

# **PARTIE III : Travaux expérimentaux : Etude chimiques et biologiques d'*Hydnellum ferrugineum* et *Phellodon niger***

## **1. Matériels et méthodes utilisés**

### **1.1. Macromycètes**

*Hydnellum ferrugineum* et *Phellodon niger*, récoltés dans la région Midi-Pyrénées à Aragnouet avant le tunnel de Bielsa ont été étudiés d'un point de vue biologique et chimique. Ils ont été identifiés par Louis Chavant, Professeur de mycologie émérite de la Faculté de Pharmacie de Toulouse (Université Paul Sabatier) et sont conservés dans une mycothèque.

### **1.2. Extraction**

Chacun des champignons a été séché à l'air libre puis broyé à l'aide d'un moulin à café afin d'obtenir une poudre. Des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (cyclohexane, dichlorométhane, méthanol et eau) ont été réalisées. Cent vingt grammes de poudre de champignon avec 1 L de solvant ont été introduits dans un ballon, préalablement pesé. Ce ballon a ensuite été porté au reflux, par un chauffe ballon et un réfrigérant à boules (Figure 21). Après 5h de reflux, le contenu du ballon a été filtré sur papier filtre. Le marc obtenu a été repris par le solvant suivant qui est plus polaire. Les phases organiques et hydroalcooliques ont alors été évaporées avec un évaporateur rotatif (Büchi R-114 couplé à une pompe à vide ILMVAC) afin d'obtenir les différents extraits secs. Ceux-ci ont été pesés et conservés dans des piluliers à température ambiante à l'abri de la lumière.

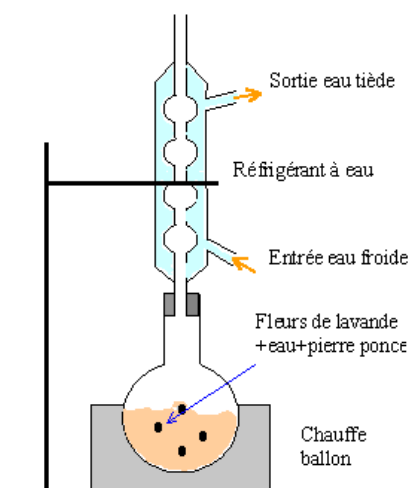


Figure 21 : Méthode d'extraction : montage au reflux

### 1.3. Evaluation de l'activité biologique des extraits sur *Haemonchus contortus*

Deux types de tests ont été réalisés à l'école vétérinaire. Le premier met en évidence le dégainement des larves et le second montre l'éclosion des œufs en larves. L'efficacité est mesurée par rapport à un témoin. Ces deux tests ont été réalisés sur une souche sensible d'*Haemonchus contortus* (JUAN) et sur une souche résistante (White River) aux anthelminthiques de synthèse : benzimidazoles et aux avermectines.

#### 1.3.1. Test d'éclosion des œufs (EHA) [64][65][66]

##### a) Récupération des œufs

Des fèces intra-anus d'animaux infestés, ont été collectées et placées dans une passoire contenant de l'eau. Les fèces ont été soigneusement écrasées jusqu'à ce que les œufs soient transférés dans l'eau. Après filtration (avec 3 gazes hydrophiles les unes au-dessus des autres), le contenu a été réparti dans 4 tubes de 45mL et centrifugé à 2500 tours par minute pendant 3 minutes à 20°C. Le surnageant a été éliminé et la phase inférieure a été transférée dans 4 tubes de 15 mL. Ces tubes ont alors été centrifugés et la phase supérieure a été éliminée à nouveau. Le culot a alors été transféré dans 2 tubes de 15 mL puis une solution saturée en sucre (640 g de sucre dans 0.5 L d'eau distillée) a été ajoutée. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions pendant 2 minutes a permis aux œufs de se retrouver dans la phase supérieure. Les œufs ont ensuite été transférés, en les « pêchant » (technique appelée *fishing*), dans un tube de 15 mL rempli de PBS.

Lorsque tous les œufs ont été transférés (leur présence a été vérifiée au microscope), quatre lavages successifs ont été effectués afin d'éliminer la solution sucrée. Cela a consisté en quatre centrifugations à 2500 tours par minute pendant 2 minutes à 20°C, le surnageant a été retiré entre chaque centrifugation et a été remplacé à nouveau par du PBS afin de diminuer la concentration en solution sucrée. A la fin des centrifugations, 10 mL de PBS ont été ajoutés et les œufs présents dans le tube ont été comptés.

## **b) Préparation des extraits**

Le contrôle négatif a été préparé avec 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans du PBS, soit 400 µL de DMSO dans 9,6 mL de PBS. Onze grammes de chaque extrait ont été dilués dans 50 µL de DMSO et 1,25 mL de PBS pour constituer une solution-mère à 8000 µg/mL. A partir de cette solution-mère, une gamme de concentrations à 4000, 2000, 1000 et 500 µg/mL a été réalisée en cascade par dilutions successives dans la même solution que le témoin négatif.

Quatre cents microlitres d'extraits de chaque concentration préparée (y compris la solution-mère) ont été déposés en quatre réplicats dans une plaque de 96 puits (Figure 22). Ensuite, 400 µL de la suspension d'œufs préalablement préparée ont été ajoutés à chaque puits de la plaque. Les concentrations finales sont ainsi de 4000, 2000, 1000, 500 et 250 µg/mL. Afin de protéger les œufs des variations de température, du PBS est ajouté en périphérie de la plaque. Enfin, la plaque a été recouverte avec du parafilm et celle-ci a été mise à l'étuve à 28°C pour une incubation de 48 heures.

Après ces 48 heures, une goutte de solution de Lugol (1 g d'iode, 2 g d'iodure de potassium et 50 mL d'eau distillée) a été ajoutée à chaque puits de la plaque pour stopper l'éclosion. Une goutte de chaque puits a ensuite été déposée sur une lame et observée au microscope, quatre fois pour chaque puits. Les œufs et les larves ont alors été comptés au microscope. La présence d'un faible nombre de larves indique qu'il y a une forte inhibition de l'éclosion des œufs et que l'extrait testé est actif. Le logiciel POLO PLUS® utilisé à l'école vétérinaire a permis de calculer des  $EC_{50}^*$  et  $IC_{95}^*$ . Une moyenne de la concentration efficace pour inhiber 50% de l'éclosion ( $EC_{50}$ ) a ainsi été calculée par les quatre réplicats de chaque concentration ainsi qu'un intervalle de confiance  $IC_{95}$ . Le test du contrôle positif, thiabendazole, a été réalisé à plusieurs concentrations : 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL sur les deux souches : sensible (JUAN) et résistante (WR).



X : ajout de PBS pour prévenir les variations de température sur la plaque

● 1<sup>er</sup> extrait testé 4 fois (colonne) à 5 concentrations différentes (B à F)

● 2<sup>nd</sup> extrait testé 4 fois (colonne) à 5 concentrations différentes (B à F)

● Témoin négatif : PBS + 4% DMSO

Figure 22 : Réalisation de la plaque pour le test EHA

### 1.3.2. Test de dégainement des larves (LEIA) [66][67]

Ce test *in vitro* a été utilisé afin d'observer l'effet anthelminthique d'un extrait de champignon sur le dégainement des larves au stade L3 dont la mue est incomplète. L'efficacité du champignon sera prouvée s'il inhibe de façon significative le dégainement des larves par rapport à un témoin. En effet, l'inhibition du dégainement chez la larve l'empêche d'acquérir son pouvoir infestant. Le test a consisté à mettre en contact les larves L3 avec des solutions de concentration croissante d'extrait de champignons. Le nombre de larves qui muent et sortent de leur gaine ont alors été comptés contre celles qui n'arrivent pas à se dégainer (Figure 23).

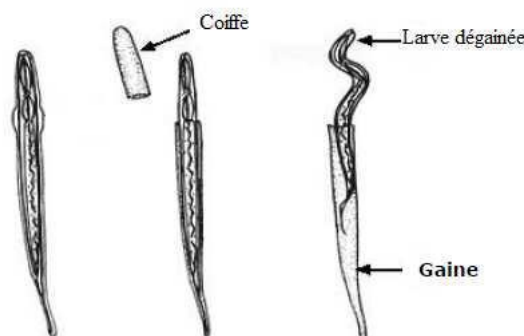


Figure 23 : *Haemonchus contortus* engainé (gauche) et dégainé (droite) [68]

#### a) Choix de l'étalon

Le dégainement artificiel des larves L3 a été induit par une solution contenant 2% d'hypochlorite de sodium et 16,5% de chlorure de sodium, appelée solution Milton®.

Avant de mettre en place le test, il a fallu au préalable déterminer la concentration en solution de Milton nécessaire pour provoquer le dégainement. Différentes dilutions ont été effectuées : 1/5, 1/4, 1/3 et au 1/2 pour donner des concentrations respectives en hypochlorite de sodium de 4 ‰, 5 ‰, 6,6 ‰ et 10 ‰. Un test de dégainement a ensuite été réalisé avec un volume égal (dilution au 1/2) de larves L3 à une concentration de 1000 larves/mL dans du PBS pour obtenir des concentrations finales respectives de 2‰, 2,5 ‰, 3,3 ‰ et 5 ‰. Puis, 40µL de chaque solution ont été prélevés toutes les 20 minutes ( $t_0$ ,  $t_{20}$ ,  $t_{40}$ ,  $t_{60}$ ), et étalés entre lame et lamelle puis fixés à la chaleur. Enfin, les larves engainées et dégainées ont été comptées. Cette expérience a été renouvelée 4 fois. La courbe obtenue pour chaque concentration en fonction du temps a permis de trouver la concentration de solution de Milton provoquant un dégainement optimal. En effet, la pente de la courbe de saturation ne doit être ni trop forte (sinon toutes les larves seraient dégainées), ni trop faible (sinon il n'y aurait pas assez de larves dégainées). La concentration de Milton, requise ici pour permettre un dégainement linéaire, progressif et total au bout de 60 minutes pour le témoin de référence, a été de 2,9 ‰ soit 0,3%.

#### **b) Protocole du test de dégainement (mise en contact des extraits avec les larves)**

Une solution mère d'extrait du champignon à tester à une concentration de 2400 µg/ml a été préparée dans du tampon phosphate salin (PBS). Un millilitre de suspension de larves L3 à 1000 larves/mL a été mis en contact avec 1 mL des différentes solutions d'extraits de champignons pour obtenir des concentrations finales dans les puits de 1200, 600, 300 et 150 µg/mL. Un contrôle négatif a été préparé avec uniquement du PBS et des larves. Les larves ont été laissées en contact avec les solutions d'extraits pendant 3 heures à 22°C et ont été agitées toutes les heures. À la fin de cette période, trois lavages successifs ont été effectués : cela a consisté en trois centrifugations à 2000 tours par minute à 20°C et 1 ml de surnageant a été remplacé par du PBS entre chaque lavage. Lors du dernier lavage, aucun ajout de PBS n'a été effectué.

#### **c) Suivi de la cinétique de dégainement**

Deux cents microlitres d'extrait à chacune des 4 concentrations ont été déposés dans un tube Eppendorf. A T=0, 40 µl de chacune de ces 4 solutions ont été déposés sur une lame afin d'observer le nombre de larves engainées et dégainées, ceci en quatre réplicats

par concentration. Cent soixante microlitres de solution Milton à 0,3% ont été ajoutés dans chaque Eppendorf puis 40 µl de chacune de ces 4 solutions ont été déposés sur une lame. Le nombre de larves a été compté à T=20, T=40 et T=60 minutes. Un contrôle positif d'épigallocatechine gallate (EGCG) a été réalisé à différentes concentrations : 37,5, 75, 150, 300 µg/mL [69]. Une moyenne de la concentration efficace pour inhiber 50% du dégagement (EC<sub>50</sub>) a ainsi été calculée par les quatre réplicats de chaque concentration grâce au logiciel POLO PLUS®.

## **1.4. Analyses chimiques**

### **1.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de type TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Allemagne). Différentes phases mobiles ont été testées. Pour les extraits bruts cyclohexane et dichlorométhane, le système d'élution toluène/acétate d'éthyle 90:10 (v/v) a été retenu. Concernant les extraits bruts méthanoliques et aqueux, l'élution a été réalisée dans un mélange n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), appelé BAW, dont la phase organique (supérieure) seulement est utilisée. Après migration des composés, une observation des plaques sous une lampe UV a été réalisée : à 254 nm et à 366 nm avec une lampe CAMAG Reprostar 3 (CAMAG, Muttenz, Switzerland). Une révélation chimique a ensuite été réalisée par pulvérisation de vanilline sulfurique. Les plaques ont été photographiées par un CAMAG ChromaCIM (CAMAG). Pour les fractions de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger* (PNM), la phase mobile a consisté en un mélange Chloroforme/Méthanol 90:10 (v/v) puis 80:20 (v/v) pour les fractions plus polaires obtenues par la suite. Pour certaines analyses CCM, le dépôt a été réalisé par un déposeur automatique de type CAMAG TLC Sampler 4 (ATS 4). Le logiciel utilisé est WinCATS® (CAMAG).

### **1.4.2. Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)**

L'appareil utilisé est LaChromUltra VWR (Hitachi, Tokyo, Japon) avec une pompe L-2160U et un injecteur L-2200U. La colonne a été maintenue à la température de 30°C par un four thermostaté L-2300. La détection a été réalisée par un détecteur à barrette de diode L-2455U. La séparation analytique des extraits méthanoliques a été réalisée sur une colonne C18 Kinetex (Phenomenex, Torrance, Etats-Unis) 2,6 µm 100A 100 x 4,6 mm.

Le débit a été de 1mL/min. Différents gradients utilisant de l'eau milliQ avec de l'acide formique et de l'acétonitrile HPLC grade (Fisher scientific, Loughborough, UK) ont été essayés. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL. Pour faire varier la résolution, différentes préparations d'échantillons, 100% MeOH ou H<sub>2</sub>O/ACN : 50:50 (v/v) et différents volumes d'injection ont été testés (10, 20 et 30 µL).

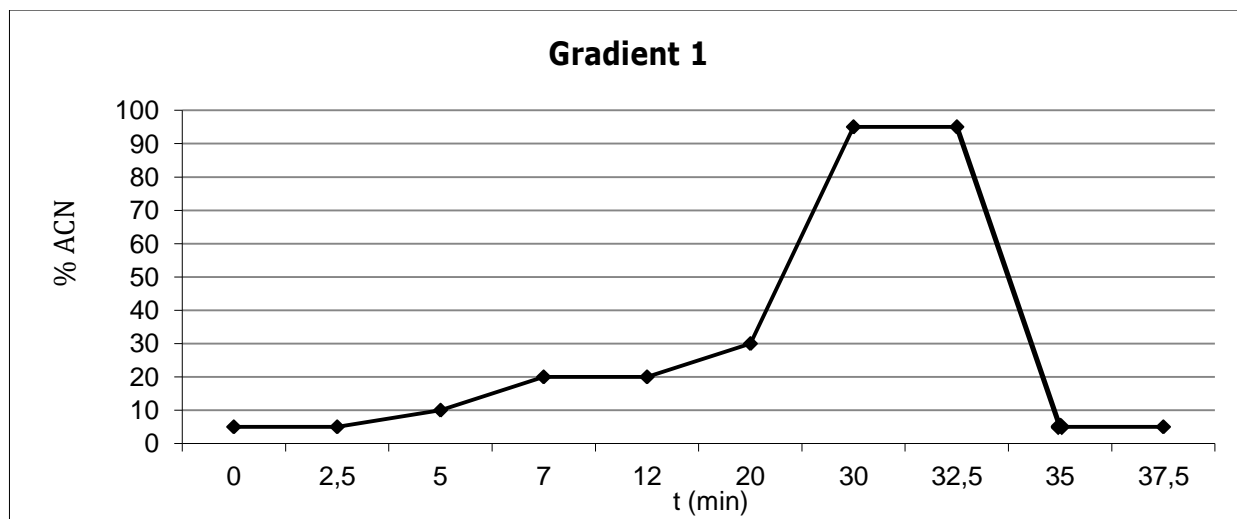


Figure 24 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la séparation en CLUHP-BD avec la colonne C18 Kinetex

Les extraits méthanoliques de *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum* ont été analysés par le gradient 1 (Figure 24), utilisant de l'acétonitrile et de l'eau milliQ + acide formique 0,1%. Le gradient a débuté avec 5% d'ACN puis différentes pentes ont été élaborées afin d'optimiser la séparation des composés présents dans ces extraits méthanoliques.

Concernant les extraits aqueux, il n'a pas été possible d'obtenir une bonne séparation avec la colonne C18 Kinetex, malgré l'augmentation, en conditions initiales, du pourcentage d'H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH à 100%.

Une colonne HILIC Luna (Phenomenex, Torrance, Etats-Unis) 5 µm 150 x 4,6 mm a alors été utilisée avec un mélange ACN/eau 90:10 (v/v) en conditions initiales avec augmentation du pourcentage de la phase aqueuse au cours du temps, gradient 2 (Figure 25). Deux tampons différents ont aussi été utilisés : formiate d'ammonium à pH 3,2 et acétate d'ammonium à pH 5,2, utilisant aussi le gradient 2.

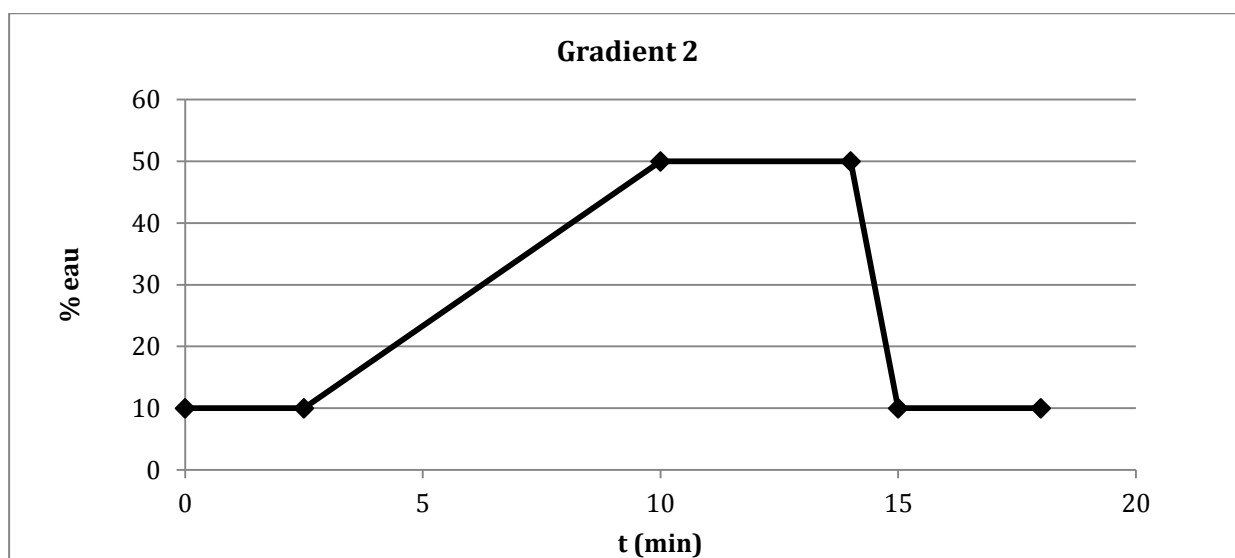


Figure 25 : Gradient ACN/eau utilisé pour la détection en CLUHP-BD avec la colonne HILIC Luna

### 1.4.3. Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type Corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)

Les analyses ont été effectuées sur un appareil de chromatographie UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) avec une pompe Dionex Ultimate 3000 RS, un injecteur Dionex Ultimate 3000 RS et une barrette de diode Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific). Un détecteur d'aérosols chargés Dionex Corona Veo (Thermo Fisher Scientific) a permis de détecter tous les types d'analytes. Le spectromètre de masse LCQ Deca XP Max (Thermo Scientific Finnigan), source ESI avec un analyseur à trappe d'ion (TI) a permis d'obtenir des analyses en mode *full scan* et en mode *data dependent scan* (fragmentation de l'ion majoritaire à chaque scan). Les paramètres de masse sont présentés dans le Tableau 11. Un splitter (Analytical Scientific instruments) a permis de détecter simultanément les composés dans chaque détecteur : barrette de diode et corona. Le logiciel utilisé pour le traitement de données est Xcalibur 4.0™ (Thermo Scientific). Un gradient de 21 min utilisant de l'acétonitrile et de l'eau avec 0,1 % d'acide formique a été mis en place, gradient 3 (Figure 26). Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL dans H<sub>2</sub>O/ACN 50:50 (v/v) pour HFM et 100% ACN pour PNM, puis filtrés sur des filtres en nylon de 0,45 µm ou sur des filtres pour Minisart® RC4 (Sartorius, Göttingen, Allemagne) avec une membrane de 0,45 µm. Un volume de 10 µL a été injecté à un débit de 0,4 ml/min.



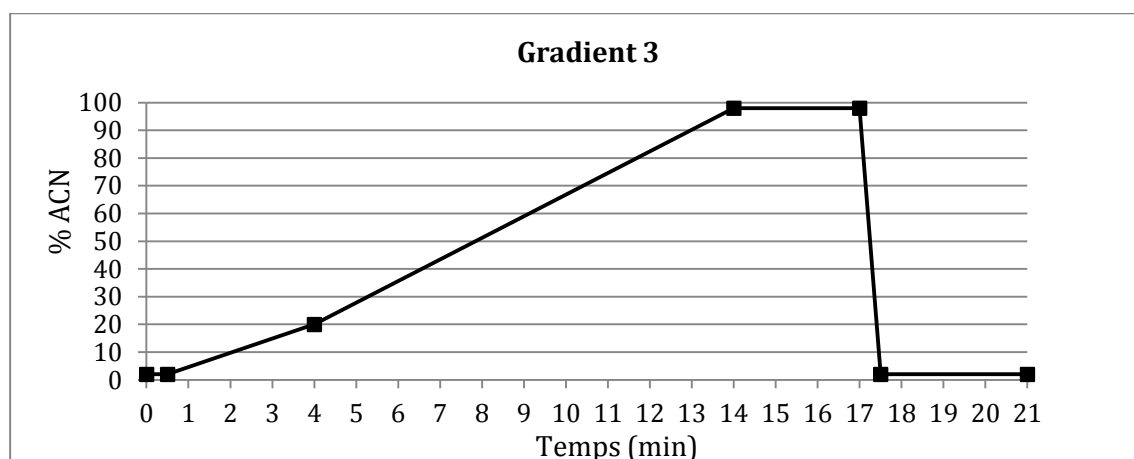


Figure 26 : Gradient ACN/eau HCOOH utilisé pour la détection en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona avec la colonne C18 Kinetex

Tableau 11 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur le LCQ

Mode d'ionisation	Positif	Négatif
Masse range	$m/z$ 50 à 2000	$m/z$ 50 à 2000
Débit du gaz vecteur	70 ua	70 ua
Débit gaz auxiliaire	15 ua	15 ua
Voltage spray	5 kV	4,5 kV
T° capillaire	350°C	350°C
Voltage capillaire	15 Volts	- 15 Volts
Tube lens offset	50 Volts	- 45 Volts
Logiciel	XCalibur	XCalibur

#### 1.4.4. Chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUP®-ESI-QToF-SM<sup>E</sup>)

Cette technique a permis d'obtenir la masse exacte des ions détectés. Les analyses ont été effectuées sur un appareil de chromatographie Acquity UPLC® (Waters, Milford, Etats-Unis). Une colonne Acquity Waters BEH C18 : 100 x 2,1 mm 1,7 µm a été utilisée avec le même gradient 3 mais utilisant de l'acide formique dans l'acétonitrile, soit H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1 % HCOOH à un débit de 0,3 mL /min. La colonne a été maintenue à 35°C. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL dans un mélange eau/ACN 50:50 (v/v) pour HFM et 100% ACN pour PNM puis filtrés sur des filtres en nylon de 0,45 µm ou sur des filtres pour Minisart® RC4 (Sartorius) avec une membrane de 0,45 µm. Un volume de 2 µL a été injecté. Les paramètres de masse sont présentés dans le Tableau 12.

L'approche SM<sup>E</sup> permet d'obtenir des informations de fragmentation dans l'étude en LC/MS de petites molécules présentes dans des mélanges complexes [70]. En réalisant des acquisitions simultanées de la masse exacte à haute et à basse énergie de collision, cette technique est capable d'élucider des informations sur la composition et la

fragmentation. Cette nouvelle technique utilise une approche dans laquelle des balayages sont acquis à basse énergie de collision dans la cellule de collision pour obtenir des informations d'ions précurseurs. En parallèle, une haute énergie de collision est alternée pour obtenir des informations telles qu'un *full scan* (balayage complet) avec les masses exactes des fragments, des ions précurseurs et des pertes de neutres (Figure 27).

Tableau 12 : Tableau des paramètres de masse de la source ESI sur QTOF

Mode d'ionisation	Positif	Négatif
Masse range	$m/z$ 50 à 1200	$m/z$ 50 à 1200
Débit Gaz de désolvatation	1100L/hr	1100L/hr
Débit Gaz Cône	20L/hr	20L/hr
Voltage Capillaire	3 kV	2,5 kV
Tube Lens offset	17 Volts	24 Volts
Température désolvatation	450°C	450°C
Energie de collision <i>Full scan</i>	6eV	6eV
Energie de collision $SM^E$	15 à 35 eV	15 à 35 eV
Logiciel	MassLynx 4.1	MassLynx 4.1

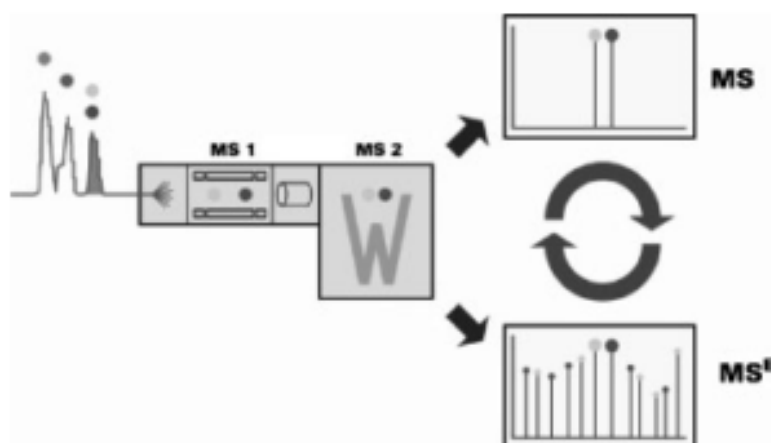


Figure 27 : Alternance de collecte de données de basse ( $MS^E$ ) et de haute énergie de collision (MS) [70]

#### 1.4.5. Chromatographie sur couche mince couplée à un spectromètre de masse (CCM-SM)

L'interface utilisée est de type CAMAG catégorie N°022.8401 et série N°181117. L'entrée de solvant se fait par la pompe CLHP LaChromUltra VWR (Hitachi) L-2160U à un débit de 0,1 à 0,3 mL/min. Le détecteur utilisé, spectromètre de masse à analyseur à trappe d'ion, est celui décrit précédemment dans les analyses par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Un piston vient prélever la tache sélectionnée sur la CCM en utilisant le l'azote à une pression de 0,4 à 0,5 bar. Un courant de solvant vient désorber les molécules de la silice. Celles-ci sont ensuite détectées par spectrométrie de masse.

## 1.5. Fractionnement

Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger* (PNM) a été réalisé sur une colonne ouverte de chromatographie. Un petit morceau de laine de verre a été préalablement déposé en bas de la colonne. La phase stationnaire a consisté en 50 g de silice Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) Merck, mis préalablement 1h à l'étuve à 70°C. La colonne a été conditionnée dans 100% de chloroforme. L'extrait étant peu soluble dans les conditions initiales d'élution, un dépôt sec a été réalisé (1 g d'extrait adsorbé sur de la silice 60 (40-63 $\mu\text{m}$ ) Merck). Ce dernier a été déposé délicatement sur la phase stationnaire et a été recouvert par du sable de Fontainebleau. La phase mobile a consisté en 200 mL de mélange de solvant de polarité croissante :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1, 97:3, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100 (v/v). Des fractions de 50 mL ont été récupérées et le solvant a été évaporé au Rotavapor® afin d'obtenir les différentes fractions sèches. Celles-ci ont été pesées et analysées en CCM. Ces fractions ont été regroupées si leur profil chimique (mêmes révélations à un même Rf) était identique (Figure 28).



Figure 28 : Montage du fractionnement de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Extraction

Les extractions successives de chaque champignon (120 g) ont permis d'obtenir 4 extraits pour chaque champignon. Des abréviations leurs ont été attribuées pour simplifier les résultats (Tableau 13).

Tableau 13 : Abréviations données aux extraits des deux champignons

	<i>Hydnellum ferrugineum</i>	<i>Phellodon niger</i>
Cyclohexane	HFC	PNC
Dichlorométhane	HFD	PND
Méthanol	HFM	PNM
Eau	HFE	PNE

Un bilan massique a été calculé en fonction de la quantité pesée au départ avant l'extraction, soit 120 g de poudre pour chaque champignon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 ci-dessous. La masse des extraits apolaires, cyclohexane et dichlorométhane, relativement faible, a mis en évidence la présence de composés très apolaires en petite quantité dans chacun des deux champignons. Les masses des extraits polaires, méthanolique et aqueux, beaucoup plus importantes, a indiqué la présence de nombreux composés polaires en petites quantités ou peu de composés mais en grande quantité.

Tableau 14 : Rendements massiques obtenus pour chaque extrait

Extrait	Masse (g) (Rendement massique en % par rapport au 120g)	Rendement en % par rapport à la masse totale d'extrait obtenue	Extrait	Masse (g) (Rendement massique en % par rapport au 120g)	Rendement en % par rapport à la masse totale d'extrait obtenue
HFC	1,73 (1,4%)	9%	PNC	2,77 (2,3%)	12%
HFD	1,06 (0,9%)	6%	PND	0,92 (0,8%)	4%
HFM	8,62 (7,2%)	47%	PNM	15,01 (12,5%)	65%
HFE	7,03 (5,8%)	38%	PNE	4,42 (3,7%)	19%
<b>Total</b>	<b>18,44 (15,3%)</b>	<b>100 %</b>	<b>Total</b>	<b>23,2 (19,3%)</b>	<b>100 %</b>

### 2.2. Evaluation de l'activité biologique des extraits sur *Haemonchus contortus*

Les extraits obtenus précédemment par l'extraction au reflux ont chacun été testés sur le parasite *Haemonchus contortus*. La réalisation de deux tests différents afin de déterminer l'activité anthelminthique, d'une part sur une souche sensible (JUAN) et

d'autre part, sur une souche résistante (WR) aux benzimidazoles et aux avermectines ont été réalisés à l'école vétérinaire de Toulouse.

### 2.2.1. Test d'éclosion des œufs (EHA)

Le test d'éclosion des œufs permet de déterminer l'activité anthelminthique. La présence d'un faible nombre de larves indique qu'il y a une forte inhibition de l'éclosion des œufs due à l'extrait testé. Les résultats sont présentés (Tableau 16) pour la souche sensible (JUAN) et (Tableau 17) pour la souche résistante (WR). L'EC<sub>50</sub> est donc la moyenne des concentrations pour laquelle 50% d'inhibition de l'éclosion est induite. Les extraits ont été testés à 5 concentrations : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL. Concernant le témoin positif, le thiabendazole, les résultats sont présentés dans le Tableau 15. Il a été testé aux concentrations suivantes : 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL.

Tableau 15 : Résultats du test EHA du témoin positif, le thiabendazole, sur la souche sensible (JUAN) et sur la souche résistante (WR)

Concentration (µg/mL)	% éclosion (JUAN)	% inhibition (JUAN)	% éclosion (WR)	% inhibition (WR)
10	0	100	13,9	86,1
5	0	100	7,5	92,5
2,5	0	100	11,2	88,8
1,25	0,1	99,9	5,5	94,5
0,6	0	100	8,5	91,5
0,3	0	100	12,3	87,7

Aucune valeur d'EC<sub>50</sub> n'a pu être déterminée car elle est inférieure à la plus faible concentration testée. Pour la souche sensible, 0 % d'éclosion signifie que le thiabendazole exerce totalement son activité d'inhibition sur l'éclosion des œufs en larves. Concernant la souche résistante, le thiabendazole n'exerce pas totalement son activité d'inhibition de l'éclosion puisque le pourcentage d'éclosion est supérieur à 0 %. Cependant, il est constaté que l'activité du thiabendazole sur les deux souches est non dose-dépendante dans la gamme de concentrations testées. Une variabilité des résultats est observée. Il serait nécessaire de répéter les tests plusieurs fois afin de calculer des écarts-types.

Tableau 16 : Résultats du test EHA sur la souche sensible (JUAN) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>95</sub> (µg/mL) inférieur	IC <sub>95</sub> (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	533,2	398,4	658,9
<i>P. niger</i>	méthanol	1942,2	1839,0	2046,6
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	Dichlorométhane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	809,9	744,8	874,7
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	2944,4	2376,8	3256
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
Témoin positif	thiabendazole	0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL***		

\* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL

\*\*\* Aucune EC<sub>50</sub> n'a pu être déterminée pour le témoin car la valeur est inférieure à la plus faible concentration testée

D'après le Tableau 16, les extraits plutôt polaires, aqueux et méthanoliques, présentent une activité inhibitrice de l'éclosion des œufs sur la souche sensible. A l'inverse, les extraits plus apolaires, cyclohexane et dichlorométhane, n'ont pas présenté d'activité dans la gamme de concentrations testées.

L'extrait aqueux de *Phellodon niger* s'est révélé avoir une activité inhibitrice sur l'éclosion la plus importante, avec une valeur d'EC<sub>50</sub> de 533,2 µg/mL. Par comparaison avec le témoin positif, l'extrait PNE est donc moins actif que l'anthelminthique de synthèse, thiabendazole. Néanmoins, l'extrait testé est un extrait brut, c'est-à-dire un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. Cependant, il est difficile de chiffrer cette différence d'activité puisqu'une variabilité des résultats est observée.

Il est donc nécessaire de poursuivre par un fractionnement afin de déterminer la substance responsable de l'activité.

Tableau 17 : Résultats du test EHA sur la souche résistante (WR) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>95</sub> (µg/mL) inférieur	IC <sub>95</sub> (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	<b>408,2</b>	353,2	464,3
<i>P. niger</i>	méthanol	760,7	733,5	787,9
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	894,8	673,2	1146,5
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	ACTIF (entre 600 et 1200 µg/mL)**		
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	INACTIF*		
Témoin positif	thiabendazole	0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 et 10 µg/mL***		

\* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL

\*\* Aucune valeur n'a pu être calculée par le logiciel POLO PLUS®

\*\*\* Aucune EC<sub>50</sub> n'a pu être déterminée pour le témoin car la valeur est inférieure à la plus faible concentration testée

D'après le Tableau 17, les extraits aqueux et méthanoliques des deux champignons présentent une activité inhibitrice sur l'éclosion des œufs de la souche résistante, aux concentrations testées. A l'inverse, les résultats ont montré que les extraits cyclohexane et dichlorométhane ne présentent pas d'activité inhibitrice dans la gamme de concentrations testées sur cette souche résistante. Aucune inhibition de l'éclosion n'a été observée, même à 4000 µg/mL, plus forte concentration testée.

L'extrait PNE se révèle avoir l'activité inhibitrice la plus importante des extraits testés sur la souche résistante avec une valeur d'EC<sub>50</sub> de 408,2 µg/mL. Néanmoins, l'extrait testé est un extrait brut, c'est-à-dire un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. Cependant, il est difficile de chiffrer cette différence d'activité puisqu'une variabilité des résultats est observée.

Au vu des résultats du test sur l'éclosion des œufs, les extraits les plus intéressants à étudier sont d'abord, les extraits aqueux puis les extraits méthanoliques.

## 2.2.2. Test de dégagement des larves (LEIA)

Le second test réalisé a été un test de dégagement des larves au stade L3. Le nombre de larves qui muent et sortent de leur gaine a été compté par comparaison à celles qui n'arrivent pas à se dégainer. L'extrait présente donc une activité s'il inhibe le dégagement. Une gamme a été réalisée avec les concentrations suivantes : 150, 300, 600, 1200 µg/mL. Les résultats des extraits sont présentés pour le test sur la souche

sensible (Tableau 18) et pour le test sur la souche résistante aux benzimidazoles et aux avermectines (Tableau 19).

D'après le Tableau 18, les extraits dichlorométhane, cyclohexane et aqueux ne présentent pas d'activité inhibitrice du dégainement des larves de la souche sensible, aux concentrations testées. L'extrait PNM est le plus actif des extraits sur l'inhibition du dégainement, avec une valeur d'EC<sub>50</sub> de 480,4 µg/mL, soit 4 fois moins actif que le contrôle positif, l'épigallocatechine gallate (ECGC) (EC<sub>50</sub> de 108,6 µg/mL). Comme précédemment lors du test EHA, ceci peut s'expliquer par le fait que l'extrait testé est un mélange complexe de molécules alors que le témoin est une molécule pure. En revanche, le logiciel n'a pas pu calculer de valeur pour HFM sur la souche sensible.

Tableau 18 : Résultats du test LEIA sur souche sensible (JUAN) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>95</sub> (µg/mL) inférieur	IC <sub>95</sub> (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	méthanol	480,4	449,1	513,2
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	***		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	840,4	788,8	895,3
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	ACTIF (entre 600 et 1200 µg/mL)**		
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	***		
EGCG	contrôle positif	108,6	98,7	119,4

\* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 150, 300, 600, 1200 µg/mL

\*\* Aucune valeur précise n'a pu être calculée avec le logiciel POLO PLUS®

\*\*\* Non testé car extrait non soluble dans le DMSO

Tableau 19 : Résultats du test LEIA sur souche résistante (WR) des différents extraits

CHAMPIGNON	EXTRACTION	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>95</sub> (µg/mL) inférieur	IC <sub>95</sub> (µg/mL) supérieur
<i>P. niger</i>	eau	817,8	772,9	863,9
<i>P. niger</i>	méthanol	198,0	188,3	209,6
<i>P. niger</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>P. niger</i>	dichlorométhane	***		
<i>H. ferrugineum</i>	eau	791,5	554,9	1343,3
<i>H. ferrugineum</i>	méthanol	328,8	276,7	386,6
<i>H. ferrugineum</i>	cyclohexane	INACTIF*		
<i>H. ferrugineum</i>	dichlorométhane	***		
EGCG	contrôle positif	165,6	117,8	223,9

\* Aucune activité inhibitrice sur l'éclosion aux concentrations testées : 150, 300, 600, 1200 µg/mL

\*\*\* Non testé car extrait non soluble dans le DMSO



D'après le Tableau 19, les extraits dichlorométhane et cyclohexane ne présentent pas d'activité inhibitrice du dégainement des larves de la souche résistante, aux concentrations testées. L'extrait PNM se révèle être l'extrait le plus actif sur l'inhibition du dégainement avec une valeur d'EC<sub>50</sub> de 198,0 µg/mL, du même ordre de grandeur que l'EC<sub>50</sub> du contrôle positif, ECGC (EC<sub>50</sub> de 165,6 µg/mL). L'objectif d'utiliser ce témoin positif, épigallocatechine gallate riche en tanins, est de comparer l'activité des extraits de champignons aux tanins, préalablement étudiés à l'ENVT [69].

Au vu des résultats du test sur le dégainement des larves, les extraits les plus intéressants à étudier sont d'abord, les extraits méthanoliques des deux champignons puis leurs extraits aqueux.

### **2.2.3. Bilan sur l'activité des extraits**

Ces deux tests montrent tous les deux l'activité anthelminthique des différents extraits sur une souche sensible et sur une souche résistante aux benzimidazoles et aux avermectines. Les extraits méthanoliques et aqueux de chacun des deux champignons se sont révélés être les extraits les plus actifs et ont été analysés en chimie pour en étudier la composition.

## **2.3. Analyses chimiques des extraits bruts des deux macromycètes**

Après les résultats d'activité biologique, les extraits ont ensuite été analysés afin d'étudier la composition de l'extrait.

### **a) Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Dans un but analytique, et afin de comparer les profils chimiques des différents extraits, ceux-ci ont été analysés en CCM. Les extraits ont été déposés sur des plaques CCM et ont été élués dans différents solvants afin d'observer la complexité de chaque extrait. Après élution, une observation des plaques sous une lampe UV a été réalisée : à 254 nm et à 366 nm. Une révélation a ensuite été accomplie par pulvérisation de vanilline sulfurique (Figure 29).

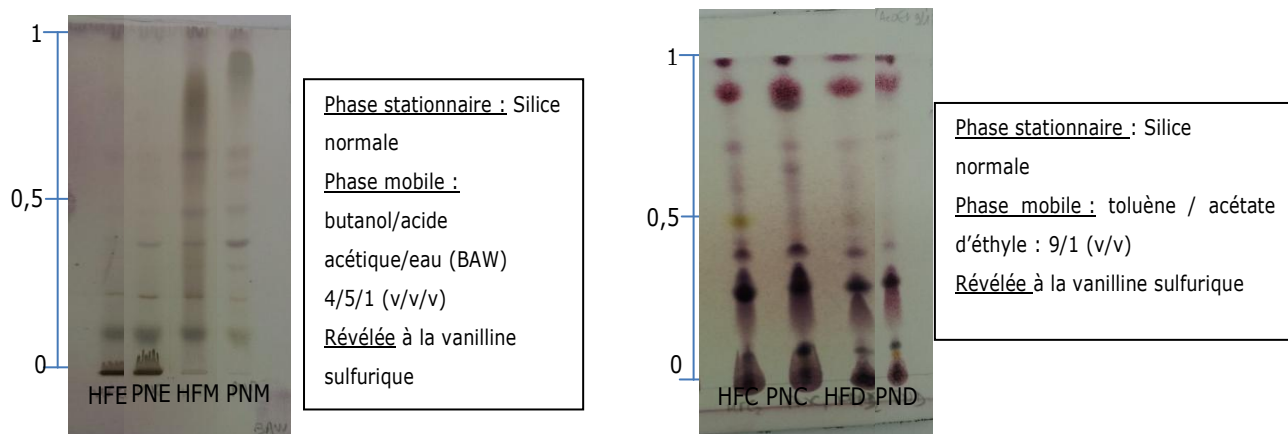


Figure 29: CCM des extraits polaires HFE, PNE et HFM, PNM (gauche) et CCM des extraits apolaires HFC, PNC et HFD, PND (droite)

Concernant les extraits aqueux, à gauche sur la Figure 29, les composés ont une très forte affinité pour la silice. Il a donc été difficile de faire éluer les composés dans le BAW avec des Rf communs entre les deux champignons : 0,11, 0,22 et une tache en plus pour PNE avec un rapport frontal (Rf) de 0,38. D'autres systèmes ont été essayés, tels que chloroforme / méthanol / eau 65:45:10 (v/v/v) ou chloroforme / méthanol / acide acétique / eau : 60:32:12:8 (v/v/v/v) dans le but de protonner tous les composés pour qu'ils restent moins adsorbés sur la silice. L'élution n'a pas été suffisante ( $R_f < 0,3$ ) pour ces deux systèmes et des traces ont été observées au lieu de taches. Le BAW a cependant été le système d'élution le plus approprié pour séparer les composés des extraits méthanoliques. Plusieurs taches ayant des Rf identiques entre HFM et PNM ont été observées : 0,11, 0,22, 0,39, 0,46. Une tache à un Rf de 0,77 pour HFM et de 0,89 pour PNM a permis de les différencier.

Concernant les extraits plus apolaires (Figure 29 droite), le système d'élution choisi, toluène / acétate d'éthyle 9:1 (v/v), a permis d'éluer un grand nombre de composés dont certains ayant des Rf identiques pour les quatre extraits HFC, PNC, HFD et PND (Rf : 0,06, 0,26, 0,33, 0,38, 0,69, 0,87 et 1). Cependant, une tache jaune à la vanilline sulfurique (Rf : 0,47) a été retrouvée sur les deux extraits cyclohexane et dichlorométhane d'*Hydnellum ferrugineum* mais n'a pas été observée dans les mêmes extraits chez *Phellodon niger*. Une tache dans l'extrait PNC (Rf : 0,62) a aussi été détectée.

Les profils des deux champignons pour chaque type d'extrait ont des profils chromatographiques très similaires ; il semblerait alors que leur composition soit relativement proche. Afin d'approfondir cette étude chimique, des analyses en CLUP-UV-SM ont été réalisées.

## **b) Extraits aqueux des deux macromycètes**

Concernant les extraits aqueux, il a été très difficile d'obtenir une bonne séparation. Les composés étant très polaires, ils ont peu d'interactions avec la phase stationnaire C18 apolaire. Après injection de 10 µL de l'extrait aqueux d'*Hydnellum ferrugineum* à 10 mg/mL, un pic a été mis en évidence sur le chromatogramme, à un temps de rétention très proche de celui du pic d'injection. Afin d'optimiser l'analyse, différents gradients ont été essayés, notamment en augmentant le pourcentage d'eau dans les conditions initiales, 100 % H<sub>2</sub>O + 0,1 % HCOOH au lieu de 95% dans la méthode décrite (Figure 24). Cependant, aucun gradient ne s'est avéré concluant pour une bonne séparation des composés contenus dans chacun des deux extraits aqueux. La phase stationnaire C18 n'étant pas adaptée à l'étude de ces composés polaires, un changement de phase stationnaire a alors été envisagé. Différentes analyses ont alors été réalisées en utilisant une phase stationnaire de type HILIC, plus adéquate pour ce type de composés, et un gradient 2 ACN/H<sub>2</sub>O (Figure 25) comme phase mobile. Malgré l'utilisation de tampons acétate d'ammonium et formiate d'ammonium, aucune séparation satisfaisante n'a pu être obtenue.

L'étape de mise au point n'a donc pas été concluante avec les deux extraits aqueux. Aucune des deux phases stationnaires n'a été adaptée pour la séparation de ces extraits.

Ainsi, au vu des résultats d'activité biologique intéressants, de la plus grande facilité d'analyse en chromatographie liquide, et de la quantité d'extrait obtenue, il a été choisi de réaliser une étude plus approfondie des extraits méthanoliques d'*Hydnellum ferrugineum* et de *Phellodon niger*.

## **c) Extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum***

### **Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)**

L'utilisation de cette technique a permis de réaliser une étape de mise au point de la méthode de séparation et de faire une analyse préliminaire de la composition chimique

des différents extraits avant de les analyser en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona ou en CLUP®-ESI QToF-SM<sup>E</sup>. Concernant les extraits méthanoliques pour les deux macro-mycètes, le gradient utilisé (ACN/H<sub>2</sub>O + 0,1 % HCOOH), après optimisation, est celui représenté sur le gradient 1 (Figure 24). Avec la colonne C18 utilisée, le pourcentage d'ACN est augmenté au cours du temps afin d'éluer les composés moins polaires. La mise au point de la méthode a été réalisée par modification de la préparation de l'échantillon et du volume injecté afin d'obtenir une meilleure résolution. Un chromatogramme expliquant ces différentes modifications est présenté (Figure 30) pour HFM. Les conditions optimales retenues pour les analyses ultérieures de l'extrait HFM ont consisté en l'injection de 10 µL d'échantillon préparé dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50:50 (v/v) (chromatogramme rose).

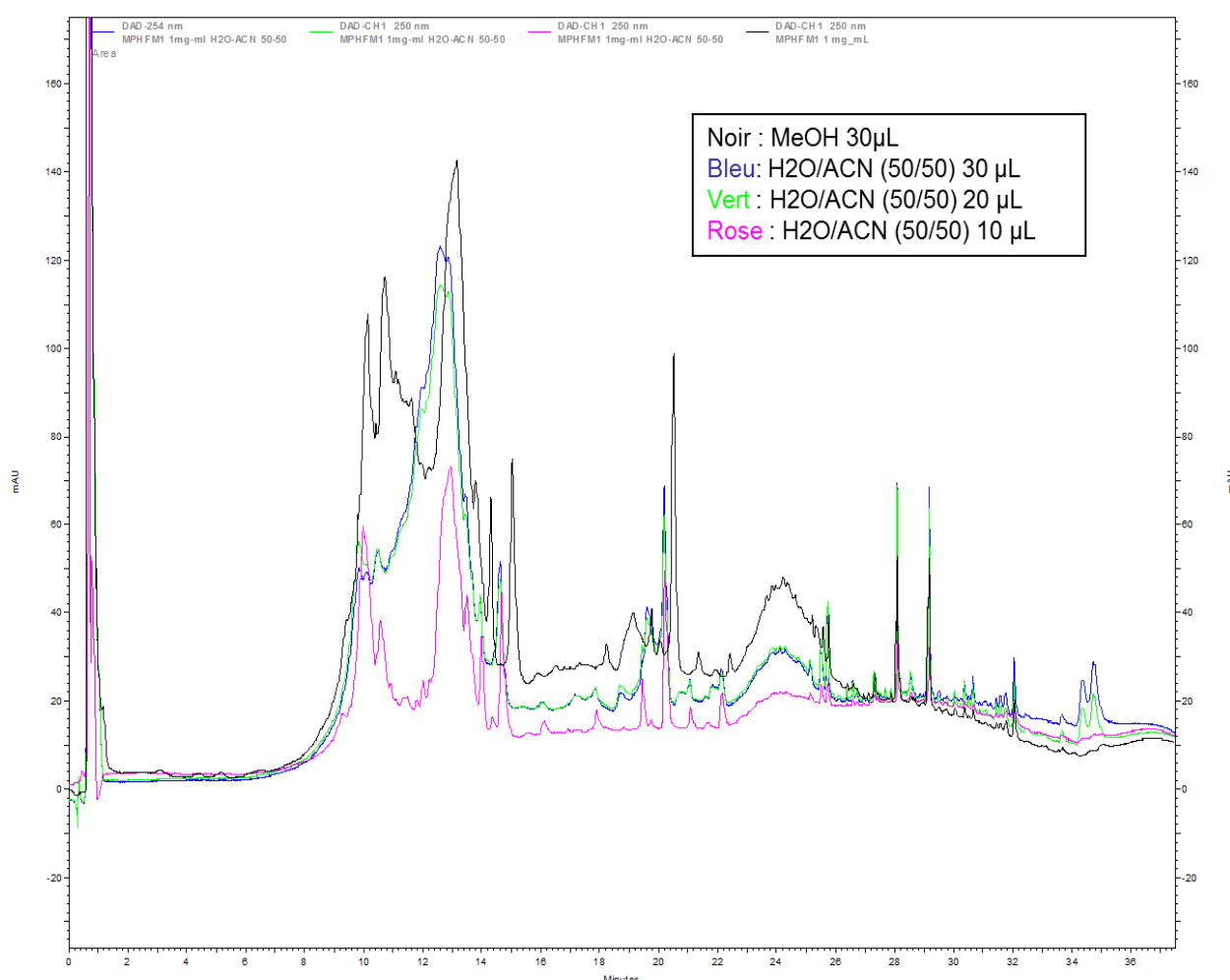


Figure 30 : Zoom de la comparaison de la préparation et du volume d'injection sur HFM en CLUHP-BD

L'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum* a révélé une composition assez complexe avec de nombreux pics observés dans le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose en Figure 30). Les composés présents dans l'extrait semblent relativement difficiles à séparer, dans ce système, malgré l'étape d'optimisation préalable.

Afin d'avoir plus d'informations sur les composés présents dans l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, des analyses en CLHP-SM/SM ont été réalisées.

### **Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)**

La mise au point réalisée en CLUHP-BD avec le gradient 1 n'a pas été reproductible en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Un nouveau gradient a donc été optimisé (Gradient 3 Figure 26).

En mode d'ionisation positive (Figure 31), l'extrait HFM a montré un profil relativement complexe notant la présence de nombreux pics mal résolus entre 5 et 7 min sur le total scan (a) et à 254 nm (c). Le Corona (b) indique aussi la présence de nombreux composés élués à des temps de rétention proche de ceux détectés sur le total scan (a) et d'autres pics élués plus tardivement qui ne seront pas analysés ici puisqu'ils ne sont pas visibles sur le total scan, et donc non observable dans les longueurs d'onde classiques (254 (c) et 366nm). Le chromatogramme CLUHP-ESI-TI-SM (d) a mis en évidence la présence de nombreux pics notamment entre 5 et 7 min dont les pics **1** et **2** à des temps de rétention respectivement de 6,3, 7,4 min. D'autres pics sont aussi présents sur le chromatogramme (d) dont les pics **3, 4, 5** et **6** à des temps de rétention respectifs de 10,3, 11, 11,8 et 12,6 min. Ces pics (**1** à **6**) ont été analysés plus en détails. Les spectres de masse de ces composés sont présentés ci-dessous (Figure 32 et Figure 34).

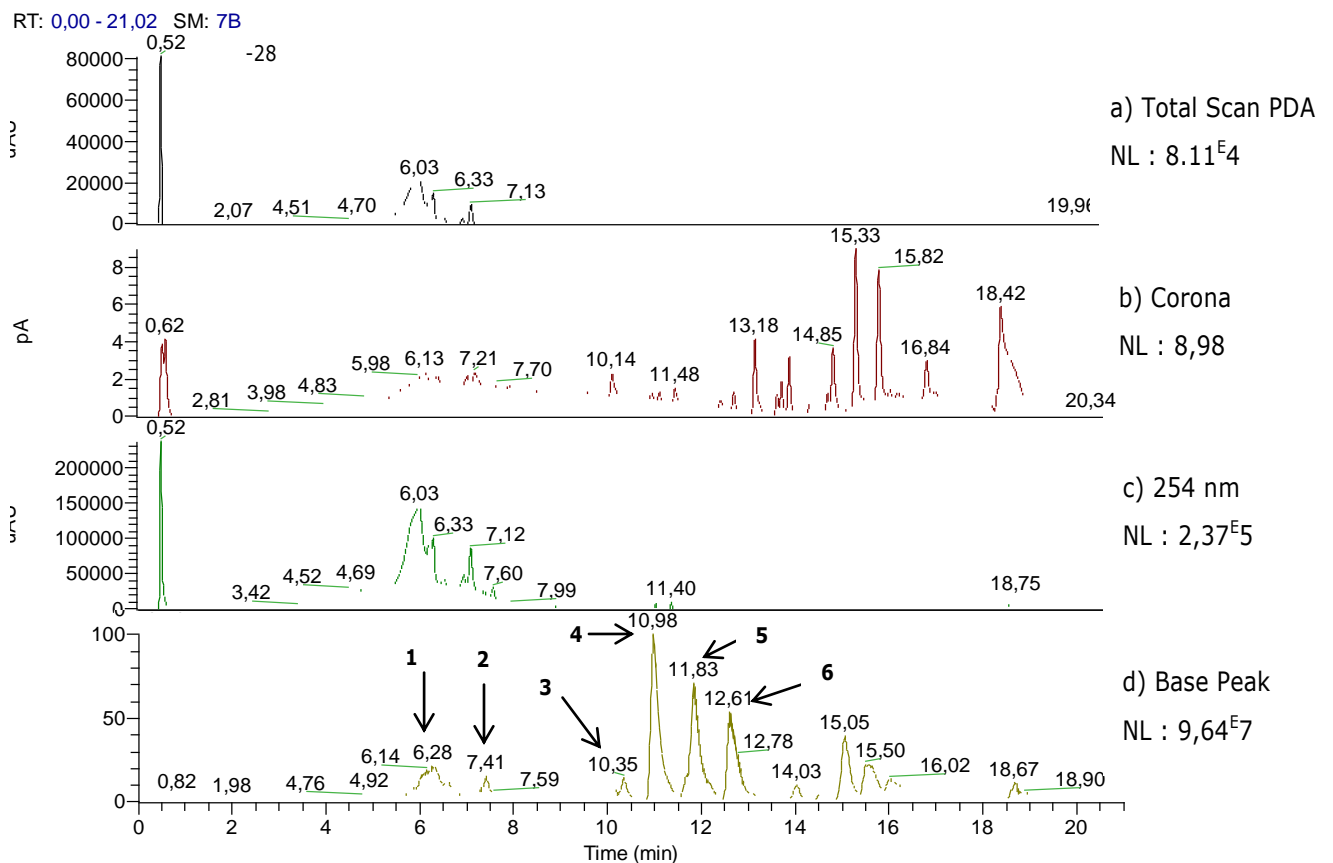


Figure 31 : Extrait de *H. ferrugineum* méthanolique en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d)

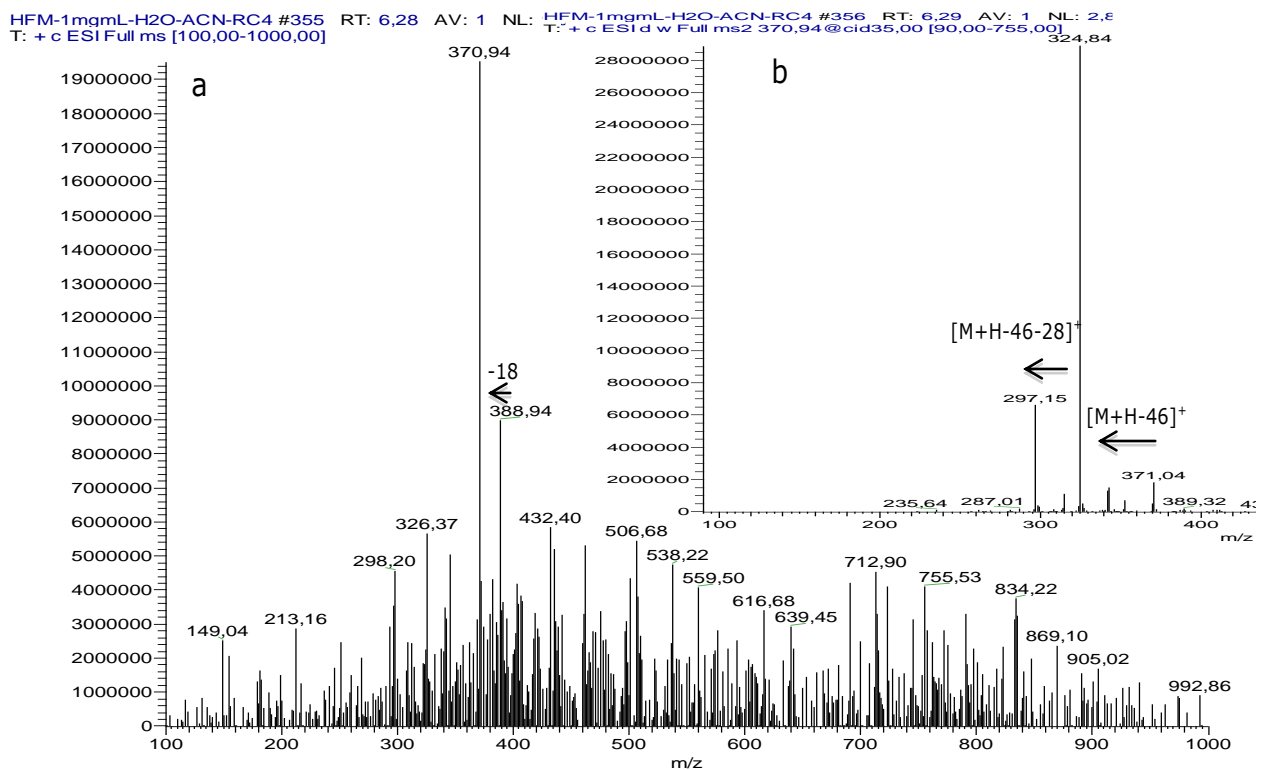


Figure 32 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 6,3 min), en mode positif d'ionisation *full scan* (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en *data dependent scan* (b)

Le spectre obtenu pour le pic **1** met en évidence la présence d'un ion majoritaire de  $m/z$  370,94 (Figure 32). Cet ion peut correspondre à l'adduit proton  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 370 g/mol ou à l'adduit sodium  $[M+Na]^+$  d'une molécule de MM 348 g/mol. Le spectre de fragmentation montre la présence de deux ions fragments de  $m/z$  324,84 correspondant à  $[M+H-46]^+$ , probablement la perte d'un  $[CO + H_2O]$  pouvant traduire la présence d'une fonction acide carboxylique dans la molécule, et de  $m/z$  297,15 correspondant à  $[M+H-46-28]^+$ . La perte de 28u pourrait correspondre à la perte d'un groupement carbonyle ou  $N_2$  ou  $C_2H_4$ . L'analyse en mode négatif n'a pas permis de mettre en évidence l'adduit  $[M-H]^-$  correspondant à ce même temps de rétention.

La Figure 32 a révélée également la présence d'un ion de  $m/z$  388,94. Dans la littérature [62], Gripenberg a isolé deux pigments l'hydnuferrogine (**36**) (MM 370 g/mol) et l'hydnuferroginine (**37**) (MM 388 g/mol) (Figure 33). Il pourrait s'agir des deux molécules co-éluées puisque le chromatogramme est mal résolu entre 5 et 7 min. Un réarrangement à partir d'un précurseur commun tel qu'une terphénylquinone (**39**) en hydnuferrogine pourrait donner l'ion de  $m/z$  370,94 majoritaire (Figure 33) [62]. La terphénylquinone pourrait être présente dans l'extrait puisqu'elle est décrite dans la littérature pour cette espèce [71]. La molécule (**39**) préalablement identifiée comme une terphénylquinone par Gripenberg en 1981 [62] est identifiée comme la variegatine par Liu en 2006 [71]. Il pourrait aussi s'agir de la molécule de MM 388 g/mol qui perd une molécule d'eau spontanément dans la source afin de donner l'ion de  $m/z$  371.

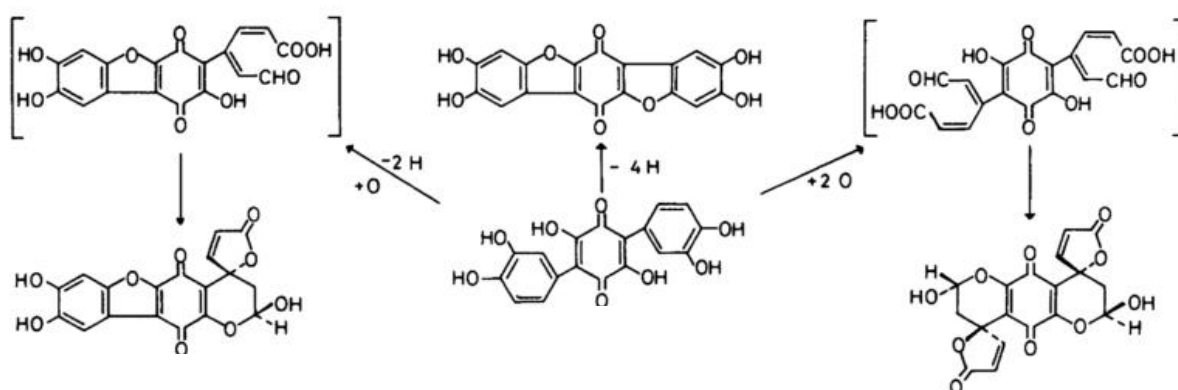


Figure 33 : Réarrangement à partir d'une terphénylquinone (**39**) en hydnuferroginine (**36**) ou en hydnuferrogine (**37**) ou en acide théléphorique (**38**) d'après Gripenberg en 1981 [62]

Après analyse des données de masse, il s'est avéré que les pics **3**, **4**, **5** et **6** (Figure 31) correspondent très probablement à des contaminants, car ils sont retrouvés dans toutes

les analyses réalisées. Une étude bibliographique nous a permis de supposer très fortement la présence de sels de benzylalkylmethylammonium dans nos extraits [72]. Ces pics sont détectés à des temps de rétention de 10,03 min avec un ion de  $m/z$  304,26 pour **3**, à 10,62 min avec un ion de  $m/z$  332,28 pour **4**, à 11,68 min avec un ion  $m/z$  de 360,29 pour **5** et à 12,51 min avec un ion de  $m/z$  388,39 pour **6**. Il s'agirait de sels présents dans des désinfectants ou agents anti-corrosion.

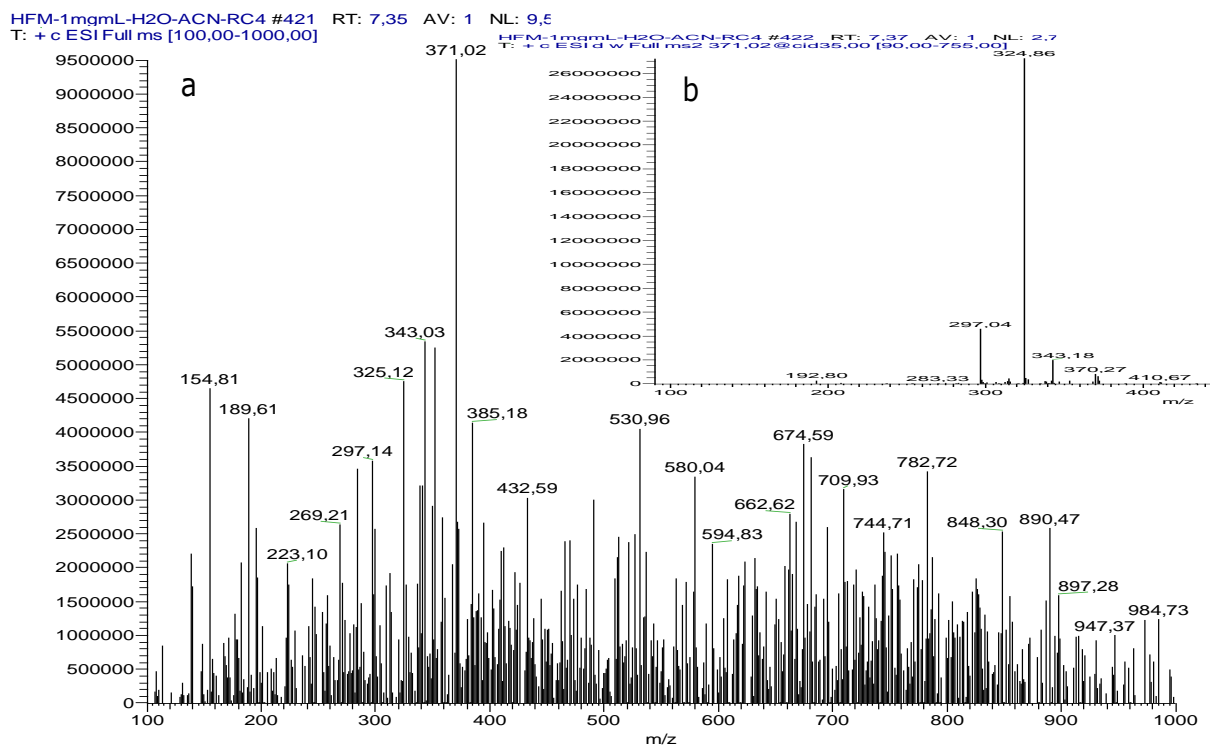


Figure 34 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 7.40 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en « *data dependent scan* » (b)

D'après la Figure 34, le spectre met en évidence la présence d'un ion majoritaire de  $m/z$  371,06. Cet ion peut correspondre à l'adduit proton  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 370 g/mol ou à l'adduit sodium  $[M+Na]^+$  d'une molécule de MM 348 g/mol. Le spectre de fragmentation montre la présence de deux ions fragments de  $m/z$  324,86 correspondant à  $[M+H-46]^+$ , probablement la perte de 28u et d'eau, et  $m/z$  297,04 correspondant à  $[M+H-46-28]^+$ . La perte de 28u pourrait correspondre à la perte de CO ou N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Il est probable que la perte de 28u soit plutôt corrélée à la perte d'un groupement carbonyle dans ce cas puisque les composés identifiés dans la littérature pour cette espèce présentent des groupements carbonyles. Cette hypothèse mérite d'être confirmée en spectrométrie de masse haute résolution. Les fragments obtenus sont les mêmes que ceux présents pour le pic **1**, ce qui peut laisser supposer des molécules de même famille.



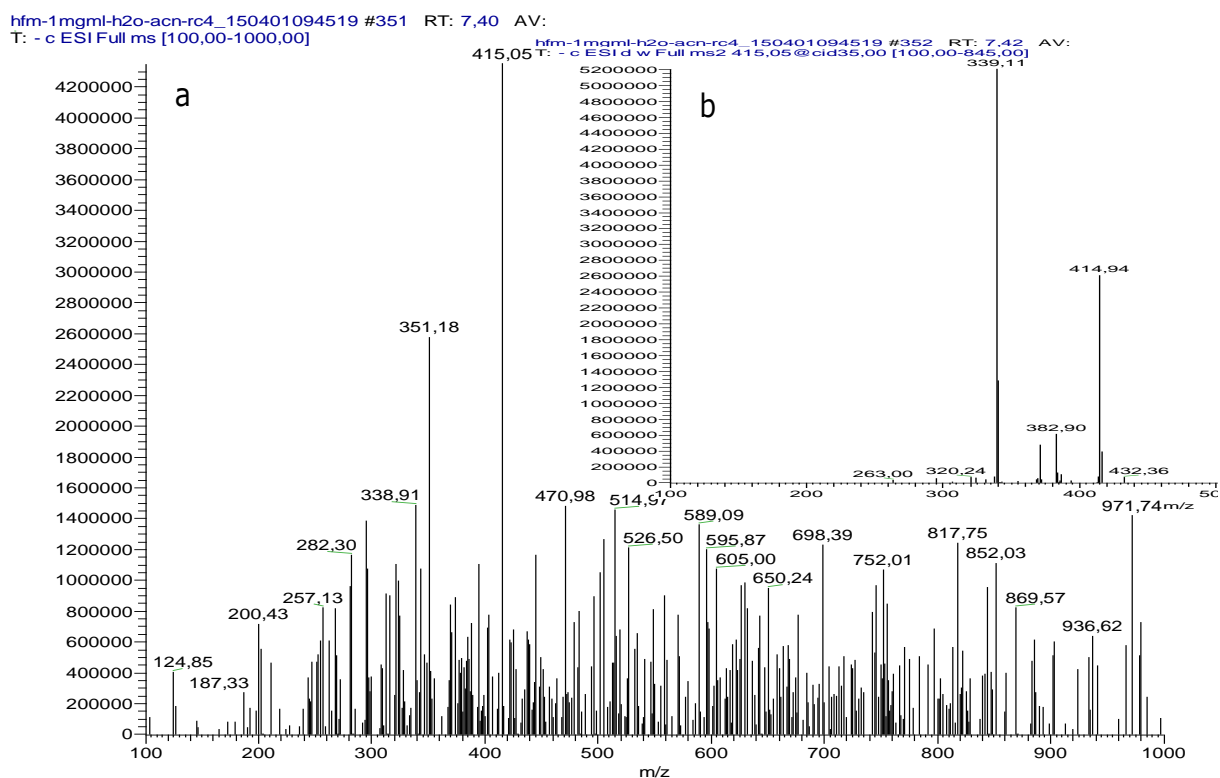


Figure 35 : Spectre de masse du pic 2 de HFM (TR : 7,40 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en mode *data dependent scan* (b)

Le spectre en mode d'ionisation négative révèle la présence d'un ion de  $m/z$  415,01 correspondant à  $[M+HCOOH-H]^-$  (Figure 35). Il pourrait aussi s'agir de la molécule supposée précédemment, ayant pour MM 370 g/mol, l'hydnuferrogine.

### Conclusion sur l'analyse de l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*

L'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum* a révélé une composition assez complexe en CLUHP-BD avec de nombreux pics observés dans le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose Figure 30) avec le gradient 1.

Dans l'analyse de l'extrait HFM, deux pics ont été annotés précédemment, **1** avec deux ions majoritaires de  $m/z$  370,94 et  $m/z$  388,94 et **2** avec un ion de  $m/z$  371,06.

Dans la littérature [62], Gripenberg a isolé deux pigments l'hydnuferrogine (**36**) (MM 370 g/mol) et l'hydnuferroginine (**37**) (MM 388 g/mol). D'après les log P déterminés pour les structures isolées de la littérature, log P = -2,6 pour l'hydnuferrogine (MM 370 g/mol) et log P = -4,9 pour l'hydnuferroginine (MM 388 g/mol), on pourrait supposer que l'hydnuferroginine serait plus polaire et donc moins retenue sur la colonne et aurait un temps de rétention inférieur à l'hydnuferrogine. Le pic **1** pourrait être l'hydnuferroginine et le pic **2** pourrait être l'hydnuferrogine. Cependant, pour le pic **1**, il peut aussi s'agir de plusieurs molécules co-éluées au vu de l'allure du pic sur le chromatogramme (d) (Figure

31). Une optimisation du gradient afin de mieux séparer ces deux molécules co-éluées lors de l'analyse CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona pourrait être envisagée.

Des réarrangements chimiques au sein de la source d'ionisation pourraient être supposé. L'un des plus probables serait alors la perte d'une molécule d'eau dans la source de l'ion  $m/z$  388,9 pour donner l'ion  $m/z$  370,9. Le pic **1** pourrait correspondre à une molécule de MM 388 g/mol telle que l'hydnuferugine, hypothèse corrélée avec les log P.

Une analyse complémentaire en CLUP-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup> pourrait confirmer l'hypothèse d'une formule brute  $C_{18}H_{12}O_{10}$  correspondant à l'hydnuferugine et  $C_{18}H_{10}O_9$  correspondant à l'hydnuferugine. Cette analyse a été réalisée, cependant la présence de contaminants majoritaires empêche de voir les composés réellement présents dans l'extrait. Ces contaminants ont été identifiés comme étant du nylon, composé présent dans les filtres utilisés pour la préparation de l'échantillon. Ces résultats ne sont donc pas présentés ici puisqu'ils ne sont pas interprétables. Cet appareil étant sur un plateau technique commun à l'université ; la réalisation de ces analyses est limitée.

Afin de compléter ces hypothèses, un fractionnement pourrait être réalisé afin de parvenir à une fraction pure pour l'analyser en RMN afin d'obtenir la structure de ces molécules correspondant aux pics **1** et **2** (Figure 31).

#### **d) Extrait méthanolique de *Phellodon niger***

##### **Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (CLUHP-BD)**

De la même manière que pour l'analyse en CLUHP-BD pour l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, le gradient utilisé (ACN/H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH), après optimisation, est celui représenté sur le gradient 1 (Figure 24). La mise au point de la méthode a été réalisée par modification de la préparation de l'échantillon et du volume injecté afin d'obtenir une meilleure résolution.

Un chromatogramme expliquant ces différentes modifications est présenté (Figure 36) pour PNM. La meilleure résolution a été obtenue en injectant 30  $\mu$ L d'extrait solubilisé dans 100 % MeOH (en rose sur le chromatogramme).

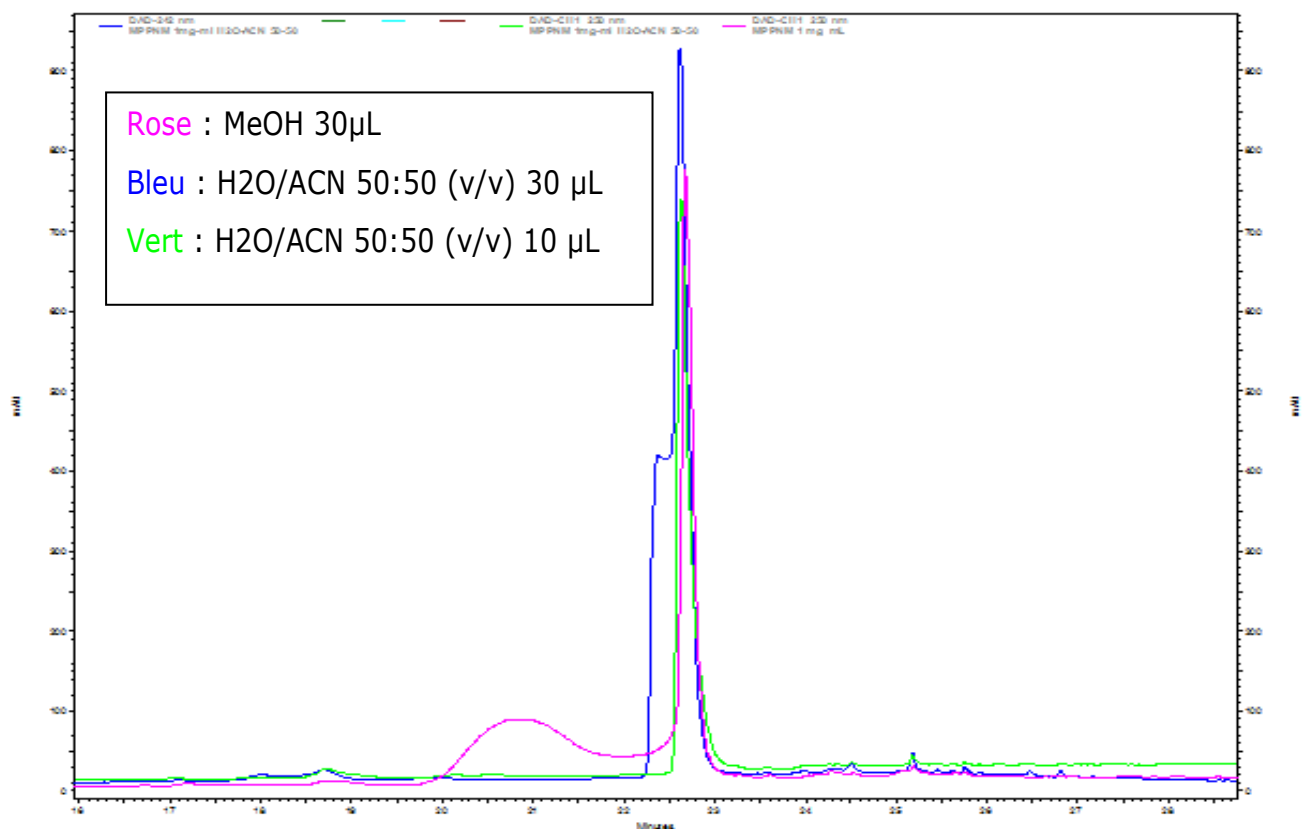


Figure 36 : Comparaison de la préparation et du volume d'injection de l'extrait PNM en CLUHP-BD

L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a présenté un profil chromatographique plus simple que celui d'*Hydnellum ferrugineum* (chromatogramme rose). La présence d'un pic majoritaire à 254 nm a pu être détectée à un temps de rétention de 22,7 min. Le spectre UV-visible correspondant présente cinq maxima d'absorption :  $\lambda_{\max} = 224_{sh*}, 246, 278, 330, 344\text{nm}$ .

Afin d'avoir plus d'informations sur les composés présents dans l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*, des analyses en CLHP-SM/SM ont été réalisées.

### **Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem et à un détecteur de type corona (CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona)**

De la même manière que pour l'extrait méthanolique d'*Hydnellum ferrugineum*, le gradient utilisé pour cette analyse est le gradient 3 (Figure 26).

La barrette de diode permet, en mode d'ionisation positive, de révéler la présence de deux pics majoritaires, correspondant à des molécules éluées à des temps de rétention 6,9 et 7,5 min sur le total scan donné (a) (Figure 37). La technologie de détection d'aérosols chargés, Corona, génère un signal directement proportionnel à la quantité d'analytes. Elle nous a permis ici de confirmer la présence des pics (**1** et **2**) d'un point de

vue quantitatif (b) (Figure 37). Le chromatogramme CLUHP-ESI-TI-SM (d) (Figure 37) a également mis en évidence la présence de deux pics majoritaires à des temps de rétention relativement proches (TR : 7,1 et 7,72) de ceux détectés sur la barrette de diode (décalage dû au montage des détecteurs en série). Les spectres de masse de ces composés sont présentés (Figure 38 et Figure 41).

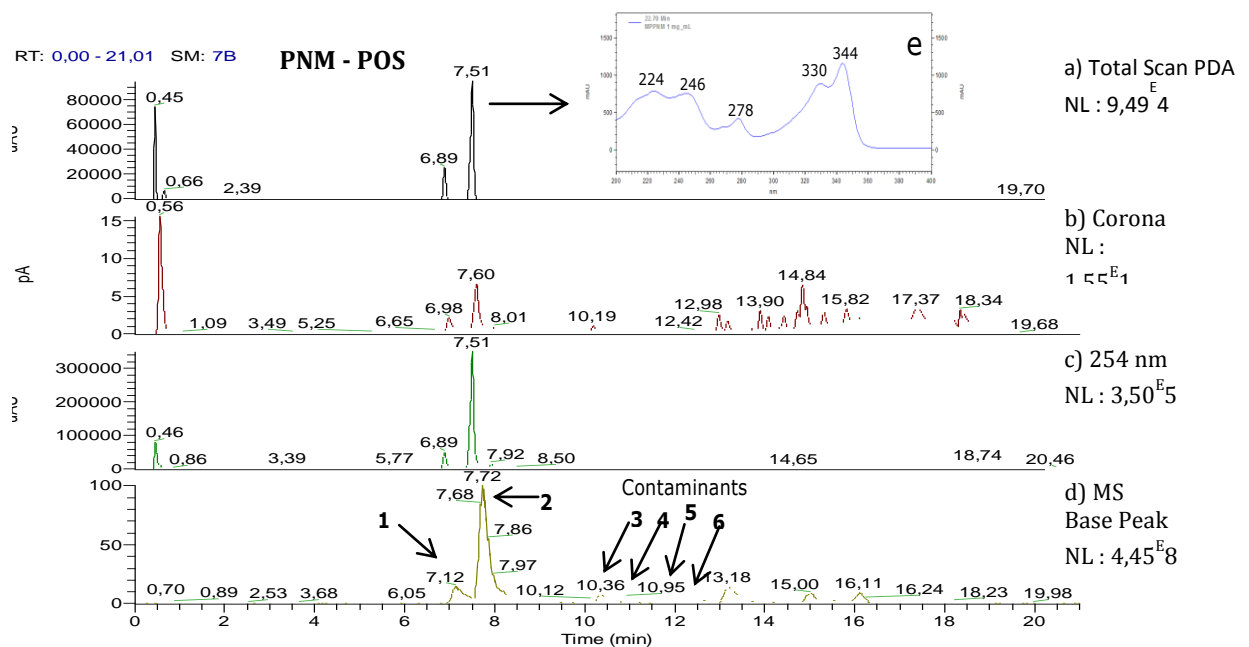


Figure 37 : Chromatogrammes de l'extrait méthanolique de *P.niger* obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et spectre UV du pic à 7,51 min (e)

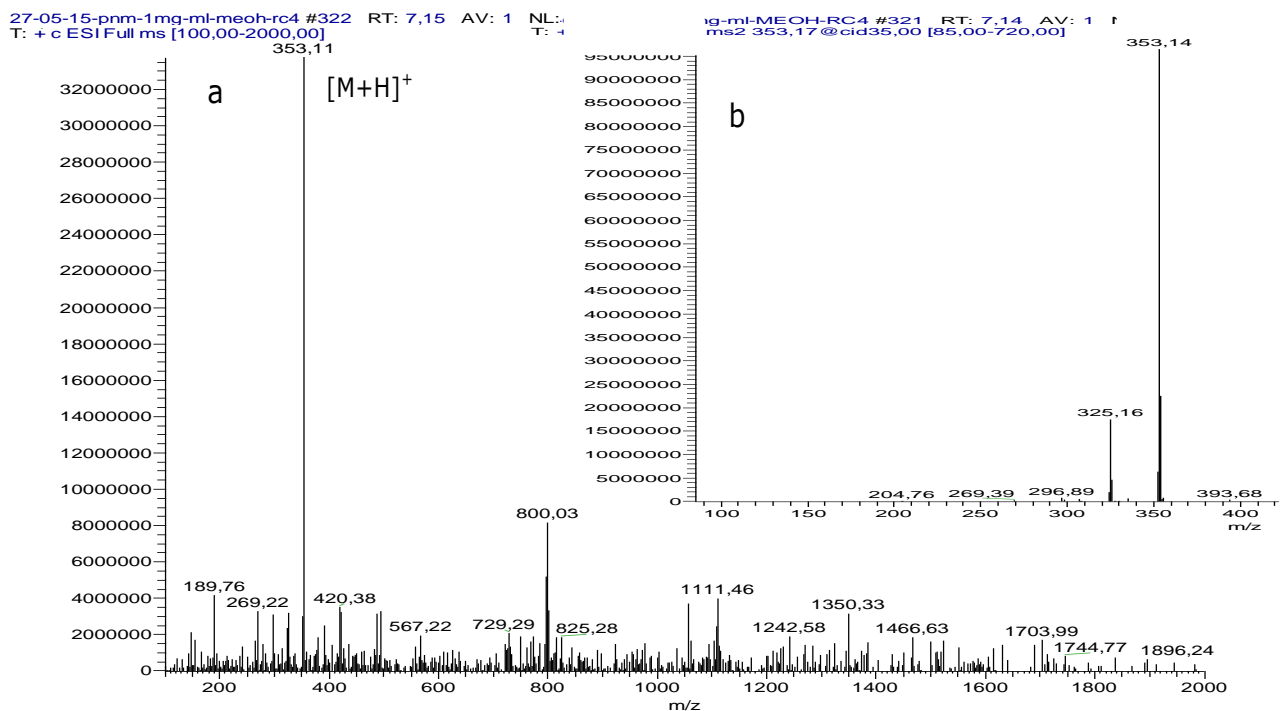


Figure 38 : Spectre de masse du pic 1 (TR : 7,2 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en mode « data dependent scan » (b)

Le spectre obtenu pour le pic **1** met en évidence la présence d'un ion majoritaire de  $m/z$  353,11 (Figure 38). Cet ion peut correspondre à l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 352 g/mol ou à l'adduit sodium  $[M+Na]^+$  d'une molécule de MM 330 g/mol. L'ion-fragment obtenu en mode *data dependent scan* indique une perte de 28u pouvant correspondre à la perte d'un groupement CO, N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Le spectre UV-visible correspondant présente trois maxima d'absorption :  $\lambda_{\max} = 237, 274, 325$ .

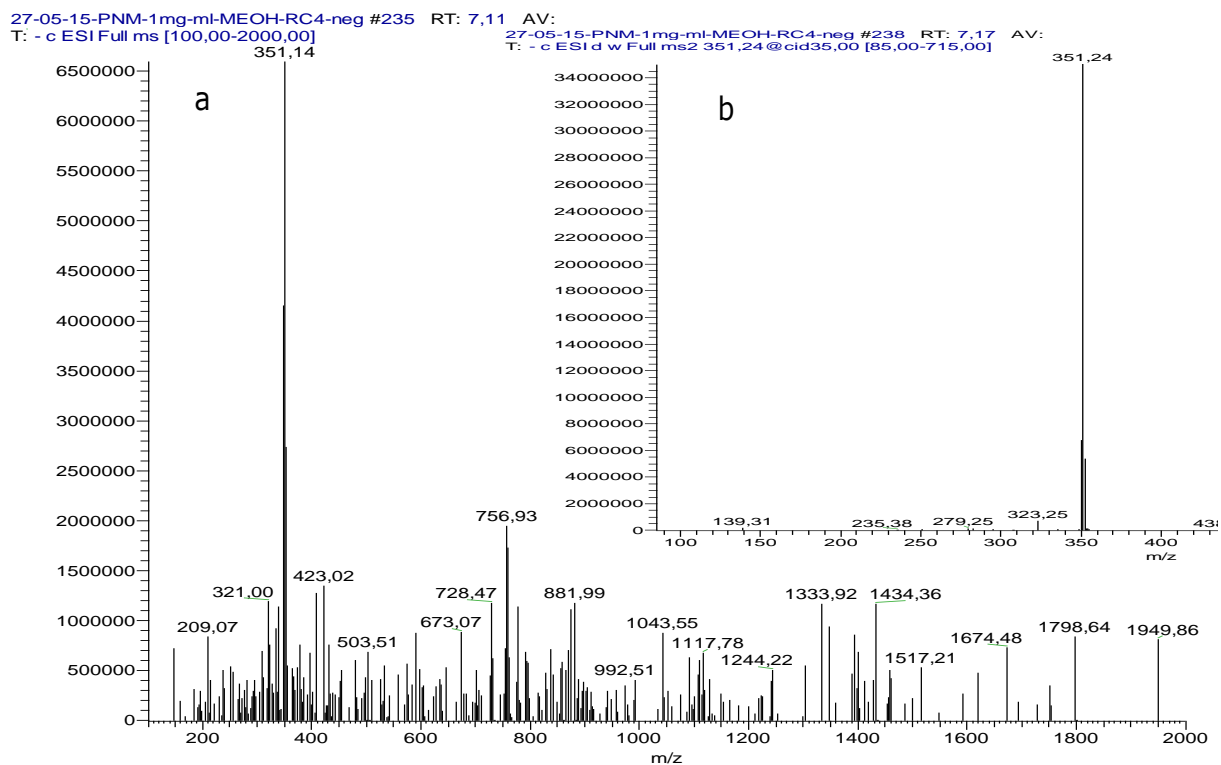
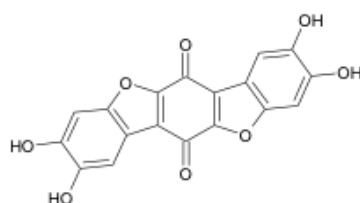


Figure 39 : Spectre de masse du pic **1** de PNM (TR : 7,1 min), en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en mode *data dependent scan* (b)

L'analyse en mode négatif (Figure 39) a mis en évidence, à ce même temps de rétention (TR : 7,1 min) un ion majoritaire de  $m/z$  351 pouvant correspondre à la forme déprotonnée  $[M-H]^-$  d'une molécule de MM 352 g/mol. En corrélant les analyses en mode négatif et positif d'ionisation, la présence d'une molécule de MM 352 g/mol dans l'extrait pourrait être fortement supposée. D'après les données de la littérature, un composé de MM 352 a déjà été décrit chez *Phellodon niger* : il s'agit de l'acide théléphorique (**38**) (Figure 40), qui pourrait donc correspondre au pic **1** [71]. Afin d'étayer cette hypothèse, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est indispensable pour accéder à la formule brute la plus probable pour cette molécule.



**38**

$C_{18}H_{18}O_8$

MM 352,25g/mol

Figure 40 : Structure de l'acide théléphorique (**38**)

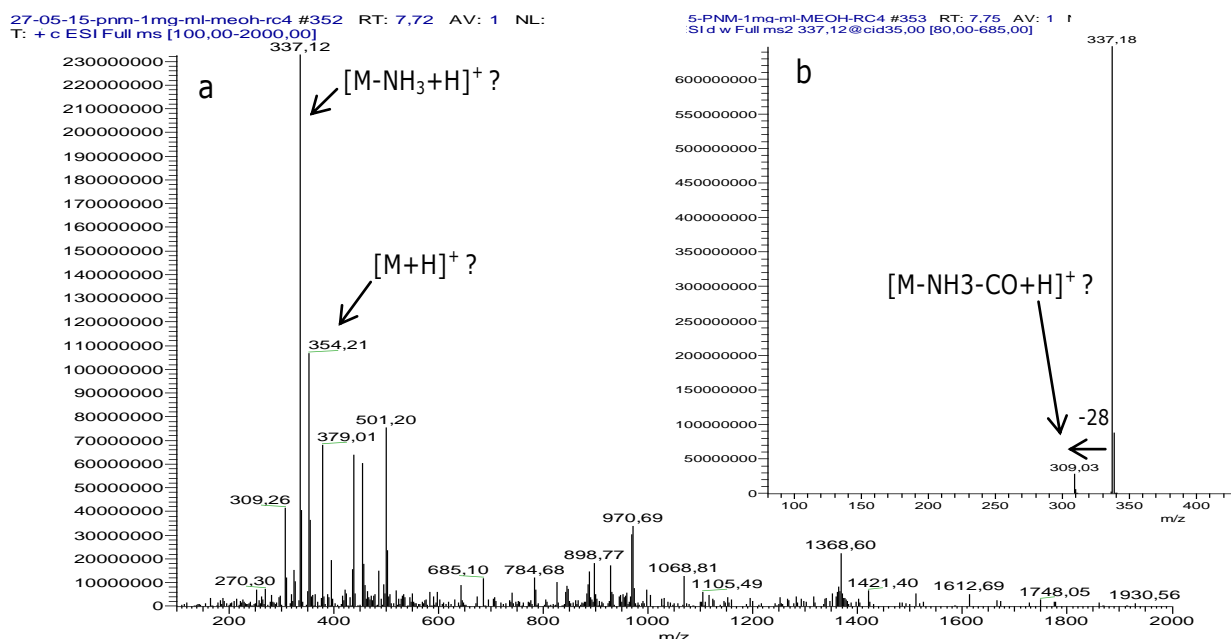


Figure 41 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 7,72 min), en mode positif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu en « *data dependent scan* » (b)

Le spectre obtenu (Figure 37), pour le pic **2**, met en évidence la présence d'un ion de  $m/z$  354,21 (Figure 41). Cet ion peut correspondre à l'adduit proton  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 353 g/mol ou à l'adduit sodium  $[M+Na]^+$  d'une molécule de MM 331 g/mol. Un ion majoritaire de  $m/z$  337,12 identifié en *full scan* pourrait correspondre à la forme ionique  $[M-NH_3+H]^+$ . L'ion-fragment obtenu de  $m/z$  309,05 à partir de l'ion de  $m/z$  337,18 en mode *data dependent scan* indique une perte de 28u pouvant correspondre à la perte d'un groupement CO ou N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Le spectre UV-visible correspondant présente cinq maxima d'absorption :  $\lambda_{max} = 224_{sh}, 246, 278, 330, 344nm$  (e Figure 37).

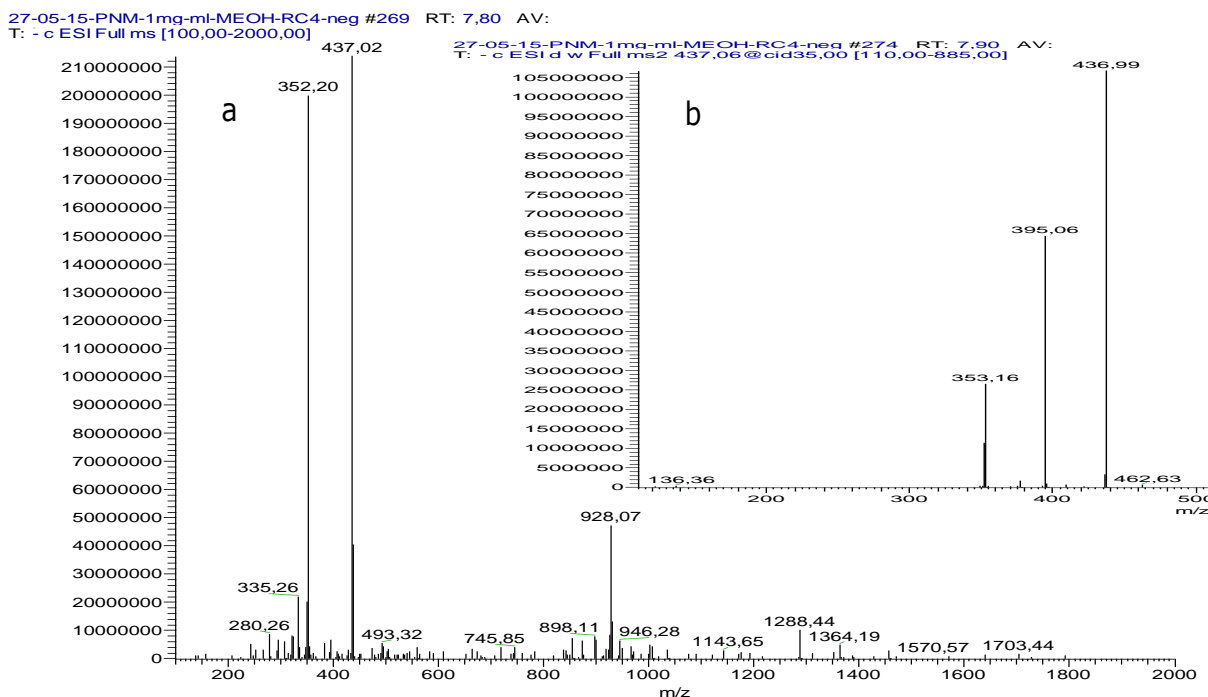


Figure 42 : Spectre de masse du pic **2** de PNM (TR : 7,80 min), en *full scan* en mode négatif d'ionisation (a) et spectre de fragmentation  $MS^2$  obtenu en mode *data dependent scan* (b)

L'analyse en mode négatif (Figure 42) a mis en évidence un ion majoritaire de  $m/z$  352,2 à ce même temps de rétention (TR : 7,80). Ceci confirmerait la présence d'une molécule de MM 353 g/mol dans l'extrait. Au vu de sa masse impaire, il s'agit d'une molécule azotée avec un nombre impair d'azote. D'après la consultation de SciFinder, aucun composé ayant cette masse n'a été identifié dans le règne des Fungi. Afin de confirmer la masse de cette molécule, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est indispensable pour accéder à sa formule brute la plus probable.

Les pics **3**, **4**, **5** et **6**, retrouvés préalablement dans HFM (Figure 31), en ionisation positive (Figure 37) correspondent très probablement à des contaminants. Il s'agirait donc de sels de benzylalkylmethylammonium [71].

### **Chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (CLUP®-ESI-QToF-SM<sup>E</sup>)**

Afin d'étayer ces hypothèses, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution est nécessaire pour accéder à la formule brute la plus probable.

Lors d'une première analyse de l'extrait PNM filtré sur des filtres en nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , des ions récurrents et présents dans le blanc ont été identifiés comme étant le nylon de formule brute  $[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2]_n$  donnant un ion de  $m/z$  227,176 correspondant à  $[\text{M}+\text{H}]^+$  avec  $n=1$ ,  $m/z$  453,343 correspondant à  $[\text{M}+\text{H}]^+$  avec  $n=2$  et  $m/z$  679,511 correspondant à

$[M+H]^+$  avec  $n=3$ . Il s'agit de la contamination d'un des lots de ces filtres en nylon utilisés usuellement au laboratoire. Les prochaines analyses dont les résultats sont présentés ci-dessous ont été réalisées en utilisant des filtres pour seringues Minisart® RC4 avec une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ .

L'extrait brut PNM a donc été analysé en CLUP-ESI-QToF en utilisant les filtres Minisart® RC4 dont le chromatogramme est présenté ci-dessous (Figure 43).

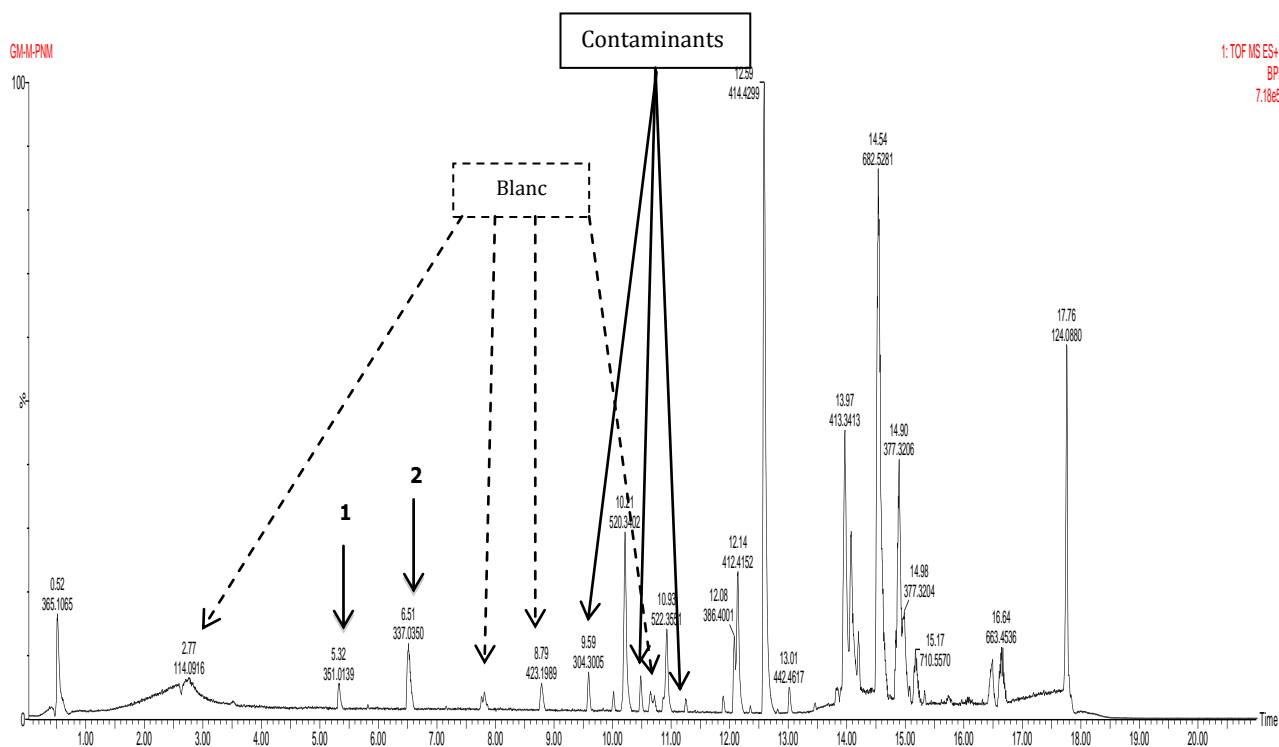


Figure 43 : Chromatogramme LCMS de l'extrait PNM analysé en CLUP®-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup> (mode positif d'ionisation)

En CLUP couplée à un détecteur de masse haute résolution en mode positif d'ionisation, l'extrait PNM a montré la présence de nombreux pics. Après soustraction des pics présents dans le blanc et de ceux des contaminants, deux pics majoritaires **1** et **2** (Figure 43) correspondant à des molécules éluées à des temps de rétention 5,33 et 6,51 min, ont été analysés plus particulièrement. Les spectres de masse de ces composés sont présentés (Figure 44) et (Figure 45).

Trois pics, identifiés comme contaminants (Figure 43), ont été retrouvés préalablement dans HFM (Figure 31) et dans PNM (Figure 37) lors des analyses en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. Ils correspondent très probablement à sels de benzylalkylmethylammonium [71].



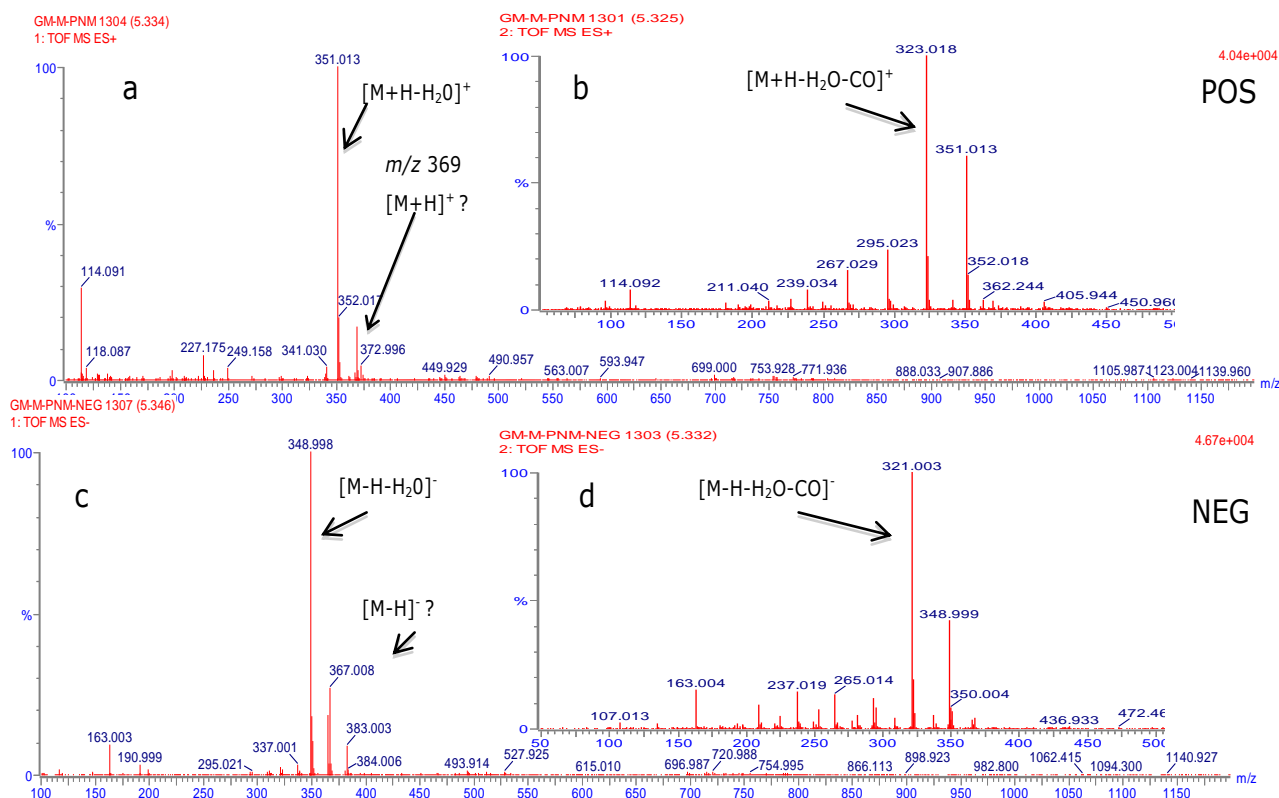


Figure 44 : Spectres de masses du pic **1** (TR : 5,32 min) de PNM en CLUP-QTOF en POS (a) et en NEG (b) et spectres de fragmentation  $SM^E$  (c et d)

D'après la Figure 44, pour le produit du pic **1**, la présence d'un ion majoritaire de  $m/z$  351,013 est observée (a). Cependant, un ion de  $m/z$  369,024 est aussi détecté correspondant à l'adduit proton  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 368 g/mol. Cette molécule se fragmente dans la source pour donner l'ion de  $m/z$  351,013 correspondant ainsi à la forme ionique  $[M+H-H_2O]^+$ . L'ion de  $m/z$  323,016 (b), pourrait provenir de la fragmentation à partir de l'ion de  $m/z$  351,013 (a), indiquant une perte de 28u. Cette différence peut correspondre à une perte de CO, N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> [73]. En analysant les formules brutes les plus probables pour la molécule et pour celle du fragment correspondant, on peut conclure sur la perte de CO.

En mode d'ionisation négative (c), un ion de  $m/z$  367,008 est retrouvé et pourrait correspondre à  $[M-H]^-$ . Une perte de neutre d'une molécule d'eau est aussi observée par la présence de l'ion  $m/z$  348,996 correspondant à la forme ionique  $[M-H-H_2O]^-$ . L'ion-fragment observé de  $m/z$  321,003 (d) indique aussi une perte de 28u correspondant à la forme ionique  $[M-H-H_2O-CO]^-$ .

Les données de masse entre le mode positif et négatif corrélient pour conclure sur une molécule de masse moléculaire 368 g/mol. D'après le logiciel utilisé pour la lecture de la spectrométrie de masse haute résolution, la formule la plus probable pour cette molécule

est  $C_{18}H_8O_9$ . D'après la littérature *via* SciFinder, aucune molécule d'origine naturelle n'a été identifiée dans la littérature pour cette formule brute.

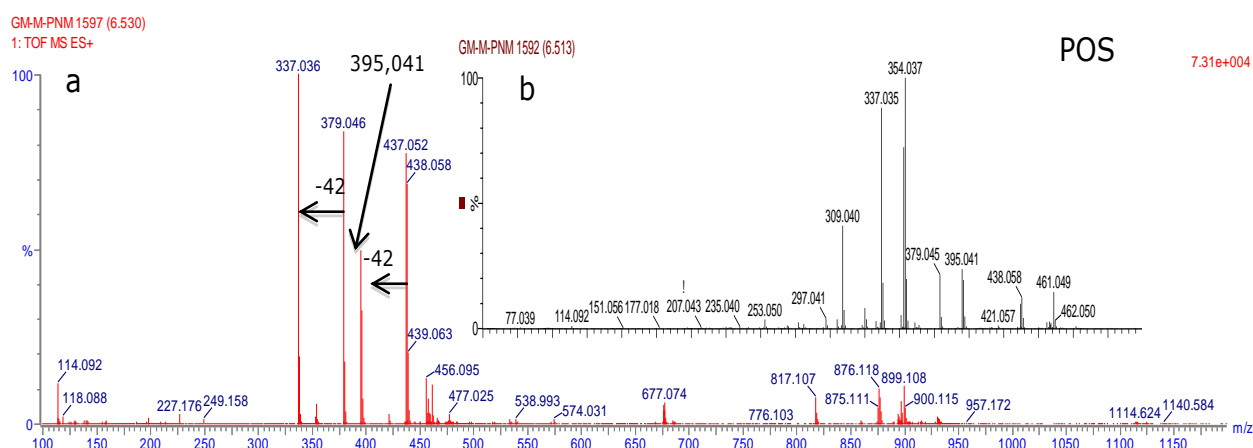


Figure 45 : Spectre de masse du pic 2 (TR : 6,53 min) de PNM en CLUP-QTOF (a) en POS et spectre de fragmentation  $MS^E$  (b)

D'après la Figure 45, 4 ions prédominants ont été mis en évidence. On observe des différences de 42 unités entre l'ion  $m/z$  379,046 et l'ion  $m/z$  337,036 ainsi qu'entre l'ion de  $m/z$  437,052 et celui de  $m/z$  395,041. Cette différence ne correspond pas à un adduit acétonitrile puisque dans ce cas, on aurait une différence de 41. Des hypothèses de formule ont été élaborées grâce au logiciel de spectrométrie de masse :  $C_{18}H_9O_7$  pour l'ion de  $m/z$  337,0348 et  $C_{20}H_{11}O_8$  pour l'ion de  $m/z$  379,0454. Ces deux formules mettent en évidence une différence due à un groupement  $C_2H_2O$ . Concernant les autres ions, aucune formule probable n'a été observée. L'analyse en mode négatif d'ionisation révèle aussi la présence de l'ion  $m/z$  437,0498 majoritaire sous un profil isotopique très particulier, similaire à celui obtenu en mode positif d'ionisation. L'interprétation est relativement difficile pour ce spectre de masse.

Cependant, une autre hypothèse peut être constituée en analysant les ions fragments. Ils ne sont pas directement issus de la fragmentation de l'ion parent majoritaire en *full scan*. La technique  $MS^E$  casse tous les ions présents avec une énergie croissante. La présence de l'ion de  $m/z$  354,037, bien que non majoritaire sur le *full scan*, mais présence d'ions fragments communs (entre a et b), pourrait correspondre à l'ion  $[M+H]^+$ , déjà identifié en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona (Figure 41). Il pourrait s'agir d'une molécule azotée de MM 353 g/mol. L'ion de  $m/z$  337 peut correspondre à la perte de  $NH_3$ . L'ion de  $m/z$  379,046  $[M-NH_3+42]^+$  et l'ion de  $m/z$  437,052  $[M+H+83]^+$  sembleraient correspondre à des adduits acétonitrile. L'ion-fragment de  $m/z$  309,040 présent en  $MS^E$  pourrait correspondre à  $[M-NH_3-CO+H]^+$ , préalablement observé (Figure 41). L'analyse en

ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à [M-H]<sup>-</sup>, probablement dû au fait que la molécule ne s'ionise pas bien en mode négatif.

### Fractionnement de l'extrait PNM

Au vu de l'activité biologique de l'extrait PNM, de son profil chromatographique relativement simple, et de la quantité importante extraite, un fractionnement a été réalisé afin d'étudier la composition de cet extrait et éventuellement relier l'activité à un composé. Celui-ci a permis de séparer l'extrait brut en 18 fractions de polarité croissante, regroupées par profil CCM identique. Le nom des fractions, leur mélange de solvant dans lequel les fractions ont été éluées sur la colonne et le rendement par rapport à la quantité déposée d'extrait brut de PNM, soit 1 g, sont présentés dans le Tableau 20. Le fractionnement a d'abord été réalisé sur 1 g d'extrait afin d'observer si la méthode de fractionnement était correcte. L'ensemble de l'extrait nécessitera un fractionnement par la suite.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des fractions obtenues à partir de PNM

Noms des fractions	Solvant d'éluion (CHCl <sub>3</sub> /MeOH )	Rendement en mg par rapport à l'extrait sec déposé 1g (%)
F1	99/1	2 (0,2%)
F2-3	99/1	2 (0,2%)
F4-6	99/1	3,5 (0,4%)
F7-13	99/1	8,4 (0,8%)
F14-15	97/3	19,7 (2,0%)
F16-19	95/5	3,7 (0,4%)
F20-23	90/10	9,7 (1,0%)
F24-25	90/10	2,8 (0,3%)
F26-27	85/15	3,5 (0,35%)
F28-29	85/15	25,4 (2,5%)
F30	80/20	5 (0,5%)
F31-38	80/20	23,2 (2,3%)
F39-41	70/30	13,3 (1,3%)
F42-55	70/30	134,3 (13,4%)
F56-61	50/50	205,4 (20,5%)
F62-66	30/70	221,1 (22,1%)
F67-68	10/90	38 (3,8%)
F69	0/100	57,2 (5,7%)
<b>Total</b>		<b>778,2 (77,8%)</b>

Ces fractions sont alors analysées en CCM (Figure 46) puis en CLHP-SM/SM-Corona afin de déterminer les ions majoritaires de chaque fraction. La multitude de données acquises

a amené à se focaliser principalement sur les pics majoritaires retrouvés en CLHP-DAD. Le détecteur universel corona nous permet de quantifier la présence des composés.

Sur la Figure 46 à gauche, une tache bleue (Rf 0,61) a été retrouvée dans la fraction F16-19, visible seulement dans cette fraction. Cette fraction a alors été analysée en infusion directe sur le LCQ en ESI positif, seuls les contaminants présents (Figure 31) ont été retrouvés avec des ions de  $m/z$  304,26 (pic **3**),  $m/z$  332,28 (pic **4**),  $m/z$  360,29 (pic **5**) et  $m/z$  388,39 (pic **6**). Aucun ion majoritaire n'a été identifié. Il est possible que les composés présents dans cette fraction ne s'ionisent pas bien avec l'électrospray. La fraction F28-29 (Figure 46 gauche) présente un profil chromatographique relativement simple et apparaît en quantité suffisante (Tableau 20) pour continuer son analyse chimique.

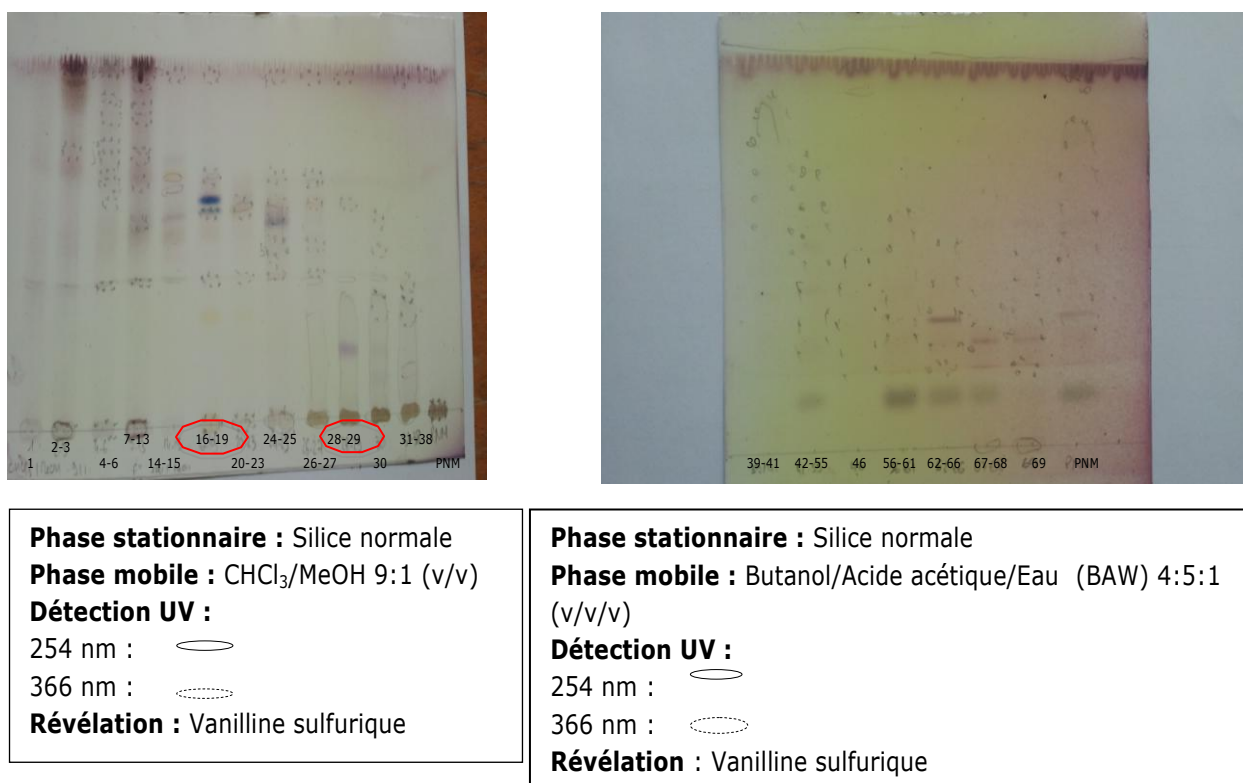


Figure 46 : CCM récapitulative des fractions réunies de l'extrait PNM de 1 à 38 (à gauche) et de 39 à 69 (à droite)

### Etude chimique de la fraction 28-29 de l'extrait PNM

Toutes les fractions ont été analysées en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona. La fraction F28-29 a montré un profil chromatographique relativement simple avec un pic majoritaire donné par la barrette de diode (a Figure 47). Le spectre UV du pic à 7,5 min présente quatre maxima d'absorption :  $\lambda_{\max} = 243, 278, 331$  et  $344$  nm (e Figure 47). Ce spectre UV présente les même  $\lambda_{\max}$  que lors de l'analyse de l'extrait brut PNM en CLUHP-BD à

22,7 min (e Figure 37 :  $\lambda_{\max} = 224_{\text{sh}}, 246, 278, 330, 344 \text{ nm}$ ). Ces deux spectres UV similaires démontrent que ces deux produits appartiennent au même groupe chimique de molécules. Sur le chromatogramme (b), le corona indique la présence de quantité sous le pic correspondant à celui détecté sur le PDA. Néanmoins, d'autres pics sont aussi détectés mais ne seront pas analysés ici puisqu'ils n'absorbent pas en UV (a et c Figure 47). En mode d'ionisation positive (d Figure 47), un pic majoritaire à un temps de rétention de 7,76 min pouvant correspondre au pic 7,5 min sur le PDA en raison du montage en série des détecteurs. D'autres pics présents aussi sur ce chromatogramme (d) indique que la fraction n'est pas pure et ne seront pas traités ici.

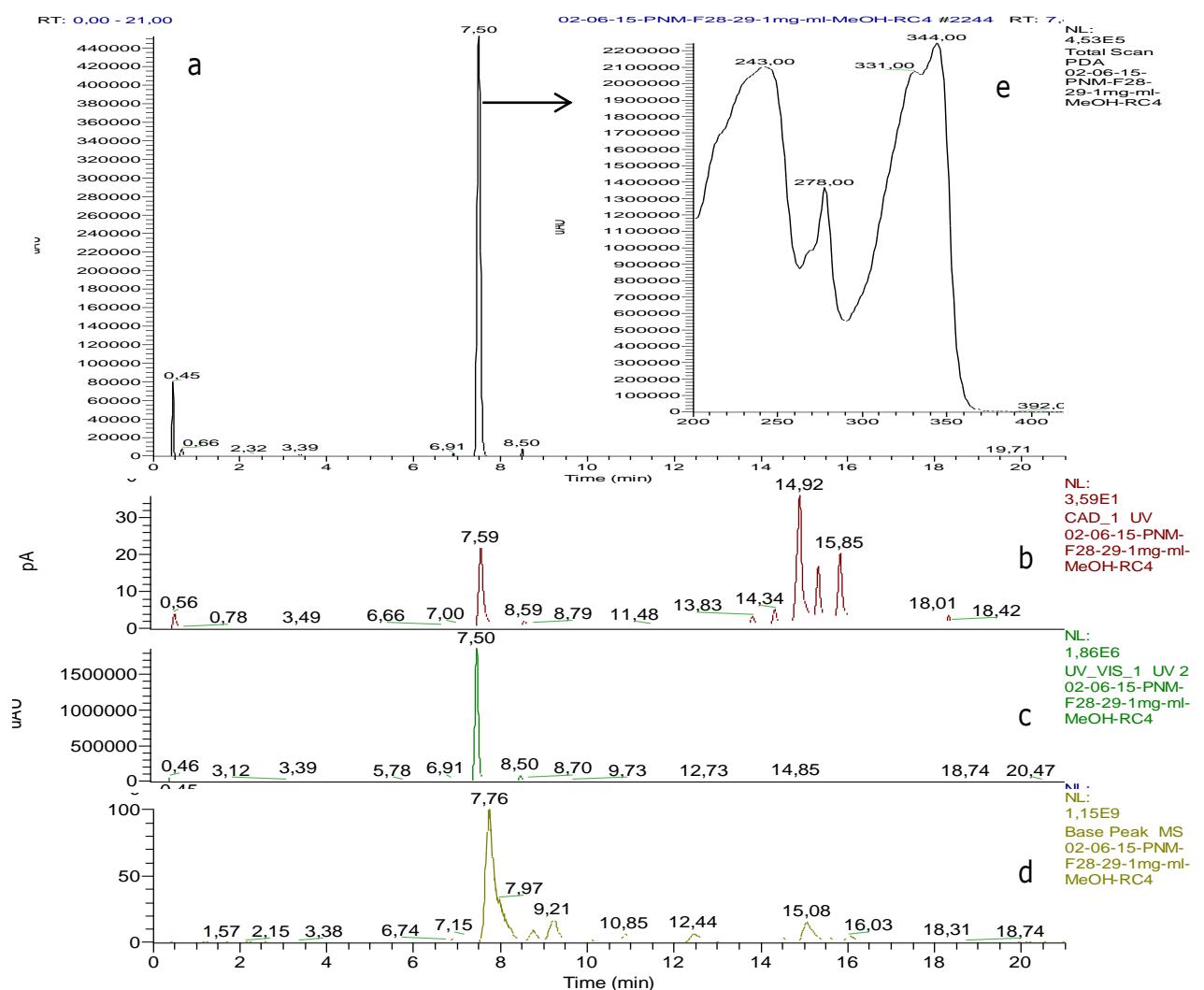


Figure 47 : Chromatogrammes de la fraction 28-29 de l'extrait méthanolique de *P.niger* obtenus par CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona : PDA (a), Corona (b), 254 nm (c), MS base Peak, mode positif d'ionisation (d) et le spectre UV du pic à 7,50 min (e)

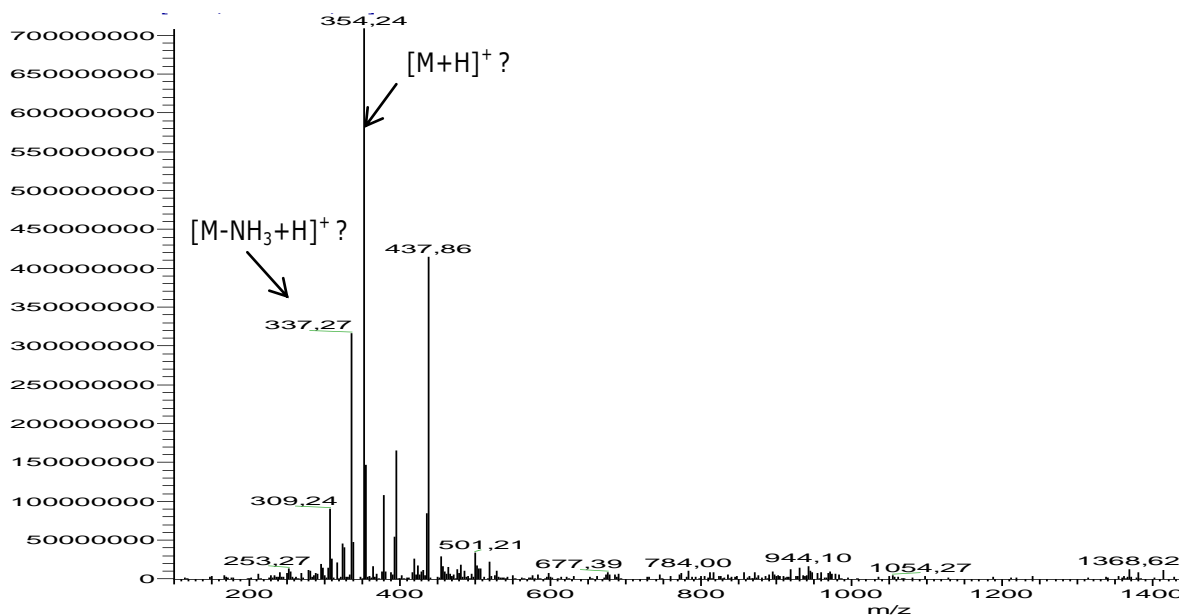


Figure 48 : Spectre de masse en *full scan* du pic (TR : 7,76 min) de la fraction 28-29 de PNM, en mode positif d'ionisation

La Figure 48 révèle pour le pic (TR : 7,76 min) un ion majoritaire de  $m/z$  354,24 pouvant correspondre à l'adduit proton  $[M+H]^+$  d'une molécule de MM 353 g/mol comme décrit précédemment lors de l'analyse du pic **2** (TR : 7,72 min) (a Figure 41) de l'extrait brut de *Phellodon niger*. Un ion de  $m/z$  337,12 identifié en *full scan* pourrait correspondre à la forme ionique  $[M-NH_3+H]^+$ . Le mode *data dependent scan* n'a pas permis de retrouver les mêmes ions fragments que décrit précédemment pour l'extrait (b Figure 41) et n'est donc pas présenté ici. Afin de confirmer l'hypothèse que cet ion de  $m/z$  354,24 présents dans la fraction 28-29 soit le même que celui identifié dans l'extrait brut, la fraction est ainsi analysée en CLUP®-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup> dont le chromatogramme (Figure 49) et les spectres (Figure 50 et Figure 52) sont présentés ci-dessous.

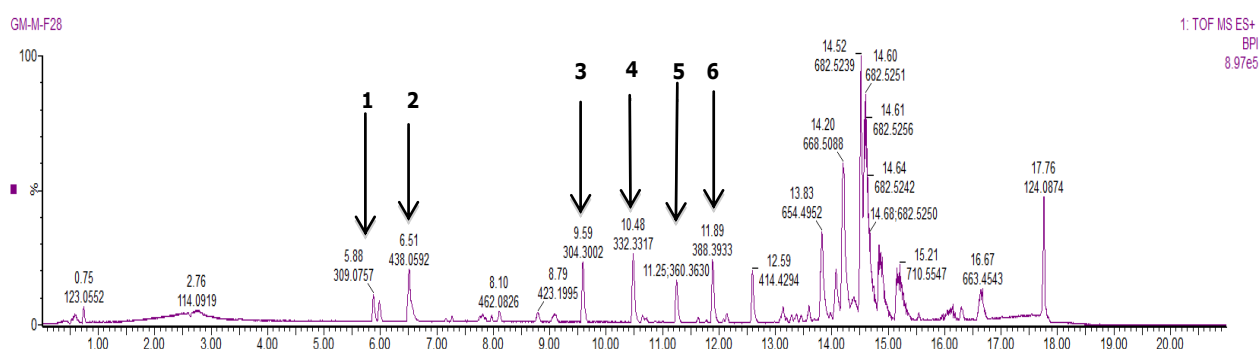


Figure 49 : Chromatogramme de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup>

Sur la Figure 49, les quatre ions identifiés comme contaminants, sels de benzylalkyl-méthylammonium sont toujours présents **3, 4, 5, 6** [71]. Cependant, on note aussi la

présence de deux pics, **1** et **2** dont les spectres de masse sont présentés (Figure 50) et (Figure 52).

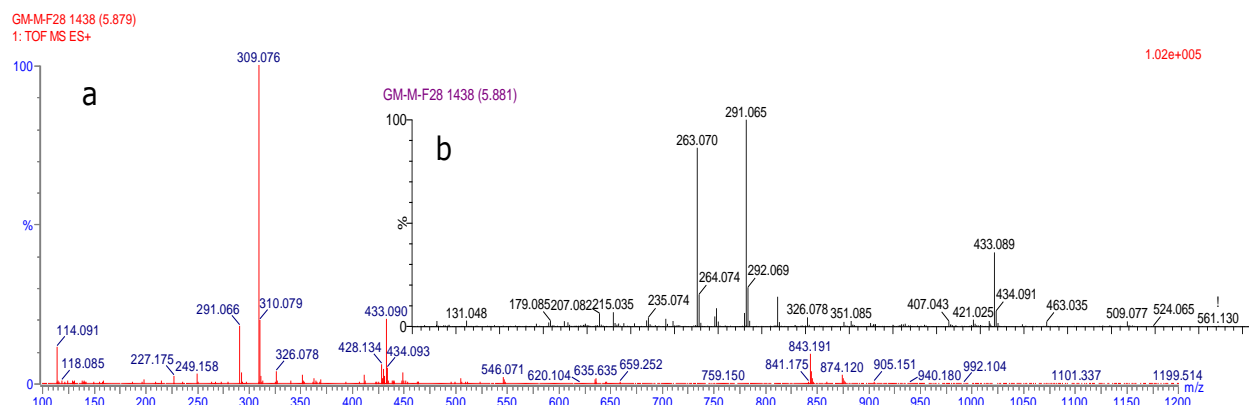


Figure 50 : Spectre de masse du pic **1** (TR : 5,88 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup> en positif (a) et spectre de fragmentation SM<sup>E</sup> (b)

Sur la Figure 50, pour le pic **1**, on note la présence d'un ion majoritaire de  $m/z$  309,076, correspondant probablement à  $[M+H]^+$ . Les ions-fragments de  $m/z$  291,065 et de  $m/z$  263,070, présents sur le spectre (b), pourraient correspondre respectivement à une perte d'eau  $[M+H-18]^+$ , et à la perte de  $[M+H-18-28]^+$  pouvant correspondre à  $[CO+H_2O]$  caractéristique d'une fonction acide carboxylique. Le logiciel MassLynx propose, pour  $m/z$   $[M+H]^+$  309,076, une formule brute probable  $C_{18}H_{13}O_5^+$ . De nombreux acides identifiés chez les macromycètes sont retrouvés chez les Boletales [75], notamment l'acide pulvinique correspondant à la formule brute  $C_{18}H_{12}O_5$  (**40** Figure 51). L'isolement de la molécule et la réalisation d'expérience en R permettraient de déterminer la structure avec certitude.

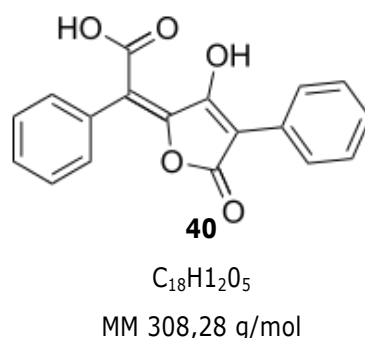


Figure 51 : Structure chimique de l'acide pulvinique (**40**)

Le spectre en ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à  $[M-H]^-$  ou encore à un adduit acide formique  $[M-HCOOH-H]^-$ . Dans le cas de l'hypothèse d'une molécule acide, cela semble relativement inattendu.

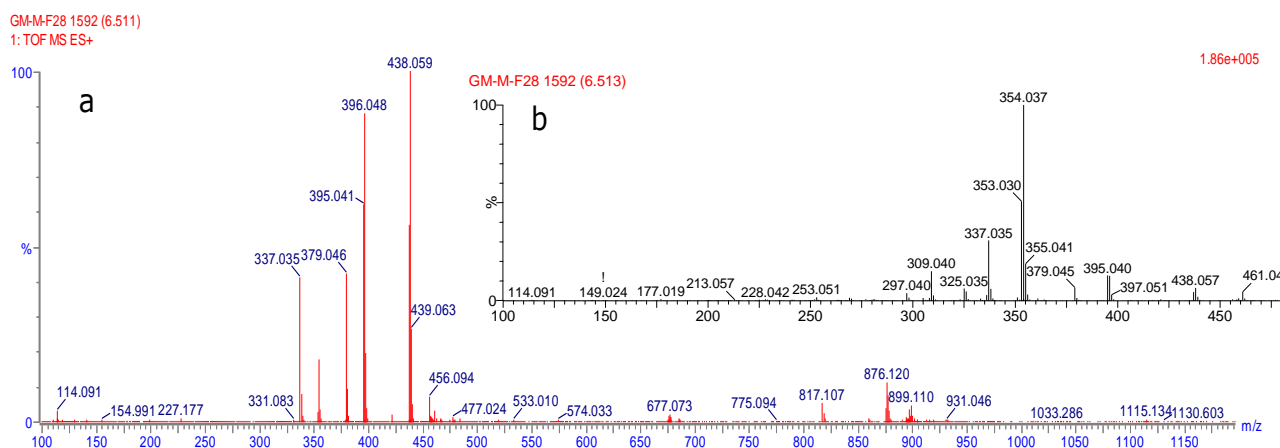


Figure 52 : Spectre de masse du pic **2** (TR : 6,51 min) de la fraction 28-29 de l'extrait PNM en CLUP®-ESI-QTOF-SM<sup>E</sup> en positif et spectre de fragmentation SM<sup>E</sup> (b)

D'après la Figure 52, 4 ions prédominants ont été mis en évidence (a). On observe des différences de 42 unités entre l'ion  $m/z$  379,046 et l'ion  $m/z$  337,036 ainsi qu'entre l'ion de  $m/z$  437,052 et celui de  $m/z$  395,041. Ce spectre de masse a déjà été analysé Figure 41 pour le pic **2** de l'extrait PNM.

La présence de l'ion  $m/z$  354,037 en MS<sup>E</sup> (b), bien que non majoritaire sur le *full scan*, pourrait correspondre au  $[M+H]^+$ , déjà identifié lors de l'analyse de l'extrait PNM en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona (Figure 41) et en CLUP-QTOF (Figure 45) en mode positif d'ionisation. Il pourrait s'agir hypothétiquement d'une molécule azotée de MM 353 g/mol. L'ion  $m/z$  337 peut correspondre à la perte de  $NH_3$ . L'ion  $m/z$  379,046  $[M-NH_3+42]^+$  et l'ion  $m/z$  437,052  $[M+H+83]^+$  semblerait correspondre à des adduits acétonitrile. L'ion-fragment  $m/z$  309,040 présent en MS<sup>E</sup> pourrait correspondre à  $[M+H-NH_3-CO]^+$ , préalablement identifié sur la Figure 41. L'analyse en ionisation négative n'a pas permis de retrouver l'ion correspondant à  $[M-H]^-$ , probablement dû au fait que la molécule ne s'ionise pas bien en mode négatif.

## Conclusion sur l'analyse de l'extrait méthanolique de *Phellodon niger*

### Analyse de l'extrait brut PNM

L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a révélé quant à lui un chromatogramme plus simple que le précédent extrait en CLUHP-BD avec un pic majoritaire et d'un pic très large sur le chromatogramme à 254 nm (chromatogramme rose Figure 36) avec le gradient 1.

D'après les données de la littérature, le composé supposé de MM 352 g/mol pourrait correspondre à l'acide théléphorique (**38**) composé déjà isolé de l'espèce *Phellodon niger*



[71]. En revanche, la molécule ayant une masse supposée de 353 g/mol n'a pas été identifiée dans la littérature dans le règne des Fungi. Une analyse en spectrométrie de masse haute résolution nous a permis de supposer une formule brute probable.

En CLUP®-ESI-QToF-SM<sup>E</sup>, deux pics ont particulièrement été étudiés (**1** et **2** Figure 43). Le pic **1** à 5,33 min laisse supposer une molécule de masse 368 g/mol. Cette molécule aurait pour formule brute probable C<sub>18</sub>H<sub>8</sub>O<sub>9</sub> qui n'a pas été retrouvée dans la littérature des produits naturels isolés.

La présence du pic **2** (TR : 6,51 min) laisse supposée une masse moléculaire de 353 g/mol. Cette masse était aussi retrouvée en CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona et était identifiée comme une molécule azotée non identifiée dans la littérature dans le règne des Fungi.

### **Analyse chimique de la fraction 28-29 de l'extrait PNM**

Le Tableau 22 résume les ions obtenus en CLUP®-ESI-QToF-SM<sup>E</sup> pour l'analyse de cette fraction.

La présence de l'ion de  $m/z$  309,05 en mode positif d'ionisation (pic **1** Figure 50) est détectée dans cette fraction. Cet ion a été préalablement évoqué comme ion-fragment d'un ion de  $m/z$  354,21, identifié comme le pic **2** lors de l'analyse de l'extrait brut PNM (Figure 45). Cette molécule pourrait correspondre à l'acide pulvinique (Figure 51), déjà identifié chez les Boletales [75].

Les composés détectés dans l'espèce *Phellodon niger* proviendraient de la même voie de biosynthèse. La biogénèse des composés terphényles provient de la voie de l'acide shikimique, transformé en acide chorismique puis en acide arylpyruvique [71]. Les terphényles quinones, résultant de la condensation de deux molécules, sont des composés produits par les basidiomycètes, dont appartient l'espèce *Phellodon niger*. Lors de cette biosynthèse, un grand nombre de dérivés d'acides pyruviques interviennent. L'atromentine, terphényle quinone (MM 324 g/mol C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), est l'intermédiaire pour de nombreuses conversions pour des composés plus hydroxylés et pour les acides pulviniques. Ces petits acides, théléphoriques et pulviniques, retrouvés dans les macromycètes dont les boletales [75], sont identifiés comme étant des pigments. Dans ces deux publications [71] et [75], les terphényles ont présentés des activités biologiques : antioxydante, piègeurs de radicaux libres et antibactérienne.

L'ion de  $m/z$  354,037 en mode positif d'ionisation (pic **2** Figure 52) est détecté dans cette fraction. Cet ion, préalablement identifié comme pouvant correspondre à une molécule de masse moléculaire 353 g/mol, laisse supposée une molécule azotée.

Cette fraction a subi une analyse RMN mais était difficilement analysable en raison d'une fraction non pure. Un nouveau fractionnement serait nécessaire afin d'obtenir un seul pic sur le chromatogramme, qui pourrait alors être plus facilement analysable en RMN afin d'obtenir la structure de la molécule.

Les deux méthodes utilisées, trappe d'ions (TI) et QTOF sont deux analyseurs différents. Le mode *data dependent scan* est possible seulement avec la TI. Il est plus facile de corréler les ions fragments aux ions parents. Cette technique, utilisant la trappe d'ion, nous permet de faire du *data dependent scan* ce qui facilite l'analyse pour corréler les fragments. Cependant, la précision est plus importante avec un *Quadrupole Time Of Flight* (QTOF) ; technique de haute résolution nous permettant d'obtenir la formule brute.

La source d'ionisation, électrospray, est la même pour les deux techniques. Cependant, les gradients utilisés ont été légèrement différents (HCOOH présent dans l'eau et dans l'ACN pour la haute résolution). Ceci pourrait expliquer les différences d'ionisation

Tableau 21 : Récapitulatif des analyses de spectrométrie de masse sur les extraits méthanoliques des deux espèces étudiées

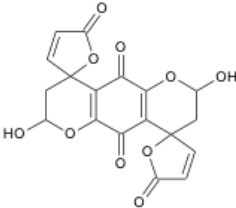
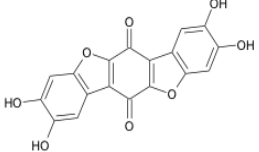
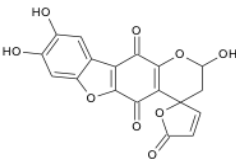
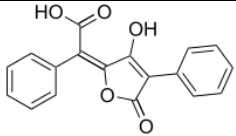
	Pic	<i>Hydnellum ferrugineum</i>						<i>Phellodon niger</i>					
		TR	Positif (m/z)	Négatif (m/z)	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée	TR	Positif (m/z)	Négatif (m/z)	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée
CLUHP-ESI-TI-SM/SM-Corona	1	6,3	370,94 388,94	-	388	Hydnuferruginine		7,1	353,11	351,14	352	Acide théléphorique C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	
	2	7,4	371,06	415,01 [M+HCO OH-H] <sup>-</sup>	370	Hydnuferrugine		7,7	354,21	352,20	353	Azotée ?	?
CLUP®-ESI-QToF-SM <sup>E</sup>	1	Réalisé mais présence de contaminants nylon => Non interprétable						5,33	369	367,008	368	C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> O <sub>9</sub>	?
	2							6,51	354,037	-	353	Azotée ?	?

Tableau 22 : Récapitulatif des analyses chimiques sur la fraction 28-29 de l'extrait *Phellodon niger* méthanolique (PNM)

<i>Phellodon niger</i>	Pic	TR	Fraction 28-29				
			Positif	Négatif	MM supposée (g/mol)	Molécule supposée	Structure chimique supposée
CLUP®-ESI-QToF-SM <sup>E</sup>	1	5,88	309,076	-	309	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
	2	6,51	354,037	-	353	Azotée ?	?

## Conclusion

La strongylose à *Haemonchus contortus* est une parasitose présente chez les ovins sur tous les continents. En France métropolitaine, l'haemonchose n'est pas la plus fréquente des strongyloses. Cependant, des conditions climatiques chaudes et humides sont favorables à l'apparition brutale et imprévisible de ce parasite, notamment de juin à septembre [76]. Ce parasite hématophage provoque des ravages dans les élevages des moutons avec en symptôme principal une anémie pouvant conduire à la mort de l'animal parasité ou encore une altération de la laine et une baisse de reproduction. Différents moyens de lutte contre ce strongle gastro-intestinal chez les ovins peuvent être utilisés. Les anté-endectocides, tels que les benzimidazoles et pro-benzimidazoles, sont les deux familles les plus utilisées dans les élevages laitiers dans le monde [19] car ils disposent de délais d'attente nuls pendant la lactation. D'autres anté-endectocides tels que les imidazo-thiazoles, tétrahydropyrimidines et les phénols halogénés sont aussi utilisés. Enfin, les endectocides tels que les lactones macrocycliques sont largement utilisés car ils possèdent un spectre d'action large et une activité rémanente. Cependant, l'apparition de résistances dans les années 1960 devient une préoccupation majeure dans l'économie de la pharmacie vétérinaire. Il s'agit d'une diminution de la réponse au traitement chez une population sensible. Ceci est dû à une préadaptation par mutation dont la transmission est héréditaire. L'utilisation de ces anthelminthiques exerce une pression de sélection permettant aux parasites naturellement résistants de survivre et de se reproduire.

Le grand public se préoccupe de plus en plus de l'utilisation de substances chimiques en agriculture et de la présence de résidus médicamenteux dans les biens de consommation [22]. L'Union Européenne encourage donc les projets visant à la recherche de solutions alternatives à l'utilisation d'anthelminthiques. C'est dans ce contexte qu'a été réalisé le travail expérimental présenté dans cette thèse : une étude chimique et biologique (activité antiparasitaire sur *Haemonchus contortus*) de deux champignons oubliés, présents en grande quantité dans la région Midi-Pyrénées, *Hydnellum ferrugineum* et *Phellodon niger*.

A partir de ces deux champignons, des extraits de polarités différentes ont été réalisés. L'activité biologique de chaque extrait brut a alors été étudiée sur deux tests différents : test d'éclosion des œufs et test de dégagement des larves sur une souche sensible

d'*Haemonchus contortus* et sur une souche résistante aux traitements anthelminthiques de type benzimidazoles et aux avermectines. Les extraits aqueux et méthanoliques se sont révélés avoir la meilleure activité inhibitrice sur l'éclosion des œufs et sur le dégainement des larves aux différentes concentrations testées. Ces deux types d'extraits ont été analysés pour étudier leur composition chimique. Les extraits aqueux étant difficiles à étudier, nos efforts se sont focalisés sur les extraits méthanoliques. Celui d'*Hydnellum ferrugineum* (HFM) a présenté un profil chromatographique relativement complexe. En spectrométrie de masse, deux composés ont été proposés pour HFM : hydnuferugine et hydnuferuginine, molécules préalablement isolées chez *Hydnellum ferrugineum* par Gripenberg en 1974 puis en 1981 [62]. Pour l'extrait brut méthanolique de *Phellodon niger*, une molécule de masse moléculaire 308 g/mol a été identifiée pouvant correspondre à l'acide pulvinique. Au vu des résultats d'activité biologique, du profil chromatographique et de la quantité de l'extrait brut PNM, un fractionnement a été réalisé sur ce dernier extrait. Dix huit fractions ont été obtenues sur la base des profils chromatographiques des sous-fractions. La fraction F28-29 a été plus particulièrement étudiée. Un composé pourrait correspondre à l'acide théléphorique, composé isolé d'un certain nombre de champignons dont notamment *Hydnellum ferugineum* et *Phellodon niger*, répertoriés dans la revue de Liu [71].

Afin de déterminer où se concentre l'activité, il faudrait réaliser à nouveau les deux tests biologiques sur les différentes fractions obtenues. Ensuite, un fractionnement sur la quantité totale d'extrait pourra être envisagé dans le but d'obtenir une quantité plus importante permettant de fractionner à nouveau l'extrait actif dans le but d'isoler la (ou les) molécule(s) responsable(s) de l'activité observée. Des analyses structurales plus approfondies, comme la RMN, permettront de déterminer la structure de ce(s) composé(s).

L'objet de cette étude était de trouver des solutions alternatives aux traitements anthelminthiques de synthèse. Des résultats intéressants ont été retrouvés sur les deux tests réalisés, inhibition de dégainement des larves et inhibition de l'éclosion des œufs en larves. Les extraits polaires ont montré des résultats particulièrement intéressants notamment l'extrait aqueux de *Phellodon niger*, avec une activité inhibitrice 50 fois moins active que l'anthelminthique thiabendazole, utilisé comme témoin positif. Cet extrait s'est

révélé difficilement analysable du point de vue de sa composition. Des analyses complémentaires pour la séparation des composés présents dans l'extrait pourraient être élaborées. L'extrait méthanolique de *Phellodon niger* a aussi présenté des résultats intéressants et a été fractionné dans cette étude. Cependant, des tests biologiques sont indispensables afin de savoir quel est le composé responsable de l'activité. Un fractionnement bio-guidé est alors nécessaire.

