



Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe

Thi Huyen Vu

► **To cite this version:**

Thi Huyen Vu. Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe. Chimie thérapeutique. Université Rennes 1, 2014. Français. <NNT : 2014REN1S149>. <tel-01214235>

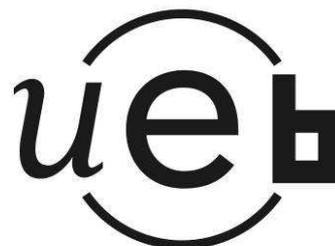
HAL Id: tel-01214235

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01214235>

Submitted on 11 Oct 2015

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

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



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale Sciences De La Matière

présentée par

Thi Huyen Vu

Préparée dans l'unité de recherche UMR CNRS 6226
Equipe PNSCM (Produits Naturels Synthèses Chimie Médicinale)
(Faculté de Pharmacie, Université de Rennes1)

**Etude des acides gras
du genre *Stereocaulon*
Etude phytochimique
du lichen *S. evolutum*
Graewe**

**Thèse soutenue à Rennes
le 10 Octobre 2014**

devant le jury composé de :

Angèle LENGO MAMBU

Professeur à l'Université de Limoges / *rapporteur*

Gaetane COLLIN

Maître de conférence à l'Université de Nantes /
rapporteur

Philippe LEGRAND

Professeur à Agrocampus Ouest de Rennes /
examineur

Manh Cuong NGUYEN

Assistant Professeur à l'institut des Sciences et
des Technologies, Hanoi, Vietnam / *Codirecteur*

Françoise LOHEZIC-LE DEVEHAT

Maître de conférences à l'Université de Rennes1/
Encadrant

Joël BOUSTIE

Professeur à l'Université de Rennes 1 /
directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier Madame le professeur Angèle Lengo Mambu et Madame le maître de conférence Gaetane Collin, pour avoir accepté d'être les rapporteuses de mon manuscrit, ainsi que Monsieur le professeur Philippe Legrand pour participer à mon jury de thèse.

J'exprime ma profonde et respectueuse gratitude à Françoise Lohézic-Le Dévéhat qui a codirigé ce travail pour son implication, sa patience, son soutien, sa disponibilité, sa confiance et ses encouragements durant trois ans. Je remercie bien également le professeur Joël Boustie, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance, m'avoir guidée, encouragée et conseillée tout au long de mon travail de thèse. Je suis heureuse d'avoir pu mener ce travail de thèse au sein de son laboratoire.

Je n'oublie pas de remercier l'assistant professeur Monsieur Manh Cuong Nguyen qui a apporté son soutien, conseils et encouragements dans l'exécution de cette thèse.

Je remercie toute l'équipe PNSCM qui m'a soutenu, qui a écouté mes demandes, donné des idées et des suggestions, de sorte que le manuscrit puisse être complété. Merci à Marylène, Béatrice, Aurélie, Isabelle, David, Maryse, Solène, Anne-Cécile, Mari-Laurence, Patricia, Philippe, Michèle, Gilles, Nicolas, Jacques, Myriam, Mickaël, Jeff, Jean-Charles. Je remercie également Sophie et Pierre, les premiers permanents de l'équipe que j'ai rencontrés à Hanoi pour leur sympathie, leur confiance et leurs encouragements. Merci à Sophie pour les premières définitions des lichens et mes démarches. J'adresse à Claudia un grand merci pour son aide et son implication dans mes manipulations en chimie. Je remercie Aurélie de m'avoir guidée lors de mes premiers pas au labo. Je remercie également Pierre LP pour son aide dans l'analyse par le MS-DART. Je tiens à remercier Béatrice pour son aide dans la quantification de l'atranorine par la HPLC/UV. Je remercie David pour son aide dans l'analyse multivariée des profils en AG.

J'inclus également mes profonds remerciements à tous les étudiants, doctorants et post-doctorants qui ont arpenté les couloirs du laboratoire, que ce soit pour un mois ou plus, et avec qui j'ai passé d'agréables moments : Friardi, Nina, Hortense, Delphine, Maiwen, Tram, Pierre, Sarah Komaty, Hung, Patricia, Vianey, Duong et Adèle.

Je remercie vivement le professeur Philippe Legrand qui m'a permis d'effectuer des analyses de CPG / FID et CPG / MS au sein de son laboratoire avec la collaboration du docteur Daniel Catheline. Je n'oublie pas bien sûr de remercier le docteur Daniel Catheline pour son implication, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier le docteur Jacques Le Seyec et le docteur Olivier Delalande pour avoir accepté de collaborer et pour leur implication, leur disponibilité ainsi que leur sympathie et leur bonne humeur.

Je remercie le professeur Hermann Stuppner et son équipe pour avoir réalisé les tests enzymatiques sur l'activité inhibitrice de PTP1B.

Je remercie également Nicolas Le Yondre, Fabian Lambert et Philippe Jehan du CRMPO, pour leur accueil et leurs conseils avisés concernant l'interprétation des spectres de masse. De la même façon, je remercie Monsieur Sourisak Sinhbandhit pour son aide et ses explications dans l'interprétation des spectres RMN.

Je remercie le gouvernement vietnamien pour l'octroi d'une bourse de 36 mois, ce qui avec des compléments du laboratoire du professeur Boustie a permis de mener à bien ce travail réalisé en France. Je souhaiterais exprimer mes remerciements sincères envers le CampusFrance et le CROUS de Rennes qui ont assuré la gestion de la bourse pendant mes séjours en France.

Enfin, une énorme pensée pour ma famille, ma petite fille et mon mari qui m'ont remonté le moral dans les moments difficiles et les moments d'incertitude.

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES	v
ABREVIATIONS ET SYMBOLES	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xvii
INTRODUCTION	1
GENERALITES SUR LES LICHENS	5
1. Présentation des lichens.....	7
1.1 Définition	7
1.2 Morphologie	7
1.2.1 Forme des thalles.....	7
1.2.2 Structure des thalles.....	9
1.3 Symbiose	10
1.3.1 Mycobiote.....	10
1.3.2 Photobiote.....	11
1.4 Ecologie.....	12
2 Métabolites lichéniques	13
2.1 Voies de biogénèse des métabolites secondaires lichéniques	13
2.2 Activités biologiques décrites.....	15
2.3 Activité antivirale des extraits et composés lichéniques	16
2.4 Activité inhibitrice d'enzymes des extraits et composés lichéniques.....	17
3 Le genre <i>Stéréocaulon</i>	18
3.1 Morphologie	18
3.2 Etudes chimiques.....	22
CHAPITRE 1: ANALYSE DES ACIDES GRAS CHEZ LES LICHENS – ETUDE PARTICULIERE DU GENRE <i>STEREOCAULON</i>	25
1 Définitions des lipides	27
1.1 Acides gras	28
1.2 Glycérides.....	31
1.3 Stérides	32
1.4 Cérides.....	32
1.5 Glycolipides.....	33
1.6 Phospholipides.....	34
2 Les lipides des lichens	34
2.1 Teneur en lipides totaux	35
2.2 Glycolipides.....	36
2.2.1 Teneur en glycolipides	36
2.2.2 Composition en acides gras des glycolipides	36
2.3 Lipides neutres	37
2.3.1 Teneur en lipides neutres.....	37
2.3.2 Composition en lipides neutres	39
2.4 Phospholipides.....	45
2.4.1 Composition en phospholipides	45

2.4.2	Composition en acides gras.....	46
2.5	Composition en acides gras totaux.....	48
3	Comparaison des profils en acides gras totaux de 4 chlorolichens, 3 cyanolichens et 8 lichens tripartites (en collaboration avec l'équipe USC1378, Agrocampus-Ouest).....	52
3.1	Objectif.....	52
3.2	Mise au point du protocole d'extraction.....	53
3.2.1	Protocoles testés.....	53
3.2.2	Sélection de la meilleure méthode d'extraction.....	54
3.3	Comparaison des profils des acides gras totaux des 15 espèces.....	56
3.3.1	Lichens sélectionnés.....	56
3.3.2	Résultats et discussion.....	58
4	Comparaison des profils d'acides gras des différents partenaires de <i>S. scutelligerum</i>	67
4.1	Travaux antérieurs.....	68
4.2	Fractionnement du thalle intact de <i>S. scutelligerum</i>	70
4.3	Comparaison des profils d'acides gras des différents partenaires du lichen <i>S. scutelligerum</i>	71
5	Conclusion.....	74

CHAPITRE 2 : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *STEREOCAULON EVOLUTUM* GRAEWE

1	Extraction.....	79
2	Purification.....	80
3	Métabolites isolés.....	86
3.1	Depsides et dérivés.....	86
3.1.1	Composé SeA.....	86
3.1.2	Composé Se11.....	87
3.1.3	Composé Se10.....	89
3.1.4	Composé Se21.....	91
3.1.5	Composé Se1.....	92
3.1.6	Composé Se15.....	93
3.1.7	Composé Se2.....	93
3.1.8	Composé Se19.....	93
3.2	Depsidones et diphényléthers.....	102
3.2.1	Composé Se4.....	102
3.2.2	Composé Se9.....	102
3.2.3	Composé Se3.....	104
3.2.4	Composé Se18.....	105
3.2.5	Composé Se6.....	105
3.2.6	Composé Se5.....	106
3.2.7	Composé Se7.....	108
3.2.8	Composé Se16.....	109
3.2.9	Composé Se20.....	110
3.2.10	Composé Se8.....	113
3.3	Autres métabolites.....	120
3.4	Dosage de l'atranorine dans l'extrait acétone de <i>S. evolutum</i> par HPLC/UV.....	122
4	Composés semi-synthétisés.....	124
4.1	Stratégie de synthèse.....	124
4.2	Synthèse du 8-hydroxy-4- <i>O</i> -déméthylebarbatate de méthyle (AR).....	125
4.3	Synthèse du 4- <i>O</i> -déméthylebarbatate de méthyle (AR2).....	126
4.4	Synthèse du (<i>E</i>)-3-(3-oxo-but-1-én-yl) atranorine (Se10).....	127

5	Discussion	128
CHAPITRE 3 : EVALUATION BIOLOGIQUE DES METABOLITES ISOLEES		133
1	Etude de la cytotoxicité des produits isolés.....	135
2	Activité antivirale contre le virus de l'hépatite C.....	137
2.1	Le virus de l'hépatite C	137
2.1.1	Morphologie	138
2.1.2	Le cycle viral	139
2.1.3	Stratégies thérapeutiques.....	140
2.2	Etude de l'activité antivirale de composés lichéniques dérivés de l'atranorine contre le virus de l'hépatite C (VHC)	141
2.2.1	Criblage préliminaire.....	141
2.2.2	Essais sur la pénétration et la réplication de l'atranorine et molécules dérivées.....	142
2.2.3	Etude de l'étape du cycle viral ciblée par l'atranorine et le 4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle	146
3	Activité sur l'enzyme PTP1B.....	149
3.1	Présentation de l'enzyme PTP1B et travaux antérieurs.....	149
3.1.1	Structure moléculaire et régulation de PTP1B	150
3.1.2	Les activités biologiques de PTP1B	153
3.1.3	Inhibiteurs de PTP1B	156
3.2	Tests <i>in vitro</i> des composés dérivés des diphényléthers avec l'enzyme PTP1B	161
3.2.1	Détermination de la CI_{50} des extraits et des composés sur le test enzymatique PTP1B	161
3.2.2	Détermination du K_d	163
3.3	Modélisation moléculaire des interactions entre l'enzyme PTP1B et les composés dérivés des diphényléthers	165
3.3.1	Composés testés	165
3.3.2	Résultats	166
3.4	Confrontation des résultats biologiques et des modèles obtenus par modélisation moléculaire	176
3.4.1	Depsidones	176
3.4.2	Diphényléthers.....	177
3.5	Conclusion.....	181
DISCUSSION - CONCLUSION - PERSPECTIVES.....		183
BIBLIOGRAPHIE		193
CHAPITRE 4 : DONNEES EXPERIMENTALES.....		213
1	Données expérimentales du chapitre 1	215
1.1	Solvants et réactifs.....	215
1.2	Optimisation de la méthode d'extraction	215
1.3	Séparation des esters méthyliques d'acides gras et identification par CPG-FID et CPG-MS	216
1.3.1	Séparation des esters méthyliques d'acides gras	216
1.3.2	CPG-FID et CPG-MS.....	217
1.4	Reproductibilité de la méthode choisie	218
1.5	Comparaison des profils d'acides gras de 15 espèces lichéniques et d'une cyanobactérie.	218
1.6	Séparation des partenaires du lichen <i>S. scutelligerum</i> grâce à la structure	218

2	Données expérimentales du chapitre 2.....	219
2.1	Méthode de séparation.....	219
2.1.1	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	219
2.1.2	Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative.....	219
2.1.3	Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	219
2.1.4	Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie flash, Chromabond®.....	219
2.1.5	Chromatographie circulaire centrifuge : Chromatotron®	220
2.1.6	Chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi-préparative.....	220
2.2	Appareillage et techniques d'analyse	220
2.2.1	Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire	220
2.2.2	Spectrométrie Infra-Rouge	221
2.2.3	Spectrométrie Ultra-Violet	221
2.2.4	Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)	221
2.2.5	Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	221
2.2.6	Spectrométrie de masse	222
2.2.7	Liquid Chromatography –Mass Spectrometry (LC-MS).....	222
2.2.8	Direct Application in real time – Mass spectrometry (DART-MS)	223
2.2.9	Pouvoir Rotatoire	223
2.2.10	Point de Fusion.....	223
2.3	Extraction des lichens.....	223
2.3.1	Récolte des lichens	223
2.3.2	Identification du lichen.....	224
2.3.3	Microscopie	224
2.3.4	Protocole d'extraction	224
2.4	Séparation et purification des extraits	224
2.4.1	Purification de l'extrait <i>n</i> -hexane	224
2.4.2	Purification de l'extrait acétone.....	225
2.4.3	Composés semi-synthétisés.....	228
2.5	Quantification de l'atranorine dans l'extrait acétone par CLHP-DAD	230
2.6	Description des produits isolés.....	230
2.6.1	Atranorine SeA.....	231
2.6.2	Cladoniodésine Se11	232
2.6.3	(E)-3-(3-oxobut-1-én-yl)-atranorine Se10.....	233
2.6.4	3'-méthyl lécanorate de méthyle (Se21).....	234
2.6.5	β-orcinol carboxylate de méthyle (Se1)	235
2.6.6	Orsellinate de méthyle (Se15)	236
2.6.7	Atranol (Se2)	237
2.6.8	Haematommate de méthyle (Se19)	238
2.6.9	Acide stictique (Se4)	239
2.6.10	Isidiophorine (Se9)	240
2.6.11	Acide lobarique (Se3).....	241
2.6.12	Acide norlobarique (Se18)	242
2.6.13	Lobarine (Se6).....	243
2.6.14	Sakisacaulon A (Se5)	244
2.6.15	Anhydro-sakisacaulon A (Se7).....	245
2.6.16	Méthyl-8-Sakisacaulon A (Se16)	246
2.6.17	Sakisacaulon A estérifié en C-7 (Se20).....	247
2.6.18	3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy- 1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane (Se8).....	248

2.6.19	3-butyl-3-acétyle-7-hydroxy-5-methoxy-1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane(Se8a).....	249
2.6.20	3-butyl-3-hydroxy-7-acétyle-5-methoxy-1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane (Se8b).....	250
2.6.21	3(but-1-én-yl)-7-acyl-5-methoxy-1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane (Se8c).....	251
2.6.22	Strepsiline (Se13).....	252
2.6.23	Brassicastérol (Seh3).....	253
2.6.24	Acide ursolique (Se12).....	254
2.6.25	Peroxyde d'ergostérol (Seh1).....	255
2.6.26	8-hydroxy-4- <i>O</i> -déméthylbarbate de méthyle (AR).....	256
2.6.27	4- <i>O</i> -déméthylbarbate de méthyle (AR2).....	257
3	Données expérimentales du chapitre 3.....	258
3.1	Cytotoxicité.....	258
3.2	Activité antivirale.....	258
3.2.1	Modèle viral expérimental utilisé.....	258
3.2.2	Composés testés.....	259
3.2.3	Dilution des composés.....	259
3.2.4	Culture des cellules Huh7.5.1.....	259
3.2.5	Évaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i>	259
3.2.6	Analyse de l'infection par le VHC.....	260
3.2.7	Analyses statistiques.....	260
3.3	Activités <i>in vitro</i> des dérivés diphenyléthers sur l'enzyme PTP1B.....	260
3.3.1	Détermination du Kd.....	260
3.3.2	Test enzymatique (test réalisé en collaboration avec Pr H.Stuppner, Autriche).....	264
3.4	Modélisation moléculaire (en collaboration avec le Dr Olivier Delalande).....	265
3.4.1	Docking ou Amarrage moléculaire.....	265
3.4.2	Les logiciels utilisés.....	266
	ANNEXES	267
	Annexe 1 : Bibliographie du genre <i>Stereocaulon</i>	269
	Annexe 2 : Bibliographie de la composition en acides gras principaux chez les lichens (% des acides gras totaux).....	278
	Annexes 3 : Tableau 36: Reproductibilité de la méthode d'extraction à partir de <i>S. vesuvianum</i> et <i>S. scutelligerum</i> en utilisant la méthode d'extraction 3 (<i>S. vesu</i> = <i>S. vesuvianum</i> ; <i>S. scut</i> = <i>S. scutelligerum</i>).....	281
	Annexe 4 : Spectre MS ² des ions présents dans le composé Se10 dégradé.....	282
	Annexe 5 : Récapitulatif de l'activité cytotoxique des composés lichéniques.....	283
	Annexe 6 : Récapitulatif de l'activité antivirale des extraits lichéniques.....	287
	Annexe 7 : Récapitulatif de l'activité antivirale des composés lichéniques.....	288
	Annexe 8 : Contacts entre le ligand et la protéine (exprimés en pourcentage) obtenus d'après le modèle par homologie.....	295
	Annexe 9 : Contacts entre le ligand et la protéine (exprimés en pourcentage) obtenus par un des modèles dynamiques en NM7.....	296
	Annexe 10 : Tableau 42: Liaisons fréquentes entre les ligands et l'enzyme PTP1B obtenus par le modèle en mode normale N ⁰⁷	297
	Annexe 11 : Spectres RMN ¹ H et ¹³ C des composés isolés et synthétisés.....	298

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AA : Acide aminé

ACC : Acétyl-Coenzyme A Carboxylase

Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A

AcOEt : Acétate d'éthyle

AF : Acide formique

AG : Acide gras

AGPI : Acides gras polyinsaturés

ALA : Acide α -linoléique

Ala: Alanine

AMP : Adénosine monophosphate cyclique

ANS : Anisaldéhyde Sulfurique

Arg: Arginine

Asp: Acide aspartique

ATP : Adénosine-5-triphosphate

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CC : Chromatographie sur Colonne

CCC : Chromatographie Circulaire Centrigue

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDP : Cytidine diphosphate

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CoA : Coenzyme A

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

Cx :y n-z : Acide gras à x : nombre d'atome de carbone ; y : nombre de double liaison ; z : position de la double liaison

Cys: Cystéine

DART-MS : Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry

DG : Diacylglycérol

DGDG : Diacylgalactosyldiacylglycérol

DHA : Acide docosahexaénoïque

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EE : Ether diéthylique

EPA : Acide eicosapentaénoïque

ESI : Electrospray ionization

FAME : Fatty acid methyl ester

Gln: Glutamine

GLUT4: Transporteur de glucose

Gly: Glycine

His: Histidine

HM : Haematommate de méthyle

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPTLC : High Performance Thin Layer Chromatography

Ile : Isoleucine

IR : Insulin Receptor

IRS : Insulin Receptor Substrat

IR-FR : Infrarouge à transformée de Fourier

JAK2 : Janus kinase 2

LC-MS : Liquide Chromatography-Mass Spectrometry

LED: Light-Emitting Diode

Lys: Lysine
MeOH: Méthanol
MG : Monoacylglycérol
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
MOC : β -orcinol carboxylate de méthyle
MST : Microscale Thermophoresis
NAD : Nicotinamide Adénine
 Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine
 Déshydrogénase
NADP : Nicotinamide Adénine
 Dinucléotide Phosphate
NADPH : Nicotinamide Adénine
 Dinucléotide Phosphate Réduit
NIC : Nombre insaturation et cycle
NOE : Nuclear Overhauser Effect
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
Phe: Phénylalanine
PI : Phosphatidylinositol
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PM : Poids Moléculaire
PS : Phosphatidylsérine
PTP1B: Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
R_f : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RSA : Relation Structure-Activité
TEA : Triéthylamine
THF : Tétrahydrofurane
Trp: Tryptophane
TMFA : Total minor fatty acid
TMS : Tétraméthylsilane
t_R : temps de rétention
Tyr: Tyrosine
UDP : Uridine diphosphate
UV : Ultra-Violet
Val: Valine
WST-1: Réactif de prolifération cellulaire
 Δ : désaturase
 ϵ : élongase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principaux types de thalles rencontrés chez les lichens.....	8
Figure 2 : Coupe transversale d'un lichen observé au microscope optique (x 400)	9
Figure 3 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens [9,12].....	12
Figure 4 : Voies probables conduisant aux grands groupes de produits lichéniques [21].....	14
Figure 5 : Structure des Stéréocaulons (éléments de diagnose) [66].....	20
Figure 6 : Caractéristiques morphologiques du lichen <i>S. evolutum</i> par observation macroscopique [66]	21
Figure 7 : Caractéristiques morphologiques du lichen <i>S. evolutum</i> Graewe par observation microscopique [66].....	22
Figure 8: Illustration des différentes dénominations d'un acide gras.....	29
Figure 9: Schéma de biosynthèse simplifié des familles d'acides gras insaturés [76]	30
Figure 10: Structure des acides gras à chaîne ramifiée (<i>iso</i> et <i>antéiso</i>).....	31
Figure 11: Représentation schématique des glycérides.....	32
Figure 12: Structure du palmitate de cholestéryle.....	32
Figure 13: Structure d'un céride (palmitate de cétyle).....	32
Figure 14: Structure du MGDG et du DGDG	33
Figure 15: Représentation schématique d'un phospholipide (Phosphocholine).....	34
Figure 16: Teneur en lipides totaux (en mg/g de poids sec) de lichens récoltés à différentes saisons..	36
Figure 17: Classe des lipides de quelques lichens.....	38
Figure 18: Composition en lipides neutres de quelques lichens.....	38
Figure 19: Composition en acides gras des lipides neutres (%) à partir du lichen <i>Xanthoria parietina</i> en fonction de la température	40
Figure 20: Teneur totale en caroténoïdes et en mutatoxanthine de deux espèces de <i>Xanthoria</i>	41
Figure 21: Teneur en <i>n</i> -alcanes (mg/g de poids sec) de <i>Xanthoria parietina</i> en fonction de l'endroit de récolté.....	42
Figure 22: Teneur en phospholipides pour les lichens <i>Xanthoria parietina</i> et <i>Physcia sp.</i> pendant la période du printemps	45
Figure 23: Composition des phospholipides dans les lichens <i>Evernia mesomorpha</i> , <i>Evernia prunastri</i> et <i>Aspicilia transbalaica</i> (% des phospholipides totaux)	46
Figure 24: Composition en acides gras ($\mu\text{g/g}$) des PC, PE, PG à partir du lichen <i>Xanthoria parietina</i> en fonction de la saison	48
Figure 25: Schéma des différentes conditions d'extraction.....	53
Figure 26: Dendrogrammes obtenus par CAH des 15 espèces lichéniques et de la cyanobactérie <i>Nostoc</i> <i>sp.</i> basés sur les AG saturés (a), les AG ramifiés (b), les AG totaux (c) et les AG insaturés (d).....	67
Figure 27: Fractionnement du thalle de <i>S. scutelligerum</i> (a : thalle intact, b : pseudopodétion, c : phylloclades)	70
Figure 28 : Schéma général de fractionnement de <i>Stereocaulon evolutum</i> Graewe	80
Figure 29 : CCM des extraits de <i>S. evolutum</i> comparés à des témoins de produits lichéniques (révélation par ANS)	81
Figure 30 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait <i>n</i> -hexane	82
Figure 31 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait acétone ..	83

Figure 32 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de la fraction Ac1	84
Figure 33 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de la fraction Ac3	85
Figure 34 : Structure de l'atranorine (SeA).....	87
Figure 35 : Corrélations proton-carbone longue distance du composé Se11	88
Figure 36 : Corrélation NOE du composé Se11 (Cladonioidésine) (DMSO- d_6 , 400 MHz)	88
Figure 37: Agrandissement des parties du spectre HMBC (100 MHz, DMSO- d_6) du composé Se10 .	90
Figure 38 : Structure du composé Se10 (acétocladonioidésine).....	91
Figure 39 : Corrélations proton-carbone longue distance du composé Se21 (3'-méthyllécanorate de méthyle).....	92
Figure 40 : Structure des composés Se1 (MOC), Se2 (Atranol), Se15 (Orsellinate de méthyle).....	94
Figure 41: Dégradation de l'atranorine	94
Figure 42 : Dégradation du méthyl-3'-lécanorate de méthyle.....	95
Figure 43 : Biosynthèse de l'acide haematommique et son incorporation dans l'atranorine.....	95
Figure 44: Agrandissement d'une partie du spectre RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) du composé Se10 au 13 Janvier et 12 Février (en rouge : pics utilisés pour calculer le ratio entre un composé de dégradation et le composé initial se10)	96
Figure 45: Cinétique de dégradation du composé Se10 dans le DMSO après 1 mois (réalisée à partir du calcul du ratio entre SSC δH 6.28 ppm / δH 7.82 ppm).....	97
Figure 46: Dégradation du composé Se10 dans le DMSO deutéré	97
Figure 47: Spectrométrie de masse du composé Se10 dégradé en mode négatif	98
Figure 48: Hypothèse proposée pour l'ion pseudomoléculaire correspondant à la formule brute $C_{11}H_8O_5$	99
Figure 49: Schéma général de fragmentation des composés de Se10 dégradé.....	100
Figure 50: Analyses LC-MS pour détecter le composé Se10 (Rt = 19.48 min): PDA chromatogrammes (total scan à $\lambda = 220-600$ nm), chromatogrammes base-peak et spectres MS de l'extrait acétone (a), de l'extrait acétate d'éthyle (b) et d'une solution d'atranorine pure macérée dans l'acétone pendant trois mois (c).....	101
Figure 51 : Structure du composé Se4 (Acide stictique).....	102
Figure 52 : Structure du composé Se9 (Isidiophorine).....	104
Figure 53 : Structure du composé Se3 (Acide lobarique)	104
Figure 54 : Structure du composé Se18 (Acide norlobarique).....	105
Figure 55 : Structure du composé Se6 (Lobarine).....	106
Figure 56 : Spectre RMN 1H de la lobarine (500 MHz, $CDCl_3$) et du composé Se5 (400 MHz, $CDCl_3$)	107
Figure 57 : Structure des composé Se5 (sakisacaulon A)	108
Figure 58 : Spectre RMN 1H du composé Se7 (400 MHz, $CDCl_3$).....	108
Figure 59 : Structure du composé Se7 (anhydrosakisacaulon A).....	109
Figure 60 : Agrandissement d'une partie du spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé Se16..	109
Figure 61 : Structure des composés Se16 (méthyl-8-sakisacaulon A)	110
Figure 62 : Agrandissement d'une partie du spectre HMBC (75 MHz, $CDCl_3$) du composé Se20....	110
Figure 63 : Spectre RMN ^{13}C du composé Se20 (75 MHz, $CDCl_3$).....	111
Figure 64 : Structure du composé Se20 (Sakisacaulon A estérifié en C-7)	111
Figure 65 : Spectre RMN 1H du composé Se8 à température ambiante (a) et à $+50^\circ C$ (b) (400 MHz, $CDCl_3$).....	114
Figure 66 : Structure du composé Se8 (3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane) ..	114

Figure 67 : Structure des deux formes de l'acide α -alectronique co-existant à température ambiante	115
Figure 68 : Spectre RMN ^{13}C du composé Se8 à - 50 °C (c) (400 MHz, CDCl_3) et à + 90 °C (d) (400 MHz, DMSO-d_6)	115
Figure 69 : Réaction d'acétylation du composé Se8	116
Figure 70: Formation du composé Se8c à partir du composé Se8a.....	116
Figure 71: Formation du composé Se8c à partir du composé Se8 ou Se8b	117
Figure 72 : Comparaison par LC-MS du composé Se8 de référence (a) avec l'extrait d'acétate d'éthyle (b)	119
Figure 73 : Spectre DART-AccuTOF du composé Se8 en mode positif	120
Figure 74 : Spectre DART-AccuTOF du lichen <i>S. evolutum</i> en mode positif	120
Figure 75 : Structure du composé Se13 (Strepsiline).....	121
Figure 76 : Structure du composé Seh3 (Brassicastérol).....	121
Figure 77 : Structure du composé Se12 (Acide ursolique).....	122
Figure 78 : Structure du composé Seh1 (Peroxyde d'ergostérol).....	122
Figure 79: Superposition des chromatogrammes ayant servi à calculer la droite d'étalonnage pour l'atranorine ($R_t = 11.25$ min)	123
Figure 80: Courbe d'étalonnage de l'atranorine (aire = f(conc. Atranorine)).....	123
Figure 81: Chromatogramme de l'extrait acétone (R_t atranorine = 11.25 min).....	124
Figure 82 : Structure des depsides synthétisés	125
Figure 83 : Réduction de l'atranorine.....	126
Figure 84 : Synthèse du 4- <i>O</i> -déméthylebarbatate de méthyle.....	127
Figure 85 : Condensation du fallacinal et de l'acétone	127
Figure 86 : Condensation de la vanilline et de l'acétone en milieu basique.....	128
Figure 87 : Synthèse du composé Se10.....	128
Figure 88 : Relation entre l'acide lobarique et les diphenyléthers isolés de <i>S. evolutum</i>	130
Figure 89 : Hypothèse sur la relation entre le composé Se8 , la lobarine et le sakisacaulon A	131
Figure 90: Morphologie du virion VHC (Image de Futura Sciences.com) issu de la thèse IlBoudo, 2013.....	138
Figure 91: Cycle biologique du VHC (http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-hepatite-c-piste-faux-virus-synthetique-promet-beaucoup-32621).....	139
Figure 92 : Cycle biologique du VHC et cibles des plus puissants inhibiteurs naturels	141
Figure 93: Résultats du criblage des 13 molécules isolées du lichen <i>S. evolutum</i> sur le virus du VHC en post-infection.....	142
Figure 94 : Activités antivirales sur le VHC de l'atranorine et composés apparentés	144
Figure 95: Schéma de présentation des protocoles (en vert : incubation du composé à tester avec les cellules ; en rouge : inoculation et incubation avec le virus; en bleu : poursuite de la culture)	146
Figure 96: Cytotoxicité sur les cellules Huh7.5.1 de l'atranorine, du 4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle (AR2).....	147
Figure 97: Effets sur les étapes de pénétration et de réplication de l'atranorine et du 4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle comparés aux deux témoins Erlotinib et Télaprévir.....	148
Figure 98 : Représentation schématique de la structure du domaine de PTP1B [203]	150
Figure 99 : Représentation de la structure de la tyrosine, sérine et thréonine.....	151
Figure 100 : Structure du site actif de PTP1B en présence d'un substrat de type hexapeptide [204]...	152
Figure 101 : Mécanisme catalytique de PTP1B [204].....	153

Figure 102: Signalisation métabolique et oncogénique de PTP1B [203].....	154
Figure 103 : Représentation de la structure de la trodusquémine.....	157
Figure 104: Graphiques montrant l'activité dose-dépendante de l'acide lobarique, l'acide norlobarique et l'anhydro-sakisacaulon A sur PTP1B.....	163
Figure 105 : MST de l'acide lobarique (à gauche) et de l'acide norlobarique (à droite)	165
Figure 106: Modèles statiques de PTP1B obtenus par I-Tasser	166
Figure 107: Protocole suivi pour l'analyse de docking de chacun des composés sur l'enzyme PTP1B	168
Figure 108: Exemple d'un histogramme comportant la moyenne des contacts entre PTP1B et l'acide lobarique.....	170
Figure 109: Liaison hydrogène.....	172
Figure 110: Les différentes conformations d'interactions non liées π - π	173
Figure 111: Exemple de l'interaction non liée cation - π	174
Figure 112: Exemple de liaisons entre l'acide norlobarique et l'enzyme PTP1B.....	175
Figure 113: Interactions les plus fréquentes entre les deux depsidones et les résidus de PTP1B	177
Figure 114: Structure générale des diphényléthers testés.....	178
Figure 115: Interactions entre l'anhydro-sakisacaulon A et l'enzyme PTP1B d'après le modèle en NM7, cluster 4.....	178
Figure 116: Interactions entre la lobarine et l'enzyme PTP1B d'après le modèle en NM7, cluster 1	179
Figure 117: Interactions entre le sakisacaulon A et l'enzyme PTP1B d'après le modèle obtenu par homologie, cluster 2	180
Figure 118 : Appareils de broyage des lichens (a) et d'extraction des lipides totaux (b, c, d).....	215
Figure 119 : Préparation des esters méthyliques d'acides gras	217
Figure 120: Réaction d'acétylation du composé Se8	228
Figure 121 : Spectres UV des aliquots lors de l'élution de la protéine marquée.....	261
Figure 122: Principe de la thermophorèse (tiré de Jerabek-Willemsen Moran, 2011) [221]	262
Figure 123 : Graphique de thermophorèse	263
Figure 124 : Coups de fluorescence dans chaque capillaire contenant la protéine et le ligand.....	263
Figure 125 : Courbe d'interaction entre le ligand et l'enzyme qui permet la détermination du Kd....	264
Figure 126: Thermophorèse de PTP1B marquée après congélation	264

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classes de métabolites secondaires dans les lichens [18].....	15
Tableau 2 : Répartition des composés isolés du genre <i>Stéréocaulon</i> d'après la bibliographie	22
Tableau 3: Les catégories de lipides.....	28
Tableau 4: Teneur en lipides totaux de cinq lichens récoltés dans plusieurs localités et à différentes saisons	35
Tableau 5: Teneur en lipides totaux du lichen <i>Ramalina lacera</i> récolté sur différents substrats [86] ..	36
Tableau 6: Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des glycolipides de quelques espèces de lichens (tr, trace) [82] (position d'insaturation non précisée).....	37
Tableau 7: Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des lipides neutres à travers cinq espèces lichéniques [82].....	39
Tableau 8: Composition en caroténoïdes (en pourcentage de la teneur totale) de sept espèces du genre <i>Xanthoria</i> [97]	41
Tableau 9: Composition en <i>n</i> -alcanes ($\mu\text{g/g}$ de lichen) à partir de l'extrait <i>n</i> -hexane du lichen <i>Xanthoria parietina</i>	43
Tableau 10: Composition en stérols de trois espèces de lichen (% des terpénoides totaux) [109]	44
Tableau 11: Composition en acides dicarboxyliques à partir de quatre espèces de lichens [101].....	44
Tableau 12: Composition en acides gras à partir des phospholipides totaux (% des acides gras totaux) [82]	47
Tableau 13: Composition en acides gras de quatre espèces lichéniques du genre <i>Collema</i> [80]	51
Tableau 14: Comparaison entre les 5 conditions d'extractions : rendement d'extraction (mg/g MS), pourcentage des AG saturés et insaturés, diversité des AG obtenus à partir du lichen <i>S. scutelligerum</i> (% des totaux pour chaque acide gras)	55
Tableau 15: Lichens sélectionnés en vue de l'étude de leur acides gras	57
Tableau 16: Composition en AG totaux obtenus à partir de 15 espèces lichéniques et d'une cyanobactérie <i>Nostoc</i> sp. (% des totaux pour chaque acide gras)	64
Tableau 17: Composition en acides gras du lichen intact et de ses partenaires cultivés (% des acides gras totaux) [116]	68
Tableau 18: Composition en acides gras du mycobiotte, du phytobionte et du thalle intact du lichen <i>Teloschistes flavicans</i> (% des acides gras totaux) [71]	69
Tableau 19: Composition en acides gras obtenue à partir des trois différents partenaires du <i>Stereocaulon scutelligerum</i> (% des acides gras totaux)	72
Tableau 20: Tableau récapitulatif des composés isolés à partir du lichen <i>S. evolutum</i>	86
Tableau 21: Données RMN ^1H et ^{13}C des composés Se4 (300 MHz, DMSO- d_6) et Se9 (500 MHz, DMSO- d_6)	103
Tableau 22 : Comparaison des données RMN des diphenyléthers isolés	112
Tableau 23: Comparaison des données du composé Se8 et ses dérivés	118
Tableau 24 : Viabilité cellulaire (% par rapport au témoin cellulaire) des composés isolés sur sept lignées cellulaires après dépôt d'une dose unique à $10 \mu\text{M}$ (tests réalisés sur la plateforme ImPACcell)	136
Tableau 25 : Structure de l'atranorine et composés apparentés	143
Tableau 26: Valeurs d'inhibition des activités antivirales (CI_{50}) pour les sept dérivés de l'atranorine ainsi que leur toxicité à $50 \mu\text{M}$ et à $100 \mu\text{M}$	145
Tableau 27 : Structures et activités d'inhibiteurs synthétiques de PTP1B [204]	158

Tableau 28 : Composés naturels inhibiteurs de PTP1B [204].....	159
Tableau 29 : Structures des composés lichéniques testés sur PTP1B et valeurs de leurs CI_{50} (μM) [204]	160
Tableau 30: Activité inhibitrice des extraits du lichen <i>S. evolutum</i> sur PTP1B.....	161
Tableau 31 : Activité des huit composés isolés de <i>S. evolutum</i> sur le modèle enzymatique de PTP1B	162
Tableau 32 : Structure des huit composés modélisés avec l'enzyme PTP1B.....	165
Tableau 33: Clusters obtenus selon l'affinité de l'interaction entre le ligand et la protéine (exprimé en % probabilité de contacts) pour le modèle par homologie.....	169
Tableau 34: Répartition sous forme de clusters des interactions entre chaque ligand et PTP1B (exprimé en % probabilité de contacts) pour le modèle NM7.....	169
Tableau 35: Zones de contacts récurrentes des huit composés isolés de <i>S. evolutum</i> avec PTP1B d'après le modèle par homologie.....	171
Tableau 36: Les composés lichéniques extraits du genre <i>Stereocaulon</i>	269
Tableau 37: Reproductibilité de la méthode d'extraction à partir de <i>S. vesuvianum</i> et <i>S. scutelligerum</i> en utilisant la méthode d'extraction 3 (<i>S. vesu</i> = <i>S. vesuvianum</i> ; <i>S. scut</i> = <i>S. scutelligerum</i>).....	281
Tableau 38: Activité cytotoxique des composés lichéniques.....	283
Tableau 39: Activité cytotoxique des extraits lichéniques.....	287
Tableau 40: Activité cytotoxique des composés lichéniques.....	288
Tableau 41: Affinité de l'interaction entre les résidus de la protéine et le ligand selon le modèle par homologie.....	295
Tableau 42: Affinité de l'interaction entre les résidus de la protéine et le ligand selon le modèle en NM7.....	296
Tableau 43: Liaisons fréquentes entre les ligands et l'enzyme PTP1B obtenus par le modèle en mode normale N ⁰ 7.....	297

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pour servir des besoins de plus en plus pressants, l'homme a exploité des ressources naturelles, y compris la flore qui est la première ressource naturelle prise en tant que nourriture et aussi en tant que thérapeutique. Plusieurs espèces sont utilisées dans la thérapeutique, cependant, de nombreuses espèces médicinales n'ont pas été profondément étudiées pour leur phytochimie. Cela est pourtant indispensable pour un usage rationnel et découvrir de nouvelles substances actives. D'un point de vue écologique, ces mêmes substances sont aussi très importantes à connaître pour leur rôle au niveau de l'organisme producteur et plus largement pour sa communication avec son environnement.

Pionniers exceptionnels, résistants aux conditions les plus difficiles, les lichens ont conquis tous les milieux, à l'exception de la haute mer. Les lichens étant une association entre une algue verte et/ou une cyanobactérie et un champignon, font preuve d'une autonomie énergétique (photosynthèse algale). Ces capacités remarquables sont dues à une physiologie particulière et un métabolisme qui aboutit à la formation de métabolites secondaires (essentiellement produits par le champignon). Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances pharmacologiquement actives. Un protocole classique pour étudier la composition chimique d'une espèce consiste à identifier précisément l'espèce, à identifier la composition chimique, à isoler les composés, à évaluer l'activité biologique et à synthétiser des composés plus actifs sur la base de composés isolés. Donc, l'étude préalable à celle de la composition chimique, est de connaître précisément l'espèce sur laquelle on travaille. La détermination est souvent moins difficile pour des plantes supérieures que pour les espèces de lichens. C'est encore plus difficile pour les stéréocaulons au niveau du genre et surtout de l'espèce, de sorte que la récolte et l'identification des échantillons est déjà un défi bien qu'ils soient largement distribués à travers le monde avec plus d'une centaine d'espèces. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'étudier ces espèces par différentes approches : botanique, chimique et analyse en biologie moléculaire. Suite à cette problématique, nous réalisons cette thèse dans le but d'avoir une meilleure connaissance chimiotaxonomique du genre *Stereocaulon*.

L'utilisation de la génomique donne de très importantes indications qui ne recouvrent cependant pas toujours les observations botaniques. Les métabolites secondaires sont particulièrement pris en compte en lichénologie (réactions thallines, CCM) mais la récurrence de certains composés ne permet pas toujours de lever les ambiguïtés, notamment en ce qui

concerne le genre d'un lichen. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'étude de la composition en acides gras totaux de 10 espèces de *Stereocaulon*. Nous avons complété ce travail par l'étude phytochimique d'un *Stereocaulon*, récolté en Bretagne et dont l'analyse des métabolites secondaires n'avait pas été réalisée.

Quelques rappels correspondant à la présentation des lichens, leurs métabolites et leurs activités biologiques et ainsi qu'une présentation plus ciblée des lichens choisis pour cette étude introduiront cette thèse.

Le premier chapitre de ce travail décrit nos démarches pour déterminer les meilleures conditions d'extraction des lipides totaux en vue d'une analyse de la composition en acides gras totaux des Stéréocaulons en utilisant comme modèle le lichen *S. scutelligerum*. Dans un second temps, nous détaillerons notre démarche d'étude de la composition en acides gras totaux portant sur 10 espèces du genre *Stereocaulon* et 6 autres lichens. Une analyse multivariée des profils en acide gras totaux sera utilisée pour comparer les profils en acides gras et dégager les éléments principaux qui pourraient être une aide pour la taxonomie de ces lichens.

L'étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe sera détaillée dans le second chapitre. Nous expliciterons la purification et l'identification structurale des métabolites secondaires. Nous décrirons aussi la synthèse de quelques composés proches des composés isolés.

Le troisième chapitre sera consacré à l'évaluation des activités biologiques des métabolites secondaires isolés. L'évaluation de la cytotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires dont des lignées cancéreuses, sera prolongée par l'étude de l'effet antiviral sur le virus de l'hépatite C (VHC) dans le cadre d'une collaboration locale (J Le Seyec, IRSET). Suite à des activités décrites pour des structures proches et à la collaboration du laboratoire avec le laboratoire autrichien du Prof Stuppner, l'étude de l'effet inhibiteur de la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) sera également présentée. Des hypothèses de relations structure-activité (RSA) seront proposées grâce aux résultats des tests *in vitro* et grâce à des études de modélisation moléculaire réalisées par le Dr Olivier Delalande (IGDR, UMR 6290, CNRS – Université de Rennes 1) pour les composés de type depsidone, diphényléther et lactone.

Une réflexion sera menée dans la partie « discussion - conclusion et perspectives » pour dégager les principaux résultats et envisager des travaux à venir.

GENERALITES SUR LES LICHENS

1. Présentation des lichens

1.1 Définition

Les lichens sont des organismes symbiotiques, généralement composés d'un partenaire fongique, le mycobiote, et d'un ou plusieurs partenaires de la photosynthèse, le photobiotique qui est le plus souvent soit une algue verte, soit une cyanobactérie [1], et une flore microbienne [2]. Bien que la double nature de la plupart des lichens soit largement reconnue à ce jour, il est moins connu que certains lichens soient des symbioses impliquant trois (lichens tripartites) ou plusieurs partenaires.

Les espèces lichéniques représentent plus de 20 % de la biodiversité mondiale fongique, et on les trouve, grâce à leur symbiose, dans certains des environnements les plus extrêmes de la planète tels que la toundra arctique, les déserts chauds, les côtes rocheuses, les terrils toxiques. Les premiers lichens remonteraient à 400 millions d'années et aujourd'hui, on dénombre environ 20 000 espèces de lichens dont une majorité reste microscopique [3].

1.2 Morphologie

À la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle. La morphologie du thalle lichénique est fortement influencée par le photobiotique et son contact direct avec le mycobiote. L'apparition d'un thalle de lichen est principalement déterminée par le mycobiote. Seuls quelques cas sont connus où le photobiotique détermine l'ensemble du thalle, par exemple, dans les genres filamenteux tels que *Coenogonium*, *Ephebe*, *Cystocoleus* et *Racodium*. Ainsi, après établissement de la symbiose, le thalle sera caractéristique du lichen développé [4], et sera caractérisé par une grande diversité de formes et couleurs.

1.2.1 Forme des thalles

Une observation à l'œil nu ou à la loupe des thalles permet de distinguer généralement 7 types de thalles [5] (Fig. 1):

- Les **thalles gélatineux** : noirs et cassants à l'état sec, ils sont gélatineux, pulpeux à l'état humide (*Collema*, *Leptogium*, etc.) ;
- Les **thalles fruticuleux** : leur surface de contact avec le substrat est généralement très réduite. Ils sont plus ou moins ramifiés à buissonnants, dressés ou prostrés (*Alectoria*, *Cetraria*, *Thamnolia*, etc.) ;

- Les **thalles foliacés** présentent une forme de lame ou de feuille plus ou moins lobée et se détachent généralement facilement du substrat (*Peltigera*, *Solorina*, etc.) ;
- Les **thalles squamuleux** sont formés de petites écailles (ou squamules) dispersées, contiguës ou plus ou moins imbriquées. La face supérieure peut être plane ou concave avec un bord plus ou moins adhérent au substrat (*Catapyrenium*, *Endocarpon*, *Placidium*, *Psora*) ;
- Les **thalles crustacés** ont une structure de croûtes intimement intégrées au substrat (*Acarospora*, *Bacidia*, *Bilimbia*, *Buellia*, etc.) ;
- Les **thalles lépreux** ressemblent à de la poudre qui se détache facilement de substrat ;
- Les **thalles complexes** (ou composites) sont formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé, squamuleux ou crustacé, adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé : podétions des *Cladonias* et pseudopodétions des *Stéréocaulons*. Les pseudopodétions sont buissonnants, recouverts d'écailles à fonction assimilatrice (les phylloclades), alors que les podétions sont de formes très diverses : « tiges » simples plus ou moins pointues ou évasées en entonnoir (ils sont dans ce dernier cas nommés scyphes), « buissons » plus ou moins denses et plus ou moins squamuleux.

Le thalle peut aussi porter un certain nombre de structures : pruine, tomentum, poils, cils, spinules, rhizines, rhizomyces, rhizomorphes, céphalodies, ou encore pseudocypelles.

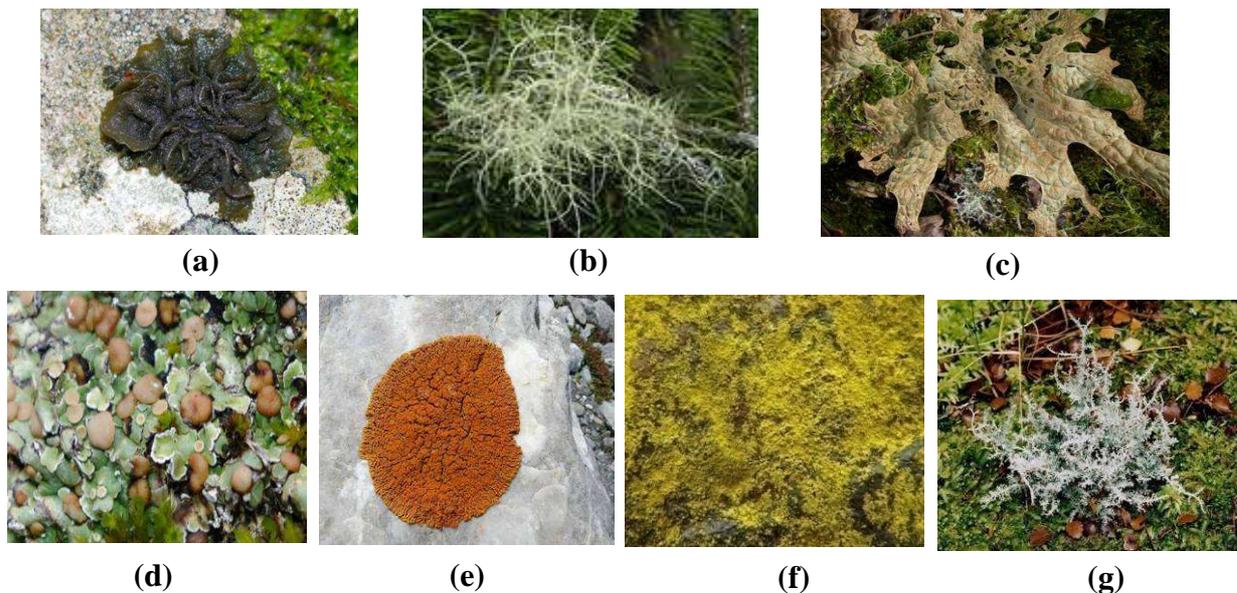


Figure 1 : Principaux types de thalles rencontrés chez les lichens.

(a) Thalle gélatineux de *Collema auriforme* ; (b) Thalle fruticuleux de *Usnea sp.* ; (c) Thalle foliacé de *Lobaria pulmonaria* ; (d) Thalle squamuleux de *Squamarina cartilaginea* ; (e) Thalle crustacé de *Caloplaca bitorina* (f) Thalle lépreux de *Chrysothrix chlorina* ; (g) Thalle complexe de *Stereocaulon corticatulum*

1.2.2 Structure des thalles

Même si leur morphologie peut être variée, leur structure est relativement homogène et assure leur unité. On distingue tout de même deux types [4]:

- **Structure de type homéomère** : Le champignon et l'algue sont répartis uniformément dans le thalle relativement homogène, et on retrouve cette structure dans les lichens crustacés *Caloplaca*, *Pyrenopsis*, les lichens gélatineux *Collema*, les lichens foliacés... Les lichens gélatineux homogènes absorbent beaucoup plus d'eau par rapport à leur poids sec comparativement aux lichens hétéromères. Cette capacité peut gêner la diffusion du gaz CO₂ et devenir un facteur limitant pour la photosynthèse [6].
- **Structure de type hétéromère** : sur une coupe transversale de thalle, on observe une disposition par couches et la structure est dite stratifiée. Les principales subdivisions sont un cortex supérieur, une couche d'algue, une zone médullaire et un cortex inférieur (Fig. 2) :
 - ❖ Un cortex supérieur formé par des cellules jointives de champignon.
 - ❖ Une couche d'algues, mélange de cellules algales et de champignon.
 - ❖ Une moelle ou une couche médullaire ou médulle formée par des hyphes lâches de champignon.
 - ❖ Un cortex inférieur, cellules de champignon d'où s'échappent des rhizines qui servent à la fixation du thalle.

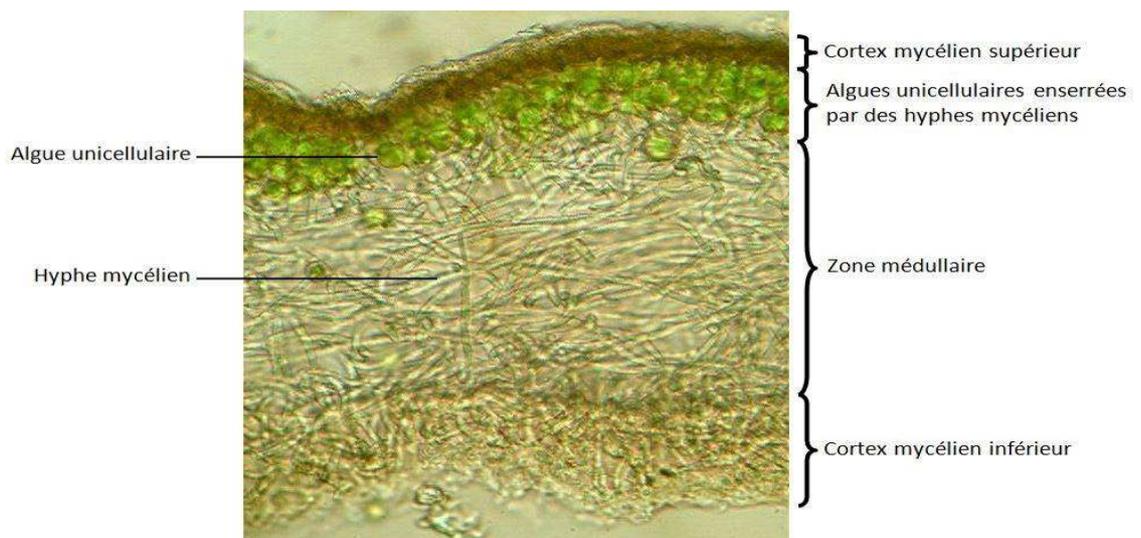


Figure 2 : Coupe transversale d'un lichen observé au microscope optique (x 400)

<http://labopathe.free.fr/symbioses.html>

Chez la plupart des lichens fruticuleux, la structure hétéromère est dite radiée. On y retrouve les mêmes couches, mais disposées de façon concentrique, le cortex inférieur faisant défaut. Le cortex et la médulle peuvent constituer deux couches distinctes (*Ramalina*) ou plus ou moins mêlées (*Roccella*). La partie interne de la médulle peut être absente (*Alectoria*) ou formée d'un réseau d'hyphes très serrées, parallèles à l'axe du thalle ; elle constitue un cordon rigide (cordon axial des *Usnea*) [7].

1.3 Symbiose

Les lichens sont des organismes symbiotiques associant un mycosymbiote et un photosymbiote. La symbiose de lichen est une grande réussite car les lichens sont trouvés dans presque tous les habitats terrestres, des tropiques aux régions polaires. Dans les lichens, les champignons utilisent les dérivés carbonés produits lors de la photosynthèse par les algues, et en retour, fournissent de l'eau et des éléments nutritifs pour les algues en assurant la protection physique à l'ensemble. Grâce à la symbiose, le photobionte et le mycobionte du lichen peuvent survivre dans de nombreux habitats où ils seraient rares ou inexistantes séparément, et font du lichen un organisme autotrophe. La spécificité d'association entre photobionte et mycobionte peut être étroite ou large, mais la plupart des lichens sont modérément spécifiques : un même photobionte peut s'associer à différentes espèces de mycobionte. Les différentes associations sont [8]:

- dans 85 % des cas, une (ou des) algue(s) associée(s) à un champignon – **Chlorolichen**.
- dans 10 % des cas, une cyanobactérie associée à un champignon – **Cyanolichen**.
- dans 5 % des cas, simultanément à la fois, une algue et une cyanobactérie associés à un champignon – **Lichen tripartite**.

1.3.1 Mycobionte

Les mycobiontes impliqués dans la symbiose lichénique représentent environ 21 % de l'ensemble des champignons actuellement connus [8]. On rencontre les mycobiontes appartenant aux ascomycètes ou aux basidiomycètes :

- Les **ascomycètes** : Les champignons lichénisés sont principalement des Ascomycètes. Ils développent leurs spores à l'intérieur de cellules spécialisées en forme de sacs nommés asques. Ces spores sont libérées par rupture du sommet de l'asque selon des mécanismes bien précis ou par désintégration de la paroi. Les organes reproducteurs se présentent sous forme de petites cupules, les apothécies, ou de petites sphères creuses plus ou moins enfoncées dans le thalle, les périthèces.

- Les **basidiomycètes** : Au contraire des ascomycètes, les spores des basidiomycètes sont formées à l'extérieur de cellules fertiles nommées basides, au sommet de petites cornes nommées stérigmates. Chez les basidiomycètes, la lichénisation est un processus assez rare (de 1 à 2 % des lichens sont des basidiomycètes). Le genre le plus commun est le genre *Lichenomphalia* : les organes reproducteurs sont de petits chapeaux à lames, tout à fait semblables à ceux des basidiomycètes non lichénisés. Ils poussent surtout en montagne, sur sols nus.

Certains lichens comme les *Thamnomlia* ou les *Lepraria* sont parfois encore rangés avec les Deuteromycota ou champignons « imparfaits », car ils ne sont connus que sous leur stade végétatif (jamais de reproduction sexuée). Mais des études récentes ont révélé que ces deux genres appartenaient bien aux Ascomycètes [5].

1.3.2 Photobionte

Les partenaires des lichens qui réalisent la photosynthèse sont nommés photobiontes ou photosymbiotes et près de 40 genres d'algues et de cyanobactéries ont été décrits [9]. Ce sont essentiellement des algues vertes (Chlorophycées ou Trébouxiophycées), dont les genres appartiennent aux espèces unicellulaires *Trebouxia* (lichen souvent vert), *Coccomyxa*, *Elliptochloris*, *Myrmecia*, et aux espèces filamenteuses *Trentepohlia* (Ulvophycées) (lichen souvent orange, en raison des gouttelettes de caroténoïdes de *Trentepohlia*). Parmi les cyanobactéries, le genre *Nostoc* est le plus commun, et les genres *Stigonema*, *Gloeocapsa* ou *Scytonema* sont moins rencontrés.

Le transfert des métabolites du photobionte autotrophe au mycobionte hétérotrophe dépend du type de photobionte impliqué. Les algues vertes fabriquent de nombreuses substances nécessaires au champignon, notamment de la vitamine B et des polyols, substances dérivées des sucres. Chez les cyanobactéries, les dérivés carbonés sont plutôt cédés au champignon sous forme de glucose. Polyols et glucose sont ensuite transformés par le champignon en mannitol et arabitol. Les cyanobactéries sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, cédé au champignon sous forme d'ammonium (Fig. 3) [10]. Le mode d'activation de l'absorption du CO₂ est une autre caractéristique de base, et varie aussi selon le photobionte. Dans de nombreux lichens à algues vertes, la photosynthèse nettement positive est seulement possible après absorption de la vapeur d'eau. En revanche, dans les lichens à cyanobactéries, de l'eau sous forme liquide (et pas seulement sous forme de vapeur) est nécessaire pour l'activation de la photosynthèse [11].

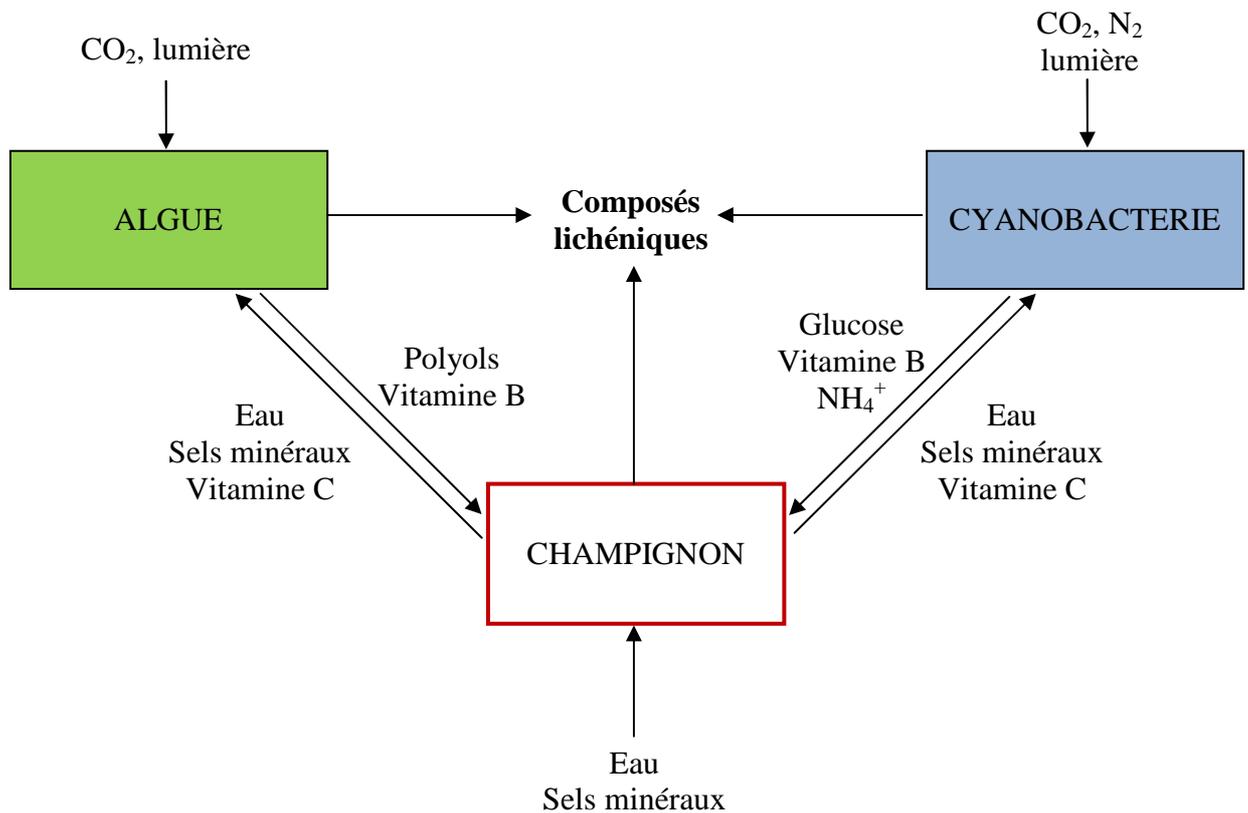


Figure 3 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens [9,12]

1.4 Ecologie

Dans l'écosystème, les lichens sont une des composantes parfois importante de la biodiversité [13]. Ils sont répandus à travers presque toutes les régions du monde : des zones les plus extrêmes, vers les pôles, jusqu'aux sommets (7400 m), à la limite des neiges éternelles, dans les déserts rocheux. On peut les considérer à plus d'un égard comme des végétaux pionniers, capables de coloniser la roche la plus dure, le sol le plus désert, de supporter de très grosses variations de températures : très froides (jusqu'à -40°C) ou très chaudes, des taux d'humidité ou de sécheresse très élevées. Après leur mort, ils créent une couche de terreau qui permettra alors l'installation des bryophytes ou des phanérogames. Si nous trouvons des lichens dans des sites extrêmement variés, ce n'est pas que les lichens soient indifférents aux lieux dans lesquels ils s'implantent ni aux conditions écologiques. Au contraire, chaque espèce de lichen a besoin, pour se développer, de conditions écologiques très strictes, ce qui rend intéressante l'étude de la relation du lichen et du milieu [7]. Par exemple, de nombreux lichens sont des indicateurs de pollution utilisés pour la biosurveillance [14]. La répartition des lichens et des associations lichéniques apporte des éléments sur la localisation de zones plus ou moins polluées. La disparition actuelle en ville de certains lichens sensibles notamment au dioxyde de soufre montre que la pollution acide a augmenté [15]. Par contre, le développement des espèces nitrophiles montre l'augmentation

de la pollution par les oxydes d'azote [16]. En zone très polluée, on trouve surtout des lichens crustacés, en zone moyennement polluée, on a surtout des lichens fruticuleux et alors qu'en zone peu polluée, essentiellement des lichens foliacés et des lichens fruticuleux [10].

2 Métabolites lichéniques

Le nombre de substances isolées des lichens ne cesse de croître : dans la dernière compilation réalisée par Huneck en 1996 et en 2001 [17,18], on en comptait 800 et actuellement, le nombre de métabolites lichéniques identifiés avoisinerait les 1050 [19], cependant beaucoup d'autres restent à identifier.

Tous les métabolites secondaires caractéristiques des lichens sont d'origine fongique. Cependant, la plupart sont propres aux lichens et seulement de 5 à 10 % d'entre eux sont synthétisés par d'autres organismes (champignons ou plantes supérieures). Par exemple, la pariétine, un pigment orange anthraquinonique courant dans la plupart des *Teloschistales* [20] est produit également par des espèces des genres fongiques non lichénisés *Achaetomium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Dermocybe*, *Penicillium*, ainsi que dans les plantes vasculaires *Rheum*, *Rumex*, et *Ventilago*. De même, un *para*-depside commun, l'acide lécanorique est produit également dans le genre fongique *Pyricularia*, tandis qu'un stérol typique des végétaux supérieurs, le brassicastérol, a été également détecté dans les lichens [21].

2.1 Voies de biogénèse des métabolites secondaires lichéniques

Les études directes de biosynthèse sur les lichens intacts en utilisant des composés marqués sont peu nombreuses, mais les voies hypothétiques sont souvent proposées sur la base de ce qui est connu pour la biosynthèse de produits analogues fongiques. En outre, la culture peut permettre de mieux comprendre leur biogénèse [21]. Des voies de biosynthèse probables pour les grandes classes de substances lichéniques sont proposées et illustrés dans la figure 4 [21]. Un des développements le plus intéressant de ces dernières décennies est la connaissance du rôle clé des *para*-depsides en tant que précurseurs potentiels (ou intermédiaires biosynthétiques) des *méta*-depsides, depsidones, diphényléthers, depsones et dibenzofuranes [22]. Plusieurs études récentes obtenues à partir des lichens en culture sont compatibles avec ce schéma.

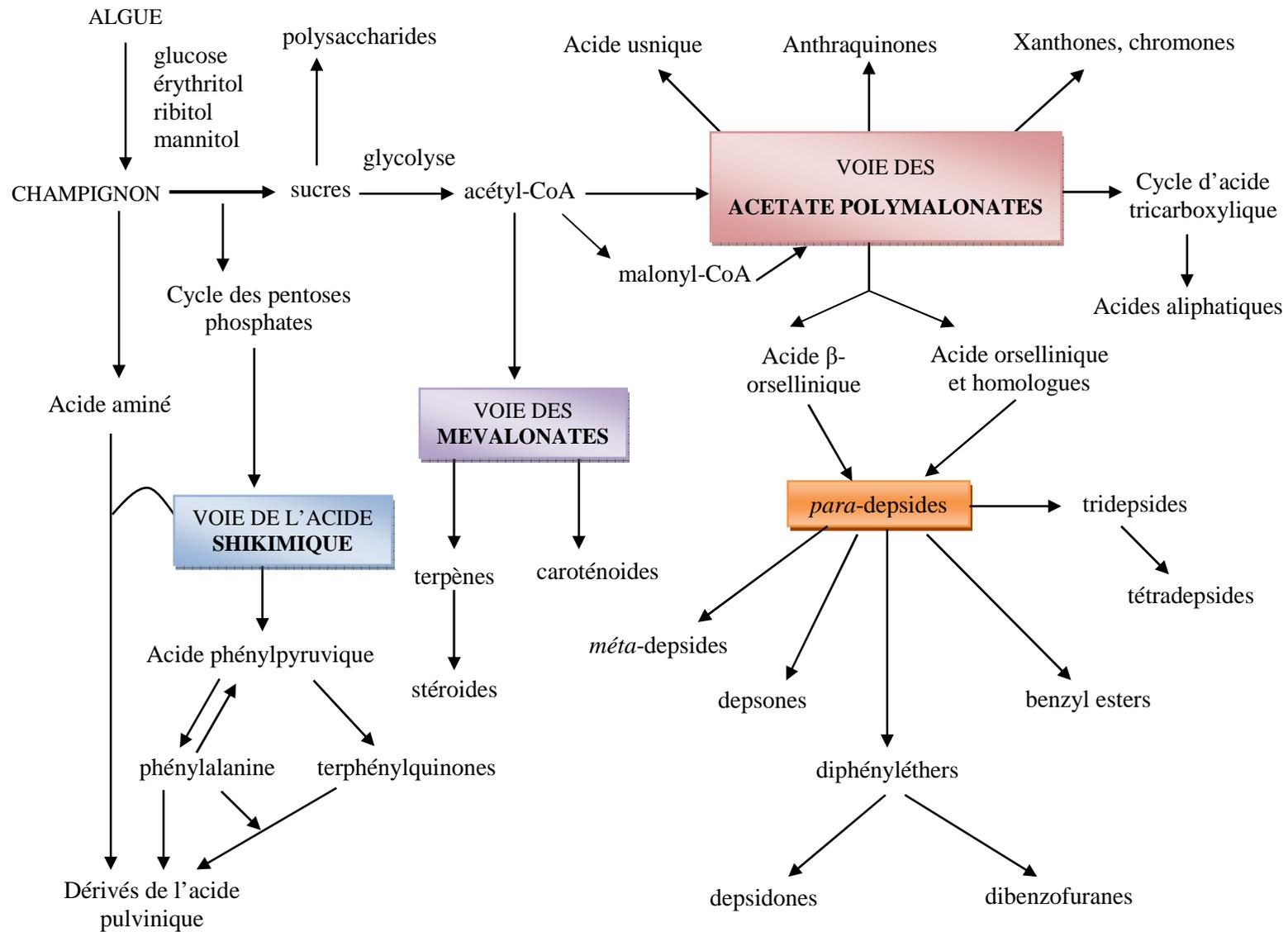


Figure 4 : Voies probables conduisant aux grands groupes de produits lichéniques [21]

La première classification des substances de lichen sur la base des structures connues et des voies de biosynthèse a été réalisée par Asahina et Shibata [23]. Cette classification est modifiée de temps en temps grâce aux études réalisées, et plus récemment par Culberson et Elix [22]. Les principales classes de métabolites secondaires lichéniques sont énumérées dans le tableau 1 selon leur origine biosynthétique avec un nombre approximatif des composés connus.

Tableau 1: Classes de métabolites secondaires dans les lichens [18]

Voie de biosynthèse	Type de composé	Nombre de composés
Voie des acétates polymalonates	Acide aliphatiques, esters et dérivés	56
	Monoaromatique phénoliques	32
	Depsides, tridepsides et benzyl esters	207
	Depsidones et diphényléthers	131
	Depsones	8
	Dibenzofuranes, acide usnique et dérivés	29
	Anthraquinones et dérivés	52
	Chromones et Chromanes	13
	Naphthaquinones et bis-Naphthaquinones	10
	Xanthones et bis-Xanthones	78
Voie des mévalonates	Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88
	Stéroïdes	33
Voie de l'acide shikimique	Terphénylquinones	2
	Dérivés de l'acide pulvinique	13

2.2 Activités biologiques décrites

Les lichens produisent des métabolites primaires et des métabolites secondaires, parfois accumulés en quantité. Les métabolites primaires comprennent les acides aminés, les polyols, les vitamines et les polysaccharides. Certains ont une signification taxonomique comme les composés polysaccharidiques de la paroi cellulaire (lichénane et isolichénane) [24]. Les métabolites secondaires lichéniques, souvent appelés acides lichéniques, sont produits principalement par le mycobote, et sécrétés à la surface des hyphes du lichen, soit sous forme amorphe, soit sous forme de cristaux [19]. Leur rôle est encore peu connu. Ils doivent probablement aider le thalle lichénique à se protéger de son environnement souvent hostile, contre les herbivores, les pathogènes et les facteurs abiotiques. Pour cette raison, la plupart des molécules isolées des lichens font souvent preuve de multiples activités biologiques comme l'atranorine, présentant à la fois des activités antioxydantes, antimicrobiennes et photoprotectrices [25]. Plusieurs études montrent que les métabolites secondaires lichéniques ont une grande variété d'activités biologiques comprenant [24–28]:

- Activité antimicrobienne : antibiotique, antifongique (approximativement une trentaine d'études) et antivirale (revue plus en détail dans la section suivante (Chap. 1 § 2.3)).
- Activité cytotoxique, antitumorale (approximativement une trentaine d'études).
- Activité antiherbivore et anti-insecticide (approximativement une vingtaine d'études).
- Activité inhibitrice d'enzymes (revue plus en détail dans la section suivante (Chap. 1 § 2.4)).
- Activité antioxydante et de photoprotection (approximativement une cinquantaine d'études).
- Activité inhibitrice sur la croissance des plantes (approximativement une quinzaine d'études).

Certains effets néfastes ont également pu être mis en évidence tels que des phénomènes d'allergie à certaines molécules. Ce phénomène cause quelques problèmes, notamment dans l'industrie des cosmétiques qui utilise l'extrait d'*Evernia prunastri* et de *Pseudevernia furfuracea* notamment, dans de nombreuses préparations parfumées.

Nous avons choisi d'illustrer plus précisément deux activités biologiques concernant les lichens à savoir l'activité antivirale et l'activité inhibitrice d'enzymes puisque certains composés isolés seront évalués à travers ces deux activités.

2.3 Activité antivirale des extraits et composés lichéniques

L'activité antivirale a été attribuée à divers extraits lichéniques et composés lichéniques: depsides, depsidones, anthraquinones, anthrones, bis-anthraquinones, bis-anthrones, dibenzofuranes, triterpènes...

- La fraction de polysaccharides bruts du lichen *Parmelia perlata* inhibait le virus à ARN enveloppé (virus de la fièvre jaune), mais était inactive sur les virus à ARN non-enveloppés (poliomyélite et le virus de la bursite infectieuse) [29].
- Des extraits aqueux et des extraits éthanoliques préparés à partir des lichens *Xanthoria parietina* et *Xanthoparmelia tinctoria* ont été évalués pour l'activité antivirale contre le virus para-influenza humain de type 2 (VPIh-2) [30].
- Cohen et al. [31] ont rapporté l'activité inhibitrice contre le virus de l'herpes simplex virus type 1 (HSV-1) de composés de type anthraquinones et bi-anthrones isolés à partir des lichens *Nephroma laevigatum* et *Heterodernia obscurata* [32,33]. Ces composés ont aussi montré une activité antivirale contre le cytomégalovirus humain [34].

- L'acide usnique isolé à partir de *Teloschistes chrysophthalmus* et la pariétine isolée à partir de *Ramalina celastri* ont montré une activité antivirale contre le virus de Junin et Tacaribe [20].
- Quatre depsides ainsi que l'acide usnique-(+), ont montré une activité contre l'activation du virus d'Epstein-Barr (EBV), et pourrait donc constituer de bons candidats en tant que promoteurs antitumoraux [35].
- Dix-sept depsides et depsidones ont été examinés pour leur activité inhibitrice contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Des dérivés de l'acide virensique ont été sélectionnés et se sont révélés être des inhibiteurs puissants [36].
- Une butyrolactone, l'acide protolichestérique, isolée à partir du lichen *Cetraria islandica*, a également montré une inhibition de l'enzyme virale de la reverse transcriptase du VIH [37].
- Un composé de type polysaccharidique, le sulfate (GE-3-S), (obtenu après traitement avec de l'acide chlorosulfonique de GE-3, un glucane (1→6) acétylé et isolé à partir du lichen *Umbilicaria esculenta*), inhiberait l'effet cytophatique du VIH *in vitro* [38].
- Récemment, l'extrait du lichen nigérien *Ramalina farinacea* a montré une activité inhibitrice contre le virus respiratoire syncytial. Les composés isolés à partir de ce lichen ont été aussi évalués pour cette activité. Parmi ces composés, un composé de type depside, l'acide sékikaïque, a montré une inhibition puissante d'une souche recombinante du virus respiratoire syncytial [39].

2.4 Activité inhibitrice d'enzymes des extraits et composés lichéniques

Des substances lichéniques, telles que l'atranorine, l'acide évernique, l'acide physodique et l'acide usnique, se sont révélées être de puissants inhibiteurs de certaines enzymes telles que l'arginase, l'arginine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase ... [40–42]. L'atranorine a été aussi rapportée comme inhibant la trypsine, une enzyme digestive du suc pancréatique qui a pour rôle de digérer les protéines [43]

L'inhibition de la lipoxigénase a également été montrée pour des extraits et des composés lichéniques [44–47]. Or, il est connu que l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines [48], et des leucotriènes B4 [49] sont liées à des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique [50].

L'inhibition de la xanthine oxydase (une enzyme clé dans l'hyperuricémie) et de la tyrosinase (impliqué dans la biosynthèse de la mélanine) par des extraits de lichens récoltés ou des tissus de lichen cultivé a été rapportée dans diverses études [51–54]. Des inhibiteurs de

la tyrosinase sont fréquemment utilisés dans le domaine cosmétique comme agents de dépigmentation [55]. D'ailleurs, un brevet a été déposé par le laboratoire PNSCM pour l'activité dépigmentante de l'acide lichestérique et de ses dérivés [56].

Récemment, certaines études ont rapporté une activité inhibitrice de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), une enzyme jouant un rôle essentiel en tant que modulateur essentiel de la régulation négative du récepteur de l'insuline, d'extraits lichéniques ainsi que de substances lichéniques [57–60]. Par conséquent, l'inhibition de PTP1B pourrait constituer une cible intéressante dans le traitement du diabète de type 2 et de l'obésité (Ces propriétés seront revues plus en détail dans le Chap 3 §3.1.3).

3 Le genre *Stereocaulon*

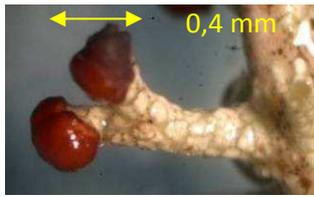
3.1 Morphologie

Au niveau de classification au sein des Fungi, les lichens du genre *Stereocaulon* appartiennent à la classification suivante:

Classe:	Ascomycètes
Sous-classe:	Ascomycetidae
Ordre:	Lecanorales
Famille:	Stereocaulaceae
Genre:	<i>Stereocaulon</i>

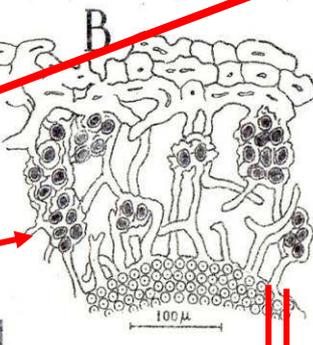
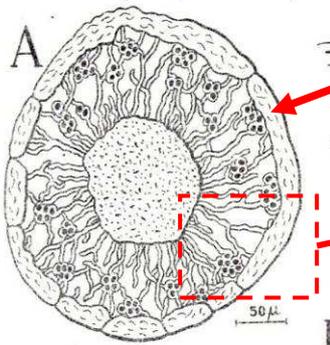
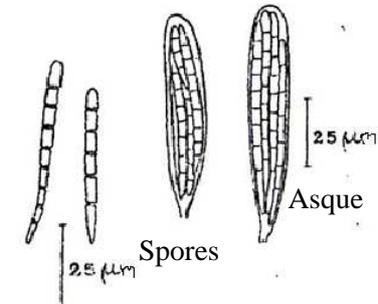
Les lichens du genre *Stereocaulon* comprennent traditionnellement les espèces qui ont un dimorphisme de thalle constitué d'un thalle primaire squamuleuse et d'un thalle secondaire fruticuleux. Le thalle primaire est constitué de granules basales appelées phylloclades, squamules qui sont étroitement fixées sur le substrat. Chez la plupart des espèces, le thalle primaire disparaît tôt pendant le développement mais dans de rares cas, il est persistant et cette caractéristique est un critère important pour la classification. Le thalle secondaire fruticuleux, ou pseudopodétion, se développe à partir du thalle primaire par allongement du thalle sous forme de tiges richement ramifiées et pleines (contrairement à celles des *Cladonias* qui sont creuses). Les pseudopodétions, se couvrent presque toujours de phylloclades, formées d'une médulle homogène et d'une couche algale, en forme de granules, papilles ou squamules, de couleur grisâtre ou blanchâtre (Fig. 5). Certains *Stereocaulons* peuvent

posséder des céphalodies (Fig. 5) contenant des cyanobactéries appartenant aux genres *Nostoc*, *Scytonema* ou *Stigonema* mais le photobiotte primaire est une algue verte appartenant au genre *Trebouxia*. La majorité des espèces de *Stereocaulon* produisent abondamment et de façon assez constante des apothécies qui sont toujours brunes, généralement grandes, dépourvues de bord thallin (Fig. 5). Au sein de l'apothécie, se trouve l'hyménium contenant les asques, elles-mêmes contenant les spores (Fig. 5). La taille et le cloisonnement des spores sont une fonction utile et importante pour la classification. Elles sont aussi soumises à des variations considérables à cause de diverses conditions écologiques et climatiques. Tous les stéréocaulons sont calcifuges, épilithiques ou terricoles, souvent très acidophiles. Ils se développent soit en montagne et régions froides, soit en régions chaudes et humides. La détermination des espèces de *Stereocaulon* est très difficile à cause de leur grande diversité morphologique au sein même d'une espèce et à cause de l'insuffisante clarté des caractères usuels de détermination. En effet, la détermination est basée sur la présence ou l'absence de soralies, la persistance ou la fugacité du thalle primaire, la nature du substrat, la morphologie des pseudopodétions, la présence ou l'absence de tomentum sur ceux-ci, et principalement sur la forme ainsi que sur les résultats des réactions thallines (avec K et P) réalisées sur les phylloclades (K : solution de KOH à 10% dans l'eau ; P : 1% de p-phénylènediamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse (10%)). Dans le premier traitement monographique du genre *Stereocaulon* publié par Fries [61,62], 23 espèces ont été reconnues, et un concept de classification infragénérique a été présenté. Par la suite, le concept de Fries a été plusieurs fois affiné et des concepts alternatifs ont été proposés. En 1951, Lamb a publié une étude approfondie de la division sous-générique de ce genre [63]. Sa classification était basée sur un concept phylogénétique (sans étude moléculaire) et les caractères ont été obtenus à partir des études approfondies de la morphologie, de l'anatomie et de l'ontogenèse des espèces inscrites dans ce genre. Cette classification a été adoptée aboutissant à un nouveau tableau synoptique du genre *Stereocaulon* [64]. Cette publication récapitule pour chaque espèce : les articles décrivant pour la première fois l'espèce, la description du type, la synonymie, les références aux illustrations réalisées, les constituants chimiques majoritaires et la répartition géographique générale. Elle constitue à ce jour l'étude la plus importante et de référence internationale pour ce genre. En 1978, Lamb a achevé son étude sur *Stereocaulon* en publiant une clé d'identification des 123 espèces reconnues dans son tableau synoptique [65].

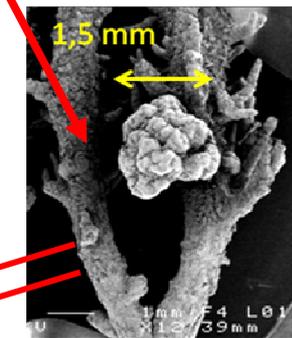
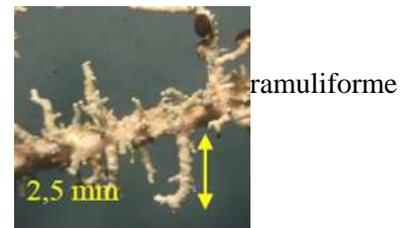
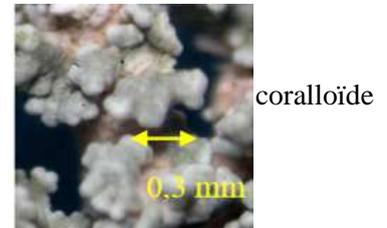
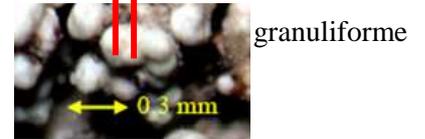
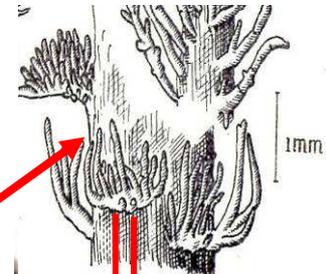
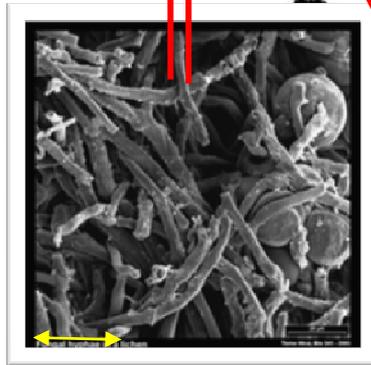


Apothécie
 Organe sexué du champignon souvent en forme de coupe. Au sein de l'apothécie, se trouve l'hyménium contenant les asques, elles-mêmes contenant les spores.

Phylloclade
 Organite où a lieu la photosynthèse réalisée par le photobiotte. Elles peuvent se présenter sous différentes formes comme photographié ci-dessous :

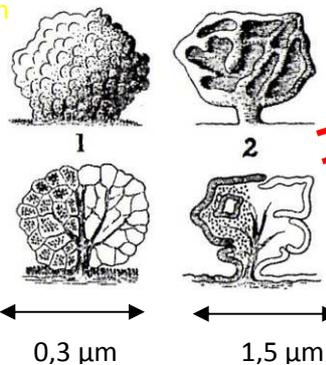


C



Pseudopodétion
 Thalle érigé dit secondaire provenant de l'élongation du thalle primaire initialement sous forme de granules basales.

A: Coupe transversale
 B: Détail du pseudopodétion
 C: Détail de l'enchevêtrement entre l'algue et le champignon (Microscope électronique à balayage)



Les céphalodies peuvent posséder des morphologies différentes. Ci-dessus type sphérique (1) et scrobiculé (2)

Céphalodies
 organite spécial contenant des cyanobactéries capables d'assimiler l'azote atmosphérique

Figure 5 : Structure des Stereocaulons (éléments de diagnose) [66]

Lors des travaux précédents réalisés par Ismed Friardi [66] portant sur un criblage de 9 espèces de *Stereocaulon*, un lichen *Stereocaulon evolutum* Graewe a montré un profil phytochimique intéressant et a donc initié la réalisation de ce travail. *S. evolutum* se rencontre surtout en zone atlantique en Europe occidentale, sur la roche siliceuse, souvent parmi les mousses. Le photosymbiote de *S. evolutum* est une algue appartenant au genre *Trebouxia*. L'observation macroscopique montre la présence d'un thalle primaire fugace et d'un thalle secondaire (de 22 - 33 mm de longueur et de 0,2 - 1 mm de diamètre) en forme de touffes compactes dues aux pseudopodétions ramifiés de façon irrégulière et couverts de phylloclades dans le tiers supérieur (Fig. 6a). La forme des phylloclades est granuliforme, digitée et coralloïde (0.36 - 0.48 mm) (Fig. 6b). Les apothécies sont nombreuses et localisées en position terminale sur la partie supérieure du pseudopodétion (1.01 - 1.44 mm) (Fig. 6c). Nous n'avons pas observé de céphalodies et elles sont décrites comme indistinctes et de type sphérique [67].



(a) Aspect général
Longueur: 22-33 mm
Diamètre: 0,2 - 1 mm



(b) Détail des phylloclades
coralloïdes, digités,
papilliformes
Taille: 0,36 - 0,48 mm



(c) Apothécie:
Taille: 1,01-1,44 mm

Figure 6 : Caractéristiques morphologiques du lichen *S. evolutum* par observation macroscopique [66]

Afin de compléter la description macroscopique, des observations microscopiques avaient été réalisées (Fig. 7). Le pseudopodétion possède une organisation dorsiventrale visible lorsque l'on réalise une coupe transversale d'une phylloclade. Après la réalisation d'une coupe transversale d'apothécies, on observe un hyménium incolore de même taille (55 à 60 μm) que l'hypothécium (Fig. 7a). Les spores incolores possèdent 3 à 4 septa, mesurent entre 16 à 17 μm de long sur 5 μm de large (Fig. 7c) et elles sont groupées dans des asques dont les dimensions sont de 42,5 - 55 μm de large et de 7,5 - 12,5 μm de long (Fig. 7b).

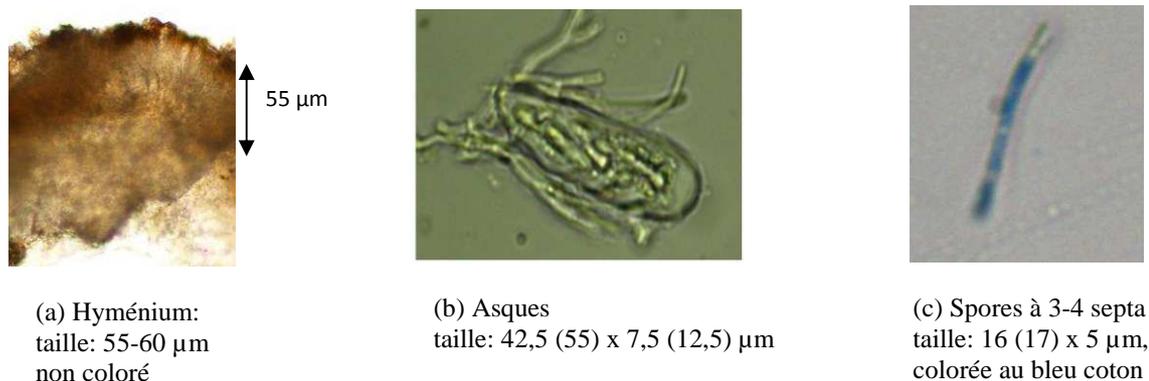


Figure 7 : Caractéristiques morphologiques du lichen *S. evolutum* Graewe par observation microscopique [66]

Les réactions thallines sont des réactions colorées utilisant soit la potasse (K), l'eau de javel (C) ou la paraphénylènediamine (P) et elles sont réalisées directement sur le thalle du lichen. *S. evolutum* Graewe a montré des réactions K, KC et P positives (couleur jaune) (KC : solutions K et C appliquées l'une après l'autre) tandis que la réaction est négative avec C.

3.2 Etudes chimiques

Le genre *Stereocaulon* regroupe 123 espèces dont seules environ 40 espèces et sous-espèces ont été étudiées phytochimiquement car leur identification est difficile. Les soixante-quinze composés isolés appartiennent aux dérivés de la voie acétate-polymalonate (39/75), aux dérivés de la voie mévalonate (21/75), aux dérivés des sucres et acides gras (15/75) (Tableau 2). Il n'existe pas de dérivés appartenant à la voie de l'acide shikimique isolés à ce jour.

Tableau 2 : Répartition des composés isolés du genre *Stéréocaulon* d'après la bibliographie

(les références et les structures figurent en annexe 1)

Type de composé	Nombre de composés
Depsides	5
Depsidones	11
Dibenzofuranes	3
Diphényléthers	13
Composés monoaromatiques	6
Anthraquinones	1
Stéroïdes	8
Triterpénoïdes	3
Caroténoïdes	10
Autres (polyols, acides gras...)	15

Parmi les composés isolés, l'atranorine (depside) semble être un métabolite constant pour ce genre.

Trois depsidones correspondantes à l'acide lobarique, l'acide stictique ou l'acide norstictique, se retrouvent très fréquemment dans le genre *Stereocaulon*. La présence d'une de ces trois depsidones pourrait permettre de distinguer entre elles les espèces du genre [63]. Récemment, le composé 1,3,7-triméthylguanine, un composé atypique de lichen, a été isolé à partir du lichen *S. ramulosum* [68].

Cette investigation relativement partielle de la chimie de ces lichens a stimulé notre intérêt pour ce genre. Nous avons donc travaillé à partir du lichen *Stereocaulon evolutum* Graewe recueilli par Françoise Lohézic-Le Dévéhat dans la région de Commana en Bretagne en vue d'enrichir la diversité des métabolites du genre *Stereocaulon* par l'isolement, l'identification des composés de ce lichen. Nous avons également cherché à valoriser les métabolites secondaires isolés étant donné le nombre restreint d'études biologiques réalisés sur ces composés.

**CHAPITRE 1: ANALYSE DES ACIDES GRAS
CHEZ LES LICHENS – ETUDE PARTICULIERE
DU GENRE *STEREOCAULON***

Dans la thèse d'Ismed Friardi [66], l'un des objectifs fut de différencier entre elles les espèces de stéréocaulons en fonction de leurs métabolites secondaires (hors acides gras) et de corrélérer ce profil métabolique à leur morphologie et à la classification proposée par Lamb. Cette étude n'ayant pas été concluante, nous nous sommes intéressés aux acides gras (AG) de ces lichens puisqu'ils avaient été décrits comme une aide chimiotaxonomique chez les bactéries, fungi, octocoraux, micro- et macro-algues et plus récemment pour un genre lichénique, *Cladonias* [69–74]. L'objectif a donc consisté à compléter ce travail par l'étude des acides gras totaux dans les lichens en vue de différencier nos espèces entre elles voire de corrélérer leur profil en AG totaux à la classification de Lamb [63].

Avant de présenter les résultats obtenus, nous ferons tout d'abord un bref rappel des lipides puis nous présenterons brièvement, à travers quelques exemples sélectionnés dans la littérature, les lipides des lichens. Nous aborderons les teneurs des lipides totaux dans les lichens, les glycolipides, les lipides neutres, les phospholipides et les acides gras totaux.

1 Définitions des lipides

Les lipides font partie des « matières grasses » des organismes vivants et sont l'un des trois composés importants du processus anabolique, les glucides et les protéines. Dans le monde du vivant, alors que la plupart des familles de molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, les lipides (du grec lipos, graisse) sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des substances organiques à solubilité nulle ou faible dans l'eau, mais par contre élevée dans les solvants organiques apolaires tels que le *n*-hexane, le chloroforme... Ce sont des molécules, soit complètement apolaires (lipide neutre), soit bipolaires, avec une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire. Les lipides sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et ont une densité inférieure à la densité de l'eau.

Les lipides se répartissent en différentes catégories dont la plus courante est appelée « lipides vrais », l'ensemble des autres composés étant qualifiés de « composés à caractère lipidique » (Tableau 3) [75]. Les lipides vrais comprennent les acides gras à plus ou moins longue chaîne ou des composés résultant de la condensation d'acides gras avec des alcools par une liaison ester. Parmi ceux-ci, on retrouve les lipides simples comprenant les glycérides (monoglycérides, diglycérides, triglycérides) dont l'alcool est le glycérol, les cériques dont les alcools sont à longue chaîne, les stériques dont l'alcool est un stérol. Ils regroupent également

les lipides complexes auxquels s'ajoutent divers groupements phosphorés, azotés, soufrés ou des oses. Ils portent alors les noms de glycolipides et phospholipides. Les composés à caractère lipidique ne sont ni des acides gras, ni le résultat de l'association entre un acide gras et un alcool. Ils possèdent donc le caractère commun à tous les lipides : l'insolubilité en milieu aqueux. Il existe deux familles chimiquement distinctes : les isoprénoïdes avec les terpènes et les dérivés des stérols, et les éicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique.

Tableau 3: Les catégories de lipides

Lipides vrais	Lipides simples	Acides gras
		Glycérides
		Stérides
		Cérides
	Lipides complexes	Glycérophospholipides
		Glycéroglycolipides
		Sphingolipides
Composés à caractère lipidique		Eicosanoïdes
		Terpènes et composés terpéniques

Dans le but de mieux appréhender les acides gras totaux des lichens sur lesquelles nous avons travaillé, nous donnerons ici des définitions des acides gras puis des classes de lipides contenant des acides gras qui pourraient être libérés par saponification.

1.1 Acides gras

Les acides gras (AG) sont des molécules communes à l'ensemble des lipides vrais. Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique ou ramifiée, présentant des chaînes d'au moins 4 carbones jusqu'à généralement 28 avec ou sans double liaison. C'est un constituant naturellement retrouvé dans les lipides tels que les huiles, les graisses animales et végétales, ou les cires sous forme estérifiées. Les acides gras sont normalement des monoacides, linéaires, à nombre pair d'atomes de carbone puisque la biosynthèse des acides gras implique l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui permet l'ajout de deux atomes de carbones à chaque étape de la synthèse des acides gras. Les acides gras se caractérisent tout d'abord par le nombre de carbones de la chaîne (noté C_n), puis par le nombre x de doubles liaisons qu'ils contiennent. Ils sont dits acides gras saturés quand ils n'ont pas de double liaison et insaturés lorsqu'ils ont au moins une double liaison dans la chaîne carbonée. Les acides gras sont également caractérisés par le nombre, la localisation et la conformation (cis/trans) de la double liaison. Dans les acides gras insaturés, deux dénominations sont possibles, soit en partant du carboxyle (1^{er} carbone) : le symbole est Δ , soit en partant du méthyle (dernier carbone), le symbole est alors oméga (ω) (Fig. 8). En médecine clinique et

en biologie, la désignation des acides gras insaturés la plus courante est celle qui fait appel au symbole oméga (ω).

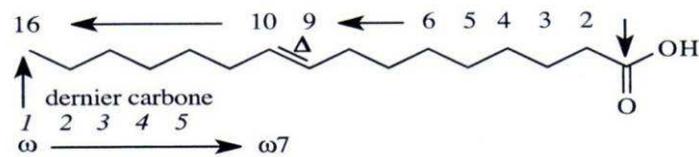


Figure 8: Illustration des différentes dénominations d'un acide gras (Acide palmitoléique C16:1 ω 7) ou (C16:1 n-7 ou C16:1 Δ 9)

Dans cette catégorie d'AG insaturés se trouvent l'acide oléique (C18:1 ω 9) ou (C18:1 n-9), l'acide linoléique (C18:2 ω 6) ou (C18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (C18:3 ω 3) ou (C18:3 n-3). Lorsque le symbole Δ est utilisé, nous avons l'acide oléique symbolisé par C18:1 Δ 9 (avec la double liaison en position 9 à partir du groupement carboxyle), l'acide linoléique par C18:2 Δ 9,12 et l'acide α -linoléique par C18:3 Δ 9,12,15. Les familles d'AG insaturés se distinguent entre elles par la position de leur première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle. Ainsi les AG de la famille – ou série – oméga 3 – ou n-3 – ont pour point commun d'avoir en troisième position à partir de l'extrémité méthyle la première de leurs doubles liaisons. De même, on distingue aussi les AG des séries n-9, n-7 et n-6.

Le stroma est le site de production prépondérant des AG. Au niveau du cytosol, des AG gras sont synthétisés jusqu'à l'acide palmitique (C16:0). Cependant, la synthèse des AG à 18 atomes de carbones ou plus s'effectue dans le réticulum endoplasmique grâce à des élongases pour allonger la chaîne et des désaturases pour introduire des doubles liaisons. La synthèse, la transformation et l'insaturation des AG polyinsaturés (AGPI) varient avec les organismes et par exemple, *Escherichia coli* ne possède aucun AGPI. Par contre, les eucaryotes synthétisent une grande variété d'AGPI, certains organismes plus que d'autres : les plantes font la synthèse d'AG insaturés dans lesquels des doubles liaisons peuvent se trouver entre l'insaturation Δ 9 et le méthyle de l'extrémité de la chaîne tandis que les animaux n'ont pas les enzymes nécessaires. Les plantes synthétisent l'acide linoléique (C18:2 n-6) par désaturation en 12-13 à partir de l'acide oléique et l'acide linoléique (C18:3 n-3) par désaturation en 15-16 à partir de l'acide linoléique. Ainsi, les mammifères ayant besoin de ces AGPI doivent les trouver dans leurs aliments. Ces AG sont appelés AG essentiels nommés n-6 ou oméga-6 (ω 6) et n-3 ou oméga-3 (ω 3), sans transformation métabolique de l'une à l'autre, et sans substitution fonctionnelle possible de l'une à l'autre (Fig. 9).

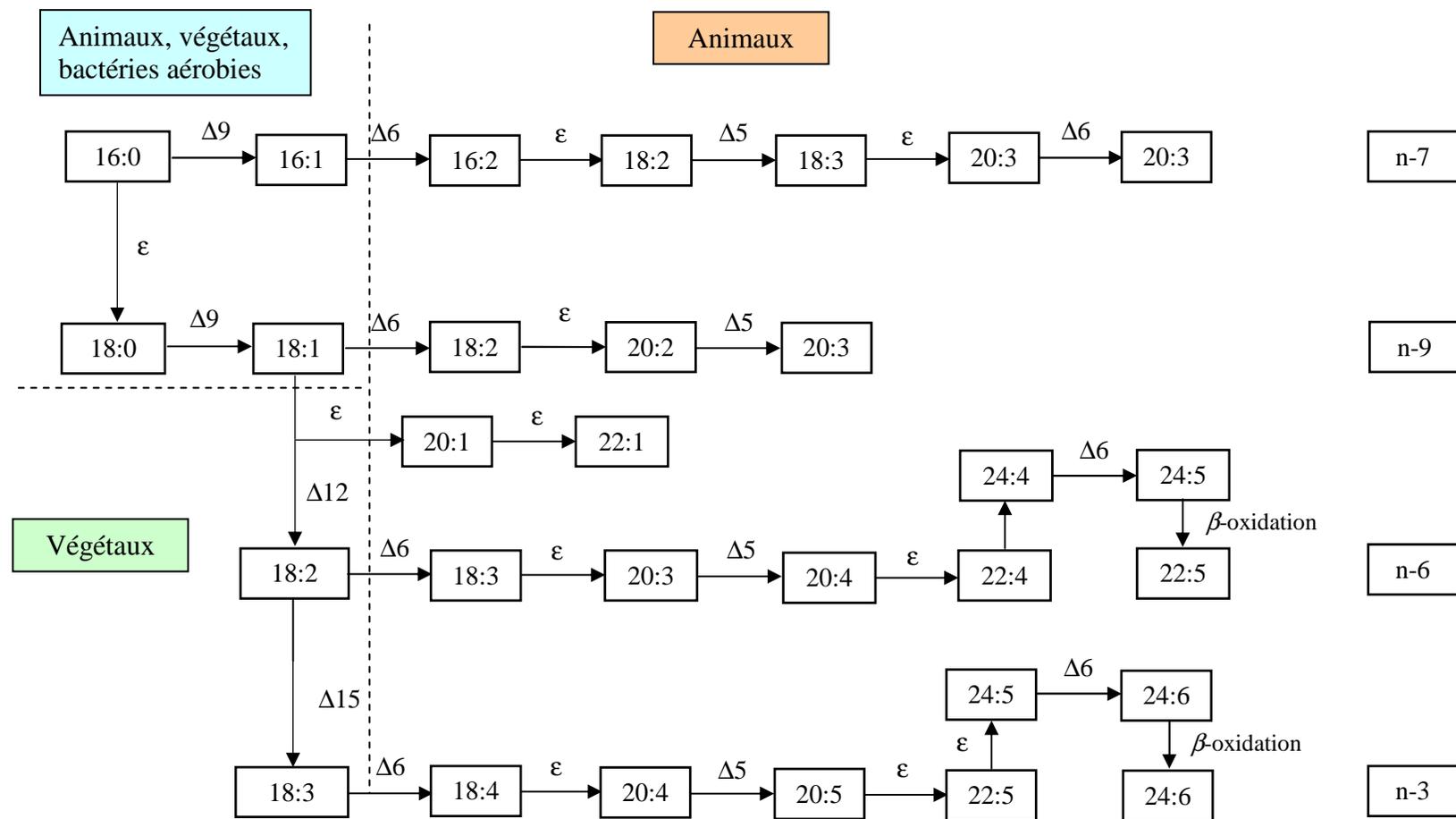


Figure 9: Schéma de biosynthèse simplifié des familles d'acides gras insaturés [76]

Le symbole Δ indique une désaturation, avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole ϵ indique une élongation. Les familles ne sont pas essentielles si leur précurseur est synthétisable par l'homme (et l'animal). Les familles n-6 et n-3 constituent les acides gras essentiels.

Une autre catégorie d'acides gras, les acides gras à chaîne ramifiée existent également. Ils sont des constituants communs aux bactéries et animaux et ils sont plus rarement retrouvés dans les plantes supérieures. Ce sont souvent des acides gras saturés où les ramifications peuvent être mono-, di-, poly-méthylées en position terminale ou intermédiaire de la chaîne. La ramification est constituée d'un groupe de méthyles, mais les acides gras di- et poly-méthyl-ramifiés sont également connus. Il existe également des acides gras à chaîne ramifiée insaturée qui sont surtout présents dans les animaux marins tandis que les AG à chaîne ramifiée saturée sont présents dans les bactéries. Les AG à chaîne ramifiée dite *iso* ou bien *antéiso* selon que la ramification est branchée respectivement sur le deuxième ou sur le troisième atome de carbone en partant de l'extrémité $-CH_3$ de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras et le groupe méthylique, ont une configuration (*S*). Ils peuvent être formés de 10 à 30 atomes de carbone mais ils possèdent le plus souvent 14 à 18 atomes de carbone dans la chaîne (sans compter le carbone additionnel dans le groupe méthyle ramifié) (Fig. 10). Ce sont des constituants courants des bactéries et ils sont rarement trouvés chez d'autres microorganismes. Chez les bactéries, leur teneur et leur composition peuvent souvent être utilisées comme marqueur taxonomique, par exemple, chez le genre *Bacillus* [69], certaines espèces ont seulement des acides gras à chaîne ramifiée *iso*, tandis que d'autres ont une structure *antéiso*.

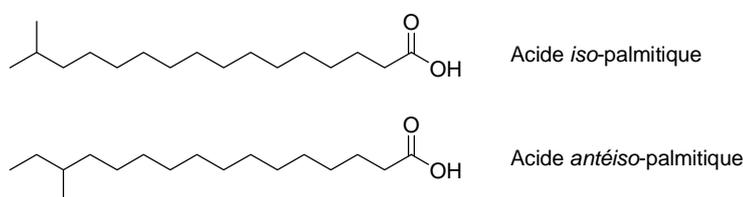


Figure 10: Structure des acides gras à chaîne ramifiée (*iso* et *antéiso*)

1.2 Glycérides

Les glycérides sont des esters d'acide gras et de glycérol (Fig. 11). Ils constituent une classe composée de monoglycérides (MAG), de diglycérides (DAG) et de triglycérides (TAG) selon le nombre d'hydroxyles du glycérol estérifiés par les acides gras (un, deux ou trois respectivement). Lorsque les molécules d'acides gras constituant le di- ou tri-ester sont identiques, on parlera de diglycérides ou triglycérides homogènes, dans le cas contraire, de diglycérides ou triglycérides mixtes.

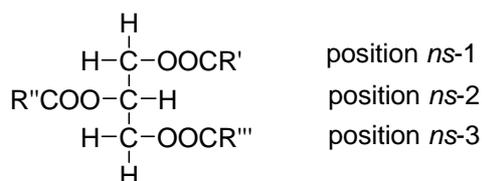


Figure 11: Représentation schématique des glycérides.

Glycérol + acide gras 1 ou acide gras 3 = α -monoacylglycérol (MAG) ; Glycérol + acide gras 2 = β -monoacylglycérol (MAG) ; Glycérol + acide gras 1 + acide gras 3 = $\alpha\alpha'$ -diacylglycérol (DAG) ; Glycérol + acide gras 1 + acide gras 2 = $\alpha\beta$ -diacylglycérol (DAG) ; Glycérol + acide gras 1 + acide gras 2 + acide gras 3 = triacylglycérol (TAG)

1.3 Stérides

Les esters de stérols ou les stérides résultent de l'estérification entre le groupe hydroxyle en C-3 du stérol et un acide gras (Fig. 12). Ils sont trouvés à l'état de traces dans tous les types cellulaires, et sont plus particulièrement présents dans les cellules spumeuses. Le plasma est, par exemple, riche en palmitate et linoléate de cholestéryle, forme estérifiée par des acides gras à 16 ou 18 atomes de carbone et représentant les 3/4 du cholestérol total. Le cholestérol et ses formes estérifiées sont transportés avec les autres lipides sous forme d'associations non covalentes : les lipoprotéines. Certains stérides utilisés comme compléments alimentaires, sont synthétisés à partir de phytostérol et d'acide gras dérivés de plantes, comme la cholestatine, composée de campestérol, stigmastérol et brassicastérol.

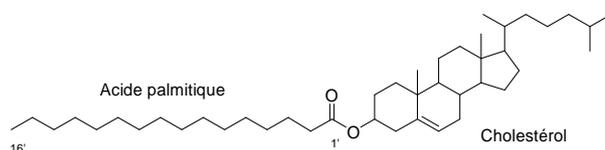


Figure 12: Structure du palmitate de cholestéryle

1.4 Cérides

Les cérides doivent leur nom générique au fait qu'ils sont les principaux constituants des cires animales, végétales et bactériennes. Ce sont des monoesters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne qui sont en général des alcools primaires, à nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés. La longueur des chaînes carbonées varie de 14 à 30 atomes de carbone pour l'acide gras et de 16 à 36 pour l'alcool gras (Fig. 13).

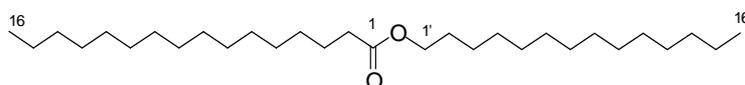


Figure 13: Structure d'un céride (palmitate de cétyle)

La composition des cires est relativement complexe. Elles contiennent en plus des différents cérides, des alcools, des acides gras libres et des hydrocarbures saturés à longues chaînes. Les plus connues sont le blanc de baleine, la cire d'abeille et les cires des parois bactériennes. Le blanc de baleine est un mélange de triacylglycérols insaturés et d'une cire simple constitué à plus de 90% de palmitate de cétyle (Fig. 13) [77]. La cire d'abeille de composition complexe est riche en palmitate de céryle (1-hexacosanol) et de myricyle (1-triacontanol).

1.5 Glycolipides

Les glycolipides résultent essentiellement de l'estérification ou de l'amidification d'acides gras par des oses ou des sucres aminés. Dans ce groupe, on trouve les glycéroglycolipides qui sont des acylglycérols dont les alcools des carbones C1 et C2 du glycérol sont estérifiés par les acides gras. L'alcool du carbone C3 est lié à un ose (Fig. 14). Ils sont très rares dans le monde animal, mais ces lipides prédominent dans les chloroplastes des plantes et des algues eucaryotes ainsi que chez les cyanobactéries sous forme de monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) dont la composition est hautement conservée à travers les espèces.

Une grande variété de glycéroglycolipides se trouve également dans différentes bactéries et l'ose impliqué est soit du glucose, du galactose, mais aussi dans certains cas, du mannose. Leur diversité structurale est bien connue mais on en sait beaucoup moins sur leurs aspects fonctionnels. Ces glycéroglycolipides possèderaient plusieurs rôles chez certaines bactéries: ils seraient nécessaires à la stabilité de la membrane bicouche, ils serviraient de précurseurs pour la formation de composants complexes de la membrane, ils seraient essentiels pour la croissance lors de carence en phosphate [78].

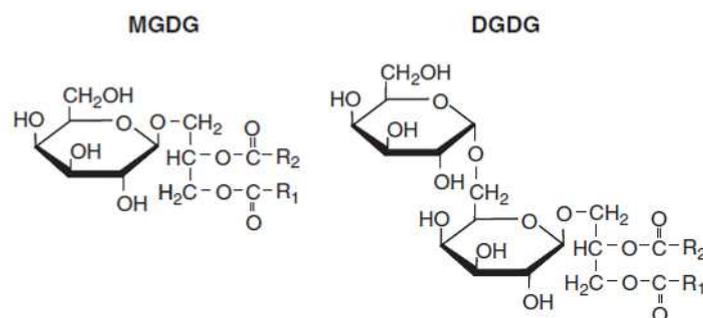


Figure 14: Structure du MGDG et du DGDG

1.6 Phospholipides

Un phospholipide est un lipide amphiphile, c'est-à-dire constitué d'une « tête » polaire (hydrophile) et de deux « queues » aliphatiques (hydrophobes). La plupart des phospholipides sont des phosphoglycérides (ou glycérophospholipides), dont la tête s'organise autour d'un squelette glycérol-3-phosphate (ou acide phosphatidique-AP) estérifié par une molécule polaire, et les deux queues sont les chaînes aliphatiques de deux acides gras (Fig. 15). La molécule polaire peut être un alcool aminé tel que la sérine, l'éthanolamine, la choline ou un polyol non azoté comme le glycérol, l'inositol ou le myo-inositol.

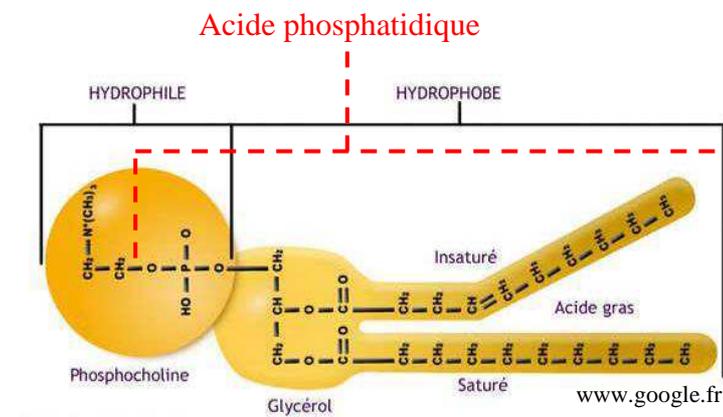


Figure 15: Représentation schématique d'un phospholipide (Phosphocholine)

Les glycérophospholipides sont présents chez les animaux, les plantes et microorganismes dont l'importance d'abondance est par ordre décroissant : les lécithines, les céphalines et les inositides. La plupart du temps, les deux acides gras sont différents avec sur le C1 un acide gras saturé à 16 ou 18 d'atomes de carbone et sur le C2 un acide mono- ou poly-insaturé (Fig. 15).

Une fois ces notions décrites, voyons à travers quelques exemples de la littérature les lipides retrouvés dans les lichens.

2 Les lipides des lichens

Les lipides de lichens ont suscité un intérêt scientifique depuis le début des années 1980. En 1992, Dembitsky [79] a résumé les résultats obtenus par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme ou à une spectrométrie de masse (CPG / FID et CPG / MS) des fractions lipidiques à partir d'une

grande variété d'espèces de lichens. Nous nous inspirons de son rapport reprenant des données bibliographiques pour décrire les lipides des lichens.

Nous allons d'abord présenter les teneurs des lichens en lipides totaux puis nous détaillerons les glycolipides, les lipides neutres (caroténoïdes, alcools gras, hydrocarbures, terpenoïdes, acides dicarboxyliques, hydroxyacides, cétoacides), les phospholipides et enfin les acides gras.

2.1 Teneur en lipides totaux

La teneur totale en lipides a été étudiée à partir de plusieurs espèces de lichens collectées, à travers le monde. Les teneurs en lipides totaux ont vraisemblablement été déterminées par pesée après extraction. Les teneurs dans les lichens varient de 6,1 à 83,9 mg/g poids sec [80–82] et sont influencées par les périodes de récolte. Dertien [83] a examiné les variations des lipides totaux sur quatre mois de deux lichens terrestres et trois lichens corticaux (Tableau 4). La teneur des lipides totaux s'est avérée relativement faible au cours du mois de mars, et élevée en avril et en mai.

Tableau 4: Teneur en lipides totaux de cinq lichens récoltés dans plusieurs localités et à différentes saisons

(en mg/g de poids frais de lichen) [83] (n.d – non déterminé)

Date de récolté	Conditions climatiques	Lichens corticaux			Lichens terrestres	
		<i>Evernia prunastri</i>	<i>Parmelia saxatilis</i>	<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Cladonia impexa</i>	<i>Cetraria islandica</i>
4 Mars	Froid (-3 ⁰ C, humide)	76	n.d	54	19	1
19 Mars	Froid (-1 ⁰ C, humide)	32	31	16	8	6
20 Avril	Modéré (15 ⁰ C, sec)	134	34	87	32	30
14 Mai	Frais (10 ⁰ C, humide)	105	n.d	106	131	141
8 Juin	Chaud (25 ⁰ C, sec)	154	19	50	7	6

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Dembitsky puisque la teneur en lipides totaux s'est avérée plus importante chez *Physcia dubia* récolté en mars (63,4 mg/g) alors que celle de *Physcia stellaris* était plus importante lorsqu'il était récolté en mai (37,5 mg/g). [84,85]. De plus, cette teneur variait peu pour le lichen *Xanthoria parietina*. D'autres facteurs doivent être pris en compte puisque *Physcia dubia* et *Physcia stellaris* récoltés au même endroit et à la même saison ont montré une teneur en lipides totaux différente (Fig. 16).

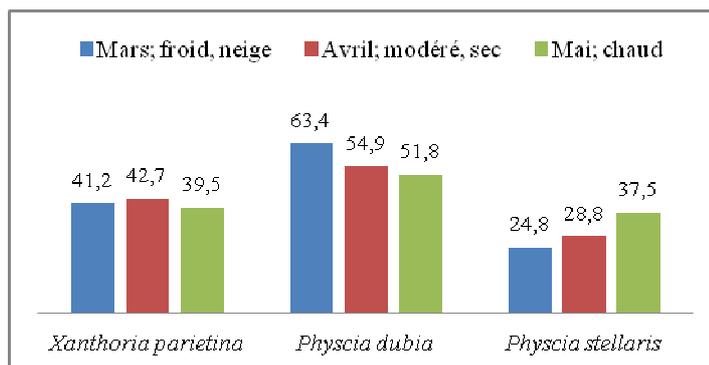


Figure 16: Teneur en lipides totaux (en mg/g de poids sec) de lichens récoltés à différentes saisons

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées des publications [84,85])

L'impact du substrat a été confirmé par Hanus [86] qui a montré que la teneur en lipides totaux de *Ramalina lacera* recueillis au cours du mois de Juillet variait de 39,6 à 51,3 mg/g de poids sec (Tableau 5).

Tableau 5: Teneur en lipides totaux du lichen *Ramalina lacera* récolté sur différents substrats [86]

Substrats	Teneur en lipides totaux (mg/g de poids sec)
<i>Crataegus sinaicus</i>	39,6
<i>Pinus halepensis</i>	42,4
<i>Quercus calliprinos</i>	51,3

La plupart des études ont rapporté une teneur en lipides totaux importante. Cela suggère que soit les lichens contiennent un niveau élevé en lipides, soit cette valeur comprend les autres métabolites secondaires qui sont facilement extraits par des solvants organiques tels que le *n*-hexane ou le chloroforme.

2.2 Glycolipides

2.2.1 Teneur en glycolipides

La quantité de glycolipides est comparativement plus faible que celle des lipides neutres et des phospholipides (Fig. 17), et varie généralement entre 7 et 39 % mais peut atteindre jusqu'à 63 % des lipides totaux [80,83,84,86,87].

2.2.2 Composition en acides gras des glycolipides

La composition en acides gras des glycolipides est plutôt intéressante. Le diglycosyldiacylglycérol (DGDG) retrouvé dans *Evernia prunastri* contient plus de 80% d'acides gras insaturés, principalement C18:3 (sans autre précision), et le monoglycosyldiacylglycérol (MGDG) retrouvé dans *Cladonia impexa* contient plus de 90%

d'acides gras à longue chaîne saturés et insaturés (à plus de 20 atomes de carbone) [83]. L'analyse de la composition en acides gras des glycolipides de cinq espèces de lichens a montré un pourcentage en acides gras insaturés de plus de 50% dans les 3 espèces et de 64,5% en C18:3 (sans autre précision) dans le lichen *Xanthoria parietina* (Tableau 6) [82]. Dans quelques espèces, la composition en acides gras des glycolipides a montré un pourcentage d'acides gras insaturés pouvant atteindre 75 % et variant en fonction de la saison [84,85].

Tableau 6: Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des glycolipides de quelques espèces de lichens (tr, trace) [82] (position d'insaturation non précisée)

Acide gras	<i>Cladonia fimbriata</i>	<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Peltigera sp.</i>	<i>Physcia grisea</i>	<i>Xanthoria parietina</i>
12:0	-	4.3	17.5	9.6	-
13:0	-	0.6	0.5	1.2	0.2
14:0	0.2	2.5	1.3	1.0	tr
15:0	-	0.8	6.6	0.9	-
16:0	27.2	52.7	31.4	3.3	2.2
17:0	1.2	-	0.6	2.0	0.7
18:0	5.1	7.7	3.5	20.0	16.6
19:0	-	-	0.5	-	-
20:0	-	6.2	-	tr	0.2
21:0	-	-	tr	-	-
22:0	-	-	0.2	0.2	-
iso-12:0	-	-	-	0.9	-
iso-15:0	tr	-	1.0	tr	-
saturés	33.7	74.8	63.1	39.1	19.9
13:1	-	0.9	0.5	-	-
14:1	1.0	0.2	2.5	0.5	0.1
15:1	0.3	-	-	0.2	-
16:1	3.6	0.4	2.6	1.3	0.2
17:1	-	-	2.4	1.5	0.3
18:1	4.6	5.5	6.5	2.5	0.1
20:1	0.1	-	0.1	tr	-
21:1	0.4	-	0.5	-	-
22:1	0.1	-	-	0.2	-
16:2	0.9	tr	3.1	1.2	0.1
18:2	54.7	8.3	13.6	19.8	14.8
20:2	-	-	0.1	-	-
16:3	-	0.2	-	-	-
18:3	0.6	9.7	4.0	33.7	64.5
insaturés	66.3	25.2	35.9	60.9	80.1

2.3 Lipides neutres

2.3.1 Teneur en lipides neutres

Les lipides neutres constituent le pourcentage le plus élevé des lipides totaux (Fig. 17) et présentent environ 50 % de poids sec pour la plupart [79,82] et jusqu'à 70 % de poids sec pour d'autres espèces de lichens [85].

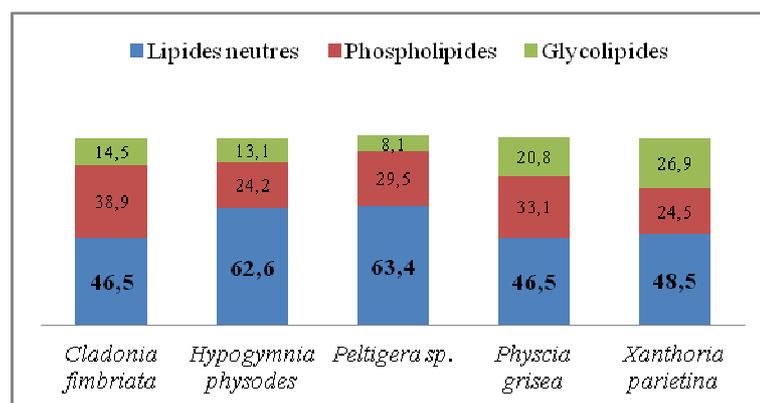


Figure 17: Classe des lipides de quelques lichens

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [85])

L'analyse des lipides neutres a montré la présence (Fig. 18) :

- de pigments et de mono-, et de di-acylglycérols (P, MG, DG),
- d'hydrocarbures (HC) [82,88],
- de triglycérides (TG) avec des teneurs de 46,8 % dans *Cladonia fimbriata* [82],
- d'acides gras libres et d'alcools [84,85],
- d'acides dicarboxyliques à un niveau de 15,2% chez *Hypogymnia physodes*.

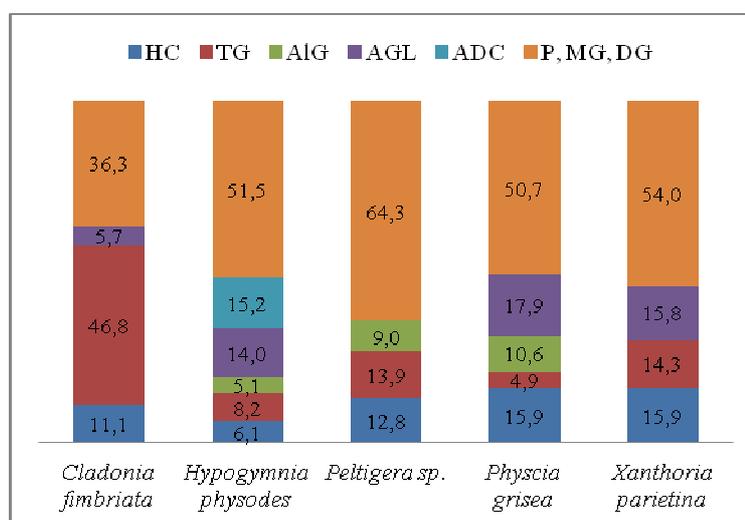


Figure 18: Composition en lipides neutres de quelques lichens

(HC: Hydrocarbures; TG: Triacylglycérols; AIG: Alcools gras; AGL: Acides gras libres; ADC: Acides dicarboxyliques; P: pigment; MG: monoacylglycérol; DG: diacylglycérol) (Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [82])

On note ici des disparités de profils qui pourraient être intéressants pour différencier des genres mais cela mérite d'être vérifié sur un plus grand nombre d'échantillons. De même la l'espèce à étudier mérite d'être précisée car peut influencer sur le contenu en lipides neutres.

2.3.2 Composition en lipides neutres

2.3.2.1 Composition en acides gras

Le tableau 7 montre la composition en acides gras des lipides neutres de cinq espèces de lichens. En pourcentage, le principal acide gras est l'acide palmitique C16:0 (de 29,2 à 69,1 %) suivi de l'acide linoléique C18:2 n-6 (de 17,6 à 26,2 % pour *Xanthoria parietina* et *Cladonia fimbriata*) et enfin l'acide stéarique C18:0 (de 18,2 % et 12,9 % pour *Hypogymnia physodes* et *Peltigera sp.* [82].

Tableau 7: Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des lipides neutres à travers cinq espèces lichéniques [82]

Espèces	<i>Cladonia fimbriata</i>	<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Peltigera sp.</i>	<i>Physia grisea</i>	<i>Xanthoria parietina</i>
12:0	-	-	1.3	-	-
13:0	tr	tr	-	-	-
14:0	0.2	6.1	2.6	2.5	1.1
15:0	-	1.1	2.8	0.1	0.3
16:0	29.2	65.0	30.9	69.0	69.1
17:0	-	-	3.9	0.4	0.8
18:0	3.3	18.2	12.9	2.4	3.4
19:0	-	-	-	tr	-
20:0	-	-	0.1	-	0.3
21:0	-	-	0.8	-	0.1
22:0	-	-	0.1	0.4	-
iso-12:0	-	-	0.9	-	-
iso-15:0	0.4	-	-	0.1	0.4
iso-17:0	-	-	-	-	0.1
Saturés	33.1	90.4	56.3	74.9	75.6
13:1	-	-	0.9	-	-
14:1	-	1.3	0.2	0.1	0.3
16:1	1.3	0.6	3.8	0.3	0.2
18:1	27.6	3.4	9.0	1.8	4.8
19:1	-	-	-	0.6	-
20:1	-	-	0.1	0.5	-
21:1	-	-	0.1	-	-
18:2	37.4	3.0	26.2	20.4	17.6
20:2	-	-	0.4	tr	-
18:3	-	1.0	2.4	0.1	1.4
Insaturés	66.3	9.3	43.1	23.8	24.3

La teneur en acides gras de ces lipides neutres varie en fonction de la température (Fig. 19) : Une variation de la température extérieure de -7⁰C (mars) à 23⁰C (mai) a été corrélée à une augmentation de la quantité en AG saturés (de 32,1 % à 40,1) et principalement des monoènes (de 35,9 % à 44,8 %) et une diminution de la quantité des AGPI (de 15,5 % en mars à 14,9 % en avril jusqu'à 5,2 % en mai) chez le lichen *Xanthoria parietina* [84].

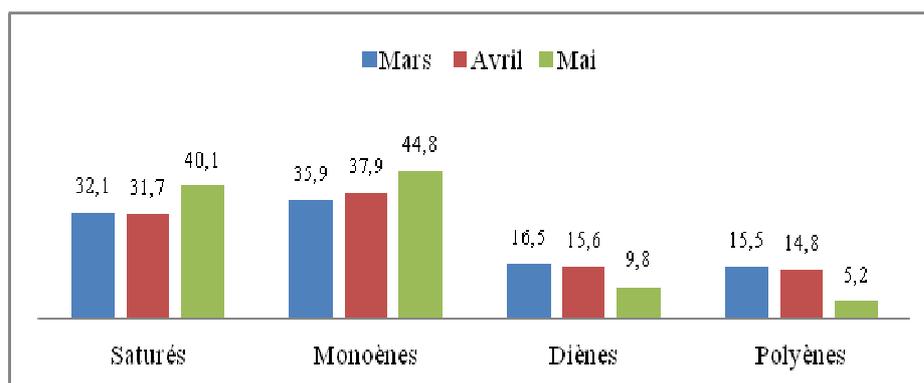


Figure 19: Composition en acides gras des lipides neutres (%) à partir du lichen *Xanthoria parietina* en fonction de la température

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [84])

2.3.2.2 Composition en caroténoïdes

Les principales études réalisées sur les caroténoïdes issus de lichens ont été réalisées par un chercheur polonais Czczuga [89–100]. Ces études ont montré la diversité chimique des caroténoïdes en fonction des espèces et l'effet des facteurs environnementaux sur leur biogénèse et leur teneur totale. Les résultats ont permis de conclure à leur intérêt en chimiotaxonomie comme chez les algues et les champignons non lichénisés. Voici quelques données pour illustrer ces conclusions.

Dans le genre *Xanthoria*, Czczuga [97] a analysé la teneur et la diversité en caroténoïdes de sept espèces de *Xanthoria* (Tableau 8). La teneur totale en caroténoïdes variait de 16,3 (*Xanthoria elegans*) à 94,7 mg/g de poids sec (*Xanthoria parietina*). Dix-sept caroténoïdes ont été identifiés et le caroténoïde avec une fonction époxyde, la mutatoxanthine, représentait le caroténoïde le plus important des caroténoïdes totaux (de 42,2 pour *Xanthoria elegans* à 94,4% pour *Xanthoria aureola*). Ces caroténoïdes présents dans les lichens étudiés, à l'exception de la rhodoxanthine et des caroténoïdes époxydes (auroxanthine, cryptoflavine, mutatochrome, mutatoxanthine), se retrouvent fréquemment dans les algues appartenant au Chlorophyceae. La mutatochrome, l'aurochrome et l'auroxanthine sont également présents dans les Cyanophyceae mais on trouve la mutatoxanthine dans une espèce d'algue *Euglena* et l'aurochrome et l'auroxanthine dans les Rhodophytes.

Tableau 8: Composition en caroténoïdes (en pourcentage de la teneur totale) de sept espèces du genre *Xanthoria* [97]

Caroténoïde	X. <i>aureola</i>	X. <i>candelaria</i>	X. <i>elegans</i>	X. <i>fallax</i>	X. <i>lobulata</i>	X. <i>parietina</i>	X. <i>polycarpa</i>
Lycopène	-	-	-	-	0.9	-	-
β -carotène	0.9	-	-	2.2	-	3.1	-
α -cryptoxanthine	-	-	9.7	-	-	-	-
β -cryptoxanthine	0.8	-	5.1	2.5	-	3.2	-
Cathaxanthine	-	3.7	13.2	-	2.0	-	-
Lutéine	1.0	-	-	-	-	-	4.3
Epoxyde de lutéine	trace	10.0	12.7	2.2	9.3	6.3	44.5
Zéaxanthine	-	-	14.7	-	-	-	-
Astaxanthine	-	15.7	-	3.2	-	-	-
Anthéroxanthine	-	-	-	-	-	-	2.9
Rhodoxanthine	-	-	-	-	-	1.5	2.5
Ester d'astaxanthine	2.9	-	-	-	-	-	-
Violaxanthine	-	-	-	1.8	-	6.5	-
Cryptoflavine	-	-	2.4	0.5	-	-	-
Mutatochrome	-	7.0	-	0.7	2.6	-	-
Mutatoxanthine	94.4	63.6	42.2	78.6	85.2	79.4	43.0
Auroxanthine	-	-	-	8.3	-	-	2.8
Teneur totale (mg/g de poids sec)	79.4	43.5	16.3	71.0	68.2	94.7	52.5

La couleur des thalles de lichens du genre *Xanthoria* varie du gris-vert au brun-orange. Cela dépend de l'exposition à la lumière : si le lichen pousse à l'ombre, il est gris-vert, alors que s'il pousse dans des endroits exposés à la lumière du soleil, il prend une couleur jaune-orange ou brune-orange. Les études sur la teneur en caroténoïdes de thalles de la même espèce de lichen poussant dans ces deux conditions différentes ont montré que les thalles bien exposés au soleil (brun-orange) contenaient près de trois fois plus de caroténoïdes (71 mg/g poids sec par rapport 25,1 mg/g poids sec à l'ombre) et beaucoup plus de mutatoxanthine (78.6 %) (Fig. 20) [97].

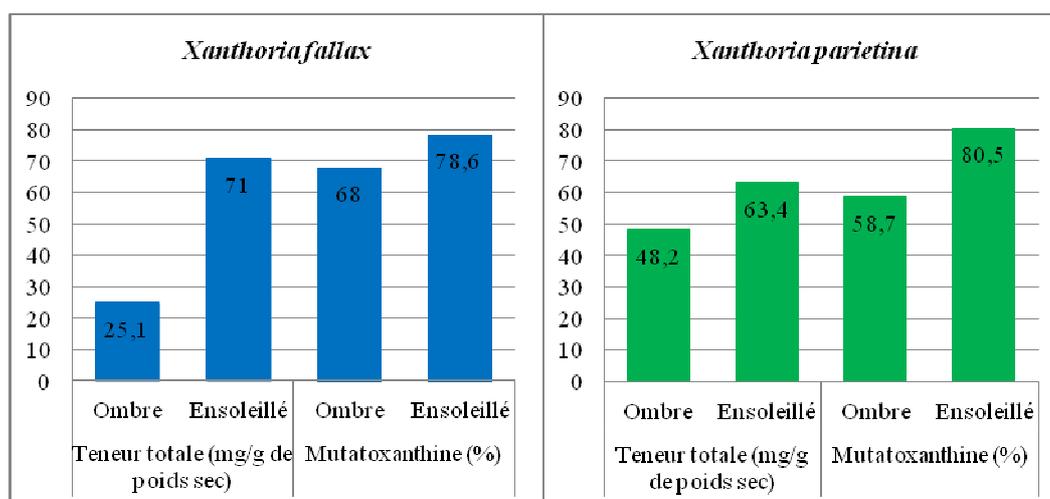


Figure 20: Teneur totale en caroténoïdes et en mutatoxanthine de deux espèces de *Xanthoria* récoltées à l'ombre et au soleil (Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication) [97]

2.3.2.3 Composition en alcools gras

Des alcools gras ont été identifiés dans certaines espèces de lichens. Par exemple, la teneur en alcools gras de trois espèces de lichen variait de 5.1 % chez *Hypogymnia physodes* à 10.6 % chez *Peltigera grisea* [82]. Cinq autres alcools gras ont été identifiés à partir des espèces *Cetraria delisei*, *Lobaria pulmonaria*, *Stereocaulon tomentosum* et *Usnea hirta* [101].

2.3.2.4 Hydrocarbures

Les hydrocarbures représentent des produits finis dans le métabolisme lipidique et sont directement affectés par les effets des facteurs endogènes et exogènes sur leurs précurseurs tels que les acides gras. Une revue de la littérature indique que les hydrocarbures de lichens ont été étudiés à partir de quelques espèces [88,102–106]. La teneur en *n*-alcanes totaux n'a pas montré de différence statistiquement significative entre des lichens ayant poussé dans différents endroits comme *Xanthoria parietina* récolté à quatre différents endroits en Israël [88] (Fig. 21). En revanche, leur teneur varie en fonction de la période de récolte et selon les espèces : Gaskell *et al.* [102] ont rapporté une grande différence de la teneur totale des hydrocarbures à partir de trois espèces *Cetraria nivalis*, *Cetraria crispa* et *Siphula ceratites* récoltées à plusieurs années d'intervalle et aux mêmes endroits [102].

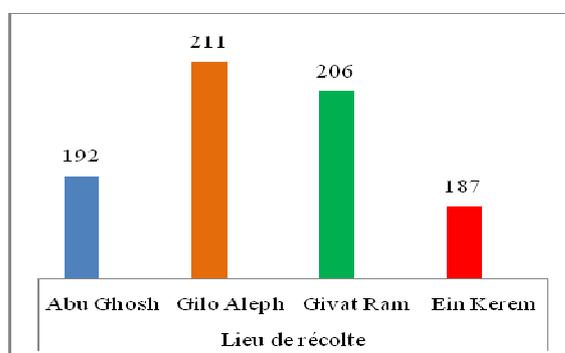


Figure 21: Teneur en *n*-alcanes (mg/g de poids sec) de *Xanthoria parietina* en fonction de l'endroit de récolté

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [88])

La plupart des lichens étudiés est constituée d'une grande diversité de *n*-alcanes allant de 17 à 34 atomes de carbone. La composition chimique qualitative des *n*-alcanes variait selon les lichens et aussi les facteurs environnementaux comme l'altitude, la température et l'humidité.

- L'analyse des hydrocarbures du lichen *Lobaria pulmonaria* [104] a montré que les principaux hydrocarbures trouvés étaient des hydrocarbures à longue chaîne tels que le C27 (21.5%), le C28 (9.7%), le C29 (32.6%) et le C31 (7.9%). Zygadlo *et al.* [106]

ont étudié 14 espèces de lichens argentins et ont constaté que les principaux étaient constitués par le C27 (25.7% chez le lichen *Rimelia reticulata*), le C29 (16.0% chez le lichen *Leptogium brebissonii*) et le C31 (45.5% chez le lichen *Punctelia subrudecta*).

- Le lichen *Xanthoria parietina* a été largement étudié par plusieurs auteurs en raison de sa tolérance vis-à-vis de la pollution [84,107]. Ce dernier a été récolté dans deux vallées climatiquement différentes en Italie [108] : la vallée de Suse et la vallée de Vermenagna pour examiner la composition en *n*-alcanes. La vallée de Suse est plus sèche en raison du climat venteux ; en revanche, la vallée de Vermenagna est plus humide et fraîche. Les principaux composés détectés chez le lichen récolté dans la vallée de Suse étaient le C27, le C28, le C29 et le C31, alors que le C25, le C27 et le C29 étaient les *n*-alcanes les plus abondants chez le lichen récolté dans la vallée de Vermenagna (Tableau 9). La présence des alcanes à longue chaîne dans des populations de la vallée de Suse pourrait être liée aux conditions plus xériques. Ils pourraient aussi représenter une réponse biochimique pour éviter la perte d'eau. D'autre part, la présence des alcanes à chaîne courte dans des populations de la vallée de Vermenagna pourrait refléter une adaptation à l'environnement humide et plus frais.

Tableau 9: Composition en *n*-alcanes ($\mu\text{g/g}$ de lichen) à partir de l'extrait *n*-hexane du lichen *Xanthoria parietina* (récolté à différentes altitudes (de 400 à 1350 m) dans deux vallées à Piedmont (Italie) [108])

<i>n</i> -Alcanes	Vallée de Suse (sec et venteux)	Vallée de Vermenagna (humide et frais)
C-18	1.71	2.71
C-21	1.72	8.93
C-22	5.50	5.54
C-23	5.58	7.16
C-24	2.93	5.56
C-25	8.54	13.88
C-26	6.68	5.72
C-27	16.82	11.02
C-28	10.99	5.06
C-29	20.84	13.38
C-30	7.85	5.15
C-31	20.44	8.17
C-32	8.80	1.14
C-33	5.96	5.54
C-34	0.44	3.09
Teneur totale	169.00	179.69

- Dans certains cas, le lichen peut renfermer une série d'alcanes *antéiso* et des alcènes. Par exemple, le lichen *Siphula ceratiles* [102] renfermait une teneur en *n*-alcanes *antéiso* de C22 à C28 de 12%. Parmi eux, l'*antéiso*-C26 était plus répandu avec de petites quantités d'*antéiso*-C24, *antéiso*-C23 et *antéiso*-C22. Chez le lichen *Cetraria*

islandica, parmi quinze hydrocarbures identifiés, le type le plus abondant était le heptadéca-1,8 diène (69,5%).

2.3.2.5 Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des lipides mineurs des lichens. Ils sont souvent isolés et identifiés grâce à leurs données spectroscopiques. Nous citerons ici quelques exemples de stérols qui sont des constituants importants des organismes végétaux ainsi que des champignons. Safe *et al.* [109] ont identifié neuf stérols différents à partir de trois espèces de lichens : *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria scrobiculata* et *Usnea longissima*. Les trois principaux composés étaient l'ergostérol, l'épistérol et le fécostérol pour les deux espèces *Lobaria* tandis que l'ergostérol, l'épistérol et le lichestérol étaient plus représentés dans le lichen *Usnea longissima* (Tableau 10).

Tableau 10: Composition en stérols de trois espèces de lichen (% des terpénoïdes totaux) [109]

Constituants	<i>Lobaria pulmonaria</i>	<i>Lobaria scrobiculata</i>	<i>Usnea longissima</i>
Ergosta-5,7,22-3 β -ol	25.0	24.7	21.1
Ergosta-7,24(28)-dien-3 β -ol	31.1	32.8	11.3
Ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol	36.0	23.8	0.4
Ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol	1.5	6.8	56.3
24-méthyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol	2.1	0.8	0.4
24-éthyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol	0.9	1.7	5.6
Cholest-5-en-3 β -ol	0.4	0.6	0.4
24-méthyl-cholest-5-en-3 β -ol	0.8	0.9	3.1
24-éthyl-cholest-5-en-3 β -ol	2.2	7.9	1.4

2.3.2.6 Acides dicarboxyliques

L'analyse des produits résultant d'une hydrolyse de quatre espèces de lichens a permis l'identification de huit acides dicarboxyliques (Tableau 11) [101]. Les quantités de ces acides n'ont pas été déterminées. Six de ces acides ont été trouvés dans *Usnea hirta*, alors qu'un seul acide, l'acide azélaïque, a été trouvé dans *Stereocaulon tomentosum*.

Tableau 11: Composition en acides dicarboxyliques à partir de quatre espèces de lichens [101]

Composant	<i>Cetraria delisei</i>	<i>Usnea hirta</i>	<i>Lobaria pulmonaria</i>	<i>Stereocaulon tomentosum</i>
Acide oxalique (C2)		+		
Acide molanique (C3)	+			
Acide fumarique (C4)	+	+		
Acide succinique (C4)	+			
Acide pimelique (C7)		+		
Acide subérique (C8)	+	+	+	
Acide azélaïque (C9)	+	+	+	+
Acide sébacique (C10)		+		

2.3.2.7 Hydroxyacides

Des hydroxyacides ont aussi été identifiés dans quelques espèces de lichens [85,101]. La teneur en hydroxyacides n'était pas élevée : de 0,05 à 0,5 % des acides gras totaux. Les structures de ces acides ont été déterminées comme étant l'acide 9,10,12,13-tétrahydroxystéarique, l'acide 9,10,12,13-tétrahydrodocosanoïque et l'acide 9,10,12,13-tétrahydrohénicosanoïque. Des hydroxyacides avec un groupement hydroxylique en position α : 2-OH-16:0, 2-OH-18:0, 2-OH-22:0, 2-OH-24:0 et 2-OH-24:1 ont également été identifiés [101].

2.3.2.8 Cétoacides

Les acides gras contenant un groupement cétonique ont été identifiés par Solberg dans un extrait lipidique du lichen *Cetraria delisei* [101]. Trois acides ont été trouvés : les acides 5-céto-15:0, 5-céto-21:0 et 5-céto-23:0. Seuls deux céto-acides : 5-céto-16:0 et 5-céto-18:0 ont été identifiés dans un extrait lipidique du lichen *Cetraria islandica* [105].

2.4 Phospholipides

2.4.1 Composition en phospholipides

De même que pour les glycérolipides, la teneur en phospholipides des lichens montre une forte variation selon les différentes espèces ainsi que selon la période de récolte [110–114]. Par exemple, Bychuk [115] a montré des variations des phospholipides de 7,1 % à 20,3% pour *Xanthoria parietina* entre le mois de mars et de mai. La différence entre les deux espèces de *Physcia* (*P. dubia* et *P. stellaris*) montre également une différence notable en phospholipides pour la date du 29 mai en 1992 (17,5% et 11,3% respectivement) (Fig. 22).

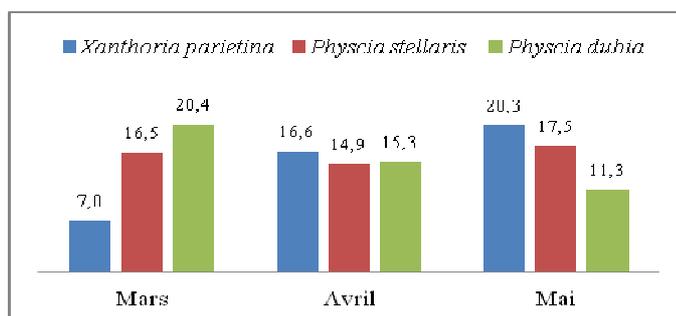


Figure 22: Teneur en phospholipides pour les lichens *Xanthoria parietina* et *Physcia sp.* pendant la période du printemps

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [115])

La composition des phospholipides diffère aussi selon les espèces et la période de récolte. Trois espèces de l'ordre des Lécánorales : *Evernia mesomorpha*, *Evernia prunastri* et

Aspicillia transbalaica ont montré des variations de leur teneur en phospholipides de 19,9 à 37,4 % par rapport aux lipides totaux [112]. Le phospholipide majeur était pour les trois espèces la phosphatidylcholine mais ses pourcentages variaient : de 59,4 % et 58,3 % dans les espèces *Evernia*, et de 33,3 % dans le lichen *Aspicillia transbaicalica* (Fig. 23).

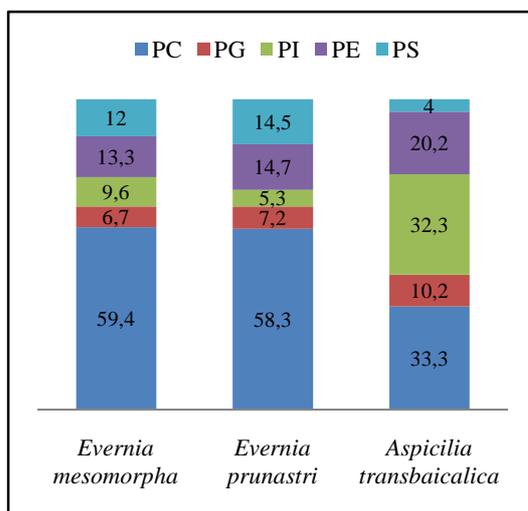


Figure 23: Composition des phospholipides dans les lichens *Evernia mesomorpha*, *Evernia prunastri* et *Aspicillia transbalaica* (% des phospholipides totaux)

(PC : Phosphatidylcholine ; PG : Phosphatidylglycérol ; PI : Phosphatidylinositol ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; PS : Phosphatidylsérine) (Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [112])

2.4.2 Composition en acides gras

La composition en acides gras de la fraction des phospholipides totaux a été étudiée dans 5 espèces de lichens [82]. Vingt-deux acides gras ont été identifiés et les majoritaires sont l'acide linoléique (C18:2 n-6) à des teneurs comprises entre 55,0 % (*Cladonia fimbriata*) et 96,7 % (*Phycia grisea*) et l'acide palmitique (C16:0) à des teneurs comprises entre 2,1 % (*Phycia grisea*) à 22,2 % (*Peltigera sp.*) (Tableau 12).

Tableau 12: Composition en acides gras à partir des phospholipides totaux (% des acides gras totaux) [82]

Acide gras	<i>Cladonia fimbriata</i>	<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>Peltigera sp.</i>	<i>Physcia grisea</i>	<i>Xanthoria parietina</i>
14:0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
15:0	-	-	1.2	-	0.3
16:0	20.2	7.9	22.2	2.1	8.0
17:0	0.8	-	-	-	-
18:0	4.0	0.4	0.6	-	0.3
19:0	-	-	0.9	-	-
20:0	0.1	1.2	0.2	-	-
22:0	0.4	-	-	-	-
iso-15:0	-	-	0.2	-	0.1
saturés	25.7	9.7	25.5	2.2	8.8
14:1	0.9	-	1.8	-	0.3
15:1	0.3	-	-	-	-
16:1	0.7	-	0.3	0.3	-
17:1	-	-	0.3	-	-
18:1	4.9	4.9	1.9	0.6	3.4
16:2	0.9	-	3.1	1.2	0.1
18:2	55.0	84.0	66.4	96.7	82.9
20:2	0.1	-	-	-	-
22:2	0.2	-	-	-	-
16:3	-	0.3	-	-	-
18:3	6.6	0.2	-	0.2	2.4
insaturés	69.6	89.4	73.8	99	89.1

La composition spécifique en acides gras à partir des classes de phospholipides (PE, PC et PG) a été décrite à travers la publication de Piervittori [114]. Il a rapporté la composition en acides gras des classes lipidiques à partir du lichen *Xanthoria parietina* récolté à différentes saisons (Fig. 24). Au printemps, les principaux acides gras étaient représentés par l'acide caprylique (C8:0) et l'acide linoléique (18:2 n-6) issus de la PC ainsi que par l'acide α -linoléique (18:3 n-3) issus de la PE. Au cours de l'été, l'acide myristique (14:0), l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18:3 n-3) étaient particulièrement abondants dans la PC, tandis que l'acide palmitique (16:0) et l'acide linoléique (18:3) l'étaient plus au sein de la PE. La PG était proportionnellement plus élevée à l'automne avec des AG saturés à chaîne courte (acide caproïque (C6:0), acide caprylique (C8:0) et acide caprique (C10:0)). En hiver, en l'absence de la PG, une augmentation des AG saturés à chaîne courte proviennent de la PC et la PE. Les résultats montrent une augmentation de la teneur en lipides du printemps à l'hiver et une relation directe entre le pourcentage des AG insaturés et une température élevée.

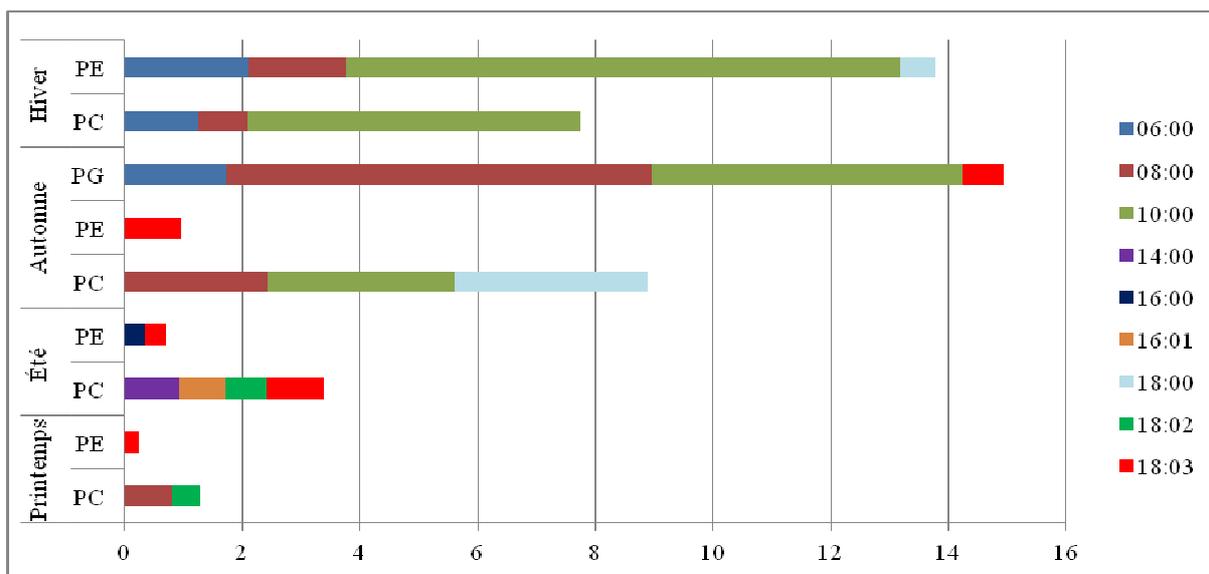


Figure 24: Composition en acides gras ($\mu\text{g/g}$) des PC, PE, PG à partir du lichen *Xanthoria parietina* en fonction de la saison

(Histogrammes réalisés à partir des données chiffrées de la publication [114])

2.5 Composition en acides gras totaux

La composition en acides gras totaux des lichens a été étudiée par de nombreux auteurs [71,80,83,86,88,101,111,112,116–123] avec des techniques qui ont évolué au cours du temps. Avant les années 80, seuls les cinq acides gras principaux : C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 étaient détectés. Plus récemment, la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG / FID) et une spectrométrie de masse (CPG/MS) ont permis d'identifier des acides gras en plus petite quantité. Nous avons compilé les données correspondant aux 14 publications [71,80,83,86,88,101,110,116,117,119–125] identifiant les acides gras des lichens et ce fichier a permis par la suite de comparer les espèces entre elles selon leur profil en acides gras totaux. D'après ces résultats, 33 AG saturés incluant les AG ramifiés ont été identifiés avec comme AG principaux les C16:0 et C18:0 à des teneurs comprises entre 3,1 % dans le lichen *Parmelia sulcata* [122] à 65,2 % dans le lichen *Ramalina usnea* [120], et de 0,8 % dans le lichen *Aspicillia transbaicalia* [112] à 45,4 % dans le lichen *Cladonia penicillata* [120]. Des acides gras à longue chaîne ont également été détectés en petites quantités telles que C24:0, C26:0 et C28:0.

La teneur en AG insaturés variait de 0,9 % dans le lichen *Cladonia penicillata* [120] à 89,3 % dans le lichen *Evernia mesomorpha* [112].

- Le groupe le plus abondant parmi les AG insaturés identifiés était composé de 36 monoènes représentés entre autres par C16:1 n-7, C16:1 n-9, C18:1 n-9 et C18:1 n-7. L'AG monoène principal trouvé était l'acide oléique (C18:1 n-9) dont le pourcentage

variait de 0,9 % à 56,7 % dans le lichen *Cladonia penicillata* [120] et le lichen *Rinodia bischoffi* [117], respectivement. Cependant, la teneur en acide oléique et en acide *cis*- vaccénique (C18:1 n-7) était similaire dans quelques espèces comme *Parmelia stenophylla* (6,1 % et 6,7%, respectivement) [122]. La somme de tous les isomères du C18 :1 variait quantitativement en fonction du substrat où poussent les lichens.

- Les AG diénoïques constituent une petite proportion des AG totaux, et sont représentés par six AG seulement, à savoir, les C14:2 n-5, C16:2 n-4, C17:2 n-4 (acide gras pourtant peu répandu), C18:2 n-6, C20:2 n-6 et C22:2 n-6 et l'acide linoléique (C18:2 n-6) est le plus répandu. Exceptionnellement, le contenu des AG diénoïques a atteint 59,8 % chez le lichen *Cladonia rangiferina* [116].
- Onze acides gras avec trois doubles liaisons ont été identifiés. L'acide α -linoléique (C18:3 n-3) est majoritaire mais des AG C24:3 n-3 et C26:3 n-3 détectés également dans diverses éponges marines, ont été identifiés.
- Les AG polyènes : tétra-, penta-et hexaénoïques sont présents en quantités beaucoup plus faibles dans diverses espèces de lichens. Dans ce groupe, l'acide hexadéca-4,7,10,13-tétraénoïque (C16:4 n-3) dont la présence est caractéristique d'algues marines vertes [126], d'acide stéaridoïque (C18:4 n-3) caractéristique d'algues marines brunes [127] ont été mis en évidence. Il semble probable que les phytobiontes des lichens peuvent synthétiser ces acides (Fig. 9).

Les analyses relatant la composition en AG totaux effectuées sur quelques espèces lichéniques ont montré la présence d'acides gras ramifiés saturés *iso* et *antéiso* [80,86,110,112,119,122,123]. Les AG *iso* de C12:0 à C20:0, ainsi que six AG *antéiso* : C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 et C18:0 étaient particulièrement bien représentés.

Des AG saturés de type isoprénoïde ont été identifiés au sein de quelques espèces de lichens à travers les acides prystanique et phytanique [110,112,119,122,123]. L'acide pristanique est minoritaire puisqu'il a été retrouvé à des teneurs de 0,13 % (*Diploschistes sp.*) à 0,33 % (*Peltigera spuria*). Les teneurs en acide phytanique étaient légèrement supérieures : 1,42 % pour le lichen *Peltigera spuria*, 0,31% pour *Peltigera aphthosa* et 0,15 % pour *Anaptychia ciliaris*. Normalement, ces AG sont produits uniquement en faible quantité chez les animaux. Ces résultats semblent montrer que les lichens peuvent synthétiser ces AG.

Les AG sont des constituants des différentes classes lipidiques et une seule petite quantité d'AG sous forme libre est présente. Comme vu précédemment, les teneurs des différentes classes lipidiques varient en fonction des espèces, des genres, des familles et aussi des facteurs environnementaux. Par conséquent, la composition en AG totaux qui les composent va varier de la même façon : en fonction de la température, du substrat... Deux espèces épiphytes, *Collema flaccidum* et *Collema fuscovirens* et deux espèces lithophiles, *Collema cristatum* et *Collema callopismum* (Tableau 13) ont ainsi montré une composition en AG totaux différente selon le substrat [80].

L'analyse des AG des espèces de *Collema* qui poussent sur les rochers calcaires et sur les arbres (le chêne *Palestine*), a révélé une teneur élevée en AG polyènes de 62.1 et 61.2 % (Tableau 13) alors que celles des deux autres espèces lithophiles étaient beaucoup plus faibles (22.5 et 19.2 %, respectivement). De même, les quantités d'acides triènes étaient plus élevées dans les échantillons provenant d'espèces épiphytes, 43,9 % dans *Collema flaccidum* et 42.7 % dans *Collema fuscovirens*. Une forte divergence entre les AG saturés (représenté par l'acide palmitique C16 :0) des espèces poussées sur les rochers (56.8 et 58.9 %) et sur les arbres (13.6 et 13.0 %) a été observée.

Tableau 13: Composition en acides gras de quatres espèces lichéniques du genre *Collema* [80]

Acides gras	Espèces lithophiles		Espèces épiphytes	
	<i>Collema cristatum</i>	<i>Collema callopismum</i>	<i>Collema flaccidum</i>	<i>Collema fuscovirens</i>
12:0	3.2	2.7	0.5	-
13:0	1.0	1.1	0.6	0.7
14:0	5.2	4.2	0.9	0.9
15:0	1.2	1.0	0.7	0.5
16:0	34.1	38.3	6.9	6.0
18:0	4.0	1.8	1.3	1.9
20:0	1.2	1.3	0.5	0.6
<i>i</i> -15:0	1.8	1.3	0.7	0.5
<i>i</i> -17:0	1.6	1.8	0.5	0.6
<i>ai</i> -17:0	1.8	1.7	0.5	0.7
Saturés	56.8	58.9	13.6	13.0
15:1 n-8	-	-	0.7	0.5
16:1 n-9	0.7	0.5	2.9	1.7
16:1 n-7	0.8	0.6	1.9	1.9
18:1 n-11	0.9	0.8	0.6	0.6
18:1 n-9	11.0	11.4	6.4	5.8
18:1 n-7	1.4	1.0	0.8	0.6
20:1 n-9	-	0.6	0.6	0.5
Monoènes	14.8	14.9	13.9	11.6
16:2 n-4	0.5	0.7	0.7	2.1
18:2 n-6	4.8	4.2	9.1	10.3
20:2 n-6	0.6	0.7	0.6	1.8
Diènes	4.9	5.6	10.4	14.2
16:3 n-6	1.1	0.9	3.1	4.1
16:3 n-3	1.6	0.7	3.7	3.9
18:3 n-6	2.2	1.9	4.1	4.0
18:3 n-3	17.5	16.6	33.3	30.7
Triènes	22.5	19.2	43.9	42.7
16:4 n-3	-	-	4.3	5.1
18:4 n-3	-	-	4.2	4.7
20:4 n-6	-	-	1.9	2.1
20:4 n-3	-	-	3.2	2.9
20:5 n-3	-	-	4.3	3.7
Tetra-, pentaènes	0	0	18.2	18.5
Polyènes	22.5	19.2	62.1	61.2

Des informations disponibles à ce jour fournissent une preuve substantielle pour une possible contribution du profil en AG comme aide à la taxonomie lichénique [120]. Or le genre *Stereocaulon* est un genre particulièrement difficile à distinguer au sein des lichens et surtout il est quelquefois difficile de différencier les espèces entre elles.

A notre connaissance, une seule espèce du genre *Stereocaulon*, *S. tomentosum*, a été étudiée pour sa composition en AG [101]. Les principaux AG étaient l'acide oléique (11.8%) et l'acide linoléique (54.2%) parmi les cinq AG détectés. En espérant établir si la distribution en AG totaux pouvait jouer un rôle dans la chimiotaxonomie du genre *Stereocaulon*, nous allons analyser et comparer la composition en AG de 10 espèces de *Stereocaulon* et élargir cette analyse à trois cyanolichens, deux chlorolichens et une cyanobactérie. Les profils en AG des partenaires d'un chlorolichen, *S. scutelligerum* ont également été analysés.

3 Comparaison des profils en acides gras totaux de 4 chlorolichens, 3 cyanolichens et 8 lichens tripartites (en collaboration avec l'équipe USC1378, Agrocampus-Ouest)

3.1 Objectif

Friardi Ismed [66] a tenté de différencier les espèces de stéréocaulon entre elles sur la base des métabolites secondaires synthétisés par la voie acétyl-polymalonate et les premiers résultats s'étaient avérés décevants sauf si les caractéristiques morphologiques étaient également pris en compte. Les acides gras totaux sont utilisés en chimiotaxonomie pour identifier les bactéries [69], les champignons (Ascomycètes, Basidiomycètes) [72], les microalgues [73] et les cyanobactéries [70,74]. Une seule publication [120] a montré à travers dix espèces de cladonias que les acides gras totaux pouvaient également être une aide en taxonomie pour les lichens.

Nous avons ainsi sélectionné dix espèces de stéréocaulons disponibles au laboratoire appartenant à des sections différentes auxquelles nous avons associées deux espèces de cladonias (car c'est un genre très proche des stéréocaulons et qui diffèrent par la constitution du pseudopodétion) et trois cyanolichens : *Lichina pygmaea*, *Collema cristatum var. marginale* et *Peltigera membranacea*. Les deux dernières espèces possèdent comme photobiotte *Nostoc sp.* et c'est la raison pour laquelle, nous avons également récolté et analysé des échantillons de la cyanobactérie *Nostoc sp.*

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point un protocole spécifique d'extraction des lipides totaux. Pour cela, les extractions réalisées en triplicat ont été effectuées sur le lichen *S. scutelligerum* en prenant en compte la durée d'extraction, le volume de solvant utilisé, la diversité des AG sous forme d'esters méthyliques identifiés par CPG / FID et la teneur en acides gras totaux. La reproductibilité de la méthode a ensuite été vérifiée en choisissant un autre stéréocaulon, *S. vesuvianum*.

Dans un second temps, la méthode choisie a été appliquée aux 15 espèces lichéniques et à la cyanobactérie pour étudier leurs profils en AG totaux. Ces profils en AG ont été comparés en utilisant une méthode statistique, la classification ascendante hiérarchique (CAH).

3.2 Mise au point du protocole d'extraction

3.2.1 Protocoles testés

Nous avons étudié différentes conditions d'extraction sur un échantillon de lichen *S. scutelligerum* que nous possédions en quantité suffisante. Les paramètres optimisés ont concerné le solvant et les appareils utilisés pour réaliser l'extraction. Nous avons ainsi choisi de soumettre le lichen pulvérisé aux cinq conditions suivantes (Fig. 25):

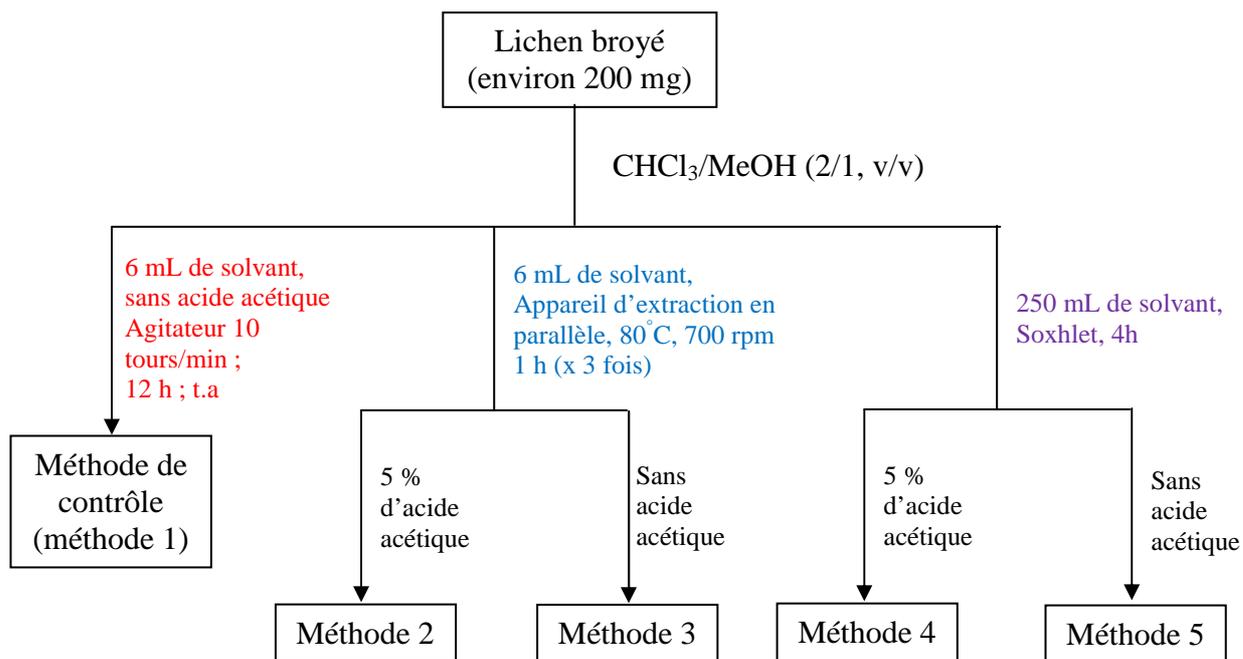


Figure 25: Schéma des différentes conditions d'extraction

Après extraction, les échantillons ont été évaporés avec ou sans centrifugation puis ils ont été ensuite stockés à -20°C. Ces expériences ont été effectuées en triplicat.

Dans un deuxième temps, les extraits ont été saponifiés puis méthylés avant d'être extraits par un solvant apolaire.

Enfin, les esters méthyliques obtenus ont été analysés par CPG / FID voire par CPG / MS quand les résultats obtenus par CPG / FID se sont révélés ambigus. Le traitement des données a permis de calculer le pourcentage de chaque acide gras (sous forme d'ester méthylique) dans l'extrait lichénique par rapport aux acides gras totaux mais aussi le rendement d'extraction des acides gras totaux en prenant en compte l'aire de l'étalon interne (C17:0 ou C21:0) (Revue Donnée expérimentale du chapitre 1§1.2 et 1.3).

3.2.2 Sélection de la meilleure méthode d'extraction

Les extractions avec les cinq différentes méthodes ont permis d'obtenir des quantités d'extraits variées (Tableau 14). Les meilleurs taux d'extraction ont été obtenus avec les méthodes 4 et 5 (2,1 et de 1,9 %, respectivement), bien que la durée de l'expérience et le volume de solvant soient peu avantageux. Les méthodes 1, 2, 3 ont permis d'obtenir le même taux d'extraction (1.4, 1.3, 1.3 mg/g, respectivement). Les méthodes 1, 4 et 5 ont finalement été exclues en raison du manque de reproductibilité concernant les AG saturés et insaturés (méthodes 4 et 5 avec un écart type entre les trois expériences de 9.7 et 6.8, 10.3 et 7.9 pour les AG saturés et insaturés, respectivement), de la durée d'extraction (la durée par échantillon est de 12 h pour la méthode 1 et de 4 h pour les méthodes 4 et 5), la consommation excessive de solvant (de 250 mL pour les méthodes 4 et 5). La méthode 3 (consistant en l'extraction par un appareil d'extraction parallèle, à 80°C, 700 rpm, 1 h x 3 fois 6 mL de solvant sans acide acétique) a finalement été préférée car elle ne nécessitait pas l'étape d'élimination de l'acide acétique. Les avantages de cette méthode étaient évidents puisque le mélange de solvant était moins cher, facile à évaporer, apte à traiter simultanément 24 échantillons et surtout capable d'extraire complètement les lipides totaux pour ensuite obtenir une analyse plus fiable des AG totaux dans le lichen.

La bonne reproductibilité obtenue avec *S. scutelligerum* (0.77 ± 0.03 mg/g de poids sec) a été de nouveau confirmée pour le lichen *S. vesuvianum* avec comme rendement d'extraction (0.82 ± 0.03 mg/g de poids sec) (Annexe 3). Les rendements obtenus après les trois extractions n'ont pas permis d'augmenter quantitativement la quantité d'AG totaux ainsi on peut considérer que cette méthode permet une extraction totale.

Tableau 14: Comparaison entre les 5 conditions d'extractions : rendement d'extraction (mg/g MS), pourcentage des AG saturés et insaturés, diversité des AG obtenus à partir du lichen *S. scutelligerum* (% des totaux pour chaque acide gras)

Acides gras	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5
C12:0	0.06	0.03	0.05	0.52	0.51
C14:0	0.39	0.44	0.43	1.34	1.26
C15:0	0.21	0.21	0.23	0.72	0.76
C16:0	14.40	16.83	15.58	23.30	20.19
C18:0	9.14	10.83	9.76	16.48	13.02
C20:0	0.52	0.65	0.58	0.97	0.99
C22:0	0.39	0.41	0.37	1.49	1.65
C24:0	-	-	-	1.06	1.25
saturés	25.11±0.01	29.41±0.86	27.01±1.60	45.89±9.75	39.62±6.76
iC12:0	-	-	-	0.01	0.01
iC13:0	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06
iC14:0	0.14	0.14	0.14	0.17	0.22
ai-C14:0	0.16	0.14	0.14	0.39	0.26
aiC15:0	0.10	0.10	0.11	0.15	0.20
iC16:0	0.35	0.33	0.35	0.29	0.33
ai-C16:0	1.21	1.11	1.08	0.81	0.94
iC17:0	0.09	0.10	0.10	0.12	0.13
aiC17:0	0.41	0.45	0.43	0.85	0.68
iC18:0	0.31	0.32	0.32	0.32	0.11
iC20:0	0.28	0.23	0.22	0.19	0.19
iC21:0	-	0.25	0.26	1.82	1.84
iso	1.24±0.03	1.42±0.02	1.45±0.16	2.99±0.19	2.88±0.74
anteiso	1.79±0.02	1.70±0.13	1.64±0.02	2.04±0.19	1.88±0.39
ramifiés	3.03±0.05	3.13±0.11	3.09±0.14	5.04±0.58	4.77±0.13
C14:1 n-5	0.11	0.13	0.13	0.17	0.16
C16:1n-9	0.41	0.45	0.46	0.33	0.64
C16:1n-7	0.80	0.75	0.74	0.45	0.60
C18:1 trans	0.05	0.04	0.04	0.15	0.18
C18:1n-9	13.91	13.67	13.56	9.19	10.45
C18:1n-7	1.99	1.95	1.93	1.38	1.62
C20:1 n-9	0.61	0.69	0.67	1.49	1.69
C22:1 n-9	0.04	-	0.02	2.79	2.60
C24:1 n-9	0.04	-	-	0.04	0.07
monoènes	17.95±0.02	17.69±0.08	17.56±0.04	16.00±6.15	18.01±2.07
C18:2n-6	43.81	39.88	41.86	24.58	27.96
C20:2 n-6	1.60	1.58	1.61	1.31	1.43
diènes	45.41±0.11	41.45±0.72	43.47±1.91	25.90±1.81	29.39±2.95
C16:3 n-3	1.24	1.12	1.26	0.73	0.83
C18:3n-6	0.30	0.27	0.25	0.21	0.22
C18:3n-3	6.51	5.69	6.46	4.94	4.85
C18:4 n-3	-	-	-	-	0.88
C20:3 n-9	-	-	-	0.02	-
C20:3 n-6	0.06	0.58	0.37	0.09	0.15
C20:4 n-6	0.09	0.06	0.05	0.02	0.04
C20:3 n-3	0.05	0.18	0.13	0.72	0.58
C20:5 n-3	-	0.03	0.03	-	0.34
C22:4 n-6	-	-	-	0.07	0.05
C22:5 n-3	0.07	0.14	0.10	0.05	0.05
C22:6 n-3	0.08	0.15	0.11	0.18	0.03
polyinsaturés	8.40±0.03	8.22±0.10	8.76±0.18	7.04±2.39	8.01±2.89
insaturés	71.76±0.05	67.36±0.74	69.79±1.77	48.93±10.34	55.41±7.91
mg/g MS	1.4±0.07	1.3±0.21	1.3±0.07	2.1±0.01	1.9±0.01

3.3 Comparaison des profils des acides gras totaux des 15 espèces

3.3.1 Lichens sélectionnés

Quinze lichens et une cyanobactérie (appartenant au groupe *Nostoc commune* et se présentant en amas macroscopiques gélatineux par temps humide) ont été collectés dans différents lieux (Tableau 15) correspondant à des climats européens et tropicaux. On dénombre trois cyanolichens (*Collema cristatum var marginale*, *Lichina pygmaea*, *Peltigera membranacea*), quatre chlorolichens (*Cladonia portentosa*, *C. rangiferina*, *Stereocaulon scutelligerum*, *S. vulcani*) et huit lichens potentiellement tripartites (*S. vesuvianum*, *S. dactylophyllum*, *S. evolutum*, *S. pileatum*, *S. alpinum*, *S. graminosum*, *S. halei*, *S. montagneanum*). Pour les lichens tripartites, seules les céphalodies de *S. montagneanum*, *S. graminosum* et *S. halei* ont été observées. Ils ont été classés en fonction de l'ordre, de la famille, du genre et de la section auxquels ils appartiennent.

Les lichens ont été séchés à l'air, à l'ombre puis ont été stockés séparément à l'obscurité.

Tableau 15: Lichens sélectionnés en vue de l'étude de leur acides gras

Lichen	Ordre	Famille	Subgenus/Section/ Subsection	Lieu de récolte / altitude/date de récolte	N° code
<i>Stereocaulon alpinum</i> Laur	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/ Stereocaulon	L'écho, Savoie (France), 2000m d'altitude, Août 2012	JB/12/45
<i>Stereocaulon dactylophyllum</i> Flörke	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/ Stereocaulon	Communa, Bretagne, (France), 260m d'altitude, Juillet 2010	JB/10/120
<i>Stereocaulon evolutum</i> Graewe	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/ Stereocaulon	Communa, Bretagne, (France), 260m d'altitude Juillet 2010	JB/10/121
<i>Stereocaulon graminosum</i> Schaer	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/ Denudata/ Denudata	Mont Singaland, Sumatra (Indonésie), 2800m d'altitude, Novembre 2009	JB/09/118
<i>Stereocaulon halei</i> Lamb	Lecanorales	Stereocaulaceae	Holostelidium/Holostelidium/ Aciculisporeae	Mont Singaland, Sumatra (Indonésie), 2800m d'altitude, Novembre 2009	JB/09/117
<i>Stereocaulon montagneanum</i> Lamb	Lecanorales	Stereocaulaceae	Holostelidium/Holostelidium/ Holostelidium	Simanau, Sumatra (Indonésie), 1500m d'altitude, Novembre 2009	JB/09/119
<i>Stereocaulon pileatum</i> Ach	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/ Stereocaulon	Coesmes, Bretagne (France) 200 m d'altitude, Septembre 2012	JB/12/44
<i>Stereocaulon scutelligerum</i> Th.Fr	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/Denudata/ Denudata	Vallée de Langevin, île de Réunion, 1000m d'altitude, Mars 2011	JB/11/123
<i>Stereocaulon vesuvianum</i> Pers	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/Denudata/ Denudata	Etna, Sicile (Italie), 1350 m d'altitude, Août 2001	JB/02/01
<i>Stereocaulon vulcani</i> (Bory) Ach	Lecanorales	Stereocaulaceae	Stereocaulon/Denudata/ Denudata	Vallée de Langevin, île de Réunion, 1000m d'altitude, Mars 2011	JB/11/122
<i>Cladonia portentosa</i> (Dufour)Coem.	Lecanorales	Cladoniaceae		Cressansac, Lot (France), 260 m d'altitude, Novembre 2005	JB/05/54
<i>Cladonia rangiferina</i> (L.)Weber x.F.H.Wigg	Lecanorales	Cladoniaceae		Lac Del Palm, Pyrénées (France), 1500 m d'altitude, Août 2002	JB/02/64
<i>Collema cristatum var.marginale</i> (L.)Weber x.F.H.Wigg	Peltigerales	Collemataceae		Cressansac, Lot (France), 260 m d'altitude, Octobre 2004	JB/04/31
<i>Lichina pygmaea</i> (Lightf.)C.Agardh.	Lichinales	Lichinaceae		Pointe de la garde, Dinard (France), niveau de la mer, Décembre 2007	JB/07/98
<i>Peltigera membranacea</i> (Ach.)Nyl.	Peltigerales	Peltigeraceae		Les Glières, Savoie (France), 1200m d'altitude, Août 2011	JB/11/130
<i>Nostoc sp.</i>	Cyanobactéries			Bétahon, Morbihan (France), niveau de la mer, Janvier 2012	JB/13/166

3.3.2 Résultats et discussion

3.3.2.1 Taux d'extraction

La méthode 3 (extraction par un appareil d'extraction parallèle, à 80°C, 700 rpm, 1 h x 3 fois, 6 mL de solvant sans acide acétique) a été sélectionnée et appliquée à environ 200 mg de poudre de chacune des quinze espèces de lichen et de la cyanobactérie en vue d'extraire les AG totaux (Cf Données expérimentale du chapitre 1 § 1.2).

La composition en AG des espèces lichéniques analysées sous forme de méthyls esters par GC / FID est présentée dans le tableau 16. La teneur en AG totaux varie de 0,3 à 2,7 mg/g de poids sec. Les lichens *S. pileatum* (2,7 mg/g) et *S. dactylophyllum* (2 mg/g) possèdent les teneurs les plus importantes en acides gras au contraire de *S. graminosum* (0,3 mg/g), *S. montagneanum* (0,5 mg/g) et des deux espèces de *Cladonia* (0,4 et 0,5 mg/g).

Comme nous l'avons vu (Cf Chap 1 §2), les AG totaux proviennent des lipides membranaires mais aussi des lipides de stockage et les teneurs en esters méthyliques d'acides gras varient en fonction des genres et des espèces. Nous nous attendions à observer une teneur plus élevée en AG chez les cyanolichens car ils sont connus pour synthétiser du glucose qui augmente la teneur en NADPH et qui par conséquent accroît l'activité de AG synthase et donc la teneur en AG [128]. Cependant, cette hypothèse n'a pas été confirmée puisque certains chlorolichens comme *S. pileatum*, dont le photobiotte à algue verte produit des polyols, a montré une haute teneur en AG.

Les espèces de *Stereocaulon* poussant dans les régions tropicales comme *S. graminosum*, *S. montagneanum*, *S. vulcani*, ont montré un faible taux d'extraction (au dessous de 1 mg/g de poids sec) alors que *S. dactylophyllum*, *S. pileatum*, *S. alpinum* croissant dans des endroits tempérés présentent un taux d'extraction élevé (au dessus de 2 mg/g de poids sec). Les conditions de stress comme la diminution de la température, l'augmentation de l'intensité lumineuse, altitude... sont connus pour favoriser l'accumulation d'AG [71,129]. Cela est en accord avec le taux d'extraction importants de *S. pileatum* et *S. alpinum*. Cependant, la température ne peut pas tout expliquer et les conditions écologiques (altitude, pollution, conditions environnementales...) peuvent également être impliquées [80] puisque

les lichens *S. evolutum* et *S. dactylophyllum* ont été récoltés dans les mêmes endroits, mais un facteur 2 différencie les teneurs en AG de ces deux lichens.

Il nous a été impossible de comparer les teneurs obtenues en AG avec celles de la littérature puisque nous avons calculé les rendements spécifiques des AG totaux en utilisant un étalon interne, alors que généralement une mesure pondérale dite des lipides totaux a été adoptée par tous les auteurs [118]. Cette méthode consiste à extraire par le solvant de Folch (CHCl_3 /méthanol 2/1) couramment utilisé pour l'extraction des lipides, les composés apolaires puis de les peser après évaporation. Cette méthode surestime la teneur en lipides totaux puisque certains composés lichéniques sont également extraits..

3.3.2.2 Composition en acides gras

L'analyse par CPG / FID des esters méthyliques d'acides gras chez les 15 espèces lichéniques et la cyanobactérie a permis d'identifier quarante-cinq AG (Tableau 16) dont vingt-quatre AG saturés en proportion d'environ 30%, à l'exception de *S. graminosum* (44,9%) et de *Cladonia rangiferina* (50,8%). Le taux le plus faible est 22% pour le lichen *S. pileatum*.

- Les principaux **AG saturés** présents dans toutes les espèces étudiées sont l'acide palmitique C16:0 (12,6 à 27,4%) et l'acide stéarique C18:0 (3,0 à 17,2%). Ces mêmes AG sont synthétisés naturellement dans les champignons [130] et étant donné que les lichens contiennent environ 90% de mycobiote, ces résultats concordent. Les résultats sont similaires aux études précédentes réalisées sur d'autres espèces de lichens. Cependant, la teneur en C18:0 est faible (< 8%) pour quelques espèces *S. dactylophyllum*, *S. pileatum*, *Cladonia portentosa*, *Peltigera membranacea*, *Lichina pygmaea*, *Nostoc* et *Collema cristatum* var. *marginale*.
- D'autres AG saturés à chaîne courte (C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C17:0) et à longue chaîne (C20:0, C22:0 et C24:0) ont été trouvés en petites quantités (moins de 2%), sauf l'acide éicosanoïque (C22:0) (2,7%) pour *Cladonia portentosa*. Les AG à nombre impair de carbone sont synthétisés par les bactéries présentes chez certains ruminants qui utilisent lors de leur voie de biosynthèse des AG, un propionyl-CoA (C3) en remplacement d'un acétyl-CoA [131]. La présence des AG à nombre impair (C15:0, C17:0) d'atomes de carbone dans les lichens pourrait s'expliquer par l'utilisation de

cette même voie de biosynthèse... Une autre hypothèse suggère qu'ils pourraient également être formés par l'oxydation des AG [132,133].

- Des AG à chaîne ramifiée sont présents en quantités importantes chez *C. cristatum* (7,8 %), *S. vesuvianum* (6,1%), *C. rangiferina* (5,7%) et *Nostoc* sp. Parmi eux, nous avons trouvé les AG de type *iso* (C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0) et *antéiso* (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0) avec un ratio 1:2 (Tableau 16). Il est couramment décrit que la synthèse de ces AG iso et antéiso utilise l'isobutyrate, la leucine, la valine ou l'isoleucine comme amorces dans leur voie de synthèse.

Chaque espèce de lichen contient des taux significatifs **d'AG insaturés** variant de 43,4 % chez lichen *C. rangiferina* à 74,7% chez lichen *S. pileatum*. Les AG insaturés contiennent une, deux ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne.

- Les monoènes totaux varient de 11,2 à 34,4% et l'AG insaturé majeur est l'acide oléique (C18:1 n- 9) variant de 2,9% chez le lichen *Lichina pygmaea* à 29,3 % chez le lichen *S. dactylophyllum*, bien que la teneur de l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et l'acide vaccénique (C18:1 n-7) soit également importante pour certains lichens comme *C. cristatum* (12,2 % et 8.0 %), *Nostoc* (5,1 % et 4,6 %) et *L. pygmaea* (5,1 % et 3,1 %). Certains AG monoinsaturés ont été détectés en petite quantité comme C14:1 n- 5, C16:1 n- 9, C20:1 n-9, C22:1 n- 9, C24:1 n- 9. Un seul AG de type diène, l'acide linoléique (C18:2 n-6) a été détecté et varie entre 12,4 % (*Collema cristatum* et *S. vesuvianum*) et 52,2 % (*S. alpinum*, *L. pygmaea*).
- Cinq AG contenant trois doubles liaisons dans la chaîne ont été identifiés avec un pourcentage de 1,9 % dans le lichen *S. graminosum* à 19,1 % dans le lichen *Collema cristatum*. Dans ce groupe, l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) domine et varie de 0,6 % pour *Cladonia portentosa* à 17,6 % pour *Collema cristatum*. Cet acide n'est pas synthétisé par les champignons [134]. Pourtant, sa biosynthèse par des désaturations successives de l'acide oléique et l'acide linoléique par les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$, respectivement, a été observé dans les plantes et les algues [135,136]. L'algue verte *Trebouxia* est connue en tant que phycobiotte pour tous les Stéréocaulons et les Cladonias. La cyanobactérie *Calothrix* est le phycobiotte de *Lichina pygmaea* tandis

que *Nostoc* est la cyanophycée retrouvée pour *Peltigera membranacea* et *Collema cristatum*. Le phycobiotte correspond à environ 10 % de la biomasse totale du lichen et pourrait être responsable des grandes quantités en acide α -linoléique, mais aussi de l'acide oléique et l'acide linoléique. Ceci est ainsi cohérent avec la haute teneur (42,94 %) en acide linoléique (C18:2 n-6) retrouvée dans l'échantillon de *Nostoc sp*

- Les AG possédant quatre, cinq, six doubles liaisons ont été identifiés, mais en petites quantités, de 0,3 % dans *S. scutelligerum* à 3,4 % dans *Peltigera membranacea*. Parmi eux, l'acide stéaridoïque (C18:4 n-3) caractéristique d'algues marines brunes représente 2,8 % chez *Peltigera membranacea*.

Les AG ω -3 (ou n-3) ont également été identifiés à un niveau important (10-19 %) pour *C. cristatum*, *L. pygmaea*, *S. pileatum*, mais en faible quantité pour *S. graminosum* (2,8 %), *S. montagneanum* (2,6 %). Les lichens *L. pygmaea* (50,1 %), *S. alpinum* (53,2 %) ont présenté une forte teneur en AG ω -6 (ou n-6) à l'opposé de *C. cristatum* (13,9 %) et de *S. vesuvianum* (18,4 %). La teneur des AG ω -9 (ou n-9) est faible pour *L. pygmaea* (3,1 %), mais plus forte (environ 30 %) pour *S. vesuvianum*, *S. dactylophyllum* et *S. pileatum*. Des AG de la famille ω -7 (ou n-7) dont deux acides palmitoléique (16:1 n-7) et vaccénique (C18:1 n-7) sont présents à des teneurs de 2,9 % chez le lichen *S. alpinum* à 20,1 % chez le lichen *Collema cristatum*.

La synthèse des AG s'effectue essentiellement dans le cytosol. Cependant, la synthèse des AG à 18 atomes de carbone ou plus s'effectue dans le réticulum endoplasmique par des élongases pour allonger la chaîne et des désaturases pour introduire les doubles liaisons. Les activations ou inhibitions partielles des gènes responsables de la biosynthèse des AG dans les lichens sont méconnues. Pourtant, à la vue de nos résultats et d'après la littérature, nous proposons quelques hypothèses impliquant les différents symbiontes du lichen.

i) Deux désaturases majeures Δ 12 et Δ 15 sont impliquées, respectivement, dans la biosynthèse des familles d'acides n-6 et n-3 (Fig. 9) et leurs activités peuvent être appréciées par le calcul du ratio (n-6)/(n-9) et (n-3)/(n-6), respectivement. La plupart des lichens possède un ratio (n-6)/(n-9) élevé, c'est à dire supérieur de 1,5, spécialement pour le cyanolichen *Lichina pygmaea* (16,1 %), la cyanobactérie *Nostoc* (6,0 %) et pour le chlorolichen *S. alpinum* (4,3 %). Cela pourrait expliquer la teneur faible des monoènes C18:1 n-9 et la teneur très forte en C18:2 n-6. Le ratio (n-3)/(n-6) est plus important (1,4) pour le cyanolichen *Collema*

crisatum avec un faible ratio (n-6)/(n- 9) ce qui est en accord avec sa teneur forte en C18:3 n-3 et sa plus faible teneur en C18:2 n-6. Pour cette espèce, la voie de biosynthèse jusqu'à la production du triène C18:3 n-3 est accentuée et a conduit à une plus grande diversité de triènes. A l'exception de *Peltigera membranacea*, les autres **cyanolichens** ont montré une **voie de biosynthèse très différente des chlorolichens avec une activité accrue des désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$** . L'écologie et les facteurs environnementaux influenceraient également l'activité de ces enzymes ce qui expliquerait la différence pour *P. membranacea*. Guschina [121] a montré que certaines espèces de *Nostoc* contenaient plus d'acide α -linoléinique (C18:3 n-3) que les algues vertes, et ne produisaient pas d'AG de longueur supérieure à 18 carbones [137]. Dans notre cas, tous les cyanolichens produisent de petites quantités d'AG insaturés possédant plus de 18 carbones.

ii) Les deux AG appartenant à la famille n-7 sont l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et l'acide *cis*-vaccénique (18:1 n-7). Les cyanolichens *L. pygmaea*, *Collema crisatum* et la cyanobactérie *Nostoc* contiennent un niveau élevé en AG monoènes n-7 (> 8%). **Ces cyanolichens ont montré une voie de biosynthèse en faveur de la famille n-7 très différente de celle des chlorolichens, avec une augmentation de l'activité des désaturases.** Ceci est en accord avec les données de la littérature. En effet, les cyanolichens *Peltigera spuria*, *Leptogium saturninum* [119] et le lichen tripartite *Peltigera aphotosa* [123] présentent également une teneur importante en AG n-7 (> 4%). Néanmoins, les espèces *Collema* récoltées sur la roche ou sur l'écorce rapportées par *Temina et al* en 2010 [80] montrent une teneur en AG monoènes de la famille n-7 faibles.

Une comparaison des profils d'AG des lichens étudiés dans notre étude avec ceux de la littérature a été réalisée après avoir compilé dans un tableau l'ensemble de ces données. En effet, quatorze articles dans la littérature ont décrit la teneur des AG totaux identifiés à partir de 87 espèces de lichens [71,80,86,88,101,111,112,116,117,119,120,122,123,125] (avec doublons) correspondant à 69 espèces (sans doublons) et 16 familles. Parmi eux, huit cyanolichens (quatre espèces de *Collema*, deux espèces de *Leptogium* et deux espèces de *Peltigera*) [80,119,120] et trois lichens tripartites (*Lobaria pulmonaria*, *Nephroma arcticum*, *Peltigera aphotosa*) [101,116,123] ont été analysés.

Les quatre espèces de *Collema* (*C. cristatum*, *C. callopismum*, *C. flaccidum* et *C. fuscovirens*) recueillies par deux équipes de recherche différentes ont montré des profils d'AG totaux semblables aux nôtres [80]. Deux espèces *C. fuscovirens* et *C. flaccidum* différaient néanmoins et cette différence pourrait s'expliquer par leur lieu de croissance différent: épiphytes pour *C. fuscovirens* et *C. flaccidum*, lithophiles pour *C. cristatum* et *C. callopismum*. Notre échantillon ayant été récolté sur de la roche, il est alors logique que son profil soit proche de ces derniers. De la même manière, l'échantillon de *Peltigera membranacea* est différent des autres espèces *Peltigera* contenant des cyanobactéries comme photobiotte primaire mais cette différence vient surtout d'une teneur élevée en diène C18:2 n-6 et une teneur faible en polyènes. Les AG de trois autres échantillons de *Cladonia rangiferina* (en plus du nôtre) ont été décrits dans la littérature et leurs profils sont proches entre eux sauf pour celui rapporté par Yamamoto [116]. Ces différences peuvent être expliquées par une instrumentation moins sensible qu'aujourd'hui et moins d'AG saturés ont été identifiés.

Tableau 16: Composition en AG totaux obtenus à partir de 15 espèces lichéniques et d'une cyanobactérie *Nostoc* sp. (% des totaux pour chaque acide gras)

(*S. vesu*: *S. vesuvianum*, *S. grami*: *S. graminosum*, *S. dactylo*: *S. dactylophyllum*, *S. monta*: *S. montagneanum*, *S. scut*: *S. scutelligerum*, *Cladonia rangif*: *Cladonia rangiferina*, *C. porten*: *Cladonia portentosa*, *Peltigera membrana*: *Peltigera membranacea*, *Collema cristat.*: *Collema cristatum* var *marginale*)

Acide gras	<i>S. vesu</i>	<i>S. grami</i>	<i>S. vulcani</i>	<i>S. dactylo</i>	<i>S. evolutum</i>	<i>S. halei</i>	<i>S. monta</i>	<i>S. pileatum</i>	<i>S. alpinum</i>	<i>S. scut</i>	<i>Cladonia rangif.</i>	<i>C. porten</i>	<i>Peltigera membrana</i>	<i>Lichina pygmaea</i>	<i>Collema cristat.</i>	<i>Nostoc sp.</i>
C10:0	-	0.28	0.77	0.09	0.17	0.05	-	0.09	0.15	0.97	0.44	0.25	2.11	-	-	0.45
C12:0	0.20	0.28	0.33	0.07	0.09	0.09	-	0.12	0.05	0.21	0.21	0.93	0.20	0.06	0.25	0.54
C14:0	0.68	1.05	0.55	0.54	0.68	0.60	0.68	0.64	0.29	0.55	0.90	1.13	0.36	0.26	1.26	0.49
C15:0	0.17	1.14	0.32	0.29	0.29	0.75	0.51	0.34	0.28	0.29	1.41	0.59	0.44	0.83	0.35	0.53
C16:0	17.94	24.87	14.29	14.07	16.61	20.10	21.50	12.58	13.27	16.99	27.37	16.47	20.13	14.38	22.53	17.69
C17:0	0.89	0.77	1.11	0.59	0.52	0.94	0.83	0.69	0.39	1.19	1.94	0.79	0.38	0.89	0.54	0.70
C18:0	12.43	14.51	10.43	6.16	10.23	9.26	14.61	5.66	9.05	11.24	17.24	7.72	3.00	6.14	3.82	4.81
C20:0	1.56	0.98	0.42	0.51	0.64	0.47	0.73	0.79	0.46	0.57	1.34	1.52	0.34	0.31	0.77	0.57
C22:0	0.10	1.07	0.37	0.34	0.87	0.55	0.57	0.62	0.44	0.46	-	2.69	1.66	1.28	0.92	1.30
C24:0	0.14	-	-	0.04	0.08	0.06	-	0.07	0.08	-	-	0.18	-	-	-	-
Saturés	34.12	44.96	28.60	22.70	30.18	32.87	39.42	21.59	24.45	32.48	50.84	32.27	28.62	24.16	30.44	27.07
iC12:0	0.18	0.20	0.32	0.04	0.05	0.09	-	0.09	0.03	0.12	0.20	-	-	-	0.13	-
iC13:0	0.12	0.22	0.13	0.08	0.12	0.12	0.14	0.07	0.06	0.10	0.51	0.18	0.25	0.16	0.22	0.11
iC14:0	0.16	-	0.35	0.04	0.11	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iC15:0	0.26	0.43	0.19	0.25	0.30	0.15	0.22	0.36	0.16	0.15	0.40	0.33	0.12	0.13	0.43	0.48
iC16:0	0.11	0.22	-	0.03	0.13	-	-	0.06	0.04	0.07	0.11	-	0.07	0.10	0.23	0.44
iC17:0	0.07	0.23	0.14	0.15	0.15	0.18	0.13	0.24	0.10	0.13	0.18	0.13	0.08	0.10	0.71	0.47
iC18:0	-	0.00	0.35	0.15	0.19	0.49	0.50	0.29	0.14	0.29	0.36	0.48	0.07	0.18	0.38	0.47
iC20:0	0.11	0.27	-	0.03	0.06	-	-	0.03	-	0.18	-	-	0.04	0.09	0.16	0.12
aiC12:0	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ai-C14:0	-	0.52	0.37	0.25	0.31	0.21	0.20	0.50	0.14	0.30	0.71	0.36	0.46	0.37	0.71	0.36
aiC15:0	0.33	0.60	0.27	0.11	0.10	0.10	0.27	0.08	0.07	0.10	0.19	0.13	0.10	0.15	0.32	0.59
ai-C16:0	0.62	1.32	1.22	1.07	1.36	0.91	0.86	0.90	0.64	1.17	2.99	1.28	2.29	2.26	4.23	1.95
aiC17:0	3.64	-	-	-	0.08	-	-	0.06	-	0.04	-	-	-	0.05	0.18	0.17
aiC18:0	0.31	-	0.22	0.46	0.23	0.39	0.19	0.99	0.12	0.91	0.10	0.10	0.21	0.12	0.18	0.06
iso	1.01	1.58	1.49	0.77	1.11	1.17	0.99	1.14	0.53	1.04	1.75	1.12	0.64	0.75	2.26	2.08
anteiso	5.05	2.44	2.09	1.89	2.09	1.61	1.52	2.53	0.97	2.52	3.99	1.87	3.07	2.95	5.62	3.13
ramifiés	6.06	4.02	3.58	2.66	3.20	2.77	2.50	3.67	1.50	3.56	5.74	2.99	3.71	3.70	7.88	5.22
C14:1n-5	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.06	0.14
C16:1n-9	0.62	0.71	0.10	0.48	0.23	0.24	0.39	0.06	0.14	0.25	0.80	0.24	0.04	0.08	0.21	0.21
C16:1n-7	1.11	0.65	0.83	0.68	0.70	0.60	0.65	0.80	0.89	0.77	0.64	0.68	1.78	5.08	12.17	5.08
C18:1n-9	28.44	21.03	17.66	29.34	14.70	15.64	19.90	28.83	11.93	15.84	11.21	22.70	19.18	2.89	7.60	6.55

C18:1n-7	2.94	2.79	2.39	2.31	2.86	2.60	2.77	2.59	2.01	2.17	2.39	2.34	1.48	3.05	7.97	4.57
C20:1 n-9	0.96	0.84	0.72	0.26	0.28	0.14	0.94	0.36	0.24	0.65	0.12	0.34	0.95	0.10	0.10	0.21
C22:1 n-9	0.18	-	-	0.09	0.21	0.06	-	0.05	0.11	-	-	0.15	0.10	0.05	0.07	0.20
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
monoènes	34.41	26.02	21.71	33.15	18.97	19.28	24.65	32.70	15.33	19.67	15.17	26.44	23.54	11.25	28.18	16.94
C18:2n-6	17.66	21.61	38.50	32.51	39.50	39.48	30.26	29.66	52.22	38.48	20.52	32.82	37.68	49.83	12.44	42.94
C18:3n-6	0.29	0.61	0.39	0.30	0.36	0.25	0.41	0.40	0.08	0.28	0.30	0.25	0.17	0.10	0.11	0.06
C20:3 n-6	-	-	0.15	0.31	0.08	0.34	0.17	0.14	0.84	0.20	1.74	0.50	0.20	0.05	0.11	0.13
C20:4 n-6	0.07	-	0.28	0.17	0.22	-	-	0.24	0.10	-	-	0.24	0.33	0.08	0.37	0.12
C22:4 n-6	0.23	-	-	0.24	-	-	-	0.10	-	-	0.37	1.30	-	-	0.84	-
C22:5 n-6	0.14	-	-	0.02	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-	0.03	-	-
C16:3 n-3	-	0.25	0.50	0.07	0.33	0.28	0.27	0.06	0.20	0.69	0.55	0.45	0.15	0.25	0.34	0.24
C18:3n-3	4.37	0.85	5.25	6.75	5.71	3.56	1.15	10.13	4.23	4.21	3.12	0.63	2.36	9.29	17.60	6.68
C18:4 n-3	0.84	-	-	0.06	0.10	0.05	0.32	0.08	0.06	-	-	-	2.78	0.18	0.13	0.04
C20:3 n-3	0.97	0.18	0.29	0.21	0.26	0.20	-	0.47	0.22	0.13	0.48	1.35	0.17	0.27	0.93	0.30
C20:5 n-3	0.67	0.35	0.21	0.30	0.31	0.17	0.13	0.27	0.25	0.09	0.46	0.21	0.08	0.61	0.22	0.06
C22:5 n-3	0.06	-	-	-	-	0.12	-	0.02	0.11	0.05	-	-	0.12	0.11	0.23	-
C22:6 n-3	0.12	1.14	0.54	0.56	0.78	0.65	0.74	0.41	0.41	0.16	0.71	0.54	0.08	0.10	0.18	0.18
n-6	18.37	22.22	39.33	33.55	40.16	40.07	30.83	30.58	53.24	38.96	22.93	35.12	38.39	50.09	13.87	43.26
n-9	30.21	22.58	18.48	30.16	15.41	16.08	21.22	29.32	12.42	16.73	12.14	23.43	20.27	3.11	7.98	7.16
n-3	7.03	2.78	6.79	7.94	7.49	5.02	2.60	11.45	5.48	5.32	5.31	3.18	5.74	10.80	19.63	7.51
n-7	4.04	3.44	3.23	2.99	3.56	3.19	3.43	3.38	2.90	2.94	3.03	3.01	3.26	8.12	20.15	9.34
polyinsaturés	25.41	25.00	46.12	41.49	47.65	45.08	33.43	42.03	58.72	44.28	28.25	38.30	44.13	60.89	33.50	50.77
ratio (n-6)/(n-9)	0.61	0.98	2.13	1.11	2.61	2.49	1.45	1.04	4.29	2.33	1.89	1.50	1.89	16.08	1.74	6.04
ratio (n-3)/(n-6)	0.38	0.12	0.17	0.24	0.19	0.13	0.08	0.37	0.10	0.14	0.23	0.09	0.15	0.22	1.41	0.17
Total des insaturés	59.81	51.02	67.83	74.64	66.63	64.36	58.07	74.73	74.05	63.95	43.41	64.74	67.66	72.14	61.67	67.71
Teneur en AG totaux (mg/g)	0.8	0.3	0.6	2.0	1.1	0.9	0.5	2.7	1.9	0.8	0.4	0.5	1.3	1.4	0.7	0.9

3.3.2.3 Analyse multivariée des profils en AG

Afin de savoir si nous pouvions confirmer les résultats de Sasaki et al [120] lors de leur étude portant sur 11 espèces de *Cladonia* ayant conclu que les EMAG totaux pourraient être une aide à la taxonomie des lichens, nous avons appliqué une analyse statistique sur nos 16 espèces. Quatre analyses de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) basées soit sur les AG totaux, soit sur les AG saturés, soit sur les AG insaturés et les acides gras *iso/anteiso* ont été réalisées afin de permettre une comparaison des profils en AG de nos 16 espèces (Fig. 26).

Les cyanolichens contenant *Nostoc* comme photobiotte (*Peltigera membranacea*, *Collema cristatum*) et la cyanobactérie *Nostoc sp.* ont un profil similaire en AG saturés (Fig. 26a), mais ils ne sont pas inclus dans le même cluster lors de l'analyse basée sur les AG totaux et insaturés (Fig. 26c et 26d). Deux clusters distincts, l'un contenant les cyanolichens et un chlorolichen *Cladonia rangiferina* et l'autre contenant les espèces *Stereocaulon*, ont également été obtenus à partir de l'analyse basée sur les AG à chaîne ramifiée (Fig. 26b). Ces AG sont communs chez des bactéries telles que *Cytophaga*, *Acetobater*, *Flavobacterium* et les Actinomycètes [138]. Aucune distinction des lichens tripartites au sein du genre *Stereocaulon* n'a été obtenue quels que soient les groupes d'AG.

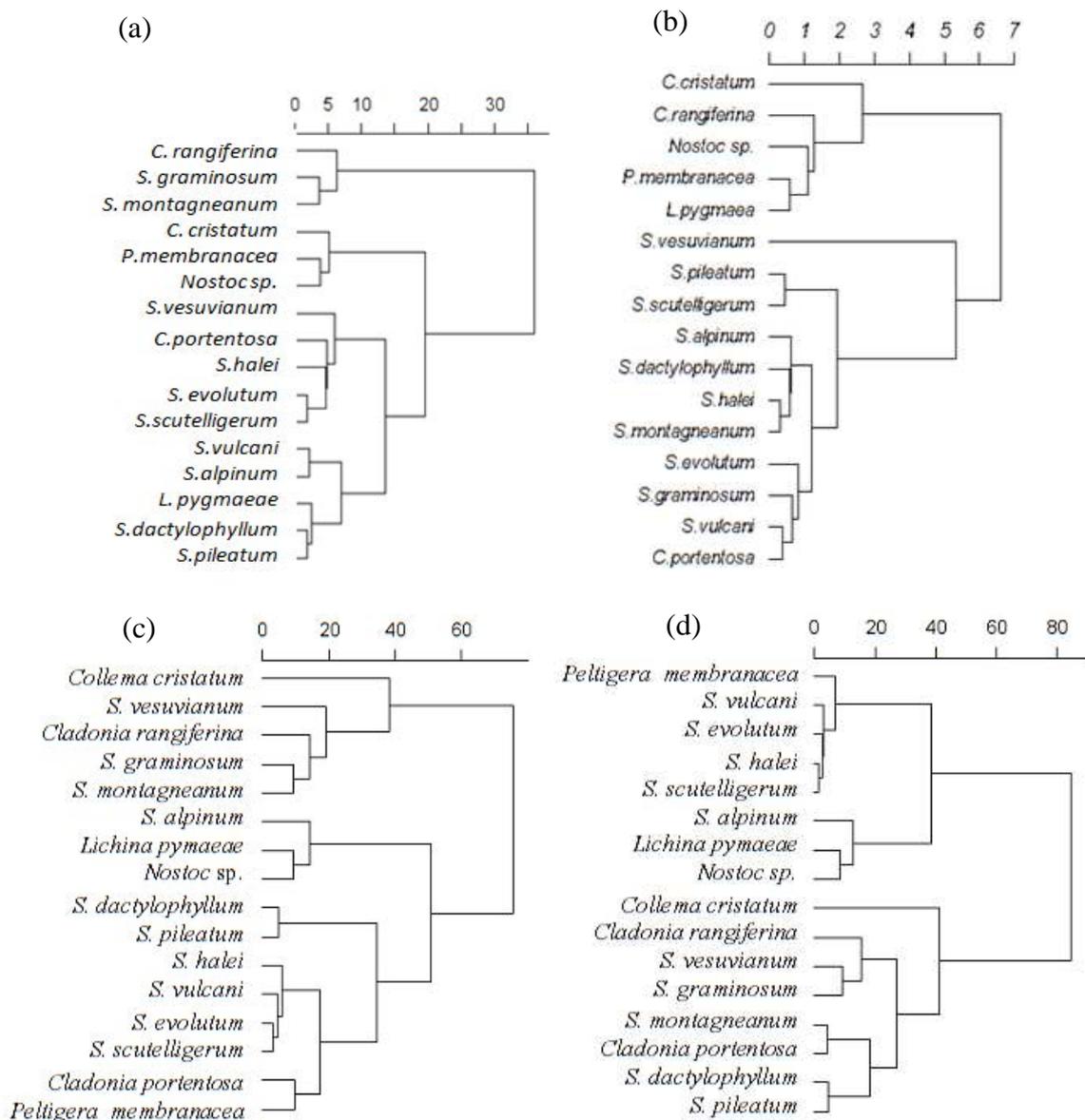


Figure 26: Dendrogrammes obtenus par CAH des 15 espèces lichéniques et de la cyanobactérie *Nostoc sp.* basés sur les AG saturés (a), les AG ramifiés (b), les AG totaux (c) et les AG insaturés (d)

4 Comparaison des profils d'acides gras des différents partenaires de *S. scutelligerum*

Comme l'interaction symbiotique entre les partenaires conduit non seulement à une morphologie du thalle tout à fait différente, mais aussi à une capacité de biosynthèse différente des composés lichéniques, la plupart des lichens contiennent des métabolites secondaires qui ne peuvent pas être synthétisés par des champignons seuls ni par les algues ou cyanobactéries seules [139]. Cependant, de nombreuses études [71,116] ont été effectuées en

utilisant des mycobiotés isolés, et fournissent les preuves d'une relation métabolique intime. Afin de mieux comprendre la répartition des acides gras totaux dans le thalle, il nous a paru intéressant de mener une analyse en ayant séparé les principaux partenaires principaux au sein du thalle lichénique. Nous avons pour cela pris *Stereocaulon scutelligerum* comme modèle et réalisé des séparation physiques à partir du thalle.

4.1 Travaux antérieurs

La plupart des études reposent sur l'analyse des AG de chacun des partenaires après mise en culture séparée. En effet, quelques études ont décrit la composition en AG des partenaires **cultivés** du lichens [71,88,116,117,124]. Yamamoto et Watanabe [116] a étudié pour la première fois la composition en AG du phycobioté appartenant au genre *Trebouxia* et du mycobioté dans quelques espèces de lichens. Les résultats ont montré que leurs AG principaux sont l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (18:1 n-9) et l'acide linoléique (18:2 n-6). L'acide arachidonique a également été trouvé en petite quantité (Tableau 17). Une comparaison entre la composition en AG des lichens intacts et de leurs composants indique que la teneur en acide linoléique (C18:2 n-6) est supérieure à la quantité d'acide oléique (C18:1 n-9) dans la plupart des lichens intacts étudiés mais cette répartition est inversée dans chaque partenaire pris séparément.

Tableau 17: Composition en acides gras du lichen intact et de ses partenaires cultivés (% des acides gras totaux) [116]

Lichen		14:0	16:0	16:1 n-7	18:0	18:1 n-9	18:2 n-6	18:3 n-3	20:4 n-3
<i>Cetraria pseudocomplicata</i>	Lichen intact	0.5	10.6	-	1.7	24.3	50.1	7.6	5.2
	<i>Trebouxia</i>	-	22.9	-	1.4	23.1	43.9	6.9	-
<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) Web	Lichen intact	0.2	8.9	1.7	2.9	21.0	59.8	4.8	-
	<i>Trebouxia</i>	-	18.6	-	2.8	40.5	27.3	8.6	2.2
<i>Usnea diffracta</i> Vain	Lichen intact	44.9	6.0	-	2.0	8.0	21.0	4.9	-
	<i>Trebouxia</i>	-	15.0	1.2	1.1	29.1	27.2	9.3	1.6
<i>Cladonia mitis</i> Sandst	Lichen intact	0.8	13.1	2.2	3.3	29.6	41.7	7.1	2.3
	<i>Trebouxia</i>	-	14.6	-	2.5	58.4	16.8	5.5	-
	Champignon	22.6	6.2	-	11.0	33.0	21.8	1.2	4.5
<i>Ramalina yasudae</i> Räs	Lichen intact	0.2	3.8	-	1.3	11.6	17.7	20.4	-
	<i>Trebouxia</i>	-	15.1	2.2	2.1	38.1	25.0	15.1	1.7
	Champignon	-	11.2	-	11.4	47.2	27.5	2.8	-

Plus récemment, le photobioté ainsi que le mycobioté de *Teloschistes flavicans* cultivés séparément, ont été analysés par CPG-MS en vue d'une comparaison de la composition en acides gras (Tableau 18) [71].

Tableau 18: Composition en acides gras du mycobiote, du photobionte et du thalle intact du lichen *Teloschistes flavicans* (% des acides gras totaux) [71]

Acide gras	Mycobiote		Photobionte		Lichen intact	
	27°C	22°C	BBM (24°C)	TM (20°C)	Février (27°C)	Août (18°C)
14:0	1.6	-	-	2.2	3.0	-
15:0	-	-	-	1.0	1.1	1.0
15:1	0.4	-	-	0.3	-	-
16:0	35.0	21.9	36.4	56.1	56.4	36.4
16:1 n-7	-	-	-	-	-	0.7
17:0	-	-	-	1.2	1.2	-
18:0	24.5	19.2	63.1	27.8	27.6	2.4
18:1 n-9	13.7	48.6	-	-	-	12.5
18:2 n-6	10.1	4.0	-	-	-	39.3
18:3 n-3	2.8	-	-	-	-	7.3
20:0	2.4	1.8	-	3.4	3.0	-
22:0	3.4	1.6	-	3.4	3.4	-
24:0	4.3	2.9	-	-	-	-
24:1	1.2	-	-	4.1	3.9	-

La composition en AG varie lorsque le mycobiote est cultivé même avec un écart de température de 5°C. Les AG insaturés représentent 52 % des AG totaux à 22°C et 28% à 27°C. De même, en fonction du milieu où le photobionte *Trebouxia sp.* est cultivé (TM : Milieu de *Trebouxia* - agar; BBM : Milieu d'inorganique-agar), le profil en AG est également modifié. Enfin, ces données montrent que la composition en AG de chacun des symbiotes ne correspond pas à celle du lichen intact pour une même température. Ce comportement reflète les différences entre les produits cultivés *in vitro* et *in vivo*. Malheureusement, à ce jour, aucun document ne rapporte la composition en AG de chacun des partenaires du lichen *in vivo*.

Dans une démarche exploratoire, nous avons tenté de savoir quels étaient les AG les plus identifiants de chaque partenaire isolé à partir du lichen naturel. Nous avons ainsi cherché à isoler les partenaires du chlorolichen *S. scutelligerum* afin d'étudier leurs profils d'AG.

Pour réaliser cette étude, trois étapes sont nécessaires :

- Fractionnement du thalle intact de *S. scutelligerum* permettant d'obtenir
 - ❖ le mycobiote,
 - ❖ un mélange mycobiote + photobionte,
 - ❖ les microorganismes associés au lichen,
- Extraction respective des lipides totaux, séparation des esters méthyliques d'acides gras et identification par CPG-FID et CPG-MS.

- Comparaison des profils d'acides gras des différents partenaires du lichen *S. scutelligerum*

4.2 Fractionnement du thalle intact de *S. scutelligerum*

Dans un premier temps, nous avons essayé de fractionner les deux partenaires principaux du lichen selon un protocole décrit dans la littérature à savoir basé sur une ultracentrifugation dans un gradient de Percoll [140]. Le mycobiote a été obtenu seul car il représente environ 90-95 % [120] de la biomasse de lichens. Par contre, nous n'avons pu isoler qu'une très petite quantité d'algues car elles sont peu nombreuses et le rendement de cette méthode d'isolement est loin d'être quantitativement élevé. D'ailleurs, la plupart des protocoles [140–142] que nous avons utilisés avaient pour but, de les isoler en vue de les cultiver. Comme nous voulions éviter l'impact de la culture sur le profil des AG [71,88,116,124], une deuxième méthode a été mise en oeuvre.

Pour séparer les deux partenaires principaux (photobiotte et mycobiote), un fractionnement du thalle intact de lichen *S. scutelligerum* a été réalisé en s'appuyant sur la structure particulière du genre *Stereocaulon*. L'essentiel du thalle (a) du genre lichen *Stereocaulon* est composé d'un pseudopodétion (b) formé par les hyphes compactes du champignon et des phylloclades (c) contenant les algues et le champignon (Fig. 27). Cependant, les algues sont cantonnées dans la couche la plus externe de l'axe constituant le pseudopodétion, ainsi que dans les phylloclades qui forment de petites excroissances compactes. Les pseudopodétions ont été pelés (raclage manuel sous la loupe binoculaire) pour obtenir la partie interne correspondant au champignon seul (b) et la partie corticale avec les phylloclades (c). La partie (b) a été observée au microscope et colorée par le bleu coton lactophénol, un colorant spécifique des champignons, ce qui a permis de confirmer qu'aucune algue n'était présente.



Figure 27: Fractionnement du thalle de *S. scutelligerum* (a : thalle intact, b : pseudopodétion, c : phylloclades)

D'après les travaux antérieurs (Chap 1 §2.5) et nos résultats, des acides gras ramifiés ont été retrouvés sur chaque lichen. Or, ils sont connus pour être essentiellement d'origine bactérienne. Le lichen est d'ailleurs de plus en plus considéré comme étant une symbiose dans laquelle la microflore associée participe pour une large part et le concept de symbiose est élargi par des lichénologues tels que Martin Grube (Graz, Autriche) au cortège microbien très riche et spécifique qui colonise le thalle lichénique [2,143,144]. Nous avons ainsi appliqué un protocole décrit dans la littérature pour obtenir cette microflore riche en bactéries. Cela correspond essentiellement à un lavage externe par l'eau distillée que nous dénommons (Surnageant « bactérie ») (Cf Données expérimentales du chapitre 1 § 1.6). Aucun filament de champignon et aucune algue n'ont été observés au microscope dans ces fractions aqueuses à l'exception d'organismes dont la taille (1-3 x 4-8 μM) pourrait correspondre à celles des bactéries.

Après séchage, les AG totaux ont été extraits à partir de chaque partie (a, b, c, surnageant bactéries) puis méthylés avant d'être identifiés par CPG / FID et CPG / MS (Cf Données expérimentales du chapitre 1 § 1.3.1 et § 1.3.2).

4.3 Comparaison des profils d'acides gras des différents partenaires du lichen *S. scutelligerum*

Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau 19. Les profils des AG saturés du champignon seul et des phylloclades sont similaires à ceux du thalle dans sa totalité. Cependant, une teneur plus élevée de monoène C18:1 n-9 ainsi que dans une moindre mesure, le C18:2 n-6, a été observée dans le pseudopodétion (20,6 %) par rapport aux phylloclades (13,5 %). Une petite quantité d'acide α -linoléique (C18:3 n-3) a été trouvée dans le pseudopodétion (0,5 %), probablement converti en C18:4 n-3 (1,2 %) par l'enzyme $\Delta 6$ -désaturase. A l'inverse, une grande quantité de C18:3 n-3 (10,6 %) a été trouvée dans les phylloclades. Cela montrerait que l'enzyme $\Delta 15$ -désaturase était active dans les phylloclades et a permis de convertir le C18:2 n-6 en C18:3 n-3. Certains AGPI ont été trouvés dans le champignon et des AG à chaîne ramifiée étaient en quantité élevée dans les phylloclades mais surtout dans l'extrait correspondant à la microflore.

Tableau 19: Composition en acides gras obtenue à partir des trois différents partenaires du *Stereocaulon scutelligerum* (% des acides gras totaux)

Acide gras	Surnageant (Bactérie)	Pseudopodétion (b)	Phylloclade (c)	Thalle intact (a)
C10:0	-	0.14	1.04	0.97
C12:0	0.73	0.14	-	0.21
C14:0	1.87	0.34	0.60	0.55
C15:0	0.57	-	-	0.29
C16:0	28.07	14.29	17.90	16.99
C17:0	0.82	0.56	1.75	1.19
C18:0	23.19	14.44	8.55	11.24
C20:0	4.36	0.75	0.46	0.57
C22:0	3.65	0.20	0.08	0.46
C24:0	-	-	-	-
Saturé	63.27	30.87	30.39	32.48
iC12:0	0.51	0.13	-	0.12
iC13:0	-	-	0.13	0.10
iC14:0	0.38	-	0.24	-
iC15:0	0.29	0.05	0.18	0.15
iC16:0	0.41	-	0.06	0.07
iC17:0	0.28	-	0.08	0.13
iC18:0	-	0.29	0.26	0.29
iC20:0	0.41	-	-	0.18
aiC12:0	0.66	0.13	-	-
ai-C14:0	-	-	-	0.30
aiC15:0	1.19	0.15	0.12	0.10
ai-C16:0	1.54	-	0.11	1.17
aiC17:0	5.77	0.27	0.59	0.04
aiC18:0	0.25	0.11	1.82	0.91
iso	2.29	0.47	0.95	1.04
anteiso	9.42	0.65	2.64	2.52
ramifié	11.71	1.13	3.59	3.56
C14:1n-5	0.30	-	0.16	-
C16:1n-9	0.82	0.16	0.23	0.25
C16:1n-7	0.65	0.29	1.05	0.77
C18:1n-9	6.43	20.61	13.46	15.84
C18:1n-7	0.99	1.48	2.30	2.17
C20:1 n-9	5.04	0.38	0.31	0.65
C22:1 n-9	-	0.07	0.06	-
C24:1 n-9	-	-	-	-
monoènes	14.25	22.99	17.57	19.67
C18:2n-6	4.89	41.13	35.44	38.48
C18:3 n-6	0.44	0.22	0.16	0.28
C20:3 n-6	-	-	-	0.20
C20:4 n-6	-	0.11	0.24	-
C22:4 n-6	1.09	0.80	0.49	-
C22:5 n-6	-	-	-	-
C16:3 n-3	0.64	0.15	0.30	0.69
C18:3n-3	1.33	0.47	10.56	4.21
C18:4 n-3	0.31	1.17	0.47	-
C20:3 n-3	1.25	0.51	0.32	0.13
C20:5 n-3	0.29	0.29	0.16	0.09
C22:5 n-3	0.53	0.15	0.30	0.05

C22:6 n-3	-	-	-	0.16
n-6	6.42	42.26	36.33	38.96
n-9	12.30	21.22	14.07	16.73
n-3	4.36	2.75	12.12	5.32
polyinsaturés	10.78	45.00	48.45	44.28
ratio (n-6)/(n-9)	0.52	1.99	2.58	2.33
ratio (n-3)/(n-6)	0.68	0.06	0.33	0.14
insaturés	25.02	68.00	66.02	63.95
Teneur en mg/g MS	1.1	1.7	2.8	0.8

Le pseudopodétium de *S. scutelligerum* contient une haute teneur en C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, ce qui est en accord avec les données antérieures connues chez les Ascomycètes [72,116,137,145–147]. Néanmoins, même si certains ascomycètes peuvent produire l'acide α -linoléique (C18:3 n-3), ils sont en faibles quantités dans le pseudopodétium de *S. scutelligerum*. Étonnamment, des AGPI ont été retrouvés bien que les ascomycètes ne peuvent pas à priori les synthétiser. Par contre, les AGPI trouvés dans le pseudopodétium (C18:3 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3) peuvent être synthétisés par des microalgues eucaryotes [124]. Par exemple, l'acide arachidonique (C20:4 n-6), peut être produit en grande quantité par la microalgue rouge *Porphyridium cruentum* [137], l'EPA (C20:5 n-3) par la diatomée *Navicula saprophylla*, le DHA (C22:6 n-3) est produit dans la plupart des algues comme les Dinoflagellés et Haptophyta [137]. *Trebouxia* est le genre de l'algue verte trouvée dans le lichen *S. scutelligerum*. Ce genre appartient à la classe des Trebouxiophycetes et l'ordre des Chlorococcales. Or, *Parietochloris incisa* qui appartient à cette même classe est connue pour produire en grandes quantités des AGPI à longue chaîne [148–151]. Ainsi, l'algue verte *Trebouxia* pourrait être impliquée dans la production des AGPI mineurs même si seuls des AG saturés et insaturés jusqu'à C18:3 ont été rapportés après isolement [71,88,116,124]. De ce fait, il semble que les AG synthétisés par chaque partenaire lichénique diffusent dans le thalle lichénique et ne semblent pas être compartimentés : le champignon et les cellules algales coexistent et interagissent.

Comme attendu, les esters méthyliques d'acides gras de la fraction de lavage des lichens (FA1+FA2) ont été analysés et ont montré une teneur élevée en AG à chaîne ramifiée (environ 11,7%). Dans ces fractions, les bactéries semblaient prédominantes au microscope, et leur présence était attendue compte tenu de la technique utilisée pour les obtenir [112,144,152,153]. Cependant, notre protocole souffre d'un biais important compte tenu du fait que nous avons utilisé des échantillons de lichen récoltés de manière non aseptique. Ils ont été conservés sur des périodes très viables (de quelques années à plus d'une dizaine

d'années) et même si les conditions sont censées limiter les proliférations microbiennes, celles-ci ne peuvent être exclues. Ils ont aussi été manipulés par divers opérateurs ce qui induit un risque de contamination indirecte par une autre flore que la flore constitutive. Nous anticipons que cet apport de microflore externe est mineur et que les observations faites sont essentiellement dues aux microorganismes du lichen mais, en toute rigueur, nous devons prendre ces résultats avec prudence et considérer qu'il s'agit là d'une étude préliminaire.

Ainsi, d'autres études sont à envisager pour confirmer cette hypothèse puisque malgré leur proportion pondérale très limitée, il semble que les bactéries pourraient représenter une aide significative dans la chimiotaxonomie des lichens. Il est légitime d'envisager qu'elles pourraient aussi jouer un rôle dans la biosynthèse des AG ramifiés. En effet, les interactions entre les champignons et les bactéries sont présentes dans de nombreux contextes (association planctonique, biofilm mixte, endophytes, colonisation intrahyphale...) basées sur des relations ectosymbiotiques et endosymbiotiques [154]. Cette symbiose multipartenaire, en utilisant diverses formes de communication moléculaire, influence le développement et le cycle de vie de chaque partenaire et nous incite à poursuivre dans l'analyse fine du métabolisme des AG au sein du lichen.

5 Conclusion

L'objectif de cette comparaison des profils d'AG totaux entre les dix espèces de *Stereocaulon* avait pour objectif de savoir si les AG totaux pouvaient apporter une aide pour différencier les espèces de Stéréocaulon. Il ne semble pas, d'après nos résultats, qu'une distinction soit possible si l'on se base uniquement sur les profils en AG, qu'ils soient totaux, saturés et insaturés. En revanche, notre étude a révélé que les AG *iso* et *antéiso* dans les espèces étudiées pourraient provenir des bactéries présentes sur le lichen et pourraient permettre de distinguer des cyanolichens au sein du genre *Stereocaulon*. Les bactéries représentent une très faible quantité de la biomasse totale du lichen [155] même en considérant que nos lichens, récoltés non stérilement et entreposés sans précaution particulière, aient pu voir un développement de la flore bactérienne initiale. Il paraît indispensable de renouveler cette expérience en récoltant des espèces de façon aseptique et d'avoir un meilleur comparatif de conservation entre les espèces pour voir si ces résultats se confirment.

Nous avons d'autre part comparé les profils des AG des 10 espèces de *Stereocaulon* avec quelques cyanolichens. Nous avons pu remarquer que les profils des AG saturés des cyanolichens étudiés diffèrent de ceux des stéréocaulons et que la voie conduisant aux AG n-7 soit favorisée dans les cyanolichens.

Nous avons d'autre part comparé les profils des AG des 10 espèces de *Stereocaulon* avec quelques cyanolichens. Nous avons pu remarquer que les profils des AG saturés des cyanolichens étudiés diffèrent de ceux des stéréocaulons. De plus, chez les cyanolichens, la voie conduisant à la synthèse des AG n-7 était favorisée et certaines désaturases semblaient être particulièrement activées. De nouvelles études chez d'autres espèces de cyanolichens seraient à envisager afin de vérifier si cette particularité est constante.

CHAPITRE 2 : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *STEREOCAULON EVOLUTUM* GRAEWE

Nous travaillerons donc à partir du lichen *Stereocaulon evolutum* Graewe recueilli par Françoise Lohézic-Le Dévéhat en Bretagne en vue d'enrichir la diversité des espèces du genre *Stereocaulon* disponibles au laboratoire et de valoriser les métabolites secondaires isolés.

L'étude phytochimique proprement dite commence seulement après une étude botanique approfondie du matériel lichénique récolté. Cette étape a été réalisée lors du travail de thèse de Friardi Ismed. Nous aborderons donc ici seulement le fractionnement phytochimique. Ensuite, après une étude structurale des différents composés isolés, nous discuterons de leurs origines et de leurs liens biosynthétiques.

1 Extraction

Le lichen a été soumis à un tri attentif de la matière première (éléments étrangers tels que la terre, la mousse...) et séchée à l'air (300 grs obtenus en fine), puis a été extrait selon un protocole précédemment optimisé au laboratoire par l'eau bidistillée au frais (4°C) pendant 10 heures afin d'extraire les mycosporines et autres composés polaires avant de procéder à une extraction classique par solvants de polarité croissante après séchage [156]. Le filtrat aqueux obtenu a été récupéré par filtration et cette extraction est renouvelée une fois. L'ensemble constitue l'extrait aqueux que nous nommerons Se H₂O (Fig. 28). Le lichen entier est ensuite séché à l'air (286 g) puis réduit en poudre grâce à un broyeur à billes et enfin placé au contact des solvants organiques. Les extractions organiques sont réalisées à température ambiante par macération et agitation avec trois solvants de polarité croissante : *n*-hexane, acétone, tétrahydrofurane. Ces opérations sont réalisées quatre fois pour chacun des solvants. Les trois extraits obtenus après réunion des quatre extraits par chacun des solvants constituent l'extrait hexanique (SeH), l'extrait acétonique (Se Ac) et l'extrait tétrahydrofuranique (Se THF) (Fig. 28).

La comparaison des quantités d'extraits obtenus nous permet de constater que l'extrait acétonique possède le taux d'extraction le plus important et serait plus susceptible de renfermer des métabolites d'intérêt.

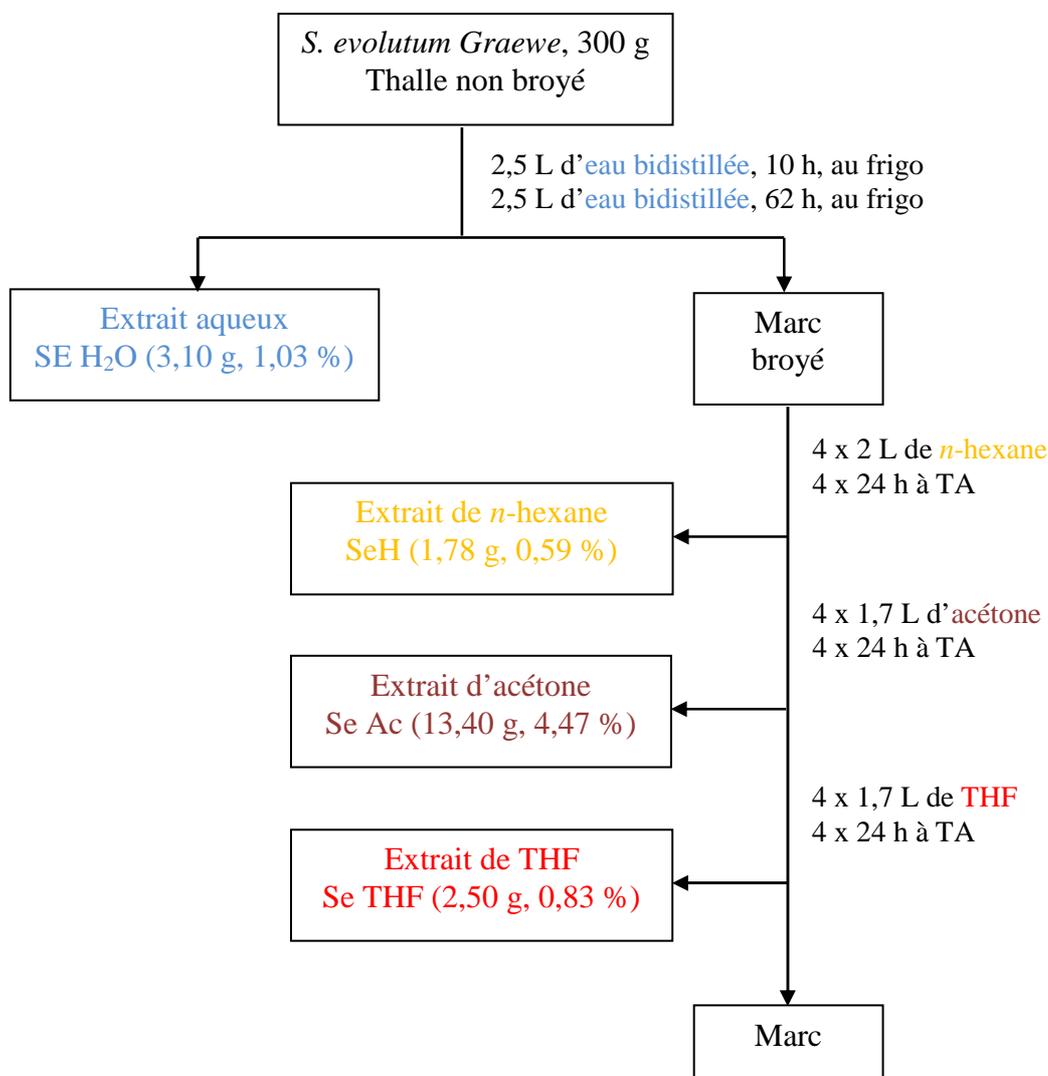
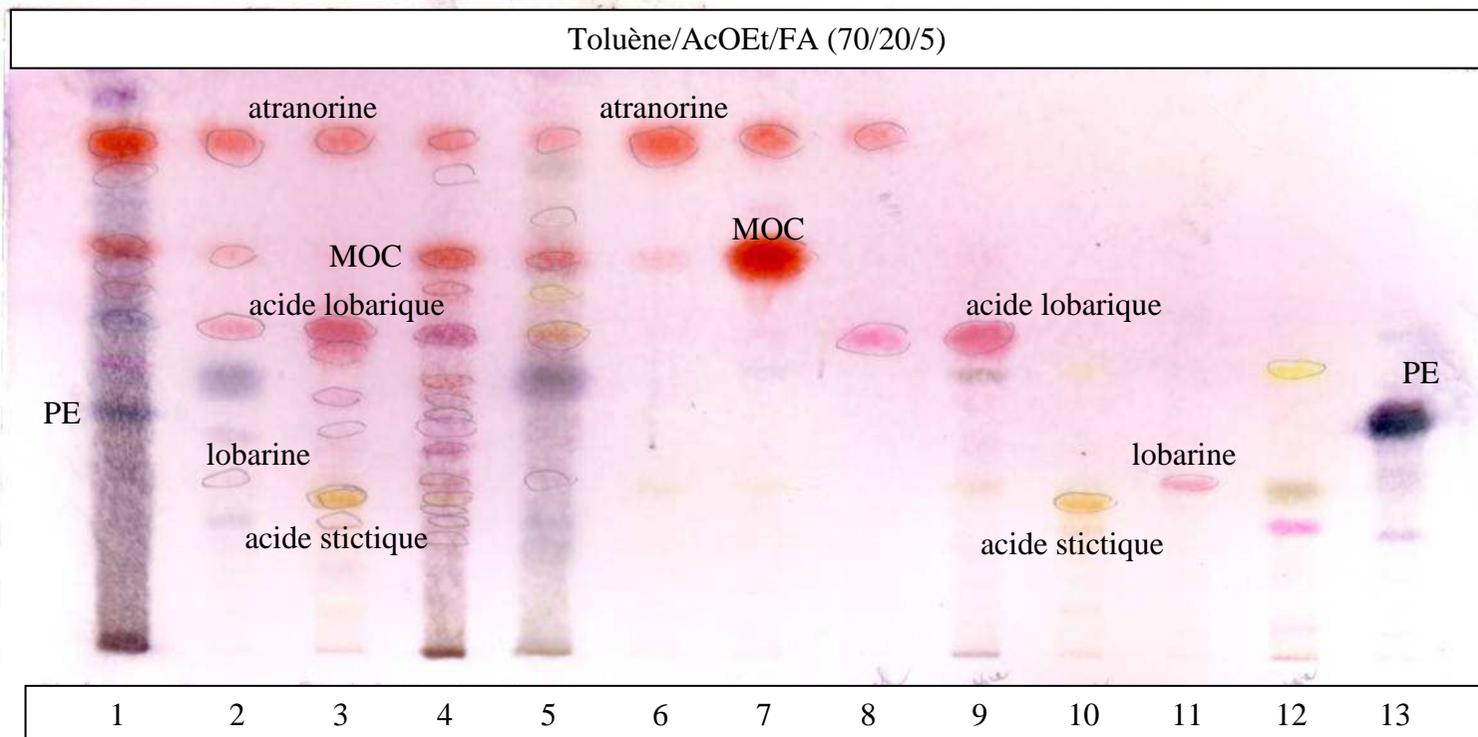


Figure 28 : Schéma général de fractionnement de *Stereocaulon evolutum* Graewe

2 Purification

Les extraits sont laissés à évaporer à température ambiante et un précipité blanc apparaît dans les extraits *n*-hexane et acétone appelés respectivement précipité A et précipité B (Fig. 30 et 31). De même, après concentration du filtrat acétonique sous pression réduite, deux précipités sont obtenus par filtration (Ac1 et Ac2) et le filtrat est évaporé à sec (Ac3) (Fig. 31).

La comparaison qualitative de chacun des extraits obtenus est effectuée par comparaison des profils en CCM. Les hypothèses formulées précédemment se révèlent justes et l'extrait acétone renferme une diversité de métabolites plus importante que les extraits *n*-hexane et tétrahydrofurane (Fig. 29). La comparaison par rapport à des témoins disponibles au laboratoire suggère la présence de l'atranorine, du β -orcinol carboxylate de méthyle, de l'acide lobarique, de l'acide stictique, de la lobarine, et du peroxyde d'ergostérol dans ce lichen.



1-SeH, 2-Ac1, 3-Ac2, 4-Ac3, 5-Se THF, 6-Atranorine, 7-MOC, 8-Atranol, 9-Acide lobarique, 10-Acide stictique, 11-Lobarine, 12-Acide norstictique, 13-Peroxyde d'ergostérol

Figure 29 : CCM des extraits de *S. evolutum* comparés à des témoins de produits lichéniques (révélation par ANS)

Les méthodes de purification employées sont essentiellement la Chromatographie sur colonne ouverte (CC), la Chromatographie flash (FC), la Chromatographie circulaire centrifuge (CCC) et la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) (Fig. 30 - 33).

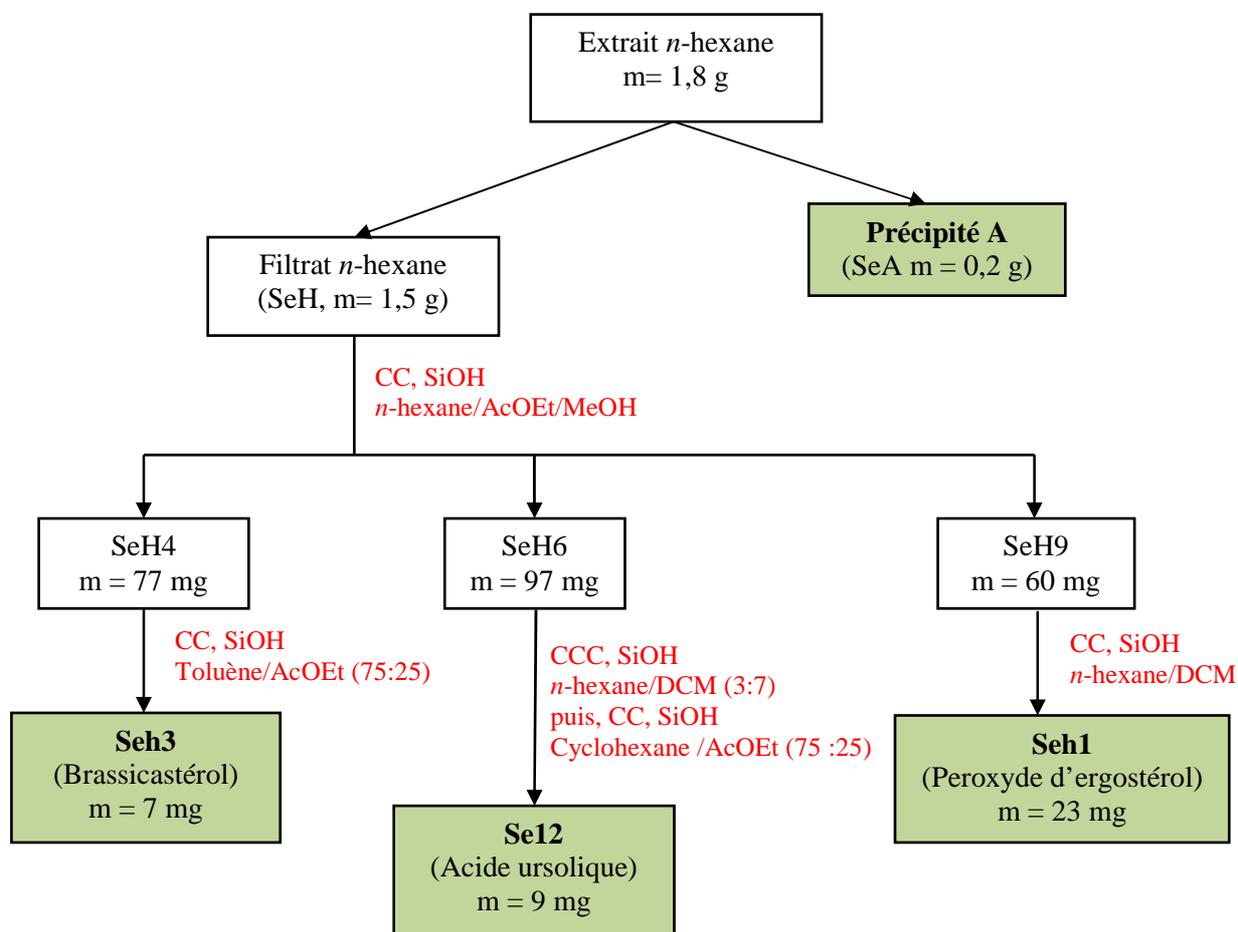


Figure 30 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait *n*-hexane

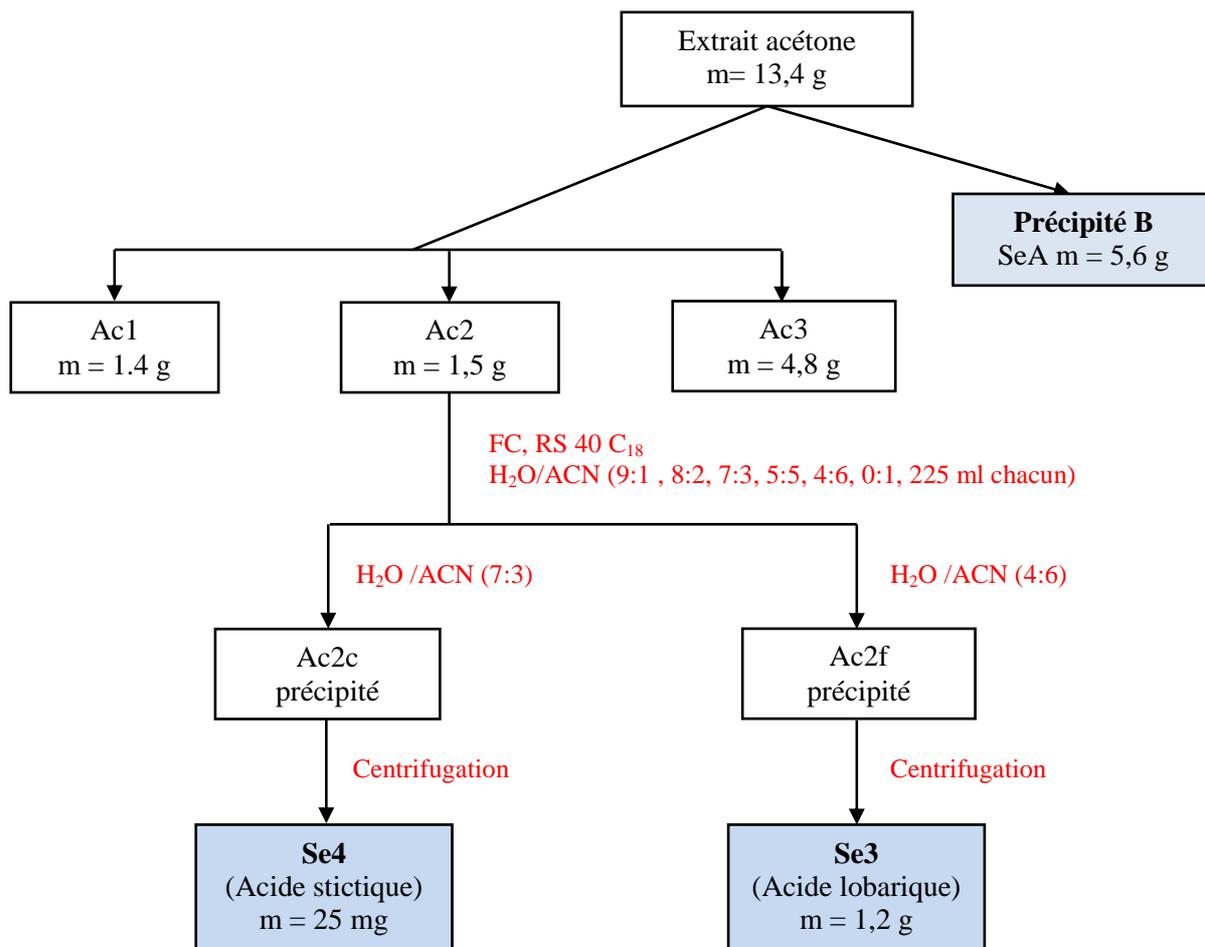


Figure 31 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait acétone

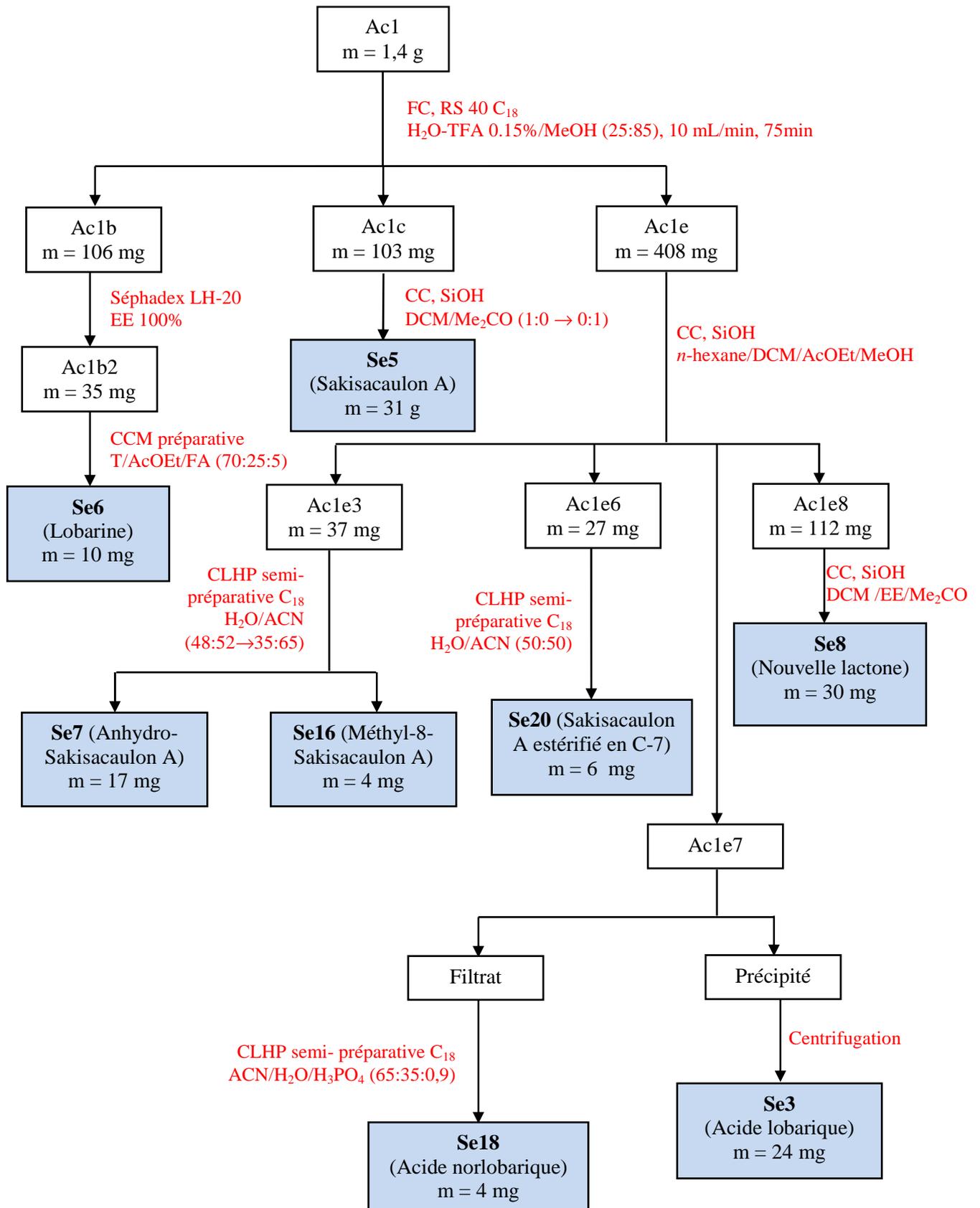


Figure 32 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de la fraction Ac1

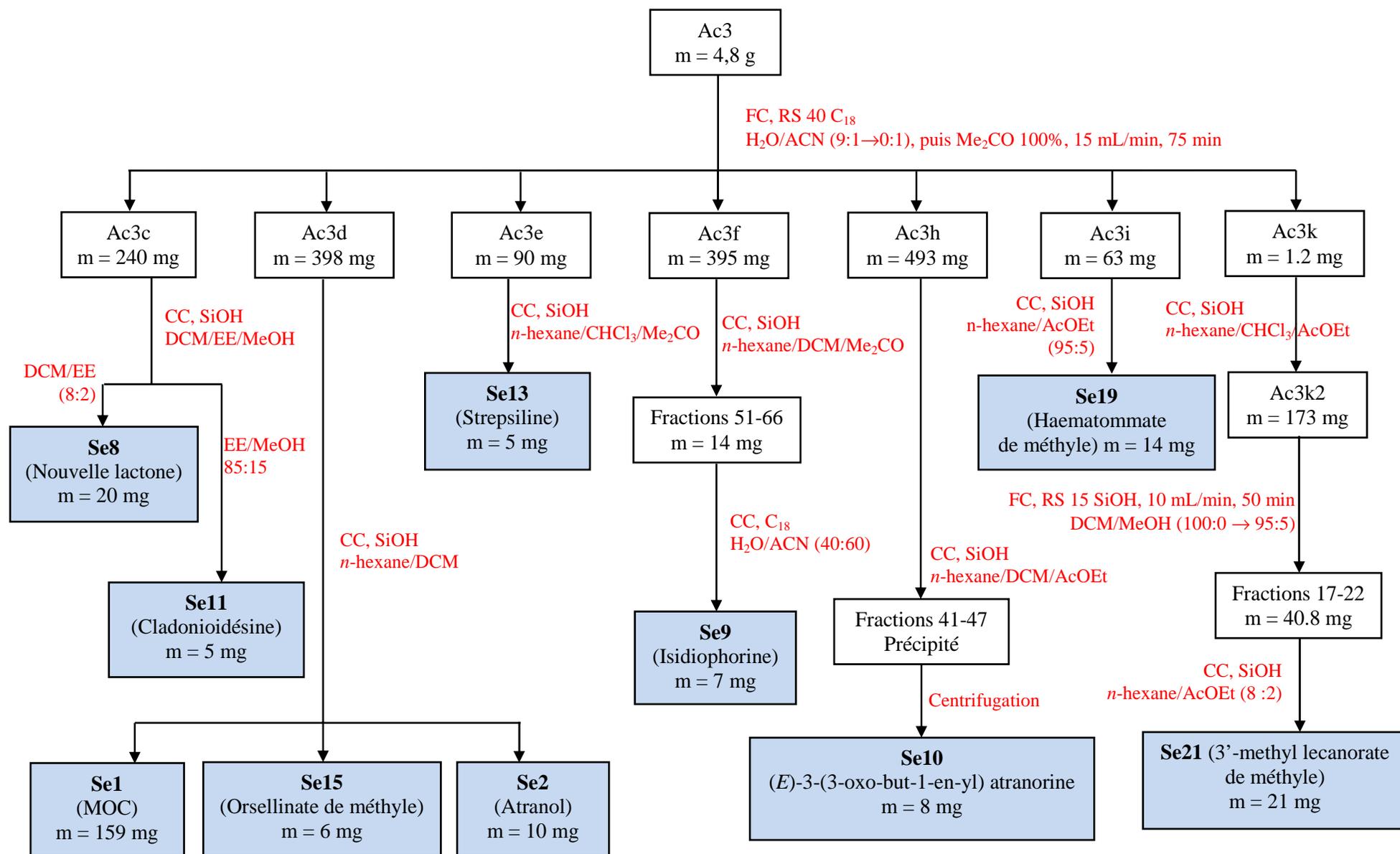


Figure 33 : Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de la fraction Ac3

3 Métabolites isolés

Vingt-deux métabolites ont été isolés à partir du lichen *S. evolutum* Graewe (Tableau 20).

Tableau 20: Tableau récapitulatif des composés isolés à partir du lichen *S. evolutum*

Extrait <i>n</i> -hexane	
SeA = Atranorine	Seh3 = Brassicastérol
Seh1 = Peroxyde d'ergostérol	Se12 = Acide ursolique
Extrait acétone	
SeA = Atranorine	Se10 = (<i>E</i>)-[3-hydroxy-4-(méthoxycarbonyl)-2,5-diméthylephenyl]-2,4-dihydroxy-6-méthyle-3-(3-oxo-but-1-én-yl) benzoate
Se1 = β -orcinol carboxylate de méthyle	Se11 = Cladonioidésine
Se2 = Atranol	Se13 = Strepsiline
Se3 = Acide lobarique	Se15 = Orsellinate de méthyle
Se4 = Acide stictique	Se16 = Méthyl-8-sakisacaulon A
Se5 = Sakisacaulon A	Se18 = Acide norlobarique
Se6 = Lobarine	Se19 = Haematommate de méthyle
Se7 = Anhydro-sakisacaulon A	Se20 = Sakisacaulon A estérifié en C-7
Se8 = 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3 <i>H</i>)-isobenzofurane	Se21 = méthyle-3'-lecanorate de méthyle
Se9 = Isidiophorine	

L'identification structurale de ces composés est détaillée ci-après. Ils seront présentés selon leurs groupes structuraux. Tous les détails concernant chaque molécule (structure, aspect, R_f , point de fusion, MS, spectres UV et IR, RMN ^1H et ^{13}C) figurent dans la partie expérimentale et en annexe.

3.1 Depsides et dérivés

3.1.1 Composé SeA

Le composé **SeA**, présent dans les précipités A et B, a été obtenu par précipitation à température ambiante à partir de l'extrait *n*-hexane et acétone. Il a été isolé en grande quantité dans le lichen puisqu'à partir des précipités et des isolements, 6,2 g ont été obtenus ce qui représente au moins 2,07 % du poids sec du lichen. Son comportement en CCM indique qu'il s'agit d'un composé très apolaire. Sa réaction à l'anisaldéhyde sulfurique donne une couleur rouge caractéristique de nombreux depsides. Son ion moléculaire m/z 397,0899 $[\text{M}+\text{Na}]$ observé sur le spectre de masse haute résolution nous indique que le composé a pour formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$. Les données bibliographiques sur le genre *Stereocaulon* laissent à penser

qu'il s'agit du depside atranorine. Cela a été confirmé par son spectre RMN ^1H qui est en tout point comparable à celui de l'**atranorine** (Fig. 34).

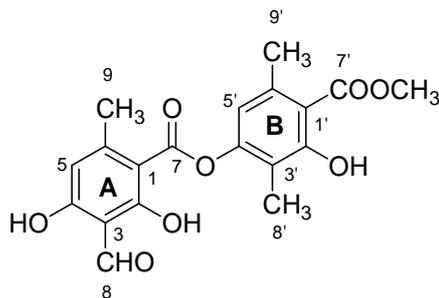


Figure 34 : Structure de l'atranorine (SeA)

3.1.2 Composé Se11

Le composé **Se11** (5 mg) a été isolé à partir de l'extrait acétone et provient de la fraction Ac3c obtenue après avoir purifié par chromatographie flash sur phase inverse le surnageant Ac3. Il apparaît sous forme d'une poudre blanche. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en électrospray met en évidence l'ion moléculaire $[\text{M-H}]^-$ à m/z 389,0881 correspondant à la formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_9$. La pulvérisation de son spot en CCM par l'anisaldéhyde sulfurique donne une couleur rouge qui fait penser à un depside.

La comparaison du spectre RMN ^1H avec celui de l'atranorine montre une similitude concernant deux protons aromatiques, un méthoxyle, trois fonctions méthyliques aromatiques et trois fonctions hydroxyles à δ 10.58, 15.07 et 15.85 ppm. Cependant, on note l'absence d'un proton à 10.25 ppm comparativement l'atranorine. Le spectre RMN ^{13}C indique la présence d'un carbone à 174,8 ppm caractéristique d'une fonction carboxylique au lieu d'une fonction aldéhydique pour l'atranorine.

L'expérience HMBC nous permet d'attribuer la position de chacun des substituants. Pour le noyau B, le proton méthylique à 2,06 ppm corrèle avec les carbones C-2' (δ 157,68), C-3' (δ 116,3) et C-4' (δ 152,1) (Fig. 35) et le proton méthylique à 2,37 ppm corrèle avec les carbones C-1' (δ 114,1), C-5' (δ 115,9) et C-6' (δ 136,4). Le proton aromatique à 6,60 ppm corrèle avec les carbones C-1' (δ 114,1) ; C-3' (δ 116,3) ; C-4' (δ 152,1) et C-9' (δ 21,2). Pour le noyau A, les protons méthyliques à 2,27 ppm corrèlent avec les carbones à C-1 (δ 108,9) ; C-5 (δ 107,1) et C-6 (δ 141,0) du noyau A (Fig. 35). Le proton aromatique (δ 6.06) corrèle avec les carbones à C-1 (δ 108,9) ; C-3 (δ 101,7) ; C-4 (δ 167,1) ; C-9 (δ 20,3) et C-7 (δ 165,4). Les fonctions hydroxyles (δ 15,07 et 15,85) sont présentes sur le même noyau puis

des corrélations entre le proton hydroxyle à 15,85 ppm avec les carbones C-1 (δ 108,9) ; C-2 (δ 162,3) et C-3 (δ 101,7) sont observées. De même, il existe des corrélations entre le proton hydroxyle à 15,07 ppm avec les carbones C-3 (δ 101,7) ; C-4 (δ 164,1) et C-5 (δ 107,1) (Fig. 35). Ces analyses nous permettent de proposer les deux structures ci-dessous pour le composé Se11 (Fig. 35):

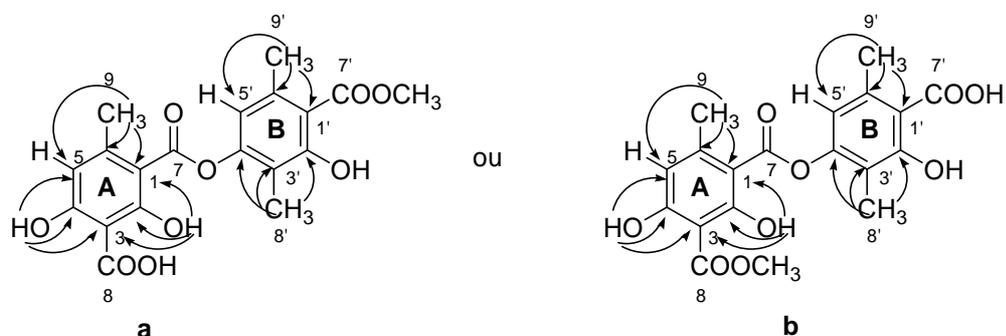


Figure 35 : Corrélations proton-carbone longue distance du composé Se11

Le spectre NOESY permet de confirmer la position de la fonction méthoxylique en C-7' et non en C-8 car un effet NOE est présent entre OCH₃-7' (δ 3.88) et H-9' (δ 2.37) (Fig. 36).

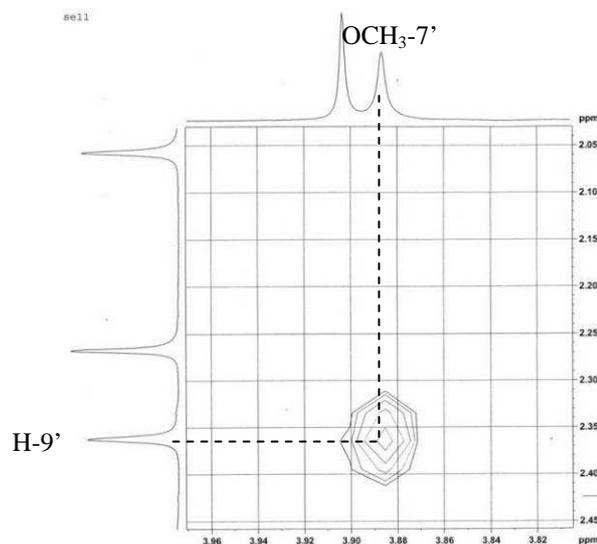


Figure 36 : Corrélation NOE du composé Se11 (Cladonioidésine) (DMSO-d₆, 400 MHz)

Tous ces déplacements et attributions semblent correspondre à un composé isolé chez le lichen *Lethariella cladonioides* dont les analyses bidimensionnelles n'avaient pas été réalisées sur le composé isolé [157]. Il s'agit de la **cladonioidésine** (Fig. 35a) isolée ici pour la première fois dans le genre *Stereocaulon*.

3.1.3 Composé Se10

Le composé **Se10** (8 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche à partir de la fraction moyennement polaire Ac3k obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3. La pulvérisation de l'anisaldéhyde sulfurique donne une couleur rose-violette peu commune parmi les composés déjà isolés au laboratoire.

Son spectre de masse haute résolution obtenu par ionisation en électrospray en mode négatif donne une formule brute $C_{22}H_{22}O_8$ avec comme ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 413,1239, ce qui porte à 12 le nombre de degrés d'insaturation. Son spectre RMN 1H montre la présence de quatre fonctions méthyliques aromatiques à 1,99 ; 2,28 ; 2,34 et 2,56 ppm et un signal méthyl plus déblindé à 3,89 ppm correspondant à la présence d'une fonction méthoxylique. Deux singulets à 6,50 et 6,76 ppm indiquent la présence de deux hydrogènes portés par deux noyaux aromatiques. Deux doublets à 7,18 et 7,85 ppm avec la même constante couplage ($J = 16,5$ Hz) suggèrent la présence d'une double liaison portant deux hydrogènes en position "trans" l'un de l'autre. Trois protons hydroxyles aromatiques ont été observés à 10,52, 11,50 et 12,04 ppm. Ces données RMN font penser que le composé **Se10** pourrait être un depside.

Les analyses RMN bidimensionnelles sont réalisées en vue de confirmer la structure de ce composé. L'expérience HMBC nous permet d'attribuer chacun des substituants sur chacun des noyaux et montre tout d'abord que le noyau B porte les mêmes substituants que ceux retrouvés pour l'atranorine et la cladonioidésine.

Pour le noyau A, les protons méthyliques à 2,56 ppm (H-12) corrélient avec les carbones C-1 (δ 104,1) ; C-5 (δ 111,6) et C-6 (δ 144,3) tandis que les protons méthyliques à 2,28 (H-11) ppm corrélient avec les carbones C-9 (δ 128,7) et C-10 (δ 198,5). Le proton aromatique δ 6,50 (H-5) ppm corréle avec les carbones C-1 (δ 104,1) ; C-3 (δ 107,5) ; C-4 (δ 162,6) et C-12 (δ 23,9). Des corrélations entre le proton hydroxyle aromatique à 12,04 ppm (OH-2) avec les carbones C-1 (δ 104,1) ; C-2 (δ 163,7) et C-3 (δ 107,5) sont également observées. Par rapport aux autres depsides présentés précédemment, deux hydrogènes à 7,18 et 7,85 ppm sont présents. Le proton à 7,18 ppm (H-9) corréle avec les carbones C-11 (δ 27,5) ; C-3 (δ 107,5) et C-10 (δ 198,5) tandis que le proton à 7,85 ppm (H-8) corréle avec les carbones C-2 (δ 163,7) ; C-4 (δ 162,6) ; C-9 (δ 128,7) et C-10 (δ 198,5) (Fig. 37).

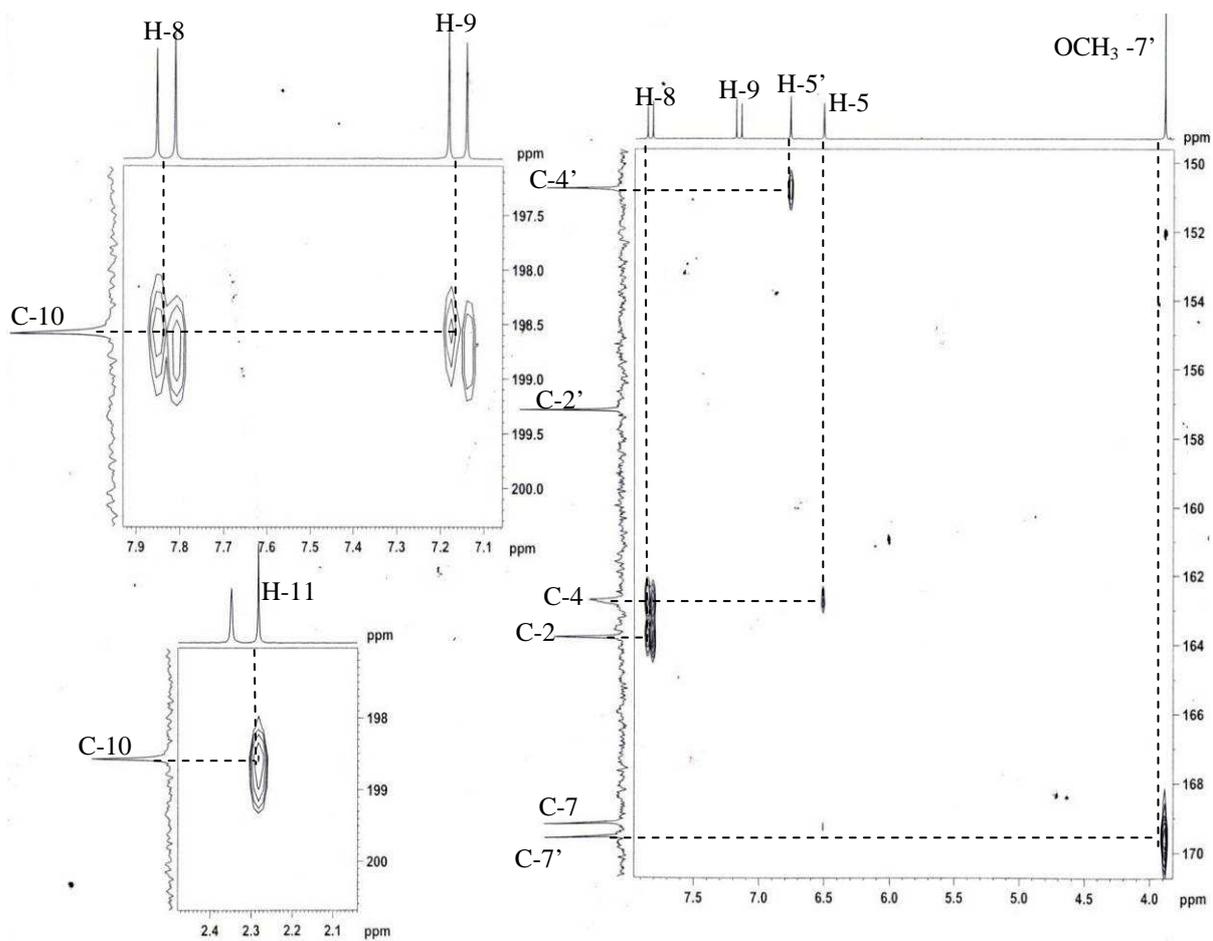
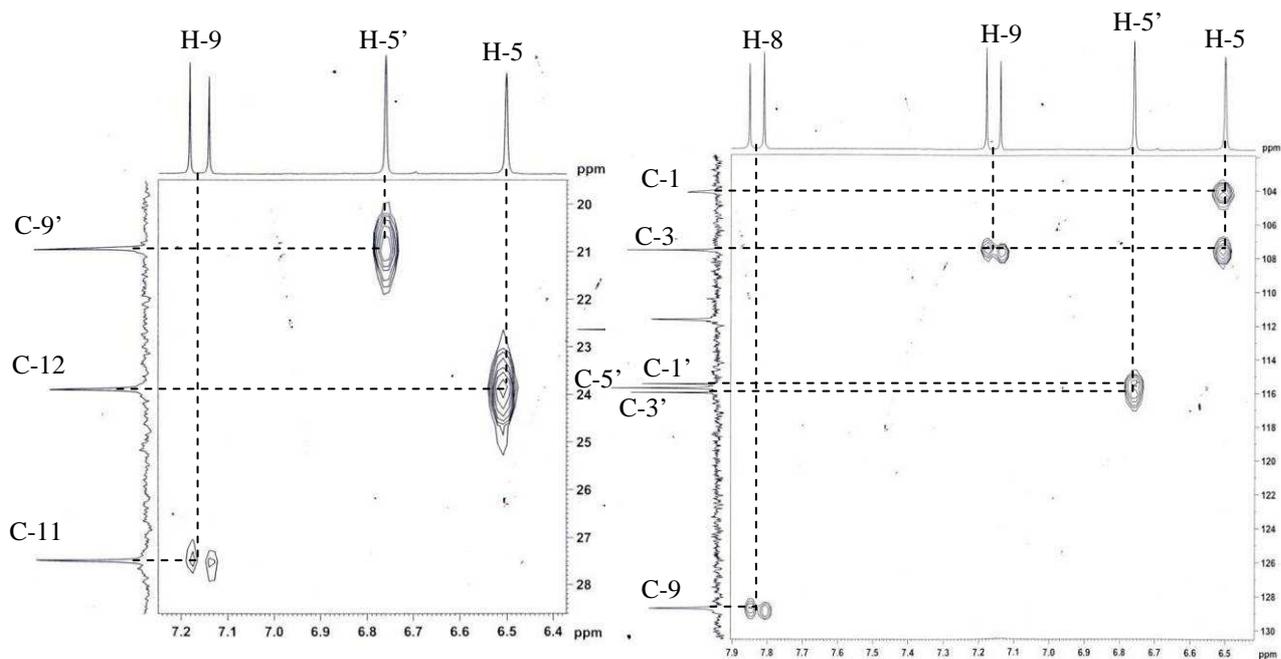


Figure 37: Agrandissement des parties du spectre HMBC (100 MHz, DMSO-*d*₆) du composé Se10

L'expérience RMN ^1H - ^1H COSY confirme la corrélation du proton à 7,18 ppm avec celui à 7,85 ppm dont la constante de couplage est $J = 16,5$ Hz. On confirme ainsi la substitution du C-8 par une chaîne latérale vinylméthylcétone dont les deux protons sont en position trans.

L'ensemble de ces données RMN confirme que le composé Se10 est un nouvelle depside, **(E)-[3-hydroxy-4-(methoxycarbonyl)-2,5-dimethylphenyl]-2,4-dihydroxy-6-methyl-3-(3-oxo-but-1-én-yl) benzoate** ou **acétocladonioidésine** (Fig. 38).

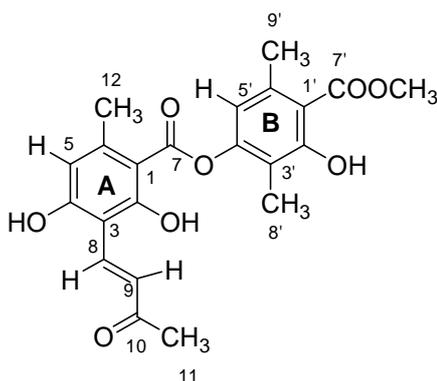


Figure 38 : Structure du composé Se10 (acétocladonioidésine)

3.1.4 Composé Se21

Le composé **Se21** (21 mg) a été isolé sous forme de cristaux blancs à partir de la fraction la plus polaire Ac3k obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3. Sa formule brute, déterminée par la mesure de la masse en haute résolution par impact électronique, correspond à $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$. La coloration de son spot en CCM après pulvérisation de l'anisaldéhyde sulfurique donne la même couleur rouge que celle obtenue avec les deux depsides atranorine et cladonioidésine. Cela nous mène à penser que le composé **Se21** est un depside.

En RMN ^1H , nous retrouvons les signaux caractéristiques des trois fonctions méthyliques aromatiques à 2,10, 2,54 et 2,65 ppm accompagnés du groupement méthoxyle à 3,99 ppm ainsi que les trois singulets à 5,47, 11,43 et 11,96 ppm signalant la présence de trois fonctions hydroxyles aromatiques. Cependant, au lieu des deux protons aromatiques retrouvés pour l'atranorine et la cladonioidésine, trois protons aromatiques apparaissent sous la forme d'un doublet à 6,33 ppm ($J = 2,58$ Hz) intégrant pour deux protons et d'un singulet à 6,53 ppm intégrant pour un proton.

La perte en masse de 28 Daltons, m/z 345,0979 $[M-H]^-$, correspondant à 1 CO et les données RMN nous orientent vers un depside dont le proton aromatique remplace la fonction aldéhydique de l'atranorine et la fonction carboxylique de la cladonioidésine. L'analyse bidimensionnelle HMBC permet de montrer que les déplacements des signaux est similaire en ce qui concerne le noyau B par rapport à la cladonioidésine et l'atranorine. Pour le noyau A, les protons méthyliques à 2,64 ppm corrélient avec les carbones C-1 (δ 104,5) ; C-5 (δ 111,9) et C-6 (δ 144,4). L'un des protons aromatiques à δ 6,33 ppm (H-3) corréle avec les carbones C-1 (δ 104,5) ; C-2 (δ 166,3) ; C-4 (δ 161,1) et C-5 (δ 111,9) tandis qu'un autre à δ 6,33 ppm corréle avec les carbones C-1 (δ 104,5) ; C-4 (δ 161,1) et C-8 (δ 24,6). Des corrélations entre le proton hydroxyle aromatique à 11,43 ppm avec les carbones C-1 (δ 104,5) ; C-2 (δ 166,3) ; C-3 (δ 101,5) et C-4 (δ 161,1) sont observées ce qui suggère une position sur le même noyau.

Toutes les données sont comparables à celles décrites dans la littérature pour **méthyl-3'-lécanorate de méthyle** (Fig. 39). Il fut isolé à partir du lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach avec une identification vérifiée par synthèse [158].

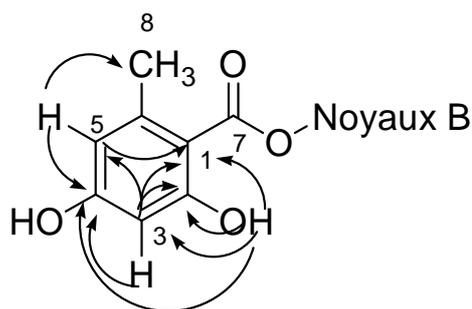


Figure 39 : Corrélations proton-carbone longue distance du composé Se21 (3'-méthyllécanorate de méthyle)

Ce type de composé est thermolabile et se dégrade sous l'influence de la chaleur, ou bien au contact du méthanol ou de la silice pour donner deux noyaux orcinol et β -orcinol. Ce phénomène de dégradation rend l'obtention et l'identification de ces depsides très délicate.

3.1.5 Composé Se1

Le composé **Se1** (159 mg) a été isolé sous forme de cristaux blancs à partir de la fraction moyennement polaire Ac3d obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en impact électronique, met en évidence l'ion moléculaire à m/z 219,0630 ($[M+Na]^+$), d'où la formule brute $C_{10}H_{12}O_4$. Une couleur rouge près pulvérisation de l'anisaldéhyde sulfurique est obtenue. Le spectre RMN 1H enregistré dans le $CDCl_3$ montre la

présence de deux fonctions méthyliques accompagnées d'une fonction méthoxylique (δ 3,93 ppm) et d'un proton aromatique ($\delta = 6,22$). La RMN ^{13}C confirme la présence de deux carbones portant les groupements méthyles à 7,64 et 24,0 ppm, un groupement méthoxy à 51,8 ppm et surtout une fonction carbonyle à 172,5 ppm. Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux d'un composé monoaromatique très fréquemment retrouvé dans les lichens **le β -orcinol carboxylate de méthyle (MOC)** (Fig. 40) [18].

3.1.6 Composé Se15

Le composé **Se15** (6 mg) obtenu sous forme cristaux blancs à partir de la même fraction que celle qui a permis l'obtention de Se1 et Se2 possède comme formule brute $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ d'après son spectre de masse haute résolution obtenu en impact électronique en mode négatif ($[\text{M}-\text{H}]^-$ à 181,0507). Sur le spectre RMN ^1H , un des groupements méthyle de Se1 à 2,11 ppm est manquant et est remplacé par un proton aromatique à 6,28 ppm couplé avec le proton aromatique H-5 à 6,24 ppm. En comparant ces données spectrales avec celles de la littérature [18], nous confirmons qu'il s'agit de **l'orsellinate de méthyle** (Fig. 40).

3.1.7 Composé Se2

Le composé **Se2** (10 mg) a été obtenu sous forme d'aiguilles jaunes à partir de la même fraction que celle qui a permis l'obtention de Se1. Le spectre de masse haute résolution obtenu par électrospray de ce composé fait apparaître un ion moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 175,0373 correspondant à la formule brute $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. En RMN ^1H , nous observons des signaux caractéristiques d'une fonction méthylique aromatique à 2,23 ppm accompagnée de la présence d'un groupement aldéhyde à 10,27 ppm. Le singulet à 6,26 ppm intégrant pour deux protons indique la présence deux protons aromatiques tandis que la présence d'un singulet à 10,69 ppm intégrant pour deux protons évoque la présence de deux fonctions phénoliques. Le spectre RMN ^{13}C confirme la présence d'un carbone portant un groupement méthyle à 22,2 ppm, deux groupements hydroxyles à 163,0 ppm et surtout d'une fonction carbonyle à 194,1 ppm. Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux décrits dans la littérature pour **l'atranol** (Fig. 40) [18].

3.1.8 Composé Se19

Le composé **Se19** (14,5 mg) a été isolé sous forme cristaux blancs à partir de la fraction moyennement polaire Ac3i obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3. L'examen du spectre RMN ^1H et ^{13}C et la comparaison

des données spectrales avec celles de la littérature [159] nous permet d'affirmer que le composé **Se19** est un autre monoaromatique, l'**haematommate de méthyle** (Fig. 40).

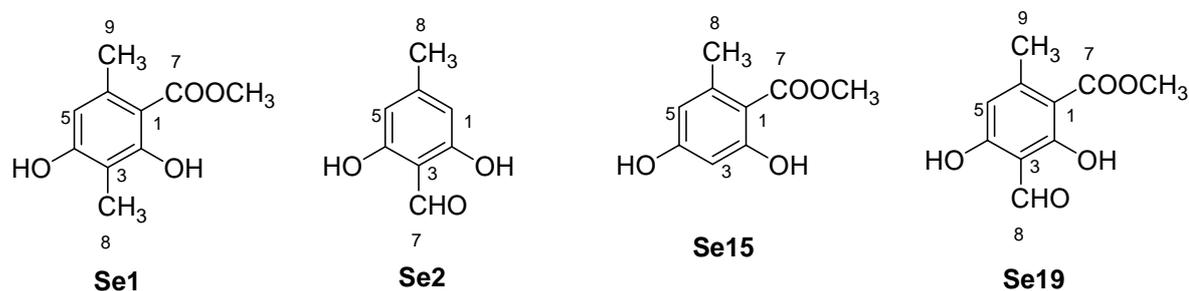


Figure 40 : Structure des composés Se1 (MOC), Se2 (Atranol), Se15 (Orsellinate de méthyle) et Se19 (Haematommate de méthyle)

La co-existence de quatre composés monoaromatiques et de deux depsides, atranorine et méthyl-3'-lécanorate de méthyle, n'est pas surprenante et leur présence peut être expliquée de deux façons. D'une part, ces depsides pourraient se décomposer pour donner les composés monoaromatiques sous l'influence de la température ou sous l'action de solvants alcooliques (méthanol, éthanol) [160,161]. De cette façon, l'atranorine en se dégradant peut générer le MOC, l'haematommate de méthyle (HM) et l'atranol (Fig. 41) [160].

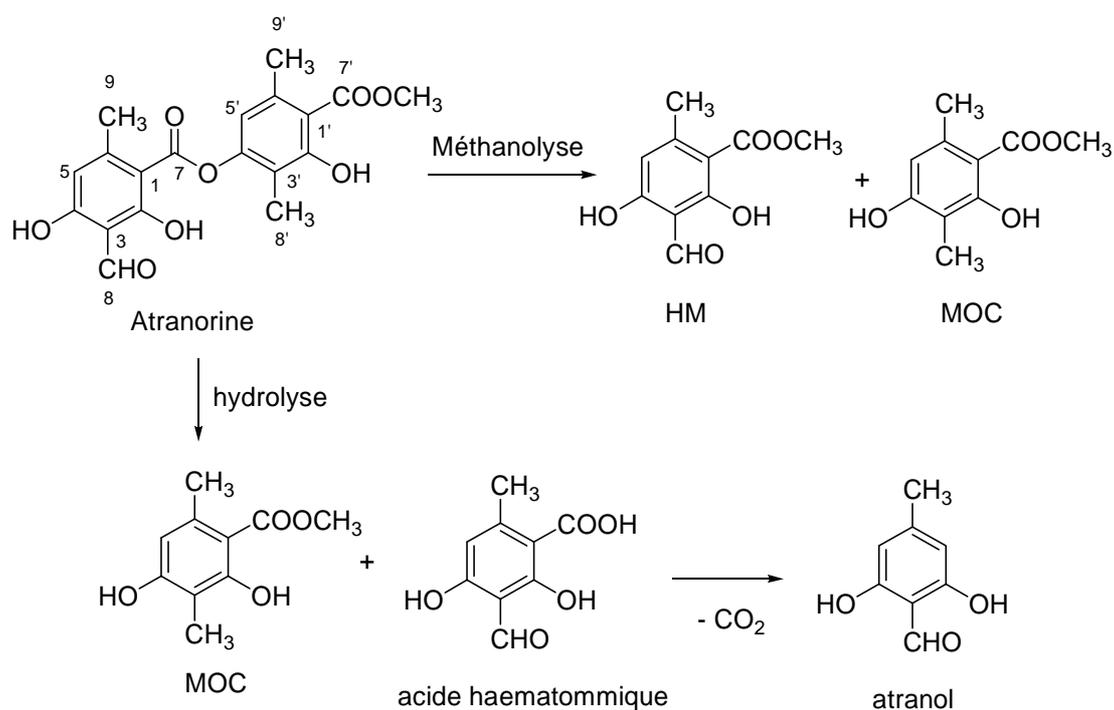


Figure 41: Dégradation de l'atranorine

L'existence de l'orsellinate de méthyle peut être expliquée par la dégradation du méthyl-3'-lécanorate de méthyle (Fig. 42).

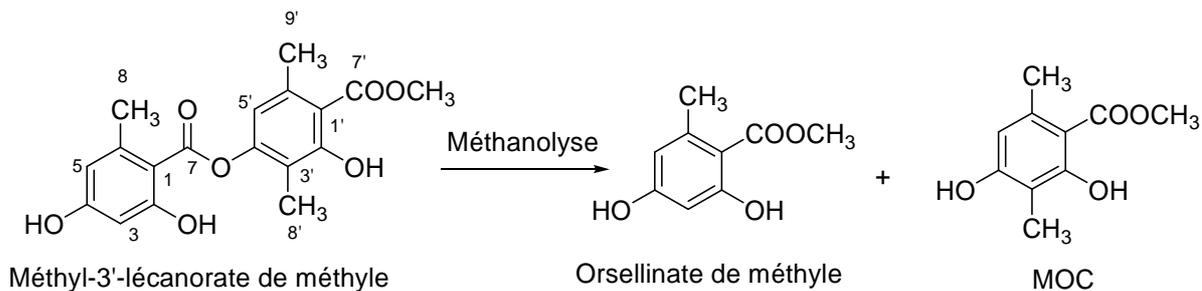


Figure 42 : Dégradation du méthyl-3'-lécánorate de méthyle

D'autre part, ces composés monoaromatiques peuvent également être considérés comme des précurseurs de la biogénèse des depsides. Par exemple, en 2003, Vicente [162] a montré qu'une oxydase était impliquée dans l'oxydation du groupe méthyle en C-3 de l'acide β -orsellinique en un groupe hydroxyméthyle. De même, une alcool déshydrogénase a été décrite pour son implication dans la conversion de la fonction hydroxyméthyle en aldéhyde conduisant alors à la formation de l'acide haematommique, noyau A de l'atranorine (Fig. 43). L'oxydation de la fonction acide β -orsellinique peut se produire avant ou après la formation de la liaison ester aboutissant à la synthèse d'un depside.

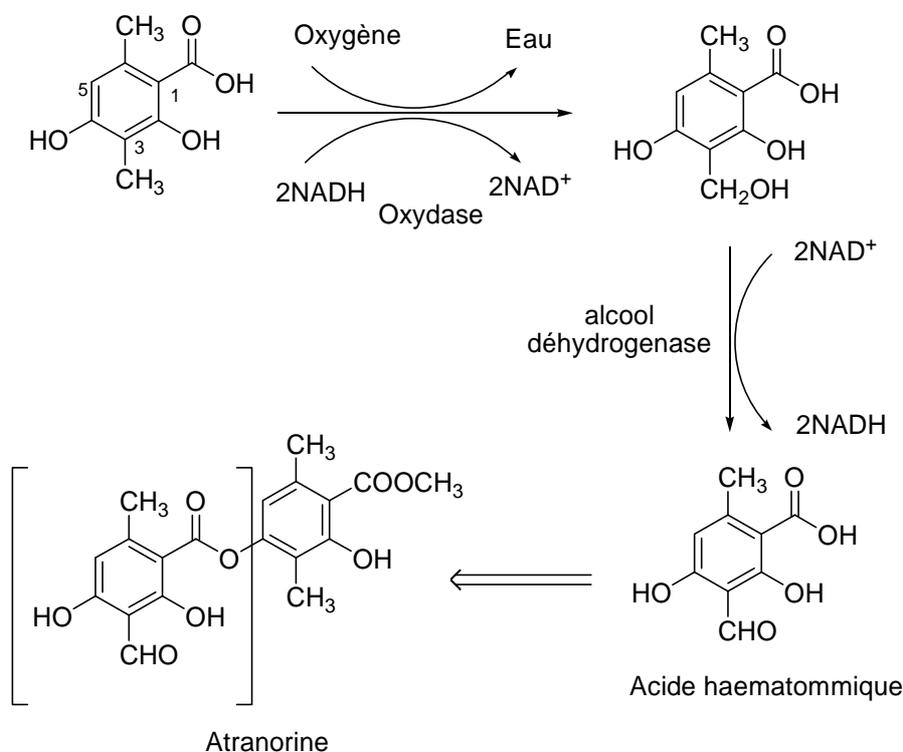
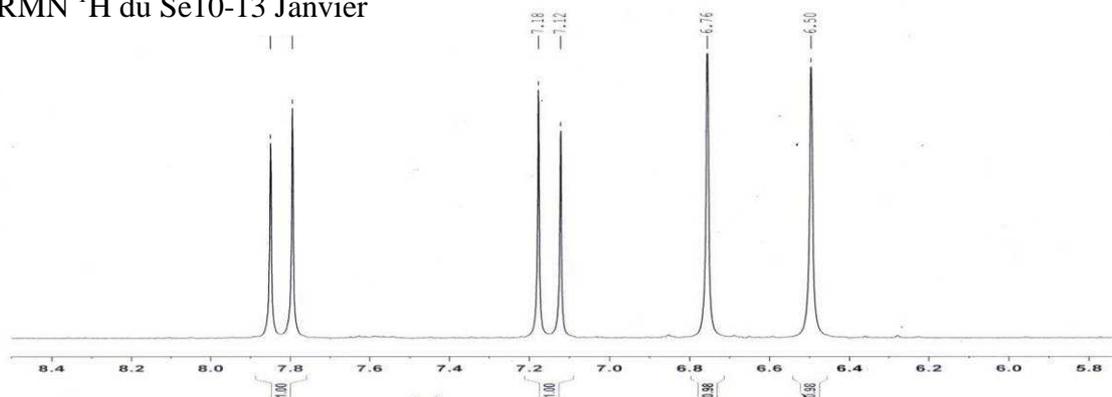


Figure 43 : Biosynthèse de l'acide haematommique et son incorporation dans l'atranorine.

Le depside **Se10** s'est révélé instable dans les solvants tels que le DMSO, l'acétonitrile, le THF. Nous avons observé sa dégradation en spectroscopie RMN¹H afin de comprendre son mécanisme de dégradation. De nouveaux signaux apparaissent au bout d'un mois (Fig. 44).

RMN ¹H du Se10-13 Janvier



RMN ¹H du Se10-12 Février

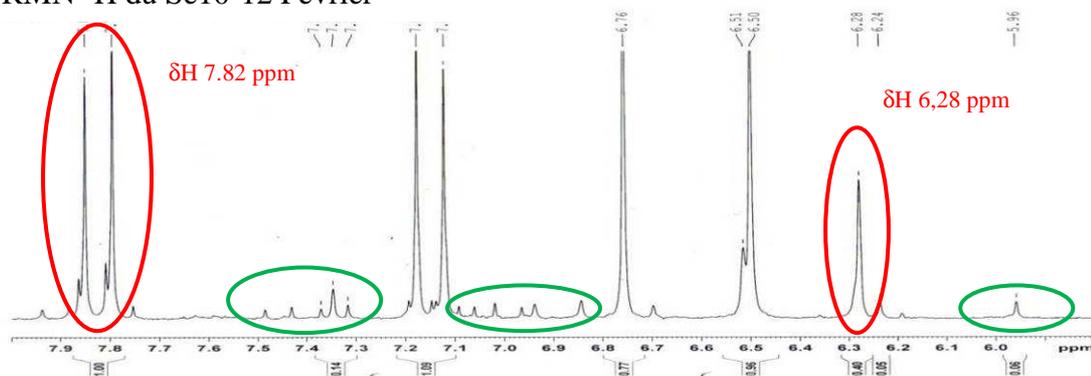


Figure 44: Aggrandissement d'une partie du spectre RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) du composé Se10 au 13 Janvier et 12 Février (en rouge : pics utilisés pour calculer le ratio entre un composé de dégradation et le composé initial se10)

Le pic à δ_H 6,28 ppm caractéristique d'un hydrogène aromatique est apparu de manière très distincte lors de la dégradation. Nous avons donc fait un ratio entre l'aire sous le pic à δ_H 6,28 ppm et δ_H 7,82 ppm, caractéristique du proton appartenant à **Se10**. D'après ces résultats, 40 % du depside **Se10** s'est dégradé à après un mois dans le DMSO-*d*₆ (Fig. 45).

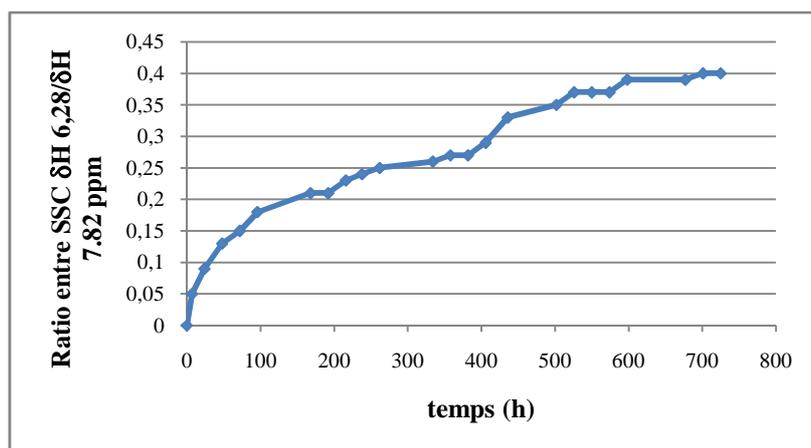


Figure 45: Cinétique de dégradation du composé Se10 dans le DMSO après 1 mois (réalisée à partir du calcul du ratio entre SSC δH 6.28 ppm / δH 7.82 ppm)

La différence entre trois depsides isolés à partir de ce lichen : atranorine, méthyl 3'-lécanorate de méthyle **Se21** et l'acétocladonioidésine **Se10** correspond à des variations dans le degré d'oxydation du substituant en C-3 : CHO, H, CH=CH-CO-CH₃, respectivement. C'est pourquoi, nous proposons comme hypothèse pour une dégradation du composé **Se10** dans le DMSO deutéré, une rupture de la liaison ester afin de former des unités correspondantes comme atranorine et méthyl 3'-lécanorate de méthyle (Fig. 46).

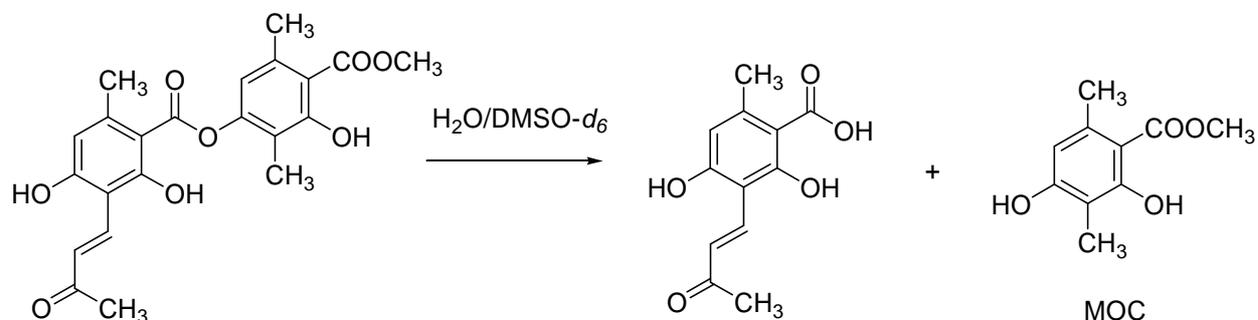


Figure 46: Dégradation du composé Se10 dans le DMSO deutéré

Pour confirmer cette hypothèse, le mélange dans le tube contenant le **Se10** dégradé a été évaporé à sec et soumis une analyse de la spectrométrie de masse en mode négatif. Les pics moléculaires obtenus à m/z 235 et 195 uma sont en faveur de l'hypothèse proposée. Nous avons aussi obtenu d'autres pics à m/z 427 et 219 uma correspondant à la formule brute C₂₂H₂₀O₉ et C₁₁H₇O₅, respectivement (Fig. 47).

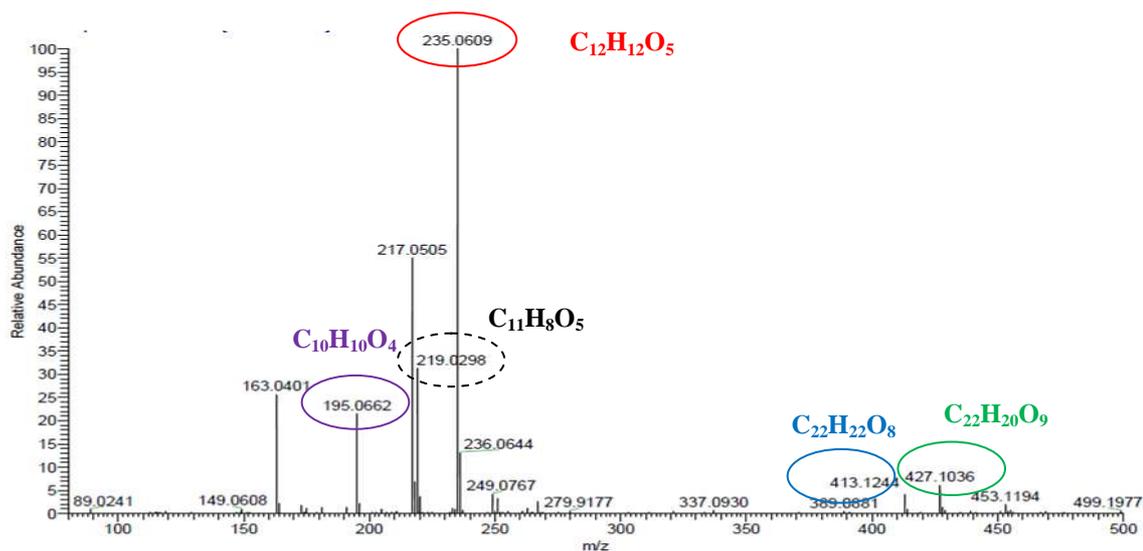


Figure 47: Spectrométrie de masse du composé **Se10** dégradé en mode négatif

Ainsi, le composé **Se10** s'est dégradé dans le DMSO deutéré en formant au moins 4 produits. Notons que l'ion m/z 413 correspondant à la formule brute du composé **Se10** présentait une intensité très faible tandis qu'il était seulement dégradé au bout d'un mois à 40 % en fonction de son spectre RMN. La fragmentation MS^2 de ce pic a montré un ion à m/z 217 uma très important (Annexe 4). Cela confirme à nouveau la fragilité de ce composé. Les fragmentations correspondent à la perte d'un C₁₀H₁₁O₃ et H₂O soit successivement, soit simultanément (en bleu sur Fig. 49). Les fragmentations de l'ion pseudomoléculaire m/z 235 uma par déshydratation (m/z 217 uma), par décarboxylation (m/z 173 uma) et la perte d'un groupe H₂C=C=O (en rouge sur Fig. 49) permettent d'affirmer que le composé **Se10** est hydrolysé par l'eau dans le DMSO pour donner deux composés correspondants. Ainsi, le deuxième noyau du composé **Se10** correspond l'ion pseudomoléculaire à m/z 195 uma et ses fragmentations (en violet sur Fig. 49). Pour l'ion m/z 219 uma correspondant à la formule brute C₁₁H₈O₅ et à partir de la base de composé du départ **Se10**, nous avons construit une structure pour l'ion à 220 uma. Il semble qu'il se soit formé par une coupure au niveau de l'ester, puis la perte d'un radical méthyle et une cyclisation intramoléculaire (Fig. 48).

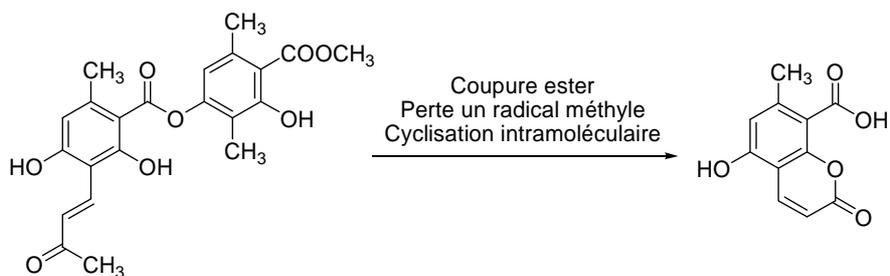


Figure 48: Hypothèse proposée pour l'ion pseudomoléculaire correspondant à la formule brute $C_{11}H_8O_5$

L'ion pseudomoléculaire à m/z 219 uma conduit à 3 fragments correspondant à une décarboxylation (m/z 175 uma) puis par une perte d'un groupe carbonyle CO (m/z 147 uma) et par double décarboxylation (m/z 131 uma) (en noir sur Fig. 49). Une formule brute $C_{22}H_{20}O_9$ est proposée pour l'ion pseudomoléculaire à m/z 427 uma. Malheureusement, nous n'avons pas pu proposer une structure pour cet ion. C'est une des raisons pour laquelle nous avons présenté des fragments issus de cet ion pseudomoléculaire sous forme de formules brutes (en vert sur Fig. 49).

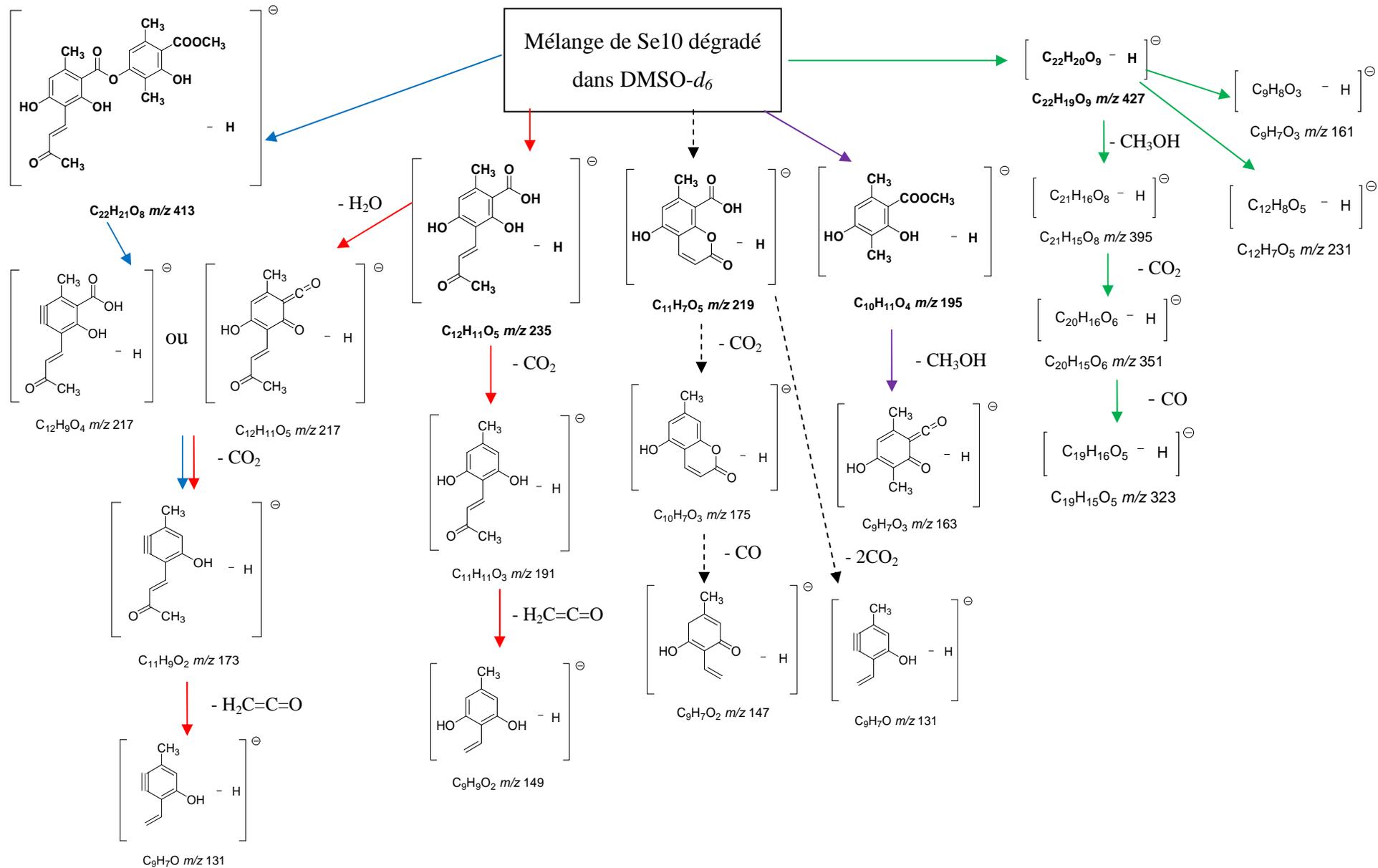


Figure 49: Schéma général de fragmentation des composés de Se10 dégradé

Le composé **Se10** diffère de l'atranorine par la présence d'une chaîne vinylméthylcétone et laisse supposer que ce produit pourrait être formé lors de la macération du lichen *S. evolutum* dans l'acétone. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse LC-MS a été réalisée sur un extrait fraîchement préparé de *S. evolutum* ainsi que sur un extrait réalisé dans l'acétate d'éthyle. Le composé **Se10** a été retrouvé dans l'extrait acétone mais pas dans l'extrait acétate d'éthyle (Fig. 50). De plus, l'atranorine macéré trois mois dans l'acétone n'a pas permis de détecter **Se10**. Ainsi ce composé est certainement formé lors de l'étape d'extraction en présence de tous les composés de l'extrait lichénique et du lichen lui-même.

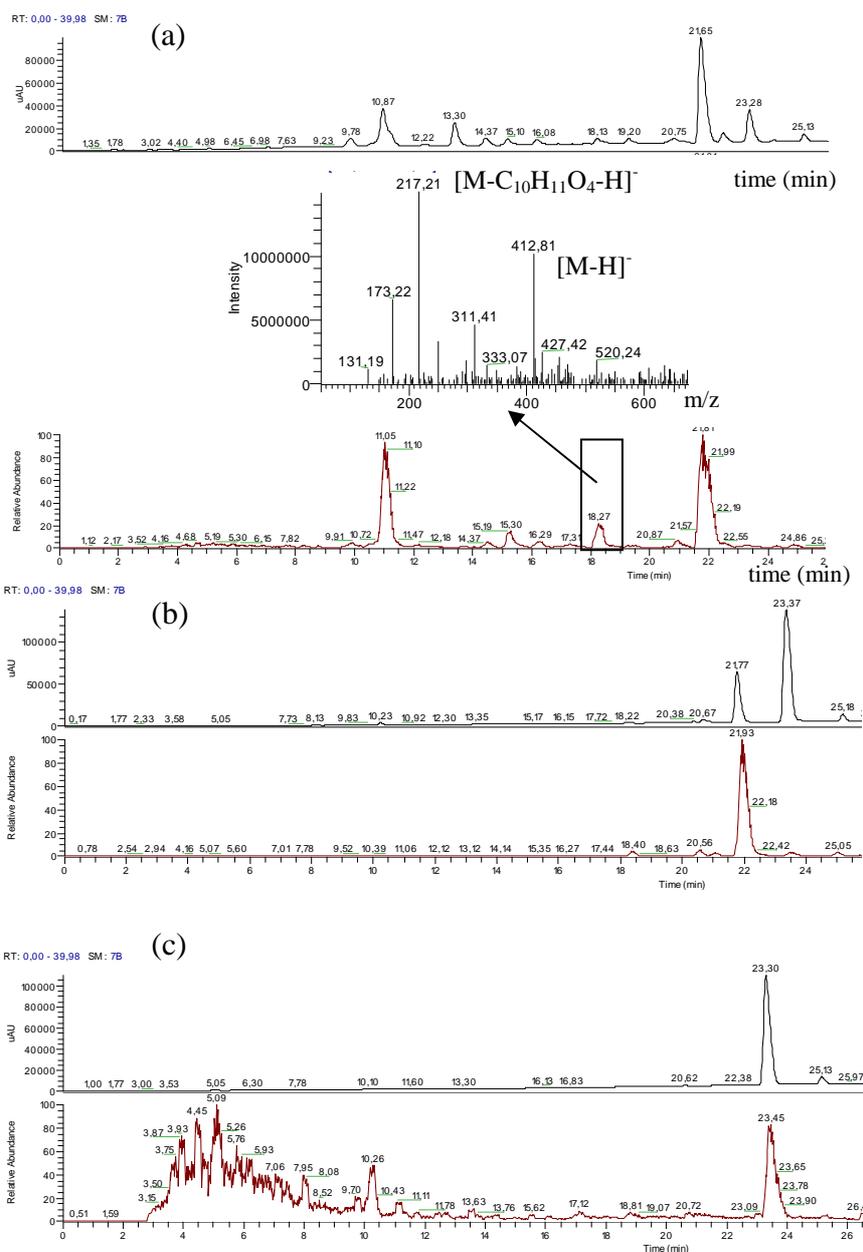


Figure 50: Analyses LC-MS pour détecter le composé Se10 (Rt = 19.48 min): PDA chromatogrammes (total scan à $\lambda = 220-600$ nm), chromatogrammes base-peak et spectres MS de l'extrait acétone (a), de l'extrait acétate d'éthyle (b) et d'une solution d'atranorine pure macérée dans l'acétone pendant trois mois (c)

3.2 Depsidones et diphényléthers

3.2.1 Composé Se4

Le composé **Se4** (25 mg) a été isolé à partir du précipité Ac2c issu de l'extrait acétone, sous la forme d'une poudre blanche amorphe. Après pulvérisation de l'anisaldéhyde sulfurique, la coloration de son spot sur silice est jaune. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution par électrospray en mode négatif a permis de déduire une formule brute correspondant à $C_{19}H_{13}O_9$ avec un ion moléculaire à m/z 385,0566 $[M-H]^-$. En RMN 1H , nous observons les signaux caractéristiques de deux fonctions méthyliques aromatiques à 2,08 et 2,21 ppm et le signal d'une fonction méthoxylique à 3,92 ppm. Le singulet à 7,10 ppm indique la présence d'un hydrogène porté par un noyau aromatique. Deux doublets à 6,62 et 8,20 ppm dont les constantes de couplage sont de 8,2 et 7,7 Hz, respectivement, suggèrent l'existence d'un noyau lactonique dans la structure de ce composé. Enfin, deux singulets à 10,18 et 10,47 ppm signent la présence d'une fonction aldéhydique et d'une fonction hydroxylique ou bien de deux fonctions hydroxyliques. En RMN ^{13}C , trois signaux correspondant à une fonction aldéhydique à 186,6 ppm et deux fonctions carbonyles à 160,7 et 162,4 ppm confirment la présence d'un noyau lactone et du pont ester présent dans les depsidones. La comparaison de ces données spectrales avec celles de la littérature [18] nous permet d'identifier sans ambiguïté l'**acide stictique** (Fig. 51) qui est un métabolite retrouvé de façon récurrente dans certains Stéréocaulons.

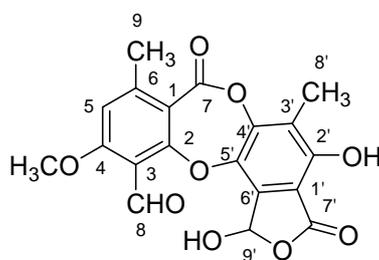


Figure 51 : Structure du composé Se4 (Acide stictique)

3.2.2 Composé Se9

Un précipité sous forme amorphe blanche (7 mg) a été isolé à partir de la fraction moyennement polaire Ac3d obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3 et a conduit après purification sur phase inverse à l'isolement du composé Se9. Ce composé possède comme formule brute $C_{22}H_{18}O_9$ grâce à l'analyse du spectre de masse haute résolution ($[M+Na]^+$ à m/z 449,0845). Le spectre RMN 1H indique la présence de trois groupes méthyliques à 2,20 ; 2,24 et 2,48 ppm accompagnés un méthoxyle à 3,97 ppm, d'un hydrogène aromatique à 7,08 ppm, de deux doublets à 6,50 et

8,06 ppm ayant la constante de couplage de 9,7 et 9,6 Hz, respectivement, d'un singulet à 10,19 ppm caractéristique d'une fonction aldéhydique ou hydroxylique et enfin, de deux doublets à 7,04 et 7,97 ppm dont la constante de couplage est de 22 et 17 Hz, respectivement. Ces données nous orientent vers la structure de l'acide stictique dans laquelle une fonction contenant deux hydrogènes vinyliques et un méthyl remplace l'hydrogène aromatique à 10,47 ppm. Cela nous rappelle aussi la structure de Se10 car la chaîne est la même. Une comparaison des données spectrales des deux composés (Tableau 21), nous confirme que le composé **Se9** est une depsidone, **l'isidiophorine** (Fig. 52).

Tableau 21: Données RMN ¹H et ¹³C des composés Se4 (300 MHz, DMSO-d₆) et Se9 (500 MHz, DMSO-d₆)

Position	Acide stictique (Se4)		Isidiophorine (Se9)	
	RMN ¹³ C (ppm)	RMN ¹ H (ppm) (mult., <i>J</i> in Hz)	RMN ¹³ C (ppm)	RMN ¹ H (ppm) (mult., <i>J</i> in Hz)
1	112.8	-	113.4	
2	166.3	-	159.8	
3	114.4	-	112.5	
4	163.1	-	161.6	
5	113.1	7.10 (1H, s)	112.1	7.08 (1H, s)
6	150.8	-	146.2	
7	160.7	-	161.0	
8	186.6	10.47 (1H, s)	131.7	7.04 (1H, d, 22)*
9	21.5	2.21 (3H, s)	132.6	7.97 (1H, d, 17)*
10			199.1	
11			26.7	2.43 (3H, s)
12			20.9	2,48 (3H, s)
1'	109.1	-	109.0	
2'	151.9	-	151.7	
3'	120.8	-	120.6	
4'	148.0	-	148.0	
5'	137.7	-	137.6	
6'	135.9	-	135.6	
7'	162.4	-	166.1	
8'	9.6	2.08 (3H, s)	9.0	2.20 (3H, s)
9'	95.1	6.62 (1H, d, 8.2)	95.2	6.50 (1H, d, 9.7)
OCH ₃ -4	56.7	3.92 (3H, s)	56.6	3.97 (3H, s)
OH-2'		10.18 (1H, s)		10.19 (1H, s)
OH-9'		8.20 (1H, d, 7.7)		8.06 (1H, d, 9.6)

*La constante couplage devrait être identique entre les protons H-8 et H-9 mais leur déplacement étant proche, il y a une légère superposition des deux pics à l'origine d'un léger décalage de ces constantes de couplage.

L'isidiophorine a été isolée pour la première fois par Bo [163] à partir des extraits acétone du lichen *Lobaria isidiophora* Yoshim, et du lichen *Stereocaulon azureum* [164]. L'isolement de l'isidiophorine dans des extraits acétone contenant de l'acide stictique suggère

que l'isidiophorine pourrait être le résultat d'une réaction de condensation de l'acide stictique avec l'acétone durant l'extraction tout comme **Se10**.

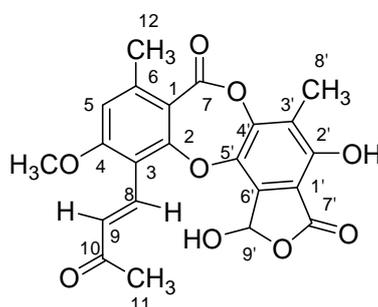


Figure 52 : Structure du composé Se9 (Isidiophorine)

A partir du précipité Ac1 obtenu à partir de la fraction acétone, plusieurs composés de structures proches appartenant à la famille des depsidones mais également des diphenylethers ont été isolés (Se3, Se18, Se5, Se6, Se7, Se8, Se16, Se18 et Se20). La comparaison des données spectrales en RMN des diphenylethers est détaillée dans le Tableau 22.

3.2.3 Composé Se3

Le composé **Se3** est obtenu à partir de la fraction Ac2f par centrifugation après une purification sur colonne en phase inverse du précipité Ac2. Ce composé est le deuxième composé présent en assez grande quantité après l'atranorine puisque 1,2 g ont été isolés. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en électrospray met en évidence l'ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 455,1713 correspondant à la formule brute $C_{25}H_{28}O_8$. La réalisation du spectre RMN 1H indique la présence de longues chaînes aliphatiques (CH_2 et CH_3 aliphatiques entre 0,91 et 3,30 ppm), d'une fonction méthoxylique à 3,98 ppm, de trois protons aromatiques apparaissant sous la forme d'un doublet à 7,00 ppm ($J= 2,2$ Hz) intégrant pour deux protons et d'un singulet à 6,74 ppm intégrant pour un proton. La comparaison des données spectrales (RMN 1D et) avec celles de la littérature [66] nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'un depside, l'**acide lobarique** (Fig. 53), un des trois depsides très répandus dans le genre *Stereocaulon*.

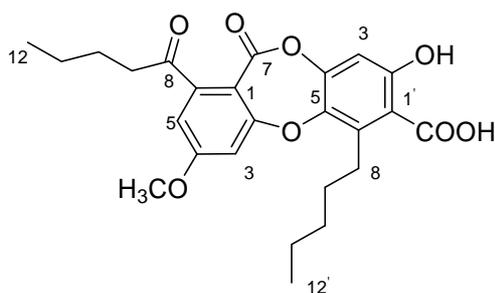


Figure 53 : Structure du composé Se3 (Acide lobarique)

3.2.4 Composé Se18

Issu des mêmes fractions que Se3 (acide lobarique), un composé Se18 (4.0 mg) de formule brute $C_{24}H_{26}O_8$ obtenu après analyse de spectre de masse haute résolution ($[M-H]^-$ à m/z 441,1588) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. En RMN 1H , nous observons des signaux entre 0,88 à 2,78 ppm caractéristiques de longues chaînes aliphatiques, de trois protons aromatiques : deux doublets à 6,77 et 6,86 ppm intégrant un proton et un proton sous forme de singulet à 6,68 ppm. Ces données spectrales nous permettent de penser à une structure similaire à l'acide lobarique, si ce n'est la perte d'une fonction méthoxylique remplacée par un atome d'hydrogène à 11,27 ppm. Les expériences RMN ^{13}C , HSQC-TOCSY et HMBC, ainsi qu'une comparaison de ces données spectrales avec celles de la littérature nous permettent de confirmer notre hypothèse et le composé **Se18** est une depsidone, l'**acide norlobarique** (Fig. 54).

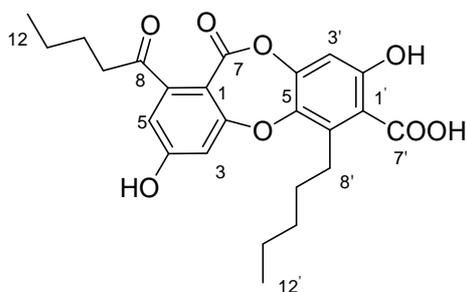


Figure 54 : Structure du composé Se18 (Acide norlobarique)

3.2.5 Composé Se6

Le composé **Se6** (10 mg) a été isolé sous forme d'un solide blanc issu du précipité Ac1 suite à une chromatographie flash (phase inverse), puis une colonne de gel de Séphadex LH-20 et une CCM préparative. L'enregistrement de son spectre de masse haute résolution permet de lui attribuer la formule brute $C_{25}H_{30}O_9$ correspondant à une addition d'eau sur la molécule d'acide lobarique.

Le spectre RMN 1H indique la présence de signaux correspondant à trois protons aromatiques (δ 6,10 ; 6,53 et 6,64 ppm), un groupe méthoxy (δ 3,79) et deux groupes méthyles (δ 0,73 et 0,87). Un signal multiplet à δ 1,14-1,36 correspondant à 10 H de type méthylénique suggère la présence de chaînes aliphatiques. L'expérience RMN 1H - 1H COSY confirme la présence de chaînes latérales butyle (C-9 à C-12) et pentyle (C-8' à C-12'). La RMN ^{13}C montre l'apparition d'un groupe carboxylique à 174,8 ppm. Après une comparaison des données spectrales avec celles de la littérature [165], le composé Se6 est confirmé comme étant un diphenyléther, la **lobarine** (Fig. 55). Précédemment, la lobarine a été isolé à partir du

lichen *S. halei* Lamb, et a été plus particulièrement étudié d'un point de vue structural [165]. Il se présente en effet sous forme de rotamères dont l'analyse RMN des spectres enregistrés à plusieurs températures permet de proposer des structures de conformères qui sont en accord avec des études de modélisation moléculaire faisant essentiellement apparaître 2 conformères dominants, ce qui est confirmé par les enregistrements à 333 K. Nous avons rencontré le même problème et les spectres RMN (1D et 2D) du composé Se6 ont ainsi été enregistrés à 333 K.

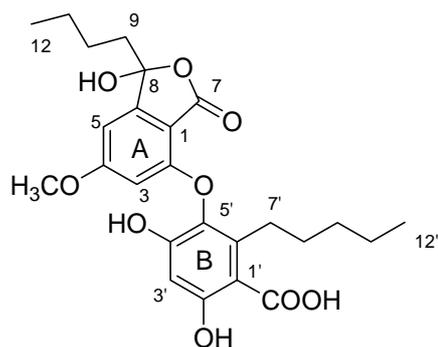


Figure 55 : Structure du composé Se6 (Lobarine)

A partir du filtrat acétonique, nous avons isolé quatre composés proches de la lobarine c'est à dire des diphenyléthers possédant deux groupes butyle et pentyle latéraux présentant des variations dans les fonctions en position C-8 et C-1'.

3.2.6 Composé Se5

Le composé **Se5** (31 mg) a été isolé sous forme d'un solide blanc et est issu de la fraction moyennement polaire de l'extrait Ac1c. Il a une formule brute $C_{24}H_{30}O_7$ basée sur la donnée du spectre de masse en haute résolution à m/z 453,1888 $[M+Na]^+$. Le spectre RMN 1H a montré clairement la présence de quatre doublets à 6,11 ppm ($J = 1,9$ Hz) ; 6,25 ($J = 2,8$ Hz) ; 6,42 ($J = 2,8$ Hz) et 6,64 ($J = 1,9$ Hz) intégrant pour un proton aromatique, d'un groupe méthoxy (δ 3,78 ppm) et deux groupes méthyles (δ 0,80 et 0,90). Deux signaux multiplets à δ 1,52-1,23 ppm et à δ 2,32-2,05 ppm correspondant à 18 H méthyléniques suggèrent la présence de chaînes aliphatiques. Les données de RMN 1H ne pouvaient pas complètement montrer le nombre de protons totaux indiqués dans la formule moléculaire, parce que certains protons échangeables n'ont pas été observés et les protons liés à des chaînes aliphatiques se chevauchaient. Ce phénomène nous rappelle le problème du composé Se6. Après plusieurs spectres RMN à différentes températures et dans différents solvants deutérés, la température 326 K a été sélectionnée pour enregistrer les spectres RMN du composé Se5.

L'analyse du spectre ^1RMN de ce composé nous amène à penser à une structure similaire de la lobarine mais avec perte d'une fonction carboxylique sur le noyau B en position C-1' (Fig. 56).

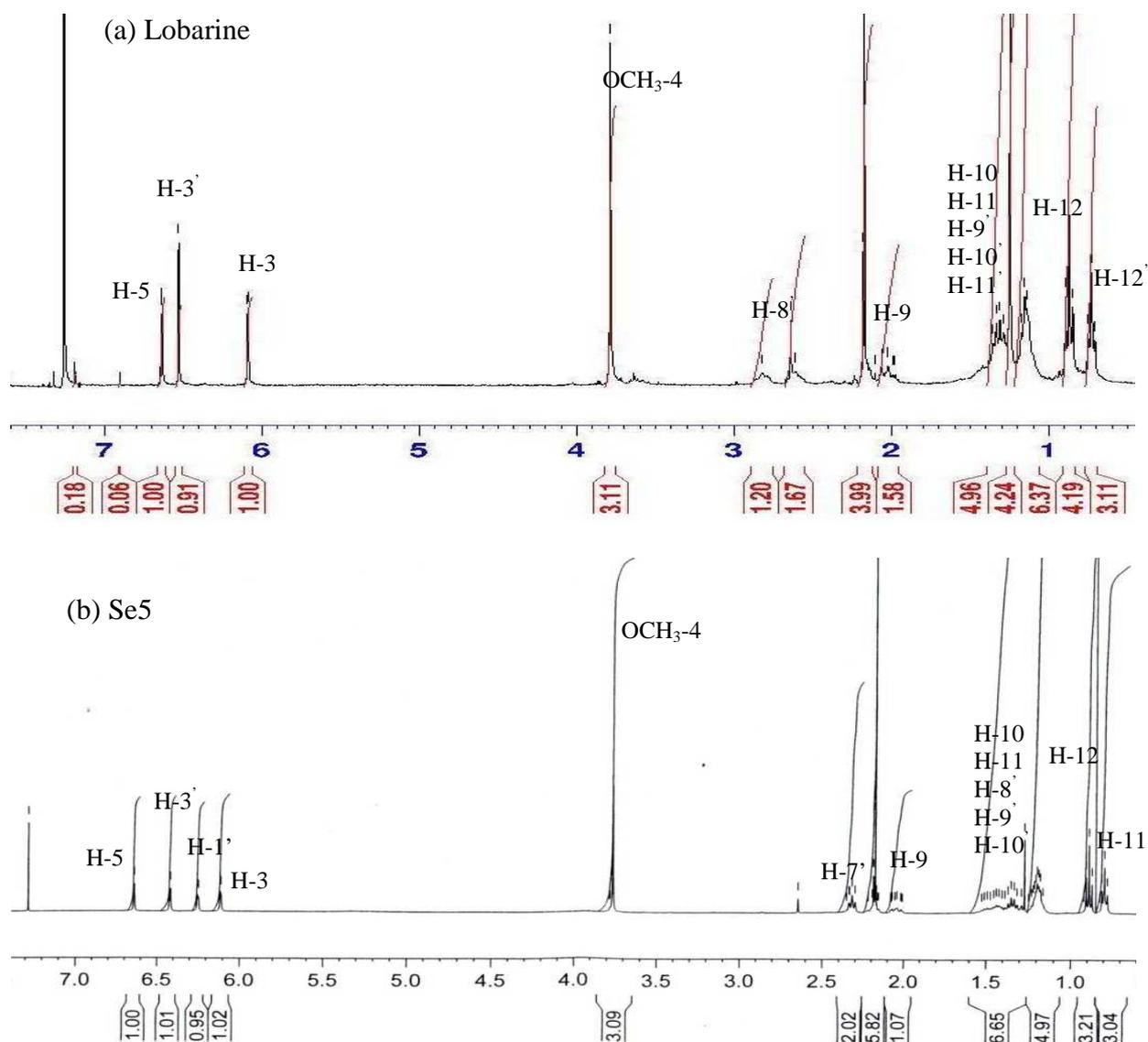


Figure 56 : Spectre RMN ^1H de la lobarine (500 MHz, CDCl_3) et du composé Se5 (400 MHz, CDCl_3)

Cette hypothèse est confirmée par le spectre RMN ^{13}C . Le spectre RMN ^{13}C du composé **Se5** a révélé vingt-quatre signaux de carbone tandis que 25 sont présents pour la lobarine. Le signal manquant à 174,8 ppm correspond au carbone carboxylique de la lobarine. La comparaison des données spectrales (RMN 1D et 2D, et MS) avec celles de la littérature nous permet de confirmer que le composé **Se5** est un diphenyl-éther, le **sakisacaulon A** (Fig. 57). Ce composé a été isolé à partir du lichen *Stereocaulon sasakii* [166].

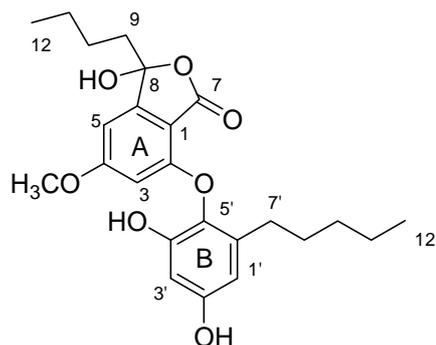


Figure 57 : Structure des composé Se5 (sakisacaulon A)

3.2.7 Composé Se7

Le composé **Se7** (17 mg) a été obtenu sous forme d'un solide blanc. L'enregistrement de son spectre de masse haute résolution permet de lui attribuer la formule brute $C_{24}H_{28}O_6$ correspondant à une perte d'eau par rapport au sakisacaulon A. En RMN 1H , nous observons un triplet supplémentaire intégrant pour un proton à 5,65 ppm ($J = 7,8$ Hz) par rapport au sakisacaulon A (Fig. 58). Ce déblindage peut s'expliquer par la perte de la fonction hydroxyle portée par le C-8 et l'apparition d'une insaturation entre les carbones C-8 et C-9.

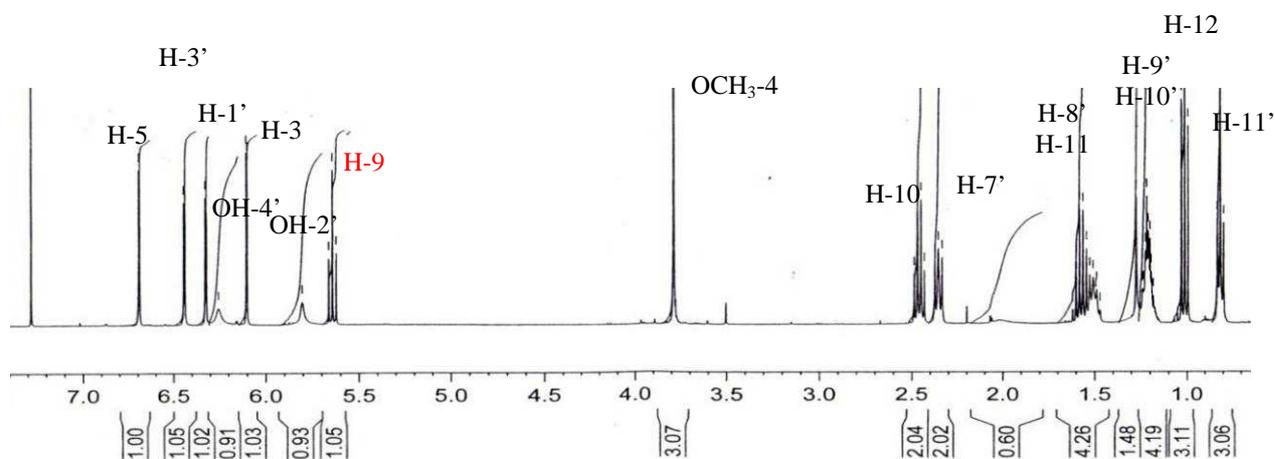


Figure 58 : Spectre RMN 1H du composé Se7 (400 MHz, $CDCl_3$)

Cette hypothèse est confirmée par l'expérience HMBC montrant des corrélations du proton H-9 avec les carbones C-6 (δ 143,8) ; C-8 (δ 145,5) et C-12 (δ 13,8). Une comparaison des données spectrales avec celles de la littérature [167] nous permet de confirmer que le composé **Se7** est un diphenyléther, l'**anhydro-sakisacaulon A** (Fig. 59).

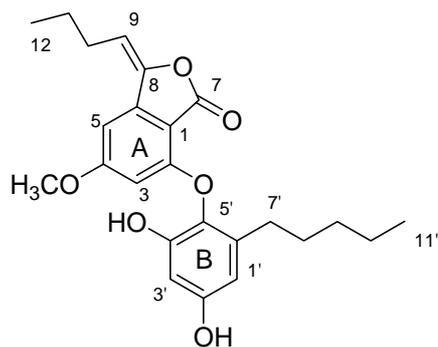


Figure 59 : Structure du composé Se7 (anhydrosakisacaulon A)

3.2.8 Composé Se16

Le composé **Se16** (4 mg) a été obtenu à partir de la fraction Ac1e3 par CLHP semi-préparative sur une colonne C₁₈ sous forme d'un solide blanc. L'enregistrement du spectre de masse haute résolution de ce composé permet de lui attribuer la formule brute C₂₅H₃₂O₇, [M+Na]⁺ à m/z = 467,2040. Le spectre RMN ¹H indique une seule différence pour la présence du signal à 3,16 ppm caractéristique d'une fonction méthoxylique par rapport au spectre RMN ¹H du sakisacaulon A. Une corrélation du groupement méthoxylique à 3,16 ppm avec le carbone C-8 (δ 109,44) sur l'expérience HMBC nous permet de confirmer une méthylation sur la fonction hydroxylique portée en position C-8 (Fig. 60).

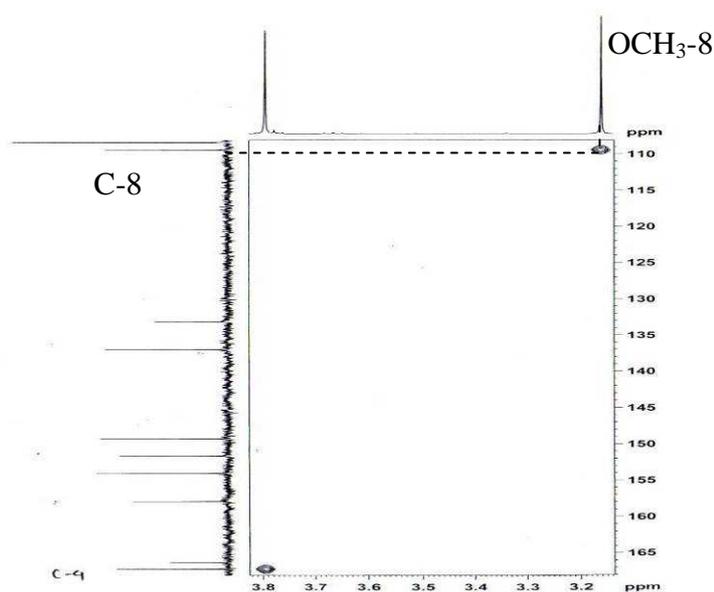


Figure 60 : Agrandissement d'une partie du spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé Se16

Cette explication confirme que le composé Se16 est un diphényléther, le **méthyl-8-sakisacaulon A** (Fig. 61).

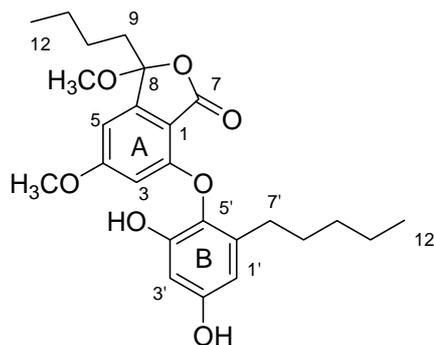


Figure 61 : Structure des composés Se16 (méthyl-8-sakisaulon A)

3.2.9 Composé Se20

A partir de la fraction Ac1e6, le composé Se20 (6 mg) a été isolé par CLHP semi-préparative sur une colonne de C₁₈. L'ion moléculaire [M+Na]⁺ à m/z 467,2038 observé sur le spectre de masse haute résolution, nous indique que le composé Se20 a pour formule brute C₂₅H₃₂O₇. Le composé Se20 a la même formule brute que le méthyl-8-sakisaulon A, et la seule différence visible sur le spectre RMN ¹H correspond au signal du méthoxyle qui est déblindé (δ 3,93 au lieu de 3,16). Ce groupe méthoxyle corrèle avec le carbone C-7 (δ 169,2) sur le spectre HMBC (Fig. 62).

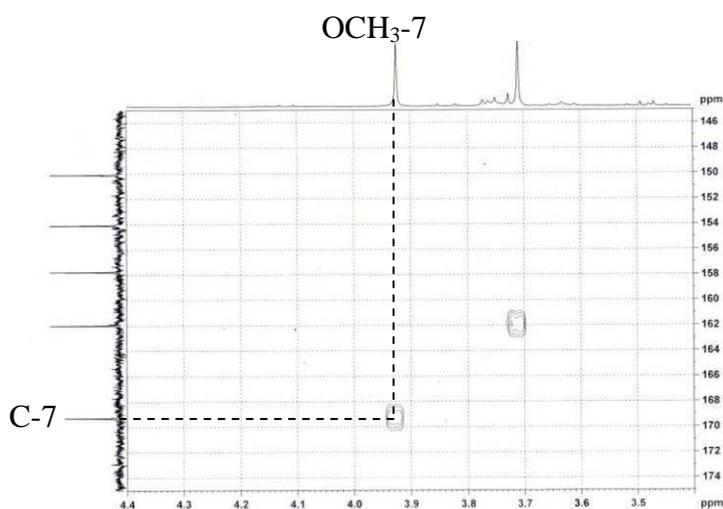


Figure 62 : Agrandissement d'une partie du spectre HMBC (75 MHz, CDCl₃) du composé Se20

En RMN ¹³C, nous observons un signal à 201,5 ppm caractéristique d'une fonction cétonique au lieu du carbone C-8 du méthyl-8-sakisaulon A (Fig. 63).

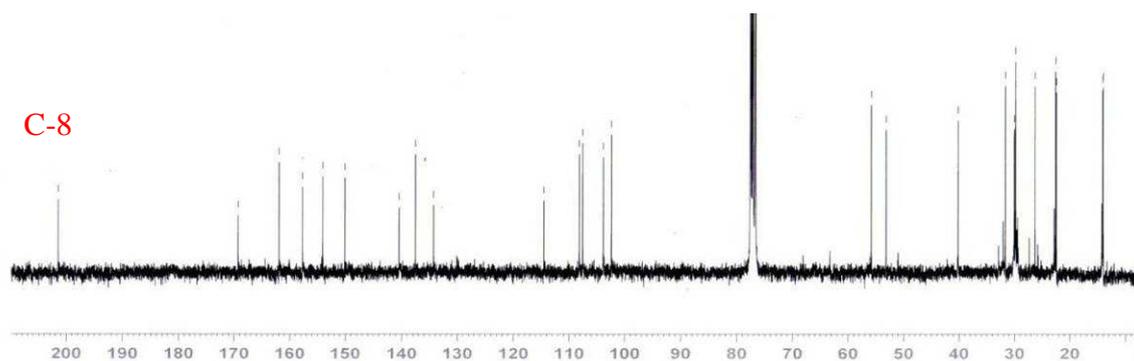


Figure 63 : Spectre RMN ^{13}C du composé Se20 (75 MHz, CDCl_3)

Les données spectrales sont comparables à celles décrites dans la littérature pour un diphényléther, le sakisacaulon A estérifié en C-7 (Fig. 64) [167].

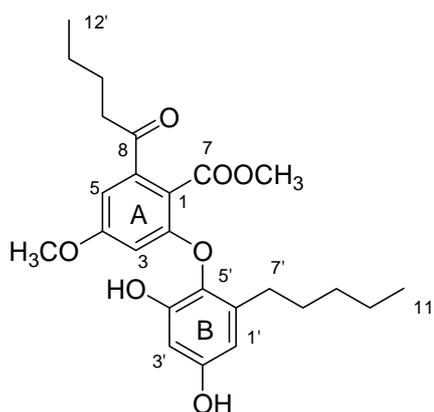
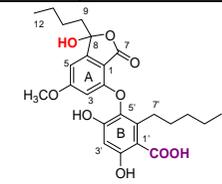
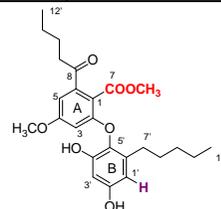
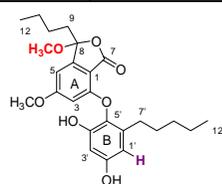
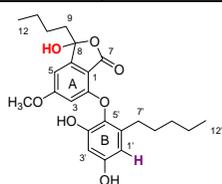


Figure 64 : Structure du composé Se20 (Sakisacaulon A estérifié en C-7)

Tableau 22 : Comparaison des données RMN des diphényléthers isolés

Position	Sakisacaulon A (400 MHz, CDCl ₃)		Méthyl-8-sakisacaulon A (400 MHz, CDCl ₃)		Sakisacaulon A estérifié en C-7 (300 MHz, CDCl ₃)		Anhydro-sakisacaulon A (400 MHz, CDCl ₃)		Lobarine (300 MHz, CDCl ₃)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)
1	106.6	-	108.4	-	114.5	-	105.6	-	106.7	-
2	157.8	-	157.8	-	157.7	-	157.7	-	157.6	-
3	101.9	6.11 (d, 1.9)	102.3	6.19 (d, 1.9)	103.8	6.33 (d, 2.2)	101.9	6.11 (d, 1.8)	102.0	6.10 (d, 1.8)
4	167.4	-	167.1	-	161.9	-	166.9	-	168.0	-
5	100.6	6.64 (d, 1.9)	100.7	6.56 (d, 1.9)	107.5	6.84 (d, 2.2)	96.8	6.70 (d, 1.8)	100.9	6.64 (d, 1.8)
6	153.6	-	151.5	-	140.4	-	143.8	-	154.0	-
7	167.0	-	166.1	-	169.2	-	165.2	-	167.8	-
8	106.7	-	109.4	-	201.5	-	145.5	-	107.5	-
9	38.2	2.19–2.05 (m)	38.2	2.20 et 1.19(m)	40.1	2.86 (t, 7.4)	110.0	5.65 (t, 7.8)	38.2	2.18-2.03 (m)
10	25.1	1.42–1.19 (m)	25.0	1.49 et 1.22(m)	26.3	1.75-1.65 (m)	27.8	2.47(dd, 15.2, 4.6)	25.3	1.36-1.15 (m)
11	22.3	1.34 (m)	22.5	1.34 (m)	22.4	1.44-1.36 (m)	22.4	1.60 (m)	22.6	1.34 (m)
12	13.6	0.90 (t, 7.2)	13.8	0.90 (t, 7.3)	14.1	0.95 (t, 7.5)	13.8	1.18 (t, 7.4)	14.0	0.87 (t, 7.2)
1'	108.3	6.25 (d, 2.8)	108.4	6.32 (d, 2.9)	108.1	6.27 (d, 2.8)	108.4	6.32 (d, 2.9)	103.5	-
2'	154.0	-	153.9	5.12 (s, OH)	154.0	-	153.9	5.80 (s, OH)	163.9	11.42 (s, OH)
3'	102.3	6.42 (d, 2.8)	102.0	6.43 (d, 2.9)	102.4	6.35 (d, 2.8)	102.1	6.45 (d, 2.9)	103.9	6.53 (s)
4'	149.1	-	149.2	6.05 (s, OH)	150.1	-	149.1	6.26 (s, OH)	155.8	-
5'	132.7	-	133.1	-	137.5	-	132.9	-	132.9	-
6'	136.9	-	136.9	-	134.3	-	137.0	-	141.1	-
7'	29.8	2.32 (m)	29.9	2.38 (m)	30.0	2.46 (m)	29.8	2.35 (t, 8.0)	174.8	-
8'	29.1	1.46 (m)	29.2	1.52 (m)	29.8	1.56-1.52 (m)	29.1	1.54 (m)	28.4	2.82-2.61 (m)
9'	31.5	1.19 (m)	31.6	1.20 (m)	31.6	1.56-1.52 (m)	31.5	1.22 (m)	30.5	1.36-1.29 (m)
10'	22.2	1.17 (m)	22.2	1.22 (m)	22.6	1.44-1.36 (m)	22.3	1.24 (m)	32.2	1.15 (m)
11'	13.7	0.80 (t, 7.2)	13.9	0.82 (t, 7.0)	14.0	0.85 (t, 6.8)	13.8	0.83 (t, 6.9)	22.1	1.14 (m)
12'									14.0	0.73 (t, 7.2)
OCH ₃ -4	55.9	3.78 (s)	56.0	3.80 (s)	55.8	3.71 (s)	55.9	3.79 (3H, s)	56.3	3.79 (s)
OCH₃-8			50.9	3.16 (s)						
OCH₃-7					53.1	3.93 (s)				



3.2.10 Composé Se8

Le composé Se8 (56,6 mg) a été isolé sous forme visqueuse brune. Son pouvoir rotatoire déterminé à 25 °C dans le CH₂Cl₂ est nul. Sa formule brute a été déterminée comme étant C₁₃H₁₆O₅ sur la base de son spectre de masse haute résolution HR-ESIMS ce qui a permis de déterminer à 6 son nombre d'insaturation et de cycles (NIC). Le spectre UV montre des longueurs d'onde d'absorptions maximales à 229, 259 et 295 nm. L'absorbance maximale à 259 nm est très caractéristique d'un cycle γ -lactone [18]. Son spectre IR montre des bandes d'absorption fortes correspondant aux groupes hydroxyles (3374 cm⁻¹), à une chaîne aliphatique (2957 cm⁻¹) et à un cycle aromatique (1694 et 1614 cm⁻¹).

Le réalisation du spectre RMN ¹H à température ambiante, indique la présence de deux protons aromatiques sous forme de singulets à 6,39 et 6,44 ppm, d'une fonction méthoxylique à 3,83 ppm, d'une fonction méthylique à 0,84 ppm. La présence de deux signaux larges entre 1,46 et 1,28 ppm intégrant pour quatre protons, et entre 2,21 et 2,18 ppm intégrant pour deux protons, indiquent que le composé existe sous forme instable à température ambiante, ce qui induit la coalescence de certains signaux (Fig. 65).

Afin de pouvoir décrire et caractériser au mieux ce composé, l'expérience RMN est réalisée à haute température (+ 50 °C ou 323 K) dans le but de fixer l'équilibre de la molécule comme les diphényléthers précédents. Le spectre RMN ¹H indique ainsi deux doublets intégrant pour un proton aromatique à 6,44 ($J = 1,6$ Hz) et 6,46 ppm ($J = 1,7$ Hz), une fonction méthoxylique à 3,86 ppm, un groupe méthyle à 0,89 ppm, un multiplet de 1,28 à 1,46 ppm correspondant à quatre protons et enfin un triplet à 2,28 ppm ($J = 6,4$ Hz) (Fig. 65).

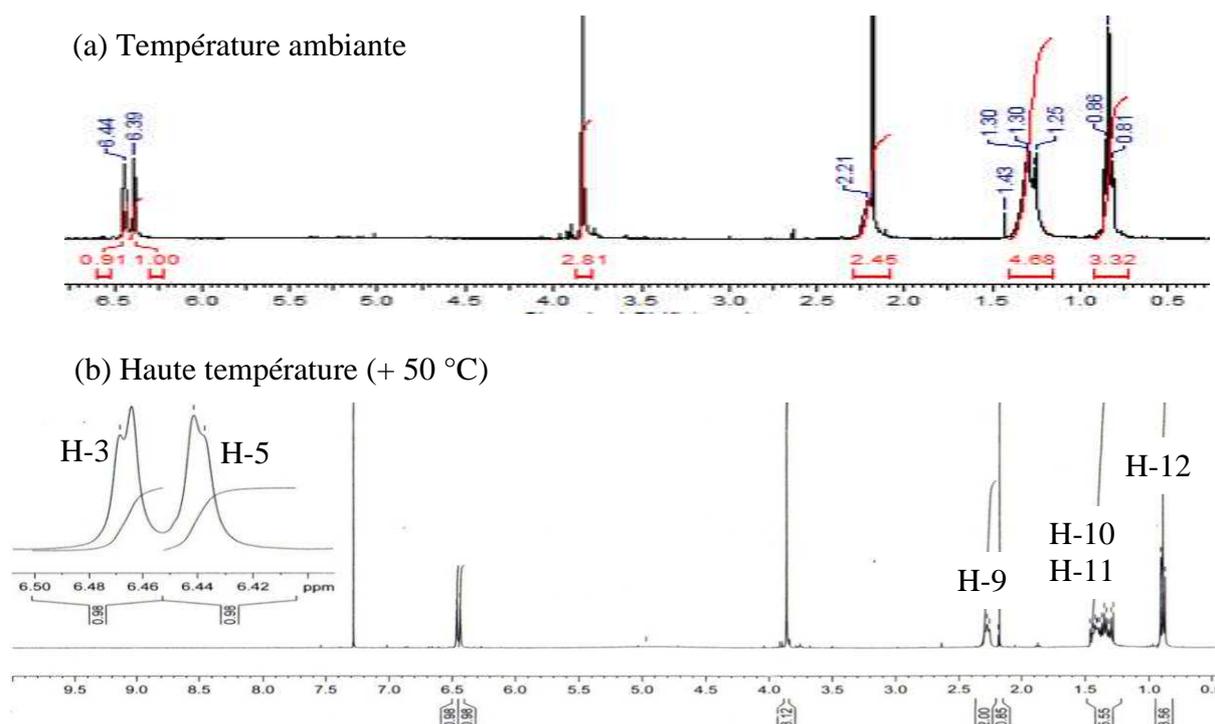


Figure 65 : Spectre RMN ^1H du composé Se8 à température ambiante (a) et à +50 °C (b) (400 MHz, CDCl_3)

Le spectre RMN ^{13}C présente des signaux correspondant à 12 carbones indiquant un carbone invisible ou superposé avec un autre. L'expérience HMBC nous permet d'attribuer la position de chacun des signaux. Le proton aromatique H-3 (δ 6,46) corrèle avec les carbones C-1 (δ 104,4), C-4 (δ 166,7), C-5 (δ 102,1) et C-7 (δ 170,2). Le proton aromatique H-5 (δ 6,44) corrèle avec les carbones C-1 (δ 104,4) ; C-3 (δ 101,9) et C-5 (δ 102,1). Les corrélations entre les protons aliphatiques avec les carbones sont: H-10 (δ 1,28 – 1,46) avec C-9 (δ 39,9) et C-11 (δ 22,3), H-11 (δ 1,28 – 1,46) avec C-9 (δ 39,9), C-10 (δ 25,5) et H-12 (δ 0,89) avec C-10 (δ 25,5) et C-11 (δ 22,3). L'expérience COSY ^1H - ^1H confirme la présence de la chaîne *n*-butyle et la connexion entre deux protons aromatiques. Ces analyses spectrales nous permettent de proposer la structure du composé **Se8** comme une nouvelle lactone, **3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane** (Fig. 66) bien que le carbone quaternaire C-8 soit invisible sur le spectre RMN ^{13}C et qu'il ne montre aucune corrélation avec les protons d'après l'expérience HMBC.

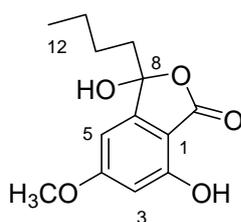


Figure 66 : Structure du composé Se8 (3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane)

En 2007, Millot [168] a présenté la structure des deux formes de l'acide α -alectronique co-existant à température ambiante (Fig. 67), et la forme cyclisée avec la forme lactonique était plus stable que la forme ouverte à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

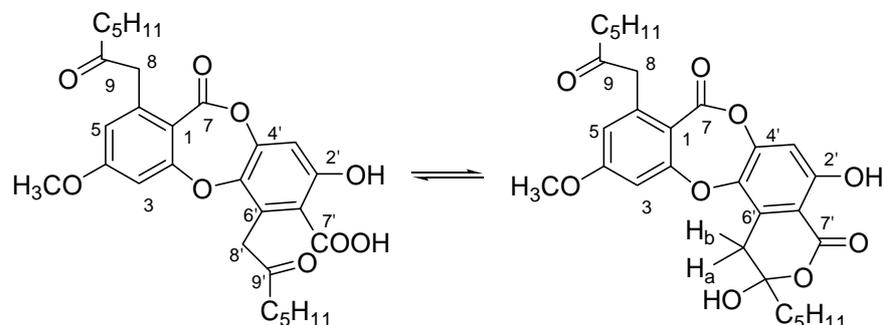


Figure 67 : Structure des deux formes de l'acide α -alectronique co-existant à température ambiante

Notre composé possède un noyau lactonique comportant deux fonctions en alpha de l'oxygène intracyclique ce qui pourrait favoriser un équilibre céto-énol comme pour l'acide α -alectronique. Les spectres RMN ont donc été enregistrés à basse température ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) dans le but de figer l'équilibre dynamique de la molécule et montrer la présence du carbone C-8. Ces tentatives réalisées dans plusieurs solvants et à différentes températures se sont soldées par des échecs (Fig. 68).

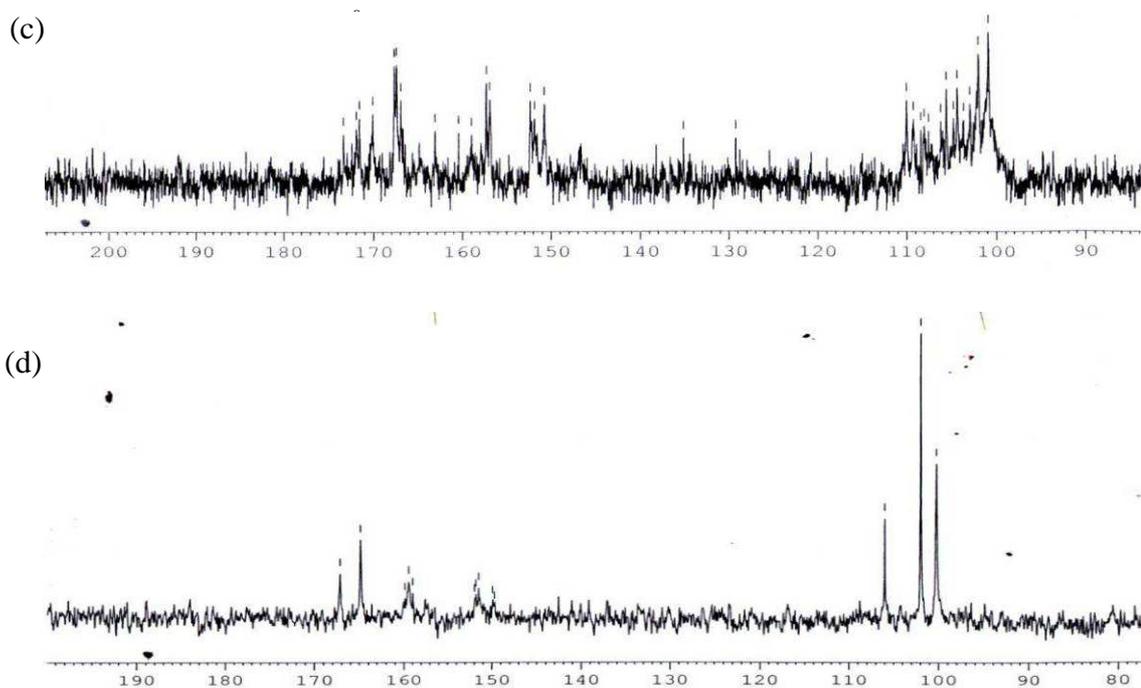


Figure 68 : Spectre RMN ^{13}C du composé Se8 à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (c) (400 MHz, CDCl_3) et à $+90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d) (400 MHz, DMSO-d_6)

Nous avons donc réalisé une réaction d'acétylation de la fonction hydroxyle en C-8. L'acétylation du composé **Se8** a été réalisée en utilisant le réactif chlorure d'acétyle en présence de triéthylamine. La réaction a abouti à la formation des produits acétylés **Se8a** (11 mg), **Se8b** (17 mg) et **Se8c** (9 mg) que nous avons purifiés (Fig. 69). Les produits acétylés du composé **Se8** ont été obtenus sous forme d'une poudre blanche amorphe. Leurs structures ont été confirmées par analyse de leurs données spectrales (Tableau 23).

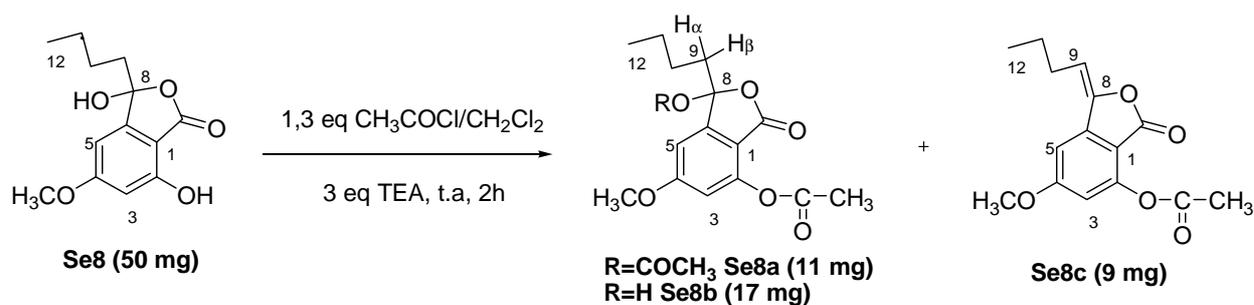


Figure 69 : Réaction d'acétylation du composé **Se8**

Avant d'analyser les spectres d'un des trois produits acétylés, nous proposons de détailler brièvement le mécanisme de cette réaction. L'objectif de cette réaction était une acétylation de la fonction hydroxylique portée en C-8 en vue de visualiser le carbone 8. Pourtant, nous avons obtenu le produit **Se8c** portant une double liaison en C-8. Sa formation pourrait être expliquée par un des deux mécanismes suivants :

Mécanisme 1 : En raison d'un excès de triéthylamine et d'une réalisation de cette réaction à température ambiante, la formation du composé **Se8c** serait effectuée par élimination du groupement CH_3COO^- et du proton à partir du composé **Se8a** sur une solution de triéthylamine. Cette réaction est la suivante (Fig. 70):

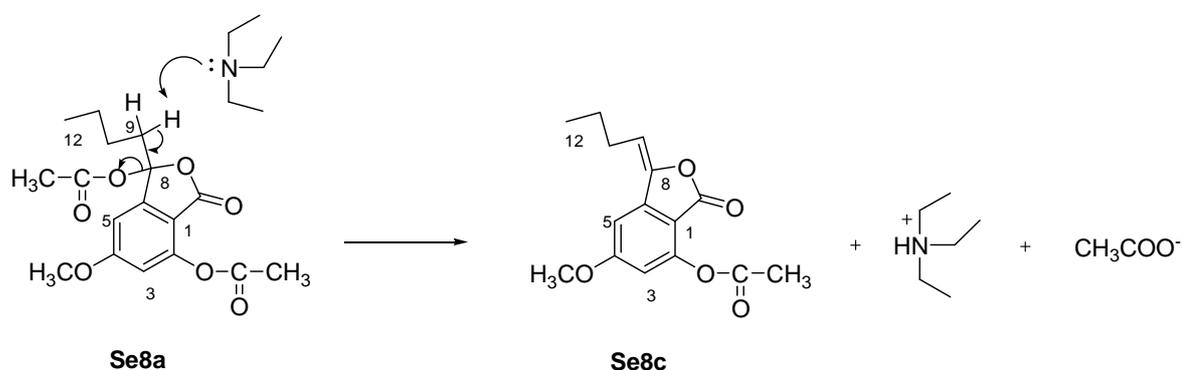


Figure 70: Formation du composé **Se8c** à partir du composé **Se8a**

Mécanisme 2 : La formation du composé **Se8c** provient des composés formés pendant la réaction (le composé **Se8b** est formé pendant la réaction mais le composé **Se8** est le composé

du départ): soit le groupement hydroxyle porté en C-8 du composé **Se8b** est déshydraté au fur et à mesure de sa formation pour conduire au composé **Se8c** ; soit la déshydratation est effectuée sur le composé du départ **Se8** avant acétylation du groupement phénolique en C-2 pour conduire au composé **Se8c** (Fig. 71) :

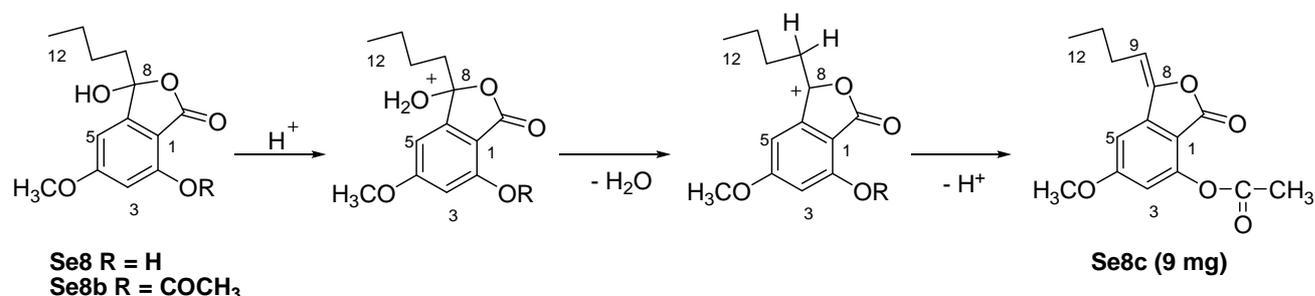


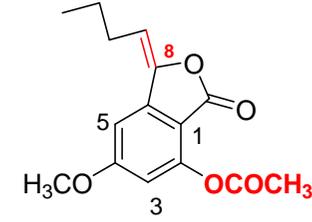
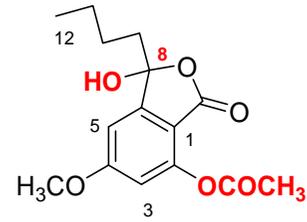
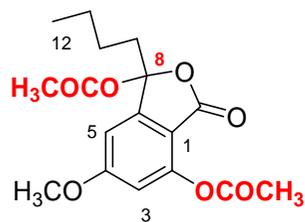
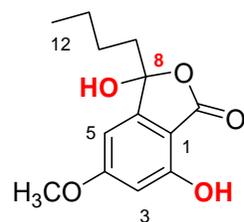
Figure 71: Formation du composé Se8c à partir du composé Se8 ou Se8b

Les trois composés permettent de visualiser le carbone manquant mais nous avons choisi de décrire le composé **Se8a** pour l'expliquer. Les autres composés **Se8b** et **Se8c** sont décrits en annexe et dans le tableau 23.

La RMN ¹H du composé **Se8a** montre différents signaux par rapport au composé **Se8** de départ. Deux signaux à 2,03 et 2,40 ppm sont caractéristiques des groupements méthyliques. Les multiplets de 2,07 à 1,99 et de 2,36 à 2,26 ppm intégrant pour un proton chacun remplacent le triplet à 2,29 ppm du composé **Se8**. Ces données spectrales nous permettent d'affirmer que les fonctions hydroxyles du composés **Se8** sont acétylées par le chlorure d'acétyle. L'acétylation de la fonction hydroxyle en position C-8 a permis de modifier le déplacement chimique des deux protons aliphatiques portés par le carbone C-9, et de confirmer la structure du composé **Se8** en visionnant le carbone C-8 grâce aux corrélations. En effet, le spectre RMN ¹³C indique la présence du carbone C-8 à 111,8 ppm. De plus, l'expérience HMBC montre une corrélation entre le proton aromatique H-5 à 6,86 ppm avec le carbone C-8 (δ 111,8). Les données spectrales nous permettent d'affirmer que le composé Se8a est dérivé du composé **Se8** par acétylation des deux fonctions hydroxyliques, et de déduire que la structure du composé **Se8** est bien une nouvelle lactone dont la formule est proposée ci-dessus (Fig. 66).

Tableau 23: Comparaison des données du composé Se8 et ses dérivés

Position	Se8 (400 MHz, CDCl ₃)		Se8a (300 MHz, CDCl ₃)		Se8b (300 MHz, CDCl ₃)		Se8c (300 MHz, CDCl ₃)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)
1	104.4	-	105.7	-	106.4	-	109.7	-
2	159.5	-	150.6	-	152.6	-	149.3	-
3	101.9	6.46 (1H, d, 1.6)	104.9	6.86 (1H, d, 1.98)	104.6	6.84 (1H, d, 1.98)	110.6	6.69 (1H, d, 1.95)
4	166.7	-	164.5	-	166.3	-	166.0	-
5	102.1	6.44 (1H, d, 1.7)	110.0	6.74 (1H, d, 1.98)	110.6	6.69 (1H, d, 1.98)	100.7	6.90 (1H, d, 1.95)
6	149.9	-	149.5	-	149.1	-	143.0	-
7	170.2	-	166.1	-	165.1	-	163.9	-
8	absence	-	111.8	-	111.1	-	145.1	-
9	39.9	2.28 (2H, t, 6,40)	37.4	H _α 2.07-1.99 (1H, m) H _β 2.36-2.26 (1H, m)	38.2	2.14-2.01 (2H, m)	110.0	5.61 (1H, t, 7.83)
10	25.5	1.46 – 1.28 (m)	24.4	1.47-1.17 (m)	25.1	1.31-1.28 (m)	27.7	2.43 et 2.40 (2H, dd, 7.5, 7.5)
11	22.3	1.46 – 1.28 (m)	22.3	1.47-1.17 (m)	22.4	1.31-1.28 (m)	22.4	1.57-1.50 (2H, m)
12	13.6	0.89 (3H, t, 6,80)	13.7	0.89 (3H, t, 9.00)	13.7	0.85 (3H, t, 7.14)	13.8	0.98 (3H, t, 7.32)
4-OCH ₃	55.8	3.86 (3H, s)	56.2	3.90 (3H, s)	56.2	3.90 (3H, s)	56.1	3.90 (3H, s)
2-CO			168.4		168.9		168.6	
2-COCH ₃			20.6	2.40 (3H, s)	20.6	2.35 (3H, s)	20.7	2.40 (3H, s)
8-CO			168.1					
8-COCH ₃			21.5	2.03 (3H, s)				



Dans notre étude, la quantité importante de composé **Se8** (50 mg) suggère qu'il est naturellement présent. Nous avons vérifié ce point en réalisant l'extraction du lichen avec différents solvants tels que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane et le méthanol en vue d'analyser directement l'extrait brut après d'extraction. Une approche LC-MS a été utilisée pour une analyse qualitative de ces extraits, en utilisant le composé **Se8** pur comme témoin. La comparaison des données obtenues pour chaque pic (le temps de rétention, le spectre UV et le spectre de masse) avec celles du composé **Se8** nous permet de confirmer que le composé **Se8** existe dans tous les extraits de départ (Fig. 72).

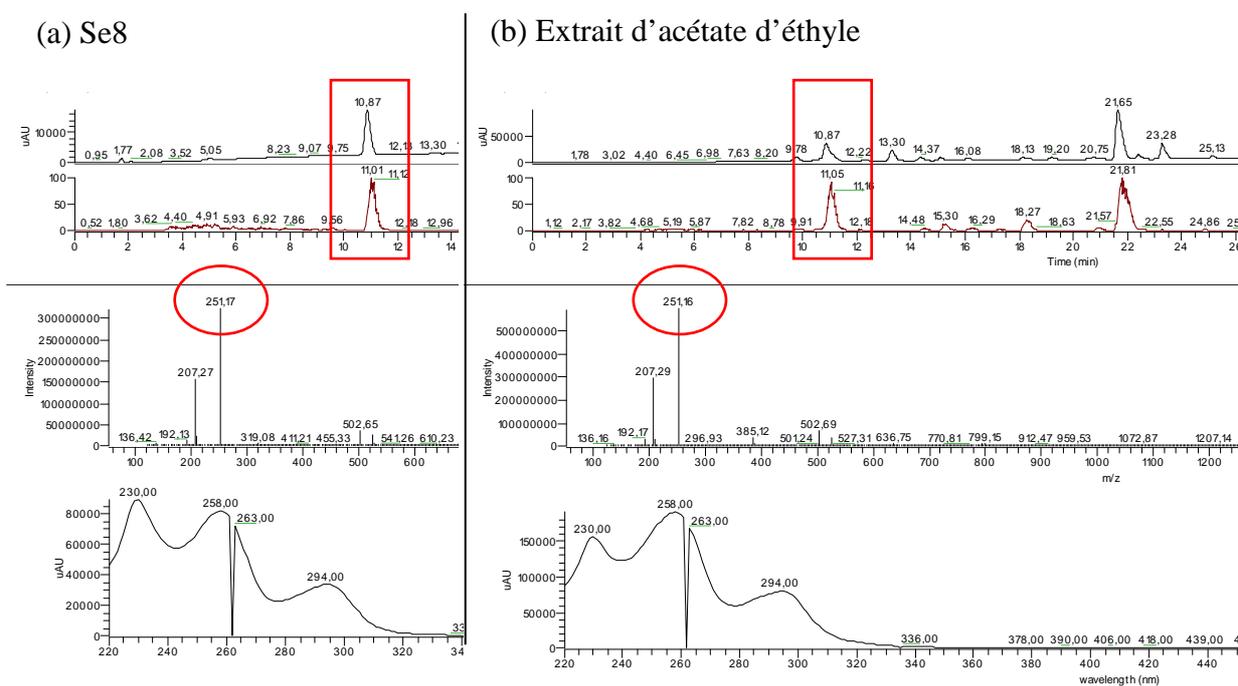


Figure 72 : Comparaison par LC-MS du composé **Se8** de référence (a) avec l'extrait d'acétate d'éthyle (b)

Nous avons ensuite cherché à savoir si la détection du composé **Se8** était possible par une analyse en spectrométrie de masse DART en mode positif. La configuration de ce type de spectromètre de masse permet la génération d'ions par un flux d'hélium. Son principal intérêt réside dans l'analyse directe des ions générés par une approche manuelle de l'échantillon à analyser (sans préparation préalable) au niveau de la source. Tout d'abord, la solution de **Se8** à 1 mg/mL a été soumise au DART en mode positif. Le composé **Se8** dont la formule brute $C_{13}H_{16}O_5$ a une masse moléculaire (M) de 252 uma, est à l'origine d'un pic moléculaire $[M+H]^+$ effectivement retrouvé à m/z 253 (Fig. 73).

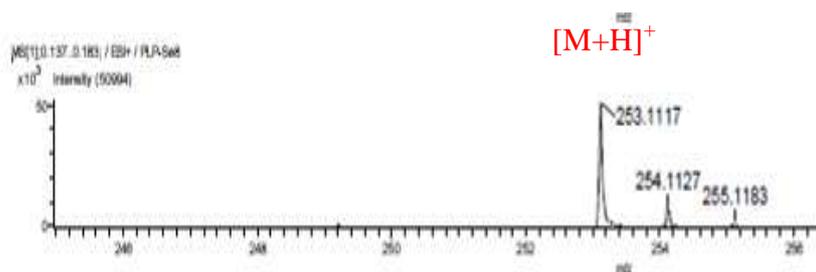


Figure 73 : Spectre DART-AccuTOF du composé Se8 en mode positif

Ensuite, le lichen *S. evolutum* broyé a été soumis au DART en mode positif (Fig. 74). Si ce spectre permet de visualiser la présence de signaux correspondant à l'atranorine (m/z 153 uma), au MOC (m/z 197 uma), à l'anhydro-sakisacaulon A (m/z 413 uma), et à l'acide lobarique (m/z 457 uma), le signal correspondant au composé **Se8** n'a pas été mis en évidence dans ces conditions. L'absence de ce signal permet de formuler deux hypothèses :

- Soit le composé Se8 n'apparaît que suite à l'extraction à partir des diphényléthers en présence de solvants polaires et moyennement polaires.
- Soit l'analyse directe du thalle de *S. evolutum* ne permet pas de visualiser le signal. Par contre, la présence d'un signal à $m/z = 413,2249$ uma caractéristique de l'ion moléculaire de l'anhydro-sakisacaulon A confirme à nouveau la présence des diphényléthers comme produits naturels *ab initio*.

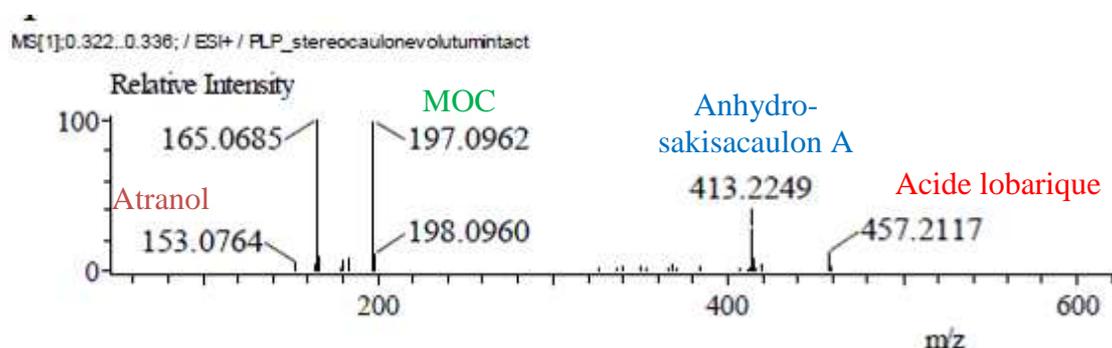


Figure 74 : Spectre DART-AccuTOF du lichen *S. evolutum* en mode positif

3.3 Autres métabolites

Le composé **Se13** a été isolé sous forme d'une poudre blanche à partir de la fraction peu polaire Ac3e obtenue après purification par flash chromatographie (en phase inverse) du surnageant acétone Ac3. L'ion moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 293,0426 observé sur le spectre de masse haute résolution nous indique que le composé Se13 a pour formule brute $C_{15}H_{10}O_5$. Le spectre RMN 1H montre des signaux représentatifs d'une fonction méthylique aromatique à 2,66 ppm, de deux protons aromatiques en position *meta* à 6,64 et 6,83 ppm ($J = 2,2$ Hz) et de

deux protons sous forme singulet à 9,86 et 10,74 ppm. Le signal sous forme de singulet observé à 5,83 ppm et intégrant pour deux protons (H-14), indique la présence d'une fonction méthylène incluse dans un noyau lactonique. Le spectre HMBC nous permet de confirmer la position de l'hydroxyle à 9,86 ppm en C-6, de l'hydroxyle à 10,74 ppm en C-3 et du méthyle en C-8. Toutes ces données spectrales correspondent à un dibenzofurane, la strepsiline [18] (Fig. 75), auparavant isolée à partir de l'extrait acétonique du lichen *S. azureum* [164].

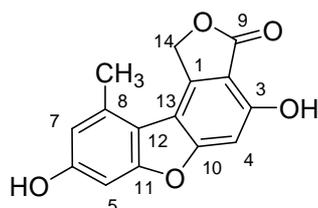


Figure 75 : Structure du composé Se13 (Strepsiline)

Les trois composés, **Se12**, **Seh1** et **Seh3**, ont été isolés à partir de l'extrait hexanique. Ils donnent une couleur bleue foncée à l'anisaldéhyde sulfurique, évoquant des dérivés terpéniques ou stéroïdiques. Le composé **Seh3** a la formule brute $C_{28}H_{46}O$ par analyse de la spectrométrie de masse haute résolution. Le spectre RMN 1H montre la présence de deux multiplets à 3,54 ppm intégrant pour un proton (H-3) et à 5,35 ppm intégrant pour un proton (H-6), d'un multiplet à 5,19 ppm intégrant pour deux protons H-22 et H-23. Les données spectrales (RMN 1H et ^{13}C) ont permis de confirmer l'identité de ce composé. Il s'agit d'un stéroïde, le **brassicastérol** (Fig. 76) [169].

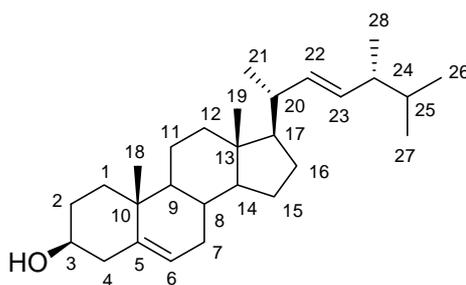


Figure 76 : Structure du composé Seh3 (Brassicastérol)

Le spectre de masse haute résolution par électrospray permet d'obtenir la formule brute du composé **Se12** comme étant $C_{30}H_{28}O_3$ ($[M+Na]^+ = m/z 479,3499$). En RMN 1H , nous observons des signaux caractéristiques de sept fonctions méthyliques à 0,78, 0,85, 0,88, 0,90, 0,96, 0,98, 1,12 ppm. Le doublet large à 2,22 ppm intégrant pour un proton correspond au proton en position H-18. Le multiplet à 3,16 ppm intégrant pour un proton est le proton en

position H-3 caractéristique des stéroïdes. Le triplet à 5,23 ppm ($J = 3,5$ Hz) intégrant pour un proton est le proton en position H-12. Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C sont comparables à celles décrites dans la littérature pour l'**acide ursolique** (Fig. 77) [18].

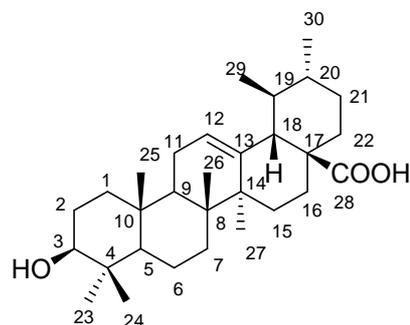


Figure 77 : Structure du composé Se12 (Acide ursolique)

La formule brute obtenue par la spectrométrie de masse haute résolution pour le composé **Seh1** est $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$. Le spectre RMN ^1H indique la présence d'un multiplet à 3,98 ppm intégrant pour un proton (H-3), de deux doublets à 6,26 ($J = 8,78$ Hz) et 6,50 ($J = 8,78$ Hz) intégrant pour un proton chacun (H-5 et H-6), de deux double doublets à 5,18 (H-23, $J = 8,23$ Hz et 15,37 Hz) et à 5,21 (H-22, $J = 7,14$ Hz et 14,82 Hz). Une comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature [170] nous permet de confirmer que ce composé est un stéroïde, le **peroxyde d'ergostérol** (Fig. 78), une molécule couramment isolée en tant que produit d'oxydation de l'ergostérol notamment à partir des champignons et des lichens. L'isolement de ces composés de type terpénoïde confirme encore leur présence dans les lichens (Cf Chap 1 § 2.3.2.5).

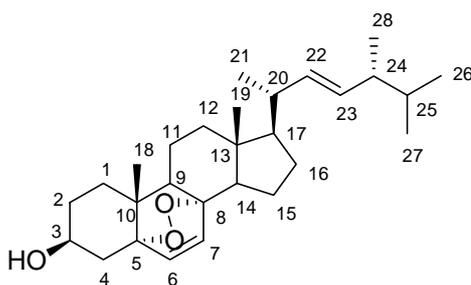


Figure 78 : Structure du composé Seh1 (Peroxyde d'ergostérol)

3.4 Dosage de l'atranorine dans l'extrait acétone de *S. evolutum* par HPLC/UV

L'atranorine étant un composé majeur isolé à partir de *S. evolutum*, sa quantification dans l'extrait acétone a été étudiée d'autant plus que ce composé a montré une activité

biologique intéressante (Cf chap 3 § 2.2). Une gamme d'étalonnage a été réalisée en HPLC/UV à partir de concentrations croissantes d'atranorine (0.05 à 1 mg/mL). Pour chaque concentration, l'aire sous le pic obtenu a été calculée à la longueur d'onde maximale d'absorption de l'atranorine ($\lambda=252$ nm) (Fig. 79).

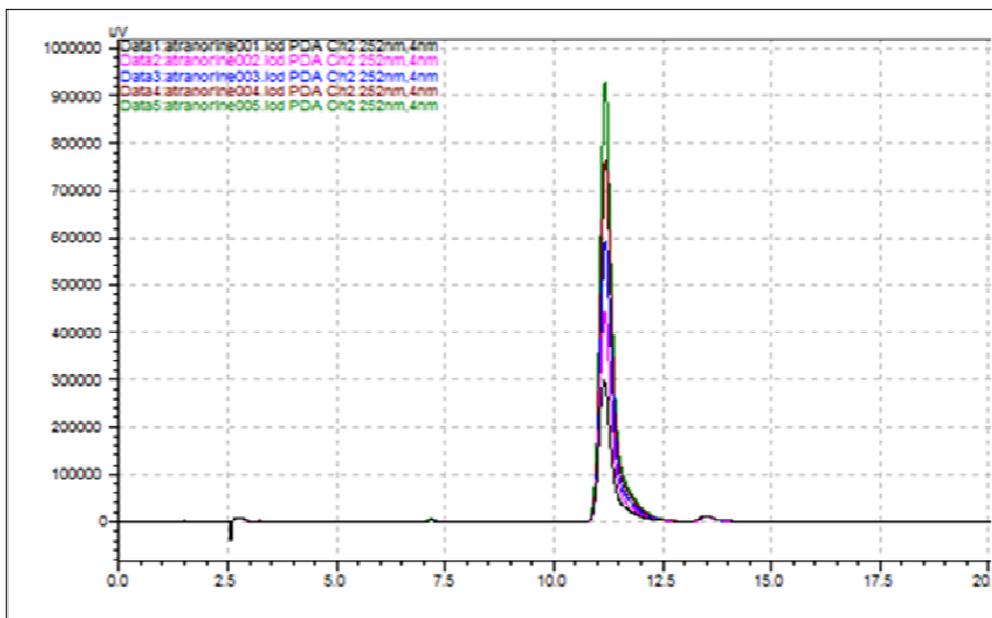


Figure 79: Superposition des chromatogrammes ayant servi à calculer la droite d'étalonnage pour l'atranorine ($R_t = 11.25$ min)

Cette expérience a été reproduite trois fois à partir de trois solutions mères préparées de façon indépendante. La courbe d'étalonnage réalisée montre une bonne linéarité de la réponse de l'atranorine entre 0.1 à 0.3 mg/mL ce qui a permis d'obtenir un coefficient de corrélation (r^2) = 0.999 ($p < 0.01$) (Fig. 80). La sensibilité a été évaluée par la détermination de la limite de détection (LD) et de la limite de quantification (LQ) qui sont de 0.002 mg/mL et de 0.01 mg/mL, respectivement.

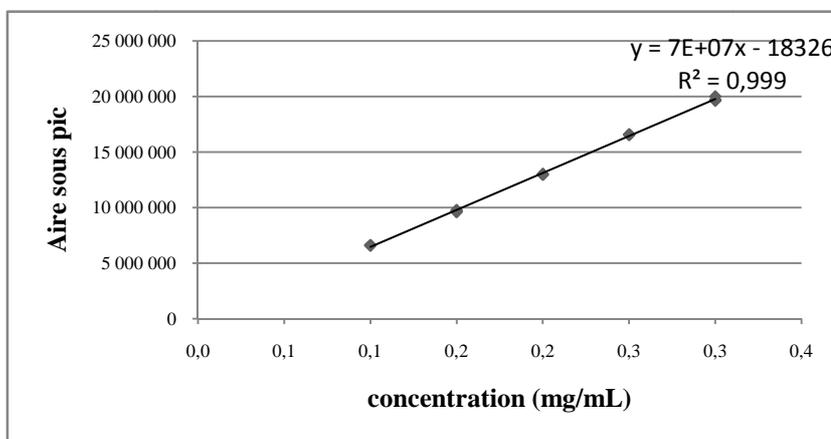


Figure 80: Courbe d'étalonnage de l'atranorine (aire = f(conc. Atranorine))

Le chromatogramme de l'extrait acétone a été obtenu suite à l'injection d'une solution à la concentration de 0.25 mg/mL (Fig. 81). En reportant sur la droite de régression, l'aire sous la courbe obtenue pour le pic d'atranorine présent dans l'extrait, nous avons pu déterminer la concentration d'atranorine dans l'extrait acétone (à 0.25 mg/mL). La teneur en atranorine qui a été quantifiée dans l'extrait acétone est de l'ordre de 41,8 % (pds/pds).

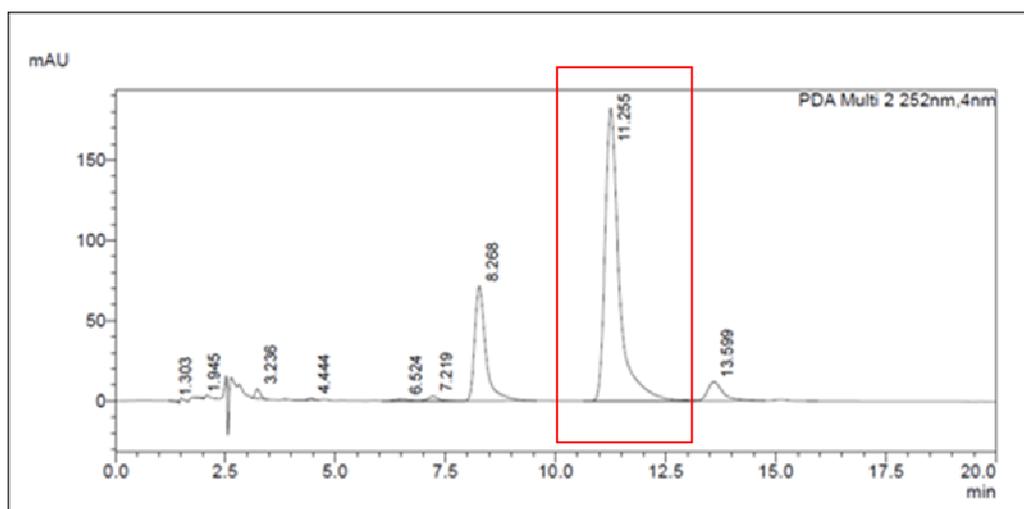


Figure 81: Chromatogramme de l'extrait acétone (Rt atranorine = 11.25 min)

4 Composés semi-synthétisés

L'isolement des quatre depsides, atranorine, cladonioidésine, 3'-méthyle-lécanorate de méthyle, acetocladonioidésine possèdent comme seule différence un degré d'oxydation différent de la fonction portée par le C-3 (noyau A) : CHO, COOH, H, CH₂=CH-COCH₃. L'atranorine a montré une activité intéressante sur le virus de l'hépatite C, et dans le but d'établir une relation structure-activité, deux autres composés ont été synthétisés.

4.1 Stratégie de synthèse

Les depsides forment un vaste groupe parmi les métabolites secondaires des lichens. Traditionnellement, ces composés biosynthétisés d'après la voie acétate-polymalonate possèdent la structure de base d'un benzoate de phényle. Le nombre élevé et la nature des substituants des noyaux aromatiques, très souvent des groupes hydroxyles, en rendent difficile la synthèse. Asahina et *al.* [171] ont réussi à synthétiser quelques depsides naturels en utilisant plusieurs méthodes de protection. De plus, plusieurs agents spécifiques de condensation (dicyclohexylcarbodiimide, anhydride trifluoracétique et *N,N'*-carbonyldiimidazole) ont permis d'accéder plus facilement à ces composés [172,173]. Nous

avons souhaité faire une synthèse des depsides dont l'un porte une fonction CH_2OH en C-3 (8-hydroxy-4-*O*-méthylebarbatate de méthyle) et l'autre est une fonction CH_3 en C-3 (4-*O*-déméthylebarbatate de méthyle) (Fig. 82), ainsi que le nouveau depside **Se10** puisque celui était instable une fois mis en solution.

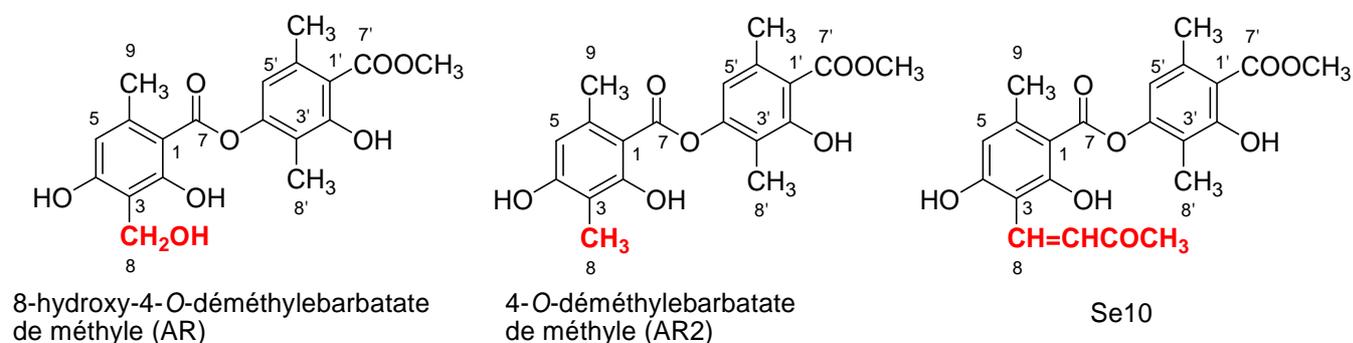


Figure 82 : Structure des depsides synthétisés

Nous avons choisi de réaliser une synthèse facile d'accès et rapide en vue d'obtenir ces composés. Le composé **AR** a été obtenu par une réduction de la fonction aldéhydique de l'atranorine, tandis que le composé **AR2** a été obtenu par une condensation de deux noyaux aromatiques. Le composé **Se10** a été obtenu par une réaction Wittig entre de l'atranorine et l'acétyl méthylène triphénylphosphorane.

4.2 Synthèse du 8-hydroxy-4-*O*-déméthylebarbatate de méthyle (AR)

Le composé **AR** (79,3 mg, 84,4 %) a été obtenu sous forme d'une poudre cristalline blanche à partir de l'atranorine par réduction de la fonction aldéhydique à température ambiante (Fig. 83). Le spectre RMN ^1H indique la présence d'un singulet intégrant pour deux protons à 4,73 ppm au lieu du proton aldéhydique à 10,21 ppm pour l'atranorine. L'expérience HSQC montre le carbone correspondant à ces protons à 54,75 ppm. Les propriétés physiques et spectroscopiques (MS, RMN ^1H) du composé **AR** correspondent parfaitement au produit naturel proposé par Culberson [160] et sa structure a été confirmée par RMN ^{13}C [18] et RMN 2D. Le composé **AR** est bien le 8-hydroxy-4-*O*-déméthylebarbatate de méthyle.

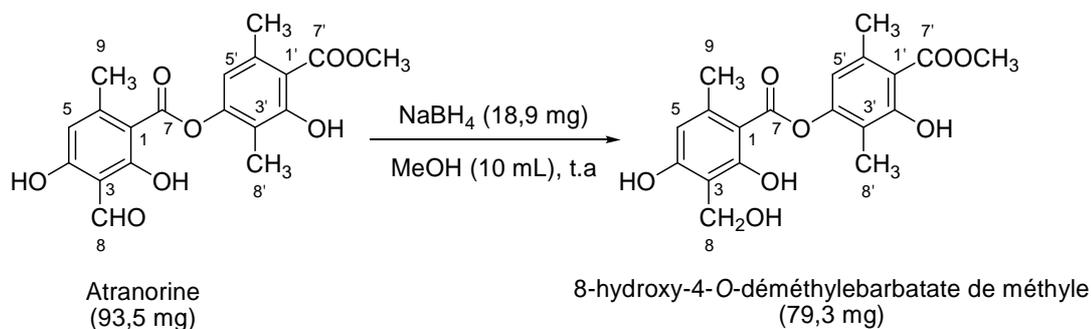


Figure 83 : Réduction de l'atranorine

4.3 Synthèse du 4-O-déméthylebarbatate de méthyle (AR2)

Le composé AR2 a été obtenu par condensation de deux noyaux aromatiques en présence d'anhydride trifluoracétique. L'un est l'acide β -orcinol carboxylique et l'autre est le β -orcinol carboxylate de méthyle (composé Se1).

Dans la première étape de synthèse, l'acide haematommique a été obtenu à partir du β -orcinol carboxylate de méthyle grâce à une déméthylation par BBr_3 , suite à une acidification et une purification. La structure de cet acide a été confirmée par CCM dans des systèmes de solvants indépendants et grâce au spectre obtenu en RMN ^1H . Toutes les données correspondent à un produit naturel décrit par Huneck [18].

Dans la seconde étape de synthèse, la condensation de cet acide avec le β -orcinol carboxylate de méthyle, en présence d'anhydride trifluoracétique (Fig. 84), nous a permis d'obtenir le depside AR2 avec un rendement faible (15 %). En effet, cette condensation pourrait donner deux produits. Le composé AR2 est le produit principal formé par condensation entre une fonction carboxylique de l'acide (noyau A) avec une fonction hydroxylique de phénol (noyau B) en position C-4, tandis que l'autre est le produit secondaire formé par condensation entre une fonction carboxylique de l'acide (noyau A) avec une fonction hydroxylique de phénol (noyau B) en position C-2 (Fig. 84). Le composé **AR2** correspond parfaitement au produit naturel isolé à partir du lichen *Erioderma sp* [174]. Après comparaison de ses caractéristiques spectrales (RMN ^1H et ^{13}C [18] et RMN 2D), il s'agit du 4-O-déméthylbarbatate de méthyle.

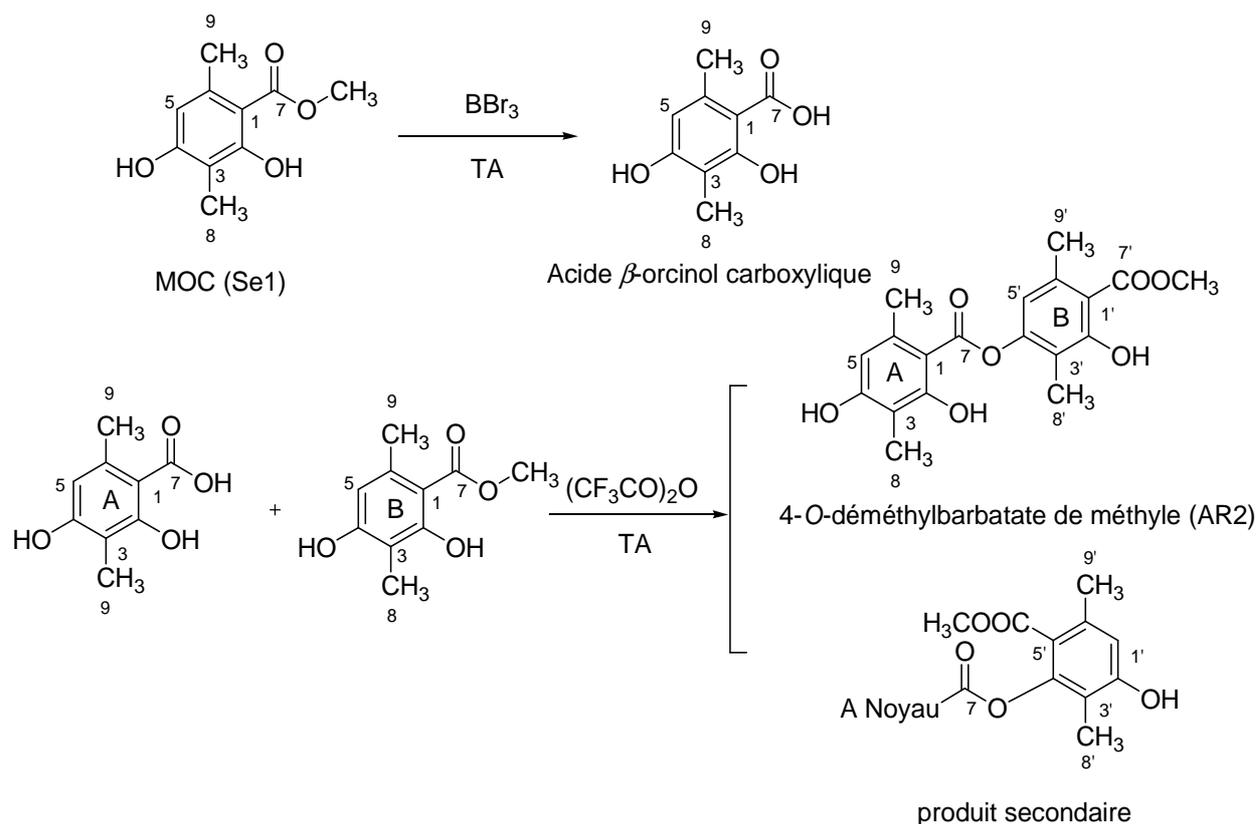


Figure 84 : Synthèse du 4-O-déméthylebarbatate de méthyle

Dans cette réaction, la protection du groupe phénolique n'a pas été réalisée. En effet, ce groupement, fortement stabilisé par la liaison hydrogène intramoléculaire, ne réagit pas dans les conditions utilisées pour la condensation. C'est aussi une raison pour laquelle la réaction de condensation n'est pas totale et possède un rendement faible. Ce rendement est d'autant plus faible que ces composés se dégradent sur silice lors des étapes de purification même si du gel de silice désactivé a été utilisé.

4.4 Synthèse du (*E*)-3-(3-oxo-but-1-én-yl) atranorine (Se10)

Le composé **Se10** a été isolé mais il n'est pas stable en solution et afin de pouvoir en disposer en quantité suffisante, une synthèse est nécessaire. Piatelli [175] a décrit la synthèse du 1,8-dihydroxy-6-méthoxy-3-(3-oxo-1-buten-1-yl) anthraquinone par condensation du fallacinal avec de l'acétone en milieu acide pendant une semaine à température ambiante (Fig. 85).

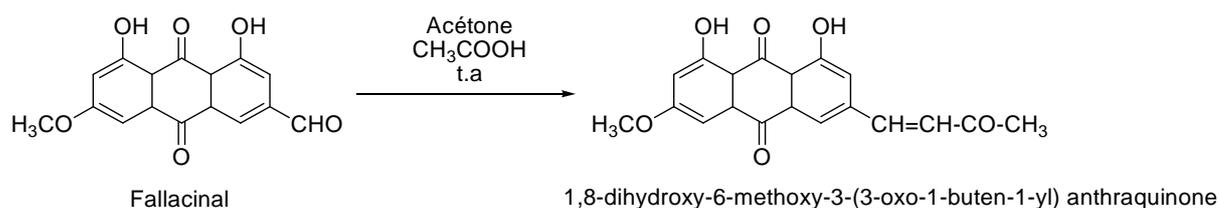


Figure 85 : Condensation du fallacinal et de l'acétone

Récemment, Wang [176] a proposé une méthode efficace pour la synthèse des cétones α,β -insaturées par réaction d'aldolisation en milieu basique (Fig. 86).

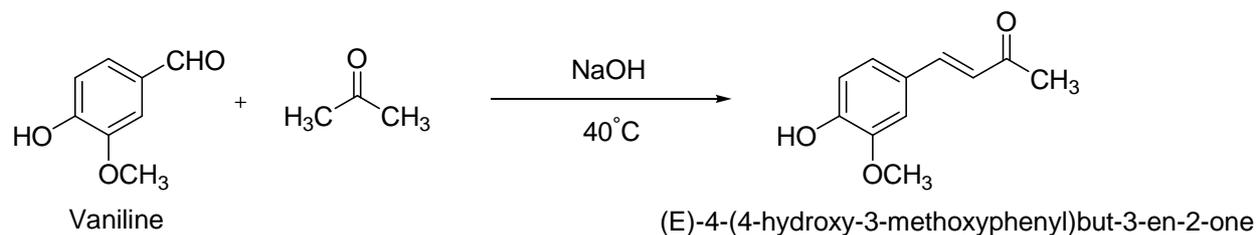


Figure 86 : Condensation de la vanilline et de l'acétone en milieu basique

Plusieurs essais ont été réalisés (en milieu acide et en milieu basique entre l'acétone et l'atranorine), mais aucun n'a été concluant (Cf Données expérimentales du chapitre 2 § 2.4.3.4)

Les conditions décrites dans la littérature ne sont pas applicables pour la synthèse de notre composé, car l'atranorine est un depside formé à partir de deux noyaux aromatiques portant trois fonctions hydroxyliques : soit le pont ester a été saponifié par le catalyseur basique, soit les fonctions hydroxyliques ont empêché l'attachement de l'acétone avec l'atranorine en milieu acide.

La synthèse du composé **Se10** a été finalement réalisée grâce à la réaction de Wittig à partir de l'atranorine avec l'acétyl méthylène triphénylphosphorane (Fig. 87). Le composé **Se10** a été obtenu sous forme de poudre blanche (43,2 mg) avec un rendement de 39 %.

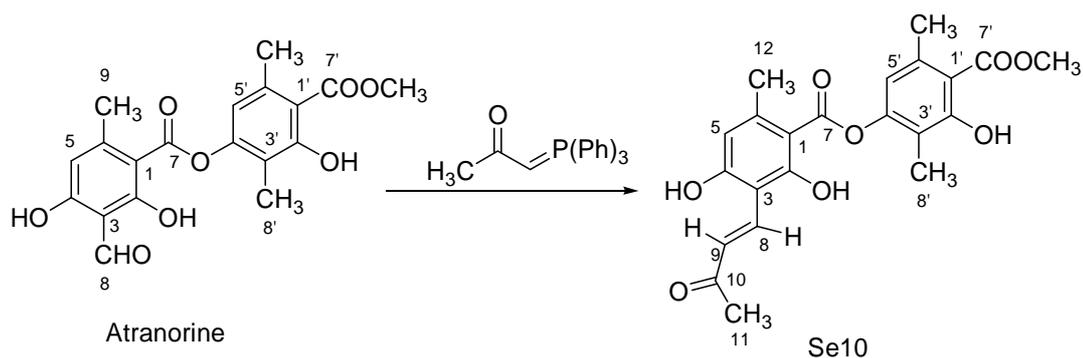


Figure 87 : Synthèse du composé Se10

5 Discussion

Le travail d'étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe nous a permis d'isoler 22 composés de structures originales et variées. Deux composés majoritaires sont représentatifs du type depside (atranorine) et du type depsidone (acide lobarique). Ce depside

est ici particulièrement abondant puisqu'il représente à lui seul 2,06 % de la quantité totale extractible à partir du lichen. Trois autres depsides, **Se10**, **Se11** et **Se21**, sont des composés apparentés de l'atranorine dont l'un est un nouveau composé, **Se10**. Le composé **Se10** est cependant produit à partir de l'atranorine lors de l'extraction par l'acétone. Il n'est pas étonnant que nous ayons également obtenu des composés monoaromatiques (MOC, atranol, orsellinate de méthyle et haemmatomate de méthyle) pouvant être formés suite à l'hydrolyse de la liaison ester de l'atranorine et du 3'-méthyllécanorate de méthyle, ceux-ci pouvant aussi être les précurseurs de ces depsides. Les autres composés tels que l'acide stictique, l'isidiophorine, la strepsiline, l'acide ursolique, le peroxyde d'ergostérol et le brassicastérol, sont retrouvés dans plusieurs espèces de ce genre. L'acide lobarique, une depsidone retrouvée en grande quantité (1.2 g) dans ce lichen, pourrait expliquer la co-occurrence de plusieurs diphenyléthers : lobarine, sakisacaulon A et leurs dérivés. Les diphenyléthers ont été parfois désignés comme des « pseudodepsidones » en raison de leur relation biosynthétique apparente. Les exemples proposés de la co-occurrence de diphenyléthers et depsidones sont l'acide lobarique et la lobarine dans le lichen *S. halei* Lamb [165], et loxodine, norlobaridone, isonorlobaridone et méthylpseudoester de norlobariol dans le lichen *Xanthoparmelia scabrosa* et *Xanthoparmelia amplexula* [177]. Récemment, une nouvelle pseudodepsidone, la lobastine, a été isolée à partir du lichen *S. alpinum* comme produit naturel [178]. Grâce à l'isolement de ces composés, nous proposons ici une relation biogénétique entre l'acide lobarique et les diphenyléthers isolés (Fig. 88).

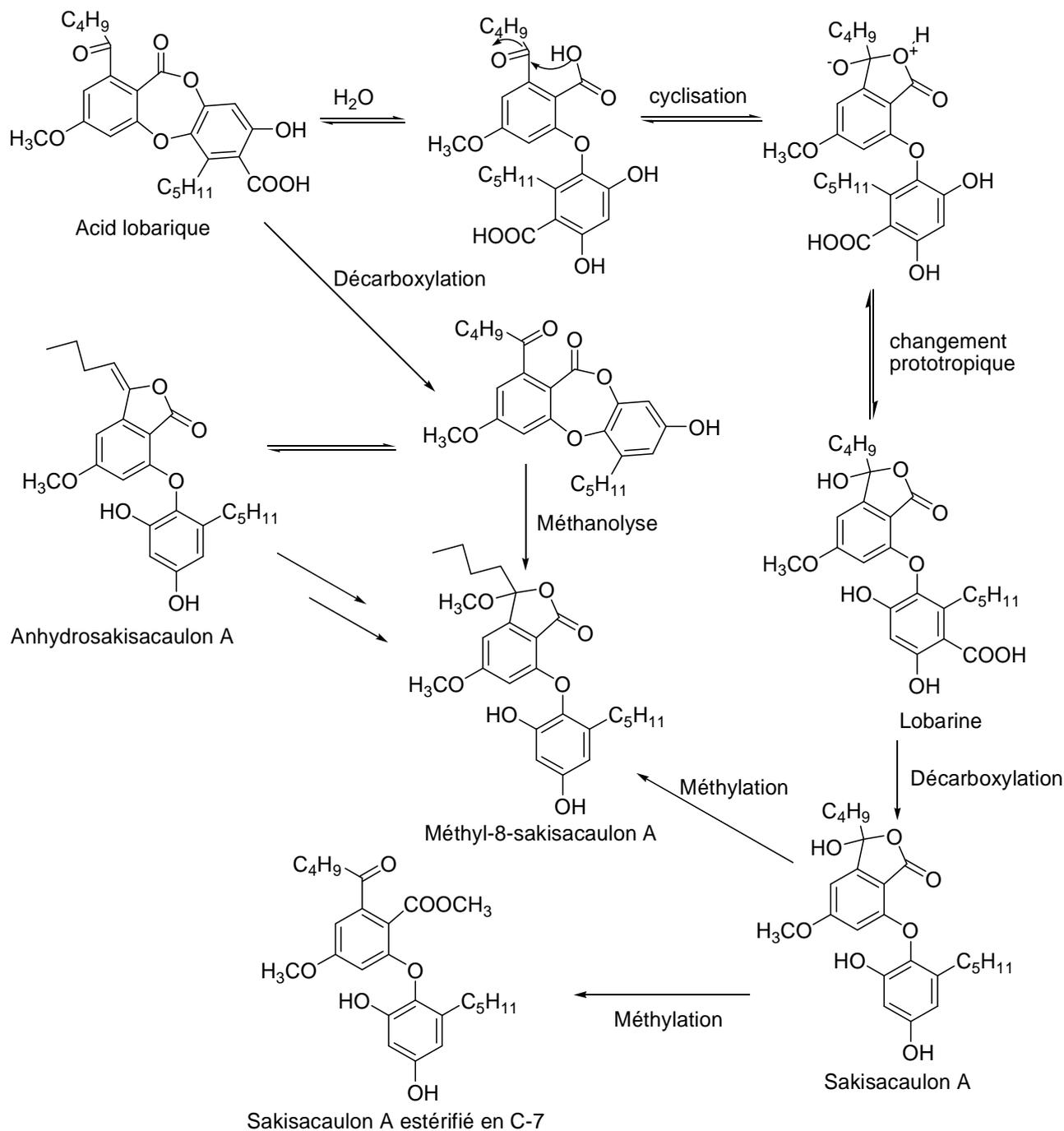


Figure 88 : Relation entre l'acide lobarique et les diphenyléthers isolés de *S. evolutum*

Une nouvelle lactone a été isolée, la 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-méthoxy-1(3*H*)-isobenzofurane. Structuralement, ce composé correspond à une des deux unités liées par une fonction éther et retrouvé dans la lobarine et le sakisacaulon A. Cela conduit à l'hypothèse qu'il pourrait dériver des diphenyléthers lors des étapes de séparation phytochimique (Fig. 89).

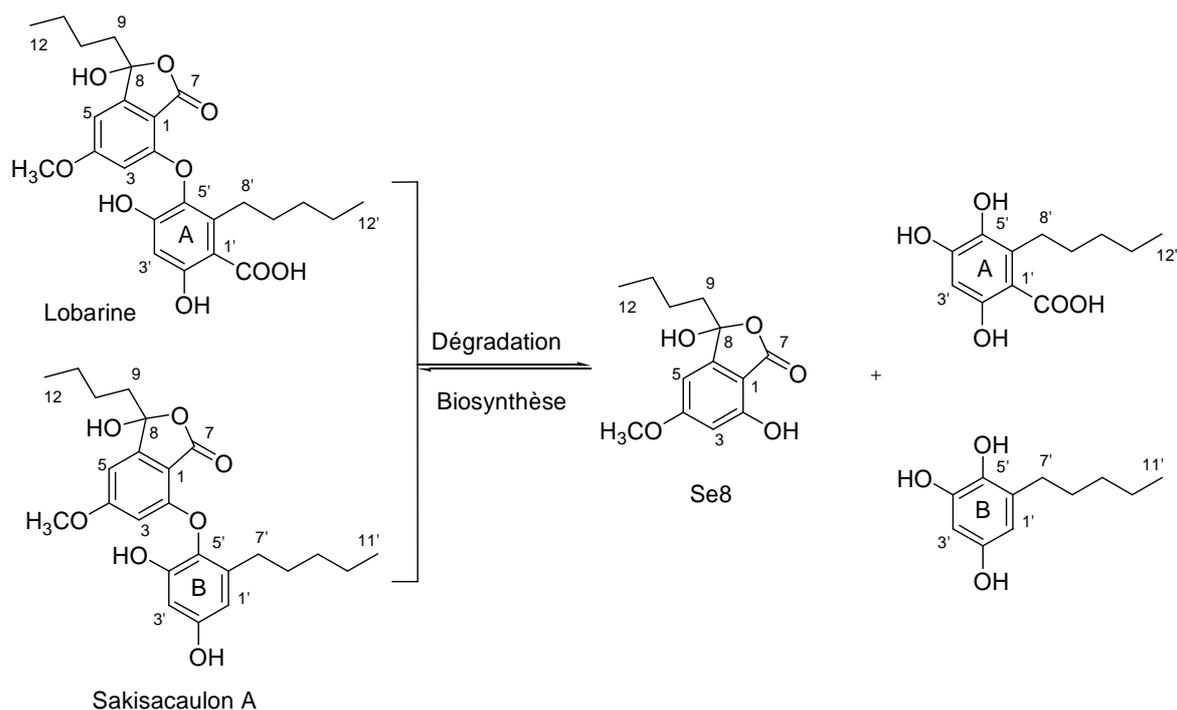


Figure 89 : Hypothèse sur la relation entre le composé Se8 , la lobarine et le sakisacaulon A

Pourtant, le résultat d'analyse des extraits «acétate d'éthyle» par LC-MS a montré que le composé Se8 n'est pas le produit de dégradation des diphenyléthers lors des étapes de séparation phytochimique. D'après ce résultat, le composé Se8 pourrait être naturellement présent. De plus, il pourrait être une de deux unités nécessaire à la biogénèse des diphenyléthers. Comme les depsides et les depsidones, les diphenyléthers pourraient être formés à partir de dérivés orcinol ou β -orcinol.

CHAPITRE 3 : EVALUATION BIOLOGIQUE DES METABOLITES ISOLES

Le travail de phytochimie a été complété par des études d'activité biologique dans l'optique de valoriser les molécules isolées et synthétisées en quantité suffisante. Deux activités ont été approfondies à travers les composés isolés :

- une activité sur le virus de l'hépatite C, suite à une sollicitation de l'équipe à laquelle appartient le Dr Jacques Le Seyec (IRSET, INSERM U1085, Fac de Pharmacie, Univ Rennes1) et un projet interéquipe soutenu à la fois par notre équipe PNSCM, UMR 6226 ISCR et la Fédération de recherche BIOSIT.

- une activité sur la phosphatase PTP1B en partenariat avec l'équipe autrichienne du Pr Hermann Stuppner compte tenu des activités décrites dans la littérature pour la lobarine et certains diphényléthers [60,179,180].

Nous avons pu également bénéficier de l'accès à la plateforme ImPACcell (Imagerie Pour Analyse du Contenu cellulaire, Université de Rennes1) où nous avons pu tester sur plusieurs lignées cellulaires la cytotoxicité de nos composés. Ce criblage réalisé en amont est intéressant pour repérer des produits dont la cytotoxicité sur des lignées cancéreuses peut orienter vers une valorisation comme anticancéreux mais aussi pour donner une appréciation de la cytotoxicité des composés que nous testons par ailleurs pour d'autres activités et où une absence de cytoxicité est un élément favorable.

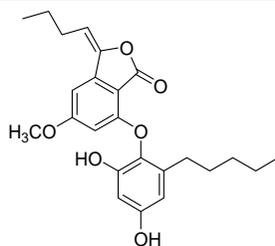
1 Etude de la cytotoxicité des produits isolés

Parmi les vingt-deux composés isolés, dix-neuf métabolites lichéniques disponibles en quantité suffisante ont été testés sur la plateforme ImPACcell. Dans un premier temps, une dose unique de 10 μ M a été évaluée sur six lignées cellulaires correspondant à plusieurs types de cellules cancéreuses et deux lignées de cellules dites « normales » (HaCat et Fibroblastes) (Tableau 24). Seuls deux produits ont montré une certaine cytotoxicité. L'anhydrosakisacaulon A **Se7** a montré une légère toxicité (d'environ 20 %) à 10 μ M sur les cellules cancéreuses de carcinome de colon (HCT116), d'adénocarcinome prostatique (PC3), de carcinome pulmonaire (NCI-H727) et s'est révélé plus toxique sur les cellules d'adénocarcinome colorectal (CaCo-2).

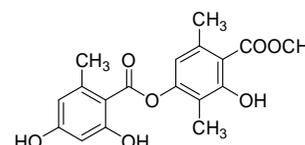
Le méthyl-3'-lécanorate de méthyle **Se21** a pour sa part montré une activité cytotoxique très intéressante sur toutes les lignées cancéreuses puisque la viabilité cellulaire après une dose unique de 10 μ M était d'environ 17 % sur les cellules HCT116, et de 30 % sur les cellules CaCo-2 et PC3. Même si une toxicité de 27 % apparaît sur les cellules HaCaT, il s'est révélé non cytotoxique sur les fibroblastes humains. Des tests sont en cours pour la détermination de son CI_{50} et affiner cette activité, d'autant que sa synthèse est envisageable.

Tableau 24 : Viabilité cellulaire (% par rapport au témoin cellulaire) des composés isolés sur sept lignées cellulaires après dépôt d'une dose unique à 10 µM (tests réalisés sur la plateforme ImPACcell)

Composé	Lignées cellulaires							
	HuH7	Caco-2	MDA-MB231	HCT116	PC3	NCI-H727	HaCaT	Fibroblastes
Atranorine (SeA)	98	109	85	107	101	82	97	95
Cladonioidésine (Se11)	Non testé car quantité insuffisante							
Méthyl-3'-lécanorate de méthyle (Se21)	52	30	66	17	35	69	27	90
Acétocladonioidésine (Se10)	89	104	99	109	91	89	95	97
8-hydroxy-4-O-déméthyl barbatate de méthyle (AR)	88	79	98	103	85	95	94	99
4-O-déméthylbarbatate de méthyle (AR2)	88	95	96	99	91	84	96	100
Atranol (Se2)	94	125	100	103	103	91	102	98
β-oricinocarboxylate de méthyle (Se1)	108	125	92	114	109	113	107	103
Orsellinate de méthyle (Se15)	96	107	100	108	103	85	102	93
Haematommate de méthyle (Se19)	97	92	96	100	93	95	94	91
Acide stictique (Se4)	90	118	96	90	85	70	82	98
Isidiophorine (Se9)	102	110	102	115	103	89	105	93
Acide lobarique (Se3)	96	123	87	102	88	93	92	98
Strepsiline (Se13)	91	115	95	114	102	79	104	94
Brassicastérol (Seh3)	116	108	98	109	96	92	99	97
Peroxyde d'ergostérol (Seh1)	110	95	101	106	95	91	94	94
Acide ursolique (Se12)	104	111	106	122	105	108	115	101
Lobarine (Se6)	94	101	85	107	84	92	88	98
Sakisacaulon A (Se5)	97	112	92	102	84	108	92	99
Anhydro-sakisacaulon A (Se7)	87	59	89	76	78	72	89	96
3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane (Se8)	92	122	89	94	92	106	87	95
Méthyl-8-sakisacaulon A (Se16)	Non testé car quantité insuffisante							
Acide norlobarique (Se18)	Non testé car quantité insuffisante							
Sakisacaulon A estérifié en C-7 (Se20)	Non testé car quantité insuffisante							



anhydro-sakisacaulon A



méthyl-3'-lécanorate de méthyle

Il est surprenant que méthyl-3'-lécanorate de méthyle **Se21** soit plus toxique que l'atranorine et l'acétocladoniodésine **Se10** dont les fonctions aldéhydique et vinylméthylcétone sur le carbone en C-3 sont connues pour entraîner des activités apoptotiques [181]. Certains composés comme le peroxyde d'ergostérol, l'atranorine, les dérivés monoaromatiques phénoliques, l'acide stictique, l'acide lobarique ont été évalués pour leurs propriétés cytotoxiques sur d'autres lignées cancéreuses à travers la littérature (Annexe 5). Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés puisque tous ont montré des activités cytotoxiques à des doses très supérieures à 10 μ M sauf le peroxyde d'ergostérol sur les cellules T47D [182] et l'acide ursolique, reconnu pour ses activités antitumorales [183–185].

Tous les autres composés testés n'affectent pas de manière significative la viabilité cellulaire à la concentration de 10 μ M et peuvent donc être évalués avec une certaine sécurité d'emploi (qui reste à vérifier) pour d'autres activités.

2 Activité antivirale contre le virus de l'hépatite C

(En collaboration avec le Dr Jacques Le Seyec, Equ. Agents antiinfectieux hépatotropes et co-facteurs environnementaux de l'IRSET = Institute of Research in Environmental and Occupational Health, INSERM U1085 Faculty of Pharmacy, France) <http://biosit.univ-rennes1.fr/plates-formes/ImPACell/>

Dans le cadre d'un projet interUMR déposé en novembre 2012 avec le Dr Jacques Le Seyec, il était prévu de tester sur le VHC les composés lichéniques qui ne présenteraient pas de forte toxicité cellulaire compte tenu du fait que les virus se multiplient en utilisant la machinerie cellulaire. Après avoir rappelé l'importance de cette recherche sur le VHC et donné des précisions sur ce virus et le protocole de recherche, nous détaillerons notre démarche et les résultats obtenus.

2.1 Le virus de l'hépatite C

Près de 170 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) soit 3% de la population mondiale. Chaque année, 3 à 4 millions de personnes supplémentaires sont contaminées par le VHC (OMS 2002). Le mode de transmission principal du VHC est parentéral. Suite à l'infection virale, une réponse immunitaire inflammatoire se déclenche. Celle-ci va soit conduire à une élimination rapide du virus (~ 20% des infections), soit, dans le cas d'une persistance virale (~ 80% des infections), induire une destruction lente du foie

évoluant progressivement en fibrose puis en cirrhose, pour aboutir finalement à l'éventuel développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Les virus des hépatites B et C (VHB, VHC) sont à l'origine de plus de 80% des hépatocarcinomes. Le cancer du foie est le 5^{ème} cancer le plus fréquent et la 3^{ème} cause de mortalité par cancer (OMS). Contrairement au VHB, à l'heure actuelle aucun vaccin n'existe pour se protéger de l'infection par le VHC qui connaît une grande variabilité génétique.

2.1.1 Morphologie

Le VHC appartient à la famille des Flaviviridae. Cette famille regroupe quatre genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* et *Hepacivirus* auquel appartient le VHC. Les virus de cette famille sont des virus enveloppés dont le génome est composé d'un ARN simple brin de polarité positive, linéaire et non segmenté et qui reste tout au long du cycle viral sous forme ARN. La traduction de la région codante donne naissance à une polyprotéine virale unique dont la maturation co- et post-traductionnelle donne naissance à au moins 10 protéines [186]. Ces protéines sont classées en protéines structurales (C, E1, E2, P7) et non structurales (enzymes virales) (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), comme représentées sur la figure 90.

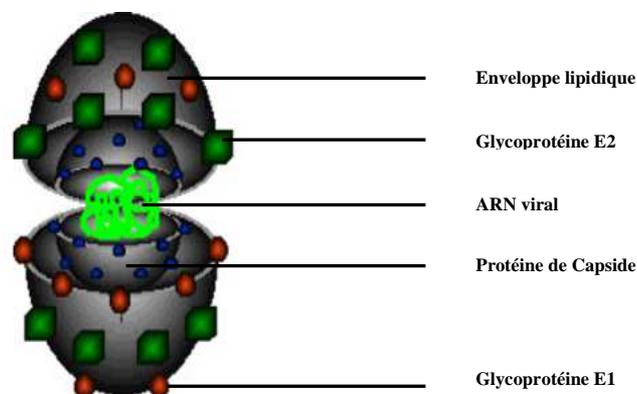


Figure 90: Morphologie du virion VHC (Image de Futura Sciences.com) issu de la thèse IIBoudo, 2013

Parmi les protéines structurales dont le rôle est plus connu, on peut citer la protéine de capsid C qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage des virus et les protéines d'enveloppe E1 et E2. Celles-ci sont impliquées dans la reconnaissance de la cellule cible et dans l'interaction des particules virales avec le(s) récepteur(s). Il est également supposé que par leur propriété fusogène, elles permettent la libération de la nucléocapsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible. L'ensemble de ces fonctions permet la pénétration du virus dans la cellule cible.

Au sein des protéines non structurales les plus connues, on trouve la protéinase NS2 qui jouerait aussi un rôle dans l'assemblage et la production des virions ainsi que la protéinase NS3 et la polymérase NS5B, enzyme clé du complexe de réplication puisqu'elle permet la synthèse des nouveaux ARN viraux de polarité (+) et (-). La protéine NS3 possède un rôle essentiel au cours de la réplication virale et de la persistance virale et est aujourd'hui une cible de choix pour le développement de nouveaux traitements antiviraux.

2.1.2 Le cycle viral

Les virus sont des particules inertes qui exploitent la machinerie de la cellule hôte pour réaliser leur cycle biologique. Ainsi, durant chacune des quatre étapes du cycle viral du VHC, le virus interagit avec de nombreux partenaires et structures cellulaires.

Plusieurs étapes sont nécessaires pour sa multiplication (Fig. 91):

- 1- Entrée du virus dans sa cellule hôte suivant un tropisme qui lui est propre. L'entrée du virus nécessite la reconnaissance de partenaire(s) cellulaire(s) exprimé(s) à la membrane plasmique permettant son attachement à la surface de la cellule. Une succession d'évènements permet ensuite la pénétration du virus dans la cellule et le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme.
- 2- Traduction du génome viral et maturation des protéines virales (de structure et enzymatiques) nécessaires au bon déroulement des étapes suivantes du cycle.
- 3- Réplication virale : le complexe de réplication se forme et aboutit à la synthèse de l'ARN viral de polarité négative et à l'amplification de l'ARN de polarité positive.
- 4- Assemblage de nouvelles particules virales et sécrétion dans le domaine extracellulaire.

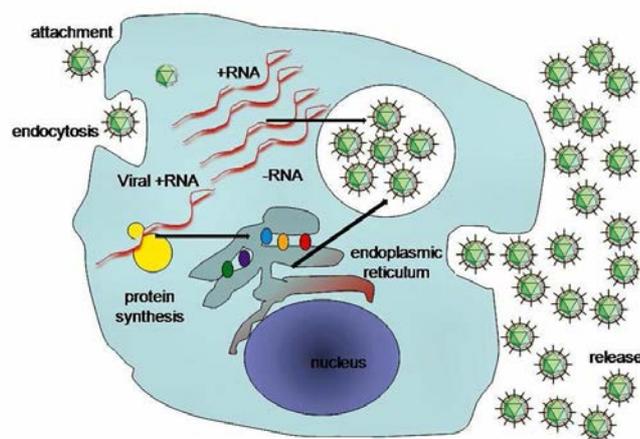


Figure 91: Cycle biologique du VHC (<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-hepatite-c-piste-faux-virus-synthetique-promet-beaucoup-32621>)

2.1.3 Stratégies thérapeutiques

Si le traitement standard contre l'infection par le VHC était basé dans les années 1990 sur l'association de l'interféron α (IFN- α) avec la ribavirine (analogue nucléosidique de la guanosine), les traitements actuels ont évolué. En 2001, le développement d'une forme stabilisée de l'IFN (IFN pégylé) associé à la ribavirine a augmenté le taux de Réponse Virologique Soutenue (RVS) à 80% mais les nombreux effets secondaires contraignent souvent les patients à arrêter le traitement. Le développement d'inhibiteurs spécifiques des protéines virales (NS3/4A, polymérase virale...) utilisés lors de quadrithérapies car ils ne sont pas appropriés pour la monothérapie en raison de la sélection rapide de variants viraux résistants, a permis récemment d'obtenir des taux de RVS de près de 100% pour la plupart des génotypes. Cependant le coût d'un tel traitement avoisine les 100 000€ et ne sera pas accessible aux pays en voie de développement qui comptent le plus grand nombre de patients. Pour cette raison, des efforts constants doivent être fournis dans le but d'identifier de nouvelles molécules antivirales, plus abordables. De récents rapports sur des composés naturels ont mis en lumière leur activité antivirale contre le VHC [187] (Fig. 92).

On peut citer des molécules apparentées aux **flavonoïdes** :

- La silybinine ou silymarine issues du chardon-marie *Silybum marianum* actifs contre la polymérase NS5B [188–190].
- L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) inhibant l'entrée du VHC indépendamment du génotype dans les lignées hépatiques [191,192].
- La ladanéine n'inhibant pas la liaison de la particule virale à la cellule, mais inhibant plutôt une étape ultérieure de l'entrée virale [193], non encore caractérisée.
- La quercétine inhibant la production des particules virales en culture cellulaire [194,195].

Des **lignanes** ont également été découverts :

- L'honokiol qui aurait un effet sur l'infection, l'entrée, la traduction et la réplication du VHC [196].
- Le 3-hydroxy-caruillignane C (3-HCL-C) inhibant la réplication de l'ARN du VHC [197].

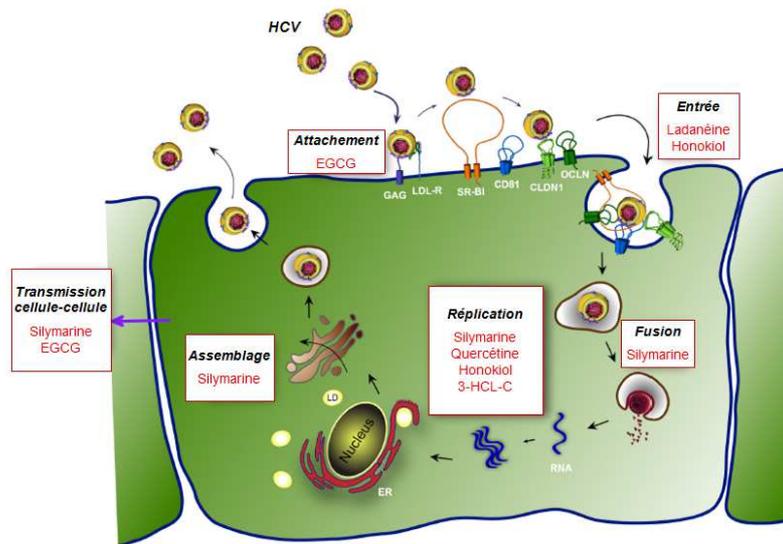


Figure 92 : Cycle biologique du VHC et cibles des plus puissants inhibiteurs naturels Epigallocatechine-3-gallate (EGCG), 3-hydroxy caruilligane C (3-HCL-C). Adaptée de [187]

2.2 Etude de l'activité antivirale de composés lichéniques dérivés de l'atranorine contre le virus de l'hépatite C (VHC)

2.2.1 Criblage préliminaire

Un criblage sur un virus amplifié en culture cellulaire (VHCcc) et portant sur 60 molécules lichéniques dont 13 avaient été isolées de notre lichen *S. evolutum* a été réalisé en collaboration avec le Dr Jacques Le Seyec. Il s'agit des molécules : atranorine **JB/A/134**, β -orcinol carboxylate de méthyle **JB/A/121**, atranol **Se2**, acide lobarique **Se3**, acide stictique **Se4**, isidiophorine **Se9**, sakisacaulon A **Se5**, lobarine **Se6**, anhydro-sakisacaulon A **Se7**, 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofuran **Se8**, strepsiline **Se13**, acide ursolique **Se12** et peroxyde d'ergostérol **Seh1**. Pour cet essai, les cellules étaient préincubées 1 heure en présence de la molécule testée avant leur infection par le virus. Ce protocole permettait ainsi de sélectionner des molécules ayant une activité soit sur l'entrée virale soit sur la réplication virale.

Lors de l'évaluation d'un composé, il est possible de déterminer simultanément :

- la viabilité cellulaire grâce un test WST-1 (partie expérimentale – partie 3.2.5).
- le niveau d'infection virale sur les cellules de la lignée hépatique humaine Huh7.5.1. par un test de luminescence (partie expérimentale – partie 3.2.6).

Pour chaque molécule et pour chaque concentration, la viabilité est établie (losanges bleus) déterminée grâce au test colorimétrique WST-1 ainsi que l'infection virale déterminée par le test à la luciférase (carrés rouges) (Fig. 93). Ceci permet de tracer une courbe de

viabilité et d'inhibition de l'infection virale. Il est important de visualiser simultanément ces deux résultats puisqu'un produit se doit d'être actif sur le virus sans être toxique pour les cellules.

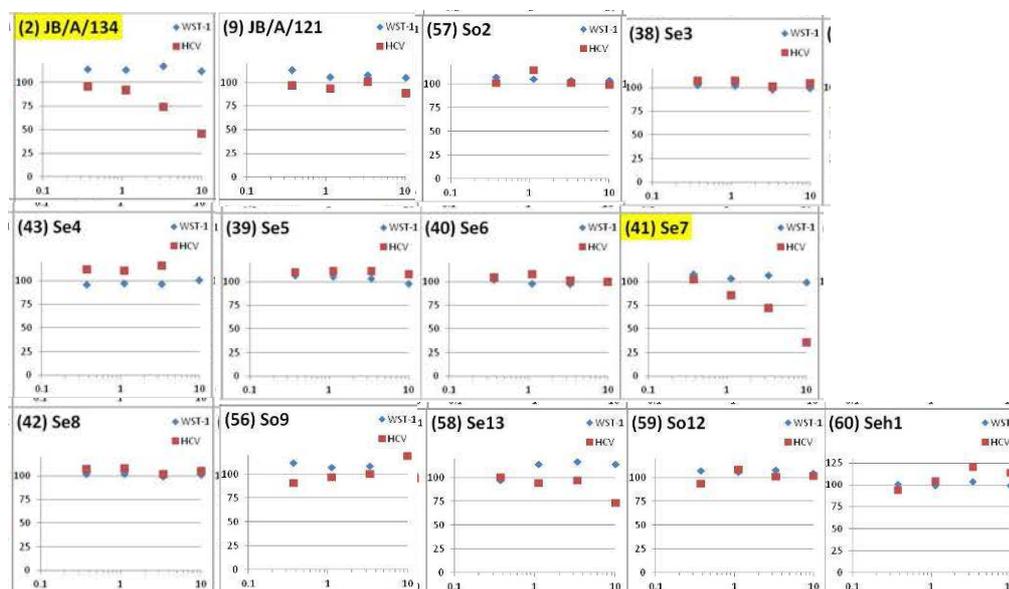


Figure 93: Résultats du criblage des 13 molécules isolées du lichen *S. evolutum* sur le virus du VHC en post-infection (JB/A/134 : Atranorine, JB/A/121 : MOC)

Les résultats figurent sur la figure 91. Deux molécules ont montré une activité inhibitrice sur la réplication du virus dont deux issues de notre lichen : l'atranorine (JB/A/134) et l'anhydro-sakisacaulon A **Se7**. Les composés proches de l'anhydro-sakisacaulon A comme le sakisacaulon A **Se5**, le 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8**, la lobarine **Se6** et l'acide lobarique **Se3** n'ont pas montré d'activité de même que l'atranol **Se2**, l'acide stictique **Se4**, l'isidiophorine **Se9**, la strepsiline **Se13**, l'acide ursolique **Se12** et le peroxyde d'ergostérol **Seh1**.

L'atranorine a été sélectionnée pour poursuivre les essais au contraire de l'anhydro-sakisacaulon A qui, à fortes concentrations $CI_{50} = 23 \mu M$, a montré une toxicité sur les cellules Huh7.5.1

2.2.2 Essais sur la pénétration et la réplication de l'atranorine et molécules dérivées

L'atranorine est composée de 2 unités aromatiques phénoliques et nous avons alors choisi d'élargir l'activité de cette molécule à toutes les molécules proches et apparentées isolés de *S. evolutum*. Nous avons ainsi sélectionné l'haematommate de méthyle, l'orsellinate de méthyle, l'atranol en ce qui concerne les dérivés monoaromatiques (obtenue en plus du β -orcinol carboxylate de méthyle déjà testé) et les depsides cladonioidésine **Se11**, méthyl-3'-

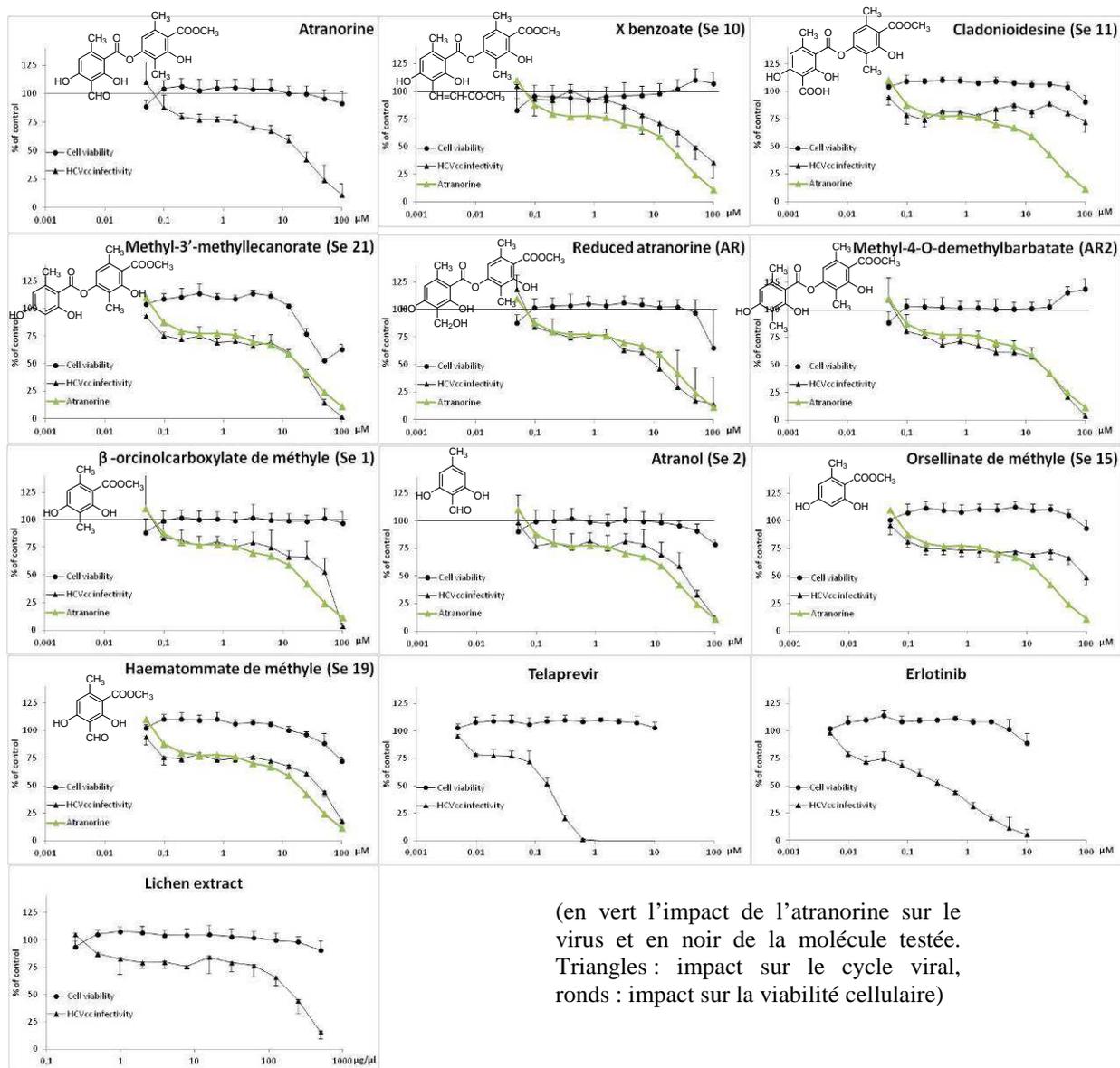
lécanorate **Se21** et (*E*)-3-(3-oxobut-1-én-yl)-atranorine **Se10** (Tableau 25). Ces trois dérivés de l'atranorine possèdent différents substituants portés sur le carbone C-3 : une fonction acide carboxylique pour **Se11**, aucun substituant pour **Se21**, une fonction méthyl vinyl cétone pour **Se10**, l'atranorine quant à elle possède une fonction aldéhyde. Nous avons alors décidé de synthétiser le 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle et le 8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle pour obtenir des composés avec des fonctions de degré d'oxydation inférieur c'est à dire une fonction méthyle et une fonction alcool méthylique, respectivement, pour les évaluer et en tirer des orientations sur la base de Relations Structure-Activité (chapitre 2, partie 4).

Tableau 25 : Structure de l'atranorine et composés apparentés

Composés	Structure	Composés	Structure
Atranorine		4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle	
(<i>E</i>)-3-(3-oxobut-1-én-yl)-atranorine		β -orcinolcarboxylate de méthyle	
Cladonioidésine		Atranol	
3'-méthyllécanorate de méthyle		Orsellinate de méthyle	
8-hydroxy-4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle		Haematommate de méthyle	
Erlotinib (témoin positif)		Télaprévir (témoin positif)	

L'essai a été réalisé en co-infection c'est-à-dire que le produit a été ajouté une heure avant le virus et est resté présent pendant les 48h de contact entre le virus et les cellules. Cette expérience permet d'apprécier à la fois l'action du produit sur l'étape de pénétration ainsi que sur l'étape de réplication. Deux témoins positifs ont été utilisés : l'**erlotinib** et le **télaprévir** qui interfèrent respectivement sur la pénétration et la réplication du virus. L'extrait brut de *S. evolutum* a également été testé.

Les courbes d'inhibition virale (Fig. 94) ont permis de calculer une valeur CI_{50} (concentration pour laquelle 50 % des virus sont inhibés) pour chacun des composés. Celles-ci figurent dans le tableau 26. Les molécules étant pas ou peu toxiques aux concentrations testées, Il n'est pas possible de déterminer une valeur de cytotoxicité qui détruit 50% des cellules Huh7.5.1 (Fig. 94) dans les conditions de l'expérience (CC_{50} = Concentrations Cytotoxiques pour 50% des cellules). Aussi avons nous indiqué les viabilités cellulaires obtenues à 50 et 100 μ M pour les composés (Tableau 26). Sur chacun des graphes, l'activité de l'atranorine a été reportée afin de comparer l'activité de nos composés par rapport à notre composé de référence.



(en vert l'impact de l'atranorine sur le virus et en noir de la molécule testée. Triangles : impact sur le cycle viral, ronds : impact sur la viabilité cellulaire)

Figure 94 : Activités antivirales sur le VHC de l'atranorine et composés apparentés

Les composés aromatiques monophénoliques se sont révélés moins actifs que les depsides avec des CI_{50} supérieures à 50 μM . Parmi les depsides, la cladonioidésine **Se11** s'est révélée inactive et le composé **Se10** portant une chaîne vinylméthylcétone peu actif. Ce dernier a d'ailleurs montré une grande variabilité dans les valeurs obtenues et son instabilité en solution pourrait en être la cause (chap 2 § 3.1.8) même si les solutions ont été préparées extemporanément. Les composés portant un hydrogène en C-3 (méthyl 3'-méthyllécanorate **Se21**) ou une fonction méthyle (4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle **AR2**) ont montré une activité dose dépendante similaire à l'atranorine (CI_{50} proche des 25 μM) et le composé portant une fonction alcool méthylique (8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbatate **AR**) s'est révélé être le plus actif (CI_{50} de 6.92 μM). Cependant, ce dernier a présenté un léger effet cytotoxique à 50 μM de même que le composé ne portant aucun substituant en C-3.

L'atranorine étant un composé majoritaire dans l'extrait (de l'ordre de 42%, chapitre 2, partie 3.4), il nous a paru intéressant de tester l'activité de l'extrait. La CI_{50} de l'extrait est de $255.1 \pm 50.58 \mu g/mL$, ce qui correspond à 28.6 μg d'atranorine, or la CI_{50} de l'atranorine est de $28.6 \pm 9.9 \mu M$. L'extrait est donc largement moins actif que le composé isolé. Ainsi, certains composés de l'extrait pourraient interagir avec l'atranorine et être responsables d'un effet antagoniste.

Pour la suite de nos expériences, deux composés ont été sélectionnés pour approfondir leur mécanisme d'action : l'atranorine comme chef de file et portant une fonction aldéhydique en C-3 et le composé de synthèse portant une fonction méthyle en C-3.

Tableau 26: Valeurs d'inhibition des activités antivirales (CI_{50}) pour les sept dérivés de l'atranorine ainsi que leur toxicité à 50 μM et à 100 μM .

Composés	CI_{50} (μM)	Viabilité à 50 μM	Viabilité à 100 μM
Atranorine	28.6±9.9	95.9±7.86	91.8 ±10.2
Acétocladonioidésine	64.5± 33.1	110.2±10.3	107.4 ±9.8
Cladonioidésine	≥ 100	104.0±4.3	90.4 ±4.3
méthyl-3'-lécanorate	25.4± 2.2	52.7±0.9	63.1 ±5.0
8-hydroxy-4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle	6.9± 2.3	97.1±11.9	65.2 ±34.8
4- <i>O</i> -déméthylbarbatate de méthyle	27.5± 11.8	115.7±5.3	119.0 ±8.9
β -orcinolcarboxylate de méthyle	50.6±6.0	101.2±9.8	97.3±10.8
Atranol	40.3±0.7	94.1±6.1	78.7 ±6.1
Orsellinate de méthyle	≥ 100	105.5±4.9	93.4 ±4.9
Haematommate de méthyle	55.5±10.5	88.1±9.5	72.2 ±3.5
Extrait global de <i>S. evolutum</i>	255.1±50.6	-	-
Erlotinib	0.20±0.02	107.5±5.9	103.0 ±5.6
Télaprevir	0.65±0.23	101.2±9.5	88.8 ±9.3

2.2.3 Etude de l'étape du cycle viral ciblée par l'atranorine et le 4-O-déméthylbarbatate de méthyle

L'atranorine et le 4-O-déméthylbarbatate de méthyle, ont été sélectionnés compte tenu de leur CI_{50} rapportée à leur toxicité relativement faible à 50 et 100 μM pour évaluer leur activité sur une des deux grandes étapes du cycle viral : l'étape de pénétration et/ou l'étape de réplication (chap 3 § 2.2.2).

Afin de répondre à cette question, deux protocoles ont été appliqués :

Protocole I (étape initiale de pénétration) : les cellules sont préincubées 1h dans un milieu contenant le produit testé. Ensuite la culture cellulaire est inoculée avec le virus en présence du produit pendant environ 17h. A la fin de cette étape d'inoculation, les cultures cellulaires sont lavées pour éliminer les virus de l'inoculum et le métabolite lichénique. La culture cellulaire est ensuite poursuivie pendant 48h supplémentaires en absence de composé, période pendant laquelle la réplication virale s'installe si l'infection n'a pas été préalablement inhibée par le métabolite lichénique. Ce protocole permet de tester l'effet du composé sur le stade de la pénétration virale (Fig. 95).

Protocole R (étape de réplication) : Les cultures cellulaires sont préalablement infectées pendant 17h par le virus (en absence des produits). A la fin de l'inoculation, les cultures cellulaires sont lavées pour éliminer les virus de l'inoculum. Les composés ne sont ajoutés au milieu de culture qu'après cette étape et sont laissés pendant 48h. Il est ainsi trop tard pour le produit d'agir lors de l'étape de pénétration car le virus a eu le temps de rentrer dans la cellule. Si le composé est actif, il ne peut alors agir que sur l'étape intracellulaire de réplication du génome viral. Cette étape dite de « réplication » teste l'effet du composé sur le stade de la réplication virale (Fig. 95).

Protocole I/R : Les composés restent présents à la fois pendant les étapes d'inoculation (I) et de réplication (R) (Fig. 95).

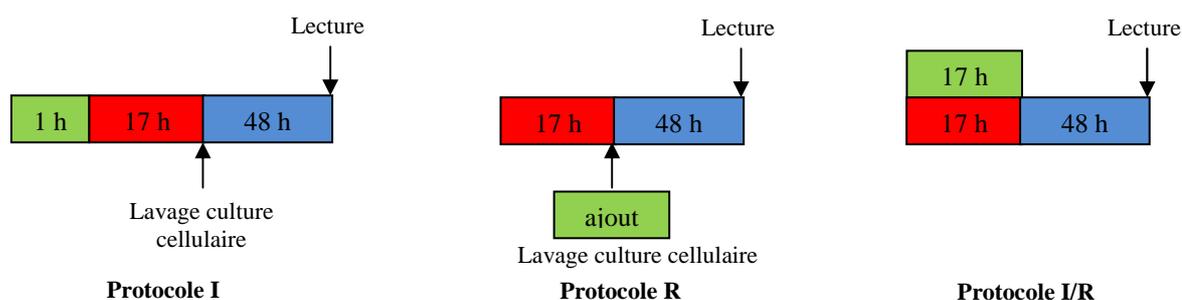


Figure 95: Schéma de présentation des protocoles (en vert : incubation du composé à tester avec les cellules ; en rouge : inoculation et incubation avec le virus; en bleu : poursuite de la culture)

Notons que ce protocole expérimental appliqué à ce modèle de propagation *in vitro* du VHC permet d'obtenir des profils d'inhibition distincts selon l'étape ciblée par le produit à tester (Fig. 95 graphes du haut). Ainsi un inhibiteur de l'entrée virale telle que l'erlotinib sera le plus efficace pour prévenir la propagation du virus lorsqu'il sera présent au cours de la période d'inoculation (conditions I et I/R). Cependant, un léger effet inhibiteur sera également visible lorsqu'il sera présent exclusivement pendant la période de « réplication » (condition R) car au cours de cette phase, de nouveaux virus (virions) sont produits et vont initier un nouveau cycle d'infection en débutant par l'étape de pénétration ciblée par l'inhibiteur. Par contre, un inhibiteur spécifique de la réplication tel que le télaprévir sera plus efficace lorsqu'il sera présent au cours de la période de « réplication » (condition R) mais sera également actif, à un moindre niveau, lors de sa présence au cours de l'inoculation (I). En effet, pendant cette étape de 17h, une infection asynchrone se met progressivement en place et les premières infections vont permettre la mise en place précoce d'une réplication qui sera enrayée par l'inhibiteur. Par conséquent, un effet additif sera visible dans la condition (I/R) lorsque l'inhibiteur est présent pendant l'inoculation et la réplication.

De la même façon que précédemment, la cytotoxicité du produit a été appréciée en même temps que son effet sur le cycle biologique du VHC (Fig. 96).

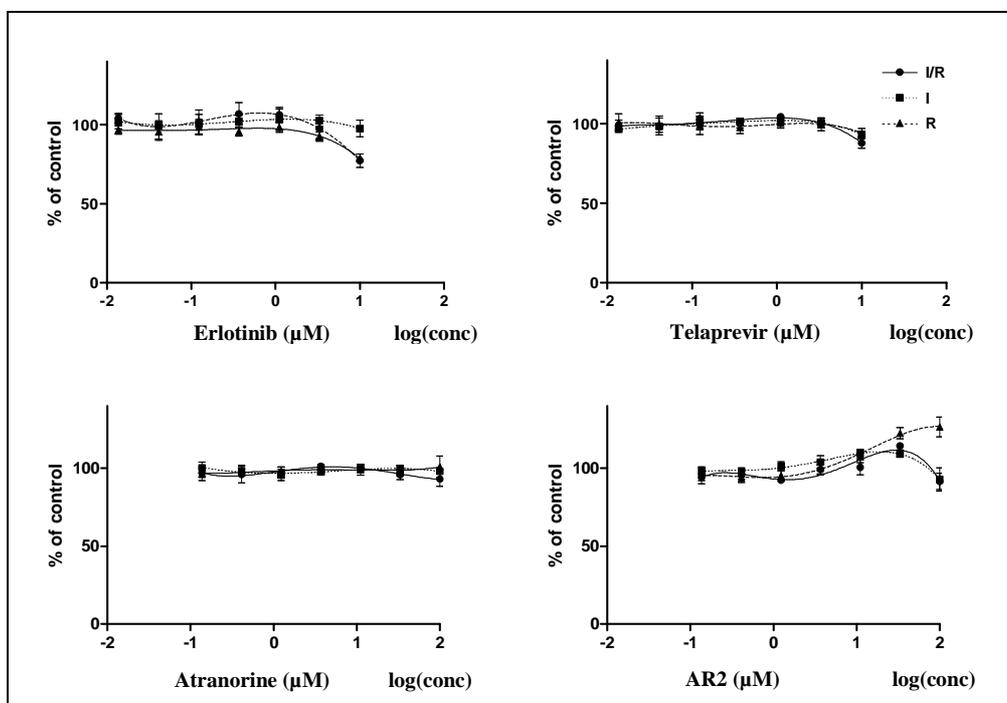


Figure 96: Cytotoxicité sur les cellules Huh7.5.1 de l'atranorine, du 4-O-déméthylbarbatate de méthyle (AR2) et des deux témoins, Erlotinib et Télaprévir

(rectangulaire : Inoculation (I) ; Triangle : Réplication (R) ; Rond : Inoculation/Réplication (I/R))

L'atranorine ne présente aucune cytotoxicité ainsi que le 4-*O*-demethylbarbatate de méthyle qui présente même une légère capacité à activer la prolifération cellulaire aux doses les plus élevées (Fig. 97).

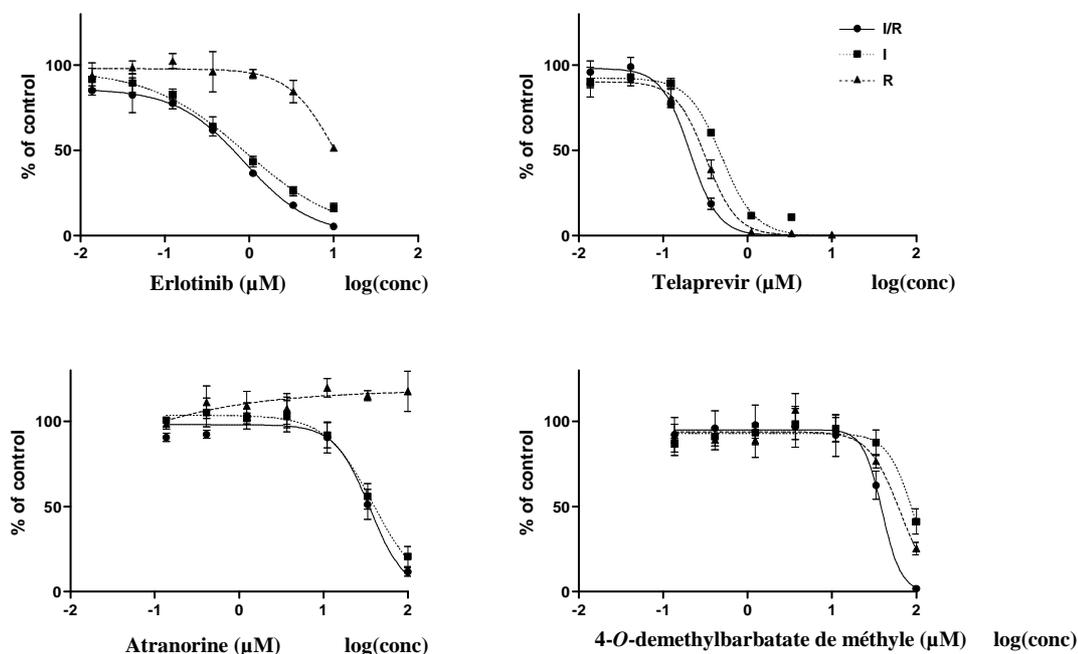


Figure 97: Effets sur les étapes de pénétration et de réplication de l'atranorine et du 4-*O*-déméthyl-barbatate de méthyle comparés aux deux témoins Erlotinib et Télaprèvir.

(rectangulaire : Inoculation (I) ; Triangle : Réplication (R) ; Rond : Inoculation/Réplication (I/R))

Les graphes obtenus (Fig. 97) permettent de mettre en évidence un profil d'activité similaire entre l'atranorine et l'erlotinib tandis que celui du 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle se rapproche de celui du Télaprèvir. Ainsi la fonction méthylique permettrait de cibler une action sur la réplication et la fonction aldéhydique aurait une action sur la pénétration du virus dans la cellule. La fonction aldéhydique est une fonction très active biologiquement et il se peut que sa réactivité s'exerce précocément et agisse donc sur l'étape de pénétration ce qui empêche son activité sur l'étape de réplication.

Certains composés naturels ont été décrits comme étant capables d'interférer sur la propagation du VHC mais jusqu'à ce jour aucun de ces composés n'était d'origine lichénique. Par contre, quelques métabolites lichéniques secondaires, tels que des anthraquinones, le dibenzofurane acide usnique (+) et un depside, l'acide sékikaique, avaient montré une activité de l'ordre de quelques μM sur respectivement le virus de l'herpes de type 1, des arénavirus et le virus respiratoire syncytial (annexe 7).

Plusieurs études complémentaires peuvent être envisagées pour poursuivre ce travail comme i) la détermination du mécanisme d'action impliqué : effet virucide ou/et ciblage de facteurs viraux ou cellulaires impliqués dans la propagation du virus (2.1.2) ii) le spectre d'activité de ces composés sur d'autres génotypes viraux iii) l'amélioration des propriétés antivirales par modulation de la fonction C-3 via la synthèse d'analogues iv) l'effet de la combinaison de ces substances naturelles avec des molécules de référence (2.1.3) puisque des multi-thérapies seront indispensables à la prévention de l'émergence de virus mutants résistants.

3 Activité sur l'enzyme PTP1B

Une activité inhibitrice décrite pour la lobarine sur la PTP1B [60,179,180] nous a incité à tester nos produits sur cette cible en sollicitant le Pr Stuppner (Innsbruck) qui avait évalué des composés végétaux comme inhibiteurs [198,199]. Les applications possibles peuvent concerner le traitement du diabète de type 2 ou des problèmes de surpoids [200].

3.1 Présentation de l'enzyme PTP1B et travaux antérieurs

La régulation de la phosphorylation des tyrosines est sous contrôle de protéines tyrosine kinases (PTKs) et de protéines tyrosine phosphatases (PTPs). Il existe une cinquantaine de gènes codant pour des PTPs et six mutations au niveau de ces gènes sont à l'origine de maladies génétiques (hypercholestérolémie, diabète, maladie d'Alzheimer...).

L'enzyme PTP1B ou Protein tyrosine phosphatase de type 1B est une de ces enzymes de type tyrosine phosphatase [201]. Elle a été purifiée à partir de placenta humain, décrite en 1988, cristallisée en 1994 [202] et de nombreuses études sont toujours en cours afin de cerner ses mécanismes de régulation.

Elle joue un rôle majeur en inhibant la voie de signalisation via les récepteurs à insuline et à leptine. Dans le cas de l'insuline et de la leptine, PTP1B déphosphoryle soit le récepteur à insuline (RI) ainsi que ses substrats primaires, les protéines IRS, soit la tyrosine kinase JAK2 (Janus kinase 2). PTP1B joue également un rôle dans la prolifération cellulaire. Ainsi cette enzyme suscite beaucoup d'intérêt pour d'éventuelles applications dans l'obésité, le diabète et le cancer.

3.1.1 Structure moléculaire et régulation de PTP1B

3.1.1.1 Présentation de l'enzyme PTP1B et de ses sites actifs

La protéine native PTP1B est composée de 435 acides aminés et possède plusieurs régions (Fig. 98):

- résidus de 30-278 : domaine catalytique de type phosphatase correspondant à la partie N-terminale (en vert sur la Fig. 98).
- résidus 279-401: région dite de régulation riche en proline (en violet sur la Fig. 98).
- résidus 401-435 : domaine dit de localisation membranaire qui permet l'accrochage de l'enzyme à la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique et correspondant à la partie C-terminale (domaine ER en orange sur la Fig. 98).

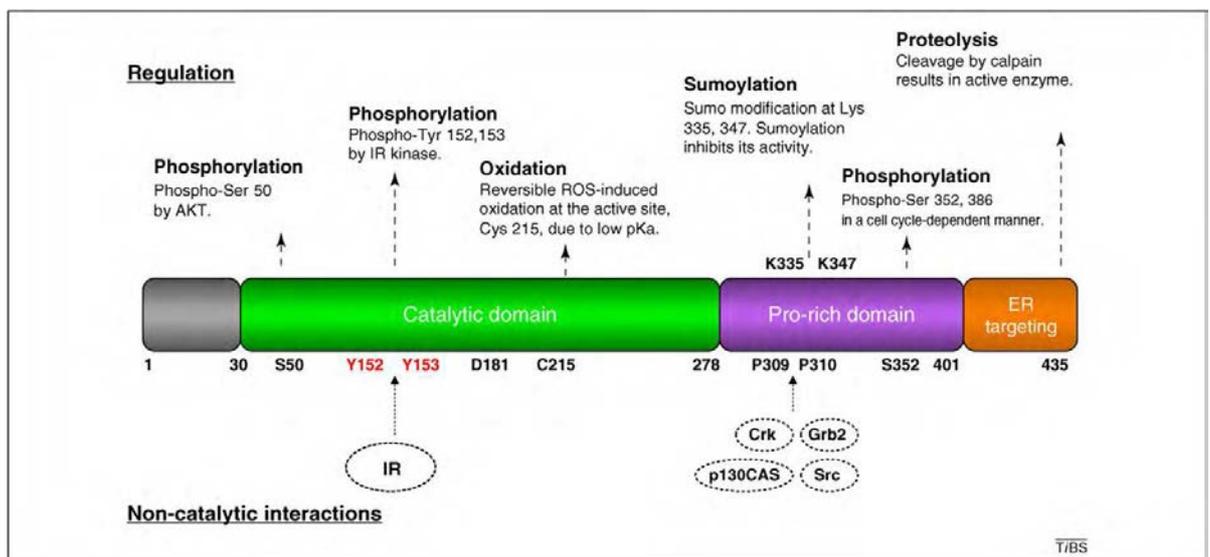


Figure 98 : Représentation schématique de la structure du domaine de PTP1B [203]

Le **site actif** de l'enzyme PTP1B se situe au niveau des acides aminés en position **30-278** et il renferme plusieurs régions importantes pour son activité : le **site catalytique** associé à la **boucle WPD** (tryptophane, proline, acide aspartique), le **site secondaire** d'attachement du groupe aryl-phosphate et quelques **sites annexes** pour augmenter les interactions entre la protéine et ses molécules d'attachement (Fig. 100).

La base du **site catalytique** est définie par le motif que l'on retrouve dans les PTP c'est-à-dire les résidus AA en position 214-221 qui forment une boucle rigide, en forme de berceau composée de 8 AA (**His214-Cys215-Ser216-Ala217-Gly218-Ileu219-Gly220-Arg221**) qui va fixer une moitié du groupe aryl-phosphate (Fig. 100) (le groupe phosphate est attaché en

4^{ème} position du groupe phényl de la tyrosine) du substrat tyrosine. Cette boucle contient également le site actif nucléophile de la Cys215. Quatre autres boucles portant des résidus invariants forment les bords de la clé catalytique et contribuent à la catalyse et à la reconnaissance du substrat (**Asp181**, **Phe182**, **Tyr46**, **Val49**, **Lys120**, **Gln262**). La profondeur de cette clé catalytique est de 8-9 Å et joue un rôle dans la sélectivité du substrat (par exemple la sérine et la thréonine (Fig. 99) ne peuvent pas atteindre la Cys215 pour une éventuelle activation).

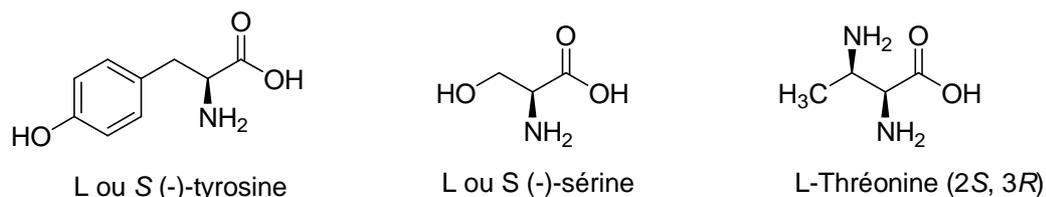


Figure 99 : Représentation de la structure de la tyrosine, sérine et thréonine

La **boucle WPD** (AA de **179-181 Trp179-Pro180-Asp181**) peut bouger d'environ 12 Å pour enfermer le noyau aromatique de la tyrosine au sein du site catalytique et ainsi augmenter les interactions hydrophobes. L'Asp181 (du site catalytique) peut ainsi jouer le rôle d'un acide et protoner le groupement tyrosyl, l'Arg221 peut se réorienter pour augmenter les liaisons ioniques avec le substrat phosphate et enfin la Cys215 est en position pour subir une attaque nucléophile du substrat contenant l'atome de phosphore. Cette boucle peut ainsi se présenter sous 2 formes, une forme ouverte et forme fermée.

Les inhibiteurs pourront donc soit inhiber PTP1B avec une boucle en position ouverte ou fermée tout en sachant que les inhibiteurs ciblant la « forme ouverte » sont de plus faibles inhibiteurs que ceux ciblant « la forme fermée ».

Les **sites secondaires de fixation du groupe aryl-phosphate** sont situés sur un site adjacent au site catalytique (**Arg24**, **Arg254**). Ce site est catalytiquement inactif et est responsable de plus faibles interactions avec le substrat qu'avec le site primaire d'autant plus qu'il est exposé aux solvants. Il intervient néanmoins pour permettre d'optimiser les interactions entre inhibiteurs de PTP1B et l'enzyme.

Quelques **sites annexes** sont également importants afin d'augmenter la sélectivité des inhibiteurs :

- **Arg47-Asp48** sont des AA chargés situés au-dessus de la poche du site catalytique et ils forment la région connue sous le nom **YRD**. En formant un pont ionique entre Asp48 et un inhibiteur contenant un atome d'azote, la sélectivité par rapport aux autres phosphatases est assurée.
- **Gly259** appartient à un site de fixation des tyrosines phosphatées proche du site catalytique et il permet de contrôler l'accès vers le site secondaire aryl-phosphate.

Ainsi, plus les inhibiteurs contiendront des substituants pouvant interagir avec toutes les régions d'intérêt de PTP1B, plus l'efficacité et la sélectivité seront augmentées.

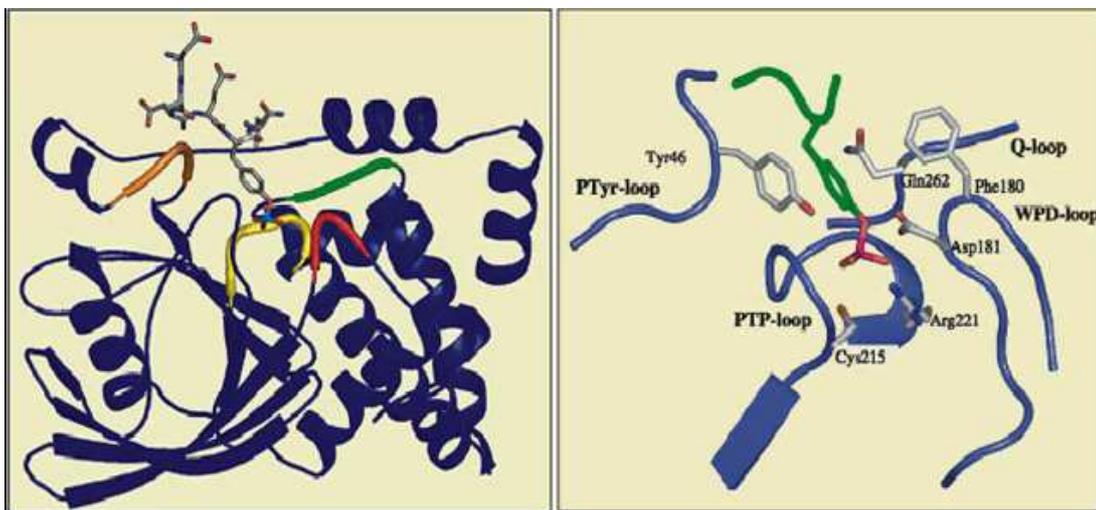


Figure 100 : Structure du site actif de PTP1B en présence d'un substrat de type hexapeptide [204]

3.1.1.2 Régulation et mécanisme d'action de l'enzyme

La cystéine 215, présente dans le site actif de l'enzyme PTP1B, est essentielle à la catalyse qui va permettre l'hydrolyse du phosphate. Cette catalyse comprend 2 étapes (Fig. 101):

- La première étape consiste en une attaque nucléophile sur le phosphate du substrat par l'atome de soufre de thiolate de la cystéine 215. Il se forme un intermédiaire phosphate et le départ du substrat déphosphorylé est favorisé par une protonation par un acide aspartique 181 proche du site catalytique.
- La deuxième étape est une hydrolyse de l'intermédiaire phosphate. Cela conduit à la libération d'un phosphate et à la restitution de la phosphatase. Cette hydrolyse se produit grâce à la glutamine Gln262 donnant une molécule d'eau et l'acide aspartique Asp181 fonctionnant comme une base conjuguée.

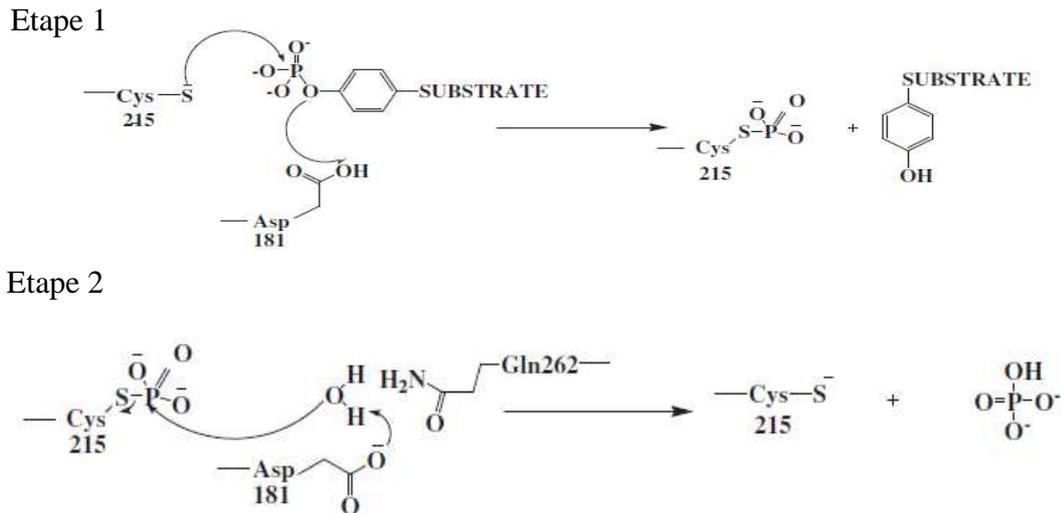


Figure 101 : Mécanisme catalytique de PTP1B [204]

Pour que les substrats puissent être actifs, il faut qu'ils puissent parvenir à la surface du réticulum endoplasmique et quatre mécanismes (qui peuvent travailler de façon indépendante ou en synergie) interviennent : des phénomènes d'oxydation, de phosphorylation, de sumoylation et de protéolyse. Nous précisons ici ces quatre mécanismes impliqués [203] :

3.1.2 Les activités biologiques de PTP1B

Les phosphatases PTP1B sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques. Par conséquent, elles peuvent intervenir dans l'expression de plusieurs maladies. Trois grandes activités sont actuellement décrites pour PTP1B : action sur le métabolisme, action sur l'oncogénèse et action sur les maladies neuro-dégénératives [203].

3.1.2.1 Action sur le métabolisme

PTP1B exerce un contrôle négatif sur les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme de l'insuline et de la leptine et pourrait être utilisé dans le traitement du diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant) et de l'obésité.

Le diabète correspond à une élévation prolongée de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Dans le cas du diabète de type 2, on constate une baisse de sensibilité des cellules à l'insuline (on parle d'insulino-résistance), notamment sous l'effet de l'obésité ou de la sédentarité. Pour répondre à la demande accrue en insuline qui en découle, les cellules insulino-sécrétrices du pancréas produisent davantage d'insuline (hyperinsulinisme) jusqu'à ce qu'elles ne puissent plus répondre ou finissent par s'épuiser. La production d'insuline devient alors insuffisante conduisant à une accumulation de glucose dans le sang

(hyperglycémie). Autrement dit, l'insuline est produite en quantité insuffisante face à une demande accrue.

Moléculairement et en conditions physiologiques, la stimulation par fixation de l'insuline à son récepteur conduit à l'autophosphorylation et l'activation du récepteur à l'insuline de type 1 (IRS-1) par phosphorylation de la tyrosine. Ces premières étapes conduisent alors à l'activation du phosphatidyl-inositol de type 3 (PI3K) et de AKT qui permettent alors la translocation du transporteur au glucose GLUT4. La phosphatase PTP1B atténue cette cascade d'activation en déphosphorylant IRS-1 et ce qui est attendu en cas de diabète de type 2 est d'inhiber cette déphosphorylation (Fig. 102, en rouge).

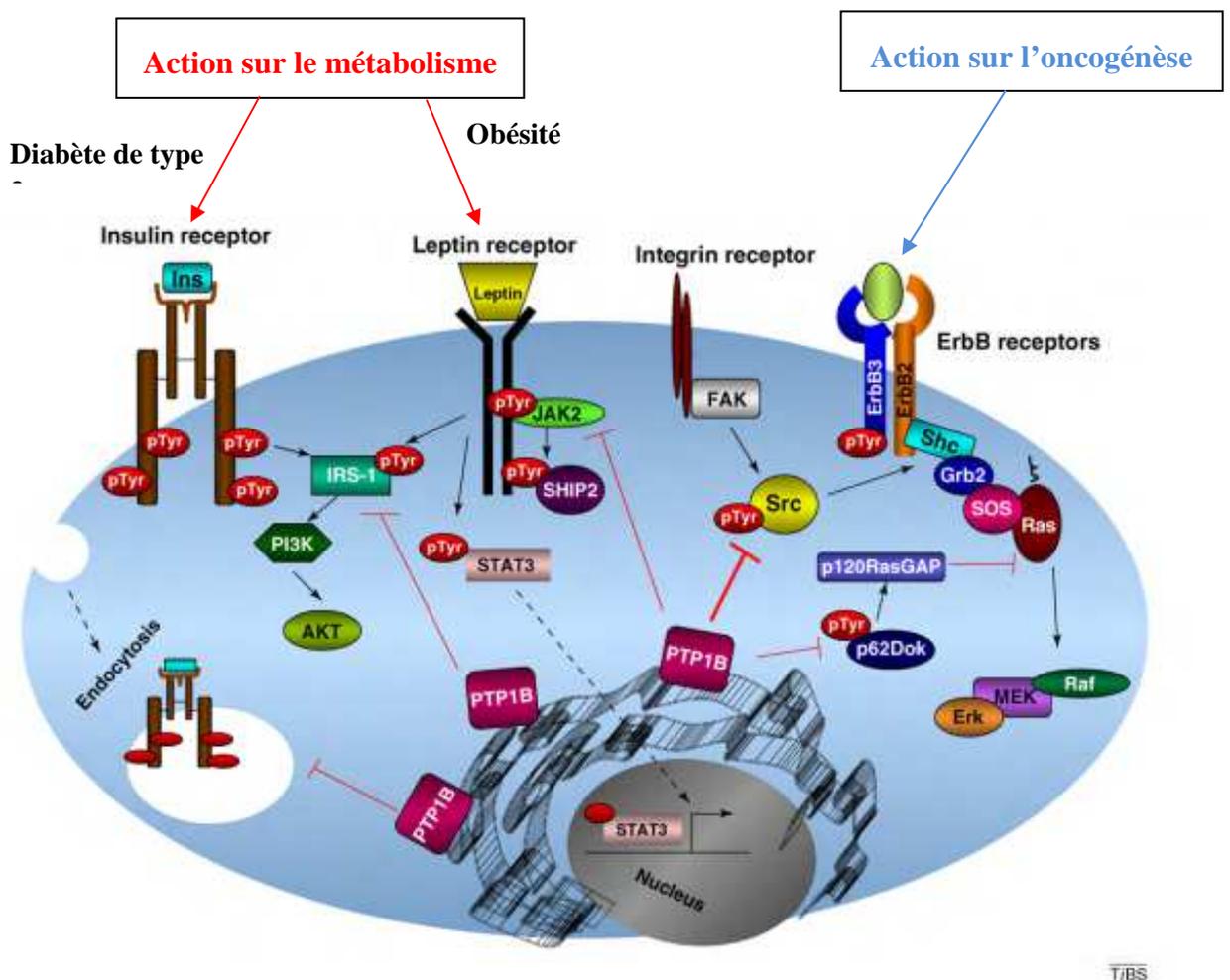


Figure 102: Signalisation métabolique et oncogénique de PTP1B [203]

La leptine est une hormone peptidique qui régule les réserves de graisses dans l'organisme et l'appétit en contrôlant la sensation de satiété. En conditions physiologiques, l'hypothalamus sécrète deux neuropeptides orexigènes (NPY et AgRP) dont la sécrétion est inhibée par la leptine, l'insuline et deux neuropeptides anorexigènes POMC et CART (eux-

mêmes sous contrôle de la leptine et de l'insuline). Une sécrétion importante de leptine induit une lipolyse, une inhibition de la lipogenèse et une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Elle diminue également la sécrétion en insuline et réduit la néoglucogénèse interprandiale. Elle agira à faible dose en stabilisant la résorption osseuse.

Moléculairement, la fixation de la leptine à son récepteur permet la phosphorylation des tyrosines de la protéine kinase JAK2 et l'activation du facteur de transcription STAT-3. Ces deux facteurs sont des cibles directes de PTP1B. La phosphatase PTP1B atténue cette cascade d'activation en déphosphorylant JAK2 ce qui est attendu dans les cas d'obésité (Fig. 102, en rouge).

3.1.2.2 Action sur l'oncogénèse

Cette enzyme pourrait également jouer un rôle en oncogénèse (Fig. 102, en bleu). En effet, PTP1B possède un contrôle positif sur le gène ErbB2 (aussi dénommé HER2) qui code pour des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques eux-mêmes impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation de la cellule. Le fait que cette protéine soit l'élément déclencheur d'une cascade de réactions biologiques fait d'elle l'origine de la prolifération cellulaire. Dans certains cancers du sein (20-30%), ce gène est amplifié à cause de mutations et conduit à une augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule. La surexpression de HER2 résultant de cette mutation s'accompagne alors d'une prolifération des cellules cancéreuses. PTP1B est capable d'agir sur la cascade d'activation cellulaire en déphosphorylant des intermédiaires comme p62Dok, p120RasGAP capables d'activer la voie des Ras-MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire. PTP1B permet ainsi de moduler la prolifération cellulaire et pourrait jouer un rôle dans l'oncogénèse. De la même façon, PTP1B pourrait jouer un rôle sur le proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src en le déphosphorylant ce qui conduit à l'inactivation de petites GTPases comme Ras et Rac impliquées dans la prolifération cellulaire.

3.1.2.3 Action sur les maladies neuro-dégénératives

La myéline entoure, protège, nourrit, isole les fibres nerveuses et joue un rôle clé dans la transmission nerveuse. Elle est détruite chez les individus atteints d'Adréno-leucodystrophie (ALD), maladie génétique touchant un individu sur 17'000. Jusqu'à 65% des malades risquent de subir une démyélinisation cérébrale, entraînant des déficits nerveux, moteurs, et cognitifs, fatals. À ce jour, aucun traitement efficace n'a atteint le marché. Or, des facteurs trophiques

(IGF-1 ou NT-3) ont la capacité de promouvoir la survie de ces cellules et la production de myéline. En 2002, l'équipe de Buckley a montré que dans des cellules déficientes en PTP1B, le signal de IGF-1 (Insulin growth factor-1) était augmenté ainsi que l'activité des récepteurs de IGF-1 [205]. Or les régions de phosphorylation des récepteurs à l'insuline et des récepteurs d'IGF-1 sont très proches et les récepteurs d'IGF-1 représenteraient un bon substrat pour les ligands de PTP1B. En modulant l'activité des récepteurs d'IGF-1, les ligands de PTP1B pourrait ainsi jouer dans les maladies neurodégénératives.

De même, la voie de IIS [insulin/IGF-1 (insulin-like growth factor 1) est très importante pour la longévité, l'homéostasie protéique, l'apprentissage des phénomènes cognitifs au niveau cérébral. Dans la maladie d'Alzheimer, cette voie est surexprimée par l'activation d'une sérine/thréonine Akt qui phosphoryle plusieurs cibles dont l'IRS-1 (insulin receptor substrate 1) qui est alors inactivé. En diminuant les niveaux de IGF-1R, l'homéostasie de la protéine Tau et du peptide Ab est perturbée et permettrait d'améliorer les fonctions cognitives et de rester plus longtemps en bonne santé [206]. En agissant sur PTP1B, cette voie pourrait être utile dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

3.1.3 Inhibiteurs de PTP1B

La cible PTP1B est une cible toujours d'actualité et les nombreux articles publiés quotidiennement l'indiquent clairement. Actuellement, de nombreux motifs structuraux ont été identifiés et développés par l'industrie pharmaceutique et les laboratoires universitaires en ciblant les sites d'intérêt nécessaires pour optimiser le *drug-design* de ces inhibiteurs.

3.1.3.1 Les composés synthétiques

Les propriétés électrostatiques du site catalytique de PTP1B sont optimales pour le substrat phosphotyrosine qui comporte 2 charges électrostatiques à pH physiologique. Les ligands chargés seraient donc à privilégier en tant qu'inhibiteurs mais ils ne peuvent que difficilement passer les membranes physiologiques. Il s'agit donc de trouver des composés inhibiteurs puissants, sélectifs, et suffisamment biodisponibles sous forme orale. Actuellement, l'inhibiteur ISIS-113715 est le seul inhibiteur en essai clinique de phase 2. Il s'agit d'un oligonucléotide antisens de 20-mers qui a été développé par la société ISIS Pharmaceuticals Inc. pour la prise en charge du diabète de type 2 [207–210]. Récemment, Lantz [211] rapporte que la trodusquemine (Fig. 103) était un inhibiteur efficace de PTP1B central et périphérique avec le potentiel de déclencher une perte de poids spécifique en matière grasse, et d'améliorer les taux d'insuline et de leptine.

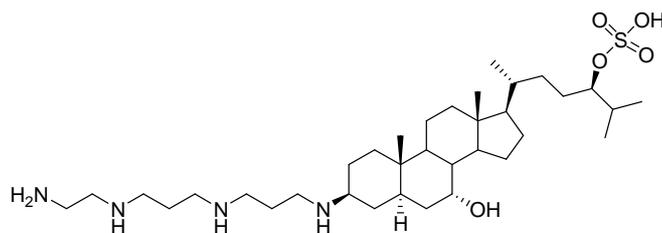
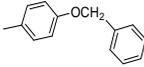
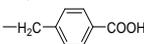
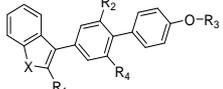
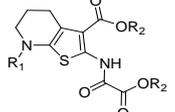
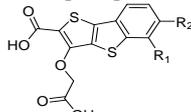
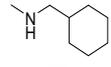
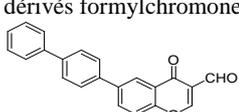
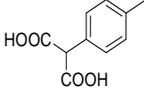
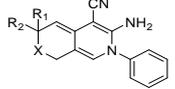
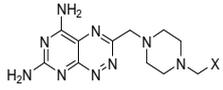
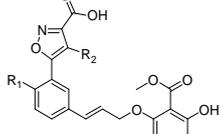
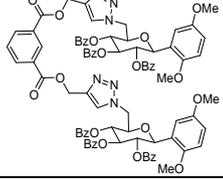


Figure 103 : Représentation de la structure de la trodusquémine

De nombreux composés synthétiques ont été synthétisés et 139 composés sont décrits dans la publication de Thareja, 2010 [204] mettant en évidence les nombreux motifs susceptibles d'interagir avec la phosphatase PTP1B. On peut citer des composés de type thiazolidinediones, des dérivés phosphorés ionisés mimant le peptide phosphotyrosyl, des dérivés isothiazolidinones, des benzofuranes et biphényles benzothiophènes, des composés contenant du vanadium, des dérivés de l'acide 2-oxalylamino benzoïque, des 1,2-naphtoquinones, des dérivés formylchromones, des analogues de la pyridazine, des acétophénones, des dérivés pyrimido[5,4-3][1,2,4] triazine-5,7-diamine, des dérivés catéchols, des cyclopenta[d][1,2]-oxazine, des acides carboxyliques isoxazole, des composés miscellaires et des dérivés acides non phosphorés mais contenant un motif phosphotyrosyl (Tableau 27).

Tableau 27 : Structures et activités d'inhibiteurs synthétiques de PTP1B [204]

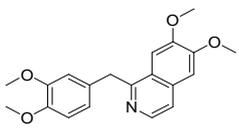
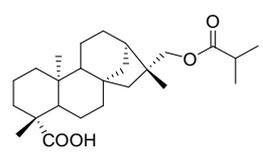
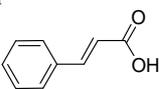
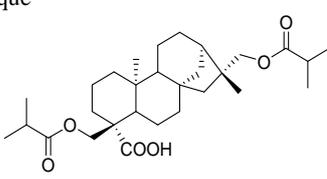
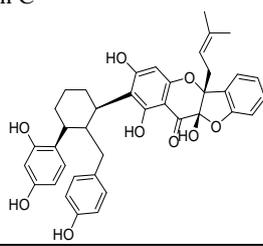
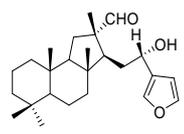
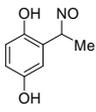
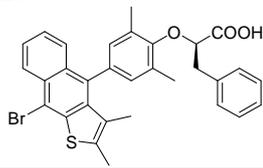
Type de composé	Structure	IC ₅₀ (µM)	Type de composé	Structure	IC ₅₀ (µM)	
Thiazodinediones	Ar :  X : 	1.6 ± 0.2	 X=O Biphényles benzofuranes X=S : biphényles benzothiophènes	X=O, R ₁ =C ₆ H ₅ CH ₂ -, R ₂ =R ₄ =H, R ₃ =CH(CH ₂ Ph)COOH	0.32	
Phosphotyrosyl mimétique	R ₁ : H R ₂ : 	0.074	dérivés de l'acide 2-oxalylamino benzoïque		R ₁ =H, R ₂ =H R ₁ =(CH ₂) ₂ Ph, R ₂ =H	0.29 0.27
Dérivés isothiazolidiones	R : 	3.0	1,2-napthoquinones		R ₁ :  R ₂ : H	0.92
Dérivés isothiazolidiones	R : 	0.8	dérivés formylchromones			4.3±0.1
dérivés acides non phosphorés	R : 	0.07	analogues de la pyridazine		R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =2-iPropyl, X=S R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =4-F, X=S R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =OMe, X=S R ₁ =R ₂ =R ₃ =H, X=S R ₁ =R ₂ =CH ₃ , R ₃ =2-butyl, R ₄ =O	2.0 2.0 1.3 1.1 1.5
Acétophénones		100	des dérivés pyrimido[5,4-3][1,2,4] triazine-5,7-diamine		X=C ₆ H ₅ X=biphényles X=1-Naphtyl X=2-Naphtyl	6.2 2.9 3.5 4.5
dérivés catéchols	R=CH ₂ Ph-4-OME, R ₁ =R ₂ =Ac, Ar=C ₆ H ₅ R=R ₁ =R ₂ =Ar=H	3.89 1.25	cyclopenta[d][1,2]-oxazine		R ₁ =R ₂ =H R ₁ =F, R ₂ =H R ₁ =H, R ₂ =NH ₂ R ₁ =F, R ₂ =CH ₂ OH	K _i =5.7 K _i =6.9 K _i =2.1 K _i =0.92
acides carboxyliques isoxazole			composés miscellaires		Gluco Glacto	0.87 0.88

3.1.3.2 Les composés naturels issus des plantes, champignons et éponges

Les composés naturels ont toujours été une source d'inspiration et parmi ceux qui ont montré une activité inhibitrice de PTP1B, on peut citer des dérivés flavonoïdes (flavonol, flavane, chalcone, flavanones) possédant ou non des chaînes isoprényles et prényles, des alcaloïdes isoquinoliniques (berbérine, papavérine), des dérivés arylbenzofuranes avec des chaînes isoprényles, des dérivés de l'acide cinnamique et chlorogénique, des diterpènes, des triterpènes, des anthraquinones. Dans le tableau 28, quelques exemples figurent.

Quelques composés sont issus de cultures de champignons comme la déphostatine (*Streptomyces sp.*) mais aussi d'éponges marines comme l'hyrtiosal (*Hyrtios erectus*).

Tableau 28 : Composés naturels inhibiteurs de PTP1B [204]

Composé	IC ₅₀ (μ M)	Composé	IC ₅₀ (μ M)
Papavérine 	1.20	Acide ent-16 β H, 17-isobutyryloxy-kauran-19-oïque 	8.7 \pm 0.9
Acide cinnamique 	29.7	Acide ent-16 β H, 18-isobutyryloxy-kauran-19-oïque 	30.6 \pm 2.1
Sangganon C 	2.6 \pm 0.3	Hyrtiosal 	42
Déphostatine 	7.7	Ertiprotafib 	1.4 \pm 0.1

3.1.3.3 Les composés issus lichens

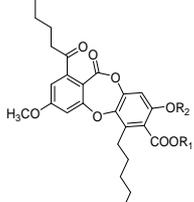
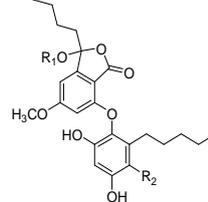
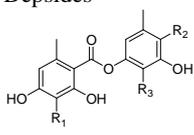
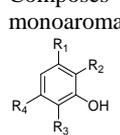
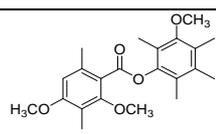
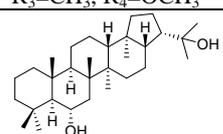
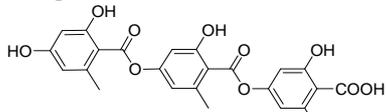
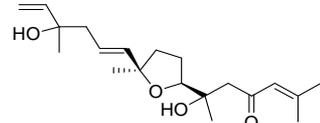
Les composés lichéniques ont également été testés sur cette cible PTP1B (Tableau 29). En 2009, deux dérivés de type diphényléthers (sakisacaulon A méthylé, lobarine méthylée) et trois depsidones (acide lobarique et 2 de ses dérivés méthylés et méthoxylés) issus de

Stereocaulon alpinum ont montré une activité intéressante sur la phosphatase PTP1B [58]. En 2012, un brevet portant sur un composé issu de l'hydrolyse alcaline de l'acide lobarique, la lobarine, est déposé pour une prise en charge dans le diabète de type 2 et l'obésité [179,180]. La lobarine est également un composé retrouvé naturellement dans le genre *Stereocaulon*.

Des composés de type depside ont également été testés comme l'atranorine [60], l'acide lécanorique [58], la brialmontine [212] avec des CI_{50} sur l'enzyme de 63.5 μM , 31 μM , 14 μM respectivement. Les composés monoaromatiques phénoliques comme l'orsellinate de méthyle ($CI_{50} > 200 \mu M$), l'éthylhaematommate ($CI_{50} > 200 \mu M$), 2,6-dihydroxy-4-methoxy-3-méthylacetophénone ($CI_{50} > 200 \mu M$), le β -orcinol carboxylate de méthyle ($CI_{50} = 51.5 \mu M$) ont également été testés mais n'ont pas montré une activité notable. Le tridepside acide gyrophorique isolé de *Umbilicaria antarctica* et le triterpène, 22-hopanediol isolé de *Lecidella carpathica* ont montré des CI_{50} similaires au composé de référence acide ursolique (de l'ordre de 3 μM), et agiraient en tant qu'inhibiteurs non compétitifs [58,212].

Des diterpènes de type furane ont été isolés de lichens du genre *Huea sp.* et l'un des composés l'hueafuranoïde A a montré une activité inhibitrice sur PTP1B (de type non compétitive) avec une CI_{50} de 13.9 μM sur le test enzymatique [57].

Tableau 29 : Structures des composés lichéniques testés sur PTP1B et valeurs de leurs CI_{50} (μM) [204]

Type de composés	Structure	IC_{50} (μM)	Type de composés	Structure	IC_{50} (μM)
Depsidones	<ul style="list-style-type: none"> - $R_1=R_2=H$ - $R_1=CH_3, R_2=H$ - $R_1=R_2=CH_3$ 	0.87 3.02 7.42	Diphényléthers	<ul style="list-style-type: none"> - $R_1=CH_3, R_2=H$ - $R_1=CH_3, R_2=COOH$ - $R_1=H, R_2=COOH$ 	6.86 2.48
Depsides	<ul style="list-style-type: none"> - $R_1=CHO, R_3=CH_3,$ $R_2=COOCH_3$ - $R_1=R_3=H, R_2=COOH$ 	63.5 31	Composés monoaromatique	<ul style="list-style-type: none"> - $R_1=CH_3, R_3=H,$ $R_2=COOCH_3, R_4=OH$ - $R_1=CH_3, R_3=CHO,$ $R_2=COOCH_3, R_4=OH$ - $R_1=R_3=CH_3, R_4=H,$ $R_2=COOCH_3$ - $R_1=OH, R_2=COCH_3,$ $R_3=CH_3, R_4=OCH_3$ 	> 200 > 200 51.5 > 200
Depsides		14	Triterpènes		3.7
Tridepsides		3.6	Hueafuranoïde A		13.9

De manière générale, l'activité des produits naturels est plus faible que celle des produits synthétiques.

3.2 Tests *in vitro* des composés dérivés des diphenyléthers avec l'enzyme PTP1B

Dans le lichen *Stereocaulon evolutum*, plusieurs composés de type diphenyléthers ainsi que les depsidones acide lobarique et acide norlobarique ont été isolés. Etant donné que des composés structurellement proches avaient été évalués, il nous a paru intéressant de pouvoir approfondir, leur activité sur l'enzyme PTP1B en réalisant des tests enzymatiques *in vitro* en collaboration avec l'équipe autrichienne du Pr Hermann Stuppner (Innsbruck) et surtout d'essayer de comprendre ces activités par modélisation moléculaire avec le Dr Olivier Delalande (Université de Rennes 1).

3.2.1 Détermination de la CI₅₀ des extraits et des composés sur le test enzymatique PTP1B

(En collaboration avec l'équipe de Prof. Dr. Hermann Stuppner, University of Innsbruck, Institute of Pharmacy/Pharmacognosy, Center for Chemistry and Biomedicine, Innsbruck en Autriche).

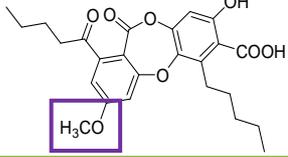
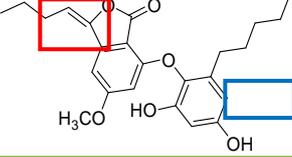
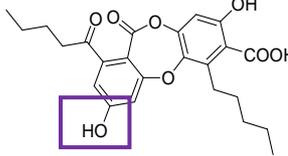
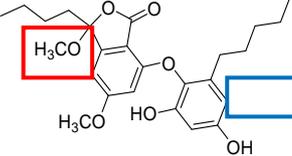
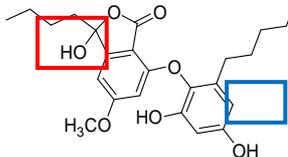
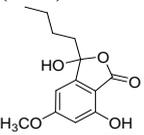
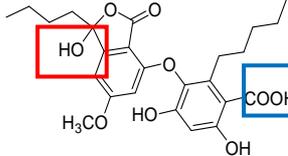
Les extraits du lichen *S. evolutum* (*n*-hexane, acétone et tétrahydrofurane) ont été testés sur l'enzyme PTP1B (Tableau 30). L'extrait tétrahydrofurane et l'extrait acétone ont montré une activité inhibitrice similaire et importante et se sont révélés plus actifs que l'extrait *n*-hexane.

Tableau 30: Activité inhibitrice des extraits du lichen *S. evolutum* sur PTP1B

Extrait	CI ₅₀ (µg/mL)
Extrait <i>n</i> -hexane	34.8
Extrait acétone	13.0
Extrait tétrahydrofurane	10.7

Dans la littérature, des composés de type diphenyléther avaient montré des activités notables sur la phosphatase PTP1B. Ainsi, huit composés ont été sélectionnés parmi ceux isolés en quantité suffisante et ont été envoyés en Autriche pour déterminer leur CI₅₀. Il s'agit de deux depsidones, cinq diphenyléthers et d'un dérivé proche (Tableau 31) ; seul le composé **Se20** n'a pas été envoyé car il était disponible en trop petite quantité (partie expérimentale, 3.2).

Tableau 31 : Activité des huit composés isolés de *S. evolutum* sur le modèle enzymatique de PTP1B

Composé	CI ₅₀ (μM)	Composé	CI ₅₀ (μM)
<p>Acide lobarique (Se3)</p> 	15.0	<p>Anhydro-sakisacaulon A (Se7)</p> 	18.6
<p>Acide norlobarique (Se18)</p> 	17.8	<p>Méthyl 8-sakisacaulon A (Se16)</p> 	70.2
<p>Sakisacaulon A (Se5)</p> 	34.9	<p>3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane (Se8)</p> 	> 100
<p>Lobarine (Se6)</p> 	34.6	<p>Acide ursolique (témoin positif)</p> <p><i>Ortho</i>-vanadate (témoin positif)</p>	16.5 4.4

L'acide ursolique et l'*ortho*-vanadate, inhibiteurs reconnus de PTP1B [198,213] ont été utilisés comme témoins positifs et ont présenté respectivement une CI₅₀ de 16.5 μM et de 4.4 μM.

Deux composés de type depsidone, l'acide lobarique **Se3** et l'acide norlobarique **Se18** ainsi qu'un composé de type diphenyléther, l'anhydro-sakisacaulon A **Se7**, présentent une activité inhibitrice de PTP1B d'une manière dose-dépendante (Fig. 104). Les graphes ont permis de déterminer des valeurs de CI₅₀ similaires de 15.0, 17.8 et 18.6 μM, respectivement. Deux autres diphenyléthers, le sakisacaulon A **Se5** et la lobarine **Se6** ont inhibé l'activité de PTP1B avec des valeurs de 34.9 et 34.6 μM, respectivement. Le diphenyléther méthyl 8-sakisacaulon A **Se16** a montré un effet inhibiteur beaucoup plus faible (CI₅₀ = 70.2 μM) et le composé de type lactone, le 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane **Se8**, s'est révélé inactif (CI₅₀ >100 μM).

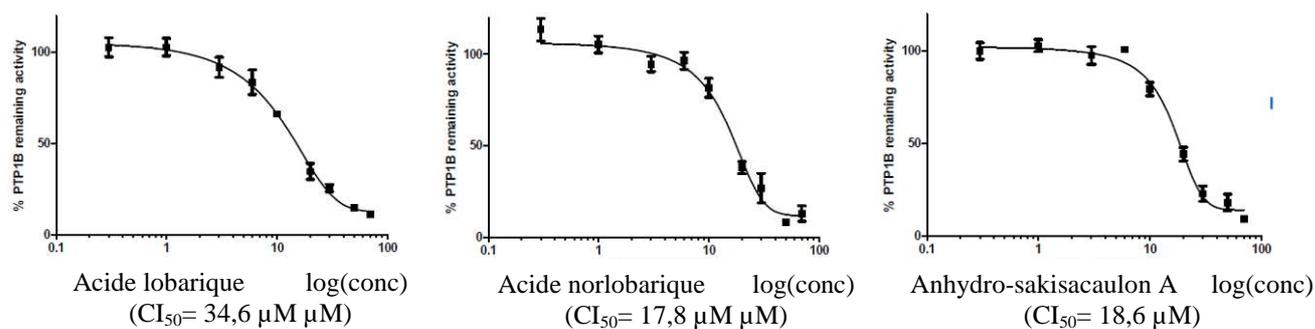


Figure 104: Graphiques montrant l'activité dose-dépendante de l'acide lobarique, l'acide norlobarique et l'anhydro-sakisacaulon A sur PTP1B

Les deux depsidones diffèrent structurellement par la présence d'un groupement méthoxylique pour l'acide lobarique et hydroxyle pour l'acide norlobarique en C-4 alors que leur activité est similaire. Ainsi il serait intéressant de vérifier si cette fonction joue un rôle dans la reconnaissance du substrat à son enzyme. Parmi les diphenyléthers, deux modifications structurales existent (entourées en rouge et bleues dans le tableau 30) et concernent le groupement chimique en C-8 et la présence ou non d'un groupement carboxylique en C-1'. La lactone **Se8** correspond à la partie « noyau phénolique associé à la lactone » retrouvée dans la lobarine et le sakisacaulon A. Parmi les molécules ne possédant pas de COOH en C-1' (Sakisacaulon A, anhydro-sakisacaulon A, méthyl 8-sakisacaulon A), la présence d'une double liaison en C-8 augmente l'activité alors que la présence d'un méthoxy la diminue ($CI_{50} = 70.2 \mu M$) ainsi qu'une fonction hydroxyle mais dans une moindre mesure ($CI_{50} = 34.9$ et $34.6 \mu M$ pour le sakisacaulon A et la lobarine respectivement). La fonction COOH en C-1' ne semble pas influencer l'activité puisque le sakisacaulon A (sans fonction COOH) et la lobarine (avec fonction COOH) présentent une activité similaire. Il semble enfin que les deux noyaux du diphenyléther soient importants pour l'activité car la lactone **Se8** est inactive sur PTP1B.

Séo a rapporté que la méthylation de la fonction COOH de l'acide lobarique diminuait l'activité mais aucune modulation n'a été réalisée sur l'hydroxyle en C-8 [60].

Afin de compléter l'activité enzymatique réalisée en Autriche, nous avons cherché à déterminer si les constantes d'affinité K_d entre la protéine PTP1B et les substrats corroboreraient les activités enzymatiques.

3.2.2 Détermination du K_d

Un appareil de thermophorèse (Monolith NT.115) est disponible sur la plateforme PRISM et permet la détermination du K_d , constante d'affinité d'une enzyme pour son ligand

(partie expérimentale, partie 3.3). La première étape consiste à mettre en contact l'enzyme (préalablement marquée avec une molécule fluorescente et à concentration fixe) avec le ligand à 16 concentrations différentes. La seconde étape correspond à la détermination du K_d par thermophorèse. A l'état initial, les molécules avec la protéine ne bougent pas puis à un temps t , la solution est chauffée par un laser (intensité de la MST modulable) et les composés ligand / protéine s'organisent de façon caractéristique pour atteindre l'état d'équilibre avant de retourner à l'état initial lorsque le laser s'éteint. Le marquage fluorescent (excitation par une LED) permet de suivre l'enzyme et ainsi de voir sa mobilité dans le tampon dans lequel elle a été placée. La façon de bouger de la protéine est différente en fonction du substrat et permet ainsi en fonction des différentes concentrations de substrat, de tracer une courbe telle que:

$$\text{Intensité fluorescence} = f(\text{concentration en ligand})$$

Le logiciel NT analysis permet d'analyser simultanément l'intensité de fluorescence et de tracer la courbe $i=f(c)$ puis de déterminer le K_d . Plus celui-ci sera faible et plus l'affinité pour la protéine est forte.

Nous avons réalisé le marquage de la protéine en suivant les recommandations du guide Monolith NT.115 édité par NanoTemper technologies et la concentration à laquelle elle a été utilisée est de 500 nM. Pour réaliser la MST de nos composés en présence de PTP1B marquée, des capillaires hydrophiliques ont été utilisés car ils permettaient l'obtention de pics de fluorescence fins et bien résolus.

La MST a permis la détermination des constantes d'affinité pour deux composés parmi les 8 testés : l'acide lobarique (Se3) et l'acide norlobarique (Se18) avec des K_d de 5.08 ± 0.784 et 0.0754 ± 0.0267 (figure 105). Le composé Se7 qui a été testé après de nombreux autres composés n'a pas montré d'interaction avec la PTP1B marquée. Actuellement, étant donné le spectre UV obtenu après marquage de PTP1B, nous nous interrogeons sur la stabilité de notre enzyme (partie expérimentale, partie 3.3) au cours du temps surtout lors de l'étape de marquage qui se réalise à température ambiante. Lors d'un second essai, avant même de pouvoir incuber nos produits avec l'enzyme, nous avons réalisé sa MST et avons constaté qu'elle formait des agrégats : elle n'est donc pas stable et avons stoppé nos tentatives.

Il semble qu'effectivement l'acide lobarique et l'acide norlobarique puissent se fixer sur PTP1B mais étant donné les conditions expérimentales, les valeurs du K_d ne peuvent pas être

prises en compte. Une nouvelle commande d'enzyme serait à envisager pour compléter ces résultats préliminaires en tenant compte de la sensibilité de l'enzyme à température ambiante.

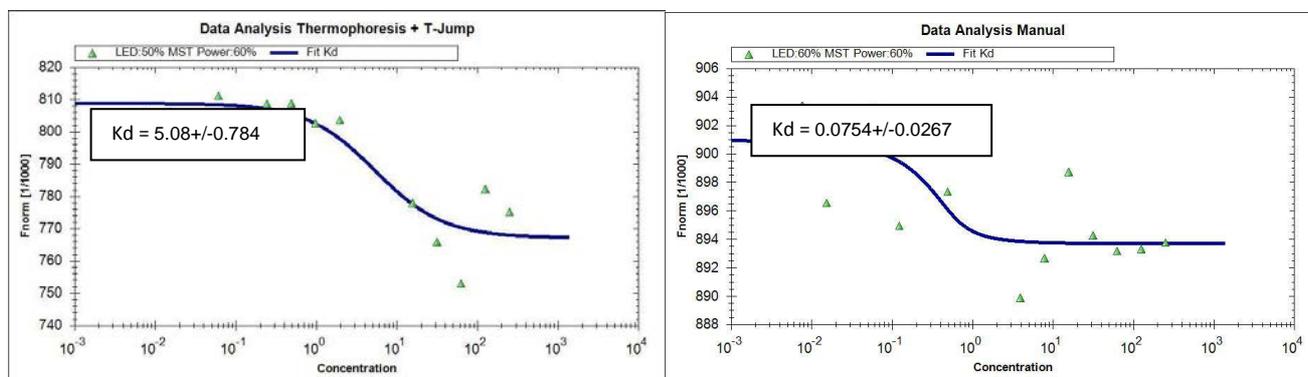


Figure 105 : MST de l'acide lobarique (à gauche) et de l'acide norlobarique (à droite)

3.3 Modélisation moléculaire des interactions entre l'enzyme PTP1B et les composés dérivés des diphenyléthers

Afin de mieux comprendre les interactions entre les diphenyléthers isolés et la protéine PTP1B, des études de modélisation moléculaire ont été entreprises en collaboration avec le Dr Olivier Delalande (IGDR, UMR 6290, CNRS - Université de Rennes 1).

3.3.1 Composés testés

A partir de l'extrait acétonique du lichen *S. evolutum*, huit composés incluant deux depsidones, 5 diphenyléthers et une lactone ont été sélectionnées en vue de leur modélisation moléculaire avec PTP1B (Tableau 32).

Tableau 32 : Structure des huit composés modélisés avec l'enzyme PTP1B

Composé	Structure	Composé	Structure
Acide lobarique		Anhydro-sakisacaulon A	
Acide norlobarique		Méthyl 8-sakisacaulon A	
Sakisacaulon A		Sakisacaulon estérifié en C-7	
Lobarine		3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane	

3.3.2 Résultats

3.3.2.1 Les modèles moléculaires de PTP1B

Cinq modèles ont été obtenus pour faire le docking de nos composés et seuls les résultats obtenus avec deux des modèles vont être décrits: un modèle obtenu par homologie et un modèle obtenu en mode normal (mode de plus basse fréquence changement conformation et le plus significatif), les autres étant toujours en cours.

Pour obtenir le **modèle par homologie**, nous avons tout d'abord identifié notre protéine sous son numéro d'enregistrement P18031 puis obtenu sa structure à partir de la Protein data bank sous le code 1A5Y qui correspond à cette protéine cristallisée en présence de l'orthovanade en formant un complexe [214]. Parallèlement, le serveur I-Tasser (méga-serveur qui centralise toutes les séquences de protéines cristallisées avec des ligands divers et variés) a été sollicité pour la construction d'un modèle complet de PTP1B. Cinq modèles ont été fournis par I-Tasser et la structure présentant le meilleur score (C-score = 0.38, max = 2) a été retenue (Fig. 106). A l'issue, un motif structural « structure template » récurrent correspondant à un complexe PTP1B-ligand a été choisi par I-TASSER pour la modélisation de PTP1B. Ce modèle donc proche d'une conformation de PTP1B renformée sur un ligand. Le site actif adopte donc une organisation tridimensionnelle « figée » dans l'état complexe : il s'agit d'un modèle statique.

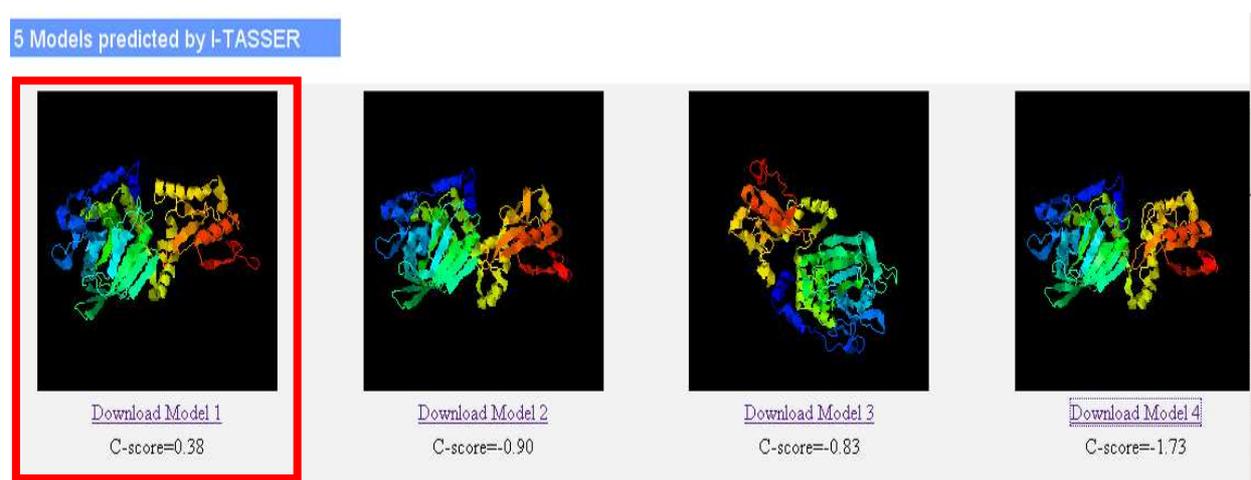


Figure 106: Modèles statiques de PTP1B obtenus par I-Tasser

Toutefois, il nous a semblé nécessaire de moduler la structure du site actif de la PTP1B site de fixation des inhibiteurs de manière à ne pas trop dépendre d'une unique vision

« figée » de la protéine en interaction avec un ligand spécifique orthovanade. Le mouvement de la boucle WPD est notamment crucial pour la structuration topographique relief forme de la poche. La méthode d'analyse de mode normaux NMA peut permettre de modéliser ces modulations de structure du site actif en considérant les mouvement de plus basse fréquence accessible au squelette de la protéine PTP1B. La méthode NMA a été appliquée grâce au serveur ELNemo.

3.3.2.2 Amarrage des composés testés aux différents conformères de PTP1B (Docking)

L'amarrage des composés sur la protéine se réalise de deux façons :

- ✓ la prédiction de la conformation, de l'orientation et de la position du composé bioactif dans la poche de liaison.
- ✓ l'estimation de l'étanchéité des interactions des ligands avec le récepteur pour guider une synthèse des composés actifs.

Grâce au logiciel informatique, chacun de nos huit composés est approché de chacun des cinq modèles (le modèle dit par homologie et les quatre modèles dits en mode normal) pour apprécier l'interaction entre la phosphatase PTP1B et le ligand. Actuellement, nous disposons des résultats pour le modèle par homologie et pour le modèle 7 en mode normal mais les autres simulations sont en cours. A l'issue de ce travail, nous avons établi les conformations les plus fréquentes pour chaque composé. Les complexes théoriques ligand-récepteur alors obtenus peuvent être associés à une interaction privilégiée et statistiquement fiable avec des acides aminés de la PTP1B pour chacun des modèles. La dernière étape consiste à comparer nos résultats avec ceux obtenus *in vitro* pour retenir la meilleure hypothèse d'ancrage de nos composés au sein de PTP1B.

Afin d'analyser les interactions entre les ligands et l'enzyme PTP1B, chaque ligand est soumis au protocole suivant (Fig. 107).

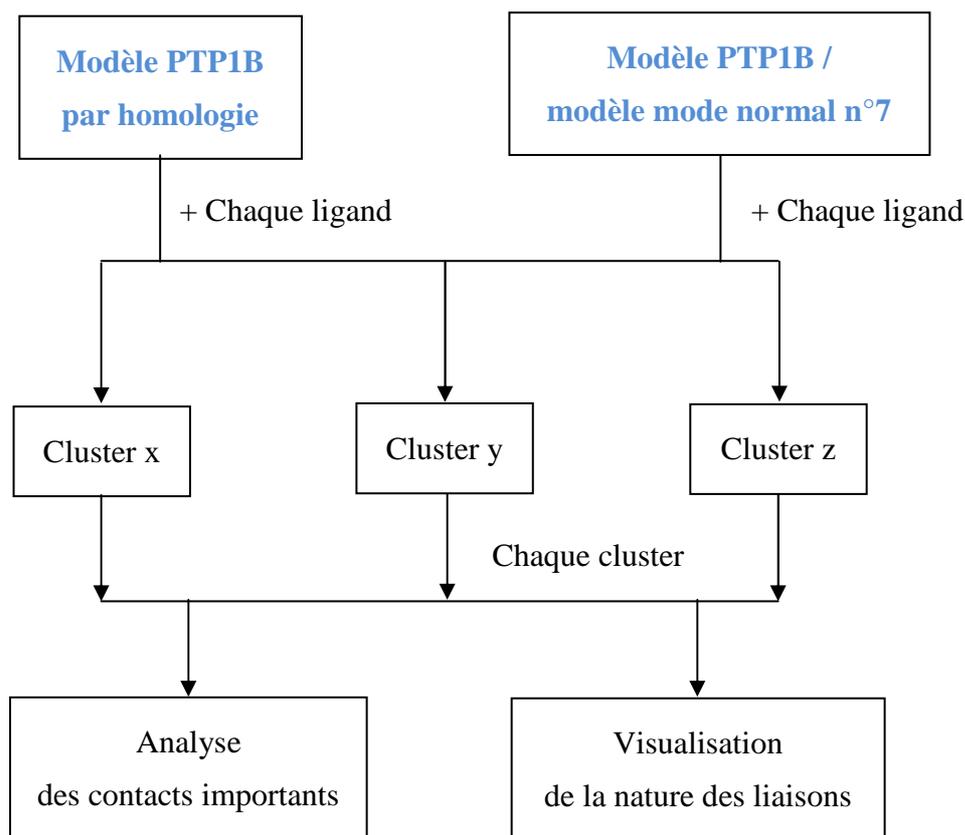


Figure 107: Protocole suivi pour l'analyse de docking de chacun des composés sur l'enzyme PTP1B

a. Familles de clusters obtenus via le modèle par homologie

Une série de dockings (1000 associations de chacun des 8 ligands à PTP1B, ligand flexible, récepteur rigide – méthode AutoDockVina) a été effectuée sur le modèle par homologie et NM7 pour évaluer l'accessibilité de notre composé au niveau du site catalytique de la phosphatase.

Chaque fixation du ligand à la protéine forme un complexe qui peut être considéré comme un état du système. Si on prend l'ensemble des mille positions du ligand, on obtient une "trajectoire de docking" qui simplifie notre analyse. Le clustering de la trajectoire de docking nous a permis de regrouper les complexes en familles de clusters pour chacun des composés, chacune constituant une position privilégiée du ligand sur la protéine comme montré ci-dessous pour chaque composé. Pour le modèle par homologie et NM7, les clusters retenus figurent en rouge dans le tableau 33 et 34 : ils ont été sélectionnés lorsque les scores étaient supérieurs à 20%.

Tableau 33: Clusters obtenus selon l'affinité de l'interaction entre le ligand et la protéine (exprimé en % probabilité de contacts) pour le modèle par homologie

Cluster	Se3	Se6	Se8	Se5	Se16	Se7	Se18	Se20
1	11,20 %	60,90 %	42,10 %	15,00 %	20 %	10,00 %	10,60 %	5,00 %
2	38,80 %	30,00 %	42,10 %	40,00 %	34,90%	29,90 %	26,20 %	59,90 %
3	27,70 %	5,00 %	10,50 %	5,00 %	30 %	35,60 %	52,60 %	25,00 %
4	11,10 %		5,20 %	24,90 %	15 %	10,00 %	10,50 %	10,00 %
5	11,10 %			15 %		15,00 %		
Clusters retenus	2 et 3	1 et 2	1 et 2	2 et 4	2 et 3	2 et 3	2 et 3	2 et 3

Tableau 34: Répartition sous forme de clusters des interactions entre chaque ligand et PTP1B (exprimé en % probabilité de contacts) pour le modèle NM7

Cluster	Se3	Se6	Se8	Se5	Se16	Se7	Se18	Se20
1	26,30 %	39,90 %	52,60 %	55 %	25 %	5,30 %	5,30 %	95 %
2	57,80 %	55 %	36,80 %	15 %	24,9 %	15,9 %	20,90 %	5 %
3	10,60 %	5 %	10,50 %	25 %	35 %	36,80 %	26,30 %	
4	5,20 %			5 %	5 %	31,40 %	10,50 %	
5					5 %	10,50 %	21,10 %	
6					5 %		10,50 %	
7							5,30 %	
Clusters retenus	1 et 2	1 et 2	1 et 2	1 et 3	1, 2 et 3	3 et 4	2, 3 et 4	1

b. Moyenne des contacts entre les résidus de la protéine et le ligand

Pour chaque cluster sélectionné (score > 20%), il est possible de déterminer précisément les contacts entre le ligand et les acides aminés de PTP1B. Ce résultat peut être illustré sous forme d'un histogramme (Fig. 108) pour chaque composé mais également sous forme d'une liste détaillée avec les fréquences de contact exprimés en pourcentage (Annexe 8 – Tableau 41). Ainsi, pour chaque ligand, nous avons répertorié dans un tableur excel les positions les plus fréquemment retrouvées pour les différentes conformations de PTP1B afin de réaliser une analyse comparative entre nos composés et l'enzyme (Annexe 9 – Tableau 42).

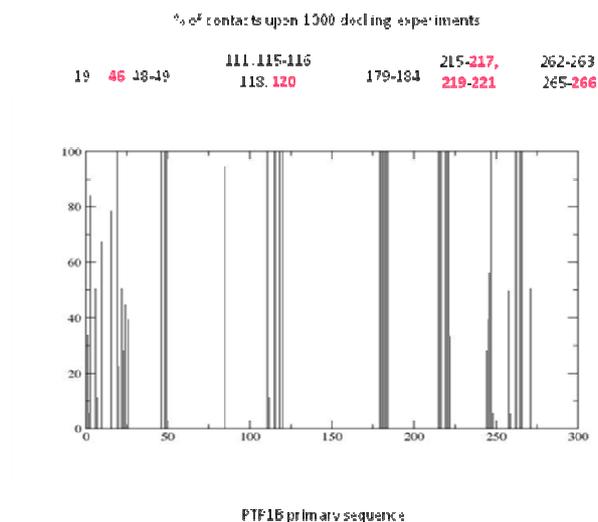


Figure 108: Exemple d'un histogramme comportant la moyenne des contacts entre PTP1B et l'acide lobarique

Ces résultats montrent que pour le modèle par homologie, les acides aminés 19, **46**, 48, 49, 111, 115, 116, 118, **120**, **179-184**, **215-217**, **219-221**, 262, 263, 265, **266** sont des zones fréquentes de contact entre les diphenyléthers et la lactone et l'enzyme PTP1B. Parmi ces acides aminés, les acides aminés Tyr46, val49, Lys120, tryp179, Pro180, Asp181, Phe182, Ser216, Ala217, Ile219, Gly220, Arg221 et Gln266 sont des zones de contact récurrentes de ligands connus de PTP1B (Tableau 35).

Sur le modèle NM7, les zones fréquentes de contact entre les ligands et l'enzyme PTP1B sont les mêmes au niveau du site catalytique, mais elles sont différentes au niveau de la boucle WPD, des sites secondaires et annexes. Les acides aminés 109, 112, 113, 123, 117, 123, 125, 127, 149, 156 et 173 sont retrouvés au lieu des acides aminés 19, 48, 111, 115, 116 et 117 obtenus avec le modèle par homologie. Les ligands ne se sont pas liés avec les acides aminés Pro 180 et Asp 181 (Tableau 43 en annexe 10).

Tableau 35: Zones de contacts récurrentes des huit composés isolés de *S. evolutum* avec PTP1B d'après le modèle par homologie

Residue	Se3	Se18	Se7	Se5	Se6	Se16	Se20	Se8
Tyr 46		Hydrophobe	Hydrophobe II-II	Hydrophobe II-II	Hydrophobe	Hydrophobe II-II	Hydrophobe	
Val 49			Hydrophobe		Hydrophobe		Hydrophobe	
Asn 111							Hydrogène	Hydrogène
Glu 115		Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe
Lys 116	Cation II Hydrophobe	Hydrophobe			Hydrophobe		Hydrophobe	
118						Hydrophobe	Hydrophobe	
Lys 120	Cation II Hydrophobe	Hydrophobe Cation II	Hydrophobe II-II Hydrogène	Hydrophobe Cation II	Hydrophobe	Hydrophobe Cation II	Hydrophobe	
Trp 179	Hydrophobe	Hydrophobe		Hydrophobe	II-II	Hydrophobe	Hydrophobe II-II	II-II
Pro 180								Hydrogène
Asp 181	Hydrophobe	Hydrophobe			Hydrophobe		Hydrophobe	
Phe 182					Hydrogène			
Gly 183			Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe
Val 184	Hydrophobe		Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe
Cys 215				Hydrophobe		Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe
Ser 216	Hydrophobe		Hydrophobe Hydrogène	Hydrophobe Hydrogène	Hydrogène	Hydrophobe		Hydrophobe
Ala 217	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe
Ile 219		Hydrophobe	Hydrophobe		Hydrophobe		Hydrophobe	
Gly 220		Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	
Arg 221	Hydrophobe Hydrogène	Hydrophobe Hydrogène	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe Cation II	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe Hydrogène
Gln 262	Hydrophobe				Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	
Thr 263	Hydrophobe			Hydrophobe		Hydrophobe		
Asp 265					Hydrophobe			Hydrophobe
Gln 266	Hydrophobe Hydrogène	Hydrophobe		Hydrogène Hydrophobe	Hydrogène	Hydrophobe Hydrogène	Hydrophobe	

c. Nature des contacts entre les ligands et l'enzyme PTP1B

La nature des liaisons mettant en contact les acides aminés de PTP1B avec chacun des ligands a été également visualisée en utilisant le logiciel YASARA et Ligplot+ (Fig. 112). Plusieurs liaisons peuvent être visualisées :

- Des ponts salins :

Les ponts salins ou liaisons ioniques constituent de fortes interactions électrostatiques attractives entre charges de signe opposé. La distance entre les centres chargés doit être inférieure à 4,0-4,5 Å environ pour que l'on considère l'interaction électrostatique comme une liaison ionique en tant que telle. Bien qu'elle soit plus faible qu'une liaison covalente, l'énergie d'une liaison ionique reste importante pour une interaction non covalente (de l'ordre de 10 kcal/mol). Elles sont d'autant plus fortes lorsqu'elles se forment dans un environnement ayant une faible constante diélectrique, comme c'est le cas dans le vide ou au cœur des protéines. Dans ce dernier cas, les liaisons ioniques stabilisent fortement les structures tridimensionnelles. Par exemple, à pH physiologique, un pont salin peut être créé entre le groupe COO^- de l'acide norlobarique et NH_3^+ d'un résidu lysine 120 lorsque les charges sont situées à proximité dans l'espace.

- Des liaisons hydrogène :

Les liaisons hydrogènes sont des interactions d'origine électrostatique entre un atome électronégatif dit « accepteur » (X porteur d'une charge partielle δ^-) et un atome d'hydrogène polaire (H porteur d'une charge partielle δ^+) qui est lié de manière covalente à un atome électronégatif dit « donneur » (D porteur d'une charge partielle δ^-). Les atomes d'oxygène et d'azote sont les donneurs et accepteurs les plus courants dans notre cas. Une distance faible entre le donneur et l'accepteur est nécessaire pour qu'une liaison hydrogène soit significative et son énergie est maximale (de l'ordre de 5 kcal/mol) lorsque les atomes D-H...A (Fig. 109) sont alignés. Du fait de cette anisotropie, les liaisons hydrogène sont considérées comme des interactions spécifiques.

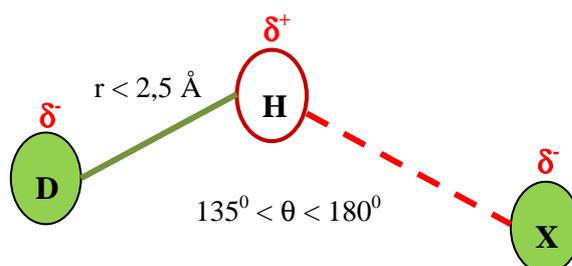


Figure 109: Liaison hydrogène

- Des interactions hydrophobes :

Les interactions hydrophobes sont fondamentales pour le repliement des protéines. Ces interactions sont provoquées par la tendance qu'ont les atomes et les groupements non polaires à fuir le milieu aqueux environnant pour des raisons thermodynamiques. Cette fuite permet aux éléments hydrophobes de se regrouper et de diminuer leur surface de contact avec le solvant. Dans une protéine, cela se traduit généralement par l'exposition des chaînes latérales polaires à la surface et l'enfouissement des chaînes latérales hydrophobes vers le cœur de la protéine. Cet effet hydrophobe est un paramètre déterminant dans la mesure où il gouverne les premières phases du repliement. Les éléments hydrophobes, vont rapprocher les cystéines pour former des ponts disulfures et les résidus chargés pour former des ponts salins.

- Des interactions π - π (Fig. 110):

Les interactions non liées π - π impliquent des systèmes π comme les cycles aromatiques. Ces derniers sont très souvent présents dans les ligands organiques et dans les macromolécules biologiques (Histidine, Tryptophane, Phénylalanine et Tyrosine dans le cas des protéines). Deux configurations sont principalement observées expérimentalement :

- ❖ Interactions π - π face à face – les deux cycles aromatiques sont parallèles et leurs centres géométriques sont distants de moins de 4 Å environ. Deux sous-catégories peuvent être créées selon la présence (conformation décalée) ou non (conformation en sandwich) d'un décalage entre deux cycles parallèles.
- ❖ Interactions π - π en forme de T – les deux cycles aromatiques forment un angle droit et leurs centres géométriques (centroïdes) sont distants de moins de 5,5 Å environ.

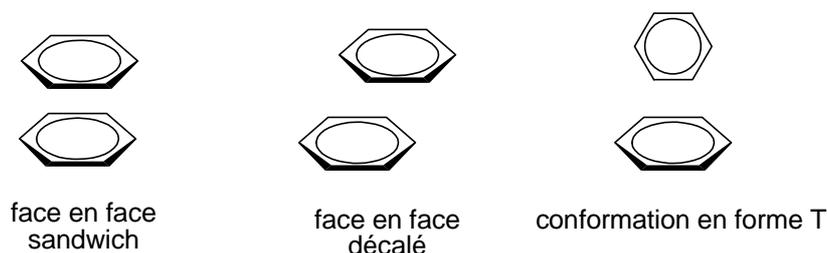


Figure 110: Les différentes conformations d'interactions non liées π - π

- Des interactions cation- π :

Comme leur nom le suggère (Fig. 111), ces interactions non liées de nature électrostatique impliquent un cation (un ion positif ou un groupe porteur d'une charge

positive) et un système π (par exemple un cycle aromatique) [215], et sont relativement fréquentes en biochimie et en chimie. Comme pour d'autres classes d'interaction, un critère de distance permet d'identifier de manière géométrique les interactions cation- π : la distance entre le centre chargé et le centre géométrique du système π doit être inférieure à 5 Å environ.

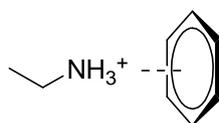
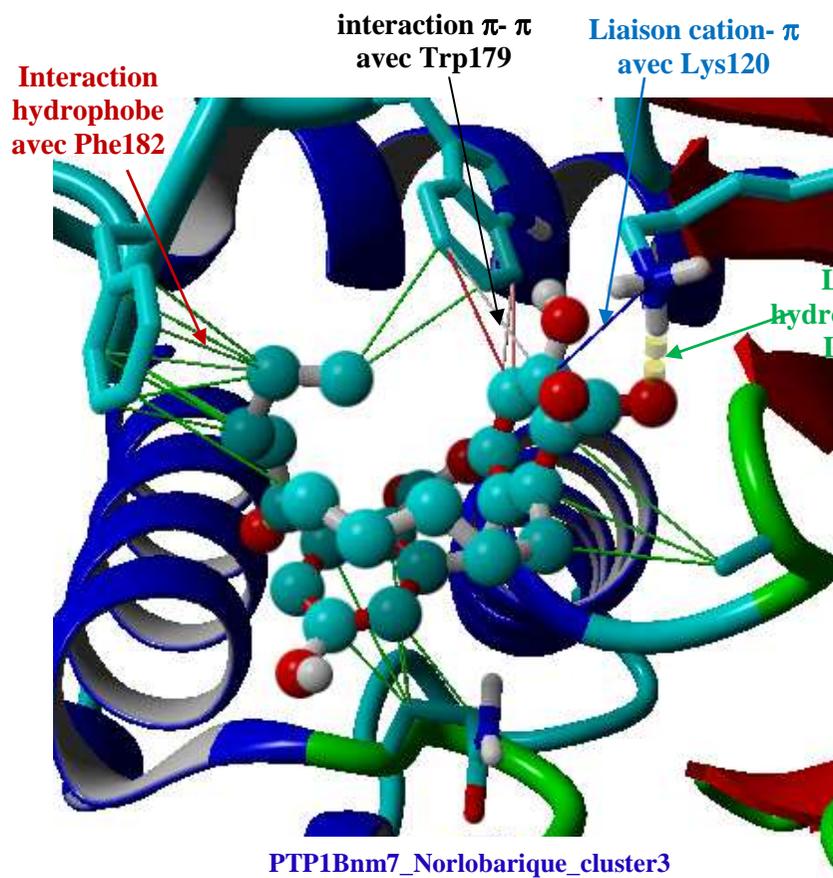


Figure 111: Exemple de l'interaction non liée cation- π

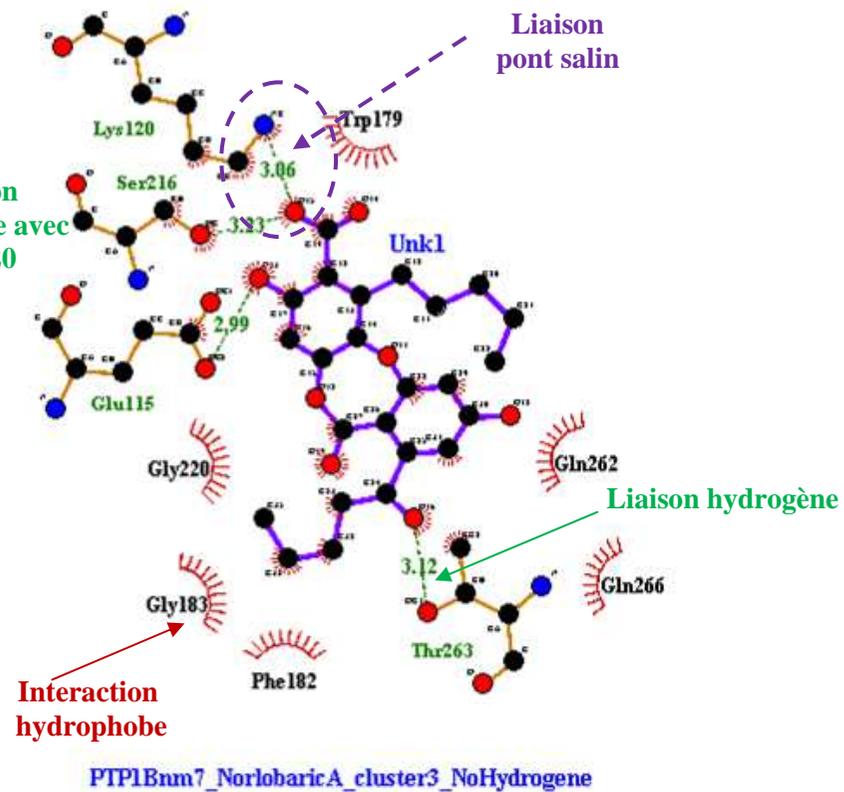
Chaque liaison possède une énergie propre et constitue une interaction plus ou moins forte entre les atomes.

Ainsi pour chaque cluster sélectionné au sein du modèle par homologie et NM7, la nature de chacune des liaisons entre PTP1B et le ligand a été répertoriée ainsi que les atomes du ligand et l'acide aminé impliqués dans cette liaison. Les résultats, pour deux des molécules les plus actives (acide lobarique et anhydro-sakisacaulon) figurent en annexe 10.

En résumé, nous avons à ce stade, des modèles **d'interactions privilégiées** entre PTP1B et chacune des molécules qui tiennent compte de la conformation de la protéine, de l'amarrage des ligands par rapport au site actif et de la nature des contacts entre PTP1B et le ligand.



Utilisation de YASARA



Utilisation de Ligplot+

Figure 112: Exemple de liaisons entre l'acide norlobarique et l'enzyme PTP1B

3.4 Confrontation des résultats biologiques et des modèles obtenus par modélisation moléculaire

Chaque cluster de chaque modèle a été visualisé sous YASARA et Ligplot+ pour mieux comprendre le positionnement du ligand dans PTP1B. Les molécules ont été classées en fonction de leur analogie structurale et corrélées aux activités biologiques obtenues.

Parmi les liaisons fréquemment retrouvées pour les deux types de molécules, on retrouve :

- Des acides aminés du site catalytique : Ser216 et Arg221
- Des acides aminés du site actif : Lys120, Tyr46, Phe182, Glu262
- Des acides aminés de la boucle WPD : Trp179
- L'acide aminé Thr263

3.4.1 Depsidones

Rapidement, nous avons pu remarquer que les depsidones se fixaient de la même façon sur le site actif de la PTP1B (Fig. 113). En effet, ces molécules sont des molécules rigides qui viennent s'ancrer sur PTP1B par des liaisons fortes telles que :

- Lysine120 ↔ O14 (O15) par une liaison hydrogène
- Ser216 ↔ O19 par une liaison hydrogène
- Tyr46 ↔ C de deux chaînes aliphatiques par une attraction $\sigma \leftrightarrow \pi$
- Phe182 ↔ C de la chaîne aliphatique appartenant au noyau B par une attraction $\sigma \leftrightarrow \pi$
- Glu266 ↔ O16 par une liaison hydrogène
- Trp179 ↔ deux noyaux aromatiques de ligand par une liaison $\pi-\pi$
- Arg221 ↔ O16 par une liaison hydrogène
- Glu115 ↔ C-16 par une attraction $\sigma \leftrightarrow \pi$

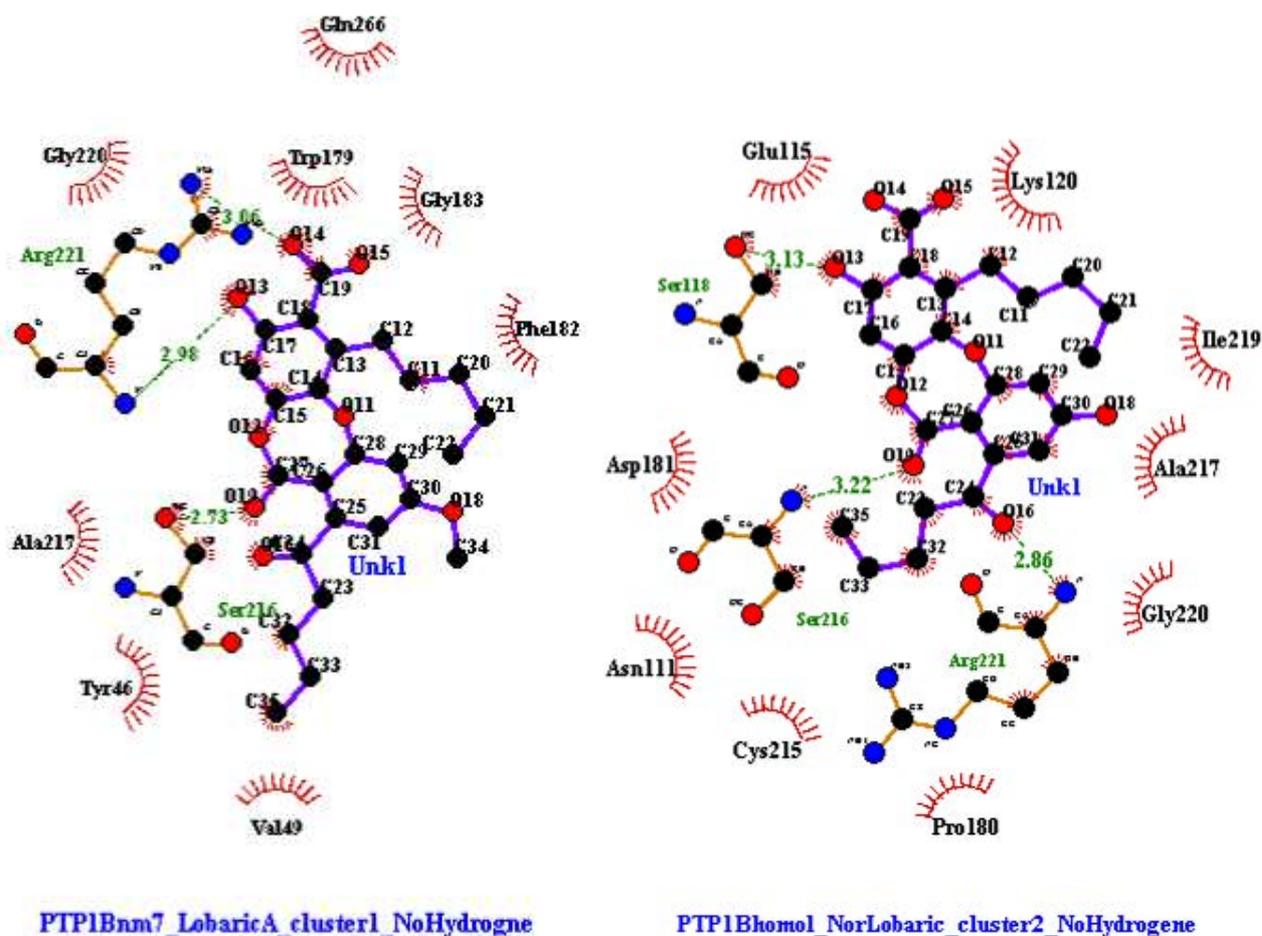


Figure 113: Interactions les plus fréquentes entre les deux depsidones et les résidus de PTP1B

D'un point de vue énergétique, ces molécules sont rigides moins de dièdres de rotation comparées aux diphényléthers et posséderont ainsi moins de conformères donc pourront accéder plus facilement au site catalytique. La fonction CH_3 (C34) qui différencie les deux depsidones n'est en contact avec aucun résidu aminé et pourrait ainsi expliquer pourquoi il n'a pas été retrouvé de différence entre leurs CI_{50} .

3.4.2 Diphényléthers

Il est difficile de comparer les depsidones avec les diphényléthers étant donné leur structure très différente mais il est possible de comparer les diphényléthers entre eux.

Les diphényléthers sont des molécules flexibles comparées aux depsidones et cette mobilité autour du pont éther va leur permettre d'adopter plusieurs conformations en arrivant au site actif. L'effet sur le site actif sera ainsi potentiellement diminué. Il est ainsi possible de trouver soit le noyau B à proximité du site actif et le noyau A près du site secondaire ou l'inverse (Fig. 114). Quelques faux-positifs ont également été retrouvés : la molécule se fixant à l'extérieur de la protéine et non pas dans la poche catalytique, qui pourraient correspondre à

une action allestolérique des composés or les résultats biologiques indiquent clairement que ceux-ci se comportent comme des inhibiteurs compétitifs directs.

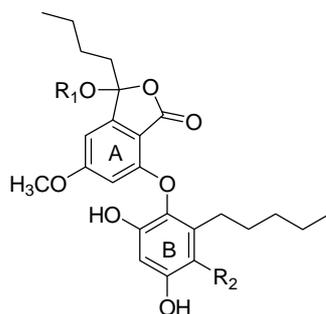
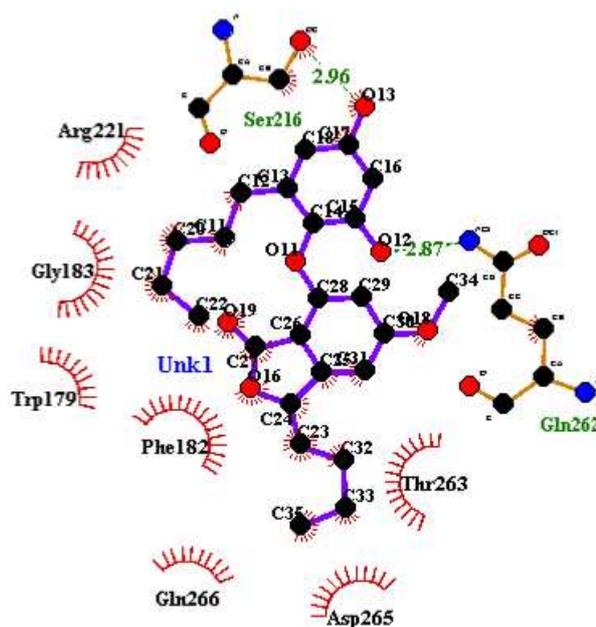


Figure 114: Structure générale des diphenyléthers testés

L'anhydro-sakisacaulon A possède la même activité que les deux depsidones testées. Sa fixation au site catalytique peut se faire des deux façons énoncées ci-dessus et dans le 2/3 des cas, on retrouve les liaisons habituellement retrouvées pour l'acide lobarique et l'acide norlobarique (Fig. 115).



PTP1Bnm7_DesHSaki_cluster4_NoHydrogene

Figure 115: Interactions entre l'anhydro-sakisacaulon A et l'enzyme PTP1B d'après le modèle en NM7, cluster 4

La lobarine possède une fonction COOH en C- 1' par rapport au sakisacaulon A et une fonction OH à la place de la double liaison par rapport à l'anhydro-sakisacaulon A. La fonction carboxylate (sous forme COO⁻ à pH physiologique) contribue pour le cluster 2 du

modèle par homologie à amarrer plus profondément le ligand dans le site catalytique en allant rechercher la ser216 cependant cela force le composé à s'écartier de la Tyr46. Le seul modèle le plus probable (Fig. 116) reste le cluster 1 du NM7 où le noyau A se trouve au niveau du site catalytique et où l'on retrouve les liaisons :

Ser216↔O19 par une liaison hydrogène

Lys120↔O16 par une liaison hydrogène

Trp179↔des C du cycle aromatique appartenant au noyau B du ligand

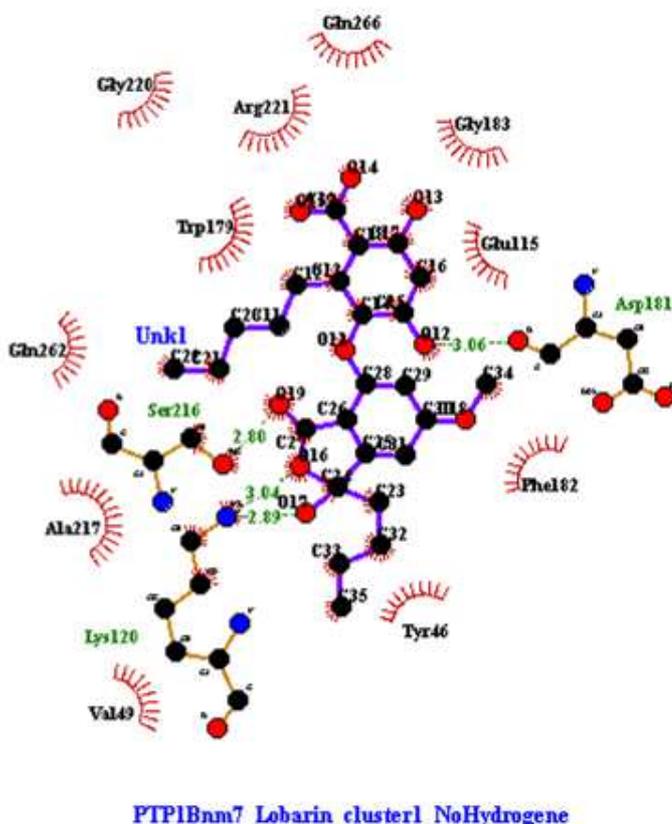


Figure 116: Interactions entre la lobarine et l'enzyme PTP1B d'après le modèle en NM7, cluster 1

Dans cette conformation, la fonction COO⁻ ne crée alors aucune interaction avec les résidus de la protéine. Seo [60] avait observé une diminution de l'activité lors de la présence du COOH ce qui ne correspond pas à nos observations. Cependant, il s'agissait du sakisacaulon A et de la lobarine méthylée et cette méthylation en C-8 pourrait induire une conformation différente.

Le sakisacaulon A diffère de l'anhydro-sakisacaulon par la présence d'un OH en C-8 et de la lobarine par l'absence de la fonction COOH. De nombreuses conformations mettent en

évidence que le noyau A se trouve le plus fréquemment au niveau du site catalytique et lorsque le noyau B s'y trouve, la molécule est positionnée plus profondément dans la poche qui l'empêche d'aller chercher des interactions avec la Lys120 et la Tyr46 (Fig. 117).

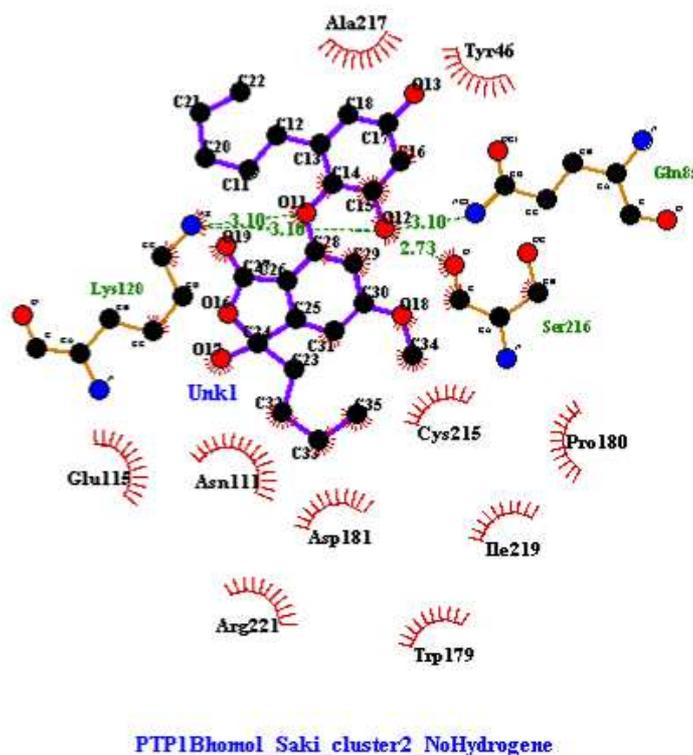


Figure 117: Interactions entre le sakisacaulon A et l'enzyme PTP1B d'après le modèle obtenu par homologie, cluster 2

Le sakisacaulon méthylé sur le OH du C-8 ne semble pas créer de liaison hydrogène avec les résidus habituellement retrouvés pour les autres diphenyléthers : le contact OCH_3 avec la Val184 reste moins énergétique que la liaison hydrogène Glu266 habituellement retrouvée.

Après avoir étudié l'ensemble des complexes théoriques PTP1B-ligand obtenus par docking, on peut expliquer que l'anhydro-sakisacaulon soit plus actif que les autres molécules du fait que la rigidité occasionnée par la double liaison en C-8 force les chaînes lipophiles à s'attacher par des interactions hydrophobes sur les sites annexes de PTP1B et incite la molécule à s'enfoncer dans le site actif. Énergétiquement, cette conformation serait moins favorisée. L'absence d'activité pour la lactone correspondant au noyau A des diphenyléthers montre qu'il est nécessaire d'occuper tout le site actif afin d'exercer une activité.

3.5 Conclusion

Ainsi, des molécules structurellement différentes comme les depsidones et les diphényléthers ont montré qu'elles pouvaient constituer de bons inhibiteurs de PTP1B à des CI_{50} voisines des molécules naturelles. Leur fixation semble différente : les depsidones bloquant le dialogue entre les deux sites (actifs et secondaires) tandis que les deux unités des diphényléthers seraient plus localisées dans chacun des sites. Il serait intéressant de confirmer cette activité sur des modèles cellulaires car le passage membranaire constitue une étape indispensable pour la sélection d'un composé de référence. La tyrosine phosphorylée est le substrat naturel de PTP1B et il serait également intéressant de déterminer le type d'inhibition mis en jeu : compétitif, incompétitif, non compétitif ou mixte. L'acide lobarique a été décrit comme un inhibiteur non compétitif [60] mais l'acide norlobarique agit-il de la même façon, de même que les diphényléthers ? En effet, leur flexibilité influence-t-elle leur affinité ?

Les résultats obtenus en docking nous avons permis également d'envisager des modulations susceptibles d'augmenter l'activité des diphényléthers surtout pour l'anhydrosakisacaulon, composé le plus actif. Il serait intéressant d'allonger sa chaîne aliphatique greffée sur le cycle A par deux carbones substitués par un cycle aromatique dans le but de générer des liaisons π - π avec la Trp179, AA important de la boucle WPD.

DISCUSSION - CONCLUSION - PERSPECTIVES

DISCUSSION - CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

Le sujet initial de cette thèse de doctorat correspond à la continuité d'un travail réalisé précédemment au laboratoire par un étudiant indonésien, Ismed Friardi qui avait mené une étude phytochimique portant sur des lichens du genre *Stereocaulon* [66]. Des questions résiduelles et l'opportunité d'une récolte quantitative sur un Stéréocaulon présent en Bretagne et non encore étudié pour sa chimie m'ont amené à travailler *Stereocaulon evolutum*. En effet, au cours d'un criblage portant sur les extraits organiques de neuf espèces de stéréocaulons récoltés de par le monde, cinq métabolites inconnus et différents de ceux retrouvés dans les neuf autres espèces avait été mis en évidence grâce à la technique HPTLC/UV. D'autre part, j'ai poursuivi un travail visant à corréliser les critères morphologiques adoptés dans la classification de Lamb pour le genre stéréocaulon avec un profil phytochimique. Lors de ces travaux antérieurs, aucune convergence évidente entre les critères morphologiques et les métabolites secondaires de type depsidone, depside...n'avait pu être mise en évidence. Nous avons ainsi cherché à savoir si une convergence était possible en extrayant sélectivement les acides gras provenant des lipides de structure et de stockage de ces espèces lichéniques puisque les acides gras sont connus pour être des marqueurs taxonomiques. J'ai également cherché à récolter dans mon pays, le Vietnam, des espèces de stéréocaulons pour enrichir la connaissance sur ce genre. Certains avaient été décrits au mont Ngoc Linh de la province de Lam Dong qui se trouve au sud du Vietnam [216]. Mes prospections ne m'ont malheureusement permis de récolter que des espèces d'un genre proche, *Cladonia* pour lesquelles le podétion est creux et non plein comme les stéréocaulons.

Lors de la première partie, nous nous sommes donc intéressés aux acides gras totaux des lichens, démarche pour laquelle nous avons pu bénéficier de la précieuse aide et collaboration de Daniel Catheline appartenant au Laboratoire du Pr Legrand (Laboratoire de Biochimie, Institut National de la Recherche Agronomique, USC 1378, Agrocampus-Ouest). Avant de réaliser les analyses sur nos espèces d'intérêt et utilisant un stéréocaulon disponible au laboratoire, nous avons mis au point une méthode qui permettait d'extraire le plus totalement possible les lipides totaux et qui se voulait peu coûteuse en temps et en solvant. Cinq méthodes ont été comparées en triplicat, les différences reposant sur l'appareil utilisé (soxhlet,

agitateur de type roue, robot d'extraction en parallèle) et le choix du solvant d'extraction (solvant de Folch avec ou sans acide acétique). L'extraction réalisée avec le robot et utilisant le solvant de Folch classique a été sélectionnée. Par la suite, nous avons pu appliquer cette condition à dix espèces de stéréocaulons (l'espèce *S. alpinum* ayant été récoltée entre temps) auxquelles nous avons incluses deux autres chlorolichens du genre *Cladonia*, trois cyanolichens (*Peltigera membranacea*, *Collema cristatum* var. *marginale*, *Lichina pygmaea*) et une cyanobactérie du genre *Nostoc* (photobiotte retrouvée dans *P. membranacea* et *C. cristatum*) pour extraire leurs acides gras totaux. Les profils en acides gras sous forme de méthyls esters ont été obtenus par une analyse CPG/FID et CPG/MS après méthylation des lipides totaux. Nous avons pu remarquer que les teneurs en AG totaux variaient en fonction des espèces d'un même genre et entre les genres eux-mêmes. De plus, l'analyse statistique par Classification Ascendante Hiérarchique a permis de comparer les profils en AG. Plusieurs analyses ont été réalisées basées sur les AG totaux, les AG saturés, les AG insaturés et les AG ramifiés. Alors que Sasaki et al [120] avaient montré que les espèces du genre *Cladonia* pouvaient être regroupées au sein d'un même cluster grâce à leur AG totaux, il n'a pas été possible de faire de même pour le genre stéréocaulon. Cependant, en se basant sur le profil des AG ramifiés, les espèces du genre stéréocaulon ont été regroupées dans un cluster différent de celui des cyanolichens et la cyanobactérie. L'étude des AG totaux du lichen a également conduit à tenter de mieux comprendre les relations entre le photobiotte et le mycobiotte. En effet, nous avons cherché à connaître la répartition des AG totaux au sein des différents partenaires du lichen *S. scutelligerum* à savoir le mycobiotte, le photobiotte et la flore exo et endo-bactérienne sans recourir à la culture qui peut modifier de manière imprévisible la production des acides gras. Nous avons facilement obtenu le mycobiotte car le pseudopodétion en est principalement constitué dans sa partie interne. La microflore résiduelle a été obtenue par lavage à l'eau distillée. Après plusieurs tentatives malheureuses pour isoler le photobiotte, nous avons finalement choisi de comparer un mélange contenant majoritairement le photobiotte et correspondant aux phylloclades avec quelques filaments fongiques (partie débarrassée mécaniquement des phylloclades). Nous avons pu observer que les eaux de lavage contenaient principalement des AG saturés de type ramifié, que le mycobiotte et le phycobiotte possédaient des profils en AG proches même si le pourcentage en AG insaturés à longue chaîne était plus important dans les phylloclades que dans le mycobiotte. Les microalgues sont connues pour synthétiser des AGPIs et il semble qu'après cette synthèse, la symbiose permet une redistribution de ces AG dans l'ensemble du thalle lichénique.

Dans un deuxième temps et dans le but d'enrichir la diversité des métabolites secondaires du genre *Stereocaulon* mais aussi de pouvoir évaluer les activités biologiques de ces molécules dont les applications sont sous-estimées, nous avons étudié le contenu chimique du lichen *S. evolutum* récolté en Bretagne. A l'issue de cette étude phytochimique, 22 composés ont été isolés. Ces composés offrent une bonne diversité structurale

- 4 depsides : l'atranorine **SeA**, le 3(3-oxo-but-én-yl)-atranorine **Se10**, la cladonioidésine **Se11** et le 3'-méthyllecanorate de méthyle **Se21**.
- 4 dérivés monoaromatiques : le β -orcinolcarboxylate de méthyle **Se1**, l'atranol **Se2**, l'orsellinate de méthyle **Se15** et l'haematommate de méthyle **Se19**.
- 4 depsidones : l'acide lobarique **Se3**, l'acide stictique **Se4**, l'isidiophorine **Se9** et l'acide norlobarique **Se18**. Comme nous l'avons vu précédemment, l'acide stictique **Se4** et l'isidiophorine **Se9** diffèrent par le groupement présent en C-3 : une fonction aldéhyde pour **Se4** et une fonction méthylvinylcétone pour **Se9**. L'acide lobarique **Se3** et l'acide norlobarique **Se18** possèdent les mêmes chaînes aliphatiques mais diffèrent par le groupement présent en C-4 : une fonction méthoxyle pour **Se3** et une fonction hydroxyle pour **Se18**.
- 5 diphenyléthers : le sakisacaulon A **Se5**, la lobarine **Se6**, l'anhydro-sakisacaulon A **Se7**, le méthyl 8-sakisacaulon A **Se16** et le sakisacaulon A estérifié **Se20**.
- Une lactone : 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane **Se8**.
- Un dibenzofurane : le strepsiline **Se13**.
- 3 terpénoïdes : le peroxyde d'ergostérol **Seh1**, le brassicastérol **Seh3** et l'acide ursolique **Se12**.

Parmi les quatre composés de type depside, l'atranorine **SeA** a été isolée en grande quantité (6,2 g à partir de 300 g du lichen sec). C'est un composé retrouvé systématiquement chez toutes les espèces du genre *Stereocaulon* mais il est aussi très commun chez les lichens. Deux d'entre eux sont des composés nouveaux (**Se8** et **Se10**) et deux autres (le méthyl-3'-méthyllecanorate et la cladonioidésine) sont nouvellement décrits pour le genre stéréocaulon. Parmi les composés nouveaux, **Se10** est un nouveau depside possédant une chaîne vinylméthylcétone à la place de la fonction aldéhydique de l'atranorine. Nous avons particulièrement étudié ce composé qui a montré plusieurs particularités. D'une part, il s'est

révéle instable en solution en redonnant rapidement dans le DMSO les deux composés monoaromatiques monophénoliques qui le constituent. Cette étude a été réalisée en suivant sa dégradation par RMN¹H, par LC-MS et par spectrométrie de masse du mélange. D'autre part, il semble que sa formation soit corrélée au solvant d'extraction : ce composé ne se forme que lorsque l'extraction a lieu dans l'acétone et en présence de la poudre de lichen : l'atranorine laissée au contact de l'acétone pendant des mois ne donne pas le composé **Se10**. En adoptant ce même raisonnement, nous pouvons maintenant supposer que l'isidiophorine **Se9** (que nous avons également isolé) et qui n'est autre l'acide stictique dont la fonction aldéhydique est remplacée également par une chaîne vinylméthylcétone puisse se former de façon similaire. Ces deux composés **Se9** et **Se10** sont donc à considérer comme des artéfacts et non des métabolites originellement présents dans le lichen.

L'identification structurale des cinq diphenyléthers, **Se5**, **Se6**, **Se7**, **Se16** et **Se20**, a été difficile car plusieurs conformations existent pour ces composés étant donné la présence des deux longues chaînes en C8 et C-6' et de la rotation autour du pont éther. De nombreux essais ont été réalisés en utilisant plusieurs solvants deutérés et en faisant varier la température afin d'obtenir un spectre RMN sans que le phénomène de coalescence soit présent. Pour le composé nouvellement décrit **Se8** correspondant à une des moitiés d'un noyau diphenyléther, une acylation de la fonction hydroxyle du C-8 a été nécessaire afin de pouvoir confirmer sa structure.

Deux depsides, le 8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle **AR** et le 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle **AR2** ont également été synthétisés afin d'enrichir la diversité structurale des composés dérivés de l'atranorine. En effet, la seule différence entre les quatre depsides isolés réside en une variation du substituant en C-3 : une fonction aldéhydique pour l'atranorine, une chaîne vinylméthylcétone pour **Se10**, une fonction carboxylique pour la cladonioidésine (**Se11**) et un hydrogène pour le méthyl-3'-methylécánorate (**Se21**). Cette synthèse a été entreprise en collaboration avec l'équipe de chimistes organiciens de notre équipe (Dr Claudia Lalli) à la suite des résultats obtenus en biologie. En effet, lors d'un criblage par le Dr Jacques Le Seyec sur le virus de l'hépatite C, l'atranorine a montré une activité sur inhibitrice sur la multiplication de ce virus. Ayant isolé plusieurs molécules apparentées, nous les avons proposées au test anti-VHC de même que les quatre dérivés monoaromatiques phénoliques, **Se1**, **Se2**, **Se15** et **Se19**. Les depsides se sont révélés plus actifs que les composés monoaromatiques monophénoliques. Les deux depsides, l'acétocladonioidésine **Se10** (portant une fonction méthylvinylcétone en C-3) et la

cladonioidésine **Se11** (portant une fonction carboxyle en C-3) ont montré une activité moins inhibitrice sur le VHC que l'atranorine. Cependant, le méthyl 3'-méthyllecanorate **Se21** (portant un hydrogène en C-3) et le 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle **AR2** (portant une fonction méthyle en C-3) ont montré une activité dose dépendante similaire à l'atranorine. Le composé 8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbatate **AR** (portant une fonction alcool méthylique en C-3) s'est révélé être le plus actif. Cependant, il a présenté, de même que le composé ne portant aucun substituant en C-3, un léger effet cytotoxique à 50 μ M et 100 μ M.

Deux composés ont été sélectionnés en se basant sur leur CI_{50} et leur absence de toxicité à 50 et 100 μ M pour approfondir leur mécanisme d'action : l'atranorine portant une fonction aldéhydique en C-3 et le composé de synthèse portant une fonction méthyle en C-3. Ces deux composés ont été testés sur l'étape de pénétration et l'étape de réplication du VHC. Les résultats ont permis de mettre en évidence un profil d'activité similaire :

- entre l'atranorine et l'erlotinib qui est un témoin positif de l'inhibition de la pénétration du VHC
- entre le 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle et le Téalaprévir qui est un témoin positif inhibant la réplication du VHC.

Ainsi la fonction méthylique permettrait de cibler une action sur la réplication et la fonction aldéhydique exercerait une action positive sur la pénétration du virus dans la cellule.

Une équipe coréenne a récemment montré que des composés de type diphenyléther et depsidone apparentés à l'acide lobarique, pouvaient être de bons inhibiteurs de la phosphatase PTP1B [60]. Cette cible est intéressante en thérapeutique dans le traitement du diabète, de l'obésité, du cancer du sein et de certaines maladies neurodégénératives. Ayant isolé des composés similaires, nous avons collaboré, respectivement, avec le Pr H. Stuppner (Autriche) et Dr O. Delalande pour déterminer leurs activités biologiques *in vitro* et mieux comprendre leurs interactions *in silico*.

L'ensemble des diphenyléthers a montré une activité qui peut être classée en 4 catégories suivant leur CI_{50} :

- CI_{50} autour de 15 μ M pour l'acide lobarique (**Se3**), l'acide norlobarique (**Se18**) et l'anhydro-sakisacaulon A (**Se7**)
- CI_{50} de l'ordre de 35 μ M pour le sakisacaulon A (**Se5**) et la lobarine (**Se6**)
- CI_{50} de 70 μ M pour le méthyl 8-sakisacaulon A (**Se16**)

- $CI_{50} > 100 \mu M$ pour **Se8**

Parmi ces diphenyléthers, le sakisacaulon A **Se5** et la lobarine **Se6** portant une fonction hydroxyle en C-8 sont plus actifs que le méthyl 8-sakisacaulon A et le sakisacaulon A estérifié en C-7. De plus, il semble important de posséder les deux noyaux aromatiques puisque **Se8** n'est pas actif.

Des études de docking ont été réalisées et ont permis de comprendre les résultats des tests *in vitro* :

- Grâce à leurs structures rigides, les depsidones se lient avec les résidus du **site actif** du récepteur PTP1B tels que le Lys120, la Ser216, la Phe182, la Glu 262, la Trp179 et l'Arg221 par des liaisons fortes : hydrogène, cation- π , π - π .
- L'anhydro-sakisacaulon A **Se7** portant une double liaison en C-8 est également plus rigide que les autres composés diphenyléthers et cette conformation favorise sa fixation sur les résidus du site actif.
- Le sakisacaulon A (**Se5**), la lobarine (**Se6**) et le méthyl 8-sakisacaulon A (**Se16**), sont des molécules flexibles comparées aux depsides et leur fixation sur les résidus du site actif de PTP1B se fait aléatoirement soit par l'intermédiaire du noyau A ou du noyau B à cause de leur mobilité autour du pont éther. C'est pourquoi l'effet de ces molécules doit être diminué puisque plus entropique.
- La lactone **Se8** possède peu d'interactions avec les résidus de PTP1B, ce qui peut expliquer son absence d'activité.

Tous ces résultats de docking sur PTP1B correspondent à ceux obtenus sur deux modèles de PTP1B et il reste à étudier les interactions entre les ligands et l'enzyme pour confirmer ces premières constatations.

Enfin, la cytotoxicité de l'ensemble de ces composés possédant une activité soit sur PTP1B, soit sur le VHC ont été testés sur 5 lignées cancéreuses et deux lignées non cancéreuses. Seuls deux composés, l'anhydro-sakisacaulon A **Se7** et le 3'-méthyllécánorate de méthyle **Se21**, ont montré une cytotoxicité à une dose de 10 μM .

En termes de perspectives, les travaux de cette thèse pourront être complétés dans l'avenir par plusieurs développements visant à améliorer certains points qui ont émergé lors de ce travail. Les principales orientations sont les suivantes :

- tout d'abord, nous avons à confirmer que les AG ramifiés pourraient être une aide en chimiotaxonomie, en ramassant stérilement des espèces du genre stéréocaulon. De plus, nous avons analysé l'ensemble des AG que ce soient les glycolipides de stockage ou les phospholipides de structure. Il serait sans doute judicieux de recommencer cette analyse après avoir isolé spécifiquement les lipides constitutifs des membranes (phospholipides) pour un comparatif plus précis : les membranes des cyanolichens et des chlorolichens étant différente, de même que les stéréocaulon bipartites et tripartites.
- concernant les propriétés biologiques de nos molécules, nous pensons que l'activité anti-VHC pourrait être approfondie. Des modifications de la fonction aldéhydique par synthèse chimique peuvent être envisagées : la fonction aldéhydique est une fonction très active biologiquement et chimiquement et il serait aisément possible de fonctionnaliser cette position en C-3, par une hydrazine par exemple. Ensuite, il serait intéressant de cibler spécifiquement le mécanisme d'action : est-ce un effet virucide qui est impliqué et quels sont les facteurs viraux ou facteurs cellulaires impliqués dans la propagation du virus ? Enfin, il serait intéressant de tester ces molécules sur d'autres génotypes viraux et voir si l'association de molécules de référence avec ces composés montrent un effet synergique.
- parmi les trois composés actifs sur PTP1B, des essais cellulaires seraient à envisager puisque le passage membranaire constitue une étape indispensable pour être un bon inhibiteur. Il serait également intéressant de déterminer le type d'inhibition mis en jeu : compétitif, incompétitif, non compétitif ou mixte. Grâce aux informations dégagées par la modélisation moléculaire et les études de relation-activité, certaines modifications structurales de diphenyléthers seraient à envisager en priorité : pontage des noyaux aromatiques pour favoriser l'amarrage de la molécule sur la protéine au niveau de résidus reconnus pour une liaison spécifique avec le ligand.

A l'issue de ce travail, nous percevons que les lichens sont des organismes particulièrement intéressants à étudier compte tenu des relations établies entre plusieurs organismes différents (champignons, algues, cyanobactéries) mais aussi la microflore associée dont il faut tenir compte dans l'équilibre symbiotique voire au niveau de la production de

métabolites. Plusieurs types structuraux méritent d'être étudiés et leur rôle ainsi que leur distribution dans le lichen ne sont que partiellement connus. Nous nous sommes cantonnés à l'étude des lipides sur plusieurs espèces et à celle de métabolites secondaires pour un stéréocaulon dans une démarche chimiotaaxonomique et de valorisation pour des propriétés biologiques d'intérêt thérapeutique. Même si le panel de molécules originales trouvées est assez réduit au niveau des métabolites secondaires, les scores d'activité et l'efficacité de certaines de ces molécules sont particulièrement encourageants pour poursuivre dans cette voie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Nash III TH (2008) Lichen Biology. 2nd ed. Nash III TH, editor Cambridge University Press.
2. Cardinale M, Puglia AM, Grube M (2006) Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 484–495.
3. Karthikai Devi G, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubramanian T (2011) Antimicrobial activities of the lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. *Indian J Geo-Marine Sci* 40: 449–453.
4. Büdel B, Scheidegger C (2008) Thallus morphology and anatomy. In: Nash III TH, editor. Lichen biology. Cambridge University Press. pp. 40–68.
5. Van Haluwyn C, Asta J, Boissière J-C, Clerc P, Gavériaux J-P (2012) Guide des lichens de France: lichens des sols. Paris.
6. Lange O., Tenhunen J. (1981) Moisture Content and CO₂ Exchange of Lichens. II. Depression of Net Photosynthesis in *Ramalina maciformis* at High Water Content is Caused by Increased Thallus Carbon Dioxide Diffusion Resistance. *Oecologia* 51: 426–429.
7. Tiévant P (2001) Guide des lichens: 350 espèces de lichens d'Europe. Paris: Delachaux et Niestlé S.A., Lausanne (Switzerland); Paris.
8. Honegger R (1991) Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 553–578.
9. Friedl T, Brüdel B (2008) Photobiont. In: Nash III TH, editor. Lichen biology. Cambridge University Press. pp. 10–26.
10. Van Haluwyn C, Asta J, Gavériaux J-P (2009) Guide des lichens de France : lichens des arbres. Paris.
11. Lange O., Kilian E, Ziegler H (1986) Water vapor uptake and photosynthesis of lichens : with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71: 104–110.
12. Palmqvist K, Dahlman L, Jonsson D, Nash III TH (2008) The carbon economy of lichens. In: Nash III TH, editor. Lichen biology. Cambridge University Press. pp. 182–215.
13. Ellis CJ (2012) Lichen epiphyte diversity: A species, community and trait-based review. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 14: 131–152.
14. Glenn MG, Orsi E V, Hemsley ME (1991) Lichen metal contents as correlates of air filter measurements. *Grana* 30: 44–47.
15. Huebert DB, L'Hirondelle SJ, Addison PA (1985) The effects of sulphure dioxide on net CO₂ assimilation in the lichen *Evernia mesomorpha* Nyl. *New Phytol* 100: 643–651.
16. Loppi S, Corsini A (1995) Lichens as bioindicators of air quality on Montecatini Terme (central northern Italy). *Ecol Mediterr* 21: 87–92.

17. Huneck S (2001) New Results on the Chemistry of Lichen Substances. Herz W, Falk H, Kirby AW, Moore RE, editors Springer-Verlag Wien GmbH.
18. Huneck S, Yoshimura I (1996) Identification of Lichen Substances. Heidelberg: Springer Verlag, Berlin.
19. Stocker-Wörgötter E (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep* 25: 188–200.
20. Fazio AT, Adler MT, Bertoni MD, Sepúlveda CS, Damonte EB, et al. (2007) Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities. *Z Naturforsch C* 62: 543–549.
21. Elix JA, Stocker-Wörgötter E (2008) Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III TH, editor. *Lichen biology*. Cambridge University Press. pp. 104–133.
22. Culberson CF, Elix JA (1989) Lichen substances. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *In Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1: Plant Phenolics*. London: Academic Press. pp. 509–535.
23. Asahina Y, Shibata S (1954) *Chemistry of Lichen Substances*. Tokyo: Japan Society for the Promotion of Science.
24. Zambare VP, Christopher LP (2012) Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm Biol* 50: 778–798.
25. Molnár K, Farkas E (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C* 65: 157–173.
26. Huneck S (1999) The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86: 559–570.
27. Shrestha G, St. Clair LL (2013) Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* 12: 229–244.
28. Nguyen K-H, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep* 30: 1490–1508.
29. Esimone CO, Ofokansi KC, Adikwu MU, Ibezim EC, Abonyi DO, et al. (2007) *In vitro* evaluation of the antiviral activity of extracts from the lichen *Parmelia perlata* (L.) Ach. against three RNA viruses. *J Infect Dev Ctries* 1: 315–329.
30. Karagoz A, Aslan A (2005) Antiviral and cytotoxic activity of some lichen extracts. *Biol Bratislava* 60: 281–286.
31. Cohen PA, Hudson JB, Towers GHN (1996) Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. Birkhäuser Verlag Basel: 180–183.
32. Cohen PA, Towers GHN (1995) Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *J Nat Prod* 58: 520–526.

33. Cohen PA, Towers GHN (1995) The anthraquinones of *Heterodermia obscurata*. *Phytochemistry* 40: 911–915.
34. Wood S, Huffman J, Weber N, Andersen D, North J, et al. (1990) Antiviral Activity of Naturally Occurring Anthraquinones and Anthraquinone Derivatives. *Planta Med* 56: 651–652.
35. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, et al. (1995) Screening of Tissue Cultures and Thalli of Lichens and Some of Their Active Constituents for Inhibition of Tumor Promoter-Induced Epstein-Barr Virus Activation. *Chem Pharm Bull* 43: 1388–1390.
36. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, et al. (1997) Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem* 40: 942–951.
37. Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HH, Lin LZ, et al. (1995) Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *J Nat Prod* 58: 1024–1031.
38. Hirabayashi K, Iwata S, Ito M, Shigeta S, Narui T, et al. (1989) Inhibitory Effect of a Lichen Polysaccharide Sulfate, GE-3-S, on the Replication of Human Immunodeficiency Virus (HIV) *in vitro*. *Chem Pharm Bull* 37: 2410–2412.
39. Lai D, Odimegwu DC, Esimone C, Grunwald T, Proksch P (2013) Phenolic compounds with *in vitro* activity against respiratory syncytial virus from the Nigerian lichen *Ramalina farinacea*. *Planta Med* 79: 1440–1446.
40. Legaz ME, Vicente C (1983) Endogenous Inactivators of Arginase, L-Arginine Decarboxylase, and Agmatine Amidinohydrolase in *Evernia prunastri* Thallus. *Plant Physiol* 71: 300–302.
41. Planelles V, Legaz ME (1987) Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci* 51: 9–16.
42. Okuyama E, Hossain CF, Yamazaki M (1991) Monoamine Oxidase inhibitors from a lichen, *Solorina crocea* (L.) Ach. *Japanese Soc Pharmacogn* 45: 159–162.
43. Khanuja S, Tiruppadiripuliyur R, Gupta V, Srivastava S, Verma S, et al. (2007) Antimicrobial and anticancer properties of methyl-betaorcinolcarboxylate from lichen (*Everniastrum cirrhatum*).
44. Ingólfsdóttir K, Bloomfield SF, Hylands PJ (1985) *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Lichen Metabolites as Potential Preservatives. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 289–292.
45. Ingólfsdóttir (2002) Usnic acid. *Phytochemistry* 61: 729–736.
46. Ingólfsdóttir K, Breu W, Huneck S, Gudjonsdóttir G a, Müller-Jakic B, et al. (1994) *In vitro* inhibition of 5-lipoxygenase by protolichesterinic acid from *Cetraria islandica*. *Phytomedicine* 1: 187–191.
47. Ogmundsdóttir HM, Zoëga GM, Gissurarson SR, Ingólfsdóttir K (1998) Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 50: 107–115.

48. Sankawat U, Shibuya M, Ebizuka Y, Noguchi H, Kinoshita T, et al. (1982) Depsides as potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis: A new active site model for fatty acid cyclooxygenase. *Prostaglandins* 24: 21–34.
49. Kumar KC, Müller K (1999) Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B4 biosynthesis by a non-redox mechanism. *J Nat Prod* 62: 817–820.
50. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y (1995) Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 61: 113–115.
51. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U (2005) Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytother Res* 19: 58–64.
52. Kim M-S, Cho H-B (2007) Melanogenesis inhibitory effects of methanolic extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima*. *J Microbiol* 45: 578–582.
53. Verma N, Behera BC, Sonone A, Makhija U (2008) Lipid peroxidation and tyrosinase inhibition by lichen symbionts grown *in vitro*. *African J Biochem Res* 2: 225–231.
54. Higuchi M, Miura Y, Boohene J, Kinoshita Y, Yamamoto Y, et al. (1993) Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta Med* 59: 253–255.
55. Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M (2000) Depigmenting Effect of a -Tocopheryl Ferulate on Normal Human. *Pigment Cell Res* 13: 170–174.
56. Boustie J, Galibert-Anne M-D, Lohezic-Le-Devehat F, Chollet-Krugler M, Tomasi S (2011) Paraconic acids as pigmentation activators.
57. Cui Y, Yim JH, Lee D-S, Kim Y-C, Oh H (2012) New diterpene furanoids from the Antarctic lichen *Huea sp.* *Bioorg Med Chem Lett* 22: 7393–7396.
58. Seo C, Choi Y-H, Ahn JS, Yim JH, Lee HK, et al. (2009) PTP1B inhibitory effects of tridepside and related metabolites isolated from the Antarctic lichen *Umbilicaria antarctica*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24: 1133–1137.
59. Seo C, HanYim J, Kum Lee H, Oh H (2011) PTP1B inhibitory secondary metabolites from the Antarctic lichen *Lecidella carpathica*. *Mycology* 2: 18–23.
60. Seo C, Sohn JH, Ahn JS, Yim JH, Lee HK, et al. (2009) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 2801–2803.
61. Fries TM (1857) *De Stereocaulis et Pilophoris commentatio*. Wahlström & co, Uppsala.
62. Fries TM (1858) *Monographia Stereocaulorum et Pilophorum*. *Nov Acta Regiae Soc Sci Ups Ser III* 2: 307–380.
63. Lamb IM (1951) On the morphology, phylogeny, and taxonomy of lichen genus *Stereocaulon*. *Can J Bot* 29: 522–584.
64. Lamb IM (1977) A Conspectus of the Lichen Genus *Stereocaulon* (Schreb.) Hoffm. *J Hattori Bot Lab* 43: 191–355.

65. Lamb IM (1978) Keys to the species of the lichen genus *Stereocaulon* (Schreb.) Hoffm. Journ Hattorio Bot Lab 44: 209–250.
66. Ismed F (2012) Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon*: étude particulière de *S. halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb, deux lichens récoltés en Indonésie. Université de Rennes 1.
67. Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ, Flechter A, Gilbert OL, et al. (2009) The Lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society London.
68. Vila JL, Mollinedo P, Flores Y, Sterner O (2008) 1,3,7-Trimethylguanidine from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. Rev Boliv Quim 25: 7–9.
69. Kaneda T (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiol Mol Biol Rev 55: 288–302.
70. Kruiger GHJ, Wet H De, Kock JLF, Pieterse AJH (1995) Fatty acid composition as a taxonomic characteristic for *Microcystis* and other coccoid cyanobacteria (blue-green alga) isolates. Hydrobiologia 145: 145–151.
71. Reis RA, Iacomini M, Gorin PAJ, Mera de Souza L, Grube M, et al. (2005) Fatty acid composition of the tropical lichen *Teloschistes flavicans* and its cultivated symbionts. FEMS Microbiol Lett 247: 1–6.
72. Ruess L, Haggblom MM, García Zapata EJ, Dighton J (2002) Fatty acids of fungi and nematodes-possible biomarkers in the soil food chain? Soil Biol Biochem 34: 745–756.
73. Sahu A, Pancha I, Jain D, Paliwal C, Ghosh T, et al. (2013) Fatty acids as biomarkers of microalgae. Phytochemistry 89: 53–58.
74. Temina M, Rezankova H, Rezanka T, Dembitsky VM (2007) Diversity of the fatty acids of the *Nostoc* species and their statistical analysis. Microbiol Res 162: 308–321.
75. Louisot P (1983) Lipides et dérivés isoprénique. Biochimie générale et médicale. Paris, Simep. pp. 259–321.
76. Legrand P (2007) Les acides gras : structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés. Cah Nutr Diététique 42: 1S7–1S12.
77. Wellendorf M (1963) Composition of Spermaceti. Nature 198: 1086–1087.
78. Hölzl G, Dörmann P (2007) Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. Prog Lipid Res 46: 225–243.
79. Dembitsky VM (1992) Lipids of lichens. Prog Lipid Res 31: 373–397.
80. Temina M, Levitsky DO, Dembitsky VM (2010) Chemical Constituents of the Epiphytic and Lithophilic Lichens of the Genus *Collema*. Rec Nat Prod 1: 79–86.
81. Dembitsky VM, Bychek IA, Rozentsvet OA, Shustov M V (1992) Fatty acid and phospholipid compositions of some lichen species from the Volga river basin. Cryptogam Bot.
82. Dembitsky VM, Bychk IA, Kashin AG (1992) Chemical constituents of some lichen species. J Hattori Bot Lab 71: 255–262.

83. Dertien BK, De Kok LJ, Kuiper PJC (1977) Lipid and Fatty acid composition of Tree-growing and Terrestrial lichens. *Physiol Plant* 40: 175–180.
84. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA (1994) Seasonal variability of lipids and fatty acids in the tree-growing lichen *Xanthoria parietina* L. *J Exp Bot* 45: 403–408.
85. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA (1994) Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. *Phytochemistry* 36: 601–608.
86. Hanus LO, Temina M, Dembitsky V (2008) Biodiversity of the chemical constituents in the epiphytic lichenized ascomycete *Ramalina lacera* grown on difference substrates *Crataegus sunaicus*, *Pinus halepensis*, and *Quercus calliprios*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 152: 203–208.
87. Kotlova ER, Sinyutina NF (2005) Changes in the content of individual lipid classes of a lichen *Peltigera aphthosa* during dehydration and subsequent rehydration. *Russ J Plant Physiol* 52: 35–42.
88. Torres A, Dor I, Rotem J, Srebnik M, Dembitsky VM (2003) Characterization of surface n - alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia sp.*, and its mycobiont, from the *Jerusalem hills*. *Eur J Biochem* 2125: 2120–2125.
89. Czacuga B, Yoshida K (1991) Carotenoids in certain lichens from the *Chichibu Mountains*, Central Japan. *J Bot Taxon Geobot* 102: 661–666.
90. Czacuga B, Von Arb C, Lumbsch HT (1995) Carotenoids in lichens from the Swiss Alps. *J Bot Taxon Geobot* 106: 173–178.
91. Czacuga B, Cifuentest B, Reynaud RA (1988) Carotenoids in Lichens from the Canary Islands. *Biochem Syst Ecol* 16: 117–118.
92. Czacuga B, Moberg R, Alstrup V (1992) Investigations on carotenoids in lichens. XXXII. Carotenoids occurring in the thalli of lichens from Kenya (Equatorial Africa).pdf. *Acta Soc Bot Pol* 61: 231–239.
93. Czacuga B, Caccamese S, Passadore V (1989) Investigations on Carotenoids in Lichens . XX . Carotenoids in Lichens from Various Italian Environments. *Phyton (B Aires)* 29: 15–22.
94. Czacuga B, Olech M (1990) Investigations on Carotenoids in Lichens. XXV. Studies of Carotenoids in Lichens from Spitsbergen. *Phyton (B Aires)* 30: 235–245.
95. Czacuga B, Gutkowski R, Czerpak R (1986) Investigations on carotenoids in lichens. V. Lichens from Antarctica. *Pol Polar Res* 7: 295–303.
96. Czacuga B, Lallemand R (1993) Investigations on Carotenoids in Lichens, 44: carotenoids of some lichens from France. *Acta Bot Gall* 140: 35–40.
97. Czacuga B (1983) Mutatoxanthin, the dominant carotenoid in lichens of the *Xanthoria* genus. *Biochem Syst Ecol* 11: 329–331.
98. Czacuga B, Bhat RB, Aptroot A, Mies B, Czacuga-Semieniuk E (1998) Carotenoids in some lichen species from South Africa, Madagascar and Cape Verde Islands. *J Bot Taxon Geobot* 109: 573–580.

99. Czczuga B, Ferraro De Corona L (1987) Carotenoids in lichens from Argentina. *Biochem Syst Ecol* 15: 519–522.
100. Czczuga B (1985) Carotenoids in representatives of the Cladoniaceae. *Biochem Syst Ecol* 13: 83–88.
101. Solberg Y (1987) Chemical constituents of the lichens *Cetraria delisei*, *Lobaria pulmonaria*, *Stereocaulon tomentosum* and *Usnea hirta*. *Journ Hattorio Bot Lab* 63: 357–366.
102. Gaskell SJ, Eglinton G, Bruun T (1973) Hydrocarbon constituents of three species of Norwegian lichen: *Cetraria Nivalis*, *C. crispata*, *Siphula ceratites*. *Phytochem Reports* 12: 1174–1176.
103. Ter Heide R, Provatoroff N, Traas PC, De Valois PJ, Van der plasse N, et al. (1975) Qualitative Analysis of the Odoriferous Fraction of Oakmoss (*Evernia prunastri* (L.) Ach.). *J Agric Food Chem* 23: 950–957.
104. Catalano S, Marsili A, Morelli I, Pacchiani M (1976) Hydrocarbons, sterols and fatty acids of *Lobaria pulmonaria*. *Phytochemistry* 15: 221.
105. Sorberg Y (1986) Chemical constituents of the lichen species *Cetraria islandica*. *J Hattori Bot Lab* 60: 391–406.
106. Zygadlo JA, Pignata M, Gonzalez C, Levin A (1993) Alkanes in lichens. *Phytochemistry* 32: 1453–1456.
107. Garty J (1993) Lichens as biomonitors for heavy metal pollution. In: Markert B, editor. *Plants as biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH Cambridge, UK. pp. 193–263.
108. Piervittori R, Usai L, Alessio F, Maffei M (1996) Surface *n*-alkane variability in *Xanthoria parietina*. *Lichenologist* 28: 79–87.
109. Safe S, Safe LM, Mass WSG (1975) Sterols of three lichen species: *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria scrobiculata* and *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 14: 1821–1823.
110. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA, Shustov M V (1991) Identification of fatty acids from *Cladonia* lichens. *Phytochemistry* 30: 4015–4018.
111. Dembitsky VM, Bychek IA, Shustov M V, Rozentsvet OA (1991) Phospholipids and fatty acids composition of some species lichens. *Phytochemistry* 30: 837–839.
112. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA (1992) Fatty acids and phospholipids from lichens of the order Lecanorales. *Phytochemistry* 31: 851–853.
113. Dembitsky VM, Irina A, Rozentsvett OA (1993) Diacylglyceryltrimethylhomoserines and phospholipids of some lichen species. *Phytochemistry* 34: 1535–1536.
114. Piervittori R, Alessio F, Usai L, Maffei M, Mattioli VPA (1995) Seasonal variations in lipids of *Xanthoria parietina* growing at high elevations. *Phytochemistry* 40: 717–723.
115. Bychuk IA (1994) Change in the lipid composition of lichens in the spring period. *Chem fungal Taxon* 29: 582–585.

116. Yamamoto Y, Watanabe A (1974) Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. *J Gen Appl Microbiol* 86: 83–86.
117. Kushnir E, Tietz A, Galun M (1978) “Oil Hyphae” of Endolithic lichens and Their fatty acid composition. *Protoplasma* 97: 47–60.
118. Piervittori R, Alessio F, Maffei M (1994) Fatty acid variations in the lichen, *Xanthoria parietina*. *Phytochemistry* 36: 853–856.
119. Rezanka T, Dembitsky VM (1999) Fatty acids of lichen species from Tian Shan Mountains. *Folia Microbiol* 44: 643–646.
120. Sasaki GL, Cruz LM, Gorin PA, Lacomini M (2001) Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. *Lipids* 36: 167–174.
121. Guschina IA, Dobson G, Harwood JL (2003) Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry* 64: 209–217.
122. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA, Shustov M V (1992) Fatty acid composition of *Parmelia* lichens. *Phytochemistry* 31: 841–843.
123. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA. (1992) Lipid composition of some lichens. *Phytochemistry* 31: 1617–1620.
124. Bychek-Gushchina IA (1997) Study of Biochemical Aspects of lichen Symbiosis. I. Lipids and Fatty acids in cultured Lichen Symbionts. *Biochemistry* 62: 574–580.
125. Beltman IH, Kok LJ De, Kuiper PJC, Hasselt PR Van (1980) Fatty acid composition and chlorophyll content of epiphytic lichens and a possible relation to their sensitivity to air pollution. *OIKOS* 35: 321–326.
126. Dembitsky VM, Pechenkina-Shubina EE, Rozentsvet OA (1991) Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. *Phytochemistry* 30: 6–8.
127. Dembitsky VM, Rozentsvet OA, Pechenkina EE (1990) Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry* 29: 3417–3421.
128. Molina MC, Crespo A, Vicente C, Elix JA (2003) Differences in the composition of phenolics and fatty acids of cultured mycobiont and thallus of *Physconia distorta*. *Plant Physiol Biochem* 41: 175–180.
129. Goss R, Wilhelm C (2009) Lipids in Algae, Lichens and Mosses. In: Wada H, Murata N, editors. *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Springer. pp. 117–135.
130. Wassef M (1977) Fungal Lipids. *Adv Lipid Res* 15: 159–185.
131. Radin NS, Akahori Y (1961) Fatty Acids of human brain cerebrosides. *J Lipid Res* 2: 335–341.
132. Lynen F (1953) Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 12: 299–314.
133. Bernard L (2000) *Biochimie*. DeBoek Université.

134. Olsson PA, Johansen A (2000) Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycol Res* 104: 429–434.
135. Harris R V, James AT (1965) Linoleic and α -linolenic acid biosynthesis in plant leaves and a green alga. *Biochim Biophys Acta* 106: 456–464.
136. Cherif A, Dubacq J, Mache R, Oursel A, Tremolieres A (1974) Biosynthesis of α -linolenic acid by desaturation of oleic and linoleic acids in several organs of higher and lower plants and in algae. *Phytochemistry* 14: 703–706.
137. Ratledge C (1988) *Microbial lipids* pp. 135–196.
138. Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils* 29: 111–129.
139. Cordeiro LMC, Iacomini M, Stocker-Wörgötter E (2004) Culture studies and secondary compounds of six *Ramalina* species. *Mycol Res* 108: 489–497.
140. Gasulla F, Guéra A, Barreno E (2010) “A simple and rapid method for isolating lichen photobionts“. *Symbiosis* 51: 175–179.
141. Calatayud a (2001) A new method to isolate lichen algae by using Percoll® gradient centrifugation. *Lichenol* 33: 361–366.
142. Maslov a. I, Pavlova E a. (2005) Simple method for fractionation of *Parmelia sulcata* lichen thalli. *Russ J Plant Physiol* 52: 271–274.
143. An S, Xiao T, Yokota A (2008) *Schumannella luteola* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae. *J Gen Appl, Microbiol*, 54: 253–258.
144. González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O (2005) Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 401–415.
145. Kock JLF, Botha A (1998) Fatty acids in fungal taxonomy. In: Frisvad JC, editor. *Chemical Fungal Taxonomy*. CRC Press. pp. 219–249.
146. Sergeeva YE, Galanina L a., Kochkina G a., Feofilova EP (2009) The effect of the preservative sorbic acid on the lipid composition of the ascomycete fungus *Penicillium roqueforti* Thom. *Microbiology* 78: 630–635.
147. Stahl PD, Klug MJ (1996) Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 4136–4146.
148. Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z (2002) Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60: 497–503.
149. Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Cohen Z (2002) Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phytochemistry* 60: 135–143.

150. Iskandarov U, Khozin-Goldberg I, Cohen Z (2011) Selection of a DGLA-producing mutant of the microalga *Parietochloris incisa*: I. Identification of mutation site and expression of VLC-PUFA biosynthesis genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 249–256.
151. Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z (2011) LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 905–915.
152. Finegold L, Singer MA, Federle TW, Vestal JR (1990) Composition and Thermal Properties of Membrane Lipids in Cryptoendolithic Lichen Microbiota from Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 54: 1191–1194.
153. Matsumoto GI, Nienow JA, Friedmann E., Sekiya E, Ocampo-Friedmann R (2004) Biogeochemical features of lipids in endolithic microbial communities in the ross desert (McMurdo Dry Valleys), Antarctica. *Cell Mol Biol* 50: 591–604.
154. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, et al. (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 583–609.
155. Anderson OR (2014) Microbial Communities Associated with Tree Bark Foliose Lichens: A Perspective on their Microecology. *J Eukaryot Microbiol*: 1–7.
156. Roullier C (2010) Recherche de mycosporines et de dérivés aminés lichéniques d'intérêt pour les cancers photoinduits. Etude phytochimique d'un lichen marin: *Lichina pygmaea* (Lightf.) C. Agardh. Université de Rennes 1.
157. Jiang B, Zhao Q-S, Yang H, Hou A-J, Lin Z-W, et al. (2001) Constituents from *Lethariella cladonioides*. *Fitoterapia* 72: 832–833.
158. Nicollier G, Rebetez M, Tabacchi R (1979) Identification et synthèse de nouveaux depsides isolés de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.). *Helv Chim Acta* 62: 711–717.
159. Kouam SF, Ngadjui BT, Krohn K, Wafo P, Ajaz A, et al. (2005) Prenylated anthranoid antioxidants from the stem bark of *Harungana madagascariensis*. *Phytochemistry* 66: 1174–1179.
160. Culberson CF, Culberson WL (1978) β -Orcinol Derivatives in Lichens: Biogenetic Evidence from *Oropogon ioxensis*. *Exp Mycol* 2: 245–257.
161. Culberson CF, Culberson WL, Johnson A (1977) Thermally induced chemical artifacts in lichens. *Phytochemistry* 16: 127–130.
162. Vicente C, Fontaniella B, Millanes AM, Sebastián B, Legaz ME (2003) Enzymatic production of atranorin: a component of the oak moss absolute by immobilized lichen cells. *Int J Cosmet Sci* 25: 25–29.
163. Bo L, Zhongwen L, Handong S (1990) Chemical constituents from *Lobaria isidiophora*. *Acta Bot Yunnanica* 12: 447–451.
164. Gonzalez AG, Rodriguez Pérez EM, Hernandez Padron CE, Barrera JB (1992) Chemical constituents of the lichen *Stereocaulon azureum*. *Z Naturforschung C* 47: 503–507.

165. Ismed F, Lohézic-Le Dévéhat F, Delalande O, Sinbandhit S, Bakhtiar A, et al. (2012) Lobarin from the Sumatran lichen, *Stereocaulon halei* Lamb. *Fitoterapia* 83: 1693–1698.
166. Morita H, Tsuchiya T, Kishibe K, Noya S, Shiro M, et al. (2009) Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 3679–3681.
167. Gonzalez AG, Rodriguez EM, Bermejo J (1995) Depsidone chemical transformations in an extract of the lichen *Stereocaulon azureum*. *An Quim* 91: 461–466.
168. Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, et al. (2007) Metabolites from the Lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. *J Nat Prod* 70: 316–318.
169. Matsumoto T, Shimizu N, Itoh T, Iida T, Nishioka A (1982) Carbon-13 NMR Spectroscopic Analysis of 24-Methyl- $\Delta^{5,22}$ -Sterols in Rape and Mustard Seed Oils. *JAOCS* 59: 521–523.
170. Atalay F, Halici MB, Mavi A, Cakir A, Odabasoglu F, et al. (2011) Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Turk J Chem* 35: 647–661.
171. Asahina Y, Shibata S (1954) Chemistry of lichen substances. Jananese Society for Promotion of Scicence, Tokyo.
172. Neelakantan S, Padmasanni R, Seshadri TR (1965) New reagents for the synthesis of depsides methyl evernate, methyl lecanorate, evernic acid and atranorin. *Tetrahedron* 21: 3531–3536.
173. Elix JA, Chester D, Gaul KL, Parker JL, Wardlaw JH (1989) The Identification and Synthesis of Further Lichen β -Orcinol para-Depsidates.
174. Elix JA, Mahadevan I, Wardlaw JH, Arvidsson L, Jorgensen PM (1987) New depsides from *Erioderma* lichens. *Aust J Chem* 40: 1581–1590.
175. Piattelli M, Giudici De Nicola M (1968) Anthraquinone pigments from *Xanthoria parietina* (L.). *Phytochemistry* 7: 1183–1187.
176. Wang Z, Yin G, Qin J, Gao M, Cao L, et al. (2008) An Efficient Method for the Selective Iodination of α,β -Unsaturated Ketones. *Synthesis (Stuttg)* 22: 3565–3568.
177. Chooi YH (2008) Genetic Potential of Lichen-Forming Fungi in Polyketide Biosynthesis.
178. Bhattarai HD, Kim T, Oh H, Yim JH (2013) A new pseudodepsidone from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* and its antioxidant, antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 66: 559–561.
179. Lim JH, Kim IC, Kim DG, Han SJ, Lee HS, et al. (2012) Lobarin for treating diabetes and obesity.
180. Yim JH, Kim IC, Han SJ, Lee HS, Datta BH, et al. (2014) Pharmaceutical and food composition for preventing or treating diabetes or obesity.

181. Bačkorová M, Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, et al. (2012) Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 26: 462–468.
182. Prompiboon P, Bhumiratana A, Ruchirawat S, Boucias DG, Wiwat C (2008) Isolation of ergosterol peroxide from *Nomuraea rileyi* infected larvae of tobacco cutworm. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2909–2917.
183. Mazumder K, Tanaka K, Fukase K (2013) Cytotoxic activity of ursolic acid derivatives obtained by isolation and oxidative derivatization. *Molecules* 18: 8929–8944.
184. Novotry L, Vachalkova A, Biggs D (2001) Ursolic acid: An anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma* 48: 241–246.
185. Sultana N (2011) Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product. *J Enzyme Inhib Med Chem* 26: 616–642.
186. Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y (1999) Processing and Functions of Hepatitis C. *Intervirolology* 8640: 145–152.
187. Calland N, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K (2012) Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses* 4: 2197–2217.
188. Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Pallier C, et al. (2010) Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology* 138: 1112–1122.
189. Wagoner J, Morishima C, Graf TN, Oberlies NH, Teissier E, et al. (2011) Differential in vitro effects of intravenous versus oral formulations of silibinin on the HCV life cycle and inflammation. *PLoS One* 6: e16464.
190. Ferenci P, Scherzer T-M, Kerschner H, Rutter K, Beinhardt S, et al. (2008) Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 135: 1561–1567.
191. Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, et al. (2012) (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 55: 720–729.
192. Ciesek S, von Hahn T, Colpitts CC, Schang LM, Friesland M, et al. (2011) The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 54: 1947–1955.
193. Haid S, Novodomská A, Gentsch J, Grethe C, Geuenich S, et al. (2012) A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology* 143: 213–22.e5.
194. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, et al. (2012) Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat* 19: e81–8.

195. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, et al. (2009) The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 50: 1756–1764.
196. Lan K-H, Wang Y-W, Lee W-P, Lan K-L, Tseng S-H, et al. (2012) Multiple effects of Honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver Int* 32: 989–997.
197. Wu S-F, Lin C-K, Chuang Y-S, Chang F-R, Tseng C-K, et al. (2012) Anti-hepatitis C virus activity of 3-hydroxy caruilignan C from *Swietenia macrophylla* stems. *J Viral Hepat* 19: 364–370.
198. Baumgartner RR, Steinmann D, Heiss EH, Atanasov AG, Ganzera M, et al. (2010) Roots As a PTP1B Inhibitor. *J Nat Prod* 73: 1578–1581.
199. Heiss EH, Baumgartner L, Schwaiger S, Heredia RJ, Atanas G, et al. (2012) Ratanhiaphenol III from *Ratanhiae Radix* is a PTP1B Inhibitor. *Planta Med* 78: 678–681.
200. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, et al. (1999) Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1 B Gene. *Science* (80-) 283: 1999.
201. Elchebly M (1999) Un nouvel espoir dans le traitement du diabète de type 2 et de l'obésité. *Médecine/sciences* 15: 1187–1188.
202. Barford D, Flint A, Tonks N (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* (80-) 263: 1397–1404.
203. Yip S-C, Saha S, Chernoff J (2010) PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci* 35: 442–449.
204. Thareja S, Aggarwal S, Bhardwaj TR, Kumar M (2010) Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors : A Molecular Level Legitimate Approach for the Management of Diabetes Mellitus. *Med Res Rev* 32: 459–517.
205. Buckley DA, Cheng A, Kiely PA, Tremblay ML, Connor RO (2002) Regulation of Insulin-Like Growth Factor Type I (IGF-I) Receptor Kinase Activity by Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP-1B) and Enhanced IGF-I-Mediated Suppression of Apoptosis and Motility in PTP-1B-Deficient Fibroblasts. *Mol Cell Biol* 22: 1998–2010.
206. O'Neill C, Kiely AP, Coakley MF, Manning S, Long-Smith CM (2012) Insulin and IGF-1 signalling: longevity, and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 40: 721–727.
207. Swarbrick MM, Havel PJ, Levin A a, Bremer A a, Stanhope KL, et al. (2009) Inhibition of protein tyrosine phosphatase-1B with antisense oligonucleotides improves insulin sensitivity and increases adiponectin concentrations in monkeys. *Endocrinology* 150: 1670–1679.
208. Zinker B a, Rondinone CM, Trevillyan JM, Gum RJ, Clampit JE, et al. (2002) PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11357–11362.
209. Waring JF, Ciurlionis R, Clampit JE, Morgan S, Gum RJ, et al. (2003) PTP1B antisense-treated mice show regulation of genes involved in lipogenesis in liver and fat. *Mol Cell Endocrinol* 203: 155–168.

210. Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, et al. (2003) Increases Insulin-Dependent Signaling in ob / ob Mice. *Diabetes* 52: 21–28.
211. Lantz K a, Hart SGE, Planey SL, Roitman MF, Ruiz-White I a, et al. (2010) Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1516–1523.
212. Seo C, HanYim J, Kum Lee H, Oh H (2011) PTP1B inhibitory secondary metabolites from the Antarctic lichen *Lecidella carpathica*. *Mycology* 2: 18–23.
213. Zhang W, Hong D, Zhou Y, Zhang Y, Shen Q, et al. (2006) Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1505–1512.
214. Pannifer ADB (1998) Visualization of the Cysteinyl-phosphate Intermediate of a Protein-tyrosine Phosphatase by X-ray Crystallography. *J Biol Chem* 273: 10454–10462.
215. Ma JC, Dougherty D a. (1997) The Cation– π Interaction. *Chem Rev* 97: 1303–1324.
216. Vo TPG (2009) New records of lichens from Vietnam. *Sci Technol Dev* 12: 9.
217. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Can J Biochem Physiol* 37: 497–509.
218. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791–796.
219. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen T, et al. (2005) Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science (80-)* 309: 623–626.
220. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, et al. (2005) Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9294–9299.
221. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* 9: 342–353.
222. Huang M-R (2008) Noteworthy species of *Stereocaulon* from China. *Mycosystema* 27: 85–90.
223. Vila JL, Canaviri Paz P, Sterner O (2004) Stictic acid and atranorin from the lichen *Stereocaulon tomentosum* Fr. *Rev Boliv Química* 21: 76–79.
224. Bolognese A, Chioccare F, Scherillo G (1974) Isolation and characterization of atranorin and 4,6 - dihydroxy - 2 - methoxy - 3 - methylacetophenone from *Stereocaulon vesuvianum*. *Phytochemistry* 13: 1989–1990.
225. Cambie RC (1968) The depsides from *Stereocaulon ramulosum*. *New Zeal J Sci* 11: 48–53.
226. Ramaut J, Serusiaux E, Brouers M, Corvisier M (1978) Lichens acids of the *Stereocaulon ramulosum* group in central East Africa. *Bryologist* 81: 415–421.
227. Huneck S (1974) Sekundärstoffe einiger *Stereocaulon*-arten. *Phytochemistry* 13: 2313–2314.

228. König GM, Wright AD (1999) ¹H and ¹³C-NMR and Biological Activity Investigations of Four Lichen-derived Compounds. *Phytochem Anal* 10: 279–284.
229. Huneck S (1972) Die sekundärstoffe einiger flechten. *Phytochemistry* 11: 1493–1495.
230. Huneck S, Follmann G (1967) Zur chemie chilenischer Flechten. XVII. Über die inhaltsstoffe von *Usnea pusilla* (RAES.) RAES, *Stereocaulon ramulosum* (SWANS.) RAEUSCH. und *Arthothelium pacificum*. *Anorg Chemie, Org Chemie, Biochem Biophys Biol* 22: 461.
231. Fox C, Klein E, Huneck S (1970) Colensoinsäure, ein neues Depsidon aus *Stereocaulon colensoi*. *Phytochemistry* 9: 2567–2571.
232. Huneck S, Follmann G (1966) Über die inhaltsstoffe von *Stereocaulon antarcticum* WAIN., *Anaptychia neoleucomelaena* KUR. und *Tornabenia ephebea* (ACH.) KUR. *Anorg Chemie, Org Chemie, Biochem Biophys Biol* 21: 714–715.
233. Kurokawa S, Jinzenji Y (1965) Chemistry and nomenclature of japanese Anzia. *Bull Natl Sci Museum* 8: 369–374.
234. Huneck S, Follman G (1965) Über die inhaltsstoffe von *Nephroma gyelnikii* (RAES) LAMB, *Byssocaulon niveum* MONT. und *Stereocaulon corticulatum* NYL. var. *procerum* LAMB. *J Biosci* 20B: 1012–1013.
235. Aghoramurthy K, Sarma KG (1961) Chemical investigation of indian lichens: Part XXV - Chemical components of some rare himalayan lichens. *J Sci Ind Res* 20B: 166–168.
236. Hamada N, Ueno T (1990) Lecanoric acid from the mycobiont of lichen *Stereocaulon curtatum*. *Phytochemistry* 2: 678–679.
237. Malik SB, Pardeshi NP (1972) Chemical investigation of indian lichens. Part XXX. *Indian J Chem* 10: 1040.
238. Solberg Y (1977) Chemical investigation of the lichen species *Alectoria ochroleuca*, *Stereocaulon vesuvianum* var. *pulvinatum* and *Icmadophila ericetorum*. *J Biosci* 32C: 182–189.
239. Ingolfssdottir K, Hylands PJ, Solberg Y (1986) Structure of vesuvianic acid from *Stereocaulon species*. *Phytochemistry* 25: 550–553.
240. Huneck S, Sainsbury M, Rickard T, Smith RI. (1984) Ecological and chemical investigations of lichens from south Georgia and the maritime Antarctic. *J Hattori Bot Lab* 56: 461–481.
241. Miyagawa H, Yamashita M, Ueno T, Hamada N (1997) Hypostrepsilalic acid from a cultured lichen mycobiont of *Stereocaulon japonicum*. *Phytochemistry* 46: 1289–1291.
242. Li B, Lin Z-W, Sun H-D (1991) The chemical constituents of four lichens from China. *Acta Bot Yunnanica* 13: 81–84.
243. Cai Z, Song M (2009) Phenolic constituents of *Stereocaulon paschale* Hoffm. *Sanxia Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 31: 94–95.
244. Accamese S, Compagninir A, Oscano OM, Ascio O (1986) Methyl- β -orcinolcarboxylate and atranol from the lichen *Stereocaulon vesuvianum*. *J Nat Prod* 49: 1959–1960.

245. Hylands PJ, Ingolfssdottir K (1985) The isolation of methyl β -orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon* species. *Phytochemistry* 24: 127–129.
246. Santesson J (1970) Some occurrences of the anthraquinone parietin in lichens. *Phytochemistry* 9: 1565–1567.
247. Bruun T (1976) Brassicasterol in *Cladonia gonecha* and *Stereocaulon tomentosum*. *Phytochemistry* 15: 1179–1180.
248. Czeuczuga B (1986) Investigations on carotenoids in lichens. XI. Lichens from Lapland. *Ann Bot Fenn* 23: 251–254.
249. Baron M, Albert P, Gorin J, Iacomini M (1989) Structural studies on a galactomannan isolated from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. *Agric Biol Chem* 53: 1751–1758.
250. Baron M, Gorin PA, Iacomini M (1988) Isolation and identification of a linear (1 \rightarrow 3)-linked β -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (SW.) Räsuc. *Carbohydr Res* 177: 235–239.
251. Hauan E, Kjoelberg O (1971) Studies on the polysaccharides in lichens. I. The structure of a water-soluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.) Fr. *Acta Chem Scand* 25: 2622–2628.
252. Gorin PAJ, Iacomini M (1985) Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydr Res* 142: 253–267.
253. Takahashi K, Kon T, Yokota I, Shibata S (1981) Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. *Carbohydr Res* 89: 166–173.
254. Yokota I, Shibata S, Saitô H (1979) A ¹³C-NMR analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. *Carbohydr Res* 69: 252–258.
255. Yokota I, Shibata S (1978) A polysaccharide of the lichen, *Stereocaulon japonicum*. *Chem Pharm Bull* 26: 2668–2670.
256. Bruun T (1973) Bourgeanic acid in the lichen *Stereocaulon tomentosum*. *Acta Chem Scand* 27: 31200.
257. Brandão LFG, Alcantara GB, Matos MDFC, Bogo D, Freitas DDS, et al. (2013) Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 61: 176–183.
258. Bačkorová M, Bačkor M, Mikeš J, Jendželovský R, Fedoročko P (2011) Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol Vitr* 25: 37–44.
259. Kumar KC, Müller K (1999) Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 62: 821–823.

260. Zofou D, Kengne ABO, Tene M, Ngemenya MN, Tane P, et al. (2011) *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of crude extracts and compounds from the stem bark of *Kigelia africana* (Lam.) Benth (Bignoniaceae). *Parasitol Res* 108: 1383–1390.
261. Correché ER, Enriz RD, Piovano M, Garbarino J, Gomez-Lechon MJ (2004) Cytotoxic and Apoptotic effect on Hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *ATLA* 32: 605–615.
262. Garcez Doria de Melo M, Antunes de Souza Araujo A, Russo Serafini M, Feitosa Carvalho L, Santos Bezerra M, et al. (2011) Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladina kalbii* Ahti in rodents. *Brazilian J Pharm Sci* 47: 862–872.
263. Toledo Marante FJ, García Castellano A, Estévez Rosas F, Quintana Aguiar J, Bermejo Barrera J (2003) Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol* 29: 2049–2071.
264. Thadhani VM, Choudhary MI, Khan S, Karunaratne V (2012) Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones. *JNatrSciFoundation Sri Lanka* 40: 43–48.
265. Correche E, Carrasco M, Giannini F, Piovano M, Garbarino J, et al. (2002) Cytotoxic Screening Activity of Secondary Lichen Metabolites. *Acta farm Bonaer* 21: 273–278.
266. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, et al. (2013) Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites : An In Vitro Study. *Phyther Reseach* 27: 431–437.
267. Menné Bonefeld C, Nielsen MM, Giménez-Arnau E, Lang M, Vennegaard MT, et al. (2014) An immune response study of oakmoss absolute and its constituents atranol and chloroatranol. *Contact Dermatitis* 70: 282–290.
268. Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Sauer L (2006) Cytotoxic activity of orsellinates. *Z Naturforsch C* 61: 653–657.
269. Bogo D, de Matos MFC, Honda NK, Pontes EC, Oguma PM, et al. (2010) *In vitro* antitumour activity of orsellinates. *Z Naturforsch C* 65: 43–48.
270. Ivanova V, Backor M, Dahse H-M, Graefe U (2010) Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. *Prep Biochem Biotechnol* 40: 377–388.
271. Ramos-Ligonio A, López-Monteon A, Trigos A (2012) Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytother Res* 26: 938–943.
272. Lee J-S, Ma C-M, Park D-K, Yoshimi Y, Hatanaka M, et al. (2008) Transformation of ergosterol peroxide to cytotoxic substance by rat intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 31: 949–954.
273. Russo a, Caggia S, Piovano M, Garbarino J, Cardile V (2012) Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein. *Chem Biol Interact* 195: 1–10.

274. Russo a, Cardile V, Piovano M, Caggia S, Espinoza CL, et al. (2010) Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22*E*)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chem Biol Interact* 184: 352–358.
275. Chen Y-K, Kuo Y-H, Chiang B-H, Lo J-M, Sheen L-Y (2009) Cytotoxic activities of 9,11-dehydroergosterol peroxide and ergosterol peroxide from the fermentation mycelia of *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium containing leguminous plants on Hep 3B cells. *J Agric Food Chem* 57: 5713–5719.
276. Makropoulou M, Aligiannis N, Gonou-Zagou Z, Pratsinis H, Skaltsounis A-L, et al. (2012) Antioxidant and cytotoxic activity of the wild edible mushroom *Gomphus clavatus*. *J Med Food* 15: 216–221.
277. Wang F-W (2012) Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Chin J Nat Med* 10: 72–76.
278. Lee IS, Kim JP, Na M, Jung HJ, Min B-S, et al. (2011) Cytotoxicity of ergosterol derivatives from the fruiting bodies of *Hygrophorus russula*. *Nat Prod Sci* 17: 85–89.
279. Lee JS, Lee MK, Tran MH, Lee IS, Min BS, et al. (2009) Steroids and Triterpenoid from the Fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxic activity. *J Prod Sci* 15: 173–179.
280. Kuo L-MY, Chen K-Y, Hwang S-Y, Chen J-L, Liu Y-Y, et al. (2005) DNA Topoisomerase I inhibitor, Ergosterol peroxide from *Penicillium oxalicum*. *Planta Med* 71: 77–79.
281. Malíková J, Swaczynová J, Kolár Z, Strnad M (2008) Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 69: 418–426.
282. Esimone CO, Grunwald T, Nworu CS, Kuete S, Proksch P, et al. (2009) Broad spectrum antiviral fractions from the lichen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. *Chemotherapy* 55: 119–126.
283. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Ellis G, et al. (1999) Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity of New Zealand Lichens. *Lichenol* 31: 627–636.
284. Campanella L, Delfini M, Ercole P, Iacoangeli A, Risuleo G (2002) Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochimie* 84: 329–334.
285. Stübler D, Buchenauer H (1996) Antiviral Activity of the Glucan Lichenan (Poly- β (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)D-anhydroglucose). *J Phytopathol* 144: 37–43.
286. Sultana N (2001) Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product. *J Enzyme Inhib Med Chem* 26: 616–642.

CHAPITRE 4 : DONNEES EXPERIMENTALES

1 Données expérimentales du chapitre 1

1.1 Solvants et réactifs

Le trifluorure de bore [BF₃, 10% dans du méthanol], les acides iso et antéiso (l'acide 11-méthylaurique, l'acide 12-methyltétradécanoïque, l'acide 13-méthylmyristique, l'acide 14-methylhexadécanoïque et l'acide 19-methylarachidique) et l'étalon interne (l'acide heptadécanoïque, l'acide hénécossanoïque) et d'autres réactifs et solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Japon, États-Unis, Suisse). Le tampon Hepes 1M dans 0.85 % NaCl a été acheté chez BioWhittaker® (Belgique).

1.2 Optimisation de la méthode d'extraction

Les lichens triés, séchés à l'air ont été broyés en poudre par un broyeur à bille (Fig. 118a), et environ 200 mg ont été utilisés pour chaque méthode d'extraction. Afin d'obtenir le plus grand rendement d'extraction d'AG et la meilleure diversité d'AG des lichens, une optimisation de l'extraction a été réalisée sur le lichen *S. scutelligerum* en utilisant trois systèmes: une roue d'extraction (Fig. 118b, un agitateur marque LABINO, LD79, Fisher Scientific), un appareil d'extraction parallèle Heidolph® (Fig. 118c, Instruction Synthèse 1, France) et un soxhlet (Fig. 118d).

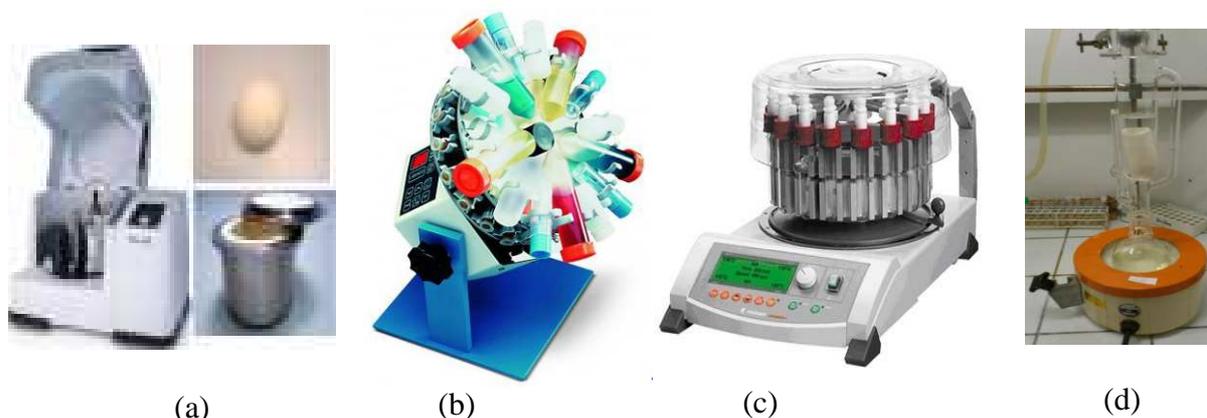


Figure 118 : Appareils de broyage des lichens (a) et d'extraction des lipides totaux (b, c, d)

Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode décrite par Folch [217] avec une légère modification du système de solvant d'extraction: chloroforme/méthanol (2:1, v/v) avec ou sans acide acétique. Finalement, cinq conditions ont été testées :

La condition de contrôle 1: extraction par une roue, avec une capacité d'extraction simultanée de 32 échantillons, à température ambiante, sous agitation constante à raison de 10

tours par minute, durée d'extraction de douze heures avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v, 6 ml).

Les conditions 2 et 3: extraction par un appareil d'extraction en parallèle, avec une capacité d'extraction simultanée de 24 échantillons, à 80°C, sous agitation constante à 700 tours par minute, extraction pendant une heure renouvelée 3 fois avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v, 6 ml) avec (méthode 3) ou sans acide acétique (méthode 4).

Les conditions 4 et 5: Soxhlet avec une capacité d'extraction simultanée d'un échantillon, extraction de 4 heures une fois avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v, 250 ml) avec (méthode 4) ou sans acide acétique (méthode 5).

Pour tous les échantillons, 50 µl de l'acide margarique (C17:0) à 2 mg/mL ont été ajoutés au début de processus d'extraction pour une analyse quantitative des acides gras, mais cet étalon a ensuite été remplacé par l'acide hénéicosanoïque (C21:0) pour l'analyse quantitative des 16 échantillons de lichens afin de ne pas interférer dans l'analyse du chromatogramme.

Les extraits finaux ont été évaporés et ont été stockés à -20°C sous atmosphère inerte (azote) en attendant d'être dérivatisés. Ces expériences ont été effectuées en triplicate.

1.3 Séparation des esters méthyliques d'acides gras et identification par CPG-FID et CPG-MS

1.3.1 Séparation des esters méthyliques d'acides gras

Pour la séparation des esters méthyliques d'acides gras à partir des lipides totaux, chaque extrait est hydrolysé par une solution d'hydroxyde de sodium (1 mL, 0,5 M) dans du MeOH pendant 30 minutes à 70°C, puis méthylé par BF₃ 14% dans du MeOH (1 mL) pendant 15 minutes à la même température. Les esters méthyliques d'acides gras résultants (EMAG) sont extraits à partir de ce mélange réactionnel avec du *n*-hexane (Fig. 119).

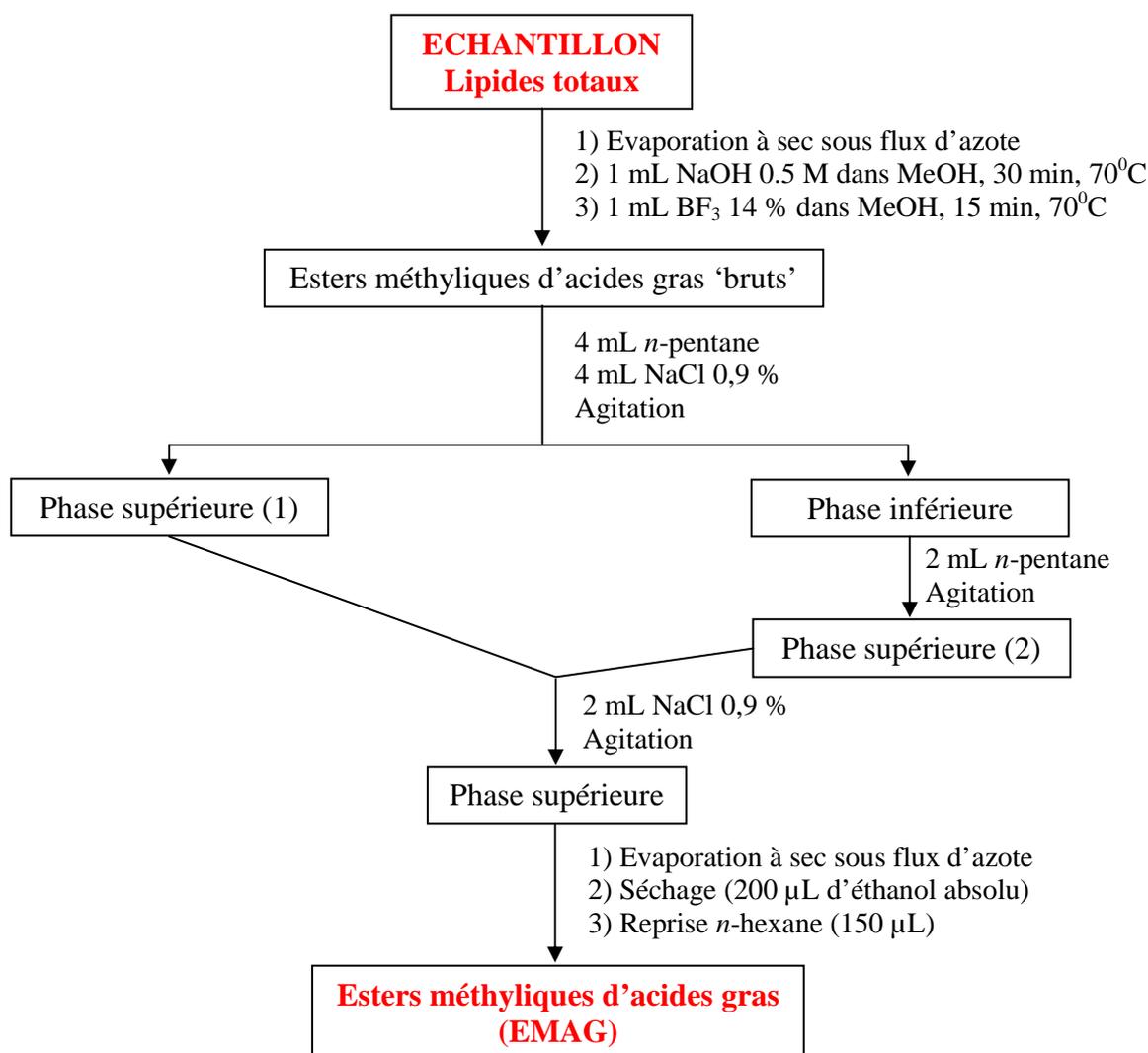


Figure 119 : Préparation des esters méthyliques d'acides gras

1.3.2 CPG-FID et CPG-MS

L'analyse des AG a été réalisée sur une chromatographie gaz 6890NGC-FID (au laboratoire de Biochimie, Agrocampus, Ouest, France) équipée d'une colonne capillaire (30 m x 0,25 mm de diamètre interne; BPX 70; SGE, Villeneuve -St- Georges, France) remplie par une phase stationnaire polaire de 70 % cyanopropylpolysilphenylene - siloxane (0,25 d'épaisseur), pendant 50 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (vitesse moyenne de 24 cm/s). La température de la colonne est d'abord fixée à 150°C pour atteindre 220°C pendant 10 min à raison de 2°C par minute. La température du détecteur à ionisation de flamme est de 250°C. L'identification des pics de EMAG a été basée sur les temps de rétention et comparés par rapport à la base de données du laboratoire.

1.4 Reproductibilité de la méthode choisie

Pour l'étude de reproductibilité, deux lichens *S. vesuvianum* et *S. scutelligerum* ont été sélectionnés. Environ 200 mg de matière sèche de chacune des espèces lichéniques, broyées en poudre par un broyeur à bille sont extraits par la méthode 3. Les étapes de saponification, de méthylation, de séparation des esters méthyliques d'acides gras ainsi que leur analyse ont été effectuées selon le protocole ci-dessus (données expérimentales du chap. 1§ 1.3.1).

1.5 Comparaison des profils d'acides gras de 15 espèces lichéniques et d'une cyanobactérie

Quinze lichens dont 10 espèces appartenant au genre *Stereocaulon* et six autres espèces sont séchées à l'air, à l'ombre et stockés séparément à l'obscurité. Ils ont été broyés en poudre par un broyeur à bille et environ 200 mg de chacun sont extraits par la méthode 3. Les étapes de saponification, de méthylation, de séparation des esters méthyliques d'acides gras ainsi que leur analyse ont été effectuées selon le protocole ci-dessus (données expérimentales du chap. 1§ 1.3.1).

1.6 Séparation des partenaires du lichen *S. scutelligerum* grâce à la structure

1 g du lichen *S. scutelligerum* intacts, secs sont lavés deux fois par 5 mL d'eau stérile sous sonication pour obtenir la fraction aqueuse (FA1). Le lichen est séché à température ambiante dans des conditions les plus stériles possibles et pelé pour obtenir deux parties : le pseudopodétion (b) et les phylloclades (c). Les parties a (pseudopodétion) et b (phylloclades) sont lavées deux fois par de l'eau stérile (5 ml) sous sonication pour obtenir une fraction aqueuse appelée FA2. Ensuite, chacune des parties b, c sont séchées et broyées séparément dans un mortier avec un pilon avant d'être lavées à nouveau dans les mêmes conditions pour obtenir un troisième extrait aqueux FA3. Les fractions FA1, FA2 et FA3 sont mélangées pour obtenir un poids suffisant. Aucun fragment de champignon et aucune cellule algale n'ont été observés au microscope dans ces fractions aqueuses à l'exception d'organismes dont la taille pourrait correspondre à celles des bactéries. Après séchage, les AG totaux sont extraits à partir de chaque partie (a, b, c, FA1+FA2+FA3 = surnageant bactéries), saponifiés puis méthylés selon le protocole ci-dessus (données expérimentales du chap. 1§ 1.3.1). Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés à l'aide du *n*-hexane puis identifiés par CPG-FID et CPG-MS.

2 Données expérimentales du chapitre 2

2.1 Méthode de séparation

2.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM ont été réalisées sur des plaques aluminium recouvertes d'un gel de silice avec indicateur de fluorescence (63-200 μm , Kieselgel 60 F254, MERCK 5554).

Après élution de la plaque dans un système de solvant adéquat, les plaques ont été observées sous UV (254, 312 et 365 nm). Les chromatographies ont été ensuite révélées par les solutions suivantes :

- Anisaldéhyde sulfurique : 0,5 mg de méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 ml de méthanol et 10 ml d'acide acétique glacial, additionnée extemporanément de 2% d'acide sulfurique concentré. Chauffage à 100°C après pulvérisation.
- Ninhydrine : 0,25 g de ninhydrine dissoute dans 100 ml d'acétone. Après pulvérisation, séchage à l'air pendant 40 min.

Les CCM ont été éluées à l'aide de quatre systèmes standards de solvants [18]:

- toluène-dioxane-acide acétique (90/25/4) ;
- *n*-hexane-diéthyléther-acide formique (130:80:20) (B) ;
- toluène-acétique (85:15) (C);
- toluène-AcOEt-acide formique (139:83:8) (G) ;

2.1.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative

Les chromatographies préparatives sur couche mince ont été réalisées sur des plaques recouvertes de gel de silice 60 PF₂₅₄ (5-40 μm , MERCK), préparées au laboratoire.

2.1.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les chromatographies sur colonne ouverte ont été effectuées à pression atmosphérique sur gel de silice (40-63 μm , Kieselgel 60, MERCK 7667), sur gel de silice désactivée (gel de silice trempée dans un mélange du dichlorométhane/triéthylamine (90/10, v :v)), sur gel de Séphadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

2.1.4 Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie flash, Chromabond®

Il s'agit d'un SPOT Liquid Chromatography Flash® (Armen Instrument) qui permet d'éluer sous pression (Plage de débit jusqu'à 250 ml / min avec plage de pression de retour jusqu'à 35 bar) les solutés. Les colonnes sont des colonnes pré-packées de silice (RS 40 SiOH,

40 g ; RS 25 SiOH, 25 g ; RS 15 SiOH, 15 g, MERCK), de silice greffée C₁₈ (RS 40 C₁₈ ec, 43 g ; RS 25 C₁₈ ec, RS 15 C₁₈ ec, 16,4 g MERCK).

Un autre appareil utilisé est un Macherey-Nagel couplé avec un appareil sous vide. Les colonnes utilisées sont des colonnes pré-packées de silice (Chromabond[®]) et de silice greffée C₁₈ (Chromabond[®]).

2.1.5 Chromatographie circulaire centrifuge : Chromatotron[®]

L'appareil utilisé est un Chromatotron[®] (Harrison Research modèle 8924) fonctionnant avec une pompe péristaltique. La phase stationnaire est constituée d'une plaque en verre circulaire (20 cm de diamètre) recouverte de silice (Silice GF₂₅₄, 35-70 μm, MERCK 7730) additionnée de plâtre qui sert de liant sur une épaisseur de 3 mm.

2.1.6 Chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi-préparative

Les séparations par HPLC semi-préparative ont été effectuées sur une colonne Hypersil[®] BDS C₁₈ (5 μm, 250 x 10 mm). La pompe est une pompe Kontron (ref. 325, Montigny le Bretonneux, France). La détection des pics se fait en ligne grâce à une lampe à barrettes de diodes (HPLC 540 DAD, Kontron instruments, Montigny le Bretonneux, France) à la longueur(s) d'onde choisie(s).

2.2 Appareillage et techniques d'analyse

2.2.1 Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les différents appareils utilisés sont :

- Appareil à transformée de Fourier BRUKER proton Avance I 500 (500 MHz pour le proton et 125 MHz pour carbone 13) (CRMPO)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER proton Avance III 400 (400 MHz pour le proton et 100 MHz pour carbone 13) (CRMPO)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER WB proton Avance I 300 (300 MHz pour le proton et 75 MHz pour carbone 13) (Laboratoire PNSCM)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER 500 (500 MHz pour le proton et 125 MHz pour carbone 13) (Plateforme PRISM).

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés : CDCl₃, Acétone-*d*₆, CD₃OD, DMSO-*d*₆ et CD₃OD. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par millions (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, ou le pic de solvant deutéré comme pic standard. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en

Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé).

2.2.2 Spectrométrie Infra-Rouge

Les spectres infra-rouge sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer Spectrum Two. Les échantillons solides ou liquides sont déposés directement.

2.2.3 Spectrométrie Ultra-Violet

Les spectres UV sont enregistrés sur un spectrophotomètre UVIKON 931 ; les échantillons sont dissous dans différents solvants en fonction de leur solubilité à la concentration 1×10^{-5} mol/L.

Soit une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon d'épaisseur l , l'absorbance vérifie la **loi de beer-lambert** soit :

$$A = \log I_0/I = \epsilon lC$$

D'où:

A : absorbance

ϵ : le coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

l : la largeur de cuve en cm

c : la concentration de la solution en mol/L

2.2.4 Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)

Les CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice avec indicateur de fluorescence (10-12 μm , Kieselgel 60 F₂₅₄, MERCK 5554). Les dépôts sont réalisés par un déposeur automatique d'échantillons ATS 4 CAMAG. L'élution se fait dans une cuve migration automatique ADC 2 CAMAG. Les chromatographies obtenues sont observées à l'aide du spectrophotodensitomètre TLC Scanner 3 CAMAG, qui permet de mesurer l'absorbance sur toute une gamme de longueurs d'onde, des composés préalablement séparés sur la plaque de CCM.

2.2.5 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les analyses CLHP sont réalisées sur deux appareils. L'un est un appareil de type Kontron serie 325 équipé d'un détecteur à barrette de diode (Kontron, 530 A). L'autre est un appareil de type Shimadzu couplé un DAD (SPD-M20A). Les échantillons sont séparés sur une colonne semi-préparative en phase inverse Hypersil[®] BDS C₁₈ (5 μm , 250 x 10 mm). Les échantillons sont analysés sur une colonne analytique en phase inverse Water Spherisorb[®] ODS2 C₁₈ (5 μm , 150 x 4,6 mm). L'élution est réalisée dans les conditions suivantes: un

gradient ACN/H₂O contenant 0,9 % d'acide phosphorique ou sans acide phosphorique. Les échantillons sont injectés à la concentration adéquate selon le but d'analyse ou de séparation.

2.2.6 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés sur deux types d'appareils disponibles au CRMPO.

- Spectromètre de masse Waters Q-Tof 2 composé de deux quadripôles et d'un analyseur orthogonal à Temps de Vol et équipé d'une source electrospray.
- Spectromètre de masse Bruker Micro-Tof-Q2, par electrospray.
- Spectromètre de masse Bruker MaXis 4G (mise à jour du Micro-Tof-Q 2): composé de quadripôles, d'un système innovant d'ion cooling et d'un analyseur orthogonal à temps de vol et équipé de sources electrospray, APCI et ASAP.
- Spectromètre de masse Thermo-fisher Q-Exactive composé de flatapôles, de quadripôles et d'un analyseur Orbitrap et équipé de sources electrospray, nano-electrospray et DART.

2.2.7 Liquid Chromatography –Mass Spectrometry (LC-MS)

Les spectres de masse LC-ESI et ESI-MS_n ont été obtenus à partir d'un LCQ Deca piège à ions spectromètre de masse (Thermo Finnigan, Villebon sur Yvette, France) équipé d'une source ESI en mode d'ionisation négative (3,5 kV, le gaz: azote 60 unités arbitraires, auxiliaire gaz 5 unités arbitraires, voltage/température du capillaire -27V/220⁰C). Le système Ion Trap MS est couplé avec un système CLHP comprenant un déposeur automatique Surveyor (Thermo Finnigan, Villebon sur Yvette, France), une pompe Serie 1100 (Agilent technologies, Santa Clara, California), un détecteur DAD UV-visible UV-6000 (Thermo Finnigan, Villebon sur Yvette, France) et équipé d'une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 2.1 mm, Agilent Technologies) à 30⁰C.

Les analyses sont effectuées à un débit de 0.2 mL/min avec un gradient A (0.1 % d'acide formique dans l'eau)/B (0.1 % d'acide formique dans l'acétonitrile) commençant par A/B dans la proportions 20/80 jusqu'à 80 % de B en 20 minutes ; de 20 à 25 minutes, linéaire, 80 % de B ; ensuite de 25 à 33 minutes, linéaire 100 % de B ; enfin retourner dans les conditions initiales en 15 minutes.

3 µL d'extrait en solution à concentration de 1 mg/mL et de composé pur en solution à concentration de 0.1 mg/mL dans le mélange de ACN/THF (50/50) sont injectés.

Un logiciel Xcalibur 1.0 a été utilisé pour l'évaluation des données.

2.2.8 Direct Application in real time – Mass spectrometry (DART-MS)

Les expérimentations de DART-MS mises en oeuvre dans le cadre de ce travail ont été réalisées avec un système DART (*Direct Analysis in Real Time*) AccuTOF (*Accurate Time Of Flight*) implanté dans la plate-forme d'imagerie analytique ONIS (Observatoire National d'Imagerie Scientifique), Rennes, Campus de Beaulieu. L'appareil présente une source d'ionisation à l'air ambiant devant laquelle est présenté l'échantillon. Au cours de l'acquisition du signal, des espèces métastables de l'hélium (hélium triplet) sont générées par la source. L'hélium triplet regagne son état fondamental, singulet, par ionisation de molécules d'eau. Les ions oxonium générés sont à l'origine d'une ionisation douce des analytes qui sont alors évacués vers l'entrée de l'analyseur situé en face de la source. Cette ionisation en conditions ambiantes permet l'analyse d'échantillons de nature physique variable (e.g plaque CCM, lichen entier, liquide...). Les paramètres physiques d'acquisition sont les suivants : débit He : 3L.min⁻¹, température gaz : 250°C (sauf indication contraire), voltages à renseigner. La calibration de l'appareil repose sur l'utilisation de deux composés étalon : la réserpine et des polyéthylène glycols.

2.2.9 Pouvoir Rotatoire

Le pouvoir rotatoire ($[\alpha_D^{25}]$) est mesuré sur un polarimètre Perkin Elmer Model 341, à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm), à la température de 25°C.

$$\frac{\alpha_D^{25}}{l \times C} = \alpha_D \text{ mesuré}$$

D'où : l = longueur de la cuve en cm

C = concentration en g/L

2.2.10 Point de Fusion

Les points de fusion des composés purs sont mesurés à l'aide d'une rampe Kofler LEICA VMHB.

2.3 Extraction des lichens

2.3.1 Récolte des lichens

Le lichen *S. evolutum* Graewe a été recueilli sur des roches siliceuses à Saint Just en novembre 2011 (Ille-et-Vilaine, France) par Françoise Lohézic Le Dévéhat.

2.3.2 Identification du lichen

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Test K : solution de KOH à 10 % dans l'eau.
- Test C : solution de NaOCl, eau de javel commerciale.
- Test KC : solution K et C appliquées l'une après l'autre.
- Test P : 1 % de *p*-phénylènediamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse (10 %).

2.3.3 Microscopie

Les échantillons sont examinés à l'aide d'un loupe qui permet de pratiquer des coupes précises. Les coupes, imprégnées ou non de colorant, sont ensuite montées entre lame et lamelle et observées au microscope (Microscope OLYMPUS CX41) équipé d'un appareil photo numérique (OLYMPUS DP20).

Le colorant utilisé est le Bleu Coton au lactophérol : 0,1 g de bleu de méthyle sont dissous dans 20 g d'acide lactique. 20 mL d'eau bidistillée sont ajoutés ainsi que 40 g de glycérol puis 2 g de phénol. Ce colorant permet de mettre en évidence l'ornementation sporale ainsi que la chitine présente dans les parois des hyphes.

2.3.4 Protocole d'extraction

Le lichen *S. evolutum* Graewe (300 g) a été extrait d'abord par l'eau bidistillée au frais (4⁰C) pendant 10 heures pour la première fois et 62 heures pour la deuxième fois. Le lichen obtenu après extraction par l'eau bidistillée, séché à l'air (286 g) est broyé en poudre à l'aide d'un broyeur à billes. Les extractions organiques sont réalisées à température ambiante par macération et agitation avec trois solvants de polarité croissante : *n*-hexane, acétone, tétrahydrofurane. Pour chacun des solvants, après vingt-quatre heures d'extraction, le filtrat est récupéré afin d'épuiser la poudre de lichen jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 fois de suite).

Après extraction, les extraits sont rassemblés et laissés à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré sur un filtre buschner. Le filtrat est ensuite concentré à sec.

2.4 Séparation et purification des extraits

2.4.1 Purification de l'extrait *n*-hexane

L'extraction de 300 g de lichen à température ambiante par le *n*-hexane a conduit à l'obtention de 200 mg de précipité pur **SeA** et 1500 mg de filtrat appelé **SeH**. Cet extrait est

chromatographié sur une colonne de silice (3,5 x 40 cm) en utilisant un gradient d'éluion *n*-hexane/AcOEt/MeOH. 190 fractions de 15 ml chacune sont recueillies.

Purification de la fraction SeH4 (77 mg) : les fractions 30 à 52 obtenues avec le solvant *n*-hexane/AcOEt (9/1) sont regroupées grâce à leur profil CCM. Une chromatographie sur une colonne de gel de silice (2,0 x 25 cm) avec un mélange de toluène/AcOEt (75 :25) comme phase mobile (400 mL) est utilisée et a permis d'obtenir le composé pur **Seh3**.

Purification de la fraction SeH6 (97 mg) : les fractions 92 à 103 obtenues avec le solvant *n*-hexane/AcOEt (8/2) sont regroupées. Cet échantillon est fractionné par chromatographie circulaire centrifuge (phase mobile : *n*-hexane/CH₂Cl₂ 3/7, 120 mL). Les fractions 3 à 6 sont rassemblées puis purifiées sur une colonne de silice (1,0 x 25 cm) avec l'éluant cyclohexane/AcOEt (75/25) pour obtenir le composé pur **Se12**.

Purification de la fraction SeH7 (60 mg) : les fractions 104 à 116 obtenues avec les proportions 7 :3 du solvant *n*-hexane/AcOEt sont rassemblées. La fraction SeH7 est ensuite chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec comme phase mobile *n*-hexane/CH₂Cl₂ (8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 50 mL chacune), puis acétone. Un précipité se forme dans les fractions 33 à 41 éluées par *n*-hexane/CH₂Cl₂ (6/4), et il est séparé par centrifugation pour donner le composé pur **Seh1**.

2.4.2 Purification de l'extrait acétone

Les extraits acétoniques sont rassemblés et laissés à évaporer à température ambiante : un précipité blanc apparaît **SeA**. De même, après concentration du filtrat acétonique sous pression réduite, deux précipités sont obtenus par filtration (Ac1 et Ac2). Le filtrat est évaporé à sec (Ac3).

Le précipité Ac1 (1440 mg) est fractionné en utilisant la chromatographie flash sur gel de RS 25 C₁₈ avec le système de solvant H₂O-TFA 0,15 %-MeOH (25:85, 10 mL/min, 75 min) pour donner 75 fractions de 10 mL. Après réunion selon leurs profils CCM, sept fractions sont obtenues (Ac1a-Ac1g).

La fraction Ac1b (106 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de Séphadex LH-20 avec l'éluant éther diéthylique pour donner 4 fractions (Ac1b1-Ac1b4). Le composé pur **Se6** est obtenu à partir de la fraction Ac1b2 (35 mg) par une CCM préparative (phase mobile : Toluène/AcOEt/HCOOH 70/25/5).

La fraction Ac1c (103 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice (1,5 x 25 cm) en éluant par un mélange CH₂Cl₂/Acétone (1:0 → 0:1). Les fractions 50 à 58 obtenues avec une élution dans les proportions CH₂Cl₂/Acétone (8/2) sont regroupées. Après évaporation du solvant, le composé **Se5** cristallise sous forme d'un solide blanc.

La fraction Ac1e (408 mg) est chromatographiée sur colonne de gel de silice (2,0 x 30 cm) en éluant par un gradient *n*-hexane/CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH pour produire dix fractions (Ac1e1-Ac1e10). La fraction Ac1e3 (37 mg) est purifiée par une CLHP semi-préparative en phase inverse sur une colonne Hypersil[®] BDSC₁₈ (5 μm, 250 x 10 mm) avec un gradient d'acétonitrile-eau (52:48 → 65:35 %, 2 mL/min, 70 min). Le composé **Se7** est obtenu au temps de rétention $t_R = 46,31$ min et le composé **Se16** à $t_R = 37,17$ min. Le composé **Se20** est obtenu au temps de rétention $t_R = 60,03$ min à partir de la fraction Ac1e6 (27 mg) par une CLHP semi-préparative en phase inverse sur une colonne Hypersil[®] BDSC₁₈ (5 μm, 250 x 10 mm) avec comme phase mobile ACN:H₂O (50:50, 2 mL/min, 75 min). Dans la fraction Ac1e7, un précipité blanc est formé et le composé **Se3** est obtenu après centrifugation. Le filtrat de cette fraction est purifié par CHLP semi-préparative en phase inverse sur une colonne Hypersil[®] BDSC₁₈ (5 μm, 250 x 10 mm) avec le système de solvant MeOH:H₂O:H₃PO₄ (65:35:0,9, 2ml/min, 90 min) comme phase mobile pour donner le composé **Se18** à 51,61 min. La fraction Ac1e8 (112 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en éluant par un mélange CH₂Cl₂/EE (100:0, 90:1, 80:20 et 0:100), puis EE/Acétone (100:0, 90:10 et 0:100). 109 fractions de 10 mL chacune sont recueillies. Le composé **Se8** est obtenu à partir des fractions 47 à 63 après évaporation du solvant.

Le précipité Ac2 (1500 mg) est purifié grâce à une chromatographie flash sur une colonne de gel de RS 25 C₁₈. L'élution est réalisée par un mélange ACN/H₂O (100:0 à 0:100). 145 fractions de 10 mL sont recueillies. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, sept fractions sont obtenues (Ac2a à Ac2g). Le composé **Se3** a été de nouveau purifié à partir de la subfraction Ac2f par centrifugation et recristallisation dans l'acétone. Le composé **Se4** précipite et est obtenu à partir de la subfraction Ac2c par centrifugation.

Le filtrat de l'extrait acétonique Ac3 (4800 mg) est fractionné sur une colonne de gel de RS 40 C₁₈ par chromatographie flash. L'élution est réalisée avec un mélange ACN/H₂O (9:1 → 0:1) pendant 75 min avec le débit 15 mL/min, puis l'acétone 100 % pendant 15 min. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, sept fractions sont obtenues (Ac3a à Ac2k).

La fraction Ac3c (240 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec un gradient de CH₂Cl₂/EE/MeOH. Le composé **Se8** est obtenu à nouveau à partir des fractions 37 à 56 avec le solvant CH₂Cl₂/EE (8/2), suivie d'une CCM préparative (phase mobile : Toluène/AcOEt/HCOOH 60/30/5). Après évaporation lente du solvant des fractions 57 à 64, le produit **Se11** cristallise sous forme d'un solide blanc. Il est obtenu après centrifugation et lavage plusieurs fois par le MeOH.

La fraction Ac3d (398 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice en éluant par un gradient *n*-hexane/CH₂Cl₂ pour donner six fractions (Ac3d1 à Ac3d6). Le composé **Se1** précipite sous forme d'un cristal blanc dans la fraction Ac3d1 obtenue avec le solvant *n*-hexane/CH₂Cl₂ (2:8). La fraction Ac3d2 (44 mg) obtenue avec élution du solvant *n*-hexane/CH₂Cl₂ (1:9) est ensuite purifiée sur une colonne de gel de silice avec l'éluant toluène/AcOEt (7:3). 40 fractions de 5 mL sont obtenues à l'issue de la colonne. Les fractions 7 à 24 sont réunies pour obtenir le composé **Se15**. Les fractions 25 à 36 sont réunies pour donner le composé **Se2**.

La fraction Ac3e (90 mg) a été soumise à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en éluant par un gradient *n*-hexane-CHCl₃ pour donner 180 fractions de 5 mL chacune. Les fractions 70 à 105 obtenues avec le solvant *n*-hexane-CHCl₃ (2:8) sont regroupées. Le lavage de cette fraction par le *n*-hexane, puis *n*-hexane-CHCl₃ (7:3) permet d'obtenir le composé **Se13**.

La fraction Ac3f (395 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice avec comme phase mobile *n*-hexane/CH₂Cl₂ (8:2, 9:1, 0:1), puis CH₂Cl₂/Acétone (0:1 → 1:0) pour donner neuf sous-fractions (Ac3f1-Ac3f9). Le composé **Se9** est obtenu à partir de la fraction Ac3f6 (14 mg) par une chromatographie en phase inverse sur une Chromabond[®] (ACN/H₂O 6:4).

La fraction Ac3h (493 mg) est purifiée sur une colonne de silice en éluant par un gradient *n*-hexane/CH₂Cl₂/AcOEt. 115 fractions de 10 mL chacune sont recueillies. Après réunion des fractions grâce à leurs profils CCM, neuf sous-fractions (Ac3h1-Ac3h9) sont obtenues. Dans la fraction Ac3h4 obtenue par élution dans les proportions CH₂Cl₂/EtOAc (8:2), un précipité est formé et obtenu par centrifugation pour donner le composé **Se10**.

La fraction **Ac3i** (63 mg) est chromatographiée sur une colonne de silice avec comme phase mobile *n*-hexane/AcOEt (95:5) pour fournir 20 fractions de 5 mL. La réunion des fractions 5 à 11 permet d'obtenir le composé **Se19**.

La fraction **Ac3k** (1200 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en éluant par un gradient *n*-hexane/CHCl₃/AcOEt en commençant par *n*-hexane/CHCl₃ (7:3) jusqu'à CHCl₃/EtOAc (0:1) pour donner huit sous-fractions (Ac3k1-Ac3k8). La fraction Ac3k2 est purifiée par une chromatographie flash sur une colonne RS 15 SiOH avec un gradient CH₂Cl₂/MeOH (100:0→95:5) comme phase mobile (10 mL/min, 50 min). 50 fractions de 10 mL chacune sont recueillies. Les fractions 17 à 22 sont ensuite chromatographiées sur une colonne de gel de silice avec comme phase mobile *n*-hexane/AcOEt (8:2) pour fournir 73 fractions de 5 mL. La réunion des fractions 48 à 52 permet d'obtenir le composé **Se21** après évaporation du solvant.

2.4.3 Composés semi-synthétisés

2.4.3.1 Acétylation du composé **Se8**

20 µL de chlorure d'acétyle ont été ajoutés à la solution du composé **Se8** (50 mg) dissous dans CH₂Cl₂ contenant 85 µL de triéthylamine dans un petit ballon. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le solvant est éliminé sous pression réduite. Le mélange obtenu est chromatographié sur une colonne de gel de silice avec un mélange de *n*-hexane:AcOEt (8:2) comme éluant pour donner les composés **Se8a** (10,5 mg), **Se8b** (16,8 mg) et **Se8c** (8,9 mg) (Fig. 120). Les produits acétylés du composé **Se8** ont été obtenus sous forme de solides amorphes blancs.

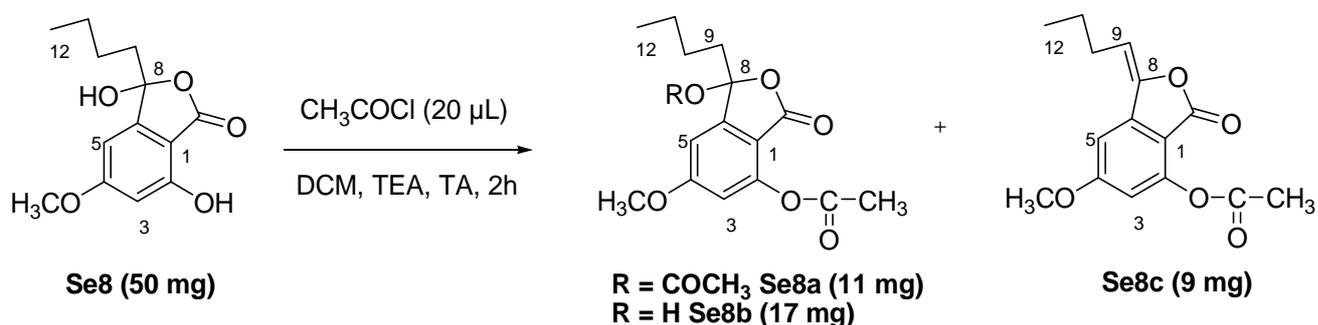


Figure 120: Réaction d'acétylation du composé **Se8**

2.4.3.2 Synthèse du 8-hydroxy-4-O-déméthylebarbatate de méthyle (AR)

Une solution d'atranorine (93.5 mg, 0.25 mmol) dissoute dans du méthanol (10 mL, 0.025 M) a été agitée à 0°C quelques minutes avant l'ajout de borohydure de sodium (18.9 mg, 0.5 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant une heure. La réaction

est coincée en ajoutant quelques gouttes de chlorure d'ammonium saturé. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur une colonne de gel de silice élué par le système de solvant éther de pétrole/CH₂Cl₂ (1:9) puis CH₂Cl₂ (100 %). Le composé **AR** (8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle) (79.3 mg, 84.4 %) a été obtenu sous forme d'un solide cristallin blanc.

2.4.3.3 Synthèse du 4-*O*-déméthylebarbatate de méthyle (**AR2**)

Une solution du composé Se1 (147 mg, 0.75 mmol) dissous dans le CH₂Cl₂ anhydre (3.75 mL, 0.2 M) a été ajoutée, à - 70⁰C, goutte à goutte à une solution de tribromure de bore à 1.0 M dans CH₂Cl₂ anhydre (3 mL, 3 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 12h à température ambiante. Ensuite, ce mélange est hydrolysé avec 10 mL d'une solution de HCl 2N et extrait par AcOEt. La phase organique est lavée avec solution HCl 2N et une solution saturée de NaCl, puis filtrée, séchée et évaporée. Le résidu est purifié sur une colonne de gel silice avec un mélange d'éther de pétrole-AcOEt (8:2) comme éluant. L'acide β-orkinol carboxylique (103 mg, 74 %) est alors obtenu sous forme d'un solide cristallin blanc.

De l'anhydride trifluoracétique (0.5 mL, 8 mmol) est ajouté à la solution d'acide β-orkinol carboxylique (98.3 mg, 0.54 mmol) dans l'éther diéthylique anhydre (5 mL, 0.1 M) sous azote. Ce mélange est agité environ 10 minutes à température ambiante. Ensuite, le composé Se1 (88.2 mg, 0.45 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est encore agité pendant 24 h à température ambiante. Après élimination du solvant sous pression réduite, le résidu est purifié par une chromatographie sur une colonne de gel de silice désactivée avec le système de solvant *n*-hexane:AcOEt (7:3, 6:4, 5:5) comme éluant. Le composé **AR2** (4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle) a été obtenu sous forme solide blanc (24 mg, 15 %).

2.4.3.4 Synthèse du composé Se10

Deux réactions de condensation de l'atranorine avec de l'acétone en milieu acide et en milieu basique ont été effectuées.

Une solution d'atranorine (9.4 mg, 0.025 mmol) dans de l'acétone (10 mL, 0.025 M) et de l'acide acétique (3 mL, 0.3 mmol) est agitée à température ambiante pendant une semaine. Le mélange réactionnel est déposé sur CCM tous les jours mais aucune modification n'apparaît. La réaction n'a pas marché.

L'atranorine (37.4 mg, 0.1 mmol) est alors ajoutée dans 5 mL d'acétone contenant de l'hydroxyde de sodium (1.2 mL, 0.1 M). Le mélange réactionnel est déposé sur CCM toutes les

deux heures. Au fil du temps, l'atranorine est hydrolysée pour donner le β -orcinolcarboxylate de méthyle et l'haematommate de méthyle, le composé attendu n'est présent que sous forme de traces.

Réaction Wittig : De l'acétylméthylène triphénylphosphorane (106,4 mg, 0,33 mmol) est ajouté à une solution d'atranorine (100 mg, 0,27 mmol) dans du THF (0,53 ml, 0,5 M), et le mélange est agité à température ambiante pendant 8 heures, puis concentré sous vide. Le produit brut est chromatographié sur une colonne de gel de silice avec le solvant CH₂Cl₂ 100% puis CH₂Cl₂-AcOEt (9:1) comme phases mobiles. Le composé **Se10** (43,2 mg, 39,0%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

2.5 Quantification de l'atranorine dans l'extrait acétone par CLHP-DAD

L'atranorine standard et l'extrait acétone ont été analysés par CLHP (Shimadzu) couplée à une barrette de diode DAD (SPD-M20A). L'acquisition des données a été réalisée grâce au logiciel LabSolution Main.

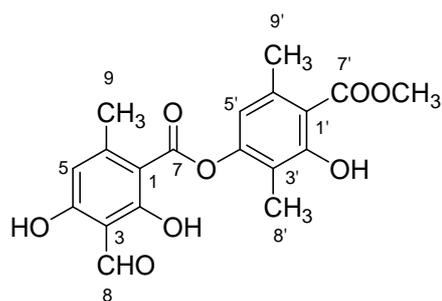
- Phase stationnaire: Spherisorb® (C18) (Waters, 5 μ m, 4.6 x 150 mm)
- Phase mobile: A (eau contenant 0.9 % d'acide phosphorique) et B (acétonitrile).
- Débit : 0.8 mL/min
- Condition : 20 min : A/B (35/65)
- Injection : 10 μ L
- Longueur d'onde observée : 252 nm

2.6 Description des produits isolés

Les caractéristiques analytiques des composés isolés, présentés dans la partie « métabolites isolés » et la partie « composés semi-synthétisés » sont détaillées ci-après. Ils sont classés selon l'ordre dans lequel ont été décrit les composés dans le chapitre 2.

2.6.1 Atranorine SeA

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM : $R_f = 0,78$ (B), $R_f = 0,70$ (C)

Point de fusion: 196-197°C

MS: HRESIMS m/z 397.0899 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{19}H_{18}O_8$)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 210 (4,20), 252 (4,16), 312 (3,57)

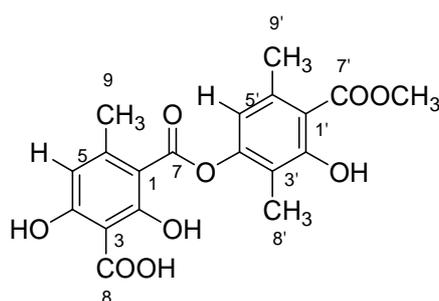
FTIR ν_{max} (cm^{-1}): 3645; 2955 (OH phénolique), 1651 (CO- ester)

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Atranorine (500 MHz, DMSO- d_6)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult. J (Hz))
1	107.9	-
2	163.6	10.52 (OH)
3	109.0	-
4	161.7	-
5	115.2	6.41 (s)
6	151.4	-
7	164.5	-
8	193.8	10.21 (s)
9	20.1	2.35 (s)
1'	110.6	-
2'	157.4	-
3'	116.3	-
4'	148.8	-
5'	115.7	6.65 (s)
6'	136.5	-
7'	169.7	-
8'	9.3	2.04 (s)
9'	21.1	2.39 (s)
7'-OCH ₃	52.3	3.88 (s)

2.6.2 Cladonioidésine Se11

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM : $R_f = 0,27$ (G), $R_f = 0,36$ (B)

Point de fusion: 107,5-120 °C

MS: HRESIMS m/z 389,0881 $[M-H]^-$ (calcd. pour $C_{19}H_{18}O_9$)

UV ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ): 315 (4,11), 275 (4,52), 243 (4,53)

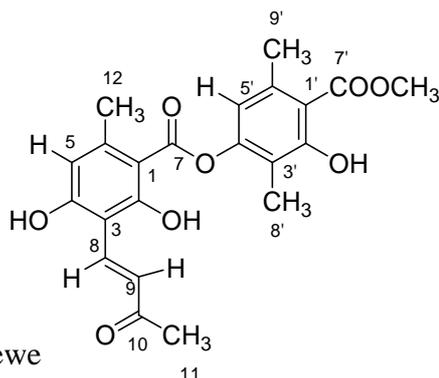
FTIR ν_{max} (cm^{-1}): 3251 ; 3000-2500, 1691 ; 1653.

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Se11 (500 MHz, DMSO- d_6)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult. J (Hz))	HMBC	NOESY
1	108.9	-		
2	162.2	15.85 (OH, s)	C-1, C-2, C-3	
3	101.7	-		
4	164.1	15.07 (OH, s)	C-3, C-4, C-5	
5	107.1	6.06 (s)	C-1, C-3, C-4, C-7, C-9	H-9
6	141.0	-		
7	165.4	-		
8	174.8	-		
9	20.3	2.27 (s)	C-1, C-5, C-6	H-5, H-5', H-8'
1'	114.1	-		
2'	157.6	10.58 (OH, s)		H-8'
3'	116.3	-		
4'	152.1	-		
5'	115.9	6.60 (s)	C-1', C-3', C-4', C-9'	H-9', H-9
6'	136.4	-		
7'	169.9	-		
8'	9.2	2.06 (s)	C-2', C-3', C-4'	H-9, OH-2, OH-2'
9'	21.2	2.37 (s)	C-1, C-5, C-6	H(OCH ₃), H-5
OCH ₃	52.1	3.88 (s)	C-7	H-9

2.6.3 (E)-3-(3-oxobut-1-én-yl)-atranorine Se10

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,26$ (C), $R_f = 0,51$ (G), $R_f = 0,40$ (B)

Point de fusion: 234-236⁰C (dec)

MS: HRESIMS m/z 413,1239 [M-H]⁻ (calcd. pour C₂₂H₂₂O₈)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 278 (4,80), 306 (4,64)

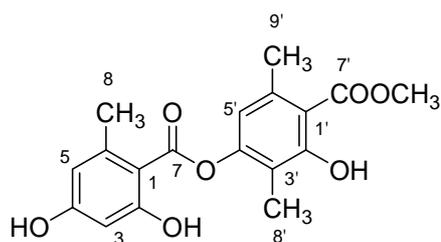
FTIR ν_{max} (cm⁻¹): 3147, 1653, 1610, 1580, 1441, 1396, 1257, 1150

RMN ¹H et ¹³C:

Position	Se10 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult. <i>J</i> (Hz))	HMBC
1	104.1	-	
2	163.7	12.04 (OH, s)	C-1, C-2, C-3
3	107.5	-	
4	162.6	11.50 (OH, br.s)	
5	111.6	6.50 (s)	C-1, C-3, C-4, C-12
6	144.3	-	
7	169.1	-	
8	133.1	7.85 (d, 16.5)	C-2, C-4, C-9, C-10
9	128.7	7.18 (d, 16.5)	C-3, C-10, C-11
10	198.5	-	
11	27.5	2.28 (s)	C-9, C-11
12	23.9	2.56 (s)	C-1, C-5, C-6
1'	115.5	-	
2'	157.1	10.52 (OH, s)	C-1', C-2', C-3'
3'	116.0	-	
4'	150.7	-	
5'	115.7	6.76 (s)	C-1', C-4', C-9'
6'	136.4	-	
7'	169.5	-	
8'	9.2	1.99 (s)	C-2', C-3', C-4'
9'	20.9	2.34 (s)	C-5', C-6'
7'-OCH ₃	52.2	3.89 (s)	C-7'

2.6.4 3'-méthyl lécanorate de méthyle (Se21)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: cristaux blancs

CCM : R_f 0,55 (A), R_f 0,40 (C)

Point de fusion: 126-128⁰C

MS: HRESIMS m/z 345,0979 [M-H]⁻ (calcd. pour C₁₈H₁₈O₇)

UV (CHCl₃) λ_{max} (nm): 230, 267-271, 306

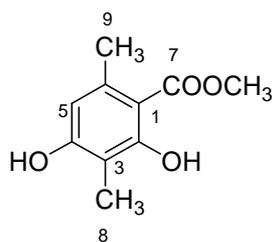
FTIR ν_{max} (cm⁻¹): 3420 ; 2970-2920 ; 1660 ; 1625

RMN ¹H et ¹³C:

Position	3'-méthyl lécanorate de méthyle Se21 (300 MHz, CDCl ₃)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult. J (Hz))	HMBC
1	104.5	-	
2	166.3	11.43 (OH, s)	C-1, C-2, C-3, C-4
3	101.5	6.33 (d, 2.58)	C-1, C-2, C-4, C-5
4	161.1	5.47 (OH, s)	
5	111.9	6.33 (d, 2.58)	C-1, C-4, C-8
6	144.4	-	
7	169.7	-	
8	24.6	2.65 (s)	C-1, C-5, C-6,
1'	109.9	-	
2'	162.8	11.96 (OH, s)	C-1, C-2, C-3', C-4'
3'	116.8	-	
4'	152.3	-	
5'	116.2	6.53 (s)	C-1, C-3, C-4'
6'	139.7	-	
7'	172.2	-	
8'	9.3	2.10 (s)	C-2, C-3, C-4, C-6
9'	24.0	2.54 (s)	C-1, C-5, C-6
OCH ₃ -7'	52.3	3.99 (s)	C-7'

2.6.5 β -orcinol carboxylate de méthyle (Se1)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: cristaux blancs (CHCl₃)

CCM: R_f = 0,70 (B), R_f = 0,52 (C)

Point de fusion: 140⁰C

MS: HRESIMS *m/z* 219.0630 [M+Na]⁺ (calcd. pour C₁₀H₁₃O₄)

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 215 (4,52); 267 (4,30); 300 (0,77)

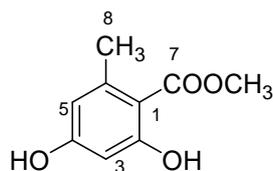
FTIR ν_{\max} (cm⁻¹): 3411; 3075; 1752; 1674 et 1613.

RMN ¹H et ¹³C:

Position	β -orcinol carboxylate de méthyle (500 MHz, CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult. <i>J</i> (Hz))
1	105.2	-
2	158.0	-
3	108.5	-
4	163.1	-
5	110.5	6.22 (1H, s)
6	140.1	-
7	172.5	-
8	7.6	2.11 (3H, s)
9	24.0	2.47 (3H, s)
OCH ₃	51.8	3.93 (3H, s)
2-OH		12.04 (1H, s)

2.6.6 Orsellinate de méthyle (Se15)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: cristaux blanc (CHCl₃)

CCM: R_f = 0,54 (A) R_f = 0,37 (C)

Point de fusion: 142⁰C

MS: HRESIMS *m/z* 181.0507 [M-H]⁻ (calcd. pour C₉H₁₀O₄)

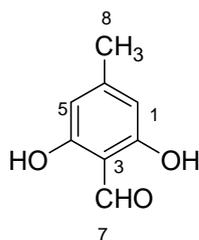
UV (MeOH) λ_{max} : 214, 262, 300 nm

RMN ¹H et ¹³C:

Position	Orsellinate de méthyle (300 MHz, CDCl ₃)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mult. <i>J</i> (Hz))
1	105.6	-
2	160.1	11.77 (OH, s)
3	101.2	6.28 (d, 2.5)
4	165.3	5.32 (OH, s)
5	111.2	6.24 (d, 2.5)
6	143.9	-
7	172.1	-
8	24.2	2.50 (s)
OCH ₃ -7	51.8	3.93 (s)

2.6.7 Atranol (Se2)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: aiguilles jaunes (CHCl₃)

CCM: R_f = 0,54 (A) R_f = 0,37 (C)

Point de fusion: 124⁰C

MS: HRESIMS *m/z* 175.0373 [M+Na]⁺ (calcd. pour C₈H₈O₃)

UV (MeOH) λ_{max} : 225, 282, 350 nm

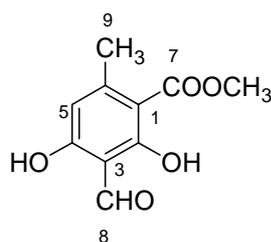
FTIR ν_{max} (cm⁻¹) : 3150 ; 1632 ; 1590 ; 1450 ; 1354 ; 1304 ; 1274 ; 1205 ; 1080 ; 1038

RMN ¹H et ¹³C:

Position	Atranol (500 MHz, Acétone- <i>d</i> ₆)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mult. <i>J</i> (Hz))
1	108.4	6.26 (s)
2	163.0	10.69 (OH, s)
3	109.2	
4	163.0	10.69 (OH, s)
5	108.4	6.26 (s)
6	151.5	
7	194.1	10.27 (s)
8	22.2	2.23 (s)

2.6.8 Haematommate de méthyle (Se19)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche (CHCl₃)

CCM: R_f = 0,82 (B), R_f = 0,58 (C), R_f = 0,78 (G)

Point de fusion: 146-147⁰C

MS: HRESIMS *m/z* 233.0430 [M+Na]⁺ (calcd. pour C₁₀H₁₀O₅)

UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 241 (3,96); 261 (2,88); 276 (3,84); 338 (2,52)

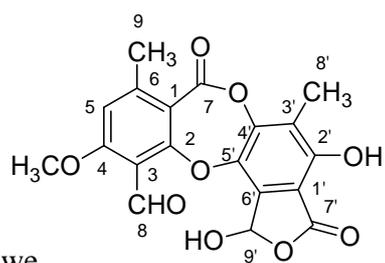
FTIR (THF) ν_{max} (cm⁻¹): 2954 ; 2952 ; 1643

RMN ¹H et ¹³C:

Position	Haematommate de méthyle (300 MHz, CDCl ₃)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mult. <i>J</i> (Hz))
1	103.7	-
2	168.2	12.89 (OH, s)
3	108.3	-
4	166.5	12.42 (OH, s)
5	112.0	6.29 (s)
6	152.3	-
7	171.9	-
8	193.8	10.34 (s)
9	25.2	2.53 (s)
OCH ₃ -7	52.3	3.97 (s)

2.6.9 Acide stictique (Se4)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,34$ (G) $R_f = 0,26$ (C)

Point de fusion: 270-272⁰C (dec)

MS: HRESIMS m/z 385,0566 $[M-H]^-$ (calcd. pour $C_{19}H_{13}O_9$)

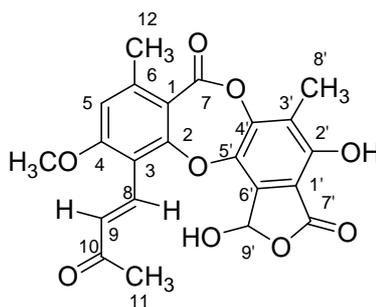
UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 237 (3,84); 273 (3,46); 313 (3,24)

FTIR (acetone) ν_{max} (cm^{-1}): 3423 ; 2928 ; 1738 (CO, cétonique) ; 1691 cm^{-1} (CO, carboxylique)

RMN ¹H et ¹³C (Revue chap 2§ 3.2.2)

2.6.10 Isidiophorine (Se9)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,28$ (C), $R_f = 0,47$ (G), $R_f = 0,30$ (B)

Point de fusion: 268-270°C

MS: HRESIMS m/z 449,0845 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{22}H_{18}O_9$)

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 267 (4,46); 301 (4,27)

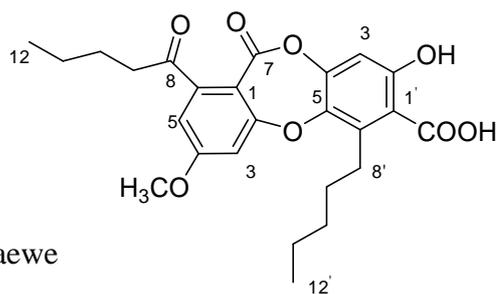
FTIR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 1670 ; 1600 ; 1590 ; 1550 ; 1330 ; 1150 ; 960

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Isidiophorine (500 MHz, DMSO- d_6)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC	COSY
1	113.4	-		
2	159.8	-		
3	112.5	-		
4	161.6	-		
5	112.1	7.08 (s)	C-3, C-4, C-6, C-12	
6	146.2	-		
7	161.0	-		
8	131.7	7.04 (d, 22)	C-2, C-4, C-10	H-9
9	132.6	7.97 (d, 17)		H-8
10	199.1	-		
11	26.7	2.43 (s)	C-9, C-10	
12	20.9	2,48 (s)	C-1, C-5, C-6	
1'	109.0			
2'	151.7	10.19 (OH, s)		
3'	120.6	-		
4'	148.0	-		
5'	137.6	-		
6'	135.6	-		
7'	166.1	-		
8'	9.0	2.20 (s)	C-2, C-3, C-4	
9'	95.2	6.50 (d, 9.7)		
OCH ₃ -4	56.6	3.97 (s)	C-4	
OH-9'		8.06 (d, 9.6)		

2.6.11 Acide lobarique (Se3)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: cristaux blancs

CCM: $R_f = 0,30$ (A), $R_f = 0,46$ (B), $R_f = 0,41$ (C)

Point de fusion: 196-197⁰C

MS: HRESIMS m/z 455.1713 [M-H]⁻ (calcd. pour C₂₅H₂₈O₈)

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 212 (4,54), 260 (3,96), 295 (3,78)

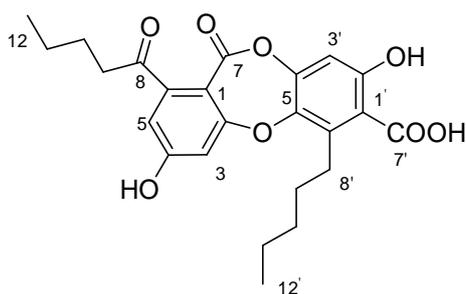
FTIR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3250 ; 3000 ; 1710 ; 1685 ; 1660 ; 1600

RMN ¹H et ¹³C :

Position	Acide lobarique (500 MHz, acétone- <i>d</i> ₆)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., <i>J</i> in Hz)
1	112.9	-
2	163.9	-
3	106.9	7.00 (d, 2.2)
4	165.5	-
5	112.2	7.00 (d, 2.2)
6	150.2	-
7	161.0	-
8	203.4	-
9	42.3	2.85 (t, 7.7)
10	26.7	1.63 (m)
11	23.2	1.39(m)
12	14.2	0.91 (m)
1'	112.2	-
2'	162.5	-
3'	107.8	6.74 (s)
4'	148.9	-
5'	142.3	-
6'	139.9	-
7'	172.4	-
8'	28.8	3.30 (t, 5.5)
9'	32.0	1.63 (m)
10'	33.0	1.51 (m)
11'	22.8	1.39 (m)
12'	14.4	0.91 (m)
OCH ₃ -4	56.9	3.98 (s)

2.6.12 Acide norlobarique (Se18)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,51$ (B), $R_f = 0,43$ (C),

MS: HRESIMS m/z 441,1588 $[M-H]^-$ (calcd. pour $C_{24}H_{26}O_8$)

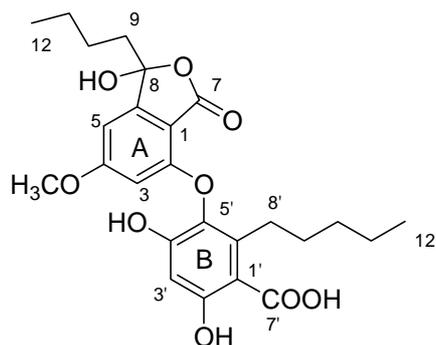
UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 210 (4,42), 215 (4,01)

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Acide norlobarique (500 MHz, DMSO- d_6)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC
1	109.1	-	
2	162.5	-	
3	107.2	6.77 (1H, d, $J = 2.2$)	C-1, C-2, C-5
4	163.1	11.27 (s)	C-3, C-4, C-5
5	112.2	6.82 (1H, d, $J = 2.2$)	C-1, C-3, C-4, C-8
6	148.8	-	
7	161.9	-	
8	203.1	-	
9	40.9	2.72-2.78 (m)	C-8, C-10
10	25.4	1.47-1.57 (m)	C-8, C-9, C-12
11	21.6	1.28-1.37 (m)	C-9, C-10, C-12
12	13.6	0.88 (m)	C-10, C-11
1'	120.1	-	
2'	152.6	11.27 (OH, s)	
3'	105.7	6.68 (1H, s)	C-1', C-2', C-4', C-5', C-7'
4'	144.3	-	
5'	140.3	-	
6'	133.6	-	
7'	168.0	-	
8'	27.2	2.72-2.78 (m)	C-1', C-5', C-6', C-9', C-11'
9'	30.0	1.47-1.57 (m)	C-11', C-12'
10'	31.3	1.28-1.37 (m)	
11'	21.3	1.28-1.37 (m)	C-9', C-10', C-12'
12'	13.7	0.88 (m)	C-9', C-11'

2.6.13 Lobarine (Se6)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,17$ (C), $R_f = 0,44$ (G)

MS: HRESIMS m/z 473.1818 $[M-H]^-$ (calcd. pour $C_{25}H_{30}O_9$)

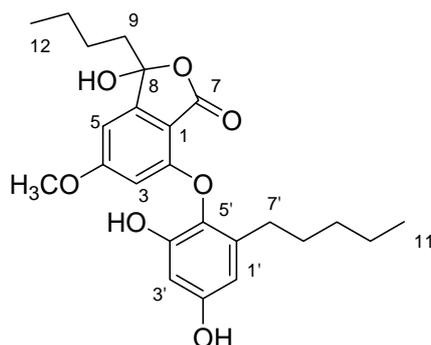
UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 213 (4,53), 255 (4,20), 293 (3,90)

FTIR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) : 3350; 2955; 1736; 1614

RMN 1H et ^{13}C : (Revue chap 2 § 3.2.9)

2.6.14 Sakisacaulon A (Se5)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,47$ (G), $R_f = 0,48$ (B)

MS: HRESIMS m/z 453,1888 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{24}H_{30}O_7$)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 207 (4,84), 258 (4,28), 286 (4,07)

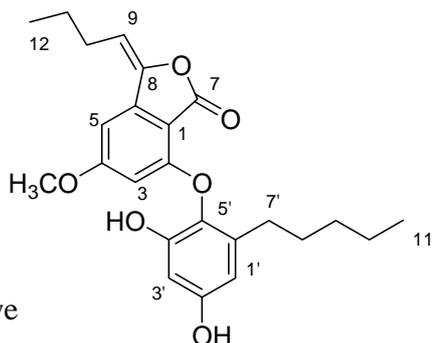
FTIR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3360 ; 2960 ; 2940 ; 1740 ; 1620

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Sakisacaulon (400 MHz, $CDCl_3$)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC	COSY
1	106.6	-		
2	157.8	-		
3	101.9	6.11 (1H, d, 1.9)	C-1, C-2, C-4, C-5	
4	167.4	-		
5	100.6	6.64 (1H, d, 1.9)	C-3, C-8	
6	153.6	-		
7	167.0	-		
8	106.7	-		
9	38.2	2.19 – 2.05 (2H, m)	C-6, C-8, C-10, C-11	H-10
10	25.1	1.42 – 1.19 (2H, m)	C-8, C-9, C-11, C-12,	H-9, H-11
11	22.3	1.34 (2H, m)	C-9, C-10	H-10, H-12
12	13.6	0.90 (3H, t, 7.2)	C-11, C-10	H-11
1'	108.3	6.25 (1H, d, 2.8)	C-2', C-5', C-7',	H-3'
2'	154.0	-		
3'	102.3	6.42 (1H, d, 2.8)	C-1', C-2', C-4', C-5'	H-1'
4'	149.1	-		
5'	132.7	-		
6'	136.9	-		
7'	29.8	2.32 (2H, m)	C-1', C-5', C-6', C-8', C-9'	H-8'
8'	29.1	1.46 (2H, m)	C-6', C-7', C-8', C-9'	H-7', H-9', H-10'
9'	31.5	1.19 (2H, m)	C-8', C-10'	H-8', H-10'
10'	22.2	1.17 (2H, m)	C-9', C-11'	H-11'
11'	13.7	0.80 (3H, t, 7.2)	C-9', C-10'	H-10'
OCH ₃ -4	55.9	3.78 (3H, s)	C-4	

2.6.15 Anhydro-sakisacaulon A (Se7)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: solide blanc

CCM: $R_f = 0,21$ (C), $R_f = 0,59$ (G), $R_f = 0,53$ (B)

MS: HRESIMS m/z 435,1783 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{24}H_{28}O_6$)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 206 (4,42) ; 246 (4,48) ; 278 (4,19) ; 329 (3,86)

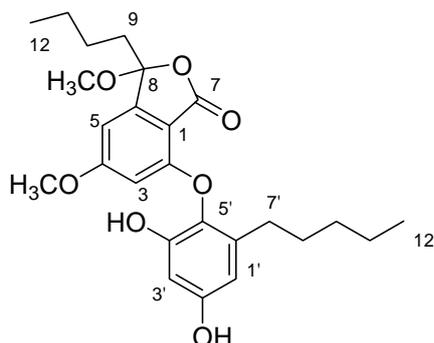
FTIR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}): 3553 ; 3372 ; 2960 ; 2860 ; 1758 ; 1684

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Anhydro-sakisacaulon (400 MHz, $CDCl_3$)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC	COSY
1	105.6	-		
2	157.7	-		
3	101.9	6.11 (d, 1.8)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7	H-3
4	166.9	-		
5	96.8	6.70 (d, 1.8)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-8	H-5
6	143.8	-		
7	165.2	-		
8	145.5	-		
9	110.0	5.65 (t, 7.8)	C-6, C-8, C12	
10	27.8	2.47 (dd, 7.7, 15.2)	C-8, C-9, C-11, C-12	H-9, H-11
11	22.4	1.60 (m)	C-9, C-10, C-12	H-10, H-12
12	13.8	1.18 (t, 7.4)	C-10, C-11	H-11
1'	108.4	6.32 (d, 2.9)	C-2', C-3', C-4', C-5', C-7'	H-3'
2'	153.9	5.80 (s, OH)		
3'	102.1	6.45 (d, 2.9)	C-1', C-2', C-4', C-5'	H-1'
4'	149.1	6.26 (s, OH)		
5'	132.9	-		
6'	137.0	-		
7'	29.8	2.35 (t, 8.0)	C-1', C-5', C-6', C-8', C-9'	H-7'
8'	29.1	1.54 (m)	C-9', C-10'	H-8'
9'	31.5	1.22 (m)	C-10'	H-9'
10'	22.3	1.24 (m)	C-9'	
11'	13.8	0.83 (t, 6.9)	C-9', C-10'	H-10'
OCH ₃ -4	55.9	3.79 (3H, s)	C-4	

2.6.16 Méthyl-8-Sakisacaulon A (Se16)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: solide blanc

CCM: $R_f = 0,20$ (C), $R_f = 0,54$ (G)

MS: HRESIMS m/z 467,2040 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{25}H_{32}O_7$)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 220 (4.27) ; 258 (3.97), 282 (3,72)

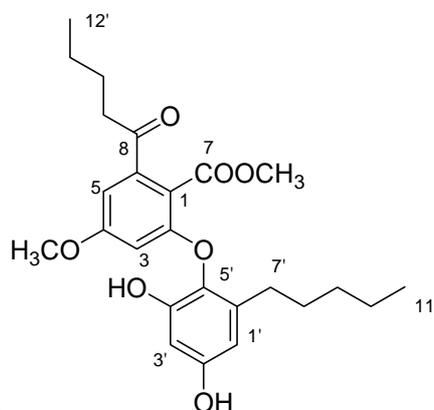
FTIR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3553 ; 3372 ; 2960 ; 2860 ; 1749, 1616

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Méthyl-8-sakisacaulon (400 MHz, $CDCl_3$)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC	COSY
1	108.4	-		
2	157.8	-		
3	102.3	6.19 (d, 1.9)	C-1, C-2, C-4, C-5	H-5
4	167.1	-		
5	100.7	6.56 (d, 1.9)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-8	H-3
6	151.5	-		
7	166.1	-		
8	109.4	-		
9	38.2	2.20 et 1.19(m)	C-6, C-8, C-10, C-11	H-9, H-10
10	25.0	1.49 et 1.22(m)	C-8, C-9, C-12	H-9
11	22.5	1.34 (m)	C-9, C-12	H-12
12	13.8	0.90 (t, 7.3)	C-10, C-11	H-11
1'	108.4	6.32 (d, 2.9)	C-2', C-3', C-4', C-5', C-7'	
2'	153.9	5.12 (s, OH)		
3'	102.0	6.43 (d, 2.9)	C-1', C-2', C-4', C-5'	
4'	149.2	6.05 (s, OH)		
5'	133.1	-		
6'	136.9	-		
7'	29.9	2.38 (m)	C-1', C-5', C-6', C-8', C-9'	H-8'
8'	29.2	1.52 (m)	C-6', C-9', C-10'	H-7'
9'	31.6	1.20 (m)	C-10'	H-8'
10'	22.2	1.22 (m)	C-9'	H-11'
11'	13.9	0.82 (t, 7.0)	C-9', C-10'	H-10'
OCH ₃ -4	56.0	3.80 (s)	C-4	
OCH ₃ -8	50.9	3.16 (s)	C-8	

2.6.17 Sakisacaulon A estérifié en C-7 (Se20)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: solide blanc

CCM: R_f = 0,24 (C), R_f = 0,59 (G), R_f = 0,55 (B)

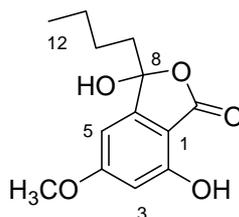
MS: HRESIMS m/z 467,2038 [M+Na]⁺ (calcd. pour C₂₅H₃₂O₇)

FTIR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹): 3500 ; 3350 ; 2960 ; 2860 ; 1720 ; 1610 ; 1570

RMN ¹H et ¹³C : (Revue chap 2 § 3.2.9)

2.6.18 3-butyl-3,7-dihydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane (Se8)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: visqueux brun

CCM: $R_f = 0,27$ (C), $R_f = 0,48$ (G), $R_f = 0,53$ (B)

MS: HRESIMS m/z 275,0895 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{13}H_{16}O_5$)

UV (ACN/THF) λ_{max} (log ϵ): 229 (4,34); 259 (4,21); 295 (3,91)

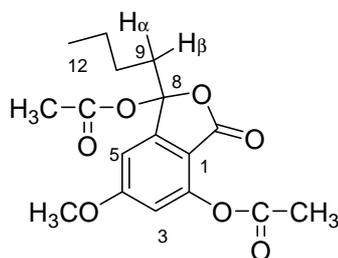
FTIR ν_{max} (cm^{-1}): 3374 ; 2957 ; 1694 ; 1614

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Se8 (400 MHz, $CDCl_3$)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mult., J in Hz)	HMBC
1	104.4	-	
2	159.5	-	
3	101.9	6.46 (1H, d, 1.6)	C-1, C-4, C-5, C-7
4	166.7	-	
5	102.1	6.44 (1H, d, 1.7)	C-1, C-3, C-5
6	149.9	-	
7	170.2	-	
8	absence	-	
9	39.9	2.28 (2H, t, 6,40)	
10	25.5	1.46 – 1.28 (m)	C-9, C-11
11	22.3	1.46 – 1.28 (m)	C-9, C-10, C-12
12	13.6	0.89 (3H, t, 6,80)	C-10, C-11
OCH ₃ -4	55.8	3.86 (3H, s)	C-4

2.6.19 3-butyl-3-acétyl-7-hydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-izobenzofurane(Se8a)

Structure



Sources: Acétylation du composé Se8

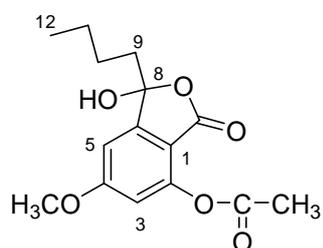
Aspect: amorphe blanche

RMN ¹H et ¹³C :

Position	Se8a (300 MHz, CDCl ₃)		
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	HMBC
1	105.7	-	
2	150.6	-	
3	104.9	6.86 (1H, d, 1.98)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7
4	164.5	-	
5	110.0	6.74 (1H, d, 1.98)	C-3, C-4, C-8
6	149.5	-	
7	166.1	-	
8	111.8	-	
9	37.4	H _α 2.07-1.99 (1H, m) H _β 2.36-2.26 (1H, m)	
10	24.4	1.47-1.17 (m)	C-11
11	22.3	1.47-1.17 (m)	C-10
12	13.7	0.89 (3H, t, 9.00)	C-11
4-OCH ₃	56.2	3.90 (3H, s)	C-4
2-CO	168.4		
2-COCH ₃	20.6	2.40 (3H, s)	CO-2
8-CO	168.1		
8-COCH ₃	21.5	2.03 (3H, s)	CO-8

2.6.20 3-butyl-3-hydroxy-7-acétyl-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane (Se8b)

Structure



Sources: Acétylation du composé Se8

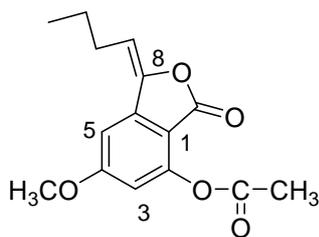
Aspect: amorphe blanche

RMN ^1H et ^{13}C :

Position	Se8b (300 MHz, CDCl_3)		
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)	HMBC
1	106.4	-	
2	152.6	-	
3	104.6	6.84 (1H, d, 1.98)	C-4
4	166.3	-	
5	110.6	6.69 (1H, d, 1.98)	C-3, C-4, C-6, C-8
6	149.1	-	
7	165.1	-	
8	111.1	-	
9	38.2	2.14-2.01 (2H, m)	
10	25.1	1.31-1.28 (m)	C-11
11	22.4	1.31-1.28 (m)	
12	13.7	0.85 (3H, t, 7.14)	C-10, C-11
4-OCH ₃	56.2	3.90 (3H, s)	
2-CO	168.9		
2-COCH ₃	20.6	2.35 (3H, s)	

2.6.21 3(but-1-én-yl)-7-acyl-5-methoxy-1(3H)-isobenzofurane (Se8c)

Structure



Sources: Acétylation du composé Se8

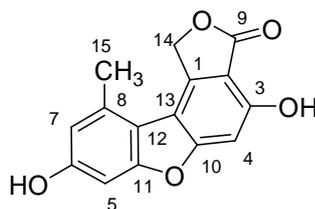
Aspect: amorphe blanche

RMN ^1H et ^{13}C :

Position	Se8c (300 MHz, CDCl_3)		
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (mul., J in Hz)	HMBC
1	109.7	-	
2	149.3	-	C-1, C-2, C-4, C-5
3	110.6	6.69 (1H, d, 1.95)	
4	166.0	-	
5	100.7	6.90 (1H, d, 1.95)	C-1, C-3, C-4, C-8
6	143.0	-	
7	163.9	-	
8	145.1	-	
9	110.0	5.61 (1H, t, 7.83)	C-8, C-11
10	27.7	2.43 et 2.40 (2H, dd, 7.5, 7.5)	C-9, C-11, C-12
11	22.4	1.57-1.50 (2H, m)	C-9, C-10, C-12
12	13.8	0.98 (3H, t, 7.32)	C-10, C-11
4-OCH ₃	56.1	3.90 (3H, s)	C-4
2-CO	168.6		
2-COCH ₃	20.7	2.40 (3H, s)	CO-2

2.6.22 Strepsiline (Se13)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,21$ (B) ; $R_f = 0,23$ (C)

MS: HRESIMS m/z 293,0426 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{15}H_{10}O_5$)

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 242 (4,42); 256 (4,23); 308 (4,10)

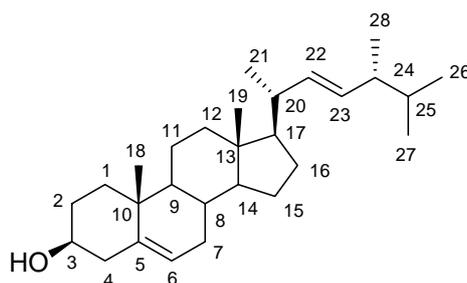
FTIR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3500 ; 3330 ; 2950 ; 1700 ; 1618

RMN 1H et ^{13}C :

Position	Strepsiline (400 MHz, DMSO- d_6)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mul., J in Hz)	HMBC
1	141.1		
2	107.3		
3	155.3	10.74 (OH, s)	C-2, C-3, C-4
4	98.2	7.06 (s)	C-2, C-3, C-9, C-10
5	95.6	6.83 (d, 2.2)	C-6, C-7, C-12
6	157.2	9.86 (OH, s)	C-5, C-6, C-7
7	113.6	6.64 (d, 2.0)	C-5, C-12, C-15
8	131.9		
9	168.6		
10	160.3		
11	157.4		
12	113.3		
13	110.8		
14	69.3	5.83 (s)	C-1, C-2, C-9, C-10, C-13
15	20.3	2.66 (s)	C-7, C-8, C-12

2.6.23 Brassicastérol (Seh3)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: solide blanc

CCM: $R_f = 0,56$ (C), $R_f = 0,66$ (G), $R_f = 0,81$ (B),

Point de fusion : 157-158⁰C

MS: HRESIMS m/z 421,3445 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{28}H_{46}O$)

RMN ¹H et ¹³C :

Position	Acide ursolique (300 MHz, CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mul., J in Hz)
1	37.2	
2	29.7	
3	71.2	3.54 (m)
4	39.6	
5	140.7	
6	121.7	5.35 (m)
7	31.6	
8	31.8	
9	50.1	
10	36.5	
11	20.9	
12	40.1	
13	42.2	
14	56.8	
15	24.2	
16	28.5	
17	56.0	
18	12.0	
19	19.3	
20	42.2	
21	21.0	
22	135.8	5.19 (m)
23	131.7	5.19 (m)
24	42.8	
25	33.1	
26	19.9	
27	19.6	
28	17.6	

2.6.24 Acide ursolique (Se12)

Structure

Sources: *S. evolutum* Graewe

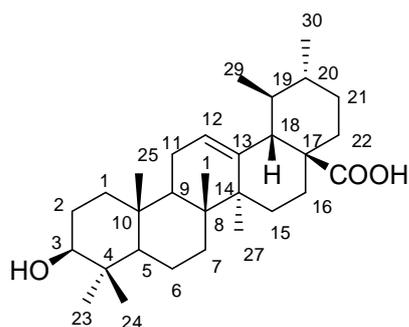
Aspect: Solide blanc

CCM: $R_f = 0,50$ (B), $R_f = 0,49$ (C)

Poind de fusion : 290-292⁰C

MS: HRESIMS m/z 479.3499 $[M+Na]^+$ (calcd. pour $C_{30}H_{48}O_3$)

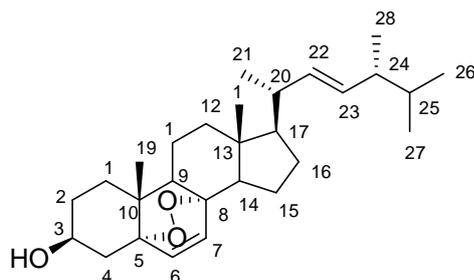
RMN ¹H et ¹³C :



Position	Acide ursolique (300 MHz, CD ₃ OH)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mul., <i>J</i> in Hz)
1	39.8	
2	27.9	
3	79.7	3.16 (dd, 6.0, 6.0)
4	40.4	
5	56.7	
6	19.5	
7	34.3	
8	40.8	
9	48.1	
10	38.1	
11	24.1	
12	126.8	5.23 (t, 3.5)
13	139.6	
14	43.2	
15	28.7	
16	25.3	
17	48.1	
18	54.4	2.22 (bd)
19	40.4	
20	40.0	
21	31.8	
22	38.1	
23	28.7	
24	16.4	
25	16.0	
26	17.6	
27	24.3	
28	181.7	
29	17.8	
30	21.6	

2.6.25 Peroxyde d'ergostérol (Seh1)

Structure



Sources: *S. evolutum* Graewe

Aspect: Solide blanc

CCM: $R_f = 0,66$ (B) ; $R_f = 0,43$ (C) ; $R_f = 0,59$ (G)

Point de fusion : 183-184⁰C

MS: HRESIMS m/z 429.337 $[M+H]^+$ (calcd. pour $C_{28}H_{46}O$)

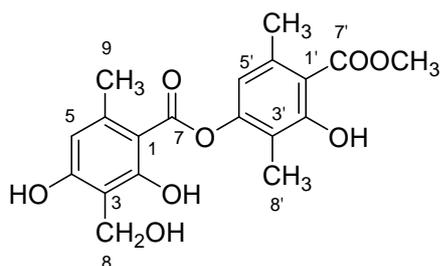
FTIR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3540 ; 3420 ; 1380 ; 1050 ; 975

RMN ¹H et ¹³C :

Position	Peroxyde d'ergostérol (300 MHz, $CDCl_3$)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (mul., J in Hz)
1	34.6	
2	30.1	
3	66.4	3.98 (m)
4	36.9	
5	82.1	
6	135.4	6.26 (d, 8.78)
7	130.7	6.50 (d, 8.78)
8	79.4	
9	51.1	
10	36.9	
11	20.6	
12	39.3	
13	44.5	
14	51.6	
15	23.4	
16	28.6	
17	56.2	
18	12.8	
19	18.6	
20	39.7	
21	20.8	
22	135.2	5.21 (dd, 7.14, 14.82)
23	132.3	5.18 (dd, 8.23, 15.37)
24	42.7	
25	33.0	
26	19.6	
27	19.8	
28	17.5	

2.6.26 8-hydroxy-4-*O*-déméthylbarbate de méthyle (AR)

Structure



Sources: Réduction de la fonction C-3 de l'atranorine

Aspect: poudre blanche

CCM: $R_f = 0,21$ (B) ; $R_f = 0,23$ (C)

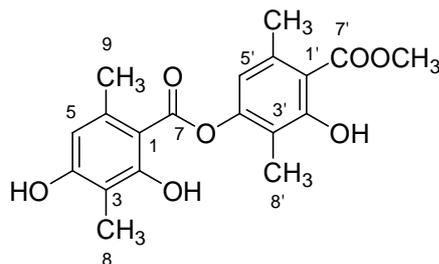
Point de fusion : 190°C (dec)

RMN ^1H et ^{13}C :

Position	8-hydroxy-4- <i>O</i> -déméthylbarbate de méthyle (300 MHz, CD_3OD)	
	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm (mult. J (Hz))
1	104.3	-
2	163.5	-
3	111.7	-
4	165.5	-
5	117.7	6.36 (s)
6	153.9	-
7	171.4	-
8	54.7	4.73 (s)
9	23.9	2.53 (s)
1'	113.2	-
2'	163.3	-
3'	112.7	-
4'	144.3	-
5'	117.9	6.59 (s)
6'	140.9	-
7'	173.5	-
8'	9.5	2.04 (s)
9'	24.9	2.60 (s)
OCH_3	52.9	3.98 (s)

2.6.27 4-O-déméthylbarbate de méthyle (AR2)

Structure



Sources: Composé synthétisé

Aspect: solide blanc

CCM: $R_f = 0,57$ (B) ; $R_f = 0,47$ (C)

Point de fusion : 109-111⁰C (dec)

RMN ¹H et ¹³C :

Position	4-O-déméthylbarbate de méthyle (300 MHz, CDCl ₃)		
	δ_C ppm	δ_H ppm (mult. <i>J</i> (Hz))	HMBC
1	104.2	-	
2	164.2	11.72 (OH, s)	C-1, C-2, C-3, C-4
3	109.0	-	
4	159.0	5.26 (OH, s)	
5	111.3	6.30 (s)	C-1, C-3, C-4, C-9
6	140.8	-	
7	170.4	-	
8	7.8	2.13 (s)	C-2, C-3, C-4
9	24.6	2.61 (s)	C-1, C-5, C-6
1'	110.1	-	
2'	162.9	11.94 (OH, s)	C-1', C-2', C-3', C-4'
3'	117.0	-	
4'	152.6	-	
5'	116.4	6.51 (s)	C-1', C-3', C-4', C-9'
6'	139.8	-	
7'	172.4	-	
8'	9.4	2.08 (s)	C-2', C-3', C-4'
9'	24.1	2.53 (s)	C-1', C-5', C-6'
OCH ₃	52.4	3.98 (s)	C-7'

3 Données expérimentales du chapitre 3

3.1 Cytotoxicité

Les produits ont été remis à Mr Rémy Le Guivel à la plateforme ImpacCell (<http://imagerie-puces-a-cellules.univ-rennes1.fr/>) sous forme d'aliquots de 10 mM dans le DMSO. Ils ont été testés sur sept lignées cellulaires disponibles : des cellules HuH7 (carcinome hépatocellulaire humain), CaCo-2 (adénocarcinome colorectal humain), MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire humain), HCT116 (carcinome humain de colon), PC3 (adénocarcinome prostatique humain), HaCaT (kératinocytes humains) and NCI-H727 (carcinome pulmonaire humain). Ces cellules ont été obtenues à partir de la banque européenne ECACC excepté pour les fibroblastes épithéliaux fournis par l'entreprise BIOPREDIC (Rennes, France). Les cellules ont été cultivées d'après les recommandations ECACC. Brièvement, toutes les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de $4 \cdot 10^3$ cellules/ puits sauf pour les cellules HCT116 à $2 \cdot 10^3$ cellules / puits. 24 heures après l'ensemencement, les composés à tester ont été déposés sur les cellules à la concentration dans le puits de 10 μ M. Après 48 heures, les cellules ont été lavées par du PBS puis fixées par un mélange éthanol / acide acétique (90/5) pendant 20 minutes. Les noyaux cellulaires ont ensuite été colorés par le Hoechst 3342 (Sigma). L'analyse de la toxicité a été appréciée en utilisant le lecteur Cellomics ArrayScan VTI/ HCS Reader (Thermo Scientific).

3.2 Activité antivirale

3.2.1 Modèle viral expérimental utilisé

Afin d'évaluer l'activité des composés lichéniques sur le virus de l'hépatite C, le modèle du clone cellulaire du VHCcc a été utilisé.

En 2005, un nouveau modèle est apparu qui a permis une évolution de la recherche sur le VHC. Ce modèle, appelé clone cellulaire du VHC (VHCcc) a été développé à partir d'un clone génomique issu d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante et nommé JFH1. Peu de temps après la découverte de ce génome, l'équipe de Wakita a montré que la transfection de cellules de la lignée Huh7 avec un ARN codant pour ce génome complet conduisait à une production de particules virales infectieuses *in vitro* sur une culture naïve, et, *in vivo* chez le chimpanzé [218]. L'utilisation des sous-populations cellulaires Huh7.5 et Huh7.5.1 a permis d'améliorer l'efficacité de répllication et de sécrétion des particules virales

[219,220]. Grâce à ce modèle, il a été possible pour la première fois de caractériser les particules virales produites *in vitro*.

3.2.2 Composés testés

Lors du premier criblage, douze composés isolés du lichen *S. evolutum* ont été testés : peroxyde d'ergostérol, acide ursolique, isidiophorine, acide stictique, strepsiline, β -orcinol carboxylate de méthyle, atranorine, acide lobarique, lobarine, anhydro-sakisacaulon A, sakisacaulon A, Se8.

A la suite de ce criblage, l'atranorine a montré une activité intéressante sur le VHCcc sans toxicité. Il a donc été entrepris de tester des molécules proches et dérivées dont la différence portait sur le groupement fonctionnel en C-3. Les composés cladonioidésine, (E)-3-(3-oxobut-1-en-yl)-atranorine, méthyl-3'-methyllecanorate et les monoaromatiques phénoliques tels que l'haematommate de méthyle, l'orsellinate de méthyle, l'atranol ainsi que des dérivés de synthèse le 4-O-déméthylbarbatate de méthyle, le 8-hydroxy-4-O-déméthylbarbatate de méthyle ont à leur tour été testés.

3.2.3 Dilution des composés

Une solution mère à 100 mM dans le DMSO 100% a été réalisée pour chaque composé puis aliquotée dans des tubes épendorffs sous un volume de 5 μ L. Pour le composé Se10, une solution extemporanée a été réalisée pour chaque expérience étant donné son instabilité dans le DMSO.

3.2.4 Culture des cellules Huh7.5.1

Les cellules de la lignée hépatique Huh7.5.1 sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine) (Gibco), complémenté avec 100 unités/mL de pénicilline (Invitrogen), 100 μ g/mL de streptomycine (Invitrogen), 1 mM d'HEPES (Invitrogen), 2,24 mM L-Glutamine (Invitrogen), des acides aminés non essentiels (Sigma) et 10% SVF (Gibco) décomplémenté (30 min à 56 °C). Toutes les cellules sont maintenues à 37 °C, avec 5% de CO₂ et sous atmosphère humide.

3.2.5 Évaluation de la cytotoxicité *in vitro*

La toxicité liée aux composés testés a été déterminée en plaque de 96 puits, 48h après l'infection par le VHC, en utilisant le kit « Cell Proliferation Reagent WST-1 » (Roche), selon les recommandations du fournisseur. Le principe de ce kit réside dans le fait que les sels de tétrazolium sont clivés en molécules de formazan par des déshydrogénases mitochondriales.

La quantité de formazan formée est directement corrélée aux nombres de cellules métaboliquement actives dans la culture. La mesure de l'absorbance du formazan a été effectuée à l'aide du spectrophotomètre FLUOstar Optima (BMG Labtech, USA) à une longueur d'onde de 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 650 nm.

3.2.6 Analyse de l'infection par le VHC

Lors de la fin de l'infection par le VHCcc, la cytotoxicité est déterminée (voir section « Evaluation de la cytotoxicité »), puis les cellules sont lysées afin de mesurer le niveau de luminescence, à l'aide du kit « Renilla Assay Luciferase » (Promega), selon le protocole du fabricant. La lecture de la luminescence est réalisée avec le luminomètre Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies). Les valeurs de luminescence sont systématiquement normalisées avec celles obtenues pour la cytotoxicité, dans le cas des cellules Huh7.5.1.

3.2.7 Analyses statistiques

Les données ont été exprimées et représentées comme la moyenne de plusieurs expériences \pm écart à la moyenne (SEM, Standard Error of the Mean). Des tests t non appariés de Student ont été utilisés pour comparer la moyenne des groupes témoins et expérimentaux.

3.3 Activités *in vitro* des dérivés diphenyléthers sur l'enzyme PTP1B

3.3.1 Détermination du Kd

La microscale thermophoresis (MST) a été développée par NanoTemper et a été validée et bien caractérisée grâce aux inhibiteurs de P38 α , BIRB796 et SB202190. L'enzyme PTP1B (PTP1B(1-321)/PTPN1 humaine (concentration de 0.84 mg/mL sous un volume de 24 μ L) a été achetée chez Sigma (SIGMA-ALDRICH, Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765) et plusieurs étapes sont nécessaires avant de déterminer son interaction avec les ligands.

3.3.1.1 Marquage de l'enzyme et détermination de sa concentration

Dans une première étape, la phosphatase PTP1B a été dessalée en suivant les recommandations du constructeur NanoTemper c'est-à-dire que nous avons éliminé toute trace de Tris-HCl, DTT, glutathione afin que la deuxième étape de marquage se fasse dans des conditions optimales. Après dessalage, PTP1B est marquée par un colorant fluorescent (NT495 qui fluoresce à 650 nm). Le colorant libre (c'est-à-dire non fixé sur la protéine) est ensuite éliminé par purification sur colonne Sephadex G-25 et l'enzyme marquée est récupérée dans trois épendorffs dans un tampon TNEG (Tris HCl 10 mM/NaCl 150 mM/EDTA 1mM/Glycérol 2%). La concentration de l'enzyme est alors déterminée en

mesurant sa densité optique au spectrophotomètre à 280 nm en sachant que le coefficient d'extinction molaire de PTP1B est de $62760 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Fig. 121).

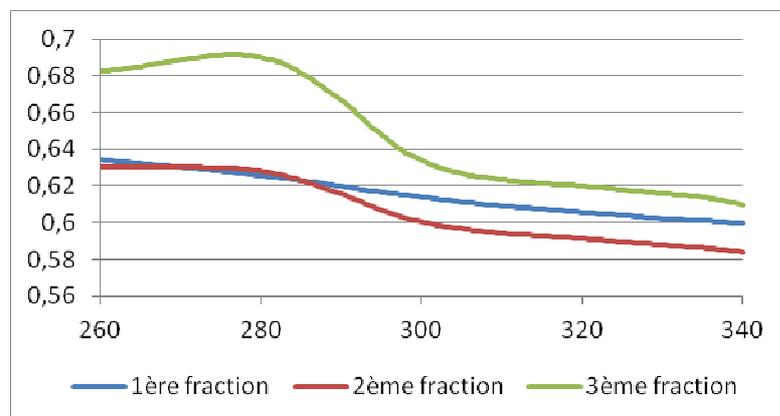


Figure 121 : Spectres UV des aliquots lors de l'élution de la protéine marquée

Une dilution au $1/20^{\text{ème}}$ de l'enzyme est alors réalisée afin que, lors de chaque thermophorèse, une concentration constante en phosphatase 1B de $0.5 \mu\text{M}$ soit utilisée tandis que les ligands seront ajoutés en concentration croissante.

3.3.1.2 Choix des capillaires

La thermophorèse s'effectue dans des capillaires dont la contenance est de $4 \mu\text{L}$ et 3 types de capillaires peuvent être utilisés : standard, hydrophiliques et hydrophobiques en fonction de l'enzyme. Il faut avant de pouvoir conduire l'expérience déterminer préalablement les capillaires les plus adaptés. Des essais sont réalisés sur l'enzyme diluée au $1/20^{\circ}$.

Les pics d'intensité de fluorescence obtenus avec les capillaires hydrophiliques sont les plus fins et ce type de capillaire a donc été sélectionné.

3.3.1.3 Dilution des composés

Seize mini-épendorffs sont disposés dans un portoir sur un lit de glace et $10 \mu\text{L}$ de tampon TNEG sont déposés dans les tubes 2-16. Ensuite $20 \mu\text{L}$ du ligand à tester sont mis dans le mini-épendorffs n°1 et une dilution de $1/2$ en $1/2$ est effectué jusqu'au tube n°16 et les $10 \mu\text{L}$ du puits n°16 excédentaires sont jetés. On ajoute alors $10 \mu\text{L}$ de PTP1B*. Au fond de chacun des épendorffs, un capillaire est disposé et la solution protéine – ligand monte le long du capillaire par capillarité. Ils sont disposés sur une plaquette et on réalise la MST.

Pour les composés type depside et diphenyléthers, la gamme de concentration sera de 500 μM à 15.2 nM tandis que pour l'acide ursolique, la gamme de concentration est de 125 μM à 3.8 nM.

3.3.1.4 MST

A l'état initial, les molécules avec la protéine ne bougent pas. A un temps t , la solution est chauffée par un laser (intensité de la MST modulable) et ligand / protéine s'organisent de façon caractéristique pour atteindre l'état d'équilibre avant de retourner à l'état initial lorsque le laser s'éteint (Fig. 122).

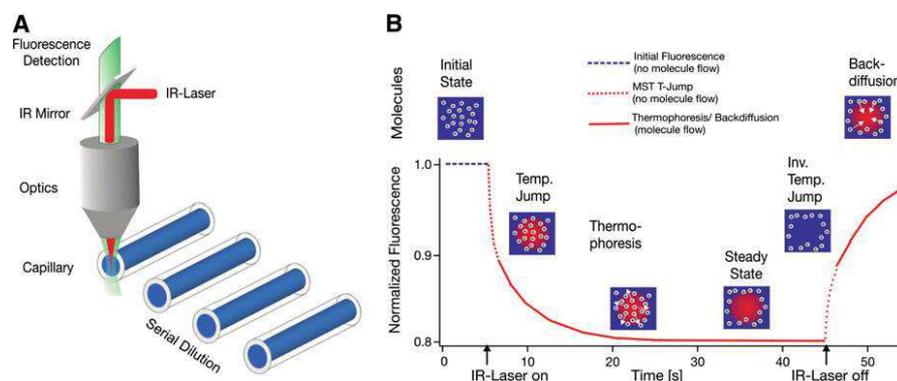


Figure 122: Principe de la thermophorèse (tiré de Jerabek-Willemsen Moran, 2011) [221]

Le marquage fluorescent (excitation par une LED) permet de suivre l'enzyme et ainsi de voir sa mobilité dans le tampon dans lequel on l'a mis. La façon de bouger de la protéine est différente en fonction du substrat et permet ainsi en fonction des différentes concentrations de tracer une courbe telle que :

$$\text{intensité fluorescence} = f(\text{concentration en ligand})$$

Lors de nos expérimentations, chaque thermophorèse est effectuée en paramétrant une puissance de LED à 50% et une puissance de laser à 60% grâce au logiciel NT control. L'ensemble des données : courbe de thermophorèse (Fig. 123), intensité de fluorescence (Fig. 124) est enregistré.

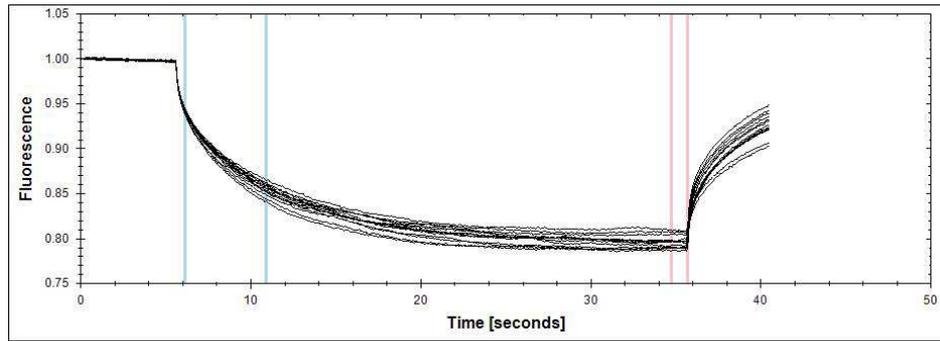


Figure 123 : Graphique de thermophorèse

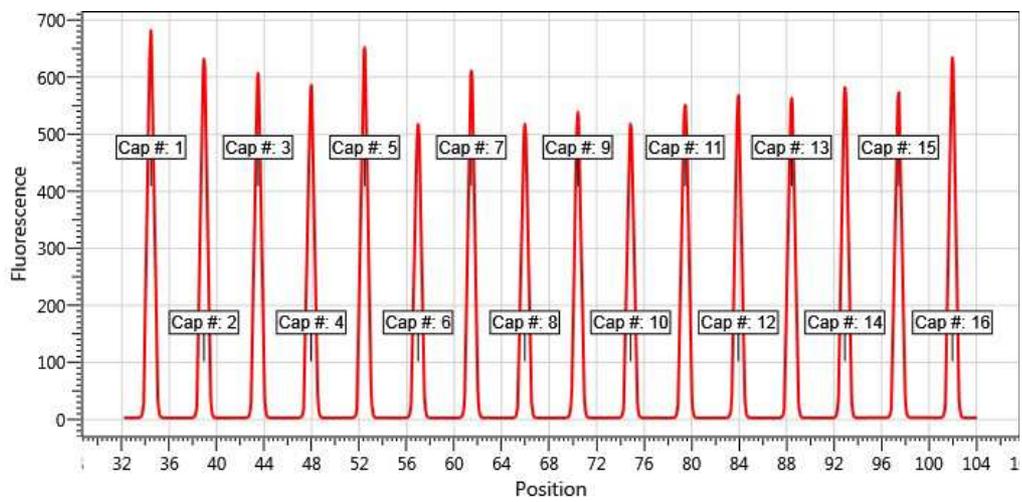


Figure 124 : Coups de fluorescence dans chaque capillaire contenant la protéine et le ligand

Ces données sont ensuite traitées par le logiciel NT analysis en prenant en compte la concentration croissante des ligands incubés avec l'enzyme afin de calculer la constante d'affinité K_d (Fig. 125).

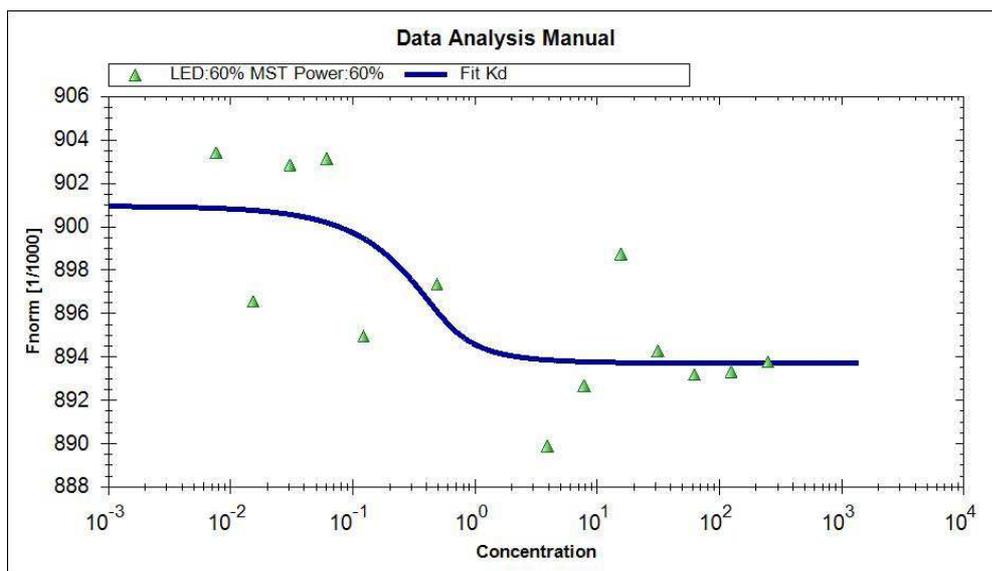


Figure 125 : Courbe d'interaction entre le ligand et l'enzyme qui permet la détermination du Kd

Cette expérience devait être réalisée en triplicate. La première fois, l'enzyme n'avait pas été congelée après marquage et les 9 composés ont été testés. A l'issue du 1^{er} essai, l'enzyme a été congelée et lors du nouvel essai, nous avons réalisé une thermophorèse et avons pu remarquer que des agrégats étaient présents sans qu'aucun composé n'ait été ajouté. L'enzyme marquée s'est dégradée après congélation à -70°C (Fig. 126).

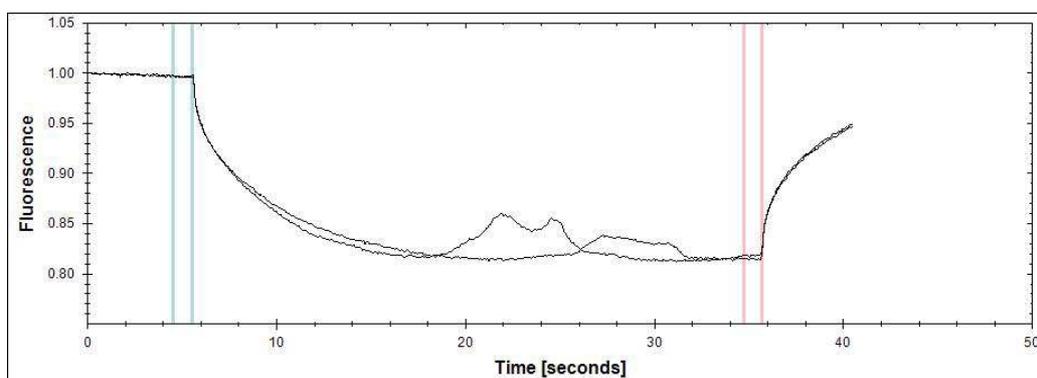


Figure 126: Thermophorèse de PTP1B marquée après congélation

3.3.2 Test enzymatique (test réalisé en collaboration avec Pr H.Stuppner, Autriche)

L'enzyme PTP1B a été achetée chez Sigma –Aldrich. L'activité de l'enzyme a été déterminée en utilisant comme substrat le *para*-nitrophénylphosphate (pNPP) 2 mM dilué dans 50 mM MOPS, pH=6.5 en présence de 1 mM de DTT. Les extraits et les composés ont été dissous dans 100% de DMSO et dilués à 1% de DMSO dans chaque puits contenant 100

μ L de tampon. Chaque concentration est réalisée en quadruplate dans une plaque 96 puits. L'absorbance de la réaction est lue à 405 nm pendant 30 minutes dans un spectrophotomètre Tecan/SUNRISE. La réaction est stoppée en ajoutant dans chaque puits du NaOH (10M). Trois essais sont réalisés et les données représentent la moyenne \pm écart types. Les différences ont été analysées en utilisant GraphPad Prism en utilisant les tests ANOVA et Dunnett ou Bonferroni pour la comparaison des échantillons entre eux. $P < 0.05$ est considéré comme significatif.

3.4 Modélisation moléculaire (en collaboration avec le Dr Olivier Delalande)

Plusieurs étapes sont nécessaires afin de modéliser les interactions entre les ligands (dérivés des diphenyléthers) avec l'enzyme ciblée c'est-à-dire PTP1B. Cette phosphatase a été cristallisée dès 1994 et nous avons ainsi la chance de pouvoir disposer de la protéine en structure tridimensionnelle disponible dans la Protein Data bank (PDB) sous le code 1A5Y.

Deux modèles de protéine PTP1B ont été obtenus : un par homologie et quatre autres par le mode normal comme décrit dans la thèse (Chap 3§ 3.2.2).

3.4.1 Docking ou Amarrage moléculaire

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus essentiels à cette interaction est donc primordial pour pouvoir expliquer l'association entre une protéine et son ligand.

De même, la découverte *in silico* de nouvelles drogues activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que les techniques d'amarrage moléculaire (ou *docking*) ont été développées. Il est à noter que les substrats et les inhibiteurs sont définis par le terme générique de "ligand", tandis que le terme "récepteur" est utilisé pour la cible sur laquelle le ligand va se fixer, que ce soit une enzyme ou un récepteur protéique.

Protocole de *docking* :

- ❖ La première étape consiste à préparer le ligand et le récepteur en définissant les charges partielles de leurs atomes. Il est possible de le faire directement par l'intermédiaire d'AutoTors, en leur attribuant des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber24.

- ❖ Dans une deuxième étape, et afin d'obtenir le minimum global d'énergie pour le complexe ligand-récepteur, les méthodes d'amarrage moléculaire utilisent différentes techniques comme la minimalisation d'énergie, le recuit simulé, le calcul de type Monte-Carlo, la complémentarité de surface...

Toutes nos séries de docking ont été faites à l'aide du programme AutoDock qui permet l'exploration de l'espace conformationnel d'un système en autorisant certains degrés de liberté au ligand (ligand flexible), tout en maintenant fixe le récepteur (récepteur rigide). Pour chaque variation de conformation du complexe, l'énergie d'interaction résultante est évaluée.

3.4.2 Les logiciels utilisés

3.4.2.1 YASARA, programme de dynamique moléculaire et docking:

Le logiciel Yet Another Scientific Artificial Reality Application ou YASARA25 est un programme de modélisation moléculaire avec une interface graphique qui permet de faire des simulations de dynamique moléculaire. Nous l'avons utilisé dans toutes les simulations, et son module Autodock nous a permis de faire les séries de docking.

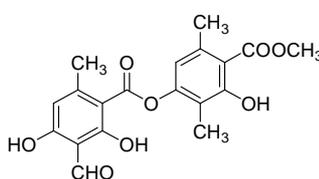
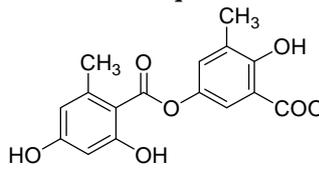
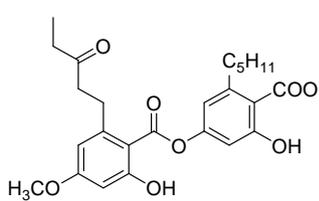
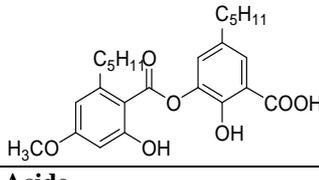
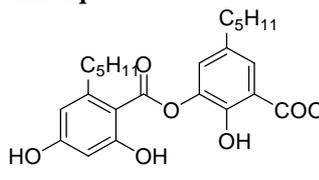
3.4.2.2 VMD, programme de visualisation moléculaire :

Le logiciel Visual Molecular Dynamics ou VMD26 est un programme de visualisation graphique, qui permet de représenter en 3D, et même d'animer, des macromolécules biologiques. Ce programme lit aussi bien les fichiers de coordonnées issus de la PDB que les fichiers trajectoires générés par le programme YASARA. Ce programme a été développé au sein du «Theoretical and Computational Biophysics Group » à l'université de l'Illinois.

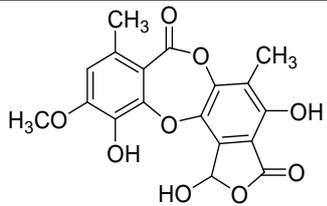
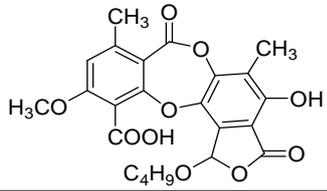
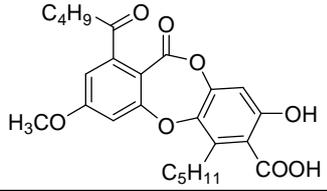
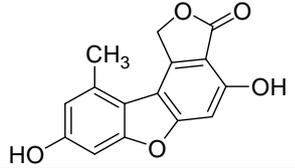
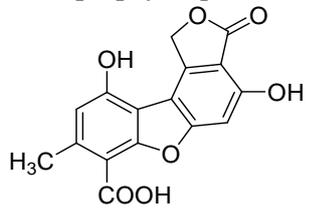
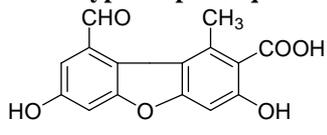
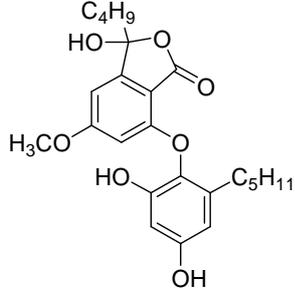
ANNEXES

Annexe 1 : Bibliographie du genre *Stereocaulon*

Tableau 36: Les composés lichéniques extraits du genre *Stereocaulon*

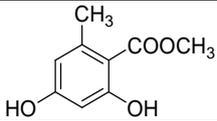
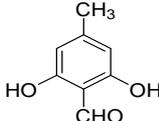
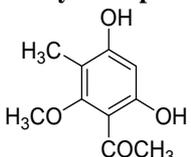
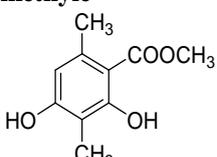
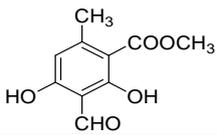
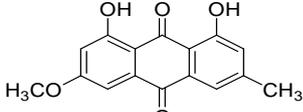
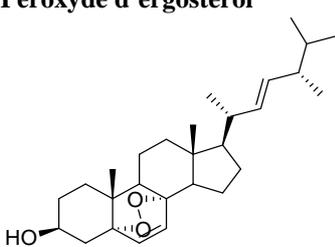
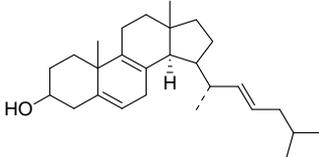
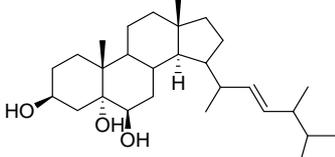
N ^o	Nom et structure	Espèces de <i>Stereocaulon</i> et références
Depsides		
1	Atranorine 	<i>S. alpinum</i> [60] <i>S. incrustatum</i> , <i>S. massartinum</i> , <i>S. sorediiferum</i> [222] <i>S. tomentosum</i> [223] <i>S. visuvianum</i> [224] <i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992), <i>S. ramulosum</i> [225] <i>S. meyeri</i> , <i>S. ramulosum</i> [226] <i>S. strictum</i> , <i>S. strictum var compressum</i> , <i>S. argus</i> , <i>S. myriocarpum</i> , <i>S. subcorraloides</i> , <i>S. tomentosum compactum</i> (Huneck, 1974) <i>S. vesuvianum</i> [228] <i>S. implexum</i> , <i>S. spathuliferum f. pygmaeum</i> , <i>S. sterile</i> (Huneck, 1972) <i>S. ramulosum</i> (Huneck & Follmann, 1967) <i>S. corticulatum</i> , <i>S. ramulosum</i> [231] <i>S. ramulosum</i> , <i>S. nanodes</i> , <i>S. antarcticum</i> (Huneck & Follmann, 1966) <i>S. exutum</i> [233] <i>S. corticulatum var. procerum</i> (Huneck & Follman, 1965) <i>S. foliosum</i> , <i>S. myriocarpum</i> [235] <i>S. curtatum</i> [236] <i>S. piluliferum</i> [237] <i>S. ramulosum</i> (Vila, Mollinedo, Flores, & Sterner, 2008)
2	Acide lécanorique 	<i>S. curtatum</i> [236] <i>S. corticulatum var. procerum</i> (Huneck & Follman, 1965)
3	Acide miriquidique 	<i>S. curtatum</i> [236]
4	Acide perlatolique 	<i>S. meyerie</i> [231] <i>S. ramulosum</i> (Vila, Mollinedo, Flores, & Sterner, 2008)
5	Acide anziaique 	<i>S. ramulosum</i> [225]
Depsidones		
6	Acide cryptostictique	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992) <i>S. montagneanum</i> Lamb [66]

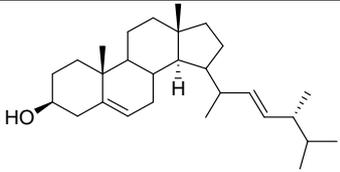
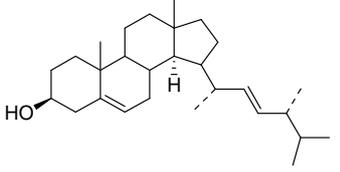
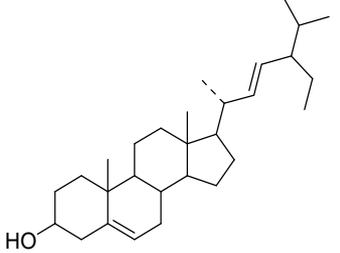
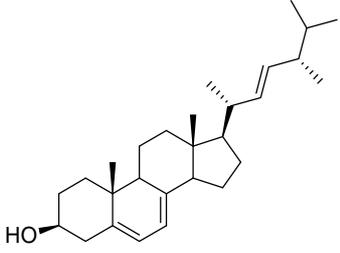
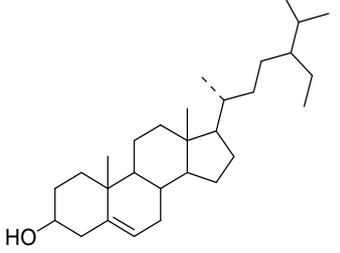
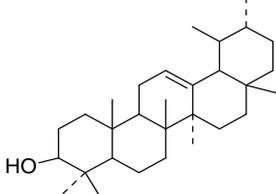
7	Acide stictique 	<i>S. cornutum</i> [231] <i>S. tomentosum</i> var. <i>compactum</i> (Huneck, 1972) <i>S. strictum</i> (Huneck, 1974) <i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992) <i>S. foliosum</i> , <i>S. myriocarpum</i> [235] <i>S. piluliferum</i> [237] <i>S. meyeri</i> [226] <i>S. tomentosum</i> (Vila, Canaviri Paz, & Sterner, 2004) <i>S. montagneanum</i> Lamb [66]
8	Isidiophorine 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992)
9	Acide constictique 	<i>S. vesuvianum</i> var. <i>pulvinatum</i> [238]
10	Acide vésvianique 	<i>S. alpinum</i> [238] <i>S. vesuvianum</i> var. <i>pulvinatum</i> [239]
11	Acide norstictique 	<i>S. meyeri</i> [226] <i>S. argus</i> , <i>S. spathuliferum</i> f. <i>pygmaeum</i> (Huneck, 1972) <i>S. montagneanum</i> Lamb [66]
12	Acide colensoïque 	<i>S. colensoi</i> [231]
13	Acide ménégazziaïque	<i>S. montagneanum</i> Lamb [66]

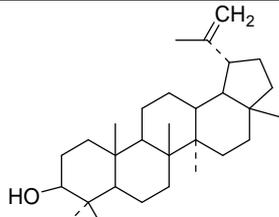
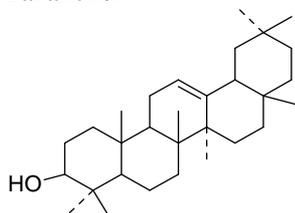
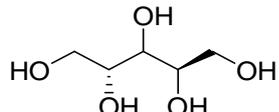
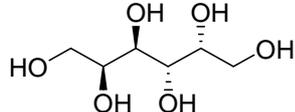
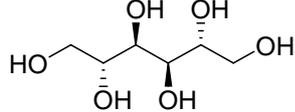
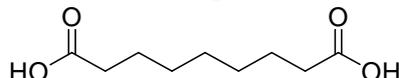
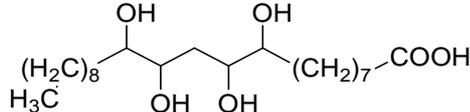
		
14	Acide butyle péristictique 	<i>S. montagneanum</i> Lamb [66]
15	Acide lobarique 	<i>S. alpinum</i> [60], <i>S. subcorraloides</i> (Huneck, 1974), <i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992), <i>S. halei</i> Lamb [165], <i>S. sasakii</i> [166], <i>S. implexum</i> , <i>S. sterile</i> (Huneck, 1972), <i>S. antarcticum</i> (Huneck & Follmann, 1966), <i>S. exutum</i> [233], <i>S. glabrum</i> (Huneck, Sainsbury, Rickard, & Smith, 1984)
Dibenzofuranes		
16	Strepsiline 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992)
17	Acide porphyrique 	<i>S. strictum</i> , <i>S. structum</i> var <i>compressum</i> (Huneck, 1974)
18	Acide hypostrepsilalique 	<i>S. japonicum</i> (culture de spore) [241]
Diphényléthers		
19	Sakisacaulon A 	<i>S. sasakii</i> [166]
20	Pseudodepsidone 1	<i>S. azureum</i> [167]

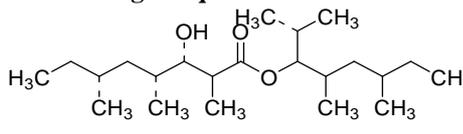
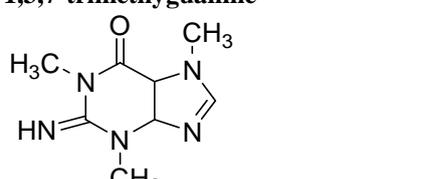
21	Pseudodepsidone 2 	<i>S. alpinum</i> [60], <i>S. azureum</i> [167]
22	Pseudodepsidone 3 	<i>S. alpinum</i> [60], <i>S. azureum</i> [167], <i>S. alpinum</i> [178]
23	Pseudodepsidone 4 	<i>S. azureum</i> [167]
24	Pseudodepsidone 5 	<i>S. azureum</i> [167]
25	Pseudodepsidone 6 	<i>S. azureum</i> [167]
26	Pseudodepsidone 7	<i>S. azureum</i> [167]

27	Pseudodepsidone 8 	<i>S. azureum</i> [167]
28	Pseudodepsidone 9 	<i>S. azureum</i> [167]
29	Pseudodepsidone 10 	<i>S. azureum</i> [167]
30	Lobastine 	<i>S. alpinum</i> [178]
31	Lobarine 	<i>S. halei</i> Lamb [165]
Composés monoaromatiques		
32	Haematommate d'éthyle 	<i>S. pomiferum</i> [242] <i>S. paschale</i> [243]
33	Orsellinate de méthyle 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992) <i>S. alpinum</i> [60]

		
34	Atranol 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992) <i>S. vesuvianum</i> [244]
35	4,6-dihydroxy,2-méthoxy-3-méthylacétophénone 	<i>S. vesuvianum</i> [224] <i>S. alpinum</i> [245]
36	β-orsinol carboxylate de méthyle 	<i>S. ramulosum</i> [68] <i>S. curtatum</i> [236] <i>S. vesuvianum</i> [244] <i>S. halei</i> Lamb [165] <i>S. montagneanum</i> Lamb [66]
37	Haematommate de méthyle 	<i>S. alpinum</i> [60] <i>S. halei</i> Lamb [165] <i>S. montagneanum</i> Lamb [66]
Anthraquinones		
38	Pariétine 	<i>S. graminosum</i> [235] <i>S. corticulatum</i> var. <i>procerum</i> [246]
Stéroïdes		
39	Peroxyde d'ergostérol 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992)
40	Lichestérol 	<i>S. tomentosum</i> [238]
41	Cérévistérol 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992)
42	Brassicatérol 	<i>S. azureum</i> (Gonzalez, 1992) <i>S. tomentosum</i> [247]

		
43	Dihydro-ergostérol 	<i>S. tomentosum</i> [238]
44	Stigmastérol 	<i>S. tomentosum</i> [238]
45	Ergostérol 	<i>S. tomentosum</i> [238]
46	β-sitostérol 	<i>S. antarcticum</i> (Huneck & Follmann, 1966)
Triterpénoïdes		
47	α-amyrine 	<i>S. tomentosum</i> [238] <i>S. azureum</i> [164]
48	Lupéol	<i>S. tomentosum</i> [238] <i>S. azureum</i> [164]

		
49	Taraxénol 	<i>S. azureum</i> [164]
Composés aliphatiques		
Caroténoïdes		
50-59	<i>β</i>-Carotène, , lycoxanthine, canthaxanthine, lutéine, époxyde de lutéine, zéaxanthine, adonixanthine, astaxanthine, mutatochrome, mutatoxanthine	<i>S. alpinum</i> [248]
Autres		
60	D-arabitol 	<i>S. corticulatum</i> var. <i>procerum</i> [246] <i>S. myriocarpum</i> car. <i>orizabae</i> , <i>S. foliosum</i> [235]
61	Galactitol 	<i>S. ramulosum</i> [68]
62	Mannitol 	<i>S. colensoi</i> [231] <i>S. montagneanum</i> [66]
Polysaccharides		
63-64	Galactomannane B Heteroglycane	<i>S. ramulosum</i> [249,250] <i>S. paschale</i> [251,252] <i>S. species</i> [253] <i>S. japonicum</i> [254,255]
Acides gras		
65-69	Acides gras saturés et insaturés C16:0, C18:0, C18:1 , C18:2, C18:3	<i>S. colensoi</i> [231] <i>S. vasuvianum</i> [238]
70	Acide gras 2-hydroxyle 2-OH-C24:0	<i>S. tomentosum</i> [238]
71	Acide dicarboxylique 	<i>S. tomentosum</i> [238]
72	Acide ventosique 	<i>S. myriocarpum</i> [235]

73	Acide bourgeanique 	<i>S. tomentosum</i> (Bruun, 1973)
74	1,3,7-triméthylguanine 	<i>S. ramulosum</i> [68]

Annexe 2 : Bibliographie de la composition en acides gras principaux chez les lichens (% des acides gras totaux)

Les contenus en AG totaux publiés pour chaque lichen ont été rapportés dans un tableur excel qu'il n'a pas été possible de rajouter dans ce document. Nous avons donc choisi de sélectionner les AG totaux les plus importants pour toutes les espèces de lichens décrits dans la littérature.

No	Espèces	C16:0	C18:0	iso et antéiso	saturés	C18:1 n-9	C18:2 n-6	C18:3 n-3	C16:4 n-3	C18:4 n-3	insaturés
1	<i>Acarospora gobiensis</i> [119]	4,5	2,17	3,27	18,16	9,67	9,12	7,25	1,05	5,87	80,85
2	<i>Sarcogyne pruinoso</i> [117]	17,6	2,2	-	21,3	47,8	28,4	-	-	-	78,4
3	<i>Cladina arbuscula</i> [110]	26,5	13,1	0,6	59,5	-	3,5	-	-	-	40,6
4	<i>Cladonia mitis</i> [116]	13,1	3,3	-	17,2	29,6	41,7	7,1	-	-	82,9
5	<i>Cladonia rangiferina</i> [117]	35,2	10,6	3,3	61,9	-	8,3	-	-	-	38,1
6	<i>Cladonia rangiferina</i> [120]	33,3	19	-	75,7	21,2	3	-	-	-	24,2
7	<i>Cladonia rangiferina</i> [116]	8,9	2,9	-	12	-	59,8	4,8	-	-	87,3
8	<i>Cladonia furcata</i> [119]	6,82	5,47	2,18	18,76	11,4	10,32	9,46	2,25	1,43	80,16
9	<i>Cladonia furcata</i> [120]	43,5	39,8	-	92,9	7,2	-	-	-	-	7,2
10	<i>Cladonia clathrata</i> [120]	23,3	45	-	79,8	16,5	2,4	-	-	-	20,3
11	<i>Cladonia connexa</i> [120]	50,6	30,1	-	91,6	4,8	3,5	-	-	-	9,2
12	<i>Cladonia crispatula</i> [120]	46,1	19,1	-	76,7	20,8	-	-	-	-	23
13	<i>Cladonia ibitipocae</i> [120]	43,8	26,6	-	85,9	14	-	-	-	-	14
14	<i>Cladonia imperialis</i> [120]	31,8	29,4	-	82,6	16,9	-	-	-	-	16,9
15	<i>Cladonia miniata</i> [120]	31,6	19,6	-	99,9	-	-	-	-	-	-
16	<i>Cladonia penicillata</i> [120]	42,5	45,4	-	99	0,9	-	-	-	-	0,9
17	<i>Cladonia salmonea</i> [120]	40,7	26,2	-	77,7	22,3	-	-	-	-	22,3
18	<i>Cladonia signata</i> [120]	43,6	37,5	-	91,7	8,3	-	-	-	-	8,3
19	<i>Cladonia substella</i> [120]	15,3	23,2	-	49	-	-	-	-	-	-
20	<i>Cladia aggregata</i> [120]	28,4	15,5	-	56,1	10,3	33,5	-	-	-	43,8
21	<i>Leptogium saturninum</i> [119]	6,1	2,03	2,89	20,09	7,41	7,25	4,66	2,37	3,17	79,91
22	<i>Leptogium phyllocarpum</i> [120]	15,2	21	-	99,9	-	-	-	-	-	-
23	<i>Collema cristatum</i> [80]	34,1	4	6,9	56,8	11	4,8	17,5	-	-	43,1
24	<i>Collema callopismum</i> [80]	38,3	2,5	7,8	58,9	11,4	4,2	16,6	-	-	40,6
25	<i>Collema flaccidum</i> [80]	6,9	1,3	2,2	13,6	6,4	9,1	33,3	4,3	4,2	86,4
26	<i>Collema fuscovirens</i> [80]	6	1,9	2,4	13	5,8	10,3	30,7	5,1	4,7	87
27	<i>Aspicillia transbaicalica</i> [123]	6,5	0,81	3,03	14,8	5,69	6,7	14,43	3,25	6,4	85,2
28	<i>Lecanora fructulosa</i> [119]	6,61	5,32	2,35	21,61	5,83	7,65	5,55	3,07	1,41	78,39
29	<i>Lobaria pulmonaria</i> [101]	9,1	4,4	-	13,5	7,3	52,7	4,7	-	-	64,7
30	<i>Evernia mesomorpha</i> [123]	3,25	2,95	1,5	10,63	3,15	6,51	13,76	3,15	4,89	89,29
31	<i>Evernia prunastri</i> [123]	4,82	11,24	4,22	26,79	6,65	7,8	21,32	1,49	2,52	73,2

32	<i>Evernia prunastri</i> [125]	6,2	3	-	9,7	8,6	17,8	57	-	-	86
33	<i>Pseudevernia furfuracea</i> [110]	22	16,3	3,7	73,7	13	5,2	3,1	-	-	26,3
34	<i>Pseudevernia furfuracea</i> [125]	15,6	4	-	19,9	18,8	32,9	14,5	-	-	70,7
35	<i>Cetraria pseudocomplicata</i> [116]	10,6	1,7	-	12,8	24,3	50,1	7,6	-	-	87,2
36	<i>Cetraria delisei</i> [101]	10,3	4,5	-	14,8	22,5	39,7	4,1	-	-	66,3
37	<i>Cetraria islandica</i> [120]	67,6	17,7	-	100,0	-	-	-	-	-	
38	<i>Cetraria chlorophylla</i> [125]	6,4	1,9	-	8,3	11,9	16,5	7,6	-	-	37,2
39	<i>Usnea hirta</i> [101]	8,1	3,6	-	11,7	11,6	49,8	6,7	-	-	68,1
40	<i>Usnea hirta</i> [125]	11,3	3,4	-	14,7	15,5	35,2	13	-	-	66,6
41	<i>Usnea diffracta</i> [116]	6	2	-	52,9	8	21	4,9	-	-	33,9
42	<i>Parmelia comtschadalis</i> [119]	7,25	1,82	2,68	21,61	4,98	7,52	9,31	1,98	5,1	76,23
43	<i>Parmelia tinctoria</i> [119]	8,3	2,37	2,67	22,96	4,25	6,11	7,78	2,14	5,93	77,07
44	<i>Parmelia stenophylla</i> [122]	5,28	3,65	2,9	17,14	6,03	8,04	7,29	2,64	6,15	82,86
45	<i>Parmelia stenophylla</i> [110]	38,1	14,9	-	62,5	25,9	9	-	-	-	37,6
46	<i>Parmelia scorteae</i> [122]	6,99	1,16	4,81	17,35	12,22	6,06	14,39	1	3,49	82,65
47	<i>Parmelia scorteae</i> [110]	37,9	18,3	-	56,2	29,9	10	-	-	-	43,8
48	<i>Parmelia sulcata</i> [122]	3,06	2,11	3,91	12,35	19,36	4,11	3,9	3,27	5,79	87,65
49	<i>Parmelia sulcata</i> [110]	35,9	6,8	1,5	78,6	13,1	8,3	-	-	-	21,4
50	<i>Parmelia sulcata</i> [125]	12,5	4,8	-	19	16,2	30,5	7,4	-	-	61,6
51	<i>Parmelia acetabulum</i> [125]	10,2	2,4	-	12,9	12,6	43	17,3	-	-	75
52	<i>Parmelia saxatilis</i> [125]	13,3	5,5	-	19,3	17,7	40	7,6	-	-	70,3
53	<i>Parmelia subrudecta</i> [125]	14,5	5,8	-	21,1	5,4	37,1	12,6	-	-	62,2
54	<i>Parmotrema delicatum</i> [120]	35,3	30,2	-	65,5	34,5	-	-	-	-	34,5
55	<i>Parmotrema mantiqueirense</i> [120]	19,3	44,7	-	99,9	-	-	-	-	-	0
56	<i>Parmotrema shindler</i> [120]	18,1	16,5	-	42,2	12,8	-	44,9	-	-	57,7
57	<i>Hypogymnia physodes</i> [125]	12,9	6,2	-	19,6	22,6	41,8	6,4	-	-	74,3
58	<i>Nephroma arcticum</i> [116]	9,2	1,7	-	11,6	11,5	29,1	16,9	-	-	61,9
59	<i>Peltigera spuria</i> [112]	9,15	7,85	5,34	40,77	15,04	0,98	2,29	-	0,22	59,23
60	<i>Peltigera aptosa</i> [112]	6,22	1,97	4,55	18,66	3,19	7,28	9,26	2,28	0,61	81,34
61	<i>Peltigera canina</i> [119]	6,06	3,85	2,8	20,88	14,3	6,25	6,22	1,28	2,6	78,26
62	<i>Anaptychia ciliaris</i> [112]	4,82	6,19	1,39	19,77	7,03	6,57	14,08	0,61	2,83	80,23
63	<i>Rinodina bischoffii-a</i> [117]	14,3	4,3	-	20,8	56,3	20,6	-	-	-	78,9
64	<i>Rinodina bischoffii-b</i> [117]	18,8	3,4	-	24,5	56,7	15	-	-	-	75,1
65	<i>Protoblastenia metzleri</i> [117]	24,4	6	-	32,8	47,9	15,7	-	-	-	66,9
66	<i>Ramalina yasudae</i> [116]	3,8	1,3	-	5,3	11,6	17,7	20,4	-	-	49,7
67	<i>Ramalina lacera-a</i> [86]	12,94	5,13	2,58	26	6,98	5,94	35,87	3,14	1,85	74
68	<i>Ramalina lacera-b</i> [86]	11,88	4,96	2,39	24,43	7,23	6,16	30,19	2,98	1,7	70,62

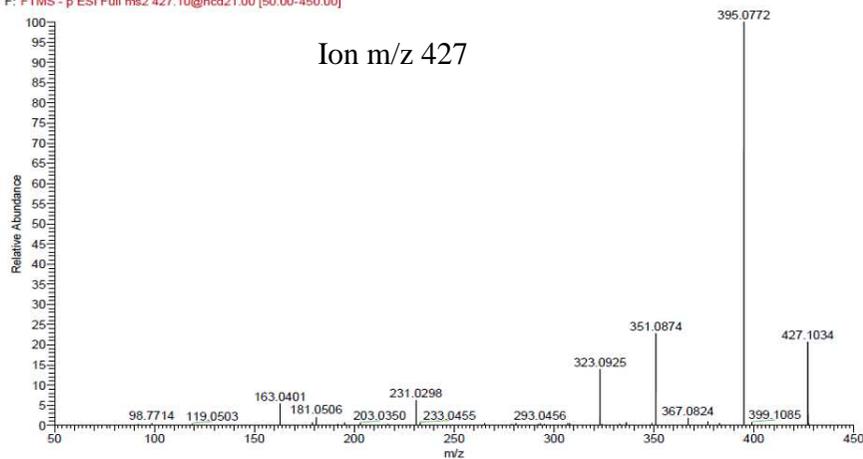
69	<i>Ramalina lacera-c</i> [86]	8,47	3,29	2,14	18,38	8,14	8,57	29,7	3,49	2,98	81,63
70	<i>Ramalina celastri</i> [120]	18,9	7,2	-	27,7	14,7	36,2	19	-	-	72,2
71	<i>Ramalina usnea</i> [120]	65,2	29,1	-	99,9	-	-	-	-	-	-
72	<i>Ramalina farinacea</i> [125]	11,7	4,3	-	16,4	13,5	33,2	16,8	-	-	70,4
73	<i>Ramalina fastigiata</i> [125]	6,7	4,1	-	11,1	12	11,8	57,6	-	-	84,4
74	<i>Ramalina fraxinea</i> [125]	11,9	3,8	-	16,2	24	30,5	12,7	-	-	72,4
75	<i>Opegrapha saxicola</i> [117]	29,8	6	-	39,2	-	13,1	-	-	-	60,4
76	<i>Stereocaulon tomentosum</i> [101]	9,4	5,9	-	15,3	11,8	54,2	6,3	-	-	72,3
77	<i>Xanthoria parietina-a</i> [88]	34,56	12,34	-	51,79	8,31	19,22	3,42	-	-	35,79
78	<i>Xanthoria parietina-b</i> [88]	39,97	11,34	-	55,76	9,14	18,45	1,95	-	-	35,03
79	<i>Xanthoria parietina-c</i> [88]	41,39	9,76	-	56,78	8,31	10,48	9,81	-	-	35,89
80	<i>Xanthoria parietina-d</i> [88]	44,89	6,87	-	55,05	7,94	13,21	14,22	-	-	40,76
81	<i>Xanthoria parietina</i> [125]	16,2	1,9	-	18,8	16,9	40,8	11,7	-	-	75,7
82	<i>Teloschistes flavicans-a</i> [71]	56,4	27,6	-	95,7	-	-	-	-	-	3,9
83	<i>Teloschistes flavicans-b</i> [71]	36,4	2,4	-	39,8	12,5	39,3	-	-	-	52,5
84	<i>Caloplaca lactea</i> [117]	25,4	8,8	-	34,2	44,4	16,6	-	-	-	65,6
85	<i>Caloplaca alociza-a</i> [117]	26,8	8,5	-	44,6	34,8	16	-	-	-	55
86	<i>Caloplaca alociza-b</i> [117]	26	3,5	-	35,4	40,9	11,9	-	-	-	63,7
87	<i>Umbilicaria deusta</i> [112]	6,04	4,09	1,86	14,62	22,91	5,46	4,19	2,05	5,17	85,38

Annexes 3 : Tableau 37: Reproductibilité de la méthode d'extraction à partir de *S. vesuvianum* et *S. scutelligerum* en utilisant la méthode d'extraction 3 (*S. vesu* = *S. vesuvianum* ; *S. scut* = *S. scutelligerum*)

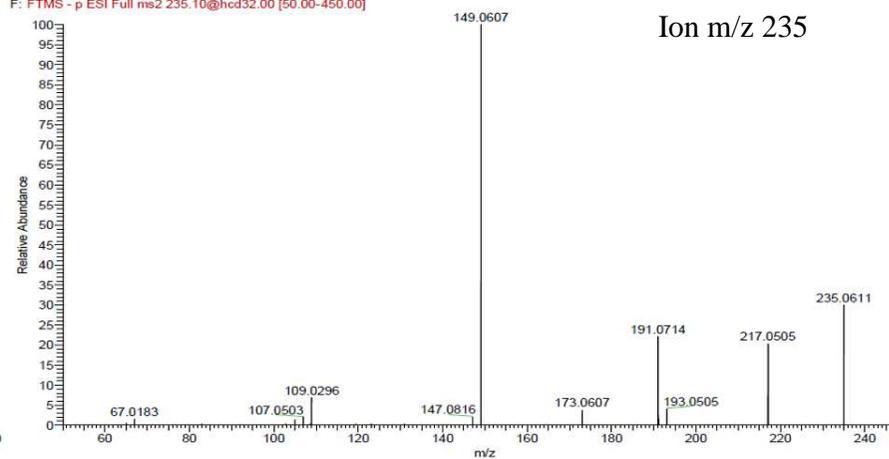
Acide gras	<i>S. vesu.1</i>	<i>S. vesu.2</i>	<i>S. vesu.3</i>	Mean ± Sdt deviation	<i>S. scut.1</i>	<i>S. scut.2</i>	<i>S. scut.3</i>	Mean ± Sdt deviation
C10:0	-	-	-	-	1.08	0.97	0.95	1.00
C12:0	0.21	0.20	0.22	0.21	0.16	0.21	0.11	0.16
C14:0	0.68	0.68	0.71	0.69	0.50	0.55	0.49	0.51
C15:0	0.14	0.17	0.18	0.16	0.22	0.29	0.20	0.24
C16:0	17.70	17.94	18.19	17.94	17.95	16.99	17.16	17.37
C17:0	0.88	0.89	0.90	0.89	1.21	1.19	1.22	1.21
C18:0	12.36	12.43	12.69	12.49	12.12	11.24	11.10	11.49
C20:0	1.10	1.56	1.13	1.27	0.59	0.57	0.58	0.58
C22:0	0.13	0.10	0.13	0.12	0.47	0.46	0.50	0.48
C24:0	0.12	0.14	0.13	0.13	-	-	-	-
Saturés	33.32	34.12	34.28	33.91 ± 0.52	34.32	32.48	32.30	33.03±1.11
iC12:0	0.18	0.18	0.18	0.18	0.15	0.12	0.13	0.13
iC13:0	0.08	0.12	0.09	0.10	0.08	0.10	0.11	0.10
iC14:0	0.11	0.16	0.14	0.13	-	-	-	-
iC15:0	0.26	0.26	0.26	0.26	0.15	0.15	0.17	0.16
iC16:0	0.12	0.11	0.11	0.11	0.07	0.07	0.07	0.07
iC17:0	0.07	0.07	0.08	0.07	0.14	0.13	0.09	0.12
iC18:0	-	-	-	-	0.29	0.29	0.28	0.29
iC20:0	0.08	0.11	-	0.06	0.18	0.18	0.18	0.18
aiC12:0	0.15	0.15	0.15	0.15	-	-	-	-
ai-C14:0	-	-	-	-	0.25	0.30	0.29	0.28
aiC15:0	0.37	0.33	0.30	0.33	0.09	0.10	0.09	0.10
ai-C16:0	0.83	0.62	0.81	0.75	1.00	1.17	1.06	1.08
aiC17:0	3.42	3.64	3.50	3.52	-	0.04	-	0.01
aiC18:0	0.31	0.31	0.30	0.31	1.01	0.91	0.90	0.94
iso	0.89	1.01	0.87	0.92±0.08	1.06	1.04	1.03	1.04 ± 0.01
anteiso	5.08	5.05	5.07	5.07±0.02	2.35	2.52	2.34	2.41 ± 0.10
ramifiés	5.98	6.06	5.93	5.99±0.07	3.41	3.56	3.37	3.45 ± 0.10
C14:1n-5	0.27	0.15	0.16	0.20	-	-	-	-
C16:1n-9	0.58	0.62	0.61	0.60	0.23	0.25	0.12	0.20
C16:1n-7	1.13	1.11	1.09	1.11	0.78	0.77	0.70	0.75
C18:1n-9	29.02	28.44	28.53	28.66	15.65	15.84	16.02	15.84
C18:1n-7	2.96	2.94	2.93	2.94	2.00	2.17	2.17	2.11
C20:1 n-9	0.31	0.96	0.63	0.63	0.63	0.65	0.66	0.65
C22:1 n-9	0.16	0.18	0.20	0.18	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-
monoènes	34.43	34.41	34.16	34.33±0.15	19.30	19.67	19.67	19.55±0.21
C18:2n-6	18.35	17.66	17.87	17.96	37.82	38.48	38.91	38.40
C18:3n-6	0.22	0.29	0.28	0.26	0.27	0.28	0.25	0.27
C20:3 n-6	-	-	-	-	0.32	0.20	0.31	0.27
C20:4 n-6	0.10	0.07	-	0.06	-	-	-	-
C22:4 n-6	0.18	0.23	0.22	0.21	-	-	-	-
C22:5 n-6	0.15	0.14	0.11	0.13	-	-	-	-
C16:3 n-3	-	-	-	-	0.12	0.69	0.23	0.35
C18:3n-3	4.47	4.37	4.50	4.45	4.16	4.21	4.49	4.29
C18:4 n-3	0.87	0.84	0.84	0.85	-	-	-	-
C20:3 n-3	0.97	0.97	1.01	0.98	-	0.13	0.20	0.11
C20:5 n-3	0.80	0.67	0.68	0.72	0.12	0.09	0.12	0.11
C22:5 n-3	0.09	0.06	-	0.05	-	0.05	-	0.02
C22:6 n-3	0.08	0.12	0.11	0.10	0.18	0.16	0.15	0.16
insaturés	60.71	59.81	59.78	60.10±0.53	62.28	63.95	64.33	63.52 ± 1.09
Teneur en AG (mg/g MS)	0.79	0.82	0.83	0.82 ± 0.02	0.77	0.79	0.74	0.77 ± 0.03

Annexe 4 : Spectre MS² des ions présents dans le composé Se10 dégradé

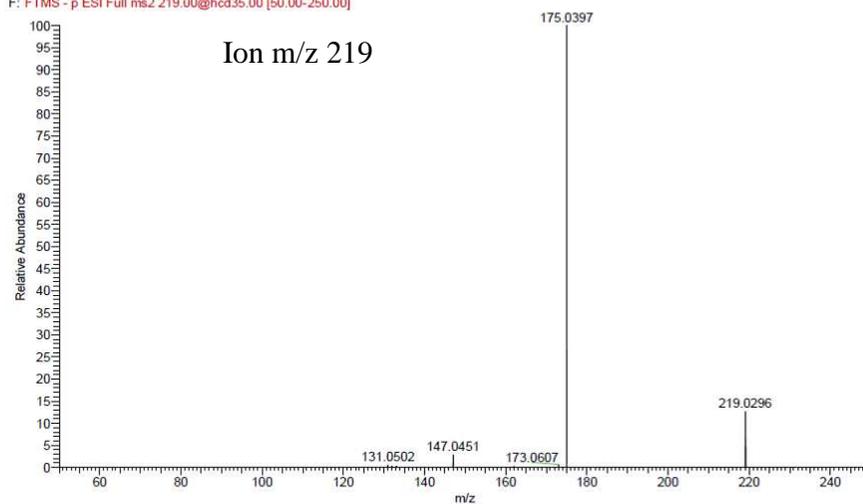
ESI 2347 MSMS 01 #1-57 RT: 0.01-0.52 AV: 56 NL: 1.01E6
 F: FTMS - p ESI Full ms2 427.10@hcd21.00 [50.00-450.00]



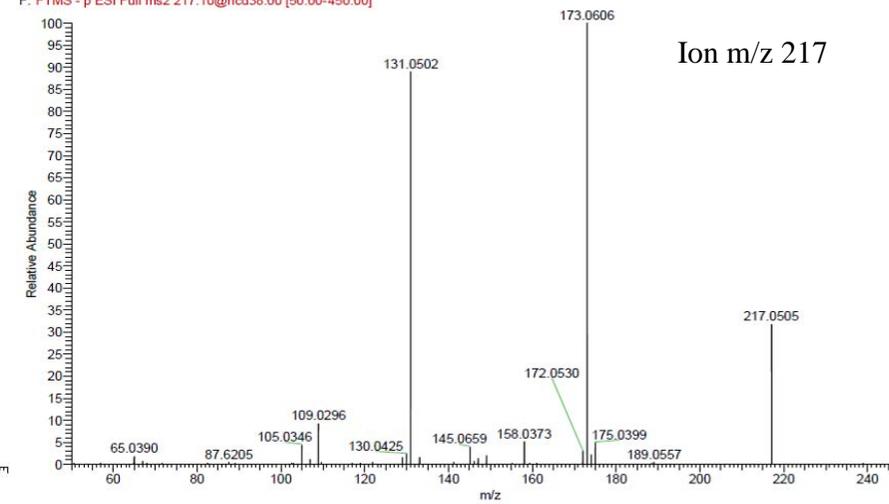
ESI 2347 MSMS 01 #112-165 RT: 1.82-2.31 AV: 54 NL: 1.21E7
 F: FTMS - p ESI Full ms2 235.10@hcd32.00 [50.00-450.00]



ESI 2347 MSMS 02 #1-225 RT: 0.01-2.01 AV: 225 NL: 1.09E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 219.00@hcd35.00 [50.00-250.00]

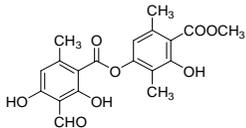
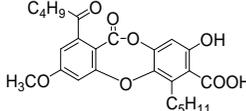


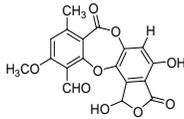
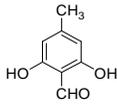
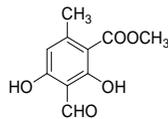
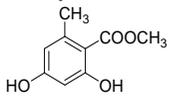
ESI 2347 MSMS 01 #165-220 RT: 2.87-3.35 AV: 55 NL: 1.38E8
 F: FTMS - p ESI Full ms2 217.10@hcd38.00 [50.00-450.00]

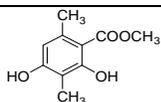


Annexe 5 : Récapitulatif de l'activité cytotoxique des composés lichéniques

Tableau 38: Activité cytotoxique des composés lichéniques

No	Compounds	Source	Cells and cytotoxic effect	Test	References
Depsides					
1	<p>Atranorin</p> 	Lichen	Murine melanoma (B16-F10) : >250 µg/ml (>668 µM) Human melanoma cells (UACC-62) : >250 µg/ml (>668 µM) Fibroblasts (NIH/3T3) : >250 µg/ml (>668 µM)	Sulforhodamine B	[257]
		Lichen	IC ₅₀ (µM) Human ovarian carcinoma (A2780) : 198 Human breast adenocarcinoma (MCF-7): >200 Human colon adenocarcinoma (HT-29): >200 Human promyelocytic leukaemia (HL-60) : 93.5 Human T cells lymphocyte leukaemia (Jurkat) : 181.6 Human cervix adenocarcinoma (HeLa) : >200 Human breast carcinoma (HCT-116) : >200	MTT	[181,258]
		Lichen	HaCaT cells : non toxic	LDH	[259]
		Plante (Kigelia africana)	Monkey kidney epithelial cells (LLC-MK2) : 28 µg/ml (74.8 µM)	LDH	[260]
		Lichen	IC ₅₀ (8 heures) = 111 µg/ml (296.5 µM) IC ₅₀ (24 heures) = 82 µg/ml (219 µM)	LDH intracellulaire	[261]
		Lichen	Cell fibroblast (L929) = IC ₅₀ > 0.16 mg/ml (427 µM)	MTT	[262]
		Lichen	Human monoblastic leukemia cell line IC ₅₀ (U937)/ Human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) IC ₅₀ >100 µM / 83.4 µM	MTT	[263]
		Lichen	IC ₅₀ > 1000 µg/ml	Brine shrimp lethality test <i>Artemisia salina</i>	[264]
Depsidones					
2	<p>Lobaric acid</p> 	Lichen		Brine shrimp lethality test <i>Artemisia salina</i>	[264]
		Lichen	IC ₅₀ (8 heures) > 100 µg/ml (219.3 µM) IC ₅₀ (24 heures) = 43 µg/ml (94.5 µM)	LDH intracellulaire	[261]
		Lichen	Incorporation de la thymidine* (ED50) 44.7 µg/ml (98 µM)	MTT	[47]
		Lichen	Incorporation de la thymidine* (10µg/ml)		[265]

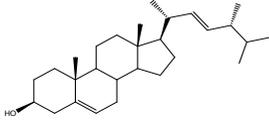
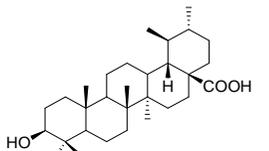
			5.77 µg/ml (12.5 µM) (témoin positif: colchine = 35)		
		Lichen	IC ₅₀ (MCF-7) = 93.2 µM IC ₅₀ (HeLa) = 78 µM IC ₅₀ (HCT-116) > 100 µM IC ₅₀ (NIH-3T3) > 100 µM	MTT	[266]
3	Stictic acid 	Lichen	IC ₅₀ (8 heures) = 88 µg/ml (228 µM) IC ₅₀ (24 heures) = 5 µg/ml (13 µM)	LDH intracellulaire	[261]
		Lichen	Incorporation de la thymidine* (10µg/ml) 5.77 µg/ml (12.5 µM) (témoin positif: colchine = 35)		[265]
Monoaromatic phenols					
4	Atranol 	Lichen	Human monoblastic leukemia cell line IC ₅₀ (U937)/ Human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) IC ₅₀ = 37.6 µM / >100 µM	MTT	[263]
		Lichen	Murine keratinocyte cell (PAM2.12) > 0.6 mM (3.9 µM)	MTT	[267]
	Methyl haematommate 	Lichen	Human monoblastic leukemia cell line IC ₅₀ (U937)/ Human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) IC ₅₀ = 26.2 µM / 39.8 µM	MTT	[263]
6	Methyl orsellinate 	lichen	IC ₅₀ > 1000 µg/ml except	Test de la crevette – brine shrimp <i>Artemisia salina</i>	[264]
		Lichen	Human monoblastic leukemia cell line IC ₅₀ (U937)/ Human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) IC ₅₀ = 37.6 µM / >100 µM IC ₅₀ = 26.2 µM / 39.8 µM IC ₅₀ = ND / ND IC ₅₀ > 100 µM / 83.4 µM	MTT	[263]
		Lichen compound Compounds synthesis	LC ₅₀ (µM) = 1100 µM	Brine shrimp lethality test <i>Artemisia salina</i>	[268]
		Synthesis	Larynx carcinoma (HEp-2), breast carcinoma (MCF7), kidney carcinoma (786-0), murine melanoma (B16-F10) IC ₅₀ > 50 µg/mL (274.7 µM)	Sulforhodamine B (SRB)	[269]
		Lichen	IC ₅₀ = 50 µg/ml (278 µM) sur L-929, K-562, HeLa		[270]
	Methyl β- orcinolcarboxylate	Lichen	HaCaT cells : non toxic	LDH	[259]
		Lichen	IC ₅₀ = 17.07 µg/ml (87.1 µM)	Test de la crevette –	[264]



brine shrimp
Artemisia salina

Terpenoids

8	<p>Ergosterol peroxide</p>	Fungi (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	IC ₅₀ / HeLa = 3.07 mg/ml (7.2 μM) Murine macrophages J774A.1 : no toxicity until 30 μg/ml (70.1 μM)	Sulphorhodamine B	[271]
		Fungi (<i>Phellinus linteus</i>)	Human colorecta cancer cell line CaCo2, wiDr, DLD-1, Colo-320 : >25 μg/ml (> 58.4 μM)	WST-1	[272]
		Mycosed insect (<i>Nomuraea rileyi</i>)	IC ₅₀ Human T4 lymphocytic cell line (1A2) = 150.8 μg/ml (352.3 μM) Hormone-dependant breast cancer cell line (T47D) = 2.5 μg/ml (5.8 μM) MDA-MB-231 (id. T47D) : 12 μg/ml (28 μM) Human epidermoid carcinoma in mouth cell line (KB) = 20 μg/ml (46.7 μM) Human cervical carcinoma cell line (HeLa) : 25 μg/ml (58.4 μM) Lung cancer cell line, MDR (H69AR) : 28 μg/ml (65.4 μM) Human cholangiocarcinoma cell line (HuCCA-1) : 45 μg/ml (105.1 μM)	MTT	[182]
		Lichen compound	IC ₅₀ Human prostate cancer androgen-responsive LNCaP : 24.03 μM Human prostate cancer androgen-non-responsive DU145 : 13.6 μM Normal human non-immortalized buccal fibroblast cells (BFC) : non toxic at 100 μM Effet apoptotique sur les cellules cancéreuses	MTT	[273,274]
		Fungi (<i>Ganoderma lucidum</i>)	Human hepatoma cell line (Hep 3B) = 19.4 μg/ml (45.3 μM) – IC ₅₀	MTT	[275]
		Fungi (<i>Inonotus obliquus</i>)	IC ₅₀ Human prostatic carcinoma cell (PC3) = 38.13 μM IC ₅₀ Breast carcinoma (MDA-MB-231) = 30.23 μM	Resazurin reduction test	
		Fungi (<i>Gomphus clavatus</i>)	Human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) = 15.3 μg/ml (35.8 μM) Human prostate cancer cells (PPC-3) = 13.1 μg/ml (30.6 μM)	MTT	[276]
		Fungi (<i>Guignardia sp.</i>)	KB cells (IC ₅₀ = 20 μg/ml – 46 μM)	MTT	[277]

		Fungi (<i>Hygrophorus russula</i>)	IC ₅₀ Human lung (A549) = 10.2 µg/ml (28.8 µM) IC ₅₀ Human skin (XF498) = 11.4 µg/ml (26.6 µM)	MTT	[278]
		Fungi (<i>Ganoderma lucidum</i>)	IC ₅₀ HL60 > 100 µg/ml (233.6 µM) IC ₅₀ MCF-7 > 100 µg/ml (233.6 µM) IC ₅₀ LLC > 100 µg/ml (233.6 µM)	MTT	[279]
		Fungi (<i>Penicillium oxalicum</i>)	IC ₅₀ Human Colon carcinoma (COLO-205)=8.56 µg/ml (20 µM) No toxicity on human oral epithelium carcinoma (KB), hepatoma (Hepa-3B), cervical carcinoma (Hela) (EC ₅₀ > 20 µg/ml = 46.7 µM) Inhibiteur de topoisomérase I (100 ng/ml) compared with camptothecin (20 ng/ml)	MTT	[280]
9	Brassicasterol 	Plant	T-lymphoblastic leukaemia (CEM) > 50 µM Multiple myeloma (RPMI 8226) > 50 µM Malignant melanoma (G361) > 50 µM Human foreskin fibroblasts (h-TERT BJ) > 50 µM	Calcein AM solution (fluorescence des cellules viable)	[281]
10	Ursolic acid 	Plant (<i>Saurauja roxburghii</i>)	human epidermoid carcinoma (A431) = no toxicity rat glioma (C6) = 10-100 µM	Vacuolar degeneration and necrosis	[183]
			Review		[184]
			Review		[185]

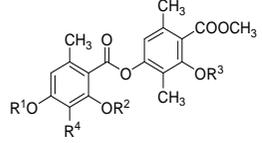
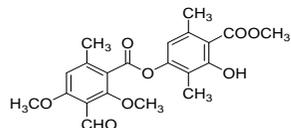
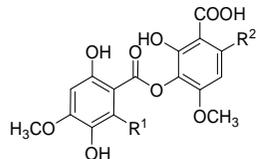
Annexe 6 : Récapitulatif de l'activité antivirale des extraits lichéniques

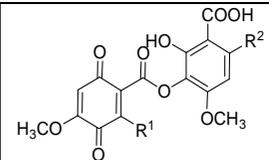
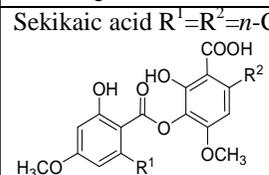
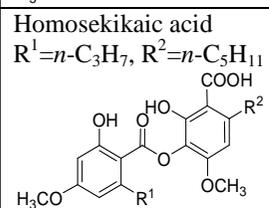
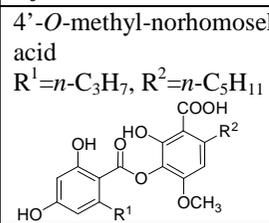
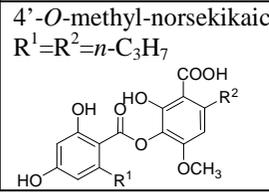
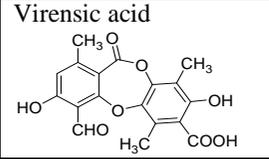
Tableau 39: Activité cytotoxique des extraits lichéniques

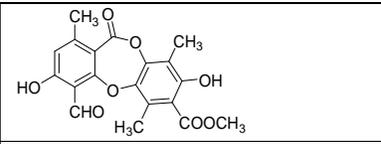
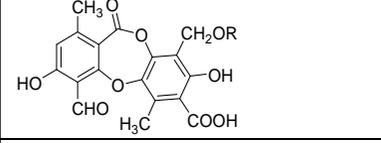
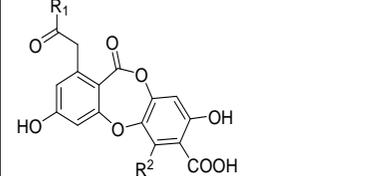
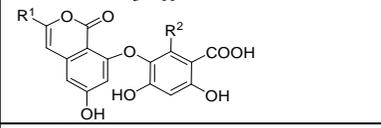
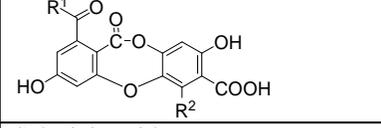
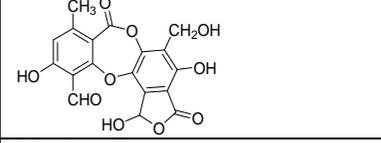
Extracts	Compounds	Virus	Antiviral activities	Virus family	References
<i>Ramalina farinacea</i> (ethylacetate extract)	Usnic acid Protocetraric acid	HIV-1 (Human <i>Immunodeficiency</i> <i>Virus</i>)	IC ₅₀ = 0.02 µg/ml	Retroviridae RNA / enveloped	[282]
<i>Ramalina farinacea</i> (ethylacetate extract)	Usnic acid Protocetraric acid	HSV-1 (<i>Herpes</i> <i>Simplex Virus</i>)	IC ₅₀ = 6.09 µg/ml	Herpesviridae DNA / enveloped	[282]
<i>Ramalina farinacea</i> (ethylacetate extract)	Usnic acid Protocetraric acid	VRS (<i>Respiratory</i> <i>Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 3.65 µg/ml	Paramyxoviridae RNA (-) / enveloped	[282]
<i>Parmelia perlata</i> (aqueous alkaline extract)	polysaccharides	Poliovirus	IC ₅₀ = 150 µg/ml	Picornaviridae RNA(+) / naked	[29]
<i>Parmelia perlata</i> (aqueous alkaline extract)	polysaccharides	Yellow fever virus	IC ₅₀ = 15 µg/ml	Flaviviridae RNA(+) / enveloped	[29]
<i>Parmelia perlata</i> (aqueous alkaline extract)	polysaccharides	IBDV (Virus Gumboro - Infectious bursal disease)	IC ₅₀ > 10000 µg/ml	Birnaviridae RNA double strand / naked	[29]
21 species The most active were <i>Xanthoria</i> <i>parietina</i> (aqueous) and <i>Xanthoparmelia tinctoria</i> (ethanolic)	Emodin, Parietin, Atranorin, Salazinic acid, Usnic acid	HPIV-2 (<i>Human</i> <i>parainfluenza Virus</i> type 2 – <i>Rubulavirus</i>)	Aq EC ₅₀ xp = 10 µg/ml EtOH EC ₅₀ xt = 20 µg/ml	Paramyxoviridae ARN(-)/enveloped	[30]

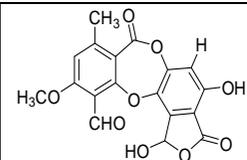
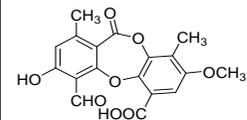
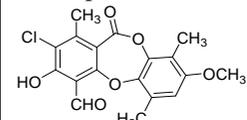
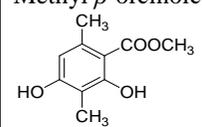
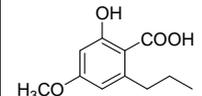
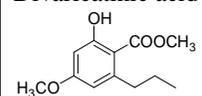
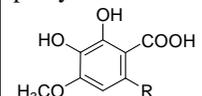
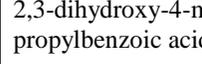
Annexe 7 : Récapitulatif de l'activité antivirale des composés lichéniques

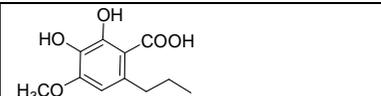
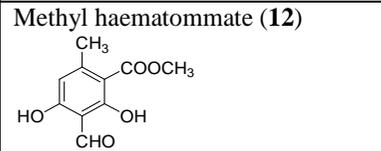
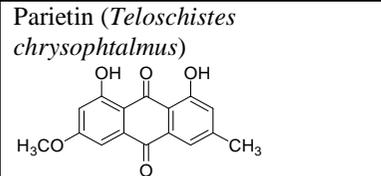
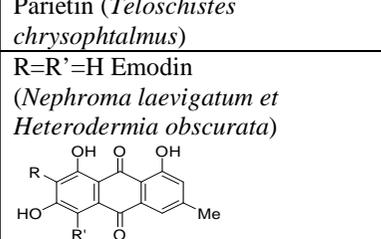
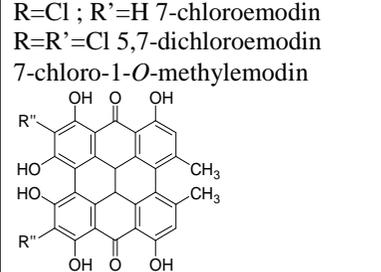
Tableau 40: Activité cytotoxique des composés lichéniques

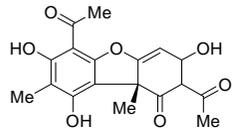
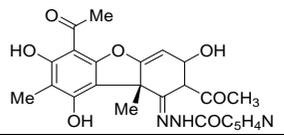
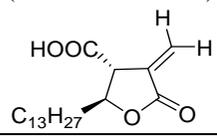
No	Compounds	Virus	Antiviral activities	Virus family	References
Depsides					
1	<p>Atranorin $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=CHO$</p> 	HIV-1	In silico : HIV integrase inactive	Retroviridae ARN / enveloped	[36]
		HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	inhibition	Herpesvirus ADN, enveloped	[283]
		Poliovirus	inhibition	Picornaviridae ARN(+) / nu	[283]
2	<p>atranorin acetate $R^1=R^2=R^3=COCH_3$</p>	HIV-1	In silico : HIV integrase inactive	Retroviridae ARN / enveloped	[36]
3	<p>Oxim of atranorin $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=CH=NOH$</p>	HIV-1	In silico : HIV integrase inactive	Retroviridae ARN / enveloped	[36]
4	<p>Phenylhydrazone of atranorin $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=CH=NHC_6H_5$</p>	HIV-1	In silico : HIV integrase inactive	Retroviridae ARN / enveloped	[36]
5	<p>DiffRACTAIC acid</p> 	HIV-1	In silico : HIV integrase inactive	Retroviridae ARN / enveloped	[36]
6, 7	<p>5-hydroxysekikaic acid (1) $R = n-C_3H_7$</p>  <p>1,4-benzoquinone of 5-hydroxysekikaic acid (1a) $R^1 = R^2 = n-C_3H_7$</p>	VRS (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	$IC_{50} = 36.48 \mu g/ml$ (mixture of 1:1a (3:1))	Paramyxoviridae RNA (-) / enveloped	[39]

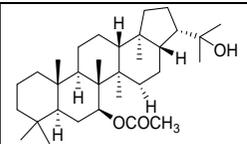
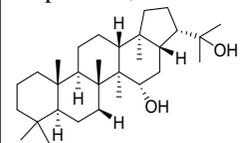
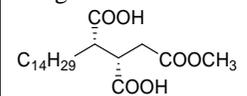
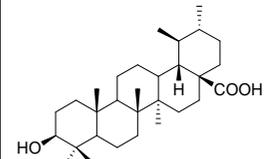
					
8	Sekikaic acid $R^1=R^2=n-C_3H_7$ 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	$IC_{50} = 13.60 \mu M$	Paramyxoviridae RNA (-) / enveloped	[39]
9	Homosekikaic acid $R^1=n-C_3H_7, R^2=n-C_5H_{11}$ 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	$IC_{50} = 50.50 \mu M$	Paramyxoviridae RNA (-) / enveloped	[39]
10	4'- <i>O</i> -methyl-norhomosekikaic acid $R^1=n-C_3H_7, R^2=n-C_5H_{11}$ 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	$IC_{50} = 63.49 \mu M$	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
11	4'- <i>O</i> -methyl-norsekikaic acid $R^1=R^2=n-C_3H_7$ 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	$IC_{50} = 136.25 \mu M$	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
Depsidones and pseudodepsidones					
12	Virensic acid 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 4.6 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
13	Granulatin	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 5.4 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]

					
14	Fumarprotocetraric acid $R=COCH=CHCOOH$ 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 4.9 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
15	Physodic acid $R^1=R^2=n-C_5H_{11}$ 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 52.2 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
16	Isophysodic acid $R^1=R^2=n-C_5H_{11}$ 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 61 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
17	Norlobaric acid $R^1=n-C_4H_9, R^2=n-C_5H_{11}$ 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 59.9 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
18	Salazinic acid 	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 19 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
19	Stictic acid	HIV-1	In silico : HIV integrase $IC_{50} = 4.4 \mu M$	Retroviridae RNA / enveloped	[36]

					
	Stictic acid	Poliovirus	Cytotoxic effect	Picornaviridae RNA(+) / naked	[283]
20	Parellic acid 	HIV-1	In silico : HIV integrase IC ₅₀ = 17 μM	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
21	Chloroparellic acid 	HIV-1	In silico : HIV integrase IC ₅₀ = 2.2 μM	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
Monoaromatic phenols					
22	Methyl β-ornicolcarboxylate 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 114.86 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
23	Divaricatinic acid 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 752.21 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
24	Divaricatinic acid methyl ester 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 178.06 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
25	2,3-dihydroxy-4-methoxy-6-pentylbenzoic acid (8) R=n-C ₅ H ₁₁ 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 71.14 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
26	2,3-dihydroxy-4-methoxy-6-propylbenzoic acid (9) 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 38.41 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]

					
27	Methyl haematommate (12) 	RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 151.31 μM	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
Anthraquinones, Anthrones, bis-Anthraquinones and bis-Anthrones					
28	Parietin (<i>Teloschistes chrysophthalmus</i>) 	Junin virus (Arenavirus JUNV)	Virucidal effect IC ₅₀ = 9.7 μM	Arenavirus RNA (-)/enveloped	[20]
	Parietin (<i>Teloschistes chrysophthalmus</i>)	TRCV (Tacaribe virus)	Virucidal effect IC ₅₀ = 20 μM	Arenavirus RNA (-)/enveloped	[20]
29-41	R=R'=H Emodin (<i>Nephroma laevigatum</i> et <i>Heterodermia obscurata</i>)  R=Cl ; R'=H 7-chloroemodin R=R'=Cl 5,7-dichloroemodin 7-chloro-1-O-methylemodin  R''=H Hypericin R''=Cl 7,7'-Dichlorohypericin 6-O-methylemodin Skyrin Endocrocin Chrysophanol Flavoobscurine A Flavoobscurine B	HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	complete inactivation of virus (μg/ml) 2 (7.4 μM) 2 (6.6 μM) 0.25 (0.82 μM) 2 (3.2 μM) < 0.06 (<0.1 μM) < 0.06 (<0.1 μM) Inactive Inactive Inactive Inactive Inactive Inactive Inactive	Herpesviridae DNA, enveloped	[31]

	7-Chloro-1- <i>O</i> -methyl- ω -hydroxyemodin				
Dibenzofuranes					
42	<p>(+) Usnic acid</p> 	Virus Junin (Arenavirus JUNV)	Effet on replication IC ₅₀ = 9.9 μ M	Arenavirus RNA (-)/enveloped	[20]
		TRCV (Tacaribe virus)	Effet on replication IC ₅₀ = 20.6 μ M	Arenavirus RNA (-)/enveloped	[20]
		HIV-1	In silico : HIV integrase IC ₅₀ = 126.4 μ M	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
		RSV (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)	IC ₅₀ = 71.77 μ M	Paramyxovirus RNA (-) / enveloped	[39]
		HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	Active (++)	Herpesvirus DNA, enveloped	[283]
		Polyomavirus of rat	Totale Inhibition of the replication à 10 μ g/ml (29 μ M)	Polyomaviridae DNA double strand / naked	[284]
43	<i>N</i> -isonicotinoylhydrazone usnic acid	HIV-1	In silico : HIV integrase IC ₅₀ = 73 μ M	Retroviridae RNA / enveloped	[36]
					
Others					
44	(-) Protolichesterinic acid (<i>Cetraria islandica</i>)	HIV1-RT HIV2-RT AMV-RT DNA polymerase RNA polymerase	IC ₅₀ = 24.3 μ M IC ₅₀ = 29.6 μ M IC ₅₀ = 21.9 μ M IC ₅₀ = 7.4 μ M IC ₅₀ = 92.8 μ M		[37]
					
45	Partially acetylated (Polysaccharide GE-3)	HIV	ID ₅₀ = 19.5 μ g/ml	Retroviridae RNA / enveloped	[38]
46	Lichenan (<i>Cetraria islandica</i>)	Mosaïc tobacco virus Virus de la mosaïque du tabac, potato virus Y, tobacco et ch virus, cucumber mosaic virus, potato virus	A 1000 μ g/ml, lichenan inhibits all viruses (putulan from <i>Umbilicaria</i> has no effect)		[285]
47	7b-acetoxypohan-22-ol	HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	Inactive (0)	Herpesvirus DNA, enveloped	[283]

		Poliovirus	Inactive (0)	Picornaviridae RNA (+) / naked	[283]
48		HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	Inactive (0)	Herpesvirus DNA, enveloped	[283]
		Poliovirus	Inactive (0)	Picornaviridae RNA(+) / naked	[283]
49	Rangiformic acid  $C_{14}H_{29}$	HSV-1 (<i>Herpes Simplex Virus</i>)	Inactive (0)	Herpesvirus DNA, enveloped	[283]
		Poliovirus	Inactive (0)	Picornaviridae RNA(+) / naked	[283]
50	Ursolic acid 	Review			[286]

Annexe 8 : Contacts entre le ligand et la protéine (exprimés en pourcentage) obtenus d'après le modèle par homologie

Tableau 41: Affinité de l'interaction entre les résidus de la protéine et le ligand selon le modèle par homologie

Residue	Se3	Se6	Se8	Se5	Se16	Se7	Se18	Se20
3	84	85	0	55	40	55	0	65
6	50,4	90	46,8	55	75	55	0	100
10	67,2	100	67,6	60	100	60	0	100
16	78,4	100	78	60	100	65	0	100
19	100	100	83,2	70	100	70	0	100
20	22,4	55	36,4	35	65	35	0	85
22	50,4	50	26	25	65	25	0	100
23	28	100	0	65	100	55	0	100
Arg 24	44,7	15	0	5	10	0	57,9	10
26	39,2	95	0	45	90	45	0	100
Tyr 46	100	100	67,6	100	100	100	100	100
48	100	100	0	100	100	100	100	100
Val 49	100	100	15,7	100	100	100	100	100
85	94,4	100	52,2	100	100	100	100	100
105	0	0	95,4	0	0	0	0	0
111	100	100	100	100	100	100	100	100
112	11,2	14,9	31,6	5	69,9	30	15,8	10
115	100	100	100	100	100	100	100	100
116	100	100	100	100	100	100	100	100
118	100	100	100	100	100	100	100	100
Lys 120	100	100	100	100	100	100	100	100
172	0	0	68,9	0	0	0	0	0
Trp 179	100	100	100	100	100	100	100	100
Pro 180	100	100	100	100	100	100	100	100
Asp 181	100	100	100	100	100	100	100	100
Phe 182	100	100	100	100	100	100	100	100
183	100	100	100	100	100	100	100	100
184	100	100	100	100	100	100	100	100
204	0	0	68,9	0	0	0	0	0
Cys 215	100	100	100	100	100	100	100	100
Ser 216	100	100	100	100	100	100	100	100
Ala 217	100	100	100	100	100	100	100	100
Ile 219	100	100	100	100	100	100	100	100
Gly 220	100	100	100	100	100	100	100	100
Arg 221	100	100	100	100	100	100	100	100
222	33,3	40	68,5	25	44,8	35	42,2	30
245	39,2	85	0	25	35	30	0	70
246	56	75	20,8	35	70	30	0	95
247	100	100	67,6	100	100	100	0	100
248	5,6	90	0	20	75	20	0	100
251	0	100	0	85	100	80	0	100
Arg 254								
Gln 262	100	100	100	100	100	100	100	100
263	100	100	100	100	100	100	100	100
265	100	100	100	100	100	100	100	100
Gln 266	100	100	100	100	100	100	100	100
271	50,4	100	52	55	95	45	0	100

Annexe 9 : Contacts entre le ligand et la protéine (exprimés en pourcentage) obtenus par un des modèles dynamiques en NM7

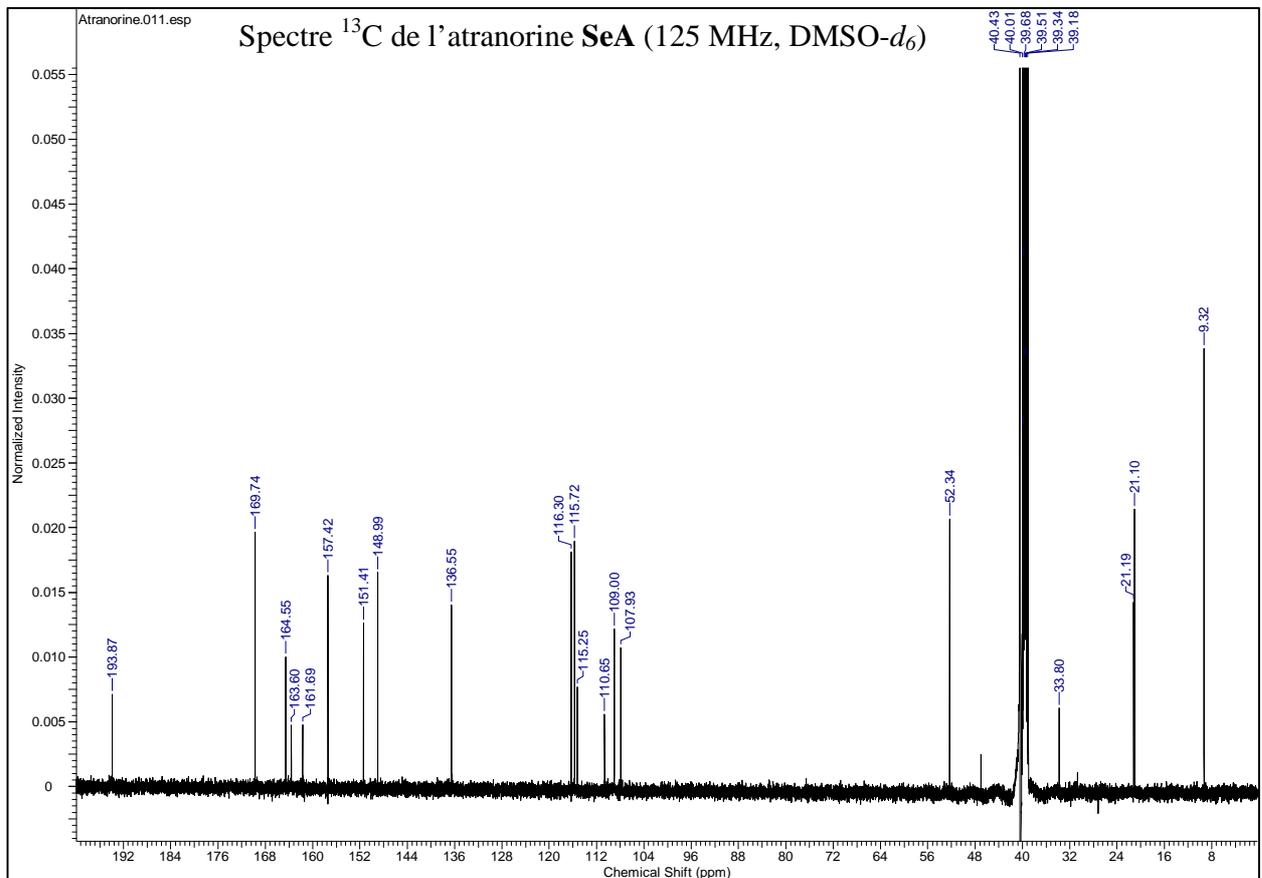
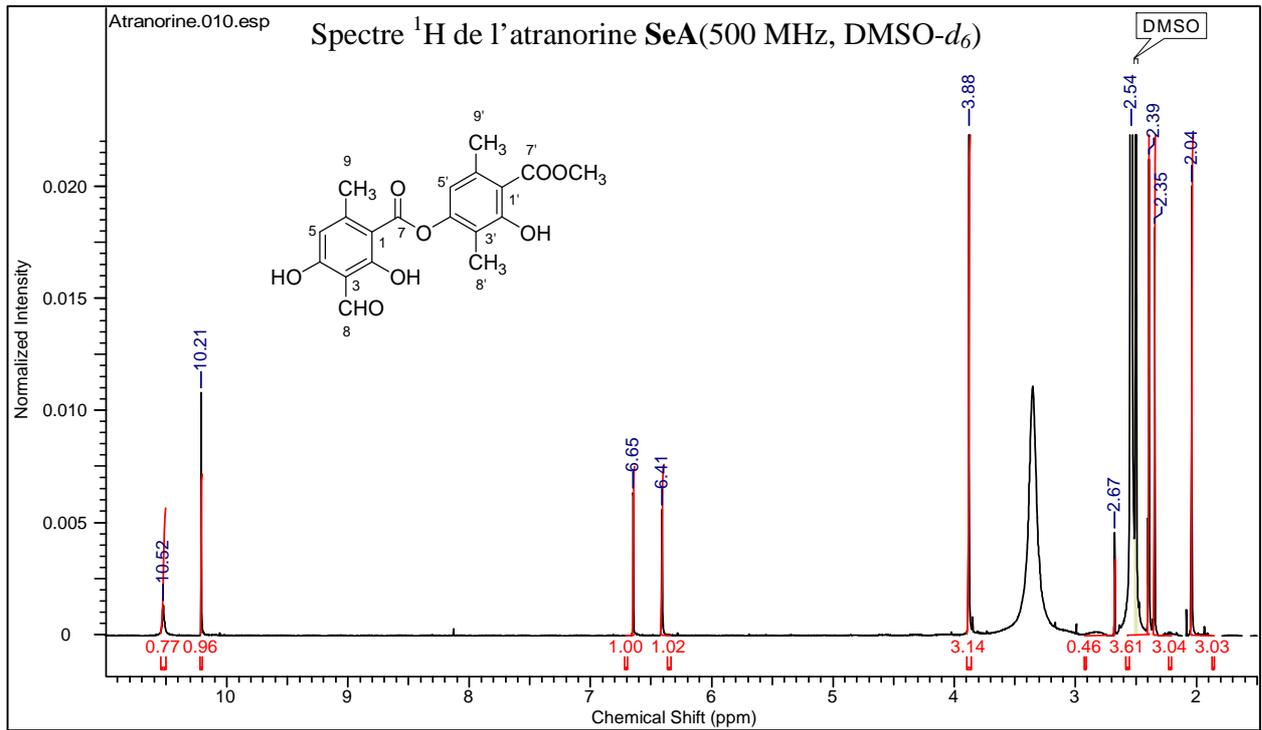
Tableau 42: Affinité de l'interaction entre les résidus de la protéine et le ligand selon le modèle en NM7

Residue	Se3	Se6	Se8	Se5	Se16	Se7	Se18	Se20
Arg 24	0	0	100	0	0	0	84,8	95
25	0	0	31,4	0	0	0	21,2	55
26	0	0	83,9	0	0	0	37,1	50
27	0	0	21	0	0	0	21,2	45
28	0	0	68,2	0	0	0	31,8	30
29	0	0	20,9	0	0	0	53	35
30	0	0	100	0	0	0	84,8	70
Tyr 46	100	100	0	100	100	100	100	100
48	15,8	100	0	40	100	79,5	47	20
Val 49	100	100	5,3	100	100	100	100	100
52	0	0	84	0	0	0	42,4	45
109	20,8	25	31,2	24,5	50	26	20,8	0
111	100	100	100	100	100	100	100	100
112	20,8	35	36,4	39,2	75	41,6	20,8	0
113	52	50	98,8	49	100	52	52	0
114	15,6	0	20,8	4,9	10	5,2	5,2	0
115	100	100	100	100	100	100	100	100
116	100	100	15,9	100	74,9	78,8	31,8	100
Lys 120	100	100	100	100	100	100	100	100
123	78	75	100	58,8	100	57,2	78	0
124	31,2	30	78	39,2	90	36,4	31,2	0
125	72,8	70	100	53,9	100	67,6	72,8	0
149	15,6	60	72,8	53,9	100	57,2	15,6	0
154	36,4	35	72,8	34,3	80	41,6	36,4	0
156	67,6	60	100	53,9	100	62,4	78	0
173	36,4	35	72,8	39,2	85	41,6	57,2	0
175	31,2	50	88,4	44,1	65	26	31,2	0
Tyr 179	100	100	100	100	100	100	100	100
Pro 180	36,6	65	42,1	35	74,9	26,3	46,9	39,8
Asp 181	100	100	100	100	100	100	100	100
Phe 182	100	100	100	100	100	100	100	100
183	100	100	100	100	100	100	100	100
184	100	100	100	100	100	100	94,8	100
Cys 215	84,3	100	100	100	100	100	94,4	100
Ser 216	100	100	100	100	100	100	100	100
Ala 217	100	100	100	100	100	100	100	100
Ile 219	100	100	100	100	100	100	100	100
Gly 220	100	100	100	100	100	100	100	100
Arg 221	100	100	100	100	100	100	100	100
Arg 254	0	0	100	0	0	0	100	80
258	42,3	10	100	5	64,9	0	100	45
259	0	0	52,5	0	5	0	31,7	10
261	52,8	19,9	47,3	40	29,9	21	58,1	55
Gln 262	100	100	100	100	100	100	100	100
263	100	100	100	100	100	100	100	100
265	89,6	100	78,5	100	100	100	94,9	100
266	100	100	100	100	100	100	100	100

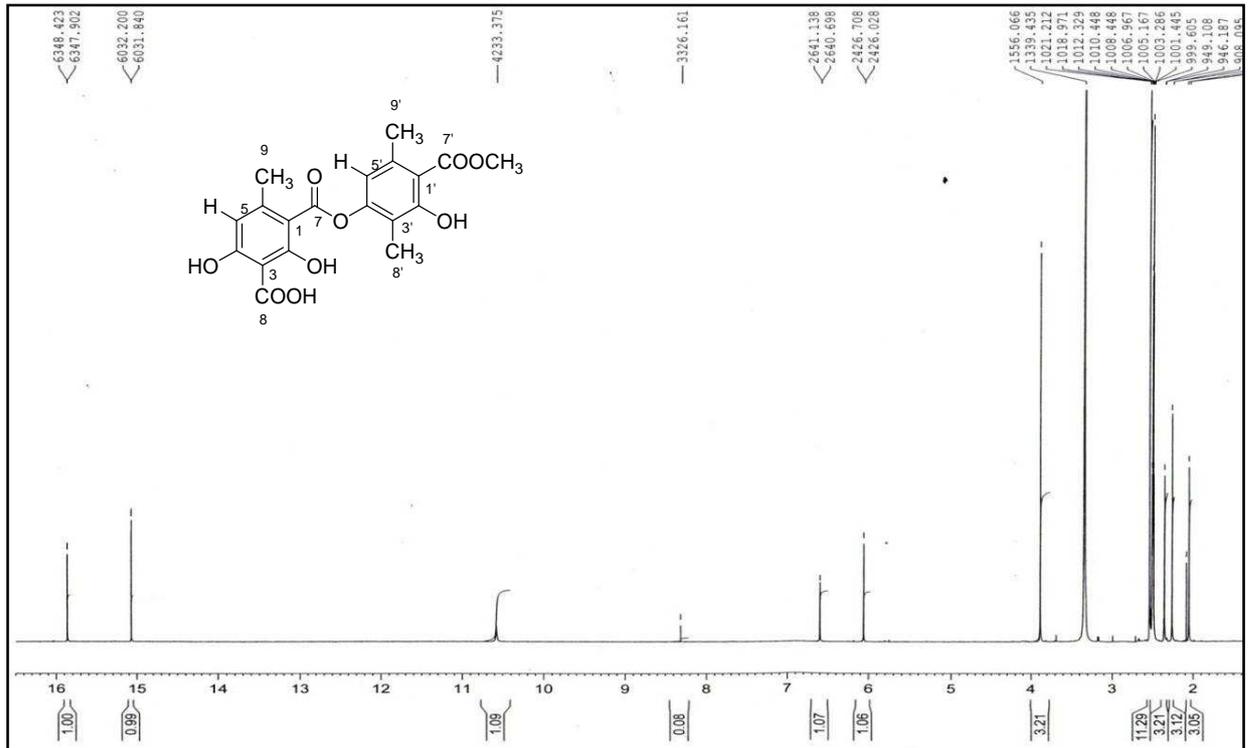
Annexe 10 : Tableau 43: Liaisons fréquentes entre les ligands et l'enzyme PTP1B obtenus par le modèle en mode normale N⁰⁷

Residue	Se3	Se18	Se7	Se5	Se6	Se16	Se20	Se8
Tyr 46	Hydrophobe	Hydrophobe	$\Pi-\Pi$		Hydrophobe	hydrophobe	hydrophobe	
Val 49	hydrophobe	Hydrophobe			hydrophobe	hydrophobe	hydrophobe	
Met 109				hydrophobe		hydrophobe		
Arg 112				cation π	hydrogène	cation π		
Val 113				Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe		
Thr 117				Hydrophobe				
Lys 120		hydrogène cation π	hydrophobe cation π	hydrophobe cation π	Hydrogène	hydrophobe	hydrophobe	
Gln 123				Hydrophobe		Hydrophobe		
Tyr 124				Hydrophobe	Hydrogène	Hydrophobe		
Trp 125				Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe		
Gln 127					Hydrophobe			
Ile 149				hydrophobe	hydrophobe	Hydrophobe		
Arg 156				hydrogène	cation π	Hydrogène		
173					$\Pi-\Pi$	$\Pi-\Pi$		
His 175				$\Pi-\Pi$	$\Pi-\Pi$	$\Pi-\Pi$		
Thr 177						Hydrophobe		
Trp 179	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$
Phe 182	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe $\Pi-\Pi$	Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe $\Pi-\Pi$	hydrophobe	hydrophobe $\Pi-\Pi$
Gly 183	hydrogène	hydrophobe	hydrophobe	Hydrophobe		hydrophobe	hydrophobe	hydrophobe
Val 184			Hydrophobe	hydrophobe				
Cys 215			Hydrophobe					
Ser 216	hydrogène	Hydrophobe	Hydrophobe		hydrogène	hydrogène		
Ala 217	hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe	hydrophobe	
Ile 219	Hydrophobe		Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe	
Gly 220	Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe	hydrophobe		hydrophobe		Hydrophobe
Arg 221	hydrophobe cation π	hydrophobe	cation π hydrogène	cation π	cation π	hydrophobe cation π	hydrophobe cation π	hydrophobe hydrogène cation π
Gln 262	Hydrophobe	Hydrophobe		Hydrophobe		Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophobe
Thr 263	hydrophobe	hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophobe		Hydrophobe	hydrophobe	
Asp 265			hydrophobe	Hydrophobe		hydrogène		
Gln 266				hydrophobe				

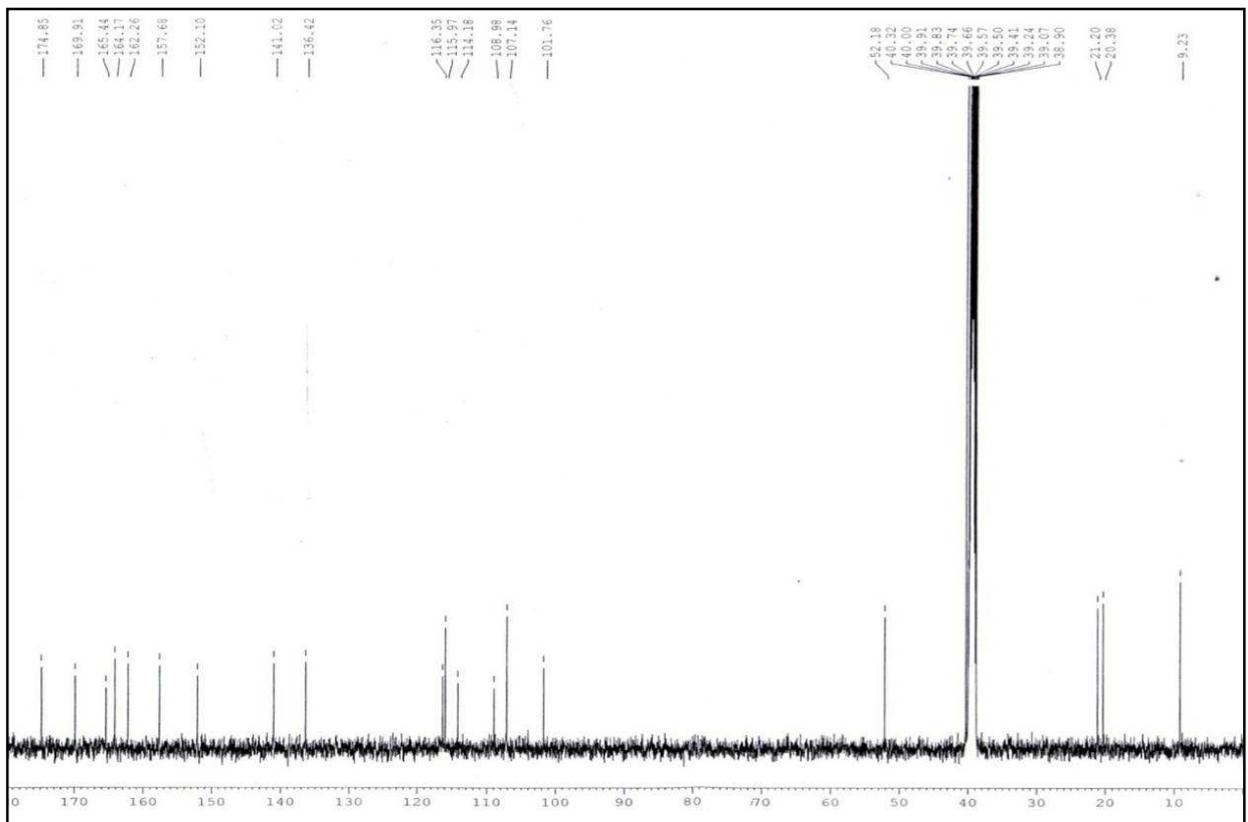
Annexe 11 : Spectres RMN ¹H et ¹³C des composés isolés et synthétisés



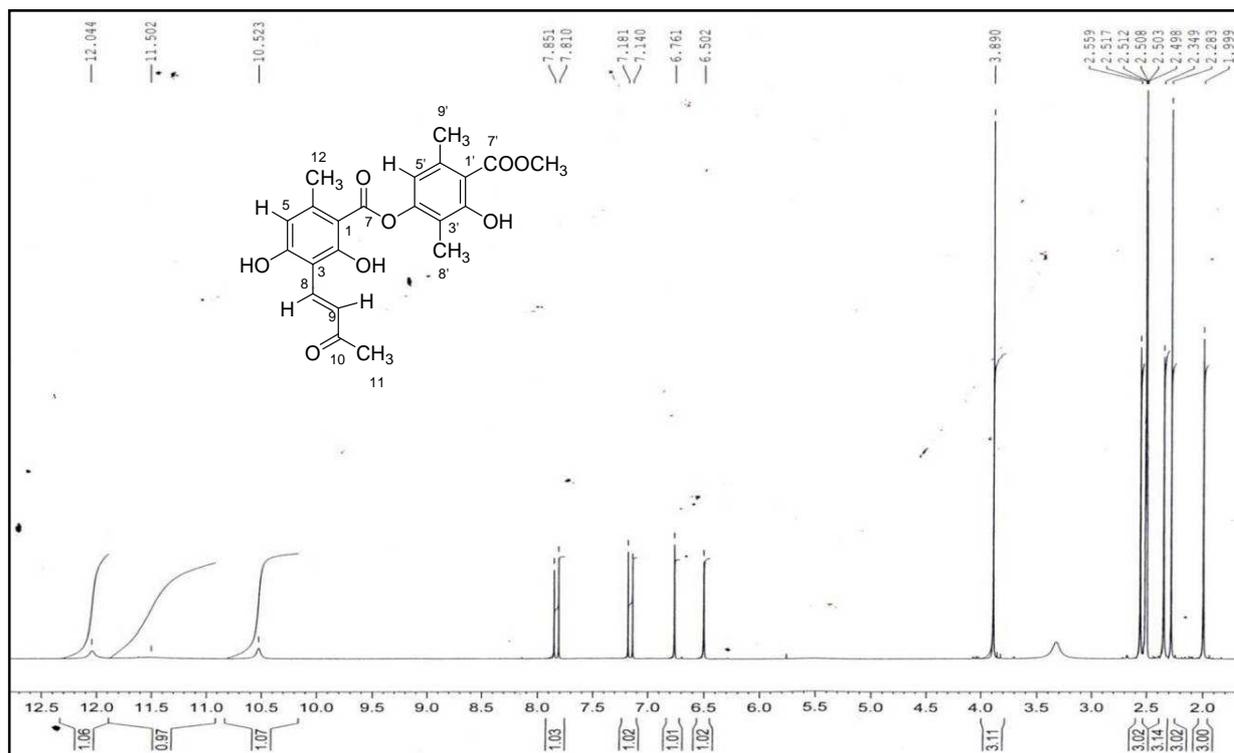
Spectre ^1H de la cladonoidésine **Se11** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



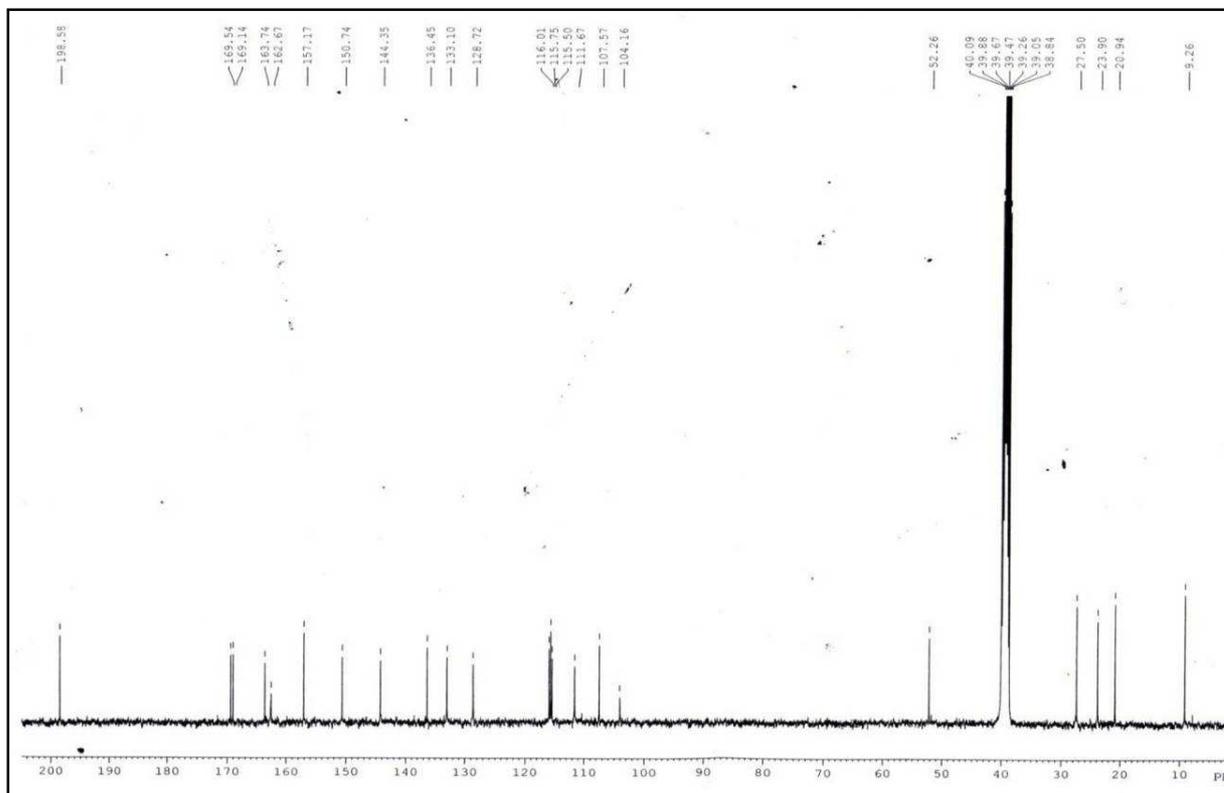
Spectre ^{13}C de la cladonoidésine **Se11** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



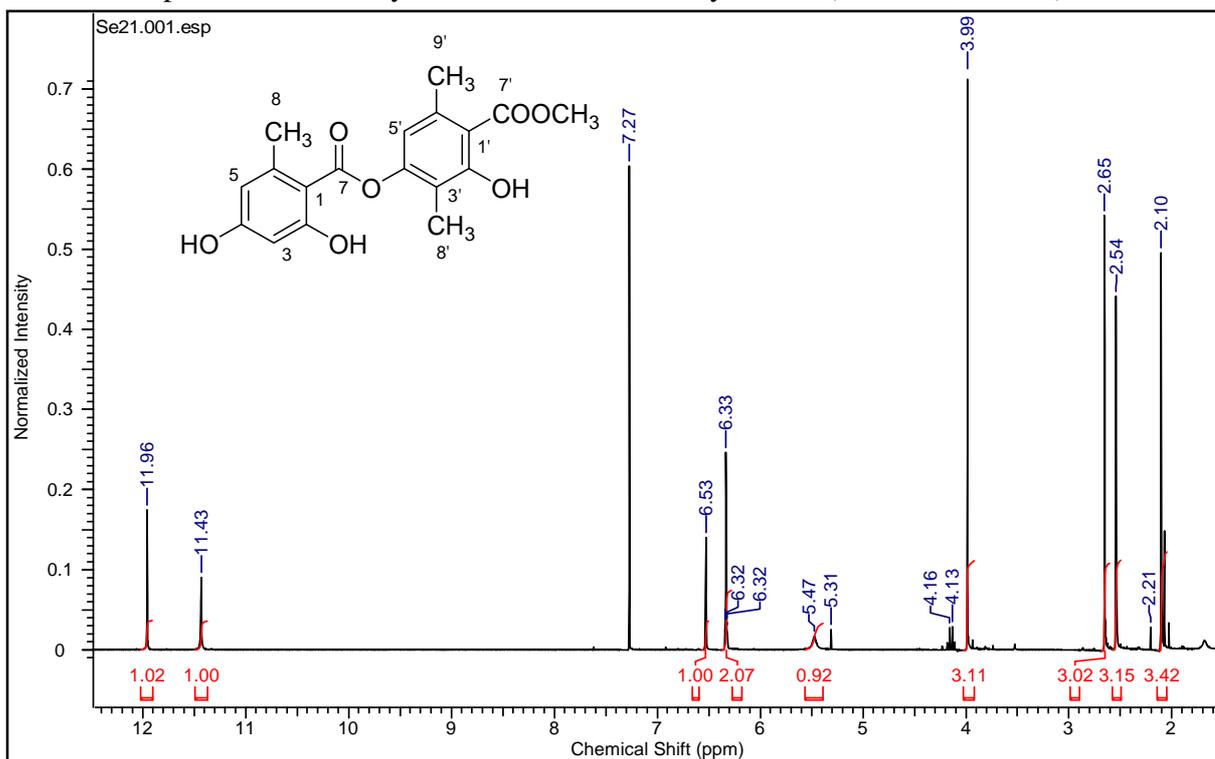
Spectre ^1H du (*E*)-3-(3-oxo-but-en-yl) atranorine **Se10** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



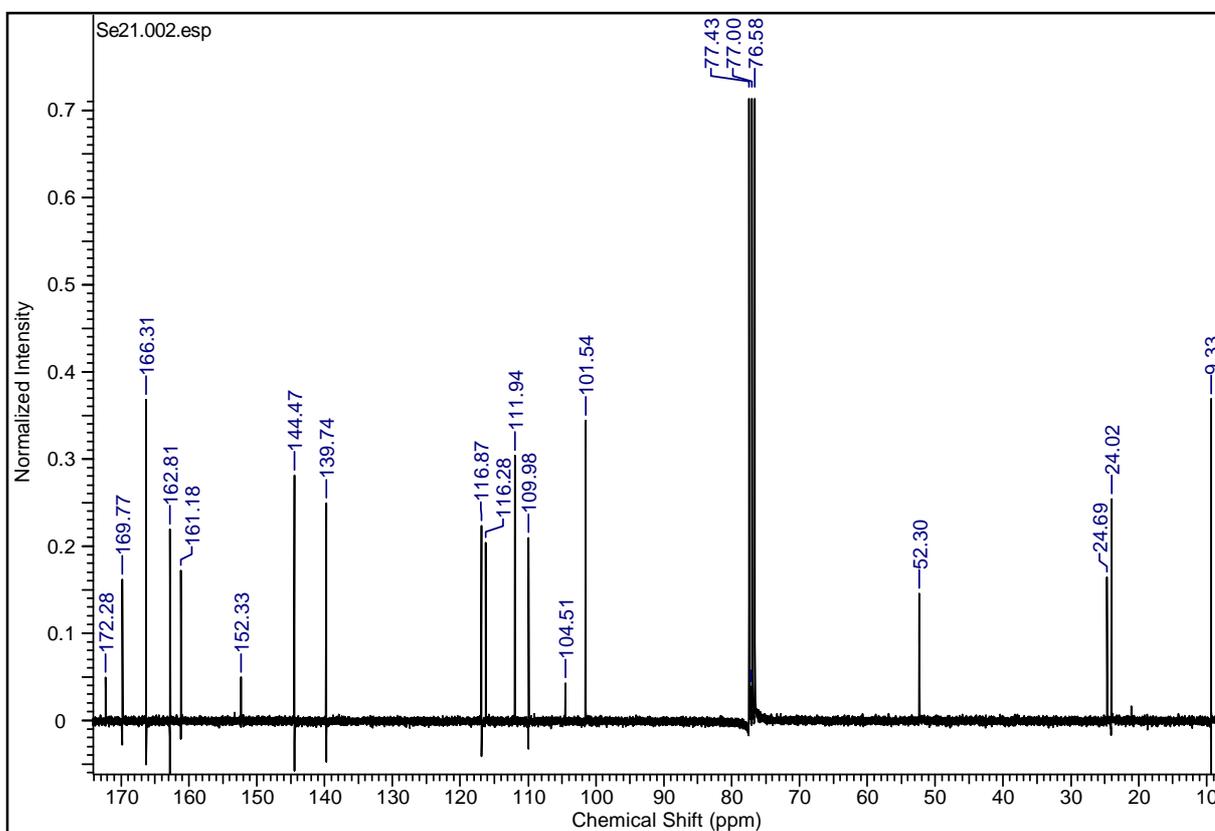
Spectre ^{13}C du (*E*)-3-(3-oxo-but-en-yl) atranorine **Se10** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



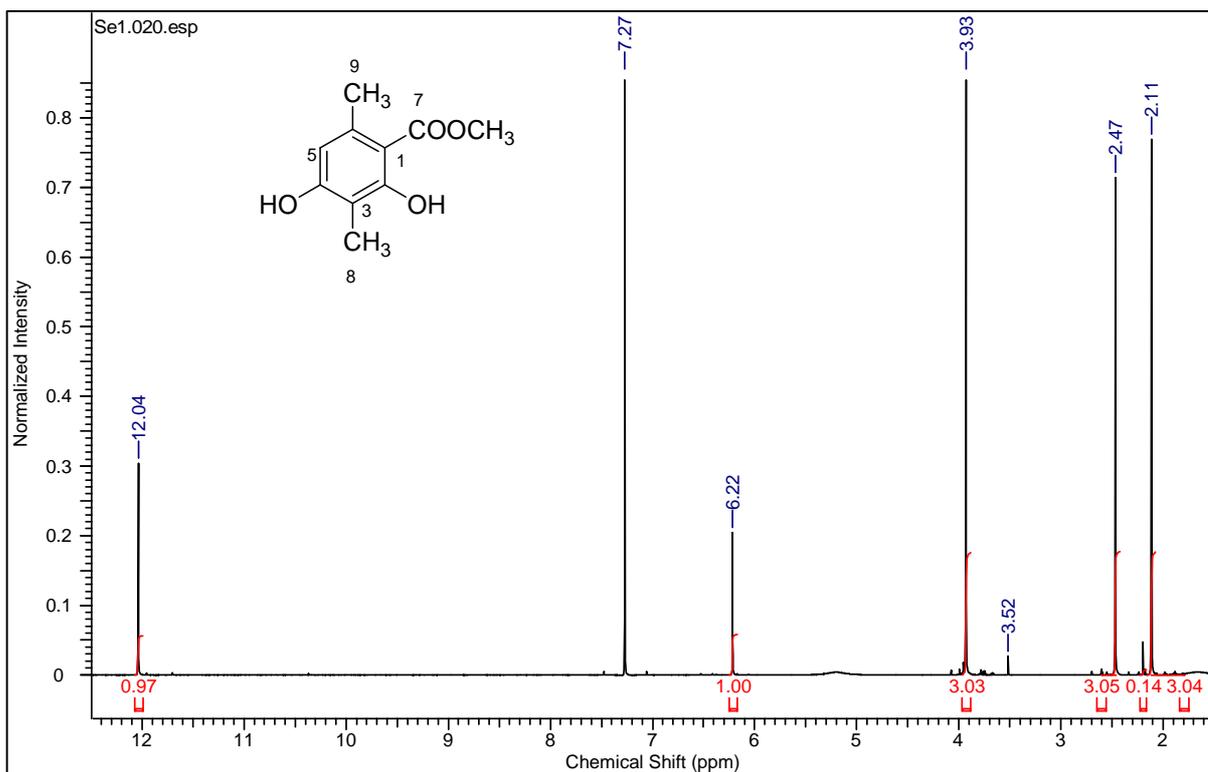
Spectre ^1H du méthyle 3'-lécanorate de méthyle **Se21** (300 MHz, CDCl_3)



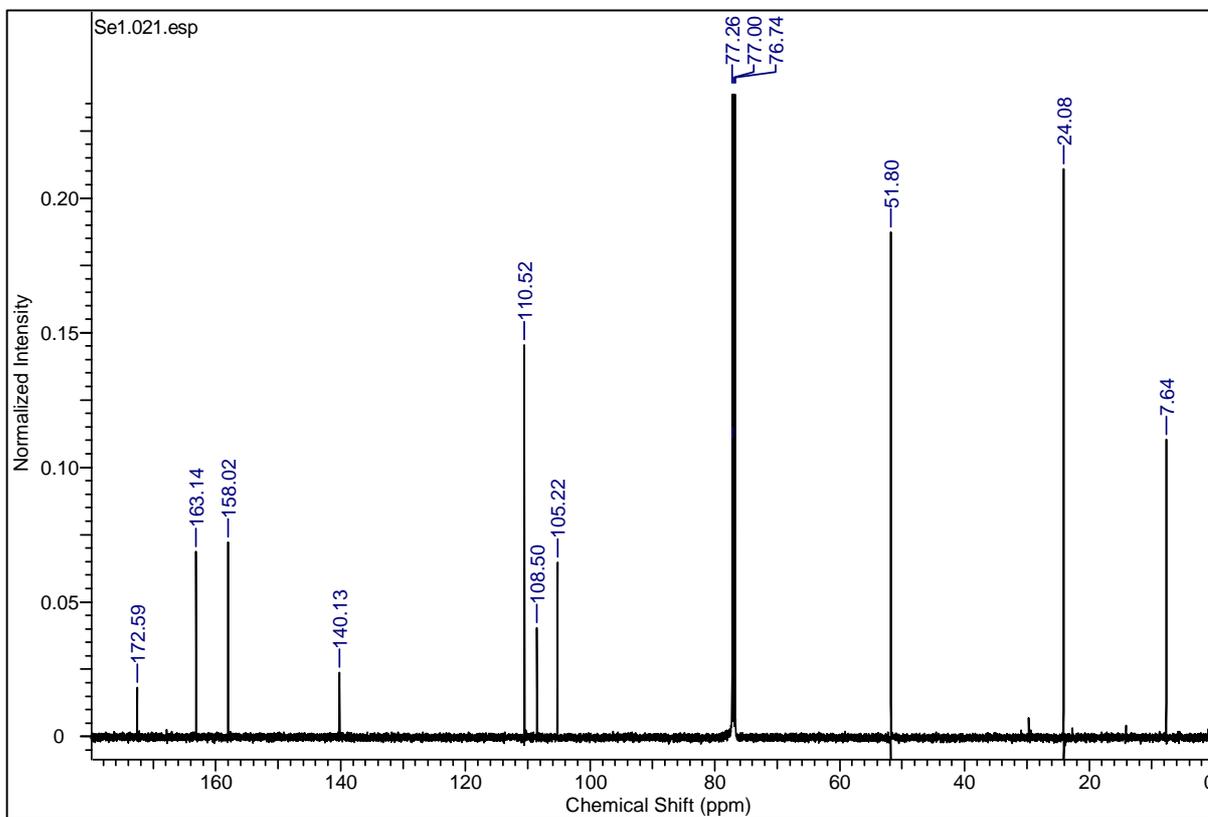
Spectre ^{13}C du méthyle 3'-lécanorate de méthyle **Se21** (75 MHz, CDCl_3)



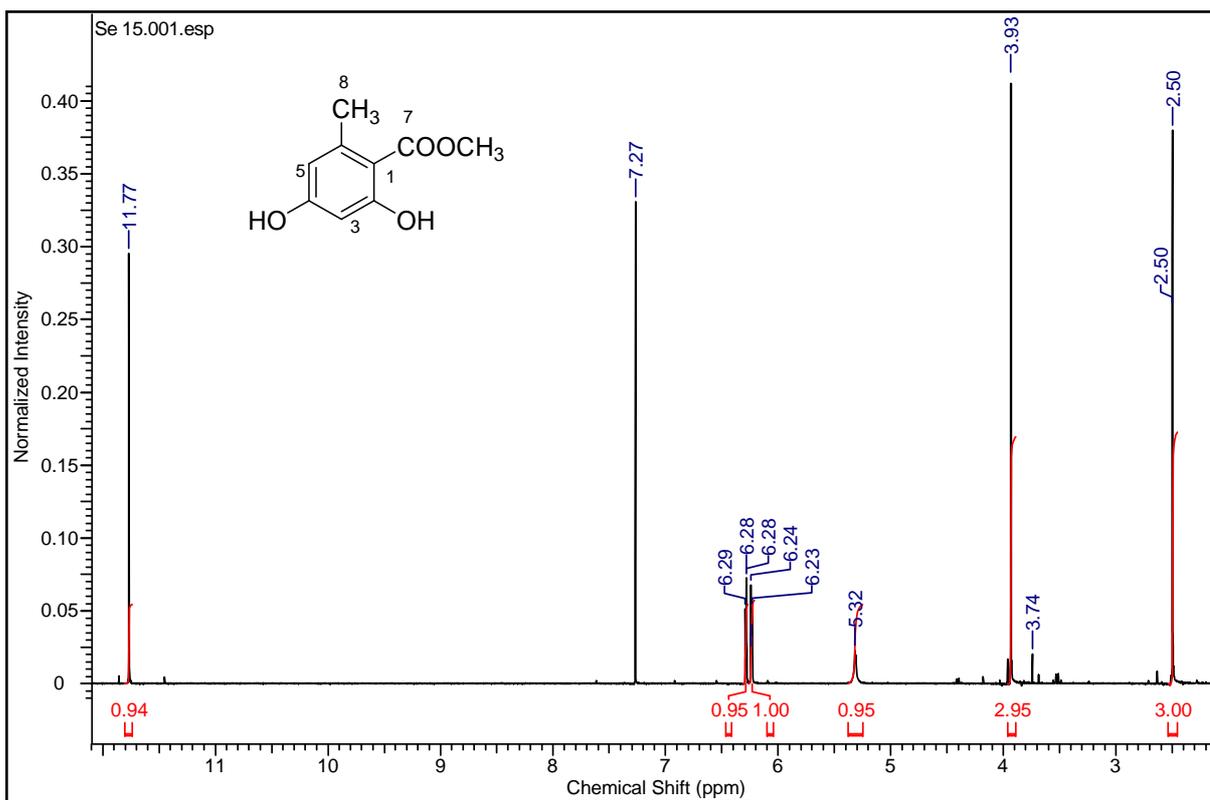
Spectre ^1H du β -orcinol carboxylate de méthyle **Se1** (500 MHz, CDCl_3)



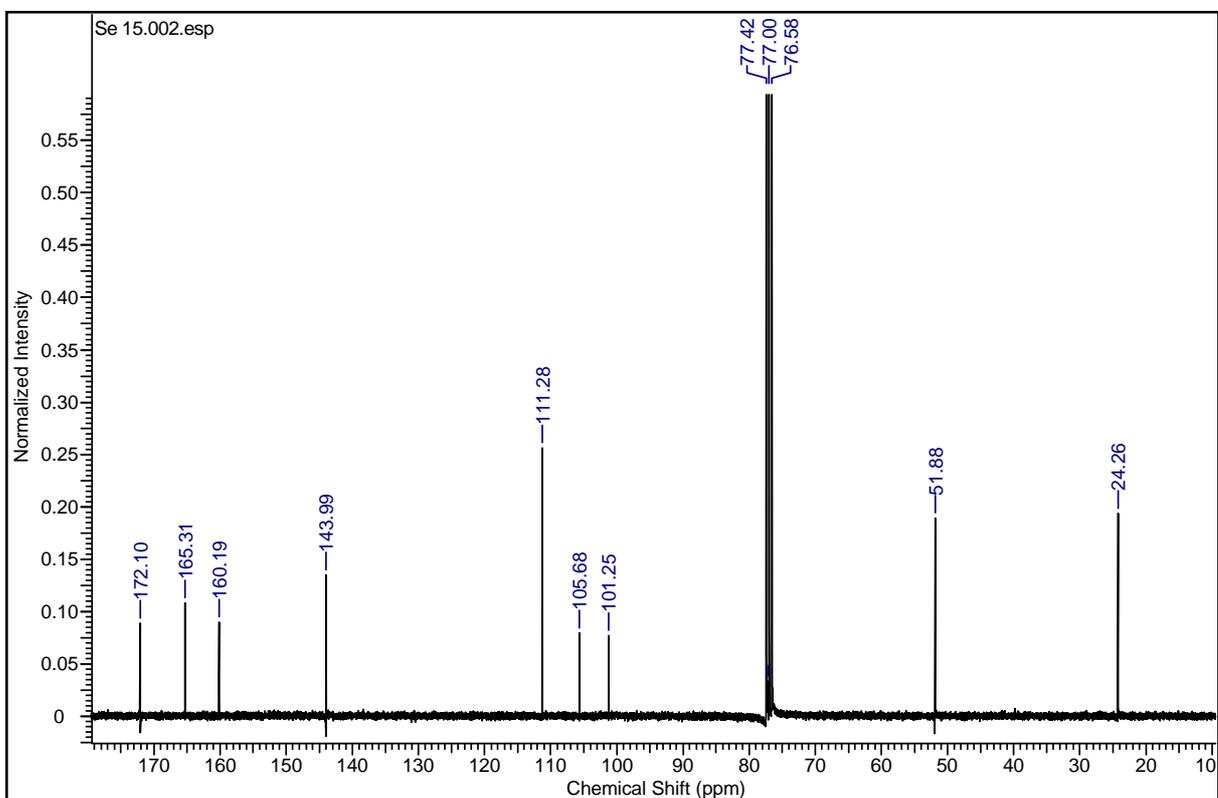
Spectre ^{13}C du β -orcinol carboxylate de méthyle **Se1** (125 MHz, CDCl_3)



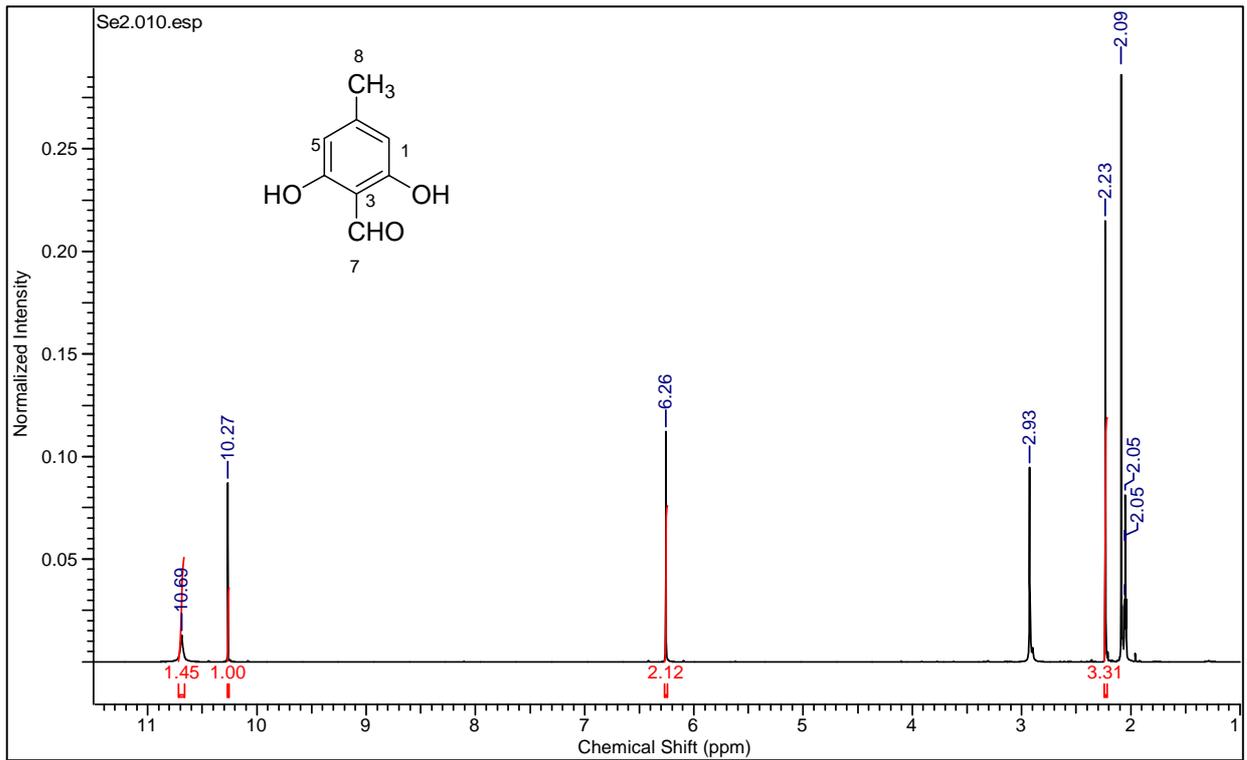
Spectre ^1H de l'orsellinate de méthyle **Se15** (300 MHz, CDCl_3)



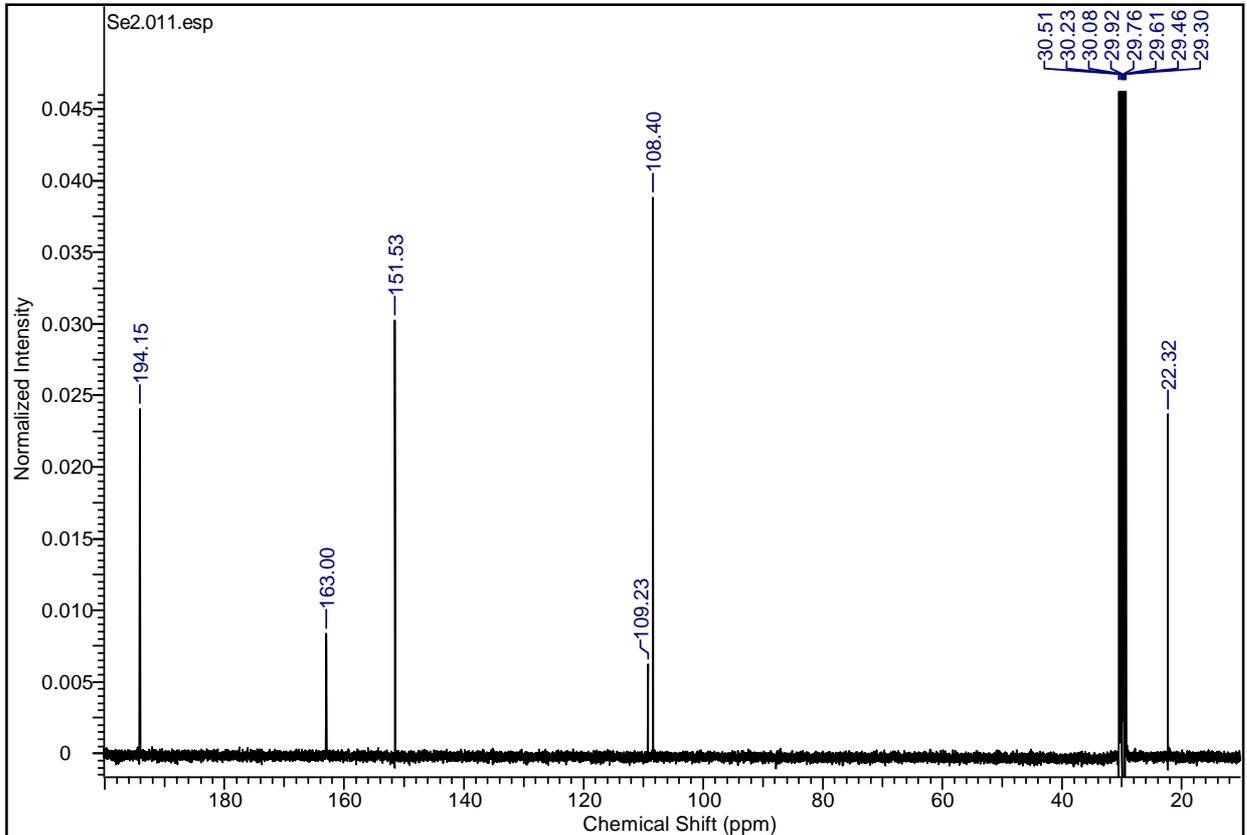
Spectre ^{13}C de l'orsellinate de méthyle **Se15** (75 MHz, CDCl_3)



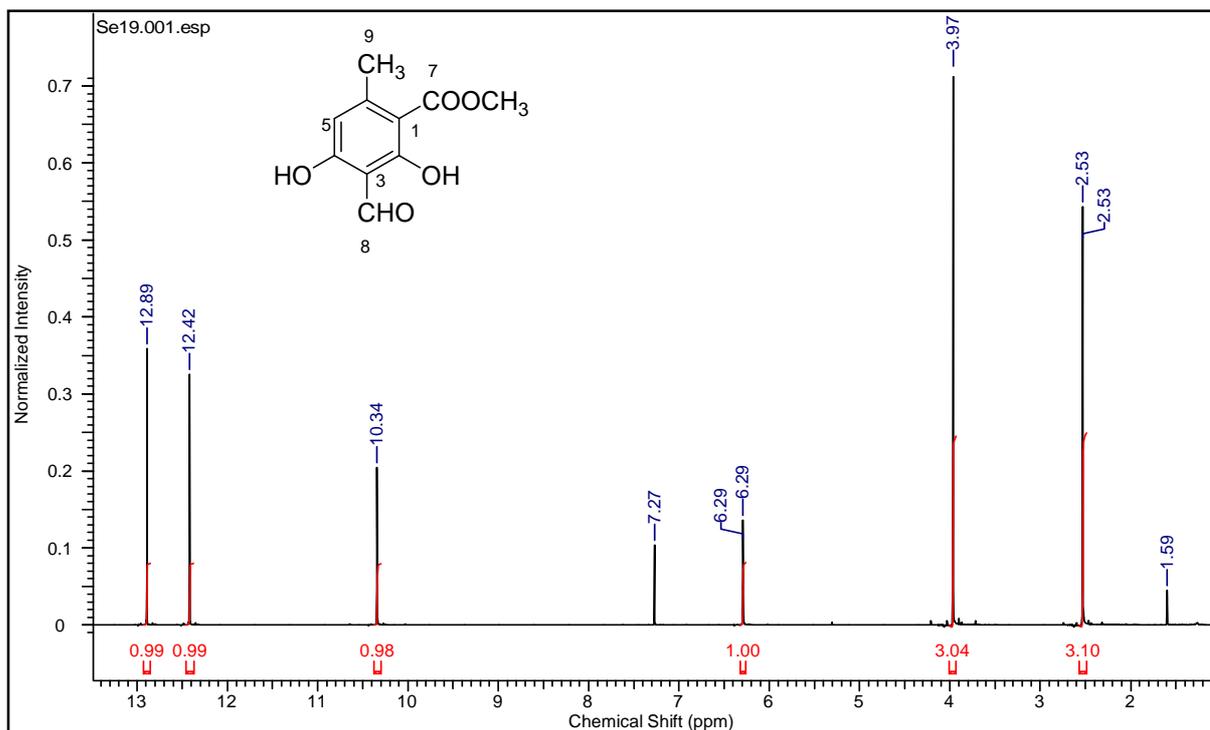
Spectre ^1H de l'atranol **Se2** (500 MHz, Acétone- d_6)



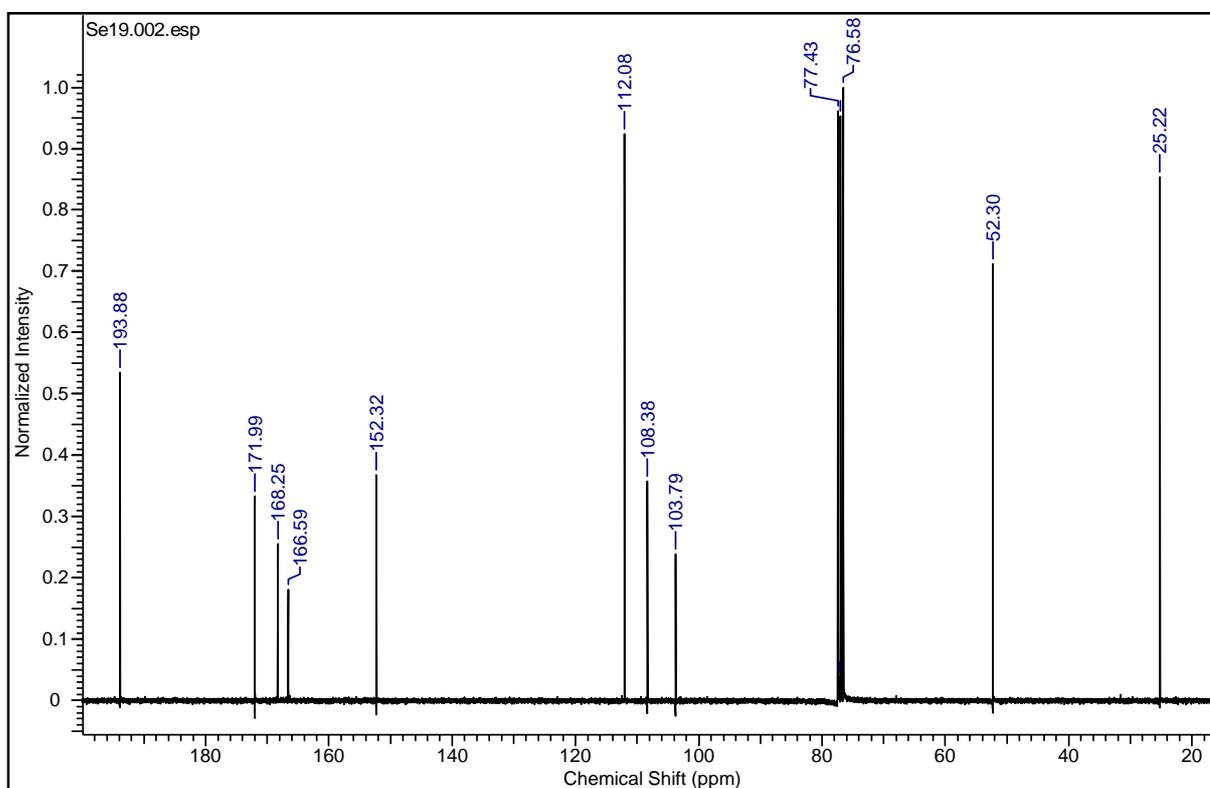
Spectre ^{13}C de l'atranol **Se2** (125 MHz, Acétone- d_6)



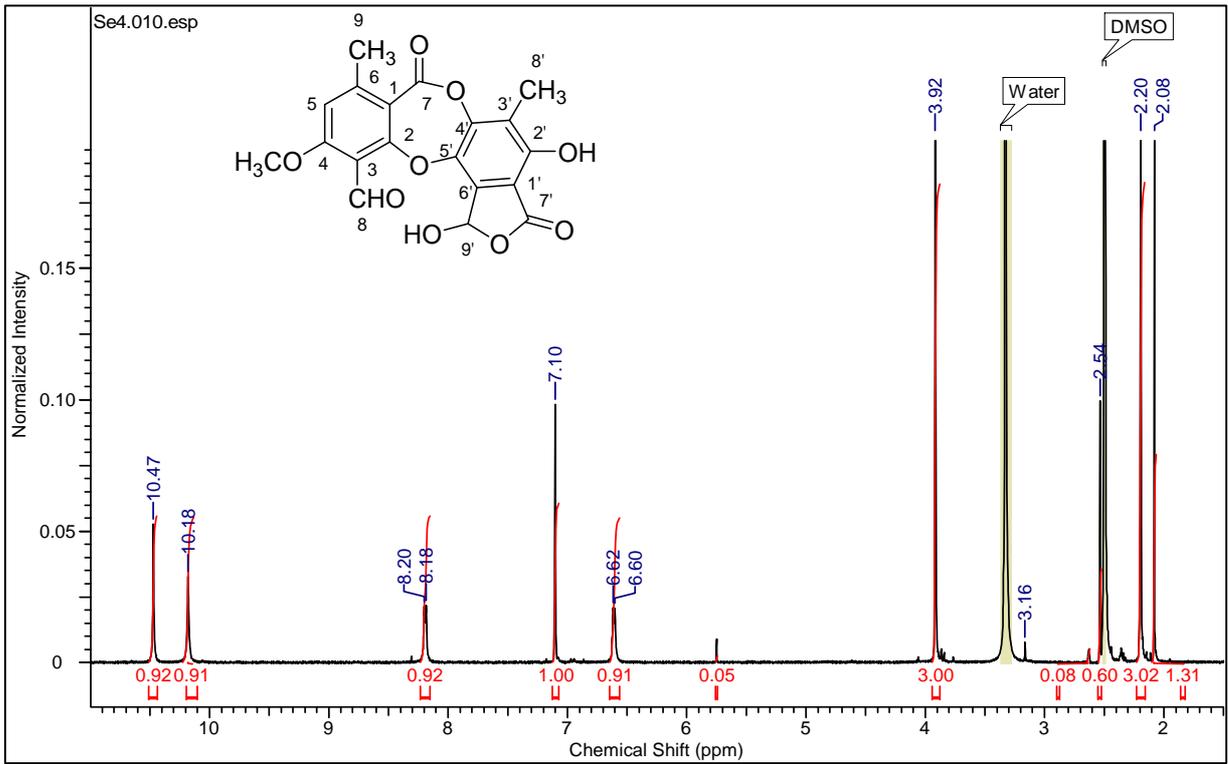
Spectre ^1H de l'haematommate **Se19** (300 MHz, CDCl_3)



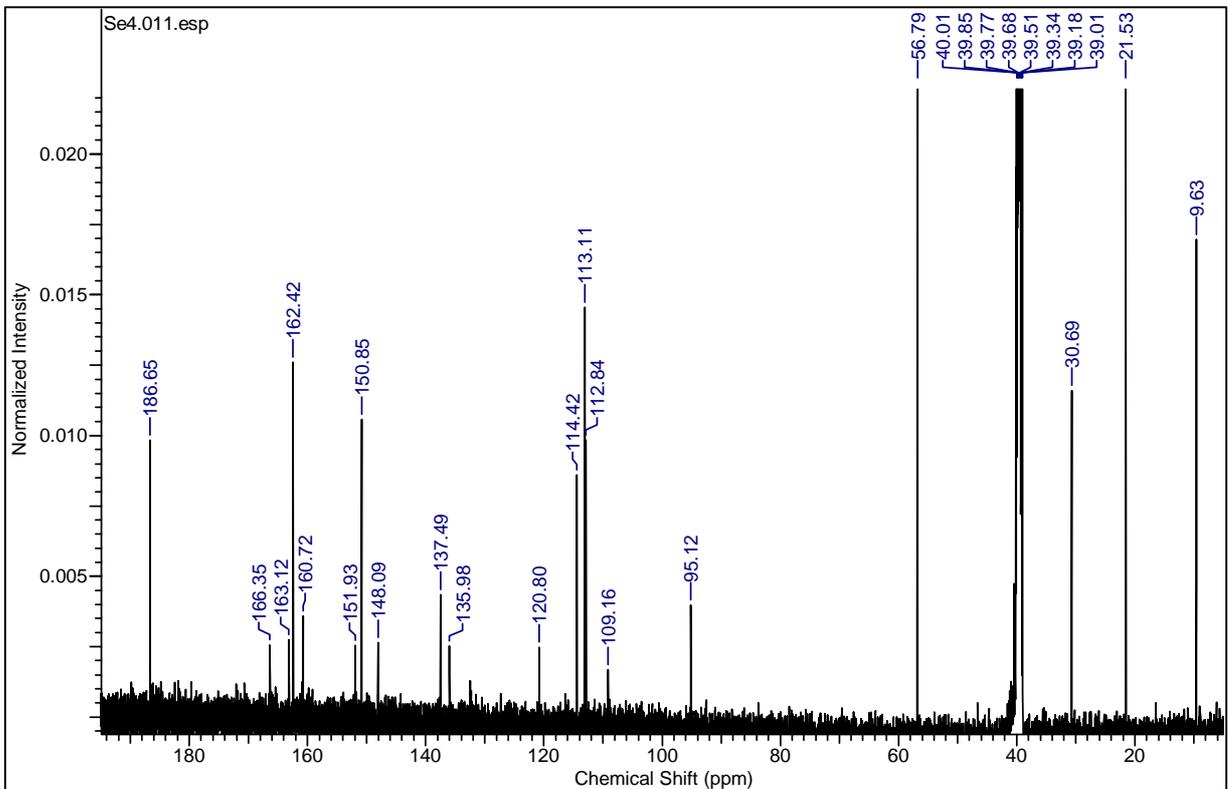
Spectre ^{13}C de l'haematommate **Se19** (75 MHz, CDCl_3)



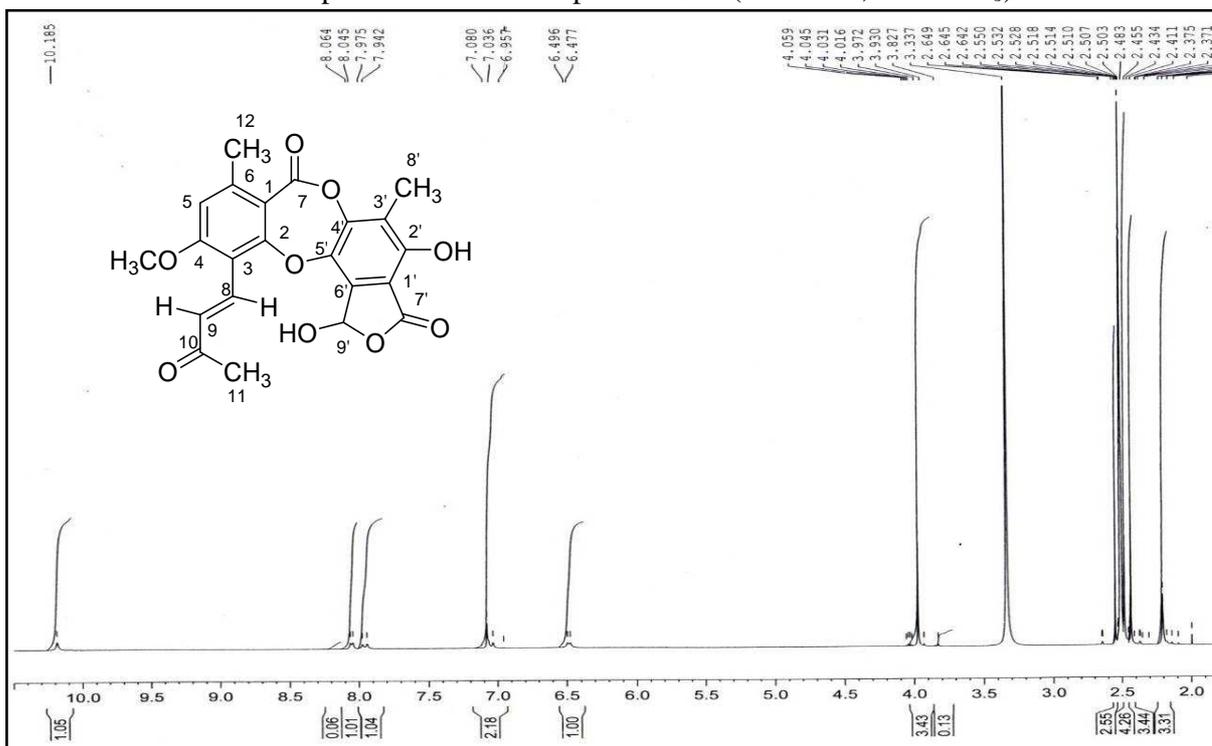
Spectre ^1H de l'acide stictique **Se4** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



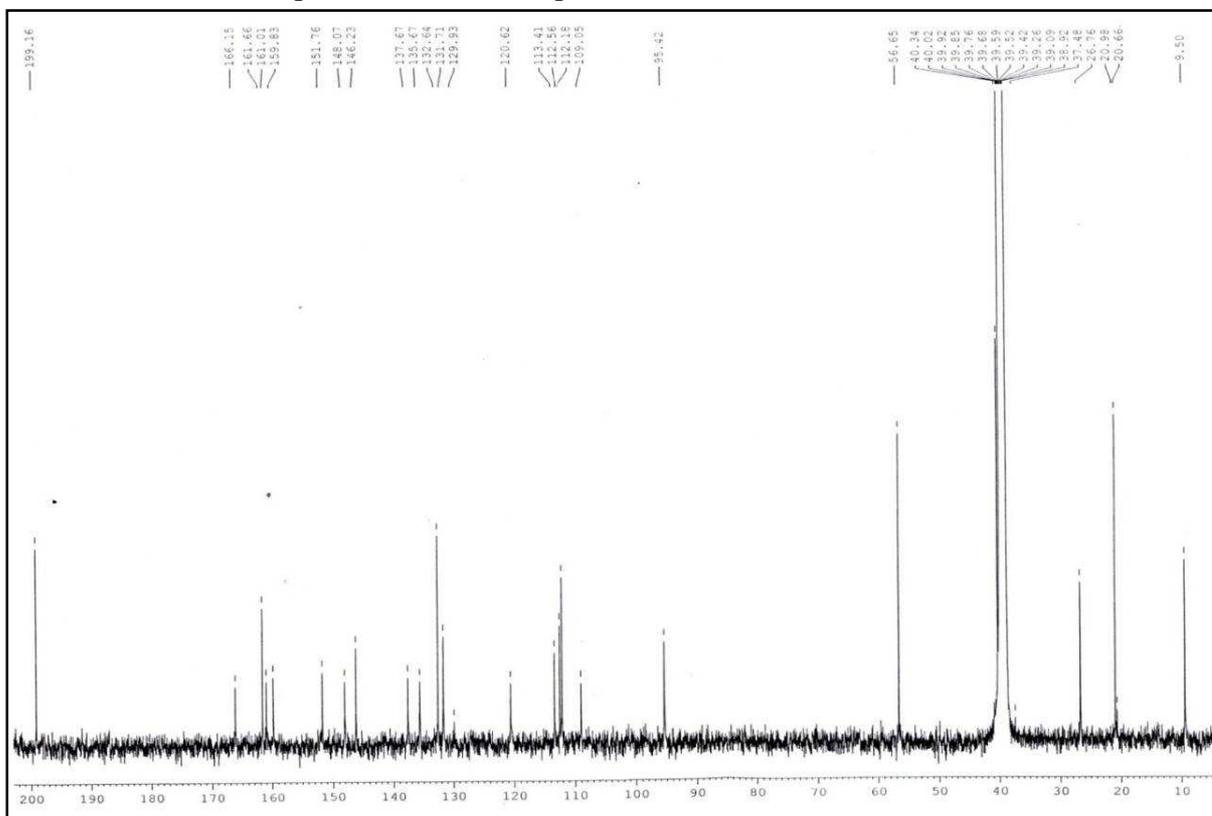
Spectre ^{13}C de l'acide stictique **Se4** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



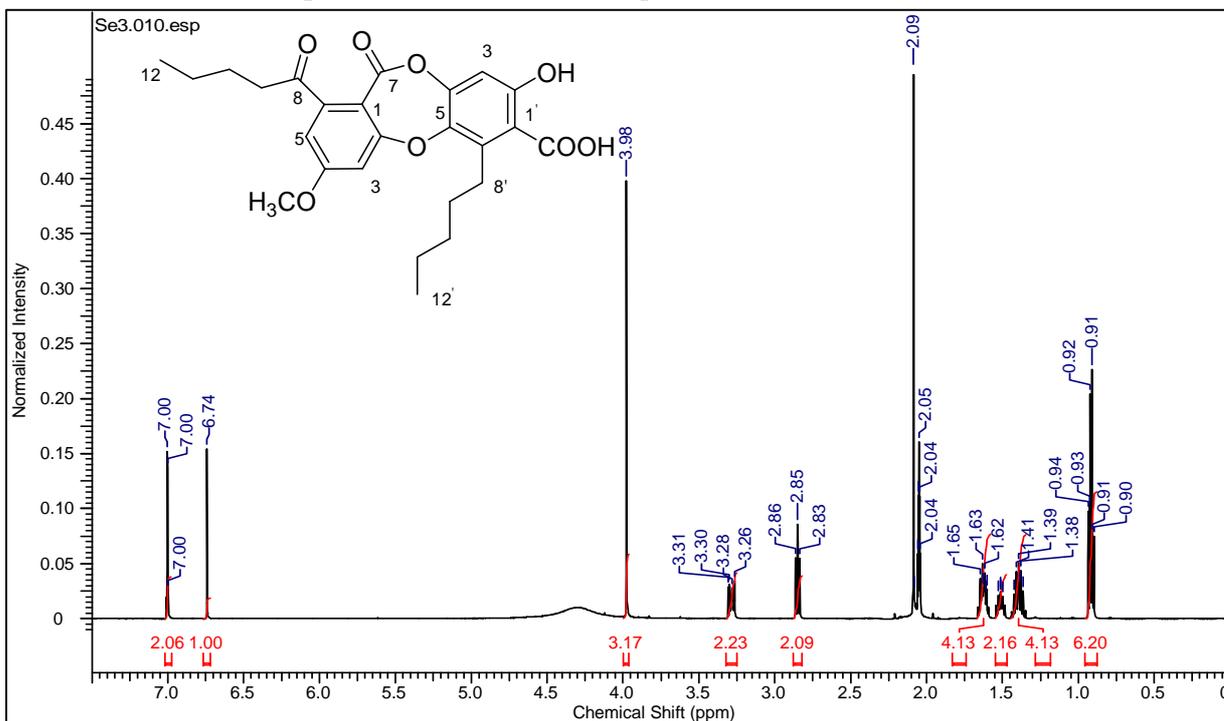
Spectre ^1H de l'isidiophorine **Se9** (500 MHz, DMSO- d_6)



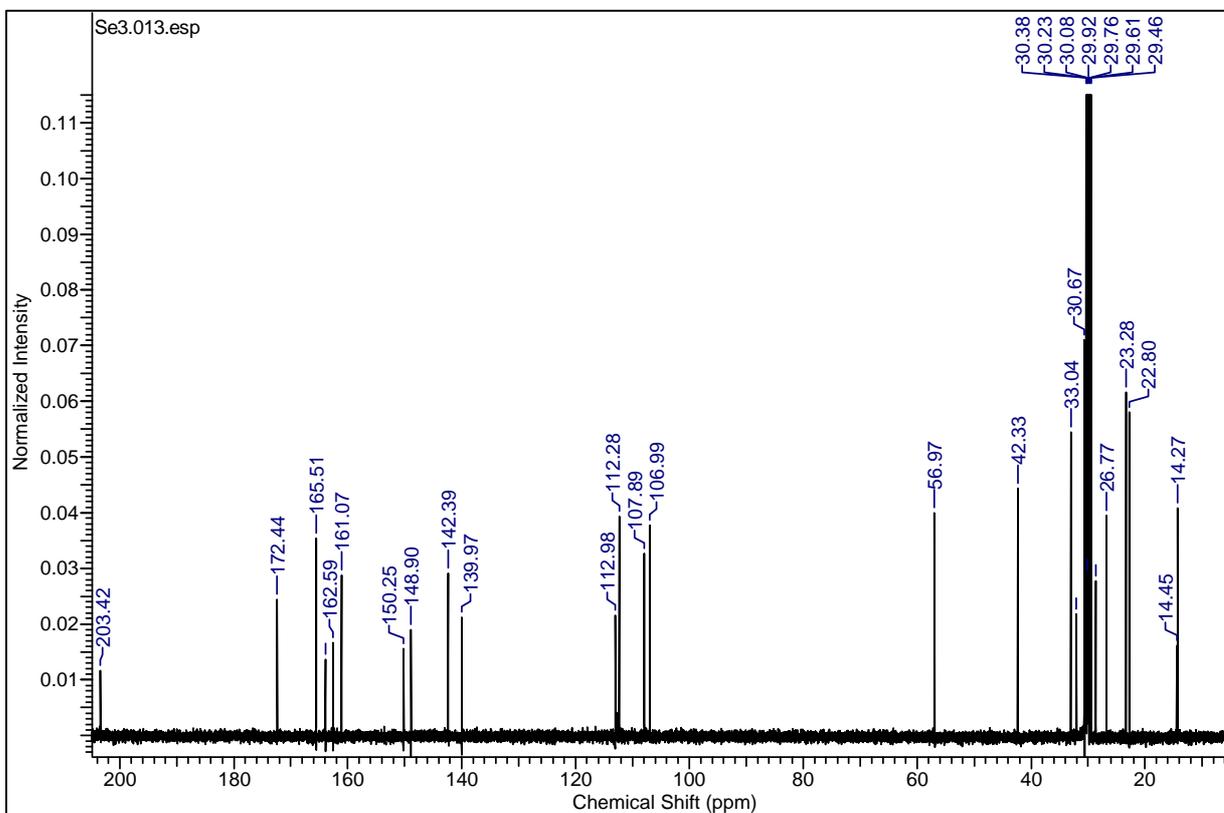
Spectre ^{13}C de l'isidiophorine **Se9** (125 MHz, DMSO- d_6)



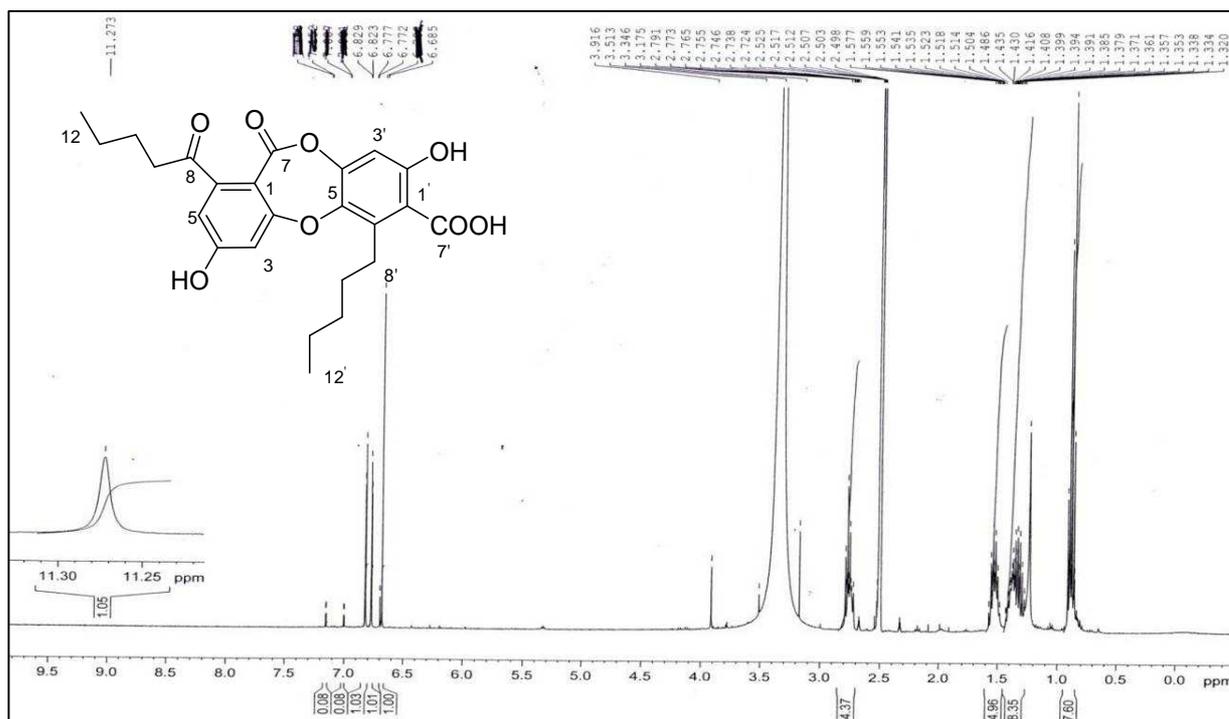
Spectre ^1H de l'acide lobarique **Se3** (500 MHz, Acétone- d_6)



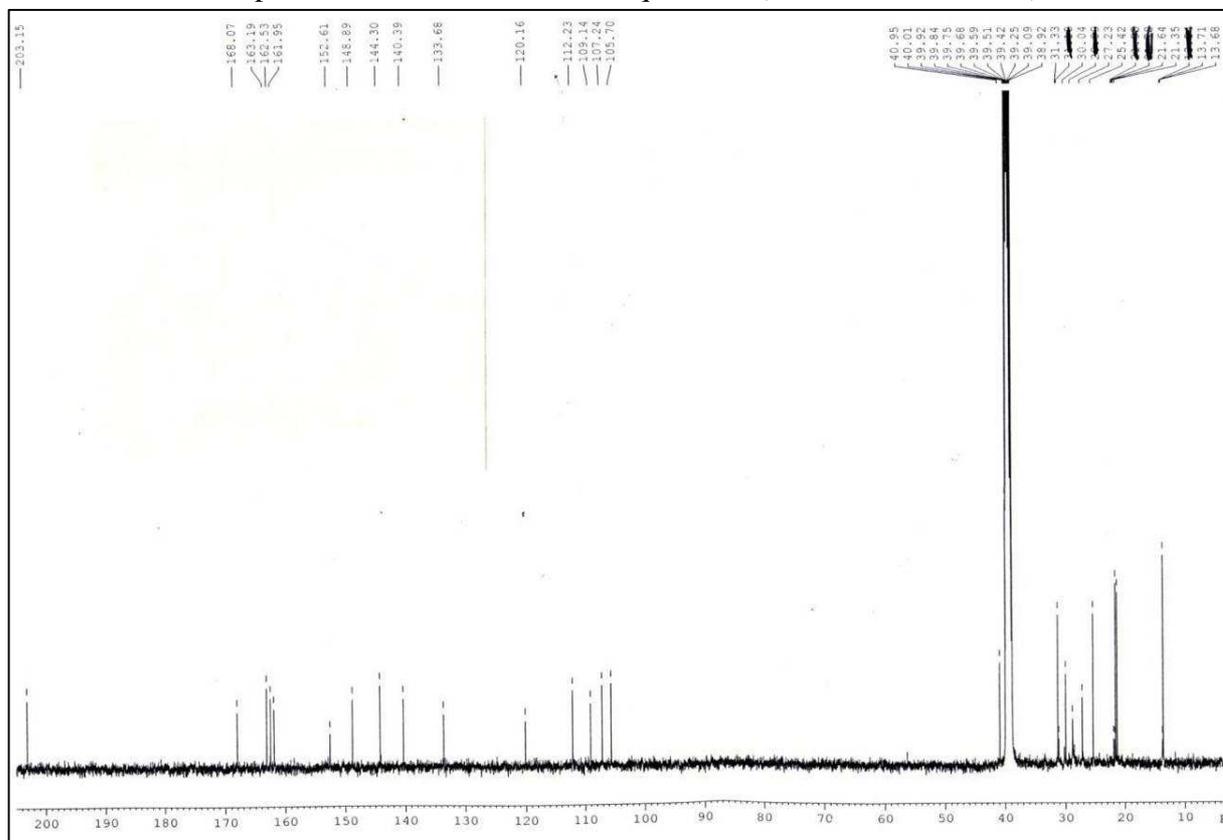
Spectre ^{13}C de l'acide lobarique **Se3** (125 MHz, Acétone- d_6)



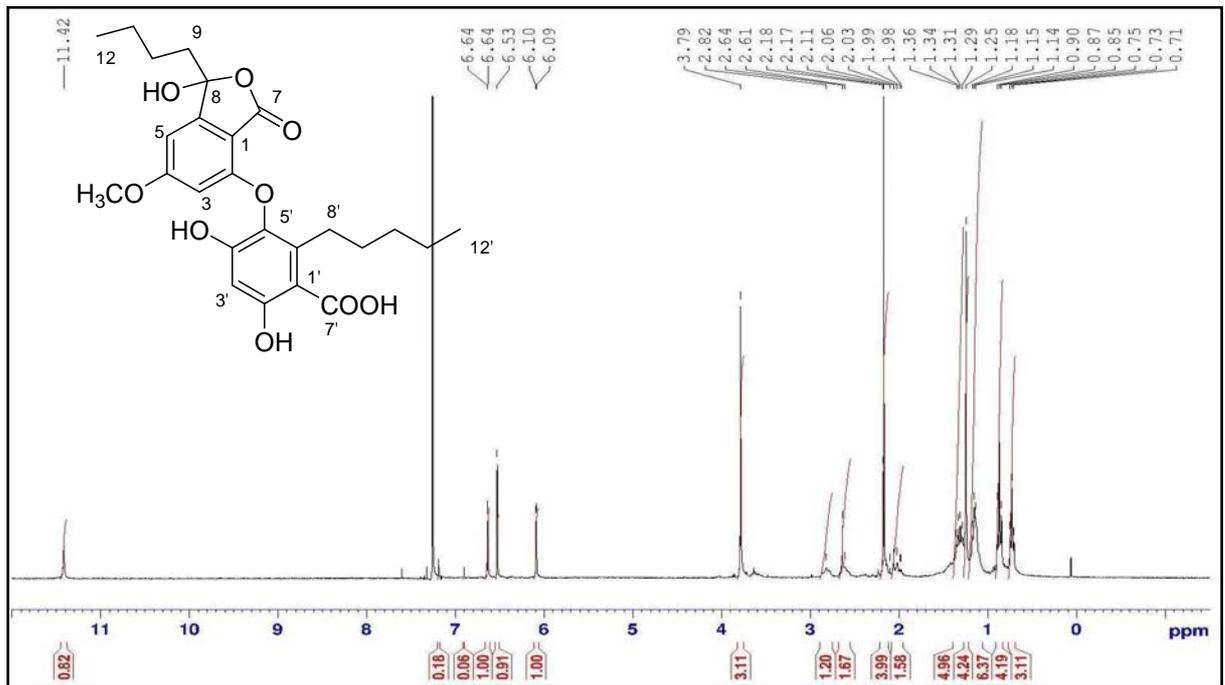
Spectre ^1H de l'acide norlobarique **Se18** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



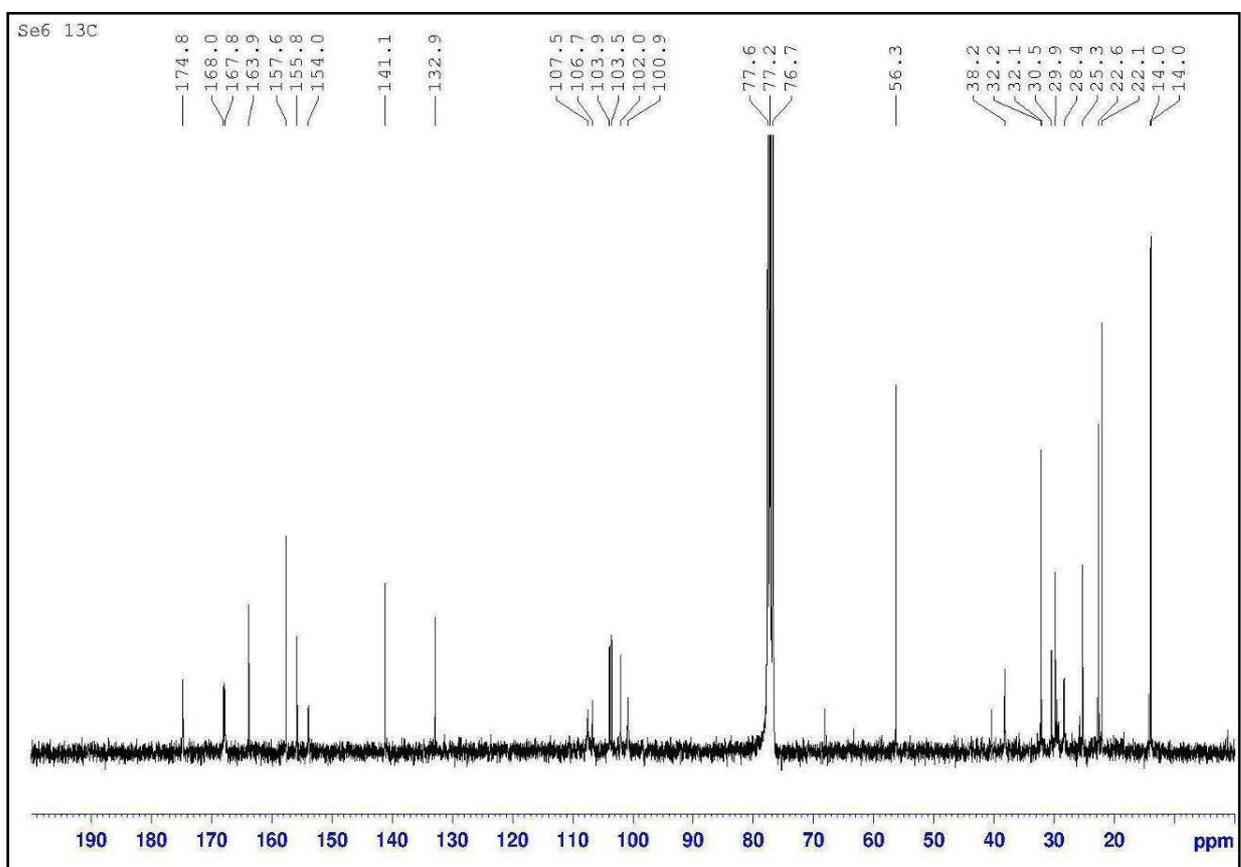
Spectre ^{13}C de l'acide norlobarique **Se18** (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



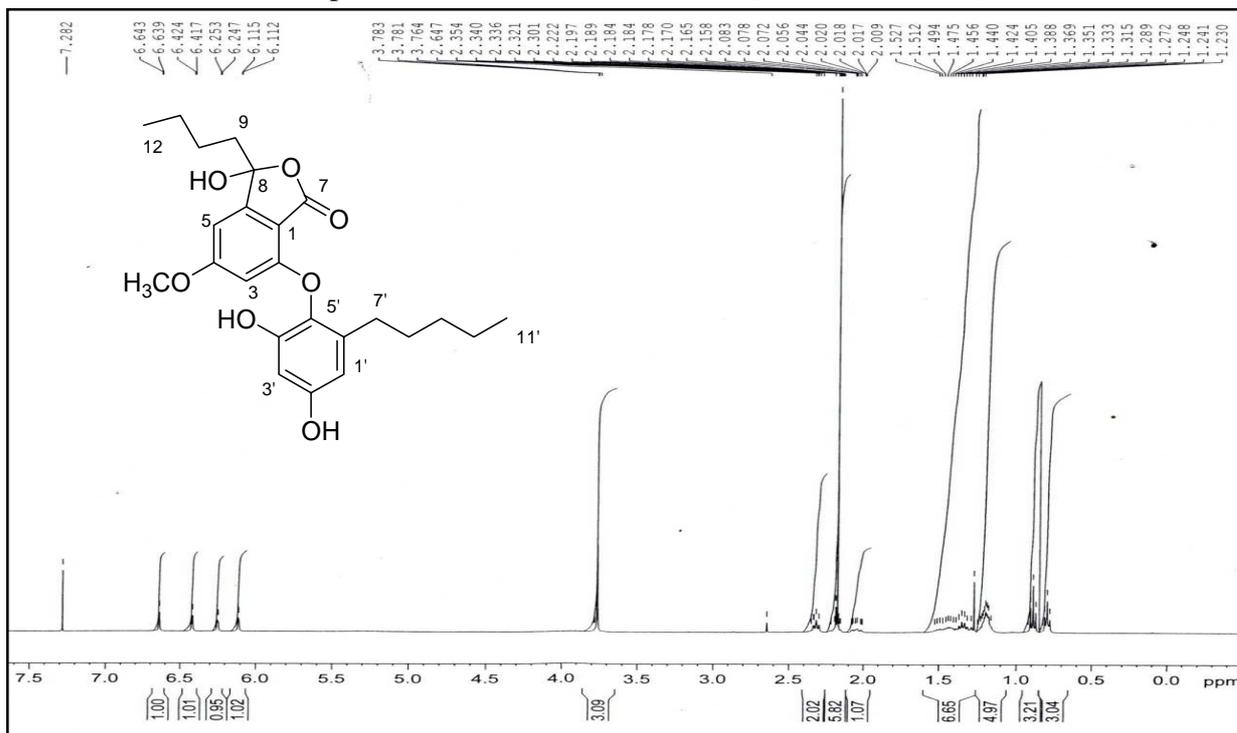
Spectre ^1H de la lobarine Se6 (500 MHz, CDCl_3)



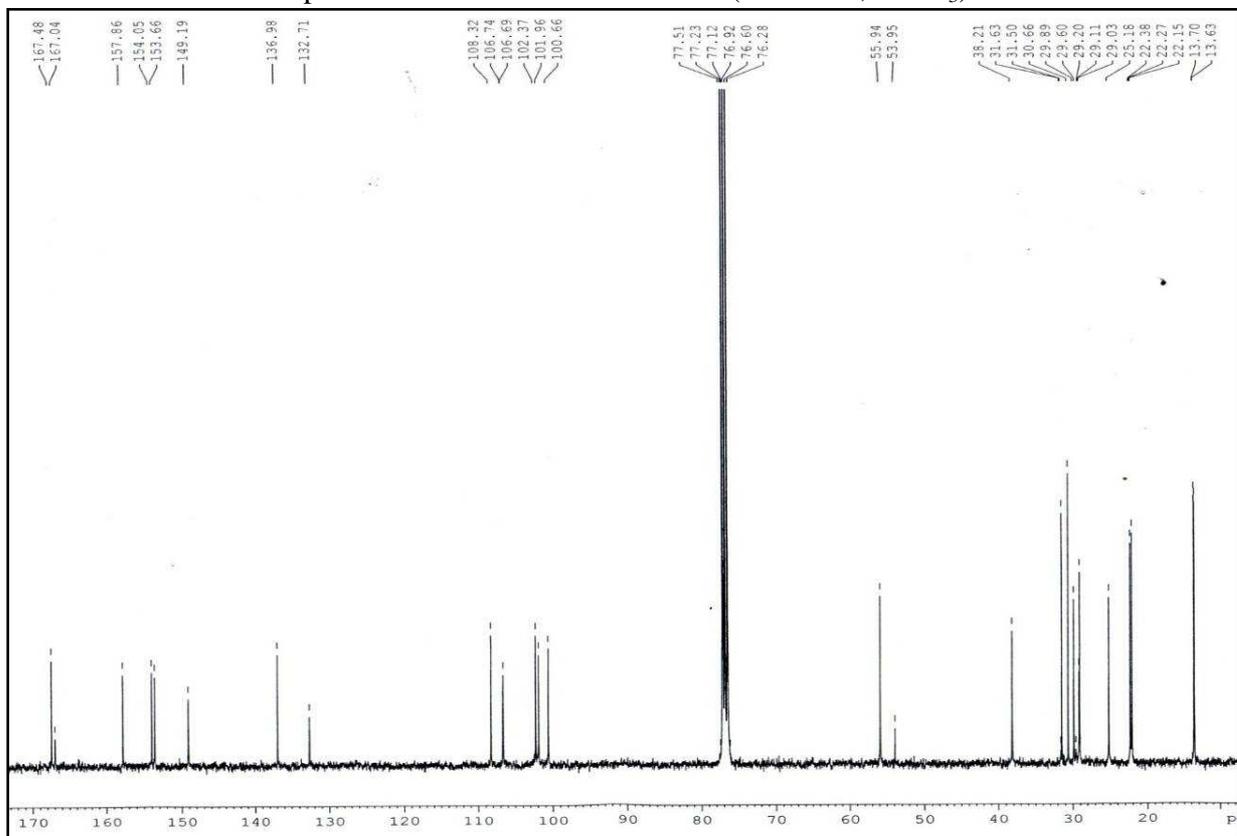
Spectre ^{13}C de la lobarine Se6 (125 MHz, CDCl_3)



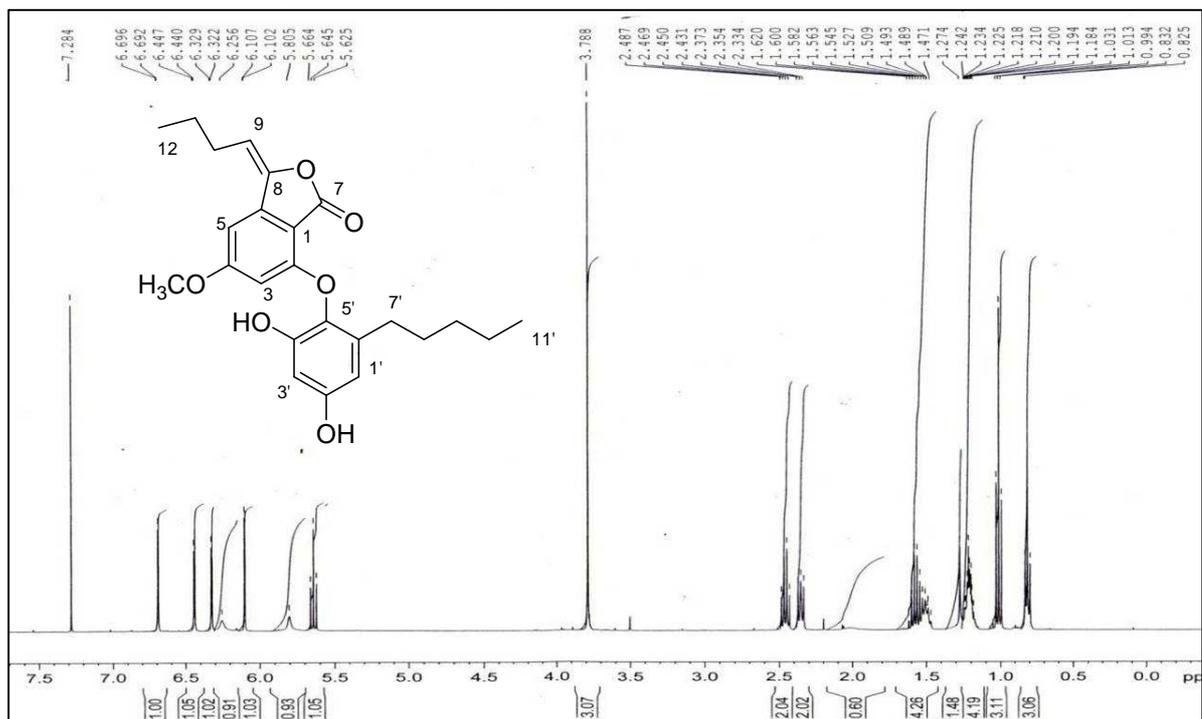
Spectre ^1H du sakisacaulon A Se5 (400 MHz, CDCl_3)



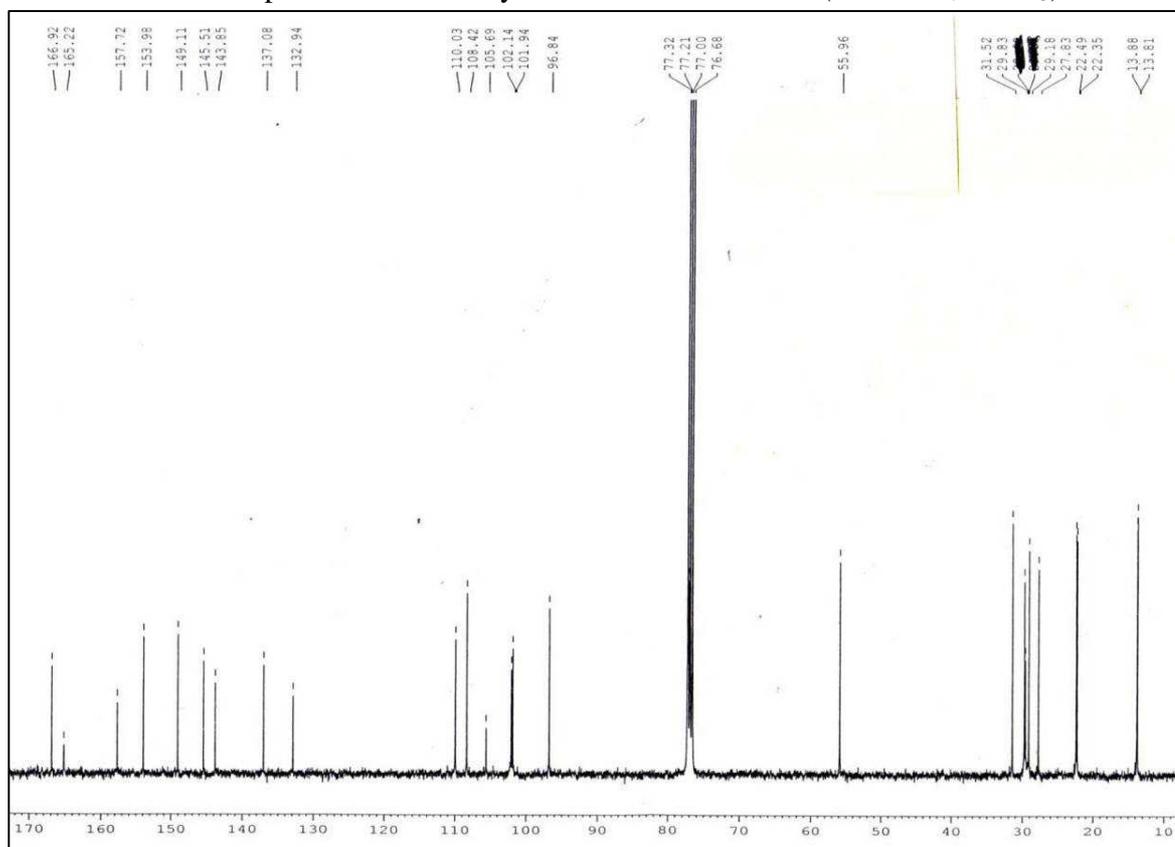
Spectre ^{13}C du sakisacaulon A Se5 (100 MHz, CDCl_3)



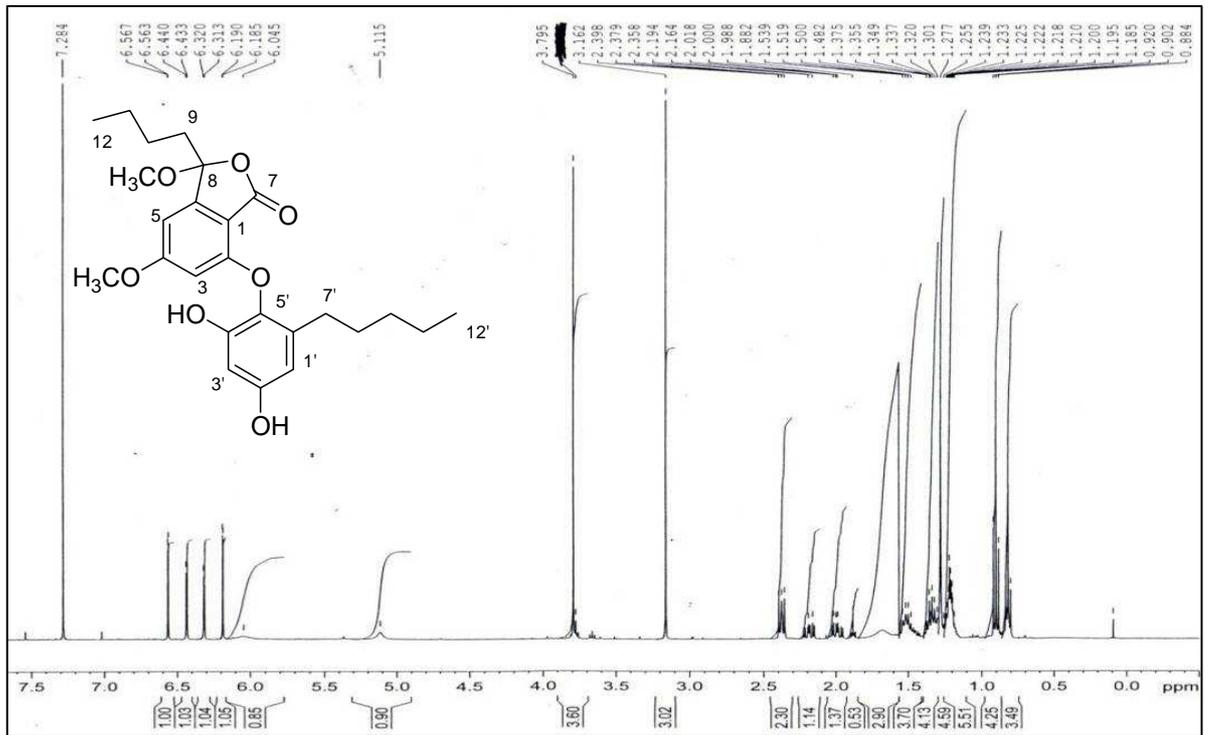
Spectre ^1H de l'anhydro-sakisacaulon A Se7 (400 MHz, CDCl_3)



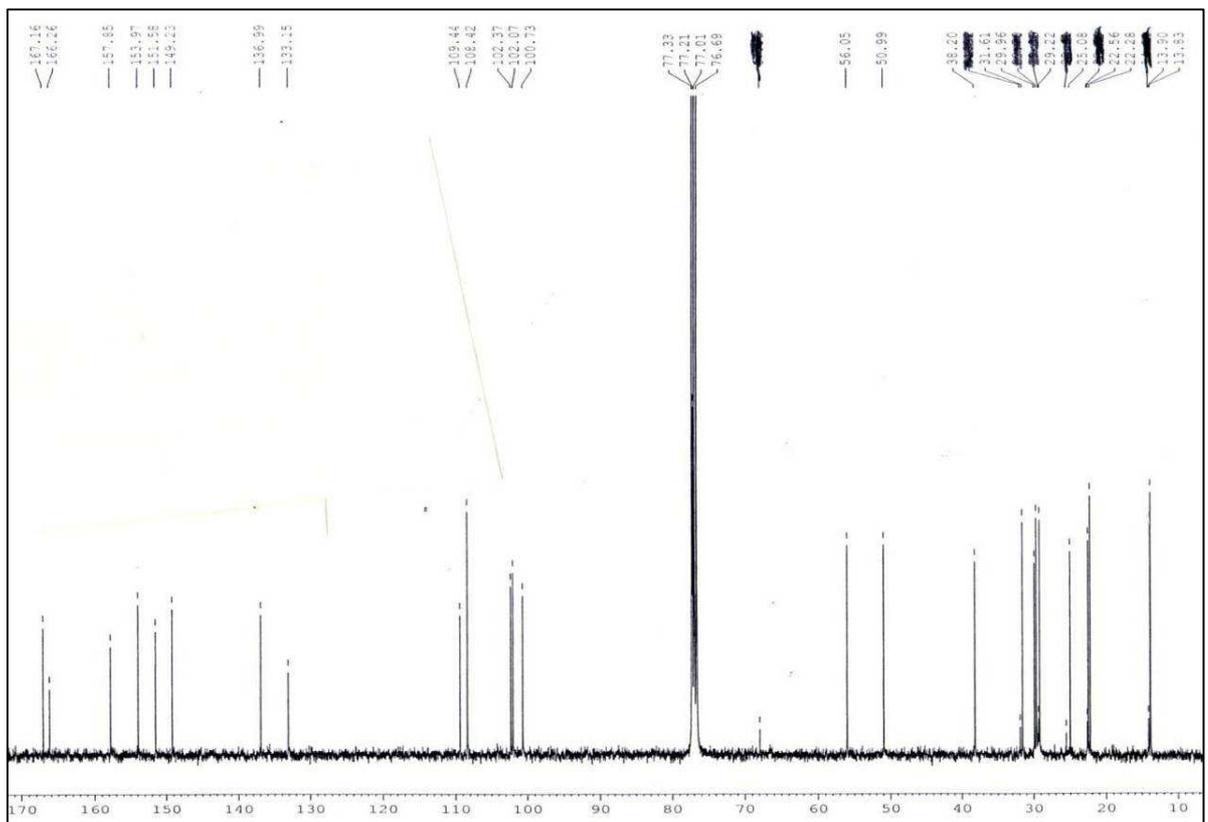
Spectre ^{13}C de l'anhydro-sakisacaulon A Se7 (100 MHz, CDCl_3)



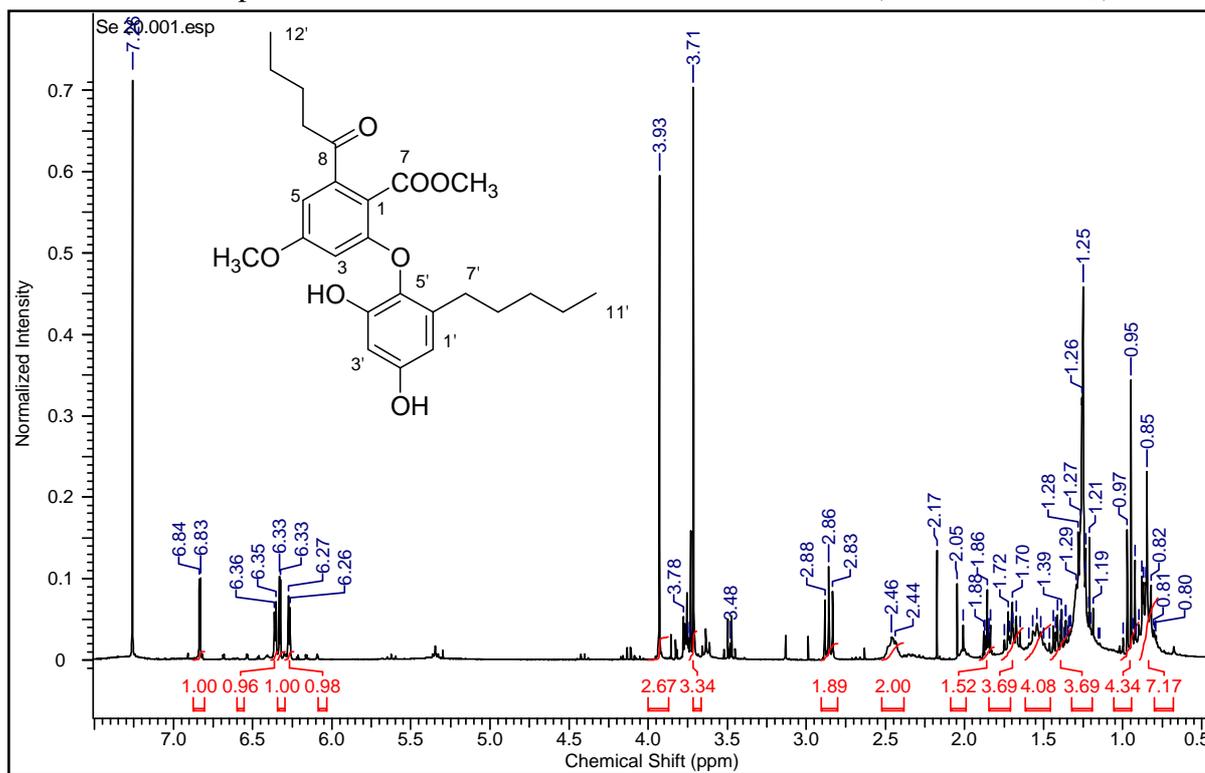
Spectre ^1H du méthyle 8-sakisacaulon A Se16 (400 MHz, CDCl_3)



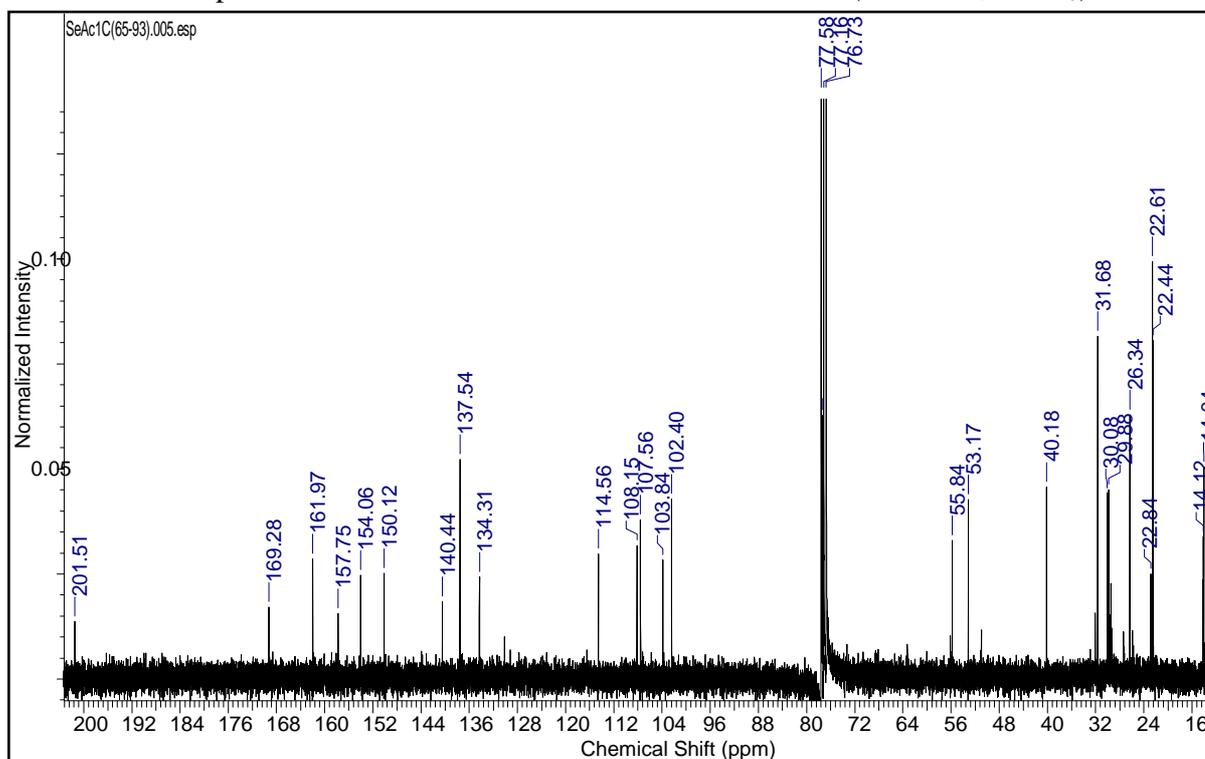
Spectre ^{13}C du méthyle 8-sakisacaulon A Se16 (100 MHz, CDCl_3)



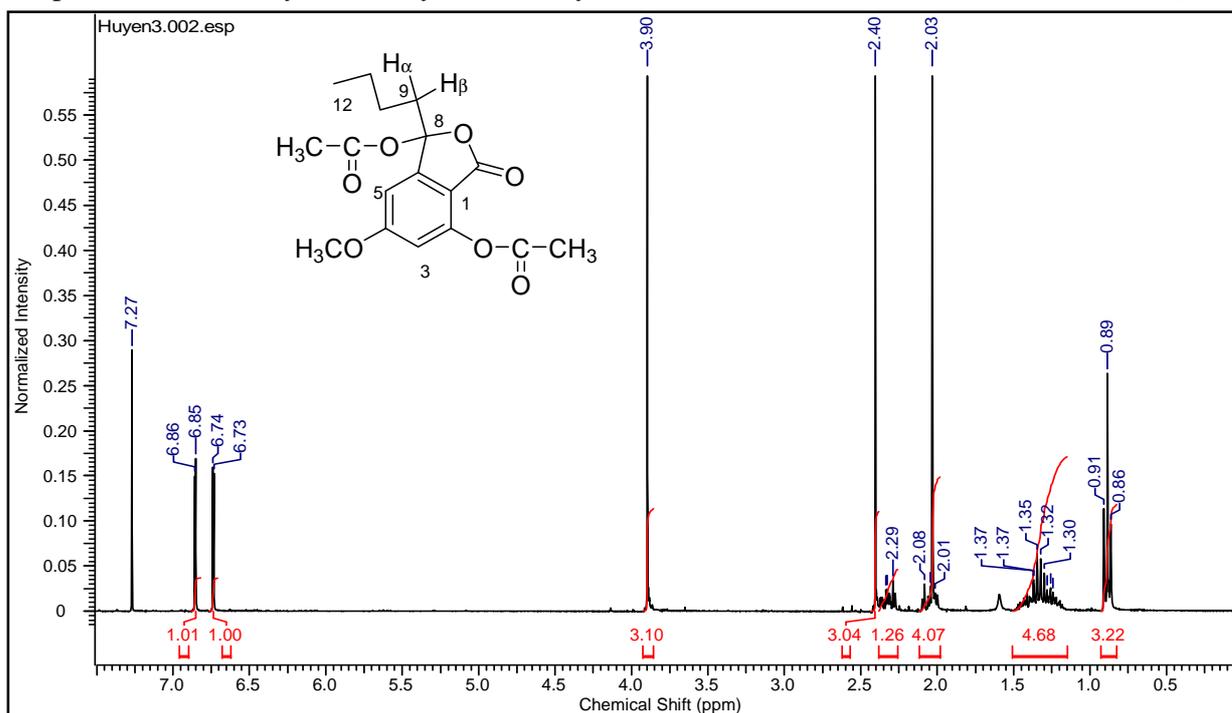
Spectre ^1H du sakisacaulon A estérifié en C-7 Se20 (300 MHz, CDCl_3)



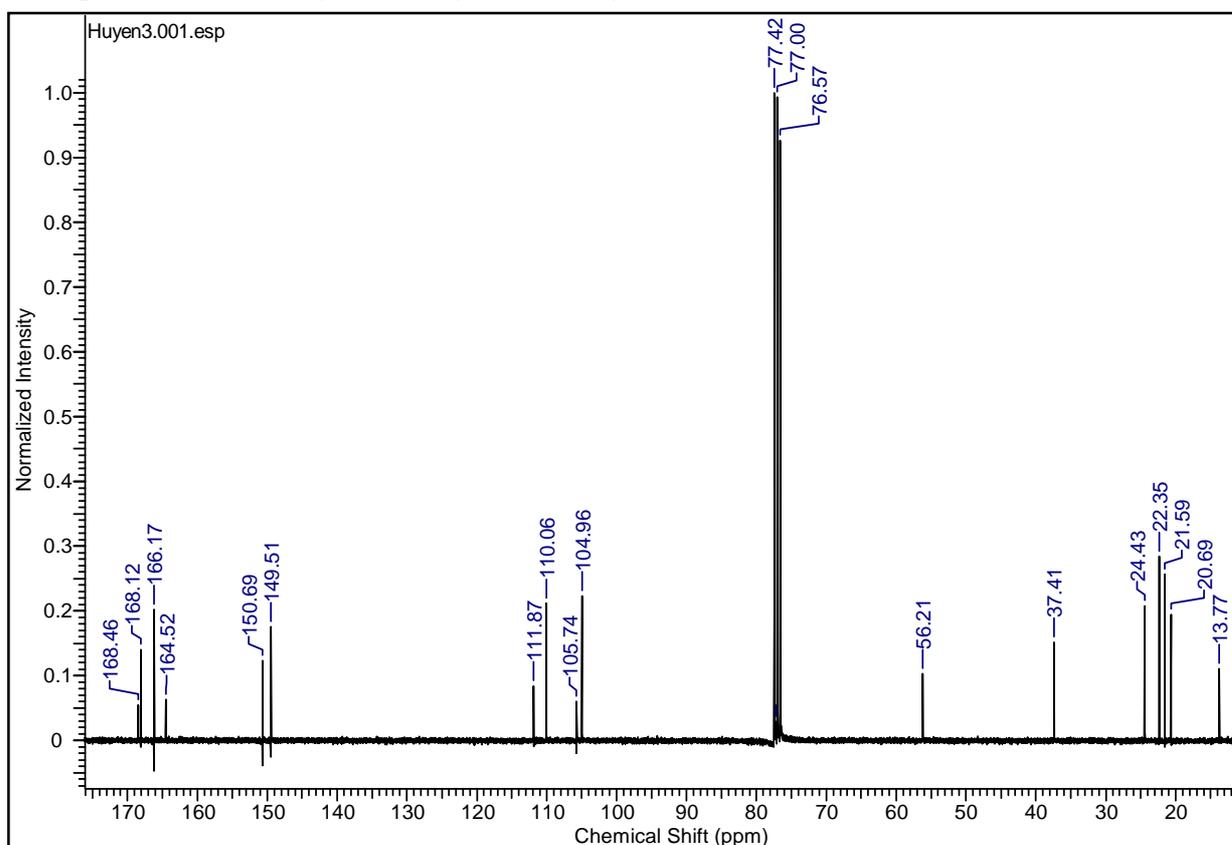
Spectre ^1H du sakisacaulon A estérifié en C-7 Se20 (300 MHz, CDCl_3)



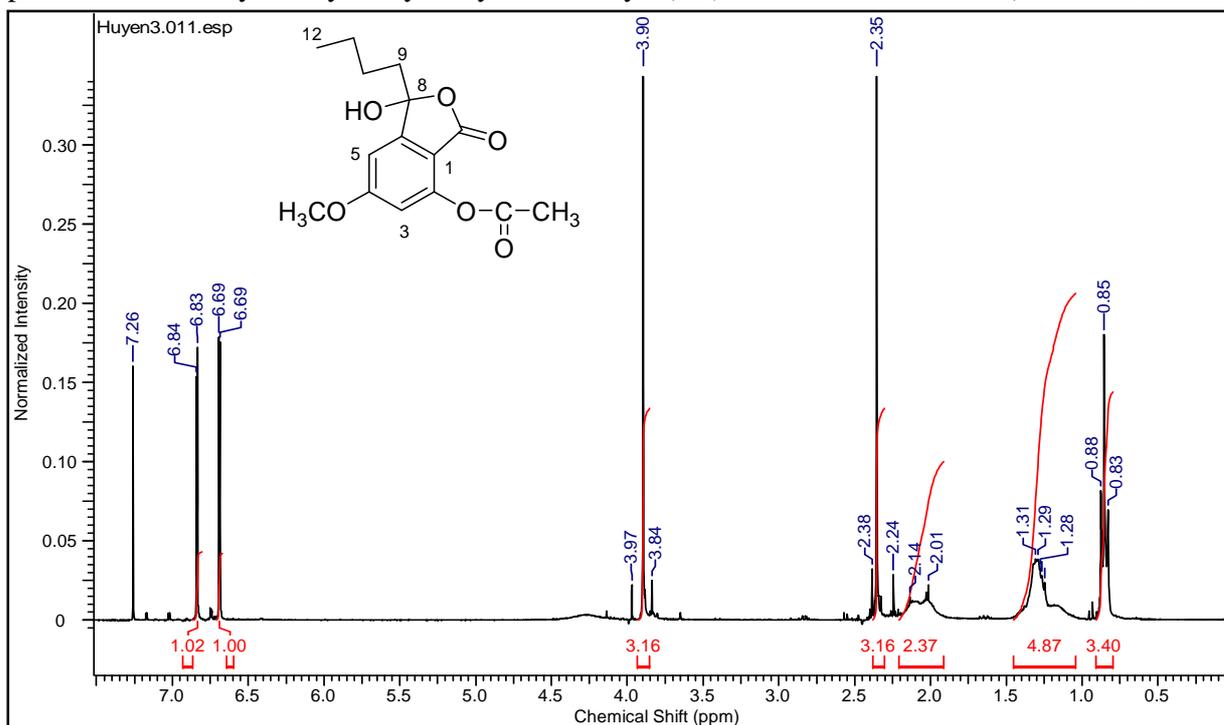
Spectre ^1H du 3-butyl-3,7-diacyl-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8a** (300 MHz, CDCl_3)



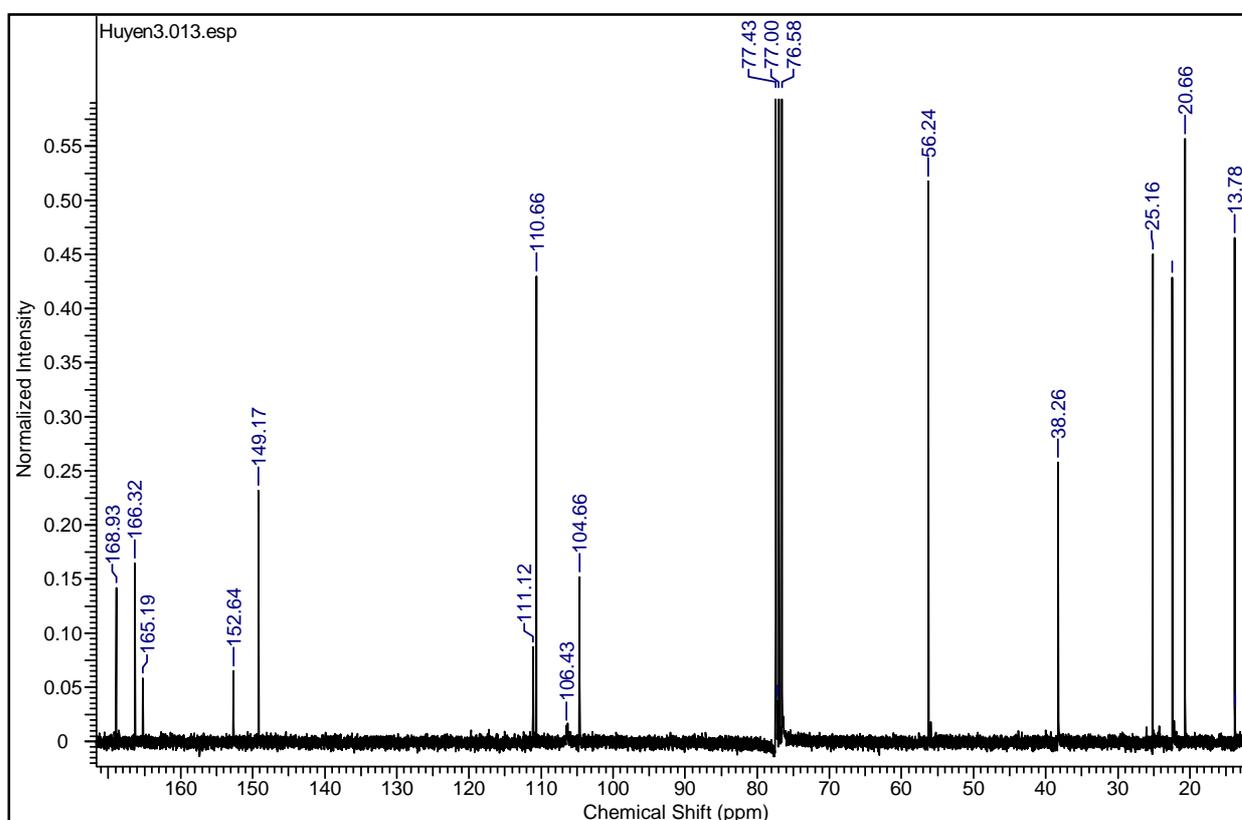
Spectre ^{13}C du 3-butyl-3,7-diacyl-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8a** (75 MHz, CDCl_3)



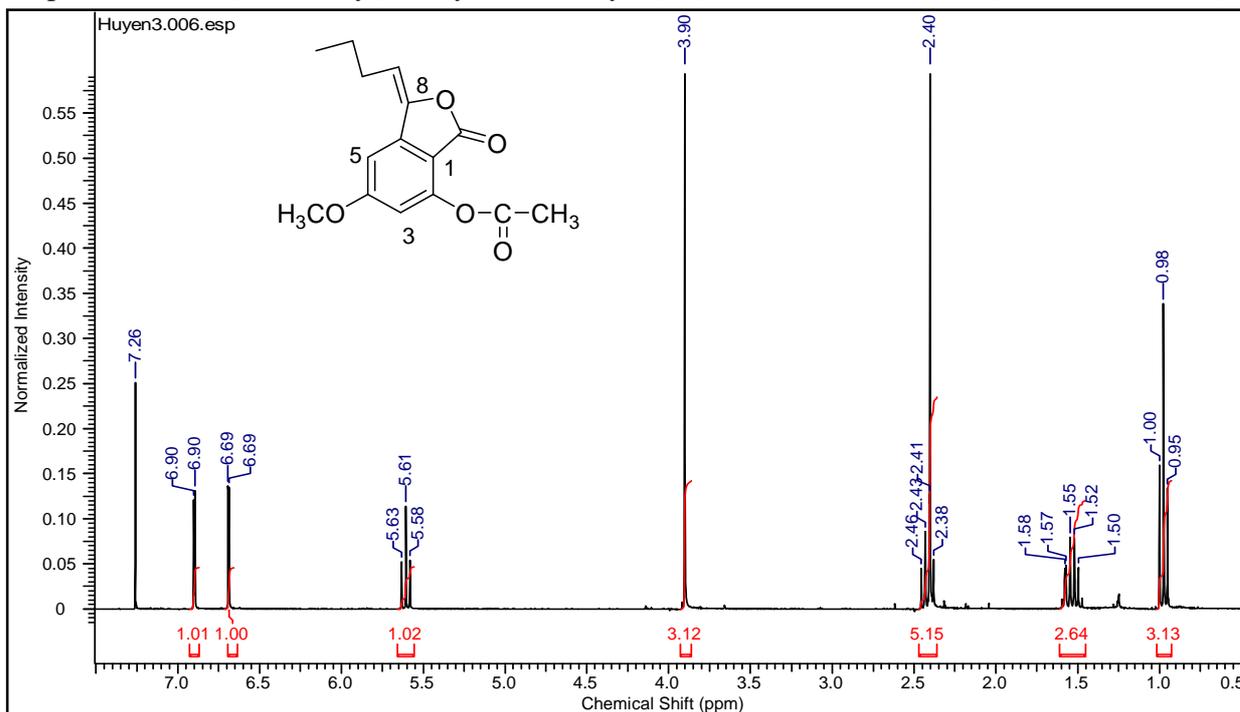
Spectre ^1H du 3-butyl-3-acyl-7-hydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8b** (300 MHz, CDCl_3)



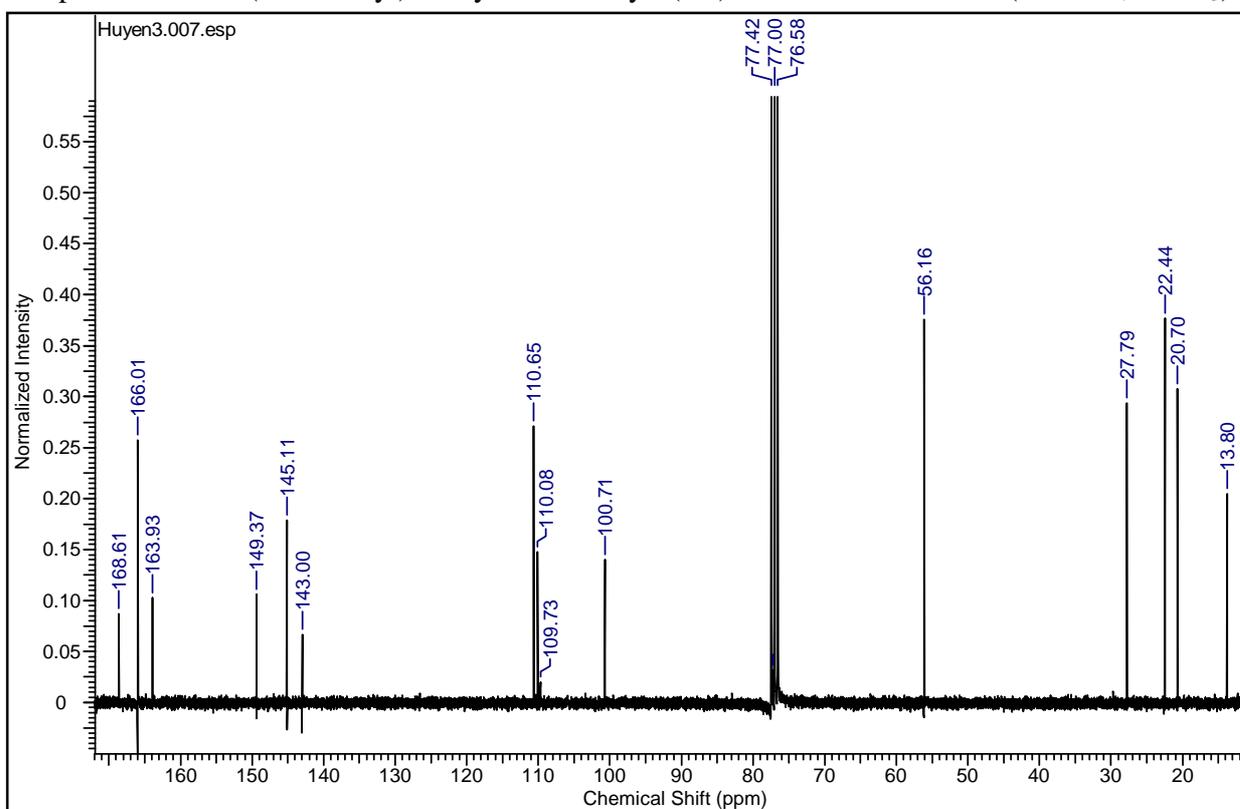
Spectre ^{13}C du 3-butyl-3-acyl-7-hydroxy-5-methoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8b** (75 MHz, CDCl_3)



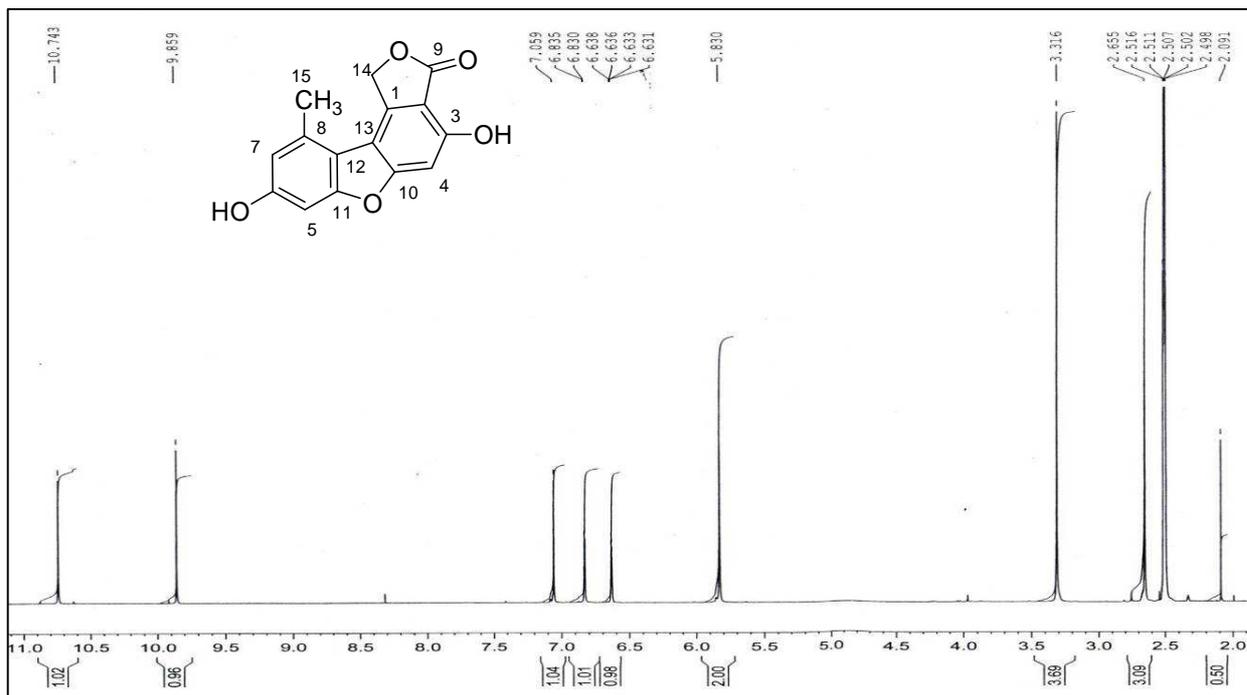
Spectre ^1H du 3(but-1-én-yl)-7-acyl-5-méthoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8c** (300 MHz, CDCl_3)



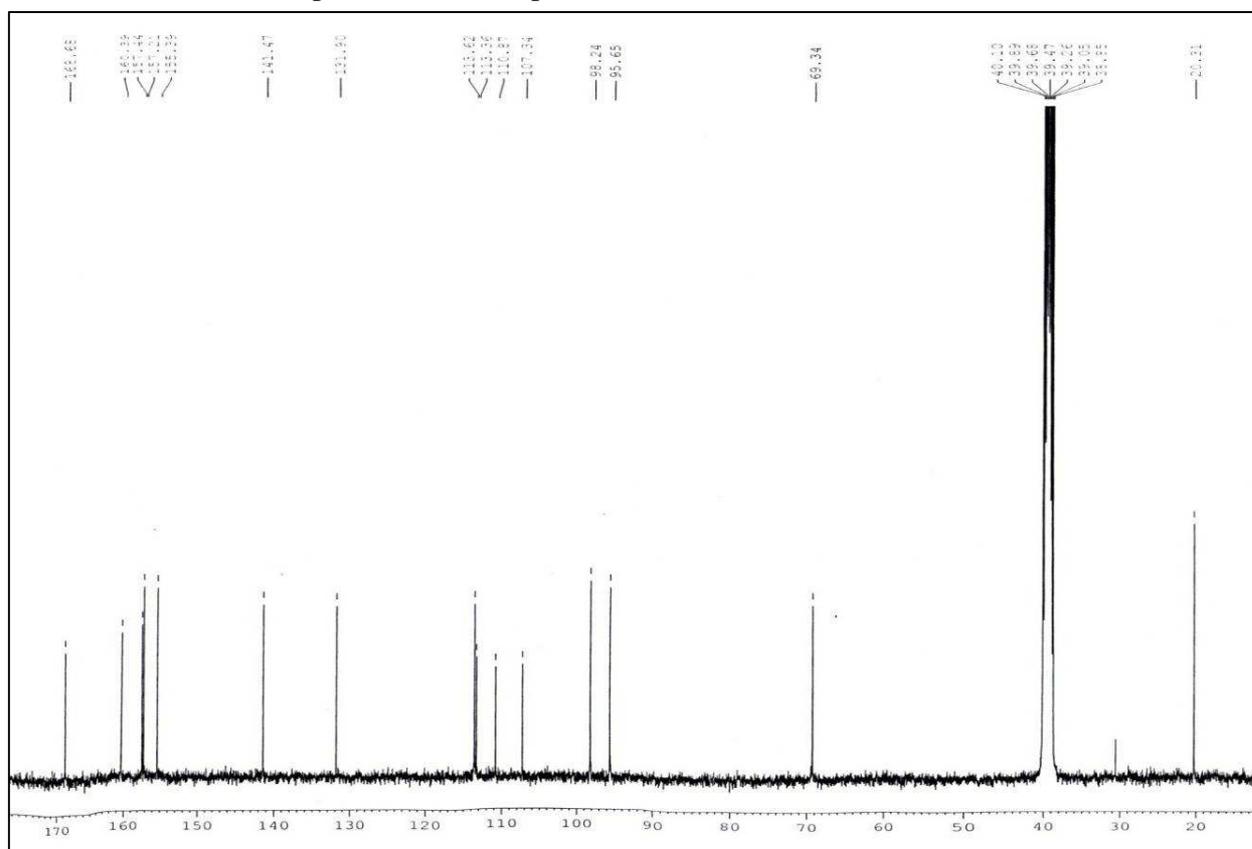
Spectre ^{13}C du 3(but-1-én-yl)-7-acyl-5-méthoxy-1(3*H*)-isobenzofurane **Se8c** (75 MHz, CDCl_3)



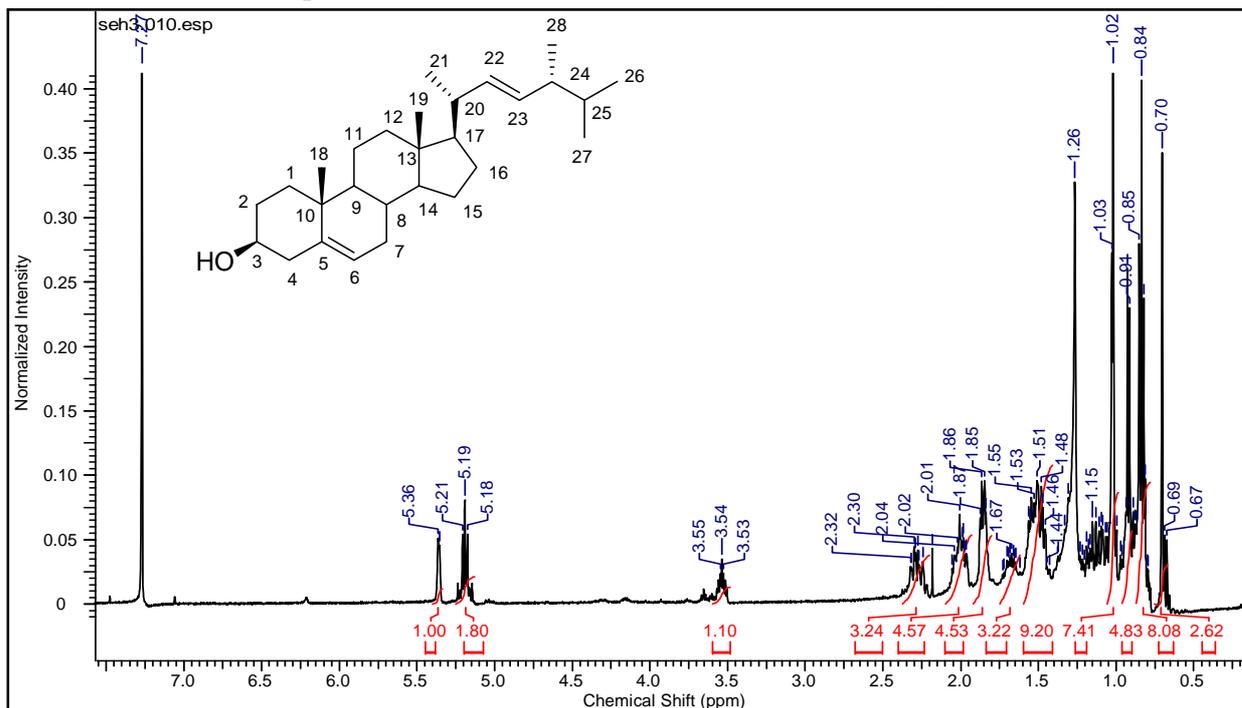
Spectre ^1H du strepsiline **Se13** (400 MHz, $\text{MDSO-}d_6$)



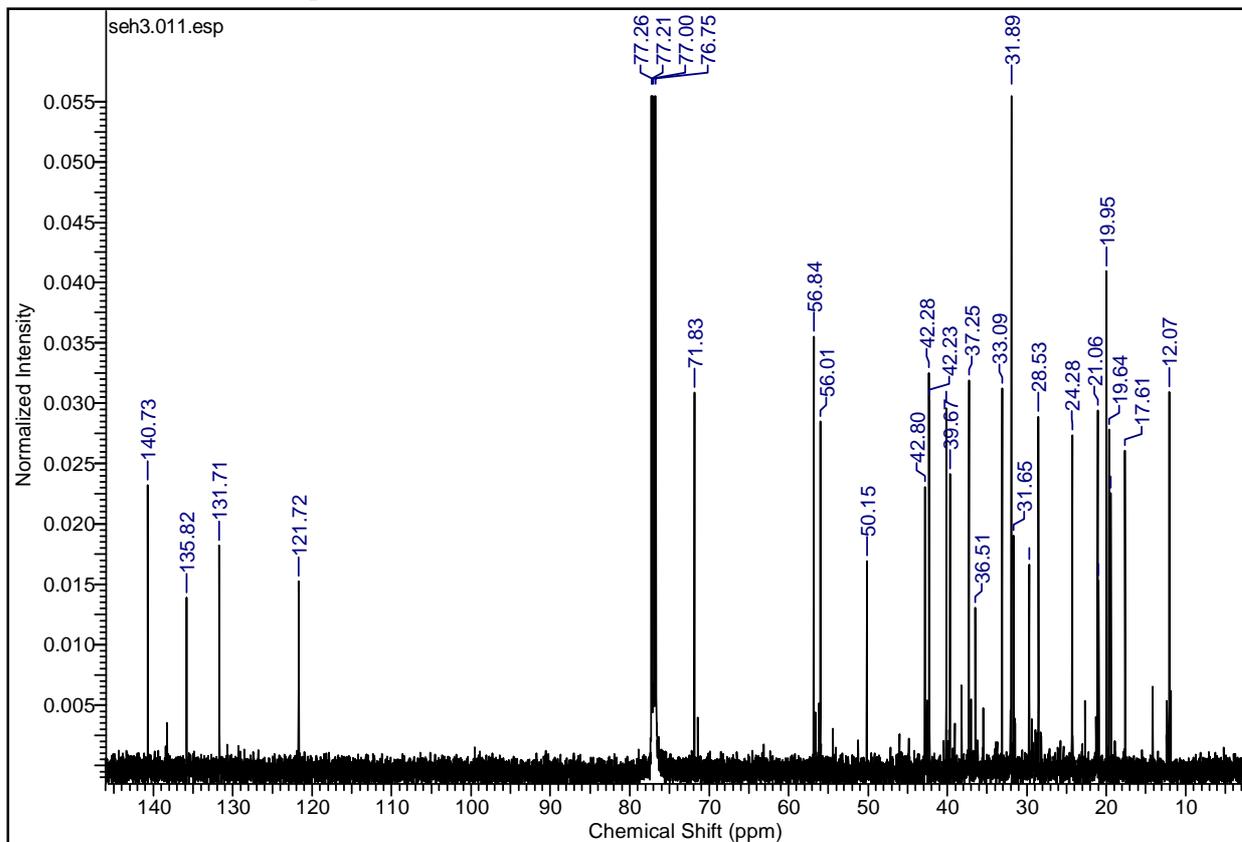
Spectre ^{13}C du strepsiline **Se13** (100 MHz, $\text{MDSO-}d_6$)



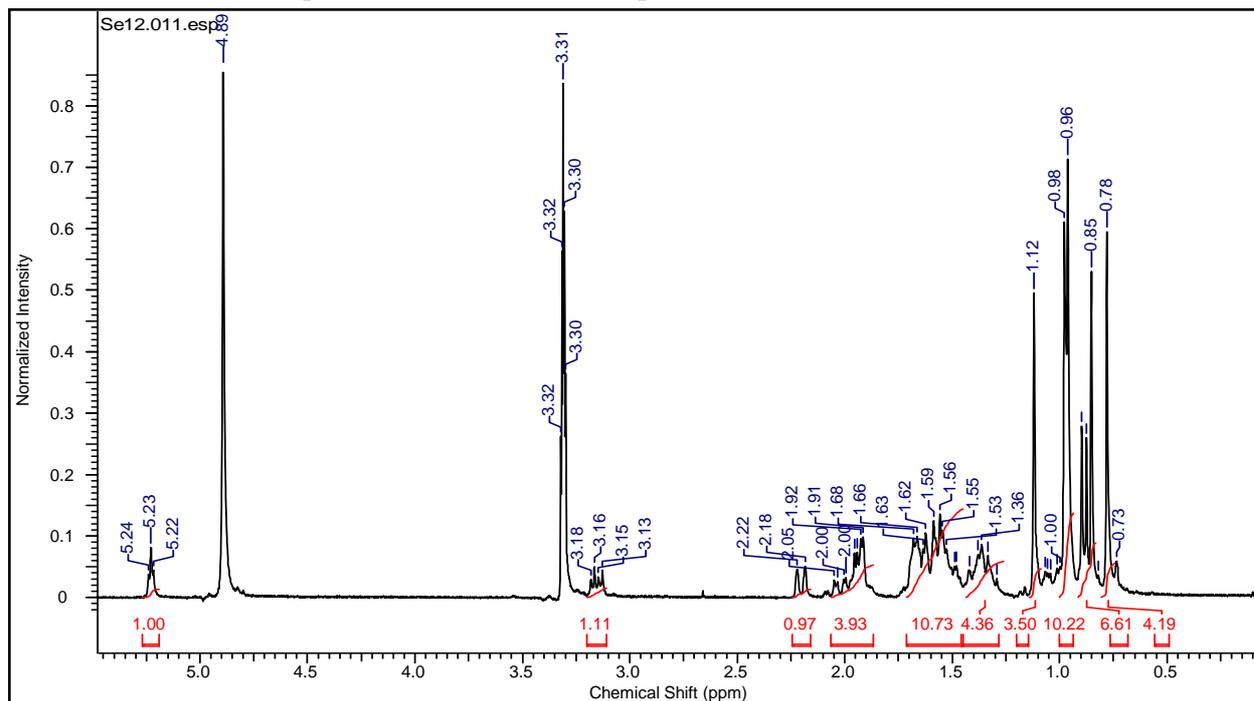
Spectre ^1H du brassicastérol **Seh3** (300 MHz, CDCl_3)



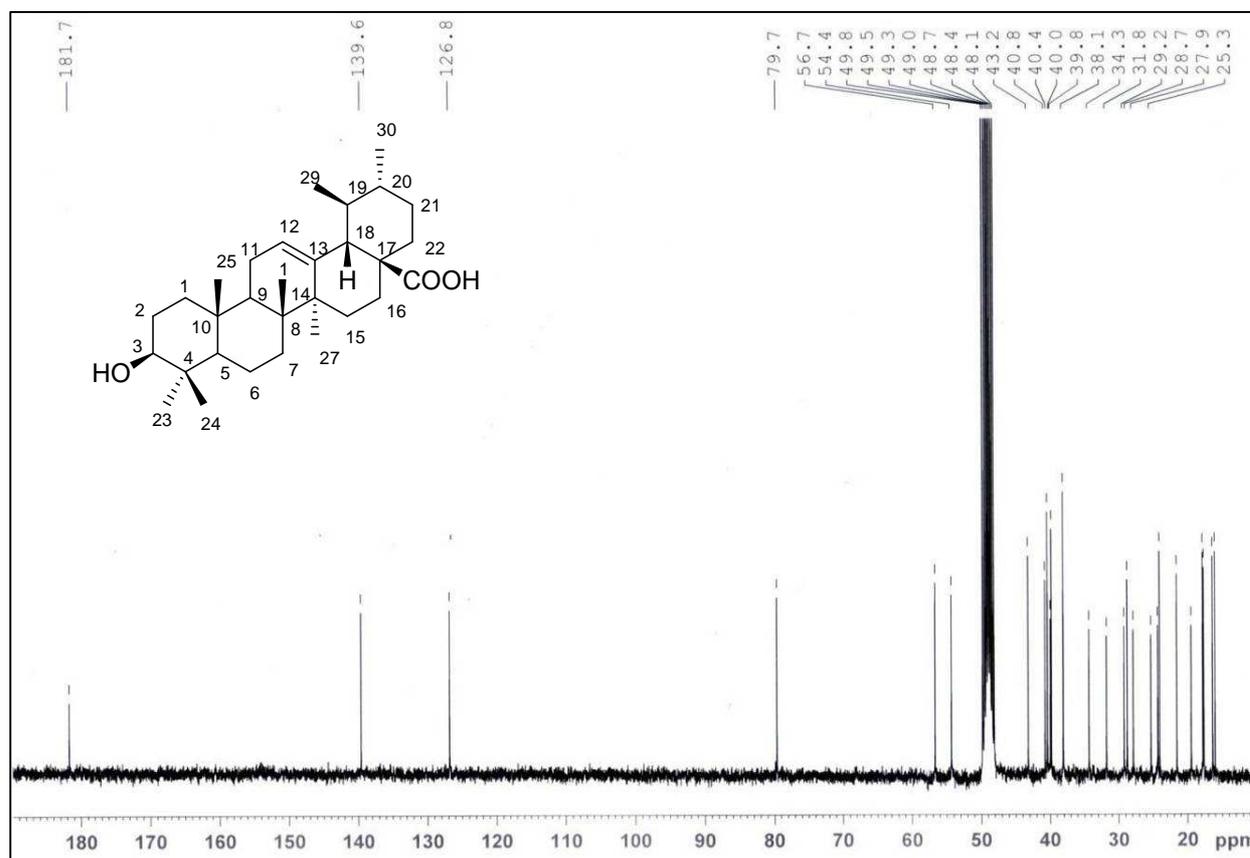
Spectre ^{13}C du brassicastérol **Seh3** (75 MHz, CDCl_3)



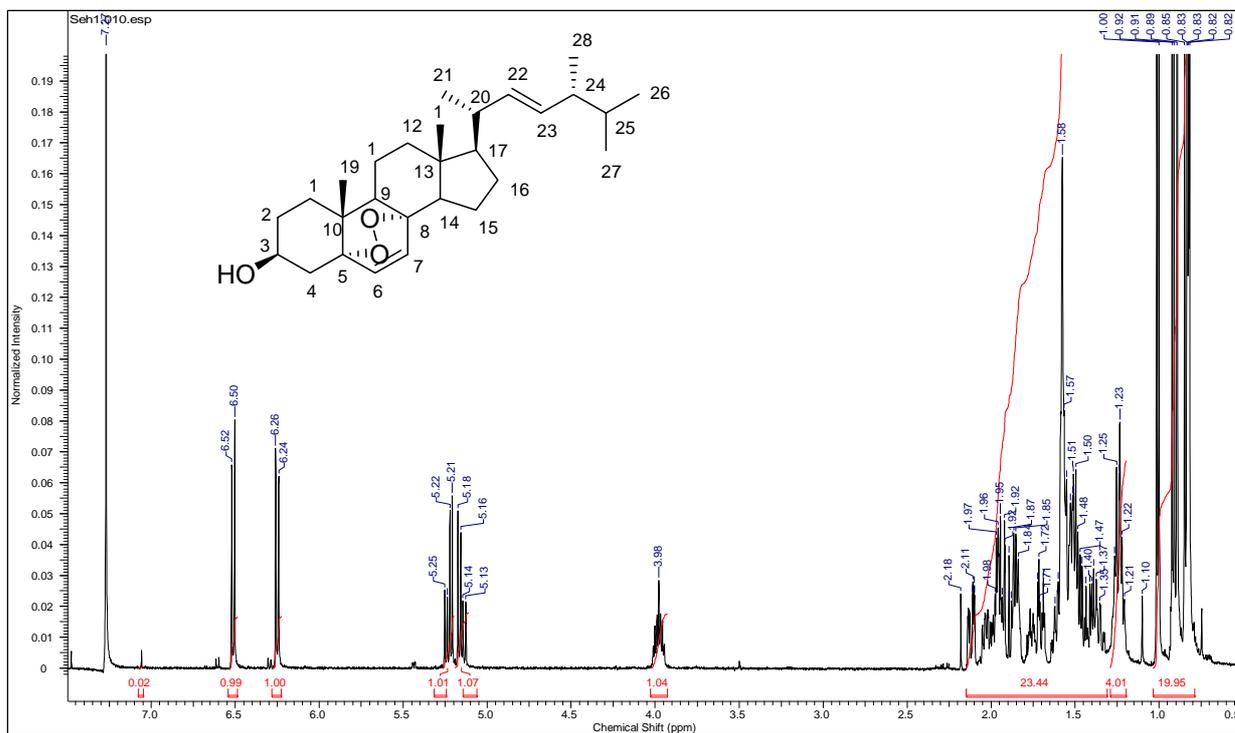
Spectre ^1H de l'acide ursolique **Se12** (300 MHz, CD_3OD)



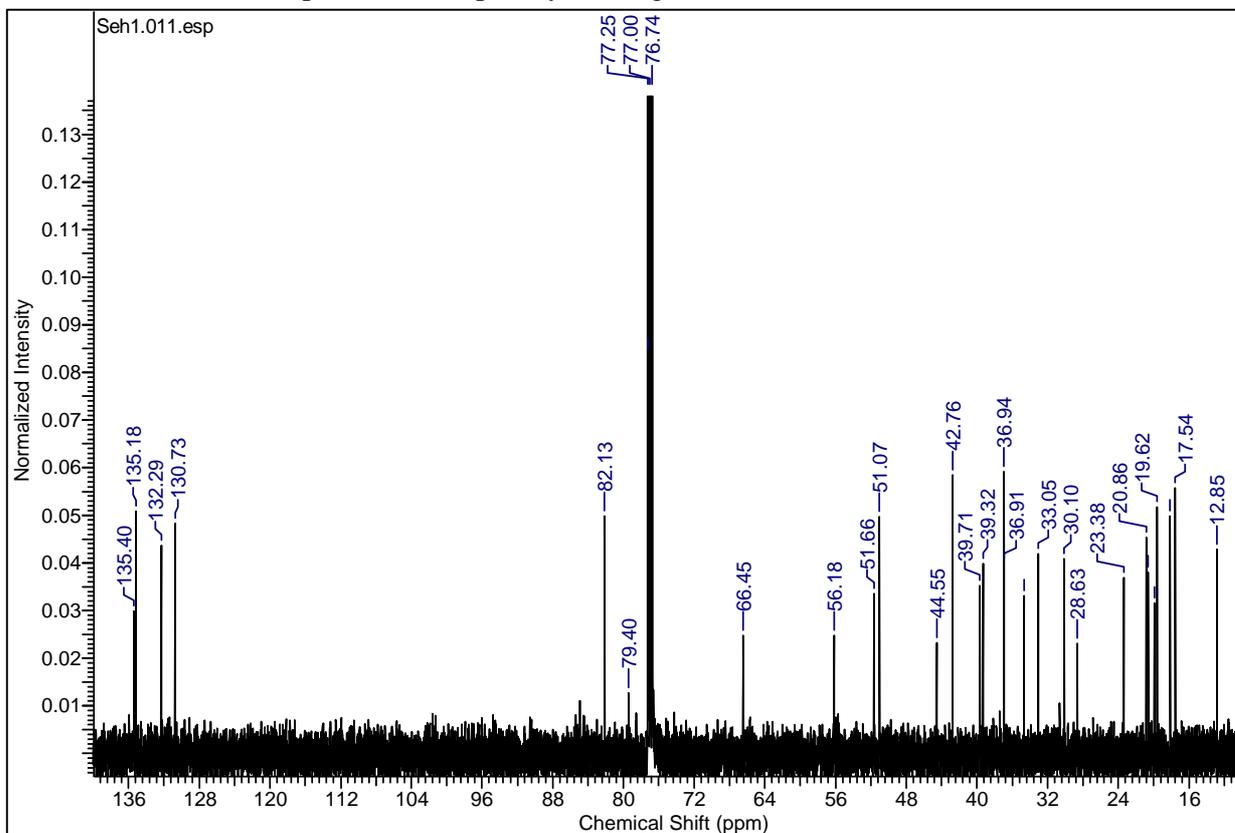
Spectre ^{13}C de l'acide ursolique **Se12** (75 MHz, CD_3OD)



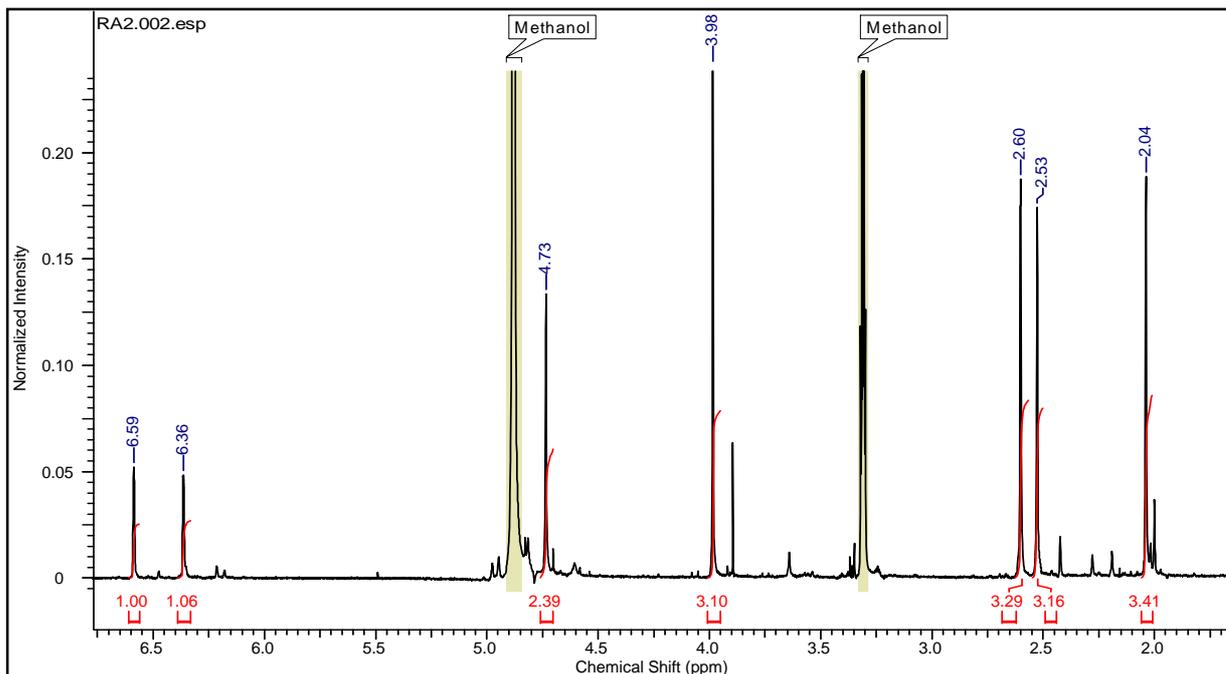
Spectre ^1H du peroxyde d'ergostérol **Seh1** (500 MHz, CDCl_3)



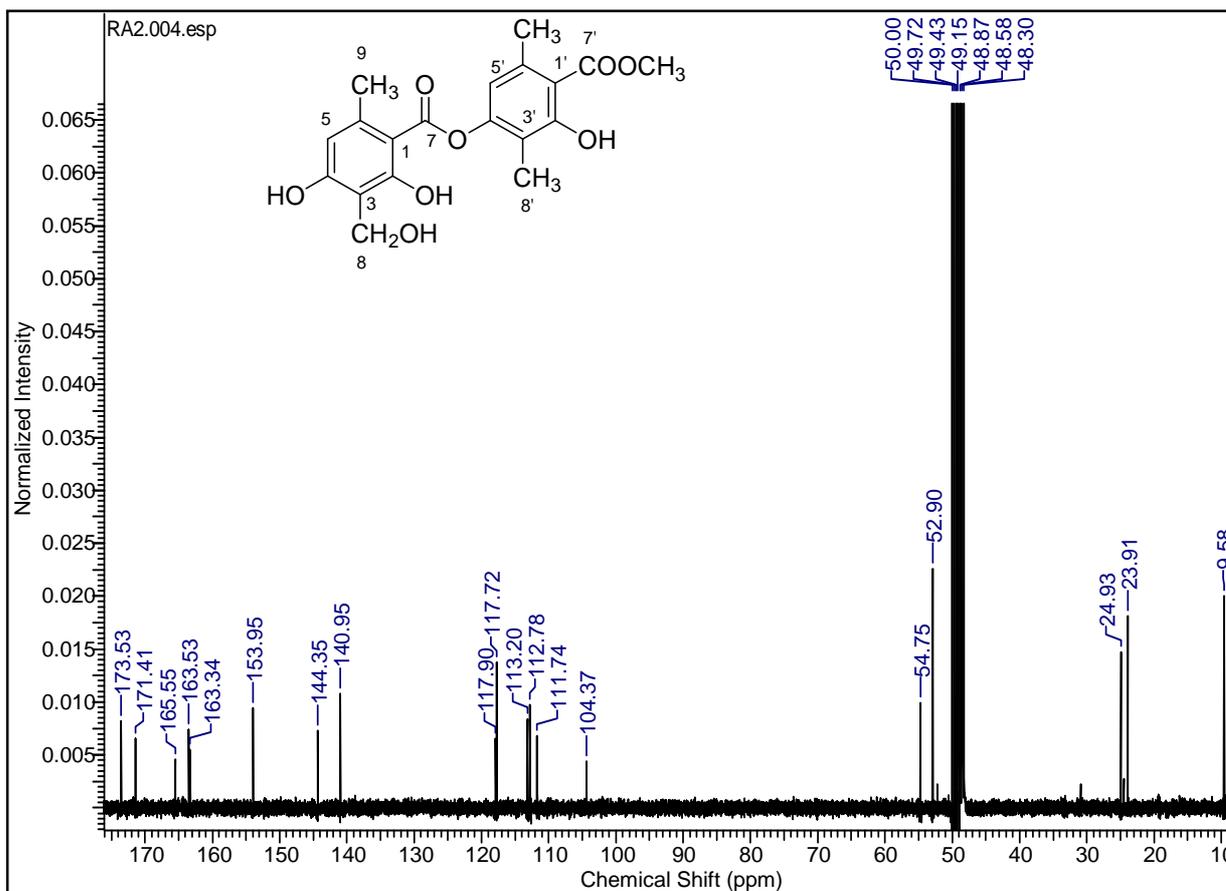
Spectre ^{13}C du peroxyde d'ergostérol **Seh1** (125 MHz, CDCl_3)



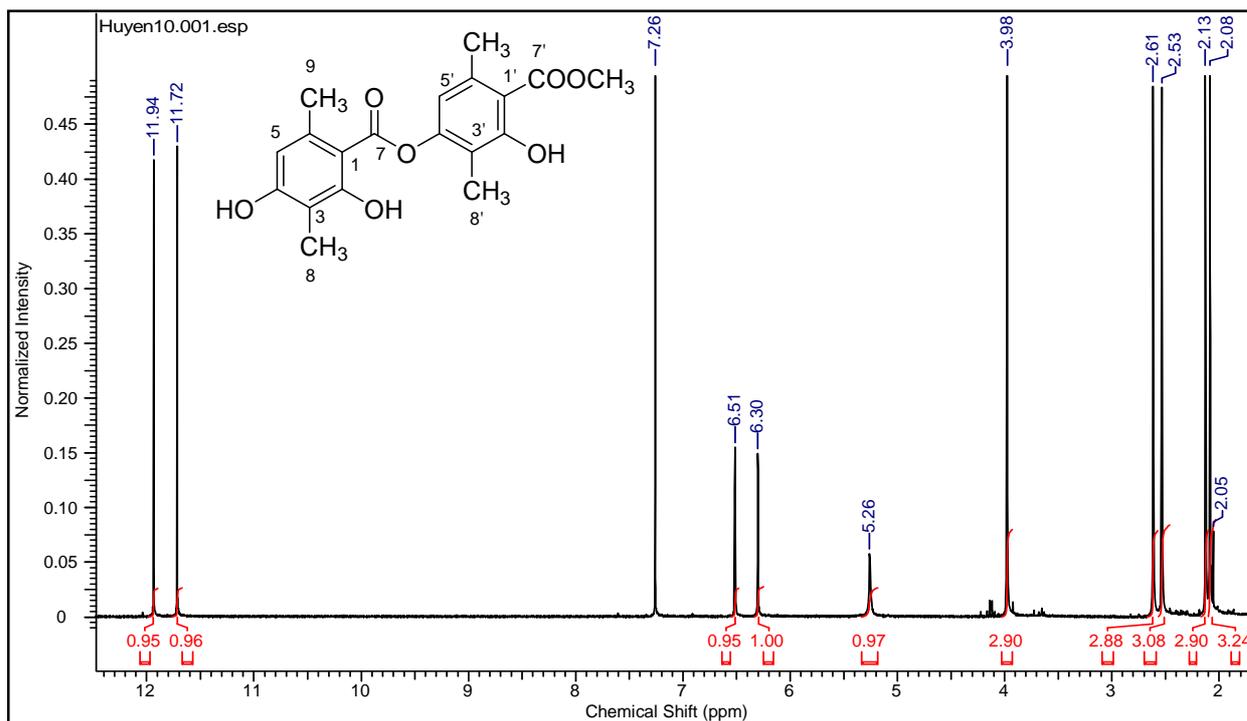
Spectre ^1H du 8-hydroxy-4-*O*-deméthyl barbatate de méthyle AR (300 MHz, CD_3OD)



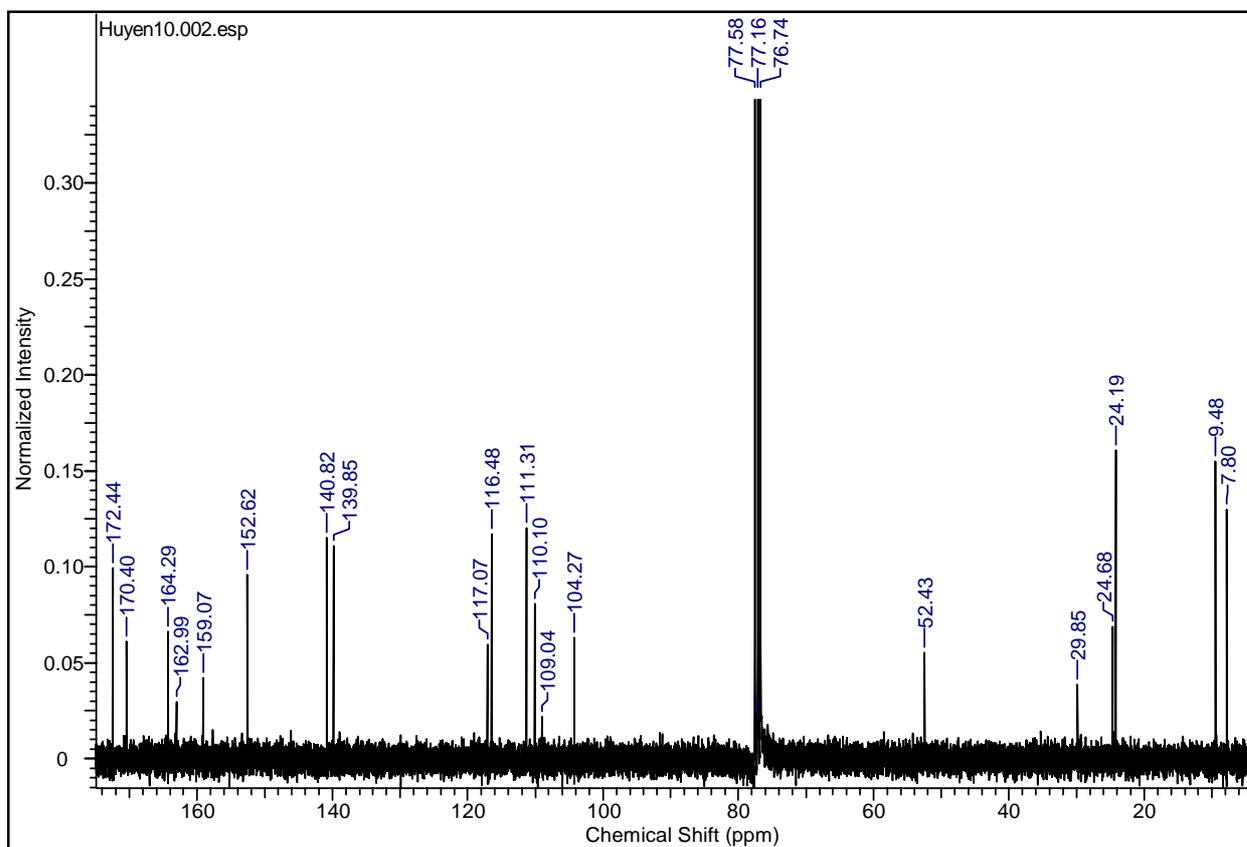
Spectre ^{13}C du 8-hydroxy-4-*O*-deméthyl barbatate de méthyle AR (75 MHz, CD_3OD)



Spectre ^1H du 4-*O*-déméthyl barbatate de méthyle **AR2** (300 MHz, CDCl_3)



Spectre ^{13}C du 4-*O*-déméthyl barbatate de méthyle **AR2** (75 MHz, CDCl_3)



Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe

Résumé : Afin d'apporter une aide pour la chimiotaxonomie du genre *Stereocaulon*, les acides gras totaux de dix espèces de Stéréocaulon, de quelques cyanolichens et d'une cyanobactérie ont été étudiés. Les profils obtenus des acides gras saturés, insaturés et ramifiés ont été comparés par classification hiérarchique ascendante. Les acides gras *iso* et *antéiso* pourraient permettre de distinguer le genre *Stereocaulon* des cyanolichens à la différence des autres classes d'acides gras.

Dans un deuxième temps, l'étude phytochimique du lichen *S. evolutum* récolté en Bretagne a permis d'isoler et de caractériser 22 métabolites secondaires. Parmi ces composés, deux sont nouveaux. Sept molécules possèdent une structure proche de l'atranorine, depside abondant et récurrent chez les Stéréocaulons. L'atranorine ayant montré lors d'un criblage une activité intéressante sur le virus de l'hépatite C, six molécules ainsi que deux dérivés hémisynthétiques ont alors été évalués. L'atranorine et le 4-*O*-déméthylbarbatate de méthyle ont présenté une bonne activité anti-VHC, le premier ciblant l'étape de pénétration et le deuxième l'étape de réplication. D'autres composés, deux depsidones et cinq diphenyléthers, ont été testés sur l'enzyme Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) qui est une cible d'intérêt dans le traitement du diabète de type 2 et le cancer du sein. Les deux depsidones (acide lobarique, acide norlobarique) et un diphenyléther, l'anhydro-sakisacaulon A, ont montré une inhibition de PTP1B avec des CI_{50} similaires au témoin acide ursolique. La modélisation de cette enzyme ayant été réalisée en parallèle, les études de docking ont permis de proposer des mécanismes d'interactions mis en jeu lors de l'inhibition de PTP1B par ces métabolites secondaires lichéniques et d'envisager l'optimisation structurale de ces composés en vue d'augmenter leur activité.

Mots-clés : Lichen, *Stereocaulon*, *Stereocaulon evolutum*, Acides gras, chimiotaxonomie, virus hépatite C, acide lobarique, atranorine, Protéine Tyrosine Phosphatase 1B, Docking.

Fatty acids study in the *Stereocaulon* genus & phytochemical study of the lichen *S. evolutum* Graewe

Abstract: Total fatty acids (FA) of ten species of *Stereocaulon* in addition to cyanolichens and one cyanobacterium were studied. FA profiles based on saturated-, unsaturated- and branched chain-FAs were compared using a hierarchical ascendant classification. Cyanolichens differed from the *Stereocaulon* genus according iso- and anteiso-FAs profiles while no differences were seen according the other FAs families.

The phytochemical study of *Stereocaulon evolutum*, harvested in Brittany, led to isolation and identification of 22 secondary metabolites. Two were new for lichens. Among the isolated compounds, seven compounds were structurally close to atranorin, a common and abundant depside in the *Stereocaulon* genus. In a previous screening, atranorin exhibited a noteworthy HCV inhibition, thus six lichen compounds and two synthetic molecules were also tested. Atranorin and methyl 4-*O*-demethylbarbatate were the most potent without any cytotoxicity, the first being active towards the virus penetration and the latter against the virus replication. Two depsidones and five diphenylethers were also isolated and were evaluated on the Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), a promising target for type 2 mellitus diabetis and breast cancer. Both depsidones (lobaric acid, norlobaric acid) and the diphenylether anhydrosakisacaulon A were as potent as the positive control ursolic acid. Simultaneously, a molecular docking study between PTP1B and the seven compounds suggested the most significant interactions to conceive possible more active compounds.

Keywords : Lichen, *Stereocaulon*, *Stereocaulon evolutum*, fatty acid, chemotaxonomy, hepatitis C virus, lobaric acid, atranorin, Protein Tyrosine Phosphatase 1B, Docking.