HAL open science

Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles

Alix Poinso

To cite this version:

Alix Poinso. Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30378 . tel-01754826

HAL Id: tel-01754826

https://theses.hal.science/tel-01754826v1

Submitted on 30 Mar 2018

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.

Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Alix POINSO-OLLIVIER

Le 23 novembre 2016

Titre :

Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles

---

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

Laboratoire des IMRCP (Intéractions moléculaires et Réactivités Chimique et Photochimique)

Directeur(s) de Thèse :

Mme Patricia VICENDO
M. François COUDERC

Rapporteurs :

M. Franck SUREAU, Chargé de recherches CNRS
Mme Nathalie DEMONT-CAULET, Maître de conférence à l'université Paris Diderot

Autre(s) membre(s) du jury :

M. Éric BENOIST, Professeur à l'université Paul Sabatier, Président
Mme Patricia VICENDO, Directrice de recherches, Examinatrice

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Alix POINSO-OLLIVIER

le mercredi 23 novembre 2016

TITRE :

Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé – CO 042

Unité de recherche :

Laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et des Réactivités Chimique et Photochimique)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Docteure Patricia VICENDO

Professeur François COUDERC

Jury :

M. E. BENOIST, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Président

Mme Nathalie DEMONT-CAULET, Maître de Conférences à l'Université Paris Diderot, Rapporteur

M. Franck SUREAU, Chargé de recherches CNRS, Rapporteur

Mme Patricia VICENDO, Directrice de recherches, Examinatrice

M. Mohamed HADDAD, Chargé de recherches IRD, Membre invité

M. Guillaume MARTI, Maître de conférences à Université Paul Sabatier, Membre invité

M. François COUDERC, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Membre invité

École doctorale :

Unité de recherche :

IMRCP Université Paul Sabatier, bâtiment 2R1, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse

Age quod agis…

Ce travail a été effectué en majeure partie au sein du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique), sous la direction de Mme. la Dr. Patricia VICENDO, chargée de recherches, et M. le Pr. Françoic COUDERC.

Le travail d'extraction et celui effectué en spectrométrie de masse a été réalisé au laboratoire de Pharmacologie et Pharmacochimie pour le développement, PHARMA-DEV, unité mixte de recherche entre l'Université Paul Sabatier III (UPS) et l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), sous la supervision de MM. le Pr. Nicolas FABRE, le Dr. Mohamed HADDAD, chargé de recherches et le Dr. Guillaume MARTI, maître de conférences.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me fait le Pr. Eric BENOIT, du laboratoire SPCMIB (Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique) et directeur de l'école doctorale Sciences de la Matière, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de ma thèse. Je souhaite exprimer ici toute la gratitude que j'ai à son égard pour avoir suivi ma thèse avec tant de bienveillance et de persévérance et ce malgré la charge de travail que lui confèrent ses nombreuses fonctions.

Je suis très honorée de remercier Dr. Nathalie DEMONT-CAULET, Maître de Conférences à l'Université Paris Diderot, chercheur à l'INRA de Versailles (UMR 1402 ECOSYS, Pôle Écotoxicologie) de même que Dr. Franck SUREAU, chargé de recherches CNRS, du laboratoire Jean Perrin (UMR 8237 - CNRS-UPMC) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cet ouvrage.

Je remercie sincèrement Dr. Mohamed HADDAD, chargé de recherches à l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) et responsable de l'équipe PEPS (Pharmacognosie, ethnopharmacologie et pathologies du Sud) de l'UMR 152 IRD-UPS, pour sa présence au sein de mon jury, ainsi que pour avoir suivi mon travail sur les endophytes. Ses nombreuses occupations ne l'ont pas empêché de me consacrer de précieux moments de fructueuses discussions. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Ce travail doit beaucoup au Dr. Guillaume MARTI, maître de conférences (Université Paul Sabatier), Pharma-DEV (UMR 152 IRD-UPS) qui n'a pas hésité à consacrer de nombreuses heures à la partie expérimentale LC-MS de ce travail et à m'expliquer le fonctionnement des logiciels de masse. J'y ajoute mes vifs remerciements pour avoir accepté la charge que lui crée la fonction de membre invité de ce jury.

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse, Dr. Patricia VICENDO, directrice de recherche, équipe IDEAS, du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique), qui a en outre accepté d'être l'examinatrice

de ce travail et Pr. François COUDERC, équipe MAPES, du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique) pour avoir si assidument suivi mon travail de thèse et m'avoir orientée dans les périodes de doute.

Je les remercie enfin tous deux pour m'avoir permis d'être autonome et donné de belles opportunités durant la réalisation de cette thèse en me permettant de travailler au sein de l'UMR 152 (IDR-UPS).

Merci au ministère de la recherche pour l'octroi de ma bourse de thèse, sans laquelle toute cette aventure n'aurait pas été possible.

J'en profite pour remercier également l'AFERP (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie) qui m'a financièrement aidée à m'envoler pour Copenhague lors du 16e Congrès sur les Substances Naturelles de 2016.

Je suis redevable à Pr. Nicolas FABRE, directeur de l'UMR 152 (Université Paul Sabatier), Pharma-DEV (UMR 152 IRD-UPS) pour m'avoir si gentiment accueillie dans son laboratoire, me permettant ainsi de travailler sur les endophytes et plus largement sur les substances naturelles. Grâce à lui j'ai aussi eu la chance de co-encadrer les TP de botanique et de pharmacognosie deux années durant, expérience très enrichissante et qui m'a permis de découvrir d'autres aspects du métier d'enseignant chercheur. Qu'il soit assuré de ma plus sincère reconnaissance.

Que Marieke VANSTEELANDT, maître de conférences (Université Paul Sabatier), Pharma-DEV (UMR 152 IRD-UPS) qui a suivi ce travail et m'a entre autres enseigné les rudiments de la culture des endophytes et qui a été ma tutrice en enseignement, reçoive ici l'expression de toute ma gratitude.

Je prie également Justine CHERVIN, doctorante à l'UMR 152 IRD-UPS, équipe, de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma gratitude pour l'aide qu'elle m'a donnée avec tant de gentillesse dans la prise en main des logiciels obscurs de masse. Grâce à toi, on peut presque dire qu'ils n'ont plus de secrets pour moi !

J'exprime ma gratitude au Dr. Alexandre MACIUK, Maître de conférences, de l'équipe de Chimie des Substances Naturelles de l'université Paris-Sud, qui m'a suggéré une nouvelle approche dans la recherche d'inhibiteurs de la SOD et pour sa collaboration ainsi que celle de son doctorant dans cette aventure.

Merci au Pr. Isabelle FOURASTE, Pharma-DEV (UMR 152 IRD-UPS), pour ses formations captivantes, sa passion communicative de l'étude des poudres de plantes et le partage de son savoir botanique inépuisable !

Je remercie le Dr. Eric DEHARO, Pharma-DEV (UMR 152 IRD-UPS), pour sa gentillesse et son aide, même à l'autre bout du monde, ainsi que pour son altruisme inspirant.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Lucie PERQUIS, qui s'est si aimablement chargée de certains des travaux de dernière minute, ainsi que pour son aide, son extrême gentillesse et son optimisme pétillant.

Merci à tous les occupants du bureau 1053, en particulier mes co-doctorants adorés : Lucie (P'tit Lu), Cécile, Marvin et bien entendu Adeline, notre cheffe tricoteuse !

Merci à toutes les autres doctorantes, anciennes, présentes, de passage et à venir : Camille, Marie, Claire, Claire, Asih, Fatima…

Merci aux « filles du troisième », j'ai nommé Cécile, Aurélie et Lucie, pour leur bonne humeur et les bons moments partagés !

Dziękuję Karolina pour tous les moments de détente et les discussions sur la vie et la bière. Je devrais l'écrire en polonais, sans doute, mais il me faudra encore quelques cours pour y arriver !

Je tiens, plus généralement, à associer à mes remerciements toutes les personnes travaillant aux IMRCP et en particulier Stéphane, qui m'a tant encouragée pour l'obtention de mon futur prix Nobel, Charles-Louis, pour son aide sur l'utilisation les appareils, Varravaddheay pour son soutien et bien sûr tous les autres pour leur présence au quotidien !

Je tiens à remercier le Dr. Lionel RECHIGNAT, du laboratoire de Chimie de Coordination, pour les après-midi de patience en RPE à guetter un pic d'$O_2^{\cdot-}$ qui n'est jamais venu. Mystère de la science…

Merci à ceux que j'oublie sans doute de citer dans ces pages, cela n'est dû qu'au planning chargé de la fin de rédaction, soyez-en assurés !

J'ai eu la chance à Toulouse de rencontrer des personnes véritablement extraordinaires. Manon, pour sa présence, sa gentillesse, sa douceur et sa vision de la vie sans faux-semblants. Je suis prête pour une seconde ruche avec toi, tu n'as qu'un mot à dire, saches-le ! Mais aussi bien sûr Cynthia, pour ses sages conseils, son soutien dans la difficile course de la thèse et de la vie et son expérience si gentiment partagée.

Spéciale dédicace à tous les copains d'Alternatiba. Grâce à vous non seulement l'espoir d'une société plus sobre et juste renaît, mais en plus j'ai pu m'évader des préoccupations de ma thèse quelques heures par semaine, ce qui n'est pas négligeable. Maintenant qu'elle est enfin terminée, je vais reprendre du service plus sérieusement, promis !

Merci à ma Maman (et pi c'est tout !), non seulement pour les corrections faites sur ce manuscrit, mais aussi pour tout ce que tu m'offres et apprends depuis toujours. Si j'ai fait tout ça, c'est grâce à toi !

Merci Anne, de ton soutien inconditionnel et de tes idées toujours avant-gardistes qui nous font toutes progresser vers une plus grande bienveillance et ouverture au monde.

Enfin, Julien, il n'y a pas de mots pour décrire tout le bonheur que tu m'apportes. Ton soutien au quotidien, ton humanité profonde, ta vision si juste de la vie, font de toi l'être exceptionnel et précieux dont j'ai la chance de partager la vie.

Vivement notre vie à trois (et plus si affinités) !

Et *longo maï* !

SOMMAIRE

SOMMAIRE 8
TABLE DES ILLUSTRATIONS 14
I. Figures 14
II. Tableaux 19
III. Photographies 20
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS 22
INTRODUCTION 25
Chapitre I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 28
IV. Stress oxydatif et régulateurs cellulaires 29
V. L'oxygène et les radicaux libres 30
V.1 L'oxygène 30
V.2 L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot -}$ 31
V.2.1 Lieu de production de l'anion superoxyde 32
V.2.2 Les propriétés de l'anion superoxyde 34
V.3 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 34
V.3.1 Formation du peroxyde d'hydrogène 34
V.3.2 Actions du peroxyde d'hydrogène, toxicité et détoxification 35
V.4 Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) 35
V.4.1 Formation du radical hydroxyle 35
V.4.2 Mode d'action du radical hydroxyle 36
V.5 Les dérivés azotés de l'oxygène 36
VI. Rôles physiologiques du stress oxydant. 37
VI.1 Rôles physiologiques 37
VI.2 Causes du stress oxydant 40
VI.2.1 Causes physiopathologiques 40
VI.3 Les effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques 42
VI.3.1 Peroxydation lipidique 43
VI.3.2 Oxydation des protéines 45
VI.3.3 Oxydation de la molécule d'ADN 46
VI.3.4 Conséquences physiopathologiques des dommages sur les cibles biologiques 48
VII. Les régulateurs cellulaires du stress oxydant 51
VII.1 Systèmes enzymatiques 51
VII.1.1 Les glutathion peroxydases (GPX) 51
VII.1.2 La catalase. 52

VII.1.3 Les thiorédoxines 52
VII.2 Le système antioxydant non enzymatique 53
VII.2.1 La vitamine E 53
VII.2.2 La vitamine C 53
VIII. Molécules antioxydantes exogènes. 54
VIII.1 Tanins et flavonoïdes 54
VIII.2 β-carotène 55
IX. Les superoxydes dismutases 56
IX.1 Introduction 56
X. La SOD 1 ou CuZnSOD 57
X.1 Généralités 57
X.2 Localisation cellulaire 57
X.3 Structure générale 57
X.3.1 Structure du site actif 58
X.3.2 Mécanisme réactionnel 59
X.4 La SOD 2 ou MnSOD 60
X.5 La SOD 3 ou FeSOD 62
XI. SOD1 et pathologie 62
XI.1 Cancer et SOD 1 62
XI.1.1 La SOD 1 : une cible pour le traitement du cancer 62
XI.1.2 Genèse du cancer 63
XI.1.3 Résistance au Cisplatine 64
XI.2 Sur-expression de la SOD 1 65
XI.3 SOD et maladie d'Alzheimer : 66
XI.4 SOD et syndrome de Down 67
XI.5 SOD et Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) 68
XII. Pourquoi développer des inhibiteurs de la SOD ? 69
XIII. Les inhibiteurs de la SOD 70
XIII.1 Les inhibiteurs synthétiques 70
XIII.1.1 Inhibiteur synthétique sélectif 70
XIII.1.2 Inhibiteurs synthétiques non sélectifs 72
XIII.2 Les inhibiteurs naturels 74
XIII.2.1 Les furocoumarines 74
XIII.2.2 Acide aristolochique 76
XIII.2.3 Flavonoïdes 77
XIII.2.4 Azoture, Cyanure, H_2O_2 78
XIV. Conclusion 78

Chapitre II : EXTRAITS D'ENDOPHYTES ÉTUDIÉS 79
I. Généralités sur les endophytes 80
I.1 Mode de colonisation 81
I.2 Interaction hôte-endophyte 82
I.3 Production de molécules bioactives 82
II. Etude des extraits 83
II.1 Caractérisation spectrale des extraits 86
II.1.1 Chromatographie sur couche mince des 197 souches 86
II.1.2 Spectre UV-Visible 86
II.2 Variabilité des cultures 87
III. Conclusion 92
Chapitre III : ETUDE DES EXTRAITS EN LC-HRMS 93
I. Introduction 94
II. Analyse en masse 94
III. Résultats : identification de molécules d'intérêt 99
III.1 Recherche de furocoumarines par leur fragmentation MS^E, obtenue par le QTOF 100
III.1.1 Alignement des pics obtenus 100
III.1.2 Vérification des identifications grâce à la fragmentation MS^E 102
III.1.3 Conclusion 111
III.2 Vérification des identifications grâce aux spectres UV, obtenue par l'OrbiTrap 111
III.2.1 Alignement des pics et identifications potentielles 112
III.2.2 Vérification des identifications par profils UV 112
III.3 Réseaux moléculaires : identification potentielle de nouvelles furocoumarines . 115
IV. Conclusion et perspectives 118
Chapitre IV : MISE AU POINT D'UN TEST ENZYMATIQUE DE DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ DE LA SOD 120
I. Introduction 121
II. Mise au point des tests 123
II.1 Test au Cytochrome C 123
II.1.1 Principe et mise au point du test 123
II.2 Test au WST-1 127
II.2.1 Principe du test au WST-1 127
II.2.2 Problèmes rencontrés avec le test au WST 130
II.3 Test au Mito SOX™ Red 131
II.3.1 Principe et mise au point du test au Mito SOX™ Red 131
II.3.2 Problèmes rencontrés avec le test au MitoSOX™ Red 133
II.4 Test au pyrogallol 134

II.4.1 Principe du test 134
II.4.2 Mise au point du test au pyrogallol 137
II.4.3 Obtention des résultats au pyrogallol 140
III. Activités biologiques des extraits 142
III.1 Activités biologiques des extraits d'Ormenis. 142
III.1.1 Introduction 142
III.1.2 Résultats des différents tests obtenus sur les extraits 143
III.2 Analyse des résultats obtenus avec le test au pyrogallol en micro-plaques sur les extraits d'endophytes 147
III.2.1 Screening rapide des 86 souches d'endophytes et discussion 148
III.2.2 Résultats obtenus sur les souches d'intérêt re-cultivées et discussion 150
III.2.3 Résultats obtenus sur les souches d'intérêt re-cultivées et testées à 160 µg/mL et discussion 154
IV. Conclusion 157
V. Perspectives 158
V.1.1 Test au pyrogallol en cuve de 2 mL 158
V.1.2 Recherche d'adduits de la SOD par LC-MS 158
CONCLUSION GÉNÉRALE 160
CHAPITRE V : MATÉRIEL ET MÉTHODE 164
I. Matériel et méthode du chapitre II : EXTRAITS ÉTUDIÉS 165
I.1.1 Culture des endophytes 165
I.1.2 Repiquage 165
I.1.3 Conservation des souches 165
I.1.4 Préparation des extraits 165
I.1.5 Méthode HPLC pour l'étude de la variabilité des endophytes 167
I.1.6 CCM 168
II. Matériel et Méthode du chapitre III: Étude des extraits en LC-HRMS 168
II.1 Profil LC-HRMS des extraits 168
II.1.1 Appareillage 168
II.2 Recueil et analyse des données 169
II.2.1 Alignement des pics des pools des 8 souches par MZmine 169
II.2.2 Alignement des pics des pools des 8 souches par MS-DIAL 171
II.3 Identification de molécules d'intérêt 171
II.3.1 Par MS-FINDER 171
II.3.2 Par CFM-id 172
II.1 Vérification de l'identité des molécules par UV 173
II.1.1 Profils UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS des extraits 173
II.1.2 Alignement des pics des pools des 8 souches par MZmine 173

II.1.3 Recherche des profils UV des molécules identifiées dans MZmine dans Xcalibur174
II.2 Réseaux moléculaires 174
II.2.1 GNPS 174
II.2.2 Cytoscape 174
III. Matériel et Méthode du chapitre IV: Mise au point d'un test enzymatique de détection de l'activité de la SOD 175
III.1 Protocole d'extraction des plantes *Ormenis africana* et *Ormenis scariosa* 175
III.2 Mise au point du test xanthine/xanthine-oxydase 175
III.3 Mise au point du test WST 177
III.4 Mise au point du test au MitoSOX^{TM} Red 178
III.5 Mise au point du test au pyrogallol 178
III.5.1 Conditions générales du test au pyrogallol 178
III.5.2 Protocole utilisé pour déterminer l'activité des 86 souches du screening rapide. 179
III.5.3 Protocole utilisé pour tester l'activité des 8 souches d'intérêt re-cultivées 179
III.5.4 Protocole utilisé pour tester l'activité des pools des 8 souches d'intérêt re-cultivées, de concentration finale 160 µg/mL 180
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE 182
ANNEXES 204
I. Annexe I : Résumé des expériences menées sur les endophytes 205
II. Annexe II : Plaques CCM des endophytes : 206
II.1 CCM visualisées en lumière visible après révélation par la vanilline et chauffage 206
II.2 CCM visualisées à 254nm 208
II.1 CCM visualisées à 365nm 210
III. Annexe III : Photos des cultures des six réplicas des huit endophytes sélectionnés... 213
IV. Annexe IV : liste de pics de MZmine du Qtof 215
V. Annexe V : spectres des molécules identifiées dans MS-FINDER 218
V.1 Spectres de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one 218
V.2 Spectres de la Déhydropachyrrhizone 219
V.3 Spectres de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one 221
V.4 Spectres du 3-carbethoxypsoralen 223
VI. Annexe VI : Alignement des pics MZmine de l'OrbiTrap 225
VII. Annexe VII : Vérification de l'identité des molécules 230
VII.1 Chromatogrammes et spectres UV obtenus avec l'OrbiTrap 230
VII.2 Identités des molécules détectées avec l'OrbiTrap 230
VII.2.1 Ochrocarpine A ou Ochrocarpine B 230
VII.2.2 Moellendorffiline 232

VII.2.3 Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide 234

VII.2.4 Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1’,2’-Dihydro, 1’hydroxy 236

VIII. Annexe VIII : Résultats test screening au pyrogallol sur les 56 échantillons exploitables 239

IX. Annexe IX: Résultats du test pyrogallol sur les 8 souches répliquées 6 fois chacune 246

X. Annexe X : Résultats obtenus sur le test au pyrogallol du pool de 8 souches d’intérêt, à 160 µg/mL 250

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I. Figures

Figure 1: Figure représentant les différents états d'oxydation lors de l'homéostasie et du stress oxydant. 29
Figure 2: Métabolisme de l'oxygène et de ses dérivés. 31
Figure 3: Rôle de la mitochondrie dans la production et la détoxification de l'anion superoxyde. 33
Figure 4: Réaction de détoxification du peroxyde d'hydrogène par la catalase 35
Figure 5: Structure de la cardiolipine, présentant chaînes hydrophobes. 38
Figure 6: La mitochondrie a un rôle central dans l'activation des facteurs protéiques de protection contre l'hypoxie. 38
Figure 7: Schéma montrant le phénomène de lipoperoxydation lipidique dans son ensemble. 43
Figure 8: 4-hydroxynonénal 44
Figure 9: Les divers facteurs pouvant générer une oxydation de la molécule d'ADN. Extrait de « La nutrition » http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-age/vieillissement/radicaux-libres-antioxydants-et-vieillissement/la-famille-des-radicaux-libres.html 47
Figure 10: molécule de glutathion réduit. 51
Figure 11: vitamine E. 53
Figure 12: Vitamine C. 53
Figure 13: Structure chimique de base des flavonoïdes. 55
Figure 14: Les atomes de Cu et de Zn sont séparés d'une distance de 6.3Å et lié par l'histidine 61 (Anzellotti and Farrell 2008). 58
Figure 15: Géométrie plan-carré du Cuivre et de ses 4 histidines, géométrie tétraédrique distordue du Zinc et de ses 3 histidines (site : http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/complmet.html). 58
Figure 16: Le Zn est enfoui, tandis que le Cu émerge de 5Å^2 (Shimazaki, Takani, and Yamauchi 2009). 59
Figure 17: Mécanisme réactionnel de la SOD. 60
Figure 18: Monomères et dimères de la MnSOD. (a) Structure du monomère (b) Structure du dimère de MnSOD (c) Atome de zinc entre deux monomères (d) Vue de la densité électronique au niveau du site du zinc (Liao et al., 2002). 61
Figure 19: Structure du monomère de FeSOD de l'archéobactérie Sulfolobus solfataricus (Ursby et al., 1999). 62
Figure 20: La SOD serait impliquée dans le mécanisme cellulaire de répression de la respiration (Reddi and Culotta, 2013) 64
Figure 21: Le LCS-1, ou 4,5-dichloro-2-m-tolylpyridazin-3(2H)-one. 70
Figure 22: Graphique montrant la détermination de l'IC50 du LCS-1. Elle a été mesurée à 1.07µM (Somwar et al., 2011) 71
Figure 23: Structure du mégazole®. 72
Figure 24: Le diéthyldithiocarbamate ou DEDTC. 72
Figure 25: Chélation d'un atome de zinc par deux DEDTC. 73
Figure 26: Le triéthylthiocarbamate, ou TETC. 73
Figure 27: Structure de base d'une coumarine. 74
Figure 28: Le psoralène. 74

Figure 29: L'impératorine. 76
Figure 30: L'acide aristolochique. 76
Figure 31: Le 12-O-tetradecanoylphorbate-12-acétate (TPA). 77
Figure 32: Cycle reproductif des endophytes : reproduction verticale (à gauche) et reproduction horizontale (à droite) (Site : https://www.researchgate.net/figure/251565969_fig1_Fig-1-Asexual-and-sexual-lifecycle-of-epichloae-fungal-endophytes). 81
Figure 33: Dans l'encadré rouge: extraits et analyses effectués dans le chapitre II. Un schéma général est visible en annexe I. 84
Figure 34: Exemple de CCM obtenue après migration des extraits d'endophytes. De gauche à droite: visualisation de la CCM à 254 nm, à 366 nm puis en lumière visible, après pulvérisation de vanilline sulfurique. 86
Figure 35: Variabilité des réplicas d'une même souche. 88
Figure 36: Différences de couleurs inter et intra cultivars (extraits bruts au méthanol). 88
Figure 37: Profils HPLC-QTOF des 6 réplicas de la souche 74. 89
Figure 38: Profils HPLC-ESI-QTOF de l'ensemble des réplicas des 8 souches. Chaque pic est associé à sa masse majoritaire. 90
Figure 39: Résultats de l'ACP pour la comparaison des profils LCMS des souches. 91
Figure 40: Dans l'encadré rouge : ensemble des analyses pratiquées en spectrométrie de masse pour le chapitre III (un schéma plus grand est visible en annexe I). 95
Figure 41: Chromatogramme de l'échantillon 83 obtenu avec le QTof. 97
Figure 42: Chromatogramme de la souche 184 obtenu après analyse LC/ESI-MS-l'OrbiTrap. Les chiffres indiqués sur les pics sont les m/z des ions majoritaires du pic chromatographique correspondant. 98
Figure 43: Chromatogrammes obtenus en LC/ESI-MS de l'OorbiTrap pour l'échantillon 184, visualisé grâce à Xcalibur. En haut : Chromatogramme de masse, en bas : chromatogramme en détection UV-visible. 98
Figure 44: Chromatogrammes obtenus en LC/ESI-MS l'OrbiTrap pour le blanc au méthanol, visualisé grâce à Xcalibur. On voit que le massif aux alentours de 6.95 min correspond à une pollution. 99
Figure 45: Alignement des différentes masses de tous les échantillons par MS Dial. Le chromatogramme et le spectre de la molécule colorée en rouge se situent respectivement en haut et à gauche de l'écran. A droite, le spectre MS/MS de ce même ion est représenté. 101
Figure 46: Spectre de masse du massif isotopique de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one. 101
Figure 47: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one. 102
Figure 48: Formule développée de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one 103
Figure 49: Formule développée de la déhydropachyrrhizone 103
Figure 50: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one, donnés par MS-FINDER. Le total score est de 5.7426. 104
Figure 51: Perte de fragments de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one. 105
Figure 52: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la déhydropachyrrhizone, donnés par MS-FINDER. Le total score est de 8.3411. 106
Figure 53: Perte de fragments de la déhydropachyrrhizone. 106
Figure 54: Formule développée de l'Alternariol. 107
Figure 55: Spectre de masse présentant le massif isotopique de l'alternariol. 107
Figure 56: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de l'Alternariol. 108

Figure 57: Spectre de fragmentation de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one obtenu par CFM-id. 109
Figure 58: Profil de fragmentation de la déhydropachyrrhizone obtenu par CFM-id..... 110
Figure 59: Exemple de fonctionnement de Cytoscape. Les ions et leurs masses sont associés à un point (en vert) et le réseau les relie entre eux en fonction de leurs différences de masses et d'autres paramètres tels que le profil de fragmentation. Ici, les deux ions de 499.325 Da et 517.336 Da ont une différence de masse de 18.011, ce qui correspond à la masse d'une molécule d'eau. L'ion de 517.336 Da possède dont un groupement H_2O supplémentaire par rapport à l'ion de 499.325 Da. D'autres paramètres interviennent dans la mise en relation de deux ions. 116
Figure 60: Réseaux moléculaires obtenus après traitement des données du QTOF par Cytoscape. Chaque point représente une masse et chaque lien entre les points est fonction de la différence de masse des deux points ainsi que des données de fragmentation MS^E. 117
Figure 61: Mécanisme d'action général des tests de détection de l'activité SOD. 121
Figure 62: Conséquences spectrales de l'activité de la SOD. 124
Figure 63: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactivée: la réduction cytochrome C n'est plus inhibée par la SOD. 124
Figure 64: Fonctionnement du test lorsque la SOD est présente et active: la réduction cytochrome C est inhibée par la SOD. 125
Figure 65: Témoins xanthine/xanthine-oxydase/cytochrome C avec et sans SOD. 126
Figure 66: formules développées du WST-1 et du Formazan. 127
Figure 67: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente, ou inhibée. La solution finale sera alors de coloration jaune. 128
Figure 68: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente, ou inhibée. La solution finale sera alors de coloration bleue. 128
Figure 69: Gamme de SOD, permettant de déterminer l'IC_{50} de la SOD. 129
Figure 70: Gamme de DEDTC. 130
Figure 71: Réaction du MitoSOX™ Red avec un anion superoxyde. 131
Figure 72: Ce graphique, issu du site de ThermoFisher, montre les longueurs d'ondes d'excitation (510 nm) et d'émission (580 nm) du MitoSOX™ Red. 132
Figure 73: Fonctionnement du test lorsque la SOD est présente et active. 132
Figure 74: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactive : le MitoSOX™ Red est oxydé et produit alors une fluorescence rouge. 133
Figure 75:molécule de pyrogallol. 134
Figure 76: Auto-oxydation du pyrogallol en milieu basique. 135
Figure 77: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactivée: l'auto-oxydation du pyrogallol n'est plus inhibée par la SOD. La solution est donc teintée d'une coloration plus ou moins jaune, en fonction du degré d'inhibition de la SOD. 136
Figure 78: Fonctionnement du test lorsque la SOD est active: l'auto-oxydation du pyrogallol est inhibée par la dismutation de l'anion superoxyde par la SOD. La solution reste incolore. 136
Figure 79: Variations de l'absorbance de la solution en absence et en présence de SOD, pendant 10 minutes, avec des concentrations finales en pyrogallol de 0.1 mM et en SOD de 1 U/mL.. 137
Figure 80: Variations d'absorption du pyrogallol en présence d'un extrait d'endophyte à 40 µg/mL, avec et sans SOD, pendant 14 min. 139
Figure 81: Cinétique de réaction du pyrogallol en présence et absence de SOD. La droite rouge représente la variation d'absorbance en fonction du temps et en présence de SOD, la bleue en son absence. 140
Figure 82: Spectres obtenus avec *Ormenis africana*. 143

Figure 83: Spectres obtenus avec *Ormenis scariosa*..... 144
Figure 84: Pourcentage de cytochrome réduit, avec ou sans SOD. 144
Figure 85: Pourcentage de consommation de xanthine en présence de SOD 145
Figure 86: Dans l'encadré rouge: ensemble des séries de tests réalisées sur le test au pyrogallol, pour les endophytes. Un schéma général plus grand est disponible en annexe I. 147
Figure 87: Résumé des propriétés des extraits vis-à-vis de la SOD..... 149
Figure 88: Graphiques permettant de visualiser, sur les 6 réplicas des 8 souches et la gélose, les moyennes des activités anti-oxydantes (Moyenne-OX, encart du haut) associées à leurs écarts-types, ainsi que les activités anti-SOD (Moy-SOD, encart du bas) associées à leurs barres d'erreurs (logiciel SIMCA) 153
Figure 89: Étude réalisée à l'aide du logiciel SIMCA par Dr. Guillaume Marti..... 154
Figure 90: Cinétique de réaction du témoin au méthanol, en présence et absence de SOD. . 155
Figure 91: Cinétique de réaction du pool 1 de la souche 83, à 160 µg/mL, en présence et absence de SOD. 155
Figure 92: La stabilité du dimère d'hème est étudiée avant et après ajout de la drogue (ici l'artémisinine) par la mesure de l'énergie nécessaire à la dissociation du complexe (Muñoz-Durango et al. 2012)..... 159
Figure 93: Echantillons destinés au screening rapide de l'activité sur la SOD..... 166
Figure 94: Banc xanthine/cytochrome C..... 176
Figure 95: Spectre de masse de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one. 218
Figure 96: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one. 218
Figure 97: Perte de fragments de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one..... 219
Figure 98: Spectre de masse de la Déhydropachyrrhizone. 219
Figure 99: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la Déhydropachyrrhizone. 220
Figure 100: Perte de fragments de la Déhydropachyrrhizone..... 220
Figure 101: Formule développée la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one 221
Figure 102: Spectre de masse de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one..... 221
Figure 103: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et in silico (en rouge) de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one 222
Figure 104: Perte de fragments de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one 222
Figure 105: Formule développée du 3-carbethoxypsoralen..... 223
Figure 106: Spectre de masse du 3-carbethoxypsoralen. 223
Figure 107: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et in silico (en rouge) du 3-carbethoxypsoralen..... 224
Figure 108: Perte de fragments du 3-carbethoxypsoralen..... 224
Figure 109: Chromatogramme et spectre obtenus avec l'orbiTrap pour l'échantillon 73. 230
Figure 110: Chromatogramme et spectre obtenus avec l'orbiTrap pour l'échantillon 181. ... 230
Figure 111: Chromatogramme de l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B 231
Figure 112: Spectre MS de l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B..... 231
Figure 113: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l': Ochrocarpin A ou ochrocarpin B 232
Figure 114: Spectre UV d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B 232
Figure 115: Moellendorffiline..... 233
Figure 116: Moellendorffiline..... 233
Figure 117: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant la Moellendorffiline. 234

Figure 118: Spectre UV d’Xcalibur associé au pic identifié comme étant l la Moellendorffiline 234
Figure 119: Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide 235
Figure 120: Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide 235
Figure 121: Spectre de masse d’Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide 236
Figure 122: Spectre UV d’Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide 236
Figure 123: Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1’,2’-Dihydro, 1’hydroxy 237
Figure 124: Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1’,2’-Dihydro, 1’hydroxy 237
Figure 125: Spectre de masse d’Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1’,2’-Dihydro, 1’hydroxy 238
Figure 126: Spectre UV d’Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1’,2’-Dihydro, 1’hydroxy 238

II. Tableaux

Tableau 1: Acides aminés et leurs produits d'oxydation. 45
Tableau 2: Les différentes stratégies de recherche des furocoumarines utilisées au chapitre III. 96
Tableau 3: Identifications de furocoumarines par MS-FINDER, après analyse au QTOF.... 103
Tableau 4: Furocoumarines identifiées grâce aux expériences menées avec l'OrbiTrap. 112
Tableau 5: Formules développées des structures identifiées par UHPLC-DAD-QTOF. 113
Tableau 6: Corrélation possible entre le genre des endophytes et leur activité sur la SOD... 149
Tableau 7: Noms et numéros des souches re-cultivées, associés à leur activité sur la SOD. 150
Tableau 8: Présentation des résultats obtenus sur les 6 réplicas des 8 souches d'intérêt, en ce qui concerne la SOD. 151
Tableau 9: Résultats statistiques du test au pyrogallol sur les pools de souches testées à 160 µg/mL. 156
Tableau 10: Conditions d'analyse en LC-HRMS 167
Tableau 11: Conditions d'analyse en LC-HRMS 169
Tableau 12: Exemple de tableau construit à partir du Dictionnary of Natural Products pour trois composés: le psoralène, le bergaptène et la magcoumarine. 170
Tableau 13: Exemple de tableau construit à partir du Dictionnary of Natural Products pour trois composés: la mamméarine A, la mangcoumarine et la bergamotine, afin d'identifier des molécules à l'aide de MS-DIAl. 172
Tableau 14: Gradient utilisé dans la méthode LCMS. 173
Tableau 15: Protocole du test à la xanthine-oxydase. 176
Tableau 16: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale. 179
Tableau 17: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale pour le test des 6 réplicas des 8 souches re-cultivées. 180
Tableau 18: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale, pour le test des pools des 8 souches. 181
Tableau 19: Alignement des pics des échantillons 68, 73, 74, 83, 85, 181, 184 et 186, obtenu avec MZmine. 215
Tableau 20: Alignement des pics des échantillons 73, 181 et 184, obtenu avec MZmine. ... 225
Tableau 21: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 35 à 49. 239
Tableau 22: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 67 à 85. 241
Tableau 23: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 86 à 170. 242
Tableau 24: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 171 à 186. 244
Tableau 25: Résultats du test au pyrogallol sur les six réplicas des 8 souches d'intérêt, à 40 µg/mL. 246
Tableau 26: Résultats du test au pyrogallol sur le pool des réplicas des 8 souches d'intérêt, à 160 µg/mL. 250
Tableau 27: Résultats obtenus avec une concentration d'extraits de 160 µg/mL. 251

III. Photographies

Photo 1: Souches 20 à 42. 206
Photo 2: Souches 43 à 64. 206
Photo 3: Souches 50 à 175. 206
Photo 4: Souches 64 à 89. 206
Photo 5: Souches 176 à 199. 207
Photo 6: Souches 200 à 221. 207
Photo 7: Souches 222 à 242. 207
Photo 8: Souches 243 à 264. 207
Photo 9: Souches 265 à 353. 207
Photo 10: Souches 355 à 408. 207
Photo 11: Souches 409 et 181. 208
Photo 12: Souches 20à 42. 208
Photo 13: Souches 43 à 64. 208
Photo 14: Souches 64 à 89. 209
Photo 15: Souches 50 à 175. 209
Photo 16: Souches 176 à 199. 209
Photo 17: Souches 200 à 221. 209
Photo 18: Souches 222 à 242. 209
Photo 19: Souches 243 à 264. 209
Photo 20: Souches 265 à 353. 210
Photo 21: Souches 355 à 408. 210
Photo 22: Souches 409 et 181. 210
Photo 23: Souches 20à 42. 210
Photo 24: Souches 43 à 64. 210
Photo 25: Souches 64 à 89 211
Photo 26: Souches 50 à 175. 211
Photo 27: Souches 176 à 199. 211
Photo 28: Souches 200 à 221. 211
Photo 29: Souches 222 à 242. 212
Photo 30: Souches 243 à 264. 212
Photo 31: Souches 265 à 353. 212
Photo 32: Souches 355 à 408. 212
Photo 33: Souches 409 et 181. 212
Photo 34: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 68 (1), 68 (2), 68 (3), 68 (4), 68 (5), 68 (6). 213
Photo 35 : Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 68 (1), 68 (2), 68 (3), 68 (4), 68 (5), 68 (6)..... 213
Photo 36: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 73 (1), 73 (2), 73 (3), 73 (4), 73 (5), 73 (6). 213

Photo 37: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 73 (1), 73 (2), 73 (3), 73 (4), 73 (5), 73 (6)..... 213
Photo 38: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 74 (1), 74 (2), 74 (3), 74 (4), 74 (5), 74 (6). 213
Photo 39: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 74 (1), 74 (2), 74 (3), 74 (4), 74 (5), 74 (6)..... 213
Photo 40: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 83 (1), 83 (2), 83 (3), 83 (4), 83 (5), 83 (6). 213
Photo 41: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 83 (1), 83 (2), 83 (3), 83 (4), 83 (5), 83 (6)..... 213
Photo 42: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 85 (1), 85 (2), 85 (3), 85 (4), 85 (5), 85 (6). 213
Photo 43: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 85 (1), 85 (2), 85 (3), 85 (4), 85 (5), 85 (6)..... 213
Photo 44: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 181 (1), 181 (2), 181 (3), 181 (4), 181 (5), 181 (6)..... 214
Photo 45: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 181 (1), 181 (2), 181 (3), 181 (4), 181 (5), 181 (6)..... 214
Photo 46: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 184 (1), 184 (2), 184 (3), 184 (4), 184 (5), 184 (6)..... 214
Photo 47: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 184 (1), 184 (2), 184 (3), 184 (4), 184 (5), 184 (6)..... 214
Photo 48: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 186 (1), 186 (2), 186 (3), 186 (4), 186 (5), 186 (6)..... 214
Photo 49: Cultures vues du dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 186 (1), 186 (2), 186 (3), 186 (4), 186 (5), 186 (6)..... 214

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

4-HNE : 4-hydroxynonénal
µg : Microgramme
µm : Micromètre
µl : Microlitre
Å : Angström
Ach : Acétylcholine
ACN : Acétonitrile
AcOEt : Acétate d'éthyle
ACP : analyse en composantes principales
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
AT: Adénine Thymine
CAT: catalase
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CFM-id (Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite identification
CLHP-MS= HPLC-MS : Chromatographie Liquide Haute performance couplée à la spectrométrie de masse= High Preformance Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Cm : Centimètre
CPC : Chromatographie par Partage Centrifuge
Da : Dalton
DAD: Diode Array Detector = Détecteur à barrette de diodes
DEDTC: diéthyldithiocarbamate
DMSO: Diméthyldithiocarbamate
DNM: Dictionary of Natural Products
EDRF : l'endothelium-derived relaxing factor
EDTA
EGF: Epithelium Growth Factor
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
ESI: ElectroSpray Ionisation
eV: électronVolt
FAD (flavine adénine dinucleotide
FT: Transformée de Fourier
GC : Guanine Cytosine
GPX : Glutathion PeroXydases
GMPc : Guanosine MonoPhosphate Cyclique
GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking
GR : Glutathion Reductase
GSH : glutathion réduit
h : heure

HE: HydroEthidine
HIF : Hypoxia-Induced Factors
ITS: Internal Transcribed Spacer
kV: kiloVolt
L: litre
LCC : Laboratoire de Chimie des Coordinations
LC-HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution
LCS-1 : Lung Cancer Screen
MDA : dialdéhyde malonique
M : molaire
MEA- : Malt Extract Agar sans antibiotiques
Min: Minute
mL: millilitre
mm : millimètre
MM : Masse Molaire
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
nm : Nanomètre
OMS : Organisme Mondial de la Santé
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDGF: Platelet-Derived-Growth factor
pg: picogramme
PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors
PPM : Partie Par Million
R^2 : coefficient de corrélation
RMN: Résonnance Magnétique Nucléaire
RPE : Résonance Paramagnétique Électronique
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SOD : Super Oxyde Dismutase
TEF: Translation Elongation Factor 1-alpha
TETC : triéthylthiocarbamate
TLC-MS : Thin-Layer Chromatography-Mass Spectrometry = Chromatographie sur couche mince couplée à la Spectrométrie de Masse
TOF-MS : spectrométrie de masse à temps de vol
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbate-12-acétate
Txnip: thioredoxin-interacting protein
UA : Unité Arbitraire
UMR : Unité Mixte de Recherche
UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra Haute Pression (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
UHPLC/HRMS : Chromatographie liquide Ultra Haute Pression couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution

UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS : Chromatographie liquide Ultra Haute Pression couplée à un détecteur à barrettes de diodes, appareilà transformée de Fourrier, fragmentation data-dépendante
UV : Ultra-Violet
UVA : Ultra Violet A
V : volt
WST : Water Soluble Tetrazolium

INTRODUCTION

Le cancer est un problème majeur de santé publique. En 2012, 14 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués à travers le monde et 8.2 millions de personnes en sont décédées. Il est estimé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) que l'apparition de nouveaux cas devrait augmenter de 70 % environ dans les 20 ans à venir et donc passer de 14 à 22 millions de cas par an. C'est dire l'urgence de la découverte de médicaments innovants et efficaces et l'importance de ce travail car il en est l'objet direct.

Cette maladie nécessite pour son traitement un arsenal de molécules sans cesse renouvelé. Les stratégies thérapeutiques doivent cibler de nouvelles voies, de nouveaux mécanismes à l'origine de la survie et de la propagation des cellules cancéreuse. En effet, ces dernières mutent et résistent aux traitements, et, de ce fait, la recherche d'un traitement efficace s'apparente au mythe de Sisyphe.

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme majeure du stress oxydant.

La recherche d'inhibiteurs de cette enzyme est une de ces nouvelles voies d'avenir qui s'ouvre aux chercheurs afin de combattre le cancer.

Cependant, les inhibiteurs spécifiques de cette classe d'enzymes sont très peu nombreux, voire inexistants, dans le règne vivant, non seulement à cause de l'intérêt relativement récent porté à ces inhibiteurs, mais encore du fait que chaque organisme vivant possède une SOD lui permettant de survivre dans le monde aérobie. Il est primordial pour un être vivant de maintenir un bon fonctionnement de cette enzyme essentielle, par ailleurs très conservée tout au long de l'évolution, et il est donc *a priori* très dangereux de synthétiser des inhibiteurs de cette enzyme.

Comme pour tout sujet innovant, pour l'étude de ces inhibiteurs, les scientifiques ne disposent pour le moment que de peu de pistes quant à la nature des composés recherchés.

Aujourd'hui, nos connaissances se limitent à une seule classe de moléculaires naturelles qui semble être associée à une inhibition de la SOD : la famille des furocoumarines (Impératorine en particulier).

Un des défis majeurs de la recherche d'anti-cancéreux est de découvrir des molécules certes efficaces, mais entraînant le moins d'effets secondaires possibles pour le patient. Il est donc préférable de trouver des molécules pouvant avoir un effet seulement sur la tumeur, soit en l'adressant, soit en l'activant *in situ*. La famille des furocoumarines nous semble très prometteuse car dans leur majorité, elles ont cette particularité de pouvoir être photo-activables. Il est donc possible d'envisager de les administrer à un patient puis, dans un second temps, de les activer à l'aide d'une fibre optique par exemple.

Nous sommes partis de ce postulat et avons recherché des furocoumarines dans diverses substances naturelles issues du règne végétal.

En effet, bien que la médecine dite « moderne » ait conquis la majorité des pays en voie de développement, environ 80 % de la population mondiale continue à avoir recours aux plantes pour protéger ou restaurer sa santé. En outre, dans les pays industrialisés, on assiste à un renouveau des médecines douces et une recrudescence de l'utilisation de plantes médicinales ou médicaments à base de plantes. De plus, les substances naturelles sont une

formidable source d'inspiration pour la recherche de nouvelles molécules possédant une très grande diversité structurale ou des motifs innovants. C'est dire l'importance, aujourd'hui encore, et malgré les progrès de la chimie de synthèse, de la pharmacognosie.

L'étude de la présence d'inhibiteurs dans les extraits de plantes par des tests biologiques étant difficile pour diverses raisons détaillées dans ce tapuscrit, nous nous sommes tournés vers l'étude des inhibiteurs de la SOD dans des champignons endophytes foliaires.

Les endophytes constituent un sujet encore peu étudié et particulièrement intéressant. L'intérêt de la communauté scientifique pour ces nouvelles sources prometteuses de métabolites secondaires est en plein essor.

En effet, les champignons endophytes sont les microorganismes commensaux des plantes. Ils assurent à ces dernières une production importante de métabolites secondaires. La colonisation de nouveaux milieux et la lutte biologique entre espèces ont pour conséquence l'apparition de stratégies de survie très élaborées. Les plantes sont ainsi capables de synthétiser puis d'exsuder des molécules hautement toxiques pour prendre la place de leurs rivales ou encore afin de lutter contre des prédateurs. La majorité de ces métabolites sont produits par leurs champignons endophytes. Cultivés sur boîtes de Pétri, ils peuvent produire ces métabolites en très grande quantité. Les extraits de ces cultures sont donc extrêmement riches en métabolites secondaires, qu'il est alors facile de purifier et d'analyser. De plus, les cultures d'endophytes revêtent un intérêt majeur, dans la mesure où il est possible, avec diverses techniques d'élicitations, tant au niveau génétique que cultural, de moduler la production des métabolites produits.

Le travail de thèse présenté ci-après s'articule en quatre parties : la première partie présente les travaux antérieurs ayant eu trait au stress oxydatif et à la superoxyde dismutase, nous permettant de définir avec précision les acteurs et enjeux de ce travail.

La seconde partie est dédiée à la présentation des divers extraits d'endophytes étudiés lors de cette thèse.

La troisième partie concerne l'étude chromatographique haute résolution de la composition des extraits endophytiques et des spectres de fragmentation des furocoumarines trouvées dans les extraits. Nous exposerons le protocole utilisé afin d'obtenir les chromatogrammes et notre méthode de recherche des molécules d'intérêt.

Enfin, il nous restait à mettre au point un test de détection de l'activité vis-à-vis de la SOD rapide et fiable. Les résultats de ce test nous permettent de mettre en relation la composition chimique des extraits avec la présence ou l'absence d'inhibiteurs de la SOD. Ainsi, grâce à une étude statistique poussée, nous sommes capables de déterminer la probabilité pour qu'une molécule soit responsable de l'activité biologique recherchée et donc en possession ou non d'une activité anti-SOD.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

IV. Stress oxydatif et régulateurs cellulaires

Dans les conditions physiologiques, un équilibre existe entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense antioxydants (voir figure 1). Cependant, de nombreuses causes peuvent rompre cet équilibre et être à l'origine d'une augmentation du taux d'ERO dans la cellule. Ce processus est appelé « stress oxydatif » ou encore « stress oxydant ».

Les ERO sont de puissants oxydants qui vont induire dans la cellule des dommages au niveau des macromolécules, être responsables de la peroxydation lipidique, de l'apparition d'une porosité membranaire et de la cytolyse cellulaire, ainsi que d'une diminution du métabolisme protéique et de l'oxydation des nucléotides.

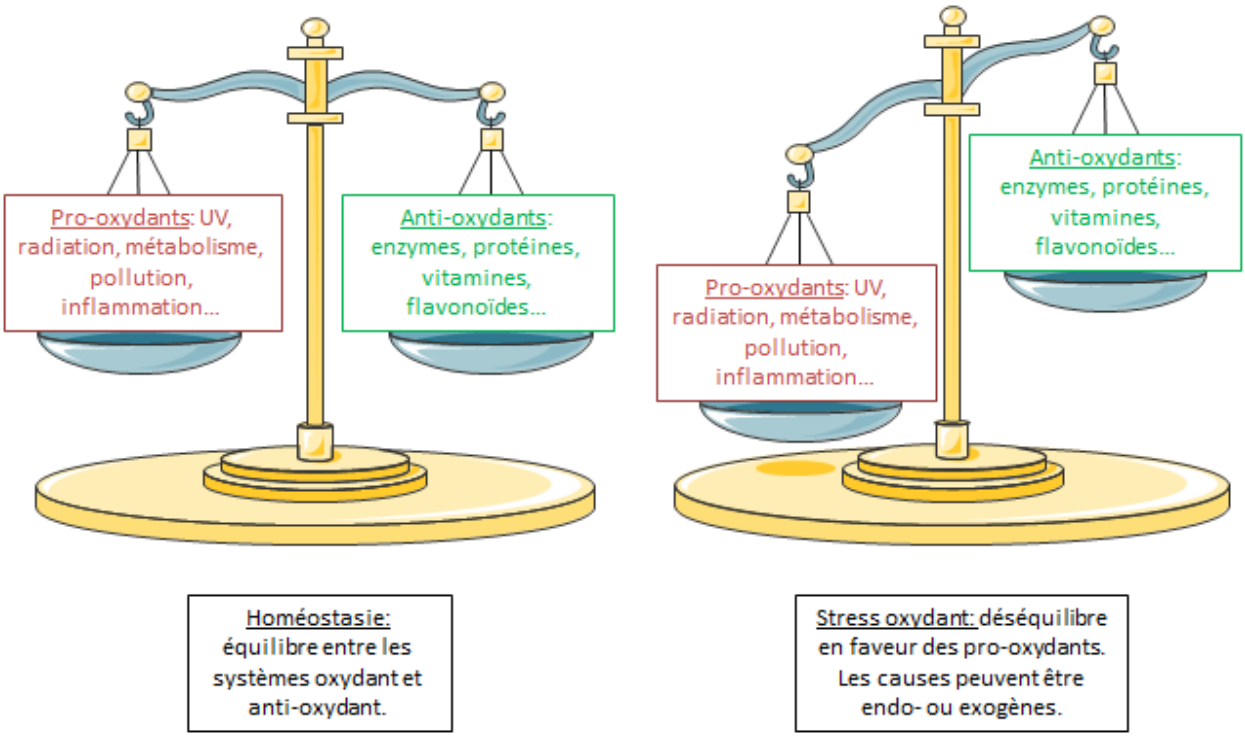


Figure 1: Figure représentant les différents états d'oxydation lors de l'homéostasie et du stress oxydant.

La persistance du stress oxydant peut être liée à l'apparition de maladies de vieillissement telles que les maladies neurodégénératives et certains cancers.

Selon le niveau des dommages générés, la cellule peut s'engager soit vers un processus de réparation soit vers la mort cellulaire.

Nous présenterons successivement l'oxygène et ses dérivés réactifs puis leurs effets physiopathologiques. Nous étudierons les régulateurs cellulaires du stress oxydatif et une

attention particulière sera portée à une enzyme majeure du maintien de l'homéostasie cellulaire : la superoxyde dismutase (SOD).

V. L'oxygène et les radicaux libres

Les organismes eucaryotes sont, pour la plupart, aérobies : ils produisent leur énergie grâce à la phosphorylation oxydative dont le siège est la mitochondrie. Leur survie dépend de la présence d'oxygène. Ceci les expose nécessairement à de fortes concentrations d'oxygène et donc à la production d'espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$), le peroxynitrite ($ONOO^-$), l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$)..: 3 à 10% de l'oxygène moléculaire se transforme en ERO. Ils sont majoritairement produits dans la mitochondrie, lieu de la respiration cellulaire.

V.1 L'oxygène

L'oxygène est le 16e élément de la classification périodique.

Dans son état fondamental, l'$^3O_2$ à l'état triplet est paramagnétique. Il ne peut donc pas réagir avec des espèces diamagnétiques sans que soit levée l'interdiction de spin. En revanche, il est admis que ses dérivés qui le peuvent. *In vivo*, cette barrière est levée grâce à des enzymes telles que les oxydases ou les oxygénases.

Toxique à des concentrations de 40% (Joenje 1989), l'$^3O_2$ n'est cependant pas délétère aux concentrations physiologiques. Sa toxicité est liée à sa capacité à générer, après réduction, des espèces radicalaires ainsi que des espèces actives ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant (voir figure2).

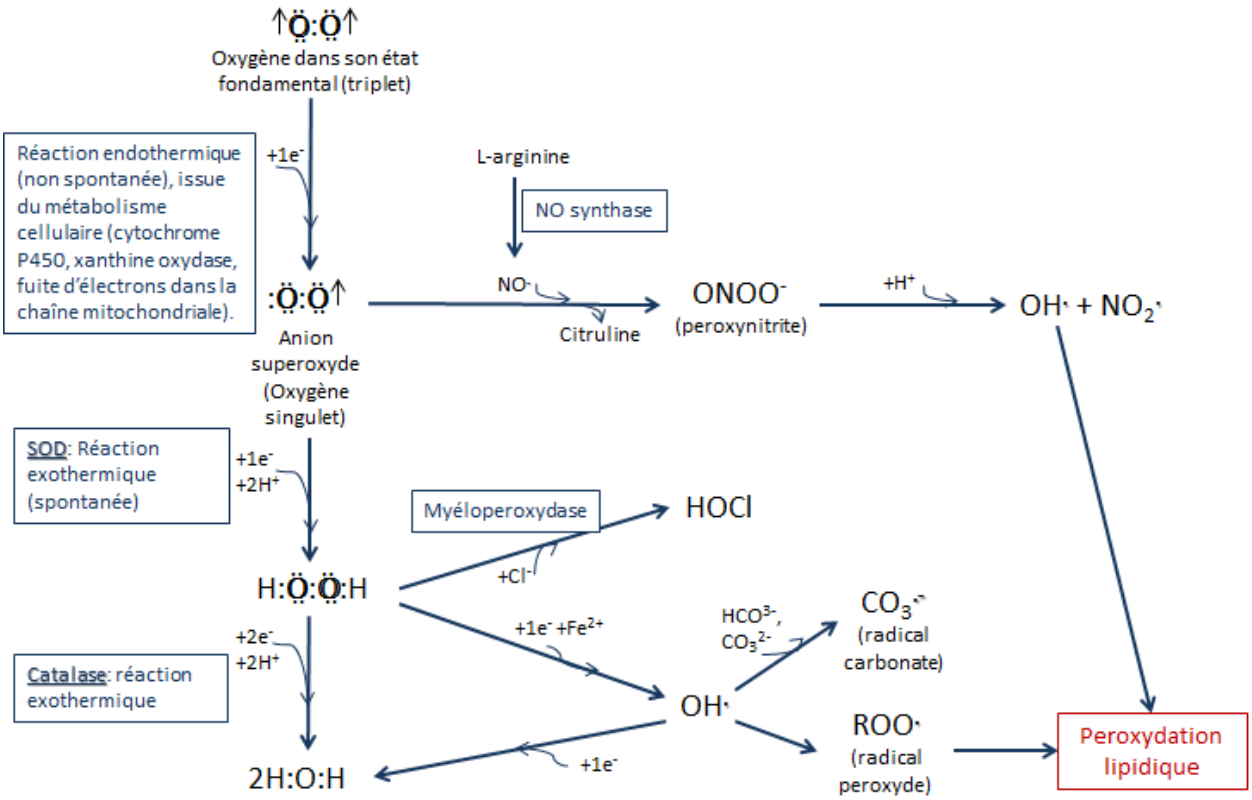


Figure 2: Métabolisme de l'oxygène et de ses dérivés.

On estime que 1 à 2% de l'oxygène est converti en anion superoxyde.(Joenje 1989), (Kowald, Lehrach, and Klipp 2006).

L'O_2 est majoritairement réduit par la cytochrome C oxydase, par le transfert direct de 4 électrons au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales, selon la réaction suivante :

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$

Des espèces réactives de l'oxygène peuvent se former à partir d'hétéroatomes comme l'azote ou de chaines carbonées pour former respectivement le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), le peroxynitrite ($ONOO^-$), les radicaux peroxydes ($ROO^{\bullet}$), ou les radicaux alkoxyles ($RO^{\bullet}$)). Les produits issus directement de la réduction de l'oxygène, ou secondairement après réaction de ces premières molécules radicalaires de l'oxygène sur des macromolécules biologiques, sont appelés radicaux libres. Cependant la réduction de l'oxygène peut conduire à la formation de molécules non radicalaires à très haut pouvoir oxydant qui seront ensuite à l'origine de radicaux libres.

V.2 L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$, est la principale espèce radicalaire de l'oxygène. Il a été mis en évidence en 1969 par Fridovich et Mc Cord (Joe M. McCord and Fridovich 1969).

Dans les milieux biologiques, lors de la formation de l'$O_2^{\bullet -}$, l'oxygène passe d'un état fondamental triplet à un état doublet. Cette réaction est à la fois endothermique et monoélectronique. *In vivo*, elle est donc thermodynamiquement impossible et ne peut se faire que grâce à l'intervention d'enzymes, les oxydases.

V.2.1 Lieu de production de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ est produit majoritairement par les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du réticulum endoplasmique (détoxification de xénobiotiques par le cytochrome P450), et de façon plus marginale, par de nombreuses autres enzymes, comme la xanthine oxydase, l'indoléamine dioxygénase, la tryptophane dioxygénase et l'aldéhyde oxydase (Halliwell 2006), NADPH oxydases (Maghazl et al Free rad Biol med 2012, 53, 1903-1918).

Dans la mitochondrie, il est un sous-produit de la phosphorylation oxidative (Cadenas and Davies 2000a).

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée d'une série de catalyseurs rédox localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Leurs potentiels rédox va de -320 mV à +380 mV. Cependant au cours des différentes réactions d'oxydo-réduction, qui ont lieu au niveau des crêtes mitochondriales, 2 à 5% d'électrons s'échappent à différents niveaux de la chaine respiratoire conduisant à la formation d'ERO et d'anion superoxyde. Ce phénomène est illustré par la figure 3 :

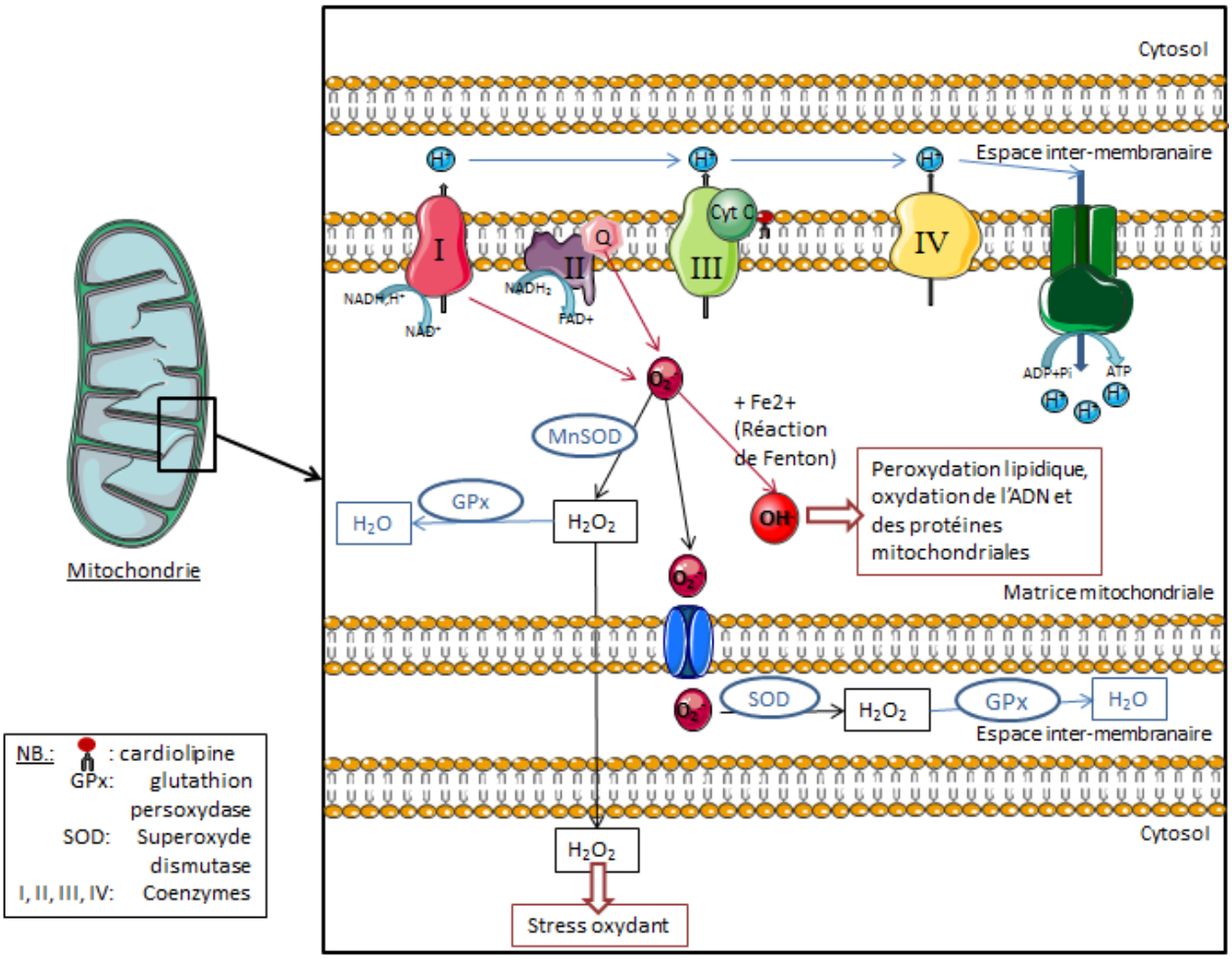


Figure 3: Rôle de la mitochondrie dans la production et la détoxification de l'anion superoxyde.

L'$O_2^{\cdot -}$ est polarisé, ce qui lui interdit le passage de la bicouche lipidique des membranes. Il emprunte donc les canaux anioniques (Gus'kova et al. 1984) (Hawkins et al. 2007) (Han et al. 2003) pour rejoindre les espaces inter-membranaires (St-Pierre et al. 2002a), où il est dégradé par les enzymes du stress oxydant (superoxyde dismutases en particulier).

Nous ajouterons que les ERO ont aussi un effet sur la morphologie des mitochondries. Ces dernières se fragmentent sous l'effet des ERO suite à une hyperglycémie et donc un stress oxydant prolongé. L'inhibition de la fragmentation mitochondriale semble par ailleurs être une cible à privilégier pour contrer les effets néfastes de l'hyperglycémie (Yu, Robotham, and Yoon 2006).

Enfin, l'anion superoxyde peut être le produit de l'auto-oxydation de divers composés biologiques (neuromédiateurs, thiols ou co-enzymes réduits) (Halliwell and Gutteridge 2015).

La production d'anion superoxyde est finement régulée par la cellule. Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale elle est contrôlée par la pression partielle en dioxygène ainsi que par l'état d'oxydation des protéines impliquées dans la respiration. Le monoxyde d'azote, et par conséquent les NO synthases mitochondriales et cytosoliques, participent aussi

à cette régulation, en augmentant la production d'$O_2^{\cdot -}$ (Poderoso et al. 1996; Poderoso et al. 1999; Brown 1999; Boveris et al. 2000; Davidson and Yellon 2005). D'une manière plus générale, tous les éléments pouvant agir sur les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale participent à la régulation de la production des anions superoxydes.

V.2.2 Les propriétés de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde est extrêmement instable. Il se dismute, en effet, en peroxyde d'hydrogène avec une vitesse de $k=10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$. Cette dismutation peut aussi être effectuée par les superoxydes dismutases présentes dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, accélérant la réaction d'un facteur 1000.

Bien que peu réactif par lui-même ($k= 10^2\ mol^{-1}.L.s^{-1}$), l'anion superoxyde peut cependant former, lors de sa rencontre avec une molécule de monoxyde d'azote, le peroxynitrite et, par cette voie le radical hydroxyle. Ce dernier est un très puissant initiateur de la lipoperoxydation lipidique.

Sous sa forme protonée, l'anion superoxyde, est plus réactif et donc plus dangereux. Il s'agit du radical hydroperoxyl : $HOO^{\cdot}$. Il peut être formé à partir de l'oxygène soit par addition de 3 électrons, soit par réaction avec une molécule d'eau. Il est connu, tout comme le peroxynitrite, pour initier la lipoperoxydation de façon très violente. Le peroxynitrite peut aussi réagir avec l'anion superoxyde pour former une molécule d'H_2O_2.

V.3 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

V.3.1 Formation du peroxyde d'hydrogène

La formation de peroxyde d'hydrogène correspond majoritairement à une réduction de l'anion superoxyde. Il est produit par dismutation de l'anion superoxyde. *In vivo*, la réaction de formation est régie par cette équation :

$$O_2^{\cdot -} + 1e^- + 2H+ \rightarrow H_2O_2$$

S'agissant d'une réaction endothermique, elle est thermodynamiquement impossible et la formation du peroxyde d'hydrogène résulte de réaction enzymatique grâce aux différentes SOD.

Cette molécule peut aussi être produite directement à partir de l'oxygène, par réduction bi-électronique et grâce à des enzymes telles que les oxydases, dans le peroxysome par exemple, ou encore *via* la monoamine oxydase de la membrane externe mitochondriale (Cadenas and Davies 2000a).

Enfin, elle peut dériver du radical hydroperoxyl suite à l'addition d'un électron. Cette réaction peut se faire *in vivo*.

V.3.2 Actions du peroxyde d'hydrogène, toxicité et détoxification

Dans le foie et les bactéries, la concentration du peroxyde d'hydrogène est d'environ 10^{-8} M dans les conditions normales (Chance, Sies, and Boveris 1979).

Le rapport $[H_2O_2]/[O_2^{\cdot-}]$ dans une cellule normale est de 10^3.

L'H_2O_2 est une espèce non radicalaire, peu réactive, mais qui diffuse très bien à travers les membranes (Nordberg and Arnér 2001). Il peut donc, à distance de son lieu de production, former *via* la réaction de Fenton et en présence de métaux, en particulier l'ion ferreux, le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$).

Le fer étant abondant dans l'organisme et pouvant provenir de diverses sources (ion ferreux, fer complexé, hème), un arsenal enzymatique est capable de détoxifier l'H_2O_2 : il s'agit en premier lieu de la catalase (voir figure 4), mais aussi de la glutathion peroxydase, de la thioréductase-2, ou encore de la peroxyrédoxine-3. Il faut aussi citer les peroxydases, ces enzymes hémiques qui, bien que d'origines polygéniques, ont en commun la même activité enzymatique vis-à-vis de l'H_2O_2 (Furtmüller et al. 2006).

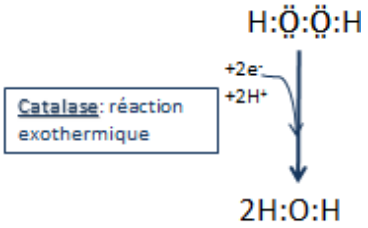


Figure 4: Réaction de détoxification du peroxyde d'hydrogène par la catalase

V.4 Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$)

Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ est l'ERO le plus réactif (sa vitesse de réaction avec les molécules biologiques est comprise entre 10^9 et $10^{10} M^{-1}.s^{-1}$) et donc le plus dangereux. Une seule collision suffit à ce que la réaction se produise sans apport d'énergie supplémentaire Sa durée de vie est extrêmement faible (10^{-9}s), il diffuse donc faiblement et n'induit des dommages biologiques que dans son environnement de production immédiat.

V.4.1 Formation du radical hydroxyle

La réaction d'Haber-Weiss, nommée d'après Fritz Haber et son étudiant Joseph Joshua Weiss, génère un radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde. Cette réaction est lente.

Elle est catalysée par l'ion ferreux Fe^{2+} ou l'ion cuivre^{2+}.

$\mathbf{Fe^{3+} + {}^{\bullet}O_2^{-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2}$ 1e étape: réduction du Fe^{3+} (présent majoritairement sous cette forme dans l'organisme) en Fe^{2+}

$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + {}^{\bullet}OH}$ 2e étape : Réaction de Fenton: production du radical hydroxyle

Bilan de la réaction:
$\mathbf{{}^{\bullet}O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^{-} + O_2}$

V.4.2 Mode d'action du radical hydroxyle

Ce radical agit par arrachage d'un électron.
Cela a trois sortes de conséquences biologiques, telles que :

- lorsqu'il attaque les macromolécules (bases azotées de l'ADN, acides aminés des protéines) et conduit à la formation de dérivés hydroxylés (J. Cadet et al. 1999),
- il peut former le radical peroxyle lorsqu'il arrache un atome d'hydrogène, ou encore lorsqu'il transfère son électron non apparié. Sur les lipides, il initie alors une cascade de lipoperoxydation, appelées aussi peroxydation lipidiques (Sonntag 1989),
- enfin, il peut s'additionner sur une double liaison.

V.5 Les dérivés azotés de l'oxygène

Il existe de nombreux dérivés azotés de l'oxygène, mais le plus réactif et le plus dangereux est dans conteste le peroxynitrite, qui peut initier des cascades de lipoperoxydations. Le monoxyde d'azote est aussi un dérivé azoté extrêmement important du fait de son rôle de second messager cellulaire.

VI. Rôles physiologiques du stress oxydant.

Les conséquences du stress oxydant sont multiples, mais, contrairement à ce que l'on pourrait imaginer, elles ne sont pas toujours défavorables à l'organisme. Il intervient dans le maintien de la fonctionnalité des organes (apoptose des cellules malades ou sénescentes, élimination des pathogènes dans les macrophages, etc.) Certains ERO sont à la base de mécanismes cellulaires. Cependant, lorsque ces molécules sont produites en trop grande quantité elles peuvent avoir des effets négatifs autant à court qu'à long terme.

VI.1 Rôles physiologiques

L'impact des espèces réactives de l'oxygène n'est pas seulement délétère pour les organismes (Jezek and Hlavatá 2005). A des concentrations physiologiques, certaines ERO comme le $NO^{\bullet}$, le radical carbonyle $CO_3^{\bullet-}$, le dioxyde d'azote $NO_2^{\bullet}$ voire le peroxynitrite ont même un rôle cellulaire très important. Elles peuvent intervenir dans de nombreux phénomènes, tels que le maintien de l'homéostasie cellulaire et la signalisation, ou encore la réponse immunitaire (Katoh et al. 1999; Nemoto et al. 2000).

La peroxydation des lipides est indispensable lors de la prolifération et de l'apoptose des cellules normales (Brookes and Darley-Usmar 2002; Brookes et al. 2004; Huang et al. 1996; Simon, Haj-Yehia, and Levi-Schaffer 2000).
Au cours de l'embryogénèse, une augmentation des ERO dans certaines cellules ciblées permet une morphogénèse harmonieuse (Salas-Vidal et al. 1998).

Les mitochondries, siège de la respiration cellulaire, sont aussi les organites centraux initiateurs des stades précoces de l'apoptose. Dans la membrane interne de ces dernières, le cytochrome C est fixé à un phospholipide particulier, la cardiolipine, ce qui l'empêche d'être libre dans l'espace inter-mitochondrial (Orrenius and Zhivotovsky 2005) (voir figure 5). Or, la peroxydation de la cardiolipine conduit à la rupture de cette liaison et donc à la libération du cytochrome C dans l'espace inter -membranaire. S'ensuivent des réactions de perméation de la membrane externe de la mitochondrie - dans lesquelles est impliqué l'$O_2^{\cdot-}$ (Ott et al. 2002) - qui aboutissent à la libération du cytochrome C dans le cytosol.

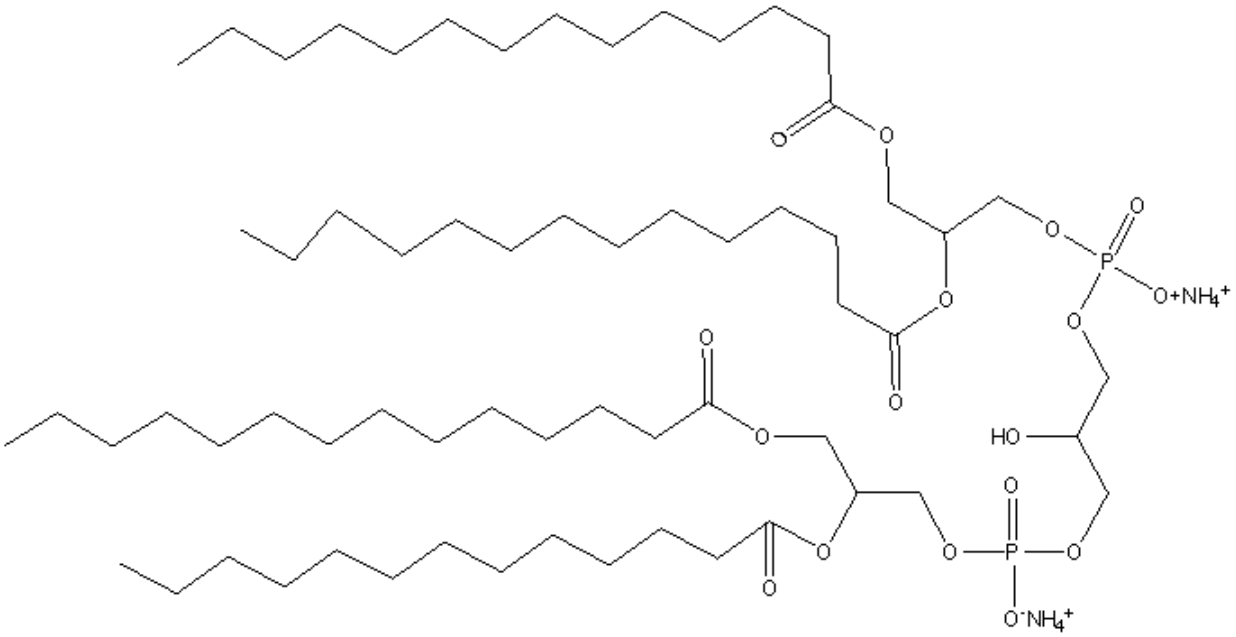


Figure 5: Structure de la cardiolipine, présentant chaînes hydrophobes.

Toujours au niveau mitochondrial, lors d'un phénomène d'hypoxie, ce sont les anions superoxydes produits par la chaîne respiratoire qui initient les cascades transcriptionnelles permettant d'activer les facteurs protéiques de protection (HIF-Hypoxia-Induced Factors (Chandel and Schumacker 2000; Schroedl et al. 2002) (voir figure 6).

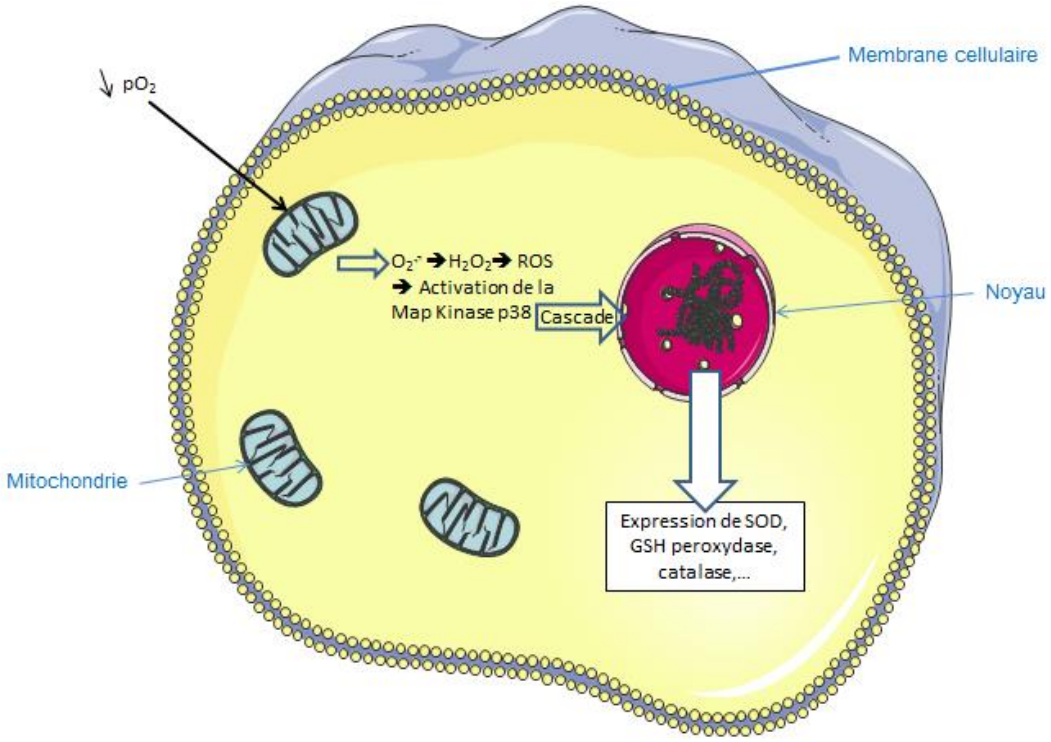


Figure 6: La mitochondrie a un rôle central dans l'activation des facteurs protéiques de protection contre l'hypoxie.

Dans la cellule normale, H_2O_2 est un messager intracellulaire ubiquitaire (Rhee, Chae, and Kim 2005).

Il agit par exemple sur la biosynthèse des prostaglandines à des concentrations de 10^{-6}M et est nécessaire à la coagulation car il transmet le signal suite à l'activation du récepteur du PDGF (Platelet-Derived-Growth factor) (Sundaresan et al. 1995). Par ailleurs, il a été démontré qu'il inhibe une tyrosine protéine phosphatase et stimule les cascades signalétiques induites par les MAP kinases.

Le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) est un neurotransmetteur majeur. Il est gazeux et est formé par les $NO^{\cdot}$ synthases à partir de L-arginine (Palmer, Ashton, and Moncada 1988).

Les NO synthases sont des enzymes héminiques largement distribuées (endothélium vasculaire, tissu digestif, monocytes, granulocytes, hépatocytes, etc.) Le NO, très diffusible, se répartit donc dans l'espace intercellulaire et dans les membranes cellulaires de tous les tissus.

Réaction de formation du NO à partir de L-arginine :

L-arginine+NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide) + Ca^{++} + Calmoduline ➔ L-citrulline + NO

La réaction nécessite la présence du FAD (flavine adénine dinucléotide), de l'hème et de la tétrahydrobioptérine (Busse and Mülsch 1990; Mayer et al. 1989; Nathan 1992; Palmer, Ashton, and Moncada 1988)

Le monoxyde d'azote a été reconnu par Furchgott en 1987 comme étant « l'endothelium-derived relaxing factor (EDRF) » (Palmer, Ferrige, and Moncada 1987). Le mécanisme d'action est le suivant : l'oxyde d'azote active la guanylate cyclase (Rapoport and Murad 1983) en se fixant au fer du complexe Hème-guanylate cyclase (Craven and DeRubertis 1978), ce qui entraîne une augmentation de la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Dunkley 1994) induisant une activation de certaines protéines kinases et enfin un relâchement des muscles lisses. Au niveau des épithéliums vasculaires il y a alors une vasodilatation. Lorsque le tissu cible est le corps caverneux, l'afflux sanguin est favorisé provoquant ainsi l'érection. Rétablir ce phénomène est à la base du mécanisme d'action du sildénafil (Sildénafil - Vidal.fr n.d.).

VI.2 Causes du stress oxydant

De multiples causes, autant intrinsèques qu'extrinsèques, peuvent déclencher un état de stress oxydant.

VI.2.1 Causes physiopathologiques

VI.2.1.1 Infections

Lors d'une infection bactérienne ou virale, la cascade signalétique qui découle de la phagocytose de bactéries par les cellules de la réponse immunitaire innée conduit à une forte consommation d'oxygène et à l'intervention du stress oxydant pour protéger l'organisme des pathogènes invasifs, ainsi que des cellules cancéreuses (Zuo et al. 2015).

Grâce à la NADPH-oxydase, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles peuvent réduire l'O_2 en $O_2^{\cdot -}$. Ce phénomène de production d'anion superoxyde de façon très intense est nommé « flambée respiratoire », ou « burst oxydatif ». Il permet de détruire les bactéries pathogènes invasives phagocytées dans les vacuoles digestives, et ce par stress oxydant.

Une partie de l'$O_2^{\cdot -}$ est dismuté en H_2O_2. Les macrophages peuvent ainsi, *via* la chloroperoxydase, produire des ions hypochlorites ClO^- au sein de leur vacuole. Les ions hypochlorites, par réaction avec des amines, peuvent former des chloramines.

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle très important dans l'activation, le maintien et la production d'ERO. Elles participent aussi à l'emballement de la réponse immunitaire ou à une réponse immunitaire non adaptée dans le cas des infections virales (Mogensen and Paludan 2001).

VI.2.1.2 L'hypoxie et l'ischémie tissulaire :

Quand un organe ou un tissu n'est plus oxygéné, c'est-à-dire quand la concentration en oxygène dissous est inférieure à 3µM, apparait le phénomène d'hypoxie. Si la concentration en oxygène continue à diminuer, le tissu se trouve alors en anoxie.

Pendant cette phase d'anoxie, la chaîne respiratoire mitochondriale ne peut plus fonctionner et la production d'ATP s'arrête. Lors de la ré-oxygénation, les cytochromes de la chaîne respiratoire ne peuvent se réactiver immédiatement, contrairement à l'ubiquinone. Les électrons de l'ubiquinone ne sont alors plus pris en charge par les cytochromes et l'ubiquinone réduit alors l'O_2 en $O_2^{\cdot -}$ (Chandel and Budinger 2007; Dirmeier et al. 2002; Jezek and Hlavatá 2005; Lesnefsky and Hoppel 2003).

L'ATP venant à manquer, les pompes ATP-dépendantes ne fonctionnent plus. Il y a alors une hypercalcémie intra-cellulaire qui active la xanthine oxydase *via* une protéase, ce qui aboutit à la formation d'une quantité d'$O_2^{\cdot -}$ exacerbée :

$$\text{Xanthine} + \text{Xanthine oxydase} \rightarrow \text{Xanthine oxydée} + O_2^{\cdot -}$$

Ce mécanisme provoque *in fine* la nécrose tissulaire.

VI.2.1.3 L'hyperglycémie

Une surnutrition conduit à une hyperglycémie chronique, puis progressivement à une insulino-résistance ainsi qu'à un trouble de la sécrétion d'insuline et une obésité. Généralement, on voit apparaitre un diabète de type II après quelques années. Les mécanismes de cette pathologie complexe mettent en jeu les ERO et un stress oxydant chronique (Brownlee 2005), tant en ce qui concerne l'apparition de la maladie que de ses complications.

Le stress oxydant provoque l'activation de cinq voies métaboliques :

- la voie des polyols,
- la formation des dérivés glyqués[1],
- une expression exacerbée du récepteur aux dérivés glyqués,
- la protéine MAP-kinase,
- la voie des hexosamines.

Il inactive en outre les enzymes anti-athérosclérose, à savoir la prostacycline synthase et l'eNOS.

Toutes ces modifications ont pour conséquences d'activer les cascades signalétiques pro-inflammatoires et de tronquer l'angiogénèse ischémie dépendante.

De plus, il est à noter que ces désordres s'inscrivent au niveau épigénétique et qu'ils changent profondément et à long terme le métabolisme général de l'organisme (Giacco and Brownlee 2010).

Par ailleurs, nous ajouterons que l'obésité provoquée à long terme par l'hyperglycémie peut aussi être source de stress oxydant. En effet, les leptines, hormones produites par le tissu adipeux, seraient capables de stimuler la production d'anion superoxyde dans les cellules aortiques. Ceci explique en partie le lien entre obésité et maladies cardiovasculaires (Yamagishi et al. 2001).

VI.2.1.4 L'ion Ca2+

L'ion calcium accroît la production d'ERO car il est un stimulateur du cycle de Krebs. Il entraîne donc une surproduction d'anion superoxyde.

Il stimule aussi la NO synthase et donc la production de $NO^{\cdot}$ (cf. sous-partie suivante). Or le monoxyde d'azote, est non seulement un radical libre en lui-même, mais aussi est un inhibiteur de complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce mécanisme renforce le premier dans la production d'anions superoxydes.

[1] La formation de dérivés glyqués intervient lorsque les acides aminés lysine et arginine réagissent avec les sucres réducteurs retrouvés dans le sang à la suite d'une hyperglycémie. On voit apparaitre les produits d'Amadori, puis, si les oxydations ne cessent pas, il y a formation d'AGEs (Advanced Glycated End Products), comme la n-carboxy-méthyl-lysine ou la pentosidine. Ces AGEs se fixent alors aux parois du système vasculaire, provoquant des obstructions de la lumière des veines et artères.

VI.2.1.5 Diminution des molécules anti-oxydantes.

Cette diminution des molécules anti-oxydantes peut être due à une insuffisance d'apport, par exemple avec un régime mal adapté, ou encore une chélation de ces molécules (charbon actif).

VI.2.1.6 Taux de métaux de transition trop élevé

Un taux d'ion ferreux trop élevé, par exemple, conduit à une augmentation du risque que la réaction de Fenton se produise.

VI.2.1.7 Causes chimiques

L'antimycine, un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale, (Boveris, Cadenas, and Stoppani 1976; Cadenas and Davies 2000b) provoque une inhibition de la respiration mitochondriale. Le couplage électronique se produit alors en faveur de la formation d'$O_2^{\cdot -}$ (Brown and Borutaite 2007; St-Pierre et al. 2002b; Turrens 2003; Turrens, Alexandre, and Lehninger 1985).

La stimulation du cycle de Krebs par les dioxines, autres poisons mitochondriaux, est aussi une voie de production des radicaux libres. Celles-ci activent la succino-déshydrogénase, augmentant ainsi la production d'H_2O_2 (Senft et al. 2002).

Enfin, nous pouvons donner l'exemple de médicaments ou de toxiques qui mettent en route la voie métabolique de l'acide arachidonique, en activant la lipo-oxygénase et la cyclo-oxygénase.

Le mécanisme d'action d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, tels que l'ibuprofène ou le kétoprofène, est de contrer ce phénomène en inhibant la cyclo-oxygénase 3 et le cycle des prostaglandines.

VI.2.1.8 Causes physiques : Radiations ionisantes (UV, Radioactivité)

Ces radiations fournissent suffisamment d'énergie aux molécules touchées (ADN, protéines, lipides, H_2O, etc.) pour arracher des électrons sur leurs couches électroniques externes, les convertissant en radicaux libres.

VI.3 Les effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques

Bien que nécessaires à de nombreuses voies physiologiques, certains ERO, lorsqu'ils sont en excès, provoquent des lésions directes sur les molécules biologiques entrainant des oxydations de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides.

VI.3.1 Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique (ou lipoperoxydation) est l'oxydation des acides gras polyinsaturés ou des liopoprotéines par les radicaux libres. Cette réaction se déroule en trois étapes comprenant l'initiation la propagation et la terminaison (Gray J, J. American Oil Chemists'.Society, 1978, 55, 539-546).

Le mécanisme d'oxydation met en jeu le radical hydroxyle, qui va arracher le proton d'un acide gras et qui se retrouve alors sous forme radicalaire. Afin de combler le manque d'électron, l'acide gras radicalaire (radical Alkyle) va réagir avec une molécule de dioxygène, formant une espèce réactive de l'oxygène le radical peroxyl. Du fait de son instabilité le radical peroxyl va à son tour réagir avec une autre double liaison, c'est le phénomène de propagation radicalaire (voir figure 7). Au cours de cette phase le radical peroxyl lipidique peut auto-réagir pour former des peroxydes cycliques qui seront rapidement transformés en dialdéhyde malonique (MDA).

Cette réaction en chaîne se poursuivra jusqu'à ce que deux composés radicalaires réagissent entre eux pour former des composés non radicalaires (Gray 1978). Cette dernière phase peut être catalysée par certains anti-oxydants (Sachdev and Davies 2008).

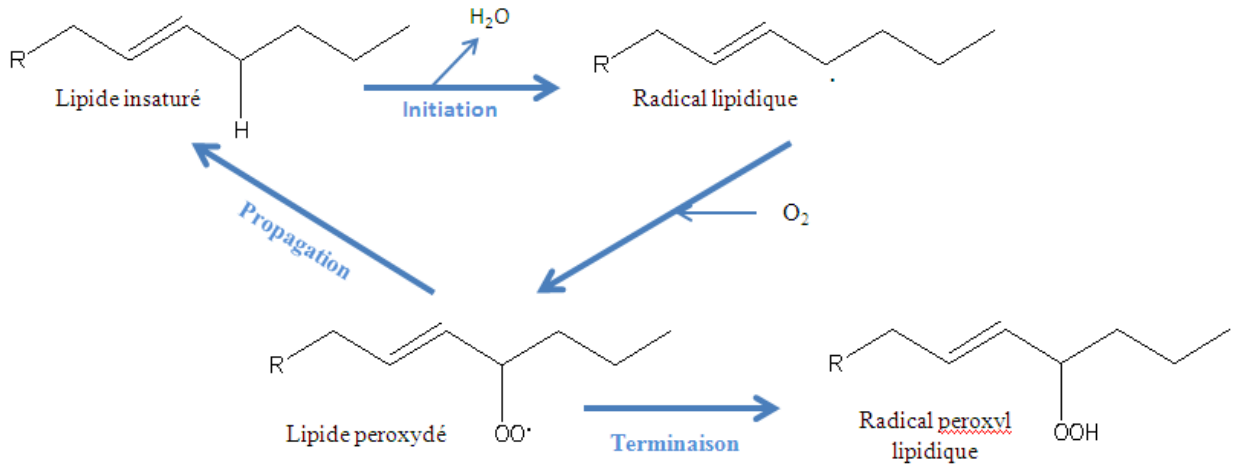


Figure 7: Schéma montrant le phénomène de lipoperoxydation lipidique dans son ensemble.

L'anion superoxyde peut aussi initier une cascade de lipoperoxydations, car il peut être réduit en $HO_2^{\cdot}$ (Halliwell 2006). Cependant, il est à noter que l'anion superoxyde peut aussi agir en tant que terminateur de chaîne de peroxydation, en réagissant avec les lipides peroxydés pour donner des lipides, suivant la réaction suivante :

$$LOO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow LOOH + O_2$$

(Nelson, Bose, and McCord 1994)

Un apport trop important en SOD, ou une augmentation de son activité serait donc délétère et conduirait vraisemblablement à une peroxydation lipidique accrue (Kowald, Lehrach, and Klipp 2006).

La peroxydation lipidique conduit à la perte de la fluidité, voire à la destruction, des membranes lipidiques. Par voie indirecte, les protéines et les canaux membranaires sont aussi touchés. Les lipides visés sont souvent ceux des bicouches membranaires, à savoir les acides gras polyinsaturés des phospholipides, mais en fait tout acide gras insaturé peut être touché, et, plus largement encore, n'importe quelle double liaison. Les lipides oxydés et ou leurs métabolites se comportent surtout comme des produits toxiques responsables d'altérations et de dysfonctionnement cellulaires (Young and McEneny 2001).

Les métabolites produits sont variés et peuvent aussi bien être des alcools, que des cétones, des alcanes, des aldéhydes ou des éthers. Parmi eux, l'isoprostane et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) (voir figure 8) (Marnett 1999). Ces métabolites sont hautement toxiques, tant au niveau protéique que cellulaire : il a en effet été prouvé que le MDA, par exemple, se fixe sur la molécule d'ADN, entraînant un effet mutagène, tandis que le 4_HNE est cytotoxique. Cela étant, et malgré son effet délétère, ce dernier composé intervient dans le rétrocontrôle négatif de la lipoperoxydation en activant le découplage mitochondrial, réduisant alors la production d'ERO par la mitochondrie et limitant donc le taux de radicaux libres dans la cellule (Echtay et al. 2003).

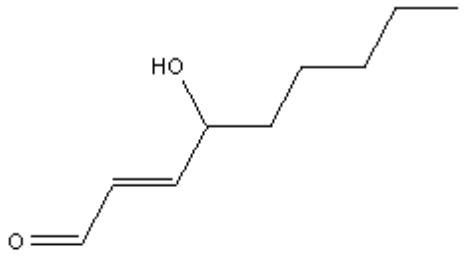


Figure 8: 4-hydroxynonénal

Tous les effets négatifs de la lipoperoxydation sont à mettre en balance avec le fait qu'il a été démontré depuis quelques années que ce phénomène existe dans la cellule normale et participe au métabolisme basal. A travers ses produits de dégradation, notamment les aldéhydes, elle participe à divers processus cellulaires, comme la multiplication, la différentiation, l'expression des gènes (Kumagai et al. 2000) et l'apoptose des cellules normales, mais aussi néoplasiques (Barrera, Pizzimenti, and Dianzani 2008).

Les récepteurs aux hormones stéroïdes, les PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors), sont des récepteurs nucléaires. Ils sont impliqués dans le métabolisme basal des acides gras et ont un rôle antiprolifératif fondamental en contrôlant l'apoptose. Il a été démontré que le 4-hydroxynonénal (4-HNE) est un ligand de ces récepteurs et qu'il amplifie leurs effets antitumoraux (Barrera et al. 2008).

Condamner entièrement la lipoperoxydation semble donc être un jugement hâtif.

VI.3.2 Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines par les radicaux libres concerne principalement les acides aminés soufrés, comme la cystéine ou la méthionine, et les acides aminés aromatiques, tels la tyrosine, la phénylalanine ou le tryptophane, mais elle peut toucher tous les acides aminés.

Le tableau 1 suivant présente les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation et leurs principaux produits de réaction :

Tableau 1: Acides aminés et leurs produits d'oxydation.

Acide aminé	Produits d'oxydation
Cystéine	Disulfides, acides cystéiques
Méthionine	Méthionine sulfoxide, méthionine sulfone
Tyrosine	Dityrosine, Nitrotyrosine, Chlorotyrosine, DOPA
Tryptophane	Hydroxytryptophane, Nitrotryptophane, Kynurénines
Phénylalanine	Hydroxyphénylalanine
Valine, Leucine	Hydroperoxydes
Histidine	2-oxo-histidine, Asparagine, Aspartate
Glutamine	Acide Oxalique, Acide Pyruvique
Proline	Hydroxyproline, Pyrrolidone, Semi-aldéhyde glutamique
Thréonine	Acide 2-amino-3-cétobutyrique
Arginine	Semi-aldéhyde glutamique, Chloramines
Lysine	Semi-aldéhydes, Chloramines

Les modifications sur les protéines sont majoritairement causées par l'$OH^{\cdot}$ (Garrison 1987; Garrison, Jayko, and Bennett 1962; Holbrook, Martin, and Lockshin 1996; O'Connell, Baum, and Peters 1986). Ces oxydations dépendent de la disponibilité en oxygène, en anion superoxyde, ainsi qu'en sa forme protonée HO_2.Elles peuvent conduire à des modifications structurales, conformationnelles ou fonctionnelles. Différents types de modifications ont été mis en évidence tels que des oxydations du squelette carboné des polypeptides (Stadtman et Levine Amino Acids 2003, 25, 207-218), le clivage des liaisons peptides par la voie de l'amidation et du diamide ((Stadtman et Levine Amino Acids 2003, 25, 207-218), la carbonylation des protéines au niveau des résidus lysine, proline, thréonine, tyrosine, histidine ((Stadtman et Levine Amino Acids 2003, 25, 207-218), la formation de complexes protéiques associés via la formation de liaison intra ou inter protéiques au niveau de résidus tyrosine par exemple ((Stadtman et Levine Amino Acids 2003, 25, 207-218), enfin les acides aminés aromatiques peuvent être oxydés par les ERO . (Berlett and Stadtman 1997).

Dans les cellules, ces différents processus oxydatifs peuvent entrainer la perte de l'activité fonctionnelle des protéines ou même leur dégradation (Fridovich 1995; Abate et al. 1990). L'oxydation des résidus cystéine est à la base de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire, notamment en ce qui concerne la différenciation et la spécialisation cellulaires (régulation du facteur de croissance épidermique (EGF) par exemple). Ces résidus cystéine sont situés sur des tyrosines kinases. Leur état d'oxydation, et donc l'activation ou non des tyrosines kinases, est déterminé par des NADPH oxydases (Heppner and van der Vliet 2016). Or, lorsque les résidus cystéine sont oxydés par les radicaux libres, l'activité des tyrosines kinases est perturbée, voire annulée, ce qui conduit à un bouleversement du métabolisme basal et à terme à l'apparition des cancers. Ce mécanisme est transposable à de nombreuses autres enzymes (élastases…)

La cellule possède néanmoins différents systèmes qui lui permettent d'éliminer ou de réparer les protéines endommagées tels que le protéasome, la surexpression des protéines chaperonnes. Cependant l'activité du protéasome diminue lors du processus de vieillissement, impliquant une accumulation des protéines anormales et annonçant des maladies dégénératives (Alzheimer, cataracte, athérosclérose…)

VI.3.3 Oxydation de la molécule d'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN), molécule essentielle à la base du phénomène de la vie, est très facilement oxydable (voir figure 9). Cette propriété est à la base du processus d'évolution, puisque le remplacement de certaines bases azotées par d'autres aboutit parfois à l'apparition de nouveaux gènes, codant pour de nouvelles protéines. Elle est également à l'origine de nombreuses pathologies, à court comme à long terme (mutagénèse, carcinogénèse), ainsi que du processus de vieillissement.

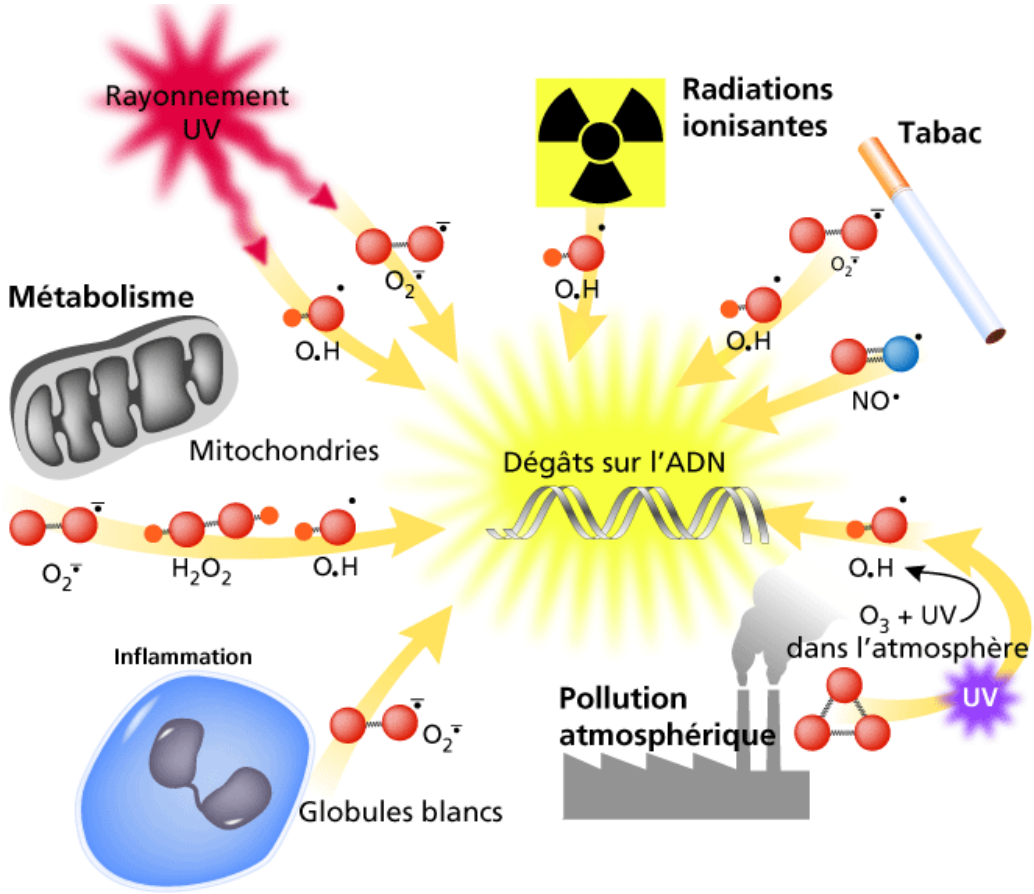


Figure 9: Les divers facteurs pouvant générer une oxydation de la molécule d'ADN. Extrait de « La nutrition » http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-age/vieillissement/radicaux-libres-antioxydants-et-vieillissement/la-famille-des-radicaux-libres.html

Comme dans le cas des acides gras, le radical le plus impliqué est le radical hydroxyle, mais les bases aromatiques et les sucres de l'ADN sont aussi très sensibles à l'action directe des radiations UV. Les lésions sur l'ADN peuvent aussi être provoquées de manière indirecte par les UV *via* des molécules photosensibilisantes. Suivant les radicaux en cause et les cibles de ces derniers, une grande diversité de produits d'oxydation est obtenue.

Enfin, les radiations radioactives entraînent des oxydations de la molécule d'ADN à travers la production d'$OH^{\cdot}$ due à la dissociation des molécules d'eau de l'organisme.

Dans une cellule, deux types d'ADN peuvent être touchés par l'oxydation : l'ADN mitochondrial et l'ADN cellulaire (Bohr, Stevnsner, and de Souza-Pinto 2002).

L'ADN mitochondrial, étant plus proche de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc du lieu de production majoritaire des radicaux libres, est le plus concerné par ce processus. Sa particularité de n'être pas associé à des histones le rend plus vulnérable encore aux attaques des radicaux libres. De plus, il a une capacité réparatrice moins importante que l'ADN nucléaire. L'ADN mitochondrial compte 2 à 3 fois plus de bases oxydées que l'ADN nucléaire (Druzhyna, Wilson, and LeDoux 2008).

Les dommages sur l'ADN peuvent être directs ou indirects (formation d'adduits). Parmi les lésions directes, il est à noter que l'oxydation de l'ADN se fait préférentiellement

sur les guanines, ces dernières étant plus facilement oxydables, notamment par le radical hydroxyle et le peroxynitrite (Jean Cadet et al. 1999).

Le produit d'oxydation majoritaire de la guanine est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo). Or cette base est à l'origine d'un phénomène de transversion génétique, c'est-à-dire de remplacement d'une purine par une pyrimidine, ou à l'inverse d'une pyrimidine par une purine. Il en découle un remplacement du couple de bases GC par le couple AT (ou inversement), entraînant de lourdes conséquences, comme des mutations à l'origine de cancers. La 8-oxodGu est donc considérée comme pré-mutagénique (Mangal et al. 2009).

Le radical $OH^{\cdot}$ est aussi capable de s'attaquer aux sucres présents dans la molécule d'ADN. Il peut en effet former un radical sur le carbone C4' du désoxyribose. Ce radical conduit à la rupture de la liaison entre le groupement phosphate et le carbone C3' du sucre. *In fine*, cela aboutit à une coupure de la molécule d'ADN.

En ce qui concerne les lésions indirectes sur la molécule d'ADN, celles-ci résultent de l'addition de certains métabolites de la lipoperoxydation sur la double hélice d'ADN. Ils se fixent sur les amines. La réaction du composé majoritaire de la peroxydation lipidique, le 4-HNE (2,3-epoxy-4-HNE), avec la guanine conduit à la formation la εdGuo 1,N2-Ethenodeoxyguanosine). Avec l'adénosine il peut former l'εdA (1,N6-deosyadenosine). Quant à sa réaction avec la cytidine, son produit de réaction est la εdC(3,N4-Ethenodeoxycytidine) (Feng et al. 2003).

Toutes ces lésions mutagènes ont des conséquences graves à long terme sur l'organisme.

VI.3.4 Conséquences physiopathologiques des dommages sur les cibles biologiques

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux effets à long terme du stress oxydant, c'est-à-dire les conséquences des lésions moléculaires répétées.

VI.3.4.1 Vieillissement

Le vieillissement est une diminution de la capacité d'un organisme à faire face aux agressions de son environnement, suite à l'accumulation d'altérations subies au cours du temps. Les radicaux libres semblent impliqués dans ce processus de vieillissement (Fleming, Leon, and Miquel 1981; Harman 1981; Harman 1956).

Cet effet est principalement dû aux dommages infligés à l'ADN. La machinerie cellulaire totalement dévolue à la réparation des lésions ne peut plus assurer la croissance des cellules et leur prolifération normales.

De même, les mitochondries, organites en première ligne des effets du stress oxydant, sous l'effet des dommages infligés à leur ADN, voient leur taux de multiplication chuter (Bulteau, Szweda, and Friguet 2006).

L'étude d'une maladie extrêmement rare, le syndrome de Hutchinson-Gilford, plus communément appelée Progéria, a permis d'identifier deux enzymes dont la mutation ou l'absence sont responsables du vieillissement : la glutathion peroxydase et la catalase. Dans cette maladie, caractérisée par un vieillissement prématuré des patients, ces deux enzymes sont diminuées, respectivement, de 50 et 30% (Yan et al. 1999). Ces enzymes étant primordiales pour le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction, ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle l'excès de radicaux libres est à l'origine d'un vieillissement prématuré.

Par ailleurs, il a été démontré que les formes oxydées des protéines s'accumulent avec l'âge, laissant émerger des pathologies dégénératives (Berlett and Stadtman 1997). C'est le cas par exemple du peptide β-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer, mais aussi des protéines des motoneurones dans la sclérose latérale amyotrophique.

VI.3.4.2 Pathologies cardiaques et dégénératives

Une augmentation de la production cellulaire en anion superoxyde a été très fortement corrélée avec l'apparition de maladies cardiovasculaires (athérosclérose, angor, infarctus…) ainsi qu'avec des pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson ou celle d'Alzheimer, ou encore la sclérose latérale amyotrophique.

Les complications cardiovasculaires multiples liées au diabète, tant insulino-résistant qu'insulino-dépendant, comme nous l'avons vu précédemment, sont aussi dues au stress oxydant chronique.

Quant à la polyarthrite rhumatoïde, c'est une pathologie dont l'origine physiopathologique est mal connue, mais dont les lésions sont dues à une inflammation chronique du liquide synovial articulaire.

VI.3.4.3 Cancers

Les ERO sont impliqués dans les premières étapes de la progression tumorale (Roberts et al. 2010; Roberts et al. 2010; Hockenberry et al. 2014) et dans l'augmentation du risque de mutagénèse *via* l'activation d'oncogènes ou la répression de gènes suppresseurs de tumeurs (Tanaka et al. 1999).

Des agressions répétées de l'organisme peuvent entrainer une production d'ERO supérieure à la capacité des systèmes antioxydants. Ce phénomène sera responsable d'une augmentation des dommages sur l'ADN. Cette forte augmentation des dommages sur l'ADN peut être une source de mutations à l'origine de l'apparition de cancers.

Ainsi le stress oxydant est responsable de nombreuses pathologies. L'occurrence de celles-ci est cependant diminuée de façon significative grâce à l'action des régulateurs cellulaires du stress oxydant ou encore de molécules anti-oxydantes.

La principale enzyme de la lutte contre le stress oxydatif est la superoxyde dismutase, mais comme nous allons le voir dans les deux prochaines sous-parties, elle est secondée par d'autres enzymes ainsi que par des molécules anti-oxydantes, tant endogènes qu'exogènes.

VII. Les régulateurs cellulaires du stress oxydant

Comme nous venons de le voir, les organismes vivants sont soumis à un stress oxydant intense, qui peut se révéler dramatique s'il n'est pas contrôlé. Il existe donc des mécanismes de régulation permettant d'en maîtriser les effets délétères.

VII.1 Systèmes enzymatiques

Nous verrons ici les principales enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant.

VII.1.1 Les glutathion peroxydases (GPX)

Les glutathion peroxydases (GPX) sont des enzymes qui ont été découvertes en 1957 (Mills 1957). Elles sont formées de quatre sous-unités. Chacune d'entre elles contient une cystéine dont le soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium : cette cystéine est donc une sélénocystéine. Selon leur localisation cellulaire on distingue la GPX cytosolique (Matés and Sánchez-Jiménez 1999), la GPX plasmatique et la GPX membranaire.

La GPX intervient dans un système bi-enzymatique, où, combinée à la glutathion réductase (GR), et à l'aide du glutathion réduit (GSH) (voir figure 10), elle réduit les peroxydes (H_2O_2 et ROOH), selon la réaction :

$$\mathbf{2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GS\text{-}SG + 2\ H_2O},$$

$$\mathbf{2\ GSH + R\text{-}OOH \rightarrow GS\text{-}SG + ROH + H_2O},$$

GS-SG étant le glutathion oxydé. Le mécanisme réactionnel implique la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines du glutathion.

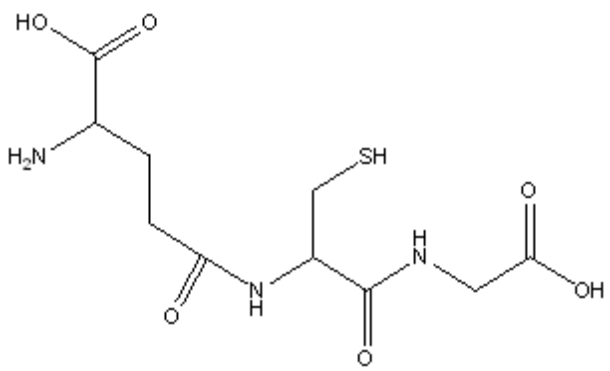


Figure 10: molécule de glutathion réduit.

La glutathion réductase réduit alors le glutathion oxydé et de ce fait oxyde le NADPH en $NADP^+$, selon la réaction suivante :

$$\mathbf{GS\text{-}SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP}$$

Le rapport GSH/GSSG est un bon indicateur de l'état d'oxydation dans la cellule.

VII.1.2 La catalase.

Tout comme la glutathion peroxydase, la catalase (CAT) catalyse la dismutation de l'H_2O_2 pour donner 2 H_2O (Glorieux et al. 2015). Pour des concentrations faibles d'H_2O_2, elle catalyse également l'oxydation de donneurs d'électrons, comme l'éthanol ou divers phénols (Percy 1984).

Mais il semblerait que la CAT soit plus active pour des concentrations élevées en H_2O_2 (c'est-à-dire supérieures à 10^8M). Elle catalyse la réaction suivante :

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O}$$

Cette protéine est composée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés portant chacun un groupement héminique, qui constituent les sites actifs de la CAT.

Présente dans tous les organismes aérobies, elle se localise principalement dans le peroxysome pour l'isoforme A et dans le cytosol pour l'isoforme T. Cependant, elle a aussi été retrouvée associée à la membrane plasmatique des érythrocytes (Percy 1984).

Le mécanisme réactionnel met en jeu le fer (III) de chaque groupement héminique. Celui-ci permet la rupture hétérolytique de la liaison entre les deux atomes d'oxygène de l'H_2O_2. Au cours de cette réaction le Fer III est oxydé en Fer (IV)=O (1), puissant oxydant qui va dans une seconde étape oxyder une deuxième molécule d'H_2O_2 pour donner une molécule d'eau et une molécule de dioxygène (2):

$$\mathbf{H_2O_2 + Fe(III)\text{-}CAT \rightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}CAT\ (1)}$$

$$\mathbf{H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}CAT \rightarrow O_2 + Fe(III)\text{-}CAT + H_2O\ (2)}$$

VII.1.3 Les thiorédoxines

Les thiorédoxines sont des enzymes qui réduisent les ponts disulfures. Une fois oxydées à leur tour, elles sont régénérées par la thiorédoxine réductase. Ces thiol-réductases ubiquitaires ont été hautement conservées dans l'évolution.

Elles peuvent être inhibées par la thioredoxin-interacting protein (Txnip). Cette dernière peut être activée en cas d'hyperglycémie par exemple : une cascade signalétique impliquant la p38 MAP kinase induit l'expression de Txnip, qui inhibe alors l'activité de la thiorédoxine. L'équilibre redox est rompu et on voit apparaitre un stress oxydant (Schulze et al. 2004).

VII.2 Le système antioxydant non enzymatique

Le liquide extra-cellulaire est pauvre en enzymes. La défense contre le stress oxydant repose donc dans ce compartiment sur de petites molécules qui vont neutraliser les radicaux libres en réagissant directement avec eux. Les plus actives sont les vitamines C et E. Il en existe d'autres - tels que le glutathion, l'acide urique, l'albumine, la transferrine, la céruloplasmine etc. que nous ne présenterons pas -

VII.2.1 La vitamine E

La vitamine E (voir figure 11), ou α–tocophérol, est le principal antioxydant membranaire : fixée aux membranes lipidiques, elle a pour rôle de stopper les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Elle est alors elle-même oxydée, mais sa réactivité est bien moindre, ce qui permet aux systèmes antioxydants de la réduire.

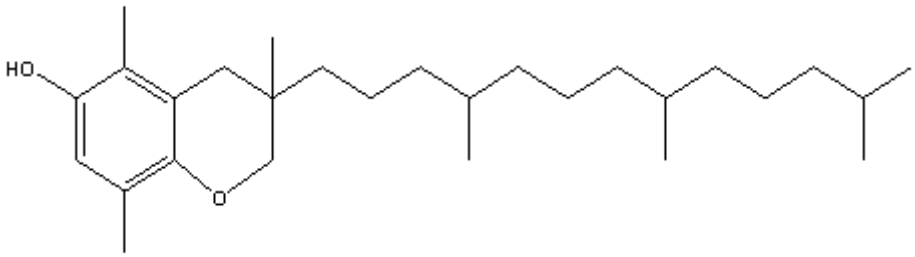


Figure 11: vitamine E.

Il est décrit que les concentrations de vitamines E et C sont corrélées de manière inverse au risque d'angor (ou angine de poitrine). Il est donc conseillé aux patients présentant un fort risque de maladie coronaire de suivre un régime diététique riche en vitamine E (Cornejo-Garcia et al. 2006).

VII.2.2 La vitamine C

La vitamine C (voir figure 12), ou acide ascorbique, ainsi appelée car elle est utilisée en traitement contre le scorbut, est un agent antioxydant majeur.

Elle est hydrophile, thermosensible et photolabile.

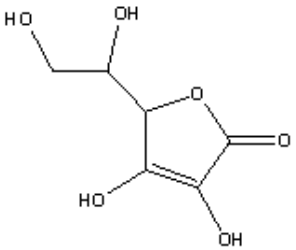


Figure 12: Vitamine C.

Cofacteur essentiel à de nombreuses réactions enzymatiques, elle a également la capacité de s'oxyder extrêmement rapidement au contact des radicaux libres. Elle peut aussi régénérer la vitamine E oxydée dans les lipides membranaires et joue donc un rôle très important dans l'inhibition de la propagation de la peroxydation lipidique.

Une fois oxydée, elle peut être régénérée par la glutathion peroxydase, qui utilise alors le GSH pour la réduire à nouveau.

Grâce à ses propriétés, il a été prouvé que la vitamine C exerce un effet protecteur contre les cancers de l'œsophage, de la cavité buccale, de l'estomac et du pancréas. Elle protègerait aussi des cancers du col de l'utérus, du rectum, du sein et du poumon (Cornejo-Garcia et al. 2006).

Il est cependant à noter qu'en présence de cuivre ou de fer, elle favorise la formation de radical hydroxyle et a donc un effet pro-oxydant.

VIII. Molécules antioxydantes exogènes.

Les régulateurs cellulaires du stress oxydatif sont l'ensemble des molécules permettant de conserver l'équilibre oxydatif de l'organisme, en luttant contre les pro-oxydants.

Ces molécules peuvent être endogènes ou exogènes. Parmi ces dernières, les flavonoïdes, les tanins, mais encore le β-carotène etc.

VIII.1 Tanins et flavonoïdes

Le terme de tanins qualifie toute substance d'origine végétale ou minérale ayant la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton n.d.). Cette propriété est liée à la création de liaisons hydrophobes et hydrogènes entre les tanins et les fibres de collagène de la peau.

Ils sont définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant de 500 Da jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Selon leur structure, ils sont généralement classés en deux groupes: les tanins hydrolysables (groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes) et les tanins condensés (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables) (Mueller-Harvey 2006).

La propriété majeure de ces molécules est celle d'être antioxydantes (Pietta 2000). Le mode d'action le plus communément admis est à rechercher dans leur structure : les nombreux cycles insaturés sont capables de capturer les radicaux libres.

La grande famille des polyphénols s'étend de molécules simples, comme les acides phénoliques, aux molécules hautement polymérisées, comme les tanins. Cependant, la

structure biochimique des tanins comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques (voir figure 13).

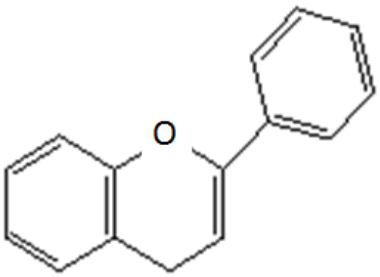


Figure 13: Structure chimique de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des polyphénols de faible poids moléculaire, regroupés sous une vaste famille chimique. Ils sont présents dans tout le règne végétal et sont des métabolites secondaires responsables de propriétés biologiques très diverses. Les flavonols et les dihydroflavonols seraient très présents chez les Fabacées. Les glycosylations présentes sur ces composés les rendent hydrophiles, permettant ainsi leur adressage dans les organes périphériques de la plante. Leurs rôles vont de la protection contre les rayonnements UV jusqu'à l'attraction les insectes polinisateurs (coloration des pétales par exemple), en passant par l'inhibition de certaines enzymes (élastase, phosphodiestérase de l'AMPc, etc) (Bruneton n.d.; Pietta 2000).

La distribution et le type de flavonoïdes retrouvés varient en fonction de la famille de plantes.

VIII.2 β-carotène

Le β-carotène est le dimère de la vitamine A. Outres ses fonctions anti-oxydantes, il participe au bon fonctionnement de la vision chez les animaux et fait partie des pigments photo-synthétiseurs chez les plantes.

IX. Les superoxydes dismutases

IX.1 Introduction

Les superoxydes dismutases (SOD) appartiennent à la famille des métallo-enzymes non-hémiques.

La première enzyme de ce genre, la SOD 1, a été isolée en 1939 à partir d'érythrocytes bovins par Mann et Keilin. Son activité n'a été découverte que 30 ans plus tard (Joe M. McCord and Fridovich 1969), pourtant son rôle biologique est primordial, puisqu'il consiste à détoxifier l'organisme du radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), en catalysant la réaction suivante :

$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$

Il existe plusieurs types de SOD, caractérisés par l'atome de métal situé sur leur site actif. Il y a la SOD1, qui présente un atome de cuivre et un de zinc, la SOD2 avec son atome de manganèse et enfin la SOD3 associée au fer. Ces atomes de métal sont essentiels dans la double réaction d'oxydo-réduction qui permet la dismutation de l'$O_2^{\cdot -}$.

$$\mathbf{M^{(n+1)+} - SOD + O_2^- \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2}$$
$$\mathbf{M^{n+} - SOD + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2}$$

Cette réaction se produit spontanément dans l'organisme, mais sa vitesse est alors de seulement de $k=10^5$ M^{-1} s^{-1}. Grace à la SOD, la vitesse de réaction passe à 10^8 M^{-1} s^{-1} en moyenne. Il est vital que ce radical soit consommé très rapidement, car bien que relativement peu réactif, il provoque de dégâts dans l'organisme. Dans les tissus, la concentration de la SOD est très élevée (environ 10^{-5} M (Tyler 1975)), pour une concentration d'$O_2^{\cdot -}$ de 10^{-11} à 10^{-12} M (Chance, Sies, and Boveris 1979).

Le peroxyde d'hydrogène produit est ensuite dégradé en eau et dioxygène par les catalases (CAT), avec une constante de vitesse de réaction de $k=10^7$ M^{-1} s^{-1}, selon la réaction :

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2}$$

Grâce à son activité anti-oxydante majeure, la SOD est donc un élément fondamental dans la lutte contre le stress oxydatif. C'est pour cette raison qu'elle fait partie des enzymes les plus conservées du règne vivant. Chaque organisme privilégie cependant le type de SOD - au fer, au cuivre-zinc ou au manganèse- qui correspond le mieux à son milieu de vie (Miller 2012).

X. La SOD 1 ou CuZnSOD

X.1 Généralités

La SOD1 est une enzyme très largement conservée au cours de l'évolution, ce qui souligne son rôle fondamental dans la survie des organismes vivants. Elle est majoritairement présente chez les eucaryotes, les animaux (Bannister, Bannister, and Rotilio 1987) comme chez les plantes (Corpas et al. 2006; Pan et al. 2001), bien qu'on puisse aussi la retrouver chez certains procaryotes (Fridovich 1978). Son pH optimal se situe entre 5.5 et 9.5. Elle est extrêmement résistante à des conditions dénaturantes fortes et reste active après traitement thermique et dans une gamme étendue de pH (Hart 2006a).

Son gène est codé par le chromosome 21, sur le bras court, au niveau du segment 21q22.

X.2 Localisation cellulaire

La SOD1 est présente majoritairement au niveau cytoplasmique mais aussi dans le noyau, l'espace inter-membranaire mitochondrial (Bruijn, Miller, and Cleveland 2004) et même, chez les mammifères, dans le compartiment extra-cellulaire (tissus et liquides) (Marklund 1984).

Elle est exprimée dans toutes les cellules avec une activité plus importante au niveau du foie, du cerveau, des neurones et des érythrocytes.

X.3 Structure générale

La SOD 1 est une enzyme homodimérique de masse moléculaire 32 000 Da. Les deux sous-unités sont liées par des interactions au niveau de leurs chaines latérales hydrophobes. Elles pèsent chacune entre 15 et 17 kDa et contiennent un atome de cuivre et un de zinc.

Chaque sous-unité est formée d'une chaîne polypeptidique de 215 acides aminés organisée en feuillets 8 β antiparallèles 3 boucles α.

L'étude cristallographique de l'enzyme donne une distance entre les deux atomes de cuivre de 30 Å (Fisher et al. 1991).

Les deux sous-unités ne montrent pas de coopération, puisque des expériences de monomérisation de la SOD attestent que les deux monomères sont actifs (Banci et al. 1998).

Il est à noter que la SOD 1 possède une liaison intra-sous-unité sous la forme d'un pont disulfure entre la cystéine 57 et la cystéine 146. Ceci est étonnant du fait de l'environnement réducteur du cytosol, mais est cependant crucial dans le maintien de la structure quaternaire de la protéine (Arnesano et al. 2004; Hart 2006b).

X.3.1 Structure du site actif

Le site actif de la SOD 1 est localisé au fond d'un canal étroit, dont la largeur va de 24 Å de bord à bord à la surface externe de l'enzyme, pour diminuer jusqu'à 4 Å au fond. Il est chargé positivement et situé sur la face externe du tonneau β, entre les 2 plus grandes boucles.

Les deux sites actifs du dimère sont séparés par une distance de 33.8 Å (Tainer et al. 1982).

Les ions cuivre présentent une activité catalytique alors que les ions zinc stabilisent la molécule. Tous les atomes métalliques ont un degré d'oxydation II. Au sein du site actif d'une même sous-unité, les atomes de cuivre et de zinc sont séparés d'une distance de 6.3Ǻ et liés par l'histidine 61 (voir figure 14).

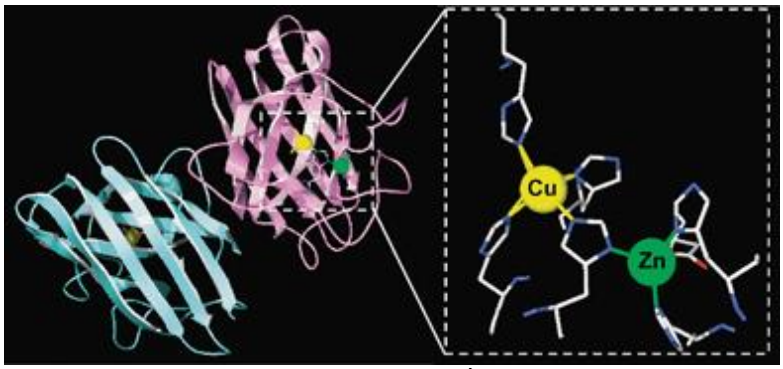


Figure 14: Les atomes de Cu et de Zn sont séparés d'une distance de 6.3Ǻ et lié par l'histidine 61 (Anzellotti and Farrell 2008).

Le Cu est lié à trois autres histidines selon une géométrie « plan carré » (voir figure 15).

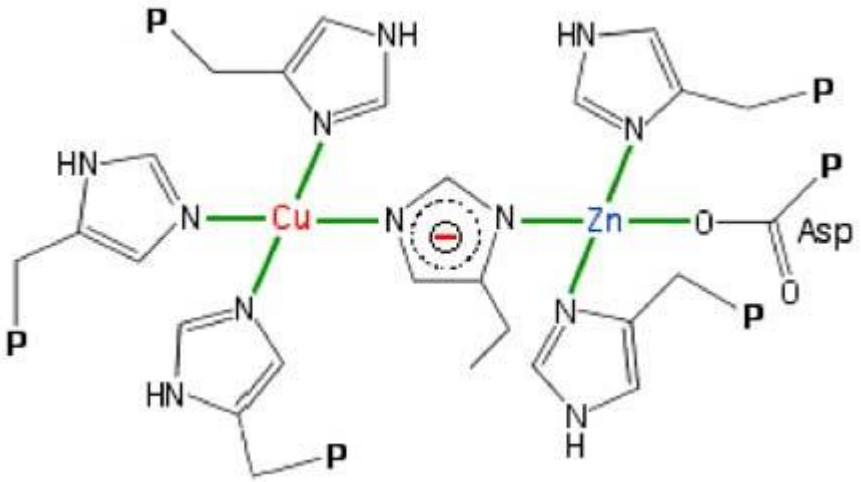


Figure 15: Géométrie plan-carré du Cuivre et de ses 4 histidines, géométrie tétraédrique distordue du Zinc et de ses 3 histidines (site : http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/complmet.html).

L'atome de zinc est enfoui, tandis que celui de cuivre émerge de 5Å^2 (voir figure 16).

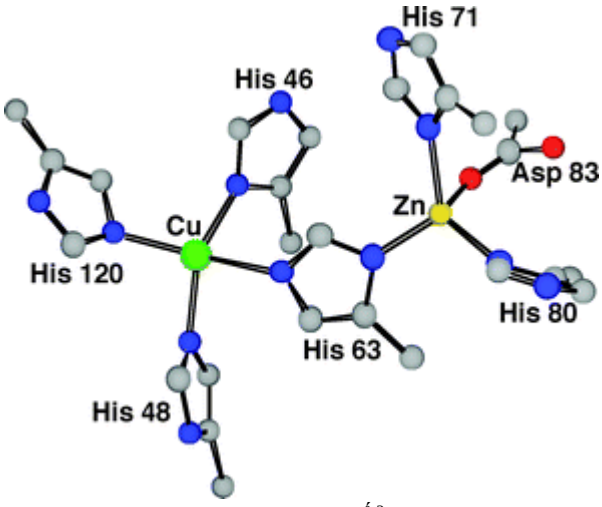


Figure 16: Le Zn est enfoui, tandis que le Cu émerge de 5Å^2 (Shimazaki, Takani, and Yamauchi 2009).

X.3.2 Mécanisme réactionnel

L'étude cristallographique a démontré que la rapidité de l'activité catalytique de la CuZnSOD dépend du canal du site actif. Ce canal présente un potentiel électrostatique positif et est constitué d'une quinzaine de résidus constants (ex. : Glu 132, Glu 133, Lys 136, Thr 137, and Arg 143). Cette région facilite la diffusion moléculaire de l'anion superoxyde (Fisher et al., 1991). De plus, les liaisons hydrogènes responsables de ces propriétés électrostatiques modifient le potentiel redox de l'enzyme, la rendant spécifique de l'anion superoxyde. Elles protègent ainsi l'enzyme de l'inhibition par certaines molécules, comme le phosphate par exemple (Perry et al. 2010).

Ces mêmes propriétés électrostatiques expliquent en partie la façon dont les mutations de la SOD entraînent une agrégation de la protéine et la formation de fibrilles.

Durant le mécanisme réactionnel de la SOD1, l'atome de cuivre est successivement réduit puis ré-oxydé (Abreu and Cabelli 2010). La réaction générale est la suivante :

$$\mathbf{Cu(II)ZnSOD + O_2^{-0/-1} \longrightarrow Cu(I)ZnSOD + O_2^{0/0} \rightarrow oxydation}$$

$$\mathbf{Cu(I)ZnSOD + O_2^{-0/-1} + 2H^+ \longrightarrow Cu(II)ZnSOD + H_2O_2^{-1/-1} \rightarrow réduction}$$

En premier lieu, l'$O_2^{\cdot-}$ se lie au Cu II et $O_2^{\cdot-}$/Guanidium de l'Arg 141, ce qui a pour effet de réduire le Cu II en Cu I. Il y a alors rupture de la liaison entre le cuivre et l'histidine 61 protonée. L'O_2 formé est libéré. L'histidine 61, déplacée entre les deux atomes de métal, se lie à nouveau à l'atome de cuivre, ce qui produit une libération de l'H^+ qui est immédiatement fixé par l'O_2. Enfin, une molécule d'H_2O protone l'O_2, aboutissant à la formation d'une molécule d'H_2O_2 (voir figure 17).

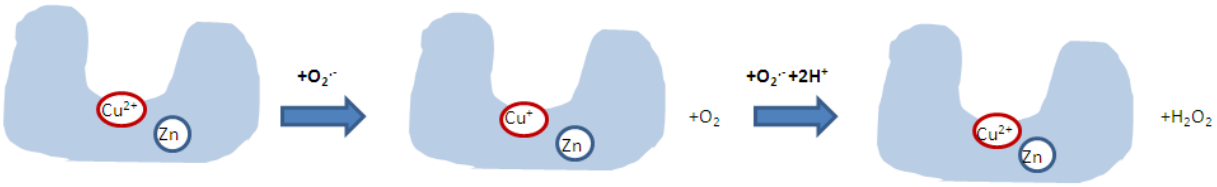


Figure 17: Mécanisme réactionnel de la SOD.

X.4 La SOD 2 ou MnSOD

La superoxyde dismutase au manganèse, MnSOD, aussi appelée SOD 2, est présente aussi bien sous forme monomérique, que dimérique ou tétramérique (voir figure 18). Chaque sous-unité comporte un ion manganèse (Mn^{3+}). La distance entre les deux ions manganèses est de 18 Å. On la retrouve chez les procaryotes aussi bien que chez les eucaryotes.

Chez l'Homme, son gène est situé sur le chromosome 6q25. La protéine codée est un polypeptide d'environ 200 acides aminés constitué en grande partie d'hélices α, contrairement à la CuZnSOD. Chaque sous-unité pèse une vingtaine de kDa (Wagner et al. 1993).

Elle est située dans la matrice et l'espace inter-membranaire mitochondriaux et protège cet organite du stress oxydant lié à l'activité de la chaîne respiratoire.

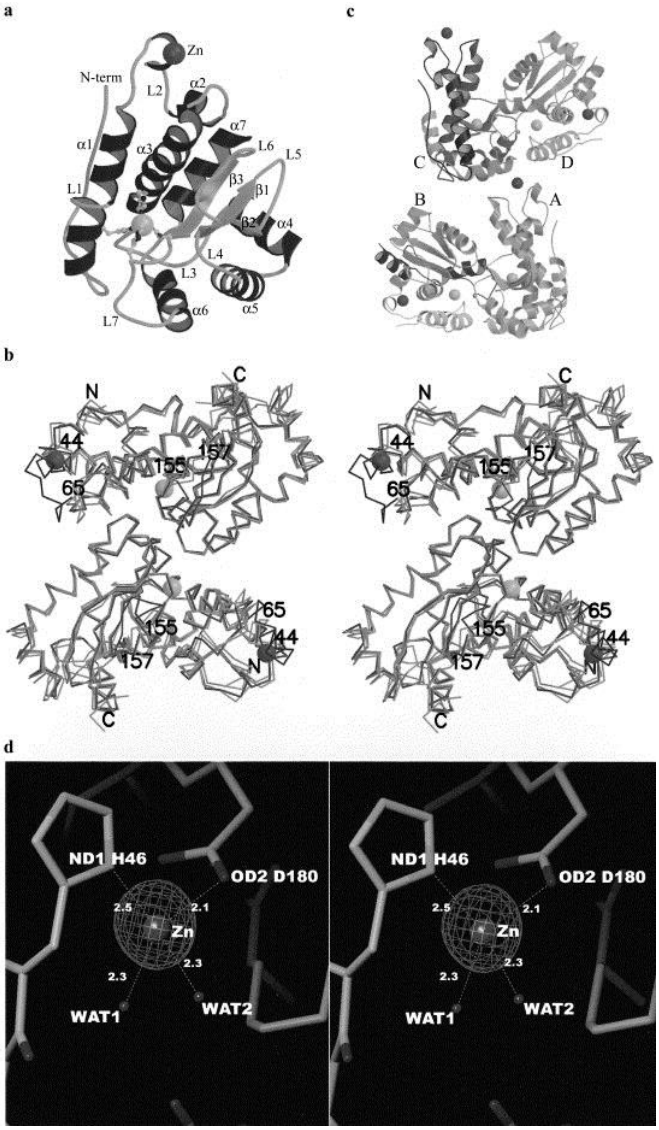


Figure 18: Monomères et dimères de la MnSOD. (a) Structure du monomère (b) Structure du dimère de MnSOD (c) Atome de zinc entre deux monomères (d) Vue de la densité électronique au niveau du site du zinc (Liao et al., 2002).

De récentes études tendent à montrer que la MnSOD serait un très bon marqueur pronostique dans le cancer du sein. En effet, l'expression génique de cette enzyme est profondément altérée dès les premiers stades du cancer du sein et diffère de celle des stades tardifs de cette maladie : elle diminue au stade préliminaire puis ré-augmente en fin de maladie. Une diminution de l'expression de la MnSOD serait de bon augure, quant à la non-formation de métastases, en diminuant la formation de H_2O_2 intracellulaire.

De plus, il est démontré que la MnSOD joue un rôle dans la prolifération et l'angiogénèse des tumeurs mammaires, à travers l'activation de voies de signalisation par les espèces réactives de l'oxygène ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2) (Becuwe et al. 2014).

Enfin, nous ajouterons que la vitesse catalytique de cette enzyme est très importante, puisqu'elle est d'environ 10^7 M^{-1} s^{-1} à pH physiologique.

X.5 La SOD 3 ou FeSOD

La troisième espèce de SOD possède un atome de fer sur le site actif de chacune de ses sous-unités. Elle est généralement dimérique mais parfois monomérique (voir figure 19) et très proche de la MnSOD au niveau structurel : elle est très riche en hélices α, leurs structures primaires présentent 45 % d'homologie et la distance entre les deux atomes de fer est de 18 Å. Cependant leurs deux atomes de métal (Fer et Manganèse) ne sont pas interchangeables.

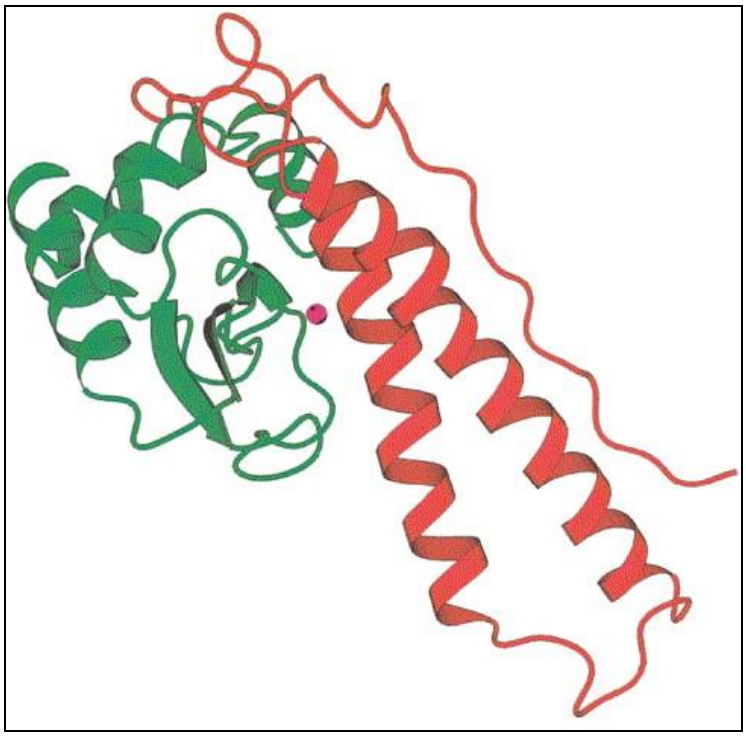


Figure 19: Structure du monomère de FeSOD de l'archéobactérie Sulfolobus solfataricus (Ursby et al., 1999).

Elle est codée au niveau du chromosome 6 (Bannister, Bannister, and Rotilio 1987) et est exprimée dans le compartiment extracellulaire des cellules procaryotes et eucaryotes – sauf chez l'humain (Li and Yi 2012).

XI. SOD1 et pathologie

XI.1 Cancer et SOD 1

XI.1.1 La SOD 1 : une cible pour le traitement du cancer

La SOD 1 protège les cellules des effets délétères du radical super-oxyde. La production exacerbée d'$O_2^{\cdot -}$ du fait d'un métabolisme très rapide (Somwar et al. 2011) (Marklund et al. 1982) et la faible activité de la SOD au sein des cellules cancéreuses les rendent donc plus sensibles à l'inhibition de la SOD que les cellules normales. La SOD est aussi connue pour son rôle dans la croissance et le métabolisme cellulaires, deux éléments cruciaux dans la survie et le développement des cellules cancéreuses (Che et al. 2016a).

Un autre mécanisme entre en jeu : au sein de la matrice des mitochondries, organites centraux du métabolisme de l'oxygène et de ses dérivés réactifs, la SOD2 joue un rôle primordial comme enzyme anti-oxydante. Or, cette dernière est régulée par la désacétylase SIRT3, qui voit son activité diminuée jusqu'à 87% dans les cancers du sein. L'activité de la SOD2 subit donc une diminution semblable, d'autant plus qu'intervient aussi une régulation négative par certains oncogènes (ex. : Ras) (Papa, Manfredi, and Germain 2014).

La concentration d'ERO augmente de façon drastique dans les cellules cancéreuses. Afin de contrer ce phénomène, le taux de SOD1 est augmenté dans les cellules cancéreuses (dans 70% des cas de cancer du sein). Il y a donc un remplacement de la SOD1 par la SOD2 (Papa et al. 2014). La SOD1 tient un rôle central dans la résistance des cellules cancéreuses contre le stress oxydant mitochondrial tandis que la SOD2 l'assure pour les cellules normales. Il a été montré que l'élévation des ERO est essentielle à la reprogrammation du métabolisme cellulaire vers la voie de la glycolyse (Papa et al. 2014).

Des essais sur des lymphocytes normaux et tumoraux (Somwar et al. 2011) ont montré une mortalité ciblée des lymphocytes tumoraux après mise en contact avec le 2-méthoxyoestradiol, un dérivé oestrogénique. Le mécanisme d'action découvert grâce à des micropuces d'ADN révèle simplement une inhibition de l'activité de la SOD1, ce qui est confirmé par la diminution de la production d'H_2O_2 dans la cellule puis par des essais *in vitro*. Les cellules normales quiescentes dont l'intégrité de leur mitochondrie repose majoritairement sur la SOD2, sont en effet bien moins sensibles à l'inhibition de la SOD.

L'inhibition de la SOD 1 provoque une accumulation de radical superoxyde dans la cellule et dans la mitochondrie en particulier, entraînant la peroxydation des lipides membranaires et le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. Cela conduit au déclanchement de l'apoptose de la cellule.

Pour conclure, nous pouvons dire qu'il est dès lors possible de considérer l'inhibition de la SOD 1 comme cible privilégiée dans le traitement de certains cancers. Nous rajouterons que la SOD1 de la fraction mitochondriale est celle qu'il est le plus judicieux d'essayer d'inhiber.

XI.1.2 Genèse du cancer

Les cellules se multipliant rapidement - les cellules cancéreuses y compris - utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie comme système producteur d'énergie plutôt que la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce qui signifie que ces cellules sont capables, même en présence d'oxygène, de se reprogrammer vers la glycolyse (Lunt and Vander Heiden 2011).

Une étude suggère que la SOD1 serait impliquée dans le mécanisme cellulaire de répression de la respiration (voir figure 20), grâce à son interaction avec deux kinases 1-gamma (CK1γ) homologues, répressives de la respiration, la Yck1p et la Yck2p. La SOD1 se fixe à l'extrémité C-terminale des kinases et inhibe leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome en dismutant l'anion superoxyde lysine (Reddi and Culotta 2013). Le peroxyde d'hydrogène promeut alors la stabilité des kinases en modifiant l'oxydation de certains résidus.

En réprimant la respiration, la SOD1 participe ainsi à la cascade signalétique permettant à la cellule normale de privilégier la glycolyse aérobie et de glisser ensuite vers la cancérisation (voir figure 20).

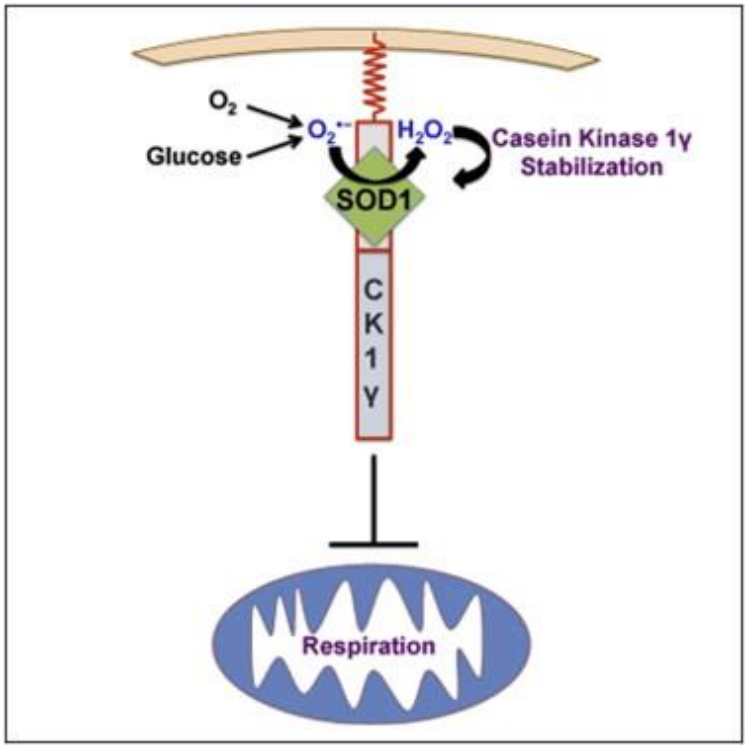


Figure 20: La SOD serait impliquée dans le mécanisme cellulaire de répression de la respiration (Reddi and Culotta, 2013)

La sur-expression de la MnSOD, quant à elle, diminue la carcinogénèse, par un effet protecteur sur les mitochondries (St Clair et al. 2005). Mais elle augmente l'activité migratoire des cellules cancéreuses et donc les métastases. Lorsque l'activité de la catalase est augmentée, la mobilité des cellules revient à la normale, indiquant par-là que ce phénomène serait lié à la concentration élevée de H_2O_2 (Connor et al. 2007).

XI.1.3 Résistance au Cisplatine

La résistance au cisplatine est une des causes des échecs de la chimiothérapie anti-cancéreuse.

De nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la régulation du stress oxydant, le transport des molécules exogènes ou encore l'apoptose ont été mises en causes. Parmi elles, la SOD, sur-exprimée dans le cas de cancer ovarien résistant au cisplatine, semble jouer un rôle majeur dans la résistance au stress oxydant des cellules cancéreuses, bien que son rôle n'ait pas encore été déterminé avec précision (Brown et al. 2009).

XI.2 Sur-expression de la SOD 1

Une sur-expression de la CuZnSOD a, dans certains cas, des effets bénéfiques. Elle protège l'organisme contre un afflux de radicaux libres lié par exemple à la radioactivité (Veldwijk et al. 2009) à la détoxification de médicaments ou de toxiques (Petrache et al. 2008; Wang et al. 2009) à une ischémie (Zaghloul et al. 2014) lors de rétinopathies diabétiques (Kowluru et al. 2006) ou encore lors d'un stress oxydant, de manière générale (Ahmed et al. 2011)

Il est à noter que la SOD au manganèse exerce aussi un effet protecteur contre les radicaux libres (Nagata et al. 2007).

Ces quelques cas mis à part, il a été prouvé que la sur-expression de la SOD1 peut-être nocive et conduise à une hypersensibilité au stress oxydant. Des Drosophiles mutantes exprimant un fort taux de SOD1 meurent lors du processus d'éclosion (Reveillaud et al. 1991). Celles survivant à l'éclosion montrent une mortalité élevée pendant leur développement (Orr and Sohal 1993).

La sur-expression de la SOD1 est, de plus, un des dénominateurs communs dans trois pathologies majeures : la maladie d'Alzheimer, la Sclérose Latérale Amyotrophique et le syndrome de Down. Il est donc important de comprendre les mécanismes qui sous-tendent son effet délétère.

Trois mécanismes sont communément admis pour expliquer l'effet négatif d'une sur-expression de l'activité de la SOD :

- la réaction de la CuZnSOD avec l'H_2O_2 mène à la formation du radical hydroxyle (Kowald, Lehrach, and Klipp 2006)
- le radical superoxyde peut, du fait de son électron singulet, agir comme terminateur de chaîne de peroxydation lipidique
- lorsque la SOD détoxifie le radical superoxyde, elle oscille entre un état oxydé et un état réduit. À des niveaux d'anions superoxydes faibles, les intermédiaires réactionnels peuvent interagir avec d'autres partenaires et augmenter l'activité réductase de la SOD. Ce court-circuit du cycle de la SOD peut mener à une augmentation de la production d'H_2O_2.

La sur-expression de la SOD1 entraîne donc un stress oxydant et la peroxydation des lipides membranaires par différents mécanismes, ce qui au niveau neuronal par exemple, aboutit à l'apoptose des neurones (Bar-Peled et al. 1996a).

Ce n'est pas tout : au niveau axonal, en piégeant les radicaux libres nécessaires à la transmission de l'influx nerveux, elle entraîne une sous-excitabilité neuronale qui a pour conséquence une faiblesse musculaire (Yarom et al. 1987a).

XI.3 SOD et maladie d'Alzheimer :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 35,6 millions de personnes dans le monde sont atteintes de démences. Le nombre de nouveaux cas de démences par an est d'environ 7,7 millions. Plus dramatique encore, le nombre total de personnes atteintes de démences devrait presque doubler tous les 20 ans. La maladie d'Alzheimer est impliquée dans 60 à 70 % des cas.

En France, 850 000 personnes présentent cette maladie. Deux cent vingt-cinq mille nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Les prévisions sont alarmistes, puisqu'en 2020, 1 Français de plus de 65 ans sur 4 devrait être touché par cette maladie. Il s'agit donc d'un problème de santé publique majeur.

La maladie d'Alzheimer est une amyloïdose, c'est-à-dire qu'elle est caractérisée par une accumulation excessive et anormale de peptides de type amyloïde (en cela elle présente une similitude avec le syndrome de Down) ainsi qu'une hyperphosphorylation de la protéine tau (τ) (Busciglio et al. 1995). Ces deux facteurs provoquent la dégénérescence neuro-fibrillaire à l'origine de la démence observée dans cette maladie.

Nous ajouterons que les peptides amyloïdes β contiennent un atome de métal. Ils sont à ce titre générateurs d'ERO (réaction de Fenton) et participent au stress oxydant et à la gravité de la maladie.

Plusieurs études suggèrent un lien entre la SOD et les peptides β-amyloïdes de la maladie d'Alzheimer.

Tout d'abord il existe une analogie structurale entre la SOD et les plaques β-amyloïdes. En effet, ces deux protéines possèdent un squelette de feuillets β, un atome métallique (Fe et/ou Cu) ainsi qu'un acide aminé fortement oxydable (tyrosine ou tryptophane).

La diminution des agrégats de peptides β-amyloïdes (Jabeen et al. 2007) est une piste curative de la maladie. Nous pouvons supposer qu'un inhibiteur de la SOD ayant comme site actif les feuillets β pourrait inhiber aussi, de fait, la formation des plaques de peptides ou encore augmenter leur clairance (Bijeire 2006).

Enfin, il a été démontré que le stress oxydant est une cause des changements intervenant au niveau cérébral chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Gella and Durany 2009).

Nous conclurons en soulignant le fait que la MnSOD exerce un effet protecteur contre le stress oxydant mitochondrial, selon un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé (Bitner et al. 2012).

XI.4 SOD et syndrome de Down

Le syndrome de Down, aussi appelé trisomie 21, est une maladie génétique parmi les plus fréquentes. Elle concerne une naissance sur mille. Elle est caractérisée par la présence d'un chromosome surnuméraire, le chromosome 21, qui entraîne un retard mental ainsi qu'un phénotype caractéristique dit « mongoloïde » (WHO | Genes and Human Disease n.d.).

On voit apparaitre chez ces personnes un état de stress oxydatif très marqué. (Pagano and Castello 2012), conséquence directe de la surexpression de la SOD 1, cette dernière étant codée au niveau du chromosome 21, plus exactement sur le segment 21q22 (Groner et al. 1990).

L'activité de la SOD est par exemple augmentée de 47 %, celles de la catalase et de la glutathione réductase de 24.7 % et 49.6 % respectivement, tandis que l'activité de la glutathione peroxydase ne varie pas (Garlet et al. 2013). Or, il a été établi qu'un déséquilibre entre la SOD et la glutathione péroxydase entraîne la formation de radicaux libres, par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène, converti ensuite par la réaction de Fenton en radical hydroxyl (Lott et al. 2006).

Des expériences menées sur des cellules nerveuses de rat (Groner et al. 1990) ont montré également que le déséquilibre dans la balance oxydants-anti-oxydants s'accompagne d'une homéostasie du calcium altérée et d'une peroxydation lipidique. Le transport des amines et par conséquent des neurotransmetteurs à travers les membranes neuronales s'en trouvent modifiés, expliquant ainsi les troubles mentaux associés à la maladie (Bar-Peled et al. 1996b; Zigman and Lott 2007).

Ces résultats ont été corroborés depuis par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la surexpression de la SOD (sujet que nous avons développé au sous-chapitre « Surexpression de la SOD »).

Par ailleurs la SOD surexprimée interfère avec les radicaux libres nécessaires à l'excitabilité des jonctions neuro-musculaires ce qui entraîne la faiblesse du tonus musculaire observée (Yarom et al. 1987b).

La peroxydation des lipides membranaires touche aussi les cellules telles que les érythrocytes, les macrophages ou encore les cellules lymphoïdes (Capone et al. 2002), provocant notamment une augmentation du taux de leucémies.

Au niveau cellulaire, des amas de peptides β amyloïdes sont retrouvés, comme dans la maladie d'Alzheimer. En effet, le chromosome 21 surnuméraire contient aussi le gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde β. L'accumulation de plaques amyloïdes se fait de façon progressive tout au long de la vie des malades et est responsable des symptômes de déficience mentale se rapprochant de ceux observés dans la maladie d'Alzheimer. Ces deux maladies étant très proches (Zigman and Lott 2007), une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques impliqués dans ce syndrome sera donc très appréciable (Lott et al. 2006; Lott and Head 2005).

XI.5 SOD et Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie se traduisant par une dégénérescence des moto-neurones évoluant vers la mort de ces dernières et se manifestant par une perte de motricité, notamment due à une altération musculaire. L'issue est fatale 3 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes.

Elle touche 1,5 personnes par an pour 100 000 habitants. Elle concerne majoritairement les hommes (1,5 hommes pour une femme). Sa prévalence est de 6 personnes pour 100 000.

Le traitement de fond de la SLA repose sur le riluzole, un anti-glutamatergique, ainsi que sur la vitamine E, molécule anti-oxydante. Cependant ce traitement n'allonge la durée de vie que de quelques mois.

Dans 5 à 10 % des cas, on retrouve une origine génétique de cette. Enfin, une anomalie est détectée sur le gène de la SOD1 dans seulement 15 % de l'ensemble des formes génétiques.

Les mutations potentielles sur le gène de la SOD sont très nombreuses et hétérogènes : il en a été découvert plus d'une centaine (Valentine, Doucette, and Zittin Potter 2005). On retrouve majoritairement le remplacement d'une alanine par une valine sur l'exon 1. D'autres exons peuvent être mutés, notamment les exons 2, 4 et 5. Il n'a pas été retrouvé de mutation sur l'exon codant 3 pour le site actif.

Ces mutations ont souvent pour effet une perte du pont disulfure intra-sous-unité qui déstabilise la protéine.

Malgré l'hétérogénéité de ces mutations, le même tableau clinique est exprimé.

La mutation sur le gène de la SOD n'entraîne pas une perte de fonction de la protéine, mais au contraire d'un gain de fonction, qui amène une toxicité, selon un mécanisme qui n'a aujourd'hui pas encore été défini avec certitude, mais qui serait lié à la mauvaise configuration de la protéine (Nordlund and Oliveberg 2006).

Les SOD mutées peuvent être divisées en deux groupes :

- le premier dans lequel la liaison à l'ion cuivre est conservée et la structure de la SOD reste proche de celle de la SOD normale ;
- le second dans lequel la région touchée par la mutation concerne la région de fixation de l'ion cuivre ou celle de la boucle du zinc. Le second groupe a donc perdu son ou ses atome-s de mét-al-aux (Hayward et al. 2002).

De plus, on retrouve très souvent une désorganisation de la structure de la SOD 1. L'oxydation de certains résidus histidine du site actif engendre une liaison anormale, voire une perte de liaison du cuivre ou du zinc (Rakhit et al. 2002).

Ces deux types de mutations entraînent des perturbations de la stabilité de la SOD. Les mutants SOD présentent en particulier une plus grande susceptibilité à la réduction de la liaison disulfure entre les cystéines 57 et 146 de chaque monomère et peuvent donc être plus facilement déstabilisés sous des conditions cellulaires réductrices, ainsi qu'à pH

physiologique. Cette dissociation du dimère précède l'agrégation de la protéine : les monomères forment alors des ponts disulfures intermoléculaires (Hart 2006a).

La dégénérescence mitochondriale caractéristique de la SLA est expliquée par la présence de ces agrégats. En effet ces derniers sont retrouvés dans la matrice des mitochondries cérébrales (Vijayvergiya et al. 2005).

Ils séquestrent alors des protéines anti-apoptotiques (protéines de choc thermique, Heat Shock Proteins), notamment la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui provoque l'apoptose des moto-neurones (Pasinelli et al. 2004).

La structure anormale de la SOD ne lui permettant plus d'assurer une activité catalytique normale, l'anion superoxyde forme alors le péroxynitrite en présence d'oxyde nitrique et perturbe les neuro-filaments des moto-neurones, qui s'accumulent de manière anormale (Chou, Wang, and Taniguchi 1996). Ce mécanisme participe aussi à la dégénérescence des motoneurones (Svensson et al. 2006)

Dans une optique thérapeutique, nous pourrions imaginer qu'un inhibiteur de la SOD empêcherait *ipso facto* la formation des agrégats de SOD responsables des mécanismes physiopathologiques de la SLA.

XII. Pourquoi développer des inhibiteurs de la SOD ?

Il parait évident, au vu des données exposées dans ce chapitre, que l'inhibition de la SOD dans les cellules cancéreuses est une cible à privilégier dans le traitement contre le cancer ainsi que dans de nombreuses pathologies mentales (Brown et al. 2009; Papa et al. 2014; Papa, Manfredi, and Germain 2014; Somwar et al. 2011; Che et al. 2016b).

Dans un autre registre, la SOD est impliquée dans les phénomènes de détoxification de médicaments antiparasitaires, ce qui rend les parasites résistants aux antiparasitaires. C'est le cas par exemple de l'infestation par *Crithidia Fasciculata* qui possède une SOD à Fer (Le Trant et al. 1983).

Nous pouvons aussi citer l'exemple de Shigella dysenteriae qui échappe à la lyse grâce à l'activation de sa SOD Cu-Zn qui détoxifie le burst oxydatif dans les macrophages (Raja et al. 2011a).

Il en est de même pour *Candida albicans*. Lorsque les levures sont cultivées en présence d'un antifongique, l'amphotéricine B, l'inhibition de la SOD entraîne une diminution de la viabilité des levures et une potentialisation de l'effet anti-biofilm de l'amphotéricine B (De Brucker et al. 2013).

Ceci s'explique par le fait que la SOD participe au phénomène de résistance à l'antifongique en luttant contre le stress oxydatif.

L'association thérapeutique entre un antifongique et un inhibiteur de la SOD serait donc une piste pour le traitement des levures, voire des bactéries résistantes.

Ces différents exemples indiquent clairement que le champ des applications d'inhibiteurs de la SOD peut être étendu à de nombreuses autres pathologies. La recherche d'inhibiteurs de la SOD est ainsi tout à fait pertinente et en accord avec les grands défis sanitaires de notre temps (Sajesh and McManus 2015; Somwar et al. 2011).

XIII. Les inhibiteurs de la SOD

Il existe très peu d'inhibiteurs spécifiques connus de la superoxyde dismutase. Deux causes principales à cela. La première est que cette enzyme vitale est présente dans le règne vivant de façon universelle et que les machineries cellulaires prendraient trop de risque en synthétisant un inhibiteur de la SOD.

La deuxième raison tient à des choix humains car jusqu'à une époque récente, l'inhibition de la SOD n'avait pas été identifiée comme cible pour lutter contre le cancer.

Les molécules activatrices de la SOD ou encore les SOD mimétiques, molécules anti-oxydantes majeures, font, en revanche, l'objet de recherches approfondies depuis longtemps déjà, en raison de leur potentiel antioxydant majeur.

XIII.1 Les inhibiteurs synthétiques

XIII.1.1 Inhibiteur synthétique sélectif

Le LCS-1 (Lung Cancer Screen) (voir figure 21) est le seul inhibiteur sélectif de la CuZnSOD connu. Il s'agit d'un dérivé pyridazine, le 4,5-dichloro-2-(3-méthylphényl)-3(2H)-pyridazinone, de 255.1 Da. Il a été découvert à la suite du screening de 189.290 molécules et son activité a été testée sur des modèles de tumeurs *in vitro* (Somwar et al. 2011).

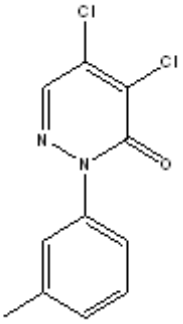


Figure 21: Le LCS-1, ou 4,5-dichloro-2-m-tolylpyridazin-3(2H)-one.

Une activité inhibitrice a été mise en évidence vis-à-vis de la croissance de lignées d'adénocarcinomes du poumon. Sa concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) a été mesurée à 1.07 µM par Somwar et al. (cf. figure 22). En outre, il a été clairement établi que cette molécule représente une piste dans le traitement du cancer, en particulier colorectal (Sajesh and McManus 2015).

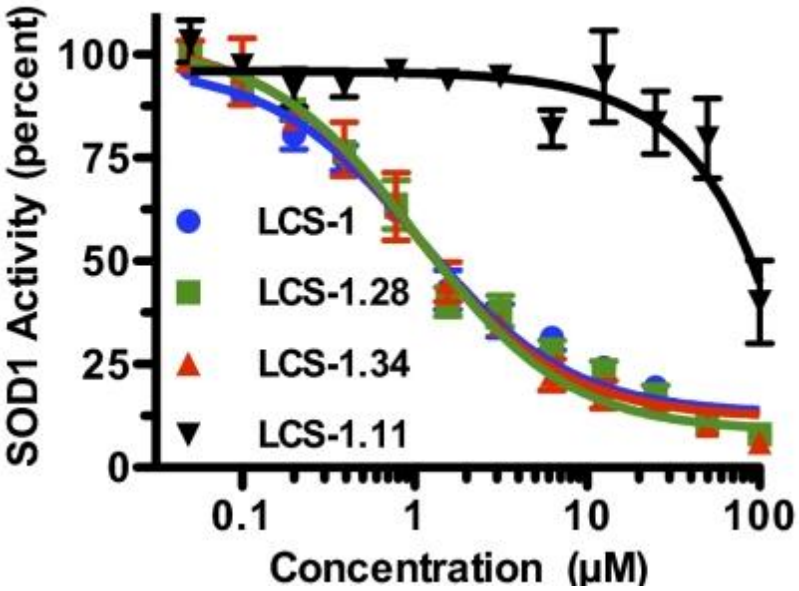


Figure 22: Graphique montrant la détermination de l'IC50 du LCS-1. Elle a été mesurée à 1.07µM (Somwar et al., 2011)

Depuis sa découverte (en 2011) (Somwar et al. 2011) il est utilisé en routine (Papa et al. 2014; Sajesh and McManus 2015) pour tester l'activité de la superoxyde dismutase. Cependant, le fait qu'il soit peu soluble dans les solvants polaires et faiblement (10mg/mL) dans le DMSO légèrement chauffé complique son usage.

XIII.1.1.1 Mégazole®

Un second inhibiteur spécifique de SOD, inhibant cette fois sur la FeSOD des trypanosomases, est le Mégazol® (voir figure 23). Il fait partie de la famille des antiparasitaires imidazolés.

Il est le principal anti-protozoaire utilisé dans la maladie de Chagas, une parasitose due essentiellement à *Trypanosoma brucei* et *T. cruzi*. Son mode d'action consiste à inhiber la SOD au Fer des parasites, probablement par interaction avec le système de liaison à l'hydrogène de l'atome de Fer, entraînant un excès de stress oxydant et la mort des parasites.

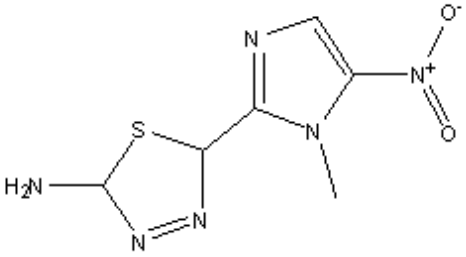


Figure 23: Structure du mégazole®.

Notons qu'un dérivé de phtalamine, utilisé dans le traitement de *Trypanosoma cruzi* et contenant un motif imidazole, possède aussi une activité inhibitrice sur la SOD au fer de ce parasite (Sánchez-Moreno et al. 2012).

XIII.1.2 Inhibiteurs synthétiques non sélectifs

1. Inhibiteurs de la SOD par chélation de l'atome de cuivre

Les inhibiteurs non sélectifs de la SOD agissent le plus souvent par chélation de l'atome de cuivre du site actif de l'enzyme. Ainsi dénaturée, elle ne peut plus catalyser la dismutation de l'anion superoxyde.

XIII.1.2.1 Diéthyldithiocarbamate

Le diéthyldithiocarbamate (DEDTC) (voir figure 24) est un petit composé de formule brute $NaS_2CN(C_2H_5)_2$

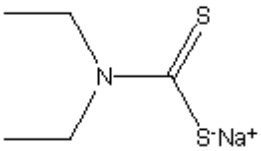


Figure 24: Le diéthyldithiocarbamate ou DEDTC.

Il possède une action chélatrice sur les métaux, grâce à son soufre chargé négativement. Deux molécules de DEDTC sont nécessaires pour chélater un ion métallique (voir figure 25).

Son action inhibitrice sur la SOD est donc médiée par la chélation du cuivre de la SOD.

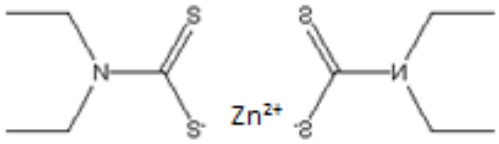


Figure 25: Chélation d'un atome de zinc par deux DEDTC.

Son IC_{50} est de 2.5 mM.

Il est également capable d'arracher le fer du cytochrome C, rendant ce dernier inutilisable comme témoin du test à la xanthine-xanthine-oxydase-cytochrome C (voir chapitre IV).

XIII.1.2.2 Triéthylthiocarbamate (TETC)

Le triéthylthiocarbamate (TETC) (voir figure 26) montre une absence de spécificité vis-à-vis de l'inhibition de la SOD.

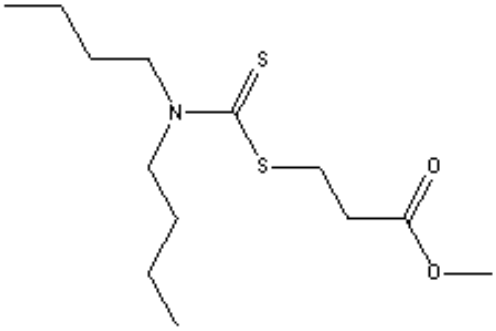


Figure 26: Le triéthylthiocarbamate, ou TETC.

XIII.1.2.3 Tétrathiomolybate d'ammonium

Le tétrathiomolybdate d'ammonium ($(NH_4)_2MoS_4$) est une molécule utilisée dans le traitement de la maladie de Wilson. Elle complexe le cuivre libre de l'organisme (Brewer et al. 2006) et agit de même avec celui du site actif de la SOD (Juarez et al. 2006).

XIII.1.2.4 Complexes de ruthénium

Quarante-quatrième élément de la classification périodique, le ruthénium est capable de former de nombreux complexes de coordination, tant avec des bases azotées que des composés carbonés ou encore des molécules phosphorées. Ces complexes sont très étudiés en raison de leurs propriétés photochimiques. Ils pourraient- en particulier le chlorure de tris(bipyridine)ruthénium(II)-, constituer les cellules photovoltaïques du futur.

Le mécanisme d'action de l'inhibition de la SOD par des complexes de ruthénium photo-activable n'a pas encore été élucidé entièrement. Cependant il semble qu'il fasse intervenir, après liaison d'un complexe avec la SOD, un double transfert d'électron au niveau du site actif de l'enzyme. Ce transfert entraîne un changement de conformation de la SOD et par voie de conséquence son inhibition (Bijeire et al. 2006).

XIII.2 Les inhibiteurs naturels

XIII.2.1 Les furocoumarines

Les furocoumarines sont des coumarines -molécules possédant deux cycles- (voir figure 28) sur lesquelles est fixé un cycle furane.

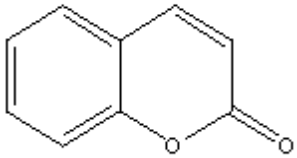


Figure 27: Structure de base d'une coumarine.

Elles se forment par prénylation en C-6 ou C-8 d'une 7-hydroxycoumarine. Leur chef de file est le psoralène (voir figure 29), une furocoumarine linéaire.

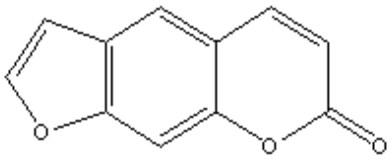


Figure 28: Le psoralène.

Ces composés sont moyennement polaires puisque solubles dans les alcools mais aussi certains solvants organiques (dioxyde d'éthyle et solvants chlorés). Leur extraction peut entraîner des artefacts en modifiant leur structure primaire, raison pour laquelle il est préconisé de les extraire par fractionnement sur gel ou encore par chromatographie liquide semi-préparative.

Les furocoumarines semblent être une piste intéressante de recherche d'inhibiteurs de la SOD, puisque ce sont des composés que les plantes synthétisent aux fins de se défendre des attaques d'insectes. Les quelques articles traitant du sujet confortent cette hypothèse.

Les furocoumarines étant fortement photosensibilisantes, en particulier les furocoumarines linéaires (bergaptène, psoralène, xanthitoxine), elles sont peu utilisées en thérapeutique, si ce n'est dans le cas du traitement du psoriasis, par voie orale ou en traitement local, associé à une UVA thérapie (Gahalaut et al. 2014).

La photosensibilisation se traduit par une rougeur, un œdème, voire des phlyctènes sur la partie anatomique touchée par le suc de la plante contenant. Cette réaction ne se produit qu'après exposition au soleil et les molécules non activées par les photons restent inoffensives.

Le mécanisme d'action de cette photosensibilisation n'est pas véritablement établi, mais il semble lié au fait que les furocoumarines ont la capacité de former des cycloadditions en C-3, C-4, C'4 et C'5 des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) de l'ADN. *Via* ce mécanisme, elles peuvent s'intercaler entre les bases, ce qui provoque des lésions de la double hélice puis la mort de la cellule. Ce mécanisme peut potentiellement entraîner une cancérisation des cellules.

Des études portant sur l'extrait hexanique d'écorce de *Cinnamomum cassia* tendent cependant à prouver que les furocoumarines, associées au trans-cinnamaldéhyde, possèdent également des propriétés anti-prolifératives ; *via* une action sur les enzymes du stress oxydant. Elles seraient capables d'inhiber la catalase, la glutathion peroxydase ainsi que la SOD. Les cellules ne peuvent alors plus lutter contre la peroxydation de la cardiolipine ni par la suite le relargage du cytochrome C dans l'espace inter-mitochondrial (Rad et al. 2015).

Un autre mécanisme viendrait de plus renforcer ce premier phénomène : l'activation de la caspase 8, cette enzyme initiant les stades précoces de l'apoptose (Kianpour Rad et al. 2015; Mujahid et al. 2015).

Parmi les furocoumarines, il a été montré que l'impératorine (voir figure 30) en particulier possède une activité anti-SOD. Des études menées sur *Shigella dysenteriae*, ont montré qu'en incubant ces entérobactéries avec un extrait aqueux d'*Aegle marmelos* - un arbuste épineux de la famille des *Rutaceae* – non seulement leur virulence diminuait, mais en plus elles succombaient, victimes du stress oxydant de l'hôte. Des études de docking ont bien identifié l'impératorine comme molécule responsable de cette activité (Raja et al. 2011b).

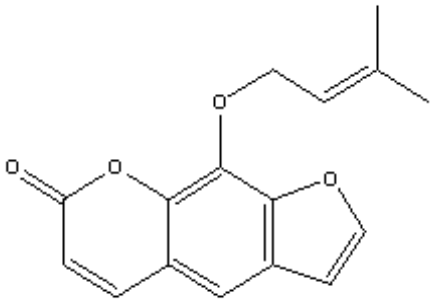


Figure 29: L'impératorine.

Ces composés semblent assez prometteurs dans la recherche d'inhibiteurs de la SOD et plus largement de molécules anti-cancer.

XIII.2.2 Acide aristolochique

Les Aristoloches, appartenant à la famille des *Aristolochiaceae*, sont des plantes herbacées, voire des lianes. Il en existe de nombreuses espèces dans le monde (environ 300).

Ces plantes sont peu utilisées en médecine en raison de leur très forte toxicité rénale (insuffisances rénales chroniques) ainsi que de leur effet cancérigène. Néanmoins, la capacité de l'acide aristolochique dont il est extrait (figure 31) à inhiber la SOD est intéressante.

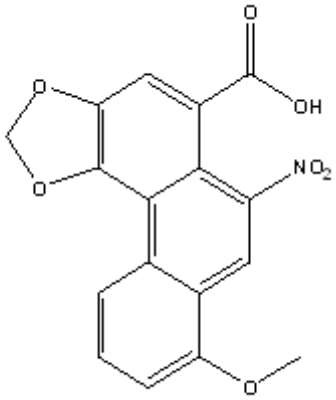


Figure 30: L'acide aristolochique.

Elle a été mise en évidence lors de recherches ethnopharmacologiques sur les plantes utilisées dans le traitement de morsures de serpents venimeux indiens (Samy et al. 2008; Samy et al. 2011).

Le mécanisme d'action de cette molécule vis-à-vis de la SOD n'a pas encore été élucidé. Il est cependant relativement certain qu'il n'est pas spécifique et agit sur diverses molécules. On parle d'une « dirty grug ».

XIII.2.3 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules d'une grande diversité structurale mais dont la structure de base (voir figure 13) est formée de 3 cycles. Par condensation, ils forment les tanins.

Les flavonoïdes sont synthétisés par l'ensemble du règne végétal, exception faite des algues, selon des spécificités de famille assez remarquables. Nous pouvons citer quelques plantes dont les flavonoïdes présentent un intérêt pharmacologique reconnu : l'écorce d'orange, la feuille de *Ginkgo biloba* L., la Passiflore (*Passiflora incarnata* L.) La liste est longue et il serait inopportun d'énumérer exhaustivement toutes les plantes contenant des flavonoïdes.

Ces molécules sont connues pour leur activité anti-oxydante et leur propension à agir comme inhibiteurs enzymatiques et sont donc *a priori* des candidats dans la recherche de molécules anti-SOD.

Tout comme l'acide aristolochique, leur action inhibitrice sur la SOD n'est pas spécifique (Campbell and Kurzer 1993; Wang et al. 1994). Il n'est donc pas intéressant de les rechercher dans le cadre de ce travail.

XIII.2.4 12-O-tetradecanoylphorbate-12-acétate (TPA)

Le 12-O-tetradecanoylphorbate-12-acétate (TPA) (voir figure 27) fait lui aussi partie de la famille des inhibiteurs de la SOD non spécifiques, dont le mécanisme d'action est encore la chélation de l'atome de cuivre du site actif de l'enzyme.

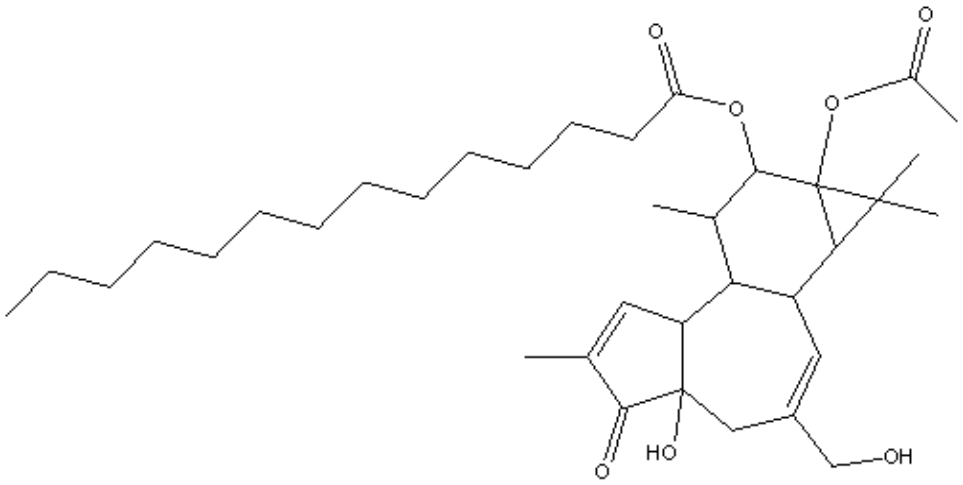


Figure 31: Le 12-O-tetradecanoylphorbate-12-acétate (TPA).

C'est un ester de phorbol, isolé à partir de certaines *Euphorbiaceae*, comme *Croton tiglium*.

XIII.2.5 Azoture, Cyanure, H_2O_2

Ces petites molécules ont une action différente en fonction du type de SOD (Goldstone, Liochev, and Fridovich 2006). Les azotures inhibent toutes les SOD, mais à des degrés différents. L'H_2O_2 quant à lui exerce une inhibition forte sur la FeSOD, une inhibition lente et irréversible sur la CuZnSOD, mais n'a pas d'action sur la MnSOD. Enfin, le cyanure se lie de façon irréversible au cuivre de la CuZnSOD, mais pas aux atomes métalliques des autres SOD.

XIV. Conclusion

L'étude du stress oxydant n'est pas nouvelle et ses différents mécanismes et acteurs sont à présent très bien connus.

La SOD est l'enzyme majoritaire permettant de lutter dans l'organisme contre les effets délétères de ce stress oxydatif.

Cependant, elle peut être cause de nombreuses pathologies, ou encore aider les cellules cancéreuses à s'immortaliser.

Une nouvelle voie de recherche s'ouvre désormais avec les inhibiteurs de la SOD. Ces molécules, peu nombreuses tant à l'état naturel que synthétique, constituent les chefs de file potentiels des nouveaux anti-cancéreux.

CHAPITRE II : EXTRAITS D'ENDOPHYTES ÉTUDIÉS

Comme nous venons de l'exposer, la recherche d'inhibiteurs de la SOD représente une piste de choix dans la lutte contre le cancer et diverses pathologies humaines. Cette recherche en est encore à ses balbutiements et peu d'inhibiteurs ont été découverts jusqu'à présent.

Nous avons choisi de travailler avec des extraits de substances naturelles issues du règne végétal, car il s'agit là d'une formidable opportunité de découvrir des molécules possédant des structures originales ou inconnues, renouvelant ainsi l'arsenal thérapeutique à notre disposition. En effet, la nature est une immense pourvoyeuse de métabolites originaux, résultat d'une stratégie évolutive vieille de plusieurs millions d'années.

L'émergence de nouvelles maladies, l'absence de traitement pour certaines pathologies ainsi que l'apparition de diverses résistances aux thérapies intiment à la communauté scientifique la nécessité de trouver des molécules innovantes, paradigmes des classes pharmaceutiques de demain.

Comme nous l'avons déjà écrit, les substances naturelles représentent un immense réservoir de nouvelles molécules à découvrir. Ces molécules ont, entre autres, la particularité d'avoir atteint un niveau de complexité tel qu'il est souvent difficile à reproduire en chimie de synthèse. Ceci permet de produire non seulement des précurseurs utiles en chimie de synthèse, mais aussi d'élargir l'horizon des chercheurs en matière de nouvelles structures. La nature repousse ainsi les limites de l'imagination des chimistes de synthèse, dont on peut cependant saluer les progrès réalisés dans ce domaine d'étude.

Les micro-organismes ont prouvé leur intérêt en tant que producteurs de molécules thérapeutiques (production d'antibiotiques, d'antifongiques, etc.) La littérature regorge aussi d'exemples de champignons endophytes produisant des furocoumarines, famille de composés contenant l'Impératorine, molécule inhibitrice de la SOD (Huang et al. 2012; Huang et al. 2012; Fracarolli et al. 2016).

I. Généralités sur les endophytes

Parmi les micro-organismes, les endophytes occupent une place à part. Ce sont des bactéries ou des champignons microscopiques commensaux des plantes, c'est-à-dire qu'ils vivent dans les plantes, en position intra ou intercellulaire. La plante fournit à son hôte les nutriments et l'habitat nécessaires à sa survie en échange de ses services, ici la production de métabolites secondaires d'intérêt particulier.

La plupart des plantes hébergent des champignons ou des bactéries endophytes. Chaque plante peut héberger une ou plusieurs espèces d'endophytes et ces derniers ne sont pas hôtes spécifiques (Cohen 2006). Ils peuvent coloniser des plantes non seulement de

diverses familles botaniques, mais encore poussant dans des aires géographiques et écologiques totalement différentes.

I.1 Mode de colonisation

Les endophytes et les plantes vivent cette relation mutualiste depuis plus de 400 millions d'années (Krings et al. 2007).

Il existe deux types de transmission des endophytes : la transmission verticale et la transmission horizontale (voir figure 32).

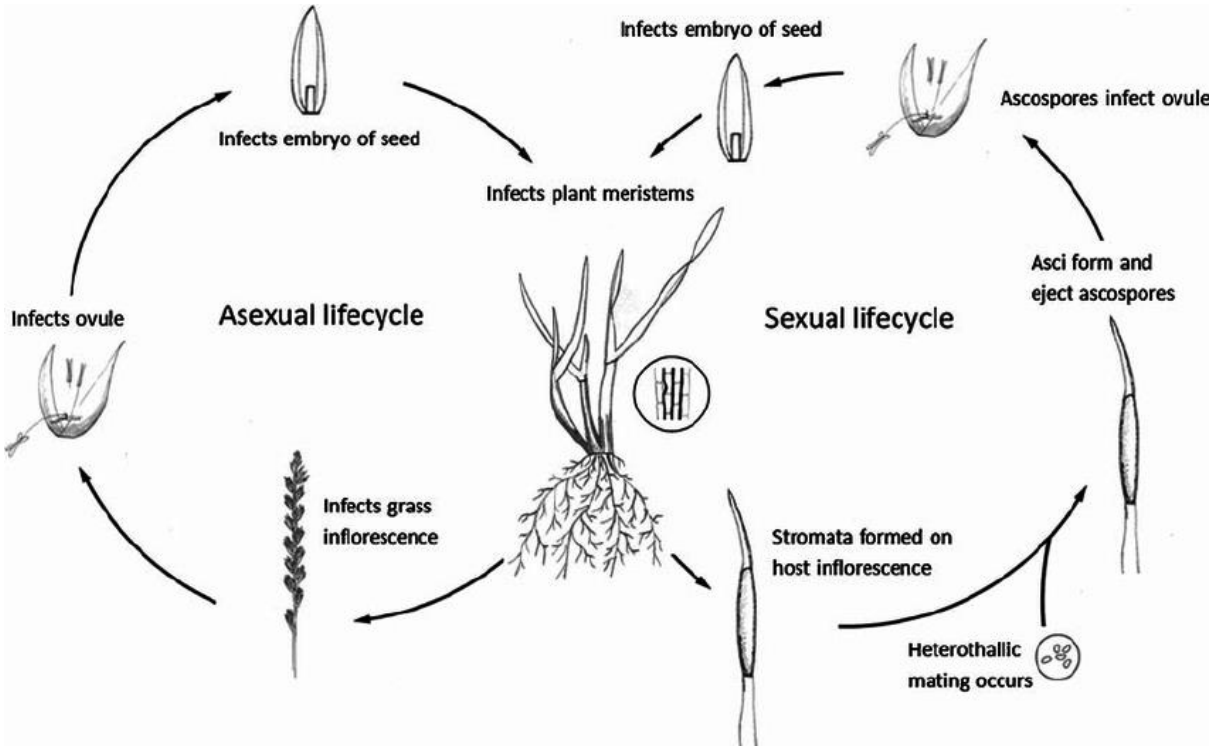


Figure 32: Cycle reproductif des endophytes : reproduction verticale (à gauche) et reproduction horizontale (à droite) (Site : https://www.researchgate.net/figure/251565969_fig1_Fig-1-Asexual-and-sexual-lifecycle-of-epichloae-fungal-endophytes).

Dans le premier cas, le cycle de vie des champignons endophytes est lié à celui de la plante.

Les filaments mycéliens de l'endophyte se développent à l'intérieur des tissus de la plante hôte, y compris dans l'ovule puis la graine. Ainsi, dans la nouvelle plantule, le champignon endophyte sera déjà présent et sera identique à celui de la plante mère.

Le second cas fait intervenir la production de spores qui ont la particularité d'être issues soit d'une mitose (reproduction asexuée) soit d'une méiose (reproduction sexuée).

Ce qu'il faut souligner, c'est que quel que soit le mode de reproduction, la production de spores n'endommage généralement pas la plante, contrairement à un champignon pathogène. La spore ainsi produite infecte alors une nouvelle plante (Gillings and Holmes 2013).

I.2 Interaction hôte-endophyte

La relation entre l'hôte et le micro-organisme dépend de divers facteurs et est régulée génétiquement à la fois par les deux génomes et par l'environnement (Moricca and Ragazzi 2008).

Il s'agit cependant d'un équilibre très fin, dans lequel le micro-organisme peut redevenir pathogène si le système immunitaire de défense de l'hôte vient à faiblir.

L'endophyte influence aussi la plante de manière directe, en régulant son génome épigénétiquement. C'est le cas par exemple de la germination de certaines variétés de riz, ou encore de la reproduction d'*Artemisia tridentata* (Rodriguez et al. 2009).

I.3 Production de molécules bioactives

Malgré le fait que certains d'entre eux puissent devenir pathogènes dans le cas où le terrain s'y prête, ils apportent généralement un avantage évolutif à la plante, en produisant certaines molécules d'intérêt du métabolisme secondaire.

Ces molécules, complexes par définition, peuvent être des hormones comme l'auxine ou les gibbérellines, favorisant de ce fait la croissance des plantes hôtes (Waqas et al. 2012). Les endophytes synthétisent aussi des molécules de défense contre d'autres micro-organismes (anti-fongiques, antibiotiques), contre divers herbivores (insecticides etc.), des molécules de résistance au stress environnemental (milieu salin (Waller et al. 2005), hautes températures) (Redman et al. 2002), diverses enzymes etc. Certaines molécules sont connues pour présenter aussi des propriétés anti-cancéreuses.

Les endophytes sont aussi impliqués dans la colonisation de nouveaux terrains par les plantes pionnières.

La palette des molécules synthétisées par les endophytes est très large, ce qui est dû à la grande diversité des voies métaboliques dont elles sont issues. Elle comprend les isoprénoïdes, des polykétides, des dérivés d'acides aminés, etc. (Tan and Zou 2001). La liste des molécules qu'ils sont capables de produire s'allonge chaque jour, cependant nous pouvons aussi citer des molécules de la famille des terpènes, des stéroïdes, des xanthones, des chinones, des phénols, des isocoumarines, des benzopyranones, des tétralones, des cytochalasines et des ennianes.

Ceci est particulièrement intéressant pour les plantes médicinales (Weber et al. 2004; Tejesvi et al. 2008; Aly et al. 2008; Huang et al. 2008; Sappapan et al. 2008). À ce titre, pour illustrer les enjeux de la présence des endophytes, nous citerons le cas du taxol, anti-

cancéreux majeur s'il en est. Extrait de l'écorce de *Taxus brevifolia* (Wani et al. 1971). Malgré la découverte de l'un de ses précurseurs, le taxotère, dans les feuilles et rameaux de *Taxus baccata* (Bissery et al. 1991), les coûts d'extraction et de purification du taxol demeurent importants. Or, *Taxmyces andreana*, isolé de *Taxus baccata*, est un endophyte producteur de taxol et de diverses taxanes, des dérivés du taxol (Stierle et al. 1995). Grâce à ces résultats, le taxol peut être produit en grandes quantités et à un coût (autant financier qu'environnemental) très faible.

Il est par ailleurs possible d'induire la production de ces molécules d'intérêt dans les plantes en modifiant les conditions de culture - stress UV, chaleur (Pommerville n.d.)…- ou encore en ajoutant au milieu de culture certaines substances : les acides valproïque et anacardique, par exemple, qui sont des inhibiteurs des histones acétylases. Leur présence dans le milieu de culture lève la répression sur l'expression des gènes.

Il est aussi possible co-cultiver plusieurs souches d'endophytes sur une même boîte de Pétri, ou des endophytes et d'autres micro-organismes (bactéries, champignons par exemple). Ainsi sollicités, les endophytes sont contraints de produire des substances de défense afin de coloniser au mieux la gélose.

En réalité, les combinaisons possibles sont presque infinies.

Cette grande diversité de métabolites peut être obtenue en une seule culture, en quantité très intéressante et facilement purifiable.

Mais malheureusement, la culture des endophytes revêt une difficulté majeure : leur variabilité.

II. Etude des extraits

Dans ce chapitre, nous avons tenté de résoudre deux problématiques : en premier lieu celle de la concentration idéale à utiliser lors des tests biologiques de l'activité de la SOD. Pour cela, nous avons travaillé sur l'ensemble des souches d'endophytes (soit les 197 souches, extraites à l'acétate d'éthyle et reprises dans le méthanol) et avons réalisé leurs spectres UV-visibles.

La seconde problématique concernait la reproductibilité des cultures de champignons endophytes. Pour y répondre, des analyses HPLC-QTOF ont été réalisées sur les six réplicas de 8 souches de champignons, soit 48 échantillons. Ces 8 souches, extraites à l'acétate d'éthyle et reprise dans le méthanol, ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus au chapitre IV avec le test au pyrogallol sur leur activité supposée sur la SOD.

La figure 33 résume les extraits et analyses effectués :

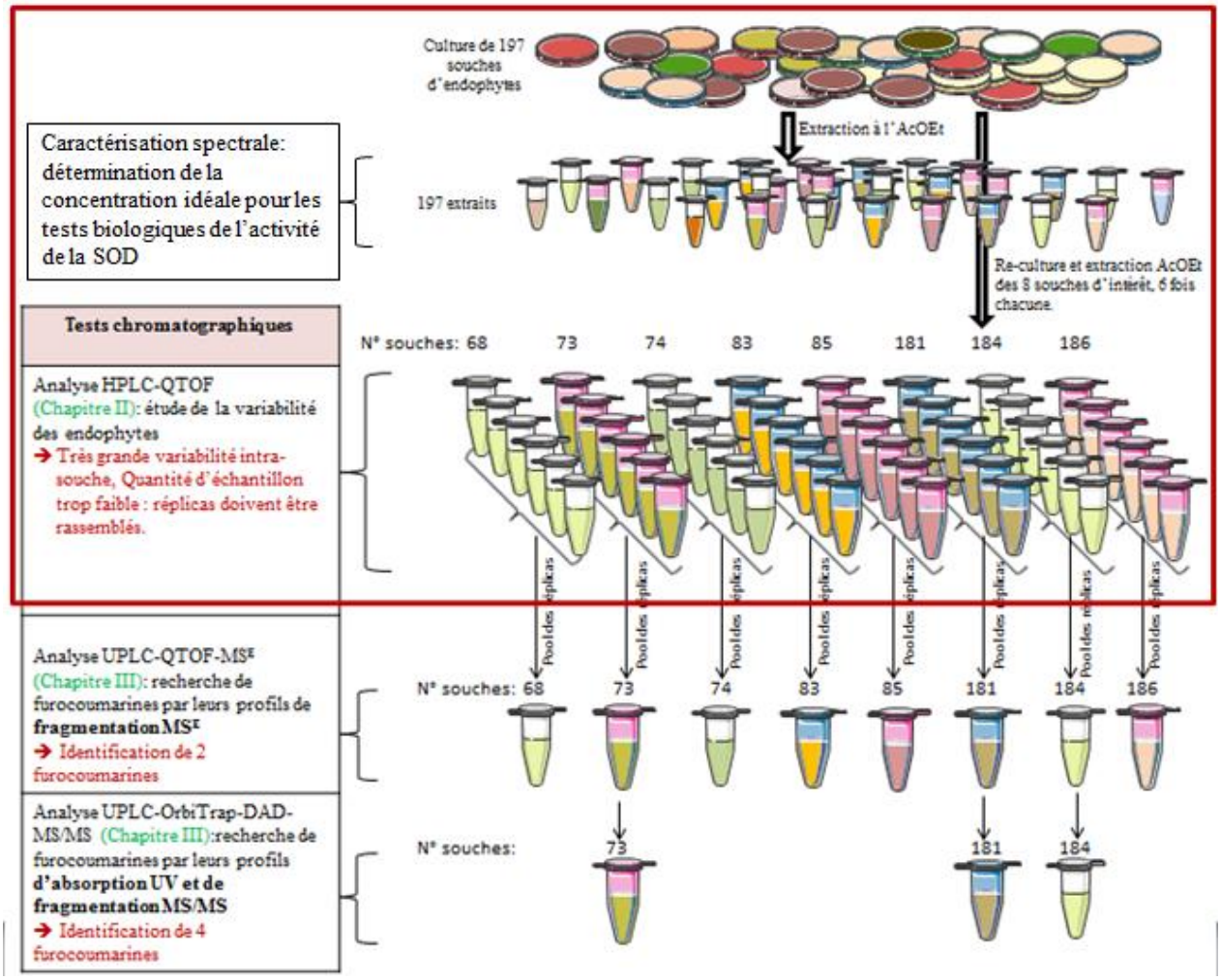


Figure 33: Dans l'encadré rouge: extraits et analyses effectués dans le chapitre II. Un schéma général est visible en annexe I.

Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés uniquement sur les champignons endophytes, laissant de côté les bactéries endophytes.

Toute cette partie a été réalisée à l'UMR 152 Pharma-Dev (Pharmacochimie et Biologie pour le Développement), dans l'équipe PEPS (Pharmacognoie, Ethnopharmacologie et Pathologies du Sud), sous la supervision des docteurs Mohamed Haddad et Marieke Vansteelandt.

La récolte des plantes a été effectuée à Iquitos (Pérou), le 14 novembre 2013, par Dr. Mohamed Haddad et Carlos Amasifuen.

Nous sommes pour l'instant en attente des autorisations supplémentaires nécessaires à la récolte et l'exploitation des plantes, provenant de la SERFOR (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre).

Le délai entre la récolte des plantes et l'isolement des champignons endophytes doit être extrêmement réduit : il ne doit pas excéder 24 h.

L'isolement a été réalisé au laboratoire PharmaDev', le 15 novembre 2013, par les Dr. Mohamed Haddad et Marieke Vansteelandt.

Le protocole d'isolement est le suivant : après un nettoyage à l'eau, les feuilles ou les fragments de racines sélectionnés sont traités à l'éthanol (95 %) pendant une minute. Un troisième nettoyage est fait à l'eau de Javel (NaOCl) pendant 30 secondes. Pendant la minute suivante, les feuilles et fragments de racines sont plongés à nouveau dans l'éthanol à 95 %. Enfin, ils sont rincés dans de l'eau distillée stérilisée.

Pour l'isolement proprement dit, les fragments végétaux nettoyés de tout pathogène sont déposés à la surface de la gélose d'une boîte de Pétri et mis en culture en étuve (28 °C) jusqu'à l'apparition de filaments mycéliens. Ces filaments sortent des fragments de plantes et colonisent peu à peu l'ensemble de la gélose.

Etant donné que plusieurs endophytes peuvent coloniser une même plante et un même fragment de plante, plusieurs endophytes sont présents, après culture, sur la même gélose. Il s'agit donc sans tarder de repiquer chaque souche sur une nouvelle boîte de Pétri.

La différenciation entre les souches est effectuée à l'œil nu, en les comparant morphologiquement.

La majorité des souches isolées ont ensuite été identifiées par la méthode de séquençage des ITS (Internal Transcribed Spacer). Les ITS sont des éléments cistron du génome ribosomal présents chez une très grande quantité de champignons et présentant une variation très spécifique, que ce soit en inter ou en intra-espèces. Ils permettent ainsi une identification fine des souches. De plus, les ITS sont aisément amplifiables par PCR (Polymerase Chain reaction), rendant le test très sensible (Schoch et al. 2012).

Malgré tous ces avantages, le séquençage des ITS n'a pas permis l'identification de l'ensemble des souches. Certaines, comme celles de *Fusarium* ont été identifiées à l'aide d'autres marqueurs, tels que les TEF (Translation Elongation Factor 1-alpha) par exemple.

L'identification par séquençage des ITS met en œuvre une extraction de l'ADN, puis une amplification des ITS par PCR, qui ont été réalisées au laboratoire PharmaDev'.

Les échantillons ont ensuite été envoyés à Eurofins pour procéder au séquençage proprement dit. Enfin, les séquences ont été comparées avec des banques de données, comme GenBank par exemple.

II.1 Caractérisation spectrale des extraits

II.1.1 Chromatographie sur couche mince des 197 souches

En premier lieu, la caractérisation des extraits a débuté par la réalisation de Chromatographies sur Couche Mince (CCM) sur les 197 échantillons d'endophytes destinés au screening rapide de l'activité SOD, afin de permettre la mise en évidence certaines molécules redondantes dans les échantillons. Le but était aussi de déterminer un profil associé à une activité de l'échantillon sur la SOD (voir figure 34).

Sur les plaques révélées à 254 nm (voir annexe II), les composés migrent peu, ce qui semble indiquer que la phase mobile (chloroforme/méthanol, 95/5) n'est pas assez polaire. Pourtant, les essais avec un pourcentage de méthanol plus élevé (95/10) montrent que ce mélange est idéal (voir chapitre V, Matériel et Méthode).

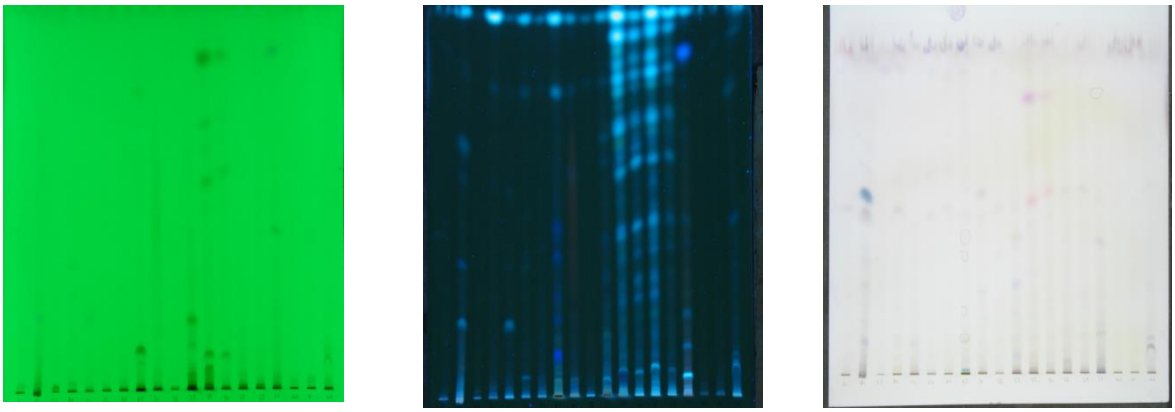


Figure 34: Exemple de CCM obtenue après migration des extraits d'endophytes. De gauche à droite: visualisation de la CCM à 254 nm, à 366 nm puis en lumière visible, après pulvérisation de vanilline sulfurique.

Les profils obtenus montrent une très grande variabilité entre les différents extraits : nous observons qu'il n'y a majoritairement pas de redondance des profils CCM à l'intérieur d'un même genre.

Il est cependant possible de trouver des exceptions et des similitudes entre les profils de certains extraits d'un même genre. Ceci est le cas pour les souches 239 et 240 (voir annexe II), appartenant toutes les deux au genre *Sordario*.

II.1.2 Spectre UV-Visible

Afin de déterminer la concentration maximale à laquelle l'activité sur la SOD des extraits peut être testée sans saturer le spectromètre UV-visible à 320 nm, un spectre UV-visible est réalisé sur les extraits à différentes concentrations.

Les spectres d'absorbance obtenus montrent que les extraits absorbent à des longueurs d'ondes et selon des intensités différentes, attestant de la présence d'une grande diversité de pigments, en concentrations variables. Certains sont très colorés et absorbent fortement à 320 nm.

Pour déterminer l'activité sur la SOD, il faut tester tous les échantillons à la même concentration. Cette dernière doit être la plus forte possible, afin de détecter des molécules très minoritaires. Il faut aussi prendre en compte le fait que peu de masse d'extrait est disponible et qu'il faut donc l'économiser.

Il a donc été décidé de tester l'activité SOD des échantillons à une concentration finale de 40 µg/mL. Cependant, comme nous le verrons au chapitre IV, les résultats des tests biologiques nous ont poussés à nous adapter et à tester d'autres concentrations pour ces extraits.

II.2 Variabilité des cultures

Un des problèmes majeurs de la culture des endophytes est que les métabolites produits varient au fur et à mesure des repiquages et des différentes cultures, tant au point de vue de leur quantité que de leur qualité (Simon, Meunier, and Rivière 1970).

Cette baisse de rendement peut être inversée en ajoutant au milieu de culture un extrait de la plante hôte. Ainsi placé dans un environnement « physiologique » convenable pour lui, l'endophyte peut réactiver les voies de biosynthèses mises en sommeil auparavant. Il est aussi possible, comme présenté ci-dessus, d'ajouter certaines substances favorisant la production des métabolites d'intérêt.

Le milieu de culture a de toute évidence un impact très fort sur la production de métabolites. Par exemple, une plus grande quantité d'extrait sera obtenue sur un milieu solide par rapport à un milieu liquide. De même, en fonction de la composition du milieu, la quantité et la nature des métabolites produits seront différents. Pour chaque production souhaitée, il s'agit donc de trouver le milieu le mieux adapté pour le micro-organisme à cultiver (Vandermolen et al. 2013).

Parmi les problèmes récurrents rencontrés lors de la production de métabolites par les organismes endophytes, il existe aussi une variabilité entre les réplicas d'une même souche et placés dans les mêmes conditions de culture. Ceci est dans doute relié au fait que la concentration en nutriments du milieu de culture peut légèrement différer d'une culture à l'autre. Il s'agit donc d'être extrêmement précautionneux au moment de couler les boîtes de Pétri, ou de commander à un fournisseur industriel un même lot standardisé de gélose. D'autres facteurs peuvent influer les cultures d'endophytes, tels que les échanges gazeux, qui ne seront pas les mêmes si l'étuve est mal ventilée par exemple, ou suivant la position de la boîte de Pétri dans l'étuve. Le nombre de boîtes de Pétri dans l'étuve doit donc toujours être le même d'un lot de culture à l'autre.

Nous pouvons illustrer ce problème à l'aide de la figure 35 ci-dessous, grâce aux réplicas des 8 souches que nous avons cultivées. Sur chacune de ces six boîtes de Pétri a été cultivée la même souche d'endophyte. Le milieu, la date de la culture et toutes les conditions expérimentales sont identiques. Cependant il apparait clairement que toutes les cultures ne sont pas au même stade de maturité, certaines ayant sporulé et colonisé toute la surface de la gélose tandis que d'autres non. Cette observation est valable pour tous les réplicas des cultures (voir annexe III).

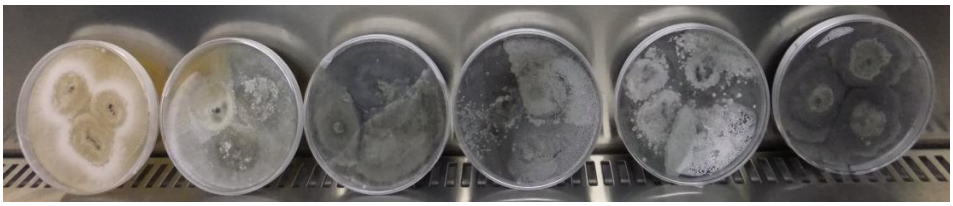


Figure 35: Variabilité des réplicas d'une même souche.

Cela est aussi vérifié après extraction de ces boîtes : la figure 36 montre les différences colorimétriques des extraits obtenus.

Figure 36: Différences de couleurs inter et intra cultivars (extraits bruts au méthanol).

Nous avons souhaité quantifier cette variation grâce à des expériences d'HPLC complétées par une analyse en composantes principales (ACP).

Nous voyons sur le chromatogramme suivant (voir figure 37) les six réplicas de la souche 74. Chaque pic est associé à sa masse majoritaire. Comme nous pouvons le constater, à première vue, les profils sont homogènes qualitativement, mais hétérogènes au niveau quantitatif.

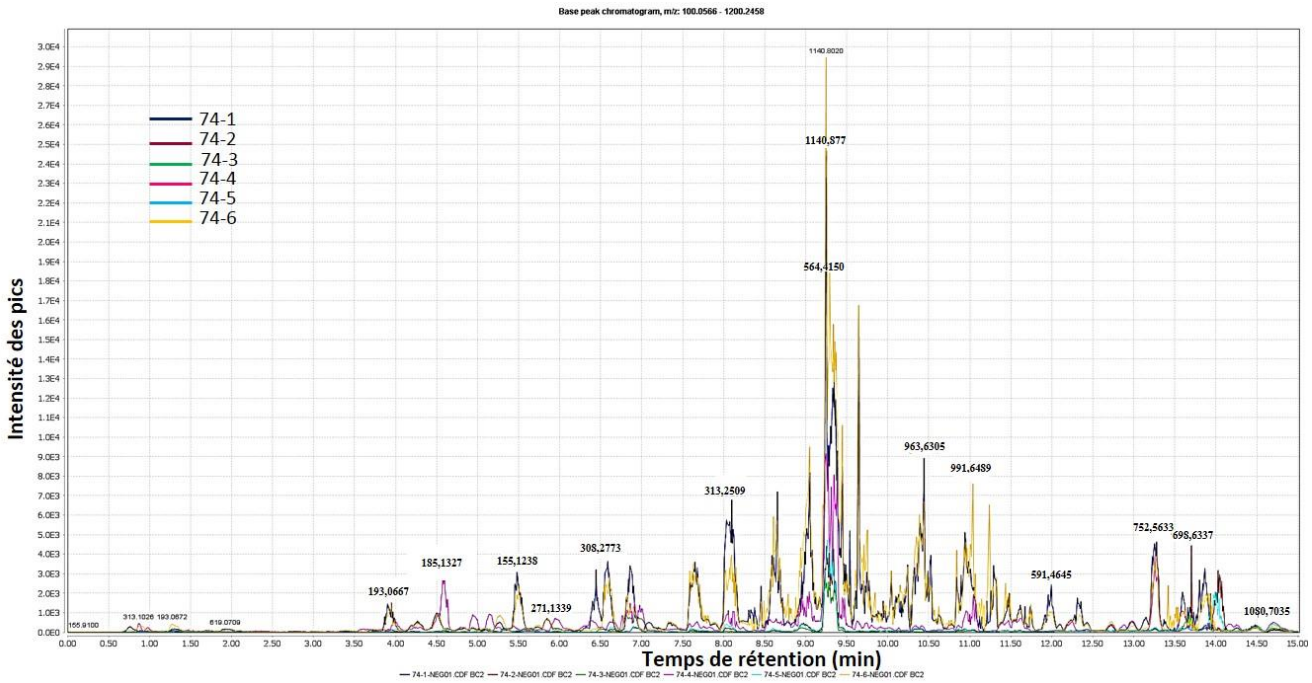


Figure 37: Profils HPLC-QTOF des 6 réplicas de la souche 74.

Lorsque l'on regarde les profils obtenus sur l'ensemble des réplicas de toutes les souches, à savoir sur les 6 réplicas des 8 souches, la constatation est la même (voir figure 38).

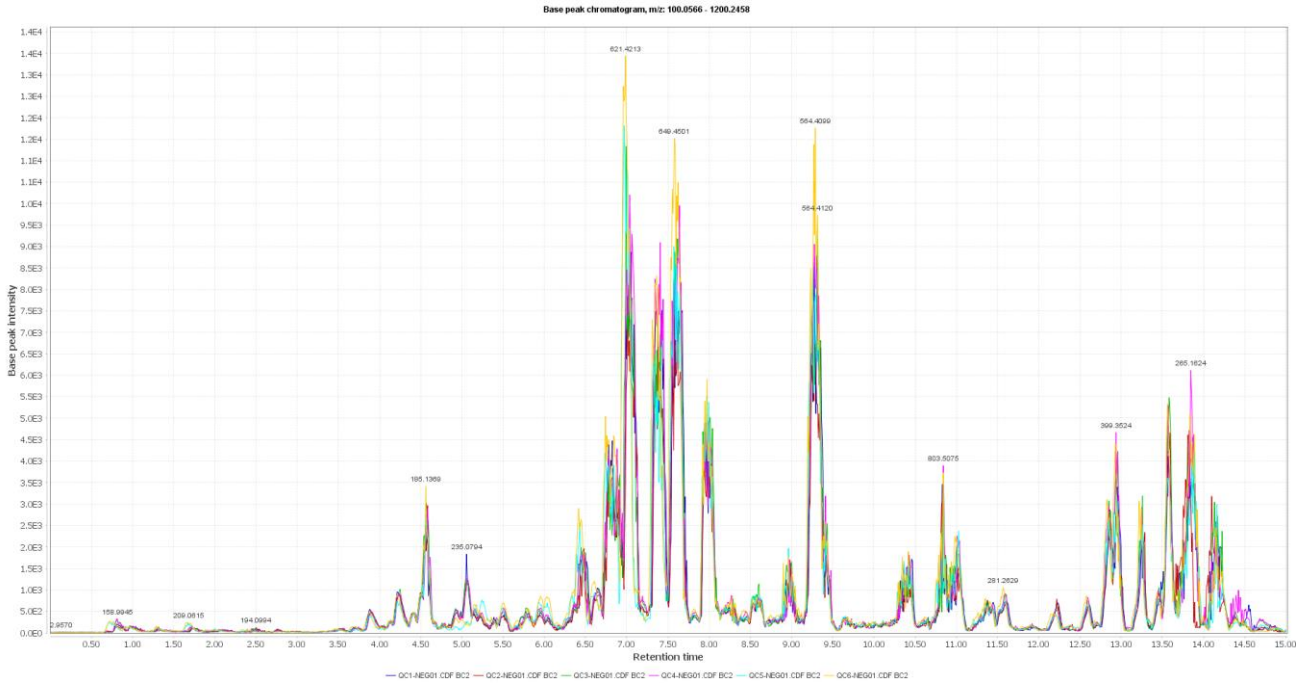


Figure 38: Profils HPLC-ESI-QTOF de l'ensemble des réplicas des 8 souches. Chaque pic est associé à sa masse majoritaire.

Enfin, les profils chromatographiques LCMS (masses et temps de rétention) obtenus sur l'ensemble des réplicas de toutes les souches ont été comparés statistiquement à l'aide du logiciel SIMCA P14.0 (Umetrics Sweden). L'ACP résume l'espace de variance d'un jeu de données. Les données sont disposées en fonction de leurs ressemblances : deux points côte à côte seront identiques.

On observe sur cette ACP quatre massifs intéressants (voir figure 39) :

- sur les deux premiers, 1 et 1', nous pouvons constater que les souches (souches 74, 83, 85, 181, 184) ne sont pas groupées, mais alignées. Couplée à l'observation de la superposition des chromatogrammes LCMS, nous pouvons en conclure que cela est dû à l'hétérogénéité quantitative des souches.
- Le massif numéro 2, centré au milieu de l'ACP, témoigne de la reproductibilité de la méthode analytique : ces profils, en rouge, sont ceux du pool de l'ensemble des échantillons (QC). Le fait qu'ils soient tous groupés montre bien que l'ACP atteste qu'ils sont tous identiques, donc que les profils LC-MS le sont aussi. Leur position centrale indique simplement que ces échantillons ont des affinités avec tous les échantillons de l'ACP, ce qui est logique.
- Enfin, le massif 3 indique que certains réplicas de certaines souches sont malgré tout semblables. la technique culturale des endophytes mérite donc d'être améliorée, mais reste intéressante pour quelques souches.

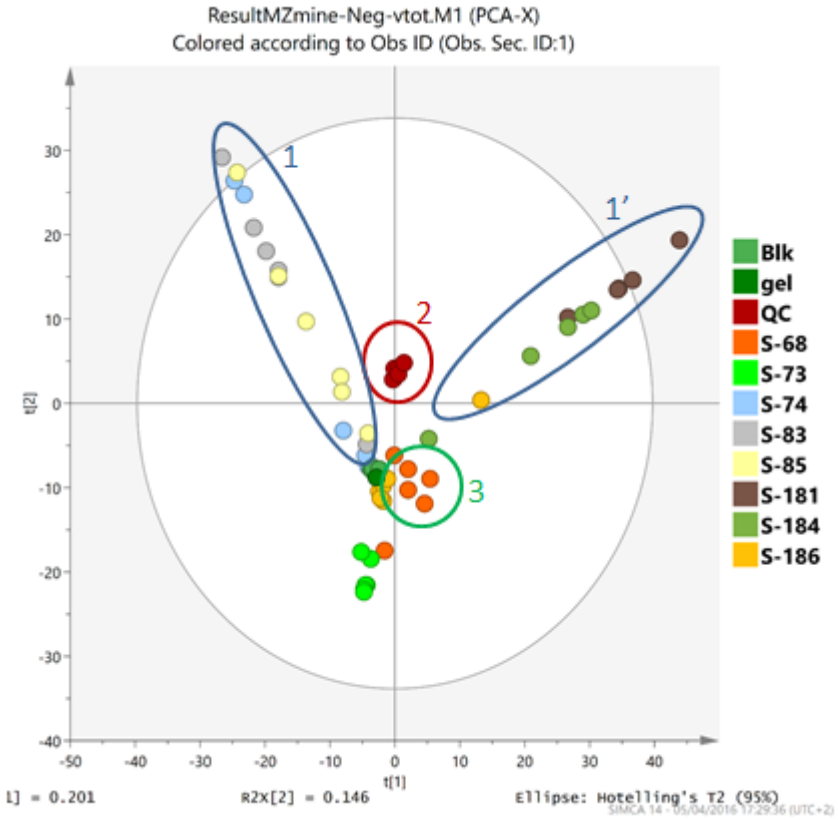


Figure 39: Résultats de l'ACP pour la comparaison des profils LCMS des souches.

Par ailleurs, il est nécessaire de cultiver les souches en grande quantité afin d'obtenir une quantité exploitable d'extrait, rendant l'exploration de la chimie des endophytes laborieuse : le rendement de culture est faible, malgré le fait que les extraits soient très riches en différents métabolites.

La recherche de nouvelles méthodes de culture, reproductibles et efficaces, est nécessaire.

III. Conclusion

Les endophytes sont une voie d'avenir pour la recherche de nouvelles molécules biologiques.

Mais ce chapitre montre bien que la culture des endophytes et la préparation des extraits peut présenter des écueils dans la mesure où elle montre des problèmes de reproductibilité.

Nous avons dépassé ce problème en rassemblant les réplicas d'une même souche pour l'analyse des données.

Par la suite, il faudrait utiliser des milieux différents, comme des milieux au riz par exemple, qui sont connus pour entraîner une meilleure reproductibilité des réplicas (Kjer et al. 2010).

La recherche d'inhibiteurs de la SOD à travers les tests colorimétriques devra s'effectuer à une concentration assez faible, puisque la coloration de certains échantillons est très importante et l'absorbance doit demeurer inférieure à une unité d'absorbance.

Ces étapes préliminaires passées, nous allons présenter les résultats issus des analyses des échantillons en chromatographie liquide ultra-haute résolution, couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution.

CHAPITRE III : ETUDE DES EXTRAITS EN LC-HRMS

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous détaillons les expériences menées en spectrométrie de masse qui nous ont permis de rechercher de nouveaux composés par une approche métabolomique.

Cette approche, préliminaire à l'extraction et à la purification de molécules, permet de gagner énormément de temps sur la découverte de nouveaux métabolites bio-actifs. Elle identifie la présence de ces molécules dans les extraits bruts, en amont de leur extraction et de leur purification, étapes lourdes et coûteuses en temps et en matériel. Dans un second temps, une fois les molécules à extraire ciblées, il est plus facile d'orienter le protocole d'isolation.

Pour cela, elle met en œuvre une méthode chromatographique (ici la LC-HRMS), permettant d'identifier les molécules présentes dans les extraits, et une étude statistique des résultats obtenus avec un screening biologique permettant de prédire l'identité des molécules potentiellement actives.

Il existe un composé naturel possédant des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la SOD : l'impératorine (Raja et al. 2011a), une furocoumarine.

Le premier a retenu notre attention, du fait de la capacité de cette famille à être photo-activable. Cette propriété est très intéressante d'un point de vue thérapeutique : elle aide à la diminution des effets secondaires d'un traitement par exemple anti-cancéreux en permettant l'activation de la molécule directement sur le site de la tumeur. Or, les effets secondaires des thérapies anti-cancéreuses sont généralement extrêmement lourds, du fait de la très haute toxicité des médicaments administrés. Ils sont à l'origine de certains arrêts de traitement du fait de la diminution de la qualité de vie, voire du décès du patient ou de la récidive du cancer.

De ce fait, les molécules ne doivent pas être actives en absence de lumière, mais seulement interagir avec la SOD. Leur activité inhibitrice ne devrait avoir lieu qu'après activation par un flux lumineux.

II. Analyse en masse

Nous nous sommes donc appliqués à rechercher des composés de la famille des furocoumarines dans nos extraits d'endophytes. Les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation négatif dans un premier temps. En effet, ce mode étant plus restrictif et plus adapté pour l'étude des polyphénols, un moins grand nombre de molécules est présent sur le chromatogramme, ce qui facilite dans un premier temps l'analyse des extraits bruts, très riches en composés. Les extraits ont aussi été analysés en mode positif. Les analyses de cette dernière série de mesures n'ont pas été traitées au cours de ce travail de thèse mais feront l'objet d'une seconde phase de travail, plus approfondie.

La Figure 400 résume les analyses réalisées au chapitre III :

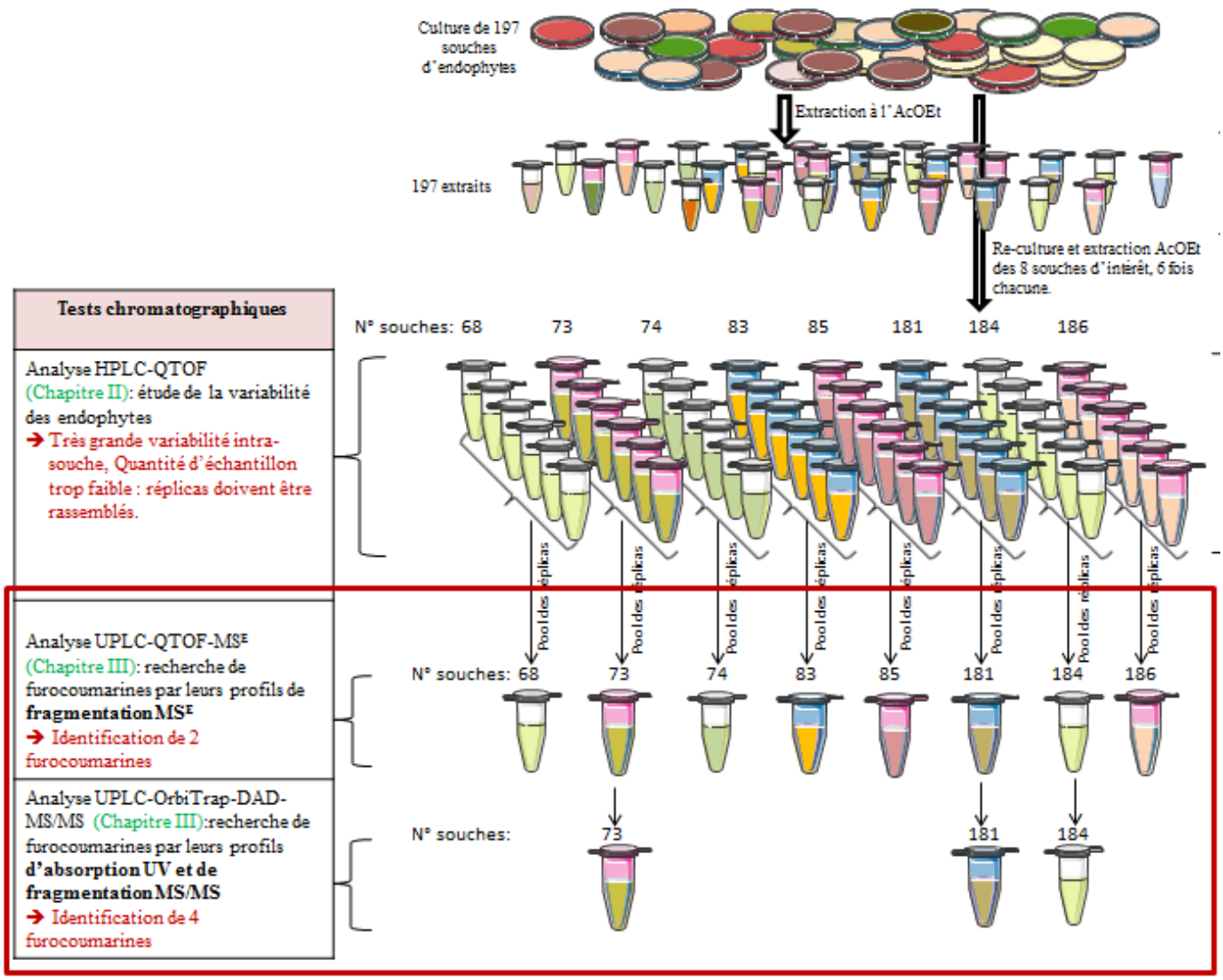


Figure 40: Dans l'encadré rouge : ensemble des analyses pratiquées en spectrométrie de masse pour le chapitre III (un schéma plus grand est visible en annexe I).

Dans ce chapitre, nous avons travaillé sur les six réplicas des 8 souches d'endophytes qui présentaient en première intention une activité sur la SOD (souches 68, 73, 74, 83, 85, 181, 184 et 186), d'après le test de screening de 86 souches d'endophytes, effectué avec le test au pyrogallol et présenté au chapitre IV (voir chapitre IV). Les analyses HPLC du chapitre II ont permis de mettre en évidence la trop grande variabilité intra-souche. Devant ces éléments (et la faible quantité d'échantillon restante), nous avons décidé d'analyser le pool de tous les réplicas d'une même souche.

Ainsi, les pools de leurs 6 réplicas ont été analysés grâce au LC-QTOF. Cependant, la quantité d'échantillons restante après cette analyse était trop faible pour tester l'ensemble des pools avec l'OrbiTrap. Seules les souches 73, 181 et 186 ont donc été testées sur ce second appareil.

Le tableau 2 suivant présente les différentes stratégies de recherche des furocoumarines mises en œuvre dans ce chapitre :

Tableau 2: Les différentes stratégies de recherche des furocoumarines utilisées au chapitre III.

1er stratégie : QTOF	MS^E : tous les ions du chromatogramme peuvent se fragmenter	Recherche des furocoumarines par leurs masses exactes et leurs profils de fragmentation
2e stratégie : OrbiTrap	Détecteur à barrette de diodes (DAD) : spectre UV-visible du pic chromatographique	Recherche des furocoumarines par leurs profils UV-visible
	MS/MS : seul l'ion majoritaire du pic chromatographique est fragmenté	Recherche des furocoumarines par leurs masses exactes et leurs profils de fragmentation (si l'ion d'intérêt est l'ion majoritaire du pic chromatographique)

La première série d'analyse a donc été réalisée en chromatographie liquide ultra-haute résolution, couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Grâce à l'analyseur à temps de vol (TOF, time of flight) quadrupôle (QTOF), nous obtenons les masses exactes des molécules de nos échantillons, nous permettant d'être plus précis dans leur identification. La fragmentation est data-indépendante, tous les ions d'un pic chromatographique sont donc fragmentés : la fragmentation n'est pas spécifique d'un ion donné. Nous avons ainsi la possibilité de connaître le profil de fragmentation de chaque ion du chromatogramme et ainsi d'objectiver la présence de furocoumarines dans les extraits étudiés.

Un exemple de séparation est donné figure 41. On remarquera la complexité de ces extraits bruts.

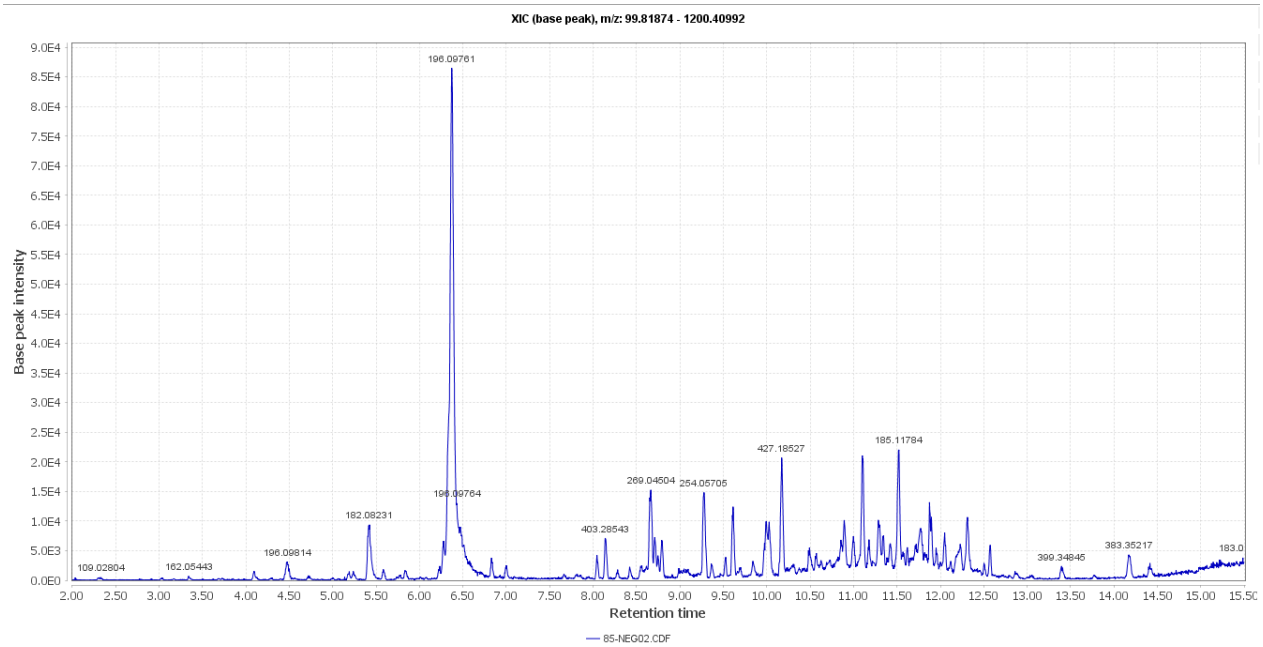


Figure 41: Chromatogramme de l'échantillon 83 obtenu avec le QTof.

Pour la seconde série d'analyses, nous avons étudié à nouveau trois échantillons (les pools des souches 73, 181 et 184), afin d'identifier des furocoumarines en MS/MS, en utilisant un OrbiTrap. Ce spectromètre de masse permet de faire de la fragmentation en MS/MS « data-dépendante » et est couplé avec un détecteur à barrettes de diodes (DAD, Diode Array Detector). Nous avons ainsi sur ces trois échantillons à la fois le profil UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS de fragmentation de l'ion majoritaire d'un spectre de masse enregistré au temps de migration de l'ion, mais aussi le profil UV associé à ce temps de migration.

Il est à noter que la limitation de cette méthode est que la molécule que nous recherchons n'est pas forcément la molécule majoritaire du spectre (donc du pic chromatographique). La fragmentation peut alors ne pas être celle de la molécule recherchée.

La figure 42 montre le chromatogramme de masse de la souche 184 obtenu avec l'OrbiTrap et avec les paramètres de MZmine.

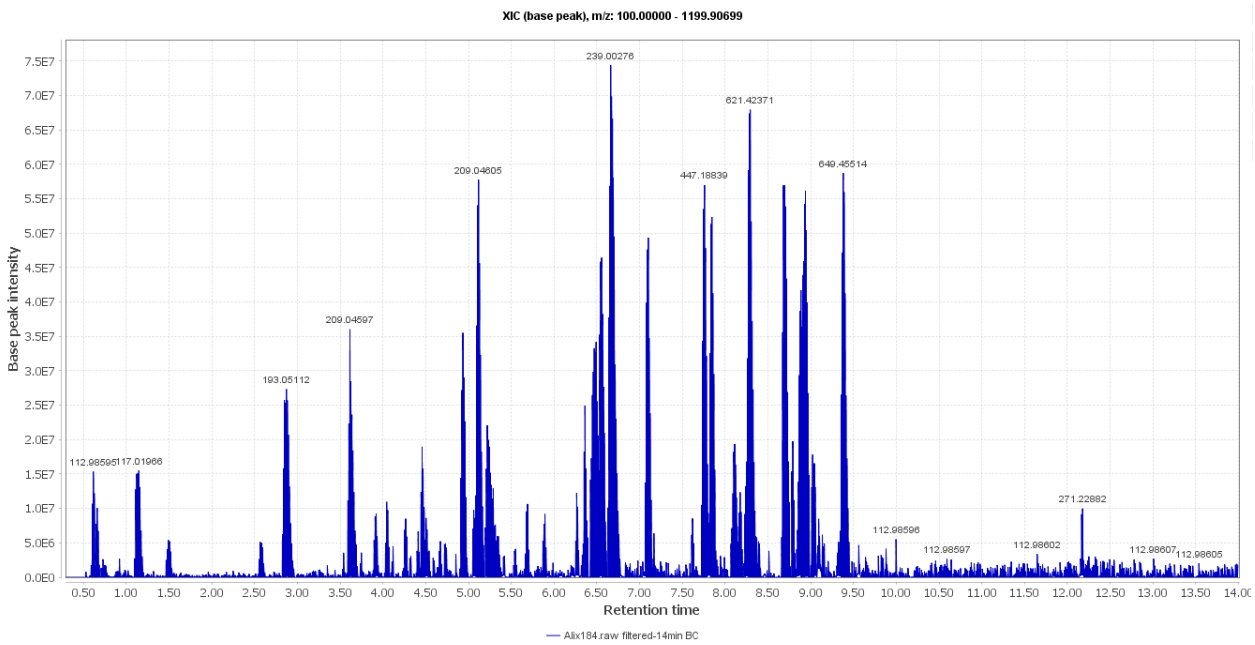


Figure 42: Chromatogramme de la souche 184 obtenu après analyse LC/ESI-MS-l'OrbiTrap. Les chiffres indiqués sur les pics sont les m/z des ions majoritaires du pic chromatographique correspondant.

La figure 43 ci-dessous présente le chromatogramme de la souche 184, associé à la détection UV, obtenu avec l'OrbiTrap et visualisé grâce à Xcalibur.

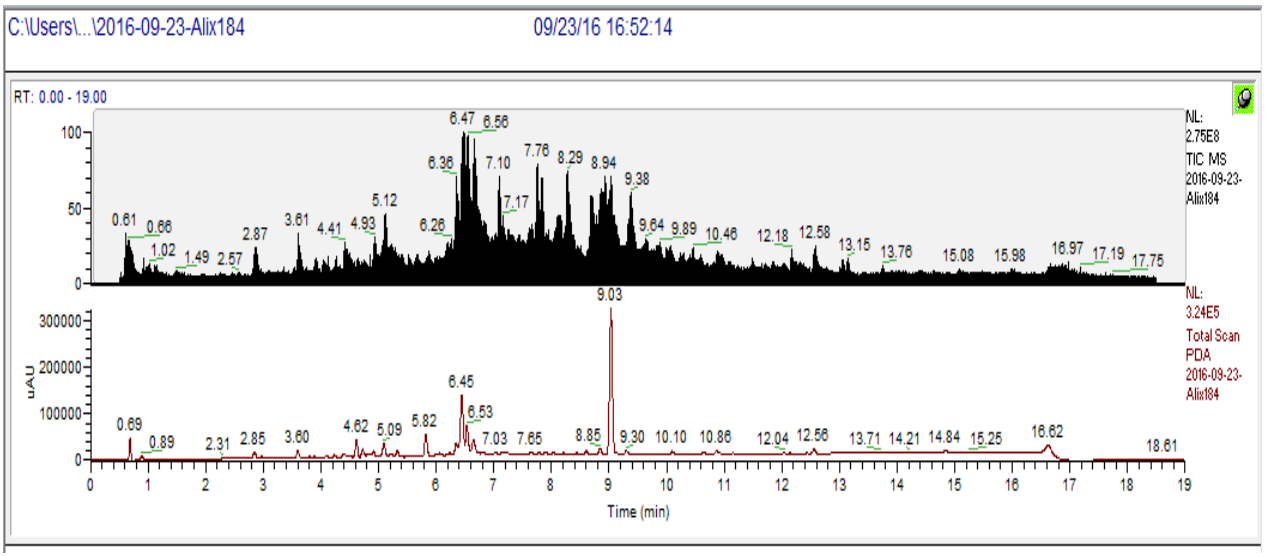


Figure 43: Chromatogrammes obtenus en LC/ESI-MS de l'OorbiTrap pour l'échantillon 184, visualisé grâce à Xcalibur. En haut : Chromatogramme de masse, en bas : chromatogramme en détection UV-visible.

On remarque la présence d'une contamination importante dans le blanc au méthanol (voir figure 44), comprise entre environ 6 et 8.5 minutes. De plus, cette contamination présente une absorbance forte en UV.

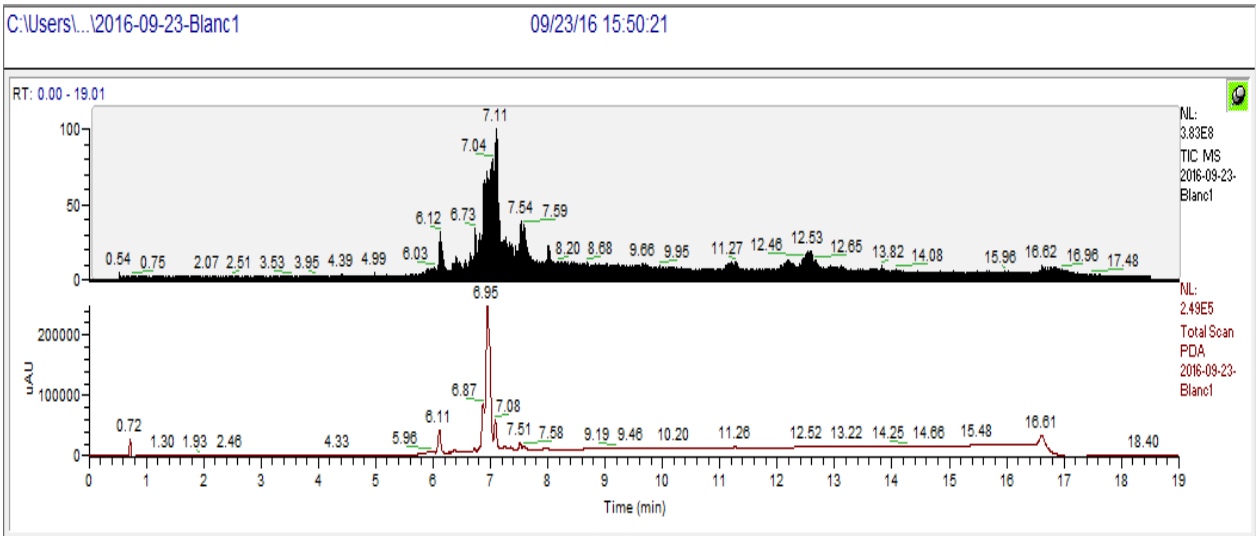


Figure 44: Chromatogrammes obtenus en LC/ESI-MS l'OrbiTrap pour le blanc au méthanol, visualisé grâce à Xcalibur. On voit que le massif aux alentours de 6.95 min correspond à une pollution.

III. Résultats : identification de molécules d'intérêt

Pour ces travaux sur les endophytes, les données obtenues en spectrométrie de masse ont pu être traitées par plusieurs logiciels, en fonction du spectromètre de masse utilisé :

- MZ-MINE et MS-DIAL pour l'alignement des différentes masses des extraits,
- MS-FINDER pour l'identification des molécules à l'aide de leurs spectres de fragmentation,
- Xcalibur pour l'identification des molécules grâce à leurs profils UV,
- CFM-id pour la confirmation des identifications à l'aide de la fragmentation *in silico*,
- GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) et Cytoscape pour le réseau moléculaire.

III.1 Recherche de furocoumarines par leur fragmentation MS^E, obtenue par le QTOF

III.1.1 Alignement des pics obtenus

Il est très difficile, une fois les échantillons analysés en spectrométrie de masse, d'organiser les données afin de pouvoir les étudier en métabolomique. Pour cela, deux logiciels libres ont été utilisés : MZmine et MS-DIAL.

III.1.1.1 Par MZmine

MZmine est un logiciel téléchargeable gratuitement (http://mzmine.github.io/).

Grâce au traitement des données par ce logiciel, il est possible d'obtenir l'alignement des chromatogrammes de plusieurs échantillons. Une liste de pics est ainsi créée, comprenant toutes les molécules des échantillons, avec leurs abondances relatives dans chaque échantillon et le blanc. MZmine n'utilise pas les données de fragmentation et se base uniquement sur la masse exacte, contrairement à MS-DIAL, pour réaliser la liste de pics.

La liste de pics issue de l'analyse des 8 souches d'endophytes compte 731 couples m/z/RT, ayant un rapport m/z s'étendant de 100 à 1187 Da.

Les données ont été croisées avec celles de bases de données comme le Dictionnary of Natural Products, ce qui a permis d'identifier *a priori* 14 structures compatibles avec des furocoumarines (liste en annexe IV). Cependant, plusieurs molécules pouvant avoir des poids moléculaires identiques (ions isobares) ou être des isomères, une confirmation ou infirmation de la structure des molécules à l'aide de la fragmentation MS/MS est nécessaire : nous avons alors utilisé MS-DIAL et MS-FINDER.

III.1.1.2 MS-DIAL

MS-DIAL est un logiciel libre permettant l'analyse des données acquises en spectrométrie de masse. Il fonctionne selon un algorithme de déconvolution des spectres de masse permettant d'associer mathématiquement les fragments des ions produits en MS^E aux ions parents dont ils sont issus : on obtient alors les spectres de masse des molécules, associés à leur fragmentation. Il devient dès lors possible de prédire les formules chimiques des molécules à analyser avec certitude et de différencier plusieurs isomères.

A la différence de MZmine, la grande majorité des paramètres est intégrée par défaut dans MS-DIAL. Ainsi, les deux logiciels sont complémentaires.

La figure 45 présente l'interface de MS-DIAL. Comme nous pouvons le voir, ce logiciel aligne les différentes masses de tous les échantillons et leur associe les spectres de masse de l'ion principal et sa fragmentation en MS/MS.

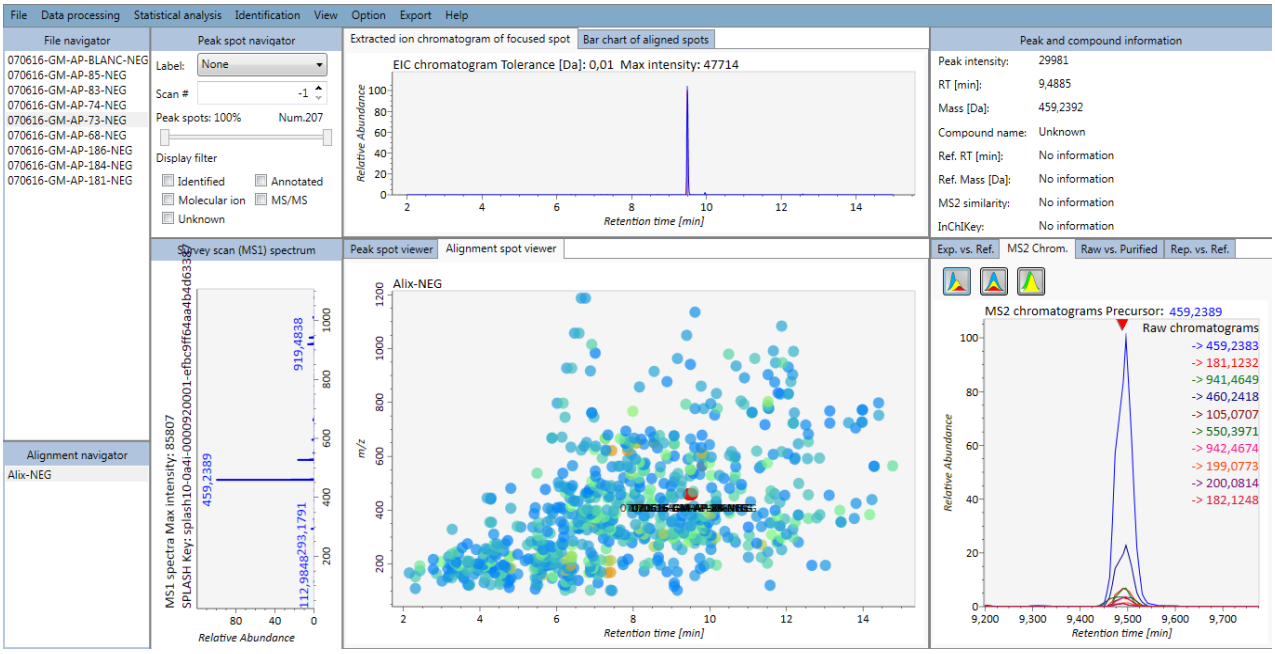


Figure 45: Alignement des différentes masses de tous les échantillons par MS Dial. Le chromatogramme et le spectre de la molécule colorée en rouge se situent respectivement en haut et à gauche de l'écran. A droite, le spectre MS/MS de ce même ion est représenté.

En guise d'exemple, nous voyons sur la figure 46 le spectre de masse du patern isotopique théorique de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one donné par MS-DIAL :

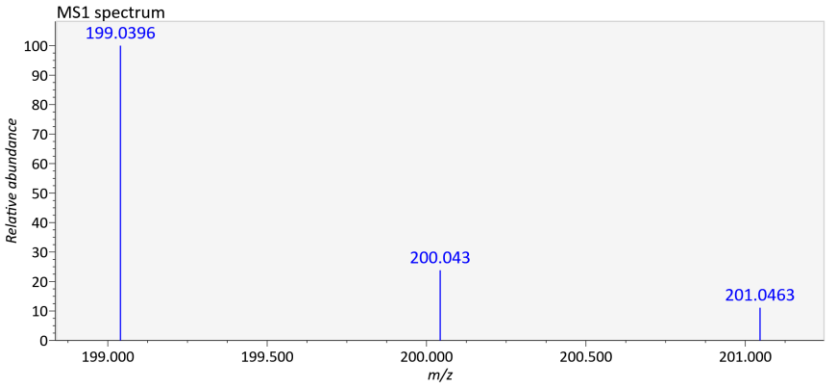


Figure 46: Spectre de masse du massif isotopique de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

MS-DIAL produit donc une liste de pics, tout comme MZmine. En l'occurrence, 724 molécules ont été trouvées dans les 8 échantillons. Afin de procéder aux identifications de ces molécules, MS-FINDER est utilisé. Ces identifications se basent sur le calcul de la formule brute de la molécule, grâce à la masse exacte et au massif isotopique.

III.1.2 Vérification des identifications grâce à la fragmentation MS^E

III.1.2.1 Par MS-FINDER

MS-FINDER est un logiciel permettant la prédiction de formules chimiques et l'élucidation de structures chimiques à partir des spectres de masse (ratio isotopiques des ions) et de fragmentation importés de MS-DIAL. Il se fie pour cela à la chémo- et la bio-informatique (Wang et al. 2016), c'est-à-dire qu'il compare les fragmentations des molécules à une fragmentation *in silico* (Tsugawa et al. 2016).

Sur la figure 47 il est possible de voir en bleu le spectre de fragmentation expérimental d'une molécule, ici la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et le spectre de fragmentation *in silico*, en rouge.

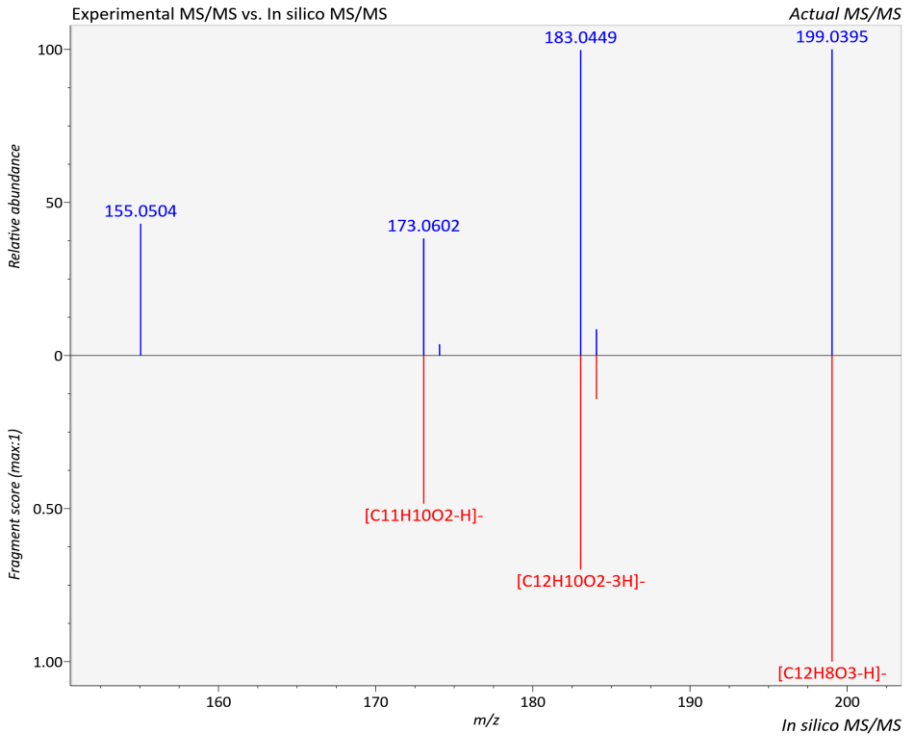


Figure 47: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

Un coefficient de similitude, appelé le « total score » est attribué à la molécule. Il varie de 1 à 10. Plus ce coefficient est élevé, plus les deux profils de fragmentation concordent et donc plus la molécule a de chances d'être celle annoncée.

De plus, MS-FINDER compare les spectres expérimentaux de fragmentation avec ceux de bases de données comme PubChem par exemple. Il classifie ensuite les structures trouvées en fonction de leur différence de masse par rapport à la masse exacte expérimentale et calcule une répartition isotopique théorique.

La liste de pics obtenue par MS-DIAL est donc travaillée par MS-FINDER. Sur les 724 molécules trouvées par MS-DIAL, MS-FINDER en a identifié 76 (voir annexe V)). Cependant, ces identifications sont faites d'après des bases de données généralistes, ces 76 molécules ne sont donc pas toutes des furocoumarines. Ces dernières ont été recherchées spécifiquement parmi les 76 identifications et deux structures semblent être des furocoumarines.

Aucune des furocoumarines identifiées par MS-FINDER d'après leur masse et leur fragmentation ne correspond à celles identifiées par MZmine. Cela peut être dû au fait que la base de données utilisée dans ces deux logiciels n'est pas la même, ou encore lié à la différence d'algorithme de détection des pics des deux logiciels.

Seules deux structures furocoumariniques (tableau 3 et figures 48 et 49) ont pour l'instant été retenues :

Tableau 3: Identifications de furocoumarines par MS-FINDER, après analyse au QTOF.

Identification	Total score	Formule brute	Masse exacte	M-H	Fragments expérimentaux	Fragments théoriques	Source biologique (littérature)
5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one	5.7426	$C_{12}H_8O_3$	200.0473	199.0396	199.0395 183.0449 173.0602 155.0504	199.0395 183.0449 173.0602	Retrouvé dans *Bothriocline lax*
Déhydropachyrrhizone	8.3411	$C_{20}H_{12}O_7$	364.058305	363.0505	363.0492 335.0555 259.1158 189.0769 112.9863	363.0492 335.0555	Retrouvé dans les graines de *Pachyrrhizus erosus*

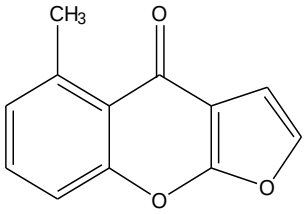


Figure 48: Formule développée de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one

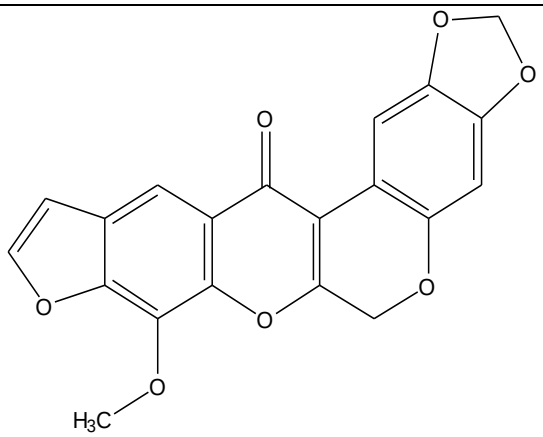


Figure 49: Formule développée de la déhydropachyrrhizone

Les spectres de masse et de fragmentation de ces deux molécules sont visibles en annexe V.

Les identifications de ces furocoumarines sont faites par MS-FINDER en fonction de la masse exacte de la molécule et du « total score », c'est-à-dire des spectres de fragmentation expérimentaux comparés aux spectres de fragmentation *in silico*.

Les spectres de fragmentation expérimental et *in silico* de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one sont présentés figure 50. Le total score de 5.7426, signant une concordance acceptable des spectres.

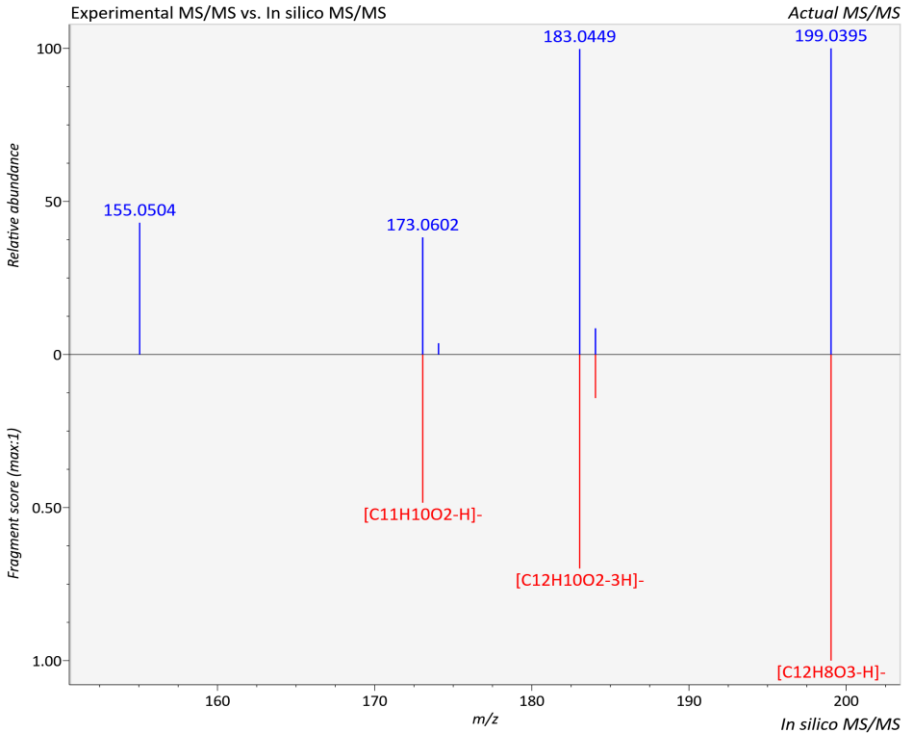


Figure 50: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one, donnés par MS-FINDER. Le total score est de 5.7426.

Il est possible de vérifier ces identifications en se basant sur les pertes de masse des molécules. En ESI négatif, les furocoumarines n'ont pas de fragmentation spécifique, elles ont des pertes de masses neutres, comme des -CO, des H_2O ou des CO_2.

La figure 51 suivante présente les pertes de masses expérimentales de la molécule identifiée comme étant la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one :

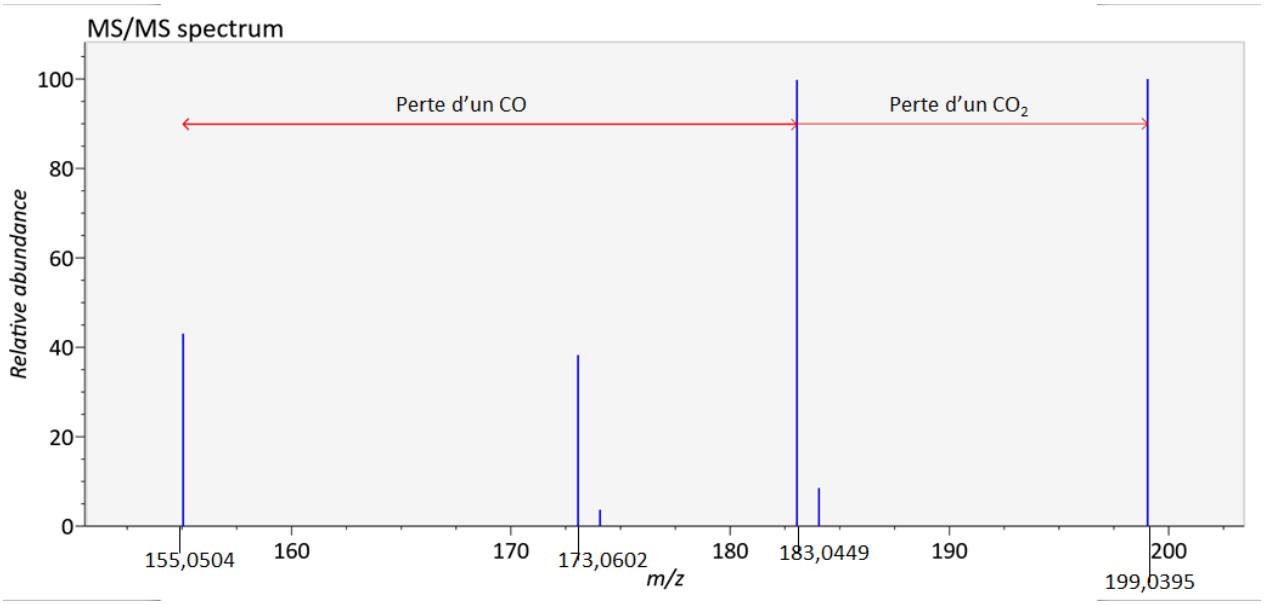


Figure 51: Perte de fragments de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

La 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one subit deux fragmentations. Elle perd à la fois un fragment de 43.9891 Da (199.0395-155.0504=43.9891), correspondant à une perte de CO_2, et un fragment de 27.9945 Da (183.0449-155.0504= 27.9945), correspondant à une perte de CO. Cette perte de masse est cohérente de celle que pourrait avoir une furocoumarine.

La même démarche a été effectuée pour la déhydropachyrrhizone.

Les spectres de fragmentation expérimental et *in silico* de la déhydropachyrrhizone sont présentés figure 52. Le total score de 8.3411, très élevé, signifie que la concordance entre ces deux spectres est pratiquement parfaite.

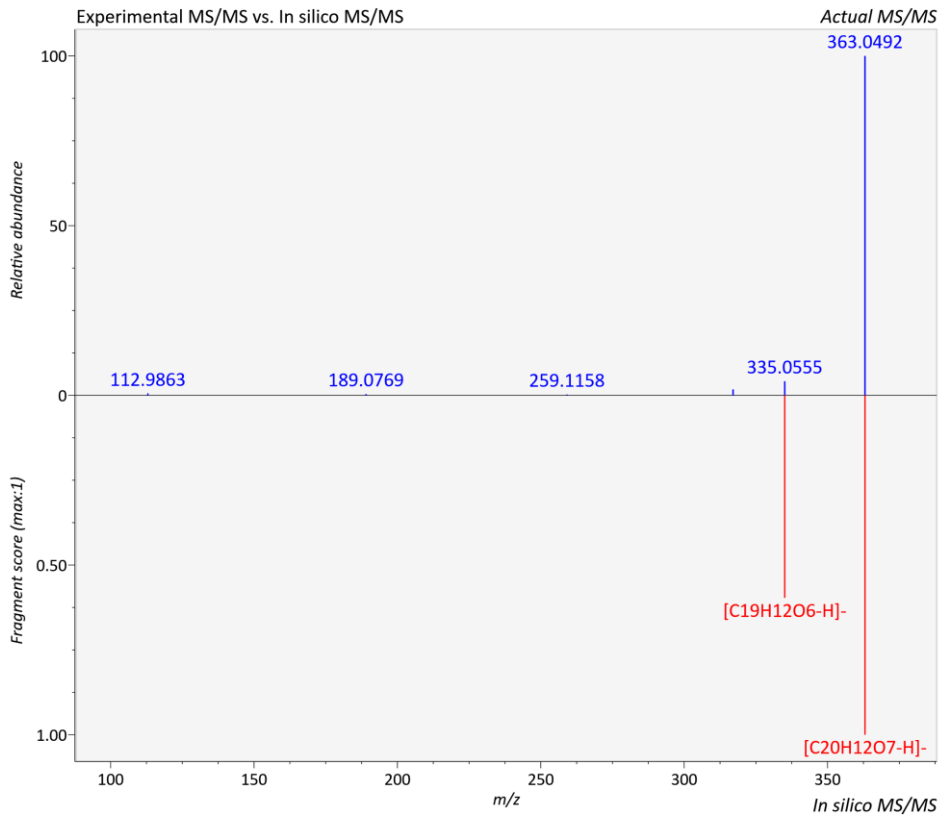


Figure 52: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la déhydropachyrrhizone, donnés par MS-FINDER. Le total score est de 8.3411.

La figure 53 suivante présente les pertes de masses expérimentales de la molécule identifiée comme étant la déhydropachyrrhizone :

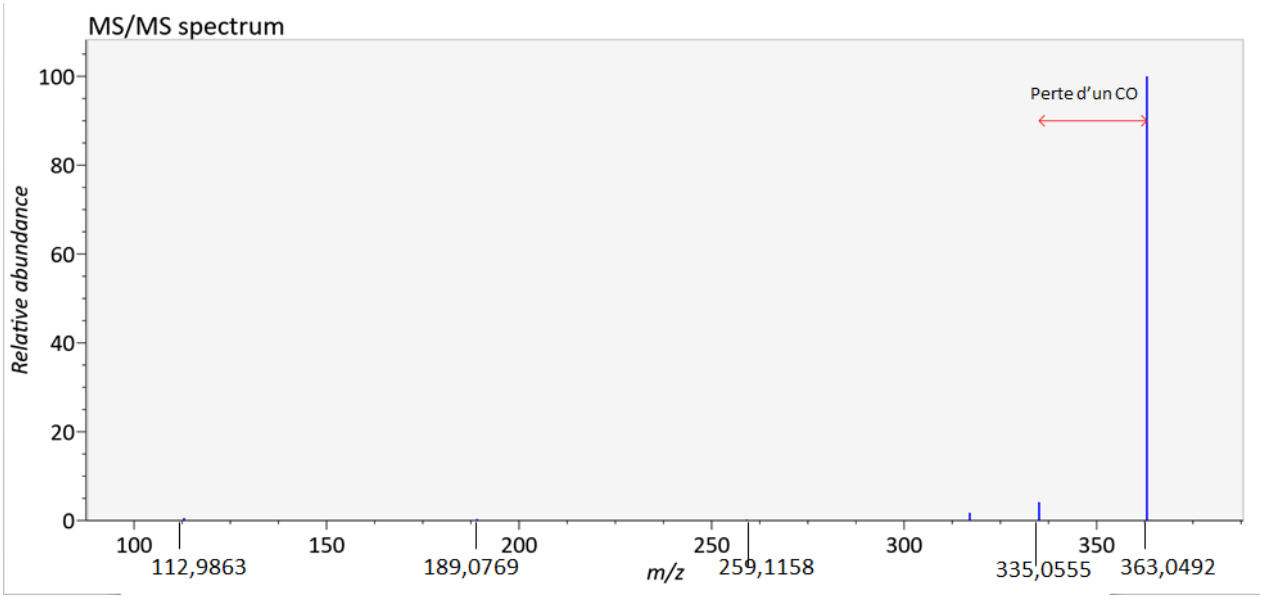


Figure 53: Perte de fragments de la déhydropachyrrhizone.

La perte de masse de cette molécule est de 27.9947 Da (363.0502-335.0555=27.9947), soit la masse d'un CO. Il est donc correct d'accepter cette structure comme étant la déhydropachyrrhizone.

En conclusion, la fragmentation de ces molécules est compatible avec celle de furocoumarines.

Nous aurions aussi pu retenir la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one ou le 3-carbethoxypsoralen (spectres en annexes V) en raison de leur structure furocoumarinique et de leurs « total scores » respectivement égaux à 8.8680 et 7.5458. Mais une autre identification possible, l'alternariol (voir figure 54), est proposée. Or, l'alternariol est un composé présent dans de nombreux champignons endophytes. Il est donc probable que cette dernière identification soit la bonne.

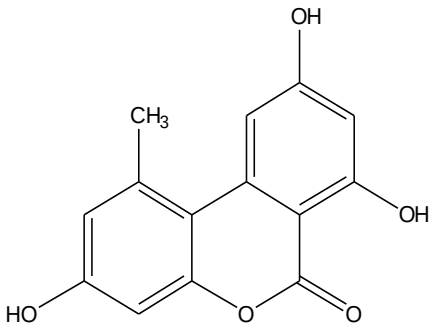


Figure 54: Formule développée de l'Alternariol.

Le massif isotopique est bien présent sur le spectre expérimental de l'alternariol (voir figure 55).

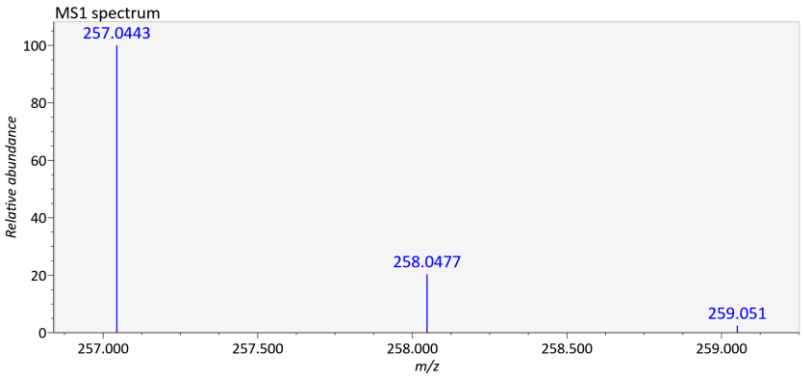


Figure 55: Spectre de masse présentant le massif isotopique de l'alternariol.

La figure 56 présente la comparaison entre la fragmentation expérimentale et la fragmentation in silico de l'alternariol. Le « total score » est très élevé et égal à 8.7454.

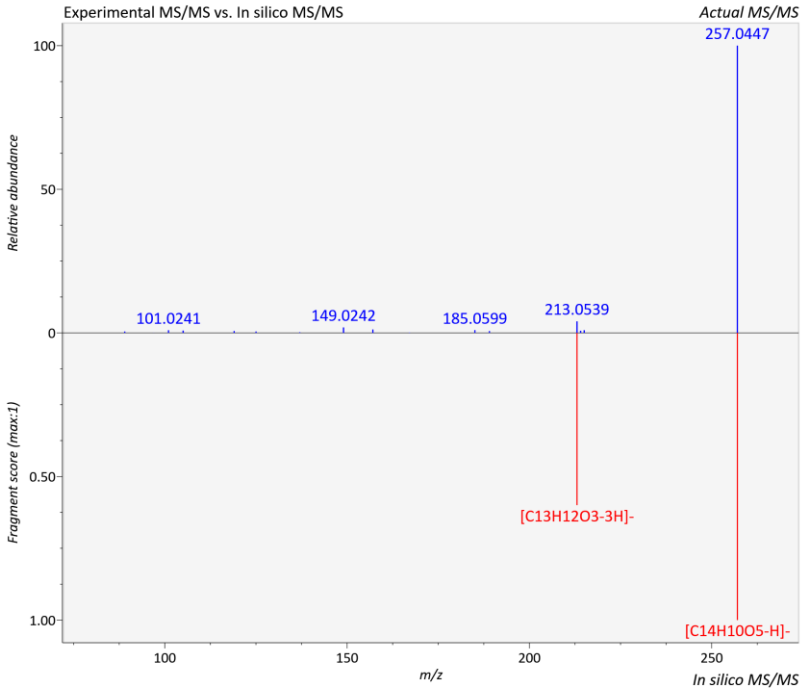


Figure 56: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de l'Alternariol.

III.1.2.2 CFM-id

La vérification de l'identification faite par MS-FINDER peut être complétée par des logiciels de fragmentation *in silico* tels que CFM-id (Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite identification) par exemple. Il prédit les spectres de fragmentation obtenus en ESI-MS (Allen et al. 2014).

Il est accessible et travaille directement en ligne (http://cfmid.wishartlab.com/) sur la base des codes « InChI » (International Chemical Identifier) Ces codes internationaux permettent de caractériser la formule développée de molécules.

Les « InChI » de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et de la déhydropachyrrhizone, respectivement InChI=1S/C12H8O3/c1-7-3-2-4-9-10(7)11(13)8-5-6-14-12(8)15-9/h2-6H,1H3 et InChI=1S/C20H12O7/c1-22-20-18-9(2-3-23-18)4-11-17(21)16-10-5-13-14(26-8-25-13)6-12(10)24-7-15(16)27-19(11)20/h2-6H,7-8H2,1H3, ont été entrés dans CFM-id. Les spectres de fragmentation *in silico* qui en sont issus sont présentés ci-dessous dans les figures 57 et 58 :

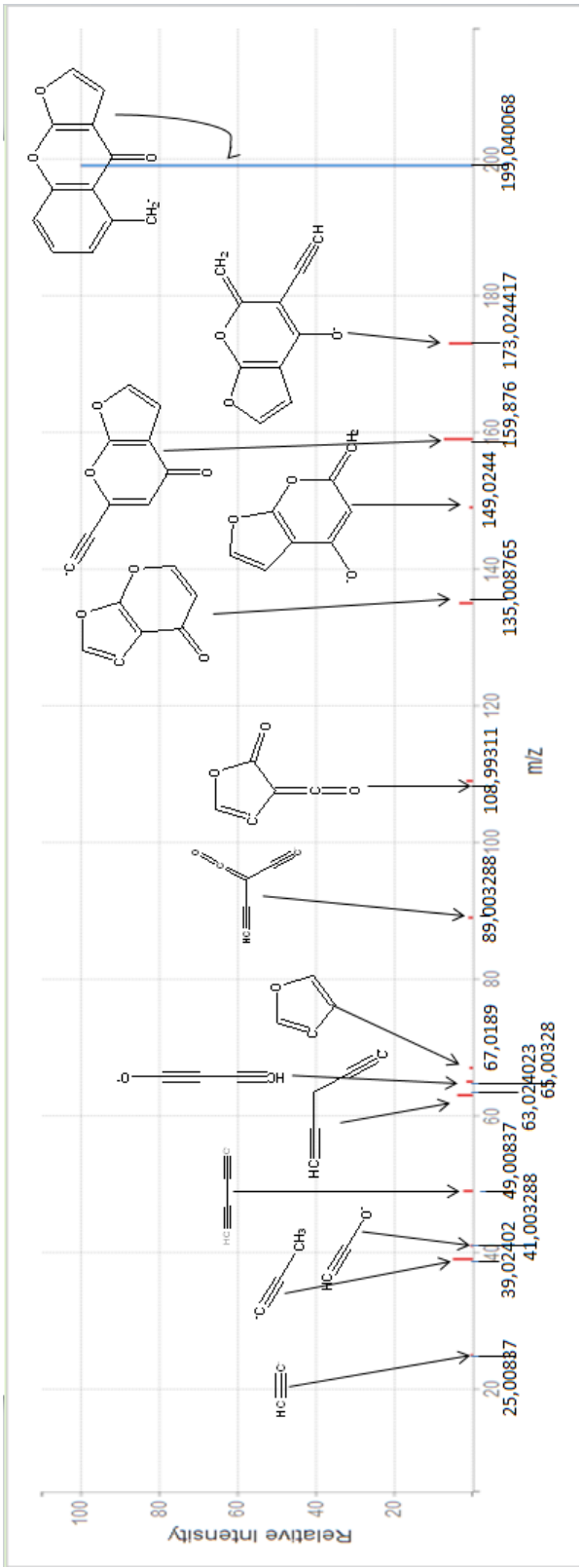


Figure 57: Spectre de fragmentation de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one obtenu par CFM-id.

Seul le fragment 173 est retrouvé à la fois avec CFMid, MS-FINDER et expérimentalement. On ne retrouve pas le fragment majoritaire 183 trouvé expérimentalement et par MS-FINDER avec CFM-id.

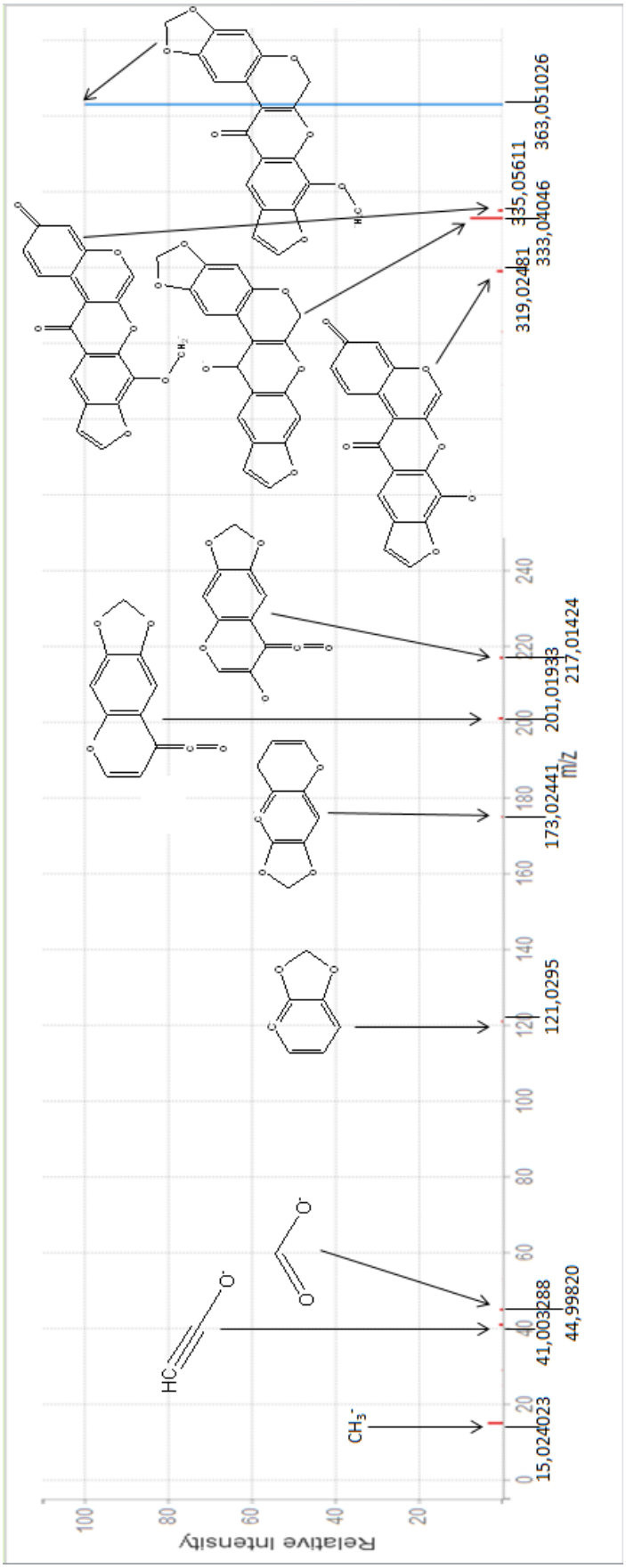


Figure 58: Profil de fragmentation de la déhydropachyrrhizone obtenu par CFM-id.

Là encore, la correspondance entre les fragmentations *in silico* de MS-FINDER et CFM-id n'est pas parfaite. Seul le fragment m/z 335, qui correspond à la perte d'un CO, est retrouvé pour les deux logiciels.

Ces différences ne remettent pas en cause les identifications de MS-FINDER. Elles soulignent plusieurs points. Le fait que l'algorithme de fragmentation utilisé n'est pas le même entre CFM-id et MS-FINDER entraîne des modifications dans les résultats. L'identification donnée par MS-FINDER est correcte dans 90.4% des cas (Tsugawa et al. 2016), tandis que CFM-id obtient une identification correcte (après comparaison avec des bases de données comme KEGG) dans 72 % des cas seulement (Allen et al. 2014).

Il est donc à retenir qu'il est nécessaire d'utiliser plusieurs logiciels de fragmentation *in silico* pour avoir une idée plus générale des fragmentations possibles d'une molécule. Dans le cas présent, et même si les deux logiciels donnent d'excellents résultats, nous privilégions ceux de MS-FINDER.

III.1.3 Conclusion

Une première série d'identifications de molécules a donc été réalisée avec succès puisque nous avons trouvé la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et la déhydropachyrrhizone dans nos extraits.

Il est à noter que ces molécules n'ont encore jamais été décrites dans les champignons endophytes.

Afin de confirmer ces hypothèses de structures par l'étude des spectres de ces molécules, nous avons souhaité utiliser un OrbiTrap équipé d'un détecteur à barrettes de diodes. Les deux spectromètres de masse étant différents, nous nous demandions aussi si les molécules détectées avec le QTOF le seraient aussi par l'OrbiTrap.

III.2 Vérification des identifications grâce aux spectres UV, obtenue par l'OrbiTrap

Les furocoumarines peuvent présenter deux profils d'absorption UV caractéristiques :

- de 250 à 300 nm, avec un maximum à 270 nm,
- de 300 à 330 nm, avec un maximum à 311 nm, qui peut se déplacer jusqu'à 320 nm.

Les analyses précédentes ne permettent pas d'obtenir les spectres UV des molécules, car la mesure de la longueur d'onde est fixée à 254 nm sur cet appareil. Il est donc décidé, de procéder à une seconde série de mesures sur un spectromètre de masse (LTQ-Orbitrap XL ETD) possédant un détecteur DAD et faisant de la fragmentation data-dépendante afin de réaliser les profils UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS.

Seuls les trois échantillons ont été analysés (le pool des six réplicas des souches 73, 181 et184) car la quantité restante des autres extraits d'endophytes est trop faible

III.2.1 Alignement des pics et identifications potentielles

Les données brutes (.raw) sont téléchargées dans MZmine, puis les pics chromatographiques des trois échantillons sont alignés et 1617 molécules ont été trouvées.

La liste de pics a été comparée à la liste des furocoumarines, construite d'après le Dictionary of Natural Products.

Vingt-huit molécules ont cette fois été identifiées par MZmine comme des furocoumarines (voir annexe VI). Là encore, MZmine ne se fiant qu'aux données de masse, nous avons vérifié cette liste d'identifications en utilisant les profils UV et de fragmentation des profils UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS, sachant que seul l'ion majoritaire du pic chromatographique est fragmenté (fragmentation « data-dépendante »).

III.2.2 Vérification des identifications par profils UV

Dans le même temps, les données sont entrées dans le logiciel de traitement des données UV, Xcalibur™ 3.0 qui est un logiciel traitant les données LC-MS obtenues avec des appareils ThermoScientific™.

Nous avons recherché les profils UV de chaque molécule identifiée par MZmine. Les résultats sont donnés en annexe VII.

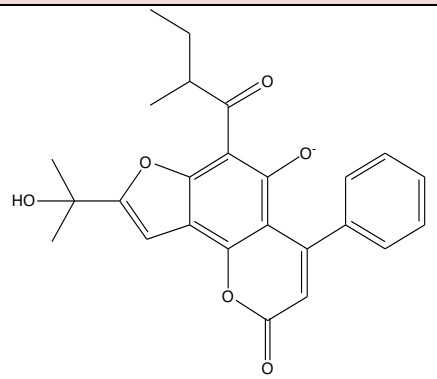
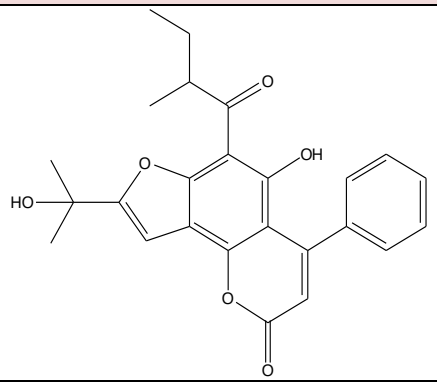
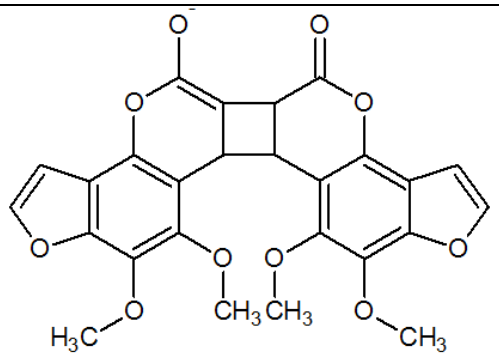
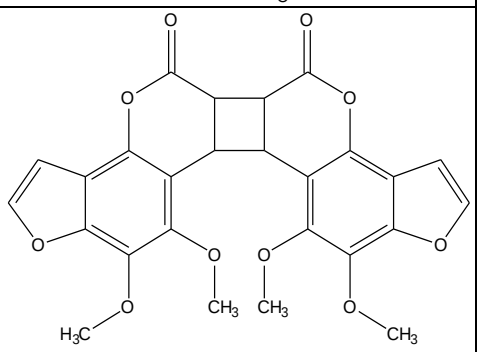
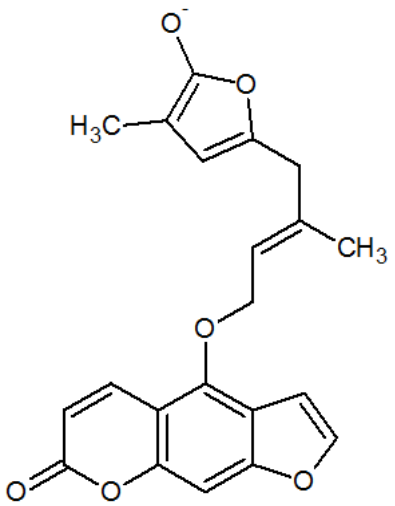
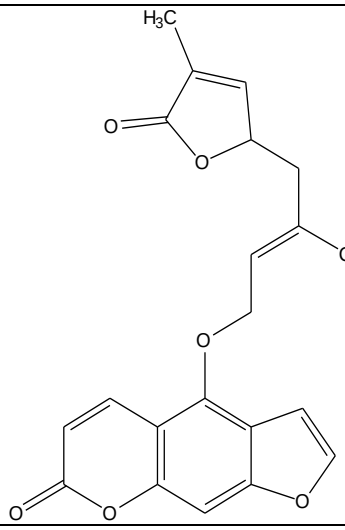
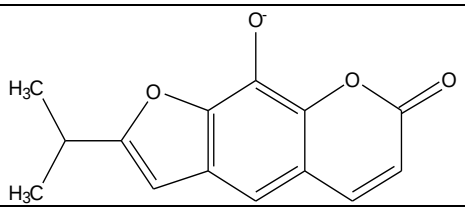
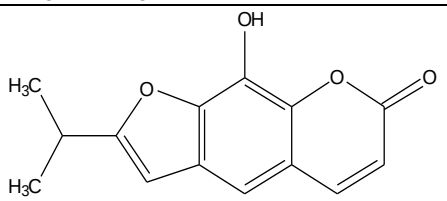
Quatre furocoumarines semblent avoir été identifiées à l'aide de ce procédé. Elles sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4: Furocoumarines identifiées grâce aux expériences menées avec l'OrbiTrap.

Nom de la molécule	Formule brute	Masse exacte (Da)	Différence de masse observée entre la masse théorique et expérimentale (ppm)	% correspondance avec le profil isotopique théorique	RT (min)	Spectre UV	Source biologique (littérature)
Ochrocarpine A	C25H24O6	420.15729	-7.6	91	2,87	260/318	Retrouvé dans l'écorce d'*Ochrocarpos punctatus*
Moellendorffiline	C26H20O10	492.10565	8,8	90,1	6,7	287/314 /329	Retrouvé dans les racines d'*Esenbeckia grandiflora* et d'*Heracleum moellendorffii* var. *paucivitatum*
Anisolactone	C21H18O7	366.11034	-0,8	94,5	7,78	270	Retrouvé dans *Clausena anisata* et *Murraya koenigii*
Anhydrorutarétine	C14H12O4	244.07356	0,6	95,5	7,66	270/308	Retrouvé dans *Apium leptophyllum*

Le tableau 5 suivant montre les formules développées des molécules identifiées, ainsi que celles de leurs ions associés :

Tableau 5: Formules développées des structures identifiées par UHPLC-DAD-QTOF.

Identité	Propositionsde structures chimiques des ions observés	Formule développée de la molécule
Ochrocarpine A		
Moellendorffiline		
Anisolactone		
Anhydrorutarétine		

Le croisement entre les bases de données et la masse exacte des composés nous laisse à penser que ces structures sont correctes. Cependant, nous émettons des réserves quant à ces identifications, dans la mesure où l'ionisation ESI^- est particulièrement bien adaptée pour identifier sélectivement des composés comprenant des fonctions phénol ou acide carboxylique, voire énol, c'est-à-dire d'une manière plus générale des molécules possédant des protons portés par des hétéroatomes (oxygène, azote). Les formes chargées de la moellendorffiline et de l'anisolactone présentent une forme possible d'énol conjugué d'ester, qui est rarement retrouvé dans la littérature.

Le seul moyen permettant de répondre à cette question serait la co-injection d'une molécule standard.

Toutes ces furocoumarines ont été retrouvée exclusivement dans la souche 181, dont le génome n'a pas pu être séquencé et dont nous ne connaissons donc pas le genre. Étant donné que seules trois souches ont été analysées en OrbiTrap, il est nécessaire de refaire les cultures et les analyses pour confirmer ces hypothèses quant à la prévalence de certaines molécules dans la souche 181.

La confirmation de ces résultats par les données de fragmentation MS/MS n'a pas pu se faire : aucune de ces molécules n'est la molécule majoritaire du pic chromatographique dont elle est issue. De plus, elles ne sont pas retrouvées dans la liste de pics de la première série d'analyse en MS^E : aucune donnée de fragmentation n'est donc accessible pour ces molécules.

Par ailleurs, cette série de molécules est différente de celle obtenue avec le QTOF, malgré le fait que les deux appareils utilisés montrent une même précision dans la détermination de la masse exacte. Cette différence d'identification a déjà été retrouvé dans la littérature (Glauser et al. 2013). Dans ce document, les performances de deux spectromètres de masse, un QTOF et un OrbiTrap, couplés à une UPLC, ont été comparées en termes de quantité et de qualité de structures identifiées, de différences entre différents échantillons, de répétabilité et de sensibilité. Bien que les résultats aient été trouvés similaires, il a été remarqué pour le QTOF une moins grande variabilité analytique et une meilleure précision, tandis que l'OrbiTrap démontrait une plus grande sensibilité. Les auteurs ne concluent pas à la supériorité des résultats d'un appareil sur l'autre mais au contraire que chacune de ces identifications est valable et utilisable en recherche de métabolites issus de substances naturelles.

Dans le cas qui nous concerne, il est aussi à noter que les deux expérimentations ont été réalisées à 4 mois d'intervalle, durant lesquels les échantillons ont subi plusieurs cycles de congélation-décongélation. Certaines molécules ont donc pu être dégradées et donc ne pas être retrouvées dans la liste de pics de l'OrbiTrap.

L'ochrocarpine A est une furocoumarine cytotoxique qui a été isolée pour la première fois en 2002 dans l'écorce d'*Ochrocarpos punctatus*., une plante originaire de la forêt

tropicale de Madagascar (Chaturvedula, Schilling, and Kingston 2002). Depuis, elle a été retrouvée dans *Mammea neurophylla* (Dang et al. 2015), et a montré des propriétés inhibitrice sur la glycation des protéines et de protection contre le vieillissement endothélial (Dang et al. 2014).

La moellendorffiline a été isolée dans les racines d'*Esenbeckia grandiflora* (une Rutacéee) et d'*Heracleum moellendorffii* var. *paucivitatum* (une Ombellifère) (Wu et al. 1986) ou encore *Pleurospermum govanianum* (Rao et al. 1995).

L'anisolactone est une furocoumarine qui a été décrite pour la première fois dans *Clausena anisata*, une plante de la famille des Rutacées (Lakshmi et al. 1984).

L'anhydrorutarétine est retrouvée dans *Apium leptophyllum* (Ombéllifère) en 1980 (Sharma, Rattan, and Sharma 1980).

Aucune de ces furocoumarines n'a été décrite dans les champignons endophytes jusqu'à ce jour.

III.3 Réseaux moléculaires : identification potentielle de nouvelles furocoumarines

Le GNPS (https://gnps.ucsd.edu) est une infrastructure en ligne permettant de partager et traiter les données de MS^E simplement en téléchargeant la liste de pics de MS-DIAL.

Le logiciel crée ensuite des réseaux mettant en relation les pics alignés dans MS-DIAL entre eux. Les réseaux permettent la visualisation des différences et des relations existant entre les ions vus dans les spectres de masse. On obtient alors des clusters d'ions permettant la déréplication des métabolites d'intérêt présents dans les échantillons.

Chaque point représente une masse et chaque lien entre les points est fonction de la différence de masse des deux points ainsi que des données de fragmentation MS^E. Deux points dans un même cluster sont liés entre eux par leurs données de fragmentation et les molécules associées à ces points auront donc des structures très proches.

Malgré toutes les avancées possibles grâce au GNPS, la visualisation des réseaux moléculaires n'est pas parfaite. Il faut donc faire intervenir un dernier logiciel, Cytoscape.

Cytoscape est une plateforme permettant de visualiser des réseaux moléculaires du GNPS de façon très sophistiquée, en leur attribuant des données comme la différence de masse entre deux ions. Un exemple est donné ci-dessous (voir figure 59) :

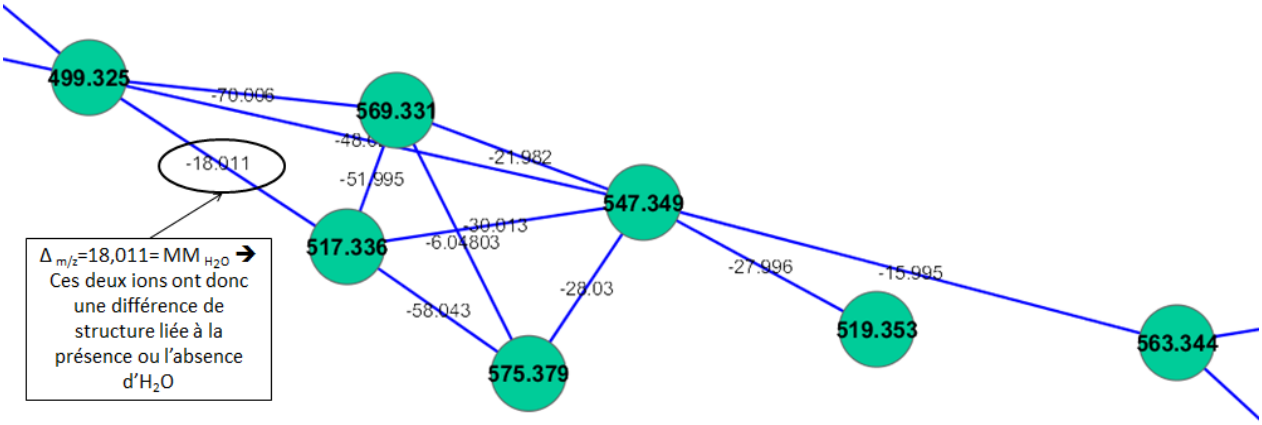


Figure 59: Exemple de fonctionnement de Cytoscape. Les ions et leurs masses sont associés à un point (en vert) et le réseau les relie entre eux en fonction de leurs différences de masses et d'autres paramètres tels que le profil de fragmentation. Ici, les deux ions de 499.325 Da et 517.336 Da ont une différence de masse de 18.011, ce qui correspond à la masse d'une molécule d'eau. L'ion de 517.336 Da possède dont un groupement H_2O supplémentaire par rapport à l'ion de 499.325 Da. D'autres paramètres interviennent dans la mise en relation de deux ions.

Pour la création de ce réseau, nous avons utilisé la liste de pics de MS-DIAL obtenue lors de la première série d'analyses en UPLC-QTOF-MS^E.

Cytoscape prend seulement en compte dans son réseau moléculaire les ions montrant une ressemblance avec d'autres ions. Ainsi, sur la liste de 724 molécules traitées par le GNPS puis Cytoscape, seules 227 ont été inclues dans le réseau.

Il est possible grâce à ces réseaux moléculaires d'extrapoler la présence de molécules : deux molécules d'une même famille chimique seront dans le même cluster de points. On peut ainsi prédire la présence dans un extrait de molécules n'ayant jamais été caractérisées sans que soient nécessaires une extraction suivie d'une purification, étapes lourdes et coûteuses.

La figure 60 montre les réseaux obtenus après traitement par le GNPS puis Cytoscape des données de MS-DIAL, obtenues avec le QTOF.

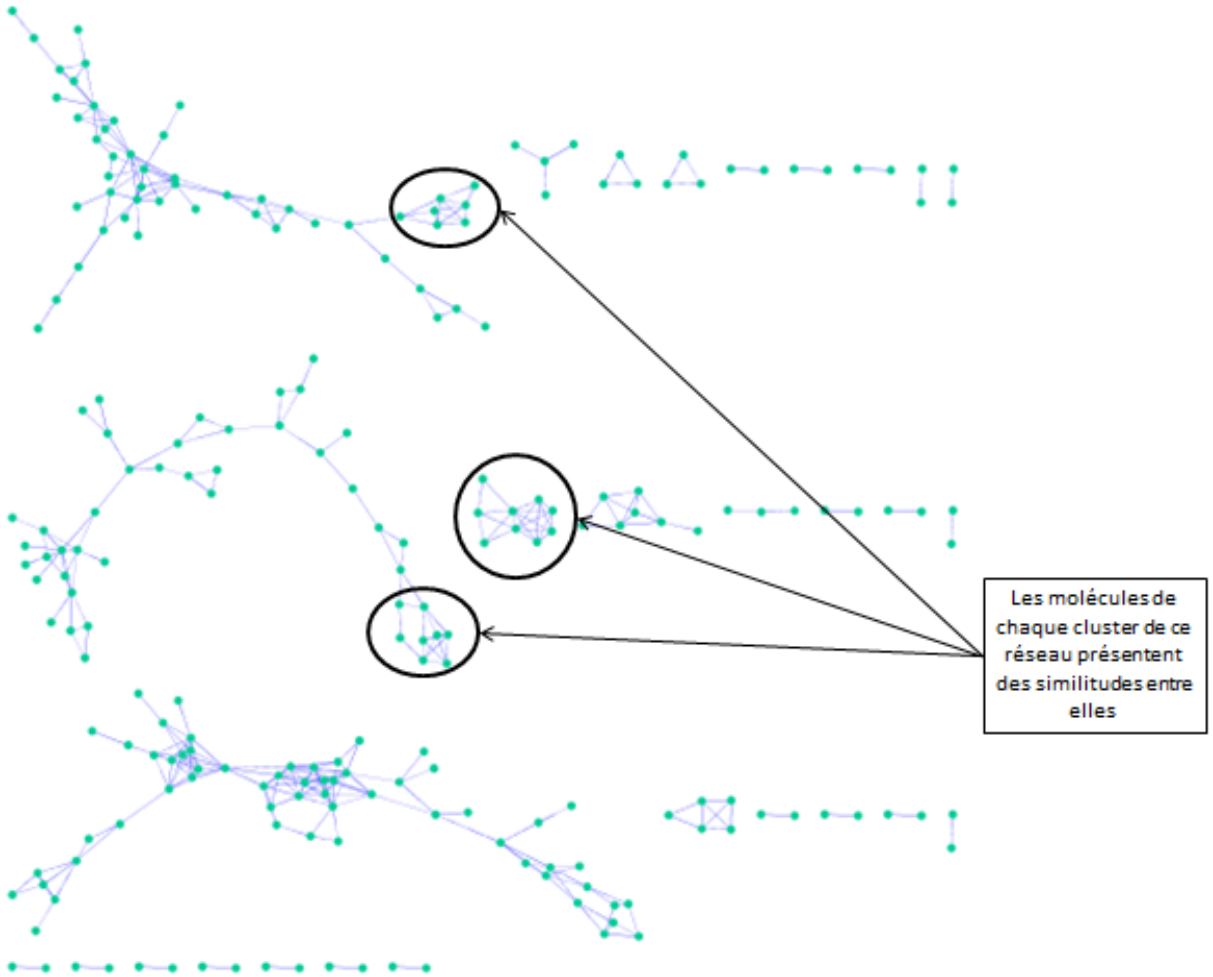


Figure 60: Réseaux moléculaires obtenus après traitement des données du QTOF par Cytoscape. Chaque point représente une masse et chaque lien entre les points est fonction de la différence de masse des deux points ainsi que des données de fragmentation MS^E.

Les masses des deux molécules identifiées par MS-FINDER ont été recherchées dans ces réseaux, mais n'ont pas été trouvées. Les paramètres entrés dans le GNPS sont donc à améliorer. Cela fera l'objet d'un travail ultérieur.

IV. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons détaillé les différentes étapes du travail de déréplication des furocoumarines dans les extraits d'endophytes. Les molécules de cette famille possèdent un potentiel d'inhibition sur la SOD et, en outre, sont photoactivables, ce qui rend les rend très intéressantes d'un point de vue médical et curatif.

Une première analyse en LC-HRMS a été réalisée. Les profils chromatographiques obtenus ont été alignés entre eux grâce à deux logiciels : MZmine et MS-DIAL. La liste de pics assortie de leurs masses et profils de fragmentation a ensuite été comparée à une base de données de furocoumarines issue du Dictionary of Natural Products. Plusieurs molécules ont été identifiées par MZmine comme étant des furocoumarines.

Cette identification préalable a été vérifiée à l'aide du profil de fragmentation MS^E par MS-DIAL et MS-FINDER : en effet, MZmine ne s'appuyant que sur la masse exacte des molécules pour ses identifications, il ne peut différencier les isomères ayant une même formule brute. La liste de pics produite par MS-DIAL n'est pas la même que celle de MZmine, ce qui est explicable par la différence d'algorithmes entre les deux logiciels, mais aussi par la différence entre les bases de données utilisées. Nous avons pu identifier deux molécules : la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et la déhydropachyrrhizone.

Une seconde série d'analyses a été faite par un OrbiTrap équipé d'un détecteur à barrettes de diodes et faisant de la fragmentation « data-dépendante » MS/MS. Nous avons à nouveau aligné et identifié les m/z grâce à MZmine. Puis nous avons recherché, dans les masses identifiées par MZmine comme étant des furocoumarines, si certaines présentaient le spectre caractéristique de cette classe de molécules, à l'aide de Xcalibur.

Nous avons ainsi pu identifier quatre autres furocoumarines : l'Ochrocarpine A, la Moellendorffiline, l'Anisolactone et l'Anhydrorutarétine, sans pouvoir confirmer ces résultats par les données de fragmentation : ces molécules n'étant pas majoritaires dans les pics chromatographiques, elles n'ont pas été fragmentées.

Ce travail a donc *a priori* permis l'identification de six furocoumarines. La complémentarité des deux appareils pour la recherche de composés est ici bien illustrée.

Enfin, étant donné le peu d'échantillons analysés, il est prématuré d'en tirer des conclusions quant aux espèces d'endophytes dans lesquelles les furocoumarines sont plus susceptibles d'être rencontrées.

Il s'agit là d'une identification de première intention, qui constitue cependant une première, dans le sens où aucune de ces molécules n'a jamais été décrite dans des champignons endophytes. Afin d'avoir la certitude qu'elles sont présentes dans les extraits, il faudrait procéder à leurs extractions, leurs purifications et leurs analyses en RMN. Enfin, la co-injection d'un standard parachèverait l'identification.

Nous soulignons aussi le côté limitant, bien que complémentaire, du grand nombre de logiciels et de bases de données utilisés. Aucun ne regroupe l'ensemble des fonctionnalités nécessaires à la déréplication et l'identification de composés d'intérêt.

En parallèle de ce travail, un fractionnement de certains extraits d'endophytes est en cours. La souche 85 a été cultivée en grande quantité - 2 m^2 de culture ont été ensemencés- puis extraite par le Dr. Mohamed Haddad. Les deux grammes d'extraits brut obtenus ont été fractionnés par MPLC et des peptides d'intérêt sont en cours d'identification.

En l'absence d'un test fiable permettant d'attester de l'activité des furocoumarines sur la SOD, il est impossible de procéder au fractionnement bio-guidé des extraits. Il est aussi impossible sans ces résultats biologiques de mettre en place un réseau de neurones qui pourrait identifier les molécules candidates à l'inhibition de la SOD.

Nous avons tenté, dans le chapitre suivant, de mettre au point un test permettant de connaître l'activité de la SOD dans les extraits étudiés.

CHAPITRE IV : MISE AU POINT D'UN TEST ENZYMATIQUE DE DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ DE LA SOD

I. Introduction

L'objectif de ce travail de thèse est de trouver des inhibiteurs de la SOD dans des substances naturelles.

Pour cela, il nous faut à présent mettre au point un test nous permettant de détecter la présence de molécules inhibitrices de la SOD dans les différents extraits bruts provenant de substances naturelles, ainsi que dans les fractions de ces extraits, afin de procéder à un fractionnement bio-guidé. Enfin, une fois la molécule candidate isolée, ce test nous confirmerait ou infirmerait notre hypothèse en re-testant la molécule pure.

De nombreux tests permettent de déterminer une activité anti-oxydante. Ce sont des tests généralistes, évaluant l'activité anti-oxydante générale d'un extrait et procédant de l'arrachage d'un proton. Nous pouvons citer en exemples les tests au DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ou à l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) (Moon and Shibamoto 2009).

Mais il existe aussi des tests spécifiques de l'anion superoxyde.

La plupart de ces tests, cités dans la littérature, mettent en œuvre un mécanisme indirect, c'est-à-dire répondant au schéma général suivant :

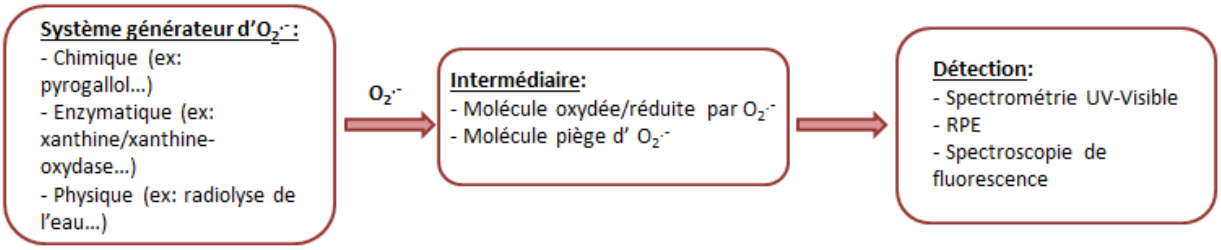


Figure 61: Mécanisme d'action général des tests de détection de l'activité SOD.

Les systèmes générateurs d'anions superoxydes peuvent être chimiques, (comme le pyrogallol (Marklund and Marklund 1974)), enzymatiques (comme le système xanthine/xanthine-oxydase (McCord and Fridovich 1968)) ou encore physiques (comme la radiolyse de l'eau (Dzaugis, Spivack, and D'Hondt 2015) (voir figure 61).

La radiolyse de l'eau consiste à irradier de l'eau pure *in vitro* à l'aide d'une source radioactive (en général du ^{137}Cs ou du ^{60}Co). Il y a alors production de différentes espèces, majoritairement radicalaires mais aussi moléculaires : des électrons hydratés, $OH^{\cdot}$, $H^{\cdot}$, H_2, H_2O_2, H^+, chacun défini par son rendement d'ionisation. Dans un second temps, grâce à l'ajout de différents réactifs, il est possible d'orienter ces différentes espèces vers la

production d'$O_2^{\cdot-}$ et de $HO_2^{\cdot}$ En équilibre acido-basique, grâce à l'adjonction d'acide formique en milieu oxygéné.

Cependant, malgré ses avantages, la radiolyse de l'eau est une technique trop lourde et coûteuse pour être utilisée en routine dans la recherche en substances naturelles.

Afin de mettre en évidence une production d'anion superoxyde, il existe de nombreuses sondes, qui peuvent être colorimétriques ou fluorescentes (Zhang, Tang, and Ding 2005). Elles sont disponibles sur le marché et permettent de déterminer la présence ou non d'anion superoxyde. Elles se distinguent par leur différence de spécificité vis-à-vis de l'$O_2^{\cdot-}$ et pour les fluorescentes leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission et l'intensité de leur fluorescence.

Enfin, des tests sur cellules vivantes peuvent être pratiqués. Ils utilisent souvent des marqueurs spécifiques des mitochondries, centres de production d'anions superoxydes.

Force est de constater que les tests permettant de déterminer l'activité de la SOD sont peu nombreux et pour la plupart peu fiables : il peut y avoir des interférences à tous les niveaux de la chaîne du test (production d'anion superoxyde, sonde de détection). Cela peut entraîner des faux négatifs ou au contraire des faux positifs.

Dans ce chapitre, nous aborderons la mise au point d'un test colorimétrique rapide, sensible et peu coûteux, pouvant être utilisé en routine, à partir des principaux tests utilisés dans la littérature.

Nous avons donc cherché à améliorer la performance des tests classiques. Pour le test au cytochrome C, nous avons travaillé sur les extraits à l'acétate d'éthyle de deux plantes tunisiennes : *Ormenis africana* et *Ormenis scariosa*. Puis nous avons étendu le champ de nos investigations au test au pyrogallol, que nous avons mis au point sur des extraits de champignons endophytes caractérisés dans les chapitres II et III. Ces extraits étant très colorés, travailler sur des tests colorimétriques était un pari risqué.

Pour tous les tests, nous avons souhaité utiliser le LCS-1, inhibiteur spécifique synthétique de la SOD (Somwar et al. 2011), en tant que témoin positif de l'inhibition de la SOD. Mais nous avons rencontré des problèmes concernant la solubilité de cette molécule. Après avoir testé de nombreux solvants, dont le DMSO, nous avons contacté les auteurs de la publication dans laquelle le LCS-1 était étudié afin qu'ils nous précisent dans quelles conditions ils avaient réellement testé cet inhibiteur. Nous n'avons pas obtenu de réponse de leur part. Nous avons donc utilisé le DEDTC comme témoin positif de l'inhibition de la SOD.

II. Mise au point des tests

Les tests détaillés dans ce chapitre sont les suivants :

- test au cytochrome C,
- test au WST-1,
- test au Mito-SOX™
- test au pyragallol.

Les échantillons que nous avons testés sont les suivants :

- extraits à l'acétate d'éthyle d'*Ormenis africana* et *Ormenis scariosa*, repris dans de l'acétate d'éthyle, donc deux échantillons, testés sur le test au cytochrome C,
- extraits à l'acétate d'éthyle de 197 souches d'endophytes, repris dans de l'acétate d'éthyle. Sur ces 197 échantillons, seuls les 86 premiers ont été testés sur le test au pyrogallol, par manque de temps.
- extraits à l'acétate d'éthyle de 8 souches sélectionnées sur leur activité supposée sur la SOD, repiquées sur 6 boîtes de Pétri par souches, repris dans du méthanol, donc 48 échantillons, testés sur le test au pyrogallol,
- pool des 6 réplicas des 8 souches sus-citées dissous dans le méthanol, donc 8 échantillons, testés sur le test au pyrogallol.

II.1 Test au Cytochrome C

II.1.1 Principe et mise au point du test

Ce test fait intervenir le système enzymatique xanthine/xanthine-oxydase comme générateur d'anion superoxyde. Cette espèce oxygénée est produite au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase. L'anion superoxyde produit est alors capable de réduire le cytochrome C présent dans le milieu réactionnel. La formation de cytochrome C réduit se caractérise en spectroscopie UV visible par l'apparition d'une bande d'absorption à 540 nm (McCord and Fridovich 1968) (voir figure 62).

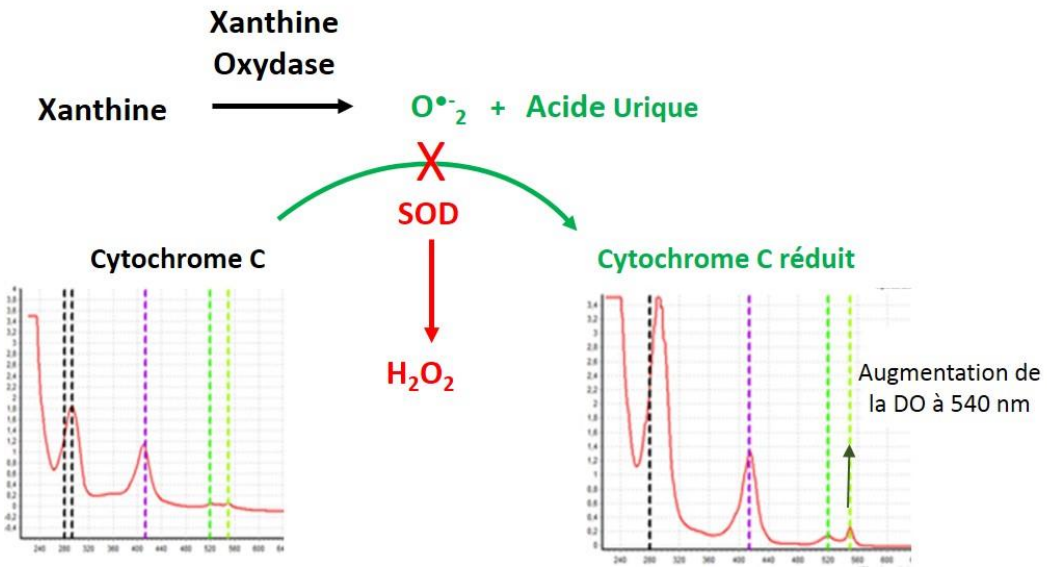


Figure 62: Conséquences spectrales de l'activité de la SOD.

Si de la SOD est rajoutée dans le milieu, l'anion superoxyde produit par le système xanthine/xanthine-oxydase sera dismuté et transformé en H_2O_2. Nous observerons alors une diminution du taux de cytochrome C réduit et de la bande caractéristique à 540 nm (voir figure 63 et 64).

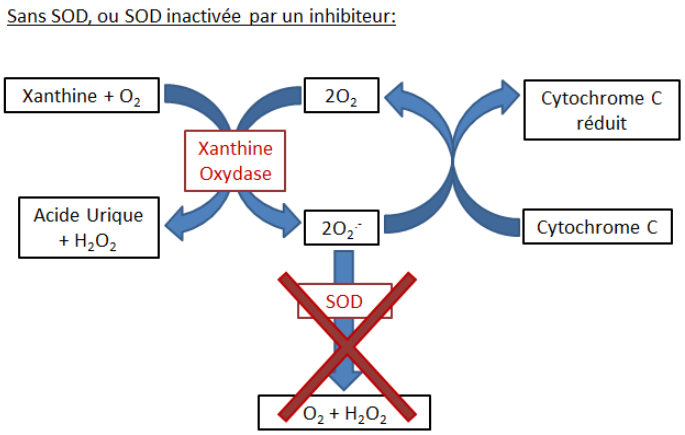


Figure 63: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactivée: la réduction cytochrome C n'est plus inhibée par la SOD.

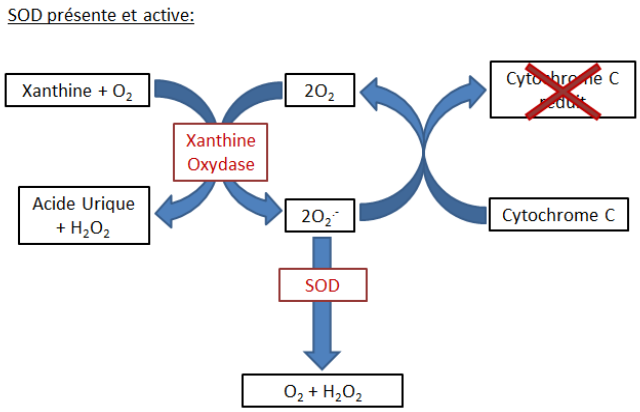


Figure 64: Fonctionnement du test lorsque la SOD est présente et active: la réduction cytochrome C est inhibée par la SOD.

La concentration en xanthine-oxydase a été fixée d'après les données de la littérature à 50 mU/mL.

La xanthine peut être présente en excès dans le milieu réactionnel puisqu'elle n'absorbe pas entre 500 et 600 nm et son excès n'influe pas le test. Elle ne doit pas être le réactif limitant. Sa concentration finale est donc fixée à 0.5 mM.

Les concentrations optimales en cytochrome C, SOD et en échantillons ont ensuite été déterminées en réalisant différentes gammes de concentration.

Des concentrations finales de cytochrome C variant de 1 µM à 25 µM entraînent une variation de l'absorbance à 550 nm de 0.145 UA à 0.2 UA, avec un plateau atteint pour une concentration de 12 µM. Il a donc été décidé que cette dernière concentration en cytochrome C est optimale.

En utilisant les concentrations précédentes en réactifs, la concentration en SOD a été déterminée. Elle est fixée de façon à ce qu'elle inhibe 50 % de la réduction du cytochrome C, afin de pouvoir visualiser autant des inhibiteurs que des activateurs de la SOD. Une variation de la concentration en SOD de 1 U/mL à 50 U/mL entraîne une inhibition de la réduction du cytochrome C à 550 nm respectivement de 0 % à 10 %, en suivant une courbe de saturation. La concentration finale de SOD qui inhibe 50 % de la réduction du cytochrome C est déterminée à 30 U/mL.

Enfin, la concentration en échantillon a été fixée en fonction de l'absorbance des extraits d'*Ormenis*. C'est la plus forte concentration qu'il est possible de tester en conservant une absorbance inférieure à 1 UA à 550 nm. Cependant, cette absorbance est dépassée dans les tests réalisés. Il faut donc prendre en compte le fait qu'à ces valeurs d'absorbance, la proportionnalité de l'équation de Beer-Lambert n'est pas optimale.

En utilisant ces concentrations optimisées et en suivant le protocole présenté dans le chapitre V, nous avons obtenu les spectres suivants pour les témoins du test xanthine/xanthine-oxydase/cytochrome C, avant et après ajout de la SOD (voir figure 65) :

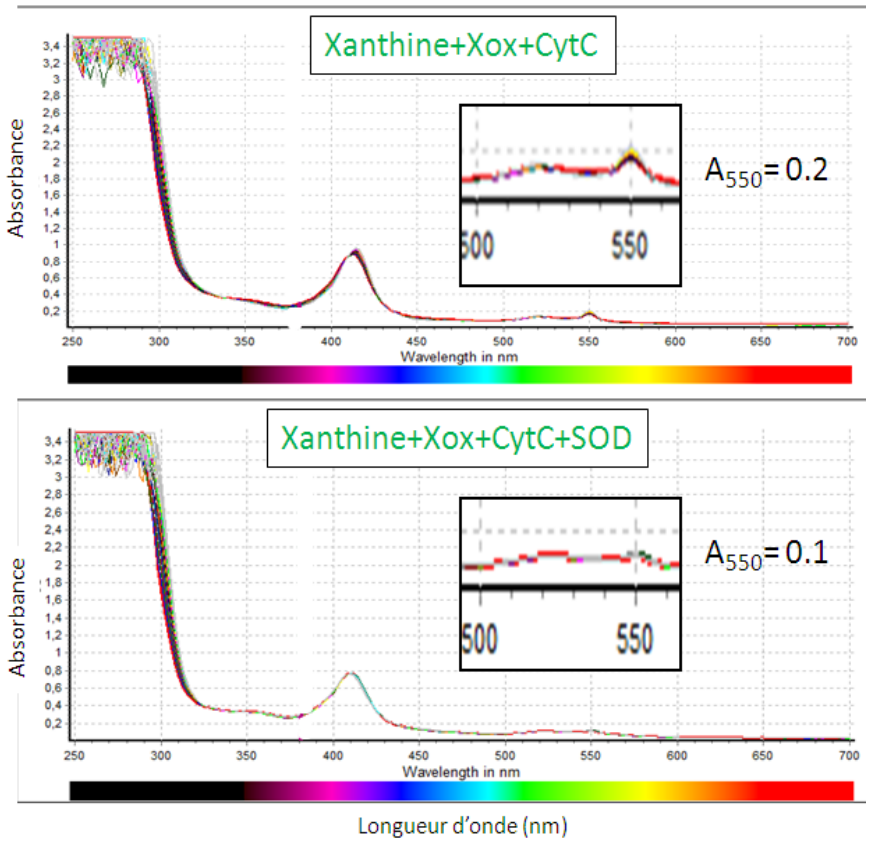


Figure 65: Témoins xanthine/xanthine-oxydase/cytochrome C avec et sans SOD.

Sur ces spectres, nous pouvons voir l'absorbance des solutions après 5 minutes d'incubation à température ambiante des deux témoins : avec et sans SOD.

Plusieurs pics sont observés :

- celui entre 280 et 293 nm signale la consommation de xanthine,
- celui à 414 nm correspond au cytochrome oxydé,
- enfin, ceux à 520 et 550 nm montrent l'apparition de cytochrome C réduit. Ce sont ceux qui sont suivis lorsque l'on recherche une inhibition ou une activation de la SOD.

Notons la très faible différence d'absorbance qui existe à 550 nm entre les témoins avec et sans SOD. Nous n'arrivons pas à obtenir une variation d'absorbance supérieure à 0.1 unité. Bien que le cytochrome C soit aussi couramment utilisé pour la détection de l'activité SOD, sa réactivité avec le superoxyde est trop élevée pour déterminer de faibles niveaux d'activité de la SOD.

II.2 Test au WST-1

II.2.1 Principe du test au WST-1

Nous avons souhaité explorer le test colorimétrique au WST-1 car il a été utilisé pour caractériser l'action du LCS-1 (inhibiteur synthétique et spécifique) sur la SOD (Somwar et al. 2011).

Une méthode indirecte utilisant du nitro bleu de tétrazolium, analogue du WST, est souvent appliquée en raison de sa commodité (Xu et al. 2013). Cependant, il existe plusieurs inconvénients à ce procédé, comme une mauvaise solubilité dans l'eau du formazan et sa réaction avec la forme réduite de la xanthine oxydase. Bien que le cytochrome C soit aussi couramment utilisé pour la détection de l'activité SOD, sa réactivité avec le superoxyde est trop élevée pour déterminer de faibles niveaux d'activité de la SOD.

Le test au WST-1met en jeu le système xanthine-xanthine oxydase comme générateur d'anions superoxydes et le WST-1 (2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfo-phényl)-2H-tétrazolium, sel monosodique) pour la détection de cette espèce réactive de l'oxygène. Ce dérivé du bleu de tétrazolium est un composé hautement soluble dans l'eau. Il produit un colorant, le WST-1 formazan, qui absorbe à 450 nm, soluble dans l'eau lors de la réduction avec un anion superoxyde (Peskin and Winterbourn 2000) (voir figure 66).

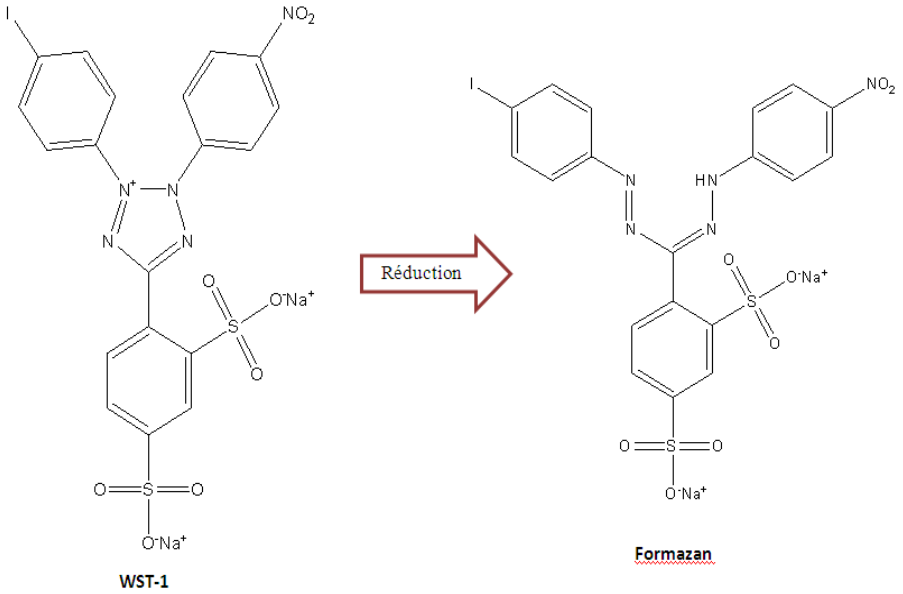


Figure 66: formules développées du WST-1 et du Formazan.

En présence de SOD (voir figure 67), la vitesse de réaction de cette enzyme étant de 10^8 M^{-1} s^{-1}, les anions superoxyde seront dismutés très rapidement par cette enzyme, et n'auront pas le temps de rentrer en contact avec le WST-1 et de le réduire. L'absorbance à450 nm ne varie donc pas, ou seulement d'une manière non significative.

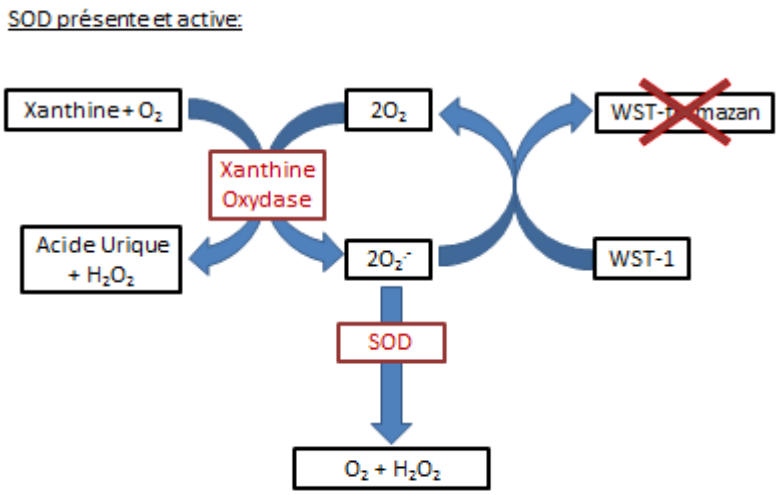


Figure 67: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente, ou inhibée. La solution finale sera alors de coloration jaune.

Lorsque l'on ajoute les échantillons à tester, si nous observons une réversion de ce phénomène, c'est-à-dire si l'absorbance à 450 nm est égale à celle observée lorsqu'il n'y a pas de SOD, nous pouvons en conclure que l'échantillon contient une molécule inhibitrice de la SOD, ou de la xanthine oxydase (voir figure 68).

Si, au contraire, l'absorbance à 450 nm augmente, nous en déduisons que l'échantillon peut contenir des activateurs de la SOD ou de la xanthine-oxydase. Il est aussi possible qu'il possède des molécules pro-oxydantes, ou des analogues de la xanthine.

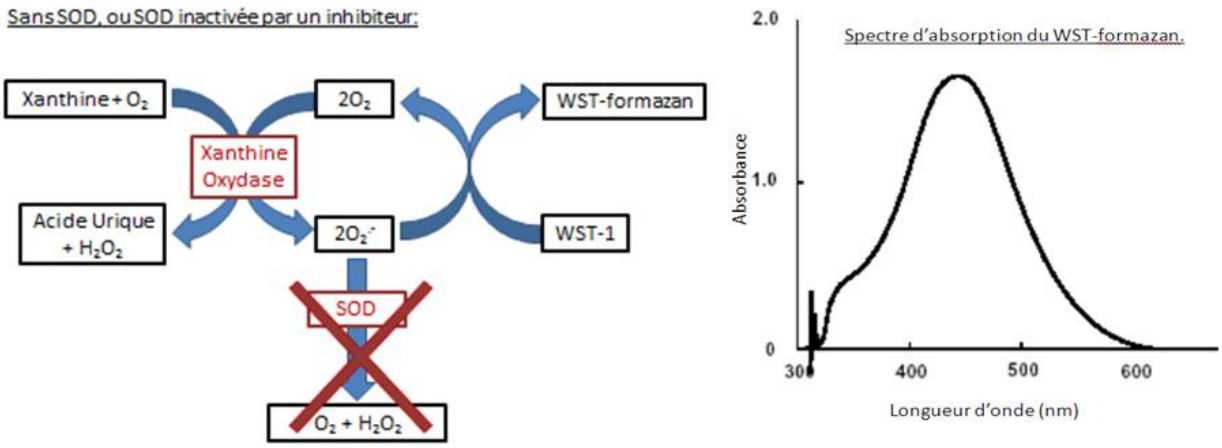


Figure 68: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente, ou inhibée. La solution finale sera alors de coloration bleue.

Le WST-1 est 70 fois moins réactif avec un anion superoxyde que le cytochrome C. Par conséquent, une détection très sensible de l'activité de la SOD est possible. La réduction du WST-1 par l'anion superoxyde est linéairement liée à l'activité de la xanthine oxydase et est inhibée par la SOD. Ce test permet donc la détermination de l'IC_{50} de molécules potentiellement inhibitrices de la SOD et d'antioxydants ayant pour cible l'anion superoxyde. Dans ce dernier cas il sera nécessaire de confirmer l'absence d'inhibition de la xanthine oxydase.

Afin de mettre au point le test sur les extraits d'endophytes nous avons étudié la réduction du WST-1 en fonction de la concentration en SOD. Notre objectif est de déterminer la concentration qui permet d'inhiber à 50% la réduction du WST-1 par l'anion superoxyde. La concentration de SOD optimale, celle qui permet d'atteindre l'IC50, est de 0.2 U/mL.

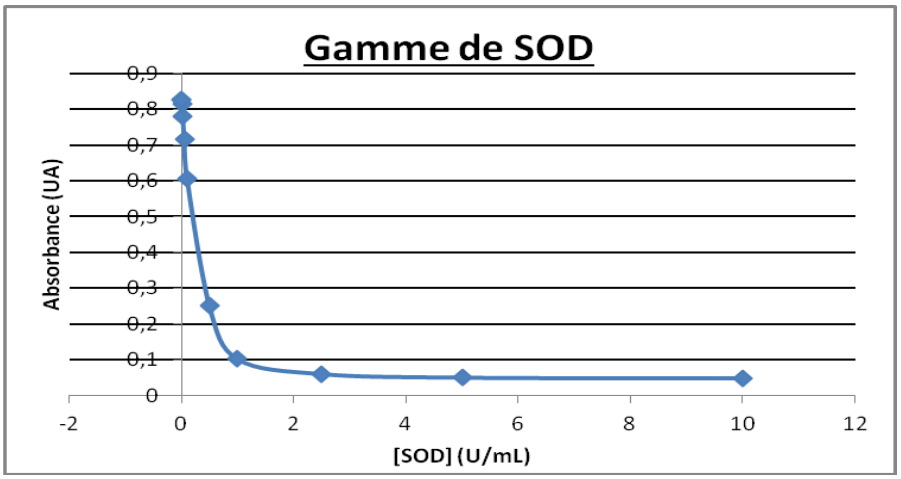


Figure 69: Gamme de SOD, permettant de déterminer l'IC_{50} de la SOD.

Afin de déterminer la concentration optimale de SOD dans l'extrait, nous avons réalisé une gamme de concentration de la SOD (voir figure 69). La concentration de SOD optimale, celle qui permet d'atteindre l'IC_{50}, est de 0.2 U/mL.

Cela nous permet en outre de voir que la variation d'absorbance est faible avec une inhibition de 50 % de l'activité de la SOD. Il sera donc difficile d'observer un inhibiteur de la SOD, même spécifique, présent par nature en faible quantité dans les extraits.

Nous voyons sur le graphique ci-dessous (voir figure 70) l'absorbance à 450 nm de la solution de WST en fonction de la concentration de DEDTC (diéthyldithiocarbamate), un inhibiteur non spécifique de la SOD, cela en présence de SOD. Plus la concentration de DEDTC est importante, plus la solution absorbe à 450 nm, jusqu'à atteindre un plateau vers 4 mM. La CI_{50} du DEDTC déterminée expérimentalement correspond à celle trouvée dans la littérature, à savoir 0.5 mM.

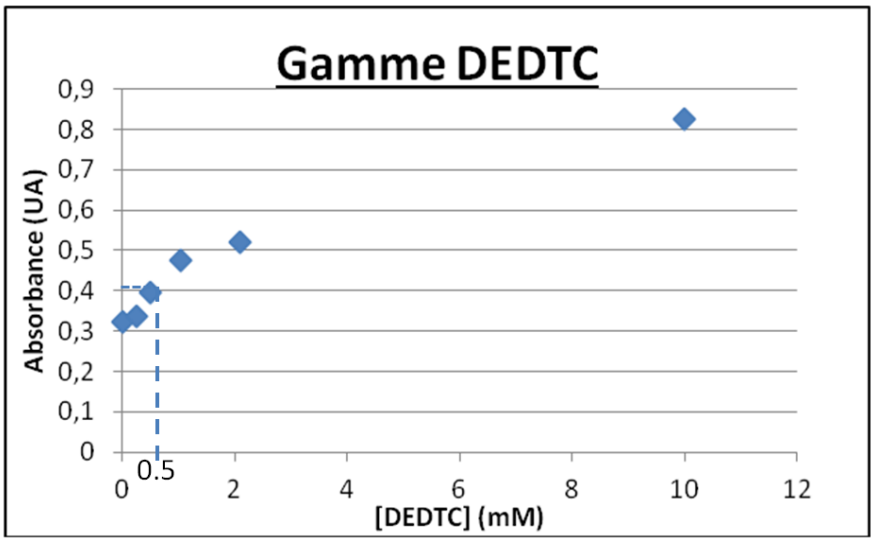


Figure 70: Gamme de DEDTC.

II.2.2 Problèmes rencontrés avec le test au WST

Les raisons pour lesquelles nous n'avons finalement pas utilisé ce test sont les suivantes : les résultats ne montrent pas de variations suffisantes de l'absorbtion à des concentrations finales en SOD de 0.2 U/mL et en suivant les conditions expériementales décrites dans le protocole commercial du test. Les absorbances varient de 0.1 à 0.2 UA. La sensibilité de ce test est donc insuffisante.

De plus, du fait qu'il s'agisse d'un kit « clefs en main », contenant 2 enzymes, ce test a un coût de revient très élevé par rapport au test au pyrogallol par exemple.

Enfin, nous avions des doutes quant à la fiabilité du test, principalement à cause de sa complexité Il n'est en effet pas exclu qu'un inhibiteur de la SOD puisse aussi inhiber la xanthine oxydase, produisant alors des faux-positifs. Il faut absolument réaliser tous les témoins sans SOD afin d'éviter ce biais.

II.3 Test au Mito SOX™ Red

Le Mito SOX™ Red est une sonde fluorescente cellulaire permettant la mise en évidence de l'anion superoxyde. Il est utilisé pour regarder le stress oxydant au niveau mitochondrial.

Nous avons essayé de le mettre au point sur un test *in vitro*.

II.3.1 Principe et mise au point du test au Mito SOX™ Red

Le MitoSOX™ Red est un réactif fluorescent : c'est une molécule d'hydroéthidine (HE) à laquelle est fixé de manière covalente un cation hexyl-triphénylphosphonium. Il est oxydé rapidement en -hydroxy-5-(triphenylphosphonium)hexylethidium par l'anion superoxyde et non par d'autres dérivés réactifs de l'oxygène et dérivés réactifs d'azote. Le produit oxydé est extrêmement fluorescent en cas de liaison avec l'acide nucléique. Ces deux réactifs produisent une réaction fluorescente après réaction avec un anion superoxyde, avec apparition du 2-hydroéthydium :

$$\mathbf{2HE + 2O_2^{\cdot -} \rightarrow 2\text{-}OH\text{-}E^+}$$

Grâce au MitoSOX™ Red, la production du superoxyde par mitochondries peut être visualisée par microscopie à fluorescence. En effet, le réactif MitoSOX™ Red pénètre dans les cellules vivantes où il cible les mitochondries de manière sélective.

La formule générale de la réaction est la suivante (voir figure 71) :

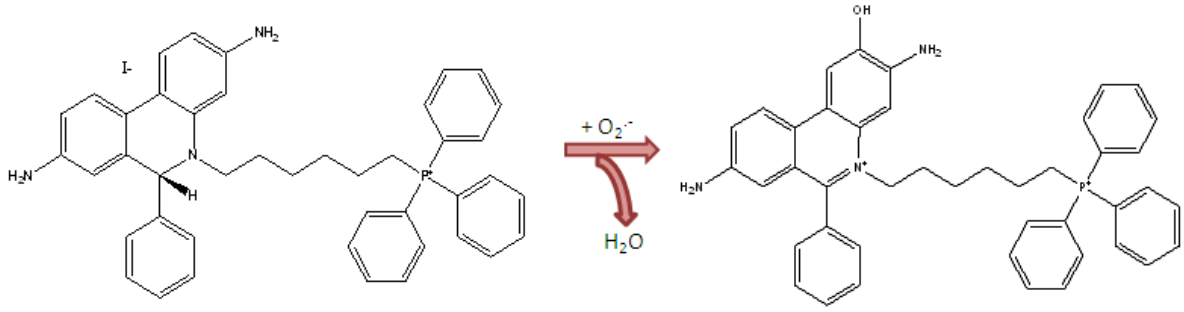


Figure 71: Réaction du MitoSOX™ Red avec un anion superoxyde.

La longueur d'onde maximale d'excitation se situe à 510 nm et la longueur d'onde d'émission est aux environs de 580 nm (voir figure 72). Nous avons choisi ce profil car il est idéal pour ne pas entrer en interaction avec les composés naturels tels que les furocoumarines par exemple, dont la présence de cycles aromatiques leur confère une absorbance pour des longueurs d'ondes comprises entre 270 et 320 nm. D'une manière générale, les réactifs

fluorescents sont assez sensibles, puisque peu de composés naturels absorbent à ces longueurs d'onde.

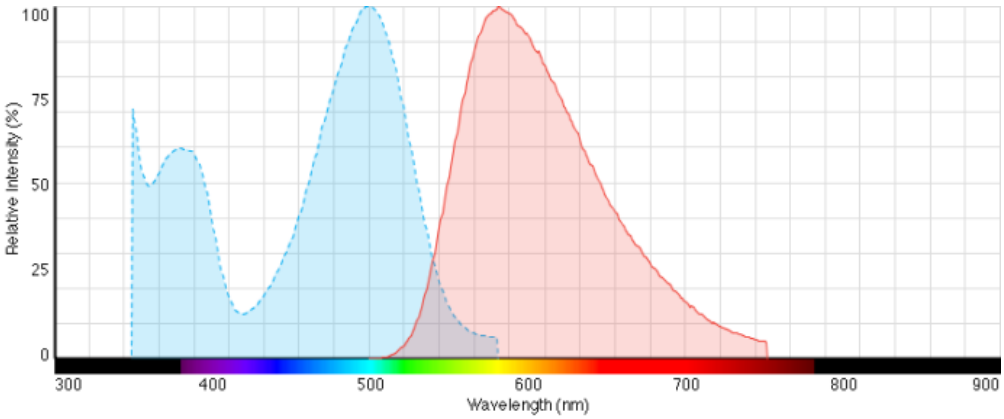


Figure 72: Ce graphique, issu du site de ThermoFisher, montre les longueurs d'ondes d'excitation (510 nm) et d'émission (580 nm) du MitoSOX™ Red.

Cependant, ce test est initialement conçu pour fonctionner dans des systèmes contenant des cellules vivantes, avec une accumulation du MitoSOX™ Red dans les mitochondries. De plus, il devient extrêmement fluorescent, mais seulement en cas de liaison avec l'acide nucléique, mais ce n'était pas notre cas.

Nous avons tenté de l'adapter sur un test en plaques de 96 puits, avec comme producteur d'anion superoxyde le pyrogallol (voir figures 73 et 74). Dans ce test l'anion superoxyde pourrait être produit soit par le système xanthine/xanthine oxydase soit par le pyrogallol. Notre choix s'est porté sur le pyrogallol afin toute interaction entre d'éventuels d'inhibiteurs de xanthine oxydase présents les extraits d'endophytes et cette enzyme.

Les concentrations finales en pyrogallol ont été fixées à 0.1 mM, conformément à celle utilisée en général dans la littérature et celles de SOD à 1 U/mL, afin .

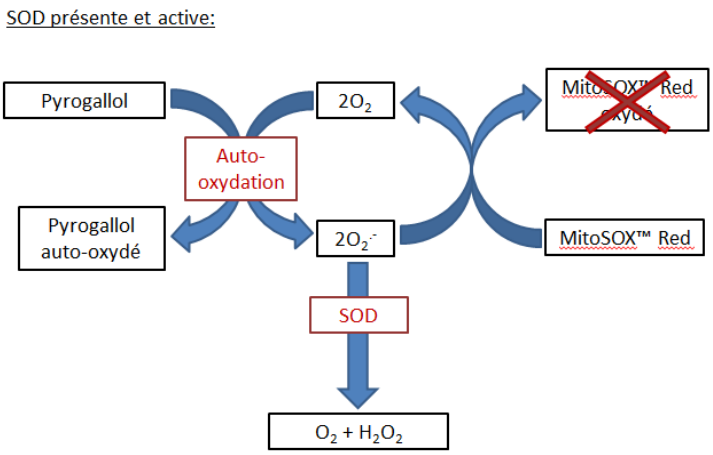


Figure 73: Fonctionnement du test lorsque la SOD est présente et active.

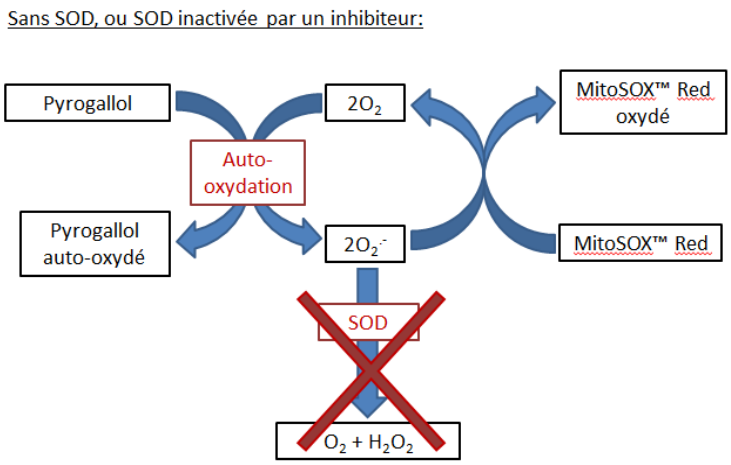


Figure 74: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactive : le MitoSOX™ Red est oxydé et produit alors une fluorescence rouge.

Sur des images issues du site internet commercial de ThermoFisher, sur lequel nous avons acheté ce réactif, nous pouvons voir les images obtenues en fluorescence avec le MitoSOX™ Red. Elles montrent des différences nettes entre les cellules contenant une grande quantité d'anion superoxyde, donc avec une SOD inactive, et celles avec un taux d'anion superoxyde faible, donc possédant une SOD active et efficace.

II.3.2 Problèmes rencontrés avec le test au MitoSOX™ Red

Malgré les quantités croissantes de réactif utilisées (de 5 à 260 µM), très supérieures à celles utilisées généralement dans ce genre de test, nous n'avons pas pu visualiser de traces de fluorescence. Ceci est sans doute dû au fait que ce colorant est normalement utilisé en culture cellulaire en colorant intra-mitochondrial, ce qui concentre le produit en un seul point de la cellule, et donc du puits. Or, ici, le test n'a pas été réalisé sur cellules vivantes, le réactif a simplement été mis en solution directement dans le puits et a donc été très dilué.

Le prix du réactif, d'autre part, est prohibitif : il s'élève à 400 euros les 500 µg.

Enfin, nous ajouterons que certaines publications (Zielonka and Kalyanaraman 2010; Robinson et al. 2006) mettent en garde sur la non-spécificité de l'origine de la fluorescence. Il se pourrait en effet que soit produit, en milieu biologique, l'éthidium, qui est un autre réactif fluorescent, à des concentrations supérieures à celles du 2-hydroéthydium. Or, l'éthidium n'est pas spécifique de la réaction avec l'anion superoxyde.

En outre, les produits d'oxydation de l'hydroéthidine seraient potentiellement cytotoxiques (Lyublinskaya et al. 2014).

II.4 Test au pyrogallol

Le test au pyrogallol a été utilisé afin de détecter l'activité de la SOD pour la première fois en 1974 par Marklund (Marklund and Marklund 1974). Il a depuis été révisé et est largement décrit dans la littérature. La mise au point de ce test sur plaques de 96 puits est basée sur les travaux récents de Li X (Li 2012).

II.4.1 Principe du test

Le principe du test est le suivant : le pyrogallol est un tri-hydroxy-phénol (voir figure 75).

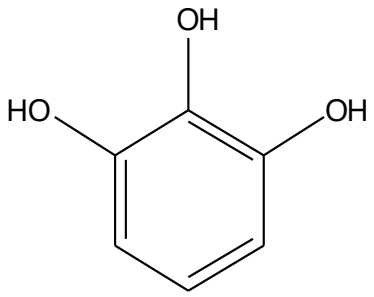


Figure 75:molécule de pyrogallol.

En milieu acide, cette molécule est stable. Mais lorsqu'elle est placée en milieu basique (pH>7), elle se dégrade. Elle produit alors des anions superoxydes qui vont oxyder le pyrogallol. On parle d'auto-oxydation du pyrogallol (Deeble et al. 1988). Le mécanisme de cette auto-oxydation n'est pas totalement élucidé. Les produits d'auto-oxydation ne sont pas non plus connus avec certitude (Gao et al. 1998). Nous pouvons cependant prendre la figure 76 comme indication sur le déroulement de la réaction.

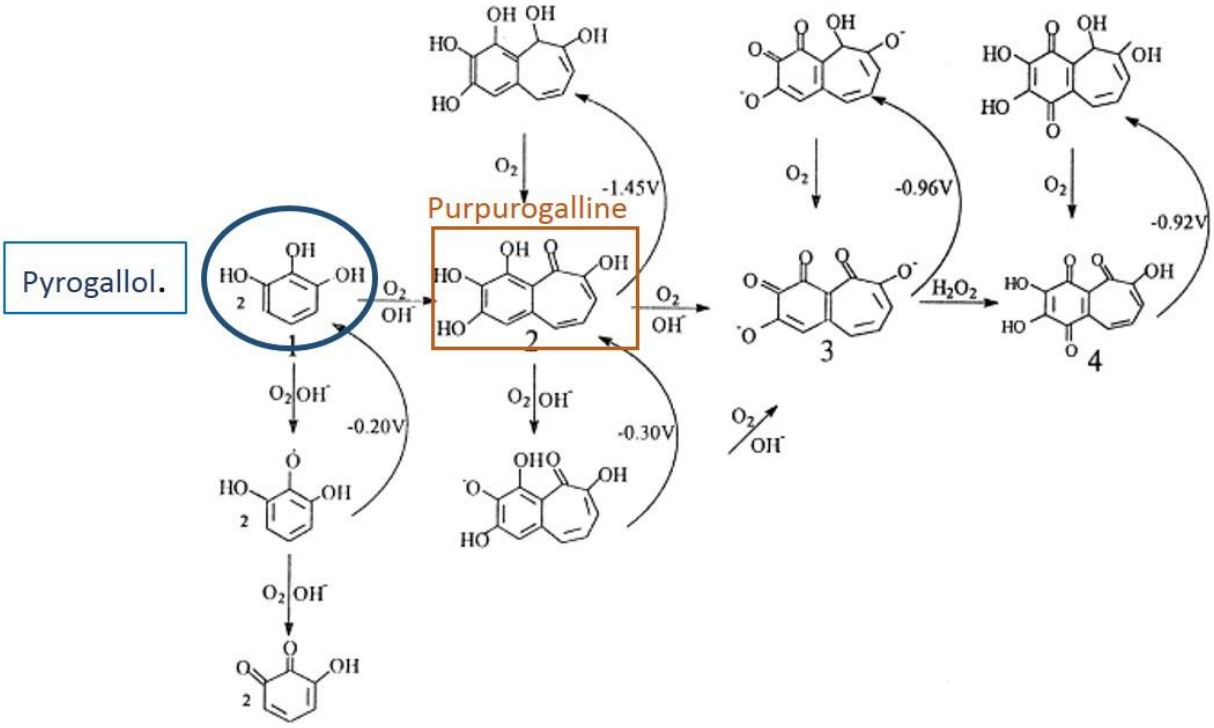


Figure 76: Auto-oxydation du pyrogallol en milieu basique.

Le composé qui donne sa coloration jaune au test serait majoritairement la purpurogalline, qui présente un pic d'absorption à 320 nm (Ramasarma et al. 2015).

Le test au pyrogallol est utilisé en routine, en raison de son faible coût et de sa facilité de mise en œuvre, pour tester des produits antioxydants, et plus particulièrement anti-anions-superoxydes.

Naturellement, il est aussi utilisé pour tester l'activité de la SOD (Li 2012).

Dans un premier temps, le pyrogallol réagit seul en milieu basique. Le spectre résultant de son auto-oxydation après 5 minutes de présentera un pic à 320 nm (voir figure 77).

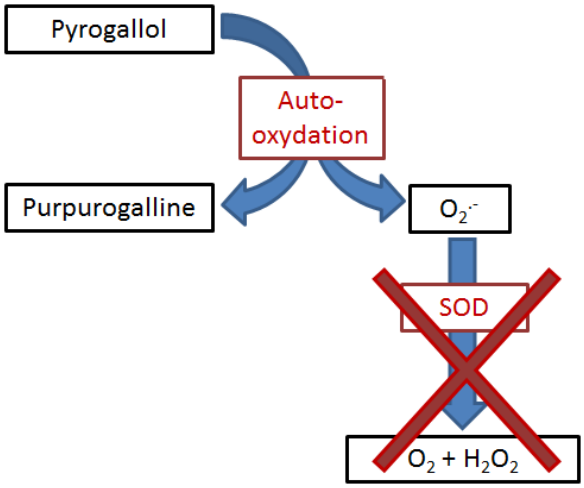


Figure 77: Fonctionnement du test lorsque la SOD est absente ou inactivée: l'auto-oxydation du pyrogallol n'est plus inhibée par la SOD. La solution est donc teintée d'une coloration plus ou moins jaune, en fonction du degré d'inhibition de la SOD.

Lorsque l'on rajoute de la SOD au mélange réactionnel, l'enzyme consomme l'$O_2^{\cdot -}$ produit par le pyrogallol. L'anion suproxyde ne sera plus alors disponible pour oxyder le pyragallol. Le pic à 320 nm sera donc moins important (voir figure 78).

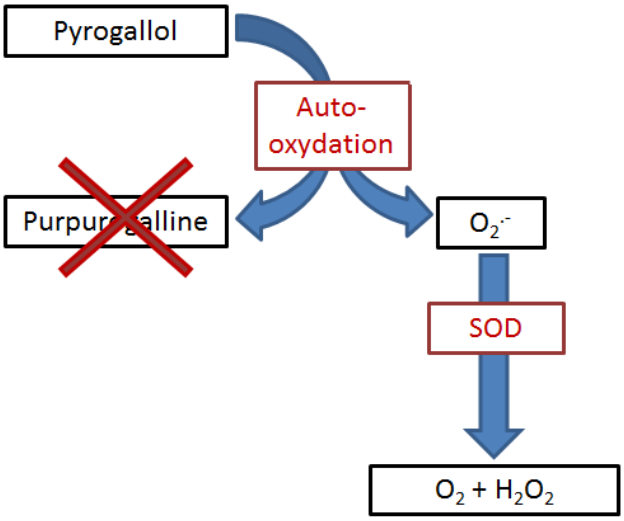


Figure 78: Fonctionnement du test lorsque la SOD est active: l'auto-oxydation du pyrogallol est inhibée par la dismutation de l'anion superoxyde par la SOD. La solution reste incolore.

Au niveau du spectre, les absorbances varient de la façon suivante (voir figure 79) :

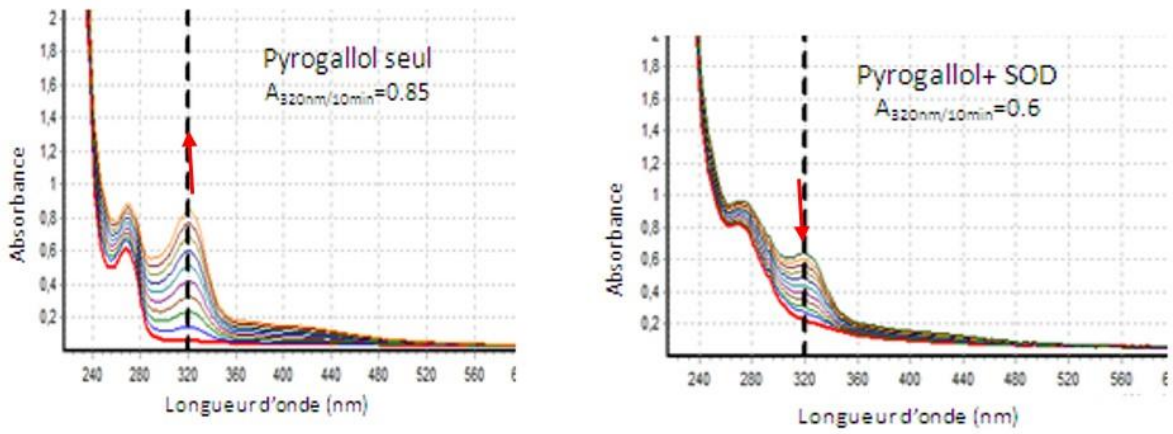


Figure 79: Variations de l'absorbance de la solution en absence et en présence de SOD, pendant 10 minutes, avec des concentrations finales en pyrogallol de 0.1 mM et en SOD de 1 U/mL..

Dans l'exemple de la figure 79, la variation d'absorbance à 320 nm des deux conditions expérimentales est de 0.35 UA ($A_{pyrogallol\ seul}$ = 0.85 UA, $A_{pyrogallol+SOD}$ = 0.6 UA).

Par ailleurs, le test d'auto-oxydation du pyrogallol permet aussi de déterminer l'activité anti-oxydante d'un extrait. Pour cela, il suffit de comparer l'absorbance à 320 nm de l'échantillon mis en présence de la solution de pyrogallol et celle du pyrogallol seul.

Si l'absorbance diminue, cela signifie que le pyrogallol a subi une auto-oxydation moins forte et donc que l'échantillon possède une activité anti-$O_2^{\cdot-}$.

L'échantillon sera au contraire pro-oxydant si l'absorbance (et donc les produit d'auto-oxydation) augmente.

II.4.2 Mise au point du test au pyrogallol

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons tenté de mettre ce test au point sur des plaques de 96 puits.

La difficulté réside dans le fait que le volume réactionnel est très faible (250 µL). Il ne permet donc pas de travailler avec de grandes quantités d'échantillon ou de réactif, ce qui peut être un avantage dans la mesure où nous n'avons pas de très grands volumes d'extraits. Cependant, la variation d'absorbance entre des conditions dans lesquelles la SOD est inhibée ou non est très faible et donc statistiquement proche du bruit de fond.

De nombreuses conditions ont été testées, en se basant sur la publication de Li X (Li 2012).

II.4.2.1 <u>Concentration en pyrogallol</u>

La concentration en pyrogallol doit aussi être déterminée de façon à ce que l'absorbance à 320 nm de la solution d'extrait et de pyrogallol auto-oxydé ne dépasse pas - ou peu - une unité d'absorbance. Les échantillons testés étant très fortement colorés, leur absorbance dépasse souvent 1 UA à 320 nm, même à faible concentration. Le but étant de les

tester à la concentration la plus forte possible pour détecter un éventuel inhibiteur en très faible quantité, il faut donc minimiser au maximum l'absorbance du pyrogallol et donc sa concentration.

Pour cela, nous avons effectué une gamme de concentration du pyrogallol, allant de 0.01 mM à 1 mM de concentration finale. Les absorbances à 320 nm varient alors de 0.05 à 2 UA.

La concentration optimale en pyrogallol a ainsi été fixée à 0.1 mM dans la solution finale, l'absorbance du témoin ne dépassant alors pas 0.5.

II.4.2.2 Concentration en SOD

Nous avons décidé arbitrairement de fixer la concentration en SOD à une valeur telle qu'elle n'inhibe pas totalement l'auto-oxydation du pyrogallol (elle doit inhiber d'environ 30% l'activité du pyrogallol). Cela nous permet en premier lieu de vérifier la présence d'antioxydants dans les échantillons à tester : en présence de substances antioxydantes, il est possible d'observer une inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol supérieure à celle de l'inhibition en présence de SOD seule. En second lieu la faible concentration de SOD nous permet d'objectiver des inhibiteurs de la SOD présents en très faible quantité dans les échantillons : la solution n'étant pas saturée en SOD, une faible variation de l'activité de la SOD se répercute de façon très sensible sur l'absorbance de la solution.

La gamme de concentrations de l'enzyme a été effectuée de 0.1 U/mL finale à 10 U/mL finale. Ă une concentration de 0.1 U/mL, la SOD inhibe 0% de l'auto-oxydation du pyrogallol, tandis qu'à 4 U/mL elle inhibe déjà 100 % de l'auto-oxydation du pyrogallol. Cette expérience nous a permis de trouver la concentration de l'enzyme entraînant une inhibition de 30 % de l'auto-oxydation du pyrogallol (concentration du pyrogallol fixée à 0.1 mM, et la concentration finale de SOD a donc été fixée à 1 U/mL dans la solution finale.

Il est à noter qu'il faut être particulièrement prudent quant au matériel utilisé. En effet, la SOD peut s'adsorber sur certains plastiques. Il est donc préférable d'utiliser des contenants en verre.

II.4.2.3 Concentration des extraits

L'influence de la concentration en extrait est très importante, les extraits étant très colorés à la longueur d'onde suivie, c'est-à-dire à 320 nm. Il s'agit donc de régler la concentration de l'extrait de façon à ce que l'absorbance de la solution à 320 nm, après 10 minutes de réaction, ne dépasse pas 1 unité d'absorbance. Nous avons fixé la concentration des extraits comme étant la plus forte possible mais ne dépassant pas une absorbance de un. Les échantillons ayant des absorbances très variables, et l'harmonisation des concentrations testées étant nécessaire à des fins d'interprétation des données, il a finalement été décidé d'utiliser une concentration finale de 40 µg/mL lors de la première série de tests (screening rapide de 86 souches). Les concentrations d'échantillons ont ensuite été modifiées.

Nous obtenons les spectres suivants (voir figure 80) :

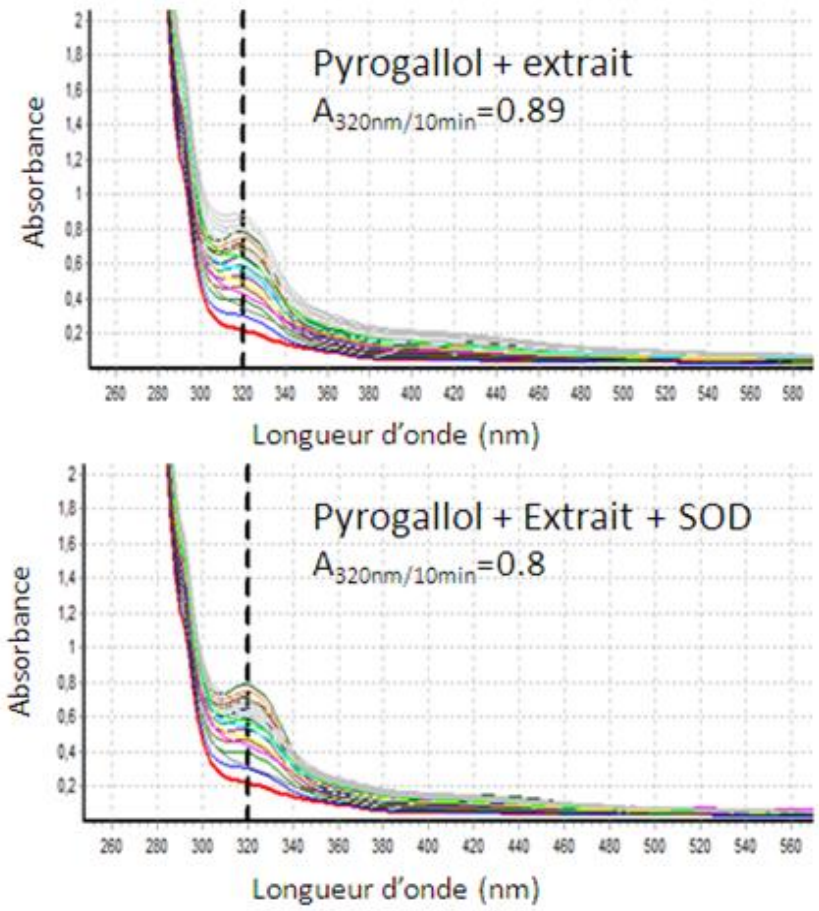


Figure 80: Variations d'absorption du pyrogallol en présence d'un extrait d'endophyte à 40 µg/mL, avec et sans SOD, pendant 14 min.

Pour tester l'action d'un échantillon sur l'activité de la SOD, cet échantillon est rajouté dans le mélange réactionnel contenant la SOD : si l'absorbance à 320 nm varie par rapport à l'absorbance à 320 nm du témoin, cet échantillon a une action vis-à-vis de la SOD :

- L'échantillon aura une activité anti-SOD si le pic à 320 nm retrouve sa hauteur initiale sans SOD. En effet, cela signifie que l'auto-oxydation du pyrogallol s'est déroulée en entier, et donc que les anions superoxyde n'ont pas été dismutés par la SOD. La SOD a donc été inhibée.
- En revanche, l'échantillon aura une activité pro-SOD si le pic d'auto-oxydation du pyrogallol est plus bas que le témoin avec SOD. Cela signe une plus faible auto-oxydation du pyragallol et donc une consommation par la SOD d'une plus grande quantité d'anions superoxyde. La SOD a donc été activée.

II.4.2.4 <u>Autres facteurs pris en compte dans la mise au point du test</u>

Les réactivités du pyrogallol et de la SOD sont facteurs de nombreux paramètres, tel que le pH. Nous avons donc testé plusieurs conditions de pH de la solution de Tris et l'avons fixé à 8.2. Autrement, la cinétique de la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol est trop rapide et le maximum d'absorption est atteint avant 10 minutes. Or, nous souhaitons que la

réaction puisse être mesurée sur 10 minutes, afin d'avoir un nombre suffisant de points sur la droite de régression.

De la même façon, la plaque de 96 puits est laissée à une température de 37°C dans le spectromètre UV-visible durant le temps de l'analyse.

Le temps d'incubation a été fixé à 5 minutes à température ambiante. En effet, si un inhibiteur spécifique existe dans l'extrait, il se liera rapidement à la SOD.

Nous avons aussi vérifié que l'acétate d'éthyle et le méthanol n'entraient pas en interaction avec le pyrogallol ou la SOD. Les concentrations des solvants étaient les mêmes que celles utilisées pour tester les échantillons, à savoir 1 µL/250 µL, mais nous avons aussi testé des concentrations plus fortes, à savoir 10 µL/250 µL. Il n'y a pas d'interaction avec le test à ces concentrations.

II.4.3 Obtention des résultats au pyrogallol

Après ajout du pyrogallol, l'absorbance à 320 nm est enregistrée toutes les 2 minutes pendant 14 minutes : c'est la cinétique de la réaction.

Le coefficient directeur des droites nous donne la vitesse de la réaction. En comparant les coefficients directeurs entre eux, nous pouvons calculer le coefficient d'activation ou d'inhibition de l'échantillon sur la SOD, ainsi que son effet anti-$O_2^{\cdot-}$(voir figure81).

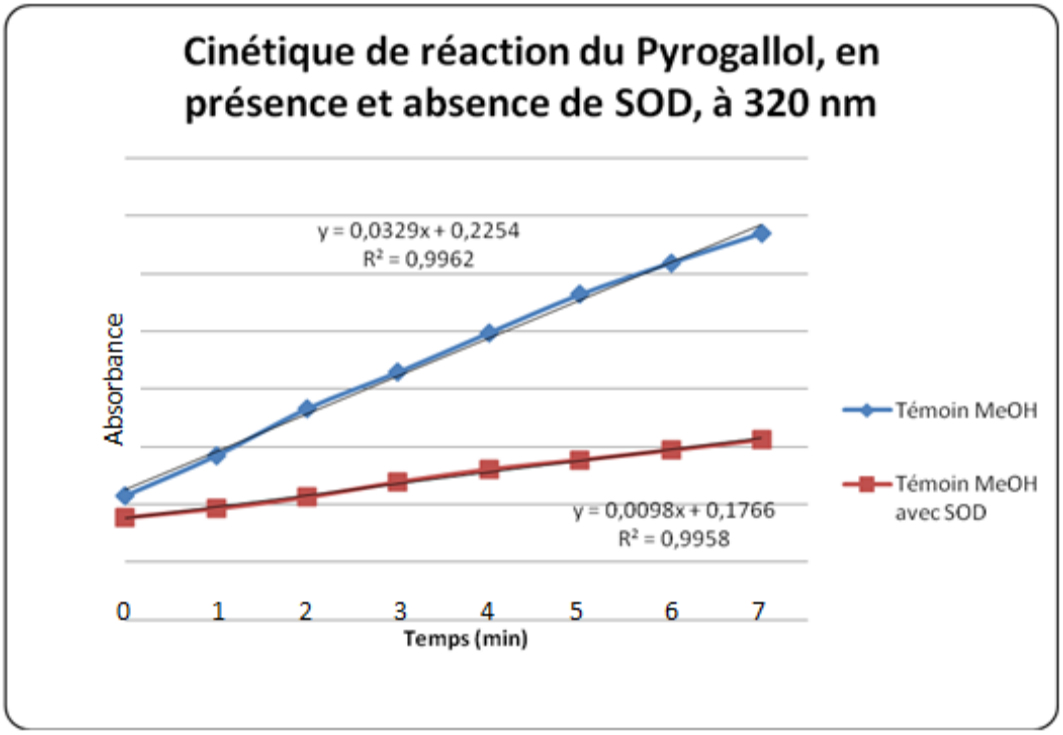


Figure 81: Cinétique de réaction du pyrogallol en présence et absence de SOD. La droite rouge représente la variation d'absorbance en fonction du temps et en présence de SOD, la bleue en son absence.

Le fait de travailler sur les données de la cinétique et non pas à un instant précis, nous permet de nous affranchir du décalage de déclanchement de la réaction dans les puits lié aux conditions expérimentales : la réaction ne peut pas être déclenchée simultanément dans 96 puits des plaques (Nous pouvons d'ailleurs vérifier cela en comparant les ordonnées à l'origine des différentes droites, qui sont différentes de quelques centièmes d'unités d'absorbance). Or la réaction étant très rapide, comme expliqué au paragraphe précédent, ce laps de temps influerait les résultats.

Par ailleurs, il est nécessaire de soustraire à toutes les valeurs d'absorbance, l'absorbance propre de l'échantillon, mesurée avant que la réaction au pyrogallol ne soit lancée. En effet, les échantillons n'ont pas tous la même coloration.

Les calculs sont les suivants :

$$\%\ \textbf{Inhibition de l'autoxydation en absence de SOD} = \left(\frac{a - a'}{a}\right) \times 100 = A$$

$$\%\ \textbf{Inhibition de l'autoxydationen présence de SOD} = \left(\frac{a - b'}{a}\right) \times 100 = \mathrm{B}$$

$$\%\ \textbf{d'activité de la SOD} = B - A$$

Avec a= coefficient directeur de la droite de cinétique du contrôle pyrogallol sans SOD,
b= coefficient directeur de la droite de cinétique du contrôle pyrogallol avec SOD,
a'= coefficient directeur de la droite de cinétique du pyrogallol plus l'échantillon sans SOD,
b'= coefficient directeur de la droite de cinétique du pyrogallol plus l'échantillon avec SOD,
A= activité anti-$O_2^{\cdot -}$,
B= activité anti-oxydante totale.

L'activité sur la SOD de chaque échantillon étant testée 9 fois, les écarts-types des résultats sont ensuite calculés. Ils ont aussi été analysés grâce à un logiciel d'analyse multivariée.

III. Activités biologiques des extraits

Les activités antioxydantes et anti-SOD des extraits d'*Ormenis* ont été évaluées par le test au cytochrome C, tandis que celles des extraits d'endophytes l'ont été par le test au pyrogallol pour des raisons pratiques.

III.1 Activités biologiques des extraits d'Ormenis.

III.1.1 Introduction

Les plantes à tester ont été sélectionnées principalement en fonction de leur accessibilité, grâce à la collaboration que nous avions avec Chemseddoha Gadhi, de l'université de Cadi Ayyad (Marrakech).

En l'occurrence, nous avons travaillé avec *Ormenis africana* et *Ormenis scariosa*.

Une étude préliminaire traitait de leur activité vis-à-vis de la SOD. Bien que ces plantes étaient présentées comme majoritairement anti-oxydantes et sans activité inhibitrice sur la SOD, pour vérification, nous nous sommes néanmoins focalisés dans un premier temps sur la recherche d'une activité anti-SOD. Il eût, bien évidemment, été plus aisé d'utiliser des Ombellifères, parmi lesquelles l'Impératoire *Peucedanum ostruthium* (L.), contenant l'impératorine décrite plus haut (Raja et al. 2011a; Vogl et al. 2011).

Ormenis africana (Synonymes: Tamazight : Irezgui, Arabe : Gartofa) et *Ormenis scariosa* sont des *Asteraceae* buissonnantes endémiques de l'Afrique du Nord. Elles sont présentes dans les forêts claires et les pâturages steppiques.

Elles sont reconnaissables à leurs feuilles ovales, vert-gris, et à leurs fleurs jaunes.

Le décocté des capitules d'*Ormenis africana* est traditionnellement utilisé comme stomachique, emménagogue et vermifuge, probablement grâce à sa forte composition en tanins et polyphénols.

Dans l'article de Ben Mensour précédemment cité (Ben Mansour et al. 2011), l'étude des propriétés de ces plantes a porté sur l'extrait hydro-alcoolique des capitules d'*Ormenis africana*.

Il contient divers flavonoïdes, des polyphénols ainsi que des anthocyanes, en concordance avec les propriétés anti-oxydantes de la plante.

L'extrait hydro-alcoolique provoque une diminution de l'activité de la SOD. Cependant, les auteurs ne concluent pas à une activité anti-SOD de l'extrait, mais pensent plutôt à un rétablissement de la balance anti-oxydant après ajout de l'extrait. Ceci explique la diminution de l'activité de l'enzyme : puisqu'il n'y a plus d'$O_2^{\cdot -}$ à dismuter dans le milieu, de fait, la SOD est inactive.

III.1.2 Résultats des différents tests obtenus sur les extraits

III.1.2.1 Résultats et discussion à propos du test au cytochrome C

Résultats obtenus sur les échantillons d'Ormenis avec le test au cytochrome C

Les résultats obtenus sur les *Ormenis* sont présentés sur la figure 82.

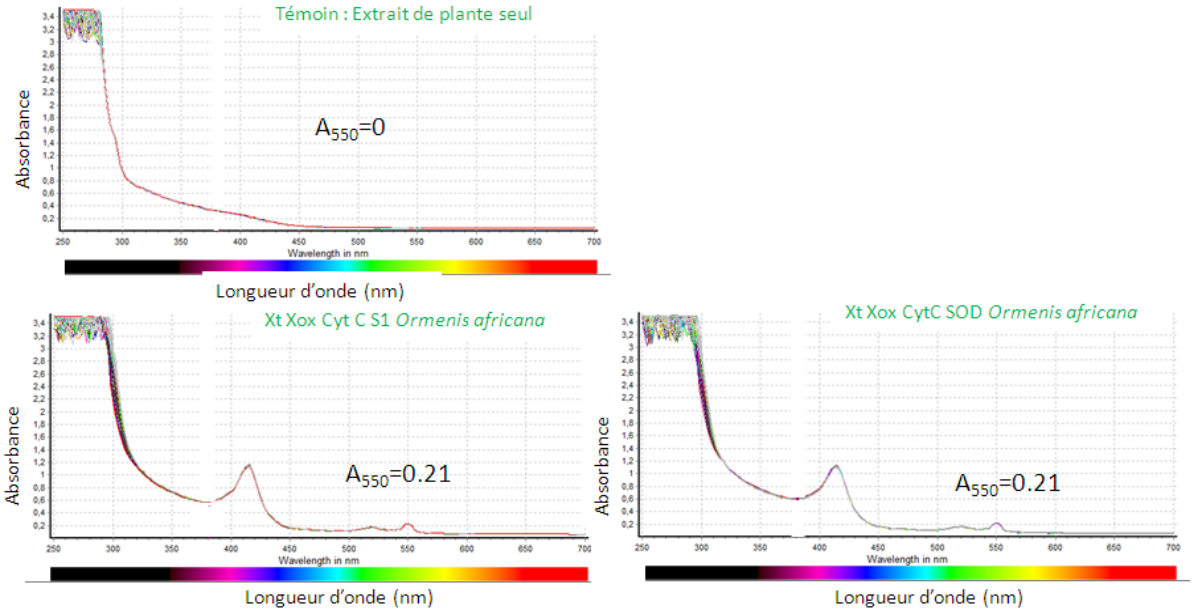


Figure 82: Spectres obtenus avec *Ormenis africana*.

Les résultats du test à la xanthine/xanthine-oxydase obtenus sur *Ormenis africana* montrent qu'il n'y a pas d'interaction avec la coloration de la plante à 550 nm, puisque l'absorbance propre d'*Ormenis africana* est de 0 à cette longueur d'onde.

Les résultats obtenus avec *Ormenis scariosa* sont légèrement différents (voir figure 83).

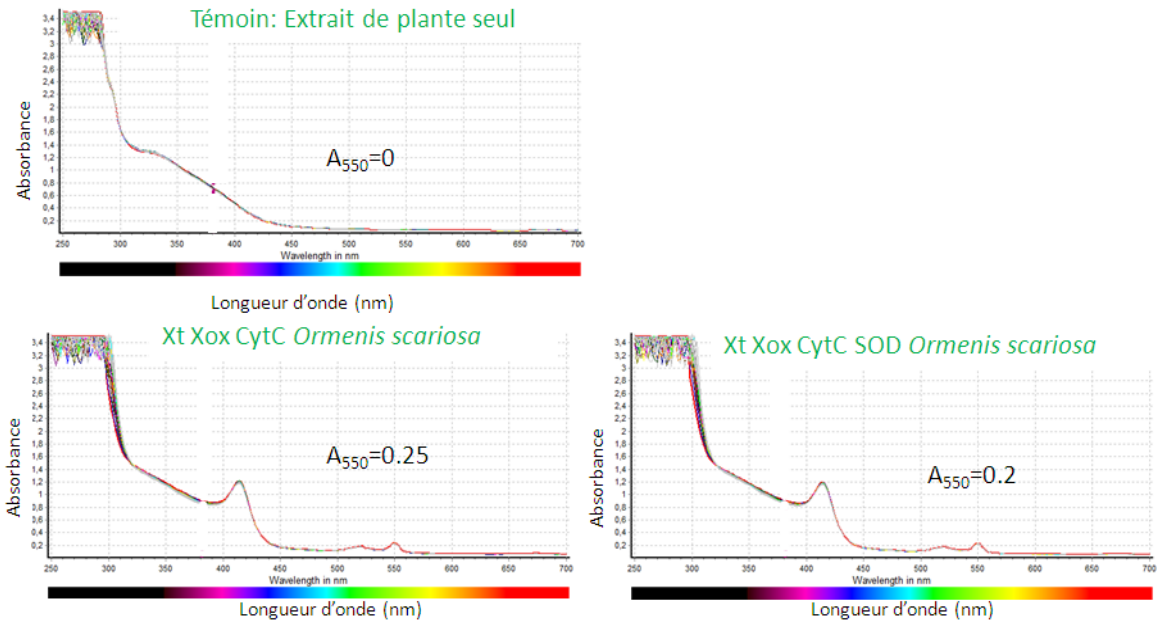


Figure 83: Spectres obtenus avec *Ormenis scariosa*.

Grâce à ces résultats, nous avons pu réaliser l'histogramme suivant (voir figure 84) :

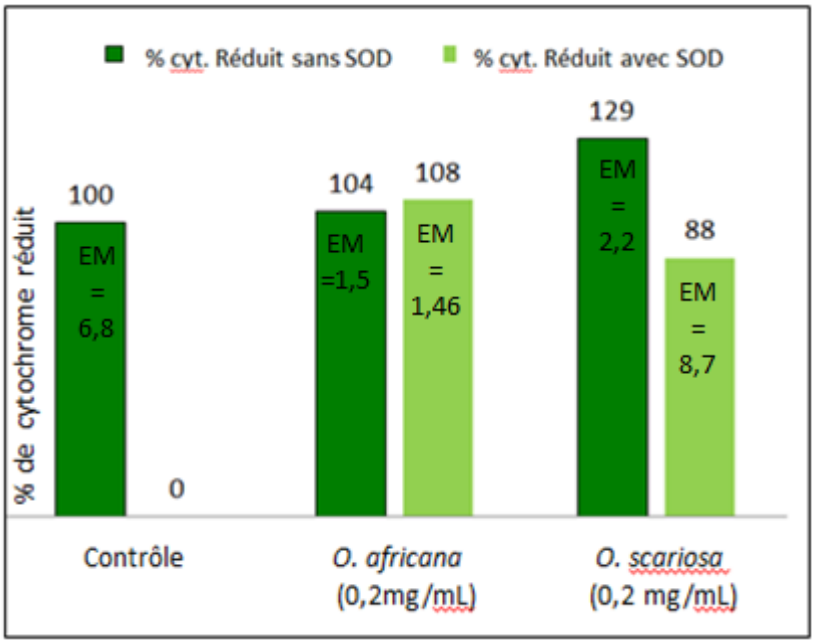


Figure 84: Pourcentage de cytochrome réduit, avec ou sans SOD.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 84, sur les deux *Ormenis*, la SOD n'a pas d'effet sur la réduction du cytochrome C, puisque le pourcentage de cytochrome réduit est pratiquement le même que la SOD soit présente ou absente. Nous pouvons donc penser que ces extraits contiennent des inhibiteurs de la SOD.

De plus, nous remarquons que la réduction du cytochrome augmente dans le cas d'*Ormenis scariosa*, avant que la SOD ne soit ajoutée au mélange réactionnel. Ceci indique donc la présence soit de composés pro-oxydants soit de molécules interagissant directement avec le cytochrome C.

Lorsque l'on rajoute la SOD, la diminution de la réduction du cytochrome C indique la présence d'inhibiteurs de la SOD. Ces inhibiteurs ne sont pas nécéssairement spécifiques de la SOD. Il peut s'agir par exemple de flavonoïdes, composés très présents dans ces plantes. Cependant au vu de l'écart moyen de ce résultat, ces résultats doivent être revérifiés par de nouvelles mesures.

Nous pouvons sans nul doute affirmer que les extraits contiennent un mélange de composés oxydants et anti-oxydants. En effet, il se pourrait que les extraits contiennent effectivement des inhibiteurs de la SOD, mais aussi des composés réducteurs, ou encore des analogues de la xanthine.

Nous avons souhaité répondre à ces questions en nous penchant sur le cas d'*Ormenis africana*. Nous avons mesuré la consommation de xanthine par la xanthine-oxydase (voir figure 85), en suivant la variation de production d'acide urique (produit d'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase) à 292 nm dans une cuve en quartz.

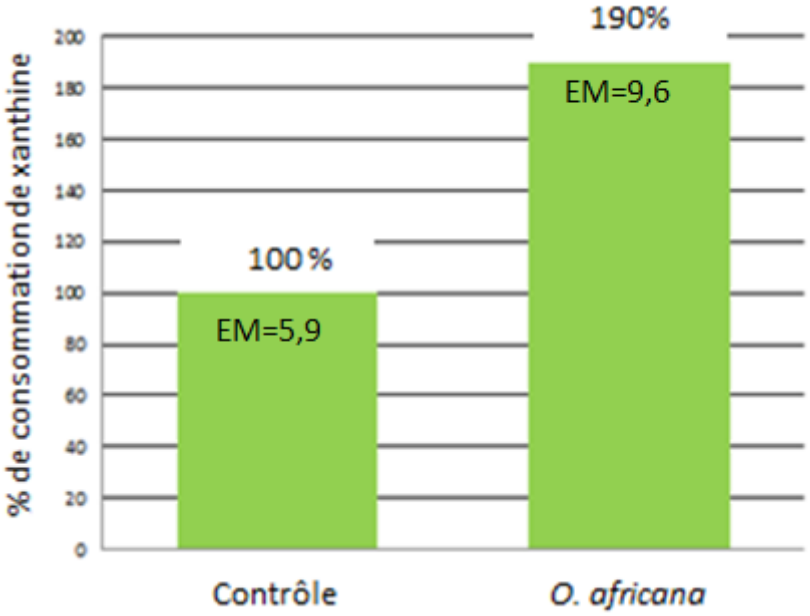


Figure 85: Pourcentage de consommation de xanthine en présence de SOD

En présence d'*Ormenis africana*, il y a effectivement une augmentation de la production d'acide urique, témoignant d'une augmentation de l'oxydation de la xanthine, et s'élevant à 190%. Nous pouvons donc conclure à la présence d'analogues de la xanthine, mais

aussi à celle de composés anti-oxydants, puisqu'il n'est pas observé d'augmentation de la réduction du cytochrome C. Ceci est cohérent avec les données de Ben Mensour (Ben Mansour et al. 2011).

Nous devrions aussi avoir une sur-production de cytochrome réduit. Cependant, elle n'est que de 104 %. Nous ne pouvons conclure qu'à l'existence d'un mécanisme compensatoire ce qui confirme la présence de composés anti-oxydants.

Ce test permet *a priori* de mettre en évidence une tendance. Mais il ne nous autorise pas à déterminer d'IC_{50} sur ces extraits.

Nous avons cependant aussi détecté dans ces extraits un effet inhibiteur sur la SOD. Malgré ce fait, nous devions les analyser grâce à des expériences de RPE (Résonance Paramagnétique Électronique), afin de déterminer si les inhibiteurs étaient spécifiques vis-à-vis de la SOD ou non, de même que l'origine de l'augmentation de la production d'anions superoxyde dans les extraits. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de variation de signal lors de l'ajout des extraits. Nous ne pouvons donc conclure à ce sujet.

Problèmes rencontrés avec le test au cytochrome C

La variation de l'absorbance entre les conditions présentant une SOD active ou inhibée a été jugée insuffisante. En effet, celle-ci varie seulement de 0.1 unité d'absorbance. Il est donc impossible de déterminer avec certitude que le résultat est significatif, d'autant plus que les molécules présentes dans les extraits peuvent présenter un pourcentage d'inhibition ou d'activation de la SOD variable.

Par ailleurs, le cytochrome C n'est pas idéal, puisqu'il est sensible aux chélateurs de métaux, étant donné la présence d'un atome de fer au sein de son site actif. Il présente alors le même profil chromatographique lorsque son fer a été chélaté que lorsqu'il est oxydé. Or, les chélateurs de métaux, comme le diéthyldithiocarbamate est un inhibiteur de la SOD, initialement utilisé comme témoin.

Pour finir, nous avons préféré abandonner la mise au point de ce test au cytochrome C car il était trop onéreux.

III.2 Analyse des résultats obtenus avec le test au pyrogallol en micro-plaques sur les extraits d'endophytes

Trois séries d'analyses ont été menées :

- la première a consisté en un screening rapide de 86[2] échantillons d'endophytes repris dans l'acétate d'éthyle, testés à 40 µg/mL,
- la seconde a concerné les réplicas de 8 souches qui paraissaient détenir une activité sur la SOD, repris dans le méthanol et testés à 40 µg/mL,
- la troisième a concerné les réplicas de 8 souches qui paraissaient détenir une activité sur la SOD, repris dans le méthanol et testés cette fois à 160 µg/mL.

Tous ces tests ont été réalisés en présence de 1 U/mL de SOD, entraînant une inhibition de 30 % de l'auto-oxydation du pyrogallol dans le témoin.

Le schéma suivant résume les séries de tests réalisées sur les endophytes avec le test au pyrogallol (voir figure 86) :

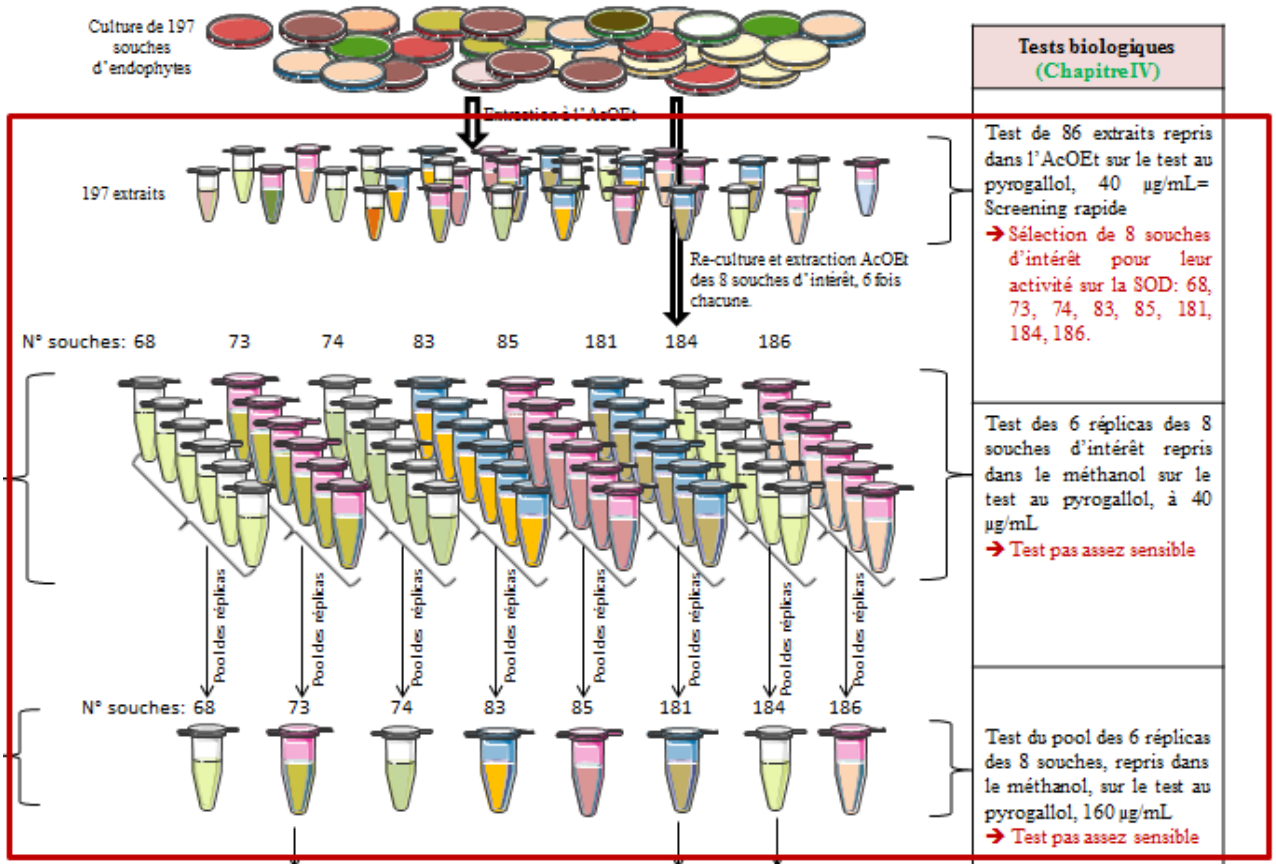


Figure 86: Dans l'encadré rouge: ensemble des séries de tests réalisées sur le test au pyrogallol, pour les endophytes. Un schéma général plus grand est disponible en annexe I.

[2] Comme précisé précédemment, seuls 86 échantillons ont pu être analysés parmi les 197 souches initialement extraites, ce par manque de temps. Une des perspectives de ce travail serait de travailler aussi sur les 111 extraits restants.

III.2.1 Screening rapide des 86 souches d'endophytes et discussion

Le screening des 197 extraits n'a été fait que sur 86 échantillons. Sur ces 86 échantillons testés (40 µg/mL), seuls 56 ont montré des résultats interprétables, autrement dit ceux qui ne montraient pas de résultats aberrants ou dont l'absorbance était très supérieure à 1 due à la forte coloration de certains extraits. Ces résultats sont visibles en annexe VIII.

III.2.1.1 Activité anti-oxydante

En absence de SOD, vingt-deux échantillons ont une activité anti-oxydante vis-à-vis de l'anion superoxyde supérieure à 10% (voir tableau 6). Aucun n'a montré de propriété pro-oxydante. Soixante-quatre possèdent une activité sur l'anion superoxyde faible, c'est-à-dire statistiquement proche de 0.

Tableau 6: Échantillons ayant une activité anti-oxydante.

Numéros de souches	Identité des souches	Équations des droites de régression sans SOD	Coefficients directeurs des droites	Pourcentages d'activité anti-oxydante (%)	Ecarts-moyens des absorbance
36	sp02_*Colletotrichum*	y = 0,0418x + 0,0311	0,0418	16,73	0,030
47	sp14c	y = 0,037x + 0,0377	0,037	26,29	0,010
67	*Sporothrix* (T99)	y = 0,0207x + 0,0328	0,0207	12,29	0,01
69	*Nigrospora* 1 _sp17	y = 0,0201x + 0,0448	0,0201	14,83	0,003
81	sp05_*Endomelanconiopsis*	y = 0,0203x + 0,013	0,0203	13,98	0,007
82	dia1.6	y = 0,0188x + 0,0215	0,0188	20,34	0,008
89	xyl_1.2	y = 0,0205x + 0,056	0,0205	15,29	0,001
90	xyl_1.2	y = 0,0214x + 0,0319	0,0214	11,57	0,003
160	Inconnu	y = 0,0213x - 0,0318	0,0213	11,98	0,09
169	sp02_*Colletotrichum*	y = 0,0206x - 0,0186	0,0206	14,88	0,021
171	dia1.7	y = 0,0254x + 0,0552	0,0254	20,87	0,0018
174	dia5	y = 0,0268x + 0,0497	0,0268	16,51	0,0072
175	Inconnu	y = 0,0277x + 0,0521	0,0277	13,71	0,0050
178	dia1.7	y = 0,028x + 0,0661	0,028	12,77	0,0048
179	*Annulohypoxylon*	y = 0,0275x + 0,0117	0,0275	14,33	0,0028
180	*Annulohypoxylon*	y = 0,0287x + 0,0195	0,0287	10,59	0,0049
181	Inconnue	y = 0,0267x + 0,0106	0,0267	16,82	0,0031
182	Inconnue	y = 0,0272x + 0,0016	0,0272	15,26	0,0304
183	*Annulohypoxylon*	y = 0,0285x + 0,0266	0,0285	11,21	0,0006
184	*Annulohypoxylon*	y = 0,0255x + 0,0304	0,0255	20,56	0,0024
185	*Annulohypoxylon*	y = 0,0287x + 0,0299	0,0287	10,59	0,0026
186	Inconnue	y = 0,0234x + 0,0458	0,0234	27,10	0,0095

L'étude statistique des résultats donne des écarts-moyens sur les valeurs d'absorbance faibles.

Nous notons que la meilleure activité anti-oxydante est obtenue par l'extrait 186 (souche non identifiée), avec une inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol de 27.1%.

Le genre *Annulohypoxylon* semble posséder une activité anti-oxydante marquée.

III.2.1.2 Activité sur la SOD

Trente-trois extraits semblent avoir une activité inhibitrice sur la SOD (voir annexe VIII). Le détail est donné dans la figure 87.

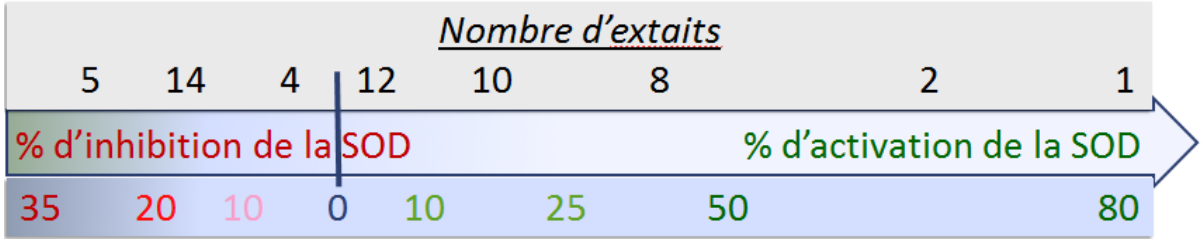


Figure 87: Résumé des propriétés des extraits vis-à-vis de la SOD.

La meilleure inhibition de la SOD a été atteinte avec un pourcentage de 34.74% pour la souche 85, qui a été identifiée comme appartenant au genre *Endomelanconiopsis*. Cette souche n'a pas d'activité anti-oxydante.

En ce qui concerne l'activité pro-SOD, c'est-à-dire la propriété d'augmenter l'activité de la SOD, elle est présente dans 23 extraits. C'est la souche 184, appartenant au genre *Annulohypoxylon*, qui montre la plus grande activité pro-SOD, avec une activation de cette dernière de 80 %. La souche 184 possède aussi une activité anti-oxydante de 20 %.

Cette activité pourra éventuellement être confirmée par RPE.

En revanche, certains extraits ne montrent pas d'activité sur la SOD, ce qui est en adéquation avec les données bibliographiques : peu de molécules sont connues pour inhiber cette enzyme.

Il est possible de faire une corrélation entre l'activité sur la SOD des extraits et le genre de l'endophyte. Celle-ci est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7: Corrélation possible entre le genre des endophytes et leur activité sur la SOD.

	Activité anti-SOD	Pas d'activité anti-SOD	Activité anti-$O_2^{\cdot -}$
Endomelanconiopsis	8	1	1
Botryosphaeria	3	0	0
Colletotrichum	2	0	6
Annulohypoxylon	0	0	6

Les genres *Endomelanconiopsis* et *Botryosphaeria* présentent un intérêt particulier vis-à-vis de notre étude, dans la mesure où nous observons que la majorité des souches testées appartenant à ces genres possèdent une activité anti-SOD.

De plus, des souches d'*Endomelanconiopsis* ont été récemment retrouvées en grande quantité (7 souches sur 19 isolées) dans *Uncaria tomentosa* (Rojas et al. 2008), une plante médicinale très utilisée en forêt amazonienne péruvienne dans de nombreuses indications comme anti-inflammatoire par exemple (Núñez et al. 2015).

Les genres *Colletotrichum* et *Annulohypoxylon* semblent quant à eux montrer une activité majoritairement ciblée contre l'anion superoxyde. Cela indique la présence de composés antioxydants vis-à-vis de l'anion superoxyde ou encore SOD-like. Afin de confirmer cette hypothèse il serait intéressant de suivre par RPE l'activité de ces extraits en utilisant le DMPO comme piégeur de spin. Ce composé donne un signal caractéristique avec l'anion superoxyde. En parallèle, il faudrait doser l'H_2O_2 produit au cours de la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol en absence et en présence d'extraits.

III.2.2 Résultats obtenus sur les souches d'intérêt re-cultivées et discussion

Suite aux résultats obtenus sur les 86 échantillons d'endophytes, nous avons souhaité re-cultiver 8 souches qui nous semblaient intéressantes au vu de leur activité sur la SOD. L'identité des souches ainsi que leur activité sont retranscrites dans le tableau 8.

Dans l'optique de réaliser une étude statistique permettant de relier l'activité des souches d'endophytes à leurs profils chimiques, puis de déterminer et extraire les principes actifs responsables de l'activité, nous avons procédé à la culture de 6 réplicas de chacune des 8 souches. Ainsi, nous avons obtenu une quantité de matière suffisante pour être exploitable.

Tableau 8: Noms et numéros des souches re-cultivées, associés à leur activité sur la SOD.

Souche et numéro de l'échantillon	Pourcentage d'inhibition de la SOD
Pestalotiopsis_1b : 68	20
Souche non identifiée : 73	18,95
sp07_Botryosphaeria : 74	20
sp05_Endomelanconiopsis : 83	23,16
sp05_Endomelanconiopsis : 85	34,74

Souche et numéro de l'échantillon	Augmentation de l'activité SOD (%)
Souche non identifiée : 181	56,67
Annulohypoxylon : 184	80
Souche non identifiée : 186	51,67

Chaque extrait a été testé trois fois, au cours de trois expériences, autrement dit 9 fois au total. Les résultats sont donnés en annexe IX.

Le tableau 9 ci-dessous présente les moyennes et écarts-types des résultats sur la SOD de toutes les expériences réalisées sur les 6 réplicas des 8 souches re-cultivées (les valeurs aberrantes ont été enlevées).

Tableau 9: Présentation des résultats obtenus sur les 6 réplicas des 8 souches d'intérêt (40 µg/mL), en ce qui concerne la SOD.

N° Ech.	Moyennes act SOD	Ecart-type act SOD	N° Ech.	Moyennes act SOD	Ecart-type act SOD	N° Ech.	Moyennes act SOD	Ecart-type act SOD	N° Ech.	Moyennes act SOD	Ecart-type act SOD
68 (1)	44,15	6,16	73 (1)	50,75	8,55	74 (1)	61,33	6,54	83 (1)	51,34	6,84
68 (2)	53,07	15,81	73 (2)	55,05	2,92	74 (2)	55,63	11,99	83 (2)	40,88	2,37
68 (3)	51,87	6,65	73 (3)	48,46	12,51	74 (3)	56,77	11,07	83 (3)	30,14	17,77
68 (4)	42,75	7,37	73 (4)	56,60	10,83	74(4)	54,63	9,06	83 (4)	51	14,89
68 (5)	45,01	12,61	73 (5)	53,54	14,21	74 (5)	50,61	15,94	83 (5)	37,37	5,73
68 (6)	58,28	9,02	73 (6)	63,31	10,59	74 (6)	53,54	3,29	83 (6)	37,5	5,04
85 (1)	65,17	20,47	181 (1)	38,73	35,04	184 (1)	50,70	9,21	186 (1)	51,61	1,85
85 (2)	47,85	12,11	181 (2)	58,03	11,98	184 (2)	44,64	21,14	186 (2)	48,61	6,43
85 (3)	57,78	15,65	181 (3)	56,16	11,02	184 (3)	51,42	17,11	186 (3)	46,81	4,54
85 (4)	53,18	16,63	181 (4)	54,21	12,26	184 (4)	51,08	14,14	186 (4)	48,76	12,12
85 (5)	54,94	11,99	181 (5)	53,56	7,99	184 (5)	50,5	14,88	186 (5)	42,9	7,91
85 (6)	58,26	11,97	181 (6)	49,60	9,56	184 (6)	51,41	6,78	186 (6)	44	8,58
Gélose	46,96	2,98									

La présence d'une activité anti-SOD est à comprendre comme un pourcentage d'inhibition de la SOD par l'extrait.

Le tableau 10 suivant, quant à lui, présente les résultats obtenus pour l'activité anti-oxydante des 6 réplicas des 8 souches d'intérêt.

Tableau 10: Activité anti-oxydante des 6 réplicas des 8 souches d'intérêt.

N° Ech.	Moyennes act anti-oxydantes	Ecart-type act anti-ox	N° Ech.	Moyennes act anti-oxydantes	Ecart-type act anti-ox	N° Ech.	Moyennes act anti-oxydantes	Ecart-type act anti-ox	N° Ech.	Moyennes act anti-oxydantes	Ecart-type act anti-ox
68 (1)	5,93	5,79	73 (1)	6,58	2,57	74 (1)	8,58	3,76	83 (1)	4,22	1,85
68 (2)	5,14	10,57	73 (2)	9,50	2,67	74 (2)	8,61	2,93	83 (2)	13,43	4,00
68 (3)	10,17	5,17	73 (3)	15,89	2,21	74 (3)	8,44	3,59	83 (3)	6,41	1,23
68 (4)	10,73	9,04	73 (4)	10,82	3,94	74(4)	10,05	1,83	83 (4)	13,09	2,45
68 (5)	9,99	3,18	73 (5)	10,64	2,08	74 (5)	10,38	5,77	83 (5)	17,58	2,68
68 (6)	4,21	3,84	73 (6)	11,33	3,90	74 (6)	8,19	3,33	83 (6)	11,85	4,45
85 (1)	9,50	2,64	181 (1)	7,39	4,10	184 (1)	7,20	5,50	186 (1)	10,29	2,24
85 (2)	8,07	2,30	181 (2)	10,28	1,17	184 (2)	11,19	6,51	186 (2)	9,24	1,59
85 (3)	9,54	4,78	181 (3)	10,86	1,93	184 (3)	9,58	3,19	186 (3)	11,99	4,10
85 (4)	13,71	3,23	181 (4)	12,88	3,38	184 (4)	9,74	2,02	186 (4)	10,27	7,12
85 (5)	11,88	2,13	181 (5)	16,14	1,11	184 (5)	10,16	3,59	186 (5)	15,76	2,08
85 (6)	12,24	3,81	181 (6)	11,79	1,07	184 (6)	12,88	1,07	186 (6)	9,41	3,43
Gélose	13,44	4,89									

Les activités antioxydantes et anti-SOD des extraits sont calculées en fonction d'un contrôle au méthanol. Le méthanol, solvant des extraits, étant le témoin négatif, ses activités sont considérées comme nulles par définition.

L'étude de ces résultats est très intéressante, puisqu'elle montre les limites du test au pyrogallol.

Premièrement, les écarts-types des résultats du test concernant les témoins ou les extraits sont tous deux très proches, environ égaux à 6.9. Ceci tend à prouver que le test n'est pas significatif : il n'y a pas de différence statistique entre les valeurs obtenues. La constatation est la même pour les activités antioxydantes.

En second lieu, ce test indiquerait que la gélose seule (témoin négatif) présenterait une activité anti-SOD. Même si cela s'avérait vrai étant donné sa composition en cuivre par exemple, l'écart-type obtenu pour ce résultat est trop élevé pour que nous puissions en tenir compte.

Enfin, les résultats obtenus pour cette seconde campagne d'expériences sont différents de ceux obtenus lors du premier screening. Ceci pourrait s'expliquer par la variabilité culturale des endophytes ou encore la différence de polarité des solvants avec lesquels ont été repris les extraits. Cependant, l'hypothèse d'une sensibilité du test au pyrogallol en micro-plaques trop faible est plus plausible étant donné le contexte et les conclusions précédentes.

Ces résultats peuvent être un peu mieux visualisés sur la figure 88. Nous voyons que les barres d'erreurs associées aux résultats, tant en ce qui concerne l'activité anti-SOD qu'anti-oxydante, sont souvent plus grands que les valeurs même de ces moyennes.

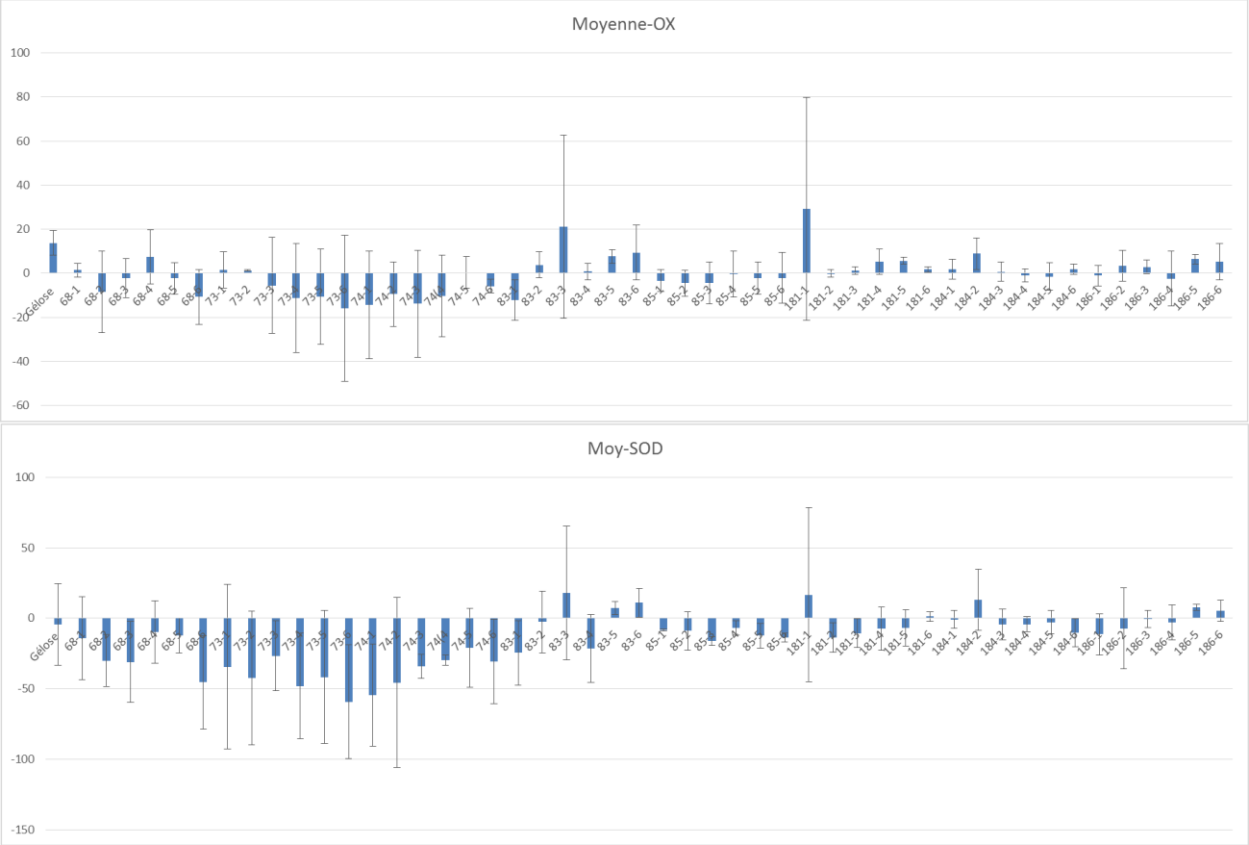


Figure 88: Graphiques permettant de visualiser, sur les 6 réplicas des 8 souches et la gélose, les moyennes des activités anti-oxydantes (Moyenne-OX, encart du haut) associées à leurs écarts-types, ainsi que les activités anti-SOD (Moy-SOD, encart du bas) associées à leurs barres d'erreurs (logiciel SIMCA)

Une étude statistique plus poussée, réalisée grâce au logiciel SIMCA P14.0, confirme cette hypothèse. SIMCA P14.0 est un logiciel de statistique permettant une analyse multivariée des données. On obtient ainsi une vue d'ensemble des données, agencées entre elles de façon à discriminer leurs disparités mais aussi les liens qui les unissent.

Sur la figure 89 sont représentés les six réplicas des huit souches re-cultivées, associés à leur activité vis-à-vis de la SOD. Nous voyons qu'aucun groupe d'échantillons ne se démarque des autres : il n'y a donc aucun lien discriminant entre les données. Les réplicas des souches ne sont pas non plus regroupés, ce qui ne peut s'expliquer par la seule variabilité culturale des endophytes. Nous nous situons donc dans le bruit de fond de ce test.

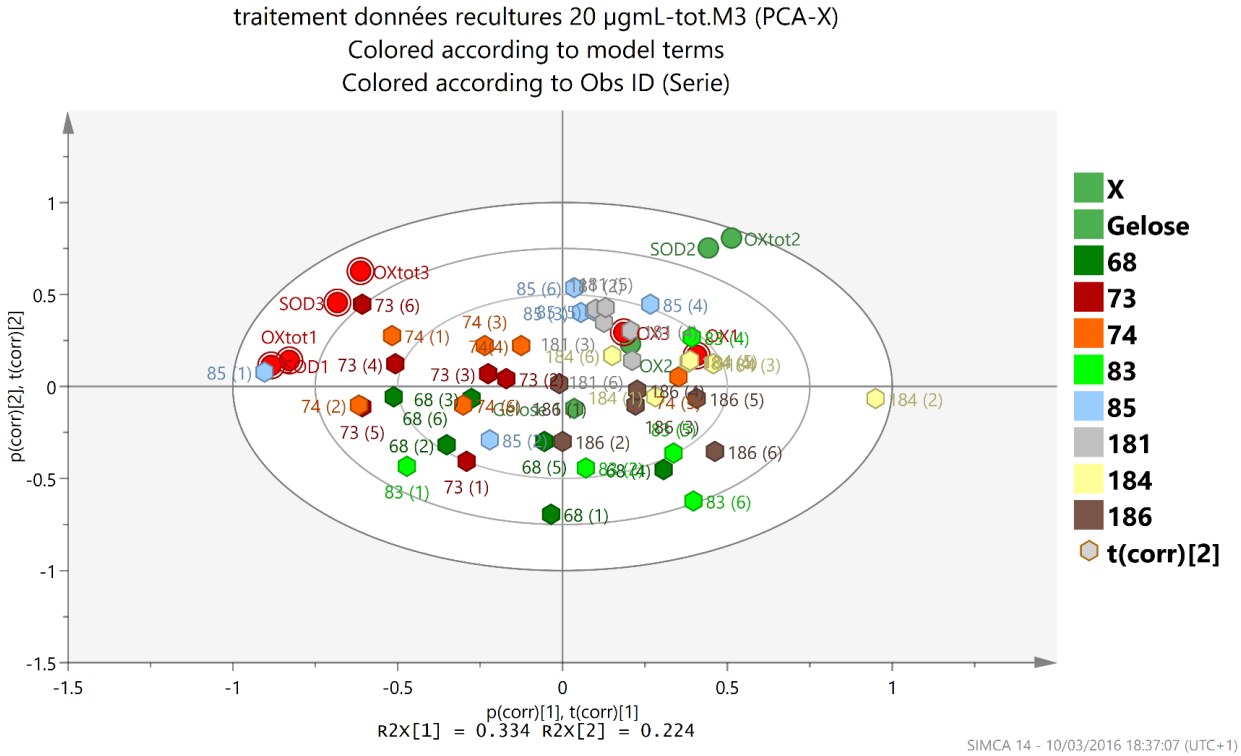


Figure 89: Étude réalisée à l'aide du logiciel SIMCA par Dr. Guillaume Marti.

III.2.3 Résultats obtenus sur les souches d'intérêt re-cultivées et testées à 160 µg/mL et discussion

Afin d'essayer de sortir du bruit de fond, il est décidé de tester les souches dans les mêmes conditions, mais à une concentration plus élevée, à savoir 160 µg/mL.

Il n'y avait pas assez de matière pour re-tester tous les échantillons 3 fois, à 3 reprises, à cette concentration. Il a donc été décidé de rassembler tous les réplicas des souches. Pour la même raison, la souche 186 n'a pas pu être re-testée.

Un témoin au méthanol a été utilisé (voir figure 90). La cinétique de la réaction semble correcte : la reproductibilité est bonne puisque le coefficient de corrélation (R^2) est très proche de 1. Chaque point de la droite est calculé d'après la moyenne des 3 points obtenus.

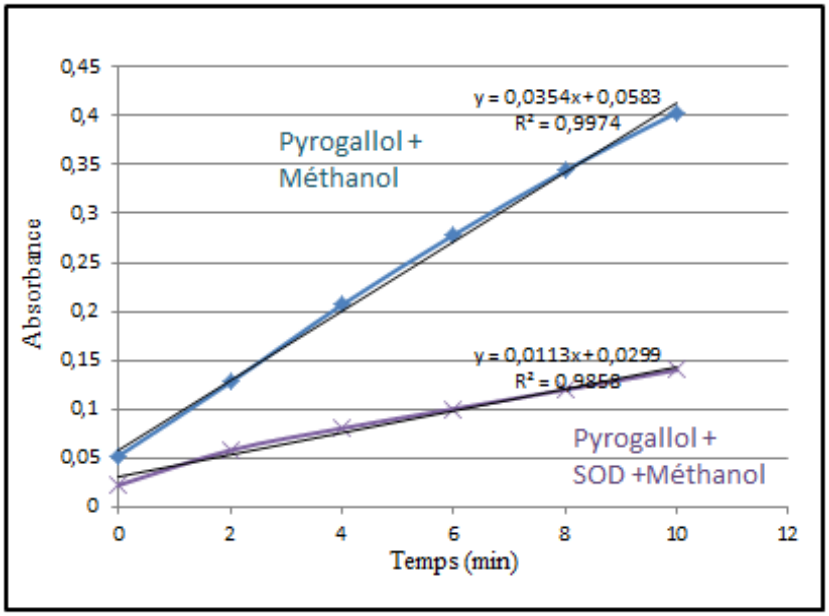


Figure 90: Cinétique de réaction du témoin au méthanol, en présence et absence de SOD.

Il en est de même lorsque l'on rajoute les extraits (voir figure 91).

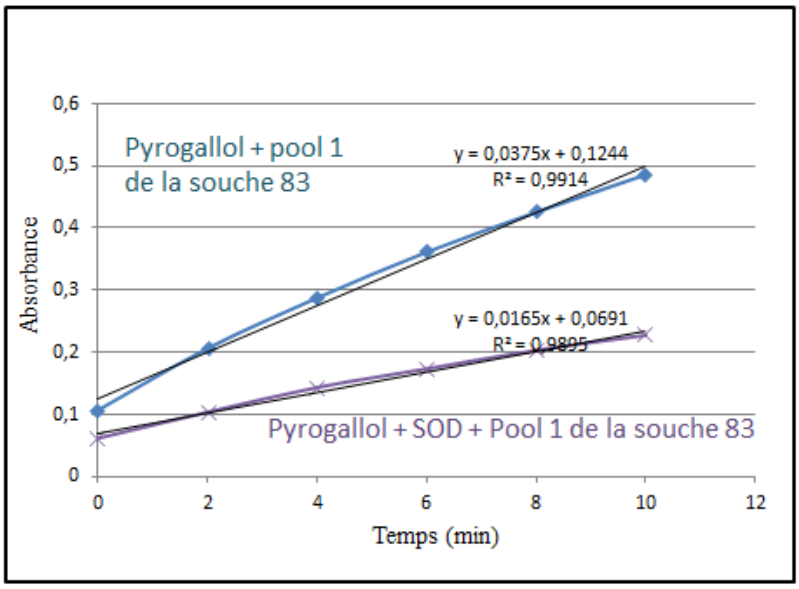


Figure 91: Cinétique de réaction du pool 1 de la souche 83, à 160 µg/mL, en présence et absence de SOD.

Tout comme pour le calcul des activités des réplicas des huit souches à 40 µg/mL, les activités antioxydantes et anti-SOD des extraits sont calculées en fonction de celles du méthanol. Le méthanol étant le témoin négatif ses activités sont considérées comme nulles par définition.

L'ensemble des résultat est présenté en annexe X.

Le résultat des tests statistiques est présenté dans le tableau 11 suivant :

Tableau 11: Résultats statistiques du test au pyrogallol sur les pools de souches testées à 160 µg/mL.

Numéro des souches	% de l'activité moyenne anti-oxydante (%)	% de l'activité moyenne pro-oxydante (%)	Écart-type activité anti-oxydante	% de l'activité moyenne anti-SOD (%)	Écart-type activité anti-SOD
68	16,25		22,13	56,10	13,86
73		5,53	6,44	20,30	28,30
74	11,13		6,69	67,93	16,72
83	4,10		3,20	40,13	8,41
85		2,30	9,35	6,90	5,31
181	28,57		21,60	71,00	21,07
186	46,80		16,44	99,30	68,59

Les écarts-types associés aux moyennes sur trois points des activités antioxydante, pro-oxydante et anti-SOD sont très élevés. Par ailleurs, de nombreuses mesures n'ont pas donné de droites de corrélations exploitables, et donc les moyennes ne se font pas toujours sur 3 points.

Nous en concluons que là encore, le test n'est pas fiable et n'est pas au point. Afin de résoudre ce problème, il faudrait revoir les conditions expérimentales. Chaque composant de ce test est susceptible d'entraîner des variations d'absorbance : des différences dans les concentrations de SOD et de pyrogallol existent d'une expérience à l'autre et pourraient, bien qu'elles soient lissées par le fait que les calculs sont faits en fonction des témoins, entraîner des variations d'absorbance. De plus, les conditions de pH ou de température varient légèrement, malgré le fait que les solutions et la température du lecteur de plaques soient standardisées.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tenté de mettre au point un test *in vitro* rapide, efficace et peu coûteux, utilisable en routine, afin de mettre en évidence l'activité d'échantillons sur la superoxyde dismutase.

En nous appuyant sur les données bibliographiques, nous avons tenté successivement cette mise au point sur :

- un système xanthine/xanthine-oxydase fonctionnant avec le cytochrome C,
- un test chimique utilisant le WST-1 en tant que révélateur colorimétrique,
- un test utilisant le MitoSOX™ Red, un réactif fluorescent,
- un test chimique d'auto-oxydation du pyrogallol en milieu basique.

La recherche d'une activité anti-SOD sur le test au cytochrome C s'est effectuée sur des extraits de plantes tunisiennes (*Ormenis africana* et *Ormenis scariosa*).

Les extraits de champignons endophytes ont été analysés au cours de trois campagnes de tests sur le test au pyrogallol :

- la première a consisté en un screening rapide de 197 souches. Cela a permis de sélectionner 8 souches qui semblaient posséder une activité sur la SOD.
- Après une re-culture suivie d'une extraction de six réplicas de ces 8 souches, chaque réplica a été testé à une concentration de 40 µg/mL. Les résultats ont mis en évidence le fait que les variations d'absorbance du pyrogallol ne sont pas assez fortes pour permettre une discrimination entre le bruit de fond du test et une activité de la SOD.
- Une dernière série de mesure réalisée à plus forte concentration (160 µg/mL) sur un pool par souche des échantillons n'a pas obtenu plus de succès.

Pour résumer cette partie, nous dirons que pour l'instant, aucun des tests décrits n'a démontré les qualités recherchées au niveau de la sensibilité ou de la spécificité vis-à-vis de l'anion superoxyde.

Aucun ne semble assez sensible ni conçu pour les colorations très importantes des extraits.

De plus, les systèmes di-enzymatiques risquent d'entraîner des faux-positifs, ce qui n'est pas compatible avec un test de routine.

Enfin, des systèmes plus simples et théoriquement plus sensibles, tels que ceux utilisant la fluorescence, ainsi que ceux impliquant un système à deux enzymes, ont un coût trop élevé.

Aucun de ces tests ne donne donc, dans cette forme, de résultats satisfaisants permettant de déterminer l'activité anti ou pro-SOD dans un extrait. Nous travaillons donc sur des approches différentes.

V. Perspectives

La recherche d'un test de détection de l'activité de la SOD s'oriente à présent sur deux axes : le premier consiste à expérimenter le test au pyrogallol sur des cuves en quarts de 2 mL, le second est une méthode mettant en œuvre la recherche d'adduits de la SOD par LC-MS.

Si ces techniques ne montrent pas non plus leur efficacité, d'autres solutions pourraient être envisagées, comme celle de la culture cellulaire couplée à un test au MitoSOX™.

V.1.1 Test au pyrogallol en cuve de 2 mL

Le test historique au pyrogallol fait intervenir l'utilisation de cuves de 2 mL et non de micro-plaques de 96 puits. Puisque ces dernières n'ont pas donné de résultats utilisables, nous avons décidé de déterminer l'activité anti-SOD des extraits dans les cuves de 2 mL.

Chaque échantillon a été testé trois fois sans SOD, afin de déterminer son activité anti-oxydante, et trois fois en présence de SOD, afin de déterminer son activité vis-à-vis de la SOD.

Les résultats sont en cours d'obtention à ce jour.

V.1.2 Recherche d'adduits de la SOD par LC-MS

Une nouvelle technique de détection d'inhibiteurs de la SOD est en cours d'élaboration dans l'équipe « Chimie des Substances Naturelles : Isolement-Structure-Synthèse et Chimiothérapie Anti-parasitaire » de l'université Paris Sud, par l'équipe du Dr Alexandre Maciuk.

Elle est basée sur le principe suivant : l'extrait contenant un potentiel inhibiteur est mis en contact avec la SOD. Si un inhibiteur est présent, il se fixera sur la SOD. L'extrait est étudié par une méthode de LC-MS permettant de mettre en évidence ces complexes enzyme-inhibiteur. De plus, cette méthode a la particularité de déterminer la force de la liaison, et donc la nature de l'inhibition (spécifique ou non spécifique), grâce à l'étude de la dissociation du complexe par collision différentielle à intensité croissante.

Cette méthode a été utilisée avec succès dans le screening de molécules antipaludiques se liant à l'hème (voir figure 92) et inhibant de ce fait la formation de cristaux d'hémozoïne. Pour rappel, l'hémozoïne est l'assemblage d'hème en cristal. Ce mécanisme permet de détoxifier l'hème, produit de dégradation de l'hémoglobine, toxique pour le parasite.

La stabilité du dimère de l'hème est étudiée avant et après ajout de la drogue (ici l'artémisinine) par la mesure de l'énergie nécessaire à la dissociation du complexe. On voit sur la figure 92 qu'après l'ajout d'artémisinine, l'énergie nécessaire à la dissociatin du dimère diminue de 195 à 150 V. Il s'agit donc bien d'un inhibiteur de la formation d'hémozoïne.

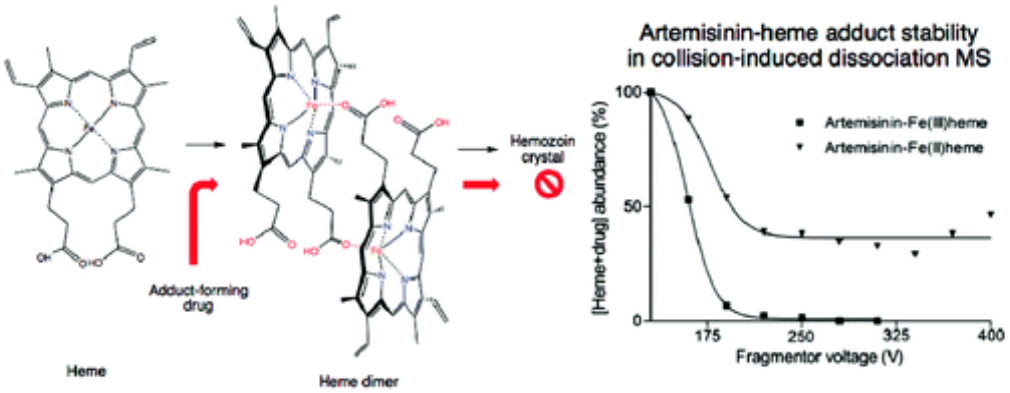


Figure 92: La stabilité du dimère d'hème est étudiée avant et après ajout de la drogue (ici l'artémisinine) par la mesure de l'énergie nécessaire à la dissociation du complexe (Muñoz-Durango et al. 2012).

Ces deux méthodes devraient permettre de déterminer de façon efficace, rapide et sensible la présence ou l'absence d'inhibiteurs de la SOD. Cette information nous permettra de compléter l'étude métabolomique des extraits d'endophytes avec la mise en place d'un réseau de travail moléculaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le but de ce travail de thèse était de rechercher de nouvelles molécules inhibitrices de la SOD dans des extraits de substances naturelles. Cette enzyme majeure du stress oxydant étant impliquée dans de nombreux mécanismes de défense des cellules cancéreuses contre l'apoptose représente une voie thérapeutique d'avenir.

Peu d'inhibiteurs de la SOD sont connus à ce jour.

Afin de maximiser nos chances de trouver des structures originales de composés inhibiteurs de la SOD, nous avons choisi de travailler avec les substances naturelles et plus particulièrement avec les champignons endophytes. Ces micro-organismes produisent la majorité des métabolites d'intérêt des plantes qui les hébergent, en particulier des substances de défense. Ils possèdent donc un éventail très riche de molécules d'intérêt pharmaceutique, peu caractérisées à ce jour. Cette étude vise à apporter des connaissances pharmacochimiques supplémentaires sur ces organismes.

Ce travail de thèse a d'abord porté sur l'isolement, la culture, l'identification, l'extraction et la caractérisation des souches de champignons endophytes provenant de plantes péruviennes.

Le but de cette analyse était de caractériser spectralement (spectres UV-visibles, CCM) et par spectrométrie de masse ces extraits.

Les analyses statistiques effectuées sur les résultats obtenus en HPLC ont confirmé les problèmes de variabilités qualitative et quantitative pouvant être rencontrés au cours de la culture des endophytes et décrites dans la littérature.

Afin de palier à ce problème, les extraits provenant des réplicas d'une même souche ont été rassemblés pour l'analyse ultérieure des données pharmacochimiques.

Cependant, ces variabilités étant majoritairement dues aux conditions de cultures, il serait intéressant de les optimiser et rationnaliser, par exemple par un meilleur contrôle des conditions de culture (nature des milieux, maitrise des conditions d'oxygénation, etc.)

La seconde partie expérimentale a porté sur la recherche de furocoumarines dans les extraits obtenus.

En effet, cette famille de molécules est intéressante car elle contient potentiellement des inhibiteurs de la SOD pouvant agir à deux niveaux : par un effet direct sur l'enzyme ou en tant que molécules photoactivables.

Nous avons donc tenté de dérépliquer ces composés dans les extraits d'endophytes au cours de deux stratégies de spectrométrie de masse.

La première stratégie a été réalisée en LC-HRMS à l'aide d'un QTOF. Les données de masse (masse exactes et fragmentation MS^E) ont été traitées par divers logiciels (MZmine, MS-DIAL, MS-FINDER). Ce traitement a abouti à l'identification de deux furocoumarines, la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et la déhydropachyrrhizone.

Une seconde série d'analyses a été réalisée à l'aide d'un OrbiTrap équipé d'un détecteur à barrette de diodes et faisant de la fragmentation « data-dépendante » (MS/MS). Les données de masse et les spectres UV ont été analysés par MZmine et Xcalibur.

Nous avons ainsi pu identifier quatre autres furocoumarines : l'Ochrocarpine A, la Moellendorffiline, l'Anisolactone et l'Anhydrorutarétine

Tous les résultats présentés ont été obtenus après analyse des échantillons en mode d'ionisation négatif. Nous avons choisi ce mode, plus sélectif que le mode positif, afin de diminuer la trop grande quantité de molécules détectée dans les extraits bruts.

Ce travail a donc *a priori* permis l'identification de six furocoumarines. La complémentarité des deux appareils pour la recherche de composés est ici bien illustrée. Il s'agit là d'une identification de première intention, qui devra être confirmée par l'étude des extraits en mode d'ionisation positif, la co-injection de standards ou encore la purification et l'analyse par RMN.

Les deux stratégies de recherche de furocoumarines, à l'aide d'un QTOF et d'un OrbiTrap s'avèrent complémentaires.

La souche 85 a, en parallèle de ce travail, été re-cultivée à grande échelle et extraite. Elle est en cours de fractionnement.

Afin de compléter cette approche métabolomique et identifier les molécules inhibitrices de la SOD, il est nécessaire de mettre au point un test permettant d'évaluer de façon fiable cette activité.

Nous avons donc tenté de mettre au point un test rapide, peu coûteux et réalisable en routine. Cependant cette mise au point nous confronte à deux problèmes majeurs : la forte absorbance des extraits dans les longueurs d'onde d'utilisation des tests et la dilution extrême des molécules inhibitrices recherchées dans les extraits totaux.

Nous avons sélectionné le test au pyrogallol afin de rechercher l'activité biologique des extraits d'endophytes sur la SOD. Mais ce test n'a pas démontré les qualités recherchées tant au niveau de la sensibilité que de la reproductibilité; malgré les différentes campagnes de mise au point. Ce problème peut être dû à la nature du test lui-même ou aux différents échantillons testés.

Nous orientons à présent les recherches vers des approches différentes, tel que effectuer les tests à des volumes supérieurs ou encore la recherche directe d'adduits sur la SOD par LC-MS.

Ces deux méthodes devraient permettre de déterminer de façon efficace, rapide et sensible la présence ou l'absence d'inhibiteurs de la SOD. Cette information nous permettra de compléter l'étude métabolomique des extraits d'endophytes avec la mise en place d'un réseau de travail moléculaire.

Cela étant, il serait aussi intéressant de tester les extraits et les furocoumarines pures commerciales sur d'autres modèles biologiques, tels que des cellules cancéreuses, polymérisation du peptide B amyloïde, anti-parasitaires, anti-fongiques, insecticides....

CHAPITRE V : MATÉRIEL ET MÉTHODE

I. Matériel et méthode du chapitre II : EXTRAITS ÉTUDIÉS

I.1.1 Culture des endophytes

Le milieu de culture utilisé est le MEA- (Malt Extract Agar sans antibiotiques).

Ce mélange est passé à l'autoclave afin d'éliminer toute contamination microbienne.

Il est coulé à chaud dans des boîtes de Pétri et peut être ensemencé immédiatement après refroidissement ou conservé en chambre froide, toujours en conditions stériles.

L'ensemencement se passe sous une hotte à flux laminaire. Tout le matériel entrant sous la hotte est stérilisé à l'aide d'une solution hydro-alcoolique. A l'aide d'une anse stérile à usage unique, les géloses sont ensemencées en 3 points.

Cette opération terminée, tous les endophytes ont été cultivés durant 14 jours, dans une étuve à 28°C.

I.1.2 Repiquage

Le repiquage se fait en milieu strictement stérile, sous une hotte à flux d'air et en milieu stérile.

La culture se fait sur milieu MEA-, pendant 14 jours et dans une étuve à 28°C, comme lors des premières cultures.

I.1.3 Conservation des souches

Chaque échantillon provenant des souches repiquées a été conservé dans quatre cryo-tubes. Deux contiennent l'échantillon dans de l'eau, les deux autres dans de l'eau avec 30% de glycérol.

Ces cryo-tubes sont gardés à -80°C.

I.1.4 Préparation des extraits

Deux séries d'extractions ont été faites. La première concernait les 197 souches d'endophytes, destinées au screening rapide de leur activité sur la SOD ; la seconde les 6 réplicas de 8 souches ayant montré une activité vis-à-vis de la SOD.

Les 8 souches ont été choisies pour leur forte activité activatrice (5 souches) ou inhibitrice (3 souches) sur la SOD.

La méthode d'extraction a été la même dans les deux séries d'échantillons.

Les géloses sur lesquelles ont été cultivés les endophytes ont été coupées en morceaux, mises en sachet et congelées à -80°C afin de les conserver.

A leur sortie du congélateur, elles sont agitées doucement pendant 15 heures dans 700 mL d'acétate d'éthyle, à température ambiante.

Après ces 15 heures, elles sont mises dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes.

La phase organique est ensuite séchée par du sulfate de magnésium anhydre et filtrée sur papier filtre. Le filtrat est récupéré et l'acétate d'éthyle est évaporé au Rotavapor.

Pour la première série d'échantillons, les extraits ont été repris dans l'acétate d'éthyle, tandis que dans le cas de la seconde série, les extraits ont été repris dans le méthanol. La raison en est que les échantillons doivent être dissous dans le méthanol lors des expériences de HPLC menées pour les études de métabolomique. Il est donc important, pour éviter tout biais, de solubiliser les échantillons dans le même solvant à la fois dans le test de l'activité sur la SOD et dans les expériences d'HPLC. Nous travaillons ainsi avec les mêmes molécules et sommes en mesure d'effectuer une corrélation entre l'activité biologique et le profil HPLC. De plus, les extraits ont été trouvés plus solubles dans le méthanol que dans l'acétate d'éthyle. Il y a ainsi moins de pertes lors de la reprise des échantillons.

Dans les deux cas, les extraits repris sont mis dans des flacons tarés, puis le solvant est laissé à évaporer sous la hotte, à température ambiante. Après séchage, le flacon est repesé afin de connaitre la masse de l'extrait.

Il a été décidé de préparer les échantillons à une concentration de 10 mg/mL lors des extractions d'extraits destinés au screening rapide (voir figure 93).

Figure 93: Echantillons destinés au screening rapide de l'activité sur la SOD.

Nous avons cependant rencontré un problème tout à fait imprévu : durant le laps de temps entre la mise en solution de l'échantillon et le test de l'activité (environ un mois), de l'acétate d'éthyle s'est évaporé des vials. Il est donc inexact de considérer que la concentration finale dans le vial est rigoureusement de 10 mg/mL.

Pour la seconde campagne d'extraction, qui concernait les réplicas des souches d'intérêt, la concentration dans les vials a été calquée sur celle utilisée pour l'HPLC, à savoir 5 mg/mL. De plus, les extraits n'ont pas été repris dans l'acétate d'éthyle, mais dans le méthanol. Ceci permet en effet d'éliminer un biais dans l'analyse des données : les extraits sont dissous dans le méthanol, que ce soit lors du test biologique ou lors de l'analyse en HPLC.

Récapitulatif des différents extraits préparés :

- 197 extraits de souches connues pour la plupart, repris dans l'acétate d'éthyle, pour procéder à un screening rapide de l'activité d'un grand nombre de souches,
- 8 souches ayant potentiellement montré une activité sur la SOD, repiquées 6 fois chacune (pour une plus grande quantité d'extrait récolée), reprises dans le méthanol.

I.1.5 Méthode HPLC pour l'étude de la variabilité des endophytes

La méthode d'HPLC utilise une colonne kinetex 100 x 2.1 mm (2.6 µm), chauffée à 40 °C et un détecteur à temps de vol (Alliance-QTOF premier). La détection a été réalisée pour les molécules de 100 à 1200 Da.

La phase mobile est constituée d'eau contenant 0.1% d'acide formique (phase A) et d'acétonitrile additionné de 0.1 % d'acide formique (phase B) en proportions variables. La vitesse de la phase mobile est de 0.45 mL/min. Les variations de proportions des phases A et B sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 12) :

Tableau 12: Conditions d'analyse en LC-HRMS

Temps (min)	% A	% B
0	95	5
0.5	95	5
10	2	98
12	2	98
12.55	95	5
15	95	5

La tension du capillaire est de 2.7 kV, celles des cônes d'échantillon et d'extraction respectivement de 40 et 3 kV.

Les températures de la source et de désolvatation sont respectivement de 120 °C et 400 °C.

Le débit de gaz dans le cône est fixé à 30 L/h, celui de désolvatation à 750 L/h.

Enfin, l'énergie de collision est de 6 eV et le débit du gaz de collision est de 25 L/h.

I.1.6 CCM

Afin d'obtenir des résultats reproductibles quantitativement, nous avons utilisé un déposeur d'échantillons (CAMAG AUTOMATIC TLC SAMPLER 4) pour déposer les extraits d'endophytes sur les plaques de silice. Les dépôts sont très fins.

Les plaques sont mises à migrer dans un mélange de chloroforme et de méthanol respectivement à 95 et 5 %. La qualité de la séparation est très bonne.

Les plaques sont observées à 254 et 366 nm ainsi qu'en lumière visible. Pour cette dernière condition, les plaques sont pulvérisées avec de la vanilline sulfurique puis chauffées à l'aide d'un pistolet à air chaud.

La vanilline sulfurique est un réactif universel, qui permet de visualiser après chauffage et à l'aide de taches de différentes couleurs et intensités les composés séparés sous lumière visible. Il peut être préparé à l'avance et conservé à l'abri de la lumière. Pour cela, il faut ajouter 1 g de vanilline à 90 mL d'éthanol à 96 %. Puis 10 mL d'acide sulfurique sont ajoutés goutte à goutte au mélange (il se produit alors une réaction exothermique pouvant entraîner l'explosion de la solution).

II. Matériel et Méthode du chapitre III: Étude des extraits en LC-HRMS

II.1 Profil LC-HRMS des extraits

II.1.1 Appareillage

L'appareil utilisé est un UPLC-UV-QTOF-MS^{E} (QTof 1, Waters, MA, USA), avec une source d'ionisation électro-spray (ESI).

La partie chromatographique a été obtenue grâce à une colonne UPLC BEH C18 Acquity (100 × 2.1 mm i.d., 1.7 µm, Waters, MA, USA), précédée d'une pré-colonne.

II.1.1.1 Conditionnement de la colonne

La phase mobile est constituée d'eau contenant 0.1% d'acide formique (phase A) et d'acétonitrile (phase B) en proportions variables. La vitesse de la phase mobile est de 0.4 mL/min. La température est fixée à 45 °C.

Les variations des phases A et B dans les conditions d'analyse sont les présentées dans le tableau ci-dessous (voir tableau 13) :

Tableau 13: Conditions d'analyse en LC-HRMS

Temps (min)	% A	% B
0 à 0.5	98	2
0.5 à 4	80	20
4 à 12	2	98
12 à 15	2	98
15 à 15.5	98	2
15.5 à 19	98	2

II.1.1.2 Conditions d'analyse

L'ionisation a été effectuée selon les conditions suivantes : le voltage du capillaire est fixé à 2.5 pour le mode ionisation négative et 3 kV pour le mode positif, avec un voltage au niveau du cône d'ionisation de 30 V, une température de désolvatation de 450 °C, la température de la source est de 130 °C et la vitesse du gaz de désolvatation de 1000 L/h.

La détection a été réalisée à 254 nm par un détecteur UV et en spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS), en mode ESI positif et négatif, pour chaque échantillon.

En ce qui concerne la fragmentation pour les scans de MS/MS, l'énergie de collision varie de 20 à 50 eV.

Enfin, la gamme de masses détectées varie de 100 à 1200 Da, avec un temps de scan de 0.1s.

II.1.1.3 Injection

Le volume d'injection de chaque échantillon est de 2 µL. Afin d'assurer la bonne conservation des échantillons, ceux-ci ont été gardés à 10 °C pendant toute la durée des analyses.

Dans le but de s'assurer du bon déroulé des analyses, nous avons utilisé une lock masse, la leucine enképhaline, à une concentration de 400 pg/µL avec un débit de 7 µL/min.

Enfin, la MS a été calibrée en utilisant du sodium formate.

II.2 Recueil et analyse des données

II.2.1 Alignement des pics des pools des 8 souches par MZmine

Les profils UPLC-QTOF-MS des échantillons des pools des 6 réplicas des 8 souches en mode ESI négatif ont été analysés par MZmine-2.20. De plus, un mélange à parts égales de tous les échantillons est injecté en plus des échantillons, ce qui permet de vérifier la reproductibilité de la mesure.

Les chromatogrammes ont été coupés de 0 à 2 min puis de 15 à 18 min, afin de ne conserver que la partie de 2 à 15 min. De même, afin de diminuer le bruit de fond, il a été décidé de ne garder que les pics dont l'intensité dépassait 3000 UA. Les masses détectées se trouvent dans un intervalle allant de 100 à 1200 Da. Comme l'analyse a été faite en haute résolution, la tolérance dans la variation de la masse a été fixée à 0.1 ppm.

L'algorithme permettant la détermination des pics est le GridMass 2D. Il permet une meilleure discrimination des différents pics en fonction de leur masse/charge et de leur temps de rétention que la plupart des autres logiciels (Treviño et al. 2015).

L'intensité minimale d'un pic est de 400 et la durée d'un pic de 0.06 à 0.35 minutes.

Les pics ont été alignés entre eux, avec une tolérance de 0.1 min pour le temps et 5 ppm pour la masse. Les adduits et les complexes ont été éliminés de la liste de pics finale.

Une liste a été créée à partir du Dictionary of Natural Products (DNP) de juin 2016, comprenant toutes les furocoumarines identifiées dans des substances naturelles. Cette liste prend en compte certaines informations, comme la source biologique des furocoumarines, leur masse exacte à laquelle on soustrait la masse exacte d'un proton, leur formule chimique et leur formule brute. Afin de construire le tableau de façon à ce qu'il soit reconnu par MZmine-2.20, il faut ajouter une colonne mentionnant un temps de rétention égal à 0 pour toutes les masses (voir tableau 14).

Tableau 14: Exemple de tableau construit à partir du Dictionnary of Natural Products pour trois composés: le psoralène, le bergaptène et la magcoumarine.

Source biologique	Masse exacte - Masse exacte d'un H^+	Temps de rétention	Formule chimique	Formule brute
Isol. from Psoralea corylifolia, Ficus salicifolia, Heracleum leskovii, Ruta chalepensis, Dictamnus hispanicus, etc. Found in common vegetables, e.g. parsnip, celery esp. if diseased	185.024415	0	Psoralen	C11H6O3
Constit. of bergamot oil (Citrus bergamia). Also from various other Citrus spp., Ficus religiosa and Ficus infectoria	201.01933	0	Bergaptol	C11H6O4
Constit. of the stem bark of Mangifera indica var. Dusehri	233.045545	0	Mangcoumarin	C12H10O5

Cette liste de pics est ensuite comparée à la liste de pics alignés dans MZmine-2.20. Les pics dont la masse correspond à des furocoumarines connues dans le DNP sont ainsi identifiés, sous réserve que leur fragmentation en MS/MS soit cohérente.

II.2.2 Alignement des pics des pools des 8 souches par MS-DIAL

Les profils UPLC-QTOF-MS des échantillons des 6 réplicas des 8 souches en mode négatif ont aussi été analysés par MS-DIAL 2.26, afin de croiser les méthodes d'identification des furocoumarines présentes dans les extraits.

Le logiciel a été paramétré de la même façon que MZmine-2.20, à savoir : la partie conservée des chromatogrammes s'étend de 2 à 15 min et le bruit de fond a été déterminé à 3000 UA pour la MS et 300 pour la MS/MS. L'intervalle des masses détectées s'étend de 100 à 1200 Da. La tolérance de variation dans la masse détectée est de 0.01 ppm pour la MS1 et de 0.05 ppm pour la MS/MS, en mode centroïde.

Enfin, les pics ont été alignés entre eux, avec une tolérance de 0.1 min pour le temps et 0.025 Da pour la masse. Les adduits et les complexes ont été éliminés de la liste de pics finale.

II.3 Identification de molécules d'intérêt

De nombreux logiciels permettent une identification de molécules à partir de leur fragmentation. Dans le cadre de ces travaux, nous avons utilisé MS-FINDER et CFM-id, deux logiciels accessibles librement en ligne.

II.3.1 Par MS-FINDER

La liste de pics a été analysée par MS-FINDER 1.76. Ce logiciel a été paramétré de façon à ce que la prédiction de la formule chimique ne se fasse qu'en intégrant trois atomes : le carbone, l'hydrogène et l'oxygène. La tolérance de masse est de 10 ppm et la tolérance pour déterminer si un pic appartient à un massif isotopique est de 20 %.

Nous avons intégré la base de données du Dictionary of Natural Products (version juin 2016), en y ajoutant les InChIKey, les « short InChIKey » et les SMILES. Le tableau 15 donne un exemple de la façon dont les données doivent être organisées afin d'être reconnues par MS-FINDER.

Tableau 15: Exemple de tableau construit à partir du Dictionnary of Natural Products pour trois composés: la mamméarine A, la mangcoumarine et la bergamotine, afin d'identifier des molécules à l'aide de MS-DIAl.

RT	Title	InChIKey	Short InChIKey	PubChem CID	Exact mass	Formula	SMILES
5,71	Mangcoumarin	InChI=1S/C12H10O5/c1-5-4-7-8(13)6-2-3-16-10(6)9(14)11(7)17-12(5)15/h4,13-14H,2-3H2,1H3	XJDRAEDTSZWIBQ-UHFFFAOYSA-N	N/A	234.052825	C12H10O5	N/A
12,57/7,14/7,46/8,28	Mammearin A	InChI=1S/C22H26O5/c1-6-12(5)19(24)18-20(25)13(9-8-11(3)4)21-17-14(15(7-2)26-21)10-16(23)27-22(17)18/h8,10,12,15,25H,6-7,9H2,1-5H3	UIUQJKPWTIMLDM-UHFFFAOYSA-N	N/A	370.178025	C22H26O5	N/A
12,31	Bergamottin; 5'-Ethoxy	InChI=1S/C23H26O5/c1-5-25-17(12-15(2)3)13-16(4)8-10-27-23-18-6-7-22(24)28-21(18)14-20-19(23)9-11-26-20/h6-9,11-12,14,17H,5,10,13H2,1-4H3/b16-8-	HUIKFGYKROOMLM-PXNMLYILSA-N	N/A	382.178025	C23H26O5	N/A

MS-DIAL fournit une liste de composés avec leurs identifications potentielles, associées à la différence de masse (en PPM) observée par rapport à la masse expérimentale et au score isotopique expérimental. Ces informations permettent de classer les identifications en fonction de leur adéquation avec l'expérimentation.

II.3.2 Par CFM-id

CFM-id est un logiciel de fragmentation in silico, c'est-à-dire qu'il calcule la fragmentation théorique d'une molécule.

Ce logiciel est accessible en ligne (cfmid.wishartlab.com). Il nécessite seulement d'entrer le code InChIKey associé à la molécule (correspondant à sa structure développée). Le résultat se présente sous la forme d'une série de fragments, qu'il suffit de comparer avec ceux obtenus expérimentalement.

II.1 Vérification de l'identité des molécules par UV

II.1.1 Profils UHPLC-DAD-FTMS-MS/MS des extraits

Puisque nous n'avons pas pu déterminer avec certitude l'identité des molécules données par MZmine, nous nous sommes aidés de leurs spectres UV, dans la mesure où ces derniers sont caractéristiques chez les furocoumarines.

La chaîne UPLC est une chaîne ThermoFisher Scientific U3000, avec une pompe HPG3400RS, un passeur automatique WPS-3000T RS, un four à colonne TCC3000 et un détecteur à barrette de diodes DAD3000. La colonne est une colonne WATERS Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm (2.1 x 100 mm). La température de la colonne a été fixée à 45 °C.

Le spectromètre de masse est un LTQ-Orbitrap XL ETD (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Le débit de la phase mobile est de 0.4 mL/min. L'éluant A est de l'eau contenant 0.1 % d'acide formique, et l'éluant B de l'acétonitrile avec aussi 0.1 % d'acide formique.

Le gradient utilisé dans le protocole des analyses par l'OrbiTrap est le suivant (voir tableau 16):

Tableau 16: Gradient utilisé dans la méthode LCMS.

Temps	%A	%B
0	98	2
0,5	98	2
4	80	20
12	2	98
15	2	98
15,5	98	2
19	98	2

Les échantillons analysés sont ceux des pools des souches 73, 181 et 184. En effet, seuls ces échantillons étaient en quantité suffisante. Ils sont dilués dans du méthanol, à une concentration de 10 mg/mL. Un µL est injecté dans la colonne.

II.1.2 Alignement des pics des pools des 8 souches par MZmine

Les profils UPLC des pools des 6 réplicas des souches 73, 181 et 184 en mode ESI négatif ont été analysés par MZmine-2.20. Ils ont été comparés à un blanc solvant.

Seule la partie allant de 0.3 à 14 minutes a été conservée. De même, afin de diminuer le bruit de fond, il a été décidé de ne garder que les pics dont l'intensité dépassait 3000 UA. Les masses détectées se trouvent dans un intervalle allant de 100 à 2000 Da. La tolérance de masse a été fixée à 0.1 ppm.

L'algorithme permettant la détermination des pics est le GridMass 2D (Treviño et al. 2015).

La hauteur minimale d'un pic a été paramétrée pour être d'une intensité minimale de 25 000 et la durée maximale d'un pic de 0.1 à 0.6 minutes.

Les pics ont été alignés entre eux, avec une tolérance de 0.1 min pour le temps et de 15 ppm pour la masse. Les adduits et les complexes ont été éliminés de la liste de pics finale.

La liste de furocoumarines issue du Dictionary of Natural Products (DNP) utilisée pour identifier les molécules dans la liste de pics des pools des 8 souches a été reprise.

Cette liste de pics est ensuite comparée à la liste de pics alignés dans MZmine-2.20.

II.1.3 Recherche des profils UV des molécules identifiées dans MZmine dans Xcalibur

La liste de pics issue de MZmine est téléchargée dans Xcalibur 3.0.

La tolérance de variation de masse est de 10 ppm.

II.2 Réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires ont été réalisés grâce au GNPS et à Cytoscape, deux logiciels libres téléchargeables en ligne.

II.2.1 GNPS

Les fichiers .mgf issus de l'analyse par MS-DIAL sont repris afin d'éliminer les adduits éventuels, puis importés sur la plate-forme en ligne GNPS.

Puis les paramètres sont optimisés de façon à obtenir un score radians le plus proche possible de 0.6. Le score radians représente la ressemblance entre deux molécules.

Le nombre minimal de pics que deux molécules doivent partager pour être affiliées est fixé à 4.

La différence de masse tolérée pour différencier deux ions est de 0.01 Da. Ainsi, seront considéré comme deux isomères toutes molécules ayant une différence de masse inférieure à 0.01 Da.

Enfin, la tolérance de différence de masse des fragments est de 0.1 Da.

II.2.2 Cytoscape

Les données du réseau obtenu avec le GNPS ont été importées sur Cytoscape-2.8.3, en suivant le protocole donné sur le site du GNPS. Cytoscape permet simplement la visualisation des réseaux créés par le GNPS.

III. Matériel et Méthode du chapitre IV: Mise au point d'un test enzymatique de détection de l'activité de la SOD

III.1 Protocole d'extraction des plantes *Ormenis africana* et *Ormenis scariosa*

La récolte a été faite à la période de floraison de la plante (c'est-à-dire au mois de mai/juin) de l'année 2014.

Le séchage et le stockage ont été réalisés dans des conditions optimales afin d'éviter le pourrissement et les moisissures.

Le protocole d'extraction a été réalisé comme expliqué ci-dessous.

L'extraction a concerné les sommités fleuries d'*Ormenis africana* et les feuilles d'*Ormenis scariosa*, ceci dans l'optique d'obtenir une plus grande diversité de composés, et donc de maximiser nos chances de trouver des molécules anti-SOD.

Pour chaque échantillon, 50 g de plantes sèches finement broyées à l'aide d'un moulin à café électrique sont placés dans un mélange éthanol-eau (800mL-200mL), sous agitation magnétique pendant 24h, à température ambiante.

Le mélange est ensuite filtré sur papier filtre et l'éthanol est évaporée sous pression réduite.

Enfin, l'échantillon est congelé puis lyophilisé et enfin conservé à -20°C. Il constitue l'extrait brut.

III.2 Mise au point du test xanthine/xanthine-oxydase

Ce test a été mis au point sur les extraits d'*Ormenis*.

Le test de réduction du cytochrome C a été adapté à partir de la méthode décrite par McCord et Fridovich (J. M. McCord and Fridovich 1969) et revisité depuis par Kuthan et *al*. (Kuthan, Haussmann, and Werringloer 1986). Ce test est réalisé en microplates de 96 puits sous un volume réactionnel final de 250µl. Dans ces conditions les échantillons d'extraits naturels sont mis en solution à une concentration finale de 0.2 mg/mL dans du tampon Tris 50 mM pH 8, en présence EDTA 0.04 mM, la xanthine et le cytochrome sont rajoutés respectivement aux concentrations finales de 0.5 mM et 0,0118mM. La réaction est déclenchée par addition de xanthine oxydase (50 mU/mL) dans les puits. La cinétique de réduction du cytochrome C est suivie à 550 nm pendant 10 min.

L'évaluation de l'effet des échantillons sur l'activité de la SOD est réalisée selon le même mode opératoire. Les échantillons en solution dans le tampon Tris 50 mM pH 8, EDTA 0.04 mM sont incubés à la température ambiante pendant 10 min en présence de SOD à la concentration finale de 1 U/mL avant addition de la xanthine et du cytochrome C.

L'évaluation de l'activité SOD sur la réduction du cytochrome est réalisée en absence d'extraits naturels, de même que l'influence des solvants d'extration sur le test.

Nous avons choisi les concertrations des réactifs en fonction de deux critères principaux : l'absorbance finale, qui doit être inférieure à 1, et la cinétique de la réaction, qui doit être de 10 minutes environ afin de permettre l'obtention de suffisemment de points pour la droite de régression indiquant l'activité de la SOD. Pour cela, nous avons multiplié les expérimentations, en faisant varier les concentrations de réactifs.

La concentration en SOD ne doit pas être trop importante, afin de pouvoir détecter de faibles quantités d'inhibiteurs.

Enfin, les échantillons ont été dissous dans le DMSO, puis le mélange réactionnel a été réalisé dans une cuve en quartz de 1mL de volume.

Le spectre du blanc obtenu avec le cytochrome C et la xanthine seule est présenté dans la figure 94 :

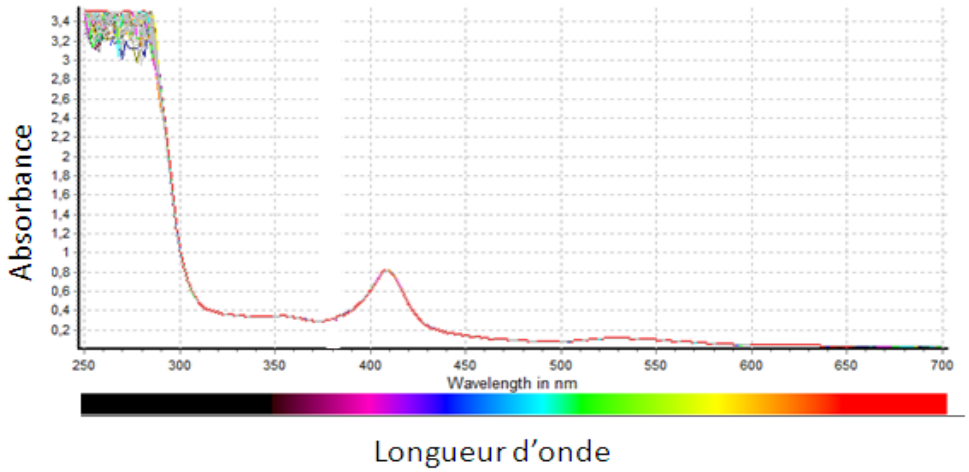


Figure 94: Banc xanthine/cytochrome C.

Les échantillons ont été analysés grâce au protocole suivant (voir tableau 17) :

Tableau 17: Protocole du test à la xanthine-oxydase.

	H_2O	Tris	EDTA	Cyt C	Xanthine	SOD	Xox	Ech (DMSO)
C_i		200mM	4mg/mL	14,6mg/mL= 1,18mM	1mM	30kU/mL	3,33u/mL	10mg/mL
C_f		50mM	0,04mg/mL	0,146mg/mL =0,0118mM	0,5mM	30U/mL	50mU/mL	0.2mg/mL
V (µL)	194	250	10	10	500	1	15	20

Étant donné que la réaction est très rapide, il s'agit de mettre le réactif, c'est-à-dire la xanthine oxydase, au dernier moment.

La lecture de la réaction se fait à 550 nm.

Les résultats obtenus sur les *Ormenis* sont présentés dans le chapitre IV.

III.3 Mise au point du test WST

Nous avons utilisé et suivi le protocole du Kit Dojindo Molecular Technologies, Inc : SOD Assay Kit-WST.

Il est composé d'une solution de WST (Water Soluble Tetrazolium) et de xanthine, d'une solution tampon et enfin d'une solution de xanthine oxydase. La solution de SOD n'est pas fournie et doit être préparée extemporanément. Il s'agit donc ici encore d'un système bi-enzymatique.

Le test a été réalisé sur des plaques de 96 puits. Le volume final de la solution est donc de 250 µL.

Une gamme de SOD a été mise au point afin de déterminer la concentration de SOD optimale : celle qui permet d'atteindre l'IC_{50}, à savoir 0.2 U/mL (voir figure 69).

Nous avons vérifié l'absence d'interaction du test avec l'acétate d'éthyle, solvant utilisé pour solubiliser les extraits d'*Ormenis*. Il n'a montré aucune interaction aux concentrations utilisées.

La cinétique de la réaction est extrêmement rapide, puisque la solution réagit entièrement dès la première minute. Il est donc important d'ajouter la solution contenant la xanthine oxydase au dernier moment.

Nous avons testé différents temps d'incubation des extraits avec la SOD, mais ce paramètre n'a finalement pas d'importance.

L'inhibition de la SOD par le DEDTC, un inhibiteur connu de la SOD, a été testée avec succès afin de donner un témoin positif à ce test (voir figure 70).

Aucun échantillon n'a finalement été testé grâce au WST-1 en raison des nombreux problèmes soulevés lors de la mise au point de ce test.

III.4 Mise au point du test au MitoSOX™ Red

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le LCC (Laboratoire de Chimie des Coordinations), à Toulouse, qui nous a aimablement permis d'utiliser leur fluorimètre à lecteur de plaques.

Chaque plaque contient 96 puits de 250 µL. La première concentration testée est de 5 µM, concentration utilisée en routine et au-delà de laquelle il existe un risque de cytotoxicité, comme indiqué dans le protocole fournit par Molecular Probes™. Cependant, les concentrations ont été augmentées jusqu'à 260 µM afin de tenter d'apercevoir une fluorescence.

Les maxima d'absorption et d'émission sont respectivement de 510 et 580 nm, longueurs d'ondes auxquelles il y a peu d'interaction avec les extraits naturels.

III.5 Mise au point du test au pyrogallol

III.5.1 Conditions générales du test au pyrogallol

La solution de pyrogallol est préparée extemporanément et n'est jamais conservée plus de 8h. Elle est maintenue à l'abri de la lumière, à 4°C, dans une solution d'eau ultra-pure milliQ, additionnée d'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la solution atteigne un pH de 2. Dès lors qu'elle entre en contact avec la solution de Tris, qui est à pH 8.2, la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol se fait instantanément.

Afin de réduire le laps de temps entre l'initiation de la réaction dans le premier et dans le dernier puits, nous avons utilisé une pipette multicanaux. Il y a donc sensiblement les mêmes conditions dans tous les puits.

La solution de tampon Tris 200 mM pH 8.2, EDTA 10 mM utilisée comme déclencheur de la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol dans les puits. Elle est aussi utilisée pour diluer les solutions de SOD.

Les mesures d'absorbance de l'ensemble des cinétiques ont été réalisées par un spectromètre UV-visible à lecteur de plaques (Star Nano SPECTRO, BMG labtech).

Trois séries d'analyses ont été menées :

- la première a consisté en un screening rapide de 86 échantillons d'endophytes repris dans l'acétate d'éthyle, testés à 40 µg/mL,
- la seconde a concerné les réplicas de 8 souches qui paraissaient détenir une activité sur la SOD, repris dans le méthanol et testés à 40 µg/mL,

- la troisième a concerné les réplicas de 8 souches qui paraissaient détenir une activité sur la SOD, repris dans le méthanol et testés cette fois à 160 µg/mL.

III.5.2 Protocole utilisé pour déterminer l'activité des 86 souches du screening rapide.

Le protocole utilisé lors du screening rapide des 86 souches d'endophytes est résumé dans le tableau suivant (voir tableau 18) :

Tableau 18: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale.

	V (µL)	**Cf**	**Commentaires**
Tampon Tris 200mM +EDTA 10mM	229	200 mM	
Pyrogallol 2.5 mM	10	0.1 mM	Préparée dans HCl pH2
SOD 25 U/mL	10	1 U/mL	
Echantillon 10 mg/mL (86 souches du screening rapide)	1	40 µg/mL	**Échantillon dissout dans l'AcOEt**

En raison de l'évaporation incontrôlée de l'acétate d'éthyle dans la série d'échantillons conservés dans ce solvant au cours du temps, il est difficile d'affirmer avec certitude que ces échantillons ont été testés à chaque fois à une concentration identique, ce qui rend d'autant plus difficile l'interprétation des tests statistiques.

Les cinétiques ont été enregistrées de 0 à 10 minutes, à raison d'une mesure d'absorbance par minute.

Les analyses n'ont pas pu être effectuées trois fois, en raison du manque d'extrait.

III.5.3 Protocole utilisé pour tester l'activité des 8 souches d'intérêt re-cultivées

Suite à ces expérimentations, un biais supplémentaire au problème de l'évaporation de l'acétate d'éthyle a été mis en évidence : les échantillons testés sont dissous dans de l'acétate d'éthyle pour le test au pyrogallol et dans le méthanol lorsqu'ils sont analysés en HPLC. Il a donc été décidé de dissoudre les échantillons dans le méthanol pour l'ensemble des tests. Ce solvant a par ailleurs l'avantage de re-dissoudre la totalité de l'extrait brut, ce qui n'était pas le cas avec l'acétate d'éthyle.

Le protocole a donc été légèrement modifié lors du test sur les souches d'intérêt re-cultivées, le reste du protocole restant le même (voir tableau 19) :

Tableau 19: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale pour le test des 6 réplicas des 8 souches re-cultivées.

	V (µL)	**Cf**	**Commentaires**
Tampon Tris 200mM +EDTA 10mM	229	200 mM	
Pyrogallol 2.5 mM	10	0.1 mM	Préparée dans HCl pH2
SOD 25 U/mL	10	1 U/mL	
Echantillon 10 mg/mL (6 réplicas des 8 souches d'intérêt re-cultivées et gélose seule)	1	40 µg/mL	**Échantillon dissout dans le méthanol**

Les cinétiques ont été enregistrées de 0 à 10 minutes, à raison d'une mesure d'absorbance par minute.

Cette fois, la cinétique de chaque condition expérimentale a pu être effectuée trois fois, afin d'analyser les données statistiquement.

III.5.4 Protocole utilisé pour tester l'activité des pools des 8 souches d'intérêt re-cultivées, de concentration finale 160 µg/mL

Le protocole utilisé pour cette nouvelle série d'expérimentations est en tout point le même que le précédent, mis à part la concentration finale des extraits testés et donc le volume d'extraits utilisé (voir tableau 20).

Seules 7 souches sur les 8 ont pu être re-testées : il n'y avait pas de quantité suffisante pour tester la souche 186, ni le témoin gélose.

Tableau 20: Concentrations de Pyrogallol et de SOD utilisées, afin d'obtenir une absorbance à 320nm optimale, pour le test des pools des 8 souches.

	V (µL)	**Cf**	**Commentaires**
Tampon Tris 200mM +EDTA 10mM	**225**	200 mM	
Pyrogallol 2.5 mM	10	0.1 mM	Préparée dans HCl pH2
SOD 25 U/mL	10	1 U/mL	
Echantillon 10 mg/mL (pool des 8 souches d'intérêt)	4	**160 µg/mL**	Échantillon dissout dans le méthanol

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Abate, C., L. Patel, F. J. Rauscher, and T. Curran 1990 Redox Regulation of Fos and Jun DNA-Binding Activity in Vitro. Science (New York, N.Y.) 249(4973): 1157–1161.

Abreu, Isabel A., and Diane E. Cabelli 2010 Superoxide Dismutases-a Review of the Metal-Associated Mechanistic Variations. Biochimica Et Biophysica Acta 1804(2): 263–274.

Ahmed, Mohamed N., Champa Codipilly, Neil Hogg, and Richard L. Auten 2011 The Protective Effect of Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase on Nitric Oxide Bioavailability in the Lung after Exposure to Hyperoxia Stress. Experimental Lung Research 37(1): 10–17.

Allen, Felicity, Allison Pon, Michael Wilson, Russ Greiner, and David Wishart 2014 CFM-ID: A Web Server for Annotation, Spectrum Prediction and Metabolite Identification from Tandem Mass Spectra. Nucleic Acids Research: gku436.

Aly, Amal H., RuAngelie Edrada-Ebel, Ine Dewi Indriani, et al. 2008 Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte Alternaria Sp. and Their Subsequent Detection in Its Host Plant Polygonum Senegalense. Journal of Natural Products 71(6): 972–980.

Anzellotti, A. I., and N. P. Farrell 2008 Zinc Metalloproteins as Medicinal Targets 37(8): 1629–1651.

Arnesano, Fabio, Lucia Banci, Ivano Bertini, et al. 2004 The Unusually Stable Quaternary Structure of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase 1 Is Controlled by Both Metal Occupancy and Disulfide Status. The Journal of Biological Chemistry 279(46): 47998–48003.

Banci, L., M. Benedetto, I. Bertini, et al. 1998 Solution Structure of Reduced Monomeric Q133M2 Copper, Zinc Superoxide Dismutase (SOD). Why Is SOD a Dimeric Enzyme? Biochemistry 37(34): 11780–11791.

Bannister, J. V., W. H. Bannister, and G. Rotilio 1987 Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. CRC Critical Reviews in Biochemistry 22(2): 111–180.

Bar-Peled, O, E Korkotian, M Segal, and Y Groner 1996a Constitutive Overexpression of Cu/Zn Superoxide Dismutase Exacerbates Kainic Acid-Induced Apoptosis of Transgenic-Cu/Zn Superoxide Dismutase Neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(16): 8530–8535.
1996b Constitutive Overexpression of Cu/Zn Superoxide Dismutase Exacerbates Kainic Acid-Induced Apoptosis of Transgenic-Cu/Zn Superoxide Dismutase Neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(16): 8530–8535.

Barrera, Giuseppina, Stefania Pizzimenti, and Mario Umberto Dianzani

2008 Lipid Peroxidation: Control of Cell Proliferation, Cell Differentiation and Cell Death. Molecular Aspects of Medicine 29(1–2): 1–8.

Barrera, Giuseppina, Cristina Toaldo, Stefania Pizzimenti, et al. 2008 The Role of PPAR Ligands in Controlling Growth-Related Gene Expression and Their Interaction with Lipoperoxidation Products. PPAR Research 2008: 524671.

Becuwe, Philippe, Marie Ennen, Rémi Klotz, Claire Barbieux, and Stéphanie Grandemange 2014 Manganese Superoxide Dismutase in Breast Cancer: From Molecular Mechanisms of Gene Regulation to Biological and Clinical Significance. Free Radical Biology & Medicine 77: 139–151.

Ben Mansour, Riadh, Bochra Gargouri, Mohamed Bouaziz, et al. 2011 Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of Inflorescence of Ormenis Africana in Vitro and in Cell Cultures. Lipids in Health and Disease 10: 78.

Berlett, B. S., and E. R. Stadtman 1997 Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. The Journal of Biological Chemistry 272(33): 20313–20316.

Bijeire, Laurent 2006 Photosensibilisation de cibles biologiques (ADN, protéines) par des complexes polypyridiques de ruthénium(II), vol.1. Toulouse.

Bijeire, Laurent, Benjamin Elias, Jean-Pierre Souchard, et al. 2006 Photoelectron Transfer Processes with ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and Cu/Zn Superoxide Dismutase. Biochemistry 45(19): 6160–6169.

Bissery, M. C., D. Guénard, F. Guéritte-Voegelein, and F. Lavelle 1991 Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. Cancer Research 51(18): 4845–4852.

Bitner, Brittany R., Carlos J. Perez-Torres, Lingyun Hu, Taeko Inoue, and Robia G. Pautler 2012 Improvements in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Through SOD2 Overexpression Are Due to Functional and Not Structural Alterations. Magnetic Resonance Insights 5: 1–6.

Bohr, Vilhelm A., Tinna Stevnsner, and Nadja C. de Souza-Pinto 2002 Mitochondrial DNA Repair of Oxidative Damage in Mammalian Cells. Gene 286(1): 127–134.

Boveris, A., E. Cadenas, and A. O. Stoppani 1976 Role of Ubiquinone in the Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. The Biochemical Journal 156(2): 435–444.

Boveris, A., L. E. Costa, J. J. Poderoso, M. C. Carreras, and E. Cadenas 2000 Regulation of Mitochondrial Respiration by Oxygen and Nitric Oxide. Annals of the New York Academy of Sciences 899: 121–135.

Brewer, George J., Fred Askari, Matthew T. Lorincz, et al.

2006 Treatment of Wilson Disease with Ammonium Tetrathiomolybdate: IV. Comparison of Tetrathiomolybdate and Trientine in a Double-Blind Study of Treatment of the Neurologic Presentation of Wilson Disease. Archives of Neurology 63(4): 521–527.

Brookes, Paul, and Victor M. Darley-Usmar
2002 Hypothesis: The Mitochondrial NO(*) Signaling Pathway, and the Transduction of Nitrosative to Oxidative Cell Signals: An Alternative Function for Cytochrome C Oxidase. Free Radical Biology & Medicine 32(4): 370–374.

Brookes, Paul S., Yisang Yoon, James L. Robotham, M. W. Anders, and Shey-Shing Sheu
2004 Calcium, ATP, and ROS: A Mitochondrial Love-Hate Triangle. American Journal of Physiology. Cell Physiology 287(4): C817-833.

Brown, Dawn P. G., Helen Chin-Sinex, Bei Nie, Marc S. Mendonca, and Mu Wang
2009 Targeting Superoxide Dismutase 1 to Overcome Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 63(4): 723–730.

Brown, G. C.
1999 Nitric Oxide and Mitochondrial Respiration. Biochimica Et Biophysica Acta 1411(2–3): 351–369.

Brown, Guy C., and Vilmante Borutaite
2007 Nitric Oxide and Mitochondrial Respiration in the Heart. Cardiovascular Research 75(2): 283–290.

Brownlee, Michael
2005 The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. Diabetes 54(6): 1615–1625.

Bruijn, Lucie I., Timothy M. Miller, and Don W. Cleveland
2004 Unraveling the Mechanisms Involved in Motor Neuron Degeneration in ALS. Annual Review of Neuroscience 27: 723–749.

Bruneton, Jean
N.d. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Paris: Lavoisier, TEC&DOC.
N.d. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 4e edition. Lavoisier, TEC&DOC.

Bulteau, Anne-Laure, Luke I. Szweda, and Bertrand Friguet
2006 Mitochondrial Protein Oxidation and Degradation in Response to Oxidative Stress and Aging. Experimental Gerontology 41(7): 653–657.

Busciglio, Jorge, Alfredo Lorenzo, John Yeh, and Bruce A Yankner
1995 β-Amyloid Fibrils Induce Tau Phosphorylation and Loss of Microtubule Binding. Neuron 14(4): 879–888.

Busse, R., and A. Mülsch
1990 Calcium-Dependent Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cytosol Is Mediated by Calmodulin. FEBS Letters 265(1–2): 133–136.

Cadenas, E., and K. J. Davies
2000a Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. Free Radical Biology & Medicine 29(3–4): 222–230.
2000b Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. Free Radical Biology & Medicine 29(3–4): 222–230.

Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, et al.
1999 Hydroxyl Radicals and DNA Base Damage. Mutation Research 424(1–2): 9–21.

Cadet, Jean, Thierry Delatour, Thierry Douki, et al.
1999 Hydroxyl Radicals and DNA Base Damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 424(1–2): 9–21.

Campbell, D. R., and M. S. Kurzer
1993 Flavonoid Inhibition of Aromatase Enzyme Activity in Human Preadipocytes. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 46(3): 381–388.

Capone, George, Peter Kim, Sole Jovanovich, et al.
2002 Evidence for Increased Mitochondrial Superoxide Production in Down Syndrome. Life Sciences 70(24): 2885–2895.

Chance, B., H. Sies, and A. Boveris
1979 Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. Physiological Reviews 59(3): 527–605.

Chandel, N. S., and P. T. Schumacker
2000 Cellular Oxygen Sensing by Mitochondria: Old Questions, New Insight. Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 88(5): 1880–1889.

Chandel, Navdeep S., and G. R. Scott Budinger
2007 The Cellular Basis for Diverse Responses to Oxygen. Free Radical Biology & Medicine 42(2): 165–174.

Chaturvedula, V. S. Prakash, Jennifer K. Schilling, and David G. I. Kingston
2002 New Cytotoxic Coumarins and Prenylated Benzophenone Derivatives from the Bark of Ochrocarpos Punctatus from the Madagascar Rainforest. Journal of Natural Products 65(7): 965–972.

Che, Meixia, Ren Wang, Xiaoxing Li, Hui-Yun Wang, and X. F. Steven Zheng
2016a Expanding Roles of Superoxide Dismutases in Cell Regulation and Cancer. Drug Discovery Today 21(1): 143–149.
2016b Expanding Roles of Superoxide Dismutases in Cell Regulation and Cancer. Drug Discovery Today 21(1): 143–149.

Chou, S. M., H. S. Wang, and A. Taniguchi
1996 Role of SOD-1 and Nitric Oxide/Cyclic GMP Cascade on Neurofilament Aggregation in ALS/MND. Journal of the Neurological Sciences 139 Suppl: 16–26.

Cohen, Susan D.

2006 Host Selectivity and Genetic Variation of Discula Umbrinella Isolates from Two Oak Species: Analyses of Intergenic Spacer Region Sequences of Ribosomal DNA. Microbial Ecology 52(3): 463–469.

Connor, Kip M., Nadine Hempel, Kristin K. Nelson, et al. 2007 Manganese Superoxide Dismutase Enhances the Invasive and Migratory Activity of Tumor Cells. Cancer Research 67(21): 10260–10267.

Cornejo-Garcia, J A, C Mayorga, M J Torres, et al. 2006 Anti-Oxidant Enzyme Activities and Expression and Oxidative Damage in Patients with Non-Immediate Reactions to Drugs. Clinical and Experimental Immunology 145(2): 287–295.

Corpas, Francisco J., Ana Fernández-Ocaña, Alfonso Carreras, et al. 2006 The Expression of Different Superoxide Dismutase Forms Is Cell-Type Dependent in Olive (Olea Europaea L.) Leaves. Plant & Cell Physiology 47(7): 984–994.

Craven, P. A., and F. R. DeRubertis 1978 Restoration of the Responsiveness of Purified Guanylate Cyclase to Nitrosoguanidine, Nitric Oxide, and Related Activators by Heme and Hemeproteins. Evidence for Involvement of the Paramagnetic Nitrosyl-Heme Complex in Enzyme Activation. The Journal of Biological Chemistry 253(23): 8433–8443.

Dang, Bach Tai, Charlotte Gény, Patricia Blanchard, et al. 2014 Advanced Glycation Inhibition and Protection against Endothelial Dysfunction Induced by Coumarins and Procyanidins from Mammea Neurophylla. Fitoterapia 96: 65–75.

Dang, Bach Tai, Yann Guitton, Ingrid Freuze, et al. 2015 Dereplication of Mammea Neurophylla Metabolites to Isolate Original 4-Phenylcoumarins. Phytochemistry Letters 11: 61–68.

Davidson, Sean M., and Derek M. Yellon 2005 The Role of Nitric Oxide in Mitochondria. Focus on “Modulation of Mitochondrial Ca2+ by Nitric Oxide in Cultured Bovine Vascular Endothelial Cells.” American Journal of Physiology. Cell Physiology 289(4): C775-777.

De Brucker, Katrijn, Anna Bink, Els Meert, Bruno P. A. Cammue, and Karin Thevissen 2013 Potentiation of Antibiofilm Activity of Amphotericin B by Superoxide Dismutase Inhibition. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2013: 704654.

Deeble, D. J., B. J. Parsons, G. O. Phillips, H. P. Schuchmann, and C. Von Sonntag 1988 Superoxide Radical Reactions in Aqueous Solutions of Pyrogallol and N-Propyl Gallate: The Involvement of Phenoxyl Radicals. A Pulse Radiolysis Study. International Journal of Radiation Biology 54(2): 179–193.

Dirmeier, Reinhard, Kristin M. O’Brien, Marcella Engle, et al. 2002 Exposure of Yeast Cells to Anoxia Induces Transient Oxidative Stress. Implications for the Induction of Hypoxic Genes. The Journal of Biological Chemistry 277(38): 34773–34784.

Druzhyna, Nadiya M., Glenn L. Wilson, and Susan P. LeDoux 2008 Mitochondrial DNA Repair in Aging and Disease. Mechanisms of Ageing and Development 129(7–8): 383–390.

Dunkley, P.r. 1994 Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, Vol. 27 : Model Systems in Signal Transduction Edited by S. Shenolikar and A. C. Nairn. Raven Press, New York, 1993, ISBN 0-88167-975-5, 224 Pp., $95.00. Journal of Neurochemistry 62(5): 2062–2062.

Dzaugis, Mary E., Arthur J. Spivack, and Steven D'Hondt 2015 A Quantitative Model of Water Radiolysis and Chemical Production Rates near Radionuclide-Containing Solids. Radiation Physics and Chemistry 115: 127–134.

Echtay, Karim S., Telma C. Esteves, Julian L. Pakay, et al. 2003 A Signalling Role for 4-Hydroxy-2-Nonenal in Regulation of Mitochondrial Uncoupling. The EMBO Journal 22(16): 4103–4110.

Feng, Zhaohui, Wenwei Hu, Shantu Amin, and Moon-shong Tang 2003 Mutational Spectrum and Genotoxicity of the Major Lipid Peroxidation Product, Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal, Induced DNA Adducts in Nucleotide Excision Repair-Proficient and -Deficient Human Cells. Biochemistry 42(25): 7848–7854.

Fisher, C. L., R. A. Hallewell, V. A. Roberts, J. A. Tainer, and E. D. Getzoff 1991 Probing the Structural Basis for Enzyme-Substrate Recognition in Cu,Zn Superoxide Dismutase. Free Radical Research Communications 12–13 Pt 1: 287–296.

Fleming, J. E., H. A. Leon, and J. Miquel 1981 Effects of Ethidium Bromide on Development and Aging of Drosophila: Implications for the Free Radical Theory of Aging. Experimental Gerontology 16(3): 287–293.

Fracarolli, Letícia, Gabriela B. Rodrigues, Ana C. Pereira, et al. 2016 Inactivation of Plant-Pathogenic Fungus Colletotrichum Acutatum with Natural Plant-Produced Photosensitizers under Solar Radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology 162: 402–411.

Fridovich, I. 1978 Superoxide Dismutases: Defence against Endogenous Superoxide Radical. Ciba Foundation Symposium(65): 77–93.

Fridovich, Irwin 1995 Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. Annual Review of Biochemistry 64(1): 97–112.

Furtmüller, Paul G., Martina Zederbauer, Walter Jantschko, et al. 2006 Active Site Structure and Catalytic Mechanisms of Human Peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics 445(2): 199–213.

Gahalaut, Pratik, Puneet Singh Soodan, Nitin Mishra, et al.

2014 Clinical Efficacy of Psoralen + Sunlight vs. Combination of Isotretinoin and Psoralen + Sunlight for the Treatment of Chronic Plaque-Type Psoriasis Vulgaris: A Randomized Hospital-Based Study. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 30(6): 294–301.

Gao, Ruomei, Zhuobin Yuan, Zhiqiang Zhao, and Xiurui Gao
1998 Mechanism of Pyrogallol Autoxidation and Determination of Superoxide Dismutase Enzyme Activity. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45(1): 41–45.

Garlet, Thais Regina, Eduardo Benedetti Parisotto, Guilherme da Silva de Medeiros, et al.
2013 Systemic Oxidative Stress in Children and Teenagers with Down Syndrome. Life Sciences 93(16): 558–563.

Garrison, W. M., M. E. Jayko, and W. Bennett
1962 Radiation-Induced Oxidation of Protein in Aqueous Solution. Radiation Research 16: 483–502.

Garrison, Warren M.
1987 Reaction Mechanisms in the Radiolysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. Chemical Reviews 87(2): 381–398.

Gella, Alejandro, and Nuria Durany
2009 Oxidative Stress in Alzheimer Disease. Cell Adhesion & Migration 3(1): 88–93.

Giacco, Ferdinando, and Michael Brownlee
2010 Oxidative Stress and Diabetic Complications. Circulation Research 107(9): 1058–1070.

Gillings, Michael, and Andrew Holmes
2013 Plant Microbiology. Taylor & Francis.

Glauser, Gaetan, Nathalie Veyrat, Bertrand Rochat, Jean-Luc Wolfender, and Ted C. J. Turlings
2013 Ultra-High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Plant Metabolomics: A Systematic Comparison of High-Resolution Quadrupole-Time-of-Flight and Single Stage Orbitrap Mass Spectrometers. Journal of Chromatography. A 1292: 151–159.

Glorieux, Christophe, Marcel Zamocky, Juan Marcelo Sandoval, Julien Verrax, and Pedro Buc Calderon
2015 Regulation of Catalase Expression in Healthy and Cancerous Cells. Free Radical Biology & Medicine 87: 84–97.

Goldstone, Andrew B., Stefan I. Liochev, and Irwin Fridovich
2006 Inactivation of Copper, Zinc Superoxide Dismutase by H2O2 : Mechanism of Protection. Free Radical Biology & Medicine 41(12): 1860–1863.

Groner, Y, O Elroy-Stein, K B Avraham, et al.
1990 Down Syndrome Clinical Symptoms Are Manifested in Transfected Cells and Transgenic Mice Overexpressing the Human Cu/Zn-Superoxide Dismutase Gene. Journal de Physiologie 84(1): 53–77.

Gus'kova, R. A., I. I. Ivanov, V. K. Kol'tover, V. V. Akhobadze, and A. B. Rubin
1984 Permeability of Bilayer Lipid Membranes for Superoxide (O2-.) Radicals. Biochimica Et Biophysica Acta 778(3): 579–585.

Halliwell, Barry
2006 Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology 141(2): 312–322.

Halliwell, Barry, and John M. C. Gutteridge
2015 Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.

Han, Derick, Fernando Antunes, Raffaella Canali, Daniel Rettori, and Enrique Cadenas
2003 Voltage-Dependent Anion Channels Control the Release of the Superoxide Anion from Mitochondria to Cytosol. The Journal of Biological Chemistry 278(8): 5557–5563.

Harman, D.
1981 The Aging Process. Proceedings of the National Academy of Sciences 78(11): 7124–7128.

Harman, Denham
1956 Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. Journal of Gerontology 11(3): 298–300.

Hart, P. John
2006a Pathogenic Superoxide Dismutase Structure, Folding, Aggregation and Turnover. Current Opinion in Chemical Biology 10(2): 131–138.
2006b Pathogenic Superoxide Dismutase Structure, Folding, Aggregation and Turnover. Current Opinion in Chemical Biology 10(2): 131–138.

Hawkins, Brian J., Muniswamy Madesh, C. J. Kirkpatrick, and Aron B. Fisher
2007 Superoxide Flux in Endothelial Cells via the Chloride Channel-3 Mediates Intracellular Signaling. Molecular Biology of the Cell 18(6): 2002–2012.

Hayward, Lawrence J., Jorge A. Rodriguez, Ji W. Kim, et al.
2002 Decreased Metallation and Activity in Subsets of Mutant Superoxide Dismutases Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. The Journal of Biological Chemistry 277(18): 15923–15931.

Heppner, David E., and Albert van der Vliet
2016 Redox-Dependent Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. Redox Biology 8: 24–27.

Hockenberry, Marilyn J., Olga A. Taylor, Alice Pasvogel, et al.
2014 The Influence of Oxidative Stress on Symptom Occurrence, Severity and Distress During Childhood Leukemia Treatment. Oncology Nursing Forum 41(4): E238–E247.

Holbrook, Nikki J., George R. Martin, and Richard A. Lockshin
1996 Cellular Aging and Cell Death. John Wiley & Sons.

Huang, P, L Feng, E A Oldham, M J Keating, and W Plunkett 2000 Superoxide Dismutase as a Target for the Selective Killing of Cancer Cells. Nature 407(6802): 390–395.

Huang, R. P., J. X. Wu, Y. Fan, and E. D. Adamson 1996 UV Activates Growth Factor Receptors via Reactive Oxygen Intermediates. The Journal of Cell Biology 133(1): 211–220.

Huang, Zhongjing, Xiaoling Cai, Changlun Shao, et al. 2008 Chemistry and Weak Antimicrobial Activities of Phomopsins Produced by Mangrove Endophytic Fungus Phomopsis Sp. ZSU-H76. Phytochemistry 69(7): 1604–1608.

Huang, Zhongjing, Jianxiang Yang, Xiaoling Cai, Zhigang She, and Yongcheng Lin 2012 A New Furanocoumarin from the Mangrove Endophytic Fungus Penicillium Sp. (ZH16). Natural Product Research 26(14): 1291–1295.

Jabeen, Rukhsana, M. Saleemuddin, John Petersen, and Amin Mohammad 2007 Inactivation and Modification of Superoxide Dismutase by Glyoxal: Prevention by Antibodies. Biochimie 89(3): 311–318.

Jezek, Petr, and Lydie Hlavatá 2005 Mitochondria in Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Cell, Tissues, and Organism. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37(12): 2478–2503.

Joenje, Hans 1989 Genetic Toxicology of Oxygen. Mutation Research/DNAging 219(4): 193–208.

Juarez, Jose C., Oscar Betancourt, Steven R. Pirie-Shepherd, et al. 2006 Copper Binding by Tetrathiomolybdate Attenuates Angiogenesis and Tumor Cell Proliferation through the Inhibition of Superoxide Dismutase 1. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 12(16): 4974–4982.

Katoh, S., Y. Mitsui, K. Kitani, and T. Suzuki 1999 Hyperoxia Induces the Neuronal Differentiated Phenotype of PC12 Cells via a Sustained Activity of Mitogen-Activated Protein Kinase Induced by Bcl-2. The Biochemical Journal 338 (Pt 2): 465–470.

Kianpour Rad, Sima, M. S. Kanthimathi, Sri Nurestri Abd Malek, et al. 2015 Cinnamomum Cassia Suppresses Caspase-9 through Stimulation of AKT1 in MCF-7 Cells but Not in MDA-MB-231 Cells. PloS One 10(12): e0145216.

Kjer, Julia, Abdessamad Debbab, Amal H. Aly, and Peter Proksch 2010 Methods for Isolation of Marine-Derived Endophytic Fungi and Their Bioactive Secondary Products. Nature Protocols 5(3): 479–490.

Kowald, Axel, Hans Lehrach, and Edda Klipp 2006 Alternative Pathways as Mechanism for the Negative Effects Associated with Overexpression of Superoxide Dismutase. Journal of Theoretical Biology 238(4): 828–840.

Kowluru, Renu A., Vibhuti Kowluru, Ye Xiong, and Ye-Shih Ho 2006 Overexpression of Mitochondrial Superoxide Dismutase in Mice Protects the Retina from Diabetes-Induced Oxidative Stress. Free Radical Biology & Medicine 41(8): 1191–1196.

Krings, Michael, Thomas N. Taylor, Hagen Hass, et al. 2007 Fungal Endophytes in a 400-Million-Yr-Old Land Plant: Infection Pathways, Spatial Distribution, and Host Responses. The New Phytologist 174(3): 648–657.

Kumagai, T., Y. Kawamoto, Y. Nakamura, et al. 2000 4-Hydroxy-2-Nonenal, the End Product of Lipid Peroxidation, Is a Specific Inducer of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 273(2): 437–441.

Kuthan, H, H J Haussmann, and J Werringloer 1986 A Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Activities in Crude Tissue Fractions. Biochemical Journal 237(1): 175–180.

Lakshmi, Vijai, Dhan Prakash, Kanwal Raj, Randhir S. Kapil, and Satya P. Popli 1984 Monoterpenoid Furanocoumarin Lactones from Clausena Anisata. Phytochemistry 23(11): 2629–2631.

Le Trant, N., S. R. Meshnick, K. Kitchener, J. W. Eaton, and A. Cerami 1983 Iron-Containing Superoxide Dismutase from Crithidia Fasciculata. Purification, Characterization, and Similarity to Leishmanial and Trypanosomal Enzymes. The Journal of Biological Chemistry 258(1): 125–130.

Lesnefsky, Edward J., and Charles L. Hoppel 2003 Ischemia-Reperfusion Injury in the Aged Heart: Role of Mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics 420(2): 287–297.

Li, Lihong, and Huilan Yi 2012 Effect of Sulfur Dioxide on ROS Production, Gene Expression and Antioxidant Enzyme Activity in Arabidopsis Plants. Plant Physiology and Biochemistry 58: 46–53.

Li, Xican 2012 Improved Pyrogallol Autoxidation Method: A Reliable and Cheap Superoxide-Scavenging Assay Suitable for All Antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(25): 6418–6424.

Lott, Ira T., and Elizabeth Head 2005 Alzheimer Disease and Down Syndrome: Factors in Pathogenesis. Neurobiology of Aging 26(3): 383–389.

Lott, Ira T., Elizabeth Head, Eric Doran, and Jorge Busciglio 2006 Beta-Amyloid, Oxidative Stress and down Syndrome. Current Alzheimer Research 3(5): 521–528.

Lunt, Sophia Y., and Matthew G. Vander Heiden

2011 Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Annual Review of Cell and Developmental Biology 27: 441–464.

Lyublinskaya, O. G., V. V. Zenin, A. N. Shatrova, et al.
2014 Intracellular Oxidation of Hydroethidine: Compartmentalization and Cytotoxicity of Oxidation Products. Free Radical Biology & Medicine 75: 60–68.

Mangal, Dipti, Daljit Vudathala, Jong-Heum Park, et al.
2009 Analysis of 7,8-Dihydro-8-Oxo-2'-deoxyguanosine in Cellular DNA during Oxidative Stress. Chemical Research in Toxicology 22(5): 788–797.

Marklund, S. L.
1984 Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines. The Journal of Clinical Investigation 74(4): 1398–1403.

Marklund, S L, N G Westman, E Lundgren, and G Roos
1982 Copper- and Zinc-Containing Superoxide Dismutase, Manganese-Containing Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Normal and Neoplastic Human Cell Lines and Normal Human Tissues. Cancer Research 42(5): 1955–1961.

Marklund, Stefan, and Gudrun Marklund
1974 Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. European Journal of Biochemistry 47(3): 469–474.

Marnett, L. J.
1999 Lipid Peroxidation-DNA Damage by Malondialdehyde. Mutation Research 424(1–2): 83–95.

Matés, J. M., and F. Sánchez-Jiménez
1999 Antioxidant Enzymes and Their Implications in Pathophysiologic Processes. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library 4: D339-345.

Mayer, B., K. Schmidt, P. Humbert, and E. Böhme
1989 Biosynthesis of Endothelium-Derived Relaxing Factor: A Cytosolic Enzyme in Porcine Aortic Endothelial Cells Ca2+-Dependently Converts L-Arginine into an Activator of Soluble Guanylyl Cyclase. Biochemical and Biophysical Research Communications 164(2): 678–685.

McCord, J. M., and I. Fridovich
1968 The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. The Journal of Biological Chemistry 243(21): 5753–5760.
1969 Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry 244(22): 6049–6055.

McCord, Joe M., and Irwin Fridovich
1969 Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). Journal of Biological Chemistry 244(22): 6049–6055.

Miller, Anne-Frances

2012 Superoxide Dismutases: Ancient Enzymes and New Insights. FEBS Letters 586(5): 585–595.

Mills, G. C.
1957 Hemoglobin Catabolism. I. Glutathione Peroxidase, an Erythrocyte Enzyme Which Protects Hemoglobin from Oxidative Breakdown. The Journal of Biological Chemistry 229(1): 189–197.

Mogensen, Trine H., and Søren R. Paludan
2001 Molecular Pathways in Virus-Induced Cytokine Production. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65(1): 131–150.

Moon, Joon-Kwan, and Takayuki Shibamoto
2009 Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(5): 1655–1666.

Moricca, S., and A. Ragazzi
2008 Fungal Endophytes in Mediterranean Oak Forests: A Lesson from Discula Quercina. Phytopathology 98(4): 380–386.

Mueller-Harvey, Irene
2006 Unravelling the Conundrum of Tannins in Animal Nutrition and Health. Journal of the Science of Food and Agriculture 86(13): 2010–2037.

Mujahid, Muhammad, Agnieszka Foltyn-Arfa Kia, Brian Duff, et al.
2015 Spectroscopic Studies, DFT Calculations, and Cytotoxic Activity of Novel silver(I) Complexes of Hydroxy Ortho-Substituted-Nitro-2 H-Chromen-2-One Ligands and a Phenanthroline Adduct. Journal of Inorganic Biochemistry 153: 103–113.

Muñoz-Durango, Katalina, Alexandre Maciuk, Abha Harfouche, et al.
2012 Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery. Analytical Chemistry 84(7): 3324–3329.

Nagata, Kazuhiro, Yoshinobu Iwasaki, Tadaaki Yamada, et al.
2007 Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase by N-Acetylcysteine in Hyperoxic Lung Injury. Respiratory Medicine 101(4): 800–807.

Nathan, C.
1992 Nitric Oxide as a Secretory Product of Mammalian Cells. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 6(12): 3051–3064.

Nelson, S. K., S. K. Bose, and J. M. McCord
1994 The Toxicity of High-Dose Superoxide Dismutase Suggests That Superoxide Can Both Initiate and Terminate Lipid Peroxidation in the Reperfused Heart. Free Radical Biology & Medicine 16(2): 195–200.

Nemoto, S., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, and T. Finkel
2000 Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. Molecular and Cellular Biology 20(19): 7311–7318.

Nordberg, J., and E. S. Arnér 2001 Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology & Medicine 31(11): 1287–1312.

Nordlund, Anna, and Mikael Oliveberg 2006 Folding of Cu/Zn Superoxide Dismutase Suggests Structural Hotspots for Gain of Neurotoxic Function in ALS: Parallels to Precursors in Amyloid Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(27): 10218–10223.

Núñez, César, Iván Lozada-Requena, Tíndara Ysmodes, et al. 2015 [Immunomodulation of Uncaria tomentosa over dendritic cells, il-12 and profile TH1/TH2/TH17 in breast cancer]. Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública 32(4): 643–651.

O'Connell, M. J., H. Baum, and T. J. Peters 1986 Haemosiderin-like Properties of Free-Radical-Modified Ferritin. The Biochemical Journal 240(1): 297–300.

Orr, W. C., and R. S. Sohal 1993 Effects of Cu-Zn Superoxide Dismutase Overexpression of Life Span and Resistance to Oxidative Stress in Transgenic Drosophila Melanogaster. Archives of Biochemistry and Biophysics 301(1): 34–40.

Orrenius, Sten, and Boris Zhivotovsky 2005 Cardiolipin Oxidation Sets Cytochrome c Free. Nature Chemical Biology 1(4): 188–189.

Ott, Martin, John D. Robertson, Vladimir Gogvadze, Boris Zhivotovsky, and Sten Orrenius 2002 Cytochrome c Release from Mitochondria Proceeds by a Two-Step Process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(3): 1259–1263.

Pagano, Giovanni, and Giuseppe Castello 2012 Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Down Syndrome. Advances in Experimental Medicine and Biology 724: 291–299.

Palmer, R. M., D. S. Ashton, and S. Moncada 1988 Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginine. Nature 333(6174): 664–666.

Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada 1987 Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. Nature 327(6122): 524–526.

Pan, S. M., M. K. Chen, M. H. Chung, K. W. Lee, and I. C. Chen 2001 Expression and Characterization of Monocot Rice Cytosolic CuZnSOD Protein in Dicot Arabidopsis. Transgenic Research 10(4): 343–351.

Papa, Luena, Mary Hahn, Ellen L. Marsh, Bradley S. Evans, and Doris Germain

2014 SOD2 to SOD1 Switch in Breast Cancer. The Journal of Biological Chemistry 289(9): 5412–5416.

Papa, Luena, Giovanni Manfredi, and Doris Germain
2014 SOD1, an Unexpected Novel Target for Cancer Therapy. Genes & Cancer 5(1–2): 15–21.

Pasinelli, Piera, Mary Elizabeth Belford, Niall Lennon, et al.
2004 Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. Neuron 43(1): 19–30.

Percy, M. E.
1984 Catalase: An Old Enzyme with a New Role? Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology = Revue Canadienne De Biochimie Et Biologie Cellulaire 62(10): 1006–1014.

Perry, J. J. P., D. S. Shin, E. D. Getzoff, and J. A. Tainer
2010 The Structural Biochemistry of the Superoxide Dismutases. Biochimica Et Biophysica Acta 1804(2): 245–262.

Peskin, A. V., and C. C. Winterbourn
2000 A Microtiter Plate Assay for Superoxide Dismutase Using a Water-Soluble Tetrazolium Salt (WST-1). Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry 293(1–2): 157–166.

Petrache, Irina, Terry R. Medler, Amy T. Richter, et al.
2008 Superoxide Dismutase Protects against Apoptosis and Alveolar Enlargement Induced by Ceramide. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology 295(1): L44-53.

Pietta, Pier-Giorgio
2000 Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products 63(7): 1035–1042.

Poderoso, J. J., M. C. Carreras, C. Lisdero, et al.
1996 Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles. Archives of Biochemistry and Biophysics 328(1): 85–92.

Poderoso, J. J., C. Lisdero, F. Schöpfer, et al.
1999 The Regulation of Mitochondrial Oxygen Uptake by Redox Reactions Involving Nitric Oxide and Ubiquinol. The Journal of Biological Chemistry 274(53): 37709–37716.

Pommerville, Jeffrey C.
N.d. Alcamo’s Fundamentals of Microbiology. 9e edition.

Rad, Sima Kianpour, M. S. Kanthimathi, Sri Nurestri Abd Malek, et al.
2015 Cinnamomum Cassia Suppresses Caspase-9 through Stimulation of AKT1 in MCF-7 Cells but Not in MDA-MB-231 Cells. PloS One 10(12): e0145216.

Raja, Subramaniya Bharathi, Malliga Raman Murali, Kothapalli Roopa, and Sivasitambaram Niranjali Devaraj

2011a Imperatorin a Furocoumarin Inhibits Periplasmic Cu-Zn SOD of Shigella Dysenteriae Their by Modulates Its Resistance towards Phagocytosis during Host Pathogen Interaction. Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie 65(8): 560–568.
2011b Imperatorin a Furocoumarin Inhibits Periplasmic Cu-Zn SOD of Shigella Dysenteriae Their by Modulates Its Resistance towards Phagocytosis during Host Pathogen Interaction. Biomedicine & Pharmacotherapy 65(8): 560–568.

Rakhit, Rishi, Patricia Cunningham, Alexandra Furtos-Matei, et al.
2002 Oxidation-Induced Misfolding and Aggregation of Superoxide Dismutase and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis. The Journal of Biological Chemistry 277(49): 47551–47556.

Ramasarma, T., Aparna V. S. Rao, M. Maya Devi, et al.
2015 New Insights of Superoxide Dismutase Inhibition of Pyrogallol Autoxidation. Molecular and Cellular Biochemistry 400(1–2): 277–285.

Rao, G., W. Dai, Q. Yang, et al.
1995 [Chemical constituents of Pleurospermum govanianum (Wall) Benth ex C. B. Clarke var. bicolor Wolff]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica 20(12): 740–742, 763.

Rapoport, R. M., and F. Murad
1983 Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. Circulation Research 52(3): 352–357.

Reddi, Amit R, and Valeria C Culotta
2013 SOD1 Integrates Signals from Oxygen and Glucose to Repress Respiration. Cell 152(1–2): 224–235.

Redman, Regina S., Kathy B. Sheehan, Richard G. Stout, Russell J. Rodriguez, and Joan M. Henson
2002 Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. Science (New York, N.Y.) 298(5598): 1581.

Reveillaud, I., A. Niedzwiecki, K. G. Bensch, and J. E. Fleming
1991 Expression of Bovine Superoxide Dismutase in Drosophila Melanogaster Augments Resistance of Oxidative Stress. Molecular and Cellular Biology 11(2): 632–640.

Rhee, Sue Goo, Ho Zoon Chae, and Kanghwa Kim
2005 Peroxiredoxins: A Historical Overview and Speculative Preview of Novel Mechanisms and Emerging Concepts in Cell Signaling. Free Radical Biology & Medicine 38(12): 1543–1552.

Roberts, Ruth A., Robert A. Smith, Stephen Safe, et al.
2010 Toxicological and Pathophysiological Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Toxicology 276(2): 85–94.

Robinson, Kristine M., Michael S. Janes, Mariana Pehar, et al.
2006 Selective Fluorescent Imaging of Superoxide in Vivo Using Ethidium-Based Probes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(41): 15038–15043.

Rodriguez, Russell J., D. Carl Freeman, E. Durant McArthur, Yong Ok Kim, and Regina S. Redman
2009 Symbiotic Regulation of Plant Growth, Development and Reproduction. Communicative & Integrative Biology 2(2): 141–143.

Rojas, Enith I., Edward Allen Herre, Luis C. Mejía, et al.
2008 Endomelanconiopsis, a New Anamorph Genus in the Botryosphaeriaceae. Mycologia 100(5): 760–775.

Sachdev, Sean, and Kelvin J. A. Davies
2008 Production, Detection, and Adaptive Responses to Free Radicals in Exercise. Free Radical Biology & Medicine 44(2): 215–223.

Sajesh, Babu V., and Kirk J. McManus
2015 Targeting SOD1 Induces Synthetic Lethal Killing in BLM- and CHEK2-Deficient Colorectal Cancer Cells. Oncotarget 6(29): 27907–27922.

Salas-Vidal, E., H. Lomelí, S. Castro-Obregón, et al.
1998 Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death. Experimental Cell Research 238(1): 136–147.

Samy, Ramar Perumal, Maung Maung Thwin, Ponnampalam Gopalakrishnakone, and Savarimuthu Ignacimuthu
2008 Ethnobotanical Survey of Folk Plants for the Treatment of Snakebites in Southern Part of Tamilnadu, India. Journal of Ethnopharmacology 115(2): 302–312.

Samy, Ramar Perumal, Maung Maung Thwin, Bradley G. Stiles, et al.
2011 Therapeutic Potential of Peptides with Neutralizing Ability towards the Venom and Toxin (CaTx-I) of Crotalus Adamanteus. Current Topics in Medicinal Chemistry 11(20): 2540–2555.

Sánchez-Moreno, Manuel, Fernando Gómez-Contreras, Pilar Navarro, et al.
2012 Phthalazine Derivatives Containing Imidazole Rings Behave as Fe-SOD Inhibitors and Show Remarkable Anti-T. Cruzi Activity in Immunodeficient-Mouse Mode of Infection. Journal of Medicinal Chemistry 55(22): 9900–9913.

Sappapan, Ruengrit, Damrong Sommit, Nattaya Ngamrojanavanich, et al.
2008 11-Hydroxymonocerin from the Plant Endophytic Fungus Exserohilum Rostratum. Journal of Natural Products 71(9): 1657–1659.

Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, et al.
2012 Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(16): 6241–6246.

Schroedl, Clara, David S. McClintock, G. R. Scott Budinger, and Navdeep S. Chandel
2002 Hypoxic but Not Anoxic Stabilization of HIF-1alpha Requires Mitochondrial Reactive

Oxygen Species. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology 283(5): L922-931.

Schulze, P. Christian, Jun Yoshioka, Tomosaburo Takahashi, et al. 2004 Hyperglycemia Promotes Oxidative Stress through Inhibition of Thioredoxin Function by Thioredoxin-Interacting Protein. The Journal of Biological Chemistry 279(29): 30369–30374.

Senft, Albert P., Timothy P. Dalton, Daniel W. Nebert, et al. 2002 Mitochondrial Reactive Oxygen Production Is Dependent on the Aromatic Hydrocarbon Receptor. Free Radical Biology & Medicine 33(9): 1268–1278.

Sharma, B. R., R. K. Rattan, and P. Sharma 1980 Anhydrorutaretin, a New Furanocoumarin and Other Minor Constituents of Apium Leptophyllum Seeds. Phytochemistry. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301365231, accessed October 13, 2016.

Shimazaki, Yuichi, Masako Takani, and Osamu Yamauchi 2009 Metal Complexes of Amino Acids and Amino Acid Side Chain Groups. Structures and Properties. Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)(38): 7854–7869.

Sildénafil - Vidal.fr N.d. https://www.vidal.fr/substances/18293/sildenafil/, accessed September 27, 2016.

Simon, H.-U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer 2000 Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Apoptosis Induction. Apoptosis 5(5): 415–418.

Simon, Pierre, Renée Meunier, and Jacques Rivière 1970 Microbiologie industrielle et génie biochimique. Paris, France: Masson et Cie.

Somwar, Romel, Hediye Erdjument-Bromage, Erik Larsson, et al. 2011 Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Is a Target for a Small Molecule Identified in a Screen for Inhibitors of the Growth of Lung Adenocarcinoma Cell Lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(39): 16375–16380.

Sonntag, C. von 1989 The Chemical Basis of Radiation Biology. London; Philadelphia, PA: Taylor & Francis.

St Clair, Daret, Yunfeng Zhao, Luksana Chaiswing, and Terry Oberley 2005 Modulation of Skin Tumorigenesis by SOD. Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie 59(4): 209–214.

Stierle, A., G. Strobel, D. Stierle, P. Grothaus, and G. Bignami 1995 The Search for a Taxol-Producing Microorganism among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, Taxus Brevifolia. Journal of Natural Products 58(9): 1315–1324.

St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, and Martin D. Brand

2002a Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. The Journal of Biological Chemistry 277(47): 44784–44790.
2002b Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. The Journal of Biological Chemistry 277(47): 44784–44790.

Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel
1995 Requirement for Generation of H2O2 for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. Science (New York, N.Y.) 270(5234): 296–299.

Svensson, Anna-Karin E., Osman Bilsel, Elena Kondrashkina, Jill A. Zitzewitz, and C. Robert Matthews
2006 Mapping the Folding Free Energy Surface for Metal-Free Human Cu,Zn Superoxide Dismutase. Journal of Molecular Biology 364(5): 1084–1102.

Tainer, J. A., E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, and D. C. Richardson
1982 Determination and Analysis of the 2 A-Structure of Copper, Zinc Superoxide Dismutase. Journal of Molecular Biology 160(2): 181–217.

Tan, R. X., and W. X. Zou
2001 Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites 18(4): 448–459.

Tanaka, T., Y. Iwasa, S. Kondo, H. Hiai, and S. Toyokuni
1999 High Incidence of Allelic Loss on Chromosome 5 and Inactivation of p15INK4B and p16INK4A Tumor Suppressor Genes in Oxystress-Induced Renal Cell Carcinoma of Rats. Oncogene 18(25): 3793–3797.

Tejesvi, Mysore V., Kukkundoor R. Kini, Harishchandra S. Prakash, Ven Subbiah, and Hunthrike S. Shetty
2008 Antioxidant, Antihypertensive, and Antibacterial Properties of Endophytic Pestalotiopsis Species from Medicinal Plants. Canadian Journal of Microbiology 54(9): 769–780.

Treviño, Victor, Irma-Luz Yañez-Garza, Carlos E. Rodriguez-López, et al.
2015 GridMass: A Fast Two-Dimensional Feature Detection Method for LC/MS. Journal of Mass Spectrometry: JMS 50(1): 165–174.

Tsugawa, Hiroshi, Tobias Kind, Ryo Nakabayashi, et al.
2016 Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. Analytical Chemistry 88(16): 7946–7958.

Turrens, Julio F.
2003 Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species. The Journal of Physiology 552(Pt 2): 335–344.

Turrens, Julio F., Adolfo Alexandre, and Albert L. Lehninger
1985 Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics 237(2): 408–414.

Tyler, D. D.

1975 Polarographic Assay and Intracellular Distribution of Superoxide Dismutase in Rat Liver. The Biochemical Journal 147(3): 493–504.

Valentine, Joan Selverstone, Peter A Doucette, and Soshanna Zittin Potter 2005 Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Annual Review of Biochemistry 74: 563–593.

Vandermolen, Karen M., Huzefa A. Raja, Tamam El-Elimat, and Nicholas H. Oberlies 2013 Evaluation of Culture Media for the Production of Secondary Metabolites in a Natural Products Screening Program. AMB Express 3(1): 71.

Veldwijk, Marlon R., Carsten Herskind, Leopold Sellner, et al. 2009 Normal-Tissue Radioprotection by Overexpression of the Copper-Zinc and Manganese Superoxide Dismutase Genes. Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et Al] 185(8): 517–523.

Vijayvergiya, Chetan, M. Flint Beal, Jochen Buck, and Giovanni Manfredi 2005 Mutant Superoxide Dismutase 1 Forms Aggregates in the Brain Mitochondrial Matrix of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 25(10): 2463–2470.

Vogl, Sylvia, Martin Zehl, Paolo Picker, et al. 2011 Identification and Quantification of Coumarins in Peucedanum Ostruthium (L.) Koch by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(9): 4371–4377.

Wagner, U. G., K. A. Pattridge, M. L. Ludwig, et al. 1993 Comparison of the Crystal Structures of Genetically Engineered Human Manganese Superoxide Dismutase and Manganese Superoxide Dismutase from Thermus Thermophilus: Differences in Dimer-Dimer Interaction. Protein Science: A Publication of the Protein Society 2(5): 814–825.

Waller, Frank, Beate Achatz, Helmut Baltruschat, et al. 2005 The Endophytic Fungus Piriformospora Indica Reprograms Barley to Salt-Stress Tolerance, Disease Resistance, and Higher Yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(38): 13386–13391.

Wang, C., T. Mäkelä, T. Hase, H. Adlercreutz, and M. S. Kurzer 1994 Lignans and Flavonoids Inhibit Aromatase Enzyme in Human Preadipocytes. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 50(3–4): 205–212.

Wang, Mingxun, Jeremy J. Carver, Vanessa V. Phelan, et al. 2016 Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nature Biotechnology 34(8): 828–837.

Wang, Zefen, Hong Yang, Aramandla Ramesh, et al. 2009 Overexpression of Cu/Zn-Superoxide Dismutase And/Or Catalase Accelerates Benzo(a)pyrene Detoxification by Upregulation of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Mouse Endothelial Cells. Free Radical Biology & Medicine 47(8): 1221–1229.

Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail 1971 Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from Taxus Brevifolia. Journal of the American Chemical Society 93(9): 2325–2327.

Waqas, Muhammad, Abdul Latif Khan, Muhammad Kamran, et al. 2012 Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. Molecules 17(9): 10754–10773.

Weber, Roland W. S., Eva Stenger, Anja Meffert, and Matthias Hahn 2004 Brefeldin A Production by Phoma Medicaginis in Dead Pre-Colonized Plant Tissue: A Strategy for Habitat Conquest? Mycological Research 108(Pt 6): 662–671.

WHO | Genes and Human Disease N.d. WHO. http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index1.html, accessed September 27, 2016.

Wu, S. J., D. Y. Li, L. Zhang, X. D. Du, and Y. K. Zhang 1986 [Studies on the coumarins from the zou-ma-qin (Heracleum moellendorffii Hance var. Paucivitatum)]. Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica 21(8): 599–604.

Xu, Chen, Shu Liu, Zhiqiang Liu, Fengrui Song, and Shuying Liu 2013 Superoxide Generated by Pyrogallol Reduces Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt to Produce a Soluble Formazan: A Simple Assay for Measuring Superoxide Anion Radical Scavenging Activities of Biological and Abiological Samples. Analytica Chimica Acta 793: 53–60.

Yamagishi, S. I., D. Edelstein, X. L. Du, et al. 2001 Leptin Induces Mitochondrial Superoxide Production and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Aortic Endothelial Cells by Increasing Fatty Acid Oxidation via Protein Kinase A. The Journal of Biological Chemistry 276(27): 25096–25100.

Yan, T., S. Li, X. Jiang, and L. W. Oberley 1999 Altered Levels of Primary Antioxidant Enzymes in Progeria Skin Fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications 257(1): 163–167.

Yarom, R., Y. Sherman, U. Sagher, et al. 1987a Elevated Concentrations of Elements and Abnormalities of Neuromuscular Junctions in Tongue Muscles of Down's Syndrome. Journal of the Neurological Sciences 79(3): 315–326.
1987b Elevated Concentrations of Elements and Abnormalities of Neuromuscular Junctions in Tongue Muscles of Down's Syndrome. Journal of the Neurological Sciences 79(3): 315–326.

Young, I. S., and J. McEneny 2001 Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis. Biochemical Society Transactions 29(2): 358–362.

Yu, Tianzheng, James L. Robotham, and Yisang Yoon

2006 Increased Production of Reactive Oxygen Species in Hyperglycemic Conditions Requires Dynamic Change of Mitochondrial Morphology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(8): 2653–2658.

Zaghloul, Nahla, Hardik Patel, Champa Codipilly, et al. 2014 Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase Protects against Brain Injury Induced by Chronic Hypoxia. PloS One 9(9): e108168.

Zhang, Li, Bo Tang, and Yi Ding 2005 Study of 2-(2-Pyridyl)benzothiazoline as a Novel Fluorescent Probe for the Identification of Superoxide Anion Radicals and the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Scallion Genus Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(3): 549–553.

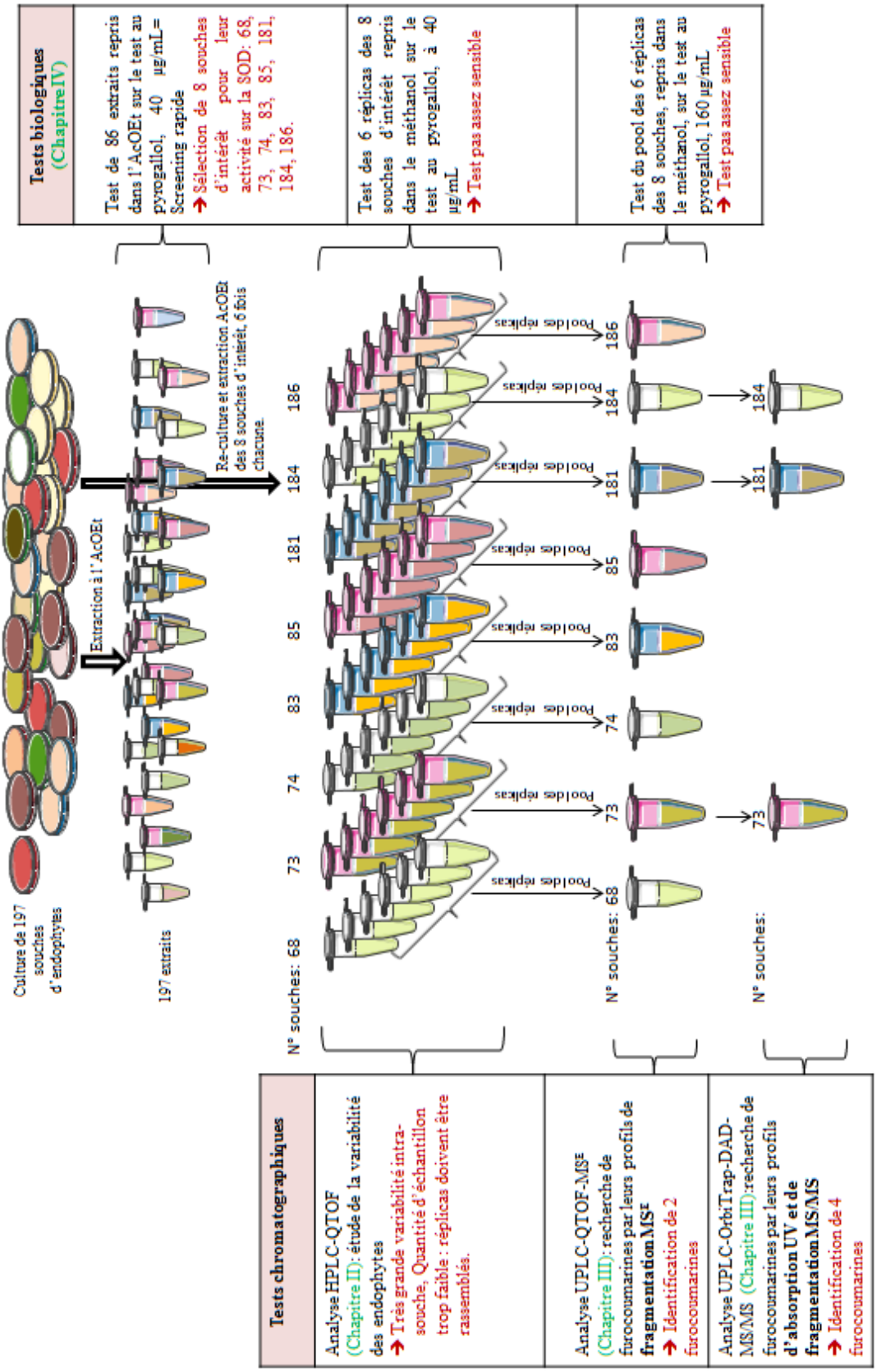
Zielonka, Jacek, and B. Kalyanaraman 2010 Hydroethidine- and MitoSOX-Derived Red Fluorescence Is Not a Reliable Indicator of Intracellular Superoxide Formation: Another Inconvenient Truth. Free Radical Biology and Medicine 48(8): 983–1001.

Zigman, Warren B., and Ira T. Lott 2007 Alzheimer's Disease in Down Syndrome: Neurobiology and Risk. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 13(3): 237–246.

Zuo, L., T. Zhou, B. K. Pannell, A. C. Ziegler, and T. M. Best 2015 Biological and Physiological Role of Reactive Oxygen Species--the Good, the Bad and the Ugly. Acta Physiologica (Oxford, England) 214(3): 329–348.

ANNEXES

I. Annexe I : Résumé des expériences menées sur les endophytes



II. Annexe II : Plaques CCM des endophytes :

II.1 CCM visualisées en lumière visible après révélation par la vanilline et chauffage

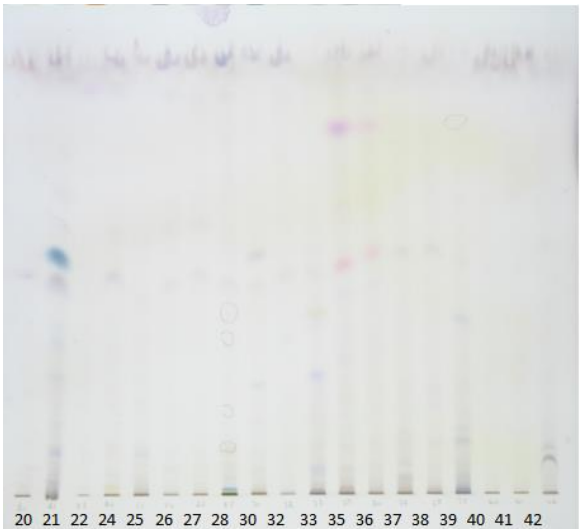


Photo 1: Souches 20 à 42.

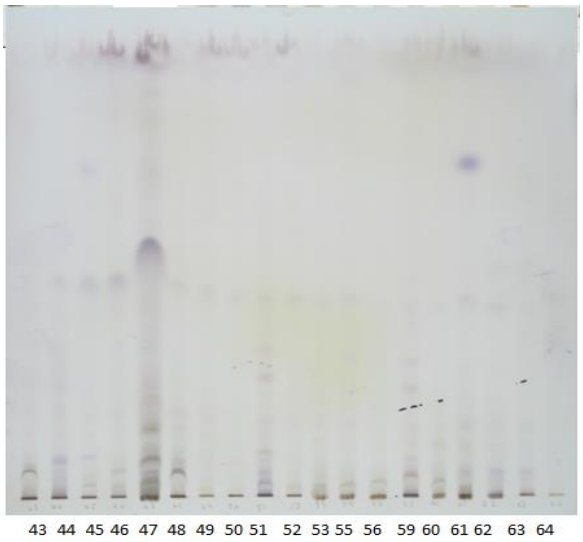


Photo 2: Souches 43 à 64.

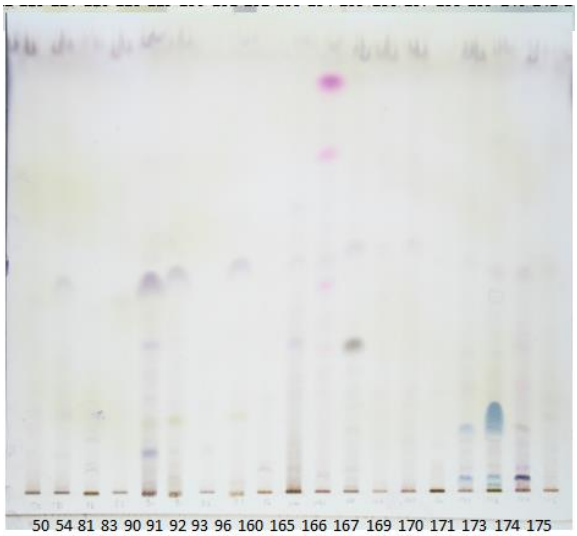


Photo 3: Souches 50 à 175.

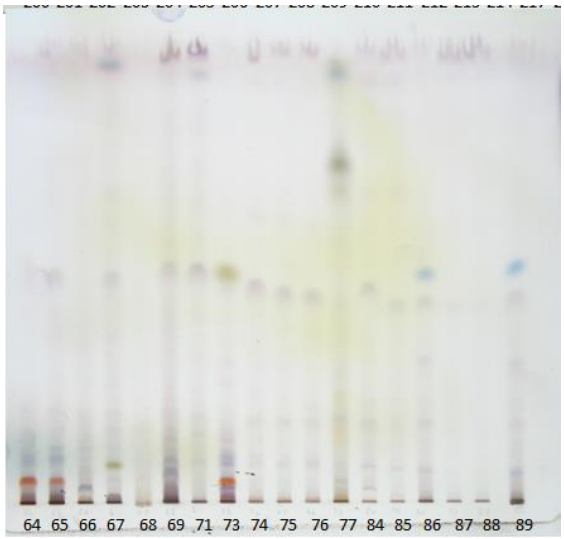


Photo 4: Souches 64 à 89.

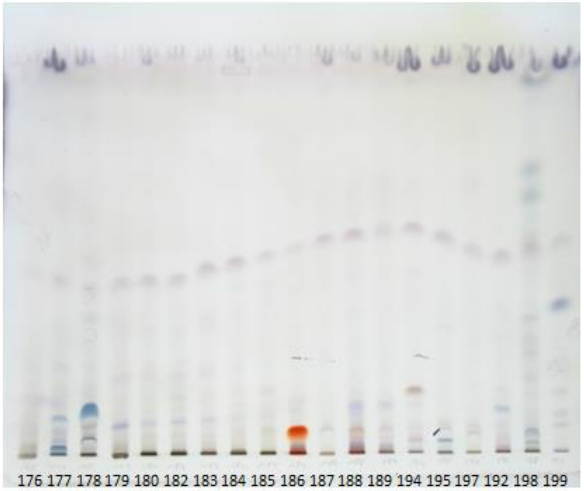


Photo 5: Souches 176 à 199.

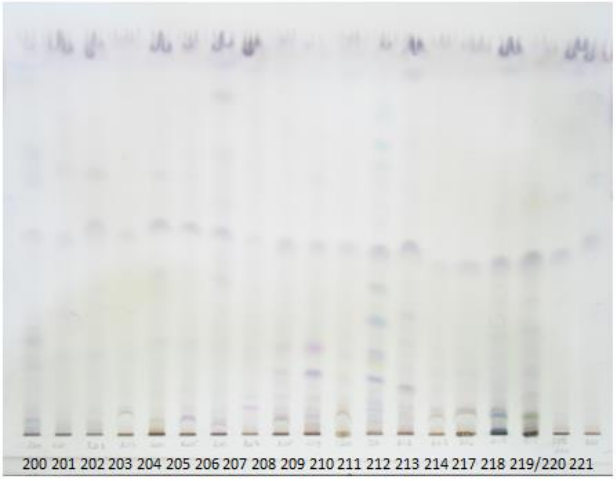


Photo 6: Souches 200 à 221.

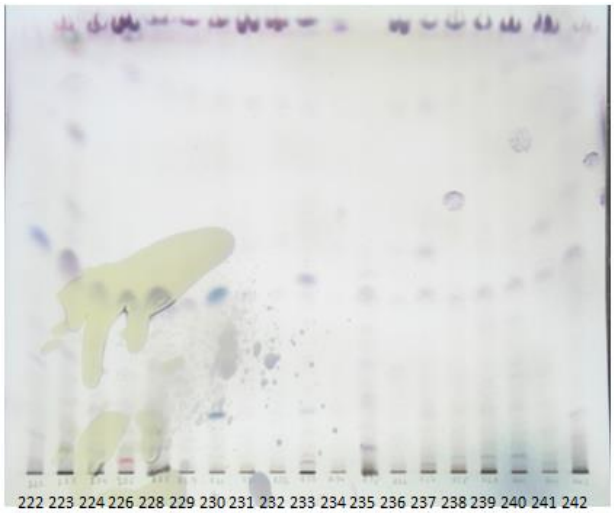


Photo 7: Souches 222 à 242.

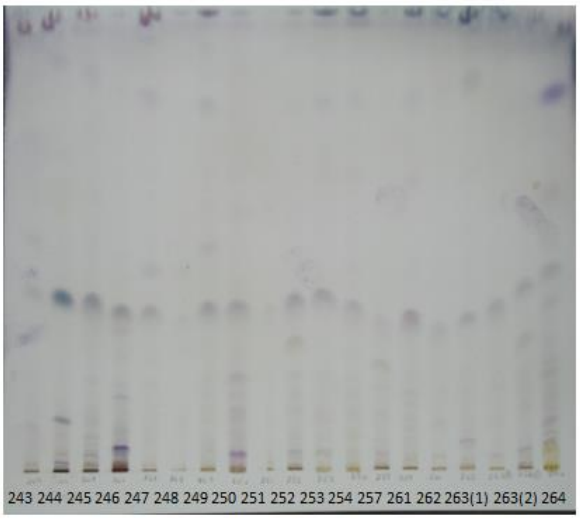


Photo 8: Souches 243 à 264.

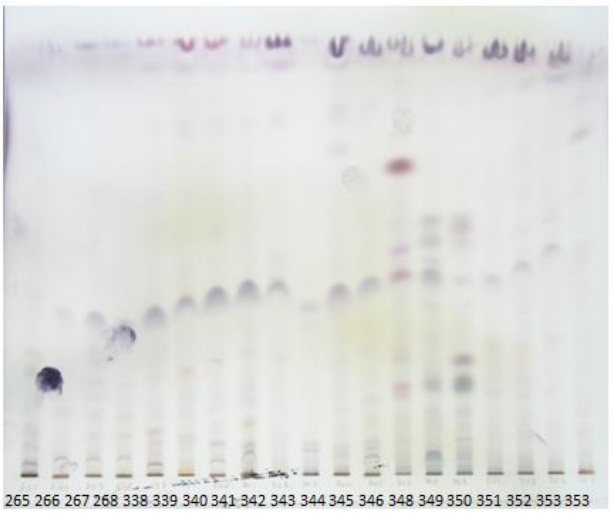


Photo 9: Souches 265 à 353.

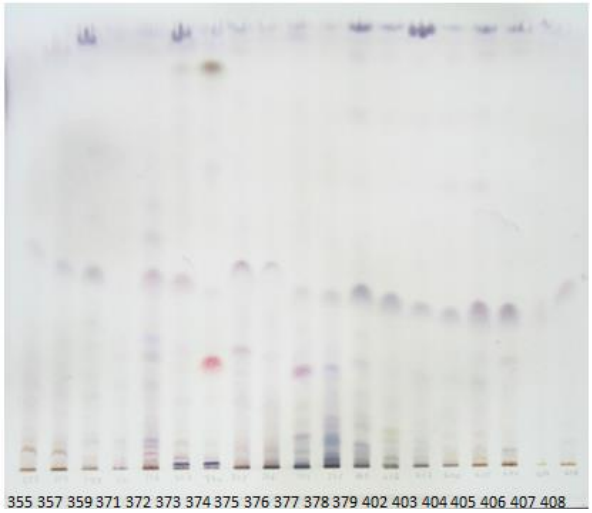


Photo 10: Souches 355 à 408.

Photo 11: Souches 409 et 181.

II.2 CCM visualisées à 254nm

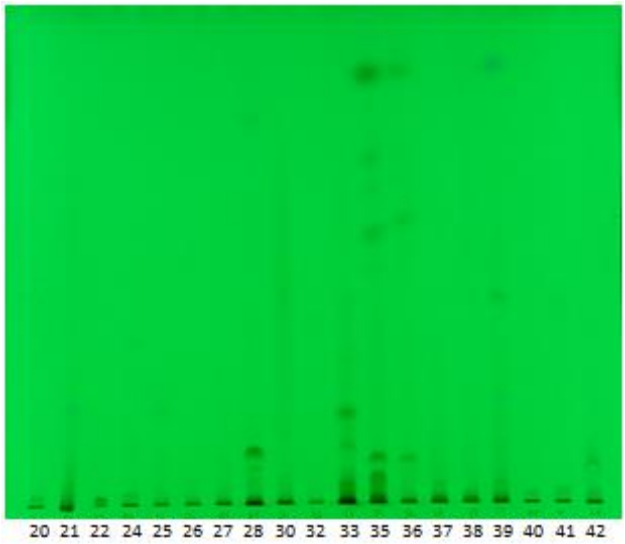


Photo 12: Souches 20à 42.

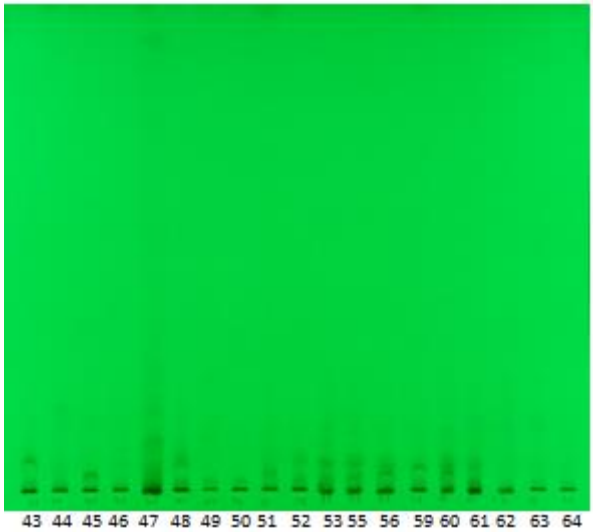


Photo 13: Souches 43 à 64.

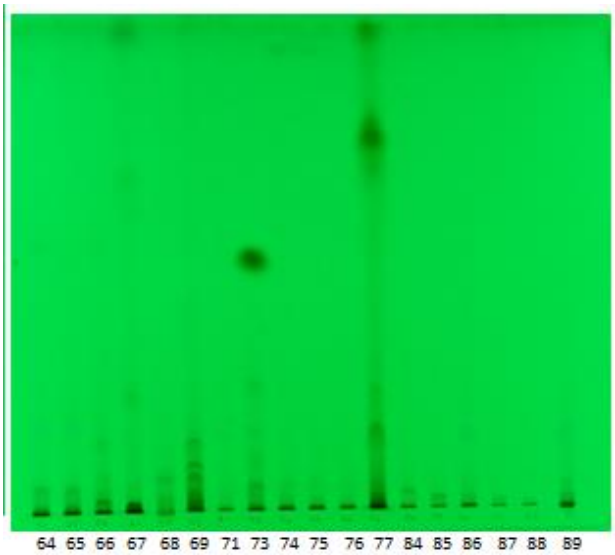


Photo 14: Souches 64 à 89.

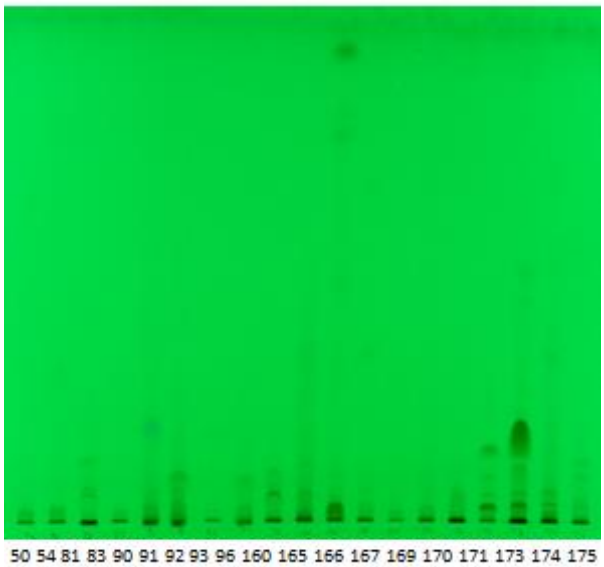


Photo 15: Souches 50 à 175.

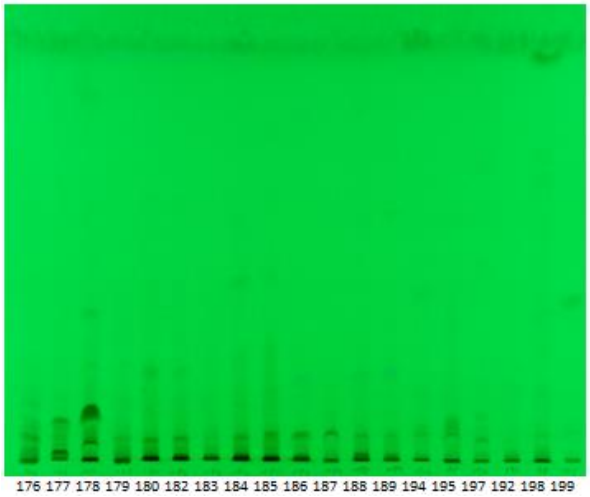


Photo 16: Souches 176 à 199.

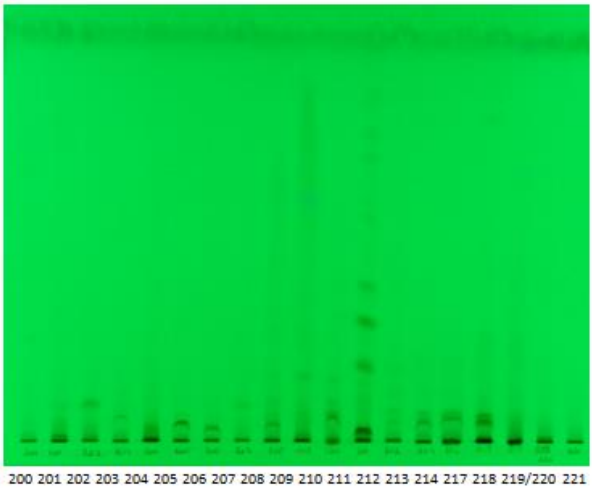


Photo 17: Souches 200 à 221.

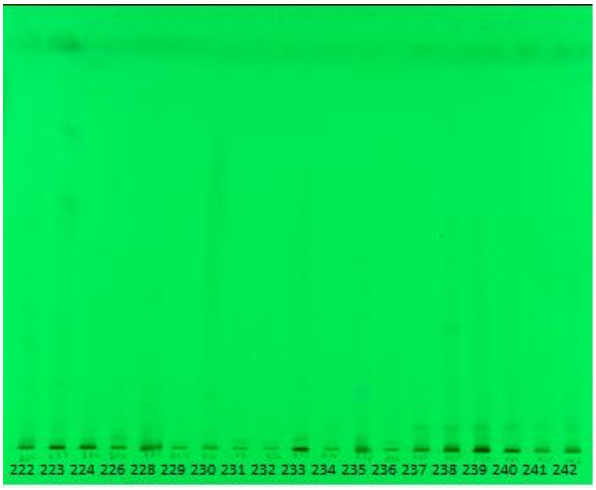


Photo 18: Souches 222 à 242.

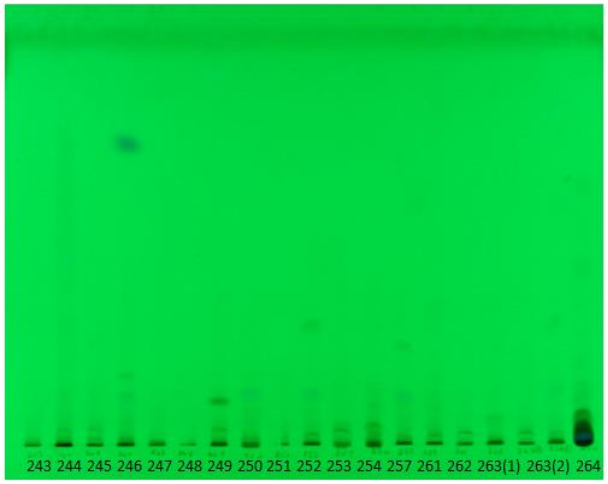


Photo 19: Souches 243 à 264.

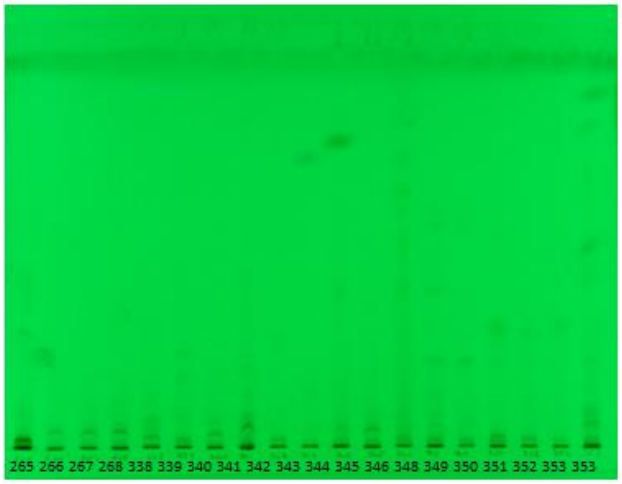


Photo 20: Souches 265 à 353.

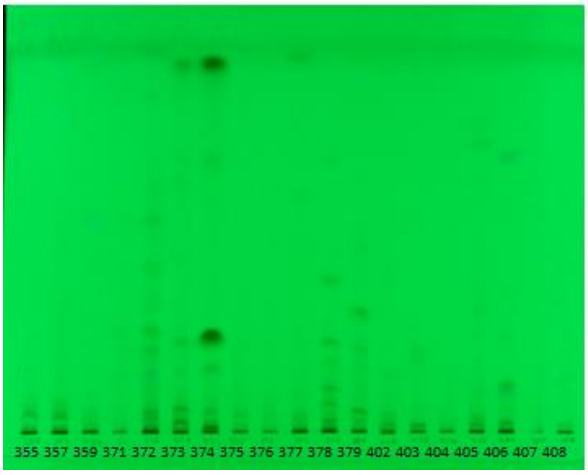


Photo 21: Souches 355 à 408.

Photo 22: Souches 409 et 181.

II.1 CCM visualisées à 365nm

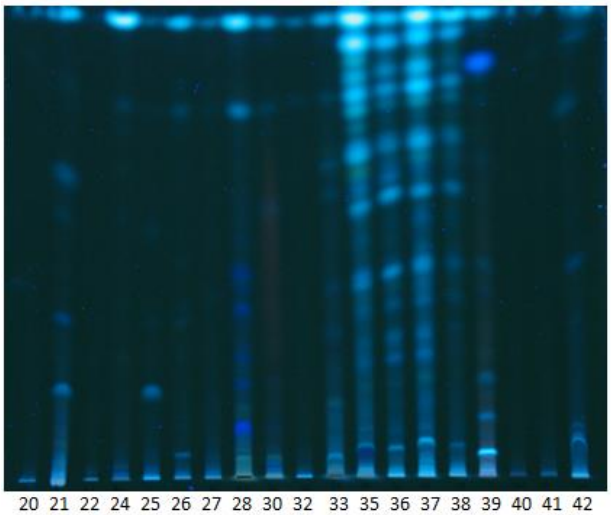


Photo 23: Souches 20à 42.

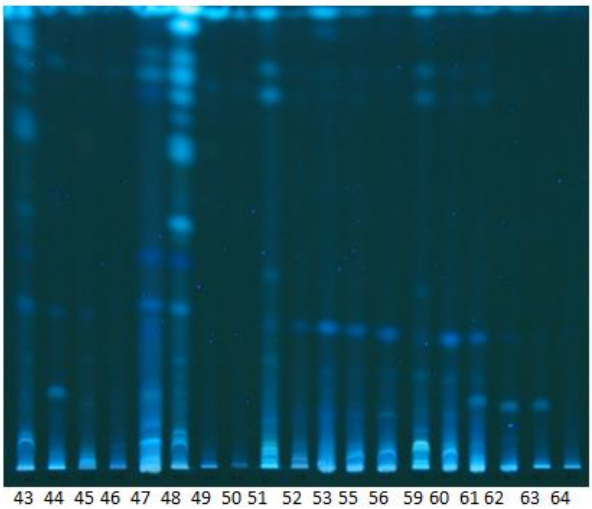


Photo 24: Souches 43 à 64.

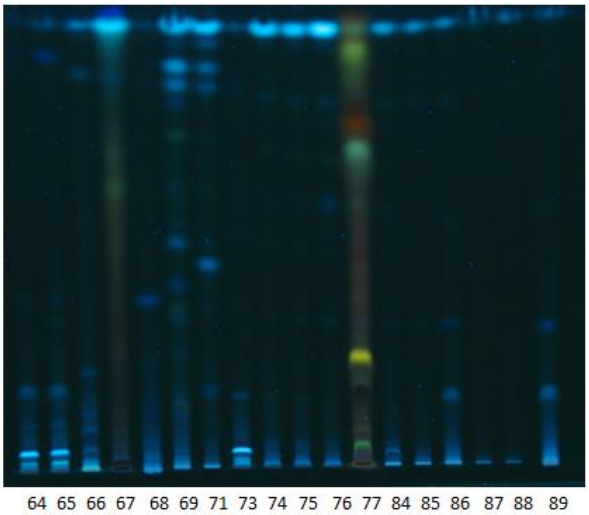


Photo 25: Souches 64 à 89

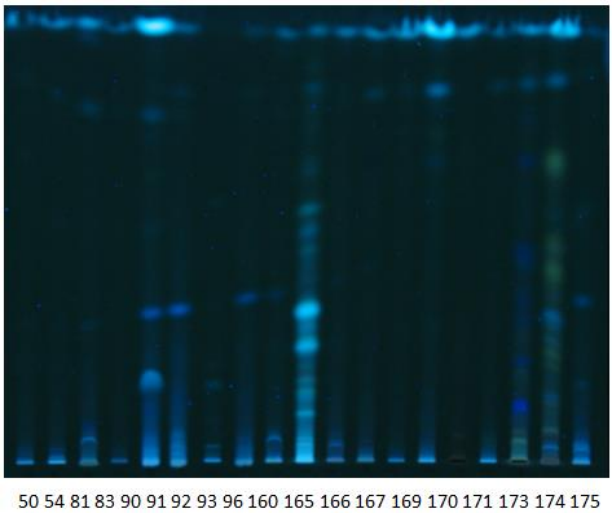


Photo 26: Souches 50 à 175.

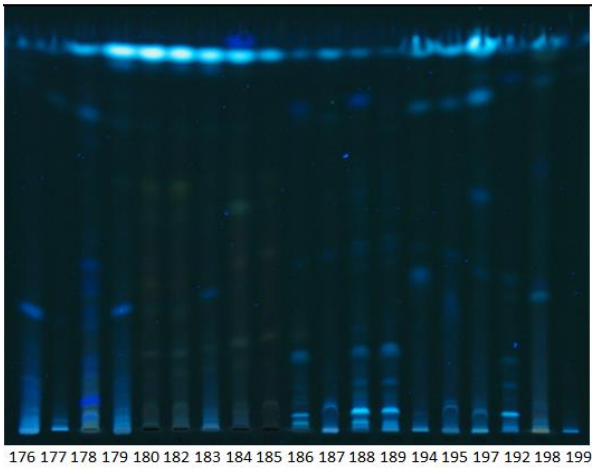


Photo 27: Souches 176 à 199.

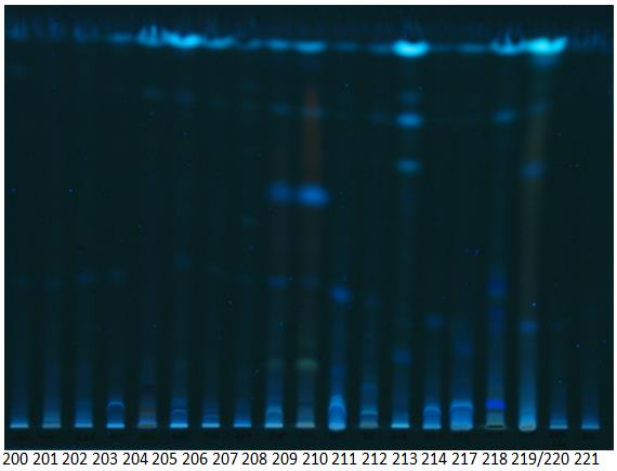


Photo 28: Souches 200 à 221.

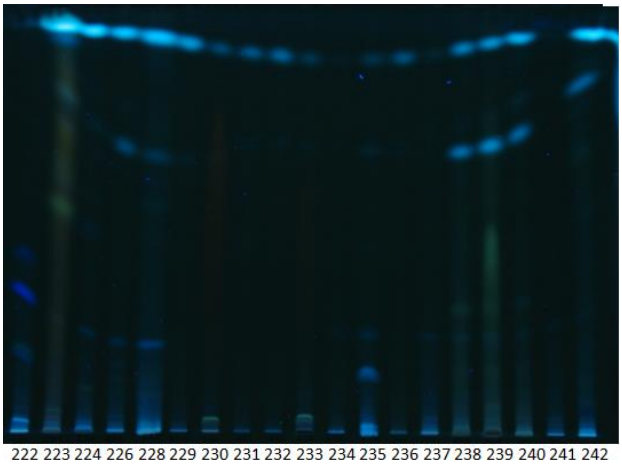


Photo 29: Souches 222 à 242.

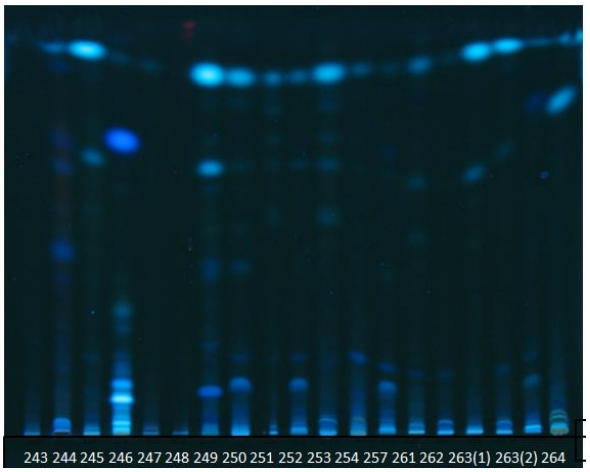


Photo 30: Souches 243 à 264.

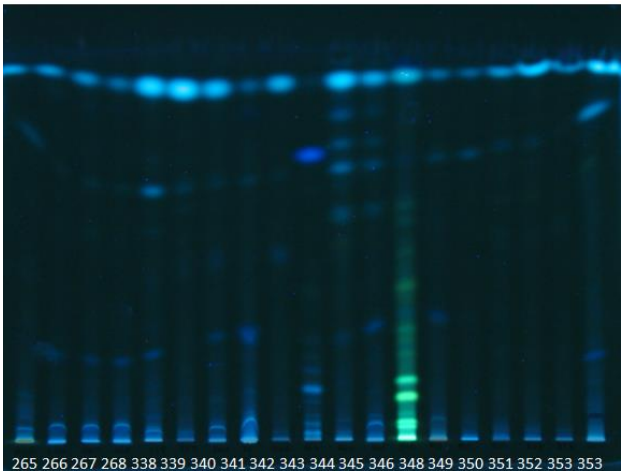


Photo 31: Souches 265 à 353.

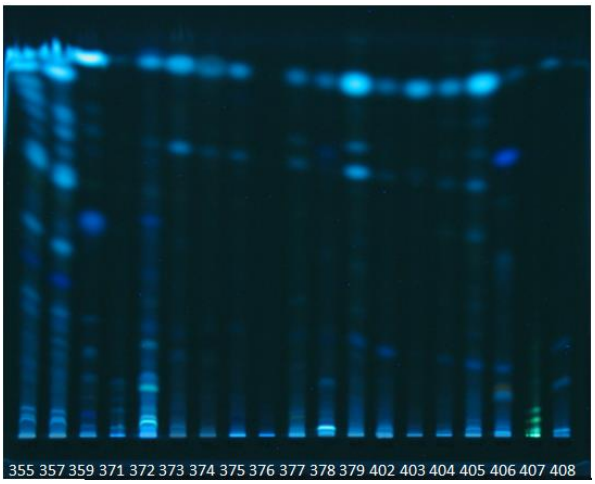


Photo 32: Souches 355 à 408.

Photo 33: Souches 409 et 181.

III. Annexe III : Photos des cultures des six réplicas des huit endophytes sélectionnés

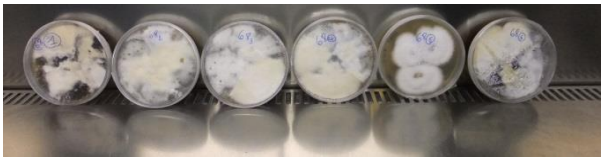


Photo 34: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 68 (1), 68 (2), 68 (3), 68 (4), 68 (5), 68 (6).

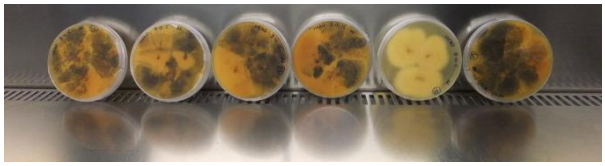


Photo 35 : Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 68 (1), 68 (2), 68 (3), 68 (4), 68 (5), 68 (6).

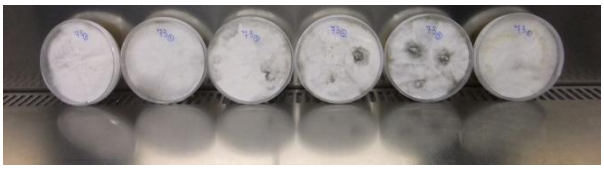


Photo 36: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 73 (1), 73 (2), 73 (3), 73 (4), 73 (5), 73 (6).

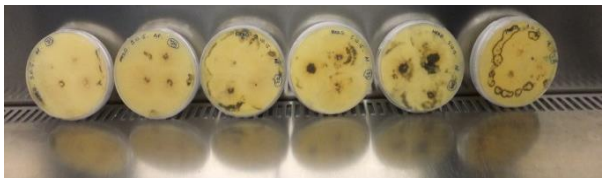


Photo 37: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 73 (1), 73 (2), 73 (3), 73 (4), 73 (5), 73 (6).

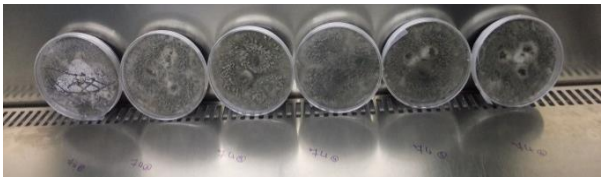


Photo 38: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 74 (1), 74 (2), 74 (3), 74 (4), 74 (5), 74 (6).

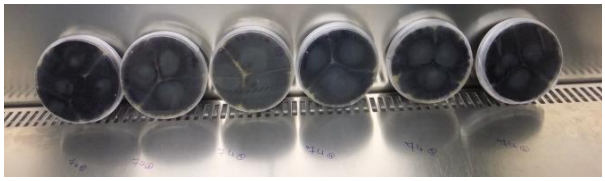


Photo 39: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 74 (1), 74 (2), 74 (3), 74 (4), 74 (5), 74 (6).

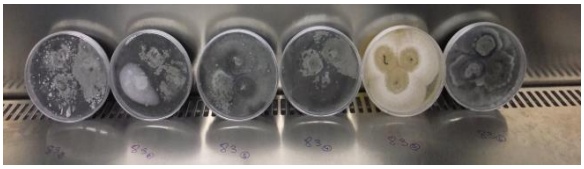


Photo 40: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 83 (1), 83 (2), 83 (3), 83 (4), 83 (5), 83 (6).

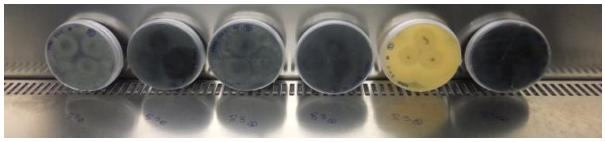


Photo 41: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 83 (1), 83 (2), 83 (3), 83 (4), 83 (5), 83 (6).

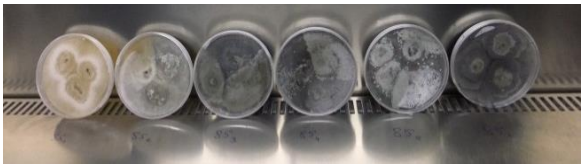


Photo 42: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 85 (1), 85 (2), 85 (3), 85 (4), 85 (5), 85

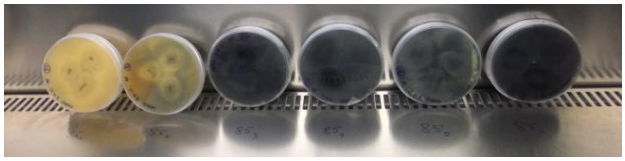


Photo 43: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 85 (1), 85 (2), 85 (3), 85 (4), 85 (5), 85

(6).

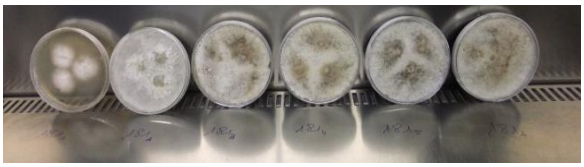


Photo 44: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 181 (1), 181 (2), 181 (3), 181 (4), 181 (5), 181 (6).

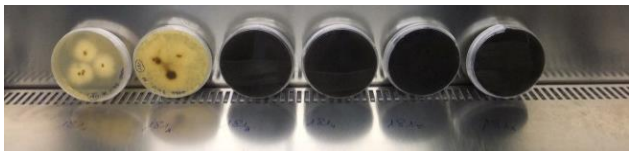


Photo 46: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 184 (1), 184 (2), 184 (3), 184 (4), 184 (5), 184 (6).

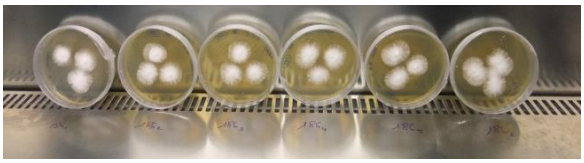


Photo 48: Cultures vues de dessus des échantillons (de la gauche vers la droite): 186 (1), 186 (2), 186 (3), 186 (4), 186 (5), 186 (6).

(6).

Photo 45: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 181 (1), 181 (2), 181 (3), 181 (4), 181 (5), 181 (6).

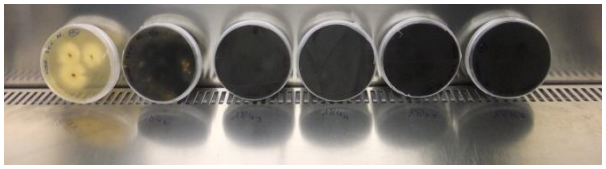


Photo 47: Cultures vues de dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 184 (1), 184 (2), 184 (3), 184 (4), 184 (5), 184 (6).

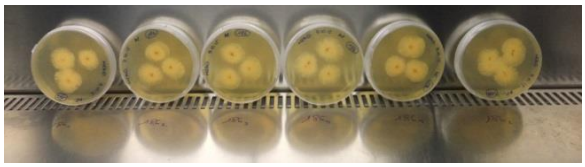


Photo 49: Cultures vues du dessous des échantillons (de la gauche vers la droite): 186 (1), 186 (2), 186 (3), 186 (4), 186 (5), 186 (6).

IV. Annexe IV : liste de pics de MZmine du Qtof

Les données de ce tableau sont issues des mesures faites avec le QTof après traitement par MZmine.

Tableau 21: Alignement des pics des échantillons 68, 73, 74, 83, 85, 181, 184 et 186, obtenu avec MZmine.

Identification potentielle à partir des données UPLC-QTOF-MS^E	Mangcoumarin	Mammearin A	Mammearin A	Mammearin A	Mammearin A
Numéro du pic	422	226	601	640	706
Masse exacte	233.0454	369.1731	369.1734	369.1731	369.1735
temps de rétention	5,71	12,57	7,14	7,46	8,28
Blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 83	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 68	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 85	Absent	Présent	Absent	Absent	Absent
		42392,80			
Ech. 184	Absent	Présent	Absent	Absent	Absent
		44581,35			
Ech. 181	Présent	Absent	Absent	Absent	Absent
	23226,96				
Ech. 74	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 73	Absent	Absent	Présent	Présent	Absent
			35088,38	12065,37	
Ech. 186	Absent	Présent	Absent	Absent	Présent
		77510,24			35568,72

Identification potentielle à partir des données UPLC-QTOF-MS[E]	Halkendin	Halfordin	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 9-O-(3,7-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadienyl), 4-Me ether	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 9-O-(2Î¾-Hydroxy-3-methyl-3-butenyl), 4-O-[2Î¾-hydroxy-3-isopropoxy-3-methylbutyl]
Numéro du pic	143	335	683	201
Masse exacte	245.0452	275.0557	383.1527	445.1852
temps de rétention	5,61	4,66	6,64	9,63
Blanc	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 83	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 68	Présent	Absent	Absent	Présent
	148526,72			19908,01
Ech. 85	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 184	Absent	Présent	Absent	Absent
		18474,39		
Ech. 181	Absent	Présent	Absent	Absent
		19573,60		
Ech. 74	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 73	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 186	Absent	Absent	Présent	Absent
			34181,01	

Identification potentielle à partir des données UPLC-QTOF-MS[E]	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 9-O-(2Î¾-Hydroxy-3-methyl-3-butenyl), 4-O-[2Î¾-hydroxy-3-isopropoxy-3-methylbutyl]	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 9-O-(2Î¾-Hydroxy-3-methyl-3-butenyl), 4-O-[2Î¾-hydroxy-3-isopropoxy-3-methylbutyl]	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 9-O-(2Î¾-Hydroxy-3-methyl-3-butenyl), 4-O-[2Î¾-hydroxy-3-isopropoxy-3-methylbutyl]	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; 4-O-(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl), 9-Me ether
Numéro du pic	211	477	702	231
Masse exacte	445.1843	445.1844	445.1838	367.1576
temps de rétention	9,84	7,33	6,84	11,95
Blanc	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 83	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 68	Présent	Absent	Absent	Absent
	15555,18			
Ech. 85	Absent	Absent	Absent	Présent
				31600,14
Ech. 184	Absent	Absent	Absent	Présent
				16404,31
Ech. 181	Absent	Absent	Absent	Absent
Ech. 74	Absent	Présent	Absent	Absent
		154819,17		
Ech. 73	Absent	Présent	Absent	Absent
		11283,82		
Ech. 186	Absent	Absent	Présent	Présent
			17964,00	18249,52

V. Annexe V : spectres des molécules identifiées dans MS-FINDER

V.1 Spectres de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one

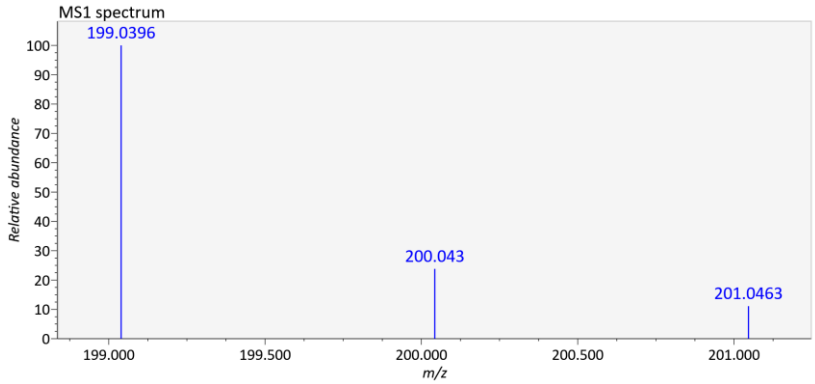


Figure 95: Spectre de masse de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

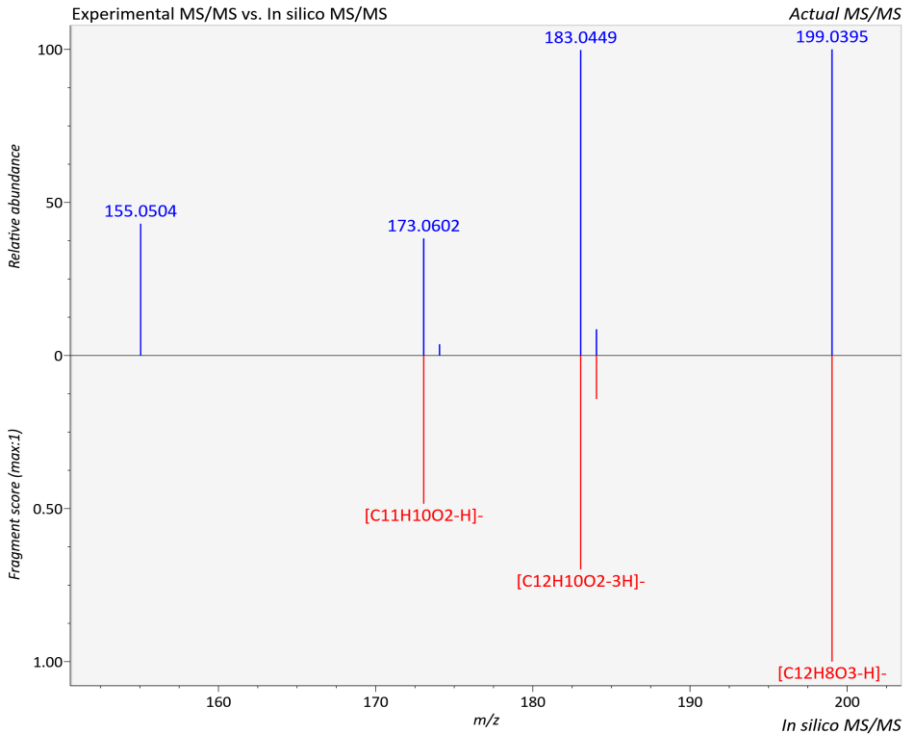


Figure 96: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

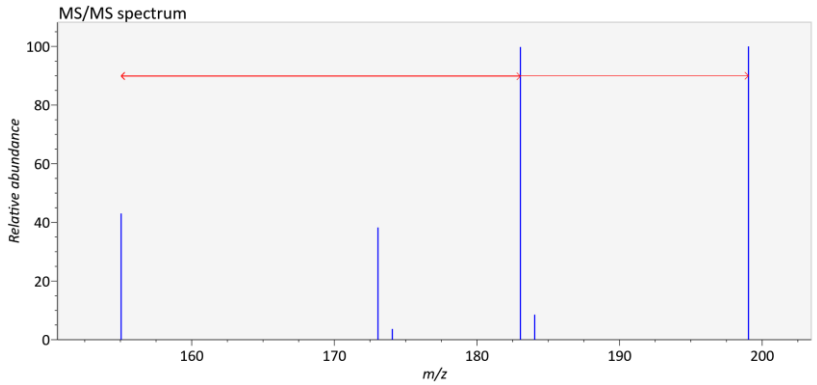


Figure 97: Perte de fragments de la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one.

V.2 Spectres de la Déhydropachyrrhizone

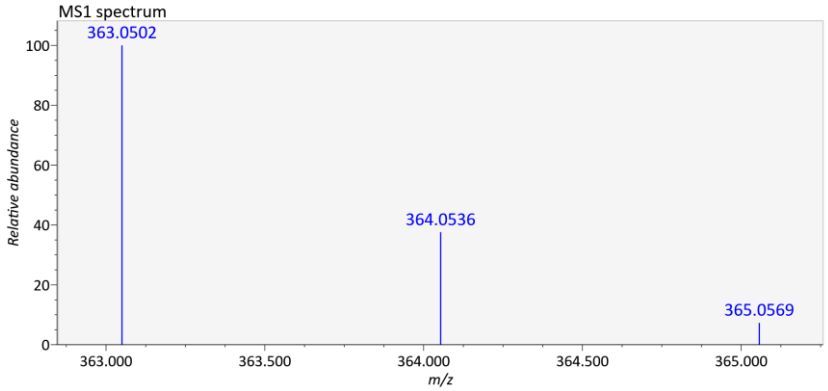


Figure 98: Spectre de masse de la Déhydropachyrrhizone.

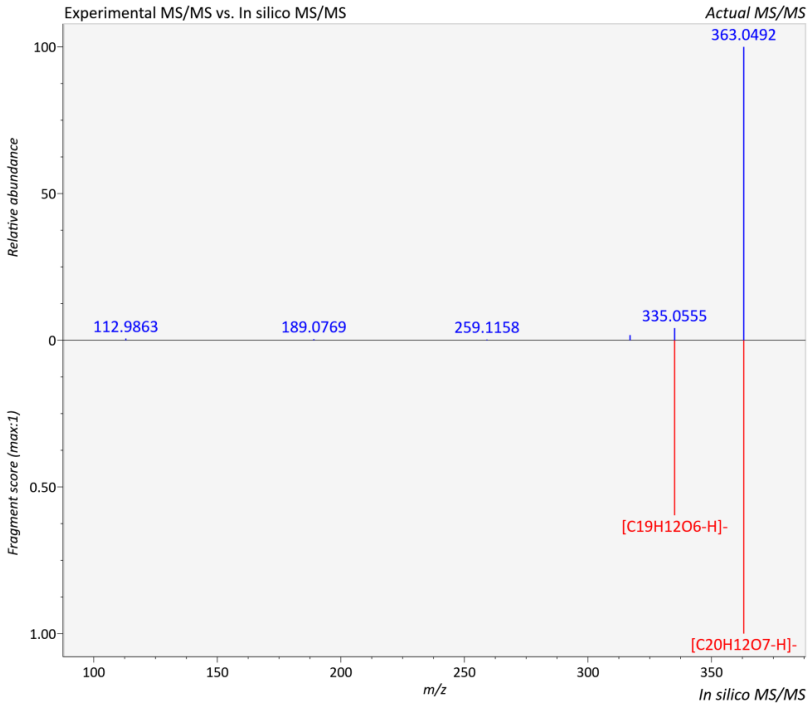


Figure 99: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et *in silico* (en rouge) de la Déhydropachyrrhizone.

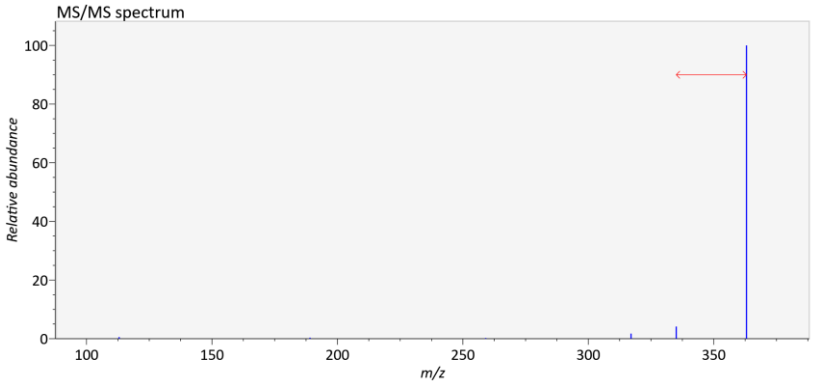


Figure 100: Perte de fragments de la Déhydropachyrrhizone.

V.3 Spectres de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one

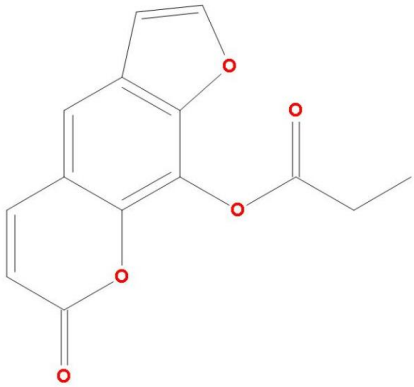


Figure 101: Formule développée la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one

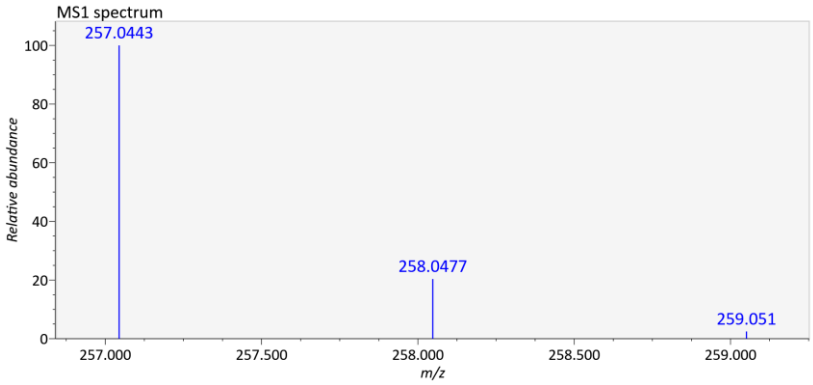


Figure 102: Spectre de masse de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one

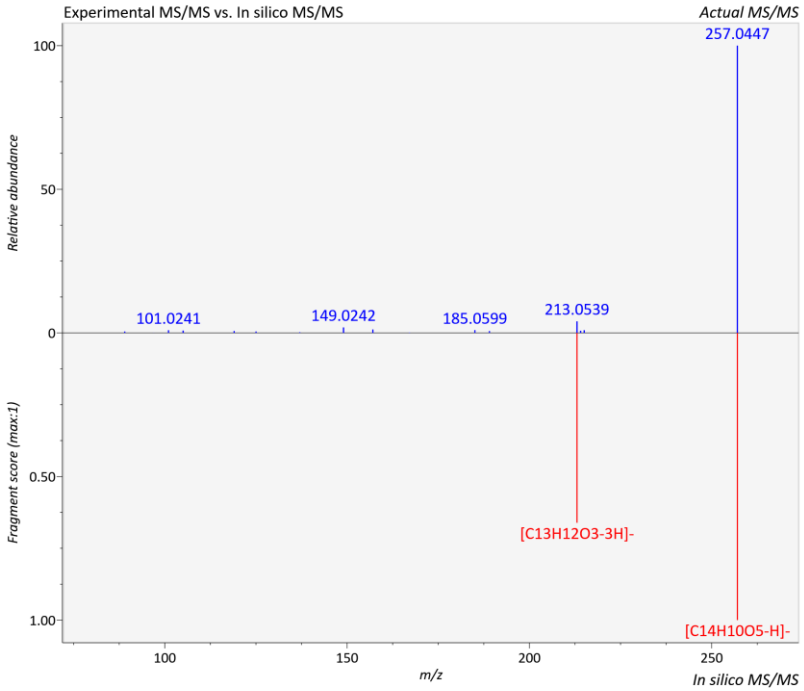


Figure 103: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et in silico (en rouge) de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one

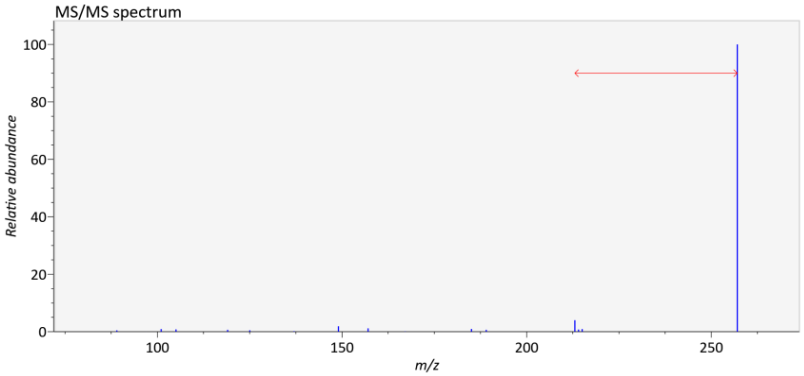


Figure 104: Perte de fragments de la 9-propionyloxy-furo[3,2-g]chromen-7-one

V.4 Spectres du 3-carbethoxypsoralen

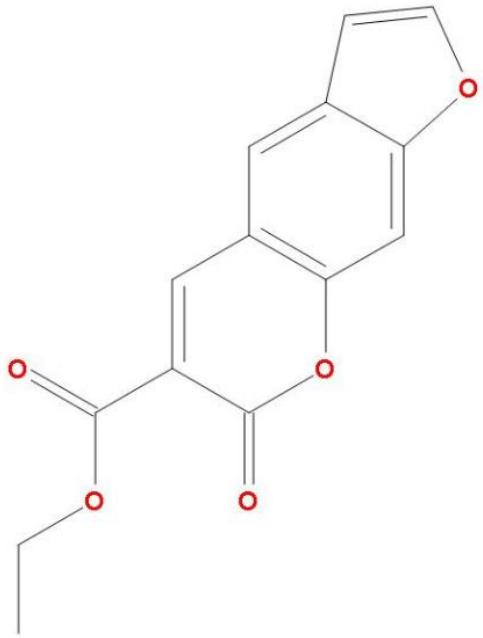


Figure 105: Formule développée du 3-carbethoxypsoralen.

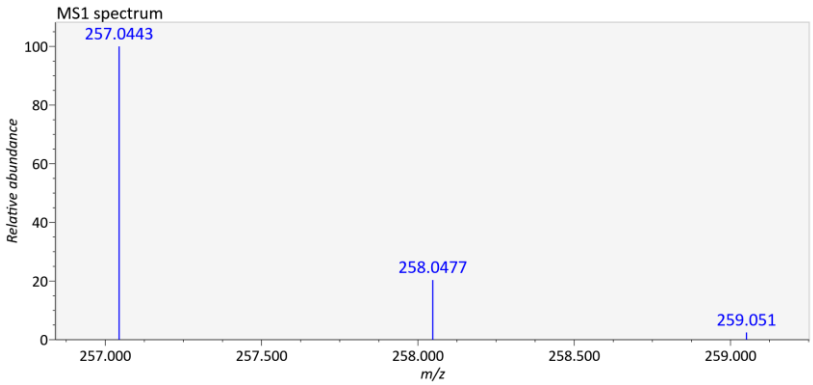


Figure 106: Spectre de masse du 3-carbethoxypsoralen.

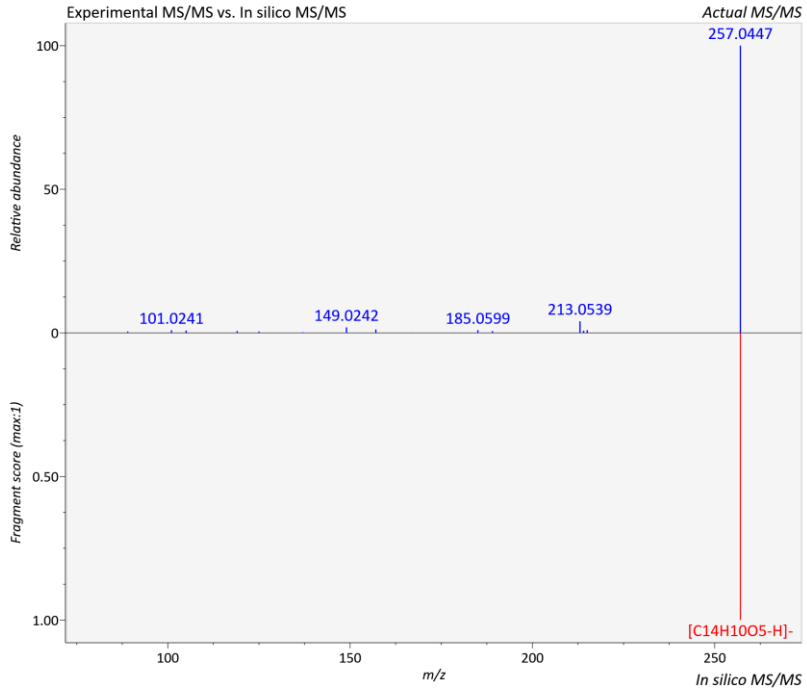


Figure 107: Spectres de fragmentation expérimental (en bleu) et in silico (en rouge) du 3-carbethoxypsoralen.

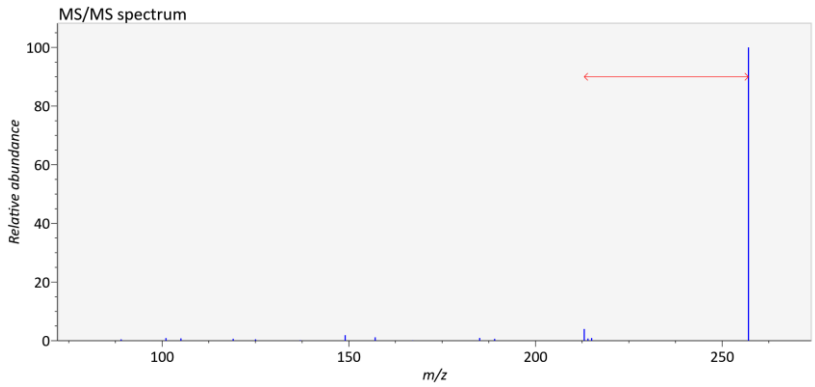


Figure 108: Perte de fragments du 3-carbethoxypsoralen.

VI. Annexe VI : Alignement des pics MZmine de l'OrbiTrap

Les données de ce tableau sont issues des mesures faites avec l'Orbi Trap après traitement par MZmine.

Tableau 22: Alignement des pics des échantillons 73, 181 et 184, obtenu avec MZmine.

Identification potentielle	Pachyrrhizin; 9-Methoxy	Ochrocarpin A; 1''-Me ether	Ochrocarpin A; 1''-Me ether	Ochrocarpin A; 1''-Me ether	Ochrocarpin A
Pics UV	Pas de spectre carac des coumarines	Maximum à 325, intensité relative à 9.97, RT 6.43	Rien	rien	Pic à 319
différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique calculée, et patern isotopique					
Masse exacte	365,0665521	433,1625214	433,163088	433,162634	419,146809
temps de rétention	7,99872	6,477401667	13,0590328	6,25024444	2,87244278
Échantillon dans lequel a été cherché le profil UV	184	184	184	73	184
Présence de pics dans le blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Présence de pics dans l'échantillon 73	Faible abondance	Présent	Faible abondance	Présent	Faible abondance
Intensité du pic de l'échantillon 73	7555,829071	4,69E+08	3060403,23	4310638,76	33334,8872
Présence de pics dans l'échantillon 184	Présent	Présent	Faible abondance	Présent	Faible abondance
Intensité du pic de l'échantillon 184	1855949,986	5,55E+08	1816781,54	5886601,45	936243,509
Présence de pics dans	Présent	Présent	Présent	Faible	Présent

l'échantillon 181				abondance	
Intensité du pic de l'échantillon 181	2478145,578	5,60E+08	7342186,73	7385206,95	1378814,72

Identification potentielle	Moellendorffiline	Melicodenine F	Mangcoumarin	Mangcoumarin	Halfordin
Pics UV	Minuscule pic à 314	rien	grand pic Masse, mais rien en UV	grand pic Masse, mais rien en UV	grand pic Masse, mais rien en UV
différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique calculée, et patern isotopique					
Masse exacte	491,1027091	456,1464539	233,045748	233,045627	275,056394
temps de rétention	6,700060833	4,78539	5,40927222	5,53601111	5,54334944
Échantillon dans lequel a été cherché le profil UV	184	73	184	184	184
Présence de pics dans le blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Présence de pics dans l'échantillon 73	Absent	Présent	Faible abondance	Faible abondance	Faible abondance
Intensité du pic de l'échantillon 73		3278555,169	998336,966	1231211,92	224359,16
Présence de pics dans l'échantillon 184	Faible abondance	Absent	Faible abondance	Présent	Faible abondance
Intensité du pic de l'échantillon 184	2192214,351		3,11E+07	5998841,3	3,22E+07
Présence de pics dans l'échantillon 181	Présent	Absent	Présent	Présent	Présent
Intensité du pic de l'échantillon 181	2925643,054		4,19E+07	1,04E+07	3,64E+07

Identification potentielle	Byakangelicin; (R)-form, 3'-Butyl ether	Byakangelicin; (R)-form, 2',3'-Carbonate	Bergaptol; Me ether	Bergamottin; 6',7'-Dihydro, 6'R,7'-dihydroxy	Bergamottin; 5'-Ethoxy	Aviprin; (R)-form, 3'-Butyl ether
Pics UV	rien	317?	Rien	271/329	Rien	rien
Masse exacte	389,1616821	359,0734314	215,032772	371,15436	381,1751	359,150909
temps de rétention	6,89	1,019	0,654	12,17	13,14	6,38
différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique calculée, et patern isotopique						
Échantillon dans lequel a été cherché le profil UV	73	73	184	184	184	73
Présence de pics dans le blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Présence de pics dans l'échantillon 73	Présent	Présent	Faible abondance	Faible abondance	Présent	Faible abondance
Intensité du pic de l'échantillon 73	5422161,076	7157436,941	4821042,99	9626,51	1,19E+07	2952749,74
Présence de pics dans l'échantillon 184	Absent	Faible abondance	Faible abondance	Faible abondance	Présent	Absent
Intensité du pic de l'échantillon 184		1429096,182	2,67E+07	1725640,02	1,13E+07	
Présence de pics dans l'échantillon 181	Absent	Faible abondance	Présent	Présent	Présent	Absent
Intensité du pic de l'échantillon 181		1111669,603	3,92E+07	2824247,92	1,20E+07	

Identification potentielle	Aviprin; (Î¾)-form, 3'-Me ether, 2'-Ac	Anisolactone; 2',3'-Epoxide	Anisolactone; 2',3'-Epoxide	Anisolactone; 2',3'-Epoxide	Anhydrorutaretin; Me ether, 1'-methoxy	Anhydrorutaretin
Pics UV	rien	Peut-être pic 319?	309/311/314/319/	rien	268/311/319	262/312/309
différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique calculée/ patern isotopique					-14.8/ 91.4%	-15/ 91.5%
Masse exacte	359,1143588	381,0987854	381,097666	381,098608	287,088236	243,062401
temps de rétention	6,786	7,43	7,77	8,23	2,45	1,014
Échantillon dans lequel a été cherché le profil UV	181	184	184	181	184	184
Présence de pics dans le blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Présence de pics dans l'échantillon 73	Absent	Absent	Absent	Absent	Présent	Présent
Intensité du pic de l'échantillon 73					9860008,1	9797410,01
Présence de pics dans l'échantillon 184	Présent	Présent	Faible abondance	Présent	Présent	Présent
Intensité du pic de l'échantillon 184	5784610,005	3938939,851	1332668,2	1445173,98	1,33E+07	9389634,21
Présence de pics dans l'échantillon 181	Faible abondance	Présent	Présent	Faible abondance	Présent	Présent
Intensité du pic de l'échantillon 181	390692,2847	3853674,541	1775280,59	2299050,33	1,95E+07	1,09E+07

Identification potentielle	Anhydrorutaretin	Anhydrorutaretin	6-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one	6,8-Dihydroxy-2H-furo[2,3-h]-1-benzopyran-2-one; 8-O-(3-Methyl-2-butenyl)	5-Hydroxychalepensin; O-(2Î¾-Hydroxy-3-methoxy-3-methylbutyl)	4,9-Dihydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one; Bis-O-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)
Pics UV	très très faiblement 260/317	270/315	rien	rien	rien	rien
différence de masse entre la masse expérimentale et la masse théorique calculée (ppm)/patern isotopique		0.6/ 95.5%				
Masse exacte	243,0623372	243,0664253	351,088051	285,072906	385,169678	421,151459
temps de rétention	0,821	7,66	7,80	3,41	8,39	4,77
Échantillon dans lequel a été cherché le profil UV	73	184	184	73	73	73
Présence de pics dans le blanc	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Présence de pics dans l'échantillon 73	Présent	Absent	Absent	Présent	Présent	Présent
Intensité du pic de l'échantillon 73	4471954,576			5606485,13	2730513,56	1839985,52
Présence de pics dans l'échantillon 184	Faible abondance	Faible abondance	Présent	Absent	Absent	Absent
Intensité du pic de l'échantillon 184	2825777,534	851095,4167	2464028,05			
Présence de pics dans l'échantillon 181	Faible abondance	Présent	Présent	Absent	Absent	Absent
Intensité du pic de l'échantillon 181	2879443,954	2140344,156	3860679,77			

VII. Annexe VII : Vérification de l'identité des molécules

VII.1 Chromatogrammes et spectres UV obtenus avec l'OrbiTrap

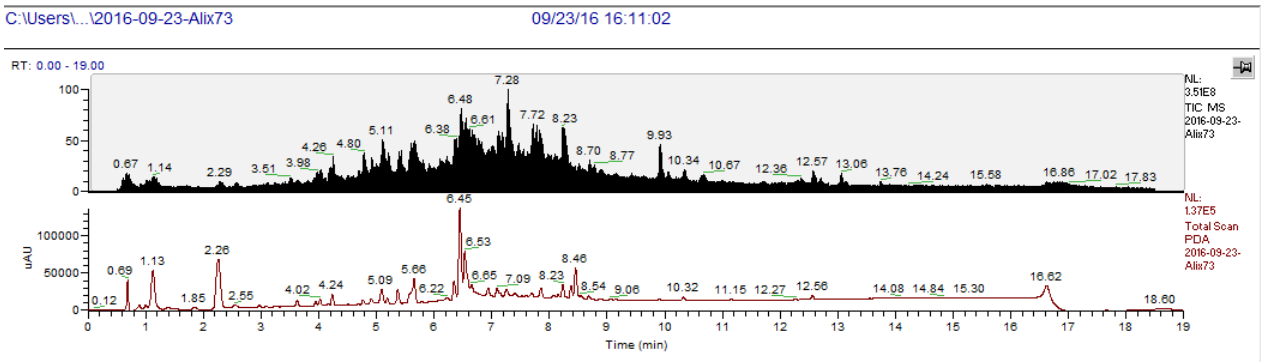


Figure 109: Chromatogramme et spectre obtenus avec l'orbiTrap pour l'échantillon 73.

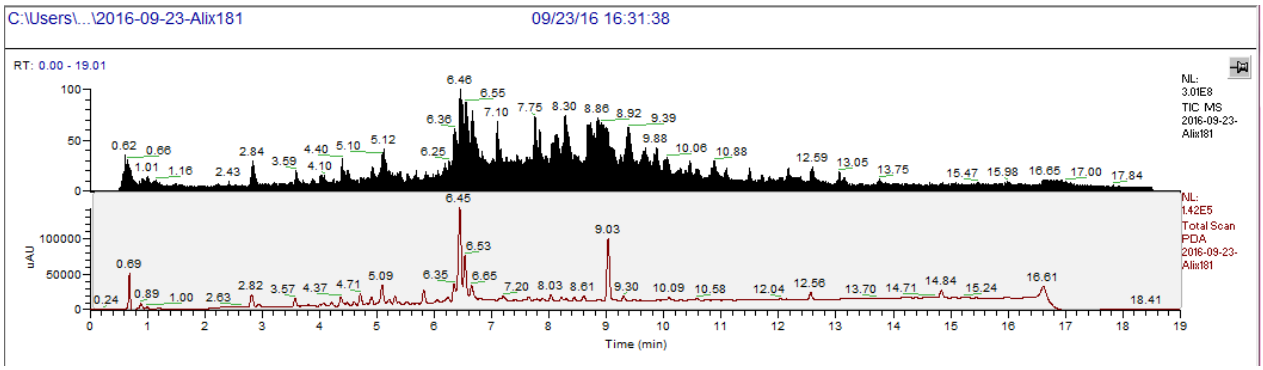


Figure 110: Chromatogramme et spectre obtenus avec l'orbiTrap pour l'échantillon 181.

VII.2 Identités des molécules détectées avec l'OrbiTrap

VII.2.1 Ochrocarpine A ou Ochrocarpine B

Nom	Formule brute	Masse exacte	Différence masses expérimentale et calculée (ppm)	Patern isotopique (%)	MS/MS de l'OrbiTrap associée ?
l'Ochrocarpine A	C25H24O6	419,146809	-7,6	91,6	Non

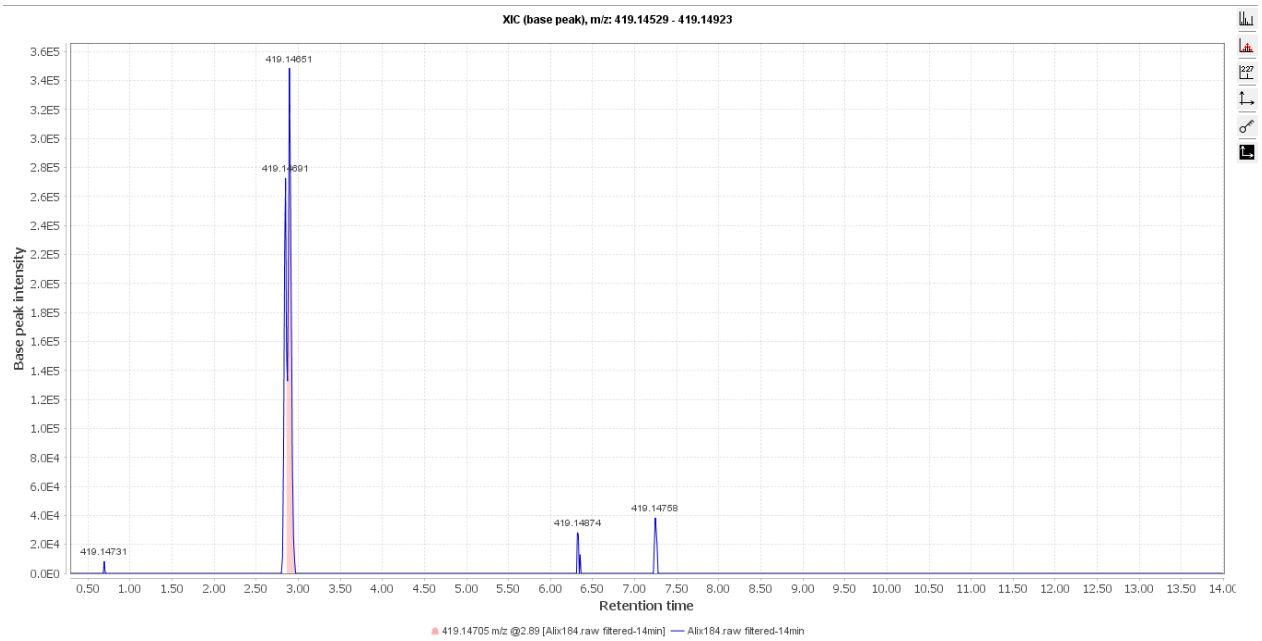


Figure 111: Chromatogramme de l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B

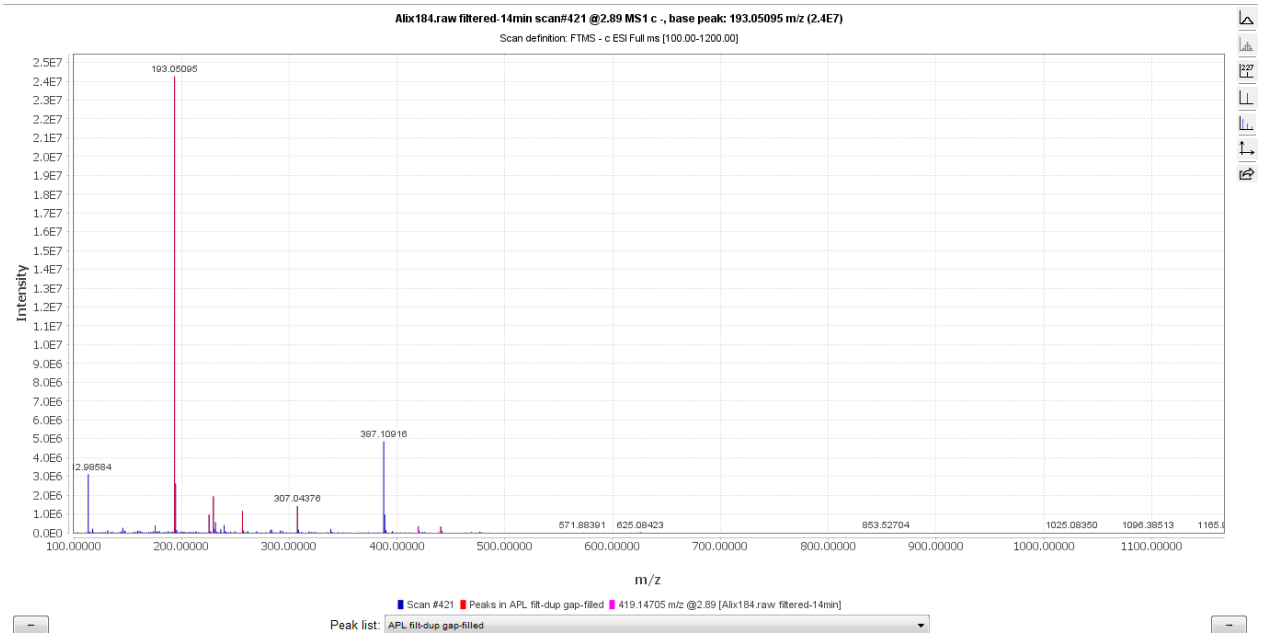


Figure 112: Spectre MS de l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B

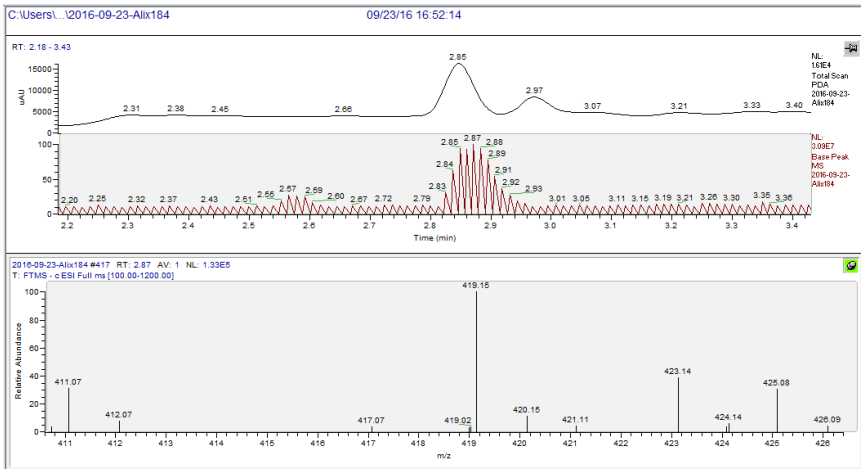


Figure 113: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l': Ochrocarpin A ou ochrocarpin B

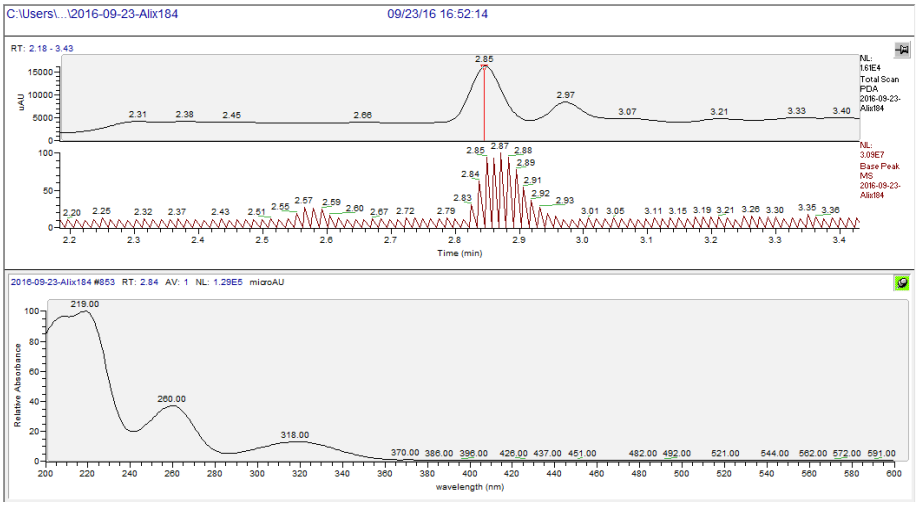


Figure 114: Spectre UV d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Ochrocarpin A ou ochrocarpin B

VII.2.2 Moellendorffiline

Nom	Formule brute	Masse exacte	Différence masses expérimentale et calculée (ppm)	Patern isotopique (%)	MS/MS de l'OrbiTrap associée ?
Moellendorffiline	C26H20O10	491,102709	8,8	90,1	Non

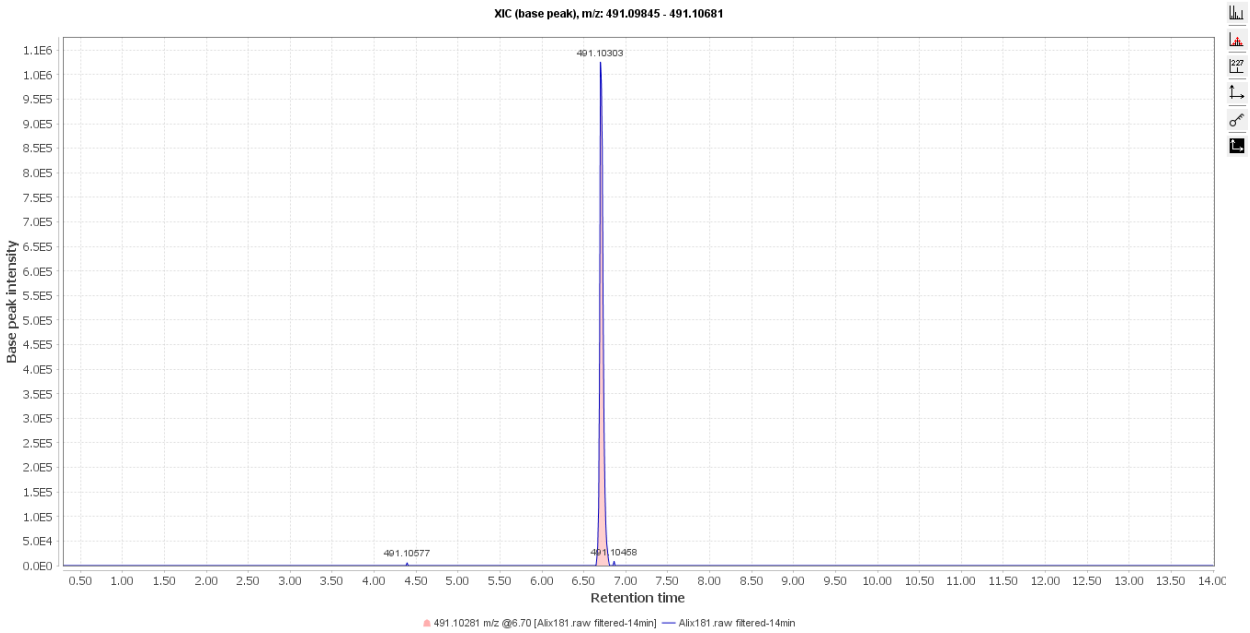


Figure 115: Moellendorffiline

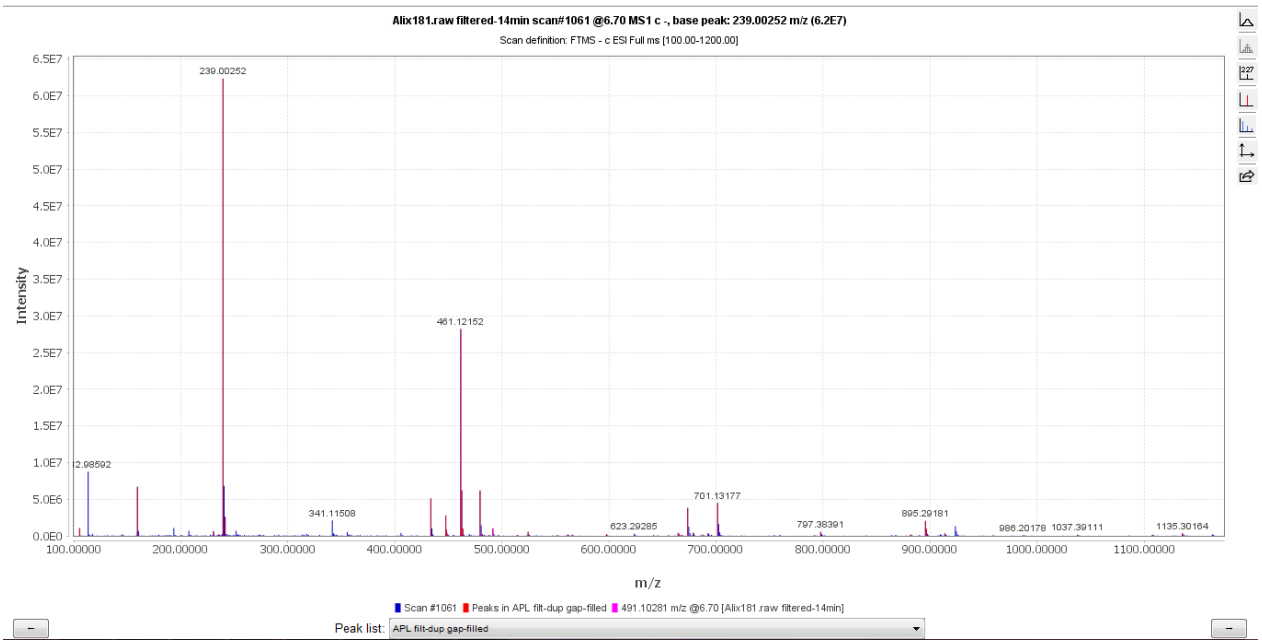


Figure 116: Moellendorffiline

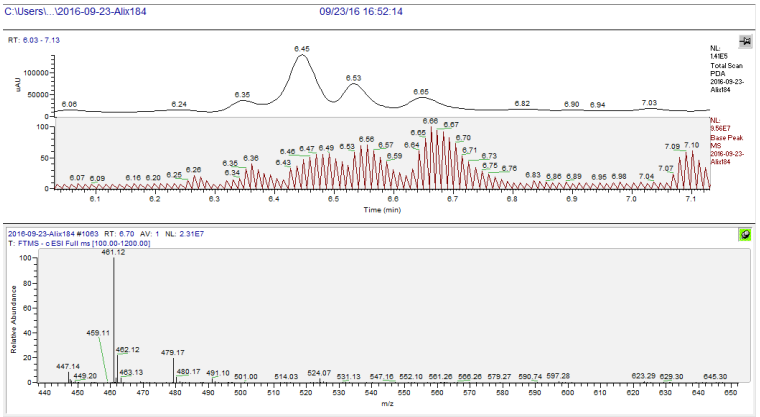


Figure 117: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant la Moellendorffiline.

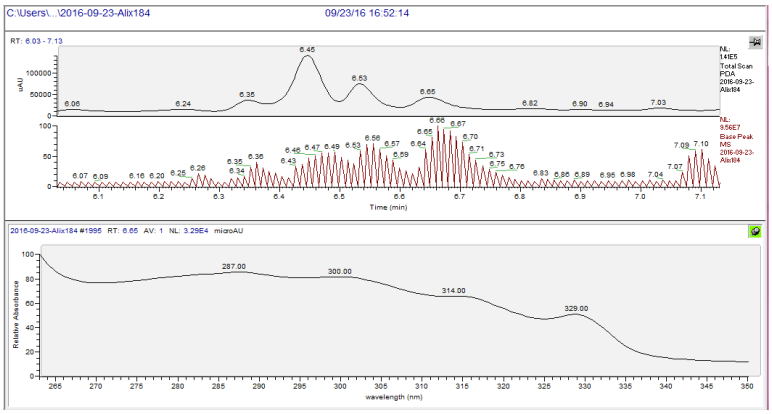


Figure 118: Spectre UV d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l la Moellendorffiline

VII.2.3 Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2'Î3/4, 3'Î3/4-Epoxide

Nom	Formule brute	Masse exacte	Différence masses expérimentale et calculée (ppm)	Patern isotopique (%)	MS/MS de l'OrbiTrap associée ?
Anisolactone	C21H18O7	381,097666	-0,8	94,5	Non

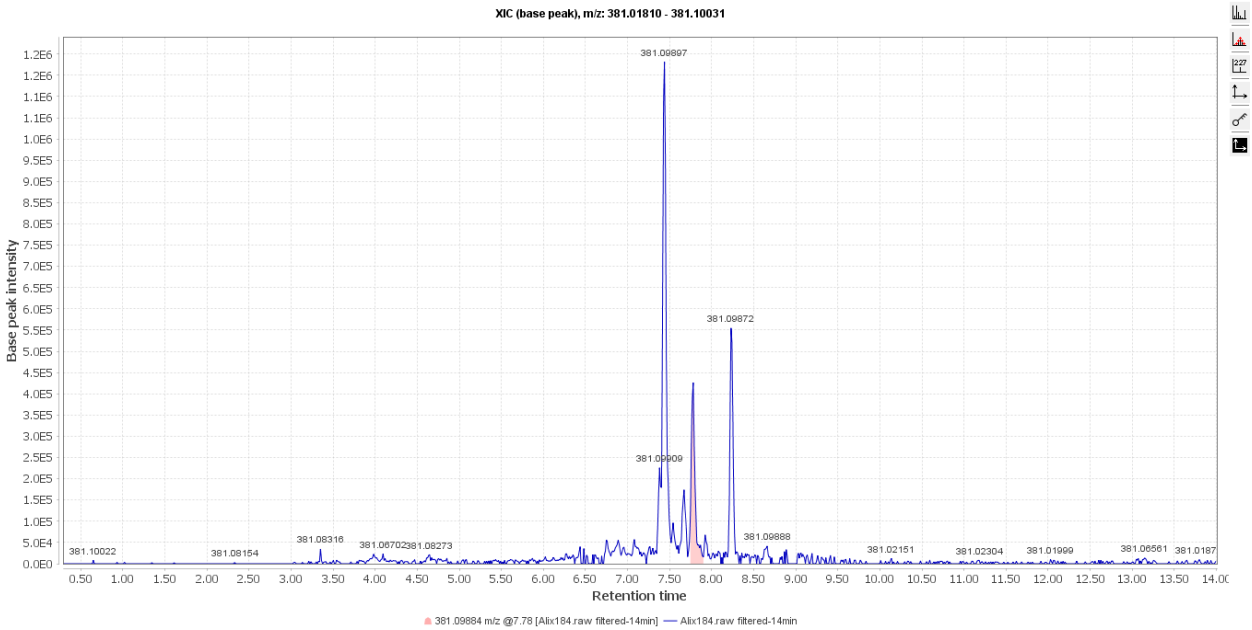


Figure 119: Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide

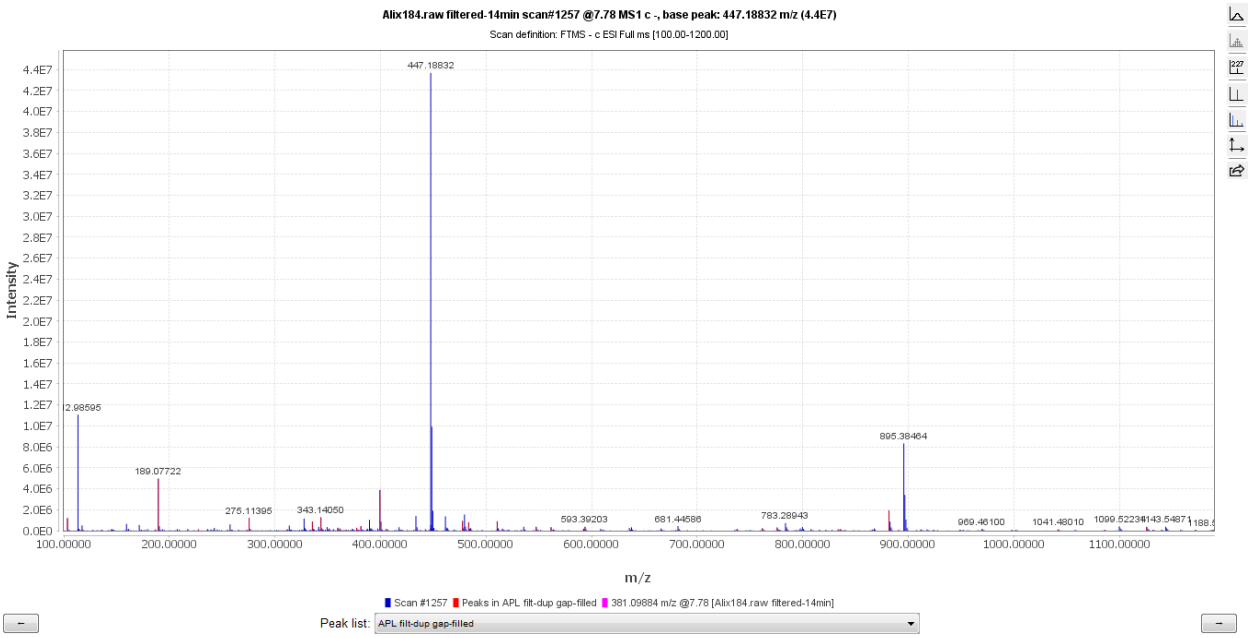


Figure 120: Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2’Î3/4, 3’Î3/4-Epoxide

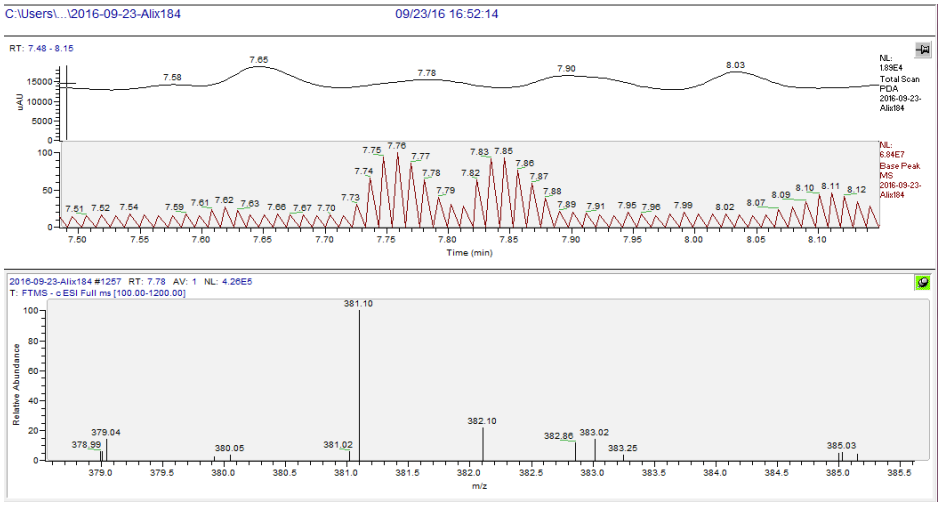


Figure 121: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2'Î3/4, 3'Î3/4-Epoxide

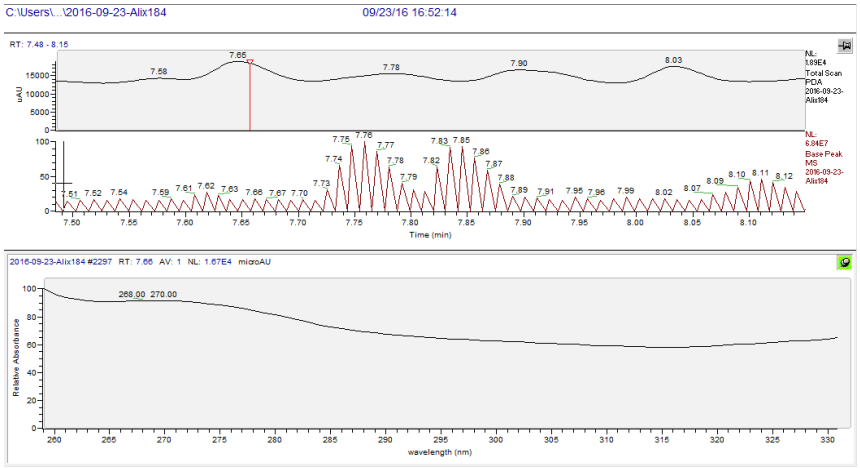


Figure 122: Spectre UV d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anisolactone; 2',3'-Epoxide, ou Indicolactone, 2'Î3/4, 3'Î3/4-Epoxide

VII.2.4 Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1',2'-Dihydro, 1'hydroxy

Nom	Formule brute	Masse exacte	Différence masses expérimentale et calculée (ppm)	Patern isotopique (%)	MS/MS de l'OrbiTrap associée ?
Anhydrorutaretin	C14H12O4	381,097666	0,6	95,5	Non

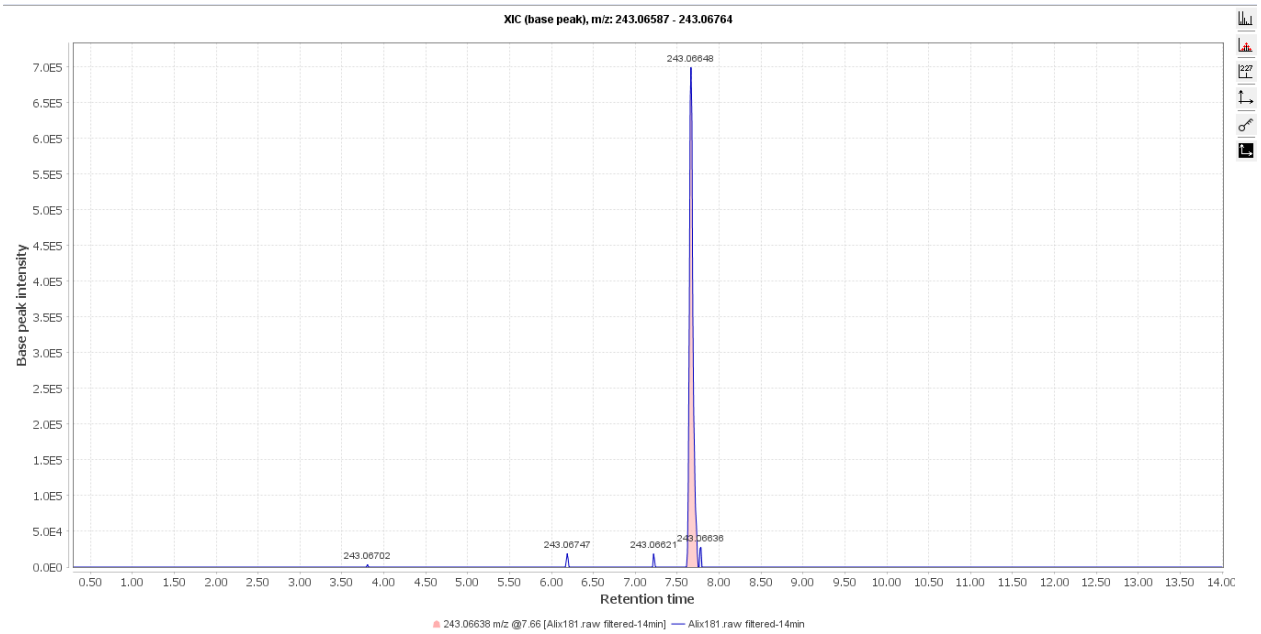


Figure 123: Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1',2'-Dihydro, 1'hydroxy

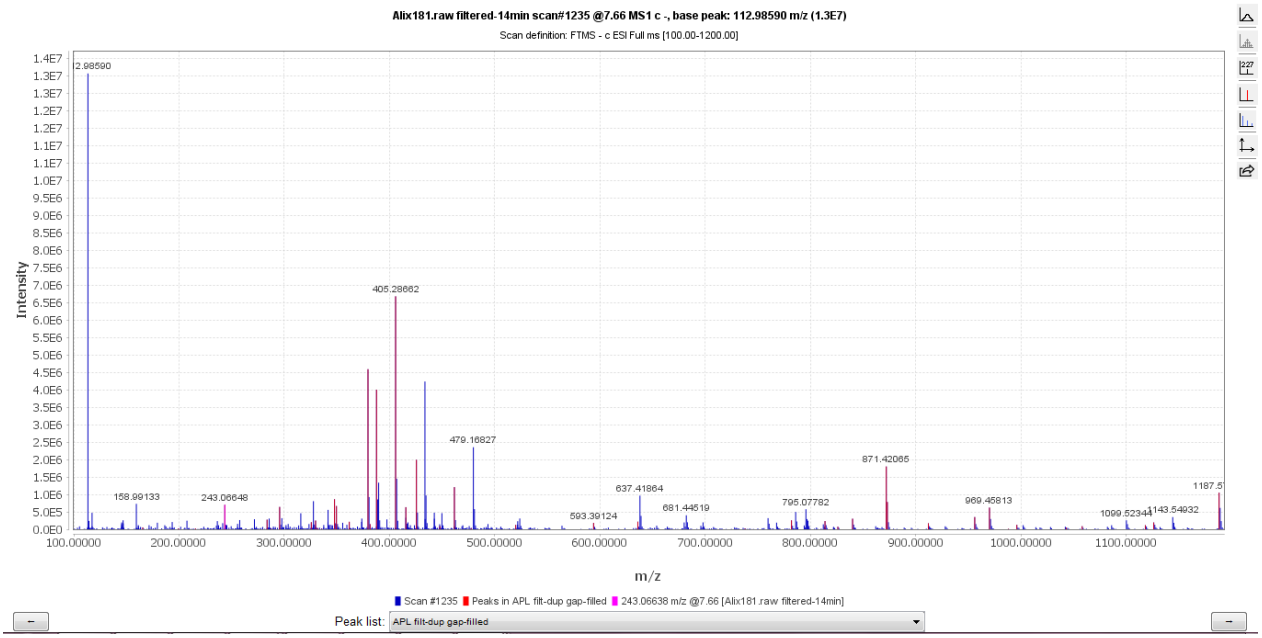


Figure 124: Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1',2'-Dihydro, 1'hydroxy

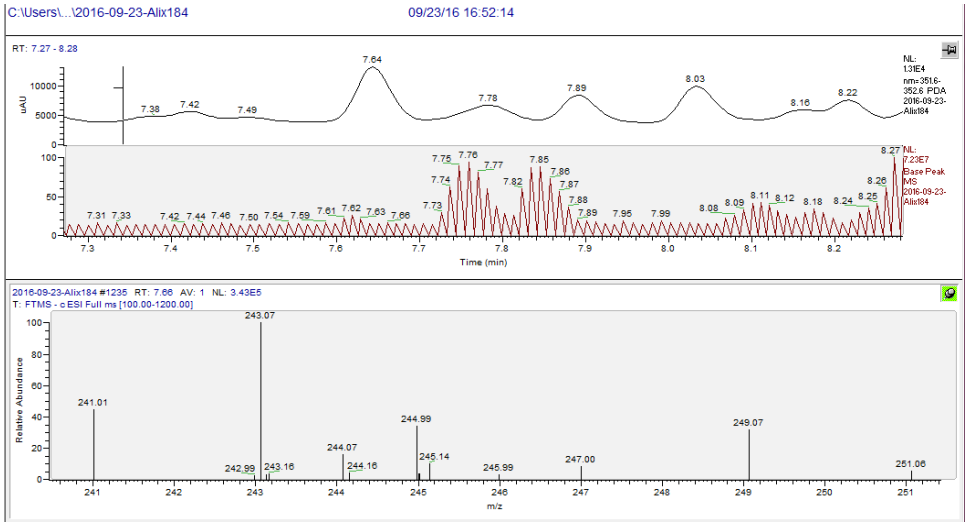


Figure 125: Spectre de masse d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1',2'-Dihydro, 1'hydroxy

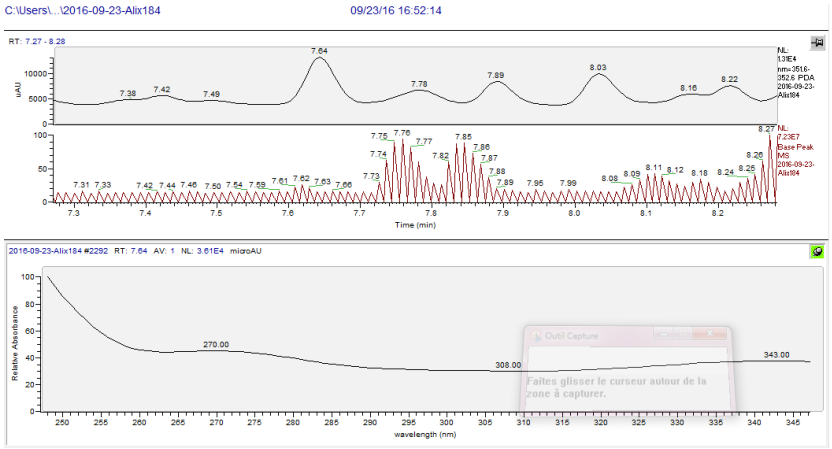


Figure 126: Spectre UV d'Xcalibur associé au pic identifié comme étant l'Anhydrorutaretin, Ou Oroselol ou Hedyotiscone B; (R)-form ou Arnocoumarin, 1',2'-Dihydro, 1'hydroxy

VIII. Annexe VIII : Résultats test screening au pyrogallol sur les 56 échantillons exploitables

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats obtenus suite au test au pyrogallol sur le screening des souches de champignons endophytes. Seuls 56 échantillons sur les 86 testés avaient montré des résultats exploitables.

Chaque tableau représente les résultats obtenus sur une plaque de 96 puits. Les pourcentages d'activité anti-oxydante (% d'act. anti-ox) et d'activité sur la SOD (% Act. Anti/Pro-SOD) sont présentés à chaque fois en fonction du témoin acétate d'éthyle (témoin négatif) propre à la plaque.

En ce qui concerne les résultats sur l'activité de la SOD, une activité anti-SOD sera marquée négativement (il y a une diminution de l'activité de cette enzyme) tandis qu'une activité pro-SOD sera elle marquée par une valeur positive (le pourcentage d'activité de la SOD est augmenté).

Tableau 23: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 35 à 49.

Genre de l'endophyte	Numéro d'échantillon	Équation des droites de régression, sans puis avec SOD	Coefficients directeurs, sans puis avec SOD	% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
	Témoin AcOET	y = 0,0502x - 0,01	0,0502		
		y = 0,0303x - 0,0186	0,0303		100
sp02_Colletotrichum	35	y = 0,0448x - 0,0426	0,0448	10,75697211	
		y = 0,0263x - 0,0463	0,0263		7,035175879
sp02_Colletotrichum	36	y = 0,0418x + 0,0311	0,0418	16,73306773	
		y = 0,0259x - 0,0041	0,0259		20,10050251
sp02_Colletotrichum	37	y = 0,0454x + 0,0393	0,0454	9,561752988	
		y = 0,0245x - 0,0027	0,0245		-5,025125628
sp02_Colletotrichum	38	y = 0,0447x + 0,0595	0,0447	10,9561753	
		y = 0,0264x - 0,0195	0,0264		8,040201005

sp01	39	y = 0,0464x + 0,0808	0,0464	7,569721116	
		y = 0,0269x + 0,0304	0,0269		2,010050251
Sp05_Endomelanconiopsis	40	y = 0,0469x + 0,0491	0,0469	6,573705179	
		y = 0,0269x + 0,0304	0,0269		-0,502512563
sp02_Colletotrichum	42	y = 0,0487x + 0,0188	0,0487	2,988047809	
		y = 0,0301x - 0,0266	0,0301		6,532663317
sp02_Colletotrichum	43	y = 0,0466x - 0,0211	0,0466	7,171314741	
		y = 0,0268x - 0,0779	0,0268		0,502512563
sp13	44	y = 0,0472x + 0,0401	0,0472	5,976095618	
		y = 0,0237x - 0,0203	0,0237		-18,09045226
sp05_Endomelanconiopsis	45	y = 0,0488x + 0,0414	0,0488	2,788844622	
		y = 0,0261x - 0,0028	0,0261		-14,07035176
sp14c	46	y = 0,0469x + 0,0414	0,0469	6,573705179	
		y = 0,0275x - 0,0025	0,0275		2,512562814
sp14c	47	y = 0,037x + 0,0377	0,037	26,29482072	
		y = 0,0272x - 0,0134	0,0272		50,75376884
sp02_Colletotrichum	48	y = 0,0469x + 0,0722	0,0469	6,573705179	
		y = 0,0245x - 0,0048	0,0245		-12,56281407

sp05_Endomelanconiopsis	49	y = 0,047x + 0,0708	0,047	6,374501992	
		y = 0,0241x + 0,0124	0,0241		-15,07537688

Tableau 24: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 67 à 85.

Genre de l'endophyte	Numéro d'échantillon	Équation des droites de régression, sans puis avec SOD	Coefficients directeurs, sans puis avec SOD	% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
				% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
	AcOEt	y = 0,0236x + 0,023	0,0236		
		y = 0,0141x - 0,0004	0,0141		100
Sporothrix (T99)	67	y = 0,0207x + 0,0328	0,0207	12,28813559	
		y = 0,0134x - 0,0029	0,0134		23,15789474
Pestalotiopsis_1b	68	y = 0,0232x + 0,0332	0,0232	1,694915254	
		y = 0,0118x + 0,0029	0,0118		-20
Nigrospora 1 _sp17	69	y = 0,0201x + 0,0448	0,0201	14,83050847	
		y = 0,0116x + 0,0007	0,0116		10,52631579
sp06	71	y = 0,0217x + 0,057	0,0217	8,050847458	
		y = 0,014x + 0,0096	0,014		18,94736842
	73	y = 0,0217x + 0,0469	0,0217	8,050847458	
		y = 0,0104x + 0,0136	0,0104		-18,94736842
sp07_Botryosphaeria	74	y = 0,0216x + 0,0501	0,0216	8,474576271	
		y = 0,0102x + 0,0247	0,0102		-20
sp07_Botryosphaeria	75	y = 0,0222x + 0,0548	0,0222	5,93220339	
		y = 0,0109x + 0,0091	0,0109		-18,94736842
sp07_Botryosphae	76	y = 0,0217x + 0,0119	0,0217	8,0508474	

ria				58	
		y = 0,0107x - 0,0097	0,0107		-15,78947368
sordario 5	77	y = 0,0232x + 0,0183	0,0232	1,694915254	
		y = 0,0142x + 0,0027	0,0142		5,263157895
sp05_Endomelanconiopsis	80	y = 0,0215x + 0,001	0,0215	8,898305085	
		y = 0,0123x - 0,0178	0,0123		3,157894737
sp05_Endomelanconiopsis	81	y = 0,0203x + 0,013	0,0203	13,98305085	
		y = 0,0108x + 0,0153	0,0108		0
dia1.6	82	y = 0,0188x + 0,0215	0,0188	20,33898305	
		y = 0,0123x - 0,0224	0,0123		31,57894737
sp05_Endomelanconiopsis	83	y = 0,0223x + 0,0216	0,0223	5,508474576	
		y = 0,0106x - 0,0168	0,0106		-23,15789474
sp05_Endomelanconiopsis	84	y = 0,0218x + 0,0039	0,0218	7,627118644	
		y = 0,0106x + 0,0033	0,0106		-17,89473684
sp05_Endomelanconiopsis	85	y = 0,0231x + 0,0317	0,0231	2,118644068	
		y = 0,0103x - 0,0002	0,0103		-34,73684211

Tableau 25: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 86 à 170.

Genre de l'endophyte	Numéro d'échantillon	Équation des droites de régression, sans puis avec SOD	Coefficients directeurs, sans puis avec SOD	% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
				% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
	AcOEt	y = 0,0242x + 0,0204	0,0242		
		y = 0,0137x - 0,0062	0,0137		
sp09	86	y = 0,0216x + 0,0234	0,0216	10,74380165	

		y = 0,0105x + 0,0045	0,0105		-5,714285714
sp05_Endomelanconiopsis	87	y = 0,0226x + 0,0168	0,0226	6,611570248	
		y = 0,0103x - 0,008	0,0103		-17,14285714
sp05_Endomelanconiopsis	88	y = 0,0233x + 0,0358	0,0233	3,719008264	
		y = 0,0109x + 0,0069	0,0109		-18,0952381
xyl_1.2	89	y = 0,0205x + 0,056	0,0205	15,2892562	
		y = 0,0101x + 0,0014	0,0101		0,952380952
xyl_1.2	90	y = 0,0214x + 0,0319	0,0214	11,57024793	
		y = 0,0118x + 0,0005	0,0118		8,571428571
	92	y = 0,0238x + 0,0415	0,0238	1,652892562	
		y = 0,0129x + 0,0208	0,0129		-3,80952381
sp03 T35_Phyllosticta	93	y = 0,0235x + 0,0027	0,0235	2,892561983	
		y = 0,0113x - 0,0019	0,0113		-16,19047619
	160	y = 0,0213x - 0,0318	0,0213	11,98347107	
		y = 0,0126x - 0,0559	0,0126		17,14285714
dia2	166	y = 0,0223x + 0,0102	0,0223	7,851239669	
		y = 0,0123x + 0,0169	0,0123		4,761904762
sp05_Endomelanconiopsis	167	y = 0,0238x + 0,0133	0,0238	1,652892562	
		y = 0,012x + 0,0025	0,012		-12,38095238
sp02_Colletotrichum	169	y = 0,0206x - 0,0186	0,0206	14,87603306	
		y = 0,012x + 0,0096	0,012		18,0952381
Annulohypoxylon	170	y = 0,0218x + 0,0163	0,0218	9,917355372	
		y = 0,013x + 0,0114	0,013		16,19047619

Tableau 26: Résultats du test au pyrogallol des échantillons 171 à 186.

Genre de l'endophyte	Numéro d'échantillon	Équation des droites de régression, sans puis avec SOD	Coefficients directeurs, sans puis avec SOD	% d'act anti-ox	% Act Anti/Pro-SOD
	AcOEt	y = 0,0321x + 0,0574	0,0321		
		y = 0,0261x + 0,0077	0,0261		100
dia1.7	171	y = 0,0254x + 0,0552	0,0254	20,87227414	
		y = 0,0218x + 0,0196	0,0218		40
dia1.7	173	y = 0,0293x + 0,0501	0,0293	8,722741433	
		y = 0,0261x + 0,0335	0,0261		46,66666667
dia5	174	y = 0,0268x + 0,0497	0,0268	16,51090343	
		y = 0,0235x + 0,0242	0,0235		45
	175	y = 0,0277x + 0,0521	0,0277	13,70716511	
		y = 0,0239x + 0,0212	0,0239		36,66666667
dia1.7	176	y = 0,0293x + 0,0737	0,0293	8,722741433	
		y = 0,0233x + 0,0294	0,0233		0
dia1.7	177	y = 0,0296x + 0,0702	0,0296	7,788161994	
		y = 0,024x + 0,0459	0,024		6,666666667
dia1.7	178	y = 0,028x + 0,0661	0,028	12,77258567	
		y = 0,0248x + 0,0441	0,0248		46,66666667
Annulohypoxylon (tt)	179	y = 0,0275x + 0,0117	0,0275	14,33021807	
		y = 0,0244x + 0,0012	0,0244		48,33333333
Annulohypoxylon (tt)	180	y = 0,0287x + 0,0195	0,0287	10,59190031	

		y = 0,0238x + 0,0045	0,0238		18,33333333
	181	y = 0,0267x + 0,0106	0,0267	16,82242991	
		y = 0,0241x + 0,0064	0,0241		56,66666667
	182	y = 0,0272x + 0,0016	0,0272	15,26479751	
		y = 0,0237x + 0,0084	0,0237		41,66666667
Annulohypoxylon	183	y = 0,0285x + 0,0266	0,0285	11,21495327	
		y = 0,0232x + 0,0184	0,0232		11,66666667
Annulohypoxylon	184	y = 0,0255x + 0,0304	0,0255	20,56074766	
		y = 0,0243x + 0,0099	0,0243		80
Annulohypoxylon	185	y = 0,0287x + 0,0299	0,0287	10,59190031	
		y = 0,024x + 0,0142	0,024		21,66666667
	186	y = 0,0234x + 0,0458	0,0234	27,10280374	
		y = 0,0205x + 0,0341	0,0205		51,66666667

IX. Annexe IX: Résultats du test pyrogallol sur les 8 souches répliquées 6 fois chacune

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus suite au test au pyrogallol sur les six réplicas des huit souches d'intérêt re-cultivées, à une concentration finale en extrait de 40 µg/mL.

Ces échantillons ont été testés trois fois chacun. Les droites de régression et leurs coefficients de corrélation sont associés à chaque échantillon. Grâce aux coefficients directeurs de des droites, il est possible de calculer les activités anti-oxydantes et les activités sur la SOD.

Lorsque des cellules du tableau sont vides, c'est que le coefficient de corrélation de la droite de régression obtenu pour l'échantillon n'est pas assez proche de un.

Tableau 27: Résultats du test au pyrogallol sur les six réplicas des 8 souches d'intérêt, à 40 µg/mL.

Plaque 4	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, première répétition	Plaque 5	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, seconde répétition	Plaque 6	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, troisième répétition
MeOH 1	y = 0,0306x + 0,305	MeOH 2	y = 0,0323x + 0,2726	MeOH 3	y = 0,0329x + 0,2254
	R^2 = 0,9984		R^2 = 0,9943		R^2 = 0,9962
MeOH SOD 1	y = 0,0148x + 0,2029	MeOH SOD 2	y = 0,0113x + 0,212	MeOH SOD 3	y = 0,0098x + 0,1766
	R^2 = 0,9995		R^2 = 0,986		R^2 = 0,9958
68 (2) 1	y = 0,0556x + 1,7128	68 (2) 2	y = 0,0466x + 1,7823	68 (2) 3	
	R^2 = 0,9841		R^2 = 0,962		
68 (2) SOD 1	y = 0,0361x + 1,723	68 (2) SOD 2	y = 0,0414x + 1,7044	68 (2) SOD 3	
	R^2 = 0,9273		R^2 = 0,9173		
68 (1) 1	y = 0,0379x + 1,2417	68 (1) 2	y = 0,0382x + 1,2008	68 (1) 3	y = 3,77E-02x + 1,21E+00
	R^2 = 0,9831		R^2 = 0,9809		R^2 = 9,83E-01
68 (1) SOD1	y = 0,0268x +	68 (1) SOD2	y = 0,0325x +	68 (1) SOD3	y = 0,0294x +

	1,2049		1,1538		1,2276
	R^2 = 0,9982		R^2 = 0,9851		R^2 = 0,9755
73 (2) 1	y = 0,0346x + 0,5911	73 (2) 2	y = 0,0316x + 0,6647	73 (2) 3	y = 0,0376x + 0,6481
	R^2 = 0,9835		R^2 = 0,9865		R^2 = 0,984
73 2 SOD 1	y = 0,0218x + 0,5704	73 2 SOD 2	y = 0,0166x + 0,6728	73 2 SOD 3	y = 0,0193x + 0,6622
	R^2 = 0,9833		R^2 = 0,9655		R^2 = 0,9909
73 5 1	y = 0,0342x + 0,7102	73 5 2	y = 0,0332x + 0,7121	73 5 3	y = 0,0334x + 0,6644
	R^2 = 0,9817		R^2 = 0,988		R^2 = 0,9889
73 5 SOD 1	y = 0,0197x + 0,5812	73 5 SOD 2	y = 0,0201x + 0,6379	73 5 SOD 3	y = 0,0212x + 0,6188
	R^2 = 0,9684		R^2 = 0,9538		R^2 = 0,9662
74 6 1	y = 0,0317x + 0,5781	74 6 2	y = 0,0303x + 0,5946	74 6 3	
	R^2 = 0,9908		R^2 = 0,9913		
74 6 SOD 1	y = 0,018x + 0,5243	74 6 SOD 2	y = 0,0174x + 0,5498	74 6 SOD 3	
	R^2 = 0,9693		R^2 = 0,9412	time	
74 1 1		74 1 2	y = 0,0321x + 0,7894	74 1 3	
	y = 0,0342x + 0,7844		R^2 = 0,9833		
	R^2 = 0,985				
74 1 SOD 1	y = 0,0134x + 0,7253	74 1 SOD 2	y = 0,0158x + 0,7539	74 1 SOD 3	
	R^2 = 0,977		R^2 = 0,9538		
83 5 1	y = 0,0289x + 0,691	83 5 2	y = 0,0247x + 0,6704	83 5 3	
	R^2 = 0,9912		R^2 = 0,9981		
83 5 SOD 1	y = 0,0248x + 0,5656	83 5 SOD 2	y = 0,0175x + 0,4352	83 5 SOD 3	
	R^2 = 0,9775		R^2 = 0,9623		
83 2 1	y = 0,0308x + 0,4228	83 2 2	y = 0,0317x + 0,4036	83 2 3	y = 0,0321x + 0,3756

	$R^2 = 0,9936$		$R^2 = 0,99$		$R^2 = 0,9935$
83 2 SOD 1	y = 0,0148x + 0,323	83 2 SOD 2	y = 0,0179x + 0,3607	83 2 SOD 3	y = 0,0166x + 0,3181
	$R^2 = 0,9479$		$R^2 = 0,9761$		$R^2 = 0,998$
85 4 1	y = 0,031x + 0,32	85 4 2	y = 0,0201x + 0,518	85 4 3	y = 0,0338x + 0,3732
	$R^2 = 0,9956$		$R^2 = 0,9732$		$R^2 = 0,9841$
85 4 SOD 1	y = 0,0175x + 0,2884	85 4 SOD 2	y = 0,0282x + 0,3454	85 4 SOD 3	y = 0,0207x + 0,3392
	$R^2 = 0,9941$		$R^2 = 0,9826$		$R^2 = 0,9567$
85 2 1	y = 0,0335x + 0,653	85 2 2	y = 0,0247x + 0,6704	85 2 3	y = 0,0324x + 0,6348
	$R^2 = 0,9908$		$R^2 = 0,9981$		$R^2 = 0,9877$
85 2 SOD 1	y = 0,0142x + 0,5867	85 2 SOD 2	y = 0,0175x + 0,4352	85 2 SOD 3	y = 0,02x + 0,5872
	$R^2 = 0,9937$		$R^2 = 0,9623$		$R^2 = 0,9777$
				time	
181 4 1	y = 0,0377x + 0,8305	181 4 2	y = 0,0343x + 0,8824	181 4 3	y = 0,036x + 0,9426
	$R^2 = 0,9936$		$R^2 = 0,9635$		$R^2 = 0,9894$
181 4 SOD 1	y = 0,0221x + 0,8423	181 4 SOD 2	y = 0,0238x + 0,8303	181 4 SOD 3	y = 0,0228x + 0,919
	$R^2 = 0,9722$		$R^2 = 0,957$		$R^2 = 0,9516$
181 6 1	y = 0,0319x + 1,1089	181 6 2	y = 0,0345x + 0,9815	181 6 3	y = 0,0314x + 1,0698
	$R^2 = 0,9973$		$R^2 = 0,9893$		$R^2 = 0,9925$
181 6 SOD 1	y = 0,0193x + 0,9201	181 6 SOD 2	y = 0,015x + 1,0023	181 6 SOD 3	y = 0,0179x + 1,0004
	$R^2 = 0,9848$		$R^2 = 0,9929$		$R^2 = 0,9919$
184 6 1	y = 0,0359x + 1,3481	184 6 2	y = 0,0395x + 1,242	184 6 3	y = 0,0306x + 1,439
	$R^2 = 0,9778$		$R^2 = 0,9893$		$R^2 = 0,9676$
184 6 SOD 1	y = 0,0204x + 1,26	184 6 SOD 2	y = 0,027x + 1,1983	184 6 SOD 3	y = 0,0185x + 1,3856
	$R^2 = 0,914$		$R^2 = 0,9831$		$R^2 = 0,9571$

184 2 1	y = 0,0311x + 1,3267	184 2 2	y = 0,0375x + 1,3638	184 2 3	y = 0,0395x + 1,44
	R^2 = 0,9787		R^2 = 0,9529		R^2 = 0,9761
184 2 SOD 1	y = 0,0187x + 1,327	184 2 SOD 2	y = 0,0204x + 1,2248	184 2 SOD 3	y = 0,0289x + 1,3471
	R^2 = 0,9833		R^2 = 0,9193		R^2 = 0,9693
Pool 1	y = 0,0352x + 0,8702	Pool 2	y = 0,0363x + 1,0942	Pool 3	
	R^2 = 0,9866		R^2 = 0,9592		
pool SOD 1	y = 0,0193x + 0,8121	pool SOD 2	y = 0,0211x + 0,841	pool SOD 3	
	R^2 = 0,9893		R^2 = 0,954		

X. Annexe X : Résultats obtenus sur le test au pyrogallol du pool de 8 souches d'intérêt, à 160 µg/mL

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus suite au test au pyrogallol sur le pool des six réplicas des huit souches d'intérêt, mesurées à une concentration finale de 160 µg/mL d'extrait.

Ces échantillons ont été testés trois fois chacun. Les droites de régression et leurs coefficients de corrélation sont associés à chaque échantillon. Grâce aux coefficients directeurs de des droites, il est possible de calculer les activités anti-oxydantes et les activités sur la SOD.

Tableau 28: Résultats du test au pyrogallol sur le pool des réplicas des 8 souches d'intérêt, à 160 µg/mL.

Numéro d'échantillon	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, première répétition	Numéro d'échantillon	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, seconde répétition	Numéro d'échantillon	Droites de régression (et coefficient de corrélation), sans puis avec SOD, troisième répétition
1 MeOH	y = 0,0354x + 0,0583	2-MeOH	y = 0,0229x + 0,0505	3-MeOH	y = 0,0334x + 0,0216
	R^2 = 0,9974		R^2 = 0,9989		R^2 = 0,9991
1 MeOH SOD	y = 0,0113x + 0,0299	2-MeOH SOD	y = 0,0123x + 0,017	3-MeOH SOD	y = 0,0177x + 0,0171
	R^2 = 0,9858		R^2 = 0,9853		R^2 = 0,9938
1 184 seul	y = 0,0453x + 0,0463	2-184 seul	y = 0,0363x - 0,0334	3-184 seul	y = 0,0514x + 0,0114
	R^2 = 0,9999		R^2 = 0,9897		R^2 = 0,9998
1 184 SOD	y = 0,028x - 0,0647	2-184 SOD		3-184 SOD	y = 0,0267x + 0,0379
	R^2 = 0,9948				R^2 = 0,9965
1 68 seul		2-68 seul	y = 0,0302x + 0,0664	3-68 seul	y = 0,0336x + 0,1083
			R^2 = 0,983		R^2 = 0,9976
1 68 SOD		2-68 SOD	y = 0,0204x + 0,0807	3-68 SOD	y = 0,0259x + 0,0644
			R^2 = 0,9909		R^2 = 0,9939
1 73 seul	y = 0,034x +	2-73 seul	y = 0,0229x +	3-73 seul	y = 0,0292x +

	0,1348		0,0779		0,0904
	R^2 = 0,9945		R^2 = 0,9899		R^2 = 0,9988
1-73 SOD	y = 0,0151x + 0,057	2-73 SOD	y = 0,0108x + 0,0918	3-73 SOD	y = 0,0247x + 0,0418
	R^2 = 0,9758		R^2 = 0,9967		R^2 = 0,9934
1-74 seul	y = 0,0398x + 0,0993	2-74 seul	y = 0,0238x + 0,079	3-74 seul	y = 0,0391x + 0,0316
	R^2 = 0,9822		R^2 = 0,9888		R^2 = 0,9805
1-74 SOD	y = 0,0176x + 0,0005	2-74 SOD	y = 0,023x + 0,0758	3-74 SOD	y = 0,0285x + 0,0443
	R^2 = 0,9631		R^2 = 0,946		R^2 = 0,9806
1-83 seul	y = 0,0375x + 0,1244	2-83 seul	y = 0,023x - 0,0032	3-83 seul	y = 0,0354x + 0,0352
	R^2 = 0,9914		R^2 = 0,9924		R^2 = 0,997
1-83 SOD	y = 0,0165x + 0,0691	2-83 SOD	y = 0,0177x + 0,0267	3-83 SOD	y = 0,0231x + 0,0295
	R^2 = 0,9895		R^2 = 0,9764		R^2 = 0,9841
1-85 seul	y = 0,0347x + 0,1063	2-85 seul	y = 0,0202x + 0,0325	3-85 seul	y = 0,0357x + 0,0565
	R^2 = 0,992		R^2 = 0,9923		R^2 = 0,9979
1-85 SOD	y = 0,0118x + 0,0544	2-85 SOD	y = 0,0127x + 0,0144	3-85 SOD	y = 0,02x + 0,0274
	R^2 = 0,9716		R^2 = 0,9962		R^2 = 0,9914
1-181 seul	y = 0,0376x + 0,1988	2-181 seul	y = 0,0342x - 0,0049	3-181 seul	y = 0,0435x + 0,0111
	R^2 = 0,9981		R^2 = 0,989		R^2 = 0,9971
1-181 SOD		2-181 SOD	y = 0,0192x + 0,0389	3-181 SOD	y = 0,0329x - 0,0727
			R^2 = 0,9606		R^2 = 0,9812

L'analyse des résultats nous permet de construire le tableau ci-dessous. Il y a 3 séries de tableaux présentant chacun les résultats d'une série de 3 mesures.

Tableau 29: Résultats obtenus avec une concentration d'extraits de 160 µg/mL.

	Activité anti-oxydante	Activité-SOD
1 MeOH	0	0
1-68		

1-73	4,0	-33,6
1-74	-12,4	-55,8
1-83	-5,9	-46,0
1-85	2,0	-4,4
1-181	-6,2	
1-184	-28,0	-147,8

	Activité anti-oxydante	Activité SOD
2-MeOH	0	0
2-68	-31,9	-65,9
2-73	0,0	12,2
2-74	-3,9	-87,0
2-83	-0,4	-43,9
2-85	11,8	-3,3
2-181	-49,3	-56,1
2-184	-58,5	

	Activité anti-oxydante	Activité SOD
3-MeOH	0	0
3-68	-0,6	-46,3
3-73	12,6	-39,5
3-74	-17,1	-61,0
3-83	-6,0	-30,5
3-85	-6,9	-13,0
3-181	-30,2	-85,9
3-184	-53,9	-50,8

Les cellules du tableau sont vides lorsqu'une série de mesures n'a pas montré un coefficient de régression suffisamment proche de 1, indiquant que les mesures ne sont pas exploitables.

Title: Research of superoxide dismutase inhibitors from natural extracts.

Abstract: Superoxide dismutase is one of the major proteins controlling the oxidizing stress and cellular homeostasis. It is involved in numerous cancer cells proliferation processes. This protein is considered as major anti-cancer target for the development of new anti-cancer drugs.

The goal of this work, was to research and identify an inhibitor of the SOD in endophytic fungi from Peruvian plants. These micro-organisms are known to produce numerous metabolites for host plants protection. During the preparation of endophytic extracts and their characterization by HPLC and statistical analyzes, we have pointed out a high quantitative and qualitative variability of the chemical content of endophytic extracts inside a same strain. Considering the literature we have focused our work on the identification of furocoumarins because of their potential inhibitory effect on the SOD. For this purpose two mass spectrometry strategies using negative ionization mode were carried out. With the QTOF mass spectrometer we have identified Methyl-4H-furo [2,3-b] [1] benzopyran-4-one and the déhydropachyrrhizone. With the OrbiTrap, the Ochrocarpine A, Moellendorffiline the Anisolactone and the Anhydrorutarétine were identified. Biological evaluation of the different extracts was performed using pyrogallol test. This investigation did not allow us to identify an inhibitor of the SOD.

In the future we may consider seeking SOD inhibitors by looking at the formation SOD-chemical compound adducts using an LC-MS investigation.

Key-words: endophytic fungi, superoxide dismutase, QTOF, OrbiTrap, pyrogallol

AUTEURE : Alix POINSO-OLLIVER

TITRE : Recherche d'inhibiteurs de la Superoxyde Dismutase à partir d'extraits naturels.

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr. Patricia VICENDO et Pr. François COUDERC

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Université Paul Sabatier, Toulouse, le 23 novembre 2016.

RÉSUMÉ : Le but de ce travail de thèse était de rechercher de nouvelles molécules inhibitrices de la SOD dans des extraits de substances naturelles. Cette enzyme majeure du stress oxydant étant impliquée dans de nombreux mécanismes de défense des cellules cancéreuses contre l'apoptose représente une voie thérapeutique d'avenir.

Nous en avons recherché dans les champignons endophytes de plantes péruviennes, ces micro-organismes produisant de nombreux métabolites de défense des plantes hôtes.

Ce travail de thèse a d'abord porté sur l'isolement, la culture, l'identification, l'extraction et la caractérisation des souches de champignons endophytes. Les analyses statistiques effectuées sur ces extraits avec les résultats obtenus en HPLC ont confirmé les problèmes de variabilités qualitative et quantitative pouvant être rencontrés au cours de la culture des endophytes et décrites dans la littérature.

La seconde partie expérimentale a porté sur la recherche de furocoumarines dans les extraits obtenus, en raison de leur potentiel effet inhibiteur sur la SOD. Nous avons dérépliqué ces composés dans les extraits d'endophytes au cours de deux stratégies de spectrométrie de masse réalisées en mode d'ionisation négatif.

La première approche, à l'aide d'un QTOF, a abouti à l'identification de deux furocoumarines, la 5-Methyl-4H-furo[2,3-b][1]benzopyran-4-one et la déhydropachyrrhizone.

La seconde, à l'aide d'un OrbiTrap, a vu l'identification de quatre autres furocoumarines : l'Ochrocarpine A, la Moellendorffiline, l'Anisolactone et l'Anhydrorutarétine

Afin de compléter cette approche métabolomique et identifier les molécules inhibitrices de la SOD, nous avons tenté de mettre au point un test d'activité de cette enzyme, rapide, peu coûteux et réalisable en routine. Nous avons sélectionné le test au pyrogallol, mais celui-ci n'a pas démontré les qualités recherchées tant au niveau de la sensibilité que de la reproductibilité.

Nous orientons à présent les recherches vers des approches différentes, la recherche directe d'adduits sur la SOD par LC-MS.

Mots-clefs : endophytes, superoxyde dismutase, QTOF, OrbiTrap, pyrogallol

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie, Biologie, Santé

UMR 5623 Laboratoire des Interactions Moléculaires et des Réactivités Chimique et Photochimique

UMR 152, IRD, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse