



**HAL**  
open science

# Agents apoptotiques issus de la flore endolichénique pour la lutte contre les cancers chimio-résistants

Hind Makhloufi

► **To cite this version:**

Hind Makhloufi. Agents apoptotiques issus de la flore endolichénique pour la lutte contre les cancers chimio-résistants. Autre. Université de Limoges, 2024. Français. NNT: 2024LIMO0062 . tel-04810629

**HAL Id: tel-04810629**

**<https://theses.hal.science/tel-04810629v1>**

Submitted on 29 Nov 2024

**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 Limoges

**Ecole doctorale Biologie, Chimie, Santé (ED 652)**

**Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'Innovation en Santé - LABCiS**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**

Discipline/S spécialité : Chimie de substances naturelles

Présentée et soutenue par  
**Hind Makhloufi**

Le 18 octobre 2024

### **Agents apoptotiques issus de la flore endolichénique pour la lutte contre les cancers chimiorésistants**

Thèse dirigée par Pr. Lengo MAMBU et Dr. Guillaume CHEMIN

#### JURY :

Président du jury

Mme. Ingrid Arnaudin, Professeure, Université de La Rochelle

Rapporteurs

Mme. Sophie Tomasi, Professeure, Université de Rennes

M. Mohamed Haddad, chargé de recherche, Université Paul Sabatier, Toulouse 3

Examineurs

M. Bastien Nay, Directeur de recherche CNRS, Ecole Polytechnique, Palaiseau

M. David Leger, Professeur, Université de Limoges

Mme. Marion Millot, Maître de conférences, Université de Limoges

M. Guillaume Chemin, Maître de conférences, Université de Limoges

Mme. Lengo Mambu, Professeure, Université de Limoges





*A mes parents*





*"The best among you are those who have the best manners and character."*  
**Sahih al-Bukhari, Book 56, Hadith 759**

*"To explore the mysteries of nature through science is to honor the intellect and expand the boundaries of human understanding."*  
**Ibn Rushd (Averroes)**



## Remerciements

---

Réaliser une thèse a toujours été l'un de mes plus grands rêves, et pouvoir la mener dans un domaine que j'admire en a été la concrétisation. Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude à ceux qui m'ont offert l'opportunité de réaliser ce rêve.

Je remercie sincèrement la **Région Nouvelle-Aquitaine** pour le soutien financier apporté au cours des deux premières années de mes travaux de recherche, ainsi que **l'Université de Limoges** pour le financement de la troisième année.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse.

À la professeure **Lengo Mambu**, je vous remercie d'avoir œuvré sans relâche pour obtenir le financement qui a rendu cette thèse possible. Merci pour votre disponibilité, pour nos discussions enrichissantes, et pour m'avoir initié au domaine des substances naturelles. Vos conseils, votre soutien dans les moments difficiles, et vos orientations scientifiques ont été inestimables. Je suis également reconnaissante pour vos corrections rigoureuses et regrette d'avoir empiété sur vos vacances d'été. Veuillez accepter l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Au docteur **Guillaume Chemin**, merci pour votre disponibilité, votre confiance, et pour m'avoir accordé une grande autonomie dans mes travaux. Veuillez recevoir l'assurance de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier le professeur **Bertrand Liagre**, directeur du Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'Innovation en Santé (LABCiS), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, et votre soutien tout au long de cette thèse. Je vous suis également reconnaissant pour le financement de mon séjour à La Rochelle et de ma participation aux congrès.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie ainsi la professeure **Sophie Tomasi** de l'Université de Rennes, le docteur **Mohamed Haddad** de l'Université Toulouse III, le professeur **Bastien Nay** de l'École Polytechnique de Palaiseau, la professeure **Ingrid Arnaudin** de l'Université de La Rochelle, le professeur **David Leger** et la docteure **Marion Millot** de l'Université de Limoges.

Je souhaite également remercier la docteure **Jennifer Saliba** du laboratoire LIENSs pour son aide précieuse dans la réalisation des tests biologiques sur les cellules MDA-MB-231, sa gentillesse, et les délicieux gâteaux libanais qu'elle nous a partagés. Un merci particulier à la docteure **Marion Millot** pour nos échanges constructifs, ses conseils avisés, et son soutien constant durant ces trois années de thèse.

À Mme **Aline Pinon**, je vous adresse mes sincères remerciements pour votre accompagnement, votre disponibilité sans faille, et vos précieux conseils sur les techniques de biologie qui ont enrichi ma thèse. Je suis reconnaissant de m'avoir initié à ce domaine. Merci à Mme **Frédérique Martin**, pour ta gentillesse et la richesse de nos échanges.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Vincent Chaleix** pour sa gentillesse, nos discussions scientifiques, et pour m'avoir permis un accès libre au HPLC, nourrissant ainsi ma curiosité de chercheuse.

À Mme **Léa Gibot-Leclerc**, merci pour ton efficacité dans la gestion des commandes liées à ma thèse, ainsi que pour l'excellente ambiance et les bons moments partagés. Merci également pour ton écoute et ta patience.

Je tiens à remercier le docteur **Yves Champavier** pour la réalisation de tous mes spectres RMN. Merci pour ta patience et ta disponibilité. Je remercie également Mme **Émilie Pinault** pour la réalisation des analyses HRMS et LC/MS-MS

Je tiens à remercier chaleureusement Mme **Sylvie Poirier** pour sa disponibilité et sa patience dans l'organisation de mes déplacements et séjours scientifiques au cours de ces trois années.

Je remercie les membres de l'équipe de chimie thérapeutique, la professeure **Christelle Pouget** et le docteur **François-Xavier Toublet**, pour leur gentillesse et pour les discussions enrichissantes que nous avons eu au détour des couloirs.

Je souhaite remercier le professeur **Serge Battu**, la docteure **Dominique Clédât**, et la docteure **Gaëlle Begaud** de m'avoir accueilli au sein du département de chimie analytique. Enseigner à vos côtés a été une expérience formidable. Merci pour votre confiance, vos conseils, et votre disponibilité.

À mes stagiaires, **Léa Juillard-Condât**, **Christelle N'Soukpoe**, et **Marlène Chancel**, merci pour votre aide précieuse tout au long de ce travail.

Au docteur **Valentin Pichon**, my bestie, et collègue de bureau, je comptais te dire que mes remerciements "attendraient lundi", mais je préfère les écrire dès maintenant ! Merci d'être la personne formidable que tu es, de m'avoir supporté dans tous mes états, et d'être si facile à vivre. Je n'oublierai jamais tous les papiers qui ont raté le panier ! Je te souhaite plein de succès pour ta carrière !

À la future docteure **Cécile Letulle**, toujours souriante, merci pour avoir illuminé notre bureau dès ton arrivée. Merci pour nos moments partagés en culture cellulaire, nos brunchs, nos fins de soirée au labo, et nos pauses déjeuner. Merci de m'avoir laissé squatter ton bureau pour Chemdraw, et pour tous les moments d'écoute, ton soutien, et ton empathie. Tu es une personne exceptionnelle ! Je te souhaite beaucoup de courage pour la finalisation de ta thèse et plein de succès pour la suite.

Aux doctorants en biologie **Rayan**, **Suzanne**, et **Soufyane**, merci pour vos précieux conseils en biologie. Je vous remercie sincèrement pour vos encouragements constants et pour votre présence au quotidien.

À ma meilleure amie, ma sœur **Yousra Aberkane**, je ne te remercierai jamais assez pour tes encouragements constants, pour avoir cru en moi sans relâche, et pour m'avoir aidé à voir le positif durant mes moments les plus difficiles. Malgré la distance entre Limoges et

Montréal et le décalage horaire, tu restes ma "bestie" que j'aime le plus au monde. Merci d'exister et d'avoir supporté mes absences dues à la pression de la thèse.

À mon chaton **Wendy**, merci de m'accompagner depuis deux ans et de remplir mes journées de douceur.

À la famille **Makhloufi** et **Djabelkheir**

C'est un grand honneur et une immense fierté de vous avoir eus dans ma vie.

À **mon père**, mon idole, ma source d'assurance, merci pour la confiance que tu m'as accordée pour poursuivre ce chemin semé de sacrifices afin d'atteindre mes objectifs. Tu me disais « take it easy on yourself », mais je n'y arrivais pas, car je voulais que tu sois le plus fier possible. Merci d'être mon repère, je t'aime profondément, mon cher papa !

À **ma mère**, merci pour tes prières, pour être toujours là à me pousser vers l'avant. C'était difficile de ne pas t'avoir dans mon quotidien, mais me voilà, te rendant fière de moi. Je t'aime, ma douce maman !

À mes frères **Rabah** et **Djihad**, mes piliers, je vous remercie pour vos encouragements et pour tout ce que vous avez fait pour que je sois la sœur la plus chouchoutée du monde ! Je vous aime !

À ma chère grande sœur **Samira**, ta chnipa de chichi a bien grandi ! Je te remercie pour tout ton amour, ton soutien et ta joie de vivre. Merci également de m'avoir donné l'occasion d'être la tata de Lyne et Tym. Je vous aime !

À ma sœur **Meryam**, my soul, the one and only who can understand even when I don't talk. I can never thank you enough for what you did and do for me. You are my inspiration and my safe zone in this world. Just thank you for existing; you are awesome and I love you so much! Staying right here thanks to you too, **Kadirou**. I'm so happy that you exist in my sister's life and for making her so happy. Love you guys so much!

À l'homme de ma vie, **Imad Berrima**, je t'ai trouvé au bout de ce long chemin. Merci de m'avoir soutenue dans la réalisation de mon rêve, même quand cela signifiait partir loin. Ta présence constante a été une source inestimable de force et de réconfort, même dans les moments les plus difficiles. Je te suis profondément reconnaissante pour ton amour inébranlable et ta confiance sans faille. Je suis impatiente de découvrir ce que l'avenir nous réserve. À nous la vie et ses promesses ! Je t'aime.

Enfin, je remercie Dieu qui m'a comblé de toutes ses bénédictions, et qui m'a donné la santé, la patience et le courage pour accomplir tout ce travail, entourée de vous tous !



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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





## Communications scientifiques

---

### ➤ Publication scientifique

**H. Makhloufi**, A. Pinon, Y. Champavier, J. Saliba, M. Millot, I. Arnaudin, B. Liagre, G. Chemin, and L. Mambu. « *In vitro* antiproliferative activity of echinulin derivatives from the endolichenic fungus *Aspergillus sp.* against colorectal cancer”. *Molecules*, under revision (minor corrections).

### ➤ Communication orale

#### **Congrès internationale**

**H. Makhloufi**, A. Pinon, L. Gibot-Leclerc, Y. Champavier, E. Pinault, M. Millot, G. Chemin, L. Mambu. Apoptotic agents from the endolichenic fungi against chemoresistant cancers. The fourth Poznan conference : Modern pharmaceuticals and biomedical analytics in health care (Webinar, Flash presentation).

Prix de la meilleure communication orale

### ➤ Communications par affiches

#### **Congrès nationaux**

**H. Makhloufi**, M. Millot, A. Pinon, L. Gibot-Leclerc, G. Chemin, L. Mambu. Les champignons habitant les lichens : un réservoir caché de nouveaux médicaments anticancéreux. 1<sup>er</sup> workshop du Groupe de travail « Chimie et Cancer » - 19-20 juin 2023.

**H. Makhloufi**, A. Pinon, L. Gibot-Leclerc, Y. Champavier, E. Pinault, M. Millot, G. Chemin, L. Mambu. Apoptotic agents from the endolichenic fungi against chemoresistant cancers. 6<sup>e</sup> Symposium International de l'AFERP, 18 juillet 2023

**H. Makhloufi**, M. Millot, A. Pinon, L. Gibot-Leclerc, G. Chemin, L. Mambu. Les champignons habitant les lichens : un réservoir caché de nouveaux médicaments anticancéreux. 2<sup>e</sup> Rencontres Interdisciplinaires de l'Oncosphère les 16 et 17 octobre 2023

#### **Congrès international**

**H. Makhloufi**, A. Pinon, L. Gibot-Leclerc, Y. Champavier, E. Pinault, M. Millot, G. Chemin, L. Mambu. Apoptotic agents from the endolichenic fungi against chemoresistant cancers. International Congress on Natural Products Research KRAKÓW 13-17 juillet 2024.

Prix de la meilleure communication par affiche. Prix Journal of Natural Product

➤ Missions complémentaires

**Séjour scientifique** : 1 semaine à La Rochelle (laboratoire LIENSs) dans le cadre de la collaboration du projet de thèse.

**Contrat doctoral** : 128 heures d'enseignement (Réalisation des TP et TD) dans les UE chimie analytique appliqué aux médicaments et à l'environnement et l'UE chromatographie pratique (master 1 et 2, 2ème et 4ème année de pharmacie).

**Encadrements stagiaires :**

- Lauryn Dessaint, BTS, 3 semaines.
- Lea Juillard-Condât et Christelle N'soukpoe, Master 2 chimie, 3 semaines.
- Marlène Chancel, Master 1 chimie, 2 mois

## Table des matières

Introduction et objectifs.....	31
Partie I. Les cancers chimiorésistants .....	35
I.1. Le cancer colorectal.....	37
I.1.1. Causes et symptômes .....	38
I.1.2. Traitements .....	38
I.2. Le cancer du sein triple négatif .....	39
I.2.1. Causes et symptômes .....	39
I.2.2. Traitements .....	39
Partie II. Champignons endolichéniques, source de molécules bioactives.....	43
II.1. Les lichens.....	43
II.1.1. Le lichen « <i>Xanthoparmelia conspersa</i> » .....	44
II.1.1.1. Définition, origine et évolution .....	44
II.1.1.2. Métabolites secondaires et activités .....	44
II.1.2. Le lichen « <i>Pleurosticta acetabulum</i> » .....	46
II.1.2.1. Définition, origine et évolution .....	46
II.1.2.2. Métabolites secondaires et activités .....	47
II.2. Les champignons endolichéniques (ELF).....	49
II.2.1. Définition, origine et évolution.....	49
II.2.2. Culture et identification .....	50
II.2.3. Métabolites secondaires : principales structures et activités .....	51
II.2.3.1. Les alcaloïdes .....	51
II.2.3.2. Les terpénoïdes .....	52
II.2.3.3. Les stéroïdes .....	52
II.2.3.4. Les composés phénoliques.....	53
II.2.3.5. Les peptides.....	56
Partie III. Travaux de thèse .....	67
III.1. Résultats et discussions.....	67
III.1.1. Récolte et identification des lichens .....	67
III.1.2. Isolement et identification de champignons endolichéniques .....	67
III.1.3. Culture à faible échelle .....	68
III.1.4. Screening et évaluation de l'activité antiproliférative .....	69
III.2. Le champignon endolichénique « <i>Aspergillus sp.</i> » .....	57
III.2.1. Origine et évolution.....	57
III.2.2. Métabolites secondaires : principales structures et activités .....	58
III.3. Investigation chimique et biologique d' <i>Aspergillus sp.</i> .....	71
III.3.1. Culture à faible échelle .....	71
III.3.2. Culture à grande échelle.....	71
III.3.2.1. Partition liquide-liquide de l'extrait brut XC04 GP .....	72
III.3.3. Profilage chimique des sous fractions d' <i>Aspergillus sp.</i> .....	73
III.3.3.1. CCM et HPLC-DAD-DEDL .....	73
III.3.3.2. Profilage LC/MS-MS .....	75
III.3.3.3. Réseaux moléculaires .....	76
III.3.4. Evaluation des activités biologiques des extraits (XC04 P et XC04 GP) et ses sous fractions .....	78
III.3.4.1. Activités antiproliférative <i>in vitro</i> .....	78



III.3.4.2. Effet de XC04 P et XC04 GP sur différentes lignées cellulaires .....	78
III.3.4.3. Test de l'activité antiproliférative des sous fractions de XC04 GP sur les cellules HT-29.....	82
III.3.4.3.1. Analyse de l'expression protéique des marqueurs apoptotiques par western blot.....	82
III.3.4.3.2. Induction de la fragmentation d'ADN .....	83
III.3.5. Etude d' <i>Aspergillus</i> sp. ....	85
III.3.5.1. Fractionnement et purification .....	85
III.3.5.2. Détermination structurale des composés isolés .....	86
III.3.5.2.1. Composé P1 .....	86
III.3.5.2.2. Composé P2.....	87
III.3.5.2.1. Composé P3.....	89
III.3.5.2.2. Composé P4.....	89
III.3.5.2.3. Composé P5.....	91
III.3.5.2.4. Voies de biosynthèse de l'échinuline et de certains de ses dérivés .....	91
III.3.5.3. Réseaux moléculaires .....	92
III.3.6. Activité antiproliférative <i>in vitro</i> des composés isolés.....	93
III.3.6.1. Test de viabilité cellulaire (MTT).....	93
III.3.6.2. Analyse des voies apoptotiques par Western blot .....	95
III.3.6.3. Fragmentation d'ADN.....	97
III.4. Le champignon endolichénique « <i>Trametes versicolor</i> » .....	61
III.4.1. Origine et évolution.....	61
III.4.2. Métabolites : principales structures.....	62
III.5. Investigation chimique et biologique de <i>Trametes versicolor</i> .....	99
III.5.1. Culture à faible échelle .....	99
III.5.2. Culture à grande échelle.....	99
III.5.2.1. Partition Liquide-liquide de l'extrait brut PA08 GS .....	100
III.5.3. Profilage chimique des sous fractions de PA08 GS.....	100
III.5.3.1. CCM et HPLC-DAD-DEDL .....	100
III.5.3.2. Profilage LC/MS-MS .....	102
III.5.3.3. Réseaux moléculaires.....	103
III.5.4. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> de l'extrait PA08 S et la sous fraction PA08 GS-M.....	105
III.5.4.1. Activité antiproliférative <i>in vitro</i> .....	105
III.5.4.1.1. Effet des sous fractions de PA08 GS sur les cellules HT-29 .....	105
III.5.4.2. Effet de PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M sur différentes lignées cellulaires .....	105
III.5.4.2.1. Observations microscopiques.....	109
III.5.4.3. Analyse de l'expression protéique des marqueurs apoptotiques par Western blot.....	110
III.5.4.4. Induction de la fragmentation d'ADN .....	110
III.5.5. Etude de <i>Trametes versicolor</i> .....	111
III.5.5.1. Fractionnement et purification .....	111
III.5.5.1.1. Fractionnement et purification de PA08 GS-M.....	112
III.5.5.1.2. Profilage chimique par CCM et CLHP-DAD .....	112
III.5.5.2. Profilage par LC/MS-MS .....	114
III.5.5.3. Réseaux moléculaires.....	115
III.5.5.4. Effet des fractions sur les cellules HT-29 .....	118

III.5.5.5. Détermination de la structure chimique des composés isolés .....	119
III.5.5.5.1. Composé C1.....	119
III.5.5.5.2. Composé C2.....	120
III.5.5.5.3. Composé C3.....	120
III.5.5.5.4. Composé C4.....	122
III.5.5.5.5. Composé C5.....	122
III.5.5.5.6. Composé C6.....	123
III.5.5.5.7. Composé C7.....	124
III.5.5.6. Réseaux moléculaires .....	125
III.5.6. Activité antiproliférative <i>in vitro</i> des composés isolés.....	127
III.5.6.1. Test de viabilité cellulaire (MTT).....	127
Conclusions et perspectives .....	133
Partie IV. Matériels et méthodes.....	139
IV.1. Récolte et identification des lichens .....	139
IV.2. Isolement, identification et caractérisation des champignons endolichéniques .....	139
IV.2.1. Matériels .....	139
IV.2.2. Milieux de culture .....	139
IV.2.3. Isolement des champignons endolichéniques .....	139
IV.2.4. Identification des champignons endolichéniques.....	140
IV.3. Cultures des souches sélectionnées.....	140
IV.3.1. Culture à faible échelle.....	140
IV.3.2. Culture à grande échelle .....	141
IV.4. Procédés d'extraction .....	141
IV.4.1. Extractions des champignons endolichéniques cultivés sur milieu solide .....	141
IV.5. Méthodes analytiques et appareillages .....	141
IV.5.1. Réactifs et solvants .....	141
IV.5.2. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM) .....	141
IV.5.3. Chromatographie liquide haute performance CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) analytique.....	142
IV.5.4. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) - Analyses basses Résolution.....	143
IV.5.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) - Analyses haute Résolution .....	143
IV.6. Méthodes de séparation .....	144
IV.6.1. Chromatographie sur couche mince préparative (CCM préparative) .....	144
IV.6.2. Chromatographie liquide moyenne pression (C-Pure).....	144
IV.6.3. Chromatographie liquide de silice sur colonne ouverte .....	144
IV.6.4. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte .....	144
IV.6.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) semi-préparative.....	144
IV.6.6. Spectroscopie de résonance Magnétique nucléaire (RMN).....	145
IV.7. Réalisation de réseaux moléculaires .....	145
IV.8. Techniques de fractionnement.....	147
IV.8.1. Purification des extraits issus de champignon endolichénique <i>Aspergillus</i> sp. .	147
IV.8.1.1. Purification de précipité 2 (XC04 GP-S2).....	147
IV.8.1.2. Purification de XC04 GP-I.....	148

IV.8.2. Purification des fractions issues du champignon endolichénique <i>Trametes versicolor</i> .....	150
IV.8.2.1. Purification de PA08 GS-M.....	150
IV.8.2.2. Purification de PA08 GS-H1 .....	151
IV.9. Résumé des données chromatographiques et RMN.....	152
IV.9.1. Molécules isolées de <i>Aspergillus</i> sp.....	152
IV.9.2. Molécules isolées de <i>Trametes versicolor</i> .....	161
IV.10. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> .....	172
IV.10.1. Matériels .....	172
IV.10.2. Lignées cellulaires (culture cellulaire).....	172
IV.10.3. Test de viabilité cellulaire .....	173
IV.10.4. Activité antiproliférative <i>in vitro</i> .....	173
IV.10.4.1. Observations microscopiques .....	173
IV.10.4.2. Analyses de l'expression des protéines par western blot .....	173
IV.10.4.2.1. Extraction des protéines .....	174
IV.10.4.2.2. Expression des protéines par analyse par western blot.....	174
IV.10.4.3. Analyse de la fragmentation d'ADN .....	175
Références bibliographiques .....	179
Annexes .....	197

## Liste des abréviations et des acronymes

Acronyme	Signification
1D	Une dimension
2D	Deux dimensions
22Rv1	Cellules de l'adénocarcinome prostatique humain
<b>A</b>	
A	Acétate d'éthyle
A549	Cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humain
ABTS	2,2'-azino-bis(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique]
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Acide formique
AGS	Cellules de l'adénocarcinome gastrique humain
ANS	Anisaldéhyde sulfurique
AsPC-1	Cellules de l'adénocarcinome pancréatique humain
<b>B</b>	
B16	Cellules de cancer de la peau (mélanome)
B16-BL6	Cellules de mélanome murin
BEL-7402	Cellules d'hépatocarcinome humain
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Br	Élargi
BRCA1	BReast CAncer gene 1
BRCA2	BReast CAncer gene 2
BSA	Albumine sérique bovine
BT-549	Cellules de cancer du sein humain de type basal
<b>C</b>	
C	Cyclohexane
CaCo2	Cellules de l'adénocarcinome colorectal humain
Caspases	Cysteinyl-aspartate-cleaving proteases
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCM prép	Chromatographie sur Couche Mince préparative
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice à 50%
CLHP-DAD	Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes
CLHP-MS	Chromatographie Liquide haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse
CLMP	Chromatographie liquide moyenne pression
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COSY	COrelated Spectroscopy

CSC221	Cellules de l'adénocarcinome colorectal humain
CSTN	Cancer du sein triple négatif
<b>D</b>	
d	Doublet
DAD	Diode Array Detection
dd	Double doublet
DEDL	Détecteur à diffusion de lumière par évaporation
DLD1	Cellules de l'adénocarcinome colorectal humain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Mélange de plusieurs désoxyribonucléotides
DO	Densité optique
<b>E</b>	
EchP450	Enzyme du cytochrome P450
EchPT1	Enzyme prényltransférase de l'échinuline 1
EchPT2	Enzyme prényltransférase de l'échinuline 2
ELF	Endolichenic fungi
ELISA	Enzyme-linked Immunorbent Assay
ESI	Electrospray ionisation
eV	Electrovolt
<b>F</b>	
FemX	Cellules de mélanome humain
<b>G</b>	
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
<b>H</b>	
HCT-116	Cellules de cancer du côlon
HEI-OC1	Cellules de l'organe auditif de souris transgéniques
HEK293	Cellules rénales embryonnaires humain
Hela	Cellules de cancer de col utérin
HepG2	Cellules du cancer du foie humain
HL-60	Cellules de leucémie humain
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRESIMS	High-resolution electrospray ionization mass spectrometry
HRMS	High resolution Mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HT-29	Cellules de l'adénocarcinome colorectal humain
HuH-7	Cellules de l'adénocarcinome hépatocellulaire humain
Hz	Hertz
<b>I</b>	
ISDB	<i>In silico</i> Database
ITS	Internal Transcribed Spacer
<b>J</b>	
<i>J</i>	Constantes de couplage



K	
KB	Cellules de cancer épidermique de la bouche
L	
L51784	Cellules de lymphome de souris
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LNCaP	Cellules de l'adénocarcinome prostatique humain
LS174	Cellules de l'adénocarcinome du côlon humain
M	
m	Multiple
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MCF-7	Cellules de cancer du sein.
MDA-MB-231	Cellules de l'adénocarcinome mammaire humain
MeOH	Méthanol
MIA-PaCa-2	Cellules de l'adénocarcinome pancréatique humain
Milieu MEA	Gélose à base d'extrait de malt
Milieu PDA	Potato dextrose agar
Milieu SAB	Sabouraud
min	minutes
mgf	Masscot Generic Format
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium
mzXML	<i>m/z</i> extensible Markup Language
N	
nd	Non déterminé
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
O	
OSMAC	One Strain Many Compounds
P	
PANC-1	Cellules de cancer du pancréas humain
PARP	Poly(ADP-ribose)-polymérase
PBS	Phosphate-buffered saline
PC-3	Cellules de l'adénocarcinome prostatique humain
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
ppm	Partie par million
R	
<i>R<sub>f</sub></i>	Rapport frontal
RKO	Cellules de cancer du côlon humain
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S	
s	Singulet
SMMC-7721	Cellules de l'adénocarcinome endométrial humain
SVF	Sérum de veau foetal

SW-480	Cellules de l'adénocarcinome du côlon humain
SW1353	Cellules de chondrosarcome humain
T	
t	Triplet
T24	Cellules de cancer de la vessie
T84	Cellules de l'adénocarcinome du côlon humain
TA	Température ambiante
TLR4	Toll Like Receptor 4
TMS	tétraméthylsilane
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF	Time Of Flight analysers
T <sub>R</sub>	Temps de rétention
U	
U87	Cellules de cancer glioblastome
UV	Ultra-violet
V	
Vero	Cellules rénales de singe vert africain
W	
WB	Western blot
X	
XIC	Extracted ion chromatogram
δ	Déplacement chimique en ppm

## Liste des figures

---

Figure 1 : Statistique de cancers dans le monde en 2022 pour les deux sexes (bleu : cas diagnostiqués, rouge : décès).....	35
Figure 2 : Incidence par type de cancer dans le monde en 2022, pour les deux sexes.....	36
Figure 3 : Les différentes parties du côlon. ....	37
Figure 4: Schéma explicatif des 4 phases du cancer colorectal. ....	38
Figure 5 : Classification des cancers du sein courants. ....	39
Figure 6 : Coupe microscopique transversal d'un lichen. ....	43
Figure 7 : Le lichen <i>Xanthoparmelia conspersa</i> . ....	44
Figure 8 : Exemples de métabolites secondaires des lichens. ....	45
Figure 9 : Structure de la quercétine.....	45
Figure 10 : structure de l'acide (+) -usnique et (-) -usnique.....	46
Figure 11 : Le lichen <i>Pleurosticta acetabulum</i> . ....	46
Figure 12 : Le thalle du lichen <i>Pleurosticta acetabulum</i> à l'état sec et hydraté.....	47
Figure 13 : Exemples de métabolites secondaires du lichen <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	48
Figure 14 : Structure de cytochalasine E. ....	48
Figure 15 : Coupe transversale par microscope électronique à balayage de thalles du lichen. ....	49
Figure 16 : Exemples d'alcaloïdes isolés des champignons endolichéniques. ....	51
Figure 17 : Structure de l'asperunguisine C. ....	52
Figure 18 : Terpénoïde isolé de champignon endolichénique. ....	52
Figure 19 : Stéroïdes isolés de champignon endolichénique. ....	52
Figure 20 : Stéroïde isolé de ELF <i>Nodulisporium</i> sp. ....	53
Figure 21 : Structure des nodulisporisteroides isolés de ELF <i>Nodulisporium</i> sp. ....	53
Figure 22 : Structure de bostrycine.....	54
Figure 23 : Structure de 1'-O-methyl-averantine. ....	54
Figure 24 : Structure de funiculosone. ....	54
Figure 25 : Structure de l'ulosporin G. ....	55
Figure 26 : Structures des furanones A-G (1-7). ....	55
Figure 27 : Structures des deux dothideopyrones E et F. ....	55
Figure 28 : Structures de clearanol A et talaromycin A. ....	56
Figure 29 : Exemples de cyclo peptides. ....	56
Figure 30 : Structure de cyclotetradepsipeptides. ....	57
Figure 31 : Structure de la xylaroamide A.....	57

Figure 32 : Structure de la terriene. ....	58
Figure 33 : Structure de l'acide norsolorinique. ....	59
Figure 34 : Structure des alcaloïdes issus de <i>Aspergillus</i> sp. ....	59
Figure 35 : Structure de la gliotoxine. ....	59
Figure 36 : Structure de l'asperolide A. ....	60
Figure 37 : Structure de l'acide kojique. ....	60
Figure 38 : Structure de l'emestrine A. ....	60
Figure 39 : Structure de l'acétylapoaranotine. ....	61
Figure 40 : Structure 3D des enzymes ligninolytiques issues de <i>Trametes versicolor</i> . ....	62
Figure 41 : Structure chimique de l'unité répétée de PSK et PSP. ....	63
Figure 42 : Les structures modèles du domaine Musarine. ....	64
Figure 43 : Exemples de métabolites secondaires isolés de <i>Trametes versicolor</i> . ....	64
Figure 44 : Avancement de la croissance des champignons endolichéniques dans une culture à faible échelle. ....	68
Figure 45 : Criblage d'un ensemble d'extraits de champignons endolichéniques sur les cellules HT-29. ....	69
Figure 46 : Exemple de boîte de Petri en fin de croissance d' <i>Aspergillus</i> sp. dans la culture à faible échelle. ....	71
Figure 47 : Exemple de boîte de Petri durant la croissance fongique d' <i>Aspergillus</i> sp. dans la culture à grande échelle. ....	72
Figure 48 : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait brut XC04 GP. ....	73
Figure 49 : Analyse par CCM des fractions issues de la partition liquide-liquide de XC04 GP. ....	73
Figure 50 : Analyse par CCM des fractions issues de la partition liquide-liquide de XC04 GP. ....	74
Figure 51 : Profils chromatographiques de sous fractions issues de l'extrait brut XC04 GP obtenus par analyse CLHP-DAD (254 nm). ....	75
Figure 52 : Comparaison de profil chromatographique en LC/MS-MS des sous fractions de l'extrait XC04 GP par MZmine2.53 . ....	76
Figure 53 : Les réseaux moléculaires des extraits d' <i>Aspergillus</i> sp. ....	77
Figure 54 : Pourcentage de viabilité des cellules HT-29. ....	79
Figure 55 : Pourcentage de viabilité des cellules MDA-MB-231. ....	80
Figure 56 : Pourcentage de viabilité des cellules HEK293. ....	81
Figure 57 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par XC04 P et XC04 GP (Western blot). ....	83
Figure 58 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29. ....	84
Figure 59 : Schéma récapitulatif du fractionnement de XC04 GP-S2 et XC04 GP-I. ....	85

Figure 60 : Structure plane de P1, corrélations COSY (en gras).....	86
Figure 61 : Structure de l'échinuline, corrélations HMBC (flèche).....	87
Figure 62 : Structure plane de P2, corrélations COSY (en gras).....	88
Figure 63 : Structure de 8-hydroxyéchinuline. ....	88
Figure 64 : Structure de didehydroéchinuline B. ....	89
Figure 65 : Structure plane de P4, corrélations COSY (en gras).....	90
Figure 66 : Structure de tardioxopiperazine B.....	90
Figure 67 : Structure de Flavoglaucine. ....	91
Figure 68 : Voie de biosynthèse de l'échinuline et de la neoéchinuline par EchPT1 et EchPT2 chez <i>Asperillus ruber</i> . ....	92
Figure 69 : Identification des molécules isolées dans les réseaux moléculaires des sous fractions issues de <i>Aspergillus</i> sp.....	93
Figure 70 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par l'échinuline (Western blot).....	96
Figure 71 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29 après traitement à différentes concentrations d'échinuline à 24 et 48 h. ....	97
Figure 72 : Exemple de boîte de Petri de la fin de croissance de <i>Trametes versicolor</i> dans la culture à faible échelle.....	99
Figure 73 : Exemple de boîte de Petri durant la croissance de <i>Trametes versicolor</i> dans la culture à grande échelle. ....	100
Figure 74 : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait brut PA08 GS.....	100
Figure 75 : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.....	101
Figure 76 : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.....	101
Figure 77 : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.....	101
Figure 78 : Profils chromatographiques des sous fractions de <i>Trametes versicolor</i> obtenus par analyse CLHP-DAD (254 nm).....	102
Figure 79 : Comparaison de profils chromatographiques en LC/MS-MS des deux extraits PA08 S et PA08 GS et la sous fraction PA08 GS-M. ....	103
Figure 80 : Visualisation des molécules annotées dans les réseaux moléculaires.....	104
Figure 81 : Pourcentage de viabilité des cellules HT-29. ....	106
Figure 82 : Pourcentage de viabilité des cellules MDA-MB-231.....	107
Figure 83 : pourcentage de viabilité des cellules HEK293. ....	108
Figure 84 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par PA08S et PA08GM (Western blot).....	110

Figure 85 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29.....	111
Figure 86 : Schéma récapitulatif des fractions issues de la purification de la 1 <sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M. ....	112
Figure 87 : CCM des fractions issues de purification de la 1 <sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.....	112
Figure 88 : CCM des fractions issues de purification de la 1 <sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.....	113
Figure 89 : CCM Phase inverse des fractions issues de purification de la 1 <sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.....	113
Figure 90 : Profils chromatographique des fractions 2, 3, 4, 5, et 6 obtenus par analyse CLHP-DAD à 254 nm. ....	114
Figure 91 : Chromatogramme (XIC) des fractions 2 à 7 et 9 issues de la purification de la 1 <sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M (MZmine 2.53). ....	115
Figure 92 : Les réseaux moléculaires des fractions 2 à 7 et 9 issues de l'extrait PA08 GS-M. ....	116
Figure 93 : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de PA08 GS-M et PA08 GS-H1. ....	119
Figure 94 : Structure de linoléate de méthyle.....	119
Figure 95 : Structure de l'acide linoléique. ....	120
Figure 96 : Corrélation 1H-1H COSY (en gras) et HMBC (flèche). ....	121
Figure 97 : 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one. ....	121
Figure 98 : Structure de l'alcool de veratryle.....	122
Figure 99 : Structure de l'opuntiol. ....	123
Figure 100 : Structure de 3-formylindole.....	124
Figure 101 : Structure de l'acide linoléique. ....	125
Figure 102 : Identifications des molécules isolées dans les réseaux moléculaires de PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M. ....	126
Figure 103 : Identifications des molécules isolées dans les réseaux moléculaires des fractions F2-F7 et F9 PA08GS-M. ....	127
Figure 104 : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de XC04 GP.....	147
Figure 105 : Schéma récapitulatif du fractionnement du XC04 GP-S2.....	148
Figure 106 : Schéma récapitulatif du fractionnement de XC04 GP-I.....	149
Figure 107 : Les chromatogrammes de la CLHP semi préparative des fractions (4-5, 4-4 et 4-2) issues de XC04 GP-I.....	149
Figure 108 : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait PA08 GS.....	150
Figure 109 : Schéma récapitulatif du fractionnement de PA08 GS-M. ....	151
Figure 110 : Schéma récapitulatif du fractionnement de PA08 GS-H1.....	152
Figure 111 : Structure de l'échinuline.....	152
Figure 112 : CCM de l'échinuline.....	153

Figure 113 : Structure de 8-hydroxyéchinuline.....	154
Figure 114 : CCM de 8-hydroxyéchinuline.....	155
Figure 115 : Structure de didehydroéchinuline B. ....	156
Figure 116 : CCM de didehydroéchinuline B. ....	157
Figure 117 : Structure de la tardioxopiperazine B. ....	158
Figure 118 : CCM de la tardioxopiperazine B. ....	159
Figure 119 : Structure de la flavoglaucine.....	160
Figure 120 : CCM de la flavoglaucine.....	160
Figure 121 : Structure de linolénate de méthyle.....	161
Figure 122 : CCM de linolénate de méthyle.....	162
Figure 123 : Structure de l'acide linoléique. ....	163
Figure 124 : CCM de l'acide linoléique. ....	163
Figure 125 : Structure de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.....	164
Figure 126 : CCM de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one. ....	165
Figure 127 : Structure de l'alcool de veratryle.....	166
Figure 128 : CCM de l'alcool de veratryle. ....	167
Figure 129 : Structure de Opuntiol.....	167
Figure 130 : CCM de l'opuntiol. ....	168
Figure 131 : Structure de 3-formylindole.....	168
Figure 132 : CCM de 3-formylindole. ....	169
Figure 133 : Structure de l'acide linoléique. ....	170
Figure 134 : CCM de l'acide linoléique. ....	170

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Classification du lichen <i>Xanthoparmelia conspersa</i> .....	44
Tableau 2 : Classification du lichen <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	47
Tableau 4 : Classification du champignon endolichénique <i>Aspergillus</i> sp.....	58
Tableau 10 : Classification du champignon endolichénique <i>Trametes versicolor</i> .....	61
Tableau 3 : Résumé des CI <sub>50</sub> des extraits de champignons endolichéniques sur les cellules HT-29.....	70
Tableau 5 : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des extraits d' <i>Aspergillus</i> sp. 78	
Tableau 6 : CI <sub>50</sub> (en µg/mL) obtenues pour les extraits <i>Aspergillus</i> sp. sur 3 lignées cellulaires.....	81
Tableau 7 : CI <sub>50</sub> (en µg/mL) obtenues pour l'extrait XC04 GP et les sous fractions sur les cellules HT-29.....	82
Tableau 8 : CI <sub>50</sub> des molécules isolées de <i>Aspergillus</i> sp. sur les cellules HT-29.....	93
Tableau 9 : CI <sub>50</sub> des molécules isolées de <i>Aspergillus</i> sp. sur les cellules HEK293.....	95
Tableau 11 : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des extraits PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M.....	104
Tableau 12 : CI <sub>50</sub> (en µg/mL) obtenues pour l'extrait brut de <i>Trametes versicolor</i> et ses sous fractions sur les cellules HT-29.....	105
Tableau 13 : CI <sub>50</sub> (en µg/mL) de PA 08 S, PA08 GS et PA08 GS-M sur 3 lignées cellulaires.....	108
Tableau 14 : Observations des cellules HT-29 après traitement avec PA08 S et PA08 GS-M à 24 et à 48 h.....	109
Tableau 15 : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des fractions 2 à 7 et 9.....	117
Tableau 16 : CI <sub>50</sub> des fractions issues de PA08 GS-M sur les cellules HT-29.....	118
Tableau 17 : CI <sub>50</sub> des molécules isolées depuis le champignon endolichénique <i>Trametes versicolor</i> sur les cellules HT-29.....	127
Tableau 18 : CI <sub>50</sub> des molécules/fractions isolées de <i>Trametes versicolor</i> sur les cellules HEK293.....	128
Tableau 19 : Composition des milieux de culture utilisés.....	139
Tableau 20 : Gradient d'élution en CLHP.....	142
Tableau 21 : Analyse par CLHP en mode isocratique.....	143
Tableau 22 : Gradient d'élution en CLHP semi préparative.....	145
Tableau 23 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P1.....	153
Tableau 24 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P2.....	155



Tableau 25 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P3.....	157
Tableau 26 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P4.....	159
Tableau 27 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P5.....	161
Tableau 28 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C1.....	162
Tableau 29 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C2.....	164
Tableau 30 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C3.....	165
Tableau 31 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C4.....	167
Tableau 32 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C5.....	168
Tableau 33 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C6.....	169
Tableau 34 : Données RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C7.....	171
Tableau 35 : Résumés des concentrations d'extraits/molécules testés.....	174
Tableau 36: Résumé des différents anticorps utilisés pour le western Blot.....	175
Tableau 37 : Résumés des concentrations d'extraits/molécule testés. ....	175

# Introduction et objectifs





## Introduction et objectifs

---

Un lichen, qui fait partie du règne fongique, est une association symbiotique permanente entre un mycobionte (champignon hétérotrophe) et un photobionte (algue ou cyanobactérie autotrophe) et un nombre indéterminé d'autres microorganismes (Hawksworth and Grube, 2020). Le champignon est responsable de la structure et de la protection de l'organisme, tandis que les algues ou les cyanobactéries produisent des sucres par photosynthèse. Les lichens forment souvent une croûte et sont omniprésents. Ils poussent sur les troncs d'arbres, les rochers, les murs, etc. Leur grande adaptabilité leur permet de résister à différents changements environnementaux extrêmes, ce qui rend leur production de métabolites secondaires très diversifiée avec des activités biologiques très intéressantes (Lagarde et al., 2018).

En fait, le lichen est composé de mycobionte (champignon principal), et d'autres champignons distincts comprenant : les champignons lichénicoles, les champignons épi- et endolichéniques. Le thalle lichénique représente la forme la plus primitive du tube digestif d'un organisme vivant, le lichen. Néanmoins, cette partie du lichen peut être colonisée par des champignons endolichéniques (ELF). Les ELF, démontrent une aptitude exceptionnelle à biosynthétiser des métabolites secondaires ayant des propriétés pharmacologiques importantes, des structures novatrices et des fonctions biologiques variées, en raison de leurs habitats spécifiques (Singh et al., 2017). Elles émergent donc comme un domaine de recherche prometteur pour l'exploration de nouveaux composés actifs.

A la suite de la première description dans la littérature de métabolites secondaires issus de champignons endolichéniques par Paranagama *et al.* l'intérêt d'isoler et de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de ces molécules s'est intensifié (Paranagama et al., 2007). Les études chimiques de ces champignons ont permis d'isoler et d'identifier la structure chimique d'une centaine de molécules. De plus, les tests biologiques ont montré une extraordinaire diversité dans leur potentiel thérapeutique, confirmant que ces produits naturels sont une voie prometteuse pour le développement de nouveaux produits pharmaceutiques (Zhang et al., 2024). Cependant, en 2024, seuls 162 articles ont été publiés sur les champignons endolichéniques, ce qui prouve qu'il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour identifier toute la diversité chimique et biologique de leurs métabolites ("National Center for Biotechnology Information," 2024)

En 2022, l'organisation mondiale de la santé a classé le cancer parmi les principales causes de décès dans le monde avec près de 10 millions de cas enregistrés. Toutefois, ces chiffres demeurent des estimations, car la collecte de données reste limitée dans certains pays. Le cancer du sein est le plus fréquemment diagnostiqué, suivi du cancer du poumon et du cancer colorectal (International Agency for Research On Cancer, 2024). Cependant, en termes de mortalité, le cancer du poumon est le cancer ayant la plus grande incidence, suivi du cancer colorectal, tandis que le cancer du sein malgré une moins grande incidence est tout de même présent en quatrième position. Malgré des progrès permanents, il est essentiel d'améliorer les traitements actuels, ayant souvent de nombreux effets indésirables, difficilement acceptables pour le malade, et de trouver des traitements adjuvants voir de substituer par des composés bioactifs naturels plus efficaces et moins toxiques. De plus en plus, les études se concentrent sur les produits naturels, dont les structures spécifiques permettent de surmonter le problème de la résistance aux traitements conventionnels.

Dans le cadre de la recherche de substances naturelles à potentiel thérapeutique, dont le laboratoire LABCiS est spécialisé, notre choix s'est porté sur l'étude de champignons endolichéniques issus de lichens récoltés en France. Ce choix a été motivé par les résultats prometteurs obtenus dans le cadre des projets de recherche du laboratoire (Lagarde et al., 2019) (Toure et al., 2022). Cette approche vise à valoriser les ressources naturelles locales et à explorer leur diversité chimique et évaluer leur potentiel thérapeutique.

Notre intérêt s'est porté sur la chimiorésistance des cancers, un facteur majeur limitant l'efficacité des traitements actuels. Le cancer colorectal et le cancer du sein ont été choisis pour ce projet de thèse car ils figurent parmi les trois cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde. Les lignées cellulaires HT-29 et MDA-MB-231 ont été sélectionnées en raison de leur résistance chimique.

Le premier objectif de cette thèse a été de sélectionner deux souches de champignons endolichéniques présentant des activités antiprolifératives prometteuses. Pour cela, un criblage de 19 extraits ELF a été effectué *in vitro* sur des cellules HT-29, révélant une activité antiproliférative en accord avec les travaux antérieurs (Lagarde *et al.*, 2019). À la suite de ces résultats, deux souches ont été retenues : *Aspergillus* sp. et *Trametes versicolor*.

Le deuxième objectif de la thèse, a consisté à mener une investigation chimique sur ces deux ELF, en combinant l'approche déréplicative par réseaux moléculaires et l'approche bio-guidée. Ce qui nous mène au troisième objectif de la thèse, qui a concerné la recherche de nouveaux agents apoptotiques à potentiel anticancéreux issus de la flore endolichénique. Des tests d'activité antiproliférative ont été réalisés sur les lignées cellulaires HT-29 et MDA-MB-231 pour les extraits, sous-fractions et molécules isolées des champignons endolichéniques.

Ce manuscrit est structuré en trois parties distinctes. La première aborde la problématique des cancers chimiorésistants définissant le cancer colorectal et le cancer du sein triple négatif, ainsi que leurs causes, symptômes et traitements.

La deuxième partie commence par une brève présentation de deux lichens, *Xanthoparmelia conspersa* et *Pleurosticta acetabulum*. Elle est suivie d'une présentation du concept de champignons endolichéniques, les deux souches sélectionnées pour ces travaux de thèse de leur culture et de leur identification, ainsi que de quelques exemples de leurs métabolites secondaires et activités.

La troisième partie traite des travaux sur les deux champignons endolichéniques. Dans cette partie, les résultats des recherches chimiques et biologiques effectuées sur les extraits sont présentés et discutés.

La quatrième partie regroupe l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ce projet de thèse.

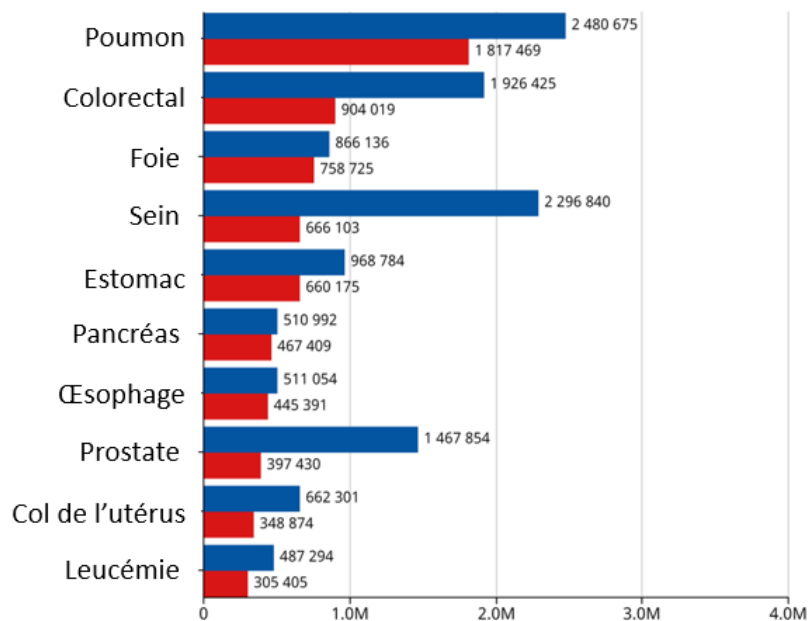
Partie I  
Les cancers chimiorésistants





## Partie I. Les cancers chimiorésistants

D'après les données de l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 19 à 20 millions de personnes sont diagnostiqués avec un cancer chaque année dans le monde, ce qui a entraîné environ 10 millions de décès en 2020 (Ferlay et al., 2021). Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont le cancer du poumon (2,5 millions de cas), le cancer du sein en deuxième position (2,3 millions de cas), et le cancer colorectal (1,9 million de cas). En terme de mortalité, le cancer du poumon est le plus préoccupant avec 1,8 million de morts, suivi du cancer colorectal avec 900 000 morts et du cancer du sein avec 670 000 morts (Figure 1) (Sung et al., 2021) (Ferlay et al., 2021).



**Figure 1 : Statistique de cancers dans le monde en 2022 pour les deux sexes (bleu : cas diagnostiqués, rouge : décès).**

Adapté d'après ( International Agency for Research On Cancer, 2024).

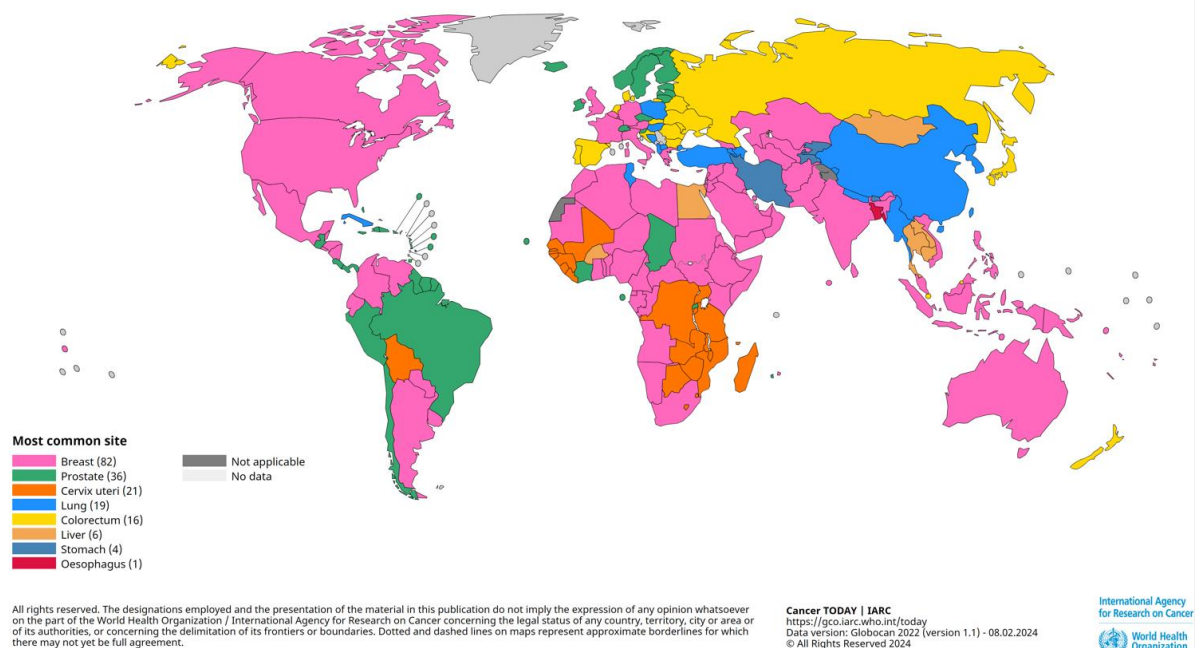
Dans le corps humain, les cellules saines suivent un schéma de prolifération hautement contrôlé. La communication cellulaire par l'envoi de signaux entre cellules en contact direct (juxtacrine), sur courtes distances (paracrine) et à plus grandes distances (système endocrinien) permet aux cellules normales de se diviser uniquement lorsqu'elles reçoivent des signaux activant le processus de division cellulaire. Ce processus assure ainsi un maintien de taille et de structure de chaque tissu en fonction des besoins de l'organisme (Weinberg, 1996).

La division cellulaire est soumise à une forte régulation et un contrôle permanent pour éviter toute prolifération anormale, cette coordination constante est essentielle pour le bon fonctionnement du corps. En revanche, les cellules cancéreuses ne respectent pas ces régulations ; elles échappent aux contrôles normaux de la prolifération cellulaire, à la suite de la dérégulation de leur programme de division. Cette prolifération anarchique peut être associée à la capacité de certaines cellules cancéreuses de migrer de leur lieu d'origine, se détacher du site d'origine, transporter par les systèmes sanguin et lymphatique. Cela conduit à un envahissement des tissus environnants, voire une propagation à des parties éloignées



du corps afin de former des tumeurs secondaires, c'est le phénomène de métastase (Matthews et al., 2022). Les tumeurs formées par ces cellules malignes deviennent de plus en plus agressives avec le temps et peuvent devenir mortelles en perturbant les fonctions des tissus et des organes nouvellement touchés.

Le cancer demeure un terme générique qui désigne une multitude de maladies, ce qui entraîne le diagnostic de nombreux types différents, chacun ayant ses propres particularités. Le cancer peut être provoqué par de nombreux facteurs tels que les influences environnementales, le stress ou l'hérédité (Cheung and Vousden, 2022) (Kumari et al., 2022). Ces facteurs sont également propres à chaque individu et le type de cancer peut également dépendre de la position géographique de la personne. Par exemple le cancer du sein est le cancer le plus fréquent à l'échelle mondiale (Figure 2). Les changements de mode de vie et l'environnement socioculturel, induits par la croissance économique, l'augmentation de l'espérance de vie et la hausse de la proportion de femmes dans la main-d'œuvre industrielle, ont influencé la prévalence des facteurs de risques associés à ce cancer. Ces facteurs incluent le report de l'âge de maternité, la diminution du nombre d'enfants, ainsi que l'augmentation du surpoids et de l'inactivité physique (Sung et al., 2021) (Chhikara and Parang, 2023).



**Figure 2 : Incidence par type de cancer dans le monde en 2022, pour les deux sexes**  
(International Agency for Research on Cancer, 2024).

Actuellement il existe une grande diversité de traitements des cancers. Les plus classiquement utilisés sont la chirurgie, la radiothérapie, qui ciblent directement la zone cancéreuse et les thérapies systémiques telles que la chimiothérapie, les traitements hormonaux et les thérapies ciblées, comme l'immunothérapie. Ce dernier a pris une part importante dans les traitements et ramenée récemment une nouvelle arme à l'arsenal thérapeutique.

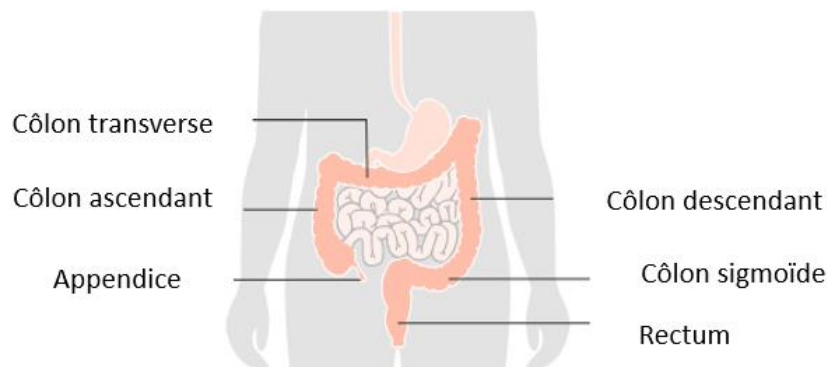
Malgré cela, le nombre de décès liés au cancer continue d'augmenter. De plus, le secteur de la santé fait face à un problème majeur : la chimiorésistance. Ce phénomène peut

être défini par la résistance des cellules cancéreuses et la perte des effets vis à vis des médicaments anticancéreux existants. Cette chimiorésistance est souvent associée à une rechute lors du traitement des patients. De plus ces thérapies ont un fort impact sur leur vie avec un grand nombre d'effets indésirables (Kroger et al., 2019). C'est pour cela que le développement de nouvelles thérapies est essentiel ainsi que le fait d'associer les stratégies thérapeutiques existantes à des stratégies adjuvantes pour améliorer la vie des patients (Zheng, 2017). La compréhension de ces mécanismes permettra de mieux diagnostiquer le type de cancers ainsi que le choix des traitements associés afin d'avoir une meilleure efficacité.

### I.1. Le cancer colorectal

Le cancer colorectal est la troisième cause de décès par cancer dans le monde. En 2020, 1,9 million de cas ont été diagnostiqués, entraînant environ 900 000 décès (Sung et al., 2021).

Il peut se développer dans les quatre parties principales du côlon : le segment droit (côlon ascendant), le segment gauche (côlon descendant), le segment transverse et le rectum (Figure 3). Ce type de cancer commence souvent par la formation de polypes bénins sur la paroi interne du côlon ou du rectum. Ces polypes peuvent rester bénins pendant des années avant de devenir cancéreux.

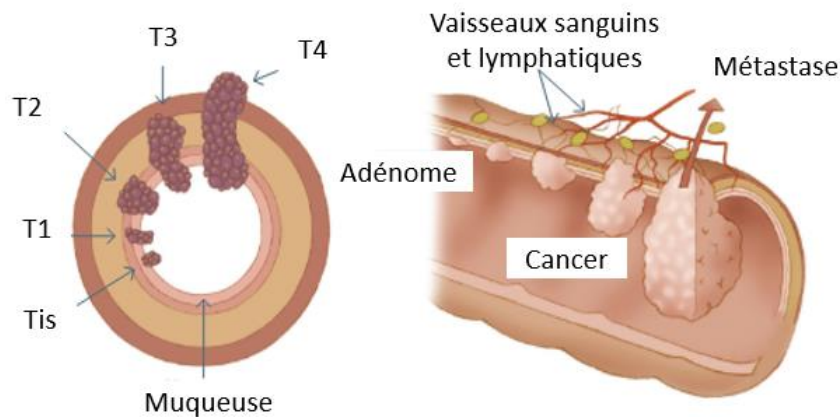


**Figure 3 : Les différentes parties du côlon.**

Adapté d'après Cancer research UK

Le développement du cancer colorectal suit plusieurs étapes, commençant par des polypes bénins qui évoluent en polypes adénomateux, puis en carcinome *in situ*, où les cellules cancéreuses sont confinées à la muqueuse du côlon ou du rectum. Ensuite, les stades I, II et III du cancer reflètent le développement et la progression des cellules cancéreuses dans les couches histologiques de l'organe (Figure 4). À un stade avancé (stade IV), le cancer colorectal peut métastaser, c'est-à-dire que les cellules tumorales se détachent de la tumeur

initiale et se propagent via le sang ou la lymphe vers d'autres organes pour former des tumeurs secondaires, ce qui complique le traitement et augmente le risque de mortalité.



**Figure 4:** Schéma explicatif des 4 phases du cancer colorectal.

Adapté d'après clinique de l'Europe (Europa Ziekenhuizen)

### I.1.1. Causes et symptômes

Le cancer colorectal est étroitement lié à la santé générale du côlon et du rectum. En effet, les maladies et conditions affectant ces parties du système digestif peuvent augmenter le risque de développement de ce type de cancer. Une alimentation riche en certaines graisses saturées, en viande rouge et produits transformés, ainsi qu'une faible consommation de fibres, de fruits et légumes, peuvent augmenter le risque de son développement. De plus, des facteurs comme l'obésité, le manque d'activité physique, la consommation excessive d'alcool et le tabagisme jouent également un rôle significatif dans l'augmentation des risques.

En revanche, une alimentation équilibrée, riche en fibres, associée à un mode de vie sain, peut aider à maintenir la santé du côlon et du rectum, réduisant ainsi les risques de cancer colorectal (Hossain et al., 2022) (Roshandel et al., 2024).

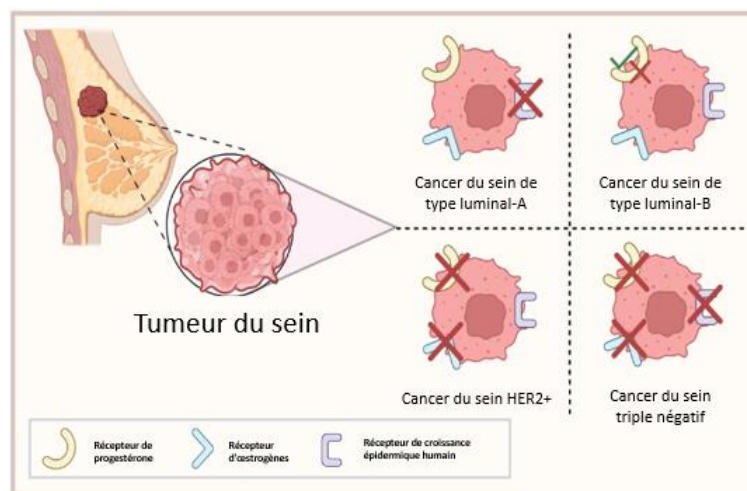
### I.1.2. Traitements

Des examens réguliers, comme la coloscopie, permettent de détecter les polypes précancéreux. En revanche, lorsque les polypes deviennent malins, plusieurs traitements peuvent être appliqués notamment la chirurgie pour l'ablation des polypes ou de la tumeur. La chimiothérapie est souvent associée à une thérapie ciblée pour inhiber la fonctionnalité de certaines protéines spécifiques impliquées dans le développement du cancer colorectal (Bennouna et al., 2019) (Kanat and Ertas, 2019) (Modest et al., 2019). En outre, la radiothérapie est également utilisée pour réduire la taille de la tumeur grâce à des faisceaux de radiations à haute énergie (Klement et al., 2019). En cas de métastase, la chirurgie peut être envisagée pour enlever la tumeur ainsi que les ganglions lymphatiques affectés (Hashiguchi et al., 2020). Il existe également des approches plus avancées pour traiter le cancer colorectal, notamment l'immunothérapie, la thérapie génique, la nano médecine, la thérapie au laser et la thérapie photodynamique (Hodgkinson et al., 2017) (Dandash et al., 2021).

## I.2. Le cancer du sein triple négatif

En 2022, le cancer du sein était le cancer le plus fréquent dans 157 pays sur 185, avec 2,3 millions de cas diagnostiqués et 6,9 % de taux de mortalité (Sung et al., 2021).

Le cancer du sein triple négatif est un sous-type de cancer du sein (Figure 5). Il est connu pour sa nature agressive et sa chimiorésistance, lié à l'absence de trois récepteurs cellulaires, le récepteur alpha des œstrogènes (Era), les récepteurs de la progestérone (PRs) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). Ces caractéristiques rendent les traitements actuels notamment la thérapie endocrinienne, inefficace, car elle agit principalement en perturbant la signalisation endocrinienne, en bloquant la synthèse hormonale ou en ciblant les récepteurs hormonaux (Orrantia-Borunda et al., 2022) (Catalano et al., 2022). De plus, le taux de récurrence est élevé, associé à un taux de survie minime.



**Figure 5 : Classification des cancers du sein courants.**

Adapté d'après (Kirkby et al., 2023)

### I.2.1. Causes et symptômes

Les causes du cancer du sein triple négatif (CSTN) incluent principalement des facteurs génétiques, environnementaux et biologiques. Les mutations héréditaires dans les gènes BRCA1 et BRCA2 augmentent significativement le risque de CSTN (Foulkes and Shuen, 2013).

Les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, et des antécédents personnels de maladies bénignes du sein sont également des facteurs de risque importants (Howard and Olopade, 2021). Des facteurs environnementaux et de mode de vie, comme l'exposition à des radiations, l'obésité, la consommation d'alcool et le tabagisme, contribuent également au risque. Enfin, des caractéristiques biologiques telles qu'une prolifération cellulaire rapide et une forte instabilité génomique sont souvent observées dans le CSTN (Borri and Granaglia, 2021).

### I.2.2. Traitements

Le traitement de CSTN repose principalement sur une combinaison de chimiothérapie, chirurgie et radiothérapie, avec des approches émergentes telles que l'immunothérapie et les thérapies ciblées. La chimiothérapie, souvent administrée en néoadjuvant pour réduire la taille

de la tumeur avant la chirurgie, ou en adjuvant pour éliminer les cellules cancéreuses restantes après l'intervention chirurgicale, reste le pilier du traitement (Catalano et al., 2022).

La chirurgie, qu'il s'agisse de la lumpectomie (ablation de la tumeur) ou de la mastectomie (ablation du sein), est déterminée par la taille et la localisation de la tumeur, tandis que la radiothérapie post-chirurgicale vise à prévenir les récurrences locales.

Les médicaments couramment utilisés incluent les anthracyclines (adriamycine, cerubidine) et les taxanes (taxol, taxotère). L'activité des anthracyclines est liée à l'inhibition de la topoisomérase II (résulte de l'intercalation de l'anthracycline entre les paires de bases d'ADN) et la production de radicaux libres hydroxyles (responsable des effets antitumoraux) (Hortobágyi, 1997). Les taxanes provoquent la rupture des microtubules pendant l'interphase du cycle cellulaire, perturbant ainsi la croissance cellulaire et le métabolisme (Murray et al., 2012).

L'atezolizumab est un médicament de thérapie ciblée et utilisé dans les thérapies innovantes comme l'immunothérapie (Schmid et al., 2018). Il agit comme un inhibiteur de point de contrôle immunitaire. C'est un anticorps monoclonal qui s'attache à la protéine PD-L1 à la surface de certaines cellules cancéreuses, ce qui les empêche de nuire au système immunitaire qui a pour rôle de les éliminer (Kwapisz, 2021). L'association de l'atezolizumab avec la chimiothérapie, montre des promesses pour les CSTN métastatiques ou inopérables en stimulant le système immunitaire contre les cellules tumorales (O'Meara et al., 2019) (Borri and Granaglia, 2021). Par ailleurs, les thérapies ciblées notamment les inhibiteurs de PARP, comme l'olaparib et le talazoparib, sont efficaces chez les patientes avec des mutations BRCA1/2, ciblant les mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses (Robson et al., 2017) (Medina et al., 2020).

## Partie II

# Champignons endolichéniques, source de molécules bioactives



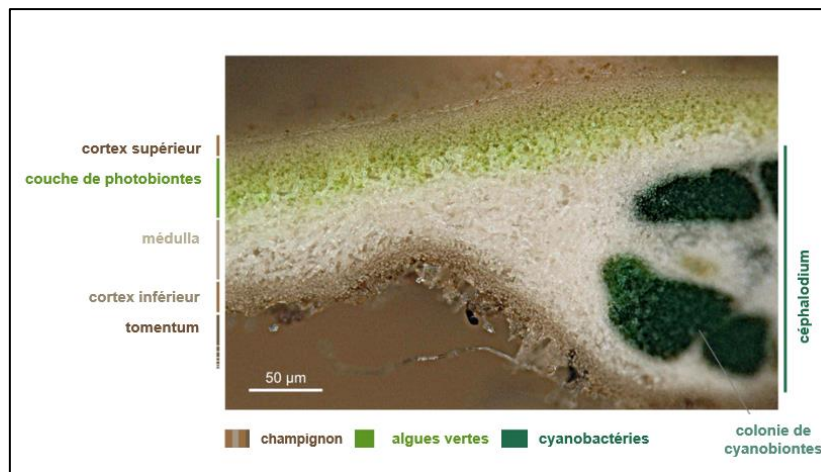


## Partie II. Champignons endolichéniques, source de molécules bioactives

### II.1. Les lichens

Le terme "lichen" est dérivé du grec *leikhén*, qui signifie "darter, cal, plante parasite". Il trouve son origine dans le mot *λείχω* / *leikhō*, dérivant de la même racine indo-européenne que lécher : la maladie, ainsi que l'organisme qui semble lécher son support (Rey, 2011).

Les lichens peuvent aussi être définis comme étant un holobionte, c'est-à-dire un ensemble constitué d'un hôte et de son microbiote. Ce mode de symbiose existe depuis plus de 600 millions d'années (Yuan et al., 2005) et domine actuellement dans près de 10% des écosystèmes terrestres (Papazi et al., 2015). Le lichen forme un écosystème autonome qui se compose d'un mycobionte (champignon), d'un ensemble d'un ou plusieurs partenaires photosynthétiques (algue verte et/ou cyanobactérie), ainsi que d'un nombre indéterminé d'autres organismes microscopiques (Hawksworth and Grube, 2020) (Figure 6). Les microorganismes associés à cette symbiose sont très diversifiés notamment les bactéries, les virus et les champignons épilichéniques (colonisent l'extérieur du thalle du lichen) et endolichéniques (colonisent l'intérieur du thalle lichénique) (Grimm et al., 2021).



**Figure 6 : Coupe microscopique transversal d'un lichen.**  
Adapté d'après (Grimm et al., 2021)

Les lichens jouent un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions écosystémiques (décomposition des roches, formation du sol, fixation du carbone et de l'azote) et favorisent la diversité de nombreux organismes, par exemple en leur offrant de la nourriture, un habitat, un abri, un camouflage ou du matériel de nidification. De plus, ils offrent de multiples avantages écosystémiques directs et indirects (Zedda and Rambold, 2015), en particulier, la production de métabolites secondaires de lichens et d'autres composés bioactifs, ainsi que l'utilisation des lichens comme bioindicateurs des changements environnementaux (Millot et al., 2017) (Delebassée et al., 2017) (Kuldeep and Prodyut, 2015).



## II.1.1. Le lichen « *Xanthoparmelia conspersa* »

### II.1.1.1. Définition, origine et évolution

*Xanthoparmelia conspersa*, communément appelé « The peppered rock-shield » c'est à dire « le bouclier de roche poivré » car il se caractérise par un thalle bien adhérent, est un lichen foliacé du genre *Xanthoparmelia*, qui se caractérise par des lobes légèrement irréguliers, des isidies denses en forme de corail (Hale Jr, 1990) (Figure 7).

Cette espèce est très répandue et bien connue en Europe, et on la trouve également en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Asie. Cependant son absence est signalée en Australie et en Afrique australe (Smithsonian Institution and Institution, 1990).



**Figure 7** : Le lichen *Xanthoparmelia conspersa*.

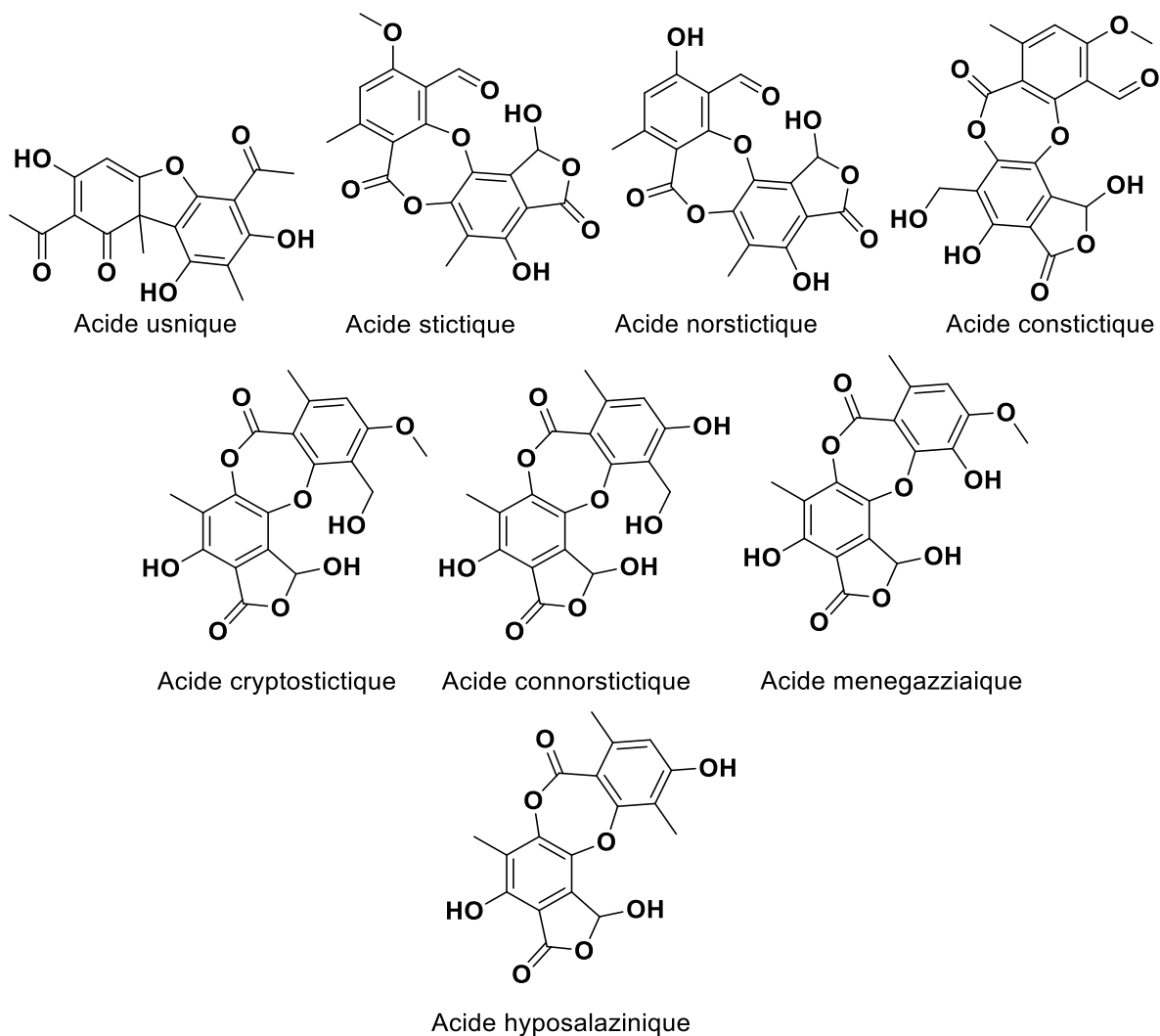
Source : [https://www.afl-lichenologie.fr/Photos\\_AFL/Photos\\_AFL\\_X/Xanthoparmelia\\_conspersa.htm](https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_X/Xanthoparmelia_conspersa.htm).

**Tableau 1** : Classification du lichen *Xanthoparmelia conspersa*.

Domaine	Eukaryota
Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Classe	Lécanoromycètes
Ordre	Lecanorales
Famille	<i>Parmeliaceae</i>
Genre	<i>Xanthoparmelia</i>
Espèce	<i>X. conspersa</i>

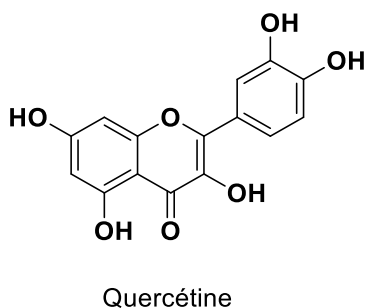
### II.1.1.2. Métabolites secondaires et activités

Le genre *Xanthoparmelia* produit une variété de métabolites secondaires, incluant des composés phénoliques tels que des depsides, depsidones, naphthoquinones, et des composés monocycliques, ainsi que des acides aliphatiques (Hale Jr, 1990). La chimie de *Xanthoparmelia conspersa* révèle que ce lichen biosynthétise principalement l'acide usnique qui est un benzofurane et les acides, stictique, norstictique et constictique, ainsi que d'autres acides synthétisés en faible quantité, comme les acides cryptostictique, connorstictique, menegazziaïque et hyposalazinique qui sont des depsidones (Figure 8) (Culberson et al., 1981).



**Figure 8 : Exemples de métabolites secondaires des lichens.**

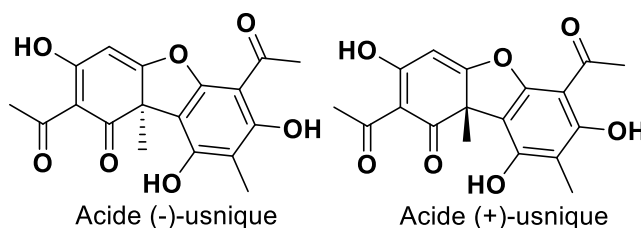
Ces composés ont été étudiés pour leurs propriétés biologiques. Les depsidones, en particulier l'acide norstictique montre une activité antioxydante en réduisant les superoxydes, avec une  $CI_{50}$  de 580  $\mu M$ , en comparaison avec le flavonoïde bien connu quercétine ( $CI_{50}$  754  $\mu M$ ) (Figure 9).



**Figure 9 : Structure de la quercétine.**

De plus, l'acide constictique (Figure 8) a également des propriétés antioxydantes significatives (Lohézic-Le Dévéhat et al., 2007). Par ailleurs, les activités antimicrobiennes et antitumorales de l'acide usnique ont été mises en évidence depuis plus de deux décennies (LAUTERWEIN et al., 1995).

L'activité de l'acide (-)-usnique (Figure 10) a été démontrée sur les cellules HT-29 avec une  $CI_{50}$  de 55  $\mu M$  à 48 h (Millot et al., 2013). L'acide (-)-usnique a aussi montré une efficacité dans le test du carcinome pulmonaire de Lewis (Morris Kupchan and Kopperman, 1975), où la lipophilie générale et les liaisons hydrogènes intramoléculaires ont été identifiées comme cruciales pour son effet cytotoxique (Takai et al., 1979). De plus, l'acide (+)-usnique (Figure 10) a démontré une activité antiproliférative contre les kératinocytes HaCaT, suggérant des propriétés antipsoriasiques potentielles (Kumar KC and Müller, 1999).



**Figure 10 : structure de l'acide (+)-usnique et (-)-usnique.**

Concernant l'activité contre l'HIV-1 intégrase, l'acide stictique (Figure 8), présente une  $CI_{50}$  de 3  $\mu M$  (Müller, 2001). Enfin, l'acide constictique émerge comme un agent neuroprotecteur prometteur grâce à ses activités antioxydantes et à l'inhibition de l'AChe (Acétylcholinestérase) et de la BuChE (Butyrylcholinestérase) (Sieteiglesias et al., 2019).

## II.1.2. Le lichen « *Pleurosticta acetabulum* »

### II.1.2.1. Définition, origine et évolution

*Pleurosticta acetabulum* est un lichen de la famille des *Parmeliaceae* (Figure 11). Il se caractérise par un thalle foliacé avec des apothécies lobées, vertes à l'état humide et vert grisâtre à l'état sec (Figure 12). Ses apothécies sont en forme de coupe, d'où son nom « *acetabulum* », signifiant « petite coupe » en latin. Ce lichen est généralement présent en Europe et pousse principalement sur les écorces d'arbres, mais on peut également le trouver sur des rochers et des sols, surtout dans des endroits boisés et humides.



**Figure 11 : Le lichen *Pleurosticta acetabulum*.**

Source : [https://www.afl-lichenologie.fr/Photos\\_AFL/Photos\\_AFL\\_P/Pleurosticta\\_acetabulum.htm](https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_P/Pleurosticta_acetabulum.htm)



**Figure 12** : Le thalle du lichen *Pleurosticta acetabulum* à l'état sec et hydraté.

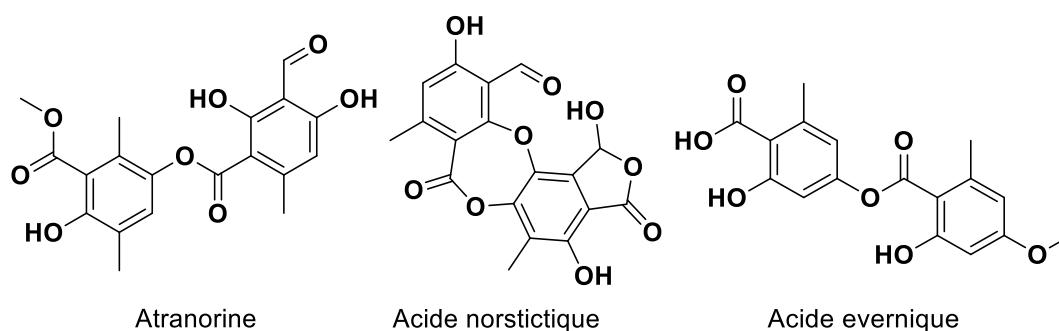
Source : [https://www.afl-lichenologie.fr/Photos\\_AFL/Photos\\_AFL\\_P/Pleurosticta\\_acetabulum.htm](https://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_P/Pleurosticta_acetabulum.htm)

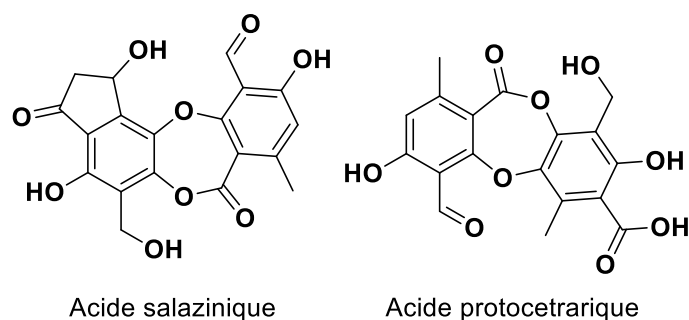
**Tableau 2** : Classification du lichen *Pleurosticta acetabulum*.

<b>Domaine</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>Règne</b>	Fungi
<b>Embranchement</b>	Ascomycota
<b>Classe</b>	Lécanoromycètes
<b>Ordre</b>	Lecanorales
<b>Famille</b>	<i>Parmeliaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pleurosticta</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pleurosticta acetabulum</i>

### II.1.2.2. Métabolites secondaires et activités

Les investigations chimiques des extraits de *Pleurosticta acetabulum* ont révélé une diversité de molécules (Figure 13), notamment l'atranorine, l'acide norstictique, l'acide évernique, l'acide salazinique et l'acide protocetrarique. Ces composés sont dotés des effets antioxydants (Ranković et al., 2012) (Kosanić et al., 2013) (Melo et al., 2011).





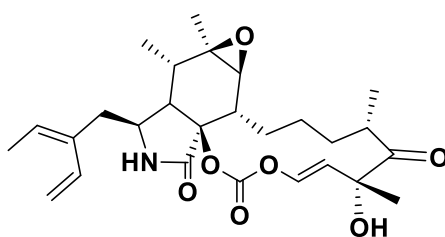
**Figure 13 :** Exemples de métabolites secondaires du lichen *Pleurosticta acetabulum*.

Les extraits d'acétone de *Pleurosticta acetabulum* ont montré diverses activités biologiques. Ils possèdent une activité antimicrobienne contre une variété de champignons et de bactéries, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 5 à 20 mg/mL pour les champignons et de 1,25 à 20 mg/mL pour les bactéries. Il a été démontré les potentiels antioxydant et anticancéreux de l'extrait méthanolique de ce lichen, avec des valeurs  $CI_{50}$  de 26,95, 24,09 et 45,94  $\mu\text{g/mL}$  contre les cellules Hela, A549 et LS174 respectivement (Tomović et al., 2017). Ces résultats indiquent que les métabolites secondaires de cet extrait sont fortement liés à ces activités. D'autres études se sont concentrées sur la purification de ces composés bioactifs pour exploiter leur potentiel thérapeutique (Manojlovic et al., 2012).

L'activité antimicrobienne est également induite par l'acide protocetrarique, l'acide salazinique, l'acide norstictique et l'acide évernique (Figure 13). Ces derniers ont des effets sur des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Yilmaz et al., 2004) (Thadhani et al., 2012) (Candan et al., 2007).

L'activité anticancéreuse de l'acide salazinique et de l'acide protocetrarique a été testée et a révélé des valeurs  $CI_{50}$  de 32,02 et 58,68  $\mu\text{g/mL}$  respectivement sur les cellules FemX et de 35,67 et 60,18  $\mu\text{g/mL}$  respectivement sur les cellules LS174 (Manojlovic et al., 2012).

La purification bioguidée d'un extrait du lichen *Pleurosticta acetabulum* a permis l'isolement de la cytochalasine E (Figure 14) qui montre une activité anticancéreuse contre les cellules HT-29 avec une valeur de  $CI_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$  (Delebassée et al., 2017).



**Figure 14 :** Structure de cytochalasine E.

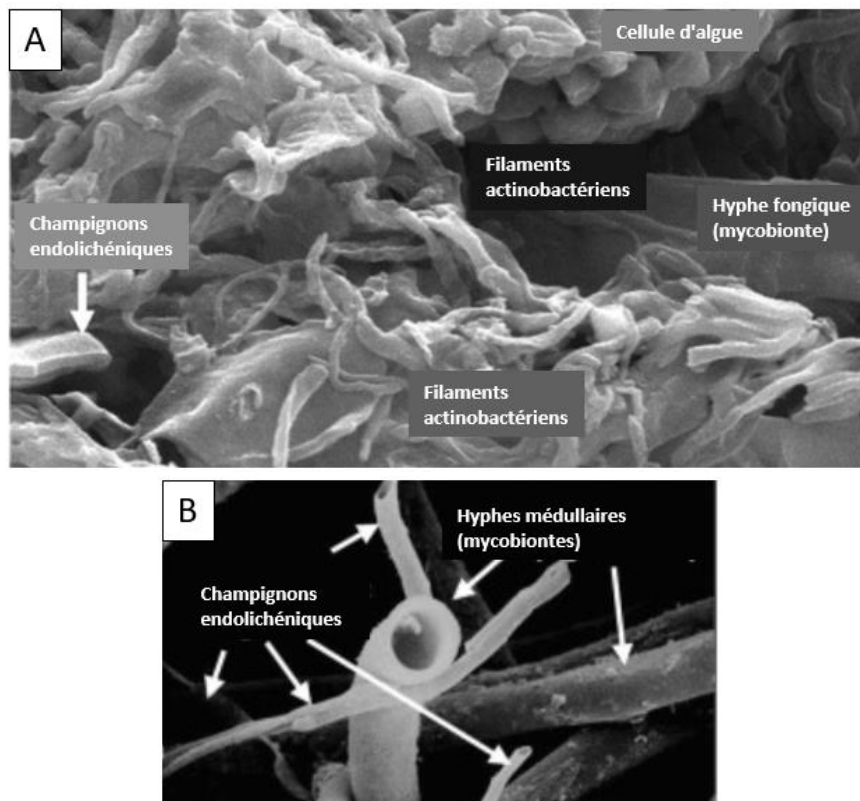


## II.2. Les champignons endolichéniques (ELF)

### II.2.1. Définition, origine et évolution

Les champignons endolichéniques sont des endosymbiotes qui colonisent l'intérieur des thalles des lichens sans présenter de symptômes visibles de leur présence. Ils ont généralement une forme filamenteuse et dépendent pour leur nutrition des photobiontes, ainsi que les autres microorganismes (bactéries, etc.) constituant le lichen (Arnold et al., 2009) (U'Ren et al., 2010) (Suryanarayanan and Thirunavukkarasu, 2017).

La présence des ELF a été effectivement prouvée via des observations au microscope optique à balayage (Figure 15), qui ont révélé des hyphes autres que ceux des partenaires fongiques (Honegger et al., 2013) (Chakarwari et al., 2020).



**Figure 15 :** Coupe transversale par microscope électronique à balayage de thalles du lichen.

Adapté d'après (Honegger et al., 2013)

A : Détail de la médulla sous la couche de photobionte ; B : Détail de la couche médullaire

Le registre fossile des champignons endolichéniques remonte à 415 millions d'années, indiquant leur présence ancienne sur Terre (Honegger et al., 2013). Cependant, ce n'est qu'en 1990, qu'une étude a démontré la diversité des champignons endolichéniques dans les thalles de lichens. Plus de 500 champignons ont été isolés à partir de 17 espèces lichéniques, dont 306 qu'une seule fois. Auparavant, ces champignons étaient souvent considérés comme des contaminants (Petrini et al., 1990).

Une analyse complète des études sur les champignons endolichéniques montre que plusieurs centaines de ces organismes ont été isolés jusqu'à présent (Tripathi and Joshi, 2019) (Zhang,

2016) (Rajulu et al., 2020). Cependant, seuls 27% ont été précisément identifiés au niveau de l'espèce, tandis que la majorité sont classés au niveau du genre ou de la classe, ou restent non identifiés (Chakarwanti et al., 2020).

De plus, des études récentes ont suggéré que les champignons endolichéniques ne se distinguent pas fondamentalement des endophytes qui colonisent les plantes, et que les techniques basées sur l'ADN offrent des moyens prometteurs pour élucider leur identité. Ces constatations mettent en lumière la vaste diversité des champignons endolichéniques (Rajulu et al., 2020).

Les champignons endolichéniques appartiennent principalement au phylum des Ascomycètes, avec une moindre présence parmi les Basidiomycètes, ainsi que d'autres groupes de champignons lichénisés tels que les Deutéromycètes et les Gloméromycètes (Asta et al., 2023). Au sein des Ascomycètes, les classes de Dothideomycètes et de Sordariomycètes comptent le plus grand nombre de champignons endolichéniques signalés jusqu'à présent. Parmi les genres les plus courants, on retrouve le genre *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Xylaria* (Wijayawardene et al., 2020).

Ces ELF sont distincts des composants fongiques principaux des lichens et des champignons lichénicoles (champignons macroscopiques vivant sur ou dans le lichen) (A. E. Arnold et al., 2009) (Lawrey and Diederich, 2003) (Lutzoni et al., 2001).

## II.2.2. Culture et identification

Au laboratoire LABCiS, le lichen collecté est traité le même jour de la récolte. Le thalle de lichen intact est débarrassé de tous les débris (terre, mousse, etc.). Il est ensuite lavé à l'eau du robinet puis eau distillée, puis stérilisé en surface par immersion dans des bains séquentiels d'éthanol à 95 % (2 min), d'hypochlorite de sodium à 10 % (0,5 % NaOCl, 2 min), puis d'éthanol à 70 % (2 min) et séché dans des conditions stériles.

Le thalle stérilisé est ensuite coupé en morceaux de 5 mm<sup>2</sup>. Ces fragments sont ensuite placés dans des boîtes de Petri contenant différents milieux de culture, scellés avec du parafilm® et incubés dans une enceinte thermostatique régulée à 25 °C, humidité régulée et à l'abri de la lumière avec un suivi de la croissance des ELF (Li et al., 2007) (U'Ren et al., 2010) (U'Ren et al., 2012).

Ces fragments de lichens sont déposés dans différents milieux de culture (PDA, SAB, MEA, Yeast, Czapek et CMA), ce qui permet la croissance d'un maximum de champignons endolichéniques différents, qui ne se développent pas nécessairement dans un milieu spécifique. De plus, il a été prouvé que la présence de magnésium, de potassium, de fer et de glucose dans les milieux de croissance est essentielle pour l'isolement réussi de différentes classes de champignons (Muggia et al., 2017). En outre, les différences dans la composition des milieux peuvent moduler la croissance des ELF et altérer la nature et la quantité des composés chimiques qu'ils produisent.

Des antibiotiques tel que la pénicilline G ou la streptomycine (50 mg/mL) sont ajoutés dans le milieu de culture afin d'éviter le développement des bactéries (Li et al., 2007). Des souches sont prélevées dès leur apparition puis repiquées dans des boîtes avec le milieu PDA. Des repiquages successifs sont effectués jusqu'à l'isolement des souches pures. Une analyse morphologique ainsi qu'une extraction de l'ADN sont effectuées pour une identification génétique (Muggia et al., 2016).

### II.2.3. Métabolites secondaires : principales structures et activités

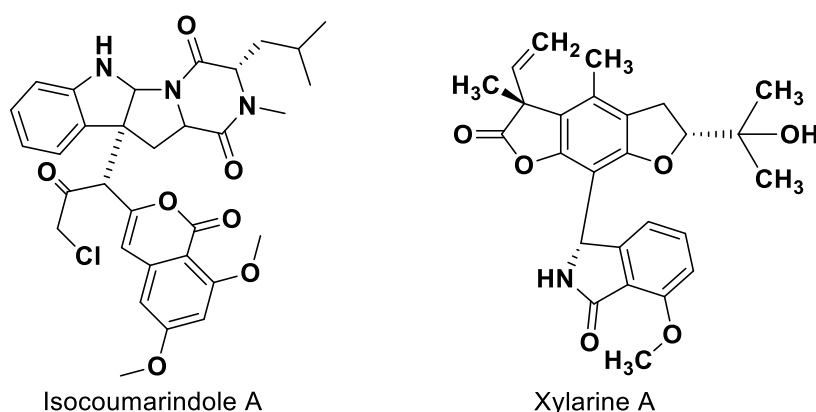
Le photobionte fournit au mycobionte des produits de la photosynthèse tels que le glucose, les polyols et certaines vitamines. En retour, le mycobionte, qui compose principalement le thalle du lichen, offre au photobionte l'accès à l'eau, aux sels minéraux et à d'autres vitamines (Kellogg and Raja, 2017) (Hawksworth and Grube, 2020). Parallèlement, les champignons endolichéniques jouent un rôle crucial dans la symbiose en apportant leurs métabolites secondaires, contribuant ainsi à la protection du lichen et à son interaction avec le photobionte (Calcott et al., 2018).

Ces dernières années, des études ont souligné la grande diversité des métabolites secondaires produits par les champignons endolichéniques tels que les alcaloïdes, les composés phénoliques et polycétides (quinones, furanones, pyrones, benzopyranoïdes, xanthones) ainsi que les terpènes, les stéroïdes et les peptides (Li et al., 2015) (Paranagama et al., 2007) (Yuan et al., 2016). La diversité chimique des métabolites secondaires des ELF et leurs propriétés pharmacologiques prometteuses ont suscité de nombreuses études, illustrées par plusieurs exemples qui mettent en lumière leur diversité chimique et leur intérêt biologique.

#### II.2.3.1. Les alcaloïdes

À partir du champignon endolichénique *Aspergillus* sp. CCCC400810 (Chen et al., 2019) a été isolé l'isocoumarindole A (Figure 16). Il est formé structurellement par la combinaison d'une isocoumarine chlorée avec une unité indolédione-pipérazine, ce qui a permis de créer une structure dimérique unique par formation d'une liaison carbone-carbone. Des tests biologiques ont révélé une cytotoxicité importante de l'isocoumarindole A sur les lignées cellulaires MIA-PaCa-2 et AsPC-1 avec des valeurs  $Cl_{50}$  de 1,63 et 5,53  $\mu$ M respectivement.

Les xylarines sont des alcaloïdes qui ont été isolés du champignon endolichénique *Xylaria* sp. provenant du lichen *Parmelia* sp. La xylarine A présente un squelette avec un système d'anneaux polycycliques (Figure 16) et son activité antithrombotique a été démontrée (Xu et al., 2021).

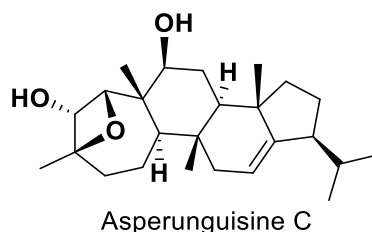


**Figure 16 : Exemples d'alcaloïdes isolés des champignons endolichéniques.**



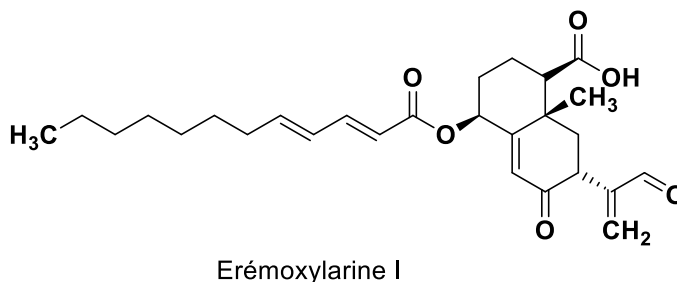
### II.2.3.2. Les terpénoïdes

L'asperungisine C a été isolée à partir du champignon endolichénique *Aspergillus unguis* (Li et al., 2019) (Figure 17). Il a été démontré que l'asperungisine C présente une  $CI_{50}$  de 6,2  $\mu\text{M}$  sur les cellules A549, et qu'elle provoque l'apoptose en arrêtant le cycle cellulaire entre la phase G0 et G1.



**Figure 17 : Structure de l'asperungisine C.**

L'éremoxylarine I (Figure 18), un sesquiterpène isolé à partir du champignon endolichénique *Xylaria Hypoxylon*, a démontré une activité antibactérienne très prometteuse avec une CMI de 0,39  $\mu\text{g/mL}$  contre les bactéries gram-positives, en particulier le *Staphylocoque aureus* (Miral et al., 2023).

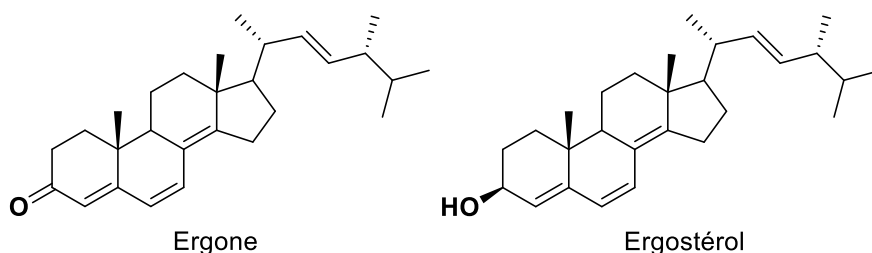


**Figure 18 : Terpénoïde isolé de champignon endolichénique.**

### II.2.3.3. Les stéroïdes

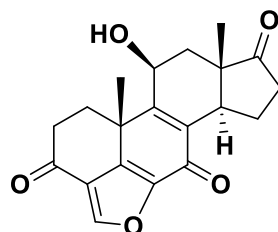
Les champignons endolichéniques semblent ne biosynthétisent que peu de stéroïdes, avec seulement 25 composés recensés jusqu'à présent (Zhang et al., 2024).

Le champignon endolichénique *Talaromyces* sp. a été identifié à partir du lichen *Xanthoparmelia angustiphylla*. Ils ont réussi à isoler deux stéroïdes, à savoir l'ergone et l'ergostérol (Figure 19). Les résultats des tests MTT sur les cellules MDA-MB-231 ont révélé une activité modérée pour l'ergone et l'ergostérol avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 84,2 et 51,3  $\mu\text{M}$  respectivement (Yuan et al., 2018).



**Figure 19 : Stéroïdes isolés de champignon endolichénique.**

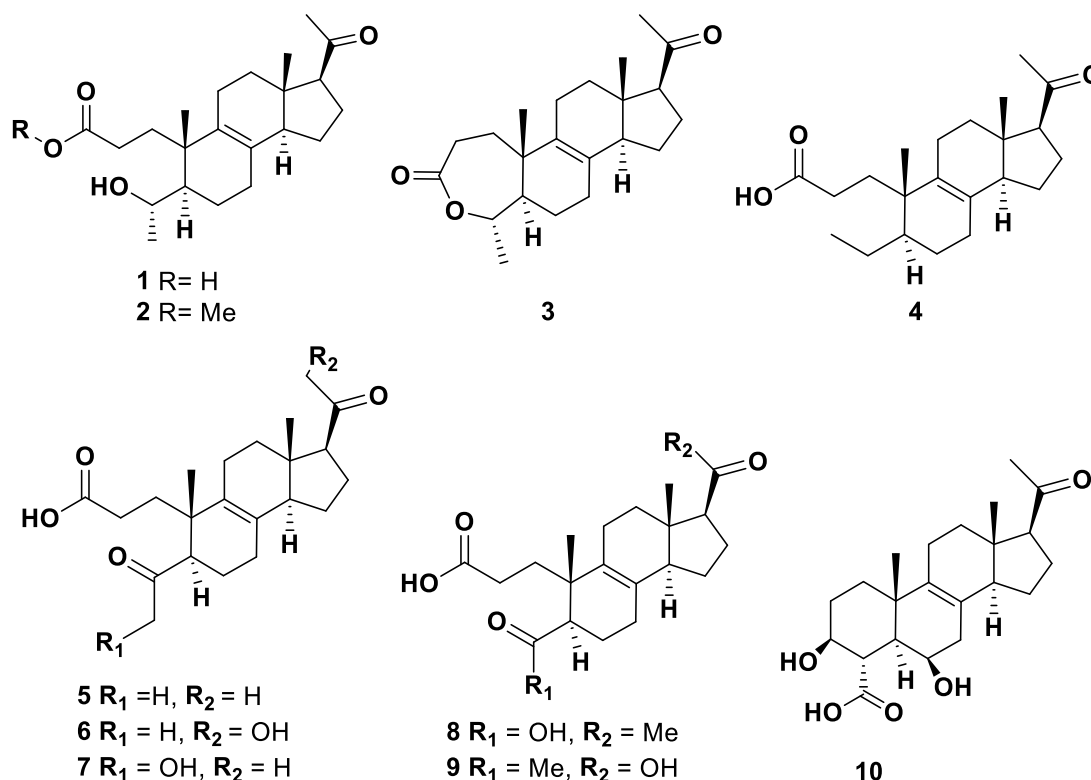
La nodulisporividine G a été isolée à partir de l'extrait du champignon endolichénique *Nodulisporium* sp. (Figure 20) (Zhao et al., 2015). La nodulisporividine G joue un rôle contre l'initiation de la maladie d'Alzheimer. Elle agit sur l'inhibition de l'accumulation de l'amyloïde  $\beta$ 42 peptide ( $A\beta$ 42), avec une valeur de  $CI_{50}$  de 1,2  $\mu$ M. Il a été aussi démontré que cette molécule a un potentiel très intéressant pour améliorer la mémoire à court terme.



Nodulisporividine G

**Figure 20 :** Stéroïde isolé de ELF *Nodulisporium* sp.

La technique OSMAC (One Strain Many Compounds) permet d'évaluer la capacité des champignons à produire divers métabolites secondaires en fonction de l'environnement de culture (Bode et al., 2002). En utilisant cette méthode avec le champignon endolichénique *Nodulisporium* sp. (No. 65-12-7-1) (Zhao et al., 2015), il a été possible d'isoler le nodulisporisteroïde C-L (1-10) (Figure 21). Cependant, ils ne sont pas actifs à 40  $\mu$ M sur les lignées cellulaires HL-60, SMMC-7721, A549, MCF-7 et SW480.

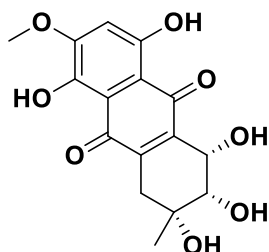


**Figure 21 :** Structure des nodulisporisteroïdes isolés de ELF *Nodulisporium* sp.

#### II.2.3.4. Les composés phénoliques

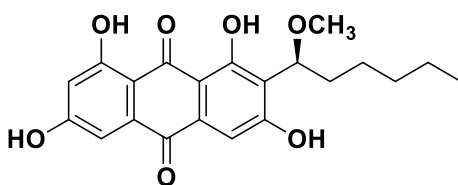
La synthèse de divers composés phénoliques est caractéristique des champignons endolichéniques, tels que les quinones, les anthraquinones, les furanones, les pyrones, les benzopyranoïdes et les xanthones.

Bostrycine, une anthraquinone, a été isolée à partir du champignon endolichénique *Apiospora montagnei*, issu du lichen *Cladonia* sp. (Figure 22). Il a été démontré que cette anthraquinone a une cytotoxicité importante contre les cellules L5178Y, avec une valeur de  $CI_{50}$  de 1,7  $\mu$ M (Wang et al., 2017).



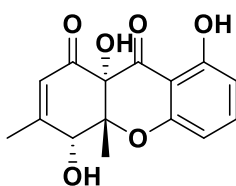
**Figure 22 : Structure de bostrycine.**

L'anthraquinone 1'-O-methyl-averantine a été isolée par fractionnement bio-guidé à partir de *Jackrogersella* sp. EL001672 (Figure 23). Elle a démontré une suppression du pouvoir régénératoire des cellules cancéreuses grâce aux signaux Sonic Hedgehog et Notch. En outre, elle a des activités avec des valeurs de  $CI_{50}$ , allant de 49,32 à 61,23  $\mu$ M, sur diverses lignées cellulaires tels que CSC221, CaCo2, DLD1 et HCT116 (Varlı et al., 2023).



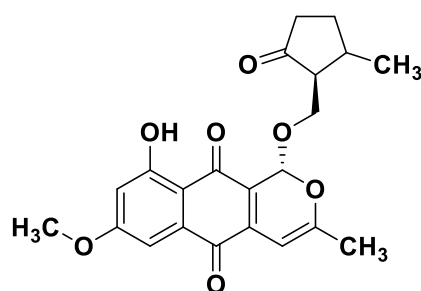
**Figure 23 : Structure de 1'-O-methyl-averantine.**

La funiculosone a été isolée à partir du champignon endolichénique *Alaromyces funiculosus* (Figure 24) (Padhi et al., 2019). Cette molécule a démontré une activité inhibitrice contre *Candida albicans*, avec une valeur de CMI de 120,7  $\mu$ M.



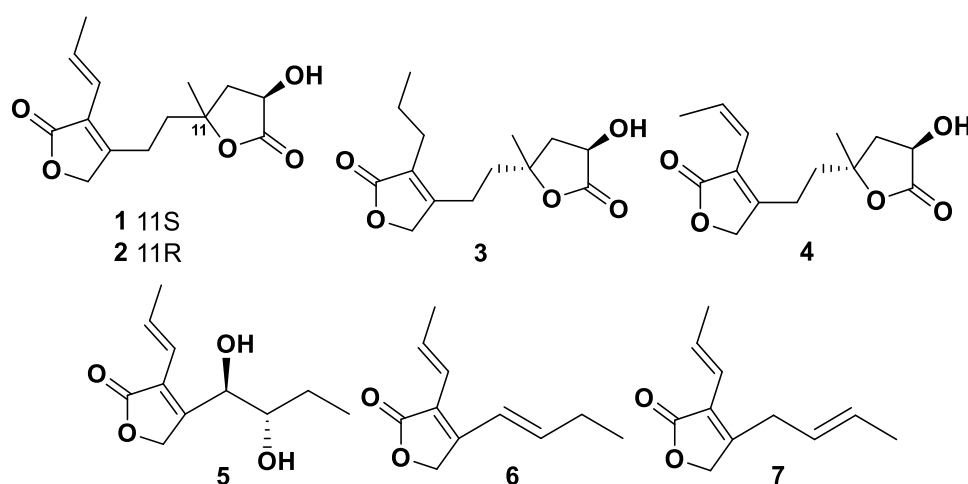
**Figure 24 : Structure de funiculosone.**

L'heptacétide ulosprine G a été isolé à partir du champignon endolichénique *Ulospora bilgramii* provenant du lichen *Umbilicaria* sp. (Figure 25) (Xie et al., 2020). Elle présente un effet antiprolifératif contre les lignées cellulaires A549, MCF-7 et KB, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 1,3 ; 1,3 et 3  $\mu$ M respectivement. Cette molécule intervient aussi dans le processus de l'apoptose en entravant le cycle cellulaire à la phase  $G_0/G_1$ .



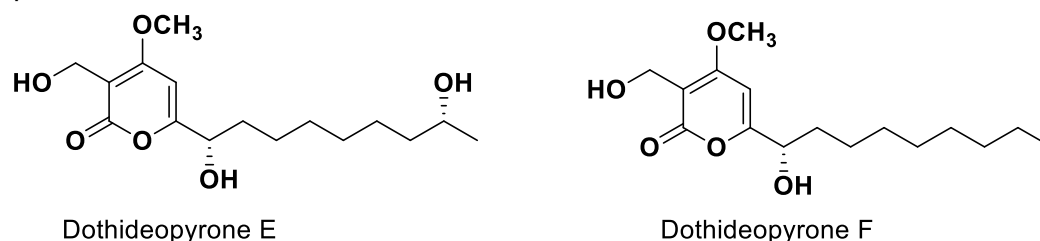
**Figure 25 : Structure de l'ulosporin G.**

Le champignon endolichénique *Peziza* sp. a été isolé du lichen *Xanthoparmelia* sp. (Zhang et al., 2014). Ces travaux ont permis d'accéder à une série de 7 mono et bis-furanones A-G (1-7) (Figure 26). Cependant, ces composés à une concentration de 20 µg/mL n'ont pas démontré d'activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, ni d'activité antiproliférative contre les cinq lignées cellulaires HeLa, A549, MCF-7, HCT116 et T24.



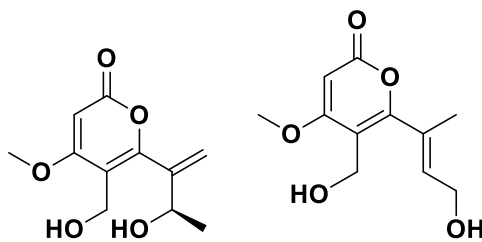
**Figure 26 : Structures des furanones A-G (1-7).**

Le champignon endolichénique *Dothideomyces* sp. (EL003334) a été isolé à partir du lichen *stereocaulon tomentosum* par (Kim et al., 2018), ce qui a permis d'isoler ensuite dothideopyrones E et F (Figure 27). La valeur de  $CI_{50}$  du dothideopyrone F a été de 15 µM dans les cellules microgliales induites par le lipopolysaccharide, tandis que le dothideopyrone E était inactif. En outre, il a été prouvé que dothideopyrone F réduit les niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine (IL)-1 $\beta$  et l'IL-6, ce qui peut préserver le système nerveux central des maladies telles que l'Alzheimer et le Parkinson.



**Figure 27 : Structures des deux dothideopyrones E et F.**

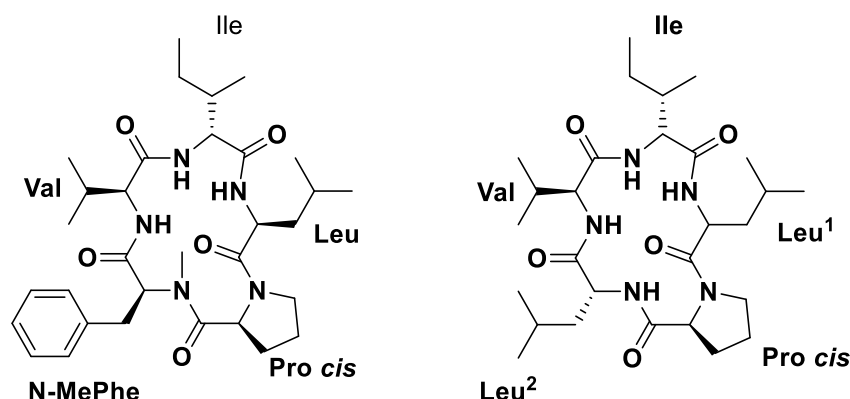
Le champignon endolichénique *Talaromyces* sp. a été isolé à partir du lichen *Xanthoparmelia angustiphylla*. Cela a permis d'isoler différents composés, tels que le clearanol A et talaromycin A (Figure 28), qui inhibent sélectivement la croissance cellulaire des cellules MDA-MB-231, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 84,5 et 106,9  $\mu\text{M}$  respectivement (Yuan et al., 2018).



**Figure 28 : Structures de clearanol A et talaromycin A.**

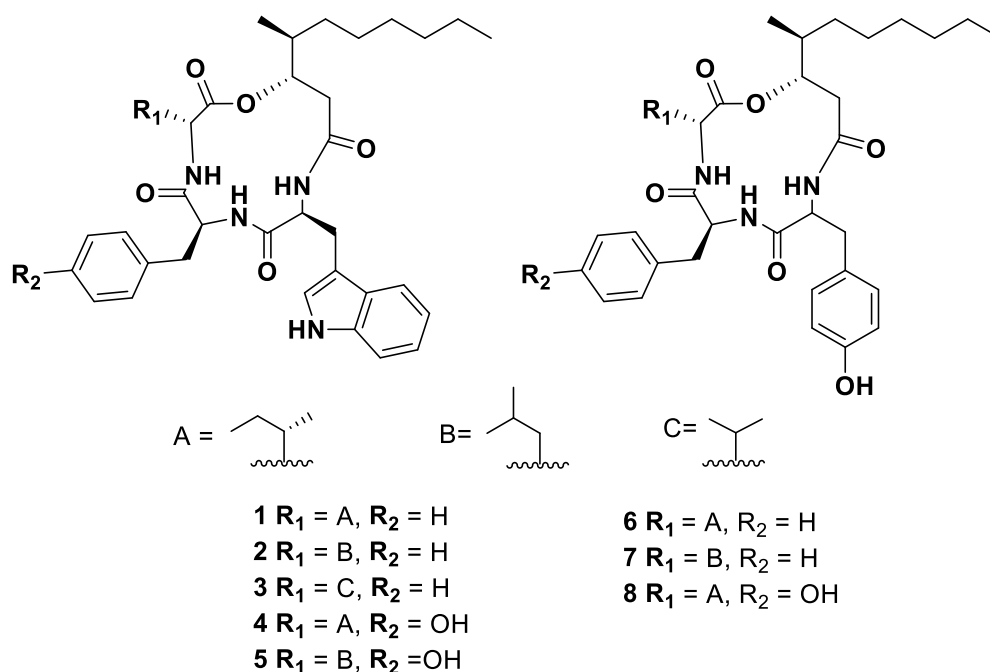
### II.2.3.5. Les peptides

Le champignon endolichénique *Xylaria* sp. a été isolé du lichen *Leptogium saturninum*, ce qui a permis l'isolement de deux cyclo peptides, cyclo (*N*-méthyl-L-Phe-L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro) et cyclo (L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro-D-Leu) (Figure 29). Toutefois, l'activité antifongique de cyclo (*N*-méthyl-L-Phe-L-Val-D-Ile-L-Leu-L-Pro) contre *Candida albicans* SC5314 s'est révélée intéressante avec une concentration de 10,7  $\mu\text{M}$  en synergie avec ketoconazole à 7,5  $\mu\text{M}$  (Wu et al., 2011)



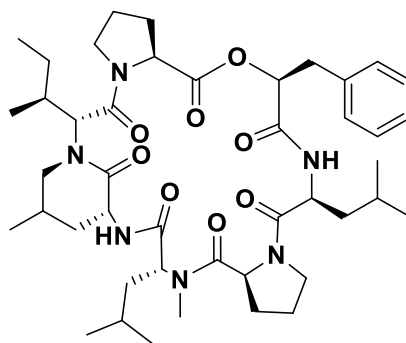
**Figure 29 : Exemples de cyclo peptides.**

Le beauverolide Ka (1) a été isolé à partir du champignon endolichénique *Beauveria* sp. provenant du lichen *Gypsoplaca macrophylla*, avec 7 cyclotetradepsipeptides (2-7) (Figure 30), dont 3 présentent des activités biologiques intéressantes. Un effet protecteur de beauverolide Ka et beauveamide A (2) à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  a été mis en évidence sur des cellules HEI-OC1. En outre, l'activité de beauverolide Ka a été démontrée en fonction de la dose dans les myoblastes. Ils ont montré que le traitement avec 50  $\mu\text{M}$  de beauverolide Ka, beauveamide C (4) et D (5) a stimulé l'absorption du glucose dans les myoblastes L6 du rat, ce qui peut être prometteur pour le traitement du diabète (Zhou et al., 2021).



**Figure 30 : Structure de cyclotetradepsipeptides.**

Une analyse par approche MS guidée de l'extrait du champignon endolichénique *Xylaria* sp. (Luo et al., 2022) a permis d'annoter et d'isoler un depsipeptide cyclique, le xylaroamide A (Figure 31). Cette molécule a démontré une activité antiproliférative contre les lignées BT-549 et RKO, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 2,5 et 9,5  $\mu M$  respectivement (Luo et al., 2022).



**Figure 31 : Structure de la xylaroamide A.**

Dans le cadre de cette thèse, nos travaux de recherche porteront sur l'étude de deux souches de champignons endolichéniques, à savoir *Aspergillus* sp. et *Trametes versicolor*.

## II.3. Le champignon endolichénique « *Aspergillus* sp. »

### II.3.1. Origine et évolution

Le nom *Aspergillus* dérive du mot latin aspergillum (aspersoir), donné par le biologiste italien Pier Antonio Micheli en 1729 (Bennett, 2007). Les espèces du genre *Aspergillus* se trouvent dans différents climats (pression osmotique élevée, environnement riche en oxygène) et différents endroits principalement dans les sols et sur les matières mortes mais aussi capables de coloniser des hôtes vivants animaux ou plantes (de Vries et al., 2017). En 1965,

la classification des *Aspergillus* a été basée sur la morphologie et couleur des colonies et des conidies (Raper and Fennell, 1965).

Ensuite, cette classification a été reformulée en se basant sur la caractérisation des conidies et des ascospores par microscopie électronique à balayage (Kozakiewicz, 1989). Sur la base de leur morphologie, de leur physiologie et de leurs caractéristiques phylogénétiques, *Aspergillus* comprend plus de 340 espèces sont connues (Samson et al., 2014).

**Tableau 3 : Classification du champignon endolichénique *Aspergillus* sp.**

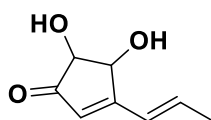
<b>Domaine</b>	Eukaryota
<b>Règne</b>	Fungi
<b>Embranchement</b>	Ascomycota
<b>Classe</b>	Eurotiomycètes
<b>Ordre</b>	Eurotiales
<b>Famille</b>	<i>Aspegillaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>

Les champignons *Aspergillus* ont la capacité de se reproduire de manière sexuée et asexuée. Cette espèce est également très répandue en raison des spores asexuées générées par les conidiophores, qui sont dispersés par le vent et colonisent de nouveaux substrats (Etxebeste et al., 2010) (Krijgsheld et al., 2013). Les espèces d'*Aspergillus* sont connues aussi pour leur reproduction sexuée via la production d'ascospores à l'intérieur des asques (Dyer and O'Gorman, 2012).

### II.3.2. Métabolites secondaires : principales structures et activités

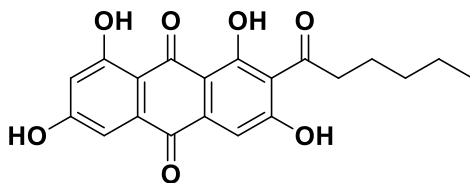
La diversité chimique du genre *Aspergillus* est remarquable, avec une gamme étendue de métabolites secondaires biologiquement actifs, tels que les polycétides, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Les propriétés biologiques de ces champignons filamenteux sont largement étudiées, notamment pour leurs effets diversifiés (de Vries et al., 2017). L'importance d'*Aspergillus* spp. dans la recherche scientifique, l'industrie, et les contextes écologiques est notable, en raison de son rôle dans la décomposition des matières organiques, la production de mycotoxines, et son impact sur l'agriculture et la sécurité alimentaire (Nji et al., 2023). Pour illustrer cette diversité chimique et le potentiel thérapeutique d'*Aspergillus*, plusieurs exemples de molécules prometteuses sont présentés, mettant en lumière des candidats intéressants pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

La terreine, un petit polycétide antifongique, a été isolée à partir de *A. terreus* (Figure 32) (Raistrick and Smith, 1935) (Ghisalberti et al., 1990). L'inhibition du cancer du sein par la terreine a été mise au jour près de 80 ans plus tard, avec une valeur de  $CI_{50}$  de 1,1 nM sur les cellules MCF-7. Ainsi, l'activité de la terreine contre cette lignée cellulaire est 100 fois supérieure à celle du taxol. De plus, la terreine montre une activité contre les cellules PANC-1 et HepG2 avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 9,8 et 66,8  $\mu$ M respectivement.



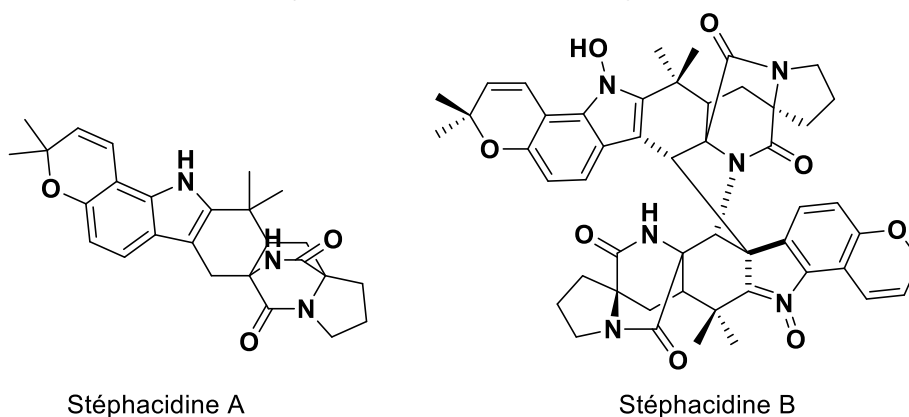
**Figure 32 : Structure de la terreine.**

L'acide norsolorinique a été isolé à partir d'*Aspergillus parasiticus* et *A. nidulans* (Figure 33) (Muroga et al., 2010). Il entraîne sélectivement l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G0/G1, induisant l'apoptose des cellules T-24 et MCF-7, avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 10,5 et 12,7  $\mu\text{M}$  respectivement (Yamada et al., 2011) (Yamada et al., 2012).



**Figure 33 : Structure de l'acide norsolorinique.**

Les stéphacidines A et B ont été isolés à partir d'*Aspergillus ochraceus*, le dernier est considéré avoir la structure la plus complexe et originale des alcaloïdes issus de la nature (Figure 34). La cytotoxicité *in vitro* de ces molécules sur un ensemble de cellules cancéreuses de prostate, ovaire, colon, sein et poumon est évident avec des valeurs de  $CI_{50}$  allant de 0,06  $\mu\text{M}$  à 6,8  $\mu\text{M}$  (Qian-Cutrone et al., 2002). La stéphacidine B a montré une plus grande puissance et sélectivité dans ses activités antitumorales, notamment contre les cellules LNCaP, avec une  $CI_{50}$  de 60 nM (Qian-Cutrone et al., 2002).

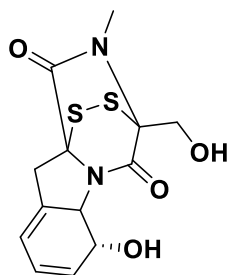


Stéphacidine A

Stéphacidine B

**Figure 34 : Structure des alcaloïdes issus de *Aspergillus* sp.**

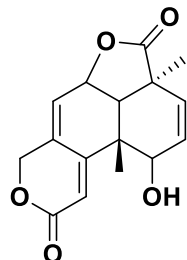
La gliotoxine est un polycétide qui a été isolée du champignon marin *Aspergillus* sp. (Figure 35). Elle a montré une cytotoxicité et une induction de l'apoptose dans les cellules Hela et SW1353 via la stimulation de l'expressions des protéines de la famille des caspases (Nguyen et al., 2014). L'activité de la gliotoxine a été démontrée sur 6 lignées cellulaires du cancer du sein avec des valeurs de  $CI_{50}$  allant de 38 à 985  $\mu\text{M}$  (Vigushin et al., 2004).



**Figure 35 : Structure de la gliotoxine.**

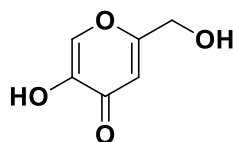


L'asperolide A est un diterpène qui a été isolé à partir du champignon endophyte *Aspergillus wentii* EN-48 (Figure 36) (Lv, 2023). Cette molécule montre un effet antiprolifératif sur les cellules MDA-MB-231 avec une valeur de  $CI_{50}$  de 7,6  $\mu$ M (Jiang et al., 2020). De plus l'asperolide A active la protéine P38 et la phosphorylation de P53 à S33, qui jouent un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose (Lv, 2023).



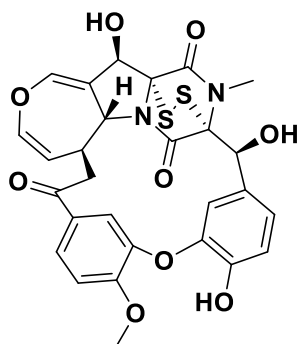
**Figure 36 : Structure de l'asperolide A.**

L'acide kojique est une molécule synthétisée par l'*Aspergillus oryzae* (Figure 37) (Sun et al., 2024). Elle est dotée des activités variées. Il a été démontré qu'elle intervient dans l'activation des macrophages, le réarrangement du cytosquelette, l'augmentation de la phagocytose, l'augmentation de la production des ROS sans avoir d'effet cytotoxique sur les cellules saines (Rodrigues et al., 2011).



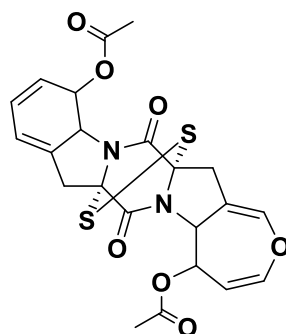
**Figure 37 : Structure de l'acide kojique.**

L'emestrine A, a été isolé à partir d'*Aspergillus striatus* (Figure 38) (Seya et al., 1986). Elle a un effet antiprolifératif sur les cellules HL-60 avec une valeur de  $CI_{50}$  de 83,5 nM (Bladt et al., 2013) (Nursid et al., 2011).



**Figure 38 : Structure de l'emestrine A.**

L'acétylapoaranotine, une dicétopipérazine avec un pont disulfure, a été isolée à partir du champignon marin *Aspergillus* sp. (Figure 39) (Choi et al., 2011). Elle a démontré une activité antiproliférative contre les cellules HCT-116, AGS, A549 et MCF-7 avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 13,8, 12,2 et 10  $\mu$ M, respectivement (Choi et al., 2011).



**Figure 39 : Structure de l'acétylapoaranotine.**

## II.4. Le champignon endolichénique « *Trametes versicolor* »

### II.4.1. Origine et évolution

*Trametes versicolor* a été décrit comme un champignon endophyte de la plante *Rosa roxburghii* (L. Li et al., 2024). La forme macroscopique appelée *Coriolus Versicolor* ou *Polyporus versicolor* est très étudiée (Ng and Chan, 1997) (Chu et al., 2002) (Mendieta et al., 2019) (Habtemariam, 2020) (He et al., 2022).

Généralement, les espèces de *Trametes* se développent dans pratiquement tous les écosystèmes forestiers et sur de nombreux genres de feuillus dans les forêts tempérées du Nord (Núñez and Ryvarden, 2001).

Les méthodes classiques taxonomiques rendent l'identification de nombreuses espèces de *Trametes* et de leurs genres apparentés difficile en raison de leurs caractéristiques morphologiques très proches (Hattori, 2002). Le champignon *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, appelée aussi « Turkey tail » l'une des espèces les plus répandues. Toutefois, la classification des *Trametes* au niveau de l'espèce reste incertaine (Carlson et al., 2014). L'utilisation de données moléculaires combinées à la morphologie permet de caractériser et de repérer les caractéristiques intraspécifiques et interspécifiques du genre (Zakaria et al., 2005).

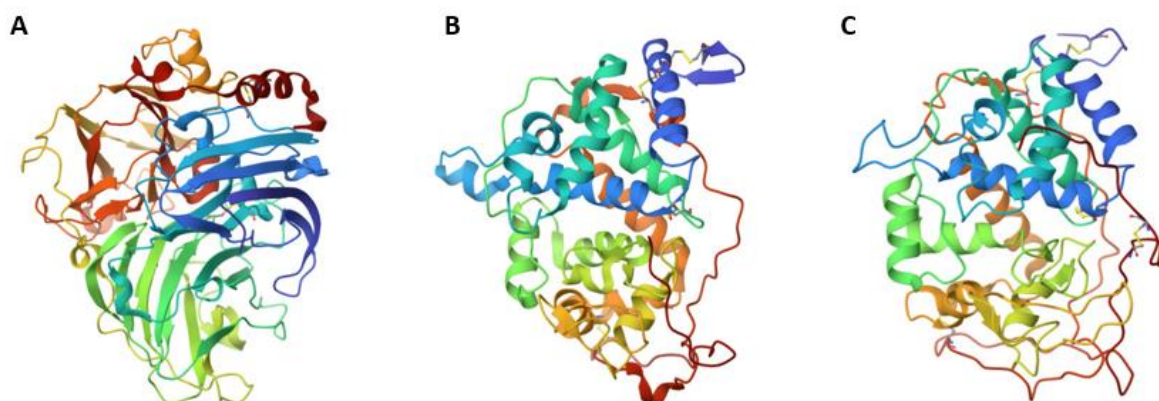
Depuis longtemps, le *Trametes versicolor* est un champignon médicinal, consommé traditionnellement dans les pays asiatiques notamment le Japon pour favoriser la longévité et la santé (Hobbs, 2004) (Benson et al., 2019) et en Chine comme remède traditionnel (Cui et al., 2011) (Wu et al., 2019). Les métabolites primaires du *Trametes versicolor* ont une abondance et une diversité d'actions biologiques, tels que les polysaccharides, les protéines ainsi que les métabolites secondaires tels que les stérols, comme l'attestent plusieurs travaux (Knežević et al., 2015) (Benson et al., 2019).

**Tableau 4 : Classification du champignon endolichénique *Trametes versicolor*.**

<b>Domaine</b>	Eukaryota
<b>Règne</b>	Fungi
<b>Embranchement</b>	Basidiomycota
<b>Classe</b>	Agaricomycètes
<b>Ordre</b>	Polyporales
<b>Famille</b>	<i>Polyporaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Trametes</i>

#### II.4.2. Métabolites : principales structures et activités

Les champignons du genre *Trametes* produisent de manière efficace les trois enzymes ligninolytiques indispensables notamment laccase, lignine peroxydase et manganèse peroxydase (Figure 40) (Ferreira et al., 2018). Ces enzymes sont considérées comme très prometteuses pour les applications biotechnologiques.



**Figure 40 :** Structure 3D des enzymes ligninolytiques issues de *Trametes versicolor*.

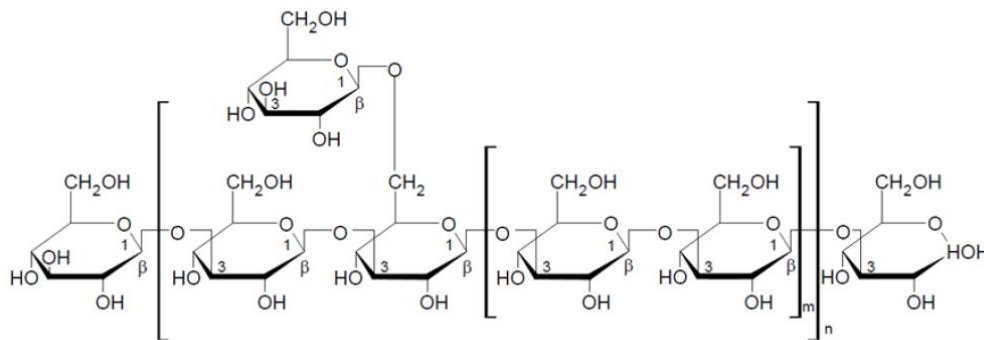
A : laccase (PDB ID 1GYC), B : lignine peroxydase (PDB ID 3Q3U), C : manganèse peroxydase (PDB ID 1MNP).

L'extrait aqueux de *Trametes versicolor* est réputé pour sa potentialité immunostimulante (Tsukagoshi et al., 1984) (Li et al., 1990). Il augmente la production d'anticorps, une activation des fonctions phagocytaires du système réticulo-endothelial et une induction de l'expression des gènes des cytokines (IL-2, IL-6, interférons et TNF) (Chu et al., 2002). L'intérêt de cet extrait réside dans sa distinction par rapport à d'autres médicaments anticancéreux, qui peuvent parfois entraîner des effets secondaires graves. Cette particularité a été corroborée par plusieurs études, confirmant que cet extrait est un outil précieux pour la prévention et peut également servir de traitement adjuvant pour plusieurs types de cancers, y compris les cancers du sein, du poumon, du côlon, de l'estomac, de la prostate etc. (Tsukagoshi et al., 1984) (Li et al., 1990) (Ng and Chan, 1997) (Qian et al., 1997) (Knežević et al., 2015) (Ricciardi et al., 2017).

Des études ont permis l'isolement de deux composants principaux, les peptides polysaccharides PSK et PSP de *Trametes versicolor* (Muñoz-Castiblanco et al., 2017) (Habtemariam, 2020).

Les PSP et PSK possèdent des liaisons alpha-1,4 et beta-1,3 glucosidiques. Le d-glucose est le monosaccharide prédominant dans les deux composés. Le polypeptide du PSK est particulièrement riche en acides aminés acides tels que l'acide aspartique et le glutamique. Les polypeptides du PSP sont également enrichis en ces acides aminés, mais le PSP se distingue du PSK par sa composition saccharidique, ne contenant pas de fructose et comportant de l'arabinose et du rhamnose. Les principales différences entre les deux se trouvent dans leur teneur en peptides et en glycanes : le PSP contient environ 10 à 30 % de

peptides, tandis que le PSK en contient jusqu'à 90 % (He et al., 2022). En raison de leur composition complexe, il est difficile de préciser leur structure exacte (Figure 41).



**Figure 41 : Structure chimique de l'unité répétée de PSK et PSP.**

(Mirończuk-Chodakowska et al., 2021)

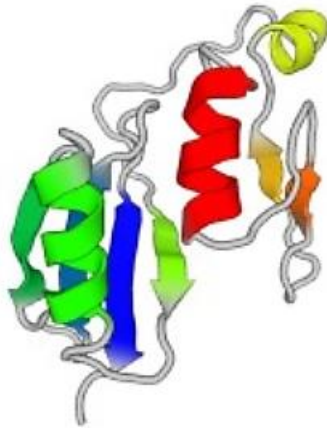
Ces peptides polysaccharides possèdent des activités anticancéreuses intéressantes. Les PSP ont un rôle dans le renforcement des réponses immunitaires innées et dans la médiation cellulaire, et possèdent des propriétés antitumorales au niveau animal et humain (Mustafin et al., 2022).

Les PSP favorisent la prolifération cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Jędrzejewski et al., 2016). Le PSP inhibe la prolifération des cellules MCF-7 à une concentration de 100 g/mL et pourrait jouer un rôle essentiel dans l'activation de l'expression du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) dans les cellules cancéreuses du sein, ce qui pourrait être l'un des mécanismes de son activité cytotoxique (Kowalczywska et al., 2016). D'après des recherches *in vivo* menées sur des souris traitées à une concentration de 25  $\mu$ g/mL, il a été démontré que le PSP stimule l'expression des cytokines et exerce son effet immunorégulateur par l'intermédiaire de récepteurs membranaires TLR4 (Z. Wang et al., 2015).

Les PSK altèrent le chimiotactisme des cellules tumorales, en réduisant leur adhérence et leur interaction avec la membrane basale (Matsunaga et al., 1996). *In vivo*, ils provoquent l'élimination des métastases pulmonaires spontanées des cellules B16-BL6. L'administration de PSK a été utilisée dans des cellules embryonnaires de souris pour retarder l'augmentation de l'expression de P53 après un stress radiologique, ce qui a été lié à une augmentation de l'apoptose (Kagohashi et al., 2002).

Les résultats prometteurs de PSK après les études cliniques effectuées chez l'homme (Sakamoto et al., 2006), ont conduit le système national de santé japonais à autoriser son utilisation comme adjuvant à diverses chimiothérapies en 1977 (Hobbs, 2004) et en Chine depuis 1987 (Hobbs, 2004) (Sakamoto et al., 2006) (Blagodatski et al., 2018).

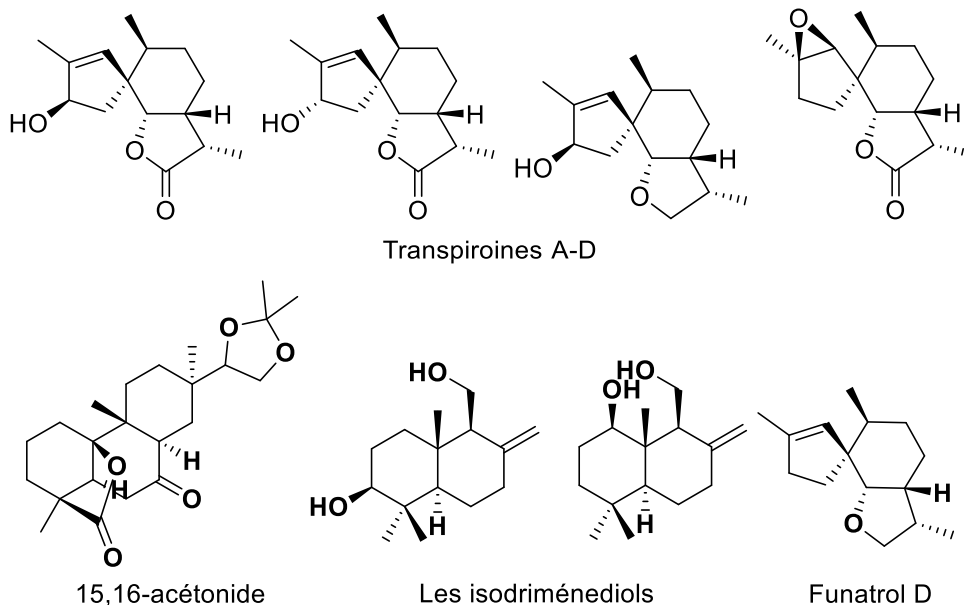
La musarine est un peptide polysaccharidique de faible poids moléculaire (12 248 Da), composé de 112 acides aminés. Elle a été isolée de la poudre du champignon *Trametes versicolor* (Figure 42) (He et al., 2021).



**Figure 42 : Les structures modèles du domaine Musarine.**

La musarine a montré une sélectivité remarquable pour inhiber différents types de cellules du cancer colorectal tout en présentant une faible cytotoxicité envers les cellules saines, ce qui constitue un avantage par rapport aux médicaments conventionnels. En outre, dans les études *in vivo*, elle a démontré une réduction des tumeurs xénogreffes après 14 jours de traitement (He et al., 2021).

La culture du *Trametes versicolor*, a permis l'isolement de transpiroines A-D, 15,16-acétonide, ainsi que deux sesquiterpènes l'isodrimédiol et le funatrol D (Figure 43) (S.-R. Wang et al., 2015).



**Figure 43 : Exemples de métabolites secondaires isolés de *Trametes versicolor*.**

L'activité cytotoxique des transpiroines A-D et du 15,16-acétonide contre les cellules HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 et SW-480 a été étudiée. Toutefois, aucun composé n'a démontré une activité significative ( $CI_{50}$  supérieur à 40  $\mu M$ ).

Partie III  
Travaux de thèse





## Partie III. Travaux de thèse

---

### III.1. Résultats et discussions

#### III.1.1. Récolte et identification des lichens

Des travaux antérieurs ont été effectués au département de pharmacognosie du laboratoire LABC/S, en collaboration avec l'Association française de lichénologie (AFL). Ces recherches ont porté sur l'étude et l'identification de diverses espèces de lichens, en mettant en avant leurs propriétés biologiques potentielles (Lagarde et al., 2018).

Dans un premier temps, l'identification des lichens a été réalisée par une observation microscopique minutieuse. Cette approche permet de détailler les structures morphologiques caractéristiques des lichens, qui sont essentielles à leur classification. Ensuite, des clés de détermination spécifiques (morphologiques et chimiques) des lichens ont été utilisées, permettant de distinguer les différentes espèces (Tievant, 2001).

La nature de photobionte montre des changements morphologiques au lichen permettant une première identification. Les lichens à cyanobactérie se caractérisent par un aspect gélatineux ou noircissement en contact avec l'eau. Cependant, les lichens à algues vertes modifient leur intensité de couleur au contact de l'eau, affichant des nuances de vert plus ou moins intense (Haluwyn et al., 2009). En outre, certains acides du lichen peuvent faire des réactions colorées avec le chlore, la potasse ou la paraphénylènediamine permettant une identification chimique. Le dépôt des réactifs à différents endroits du lichen joue également un rôle important. Dans le cas du lichen *Pleurosticta acetabulum*, une réaction positive de potasse dans le cortex donne une couleur jaune-brun. Au niveau de la médulle, cela donne une couleur rouge.

L'approche combinée de l'observation microscopique et de l'utilisation des clés de détermination a permis de réaliser une identification précise des espèces de lichens étudiées. Ces travaux ont ainsi contribué à enrichir la base de connaissances sur les lichens et leurs propriétés, ouvrant la voie à de nouvelles recherches sur leurs applications potentielles en pharmacognosie (Millot et al., 2013) (Delebassée et al., 2017) (Lagarde et al., 2018) (Dieu et al., 2020).

#### III.1.2. Isolement et identification de champignons endolichéniques

Les ELF ont été isolés comme décrits dans IV.2.4. Leur identification a été réalisée selon un protocole rigoureux et bien défini. Après isolement des souches pures des champignons endolichéniques, des fragments de mycélium ont été prélevés et placés dans le tampon « Nuclei Lysis Solution » (300 µL). Ces échantillons sont ensuite envoyés au Dr Patricia Jargeat, du Laboratoire Évolution et Diversité Biologique, UMR 5174, à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, pour une caractérisation moléculaire détaillée des champignons isolés.

Les souches fongiques sont identifiées par séquençage des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique. Ce marqueur est particulièrement utile pour l'identification des champignons, car il correspond aux régions non-codantes qui séparent les sous-unités 18S, 5S, 8S et 28S de l'ADN ribosomique. Les sous-unités de l'ADN ribosomique sont fortement conservées chez les espèces fongiques, tandis que les régions ITS présentent une variabilité suffisante pour permettre une identification précise des espèces. Cette variabilité fait des régions ITS un marqueur de référence pour les études taxonomiques et



l'identification des champignons en écologie moléculaire. Le séquençage des régions ITS permet ainsi de distinguer les champignons de manière précise, en s'appuyant sur les différences génétiques présentes dans ces régions, ce qui est essentiel pour les études de biodiversité et d'écologie (Horton and Bruns, 2001) (Nilsson et al., 2008)

Les seuils de similarité suivants ont été utilisés pour identifier les souches fongiques :

- Lorsque l'identité des séquences ITS était  $\geq 99\%$ , les espèces fongiques ont été acceptées.
- Pour une homologie comprise entre 97% et 99%, seul le genre a été accepté.

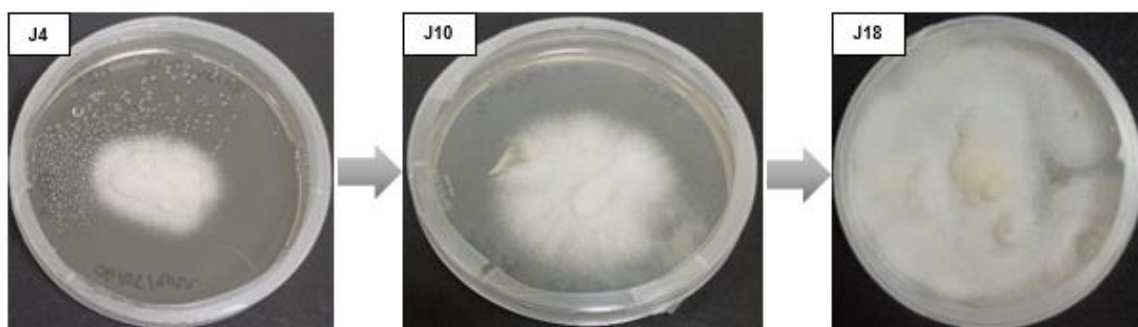
Les résultats de l'identification moléculaire ont révélé que la souche XC04 correspond à un champignon endolichénique du genre *Aspergillus*, isolé du lichen *Xanthoparmelia conspersa*. Cependant, comme l'homologie de séquence n'atteint pas 99%, l'espèce exacte n'a pas pu être déterminée avec certitude, d'où l'utilisation de la désignation *Aspergillus* sp. Quant à la souche PA08, elle a été identifiée comme étant *Trametes versicolor*, un champignon endolichénique isolé du lichen *Pleurosticta acetabulum*.

### III.1.3. Culture à faible échelle

Au laboratoire du LABCiS, les champignons endolichéniques isolés par repiquage successif à partir de culture des lichens sont conservés dans des cryotubes avec 10% de glycérol à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Des précultures ont été effectuées en utilisant les mycéliums conservés dans les cryotubes, cultivés sur milieu PDA dans quatre boîtes de Petri. Après la croissance des champignons endolichéniques, des cultures à faible échelle ont été mises en place sur trois milieux différents : PDA à 39 g/L, MEA à 50 g/L et SAB à 65 g/L. Chaque milieu a été préparé et distribué dans 20 boîtes de Petri de 90 mm, dans des conditions stériles, avec l'ajout de fragments de mycélium des champignons endolichéniques.

Après 21 jours, le mycélium a envahi la surface des boîtes (Figure 44). Des extractions successives (x3) sont effectuées chaque 48 h à 100 % d'acétate d'éthyle. Cela permet d'obtenir un extrait brut d'acétate d'éthyle pour chaque souche (cf. IV.4.1). Une collection d'extraits issus des cultures à faible échelle est disponible au Laboratoire.

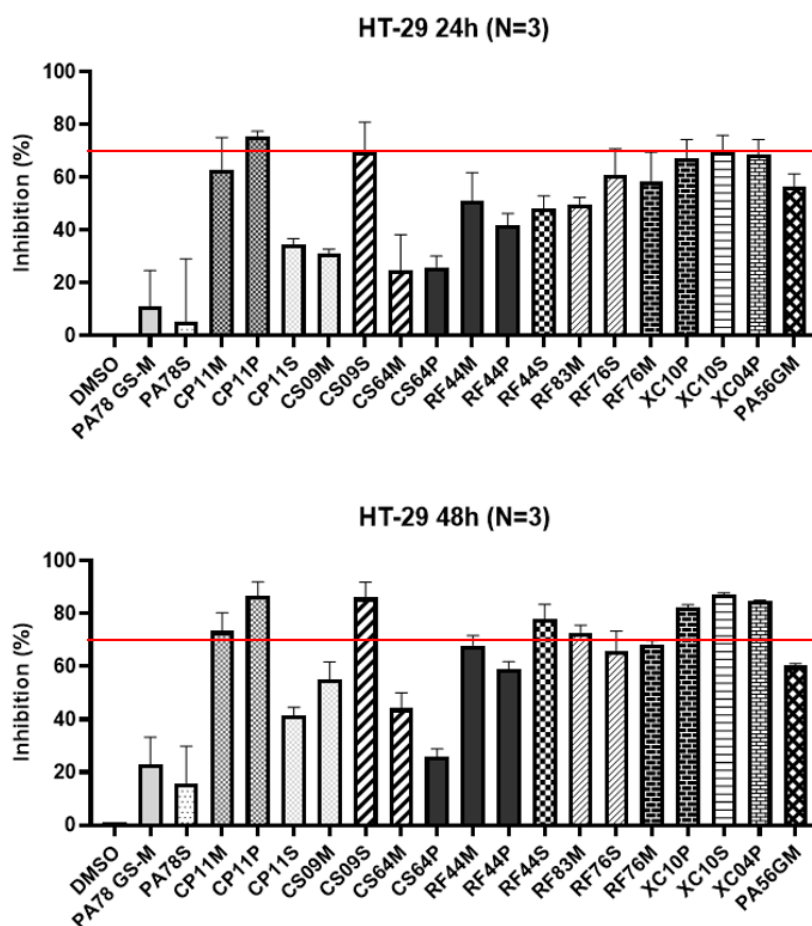


**Figure 44 : Avancement de la croissance des champignons endolichéniques dans une culture à faible échelle.**

### III.1.4. Criblage et évaluation de l'activité antiproliférative

Ce travail de thèse a commencé par un criblage des extraits issus de cultures à faible échelle *in vitro* sur les cellules HT-29. Cette étape préliminaire est cruciale pour identifier les extraits les plus pertinents avant de poursuivre avec des analyses plus approfondies.

Un ensemble de 19 extraits bruts de champignons endolichéniques provenant de 5 lichens différents a été criblé à 50 µg/mL sur des cellules HT-29. Cela a été réalisé à l'aide du test MTT (Freimoser et al., 1999) à 24 et 48 h pour déterminer le pourcentage d'inhibition de prolifération cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport aux cellules témoins (non traitées) (Figure 45). On note que les pourcentages d'inhibition s'améliorent en augmentant le temps d'interaction entre les extraits et les cellules HT-29. Les 8 extraits CP11M, P, CS09S, RF44S, RF83M, XC10P, S et XC04P ont un pourcentage d'inhibition  $\geq 70\%$  à 48 h. 5 extraits CS09M, RF44M, P, RF76S et PA56GM montrent une inhibition modérée entre 50 et 70%. Enfin, 5 extraits PA78GS, S, CP11S et CS64M, P présentent des pourcentages d'inhibition  $< 50\%$  sur les cellules HT-29.



**Figure 45 :** Criblage d'un ensemble d'extraits de champignons endolichéniques sur les cellules HT-29.

Les 8 extraits franchissant le seuil d'inhibition de 70%, ainsi que 10 extraits criblés dans des travaux antérieurs du laboratoire, ont été sélectionnés pour déterminer leurs valeurs de  $CI_{50}$  sur les cellules HT-29 à 24 et 48 h (Tableau 3).

**Tableau 5 : Résumé des  $CI_{50}$  des extraits de champignons endolichéniques sur les cellules HT-29.**

Extraits	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 24 h	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 48 h
<b>PA08 S</b>	<b>1,70 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>2,10 <math>\pm</math> 0,5</b>
PA08 M	> 50	33,90 $\pm$ 3,5
PA08 P	31,70 $\pm$ 5	14,20 $\pm$ 1,4
PA32 M	> 70	55,50 $\pm$ 1,5
PA56 M	19,20 $\pm$ 3,6	10,90 $\pm$ 0,7
PA56 GM	64,70 $\pm$ 11	41,60 $\pm$ 0,7
PA78 S	> 50	> 50
PA78 M	> 50	> 50
CP11 M	> 50	40,40 $\pm$ 8,5
CP11 P	19 $\pm$ 6	13,30 $\pm$ 0,3
CS09 S	30,80 $\pm$ 7,4	21,30 $\pm$ 3,9
RF37 P	> 50	> 50
RF44 S	> 30	23,90 $\pm$ 1,0
RF44 M	> 30	17,80 $\pm$ 2,6
RF83 M	> 50	22,80 $\pm$ 0,0
<b>XC04 P</b>	<b>24,30 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>8,50 <math>\pm</math> 1,2</b>
XC10 S	17 $\pm$ 3	16,60 $\pm$ 2,4
XC10 P	23 $\pm$ 8	14,40 $\pm$ 6,6

Les valeurs des concentrations inhibitrices de ces extraits ont été évaluées en utilisant au moins six concentrations différentes. Les  $CI_{50}$  ont pu être déterminées pour 9 extraits à 24 h, tandis qu'à 48 h, les  $CI_{50}$  ont été établies pour 16 extraits, démontrant un effet dépendant du temps sur les cellules HT-29.

Conformément aux normes de l'Institut national du cancer des États-Unis (NCI), un extrait de produits naturels est généralement considéré comme ayant une activité cytotoxique *in vitro* si la valeur de son  $CI_{50}$  est  $\leq 20 \mu\text{g/mL}$  (Boik, 2001) (Tran et al., 2022). Les résultats ont révélé que quinze extraits présentaient des valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 2 et 55,50  $\mu\text{g/mL}$  à 48 heures, dont huit extraits actifs présentant une forte cytotoxicité avec des valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 2 et 17,80  $\mu\text{g/mL}$  (Tableau 3).

Les extraits ayant une activité faible ont des valeurs de  $CI_{50}$  entre 20 et 57  $\mu\text{g/mL}$  et représentent 60% des extraits cultivés sur milieux MEA. Les extraits à forte activité ( $CI_{50} = 2,10$  à 17,80  $\mu\text{g/mL}$ ) sont cultivés dans les milieux MEA, SAB et PDA à 37,5%, 25% et 37,5% respectivement. Il ne semble pas y avoir de relation claire entre le milieu de culture et l'activité des extraits obtenus à partir de ces souches.

La souche PA08 a été cultivée sur trois milieux de culture différents (SAB, MEA et PDA), présente des activités biologiques distinctes avec des valeurs de  $CI_{50}$  allant de 1,7 à > 50  $\mu\text{g/mL}$ . Les différences d'activité observées reflètent une variation dans la production de métabolites secondaires bioactifs en fonction du milieu de culture utilisé. Le milieu SAB semble être le plus conforme au critère établi par le NCI avec des valeurs de  $CI_{50}$  de l'ordre de 2  $\mu\text{g/mL}$  à 24 h et 48 h. Il est aussi le plus favorable pour produire des métabolites actifs. Tandis que les milieux MEA et PDA sont moins efficaces, avec le milieu MEA étant particulièrement défavorable pour l'activité antiproliférative.

Enfin, bien que les huit extraits présentant une forte activité antiproliférative envers les cellules HT-29 méritent une investigation approfondie, ce projet de thèse se concentre sur les

extraits PA08 S et XC04 P, dont les  $CI_{50}$  sont respectivement de 2,10  $\mu\text{g/mL}$  et 8,50  $\mu\text{g/mL}$  à 48 h. Ces extraits ont été sélectionnés pour une analyse chimique et biologique approfondie afin d'identifier et d'isoler les molécules responsables de leur activité.

## III.2. Investigation chimique et biologique d'*Aspergillus* sp.

### III.2.1. Culture à faible échelle

Une culture à faible échelle a été effectuée afin d'obtenir un extrait brut pour les tests MTT afin d'évaluer l'activité de l'extrait sur les cellules HT-29.

Une pré-culture a été réalisée sur 4 boîtes de Petri pour permettre le démarrage ultérieur d'une culture à faible échelle, une fois la croissance fongique constatée au bout de 21 jours.

260 mL de milieu PDA ont été préparés et ajoutés dans 20 boîtes de Petri (90 mm) dans des conditions stériles, avec dépôt de morceaux de mycélium de *Aspergillus* sp. La croissance du champignon a été suivie régulièrement. Après 21 jours, le mycélium a envahi la surface des boîtes (Figure 46), ce qui a permis de réaliser trois extractions successives à l'AcOEt et d'obtenir un extrait brut (XC04 P) de 280,8 mg.



**Figure 46** : Exemple de boîte de Petri en fin de croissance d'*Aspergillus* sp. dans la culture à faible échelle.

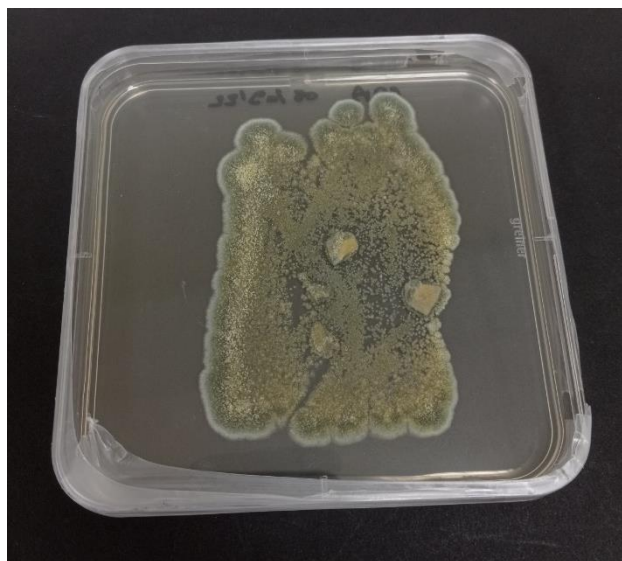
### III.2.2. Culture à grande échelle

Pour obtenir suffisamment de matériel fongique en vue d'identifier et d'isoler les molécules responsables de l'activité antiproliférative de l'extrait brut, une culture à grande échelle a été mise en place.

Une pré-culture a été initiée avec quatre boîtes de Petri de 90 mm, fournissant suffisamment de gélose enrichie en mycélium pour effectuer la culture à grande échelle.

Compte tenu du rendement obtenu lors de la culture à faible échelle (280,8 mg par 260 mL), 5 litres de milieu PDA ont été préparés pour obtenir environ 5 g d'extrait, stérilisés et répartis dans des boîtes de Petri de 120 mm. Des morceaux de mycélium d'*Aspergillus* sp. issus de la pré-culture ont été déposés dans ces boîtes. Un suivi visuel de la croissance des champignons a été effectué (Figure 47), permettant de procéder à l'extraction après 21 jours.

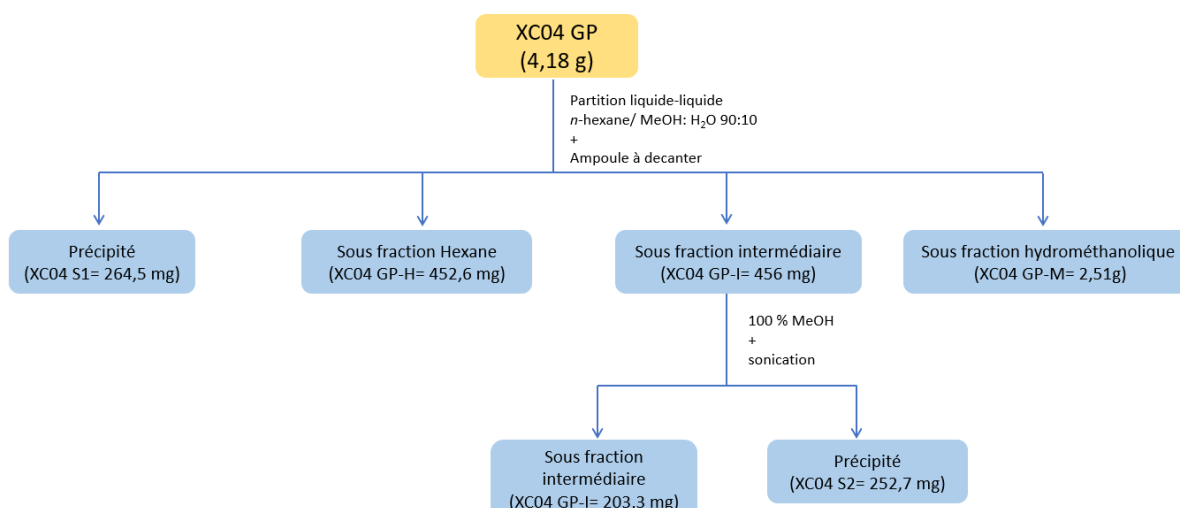
L'extraction, a été réalisée trois fois avec 100 % d'acétate d'éthyle et a permis d'obtenir un extrait brut (XC04 GP) de 4,18 g.



**Figure 47** : Exemple de boîte de Petri durant la croissance fongique d'*Aspergillus* sp. dans la culture à grande échelle.

### III.2.2.1. Partition liquide-liquide de l'extrait brut XC04 GP

Cette partition a été effectuée dans le but de délipider l'extrait et de séparer les composés peu polaires de plus polaires. La solubilisation de l'extrait brut issu de la culture à grande échelle XC04 GP dans le mélange hydroalcoolique (90 :10) permet de récupérer un premier précipité (XC04 GP-S1) après filtration. L'ajout de *n*-hexane dans l'ampoule à décanter forme 3 phase : une sous fraction hydrométhanolique (XC04 GP-M) avec des molécules polaires, une sous fraction hexane (XC04 GP-H) avec des molécules apolaires et une sous fraction qui se positionne entre les deux (XC04 GP-I). Cette dernière, contient des molécules polaires ou amphiphiles donc un lavage à 100% de MeOH, et une étape de sonication suivie d'une filtration pour séparer un second précipité (XC04 GP-S2) a été effectuée (Figure 48).



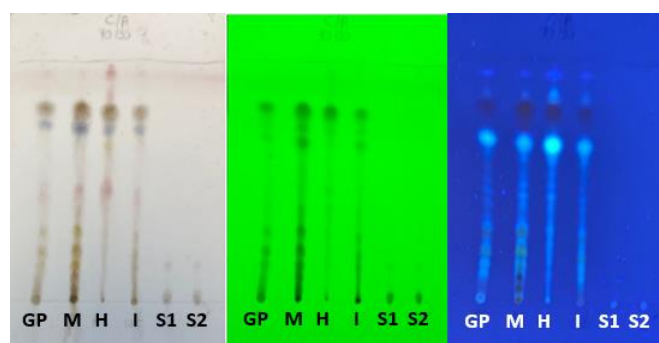
**Figure 48** : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait brut XC04 GP.

### III.2.3. Profilage chimique des sous fractions d'*Aspergillus* sp.

#### III.2.3.1. CCM et HPLC-DAD-DEDL

Les profils de CCM suivants montrent l'extrait XC04 GP et ses sous fractions issues de la partition liquide-liquide. Les plaques CCM ont été observées sous lumière UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'ANS.

D'après les CCM (Figure 49-50), la partition a été efficace. On constate que XC04 GP-M reste complexe avec un profil similaire à XC04 GP, les sous fractions XC04 GP-H et XC04 GP-I apparaissent moins complexes et enfin les deux précipités présentent très peu de tâches. Les deux précipités n'ont pas le même profil en CCM, ils ont été traités séparément (Figure 50).

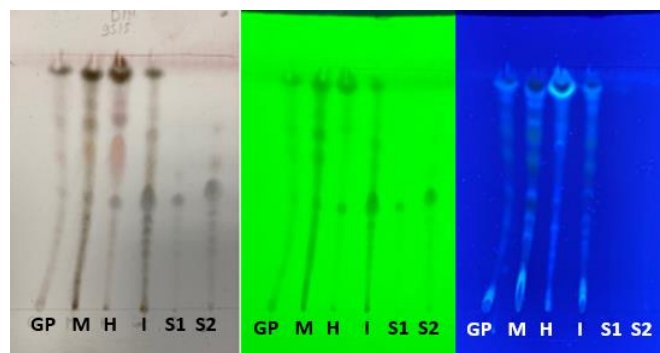


**Figure 49** : Analyse par CCM des fractions issues de la partition liquide-liquide de XC04 GP.

Eluant : C / A 70 : 30 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.





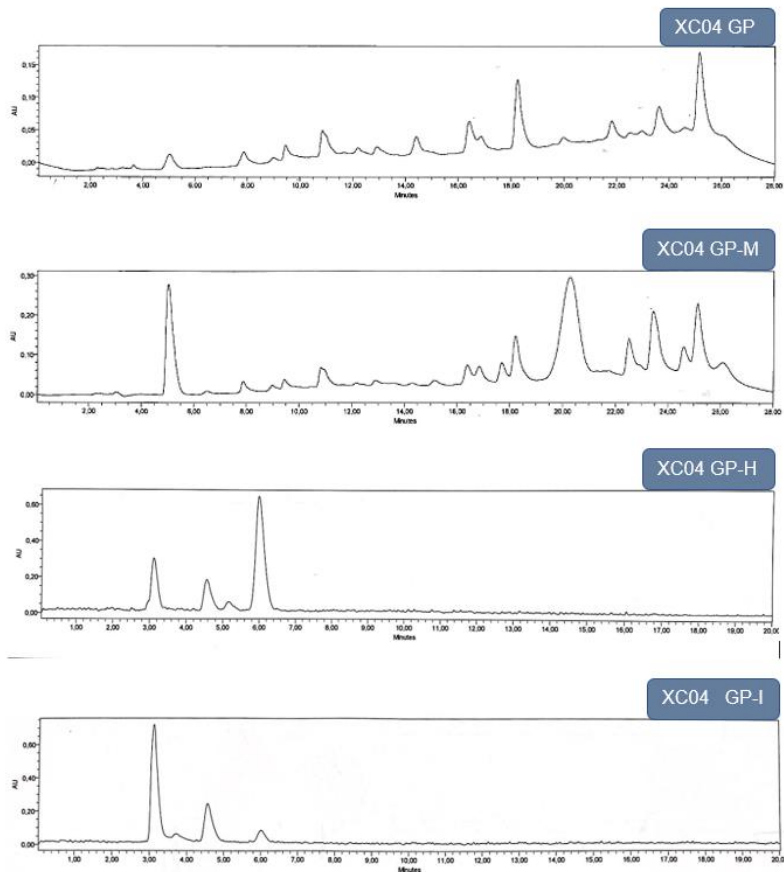
**Figure 50** : Analyse par CCM des fractions issues de la partition liquide-liquide de XC04 GP.

Eluant : Dichloromethane /Methanol 95 : 5 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

Les profils CLHP en phase inverse (C18) des sous fractions issues de XC04 GP sont plus ou moins similaires (Figure 51). Les chromatogrammes de XC04 GP et XC04 GP-M, présentent des similitudes par rapport au temps de rétention des pics avec une variation d'intensité. Certains pics s'intensifient dans XC04 GP-M, notamment les pics à  $T_R = 5,0$  ;  $20,2$  ;  $22,5$  ;  $23,4$  et  $25,1$  min.

Les chromatogrammes des sous fractions XC04 GP-H et XC04 GP-I sont également similaires, avec 3 pics majeurs mais d'intensités différentes. On constate que le pic à  $T_R = 3,1$  min est plus intense dans XC04 GP-I que dans XC04 GP- H, le pic à  $T_R = 6$  min est nettement moins intense dans XC04 GP-I que dans XC04 GP-H. Cependant le pic à  $T_R = 4,5$  min conserve la même intensité dans les deux sous fractions.

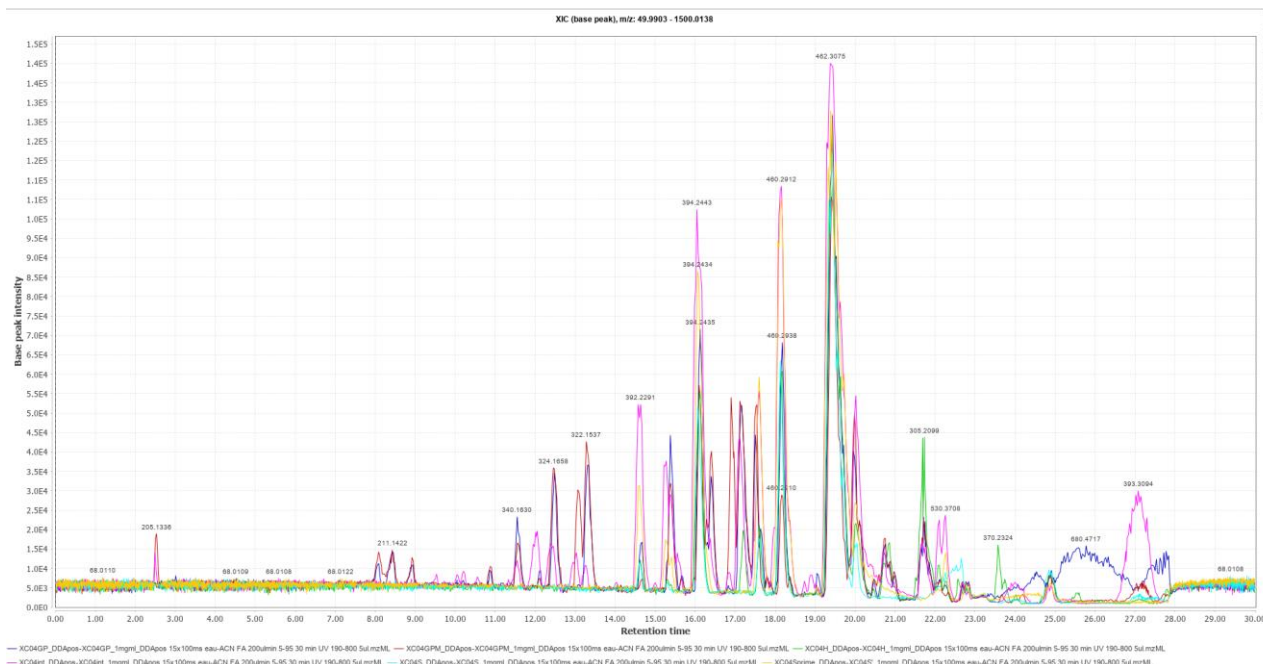


**Figure 51 : Profils chromatographiques de sous fractions issues de l'extrait brut XC04 GP obtenus par analyse CLHP-DAD (254 nm).**

### III.2.3.2. Profilage LC/MS-MS

Dans cette étude, l'approche guidée par spectrométrie de masse a également été utilisée pour analyser et annoter les molécules composant les extraits sur la base de la comparaison de leurs spectres  $MS^2$  avec ceux répertoriés dans les bases de données de substances naturelles. L'extrait à grande échelle XC04 GP, ainsi que les sous fractions XC04 GP-H, XC04 GP-M, XC04 GP-I, XC04 GP-S1 et XC04 GP-S2 ont été analysés par HPLC-ESI (+)-MS/MS (Figure 52).



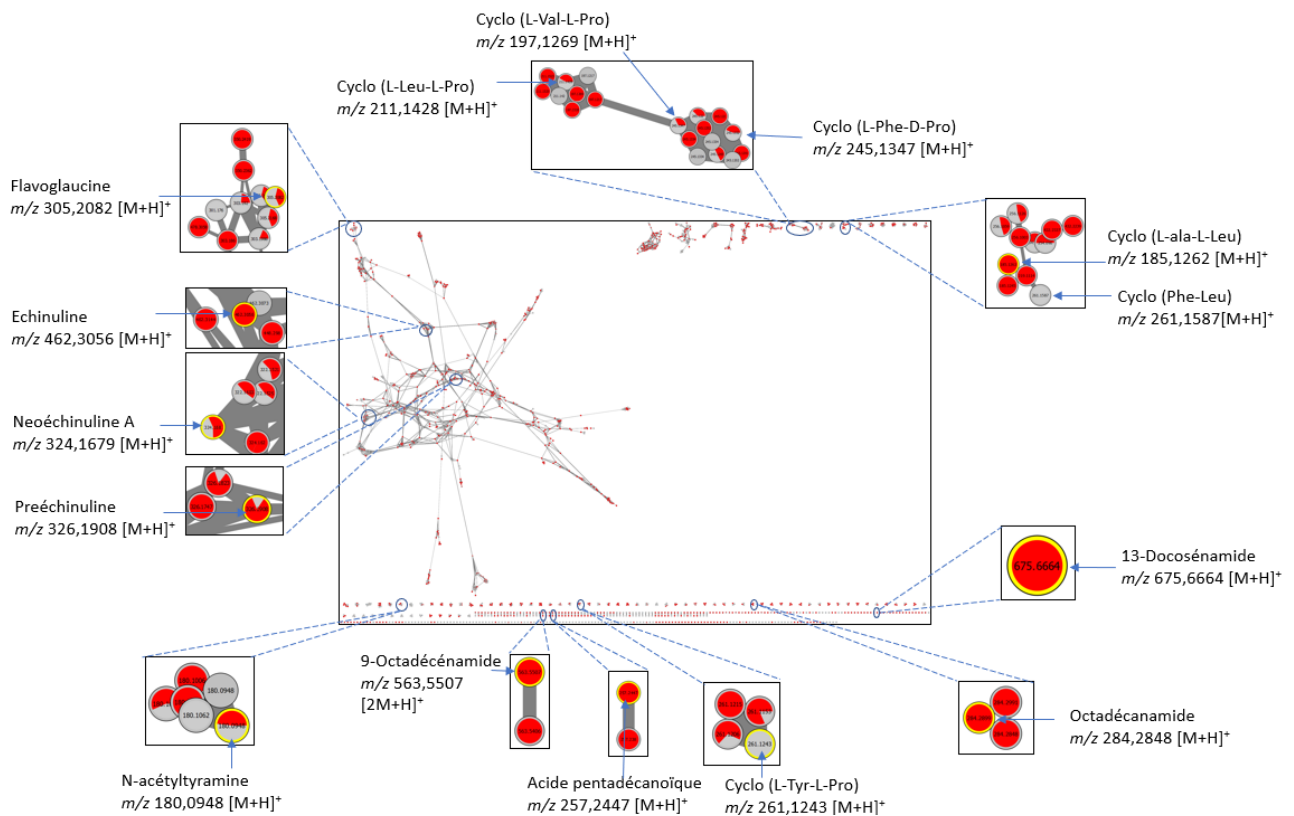


**Figure 52 : Comparaison de profil chromatographique en LC/MS-MS des sous fractions de l'extrait XC04 GP par MZmine2.53 .**

Le traitement des fichiers issus des injections LC/MS-MS a permis de visualiser les profils chromatographiques de l'extrait et de ses sous-fractions à l'aide du logiciel MZmine 2.53. En général, les signaux sont concentrés dans l'intervalle [11-22 min] avec une similarité entre les TIC des échantillons analysés. L'analyse a également révélé des signaux intenses aux  $m/z$  : 462,3075 ; 460,2912 ; 305,2099 ; 394,2443 ; 392,2291 et 322,1537. Ils correspondent aux molécules majoritaires dans les échantillons injectés.

### III.2.3.3. Réseaux moléculaires

Les données de LC/MS-MS de XC04 GP et ses sous fractions ont été utilisées pour générer des réseaux moléculaires (Figure 53).



**Figure 53 : Les réseaux moléculaires des extraits d'*Aspergillus* sp.**

Rouge (actifs ; XC04 GP, XC04 GP-I, XC04 GP-S et XC04 GP-S') et en gris (peu actives ; XC04 GP-M et XC04 GP-H).

Dans cette analyse, 91 hits ont été trouvés ce qui correspond à 20 molécules annotées avec un score de cosine  $\geq 0,7$  et un minimum de 4 fragments communs (Tableau 5). Les molécules annotées peuvent être classées en plusieurs catégories notamment des peptides cycliques, des acides gras et amides, des alcaloïdes et des amines aromatiques (Figure 53). Parmi les molécules détectées, l'échinuline à  $m/z$  462,3056 [M+H]<sup>+</sup> avec un cosine de 0,7 repérée dans les fractions actives et la flavoglaucine à  $m/z$  305,2082 [M+H]<sup>+</sup> avec un cosine de 0,84 repérée à la fois dans les fractions actives et non actives, donnant des indications sur le processus de purification.

**Tableau 6 : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des extraits d' *Aspergillus* sp.**

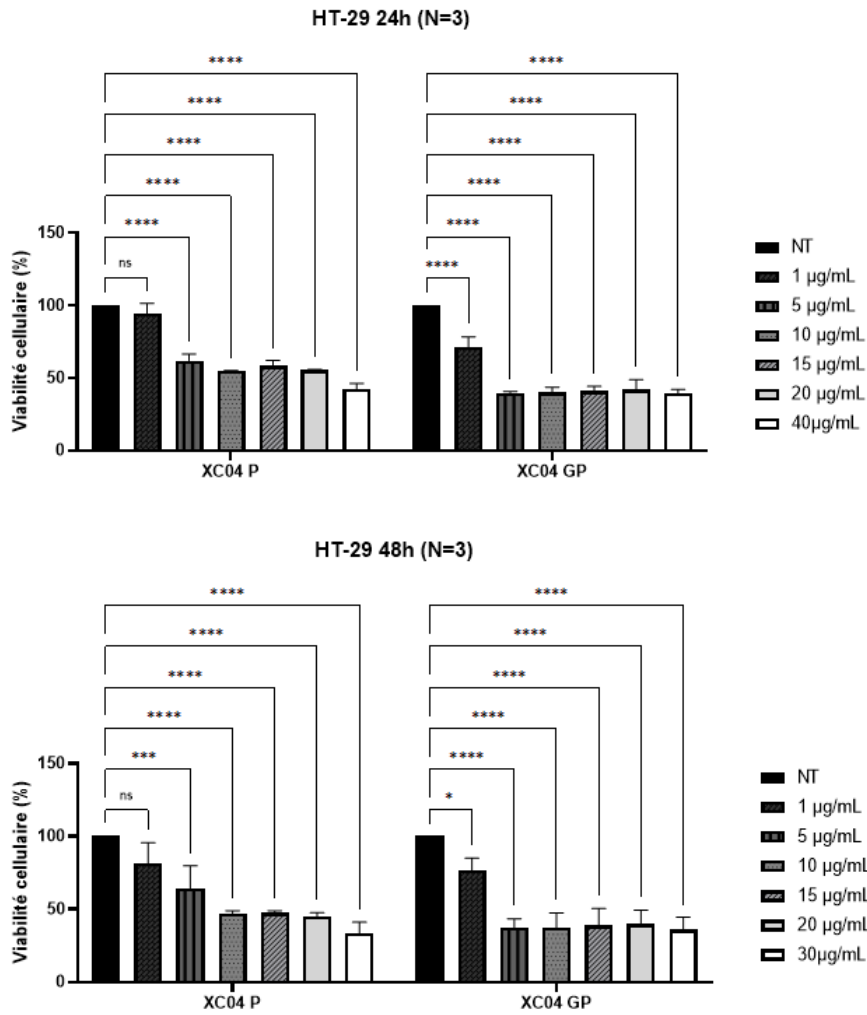
<b>m/z [M+H]<sup>+</sup> parent</b>	<b>Formule moléculaire [M]</b>	<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Annotation</b>	<b>Score cosine</b>	<b>Base de données</b>
180,0948	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	7,14	N-acétyltyramine	0,84	Massbank/GNPS
185,1262	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7,30	Cyclo (L-ala-L-Leu)	0,83	GNPS
197,1269	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,79	Cyclo (L-Val-L-Pro)	0,95	
211,1428	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,56	Cyclo (L-Leu-L-Pro)	0,87	NIH
245,1347	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,49	Cyclo (L-Phe-D-Pro)	0,96	GNPS
252,1495	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	22,63	UNPD182389	0,83	Massbank
257,2447	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	21,11	Acide pentadécanoïque	0,83	GNPS
261,1587	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10,56	Cyclo (Phe-Leu)	0,89	
261,1243	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6,62	Cyclo (L-Tyr-L-Pro)	0,87	NIST
284,2848	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO, [M+H] <sup>+</sup>	22,42	Octadécaneamide	0,80	GNPS
284,2899	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	22,42	Octadécaneamide	0,84	
305,2082	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	21,70	Flavoglucine	0,84	NIH
324,1679	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	12,44	Neoéchinuline A	0,84	GNPS
326,1908	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11,60	Preéchinuline	0,82	NIH
445,2584	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	22,80	UNPD10359	0,86	NIH/GNPS
462,3056	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	21,85	Echinuline	0,80	GNPS
532,2541	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	24,86	UNPD103616	0,78	
563,5507	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO, [2M+H] <sup>+</sup>	18,89	9-Octadécaneamide	0,80	
588,3380	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>11</sub> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	22,86	/	0,79	NIH
675,6664	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO; [2M+H] <sup>+</sup>	25,94	13-Docoséneamide	0,81	GNPS

### III.2.4. Evaluation des activités biologiques des extraits (XC04 P et XC04 GP) et ses sous fractions

#### III.2.4.1. Activités antiproliférative *in vitro*

#### III.2.4.2. Effet de XC04 P et XC04 GP sur différentes lignées cellulaires

L'activité antiproliférative de deux extraits XC04 P et XC04 GP a été évaluée sur deux lignées cellulaires cancéreuses, l'une colorectal (HT-29) et l'autre issue d'un cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231) (Figures 54-55). La viabilité des cellules a été déterminée à 24 et 48 h après traitement à l'aide du test MTT (Freimoser et al., 1999), une comparaison a été effectuée avec celle de cellules témoins dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins, ce qui a permis de déterminer les valeurs des concentrations inhibant 50 % de la croissance cellulaire (C<sub>150</sub>) (Tableau 6).

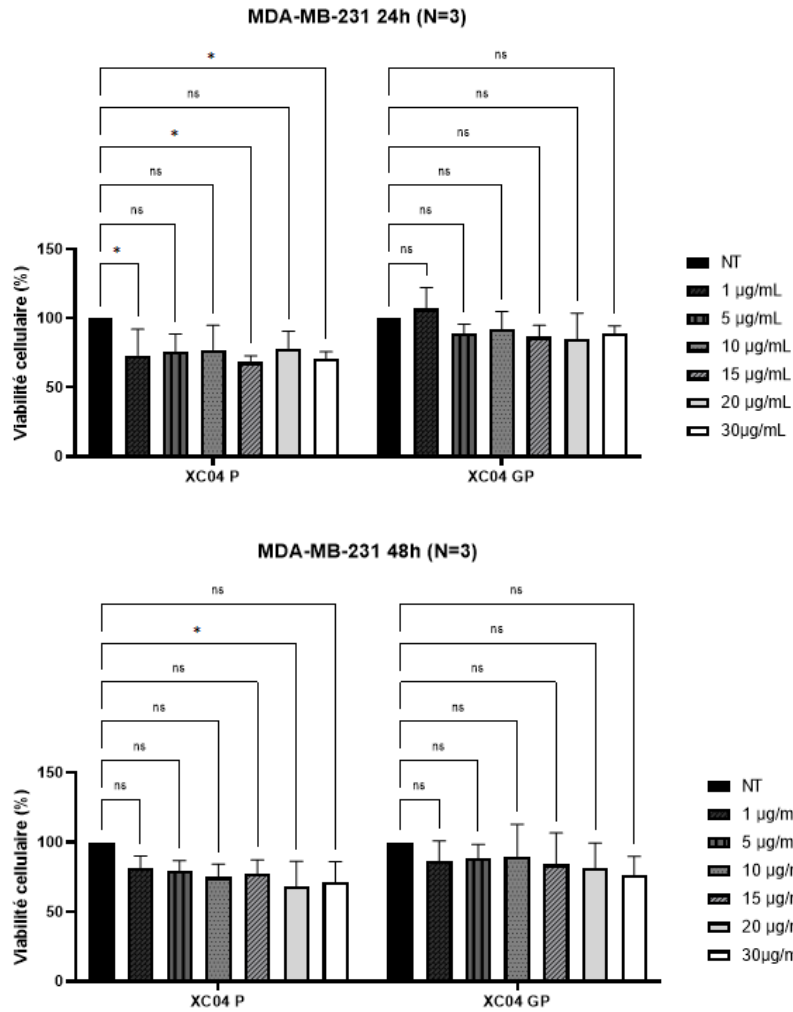


**Figure 54 : Pourcentage de viabilité des cellules HT-29.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Les résultats montrent que les deux extraits, XC04 P et XC04 GP, réduisent significativement la viabilité des cellules HT-29 de manière dose-dépendante à 24 et 48 h. Cependant, XC04GP semble être plus efficace que XC04P dès 24 h, surtout à des concentrations plus élevées, où la viabilité cellulaire chute de manière plus marquée.

L'activité antiproliférative a été également testée sur les cellules MDA-MB-231 (Figure 55)

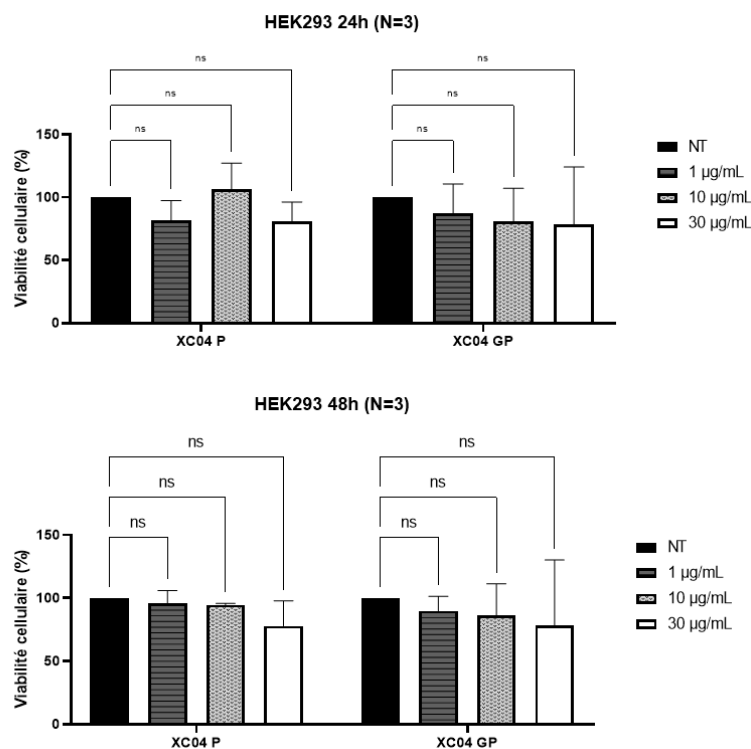


**Figure 55 : Pourcentage de viabilité des cellules MDA-MB-231.**

NT : non traitée, NS : non significatif ; \*  $p < 0,05$

Les extraits XC04 P et XC04 GP n'ont pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules MDA-MB-231. Ces résultats suggèrent une faible cytotoxicité de ces extraits sur ces cellules dans les conditions testées.

Afin d'évaluer la toxicité de ces extraits sur des cellules non cancéreuses, une lignée cellulaire de rein embryonnaire humain (HEK293) a été utilisée (Figure 56)



**Figure 56 : Pourcentage de viabilité des cellules HEK293.**

NT : non traitée, NS : non significatif

Les résultats obtenus après traitement avec les extraits XC04 P et XC04 GP ne montrent pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules HEK293. Cela suggère que ces extraits ne sont pas cytotoxiques pour les cellules saines.

Les  $CI_{50}$  des extraits XC04 P et XC04 GP sur les trois lignées cellulaires ont été déterminées. Le tableau ci-dessous résume ces activités.

**Tableau 7 :  $CI_{50}$  (en µg/mL) obtenues pour les extraits *Aspergillus* sp. sur 3 lignées cellulaires.**

Lignées cellulaires	Extraits	$CI_{50}$ µg/mL 24 h	$CI_{50}$ µg/mL 48 h
<b>HT-29</b>	XC04 P	24,30 ± 1,4	8,50 ± 1,2
	XC04 GP	2,90 ± 0,4	3,20 ± 0,4
<b>MDA-MB-231</b>	XC04 P	> 30	> 30
	XC04 GP	> 30	> 30
<b>HEK</b>	XC04 P	> 30	> 30
	XC04 GP	> 30	> 30

Les deux extraits montrent une activité sur la lignée cellulaire HT-29, mais la valeur de  $CI_{50}$  du XC04 GP est nettement meilleure dès 24 h à 2,90 µg/mL par rapport au XC04 P à 24,30 µg/mL. Cette activité est supérieure à 48 h pour l'extrait XC04 P avec une  $CI_{50}$  à 8,50 µg/mL, ce qui permet de déduire un effet lié au temps d'exposition des cellules au traitement.

En revanche, les extraits XC04 P et XC04 GP n'affectent pas la prolifération des cellules MDA-MB-231, même à la concentration maximale testée (30 µg/mL), suggérant une sélectivité potentielle de l'activité cytotoxique des extraits en fonction du type cellulaire.

La prolifération des cellules HEK293, n'est pas impactée par les traitements, suggérant que les deux extraits ne sont pas toxiques pour les cellules non cancéreuses, ce qui est un résultat prometteur.

### III.2.4.3. Test de l'activité antiproliférative des sous fractions de XC04 GP sur les cellules HT-29

Une étape importante de l'approche bio-guidée consiste à déterminer l'efficacité du traitement avec les sous fractions issues de XC04 GP (Tableau 7), ainsi la viabilité des cellules HT-29 a été évaluée. Les résultats du test MTT sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 8 :  $CI_{50}$  (en  $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues pour l'extrait XC04 GP et les sous fractions sur les cellules HT-29.**

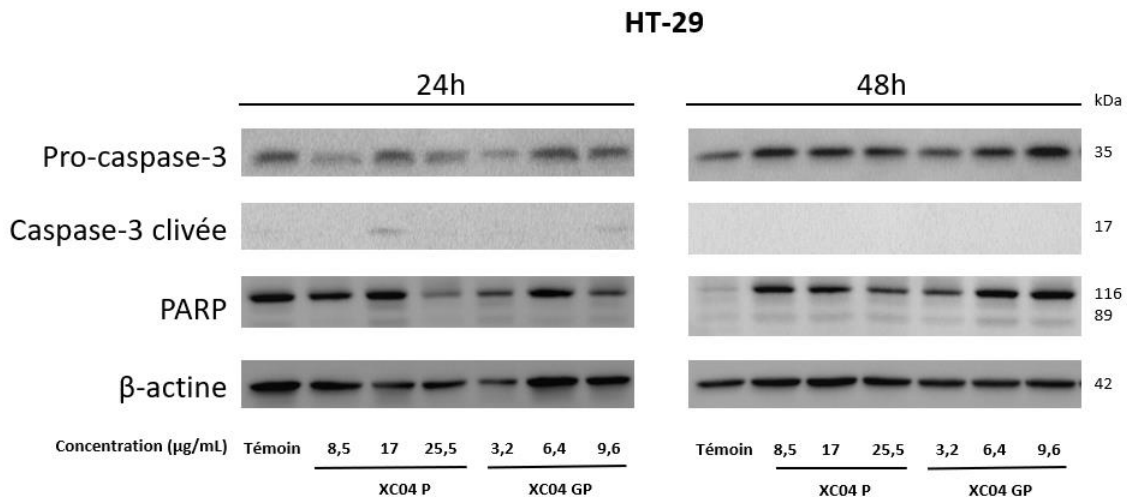
<i>Extraits/ sous Fractions</i>	<i><math>CI_{50}</math> <math>\mu\text{g/mL}</math> 24 h</i>	<i><math>CI_{50}</math> <math>\mu\text{g/mL}</math> 48 h</i>
<i>XC04 GP</i>	$2,90 \pm 0,4$	$3,20 \pm 0,4$
<i>XC04 GP-H</i>	$39,50 \pm 6,4$	$19,80 \pm 1,9$
<i>XC04 GP-M</i>	$27,90 \pm 3,6$	$36,90 \pm 3,4$
<i>XC04 GP-I</i>	$4,80 \pm 1,1$	$1,80 \pm 0,3$
<i>XC04 GP-S1</i>	$5,10 \pm 2,1$	$2,90 \pm 0,6$
<i>XC04 GP-S2</i>	$0,90 \pm 0,6$	$0,80 \pm 1$

Les résultats du test MTT montrent que l'activité est préservée à la fois dans XC04 GP-S1, XC04 GP-S2 et XC04 GP-I. En revanche, XC04 GP-H et XC04 GP-M montrent une activité modérée par rapport à XC04 GP. Ceci confirme l'importance de la partition liquide-liquide pour séparer les molécules et concentrer l'activité dans certaines sous fractions. L'activité des deux précipités reste nettement différente à 24 et 48 h, même si leurs profils CCM donnent une impression de similitude. Ceci confirme la présence de métabolites actifs en très faibles quantités, difficilement détectables par CCM.

La sous-fraction XC04 GP-I montre une activité intéressante comparée à XC04 GP-H, ce qui contraste avec leurs profils HPLC-DAD, qui sont pourtant assez similaires.

#### III.2.4.3.1. Analyse de l'expression protéique des marqueurs apoptotiques par western blot

Afin de vérifier si la diminution de la viabilité cellulaire est associée à une induction de l'apoptose, une analyse par Western blot de l'expression des marqueurs de la voie apoptotique a été réalisée sur des cellules HT-29 traitées avec XC04 P et XC04 GP. L'activation de la procaspase 3 et le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) ont été observés après 24 et 48 h de traitement à différentes concentrations ( $CI_{50}$ ,  $CI_{50} \times 2$  et  $CI_{50} \times 3$ ) (Figure 57).



**Figure 57 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par XC04 P et XC04 GP (Western blot).**

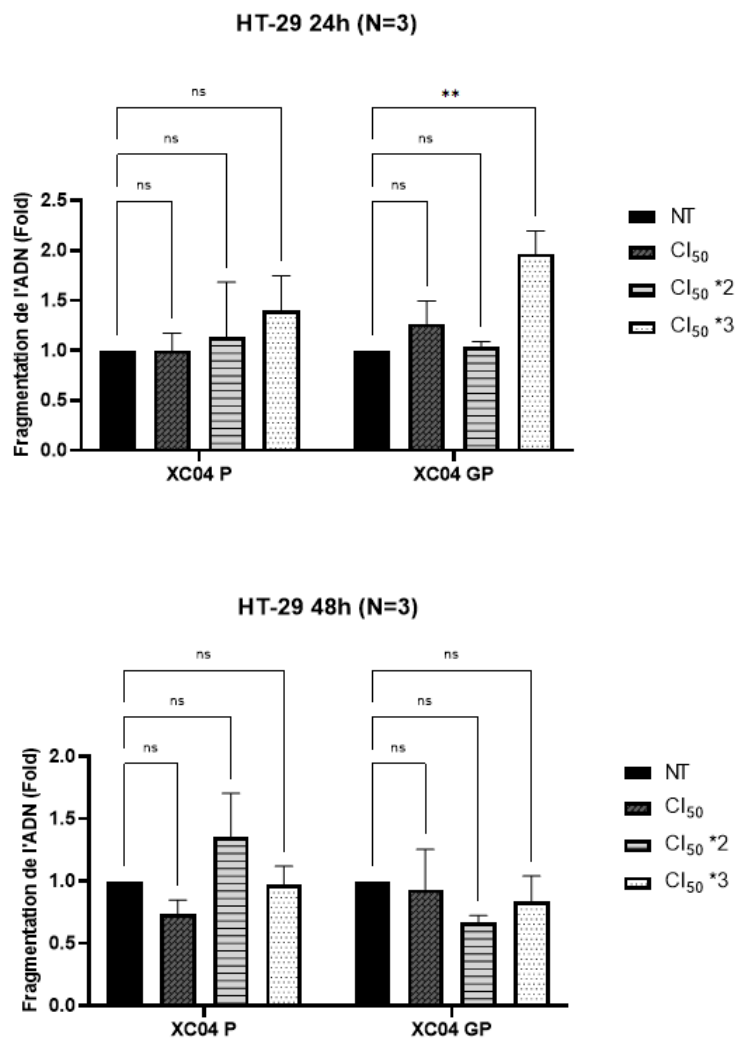
La caspase-3 est une protéase clé dans la voie apoptotique, jouant un rôle crucial dans l'exécution de l'apoptose. Son activation implique la conversion de la procaspase 3 en sa forme active par clivage protéolytique. A 24 h on remarque l'apparition de la caspase-3 clivée après traitement à 25,50  $\mu\text{g/mL}$  et 9,60  $\mu\text{g/mL}$  par l'extrait XC04 P et XC04 GP respectivement. Cela s'explique par une induction d'apoptose dès 24 h et elle est dose dépendante. Ces résultats ne sont pas confirmés à 48 h.

La PARP est une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité génomique. Pendant l'apoptose, la PARP est clivée par la caspase-3, ce qui inhibe sa fonction de réparation de l'ADN et contribue à la progression de l'apoptose. A 24 h on voit une légère apparition du fragment clivée de la PARP à 89 KDa après traitement à 25,50  $\mu\text{g/mL}$  et 9,60  $\mu\text{g/mL}$  par XC04 P et XC04 GP respectivement (Figure 57). En revanche l'induction de l'apoptose à 48 h est très faible comme le suggère l'absence significative du fragment clivée à la plupart des concentrations testées. Ces résultats doivent être complémenter par d'autres tests avec des concentrations plus élevées des deux extraits afin de montrer une induction de l'apoptose significative à 24 et 48 h.

### III.2.4.3.2. Induction de la fragmentation d'ADN

Le kit de fragmentation de l'ADN « Cell Death Elisa<sup>PLUS</sup> » permet la quantification des fragments mono-oligo-nucléosomes dans la fraction cytoplasmique des cellules HT-29 lysées. La présence de ces fragments est un marqueur de la phase dite tardive de l'apoptose liée à la fragmentation du matériel génétique de la cellule. Le taux de fragmentation d'ADN est déterminé à 24 et 48 h après traitements et désigné par les valeurs de "Fold" qui indiquent l'augmentation relative de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules témoins (la valeur de référence est égale à 1) (Figure 58).





**Figure 58 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*\* p < 0,01

Les traitements avec XC04 P à des concentrations plus élevées (Cl<sub>50</sub>\*2 = 17 µg/mL, Cl<sub>50</sub>\*3 = 25,5 µg/mL) montrent une augmentation de la fragmentation de l'ADN à 24 h qui persiste à 48 h, suggérant un effet pro-apoptotique. Les traitements avec XC04 GP montrent une augmentation initiale de la fragmentation de l'ADN à 24 h, en particulier à des concentrations plus élevées (Cl<sub>50</sub>\*2 = 6,4 µg/mL, Cl<sub>50</sub>\*3 = 9,6 µg/mL), suivie d'une diminution significative à 48 h. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules survivantes après le traitement à 24 heures deviennent prédominantes, ce qui réduit la détection de la fragmentation de l'ADN. Cependant, il ne s'agit que d'une hypothèse, car les données disponibles doivent être complétées par d'autres tests.

En général, XC04 P semble avoir un effet plus marqué sur la fragmentation de l'ADN par rapport à XC04 GP. Ces observations complètent les résultats du western blot montrant l'activation de la caspase-3 et le clivage de PARP, confirmant ainsi l'induction de l'apoptose par XC04 P et, dans une moindre mesure, par XC04 GP à ces concentrations.

### III.2.5. Etude d'*Aspergillus* sp.

Après la partition liquide-liquide de l'extrait XC04 GP, les résultats biologiques ont montré qu'une activité antiproliférative était présente dans le XC04 GP-S2, XC04 GP-I et XC04 GP-S1 avec des  $CI_{50}$  de 0,80 ; 1,80 et 2,90  $\mu\text{g/mL}$  à 48 h respectivement. Cela a permis d'établir des priorités dans le processus de fractionnement.

#### III.2.5.1. Fractionnement et purification

Le précipité XC04 GP-S2 (252.7 mg) a été purifié par combinaison de CCM préparative et chromatographie sur silice conduisant à l'obtention de 3 produits purs (Figure 59).

La purification des produits est détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit (cf.IV.8.1).

Trois produits ont été isolés du précipité XC04 GP-S2 :

- **P1** : échinuline
- **P2** : 8-hydroxyéchinuline
- **P4** : tardioxopiperazine B

La sous fraction XC04 GP-I (156 mg) a été fractionnée sur une colonne de Séphadex® LH-20 conduisant à l'obtention de 10 fractions. La purification des fractions obtenues a été faite principalement par CLHP semi préparative, aboutissant à l'isolement de 2 autres produits (Figure 59).

Deux produits ont été isolés de la sous fraction XC04 GP-I :

- **P3** : didehydroéchinuline B
- **P5** : flavoglaucine

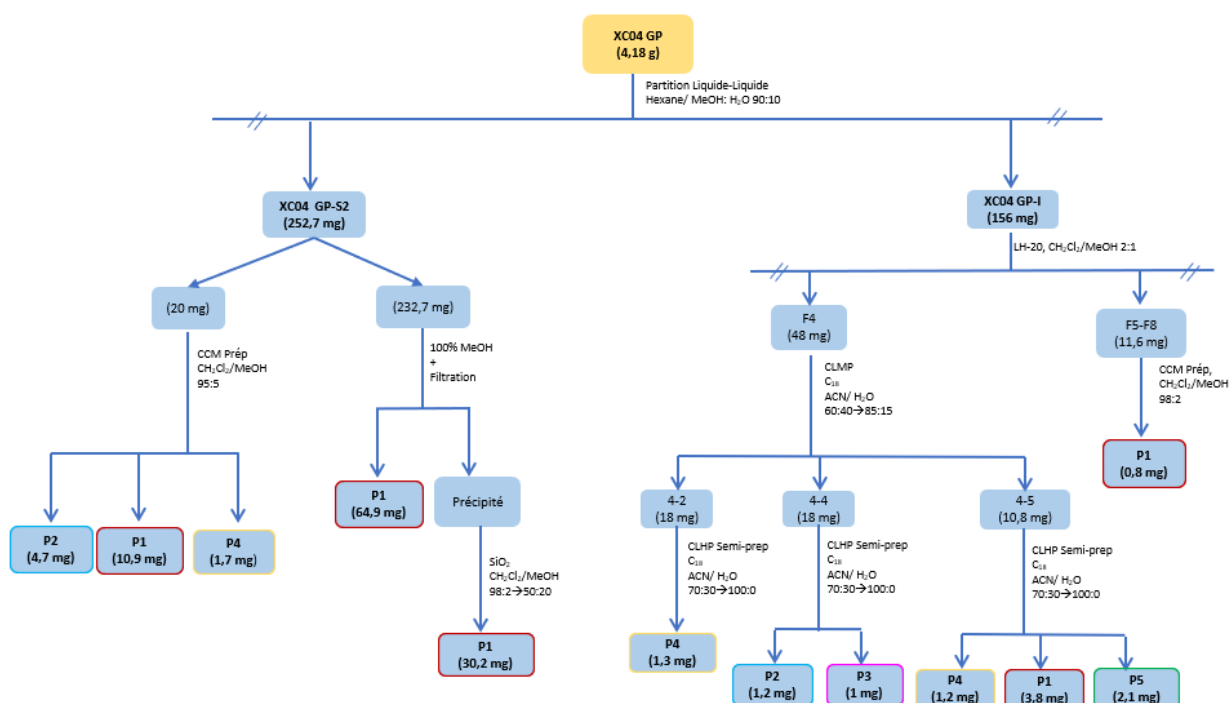


Figure 59 : Schéma récapitulatif du fractionnement de XC04 GP-S2 et XC04 GP-I.

### III.2.5.2. Détermination structurale des composés isolés

Les composés isolés de ces deux sous fractions actives sont tous de dérivés prénylés dont un aldéhyde-hydroquinone et quatre alcaloïdes indolo dicétopipérazines. Leur élucidation structurale s'est focalisée sur les données spectroscopiques [SM, RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC)]. Elle a été confirmée par les données de la littérature.

#### III.2.5.2.1. Composé P1

Le composé **P1** (110,6 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 462,3163 [M+H]<sup>+</sup> (calc pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_2$  : 462,3111) correspondant à la formule brute  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$ . Ce qui implique 12 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 1) met en évidence la présence de trois singulets élargis à 8,03 ; 6,30 et 5,66 ppm caractéristiques de trois groupes NH qui sont des protons échangeables. Les deux protons aromatiques H-6 et H-4 résonnent à 6,79 et 7,12 ppm respectivement sous forme des singulets élargis. Il a été observé la présence de cinq protons éthyléniques qui résonnent à 6,08 ; 5,33 ; 5,41 ; 5,14 ; 5,14 ppm.

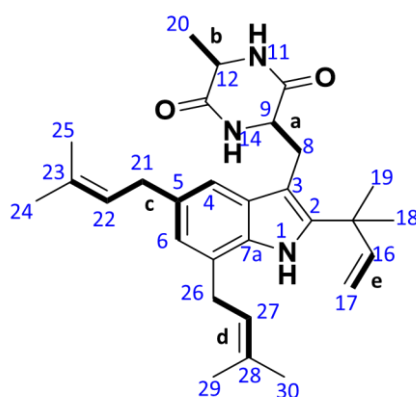
Plusieurs protons aliphatiques sont présents entre 4,40 et 3,14 ppm. Les singulets intenses à 1,49 ; 1,72 ; 1,79 et 1,85 ainsi que le doublet à 1,52 ppm correspondent à 7 groupes méthyles.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 1) montre la présence de 29 signaux.

L'analyse de spectres de RMN 2D a permis l'attribution des protons et des carbonés.

Le spectre HSQC (cf. Annexe 2) montre les corrélations directes entre le proton et le carbone. Il met en évidence la présence d'un  $\text{CH}_2$  portant des protons inéquivalents à 29,7 ppm (C-8) et a permis de déduire la présence de onze carbonés quaternaires à 39,2 ; 104,3 ; 123,6 ; 129,2 ; 133,1 ; 131,8 ; 132,5 ; 134,1 ; 141,6 ; 168,0 et 168,7 ppm. .

L'analyse du spectre COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (cf. Annexe 2) a permis de définir cinq sous-structures (a-e) (Figure 60). La sous structure **a** ( $\text{H}_2$ -8 et H-9) fait référence au couplage du proton à 4,39 ppm (H-9) avec les protons à 3,17 et 3,64 ppm ( $\text{H}_2$ -8) tandis que la **b** caractérise le couplage du proton à 4,08 ppm (H-12) avec le méthyl à 1,52 ppm ( $\text{CH}_3$ -20). La sous-structure **c** est définie par les corrélations du proton à 3,37 ppm (H-21) avec les protons à 1,72 (H-24) et 5,33 (H-22) ; H-4 avec H-6 et H-21. La sous structure **d** est définie par les corrélations du proton à 3,51 ppm (H-26) avec H-27,  $\text{CH}_3$ -29 et  $\text{CH}_3$ -30. La sous structure **e** correspond au couplage du proton à 6,08 ppm (H-16) avec ceux à 5,13 et 5,14 ppm ( $\text{CH}_2$ -17)



**Figure 60** : Structure plane de P1, corrélations COSY (en gras).

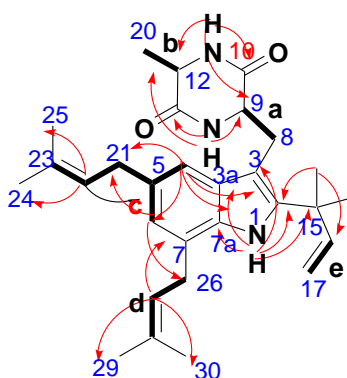
Ces sous-structures ont pu être reliées à l'aide des corrélations  $^2J$  et  $^3J$  observées sur le spectre HMBC (cf. Annexe 2). Les corrélations entre le proton à 8,03 ppm (NH-1) et les carbones à  $\delta$  141,6 (C-2), 104,3 (C-3), 129,2 (C-3a), 132,5 (C-7a) et 39,2 (C-15), celles de du proton H-4 avec les carbones C3, C3a, C6, C7a et C21 ont permis de construire le noyau indole. Le proton à 5,33 ppm (H-22) corrèle avec les carbones à  $\delta$  131,8 (C-5), C-21, C-24 et C-25 formant le premier groupement prényle. Les corrélations de H-27 à 5,41 ppm avec les carbones C-7, C-26, C-29 et C-30 et celles des protons à 1,79 ppm (CH<sub>3</sub>-29) avec C-28, C-27 et C-30 complète la sous-structure **d** qui constitue le deuxième groupement prényle.

Les corrélations du proton à 6,79 ppm (H-6) avec C-4 (115,2), C-7a (132,5), C-21(34,8) et C-26 (31,6) reliant ainsi les sous-structures **c** et **d** au noyau indole et confortent la position de ces deux groupements prényle en position en C-5 et C-7.

Les protons à 1,49 ppm (CH<sub>3</sub>-18) corrélient avec les carbones à 141,6 (C-2), 146,0 (C-16), 112,6 (C-17), 39,2 (C-15) et 28,2 (CH<sub>3</sub>-19) regroupant la sous-structure **e** avec C-15 qui forme le 3<sup>ème</sup> groupement prényle en position C-2 du noyau indolique.

Les sous-structures **a** et **b** sont liées au noyau dicétopipérazine par les corrélations du proton à  $\delta$  5,66 ppm (NH-11) avec les carbones à  $\delta$  54,8 (C-9), 168,7 (C-10) et 51,0 (C-12) et celle du proton à  $\delta$  6,30 ppm (NH-14) avec C-9, C-12 et C-13 ( $\delta$  168,0).

Les corrélations de H-8 ( $\delta$  3,64) avec C-2, C-3, C-3a et C-9 permettent de regrouper le noyau indole et le noyau dicétopipérazine. Ces différentes données ont conduit à déterminer la structure du composé **P1**.



**Figure 61** : Structure de l'échinuline, corrélations HMBC (flèche).

Après une comparaison avec la littérature (Talapatra et al., 2001), le composé **P1** a été identifié comme étant l'échinuline. Cette dicétopipérazine a été isolée à partir d'*Aspergillus echinatus* (Quilico et al., 1949). Par la suite, l'échinuline a été isolée à partir d'*Eurotium repens* cultivé sur un milieu MEA ou PDA (Podojil et al., 1978) (Gao et al., 2011). Elle a également été isolée à partir d'*Aspergillus chevalieri* cultivé sur un milieu à base d'extrait de levure et de saccharose (Ali et al., 1989).

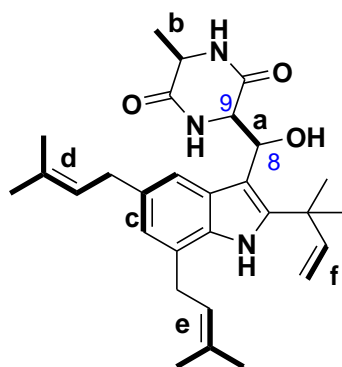
### III.2.5.2.2. Composé P2

Le composé **P2** (1,2 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 478,3012 [M+H]<sup>+</sup> (calc. pour C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> : 478,3060) correspondant à la formule brute C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> avec 12 degrés d'insaturation.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 3) montre des signaux semblables avec le spectre de l'échinuline (**P1**). Une disparition des protons a été observée à 3,17 et 3,64 ppm et l'apparition d'un doublet à 5,43 ppm et d'un singulet qui intègre pour un proton à 4,91 ppm.

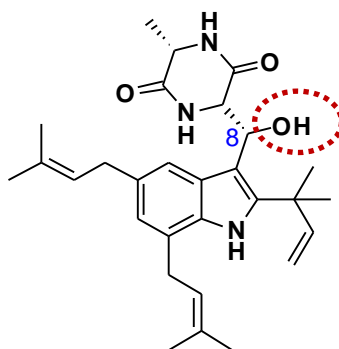
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 3) présente une similarité avec celui de l'échinuline avec la présence de vingt-neuf carbones.

L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 4) montre la présence de dix-huit carbones liés directement avec des protons et permet de déduire la présence de onze carbones quaternaires. Il montre une corrélation directe entre le proton à 5,44 ppm avec le carbone à 69,7 ppm suggérant la présence d'un oxyméthine. Six sous-structures (**a-f**) ont été mises en évidence par l'analyse du spectre COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) dont le couplage de ce proton (sous structure **a**) (Figure 62).



**Figure 62** : Structure plane de **P2**, corrélations COSY (en gras).

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 4) permet de voir les corrélations entre le proton du groupe hydroxyle (H-8a) avec les carbones à  $\delta$  106,4 (C-3) et 56,3 (C-9). Les corrélations des différents protons du noyau indolique et dicétopipérazine nous ont permis de construire et valider la structure du composé **P2** qui est un dérivé de l'échinuline et correspond au 8-hydroxyéchinuline (Figure 63).



**Figure 63** : Structure de 8-hydroxyéchinuline.

Une comparaison avec les données de la littérature a permis de confirmer la structure du composé **P2** qui a été récemment isolé à partir du champignon *Eurotium amstelodami* (S. Li et al., 2024).

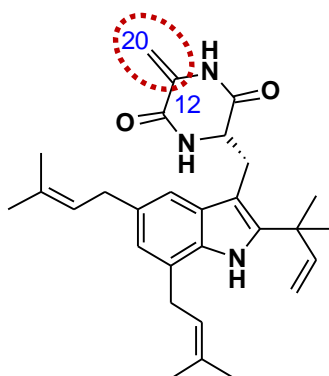
### III.2.5.2.1. Composé P3

Le composé **P3** (1 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 460,2964  $[M+H]^+$  (calc. Pour  $C_{29}H_{38}N_3O_2$  : 460,2955) correspondant à la formule brute  $C_{29}H_{37}N_3O_2$ . Il possède un degré d'insaturation de 14.

Son spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 5) montre des signaux comparables au spectre de l'échinuline avec la disparition du quadruplet à 4,08 ppm. La présence de deux singlets chacun intégrant pour 1 proton a été constatée à 4,80 et 5,54 ppm.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 5) permet de déceler une similarité avec celui de l'échinuline. Le spectre HSQC (cf. Annexe 6) permet de déduire un carbone quaternaire en plus ce qui fait douze carbones quaternaires et que les deux protons à 4,80 et 5,54 ppm sont portés par le carbone à 101,9 ppm, ce qui confirme dans un premier temps l'apparition d'une double liaison ou la présence d'un groupement éthylénique.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 6) permet d'établir les corrélations entre les deux protons à 4,80 et 5,54 ppm avec les carbones à  $\delta$  133,3 (C-12) et 158,0 (C-13) et celle du proton à  $\delta$  5,68 NH-11 avec les carbones C-10 (166,0) et C-12. La suite de l'analyse en HMBC montre une similarité entre les corrélations observées dans la structure de l'échinuline.



**Figure 64 : Structure de didydroéchinuline B.**

Après une comparaison avec les données de la littérature (Lv et al., 2022), le composé **P3** (Figure 64) a été identifié comme étant la 12-20 didydroéchinuline appelé aussi didydroéchinuline B. Il a été isolé à partir du champignon océanique *Penicillium griseofulvum*, du champignon *Aspergillus effuses* H1-1 et du champignon marin *Aspergillus chevalieri* cultivé également sur un milieu PDA cultivé sur un milieu PDA (Zhou et al., 2010) (Gao et al., 2013) (Lv et al., 2022).

### III.2.5.2.2. Composé P4

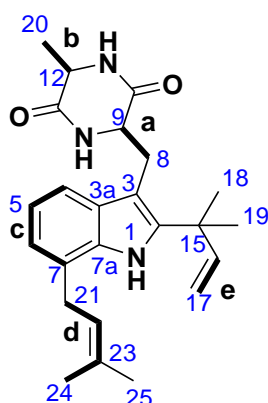
Le composé **P4** (4,2 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 394,2494  $[M+H]^+$  (calc. pour  $C_{24}H_{32}N_3O_2$  : 394,2487 ) correspondant à la formule brute  $C_{24}H_{31}N_3O_2$ , ce qui implique un degré d'insaturation de 11.

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 7) met en évidence la présence des protons aromatiques en position 7,34 ; 7,01 et 6,95 ppm. Par rapport au spectre proton de l'échinuline, la disparition des protons à  $\delta$  5,41 ; 3,37 et 1,72 a été observé. Ceci est dû à l'absence du

prényle en position 5 dans la structure de l'échinuline, ce qui correspondrait à un autre dérivé de l'échinuline.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 7) révèle seulement la présence de 24 carbones comme l'indique la formule brute. Le spectre HSQC permet de déduire la présence de neuf carbones quaternaires, ce qui confirme la disparition du groupement prényle (5 carbones) par rapport à l'échinuline.

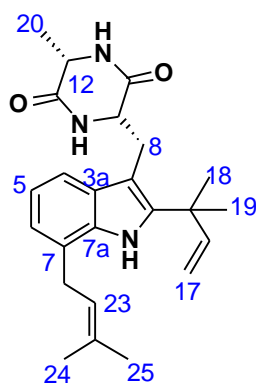
L'analyse du spectre COSY( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (cf. Annexe 8) permet de définir 5 sous structures **a** à **e** comme le montre la figure 65.



**Figure 65 : Structure plane de P4, corrélations COSY (en gras).**

L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 8) confirme la disparition des carbones C-21, C-22, C-24 et C-25.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 8) montre une corrélation entre le proton en position 5 et les carbones C-3a et C-7. Les résultats de ces analyses suggèrent qu'il s'agit d'une structure d'un autre dérivé de l'échinuline (Figure 66).



**Figure 66 : Structure de tardioxopiperazine B.**

Après une comparaison avec la littérature (Wohlgemuth et al., 2017), le composé **P4** a été identifié comme étant le tardioxopiperazine B. Il a été isolé pour la première fois en 1999 à partir d'un ascomycète, *Microascus tardifaciens*, cultivé sur du riz stérilisé (Fujimoto et al., 1999). Il a également été isolé à partir du champignon *Aspergillus amstelodami* cultivé sur des plaques de malt (Elsbaey et al., 2019).



### III.2.5.2.3. Composé P5

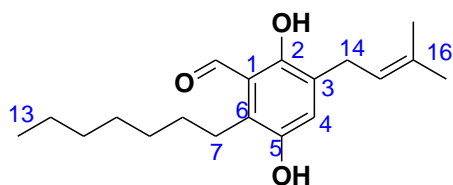
Le composé **P5** (2,1 mg) a été isolé sous forme d'une poudre jaune. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 305,2116  $[M+H]^+$  (calc. Pour  $C_{19}H_{29}O_3$  : 305,2109 ) correspondant à la formule brute  $C_{19}H_{28}O_3$ .

L'analyse du spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 9) montre la présence d'un signal caractéristique du proton de la fonction aldéhyde à 10,23 ppm. Le proton du groupe hydroxyle (OH) lié au cycle aromatique est attribué au signal à 11,90 ppm. Le déblindage de ce proton suggère une liaison hydrogène intramoléculaire avec le carbonyle. Le proton aromatique en position 4 résonne sous forme un singulet à 6,87 ppm. Le signal déblindé à 5,24 ppm est attribué au proton en position 15. Les deux protons du groupe  $CH_2$  en position 14 sont assignés pour le signal à 3,27 ppm. Les protons des trois groupes méthyle en position 13, 17 et 18 résonnent sous forme de singulets à 2,85 ; 1,68 et 1,74 ppm respectivement.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 9) montre la présence de 19 atomes de carbones. Le signal caractéristique du carbonyle de la fonction aldéhyde se trouve à 195,7 ppm.

Le spectre HSQC met en évidence la présence de corrélation de protons avec treize atomes de carbones. Ce qui a permis de déduire que cette molécule contient six carbones quaternaires à 117,5 ; 128,8 (C-3, C-6) ; 134,1 ; 145,2 et 156,0 ppm.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 10) montre une corrélation entre le proton du l'hydroxyle en position 2 et les carbones aromatiques C-1, C-2 et C-3. Le proton de la fonction aldéhyde en position 19 montre une corrélation avec les carbones aromatiques, C-1, C-2 et C-3. Le proton aromatique à  $\delta$  6.87 (H-4) corrèle avec les carbones C-2, C-3, C-5 et C1-5. Les corrélations du proton à 2,85 ppm (H-7) avec C-1, C-4, C-5, C-6 et C-8 a permis de relier la chaîne latérale à 7 atomes de carbone et le noyau aromatique et de conduire la structure du composé P5 (Figure 67).



**Figure 67 : Structure de Flavoglaucine.**

Après une comparaison avec les données de la littérature (Liang et al., 2018), le composé **P5** a été identifié comme étant la flavoglaucine. Elle a été isolée pour la première fois en 1949 à partir d'*Aspergillus glaucus* (Quilico et al., 1949), puis d'*Eurotium repens* S-669 cultivé sur milieu MEA (Podojil et al., 1978). La flavoglaucine est également connue pour être produite par plusieurs espèces du genre *Aspergillus*, comme *Aspergillus amstelodami* et *Aspergillus calidoustus*, cultivées sur un milieu PDA (Fathallah et al., 2019) (Slack et al., 2009).

### III.2.5.2.4. Voies de biosynthèse de l'échinuline et de certains de ses dérivés

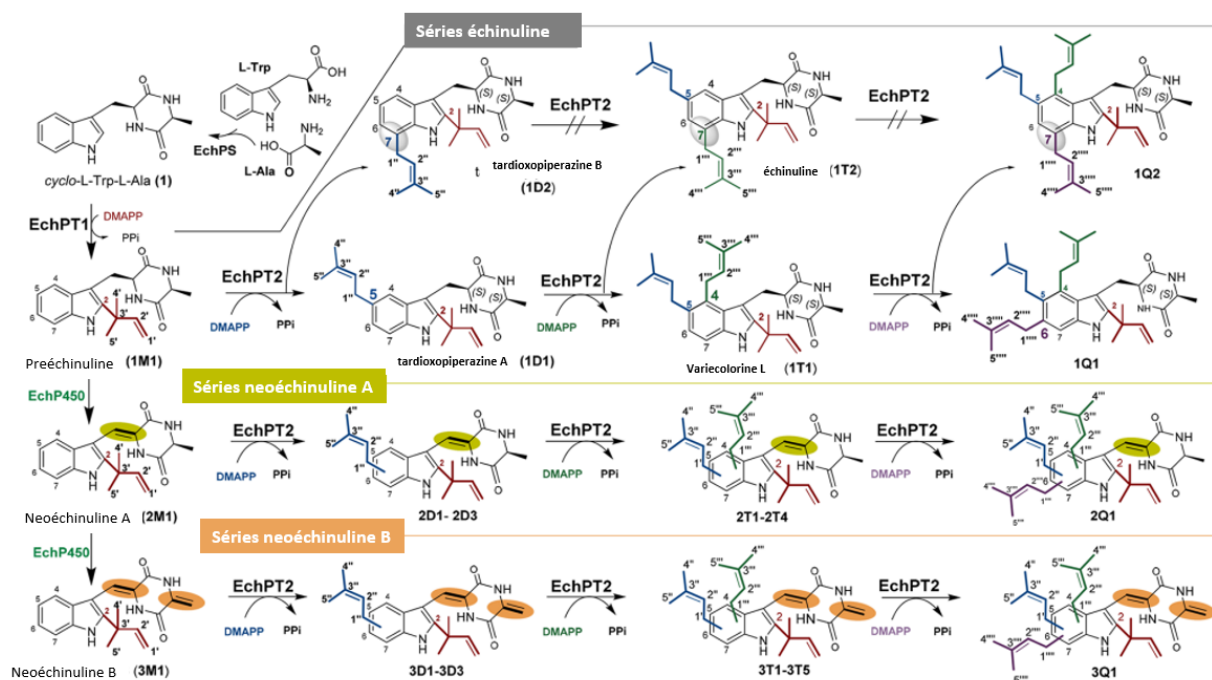
Les alcaloïdes indolo dicétopipérazines, tels que l'échinuline (**P1**) et ses dérivés, sont des molécules très répandues dans les champignons, notamment dans le genre *Aspergillus* (Frisvad and Larsen, 2015). Ils se caractérisent par un système d'anneau central (indole) généralement formé à partir d'un L-tryptophane et d'un second acide aminé, processus généralement catalysé par une synthétase de peptide non ribosomique (NRPS).



Le noyau indole de ces dicétopipérazines constitue un point de départ pour la biosynthèse de nouvelles structures dérivées de l'échinuline (Figure 68). L'addition de trois groupes prényle en positions 4, 5 et 7, ainsi que les variations de saturation de la liaison en position 8, la substitution d'un groupe méthyl par un groupe méthylène en position 12 (**P3**), ou bien la substitution d'un proton par un hydroxyle en position 8 (**P2**), font partie des modifications possibles qui pourraient permettre de synthétiser des dérivés aux activités différentes.

Des enzymes, telles que les prényltransférases (PT), contrôlent la biosynthèse de ces dicétopipérazines indoliques via des réactions de prénylation séquentielles (Figure 68). La prénylation en position 2 du cyclo (L-Trp-L-Ala) par EchPT1 conduit au premier dérivé, le prééchinuline. L'EchPT2 effectue ensuite la réaction en cascade de prénylation, soit en position 5, 7, donnant respectivement la tardioxopipérazine A et B, soit aux deux positions 4 et 5, ou 5 et 7, donnant la varicolorine L et l'échinuline, soit aux positions 4, 5, 6 ou 4, 5, 7.

D'autres types d'enzymes, notamment EchP450, peuvent catalyser une réaction de déshydrogénation de la liaison entre C8 et C9, donnant naissance à une série de dérivés de la neoéchinuline A. La série de dérivés de la neoéchinuline B peut être générée par l'intervention de la même enzyme EchP450, qui assure en plus la déshydratation de la simple liaison en C12.

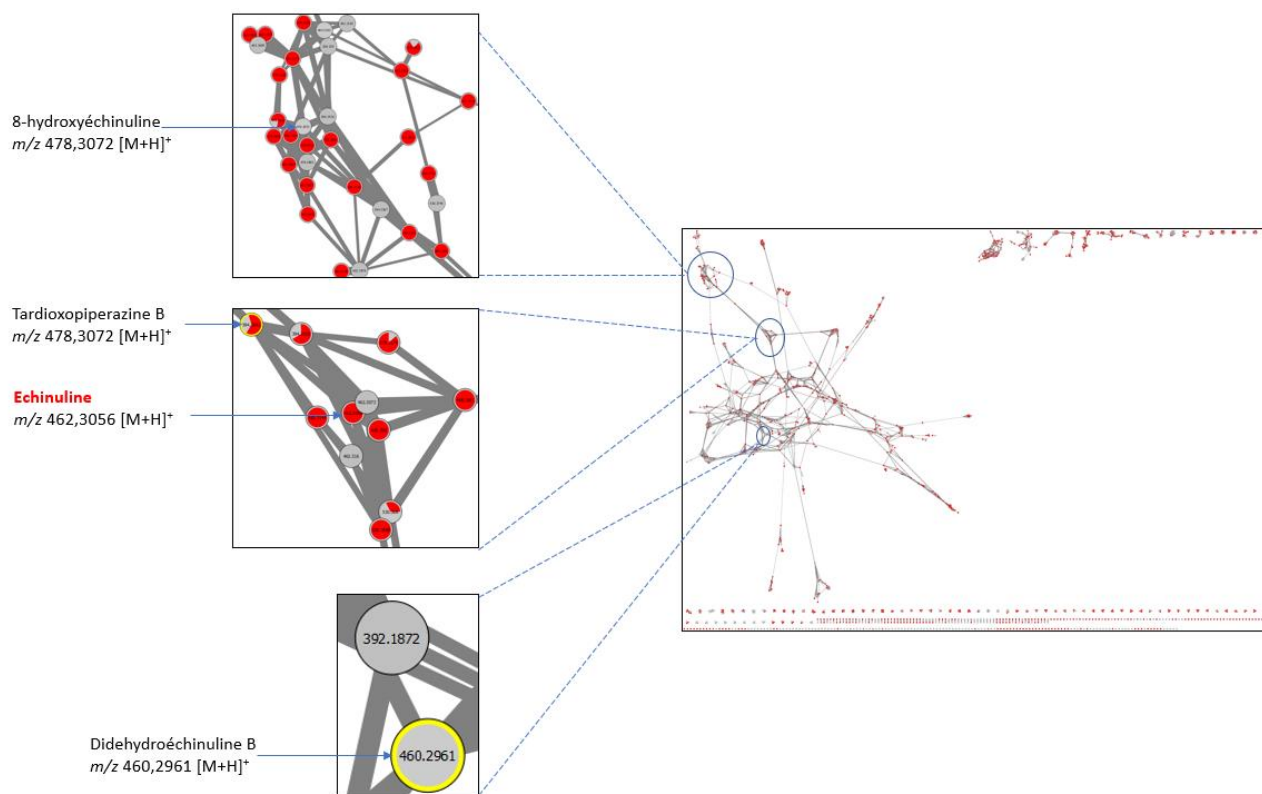


**Figure 68** : Voie de biosynthèse de l'échinuline et de la neoéchinuline par EchPT1 et EchPT2 chez *Asperillus ruber*.

Adapté d'après (Wohlgemuth et al., 2017)

### III.2.5.3. Réseaux moléculaires

La purification des dérivés de l'échinuline et la détermination de leur  $m/z$  ont permis de les rechercher et de les identifier dans les réseaux moléculaires (Figure 69).



**Figure 69** : Identification des molécules isolées dans les réseaux moléculaires des sous fractions issues de *Aspergillus* sp.

Rouge (actif ; XC04 GP, XC04 GP-I, XC04 GP-S et XC04 GP-S') et en gris (peu actif ; XC04 GP-M et XC04 GP-H).

Au début de l'analyse, ces molécules n'ont pas été annotées par les bases des données d'où l'intérêt du travail d'isolement et purification des molécules en combinant les approches MS- et Bio-guidées. Le tardioxopiperazine B appartient au cluster de l'échinuline, le 8-hydroxyéchinuline et le didehydroéchinuline B restent liée au cluster de l'échinuline avec des distances plus ou moins variées.

### III.2.6. Activité antiproliférative *in vitro* des composés isolés

#### III.2.6.1. Test de viabilité cellulaire (MTT)

Les molécules isolées ont été testées pour leur activité antiproliférative sur les cellules HT-29 (Tableau 8). Les résultats du test MTT sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 9** :  $CI_{50}$  des molécules isolées de *Aspergillus* sp. sur les cellules HT-29.

Molécules	$CI_{50}$ $\mu M$ 24 h	$CI_{50}$ $\mu M$ 48 h
Echinuline	1,51 $\pm$ 0,1	1,73 $\pm$ 0,1
8-hydroxyéchinuline	7,12 $\pm$ 0,7	8,80 $\pm$ 1,1
Didehydroéchinuline B	> 50	44,84 $\pm$ 0,7
Tardioxopiperazine B	11,90 $\pm$ 0,8	13,70 $\pm$ 0,0
Flavoglaucine	9,17 $\pm$ 1,4	34,40 $\pm$ 0,9
5-FU	> 50	17,30 $\pm$ 1,4
Irinotécan	44.50 $\pm$ 1,2	28 $\pm$ 0,4

L'échinuline a clairement l'activité la plus élevée sur les cellules HT-29 à 48 h, presque 10 fois plus que le 5-FU et 16 fois plus que l'irinotécan. En outre, Yan et al. ont démontré que l'effet immunisant de l'échinuline sur les lymphocytes T (acteur de l'immunité spécifique) est renforcé par l'activation de la voie de signalisation NFκB (facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire), ce qui suggère que l'échinuline pourrait servir de nouvel agent immunothérapeutique (Yan et al., 2017). Smetanina et al. ont également démontré la cytotoxicité de l'échinuline sur trois types différents de lignées cellulaires 22Rv1, PC-3 et LNCaP avec des valeurs  $CI_{50}$  de 63,20 ; 41,70 et 25,90  $\mu$ M (Smetanina et al., 2020). Ce qui en fait une molécule extrêmement prometteuse en complément des traitements actuels du cancer colorectal.

Dans ce projet de thèse, l'activité antiproliférative du 8-hydroxyéchinuline sur la lignée chimiorésistante HT-29 est décrite pour la première fois. Cette activité est 2 fois supérieure à celle du 5-FU et 3 fois supérieure à celle de l'irinotécan, ce qui est prometteur. D'autres tests biologiques sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action de cette molécule.

Le didehydroéchinuline B est très peu actif en comparaison avec l'échinuline et ces dérivés sur les cellules chimiorésistantes HT-29. Il a été démontré que l'activité de la didehydroéchinuline B est respectivement de 4,20  $\mu$ M et de 1,43  $\mu$ M, sur les cellules BEL-7420 et A549 (Gao et al., 2013).

La tardioxopiperazine B montre une activité inférieure à celle de l'échinuline avec une  $CI_{50}$  de 13,7  $\mu$ M à 48 h sur les cellules HT-29 mais reste plus intéressante que les activités du 5-FU et de l'irinotécan. Une faible activité immunosuppressive a été décrite pour la tardioxopiperazine B contre la prolifération induite par des mitogènes de lymphocytes spléniques de souris (Fujimoto et al., 1999). De même, la tardioxopiperazine B a montré une activité antimélanogène modérée par rapport à l'échinuline avec une valeur  $CI_{50}$  de 30  $\mu$ M et 98  $\mu$ M, respectivement, contre les cellules B16 (Elsbaey et al., 2019). Orfali et al. ont montré que l'échinuline et la tardioxopiperazine B peuvent agir sélectivement sur les cellules B16 en inhibant la synthèse de la mélanine avec des valeurs  $CI_{50}$  de 38,50 et 52,60  $\mu$ M respectivement (Orfali et al., 2021).

Une analyse de la relation structure-activité a été effectuée en comparant les structures des dérivés de l'échinuline avec celle de la molécule de départ, l'échinuline. La substitution d'un proton par un groupe hydroxyle en position 8 (comme dans le cas de l'8-hydroxyéchinuline) entraîne un léger changement dans la  $CI_{50}$  contre les cellules HT-29 par un facteur de 5. La suppression d'un groupement prényle en position 5 (comme dans le cas de la tardioxopiperazine B) réduit l'activité contre les cellules HT-29 par un facteur de 8. Enfin, la substitution du groupe méthyle par un méthylène en position 12 entraîne une perte d'activité ( $CI_{50} > 50 \mu$ M à 24 h). Ces résultats nous éclairent sur les groupes fonctionnels dans la structure de l'échinuline responsables de son activité.

La flavoglaucine présente une bonne activité inhibitrice à 24 h avec une valeur de  $CI_{50}$  de 9,17  $\mu$ M, mais son efficacité diminue considérablement à 48 h ( $CI_{50} = 34,40 \mu$ M). Cette diminution d'efficacité à 48 h pourrait limiter son potentiel comme traitement anticancéreux. Néanmoins, dans d'autres études, la flavoglaucine a démontré un grand impact *in vitro* sur les cellules Caco2 et A549 avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 2,87 et 22,20  $\mu$ M respectivement (Elissawy et al., 2019) (Cai et al., 2021). *In vivo*, Yoshimi et al. démontrent que la multiplicité et l'incidence des tumeurs intestinales sont moindres chez les rats recevant de la flavoglaucine avec de l'azoxyméthane. Cela lui confère un potentiel de développement en tant que molécule

adjuvante aux traitements actuels pour la prévention des néoplasies du gros intestin humain (Yoshimi et al., 1992). Une étude de relation structure activité de flavoglaucine et ses dérivés a démontré l'importance de la position de la double liaison dans le groupe prényle et le degré de saturation sur l'activité cytotoxique de la flavoglaucine (Lin et al., 2021).

Les molécules isolées ont toutes été testées, à l'exception de la didehydroéchinuline B en raison de sa quantité insuffisante, pour évaluer leur effet sur les cellules HEK293 (Tableau 9).

L'indice de sélectivité (IS) des molécules est défini comme le rapport entre la cytotoxicité (valeurs  $CI_{50}$ ) sur les cellules saines HEK293 et les cellules cancéreuses HT-29. Les molécules dont l'indice de sélectivité est supérieur à 3 sont considérées comme très sélectives vis-à-vis des cellules cancéreuses (Mahavorasirikul et al., 2010).

Les résultats du test MTT sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10 :  $CI_{50}$  des molécules isolées de *Aspergillus* sp. sur les cellules HEK293.**

Molécules	$CI_{50}$ $\mu$ M 24 h	IS	$CI_{50}$ $\mu$ M 48 h	IS
<i>Echinuline</i>	29,43 $\pm$ 0,5	19,49	44,19 $\pm$ 0,8	25,54
<i>8-hydroxyéchinuline</i>	13,81 $\pm$ 4	1,93	36,42 $\pm$ 2	4,13
<i>Tardioxopiperazine B</i>	13,56 $\pm$ 0,3	1,13	24,14 $\pm$ 3	1,76
<i>Flavoglaucine</i>	13,79 $\pm$ 1,6	1,50	60,77 $\pm$ 0,8	1,76

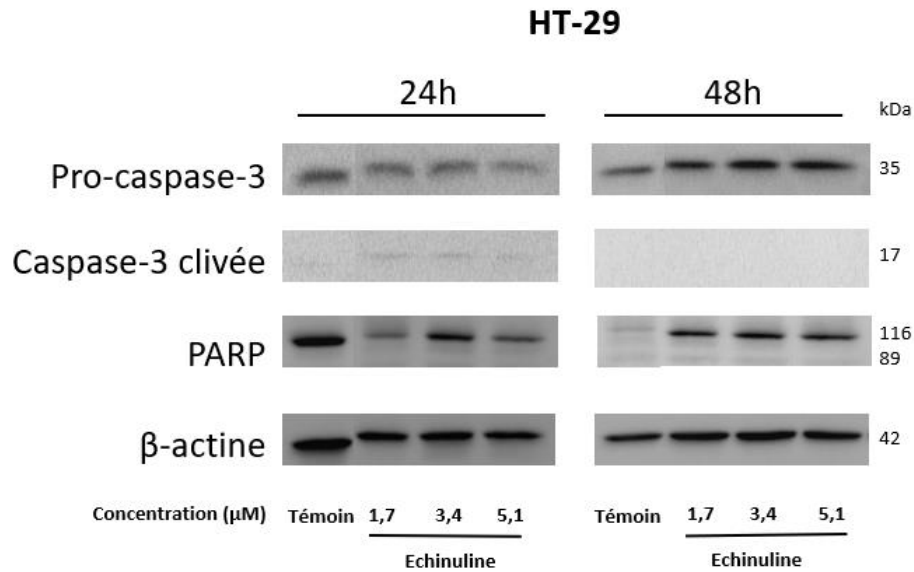
L'échinuline, molécule très active sur les cellules HT-29, montre une faible cytotoxicité sur les cellules HEK293. Cela indique la capacité de cette molécule de cibler ces cellules cancéreuses avec un indice de sélectivité (IS) de 25,54.

Le 8-hydroxyéchinuline est quatre fois moins toxique sur les cellules HEK293 à 48 h avec une  $CI_{50}$  de 36  $\mu$ M et un IS de 4,13. La tardioxopiperazine B et la flavoglaucine sont deux fois moins actives sur les cellules HEK293 à 48 h avec des  $CI_{50}$  de 24,14 et 60,77  $\mu$ M respectivement et un IS de 1,76 pour les deux composés.

Ces résultats indiquent que la tardioxopiperazine B et la flavoglaucine sont les deux molécules les moins prometteuses en tant que candidats en raison de leur faible sélectivité. En revanche, la 8-hydroxyéchinuline se distingue par un indice de sélectivité supérieur à 3, la rendant intéressante, tandis que l'échinuline, avec une sélectivité particulièrement notable pour les cellules HT-29, apparaît comme le candidat le plus prometteur en tant qu'agent anticancéreux.

### III.2.6.2. Analyse des voies apoptotiques par Western blot

Les résultats du Western blot après traitement avec différentes concentrations d'échinuline sont présentés ci-dessous (Figure 70).

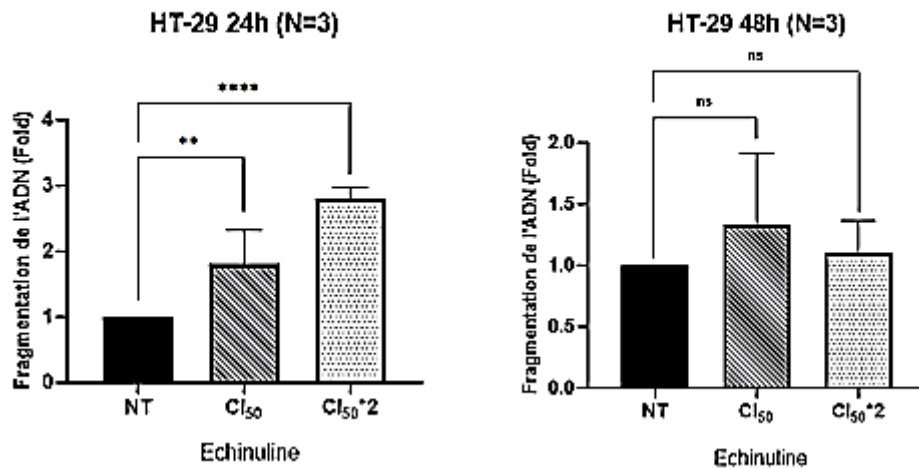


**Figure 70 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par l'échinuline (Western blot).**

L'échinuline semble montrer une légère induction de l'apoptose dans les cellules HT-29. Une bande de fragment clivé de la PARP apparait avec une faible intensité à 89 KDa. Cependant, il n'y a pas d'activation visible de la caspase-3. Ces résultats peuvent suggérer que l'échinuline pourrait induire l'apoptose via une voie indépendante de la caspase-3 ou que les conditions expérimentales (concentrations testées) ne permettent pas de détecter la caspase-3 clivée. La diminution de la pro-caspase-3 pourrait néanmoins indiquer un début d'activation de la caspase-3 qui n'est pas suffisamment détectable avec cette analyse. Une répétition des expérimentions ou des analyses par RT-PCR pourraient permettre de mieux comprendre ces débuts d'observations, en analysant les taux de transcrits de ces différents gènes impliqués dans l'apoptose.

### III.2.6.3. Fragmentation d'ADN

Les résultats de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 après traitement avec différentes concentrations d'échinuline obtenues sont présentés ci-dessous (Figure 71).



**Figure 71 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29 après traitement à différentes concentrations d'échinuline à 24 et 48 h.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Ces résultats montrent une fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 traitées avec l'échinuline. Dès 24 h, l'échinuline entraîne une fragmentation de l'ADN qui est beaucoup plus prononcée après un traitement avec  $Cl_{50} * 2 = 3,4 \mu M$ . A 48h, les résultats obtenus montrent une fragmentation moins marquée qu'à 24 h, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les cellules non impactées par le traitement masquent l'effet visible à 24 h sur les cellules en apoptose, des concentrations plus élevées ou des traitements répétés pourraient être envisagés.

En conclusion, dans cette investigation chimique et biologique sur le champignon endolichénique *Aspergillus* sp., cinq molécules majoritaires ont été isolées et évaluées pour leur activité antiproliférative sur les cellules HT-29. L'indice de sélectivité a été déterminé pour quatre de ces molécules en utilisant les cellules HEK293.

Parmi elles, l'échinuline, un alcaloïde de type dicétopipérazine, s'est distinguée par son activité la plus élevée contre les cellules HT-29 et par un indice de sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses supérieur aux autres composés testés (IS = 25,54). Des analyses supplémentaires, pour quantifier les marqueurs apoptotiques western blot et les tests de fragmentation de l'ADN, ont confirmé l'effet de l'échinuline dans l'induction de l'apoptose, et une analyse par cytométrie en flux pourrait apporter des informations supplémentaires sur ce processus apoptotique (marquage Annexin V-Iodure de propidium, permettant de distinguer apoptose précoce et tardive). Cette molécule est particulièrement intéressante et mérite des études approfondies sur son mécanisme d'action. Il serait également pertinent d'examiner son activité sur les cellules MDA-MB-231. Le phénomène d'apoptose observé justifie la poursuite des recherches.

Une étude de relation structure-activité entre l'échinuline et ses dérivés a été mise en place pour identifier les groupes fonctionnels et les segments structuraux responsables de leur activité antiproliférative. Cette approche vise à comprendre comment les variations dans la structure chimique de ces molécules influencent leur efficacité biologique, en particulier leur capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. En examinant les différentes molécules isolées, cette étude ouvre ainsi la voie à la modification structurelle de ces composés afin de maximiser leur potentiel thérapeutique.

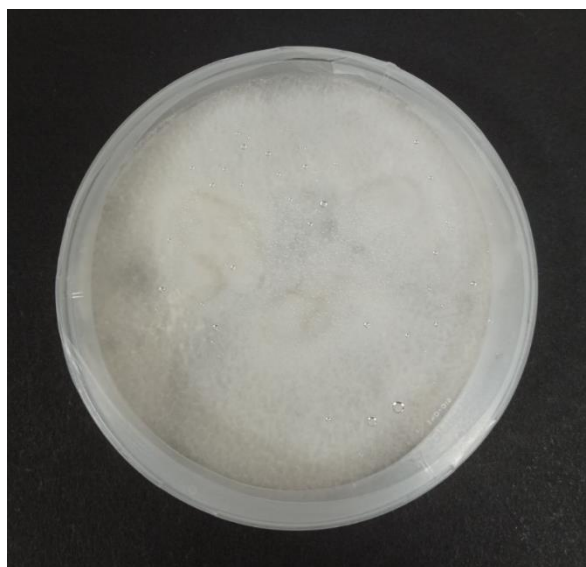
Les molécules isolées ont ensuite été intégrées dans des réseaux moléculaires, une approche puissante permettant de visualiser les relations structurelles entre différents composés chimiques au sein des extraits et sous-fractions analysés. Cette méthode utilise des données de spectrométrie de masse pour regrouper les molécules présentant des similarités structurelles en « clusters ». Elle a non seulement facilité l'annotation des molécules connues, mais aussi permis d'établir des liens avec d'autres métabolites secondaires présents dans l'extrait.

### III.3. Investigation chimique et biologique de *Trametes versicolor*.

#### III.3.1. Culture à faible échelle

Une culture à faible échelle a été réalisée afin d'obtenir un extrait brut pour les tests MTT pour évaluer l'activité de l'extrait sur les cellules HT-29.

Une pré-culture a été réalisée sur 4 boîtes de Petri pour permettre le démarrage ultérieur d'une culture à faible échelle, une fois la croissance fongique constatée au bout de 21 jours. 260 mL de milieu SAB sans chloramphénicol (65 g/L) ont été préparés et ajoutés dans 20 boîtes de Petri (90 mm) dans des conditions stériles, avec dépôt de morceaux de mycélium de *Trametes versicolor*. Après 21 jours, le mycélium a envahi la surface des boîtes (Figure 72), ce qui a permis de réaliser trois extractions successives à l'AcOEt et d'obtenir un extrait brut (PA08 S) de 235 mg.



**Figure 72 :** Exemple de boîte de Petri de la fin de croissance de *Trametes versicolor* dans la culture à faible échelle.

#### III.3.2. Culture à grande échelle

Pour obtenir suffisamment de matériel fongique en vue d'identifier et d'isoler les molécules responsables de l'activité antiproliférative, une pré-culture suivie d'une culture à grande échelle ont été effectuées comme dans le cas du premier ELF étudié.

Compte tenu du rendement de la culture à faible échelle (235 mg par 260 mL), 10 L de milieu de SAB ont été préparés (65 g/L), stérilisés et ajoutés dans des boîtes de Petri (120 mm). Des morceaux de mycélium de *Trametes versicolor* issus de la pré-culture ont été déposés dans ces boîtes. Un suivi visuel de la croissance des champignons a été effectué (Figure 73), permettant de procéder à l'extraction après 21 jours. L'extraction, a été réalisée trois fois avec 100 % d'acétate d'éthyle, a permis d'obtenir un extrait brut (PA08 GS) de 5,38 g.

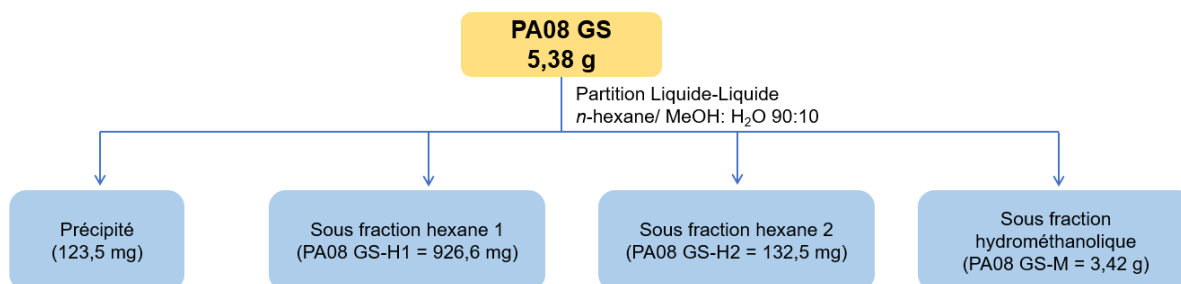




**Figure 73 :** Exemple de boîte de Petri durant la croissance de *Trametes versicolor* dans la culture à grande échelle.

### III.3.2.1. Partition liquide-liquide de l'extrait brut PA08 GS

La solubilisation de l'extrait brut dans le mélange hydroalcoolique (90 :10) entraîne la formation d'un précipité, qui est ensuite récupéré par filtration. Le filtrat est ensuite placé dans une ampoule à décanter avec 100 mL de *n*-hexane et homogénéisé pour séparer les molécules en fonction de leur polarité. Une sous fraction hydrométhanolique (PA08 GS-M) contenant des molécules moyennement polaires et polaires est récupérée, ainsi que deux sous fractions hexanes (PA08 GS-H1 et PA08 GS-H2) avec des molécules apolaires distinctes (Figure 74).

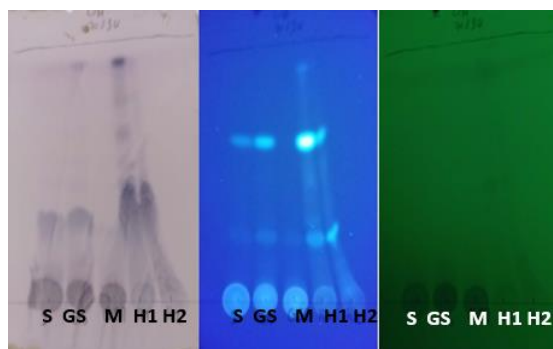


**Figure 74 :** Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait brut PA08 GS.

### III.3.3. Profilage chimique des sous fractions de PA08 GS

#### III.3.3.1. CCM et HPLC-DAD-DEDL

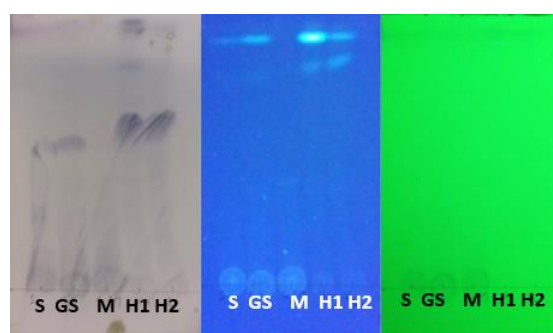
Les profils de CCM suivants montrent les extraits PA08 S et PA08GS ainsi que les sous fractions PA08 GS-M, PA08 GS-H1 et PA08 GS-H2 issues de la partition liquide-liquide. Les plaques CCM ont été observées sous lumière UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'ANS (Figure 75-76).



**Figure 75** : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.

Eluant : C/A 70:30 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

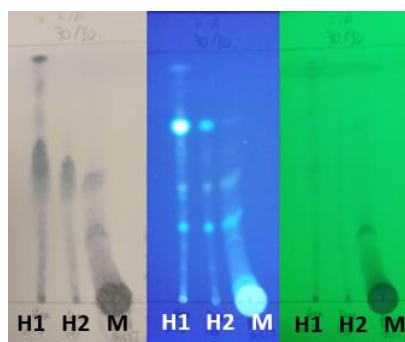


**Figure 76** : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.

Eluant : Dichloromethane /Methanol 98 :2 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

Les profils chromatographiques du PA08 S et du PA08 GS sont similaires. Le dépôt concentré de PA08 GS-M révèle sa composition en molécules polaires. Cela confirme que la partition liquide-liquide a été réussie. En revanche, les sous-fractions PA08 GS-H1 et PA08 GS-H2 contiennent des molécules moyennement polaires à apolaires (Figure 77). Les profils de CCM de PA08 GS-H1 et H2 étant différents, ces deux sous fractions ne seront pas mélangées.

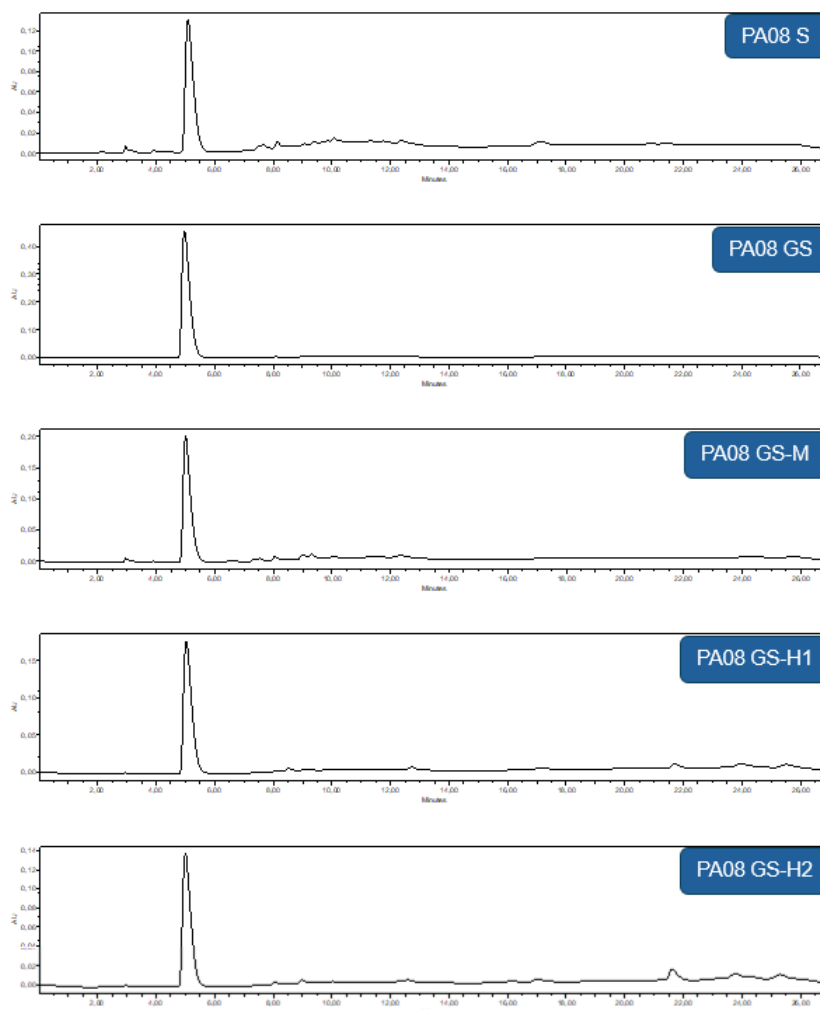


**Figure 77** : Analyse par CCM des sous fractions issues de la partition liquide-liquide de PA08 GS.

Eluant : C /A 70 :30 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

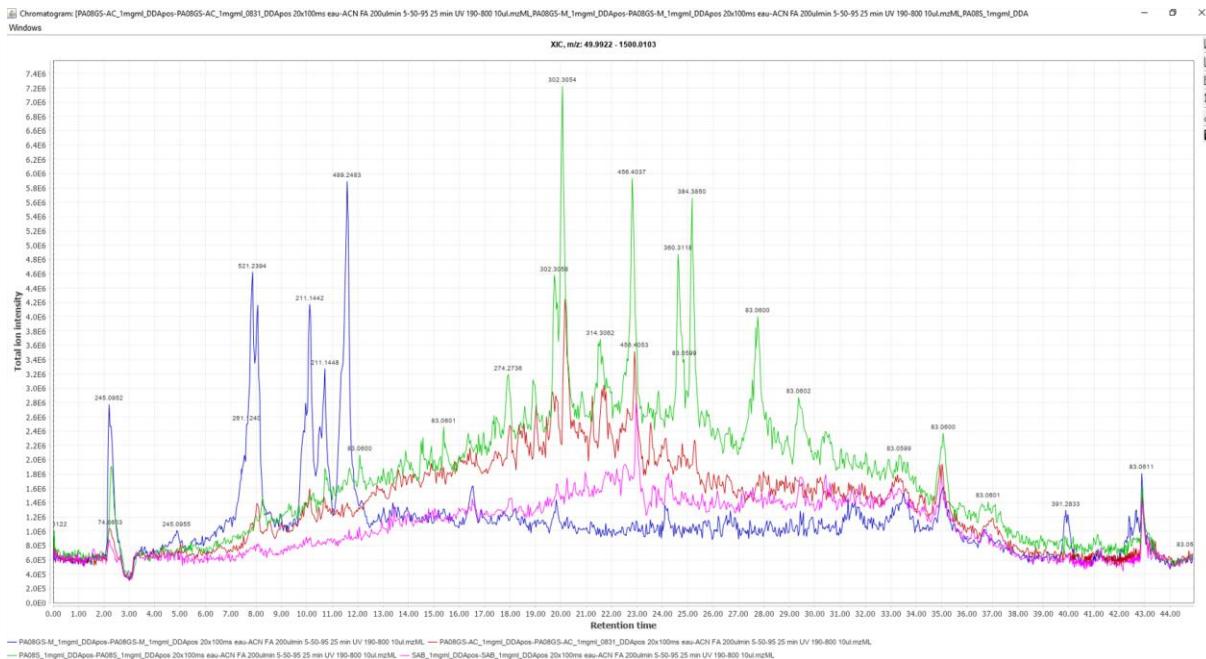
Les profils CLHP en phase inverse (C18) des sous fractions de PA08 GS présentent des similitudes, avec un pic majoritaire à un temps de rétention ( $T_R$ ) de 5 minutes (Figure 78). PA08 S et PA08 GS-M sont particulièrement semblables, non seulement en ayant le pic majoritaire à  $T_R = 5$  min, mais également en présentant quelques pics mineurs moins définis dans les intervalles de [2 à 4 min] et [6 à 24 min]. PA08 GS-H1 et H2 affichent également des profils similaires, caractérisés par un pic majoritaire accompagné de plusieurs pics mineurs.



**Figure 78** : Profils chromatographiques des sous fractions de *Trametes versicolor* obtenus par analyse CLHP-DAD (254 nm).

### III.3.3.2. Profilage LC/MS-MS

Les extraits à faible et grande échelle (PA08 S et GS), ainsi que la sous fraction PA08 GS-M ont été analysés par HPLC-ESI (+)-MS/MS (Figure 79).



**Figure 79 : Comparaison de profils chromatographiques en LC/MS-MS des deux extraits PA08 S et PA08 GS et la sous fraction PA08 GS-M.**

Le TIC de PA08 S montre quelques signaux intenses à  $m/z$  : 302,3054 ; 456,4037 ; 384,3850 et 360,3118. La comparaison de TIC de PA08 S et PA08 GS en LC/MS-MS en mode positif montre peu de similitude. Une diminution de l'intensité des deux signaux à  $m/z$  : 302,3054 et 456,4037 dans l'extrait PA08 GS par rapport au PA08 S, et une disparition des signaux dans l'intervalle [24 à 31 min] dans PA08 GS (Figure 79).

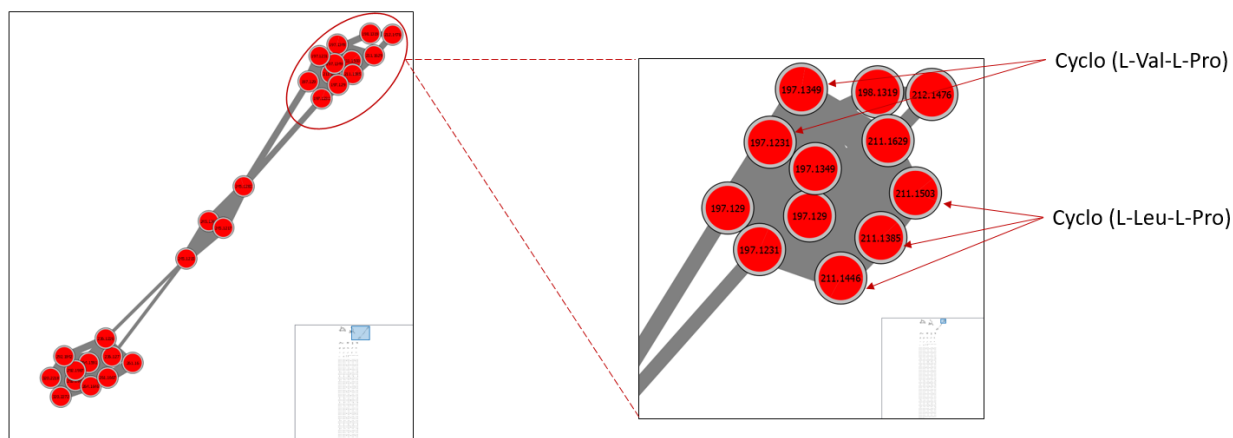
Pour PA08 GS-M, il est noté l'apparition des signaux aux  $m/z$  : 245,0952 ; 521,2394 ; 211,1442 et 489,2483 dans l'intervalle [2 à 12 min] ce qui est logique car cette sous fraction devrait contenir des molécules polaires voir moyennement polaires. Ces molécules non majoritaires dans l'extrait PA08 S et PA08 GS se concentrent dans PA08 GS-M avec des signaux plus intenses.

En général, le TIC montre peu de signaux par rapport à la complexité des extraits, la majorité se trouvant dans le bruit de fond.

### III.3.3.3. Réseaux moléculaires

Le profilage en LC/MS-MS a fourni des données permettant la construction des réseaux moléculaires via le logiciel MetGem, ainsi que des annotations basées sur la comparaison des spectres de modèles de fragmentation MS/MS d'ions précurseurs.

L'analyse a permis d'avoir 8 hits qui correspondent à 2 molécules annotées (Figure 80).



**Figure 80** : Visualisation des molécules annotées dans les réseaux moléculaires.

Extraits actifs (PA08 S, PA08 GS et PA08GS-M) en rouge.

Ces molécules sont principalement des cyclo dipeptides notamment cyclo (L-Val-L-Pro) et cyclo (L-Leu-L-Pro) (Tableau 11). Bien que les bases de données des produits naturels soient en développement constant, nous n'avons réussi à annoter que ces deux molécules. Cette limitation peut s'expliquer par l'efficacité variable de la reconnaissance des spectres MS/MS expérimentaux par rapport à ceux enregistrés dans les bases de données avec des énergies de collision différentes. L'apparition de certains fragments spécifiques dépend souvent de l'énergie de collision utilisée ; ainsi, si l'acquisition est effectuée avec une énergie trop basse ou trop élevée, certains ions fragments peuvent ne pas apparaître. Si les bases de données ne contiennent pas ces informations, il est possible de passer à côté d'une similarité, et la molécule ne sera pas annotée.

Même en utilisant l'option "énergie de collision par palier", l'annotation reste un défi. La meilleure solution consiste à connaître l'énergie de collision optimale pour les molécules à analyser afin d'obtenir des spectres MS/MS de haute qualité.

Bien que cette méthode de déréplication n'apporte pas plus d'informations. Une étude phytochimique classique a été envisagée pour isoler les molécules responsables de cette activité.

**Tableau 11** : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des extraits PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M.

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> parent	Formule moléculaire [M]	Rt (min)	Annotation	Score cosine	Base de données
197,1231	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,04	Cyclo(L-Val-L-Pro)	0,68	GNPS
211,1503	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10,13	Cyclo(L-Leu-L-Pro)	0,73	

### III.3.4. Evaluation des activités biologiques *in vitro* de l'extrait PA08 S et la sous fraction PA08 GS-M

#### III.3.4.1. Activité antiproliférative *in vitro*

##### III.3.4.1.1. Effet des sous fractions de PA08 GS sur les cellules HT-29

Dans une approche bio-guidée, des tests MTT sont effectués à chaque étape pour guider le processus de purification, qui se focalisera sur les fractions actives.

Le test MTT a été réalisé sur la lignée cellulaire HT-29 à 24 et 48 h, et les résultats sont présentés ci-dessous.

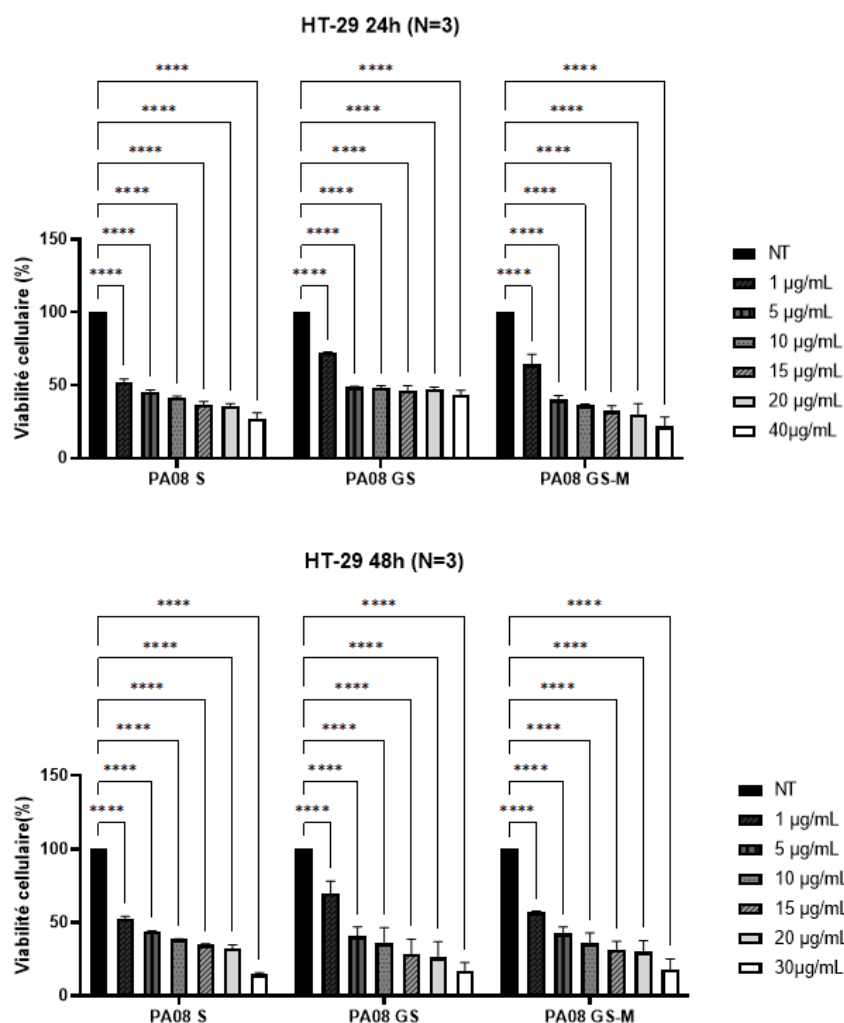
**Tableau 12** :  $CI_{50}$  (en  $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues pour l'extrait brut de *Trametes versicolor* et ses sous fractions sur les cellules HT-29.

Extraits/Fractions	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 24 h	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 48 h
PA08 GS	4,60 $\pm$ 0,1	3,10 $\pm$ 0,8
PA08 GS-M	2,20 $\pm$ 0,6	2,50 $\pm$ 0,6
PA08 GS-H1	> 40	18,70 $\pm$ 2,7
PA08 GS-H2	> 40	11,20 $\pm$ 3,3
Précipité	32,50 $\pm$ 7,2	25,60 $\pm$ 2

Les résultats montrent que PA08 GS-M a une activité comparable à celle de PA08 GS. Le PA08 GS-H1 et H2 ont une bonne activité à 48 h mais restent trop élevées 6 fois plus que l'extrait PA08 GS pour PA08 GS-H1 et 3,6 fois plus pour PA08 GS-H2. Les résultats montrent également que le précipité est 8 fois moins actif que le PA08 GS.

##### III.3.4.2. Effet de PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M sur différentes lignées cellulaires

Les extraits PA08 S, PA08 GS et la sous fraction PA08 GS-M ont été testés sur la lignée cellulaire HT-29 à 24 et 48 h (Figure 81).

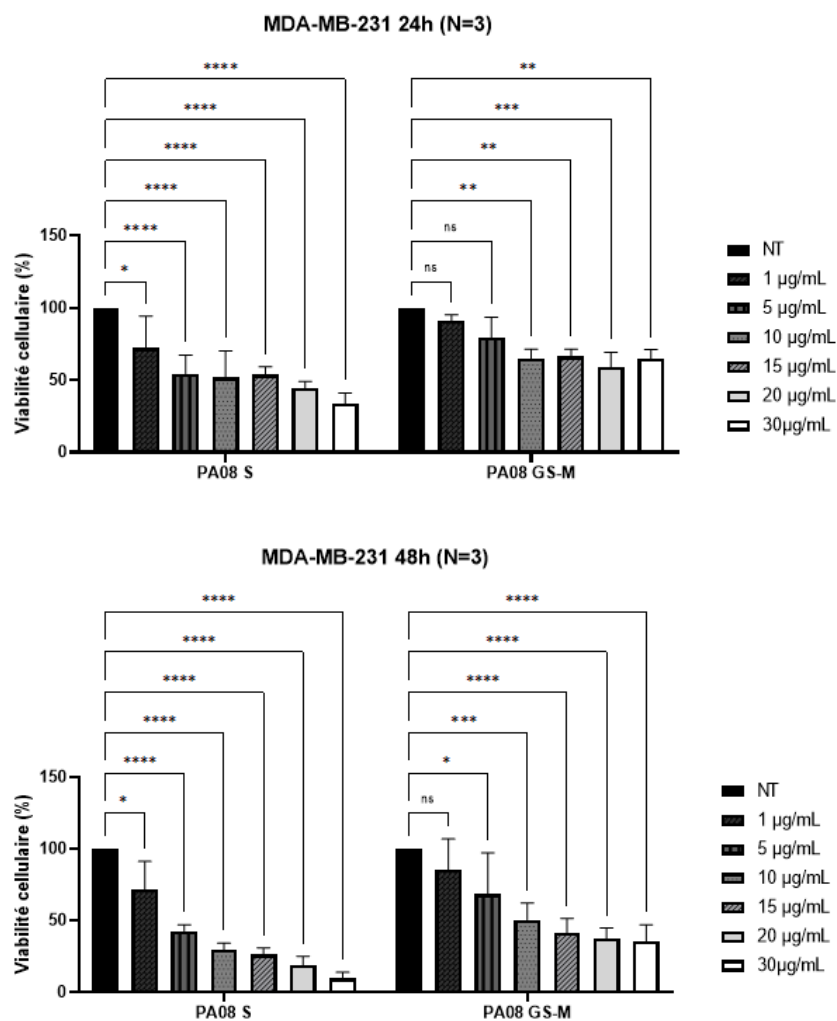


**Figure 81 : Pourcentage de viabilité des cellules HT-29.**

NT : non traitées, \*\*\*\* p <0,0001

Les résultats montrent que PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M réduisent significativement la viabilité cellulaire des cellules HT-29 de manière dose-dépendante à 24 h et 48 h. Cependant, PA08 GS-M semble avoir une activité semblable à PA08 S, surtout à des concentrations plus élevées, où la viabilité cellulaire chute de manière plus marquée.

L'extrait PA08 S et la sous fraction PA08 GS-M ont aussi été testés sur les cellules MDA-MB-231 (Figure 82).



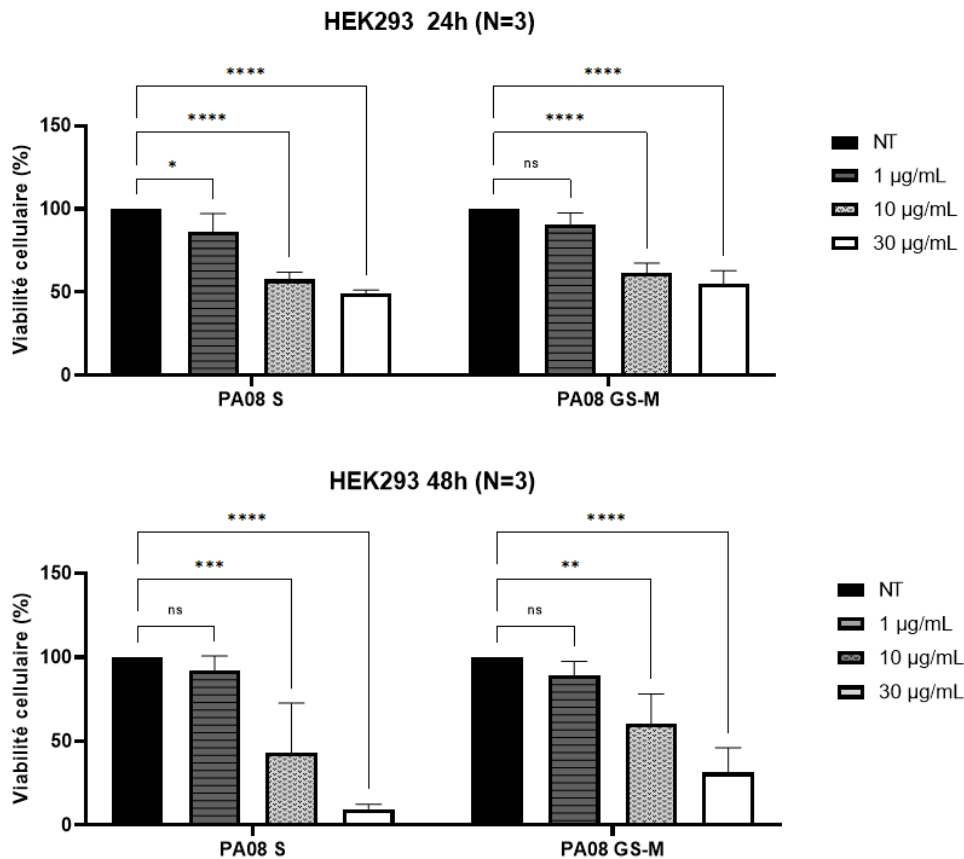
**Figure 82 : Pourcentage de viabilité des cellules MDA-MB-231.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Les résultats montrent que PA08 S et PA08 GS-M réduisent significativement la viabilité des cellules MDA-MB-231 de manière dose-dépendante, à la fois après 24 h et 48 h d'exposition. PA08 S est plus efficace que PA08 GS-M, avec une réduction plus prononcée à 48 h de la viabilité cellulaire, particulièrement à des concentrations plus élevées.

Ces résultats ont été complétés par un autre test MTT sur une lignée témoin de cellules non cancéreuses HEK293 (Figure 83).





**Figure 83 : pourcentage de viabilité des cellules HEK293.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Selon les normes de NCI, les valeurs de  $CI_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$  pour PA08 S et PA08 GS-M suggèrent une absence d'effet cytotoxique sur les cellules HEK293 à 24 h. Cependant, une cytotoxicité devient apparente pour ces extraits après 48 h d'exposition. Ces résultats soulignent l'importance de bien choisir la durée d'exposition pour minimiser la toxicité.

Les  $CI_{50}$  et les indices de sélectivité de PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M ont été déterminées et comparées (Tableau 12).

**Tableau 13 :  $CI_{50}$  (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de PA 08 S, PA08 GS et PA08 GS-M sur 3 lignées cellulaires.**

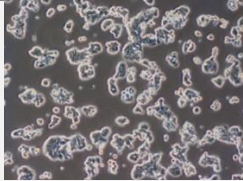
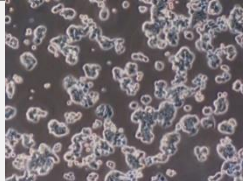
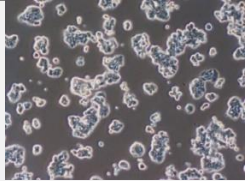
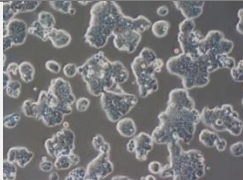
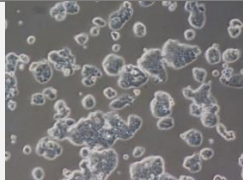
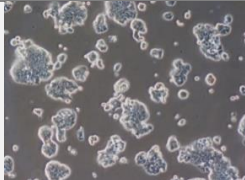
Lignées cellulaires	Extraits	$CI_{50} \mu\text{g/mL}$ 24 h	IS	$CI_{50} \mu\text{g/mL}$ 48 h	IS
HT-29	PA08 S	$1,70 \pm 0,7$	14,35	$2,10 \pm 0,5$	2,14
	PA08 GS	$4,60 \pm 0,1$	/	$3,10 \pm 0,8$	/
	PA08 GS-M	$2,20 \pm 0,6$	/	$2,50 \pm 0,6$	4,40
MDA-MB-231	PA08 S	$3,10 \pm 2,2$	7,80	$4,10 \pm 0,7$	1,09
	PA08 GS-M	> 30	/	$9,30 \pm 0,4$	1,18
HEK293	PA08 S	$24,40 \pm 0,9$		$4,50 \pm 0,0$	
	PA08 GS-M	> 30		$11 \pm 3,3$	

Les résultats montrent que l'extrait PA08 S est particulièrement efficace contre les cellules HT-29 et MDA-MB-231, bien qu'il entraîne une toxicité significative pour les cellules HEK293 après 48 h. PA08 S affiche une sélectivité notable en faveur des cellules HT-29 après 24 h, avec des indices de sélectivité (IS) de 14,35 pour HT-29 et 7,80 pour MDA-MB-231. De son côté, l'extrait PA08 GS-M est très actif sur les cellules HT-29 et commence à montrer un effet intéressant sur les cellules MDA-MB-231 après 48 h. PA08 GS-M présente une sélectivité modérée pour les cellules HT-29, avec un IS de 4,4. En conclusion, bien que l'extrait PA08 S soit efficace contre les cellules cancéreuses HT-29 et MDA-MB-231, c'est l'extrait PA08 GS-M qui sera privilégié pour des études chimiques plus approfondies en raison de sa quantité.

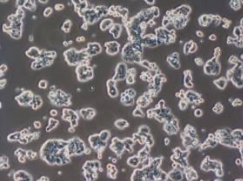
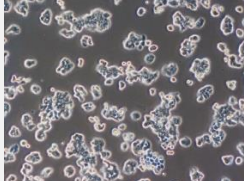
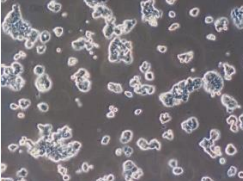
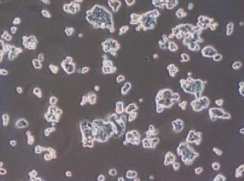
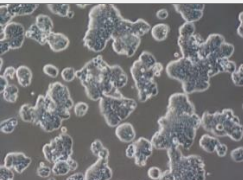
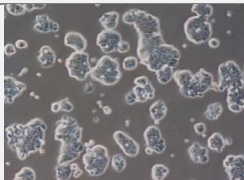
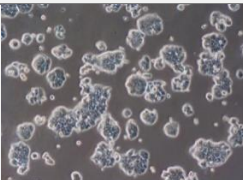
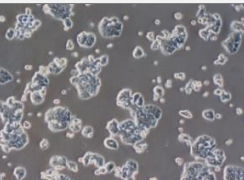
### III.3.4.2.1. Observations microscopiques

Une visualisation au microscope des cellules HT-29 après traitement avec différentes concentrations de PA08 S et PA08 GS-M à 24 et 48 h a été réalisée afin d'observer leur effet sur la morphologie cellulaire (Tableau 14).

**Tableau 14 : Observations des cellules HT-29 après traitement avec PA08 S et PA08 GS-M à 24 et à 48 h.**

	Témoin	PA08 S		
		Cl <sub>50</sub> = 2,1 µg/mL	Cl <sub>50</sub> *2 = 4,2 µg/mL	Cl <sub>50</sub> *4 = 8,4 µg/mL
24 h				
48 h				

	Témoin	PA08 GS-M		
		Cl <sub>50</sub> = 2,5 µg/mL	Cl <sub>50</sub> *2 = 5 µg/mL	Cl <sub>50</sub> *4 = 7,5 µg/mL
24 h				
48 h				

Les observations microscopiques révèlent une diminution des îlots cellulaires des cellules HT-29 (îlots signe d'une prolifération normale) et une augmentation du nombre de cellules mortes (flottantes) avec l'augmentation des concentrations et de la durée d'exposition au traitement.

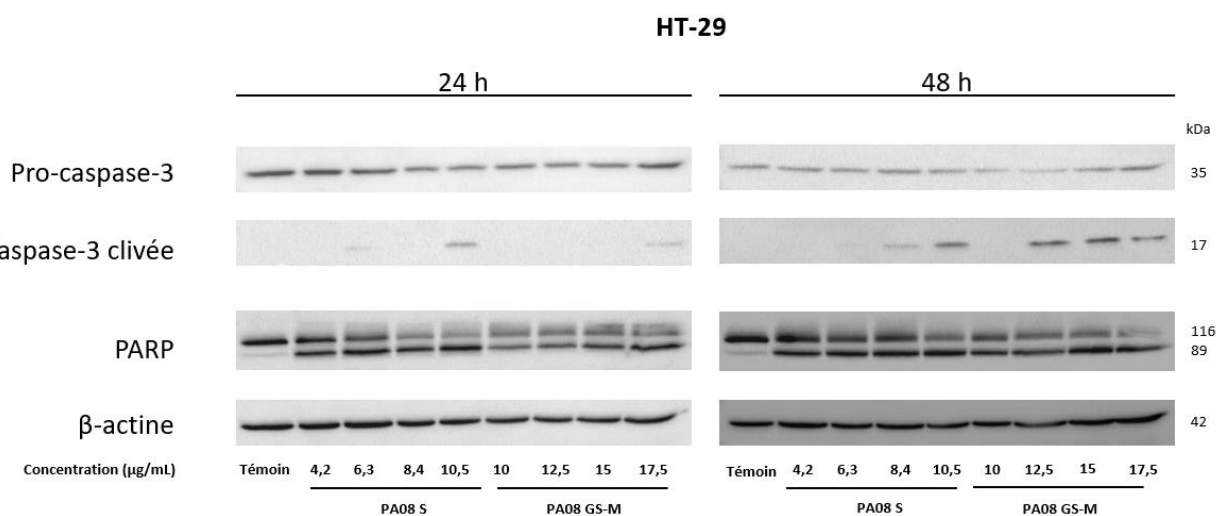
Ces observations confirment les résultats obtenus par le test MTT et mettent en évidence l'effet de PA08 S et PA08 GS-M sur la croissance cellulaire des HT-29. Par conséquent, une étude de l'apoptose, phénomène qui se déclenche principalement par des voies de signalisation intrinsèques ou extrinsèques, a été réalisée en analysant l'expression de marqueurs protéiques pro- et anti-apoptotiques ainsi que la fragmentation de l'ADN, ce qui permet de comprendre leur mécanisme d'action.

### III.3.4.3. Analyse de l'expression protéique des marqueurs apoptotiques par Western blot

L'activation de la procaspase 3 ainsi que le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) ont été observés par western blot après 24 et 48 h de traitement à différentes concentrations (PA08 S :  $CI_{50} \times 2$  et  $CI_{50} \times 3$ ,  $CI_{50} \times 4$ ,  $CI_{50} \times 5$  et pour PA08 GS-M :  $CI_{50} \times 4$ ,  $CI_{50} \times 5$ ,  $CI_{50} \times 6$ ,  $CI_{50} \times 7$ ) des cellules HT-29 (Figure 84).

La présence de la caspase-3 clivée (bande à 17 kDa) confirme que les cellules traitées avec PA08 S et PA08 GS-M subissent une apoptose dès 24 h à partir de la  $CI_{50} \times 3$  de PA08 S et  $CI_{50} \times 7$  pour PA08 GS-M, ces résultats sont plus marqués à 48 h mais cette fois dès  $CI_{50} \times 4$  de PA08 S et  $CI_{50} \times 5$  pour PA08 GS-M.

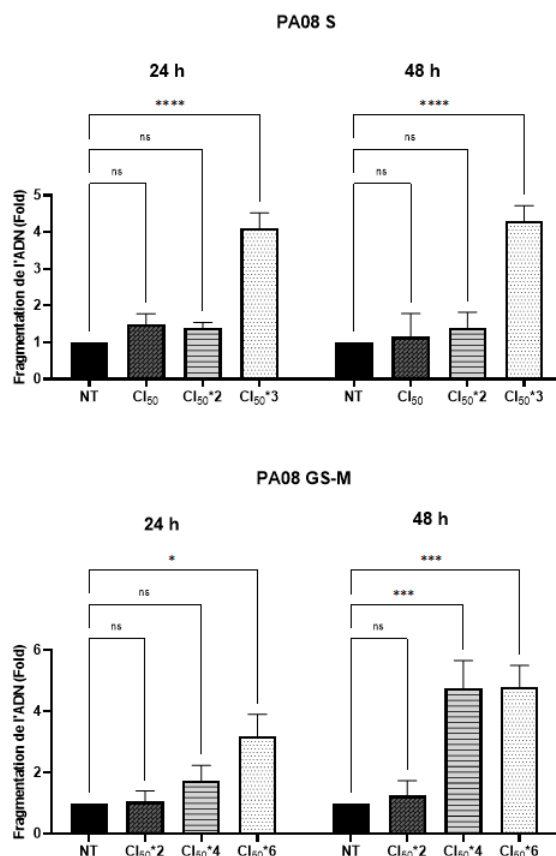
Le clivage de la PARP et l'apparition du fragment à 89 kDa est observé par Western blot à 24 et 48 h pour toutes les concentrations d'extraits testées est également un marqueur fiable de l'apoptose, corroborant l'activation de la caspase-3 et confirmant que l'extrait PA08 S et PA08 GS-M induisent efficacement l'apoptose.



**Figure 84 : Expression protéique des marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 après traitement par PA08S et PA08GM (Western blot).**

### III.3.4.4. Induction de la fragmentation d'ADN

Le kit de fragmentation de l'ADN « Cell Death Elisa<sup>PLUS</sup> » permet la quantification des fragments mono-oligo-nucléosomes dans la fraction cytoplasmique des cellules HT-29 lysées. Les taux de fragmentation d'ADN sont déterminés à 24 et 48 h après traitements (Figure 85).



**Figure 85 : Résultats de fragmentation d'ADN des cellules HT-29.**

NT : non traitées, NS : non significatif ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Les résultats montrent que la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 dépend de la concentration et du temps d'exposition aux extraits.

Ils suggèrent que des concentrations de Cl<sub>50</sub>\*3 (6.30 µg/mL) pour PA08 S et des concentrations plus élevées de Cl<sub>50</sub>\*4 (10 µg/mL) et Cl<sub>50</sub>\*6 (15 µg/mL) pour PA08GS-M sont les plus efficaces pour induire l'apoptose des cellules HT-29, cela est particulièrement marqué après 48 h. Ces résultats confirment le phénomène d'apoptose dans les cellules HT-29, en accord avec les résultats du MTT et les observations antérieures de l'activation de la caspase-3 et du clivage de la PARP par Western Blot. Cela suggère que la sous-fraction PA08 GS-M, compte tenu de sa quantité suffisante, pourrait être prometteuse pour isoler des molécules anticancéreuses.

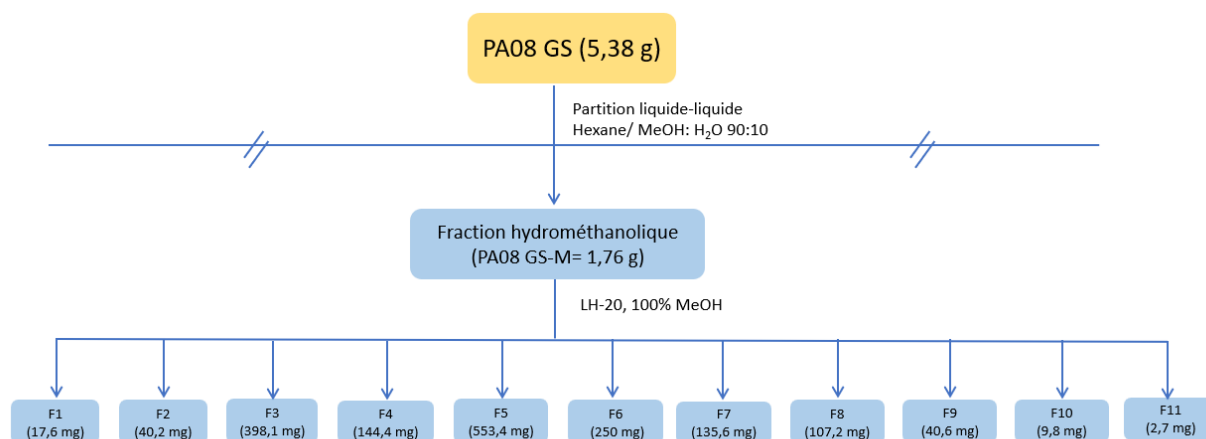
### III.3.5. Etude de *Trametes versicolor*

#### III.3.5.1. Fractionnement et purification

Après la partition liquide-liquide de l'extrait brut PA08 GS, les tests MTT de ses sous fractions ont montré une inhibition de la croissance cellulaire dans les cellules HT-29. Le PA08 GS-M présente une activité intéressante avec une valeur de Cl<sub>50</sub> = 2,20 µg/mL dès 24 h. Donc les études chimiques seront portées en priorité sur cette sous fraction afin d'isoler les molécules responsables de cette activité.

### III.3.5.1.1. Fractionnement et purification de PA08 GS-M

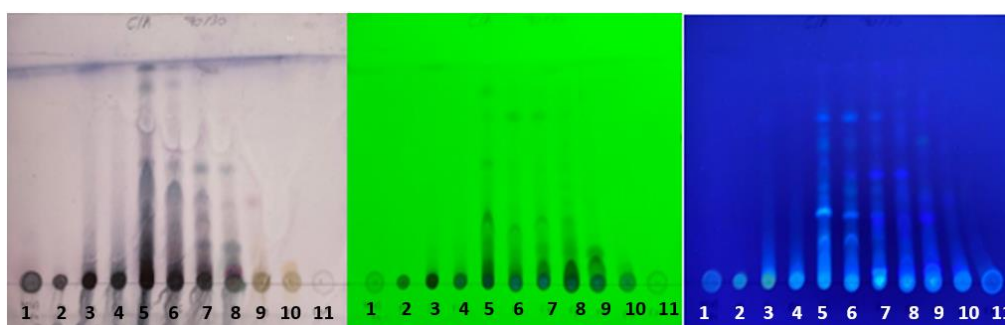
La sous fraction PA08 GS-M (3,16 g) a été séparée en deux parties. La première partie de PA08 GS-M (1,76 g) a été fractionnée sur une colonne ouverte de gel de Séphadex® LH-20 conduisant à l'obtention de 11 fractions (Figure 86).



**Figure 86** : Schéma récapitulatif des fractions issues de la purification de la 1<sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.

### III.3.5.1.2. Profilage chimique par CCM et CLHP-DAD

L'analyse CCM des fractions obtenues a été effectuée sur de la silice normale avec différents systèmes d'éluant, permettant d'obtenir des informations sur les profils chromatographiques des fractions (Figure 87-88).

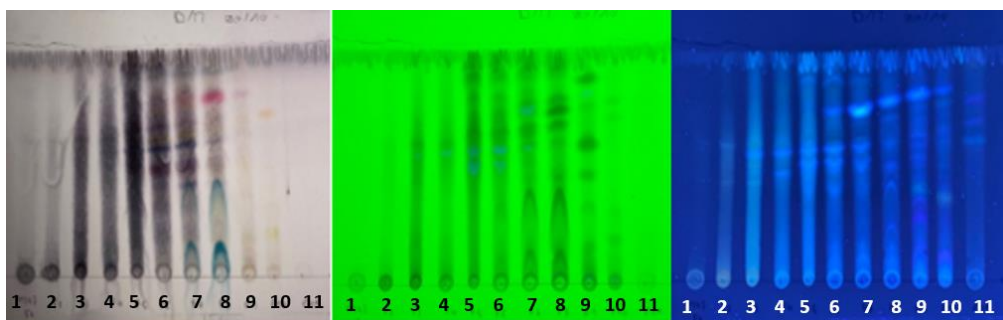


**Figure 87** : CCM des fractions issues de purification de la 1<sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.

Eluant : C /A 70:30 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.



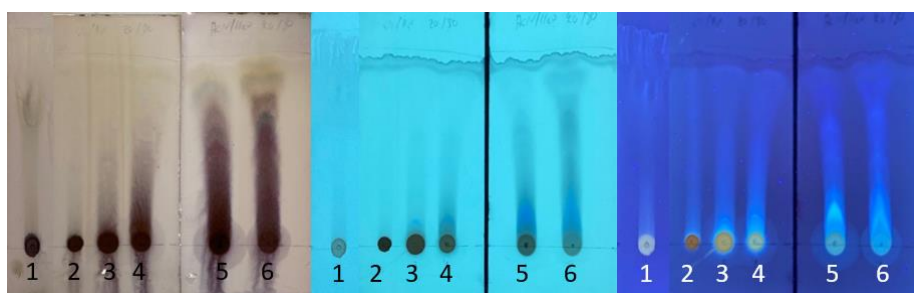


**Figure 88** : CCM des fractions issues de purification de la 1<sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.

Eluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH 90 :10 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

Les profils CCM sur phase inverse pour les fractions 1, 2, 3, 4, 5 et 6 montrent très peu de séparation entre les composés (Figure 89). Les résultats de différents systèmes éluants testés sur CCM (phase inverse et normale) montre un profil chargé des fractions avec une coélution (des trainés).

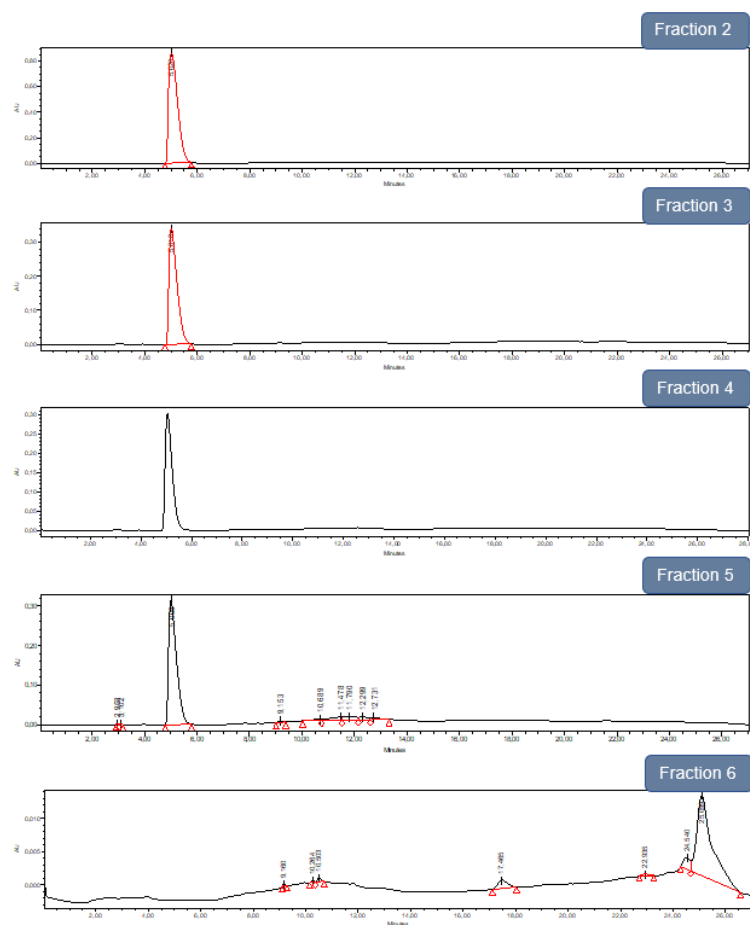


**Figure 89** : CCM Phase inverse des fractions issues de purification de la 1<sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M.

Eluant : Acétonitrile /Eau 20 :80 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

Une analyse CLHP-DAD en phase inverse (C18) a été effectuée, mais cela n'a pas révélé tous les composés dans les fractions, on remarque la présence d'un seul pic majoritaire à 5 min (Figure 90).

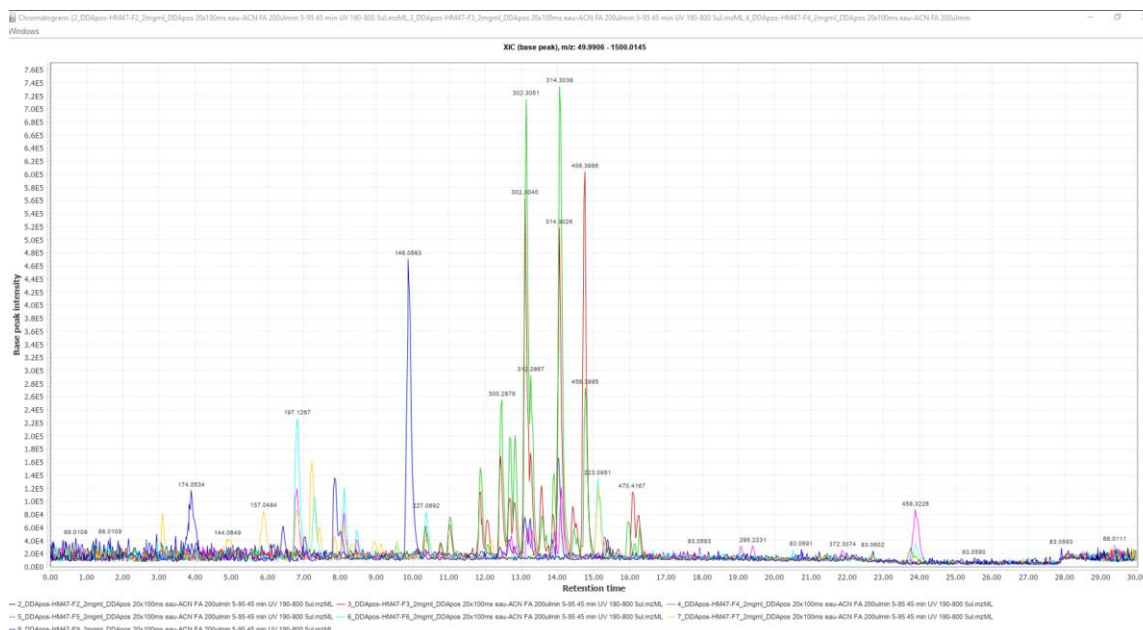


**Figure 90** : Profils chromatographique des fractions 2, 3, 4, 5, et 6 obtenus par analyse CLHP-DAD à 254 nm.

Les résultats des essais d'optimisation des gradients par CLHP analytique pour ces 11 fractions, en testant plusieurs colonnes : C18 (phase inverse),  $\pi^2$  (phase hydrophobe à sélectivité alternative par rapport aux modifications conventionnelles du C18), le principe de séparation est basé sur deux mécanismes de rétention : les interaction  $\pi$ - $\pi$  et les interactions hydrophobes, et DIOL (phase normale) n'ont montré aucune amélioration.

### III.3.5.2. Profilage par LC/MS-MS

L'optimisation des conditions d'analyse LC/MS-MS est essentielle pour obtenir des résultats de qualité qui pourront être traités par différents logiciels, notamment MetGem, pour établir des réseaux moléculaires. Les résultats de la première analyse (extraits PA08 S et PA08 GS et sa sous-fraction PA08 GS-M) ne nous ont pas permis d'annoter un maximum de molécules. Une seconde analyse a été réalisée par LC/MS-MS pour les fractions 2-7 et 9 en augmentant les concentrations à 5 mg/mL au lieu de 1 mg/mL. En effet, le chromatogramme (XIC) de cette analyse apparaît beaucoup plus résolu et les signaux sont plus nombreux (Figure 91).



**Figure 91 : Chromatogramme (XIC) des fractions 2 à 7 et 9 issues de la purification de la 1<sup>ère</sup> partie de PA08 GS-M (MZmine 2.53).**

Les XIC des fractions 3 (rouge) et 4 (vert) semblent présenter des similarités, en particulier avec les pics à  $m/z$  : 300,2878 ; 302,3040 ; 314,3038 ; 456,3995 ; 470,4167. En revanche, les fractions 2 (bleu), 6 (bleu ciel) et 5 (rose) présentent très peu de pics intenses par rapport aux précédentes, se distinguent uniquement par un pic à  $m/z$  : 146,0583 ; 197,1267 et 458,3226 respectivement. Les fractions 7 et 9 semblent ne présenter que des signaux dans le bruit de fond.

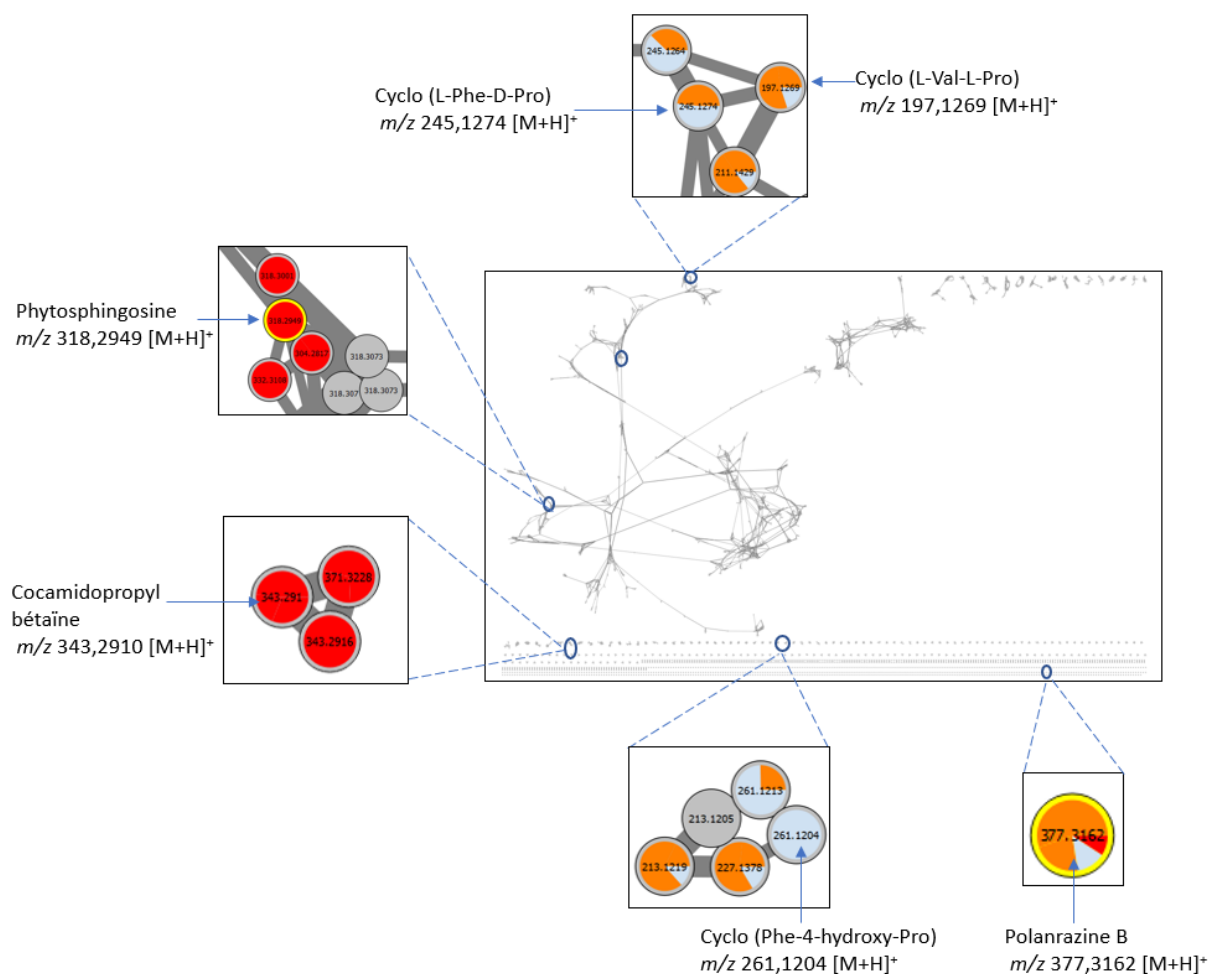
Globalement, ces résultats contredisent les profils observés en CCM des fractions analysées. Ils révèlent également que l'analyse en CLHP-DAD n'a pas permis de détecter tous les signaux des molécules présentes dans les fractions.

De plus, cette analyse ne permet pas de conclure sur la complexité des fractions, car de nombreux signaux sont peu intenses et masqués par le bruit de fond.

### III.3.5.3. Réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires des fractions 2-7 et 9 issues de PA08 GS-M sont visualisés à l'aide du logiciel MetGem (Figure 92).





**Figure 92 :** Les réseaux moléculaires des fractions 2 à 7 et 9 issues de l'extrait PA08 GS-M. Rouge (fractions très actives ; F2-F4), orange (fractions actives ; F5-F6) et bleu (fractions peu actives ; F7 et F9).

L'analyse permet d'avoir 76 hits correspondant à 45 molécules annotées depuis les bases de données GNPS et ISDB (Tableau 15).

Les résultats de l'annotation restent limités par rapport à la richesse de ces fractions. Cependant, ces résultats mettent en évidence des classes moléculaires variées, notamment les peptides cycliques, les sphingolipides, les dérivés d'acides aminés, les alcaloïdes sulfurés et enfin des molécules non répertoriées dans la littérature, puisqu'elles sont annotées à partir des bases de données *in silico*.

**Tableau 15** : Composés annotés sur les réseaux moléculaires des fractions 2 à 7 et 9.

<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup> parent	Formule moléculaire [M]	Rt (min)	Annotation	Score cosine	Base de données
106,9894	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ClO <sub>2</sub>	2,24	UNPD59171	0,72	GNPS
165,0910	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	13,50	UNPD103721	0,78	
168,0807	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N	21,17	UNPD106883	0,91	
197,1269	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,81	Cyclo (L-Val-L-Pro)	0,95	
217,0971	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,68	UNPD106814	0,73	
239,1641	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	5,09	UNPD103588	0,77	
245,1274	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,49	Cyclo (L-Phe-D-Pro)	0,81	
261,1240	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,60	Cyclo (Phe-4-hydroxy-Pro)	0,70	
269,3202	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	19,79	UNPD104027	0,93	
295,1692	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	4,22	UNPD37843	0,92	
315,1590	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	18,12	UNPD102223	0,82	
318,2949	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>	14,98	Phytosphingosine	0,78	
329,1747	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	15,12	UNPD103166	0,89	
335,1754	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15,13	UNPD10417	0,84	
343,1387	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	9,71	UNPD106171	0,88	
343,1539	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	8,18	UNPD38022	0,78	
343,2910	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	13,86	Cocamidopropyl bétaine	0,85	
347,1860	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	8,76	/	0,72	
351,2166	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	22,88	UNPD107027	0,85	
377,3162	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	23,15	Polanrazine B	0,75	
390,3730	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> NO	14,76	UNPD107046	0,80	
417,1180	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	18,49	UNPD102139	0,88	
421,1856	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	15,12	UNPD106655	0,93	
431,3155	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	14,36	UNPD102397	0,77	
441,3363	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	5,83	UNPD102313	0,82	
445,2584	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	22.88	UNPD10359	0,85	
447,0922	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	9,71	UNPD106730	0,82	
447,3832	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	8,26	UNPD1104855	0,87	
459,3832	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	5,16	UNPD106938	0,87	
469,1281	C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	9,09	UNPD105562	0,81	
495,4771	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>	23.28	UNPD104295	0,82	
497,1442	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	8,95	UNPD105007	0,77	
501,1901	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S	5,50	UNPD787	0,75	
501,3938	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	26,46	UNPD105767	0,83	GNPS
561,3600	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	8,11	/	0,92	
563,2486	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	5,10	UNPD104326	0,87	NIH
588,3380	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>11</sub>	22,88	/	0,75	
617,1860	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	16,69	/	0,77	GNPS
619,3840	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub>	9,56	UNPD99120	0,73	ISDB
623,1620	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	4,35	/	0,77	GNPS
697,3793	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>13</sub>	2,24	UNPD104966	0,80	
892,4814	C <sub>46</sub> H <sub>65</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub>	26,42	UNPD103544	0,88	
1011,5159	C <sub>51</sub> H <sub>78</sub> O <sub>20</sub>	2,24	UNPD104271	0,87	
1177,1364	C <sub>55</sub> H <sub>36</sub> O <sub>30</sub>	3,89	UNPD109057	0,87	

### III.3.5.4. Effet des fractions sur les cellules HT-29

Les 11 fractions ont été testées sur les cellules HT-29 afin de déterminer leur  $CI_{50}$  à 24 et 48 h. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 16** :  $CI_{50}$  des fractions issues de PA08 GS-M sur les cellules HT-29.

Fractions	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 24 h	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ 48 h
F1	18,90 $\pm$ 0,4	10,50 $\pm$ 1,8
F2	2,20 $\pm$ 0,9	2,60 $\pm$ 0,1
F3	< 1	< 1
F4	< 1	< 1
F5	4,60 $\pm$ 1,3	6,70 $\pm$ 0,5
F6	14,40 $\pm$ 4,3	16,20 $\pm$ 9
F7	> 80	52,20 $\pm$ 14
F8	> 80	62,10 $\pm$ 9
F9	> 80	60,80 $\pm$ 13
F11	9,23 $\pm$ 0,21	6,15 $\pm$ 0,83

L'activité inhibitrice des fractions F2, F3 et F4 contre les cellules HT-29 est très élevée. L'efficacité reste intéressante pour les fractions F1, F5, F6 et F11, en revanche pour les fractions F7, F8 et F9 l'inhibition est très peu significative.

Selon ces résultats, il est probable que les composés d'intérêts soient concentrés dans les fractions considérées comme très actives (F2, F3 et F4) et actives (F1, F5, F6 et F11). Elles méritent une étude plus approfondie pour isoler les molécules responsables de cette activité. Toutefois, cela n'exclut pas l'importance de la purification des fractions considérées peu actives voir non actives (F7, F8 et F9), qui peuvent également contenir des molécules aux structures nouvelles.

Les fractions 5, 7, 8 et 9 semblent avoir un profil abordable pour les purifications donc elles ont été fractionnées par différentes méthodes chromatographiques (Figure 93).

La deuxième partie de PA08 GS-M (1,4 g) a été fractionnée par CLMP conduisant à l'obtention de 28 fractions (Figure 93).

Afin de purifier les fractions obtenues, il a été nécessaire de procéder à plusieurs étapes de séparation en utilisant diverses techniques chromatographiques (CCM préparative, CLMP). À la fin de chaque étape de séparation, une analyse par CCM du profil chromatographique des fractions obtenues a été effectuée.

La purification des composés est détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit (cf.IV.8.1).

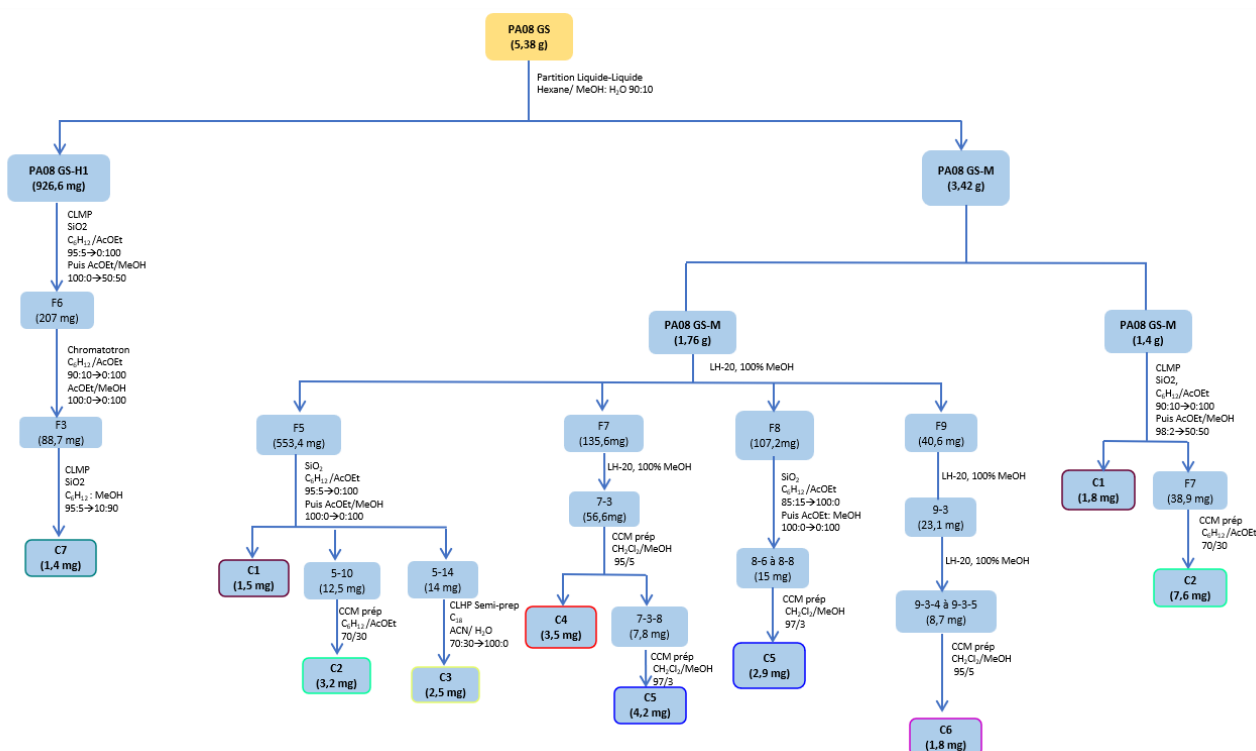
Les sept composés ont été isolés de PA08 GS-M :

- **C1** : linoléate de méthyle.
- **C2** : acide linoléique.
- **C3** : 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.
- **C4** : alcool de veratryle.
- **C5** : opuntiol.
- **C6** : 3-formylindole.

La sous fraction PA08 GS-H1 a été fractionnée par diverses techniques chromatographiques (Chromatotron et CLMP) ce qui ont permis d'isoler le composé 8 (Figure 93).

Un composé a été isolé de PA08 GS-H1 :

- **C7** : acide linoléique.



**Figure 93** : Schéma récapitulatif des purifications des composés issus de PA08 GS-M et PA08 GS-H1.

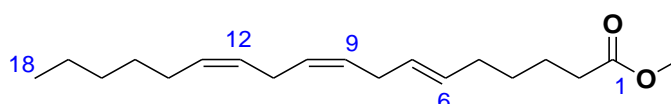
### III.3.5.5. Détermination de la structure chimique des composés isolés

#### III.3.5.5.1. Composé C1

Le composé **C1** (3,3 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 293,2462  $[M+H]^+$  (calc. pour  $C_{19}H_{33}O_2$  : 293,2472) correspondant à la formule brute  $C_{19}H_{32}O_2$ .

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz ; cf. Annexe 11) met en évidence la présence de 6 protons caractéristiques des groupes méthines de 5,29 à 5,39 ppm. De plus, les trois protons du groupe méthoxy qui sont attribués au signal singulet déblindé à 3,6 ppm.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz ; cf. Annexe 11) révèle la présence d'un carbonyle à 174,8 ppm qui correspond à une fonction ester. Les signaux déblindés à 127,9 ; 129,6 et 129,7 ppm sont attribués aux carbones des groupes méthylènes. Le groupe méthoxy se caractérise par le signal déblindé à 50,7 ppm.



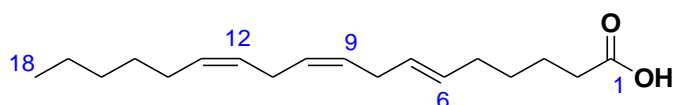
**Figure 94** : Structure de linoléate de méthyle.

Après une comparaison avec les données de la littérature (S. et al., 2015), le composé **C1** (Figure 94) a été identifié comme étant le linolénate de méthyle. Il a été isolé à partir de cultures de la cyanobactérie *Spirulina platensis* (S. et al., 2015). Il a également été purifié à partir de l'huile d'onagre de la plante *Oenothera biennis* L. (González-Fernández et al., 2020).

### III.3.5.5.2. Composé C2

Le composé **C2** (10,8 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 279,2396  $[M+H]^+$  (calc. pour  $C_{18}H_{31}O_2$  : 279,2316) correspondant à la formule brute  $C_{18}H_{30}O_2$ .

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz ; cf. Annexe 12) met en évidence la présence de 6 protons caractéristiques de trois groupes méthines à 5,34 ppm.



**Figure 95 : Structure de l'acide linoléique.**

Après une comparaison avec les données de la littérature (Xu et al., 2019), le composé **C2** (Figure 95) a été identifié comme étant l'acide linoléique. Il a été isolé à partir des parties aériennes de la plante *Artemisia integrifolia* (Xu et al., 2019).

### III.3.5.5.3. Composé C3

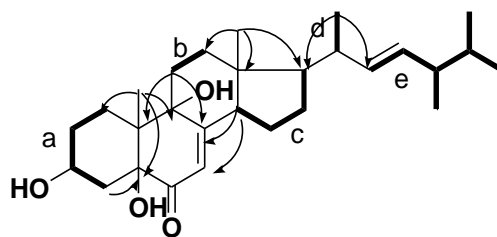
Le composé **C3** (2,5 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode négative présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 443,3145  $[M-H]^-$  (calc. pour  $C_{28}H_{43}O_4$  : 443,3150) correspondant à la formule brute  $C_{28}H_{44}O_4$ .

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 13) est caractérisé par la présence de 3 protons éthyléniques (H-7) à 5,64 ppm, (H-22) et (H-23) à 5,12 et 5,20 ppm ainsi que protons aliphatiques entre 4,03 et 1,25 ppm. Il met en évidence la présence de signaux intenses intégrant chacun pour 3 protons à 0,60 ; 0,89 et 1,01 ppm et 6 protons à 0,82 qui correspondent à des groupements méthyles.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 13) révèle la présence de 28 atomes de carbone dont un carbonyle à 197,8 ppm.

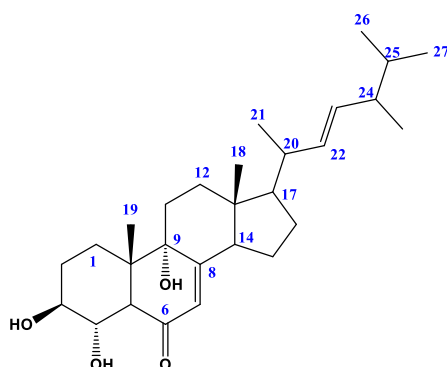
L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 14) montre que cette molécule contient vingt-deux carbones qui corrélerent avec des protons directement liés. Il met en évidence de la présence de protons équivalents portés par les carbones à  $\delta$  22,6 ; 25,6 ; 28,1 ; 30,3 ; 29,1 ; 35,1 ; et 37,4. Il a permis de déduire la présence de six carbones quaternaires.

Les différents couplages observés sur le spectre  $^1H$ - $^1H$  COSY a permis de mettre en évidence cinq sous structures (**a-e**) (Figure 96).



**Figure 96 : Corrélation 1H-1H COSY (en gras) et HMBC (flèche).**

Les corrélations à longue distance permettent de compléter les attributions des protons et carbones et d'aboutir à la structure du composé **C3**. Le proton du méthyle à  $\delta$  0,99 porté par le carbone à  $\delta$  20,7 corrélient avec C-1, C-5, C-9 et C-10 tandis que le proton à  $\delta$  2,03 corrélient avec C-3, C-5 et C-10. Les corrélations de H-11 avec C-8, C-9, C-12 et C-13 permettent de joindre les deux cycles à six (**a** et **b**) tandis que celle des protons du méthyle à  $\delta$  0,60 (CH<sub>3</sub>-12) avec C-12, C-13, C-14 et C-17 relie les cycles B et C. La chaîne latérale a été reliée au noyau tétracyclique par les corrélations de protons à  $\delta$  1,01 (CH<sub>3</sub>-21) avec C-17, C-20 et C-22. Aucune corrélation n'a été observée entre les différents protons avec le carbonyle à  $\delta$  197,8. Hors, la formule brute de cette molécule fait état de 4 atomes d'oxygène. La présence d'un carbone fortement déblindé à  $\delta$  164,5 (C-8) ne peut s'expliquer que par la présence d'une cétone a,b insaturée. La fonction cétone a été placée en position 6.



**Figure 97 : 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.**

Après une comparaison avec les données de la littérature (Valisolalao et al., 1983), le composé **C3** a été identifié comme étant le 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one. De plus les corrélations obtenues par RMN bidimensionnelles (COSY, HSQC, et HMBC) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée.

Il a été isolé à partir du champignon endophyte *Annulohyphoxylon stygium* var. *annulatum* cultivé sur un milieu PDA (Cheng et al., 2023). Il a également été isolé à partir du champignon endophyte *Penicillium* sp. cultivé sur un milieu solide à base de riz (Zeng et al., 2022).

Ce composé provoque une inhibition complète de la prolifération des cellules HeLa après traitement à 18  $\mu$ M (Kawagishi et al., 1988). Il a aussi montré une capacité d'inhiber la prolifération cellulaire et d'activer l'apoptose dans les cellules vero (Khan et al., 2018).

#### III.3.5.5.4. Composé C4

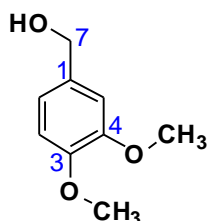
Le composé **C4** (3,5 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 169,0898  $[M+H]^+$  (calc. pour  $C_9H_{13}O_3$  : 169,0861) correspondant à la formule brute  $C_9H_{12}O_3$ .

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz ; cf. Annexe 15) met en évidence la présence de deux groupes méthoxy qui résonnent sous forme de singulets à 3,84 et 3,82 ppm. Les deux protons de groupe méthylène ( $CH_2$ ) sont déblindés par le groupement OH et résonnent à 4,53 ppm. Les deux protons aromatiques sont assignés aux deux signaux à 6,98 et 6,89 ppm. Le proton aromatique en position 2 est un doublet à 6,91 ppm avec une faible constante de couplage.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz ; cf. Annexe 15) montre un signal déblindé à 56,7 ppm. Il a été attribué au carbone du groupe méthoxy en position 3. Les carbones C-3 et C-4 du cycle aromatique sont déblindés car ils portent les deux groupes méthoxy. Ils sont attribués aux signaux à 150,6 et 150,0 ppm respectivement. Les autres signaux à 135,8 ; 112,4 ; 113,0 et 120,9 ppm sont attribués aux protons du cycle aromatique.

L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 16) montre que cette molécule contient trois carbones quaternaires et six carbones liés à des protons.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 16) permet de voir la corrélation entre les deux protons du groupe méthine avec le C-1, C-3 et C-5. Le proton aromatique à 120,9 ppm (H-6) corrèle avec les carbones C-2, C-4 et C-7. Les protons des deux groupes méthoxy sont en corrélation avec les carbones C-3 ( $\delta$  150,6) et C-4 ( $\delta$  150,0).



**Figure 98** : Structure de l'alcool de veratryle.

Après une comparaison avec les données de la littérature, le composé **C4** (Figure 98) a été identifié comme étant l'alcool de veratryle (Mokhtar et al., 2023). De plus les corrélations obtenues par RMN bidimensionnelles (HSQC, et HMBC) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée. Il a été isolé du champignon *Phanerochaete chrysosporium* (Khindaria et al., 1995).

L'alcool de veratryle a montré une action inhibitrice contre les infections provoquées par *Pseudomonas aeruginosa* (Fu et al., 2024).

#### III.3.5.5.5. Composé C5

Le composé **C5** (2,9 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 157,0400  $[M+H]^+$  (calc. pour  $C_7H_9O_4$  : 157,0498) correspondant à la formule brute  $C_7H_8O_4$ .

Le spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 17) met en évidence la présence d'un groupe méthoxy qui résonne sous forme d'un singulet à 3,79 ppm qui intègre pour 3 protons.

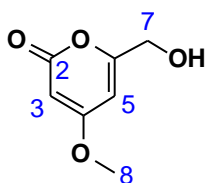


Le signal à 4,39 ppm qui intègre pour 2 protons correspond au groupe méthylène portant une fonction OH. Les deux protons du cycle pyrone sont attribués aux deux signaux à 5,42 et 6,05 ppm.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 17) révèle la présence d'un groupe carbonyle qui est déblindé et résonne à 171,4 ppm a été attribué à la fonction ester cyclique. Les signaux observés à 164,4 et 163,4 ppm sont attribués aux carbones insaturés de cycle en position 4 et 6 respectivement. Le signal déblindé à 56,2 ppm a été attribué au carbone du groupe méthoxy en position 8.

L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 18) a permis de déduire que cette molécule contient trois carbones quaternaires.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 18) permet de voir la corrélation entre le méthine (H-3) à 5,42 ppm avec C-2, C-4 et C-5. Les carbones C-2, C-3, C-6 et C-7 sont aperçu par le proton (H-5) à 6,05 ppm. Les protons ( $\text{H}_2$ -7) à 4,39 ppm corrélient avec les carbones C-5 et C-6.



**Figure 99 : Structure de l'opuntiol.**

Après une comparaison avec les données de la littérature (Siddiqui et al., 2016), le composé **C5** (Figure 99) a été identifié comme étant l'opuntiol. De plus les corrélations obtenues par RMN bidimensionnelles (HSQC, et HMBC) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée.

Ce composé a été isolé d'un cactus *Opuntia Ficus Indica* (L.Mill) (kandan et al., 2021). Il a également été isolé à partir de l'extrait méthanolique de la plante *Opuntia dellini* cladode (Siddiqui et al., 2016).

### III.3.5.5.6. Composé C6

Le composé **C6** (1,8 mg) a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 146,0683  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. pour  $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}$  : 146,0604) correspondant à la formule brute  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$ .

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz ; cf. Annexe 19) met en évidence la présence d'un signal caractéristique du proton de la fonction aldéhyde à 9,89 ppm. Les protons aromatiques en position 4, 5, 6 et 7 résonnent à 7,26 ; 7,22 ; 8,15 et 7,47 ppm respectivement. Le proton en position 2 résonne à 8,12 ppm.

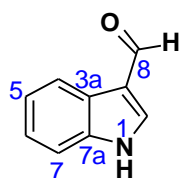
L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz ; cf. Annexe 19) montre que cette molécule contient neuf carbones dont 3 sont quaternaires qui résonnent à 120,3 ; 125,8 ; 125,8 ppm. Le signal caractéristique du carbonyle de la fonction aldéhyde se trouve à 187,6 ppm.

L'analyse de spectres de RMN 2D a permis d'attribuer les protons et les carbones.

Le spectre HSQC (cf. Annexe 20) montre les corrélations directes ( $^1\text{J}$ ) entre le proton et le carbone. Il confirme que cette molécule possède 3 carbones quaternaires.



Le spectre HMBC (cf. Annexe 20) montre les corrélations  $^2J$  et  $^3J$  entre les carbones et les protons. Les corrélations entre le proton à 9,89 ppm (CHO) et les carbones à C-3a et C-3. Le proton à 7,47 ppm corrèle avec les deux carbones aromatiques à  $\delta$  125,9 (C-3a) et 123,8 (C-5). Le proton à 8,15 ppm corrèle avec les carbones à  $\delta$  125,1 (C-4), 120,3 (C-3) et 113,3 (C-7). Le proton à 7,22 ppm corrèle avec les deux carbones à  $\delta$  125,8 (C-3a) et 113,3 (C-7) qui forment le cycle aromatique de l'indole. Le proton à 7,26 ppm corrèle avec les carbones à  $\delta$  139,8 (C-2) et 122,5 (C-6). Le proton à 8,12 corrèle avec les carbones à  $\delta$  187,6 (C-8), 125,8 (C-3a) et 120,3 (C-3).



**Figure 100** :Structure de 3-formylindole.

Après une comparaison avec les données de la littérature (Yu et al., 2018), le composé **C6** (Figure 100) a été identifié comme étant le 3-formylindole. De plus les corrélations obtenues par RMN bidimensionnelles (HSQC, et HMBC) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée.

Ce composé a été précédemment isolé à partir des bactéries notamment *Streptomyces axinellae* et *Enterobacter cloacae* cultivées sur des plaques d'agar M7 et de gélose Luria Bertani respectivement (Ai et al., 2014) (Yap et al., 2015). Il a également été isolé dans des plantes comme *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (Yu et al., 2018).

Le 3-formylindole montre une inhibition vis-à-vis *Candida albicans* (ATCC 10231) avec un CMI de 11,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fang et al., 2020)

### III.3.5.5.7. Composé C7

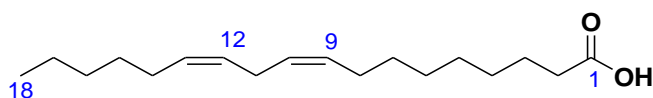
Le composé **C7** (1,4 mg) a été isolé sous forme d'un liquide visqueux marron. Le spectre de masse haute résolution ESI-qTOF en mode positif présente un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  : 281,2462  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. pour  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$  : 281,2472) correspondant à la formule brute  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ .

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz ; cf. Annexe 23) met en évidence la présence de 4 protons caractéristiques de deux groupes méthylènes à 5,33 ppm.

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz ; cf. Annexe 23) révèle la présence d'un groupe carbonyle de la fonction acide carboxylique à 178,0 ppm.

L'analyse du spectre HSQC (cf. Annexe 24) montre que cette molécule contient un seul carbone quaternaire.

L'analyse du spectre HMBC (cf. Annexe 24) permet de voir la corrélation entre le proton en position 17 et les carbones C-18, C-16, C-15, C-14, C-13, C-12, C-8, C-4. Le produit correspond à un acide gras avec deux doubles liaisons.



**Figure 101** : Structure de l'acide linoléique.

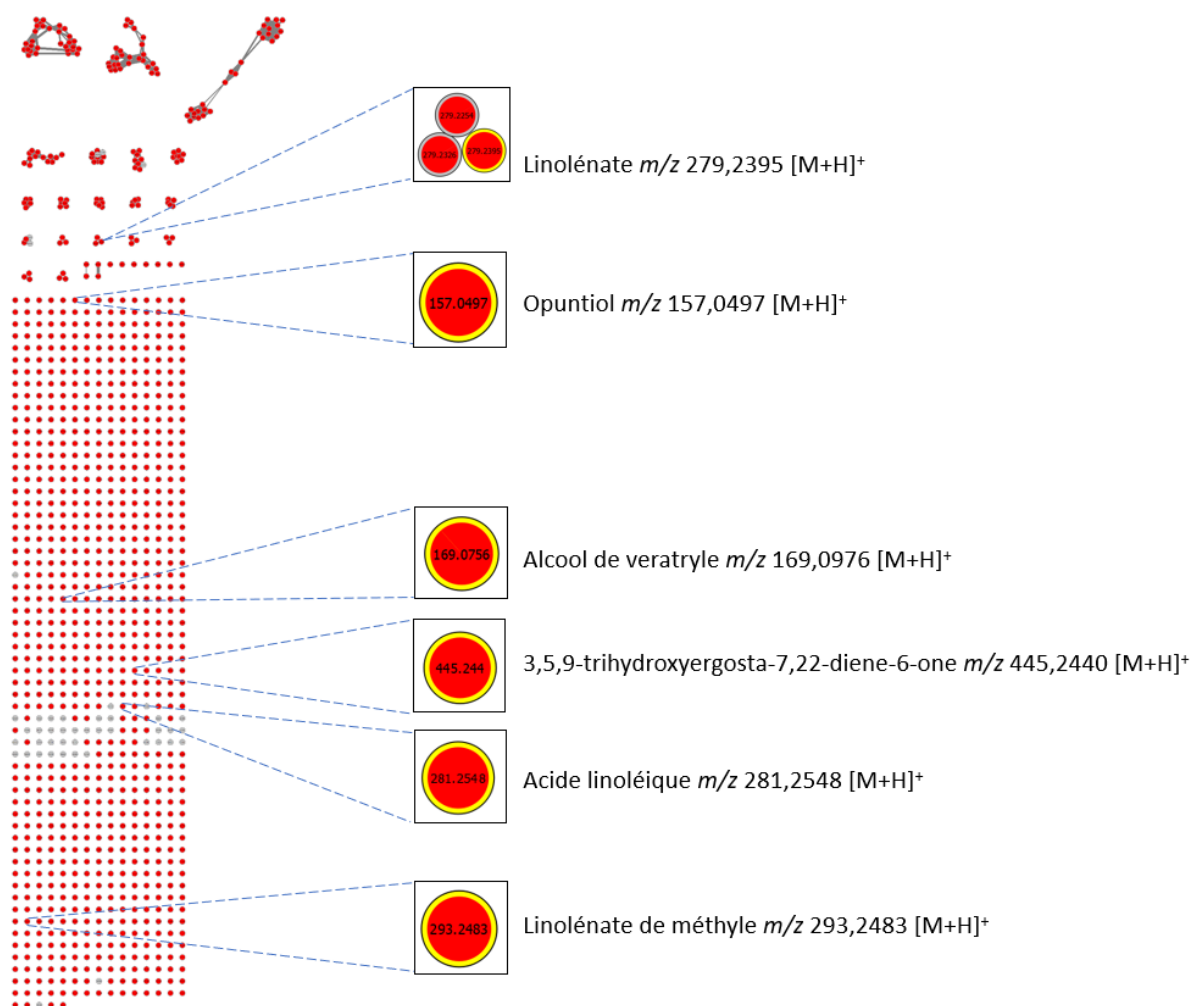
Après une comparaison avec les données de la littérature (Cai et al., 2013), le composé **C7** (Figure 101) a été identifié comme étant l'acide linoléique. De plus les corrélations obtenues par RMN bidimensionnelles (HSQC, et HMBC) au cours de ce travail permettent d'appuyer la structure proposée.

Il a été isolé du champignon *Paxillus involutus* (Antkowiak et al., 2003). Il a également été isolé à partir du champignon marin *Corollospora lacera* (MacKenzie et al., 2004).

Les effets pro-inflammatoires mesurés de l'acide linoléique ont été démontrés grâce à la signalisation du calcium et du pyroxynitrite, ainsi qu'à la production d'insuline dans les cellules bêta pancréatiques du rat (Saraswathi et al., 2004) (Feng et al., 2006).

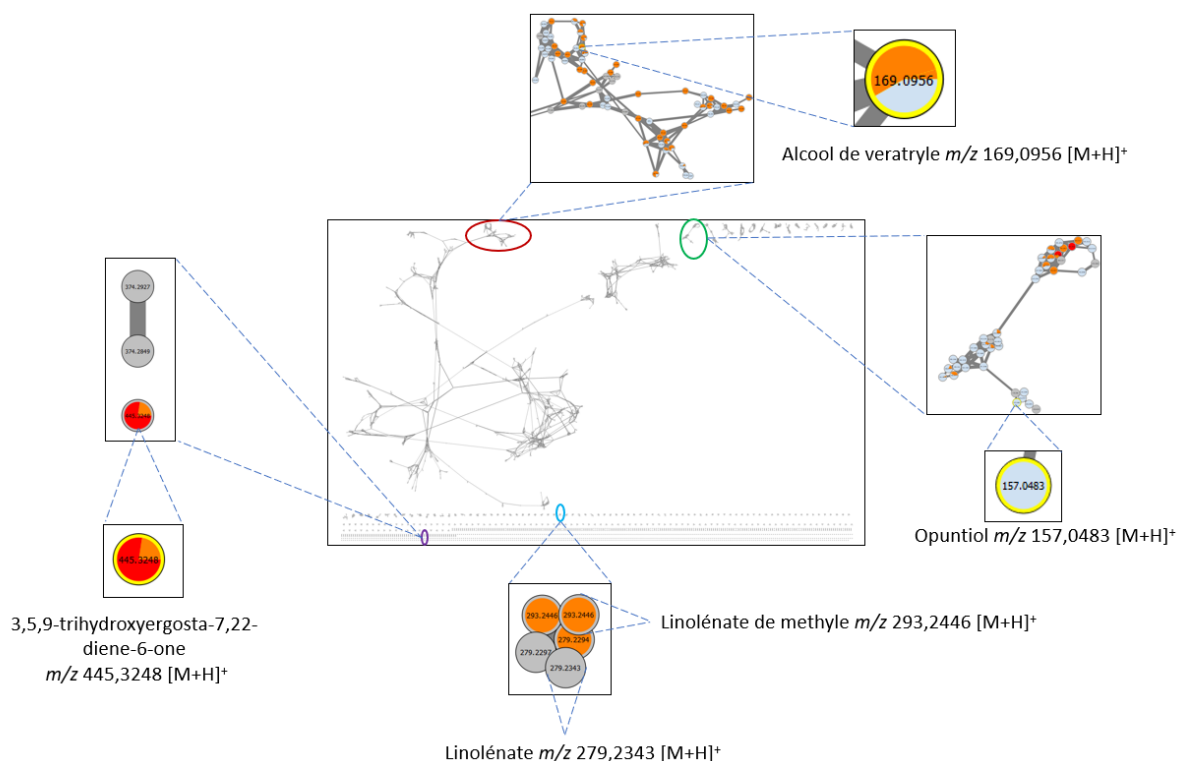
### III.3.5.6. Réseaux moléculaires

Les molécules isolées ont été identifiées dans les réseaux moléculaires grâce à leur  $m/z$  en mode positif  $[M+H]^+$ . Ces molécules n'étaient pas annotées depuis les bases des données au début de l'analyse des extraits et des fractions (Figure 102-103).



**Figure 102 : Identifications des molécules isolées dans les réseaux moléculaires de PA08 S, PA08 GS et PA08 GS-M.**

Rouge (Extraits actives ; PA08 S, PA08 GS et PA08GS-M) gris (milieu de culture ; Sabouraud)



**Figure 103 : Identifications des molécules isolées dans les réseaux moléculaires des fractions F2-F7 et F9 PA08GS-M.**

Rouge ( très actives ; F2-4), orange (active ; F5-6) et bleu (peu active ; F7 et F9)

### III.3.6. Activité antiproliférative *in vitro* des composés isolés

#### III.3.6.1. Test de viabilité cellulaire (MTT)

Parmi les molécules isolées, seules celles dont la quantité était suffisante ont été testées pour leur activité antiproliférative sur les cellules HT-29. Les résultats du test MTT sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 17 :  $CI_{50}$  des molécules isolées depuis le champignon endolichénique *Trametes versicolor* sur les cellules HT-29.**

Molécules	$CI_{50}$ $\mu M$ 24 h	$CI_{50}$ $\mu M$ 48 h
Opuntiol	152,40 $\pm$ 0,4	124,80 $\pm$ 0,7
Linolénate de méthyle	84,80 $\pm$ 2,6	70,60 $\pm$ 0,2
L'acide linoléinique	91,60 $\pm$ 0,4	56,60 $\pm$ 0,5
80-4	25,90 $\pm$ 0,9 $\mu g/mL$	22,70 $\pm$ 1,2 $\mu g/mL$
80-6	15,90 $\pm$ 1 $\mu g/mL$	5,20 $\pm$ 0,3 $\mu g/mL$
5-FU	> 50	17,30 $\pm$ 1,4
Irinotecan	44,50 $\pm$ 1,2	28,00 $\pm$ 0,4

L'opuntiol est nettement le moins efficace parmi les molécules isolées, montrant une activité inhibitrice limitée sur les cellules HT-29. Ce composé, a démontré une activité antiproliférative sur les cellules KB et U87, avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectives de 30  $\mu M$  et 357  $\mu M$  (kandan et al., 2021) (Ashfaque et al., 2021).

Le linolénate de méthyle présente une faible activité sur les cellules HT-29 après 24 h, avec une légère amélioration après 48 h. Il exerce un effet inhibiteur sur les cellules A549,

avec une valeur de  $CI_{50}$  de 0,4  $\mu\text{M}$  (S. et al., 2015). Il a également été démontré qu'il agit sur les cellules HT-29 à une concentration de 255  $\mu\text{M}$  (González-Fernández et al., 2020). Des études ont révélé que son mécanisme d'action repose sur l'augmentation sélective de la production de radicaux libres dans les cellules tumorales, en particulier dans les cellules HuH-7 (Das, 2006) (Itoh et al., 2010).

L'acide linoléique montre une faible activité sur les cellules HT-29, avec une amélioration après 48 heures. Dans d'autres études, une inhibition de la prolifération des cellules HT-29 a été observée après traitement avec 230  $\mu\text{M}$ . Ce composé induit également l'apoptose en activant les voies de signalisation impliquant les protéines mitochondriales (González-Fernández et al., 2020).

Les deux fractions 80-4 (1,3 mg) et 80-6 (1,4 mg) présentent un mélange de molécules. Elles sont issues de la fraction 5 ( $CI_{50} = 6,70 \mu\text{g/mL}$ ). En revanche, suite aux purifications de la fraction 5, l'activité de 80-6 est conservée ( $CI_{50} = 5,20 \mu\text{g/mL}$ ) par contre l'activité de 80-4 devient modérée ( $CI_{50} = 22,70 \mu\text{g/mL}$ ) cela peut s'expliquer par la présence d'une synergie entre les molécules et qu'on perd en fonction des purifications effectuées.

En raison de la faible quantité, la fraction 80-6 n'a pas été purifiée afin d'isoler les molécules responsables de cette activité.

Des tests MTT ont été effectués sur les cellules HEK293 pour évaluer la toxicité des molécules isolées et pour calculer l'indice de sélectivité (IS). Les résultats du test MTT sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 18 :  $CI_{50}$  des molécules/fractions isolées de *Trametes versicolor* sur les cellules HEK293.**

Molécules	$CI_{50} \mu\text{M} 24 h$	IS	$CI_{50} \mu\text{M} 48 h$	IS
Linoléate de méthyle	$74,52 \pm 0,2$	0,87	$88,54 \pm 1,4$	1,25
Linoléate	$77,14 \pm 0,3$	0,84	$84,71 \pm 0,1$	1,49
80-4	$19,20 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$	0,74	$18,00 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$	0,79
80-6	$10,82 \pm 1 \mu\text{g/mL}$	0,68	$7,90 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$	1,51

Le gamma-linolénate de méthyle et l'acide linoléique montrent une légère variation d'effet sur la croissance des cellules HT-29 et HEK293. Les deux molécules sont considérées comme non actives et non sélectives pour les cellules cancéreuses HT-29

Les fractions 80-4 et 80-6 semblent avoir une activité similaire sur les cellules HT-29 et HEK293, ainsi qu'une faible sélectivité.

En conclusion, l'investigation chimique et biologique des extraits et sous fractions de *Trametes versicolor* ont permis d'isoler et de caractériser sept molécules, grâce à des méthodes de purification basées à la fois sur le poids moléculaire et la polarité des composés.

La première purification de la sous-fraction PA08 GS-M, basée sur la taille moléculaire par LH-20, a permis de récupérer des fractions contenant des composés de poids plus élevé, qui ont montré une activité biologique (fraction 2, 3 et 4). En adoptant une approche bio-guidée, les études chimiques ont été orientées vers l'isolement de ces molécules. Ces fractions actives de *Trametes versicolor*, composées de molécules peu polaires, nécessitent des ajustements des méthodes chromatographiques pour assurer une purification optimale et identifier précisément les composés bioactifs.

La deuxième étape de purification de PA08 GS-M, fondée sur la polarité des molécules à l'aide d'une colonne de silice, a permis d'isoler des composés peu polaires tels que le linoléate de méthyle et l'acide linoléique. Toutefois, en raison de contraintes de temps, certaines fractions n'ont pas encore été complètement explorées et nécessitent une purification plus approfondie pour dévoiler leur potentiel.

L'analyse des réseaux moléculaires des extraits et sous-fractions de *Trametes versicolor* a mis en lumière la nécessité de sélectionner avec précision les paramètres d'acquisition, ce qui est essentiel pour obtenir des résultats fiables et exploitables. Cette méthode a non seulement permis d'identifier les molécules isolées, mais aussi d'explorer les interactions structurales entre les différents composés présents.

Parmi les sept molécules isolées, seules trois ont été testées pour leur activité antiproliférative sur les cellules HT-29, sans révéler d'efficacité significative. Cette observation souligne l'importance de poursuivre les tests sur les autres molécules isolées afin d'évaluer pleinement leur potentiel biologique. Par ailleurs, compte tenu de l'activité très intéressante des fractions restantes, il est indispensable de poursuivre les études chimiques sur ces fractions de PA08 GS-M ( $CI_{50} = 2,50 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ). L'ensemble de ces résultats ouvre la voie à des recherches futures, non seulement pour optimiser les techniques de purification et d'annotation, mais aussi pour explorer les mécanismes d'action des composés isolés, leur potentiel thérapeutique.



# Conclusions et perspectives







## Conclusions et perspectives

---

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit traitent l'élaboration, la mise en place des stratégies de recherches universelles et efficaces pour l'isolement des métabolites secondaires issus des champignons endolichéniques et tester leur activité biologique notamment antiproliférative sur les cancers chimiorésistants.

Ces recherches ont démontré que les champignons endolichéniques sont une source de diversité chimique et de molécules bioactives. En effet la présentation des données chromatographiques et spectrales des extraits de champignons endolichéniques permet une analyse et une exploration de leur diversité chimique. Les réseaux moléculaires permettent de former des « clusters » des molécules structurellement proches, identifier les ions majoritaires, annoter les molécules connues par les bases de données, ainsi que l'identification des molécules inconnues grâce à leur  $m/z$  et leur temps de rétention. Les études chimiques sur les extraits des champignons endolichéniques et l'isolement des molécules viennent confirmer les annotations faites dans les réseaux moléculaires ou pour enrichir les annotations lorsque ces molécules n'ont pu l'être. Les tests biologiques qui sont associés à chaque étape de ces études chimiques constituent l'approche bio-guidée qui a permis d'orienter les purifications des extraits pour isoler les molécules responsables de l'activité sur les cellules du cancer colorectal.

### ➤ Criblage des extraits de champignons endolichéniques

Les cultures sur des milieux solides de 10 souches de champignons endolichéniques isolées de différents lichens récoltés en France ont abouti à 19 extraits d'acétate d'éthyle. Ces derniers ont fait l'objet d'un criblage sur les cellules HT-29 afin de sélectionner les extraits provoquant 70% d'inhibition de la croissance cellulaire à partir de 48 h. Huit extraits démontrent des pourcentages d'inhibition des cellules HT-29 très intéressants ( $\geq 70\%$ ) et méritent d'être étudiés pour isoler les molécules responsables de cette activité. Pour ces travaux de thèse, un intérêt particulier a été porté sur les deux champignons endolichéniques *Aspergillus* sp. et *Trametes versicolor* en raison de leurs activités avec des valeurs de  $CI_{50}$  de l'ordre de 2 et 8,50  $\mu\text{g/mL}$  à 48 h respectivement.

### ➤ Le champignon endolichénique *Aspergillus* sp.

Les cultures à faible et grande échelles nous ont permis d'obtenir deux extraits XC04 P et XC04 GP respectivement. Grâce au test MTT de ces extraits, nous avons pu évaluer l'impact sur les cellules HT-29. La concentration des molécules actives présentes dans chaque extrait explique pourquoi l'activité de la culture à grande échelle semble être trois fois supérieure à celle de la culture à faible échelle. Ce travail a permis de démontrer que les extraits XC04 P et XC04 GP ont la particularité d'agir spécifiquement sur les cellules du cancer colorectal sans avoir d'effet sur les cellules du cancer du sein triple négative ou les cellules non cancéreuses dans la gamme des concentrations testées.

Ensuite, grâce à l'étude des réseaux moléculaires de l'extrait XC04 GP et ses sous fractions provenant de sa partition liquide-liquide (XC04 GP-I, XC04 GP-M et XC04 GP-H), nous avons pu repérer l'ion principal qui est annoté comme échinuline, ainsi que la neoéchinuline et la prééchinuline qui sont des alcaloïdes indoliques dicétopipérazines. De plus, les activités biologiques de ces molécules nous ont incité à les isoler afin d'approfondir notre étude du phénomène d'apoptose. Contrairement à nos attentes, d'autres dérivés

d'échinuline non annotés ont pu être isolés puis identifiés grâce aux résultats des purifications, tels que le 8-hydroxyéchinuline, la tardioxopiperazine B et le didehydroéchinuline B. Cela renforce l'importance des processus d'isolement des molécules. L'activité très intéressante de l'échinuline a été démontrée sur les cellules du cancer colorectal ( $CI_{50} = 1,73 \mu\text{M}$ ) et une faible toxicité sur les cellules non cancéreuses ( $CI_{50} = 44,19 \mu\text{M}$ ). En outre, ces études ont prouvé que la fragmentation de l'ADN des cellules du cancer colorectal est dose-dépendante du traitement avec l'échinuline. Il sera donc pertinent de continuer les recherches biologiques afin de comprendre le mécanisme d'action de cette molécule sur cette catégorie cellulaire, ainsi que de réaliser des tests *in vivo*.

Dans ces travaux de thèse, l'activité antiproliférative *in vitro* du 8-hydroxyéchinuline a été décrite sur les cellules HT-29 ( $CI_{50} = 8,80 \mu\text{M}$ ). Il est crucial de continuer les tests afin d'analyser son mécanisme d'action.

Dans le cadre d'une approche bio-guidée, l'activité antiproliférative de XC04 GP-H demeure intéressante ( $CI_{50} = 19,80 \mu\text{g/mL}$ ) et il doit être une priorité pour les futures études chimiques.

Dans une optique d'étudier la diversité chimique des métabolites secondaires synthétisés par le champignon endolichénique cultivé sur le milieu solide PDA, il serait donc pertinent de purifier tous ces extraits pour caractériser toutes les molécules respectives.

Dans la même optique, il sera intéressant d'effectuer des cultures sur différents milieux de culture et faire un profilage métabolomique des extraits suivis par une construction des réseaux moléculaires pour étudier la diversité chimique et mettre en évidence l'effet du milieu sur les voies de biosynthèses des métabolites secondaires par l'*Aspergillus* sp.

Enfin, la mise en place d'une culture à grande échelle permettrait d'obtenir une quantité significative d'extrait de départ (> 15 g), étant donné que les champignons endolichéniques sont connus pour produire de nombreuses molécules, mais en faible quantité. Cela faciliterait l'isolement de ces molécules minoritaires, l'identification de leurs structures, ainsi que l'évaluation de leur potentiel thérapeutique à travers des études sur leurs mécanismes d'action.

#### ➤ Le champignon endolichénique *Trametes versicolor*

Le champignon endolichénique *Trametes versicolor* a été étudié selon la même approche qu'*Aspergillus* sp.

Le profilage chimique par CLHP n'a pas montré de différence entre les deux profils d'extraits à faible échelle (PA08 S) et à grande échelle (PA08 GS). Cela a été confirmé par les résultats des tests MTT. Les  $CI_{50}$  des deux extraits sont plus au moins similaires 2,1 et 3,10  $\mu\text{g/mL}$  à 48 h.

L'expression des protéines de marqueurs apoptotiques (pro-caspase-3, caspase-3 clivée et la PARP) par les cellules du cancer colorectal après traitement avec l'extrait PA08 S et PA08 GS-M est très évidente. De plus, les taux de fragmentation de l'ADN des cellules HT-29 est dose dépendant après traitement avec ces extraits, ce qui confirme l'induction du phénomène de l'apoptose. Il sera donc pertinent de procéder à une cytométrie en flux afin de mieux observer les différentes étapes de l'apoptose.

L'étude chimique de la sous fraction active (PA08 GS-M,  $CI_{50} = 2,50 \mu\text{g/mL}$ ) a permis d'isoler le linolénate de méthyle, l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'opuntiol, l'alcool de veratryle et le 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one. Ces molécules ont été identifiées sur

les réseaux moléculaires grâce à leur  $m/z$  obtenu après leur purification et la comparaison des fragmentations de leur ion moléculaire.

Il est difficile d'analyser les fractions provenant de la purification de la première partie de l'extrait PA08 GS-M en CLHP. Des molécules polaires sont présentes dans leurs profils en CCM. Toutefois, leur analyse en CCM phase inverse ou en utilisant la colonne C18 en CLHP analytique demeure difficile. Il est essentiel de mener d'autres essais d'optimisation avec d'autres types de colonne afin de déterminer les conditions appropriées pour purifier et isoler les molécules responsables de cette activité, en particulier pour les fractions 2, 3 et 4, qui présentent des activités intéressantes avec des  $CI_{50}$  inférieures à 2,60  $\mu\text{g/mL}$ .

Dans le cadre d'une approche bio-guidée, les activités antiprolifératives des sous fractions hexaniques 1 et 2 demeurent intéressantes avec des  $CI_{50}$  de 18,7 et 11,2  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Il conviendra donc de poursuivre les purifications.

Dans le but d'étudier la diversité chimique des métabolites secondaires produits par le *Trametes versicolor* cultivé sur le milieu solide SAB, il serait pertinent de purifier tous ses sous fractions afin de caractériser chaque molécule individuellement.

Enfin, l'intérêt des deux extraits de *Trametes versicolor* (PA08 S et PA08 GS-M) réside dans leur activité sur les deux lignées de cancer du sein triple négatif et colorectal, avec des  $CI_{50}$  variant de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  à 9  $\mu\text{g/mL}$ . Il est donc pertinent d'isoler les molécules qui sont à l'origine de cette activité et déterminer leur mécanisme d'action.



Partie IV  
Matériels et Méthodes





## Partie IV. Matériels et méthodes

### IV.1. Récolte et identification des lichens

Le lichen *Pleurosticta acetabulum* a été collecté en juin 2016 à Limoges, aux coordonnées GPS 45°48'50.1"N et 1°13'53.7"E, sur l'écorce d'*Acer pseudoplatanus*. Les échantillons d'herbier ont été déposés à l'herbier du Laboratoire sous le numéro HL-L06/16-02. Le lichen *Xanthoparmelia conspersa* a été collecté en mai 2020 accolé sur les pierres dans la forêt de Vaseix à Limoges, les coordonnées GPS exactes (45.832310, 1.177927).

Après la collecte, il a été procédé à la préparation des lichens en retirant soigneusement la mousse, les autres espèces de mousses, les végétaux, les cailloux, la terre et les écorces présentes sur les échantillons. Les échantillons de lichens ont été identifiés par des tests chimiques sur les thalles mettant en évidence les acides lichéniques caractéristiques. Leur identification a été vérifiée par des lichénologues de l'Association française de lichénologie. Une observation à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un transformateur Nikon (modèle XN) et d'un microscope optique (Leica) a été aussi réalisée.

### IV.2. Isolement, identification et caractérisation des champignons endolichéniques

#### IV.2.1. Matériels

Tous les milieux de culture et les cryotubes ont été fournis par Deutscher SAS (Brumath, France). Les boîtes de Petri et parafilm sont de Ugap (Marnes-la-Vallée, France), et le glycérol est de Carlo Erba (Val de Reuil, France).

#### IV.2.2. Milieux de culture

Les champignons endolichéniques ont été cultivés sur des milieux solides. Ceux-ci sont solubilisés dans de l'eau distillée, puis stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. Les milieux de culture sont ensuite coulés dans des boîtes de Petri 20 mL/ 90 mm (pour la culture à faible échelle) ou 50 mL/ 120 mm (pour la culture à grande échelle) dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

**Tableau 19** : Composition des milieux de culture utilisés.

Milieux solides	Composition		Préparation
<b>PDA</b> <b>Potato Dextrose</b> <b>Agar</b>	Dextrose Infusion de pomme de terre Agar pH	20 g/L 4 g/L 15 g/L 5,6 ± 0,2	39 g de milieu par 1 L d'eau distillée (Eur Pharm)
<b>SAB</b> <b>Sabouraud (sans chloramphénicol)</b>	Dextrose Agar bactériologique Mélange de digestat peptique de tissu animal et de digestat pancréatique de caséine (1 :1) pH	40 g/L 15 g/L 10 g/L 5,6 ± 0,2	65 g de milieu dans 1 L d'eau distillée (Eur Pharm)

#### IV.2.3. Isolement des champignons endolichéniques

D'après le protocole de (Guo et al., 2000) et avec quelques ajustements, la stérilisation de surface des thalles lichéniques a été effectuée de la manière suivante. Trois bains successifs



de 2 minutes chacun est nécessaire pour effectuer l'opération (1er bain : éthanol à 70% ; 2ème bain : solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% et 3ème bain : éthanol à 70%).

Ensuite, le thalle est rincé dans de l'eau distillée stérile pour éliminer les résidus d'éthanol. Les thalles stérilisés sont ensuite coupés en morceaux d'environ 0,5 x 0,5 cm à l'aide d'un scalpel stérile, puis transférés sur du papier stérile. Dans des boîtes de Petri (120 mm), deux à quatre morceaux de thalle et du milieu MEA sont ajoutés. Les antibiotiques sont ajoutés dans les deux milieux pour stopper la prolifération des bactéries (streptomycine à 50 mg/L).

Dans une boîte de Petri contenant du milieu PDA, l'eau de rinçage (1 mL) est ajoutée afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation. Le Parafilm® a été utilisé pour fermer les boîtes de Petri et elles ont été placées à température ambiante à la lumière naturelle jusqu'à ce que des colonies fongiques se forment autour des segments de thalle, pendant environ un mois. Dès qu'une croissance est observée, les échantillons sont prélevés et transférés dans des boîtes de Petri. Ils sont ensuite isolés par repiquages successifs jusqu'à obtenir une colonie pure.

Chaque échantillon de champignons isolés a été étiqueté et conservé soit directement dans un tube incliné (milieu SAB) à une température de 4°C, soit dans des cryotubes contenant une solution de glycérol 15% (v/v) à des températures de -20 °C et -80 °C (Kusari et al., 2009).

#### **IV.2.4. Identification des champignons endolichéniques**

L'identification des souches fongiques a été réalisée par caractérisation moléculaire des champignons isolés, en collaboration avec le Dr Patricia Jargeat du laboratoire Évolution et Diversité Biologique (UMR 5174) à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Cette caractérisation a commencé par une extraction de l'ADN à partir des mycéliums des champignons. L'ADN extrait a été utilisé pour une amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les ADN amplifiés ont ensuite été envoyés à Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) pour séquençage avec l'amorce ITS 5.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit pour interpréter les chromatogrammes bruts. La recherche de séquences similaires à nos séquences a été effectuée dans la base de données GenBank en utilisant l'outil BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). Les souches ont été identifiées sur la base de la similarité des séquences, c'est-à-dire l'évaluation du pourcentage d'identité nucléotidique avec les séquences de référence, et de leur position dans l'arbre phylogénétique, permettant ainsi de définir l'espèce, voire la variété, de la souche fongique lorsqu'elle est répertoriée.

### **IV.3. Cultures des souches sélectionnées**

#### **IV.3.1. Culture à faible échelle**

Les souches sélectionnées PA08 et XC04 sont cultivées sur des milieux SAB et PDA respectivement.

Pré-culture : récupération de deux cryotubes stockés à -80°C contenant les deux souches endolichéniques.

Pour chaque souche, 4 boîtes de Petri (90 mm) sont remplies avec 20 mL de milieu, puis dans chacune 2 à 3 morceaux de mycélium de 5 mm de diamètre sont déposés. Les boîtes de Petri sont datées et scellées avec du parafilm, puis transférées dans un incubateur pour 15 jours de croissance à 25°C.

Culture à faible échelle : après avoir préparé et stérilisé 400 mL de milieu de culture, des boîtes de Petri (90 mm) sont remplies avec 20 mL de milieu de culture sous une hotte. La gélose de chaque boîte de Petri de pré-culture est coupée en petits morceaux, qui sont ensuite placés dans 20 boîtes de Petri (90 mm) pour initier la culture à petite échelle pendant 21 jours supplémentaires, en surveillant la croissance et les éventuelles contaminations.

#### **IV.3.2. Culture à grande échelle**

Après avoir préparé et stérilisé 10 L de milieu SAB et 6 L de milieu PDA, 200 boîtes de Petri (120 mm) ont été remplies avec le milieu SAB sans chloramphénicol pour la souche PA08, tandis que 120 boîtes de Petri (120 mm) ont été remplies avec le milieu PDA pour la souche XC04.

La récupération des boîtes de Petri issues de la culture à faible échelle de chaque souche fournira le matériel nécessaire pour effectuer la culture à grande échelle correspondante. 2 à 3 morceaux de 5 mm de mycélium sont placés dans chaque boîte de Petri. La croissance est vérifiée régulièrement.

#### **IV.4. Procédés d'extraction**

##### **IV.4.1. Extractions des champignons endolithiques cultivés sur milieu solide**

Après 21 jours de croissance, les boîtes de Petri contenant le mycélium et la gélose sont récupérées. À l'aide d'un scalpel, la gélose est coupée en petits morceaux afin de maximiser le contact avec le solvant pour une meilleure extraction. Le matériel fongique est ensuite placé dans un grand seau de 10 L, additionné de 2,5 L d'acétate d'éthyle, et une agitation mécanique est effectuée pendant 48 h. Une filtration est ensuite effectuée à l'aide d'un papier filtre standard (0,5 µm) et d'un Buchner pour séparer le solide (matériel fongique et gélose) du filtrat (solvant + métabolites). Le filtrat est lavé avec 50 mL d'eau puis séché avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute eau résiduelle. Il est ensuite filtré une seconde fois avec un filtre standard (0,5 µm). Le matériel fongique et l'agar subissent une deuxième et une troisième extraction à l'acétate d'éthyle toutes les 48 h. Les étapes de filtration seront les mêmes que ci-dessus. Le filtrat récupéré après chaque extraction est évaporé à sec pour obtenir un extrait brut.

#### **IV.5. Méthodes analytiques et appareillages**

##### **IV.5.1. Réactifs et solvants**

L'ensemble des réactifs, solvants et acides sont de Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France), VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France), Carl Roth (Lauterbourg, France) et Sigma Aldrich (Darmstadt, Allemagne). Les colonnes analytiques et semi préparatives, la silice, les plaques CCM, les plaques CCM préparatives sont de Fisher Scientific (Strasbourg, France) et Macherey-Nagel (Strasbourg, France).

##### **IV.5.2. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM)**

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (SiO<sub>2</sub>) et d'un indicateur de fluorescence (ALUGRAM® SIL G/UV254 ; 0,20 mm, Macherey-Nagel). Le révélateur anisaldéhyde sulfurique, utilisé comme révélateur universel, agit par oxydation et condensation des composés organiques présents sur la plaque CCM, produisant des taches colorées qui facilitent leur visualisation et identification. Il permet de révéler divers composés, notamment des lichéniques, des sucres, des stéroïdes, des alcaloïdes terpéniques et des phénols, qui apparaissent sous différentes

couleurs telles que le bleu, le rose, le marron, le jaune, le vert, et le violet. Le révélateur anisaldéhyde sulfurique est préparé par l'ajout de 5 mL de solution concentrée d'anisaldéhyde à 895 mL de méthanol, 100 mL d'acide acétique glacial, et 5% d'acide sulfurique concentré. Les plaques CCM sont ensuite observées sous UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec une solution d'anisaldéhyde sulfurique. Les plaques CCM, sont chauffées à 100°C pendant 1 min.

#### **IV.5.3. Chromatographie liquide haute performance CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) analytique**

Un appareil Alliance (Waters 2690) a été utilisé pour effectuer des chromatographies liquides haute performance, couplé à un détecteur à barrette de diodes (Waters 996) et à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL).

Une colonne de silice greffée C18 HTec (Nucleodur® EC 250 x 4,6 mm, 10 µm, Macherey-Nagel) a été employée pour analyser les extraits des champignons endolichéniques. Une fois que les échantillons ont été solubilisés dans 100% de MeOH, 10 µL à une concentration de 5 mg/mL ont été injectés. L'élution a été effectuée à 1 mL/min en utilisant un gradient A (H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH) et B (ACN + 0,1% HCOOH).

Les gradients employés ont été améliorés à la suite de nombreux essais. Les gradients suivants sont utilisés pour analyser chaque extrait et sous fraction (PA08 S, PA08 GS-M, PA08GS-H1, PA08 GS-H2, Précipité).

Les fractions (F2 à F9) issues du fractionnement de la 1ère partie de la sous fraction PA08 GS-M ont été aussi analysées suivant ce gradient.

Le logiciel Empower™ 3 (Waters) a été utilisé pour collecter et traiter les données des analyses.

**Tableau 20 : Gradient d'élution en CLHP.**

<b>Temps (min)</b>	<b>ACN %</b>	<b>H<sub>2</sub>O %</b>
<b>0</b>	10	90
<b>2</b>	10	90
<b>8</b>	40	60
<b>11</b>	40	60
<b>21</b>	70	30
<b>23</b>	70	30
<b>25</b>	10	90
<b>27</b>	10	90

L'extrait (XC04 GP) et les sous fractions (XC04 GP-M, XC04 GP-I et XC04 GP-H) ont été analysés en isocratique avec 98% d'acétonitrile + 0,01% HCOOH gradient suivant.

**Tableau 21 : Analyse par CLHP en mode isocratique.**

Temps (min)	ACN %	H <sub>2</sub> O %
0	98	2
20	98	2

D'autres analyses CLHP ont été effectuées sur un système CLHP-UV comprenant une pompe Shimadzu LC-20AB, un passeur d'échantillons SIL-20AC, une colonne four CTO-10AS réglé à 40°C et, pour la détection, une matrice de photodiodes Shimadzu SPD-M20A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). L'instrument HPLC a été contrôlé par le logiciel Shimadzu LCMS LabSolution.IV.4.

#### **IV.5.4. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) - Analyses basses Résolution**

La détection a été effectuée par le détecteur à barrettes de photodiodes Shimadzu SPD-M20A connecté en série à un spectromètre de masse Shimadzu LCMS-2020 ESI. La source d'ionisation par électrospray (ESI) fonctionnait en mode d'ionisation positive (plage de balayage  $m/z$  100-700).

La colonne analytique CLHP utilisée était une colonne Nucleodur C18 en phase inversée (taille des particules 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4,6 mm D.I.). La phase mobile était composée d'H<sub>2</sub>O ultrapur avec 0,1% d'acide formique (A) et d'ACN avec 0,1% d'acide formique (B). Le gradient a été délivré à un débit de 1mL/min, et le volume d'injection était de 10  $\mu\text{L}$ . La température du four de la colonne était de 40°C. Pour la détection UV-Visible, le balayage de la longueur d'onde a été réglé entre 200 et 400 nm.

#### **IV.5.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS) - Analyses haute Résolution**

Les analyses ont été effectuées par Emilie Pinault à la plateforme de spectrométrie de masse, Institut de Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement (BISCEM), Université de Limoges.

Les analyses LC-HRMS ont été réalisées à l'aide d'un système Nexera X2 LC40 (Shimadzu Corporation, Noisiel, France) couplé à un DAD couvrant toute la gamme d'acquisition (190-800 nm). Il était interfacé avec un spectromètre de masse à triple temps de vol (QTOF) (TripleTOF® 5600+, Sciex, Concord, Canada), équipé d'une source d'ions DuoSpray™. La séparation a été réalisée sur une colonne ATLANTIS T3 100 Å (2,1 mm  $\times$  100 mm) avec des particules de 5  $\mu\text{m}$ . La colonne a été thermostatée à 40°C et un gradient (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) de solvant utilisant de l'eau +0,1% FA (solvant A) et de l'acétonitrile +0,1% FA (solvant B) a été appliqué de 5% à 95% du solvant B en 20 min. Les échantillons ont été reconstitués à 1 mg/mL avec du méthanol et 5  $\mu\text{L}$  ont été injectés.

Les expériences de masse ont été enregistrées avec une source d'ions ESI en mode positif en utilisant les paramètres suivants : potentiel de déclustering (DP) à -50 V, énergie de collision (CE) à -30 +/- 15 V et l'acquisition a été réalisée en mode DDA (Data Dependent Acquisition), dans lequel le TripleTOF 5600+ a continuellement basculé entre un scan de 200 ms acquis en

mode TOF-MS (de 50 à 1500 m/z) et jusqu'à 15 scans dépendants de 100 ms requis en mode TOF-MS/MS (de 10 à 2000 m/z).

## **IV.6. Méthodes de séparation**

### **IV.6.1. Chromatographie sur couche mince préparative (CCM préparative)**

La chromatographie préparative sur couche mince a été réalisée sur des plaques en verre commerciales (20X20 cm) recouvertes de silices (60G F254 ; 0,25 mm, Merck Millipore ou SIL G-25 UV254 ; 0,25 mm, Macherey-Nagel).

### **IV.6.2. Chromatographie liquide moyenne pression (C-Pure)**

La chromatographie liquide à moyenne pression a été réalisée sur gel de silice (15-25 µm, Macherey-Nagel) ou sur silice greffée C18 (LiChroprep® 15-25 µm, Merck) avec une pompe Büchi (C-605, C-615 ou C-850).

### **IV.6.3. Chromatographie liquide de silice sur colonne ouverte**

La chromatographie liquide a été réalisée sur une colonne ouverte de gel de silice (15-25 µm, Macherey-Nagel) à pression atmosphérique.

### **IV.6.4. Chromatographie liquide d'exclusion stérique sur colonne ouverte**

La chromatographie liquide d'exclusion stérique a été réalisée sur une colonne ouverte de gel Séphadex® LH-20 (Sigma Aldrich) à pression atmosphérique.

### **IV.6.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) semi-préparative**

La CLHP semi-préparative a été équipée d'une pompe waters 600 avec un détecteur à barrette photodiode waters 996. La colonne utilisée était une colonne Nucleodur C18 en phase inverse (taille des particules 10 µm, 250 mm x 21 mm I.D., Macherey-Nagel). La phase mobile est composée de H<sub>2</sub>O ultrapur avec 0,1% d'acide formique (A) et d'ACN avec 0,1% d'acide formique (B). Les échantillons ont été solubilisés dans 100% de MeOH, Le gradient a été optimisé en HPLC analytique et a été délivré à un débit de 20 mL/min, et le volume d'injection était de 200 µL à température ambiante et la boucle de 1 mL. Pour la détection UV-Visible, la longueur d'onde a été fixée à 254 nm. Le logiciel Impower a été utilisé pour analyser les spectres.

Le gradient suivant a été utilisé en HPLC semi préparative pour isoler les molécules de la sous fraction XC04 GP-I

**Tableau 22 : Gradient d'élution en CLHP semi préparative.**

Temps (min)	ACN %	H <sub>2</sub> O %
1	70	30
6	85	15
9	85	15
13	99	1
17	99	1
19	70	30
21	70	30

#### **IV.6.6. Spectroscopie de résonance Magnétique nucléaire (RMN)**

Les analyses en RMN ont été réalisées par le Dr Yves Champavier, plateforme de spectrométrie de RMN, Institut de Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement (BISCEM), Université de Limoges.

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés : chloroforme-*d*<sub>1</sub> (CDCl<sub>3</sub>) et méthanol-*d*<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD).

Un spectromètre Bruker 500 MHz avance III HD (500.1525 MHz pour les spectres <sup>1</sup>H et 125 MHz pour les spectres <sup>13</sup>C) est utilisé pour les acquisitions de spectres 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et 2D (Cosy, HSQC et HMBC).

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en parties par million (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS ; 0 ppm), utilisé comme étalon interne. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en Hertz (Hz) et calculées à partir de la multiplicité du signal.

La multiplicité du signal est indiquée comme suit : s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet), dd (doublet) et br (singlet large).

Selon l'expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), les carbones et les protons sont liés par trois et, parfois, quatre liaisons dans les systèmes conjugués. L'absence de corrélations directes à une liaison.

Les liaisons simples proton-carbone sont étudiées à l'aide de l'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

L'expérience de spectroscopie de corrélation (COSY) RMN consiste à détecter le couplage scalaire (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) à <sup>3</sup>J des protons à l'aide d'une expérience 2D.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel TopSpin version 4.1.4 (Bruker).

#### **IV.7. Réalisation de réseaux moléculaires**

Le concept des réseaux moléculaires (MN) a été développé par les groupes de recherche de Pieter C. Dorrestein et Nuno Bandejas de l'Université de Californie à San Diego.

Ils ont mis en ligne en janvier 2014 la plateforme internet d'analyse et de partage de données MS/MS "Global Natural Products Social Molecular Networking – GNPS, Spectrometry Interactive Virtual Environment MassIVES" (<http://gnps.ucsd.edu>) (Nothias-Scaglia et al., 2015).

Les réseaux moléculaires ont été construits pour représenter la diversité chimique des différentes familles de molécules présentes dans les extraits fongiques ou d'autres échantillons. Cette approche permet de visualiser et de comparer la composition chimique complexe des extraits et d'annoter des molécules spécifiques potentiellement responsables de l'activité antiproliférative observée. Le logiciel MetGem a été utilisé pour générer ces réseaux moléculaires. MetGem aligne les spectres MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) entre eux, ce qui permet de regrouper les molécules ayant des structures similaires en clusters distincts. Chaque nœud des réseaux représente une molécule, tandis que les arêtes (ou liens) entre les nœuds indiquent une similarité structurale basée sur les spectres MS/MS.

Au préalable, une analyse en LC/MS-MS a été réalisée afin de collecter des données de spectrométrie de masse de ces échantillons. Ensuite, ces données ont été converties en format universel (\*.mzXML) à l'aide du logiciel MSConvert.

Les profils HPLC-ESI-(+) HRMS/MS ont été téléchargés dans le logiciel MZmine 2 (version 2.53) au format \*.mzXML. La détection des pics en mode positif a été effectuée en utilisant l'algorithme "mass detection1" (MS<sup>1</sup>) avec un niveau de bruit de "1E3" en mode centroïde. Les mêmes paramètres ont été utilisés pour la "mass detection2" (MS<sup>2</sup>).

Ensuite, les chromatogrammes ont été construits pour tous les ions détectés avec l'algorithme "ADAP chromatogram builder", avec une taille minimale de groupe de 5 scans, un seuil d'intensité de groupe de 500, une intensité maximale minimale de 1000 et une tolérance  $m/z$  de 0,005 ou 20 ppm. La déconvolution des pics a été appliquée pour générer des chromatogrammes avec l'algorithme "Baseline cut-off" en utilisant les paramètres suivants : hauteur minimale de pic de 2000, plage de durée des pics de 0 à 2, niveau de base de 1E3, plage  $m/z$  pour le couplage des scans MS<sup>2</sup> (Da) de 0,02 est cochée et la plage  $T_R$  de 0,5 est également cochée.

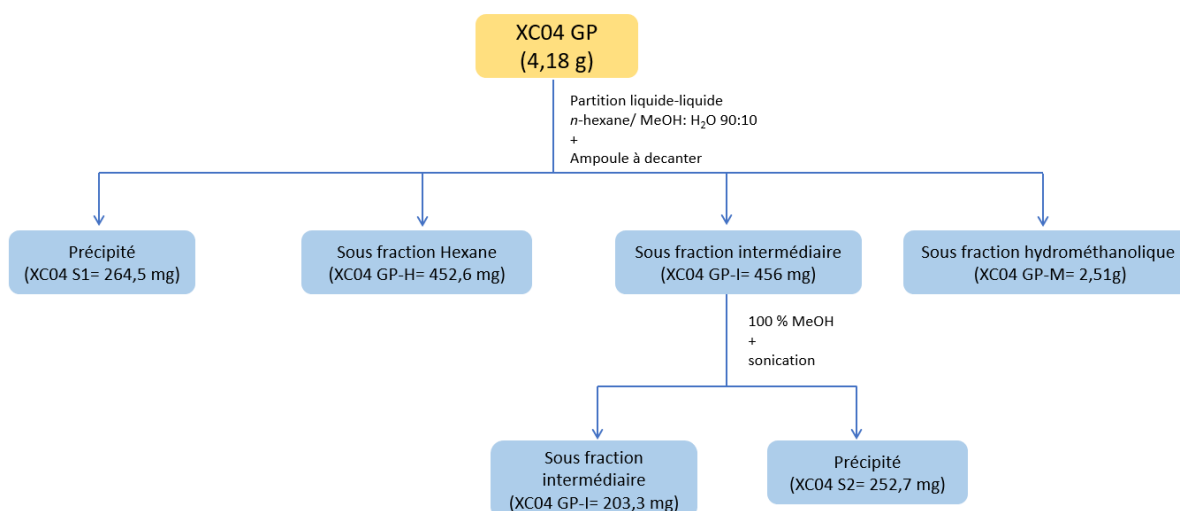
La suppression des isotopes a été réalisée avec le "isotopic peaks grouper" en utilisant les paramètres suivants : tolérance  $m/z$  de 0,005 ou 10 ppm, tolérance  $T_R$  de 0,2 min, charge maximale de 2 et l'ion le plus représentatif conservé était le plus intense. L'alignement a ensuite été effectué avec une tolérance  $m/z$  de 0,005 à 10 ppm et une tolérance  $T_R$  de 0,2 min, avec  $T_R$  après correction de 0,1, itératif RANSAC 0, nombre minimum de points : 50%, valeur seuil : 0,2 et même état de charge requis est coché. Un fichier \*.csv a été généré, regroupant tous les pics avec les données MS<sup>2</sup> correspondantes.

Les réseaux moléculaires ont été construits en utilisant le logiciel MetGem. Les paramètres suivants ont été appliqués pour MetGem : le score (cosine) a été fixé à 0,7, les données MS<sup>1</sup> ont été cochées, la tolérance  $m/z$  a été fixée à 0,02 Da et le nombre minimal de pics correspondants à 4 ; intensité minimale : 0.

## IV.8. Techniques de fractionnement

### IV.8.1. Purification des extraits issus de champignon endolichénique *Aspergillus sp.*

L'extrait brut de XC04 GP a fait l'objet d'une partition liquide-liquide avec le *n*-hexane et méthanol /H<sub>2</sub>O (90 :10). La solubilisation de l'extrait brut dans 200 mL de mélange hydroalcoolique (90 :10), donne un précipité (XC04 GP-S1). Ensuite la solution d'extrait a été additionnée à 100 mL d'hexane dans une ampoule à décanter. L'homogénéisation a permis de séparer les molécules selon leurs polarités dans 3 phases. On a obtenu une sous fraction hydrométhanolique (XC04 GP-M), une sous fraction hexane (XC04 GP-H) une sous fraction intermédiaire (XC04 GP-I). cette dernière, contient probablement des molécules amphiphiles, a subi un lavage au MeOH et sonication qui a permis d'avoir un deuxième précipité (XC04 GP-S2) (Figure 104)



**Figure 104 : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de XC04 GP.**

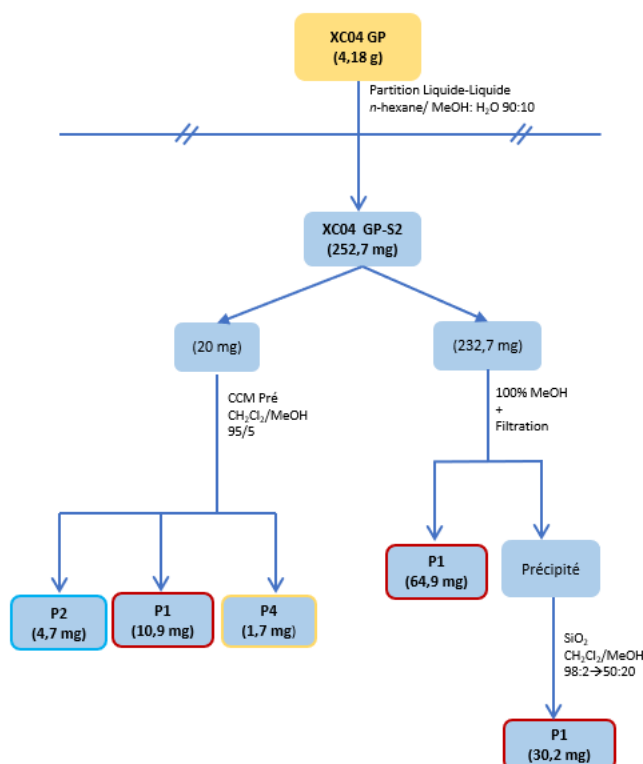
Les sous fractions suivantes ont été fractionnées selon un ordre de priorité en fonction de leur activité sur les cellules HT-29.

#### IV.8.1.1. Purification de précipité 2 (XC04 GP-S2)

La première partie du précipité S2 (20 mg) a été fractionnée sur CCM préparative dans un système d'élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95 :5. Cela a permis d'avoir **P1** (10,9 mg), **P2** (4,7 mg), et **P3** (1,7 mg) (Figure 105).

Le reste du précipité S2 (232,7 mg) a été solubilisé dans 100% de MeOH, le filtrat (64,9 mg) a été concentrée et l'analyse montre que c'est le **P1**, et le précipité a été fractionné sur une colonne ouverte de silice avec un gradient CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98 : 2 à 50 : 50 permettant d'isoler encore le produit **P1** (30,2 mg) (Figure 105).





**Figure 105 : Schéma récapitulatif du fractionnement du XC04 GP-S2.**

#### IV.8.1.2. Purification de XC04 GP-I

La sous fraction intermédiaire (XC04 GP-I = 156 mg) a été fractionnée sur une colonne ouverte du gel Séphadex® LH-20 et éluée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2 : 1. Dix fractions ont été obtenues (Figure 106).

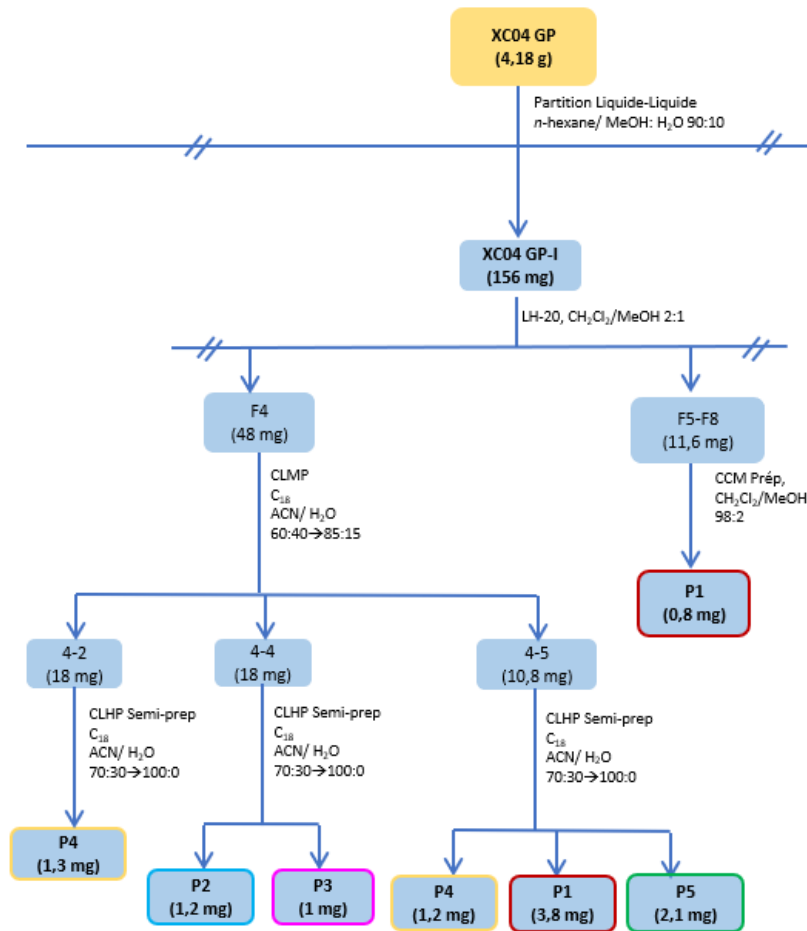
La fraction 5 à 8 ont été regroupées selon leur profil sur CCM et fractionnées sur une CCM préparative avec un mélange éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98 : 2, ce qui a conduit à l'isolement du produit pur **P1** (0,8 mg).

La fraction 4 (48 mg) a été fractionnée par CLMP sur silice phase inverse avec un gradient  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  60 : 40 à 85 : 15 ce qui a donné 6 fractions regroupées selon leur profil CCM. Les essais d'optimisation de gradient ont permis d'obtenir les profils chromatographiques des fractions 4-2, 4-4 et 4-5 (Figure 107).

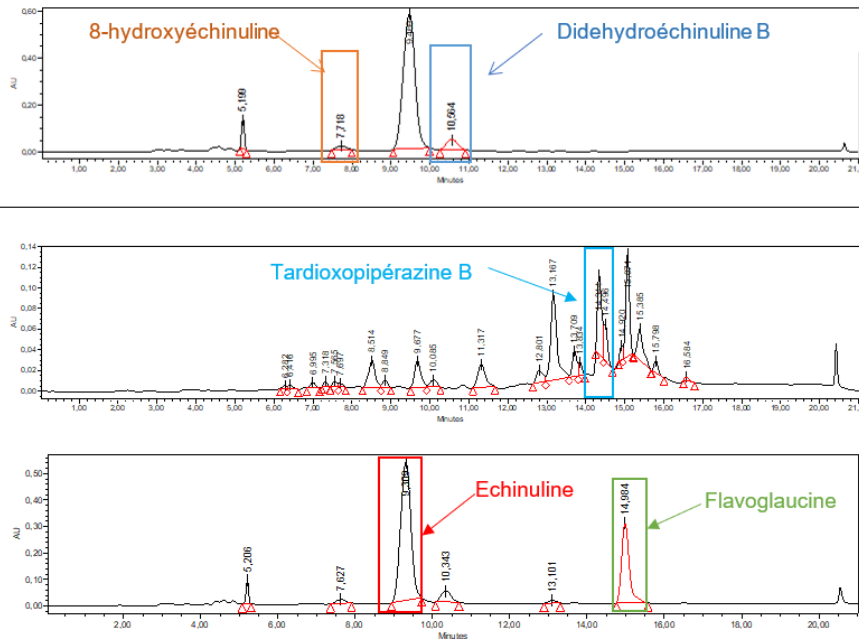
La fraction 4-2 (18 mg) a été purifiée par CLHP semi préparative sur silice phase inverse avec un gradient  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  70 : 30 à 100 : 0, ce qui conduit à l'isolement de nouveau de produit **P4** (1,3 mg).

La fraction 4-4 (18 mg) a été purifiée par CLHP semi préparative sur silice phase inverse avec un gradient  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  70 : 30 à 100 : 0, ce qui a donné de nouveau le produit **P2** (1,2 mg) et **P3** (0,9 mg).

La fraction 4-5 (10,8 mg) a été purifiée par CLHP semi préparative sur silice phase inverse avec un gradient  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  70 : 30 à 100 : 0, ce qui a donné de nouveau le produit **P1** (3,8 mg), **P4** (1,2 mg) et **P5** (2,1 mg).



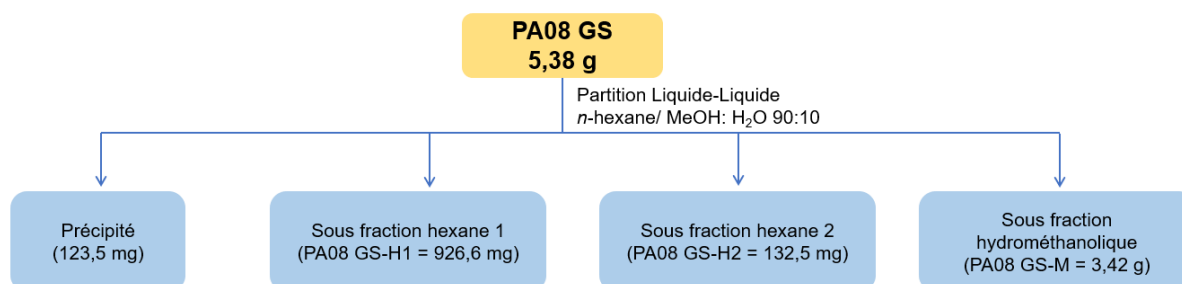
**Figure 106** : Schéma récapitulatif du fractionnement de XC04 GP-I.



**Figure 107** : Les chromatogrammes de la CLHP semi préparative des fractions (4-5, 4-4 et 4-2) issues de XC04 GP-I.

## IV.8.2. Purification des fractions issues du champignon endolichénique *Trametes versicolor*.

L'extrait brut de PA08 GS a fait l'objet d'une partition liquide-liquide (Figure 108). Premièrement l'extrait brut a été solubilisé dans un mélange hydroalcoolique (90 : 10) ce qui a conduit à la formation d'un précipité (123,5 mg). La solution de l'extrait a été additionnée à 100 mL de *n*-hexane. Cela a permis de partager les molécules selon leur polarité. Cela a permis d'avoir une sous fraction hydrométhanolique (PA08 GS-M), et deux sous fractions hexanes (PA08GS-H1) et (PA08 GS-H2).



**Figure 108** : Schéma récapitulatif de la partition liquide-liquide de l'extrait PA08 GS.

### IV.8.2.1. Purification de PA08 GS-M

La sous fraction hydrométhanolique (PA08 GS-M) a été séparée en deux (Figure 109). La première partie de PA08 GS-M (1,76 g) a été fractionnée sur colonne ouverte de gel de Séphadex® LH-20 et éluée avec 100% de MeOH, ce qui a abouti à 11 fractions.

La fraction 5 a été purifiée sur colonne ouverte de silice avec un gradient  $C_6H_{12}/MeOH$  95 : 5 à 0 : 100 puis  $AcOEt/MeOH$  100 : 0 à 0 : 100. Ce qui a permis d'isoler le composé **C1** (1,5 mg). Par la suite la fraction 5-10 a été purifiée sur CCM préparative avec un mélange éluant  $C_6H_{12}/AcOEt$  70 : 30 donnant le composé **C2** (3,2 mg).

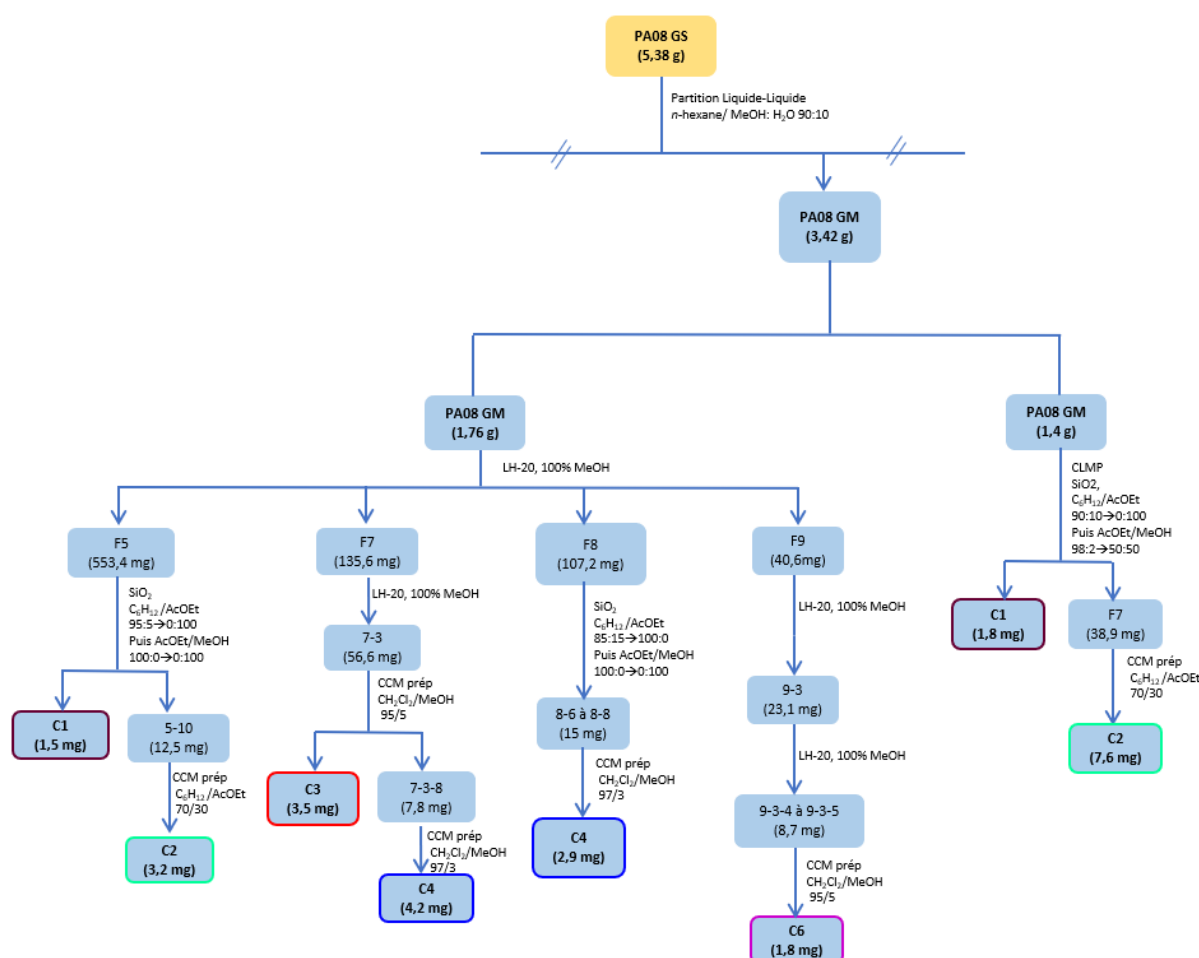
La fraction 7 a été purifiée sur une colonne ouverte de gel Séphadex® LH-20 et éluée avec 100% de MeOH ce qui permis d'obtenir 4 fractions, la fraction 7-3 (56,6 mg) a été purifiée avec CCM préparative avec un mélange éluant  $CH_2Cl_2/MeOH$  95 : 5 donnant le composé **C3** (2,5 mg) et la fraction 7-3-8 qui a été purifiée par CCM préparative avec un mélange éluant  $CH_2Cl_2/MeOH$  97 : 3 ce qui permis d'isoler le composé **C4** (3,5 mg).

La fraction 8 (107,2 mg) a été purifiée sur une colonne ouverte de silice avec un gradient  $C_6H_{12}/AcOEt$  85 : 15 à 100 : 0 puis  $AcOEt/MeOH$  100 : 0 à 0 : 100 donnant 14 fractions. Les fractions 8-6 à 8-8 (15 mg) ont été regroupées et f purifiées par CCM préparative avec un mélange éluant  $CH_2Cl_2/MeOH$  97 : 3, ce qui a permis d'isoler le composé pur **C5** (2,9 mg).

La fraction 9 (40,9 mg) a été purifiée avec une colonne ouverte de gel Séphadex® LH-20 et élué avec 100% de MeOH ce qui a permis d'obtenir la fraction 9-3 (23,1 mg) qui a été purifiée avec une colonne ouverte de gel de Séphadex® LH-20 et éluée avec 100% de MeOH donnant 9 fractions. Les fractions 9-3-4 et 9-3-5 ont été regroupées (8,7 mg) et purifiées par CCM préparative avec un mélange éluant  $CH_2Cl_2/MeOH$  95 : 5 ce qui a permis d'isoler le produit **C6** (1,8 mg) et **C7** (1,3 mg).

La deuxième partie de PA08 GS-M (1,4 g) a été fractionnée par CLMP sur silice avec un gradient  $C_6H_{12}/AcOEt$  90 : 10 à 0 : 100 puis  $AcOEt/MeOH$  98 : 2 à 50 : 50 a conduit à

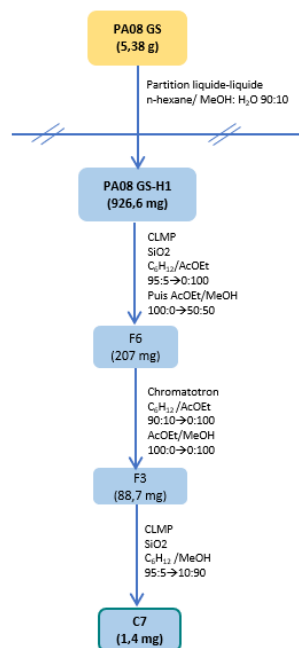
l'isolement d'un produit pur **C1** (1,8 mg). La fraction 7 a été purifiée par CCM préparative avec un gradient  $C_6H_{12}/AcOEt$  70 : 30, ce qui a permis d'obtenir le composé **C2** (7,6 mg).



**Figure 109** : Schéma récapitulatif du fractionnement de PA08 GS-M.

#### IV.8.2.2. Purification de PA08 GS-H1

La sous fraction hexane 1 (PA08 GS-H1) a été fractionnée par CLMP sur silice avec un gradient  $C_6H_{12}/MeOH$  95 : 5 à 0 : 100 puis  $AcOEt/MeOH$  100 : 0 à 50 : 50 ce qui a donné 19 fractions. La fraction 6 (207 mg) a été purifiée par chromatotron (chromatographie circulaire) avec un gradient  $C_6H_{12}/AcOEt$  90 : 10 à 0 : 100 puis  $AcOEt/MeOH$  100 : 0 à 0 : 100, cette manip a abouti à 8 fractions et la fraction 3 (88,7 mg) a été purifiée par CLMP sur silice avec gradient  $C_6H_{12}/MeOH$  95 : 5 à 10 : 90 pour donner lieu à **C7** (1,4 mg) (Figure 110).

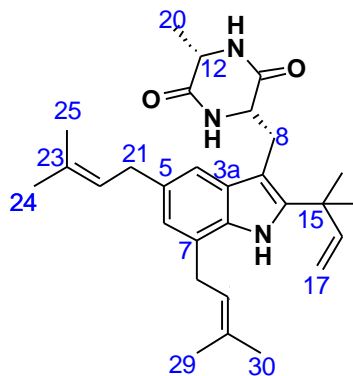


**Figure 110** : Schéma récapitulatif du fractionnement de PA08 GS-H1.

## IV.9. Résumé des données chromatographiques et RMN

### IV.9.1. Molécules isolées de *Aspergillus* sp.

#### Produit 1 : Echinuline

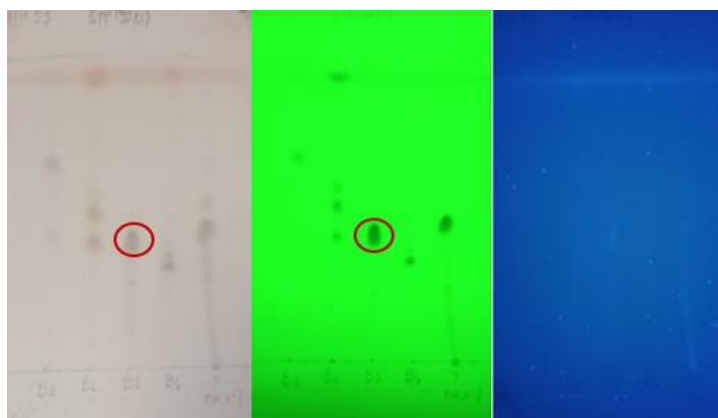


**Figure 111** : Structure de l'échinuline.

**Quantité** : 120,7 mg

**HRESIMS**:  $m/z$   $[M+H]^+$ : 462,3163

**Formule brute** :  $C_{29}H_{39}N_3O_2$



**Figure 112** : CCM de l'échinuline.

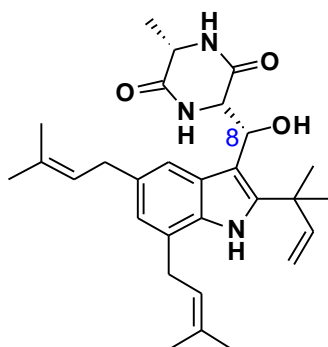
Eluant : Dichloromethane /Methanol 95 :5 (v/v)  
 Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 23** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du produit P1.

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ , multiplet ( $J$ en Hz)	COSY	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	- NH	8,03 ; 1H ; br s	-	C2, C7a, C3a, C3, C15
2	141,6	-	-	-
3	104,3	-	-	-
3a	129,2	-	-	-
4	115,3	7,12; 1H ; br s	H6, H21	C7a, C3a, C6, C3, C21
5	131,8	-	-	-
6	123,1	6,79 ; 1H ; bs s	H4, H26	C7a, C4, C21, C26
7	123,6	-	-	-
7a	132,5	-	-	-
8	29,7	3,64 ; 1H ; dd (3,6 ; 14,7) 3,17 ; 1H ; dd (11,7 ; 14,7)	H9, H8 H9, H8	C2, C3a, C3, C9 C10, C2, C3a, C3, C9
9	54,8	4,39 ; 1H ; ddd (1,8 ; 3,2 ; 11,5)	$\text{CH}_2$ -8	C10, C3, C8
10	168,7	-	-	-
11	- NH	5,66 ; 1H ; br s	-	C10, C9, C12
12	51,0	4,08 ; 1H ; q (7,0)	H20	C13, C20
13	168,0	-	-	-
14	- NH	6,30 ; 1H ; br s	-	C13, C9, C12
15	39,2	-	-	-
16	14,0	6,08 ; 1H ; dd (10,6 ; 17,4)	$\text{CH}_2$ -17	C2, C15, C19, C18
17	112,6	5,14 ; 1H ; br d (18,1)	H16, H17	C16, C2, C15, C19, C18

		5,13 ; 1H ; br d (10,0)	H16, H17	C16, C2, C15, C19, C20
<b>18</b>	28,1	1,49 ; 3H ; s	-	C16, C2, C17, C15, C19
<b>19</b>	28,2	1,49 ; 3H ; s	-	C16, C2, C17, C15, C18
<b>20</b>	20,1	1,52 ; 3H ; d (7,0)	H12	C13, C12
<b>21</b>	34,8	3,37 ; 2H ; d (7,1)	H22, H24	C23, C5, C22, C4, C24
<b>22</b>	124,7	5,33 ; 1H ; t (7,2)	H21, H24	C23, C21, C24, C25
<b>23</b>	134,1	-	-	-
<b>24</b>	26,0	1,72 ; 3H ; br s	H22, H21	C5, C22, C25
<b>25</b>	18,1	1,72 ; 3H ; br s	H22, H21	C5, C22, C24
<b>26</b>	31,6	3,51 ; 2H ; d (7,2)	H27, H30, H29	C28, C27, C29
<b>27</b>	123,1	5,41 ; 1H ; t (7,3)	H26, H30, H29	C7, C26, C29, C30
<b>28</b>	133,1	-	-	-
<b>29</b>	25,9	1,79 ; 3H ; s	H27, H26	C28, C27, C30
<b>30</b>	18,2	1,85 ; 3H ; s	H27, H26	C28, C27, C29

## Produit 2 : 8-hydroxyéchinuline

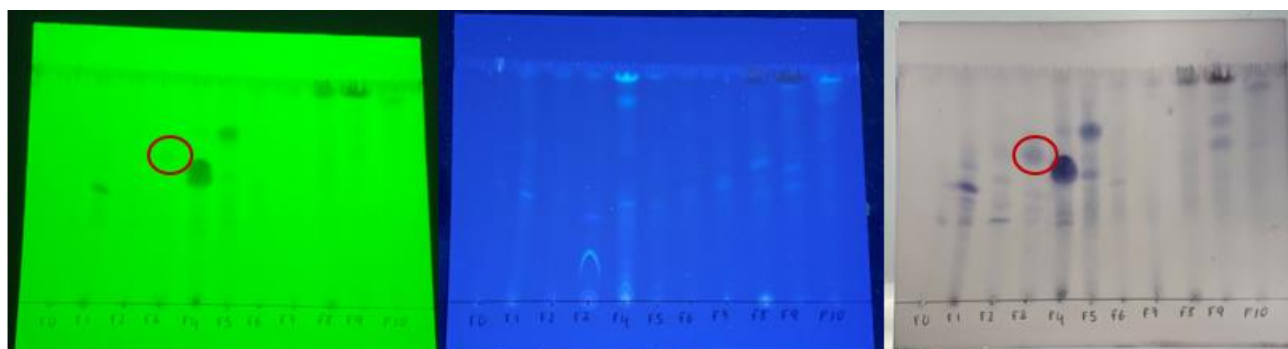


**Figure 113** : Structure de 8-hydroxyéchinuline.

**Quantité** : 1,2 mg

**HRESIMS**:  $m/z$   $[M+H]^+$ : 478,3072

**Formule brute** :  $C_{29}H_{39}N_3O_3$



**Figure 114 : CCM de 8-hydroxyéchinuline.**

Eluant : Dichloromethane /Methanol 95 :5 (v/v)  
Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

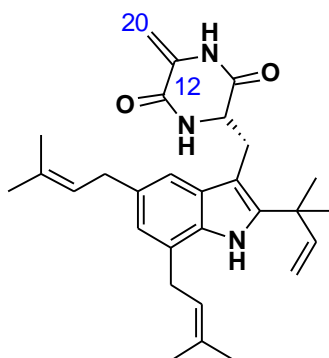
**Tableau 24 : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P2.**

Position	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H, multiplet (J en Hz)	COSY	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	- NH	8,13 ; 1H ; s	-	C2, C7a, C3a, C3
2	145,8	-	-	-
3	106,3	-	-	-
3a	127,0	-	-	-
4	117,3	7,39 ; 1H ; s	H6, H21	C7a, C3a, C6, C3, C21
5	134,3	-	-	-
6	123,2	6,76 ; 1H ; s	H4, H26	C7a, C4, C21, C26
7	123,3	-	-	-
7a	132,8	-	-	-
8	69,6	5,44 ; 2H ; dd (9,3 ; 18,7)		C3a, C3, C10, C9
8a	OH	4,91 ; 1H ; s		C3, C8, C9
9	56,3	4,64 ; 1H ; d (9,3)	H8	C10, C3, C8
10	170,2	-	-	-
11	- NH	5,33 ; 1H ; br s	-	C10, C9, C12
12	50,8	4,13 ; 1H ; br q (7,0)	H20	C13, C20
13	167,2	-	-	-
14	- NH	6,12 overlap	-	C13, C9
15	38,9	-	-	-
16	145,8	6,12 ; 1H ; dd (10,6 ; 17,5)	CH <sub>2</sub> -17	C2, C15, C19, C18



<b>17</b>	112,8	5,20 ; 1H ; dd (10,5 ; 17,5) 5,14 ; 1H ; dd (10,5 ; 17,5)	H16, H17 H16, H17	C16, C15
<b>18</b>	28,3	1,56 ; br s	-	C16, C2, C15, C19
<b>19</b>	28,5	1,49 ; br s	H12	C16, C2, C15, C18
<b>20</b>	19,5	1,51 ; br s	H12	C13, C12
<b>21</b>	34,9	3,35 ; 2H ; d (7,2)	H22, H24	C23, C5, C22, C4
<b>22</b>	124,8	5,33 ; overlap	H21, H24	C21, C24, C25
<b>23</b>	131,6	-	-	-
<b>24</b>	18,1	1,71 ; s	H22, H21	C23, C22, C25
<b>25</b>	25,9	1,71 overlap	H22, H21	C23, C22, C24
<b>26</b>	31,7	3,51 ; 2H, d (7,1)	H27, H30, H29	C28, C27
<b>27</b>	123,2	5,40 ; 1H; t (9,4)	H26, H30, H29	C26, C29, C30
<b>28</b>	133,8	-	-	-
<b>29</b>	25,9	1,90 ; 3H ; s	H27, H26	C28, C27, C30
<b>30</b>	18,1	1,85 ; 3H ; s	H27, H26, H8	C28, C27, C29

### Produit 3 : didehydroéchinuline B

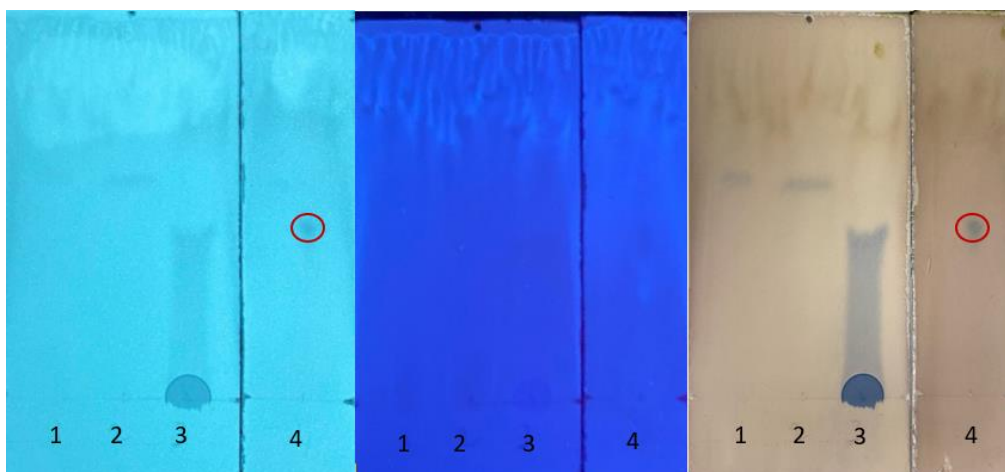


**Figure 115 : Structure de didehydroéchinuline B.**

**Quantité : 1 mg**

**HRESIMS:**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>: 460,2964

**Formule brute :** C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>



**Figure 116 : CCM de didydroéchinuline B.**

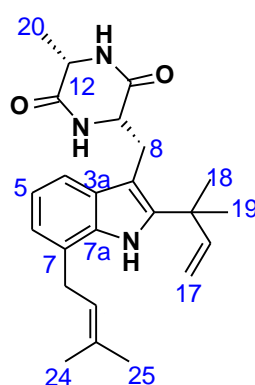
Eluant : Acétonitrile /H<sub>2</sub>O 65 : 35 (v/v)  
 Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 25 : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P3.**

Position	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H, multiplet (J en Hz)	COSY	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	- NH	8,04 ; 1H ; br s	-	C3, C3a
2	141,6	-	-	-
3	103,8	-	-	-
3a	129,2	-	-	-
4	115,2	7,11 ; 1H ; s	H6, H21	C7a, C6, C21
5	134,2	-	-	-
6	123,2	6,78 ; 1H ; s	H4, H26	C7a, C4, C26
7	123,6	-	-	-
7a	132,5	-	-	-
8	30,9	3,59 ; 1H ; dd (3,7 ; 14,5) 3,19 ; 1H ; dd (11,7 ; 14,5)	H9, H8	C3a, C9
9	55,8	4,50 ; 1H ; ddd (1,9 ; 3,7 ; 11,8)	CH <sub>2</sub> -8	-
10	166,0	-	-	-
11	- NH	5,68 ; 1H ; s	-	C10, C12
12	133,3	-	-	-
13	158,0	-	-	-
14	- NH	7,56 ; 1H ; s	-	-
15	39,2	-	-	-

16	145,9	6,03 ; 1H ; dd (10,6 ; 17,4)	H17	C15, C18, C19
17	112,4	5,12 ; 2H ; d (9,1) 5,10 ; 1H ; s	H16	C16, C2, C15, C18, C19 C16, C2, C15, C18, C19
18	28,0	1,47 ; 3H ; s	-	C16, C2, C17, C15, C19
19	27,9	1,48 ; 3H ; s	-	C16, C2, C17, C15, C18
20	101,9	5,54 ; 1H ; s 4,8 ; 1H ; s	-	C13, C12
21	34,8	3,36 ; 2H ; d (7,1)	H22, H24	C5, C22, C4, C24
22	124,7	5,31 ; 1H ; tt (1,4 ; 7,4)	H21, H24	C23, C21, C24, C25
23	131,8	-	-	-
24	26,0	1,72 ; 3H ; br s	H21	C23, C22, C25
25	18,1	1,72 ; 3H ; br s	H22, H21	C23, C22, C24
26	31,5	3,51 ; 2H ; d (6,8)	H27, H30, H29	C28, C27, C29
27	123,0	5,38 ; 1H ; t (1,4 ; 7,4)	H26, H30, H29	C30
28	133,0	-	-	-
29	25,9	1,79 ; 3H ; s	H27, H26	C12, C30
30	18,1	1,85 ; 3H ; s	H27, H26	C12, C27, C29

#### Produit 4 : tardioxopiperazine B

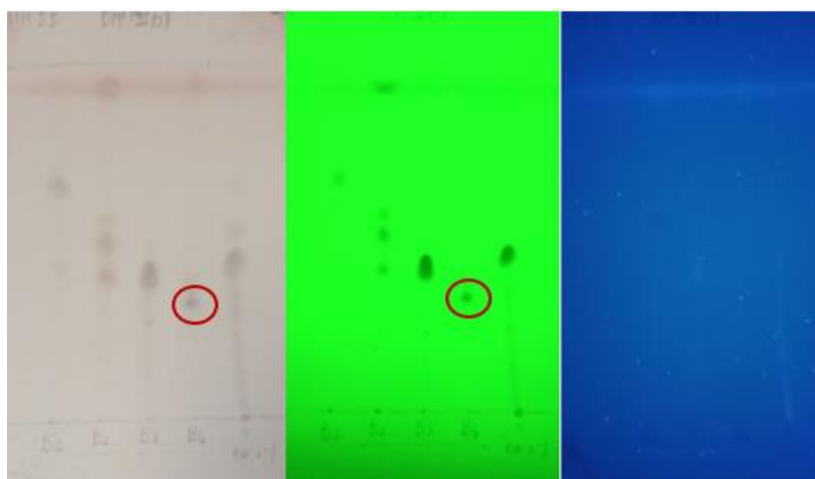


**Figure 117 : Structure de la tardioxopiperazine B.**

**Quantité :** 4,2 mg

**HRESIMS:**  $m/z$   $[M+H]^+$ : 394,2494

**Formule brute :**  $C_{24}H_{31}N_3O_2$



**Figure 118 : CCM de la tardioxopiperazine B.**

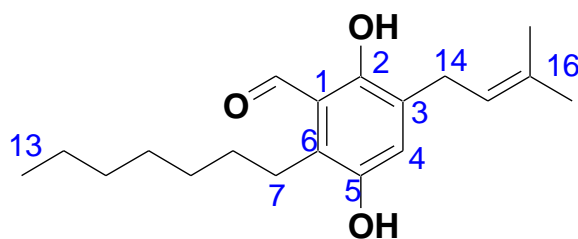
Eluant : Dichloromethane /Methanol 95 :5 (v/v)  
Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 26 : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P4.**

Position	$\delta$ C (ppm)	$\delta$ H, multiplet (J en Hz)	COSY (H)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
<b>1</b>	-NH	8,11 ; 1H ; br s	-	C2, C3a, C3
<b>2</b>	141,4	-	-	-
<b>3</b>	104,7	-	-	-
<b>3a</b>	129,0	-	-	-
<b>4</b>	116,3	7,34 ; 1H ; d (7,8 ; 0,5)	H5	C23, C3, C3a
<b>5</b>	120,5	7,01 ; 1H ; dd (7,1 ; 7,8)	H4	C3a, C7
<b>6</b>	122,1	6,95 ; dd ; 1H (0,5 ; 7,1)	-	C7a, C4, C21
<b>7</b>	123,8	-	-	-
<b>7a</b>	133,9	-	-	-
<b>8</b>	29,6	3,65 ; 1H ; dd (3,6 ; 14,8)	H9	C2, C3, C9, C10
		3,16 ; 1H ; dd (4,4 ; 11,6)	H9	C10, C2, C3a, C3, C9
<b>9</b>	54,9	4,37 ; 1H ; ddd (1,4 ; 4,9 ; 11,6)	H8	C13, C8
<b>10</b>	168,0	-	-	-
<b>11</b>	-NH	5,65 ; 1H ; s	-	C13, C12
<b>12</b>	51,0	4,04 ; 1H ; q (7,0)	H20	C10, C20
<b>13</b>	168,7	-	-	-

14	-NH	5,91 ; 1H ; s	-	C10, C9
15	39,2	-	-	-
16	146,9	6,07 ; 1H ; dd (10,6 ; 17,4)	H17	C2, C15, C19, C18
17	112,7	5,16 ; 1H ; dd (8,10 ; 10,6) 5,14 ; 1H ; s	H16	C16, C15 C15
18	28,0	1,52 ; 3H ; s	-	C16, C2, C17, C15, C19
19	28,2	1,49 ; 3H ; s	-	C16, C15, C18
20	20,0	1,51 ; 3H ; d (7,0)	H12	C10, C12
21	31,5	3,54 ; 2H ; d (7,3)	H22	C23, C7, C22, C6
22	122,9	5,39 ; 1H ; t (7,3)	H21, H24, H25	C23, C7, C21, C24, C25
23	133,3	-	-	-
24	25,9	1,79 ; 3H ; d (0,9)	-	C23, C22, C25
25	18,2	1,86 ; 3H ; s	-	C23, C22, C24

### Produit 5 : flavoglaucine

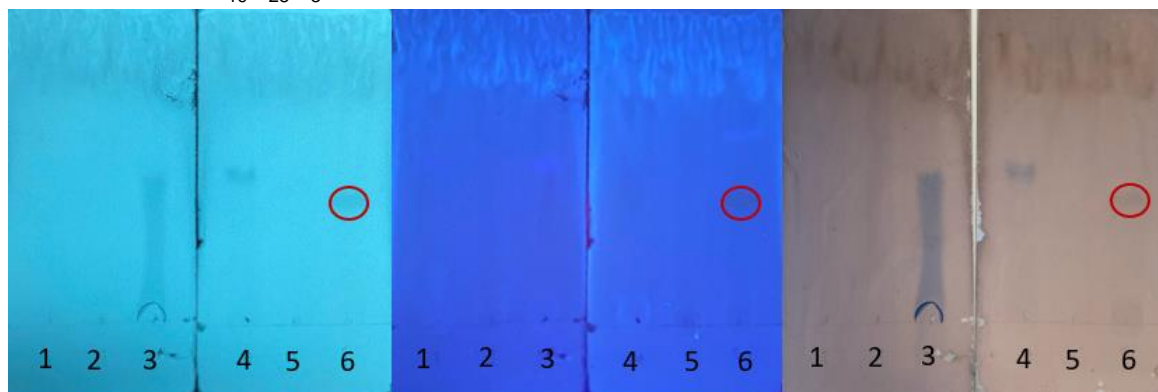


**Figure 119** : Structure de la flavoglaucine.

Quantité : 2,1 mg

HRESIMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>: 305,2116

Formule brute : C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>



**Figure 120** : CCM de la flavoglaucine.

Eluant : Acétonitrile /H<sub>2</sub>O 65 : 35 (v/v)

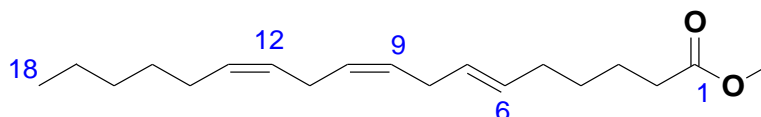
Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 27** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du produit P5.

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ , multiplet ( $J$ en Hz)	COSY (H)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	117,5	-	-	-
2	156,0	-	-	-
2-OH	-	11,90 ; 1H ; s	-	C1, C3, C2
3	128,8	-	-	-
4	125,9	6,87 ; 1H ; s	H14	C3, C5, C2, C14
5	145,2	-	-	-
6	128,8	-	-	-
7	24,2	2,85 ; t (8)	H8	C5, C8, C1, C8
8	32,2	1,47-1,58 ; 11H ; m	H7	C16, C17
9	29,4	1,24 ; m	-	-
10	29,6	1,24 ; m	-	-
11	32,1	1,24 ; m	-	-
12	22,9	1,25 ; m	H13	C9, C10, C11
13	14,3	0,84 ; t (6,9)	H12, H8	C11, C12
14	27,2	3,27 ; d (7,4)	H4, H15, H18, H17	C2, C16, C3
15	121,4	5,24 ; m	H14, H18	C17, C18
16	134,1	-	-	-
17	18,0	1,68 ; 3H ; s	H14	C16, C15, C18
18	26,0	1,74 ; 3H ; s	H14	C16, C15, C17
19	195,7	10,23 ; 1H ; s	-	C1, C3, C2

#### IV.9.2. Molécules isolées de *Trametes versicolor*

##### Composé 1 : Linoléate de méthyle



**Figure 121** : Structure de linoléate de méthyle.

Quantité : 3,3 mg

HRESIMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 293,2462

Formule brute :  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$



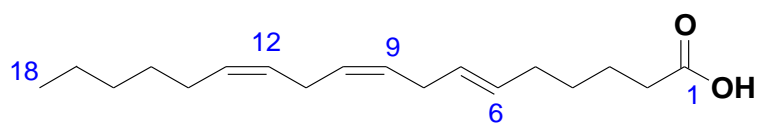
**Figure 122** : CCM de linoléate de méthyle.

Eluant : C / A 90:10 (v/v)  
 Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 28** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé C1.

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ , multiplet (J en Hz)
1	174,8	-
2	31,8	2,32 ; 2H ; t (7,45)
3	25,3	1,57-1,63 ; m
4	29,2	
5	26,9	2,05 ; 4H ; m
6	129,7	5,29-5,39 ; 4H ; m
7	127,9	
8	24,8	2,77 ; 2H ; t (6,38)
9	129,6	5,29-5,39 ; 4H ; m
10	129,6	
11	24,8	2,77 ; 2H ; t (6,38)
12	127,9	5,29-5,39 ; 4H ; m
13	129,7	
14	26,9	2,05 ; 4H ; m
15	29,4	1,57-1,63 ; m
16	33,6	
17	22,4	1,32 ; 21H, m
18	13,2	0,90 ; 3H ; t (7,12)
19	50,7	3,6 ; 3H ; s

## Composé 2 : Acide linoléique

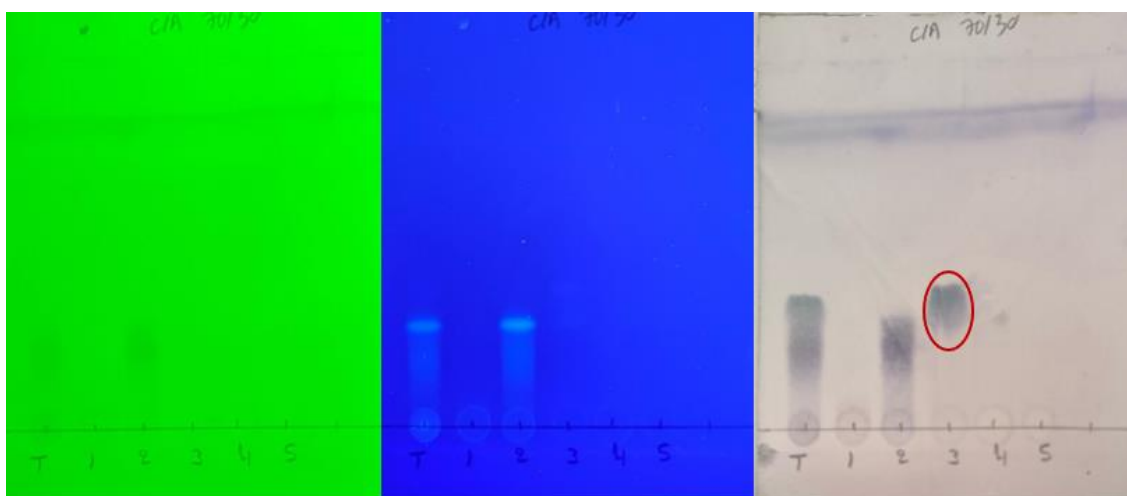


**Figure 123** : Structure de l'acide linoléique.

**Quantité** : 10,8 mg

**HRESIMS**:  $m/z$   $[M+H]^+$ : 279,2396

**Formule brute** :  $C_{18}H_{30}O_2$



**Figure 124** : CCM de l'acide linoléique.

Eluant : C / A d'éthyle 70:30 (v/v)

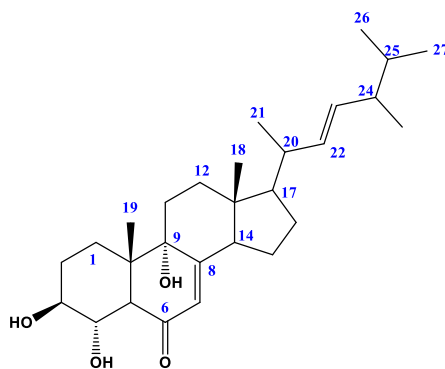
Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.



**Tableau 29** : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C2.

Position	δH, multiplet (J en Hz)
1	-
2	2,32 ; 2H ; t (7,45)
3	1,57-1,63 ; m
4	
5	2,05 ; 4H ; m
6	5,34 ; 4H ; m
7	
8	2,77 ; 2H ; t (6,38)
9	5,34 ; 4H ; m
10	
11	2,77 ; 2H ; t (6,38)
12	5,34 ; 4H ; m
13	
14	2,05 ; 4H ; m
15	1,57-1,63 ; m
16	
17	1,32 ; 2H ; m
18	0,90 ; 3H ; t (7,12)

**Composé 3 : 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one**

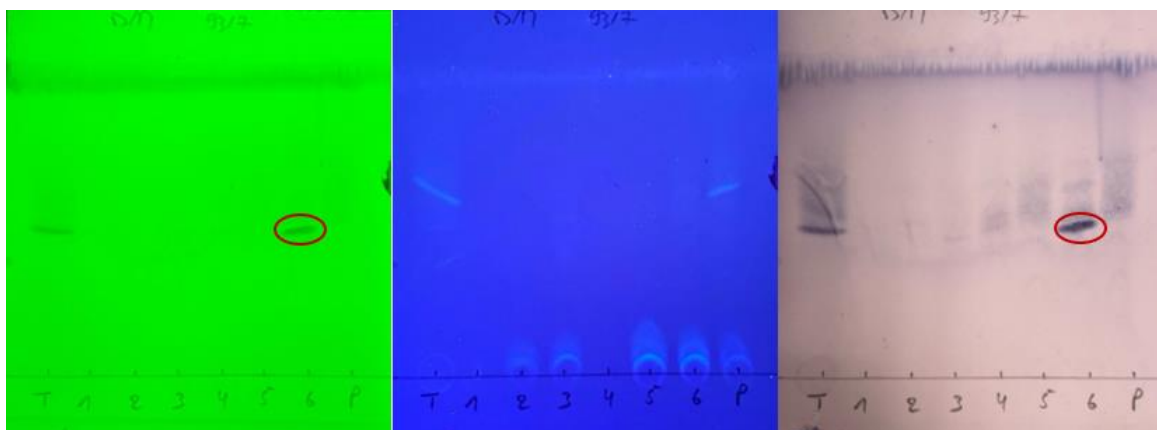


**Figure 125** : Structure de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.

**Quantité** : 2,5 mg

**HRESIMS**: *m/z* [M-H] : 443,3145

**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>



**Figure 126** : CCM de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.

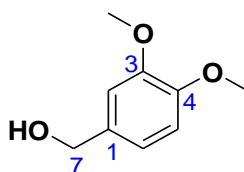
Eluant : Dichloromethane /Methanol 97 : 3 (v/v)  
 Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

**Tableau 30** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du composé C3.

Positions	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ , multiplet ( $J$ en Hz)	COSY	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	25,6	Ha : 2,29 ; t (13,9) Hb: 1,46 ; m	H1b, H2a, H2b, H3	C2, C5, C10
2	30,3	H2a : 1,90 ; m H2b : 1,41 ; m	H1, H3, H4b H2a	C4
3	67,4	4,03 ; 2H ; m	H2a, H2b, H4b	C2, C4
4	37,4	Ha : 2,03 ; m Hb : 1,72 ; m	H2b, H3b	C3, C5, C10
5	79,9	-	-	-
6	197,8	-	-	-
7	120,1	5,64 ; 1H ; brs	H14	C5, C9, C14
8	164,5	-	-	-
9	74,9	-	-	-
10	42,0	-	-	-
11	29,1	Ha : 1,85 ; m Hb : 1,69 ; m	H12a H12b	C8, C9, C13, C12
12	35,1	Ha : 1,87 ; m Hb : 1,67 ; m	H11a H12b	C9, C13, C14, C18,
13	45,5	-	-	-
14	52,0	2,72 ; 1H ; dd (7,0 ; 17,5)	H7, H15a	C8, C7, C13, C15, C18
15	22,6	Ha: 1,53 ; m	H14, H16a	C8, C9, C17

		Hb : 1,25 ; m	H16a	
<b>16</b>	28,1	Ha : 1,75 ; m Hb : 1,28 ; m	H16b, H17 H15b	C17
<b>17</b>	56,2	1,41 ; m superposé	H16a, H20	C13, C16, C18, C20, C22
<b>18</b>	12,4	0,60 ; 3H ; s	-	C17, C14, C13, C12
<b>19</b>	20,7	0,99 ; 3H ; s	-	C1, C5, C9, C10
<b>20</b>	40,5	1,98 ; m	H17, H21, H22	C17, C23
<b>21</b>	21,3	1,01; d (6,8)	H20	C22, C17, C20
<b>22</b>	135,3	5,12 ; qd (7,0 ; 14,8)	H20	C17, C20, C21, C20, C23, C24
<b>23</b>	132,7	5,20 ; 1H ; dd (7,0 ; 14,8)	H24	C22, C24, C28
<b>24</b>	43,0	1,80 ; m	H23, H28	C22, C23, C25, C26, C28
<b>25</b>	33,3	1,41 ; m superposé	H26, H27	C22, C24, C26, C28
<b>26</b>	20,2	0,82 ; 3H ; d (6,8)	H25	C24, C25, C27
<b>27</b>	19,9	0,79 ; 3H ; d (6,8)	H25	C24, C25, C26
<b>28</b>	17,8	0,89 ; 3H ; d (6,8)	H24	C23, C24, C25

#### Composé 4 : Alcool de veratryle

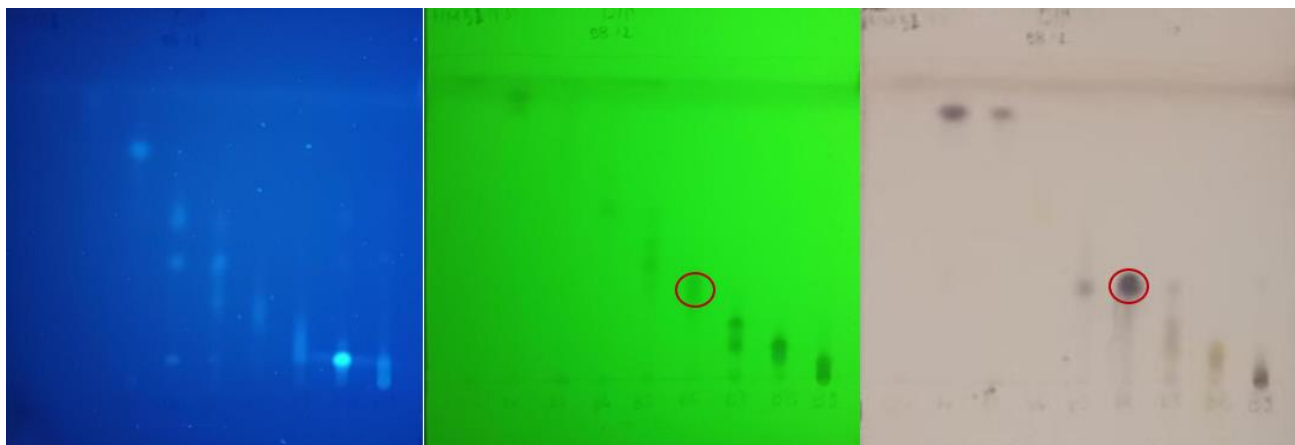


**Figure 127** : Structure de l'alcool de veratryle.

**Quantité** : 3,5 mg

**HRESIMS**:  $m/z$   $[M+H]^+$ : 169,0898

**Formule brute** :  $C_9H_{12}O_3$



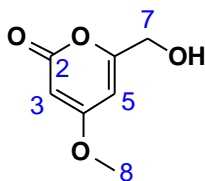
**Figure 128 : CCM de l'alcool de veratryle.**

Eluant : Dichloromethane /Methanol 98 : 2 (v/v)  
Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

**Tableau 31 : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C4.**

Position	δC (ppm)	δH, multiplet (J en Hz)	HMBC (H → C)
1	135,8	-	-
2	112,4	6,98 ; 1H ; d (1,5)	C3-OCH <sub>3</sub> , C3, C7
3	150,6	-	-
3-OCH <sub>3</sub>	56,7	3,84 ; 3H ; s	C3
4	150,0	-	-
4-OCH <sub>3</sub>	-	3,82 ; 3H ; s	C4
5	113,0	6,89 ; 2H ; m	C3, C1,
6	120,9	6,91 ; 1H	C4, C2, C7
7	65,3	4,53 ; 2H ; s	C1, C3, C5

### Composé 5 : Opuntiol

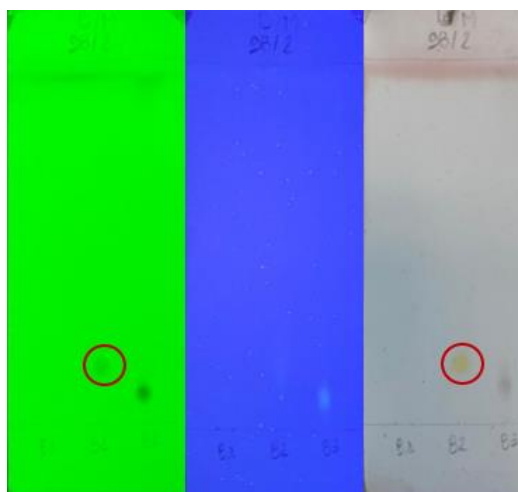


**Figure 129 : Structure de Opuntiol.**

**Quantité :** 4,2 mg

**HRESIMS:**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>: 157,0400

**Formule brute :** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>



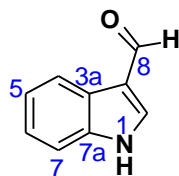
**Figure 130** : CCM de l'opuntiol.

Eluant : Dichloromethane /Methanol 98 : 2 (v/v)  
 Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

**Tableau 32** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du composé C5.

Position	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ , multiplet ( $J$ en Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1-O	-	-	-
2	171,4	-	-
3	88,6	5,42 ; 1H ; d (2,2)	C2, C4, C5
4	164,4	-	-
5	99,3	6,05 ; 1H ; dd (2.1)	C2, C6, C3, C7
6	163,4	-	-
7	61,3	4,39 ; 2H ; s	C6, C5
8	56,2	3,79 ; 3H ; s	C2, C3

### Composé 6 : 3-formylindole

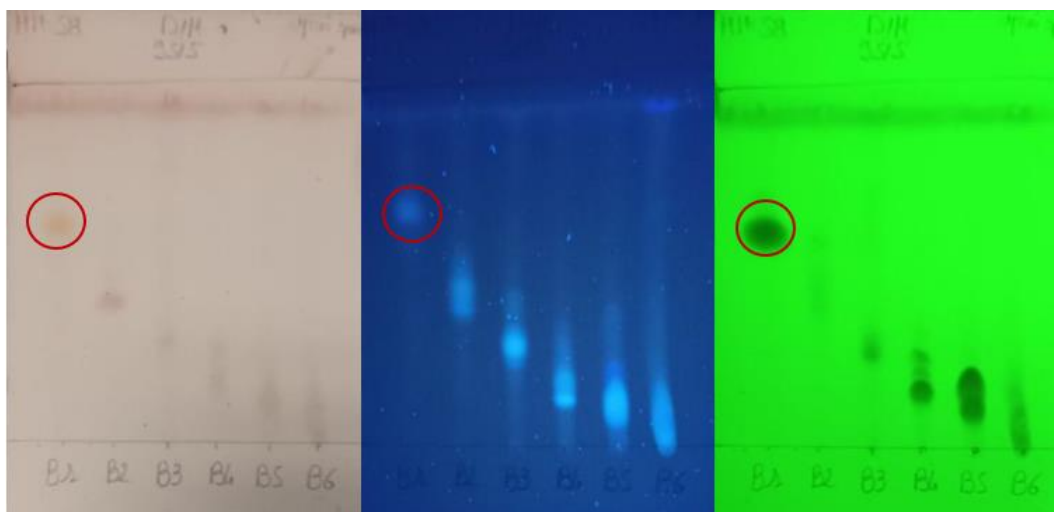


**Figure 131** : Structure de 3-formylindole.

**Quantité** : 1,8 mg

**HRESIMS**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 146,0683

**Formule brute** :  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$



**Figure 132 : CCM de 3-formylindole.**

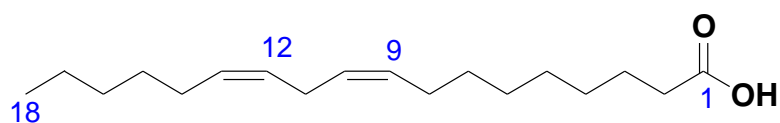
Eluant : Dichloromethane /Methanol 95 : 5 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS.

**Tableau 33 : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C6.**

Position	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ , multiplet (J en Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
<b>1</b>	-	NH	-
<b>2</b>	139,8	8,12 ; 1H ; s	C8, C3a, C3
<b>3</b>	120,3	-	-
<b>3a</b>	125,8	-	-
<b>4</b>	125,1	7,26 ; 1H ; td (1,2 ; 1,31 ; 7,2)	C2, C6
<b>5</b>	123,8	7,22 ; 1H ; td (1,1 ; 1,31 ; 7,2)	C3a, C7
<b>6</b>	122,5	8,15 ; 1H ; dt (1,2 ; 7,8)	C4, C3, C7
<b>7</b>	113,3	7,47 ; 1H ; dt (1,1 ; 7,8)	C3a, C5
<b>7a</b>	125,8	-	-
<b>8</b>	187,6	9,89 ; 1H ; s	C3a, C3

## Composé 7: Acide linoléique

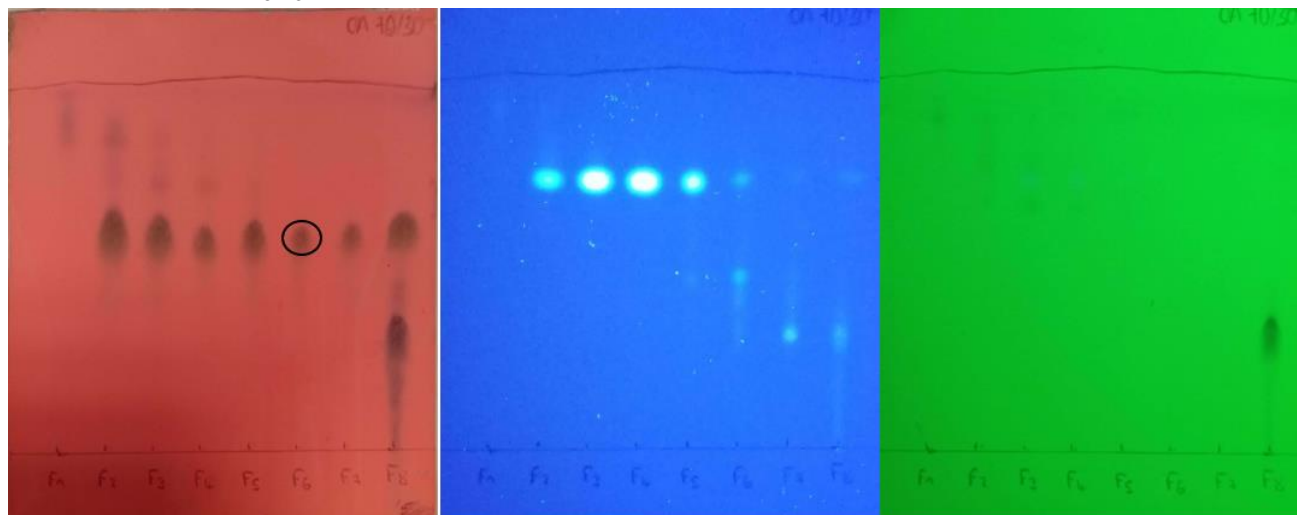


**Figure 133** : Structure de l'acide linoléique.

**Quantité** : 1,4 mg

**HRESIMS**:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>: 281,2462

**Formule brute** : C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>



**Figure 134** : CCM de l'acide linoléique.

Eluant : C /A 70:30 (v/v)

Observation sous UV (254 nm et 365 nm), révélation à l'ANS

**Tableau 34** : Données RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé C7.

Position	δC (ppm)	δH, multiplet (J en Hz)	Cosy	HMBC (H → C)
1	178,0	-	-	-
2	33,8	2,32 ; 2H ; t (7,53)	H4, H12, H16	C8, C13, C14, C15, C18, C16, C12, C4
3	24,9	1,60 ; 4H ; m	-	-
4	29,0-29,7	1,20-1,35 ; 21 H ; m	-	-
5				
6				
7				
8	27,4	2,04 ; 2H ; m	-	C9, C7, C13, C14, C15, C3
9	128,2	5,33 ; 2H ; m	-	C8, C11
10	130,4			
11	25,8	2,75 ; 1H ; t (6,48)	H6, H7, H9, H10	C6, C7
12	130,2	5,33 ; 2H ; m	-	C8, C11
13	128,1			
14	27,4	2,03 ; 2H ; m	H6, H7, H9, H10,	-
15	24,9	1,60 ; 4H ; m	H2, H3, H13, H14, H15, H17	C18, C13, C14, C15, C17
16	24,9	1,60 ; 4H ; m	-	-
17	22,6	1,20-1,35 ; 21 H ; m	H1, H4, H12, H16	C7, C13, C14, C15
18	14,3	0,88 ; 3H ; m	H2, H3, H13, H14, H15	C3, C2



## IV.10. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

### IV.10.1. Matériels

Les milieux de culture RPMI 1640 et le sérum de veau fœtal (SVF), la L-glutamine, et la solution de pénicilline/streptomycine ont été fournis par Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5- diphényltétrazolium (MTT), l'anticorps anti- $\beta$ -actine humaine, et le kit "Cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay<sup>PLUS</sup> (ELISA)" proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les anticorps anti-caspase-3, anti-caspase-3 clivée, anti-PARP, et l'anticorps secondaire IgG H&L anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) proviennent de Cell Signaling Technology - Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'anticorps secondaire anti-IgG-IgM H&L de souris couplé à la HRP, la membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF), et le marqueur de poids moléculaires (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) proviennent de Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Le substrat HRP chimioluminescent Immobilon Western, a été obtenu auprès de Merck (Lyon, France) et le réactif caspase-3/7 auprès de Sartorius (Göttingen, Allemagne).

### IV.10.2. Lignées cellulaires (culture cellulaire)

Les deux lignées cellulaires cancéreuses humaines étudiées sont :

HT-29 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards, Molsheim, France). Adénocarcinome colorectal de stade II d'une femme de 44 ans.

MDA-MB-231 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) Utilisée en collaboration avec le laboratoire LIENSs de La Rochelle.

La lignée cellulaire non cancéreuse utilisée comme contrôle est :

HEK-293 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) utilisée en collaboration avec le laboratoire LIENSs de La Rochelle. Utilisée uniquement pour tester l'activité des extraits.

HEK-293 utilisées dans le laboratoire LABCiS proviennent de de l'American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards, Molsheim, France) et sont utilisées pour tester l'activité de molécules isolées.

Le milieu de culture utilisé pour ensemercer les cellules HT-29 et HEK293 du LABCiS est le RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium).

Le milieu de culture utilisé pour ensemercer les cellules MDA-MB-231 et HEK293 du LIENSs est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Tous les milieux de culture sont complétés par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de L-glutamine à 100  $\mu$ g/mL et 1 % de solution de pénicilline/streptomycine à 100  $\mu$ g/mL.

Toutes les cellules ont été cultivées dans un incubateur à atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub> et une température thermostatée à 37°C.

Pour les expériences *in vitro* à LABCiS, les cellules ont été ensemençées à 8 000 cellules/puits (0,32 cm<sup>2</sup>) pour HT-29 10 000 cellules/puits pour les HEK293.

Pour les expériences *in vitro* à LIENSs, les cellules ont été ensemençées à 10 000 cellules/puits (0,32 cm<sup>2</sup>) pour MDA-MB-231 et HEK293.

Les cellules sont comptées par un test d'exclusion au bleu Trypan en utilisant une cellule de Malassez.

### IV.10.3. Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire ou test MTT est une méthode colorimétrique permettant de déterminer la viabilité des cellules. Il repose sur le principe selon lequel le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT) est converti en cristaux de formazan bleu-violet par l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase. La vitesse de formation des cristaux est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les cristaux sont ensuite solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin que la densité optique puisse être déterminée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantité relative de cellules vivantes est alors déterminée en comparant les absorbances des cellules traitées (avec l'extrait ou les molécules) à celles des cellules non traitées (contrôles).

Les cellules HT-29, HEK293 et MDA-MB-231 sontensemencées à 100 µL/puits à raison de 8000, 10 000 et 10 000 cellules par puits respectivement. 6 puits sont dédiés à chaque condition de test et au moins 3 expériences indépendantes sont réalisées. Après 24 h d'adhésion, le milieu dans les puits est aspiré et remplacé par différentes concentrations d'extraits, de sous-fractions ou de molécules isolées préparées dans le milieu de culture approprié.

Après 24 et 48 h d'incubation, 10 µL de MTT (5 mg/mL dans du PBS phosphate buffer saline) sont ajoutés par puits. Après 3 h d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 100 µL de DMSO sont ajoutés à chaque puits pour solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance de chaque puits est ensuite mesurée à 550 nm par spectrophotomètre (Thermoscientific, Multiscan FC). La valeur de l'absorbance du blanc (puits contenant seulement 100 µL de DMSO) est soustraite de tous les puits et la viabilité cellulaire des cellules traitées est présentée en pourcentage des cellules de contrôle.

La CI<sub>50</sub> (concentration qui inhibe 50% des cellules par rapport aux cellules témoins) des extraits, sous-fractions et molécules isolées est déterminée en appliquant la formule suivante

$$\frac{(\text{Absorbance moyenne des cellules traitées})}{(\text{Absorbance moyenne des cellules témoins})} \times 100 \pm SEM$$

### IV.10.4. Activité antiproliférative *in vitro*

#### IV.10.4.1. Observations microscopiques

Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits dans 2 mL de milieu de culture RPMI, ce qui correspond à une densité cellulaire de 232727 cellules/puits.

Après 24 h d'adhésion et de croissance cellulaire, les cellules ont été traitées avec les concentrations d'extrait suivantes : PA08 S (CI<sub>50</sub>), PA08 S (CI<sub>50</sub>\*2), PA08 GS-M (CI<sub>50</sub>), PA08 GS-M (CI<sub>50</sub>\*2), PA08 GS-M (CI<sub>50</sub>\*3).

Après 24 et 48 h de traitement, les cellules de chaque condition ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase et les images ont été enregistrées à l'aide d'un système d'acquisition d'images (Nikon, Champigny sur Marne, France).

#### IV.10.4.2. Analyses de l'expression des protéines par western blot

Les cellules HT-29 sontensemencées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> (T75) à raison de 1,6 million de cellules dans 10 mL de milieu RPMI. Après 24 h d'adhésion et de croissance cellulaire, les cellules sont traitées avec les concentrations mentionnées ci-dessous.

**Tableau 35 : Résumés des concentrations d'extraits/molécules testés.**

Extraits/ Molécule	Concentrations testées
PA08 S	4,2 / 6,3 / 8,4 / 10,5 µg/mL
PA08 GS-M	10 / 12,5 / 15 / 17,5 µg/mL
XC04 P	8,5 / 17 / 25,5 µg/mL
XC04 GP	3,2 / 6,4 / 9,6 µg/mL
Echinuline	1,7 / 3,5 / 5,2 µM

Après 24 et 48 h de traitement, les cellules ont été soumises à une centrifugation et sont récupérées. Ensuite un comptage et lavage avec du PBS 1X ont été réalisés. Enfin, le surnageant a été éliminé et les culots cellulaires secs ont été conservés à -20 °C.

#### **IV.10.4.2.1. Extraction des protéines**

Les culots cellulaires ont été lysés dans un tampon RIPA (HEPES 50 mM pH = 7,5 ; Désoxycholate 1% ; Nonidet P-40 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150 mM et Aprotinine 20 µg/mL) contenant une solution d'inhibiteur de protéase. Les lysats ont ensuite été récupérés après centrifugation (12 000 rpm à 4 °C pendant 20 min). Les concentrations en protéines ont été déterminées par la technique colorimétrique de Bradford. La densité optique de chaque condition a été analysée par spectrophotométrie à 595 nm et comparée à une gamme standard d'albumine sérique bovine (BSA) de 0-2 mg/mL.

#### **IV.10.4.2.2. Expression des protéines par analyse par western blot**

Les protéines (60 µg) en solution aqueuse et en présence de tampon d'échantillonnage 2X ont été dénaturées pendant 5 min à 95°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (12%). La migration a été réalisée pendant environ 4 h à 90 V dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 192 mM Glycine et 0,1% SDS) en utilisant le système d'électrophorèse XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific). Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF. Cette membrane a été préalablement activée dans du méthanol, rincée et équilibrée, tout comme le gel de polyacrylamide contenant les protéines, dans un tampon de transfert (Tris 50 mM ; Glycine 380 mM ; SDS 0,1% et Méthanol 20%). Le transfert a été effectué à 100 mA pendant 1h30. La membrane a ensuite été incubée pendant au moins 1h dans un tampon de blocage (TBS 1X-Lait 5%) sous agitation à température ambiante pour saturer les sites aspécifiques. L'anticorps primaire a été incubé dans un tampon de blocage pendant une nuit sous agitation à 4 °C. La membrane a ensuite été rincée plusieurs fois dans un tampon de lavage (TBS 1X-Tween 0,1%) avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire correspondant sous agitation à température ambiante pendant 1 h. La membrane a ensuite été rincée dans le tampon de lavage pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation a été réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le substrat de révélation HRP et le système G : BOX (Syngene, Cambridge, UK). Les poids moléculaires des bandes spécifiques ainsi révélées ont été déterminés à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme protéine de référence.

**Tableau 36: Résumé des différents anticorps utilisés pour le western Blot.**

Protéines	Sources	Dilution d'anticorps primaires	Dilution d'anticorps secondaires
Caspase-3	Souris	1/1000 <sup>ème</sup>	1/5000 <sup>ème</sup>
Caspase-3 clivée	Lapin	1/1000 <sup>ème</sup>	1/2000 <sup>ème</sup>
PARP	Lapin	1/1000 <sup>ème</sup>	1/2000 <sup>ème</sup>
$\beta$ -actine	Souris	1/5000 <sup>ème</sup>	1/5000 <sup>ème</sup>

#### IV.10.4.3. Analyse de la fragmentation d'ADN

Pour l'analyse quantitative de la fragmentation d'ADN, les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des flasques de cultures de 75 cm<sup>2</sup> à 1,6 millions de cellules dans 10 mL de milieu RPMI. Après 24 h d'adhésion et de croissance cellulaire, les cellules sont traitées avec les concentrations mentionnées ci-dessous.

**Tableau 37 : Résumés des concentrations d'extraits/molécule testés.**

Extraits/ Molécule	Concentrations testées
PA08 S	4,2 / 6,3 / 8,4 / 10,5 $\mu$ g/mL
PA08 GS-M	10 / 12,5 / 15 / 17,5 $\mu$ g/mL
XC04 P	8,5 / 17 / 25,5 $\mu$ g/mL
XC04 GP	3,2 / 6,4 / 9,6 $\mu$ g/mL
Echinuline	1,7 / 3,5 / 5,2 $\mu$ M.

La récupération des cellules vivantes et mortes se fait après 24 et 48 h de traitement. Les HT-29 sont lavées au PBS 1X, des culots cellulaires à 200000 cellules sont récupérés par conditions et sont centrifugés à 1500 rpm pendant 5 min. le surnageant est éliminé et des culots secs ont été obtenus et conservés à -20 °C.

La fragmentation de l'ADN a été quantifiée à l'aide du kit « Cell death detection enzyme linked immunosorbent assay<sup>PLUS</sup> ». Chaque culot cellulaire à 2x10<sup>5</sup> cellules récupérées à 24 et 48 h a été remis en suspension dans 400  $\mu$ L de tampon de lyse pendant 30 min à température ambiante. Après centrifugation pendant 10 min à 200 g, 20  $\mu$ L de surnageant de lysat cellulaire ont été déposés dans des puits recouverts de streptavidine. Ensuite, 80  $\mu$ L d'une solution contenant des anticorps anti-histones biotinylés et des anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase ont été ajoutés dans chaque puits. Pendant la période d'incubation de 2 h, sous agitation à 300 rpm dans l'obscurité, les mono- et oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN ont été complexés par les anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase et par les anticorps anti-histone, eux-mêmes capturés au fond des puits par la streptavidine. Après trois lavages successifs, 100  $\mu$ L d'une solution de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), le substrat de la peroxydase, ont été ajoutés par puits. Pendant l'incubation, qui a duré environ 15 minutes, une réaction colorimétrique s'est développée entre l'ABTS et la peroxydase présente sur les anticorps anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé est proportionnelle à la quantité d'ADN fragmenté. La réaction a été ensuite arrêtée et la densité optique pour chaque condition a été mesurée à 405 nm. Le blanc de lecture est représenté par la solution d'ABTS avec la longueur d'onde de référence de 490 nm. Les valeurs moyennes d'absorbance (405 nm - 490 nm) sont alors déterminées pour chaque

condition et comparées aux valeurs obtenues pour les conditions de contrôle. La quantité de fragmentation de l'ADN dans les conditions de contrôle est normalisée à 1, et celle des conditions traitées est exprimée en n-fois par rapport au contrôle. Chaque condition a été réalisée en duplicatas techniques et en triplicatas biologiques (n=3).

# Références bibliographiques





## Références bibliographiques

---

- Ai, W., Lin, X.-P., Tu, Z., Tian, X.-P., Lu, X., Mangaladoss, F., Zhong, Z.-L., Liu, Y., 2014. Axinelline A, a new COX-2 inhibitor from *Streptomyces axinellae* SCSIO02208. *Nat. Prod. Res.* 28, 1219–1224. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.891204>
- Ali, M., Mohammed, N., Alnaqeeb, M.A., Hassan, R.A., Ahmad, H.S., 1989. Toxicity of echinulin from *Aspergillus chevalieri* in rabbits. *Toxicol. Lett.* 48, 235–241. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90049-0](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90049-0)
- Antkowiak, R., Antkowiak, W.Z., Banczyk, I., Mikolajczyk, L., 2003. A new phenolic metabolite, involutone, isolated from the mushroom *Paxillus involutus*. *Can. J. Chem.* 81, 118–124. <https://doi.org/10.1139/v02-194>
- Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Higgins, K.L., Sarvate, S.D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V., Kauff, F., Lutzoni, F., 2009. A Phylogenetic Estimation of Trophic Transition Networks for Ascomycetous Fungi: Are Lichens Cradles of Symbiotrophic Fungal Diversification? *Syst. Biol.* 58, 283–297. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp001>
- Arnold, Miadlikowska, J., Higgins, K.L., Sarvate, S.D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V.R., Kauff, F., Lutzoni, F.O., 2009. A Phylogenetic Estimation of Trophic Transition Networks for Ascomycetous Fungi: Are Lichens Cradles of Symbiotrophic Fungal Diversification? *Syst. Biol.* 58.
- Ashfaq, A., Hanif, F., Simjee, S.U., Bari, M.F., Faizi, S., Zehra, S., Mirza, T., Begum, S., Khan, L., 2021. Opuntiol Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells by Upregulating Active Caspase 3 Expression. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 22, 3607–3613. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.11.3607>
- Asta, J., Bertrand, M., Gaveriaux, J.-P., 2023. Guide des lichens de France - Lichens des roches. Humensis.
- Bennett, S.E.B.J.W., 2007. An Overview of the Genus *Aspergillus*, in: *The Aspergilli*. CRC Press.
- Bennouna, J., Hiret, S., Bertaut, A., Bouché, O., Deplanque, G., Borel, C., François, E., Conroy, T., Ghiringhelli, F., des Guetz, G., Seitz, J.-F., Artru, P., Hebbbar, M., Stanbury, T., Denis, M.G., Adenis, A., Borg, C., 2019. Continuation of Bevacizumab vs Cetuximab Plus Chemotherapy After First Progression in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The UNICANCER PRODIGE18 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 5, 83–90. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4465>
- Benson, K.F., Stamets, P., Davis, R., Nally, R., Taylor, A., Slater, S., Jensen, G.S., 2019. The mycelium of the *Trametes versicolor* (Turkey tail) mushroom and its fermented substrate each show potent and complementary immune activating properties in vitro. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 342. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2681-7>
- Bladt, T.T., Frisvad, J.C., Knudsen, P.B., Larsen, T.O., 2013. Anticancer and Antifungal Compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and Other Filamentous Fungi. *Molecules* 18, 11338–11376. <https://doi.org/10.3390/molecules180911338>
- Blagodatski, A., Yatsunskaya, M., Mikhailova, V., Tiasto, V., Kagansky, A., Katanaev, V.L., 2018. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget* 9, 29259–29274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25660>
- Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A., 2002. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem* 3, 619–627. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9)



- Boik, J., 2001. Natural compounds in cancer therapy, ISBN 0-9648280-1-4, Oregon Medical 2001.LLC.
- Borri, F., Granaglia, A., 2021. Pathology of triple negative breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 72, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>
- Cai, H., Liu, X., Chen, Z., Liao, S., Zou, Y., 2013. Isolation, purification and identification of nine chemical compounds from *Flammulina velutipes* fruiting bodies. *Food Chem.* 141, 2873–2879. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.124>
- Cai, J., Chen, C., Tan, Y., Chen, W., Luo, X., Luo, L., Yang, B., Liu, Y., Zhou, X., 2021. Bioactive Polyketide and Diketopiperazine Derivatives from the Mangrove-Sediment-Derived Fungus *Aspergillus* sp. SCSIO41407. *Molecules* 26, 4851. <https://doi.org/10.3390/molecules26164851>
- Calcott, M.J., Ackerley, D.F., Knight, A., Keyzers, R.A., Owen, J.G., 2018. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* 47, 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/C7CS00431A>
- Candan, M., Yilmaz, M., Tay, T., Erdem, M., Türk, A.Ö., 2007. Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Parmelia sulcata* and its Salazinic Acid Constituent. *Z. Für Naturforschung C* 62, 619–621. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-827>
- Carlson, A., Justo, A., Hibbett, D.S., 2014. Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia* 106, 735–745. <https://doi.org/10.3852/13-275>
- Catalano, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Mariconda, A., Rosano, C., Scumaci, D., Saturnino, C., Longo, P., Sinicropi, M.S., 2022. New Achievements for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Appl. Sci.* 12, 5554. <https://doi.org/10.3390/app12115554>
- Chakarwanti, J., Nayaka, S., Srivastava, S., 2020. The diversity of endolichenic fungi – A review.
- Chen, M., Wang, R., Zhao, W., Yu, L., Zhang, C., Chang, S., Li, Y., Zhang, T., Xing, J., Gan, M., Feng, F., Si, S., 2019. Isocoumarindole A, a Chlorinated Isocoumarin and Indole Alkaloid Hybrid Metabolite from an Endolichenic Fungus *Aspergillus* sp. *Org. Lett.* 21, 1530–1533. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00385>
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Chen, J.-J., 2023. Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus of *Annulohyphoxylon stygium* var. *annulatum*. *Chem. Nat. Compd.* 59, 1009–1011. <https://doi.org/10.1007/s10600-023-04181-7>
- Cheung, E.C., Vousden, K.H., 2022. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer* 22, 280–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- Chhikara, B.S., Parang, K., 2023. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem. Biol. Lett.* 10, 451–451. <https://scholar.google.com/scholar?q=urn:nbn:sciencein.cbl.2023.v10.451>
- Choi, E.J., Park, J. -S., Kim, Y. -J., Jung, J. -H., Lee, J.K., Kwon, H.C., Yang, H.O., 2011. Apoptosis-inducing effect of diketopiperazine disulfides produced by *Aspergillus* sp. KMD 901 isolated from marine sediment on HCT116 colon cancer cell lines. *J. Appl. Microbiol.* 110, 304–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04885.x>
- Chu, K.K.W., Ho, S.S.S., Chow, A.H.L., 2002. *Coriolus versicolor*: A Medicinal Mushroom with Promising Immunotherapeutic Values. *J. Clin. Pharmacol.* 42, 976–984. <https://doi.org/10.1177/009127000204200904>
- Cui, D.Z., Zhao, M., Yang, H.Y., Wang, C.I., Dai, H.B., 2011. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera based on internal transcribed spacer (ITS) and nearly complete mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mt SSU rDNA) sequences. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 18111–18121. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1830>

- Culberson, C.F., Culberson, W.L., Johnson, A., 1981. A Standardized TLC Analysis of  $\beta$ -Orcinol Depsidones. *The Bryologist* 84, 16–29. <https://doi.org/10.2307/3242974>
- Dandash, F., Leger, D.Y., Diab-Assaf, M., Sol, V., Liagre, B., 2021. Porphyrin/Chlorin Derivatives as Promising Molecules for Therapy of Colorectal Cancer. *Molecules* 26, 7268. <https://doi.org/10.3390/molecules26237268>
- Das, U.N., 2006. Tumoricidal and Anti-Angiogenic Actions of Gamma-Linolenic Acid and Its Derivatives. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 457–466. <https://doi.org/10.2174/138920106779116892>
- De Vries, R.P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C.A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S.A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G.C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., dos Santos, R.A.C., Damásio, A.R. de L., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M.L., Henrissat, B., Hildén, K.S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševac, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Lagendijk, E.L., Lapidus, A., Lvasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A.F., MacCabe, A., Mäkelä, M.R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á.P., Mulé, G., Ngan, C.Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J.P., Overkamp, K.M., Park, H.-S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P.J., Ram, A.F.J., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D.M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N.S., Samson, R.A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F.M., Sun, H., Susca, A., Todd, R.B., Tsang, A., Unkles, S.E., van de Wiele, N., van Rossen-Uffink, D., Oliveira, J.V. de C., Vesth, T.C., Visser, J., Yu, J.-H., Zhou, M., Andersen, M.R., Archer, D.B., Baker, S.E., Benoit, I., Brakhage, A.A., Braus, G.H., Fischer, R., Frisvad, J.C., Goldman, G.H., Houbraeken, J., Oakley, B., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., vanKuyk, P.A., Wortman, J., Dyer, P.S., Grigoriev, I.V., 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 18, 28. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Delebassée, S., Mambu, L., Pinault, E., Champavier, Y., Liagre, B., Millot, M., 2017. Cytochalasin E in the lichen *Pleurosticta acetabulum*. Anti-proliferative activity against human HT-29 colorectal cancer cells and quantitative variability. *Fitoterapia* 121, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.07.006>
- Dieu, A., Mambu, L., Champavier, Y., Chaleix, V., Sol, V., Gloaguen, V., Millot, M., 2020. Antibacterial activity of the lichens *Usnea Florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Nat. Prod. Res.* 34, 3358–3362. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1561678>
- Dyer, P.S., O’Gorman, C.M., 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 165–192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x>
- Elissawy, A.M., Ebada, S.S., Ashour, M.L., El-Neketi, M., Ebrahim, W., Singab, A.B., 2019. New secondary metabolites from the mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. AV-2. *Phytochem. Lett.* 29, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.10.014>
- Elsbaey, M., Sallam, A., El-Metwally, M., Nagata, M., Tanaka, C., Shimizu, K., Miyamoto, T., 2019. Melanogenesis Inhibitors from the Endophytic Fungus *Aspergillus amstelodami*. *Chem. Biodivers.* 16, e1900237. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900237>
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18, 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.007>

- Fang, Q., Maglangit, F., Mugat, M., Urwald, C., Kyeremeh, K., Deng, H., 2020. Targeted Isolation of Indole Alkaloids from *Streptomyces* sp. CT37. *Molecules* 25, 1108. <https://doi.org/10.3390/molecules25051108>
- Fathallah, N., Raafat, M.M., Issa, M.Y., Abdel-Aziz, M.M., Bishr, M., Abdelkawy, M.A., Salama, O., 2019. Bio-Guided Fractionation of Prenylated Benzaldehyde Derivatives as Potent Antimicrobial and Antibiofilm from *Ammi majus* L. Fruits-Associated *Aspergillus amstelodami*. *Mol. Basel Switz.* 24, 4118. <https://doi.org/10.3390/molecules24224118>
- Feng, D.D., Luo, Z., Roh, S.-G., Hernandez, M., Tawadros, N., Keating, D.J., Chen, C., 2006. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology* 147, 674–682. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0225>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* 149, 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Ferreira, D.S.S., Kato, R.B., Miranda, F.M., da Costa Pinheiro, K., Fonseca, P.L.C., Tomé, L.M.R., Vaz, A.B.M., Badotti, F., Ramos, R.T.J., Brenig, B., Azevedo, V.A. de C., Benevides, R.G., Góes-Neto, A., 2018. Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. *Data Brief* 18, 1581–1587. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.074>
- Foulkes, W.D., Shuen, A.Y., 2013. In Brief: BRCA1 and BRCA2. *J. Pathol.* 230, 347–349. <https://doi.org/10.1002/path.4205>
- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., Tuor, U., 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3727–3729. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3727-3729.1999>
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7859–7877. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6839-z>
- Fu, S., Song, W., Han, X., Chen, L., Shen, L., 2024. Veratryl Alcohol Attenuates the Virulence and Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* Mainly via Targeting las Quorum-Sensing System. *Microorganisms* 12, 985. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050985>
- Fujimoto, H., Fujimaki, T., Okuyama, E., Yamazaki, M., 1999. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 47, 1426–1432. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1426>
- Gao, H., Zhu, T., Li, D., Gu, Q., Liu, W., 2013. Prenylated indole diketopiperazine alkaloids from a mangrove rhizosphere soil derived fungus *Aspergillus effusus* H1-1. *Arch. Pharm. Res.* 36, 952–956. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0107-5>
- Gao, J., León, F., Radwan, M.M., Dale, O.R., Husni, A.S., Manly, S.P., Lupien, S., Wang, X., Hill, R.A., Dugan, F.M., Cutler, H.G., Cutler, S.J., 2011. Benzyl derivatives with in vitro binding affinity for human opioid and cannabinoid receptors from the fungus *Eurotium repens*. *J. Nat. Prod.* 74, 1636–1639. <https://doi.org/10.1021/np200147c>
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Rowland, C.Y., 1990. Metabolites of *Aspergillus terreus* Antagonistic Towards the Take-all Fungus. *J. Nat. Prod.* 53, 520–522. <https://doi.org/10.1021/np50068a043>
- González-Fernández, M.J., Ortea, I., Guil-Guerrero, J.L., 2020.  $\alpha$ -Linolenic and  $\gamma$ -linolenic acids exercise differential antitumor effects on HT-29 human colorectal cancer cells. *Toxicol. Res.* 9, 474–483. <https://doi.org/10.1093/toxres/taaa046>

- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., Riedel, K., 2021. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front. Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623839>
- Guo, L.D., Hyde, K.D., Liew, E.C.Y., 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol.* 147, 617–630. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00716.x>
- Habtemariam, S., 2020. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy. *Biomedicines* 8, 135. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050135>
- Hale Jr, M.E., 1990. A synopsis of the lichen genus *Xanthoparmelia* (Vainio) Hale (Ascomycotina, Parmeliaceae). *Smithson. Contrib. Bot.*
- Haluwyn, C., Asta, J., Gavériaux, J.-P., 2009. Guide des lichens de France - Lichens des arbres -. Belin.
- Hashiguchi, Y., Muro, K., Saito, Y., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., Hotta, K., Ishida, H., Ishiguro, M., Ishihara, S., Kanemitsu, Y., Kinugasa, Y., Murofushi, K., Nakajima, T.E., Oka, S., Tanaka, T., Taniguchi, H., Tsuji, A., Uehara, K., Ueno, H., Yamanaka, T., Yamazaki, K., Yoshida, M., Yoshino, T., Itabashi, M., Sakamaki, K., Sano, K., Shimada, Y., Tanaka, S., Uetake, H., Yamaguchi, S., Yamaguchi, N., Kobayashi, H., Matsuda, K., Kotake, K., Sugihara, K., Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum, 2020. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 25, 1–42. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01485-z>
- Hattori, T., 2002. Type studies of the polypores described by E.J.H. Corner from Asia and West Pacific Areas. IV. Species described in *Tyromyces* (1). *Mycoscience* 43, 307–315. <https://doi.org/10.1007/S102670200045>
- Hawksworth, D.L., Grube, M., 2020. Lichens redefined as complex ecosystems. *New Phytol.* 227, 1281–1283. <https://doi.org/10.1111/nph.16630>
- He, Y., Liu, S., Newburg, D.S., 2021. Musarin, a novel protein with tyrosine kinase inhibitory activity from *Trametes versicolor*, inhibits colorectal cancer stem cell growth. *Biomed. Pharmacother.* 144, 112339. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112339>
- He, Z., Lin, J., He, Y., Liu, S., 2022. Polysaccharide-Peptide from *Trametes versicolor*: The Potential Medicine for Colorectal Cancer Treatment. *Biomedicines* 10, 2841. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112841>
- Hobbs, C., 2004. Medicinal Value of Turkey Tail Fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pil&acute;t (Aphyllophoromycetidae). A Literature Review. *Int. J. Med. Mushrooms* 6. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v6.i3.10>
- Hodgkinson, N., Kruger, C.A., Abrahamse, H., 2017. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. *Tumor Biol.* 39, 1010428317734691. <https://doi.org/10.1177/1010428317734691>
- Honegger, R., Axe, L., Edwards, D., 2013. Bacterial epibionts and endolichenic actinobacteria and fungi in the Lower Devonian lichen *Chlorolichenomycites salopensis*. *Fungal Biol.* 117, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.05.003>
- Hortobágyi, G.N., 1997. Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs* 54, 1–7. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700544-00003>
- Horton, T.R., Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* 10, 1855–1871. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x>

- Hossain, M.S., Karuniawati, H., Jairoun, A.A., Urbi, Z., Ooi, D.J., John, A., Lim, Y.C., Kibria, K.M.K., Mohiuddin, A.K.M., Ming, L.C., Goh, K.W., Hadi, M.A., 2022. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* 14, 1732. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
- Howard, F.M., Olopade, O.I., 2021. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Cancer J.* 27, 8. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000500>
- International Agency for Research On Cancer, 2024. Cancer Today [WWW Document]. <https://gco.iarc.who.int/today/>. URL <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed 7.2.24).
- Itoh, S., Taketomi, A., Harimoto, N., Tsujita, E., Rikimaru, T., Shirabe, K., Shimada, M., Maehara, Y., 2010. Antineoplastic Effects of Gamma Linolenic Acid on Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47, 81–90. <https://doi.org/10.3164/jcbn.10-24>
- Jędrzejewski, T., Pawlikowska, M., Piotrowski, J., Kozak, W., 2016. Protein-bound polysaccharides from *Coriolus versicolor* attenuate LPS-induced synthesis of pro-inflammatory cytokines and stimulate PBMCs proliferation. *Immunol. Lett.* 178, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.08.013>
- Jiang, W., Rixiati, Y., Huang, H., Shi, Y., Huang, C., Jiao, B., 2020. Asperolide A prevents bone metastatic breast cancer via the PI3K/AKT/mTOR/c-Fos/NFATc1 signaling pathway. *Cancer Med.* 9, 8173–8185. <https://doi.org/10.1002/cam4.3432>
- Kagohashi, Y., Naora, H., Otani, H., 2002. PSK, a biological response modifier, modifies p53 expression, mitosis and apoptosis in X-ray irradiated mouse embryos: Possible cellular mechanism of the anti-terato-genic effect. *Congenit. Anom.* 42, 15–20. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2002.tb00849.x>
- Kanat, O., Ertas, H., 2019. Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. *World J. Clin. Oncol.* 10, 52–61. <https://doi.org/10.5306/wjco.v10.i2.52>
- kandan, P.V., Dhineshkumar, E., Karthikeyan, R., Anbuselvan, C., Maqbool, I., Kanimozhi, G., Prakasam, B.A., Prasad, N.R., 2021. Isolation and characterization of opuntiol from *Opuntia Ficus indica* (L. Mill) and its antiproliferative effect in KB oral carcinoma cells. *Nat. Prod. Res.*
- Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1988. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27, 2777–2779. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80662-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80662-9)
- Kellogg, J.J., Raja, H.A., 2017. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. *Phytochem. Rev.* 16, 271–293. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9473-1>
- Khan, N., Afroz, F., Begum, Mst.N., Roy Rony, S., Sharmin, S., Moni, F., Mahmood Hasan, C., Shaha, K., Sohrab, Md.H., 2018. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. *Toxicol. Rep.* 5, 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.016>
- Khindaria, A., Yamazaki, I., Aust, S.D., 1995. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. *Biochemistry* 34, 16860–16869. <https://doi.org/10.1021/bi00051a037>
- Kim, G.S., Ko, W., Kim, J.W., Jeong, M.-H., Ko, S.-K., Hur, J.-S., Oh, H., Jang, J.-H., Ahn, J.S., 2018. Bioactive  $\alpha$ -Pyrone Derivatives from the Endolichenic Fungus *Dothideomycetes* sp. EL003334. *J. Nat. Prod.* 81, 1084–1088. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01022>

- Kirkby, M., Popatia, A.M., Lavoie, J.R., Wang, L., 2023. The Potential of Hormonal Therapies for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* 15, 4702. <https://doi.org/10.3390/cancers15194702>
- Klement, R.J., Abbasi-Senger, N., Adebahr, S., Alheid, H., Allgaeuer, M., Becker, G., Blanck, O., Boda-Heggemann, J., Brunner, T., Duma, M., Eble, M.J., Ernst, I., Gerum, S., Habermehl, D., Hass, P., Henkenberens, C., Hildebrandt, G., Imhoff, D., Kahl, H., Klass, N.D., Krempien, R., Lewitzki, V., Lohaus, F., Ostheimer, C., Papachristofilou, A., Petersen, C., Rieber, J., Schneider, T., Schrade, E., Semrau, R., Wachter, S., Wittig, A., Guckenberger, M., Andratschke, N., 2019. The impact of local control on overall survival after stereotactic body radiotherapy for liver and lung metastases from colorectal cancer: a combined analysis of 388 patients with 500 metastases. *BMC Cancer* 19, 173. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5362-5>
- Knežević, A., Živković, L., Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, I., Spremo-Potporević, B., 2015. Antigenotoxic Effect of *Trametes* spp. Extracts against DNA Damage on Human Peripheral White Blood Cells. *Sci. World J.* 2015, 146378. <https://doi.org/10.1155/2015/146378>
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., Ranković, B., 2013. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem. Toxicol.* 53, 112–118.
- Kowalczywska, M., Piotrowski, J., Jędrzejewski, T., Kozak, W., 2016. Polysaccharide peptides from *Coriolus versicolor* exert differential immunomodulatory effects on blood lymphocytes and breast cancer cell line MCF-7 *in vitro*. *Immunol. Lett.* 174, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.04.010>
- Kozakiewicz, Z., 1989. *Aspergillus* species on stored products, 161-188.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J., Wösten, H.A.B., 2013. Development in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 74, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Kroker, L., Dubois, C., Münstedt, K., Büntzel, J., Keinki, C., Hübner, J., 2019. A Pilot Study of Side Effects of Cancer Therapies and their Impact on Satisfaction with Life. *Cancer Invest.* 37, 216–226. <https://doi.org/10.1080/07357907.2019.1625055>
- Kuldeep, S., Prodyut, B., 2015. Lichen as a bio-indicator tool for assessment of climate and air pollution vulnerability. *Int Res J Env. Sci* 4, 107–117.
- Kumar KC, S., Müller, K., 1999. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *J. Nat. Prod.* 62, 821–823. <https://doi.org/10.1021/np980378z>
- Kumari, S., Sharma, V., Tiwari, R., Maurya, J.P., Subudhi, B.B., Senapati, D., 2022. Therapeutic potential of p53 reactivation in prostate cancer: Strategies and opportunities. *Eur. J. Pharmacol.* 919, 174807. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174807>
- Kusari, S., Lamshöft, M., Spitteller, M., 2009. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1019–1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04285.x>
- Kwapisz, D., 2021. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 70, 607–617. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02736-z>
- Lagarde, A., Jargeat, P., Roy, M., Girardot, M., Imbert, C., Millot, M., Mambu, L., 2018. Fungal communities associated with *Evernia prunastri*, *Ramalina fastigiata* and *Pleurosticta acetabulum*: Three epiphytic lichens potentially active against *Candida* biofilms. *Microbiol. Res.* 211, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.006>

- Lagarde, A., Millot, M., Pinon, A., Liagre, B., Girardot, M., Imbert, C., Ouk, T.-S., Jargeat, P., Mambu, L., 2019. Antiproliferative and antibiofilm potentials of endolichenic fungi associated with the lichen *Nephroma laevigatum*. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1044–1058.
- LAUTERWEIN, M., Oethinger, M., Belsner, K., PETERS, T., Marre, R., 1995. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (1)-Usnic Acid, and (2)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2541–3. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2541>
- Lawrey, J.D., Diederich, P., 2003. Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. *The Bryologist* 106, 80–120. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2003\)106\[0080:LFIEAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2003)106[0080:LFIEAB]2.0.CO;2)
- Li, L., Xian, T., Yan, Y., Chen, F., Liang, Q., Li, H., Yang, L., Li, J., Deng, T., Pan, X., Ge, L., Gao, M., Yang, J., Peng, M., Yang, X., 2024. Isolation, Identification, Phytochemical Characterization, and In Vitro Anti-Inflammatory Property of an Endophytic *Trametes versicolor* CL-1 Isolated from *Rosa roxburghii*. *Chem. Biodivers.* n/a, e202400873. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202400873>
- Li, S., Liu, X., Gu, Q., Yu, X., 2024. Isolation and Identification of Indole Alkaloids from *Aspergillus amstelodami* BSX001 and Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Neoechinulin A. *Microorganisms* 12, 864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050864>
- Li, W.-C., Zhou, J., Guo, S.-Y., Guo, L.-D., 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Divers.*
- Li, X.-B., Li, L., Zhu, R.-X., Li, W., Chang, W.-Q., Zhang, L.-L., Wang, X.-N., Zhao, Z.-T., Lou, H.-X., 2015. Tetramic Acids and Pyridone Alkaloids from the Endolichenic Fungus *Tolypocladium cylindrosporium*. *J. Nat. Prod.* 78, 2155–2160. <https://doi.org/10.1021/np501018w>
- Li, X.Y., Wang, J.F., Zhu, P.P., Liu, L., Ge, J.B., Yang, S.X., 1990. Immune enhancement of a polysaccharides peptides isolated from *Coriolus versicolor*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 11, 542–545.
- Li, Y.-L., Gao, Y., Liu, C.-Y., Sun, C.-J., Zhao, Z.-T., Lou, H.-X., 2019. Asperunguisins A–F, Cytotoxic Asperane Sesterterpenoids from the Endolichenic Fungus *Aspergillus unguis*. *J. Nat. Prod.* 82, 1527–1534. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01066>
- Liang, T.-M., Fang, Y.-W., Zheng, J.-Y., Shao, C.-L., 2018. Secondary Metabolites Isolated from the Gorgonian-Derived Fungus *Aspergillus ruber* and Their Antiviral Activity. *Chem. Nat. Compd.* 54, 559–561. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2406-z>
- Lin, L.-B., Gao, Y.-Q., Han, R., Xiao, J., Wang, Y.-M., Zhang, Q., Zhai, Y.-J., Han, W.-B., Li, W.-L., Gao, J.-M., 2021. Alkylated salicylaldehydes and prenylated indole alkaloids from the endolichenic fungus *Aspergillus chevalieri* and their bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* 69, 6524–6534.
- Lohézic-Le Dévéhat, F., Tomasi, S., Elix, J.A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., 2007. Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. *J. Nat. Prod.* 70, 1218–1220. <https://doi.org/10.1021/np070145k>
- Luo, M., Chang, S., Li, Y., Xi, X., Chen, M., He, N., Wang, M., Zhao, W., Xie, Y., 2022. Molecular Networking-Based Screening Led to the Discovery of a Cyclic Heptadepsipeptide from an Endolichenic *Xylaria* sp. *J. Nat. Prod.* 85, 972–979. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01108>
- Lutzoni, F., Pagel, M., Reeb, V., 2001. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411, 937–940. <https://doi.org/10.1038/35082053>

- Lv, C., 2023. Asperolide A induces apoptosis and cell cycle arrest of human hepatoma cells with p53-Y220C mutant through p38 mediating phosphorylation of p53 (S33).
- Lv, D., Xia, J., Guan, X., Lai, Q., Zhang, B., Lin, J., Shao, Z., Luo, S., Zhangsun, D., Qin, J.-J., Wang, W., 2022. Indole Diketopiperazine Alkaloids Isolated From the Marine-Derived Fungus *Aspergillus chevalieri* MCCC M23426. *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.950857>
- MacKenzie, S.E., Gurusamy, G.S., Piórko, A., Strongman, D.B., Hu, T., Wright, J.L., 2004. Isolation of sterols from the marine fungus *Corollospora lacera*. *Can. J. Microbiol.* 50, 1069–1072. <https://doi.org/10.1139/w04-103>
- Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W., Itharat, A., Na-Bangchang, K., 2010. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 55. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-55>
- Manojlovic, N., B, R., Kosanic, M., Vasiljević, P., Stanojkovic, T., 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012>
- Matsunaga, K., Ohhara, M., Oguchi, Y., Iijima, H., Kobayashi, H., 1996. Antimetastatic effect of PSK, a protein-bound polysaccharide, against the B16-BL6 mouse melanoma. *Invasion Metastasis* 16, 27–38.
- Matthews, H.K., Bertoli, C., de Bruin, R.A.M., 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Medina, M.A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L.G., Hernández Hernández, J.M., Rotello, V.M., Ramirez, J.T., 2020. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 2078. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>
- Melo, M.G.D., dos Santos, J.P.A., Serafini, M.R., Caregnato, F.F., de Bittencourt Pasquali, M.A., Rabelo, T.K., da Rocha, R.F., Quintans Jr, L., de Souza Araújo, A.A., da Silva, F.A., 2011. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol. In Vitro* 25, 462–468.
- Mendieta, E., Ramos, M., Segura Miranda, A., Granados, C., 2019. Evaluation of Crude Extracts of *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát to Control of Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Plant Res.* 8–13. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20190901.02>
- Millot, M., Girardot, M., Dutreix, L., Mambu, L., Imbert, C., 2017. Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Acetone Lichen Extracts against *Candida albicans*. *Molecules* 22, 651. <https://doi.org/10.3390/molecules22040651>
- Millot, M., Kaouadji, M., Champavier, Y., Gamond, A., Simon, A., Chulia, A.J., 2013. Usnic acid derivatives from *Leprocaulon microscopicum*. *Phytochem. Lett.* 6, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.10.009>
- Miral, A., Ferron, S., Rouaud, I., Slyambayev, D., Bousarghin, L., Camuzet, C., Belouzard, S., Séron, K., Le Pogam, P., Tranchimand, S., Tomasi, S., 2023. Eremoxylarins D–J, Antibacterial Eremophilane Sesquiterpenes Discovered from an Endolichenic Strain of *Xylaria hypoxylon*. *J. Nat. Prod.* 86, 730–738. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00881>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Kujawowicz, K., Witkowska, A., 2021. Beta-Glucans from Fungi: Biological and Health-Promoting Potential in the COVID-19 Pandemic Era. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13113960>



- Modest, D.P., Pant, S., Sartore-Bianchi, A., 2019. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 109, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.12.019>
- Mokhtar, M.M., Andersen, J.M., Kister, E.A., Hopkins, J.X., Estier, T., Hamilton, F., Guan, H., Mack, J., Haley, R.A., 2023. A Mechanistic Perspective on the Mechanochemical Method To Reduce Carbonyl Groups with Stainless Steel and Water. *Eur. J. Org. Chem.* 26, e202300149. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202300149>
- Morris Kupchan, S., Kopperman, H.L., 1975. I-Usonic acid: Tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia* 31, 625–625. <https://doi.org/10.1007/BF01944592>
- Muggia, L., Fleischhacker, A., Kopun, T., Grube, M., 2016. Extremotolerant fungi from alpine rock lichens and their phylogenetic relationships. *Fungal Divers.* 76, 119–142. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0343-8>
- Muggia, L., Kopun, T., Grube, M., 2017. Effects of Growth Media on the Diversity of Culturable Fungi from Lichens. *Molecules* 22, 824. <https://doi.org/10.3390/molecules22050824>
- Müller, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 9–16. <https://doi.org/10.1007/s002530100684>
- Muñoz-Castiblanco, T., Mejía-Giraldo, J.C., Puertas-Mejía, M.A., 2017. Trametes genus, a source of chemical compounds with anticancer activity in human osteosarcoma: A systematic review. *J. Appl. Pharm. Sci.*
- Muroga, Y., Yamada, T., Numata, A., Tanaka, R., 2010. 11- and 4'-Epimers of Chaetomugilin A, Novel Cytostatic Metabolites from Marine Fish-Derived Fungus *Chaetomium globosum*. *Helv. Chim. Acta* 93.
- Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., Papadimitriou, C., 2012. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* 38, 890–903. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.02.011>
- Mustafin, K., Bisko, N., Blieva, R., Al-Maali, G., Krupodorova, T., Narmuratova, Z., Saduyeva, Z., Zhakipbekova, A., 2022. Antioxidant and antimicrobial potential of *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Turk. J. Biochem.* 47, 483–489. <https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0141>
- National Center for Biotechnology Information [WWW Document], 2024. . PubMed. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=endolichenic+fungi&sort=pubdatehttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 8.9.24).
- Ng, T.B., Chan, W.Y., 1997. Polysaccharopeptide from the mushroom *Coriolus versicolor* possesses analgesic activity but does not produce adverse effects on female reproductive or embryonic development in mice. *Gen. Pharmacol.* 29, 269–273. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00412-0](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00412-0)
- Nguyen, V.-T., Lee, J.S., Qian, Z.-J., Li, Y.-X., Kim, K.-N., Heo, S.-J., Jeon, Y.-J., Park, W.S., Choi, I.-W., Je, J.-Y., Jung, W.-K., 2014. Gliotoxin Isolated from Marine Fungus *Aspergillus* sp. Induces Apoptosis of Human Cervical Cancer and Chondrosarcoma Cells. *Mar. Drugs* 12, 69–87. <https://doi.org/10.3390/md12010069>
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol. Bioinforma.* 4, EBO.S653. <https://doi.org/10.4137/EBO.S653>
- Nji, Q.N., Babalola, O.O., Mwanza, M., 2023. Soil *Aspergillus* Species, Pathogenicity and Control Perspectives. *J. Fungi* 9, 766. <https://doi.org/10.3390/jof9070766>

- Nothias-Scaglia, L.-F., Esposito, M., Costa, J., Paolini, J., Touboul, D., Litaudon, M., 2015. Les réseaux moléculaires, une approche bio-informatique globale pour interpréter les données de spectrométrie de masse tandem. *Spectra Anal.* 307, 73–78.
- Núñez, M., Ryvarden, L., 2001. *East Asian Polypores*. Fungiflora Oslo.
- Nursid, M., Chasanah, E., Wahyuono, S., 2011. Isolation and Identification of Emestrin from *Emericella nidulans* and Investigation of Its Anticancer Properties 5.
- O'Meara, T., Safonov, A., Casadevall, D., Qing, T., Silber, A., Killelea, B., Hatzis, C., Pusztai, L., 2019. Immune microenvironment of triple-negative breast cancer in African-American and Caucasian women. *Breast Cancer Res. Treat.* 175, 247–259. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05156-5>
- Orfali, R., A. Aboseada, M., M. Abdel-Wahab, N., M. Hassan, H., Perveen, S., Ameen, F., Alturki, E., Ramadan Abdelmohsen, U., 2021. Recent updates on the bioactive compounds of the marine-derived genus *Aspergillus*. *RSC Adv.* 11, 17116–17150. <https://doi.org/10.1039/D1RA01359A>
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Núñez, P., Acuña-Aguilar, L.E., Gómez-Valles, F.O., Ramírez-Valdespino, C.A., 2022. Subtypes of Breast Cancer, in: Mayrovitz, H.N. (Ed.), *Breast Cancer*. Exon Publications, Brisbane (AU).
- Padhi, S., Masi, M., Cimmino, A., Tuzi, A., Jena, S., Tayung, K., Evidente, A., 2019. Funiculosone, a substituted dihydroxanthene-1,9-dione with two of its analogues produced by an endolichenic fungus *Talaromyces funiculosus* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 157, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.031>
- Papazi, A., Kastanaki, E., Pirintsos, S., Kotzabasis, K., 2015. Lichen Symbiosis: Nature's High Yielding Machines for Induced Hydrogen Production. *PLOS ONE* 10, e0121325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121325>
- sung, P.A., Wijeratne, E.M.K., Burns, A.M., Marron, M.T., Gunatilaka, M.K., Arnold, A.E., Gunatilaka, A.A.L., 2007. Heptaketides from *Corynespora* sp. Inhabiting the Cavern Beard Lichen, *Usnea cavernosa*: First Report of Metabolites of an Endolichenic Fungus. *J. Nat. Prod.* 70, 1700–1705. <https://doi.org/10.1021/np070466w>
- Petrini, O., Hake, U., Dreyfuss, M.M., 1990. An Analysis of Fungal Communities Isolated from Fruticose Lichens. *Mycologia* 82, 444–451. <https://doi.org/10.1080/00275514.1990.12025907>
- Podojil, M., Sedmera, P., Vokoun, J., Betina, V., Baráthová, H., Ďuračková, Z., Horáková, K., Nemeč, P., 1978. Eurotium (*Aspergillus*) *repens* metabolites and their biological activity. *Folia Microbiol. (Praha)* 23, 438–443. <https://doi.org/10.1007/BF02885572>
- Qian, Z.M., Xu, M.F., Tang, P.L., 1997. Polysaccharide Peptide (PSP) Restores Immunosuppression Induced by Cyclophosphamide in Rats. *Am. J. Chin. Med.* 25, 27–35. <https://doi.org/10.1142/S0192415X97000068>
- Qian-Cutrone, J., Huang, S., Shu, Y.-Z., Vyas, D., Fairchild, C., Menendez, A., Krampitz, K., Dalterio, R., Klohr, S.E., Gao, Q., 2002. Stephacidin A and B: Two Structurally Novel, Selective Inhibitors of the Testosterone-Dependent Prostate LNCaP Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14556–14557. <https://doi.org/10.1021/ja028538n>
- Quilico, A., Panizzi, L., Mugnaini, E., 1949. Structure of Flavoglaucin and Auroglaucin. *Nature* 164, 26–27. <https://doi.org/10.1038/164026a0>
- Raistrick, H., Smith, G., 1935. Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.* 29, 606–611.

- Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu, N., Kumar, S.S., Kaur, T., Reddy, M.S., Suryanarayanan, T.S., 2020. Endolichenic fungal diversity associated with some lichens of the Western Ghats. *Planta Med.* 86, 960–966. <https://doi.org/10.1055/a-1045-1989>
- Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P., Manojlović, N., 2012. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14707–14722.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. The Genus *Aspergillus* Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins. Field View Dis. Cotton Plant Show. Coagulated Fibers.
- Rey, A., 2011. Dictionnaire Historique de la langue française. Nathan.
- Ricciardi, M.R., Licchetta, R., Mirabilii, S., Scarpari, M., Parroni, A., Fabbri, A.A., Cescutti, P., Reverberi, M., Fanelli, C., Tafuri, A., 2017. Preclinical Antileukemia Activity of Tramesan: A Newly Identified Bioactive Fungal Metabolite. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 5061639. <https://doi.org/10.1155/2017/5061639>
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., Conte, P., 2017. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* 377, 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>
- Rodrigues, A.P.D., Carvalho, A.S.C., Santos, A.S., Alves, C.N., do Nascimento, J.L.M., Silva, E.O., 2011. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biol. Int.* 35, 335–343. <https://doi.org/10.1042/CBI20100083>
- Roshandel, G., Ghasemi-Kebria, F., Malekzadeh, R., 2024. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers* 16, 1530. <https://doi.org/10.3390/cancers16081530>
- S., J., S. P., D., M. V. N. L., C., 2015. Isolation of methyl gamma linolenate from spirulina platensis using flash chromatography and its apoptosis inducing effect. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 263. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0771-8>
- Sakamoto, J., Morita, S., Oba, K., Matsui, T., Kobayashi, M., Nakazato, H., Ohashi, Y., Meta-Analysis Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon Rectum, 2006. Efficacy of adjuvant Immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 404–411. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0054-1>
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sanders, W.B., 2014. Complete life cycle of the lichen fungus *Calopadia puiggarii* (Pilocarpaceae, Ascomycetes) documented in situ: Propagule dispersal, establishment of symbiosis, thallus development, and formation of sexual and asexual reproductive structures. *Am. J. Bot.* 101, 1836–1848. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400272>
- Saraswathi, V., Wu, G., Toborek, M., Hennig, B., 2004. Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. *J. Lipid Res.* 45, 794–804. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300497-JLR200>
- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H.S., Schneeweiss, A., Barrios, C.H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S.Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E.P., Loi, S., Emens, L.A., 2018. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel

- in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 379, 2108–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>
- Seya, H., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K., Udagawa, S., 1986. Studies on fungal products. Part 8. Isolation and structure of emestrin, a novel antifungal macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*. X-Ray molecular structure of emestrin. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 0, 109–116. <https://doi.org/10.1039/P19860000109>
- Siddiqui, F., Naqvi, S., Abidi, L., Faizi, S., Lubna, Avesi, L., Mirza, T., Farooq, A.D., 2016. *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 182, 221–234. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.016>
- Sieteiglesias, V., González-Burgos, E., Bermejo-Bescós, P., Divakar, P.K., Gómez-Serranillos, M.P., 2019. Lichens of Parmelioid Clade as Promising Multitarget Neuroprotective Agents. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1165–1177. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00010>
- Singh, B.N., Upreti, D.K., Gupta, V.K., Dai, X.-F., Jiang, Y., 2017. Endolichenic Fungi: A Hidden Reservoir of Next Generation Biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 35, 808–813. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.003>
- Slack, G.J., Puniani, E., Frisvad, J.C., Samson, R.A., Miller, J.D., 2009. Secondary metabolites from Eurotium species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* 113, 480–490. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.12.002>
- Smetanina, O.F., Yurchenko, A.N., Girich (Ivanets), E.V., Trinh, P.T.H., Antonov, A.S., Dyshlovoy, S.A., von Amsberg, G., Kim, N.Y., Chingizova, E.A., Pislyagin, E.A., Menchinskaya, E.S., Yurchenko, E.A., Van, T.T.T., Afiyatullo, S.S., 2020. Biologically Active Echinulin-Related Indolediketopiperazines from the Marine Sediment-Derived Fungus *Aspergillus niveoglaucus*. *Molecules* 25, 61. <https://doi.org/10.3390/molecules25010061>
- Smithsonian Institution, Institution, S., 1990. Smithsonian contributions to botany. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Sun, Z., Wu, Y., Long, S., Feng, S., Jia, X., Hu, Y., Ma, M., Liu, J., Zeng, B., 2024. *Aspergillus oryzae* as a Cell Factory: Research and Applications in Industrial Production. *J. Fungi Basel Switz.* 10, 248. <https://doi.org/10.3390/jof10040248>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., 2017. Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens. *Mycology* 8, 189–196. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1352048>
- Takai, M., Uehara, Y., Beisler, J.A., 1979. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J. Med. Chem.* 22, 1380–1384. <https://doi.org/10.1021/jm00197a019>
- Talapatra, S.K., Mandai, S.K., Bhaumik, A., Mukhopadhyay, S., Kar, P., Patra, A., Talapatra, B., 2001. Echinulin, a novel cyclic dipeptide carrying a triprenylated indole moiety from an Anacardiaceae, a Cucurbitaceae and two Orchidaceae plants: detailed high resolution 2D-NMR and mass spectral studies.
- Thadhani, V.M., Choudhary, M.I., Khan, S., Karunaratne, V., 2012. Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones.
- Tievent, P., 2001. Guide des lichens. Lausanne : Delachaux et Niestlé.

- Tomović, J., Kosanić, M., Ristić, S., Ranković, B., Stanojković, T., Manojlović, N., 2017. Chemical composition and bioactive properties of the lichen, *Pleurosticta acetabulum*. *Trop. J. Pharm. Res.* 16, 2977–2984. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i12.23>
- Toure, S., Millot, M., Ory, L., Roullier, C., Khaldi, Z., Pichon, V., Girardot, M., Imbert, C., Mambu, L., 2022. Access to Anti-Biofilm Compounds from Endolichenic Fungi Using a Bioguided Networking Screening. *J. Fungi* 8, 1012. <https://doi.org/10.3390/jof8101012>
- Tran, Hoa Thi, Nguyen, G.T., Nguyen, H.H.T., Tran, Huyen Thi, Tran, Quang Hong, Tran, Quang Ho, Ninh, N.T., Do, P.T., Chu, H.H., Pham, N.B., 2022. Isolation and Cytotoxic Potency of Endophytic Fungi Associated with *Dyosma difformis*, a Study for the Novel Resources of Podophyllotoxin. *Mycobiology* 50, 389. <https://doi.org/10.1080/12298093.2022.2126166>
- Tripathi, M., Joshi, Y., 2019. Taxonomic Descriptions of Endolichenic Fungi, in: Tripathi, M., Joshi, Y. (Eds.), *Endolichenic Fungi: Present and Future Trends*. Springer, Singapore, pp. 147–169. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7268-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7268-1_7)
- Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K., 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* 11, 131–155. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(84\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0305-7372(84)90005-7)
- U'Ren, J.M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Arnold, A.E., 2010. Community Analysis Reveals Close Affinities Between Endophytic and Endolichenic Fungi in Mosses and Lichens. *Microb. Ecol.* 60, 340–353. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9698-2>
- U'Ren, J.M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Laetsch, A.D., Arnold, A.E., 2012. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *Am. J. Bot.* 99, 898–914. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100459>
- Valisolalao, J., Luu, B., Ourisson, G., 1983. Steroides cytotoxiques de *Polyporus versicolor*. *Tetrahedron* 39, 2779–2785. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)82446-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82446-7)
- Varlı, M., Lee, E.-Y., Yang, Y., Zhou, R., Taş, İ., Pulat, S., Gamage, C.D.B., Park, S.-Y., Hur, J.-S., Nam, S.-J., Kim, H., 2023. 1'-O-methyl-averantin isolated from the endolichenic fungus *Jackrogersella* sp. EL001672 suppresses colorectal cancer stemness via sonic Hedgehog and Notch signaling. *Sci. Rep.* 13, 2811. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28773-z>
- Vigushin, D.M., Mirsaidi, N., Brooke, G., Sun, C., Pace, P., Inman, L., Moody, C.J., Coombes, R.C., 2004. Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer in vivo. *Med. Oncol.* 21, 21–30. <https://doi.org/10.1385/MO:21:1:21>
- Wang, H., Umeokoli, B.O., Eze, P., Heering, C., Janiak, C., Müller, W.E.G., Orfali, R.S., Hartmann, R., Dai, H., Lin, W., Liu, Z., Proksch, P., 2017. Secondary metabolites of the lichen-associated fungus *Apiospora montagnei*. *Tetrahedron Lett.* 58, 1702–1705. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.03.052>
- Wang, S.-R., Zhang, L., Chen, H.-P., Li, Z.-H., Dong, Z.-J., Wei, K., Liu, J.-K., 2015. Four new spiroaxane sesquiterpenes and one new rosenonolactone derivative from cultures of Basidiomycete *Trametes versicolor*. *Fitoterapia* 105, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.017>
- Wang, Z., Dong, B., Feng, Z., Yu, S., Bao, Y., 2015. A study on immunomodulatory mechanism of Polysaccharopeptide mediated by TLR4 signaling pathway. *BMC Immunol.* 16, 34. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0100-5>
- Weinberg, R.A., 1996. How Cancer Arises. *Sci. Am.* 275, 62–70.
- Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Al-Ani, L.K.T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K.C., Zhao, R.L., Aptroot, A., Leontyev, D.V., Saxena, R.K., Tokarev, Y.S., Dai, D.Q.,

- Letcher, P.M., Stephenson, S.L., Ertz, D., Lumbsch, H.T., Kukwa, M., Issi, I.V., Madrid, H., Phillips, A.J.L., Selbmann, L., Pfliegler, W.P., Horváth, E., Bensch, K., Kirk, P.M., Kolaríková, K., Raja, H.A., Radek, R., Papp, V., Dima, B., Ma, J., Malosso, E., Takamatsu, S., Rambold, G., Gannibal, P.B., Triebel, D., Gautam, A.K., Avasthi, S., Suetrong, S., Timdal, E., Fryar, S.C., Delgado, G., Réblová, M., Doilom, M., Dolatabadi, S., Pawlowska, J.Z., Humber, R.A., Kodsueb, R., Sánchez-Castro, I., Goto, B.T., Silva, D.K.A., de Souza, F.A., Oehl, F., da Silva, G.A., Silva, I.R., Blaszkowski, J., Jobim, K., Maia, L.C., Barbosa, F.R., Fiuza, P.O., Divakar, P.K., Shenoy, B.D., Castañeda-Ruiz, R.F., 2020. Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere Online J. Fungal Biol.* 11, 1060–1456.
- Wohlgemuth, V., Kindinger, F., Xie, X., Wang, B.-G., Li, S.-M., 2017. Two Prenyltransferases Govern a Consecutive Prenylation Cascade in the Biosynthesis of Echinulin and Neoehinulin. *Org. Lett.* 19, 5928–5931. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02926>
- Wu, F., Zhou, L.-W., Yang, Z.-L., Bau, T., Li, T.-H., Dai, Y.-C., 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Divers.* 98, 1–76. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00432-7>
- Wu, W., Dai, H., Bao, L., Ren, B., Lu, J., Luo, Y., Guo, L., Zhang, L., Liu, H., 2011. Isolation and Structural Elucidation of Proline-Containing Cyclopentapeptides from an Endolichenic *Xylaria* sp. *J. Nat. Prod.* 74, 1303–1308. <https://doi.org/10.1021/np100909y>
- Xie, F., Luan, X.-Y., Gao, Y., Xu, K., Lou, H.-X., 2020. Cytotoxic Heptaketides from the Endolichenic Fungus *Ulospora bilgramii*. *J. Nat. Prod.* 83, 1623–1633. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00108>
- Xu, K., Li, R., Zhu, R., Li, X., Xu, Y., He, Q., Xie, F., Qiao, Y., Luan, X., Lou, H., 2021. Xylarins A–D, Two Pairs of Diastereoisomeric Isoindoline Alkaloids from the Endolichenic Fungus *Xylaria* sp. *Org. Lett.* 23, 7751–7754. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c02730>
- Xu, Y., Wang, Q., Bao, W., Pa, B., 2019. Antihyperlipidemic Effect, Identification and Isolation of the Lipophilic Components from *Artemisia integrifolia*. *Molecules* 24, 725. <https://doi.org/10.3390/molecules24040725>
- Yamada, T., Jinno, M., Kikuchi, T., Kajimoto, T., Numata, A., Tanaka, R., 2012. Three new azaphilones produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 65, 413–417. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.40>
- Yamada, T., Muroga, Y., Jinno, M., Kajimoto, T., Usami, Y., Numata, A., Tanaka, R., 2011. New class azaphilone produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*. The stereochemistry and biological activities. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 4106–4113. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.008>
- Yan, Z.-F., Lin, P., Kook, M., Yi, T.-H., Li, C.-T., 2017. Immune activation effects of *Eurotium cristatum* on T cells through NF- $\kappa$ B signaling pathways in humans. *Food Agric. Immunol.* 28, 388–402. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1293012>
- Yap, A.-C., Teoh, W.-Y., Chan, K.-G., Sim, K.-S., Choo, Y.-M., 2015. A new oxathiolane from *Enterobacter cloacae*. *Nat. Prod. Res.* 29, 722–726. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.983507>
- Yılmaz, M., Türk, A.Ö., Tay, T., Kivanç, M., 2004. The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (–)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents. *Z. Für Naturforschung C* 59, 249–254. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-423>
- Yoshimi, N., Wang, A., Morishita, Y., Tanaka, T., Sugie, S., Kawai, K., Yamahara, J., Mori, H., 1992. Modifying Effects of Fungal and Herb Metabolites on Azoxymethane-induced

- Intestinal Carcinogenesis in Rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 1273–1278. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1992.tb02758.x>
- Yu, Lili, Liu, J., Yu, Liquan, Chen, L., Qiu, F., 2018. Chemical Constituents of Seed Oil Leavings of *Xanthoceras sorbifolia*. *Chem. Nat. Compd.* 54, 769–771. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2469-x>
- Yuan, C., Guo, Y.-H., Wang, H.-Y., Ma, X.-J., Jiang, T., Zhao, J.-L., Zou, Z.-M., Ding, G., 2016. Allelopathic Polyketides from an Endolichenic Fungus *Myxotrichum* SP. by Using OSMAC Strategy. *Sci. Rep.* 6, 19350. <https://doi.org/10.1038/srep19350>
- Yuan, W.-H., Teng, M.-T., Sun, S.-S., Ma, L., Yuan, B., Ren, Q., Zhang, P., 2018. Active Metabolites from Endolichenic Fungus *Talaromyces* sp. *Chem. Biodivers.* 15, e1800371. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800371>
- Yuan, X., Xiao, S., Taylor, T.N., 2005. Lichen-Like Symbiosis 600 Million Years Ago. *Science* 308, 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/science.1111347>
- Zakaria, L., Kulaveraasingham, H., Guan, T.S., Abdullah, F., Wan, H.Y., 2005. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Random Amplified Microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from Infected Oil Palm and Coconut Stumps in Malaysia 13.
- Zedda, L., Rambold, G., 2015. The Diversity of Lichenised Fungi: Ecosystem Functions and Ecosystem Services, in: Upreti, D.K., Divakar, P.K., Shukla, V., Bajpai, R. (Eds.), *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, Volume 2*. Springer India, New Delhi, pp. 121–145. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2235-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2235-4_7)
- Zeng, W.-N., Jin-Cai, Wang, B., Chen, L.-Y., Pan, C.-X., Chen, S.-J., Huang, G.-L., Zheng, C.-J., 2022. Secondary Metabolites from the Mangrove-Derived Fungus *Penicillium* sp. TGM112 and their Bioactivities. *Chem. Nat. Compd.* 58, 574–577. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03742-6>
- Zhang, K., Ren, J., Ge, M., Li, L., Guo, L., Chen, D., Che, Y., 2014. Mono- and bis-furanone derivatives from the endolichenic fungus *Peziza* sp. *Fitoterapia* 92, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.011>
- Zhang, T., 2016. Diversity and distribution of cultured endolichenic fungi in the Ny-Ålesund Region, Svalbard (High Arctic).
- Zhang, W., Ran, Q., Li, H., Lou, H., 2024. Endolichenic Fungi: A Promising Medicinal Microbial Resource to Discover Bioactive Natural Molecules—An Update. *J. Fungi* 10, 99. <https://doi.org/10.3390/jof10020099>
- Zhao, Q., Chen, G.-D., Feng, X.-L., Yu, Y., He, R.-R., Li, X.-X., Huang, Y., Zhou, W.-X., Guo, L.-D., Zheng, Y.-Z., Yao, X.-S., Gao, H., 2015. *hawksworth*. Nodulisporiviridins A–H, Bioactive Viridins from *Nodulisporium* sp. *J. Nat. Prod.* 78, 1221–1230. <https://doi.org/10.1021/np500912t>
- Zheng, H.-C., 2017. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 8, 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
- Zhou, L., Zhu, T., Cai, S., Gu, Q., Li, D., 2010. Three New Indole-Containing Diketopiperazine Alkaloids from a Deep-Ocean Sediment Derived Fungus *Penicillium griseofulvum*. *Helv. Chim. Acta* 93, 1758–1763. <https://doi.org/10.1002/hlca.200900443>
- Zhou, Y.-F., Hu, K., Wang, F., Tang, J.-W., Zhang, L., Sun, H.-D., Cai, X.-H., Puno, P.-T., 2021. 3-Hydroxy-4-methyldecanoic Acid-Containing Cyclotetradepsipeptides from an Endolichenic *Beauveria* sp. *J. Nat. Prod.* 84, 1244–1253. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01305>

# Annexes







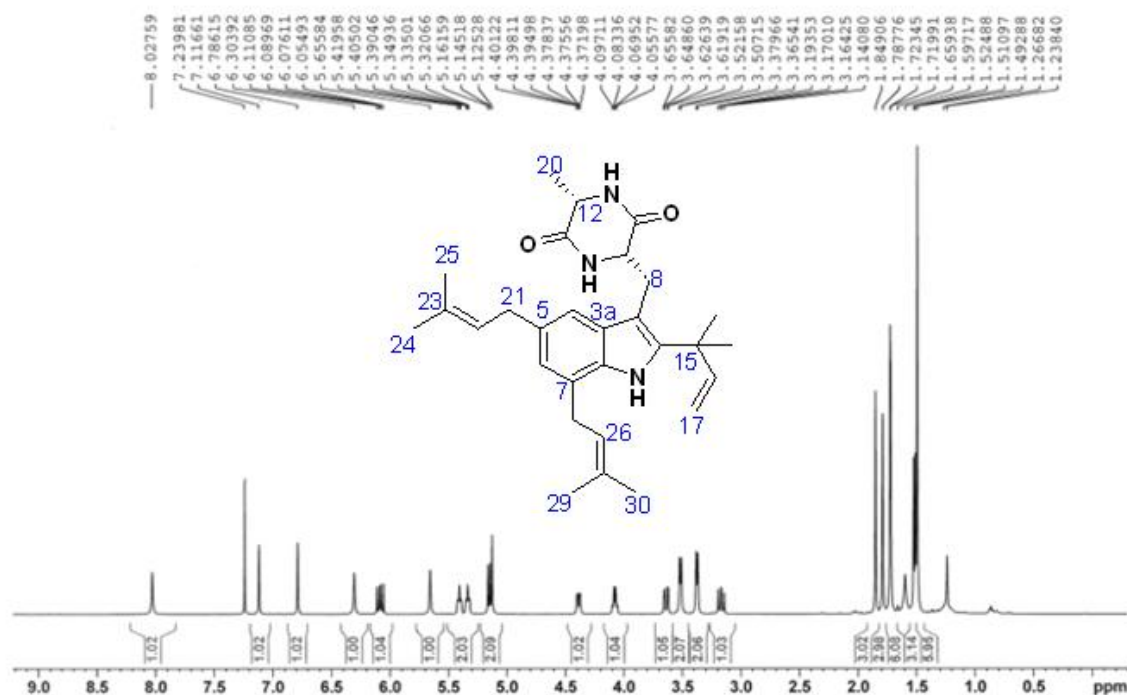
## Annexes

---

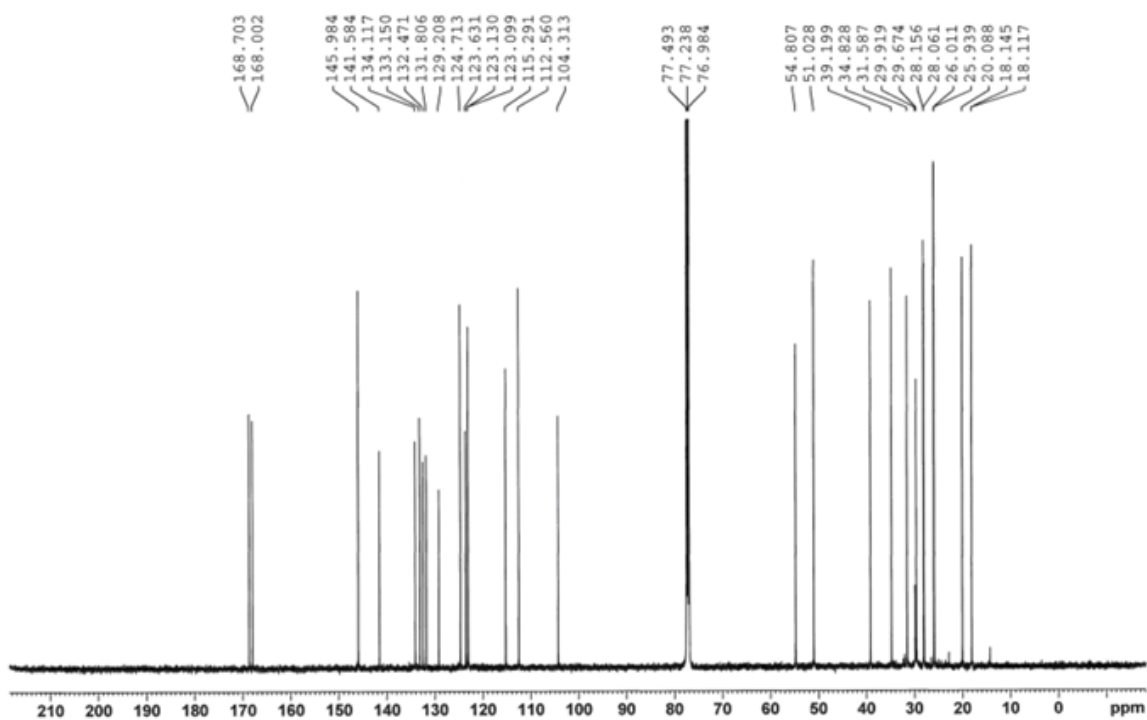
Annexe 1. RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P1 .....	198
Annexe 2. COSY, HSQC et HMBC du produit P1 .....	199
Annexe 3. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P2.....	201
Annexe 4. HSQC, COSY et HMBC du produit P2.....	202
Annexe 5. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P3.....	204
Annexe 6. COSY, HSQC et HMBC du produit P3.....	205
Annexe 7. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P4.....	207
Annexe 8. COSY, HSQC et HMBC du produit P4.....	208
Annexe 9. RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du produit P5 .....	210
Annexe 10. COSY, SQC et HMBC du produit P5.....	211
Annexe 11. RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C1 .....	213
Annexe 12. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C2.....	214
Annexe 13. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C3.....	215
Annexe 14. COSY, HSQC et HMBC du composé C3 .....	216
Annexe 15. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C4 .....	218
Annexe 16. HSQC et HMBC du composé C4 .....	219
Annexe 17. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C5.....	220
Annexe 18. HSQC et HMBC du composé C5 .....	221
Annexe 19. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du composé C6 .....	222
Annexe 20. HSQC et HMBC du composé C6 .....	223
Annexe 21. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé C7.....	224
Annexe 22. COSY, HSQC et HMBC du composé C7 .....	225
Annexe 23. Spectre de masse en mode positif de l'échinuline.....	227
Annexe 24. Spectre de masse en mode négatif de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one. ....	228

# Annexe 1. MN $^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du produit P1

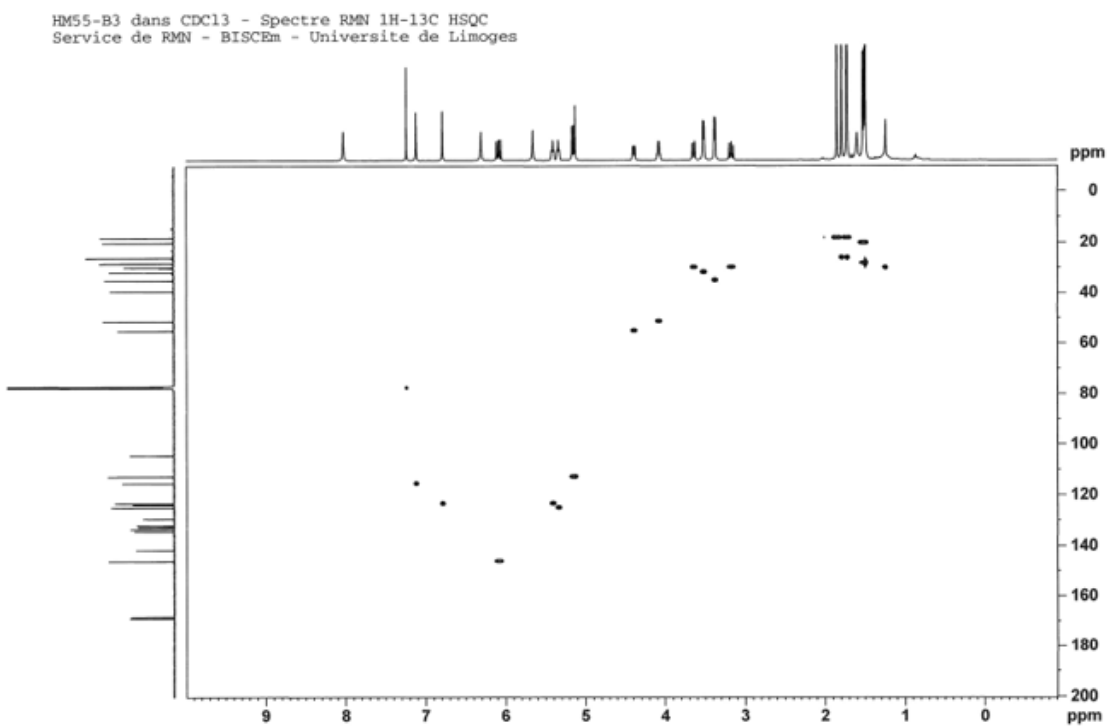
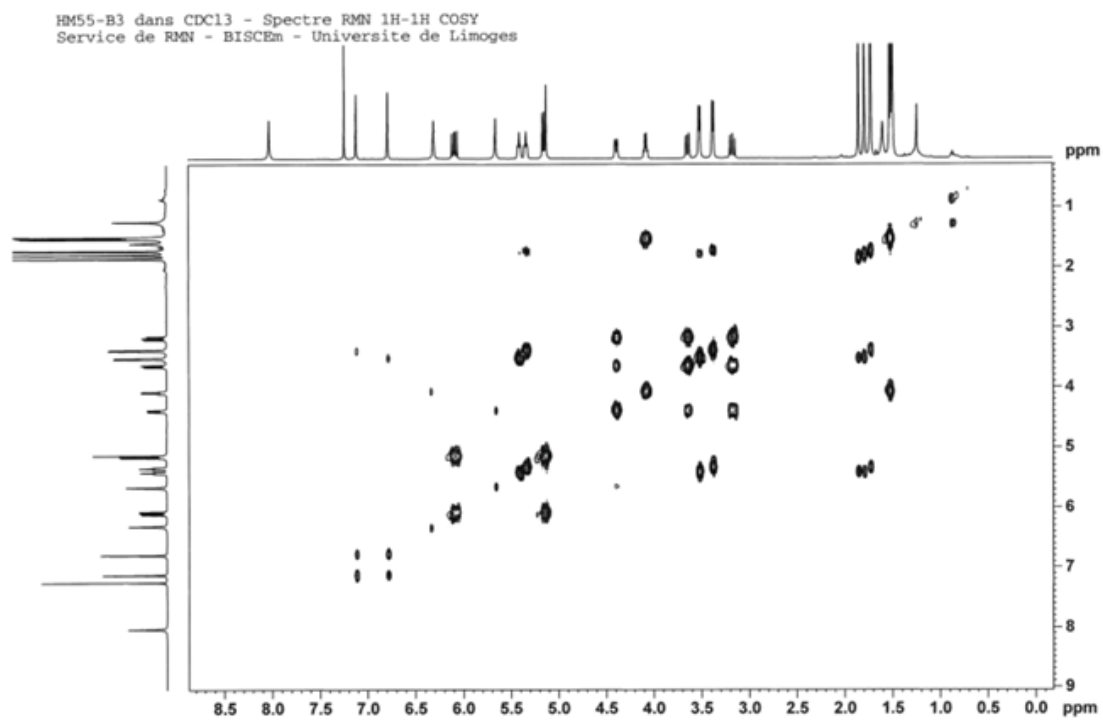
HM55-B3 dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^1\text{H}$   
 Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



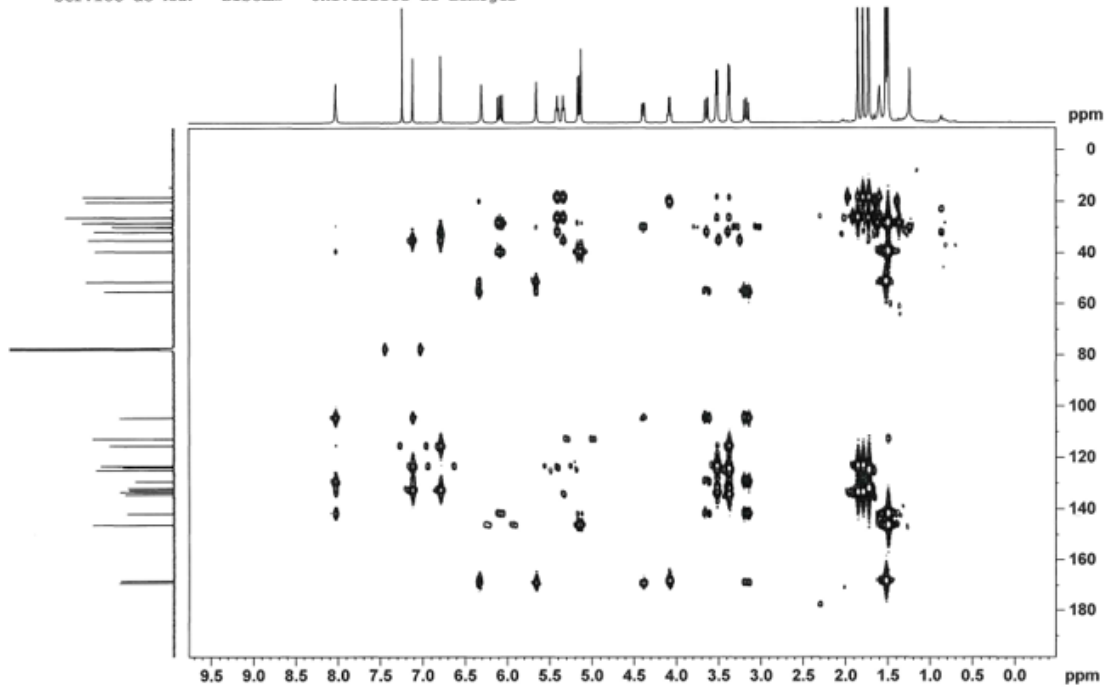
HM55-B3 dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   
 Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



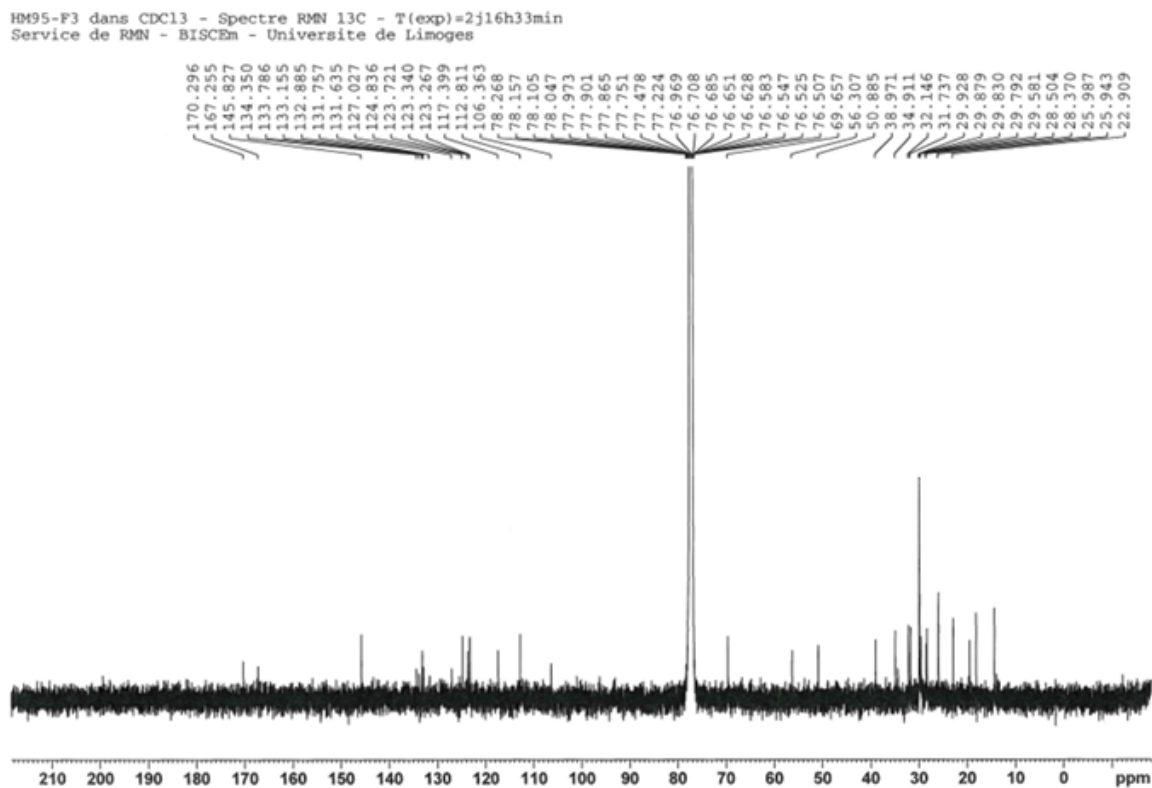
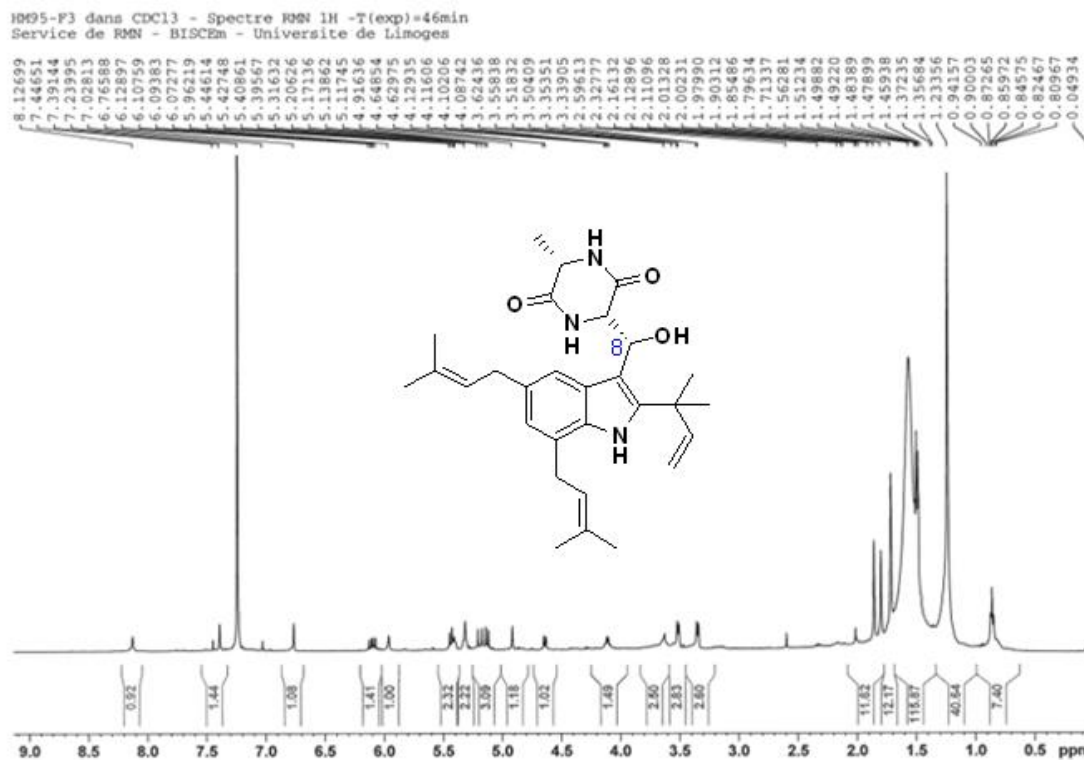
## Annexe 2. COSY, HSQC et HMBC du produit P1



HM55-B3 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

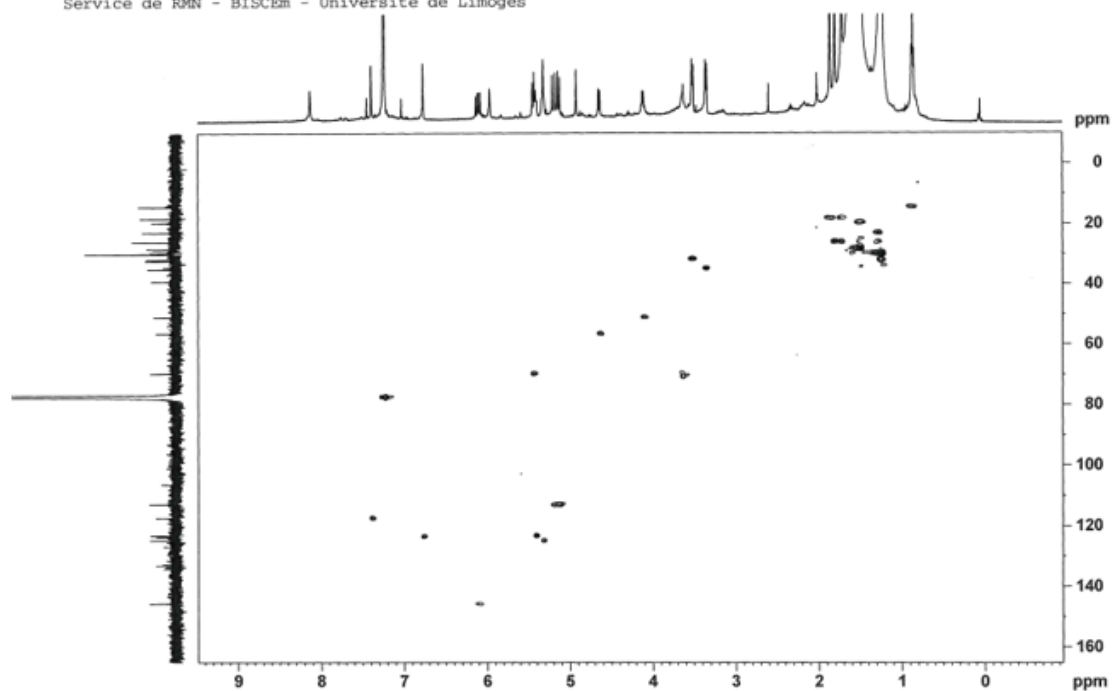


### Annexe 3. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125, CDCl<sub>3</sub>) du produit P2

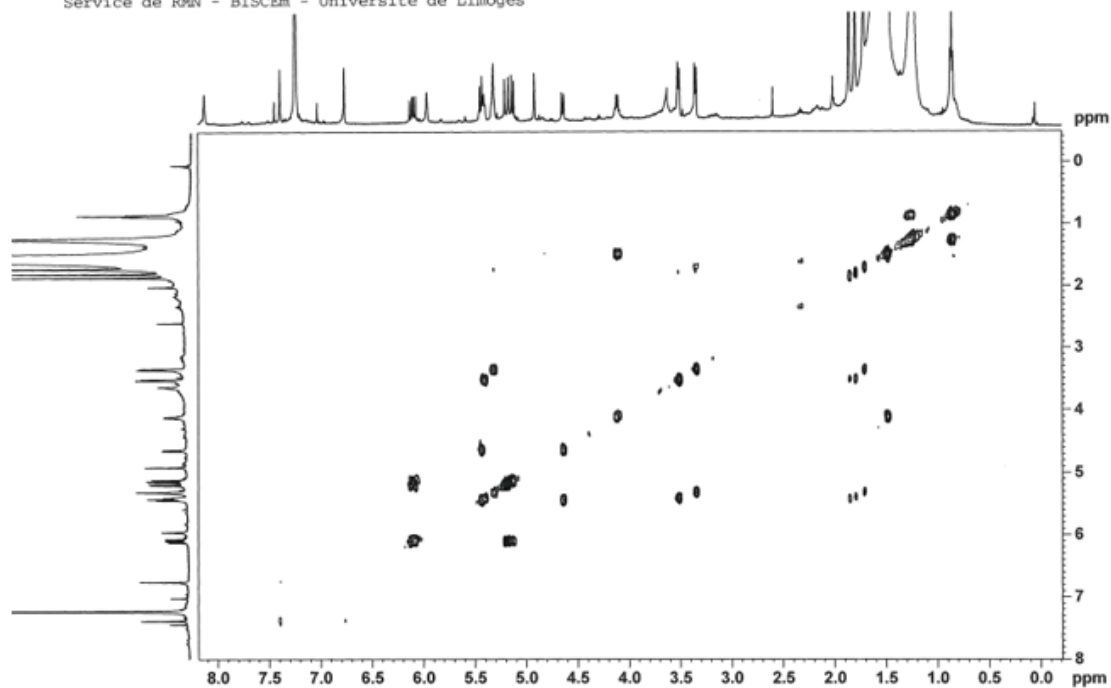


## Annexe 4. HSQC, COSY et HMBC du produit P2

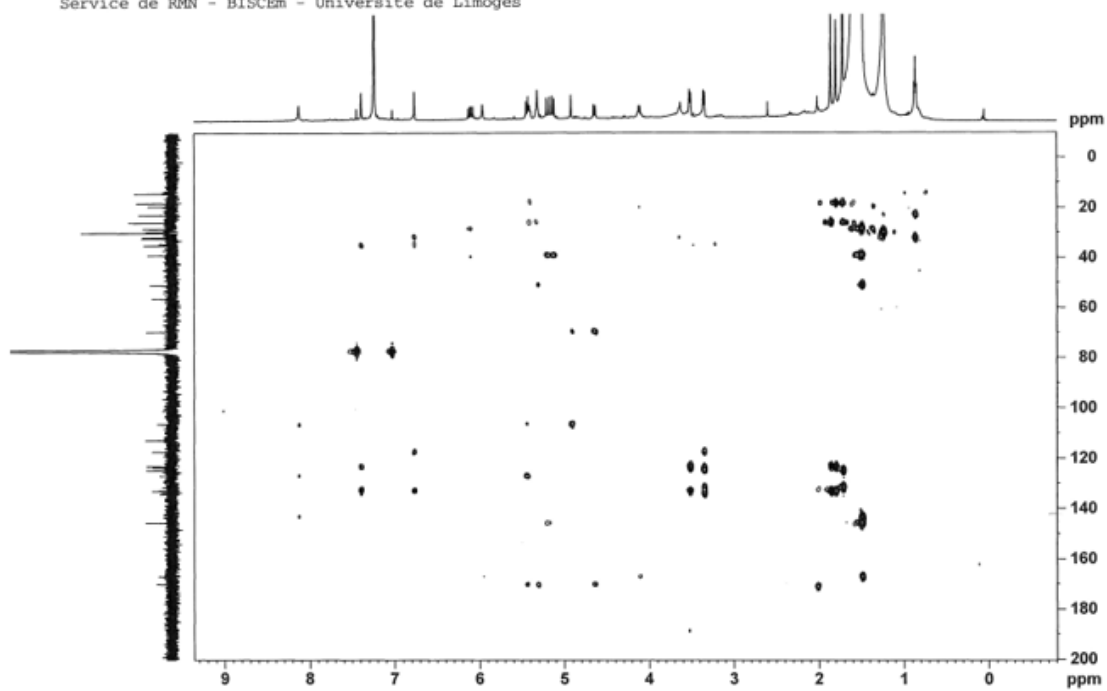
HM95-F3 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC - T(exp)=7h54min  
Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges



HM95-F3 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-1H COSY - T(exp)=7h00min  
Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges



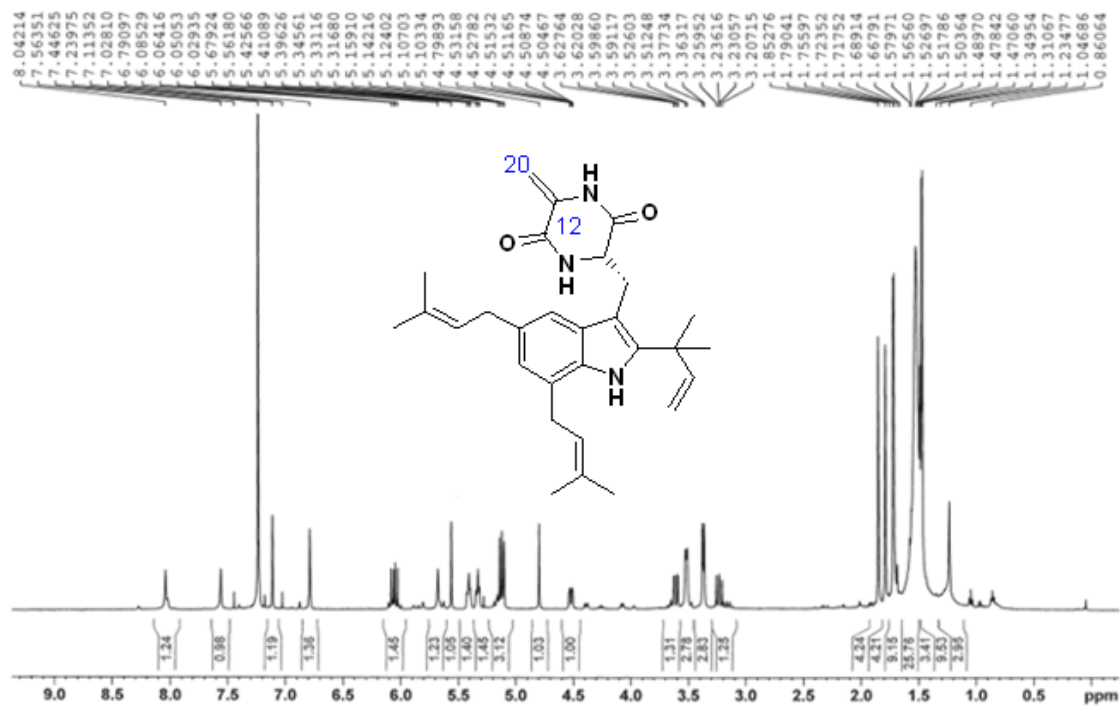
HM95-F3 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



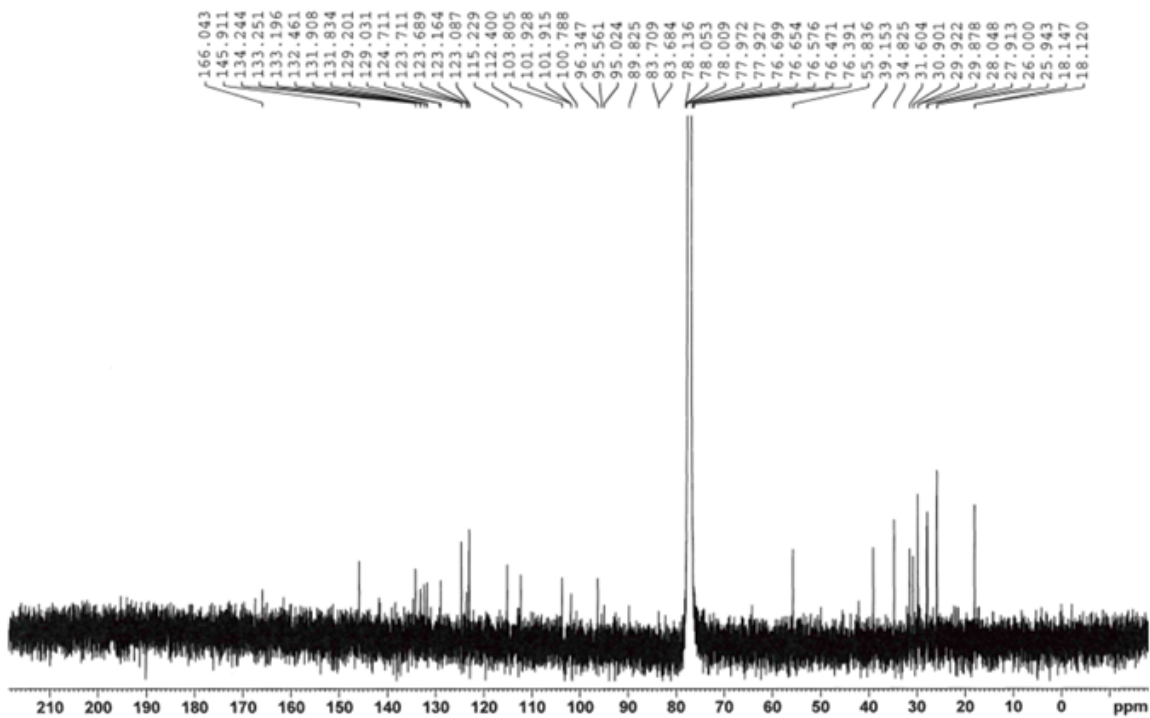


## Annexe 5. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P3

HM77-F4 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>1</sup>H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

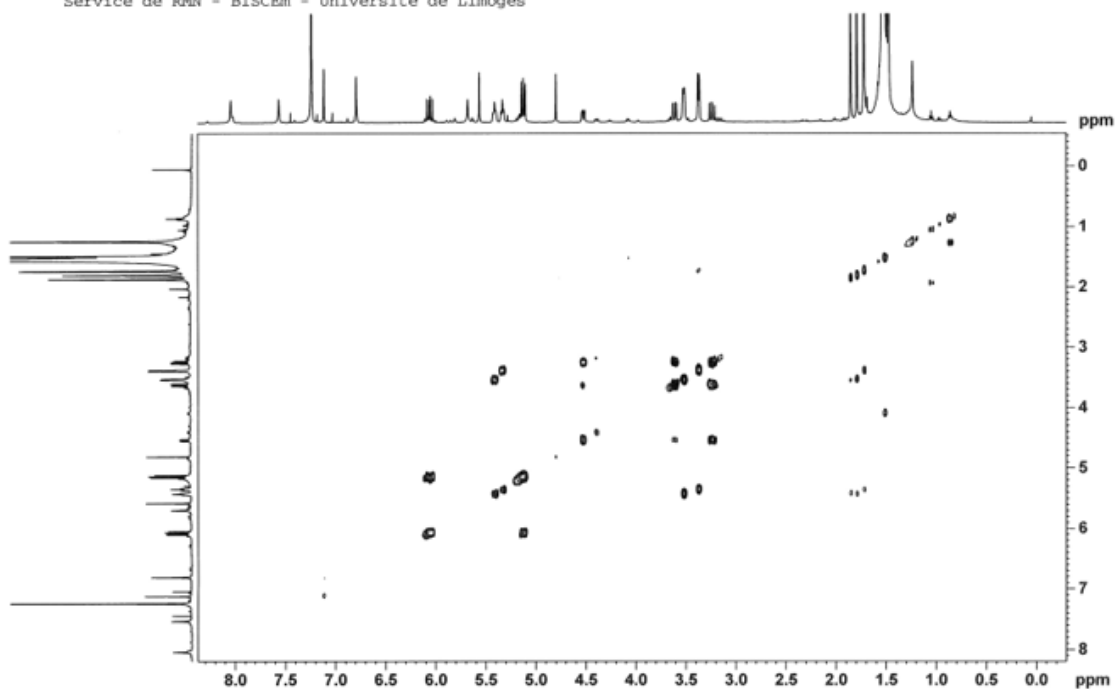


HM77-F4 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>13</sup>C - T(exp)=2j15h59min  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

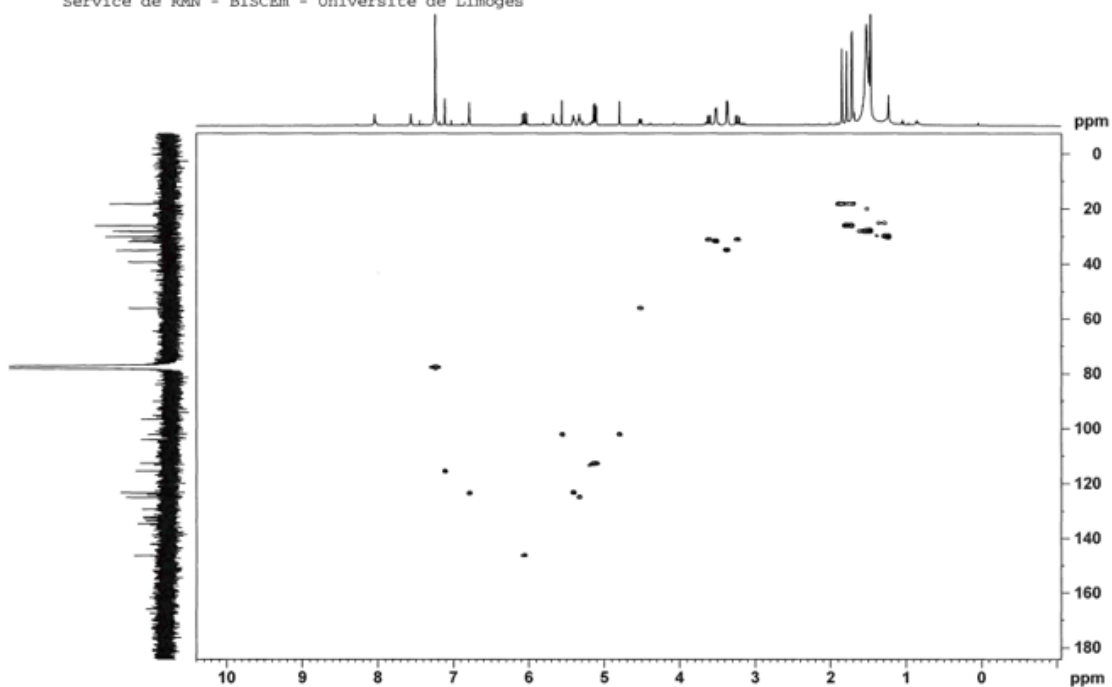


## Annexe 6. COSY, HSQC et HMBC du produit P3

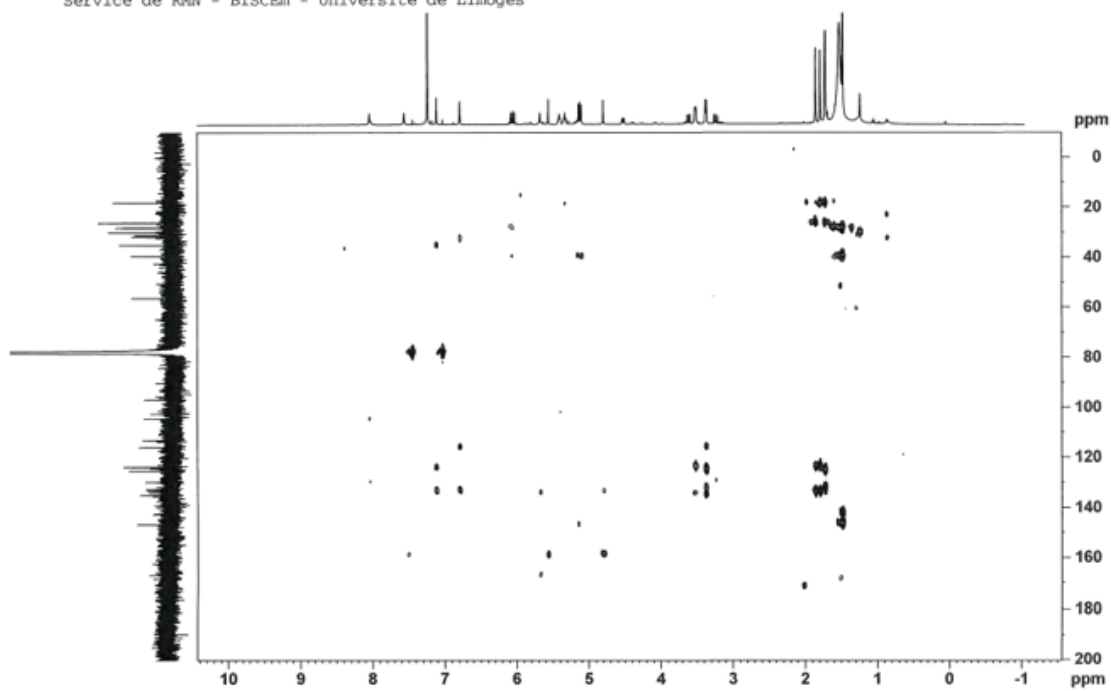
HM77-F4 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-1H COSY  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



HM77-F4 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

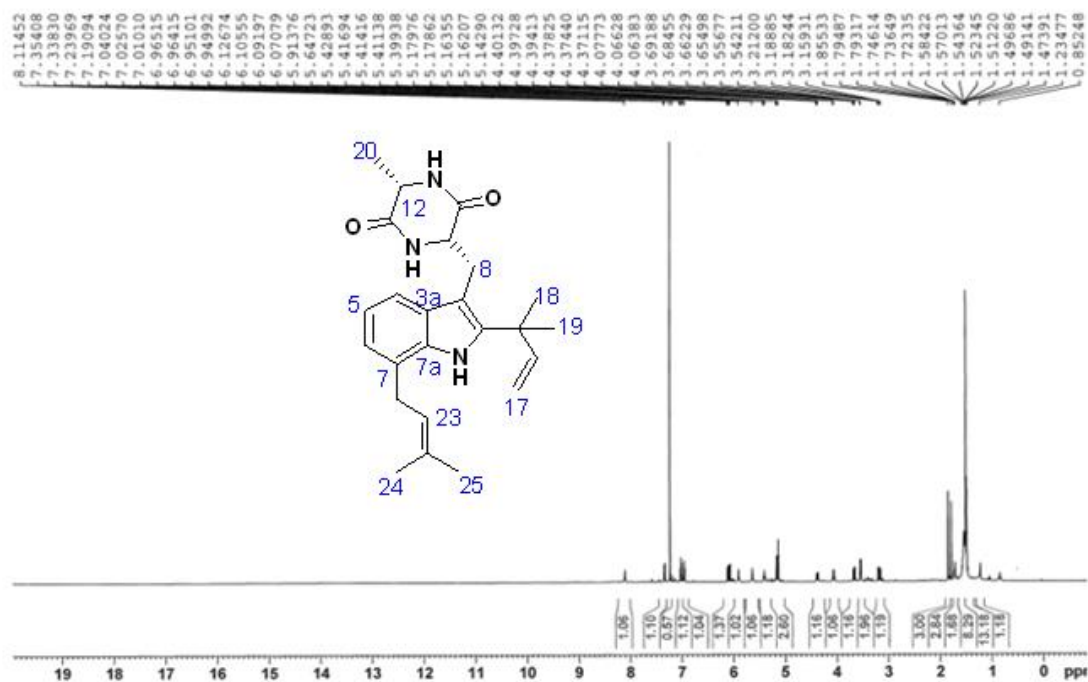


HM77-F4 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

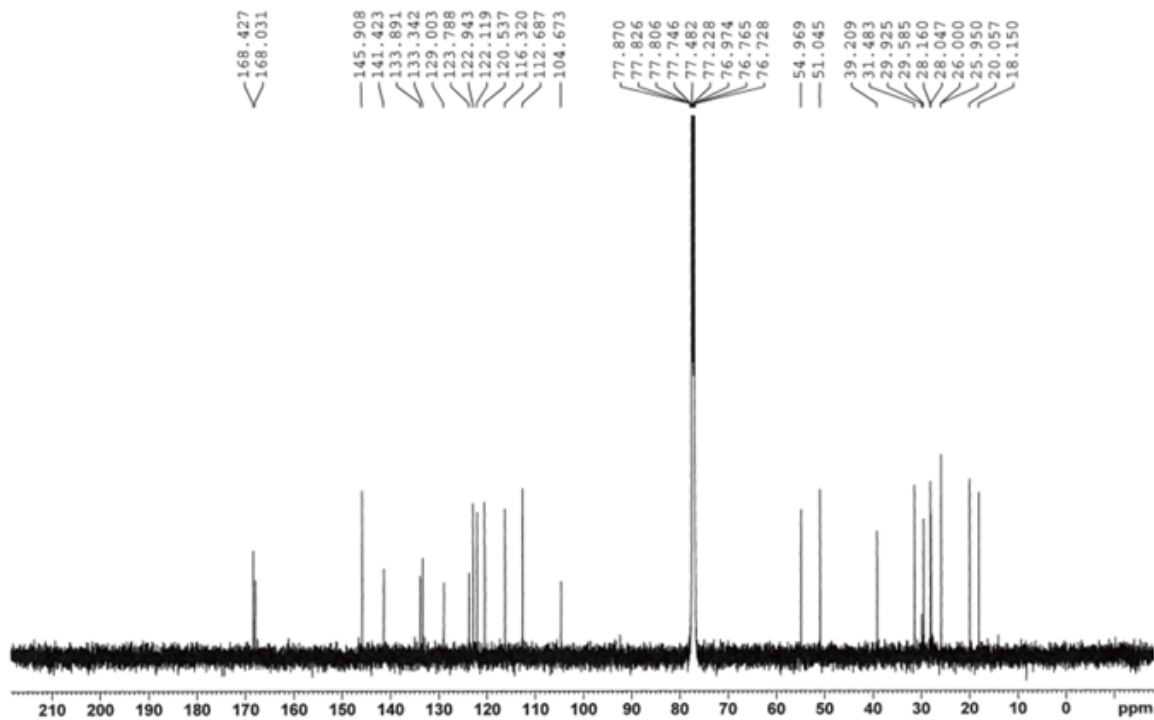


## Annexe 7. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P4

HM76-F10 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

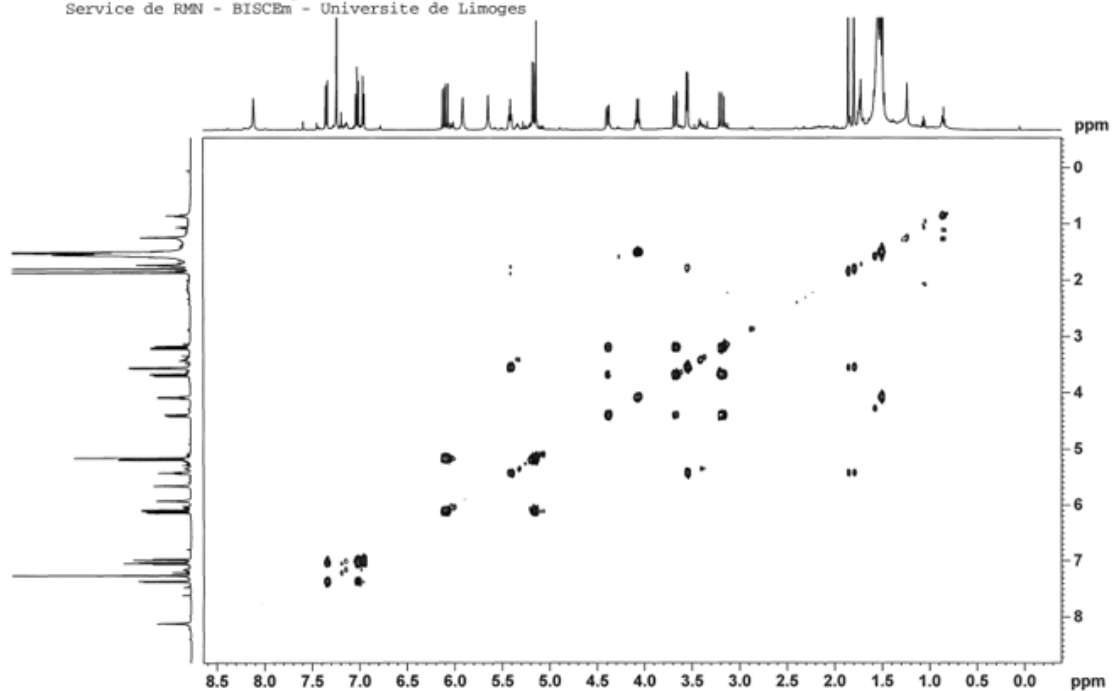


HM76-F10 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 13C  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

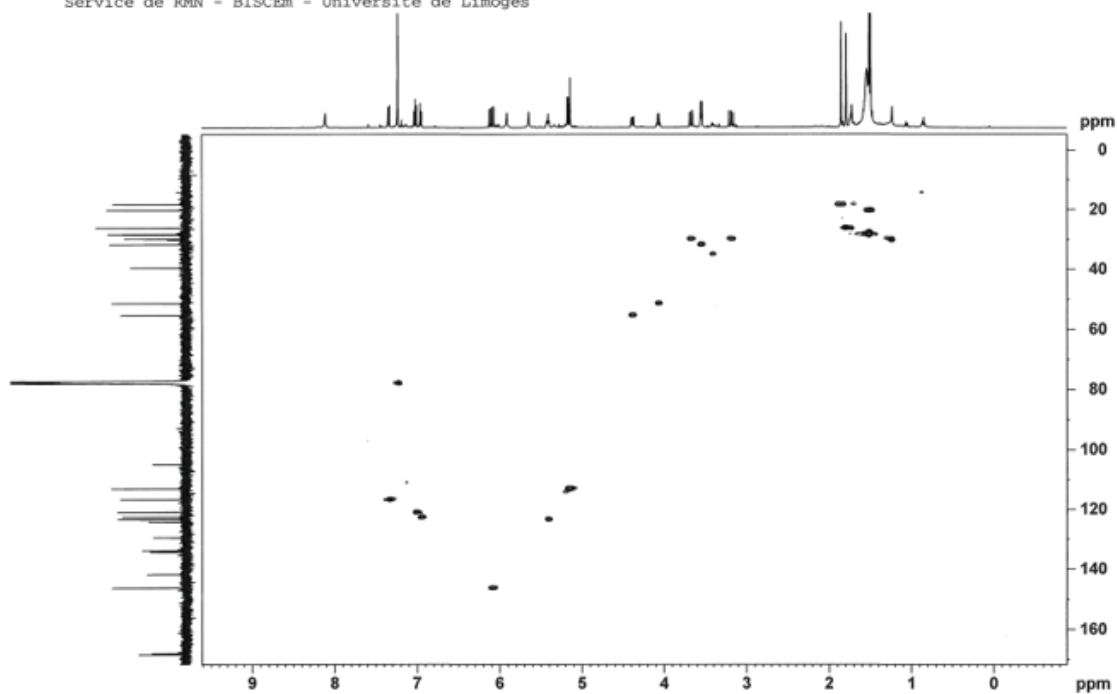


## Annexe 8. COSY, HSQC et HMBC du produit P4

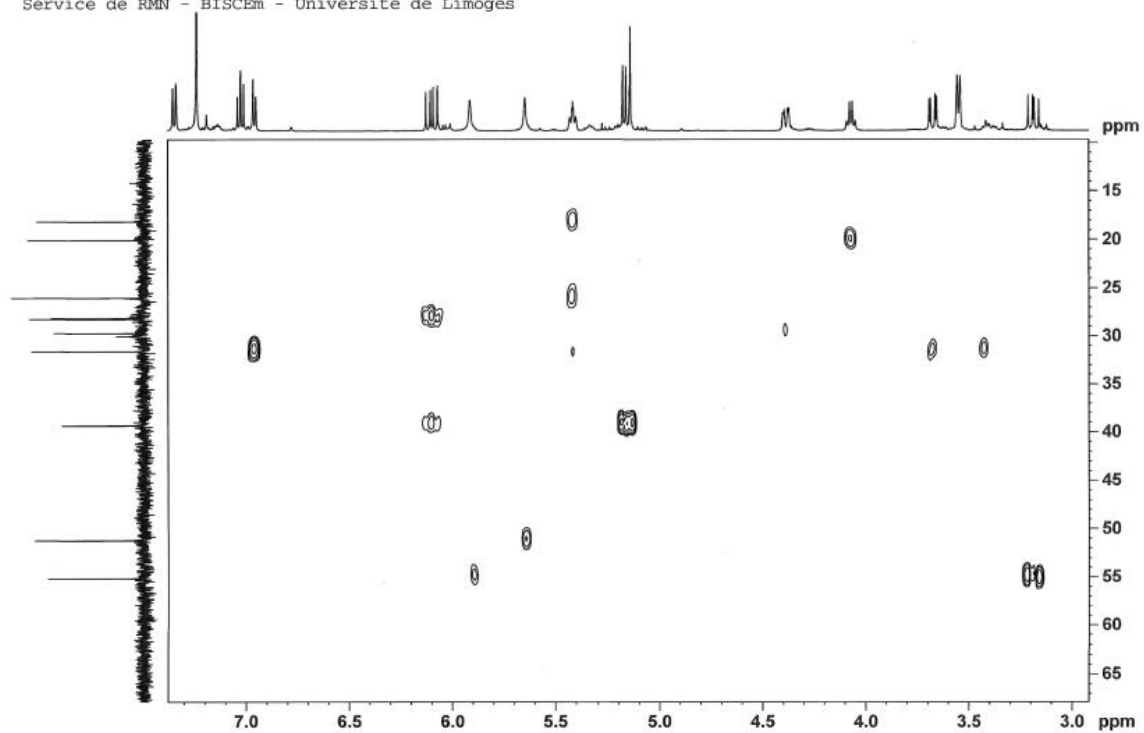
HM76-F10 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-1H COSY  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



HM76-F10 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

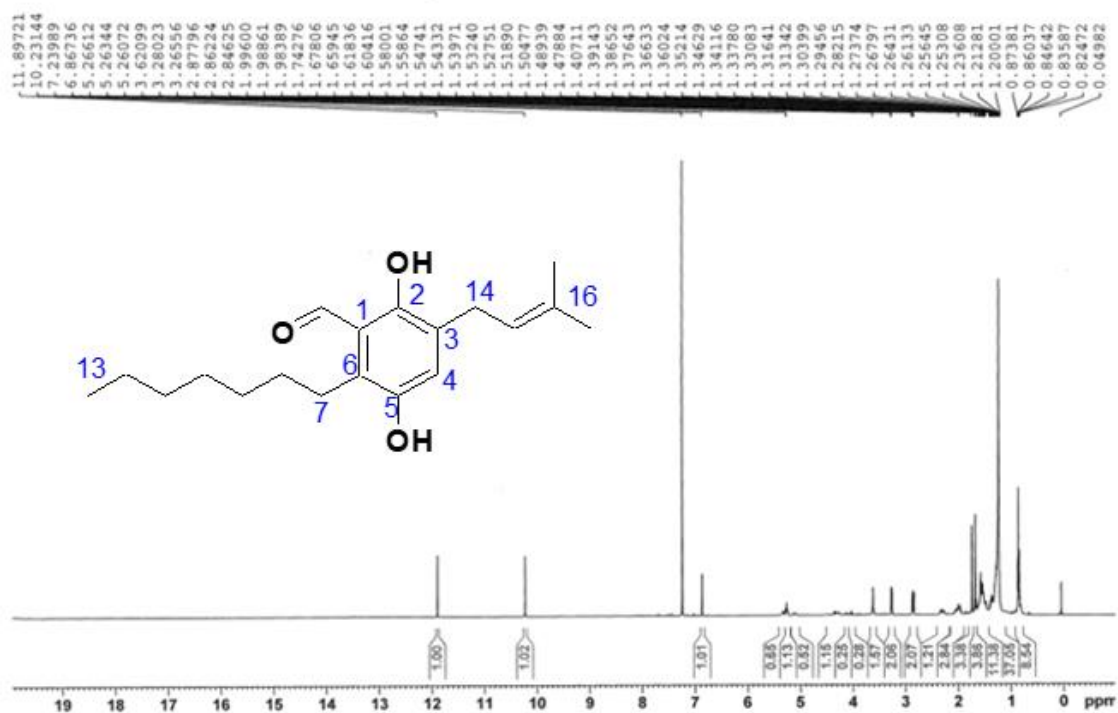


HM76-F10 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

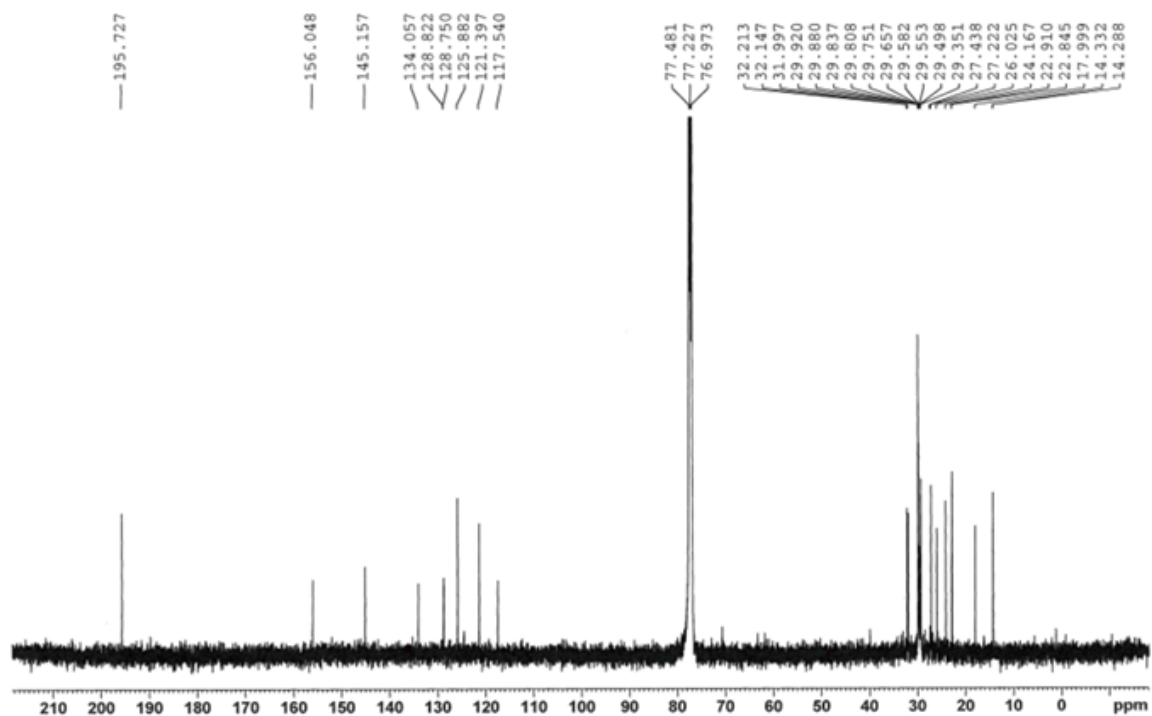


## Annexe 9. RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du produit P5

HM75-P6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>1</sup>H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

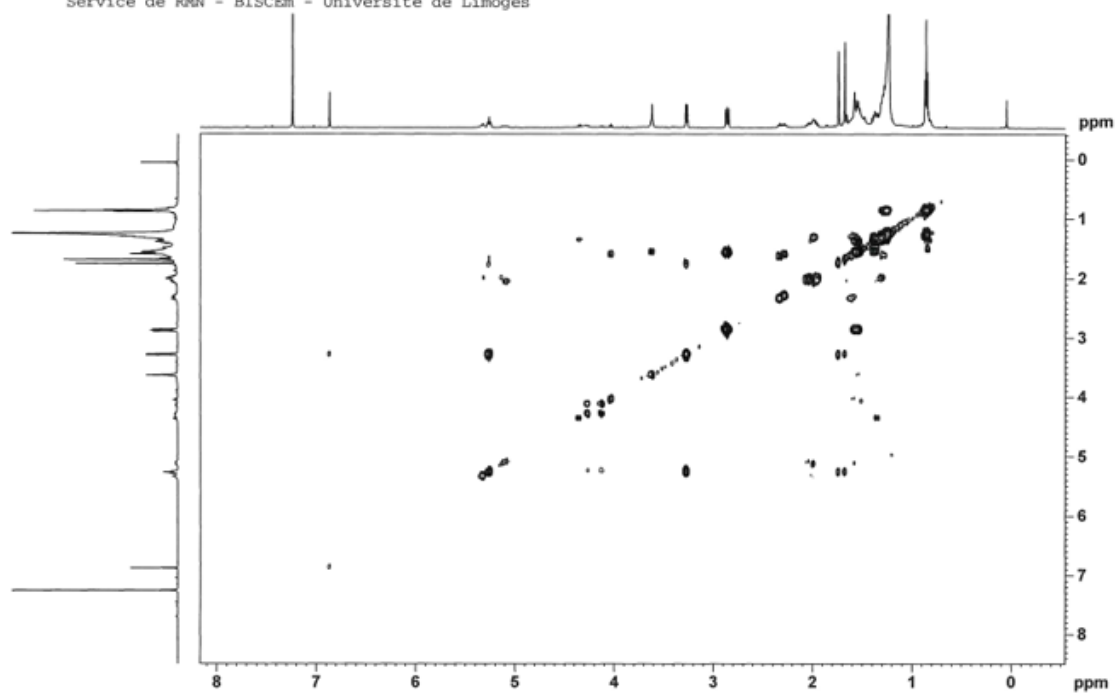


HM75-P6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>13</sup>C - T(exp)=15h15min  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

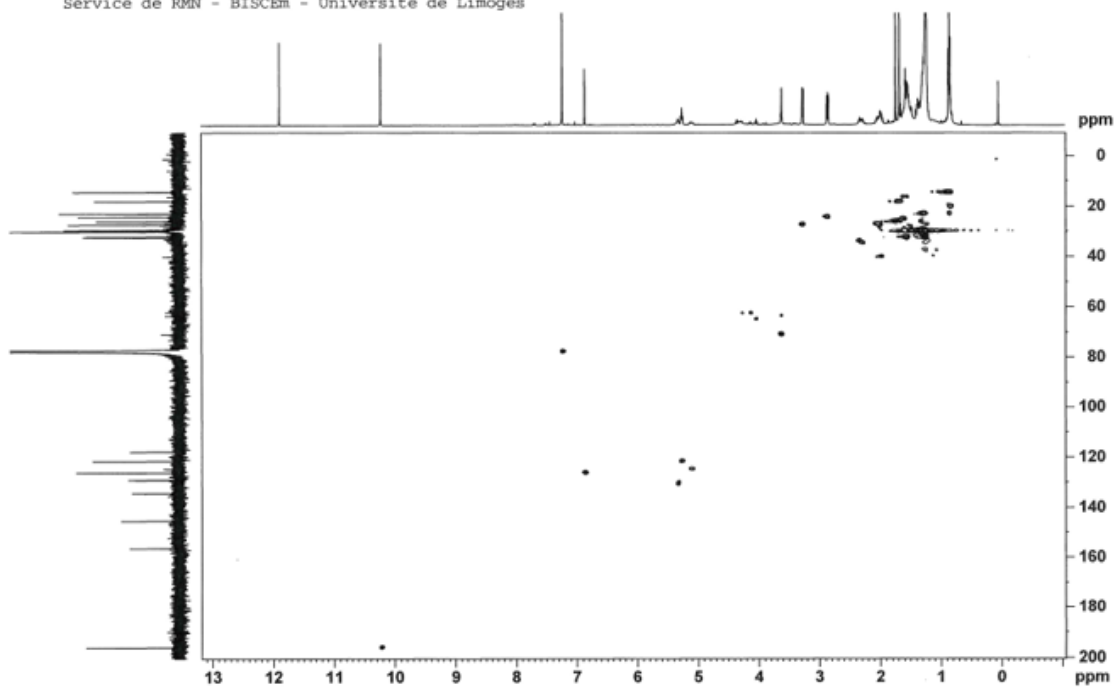


## Annexe 10. COSY, SQC et HMBC du produit P5

HM75-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-1H COSY  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

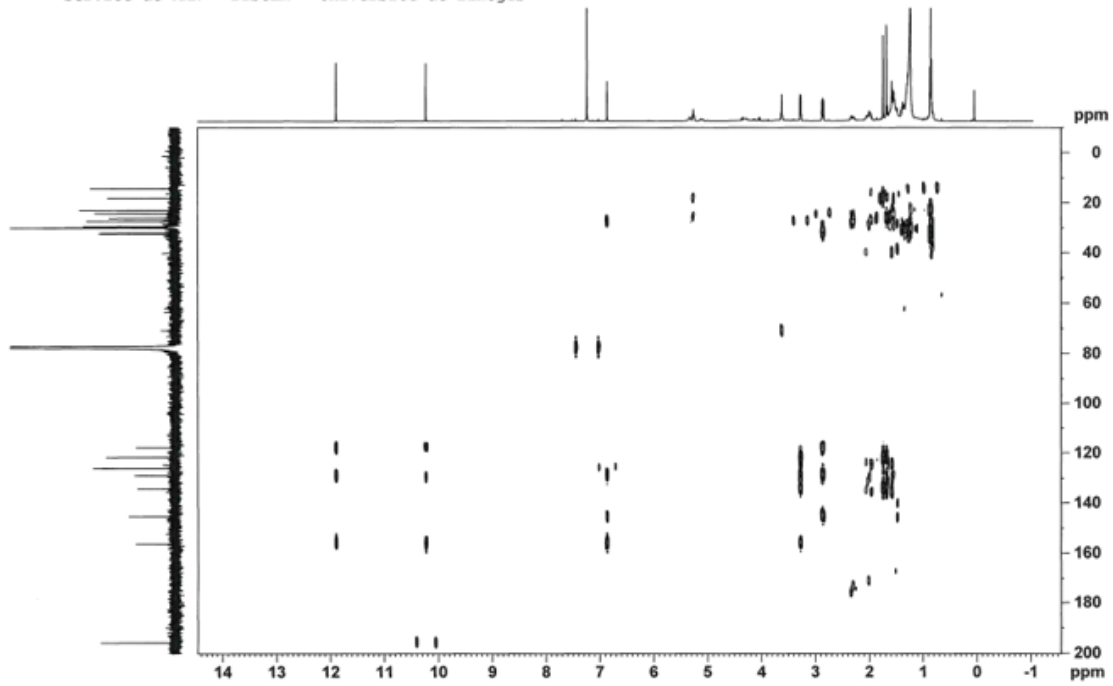


HM75-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



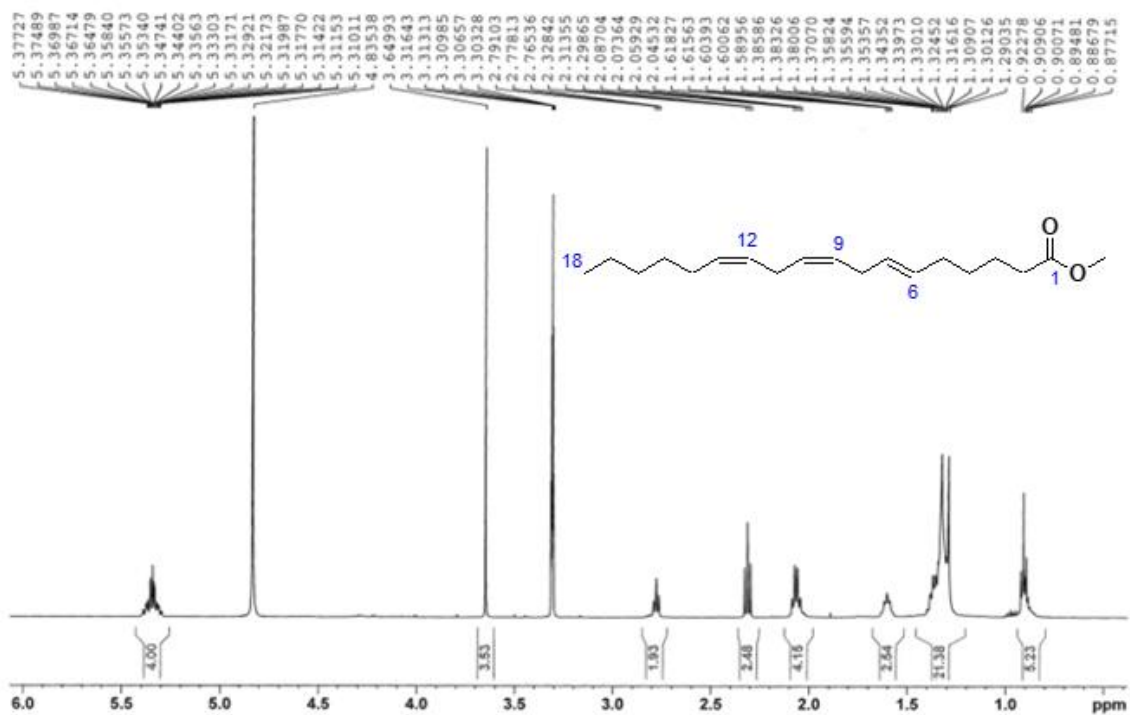


HM75-F6 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

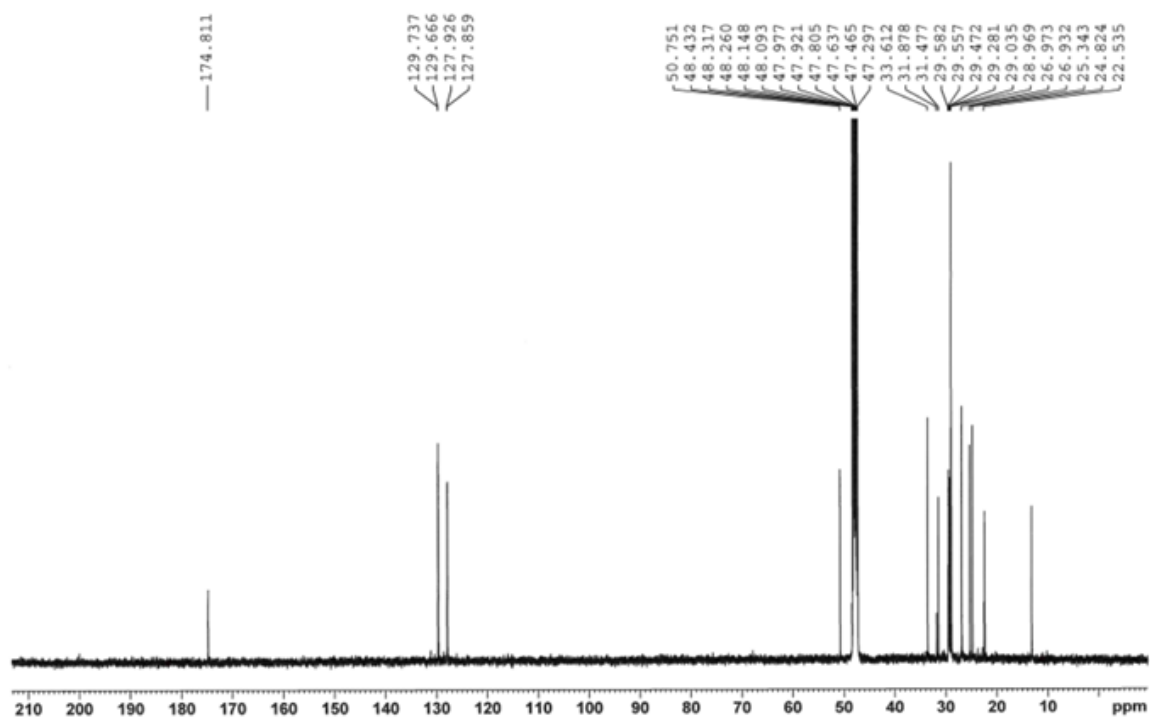


## Annexe 11. RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C1

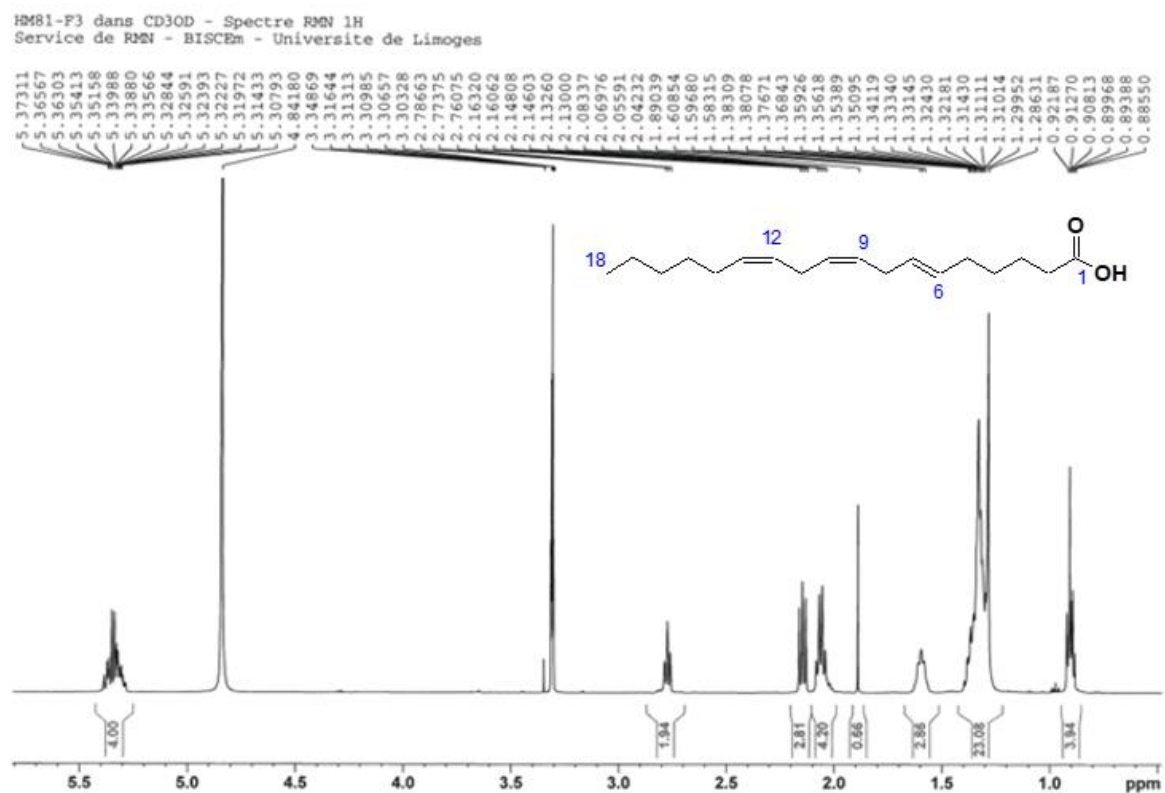
HM80-F1 dans CD<sub>3</sub>OD - Spectre RMN <sup>1</sup>H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



HM80-F1 dans CD<sub>3</sub>OD - Spectre RMN <sup>13</sup>C - T(exp)=21h00min  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

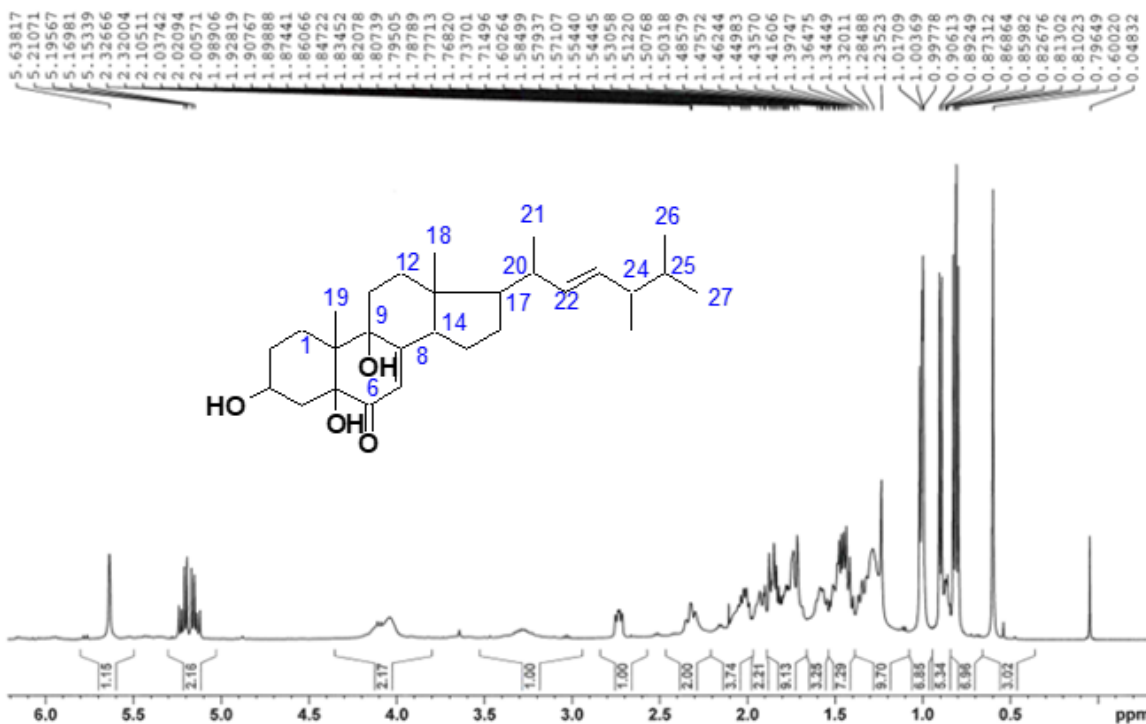


## Annexe 12. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C2

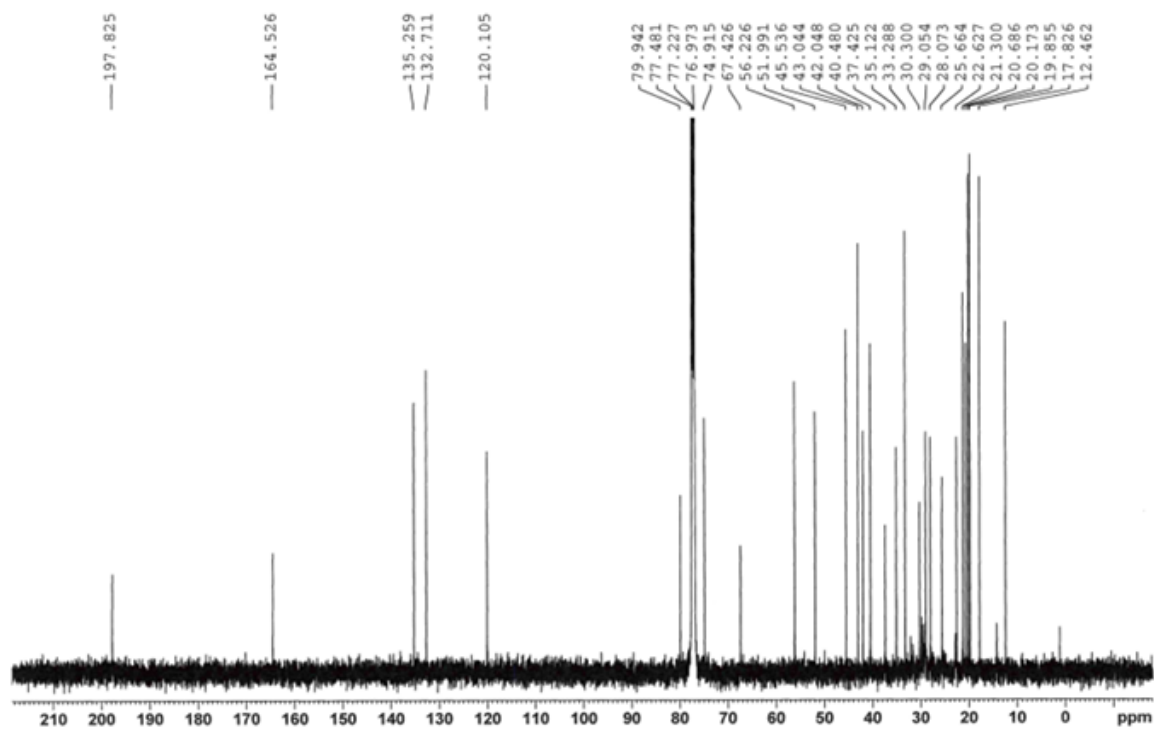


### Annexe 13. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé C3

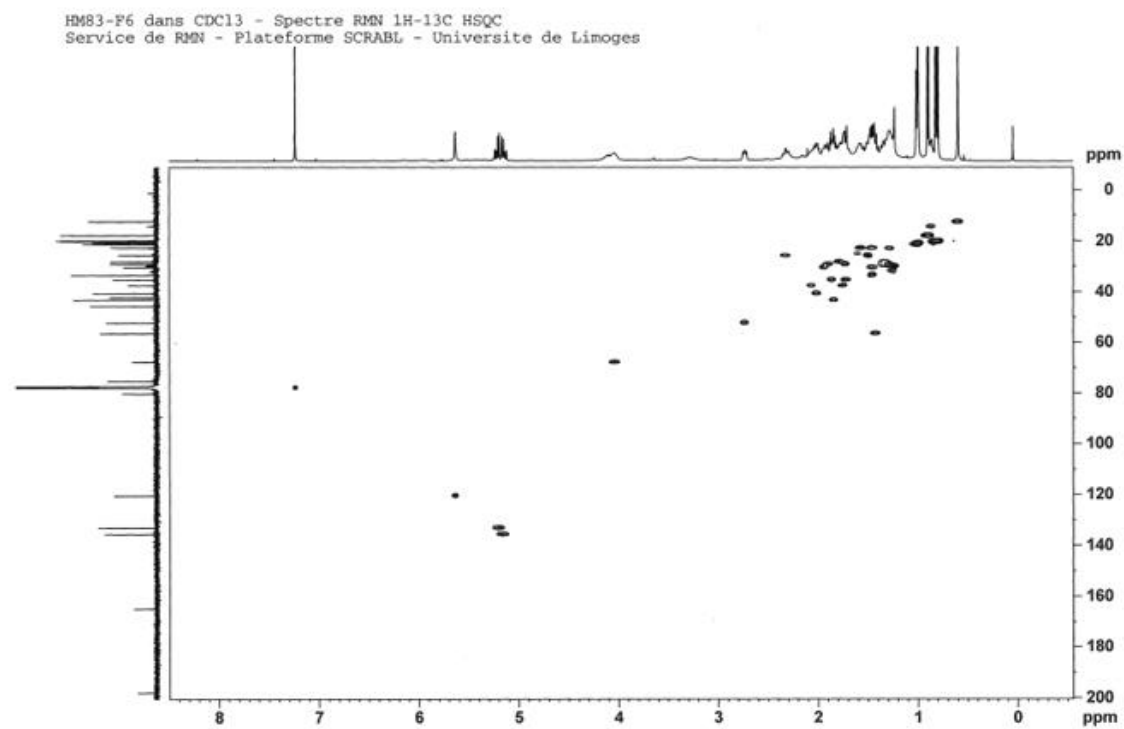
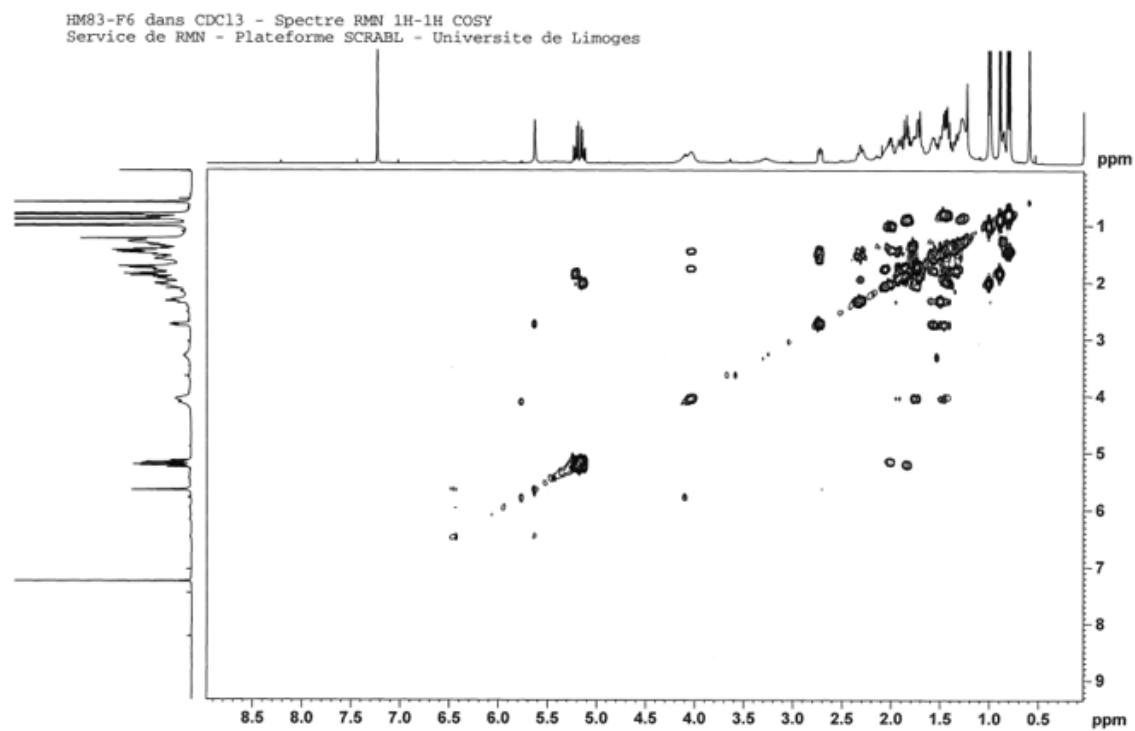
HM83-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>1</sup>H  
 Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges



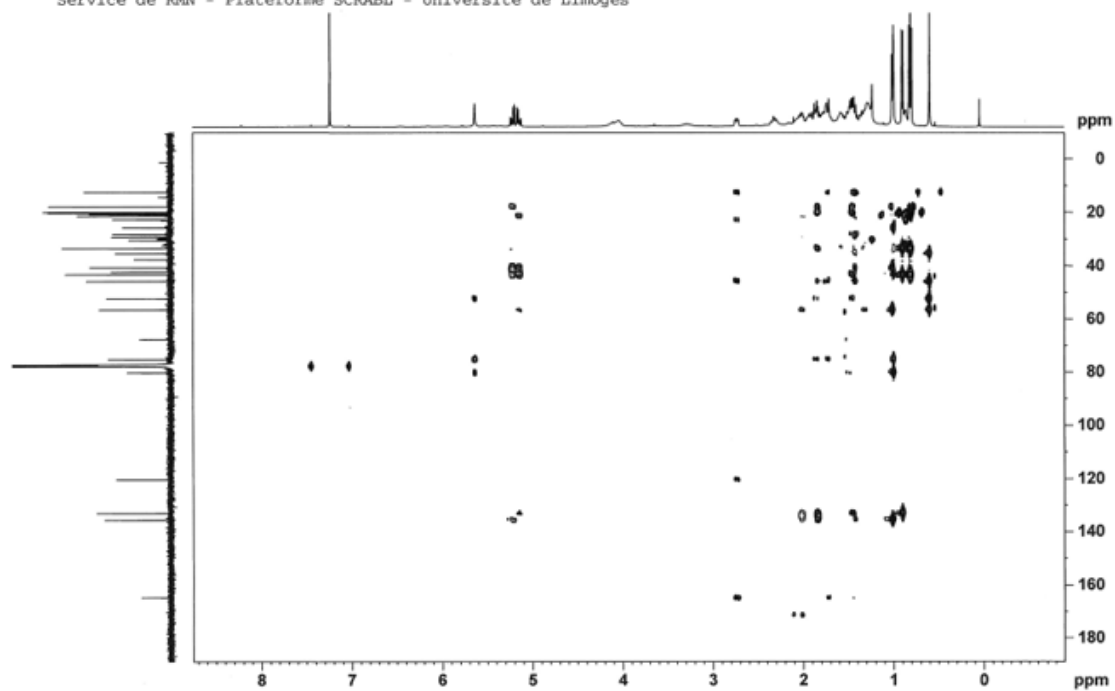
HM83-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN <sup>13</sup>C - T(exp)=21h29min  
 Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges



## Annexe 14. COSY, HSQC et HMBC du composé C3

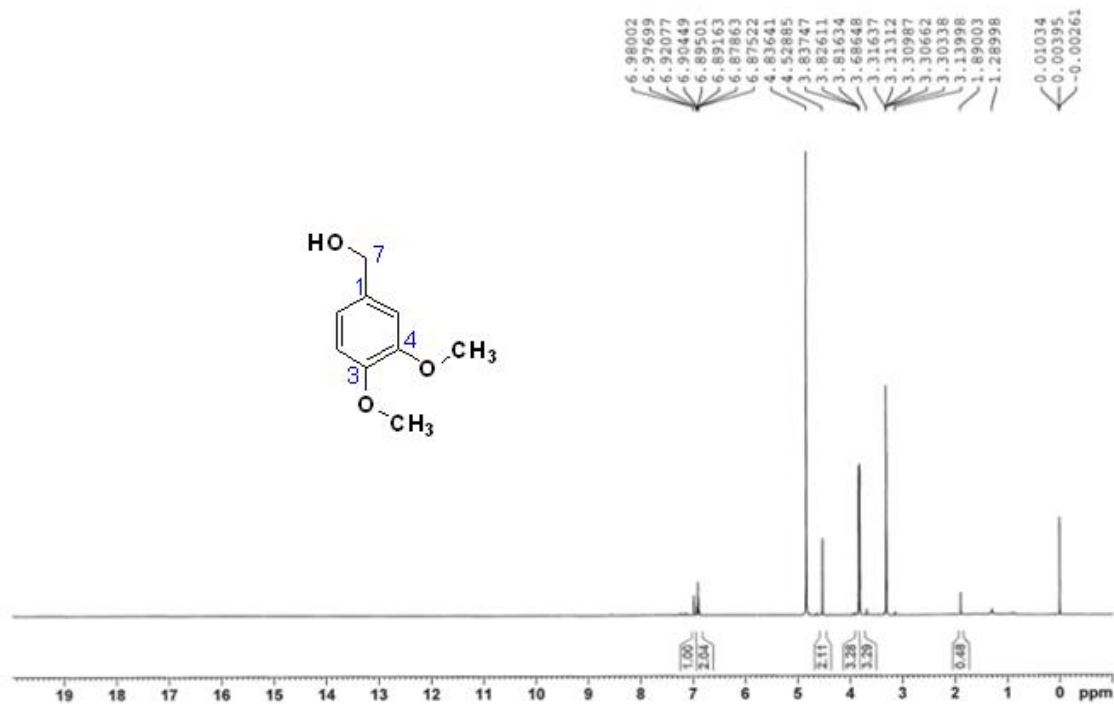


HM83-F6 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - Plateforme SCRABL - Université de Limoges

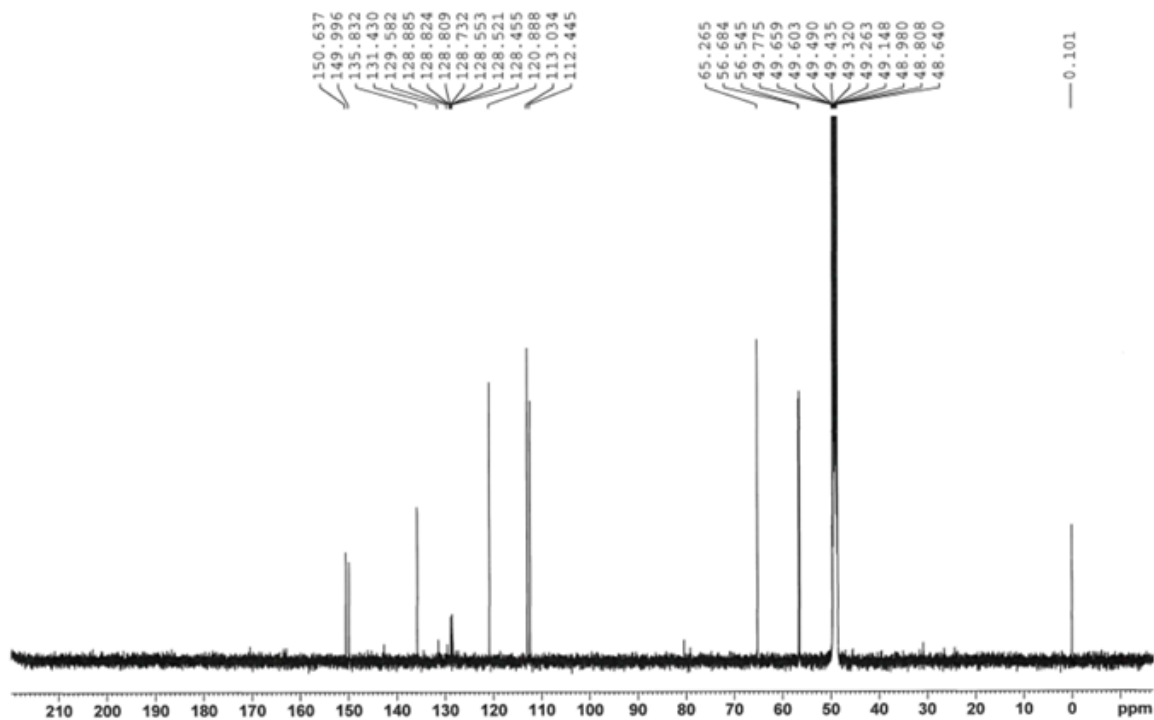


## Annexe 15. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C4

HM54-B6 dans CD3OD - Spectre RMN 1H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

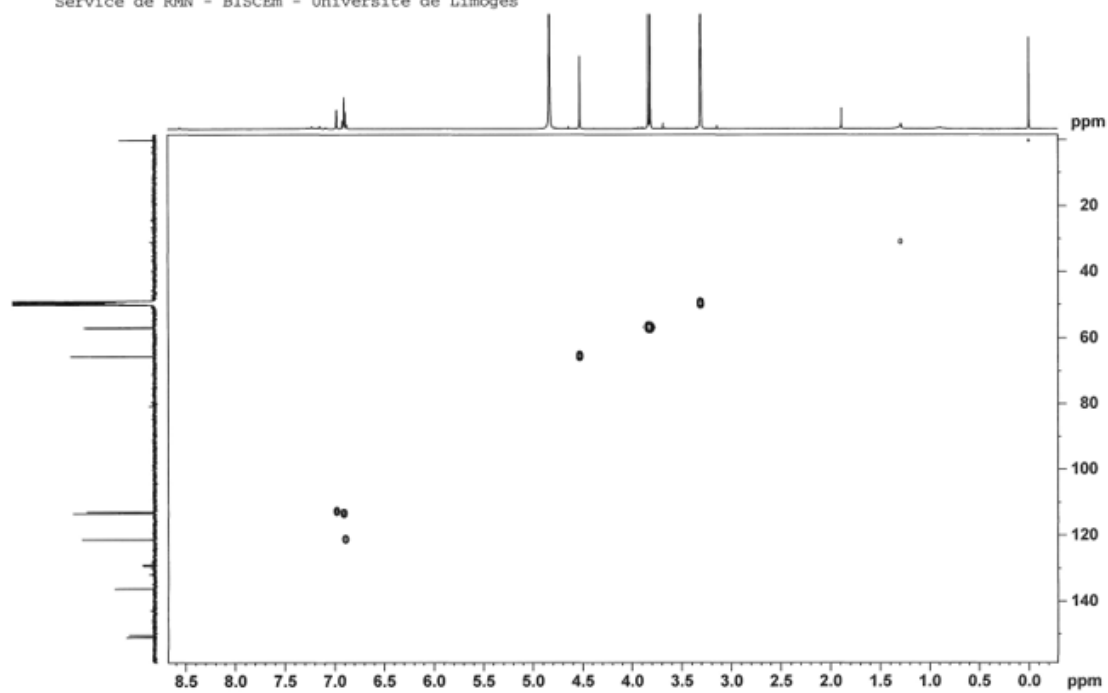


HM54-B6 dans CD3OD - Spectre RMN 13C - T(exp)=16h51min  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

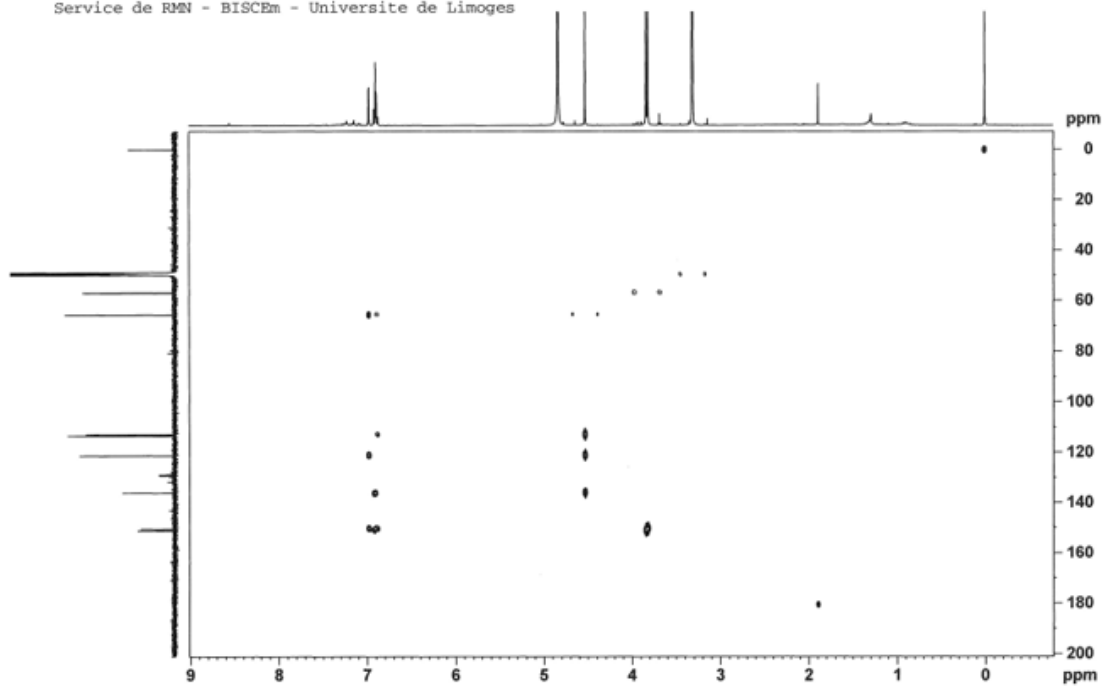


## Annexe 16. HSQC et HMBC du composé C4

HM54-B6 dans CD3OD - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



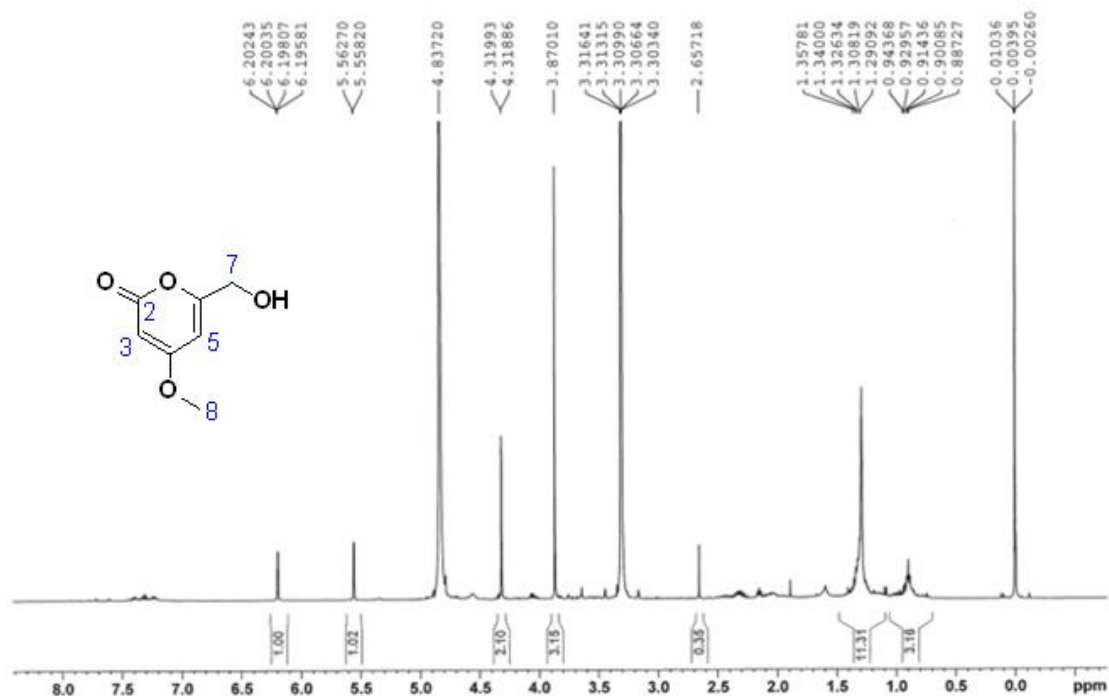
HM54-B6 dans CD3OD - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



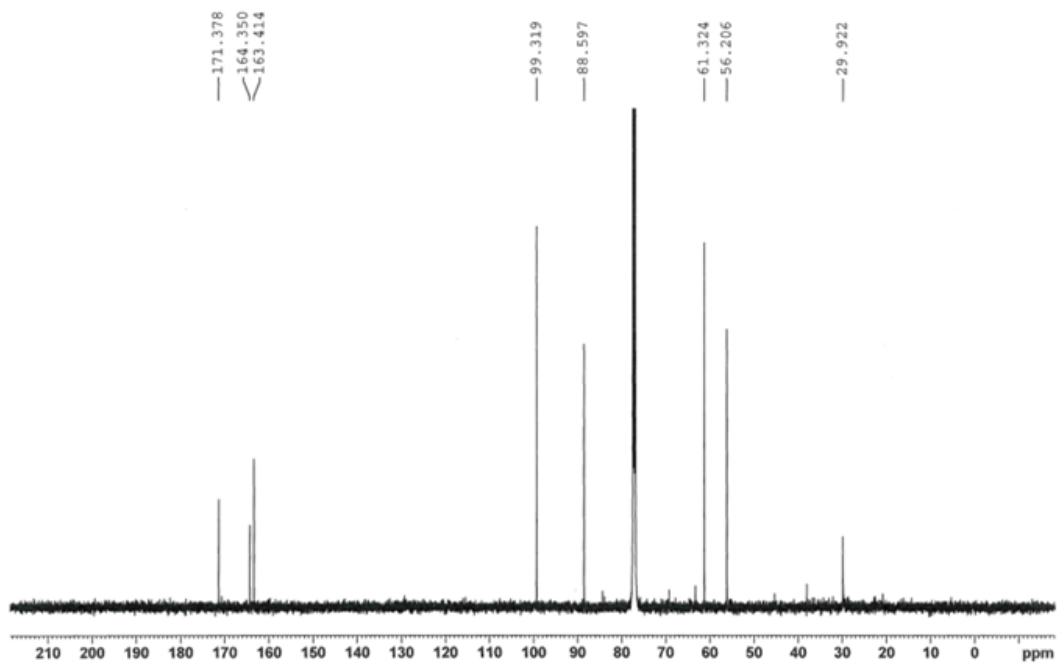


## Annexe 17. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé C5

HM56-B1 dans CD3OD - Spectre RMN 1H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

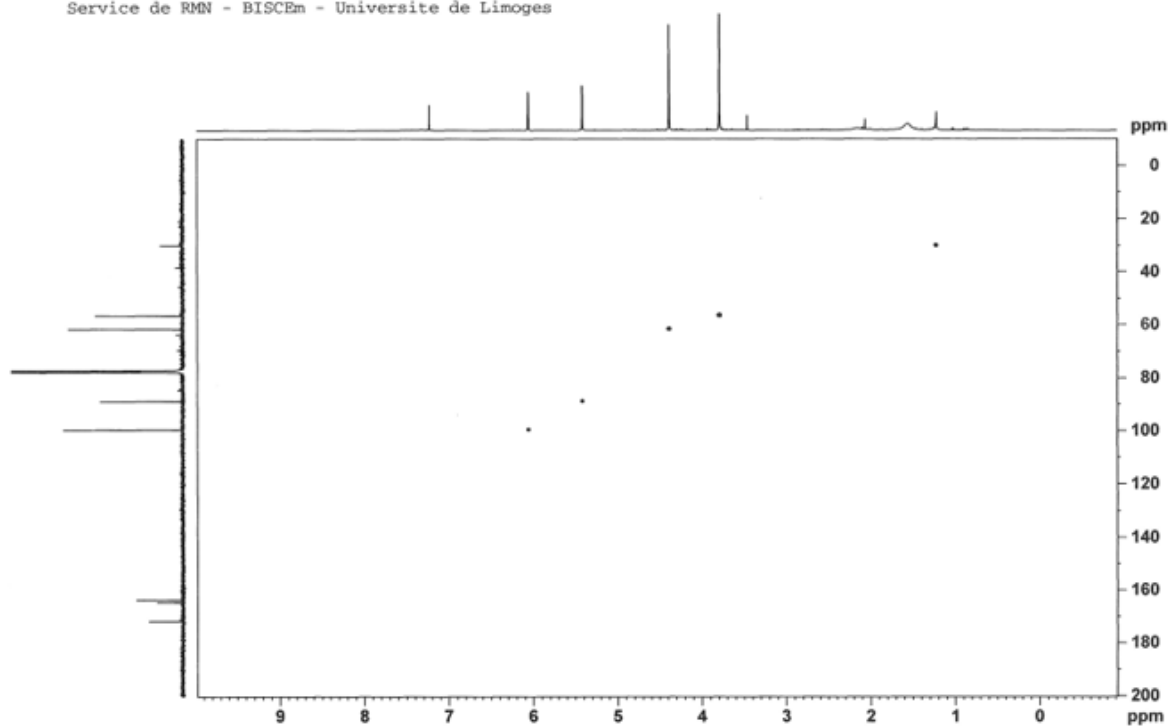


HM50-B2 dans CDCl3 - Spectre RMN 13C  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

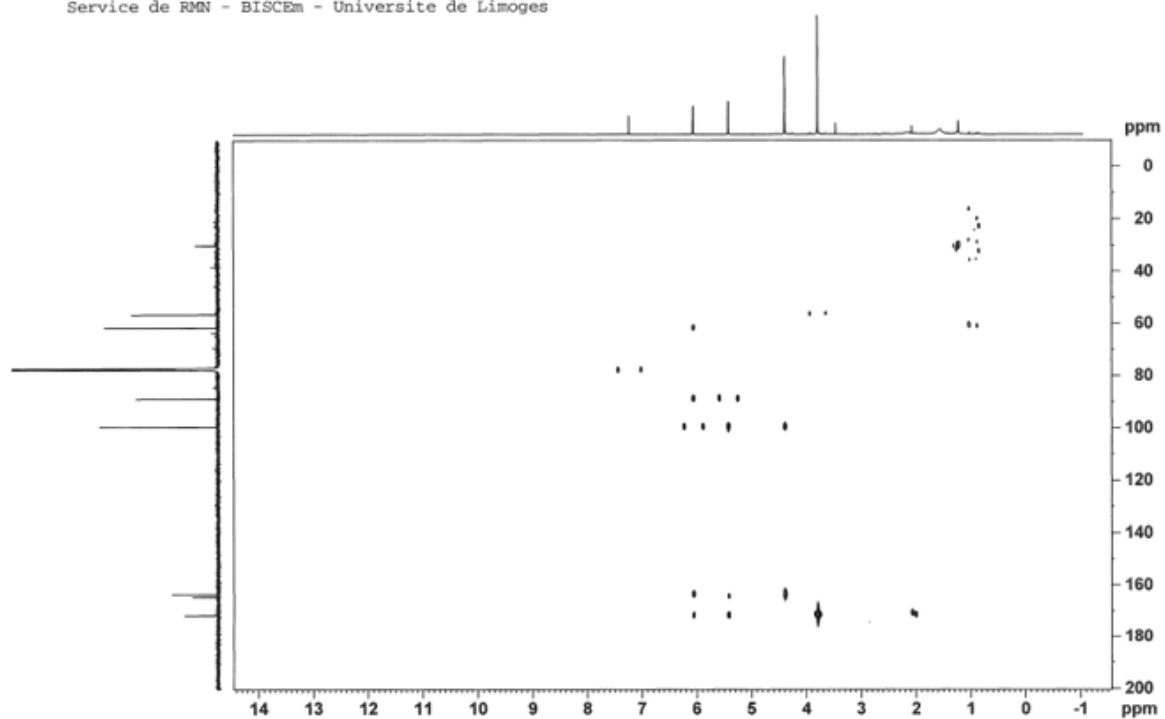


## Annexe 18. HSQC et HMBC du composé C5

HM50-B2 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges

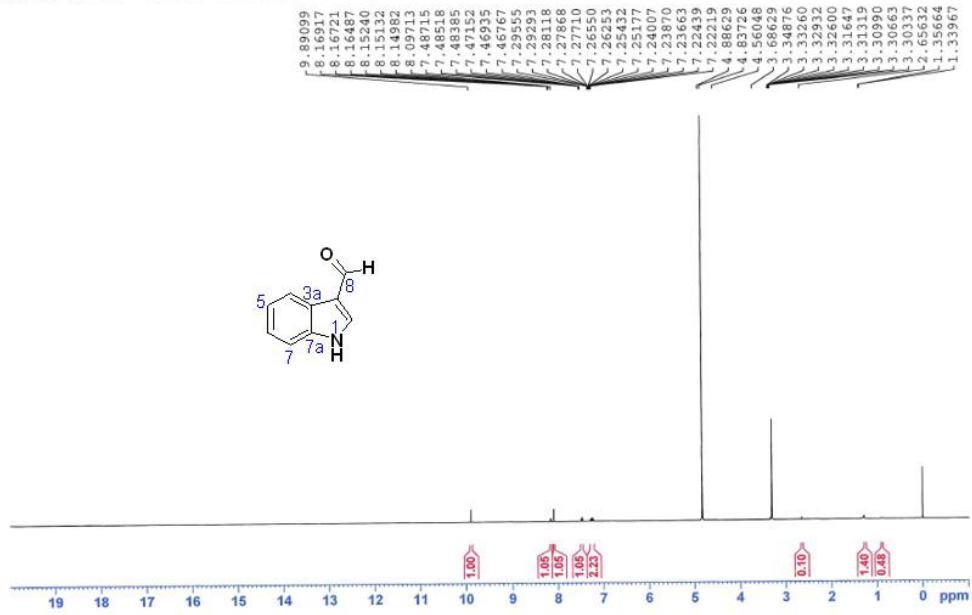


HM50-B2 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEm - Université de Limoges

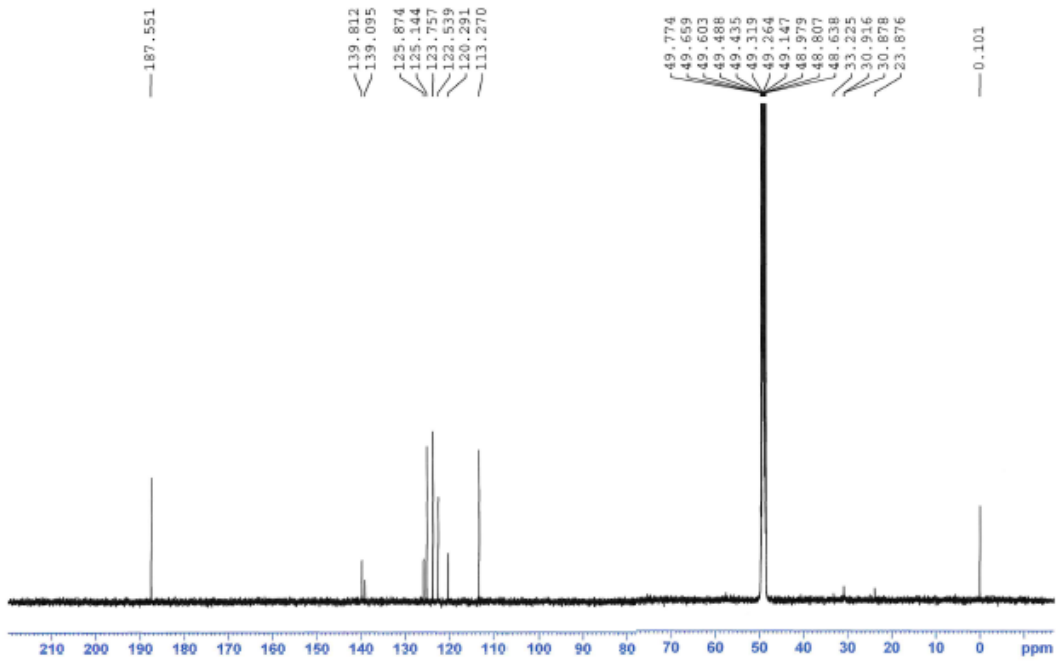


## Annexe 19. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé C6

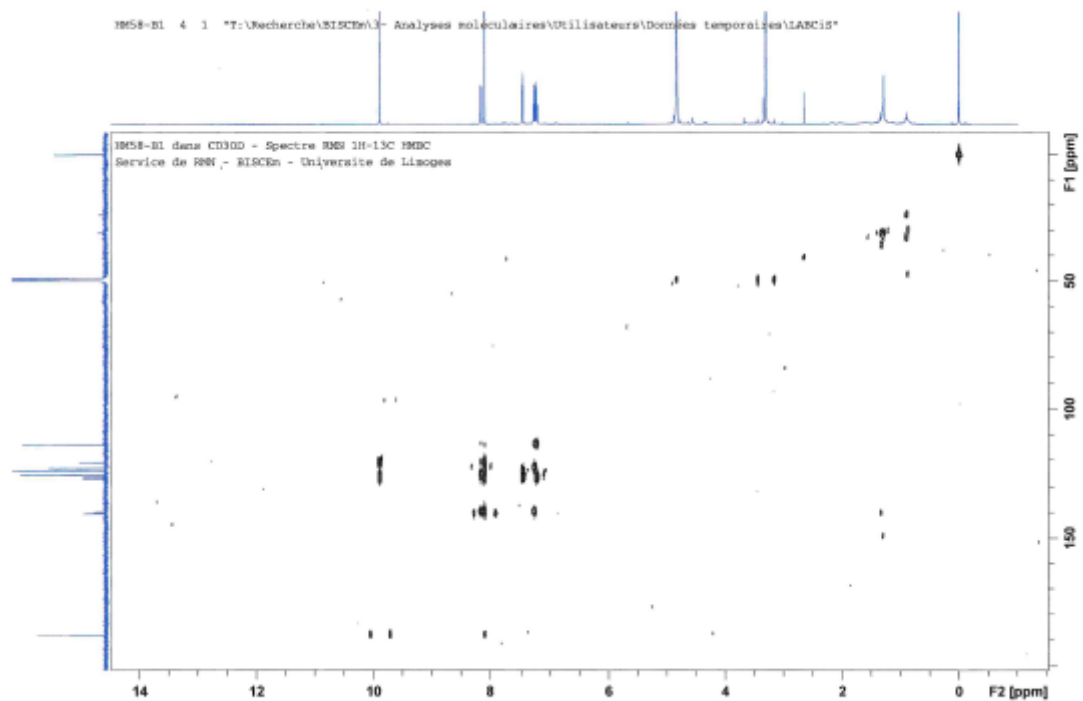
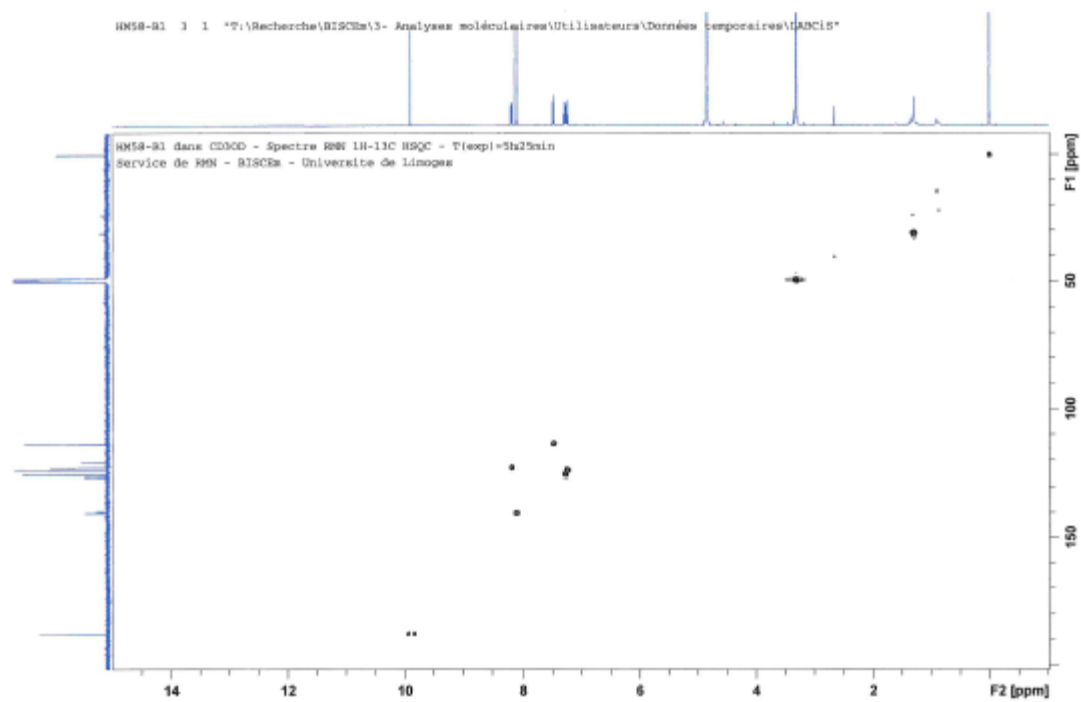
HM58-B1 dans CD<sub>3</sub>OD - Spectre RMN <sup>1</sup>H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



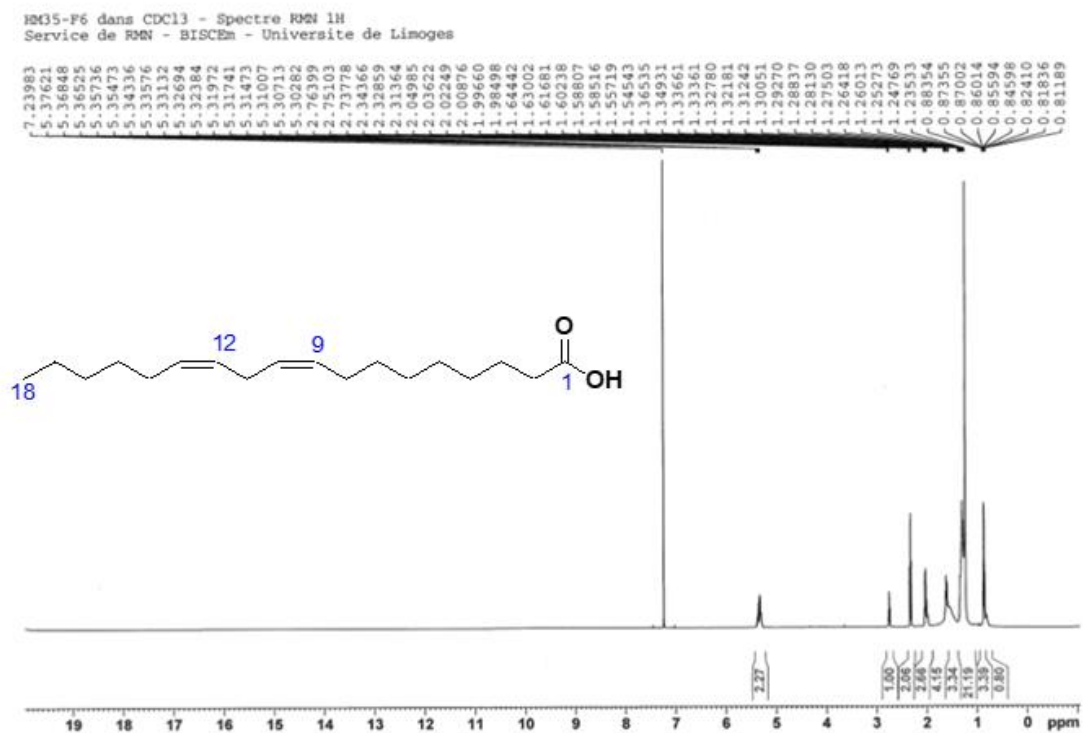
HM58-B1 dans CD<sub>3</sub>OD - Spectre RMN <sup>13</sup>C - T(exp)=1j113h48min  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



## Annexe 20. HSQC et HMBC du composé C6

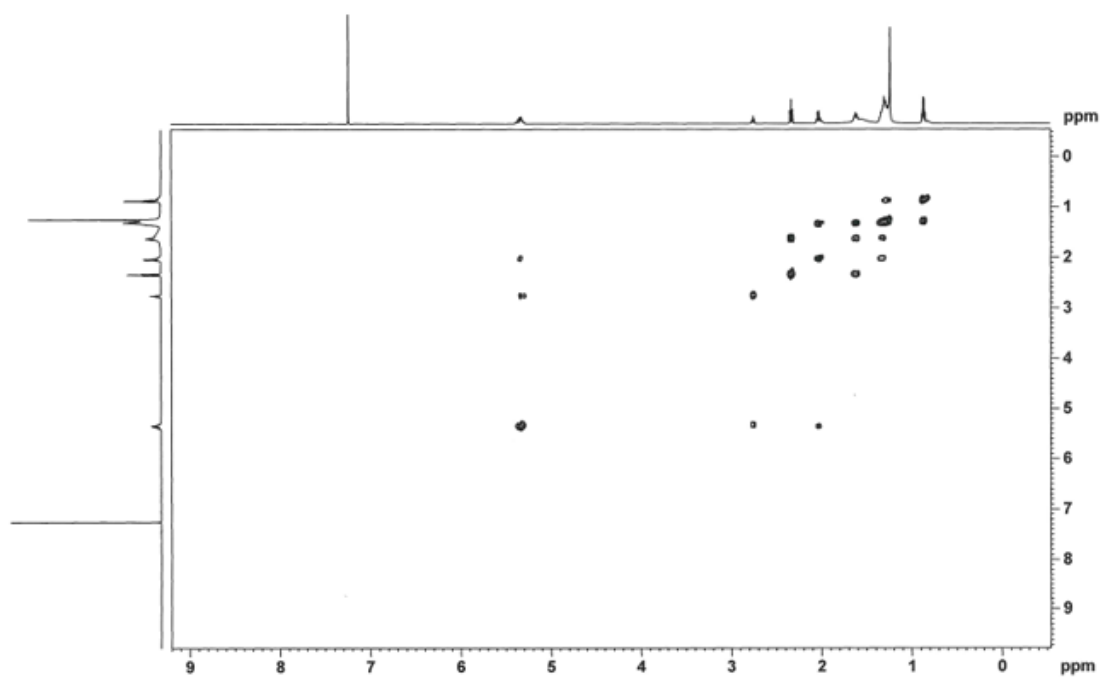


## Annexe 21. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé C7

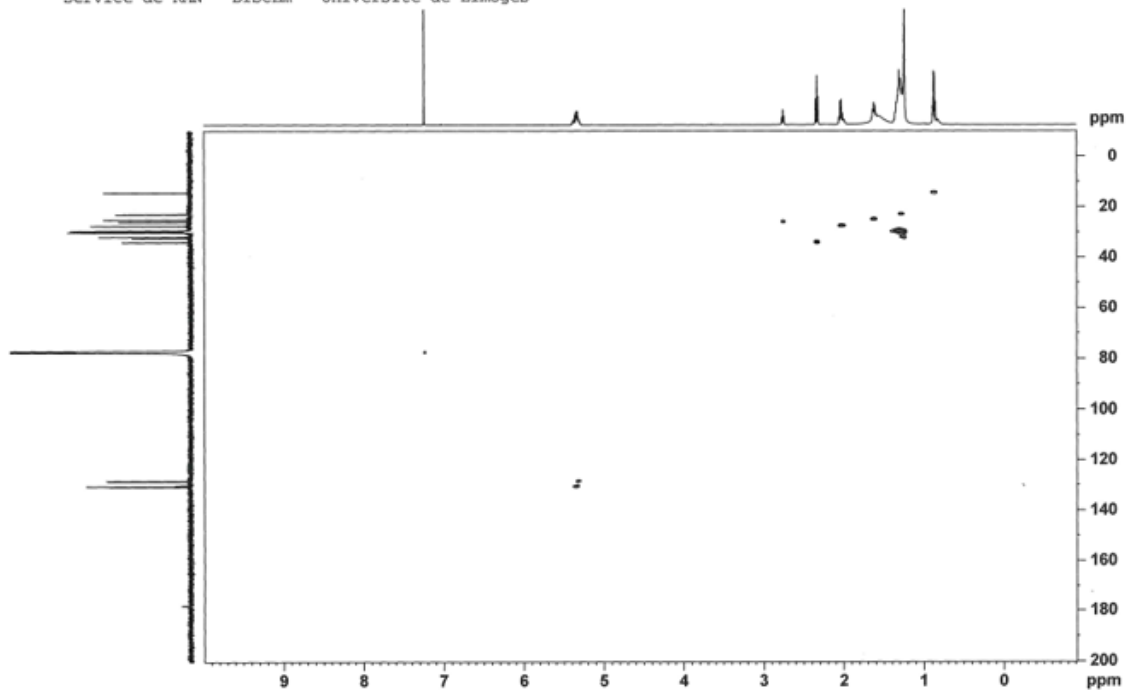


## Annexe 22. COSY, HSQC et HMBC du composé C7

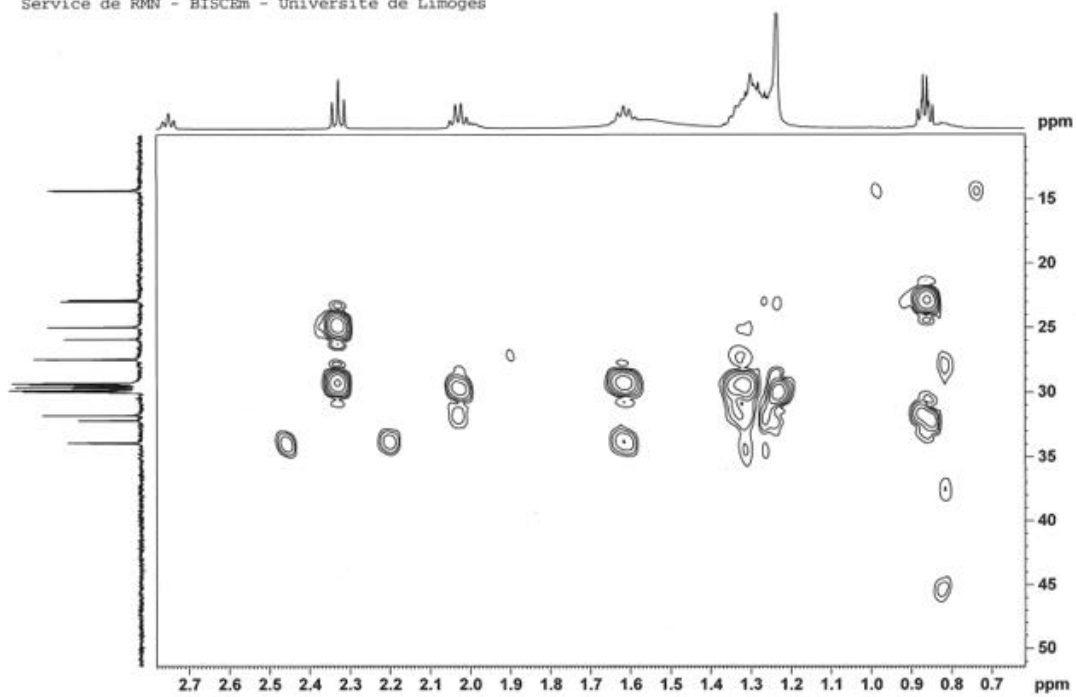
HM35-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-1H COSY  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



HM35-F6 dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H-13C HSQC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

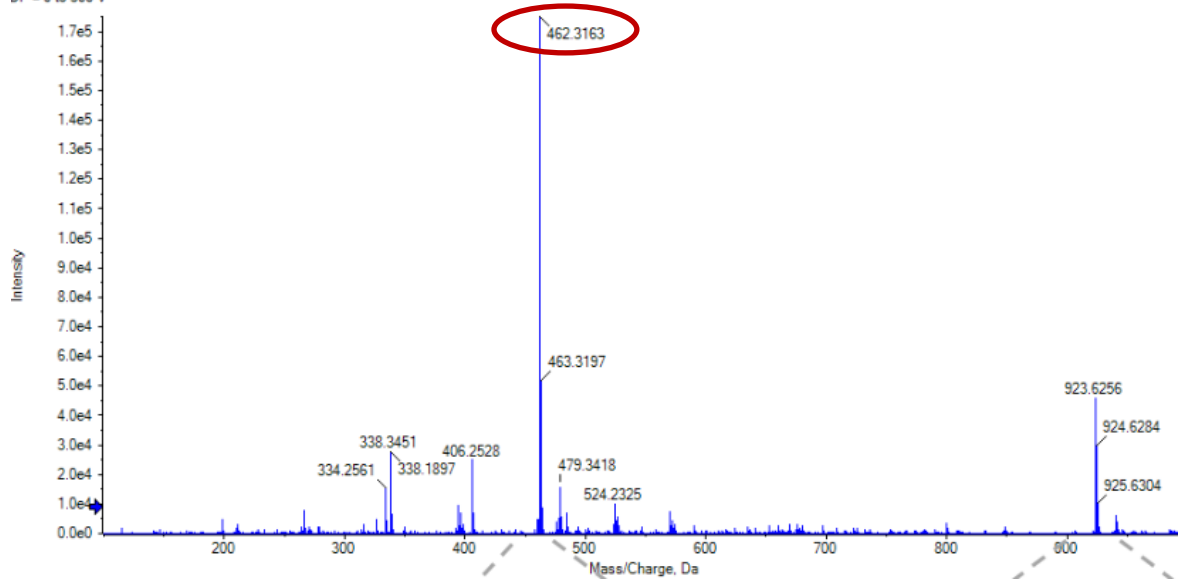


HM35-F6 dans CDCl3 - Spectre RMN 1H-13C HMBC  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



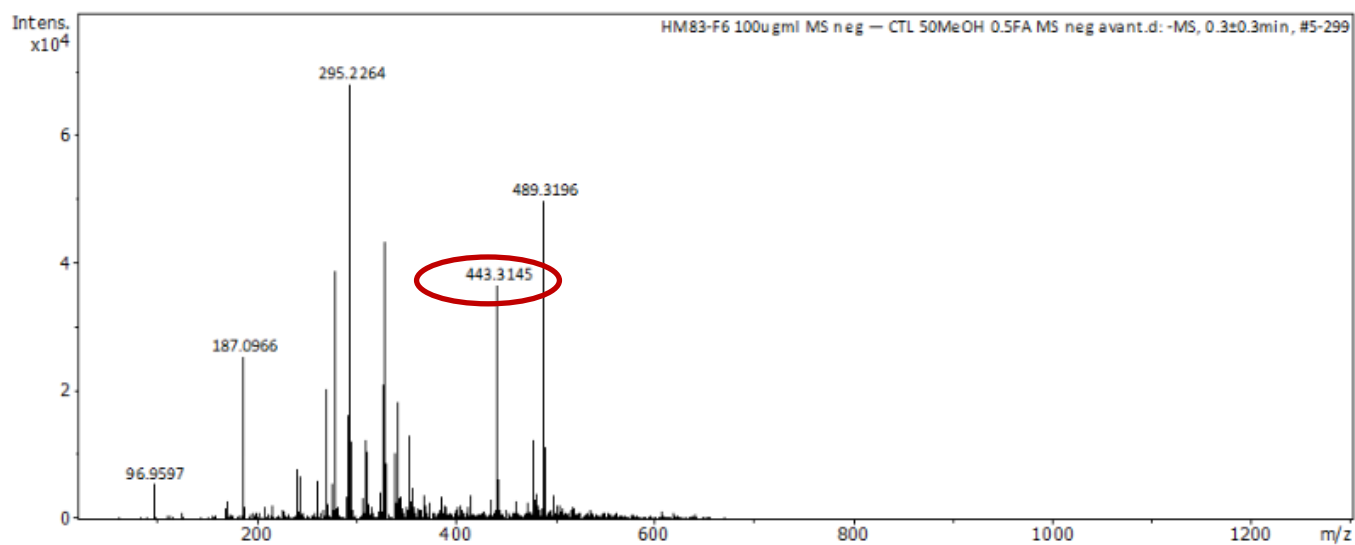
## Annexe 23. Spectre de masse en mode positif de l'échinuline.

Spectrum from HM55-B3.wiff (sample 2) - TOF MS posDP ramp, +TOF MS (100 - 1000) from 0.017 to 1.046 min  
DP = 0 to 300 V





**Annexe 24. Spectre de masse en mode négatif de 3,5,9-trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one.**



## Article

# In Vitro Antiproliferative Activity of Echinulin Derivatives from Endolichenic Fungus *Aspergillus* sp. against Colorectal Cancer

Hind Makhloufi <sup>1</sup>, Aline Pinon <sup>1</sup>, Yves Champavier <sup>2</sup>, Jennifer Saliba <sup>3</sup>, Marion Millot <sup>1</sup>, Ingrid Fruitier-Arnaudin <sup>3</sup>, Bertrand Liagre <sup>1</sup>, Guillaume Chemin <sup>1</sup> and Lengo Mambu <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> LABCIS, UR 22722, Faculté de Pharmacie, Univ. Limoges, F-87000 Limoges, France; hind.makhloufi@unilim.fr (H.M.); aline.pinon@unilim.fr (A.P.); marion.millot@unilim.fr (M.M.); bertrand.liagre@unilim.fr (B.L.); guillaume.chemin@unilim.fr (G.C.)

<sup>2</sup> Univ. Limoges, CNRS, Inserm, CHU Limoges, BISCem, UAR 2015, US 42, F-87025 Limoges, France; yves.champavier@unilim.fr

<sup>3</sup> Laboratoire LIENS, Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, F-17000 La Rochelle, France; jennifer.saliba@univ-lr.fr (J.S.); ingrid.fruitier@univ-lr.fr (I.F.-A.)

\* Correspondence: lengo.mambu@unilim.fr; Tel: +33-5-55-43-58-34

**Abstract:** The endolichenic fungus *Aspergillus* sp. was isolated from the lichen *Xanthoparmelia conspersa* harvested in France. *Aspergillus* sp. was grown on a solid culture medium to ensure the large-scale production of the fungus with a sufficient mass of secondary metabolites. The molecular network analysis of extracts and subfractions enabled the annotation of 22 molecules, guiding the purification process. The EtOAc extract displayed an antiproliferative activity of  $3.2 \pm 0.4$   $\mu\text{g/mL}$  at 48 h against human colorectal cancer cells (HT-29) and no toxicity at 30  $\mu\text{g/mL}$  against human triple-negative breast cancer (TNBC) cells (MDA-MB-231) and human embryonic kidney (HEK293) non-cancerous cells. Among the five prenylated compounds isolated, of which four are echinulin derivatives, compounds 1 and 2 showed the most important activity, with  $\text{IC}_{50}$  values of 1.73  $\mu\text{M}$  and 8.8  $\mu\text{M}$ , respectively, against HT-29 cells.

**Keywords:** endolichenic fungi; *Aspergillus* sp.; human colorectal cancer; chemoresistant cancers



Citation: Makhloufi, H.; Pinon, A.; Champavier, Y.; Saliba, J.; Millot, M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Liagre, B.; Chemin, G.; Mambu, L. In Vitro Antiproliferative Activity of Echinulin Derivatives from Endolichenic Fungus *Aspergillus* sp. against Colorectal Cancer. *Molecules* **2024**, *29*, 4117. <https://doi.org/10.3390/molecules29174117>

Academic Editors: Irwin Rose, Alencar Menezes, Henrique Douglas Melo Coutinho, Almir Gonçalves Wanderley and Jaime Ribeiro-Filho

Received: 23 July 2024

Revised: 20 August 2024

Accepted: 25 August 2024

Published: 30 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

According to World Health Organization (WHO) reports, cancer constitutes a major health problem [1]. In the human body, healthy cells adhere to a highly regulated pattern of proliferation. Cell division is subject to stringent regulation and continuous monitoring to prevent abnormal proliferation; this constant coordination is essential for the proper functioning of the body. However, cancer cells deviate from these regulations, bypassing the normal controls over cell proliferation due to the deregulation of their division programs. This unchecked proliferation is often associated with the ability of certain cancer cells to migrate from their site of origin, detach, and travel through the bloodstream and lymphatic system. This leads to the invasion of surrounding tissues or even distant parts of the body, forming secondary tumors, a process known as metastasis [2]. Tumors formed by these malignant cells tend to become increasingly aggressive over time and can be life-threatening by disrupting the functions of the newly affected tissues and organs.

In 2020, 1.9 million colorectal cancer (CRC) cases were diagnosed, leading to around 900,000 deaths [3]. CRC can develop in the four main parts of the colon: the ascending colon, the descending colon, the transverse colon, and the rectum. It often starts as benign polyps that may become cancerous over time. Further, breast cancer was the most common cancer in 157 out of 185 countries, with 2.3 million cases and a 6.9% mortality rate [3]. Triple-negative breast cancer (TNBC), a particularly aggressive and chemoresistant subtype, lacks three key receptors, i.e., estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), progesterone receptors (PRs), and HER2, making endocrine therapy ineffective [4]. This subtype has a high recurrence

and low survival rate. Treatment options include surgery, radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy, which are effective in early stages but less so later, often causing severe side effects, recurrence, and resistance in the case of CRC [5].

The progress in biology, immunotherapy and the substantial improvements in modern drug design and manufacturing have made the discovery of a cure for cancer a feasible goal [6]. Despite the significant advances of current therapies, multiple side effects and adverse reactions in normal cells have been reported with chemotherapy, including nausea, vomiting, mucositis, alopecia, neuropathy, and myelosuppression [7]. Furthermore, they have been found to be associated with multidrug resistance (MDR), an undesirable phenomenon responsible for more than 90% of the deaths of cancer patients undergoing chemotherapy [7].

These observations motivate the search for other effective cures with fewer side effects constituting better alternatives that balance efficacy and toxicity and comply with drug resistance prevention measures.

Natural products represent an available source of new drugs, drug leads, and chemical entities [8]. Approximately 80% of the approved chemotherapeutic drugs [9] and more than half of all drugs are based on bioactive natural products [10]. Eighty-seven percent of human diseases, including cancer, are treated by using natural products [11]. Natural bioactive molecules exhibit cytotoxic effects by attacking macromolecules expressed by cancer cells, such as those in oncogenic signal transduction pathways [12]. They exhibit several advantages: they are mainly non-toxic or present little toxicity, are highly compatible, are associated with multitargeted actions, and can constitute the base for lead compounds [8]. Finally, some have demonstrated abilities to enhance common anticancer therapies' efficacy by lowering the effective doses of cytotoxic drugs or overcoming their limitations, like in colorectal cancer immunotherapy [13].

Thus, it is important to search for other therapeutic agents with more innovative means, notably through natural bioactive substances [14]. The genus *Aspergillus* comprises several hundreds of species of mold that are remarkably diverse and adaptable to a wide range of the planet's environments. These species are important from an ecological and economic standpoint in many ways. Certain *Aspergillus* species are beneficial, especially for industrial uses, but others are very dangerous to human health due to the production of mycotoxins [15].

Like plants, lichens provide an enabling environment for various microscopic organisms [16]. Among them, endolichenic fungi (ELF), which are different from lichen mycobionts and lichenicolous fungi, live asymptotically in the lichen thallus. They resemble endophytes in plants [17].

Endolichenic fungi constitute a niche for secondary metabolites, and an original source for the discovery of new natural substances of therapeutic interest [18]. Over the last few decades, researchers have become increasingly interested in endolichenic fungi.

Chemical investigations on ELF highlighted their ability to biosynthesize interesting metabolites, of which 64% were isolated as new compounds [14]. High chemical diversity is described in ELF, as they produce alkaloids, peptides, polyketides, polyphenols, terpenoids, steroids, and others, like fatty acids and chain alcohols [14,18]. These molecules have been demonstrated to have therapeutic potential as antibacterial immunosuppressive, antiviral, antiparasitic, anticancer, antifungal, and anti-Alzheimer's agents [19–22].

As part of our ongoing search for potential anticancer compounds from endolichenic fungi, we have evaluated the antiproliferative activity of a pool of extracts obtained from different endolichenic species. Preliminary screening in our laboratory showed that the EtOAc extract of *Aspergillus* sp. (XC04 GP) isolated from the lichen *Xanthoparmelia conspersa* exerted substantial *in vitro* activity against HT-29 human CRC cell line, whereas it showed no cytotoxicity against human TNBC nor non-cancerous HEK293 (human embryonic kidney) cells.

This article deals with the isolation and structural elucidation of bioactive compounds from *Aspergillus* sp. The antiproliferative activity of the isolated compounds was evaluated against the HT-29 cell line after MS- and bio-guided fractionation from crude EtOAc extract



## 2. Results

### 2.1. Fungal Identification, Culture, and Extraction

The endolichenic fungus *Aspergillus* sp. was obtained from the culture of the lichen *Xanthoparmelia conspersa* in Sabouraud medium. Molecular identification was performed by comparison of its DNA sequence with those present in the GenBank database. The similarity of its ITS sequence enabled only the determination of the genus.

The culture of *Aspergillus* sp. was carried out in a solid culture medium on a small scale (400 mL) and a large scale (6 L) by using potato dextrose agar (PDA). After 21 days at controlled temperature (25 °C), extraction was performed, and the resulting EtOAc crude extracts XC04 P and XC04 GP were obtained from the small- and large-scale cultures, respectively.

Liquid–liquid partition was performed from the EtOAc crude extract (XC04 GP) with hexane and aqueous methanol (10:90) in order to remove the fatty acids abundantly biosynthesized by the fungus. This resulted in hexane and hydro-methanol subfractions along with an intermediate extract and a precipitate.

### 2.2. Viability Test

As multidrug resistance (MDR) is responsible for over 90% of deaths in cancer patients receiving traditional chemotherapeutics, two chemoresistant cancer cell lines were selected, i.e., HT-29, a cell line derived from colorectal adenocarcinoma and MDA-MB-231, a cell line derived from triple-negative breast cancer, for the evaluation of antiproliferative activity. In parallel, the non-cancerous HEK293 cell line, isolated from the kidney of a human embryo [23], was tested as a control.

The EtOAc extracts resulting from the small-scale and the large-scale cultures on PDA showed similar activity at 24 and 48 h against the HT-29, MDA-MB-231, and HEK293 cell lines.

As shown by the MTT results (Figure 1), XC04 GP displayed selectivity towards HT-29 cells, with  $IC_{50}$  of  $2.90 \pm 0.4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  at 24 h and  $3.20 \pm 0.4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  at 48 h. However, it was not active at the maximum concentrations tested (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against MDA-MB-231 cells (Figure 2). This extract had no toxicity against the HEK293 cell line at 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 3).

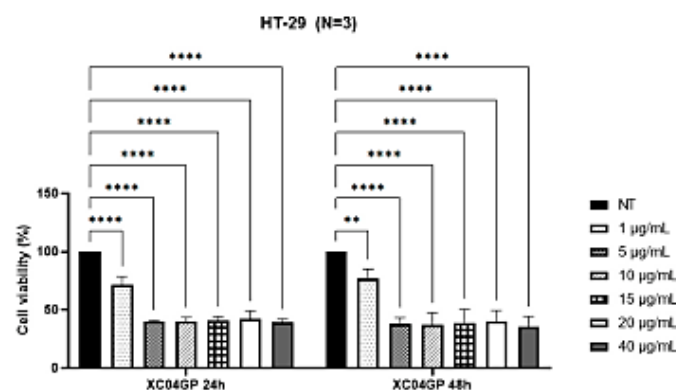


Figure 1. Percentage of viability of HT-29 cells after treatments with XC04 GP extract at 24 h and 48 h. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; NT: Not Treated.

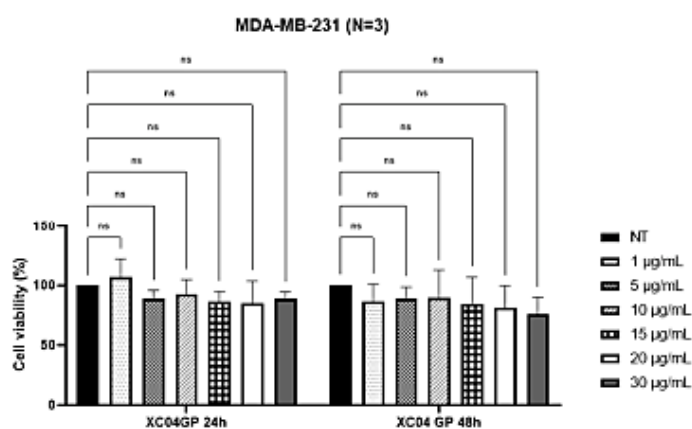


Figure 2. Percentage of viability of MDA-MB-231 cells after treatments with XC04 GP extract at 24 h and 48 h. NT: Not Treated; ns: not significant.

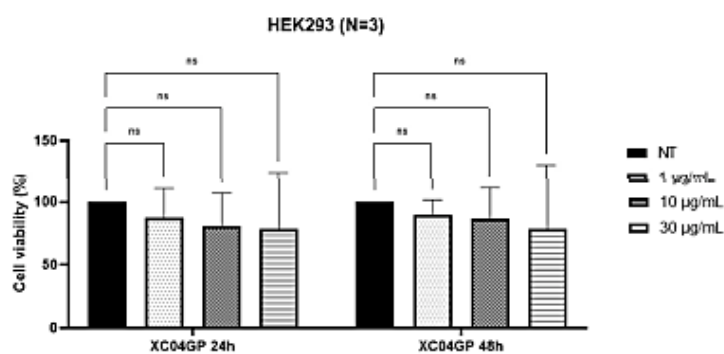


Figure 3. Percentage of viability of HEK293 cells after treatments with XC04 GP extract at 24 h and 48 h. NT: Not Treated; ns: not significant.

By following a bio-guided approach, the growth inhibition of HT-29 cells after treatment with the resulting subfractions and precipitate from the liquid–liquid partition of the XC04 GP extract was determined. The results of the MTT assay are summarized in Table 1.

Table 1. Cell viability (MTT test) of the intermediate subfraction and precipitate on HT-29 cells at 24 and 48 h.

Subfractions	IC <sub>50</sub> (µg/mL) at 24 h	IC <sub>50</sub> (µg/mL) at 48 h
Hexane subfraction	39.5 ± 6.4	19.8 ± 1.9
Hydro-methanol subfraction	27.9 ± 3.6	36.9 ± 3.4
Intermediate subfraction	4.8 ± 1.1	1.8 ± 0.3
Precipitate	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.9

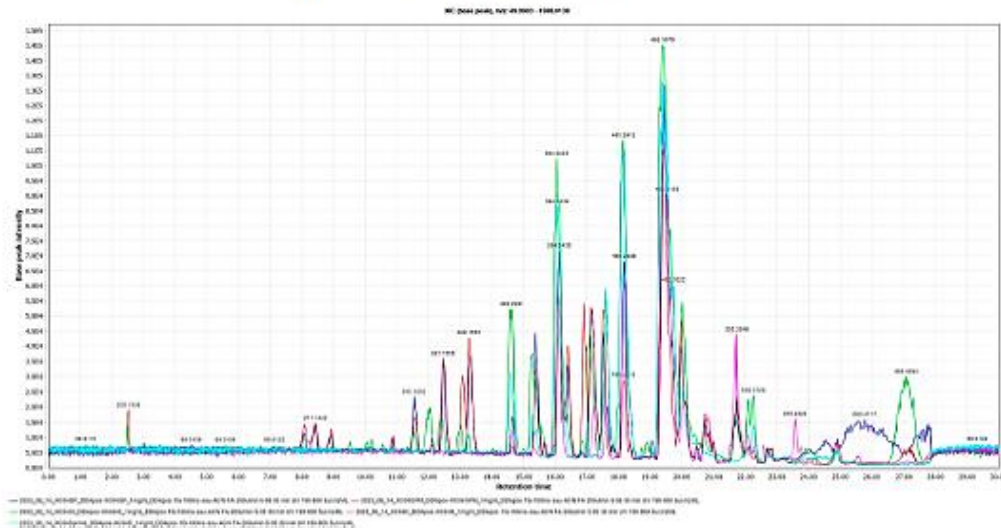
IC<sub>50</sub>: medium inhibitory concentration. Concentration that causes 50% of growth inhibition.

The MTT test showed that the activity was preserved in both the precipitate and the intermediate subfraction, while the hexane and hydro-methanol or aqueous MeOH subfractions had moderate activity compared with XC04 GP. This confirms the importance of this step to eliminate the fatty acids synthesized by the fungus, which can mask the molecules' activity.



### 2.3. Molecular Network

The extract (XC04 GP) and the three other subfractions obtained from the partition were analyzed by LC/MS-MS in (Figure 4).



**Figure 4.** Comparison of LC/MS-MS chromatographic profiles in positive mode of extracts XC04 GP (large scale), XC04 GP-M (hydro-methanol subfraction), XC04 GP-H (hexane subfraction), XC04 GP-I (intermediate subfraction), and XC04 GP-S (precipitate).

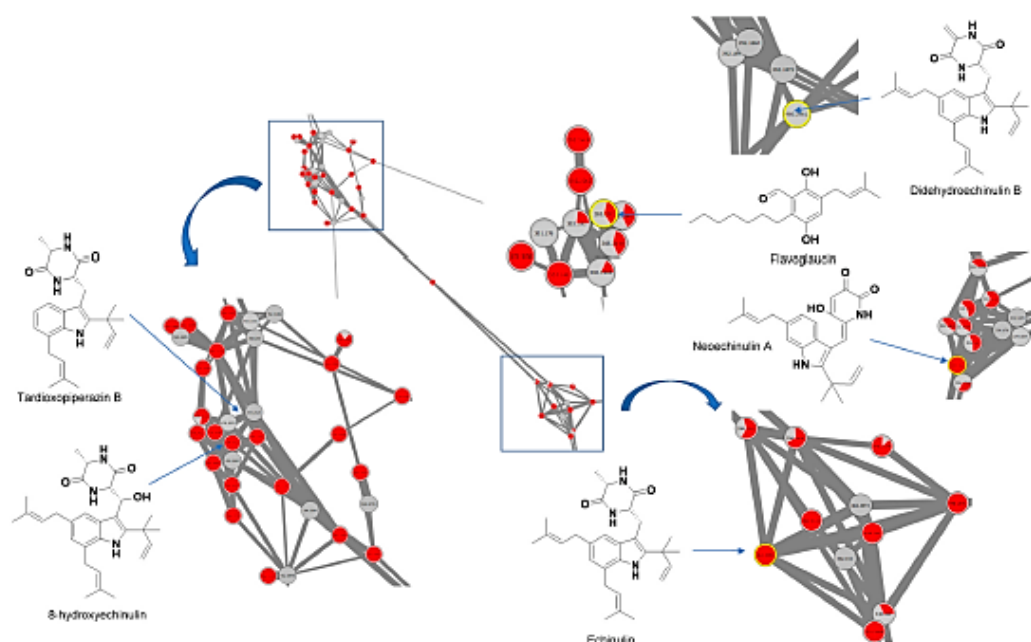
In this study, the MS-guided approach was also used to analyze and annotate the molecules composing the extract and their subfractions based on the comparison of their MS<sup>2</sup> spectra with those listed in natural substance databases. The small-scale and large-scale extracts, as well as the hexane, hydro-methanol, and intermediate subfractions, and the precipitate were analyzed by using LC/MS-MS in positive and negative modes to generate a molecular network. The recovered data were converted into mzML format by using MScConvertGUI (64 bits) software (version: 3.0.19124-6efa8cbfe). The files were then processed by using MZmine 2.53 software, and depending on the parameters set, a quant file was generated. This file was then downloaded into MetGem software (version: 1.2.1), which was used to generate a molecular network. Molecule annotation was performed after downloading the databases, and the results given are based on a comparison of MS/MS fragmentation similarity between spectra among chromatograms. The similarity score (cosine) can be set from 0 to 1 (the closer to 1, the more reliable the similarity).

Few molecules were annotated from the negative-mode analysis. Thus, the annotations of data obtained in positive mode were favored. In this analysis, 67 hits corresponding to 22 molecules were annotated with a cosine score  $\geq 0.7$  and a minimum of four common fragments (Table 2). The annotated molecules can be classified into several categories, including cyclic peptides, phthalates, acylglycerols, amino acid derivatives, fatty acids and amides, and diketopiperazines. Among the molecules detected, echinulin at  $m/z$  462.3056  $[M + H]^+$  with a cosine of 0.7 was found in the active fractions, and flavoglucan at  $m/z$  305.2082  $[M + H]^+$  with a cosine of 0.84 was found in both the active extract and corresponding active subfractions, giving indications for the purification process that led to the isolation of these two molecules (Figure 5). Several peaks were not annotated, such  $m/z$  394.2515 and  $m/z$  478.3012. Moreover, neoechinulin A was annotated at  $m/z$  324.1679. This prompted us to purify and isolate the corresponding compounds.

Table 2. Annotated compounds in the molecular network of extracts of *Aspergillus* sp.

$m/z$ [M + H] <sup>+</sup> Parent	Molecular Formula [M]	R <sub>t</sub> (min)	Annotation	Cosine Score	Database
180.0948	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	7.14	N-Acetyltyramine	0.84	Massbank/ GNPS
185.1262	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7.30	Cyclo (L-ala-L-Leu)	0.83	GNPS
197.1269	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6.79	Cyclo (L-Val-L-Pro)	0.95	GNPS
211.1428	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.56	Cyclo (L-Leu-L-Pro)	0.87	NIH
245.1347	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8.49	Cyclo (L-Phe-D-Pro)	0.96	GNPS
257.2447	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	21.11	Pentadecanoic acid	0.83	GNPS
261.1587	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.56	Cyclo (Phe-Leu)	0.89	GNPS
261.1243	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6.62	Cyclo (L-Tyr-L-Pro)	0.87	NIST
267.1638	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	18.34	Tributylphosphate	0.72	GNPS
279.1617	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	19.69	Dibutylphthalate	0.82	GNPS
281.2458	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	22.63	Linoleic acid	0.83	Massbank
284.2899	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	22.42	Octadecanamide	0.84	GNPS
305.2082	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	21.70	Flavoglucosin	0.84	NIH
324.1679	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	12.44	Neoechinulin A	0.84	GNPS
326.1908	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.60	Preechinulin	0.82	NIH
331.2803	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	22.80	1-Hexadecanoyl-sn-glycerol	0.86	NIH/GNPS
348.3072	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>11</sub> , [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	22.86	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	0.79	NIH
359.3043	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	24.86	Glycerol 1-stearate	0.78	GNPS
462.3056	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	21.85	Echinulin	0.80	GNPS
563.5507	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO, [2M + H] <sup>+</sup>	18.89	9-Octadecanamide	0.80	GNPS
567.5745	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO, [2M + H] <sup>+</sup>	22.42	Octadecanamide	0.80	GNPS
675.6664	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>3</sub> , [2M + H] <sup>+</sup>	25.94	13-Docosanamide	0.81	GNPS

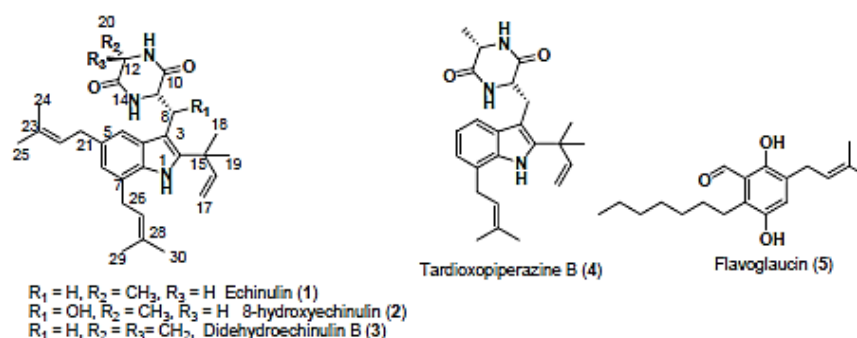
However, the effectiveness of this technique depends to a large extent on the ionization and fragmentation of the compounds, as well as on the specific parameters used during analysis. Optimizing these parameters is crucial to obtaining reliable and accurate results. Furthermore, the databases available in the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), which facilitate direct identification by matching MS/MS spectra, are currently still limited in terms of the diversity and number of annotated molecules. This limitation hinders the ability to exhaustively identify compounds present in the analyzed extracts and subfractions. Nevertheless, this dereplication method offers valuable complementary information that enriches conventional phytochemical analysis. However, due to the limited number of molecules annotated from the molecular network, this approach was combined with the bio-guided fractionation of extracts and the purification of active fractions for the isolation of compounds.



**Figure 5.** The molecular networks in positive mode of *Aspergillus* sp. extracts obtained by using MetGem software and some annotated compounds. Active extract and subfractions (red: XC04 GP, XC04 GP-I, and XC04 GP-S) and inactive extract and subfractions (gray: XC04GP-H and XC04 GP-M).

#### 2.4. Fractionation and Purification of Active Compounds

The XC04 GP extract underwent partitioning, and both the intermediate subfraction and precipitate were submitted to purification. Five prenylated compounds were isolated, including one hydroquinone and four diketopiperazines (Figure 6). Their structures were elucidated by careful analysis of their NMR spectra 1D ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and 2D (COSY, HSQC, and HMBC), HR ESI MS-MS data, and comparison with the spectroscopic data available in the literature. Among them, four compounds were already known and compound 2 was recently described [24]. Compounds 1–5 were identified as echinulin (1) [25], 8-hydroxyechinulin (2) [24], didehydroechinulin B (3) [26], tardioxopiperazine B (4) [27], and flavoglaucin (5) [28], respectively.



**Figure 6.** Structure of the isolated molecules from *Aspergillus* sp.



Compounds **1**, **2**, and **4** were isolated from the precipitate. Compounds **3** and **5** were isolated from the intermediate subfraction along with compounds **1**, **2**, and **4**. We noticed that echinulin (**1**) was the major compound found in the active intermediate subfraction and precipitate.

### 2.5. Antiproliferative Activity

The isolated compounds (**1**–**5**) were evaluated for their antiproliferative activity against HT-29 cells. Those molecules were not tested on MDA-MB-231. The results of the MTT assay are summarized in Table 3.

**Table 3.** Growth inhibition of isolated compounds from *Aspergillus* sp. on HT-29 cells.

Molecules	IC <sub>50</sub> (μM) at 24 h	IC <sub>50</sub> (μM) at 48 h
Echinulin ( <b>1</b> )	1.51 ± 0.1	1.73 ± 0.1
8-Hydroxyechinulin ( <b>2</b> )	7.12 ± 0.7	8.80 ± 1.1
Didehydroechinulin B ( <b>3</b> )	>50	44.84 ± 0.7
Tardioxopiperazine B ( <b>4</b> )	11.90 ± 0.8	13.70 ± 0.0
Flavoglucin ( <b>5</b> )	9.17 ± 1.4	34.40 ± 0.9
5-Fluorouracil	>50	17.30 ± 1.4
Irinotecan	44.50 ± 1.2	28.00 ± 0.4

Echinulin (**1**) clearly displayed the highest activity against HT-29 cells, even more than 5-FU and irinotecan, with IC<sub>50</sub> of 1.51 and 1.73 μM at 24 and 48 h, respectively. 8-Hydroxyechinulin (**2**) and tardioxopiperazine B (**4**) displayed interesting activity with IC<sub>50</sub> values of 8.80 μM and 13.70 μM at 48 h, respectively. From all the echinulin derivatives, didehydroechinulin B (**3**) was the least active, with an IC<sub>50</sub> of 44.84 μM at 48 h. Flavoglucin (**5**) activity at 24 h was more significant than the positive control, with an IC<sub>50</sub> value of 9.17 μM; however, at 48 h, the activity of flavoglucin appeared to be closer to irinotecan, with an IC<sub>50</sub> of 34.40 μM.

### 2.6. Study of Apoptosis

#### DNA Fragmentation

Apoptosis is a genetically programmed process of cell death which allows the cell to be eliminated after having received intra- or extracellular signals in order to maintain tissue homeostasis [29]. The cell can, therefore, induce the degradation of the genetic material (DNA fragmentation), which is one of the major markers of the phenomenon of apoptosis. In this study, the photometric ELISA for cell death detection was used for the in vitro quantitative determination of cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono- and oligonucleosomes) following induced cell death. The amount of DNA fragmentation under control conditions was normalized to 1, and that under treatment conditions was expressed as n-fold compared with the control.

Below, we show the DNA fragmentation fold results after treatment with the XC04 GP extract and echinulin (as a major isolated molecule) at IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> × 2, and IC<sub>50</sub> × 3 in HT-29 cells (Figure 7).

For both the EtOAc extract and echinulin (**1**), DNA fragmentation was often visible in a concentration-dependent manner. The MTT assay results are confirmed by DNA fragmentation, whose results were 1.7- and 2.7-fold for XC04 GP and echinulin treatments, respectively, at the IC<sub>50</sub> × 3 and IC<sub>50</sub> × 2 concentrations.

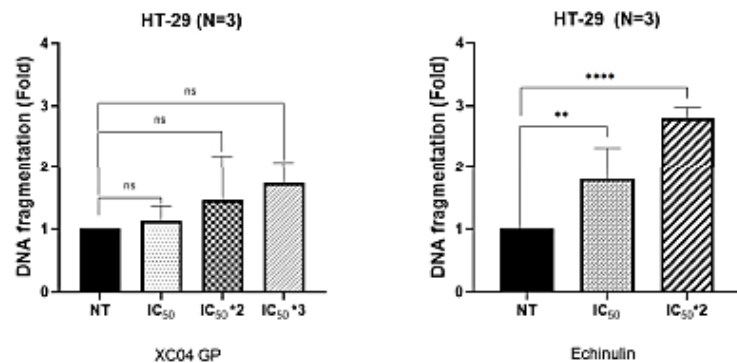


Figure 7. Quantification of DNA fragmentation after treatment with different concentrations of EtOAc extract (XC04 GP) and echinulin (ELISA test) on HT-29 cells. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns: not significant.

### 3. Discussion

Natural products are recognized as a niche of bioactive compounds that could lead to the discovery of new anticancer drugs and that have led to the successful development of numerous naturally derived anticancer agents into drugs over the last 30 years [30]. Secondary metabolites from lichens and endolichenic fungi have also been demonstrated to have a wide range of anticancer activities against various types of cancers [31–37].

Some endolichenic fungal species may produce selected types of compounds. Environmental factors including pollution, biodiversity loss, and climate change might also have an impact on this production. For instance, the genus *Aspergillus* is known to biosynthesize some unique secondary metabolites (asperglauclide, asperterins, auroglaucons, echinulins, epiheveadride, flavoglaucons, and neocheinulins) [38].

Apoptosis is the process of programmed cell death and the most popular target of many anticancer therapies. The dysregulation of apoptosis signals in cancers promotes abnormal cell growth and tumorigenesis [39]. Restoring the lost apoptotic function in cancer cells is the main objective of much of the research on anticancer drugs. The initiation of apoptosis in cells can be identified by morphological changes, such as nuclear fragmentation, chromatin condensation, cell shrinkage, and membrane blebbing [40].

The EtOAc extract (XC04 GP) showed an antiproliferative effect on CRC cells (HT-29) with an IC<sub>50</sub> value of  $3.2 \pm 0.4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  and insensitivity towards TNBC cells (MDA-MB-231) when treating at 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the proliferation of HEK293 cells was not affected by treatment at this same dose. This result suggests that the extract XC04 GP is not toxic to that non-cancerous cell line, which is a promising result and highlights a potential selectivity toward this type of chemoresistant colorectal cells. Thus, the chemical investigation of the extract is relevant in order to isolate molecules responsible for this activity, which are more likely to be less toxic than actual anticancer drugs. These results are confirmed by the DNA fragmentation of HT-29 cells after treatment with different concentrations of the *Aspergillus* sp. EtOAc extracts, showing a slight increase in DNA fragmentation, 1.7-fold compared with the control cells.

The molecular network resulted from the LC/MS-MS analysis of the EtOAc extracts and their subfractions (hydro-methanol, hexane, and precipitate) enabled the annotation of some of the most common compounds for this genus, the echinulin derivatives and flavoglaucon [41]. Moreover, amino acid derivatives and cyclic peptides were also highlighted with other compounds. The annotation was limited but focused on compounds responsible for activity, such as echinulin, neocheinulin A, and flavoglaucon, which were annotated in the EtOAc extracts, intermediate subfraction, and precipitate.

Several other molecules present in the active extracts and subfractions were not annotated, such as isolated compounds 2, 3, and 4 at  $m/z$   $[M + H]^+$  460.2964,  $m/z$   $[M + H]^+$  478.3069,

and  $m/z$   $[M + H]^+$  394.2515, respectively. Their detection seems difficult because their MS<sup>2</sup> spectra have not yet been included in the databases. However, this work also shows that this ELF biosynthesizes several compounds in very low quantities, which makes their purification difficult despite their annotation by LC/MS-MS.

In 1948, echinulin (1) was isolated for the first time from the mycelium of *Aspergillus echinulatus* [42]. Afterwards, echinulin was isolated from *Eurotium repens* cultured on MEA or PDA medium [15,43] and also from *Aspergillus chevalieri* grown on yeast extract sucrose medium [44]. In this study, echinulin was isolated from an endolichenic fungus, *Aspergillus* sp., grown on PDA medium and was isolated as a major compound (26%) from the active extracts. The antiproliferative activity of echinulin against HT-29 cells was evaluated, and it was clearly significant compared with two anticancer drugs commercialized for use in colorectal cancer treatments. 5-Fluorouracil (5-FU) is a first-line treatment for many cancers, including CRC. 5-FU leads cells to death by preventing DNA replication and RNA synthesis through the inhibition of cellular thymidylate synthase [45,46], while irinotecan, known by the commercial name Campto®, targets topoisomerase 1 to treat metastatic or advanced tumors such as colorectal cancer [47]. Echinulin clearly had the highest activity on HT-29 at 48 h, almost 10 times more than 5-FU and 16 times more than irinotecan. In addition, Yan et al. demonstrated that the immunizing effect of echinulin on T cells is enhanced by the activation of the NFκB signaling pathway, suggesting that it could serve as a novel immunotherapeutic agent [48]. Smetanina et al. have also demonstrated the cytotoxicity of echinulin on three different types of human prostate carcinoma (22Rv1, PC-3, and LNCaP) cell lines with IC<sub>50</sub> values of 63.20, 41.70, and 25.90 μM [49]. It exhibited low cytotoxicity towards the Hela cell line [42]. Echinulin is also considered an antioxidant agent, with an IC<sub>50</sub> of 18 μM, more active than ascorbic acid, with an IC<sub>50</sub> of 25 μM [50]. In this study, it was proven that echinulin induces apoptotic process in HT-29 cells by causing DNA fragmentation with a fold of 2.7 after treatment with IC<sub>50</sub> × 3, and this result comes to complete its antiproliferative activity against chemoresistant colorectal cancer.

8-Hydroxyechinulin (2) was isolated for the first time just recently from *Aspergillus amstelodami* BSX001 grown on modified PDA medium for 5 days and then on Czapek's medium for another 4 days [24]. In this previous work, the antioxidant activity of this compound was described. In this study, we isolated 8-hydroxyechinulin from the endolichenic fungus *Aspergillus* sp. grown also on PDA medium. To the best of our knowledge, this study reports, for the first time, the activity of 8-hydroxyechinulin against HT-29 cells. Its activity on the growth inhibition of chemoresistant cells as HT-29 was interesting, with an IC<sub>50</sub> of around 8.8 μM. This activity is twice higher than 5-FU and three times better than irinotecan, which is promising, and further biological test are needed to comprehend the signaling pathway and the toxicity of this molecule. The structure of compound 2 was found to have a hydroxyl group at C8, instead of a hydrogen as in compound 1, which led to a slight reduction in activity.

Didehydroechinulin B (3) was first isolated from ocean fungus *Penicillium griseofulvum* grown on PDA medium [51] and was also isolated from the marine fungus *Aspergillus chevalieri* grown also on PDA medium [26]. Its production was also reported from the soil-derived fungus *Aspergillus effuses* H1-1 grown on PDA medium [52]. The antiproliferative activity against HT-29 cells was only determined at 48 h as being around 44 μM. In the literature, it was demonstrated that the activity of didehydroechinulin B was quantified as 4.20 μM and 1.43 μM in suppressing the proliferation of human hepatocarcinoma and lung cancer cells, respectively [53].

The structure of didehydroechinulin B (3) turned out to have a double bond at position C12, instead of a methyl group in the echinulin structure. This work highlights the impact of the presence of this methyl moiety at C12 for the activity, which was drastically reduced in comparison with echinulin (1).

Tardioxopiperazine B (4) was first isolated in 1999 from an Ascomycete, *Microascus tardifaciens*, grown on sterilized rice [27]. It was also isolated from the fungus *Aspergillus amstelodami* grown on malt plates [54]. In this study, the antiproliferative activity of tar-



dioxopiperazine B was shown to be less than that of echinulin, with an  $IC_{50}$  of 13.7  $\mu\text{M}$  at 48 h, against HT-29 cells, but still more interesting than 5-FU and irinotecan activities. A weak immunosuppressive activity was described for tardioxopiperazine B against the mitogen-induced proliferation of mouse splenic lymphocytes [27]. Also, tardioxopiperazine B displayed moderate antimelanogenic activity compared with echinulin, with  $IC_{50}$  values of 30  $\mu\text{M}$  and 98  $\mu\text{M}$ , respectively, against B16 melanoma cells [54]. Orfali et al. showed that echinulin and tardioxopiperazine B can act selectively against B16 melanoma cancer cells by inhibiting melanin synthesis, with  $IC_{50}$  values of 38.50 and 52.60  $\mu\text{M}$ , respectively [54].

Based on a structure–activity relationship study and as previously reported [55], the presence of the prenyl groups at C-5 and C-7, the vinyl moieties at C-15 to C-17, and the carbonyl groups at C-10 and C-13 are of great importance for activity. In this study, this was confirmed, and echinulin activity against HT-29 was very interesting, with an  $IC_{50}$  value of 1.73  $\mu\text{M}$ . On the other hand, the activity of tardioxopiperazine B dropped and was 7.91 times lower when it only had one prenyl group at C-7 compared with echinulin. Thus, this study highlights that the presence of the two prenyl groups is essential for antiproliferative activity.

According to these findings, the antiproliferative activity of the four echinulin derivatives can be affected by the presence or the substitution of some groups. The substitution of a proton at position C8 can slightly decrease the antiproliferative activity, as shown for compound 2. The presence of two prenyl groups at positions C5 and C7 enhances this activity, and the presence of a methyl group at position C12 turns out to be the key to echinulin's highly intriguing activity against HT-29 cells.

Although pulmonary and hepatic toxicity has been demonstrated for echinulin in rabbits [44], this result paves the way for work on modulating its activity by the hemisynthesis of derivatives. Echinulin shows considerable promise in targeting specific, chemoresistant cancer cells, making it a valuable candidate for further investigation. Access to a large number of echinulin derivatives will enable to refine its structure–activity relationship, enhance its antiproliferative activity, and reduce its toxicity, with a view to possibly use it in therapeutics.

Flavoglaucin (5) was first isolated in 1949 from *Aspergillus glaucus* [42] and then from *Eurotium repens* S-669 grown on MEA medium [15]. Flavoglaucin is also known to be produced by several species of the genus *Aspergillus*, like *Aspergillus amstelodami* and *Aspergillus calidoustus*, grown on PDA medium [44,56,57]. In this study, flavoglaucin was isolated from the endolichenic fungus *Aspergillus* sp. The antiproliferative activity against HT-29 cells was 34.40  $\mu\text{M}$ , which is interesting. Flavoglaucin has a great impact in vitro on human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2), lung cancer (A549), and human breast carcinoma (MCF-7) cell lines, with  $IC_{50}$  values of 2.87 and 22.20  $\mu\text{M}$  and a percentage of inhibition of  $27 \pm 0.53\%$  (at 10  $\mu\text{M}$ ), respectively [28,57]. In vivo, Yoshimi et al. demonstrated that the multiplicity and the incidence of intestinal tumors are lower in rats given flavoglaucin with azoxymethane; thus, flavoglaucin, as a natural product, can be a promising chemopreventive agent for human large-bowel neoplasia [58]. The comparative cytotoxic activity of prenylated benzaldehyde derivatives revealed that both the position of the double bond in the prenyl group at C-3 and the degree of saturation have a great impact on the cytotoxic activity of flavoglaucin [59].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

Ethyl acetate, cyclohexane, dichloromethane, methanol, and acetonitrile of HPLC grade (all with purity  $\geq 99.8\%$ ) were purchased from Carlo Erba (Reagents (Val de Reuil, France)). Formic acid ( $\geq 99.3\%$ ) was purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

TLC sheet Reversed phase C18 (20–40  $\mu\text{m}$ ) was purchased from A.L.T France (Houilles, France).

TLC sheet ALUGRAM XTRA SIL G/UV254, 2 mm) and medium culture potato dextrose agar were purchased from Dominique Dutscher SAS (Brumath, France).

Sephadex LH-20 was purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Silica gel was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

#### 4.2. General Experimental Procedures

$^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were acquired with a Bruker Avance III HD spectrometer at 500 and 125 MHz, respectively, on the BISCeM Platform.

HPLC analyses were performed on an HPLC-UV system comprising a Shimadzu LC-20AB pump, an SIL-20AC autosampler, a CTC-10AS oven column, and for detection, a Shimadzu SPD-M20A photodiode array (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The HPLC instrument was monitored by Shimadzu LCMS LabSolution software (Version: 5.127SP1).

The HPLC analytical column used was a reverse-phase Nucleodur C18 column (particle size of 10  $\mu\text{m}$ ; 250 mm  $\times$  4.6 mm I.D.). The mobile phase consisted of ultrapure  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% formic acid (A) and ACN with 0.1% formic acid (B). The gradient was delivered at a flow rate of 1 mL/min, and the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . The column oven temperature was 40  $^\circ\text{C}$ . For UV-visible detection, the wavelength sweep was set between 200 and 400 nm.

The semi-preparative HPLC was a Waters 600 pump with a Waters 996 photodiode array detector. The column used was a reverse-phase Nucleodur C18 column (particle size of 10  $\mu\text{m}$ ; 250 mm  $\times$  21 mm I.D.). The mobile phase consisted of ultrapure  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% formic acid (A) and ACN with 0.1% formic acid (B). The gradient was delivered at a flow rate of 20 mL/min, the samples were prepared at a concentration of 10 mg/mL, and the injection volume was 250  $\mu\text{L}$  at room temperature. For UV-visible detection, the wavelength was set to 254 nm. Empower software (version: 6.20.00.00) was used for spectra analysis.

MPLC was carried out by using Buchi pump model C-810 with silica gel 60 (40–63  $\mu\text{m}$ ; Merck).

#### 4.3. LC/MS-MS Analyses

LC/MS-MS analyses were performed by using a Nexera X2 LC40 system (Shimadzu Corporation, Noisiel, France) coupled to a DAD covering the full range of acquisition (190–800 nm). It was interfaced with a quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (TripleTOF<sup>®</sup> 5600+; Sciex, Concord, Vaughan, OR, Canada), equipped with a DuoSpray<sup>TM</sup> ion source. Separation was achieved on an ATLANTIS T3 100  $\text{\AA}$  (2.1 mm  $\times$  100 mm) with particle size of 5  $\mu\text{m}$ . The column was thermostated at 40  $^\circ\text{C}$ , and a solvent gradient (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) using water + 0.1% FA (solvent A) and acetonitrile + 0.1% FA (solvent B) was applied from 5% to 95% of solvent B in 20 min. The samples were reconstituted at 1 mg/mL with methanol, and 5  $\mu\text{L}$  was injected. Mass experiments were recorded with an ESI ion source in positive and negative modes by using the following parameters: declustering potential (DP) of 50 V and  $-50$  V, respectively; collision energy (CE) of 30 and  $-30 \pm 15$  V, respectively. Acquisition was performed in DDA (Data-Dependent Acquisition) mode, in which the TripleTOF 5600+ continuously switched between a survey 200 ms scan acquired in the TOF-MS mode (from 50 to 1500  $m/z$ ) and up to 15 dependent scans of 100 ms scan required in TOF-MS/MS mode (from 10 to 2000  $m/z$ ).

#### 4.4. Data Treatment (Molecular Network Construction)

LC/MS-MS profiles were downloaded in MZmine2 software (version 2.53) in \*.mzXML format. Peak detection in positive mode was performed by using the "mass detection1" (MS1) algorithm with a noise level of "1E3" in centroid mode. The same parameters were used for "mass detection2" (MS2).

Then, chromatograms were constructed for all detected ions with the "ADAP chromatogram builder" algorithm with a min group size scan of 5, a group intensity threshold of 500, a min highest intensity of 1000, and an  $m/z$  tolerance of 0.005 or 20 ppm. Peak deconvolution was applied to generate chromatograms with the "Baseline cut-off" algorithm with the following parameters: min peak height of 2000, peak duration range from 0 to 2, and baseline level 1E3; the  $m/z$  range for MS2 scan pairing (Da) of 0.02 was ticked, and

the RT range of 0.5 was also ticked. Isotope removal was carried out with the isotopic peaks grouper by using the following parameters:  $m/z$  tolerance of 0.005 or 10 ppm, RT tolerance of 0.2 min, and maximum charge of 2; the most representative ion kept was the most intense. Alignment was then performed with an  $m/z$  tolerance of 0.005 to 10 ppm and an RT tolerance of 0.2 min, with an RT after correction of 0.1, an RANSAC iterative of 0, a min number of points of 50%, and a threshold value of 0.2; the required same charge state was ticked. An \*.csv file was generated, gathering 1561 peaks with the corresponding MS2 data. The molecular network was built by using both MetGem and the GNPS platform. The following parameters were applied for MetGem: the cosine score was set to 0.7, MS1 data were ticked,  $m/z$  tolerance was set to 0.02 Da, the minimum matched peaks was set to 4, and the min intensity was 0.

#### 4.5. Extraction Isolation and Purification

The lichen *Xanthoparmelia conspersa* was collected in May 2020 in the Vaseix forest in Limoges (45.832310, 1.177927). The isolation and identification of the *Aspergillus* sp. isolate were performed as previously described [60]. Briefly, the ITS sequence obtained after DNA extraction and purification, PCR amplification, and sequencing was compared to fungal sequences present in the NCBI GenBank database. A similarity of 97% allowed only for identification at the genus level.

This ELF was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  at the LABCiS laboratory under code XC04.

The XC04 endolichenic fungus was grown on solid potato dextrose agar (234 g in 6 L of distilled water, autoclaved for 20 min at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in 230 square petri dishes for 21 days in a temperature-controlled chamber at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The fungal cultures were extracted with ethyl acetate (2.5 L) and homogenized for 48 h for 3 times. The combined extracts were then evaporated under pressure, resulting in a crude extract of 5 g. The latter was subjected to liquid–liquid partition between n-hexane (100 mL) and aqueous methanol (90% MeOH/10%  $\text{H}_2\text{O}$ ) (200 mL).

The intermediate subfraction obtained (203.3 mg) was fractionated by Sephadex LH-20 gel and eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2:1, resulting in 8 fractions (F1–F8), which were then grouped according to their profile in thin-layer chromatography. Fractions 5–8 (11.6 mg) were purified by preparative TLC, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2, to give compound 1 (1 mg).

Fraction 4 (48 mg) was subjected to reverse-phase silica column separation by Flash C-pure by using a gradient of ACN:  $\text{H}_2\text{O}$  from 65:35 to 85:15, yielding three fractions (4-A, 4-B, and 4-C).

Fraction 4-A was then separated by a semi-preparative HPLC C-18 column by using ACN: $\text{H}_2\text{O}$  from 70:30 to 100:0 at 20 mL/min for 21 min, which resulted in compound 2 (1.2 mg) and compound 3 (1 mg).

Fraction 4-B was separated by a semi-preparative HPLC C-18 column by using ACN: $\text{H}_2\text{O}$  from 70:30 to 100:0 at 20 mL/min for 21 min, which gave compound 4 (1.3 mg).

Fraction 4-C (10.8 mg) was separated by a semi-preparative HPLC C-18 column by using ACN: $\text{H}_2\text{O}$  from 70:30 to 100:0 at 20 mL/min for 21 min, yielding compound 4 (1.2 mg), compound 1 (3.8 mg), and compound 5 (2.1 mg).

The precipitate was purified by preparative TLC with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95/5) to give a mixture of compound 2 (4.7 mg) and compound 4 (1.7 mg), and pure compound 1 (10.9 mg).

#### 4.6. Cell Culture and Treatments

The HT-29 human CRC cell line was from the American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards, Mosheim, France) used in LABCiS (Limoges, France). The culture medium used was Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco BRL–Fisher Scientific (Illkirch, France)) medium.

The human MDA-MB-231 (TNBC) and the human embryonic kidney non-cancerous HEK293 cell lines were also from ATCC and were used in the framework within the LIENSs laboratory (La Rochelle, France). The culture medium used was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) for both cell lines.



All culture media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution. RPMI medium was in addition supplemented with 1% glutamine.

Cell cultures were preserved in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were seeded in culture media and left to adhere for 24 h.

A stock solution of each extract and molecules was prepared at a concentration of 1 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in culture medium to obtain the de-sired test concentrations.

#### 4.7. Cytotoxicity (MTT) Assay

Cell viability was measured by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). HT-29 cells were seeded in vitro in 96-well plates at 8000 cells per well. After 24 h of adhesion, the cells were treated with concentrations (0.5–40 µg/mL) of fungal extracts and molecules diluted in the culture medium. After 24 and 48 h of contact with the treatment, the absorbance was measured at 550 nm by a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific (Illkirch, France)). The results obtained were from 3 independent experiments.

MDA-MB-231 and HEK293 cells were seeded in vitro in 96-well plates at 10,000 cells per well and treated with different concentrations (0.5 µg/mL to 40 µg/mL) of fungal extracts.

#### 4.8. DNA Fragmentation

The phenomenon of apoptosis was studied by quantifying the mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction of HT-29 cell lysates after treatment by using the cell death ELISA (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

A total of  $2 \times 10^5$  cells of each condition were then obtained, and DNA fragmentation was measured as detailed below.

HT-29 cells were grown in T75 flasks. After treatment or not with IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> × 2, and IC<sub>50</sub> × 3 of the EtOAc extract (XC04 GP) and Echinulin, pellets of  $2 \times 10^5$  cells were obtained from the two pooled cell fractions (floating cells and adherent cells) after trypsin harvesting. The assay was performed on 20 µL of cell lysate of each condition placed into a streptavidin-coated microplate. A mixture (80 µL) of mouse monoclonal antibodies directed against DNA and histones diluted in incubation buffer was added to each well and then incubated under gentle shaking (300 rpm) for 2 h at room temperature. After incubation, the solution was removed, and the wells were rinsed three times with incubation buffer before adding 100 µL per well of substrate ABTS solution; afterwards, the microplate was incubated at 250 rpm for approximately 10–20 min.

The reaction was developed with the peroxidase substrate and stopped with ABTS stop solution (100 µL). The absorbance was measured at 405 nm and 490 nm (reference wavelength) with a microplate reader. The results were reported as n-fold compared with the control.

#### 4.9. Statistical Analysis

One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to identify significant differences between the control and experimental groups. All experimental data were acquired from at least three independent experiments. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9.0.0 for Windows. A probability (*p*) value of <0.05 was considered statistically significant.

### 5. Conclusions

The chemical and biological potential of endolichenic fungi is confirmed through this study. A small number of annotated nodes was found in the metabolomic network analysis conducted on four extracts issued from an endolichenic fungus. However, the molecular network identified two intriguing and often biosynthesized compounds by the *Aspergillus* genus (flavoglaucin and echinulin derivatives). Considering the fact that no cytotoxicity

was reported against healthy cells after treatment with *Aspergillus* sp. EtOAc extract, further studies on the activity of this extract against human chemoresistant cancers, such as TNBC and CRC, reveal a preference for colorectal cancer. Therefore, these cell lines were used to examine the isolated compounds. Their activity ranged from 1.7  $\mu\text{M}$  to 44.84  $\mu\text{M}$ , which is noteworthy. Additional biological tests of these molecules are needed to determine their signaling pathway.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.M.; methodology, I.F.-A., G.C. and L.M.; validation, M.M. and L.M.; formal analysis, Y.C., A.P. and J.S.; investigation, H.M.; resources, M.M., I.F.-A., B.L. and L.M.; writing—original draft preparation, H.M. and L.M.; writing—review and editing, M.M., G.C. and L.M.; supervision, L.M. and G.C.; funding acquisition, L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by University of Limoges, with support from the Haute-Vienne departmental committee of La Ligue contre le Cancer (2019-CACOFUNG project) and Region Nouvelle Aquitaine AAPR2021A-2020-12085910 (PI: L.Mambu).

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

**Acknowledgments:** We are grateful to Emile Pinault for the LC/MS-MS analyses of the fungal extracts. The authors thank the BISCEM Unit (Univ. Limoges, Inserm U5042, CNRS UAR 2015, CHU Limoges) for providing access to mass spectrometry equipment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789. [\[CrossRef\]](#)
2. Matthews, H.K.; Bertoli, C.; de Bruin, R.A.M. Cell Cycle Control in Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 74–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Catalano, A.; Iacopetta, D.; Ceramella, J.; Mariconda, A.; Rosano, C.; Scumaci, D.; Saturnino, C.; Longo, P.; Sinicropi, M.S. New Achievements for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 5554. [\[CrossRef\]](#)
5. Simelane, N.W.N.; Ann Kruger, C.; Abrahamse, H. Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 41560–41576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Khalifa, S.A.M.; Elias, N.; Farag, M.A.; Chen, L.; Saeed, A.; Hegazy, M.-E.F.; Moustafa, M.S.; Abd El-Wahed, A.; Al-Mousawi, S.M.; Musharraf, S.G.; et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 491. [\[CrossRef\]](#)
7. Liu, S.; Khan, A.R.; Yang, X.; Dong, B.; Ji, J.; Zhai, G. The Reversal of Chemotherapy-Induced Multidrug Resistance by Nanomedicine for Cancer Therapy. *J. Controlled Release* **2021**, *335*, 1–20. [\[CrossRef\]](#)
8. Naeem, A.; Hu, P.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhu, W.; Zheng, Q. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27*, 8367. [\[CrossRef\]](#)
9. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661. [\[CrossRef\]](#)
11. White, J. Drug Addiction: From Basic Research to Therapy. *Drug Alcohol Rev.* **2009**, *28*, 455. [\[CrossRef\]](#)
12. Nobili, S.; Lippi, D.; Witort, E.; Donnini, M.; Bausi, L.; Mini, E.; Capaccioli, S. Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention. *Pharmacol. Res.* **2009**, *59*, 365–378. [\[CrossRef\]](#)
13. Dong, J.; Qian, Y.; Zhang, G.; Lu, L.; Zhang, S.; Ji, G.; Zhao, A.; Xu, H. Can Natural Products Be Used to Overcome the Limitations of Colorectal Cancer Immunotherapy? *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 884423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Zhang, W.; Ran, Q.; Li, H.; Lou, H. Endolichenic Fungi: A Promising Medicinal Microbial Resource to Discover Bioactive Natural Molecules—An Update. *J. Fungi* **2024**, *10*, 99. [\[CrossRef\]](#)
15. Podojil, M.; Sedmera, P.; Vokoun, J.; Betina, V.; Baráthová, H.; Ďuračková, Z.; Horáková, K.; Nemeč, P. *Euotium (Aspergillus) repens* Metabolites and Their Biological Activity. *Folia Microbiol.* **1978**, *23*, 438–443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Hawksworth, D.L.; Grube, M. Lichens Redefined as Complex Ecosystems. *New Phytol.* **2020**, *227*, 1281–1283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. U'Ren, J.M.; Lutzon, F.; Miadlikowska, J.; Arnold, A.E. Community Analysis Reveals Close Affinities between Endophytic and Endolichenic Fungi in Mosses and Lichens. *Microb. Ecol.* **2010**, *60*, 340–353. [\[CrossRef\]](#)



18. Kellogg, J.J.; Raja, H.A. Endolichenic Fungi: A New Source of Rich Bioactive Secondary Metabolites on the Horizon. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 271–293. [\[CrossRef\]](#)
19. Paranagama, P.A.; Wijeratne, E.K.; Burns, A.M.; Marron, M.T.; Gunatilaka, M.K.; Arnold, A.E.; Gunatilaka, A.L. Heptaketides from *Corynespora* sp. Inhabiting the Cavern Beard Lichen, *Usnea cavemosz*: First Report of Metabolites of an Endolichenic Fungus. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1700–1705. [\[CrossRef\]](#)
20. Ding, G.; Li, Y.; Fu, S.; Liu, S.; Wei, J.; Che, Y. Ambuic Acid and Torreyanic Acid Derivatives from the Endolichenic Fungus *Pestalotiopsis* sp. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 182–186. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhang, F.; Liu, S.; Lu, X.; Guo, L.; Zhang, H.; Che, Y. Allenyl and Alkynyl Phenyl Ethers from the Endolichenic Fungus *Neurospora terricola*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1782–1785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Li, X.-B.; Li, L.; Zhu, R.-X.; Li, W.; Chang, W.-Q.; Zhang, L.-L.; Wang, X.-N.; Zhao, Z.-T.; Lou, H.-X. Tetramic Acids and Pyridone Alkaloids from the Endolichenic Fungus *Tolyptocladium cylindrosporum*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2155–2160. [\[CrossRef\]](#)
23. Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Li, S.; Liu, X.; Gu, Q.; Yu, X. Isolation and Identification of Indole Alkaloids from *Aspergillus amstelodami* BSX001 and Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Neochininulin A. *Microorganisms* **2024**, *12*, 864. [\[CrossRef\]](#)
25. Almeida, A.P.; Dethoup, T.; Singburadom, N.; Lima, R.; Vasconcelos, M.H.; Pinto, M.; Kijjoa, A. The in Vitro Anticancer Activity of the Crude Extract of the Sponge-Associated Fungus *Euotium cristatum* and Its Secondary Metabolites. *J. Nat. Pharm.* **2010**, *1*, 25–29.
26. Lv, D.; Xia, J.; Guan, X.; Lai, Q.; Zhang, B.; Lin, J.; Shao, Z.; Luo, S.; Zhangsun, D.; Qin, J.-J.; et al. Indole Diketopiperazine Alkaloids Isolated From the Marine-Derived Fungus *Aspergillus chevalieri* MCCC M23426. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 950857. [\[CrossRef\]](#)
27. Fujimoto, H.; Fujimaki, T.; Okuyama, E.; Yamazaki, M. Immunomodulatory Constituents from an Ascomycete, *Microascus tardificans*. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1426–1432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Gao, H.; Wang, Y.; Luo, Q.; Yang, L.; He, X.; Wu, J.; Kachanuban, K.; Wilaipun, P.; Zhu, W.; Wang, Y. Bioactive Metabolites from Acid-Tolerant Fungi in a Thai Mangrove Sediment. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 609952. [\[CrossRef\]](#)
29. Ségal-Bendirdjian, E. Mort Cellulaire: Signalisation et Exécution de l'apoptose. *Hématologie* **1999**, *5*, 376–387.
30. Huang, M.; Lu, J.-J.; Ding, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat. Prod. Bioprospecting* **2021**, *11*, 5–13. [\[CrossRef\]](#)
31. Yang, Y.; Bae, W.K.; Nam, S.-J.; Jeong, M.-H.; Zhou, R.; Park, S.-Y.; Tas, I.; Hwang, Y.-H.; Park, M.-S.; Chung, L.J.; et al. Acetonic Extracts of the Endolichenic Fungus EL002332 Isolated from *Endocarpon pusillum* Exhibits Anticancer Activity in Human Gastric Cancer Cells. *Phytomedicine* **2018**, *40*, 106–115. [\[CrossRef\]](#)
32. Nguyen, T.T.; Yoon, S.; Yang, Y.; Lee, H.-B.; Oh, S.; Jeong, M.-H.; Kim, J.-J.; Yee, S.-T.; Crisan, E.; Moon, C.; et al. Lichen Secondary Metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Yang, Y.; Park, S.-Y.; Nguyen, T.T.; Yu, Y.H.; Nguyen, T.V.; Sun, E.G.; Udeni, J.; Jeong, M.-H.; Pereira, L.; Moon, C.; et al. Lichen Secondary Metabolite, Physciosporin, Inhibits Lung Cancer Cell Motility. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137889. [\[CrossRef\]](#)
34. Tas, I.; Han, J.; Park, S.-Y.; Yang, Y.; Zhou, R.; Gamage, C.D.B.; Van Nguyen, T.; Lee, J.-Y.; Choi, Y.J.; Yu, Y.H.; et al. Physciosporin Suppresses the Proliferation, Motility and Tumorigenesis of Colorectal Cancer Cells. *Phytomedicine* **2019**, *56*, 10–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tas, I.; Varli, M.; Son, Y.; Han, J.; Kwak, D.; Yang, Y.; Zhou, R.; Gamage, C.D.B.; Pulat, S.; Park, S.-Y.; et al. Physciosporin Suppresses Mitochondrial Respiration, Aerobic Glycolysis, and Tumorigenesis in Breast Cancer. *Phytomedicine* **2021**, *91*, 153674. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Yang, Y.; Bhosle, S.R.; Yu, Y.H.; Park, S.-Y.; Zhou, R.; Tas, I.; Gamage, C.D.B.; Kim, K.K.; Pereira, L.; Hur, J.-S.; et al. Tumidulin, a Lichen Secondary Metabolite, Decreases the Stemness Potential of Colorectal Cancer Cells. *Molecules* **2018**, *23*, 2968. [\[CrossRef\]](#)
37. Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.-Y.; Nguyen, T.T.; Seo, Y.-W.; Lee, K.H.; Lee, J.H.; Kim, K.K.; Hur, J.-S.; Kim, H. The Lichen Secondary Metabolite Atranorin Suppresses Lung Cancer Cell Motility and Tumorigenesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8136. [\[CrossRef\]](#)
38. Frisvad, J.C.; Larsen, T.O. Chemodiversity in the Genus *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 7859–7877. [\[CrossRef\]](#)
39. Wong, R.S. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87. [\[CrossRef\]](#)
40. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [\[CrossRef\]](#)
41. Zhu, J.; Song, L.; Shen, S.; Fu, W.; Zhu, Y.; Liu, L. Bioactive Alkaloids as Secondary Metabolites from Plant Endophytic *Aspergillus* Genus. *Molecules* **2023**, *28*, 7789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Quilico, A.; Panizzi, L.; Mugnaini, E. Structure of Flavoglucan and Auroglucan. *Nature* **1949**, *164*, 26–27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Gao, J.; León, F.; Radwan, M.M.; Dale, O.R.; Husni, A.S.; Manly, S.P.; Lupien, S.; Wang, X.; Hill, R.A.; Dugan, F.M.; et al. Benzyl Derivatives with In Vitro Binding Affinity for Human Opioid and Cannabinoid Receptors from the Fungus *Euotium repens*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1636–1639. [\[CrossRef\]](#)
44. Ali, M.; Mohammed, N.; Alnaqeb, M.A.; Hassan, R.A.; Ahmad, H.S. Toxicity of Echinulin from *Aspergillus chevalieri* in Rabbits. *Toxicol. Lett.* **1989**, *48*, 235–241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Ghafouri-Fard, S.; Abak, A.; Tondro Anamag, F.; Shoorei, H.; Fattahi, F.; Javadinia, S.A.; Basiri, A.; Taheri, M. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 658636. [CrossRef]
46. Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330–338. [CrossRef]
47. Bailly, C. Irinotecan: 25 Years of Cancer Treatment. *Pharmacol. Res.* **2019**, *148*, 104398. [CrossRef]
48. Yan, Z.-F.; Lin, P.; Kook, M.; Yi, T.-H.; Li, C.-T. Immune Activation Effects of *Eurotium cristatum* on T Cells through NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Humans. *Food Agric. Immunol.* **2017**, *28*, 388–402. [CrossRef]
49. Smetanina, O.F.; Yurchenko, A.N.; Girich (Ivanets), E.V.; Trinh, P.T.H.; Antonov, A.S.; Dyshlovoy, S.A.; von Amsberg, G.; Kim, N.Y.; Chingizova, E.A.; Pisyagin, E.A.; et al. Biologically Active Echinulin-Related Indole-diketopiperazines from the Marine Sediment-Derived Fungus *Aspergillus niveoglauca*. *Molecules* **2020**, *25*, 61. [CrossRef]
50. Zhong, W.-M.; Wang, J.-F.; Shi, X.-F.; Wei, X.-Y.; Chen, Y.-C.; Zeng, Q.; Xiang, Y.; Chen, X.-Y.; Tian, X.-P.; Xiao, Z.-H.; et al. Eurotiumins A–E, Five New Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Eurotium* sp. SCSIO F452. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 136. [CrossRef] [PubMed]
51. Zhou, L.; Zhu, T.; Cai, S.; Gu, Q.; Li, D. Three New Indole-Containing Diketopiperazine Alkaloids from a Deep-Ocean Sediment Derived Fungus *Penicillium griseofulvum*. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1758–1763. [CrossRef]
52. Gao, H.; Liu, W.; Zhu, T.; Mo, X.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Li, J.; Ai, J.; Gu, Q.; Li, D. Diketopiperazine Alkaloids from a Mangrove Rhizosphere Soil Derived Fungus *Aspergillus effuses* H1-1. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9501. [CrossRef] [PubMed]
53. Gao, H.; Zhu, T.; Li, D.; Gu, Q.; Liu, W. Prenylated Indole Diketopiperazine Alkaloids from a Mangrove Rhizosphere Soil Derived Fungus *Aspergillus effuses* H1-1. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 952–956. [CrossRef]
54. Elsbaey, M.; Sallam, A.; El-Metwally, M.; Nagata, M.; Tanaka, C.; Shimizu, K.; Miyamoto, T. Melanogenesis Inhibitors from the Endophytic Fungus *Aspergillus amstelodami*. *Chem. Biodivers.* **2019**, *16*, e1900237. [CrossRef]
55. Kamauchi, H.; Kinoshita, K.; Sugita, T.; Koyama, K. Conditional Changes Enhanced Production of Bioactive Metabolites of Marine Derived Fungus *Eurotium rubrum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4911–4914. [CrossRef]
56. Fathallah, N.; Raafat, M.M.; Issa, M.Y.; Abdel-Aziz, M.M.; Bishr, M.; Abdelkawy, M.A.; Salama, O. Bio-Guided Fractionation of Prenylated Benzaldehyde Derivatives as Potent Antimicrobial and Antibiofilm from *Annona muricata* L. Fruits-Associated *Aspergillus amstelodami*. *Molecules* **2019**, *24*, 4118. [CrossRef] [PubMed]
57. Luo, Y.; Luo, X.; Zhang, T.; Li, S.; Liu, S.; Ma, Y.; Wang, Z.; Jin, X.; Liu, J.; Wang, X. Anti-Tumor Secondary Metabolites Originating from Fungi in the South China Sea's Mangrove Ecosystem. *Bioengineering* **2022**, *9*, 776. [CrossRef]
58. Yoshimi, N.; Wang, A.; Morishita, Y.; Tanaka, T.; Sugie, S.; Kawai, K.; Yamahara, J.; Mori, H. Modifying Effects of Fungal and Herb Metabolites on Azoxymethane-induced Intestinal Carcinogenesis in Rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **1992**, *83*, 1273–1278. [CrossRef]
59. Lin, L.-B.; Gao, Y.-Q.; Han, R.; Xiao, J.; Wang, Y.-M.; Zhang, Q.; Zhai, Y.-J.; Han, W.-B.; Li, W.-L.; Gao, J.-M. Alkylated Salicylaldehydes and Prenylated Indole Alkaloids from the Endolichenic Fungus *Aspergillus chevalieri* and Their Bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 6524–6534. [CrossRef]
60. Lagarde, A.; Jargeat, P.; Roy, M.; Girardot, M.; Imbert, C.; Millot, M.; Mambu, L. Fungal Communities Associated with *Evernia prunastri*, *Ramalina fastigiata* and *Pleurosticta acetabulum*: Three Epiphytic Lichens Potentially Active against *Candida* Biofilms. *Microbiol. Res.* **2018**, *211*, 1–12. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





## Agents apoptotiques issus de la flore endolichénique pour la lutte contre les cancers chimiorésistants

---

Le cancer est devenu l'une des principales causes de décès dans le monde, avec les cancers du sein, du poumon et du côlon étant les plus répandus. Les champignons endolichéniques, des champignons non pathogènes présents dans les lichens, pourraient offrir une percée en fournissant de nouveaux composés bioactifs à potentiel anticancéreux. Actuellement, la chimiorésistance constitue un défi majeur dans le traitement des cancers. Notre étude vise à combiner l'analyse métabolomique et les résultats biologiques en parallèle d'études chimiques sur des extraits de champignons endolichéniques pour isoler des molécules ayant une activité antiproliférative contre des lignées cellulaires de cancer colorectal chimiorésistant (HT-29) et de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231).

Ainsi, ce travail a d'abord conduit à la mise en place de réseaux moléculaires pour étudier la diversité chimique des extraits de champignons endolichéniques. Ensuite, la réalisation des tests biologiques pour orienter les études chimiques des extraits montrant une activité antiproliférative sur l'une ou les deux lignées de cancer chimiorésistantes. Enfin, cette approche nous a permis d'annoter, d'identifier des molécules dans les réseaux moléculaires et d'isoler 13 molécules, dont l'activité antiproliférative sur les cellules HT-29 a été évaluée.

---

Mots-clés : Champignons endolichéniques, *Trametes versicolor*, *Aspergillus* sp., Métabolites secondaires, Activité antiproliférative, Cancer colorectal, Cancer du sein triple négatif

### Apoptotic agents from endolichenic fungi against chemoresistant cancers.

---

Cancer became one of the leading causes of death worldwide, with breast, lung and colon cancers being the most prevalent. Endolichenic fungi, non-pathogenic fungi found in lichens, could offer a breakthrough by providing new bioactive compounds with anticancer potential. Currently, chemoresistance is a major challenge in cancer treatment. Our study aims to combine metabolomic analysis and biological results alongside chemical studies on endolichenic fungi extracts to isolate molecules with antiproliferative activity against chemo resistant colorectal cancer (HT-29) and triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. Thus, this work first led to the establishment of molecular networks to study the chemical diversity of endolichenic fungi extracts. This was followed by biological assays to guide chemical studies of extracts showing antiproliferative activity on one or both chemo resistant cancer lines. Finally, this approach enabled us to annotate, identify molecules in the molecular networks and isolate 13 molecules, whose antiproliferative activity on HT-29 cells was evaluated.

---

Keywords: Endolichenic fungi, *Trametes versicolor*, *Aspergillus* sp., Secondary metabolites, Antiproliferative activity, Colorectal cancer, Triple negative breast cancer.

