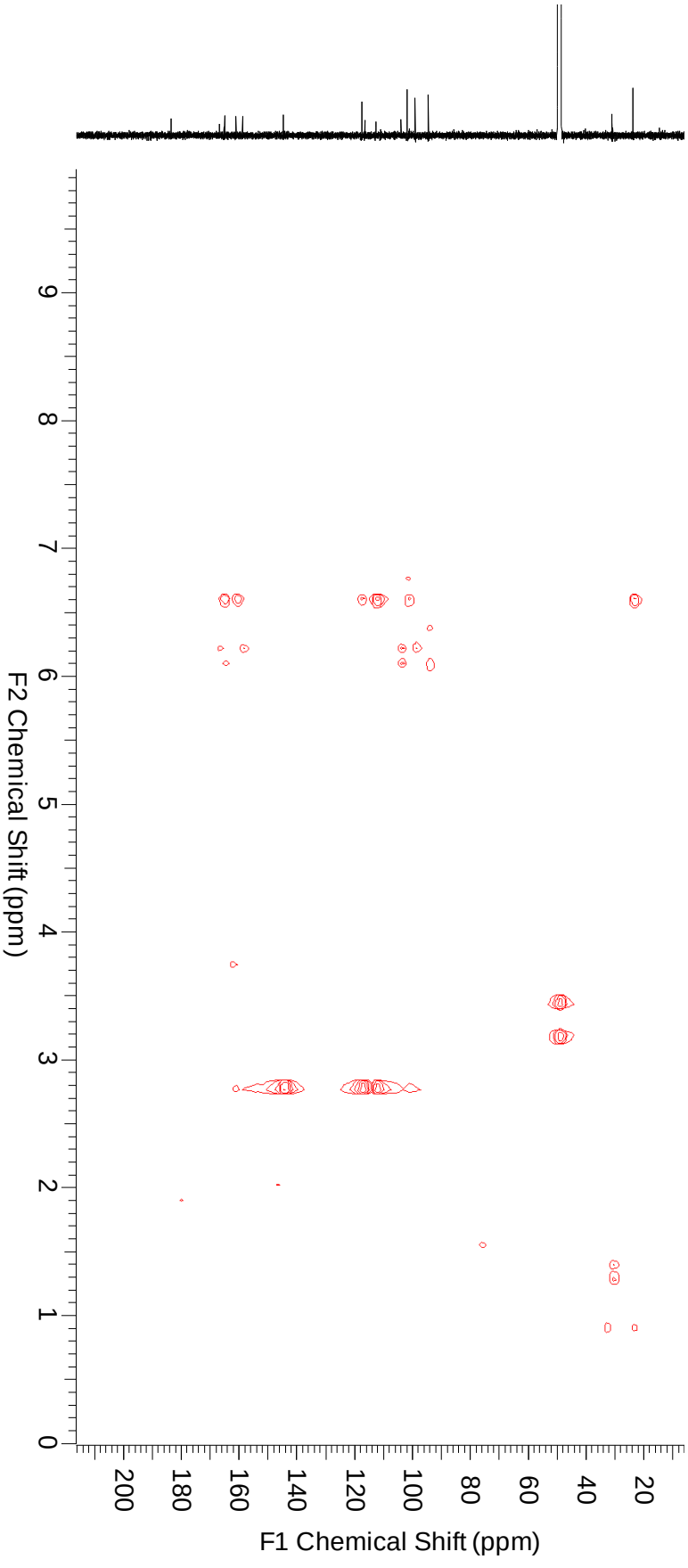


Figure A 17 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de la norlichéxanthone

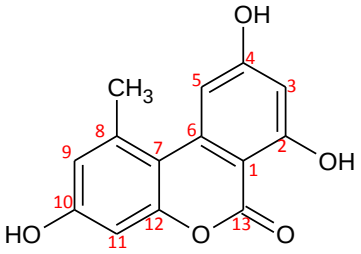
ANNEXE VI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN l'alternariol (351-N5)

1. Caractéristiques physico-chimiques

Alternariol (351-N5)

Formule brute : $C_{14}H_{10}O_5$
Poids moléculaire :258,0528 Da
T_{Ra} : 19,9 min ; **T_{Rb} :** 8,6 min
Spectre UV-visible : λ_{max} 202(50), 254(100), 288(20), 299(20), 338(23)
HRMS/MS: MS-ESI$^+$: m/z 259,0572[M+H]$^+$; **MS/MS :** 244,0323 (18) ; 241,0538 (18) ; 213,0548 (50); 185,0582 (100) 161,0605 (32); 139,0553 (30); 115,0545 (16)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	98,6			
2	167,0			
3	102,4	6,33 (d ; 1H ; 2,5Hz)	7,22	98,6; 106,2 ; 166,3 ; 168,5
4	166,3			
5	106,2	7,22 (d ; 1H ; 2,5Hz)	6,33	98,6 ; 102,4 ; 111,1 ; 167,0 ; 168,5
6	139,9			
7	111,1			
8	140,1			
9	118,7	6,68 (d ; 1H ; 2,5Hz)	2,75 ; 6,59	26,0 ; 102,9 ; 111,1 ; 160,1
10	160,1			
11	102,9	6,59 (d ; 1H ; 2,5Hz)	6,68	111,1 ; 118,7 ; 154,6 ; 160,1
12	154,6			
13	168,5			
8-CH_3	26,0	2,75 (s ; 3H)	6,68	106,2 ; 111,1 ; 118,7 ; 139,9

→Spectres RMN réalisés dans le $CDOD_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D de l'alternariol

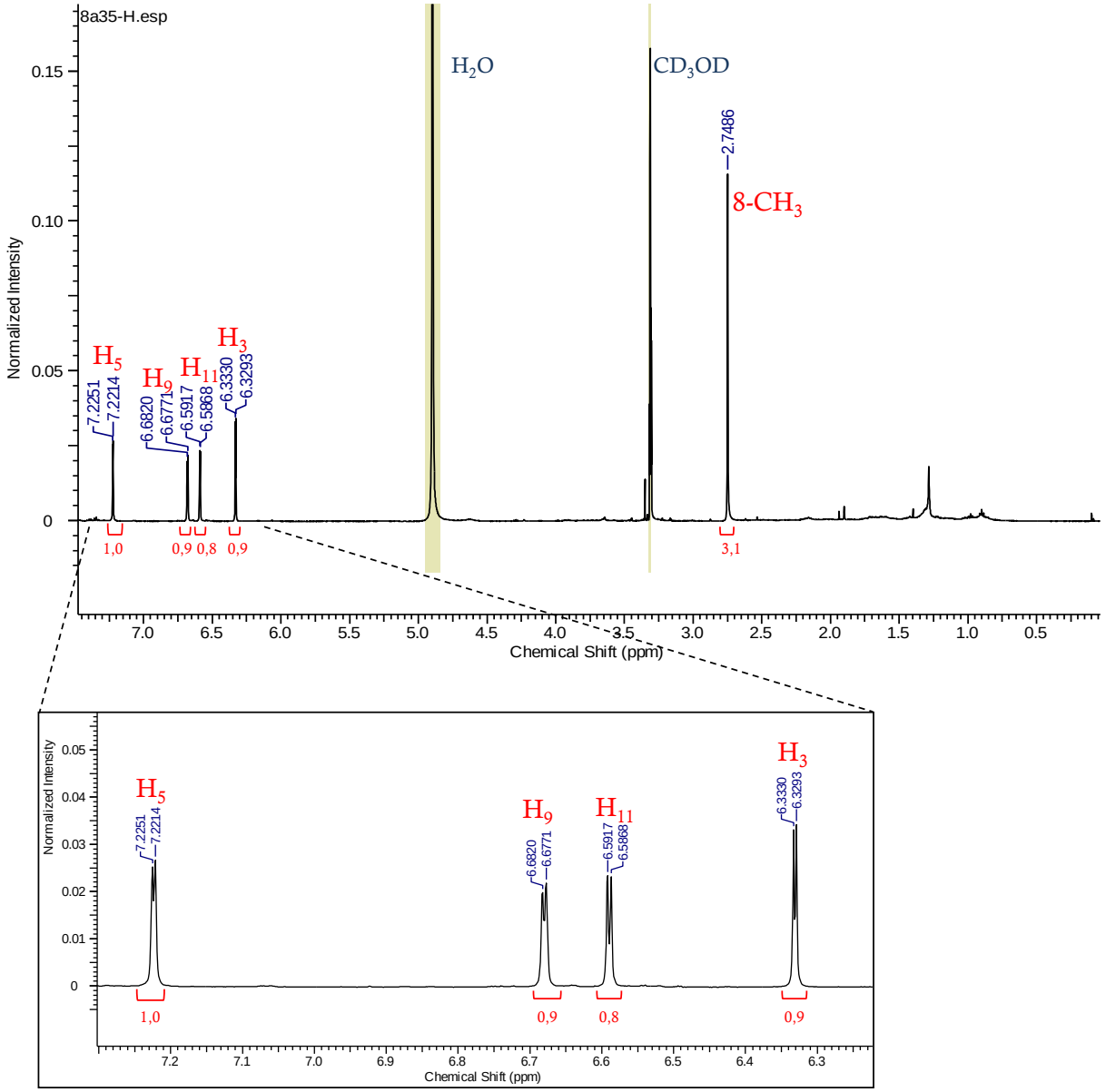


Figure A 18 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol

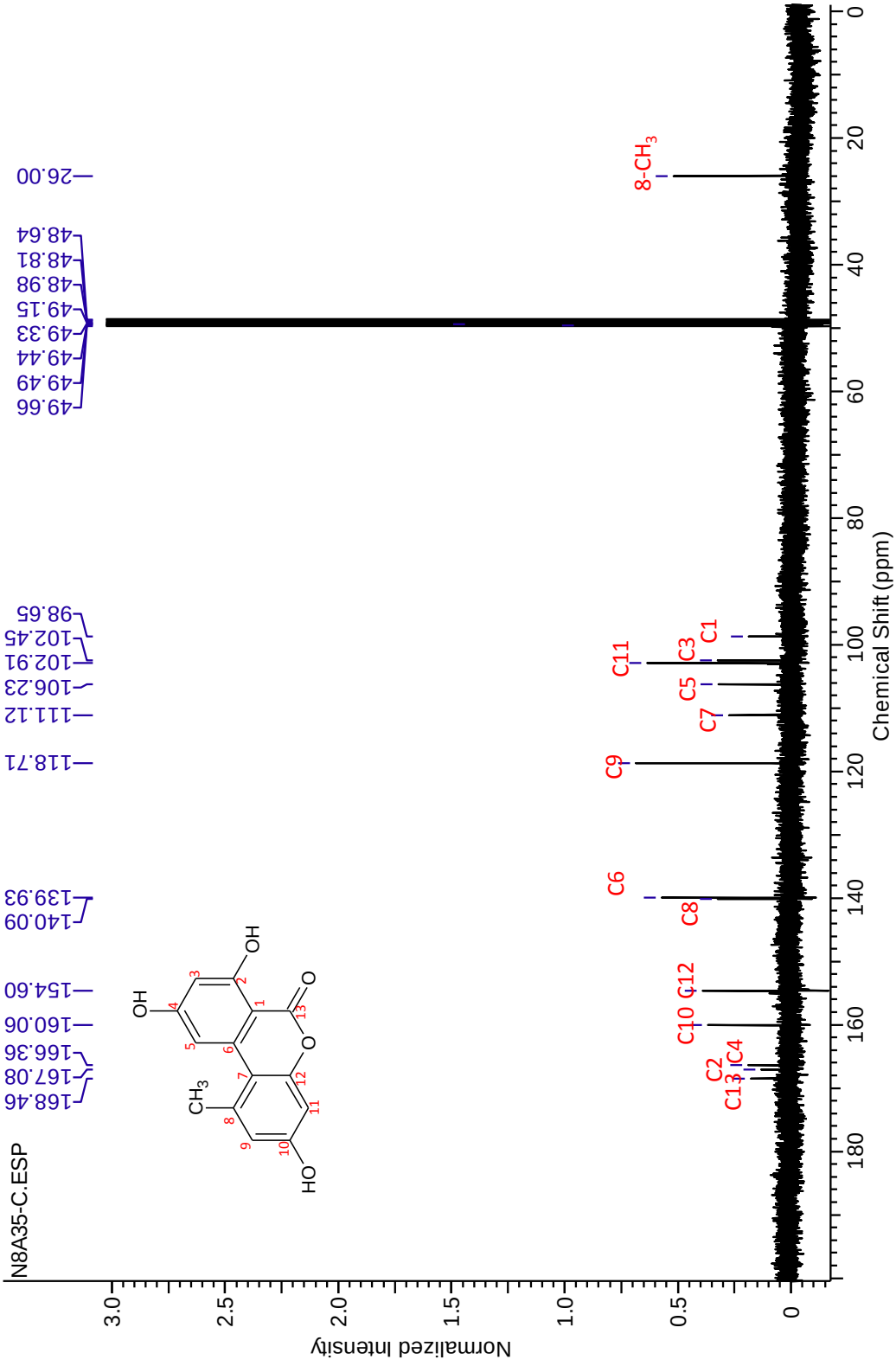


Figure A 19 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol

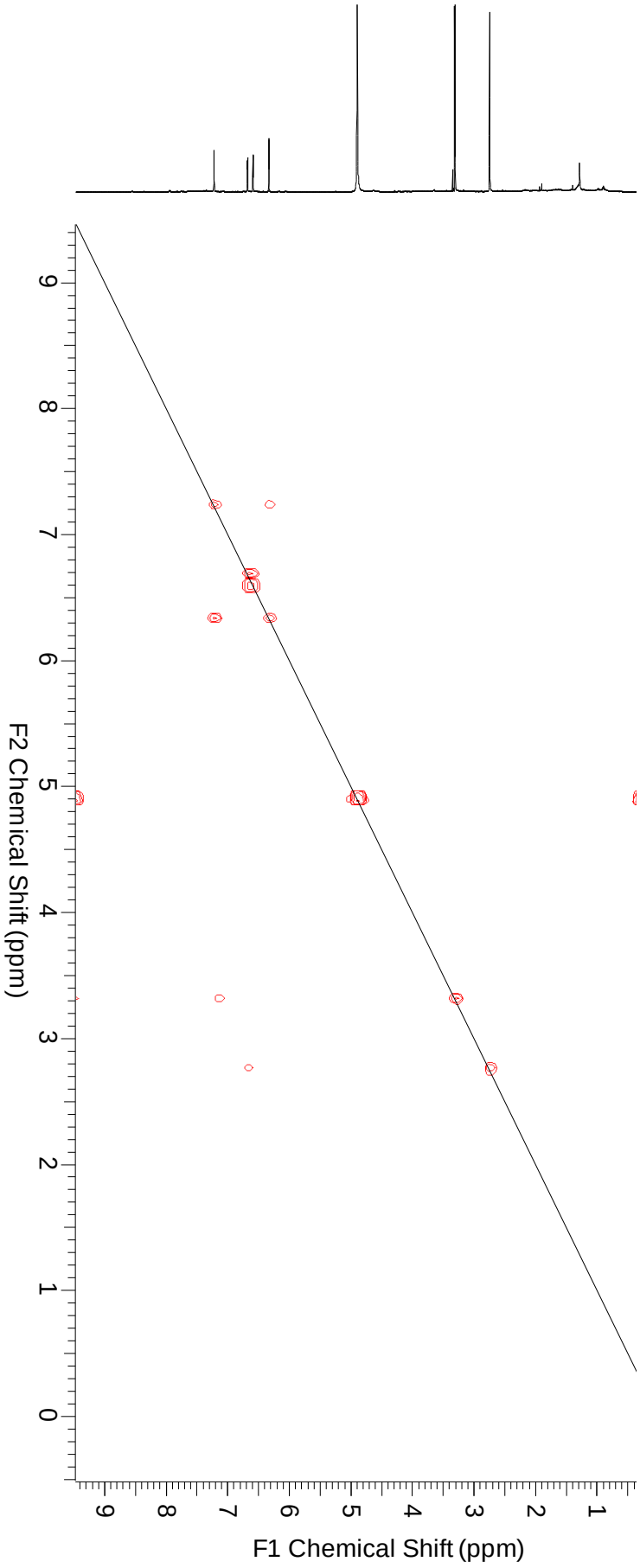


Figure A 20 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol

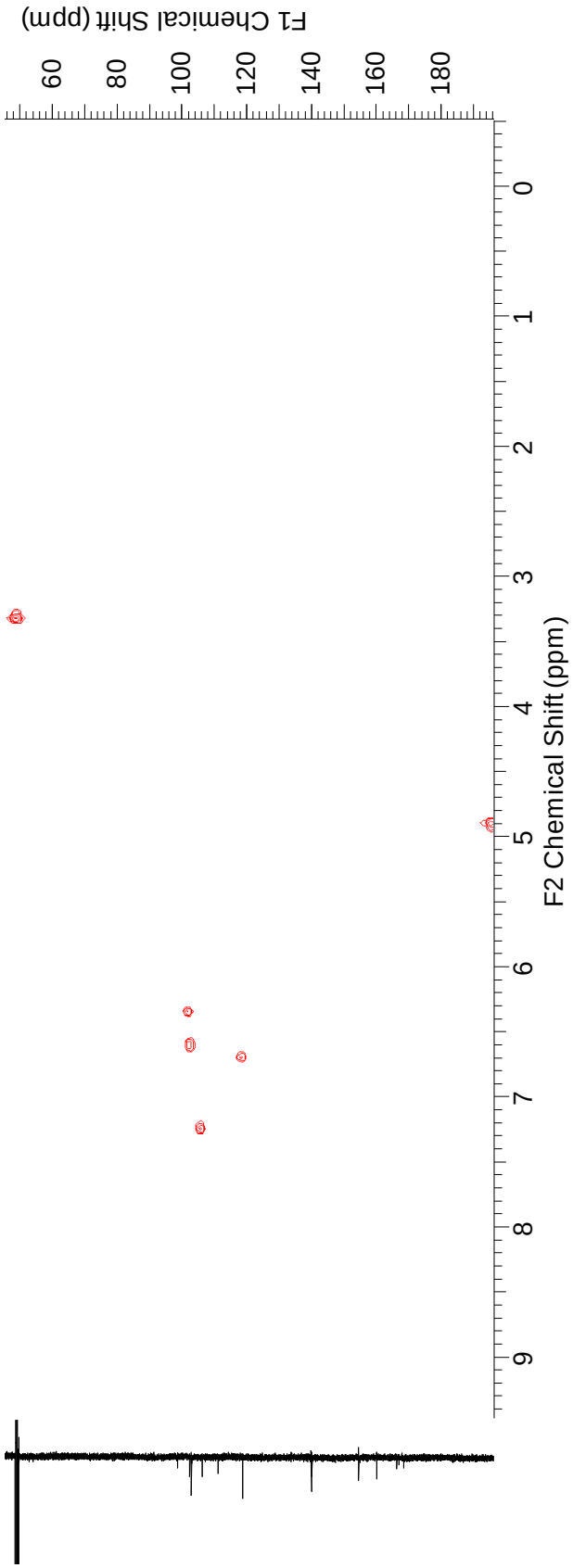


Figure A 21 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol

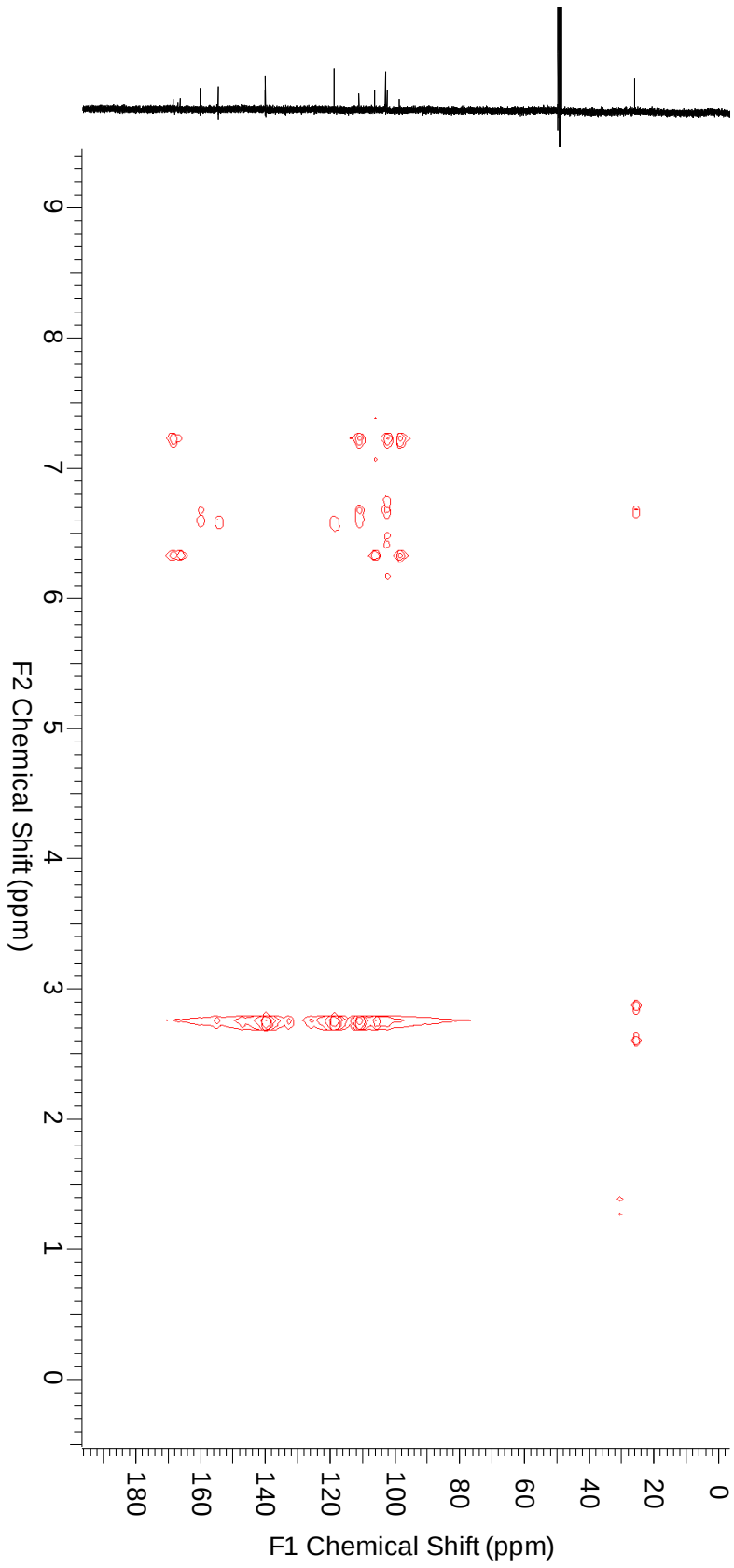


Figure A 22 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'alternariol

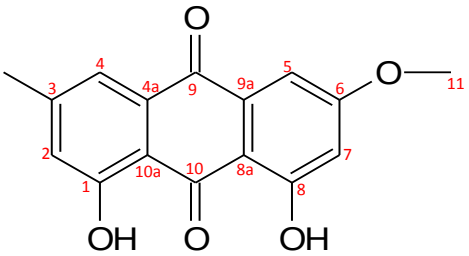
ANNEXE VII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN duphyscion (351-N6)

1. Caractéristiques physico-chimiques

Physcion (351-N6)

Formule brute : $C_{16}H_{12}O_5$
Poids moléculaire : 284,0685 Da
T_{Ra} : 31,4 min ; **T_{Rb} :** 15,0 min
Spectre UV-visible : λ_{max} 222(100), 254sh, 267(54),288(55), 440(36)
HRMS/MS : *m/z*285,0774 $[M+H]^+$ **MS/MS :** 253,0464 (33) ; 242,0542 (100) ; 225,0504 (40) 211,0730 (95) ; 197,0572 (35) ; 168,0557 (73) ; 151,0380 (33)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	162,4			
2	124,4	7,09 (s ; 1H)	2,46 ; 7,63	22,2 ; 113,7 ; 121,2
3	148,4			
4	121,2	7,63 (s; 1H)	2,46 ; 7,08	22,2 ; 113,7 ; 124,4 ; 182,0
4a	133			
5	108,1	7,37 (d ; 1H ; 2,4Hz)	6,69	106,6 ; 110,2 ; 182,0
6	166,5			
7	106,6	6,69 (d ; 1H ; 2,4Hz)	7,37	108,1 ; 110,2 ; 165,2
8	165,2			
8a	110,2			
9	182,0			
9a	135			
10	190,8			
10a	113,7			
11	56,1	3,95 (s ; 3H)		166,5
3-CH_3	22,2	2,46 (s ; 3H)	7,09 ; 7,63	121,2 ; 124,4 ; 148,4
1-OH		12,12 (s)		113,7 ;124,4 ; 162,4
8-OH		12,32 (s)		106,6 ; 110,9 ; 165,

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D du physcion

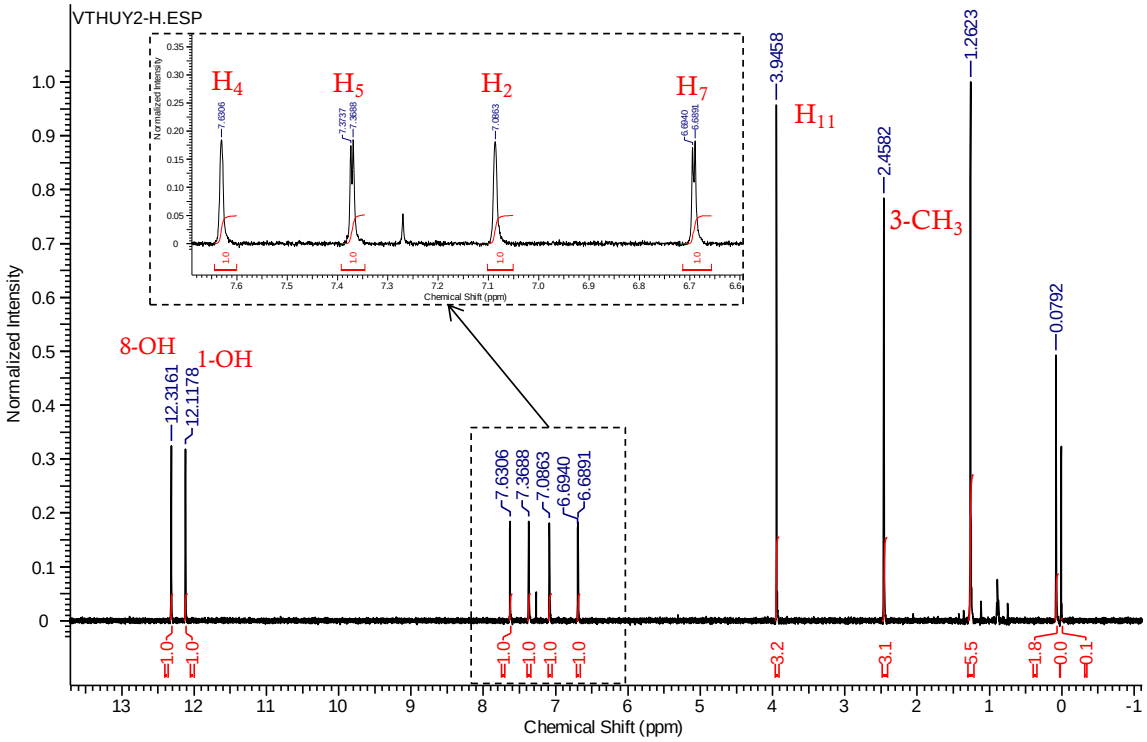


Figure A 23 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) du physcion

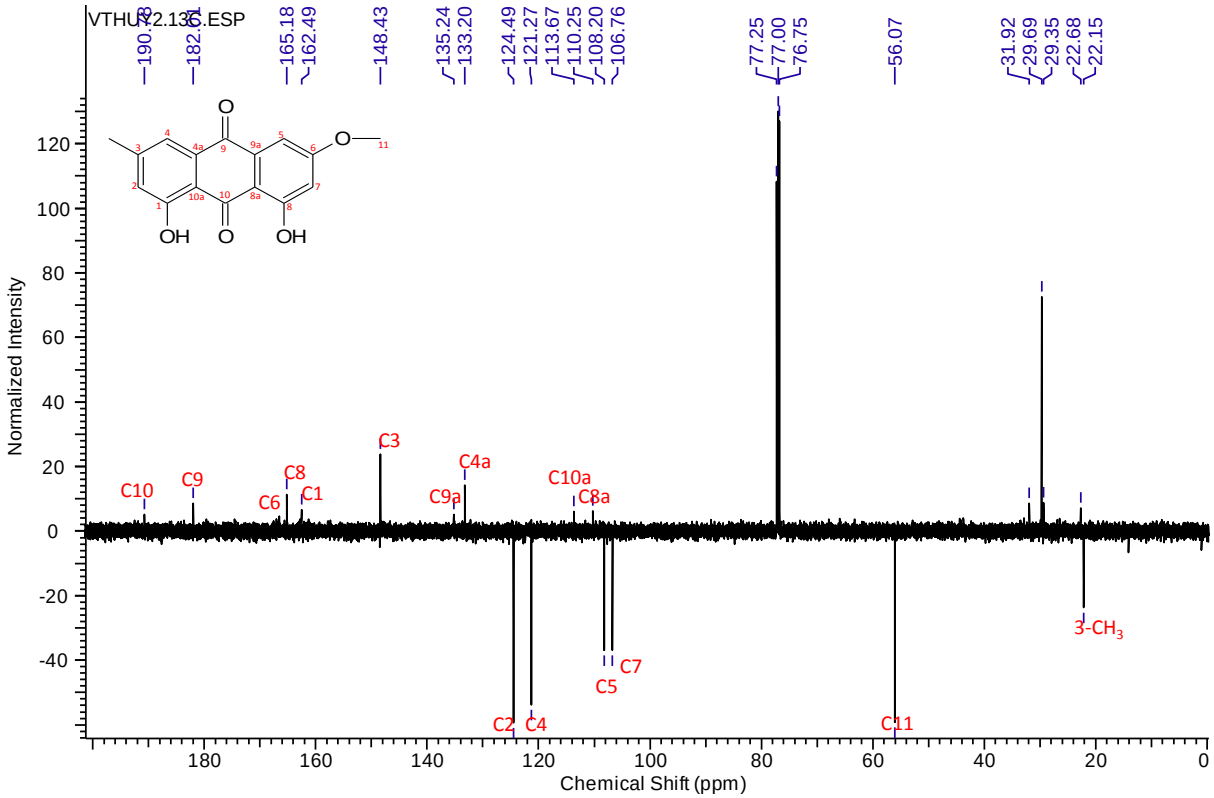


Figure A 24 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) du physcion

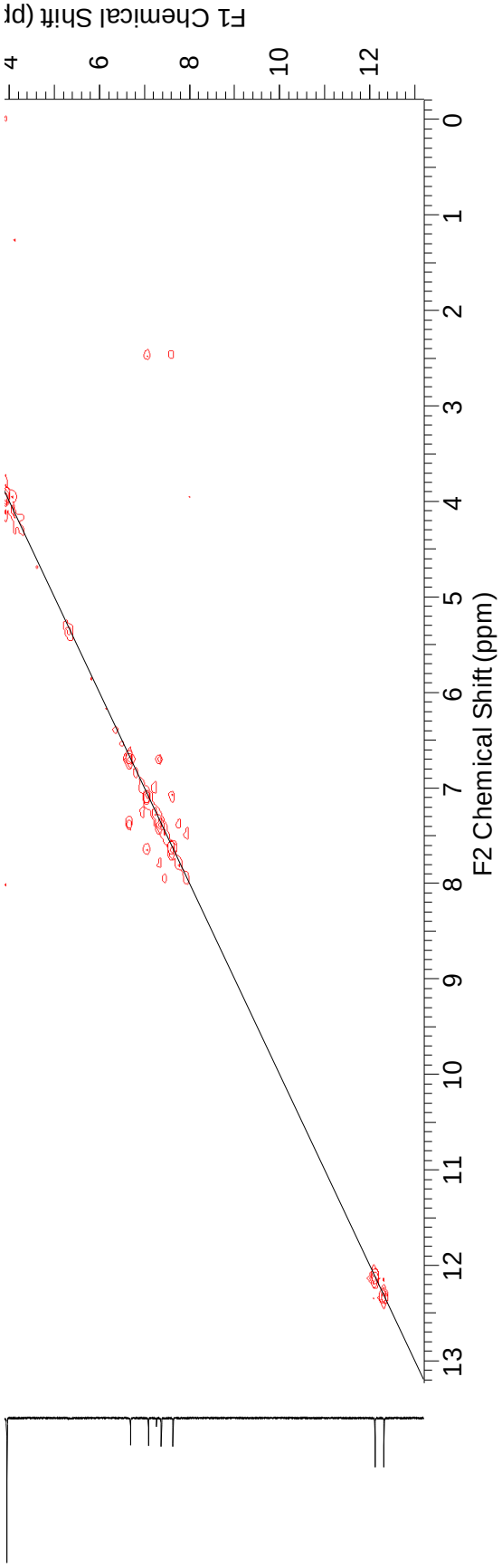


Figure A 25 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) du physcion

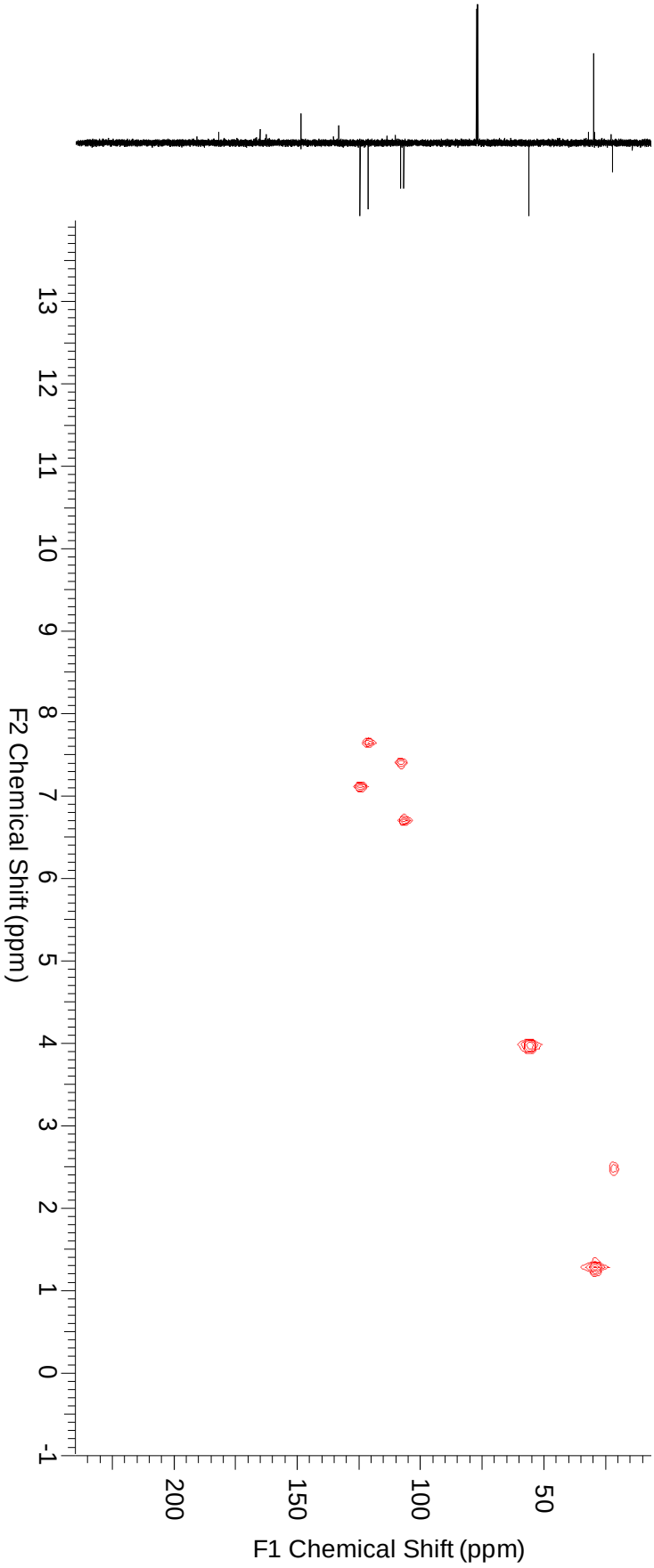


Figure A 26 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) du physcion

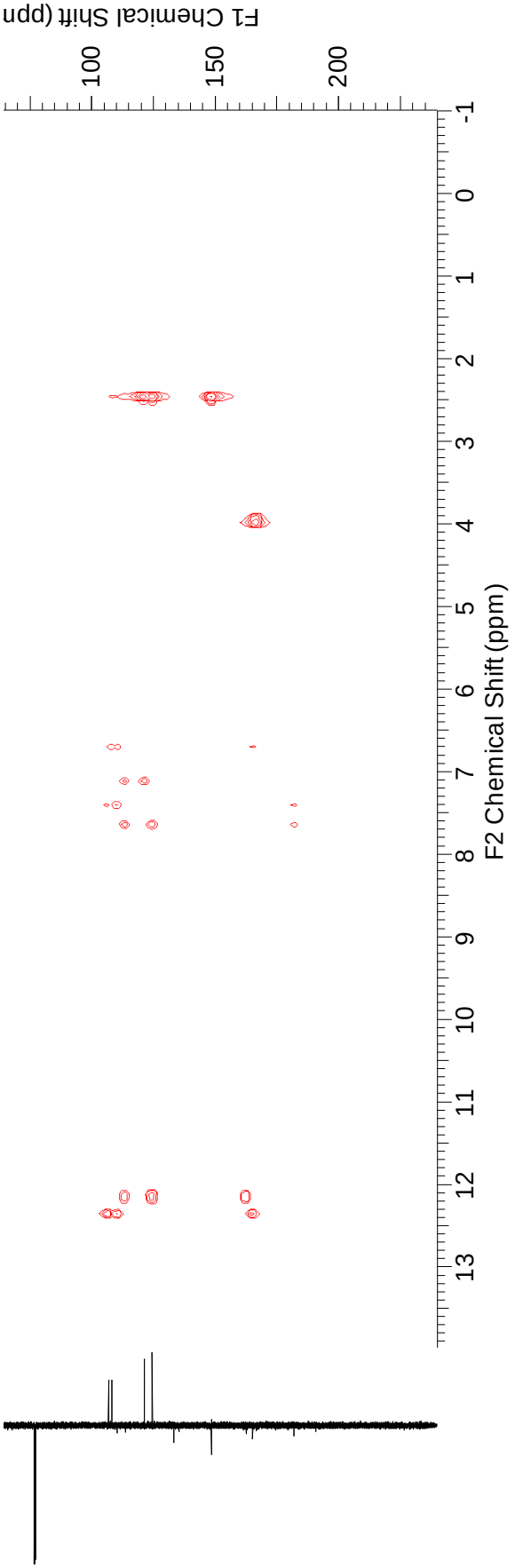


Figure A 27 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) du physcion

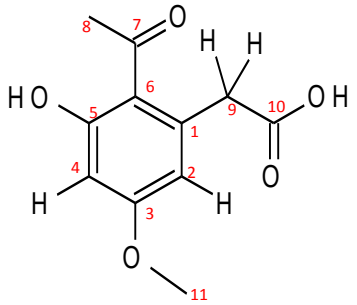
ANNEXE VIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de l'acide 3-O-methyl-curvulinique(351-N7)

1. Caractéristiques physico-chimiques

Acide 3-O-méthyl-curvulinique (351-N7)

Formule brute : $C_{11}H_{12}O_5$
Poids moléculaire : 224,0685 Da
T_{Ra} : 11,9 min ; **T_{Rb} :** 5,2 min
Spectre UV-visible : λ_{max} End(100), 217 (63), 269 (33), 297 (23)
HRMS/MS : *m/z*225,0757 $[M+H]^+$MS/MS : 207,0683 (48) ; 165,0582 (14) ; 137,0623 (100)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	HSQC ^{1}H-^{13}C (1J) ^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)	COSY ^{1}H-^{1}H ^{1}H, δH (ppm)	HMBC ^{1}H-^{13}C (2J, 3J, 4J) ^{13}C, δC (ppm)
1	137,8			
2	110,8	6,34 (d ; 1H ; 2,4Hz)	3,69 ; 6,36	40,7 ; 101,2 ; 121,9 ; 163,8 ; 175,4
3	163,8			
4	101,2	6,36 (d ; 1H ; 2,4Hz)	6,34	110,8 ; 121,9 ; 160,6 ; 163,8 ; 206,4
5	160,6			
6	121,9			
7	206,4			
8	32,5	2,53 (s ; 3H)		121,9 ; 206,4
9	40,7	3,69 (s ; 2H)		110,8 ; 121,9 ; 137,8 ; 175,4
10	175,4			
11	55,9	3,78 (s ; 3H)		163,8

→Spectres RMN réalisés dans le $CDOD_3$

2. Spectres RMN 1D et 2D de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique

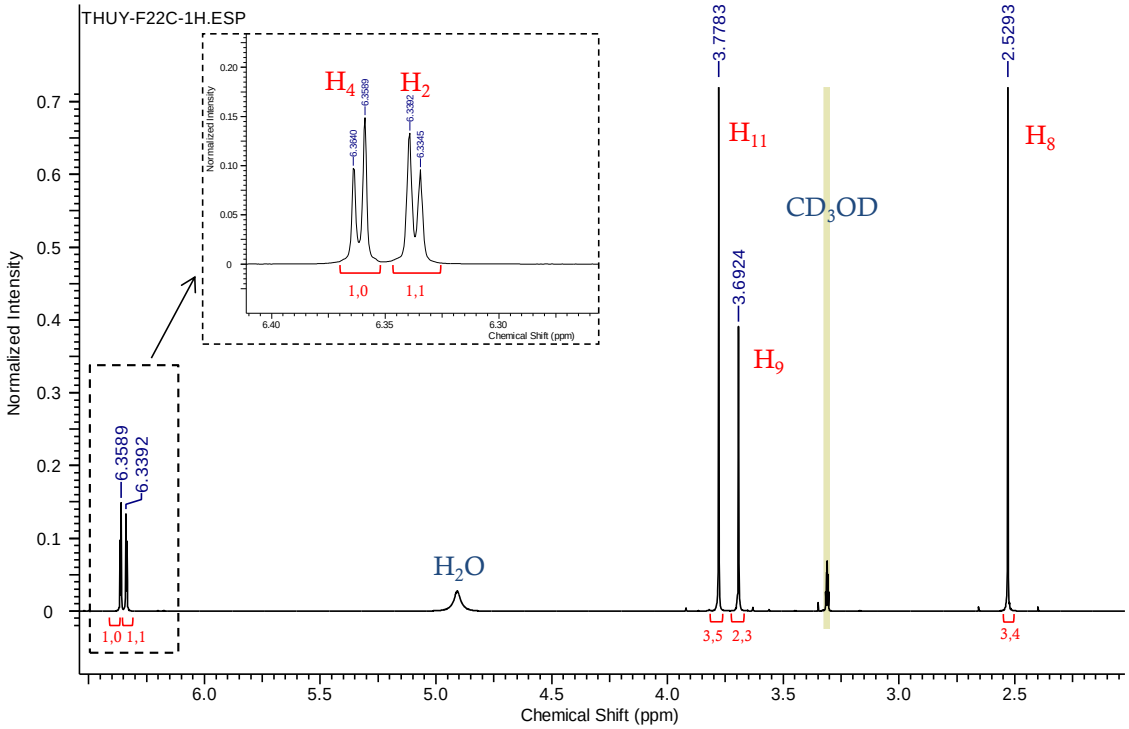


Figure A 28 : Spectre ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-curvulinique

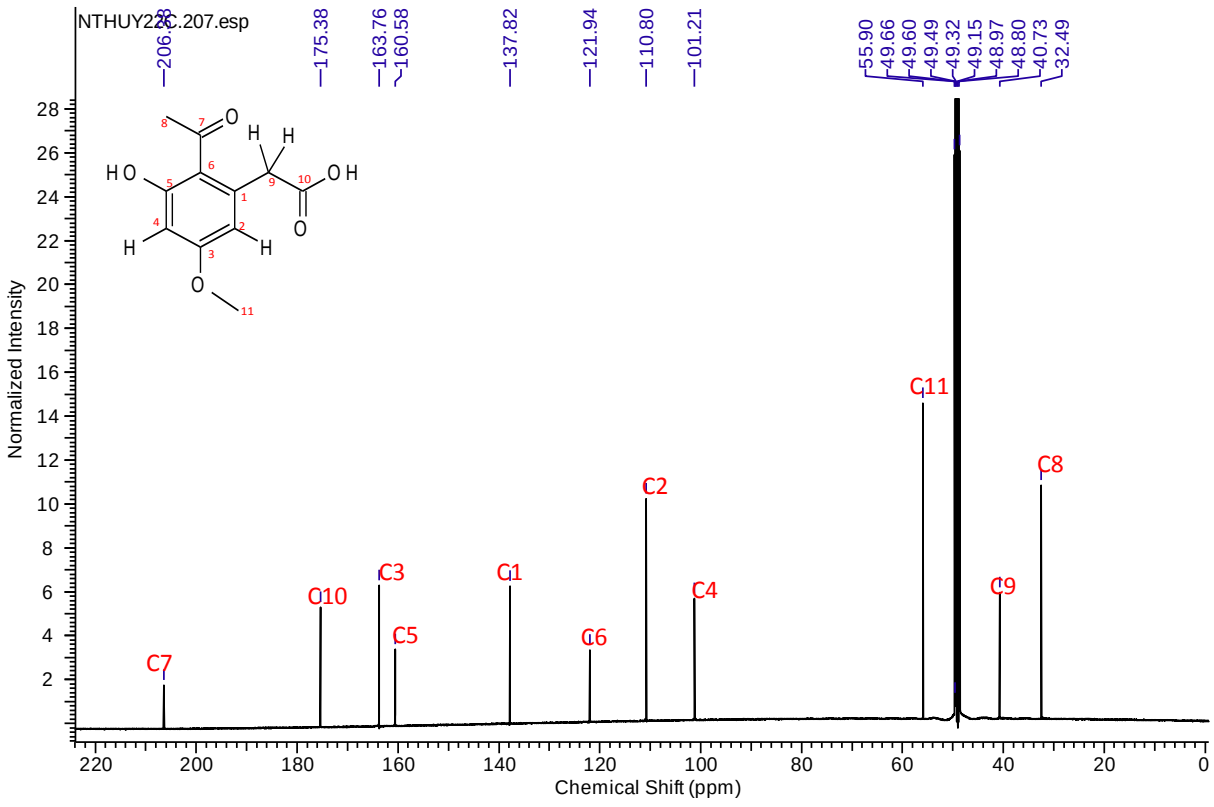


Figure A 29 : Spectre ^{13}C-RMN (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-curvulinique

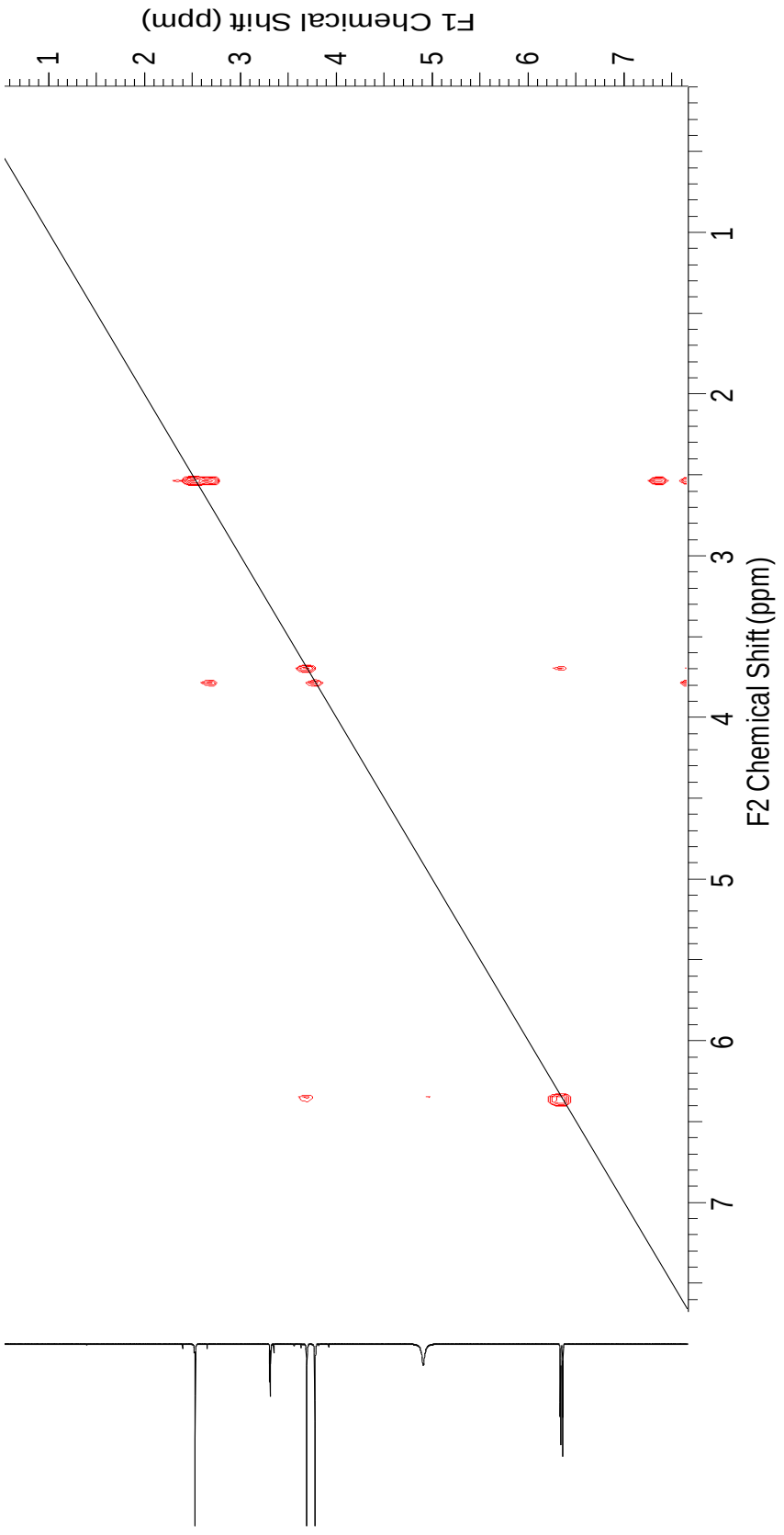


Figure A 30 : Spectre COSY (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique

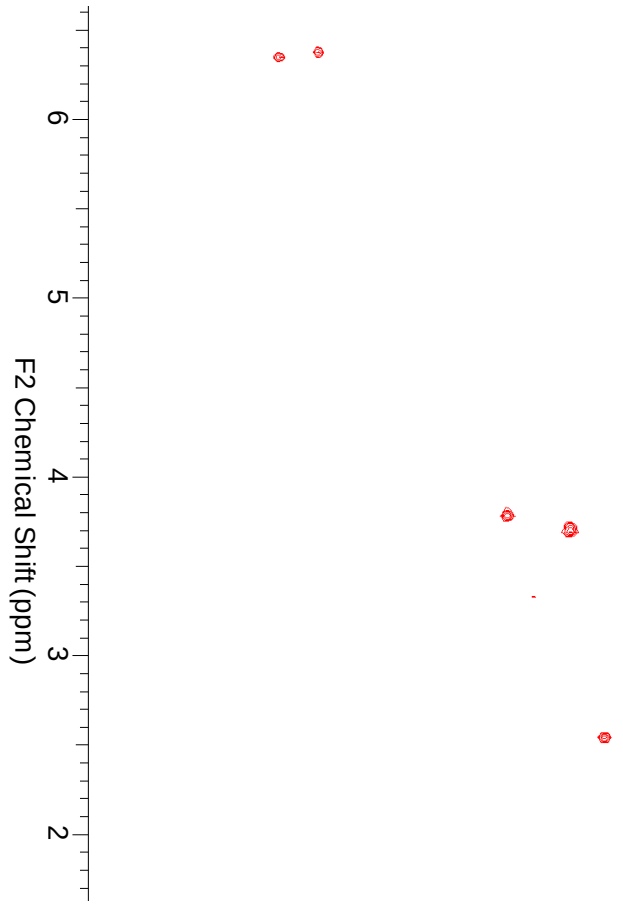


Figure A 51 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique

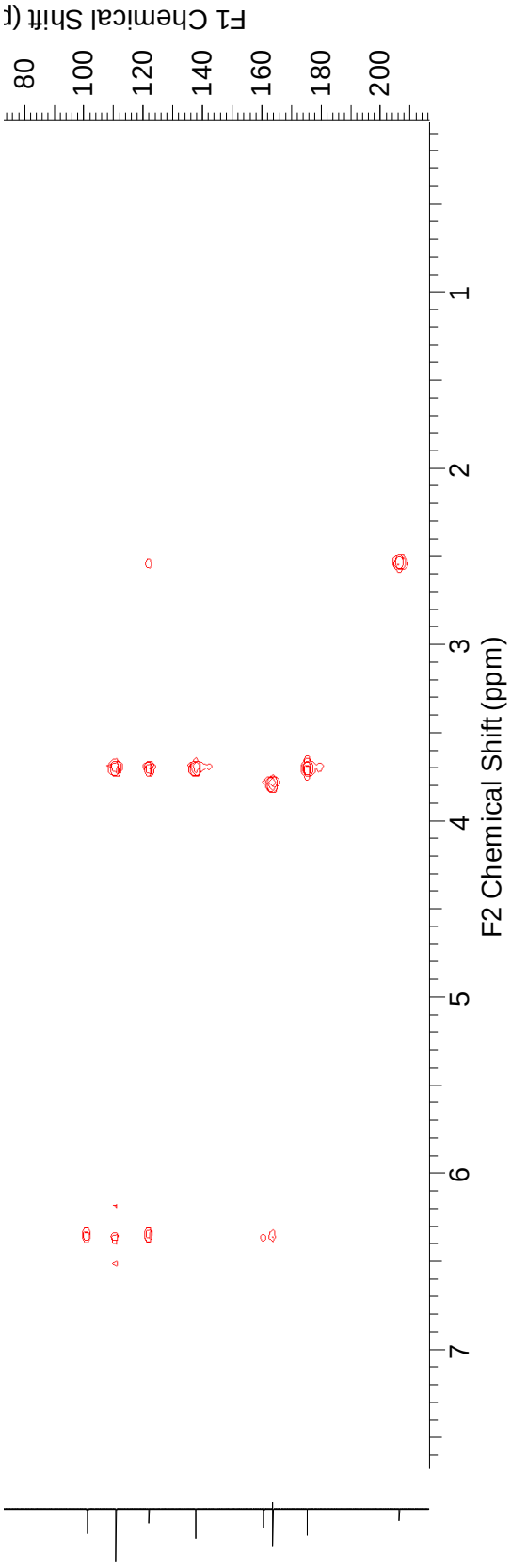


Figure A 32 : Spectre HMBC (500 MHz, CD_3OD) de l'acide 3-O-méthyl-curvulinique

ANNEXE IX : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN de la ligérine

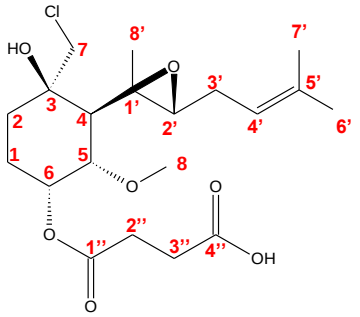
1. Caractéristiques physico-chimiques

Ligérine

7-chloro-6-O-succinyl-fumagillol

Formule brute : $C_{20}H_{31}ClO_7$
Poids moléculaire : 418,1758 Da
T_{Ra} : 22,2 min ; **T_{Rb} :** 11,6 min
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : *m/z* 441,1694 $[M+Na]^+$ **MS/MS :** 405,1922 (92) ;387,1847 (3) ; 341,1509 (10) ; 335,11 (2) ; 323,141 (13) ; 305,1748 (14) ; 287,163 (28) ; 257,1511 (2) ; 255,1372 (3)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	23,4 (CH_2)	1,80-1,86 (m ; 2H)
2	29,3 (CH_2)	1,42 (m ; 1H) 2,16 (m ; 1H)
3	76,7 (Cq)	
4	43,2 (CH)	2,42 (m ; 1H)
5	78,4 (CH)	3,27 (m ; 1H)
6	66,4 (CH)	5,49 (s ; 1H)
7	50,3 (CH_2)	3,49(d ; 1H ; 10 Hz) 3,83 (d ; 1H ; 10 Hz)
8	56,6 (CH_3)	3,27 (s ; 3H)
1'	64,0 (Cq)	
2'	62,3 (CH)	2,95 (t ; 1H ; 5,5 Hz)
3'	27,4 (CH_2)	2,16(m ; 1H) 2,42 (m ; 1H)
4'	118,2 (CH)	5,17 (t ; 1H ; 7,3 Hz)
5'	134,8 (Cq)	
6'	25,8 (CH_3)	1,73 (s ; 3H)
7'	17,9 (CH_3)	1,66 (s ; 3H)
8'	22,2 (CH_3)	1,48 (s ; 3H)
1''	171,5 (Cq)	
2''	29,3 (CH_2)	2,71 (m ; 2H)
3''	29,3 (CH_2)	2,71 (m ; 2H)
4''	176,9 (Cq)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D de la ligérine

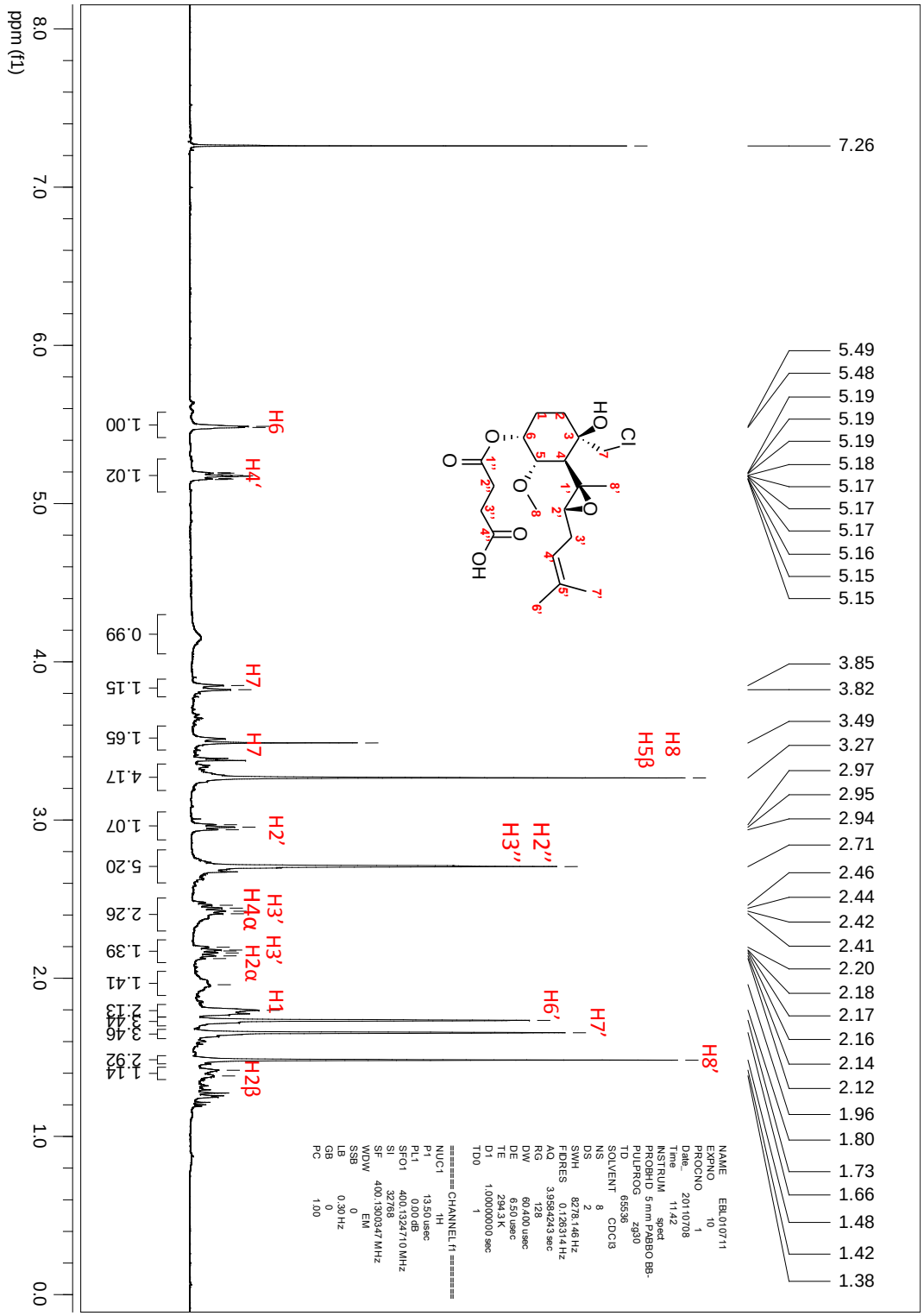


Figure A 33 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) de la ligérine

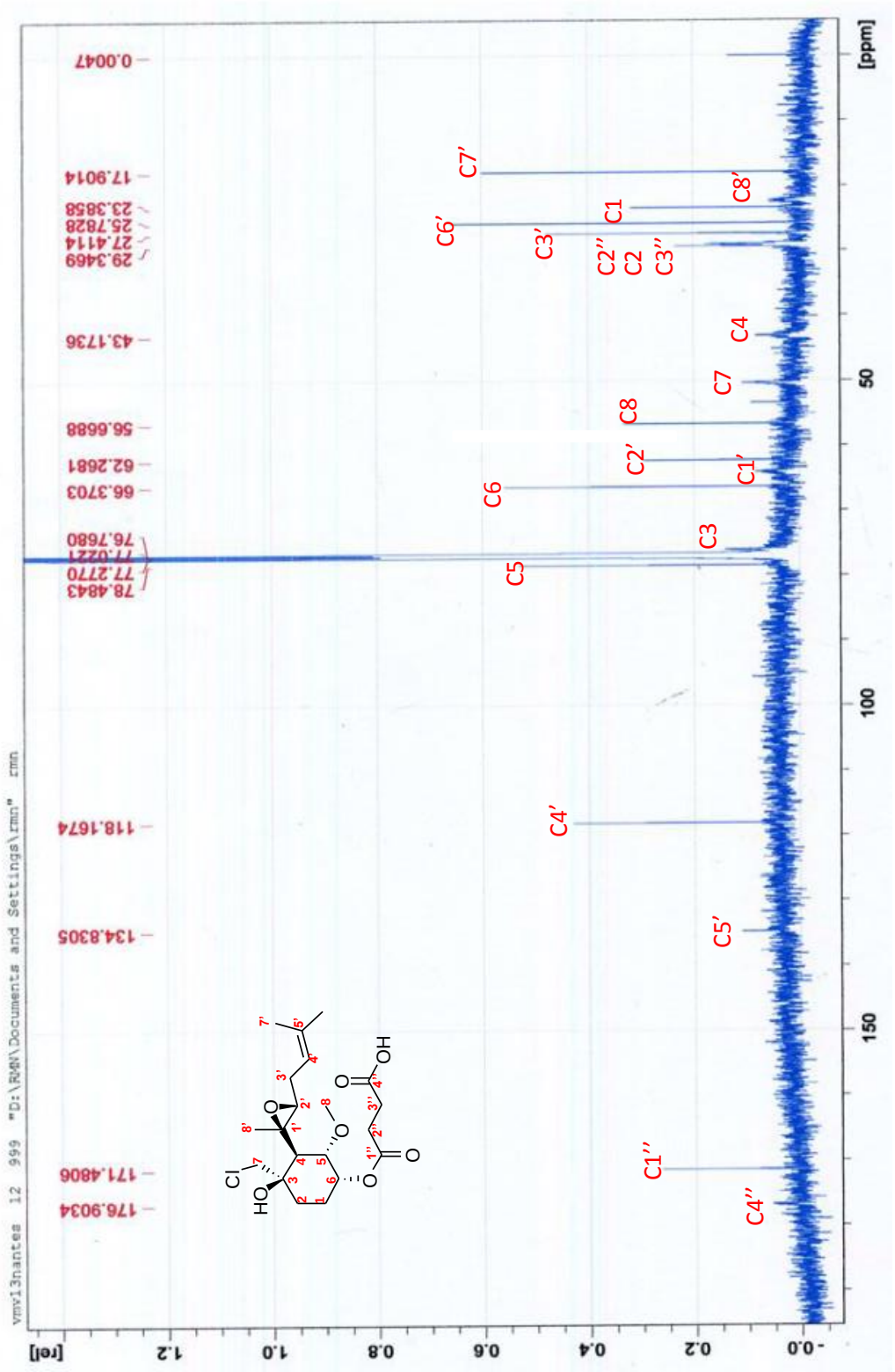


Figure A 34 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) de la ligérine

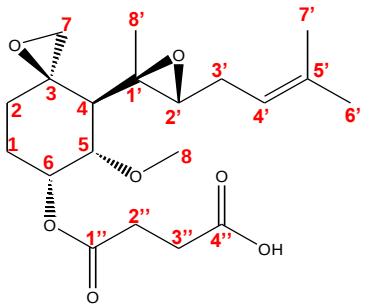
ANNEXE X : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 6-O-succinyl-fumagillol

1. Caractéristiques physico-chimiques

6-O-succinyl-fumagillol
6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol

Formule brute : $C_{20}H_{30}O_7$
Poids moléculaire : 382,1992 Da
T_{Ra} : 20,6 min ; **T_{Rb} :** 10,3 min
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : *m/z* 405,184 $[M+Na]^+$ **MS/MS :** 405,192 (28); 305,1757 (100); 287,1638 (89); 257,1525 (6); 255,1396 (9); 233,0808 (8)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	26,0 (CH_2)	1.82-1.86 (m ; 2H)
2	29,7 (CH_2)	1.10 (m ; 1H) 2.05 (m ; 1H)
3	59,7 (C)	
4	48,1 (CH)	1.98 (m ; 1H)
5	79,2 (CH)	3.63 (dd ; 1H ; 4 et 12Hz)
6	67,2 (CH)	5.68 (s ; 1H)
7	51,2 (CH_2)	2.56 (d ; 1H ; 4.3 Hz) 2.96 (d ; 1H ; 4.3 Hz)
8	57,1 (CH_3)	3.40 (s ; 3H)
1'	59,6 (C)	
2'	61,5 (CH)	2.63 (t ; 1H ; 5.0 Hz)
3'	27,7 (CH_2)	2.17 (m ; 1H) 2.39 (m ; 1H)
4'	118,7 (CH)	5.19 (t ; 1H ; 7.0 Hz)
5'	135,4 (C)	
6'	18,3 (CH_3)	1.76 (s; 3H)
7'	26,1 (CH_3)	1.68 (s; 3H)
8'	14,0 (CH_3)	1.2 (s; 3H)
1''	171,9 (C)	
2''	29,7 (CH_2)	2.71 (s; 2H)
3''	29,7 (CH_2)	2.71 (s; 2H)
4''	175,7 (C)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du 6-O-succinyl-fumagillol

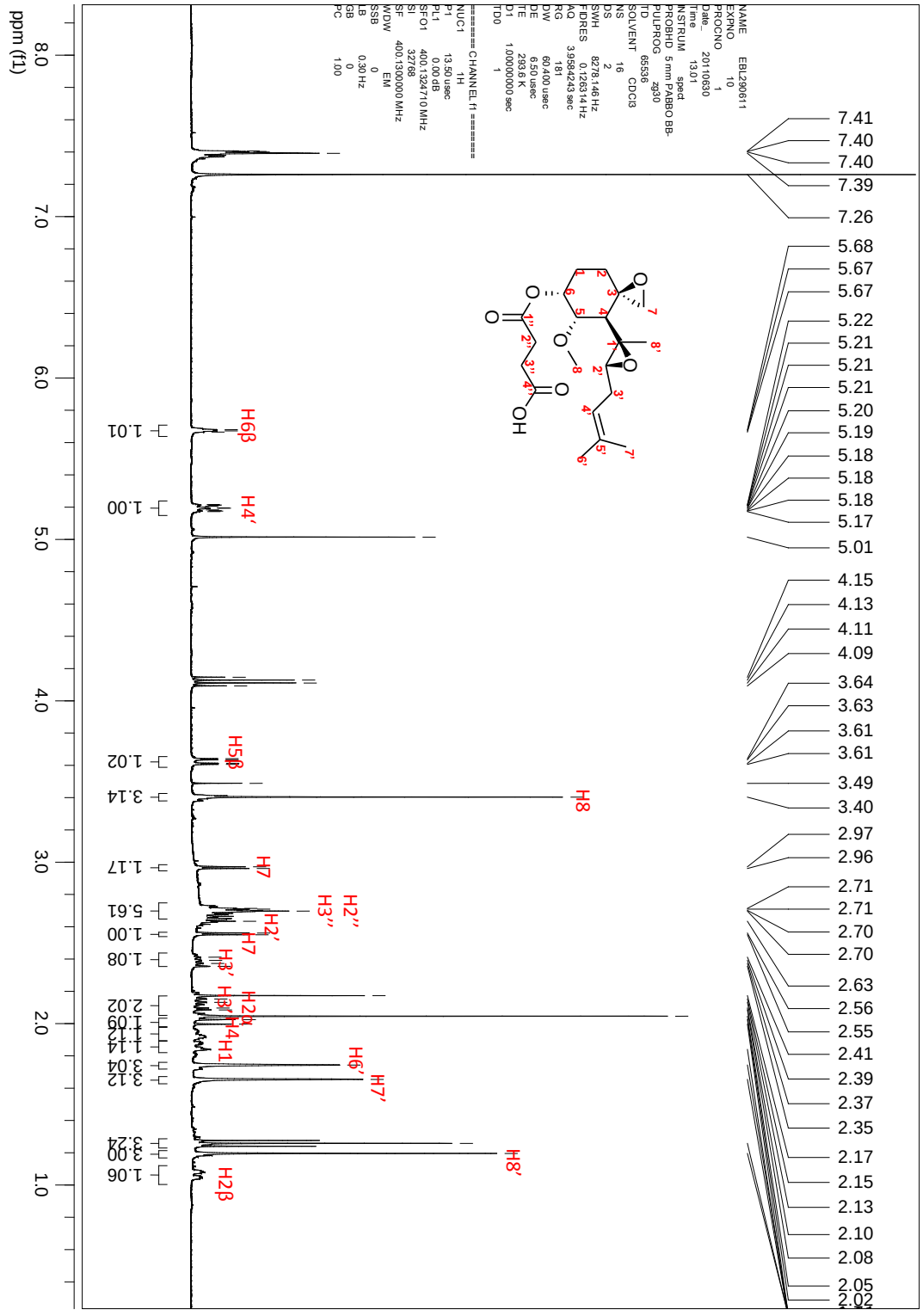


Figure A 35 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 6-O-succinyl-fumagillol

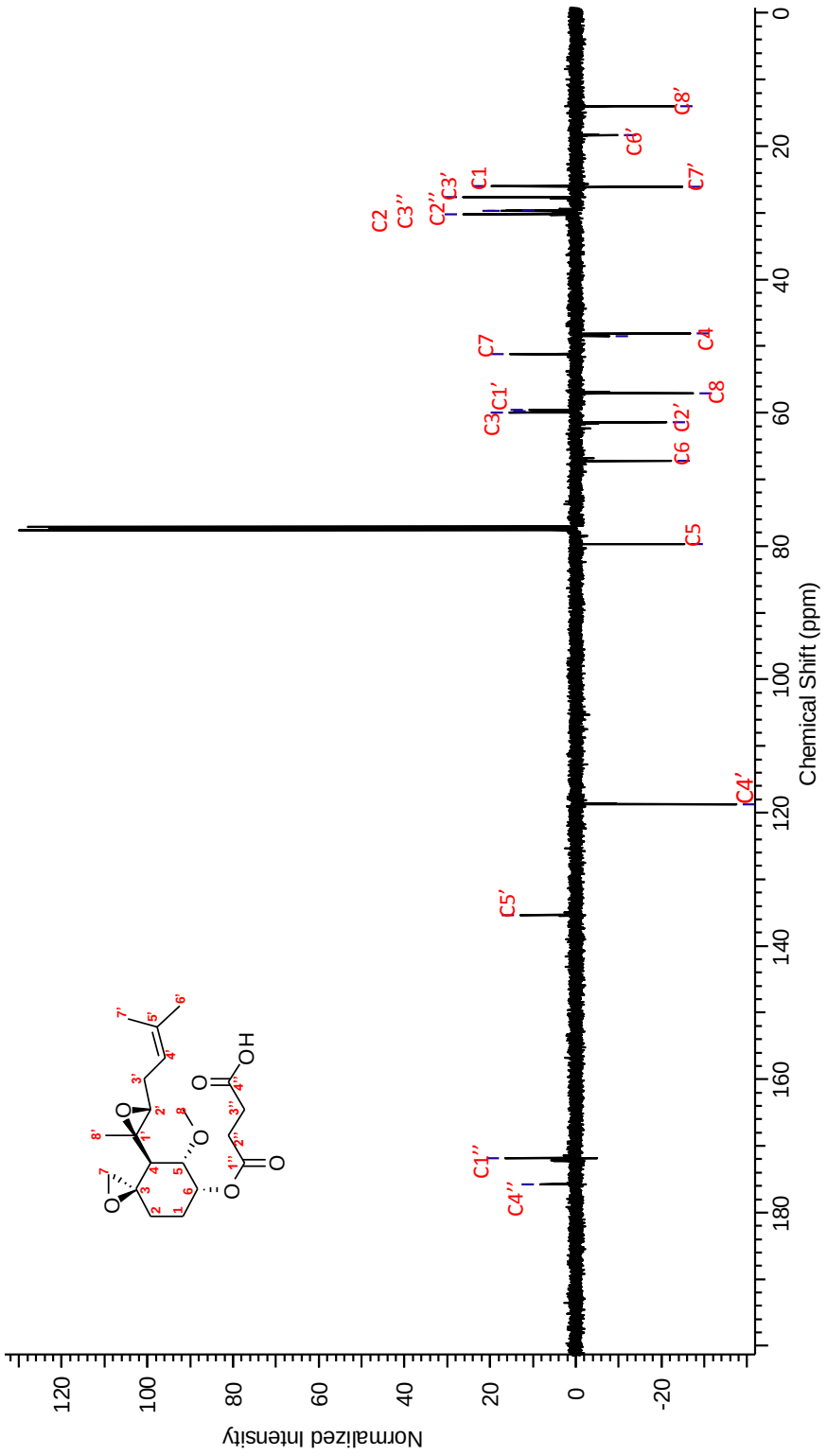


Figure A 36 : Spectre RMN ^{13}C (APT, 500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 6-O-succinyl-fumagillol

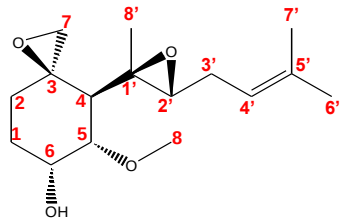
ANNEXE XI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du fumagillol

1. Caractéristiques physico-chimiques

Fumagillol

Formule brute : $C_{16}H_{26}O_4$
Poids moléculaire : 282,1831 Da
T_{Ra} : 19,3 min; **T_{Rb} :** 9,3 min
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : *m/z* 283,1904 $[M+H]^+$ **MS/MS :** 265,1828 (91) ; 251,166 (100) ; 247,1702 (19) ; 233,1561 (91) ; 215,1376 (14) ; 211,1366 (15) ; 187,1485 (19) ; 139,0732 (14) ; 134,0988 (75)

Formule développée



Position	^{1}**H, δH** (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	1,75-1,80 (m ; 2H)
2	0,96(m ; 1H) 2,19 (m ; 1H)
3	
4	1,93 (d ; 1H ; 11,2 Hz)
5	3,62 (dd ; 1H ; 2,8 et 11,2 Hz)
6	4,37 (m ; 1H)
7	2,54 (d ; 1H ; 10,8 Hz) 2,94 (d ; 1H ; 10,8 Hz)
8	3,62 (s ; 3H)
1'	
2'	2,58 (t ; 1H ; 6,4 Hz) 2,17 (m ; 1H)
3'	2,35 (m ; 1H)
4'	5,20 (t ; 1H ; 6,8 Hz)
5'	
6'	1,73 (s ; 3H)
7'	1,65 (s ; 3H)
8'	1,21 (s ; 3H)

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectre RMN 1D du fumagillol

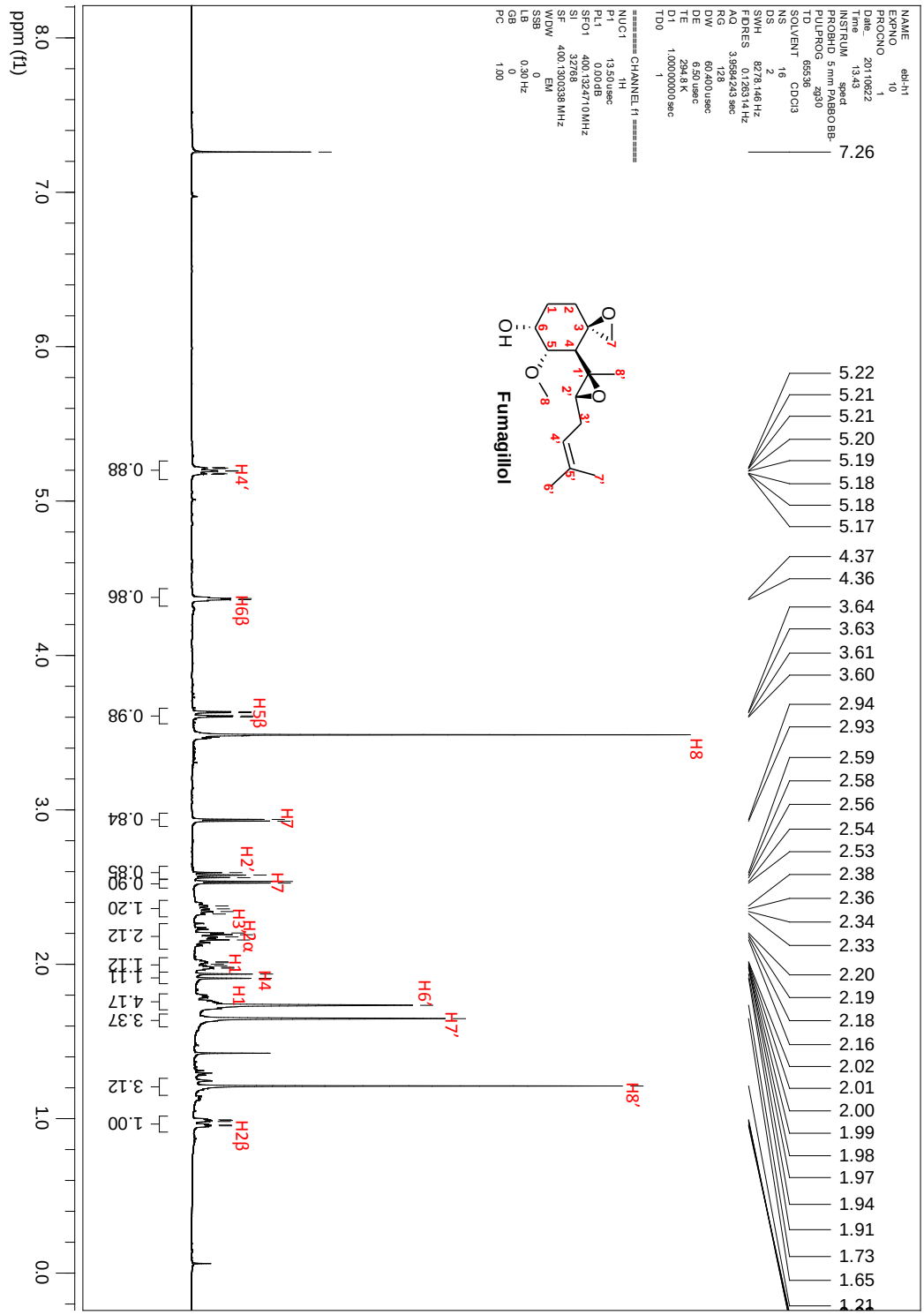


Figure A 37 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du fumagillol

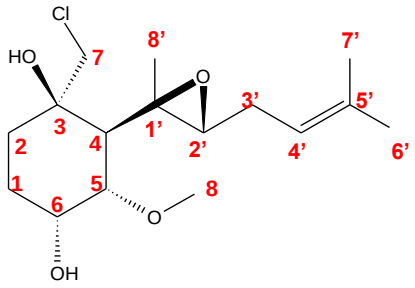
ANNEXE XII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 7-chloro-fumagillol

1. Caractéristiques physico-chimiques

7-chloro-fumagillol

Formule brute : $C_{16}H_{27}O_4Cl$
Poids moléculaire : 318,1598 Da
T_{Ra} : 20,9 min ; **T_{Rb} :** 10,7 min
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : *m/z* 341,1512 $[M+Na]^+$ **MS/MS :** 305,1768 (100) ; 324,9887 (7) ; 233,1558 (2) ; 311,1408 (2) ; 187,1483 (2)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	24,6 (CH_2)	1,82-1,86 (m ; 2H)
2	30,0 (CH_2)	1,37(m ; 1H) 2,10 (m ; 1H)
3	76,5 (Cq)	
4	42,6 (CH)	2,40 (m ; 1H)
5	80,8 (CH)	3,32 (m ; 1H)
6	64,2 (CH)	4,21 (s ; 1H)
7	51,0 (CH_2)	3,49 (d ; 1H ; 10,8 Hz) 3,80 (d ; 1H ; 10,8 Hz)
8	56,6 (CH_3)	3,34 (s ; 3H)
1'	63,6 (Cq)	
2'	62,5 (CH)	2,99 (t ; 1H ; 5 Hz)
3'	27,8 (CH_2)	2,18 (m ; 1H) 2,43 (m ; 1H)
4'	118,6 (CH)	5,19 (t ; 1H ; 6,8 Hz)
5'	135,1 (Cq)	
6'	26,1 (CH_3)	1,74 (s ; 3H)
7'	18,2 (CH_3)	1,66 (s ; 3H)
8'	22,5 (CH_3)	1,47 (s ; 3H)

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du 7-chloro-fumagillol

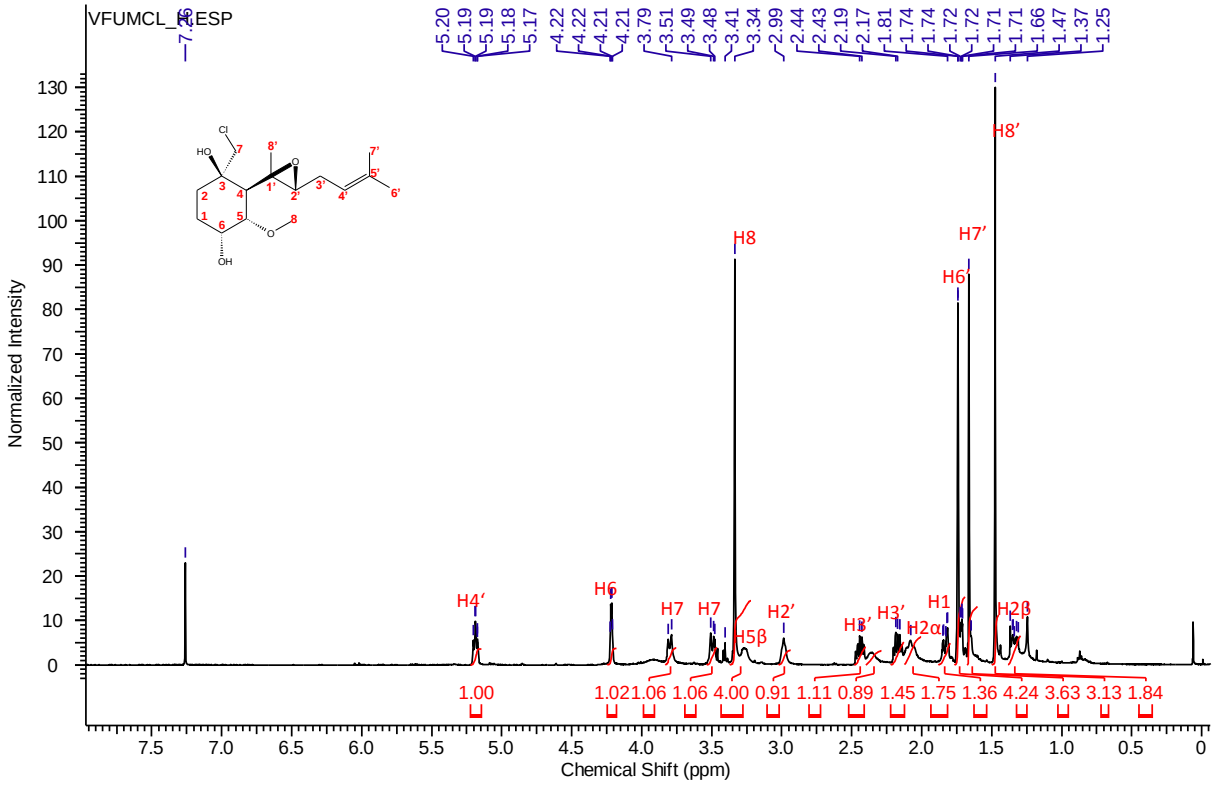


Figure A 38 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 7-chloro-fumagillol

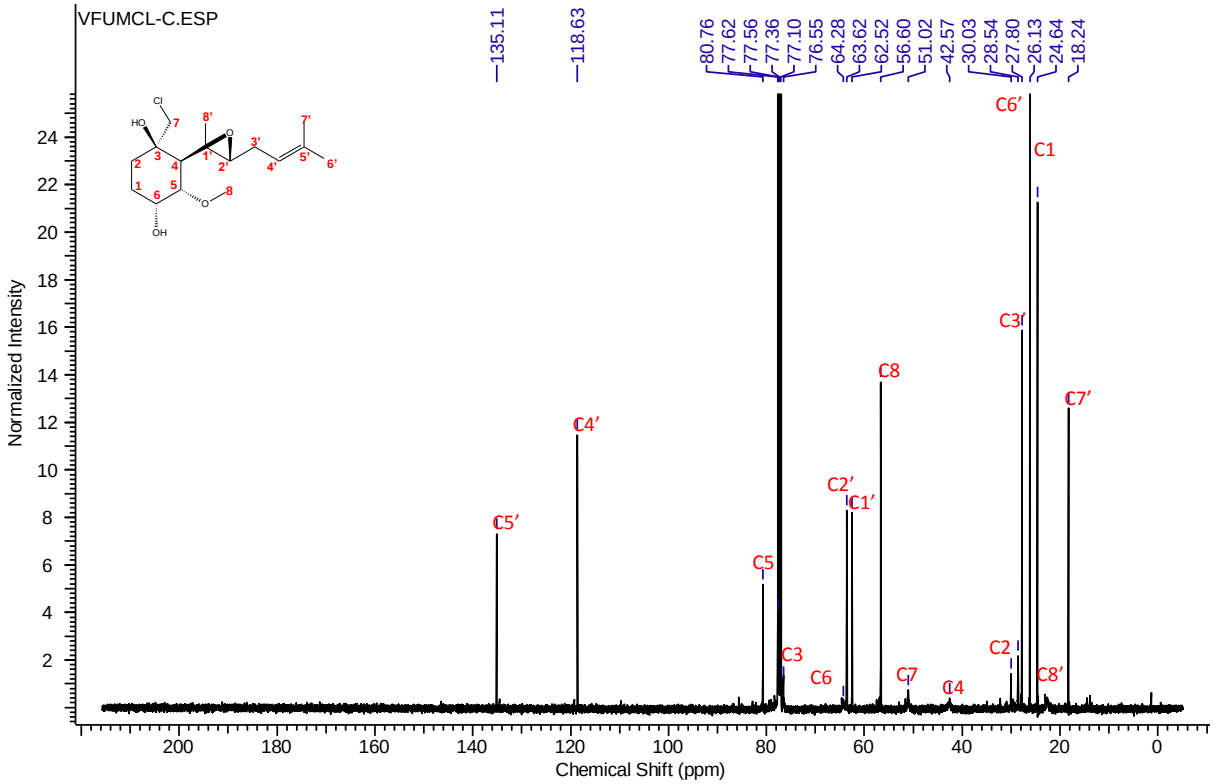


Figure A 39 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 7-chloro-fumagillol

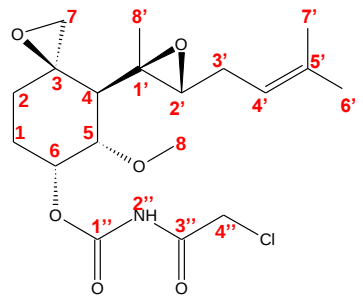
ANNEXE XIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du TNP-470

1. Caractéristiques physico-chimiques

TNP-470
6-O-chloroacétylcarbamoyl-fumagillol

Formule brute : $C_{19}H_{28}ClNO_6$
Poids moléculaire : 401,1605 Da
T_R: /
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : /

Formule développée



Position	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	1.82-1.86 (m ; 2H)
2	1.10 (m ; 1H) 2.05 (m ; 1H)
3	
4	2.15 (m ; 1H)
5	3,68 (dd ; 1H ; 4 et 12Hz)
6	5,60 (s ; 1H)
7	2,57 (m ; 1H) 2,98 (d ; 1H ; 5 Hz)
8	3,46 (s ; 3H)
1'	
2'	2.57 (m ; 1H)
3'	2,08 (m ;1H) 2,36 (m ; 1H)
4'	5,19 (t ; 1H; 7 Hz)
5'	
6'	1,78 (s ; 3H)
7'	1,68 (s ; 3H)
8'	1,22 (s ; 3H)
1''	
2''	8,08 (s ; 1H)
3''	4,42 (s ; 2H)
4''	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectre RMN 1D du TNP-470

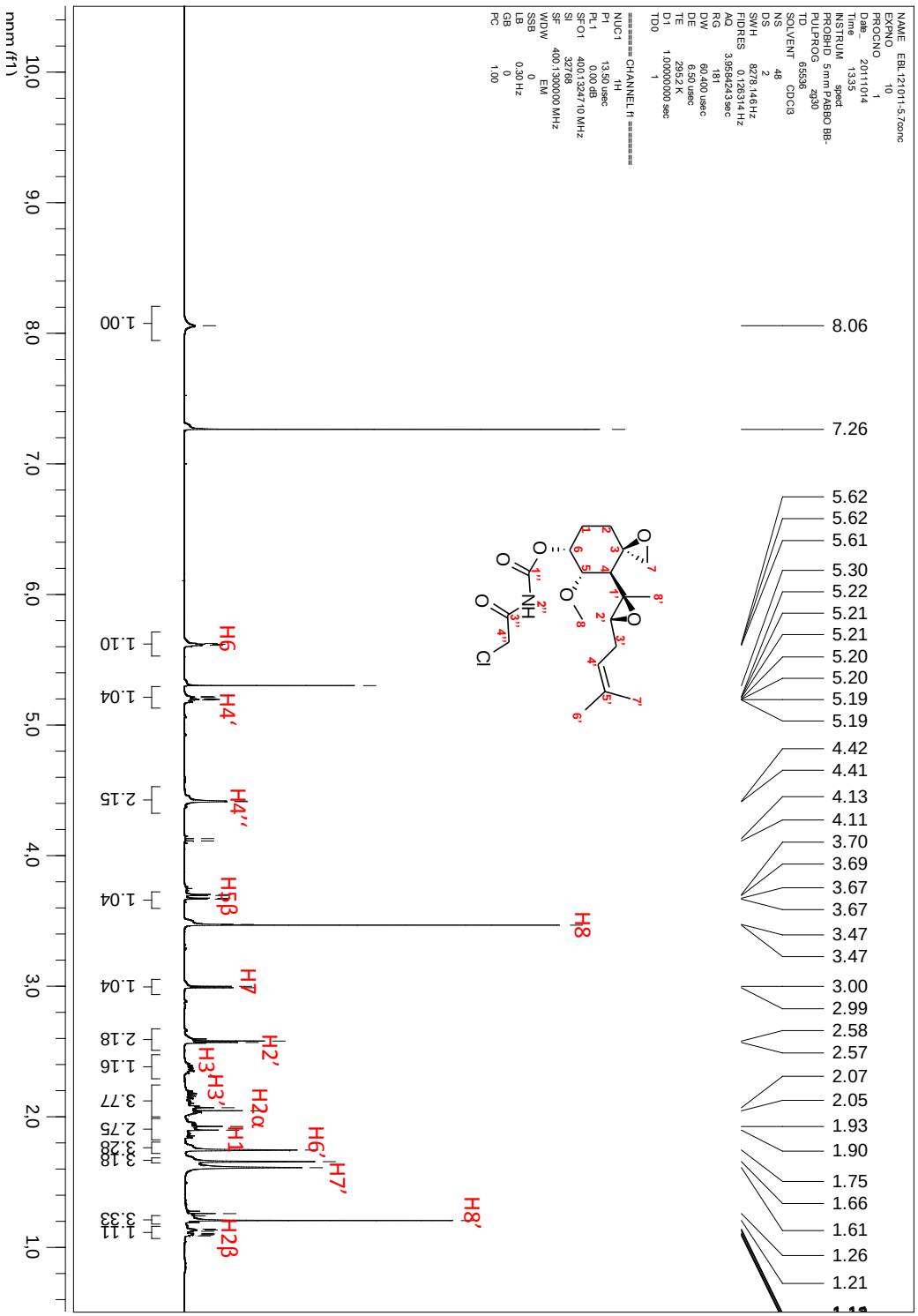


Figure A 40 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du TNP-470

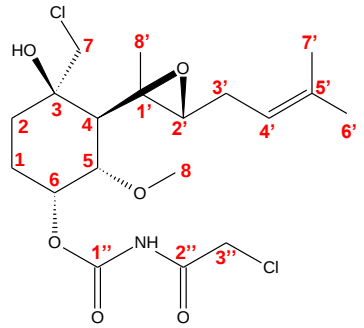
ANNEXE XIV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du 7-chloro-TNP-470

1. Caractéristiques physico-chimiques

7-chloro-TNP-470
7-chloro-6-O-chlorocarbamoylacetyl-fumagillol

Formule brute : $C_{19}H_{29}Cl_2NO_6$
Poids moléculaire : 437,1372 Da
T_R : /
Spectre UV-visible : /
HRMS/MS : /

Formule développée



Position	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	1.88-1.99 (m ; 2H)
2	1.40 (m ; 1H) 2.00 (m ; 1H)
3	
4	2.45 (m ; 1H)
5	3,49 (s ; 1H)
6	5,47 (s ; 1H)
7	3,88 (m ; 1H) 4,16 (m ; 1H)
8	3,49 (s ; 3H)
1'	
2'	2.99 (t ; 1H ; 5 Hz)
3'	2,17 (m ;1H) 2,50 (m ; 1H)
4'	5,20 (t ; 1H; 7 Hz)
5'	
6'	1,78 (s ; 3H)
7'	1,68 (s ; 3H)
8'	1,52 (s ; 3H)
1''	
2''	7,97 (s ; 1H)
3''	4,5 (s ; 2H)
4''	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectre RMN 1D du 7-chloro-TNP-470

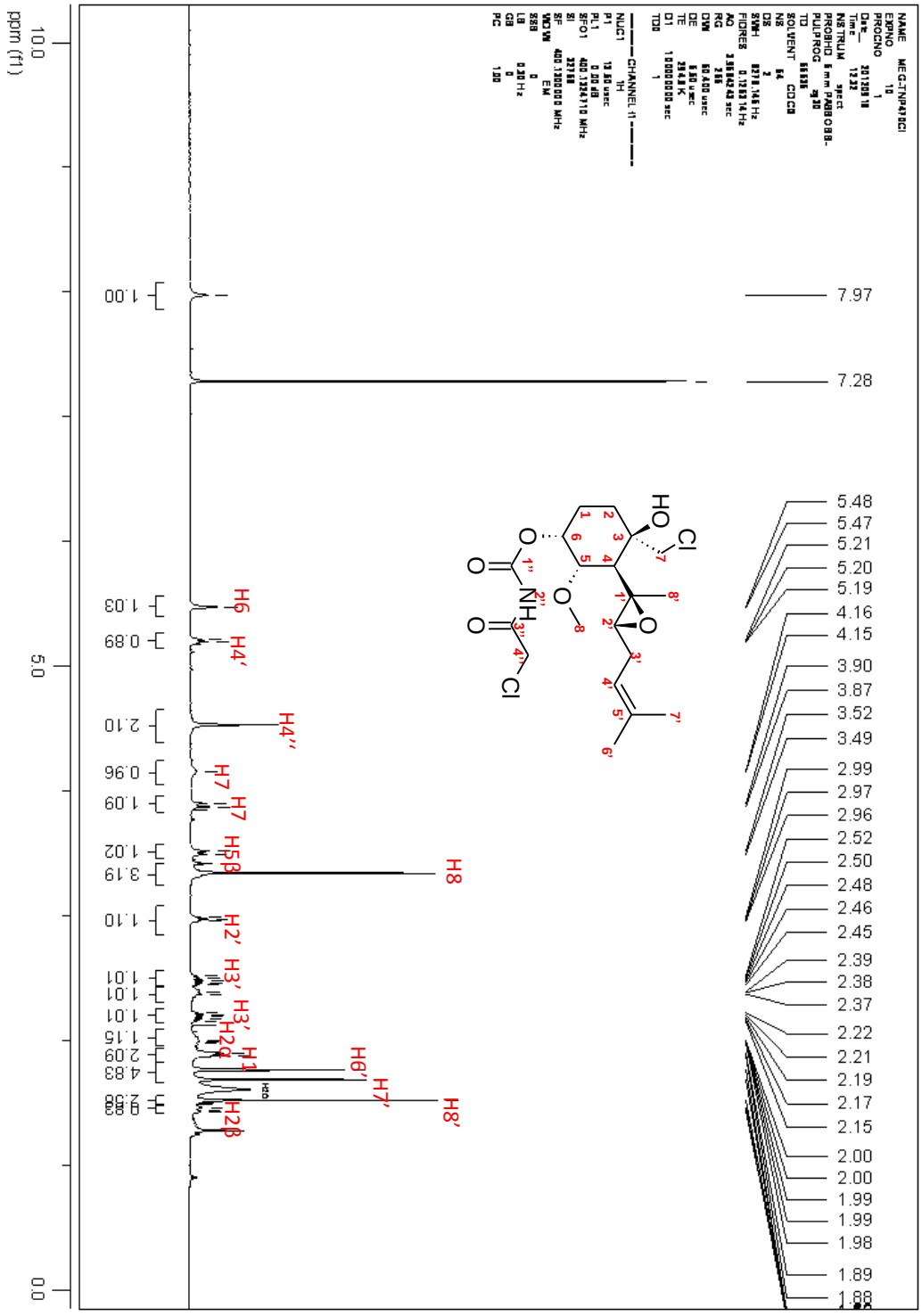


Figure A 38 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du 7-chloro-TNP-470

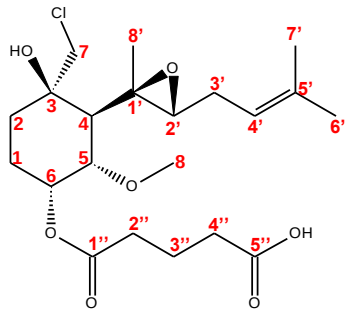
ANNEXE XV : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S1

1. Caractéristiques physico-chimiques

S1
7-chloro-6-(4-carboxy-1-oxobutoxy)-fumagillol

Formule brute : $C_{21}H_{33}ClO_7$
Poids moléculaire : 432,1915 Da
Spectre UV-visible : /
HRMS : *m/z* $[M+Na]^+$ 455,1811 (*m/z* théorique calculé pour $C_{21}H_{33}ClO_7Na$; 455,1807 ; Δppm 0,88)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	23,5 (CH_2)	1,83 (m ; 2H)
2	29,0 (CH_2)	1,40 (m ; 1H) 2,03 (m ; 1H)
3	76,6 (C)	
4	43,1 (CH)	2,20 (m ; 1H)
5	78,6 (CH)	3,31 (m ; 1H)
6	65,8 (CH)	5,52 (s ; 1H)
7	50,0 (CH_2)	3,51 (d ; 1H ; 10 Hz) 3,7 (d ; 1H ; 10 Hz)
8	56,6 (CH_3)	3,31 (s ; 3H)
1'	64,0 (C)	
2'	62,3 (CH)	2,98 (t ; 1H ; J= 5,5 Hz)
3'	27,4 (CH_2)	2,03 (m ; 1H) 2,20 (m ; 1H)
4'	118,1 (CH)	5,20 (t ; 1H ; 7,3 Hz)
5'	134,8 (C)	
6'	25,9 (CH_3)	1,80 (s ; 3H)
7'	17,9 (CH_3)	1,68 (s ; 3H)
8'	22,7 (CH_3)	1,51 (s ; 3H)
1''	172,6 (C)	
2''	33,6 (CH_2)	2,50 (m ; 2H)
3''	20,5 (CH_2)	2,50 (m ; 2H)
4''	33,6 (CH_2)	2,50 (m ; 2H)
5''	176,1 (C)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du composé S1

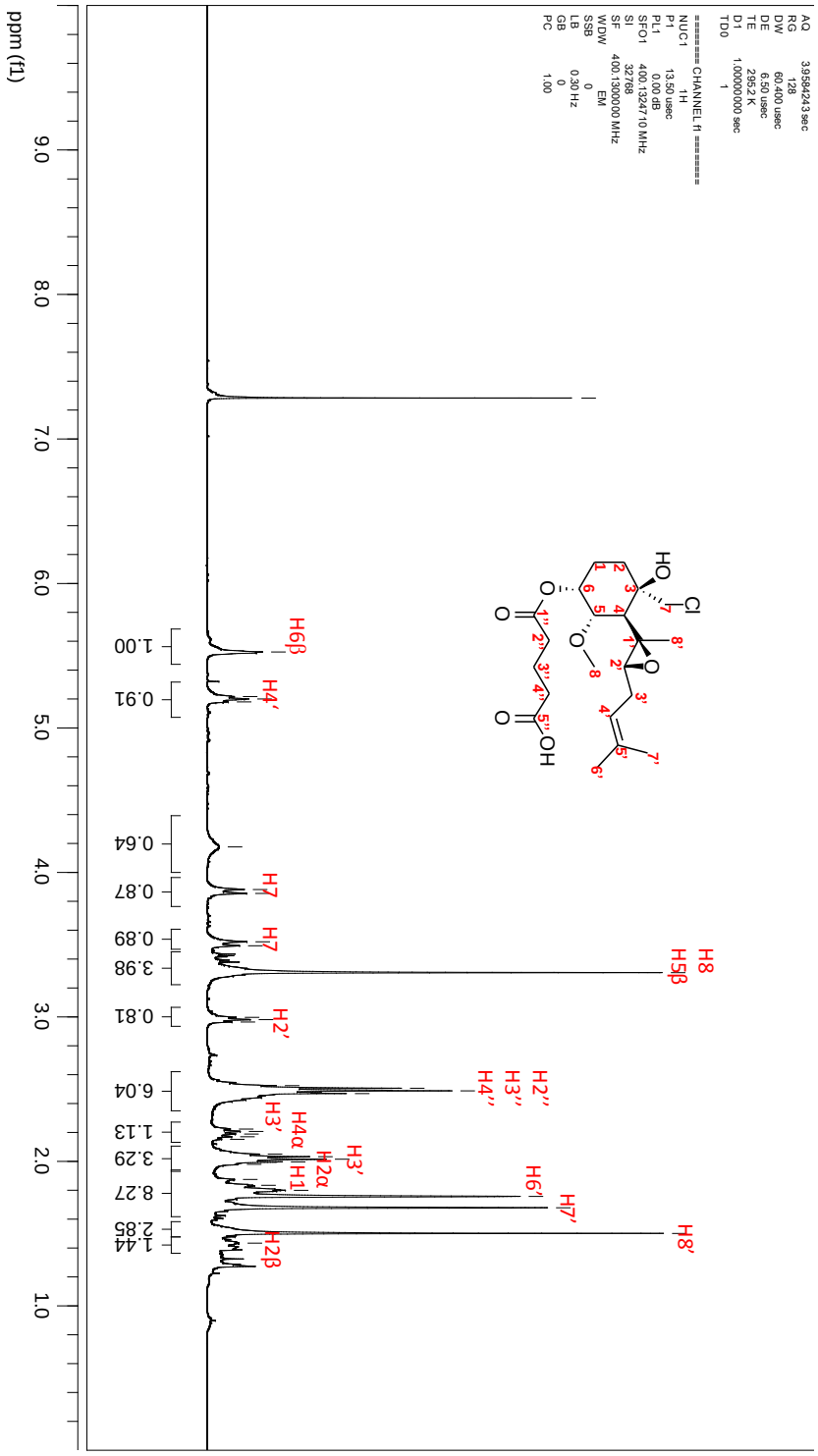


Figure A 41 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S1

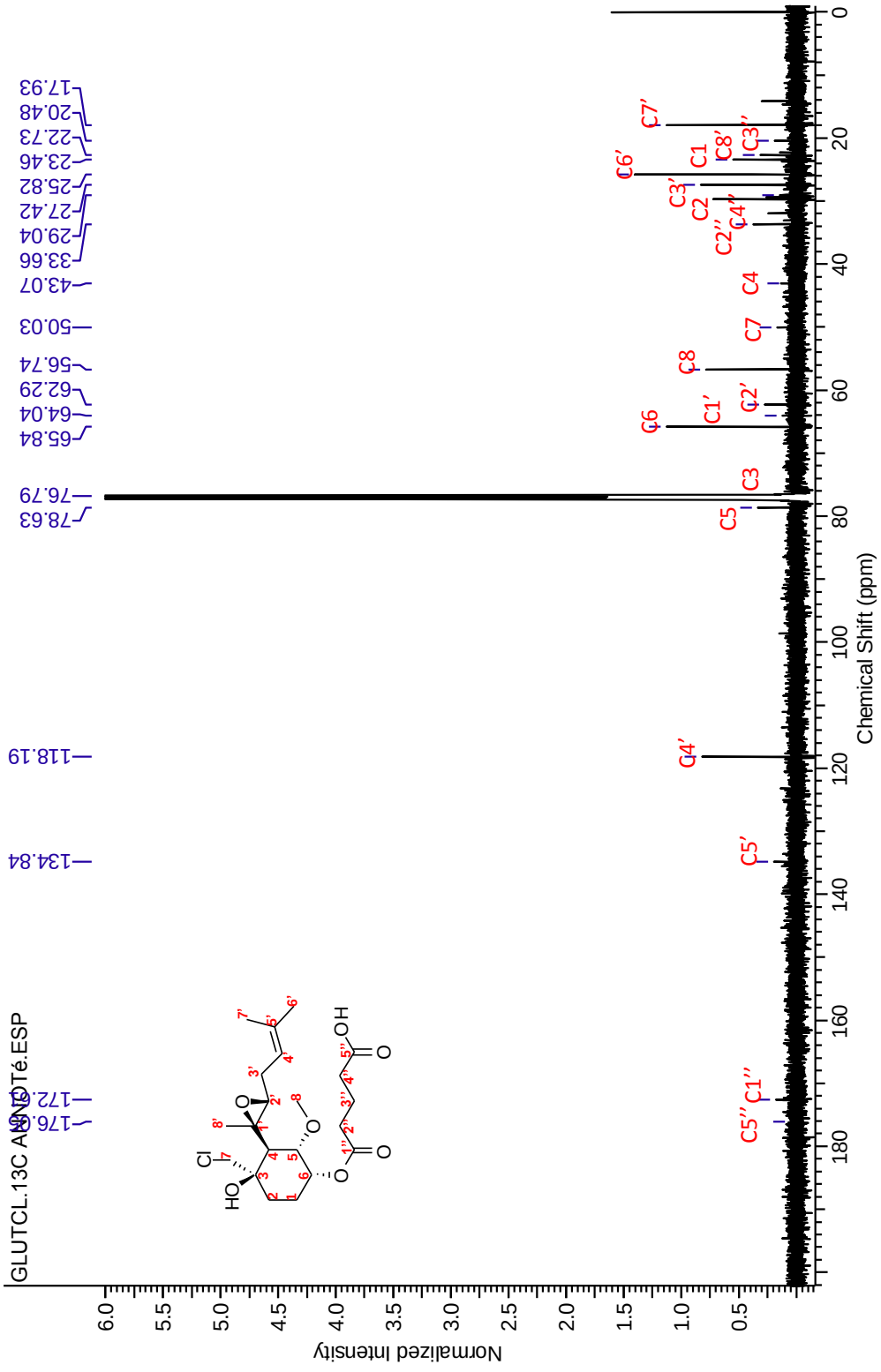


Figure A 42 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S1

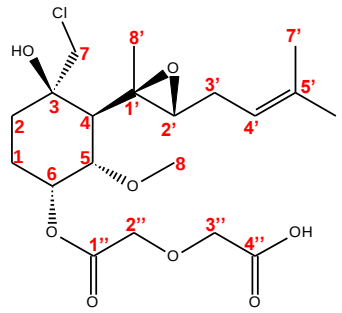
ANNEXE XVI : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S2

1. Caractéristiques physico-chimiques

S2
7-chloro-6-[[2-carboxymethoxy)acetyl]oxy]-fumagillol

Formule brute : $C_{20}H_{31}ClO_8$
Poids moléculaire : 434,1707 Da
Spectre UV-visible : /
HRMS : *m/z* $[M+Na]^+$ 457,1596 (*m/z* théorique calculé pour $C_{20}H_{31}ClO_8Na$; 457,1600 ; Δppm 0,85)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	23,4 (CH_2)	1,82-1,86 (m ; 2H)
2	29,0 (CH_2)	1,35 (m ; 1H) 1,98 (m ; 1H)
3	76,0 (C)	
4	43,1 (CH)	2,39 (m ; 1H)
5	78,4 (CH)	3,48 (s ; 1H)
6	66,8 (CH)	5,58 (s ; 1H)
7	50,3 (CH_2)	3,34 (d ; 1H ; 10 Hz) 3,85 (d ; 1H ; 10 Hz)
8	56,9 (CH_3)	3,29 (s ; 3H)
1'	63,3 (C)	
2'	62,2 (CH)	2,96 (t ; 1H ; 5,5 Hz) 2,18 (m ; 2H) 2,46 (m ; 2H)
3'	27,4 (CH_2)	
4'	118,0 (CH)	5,18 (t ; 1H ; 7,5 Hz)
5'	134,9 (C)	
6'	25,8 (CH_3)	1,75 (s ; 3H)
7'	17,8 (CH_3)	1,68 (s ; 3H)
8'	22,7 (CH_3)	1,48 (s ; 3H)
1''	169,4 (C)	
2''	67,5 (CH_2)	4.12-4.45 (m; 2H)
3''	68,3 (CH_2)	4.12-4.45 (m; 2H)
4''	176,2 (C)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du composé S2

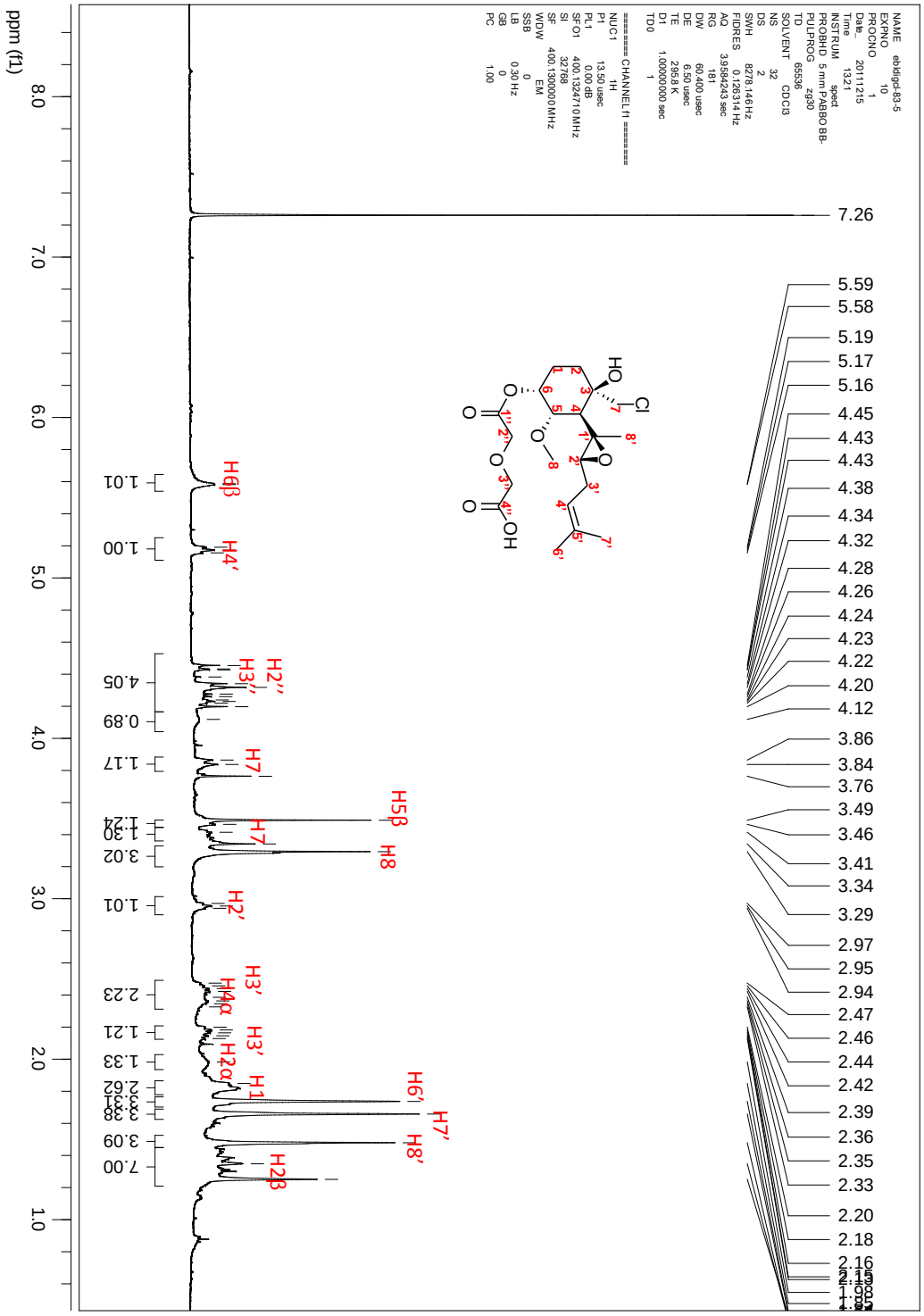


Figure A 43 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S2

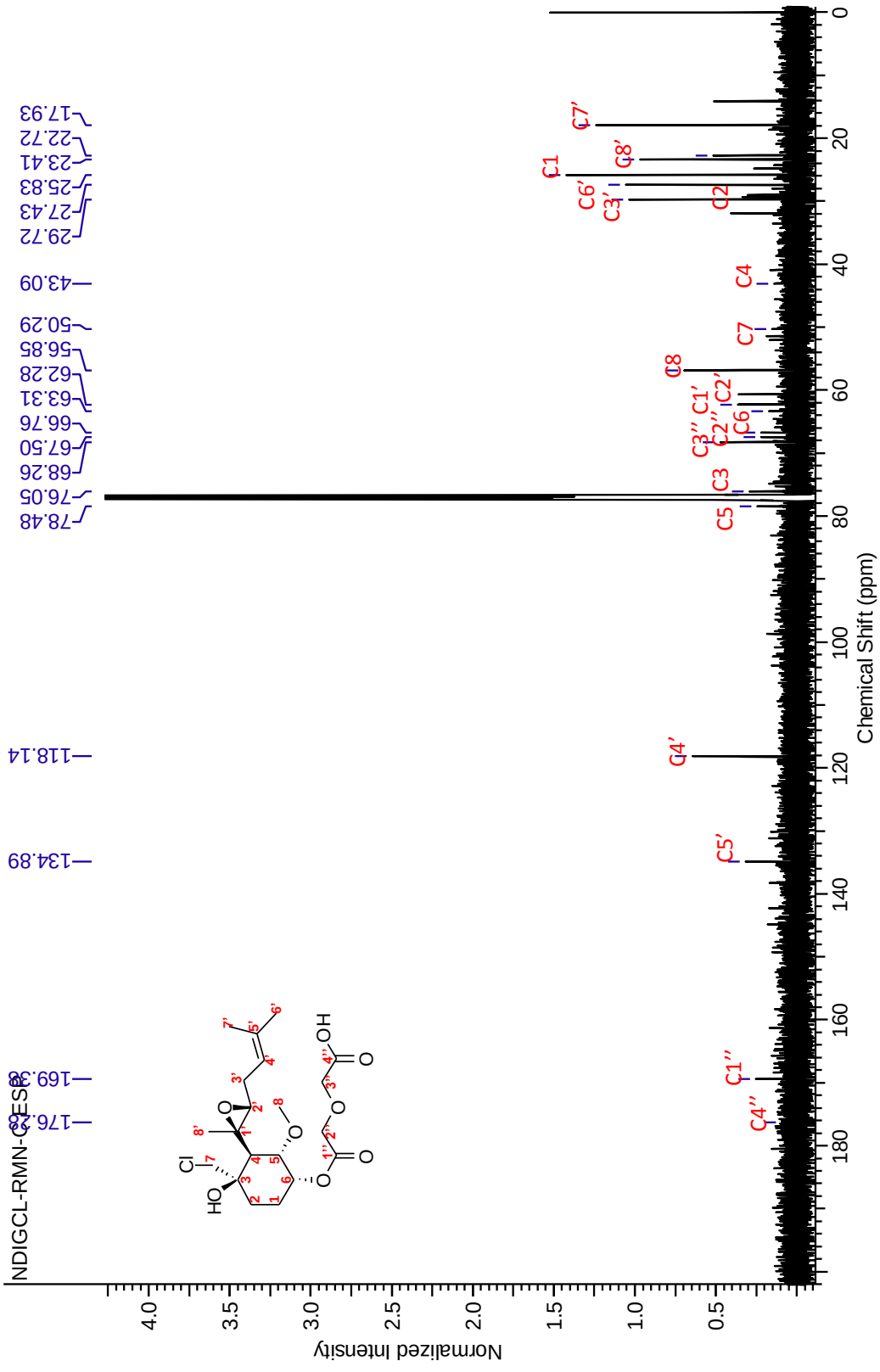


Figure A 44 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S2

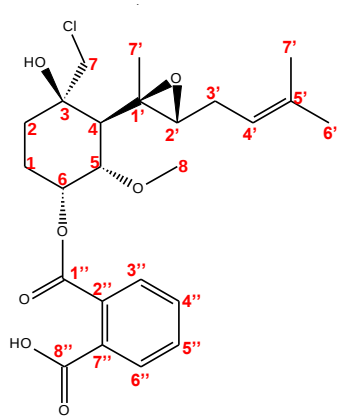
ANNEXE XVII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S3

1. Caractéristiques physico-chimiques

S3
7-chloro-6-[(2-carboxybenzoyl)oxy]-fumagillol

Formule brute : $C_{24}H_{31}ClO_7$
Poids moléculaire : 466,1758 Da
Spectre UV-visible : ?
HRMS : *m/z* $[M+Na]^+$ 489,1655 (*m/z* théorique calculé pour $C_{24}H_{31}ClO_7Na$; 489,1651 ; Δppm 0,82)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	23,2 (CH_2)	1,82-1,93 (m ; 2H)
2	29,1 (CH_2)	1,48 (m ; 1H) 1,93 (m ; 1H)
3	76,0 (C)	
4	43,4 (CH)	2,23 (m ; 1H)
5	78,7 (CH)	3,39 (m ; 1H)
6	67,6 (CH)	5,77 (s ; 1H)
7	50,4 (CH_2)	3,57 (d ; 1H ; 10 Hz) 3,90 (d ; 1H ; 10 Hz)
8	56,8 (CH_3)	3,39 (s ; 3H)
1'	64,1 (C)	
2'	62,4 (CH)	2,98 (t ; 1H ; 5,5 Hz)
3'	27,3 (CH_2)	2,19 (m ; 1H) 2,47 (m ; 1H)
4'	118,2 (CH)	5,21 (t ; 1H ; 7,0 Hz)
5'	134,9 (C)	
6'	25,8 (CH_3)	1,76 (s ; 3H)
7'	17,9 (CH_3)	1,68 (s ; 3H)
8'	22,7 (CH_3)	1,51 (s ; 3H)
1''	171,8 (C)	
2''	134,7 (C)	
3''	131,2 (CH)	7,84 (d ; 1H ; 8 Hz)
4''	128,8 (CH)	7,58 (d ; 1H ; 8 Hz)
5''	130,9 (CH)	7,58 (d ; 1H ; 8 Hz)
6''	129,0 (CH)	7,84 (d ; 1H ; 8 Hz)
7''	129,6 (C)	
8''	167,4 (C)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du composé S3

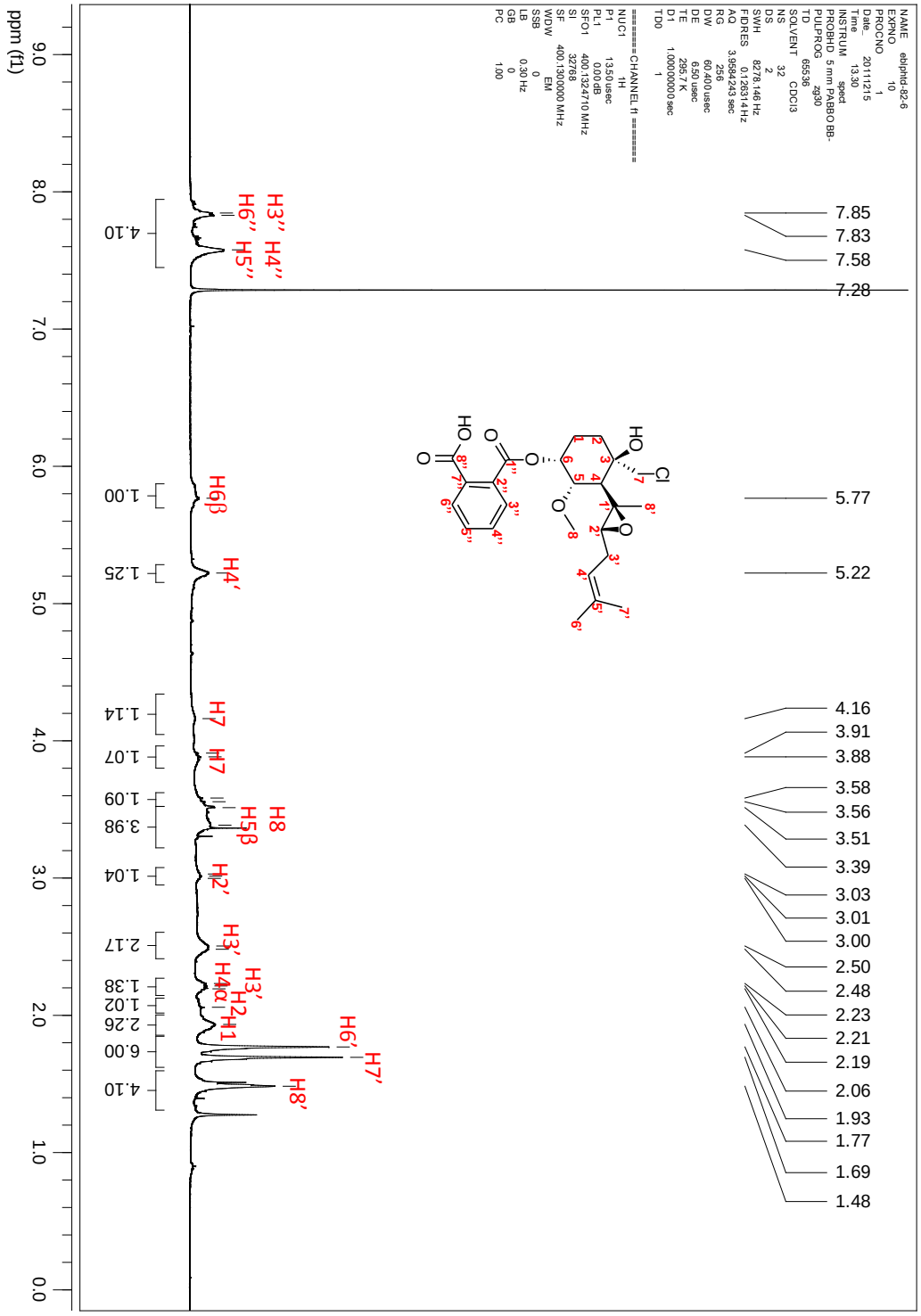
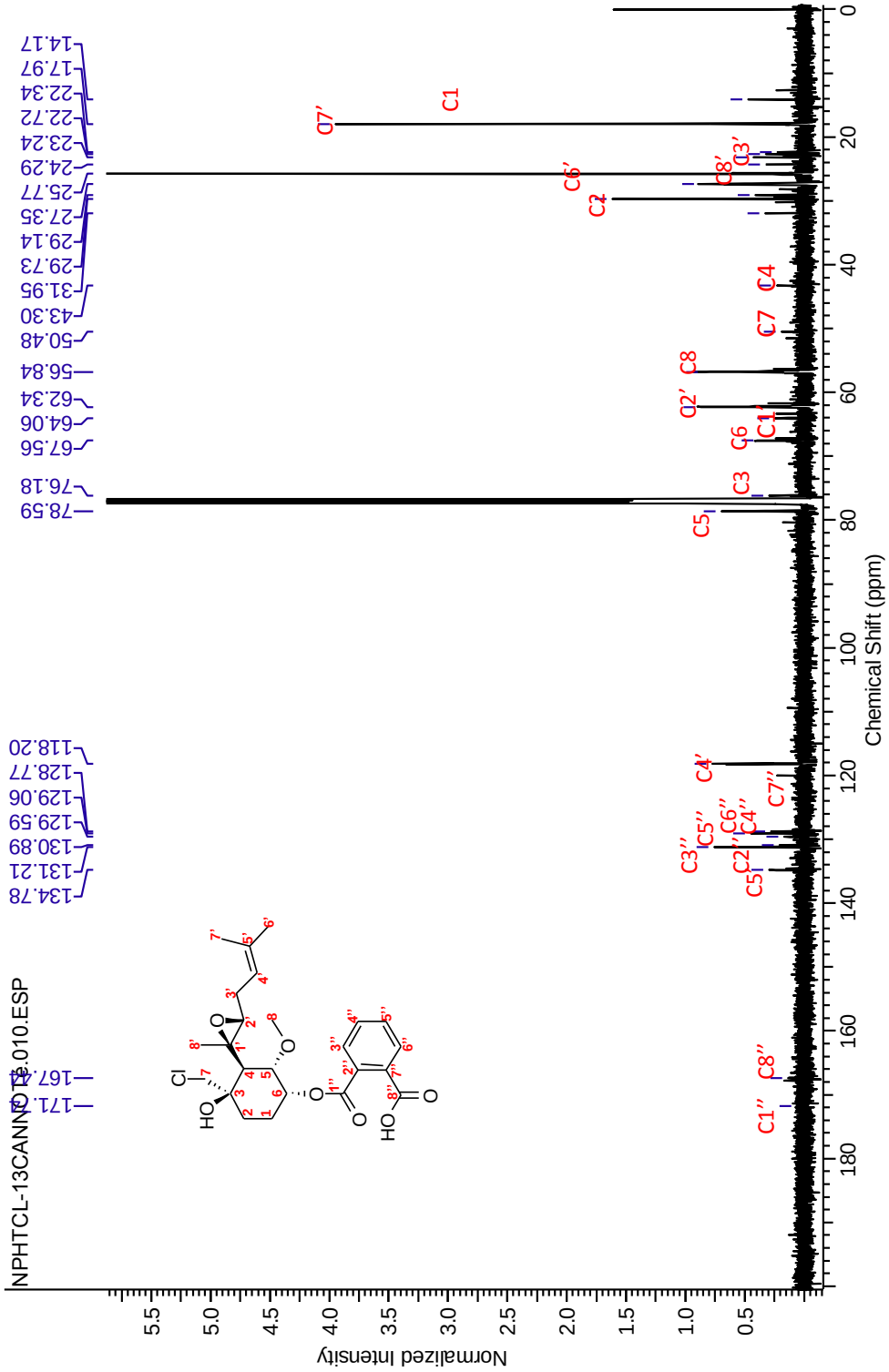


Figure A 45 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S3


NPHTCL-13CANNO 10.010.ESP
Chemical Shift (ppm)
Normalized Intensity
14.17
17.97
22.34
22.72
23.24
24.29
25.77
27.35
29.14
29.73
31.95
43.30
50.48
56.84
62.34
64.06
67.56
76.18
78.59
118.20
128.77
129.06
129.59
130.89
131.21
134.78
167.41
171.23
C1
C7'
C6'
C2
C8'
C3'
C4
C7
C8
C2'
C1'
C6
C3
C5
C4'
C7''
C6''
C4''
C5''
C3''
C2''
C5''
C8''
C1''
HO
Cl
O
HO
O

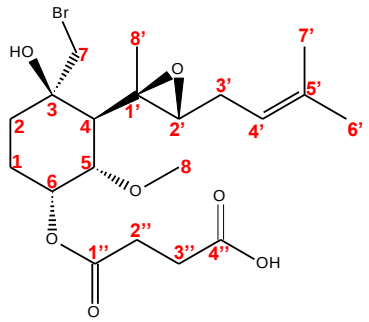
ANNEXE XVIII : Caractéristiques physico-chimiques et spectres RMN du composé S4

1. Caractéristiques physico-chimiques

S4
7-bromo-6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol

Formule brute : $C_{20}H_{31}BrO_7$
Poids moléculaire : 462,1253 Da
Spectre UV-visible : /
HRMS : *m/z* $[M+Na]^+$ 485,1133 (*m/z* théorique calculé pour $C_{20}H_{31}BrO_7Na$; 485,1145 ; Δppm 2,47)

Formule développée



Position	^{13}C, δC (ppm)	^{1}H, δH (ppm) (multiplicité ; intégration ; couplage J)
1	23,5 (CH_2)	1,81 (m ; 2H)
2	31,2 (CH_2)	1,48 (m ; 1H) 1,99 (m ; 1H)
3	76,6 (Cq)	
4	43,7 (CH)	2,48 (m ; 1H)
5	78,7 (CH)	3,29 (m ; 1H)
6	66,4 (CH)	5,51 (s ; 1H)
7	39,9 (CH_2)	3,50 (d ; 1H ; 10 Hz) 3,75 (d ; 1H ; 10 Hz)
8	56,7 (CH_3)	3,29 (s ; 3H)
1'	64,0 (Cq)	
2'	62,3 (CH)	2,99 (t ; 1H ; 5,5 Hz)
3'	27,4 (CH_2)	2,19 (m ; 1H) 2,48 (m ; 1H)
4'	118,2 (CH)	5,20 (t ; 1H ; 7,0 Hz)
5'	134,8 (Cq)	
6'	25,8 (CH_3)	1,76 (s ; 3H)
7'	17,9 (CH_3)	1,68 (s ; 3H)
8'	22,7 (CH_3)	1,51 (s ; 3H)
1''	171,4 (Cq)	
2''	29,1 (CH_2)	2,74 (s ; 2H)
3''	29,1 (CH_2)	2,74 (s ; 2H)
4''	177,5 (Cq)	

→Spectres RMN réalisés dans le $CDCl_3$

2. Spectres RMN 1D du composé S4

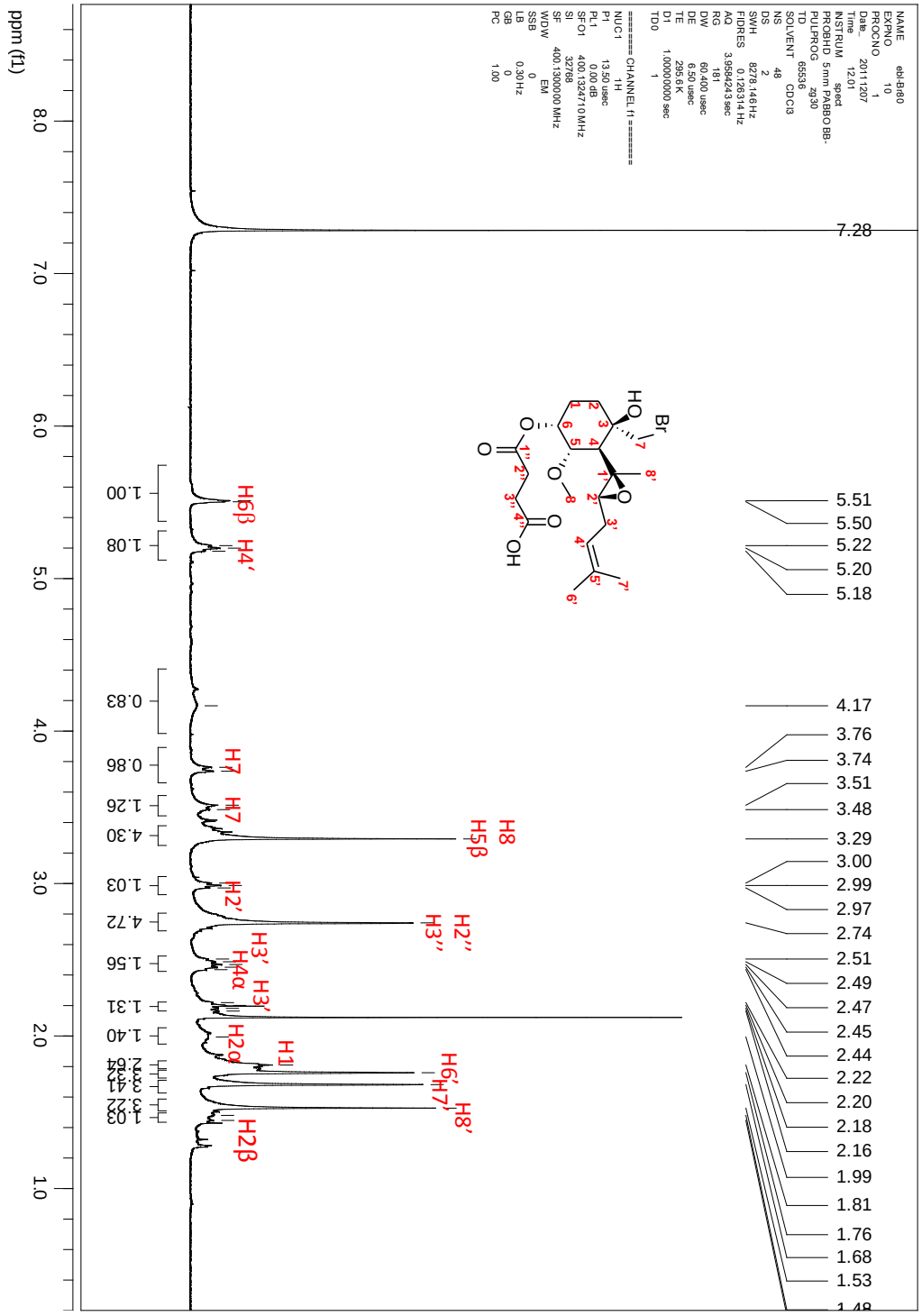


Figure A 47 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, cryoprobe, $CDCl_3$) du composé S4

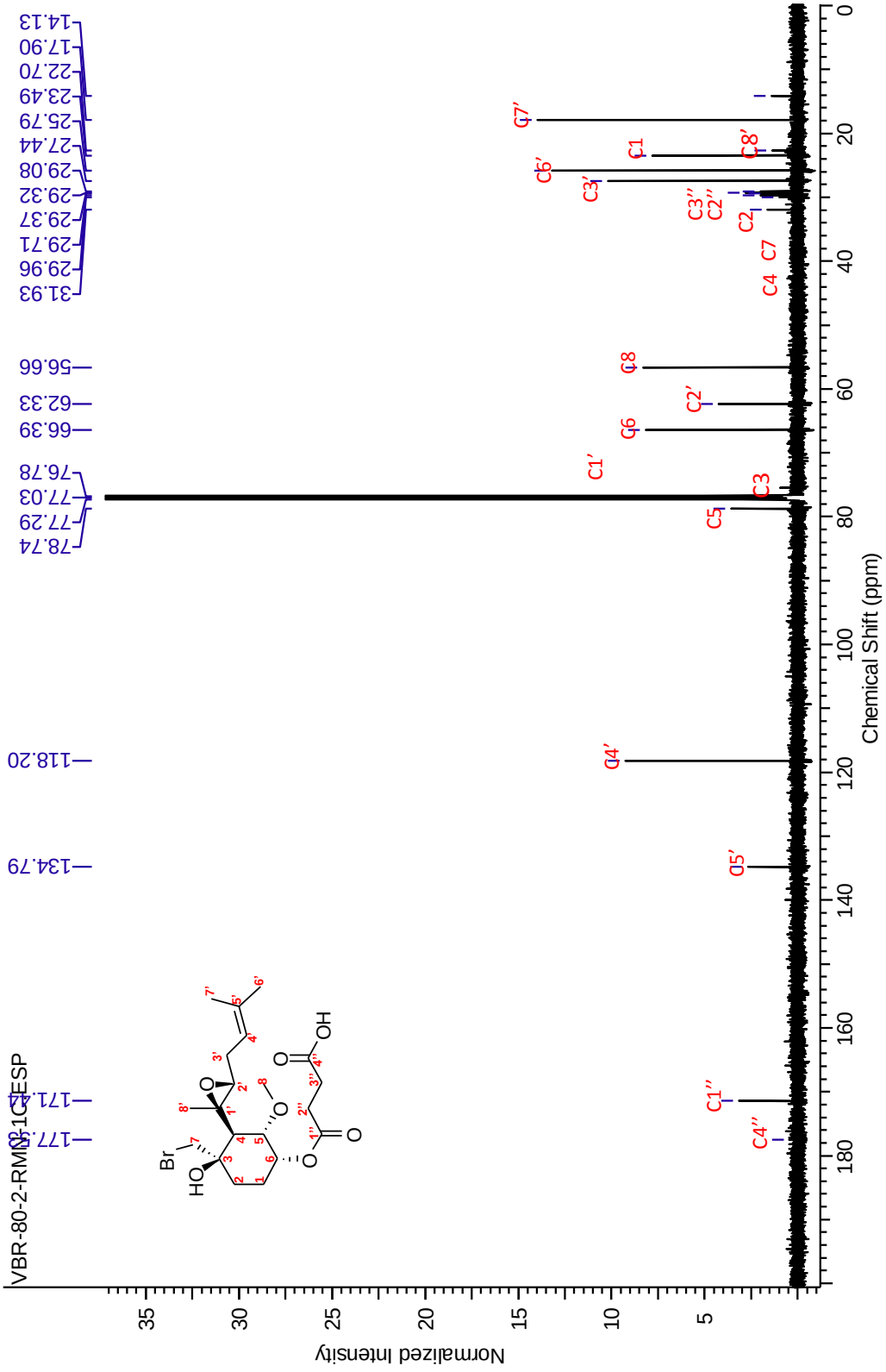


Figure A 48: Spectre RMN 13C (500 MHz, cryoprobe, CDCl3) du composé S4

ANNEXE XIX : Alcaloïdes indoliques de la famille des tryptoquivalines

Tableau A 6 : Alcaloïdes indoliques de la famille des tryptoquivalines (formule brute, masse moléculaire, espèces productrices (*P. Penicillium N. Neosartorya, A. Aspergillus, C. Corynascus*), activités biologiques et références)

Nom	Formule brute	Masse moléculaire (en Da)	Espèces productrices	Activités	Références
Anacine	$C_{18}H_{22}N_4O_3$	342,1692	*P. verrucosum* *P. aurantiogriseum*		(Larsen *et al.*, 1999) (Boyes-Korkis *et al.*, 1993)
(–)-Glyantrypine	$C_{20}H_{16}N_4O_2$	344,1273	*A. clavatus*		(Penn *et al.*, 1992)
Fumiquinazoline F	$C_{21}H_{18}N_4O_2$	358,1430	*A. fumigatus* *P. thymicola*	cytotoxique	(Takahashi *et al.*, 1995) (Larsen *et al.*, 1998)
Fumiquinazoline G	$C_{21}H_{18}N_4O_2$	358,1430	*A. fumigatus*	cytotoxique	(Takahashi *et al.*, 1995)
(+)-Alantrypinone	$C_{21}H_{16}N_4O_3$	372,1222	*P. thymicola* *A. terreus*	insecticide	(Larsen *et al.*, 1998) (Kuriyama *et al.*, 2004)
(+)-Verrucine A	$C_{21}H_{20}N_4O_3$	376,1535	*P. verrucosum*		(Larsen *et al.*, 1999)
(+)-Verrucine B	$C_{21}H_{20}N_4O_3$	376,1535	*P. verrucosum*		(Larsen *et al.*, 1999)
Sartorymensine	$C_{23}H_{20}N_4O_2$	384,1586	*N. siamensis*		(Buttachon *et al.*, 2012)
Fiscaline B	**$C_{23}H_{22}N_4O_2$**	**386,4500**	***N. fischeri*** ***C. setous***		**(Wong *et al.*, 1993)** **(Fujimoto *et al.*, 1996)**
(–)-Serantrypinone	$C_{21}H_{16}N_4O_4$	388,1172	*P. thymicola* *A. terreus*	insecticide	(Larsen *et al.*, 1998) (Kuriyama *et al.*, 2004)
Tryptoquivaline F	$C_{22}H_{18}N_4O_4$	402,1328	*N. siamensis*		(Buttachon *et al.*, 2012)
Chaetominine	$C_{22}H_{18}N_4O_4$	402,1328	*Chaetomium sp.*	cytotoxique	(Jiao *et al.*, 2006)
Tryptoquivaline H	$C_{22}H_{18}N_4O_5$	418,1277	*N. siamensis*		(Buttachon *et al.*, 2012)
(–)-Spiroquinazoline	$C_{23}H_{19}N_5O_4$	429,1437	*A.flavipes*	anti-inflammatoire	(Barrow et Sun, 1994)
Tryptoquivaline O	$C_{23}H_{18}N_4O_5$	430,1277	*N. siamensis*		(Buttachon *et al.*, 2012)
Tryptoquivaline L	$C_{23}H_{20}N_4O_5$	432,1434	*N. siamensis*		(Buttachon *et al.*, 2012)
Quinadoline B	$C_{25}H_{21}N_5O_3$	439,1644	*A. sp.*		*(Koyama et al., 2008)*
Fumiquinazoline C	$C_{24}H_{21}N_5O_4$	443,1594	*A. fumigatus*	cytotoxique	
Fumiquinazoline D	$C_{24}H_{21}N_5O_4$	443,1594	*A. fumigatus*	cytotoxique	(Takahashi *et al.*, 1995)
Fumiquinazoline B	$C_{24}H_{23}N_5O_4$	445,1750	*A. fumigatus*	cytotoxique	
Norquinadoline A	$C_{26}H_{25}N_5O_4$	471,1907	*Cladosporium sp.*		(Peng *et al.*, 2013)
Déoxytryptoquivalone, Déoxynortryptoquivalone, Déoxytryptoquivaline B, Tryptoquivaline N	$C_{26}H_{24}N_4O_5$	472,1747	*A. clavatus*		(Buechi *et al.*, 1977)
Fiscaline A	**$C_{26}H_{27}N_5O_4$**	**473,2063**	***N. fischeri*** ***N. siamensis***		**(Wong *et al.*, 1993)** **(Buttachon *et al.*, 2012)**
Epi-fiscaline A	**$C_{26}H_{27}N_5O_4$**	**473,2063**	***N. siamensis***		**(Buttachon *et al.*, 2012)**
Néofiscaline A	**$C_{26}H_{27}N_5O_4$**	**473,2063**	***N. siamensis***		**(Buttachon *et al.*, 2012)**
Epi-néofiscaline A	**$C_{26}H_{27}N_5O_4$**	**473,2063**	***N. siamensis***		**(Buttachon *et al.*, 2012)**
Fumiquinazoline E	$C_{25}H_{25}N_5O_5$	475,1856	*A. fumigatus*	cytotoxique	(Takahashi *et al.*, 1995)

Nom	Formule brute	Masse moléculaire (en Da)	Espèces productrices	Activités	Références
Fumiquinazoline A	$C_{26}H_{29}N_5O_4$	475,2220	*A. fumigatus*	cytotoxique	*(Peng et al., 2013)* *(Koyama et al., 2008)*
Quinadoline A	$C_{27}H_{27}N_5O_4$	485,2063	*Cladosporium sp.* *A. sp.*		
(–)-Fumiquinazoline H	$C_{27}H_{27}N_5O_4$	485,2063	*Acremonium sp.*	antifongique	
Fiscaline C	**$C_{27}H_{29}N_5O_4$**	**487,2220**	***N. fischeri*** ***N. siamensis***		**(Wong *et al.*, 1993)** **(Buttachon *et al.*, 2012)**
Epi-fiscaline C	**$C_{27}H_{29}N_5O_4$**	**487,2220**	***N. siamensis***		**(Buttachon *et al.*, 2012)**
(–)-Fumiquinazoline I	$C_{27}H_{29}N_5O_4$	487,222	*Acremonium sp.*	antifongique	(Belofsky *et al.*, 2000)
Tryptoquivalone, Nortryptoquivalone, Tryptoquivaline B	**$C_{26}H_{24}N_4O_6$**	**488,1696**	***A. clavatus***		**(Buechi *et al.*, 1977)**
Tryptoquialanine B	$C_{26}H_{24}N_4O_7$	504,1645	*P. digitatum* *P. aethiopicum*		(Ariza *et al.*, 2002) (Frisvad *et al.*, 2004)
Déoxynortryptoquivaline	$C_{28}H_{28}N_4O_6$	516.2009	*A. clavatus* *Cladosporium sp.*	antivirale	(Buechi *et al.*, 1977) (Peng *et al.*, 2013)
Tryptoquialanine A	$C_{27}H_{26}N_4O_7$	518,1801	*P. digitatum* *P. aethiopicum*		(Ariza *et al.*, 2002) (Frisvad *et al.*, 2004)
Déoxytryptoquivaline	$C_{29}H_{30}N_4O_6$	530,2165	*A. clavatus* *Cladosporium sp.*	antivirale	(Buechi *et al.*, 1977) (Peng *et al.*, 2013)
Nortryptoquivaline	**$C_{28}H_{28}N_4O_7$**	**532,1958**	***A. clavatus*** ***A. giganteus***		**(Buechi *et al.*, 1977)** **(Fischer *et al.*, 2000)**
Tryptoquivaline	$C_{31}H_{36}N_4O_7$	576,2584	*A. clavatus* *N. siamensis* *Cladosporium sp.*	antivirale	(Buechi *et al.*, 1977) (Buttachon *et al.*, 2012) (Peng *et al.*, 2013)

ANNEXE XX : Publication relatant l'isolement de la ligerine

VANSTEELANDT M., BLANCHET E., EGOROV M., PETIT F., TOUPET L., BONDON A., MONTEAU F., LE BIZEC B., POUCHUS Y.F., LE BOT R. ET GROVEL O., Ligerin, an Antiproliferative Chlorinated Sesquiterpenoid from a Marine-Derived Penicillium Strain. . Journal of Natural Products, 2013, 76, 297–301.

JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

Note

pubs.acs.org/jnp

Ligerin, an Antiproliferative Chlorinated Sesquiterpenoid from a Marine-Derived *Penicillium* Strain

Marieke Vansteelandt,[†] Elodie Blanchet,[†,‡] Maxim Egorov,[‡] Fabien Petit,[‡] Loïc Toupet,[§] Arnaud Bondon,[⊥] Fabrice Monteau,[∥] Bruno Le Bizec,[∥] Olivier P. Thomas,[▽] Yves François Pouchus,[†] Ronan Le Bot,[‡] and Olivier Grovel*[,†]

[†]LUNAM Université, Université de Nantes, MMS-EA2160, Nantes, France

[‡]Atlanthera, Atlantic Bone Screen, Nantes, France

[§]Institut de Physique-IPR-UMR CNRS 6251, Université de Rennes 1, Rennes, France

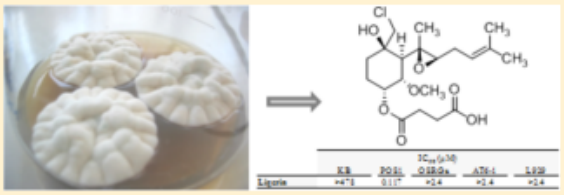
[⊥]UMR CNRS 6290, Université de Rennes 1, Rennes, France

[∥]ONIRIS, L'UNAM, Atlanpôle la Chantrerie, Nantes, France

[▽]Université de Nice-Sophia Antipolis, ICN-PCRE, UMR 7272 CNRS, Nice, France

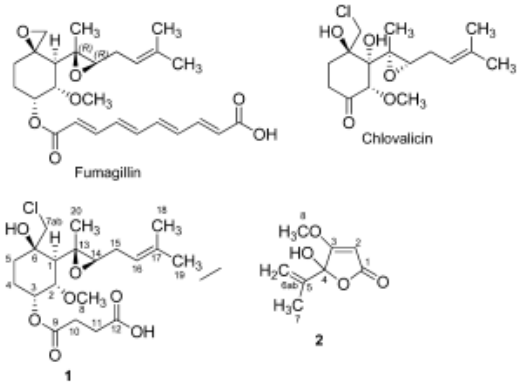
Supporting Information

ABSTRACT: A new chlorinated sesquiterpenoid analogue of fumagillin, ligerin (**1**), was isolated from a marine-derived strain of *Penicillium*, belonging to the subgenus *Penicillium*, along with the known compounds penicillic acid (**2**), orcinol, and orsellinic acid. Chemical structures were established by an interpretation of spectroscopic data including IR, UV, and HRESIMS, together with analyses of 1D and 2D NMR spectra and X-ray analysis for the determination of the absolute configuration. Ligerin (**1**) displayed strong inhibitory activity against an osteosarcoma cell line. This is the first report of the isolation of a fumagillin analogue from a marine-derived *Penicillium* strain.



Fumagillin is a natural secondary metabolite produced by various fungal genera such as *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. It is characterized by a sesquiterpene core esterified by a deca-2,4,6,8-tetraenedioic acid and functionalized by a spiroepoxide bound to the cyclohexane ring and another epoxide on the C-1 side chain. Its main molecular target is methionine amino-peptidase 2 (MetAP2), to which it binds covalently through C-7 of the spiroepoxide, which alkylates a histidine residue in the active site of the enzyme.[1] Since its first isolation from *Aspergillus fumigatus*,[2] numerous fumagillin derivatives have been studied for their antiangiogenic and antiparasitic activities,[3] showing that the epoxide of the C-1 side chain is also engaged in the enzyme linkage and the C-3 chain modulates the antitumor activity.[4] Several natural analogues of fumagillin have been described to be also produced by *A. fumigatus* and species of other genera, but only one natural fumagillin analogue includes a halogen atom in its chemical structure, chlovalicin, a chlorinated ovalicin derivative isolated from a terrestrial strain of *Sporothrix* sp.[5]

In the course of our search for new antiproliferative compounds from marine-derived fungi, we investigated a strain of *Penicillium* sp. belonging to the section *Canescentia* of the subgenus *Penicillium*, previously studied for its production of griseofulvin.[6] This strain was selected after screening for cytotoxicity against cancer cell lines versus nontumor cell lines. The EtOAc extract of cultures of this *Penicillium* strain, grown on seawater medium, exhibited cytotoxic activity against three



cancer cell lines, POS1, AT6-1, and KB, but showed no activity against the nontumor cell line L929. Herein we report the isolation and structure elucidation of ligerin (**1**), a new chlorinated sesquiterpenoid compound related to fumagillin, together with penicillic acid (**2**), orcinol, and orsellinic acid. Biological activities of compounds **1** and **2** against five cell lines are also presented.

Received: October 23, 2012

ACS Publications © XXXX American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy

dx.doi.org/10.1021/np3007364 | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

The marine-derived *Penicillium* sp. culture extract was submitted to successive fractionations including silica gel or Sephadex LH-20 chromatography and C18 reversed-phase HPLC, to afford compound **1**, penicillic acid (**2**), orcinol, and orsellinic acid.

Ligerin (**1**) was obtained as a colorless oil after three purification steps using bioassay-guided fractionation based on activity against POS1 cells. The analysis of its isotopic pattern by LRESIMS revealed the presence of a chlorine atom in the molecule with a 3:1 ratio for peak intensities of respectively *m/z* 441, i.e., $[M + Na]^+$, and *m/z* 443, i.e., $[M + 2 + Na]^+$. The HRESIMS spectrum showed an $[M + Na]^+$ ion at *m/z* 441.16507 and its cluster ion $[2M + Na]^+$ at *m/z* 859.34186, suggesting $C_{20}H_{31}ClO_7$ as the elemental composition of compound **1**, indicating five degrees of unsaturation. The NMR data for **1** are listed in Table 1. The ^{13}C NMR spectrum

Table 1. NMR Spectroscopic Data (500 MHz, Cryoprobe, $CDCl_3$) for Ligerin (1)

position	δ_C, type	δ_H (*J* in Hz)	HMBC[a]
1	43.2, CH	2.39, m	
2	78.4, CH	3.3, m	
3	66.4, CH	5.52, s	1, 2, 5, 9
4	23.4, CH_2	1.82–1.86, m	2, 3, 5, 6
5	29.3,[b] CH_2	1.40, m	1, 6
		1.96, m	4
6	76.7, C		
7	50.3, CH_2	3.52, d (10.0)	
		3.85, d (10.0)	
8	56.6, CH_3	3.28, s	2
9	171.5, C		
10	29.3,[b] CH_2	2.73, s	9, 11, 12
11	29.3,[b] CH_2	2.73, s	9, 10, 12
12	176.9, C		
13	64.0, C		
14	62.3, CH	2.98, t (5.5)	15
15	27.4, CH_2	2.19, m	14, 16, 17
		2.47, m	14, 16, 17
16	118.2, CH	5.21, t (7.0)	14, 18, 19
17	134.8, C		
18	25.8, CH_3	1.76, s	14, 16, 17, 19
19	17.9, CH_3	1.68, s	14, 16, 17, 18
20	22.2, CH_3	1.51, s	1, 13

[a]HMBC conelations are from proton(s) stated to the indicated carbon(s). [b]Signals were not distinguishable.

and HSQC correlations indicated the presence of three methyl carbons (δ_C 17.9, 22.2, 25.8 ppm), one methoxy carbon (δ_C 56.6 ppm), six methylene carbons (δ_C 23.4, 27.4, 29.3 (3 carbons), 50.3 ppm), one vinylic methine (δ_C 118.2 ppm), four saturated methines (δ_C 43.2, 62.3, 66.4, 78.4 ppm), two carboxy groups (δ_C 171.5, 176.9 ppm), one quaternary vinylic carbon (δ_C 134.8 ppm), and two other saturated quaternary carbons (δ_C 76.7, 64.0 ppm). These data suggested the presence of two rings in the molecule and that seven carbons may be attached to a heteroatom (δ_C 50.3, 56.6, 62.3, 64.0, 66.4, 76.7, 78.4 ppm). The ^1H NMR spectrum indicated the presence of a hydroxy (δ_H 4.15 ppm, s), three methyl groups (δ_H 1.51, 1.68, 1.76 ppm, s), one olefinic proton (δ_H 5.21 ppm, t), one methine proton (5.52 ppm, s), and four equivalent methylene protons (δ_H 2.73 ppm, s). HMBC and COSY correlations between the two equivalent methylene groups (δ_C 29.3 ppm) and the two carboxy groups defined the butanedioic acid structural unit (Figure 1).

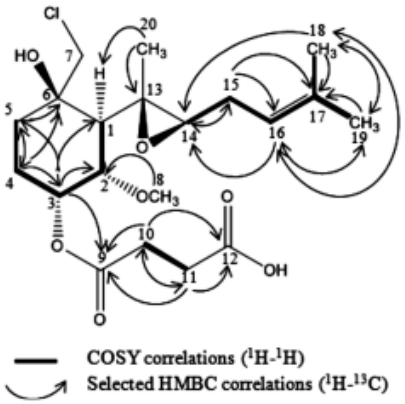


Figure 1. COSY and selected HMBC correlations for ligerin (**1**).

HMBC correlations indicated a six-carbon ring (δ_C 23.4, 29.3, 43.2, 66.4, 76.7, and 78.4 ppm), and $^1H-^{13}C$ connectivities observed for H-20 to C-13 and C-1 indicated that a side chain constituted by eight carbons (δ_C 64.0, 62.3, 27.4, 118.2, 134.8, 25.8, 17.9, 22.2 ppm) was linked to this ring at C-1. The locations of the methoxy group (δ_C 56.6 ppm) at C-2 and of the acidic moiety at C-3 were established by the HMBC connectivities. The methylene at δ_C 50.3 ppm was deshielded compared to the other methylenes, suggesting its binding to the chlorine atom. On the basis of the literature data, the ring moiety and the side chain at C-1 were consistent with the sesquiterpene core of fumagillin.[7]

In the absence of HMBC correlations involving the chloromethylene (C-7), comparison of NMR data with those of chlovalicin,[8] a C-7-chlorinated fumagillol derivative, indicated that C-7 was linked to the C-6 carbon of the cyclohexane ring. The relative configuration of compound **1** was elucidated by NOE experiments (Figure 2). These assignments were in agreement with data previously reported in the literature for fumagillin derivatives.[7,9,10] To further confirm the structure of ligerin (**1**), semisynthesis was conducted from fumagillol, obtained after hydrolysis of commercial fumagillin under basic conditions. Semisynthesis led to 44 mg of **1**, with an overall yield of 38%. NMR data of the semisynthetic compound **1** and natural ligerin were identical, revealing that ligerin (**1**) presented a relative configuration identical to that described for fumagillin.[7] Good-quality crystals of **1** were obtained by slow evaporation from a benzene/cyclohexane (1:1 (v/v)) solution under hexane vapors and were submitted for X-ray diffraction analysis. The three-dimensional structure of compound **1** unambiguously confirmed the envisaged structure, and its absolute configuration was determined as 1*S*,2*S*,3*R*,6*R*,13*R*,14*R* as depicted (Figure 2). This absolute configuration is the same as previously established for fumagillol and fumagillin.[11,12]

The EtOAc extract was examined for other fumagillin analogues by dereplication using LC-HRESIMS/MS. One of the chromatographic peaks was characterized by an ion at *m/z* 459.23569 corresponding to the $[M + H]^+$ of fumagillin ($C_{26}H_{35}O_7$, calculated 459.23828, Δ 5.6 ppm). MS/MS fragmentation data were consistent with literature data of this

dx.doi.org/10.1021/np3007364 | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

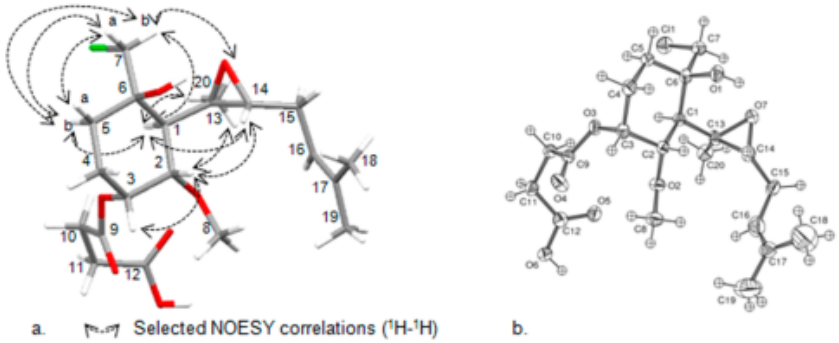


Figure 2. (a) Key NOESY correlations of compound **1**; (b) ORTEP drawing of ligerin (**1**).

compound.[13] Compound **2** was obtained as white needles after two purification steps by bioassay-guided fractionation and recrystallization. The ESI mass spectrum showed a pseudomolecular ion ($[M + H]^+$) in the positive mode at m/z 171 and an ion ($[M - H]^-$) in the negative mode at m/z 169. MS/MS fragmentation data, along with NMR data, were compared to data reported in the literature and were in concordance with those for the lactonic form of penicillic acid.[14]

After two steps of fractionation of the EtOAc extract, orcinol and orsellinic acid were obtained as a 39:61 mixture of these compounds, respectively. Further separation steps did not allow their total purification. They were identified by comparison of MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, and 2D NMR data with those reported in the literature.[15]

Among marine fungi, only marine-derived *Aspergillus* strains have been reported to produce penicillic acid.[14,16,17] Thus, this study is the first description of its production by a marine-derived strain of *Penicillium*. As orcinol and orsellinic acid are the first biosynthetic intermediates in the biosynthesis of penicillic acid,[18] the simultaneous presence of these metabolites is not surprising.

The cytotoxic activities of ligerin (**1**) and penicillic acid (**2**) were evaluated against a panel of four cancer cell lines, KB, OSRGa, POS1, and AT6-1, and one nontumor fibroblastic cell line, L929. Ligerin (**1**) displayed antiproliferative activity against all cell lines except for KB. Higher cytotoxicity was observed against the POS1 cell line (IC_{50} = 117 nM). Activities against OSRGa, AT6-1, and L929 were weaker. No IC_{50} could be calculated with the observation of a plateau at 22%, 20%, and 35% of cell viability inhibition, respectively, for all concentrations tested in the range 60−2400 nM. These results may suggest selectivity of ligerin against the osteosarcoma cell line, as the POS1 cell line was 20 times more sensitive to ligerin than the others. Further experiments will consist of *in vivo* studies using an osteosarcoma mouse model, in order to assess the antitumor activity of ligerin (**1**). Penicillic acid (**2**) displayed cytotoxicity against the POS1 cell line with an IC_{50} of 7.8 μM. It showed a weaker cell viability inhibition against the AT6-1 and L929 cell lines, with IC_{50} values of 29.4 and 12.9 μM, respectively. Penicillic acid was inactive against the KB cell line (IC_{50} >100 μM). These results confirmed the toxicity of this mycotoxin, as its level of activity was equivalent against both tumoral and nontumoral cell lines.

To date, more than 300 cytotoxic compounds have been described among the 1667 *Penicillium* secondary metabolites listed in AntiBase 2011 (Supporting Information, S8).[19] Despite the abundance of chlorine in the marine environment, only eight compounds from marine-derived *Penicillium* strains have been described to possess a chlorine atom in their chemical structure. They are griseofulvin, 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide, and six monomer or dimer derivatives of gentisyl alcohol, which all displayed cytotoxicity against cancer cell lines.[6,20−22]

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. The melting point of compound **1** was determined on an ElectroThermal Thermo Scientific 9300. The optical rotation of compound **1** was measured on a Perkin-Elmer model 341 polarimeter (c g/100 mL) at 589 nm. IR spectra (KBr disks or NaCl) were recorded on an FTIR Paragon 1000 PC Perkin-Elmer spectrometer. 1D and 2D NMR spectra were recorded in $CDCl_3$ on a Bruker 500 MHz spectrometer fitted with a TXI cryoprobe (compound **1**), in DMSO on a Bruker 400 MHz spectrometer (compound **2**), or in CD_3OD on a Bruker 400 MHz spectrometer (orcinol and orsellinic acid). MS analyses were performed on an LCQ (Finnigan Thermo Separation Products) ion trap mass spectrometer, operated in ESI positive mode and negative mode with a source voltage of 4.5 kV, sheath gas (N_2) flow rate of 59 AU, capillary temperature of 160 °C, and capillary voltage of 19.5 V (positive mode) or −10 V (negative mode). Compounds were analyzed by direct infusion of a methanolic solution at a concentration of 10 or 25 μg/mL. HRESIMS was conducted using a linear ion trap coupled to an Orbitrap mass spectrometer (LTQ/Orbitrap Thermo Fisher Scientific). Organic solvents used for extraction and purification of compounds were purchased form Carlo Erba SDS. HPLC analyses were performed using HPLC-grade methanol (Baker). Water was purified to HPLC-grade quality with a Millipore-QRG ultrapure water system (Millipore). Trifluoroacetic acid was obtained from Sigma Aldrich.

Fungal Material. The fungal strain MMS351 was isolated from a seawater sample, gathered on the French Atlantic coast near the Loire river estuary (La Prée, Loire Atlantique, France) in 1997. It is stored in the laboratory fungal collection (MMS-Marine Fungal Collection, University of Nantes) under the reference number MMS351 as well as in the collection of Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) in Paris, France, with the code LCP.99.43.43. It was identified by sequencing the internal transcribed spacers (ITS) and beta-tubulin regions (GenBank accession number JN676192 for ITS and JN794530 for beta-tubulin sequence) and by the phenotypic approach by Prof. J. C. Frisvad (Center for Microbial Biotechnology, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark), as a species of the genus *Penicillium*, belonging to the section *Canescentia* of the subgenus *Penicillium*.

Culture and Extraction. The MMS351 strain was grown on yeast extract sucrose solid medium, prepared with 20 g/L of agar, 5 mg/L of $CuSO_4$, 10 mg/L of $ZnSO_4$, 0.5 g/L of $MgSO_4$, 20 g/L of yeast extract, and 150 g/L of sucrose solubilized in sterilized natural seawater (salinity of 32.8 g/L). Cultures were realized in a series of 418

Erlenmeyers flasks each containing 50 mL of solid medium and incubated at 27 °C for 11 days. After incubation culture medium and mycelia were ground together and extracted twice with 100 mL of EtOAc. The ground mixture was then ultrasonicated for 30 min and shaken for 1 h. After dehydration on Na_2SO_4 and filtration under vacuum through a regenerated cellulose membrane (0.45 μm, Sartorius), the organic phase was evaporated to dryness, leading to an EtOAc extract (38 g).

Isolation of Ligerin (1), Penicillic Acid (2), Orcinol, and Orsellinic Acid. The extract was first fractionated by liquid chromatography on a silica gel column (60 Å, 35−70 μm, SDS) with a hexane/EtOAc and a CH_2Cl_2/MeOH nonlinear gradient. Fifty-three subfractions were collected, and their cytotoxicities against KB and POS1 cancer cell lines were evaluated. The most active subfraction against POS1 (Fr. 32, eluted by hexane/EtOAc, 60:40 (v/v)) was fractionated by liquid chromatography on a silica gel column (60 Å, 35−70 μm, SDS) with a CH_2Cl_2/MeOH nonlinear gradient. Fractions eluted by CH_2Cl_2/MeOH (99:1, v/v) (Fr. 32-14 to Fr. 32-20) were separated on a C_{18} analytical column (Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 150 × 4,6 mm) with a MeOH/acidified water (containing 0.005% trifluoroacetic acid) gradient, leading to compound **1** (t_R = 28 min) (10 mg). The most active subfraction against KB (Fr. 33, eluted by hexane/EtOAc, 50:50 (v/v)) was fractionated by liquid chromatography on a silica gel column (60 Å, 35−70 μm, SDS) with a CH_2Cl_2/MeOH nonlinear gradient. After recrystallization of fractions eluted by CH_2Cl_2/MeOH (97:3, v/v) in CH_2Cl_2, compound **2** was obtained as thin white needles (2 g). Another subfraction (Fr. 26) eluted by hexane/EtOAc (60:40, v/v) was also fractionated by liquid chromatography on a Sephadex LH20 column with a CH_2Cl_2/MeOH nonlinear gradient. The fraction eluted by CH_2Cl_2/MeOH (70:30, v/v) was a mixture of orcinol and orsellinic acid (15 mg).

Ligerin (1): colorless oil; mp 89.6 °C; $[\alpha]^{20}_D$ −37 (*c* 0.47, EtOH); IR (NaCl) ν_{max} 3423, 2964, 2929, 1736, 1439, 1406, 1373, 1261, 1165, 1123, 1087, 1027, 966, 832 cm^{-1}; ^1H and ^{13}C spectroscopic data, see Table 1; HRESIMS *m/z* [M + Na]$^+$ 441.16507 (calcd for $C_{20}H_{31}ClO_7Na$, 441.16560, Δ 1.2 ppm); ESIMS/MS *m/z* 423 ([M + Na − H_2O]$^+$), 387 ([M + Na − HCl − H_2O]$^+$), 341, 323, 305, 287, 255, and 215.

Semisynthesis of Ligerin (1). Fumagillin was purified from Fumidil B, Ceva Santé Animale, on a silica gel column (elution by CH_2Cl_2 and CH_2Cl_2/MeOH, 10:1 (v/v)). Purified fumagillin (100 mg) was dissolved in 10 mL of NaOH (0.1 N). The reaction was stirred at room temperature (rt) for 4 h. After extraction with diethyl ether, the organic phase was dried with $NaHCO_3$/anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum, to give fumagillol (yellow oil, 57 mg). The procedure was repeated to obtain an extra 100 mg of fumagillol. Fumagillol (145 mg, 0.514 mmol, 1 equiv) was dissolved with dimethylaminopyridine (80 mg, 0.655 mmol, 1.27 equiv) and succinic anhydride (200 mg, 2 mmol, 3.9 equiv) in 1 mL of anhydrous pyridine. The reaction mixture was stirred at rt for 16 h. Purification on a silica gel column (elution by cyclohexane and CH_2Cl_2/MeOH, 10:1 (v/v)) led to the dechlorinated compound **1** (colorless oil, 130 mg). This compound (65 mg, 0.17 mmol, 1 equiv) was dissolved with LiCl (30 mg, 0.715 mmol, 4.2 equiv) in 0.5 mL of THF at 0 °C, and acetic acid (50 μL, 54 mg, 0.09 mmol, 5.3 equiv) was then added. The mixture was warmed to rt, and the reaction mixture was stirred for 24 h. Compound **1** (colorless oil, 44 mg) was purified by low-pressure liquid chromatography on a silica gel column (elution by cyclohexane and CH_2Cl_2/MeOH, 10:1 (v/v)). Specific rotation value of semi-synthetic **1** was $[\alpha]^{20}_D$ −47 (*c* 0.51, EtOH).

Crystal Structure Determination of Ligerin (1). Colorless, prism-shaped single crystals of **1** were obtained at ambient temperature by slow evaporation of a benzene/cyclohexane (1:1 v/v) solution, under hexane vapors. X-ray data collection was performed at 140 K under N_2 flow on an Xcalibur Oxford Diffraction CCD diffractometer equipped with graphite-monochromated Mo Kα radiation (λ = 0.71073 Å, CCD rotation images, thick slices, φ and ω scans to fill asymmetric unit). Cell parameters were obtained from a least-squares fit of the θ angles of 4069 reflections in the range 2.62° ≤ θ ≤ 27.5°. The structure was solved by direct methods and anisotropically refined by the full matrix least-squares method on F^2 against all independent measured reflections (SIR2002 package)[23] and refined by the full matrix least-squares method on F^2 against all independent measured reflections (SHELXL program of the SHELX97 package).[24] The position of hydroxy H atoms was determined from a difference Fourier map and refined according to a riding model. The absolute configuration was determined with the Flack parameter [*x* = −0.03(8)]. The final refinement converged to R1 = 0.0489 for 4010 observed reflections having $I > 2\sigma(I)$. Minimum and maximum residual electronic density was −0.291 and 0.672 e $Å^{-3}$. Crystal data: formula $ClC_{20}H_{31}O_7$, formula weight 418.9 g mol^{-1}, monoclinic *C*2, *a* = 29.206(1) Å, *b* = 6.4041(2) Å, *c* = 11.7836(5) Å, β = 106.671(4)°, 7709 collected reflections, 4010 unique reflections.

Cytotoxic Activity Assays. Cytotoxic activities of ligerin (**1**) and penicillic acid (**2**) were evaluated against four cancer cell lines, KB (human nasopharyngeal epidermoid tumor, ATCC number CCL-17), AT6-1 (murine prostatic carcinoma), and POS1 and OSRGa (murine osteosarcomas), and one nontumor cell line, L929 (murine fibroblasts, ATCC number CCL-1). The KB cell line was grown in BME medium (Sigma-Aldrich) supplemented with fetal bovine serum (5% (v/v)), glutamine (1% (v/v)), and antibiotics (penicillin/streptomycin 10 000 μg/mL, 1% (v/v)). L929 and POS1 cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 5% (v/v) of fetal bovine serum. AT6-1 and OSRGa cell lines were grown in DMEM medium (Gibco) supplemented with fetal bovine serum (5% v/v). Cytotoxicities were assayed by the colorimetric method using tetrazolium salts as previously described, after 72 h of contact: MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] on KB cells or XTT [sodium 3′-[1-[(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium]bis-(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate] on AT6-1, POS1, OSRGa, and L929 cell lines. Doxorubicin at various concentrations was used as a positive control. IC_{50} values against KB, POS1, OSRGa, AT6-1, and L929 were respectively 300 nM, 43 nM, 93 nM, 2 μM, and 161 nM.

MTT Protocol. Cells were harvested by trypsination and seeded in 96-well plates (50 μL/well at a density of 2 × 10^5 cells/mL). After 48 h incubation at 37 °C and 5% CO_2 to allow cell attachment, cells were exposed to various concentrations of extracts or isolated compounds for 72 h. MTT solution (5 mg/mL in PBS, Sigma Aldrich) was then added at the rate of 50 μL/well. Plates were incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO_2, and the formazan crystals formed were dissolved by adding 100 μL of an acidic 2-propanol solution (0.04% HCl 1 N). Absorption at 570 and 630 nm (background noise) was measured with a plate reader (ELx800, Universal Microplaque Reader, Bioteck Instruments, Inc).

XTT Protocol. Cells were harvested by trypsination and seeded in 96-well plates (100 μL/well at a density of 1 × 10^4 cells/mL for POS1, AT6-1, and L929 and 2.5 × 10^4 cells/mL for OSRGa). After 24 h incubation at 37 °C and 5% CO_2 to allow cell attachment, and renewal of culture medium, cells were exposed to various concentrations of extracts or isolated compounds for 72 h. XTT solution (Roche Applied Science) was then added to the extent of 50 μL/well. Plates were incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO_2. Absorption at 450 nm was measured with a plate reader (Wallace Victor 2 1420 MultiLabel Counter, Perkin-Elmer). IC_{50} values were determined as the concentrations that inhibited cell viability by 50%.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

1D NMR spectra for ligerin (**1**), reaction scheme of semisynthesis of ligerin (**1**), MS spectra for penicillic acid (**2**), experimental data for penicillic acid (**2**), orcinol, and orsellinic acid, chlorinated marine-derived *Penicillium* metabolites among microbial compounds (AntiBase 2011). This material is available and free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org. Crystallographic data for **1** reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallo-

dx.doi.org/10.1021/np3007364 | J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX−XXX

graphic Data Centre as supplementary publication number CCDC 886474. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +33 2 51 12 56 84. E-mail: olivier.grovel@univ-nantes.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge the French Ministry of Higher Education and Research for a Ph.D. students grant.

■ REFERENCES

(1) Liu, S.; Widom, J.; Kemp, C. W.; Crews, C. M.; Clardy, J. *Science* **1998**, *282*, 1324−1327.

(2) Eble, T. E.; Hanson, F. R. *Antibiot. Chemother.* **1951**, *1*, 54−58.

(3) Arico-Muendel, C.; Centrella, P. A.; Contonio, B. D.; Morgan, B. A.; O'Donovan, G.; Paradise, C. L.; Skinner, S. R.; Sluboski, B.; Svendsen, J. L.; White, K. F.; Debnath, A.; Gut, J.; Wilson, N.; McKerrow, J. H.; DeRisi, J. L.; Rosenthal, P. J.; Chiang, P. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5128−5131.

(4) Arico-Muendel, C. C.; Benjamin, D. R.; Caiazzo, T. M.; Centrella, P. A.; Contonio, B. D.; Cook, C. M.; Doyle, E. G.; Hannig, G.; Labenski, M. T.; Searle, L. L.; Lind, K.; Morgan, B. A.; Olson, G.; Paradise, C. L.; Self, C.; Skinner, S. R.; Sluboski, B.; Svendsen, J. L.; Thompson, C. D.; Westlin, W.; White, K. F. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 8047−8056.

(5) Hayashi, M.; Kim, Y.-P.; Takamatsu, S.; Preeprame, S.; Komiya, T.; Masuma, R.; Tanaka, H.; Komiyama, K.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 631−634.

(6) Petit, K. E.; Mondeguer, F.; Roquebert, M. F.; Biard, J. F.; Pouchus, Y. F. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *58*, 59−65.

(7) Halasz, J.; Podanyi, B.; Vasvari-Debreczy, L.; Szabo, A.; Hajdu, F.; Bocskei, Z.; Hegedus-Vajda, J.; Gyorbiro, A.; Hermecz, I. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10081−10085.

(8) Takamatsu, S.; Kim, Y.-P.; Komiya, T.; Sunazuka, T.; Hayashi, M.; Tanaka, H.; Komiyama, K.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 635−638.

(9) Chu, M.; Mierzwa, R.; He, L.; Xu, L.; Patel, M.; Patel, D.; Chan, T.-M. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 1096−1099.

(10) Asami, Y.; Kakeya, H.; Okada, G.; Toi, M.; Osada, H. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 724−728.

(11) Rodeschini, V.; Boiteau, J.-G.; Van de Weghe, P.; Tarnus, C.; Eustache, J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 357−373.

(12) Marui, S.; Itoh, F.; Kozai, Y.; Sudo, K.; Kishimoto, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 96−101.

(13) Nielsen, K. F.; Mansson, M.; Rank, C.; Frisvad, J. C.; Larsen, T. O. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2338−2348.

(14) Li, H.-J.; Cai, Y.-T.; Chen, Y.-Y.; Lam, C.-K.; Lan, W.-J. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2010**, *26*, 415−419.

(15) Ivanova, V.; Backor, M.; Dahse, H.-M.; Graefe, U. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *40*, 377−388.

(16) Namikoshi, M.; Negishi, R.; Nagai, H.; Dmitrenok, A.; Kobayashi, H. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 755−761.

(17) Zhang, D.; Yang, X.; Kang, J. S.; Choi, H. D.; Son, B. W. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1458−1460.

(18) Sekiguchi, J.; Katayama, S.; Yamada, Y. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 1531−1535.

(19) Laatsch, H. *AntiBase 2011, The Natural Compound Identifier*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2011.

(20) Zhang, Y.; Ahn, E.-Y.; Jiang, Y.; Kim, D.-K.; Kang, S.-G.; Wu, C.; Kang, S.-W.; Park, J.-S.; Son, B. W.; Jung, J. H. *Int. J. Oncol.* **2007**, *31*, 1317−1323.

(21) Chen, L.; Fang, Y.; Zhu, T.; Gu, Q.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 66−70.

(22) Hiort, J. Neue Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres: Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung der Biologischen Aktivität. Ph.D. dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2002.

(23) Burla, M. C.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 1103.

(24) Sheldrick, G. M.; Schneider, T. R. *Methods Enzymol.* **1997**, *277*, 319−343.

ANNEXE XXI : Publication ligérine et analogues : hémisynthèses et activités antiprolifératives sur ostéosarcomes

BLANCHET E., VANSTEELANDT M., LE BOT R., EGOROV M., GUITTON Y., POUCHUS Y.F. AND GROVEL O.Synthesis and antiproliferative activity of ligerin and new fumagillin analogs against osteosarcoma. European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 79C, 244–250

European Journal of Medicinal Chemistry 79 (2014) 244–250

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Original article

Synthesis and antiproliferative activity of ligerin and new fumagillin analogs against osteosarcoma

Elodie Blanchet [a,b], Marieke Vansteelandt [a,1], Ronan Le Bot [b], Maxim Egorov [b], Yann Guitton [a], Yves François Pouchus [a], Olivier Grovel [a,*]

[a] University of Nantes, Faculty of Pharmacy, MMS-EA260, Nantes F-44000, France
[b] Atlanthera, Atlantic Bone Screen, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 February 2014
Received in revised form
31 March 2014
Accepted 4 April 2014
Available online 5 April 2014

Keywords:
Ligerin
Fumagillin
Osteosarcoma
Antiproliferative
Cytostatic
Marine-derived *Penicillium*

ABSTRACT

Ligerin (**1**) is a natural chlorinated merosesquiterpenoid related to fumagillin (**2**) exhibiting a selective antiproliferative activity against osteosarcoma cell lines and an *in vivo* antitumor activity in a murine model. Semisynthesis of ligerin analogs was performed in order to study the effects of the C3-spiroepoxide substitution by a halogenated moiety together with the modulation of the C6 chain. Results showed that all derivatives exhibited an *in vitro* antiproliferative activity against osteosarcoma cell lines and that chlorohydrin compounds were equally or more active than their spiroepoxy analogs. Among semisynthetic analogs, the parent compound **1** was the best candidate for further studies since it exhibited higher or equivalent activity compared to TNP470 (**3**) against SaOS2 and MG63 human osteosarcoma cells with a four times weaker toxicity against HFF2 human fibroblasts. Quantitative videomicroscopy analysis was conducted and allowed a better understanding of the mechanism of its antiproliferative activity.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Despite its low incidence (around 300 new cases/year in Europe), osteosarcoma is the most frequent malignant primary bone tumor. It affects predominantly children, teenagers and young adults and accounts for 8.9% of cancer-related deaths in children [1,2]. No satisfactory treatment is currently available and no significant improvement in prognosis has been noticed since the advent of combined chemotherapy in the 90's. The 5-year survival rate for patients diagnosed with osteosarcoma is still remaining between 60% and 70% without metastasis [2]. Current therapy consists in combining surgery and multiagents chemotherapy (neoadjuvant and post-surgery) based principally on methotrexate, ifosfamide, doxorubicin and cisplatin treatments. All these drugs induce significant side effects, highlighting the need to improve current treatment strategies.

Fumagillin (**2**) is a merosesquiterpene isolated for the first time in 1949 from a crude extract of a strain of *Aspergillus fumigatus* [3,4]. First studied and used in clinical medicine for its antimicrobial activity in human and veterinary health [5], this molecule has known a renewed interest since 1990 because of its anti-angiogenic properties [6]. Given the high toxicity of this compound, many syntheses of derivatives were done and led to the synthesis of the first clinically developed analog: the 6-O-chloroacetylcarbamoyl-fumagillol named TNP470 (**3**). This compound presented a strong activity against adenocarcinoma but its clinical development was stopped in phase II trial due to its neurotoxicity [7–10]. The instability and the toxicity of TNP-470 are likely due, at least in part, to the presence of three functional groups chemically labile or metabolically unstable, the two epoxides (the spiroepoxide and the 1′-2′ epoxide on the C4 side chain) and the chloroacetyl moiety at C6.

The mechanism of action of this class of compounds remains not fully resolved, but the methionine aminopeptidase-2 (MetAP2) has been identified as their main molecular target. This metalloprotease is responsible for the removal of the methionine residue from newly synthetized polypeptides, allowing their further myristoylation and functionalization. Inhibition of this enzyme would cause cell-cycle arrest. Most of these sesquiterpenes inhibit selectively and irreversibly the MetAP2 through insertion of the C4 chain in the active pocket, mimicking the terminal part of native proteins, and via the formation of a covalent bond between the C-7 of the

* Corresponding author.
E-mail address: olivier.grovel@univ-nantes.fr (O. Grovel).
[1] Present address: University of Toulouse III, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UMR 152 IRD/UPS Pharma-DEV, F-31062 Toulouse Cedex 9, France.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.012
0223-5234/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

spiroepoxide group and a nitrogen of the 231-histidine residue of the enzyme [11].

In 2005, Rodeschini [12] defined the role of the two epoxides for the binding of fumagillin analogs to the active site of MetAP2 which involves two water molecules, a binuclear metal center and the 231-histidin residue [13]. As the removal of the 1′-2′ epoxide doesn't impact the activity of the molecule, it would most likely be involved in the orientation of the side chain for the recognition by the enzyme [14]. Griffith et al. defined the importance of the second epoxide, demonstrating that the removal of the ring epoxide dramatically lowered the activity of fumagillol against MetAP2 [15]. Since its first discovery and use in medicine, structural modifications on the sesquiterpene backbone concerned mainly the C4-branched chain in order to improve the affinity for the hydrophobic channel surrounding the catalytic pocket [16]. Among dozens of synthetic derivatives of fumagillin, two analogs have recently been undergoing development in phase I clinical trials. CKD-732 is studied for the treatment of refractory solid cancer [17] and in combination with capecitabine and oxaliplatine for the treatment of metastatic colorectal cancer in patients who progressed on chemotherapy based on irinotecan [18]. PPI-2458 is evaluated for the treatment of non-Hodgkin lymphomas and several solid tumors [19]. These two compounds corroborate the interest of this chemical family in the search for new anticancer drugs.

In the course of our search for new drugs against osteosarcoma, ligerin (**1**), a new natural compound related to fumagillin (**2**), has previously been isolated from a marine-derived strain of *Penicillium* sp. (Fig. 1). Ligerin, the 3-hydroxy, 3-chloromethylene, 6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol was the second natural product exhibiting a halogenated moiety in place of the common spiroepoxide. Assayed against various murine cell lines, it exhibited a selective antiproliferative activity against osteosarcoma compared to non-tumor cells [20].

This work was focused on the semisynthesis of new halogenohydrin analogs related to ligerin, in order to investigate the impact of halogen atoms such as chlorine or bromine on the antiproliferative activity compared to their spiroepoxide analogs. Structural modulations of C6-side chain were also explored, maintaining the terminal carboxylic acid moiety. Bioactivities as well as selectivity of all compounds were evaluated using *in vitro* assays against both murine and human osteosarcoma and non-tumor cell lines and were compared to TNP470 (**3**) and reference anticancer compounds. Further studies on the ligerin bioactivity were also conducted, in order to get a better understanding of its antiproliferative mechanism.

2. Results and discussions

2.1. Chemistry

In order to evaluate the effect of the spiroepoxide opening and its substitution by a halogenomethylene moiety on the cytotoxicity of this chemical series, 6-O-succinylfumagillol (**1a**) and fumagillol (**4a**) were synthesized together with their respective chlorohydrin analogs, ligerin (**1**) and 7-chloro-fumagillol (**4**) (Scheme 1). Given that only two brominated compounds have been described in the literature in the fumagillin series [21], the synthesis of a bromohydrin analog of ligerin was also performed (**5**). In a second time, some ligerin analogs with different C6 moieties were synthesized, by introducing a heteroatom or a benzene ring in the side chain or by extending the length of the carboxylic acid side chain.

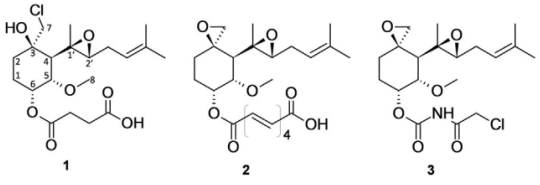


Fig. 1. Structures of ligerin (**1**), fumagillin (**2**) and TNP470 (**3**).

For that purpose, a first step consisted in preparing **4a**, the saponification product of (+)-fumagillin. Instead of the classical two steps process consisting in a first purification of the fumagillin dicyclohexylamine salt contained in a commercial product (Fumidil B®) followed by the hydrolysis of the C-6 ester, a one-step reaction was developed. In this way, the entire commercial preparation was directly submitted to alkaline hydrolysis using 0.5 N NaOH, allowing to purify **4a** from the reaction mix by liquid/liquid partition after acidification. From **4a**, each structural modulation was obtained with the same semisynthetic approach. Compound **4a** was esterified using different anhydrides to afford compounds **1a**, **6a**, **7a**, **8a**. To obtain the chlorohydrin or bromohydrin analogs (compounds **1**, **5**–**8**), a halogenation step was further performed using the corresponding halogenous salt, i.e. LiCl or LiBr. The structures of all compounds were confirmed by ^{1}H and ^{13}C NMR analyses.

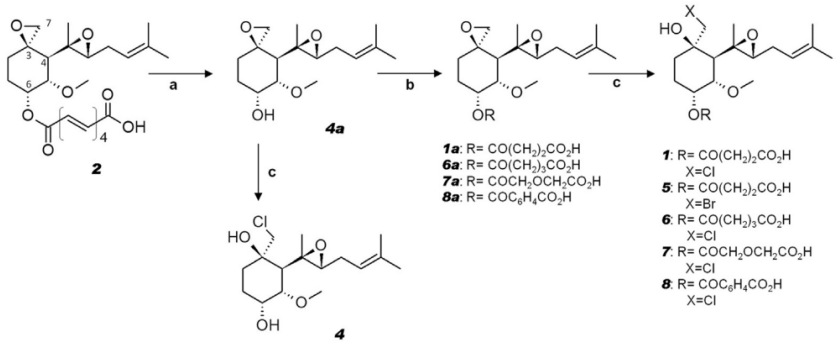
2.2. Pharmacology

2.2.1. Antiproliferative activity

The antiproliferative activity of halogenated compounds (**1**, **4** and **5**) and their respective spiroepoxide analogs (**1a**, **4a**) was tested *in vitro* against two osteosarcoma cell lines: one murine (POS-1) and one human (SaOS2).

As shown in Fig. 2, compounds **1a** and **1** were more active than **4a** and **4** as no IC_{50} could be measured in the range of 0.40–2100 nM for these last compounds. This first result confirms that a C6 side-chain is required for a high activity against these cancer cells [22]. The C7 halogen substitution was shown to have a weaker influence on the cytotoxicity. The activity of the chlorohydrins and their respective spiroepoxide analogs was found to be equivalent except for **1** against SaOS2 cell line which was more active than its spiroepoxide analog **1a** and in the same manner for **4** and **4a** against POS-1 cells. Similar activity was also obtained for **3** and its halogenohydrin derivative against the two osteosarcoma cell lines. Nonetheless, substitution of the chlorine atom by a bromine atom decreased the activity as **5** exhibited an intermediate activity compared to **1** and other analogs. IC_{50} of **5** against POS-1 and SaOS2 cells were respectively 272 nM and 801 nM whereas IC_{50} of **1** were 78 nM and 137 nM.

In literature, the two epoxides have often been described as essential for the binding to MetAP2, the target enzyme of this class of compounds [12], but the impact of the C3 epoxide opening on the activity remains unclear. In this way, it has been reported that compounds for which the spiroepoxide was opened were less active than their intact analog. For instance, the C3-methylthiomethyl derivative of **3** was over 100 times less active than the parent compound on both MetAP2 inhibition and HUVEC assays [23], and halogenation of the spiroepoxide of fumagillin derivatives led to a 10 fold decrease of their activity on the enzyme [24]. On the contrary, Hayashi et al. have shown that chlovalicin, a natural chlorinated analog in the fumagillol series, was 3 times more active than its epoxidized form ovalicin [25]. More recently, in a *in vitro* metabolization study, Arico-Muendel et al. have shown that, after exposure of the fumagillin analog PPI-2458 to an acidic treatment mimicking the stomach milieu, some metabolites formed were chlorohydrin analogs. These compounds were found as effective as their epoxide precursor on a MetAP2 inhibition assay



Scheme 1. Synthetic routes for compounds **1**, **5**–**8**. Reagents and conditions: a) 0.5 N NaoH, rt, 18 h; b) anhydride, DMAP/dry pyridine, rt, 24 h; c) LiCl or LiBr, THF, acetic acid, rt, 24 h.

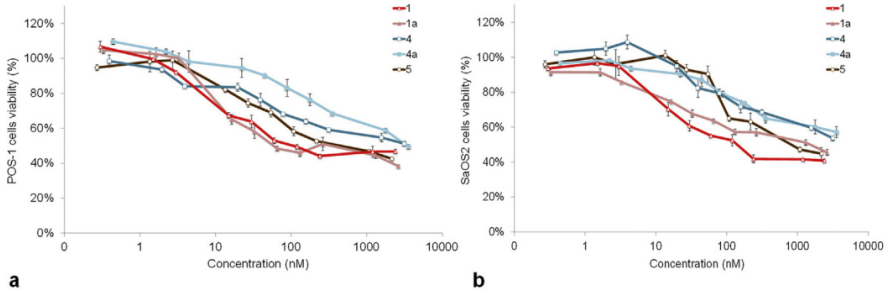


Fig. 2. Effects of compounds **1**, **1a**, **4**, **4a** and **5** against POS-1 (a) or SaOS2 (b) cell proliferation after 72 h exposure. Cell viability was measured by XTT assay. Data are mean ± SD of triplicate experiments.

and against HUVEC proliferation [19], as we observed for **1a** and **1** against osteosarcoma cells. Because of a rapid re-cyclization observed in rat plasma to afford the initial epoxide form they hypothesized that chlorohydrins lack intrinsic activity [19]. In the present study, the observation of a lower cytotoxicity for the bromohydrin analog **5** should tend to envisage that the C7 methylene substitution has an effective involvement in the activity of these compounds. Nevertheless, a molecular docking study performed with **1** and **5** using the 3-dimensional structure of the human MetAP2/fumagillin complex (PDB code: 1Boa) [11] revealed that nor a chlorine nor a bromine atom can prevent the interaction of the C7 methylene with the His231 residue of MetAP2, as it has been described for **2** and **3** [11] (data not shown).

In a second time, the modulation of the C6 moiety was explored. Cytotoxicity of compounds **6**–**8** was evaluated against a panel of three osteosarcoma cell lines, one murine (POS-1) and two human (SaOS2 and MG63) and two non-tumor fibroblasts L929 (murine) and HFF2 (human) (Table 1). All compounds displayed an antiproliferative activity associated with a dose effect against osteosarcoma cells, even if IC_{50} could not be reached for compounds **5**–**8** against MG63 and for **8** against SaOS2 (maximum 42–48% inhibition). For all tested compound except **7**, activity was higher against murine than human cell lines.

Results showed that all derivatives exhibited a lower activity compared to the parent compound **1**, whatever the cell line. For example, against POS-1 compounds **6**–**8** were found to be 3 to 17 times less active than **1**. Thus, the introduction of a heteroatom or a benzene ring in the succinyl moiety or the lengthening of the carbon chain could not improve the antiproliferative activity of **1**. As the different IC_{50} observed for the three synthetized compounds were cell line-dependent, no clear structure–activity relationship could be deduced.

For determination of selectivity against cancer cells and toxicity assessment, activities against osteosarcoma cells were compared with cytotoxicity against non-tumor fibroblastic cell lines. All

Table 1
Antiproliferative activity of compounds **1**, **3**, **5**–**8** and reference anticancer molecules against three tumor cell lines (one murine POS1, and two human SaOS2 and MG63) and two non-tumor cell lines (one murine L929 and one human HFF2), expressed as IC_{50} [nM] and SI (selectivity index).

Compound	Murine cell lines			Human cell lines			
	IC_{50} (nM)		SI[b]	IC_{50} (nM)[a]			SI[b]
	POS-1	L929		SaOS2	MG63	HFF2	
1	78	>2300	>29	137	1459	>2300	>17
3	2	>2300	>961	508	1521	1979	4
5	272	>2100	>8	801	>2100	>2100	>3
6	234	>2300	>10	863	>2300	>2300	>3
7	1394	>2300	>2	629	>2300	>2300	>4
8	230	>2100	>9	>2100	>2100	>2100	
Paclitaxel	95	521	5	52	NT	NT	
Vinscristine	75	419	6	11	NT	NT	
Doxorubicin	43	161	4	48	NT	NT	
Irinotecan	6300	6500	1	NT	NT	NT	
Fludarabine	5700	17,500	3	NT	NT	NT	

[a] NT: Non Tested.
[b] The selectivity index (SI) was calculated as the ratio between the IC_{50} values on normal cells *versus* cancer cells from the same origin (L929/POS-1; HFF2/SaOS2).

compounds induced a higher inhibition of cancer cell proliferation *versus* the non-tumor one from the same origin (murine or human). In this way, none of the compounds showed a sufficient activity allowing to establish an IC_{50} value against L929, and a maximum of 40% of inhibition of cell viability was attained in the range of concentrations tested. Furthermore, all compounds were at least 3 times more potent against human cancer cells than against HFF2. The selectivity index of compounds **6**–**8** was compared to **1** by calculating the ratio between the IC_{50} values against normal cells *versus* cancer cells from the same origin, highlighting that ligerin seems to be the most selective compound against osteosarcoma cells, with SI found over 29 and 17 against murine and human cell lines respectively.

As among all compounds tested, **1** appeared to be the more potent analog, its antiproliferative activity and selectivity for osteosarcoma were compared to the phase II engaged drug candidate, TNP-470 (**3**) the 6-O-chloroacetylcarbamoyl semisynthetic derivative of fumagillol. Against murine osteosarcoma, **3** was found to be more potent than **1** with IC_{50} values of 2 and 78 nM, respectively. On the contrary, **1** exhibited a higher activity against human SaOS2 (IC_{50} of 137 and 801 nM for **1** and **3** respectively), whereas the two compounds exhibited a similar activity against MG63 with a maximal diminution of cell viability of 55% within the range of concentrations tested. Against the non-tumor L929 and HFF2 cell lines, the cytotoxicity of **1** was weaker than **3** in the range 0.30–230 nM. Although **3** showed a high selectivity against murine cells ($SI > 961$), **1** exhibited a better ratio against human cell lines, with a selectivity index 4 times higher than the one of **3**. For instance, at a concentration of 30 nM, the decrease of MG63 and SaOS2 viability was 30–35% for both compounds, whereas the proliferation of HFF2 fibroblasts was inhibited of 15% and 43% for **1** and **3** respectively.

Furthermore, **1** was found to be at least 70 times more active than irinotecan and fludarabine against POS-1 and showed equipotent efficacy with vincristine and paclitaxel. Compared to the five anticancer drugs tested, the selectivity index of **1** was higher against murine cell lines. For instance, **1** presented a selectivity index at least 7 times higher than the one of the most active drug doxorubicin.

2.2.2. Effect of ligerin on cell replication/viability

Further studies were performed to determine whether **1** exhibited a cytotoxic or a cytostatic activity. After 72 h exposure to **1**, viable POS-1 and L929 cells were counted using a trypan blue dye exclusion assay. Two positive controls were used, apomine as reference compound for cytostatic activity and staurosporin for cytotoxicity. Contrary to the staurosporin treatment which induced immediate cell death against POS-1, 81% of cells were found to be living cells after a contact with 0.7 μM of **1**, a concentration which induced 54% inhibition of POS-1 proliferation. This result was similar to the proportion of living cells in the assay performed with the solvent negative control (82% living cells) and slightly higher than with apomine (67%). On L929, equivalent percentages were obtained for **1**, apomine and negative control.

The effect of ligerin on the cell division duration and on the morphology of L929 and POS-1 cells was evaluated thanks to a time lapse analysis using quantitative videomicroscopy performed with a reversed microscope and a camera taking a picture of each well of a 24-well plate every 10 min. Each experiment, i.e. negative control, staurosporine, apomine and **1** was performed in triplicate. Cells were then counted and growth curves were constructed as shown in Fig. 3. With a treatment consisting of 0.7 μM of ligerin, POS-1 proliferation was slowed down and the doubling time of cell population was twice longer, 30 h instead of 15 h for negative control. This effect was weaker against L929, as the cell cycle duration increased from 17 h for negative control to 22 h for the ligerin-treated cells. Videomicroscopy also allowed the observation of the effects induced by the tested compounds on cell shape and movements. In normal conditions, POS-1 cells are continuously exhibiting unilateral movements, and they require an initial contact between them to engage their division. In the presence of **1**, cell movements were dramatically perturbed and cell divisions were observed even when cells were isolated, without any previous contact with other cells. However, no morphological modifications were noticed on osteosarcoma cells, contrary to what occurred on L929 which exhibited a rounded form in place of their characteristic fibroblastic shape (Fig. 4). Then, at the tested concentration, **1** exhibited a selective activity against osteosarcoma. As it was observed for apomine, this activity was characterized as cytostatic.

3. Conclusion

In conclusion, new analogs of the fumagillin-related natural compound ligerin **1** were semisynthesized using a simplified three-step process and were investigated for their antiproliferative activity against osteosarcoma and normal cell lines. Results showed that both halogenohydrin and spiroepoxy compounds exhibited an antiproliferative activity against murine or human cancer cell lines higher than against normal fibroblastic cells. Chlorohydrins **1** and **4** were found to be at least as active as their epoxy derivatives against SaOS2 and POS1 osteosarcoma cell lines, whereas the bromohydrin **5** showed a reduced activity, emphasizing the role of the C7 substituents. Compared to synthetized compounds and the reference drug candidate **3**, **1** exhibited a higher activity against human SaOS2 and MG63 cancer cells together with a lower cytotoxicity against normal cells. Furthermore, **1** was evaluated as more than 70 times more active than irinotecan and fludarabine and as potent as vincristine and paclitaxel against POS-1 cells. Pharmacological investigations highlighted that **1** exerted its antiproliferative activity through a cytostatic mechanism. Further studies will be performed in order to better understand the mechanism of action of **1** at the molecular level.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Solvents from Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France) were distilled before use. Fumidil B® was obtained from Ceva Santé Animale (Libourne, France). Progress of reactions was monitored by thin layer chromatography on Silica Gel plates Alugram® Xtra SIL G/UV_{254} (Macherey–Nagel, Hoerdt, France). 1D and 2D NMR spectra were recorded in $CDCl_3$ on a Bruker 500 MHz spectrometer fitted with a TCI cryoprobe. Chemical shift are expressed in δ (ppm) with TMS as internal standard and coupling constants in Hertz. HRMS analyses were performed with an IT-TOF mass spectrometer composed of an ESI ion source and a hybrid Ion Trap-Time-Of-Flight mass analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4.1.2. Semisynthesis

Each semisynthetic approach started from **2**. The first step consisted of an alkaline hydrolysis of **2** contained in the commercial product Fumidil B®. For that purpose, 50 g of Fumidil B® were dissolved in 1 L of NaOH (0.5 N) and the reaction was stirred at room temperature during 18 h. 5% citric acid was added before extraction with diethyl ether. Then, organic phase was dried with $NaHCO_3$/anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum, to give **4a** (yellow oil, 609 mg). The second step consisted of the

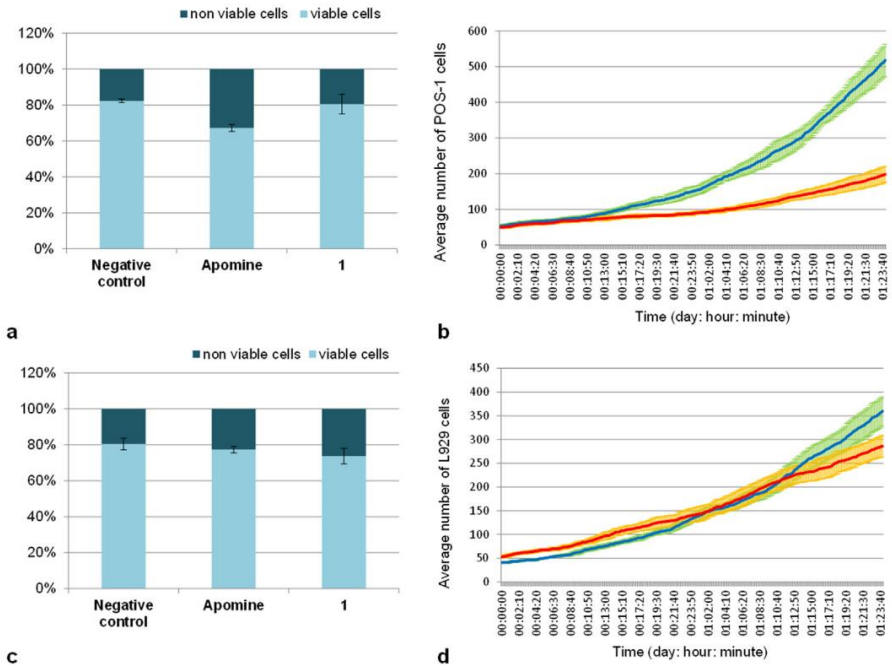


Fig. 3. Effect of 0.7 μM **1** on cell viability and cell proliferation of POS-1 (a, b) and L929 (c, d) cells. a, c Trypan blue exclusion assay after 72 h incubation (values ±SD of four independent experiments). b, d Growth curves of cells observed every 10 min during 2 days by quantitative videomicroscopy. Red line average number of cells exposed to **1**, (orange area: ±SD of triplicates); blue line average number of cells exposed to negative control, (green area: ±SD of triplicates). Apomine concentration 10 μM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

esterification of **4a**. This compound (600 mg, 2.12 mmol, 1 eq) was dissolved with DMAP (dimethylaminopyridine, 330 mg, 2.75 mmol, 1.30 eq), succinic anhydride (827 mg, 8.28 mmol, 3.9 eq) in 4 mL of anhydrous pyridine. The reaction was stirred at room temperature during 24 h. The reaction mix was extracted with AcOEt and washed with water. The organic phase was then extracted with a saturated solution of $NaHCO_3$ before the acidification until pH4 with NaH_2PO_4. The mixture was finally extracted with AcOEt and dried using Na_2SO_4anh before concentration under vacuum to obtain compound **1a** (yellow oil, 620 mg). This compound (600 mg,

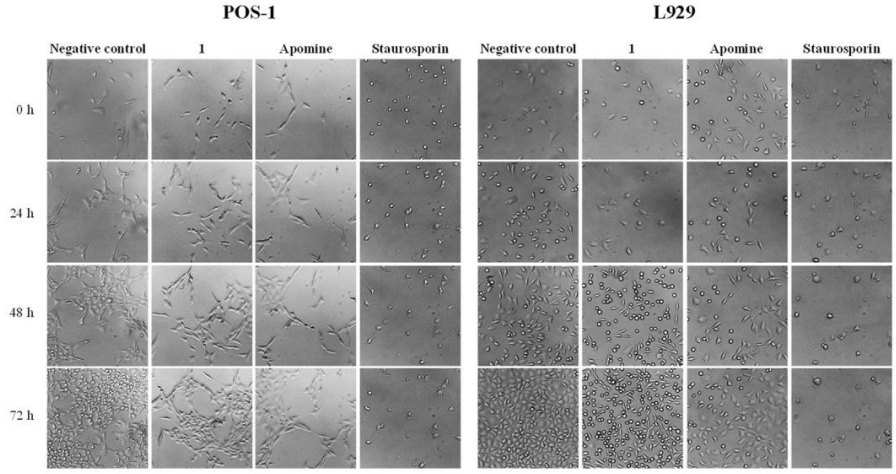


Fig. 4. Morphological changes of POS-1 (left) and L929 (right) cells after 0, 24, 48, 72 h exposure to negative control, 0.7 μM **1**, 10 μM apomine, 1 μM staurosporin (G×10 magnification).

1.56 mmol, 1 eq) was dissolved with LiCl (285 mg, 6.80 mmol, 4.35 eq) in 5 mL of THF at 0 °C and acetic acid (450 μL, 486 mg, 8.1 mmol, 5.2 eq) was then added. Mixture was warmed to room temperature and the reaction was stirred during 24 h. Ligerin (**1**) (colorless oil, 401 mg) was purified by liquid chromatography on a silica gel column (elution by cyclohexane and CH_2Cl_2/MeOH 10:1 (v/v)). Compounds **5**–**8** were synthesized with the same semisynthetic approach; only the anhydride used for the esterification step and the halogenous salt for the last step changed (succinic anhydride and LiBr for **5**, glutaric anhydride and LiCl for **6**, diglycolic anhydride and LiCl for **7**, phthalic anhydride and LiCl for **8**). For compound **4**, the halogenation step with LiCl was performed with **4a**. Compound **3** was synthesized according to the method described by Marui et al. [26].

*4.1.2.1. 6-(3-Carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol (**1a**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 405.1896 (calcd for $C_{20}H_{30}O_7Na$, 405.1884, Δ 3.0 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.10 & 2.05 (m; 2H); 1.2 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.76 (s; 3H); 1.82–1.86 (m; 2H); 1.98 (m; 1H); 2.17 & 2.39 (m; 2H); 2.56 & 2.96 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 2.63 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 2.71 (s; 4H); 3.40 (s; 3H); 3.63 (m; 1H); 5.19 (t; *J* = 7.0 Hz; 1H); 5.68 (s; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 18.3 (CH_3); 26.0 (CH_2); 26.1 (CH_3); 27.7 (CH_2); 29.7 (CH_2); 29.7 (CH_2); 29.7 (CH_2); 48.1 (CH); 51.2 (CH_2); 57.1 (CH_3); 59.6(C); 59.7 (C); 61.5 (CH); 67.2 (CH); 79.2 (CH); 118.7 (CH); 135.4 (C); 14.0 (CH_3); 171.9 (C); 175.7 (C).

*4.1.2.2. Ligerin (**1**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 441.1656 (calcd for $C_{20}H_{31}ClO_7Na$, 441.1651, Δ 1.3 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.40 & 1.96 (m; 2H); 1.51 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.76 (s; 3H); 1.82–1.86 (m; 2H); 2.19 & 2.47 (m; 2H); 2.39 (m; 1H); 2.73 (s; 4H); 2.98 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 3.28 (s; 3H); 3.3 (m; 1H); 3.52 & 3.85 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 5.21 (t; *J* = 7.0 Hz; 1H); 5.52 (s; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 17.9 (CH_3); 22.2 (CH_3); 23.4 (CH_2); 25.8 (CH_3); 27.4 (CH_2); 29.3 ($2CH_2$); 43.2 (CH); 50.3 (CH_2); 56.6 (CH_3); 62.3 (CH); 64.0 (C); 66.4 (CH); 76.7 (C); 78.4 (CH); 118.2 (CH); 134.8 (C); 171.5 (C); 176.9 (C).

*4.1.2.3. 7-Chloro-fumagillol (**4**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 341.1502 (calcd for $C_{16}H_{27}ClO_4Na$, 341.1490, Δ 3.74 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.36 & 2.10 (m; 2H); 1.48 (s; 3H); 1.67 (s; 3H); 1.74 (s; 3H); 1.82–1.86 (m; 2H); 2.18 & 2.45 (m; 2H); 2.40 (m; 1H); 2.98 (t; *J* = 5 Hz; 1H); 3.33 (m; 1H); 3.35 (s; 3H); 3.51 & 3.81 (d; *J* = 10.8 Hz; 2H); 4.22 (s; 1H); 5.20 (t; *J* = 6.8 Hz; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 18.2 (CH_3); 22.5 (CH_3); 23.6 (CH_2); 26.1 (CH_3); 27.8 (CH_2); 30.0 (CH_2); 42.6 (CH); 51.0 (CH_2); 56.6 (CH_3); 62.5 (CH); 63.6 (C); 64.2 (CH); 76.5 (C); 80.8 (CH); 118.6 (CH); 135.1 (C).

*4.1.2.4. 7-Bromo-6-(3-carboxy-1-oxopropyl)-fumagillol (**5**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 485.1133 (calcd for $C_{20}H_{31}BrO_7Na$, 485.1145, Δ 2.47 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.48 & 1.99 (m; 2H); 1.513 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.76 (s; 3H); 1.81 (m; 2H); 2.19 & 2.48 (m; 2H); 2.48 (m; 1H); 2.74 (s; 4H); 2.99 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 3.29 (m; 1H); 3.29 (s; 3H); 3.50 & 3.75 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 5.20 (t; *J* = 7.0 Hz; 1H); 5.51 (s; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 17.6 (CH_3); 22.0 (CH_3); 23.3 (CH_2); 25.5 (CH_3); 27.0 (CH_2); 28.8 (CH_2); 28.8 (CH_2); 29.9 (CH_2); 39.9 (CH_2); 43.7 (CH); 56.7 (CH_3); 62.3 (CH); 64.0 (C); 66.1 (CH); 78.7 (C); 78.7 (CH); 118.2 (CH); 135.4 (C); 171.4 (C); 177.5 (C).

*4.1.2.5. 7-Chloro-6-(4-carboxy-1-oxobutoxy)-fumagillol (**6**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 455.1811 (calcd for $C_{21}H_{33}ClO_7Na$, 455.1807, Δ 0.88 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.40 & 2.03 (m; 2H); 1.51 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.80 (s; 3H); 1.83 (m; 2H); 2.03 & 2.20 (m; 2H); 2.20 (m; 1H); 2.42–2.56 (m; 6H); 2.98 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 3.31 (s; 3H); 3.32 (m; 1H); 3.51 & 3.7 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 5.20 (t; *J* = 7.3 Hz; 1H); 5.52 (s; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 17.9 (CH_3); 20.4 (CH_2); 22.7 (CH_3); 23.5 (CH_2); 25.9 (CH_3); 27.4 (CH_2); 29.0 (CH_2); 33.6 ($2CH_2$); 43.1 (CH); 50.0 (CH_2); 56.6 (CH_3); 62.3 (CH); 64.0 (C); 65.8 (CH); 76.7 (C); 78.6 (CH); 118.1 (CH); 134.8 (C); 172.6 (C); 176.1 (C).

*4.1.2.6. 7-Chloro-6-[[(2-carboxymethoxy)acetyl]oxy]-fumagillol (**7**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 457.1596 (calcd for $C_{20}H_{31}ClO_8Na$, 457.1600, Δ 0.85 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.35 & 1.98 (m; 2H); 1.48 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.75 (s; 3H); 1.82–1.86 (m; 2H); 2.18 & 2.46 (m; 2H); 2.39 (m; 1H); 2.96 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 3.29 (s; 3H); 3.34 & 3.85 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 3.48 (s; 1H); 4.12–4.45 (m; 4H); 5.18 (t; *J* = 7.5 Hz; 1H); 5.58 (s; 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 17.8 (CH_3); 22.7 (CH_3); 23.4 (CH_2); 25.9 (CH_3); 27.4 (CH_2); 29.0 (CH_2); 43.1 (CH); 50.3 (CH_2); 56.9 (CH_3); 62.2 (CH); 63.3 (C); 66.8 (CH); 67.5 (CH_2); 68.3 (CH_2); 76.0 (C); 78.4 (CH); 118.0 (CH); 134.8 (C); 169.4 (C); 176.2 (C).

*4.1.2.7. 7-Chloro-6-[(2-carboxybenzoyl)oxy]-fumagillol (**8**).* Colorless oil; HRESIMS *m/z* $[M+Na]^+$ 489.1655 (calcd for $C_{24}H_{31}ClO_7Na$, 489.1651, Δ 0.82 ppm); ^1H NMR ($CDCl_3$) *δ*: 1.48 & 1.93 (m; 2H); 1.51 (s; 3H); 1.68 (s; 3H); 1.76 (s; 3H); 1.82–1.93 (m; 2H); 2.19 & 2.47 (m; 2H); 2.23 (m; 1H); 2.98 (t; *J* = 5.5 Hz; 1H); 3.39 (m; 1H); 3.39 (s; 3H); 3.57 & 3.90 (d; *J* = 10 Hz; 2H); 5.21 (t; *J* = 7.0 Hz; 1H); 5.77 (s; 1H); 7.58 (d; *J* = 8 Hz; 4H); 7.84 (d; *J* = 8 Hz; 4H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) *δ*: 17.8 (CH_3); 22.7 (CH_3); 23.2 (CH_2); 25.8 (CH_3); 27.3 (CH_2); 29.1 (CH_2); 43.4 (CH); 50.4 (CH_2); 56.8 (CH_3); 62.4 (CH); 64.1 (C); 67.6 (CH); 76.0 (C); 78.7 (CH); 118.4 (CH); 128.8 (CH); 129.0 (CH); 129.6 (C); 130.9 (CH); 131.2 (CH); 134.8 (C); 134.9 (C); 167.4 (C); 171.8 (C).

4.2. Biological activities

4.2.1. Cell lines and cell culture

Three cancer cell lines POS-1 (murine osteosarcoma), MG63 and SaOS2 (human osteosarcomas ATCC number CRL-1427 and HTB-85), and two non-tumor cell lines, L929 (murine fibroblasts, ATCC number CCL-1) and HFF2 (human fibroblasts) were cultured. L929 and POS-1 cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Gibco®, Grand Island, New York) supplemented with 5% (v/v) of fetal bovine serum. MG63, SaOS2 and HFF2 cell lines were grown in DMEM medium (Gibco® Grand Island, New York) supplemented with fetal bovine serum 10% (v/v). All the cell lines were maintained in culture at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2.

4.2.2. XTT assay

In order to evaluate the antiproliferative activity of the semi-synthetic compounds, cells were sown in 96-well plates (100 μL/well at a density of $1 \cdot 10^4$ cells/mL for POS-1, HFF2 and L929, $1.5 \cdot 10^4$ for SaOS2 and MG63). After 24 h incubation at 37 °C with 5% CO_2 to allow cell attachment, and renewal of culture medium, cells were exposed to various concentrations of tested compounds for 72 h. Cytotoxic activity was determined by colorimetric method using tetrazolium salts. An XTT solution (sodium 3′-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate, Roche Applied Science) was added in each well (50 μL/well) and plates were incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO_2. Absorption at 450 nm was measured with a plate reader (Wallace Victor 2™ 1420 MultiLabel Counter Perkin Elmer®). IC_{50} were determined as the concentration that inhibited cell viability by 50%.

4.2.3. Quantitative videomicroscopy

The cell growth was evaluated thanks to a time lapse experiment using quantitative videomicroscopy. Cells were grown in 24-well plates. A negative control and two positive controls (apomine and staurosporin treatment) were used. Assays were performed in

triplicate with 0.7 μM ligerin, 10 μM apomine and 1 μM staurosporin. The plates were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Pictures of each well were taken in a unique optical field every 10 min for 72 h with a reversed microscope (Shutter Leica) at a G×10 magnification. Data acquisition was performed using the software MetaMorph™, multi-dimensional acquis 31. The 433 pictures obtained were analyzed with the software ImageJ (NIH, USA) and assembled to create movies allowing observation of the cell phenotypes throughout the treatment. Cells were counted on each picture for each well and cell viability was assessed by a trypan blue dye exclusion assay.

Acknowledgment

The authors want to acknowledge the French National Association of Research and Technology for a Ph.D. grant for E. Blanchet. Authors also thank Fabien Petit and Marie-Claude Boumard for technical assistance, Sandrine Pottier and Arnaud Bondon from UMR CNRS 6290, PRISM, Université de Rennes 1 for NMR spectra acquisition, and P. Hulin from IFR26 PICell platform, Université de Nantes, for time-lapse data acquisition.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.012.

References

[1] G. Ottaviani, N. Jaffe, Cancer Treatment and Research 152 (2009) 15–32.
[2] M.L. Broadhead, J.C.M. Clark, D.E. Myers, C.R. Dass, P.F.M. Choong, Sarcoma (2011).
[3] F.R. Hanson, T.E. Elbe, Journal of Bacteriology 58 (1949) 527–529.
[4] T.E. Elbe, F.R. Hanson, Antibiotica et Chemotherapia 1 (1951) 54–58.
[5] L. Bailey, Nature 171 (1953) 212–213.
[6] J. Folkman, D. Ingber, T. Fujita, T. Kanamaru, Patent EP325199A2 Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan, 1989.
[7] V. Castronovo, D. Belotti, European Journal of Cancer 32A (1996) 2520–2527.
[8] P. Bhargava, J.L. Marshall, N. Rizvi, W. Dahut, J. Yoe, M. Figuera, K. Phipps, V.S. Ong, A. Kato, M.J. Hawkins, Clinical Cancer Research 5 (1999) 1989–1995.
[9] R.S. Herbst, T.L. Madden, H.T. Tran, G.R. Blumenschein Jr., C.A. Meyers, L.F. Seabrooke, F.R. Khuri, V.K. Puduvalli, V. Allgood, H.A. Fritsche Jr., L. Hinton, R.A. Newman, E.A. Crane, F.V. Fossella, M. Dordal, T. Goodin, W.K. Hong, Journal of Clinical Oncology 20 (2002) 4440–4447.
[10] B. Datta, Biochimica et Biophysica Acta 1796 (2009) 281–292.
[11] S. Liu, J. Widom, C.W. Kemp, C.M. Crews, J. Clardy, Science 282 (1998) 1324–1327.
[12] V. Rodeschini, P. Van de Weghe, C. Tarnus, J. Eustache, Tetrahedron Letters 46 (2005) 6691–6695.
[13] C. Drahl, B.F. Cravatt, E.J. Sorensen, Angewandte Chemie International Edition 44 (2005) 5788–5809.
[14] V. Rodeschini, J.-G. Boiteau, P. Van de Weghe, C. Tarnus, J. Eustache, Journal of Organic Chemistry 69 (2004) 357–373.
[15] E.C. Griffith, Z. Su, S. Niwayama, C.A. Ramsay, Y.-H. Chang, J.O. Liu, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (1998) 15183–15188.
[16] E.C. Griffith, Z. Su, B.E. Turk, S. Chen, Y.-H. Chang, Z. Wu, K. Biemann, J.O. Liu, Chemistry & Biology 4 (1997) 461–471.
[17] S.J. Shin, H.C. Jeung, J.B. Ahn, S.Y. Rha, J.K. Roh, K.S. Park, D.H. Kim, C. Kim, H.C. Chung, Investigational New Drugs 28 (2010) 650–658.
[18] S.J. Shin, J.B. Ahn, K.S. Park, Y.J. Lee, Y.S. Hong, T.W. Kim, H.R. Kim, S.Y. Rha, J.K. Roh, D.-H. Kim, C. Kim, H.C. Chung, Investigational New Drugs 30 (2012) 672–680.
[19] C.C. Arico-Muendel, B. Belanger, D. Benjamin, H.S. Blanchette, T.M. Caiazzo, P.A. Centrella, J. DeLorey, E.G. Doyle, U. Gradhand, S.T. Griffin, S. Hill, M.T. Labenski, B.A. Morgan, G. O'Donovan, K. Prasad, S. Skinner, N. Taghizadeh, C.D. Thompson, J. Wakefield, W. Westlin, K.F. White, Drug Metabolism and Disposition 41 (2013) 814–826.
[20] M. Vansteelandt, E. Blanchet, M. Egorov, F. Petit, L. Toupet, A. Bondon, F. Monteau, B. Le Bizec, Y.F. Pouchus, R. Le Bot, O. Grovel, Journal of Nature Products 76 (2013) 297–301.
[21] S. Kishimoto, S. Marui, T. Fujita, Patent EP415294A2 Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan, 1991.
[22] C.K. Han, S.K. Ahn, N.S. Choi, R.K. Hong, S.K. Moon, H.S. Chun, S.J. Lee, J.W. Kim, C.I. Hong, D. Kim, J.H. Yoon, K.T. No, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10 (2000) 39–43.
[23] B.E. Turk, Z. Su, J.O. Liu, Bioorganic & Medicinal Chemistry 6 (1998) 1163–1169.
[24] M. Fardis, H.-J. Pyun, J. Tario, H. Jin, C.U. Kim, J. Ruckman, Y. Lin, L. Green, B. Hicke, Bioorganic & Medicinal Chemistry 11 (2003) 5051–5058.
[25] M. Hayashi, Y.-P. Kim, S. Takamatsu, S. Preeprame, T. Komiya, R. Masuma, H. Tanaka, K. Komiyama, S. Omura, Journal of Antibiotics 49 (1996) 631–634.
[26] S. Marui, F. Itoh, Y. Kozai, K. Sudo, S. Kishimoto, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 40 (1992) 96–101.

ANNEXE XXII : Brevet ligérine

EGOROV M., LE BOT R., PETIT F., GROVEL O., POUCHUS Y.F. et VANSTEELANDT M., Preparation of fumagillol derivatives useful for the treatment or prevention of bone tumors. 2012, Patent WO 2012/130906 A1, Atlanthera, Fr.; Universite de Nantes.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
4 octobre 2012 (04.10.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/130906 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 303/22 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2012/055563

(22) Date de dépôt international :
28 mars 2012 (28.03.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1152545 28 mars 2011 (28.03.2011) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **ATLANTHERA** [FR/FR]; 1, rue Gaston Veil, F-44000 Nantes (FR). **UNIVERSITE DE NANTES** [FR/FR]; 1 Quai de Tourville, F-44000 Nantes (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **EGOROV, Maxim** [RU/FR]; 5 rue des Brosses, F-44100 Nantes (FR). **LE BOT, Ronan** [FR/FR]; 11 rue Georges Claude, F-44100 Nantes (FR). **PETIT, Fabien** [FR/FR]; 64, Bld Ernest Dalby, F-44000 Nantes (FR). **GROVEL, Olivier** [FR/FR]; 1, rue Allin - La Haute Ile, F-44400 Reze (FR). **POUCHUS, Yves Francois** [FR/FR]; 36 rue General O'neil, F-44100 Nantes (FR). **VANSTEELANDT, Marieke** [FR/FR]; 2, BD Eugene Orieux, F-44000 Nantes (FR).

(74) Mandataire : **AHNER, Francis**; 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

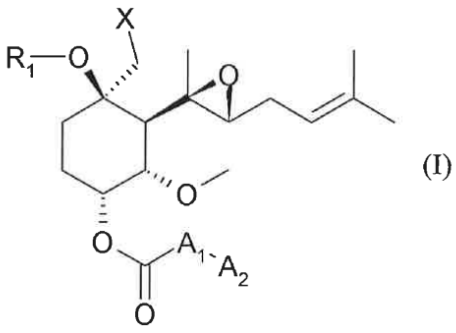
(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : DERIVATIVES USEFUL FOR THE TREATMENT OR PREVENTION OF BONE TUMORS

(54) Titre : DERIVES UTILES DANS LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DE TUMEURS OSSEUSES



(I)

(57) Abstract : The invention relates to a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, where: X is a halogen atom or an OR_3, SR_3, or NR_3R_4 group; A_1 is an X_1-A_3-X_2 group in which X_1 and X_2 independently are an -O-, -S-, $-NR_5$-, or -C=C- bond, and A_3 is a $(C_1$-$C_{10})$alkyl chain optionally interrupted by one or more unit, preferably one unit, selected from among -O-, -S-, $-NR_6$-, -C(O)-, and -C=C-, or an optionally substituted aryl group; A_2 is a -COOH-, C(O)O-$((C_1$-$C_6)$alkyl), or -C(OH)$(PO_3H_2)_2$ group; and - R_1 is a hydrogen atom or a -C(O)-$((C_1$-$C_6)$alkyl) group. The invention also relates to the use of said compound as a medicament, in particular for the treatment and prevention of bone tumors, pharmaceutical compositions containing the same, and a method for producing the same.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2012/130906 A1

WO 2012/130906 A1

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

La présente invention concerne un composé de formule (I) suivante : ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, pour lequel : - X représente un atome d'halogène ou un groupe OR_3, SR_3 ou NR_3R_4, - A_1 représente un groupe X_1-A_3-X_2 pour lequel : ■ X_1 et X_2 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, une liaison, -O-, -S-, -NR_5- ou -C=C-, et ■ A_3 représente une chaîne (C_1-C_{10})alkyle éventuellement interrompue par un ou plusieurs motifs, de préférence par un, choisis parmi -O-, -S-, -NR_6-, -C(O)- et -C=C-; ou un groupe aryle éventuellement substitué, - A_2 représente un groupe -COOH, -C(O)O-((C_1-C_6)alkyle) ou -C(OH)(PO_3H_2)$_2$, et - R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe -C(O)-((C_1-C_6)alkyle), ainsi que son utilisation en tant que médicament, notamment dans le traitement et la prévention de tumeurs osseuses, les compositions pharmaceutiques le comprenant et un procédé de synthèse de celui-ci.

DERIVES UTILES DANS LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DE TUMEURS OSSEUSES

La présente invention concerne des dérivés utiles comme médicament, et plus particulièrement pour le traitement de tumeurs osseuses, ainsi que leur procédé de préparation.

Deux types de tumeurs osseuses sont dénombrés actuellement : d'une part les tumeurs osseuses primitives telles que les ostéosarcomes, les chondrosarcomes et les sarcomes d'Ewing ; d'autre part, les tumeurs secondaires ou métastases osseuses (particulièrement fréquentes dans l'évolution des pathologies cancéreuses) dues à la dissémination de cellules tumorales qui ont un fort tropisme osseux (ostéophiles) telles que les cellules de carcinome mammaire ou prostatique.

Dans les conditions pathologiques, l'équilibre entre formation et résorption osseuse est rompu, quelle que soit l'origine des cellules tumorales (osseuses ou non). Ainsi, le remodelage osseux, continu tout au long de la vie, peut se faire soit en faveur de la formation osseuse (tumeurs ostéocondensantes), soit à l'inverse, en faveur de la résorption osseuse (tumeurs ostéolytiques). Mais dans la plupart des cas, les tumeurs sont mixtes, comme dans les cas d'ostéosarcomes ou de métastases osseuses secondaires à un carcinome. L'ostéosarcome d'origine ostéoblastique, est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives, et se caractérise par une formation osseuse abondante associée à des lésions ostéolytiques importantes.

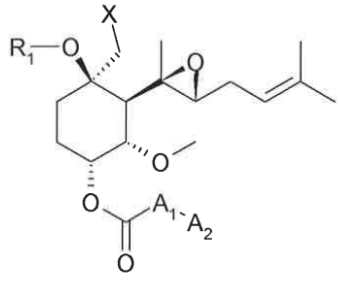
Le traitement standard actuel des tumeurs osseuses primitives débute par une biopsie en vue d'établir le diagnostic histologique. Une poly-chimiothérapie (OS 2006) est initiée qui comporte 10 cures au total. Quatre cures d'induction néo-adjuvantes associant l'ifosfamide et le vépéside ou le méthotrexate seul précèdent l'exérèse de la tumeur avant une nouvelle poly-chimiothérapie adjuvante de 6 cures. En fonction de la réponse de la tumeur au premier traitement, le même traitement est appliqué (bon répondeur) ou à défaut l'association adriamycine / cisplatine est utilisée (dans le cas des mauvais répondeurs au premier traitement).

Malheureusement, dans de nombreux cas, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales est observée conduisant au développement de métastases (principalement

pulmonaires) puis au décès du patient. Ainsi, la survie des patients est de 56 à 83% à 5 ans en absence de métastases pulmonaires au moment du diagnostic et de 30% à 5 ans lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic.

Il existe donc un réel besoin de développer de nouvelles molécules utiles dans le traitement et la prévention des tumeurs osseuses.

La présente invention a donc pour objet un composé de formule (I) suivante :



(I)

ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci,

pour lequel :

- X représente un atome d'halogène ou un groupe OR_3, SR_3 ou NR_3R_4,
- A_1 représente un groupe X_1-A_3-X_2 pour lequel :
  - X_1 et X_2 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, une liaison, -O-, -S-, -NR_5-, -C(O)- ou –C=C-, et
  - A_3 représente une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un ou plusieurs motifs, de préférence un, choisis parmi –O-, -S-, -NR_6-, -C(O)- et –C=C- ; ou un groupe aryle, cycloalkyle ou hétéroaryle éventuellement substitué,
- A_2 représente un groupe –COOH, –C(O)O-((C_1-C_6)alkyle) ou -C(OH)(PO_3H_2)$_2$,
- R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe –C(O)-((C_1-C_6)alkyle),
- R_3 et R_4 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle, et
- R_5 et R_6 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, cycloalkyle, hétérocyclique, aryle, hétéroaryle, aryl-(C_1-C_6)alkyle ou acyle ; notamment un atome d'hydrogène ou

un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle ; de préférence un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle,

les groupes cycloalkyle, hétérocyclique, aryle et hétéroaryle étant éventuellement substitués ; et de préférence non substitués.

Dans la présente invention, on entend désigner par « pharmaceutiquement acceptable » ce qui est utile dans la préparation d'une composition pharmaceutique qui est généralement sûre, non toxique et ni biologiquement ni autrement non souhaitable et qui est acceptable pour une utilisation vétérinaire de même que pharmaceutique humaine.

On entend désigner par « sels pharmaceutiquement acceptables » d'un composé, des sels qui sont pharmaceutiquement acceptables, comme défini ici, et qui possèdent l'activité pharmacologique souhaitée du composé parent. De tels sels comprennent :

(1) les hydrates et les solvates,

(2) les sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptable formés avec des acides inorganiques pharmaceutiquement acceptables tels que l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique et similaires ; ou formés avec des acides organiques pharmaceutiquement acceptables tels que l'acide acétique, l'acide benzènesulfonique, l'acide benzoïque, l'acide camphresulfonique, l'acide citrique, l'acide éthane-sulfonique, l'acide fumarique, l'acide glucoheptonique, l'acide gluconique, l'acide glutamique, l'acide glycolique, l'acide hydroxynaphtoïque, l'acide 2-hydroxyéthanesulfonique, l'acide lactique, l'acide maléique, l'acide malique, l'acide mandélique, l'acide méthanesulfonique, l'acide muconique, l'acide 2-naphtalènesulfonique, l'acide propionique, l'acide salicylique, l'acide succinique, l'acide dibenzoyl-L-tartrique, l'acide tartrique, l'acide p-toluènesulfonique, l'acide triméthylacétique, l'acide trifluoroacétique et similaires, ou

(3) les sels d'addition de base pharmaceutiquement acceptable formés lorsqu'un proton acide présent dans le composé parent est soit remplacé par un ion métallique, par exemple un ion de métal alcalin, un ion de métal alcalino-terreux ou un ion d'aluminium ; soit coordonné avec une base organique ou inorganique pharmaceutiquement acceptable. Les bases organiques acceptables comprennent la diéthanolamine, l'éthanolamine, N-méthylglucamine, la triéthanolamine, la

trométhamine et similaires. Les bases inorganiques acceptables comprennent l'hydroxyde d'aluminium, l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde de potassium, le carbonate de sodium et l'hydroxyde de sodium.

Par « atome d'halogène », on entend, au sens de la présente invention, les atomes de fluor, de chlore, de brome et d'iode.

Par groupement « (C_1-C_{10})alkyle » ou « (C_1-C_6)alkyle », on entend, au sens de la présente invention, une chaîne hydrocarbonée saturée, linéaire ou ramifiée, comportant 1 à 10, respectivement 1 à 6, et de préférence 1 à 4, atomes de carbone. A titre d'exemple, on peut citer les groupes méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, sec-butyle, *tert*-butyle, pentyle ou encore hexyle.

Par « aryle », on entend, au sens de la présente invention, un groupement hydrocarboné aromatique, comportant de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, et comprenant un ou plusieurs cycles accolés, comme par exemple un groupement phényle ou naphtyle. Avantageusement, il s'agit du phényle.

Par « aryl-(C_1-C_6)alkyle », on entend, au sens de la présente invention, un groupe aryle, tel que défini ci-dessus, lié à la molécule par l'intermédiaire d'une chaîne (C_1-C_6)alkyle, telle que définie ci-dessus. A titre d'exemple, on peut citer le groupe benzyle.

Par « hétéroaryle », on entend, au sens de la présente invention, un groupe aromatique comprenant un ou plusieurs cycles accolés, 5 à 10 atomes formant le(s) cycle(s) dont un ou plusieurs hétéroatomes, avantageusement 1 à 4 et encore plus avantageusement 1 ou 2, tels que par exemple des atomes de soufre, azote, oxygène, phosphore ou sélénium et de préférence de soufre, azote ou oxygène, les autres atomes du ou des cycliques étant des atomes de carbone. Des exemples de groupes hétéroaryle sont les groupes furyle, thiényle, pyrrolyle, pyridinyle, pyrimidinyle, pyrazolyle, imidazolyle, triazolyle, tétrazolyleindyle ou encore sélénophényle.

Par groupement « cycloalkyle », on entend, au sens de la présente invention, une chaîne hydrocarbonée saturée mono- ou poly-cyclique (et notamment bicyclique ou tricyclique), 3 à 10 atomes de carbone formant le(s) cycle(s). Lorsqu'il s'agit d'un groupe polycyclique, les cycles peuvent être, deux à deux, accolés, pontés ou joints par une jonction de cycle de type spiro. A titre d'exemple, on peut citer les groupes cyclopropyle, cyclopentyle, cyclohexyle et cycloheptyle.

Par groupement « hétérocyclique », on entend, au sens de la présente invention, un cycle à 5 à 10 chaînons, saturé ou non, mais non aromatique, et contenant un ou plusieurs, avantageusement 1 à 4, encore plus avantageusement 1 ou 2, hétéroatomes, tels que par exemple des atomes de soufre, azote ou oxygène. Il peut s'agir notamment du groupe pyrrolidinyle, pipéridinyle, pipérazinyle ou morpholinyle.

Les groupes aryle, cycloalkyle, hétéroaryle et hétérocyclique, lorsqu'ils sont substitués, peuvent l'être par un ou plusieurs groupements choisis dans le groupe constitué par un atome d'halogène, $-NO_2$, -CN, -OH, -SH, $-NR_7R_8$, $-SO_3R_9$, $-COOR_{10}$, $-OP(O)(OR_{11})(OR_{12})$, $-P(O)(OR_{13})(OR_{14})$, $-C(O)R_{15}$, (C_1-C_6)alkyle et (C_1-C_6)alcoxy, avec R_7 à R_{15} représentant, indépendamment les uns des autres, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle.

Par groupement « acyle », on entend, au sens de la présente invention, un groupe $-C(O)-R_{22}$ dans lequel R_{22} représente un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les composés selon l'invention correspondent à un composé de formule (I) pour lequel :

- X représente un atome d'halogène ou un groupe OR_3, SR_3 ou NR_3R_4,
- A_1 représente un groupe $X_1-A_3-X_2$ pour lequel :
  - X_1 et X_2 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, une liaison, -O-, -S-, $-NR_5-$, -C(O)- ou –C=C-, et
  - A_3 représente une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un ou plusieurs motifs, de préférence par un, choisis parmi –O-, -S-, $-NR_6-$, -C(O)- et –C=C- ; ou un groupe aryle, cycloalkyle ou hétéroaryle éventuellement substitué,
- A_2 représente un groupe –COOH ou–C(O)O-((C_1-C_6)alkyle),
- R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe –C(O)-((C_1-C_6)alkyle),
- R_3 et R_4 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle,
- R_5 et R_6 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, cycloalkyle, hétérocyclique, aryle, hétéroaryle, aryl-(C_1-C_6)alkyle ou acyle ; notamment un atome d'hydrogène ou

un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle ; de préférence un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle,

les groupes cycloalkyle, hétérocyclique, aryle et hétéroaryle étant éventuellement substitués.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les composés selon l'invention correspondent à un composé de formule (I) pour lequel :

- X représente un atome d'halogène ou un groupe OR_3, SR_3 ou NR_3R_4,
- A_1 représente un groupe (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle,
- A_2 représente un groupe –COOH, –C(O)O-((C_1-C_6)alkyle) ou -C(OH)(PO_3H_2)$_2$,
- R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe –C(O)-((C_1-C_6)alkyle), et
- R_3 et R_4 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle.

De préférence, X représentera un atome d'halogène, tel qu'un atome de chlore ou éventuellement de brome.

Avantageusement, X_1 et X_2 représenteront chacun une liaison.

Avantageusement, A_3 représentera une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un motif choisi parmi –O-, -S-, -NR_6-, -C(O)- et –C=C- ; ou un groupe aryle éventuellement substitué, et notamment non substitué. De préférence, A_3 représentera une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un motif choisi parmi –O-, -S-, et -NR_6-, et notamment –O- ; ou un groupe aryle éventuellement substitué, et notamment non substitué.

Avantageusement, A_2 représentera un groupe -COOH.

De préférence, R_1 représentera un atome d'hydrogène.

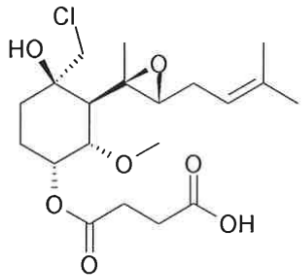
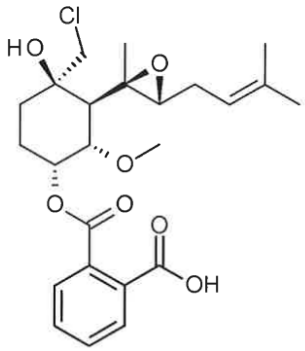
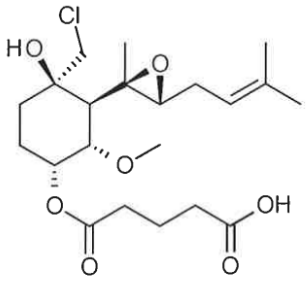
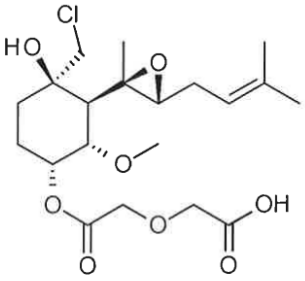
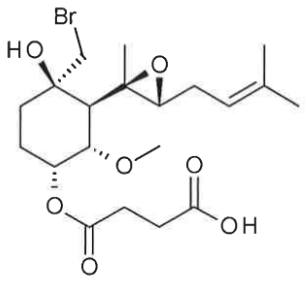
Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le composé selon l'invention sera un composé de formule (I) pour lequel :

- X représente un atome d'halogène tel que Cl ou Br,
- A_1 représente une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un motif choisi parmi –O-, -S-, et -NR_6-, et

notamment –O- ; ou un groupe aryle éventuellement substitué, et notamment non substitué,

- A_2 représente un groupe –COOH,
- R_1 représente un atome d'hydrogène, et
- R_6 représente un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle ; de préférence un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle.

Le composé de formule (I) pourra plus particulièrement être l'un des composés suivants :

I-1	 (composé dénommé ligérine)	I-2	
I-3		I-4	
I-5			

La présente invention a également pour objet un composé de formule (I) selon la présente invention pour son utilisation comme médicament, notamment dans le traitement ou la prévention d'une tumeur osseuse.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un composé de formule (I) selon l'invention pour la préparation d'un médicament, destiné notamment à traiter ou prévenir une tumeur osseuse.

La présente invention concerne également une méthode de traitement ou de prévention d'une tumeur osseuse, comprenant l'administration à une personne en ayant besoin d'une quantité efficace d'au moins un composé de formule (I) selon l'invention.

La tumeur osseuse pourra être une tumeur osseuse primitive telle qu'un ostéosarcome, un chondrosarcome et un sarcome d'Ewing ; ou une tumeur osseuse secondaire ou des métastases osseuses telles que les cellules de carcinome mammaire ou prostatique.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) selon l'invention et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être formulées pour une administration orale ou parentérale telle qu'intraveineuse, destinée aux mammifères, y compris l'homme. La posologie varie selon le traitement et selon l'affection en cause.

L'ingrédient actif peut être administré sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, aux animaux ou aux êtres humains. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, et les formes d'administration parentérale telle qu'intraveineuse.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on mélange l'ingrédient actif principal avec un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose ou d'autres matières appropriées ou encore on peut les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'ingrédient actif avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir peut contenir l'ingrédient actif conjointement avec un édulcorant, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié.

Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'ingrédient actif en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs du goût ou des édulcorants.

Pour une administration parentérale, notamment intraveineuse, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles.

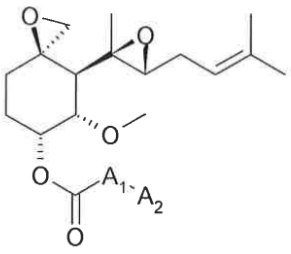
Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules, éventuellement avec un ou plusieurs supports additifs.

Les composés de l'invention en tant que principes actifs peuvent être utilisés à des doses comprises entre 0,01 mg et 1000 mg par jour, donnés en une seule dose une fois par jour ou administrés en plusieurs doses tout au long de la journée, par exemple deux fois par jour en doses égales. La dose administrée par jour est avantageusement comprise entre 5 mg et 500 mg, encore plus avantageusement entre 10 mg et 200 mg. Il peut être nécessaire d'utiliser des doses sortant de ces gammes ce dont l'homme du métier peut se rendre compte lui-même.

La composition pharmaceutique selon l'invention pourra en outre contenir un autre principe actif tel qu'un agent anticancéreux.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'invention comprenant les étapes successives suivantes :

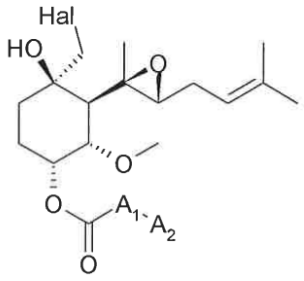
(a) ouverture de l'époxyde et halogénation du composé de formule (II) suivante :



(II)

pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis précédemment,

pour donner un composé de formule (Ia) suivante :



(Ia)

pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis précédemment et Hal représente un atome d'halogène, les composés de formule (Ia) correspondant à des composés de formule (I) selon l'invention avec X = Hal et R_1 = H,

(b) éventuellement substitution nucléophile de la fonction OH ou Hal du composé de formule (Ia) obtenu à l'étape précédente pour donner un composé de formule (I) pour lequel X ≠ Hal et/ou $R_1 \neq H$, et

(c) éventuellement salification du composé de formule (I) ou (Ia) obtenu à l'étape précédente pour obtenir un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

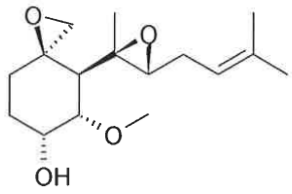
Etape (a) :

Cette étape sera réalisée en présence d'un réactif d'halogénation dans des conditions bien connues de l'homme du métier.

Cette réaction pourra notamment être réalisée en présence d'un acide tel que l'acide acétique et d'un sel d'halogénure tel que M-Hal avec M choisi parmi Li, K, Na, Rb, Cs, ou NH_4. M-Hal représentera notamment Li-Cl ou encore Li-Br. Dans ce cas, la réaction pourra être réalisée dans un solvant tel que le tétrahydrofurane, notamment à une température comprise entre 0 et 30°C.

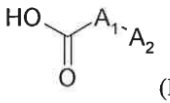
Toute autre condition réactionnelle d'halogénation connue de l'homme du métier pourra cependant être utilisée.

Le composé de formule (II) peut être obtenu par couplage de la fonction OH du fumagillol de formule **2** suivante :



2

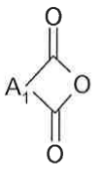
avec la fonction COOH de l'acide carboxylique de formule (III) suivante :



(III)

pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis précédemment, A_2 étant éventuellement sous une forme protégée qui sera déprotégée une fois la réaction réalisée ou ultérieurement,

ou encore avec l'anhydride de formule (IV) suivante :



(IV),

pour laquelle A_1 est tel que défini précédemment, pour donner dans ce cas un composé de formule (II) avec A_2 = COOH.

Ce couplage pourra être réalisé par des techniques bien connues de l'homme du métier et notamment en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) dans la pyridine comme solvant dans le cas d'une réaction avec un anhydride de formule (IV). La réaction sera réalisée notamment à température ambiante, c'est-à-dire à une température comprise entre 15 et 40°C, notamment entre 20 et 30°C.

Le composé de fumagillol **2**, quant à lui, peut être obtenu à partir de la fumagilline **1** selon une procédure décrite dans les exemples ci-après.

Avantageusement, le couplage sera réalisé avec un composé de formule (III) pour lequel A_2 = COOH éventuellement sous forme protégée, ou encore de préférence avec un anhydride de formule (IV). La fonction COOH pourra alors être estérifiée

ultérieurement pour donner accès à un composé de formule (I) pour lequel A_2 = CO-((C_1-C_6)alkyle) dans des conditions d'estérification bien connue de l'homme du métier. De même la fonction COOH pourra être transformée en fonction acide hydroxybisphosphonique (-C(OH)(PO_3H_2)$_2$) dans des conditions bien connues de l'homme du métier telles que celles décrites dans WO 2009/083613.

Etape (b) :

Cette étape de substitution pourra être réalisée par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Si nécessaire, certaines fonctionnalités présentes sur la molécule et sensibles aux conditions de la réaction de substitution pourront être protégées auparavant puis être déprotégées une fois la substitution réalisée.

Etape (c) :

Cette étape pourra être réalisée par des techniques bien connues de l'homme du métier en présence d'une base ou d'un acide pharmaceutiquement acceptable tel que défini précédemment.

En outre, le composé de formule (I) ainsi obtenu pourra être séparé du milieu réactionnel par des méthodes bien connues de l'homme du métier, comme par exemple par extraction, évaporation du solvant ou encore par précipitation et filtration.

Le composé pourra être par ailleurs purifié si nécessaire par des techniques bien connues de l'homme du métier, comme par recristallisation, par chromatographie sur colonne sur gel de silice ou encore par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

La présente invention sera mieux comprise à la lumière des figures et exemples non limitatifs qui suivent.

FIGURES

La Figure 1 représente le pourcentage de viabilité cellulaire pour les lignées cellulaires SaOS2 (a), MG63 (b), POS1 (c), OSRGa (d), HFF2 (e) et L929 (f) en fonction de la concentration de composé selon l'invention administrée, en utilisant une échelle semi-logarithmique.

La Figure 2 représente le pourcentage de viabilité cellulaire pour les lignées cellulaires SaOS2 (a), MG63 (b), POS1 (c), OSRGa (d), HFF2 (e) et L929 (f) en fonction de la concentration administrée du composé **I-1** ou du TNP470, en utilisant une échelle semi-logarithmique.

La Figure 3 représente le suivi pondéral (poids en grammes) du groupe de souris contrôle et du groupe de souris ayant reçu le composé **I-1** selon l'invention au cours de l'étude (temps en jours).

La Figure 4 représente le taux de survie des souris du groupe de souris contrôle et du groupe de souris ayant reçu le composé **I-1** selon l'invention en fonction du temps.

EXEMPLES

I. Préparation des composés selon l'invention

I.1. Préparation par extraction à partir d'une souche de Penicillium

- Souche utilisée

La souche utilisée est un micromycète saprotrophe d'origine marine. Elle a été isolée à partir d'un prélèvement d'eau de mer effectué en janvier 1997 sur le site de La Prée, Loire-Atlantique (Sallenave, 1999). Elle est conservée dans la mycothèque marine du laboratoire MMS-EA2160 de l'Université de Nantes sous le code MMS 351 ainsi que dans la collection du Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris) sous la cote LCP 99.43.43, et a été identifiée morphologiquement comme appartenant à l'espèce *Penicillium waksmanii* Zaleski.

- Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu solide semi-synthétique YES/eau de mer (Frisvad J.C., 1981, Applied and Environmental Microbiology, 41 (3):568-579 ; Filtenborg O. *et al.*, 1990, *In* Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Samson R.A., Pitt J.I. eds, Plenum Press, New York, USA : 433-440) dont la composition massique est la suivante :

Extrait de levure : 2,0 g

Sucrose (D (+)-saccharose) : 15,0 g

$MgSO_4$, $7H_2O$: 0,05 g

$CuSO_4$, $5H_2O$: 0,0005 g

$ZnSO_4$, $7H_2O$: 0,001 g

Agar bactériologique type E : 2,0 g

Eau de mer stérile : 100 mL.

- Ensemencement et incubation

Les cultures ont été mises à incuber à 27°C sous exposition à la lumière naturelle après ensemencement des milieux stériles répartis à hauteur de 50 mL par Erlenmeyer de 250 mL.

- Protocole d'extraction des cultures fongiques

L'extraction des cultures de la souche MMS 351 a été effectuée après 11 jours d'incubation.

L'ensemble des cultures (biomasse et gélose) a été mis en contact avec 100 mL d'acétate d'éthyle, pendant 1 h 30, puis broyé.

Le tout a été placé sur un banc d'agitation pendant 1 h à 150 rpm, puis soumis à l'action des ultrasons pendant 30 min.

Après filtrations successives (papier filtre, puis membrane de cellulose régénérée de porosité 0,45 µm) et adsorption de l'eau résiduelle à l'aide de sulfate de sodium anhydre, le solvant a été évaporé à l'évaporateur rotatif jusqu'à siccité, aboutissant à l'obtention d'un extrait brut.

- Méthodes séparatives d'analyse et de purification utilisées et tests de cytotoxicité réalisés sur les lignées cellulaires

– *Chromatographie liquide à basse pression 1 (CLBP 1)*

La première étape de fractionnement de l'extrait brut a consisté en une chromatographie liquide à basse pression (CLBP) réalisée sur une colonne de verre remplie de 1,5 kg desilice de porosité 60 Å et de granulométrie 35-70 µm (Chromagel, SDS). Le dépôt sec a consisté en 33 g d'extrait brut adsorbés sur 30 g de silice.

L'élution a été réalisée par un gradient discontinu de solvants de polarités croissantes : hexane/EtOAc (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 et 50% d'EtOAc en volume) puis CH_2Cl_2/MeOH (0, 30 et 100% de MeOH en volume) ; un volume de 4 L a été utilisé pour chacun des 6 premiers mélanges de solvants, 8L pour le mélange hexane/EtOAc 60 :40 (v/v) et le mélange hexane/EtOAc 50 :50 (v/v), 6L pour le CH_2Cl_2 pur et 12L pour le mélange CH_2Cl_2/MeOH 70 :30 (v/v) et le MeOH pur. Les fractions obtenues ont été évaporées jusqu'à siccité.

– *Tests de cytotoxicité*

Les fractions ont été solubilisées dans de l'éthanol absolu puis elles ont été testées sur deux lignées cellulaires :

- une lignée fibroblastique d'origine murine : L929 (lignée non tumorale) ;
- une lignée issue d'un ostéosarcome de souris : POS1 (lignée tumorale).

Pour réaliser les tests de cytotoxicité, les différentes lignées cellulaires ont été ensemencées à T0 dans des plaques 96 puits, puis incubées dans une atmosphère humide à 37°C délivrant 5% de CO_2.

En fonction des types cellulaires, l'ensemencement des puits différait :

- Cellules d'ostéosarcome de souris (POS1) : 2500 cellules/puits
  Milieu RPMI complémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF)
- Cellules fibroblastiques de souris (L929) : 1000 cellules/puits
  Milieu RPMI complémenté avec 5% de SVF

A T=24h, les milieux de culture ont été renouvelés puis les différentes fractions ont été mises en contact avec les lignées cellulaires à différentes concentrations.

Le pourcentage d'éthanol était identique dans chaque puits pour chaque concentration à savoir 0,1% d'éthanol par puits. Un contrôle solvant a été réalisé en parallèle.

Un test de cytotoxicité (XTT – hydroxyde de tétrazolium, Cellproliferation kit II, Roche-Applied Sciences) a été réalisé conformément aux prescriptions du fabricant à T=96h, après 72h de mise en contact des cellules avec les différents extraits aux différentes concentrations.

– *Chromatographie liquide à basse pression 2 (CLBP 2)*

La deuxième étape de purification de la fraction active (éluée par le mélange hexane/EtOAc 60 :40 v/v) a consisté en une deuxième chromatographie liquide à basse pression, sur une colonne de verre remplie de 20 g de silice de porosité 60 Å et de granulométrie 35-70 µm (Chromagel, SDS). Le dépôt sec a consisté en 272 mg d'échantillon adsorbés sur 600 mg de silice. L'élution a été réalisée par un gradient discontinu de solvants de polarités croissantes (400 mL de chaque solvant) : CH_2Cl_2/MeOH (0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 70 et 100% de MeOH en volume). Après évaporation du solvant jusqu'à siccité, les fractions ont été reprises dans de l'éthanol absolu et testées sur les lignées POS1 et L929 en suivant le même protocole que celui décrit précédemment.

– *Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)*

La troisième étape de fractionnement a consisté en une chromatographie liquide à haute performance. Les fractions issues de la CLBP 2 ayant présenté une activité intéressante sur la lignée tumorale ont été fractionnées par CLHP dotée d'un détecteur à barrettes de diode sur phase inverse (silice greffée C18) avec un gradient MeOH/eau+0,005%TFA (acide trifluoroacétique) dans les conditions suivantes :

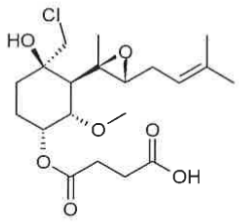
- De t = 0 à t = 5min : MeOH/eau+TFA 30 :70 (v/v)
- Augmentation du pourcentage de MeOH jusqu'à atteindre 100% de MeOH à t = 30 min
- Plateau à 100% de MeOH pendant 5 min (t = 30 min à t = 35 min)
- Diminution du pourcentage de MeOH de t = 35min à t = 53 min afin de revenir aux conditions initiales, c'est-à-dire MeOH/eau+TFA 30 :70 (v/v)
- Conditions initiales MeOH/eau+TFA 30 :70 (v/v) pendant 10 min (de t = 53 min à t = 63 min)

Cette étape de CLHP a permis l'obtention de la molécule **I-1**, dénommée ligérine (tR≈28 min ; 10 mg).

Le rendement d'obtention de cette molécule pure, à ce stade non optimisé, est donc de 0,03% par rapport à l'extrait brut de culture de la souche fongique.

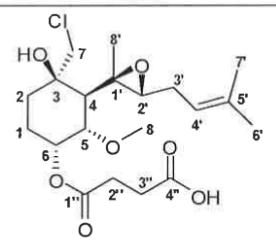
- Elucidation structurale

Les analyses effectuées sur cette molécule ont permis de déterminer la structure chimique de ce composé comme suit :



(I-1).

Les données de résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D (^{1}H et ^{13}C) du composé **I-1** sont reportées dans le tableau ci-dessous (analyse réalisée sur un spectromètre 500MHz avec cryosonde, Bruker) :

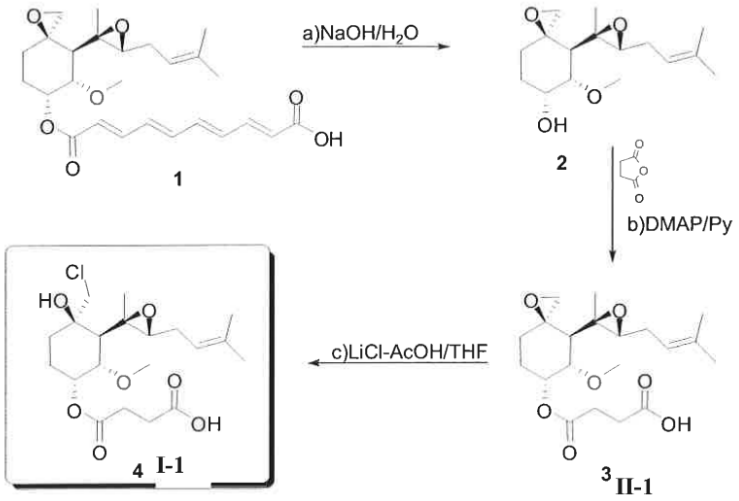
	**RMN ^{1}H, δ (ppm)** dans $CDCl_3$ le signal de $CHCl_3$ résiduel est calibré à 7.26 ppm	**RMN ^{13}C, δ (ppm)** dans $CDCl_3$ le signal de $CDCl_3$ est calibré à 77.04 ppm
1	massif 1.82-1.86 (2H)	23.35
2α(ax)	1.96 m	29
2β(éq)	1.40 m	
3	-	76.11
4α(ax)	2.39 (large)	43.28
5β(ax)	3.28 m	78.44
6β(éq)	5.48 m	66.40
7	3.50 d et 3.83 d J^2 = 11 Hz	50.43
8	3.26 s (3H)	56.65
1'	-	63.99
2'	2.95 t J^3 = 6.3 Hz	62.30
3'	2.16 m et 2.44 m	27.43
4'	5.17 m J^3 = 7.4 Hz	118.19
5'	-	134.81
6'	1.73 s (élargi)	25.82
7'	1.65 s (élargi)	17.92
8'	1.48 s (3H)	22.23
1''	-	171.49
2''	2.71 s (élargi) (2H)	29
3''	2.71 s (élargi) (2H)	29
4''	-	177.18
OH	4.15	-

Le point de fusion du composé **I-1** a été mesuré à 89,6°C sur un bloc Electrothermal Thermo Scientific 9300.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a permis de déterminer la formule brute du composé I-1, comme étant $C_{20}H_{31}ClO_7$ (observation de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ de $m/z = 441,16507$ ($C_{20}H_{31}ClO_7Na$ masse théorique 441,16560, Δmmu=0,53soit Δppm=1,2).

I.2. Synthèse par voie chimique

Le composé I-1 selon l'invention a également été préparé par hémisynthèse à partir de la fumagilline selon le schéma réactionnel suivant :



Etape a) :

La fumagilline **1** (100 mg) a été mise en solution dans du NaOH (0,1N, 10 mL) et agitée à température ambiante pendant 4 h. Le produit final a été extrait avec de l'éther, la solution a été filtrée à travers un mélange $NaHCO_3/Na_2SO_{4anh.}$ et concentrée sous vide. Le fumagillol **2** a été obtenu sous forme d'une huile jaune (57 mg, rendement = 93%).

L'étape a) a été réalisée une seconde fois permettant d'obtenir 100 mg de fumagillol **2** additionnels.

Etape b) :

Le fumagillol **2** (145 mg, 0,514 mmol, 1 éq.) a été mis en contact avec de la diméthylaminopyridine (DMAP) (80 mg, 0,655 mmol, 1,27 éq.) et de l'anhydride succinique (200 mg, 2 mmol, 3,9 éq.) dans 1 mL de pyridine (Py) anhydre. Le tout a été agité pendant 16 h à température ambiante. Une chromatographie sur gel de silice a été réalisée avec une phase mobile consistant en un gradient de polarité croissante (du

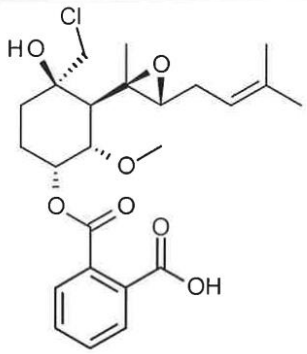
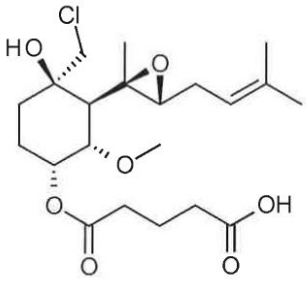
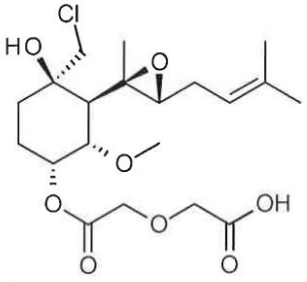
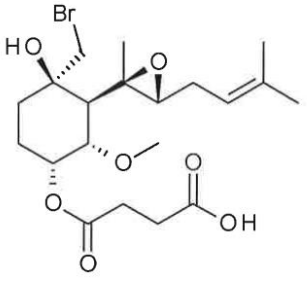
cyclohexane à un mélange CH_2Cl_2/MeOH 10 :1 v/v). Le composé **II-1** a été obtenu sous forme d'une huile incolore (130 mg, rendement = 66%).

Etape c) :

Le composé **II-1** (65 mg, 0,17 mmol, 1 éq.) a alors été mis en contact avec de l'acide acétique (50 µl, 54 mg, 0,9 mmol, 5,3 éq.), du LiCl (30 mg, 0,715 mmol, 4,2 éq.) dans 0,5 mL de tétrahydrofurane (THF) à 0°C sous agitation. Le mélange réactionnel a été réchauffé progressivement à la température ambiante, puis agité pendant 24 h à cette température. Le mélange a alors été soumis à une chromatographie sur gel de silice avec comme phase mobile un gradient allant du cyclohexane à un mélange CH_2Cl_2/MeOH 10:1 (v/v). Le composé **I-1** selon l'invention a été obtenu sous forme d'une huile incolore (44 mg, rendement = 62%).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) obtenus correspondent à ceux obtenus à partir de la molécule isolée de la souche MMS 351.

Les composés **I-2** à **I-5** ont également été préparés par hémisynthèse selon le même procédé que celui décrit ci-dessus pour le composé (**I-1**). Seuls l'anhydride utilisé pour l'estérification de l'étape b) et le sel d'halogénure utilisé lors de l'étape c) ont été modifiés. Les composés préparés et les réactifs utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

N°	Structure	Anhydride	Sel d'halogénure
I-2		Anhydride phtalique	LiCl
I-3		Anhydride glutarique	LiCl
I-4		Anhydride diglycolique	LiCl
I-5		Ahnydride succinique	LiBr

II. Evaluation de l'activité biologique des composés selon l'invention

II.1. Evaluation de l'activité biologique in vitro des composés ***I-1*** *à* ***I-5***

Les composés **I-1** à **I-5** ont été testés *in vitro* sur quatre lignées tumorales (ostéosarcome humain : MG63 et SaOS2, ostéosarcome murin : POS1 et ostéosarcome de rat : OSRGa) et sur deux lignées non tumorales (fibroblastes murins : L929 et fibroblastes humains : HFF2).

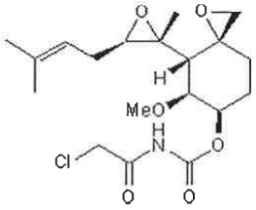
Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1.

Tous les composés présentent ainsi une activité antiproliférative associée à un effet dose sur toutes les lignées cellulaires. Sur lignées de même origine (humaine ou murine), les activités sont plus faibles sur les cellules non tumorales.

Le composé **I.1** a présenté une activité sensiblement plus importante sur cellules tumorales par rapport aux autres composés.

II.2. Evaluation de l'activité biologique in vitro du composé ***I-1*** *et du TNP470*

Le composé TNP470 de l'art antérieur répond à la formule suivante :



Les deux composés ont été testés sur quatre lignées tumorales (ostéosarcome humain : MG63 et SaOS2, ostéosarcome murin : POS1 et ostéosarcome de rat : OSRGa) et sur deux lignées non tumorales (fibroblastes murins : L929 et fibroblastes humains : HFF2).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2.

Les composés **I-1** et TNP470 ont présenté une activité antiproliférative associée à un effet-dose sur les 6 lignées cellulaires. Sur les lignées tumorales humaines, les deux composés induisent une diminution maximale de la viabilité cellulaire de 55% sur la lignée MG63 et de respectivement 52% et 59% pour le TNP470 et le composé **I-1** sur la lignée SaOS2.

Le composé **I-1** présente cependant une toxicité sur les cellules saines humaines HFF2 moins importante que le TNP470 pour une concentration testée comprise entre 0,125 ng/mL et 100 ng/mL. Ainsi, à 12,5 ng/mL, la diminution de la viabilité des

cellules saines HFF2 n'est que de 15% pour le composé **I-1** alors qu'elle est de 43% pour le TNP470.

Ainsi, pour une efficacité similaire des deux molécules sur cellules tumorales humaines, la toxicité observée sur cellules saines humaines est bien moindre pour le composé **I-1** comparé au TNP470.

*II.3. Evaluation de l'activité biologique in vivo du composé **I-1***

Le composé **I-1** a été testé *in vivo* dans un modèle d'ostéosarcome chez la souris immunocompétente selon le protocole décrit dans Rousseau *et al.*, Journal of Bone and Mineral Research, 2011, 26, 2452-2462.

Le modèle consiste en la transplantation de cellules tumorales murines (POS1) à proximité des tibias de souris C3H/HeN. La tumeur se développe environ 14 jours après la transplantation et progresse rapidement. Dans le contexte de l'ostéosarcome, les cellules tumorales utilisées induisent une ostéolyse.

Le composé **I-1** a été utilisé en traitement préventif dès la transplantation des tumeurs, c'est-à-dire que les injections ont commencées le jour de la transplantation. Pour cela, le mode d'administration du composé (en solution dans une solution de NaCl à 0,9% + 20% EtOH) est le suivant : 3 injections par semaine par voie intra-péritonéale à 30 mg/kg (10 mL/kg) espacées chacune de 24 h, pendant toute la durée de l'étude. Un groupe contrôle négatif a été constitué avec des injections de NaCl 0,9% (véhicule seul).

Au début de l'expérimentation (transplantation des fragments de tumeurs), le groupe contrôle était constitué de 12 animaux et le groupe traité avec le composé **I-1** de 14.

Le volume tumoral a été calculé de la façon suivante : volume = $(l^2 xL)/2$, avec l la petite longueur et L la grand longueur de la tumeur.

Les animaux ont été euthanasiés lorsque l'une des conditions suivantes a été observée :

- le volume de la tumeur est supérieur à 2500 mm^3,
- une des longueurs de la tumeur est supérieure à 25 mm, ou
- la tumeur nécrose.

Ainsi, la survie des animaux, dépendante de la taille de la tumeur, a été évaluée.

De même, l'ostéolyse induite par les tumeurs a été déterminée par analyse des clichés radiographiques pris à différents temps au cours des expériences, à savoir à J0, J28 et J57.

Le poids de chaque animal a été déterminé deux fois par semaine pendant toute la durée de l'étude. Les résultats présentés sur la Figure 3 indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris du groupe contrôle et celles du groupe ayant reçu l'administration du composé **I-1**. Dans les deux cas, l'évolution du poids correspond à un développement physiologique.

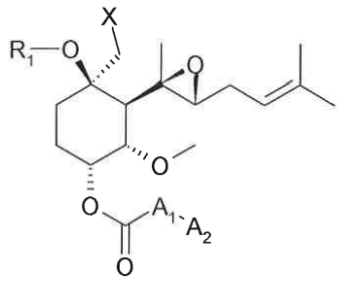
La survie des animaux est étroitement liée à la vitesse de prolifération des tumeurs. Le taux de survie des souris au cours du temps est donc représenté sur la Figure 4. Cette figure montre clairement que, quel que soit le stade de l'étude, le taux de survie est supérieur pour le groupe de souris ayant reçu le composé **I-1** selon l'invention comparativement au groupe de souris contrôle.

En outre, à la fin de l'étude réalisée sur 54 jours, il peut être noté que le taux de survie est seulement de 8,3 % dans le groupe contrôle négatif tandis qu'il est de 21,4 % pour le groupe de souris ayant reçu le composé **I-1** selon l'invention.

Dans les conditions expérimentales testées, le composé **I-1** selon l'invention augmente donc le taux de survie des souris comparativement aux souris du groupe contrôle.

REVENDICATIONS

1. Composé de formule (I) suivante :



(I)

ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci,

pour lequel :

- X représente un atome d'halogène ou un groupe OR_3, SR_3 ou NR_3R_4,
- A_1 représente un groupe X_1-A_3-X_2 pour lequel :
  - X_1 et X_2 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, une liaison, -O-, -S-, -NR_5-, -C(O)- ou –C=C-, et
  - A_3 représente une chaîne (C_1-C_{10})alkyle, de préférence (C_1-C_6)alkyle, éventuellement interrompue par un ou plusieurs motifs, de préférence par un, choisis parmi –O-, -S-, -NR_6-, -C(O)- et –C=C- ; ou un groupe aryle, cycloalkyle ou hétéroaryle éventuellement substitué,
- A_2 représente un groupe –COOH,–C(O)O-((C_1-C_6)alkyle) ou -C(OH)(PO_3H_2)$_2$,
- R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe –C(O)-((C_1-C_6)alkyle),
- R_3 et R_4 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, aryle ou aryl-(C_1-C_6)alkyle, et
- R_5 et R_6 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6)alkyle, cycloalkyle, hétérocyclique, aryle, hétéroaryle, aryl-(C_1-C_6)alkyle ou acyle ;

  les groupes cycloalkyle, hétérocyclique, aryle et hétéroaryle étant éventuellement substitués.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X représente un atome d'halogène, tel qu'un atome de chlore ou de brome.

3. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que X_1 et X_2 représentent chacun une liaison.

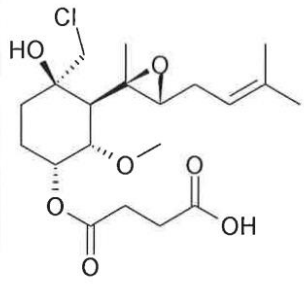
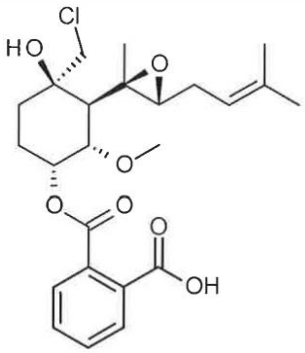
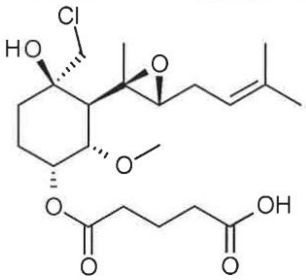
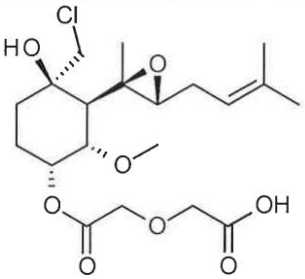
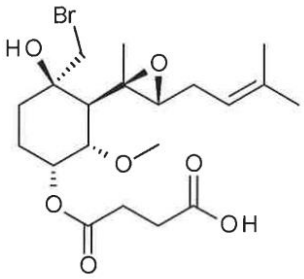
4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que A_3 représente une chaîne $(C_1\text{-}C_{10})$alkyle, de préférence $(C_1\text{-}C_6)$alkyle, éventuellement interrompue par un motif choisi parmi –O-, -S-, et -NR_6-, et notamment –O- ; ou un groupe aryle éventuellement substitué.

5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R_1 représente un atome d'hydrogène.

6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que A_2 représente un groupe COOH.

7. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que R_5 et R_6 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupe $(C_1\text{-}C_6)$alkyle, aryle ou aryl-$(C_1\text{-}C_6)$alkyle ; de préférence un atome d'hydrogène ou un groupe $(C_1\text{-}C_6)$alkyle.

8. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

I-1	 (composé dénommé ligérine)	I-2	
I-3		I-4	
I-5			

9. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour son utilisation en tant que médicament.

10. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour son utilisation dans le traitement ou la prévention d'une tumeur osseuse.

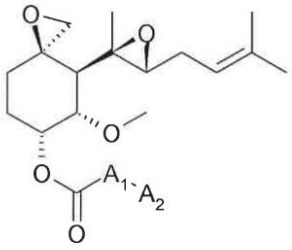
11. Composé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la tumeur osseuse est une tumeur osseuse primitive telle qu'un ostéosarcome, un chondrosarcome et un sarcome d'Ewing ; ou une tumeur osseuse secondaire ou des métastases osseuses telles que les cellules de carcinome mammaire ou prostatique.

12. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un autre principe actif tel qu'un agent anticancéreux.

14. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comprenant les étapes successives suivantes :

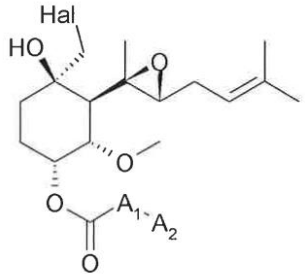
(a) ouverture de l'époxyde et halogénation du composé de formule (II) suivante :



(II)

pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis à la revendication 1,

pour donner un composé de formule (Ia) suivante :



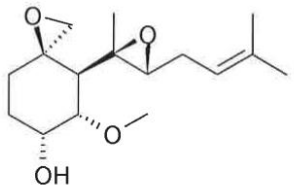
(Ia)

pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis à la revendication 1 et Hal représente un atome d'halogène, les composés de formule (Ia) correspondant à des composés de formule (I) selon la revendication 1 avec X = Hal et R_1 = H,

(b) éventuellement substitution nucléophile de la fonction OH ou Hal du composé de formule (Ia) obtenu à l'étape précédente pour donner un composé de formule (I) pour lequel $X \neq$ Hal et/ou $R_1 \neq H$, et

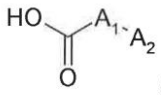
(c) éventuellement salification du composé de formule (I) ou (Ia) obtenu à l'étape précédente pour obtenir un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le composé de formule (II) est obtenu par couplage de la fonction OH du fumagillol de formule **2** suivante :



2

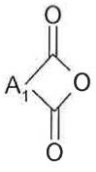
avec la fonction COOH de l'acide carboxylique de formule (III) suivante :



(III)

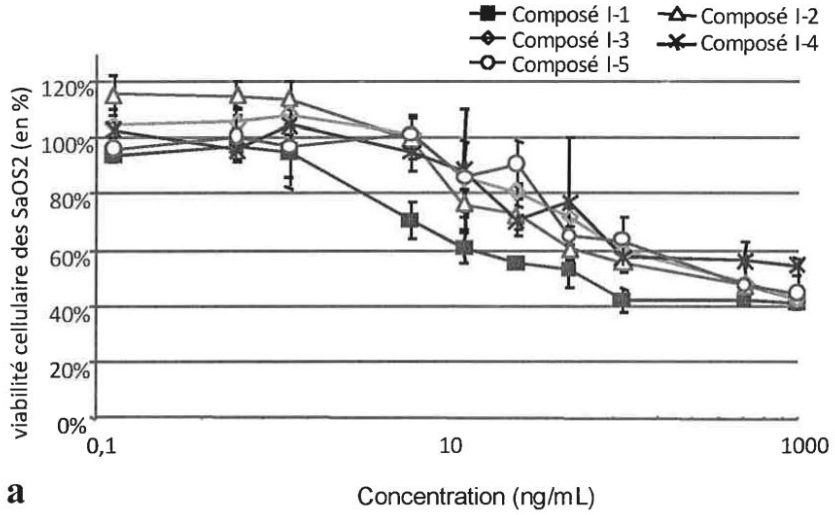
pour laquelle A_1 et A_2 sont tels que définis à la revendication 1, A_2 étant éventuellement sous une forme protégée,

ou avec l'anhydride de formule (IV) suivante :

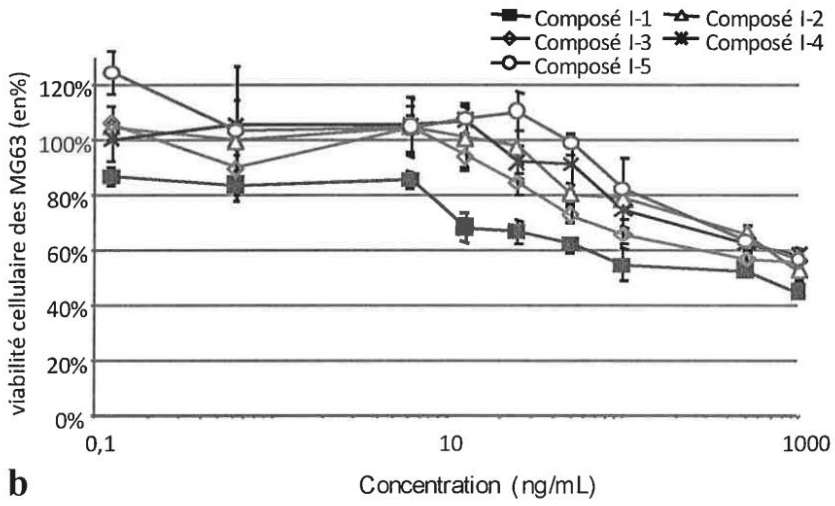


(IV),

pour laquelle A_1 est tel que défini à la revendication 1.

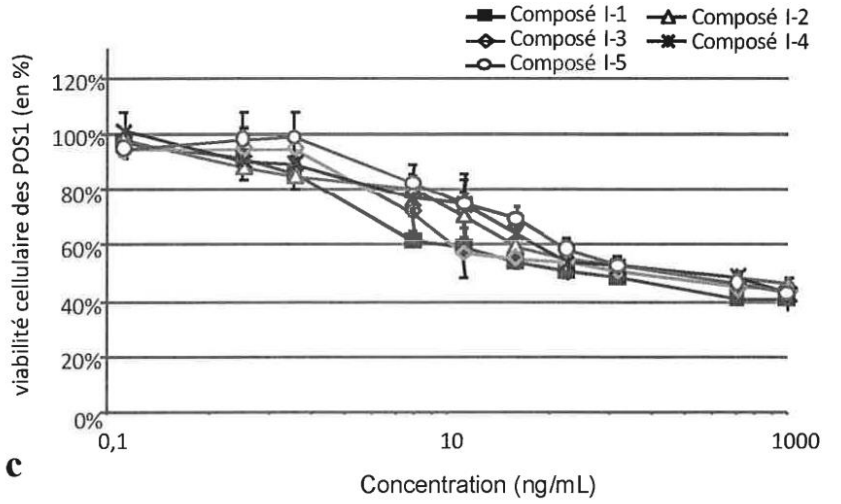

Composé I-1
Composé I-2
Composé I-3
Composé I-4
Composé I-5
viabilité cellulaire des SaOS2 (en %)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0,1
10
1000
Concentration (ng/mL)

a

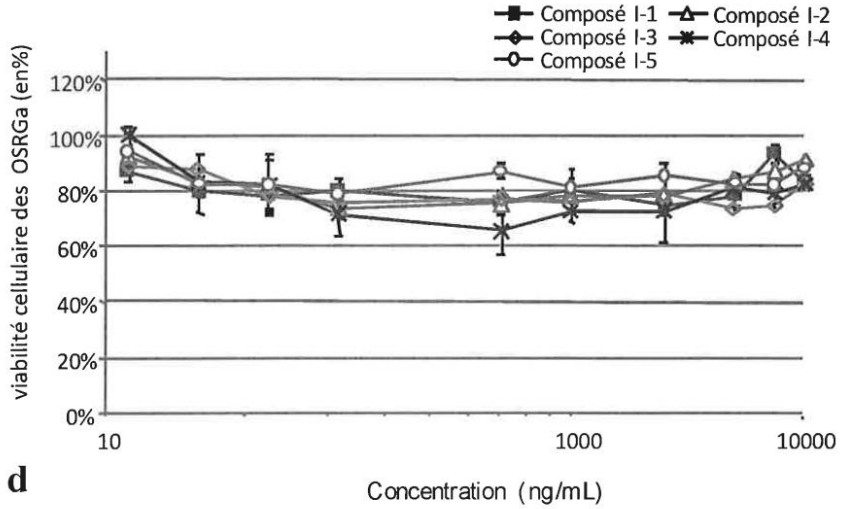

Composé I-1
Composé I-2
Composé I-3
Composé I-4
Composé I-5
viabilité cellulaire des MG63 (en%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0,1
10
1000
Concentration (ng/mL)

b

Figure 1

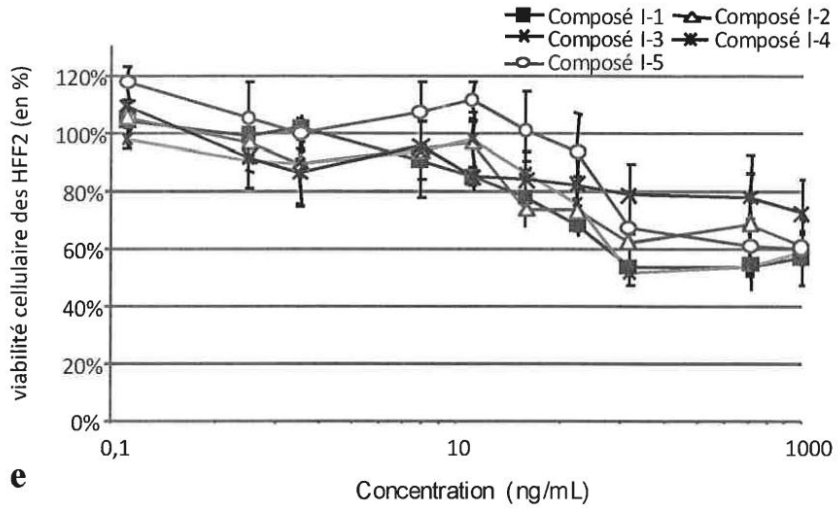


c

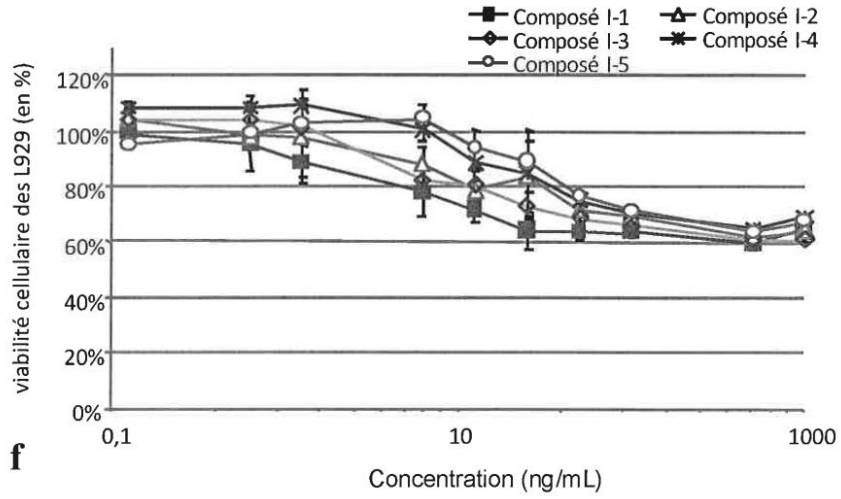


d

Figure 1(suite)

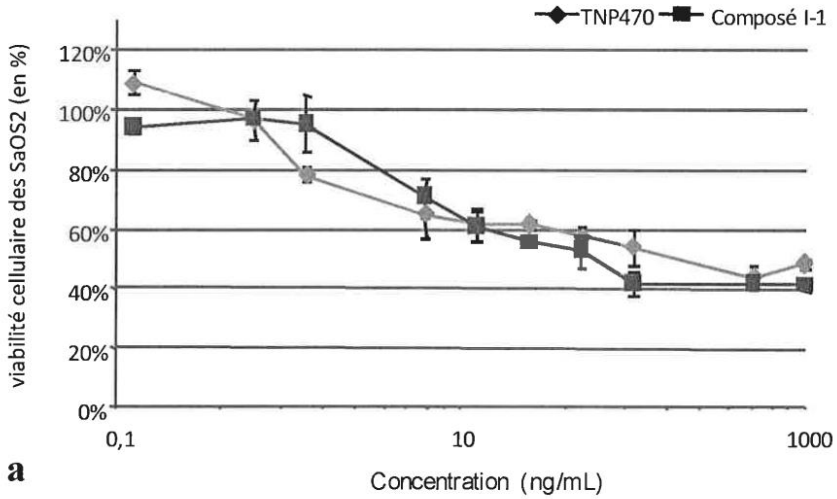


e

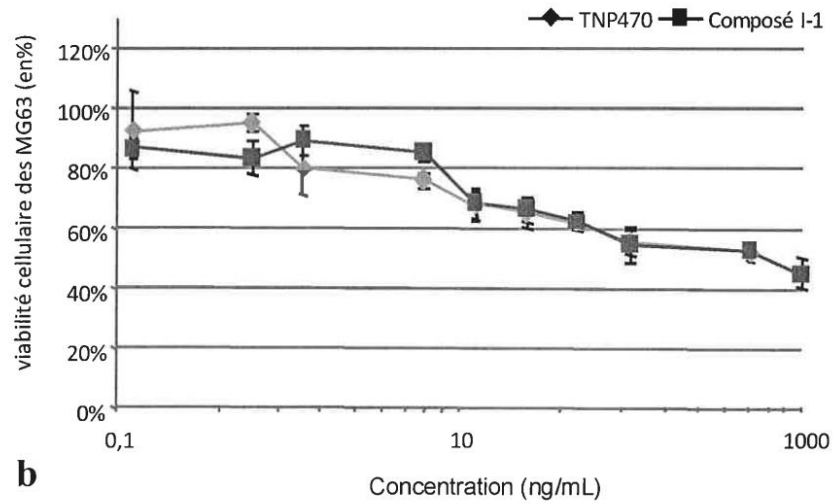


f

Figure 1(suite)


TNP470
Composé I-1
viabilité cellulaire des SaOS2 (en %)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0,1
10
1000
Concentration (ng/mL)

a


TNP470
Composé I-1
viabilité cellulaire des MG63 (en%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0,1
10
1000
Concentration (ng/mL)

b

Figure 2

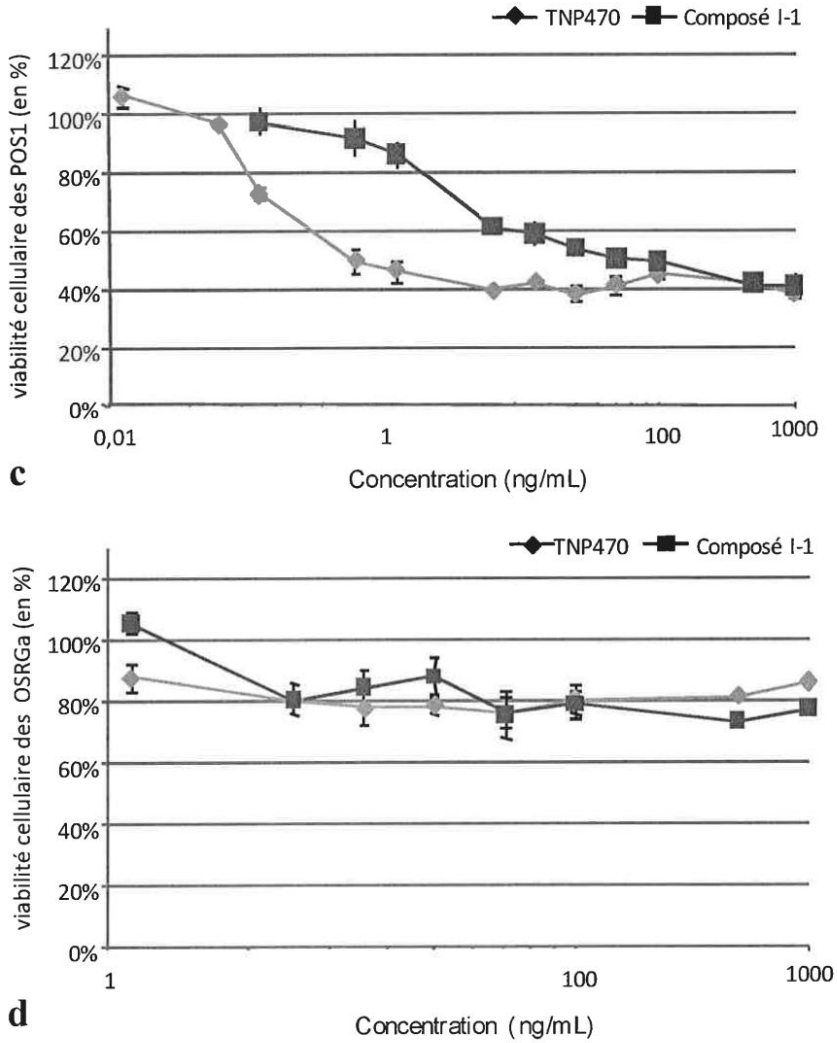
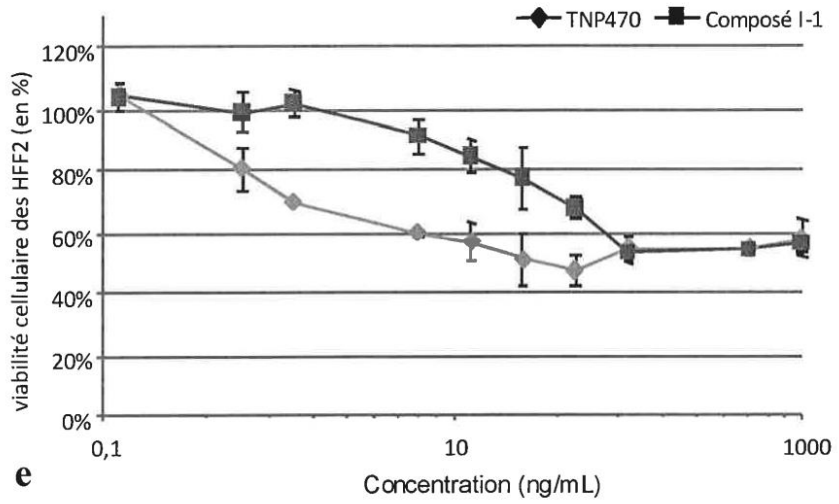
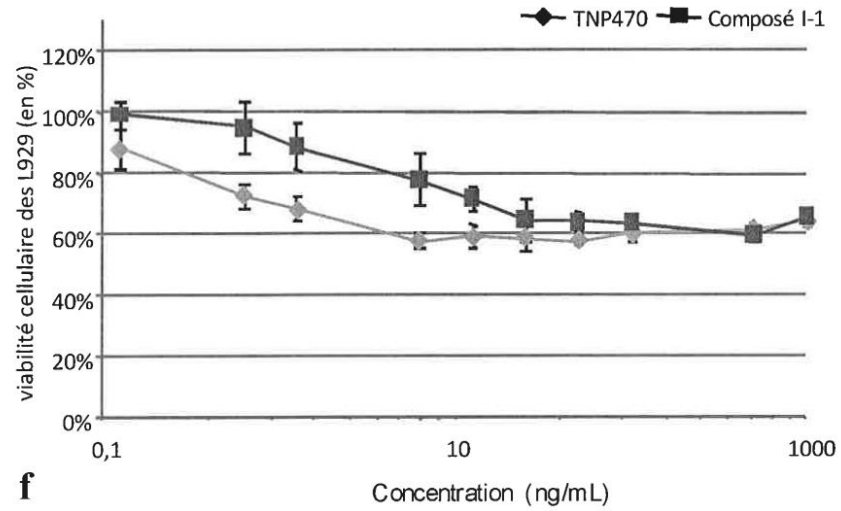


Figure 2(suite)



e



f

Figure 2(suite)

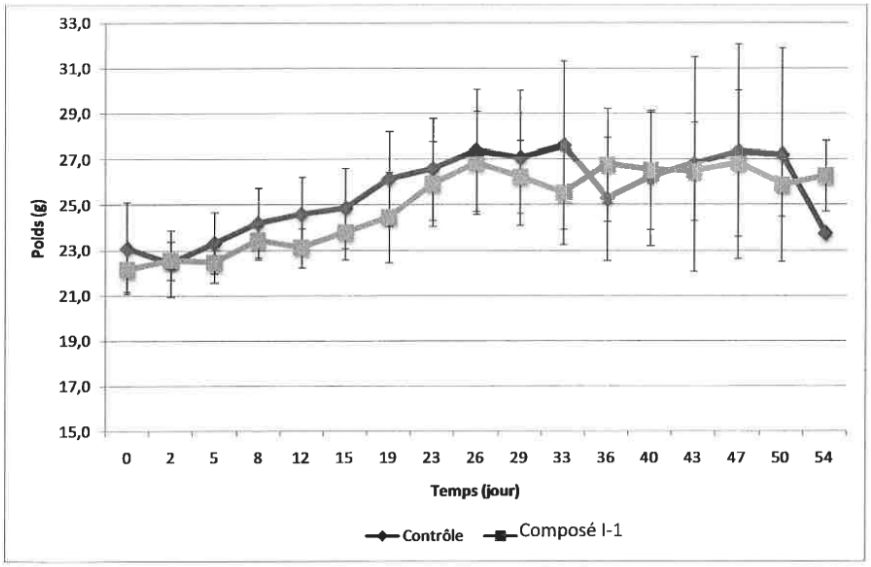


Figure 3

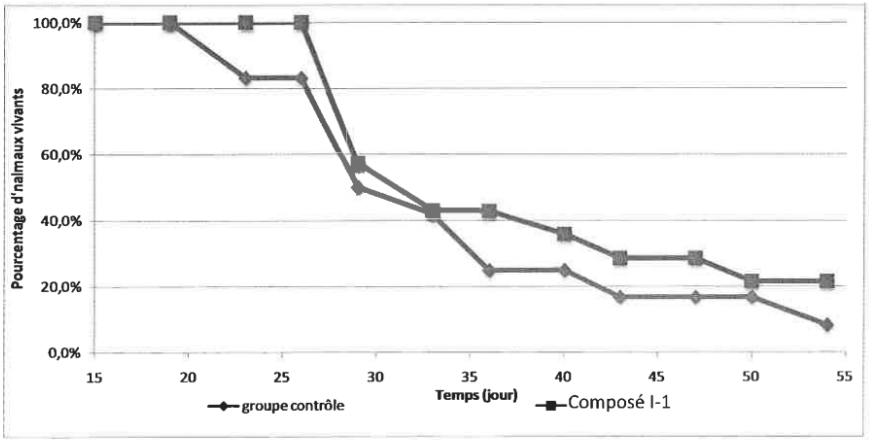


Figure 4

Bibliographie

ALVES, I., OLIVEIRA, N. G., LAIRES, A., RODRIGUES, A. S., RUEFF, J., Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. Mutagenesis, 2000, **15**, 229-234.

AMAGATA, T., MINOURA, K., NUMATA, A., Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a *Sargassum* alga. The Journal of Antibiotics, 1998, **51**, 432-434.

ANDERSEN, R., BUECHI, G., KOBBE, B., DEMAIN, A. L., Secalonic acids D and F are toxic metabolites of *Aspergillus aculeatus*. The Journal of Organic Chemistry, 1977, **42**, 352-353.

ANDRADE, R., AYER, W. A., MEBE, P. P., The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*.Part 1.Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. Canadian Journal of Chemistry, 1992, **70**, 2526-2535.

ARAI, K., KIMURA, K., MUSHIRODA, T., YAMAMOTO, Y., Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from *Penicillium fructigenum* Takeuchi. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989, **37**, 2937-2939.

ARICO-MUENDEL, C. C., BELANGER, B., BENJAMIN, D., BLANCHETTE, H. S., CAIAZZO, T. M., CENTRELLA, P. A., DELOREY, J., DOYLE, E. G., GRADHAND, U., GRIFFIN, S. T.*, et al.*, Metabolites of PPI-2458, a selective, irreversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2: structure determination and *in vivo* activity. Drug Metabolism and Disposition, 2013, **41**, 814-826.

ARIZA M.R., LARSEN T.O., PETERSEN B.O., DUUS J.O. ET BARRERO A.F., *Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, **50**, 6361-6365.

ASAMI, Y., KAKEYA, H., ONOSE, R., CHANG, Y. H., TOI, M., OSADA, H., RK-805, an endothelial-cell-growth inhibitor produced by *Neosartorya* sp., and a docking model with methionine aminopeptidase-2. Tetrahedron, 2004, **60**, 7085-7091.

ASAMI, Y., KAKEYA, H., OKADA, G., TOI, M., OSADA, H., RK-95113, a new angiogenesis inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. The Journal of Antibiotics, 2006, **59**, 724-728.

AUCAMP, P. J. AND HOLZAPFEL, C. W., Polyhydroxyanthraquinones from *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, and *Bipolaris* sp.Their significance in relation to biogenetic theories on aflatoxin B1. South African Journal of Chemistry, 1970, **23**, 40-56.

AYENT, A. G., HANSON, J. R., TRUNEH, A., Metabolites of *Gliocladium flavofuscum*. Phytochemistry, 1992, **32**, 197-198.

BARROW C.J. ET SUN H.H., Spiroquinazoline, a novel substance P inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from Aspergillus flavipes. Journal of Natural Products, 1994, **57**, 471-476.

BARROW, C. J. AND SEDLOCK, D. M.,1'-(2-Phenyl-ethylene)-ditryptophenaline, a new dimeric diketopiperazine from *Aspergillus flavus*. Journal of Natural Products, 1994, **57**, 1239-1244.

BEECHAM, A. F., FRIDRICHSONS, J., MATHIESON, A. M. The structure and absolute configuration of gliotoxin and the absolute configuration of sporidesmin. Tetrahedron Letters, 1966, **7**, 3131-3138.

BELOFSKY G.N., ANGUERA M., JENSEN P.R., FENICAL W. ET KOCK M., Oxepinamides A-C and fumiquinazolines H-I: bioactive metabolites from a marine isolate of a fungus of the genus Acremonium. Chemistry - A European Journal, 2000, **6**, 1355-1360.

Bhatnagar, I. and Kim, S. K., Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. Marine Drugs, 2010, **8**, 2673-2701.

BILLIAU A., EDY V.G., HEREMANS H., VAN D.J., DESMYTER J., GEORGIADES J.A. ET DE S.P., Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1977, **12**, 11-15.

BIRKINSHAW, J. H., MICHAEL, S. E., BRACKEN, A., RAISTRICK, H., Patulin in the common cold. Collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and chemistry. Lancet, 1943, **II**, 625-630.

BIRKINSHAW, J. H., OXFORD, A. E., RAISTRICK, H., The biochemistry of micro-organisms. XLVIII. Penicillic acid, a metabolic product of *Penicillium puberulum* Bainier and *P. cyclopium* Westling. Biochemical Journal, 1936, **30**, 394-411.

BLUNT, J. W., COPP, B. R., MUNRO, M. H. G., NORTHCOTE, P. T., PRINSEP, M. R., Marine natural products. Natural Product Reports, 2011, **28**, 196-268.

BODE H.B., BETHE B., HOFS R. ET ZEECK A., Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem, 2002, **3**, 619-627.

BOLLINGER, P., SIGG, H. P., WEBER, H. P., Structure of ovalicin. Helvetica Chimica Acta, 1973, **56**, 819-830.

BOYES-KORKIS J.M., GURNEY K.A., PENN J., MANTLE P.G., BILTON J.N. ET SHEPPARD R.N., Anacine, a new benzodiazepine metabolite of *Penicillium aurantiogriseum* produced with other alkaloids in submerged fermentation. Journal of Natural Products, 1993, **56**, 1707-1717.

BRACKEN, A., POCKER, A., RAISTRICK, H., Studies in the biochemistry of micro-organisms. 93. Cyclopenin, a nitrogen-containing metabolic product of *Penicillium cyclopium* Westling. Biochemical Journal, 1954, **57**, 587-595.

BRINGMANN, G., LANG, G., GULDER, T. A. M., TSURUTA, H., MUHLBACHER, J., MAKSIMENKA, K., STEFFENS, S., SCHAUMANN, K., STOHR, R., WIESE, J.*, et al.*, The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. Tetrahedron, 2005, **61**, 7252-7265.

BRINGMANN, G., LANG, G., MUEHLBACHER, J., SCHAUMANN, K., STEFFENS, S., RYTIK, P. G., HENTSCHEL, U., MORSCHHAEUSER, J., MUELLER, W. E. G., Sorbicillactone A: a structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus.Progress in Molecular and Subcellular Biology, 2003, 231-253.

BRINGMANN, G., LANG, G., STEFFENS, S., SCHAUMANN, K., Petrosifungins A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge-derived strain of *Penicillium brevicompactum*. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 311-315.

BROWN, A. G., SMALE, T. C., KING, T. J., HASENKAMP, R., THOMPSON, R. H., Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1,1976, **1**, 1165-1170.

BU, X. Y., CUI, C. B., LI, C. W., Antitumor metabolites produced by a bioactive mutant from ultrasound mutagenesis of *Penicillium purpurogenum* G59. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2010, **34**, 423-426, 475.

BUECHI G., LUK K.C., KOBBE B. ET TOWNSEND J.M., Four new mycotoxins of Aspergillus clavatus related to tryptoquivaline. Journal of Organic Chemistry, 1977, **42**, 244-246.

BUGNI T.S., HARPER M.K., MCCULLOCH M.W. ET WHITSON E.L., Advances in Instrumentation, Automation, Dereplication and Prefractionation. Natural Product Chemistry for Drug Discovery, 2010,272.

BUGNI, T. S., BERNAN, V. S., GREENSTEIN, M., JANSO, J. E., MAIESE, W. M., MAYNE, C. L., IRELAND, C. M., Brocaenols A-C: Novel polyketides from a marine-derived *Penicillium brocae*. Journal of Organic Chemistry, 2003, **68**, 2014-2017.

BUGNI, T. S. AND IRELAND, C. M., Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports, 2004, **21**, 143-163.

BUNGER, J., WESTPHAL, G., MONNICH, A., HINNENDAHL, B., HALLIER, E., MULLER, M., Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology, 2004, **202**, 199-211.

BUTTACHON S., CHANDRAPATYA A., MANOCH L., SILVA A., GALES L., BRUYÈRE C., KISS R. ET KIJJOA A.,Sartorymensin, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptoquivaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* KUFC 6349). Tetrahedron, 2012, **68**, 3253-3262.

CAPON, R. J., STEWART, M., RATNAYAKE, R., LACEY, E., GILL, J. H., Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. Journal of Natural Products, 2007, **70**, 1746-1752.

CHAI, Y., CUI, C., LI, C., HUA, W., Antitumor metabolites newly produced by a gentamicin-resistant mutant of *Penicillium purpurogenum* G59. Guoji Yaoxue Yanjiu Zazhi, 2011, **38**, 216-222.

CHAI, Y. J., CUI, C. B., LI, C. W., WU, C. J., TIAN, C. K., HUA, W., Activation of the dormant secondary metabolite production by introducing gentamicin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. Marine Drugs, 2012, **10**, 559-582.

CHEN, Y., ZHANG, Y. X., LI, M. H., ZHAO, W. M., SHI, Y. H., MIAO, Z. H., ZHANG, X. W., LIN, L. P., DING, J., Antiangiogenic activity of 11,11'-Dideoxyverticillin, a natural product isolated from the fungus *Shiraia bambusicola*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005a, **329**, 1334-1342.

CHEN, Y., MIAO, Z. H., ZHAO, W. M., DING, J., The p53 pathway is synergized by p38 MAPK signaling to mediate 11,11'-Dideoxyverticillin-induced G2/M arrest. FEBS Letters, 2005b, **579**, 3683-3690.

CHEN, G., ZHU, Y., WANG, H. Z., WANG, S. J., ZHANG, R. Q., The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomii*. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, **9**, 159-164.

CHEN, L., FANG, Y., ZHU, T., GU, Q., ZHU, W., Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. Journal of Natural Products, 2008, **71**, 66-70.

CHEN, Z., ZHENG, Z., HUANG, H., SONG, Y., ZHANG, X., MA, J., WANG, B., ZHANG, C., JU, J., Penicacids A-C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SOF07. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, **22**, 3332-3335.

CHU, M., MIERZWA, R., HE, L., XU, L., PATEL, M., PATEL, D., CHAN, T. M., Structure of Sch 528647. Journal of Antibiotics, 2001, **54**, 1096-1099.

CHU, M., TRUUMEES, I., ROTHOFSKY, M. L., PATEL, M. G., GENTILE, F., DAS, P. R., PUAR, M. S., LIN, S. L., Inhibition of *c-fos* proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901, novel diketopiperazine produced by *Gliocladium* sp. Journal of Antibiotics, 1995, **48**, 1440-1445.

CLUTTERBUCK, P. W., OXFORD, A. E., RAISTRICK, H., SMITH, G., Biochemistry of micro-organisms. XXIV. The metabolic products of the *Penicillium brevi-compactum* series. Biochemical Journal, 1932, **26**, 1441-1458.

COLE, R. J., KIRKSEY, J. W., DORNER, J. W., WILSON, D. M., JOHNSON, J. C., JR., JOHNSON, A. N., BEDELL, D. M., SPRINGER, J. P., CHEXAL, K. K., CLARDY, J. C., COX, R. H., Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, **25**, 826-830.

COREY, E. J. AND SNIDER, B. B., Total synthesis of (+-)-fumagillin. Journal of the American Chemical Society, 1972, **94**, 2549-2550.

CRAWLEY, S. L. AND FUNK, R. L., A Synthetic approach to nomofungin/communesin B. Organic Letters, 2003, **5**, 3169-3171.

CRAWLEY, S. L. AND FUNK, R. L., Generation of aza-ortho-xylylenes *via* ring opening of 2-(2-acylaminophenyl)aziridines: Application in the construction of the communesin ring system. Organic Letters, 2006, **8**, 3995-3998.

CUI, C. B., KAKEYA, H., OKADA, G., ONOSE, R., OSADA, H., Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. Journal of Antibiotics, 1996, **49**, 527-533.

DALSGAARD, P. W., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G., FRISVAD, J. C., CHRISTOPHERSEN, C., Communesins G and H, new alkaloids from the psychrotolerant fungus *Penicillium rivulum*. Journal of Natural Products, 2005, **68**, 258-261.

DATTA, B., Roles of P67/MetAP2 as a tumor suppressor. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer, 2009, **1796**, 281-292.

DENIZOT F. ET LANG R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods, 1986, **89**, 271-277.

DONG, J. Y., HE, H. P., SHEN, Y. M., ZHANG, K. Q., Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. Journal of Natural Products, 2005, **68**, 1510-1513.

DU, L., FENG, T., ZHAO, B., LI, D., CAI, S., ZHU, T., WANG, F., XIAO, X., GU, Q., Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. Journal of Antibiotics, 2010, **63**, 165-170.

DU, L., LI, D., ZHU, T., CAI, S., WANG, F., XIAO, X., GU, Q., New alkaloids and diterpenes from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp.. Tetrahedron, 2009, **65**, 1033-1039.

EAGLE H., Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Experimental Biology and Medicine, 1955, **89**, 362-364.

EBRAHIM, W., KJER, J., EL AMRANI, M., WRAY, V., LIN, W., EBEL, R., LAI, D., PROKSCH, P., Pullularins E and F, two new peptides from the endophytic fungus *Bionectria ochroleuca* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. Marine Drugs, 2012, **10**, 1081-1091.

EGOROV, M., LE BOT, R., PETIT, F., GROVEL, O., POUCHUS, Y. F., VANSTEELANDT, M., Preparation of fumagillol derivatives useful for the treatment or prevention of bone tumors. Patent FR2973376A1, 2011 France.

ELBE, T. E. AND HANSON, F. R., Fumagillin, an antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. Antibiotics and Chemotherapy, 1951, **1**, 54-58.

ELSEBAI, M. F., REMPEL, V., SCHNAKENBURG, G., KEHRAUS, S., MÜLLER, C. E., KÖNIG, G. M., Identification of a potent and selective cannabinoid CB1 receptor antagonist from *Auxarthron reticulatum*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2011, **2**, 866-869.

ENDO, A., KURODA, M., TSUJITA, Y., ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinium*. Journal of Antibiotics, 1976, **29**, 1346-1348.

ERKEL, G., GEHRT, A., ANKE, T., STERNER, O., Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by the verticillin derivative Sch 52900. Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences, 2002, **57**, 759-767.

FANG, S. M., CUI, C. B., LI, C. W., WU, C. J., ZHANG, Z. J., LI, L., HUANG, X. J., YE, W. C., Purpurogemutantin and purpurogemutantidin, new drimenyl cyclohexenone derivatives produced by a mutant obtained by diethyl sulfate mutagenesis of a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. Marine Drugs, 2012, **10**, 1266-1287.

FIGUEROA, M., GRAF, T. N., AYERS, S., ADCOCK, A. F., KROLL, D. J., YANG, J., SWANSON, S. M., MUNOZ-ACUNA, U., CARCACHE DE BLANCO, E. J., AGRAWAL, R.*, et al.*, Cytotoxic epipolythiodioxopiperazine alkaloids from filamentous fungi of the Bionectriaceae. Journal of Antibiotics, 2012, **65**, 559-564.

FISCHER G., MULLER T., SCHWALBE R., OSTROWSKI R. ET DOTT W., Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2000, **203**, 105-116.

FLEMING, A., On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzæ*. British Journal of Experimental Pathology, 1929, **10**, 223-236.

FOGH J., FOGH J.M. ET ORFEO T., One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. Journal of the National Cancer Institute, 1977a, **59**, 221-226.

FOGH J., WRIGHT W.C. ET LOVELESS J.D., Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. Journal of the National Cancer Institute, 1977b, **58**, 209-214.

FORD, J. H., JOHNSON, A. R., HINMAN, J. W., The structure of penicillic acid. Journal of the American Chemical Society, 1950, **72** (10), 4529-4531.

FRISVAD J.C., SMEDSGAARD J., LARSEN T.O. ET SAMSON R.A., Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Studies in Mycology, 2004, **49,**, 201-242.

FUJIMOTO H., NEGISHI E., YAMAGUCHI K., NISHI N. ET YAMAZAKI M., Isolation of new tremorgenic metabolites from an ascomycete, Corynascus setosus. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1996, **44**, 1843-1848.

GAO, S.-S., LI, X.-M., ZHANG, Y., LI, C.-S., CUI, C.-M., WANG, B.-G., Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. Journal of Natural Products, 2011, **74**, 256-261.

GAO, H., ZHANG, L., ZHU, T., GU, Q., LI, D., Unusual pyrrolyl 4-quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. ghq208. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012, **60**, 1458-1460.

GARCIA-ESTRADA, C., ULLAN, R. V., ALBILLOS, S. M., FERNANDEZ-BODEGA, M. A., DUREK, P., VON DOHREN, H., MARTIN, J. F., A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. Chemistry & Biology, 2011, **18**, 1499-1512.

GARDINER, D. M., WARING, P., HOWLETT, B. J., The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. Microbiology, 2005, **151**, 1021-1032.

GAUTSCHI, J. T., AMAGATA, T., AMAGATA, A., VALERIOTE, F. A., MOOBERRY, S. L., CREWS, P., Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: a chemical investigation of *Penicillium* obtained from deep water sediment. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 362-367.

GOSIO, B. AND FERRATI, E., Contributo all'eziologia della pellagra ; ricerche chimiche e batteriologiche sulle alterazioni del mais. G. R. Accademia di Medicina di Torino, 1893, **61**, 484-487.

GRÄBSCH, C., WICHMANN, G., LOFFHAGEN, N., HERBARTH, O., MÜLLER, A., Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*. Environmental Toxicology, 2006, **21**, 111-117.

HAISHI, T., FURUYA, K., NAKAJIMA, M., KINOSHITA, T., KAGAZAKI, T., SAKAIDA, Y., Novel antibiotic phthalexin and its manufacture with *Eupenicillium parvum*.Patent JP01290667A. 1989, Japan.

HALÁSZ, J., PODANYI, B., VASVARI-DEBRECZY, L., SZABO, A., HAJDU, F., BOCSKEI, Z., HEGEDUS-VAJDA, J., GYORBIRO, A., HERMECZ, I., Structure elucidation of fumagillin-related natural products. Tetrahedron, 2000, **56**, 10081-10085.

HAN, X., LIN, Z., TAO, L., LIU, P., WANG, Y., ZHU, W., Cytotoxic metabolites from symbiotic fungus *Penicillium* sp. HK13-8 with *Rhizophora stylosa*. Zhongguo Haiyang Yaowu, 2009, **28**, 11-16.

HANSON, J. R. AND O'LEARY, M. A., New piperazinedione metabolites of *Gliocladium deliquescens*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 11981, **1**, 218-220.

HAYASHI, H., MATSUMOTO, H., AKIYAMA, K., New insecticidal compounds, communesins C, D and E, from *Penicillium expansum* Link MK-57. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, **68**, 753-756.

HE, J., LION, U., SATTLER, I., GOLLMICK, F. A., GRABLEY, S., CAI, J., MEINERS, M., SCHUENKE, H., SCHAUMANN, K., DECHERT, U., KROHN, M., Diastereomeric quinolinone alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium janczewskii.* Journal of Natural Products, 2005, **68**, 1397-1399.

HEUSSNER, A. H., DIETRICH, D. R., O'BRIEN, E., *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. Toxicology in Vitro, 2006, **20**, 332-341.

HUANG, Y. F., QIAO, L., LV, A. L., PEI, Y. H., TIAN, L., Eremophilane sesquiterenes from the marine fungus *Penicillium* sp. BL27-2. Chinese Chemical Letters, 2008, **19**, 562-564.

HUANG, Z., YANG, J., CAI, X., SHE, Z., LIN, Y., A new furanocoumarin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. ZH16. Journal of Natural Products, 2012, **26**, 1291-1295.

INDRIANI, I. D. Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites, PhD dissertation, Düsseldorf University, 2008.

INTARAUDOM, C., BOONYUEN, N., SUVANNAKAD, R., RACHTAWEE, P., PITTAYAKHAJONWUT, P., Penicolinates A-E from endophytic *Penicillium* sp. BCC16054. Tetrahedron Letters, 2013, **54**, 744-748.

IWAMOTO, C., MINOURA, K., HAGISHITA, S., NOMOTO, K., NUMATA, A. Penostatins F-I, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* marine alga. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1,1998, 449-456.

IWAMOTO, C., MINOURA, K., OKA, T., OHTA, T., HAGISHITA, S., NUMATA, A., Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, penostatins A-E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga. Tetrahedron, 1999a, **55**, 14353-14368.

IWAMOTO, C., YAMADA, T., ENOMOTO, S., MINOURA, K., NUMATA, A., Structures for cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a marine alga. Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 1999b, **41st**, 601-606.

IWAMOTO, C., YAMADA, T., ITO, Y., MINOURA, K., NUMATA, A., Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga. Tetrahedron, 2001, **57**, 2997-3004.

JADULCO, R., EDRADA, R. A., EBEL, R., BERG, A., SCHAUMANN, K., WRAY, V., STEUBE, K., PROKSCH, P., New communesin derivatives from the fungus *Penicillium* sp. derived from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*. Journal of Natural Products, 2004, **67**, 78-81.

JASMIN C., ALLOUCHE M., JUDE J.G., KLEIN B., THIERY J.P., PERDEREAU B., GONGORA R., GONGORA G. ET MAZABRAUD A., An experimental model of osteosarcomas in rats. La semaine des hôpitaux : organe fondé par l'association d'enseignement médical des hôpitaux de Paris., 1982, **58**, 1684-1689.

JIAO R.H., XU S., LIU J.Y., GE H.M., DING H., XU C., ZHU H.L. ET TAN R.X., Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium sp*. IFB-E015. Organic Letters, 2006, **8**, 5709-5712.

JORDAN, T. W. AND PEDERSEN, J. S., Sporidesmin and gliotoxin induce cell detachment and perturb microfilament structure in cultured liver cells. Journal of Cell Science, 1986, **85**, 33-46.

JOSHI, B. K., GLOER, J. B., WICKLOW, D. T., New verticillin and glisoprenin analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia.Journal of Natural Products, 1999, **62**, 730-733.

JULIANTI, E., LEE, J. H., LIAO, L., PARK, W., PARK, S., OH, D. C., OH, K. B., SHIN, J., New polyaromatic metabolites from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. Organic Letters, 2013, **15**, 1286-1289.

KAKEYA, H., ONOZAWA, C., SATO, M., ARAI, K., OSADA, H., Neuritogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors. Journal of Medicinal Chemistry, 1997, **40**, 391-394.

KAKEYA, H., TAKAHASHI, I., OKADA, G., ISONO, K., OSADA, H., Epolactaene, a novel neuritogenic compound in human neuroblastoma cells, produced by a marine fungus. Journal of Antibiotics, 1995, **48**, 733-735.

KAMAL, A., KHAN, M. A., QURESHI, A. A., Studies in the biochemistry of micro-organismum - II: Constitution of curvulin, curvulinic acid and curvulol, metabolic products of *Curvularia siddiqui*. Tetrahedron, 1963, **19** , 111-115.

KAMIJO A., KOSHINO T., UESUGI M., NITTO H. ET SAITO T., Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma cell line POS-1 transplanted into mice by thigh ligation. Cancer Letters, 2002, **188**, 213-219.

KATAGIRI, K., SATO, K., HAYAKAWA, S., MATSUSHIMA, T., MINATO, H., Verticillin A, a new antibiotic from *Verticillium*. Journal of Antibiotics, 1970, **23**, 420-422.

KAWAHARA, N., NOZAWA, K., NAKAJIMA, S., KAWAI, K. I., Studies on fungal products.Part 13.Isolation and structures of dithiosilvatin and silvathione, novel dioxopiperazine derivatives from *Aspergillus silvaticus*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1987, 2099-2101.

KEBLYS, M., BERNHOFT, A., HÖFER, C. C., MORRISON, E., LARSEN, H. J. S., FLÅØYEN, A., The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes. Mycopathologia, 2004, **158**, 317-324.

KERZAON, I., POUCHUS, Y. F., MONTEAU, F., LE BIZEC, B., NOURRISSON, M. R., BIARD, J. F., GROVEL, O., Structural investigation and elucidation of new communesins from a marine-derived *Penicillium expansum* Link by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, **23**, 3928-3938.

KIM, J., ASHENHURST, J. A., MOVASSAGHI, M., Total Synthesis of (+)-11,11'-Dideoxyverticillin A. Science, 2009, **324**, 238-241.

KIRBY, G. W., RAO, G. V., ROBINS, D. J., New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1988, 301-304.

KIRBY, G. W., ROBINS, D. J., SEFTON, M. A., TALEKAR, R. R., Biosynthesis of bisdethiobis(methylthio)gliotoxin, a new metabolite of *Gliocladium deliquescens*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1980, 119-121.

KLEIN B., PALS S., MASSE R., LAFUMA J., MORIN M., BINART N., JASMIN J.R. ET JASMIN C., Studies of bone and soft-tissue tumors induced in rats with radioactive cerium chloride. Internationnal Journal of Cancer, 1977, **20**, 112-119.

KONO, K., GARDNER, J. M., SUSUKI, Y., TAKEUCHI, S., New minor components of host-selective ACTG-toxin and a novel sesquiterpene produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins. Journal of Pesticide Science, 1989, **14**, 223-228.

KOSSUGA, M. H., ROMMINGER, S., XAVIER, C., MILANETTO, M. C., DO VALLE, M. Z., PIMENTA, E. F., MORAIS, R. P., DE CARVALHO, E., MIZUNO, C. M., CORADELLO, L. F. C*., et al.*, Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012, **22**, 257-267.

KOYAMA N., INOUE Y., SEKINE M., HAYAKAWA Y., HOMMA H., OINMURA S. ET TOMODA H., Relative and absolute stereochemistry of quinadoline B, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages. Organic Letters, 2008, **10**, 5273-5276.

KOZLOVSKII, A. G., ZHELIFONOVA, V. P., ADANIN, V. M., ANTIPOVA, T. V., SHNYREVA, A. V., VIKTOROV, A. N., The biosynthesis of low-molecular-weight nitrogen-containing secondary metabolites-alkaloids-by the resident strains of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum* isolated on board the Mir space station. Microbiology, 2002, **71**, 666-669.

KOZLOVSKII, A. G., ZHELIFONOVA, V. P., ANTIPOVA, T. V., Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, **49**, 1-10.

KOZLOVSKY, A. G., ADANIN, V. M., DAHSE, H. M., GRÄFE, U., Rugulosuvines A and B, diketopiperazine alkaloids of *Penicillium rugulosum* and *Penicillium piscarium* fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, 2001, **37**, 253-256.

KUO, L. M. Y., CHEN, K. Y., HWANG, S. Y., CHEN, J. L., LIU, Y. Y., LIAW, C. C., YE, P. H., CHOU, C. J., SHEN, C. C., KUO, Y. H., DNA topoisomerase I inhibitor, ergosterol peroxide from *Penicillium oxalicum*. Planta Medica, 2005, **71**, 77-79.

KURIYAMA T., KAKEMOTO E., TAKAHASHI N., IMAMURA K.-I., OYAMA K., SUZUKI E., HARIMAYA K., YAGUCHI T. ET OZOE Y., Receptor assay-guided isolation of anti-gabaergic insecticidal alkaloids from a fungal culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, **52**, 3884-3887.

KUSAKABE, Y., YAMAUCHI, Y., NAGATSU, C., ABE, H., AKASAKI, K., Citromycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization. Journal of Antibiotics, 1969, **22**, 112-118.

KUSANO, M., KOSHINO, H., UZAWA, J., FUJIOKA, S., KAWANO, T., KIMURA, Y., Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, **64**, 2559-2568.

LAMOUREUX F., ORY B., BATTAGLIA S., PILET P., HEYMANN M.F., GOUIN F., DUTEILLE F., HEYMANN D. ET REDINI F., Relevance of a new rat model of osteoblastic metastases from prostate carcinoma for preclinical studies using zoledronic acid. International Journal of Cancer, 2008, **122**, 751-760.

LARSEN T.O., FRANZYK H. ET JENSEN S.R., UV-Guided Isolation of Verrucines A and B, Novel Quinazolines from Penicillium v errucosum Structurally Related to Anacine from Penicillium a urantiogriseum. Journal of Natural Products, 1999, **62**, 1578-1580.

LARSEN T.O., FRYDENVANG K., FRISVAD J.C. ET CHRISTOPHERSEN C., UV-Guided Isolation of Alantrypinone, a Novel Penicillium Alkaloid. Journal of Natural Products, 1998, **61**, 1154-1157.

LI, C. S., AN, C. Y., LI, X. M., GAO, S. S., CUI, C. M., SUN, H. F., WANG, B. G., Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. Journal of Natural Products, 2011, **74**, 1331-1334.

LI, C. Y., DING, W. J., SHAO, C. L., SHE, Z. G., LIN, Y. C., Secondary metabolites of a marine mangrove fungus (*Penicillium* sp. no. 2556) from South China Sea. Chinese Journal of Natural Medicines, 2008, **31**, 960-962.

LI, D., CHEN, L., ZHU, T., KURTAN, T., MANDI, A., ZHAO, Z., LI, J., GU, Q., Chloctanspirones A and B, novel chlorinated polyketides with an unprecedented skeleton, from marine sediment derived fungus *Penicillium terrestre*. Tetrahedron, 2011, **67**, 7913-7918.

LI, N., YI, Z., WANG, Y., ZHANG, Q., ZHONG, T., QIU, Y., WU, Z., TANG, X., Differential proteomic analysis of HL60 cells treated with secalonic acid F reveals caspase 3-induced cleavage of Rho GDP dissociation inhibitor 2. Oncology Reports, 2012, **28**, 2016-2022.

LI, X. M., CHOI, H. D., KANG, J. S., LEE, C. O., SON, B. W., New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyyanuthone A and its hydro derivative from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. Journal of Natural Products, 2003, **66**, 1499-1500.

LI, Y., YE, D., SHAO, Z., CUI, C., CHE, Y., A sterol and spiroditerpenoids from a *Penicillium* sp. isolated from a deep sea sediment sample. Marine Drugs, 2012, **10**, 497-508.

LIN, H. C., CHOOI, Y. H., DHINGRA, S., XU, W., CALVO, A. M., TANG, Y., The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β-trans-bergamotene. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135, 4616-4619.

LIN, Z. J., LU, Z. Y., ZHU, T. J., FANG, Y. C., GU, Q. Q., ZHU, W. M., Penicillenols from *Penicillium* sp.GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2008, **56**, 217-221.

LIN, Z., ZHU, T., FANG, Y., GU, Q., ZHU, W., Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. Phytochemistry, 2008, **69**, 1273-1278.

LIU, B. H., WU, T. S., YU, F. Y., WANG, C. H., Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. Toxicological Sciences, 2006, **89**, 423-430.

LIU, F., LIU, Q., YANG, D., BOLLAG, W. B., ROBERTSON, K., WU, P., LIU, K., Verticillin A overcomes apoptosis resistance in human colon carcinoma through DNA methylation-dependent upregulation of BNIP3. Cancer Research, 2011, **71**, 6807-6816.

LIU, F., WU, S., CHEN, Y., YANG, L., WU, P., Verticillin chloroform solvate. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online, 2006, **62**, o974-o976.

LIU, M., JIANG, X., YAO, H., Injury of myocardial cells induced by citreoviridin. Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi, 2006, **24**, 177-178.

LIU, S., WIDOM, J., KEMP, C. W., CREWS, C. M., CLARDY, J., Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. Science, 1998, **282**, 1324-1327.

LIU, S., YAN, X., YU, M., CHEN, J., ZHANG, L., A novel compound from *Penicillium* sp. (M207142). Chemistry of Natural Compounds, 2010, **46**, 116-118.

LIU, T., LI, Z., WANG, Y., ZHANG, L., SONG, J., TIAN, L., PEI, Y., HUA, H., Study on the secondary metabolites of marine-derived fungus *Penicillium sacculum*. Chinese Pharmaceutical Journal, 2012, **47**, 577-580.

LIU, W., GU, Q., ZHU, W., CUI, C., FAN, G., Dihydrotrichodimerol and tetrahydrotrichodimerol, two new bisorbicillinoids, from a marine-derived *Penicillium terrestre*. Journal of Antibiotics., 2005b, **58**, 621-624.

LIU, W., GU, Q., ZHU, W., CUI, C., FAN, G., Two new benzoquinone derivatives and two new bisorbicillinoids were isolated from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. Journal of Antibiotics, 2005a , **58**, 441-446.

LU, Z., ZHU, H., FU, P., WANG, Y., ZHANG, Z., LIN, H., LIU, P., ZHUANG, Y., HONG, K., ZHU, W., Cytotoxic polyphenols from the marine-derived fungus *Penicillium expansum*. Journal of Natural Products, 2010, **73**, 911-914.

MA, C., LI, Y., NIU, S., ZHANG, H., LIU, X., CHE, Y., N-Hydroxypyridones, phenylhydrazones, and a quinazolinone from *Isaria farinosa*. Journal of Natural Products., 2011, **74**, 32-37.

MA, L. Y., LIU, W. Z., SHEN, L., HUANG, Y. L., RONG, X. G., XU, Y. Y., GAO, X. D., Spiroketals, isocoumarin, and indoleformic acid derivatives from saline soil-derived fungus *Penicillium raistrickii*. Tetrahedron, 2012, **68**, 2276-2282.

MACIAS, F. A., VARELA, R. M., SIMONET, A. M., CUTLER, H. G., CUTLER, S. J., ROSS, S. A., DUNBAR, D. C., DUGAN, F. M., HILL, R. A., (+)-Brevione A. The first member of a novel family of bioactive spiroditerpenoids isolated from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. Tetrahedron Letters, 2000, **41**, 2683-2686.

MARSTON A. ET HOSTETTMANN K., Natural product analysis over the last decades. Planta Medica, 2009, **75**, 672-682.

MARUI, S., ITOH, F., KOZAI, Y., SUDO, K., KISHIMOTO, S., Chemical modification of fumagillin. I. 6-O-acyl, 6-O-sulfonyl, 6-O-alkyl, and 6-O-(N-substituted-carbamoyl)fumagillols. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1992, **40**, 96-101.

MAY, J. A. AND STOLTZ, B., The structural and synthetic implications of the biosynthesis of the calycanthaceous alkaloids, the communesins, and nomofungin. Tetrahedron, 2006, **62**, 5262-5271.

MAY, J. A., ZEIDAN, R. K., STOLTZ, B. M., Biomimetic approach to communesin B (a.k.a. nomofungin). Tetrahedron Letters, 2003, **44**, 1203-1205.

MINATO, H., MATSUMOTO, M., KATAYAMA, T., Studies on the metabolites of *Verticilliumsp.* Structures of verticillins A, B, and C. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1973, 1819-1825.

MONTASER, R. AND LUESCH, H., Marine natural products: a new wave of drugs? Future Medicinal Chemistry, 2011, **3**, 1475-1489.

MOSMANN T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 1983, **65**, 55-63.

MOTOHASHI, K., HASHIMOTO, J., INABA, S., KHAN, S. T., KOMAKI, H., NAGAI, A., TAKAGI, M., SHIN-YA, K., New sesquiterpenes, JBIR-27 and -28, isolated from a tunicate-derived fungus, *Penicillium* sp. SS080624SCf1. Journal of Antibiotics, 2009, **62**, 247-250.

MÜLLBACHER, A., WARING, P., EICHNER, R. D., Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vitro*..Journal of General Microbiology, 1985, **131**, 1251-1258.

MUSGRAVE, O. C., Curvularin.Part I. Isolation and partial characterisation of a metabolic product from a new species of *Curvularia*. Journal of the Chemical Society, 1956, 4301-4305.

NAGASAWA, H., SUZUKI, A., TAMURA, S., Isolation and structure of (+)-desoxyepiepoxydon and (+)-epiepoxydon, phytotoxic fungal metabolites. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, **42,** 1303-1304.

NAGUMO, Y., KAKEYA, H., YAMAGUCHI, J., UNO, T., SHOJI, M., HAYASHI, Y., OSADA, H., Structure-activity relationships of epolactaene derivatives: structural requirements for inhibition of Hsp60 chaperone activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, **14**, 4425-4429.

NAKAI, J., KAWADA, K., NAGATA, S., KURAMOCHI, K., UCHIRO, K., KOBAYASHI, S., IKEKITA, M., A novel lipid compound, epolactaene, induces apoptosis: its action is modulated by its side chain structure. Biochimica et Biophysica - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2002, **1581**, 1-10.

NICOLETTI, R., CIAVATTA, M. L., BUOMMINO, E., TUFANO, M. A., Antitumor extrolites produced by *Penicillium* species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2008, **2**, 1-23.

NIELSEN K.F., MÅNSSON M., RANK C., FRISVAD J.C. ET LARSEN T.O., Dereplication of Microbial Natural Products by LC-DAD-TOFMS. Journal of Natural Products, 2011, **74**, 2338-2348.

NIERMAN, W. C., PAIN, A., ANDERSON, M. J., WORTMAN, J. R., KIM, H. S., ARROYO, J., BERRIMAN, M., ABE, K., ARCHER, D. B., BERMEJO, C.*, et al.*, Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature, 2005, **438**, 1151-1156.

NIESSEN W.M.,Liquid chromatography-mass spectrometry.CRC Press, 2012,p.

NOZAWA, K. AND NAKAJIMA, S. Studies on fungal products.Part 6.Isolation of radicicol from *Penicillium luteo-aurantium*, and melegrin, a new metabolite, from *Penicillium meleagrinum*. Journal of Natural Products, 1979, **42**, 374-377.

NUMATA, A., TAKAHASHI, C., ITO, Y., TAKADA, T., KAWAI, K., USAMI, Y., MATSUMURA, E., IMACHI, M., ITO, T., HASEGAWA, T., Communesins, cytotoxic metabolites of a fungus isolated from a marine alga. Tetrahedron Letters, 1993, **34**, 2355-2358.

NUMATA, A., TAKAHASHI, C., ITO, Y., MINOURA, K., YAMADA, T., MATSUDA, C., NOMOTO, K., Penochalasins, a novel class of cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga: structure determination and solution conformation. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1996, 239-245.

OKAMOTO, M., YOSHIDA, K., UCHIDA, I., NISHIKAWA, M., KOHSAKA, M., AOKI, H., Studies of platelet activating factor (PAF) antagonists from microbial products. I. Bisdethiobis(methylthio)gliotoxin and its derivatives. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1986, **34**, 340-344.

ORY B., HEYMANN M.-F., KAMIJO A., GOUIN F., HEYMANN D. ET REDINI F., Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. Cancer, 2005, **104**, 2522-2529.

PENG J., LIN T., WANG W., XIN Z., ZHU T., GU Q. ET LI D., Antiviral Alkaloids Produced by the Mangrove-Derived Fungus *Cladosporium sp*. PJX-41. Journal of Natural Products, 2013, **76**, 1133-1140.

PENN J., MANTLE P.G., BILTON J.N. ET SHEPPARD R.N., Glyantrypine, a novel anthranilic acid-containing metabolite of *Aspergillus clavatus*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, 1992,1495-1496.

PERDUE R.E., JR., KB cell culture. I. Role in discovery of antitumor agents from higher plants. Journal of Natural Products, 1982, **45**, 418-426.

PERPELESCU, M., KOBAYASHI, J., FURUTA, M., ITO, Y., IZUTA, S., TAKEMURA, M., SUZUKI, M., YOSHIDA, S., Novel phenalenone derivatives from a marine-derived fungus exhibit distinct inhibition spectra against eukaryotic DNA polymerases. Biochemistry, 2002, **41**, 7610-7616.

PETIT, K. E., MONDEGUER, F., ROQUEBERT, M. F., BIARD, J. F., POUCHUS, Y. F., Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods, 2004, **58**, 59-65.

PIVKIN, M. V., KHUDYAKOVA, Y. V., SMETANINA, O. F., KUZNETSOVA, T. A., *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom fungus strain as producer of shearinines. Patent RU2422508C1, Russia, 2011

RABINDRAN, S. K., ROSS, D. D., DOYLE, L. A., YANG, W., GREENBERGER, L. M., Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. Cancer Research, 2000, **60**, 47-50.

RATNAYAKE, A. S., YOSHIDA, W. Y., MOOBERRY, S. L., HEMSCHEIDT, T. K., Nomofungin: a new microfilament disrupting agent. Journal of Organic Chemistry, 2001, **66**, 8717-8721.

REN, H., GU, Q., CUI, C., Anthraquinone derivatives produced by marine-derived *Penicillium flavidorsum* SHK1-27 and their antitumor activities. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2007, **17**, 148-154.

REN, H. AND LIU, W. W., Nidurufin as a new cell cycle inhibitor from marine-derived fungus *Penicillium flavidorsum* SHK1-27. Archives of Pharmacal Research, 2011, **34**, 901-905.

REN, H. AND YU, Y., Antitumor metabolites of *Penicillium* sp. WF-06 from marine sediment. Guowai Yiyao Kangshengsu Fence, 2011, **32**, 86-90.

RESHETILOVA, T. A., VINOKUROVA, N. G., KHMELENINA, V. N., KOZLOVSKII, A. G., The role of roquefortine in the synthesis of alkaloids meleagrine, glandicolines A and B, and oxaline in fungi *Penicillium glandicola* and *P. atramentosum*. Microbiology, 1995, **64**, 27-29.

ROEHM N.W., RODGERS G.H., HATFIELD S.M. ET GLASEBROOK A.L., An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Journal of Immunological Methods, 1991, **142**, 257-265.

ROTHE, W., Antibiotic complex produced by *Penicillium notatum* Westling. Pharmazie, 1950, **5**, 190.

SANFORD K.K., EARLE W.R. ET LIKELY G.D., The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. Journal of the National Cancer Institute, 1948, **9**, 229-246.

SASSA, T. AND YOSHIKOSHI, H., New terpene-linked cyclohexenone epoxides, macrophorin A, B and C, produced by the fungus caused *Macrophoma* fruit rot of apple. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, **47**, 187-189.

SATO, H., KONOMA, K., SAKAMURA, S., FURUSAKI, A., MATSUMOTO, T., MATSUZAKI, T., X-ray crystal structure of pyrenocine A, a phytotoxin from *Pyrenochaeta terrestris*. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, **45**, 795-797.

SEO, J. H., ARTMAN, G. D., WEINREB, S. M., Synthetic studies on perophoramidine and the communesins: A construction of the vicinal quaternary stereocenters. Journal of Organic Chemistry, 2006, **71**, 8891-8900.

SHANG, Z., LI, X., MENG, L., LI, C., GAO, S., HUANG, C., WANG, B., Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, **30**, 305-314.

SHAO, C. L., WANG, C. Y., GU, Y. C., WEI, M. Y., PAN, J. H., DENG, D. S., SHE, Z. G., LIN, Y. C., Penicinoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an endophytic fungus *Penicillium* sp. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, **20**, 3284-3286.

SHIGEMORI, H., WAKURI, S., YAZAWA, K., NAKAMURA, T., SASAKI, T., KOBAYASHI, J., Fellutamides A and B, cytotoxic peptides from a marine fish-possessing fungus *Penicillium fellutanum*. Tetrahedron, 1991, **47**, 8529-8534.

SIENGALEWICZ, P., GAICH, T., MULZER, J., It all began with an error: The nomofungin/communesin story. Angewandte Chemie International Edition, 2008, **47**, 8170-8176.

SIGG, H. P. AND WEBER, H. P. Isolation and structural elucidation of ovalicin. Helvetica Chimica Acta, 1968, **51**, 1395-1408.

SMETANINA, O. F., KALINOVSKY, A. I., KHUDYAKOVA, Y. V., PIVKIN, M. V., DMITRENOK, P. S., FEDOROV, S. N., JI, H., KWAK, J. Y., KUZNETSOVA, T. A., Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. Journal of Natural Products, 2007, **70**, 906-909.

SOLOV'EVA, T. F., BASKUNOV, B. P., KISELEVA, O. V., KOZLOVSKII, A. G., Biosynthesis of alkaloids by *Penicillium puberulum*. Mikrobiologiya, 1992, **61**, 395-403.

SON, B. W., JENSEN, P. R., KAUFFMAN, C. A., FENICAL, W. New cytotoxic epidithiodioxopiperazines related to verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. Natural Product Letters, 1999, **13**, 213-222.

SON, K. H., KWON, J. Y., JEONG, H. W., KIM, H. K., KIM, C. J., CHANG, Y. H., CHOI, J. D., KWON, B. M., 5-demethylovalicin, as a methionine aminopeptidase-2 inhibitor produced by *Chrysosporium*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, **10**, 185-188.

SORENSON, W. G., SIMPSON, J., CASTRANOVA, V.,Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages. Environmental Research, 1985, **38**, 407-416.

STANIMIROVIC, Z., STEVANOVIC, J., BAJIC, V., RADOVIC, I., Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests *in vivo*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007, **628**, 1-10.

STETINA, R. AND VOTAVA, M., Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin, and aflatoxin B1 in cell lines CHO and AWRF. Folia Biologica, 1986, **32**, 128-144.

STEYN, P. S. AND VLEGGAAR, R., Roquefortine, an intermediate in the biosynthesis of oxaline in cultures of *Penicillium oxalicum*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1983, 560-561.

SUN, Y., TIAN, L., HUANG, J., LI, W., PEI, Y. H., Cytotoxic sterols from marine-derived fungus *Penicillium* sp. Natural Product Research*, Part B*, 2006, **20**, 381-384.

SUN, Y. L., HE, F., LIU, K. S., ZHANG, X. Y., BAO, J., WANG, Y. F., NONG, X. H., XU, X. Y., QI, S. H., Cytotoxic dihydrothiophene-condensed chromones from marine-derived fungus *Penicillium oxalicum*. Planta Medica, 2012, **78**, 1957-1961.

SUN, Y., TAKADA, K., TAKEMOTO, Y., YOSHIDA, M., NOGI, Y., OKADA, S., MATSUNAGA, S., Gliotoxin analogs from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. Natural Product Research, 2012, **75**, 111-114.

TAKAHASHI, C., NUMATA, A., MATSUMURA, E., MINOURA, K., ETO, H., SHINGU, T., ITO, T., HASEGAWA, T., Leptosins I and J, cytotoxic substances produced by a *Leptosphaeria* sp. Physico-chemical properties and structures. Journal of Antibiotics, 1994a, **47**, 1242-1249.

TAKAHASHI, C., NUMATA, A., ITO, Y., MATSUMURA, E., ARAKI, H., IWAKI, H., KUSHIDA, K., Leptosins, antitumor metabolites of a fungus isolated from a marine alga. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1994b, 1859-1864.

TAKAHASHI C., MATSUSHITA T., DOI M., MINOURA K., SHINGU T., KUMEDA Y. ET NUMATA A., Fumiquinazolines A-G, novel metabolites of a fungus separated from a *Pseudolabrus* marine fish. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, 1995,2345-2353.

TAKAHASHI, C., YAMADA, T., MINOURA, K., ENOMOTO, S. I., NUMATA, A., HAGISITA, S., Cytotoxic substances produced by *Penicillium* sp. from marine organisms. Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 1996a, **38th**, 67-72.

TAKAHASHI, C., NUMATA, A., YAMADA, T., MINOURA, K., ENOMOTO, S., KONISHI, K., NAKAI, M., MATSUDA, C., NOMOTO, K. Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga. Tetrahedron Letters, 1996b, **37**, 655-658.

TAKAMATSU, S., KIM, Y. P., KOMIYA, T., SUNAZUKA, T., HAYASHI, M., TANAKA, H., KOMIYAMA, K., OMURA, S., Chlovalicin, a new cytocidal antibiotic produced by *Sporothrix* sp. FO-4649. II. Physicochemical properties and structural elucidation. Journal of Antibiotics, 1996, **49**, 635-638.

TAKIGUCHI, S., IIZUKA, T., KUMAKURA, Y. S., MURASAKI, K., BAN, N., HIGUCHI, K., KAWASAKI, T., Total syntheses of (-)-Fructigenine A and (-)-5-N-Acetylardeemin. Journal of Organic Chemistry, 2010, **75**, 1126-1131.

TANAKA, S., WADA, K., KATAYAMA, M., MARUMO, S., Isolation of sporogen AO1, a sporogenic substance, from *Aspergillus oryzae*. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, **48**, 3189-3191.

TANG, X., YI, Z., LI, N., Cytotoxic compound secalonic acid F-producing deep-sea *Penicillium* F11. Patent CN102408997A, China, 2012.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., Introduction à la microbiologie, Pearson Education, Inc., Québec. 2003, 945.

TSUDA, M., KASAI, Y., KOMATSU, K., SONE, T., TANAKA, M., MIKAMI, Y., KOBAYASHI, J., Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. Organic Letters, 2004, **6**, 3087-3089.

TURNER, H. D., Fungal metabolites, Academic Press, London and New York. 1971, 446.

USAMI, Y., YAMAGUCHI, J., NUMATA, A., Gliocladins A - C and glioperazine; cytotoxic dioxo- or trioxopiperazine metabolites from a *Gliocladium* sp. separated from a sea hare. Heterocycles, 2004, **63**, 1123-1129.

VANSTEELANDT, M., BLANCHET, E., EGOROV, M., PETIT, F., TOUPET, L., BONDON, A., MONTEAU, F., LE, B. B., THOMAS, O. P., POUCHUS, Y. F., *et al.*, Ligerin, an antiproliferative chlorinated sesquiterpenoid from a marine-derived *Penicillium* strain. Journal of Natural Products, 2013, **76**, 297-301.

WANG, H., GLOER, K. B., GLOER, J. B., SCOTT, J. A., MALLOCH, D., Anserinones A and B: new antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*. Journal of Natural Products, 1997, **60**, 629-631.

WANG, J., LU, Z., LIU, P., WANG, Y., LI, J., HONG, K., ZHU, W., Cytotoxic polyphenols from the fungus *Penicillium expansum* 091006 endogenous with the mangrove plant *Excoecaria agallocha*. Planta Medica, 2012, **78**, 1861-1866.

WARR, G. A., VEITCH, J. A., WALSH, A. W., HESLER, G. A., PIRNIK, D. M., LEET, J. E., LIN, P. F. M., MEDINA, I. A., MCBRIEN, K. D., FORENZA, S., *et al.*, BMS-182123, a fungal metabolite that inhibits the production of TNF-alpha by macrophages and monocytes. Journal of Antibiotics, 1996, **49**, 234-240.

WATTS, K. R., RATNAM, J., ANG, K. H., TENNEY, K., COMPTON, J. E., MCKERROW, J., CREWS, P., Assessing the trypanocidal potential of natural and semi-synthetic diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, **18**, 2566-2574.

WEINDLING, R., *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 1932, **22**, 837-845.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathology, 1934, **24**, 1153-1179.

WEINDLING, R. AND EMERSON, O. H., The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology, 1936, **26**, 1068-1070.

WEINDLING, R. AND FAWCETT, H. S., Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off *citrus* seedlings. Hilgardia, 1936, **10**, 1-16.

WEINDLING, R., Isolation of toxic substances from the culture filtrates of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Phytopathology, 1937, **27**, 1175-1177.

WEINDLING, R., Association effects of fungi. Botanical Review, 1938, **4**, 475-496.

WEINDLING, R., Experimental consideration of the mold toxins of *Gliocladium* and *Trichoderma*. Phytopathology, 1941, **31**, 991-1003.

WENEHED, V., SOLYAKOV, A., THYLIN, I., HAGGBLOM, P., FORSBY, A., Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. Food and Chemical Toxicology., 2003, **41**, 395-403.

WIGLEY, L. J., Biosynthesis of communesin alkaloids, PhD thesis, University of London, 1996.

WIGLEY, L. J., MANTLE, P. G., PERRY, D. A., Natural and directed biosynthesis of communesin alkaloids. Phytochemistry, 2006, **67**, 561-569.

WIGLEY, L. J., PERRY, D. A., MANTLE, P. G., An experimental strategy towards optimizing directed biosynthesis of communesin analogues by *Penicillium marinum* in submerged fermentation. Mycological Research, 2008, **112**, 131-137.

WINDAUS, A., Über die photochemische oxydation des ergosterins. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1928, **460**, 225-235.

WONG S.M., MUSZA L.L., KYDD G.C., KULLNIG R., GILLUM A.M. ET COOPER R., Fiscalins: new substance P inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*. Taxonomy, fermentation, structures, and biological properties. The Journal of antibiotics, 1993, **46**, 545-553.

XIN, Z. H., ZHU, W. M., GU, Q. Q., FANG, Y. C., DUAN, L., CUI, C. B., A new cytotoxic compound from *Penicillium aurantiogriseum*, symbiotic or epiphytic fungus of sponge *Mycale plumose*. Chinese Chemical Letters, 2005, **16**, 1227-1229.

XIN, Z., FANG, Y., ZHU, T., DUAN, L., GU, Q., ZHU, W. Antitumor components from sponge-derived fungus *Penicillium auratiogriseum* Sp-19. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, **25**, 1-6.

XIN, Z. H., LI, T., ZHU, T. J., WANG, W. L., DU, L., FANG, Y. C., GU, Q. Q., ZHU, W. M., Isocoumarin derivatives from the sea squirt-derived fungus *Penicillium stoloniferum* QY2-10 and the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52. Archives of Pharmacal Research, 2007, **30**, 816-819.

YAMAGUCHI, J. AND HAYASHI, Y., Syntheses of fumagillin and ovalicin. Chemistry - A European Journal, 2010, **16**, 3884-3901.

YANAGIHARA, M., SASAKI-TAKAHASHI, N., SUGAHARA, T., YAMAMOTO, S., SHINOMI, M., YAMASHITA, I., HAYASHIDA, M., YAMANOHA, B., NUMATA, A., YAMORI, T., ANDOH, T., Leptosins isolated from marine fungus *Leptosphaeria* species inhibit DNA topoisomerases I and/or II and induce apoptosis by inactivation of Akt/protein kinase B. Cancer Science, 2005, **96**, 816-824.

YANG, J., SONG, H., XIAO, X., WANG, J., QIN, Y., Biomimetic approach to perophoramidine and communesin *via* an intramolecular cyclopropanation reaction. Organic Letters, 2006, **8**, 2187-2190.

YANG, J., WU, H., SHEN, L., QIN, Y., Total synthesis of (±)-communesin F. Journal of the American Chemical Society, 2007, **129**, 13794-13795.

YOO, S. J. AND PARK, B. K. Isolation and properties of antitumor antibiotic YS-1649 from *Penicillium* sp. strain 1649. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995, **5**, 31-35.

YURCHENKO, A. N., SMETANINA, O. F., KALINOVSKII, A. I., KIRICHUK, N. N., YURCHENKO, E. A., AFIYATULLOV, S. S., Biologically active metabolites of the facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. Chemistry of Natural Compounds, 2013, **48**, 996-998.

ZHANG, Y. X., CHEN, Y., GUO, X. N., ZHANG, X. W., ZHAO, W. M., ZHONG, L., ZHOU, J., XI, Y., LIN, L. P., DING, J., 11,11'-Dideoxy-verticillin: a natural compound possessing growth factor receptor tyrosine kinase-inhibitory effect with anti-tumor activity. Anticancer Drugs, 2005, **16**, 515-524.

ZHANG, Y., AHN, E. Y., JIANG, Y., KIM, D. K., KANG, S. G., WU, C. F., KANG, S. W., PARK, J. S., SON, B. W., JUNG, J. H., 3-chloro-2,5-dihydroxybenzyl alcohol activates human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis by inducing DNA damage. International Journal of Oncology, 2007, **31**, 1317-1323.

ZHANG, L., LI, D. L., CHEN, Y. C., TAO, M. H., ZHANG, W. M., Study on secondary metabolites of marine fungus *Penicillium* sp. FS60 from the South China Sea. Zhong Yao Cai., 2012, **35**, 1091-1094.

ZHAO, Y., CHEN, H., SHANG, Z., JIAO, B., YUAN, B., SUN, W., WANG, B., MIAO, M., HUANG, C., SD118-xanthocillin X (1), a novel marine agent extracted from *Penicillium commune*, induces autophagy through the inhibition of the MEK/ERK pathway. Marine Drugs, 2012, **10**, 1345-1359.

ZHENG, C. J., KIM, C. J., BAE, K. S., KIM, Y. H., KIM, W. G., Bionectins A-C, epidithiodioxopiperazines with anti-MRSA activity, from *Bionectria byssicola* F120. Journal of Natural Products, 2006, **69**, 1816-1819.

ZHENG, C. J., PARK, S. H., KOSHINO, H., KIM, Y. H., KIM, W. G., Verticillin G, a new antibacterial compound from *Bionectra byssicola*. The Journal of Antibiotics, 2007, **60**, 61-64.

ZHOU, X., ZHAO, A., GOPING, G., HIRSZEL, P., Gliotoxin-induced cytotoxicity proceeds *via* apoptosis and is mediated by caspases and reactive oxygen species in LLC-PK1 cells. Toxicological Sciences, 2000, **54**, 194-202.

ZHU, F. AND LIN, Y., Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea.

Métabolites fongiques d'une nouvelle espèce de *Penicillium* marin : déréplication, isolement, caractérisation, hémisynthèse et évaluation pharmacologique sur ostéosarcomes

Résumé

Dans une précédente étude, la purification par biosuivi d'un extrait de Penicillium ligerum, une nouvelle espèce fongique d'origine marine, avait mené à l'isolement de la ligérine. Ce mérosesquiterpène chloré analogue de la fumagilline présente in vitro une activité antiproliférative sélective sur différentes lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains et murins et une activité antitumorale in vivo dans un modèle murin d'ostéosarcome. Dans ce contexte, le travail a porté sur la synthèse d'analogues de ligérine afin de trouver le meilleur candidat bioactif. Bien qu'aucun des analogues hémisynthétiques n'ait présenté une activité plus importante que la ligérine, les résultats ont permis une meilleure compréhension des relations structure-activité des composés de cette série chimique. L'évaluation pharmacologique de la ligérine a été poursuivie en comparaison avec le TNP-470, composé de référence et a montré la sélectivité supérieure de la ligérine sur lignées humaines avec une toxicité moindre. Parallèlement, afin de décrire la nouvelle espèce fongique productrice de ligérine, le phénotype, le génotype et le métabolome de quatre souches de P. ligerum ont été comparés. Différentes approches ont été sollicitées pour l'étude du métabolome: l'isolement et l'identification structurale de métabolites majoritaires et l'étude déréplicative par analyses LC-UV/DAD-HRMS/MS des empreintes métaboliques des quatre souches cultivées sur différents milieux. En utilisant, un modèle de fragmentation du noyau sesquiterpène, des analogues naturels de la ligérine ont aussi pu être recherchés permettant la mise en évidence de plusieurs nouveaux composés de cette série chimique.

Mots clés :micromycètes marins, ligérine, fumagilline, antiprolifératif, ostéosarcomes, hémisynthèse, déréplication, LC-HRMS/MS

Metabolites of a new species of marine-derived fungi: dereplication, isolation, structural characterization, semisynthesis and pharmacological evaluation against osteosarcoma

Summary

In a previous study, bioguided fractionation of an extract of a marine-derived strain belonging to the new species Penicillium ligerum, led to the isolation of ligerin. This chlorinated merosesquiterpene analog of fumagillin exhibited a specific antiproliferative activity against osteosarcoma cell lines and in vivo antitumor activity in a murine osteosarcoma model. In this context, the work first falls within a semisynthetic approach of ligerin analogs in order to develop the best anti-osteosarcoma candidate. Although none exhibits a higher activity than ligérine, the results allow a better understanding of the structure activity behaviour of compounds in this chemical series. Pharmacological investigation of ligerin was then performed in comparison to TNP-470, reference compound and underlined the better selectivity of ligerin against human cell lines with a low toxicity. At the same time, in order to describe the new species producer of ligerin, phenotype, genotype and metabolome of four strains belonging to P. ligerum were compared. Different approaches were used to study the metabolome: isolation and structural identification of some metabolites and LC-HRMS/MS investigation and dereplication of the metabolic fingerprints of the four strains. Using HRMS/MS modelization of the sesquiterpene core, natural analogs of ligerin were also searched, allowing the identification of several new compounds related to ligerin.

Keywords: marine derived fungi, ligerin, fumagillin, antiproliferative, osteosarcoma, semisynthesis, dereplication, LC-HRMS/MS