

ANNÉE 2015

N° 046

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Lydia Genthon

Présentée et soutenue publiquement le 16 Octobre 2015

***Etude et identification des composés
cytotoxiques issus d'un champignon
de la forêt boréale québécoise.***

Président : M. Pascal Marchand, Professeur de Chimie Organique,
Université de Nantes

Membres du jury : M. Marc-Antoine Bazin, Maître de Conférences en Chimie
Thérapeutique, Université de Nantes

M. Olivier Grovel, Maître de Conférences en Pharmacognosie,
Université de Nantes

Mme Marylène Chollet-Krugler, Maître de Conférences en
Chimie Analytique, Université de Rennes

Remerciements

A Monsieur Pascal Marchand, Professeur des Universités, pour l'honneur que vous me faites de présider le jury de cette thèse, je vous adresse l'expression de ma considération.

A Monsieur Marc-Antoine Bazin, mon directeur de thèse, Maître de Conférences. Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse et de la juger. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien et votre gentillesse. Vous trouverez ici mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur Olivier Grovel, pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury. Merci également pour l'intérêt porté à mon travail, mais aussi pour vos enseignements qui m'ont transmis une passion certaine pour les ressources naturelles et leur place en santé.

A Madame Marylène Chollet-Krugler, pour avoir accepté de prendre part à ce jury.

Mes remerciements s'adressent également :

A Monsieur André Pichette, directeur du laboratoire Laseve, merci de m'avoir permis de réaliser ce stage très formateur au sein du laboratoire Laseve. Et à tous les collaborateurs du laboratoire Laseve qui m'ont conseillée et accueillie au sein du laboratoire.

A Monsieur Patrice Le Pape, qui m'a encouragée et m'a aidée à trouver ma voie lors de ma troisième année d'étude en pharmacie.

A ma famille. Un immense merci pour m'avoir permis d'aller au bout de mes études et de me réaliser dans les domaines qui me passionnent. Merci pour leur ouverture d'esprit, leurs soutiens moral et financier sans lesquels je n'aurais pu arriver jusqu'ici.

A celui qui partage désormais ma vie pour son soutien sans faille, ses encouragements, sa patience et son affection. Merci d'être là dans les meilleurs comme dans les pires moments.

A mes amis, pour tous les moments de joie et de bonheur mais aussi pour les moments plus difficiles. Je souhaite remercier tout particulièrement Hélène Marsac, Eve-Marie Takoudju et Claire Crucis, merci pour vos conseils et votre soutien.

Table des matières

Liste des Figures.....	iv
Liste des Tableaux.....	viii
Liste des Abréviations.....	ix
Liste des Annexes.....	x
I – Introduction.....	1
A – La forêt boréale, une richesse naturelle.....	1
B – Le cancer – contexte mondial	2
C – Les substances naturelles : utilisation thérapeutique.....	4
1 – Les grandes découvertes.....	4
2 – Place du règne fongique en thérapeutique.....	5
D – La classe des phénoxazones – molécules d'intérêt.....	6
1 – L'actinomycine D.....	6
2 – Les autres molécules actives.....	7
E – Contexte de l'étude phytochimique et biologique des extraits du champignon étudié.....	10
1 – Caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées.....	10
2 – Caractéristiques biologiques des phénoxazones étudiées.....	11
3 – Champignon étudié.....	12
II - Etude phytochimique du champignon PP02057A.....	14
A – Généralités sur les différentes techniques de séparation.....	14
B - Techniques de détection et d'identification structurale utilisées.....	19
C – Choix du champignon étudié.....	23
D – Choix de la méthode d'extraction.....	23
1 – Procédés et solvants d'extraction.....	23
2 – Résultats et discussion.....	24

E – Première technique de séparation : Chromatographie sur colonne Diaion®	
HP-20.....	28
1 – Généralités.....	28
2 – Résultats et discussion.....	28
F – Deuxième technique de séparation : Chromatographie flash.....	30
1 – Généralités.....	30
2 – Résultats et discussion.....	30
G – Troisième technique de séparation : CLHP préparative.....	32
1 – Généralités.....	32
2 – Résultats et discussion.....	32
H – Quatrième technique de séparation : Colonne basse pression.....	36
1 – Généralités.....	36
2 – Résultats et discussion.....	36
III – Conclusion.....	42
Références.....	44
Annexes.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des cancers chez l'homme et chez la femme en France.....	3
Figure 2 : Répartition des cancers chez l'homme et chez la femme au Canada.....	3
Figure 3 : Répartition des médicaments anticancéreux en fonction de leur origine.....	4
Figure 4 : Structure de l'actinomycine D.....	7
Figure 5 : Composés d'origine naturelle à squelette phénoxazone.....	8
Figure 6 : Structure de la molécule d' <i>o</i> -aminophénol.....	9
Figure 7 : Exemple de synthèse des phénoxazones au moyen de laccases (R = CO ₂ H, SO ₃ H, SO ₂ NH ₂ , SO ₂ NHR, PO ₃ H ₂).....	9
Figure 8 : Molécules d'intérêt dérivées de l'acide cinnabarinique.....	10
Figure 9 : Spectres d'absorption UV/visible de différentes molécules de la classe des phénoxazones après séparation CLHP.....	11
Figure 10 : Etapes d'utilisation d'une CCM.....	16
Figure 11 : Représentation de l'élution d'un mélange au moyen d'une chromatographie sur colonne ouverte.....	17
Figure 12 : Représentation schématique d'un appareil de chromatographie liquide haute performance.....	18
Figure 13 : Exemple d'un mécanisme de silylation.....	19
Figure 14 : Schéma de fonctionnement d'un détecteur à barrette de diodes.....	20
Figure 15 : Schéma du principe de la spectrométrie de masse.....	21
Figure 16 : Représentation de l'alignement des spins nucléaires à un champ magnétique B ₀ induit.....	22
Figure 17 : Montage Soxhlet.....	24

Figure 18 : Extraction du champignon, masses obtenues et rendements.....	24
Figure 19 : CCM des trois extraits avec les trois solvants testés : hexane (α), éthanol/eau 50:50 (β) et éthanol 95% (δ) révélé avec H_2SO_4 visionné en visible (gauche) et en UV (365nm) (droite). (milieu : chloroforme/méthanol 10:1 + 0,1% acide formique).....	25
Figure 20 : Chromatogramme de la fraction extraite avec l'hexane (α). (λ =254nm).....	26
Figure 21 : Chromatogramme de la fraction extraite avec éthanol/eau 50:50 (β) montrant la présence de molécules au profil type phénoxazone avec un spectre UV/Visible typique. ($\lambda = 254nm$).....	26
Figure 22 : Chromatogramme de la fraction extraite avec éthanol 95% (δ) montrant la présence de molécules de type phénoxazone par un spectre UV/Visible typique. (λ = 254nm).....	27
Figure 23 : Comparaison des profils β et δ aux mêmes échelles mettant en évidence la présence de molécules aux spectres UV/visible similaires. ($\lambda = 254nm$).....	27
Figure 24 : Représentation des 5 fractions obtenues après élution.....	28
Figure 25 : Chromatogramme de la fraction la plus active (F) avec présence de molécules ayant le spectre UV/visible typique des molécules dérivées de l'acide cinnabarinique. ($\lambda = 254nm$).....	29
Figure 26 : Chromatogramme de la fraction E avec présence de molécules ayant le spectre UV/visible typique des molécules dérivées de l'acide cinnabarinique. ($\lambda =$ 254nm).....	30
Figure 27 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction E au moyen d'une colonne de silice.....	31
Figure 28 : CCM des fractions obtenues après rassemblement des fractions obtenues après séparation par colonne de gel de silice avec dépôt de la fraction initiale en milieu de CCM. (éluant : toluène/acétate d'éthyle 10:1).....	31
Figure 29 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction F au moyen d'une colonne CLHP préparative.....	32

Figure 30 : Profil de séparation des pics collectés avec la CLHP préparative. ($\lambda = 455\text{nm}$).....	33
Figure 31 : Profil de séparation des pics collectés avec la CLHP préparative. ($\lambda = 254\text{nm}$).....	33
Figure 32 : Chromatogramme de la fraction F2 montrant le spectre UV/visible spécifique des phénoxazones et le spectre MS montrant un m/z 287,1 [M-H] ⁻ correspondant à la cinnabarine.....	34
Figure 33 : Chromatogramme de la fraction F4 montrant le spectre UV/visible spécifique des phénoxazones et le spectre MS montrant un m/z 300,9 [M-H] ⁻ correspondant à l'acide cinnabarinique.....	35
Figure 34 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction β au moyen d'une colonne basse pression.....	36
Figure 35 : Chromatogramme de la fraction β_4 aux longueurs d'onde 254nm, 300nm et 435nm et spectre MS [M-H] ⁻	37
Figure 36 : Agrandissement de la portion d'un chromatogramme de la fraction β_4 montrant les spectres UV/visible des différents composés d'intérêt. ($\lambda = 435\text{nm}$).....	38
Figure 37 : Agrandissement de la portion d'un chromatogramme de la fraction β_4 montrant les données MS permettant de déterminer quel pic correspond à quelle molécule.....	39
Figure 38 : Comparaison des chromatogrammes de la fraction β_4 et de la fraction de lavage. ($\lambda = 254\text{nm}$).....	40
Figure 39 : Comparaison des chromatogrammes des fractions β , β_4 et de lavage. ($\lambda = 254\text{nm}$).....	41
Figure 40 : Résultat du champignon après broyage.....	47
Figure 41 : Image des trois ballons après extractions avec de gauche à droite : le ballon extrait à l'hexane, à l'éthanol/eau et à l'éthanol.....	47
Figure 42 : Chromatogramme du premier test CLHP montrant que la cinnabarine et l'acide cinnabarinique ne sont pas séparés. ($\lambda = 254\text{nm}$).....	50

Figure 43 : CCM des fractions obtenues par séparation avec la colonne Diaion.....	51
Figure 44 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement des fractions 1 à 5.....	53
Figure 45 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement des fractions 5 et 6.....	53
Figure 46 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement de la fraction 7 avec dépôt de la fraction initiale E.....	54
Figure 47 : CCM des tubes 1 à 8 obtenus après la basse pression avant regroupement des fractions β 1 à β 4.....	56
Figure 48 : CCM C18 des 4 fractions obtenues par basse pression. (éluant : méthanol/eau 6:4 + 0,1% acide formique. Révélateur : H ₂ SO ₄ visualisé à 365nm).....	56
Figure 49 : RMN ¹ H (400MHz, MeOH-d ₄) fraction A : monosaccharide.....	59
Figure 50 : Agrandissement RMN ¹ H fraction A : monosaccharide.....	60
Figure 51 : RMN ¹³ C (400MHz, MeOH-d ₄) fraction A : monosaccharide.....	61
Figure 52 : Diagramme récapitulatif.....	62

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Cl ₅₀ obtenues lors de la première extraction du champignon.....	23
Tableau 2 : Cl ₅₀ des extraits du champignon obtenus avec trois solvants différents.....	25
Tableau 3 : Cl ₅₀ des fractions obtenues avec la colonne Diaion.....	29
Tableau 4 : Cl ₅₀ des fractions obtenues avec la colonne de silice.....	31
Tableau 5 : Cl ₅₀ des pics collectés par la méthode de la CLHP préparative.....	34
Tableau 6 : Cl ₅₀ des fractions obtenues avec la colonne basse pression.....	37
Tableau 7 : Cl ₅₀ des fractions β , β_4 et de lavage.....	41
Tableau 8 : Tests de CCM avec différentes phases mobiles sans révélateur à 365nm.....	48
Tableau 9 : Tests CCM avec différentes phases mobiles révélées au NP/PEG visualisées à 365nm.....	49
Tableau 10 : Tests CCM avec la même phase mobile mais des révélateurs différents.....	49
Tableau 11 : Correspondance solvant-fraction.....	52

Liste des Abréviations

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DAD	Diode Array Detector (DéTECTEUR à barrette de diodes)
DCI	Dénomination Commune Internationale
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
MS	Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Dodécylsulfate de sodium

Liste des annexes

Annexe I – Partie expérimentale.....	47
Annexe II – Tests biologiques.....	57
Annexe III – Données spectrales : monosaccharide.....	59
Annexe IV – Diagramme récapitulatif.....	62

I – Introduction

A – La forêt boréale, une richesse naturelle

La forêt boréale canadienne est la deuxième plus grande forêt boréale planétaire. C'est l'une des dernières grandes forêts restée intacte et elle recouvre plus de la moitié des terres canadiennes. Avec une surface de 270 millions d'hectares, elle joue un rôle de stockage du carbone et intervient dans la régulation du climat mais aussi la purification de l'air et de l'eau. Elle constitue ainsi une véritable richesse.

Réservoir écologique, elle renferme une grande variabilité biologique et génétique autant au niveau de sa faune que de sa flore. En effet, on y trouve une faune adaptée avec des grands mammifères tels que des ours grizzlis et des caribous mais aussi de nombreux oiseaux, insectes et bon nombre de micro-organismes. La flore qui constitue la forêt est majoritairement composée d'épinettes, de sapins, de bouleaux, de pins et de peupliers.

Elle constitue aussi une zone de vie et de travail notamment pour les peuples autochtones pour qui la forêt a une grande importance spirituelle, culturelle et économique. En effet, elle est utilisée depuis toujours par ces peuples pour subvenir à leurs besoins matériels, alimentaires mais aussi médicaux. La médecine traditionnelle autochtone est d'ailleurs encore utilisée de façon majoritaire dans ces communautés. Comme dans de nombreuses sociétés où les médecines traditionnelle et conventionnelle coexistent, la place et la pertinence de chacune est parfois difficile à admettre et donc à accepter. ¹

Au Canada, la forêt fait partie intégrante du patrimoine, de la culture, de l'économie et de l'environnement. Conscients de cette richesse et de son aspect essentiel et soucieux de la préserver, les gouvernements fédéraux, provinciaux et territoriaux en réglementent l'accès. Un aménagement forestier durable a été mis en place permettant de gérer la forêt assurant ainsi sa santé, sa sécurité et son développement. Des lois ont été mises en place assurant par exemple la protection de la faune et des droits ancestraux ou encore empêchant l'exploitation illégale des forêts. Ces mesures permettent de concilier deux concepts qui peuvent sembler antagonistes ; assurer un avenir pérenne pour cette forêt tout en l'exploitant de diverses manières : industrie du bois, énergie hydroélectrique, exploitations minières, tourisme...²

1 Trousse d'enseignement de l'Association forestière canadienne « La forêt boréale : un héritage mondial ». consulté le 3 juin 2015 (http://www.canadianforestry.com/kits/francais/vol7_f.pdf/02_heritage_mondial.pdf)

2 Gouvernement du Canada « La forêt boréale au Canada » consulté le 3 juin 2015 (<https://www.rncan.gc.ca/forets/boreale/13072>)

Cette forêt constitue néanmoins une ressource non négligeable de produits naturels qui renferment potentiellement de nouveaux actifs. Dans ce contexte, des recherches sont effectuées notamment sur le thé du Labrador, les épinettes...L'industrie pharmaceutique est aujourd'hui à la recherche de nouvelles molécules pour pallier aux grandes pathologies actuelles telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives ou encore le cancer.

B – Le cancer – contexte mondial

Selon le World Cancer Report, avec 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès en 2012, le cancer est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. Selon les prévisions, une augmentation de 75% des cas devrait avoir lieu dans les deux décennies à venir engendrant ainsi l'apparition de 25 millions de cas.

Aujourd'hui, les pays développés sont les plus touchés en particulier par quatre types de cancers que sont les cancers du poumon, du sein, de la prostate et colorectal. Mais un diagnostic précoce, une prise en charge rapide et adaptée permettent de réduire le nombre de décès. Les pays les moins développés sont plutôt touchés par des cancers d'origine virale dont les principaux agents responsables sont les virus de l'hépatite B, de l'hépatite C et le papillomavirus humain. Le cancer du col de l'utérus est d'ailleurs le premier cancer chez la femme dans ces pays.

L'apparition des cancers est souvent liée à la présence de facteurs de risques environnementaux, comportementaux et alimentaires. La répartition de l'origine des cancers varie en fonction de l'état de développement du pays. En effet, dans les pays les plus développés, les causes seront plutôt liées à l'obésité et à la sédentarité. Pour les populations des pays d'Asie et d'Afrique, les causes sont liées à des maladies chroniques mais aussi à l'exposition à des carcinogènes tels que les aflatoxines. La consommation d'alcool, l'exposition au soleil et aux environnements pollués tels que ceux des grandes villes, sont aussi des facteurs de risques.

Le tabagisme est néanmoins le facteur de risque le plus important toutes zones confondues, responsable de 20% des décès par cause de cancer et 70% de mortalité par cancer du poumon.

Des facteurs génétiques entrent aussi en considération. Ils sont responsables de la variation de sensibilité d'un individu à un autre. De même, le vieillissement est un facteur primordial et l'augmentation d'occurrence dans les populations plus âgées est évidente, attribuable au fait que les mécanismes de réparation des anomalies génétiques perdent de l'efficacité avec l'âge.³

³ Internationale Agency for Research on Cancer – World Health Organization - World Cancer Report 2014 : 1-16

Selon l'OMS, en 2014 en France, environ 30% des décès sont imputables au cancer (Figure 1). Les principaux facteurs de risques en cause recensés sont, dans l'ordre, le tabagisme, la sédentarité et l'obésité. Au Canada la proportion de décès liés au cancer est équivalente (Figure 2) et les facteurs de risque en cause sont, dans l'ordre, l'obésité, la sédentarité et le tabagisme. ⁴

Face à cette situation critique, les différents gouvernements ont pris en considération cette épidémie en mettant en place des plans de lutte contre le cancer, des suivis et des surveillances ainsi que des politiques de prévention, de dépistage et de détection précoce.

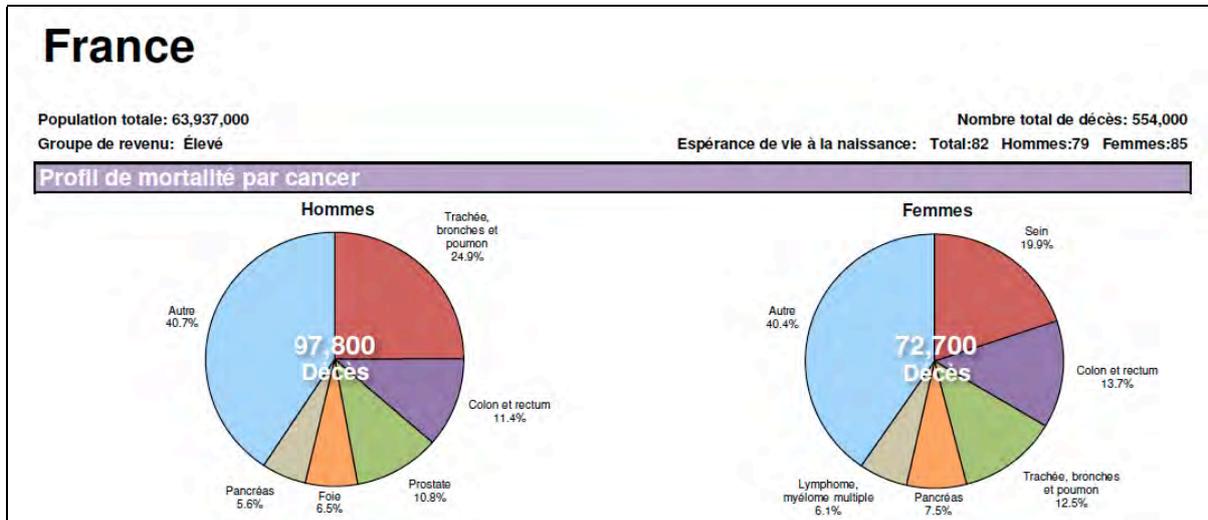


Figure 1 : Répartition des cancers chez l'homme et chez la femme en France.

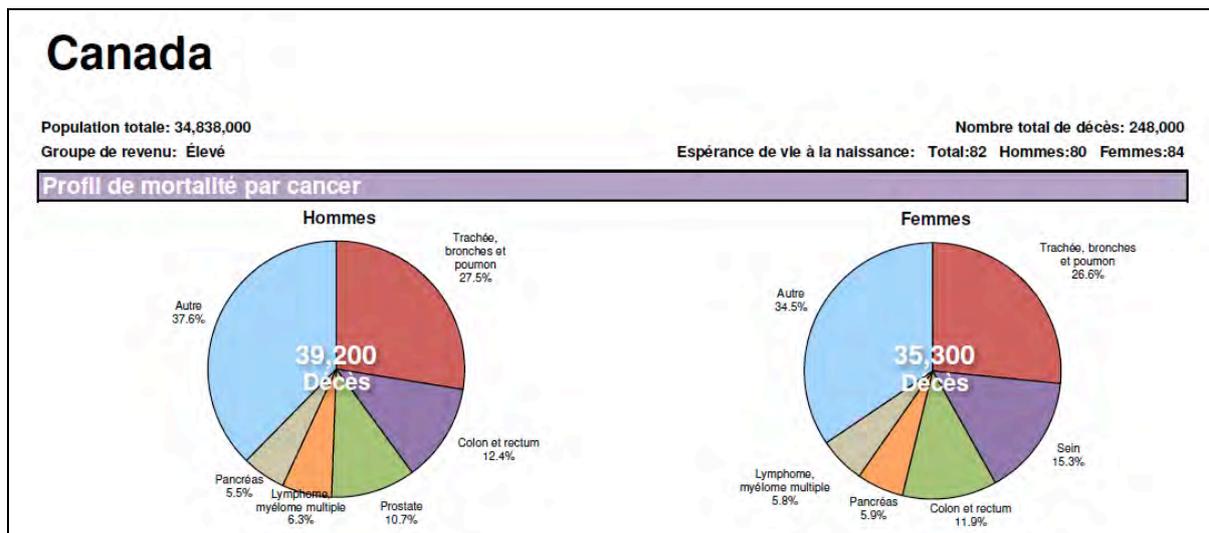


Figure 2 : Répartition des cancers chez l'homme et chez la femme au Canada.

⁴ Organisation Mondiale de la Santé – Profil des pays pour le cancer, 2014

De nombreux traitements contre le cancer sont utilisés aujourd'hui. Plusieurs stratégies anticancéreuses existent, les plus classiques étant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. De nouvelles voies sont aussi explorées telles que la stimulation des défenses immunitaires, l'inhibition de l'angiogenèse, le rétablissement de l'apoptose ou encore l'induction de la redifférenciation cellulaire.

Aujourd'hui en chimiothérapie anticancéreuse, environ 61% des médicaments sont d'origine naturelle (Figure 3). Il existe de nombreux exemples d'anticancéreux d'origine naturelle avec des mécanismes d'action différents tels que les camptothécines, les podophylotoxines et les vinca-alcaloïdes qui sont d'origine végétale. La nature est donc une bonne source de découverte de molécules anticancéreuses. ⁵

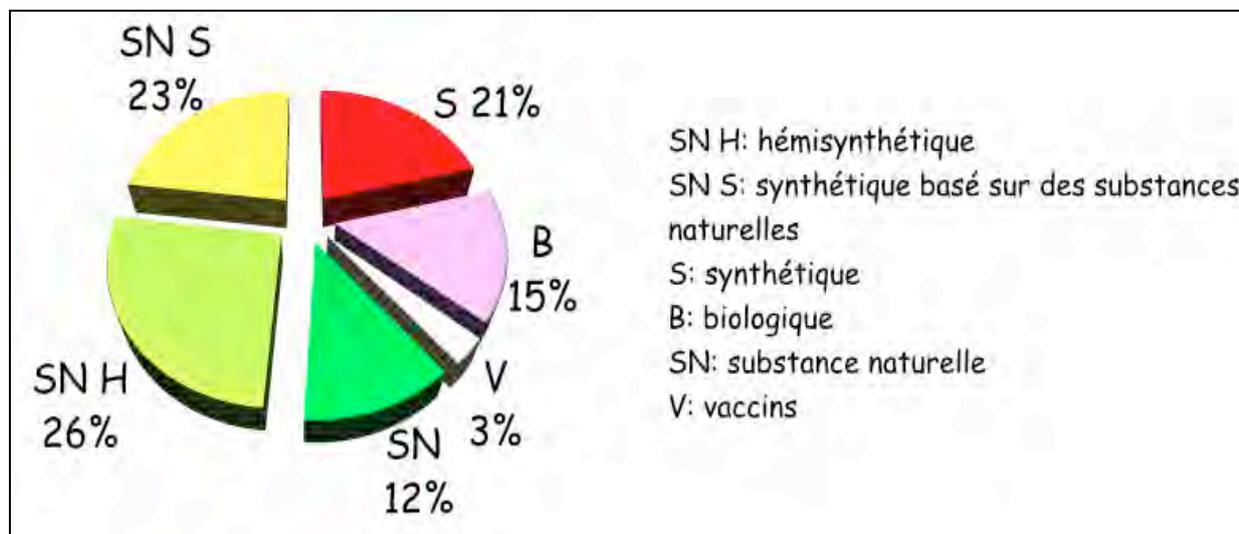


Figure 3 : Répartition des médicaments anticancéreux en fonction de leur origine.

C – Les substances naturelles : utilisation thérapeutique

1 – Les grandes découvertes

Depuis la préhistoire, l'homme a recours à la nature pour se soigner. En effet, d'origine végétale ou animale, les substances naturelles renferment une infinité de molécules qui s'avèrent parfois intéressantes pour l'homme, notamment en thérapeutique.

Près de 60% des médicaments utilisés aujourd'hui ont une origine naturelle ou sont synthétisés à partir de produits naturels. Ainsi, on peut traiter des pathologies allant des plus simples aux plus importantes à partir de « remèdes » issus de la nature.

De nombreuses molécules, découvertes et utilisées depuis longtemps ont une place cruciale dans la médecine moderne telles que l'acide acétylsalicylique, la quinine ou encore la morphine isolées respectivement de l'écorce de saule, de quinquina et de la capsule de pavot.

⁵ Taxoïdes anticancéreux, Cours M2, Dr. Joëlle Dubois, ICSN, Paris sud, 2015

Des découvertes plus récentes mais tout aussi importantes ont des intérêts remarquables. Parmi ces grandes découvertes, on peut citer le taxol, issu de l'if du pacifique qui a permis de découvrir le Taxotère®, qui fait partie des anticancéreux les plus utilisés en chimiothérapie.

D'autres molécules sont encore à l'étude telles que la mambalgine issue du venin du mamba noir qui a un effet antalgique ou encore les acétogénines des *Anonaceae*, anticancéreux potentiels. ⁶

Au-delà du monde terrestre, de nouveaux axes de recherche sont développés autour du monde marin. Moins facile d'accès, il a été moins exploré et est donc moins connu.

Le milieu marin est peuplé de plusieurs millions d'espèces animales, végétales et microbiennes et renferme donc un potentiel en terme de diversité biomoléculaire avec des structures chimiques originales et des propriétés biologiques puissantes. Les difficultés rencontrées dans le monde marin sont multiples. Premièrement l'identification de l'organisme producteur de la molécule d'intérêt. En effet, il peut s'agir d'un micro-organisme symbiotique à l'organisme étudié initialement. Le deuxième problème qui se pose est celui de l'approvisionnement. Les molécules sont synthétisées en très faibles quantités et l'organisme responsable est très souvent difficile à cultiver. Du fait de leur faible quantité mais aussi de leur dilution dans le milieu marin, les molécules découvertes sont souvent très actives et donc toxiques. Cependant, certains produits sont commercialisés tels que l'immunocyanine, issue d'un mollusque et utilisée dans le traitement des carcinomes vésicaux ou encore les céphalosporines issus d'un champignon marin et utilisées comme antibiotiques. D'autres molécules issues du monde marin sont à l'étude telles que la squalamine, issue du cartilage de requin et étudiée pour son efficacité dans le cancer du poumon.⁷

2 – Place du règne fongique en thérapeutique

Les champignons constituent un règne à part entière. Ni végétaux, ni animaux, ils sont utiles de bien des manières. Les champignons ont certes un intérêt alimentaire, mais ils sont aussi utiles dans la transformation des déchets agricoles, industriels et ménagers. A l'échelle industrielle, ils sont utilisés dans les fermentations alimentaires mais aussi pour la production de métabolismes primaires et secondaires et d'enzymes de biotransformation.⁸ Si certains champignons sont comestibles, d'autres sont toxiques, parasites de l'homme ou considérés comme des moisissures. ⁹

⁶ Médicaments, l'officine de la nature (2013) *Science et santé* 13 : 27-37

⁷ J-Y. Mérour (2004) La mer, source de molécules bioactives, *Science* 3 : 15-22

⁸ Atthasampunna P., Chang S.T. (1994) Mushroom's Magic, *Le courrier de l'Unesco* 17 (6) :16-16

⁹ Botton B. *et al* (1985) Moisissures utiles et nuisible. Importance industrielle

De nombreuses molécules ont été isolées et identifiées, les plus connues étant :

- les aflatoxines : isolées notamment d'*Aspergillus flavus*, ce sont des molécules à fort pouvoir cancérigène (action par formation d'adduits à l'ADN),
- la psilocybine : isolée notamment de *Psilocybe mexicana*, considérée comme hallucinogène (action sur les récepteurs sérotoninergiques),
- la muscarine : isolée d'*Amanita muscaria*, elle est très toxique et provoque un syndrome muscarien (action sur les récepteurs cholinergiques muscariniques),
- les pénicillines : isolées du genre *Penicillium*, antibiotique de la famille des β -lactamines (action sur la paroi cellulaire bactérienne).

Les macromycètes ainsi que les micromycètes ont un potentiel en terme de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Néanmoins, elles se révèlent parfois toxiques pour l'homme.

D – La classe des phénoxazones – molécules d'intérêt

1 – L'actinomycine D

L'actinomycine D est à l'origine un antibiotique isolé d'une bactérie du genre *Streptomyces*. Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques identiques reliées à un noyau phénoxazone (Figure 4). Cette structure lui permet de s'insérer au niveau des bases (G-C).(G-C) de l'ADN, empêchant ainsi l'action de l'ADN polymérase et donc la synthèse de l'ARN. De par son pouvoir antimitotique, elle est désormais utilisée comme anticancéreux notamment dans le traitement du rhabdomyosarcome, des tumeurs des testicules ou encore du neuroblastome. Cependant, l'actinomycine D a montré un manque de sélectivité et une activité cytotoxique certaine. L'activité anticancéreuse de l'actinomycine D repose sur la capacité du cycle phénoxazone à fixer de manière spécifique l'ADN. La modification des acides aminés des cycles peptidiques engendre soit une diminution de l'activité soit une activité moindre de la molécule. Une légère modification sur les acides aminés modifie le taux de diffusion dans différents types de cellules et permet de générer une spécificité vis-à-vis certaines cellules cancéreuses.^{10 11}

10 Huifen C. *et al* (1996) DNA Bending and Unwinding Associated with Actinomycin D Antibiotics Bound to Partially Overlapping Sites on DNA, *Journal of Molecular Biology* 258 : 475-479

11 Takusagawa F. *et al* (2001) Anti-leukemia selectivity in actinomycin analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 : 719-725

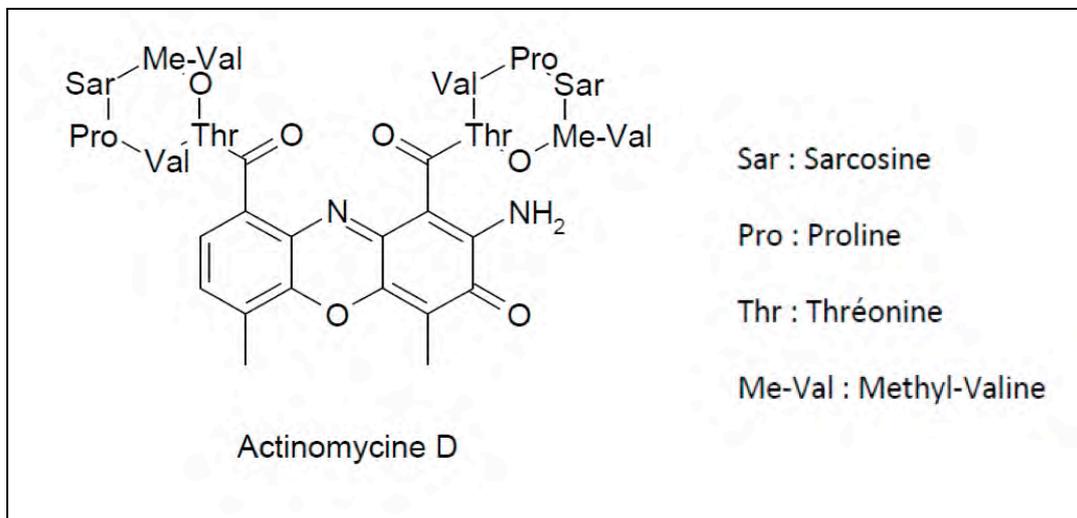


Figure 4 : Structure de l'actinomycine D.

Au sein de l'organisme humain, la protéine p53 est codée par un gène suppresseur de tumeurs. Cette protéine est activée de façon spécifique lors d'un stress dans la cellule. Une fois activée, cette protéine va intervenir, soit en inhibant la prolifération de la cellule touchée, permettant ainsi sa réparation, soit en engendrant l'apoptose si la cellule est trop atteinte, empêchant ainsi sa multiplication. Cette protéine joue donc un rôle fondamental dans l'apparition du cancer. Une équipe de recherche a montré que l'actinomycine D, à faible dose, permettait de stimuler l'activation de la protéine p53 et donc d'augmenter l'efficacité du traitement antitumoral.^{12 13}

2 – Les autres molécules actives

Les molécules ayant un squelette de type phénoxazone sont répandues dans la nature et connues pour avoir des activités biologiques.

Ces molécules ont été isolées et identifiées à partir de différents organismes tels que des champignons, des bactéries et des invertébrés. Parmi ces molécules, les elloxazinones **(1)** isolées de *Streptomyces griseus* ont montré une activité antitumorale intéressante. D'autres molécules telles que la grixazone A **(2)**, la questiomycine A **(3)** ou encore les bezerramycines **(4)** ont aussi été isolées de bactéries du genre *Streptomyces* (Figure 5).¹⁴

¹⁵

12 Institut National de la santé et de la recherche médicale « Protéine p53 : le bon timing pour éviter le cancer » consulté le 10 septembre 2015 (<http://www.inserm.fr/espace-journalistes/proteine-p53-le-bon-timing-pour-eviter-le-cancer>)

13 Zajkowicz A. *et al* (2015) Actinomycin D and nutlin-3a synergistically promote phosphorylation of p53 on serine 46 in cancer cell lines of different origin, *Cellular Signalling* 27 : 1677–1687

14 Pasceri R. *et al* (2013) Aminophenoxazinones as Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO). Synthesis of Exfoliazone and Chandrananimycin A, *Journal of Medicinal Chemistry* 56 : 3310-3317

15 Graf E. *et al* (2007) Elloxazinones A and B, New Aminophenoxazinones from *Streptomyces griseus* Acta 2871, *Journal of antibiotics* 60 (4): 277–284

Il semblerait que ces molécules, du fait de leur similarité de structure, aient un mécanisme d'action similaire. Leur activité cytotoxique est due à leur propriété d'intercalant de l'ADN. En effet, tout comme l'actinomycine D, la présence d'un squelette aromatique plan constitué de 3 ou 4 cycles assure l'intercalation des molécules entre des paires de bases spécifiques dans l'ADN. De plus, la présence de substituants amine, sucre ou peptidique favorise l'insertion et la fixation par des liaisons hydrogène dans les grands ou petits sillons.¹⁶

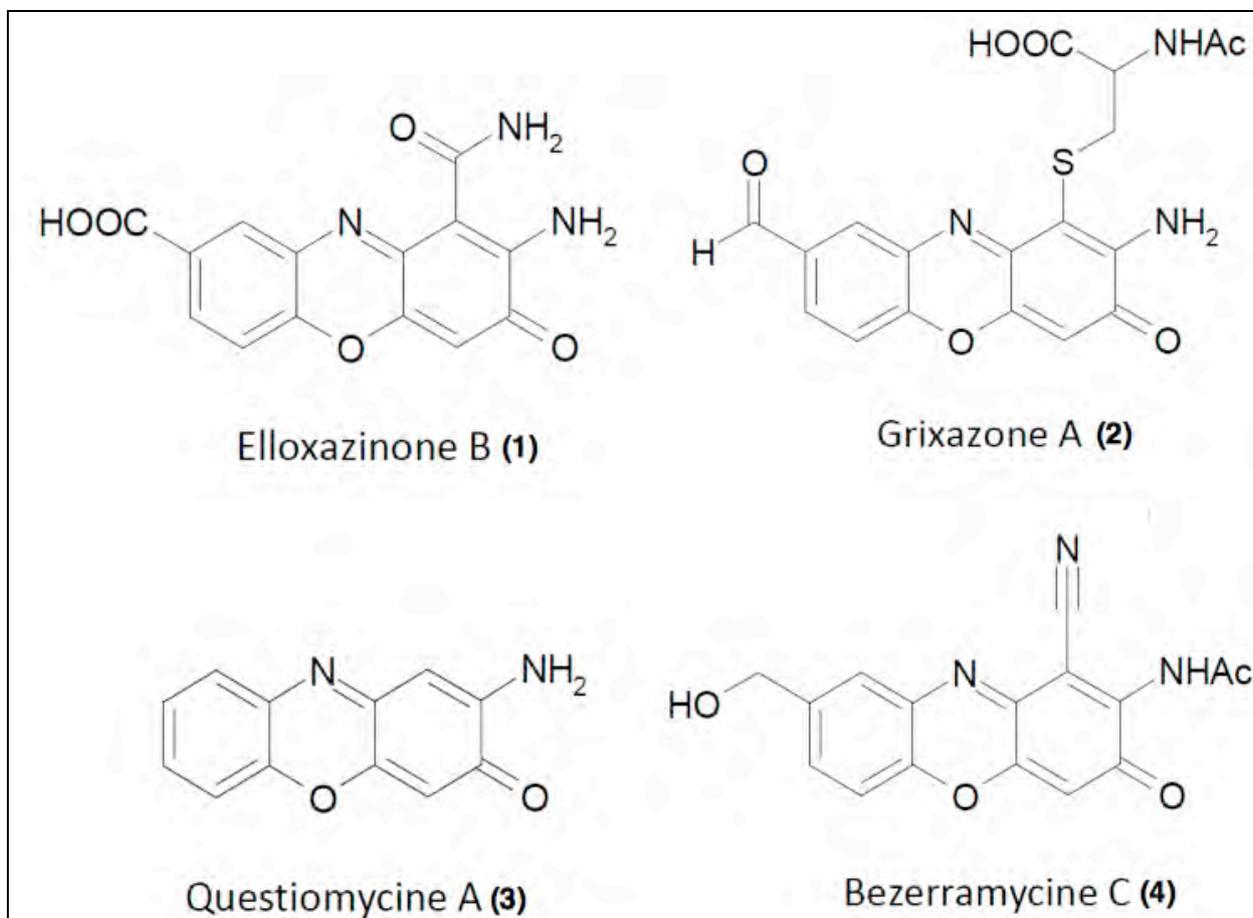


Figure 5 : Composés d'origine naturelle à squelette phénoxazone.

D'un point de vue biogénétique, le possible précurseur commun à toutes ces molécules est l'*o*-aminophénol. Celui-ci subirait différentes réactions telles que des acétylations et des méthylation puis des réactions enzymatiques avec des laccases, des phénoxazinone synthases ou des tyrosinases.

L'équipe de Bruyneel a synthétisé des molécules de ce genre en utilisant des enzymes de type laccase. A partir d'une molécule dérivée de l'*o*-aminophénol (Figure 6) telle que l'acide 3-hydroxyanthranilique, à raison de deux équivalents en présence de laccase, des dimères sont obtenus avec des structures de type squelette phénoxazone (Figure 7).¹⁷

¹⁶ Bendic C., Volanschi E., (2006) Molecular Modeling of the Interaction of Some Phenoxazine – Antitumoral Drugs with DNA, *Internet Electronic Journal of Molecular Design* 5 (6) : 320-330

¹⁷ Bruyneel F. *et al* (2012) Non-symmetrically substituted phenoxazinones from laccase-mediated oxidative cross-coupling of aminophenols: an experimental and theoretical insight, *Organic and Biomolecular Chemistry* 10 :1834-1846

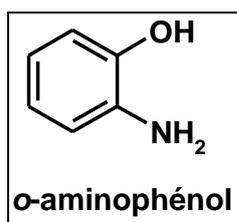


Figure 6 : Structure de la molécule d'o-aminophénol.

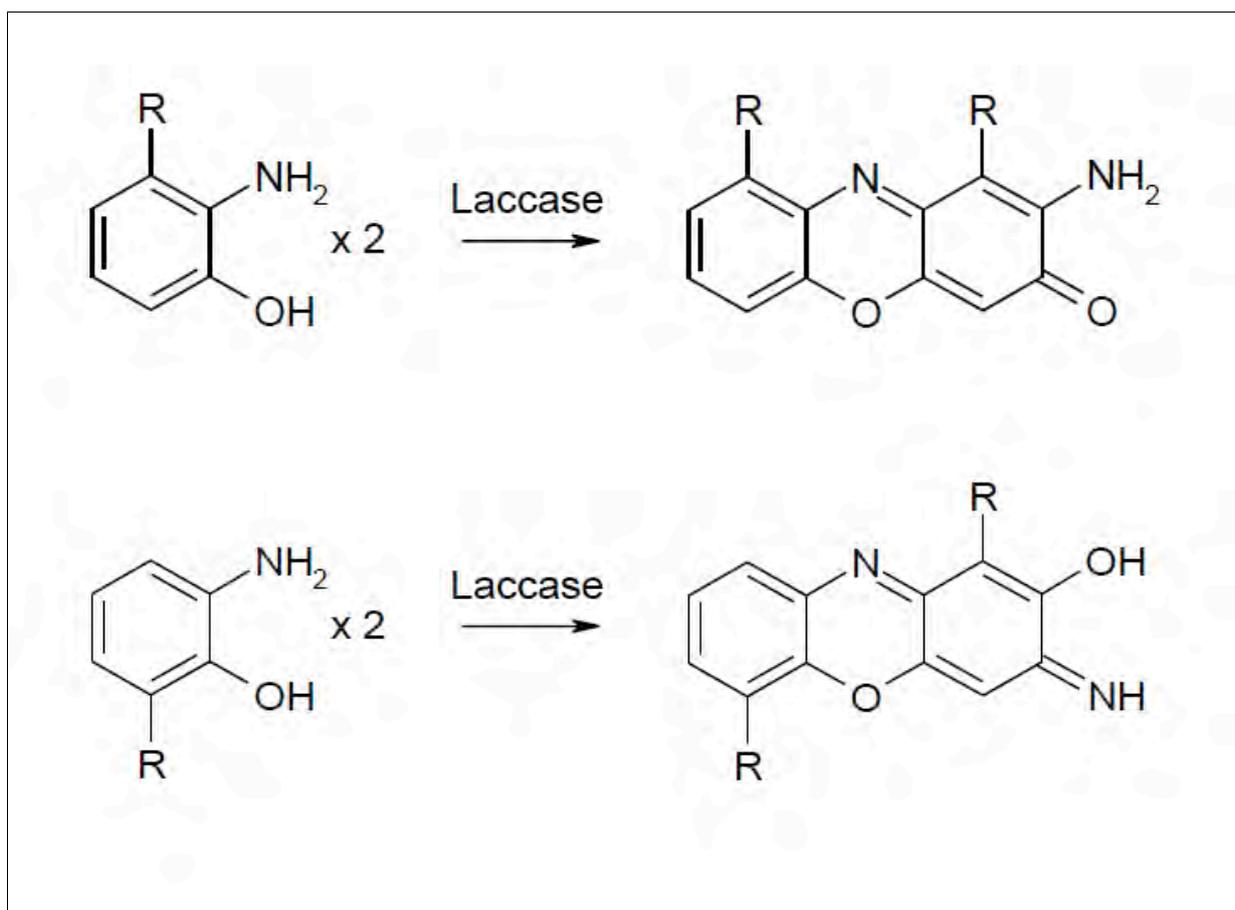


Figure 7 : Exemple de synthèse des phénoxazones au moyen de laccases (R = CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHR, PO₃H₂).

E – Contexte de l'étude phytochimique et biologique des extraits du champignon étudié

1 – Caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées

Les propriétés physico-chimiques qui nous ont intéressées sont surtout celles relatives à l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes et un spectromètre de masse. Ainsi, les propriétés présentées ici sont des informations sur les données HPLC telles que les spectres UV/visible et les spectres de masse.

Les molécules qui nous ont intéressées lors de cette étude sont des phénoxazones dérivées de l'acide cinnabarinique (**5**). Les principales sont la cinnabarine (**6**), le tramesanguin (**7**) et la pycnoporine (**8**) (Figure 8).

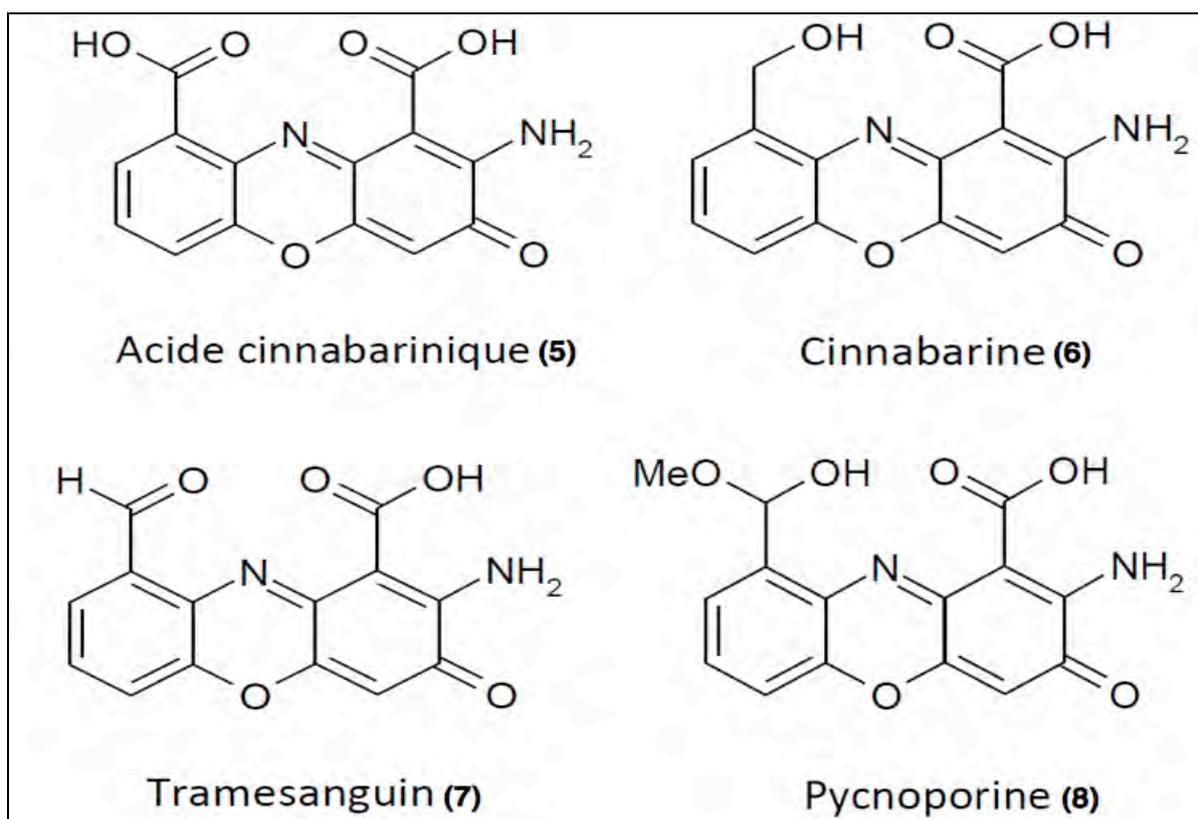


Figure 8 : Molécules d'intérêt dérivées de l'acide cinnabarinique.

Ces molécules sont connues pour être insolubles dans la plupart des solvants organiques et aqueux, ce qui engendre une difficulté pour l'isolement et la séparation.

Les composés isolés se présentent sous la forme d'une poudre de couleur rouge-orangé et ont un spectre d'absorption UV/visible particulier relativement proche entre chaque molécule du fait de leur similarité de structure. Ainsi pour la cinnabarine, le spectre présente des pics d'absorption aux longueurs d'onde λ_{\max} 235, 266, 308, 433 et 451nm (Figure 9). Elles ont un fort pouvoir colorant.

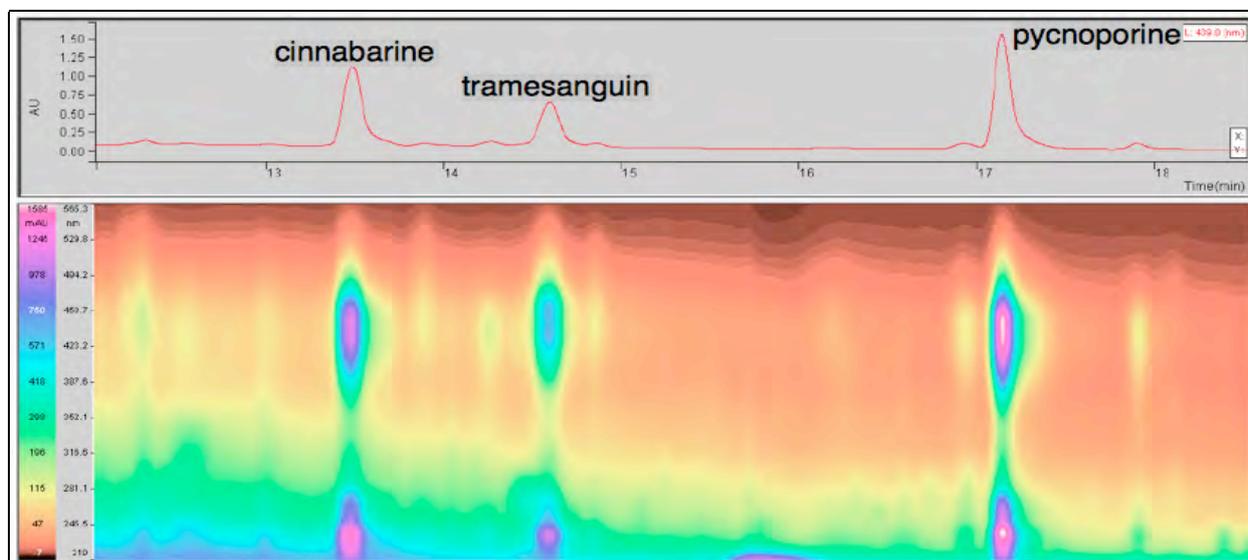


Figure 9 : Spectres d'absorption UV/visible de différentes molécules de la classe des phénoxazones après séparation CLHP.

Les spectres de masse de ces molécules, déterminés par ESI-MS montrent des ions $[M+H]^+$: pour la cinnabarine m/z 287, le tramesanguin m/z 285, l'acide cinnabarinique m/z 301 et la pycnoporine m/z 317,0773 (déterminée par HR-ESI-MS).¹⁸

2 – Caractéristiques biologiques des phénoxazones étudiées

Du fait de la présence d'un squelette phénoxazone dans les molécules d'intérêt, on peut logiquement s'attendre à une activité antitumorale de celles-ci. En effet, les molécules 5, 6, 7 et 8 montrent des activités antiprolifératives sur les cellules leucémiques de souris (lignée P388). La cinnabarine est la plus active avec une CI_{50} de $13\mu M$. C'est la pycnoporine qui est la deuxième plus active avec une CI_{50} de $36\mu M$. L'acide cinnabarinique et le tramesanguin sont moins actifs avec une CI_{50} de $44\mu M$.

Cependant, contrairement à l'actinomycine D qui est très toxique pour l'homme, la cinnabarine ne semble pas montrer de toxicité sur les modèles animaux. Pour une dose de 1 g/mL , la mortalité est nulle.¹⁹

¹⁸ Dias A. D., Urban S., (2009) HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Natural Product Communications* 4 (4) : 489-498

¹⁹ Smânia J. A. *et al* (2003) Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr, *Phytotherapy Research* 17, 1069–1072

La cinnabarine a aussi été étudiée pour son activité antibactérienne. Celle-ci a été évaluée pour 11 souches bactériennes issues de l'alimentation. Parmi ces souches, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont été testées pour leur sensibilité à la cinnabarine et les résultats ont montré une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL et 4,0 mg/mL respectivement. Les souches les plus sensibles se sont avérées être *Bacillus cereus* et *Lactobacillus plantarum* avec une CMI de 0,0625 mg/mL.²⁰

La cinnabarine semble aussi avoir une activité antivirale, notamment sur le virus de la rage.

3 – Le champignon étudié

Pour des raisons de confidentialité, le nom du champignon étudié ne sera pas dévoilé, il sera donc nommé PP02057A.

La cinnabarine, l'acide cinnabarinique et le tramesanguin ont déjà été isolées du champignon PP02057A mais aussi dans d'autres champignons du même genre. Les champignons de ce genre sont connus dans différents pays, de l'hémisphère nord à l'hémisphère sud, pour avoir des usages traditionnels médicaux tels que le traitement des maux de gorges, des infections parasitaires ou encore des hémorragies.^{21 22}

Les études sur le champignon ont montré que selon les solvants d'extraction utilisés, les activités biologiques étaient différentes.

Des tests d'activité anti-oxydante ont été menés par la méthode du DPPH et ont permis de montrer que certains extraits étaient actifs : En particulier, l'extrait acétate d'éthyle s'est avéré intéressant. Contrairement à l'extrait aqueux, les extraits au méthanol et au dichlorométhane ont aussi montré une activité antioxydante bien que moindre.

L'activité anti-inflammatoire a aussi été testée et évaluée en fonction de l'action sur la 5-lipoxygénase. Cette enzyme est responsable de la synthèse de molécules intervenant dans les voies de l'inflammation. Les extraits ont été testés à une concentration de 10 mg/mL. L'extrait acétate d'éthyle est le plus actif mais les extraits au dichlorométhane et au méthanol sont aussi actifs.²³

20 Smânia E. F. A. *et al* (1998) Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products, *Review of Microbiology* 29 (4)

21 Food and Agriculture Organisation of the United Nations « Produits forestiers non ligneux : Champignons comestibles sauvages vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations. » consulté le 3 juin 2015 (<http://www.fao.org/3/a-y5489f.pdf>)

22 Francia C. *et al*, (2007) Activités biologiques des champignons utilisations en médecine traditionnelle, *Annales de la Société d'Horticulture et d'Histoire Naturelle de l'Hérault* 147 (4) : 77-88

23 Dias A. D., Urban S., (2009) HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Natural Product Communications* 4 (4) : 489-498

A partir des études des différentes activités observées sur extraits bruts ou sur molécules isolées, le laboratoire Laseve a décidé de s'intéresser au champignon PP02057A, encore jamais étudié au Canada.

L'objectif de ce stage a donc été de s'intéresser au potentiel anticancéreux du champignon et d'en isoler la ou les molécules responsables. Ces molécules, d'après la littérature, sont supposées être de la famille des phénoxazones, mais une variabilité de la composition chimique du fait de la provenance différente du champignon pourrait révéler la présence d'autres molécules actives.

II - Etude phytochimique du champignon PP02057A

A – Généralités sur les différentes techniques de séparation

L'étude des composés d'un mélange se fait grâce à l'analyse chimique. Cette branche de la chimie permet de caractériser et d'identifier les composés d'un mélange. La chimie analytique se fait au moyen de plusieurs techniques.

La chromatographie est la technique indispensable pour la séparation et l'identification des composés, elle a des applications qualitatives, quantitative et préparative permettant ainsi l'identification, le dosage et la purification. Les techniques de détection et d'identification des composés sont utilisées pour déterminer la présence et la structure des molécules. Les principales utilisées lors de cette étude sont la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire et l'absorption UV-Visible. D'autres techniques de détection peuvent être utilisées telles que la fluorimétrie, l'absorption UV, l'ampérométrie, la conductimétrie... mais elles sont minoritaires.²⁴

La chromatographie est une méthode qui met en jeu des interactions entre les composés d'un mélange étudié, une phase stationnaire et une phase mobile. Ainsi, le mélange est dilué et entraîné dans la phase mobile puis évolue au sein de celle-ci en effectuant des interactions de différents types avec la phase stationnaire.²⁵

On distingue deux principaux types de chromatographies :

- chromatographie en phase liquide (CPL)
 - chromatographie sur couche mince (CCM)
 - chromatographie sur colonne (ouverte ou basse pression)
 - chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP)
- chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Parmi les chromatographies en phase liquide, en fonction des interactions mises en jeu on peut distinguer :

- la chromatographie d'adsorption
- la chromatographie de partage
- la chromatographie d'échange d'ions et de paires d'ions
- la chromatographie chirale
- la chromatographie d'exclusion stérique

²⁴ « La chromatographie » consulté le 11 septembre 2015
(<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/>)

²⁵ Introduction à la chromatographie, Cours M2, Pr. Taverna, Paris sud 2015

D'autres techniques plus spécifiques existent telles que l'immunoaffinité ou l'empreinte moléculaire (MIP) mais sont moins courantes. Il s'agit de phases d'extraction sélectives.²⁶ Les techniques utilisées lors de l'étude réalisée sont décrites succinctement dans les paragraphes suivants.

Chromatographie en phase liquide :

La chromatographie en phase liquide peut se faire avec une phase stationnaire liquide ou solide. Lorsque la phase stationnaire est liquide on parle de chromatographie de partage. Si elle est solide il peut s'agir de chromatographie ionique, d'adsorption, d'exclusion ou d'affinité.

→ **Chromatographie sur couche mince (CCM) :**

Une phase stationnaire de type silice, cellulose ou alumine est déposée sur un support de verre ou d'aluminium. Sur la plaque, un dépôt peut être fait de manière automatique ou manuelle puis la plaque est déposée dans une cuve à solvant. Cette cuve contient un solvant ou un mélange de solvants qui constitue la phase mobile. Le choix du solvant se fait en fonction de la phase stationnaire (qui peut être polaire ou apolaire) mais aussi de l'échantillon déposé et de ce que l'on souhaite voir. Par capillarité, le solvant migre entraînant avec lui les composés du mélange qui vont réaliser des interactions avec la phase stationnaire. En fonction de leurs propriétés, les composés vont se séparer en migrant plus ou moins. On peut ainsi caractériser les composés grâce à leur facteur de rétention (Rf) et les comparer à des produits de référence soit en les déposant sur la même plaque soit en utilisant les mêmes conditions d'éluion.²⁷

La chromatographie sur couche mince peut être utilisée en bidimensionnel, en procédant à une double éluion. Il suffit de tourner la plaque à 90° et de l'éluier dans une nouvelle phase mobile. Cela permet de séparer les mélanges complexes et de s'assurer qu'une tâche n'est pas en fait la superposition de deux composés.

Pour identifier les composés, la plaque est observée à la lumière visible puis à l'UV à des longueurs d'onde de 254nm et 365nm. Des révélateurs peuvent aussi être pulvérisés sur la plaque permettant de mettre en évidence la présence de certaines familles de molécules : la vanilline (stéroïdes), l'acide sulfurique (sapogénines), le dragendorff (alcaloïdes), le NP/PEG (flavonoïdes) en sont des exemples (Figure10).²⁸

26 Couplage, Cours M2, Dr. Maciuk, Paris sud 2015

27 « Identification en CCM » consulté le 11 septembre 2015)
(<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/CCM/identification-ccm.php>)

28 «La révélation en chromatographie sur couche mince» consulté le 11 septembre 2015
http://www.clubdeccm.com/PDF/20101014/20101014_9.pdf

La chromatographie sur couche mince est une technique simple, rapide, fiable et relativement peu coûteuse. Elle permet de réaliser une étude préliminaire, notamment avant une chromatographie flash pour choisir la meilleure phase mobile. Elle permet aussi d'orienter sur la composition de l'échantillon.

Elle peut aussi être utilisée en préparatif avec une phase stationnaire plus épaisse et un dépôt conséquent, il est possible de récupérer un composé bien séparé en raclant la silice à l'endroit déterminé. Il suffit ensuite de séparer le composé de la silice avec un solvant adapté.²⁹

La CCM peut aussi être automatisée permettant ainsi la répétabilité et le contrôle de l'humidité relative.

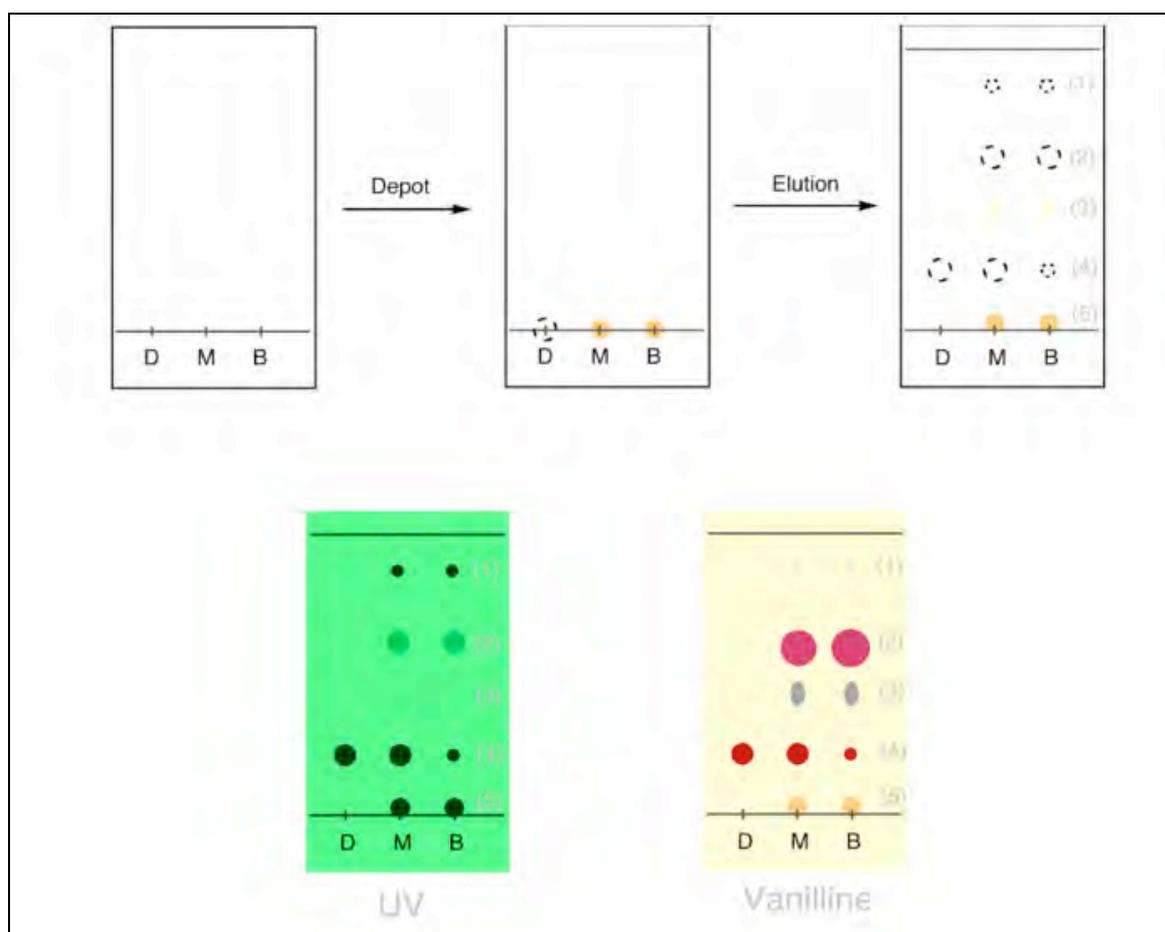


Figure 10 : Etapes d'utilisation d'une CCM.

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_sur_couche_mince)

²⁹ « Du dépôt à la séparation, Cas concret de l'importance du dépôt et du soin nécessaire à la migration : règles de base, astuces, anomalies rencontrées... »consulté le 11 septembre 2015) (http://www.clubdeccm.com/PDF/20081023/20081023_01.pdf)

→ Chromatographie sur colonne :

Il s'agit d'une chromatographie réalisée sur une colonne préparée manuellement ou de façon industrielle. Si la colonne est préparée manuellement, il faut choisir un diamètre de colonne ainsi que la quantité de silice nécessaire en fonction de l'échantillon à séparer. La colonne de verre sélectionnée est remplie avec de la silice mélangée à un solvant afin d'éviter le formation de bulles. Si elle est préparée de façon industrielle elle est livrée toute prête avec les paramètres choisis au préalable. Ensuite il s'agit de déposer le mélange à séparer en haut de colonne puis d'éluer avec le ou les solvants choisis (Figure 11).

Cette technique est souvent utilisée par les chimistes organiciens afin de séparer et purifier des produits de réaction. Elle est aussi utilisée par les phytochimistes pour la séparation de grosses quantités de matière première. Elle permet de séparer jusqu'à 20g en laboratoire.

Il existe deux catégories de chromatographie sur colonne : les chromatographies par gravité et les chromatographies basse pression dites « flash ». La première technique consiste à mettre le solvant d'élution en haut de colonne et le laisser migrer par gravité, mais cette technique peut s'avérer longue et coûteuse car elle nécessite beaucoup de solvant. La chromatographie flash se fait sous pression d'air comprimé. Ainsi l'élution a lieu plus rapidement. La chromatographie sur colonne est automatisable.³⁰

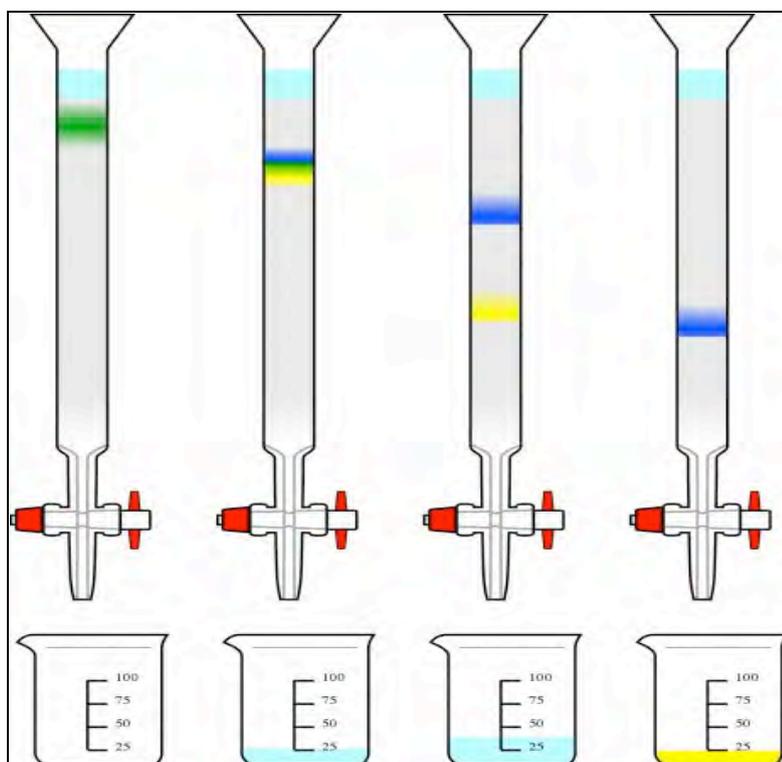


Figure 11 : Représentation de l'élution d'un mélange au moyen d'une chromatographie sur colonne ouverte. (http://www.physique-appliquee.net/banque_images/picture.php?/537)

³⁰ « Chromatographie sur colonne » consulté le 11 septembre 2015 (<http://www.zysman-colman.com/courses/chm302/Chromatographie%20sur%20colonne.pdf>)

→ Chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) :

La CLHP est une technique automatisée. Elle consiste à injecter un faible volume d'un échantillon liquide dans une colonne. L'intérieur de la colonne est tapissé d'une phase stationnaire constituée de fines particules. Cette phase peut être polaire (silice avec groupements silanol libres ou bien greffée avec des groupements polaires) ou apolaire (silice greffée avec des chaînes alkyle couramment à 8 ou 18 atomes de carbones) on parle alors de chromatographie en phase normale ou en phase inverse. L'échantillon est entraîné par une phase mobile liquide préparée avec les solvants choisis en fonction de leurs propriétés.

La phase mobile est injectée au moyen de pompes à fort débit, ce qui crée une pression et permet alors une élution relativement rapide. Le mélange est séparé en fonction des interactions des composés avec la phase stationnaire et la phase mobile. Ils sortent alors de la colonne et un détecteur permet de détecter leur présence. L'ordre de sortie des composés, en fonction de la phase stationnaire et de la phase mobile, va varier selon leur polarité. Le détecteur le plus couramment utilisé en sortie de CLHP est le détecteur à barrette de diodes (DAD) mais elle peut aussi être couplée à un spectromètre de masse (MS). D'autres détecteurs peuvent être utilisés mais sont moins fréquents. Les données sont ensuite envoyées vers un système informatique permettant d'avoir les chromatogrammes en fonction d'une longueur d'onde donnée ou des spectres de masse (Figure 12).³¹

La CLHP peut être utilisée en mode analytique ou préparatif. Dans le deuxième cas, un collecteur de fractions est installé en sortie de système permettant de récupérer les composés souhaités. Les colonnes utilisées sont plus grosses ; les débits d'injection et la quantité d'échantillon injectée sont plus importants.

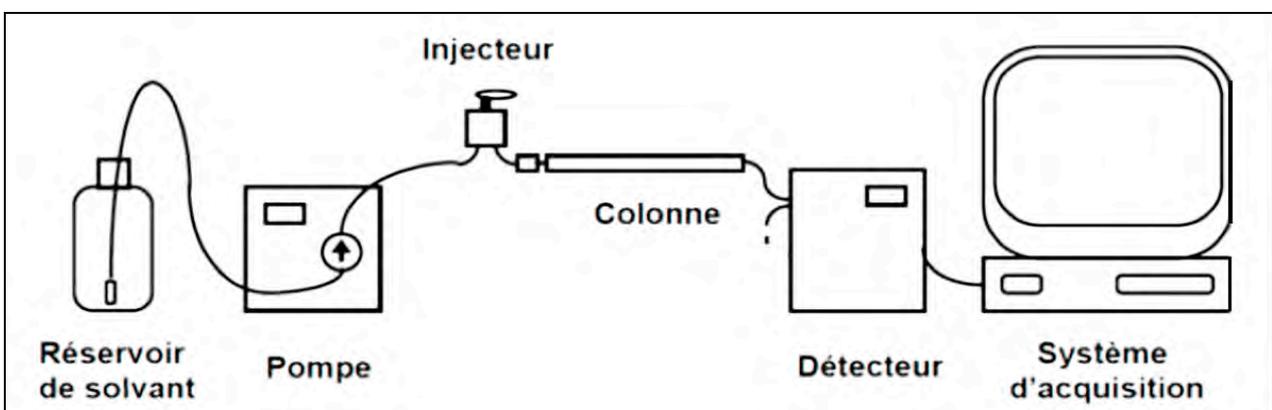


Figure 12 : Représentation schématique d'un appareil de chromatographie liquide haute performance.

³¹ Introduction à la chromatographie, Cours M2, Pr. Taverna, Paris sud 2015

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour séparer, analyser et comparer des composés volatils et thermostables. Cette méthode d'analyse consiste à injecter un composé ou un mélange de composés dans une colonne thermostatée placée dans un four. Le mélange peut être liquide puis volatilisé dans l'injecteur. Il est ensuite injecté et entraîné dans la colonne par un gaz vecteur qui constitue la phase mobile. Des échanges phase stationnaire-composés-phase mobile ont lieu. La progression des composés dans la colonne permet une rétention plus ou moins importante en fonction de leurs propriétés et donc une séparation.

En sortie de colonne, le détecteur le plus couramment utilisé est un détecteur à ionisation de flamme (FID) qui permet de distinguer les différentes molécules. Un système d'acquisition des données va permettre d'obtenir un chromatogramme avec chaque pic correspondant à une molécule.

Les composés qui ne sont pas suffisamment volatils, trop polaires, trop instables ou difficiles à détecter peuvent tout de même être étudiés par CPG. Pour cela ils doivent subir une réaction de dérivation qui permettra de pallier à ces problèmes. La dérivation regroupe différentes réactions telles que la silylation, l'alkylation, l'acylation (Figure 13).³²



Figure 13 : Exemple d'un mécanisme de silylation.

B - Techniques de détection et d'identification structurale utilisées

Une fois les composés séparés, il faut les identifier. De nombreux systèmes de détection, d'identification et de détermination des structures des composés existent. En fonction du système de chromatographie, ils sont différents. En sortie de CPG, un détecteur FID est généralement utilisé. En sortie de CLHP, c'est plutôt un détecteur à barrette de diodes (DAD) ou un spectromètre de masse (MS) qui sera utilisé.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'analyse qui permettra ensuite d'identifier précisément la structure de la molécule. Les plus utilisés au cours de cette étude sont le détecteur à barrette de diodes, le spectromètre de masse et la résonance magnétique nucléaire.

³² « Chromatographie en phase gazeuse » consulté le 11 septembre 2015 (<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/CPG/CPG.php>)

Détecteur à barrette de diodes :

Il s'agit d'un détecteur qui mesure l'absorbance en UV et en Visible. Ainsi le phase mobile en sortie de colonne passe dans une cellule de détection où un faisceau lumineux est projeté. Ce faisceau lumineux, grâce à la barrette de diode est composé d'une multitude de longueurs d'onde. Les composés passant dans ce faisceau absorbent différentes longueurs d'onde en fonction de leurs propriétés. Le fonctionnement de ce détecteur repose sur la loi de Beer-Lambert, ainsi l'absorbance mesurée est fonction de la concentration du composé. On mesure donc en permanence l'absorbance des composés dans la phase mobile en sortie de colonne (Figure 14).

C'est le détecteur le plus utilisé car il est peu sensible aux variations de débit et de température. De plus, les solvants utilisés en CLHP absorbent peu dans l'UV ce qui permet de faire abstraction de l'absorbance de la phase mobile lors de la détection. Chaque solvant est caractérisé par un « UV cut-off » qui détermine sa limite de détection dans l'UV.³³

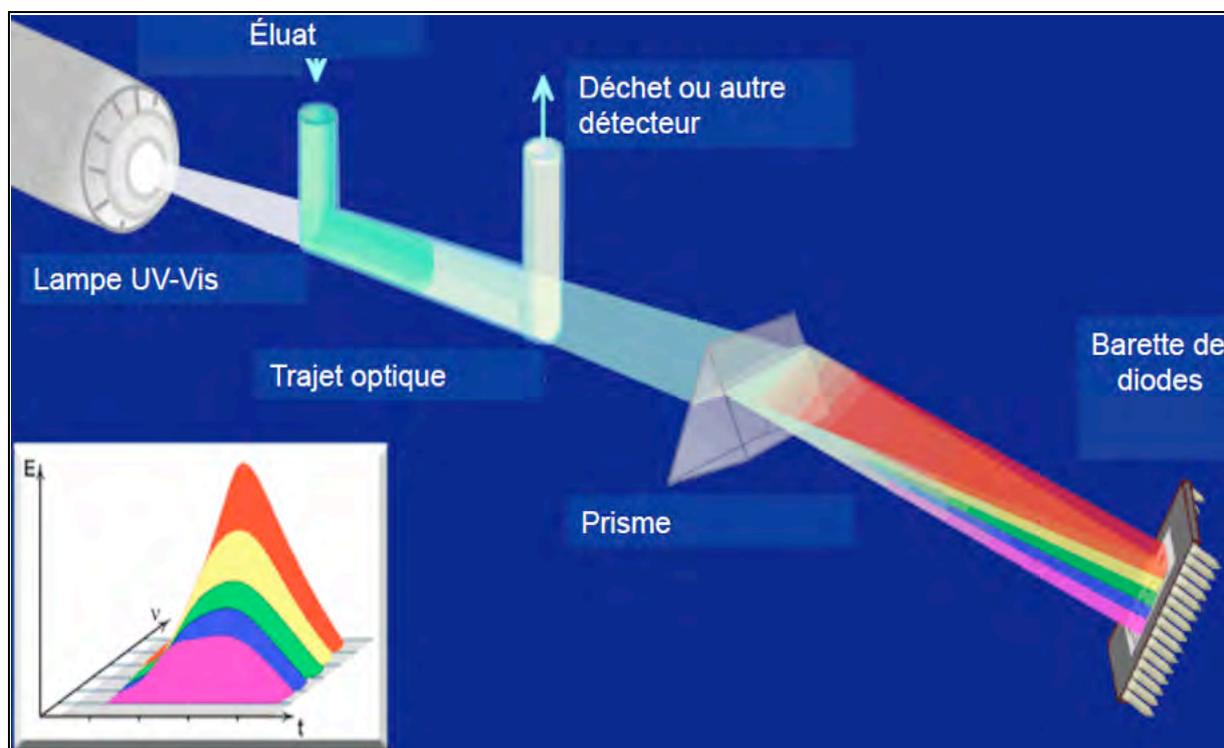


Figure 14 : Schéma de fonctionnement d'un détecteur à barrette de diodes.

³³ La chromatographie liquide haute performance, Véronique Jacob, IUT de Chimie de Grenoble p9-12

Spectromètre de masse :

Le spectromètre de masse est un détecteur qui permet d'identifier les molécules en fonction de leur masse.

L'analyse se fait en 3 étapes essentielles : (Figure 15)

- l'ionisation de l'échantillon dans une source,
- l'analyse des ions formés grâce à un analyseur avec des variations électromagnétiques qui induisent une mobilité dépendante de la masse des ions,
- la détection du signal.

L'ionisation se fait de différentes manières :

- directe : si les molécules sont déjà volatilisées : ionisation électronique, ionisation chimique,
- indirecte : si les molécules sont dans une matrice non volatilisée : MALDI, ESI, APCI, API, FAB, LSMIS.

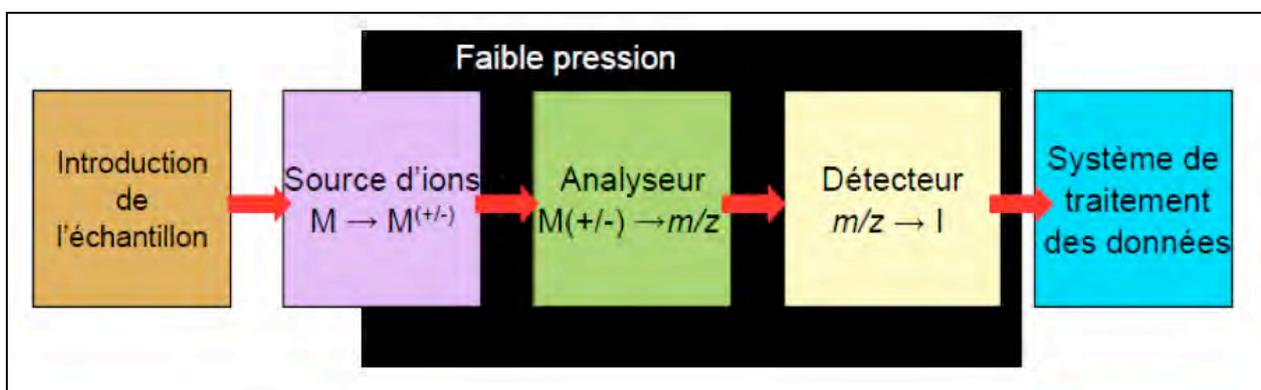


Figure 15 : Schéma du principe de la spectrométrie de masse.

Il existe différents analyseurs en fonction de la technique utilisée pour induire un trajet jusqu'au détecteur et donc en fonction du principe de mesure du rapport m/z de chaque ion. On distingue le quadropole, l'octopole de focalisation, la trappe ionique, le TOF (Time of Flight) et l'orbitrap.

Puis le détecteur va transformer un courant ionique en courant électrique selon différents principes physiques permettant d'obtenir un même résultat ; un spectre de masse. ³⁴

³⁴ Principe de la spectrométrie de masse, Cours M2, Dr. Touboul, ICSN, Paris Sud

Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

En chimie, la RMN est une technique qui permet d'établir la structure de nouvelles molécules. Elle est aussi utilisée en biologie et en médecine.

Le principe de la RMN repose sur la propriété de certains noyaux à avoir un spin non nul. C'est le cas de l'atome d'hydrogène pour lequel le spin I est de $\frac{1}{2}$. Le phénomène de résonance magnétique résulte du moment magnétique de ce spin. La technique utilise des champs magnétiques induits par un aimant. Pour un champ magnétique B_0 , le moment magnétique μ du noyau se positionne dans le même axe que B_0 de façon parallèle (situation la plus stable $m_s = +\frac{1}{2}$) ou anti-parallèle (situation la moins stable $m_s = -\frac{1}{2}$). L'ensemble des noyaux va donc se positionner dans un état d'énergie ou un autre, la position la plus stable ($m_s = +\frac{1}{2}$) étant majoritaire. Ce sont les échanges entre le niveau $m_s = +\frac{1}{2}$ et le niveau $m_s = -\frac{1}{2}$ qui constituent le phénomène de résonance magnétique nucléaire. La spectroscopie RMN consiste en l'observation des transitions entre les niveaux d'énergie. Pour observer la transition des niveaux d'énergie il faut générer cette transition, c'est pour cela qu'il faut appliquer un moment magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 qui induira la transition (Figure 16).

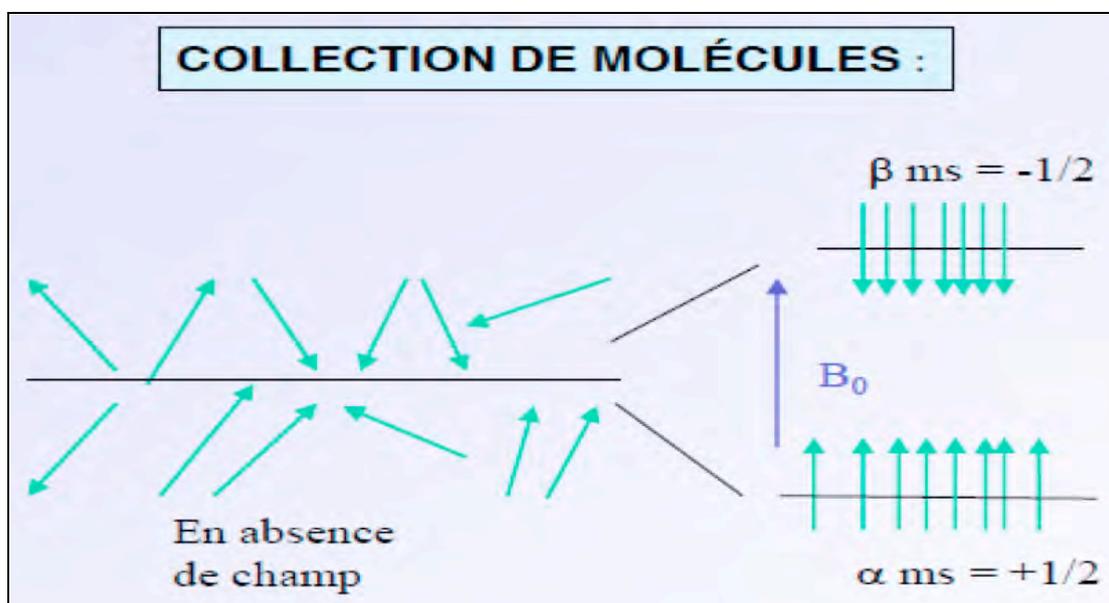


Figure 16 : Représentation de l'alignement des spins nucléaires à un champ magnétique B_0 induit.

La résultante de la collection de spins se nomme M_0 . En faisant varier le moment magnétique par impulsions de B_1 , M évolue par rapport à son état initial M_0 ce qui constitue le phénomène de relaxation. Il en résulte un signal donné en intensité en fonction de la fréquence. On obtient ainsi les déplacements chimiques et donc les spectres RMN qui peuvent être interprétés grâce à la connaissance des zones de déplacement des différents groupements. ³⁵

35 Résonance magnétique nucléaire, Cours M2, Pr. Onger, CNRS, Paris Sud

C – Choix du champignon étudié

Le champignon PP02057A a été sélectionné à partir d'un screening biologique effectué sur des champignons comestibles ou non, issus de la forêt boréale. Les champignons avaient été extraits à l'hexane puis successivement à l'éthanol. Ce screening a mis en évidence l'activité cytotoxique du champignon PP02057A (Tableau 1).

Les lignées cellulaires utilisées sont les A-549, les DLD-1 et les WS-1. Les A-549 et les DLD-1 sont des lignées cellulaires cancéreuses et les WS-1 sont des cellules saines. La résazurine et le Hoechst sont deux composés qui vont permettre de mettre en évidence le taux de survie cellulaire. Les deux composés sont appliqués sur les cellules successivement afin de s'assurer d'avoir le résultat le plus précis possible (Cf Annexe II).

Les résultats mettent en évidence une CI_{50} comprise entre 3,5 $\mu\text{g/mL}$ et 9,8 $\mu\text{g/mL}$ sur les lignées cellulaires cancéreuses, ce qui est une dose relativement faible pour un extrait, soit une bonne activité. La CI_{50} sur les cellules saines est comprise entre 46 $\mu\text{g/mL}$ et 63 $\mu\text{g/mL}$, soit un rapport moyen de 9, soit une bonne sélectivité.

Tableau 1: CI_{50} obtenues lors de la première extraction du champignon.

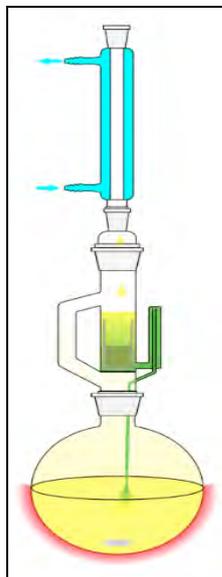
Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
PP02057A	3,5 \pm 0,2 $\mu\text{g/ml}$	5,6 \pm 0,5 $\mu\text{g/ml}$	63 \pm 10 $\mu\text{g/ml}$	4,84 \pm 0,10 $\mu\text{g/ml}$	9,8 \pm 0,9 $\mu\text{g/ml}$	46 \pm 5 $\mu\text{g/ml}$
Etoposide	0,56 \pm 0,06 μM	1,4 \pm 0,3 μM	10 \pm 4 μM	1,3 \pm 0,2 μM	1,5 \pm 0,3 μM	6,1 \pm 1,0 μM

D – Choix de la méthode d'extraction

1 – Procédés et solvants d'extraction

L'extraction est une technique qui permet de retirer des espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide. Elle consiste à faire passer une espèce chimique d'une phase à une autre, pour laquelle elle a plus d'affinité. Cette affinité peut résulter de différents mécanismes : adsorption sur un solide, solubilisation dans un liquide ou volatilisation dans un gaz. Il existe donc trois types d'extractions :

- l'extraction liquide-liquide : elle se fait généralement dans une ampoule à décanter avec deux solvants non miscibles ayant des propriétés différentes.
- l'extraction solide-gaz ou liquide-gaz : il faut que les molécules soient volatiles. Pour accélérer la réaction, l'échantillon peut être chauffé puis on analyse directement la phase gazeuse, on parle de la technique d'espace de tête statique. Par opposition à la technique de l'espace de tête dynamique où les molécules libérées sont piégées sur une résine polymère.



- l'extraction solide-liquide : il faut au préalable broyer la matière première afin d'augmenter la surface d'échange avec le solvant d'extraction et donc optimiser l'extraction. Elle peut être réalisée à froid ou à chaud. La technique la plus simple consiste en une macération à chaud ou à froid. Pour optimiser le rendement, il suffit d'extraire en continu. Pour cela, il est possible de distiller en continu avec un Soxhlet. Il est constitué d'un ballon à fond rond chauffé surmonté d'un réfrigérant qui permet de condenser les vapeurs émises (Figure 17).³⁶

Figure 17 : Montage Soxhlet.

Le choix des solvants d'extraction est important. On peut utiliser une multitude de solvants et le choix se fait en fonction des propriétés de ce solvant et des molécules recherchées. Il faut en effet que ces molécules y soient le plus soluble possible afin qu'elles aient une plus grande affinité pour le solvant que pour la matière première. Le solvant doit ensuite être évaporé, c'est pourquoi il faut aussi tenir compte de la volatilité de celui-ci.

2 – Résultats et discussion

La technique utilisée pour l'extraction est une technique avec chauffage en continue. Afin de connaître le meilleur solvant d'extraction, la matière première a été extraite avec différents solvants : un apolaire : hexane (α), un très polaire : éthanol/eau 50:50 (β) et un intermédiaire : éthanol 95% (δ), puis chaque extrait a été testé biologiquement (Figure 18).

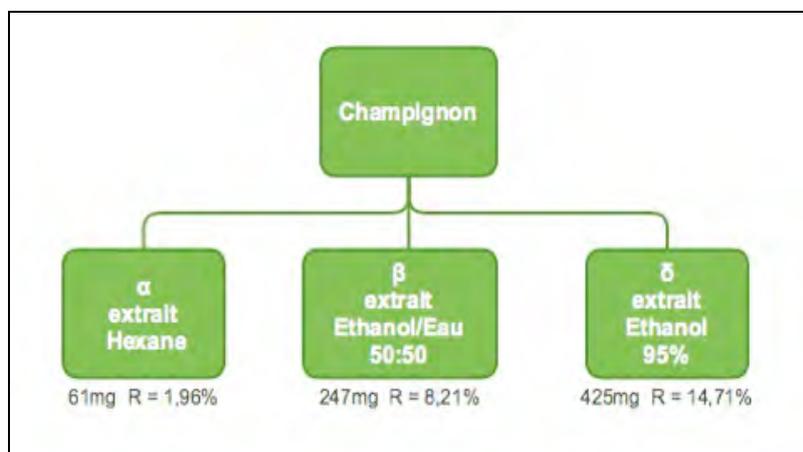


Figure 18 : Extraction du champignon, masses obtenues et rendements.

³⁶ Ducauze C. (2014), Chimie analytique, analyse chimique et chimométrie : Concept, démarche et méthode 113-118

Les résultats obtenus montrent que l'activité la plus intéressante était obtenue après une extraction avec un mélange éthanol/eau 50:50 (Tableau 2). L'effet cytotoxique du champignon est très intéressant car les doses actives sont faibles et la toxicité est sélective des cellules cancéreuses. Pour l'extrait éthanol/eau 50:50 la CI_{50} varie de moins de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ à 1,83 $\mu\text{g/mL}$ sur les cellules cancéreuses pour un CI_{50} de 10,00 $\mu\text{g/mL}$ à 56,00 $\mu\text{g/mL}$ en fonction du test, sur les cellules saines, soit un rapport de 19,64 .

Tableau 2 : CI_{50} des extraits du champignon obtenus avec trois solvants différents.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
α	19 \pm 3 $\mu\text{g/ml}$	30 \pm 4 $\mu\text{g/ml}$	59 \pm 10 $\mu\text{g/ml}$	11,0 \pm 0,6 $\mu\text{g/ml}$	25 \pm 3 $\mu\text{g/ml}$	67 \pm 12 $\mu\text{g/ml}$
β	<1,563 $\mu\text{g/ml}$	1,77 \pm 0,06 $\mu\text{g/ml}$	10 \pm 4 $\mu\text{g/ml}$	<1,563 $\mu\text{g/ml}$	1,83 \pm 0,09 $\mu\text{g/ml}$	56 \pm 6 $\mu\text{g/ml}$
δ	<1,563 $\mu\text{g/ml}$	2,1 \pm 0,2 $\mu\text{g/ml}$	7 \pm 1 $\mu\text{g/ml}$	1,94 \pm 0,10 $\mu\text{g/ml}$	3,3 \pm 0,2 $\mu\text{g/ml}$	12,8 \pm 0,7 $\mu\text{g/ml}$
Etoposide	0,56 \pm 0,06 μM	1,4 \pm 0,3 μM	10 \pm 4 μM	1,3 \pm 0,2 μM	1,5 \pm 0,3 μM	6,1 \pm 1,0 μM

Les trois extraits ont aussi été déposés sur chromatographie sur couche mince (CCM) afin d'avoir une idée de la composition de chacun. L'extrait à l'hexane (α), comme attendu, contient des composés peu polaires alors que les extraits à l'éthanol/eau 50:50 (β) et éthanol 95% (δ) contiennent plus de composés polaires qui migrent moins sur la plaque CCM du fait de leurs interactions avec les groupements silanol (Figure 19).

La corrélation entre le solvant d'extraction et la polarité des molécules dans chaque extrait est évidente. Au vue des résultats biologiques, on peut donc émettre l'hypothèse que les composés les plus actifs sont plutôt polaires.

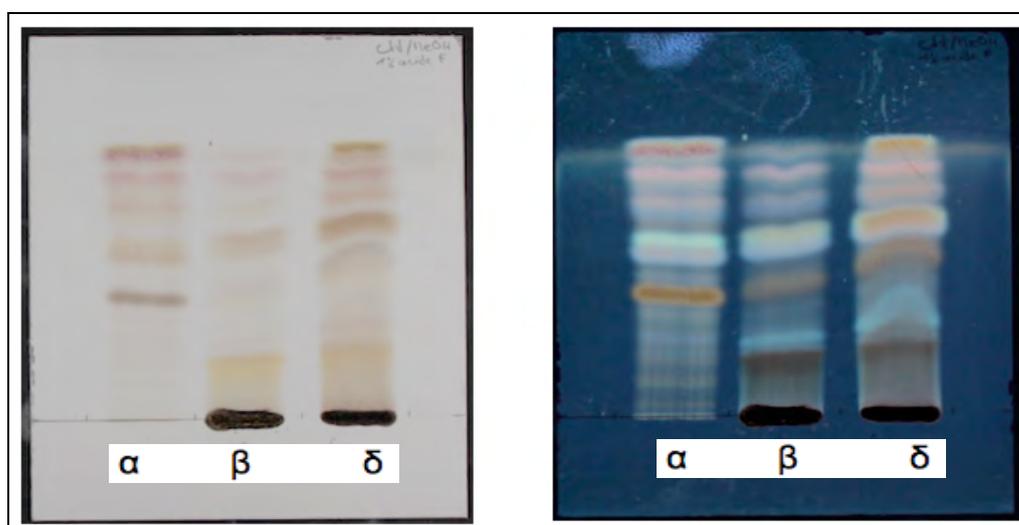


Figure 19 : CCM des trois extraits avec les trois solvants testés : hexane (α), éthanol/eau 50:50 (β) et éthanol 95% (δ) révélé avec H_2SO_4 visionné en visible (gauche) et en UV (365nm) (droite). (éluant : chloroforme/méthanol 10:1 + 0,1%acide formique).

Une méthode CLHP a été mise au point puis les trois extraits ont été étudiés par CLHP analytique et les résultats obtenus ont permis de déterminer, au moyen du spectre d'absorption UV/visible, la présence de molécules à squelette phénoxazone.

Le chromatogramme de la fraction extraite à l'hexane ne comporte pas de composés absorbant dans l'UV/visible ou peu (Figure 20). Cependant le pic majoritaire en fin de chromatogramme est très intense (le pic du DMSO en début de chromatogramme très important, peut laisser croire que le pic en fin de chromatogramme est petit).

Alors que les deux autres extraits contiennent des composés intéressants, notamment les deux pics en milieu de chromatogramme ($tr = 16,3\text{min}$ et $20,4\text{min}$) ont un spectre UV/visible correspondant à celui des molécules dérivées de l'acide cinnabarinique (Figures 21 et 22).

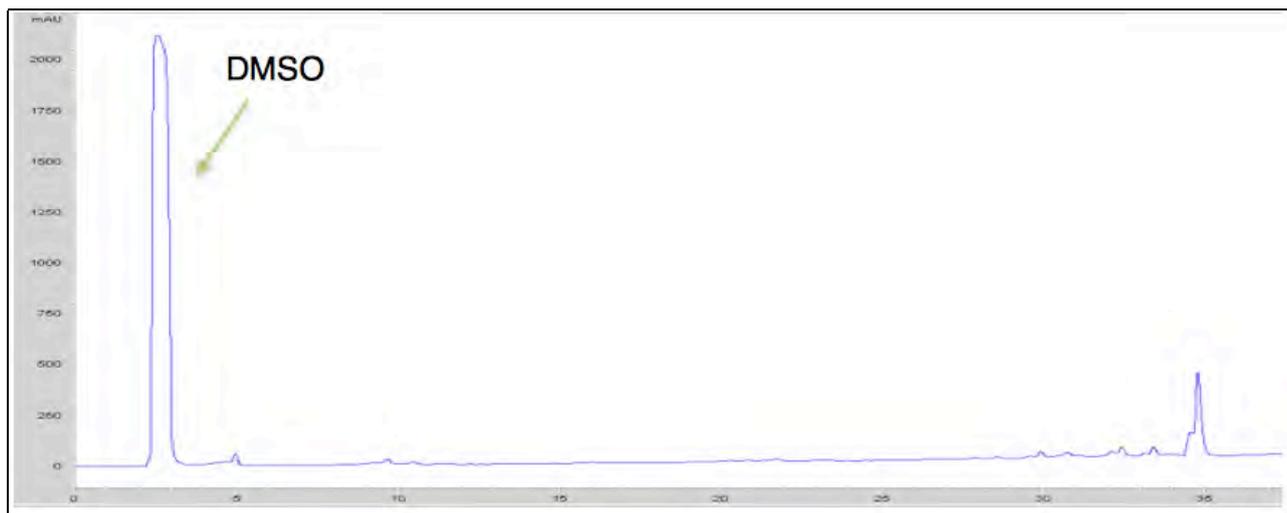


Figure 20 : Chromatogramme de la fraction extraite avec l'hexane (α). ($\lambda = 254\text{nm}$)

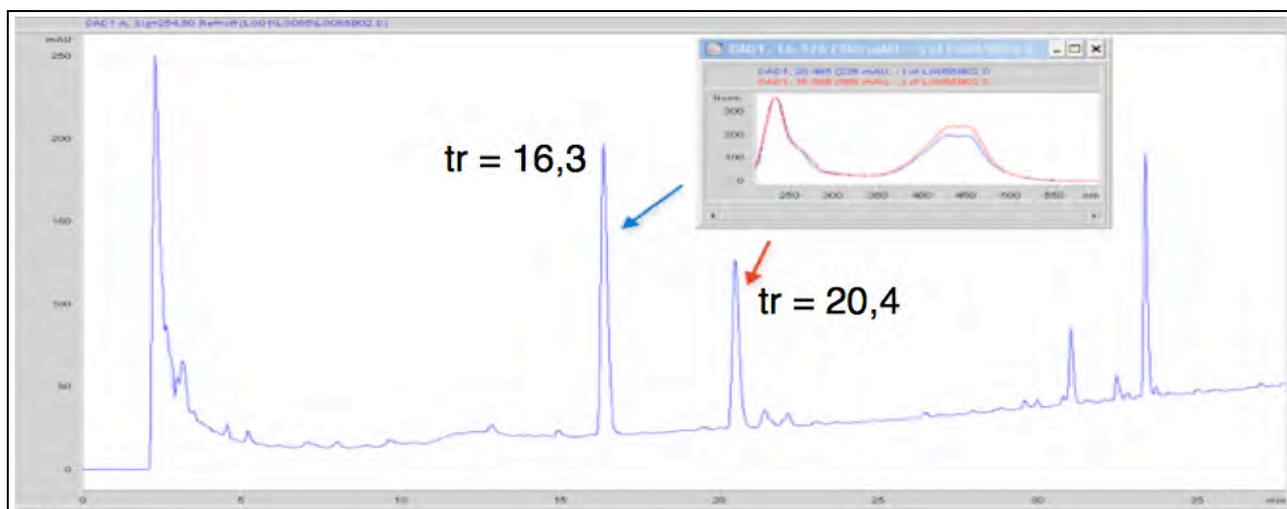


Figure 21 : Chromatogramme de la fraction extraite avec éthanol/eau 50:50 (β) montrant la présence de molécules au profil type phénoxazone avec un spectre UV/Visible typique. ($\lambda = 254\text{nm}$)

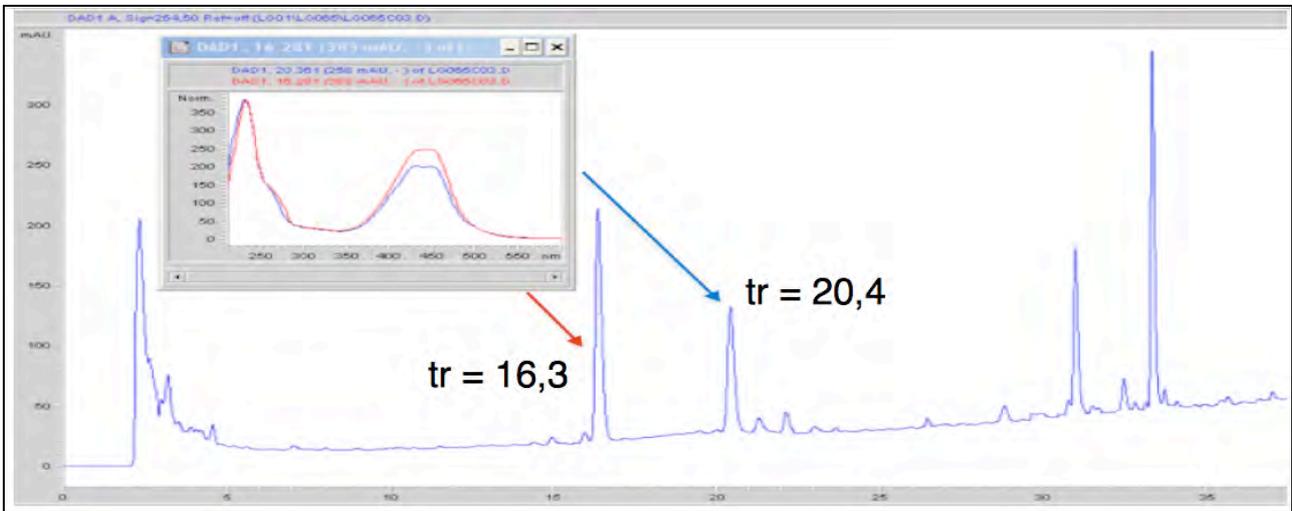


Figure 22 : Chromatogramme de la fraction extraite avec éthanol 95% (δ) montrant la présence de molécules de type phénoxazone par un spectre UV/Visible typique. ($\lambda = 254\text{nm}$)

La comparaison des chromatogrammes des fractions β et δ (Figure 23) montre que les pics des composés dérivés de l'acide cinnabarinique ($tr = 16,3$ et $20,4$) sont légèrement plus intenses dans la fraction β . Pour des échantillons préparés à la même concentration et le même volume d'injection, on peut penser que la fraction β est plus concentrée en molécules d'intérêt. Les molécules les plus polaires apparaissant en début de chromatogramme sont aussi en plus grande proportion dans la fraction β . Les derniers pics semblent être plus présents dans la fraction δ .

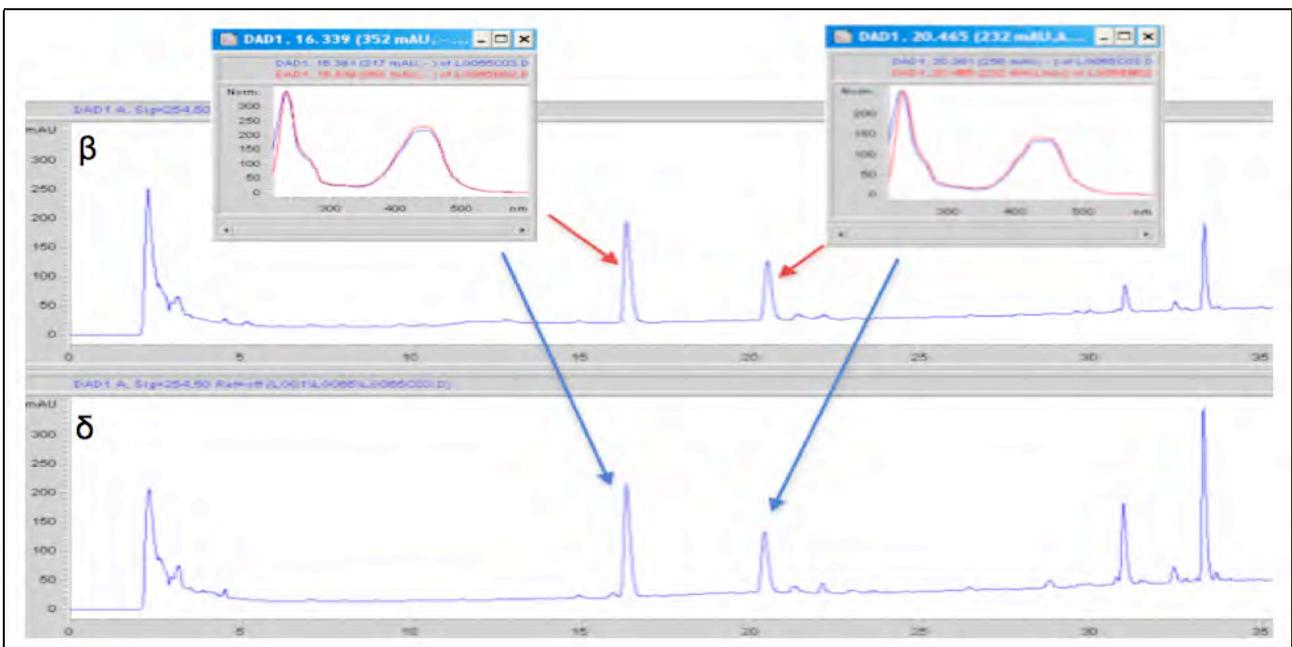


Figure 23 : Comparaison des profils β et δ aux mêmes échelles mettant en évidence la présence de molécules aux spectres UV/visible similaires. ($\lambda = 254\text{nm}$)

E - Première technique de séparation : Chromatographie sur colonne Diaion® HP-20

1 – Généralités

La technique de séparation utilisée est une colonne ouverte préparée manuellement remplie avec des particules spéciales appelées Diaion® HP-20. Elles forment une résine absorbante notamment utilisée pour capturer les composés hydrophobes. Cette technique permet de séparer les molécules en fonction de leur polarité mais aussi de leur taille. Cette première approche beaucoup utilisée au laboratoire pour la séparation des produits naturels est utilisée dans le but de faire une première séparation grossière.

2 – Résultats et discussion

Le champignon a été extrait en plus grande quantité avec de l'éthanol 95%. Cet extrait brut a ensuite été fractionné avec une colonne de résine Diaion® HP-20 dont l'élution a été effectuée avec des solvants de polarités décroissantes (Cf Annexe I). Lors de la solubilisation de l'extrait brut pour le déposer sur la colonne, il y a eu formation de cristaux. Ces cristaux ont été prélevés puis étudiés par RMN. Il s'agit d'un monosaccharide. Cependant, l'acquisition 2D n'a pas pu être réalisée et donc l'identification de la structure n'a pas pu être déterminée (Cf Annexe III). Le fractionnement a abouti à l'obtention de 5 fractions qui ont été testées biologiquement (Figure 24) (Tableau 3).

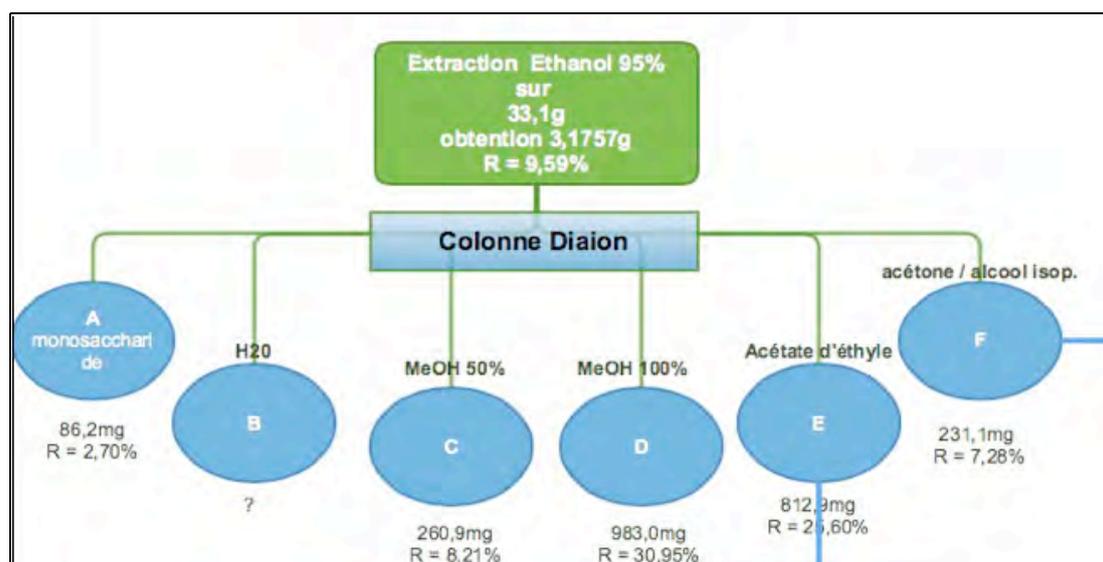


Figure 24 : Représentation des 5 fractions obtenues après élution.

Tableau 3 : CI_{50} des fractions obtenues avec la colonne Diaion.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
B	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
C	167 ± 18 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	158 ± 7 µg/ml	>200 µg/ml	128 ± 26 µg/ml
D	17 ± 1 µg/ml	13 ± 1 µg/ml	32 ± 3 µg/ml	10,4 ± 0,4 µg/ml	13,2 ± 0,7 µg/ml	28 ± 2 µg/ml
E	1,79 ± 0,09 µg/ml	3,5 ± 0,2 µg/ml	16 ± 1 µg/ml	1,80 ± 0,05 µg/ml	3,15 ± 0,10 µg/ml	16 ± 2 µg/ml
F	1,28 ± 0,06 µg/ml	1,34 ± 0,04 µg/ml	>50 µg/ml	0,68 ± 0,04 µg/ml	1,29 ± 0,08 µg/ml	>50 µg/ml
Etoposide	1,5 ± 0,3 µM	5,1 ± 0,9 µM	>38 µM	1,4 ± 0,1 µM	0,6 ± 0,1 µM	12 ± 2 µM

Les fractions obtenues avec les solvants moins polaires sont les plus actives avec une sélectivité vis à vis des cellules cancéreuses. En effet, la fraction E a une CI_{50} comprise entre 1,79 µg/mL et 3,50 µg/mL sur les cellules cancéreuses alors que l'activité sur les cellules saines est de 16,00 µg/mL, soit un rapport d'environ 6,25.

De même, pour la fraction F, la CI_{50} est comprise entre 0,68 µg/mL et 1,34 µg/mL sur les cellules cancéreuses pour une CI_{50} supérieur à 50,00 µg/mL sur les cellules saines soit un rapport de plus de 43,48. Pour ces deux fractions actives les chromatogrammes ont été analysés (Figures 25 et 26).

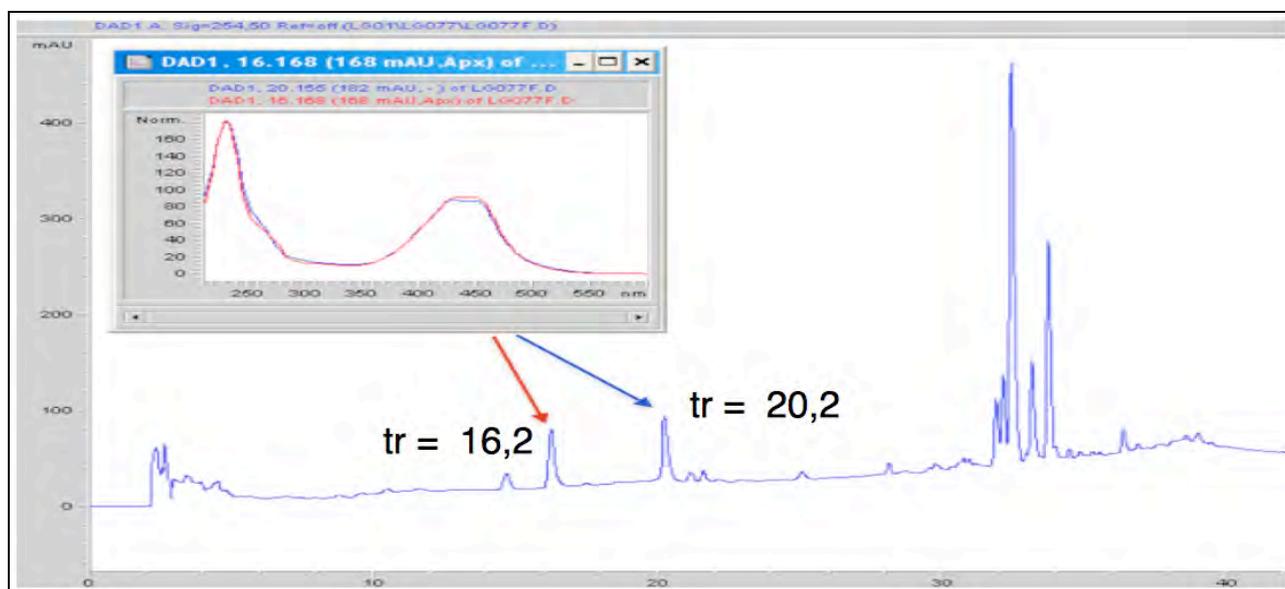


Figure 25 : Chromatogramme de la fraction la plus active (F) avec présence de molécules ayant le spectre UV/visible typique des molécules dérivées de l'acide cinnabarinique.

($\lambda = 254\text{nm}$)

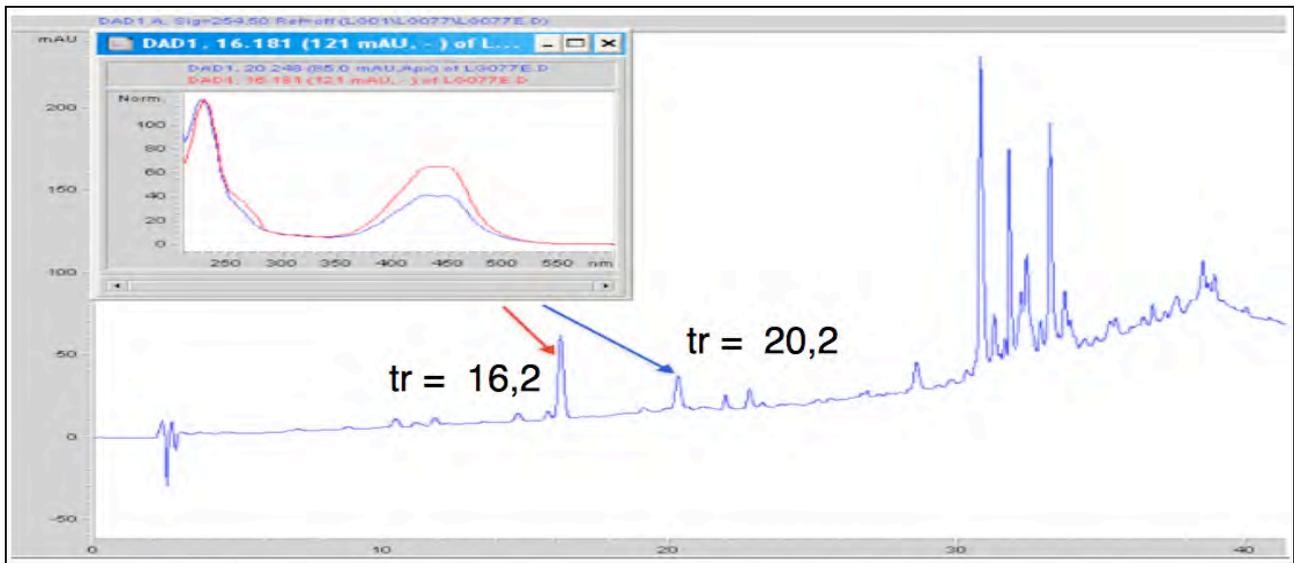


Figure 26 : Chromatogramme de la fraction E avec présence de molécules ayant le spectre UV/visible typique des molécules dérivées de l'acide cinnabarinique. ($\lambda = 254\text{nm}$)

La fraction F est un peu moins encombrée que la fraction E dans la mesure où il y a moins de composés à la fin du chromatogramme. De plus, dans la fraction F, les deux pics aux temps de rétention 16,2 et 20,2min (ayant des spectres UV/visible caractéristiques) sont plus intenses sachant que les solutions ont été préparées aux mêmes concentrations.

F – Deuxième technique de séparation : Chromatographie flash

1 – Généralités

La technique utilisée est une chromatographie sur colonne de silice ouverte sous faible pression. La colonne est préparée manuellement avec des particules de silice. La phase stationnaire est polaire. La phase mobile entraîne les molécules au travers de la colonne et les sépare en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. L'objectif est d'améliorer la séparation des composés d'une des fractions les plus actives afin de cibler les molécules actives.

2 – Résultats et discussion

A partir de la fraction E, une colonne sur gel de silice a donc été effectuée. Les solvants utilisés allaient du moins polaire au plus polaire. Les fractions successives obtenues après élution ont été rassemblées en fonction des profils obtenus sur CCM permettant d'obtenir 7 fractions (Figure 27 et 28). Celles-ci ont ensuite fait l'objet de tests biologiques (Tableau 4).

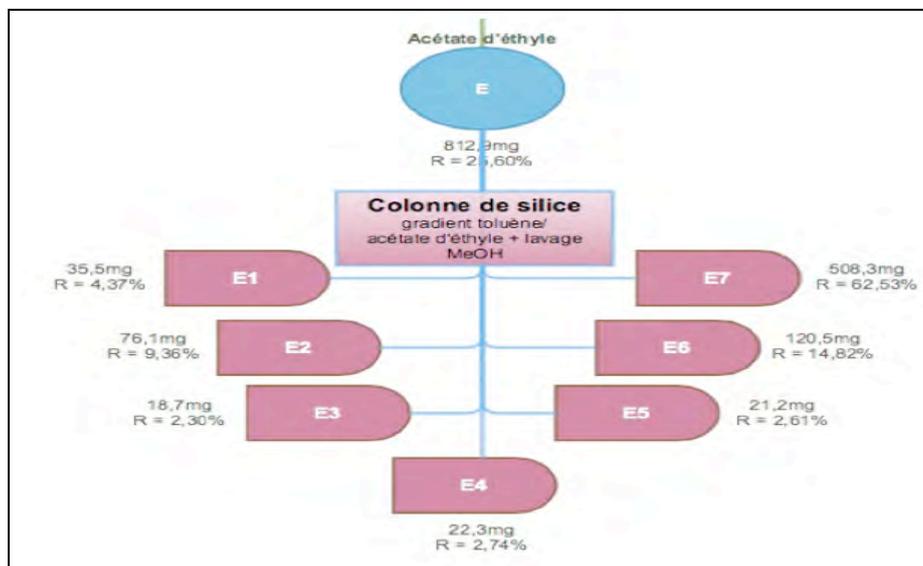


Figure 27 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction E au moyen d'une colonne de silice.

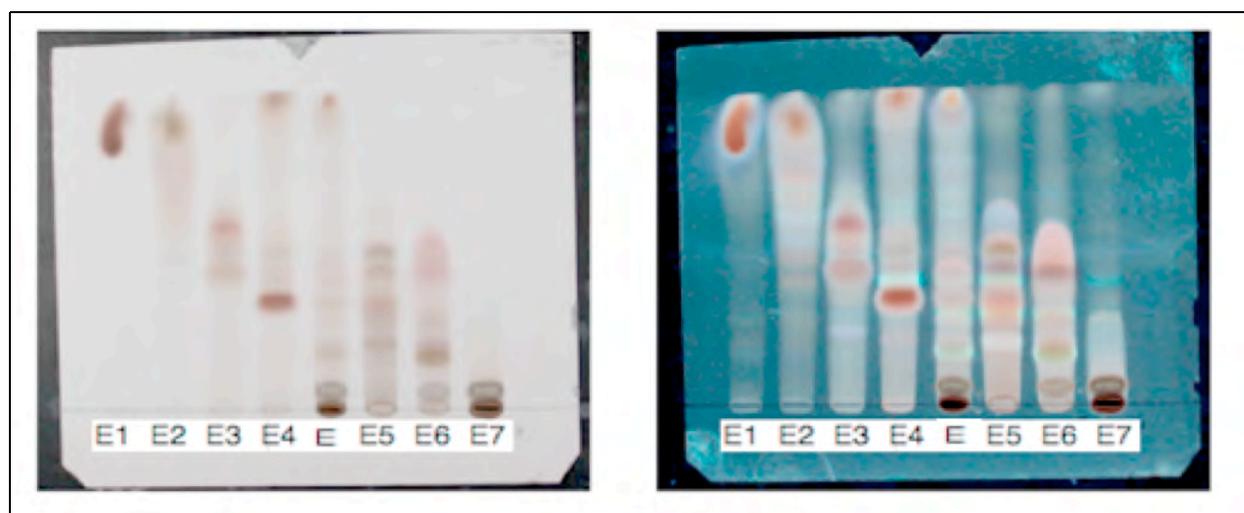


Figure 28 : CCM des fractions obtenues après rassemblement des fraction obtenues après séparation par colonne de gel de silice avec dépôt de la fraction initiale en milieu de CCM. (éluant : toluène/acétate d'éthyle 10:1)

Tableau4 : CI_{50} des fractions obtenues avec la colonne de silice.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
E1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml
E2	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml
E3	>100 µg/ml	81 ± 3 µg/ml	>100 µg/ml	74 ± 8 µg/ml	53 ± 4 µg/ml	>100 µg/ml
E4	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml
E5	39 ± 2 µg/ml	49 ± 1 µg/ml	47,6 ± 0,7 µg/ml	33 ± 2 µg/ml	32 ± 3 µg/ml	38 ± 4 µg/ml
E6	63 ± 16 µg/ml	47 ± 6 µg/ml	84 ± * µg/ml	28 ± 2 µg/ml	32 ± 3 µg/ml	63 ± 5 µg/ml
E7	14 ± 2 µg/ml	20,8 ± 0,5 µg/ml	>100 µg/ml	15 ± 1 µg/ml	19,6 ± 0,4 µg/ml	>100 µg/ml
ETOPOSIDE				2,6 ± 0,2 µM	1,9 ± 0,2 µM	>50 µM

Les fractions obtenues avec les solvants les plus polaires sont les plus actives. Cependant il y a une perte d'activité et de sélectivité. La colonne de silice étant restée très colorée, il y a peut être eu une perte de composés. La méthode de la colonne de silice est donc abandonnée.

G - Troisième technique de séparation : CLHP préparative

1 – Généralités

La CLHP préparative est une technique chromatographique qui va permettre une élution rapide et fine des composés, mais aussi de les récupérer. Elle est non destructive. La CLHP préparative peut être utilisée avec différentes phases, normale ou inverse. Le but de cette manipulation est de mettre en jeu une phase polaire avec les composés du mélange. La particularité de cette phase stationnaire est qu'elle est greffée biphenyle. Les interactions sont donc particulières. Ici, la méthode est inspirée de la méthode mise au point sur la CLHP analytique et transposée à plus grande échelle.

L'objectif est d'obtenir une bonne séparation d'une des fractions les plus actives obtenues lors de la première séparation. Après l'échec de la colonne de silice, cette nouvelle approche a pour but une meilleure séparation et un meilleur rendement voire l'obtention de molécules pures pour pouvoir les identifier par RMN.

2 – Résultats et discussion

La fraction F obtenue précédemment avec la colonne Diaion a alors été utilisée pour essayer une nouvelle méthode. La composition de la fraction F ne semblant pas trop complexe, une nouvelle séparation a été réalisée sur CLHP préparative. La méthode utilisée au préalable sur la CLHP analytique est transposée sur la CLHP préparative permettant d'obtenir 6 fractions (Figure 29).

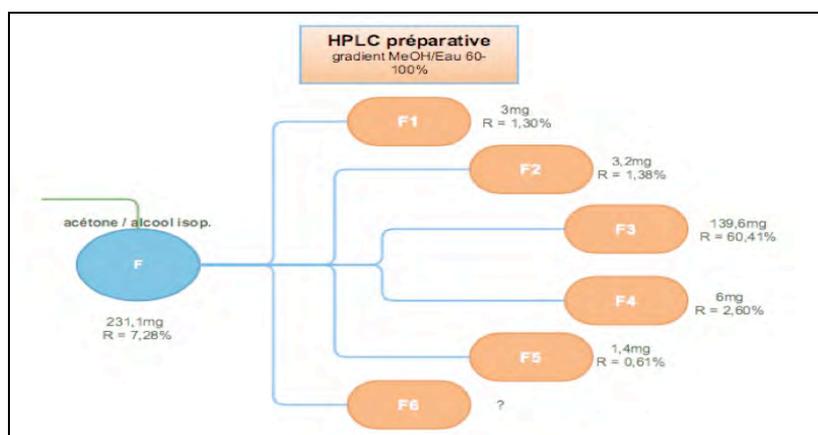


Figure 29 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction F au moyen d'une colonne CLHP préparative.

Le chromatogramme obtenu est satisfaisant avec des pics bien séparés (Figure 30).

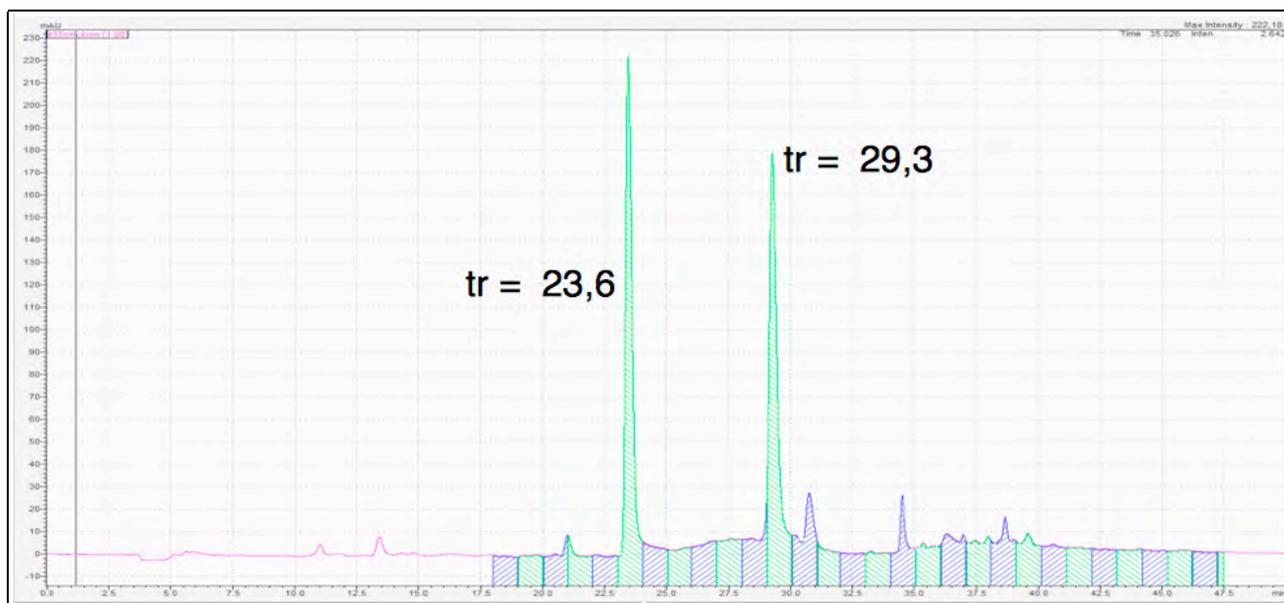


Figure 30 : Profil de séparation des pics collectés avec la CLHP préparative. ($\lambda = 455\text{nm}$)

A partir des temps de rétention et des chromatogrammes obtenus à différentes longueurs d'onde, il a été possible de déterminer que les deux pics majoritaires à la longueur d'onde 455nm (aux temps de rétention 23,6min et 29,3min) sont les pics des molécules de types phénoxazone. A la longueur d'onde de 455nm, ils sont majoritaires car les composés absorbants dans le visible sont moins courants. À une longueur d'onde de 254nm, il est évident que les composés ciblés ne sont pas majoritaires mais ils sont néanmoins bien séparés (Figure 31).

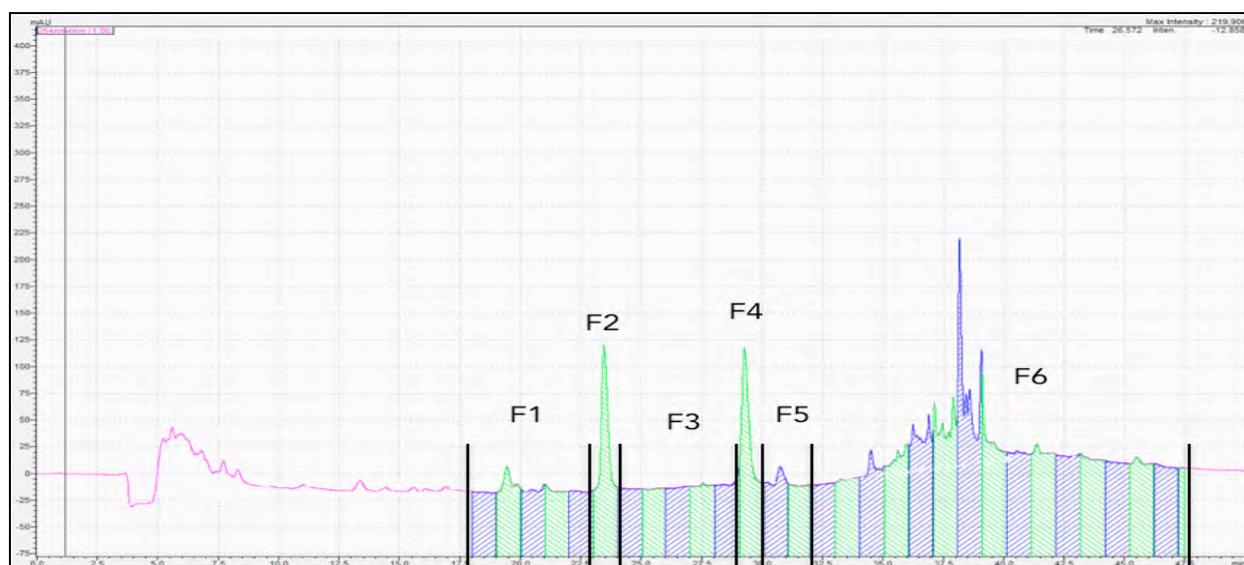


Figure 31 : Profil de séparation des pics collectés avec la CLHP préparative. ($\lambda = 254\text{nm}$)

Les pics ainsi récoltés ont été testés biologiquement (Tableau 5). Malheureusement tous les pics n'ont pas été récoltés en quantité suffisante pour être testés. Les pics correspondants aux fractions F2 et F4 sont supposés être les pics intéressants.

Cependant, bien que F2 n'ait pas été obtenu en quantité suffisante, F4 a pu être testée et le résultat est décevant puisque l'activité biologique n'est pas du tout celle attendue. La fraction F3 est un peu active contrairement à ce qui était attendu.

Tableau 5 : CI_{50} des pics collectés par la méthode de la CLHP préparative.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
F3	45,7 ± 0,7 µg/ml	9,9 ± 0,6 µg/ml	45 ± 2 µg/ml	22 ± 3 µg/ml	6,3 ± 0,3 µg/ml	37 ± 7 µg/ml
F4	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	83 ± 8 µg/ml	>100 µg/ml
F6	53 ± 9 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	30 ± 3 µg/ml	45 ± 4 µg/ml	69 ± 12 µg/ml
Camptotecin	0,0552 ± 0,0003 µM	0,14 ± 0,02 µM	0,30 ± 0,06 µM	<0,039 µM	<0,039 µM	0,32 ± 0,04 µM

Les pics collectés ont fait l'objet d'une CLHP analytique. Les chromatogrammes obtenus montrent pourtant la présence des molécules d'intérêt. Malheureusement l'appareil a eu des problèmes de pression ne permettant pas d'obtenir de beaux chromatogrammes. Ces chromatogrammes permettent de mettre en évidence la présence de cinnabarine et d'acide cinnabarinique (Figures 32 et 33).

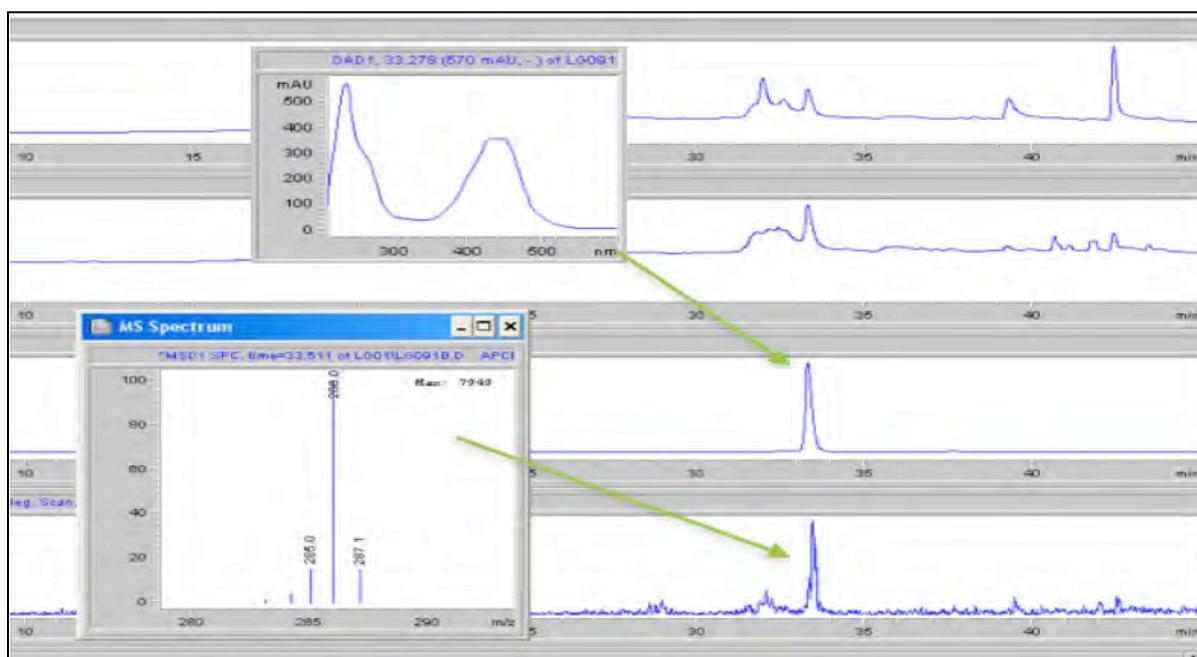


Figure 32 : Chromatogramme de la fraction F2 montrant le spectre UV/visible spécifique des phénoxazones et le spectre MS montrant un m/z 287,1 $[M-H]^-$ correspondant à la cinnabarine.

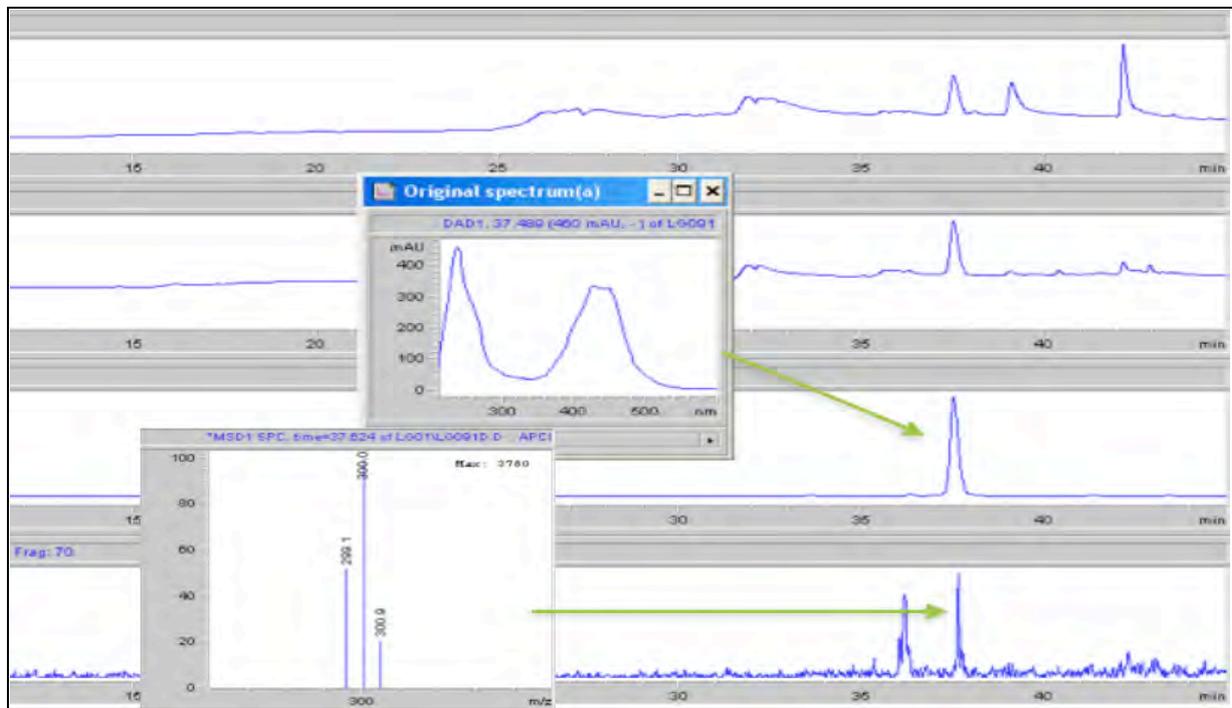


Figure 33 : Chromatogramme de la fraction F4 montrant le spectre UV/visible spécifique des phénoxazones et le spectre MS montrant un m/z 300,9 [M-H]⁻ correspondant à l'acide cinnabarinique.

La masse obtenue pour F4 était suffisante pour une RMN. Cependant les résultats obtenus sont ininterprétables laissant supposer que la masse obtenue était plutôt composée d'impuretés telles que des graisses et de l'eau.

Le chromatogramme couplé au spectre de masse obtenus par CLHP analytique montrent la présence d'acide cinnabarinique dans la fraction F4 (à 254nm l'intensité est d'environ 200mAU), or, les résultats des tests biologiques ne montrent pas une activité aussi intense qu'attendue. Bien que la fraction ne soit pas pure, ce résultat est inattendu. La corrélation entre les résultats de la CLHP, de la RMN et de biologie peut laisser penser que les molécules de type phénoxazones absorbent de façon très intense mais cette absorption n'est sûrement pas représentative de la quantité du produit dans l'extrait.

Cette méthode a donc été abandonnée car non satisfaisante.

H - Quatrième technique de séparation : Colonne basse pression

1 - Généralités

Une nouvelle approche est alors essayée, il s'agit d'une colonne en phase inverse à basse pression. L'appareil est automatisé et exerce une faible pression. En sortie de colonne se trouve un collecteur qui va récupérer les fractions. Les méthodes utilisées au préalable n'étant pas satisfaisantes, cette nouvelle technique va mettre en jeu d'autres interactions. La phase stationnaire est apolaire, le but est de faire interagir la partie non polaire des molécules cibles. Pour les dérivés de l'acide cinnabarinique ce sont donc les cycles aromatiques qui vont intervenir.

2 – Résultats et discussion

A partir de la fraction brute β , la séparation est réalisée au moyen d'un gradient d'élution du plus polaire vers le moins polaire suivi d'un lavage (Figure 34). Les fractions obtenues ont été déposées sur CCM afin d'être regroupées puis testées biologiquement (Tableau 6). Comme précédemment, une fraction a été obtenue en quantité insuffisante et n'a donc pas pu être testée.

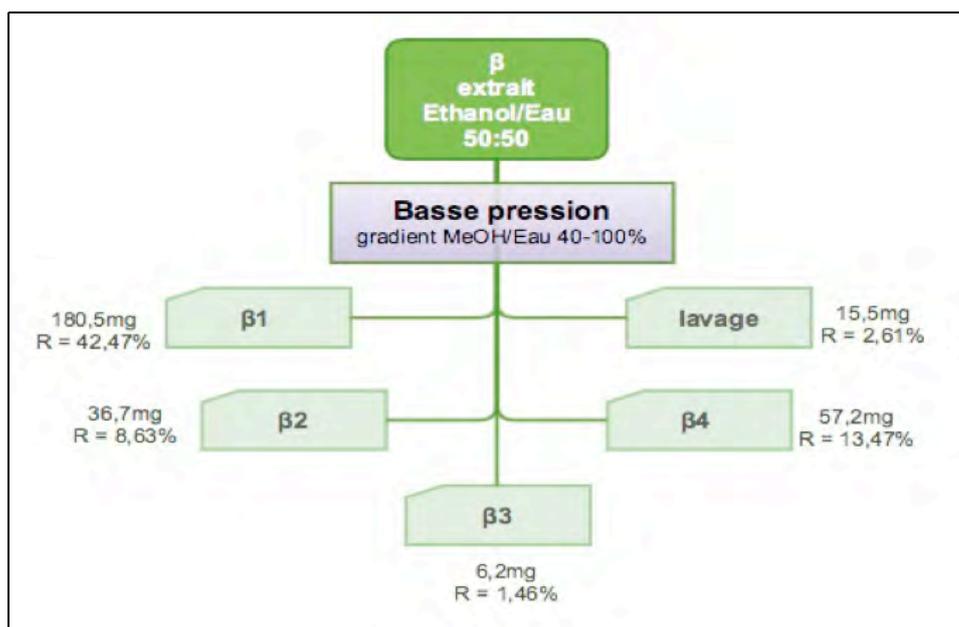


Figure 34 : Représentation des fractions obtenues après séparation de la fraction β au moyen d'une colonne basse pression.

Tableau 6 : CI_{50} des fractions obtenues avec la colonne basse pression.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
B1	76 ± 9 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	43 ± 4 µg/ml	76 ± 27 µg/ml	>100 µg/ml
β2	>100 µg/ml	>100 µg/ml	<0,781 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml	>100 µg/ml
β4	1,70 ± 0,08 µg/ml	4,0 ± 0,2 µg/ml	15 ± 1 µg/ml	1,32 ± 0,07 µg/ml	4,0 ± 0,2 µg/ml	17 ± 1 µg/ml
lavage	<0,781 µg/ml	0,94 ± 0,01 µg/ml	2,49 ± 0,09 µg/ml	<0,781 µg/ml	<0,781 µg/ml	4,8 ± 0,2 µg/ml
Camptotecin	0,0552 ± 0,0003 µM	0,14 ± 0,02 µM	0,30 ± 0,06 µM	<0,039 µM	<0,039 µM	0,32 ± 0,04 µM

La fraction β4 est la plus active avec une sélectivité intéressante ; la CI_{50} sur les cellules cancéreuses varie de 1,32 µg/mL à 4,00 µg/mL alors qu'elle varie de 15,00 µg/mL à 17,00 µg/mL sur les cellules saines soit un rapport de 5,92. Le lavage a été récolté puis séché et, bien qu'inattendu, il est encore plus actif ; la CI_{50} sur les cellules cancéreuses varie de moins de 0,78 µg/mL à 0,94 µg/mL contre 2,59 µg/mL à 4,80 µg/mL sur les cellules saines, soit un rapport de 4,44. La sélectivité est un peu moins grande mais tout de même intéressante.

La fraction β4 (Figure 35) et le lavage ont donc été étudiées sur CLHP analytique.

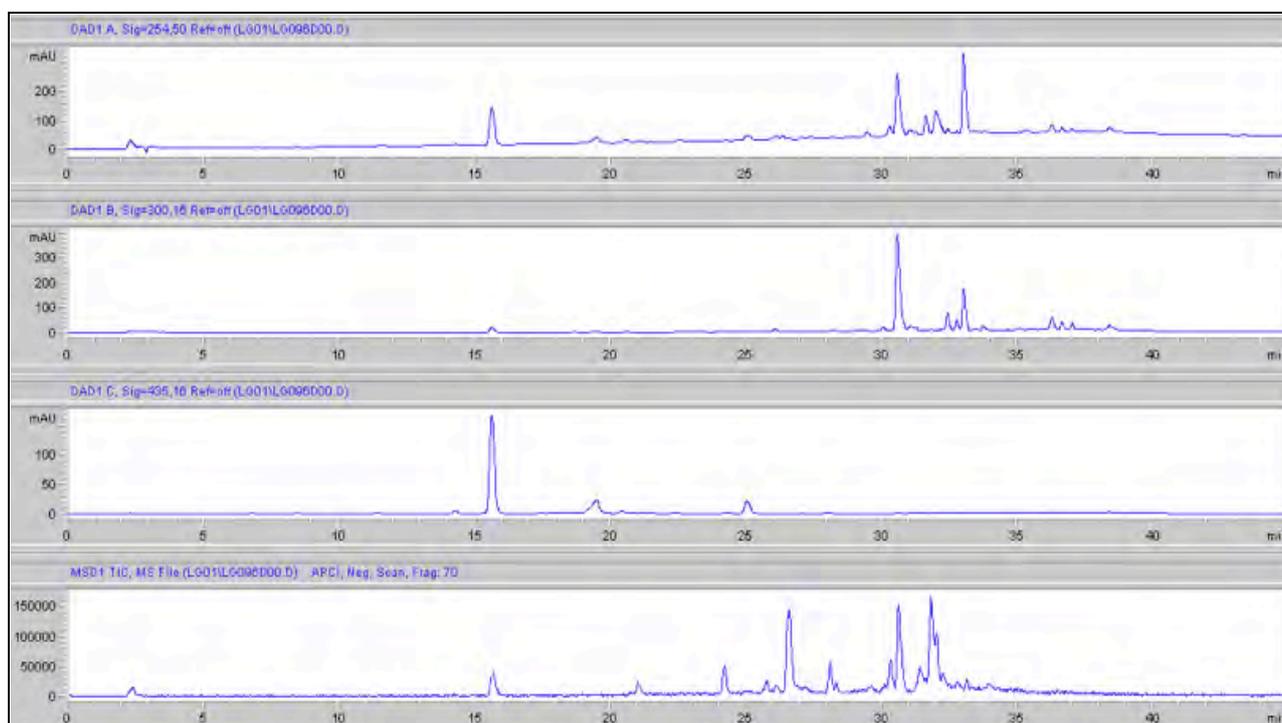


Figure 35 : Chromatogramme de la fraction β4 aux longueurs d'onde 254nm, 300nm et 435nm et spectre MS [M-H].

Bien que les quantités obtenues fussent insuffisantes pour être étudiées sur RMN, les résultats permettent quand même d'identifier des composés. De nombreux pics observés en CLHP analytique ont des spectres UV/visibles spécifiques des molécules recherchées (Figure 36).

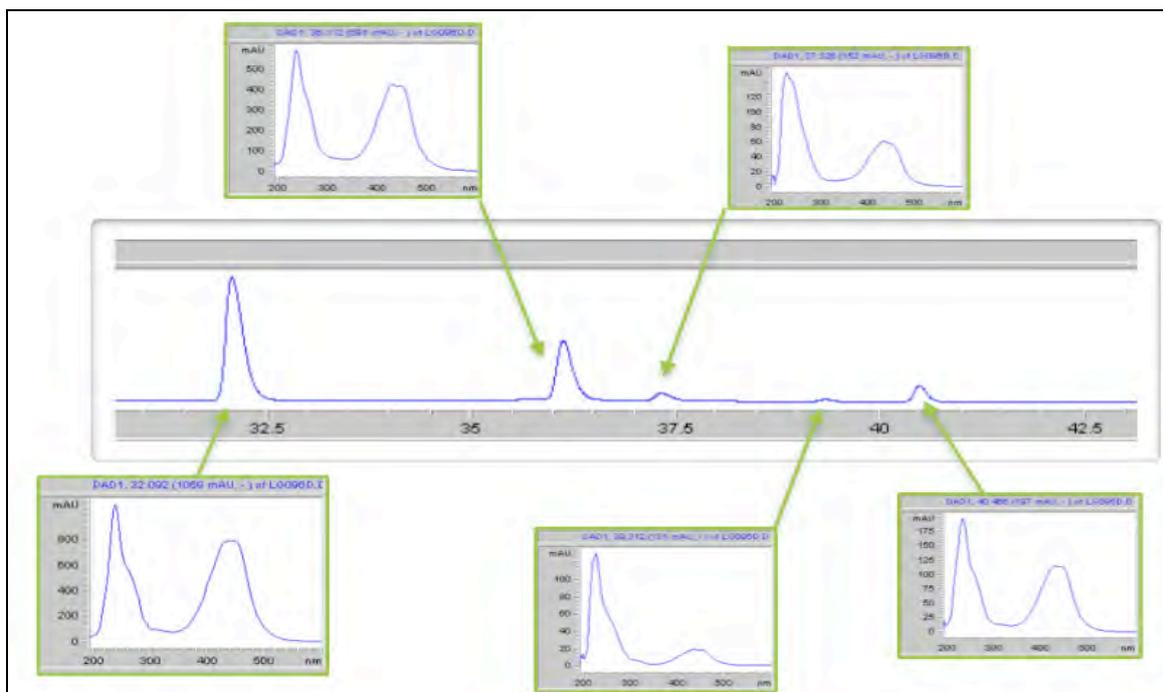


Figure 36 : Agrandissement de la portion d'un chromatogramme de la fraction $\beta 4$ montrant les spectres UV/visible des différents composés d'intérêt. ($\lambda = 435\text{nm}$)

Les m/z étant connus, les résultats donnés par le spectromètre de masse permettent d'identifier la cinnabarine (m/z 287,1) comme étant le composé majoritaire. Les autres composés sont, dans l'ordre d'élution, l'acide cinnabarinique (m/z 300,9) le tramesanguin (m/z 285,0) et la pycnoporine (m/z 317,4). Un composé ayant le même spectre d'absorption que les autres composés avec un m/z de 330,1 ne figure pas dans la littérature, il semble qu'il ne soit pas connu (Figure 37).

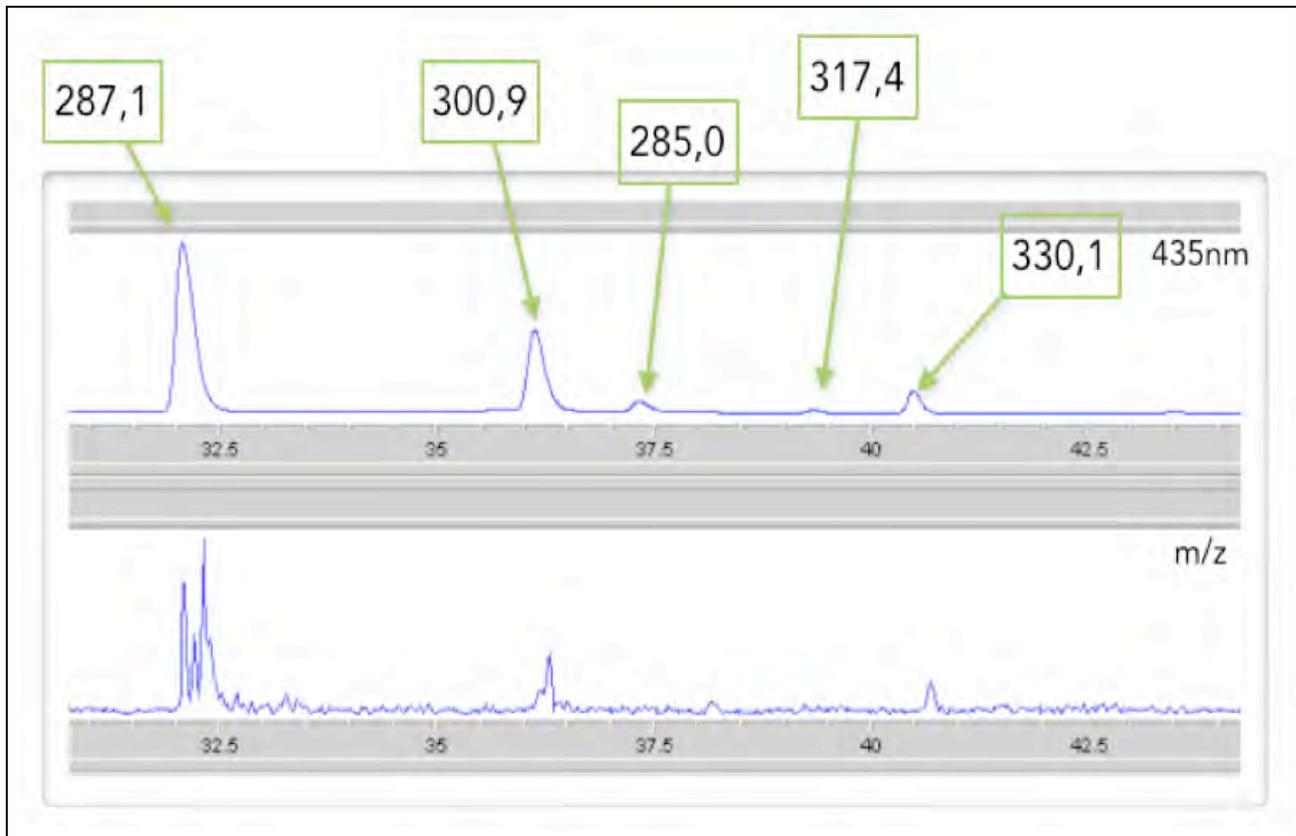


Figure 37 : Agrandissement de la portion d'un chromatogramme de la fraction $\beta 4$ montrant les données MS permettant de déterminer quel pic correspond à quelle molécule.

La comparaison des chromatogrammes de la fraction $\beta 4$ et de la fraction de lavage (bien que le chromatogramme de celle-ci ne soit pas de très bonne qualité) permet de dire qu'il y a bien présence de cinnabarine dans chacune des fractions ($t_r = 15,6\text{min}$ et $16,0\text{min}$), cependant les pics en fin de chromatogramme sont différents. Peut-être que la différence d'activité se trouve dans la différence des pics les moins polaires (Figure 38).

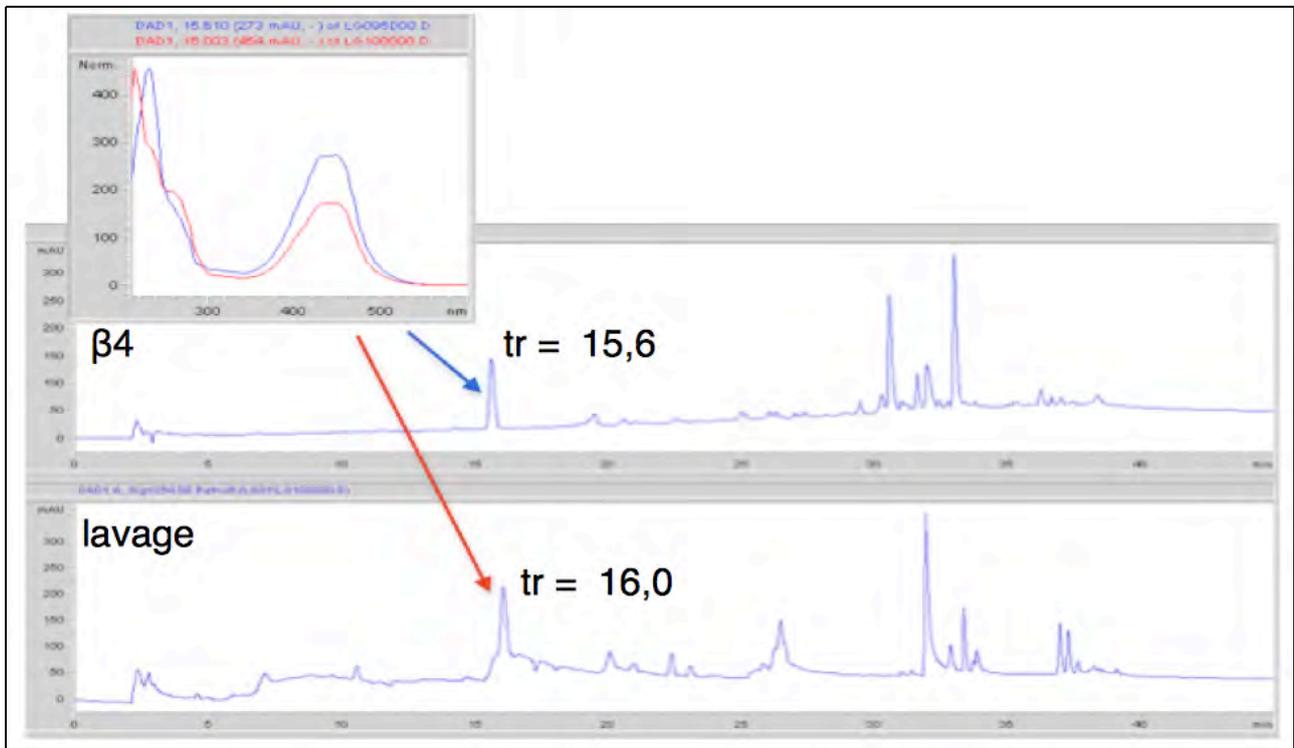


Figure 38 : Comparaison des chromatogrammes de la fraction β_4 et de la fraction de lavage. ($\lambda = 254\text{nm}$)

De même, la comparaison de ces deux fractions très actives à la fraction initiale (β) permet de mettre en évidence de nombreuses similitudes entre les chromatogrammes (Figure 39). La fraction initiale comporte tout de même des composés supplémentaires polaires en début de chromatogramme, lesquels ont été séparés lors de la colonne basse pression. La fraction β_4 étant obtenue à un pourcentage de méthanol proche de 100% les composés les plus polaires ont déjà été élués lorsque la phase mobile était plus riche en eau. Comme dit précédemment, il y a de nouveaux composés en fin de chromatogramme de la fraction de lavage. Les composés polaires en début de chromatogramme sont aussi absents dans cette fraction. Elle comporte aussi de nouveaux composés apolaires qui apparaissent en fin de chromatogramme probablement dus à l'enrichissement lors du rinçage.

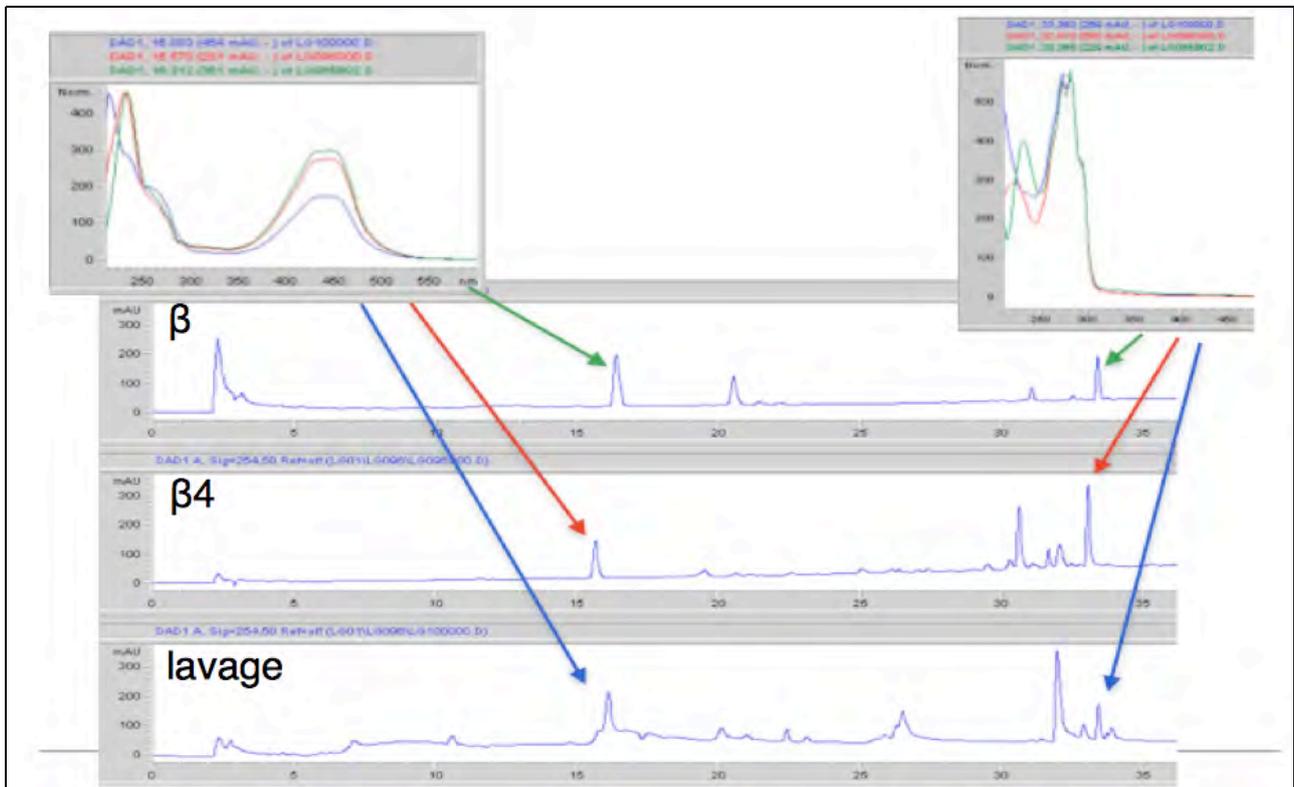


Figure 39 : Comparaison des chromatogrammes des fractions β , β_4 et de lavage. ($\lambda = 254\text{nm}$)

Une corrélation entre les chromatogrammes et les activités biologiques des différentes fractions laisse penser que l'activité n'augmente pas nécessairement avec la purification et que la sélectivité diminue avec celle-ci. Des effets de synergie sont peut être responsables de ces variations d'activité (Tableau 7).

Tableau 7 : CI_{50} des fractions β , β_4 et de lavage.

Échantillons	Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
β	$<1,563 \mu\text{g/ml}$	$1,77 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$	$10 \pm 4 \mu\text{g/ml}$	$<1,563 \mu\text{g/ml}$	$1,83 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$	$56 \pm 6 \mu\text{g/ml}$
β_4	$1,70 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$	$4,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$	$15 \pm 1 \mu\text{g/ml}$	$1,32 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$	$4,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$	$17 \pm 1 \mu\text{g/ml}$
lavage	$<0,781 \mu\text{g/ml}$	$0,94 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$	$2,49 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$	$<0,781 \mu\text{g/ml}$	$<0,781 \mu\text{g/ml}$	$4,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$
Camptotecin	$0,0552 \pm 0,0003 \mu\text{M}$	$0,14 \pm 0,02 \mu\text{M}$	$0,30 \pm 0,06 \mu\text{M}$	$<0,039 \mu\text{M}$	$<0,039 \mu\text{M}$	$0,32 \pm 0,04 \mu\text{M}$

III - Conclusion

Le champignon PP02057A a été extrait puis fractionné avec différentes techniques. Parmi ces techniques, un problème persistait. Les molécules cibles semblent faire des interactions particulières avec chaque phase stationnaire utilisée. Au vu de la structure de ces molécules, notamment, une fonction acide et une fonction amine très proches et dépendamment des distances entre ces fonctions, on peut supposer qu'il existe des équilibres en fonction du pH qui via des liaisons hydrogènes stabiliseraient la molécule lorsqu'elle est sous forme ionisée. De plus, il est difficile de stabiliser la molécule sous forme moléculaire puisque les pKa ne sont pas connus, le pH optimal est donc difficile à déterminer. Les molécules de cette famille semblent être polaires au vu des différents groupements acide, amine, aldéhyde... mais aussi apolaires du fait des cycles qui les constituent. Les interactions de ces molécules avec les différentes phases stationnaires sont d'autant plus complexes car de nombreux paramètres entrent en jeu.

Après les nombreuses techniques utilisées, il est difficile de déterminer quelles molécules exactement sont responsables de l'activité. Bien que la littérature rapporte que ce sont les dérivés de l'acide cinnabarinique qui sont actifs, les travaux menés ici ne permettent pas d'exclure la présence d'autres molécules intervenant dans l'activité. Les tests biologiques effectués sur la fraction α extraite à l'hexane montrent d'ailleurs une activité cytotoxique (bien que moins importante que pour les autres extraits) alors qu'elle ne semble pas comporter de dérivés de l'acide cinnabarinique. Certes les pics spécifiques des composés dérivés de l'acide cinnabarinique sont présents dans toutes les fractions actives, mais d'autres molécules, moins polaires et de m/z plus importants (autour de 600) sont toujours présentes et à des proportions variables. Bien qu'il soit difficile de démontrer la présence constante d'un pic en particulier, il n'est pas possible d'écarter la possibilité d'un effet de synergie.

Malgré que les spectres RMN obtenus n'aient pas permis de déterminer les structures exactes des composées, la comparaison des données obtenues à celles de la littérature permet de dire avec certitude que la cinnabarine, l'acide cinnabarinique, le tramesanguin et la pycnoporine sont présents dans le champignon étudié. De plus, un composé non identifié dans la littérature dont le rapport m/z est de 330,1 semble inconnu. Bien que minoritaire, une quantité importante de champignon et une méthode optimisée permettrait de l'isoler et l'identifier.

Ce projet a permis d'explorer la composition chimique du champignon et d'étudier différentes méthodes d'extraction et de séparation. La faible quantité de matière première n'a pas permis d'aller plus loin dans l'exploration mais avec des quantités plus importantes de champignon il sera possible de mettre au point une méthode optimale et donc d'obtenir de plus grandes quantités de chaque molécule d'intérêt. Les spectres RMN pourront ainsi être obtenus ce qui permettra de découvrir de nouvelles structures.

L'élaboration de différentes méthodes m'a permis d'apprendre énormément sur les techniques de séparation mais aussi sur cette catégorie particulière de molécules. J'ai pu acquérir beaucoup d'autonomie et de connaissances au sein du laboratoire. Ainsi je me permet de me prononcer sur la méthode qui me semble la plus intéressante à poursuivre.

L'utilisation de la colonne basse pression me semble pertinente. Elle permet de travailler directement sur un extrait brut et d'en avoir une bonne séparation avec des fractions très actives. Les solvants d'élution pourraient être changés notamment en utilisant des solvants plus drastiques tels que l'acétonitrile ou l'acétone. Les fractions obtenues pourraient ensuite faire l'objet d'une colonne préparative afin d'obtenir des fractions plus propres et éventuellement pures ce qui permettrait une étude RMN.

L'approche consistant à utiliser une colonne Diaion semble aussi intéressante. En effet, certaines fractions sont très actives avec une sélectivité importante et les rendements sont satisfaisants. L'optimisation de cette méthode permettrait peut être d'obtenir des fractions plus pures.

Bien que non terminée cette étude est très prometteuse car le potentiel anticancéreux des molécules étudiées est encourageant. L'efficacité d'une seule molécule ne pouvant être prouvée, la question d'effet de synergie reste envisageable. Bien qu'aujourd'hui les traitements utilisés reposent sur la pureté chimique des molécules, les thérapies de demain auront peut-être une approche plus globale. La notion de « totum » est d'ailleurs d'actualité. L'ensemble des molécules d'une plante étant dans plusieurs cas plus actif qu'une molécule isolée de cette même plante. Cela s'explique par les effets de synergie, de potentialisation ou même d'antagonisme de l'ensemble des molécules actives dépendamment de la dose total de la drogue mais aussi de la quantité proportionnelle de chaque composé.³⁷

Le cancer étant aujourd'hui une pathologie majoritaire il est important de continuer à rechercher de nouvelles molécules anticancéreuses qui seront peut être les traitements efficaces de demain. La nature reste une source évidente de nouvelles molécules et constitue un réservoir encore peu exploré qui offre une diversité chimique infinie.

³⁷ Cieur. C., Carillon. A. (2012) « La plante médicinale - notion de totum - implication en phytothérapie clinique intégrative » consulté le 21 septembre 2015 <http://www.simepi.info/spip.php?article57>

Références

- 1 - Trousse d'enseignement de l'Association forestière canadienne « La forêt boréale : un héritage mondial ». consulté le 3 juin 2015
(http://www.canadianforestry.com/kits/francais/vol7_f.pdf/02_heritage_mondial.pdf)
- 2 - Gouvernement du Canada « La forêt boréale au Canada » consulté le 3 juin 2015
(<https://www.rncan.gc.ca/forets/boreale/13072>)
- 3 - Internationale Agency for Research on Cancer – World Health Organization - World Cancer Report 2014 : 1-16
- 4 - Organisation Mondiale de la Santé – Profil des pays pour le cancer 2014
- 5 - Taxoïdes anticancéreux, Cours M2, Dr. Joëlle Dubois, ICSN, Paris sud, 2015
- 6 - Médicaments, l'officine de la nature (2013) *Science et santé* 13 : 27-37
- 7 - J-Y. Mérour (2004) La mer, source de molécules bioactives, *Science* 3 : 15-22
- 8 - Atthasampunna P., Chang S.T. (1994) Mushroom's Magic, *Le courrier de l'Unesco* 17 (6) :16-16
- 9 - Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S, Guy PH., Larpent JP., Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier Y. et Veau P. (1985) Moisissures utiles et nuisible. Importance industrielle
- 10 - Huifen C., Xiucan L., Dinshaw J.P. (1996) DNA Bending and Unwinding Associated with Actinomycin D Antibiotics Bound to Partially Overlapping Sites on DNA, *Journal of Molecular Biology* 258 : 475-479
- 11 - Institut National de la santé et de la recherche médicale « Protéine p53 : le bon timing pour éviter le cancer » consulté le 10 septembre 2015
(<http://www.inserm.fr/espace-journalistes/proteine-p53-le-bon-timing-pour-eviter-le-cancer>)
- 12 - Zajkowicz A., Gdowicz-Klosok A., Krzesnicak M., Scieglinska D., Rusin M. (2015) Actinomycin D and nutlin-3a synergistically promote phosphorylation of p53 on serine 46 in cancer cell lines of different origin, *Cellular Signalling* 27 : 1677–1687

- 13** - Takusagawa F., Carlson RG., Weaver RF. (2001) Anti-leukemia selectivity in actinomycin analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 : 719-725
- 14** - Graf E., Schneider K., Nicholson G., Ströbele M., Jones A.L., Goodfellow M., Beil W., Süßmuth R.D., Fiedler H-P. (2007) Elloxazinones A and B, New Aminophenoxazinones from *Streptomyces griseus* Acta 2871, *Journal of antibiotics* 60 (4): 277–284
- 15** – Bendic C., Volanschi E., (2006) Molecular Modeling of the Interaction of Some Phenoxazone – Antitumoral Drugs with DNA, Internet Electronic *Journal of Molecular Design* 5 (6) : 320-330
- 16** – Pasceri R. , Pasceri R., Siegel D., Ross D., Moody C.J. (2013) Aminophenoxazinones as Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO). Synthesis of Exfoliazone and Chandrananimycin A, *Journal of Medicinal Chemistry* 56 : 3310-3317
- 17** - Bruyneel F., Dive G., Marchand-Brynaert J. (2012) Non-symmetrically substituted phenoxazinones from laccase-mediated oxidative cross-coupling of aminophenols: an experimental and theoretical insight, *Organic Biomolecular Chemistry* 10 :1834-1846
- 18** - Dias A. D., Urban S., (2009) HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Natural Product Communications* 4 (4) : 489-498
- 19** - Smânia J. A., Marques C.J.S., Smânia E.F.A., Zanetti C.R., Carobrez S.G., Tramonte R., Loguercio-Leite C. (2003) Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr, *Phytotherapy Research* 17, 1069–1072
- 20** - Smânia E. F. A., Smânia J.A., Loguercio-Leite C. (1998) Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products, *Review of Microbiology* 29 (4)
- 21** - Food and Agriculture Organisation of the United Nations « Produits forestiers non ligneux : Champignons comestibles sauvages vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations. » consulté le 3 juin 2015 (<http://www.fao.org/3/a-y5489f.pdf>)
- 22** - Francia C., Fons F., Poucheret P., Rapior S. (2007) Activités biologiques des champignons utilisations en médecine traditionnelle, *Annales de la Société d'Horticulture et d'Histoire Naturelle de l'Hérault* 147 (4) : 77-88
- 23** - Dias A. D., Urban S., (2009) HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Natural Product Communications* 4 (4) : 489-498

- 24** - « La chromatographie » consulté le 11 septembre 2015
(<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/>)
- 25** - Introduction à la chromatographie, Cours M2, Pr. Taverna, Paris sud 2015
- 26** - Couplage, Cours M2, Dr. Maciuk, Paris sud 2015
- 27** - « Identification en CCM » consulté le 11 septembre 2015
(<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/CCM/identification-ccm.php>)
- 28** - « Dyeing Reagents for Thin-Layer and Paper Chromatography » consulté le 11 septembre 2015 (http://www.clubdeccm.com/PDF/Dyeing_Reagents_TLC.pdf)
- 29** - « Du dépôt à la séparation, Cas concret de l'importance du dépôt et du soin nécessaire à la migration : règles de base, astuces, anomalies rencontrées... » consulté le 11 septembre 2015)(http://www.clubdeccm.com/PDF/20081023/20081023_01.pdf)
- 30** - « Chromatographie sur colonne » consulté le 11 septembre 2015 (<http://www.zysman-colman.com/courses/chm302/Chromatographie%20sur%20colonne.pdf>)
- 31** - Introduction à la chromatographie, Cours M2, Pr. Taverna, Paris sud 2015
- 32** - « Chromatographie en phase gazeuse » consulté le 11 septembre 2015
(<http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/CPG/CPG.php>)
- 33** - La chromatographie liquide haute performance, Véronique Jacob, IUT de Chimie de Grenoble p9-12
- 34** - Principe de la spectrométrie de masse, Cours M2, Dr. Touboul, ICSN, Paris Sud
- 35** - Résonance magnétique nucléaire, Cours M2, Pr. Ongeri, CNRS, Paris Sud
- 36** - Ducauze C. (2014), Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie : Concept, démarche et méthode 113-118
- 37** - Cieur. C., Carillon. A. (2012) « La plante médicinale - notion de totum - implication en phytothérapie clinique intégrative » consulté le 21 septembre 2015
<http://www.simepi.info/spip.php?article57>

Annexe I : Partie Expérimentale

A – Approvisionnement de la matière première

Le champignon a été récolté dans la forêt avoisinante par une association forestière qui a pu l'identifier avec certitude. Le champignon a été stocké au congélateur puis séché au moyen d'un lyophilisateur. La masse totale de matière sèche était d'environ 40g.

B – Méthode d'extraction du champignon

Le champignon sec a été préparé pour tester plusieurs solvants d'extraction. Pour cela, 10g de champignon ont été broyés au moyen d'un moulin à café propre. Ensuite 3 fois 3g de matière ont été pesés puis déposés dans des ballons de 250mL. Trois solvants ont été choisis que sont l'hexane, l'éthanol 95% et un mélange éthanol/eau 50/50 puis 100mL de chacun a été versé dans 3 ballons. Pour chaque solvant, l'extraction a été réalisée trois fois pendant 1h30 chacune chauffée au moyen d'une mante chauffante. Les solvants étaient renouvelés à chaque extraction et le résultat était filtré puis évaporé (Figures 40 et 41).



Figure 40 : Résultat du champignon après broyage.



Figure 41 : Image des trois ballons après extractions avec de gauche à droite : le ballon extrait à l'hexane, à l'éthanol/eau et à l'éthanol.

Les rendements obtenus pour chaque solvant sont 1,96%, 8,21% et 14,71% respectivement. Les résultats biologiques ont mis en évidence des activités cytotoxiques intéressantes permettant de choisir un solvant. La quantité de champignon restante, soit 33,1g, a été extraite à reflux quatre fois pendant 1h30 avec de l'éthanol 95% permettant d'obtenir une masse de 3,18g soit un rendement de 9,59%.

C – Optimisation du milieu d'élution et du révélateur CCM

Les CCM utilisées sont constituées d'un support en aluminium recouvert d'une couche de silice.

Différents milieux d'élution inspirés de la littérature, ainsi que différents révélateurs ont été testés sur les trois extraits bruts à l'hexane, éthanol/eau 50:50 et éthanhol 95% (dans l'ordre de gauche à droite sur les CCM dans les tableaux 8, 9 et 10).

Les dépôts étaient en général de 20µL pour des solutions préparés à 10 mg/mL.

Tableau 8 : Tests de CCM avec différentes phases mobiles sans révélateur à 365nm.

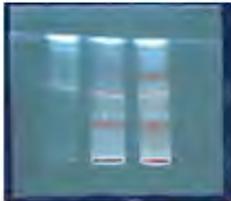
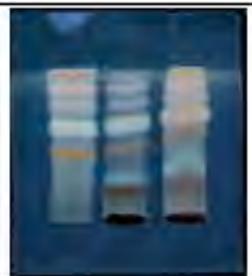
Milieu	Révélateur	Longueur d'onde	CCM
CHCl ₃ /MeOH 10:1 + 0,1% AF	aucun	365nm	
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 26:14:3 + 0,1% AF	aucun	365nm	
AcOEt/AcOH 9:1	aucun	365nm	
Toluène/AcOEt/AcOH glacial/AF 12:6:1:1	aucun	365nm	

Tableau 9 : Tests CCM avec différentes phases mobiles révélées au NP/PEG visualisées à 365nm.

Milieu	Révéléateur	Longueur d'onde	CCM
CHCl ₃ /MeOH 10:1 + 0,1% AF	NP-PEG	365nm	
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 28:14:3 + 0,1% AF	NP-PEG	365nm	
AcOEt/AcOH 9:1	NP-PEG	365nm	
Toluène/AcOEt/AcOH glacial/AF 12:6:1:1	NP-PEG	365nm	

Tableau 10 : Tests CCM avec la même phase mobile mais des révéléateurs différents.

Milieu	Révéléateur	Longueur d'onde	CCM
CHCl ₃ /MeOH 10:1 + 0,1% AF	Vanilline	Visible	
CHCl ₃ /MeOH 10:1 + 0,1% AF	H ₂ SO ₄	365nm	
CHCl ₃ /MeOH 10:1 + 0,1% AF	<u>Dragendorff</u>	Visible	

D – Mise au point de la méthode CLHP analytique

La méthode CLHP analytique a été réalisée sur un appareil Agilent 1100 series avec une pompe quaternaire. Les détecteurs utilisés étaient, dans un premier temps un DAD puis dans un deuxième temps un DAD couplé à un spectromètre de masse. Les acquisitions avec le DAD ont été réalisées à une longueur d'onde typique des composés recherchés, soit 435nm, mais aussi à des longueurs d'ondes plus communes ; 254nm et 300nm. Le spectromètre de masse a été utilisé avec un système APCI et les résultats sont obtenus en $[M-H]^-$. Les échantillons sont préparés à une concentration de 10 mg/mL puis injectés à un volume de 20 μ L.

Une première méthode a été testée selon la littérature. La colonne utilisée est une Kinetex XB C18. 250 x 4,6mm (5 μ). La méthode utilisée est un gradient acétonitrile acidifié (+0,1% acide formique) / eau acidifiée (+0,1% acide formique) variant de 10% à 100% avec un palier à 75% en 35min avec un débit de 1 mL/min. Les résultats n'étaient pas satisfaisants. Le gradient a donc été modifié en augmentant la durée du gradient allant de 10 à 75%. Les résultats n'étaient toujours pas satisfaisants, notamment l'acide cinnabarinique et la cinnabarine n'étaient pas séparées (Figure 42).

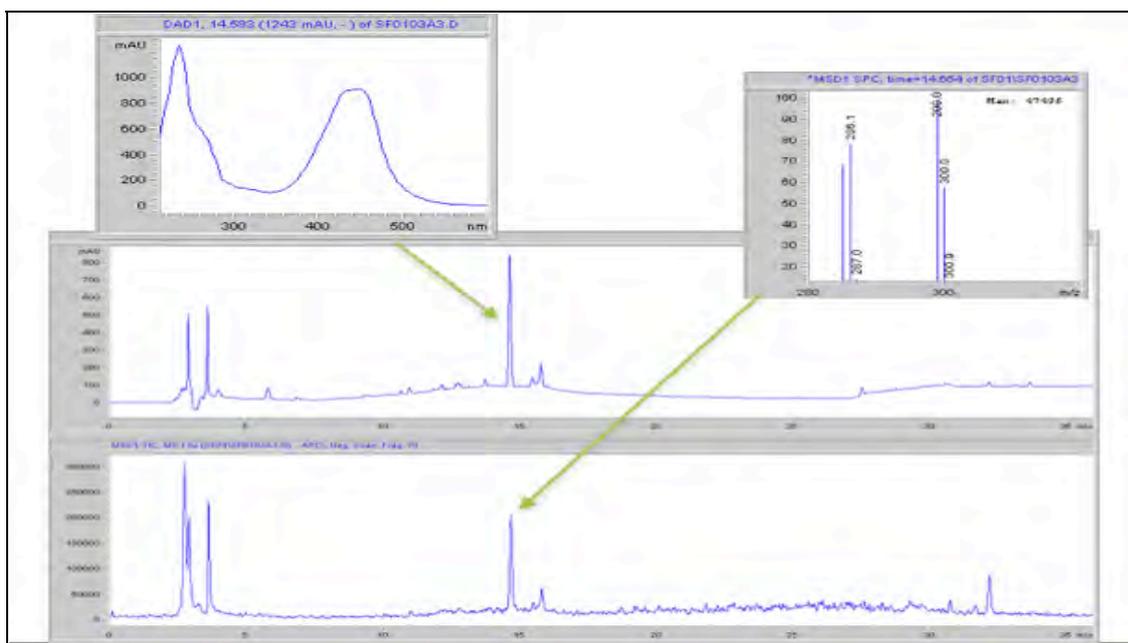


Figure 42 : Chromatogramme du premier test CLHP montrant que la cinnabarine et l'acide cinnabarinique ne sont pas séparés. ($\lambda = 254\text{nm}$)

Une nouvelle approche est alors essayée. La colonne utilisée est une Kinetex Biphenyl 100Å 250 x 4,6mm (5µ). La méthode a été optimisée pour aboutir à un gradient méthanol acidifié (+0,01% acide formique) / eau acidifiée (+0,01% acide formique) 60% à 100% en 35 minutes avec un débit de 1 mL/min permettant ainsi d'avoir une bonne séparation des pics notamment de la cinnabarine, l'acide cinnabarinique et autres composés de la même famille.

E – Déroulement de la méthode utilisée pour la colonne Diaion® HP-20

L'extrait brut obtenu a ensuite fait l'objet d'une séparation avec une colonne avec particules Diaion® HP-20 de chez Alpha Aesar. Cette technique permet de faire une séparation en fonction de la polarité et de la taille des particules. L'élution a été faite avec des solvants de polarités décroissantes : eau, méthanol 50%, méthanol 100%, acétate d'éthyle, acétone et alcool isopropylique.

Les fractions ont été déposées sur CCM afin de savoir lesquelles rassembler. Chaque rassemblement correspond à un solvant (Figure 43) et à une fraction. Chacune de ces fractions a été passée sur CLHP analytique puis testée biologiquement (Tableau 11).

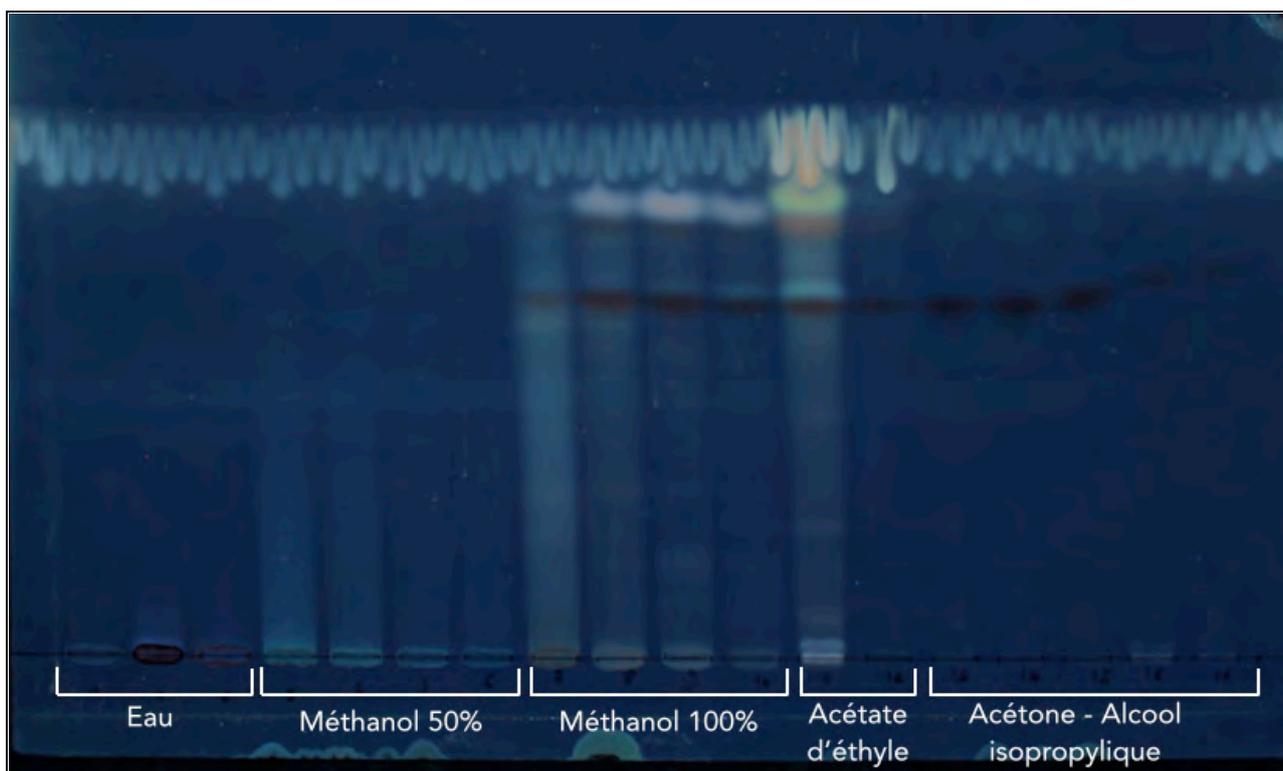


Figure 43 : CCM des fractions obtenues par séparation avec la colonne Diaion.

Tableau 11 : Correspondance solvant-fraction.

Solvant	Fraction
Eau	B
Méthanol 50%	C
Méthanol 100%	D
Acétate d'éthyle	E
Acétone + alcool isopropylique	F

F - Méthode utilisée pour la colonne de silice

Cette colonne permet de séparer les composés en fonction de leur affinité pour les groupements silanols et donc de leur polarité. Pour déterminer la quantité de silice à utiliser pour faire la colonne, dans ce cas particulier où l'objectif est de séparer un mélange complexe, il faut multiplier par 100 la masse de l'extrait à séparer. Ici la masse de l'échantillon était de 800mg. La colonne a donc été préparée avec 80g de silice. Il faut ensuite choisir la colonne en fonction du volume qu'occupe 80g de silice. Pour cela, il faut multiplier par 2 la masse, soit 160. Ce chiffre donne le volume d'eau que doit pouvoir contenir la colonne qui sera utilisée. Une fois la masse de silice connue et la colonne choisie, il faut mettre la silice dans la colonne. La silice est alors mélangée au solvant d'élution puis versée dans la colonne en veillant à ne pas faire de bulles.

Un mélange toluène / acétate d'éthyle a été utilisé comme solvant d'élution avec des rapports 30:10, 20:10 et 10:10 suivi d'un lavage au méthanol puis méthanol acidifié (0,1% acide formique).

Lors de l'élution, un débit d'air est appliqué manuellement à l'entrée de la colonne. Ce débit d'air permet d'accélérer l'élution.

Les fractions ainsi obtenues ont été déposées sur CCM (milieu toluène / acétate d'éthyle 20:1) afin d'être rassemblées. Le choix du rassemblement des tubes se fait grâce à la révélation de la plaque. En comparant ainsi les différents spots élués, et en évaluant la ressemblance ou la différence entre chacun d'entre eux, on peut faire des fractions (Figures 44, 45 et 46). Ces fractions ont ensuite fait l'objet de tests biologiques afin d'orienter sur la composition de chacune, notamment la présence de composés cytotoxiques.

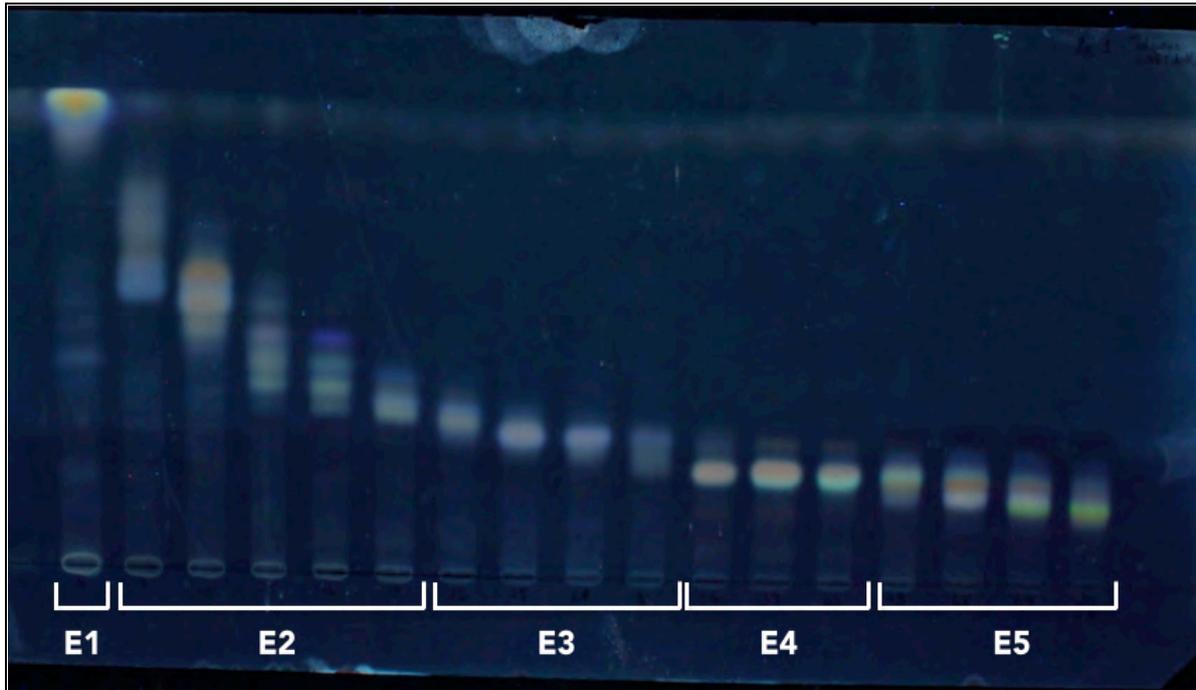


Figure 44 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement des fractions 1 à 5.

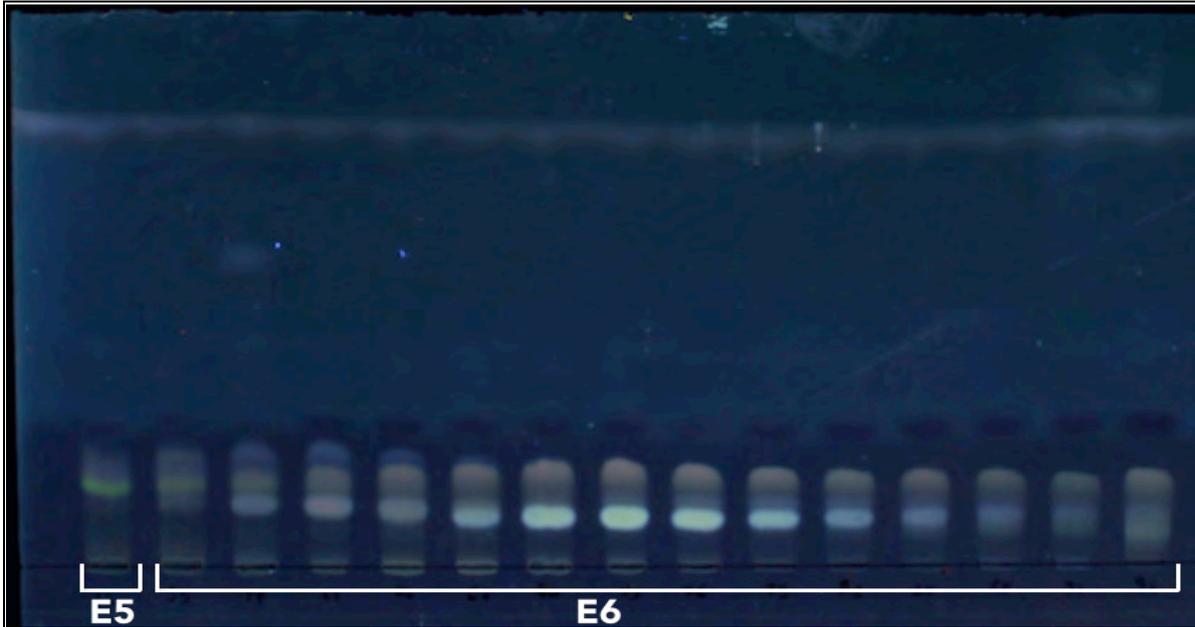


Figure 45 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement des fractions 5 et 6.

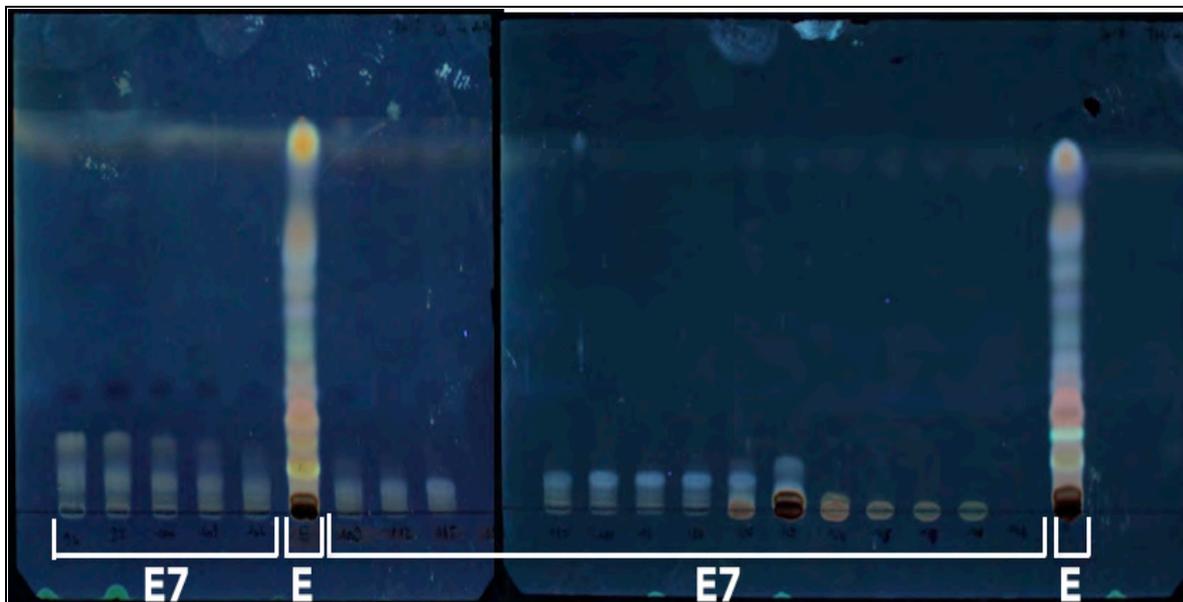


Figure 46 : Dépôts des tubes obtenus par colonne de silice avant le regroupement de la fraction 7 avec dépôt de la fraction initiale E.

G – Méthode utilisée en CLHP préparative

L'appareil utilisé est un Shimadzu Prominence avec une colonne Kinetex Biphenyl 100Å 250 x 21,2mm (5µ). La méthode optimisée sur CLHP analytique a été transposée sur CLHP préparative. La méthode a été légèrement modifiée pour être adaptée à la colonne et à l'appareil. Ainsi un gradient éthanol acidifié / eau acidifiée 70% à 100% en 50minutes avec un débit de 20 mL/min a été utilisé. Le volume d'injection étant de 250µL. Le détecteur utilisé est un DAD balayant les longueurs d'onde allant de 200 à 600nm.

Bien que quelques modifications aient été nécessaires, les résultats obtenus en terme de séparation étaient satisfaisants. Les pics ont été collectés à raison de 10mL par tube, permettant de sélectionner les pics d'intérêt. Puis la séparation a été répétée de nombreuses fois de façon à obtenir des masses suffisantes.

H – Expérimentation d'une méthode d'extraction Liquide Liquide

Au vu du profil des molécules, une extraction liquide liquide a été envisagée. En jouant sur les différentes formes ionisées ou moléculaire, l'extraction liquide-liquide aurait pu permettre de séparer les composés.

L'extrait a été solubilisé dans une phase aqueuse basique (NaHCO₃) à pH 11. Puis de l'acétate d'éthyle a été ajouté. A pH basique, les fonctions acides sont ionisées et les fonctions basiques sont neutres. Les molécules avec plus de fonctions acides sont supposées rester dans la phase aqueuse et les molécules sous forme moléculaire passent dans la phase organique.

Le milieu est neutralisé avec de l'acide (HCl). Dépendamment des Pka des différentes fonctions, la molécule peut prendre une forme zwitterionique, il se peut alors qu'il y ait un équilibre entre la fonction acide et la fonction amine des molécules d'intérêt. La molécule prend alors une forme stable et l'affinité pour une phase plutôt qu'une autre est difficile à déterminer. Le milieu est alors acidifié en ajoutant de l'acide. Les fonctions basiques telles que les amines prennent une forme ionisée soluble dans la phase aqueuse alors que les fonctions acides restent protonées et donc plutôt affines pour la phase organique.

Au vu des nombreuses et différentes fonctions présentes sur les molécules d'intérêt et de l'absence de connaissance des Pka de ces molécules, il a été difficile d'obtenir des résultats intéressants avec cette méthode. Les molécules ont une affinité trop importante pour l'acétate d'éthyle et semblent y rester quel que soit le pH de la phase aqueuse.

I – Appareil RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 400 utilisé à 400,13MHz pour les spectres ¹H et 100,61MHz pour les spectres ¹³C.

J – Méthode de la colonne basse pression

Une méthode de séparation sur colonne C18 basse pression est envisagée. L'appareil utilisé est un Buchi C-620 couplé à un détecteur UV C-635. La colonne utilisée est une colonne RP18ec 12 x 150 mm, 40-63µm.

Pour la méthode de séparation la phase mobile a été optimisée à partir de CCM C18. Des dépôts successifs en faisant varier les solvants ont permis de déterminer la phase mobile optimale soit un gradient méthanol / eau + 0,01% acide formique 40% à 100% à raison de 5 mL/min pendant 40 minutes. La difficulté de solubilisation de l'extrait dans la phase mobile n'a pas permis de l'injecter directement dans l'injecteur. Il a donc fallu préparer un drypack. Le drypack consiste à mélanger de la phase stationnaire avec de l'extrait à séparer pour que celui-ci se fixe dessus, permettant de faire un dépôt sec.

Pour préparer le drypack, 425mg de matière première ajoutés à 480mg de silice C18 (extraite d'une colonne similaire à celle utilisée pour la séparation) ont été mélangés à l'aide d'un solvant : méthanol 2mL + eau 0,5mL. Le mélange a ensuite été évaporé au rotavapor afin que les composés de la fraction se déposent sur la silice. Le drypack a ensuite été déposé en haut de colonne puis élué au moyen des solvants décrits précédemment. L'élution a été suivie d'un lavage à l'acétone.

Les fractions ont été récupérées à raison de 15mL par tube. Toutes les fractions ont été déposées sur CCM (éluant : méthanol / eau 8:2 révélé à H₂SO₄ visualisé à 365nm) pour ensuite être rassemblées en fonction des similitudes des profils (Figure 47). Quatre fractions ont été obtenues plus une supplémentaire par lavage à l'acétone (la première fraction semble avoir été mal éluée, il s'agirait de méthanol 100% qui serait resté dans le tube avant l'installation de la colonne) (Figure 48).

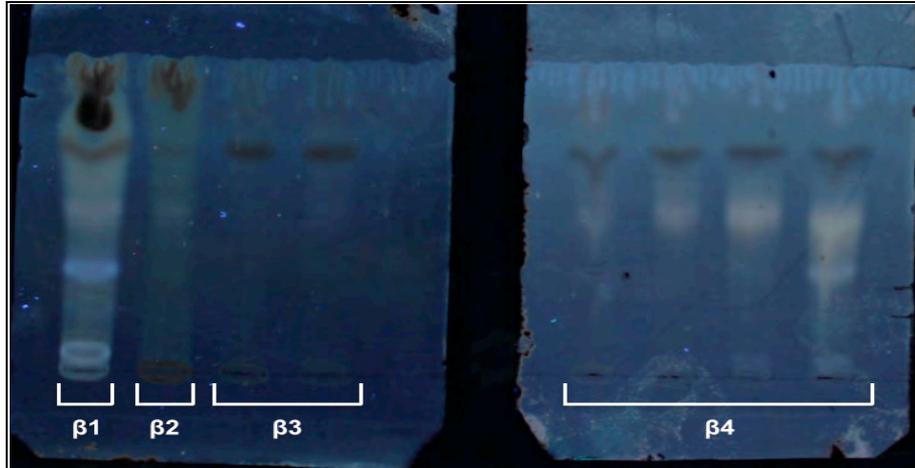


Figure 47 : CCM des tubes 1 à 8 obtenus après la colonne basse pression avant regroupement des fractions β1 à β4.

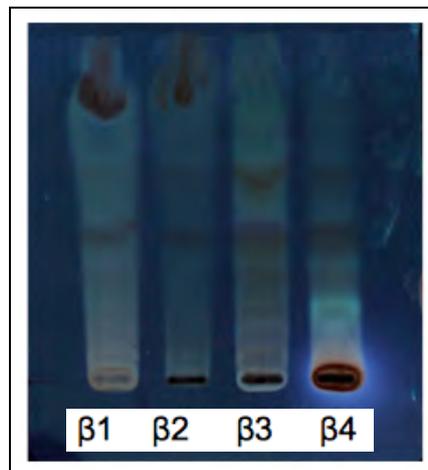


Figure 48 : CCM C18 des 4 fractions obtenues par basse pression. (éluant : méthanol/eau 6:4 + 0,1% acide formique. Révélateur : H₂SO₄ visualisé à 365nm)

Annexe II : Tests biologiques

L'objectif du stage étant de cibler les molécules cytotoxiques, des tests de cytotoxicité ont été réalisés lors de chaque fractionnement.

Pour cela, trois lignées cellulaires sont utilisées :

- A-549 : lignée cellulaire issue de carcinome pulmonaire humain.
- DLD-1 : lignée cellulaire issue d'adénocarcinome colorectal humain.
- WS-1 : lignée cellulaire issue fibroblaste cutané humain.

Les tests sont effectués sur deux lignées cancéreuses humaines et une lignée saine permettant ainsi d'évaluer la cytotoxicité et la sélectivité des fractions. L'activité d'un extrait est considérée comme intéressante lorsque la concentration inhibant la croissance de 50% des cellules est inférieure à 50 µg/mL.

Des témoins sont utilisés afin de s'assurer de la validité du test, ces témoins peuvent être :

- la camptothécine : alcaloïde pentacyclique toxique inhibitrice de la topoisomérase I.
- l'étoposide : anticancéreux inhibiteur de la topoisomérase II.

Déroulement des tests :

Lundi : les cellules qui ont préalablement été cultivées dans des flasques sont prélevées et déposées dans des plaques 96 puits : dix puits sur six lignes. Les plaques sont ensuite mises à l'étuve pendant 24h.

Mardi : les échantillons à tester sont préparés à une concentration mère décidée au préalable en fonction de la toxicité supposée : 80 mg/mL, 40 mg/mL ou 20 mg/mL. Le solvant utilisé est le DMSO. Ces concentrations initiales sont ensuite diluées de un demi afin d'avoir huit concentrations différentes. Ces dilutions sont ensuite diluées à nouveau dans du DMEM (milieu standard de culture cellulaire) et déposées dans huit puits sur trois lignes, les deux derniers puits constituant le blanc milieu (DMEM) et le blanc solvant (DMSO). Les cellules sont ensuite mises à l'étuve pour 48h. Un témoin étoposide ou camptothécine est déposé sur 3 lignes constituant une assurance de la validité du test.

Jeudi : La toxicité des fractions est évaluée avec de le test à la résazurine. La résazurine est un composé bleu qui est métabolisé par les cellules en composé fluorescent. Les puits sont rincés au PBS permettant d'éliminer les cellules mortes. Puis la résazurine est déposée dans chacun d'entre eux. La plaque est ensuite mise à incuber 1 à 2h à 37°C permettant aux cellules de métaboliser le réactif. Au moyen d'un appareil automatisé associé à un logiciel, la corrélation entre la fluorescence et le taux de survie des cellules est possible, permettant ainsi de déduire l'effet cytotoxique des différentes fractions.

Vendredi: Un deuxième test permettant d'évaluer la survie cellulaire est le test de Hoechst. Pour cela, les cellules restantes sont lysées avec un détergent : le SDS. Le réactif est ensuite déposé. Le réactif de Hoechst va se fixer à l'ADN et devenir fluorescent. Un automate lit l'intensité de la fluorescence et fait la corrélation entre celle-ci et la survie cellulaire. Il est ainsi possible de confirmer les résultats du premier test à la résazurine.

Annexe III : Spectre RMN monosaccharide

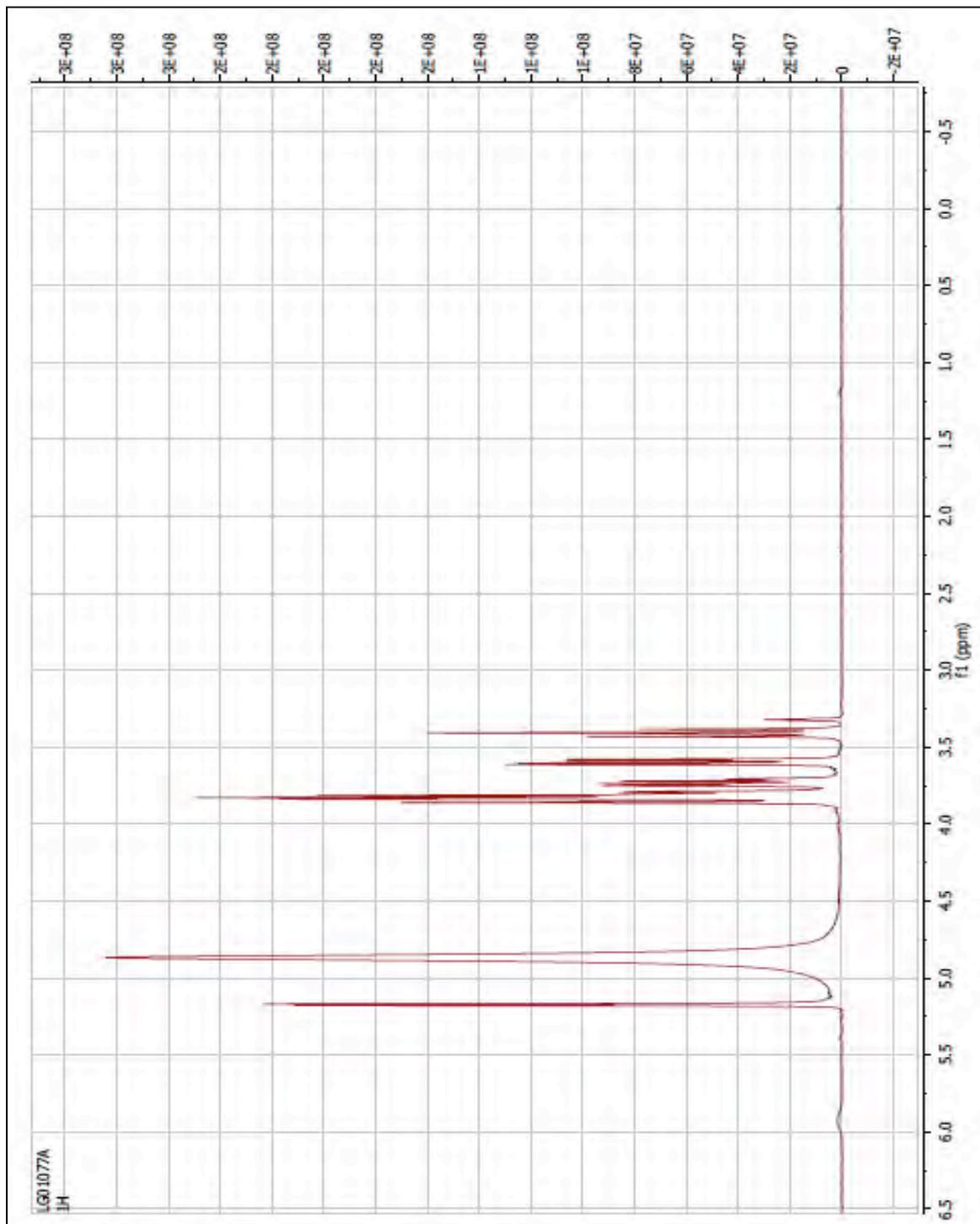


Figure 49 : RMN ^1H (400MHz, MeOH-d_4) fraction A : monosaccharide.

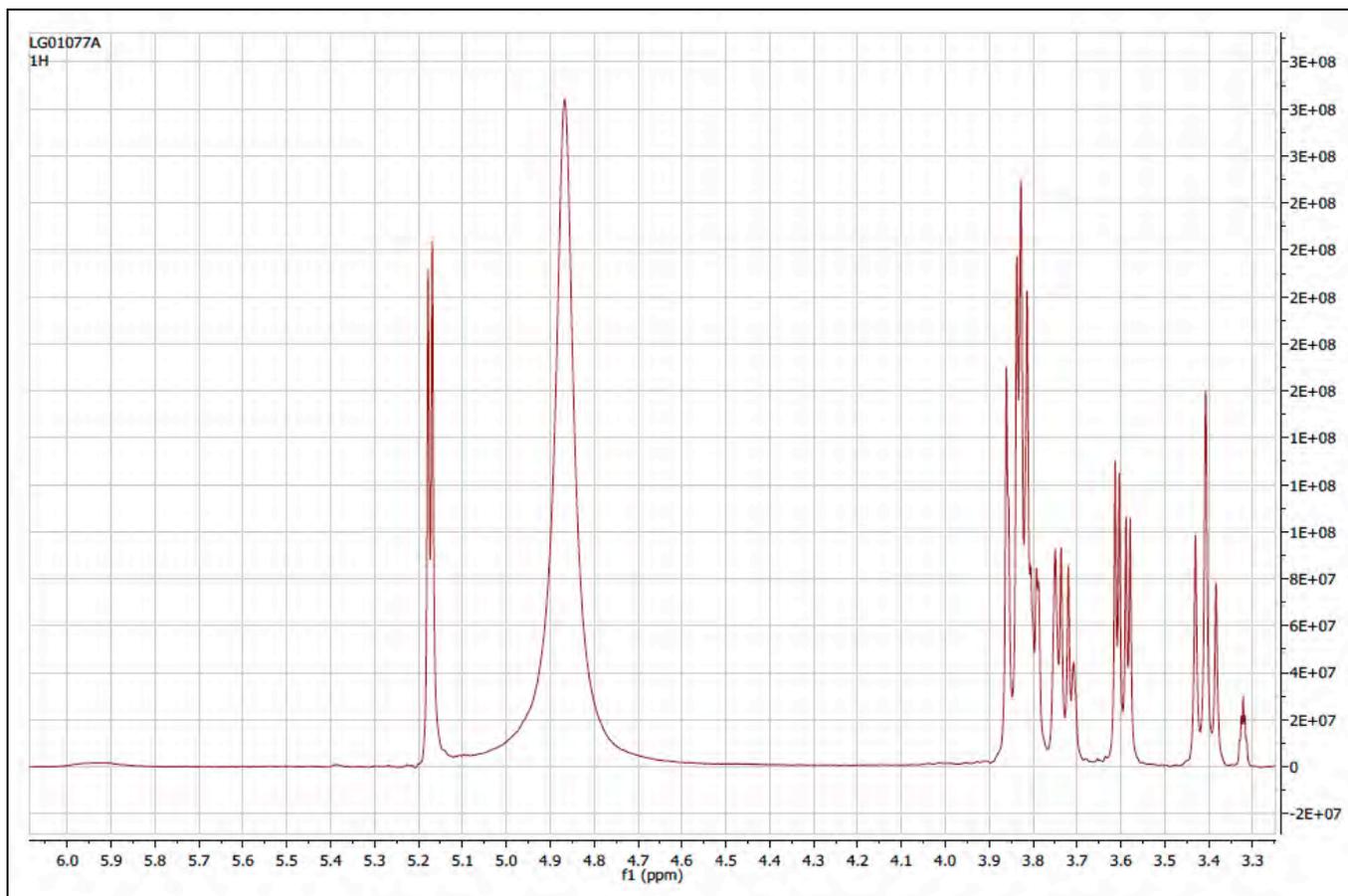


Figure 50 : Agrandissement RMN ^1H fraction A : monosaccharide.

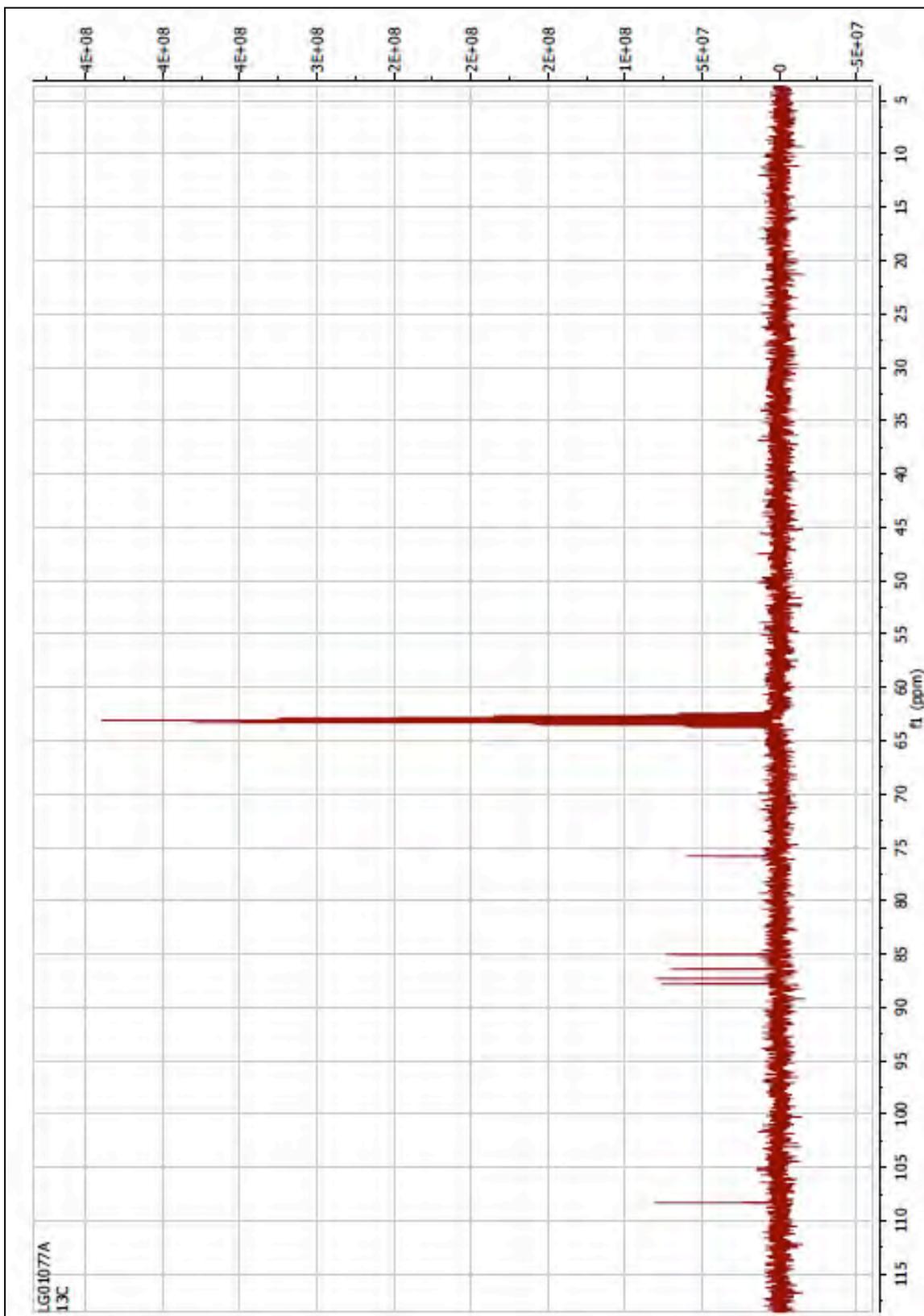


Figure 51 : RMN ^{13}C (400MHz, MeOH-d4) fraction A : monosaccharide.

Annexe IV : Diagramme récapitulatif

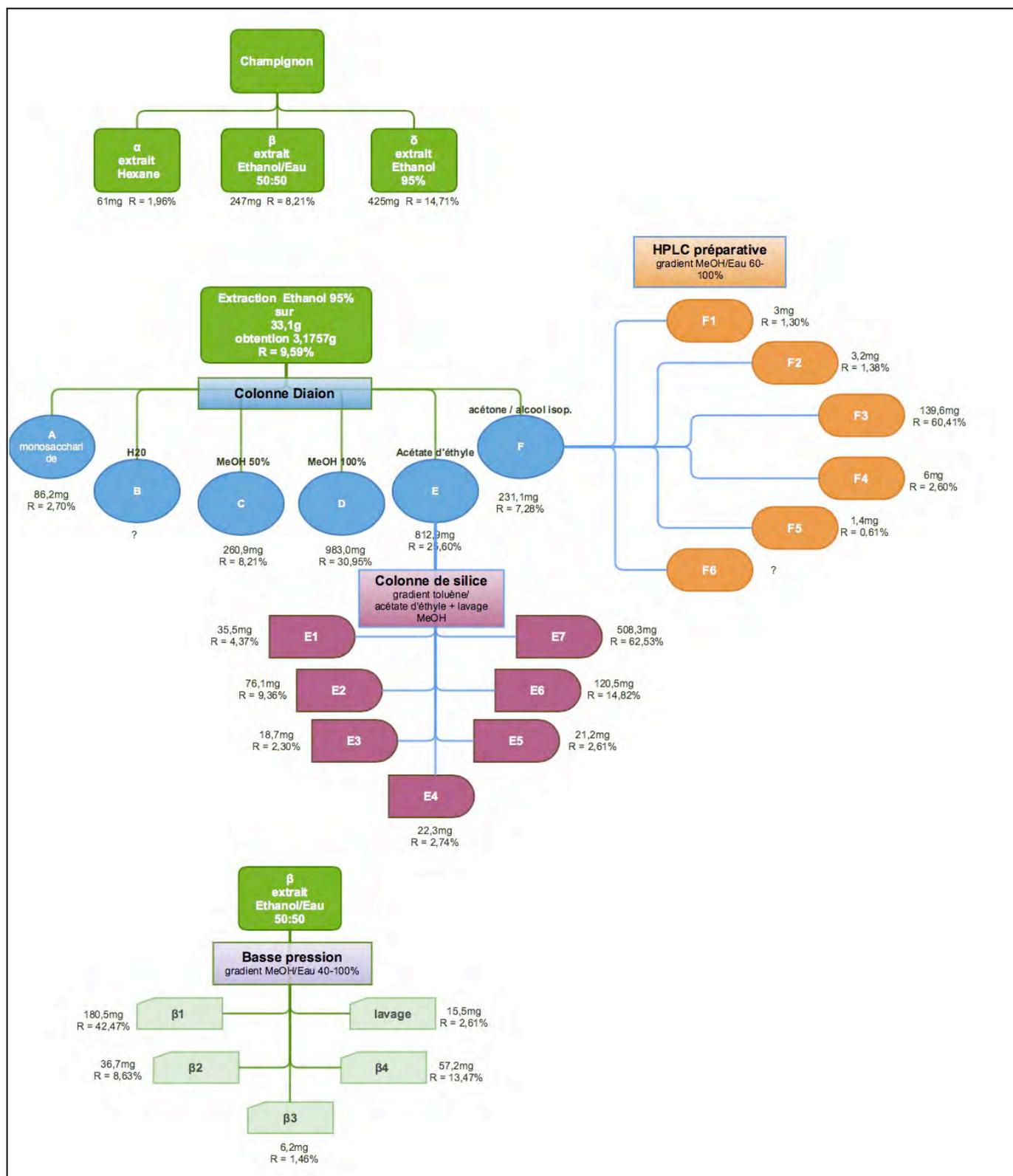


Figure 52 : Diagramme récapitulatif

Nom - Prénoms : GENTHON Lydia

Titre de la thèse : Etude et identification des composés cytotoxiques issus d'un champignon de la forêt boréale québécoise.

Résumé de la thèse :

De nombreuses molécules au squelette phénoxazone ont été isolées de la nature. Elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et biologiques et montrent des activités cytotoxiques intéressantes. La plus connue, l'actinomycine D est synthétisée par une bactérie du genre *Streptomyces*. Elle est utilisée comme antimétabolite dans le traitement de nombreux cancers dont les carcinomes des testicules, les rhabdomyosarcomes ou encore les néphroblastomes. Le squelette particulier de ces molécules semble leur conférer des activités particulières.

Plusieurs organismes sont capables de synthétiser ce type de molécules. Parmi ceux-ci, des macromycètes de la famille des *Polyporaceae* synthétisent des molécules de type acide cinnabarinique. Trois molécules dérivées de cet acide ont été identifiées qui sont la cinnabarine, le tramesanguin et la pycnoporine. Il a été mis en évidence que ces molécules ont une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses avec une faible atteinte des cellules saines.

Un polypore récolté dans la forêt boréale québécoise a montré une activité cytotoxique intéressante, sélective envers des cellules cancéreuses. Différentes méthodes de séparation ont été testées et ont permis de mettre en évidence la présence de molécules de la famille des phénoxazones dont l'acide cinnabarinique, la cinnabarine, le tramesanguin et la pycnoporine. Des méthodes de séparation usuelles telles que les colonnes de résine Diaion et de gel de silice ainsi que des Chromatographies Liquides Haute Performance (CLHP) analytique et préparative ont été testées. Une méthode de chromatographie basse pression sur phase inverse a donné des résultats intéressants. La mise en évidence de ces molécules a été faite au moyen d'un détecteur à barrettes de diodes et d'un spectromètre de masse couplés à la CLHP. Le champignon étant assez rare dans la forêt boréale, les quantités étudiées étaient insuffisantes pour obtenir des masses permettant une étude par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

MOTS CLÉS : PHENOXAZONES – POLYPORACEAE – PHYTOCHIMIE – CANCER

JURY :

**PRÉSIDENT : M. Pascal MARCHAND, Professeur de chimie organique,
Université de Nantes**

**ASSESEURS : M. Marc-Antoine Bazin, Maître de Conférences en Chimie
Thérapeutique, Université de Nantes**

**M. Olivier Grovel, Maître de Conférences en Pharmacognosie,
Université de Nantes**

**Mme Marylène Chollet-Krugler, Maître de Conférences en
Chimie Analytique, Université de Rennes**

**Adresse de l'auteur : GENTHON Lydia
12 rue du Grand Pilonnais
44470 Carquefou**