

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

PYCNOPORUS CINNABARINUS : EXTRACTION, ISOLATION ET CARACTÉRISATION DE MOLÉCULES
AYANT UN EFFET CYTOTOXIQUE

PAR
SOPHIE FORTIN
B. SC. (CHIMIE)

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

*« ALL THAT MAN NEEDS FOR HEALTH AND HEALING HAS BEEN PROVIDED BY GOD IN NATURE,
THE CHALLENGE OF SCIENCE IS TO FIND IT. »*

- Paracelcus, né Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus

RÉSUMÉ

Au Canada, en 2017, on estime à 206 200 le nombre de diagnostics de cancer posés et à 80 800 les décès des suites de cette maladie. Plusieurs médicaments issus de sources naturelles sont actuellement utilisés en chimiothérapie. C'est notamment le cas de la dactinomycine (actinomycine D) et du Taxol® (paclitaxel) que l'on isole respectivement de bactéries *Streptomyces* et des écorces de différents ifs. Cependant, leur usage pour le traitement du cancer est souvent limité en raison d'effets secondaires importants, autant envers les cellules cancéreuses que certains groupes de cellules saines. Dans plusieurs cas, les effets secondaires peuvent être fatals pour les patients traités ou encore contraindre le clinicien à mettre fin au traitement. Pour cette raison, la recherche de composés actifs offrant une meilleure sélectivité envers les cellules malignes présente un grand intérêt. C'est autour de cette vision qu'un criblage de quinze espèces de champignons de la forêt boréale, comestibles ou non, a précédemment été mené au Laboratoire LASEVE. Cette étude a permis d'identifier un extrait à l'hexane et à l'éthanol d'un champignon de type polypore présentant une forte cytotoxicité sélective envers les lignées cancéreuses comparativement aux lignées cellulaires saines. Il s'agit de *Pycnoporus cinnabarinus*, un champignon poreux de forme semi-circulaire et de couleur rouge-orangé caractéristique.

L'objectif principal du projet de recherche consistait à identifier et à caractériser les composés responsables de l'activité cytotoxique d'un extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus*. Plusieurs étapes de fractionnement ont permis d'isoler et d'identifier quatre composés incluant la cinnabarine, l'acide cinnabarinique, le peroxyde d'ergostérol ainsi que le tréhalose. Les molécules isolées dans le cadre du projet sont déjà connues de la littérature scientifique et identifiées comme présentes dans *P. cinnabarinus*, mais les résultats du projet permettent de fournir des données spectrales plus récentes pour certains composés. Les résultats suggèrent que l'activité cytotoxique ainsi que la sélectivité pour les lignées cancéreuses de l'extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus* sont attribuables en partie aux molécules de type phénoxazone, soient l'acide cinnabarinique et la cinnabarine. On constate effectivement une activité cytotoxique pour ces composés, avec des valeurs d'IC₅₀ entre 10

et 16 μM sur A-549 et entre 13 et 20 μM sur DLD-1. Cependant, ces phénoxazones sont moins actives envers les cellules saines, WS-1. Par ailleurs, les deux composés testés individuellement présentent une activité moindre par rapport aux extraits bruts de départ, suggérant un effet de synergie entre ces deux molécules ou avec d'autres présentes dans l'extrait.

En résumé, ce projet a permis d'expliquer partiellement l'activité cytotoxique marquée d'un extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus*, en plus de consolider les connaissances déjà existantes sur ce polypore.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur, le professeur André Pichette, pour la chance qu'il m'a donné de travailler dans son laboratoire sur un projet des plus stimulant et rempli de défis. Je remercie également le professeur Jean Legault, mon codirecteur de maîtrise, pour son soutien tout au long du projet. J'ai pu évoluer au sein du Laboratoire LASEVE dans une grande autonomie qui m'a permis de développer des qualités essentielles pour la poursuite de mon cheminement académique et professionnel.

Je n'aurais jamais pu atteindre les objectifs du projet sans les précieux conseils de François Simard et Vakhtang Mshvildadze (techniques de séparation et criblage phytochimique), Alexis St-Gelais (procédures générales au laboratoire et confident), Balla Sylla (synthèse organique et motivation au quotidien) et Serge Lavoie (RMN), qui ont été de précieux alliés. Bien sûr, le travail au niveau des tests d'activité biologique de Catherine Dussault et Karl Lalancette mérite d'être souligné et remercié.

Je remercie chaudement ma binôme, Lydia Genthon, pour avoir mis les bases du projet et défriché efficacement les premières étapes du projet. Sans son travail acharné dans le cadre de son stage de maîtrise, il aurait été difficile d'atteindre les objectifs du projet et d'obtenir des résultats. Sa compagnie m'a beaucoup manqué dans la suite du projet. Bien sûr, sans de fantastiques collègues pour partager au quotidien les joies du laboratoire, le parcours de maîtrise serait bien long et ardu. Un merci tout spécial à Gilles Jost, Charlotte Pichard, Simon Gandrieau, Marion Étienne, Ludivine Chaurand, Lorry Jean, Paul Gormand et bien d'autres, qui ont embellit mon quotidien et été les responsables de plusieurs discussions et fous rire.

Le soutien familial est également indispensable pour réussir des études aux cycles supérieurs. Un merci tout spécial à mes parents, qui ont toujours cru en moi et éprouvés de la fierté à me voir évoluer dans le domaine de la chimie. Un merci plus particulier à celui qui partageait mon quotidien à la maîtrise et qui m'a toujours épaulé et motivé à continuer.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Remerciements.....	Erreur ! Signet non défini.
Table des matières	iv
Abréviations.....	Erreur ! Signet non défini.
Liste des figures	Erreur ! Signet non défini.
Liste des tableaux.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre I. Introduction.....	1
Mise en contexte	2
Problématique	3
Objectif général.....	4
Objectifs spécifiques	4
Structure du mémoire.....	5
Chapitre II. Revue de littérature	7
A. <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	7
Les Polyporaceae	7
Le genre <i>Pycnoporus</i> et l'espèce <i>P. cinnabarinus</i>	9
B. Aspect synthèse pour la préparation des phénoxazones	21
Chapitre III. Matériel et méthodes	26
A. Matériel	24
B. Méthodes	27
Extraction des composés actifs	Erreur ! Signet non défini.
Travaux de fractionnement et d'isolation sur l'extrait hydroéthanolique de <i>P. cinnabarinus</i>	Erreur ! Signet non défini.

Travaux de fractionnement et d'isolation d'un second extrait hydroéthanolique de <i>P. cinnabarinus</i>	Erreur ! Signet non défini.
Évaluation de l'activité cytotoxique des extraits, fractions et composés isolés.....	42
Synthèse de l'acide cinnabarinique.....	43
Réaction de phénoxazones avec le chlorure de fluorénylméthoxycarbone	44
Chapitre IV. Résultats et discussions.....	49
A. Rendements et activités anticancéreuses des extraits de <i>P. cinnabarinus</i>	Erreur ! Signet non défini.
B. Fractionnement et identification des composés responsables de l'activité cytotoxique de l'extrait hydroéthanolique de <i>P. cinnabarinus</i>	49
C. Synthèse	74
Chapitre V. Conclusions et perspectives	76
Références.....	79
Annexe 1. Revue de littérature : L'acide cinnabarinique – activités biologiques et dérivés connus	87
Annexe 2. Voie hypothétique de synthèse de la cinnabarine et autres phénoxazones	119
Annexe 3. Spectres RMN	125

ABRÉVIATIONS

3-HAA : acide 3-hydroxyanthranilique

Å : Ångström (10^{-10} m)

A-549 : cellules du carcinome pulmonaire humain (cancer du poumon)

AcOEt : acétate d'éthyle

ACS : spécifications de l'American Chemical Society

AF : acide formique (HCOOH)

APT : « *attached proton test* »

ATR : réflectance totale atténuée

BF₃ : trifluorure de bore

BuOH : 1-butanol

AC : acide cinnabarinique

CCM : chromatographie sur couche mince

CE₅₀ : concentration efficace médiane

CHCl₃ : chloroforme

cm⁻¹ : unité du nombre d'onde (IR)

COSY : « *correlated spectroscopy* »

DCM : dichlorométhane

DEPT : « *distortionless enhancement by polarization transfer* »

DLD-1 : cellules de l'adénocarcinome colorectal humain (cancer du côlon)

DMSO : diméthylsulfoxyde

EtOH : éthanol

ESI : ionisation par électronébuliseur

Fmoc-Cl : chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

g : gramme(s)

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

H₂O : eau

H₂SO₄ : acide sulfurique

Hex : hexane

HCl : acide chlorhydrique

HMBC : « *heteronuclear multiple bond correlation* »

HPLC-MS : chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

HSQC : « *heteronuclear single quantum coherence* »

Hz : hertz

IC₅₀ : concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire

KOH : hydroxyde de potassium

L : litre

LASEVE : Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales

LC₅₀ : concentration létale

MeOH : méthanol

MgSO₄ : sulfate de magnésium

MIC : « *minimal inhibitory concentration* » ou concentration inhibitrice minimale

N : normalité (Néq·L⁻¹)

NaCl : chlorure de sodium

NOESY : « *nuclear overhauser effect spectroscopy* »

ppm : parties par million

r : rendement

R_f : rapport frontal (distance du front de solvant·distance de la tache⁻¹)

RMN : résonance magnétique nucléaire

TEA : triéthylamine

TOF : « *time-of-flight* » ou temps de vol

TMS : tétraméthylsilane

t_r : temps de rétention (min)

μM : symbole de la micromolarité (10⁻⁶ mole·L⁻¹)

UV : ultraviolet

WS-1 : fibroblaste cutané humain

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structures de la dactinomycine (à gauche) et du paclitaxel (à droite).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2. Représentation simplifiée des polypores (Denis et Guérineau 1988).	11
Figure 3. <i>P. cinnabarinus</i> sur un hôte (gauche) (Prêt à pousser) et spécimen isolé (droite) (Wikimédia).	12
Figure 4. Représentation générale des phénoxazones.	14
Figure 5. Représentation générale des 2-amino-phénoxazinones.....	15
Figure 6. Structures des principales phénoxazones retrouvées dans le genre <i>Pycnoporus</i> ...	15
Figure 7. Structures de la pycnoporine dans <i>P. cinnabarinus</i>	16
Figure 8. Structures de l'endoperoxyde d'ergostérol (gauche) et de l'ergostérol (droite). ..	17
Figure 9. Structures des coibanoles isolées de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	17
Figure 10. Représentation générale de la synthèse de l'acide cinnabarinique.....	22
Figure 11. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait brut total (SF01117A).	30
Figure 1. Chromatogramme illustrant les fractions récoltées en HPLC préparative pour la purification du résidu AcOEt (SF01126A).....	31
Figure 13. Schéma de fractionnement et rendements de purification en HPLC préparative sur le résidu AcOEt (SF01126A).....	31
Figure 14. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice ouverte sur le résidu aqueux (SF01129A).....	32
Figure 15. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour l'extraction liquide-liquide sur l'émulsion AcOEt-H ₂ O (SF01127A).	33
Figure 16. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction BuOH (SF01125D).	35
Figure 17. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction DCM (SF01125B).....	36
Figure 18. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur le second extrait brut (SF01176A).	37

Figure 19. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01186C.	38
Figure 20. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01197B.	39
Figure 21. Schéma de filtration et rendement pour la filtration sur coton du résidu du « dry-pack » (SF01189A).	40
Figure 22. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour chromatographie sur couche mince préparative sur la fraction SF02023A.	41
Figure 23. Formation de l'acide cinnabarinique.	43
Figure 24. Protection de l'acide cinnabarinique avec Fmoc-Cl.	44
Figure 25. CCM comparative des trois premiers extraits bruts avec AC (à gauche sur la plaque) dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF et révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm (droite).	48
Figure 26. CCM récapitulative des sept fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'extrait brut total (SF01117A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF et révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (haut) et à 365 nm (bas).	50
Figure 27. CCM récapitulative des fractions A à F issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 0,5 : 0,1) révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm.	58
Figure 28. CCM récapitulative des fractions G à L issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 3 : 0,1) révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm.	58
Figure 29. CCM comparative de la fraction SF02009C avec l'ergostérol dans un milieu Hex : AcOEt (7 : 3) sans révélation (gauche) et révélée avec H_2SO_4 (milieu et droite). Visionnement à 365 nm (gauche et droite) et dans le visible (milieu).	63
Figure 30. Structure du 5,6-dihydroergostérol.	64
Figure 31. Chromatogramme GC-MS de la fraction SF02009C.	64
Figure 32. Structure de l'acide palmitique ou acide hexadécanoïque.	68

Figure 33. Structure du tréhalose ou α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside.	69
Figure 34. Chromatogrammes de l'extrait brut de départ (haut) et du mélange réactionnel (bas) pour la protection avec Fmoc-Cl à 280 nm.....	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des espèces faisant partie de la famille des Polyporaceae selon une classification de type cladistique (Kim et Jung 2002)	8
Tableau 2. Classification taxonomique des trois espèces du genre <i>Pycnoporus</i>	10
Tableau 3. Activité cytotoxique des différents extraits aux solvants	46
Tableau 4. Rendements d'extraction des différents lots de <i>P. cinnabarinus</i> en utilisant un mélange EtOH:H ₂ O 50:50	47
Tableau 5. Activité cytotoxique des extraits bruts de <i>P. cinnabarinus</i>	49
Tableau 6. Activité cytotoxique des sept fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'extrait brut total (SF01117A)	51
Tableau 7. Activité cytotoxique des huit fractions issues de la séparation par colonne de silice ouverte du résidu aqueux (SF01129A)	53
Tableau 8. Activité cytotoxique des deux fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'émulsion AcOEt-H ₂ O (SF01127A)	54
Tableau 9. Activité cytotoxique des 12 fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression sur la fraction BuOH (SF01125D)	55
Tableau 10. Activité cytotoxique des huit fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression sur la fraction DCM (SF01125B)	57
Tableau 11. Activité cytotoxique des 12 fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A)	60
Tableau 12. Activité cytotoxique de quatre des cinq fractions issues de la purification par colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01186C	62
Tableau 13. Activité cytotoxique de la fraction SF02009C et du standard commercial d'ergostérol	65
Tableau 14. Activité cytotoxique du précipité issu de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A)	66
Tableau 15. Activité cytotoxique des sept fractions issues de la séparation par chromatographie sur couche mince préparative sur la fraction SF02023A	68
Tableau 16. Activité cytotoxique des quatre composés isolés exprimée en μM	72

Tableau 17. Activité cytotoxique des quatre composés isolés convertie en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	72
Tableau 18. Rappel des activités cytotoxiques des extraits bruts (SF01117A et SF01176A)	73
Tableau 19. Activité cytotoxique de l'acide cinnabarinique (AC) synthétique, standard et isolé de <i>P. cinnabarinus</i> exprimée en μM	75

CHAPITRE I.
INTRODUCTION

Mise en contexte

Le cancer est une maladie qui affecte de plus en plus de Canadiens annuellement. Pour être exact, ce sont deux individus sur cinq qui développeront un cancer au cours de leur vie. Il est responsable d'une grande partie des décès au Canada, soit environ 30% du nombre total de chaque année (Société canadienne du cancer 2017). Au Canada, en 2017, on estime à 206 200 le nombre de diagnostics de cancer posés et à 80 800 les décès des suites de cette maladie. C'est une augmentation notable par rapport à 2015 où 196 900 personnes ont été diagnostiquées et 78 000 sont décédées des suites du cancer. Il est inquiétant de voir l'augmentation de l'incidence du cancer malgré les avancées scientifiques actuelles, autant au niveau de la connaissance de la maladie que des traitements disponibles. Les cancers colorectaux, du poumon, de la prostate et du sein représentent environ la moitié des nouveaux cas diagnostiqués annuellement. Parmi ces quatre types de cancer, celui du poumon est le plus ravageur. En effet, il entraîne plus de décès que les trois autres types réunis. Il existe plusieurs traitements, souvent utilisés de manière complémentaire, visant à prévenir, guérir ou limiter la progression du cancer. La chimiothérapie, où l'on utilise des composés cytotoxiques pour détruire les cellules malignes, fait partie des trois traitements principaux, avec la chirurgie et la radiothérapie (Société canadienne du cancer 2017). Plusieurs médicaments issus de sources naturelles sont actuellement utilisés en chimiothérapie. En effet, entre 1981 et 2010, ce sont 128 nouveaux médicaments aux propriétés anticancéreuses et issus de sources naturelles qui ont été approuvés au niveau mondial (Newman et Cragg 2012). C'est notamment le cas de la dactinomycine, connue sous le nom d'actinomycin D et isolée directement de bactéries *Streptomyces*, et du paclitaxel, formulé sous le nom Taxol® et issu de l'écorce d'if du Canada et du Pacifique (*Taxus canadensis* et *T. brevifolia*), qui sont présentés à la figure 1 (Wani *et al.* 1971; Takusagawa *et al.* 2001).

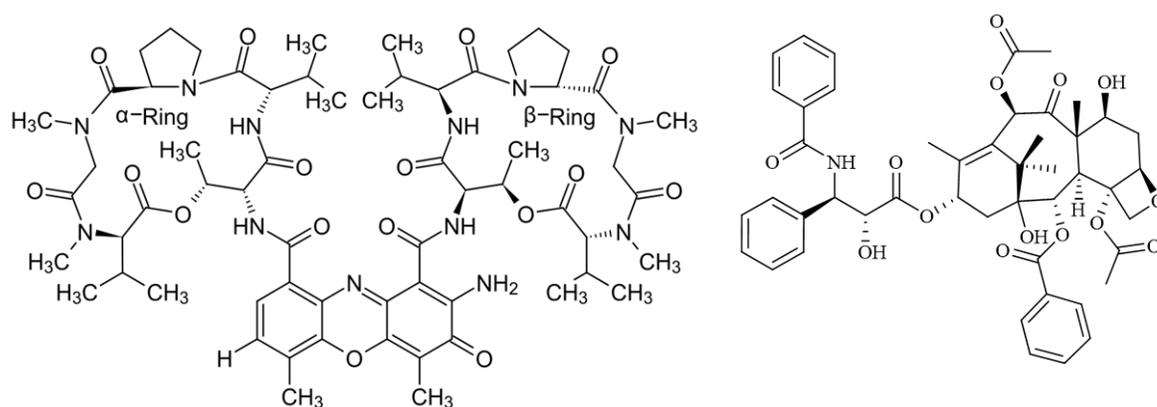


Figure 2. Structures de la dactinomycine (à gauche) et du paclitaxel (à droite).

Problématique

Les composés actifs naturels actuellement utilisés en chimiothérapie offrent d'excellentes performances en raison de leur toxicité envers les cellules cancéreuses. Toutefois, ces molécules actives ne parviennent pas à distinguer parfaitement les cellules malignes des cellules saines (Takusagawa *et al.* 2001). Ce manque de sélectivité limite malheureusement leur usage pour le traitement du cancer. Dans plusieurs cas, les effets secondaires occasionnés par cette toxicité peuvent être fatals pour les patients traités ou encore contraindre le clinicien à mettre un terme à celui-ci. C'est pour cette raison que la recherche de composés actifs naturels offrant une meilleure sélectivité envers les cellules malignes par rapport aux cellules saines présente un grand intérêt dans le domaine de la recherche sur le cancer.

C'est autour de cette problématique que s'articulent plusieurs des projets de recherche du Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE). En effet, ceux-ci cherchent à augmenter les connaissances sur les espèces de la forêt boréale québécoise à partir des connaissances de la médecine traditionnelle amérindienne. Ces projets permettent une valorisation de la richesse de la forêt boréale, et des produits naturels dont elle regorge, par une évaluation de leur potentiel anticancéreux. Dans ce contexte, un criblage de quinze espèces de champignons de la forêt boréale, comestibles ou non, a précédemment été mené au Laboratoire LASEVE (Plourde 2016). Cette étude a permis l'identification d'un extrait à l'hexane et à l'éthanol d'un champignon de type polypore présentant une cytotoxicité

sélective envers les lignées cellulaires cancéreuses comparativement aux lignées saines. Il s'agit de *Pycnoporus cinnabarinus*, un champignon poreux de forme semi-circulaire et de couleur rouge-orangé (McNeil 2007). Il s'agit d'un champignon lignivore ou de pourriture blanche, c'est-à-dire qu'il décompose la cellulose, l'hémicellulose ainsi que la lignine de son hôte (Martínez *et al.* 2005). C'est pourquoi on le retrouve sur du bois mort, généralement des essences de feuillus et rarement sur des conifères (Schatz *et al.* 1956; Smânia Jr *et al.* 2003). Il existe également deux autres espèces dans le genre *Pycnoporus*, soient les espèces *P. sanguineus* et *P. coccineus* (Nobles et Frew 1962; Ryvarden et Johansen 1980; Gilbertson et Ryvarden 1987).

À l'heure actuelle, on dénombre seulement une publication scientifique traitant de la composition chimique et des activités biologiques d'un extrait de *P. cinnabarinus* (Dias et Urban 2009). Toutefois, il reste encore certains travaux à effectuer afin d'augmenter les connaissances sur les composés responsables de l'activité cytotoxique, le ou les mécanismes d'action régissant cette activité ainsi que l'effet de synergie possible entre eux. Le présent projet pourrait donc représenter les premières étapes de développement d'un agent anticancéreux plus sélectif pour une utilisation en chimiothérapie. De plus, des résultats positifs permettraient une valorisation de la biomasse fongique de la forêt boréale québécoise.

Objectif général

Isolation et caractérisation structurale des composés responsables de l'activité cytotoxique d'un extrait de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Objectifs spécifiques

- Extraire efficacement les composés bioactifs et procéder au fractionnement bioguidé de l'extrait;
- Isoler et caractériser les composés responsables de l'activité biologique de l'extrait;
- Effectuer la synthèse totale de certaines molécules identifiées dans le champignon pour les obtenir en quantité plus importante.

Structure du mémoire

Le chapitre suivant sera consacré à une revue de littérature exhaustive sur le genre *Pycnopus*, et plus précisément sur l'espèce *P. cinnabarinus*, afin de faire l'état des connaissances actuelles. Les troisième et quatrième chapitres présentent et discutent des travaux qui ont été réalisés sur *P. cinnabarinus* dans le cadre de ce projet, autant dans le volet fractionnement et isolation que celui de la synthèse. Le chapitre V présente les conclusions et propose des perspectives pour la suite du projet.

L'annexe 1 présente une revue de littérature détaillée sur l'acide cinnabarinique ainsi que ses différentes activités biologiques tandis que l'annexe 2 propose une stratégie de synthèse pour la cinnabarine, basée sur des données théoriques de la littérature.

CHAPITRE II.
REVUE DE LITTÉRATURE

A. *PYCNOPORUS CINNABARINUS*

Depuis longtemps, plusieurs champignons font partie de l'alimentation de l'homme et possèdent des qualités nutritionnelles intéressantes (Mallavadhani *et al.* 2006). Leurs caractéristiques nutritives et chimiques présentent un intérêt de plus en plus grand pour la communauté scientifique (Manzi *et al.* 1999). En effet, l'isolation de plusieurs composés de champignons a permis de mettre en évidence plusieurs propriétés biologiques présentant un attrait certain pour le domaine médical. On pense notamment à des propriétés immunomodulatoires, antifibrotiques, anti-inflammatoires, antidiabétiques, antivirales, antimicrobiennes ainsi que des effets protecteurs pour le foie, pour ne nommer que celles-là (Gunde-Cimerman 1999; Ooi et Fang 1999; Wasser et Weis 1999; Ooi 2000). Les champignons non comestibles attirent aussi l'intérêt des chercheurs, car leur caractère toxique ou partiellement toxique présente des propriétés intéressantes pour le développement de certains médicaments tels que des anticancéreux. Tel que suggéré dans la revue de littérature suivante, les champignons du genre *Pycnoporus* présentent des propriétés biologiques intéressantes pouvant potentiellement être valorisées pour une utilisation dans le domaine médical.

Les Polyporaceae

Les Champignons, du latin Fungi, sont des organismes pluricellulaires maintenant considérés comme un règne au niveau taxonomique, ce qui n'a pas toujours été le cas (Després 2008). Il y a une quarantaine d'années, on les retrouvait plutôt comme un sous-ensemble du règne végétal, considérés à l'époque comme des plantes non vasculaires ne produisant pas de chlorophylle, faute de meilleur classement (Jean 2008). En effet, on leur attribuait des propriétés semblables aux cryptogames, végétaux sans fleur et dont les organes reproducteurs, les spores, sont généralement difficiles à voir (Lebrun et Guérineau 1988). On compte au-delà de 150 000 espèces de champignons, mais seulement une fraction est observable à l'œil nu étant donné que la grande majorité se présente sous forme microscopique (Lebrun et Guérineau 1988). Au Québec, ce ne sont pas moins de 2 000

espèces charnues, ou macromycètes, qui peuvent être observées et une grande partie de ceux-ci sont comestibles (Lebrun et Guérineau 1988).

La famille des Polyporaceae est constituée en grande partie de champignons ayant la capacité de décomposer le bois ou d'agents pathogènes arboricoles (Kim et Jung 2002). Cette famille est considérée comme un regroupement d'espèces n'ayant pas été assignées à une famille et une très grande variété de caractéristiques microscopiques et macroscopiques y est donc observée (fructification, hyménophores, mycélium, etc.) (Kim et Jung 2002). Plusieurs chercheurs ont tenté d'éclaircir la confusion qui régnait au sein de cette famille. Par exemple, Ryvar den (Ryvar den, 1991) a proposé une approche de classification taxonomique de type cladistique. Celle-ci considère tous les membres d'une famille, aussi différents soient-ils, comme découlant d'un ancêtre commun et partageant donc des caractéristiques mycologiques semblables. Comme le démontre le tableau 1, ce type de classement permet le rapprochement de plusieurs espèces de champignons comme faisant partie des Polyporaceae (Kim et Jung 2002).

Tableau 1. Liste des espèces faisant partie de la famille des Polyporaceae selon une classification de type cladistique (Kim et Jung 2002)

<i>Abortiporus biennis</i>	<i>Albatrellus ovinus</i>	<i>Amytocyttis lapponicus</i>
<i>Anomoporia bombycina</i>	<i>Antrodia carbonica</i>	<i>Antrodiella semisupina</i>
<i>Auriporia aurea</i>	<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Ceripona vindans</i>
<i>Ceriponopsis gilvescens</i>	<i>Cerrera unicolor</i>	<i>Climacocystis borealis</i>
<i>Coltricia perennis</i>	<i>Cryptoporus volvatus</i>	<i>Daedalea quercina</i>
<i>Daedaleopsis contragosa</i>	<i>Datronia mollis</i>	<i>Diacanthodes novo-guineensis</i>
<i>Dichomitus squalens</i>	<i>Diplomitoporus flavescens</i>	<i>Donkiporua expansa</i>
<i>Earlirella scabrosa</i>	<i>Echinochaete brachyporus</i>	<i>Echinoporia hydnoportia</i>
<i>Flaviporus brownii</i>	<i>Flavodon flavus</i>	<i>Fomes fomentarius</i>
<i>Fomitella supina</i>	<i>Fomitopsis pinicola</i>	<i>Fuscocerrena portoricensis</i>
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Globifomes graveolens</i>	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>
<i>Gloeoporus theleporoides</i>	<i>Grifola frondosa</i>	<i>Hapalopilus nidulans</i>
<i>Haploporus odoratus</i>	<i>Heterobasidion annosum</i>	<i>Hexagonia hydnoidea</i>
<i>Hydnopolyporus timbriatus</i>	<i>Inonotus hispidus</i>	<i>Irpex lacteus</i>
<i>Ischnoderma resinatum</i>	<i>Jahnoporus hirtus</i>	<i>Junghuhnia nitida</i>

<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Lenzites betulina</i>	<i>Leptoporus moilis</i>
<i>Lignosus sacer</i>	<i>Loweporus fusco-purpureus</i>	<i>Macrohyporia dictyopora</i>
<i>Megasporoporia cavemulosa</i>	<i>Melanoporella carbonaceus</i>	<i>Melanoporia nigra</i>
<i>Meripilus giganteus</i>	<i>Microporellus dealbatus</i>	<i>Microporus xanthopus</i>
<i>Nigrofomes melanoporus</i>	<i>Nigroporus vinosus</i>	<i>Oligoporus rennyii</i>
<i>Oxyporus populinus</i>	<i>Pachykytopora tuberculosa</i>	<i>Parmastomyces transmutans</i>
<i>Perenniporia medulla-panis</i>	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	<i>Phellinus gilvus</i>
<i>Phellinus igniarius</i>	<i>Physisporinus vitreus</i>	<i>Piloporia sajanensis</i>
<i>Piptoporus betulinus</i>	<i>Podofomes trogii</i>	<i>Polyporoletus sublividus</i>

Le genre *Pycnoporus* et l'espèce *P. cinnabarinus*

Le genre *Pycnoporus* fait partie du phylum Basidiomycota, dans la classe des basidiomycètes, qui appartiennent à la famille des Polyporaceae (De Oliveira *et al.* 2007; Téllez-Téllez *et al.* 2016). Le genre *Trametes* présente des caractéristiques morphologiques semblables, la seule différence étant la couleur des basidiocarpes (Téllez-Téllez *et al.* 2016). Les polypores sont des champignons sans lame, mais plutôt constitués de tubes, inséparables de la chair, se terminant par de petits orifices (pores) que l'on peut apercevoir à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe (Lebrun et Guérineau 1988; Després 2008). Le terme *Pycnoporus* découle de la combinaison des mots « *pycno* », qui signifie dense, et « *porus* », qui réfère aux pores. On attribue donc aux champignons de ce genre une densité élevée de pores à leur surface.

Trois espèces appartiennent au genre *Pycnoporus* : *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril, *P. cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. et *P. coccineus* (Fr.) Bondartsev. & Singer (Ryvarden et Johansen 1980; Gilbertson et Ryvarden 1987; Téllez-Téllez *et al.* 2016). Des preuves morphologiques et génétiques suffisantes ont effectivement entériné la validité de ces trois espèces (Nobles et Frew 1962). Dans certains ouvrages, on mentionne une quatrième espèce, *Pycnoporus puniceus* (Fr.) Ryvarden, mais la littérature à ce sujet est plutôt rare (Ryvarden et Johansen 1980; Gilbertson et Ryvarden 1987). Les quatre espèces ont toutefois pu être différenciées dans le passé en fonction de leurs caractéristiques morphologiques (forme du basidiocarpe et grosseur des pores) et de leur répartition géographique (Nobles et Frew

1962; Ryvar den et Johansen 1980). À l'échelle mondiale, en fonction des dépôts de spécimens dans les collections à travers le monde, l'espèce la plus étudiée est *P. sanguineus* suivie de *P. cinnabarinus*, *P. coccineus* et *P. puniceus*. Tel qu'il le sera énoncé, celles-ci sont très proches en apparence (Eggert 1997) et présentent des caractéristiques mycologiques semblables.

Caractéristiques mycologiques

Les trois espèces principales faisant partie du genre *Pycnoporus* (tableau 2) ont des caractéristiques mycologiques assez semblables, ce qui rend parfois leur identification difficile. L'endroit de la récolte donne toutefois de précieuses informations permettant de distinguer ces trois espèces. Typiquement, celles-ci produisent des carpophores vifs, de couleur rouge-orangé à cinabre caractéristique, flabelliformes, c'est-à-dire en forme d'éventail, et poussant horizontalement sur leur hôte (figure 2) (Correa *et al.* 2006; De Oliveira *et al.* 2007). La couleur du basidiocarpe, ou carpophore, peut toutefois prendre des couleurs allant de l'orange au rouge en passant par le rouge-brun en certaines occasions (Basar 2007). Le chapeau du champignon ainsi que les pores sont également de couleur orange-rouge (Schatz *et al.* 1956). De manière générale, les espèces *P. cinnabarinus* et *sanguineus* sont matures en été et en automne (Schatz *et al.* 1956), mais on peut les retrouver en toutes saisons. Les espèces du genre *Pycnoporus* ne sont pas comestibles (McNeil 2007).

Tableau 2. Classification taxonomique des trois espèces du genre *Pycnoporus*

Classification taxonomique	
Règne	Fungi
Division	Basidiomycota
Classe	Agaromycetes
Ordre	Polyporales
Famille	Polyporaceae
Genre	<i>Pycnoporus</i>
Espèces	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>P. coccineus</i>

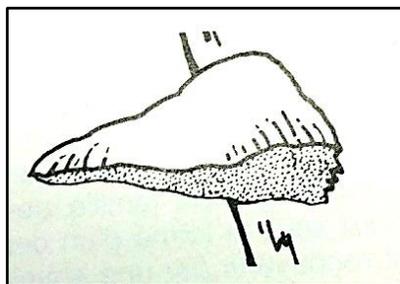


Figure 3. Représentation simplifiée des polypores (Denis et Guériteau 1988).

Pour ce qui est de *P. cinnabarinus*, *Polyporus cinnabarinus* ou tramète cinabre, c'est un champignon poreux non comestible de forme semi-circulaire et présentant un corps fructifère d'une largeur de 2 à 10 cm, de 2 à 6 cm en surplomb et de 1 à 2 cm d'épaisseur (McNeil 2007). Sa surface piléique, ou son chapeau, est plane ou légèrement convexe, mate, de couleur orange ou rougeâtre et peut présenter des bosses, des excroissances ou un léger velours (McNeil 2007). Ses tubes, ou pores, sont d'une longueur allant de 4 à 6 mm, parfois en deux à trois couches sous forme de strates. Une densité d'environ 4 à 6 pores par millimètre est retrouvée dans un système anguleux, dans des couleurs allant de l'orange au rouge-orangé (McNeil 2007).

Sa chair est de couleur orange ou rouge-orangé caractéristique (Dias et Urban 2009), et on pourrait qualifier sa texture de liégeuse (figure 3, gauche). La couleur est la plus intense pendant la croissance du fruit (Téllez-Téllez *et al.* 2016). Généralement, on retrouve une épaisseur allant de 0,5 à 1,5 cm pour les spécimens de *P. cinnabarinus* (McNeil 2007). La sporée, soit l'ensemble des spores que l'on peut retrouver sous son chapeau, est blanche (McNeil 2007).

P. cinnabarinus est généralement retrouvé en spécimen isolé ou par groupe de deux à trois chapeaux soudés latéralement sur l'hôte (figure 3, droite). Il croît préférentiellement sur des souches, chicots ou tronc renversés (McNeil 2007), majoritairement de feuillus, sur lesquels il cause de la pourriture blanche. Ses essences de prédilection pour croître sont le bouleau, le sorbier, l'aulne, le noisetier, le frêne, le pommier, le peuplier, le saule, le chêne et les espèces

du genre *Prunus* (prunier, cerisier, pêchier, etc.) (Téllez-Téllez *et al.* 2016). On le retrouve rarement sur des espèces de conifères et il est souvent présent sur du bois mort (Lepp 2013).



Figure 4. *P. cinnabarinus* sur un hôte (gauche) (Prêt à pousser) et spécimen isolé (droite) (Wikimédia).

Les trois espèces du genre *Pycnoporus* (*cinnabarinus*, *sanguineus* et *coccineus*) jouent un rôle dans la décomposition du bois mort (De Oliveira *et al.* 2007). De manière générale, les champignons de la division des basidiomycètes dégradent la lignine du bois pour produire une matière blanchâtre enrichie en cellulose : la pourriture blanche (Martínez *et al.* 2005). C'est pourquoi on les appelle champignons de pourriture blanche (Correa *et al.* 2006), par comparaison aux champignons de pourriture brune ou molle. En effet, les “*white-rot fungi*” sont les seuls champignons capables de dégrader la lignine en milieu naturel de façon efficace et sélective (Geng *et al.* 2004; Martínez *et al.* 2005) ou de manière simultanée, avec la cellulose (Martínez *et al.* 2005). *P. cinnabarinus* est effectivement un champignon lignivore, ou détritivore, c'est-à-dire qu'il décompose la cellulose, l'hémicellulose ainsi que la lignine de son hôte (Díaz-Godínez *et al.* 2016). C'est pourquoi on le retrouve en grande partie sur des matériaux lignocellulosiques comme du bois mort ou en décomposition ou des déchets forestiers et agricoles (Díaz-Godínez *et al.* 2016). Le bois colonisé par *P. cinnabarinus* présente l'apparence typique de la pourriture blanche (Temp et Eggert 1999), c'est-à-dire qu'il est mou, spongieux et de couleur blanche ou jaune. Ce champignon est un modèle intéressant pour l'étude de ce phénomène, étant donné son système lignolytique simple (Geng *et al.* 2004).

Distribution

On retrouve des espèces du genre *Pycnopus* sur un grand territoire au niveau mondial, notamment dans les régions avec des climats tropicaux et subtropicaux de tout l'hémisphère nord (Sullivan et Henry 1971). *P. cinnabarinus* peut être retrouvé en Australie (Dias et Urban 2009), tout comme *P. coccineus* et *P. sanguineus* (Lepp 2013). De manière générale, *P. cinnabarinus* a une distribution plus nordique que *P. sanguineus* (Schatz *et al.* 1956). *P. cinnabarinus* est effectivement l'espèce la plus nordique du genre puisqu'on la retrouve en grande partie en zone tempérée du nord (Sullivan et Henry 1971). Des spécimens ont notamment été retrouvés en Belgique, à Madagascar, en Australie, en Autriche, en Finlande, en France, en Espagne et en Russie (Téllez-Téllez *et al.* 2016). *P. sanguineus*, quant à lui, est retrouvé en grande majorité dans les forêts présentant un climat de type tropical ou subtropical, autant dans l'hémisphère nord que sud (Nobles et Frew 1962; Smânia Jr *et al.* 2003). Ce dernier se retrouve effectivement dans des zones géographiques avec ce climat particulier, autant en Afrique, en Amérique qu'en Asie (Achenbach et Blumm 1991). Des spécimens de cette espèce ont été répertoriés en Espagne, en Géorgie, en Malaisie, en Inde, au Sri Lanka, en Chine, en Équateur, en Thaïlande, en Argentine, en Uruguay, en Guyane, au Vietnam, au Venezuela, en Nouvelle-Calédonie, au Brésil, en Colombie et au Mexique (Téllez-Téllez *et al.* 2016). *P. cinnabarinus* et *coccineus* ont tendance à se retrouver dans des zones au climat plus tempéré, dans les deux hémisphères (De Oliveira *et al.* 2007). Par contre, pour les distinguer, *P. cinnabarinus* occupe majoritairement la zone tempérée du nord tandis qu'on retrouve *P. coccineus* dans celle du sud, dans les pays au bord des océans Indien et Pacifique (Nobles et Frew 1962). D'ailleurs, des spécimens de *P. coccineus* ont été retrouvés aux Îles Salomon, au Japon, au Australie et en Thaïlande (Téllez-Téllez *et al.* 2016). *P. puniceus*, quant à lui, a été retrouvé en Thaïlande, à Cuba et en Guyane (Téllez-Téllez *et al.* 2016). On constate que la distribution des différentes espèces a tendance à se chevaucher, mais que chacune occupe une zone avec un climat particulier ayant une influence directe sur la composition chimique (Dias et Urban 2009).

Composition chimique

- Les phénoxazones

Une grande partie des connaissances chimiques sur les espèces du genre *Pycnoporus* est attribuée à Gripenberg et ses collaborateurs (Gripenberg 1951, 1958, 1963; Gripenberg *et al.* 1957) ainsi que Cavill et ses collaborateurs (Cavill *et al.* 1953, 1959). En effet, ces deux équipes de chercheurs ont isolé et caractérisé les composés majoritaires de ces espèces comme des molécules au squelette phénoxazone (figure 4).

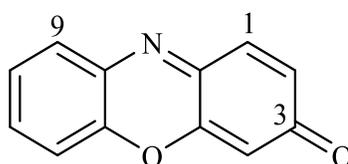


Figure 5. Représentation générale des phénoxazones.

Les trois espèces du genre *Pycnoporus* produisent effectivement des pigments caractéristiques de types 2-amino-phénoxazinone (figure 5) (Eggert 1997). Ce sont les chromophores associés à cette catégorie de molécules qui explique la couleur typique des champignons du genre (Eggert 1997). Le caractère conjugué de ces molécules explique leur absorption forte dans la région des ultraviolets (UV), mais aussi dans la partie visible du spectre de la lumière. On les perçoit de couleur rouge-orangé étant donné leur absorption vers 435 nm, dans le bleu, la couleur complémentaire de l'orange. Les constituants responsables de la couleur intense de *P. cinnabarinus* et les autres espèces du genre ont déjà été identifiés comme étant des pigments alcaloïdes de type phénoxazone (Dias et Urban 2009). Plusieurs études attribuent toutefois à l'acide cinnabarinique l'intense couleur rouge-orangé des espèces du genre *Pycnoporus* (Gripenberg 1958; Gerber 1968; Sullivan et Henry 1971; Manthey *et al.* 1988; Eggert *et al.* 1995; Eggert 1997; Temp et Eggert 1999; Dhawan *et al.* 2005; Bruyneel *et al.* 2008; Le Roes-Hill *et al.* 2009). En effet, un extrait de *P. cinnabarinus* en contiendrait 0,65 % du poids du champignon frais (Eggert 1997). Lors de cultures liquides de souches de ce champignon, le pigment majoritaire retrouvé dans le filtrat est également l'acide cinnabarinique (Eggert *et al.* 1995).

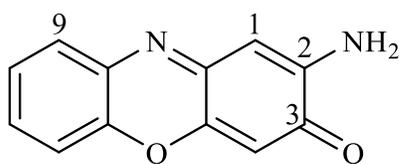


Figure 6. Représentation générale des 2-amino-phénoxazinones.

De manière générale, les corps fructifères des champignons du genre *Pycnoporus* contiennent de l'acide cinnabarinique (2-amino-3-oxo-3*H*-phénoxaine-1,9-dicarboxylic acid) (I), de la cinnabarine (2-amino-9-hydroxyméthyl-3-oxo-3*H*-phénoxazine-1-carboxylic acid) (II) ainsi que du tramesanguin (2-amino-9-formyl-3-oxo-3*H*-phénoxazine-1-carboxylic acid) (III), trois molécules dérivées du squelette 2-amino-phénoxazinone (figure 6) (Sullivan et Henry 1971). Celles-ci sont effectivement identiques, à l'exception de l'état d'oxydation du substituant présent en position C-9 (Le Roes-Hill *et al.* 2009).

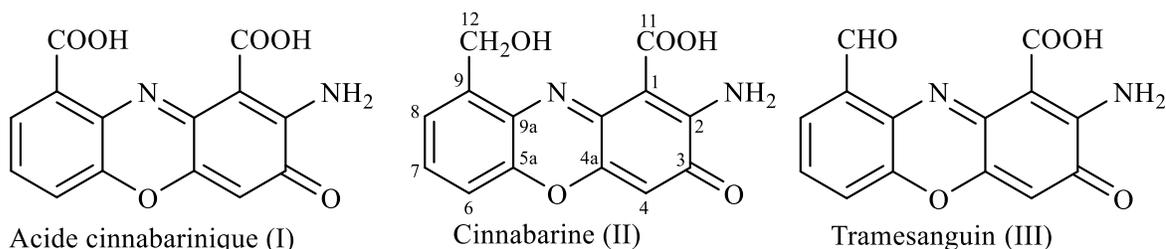


Figure 7. Structures des principales phénoxazines retrouvées dans le genre *Pycnoporus*.

La distribution des pigments dépend de l'espèce et de la saison, mais aussi de la localisation géographique de croissance (Gripenberg 1963; Dias et Urban 2009). Il a été démontré que les espèces *P. sanguineus* et *cinnabarinus* contiennent de la cinnabarine (Smânia Jr *et al.* 2003). *Pycnoporus sanguineus* synthétise pas moins de sept pigments, dont l'antibiotique cinnabarine (Smânia Jr *et al.* 2003). En effet, dans l'extrait acétonique du champignon, celle-ci représente 90 % des constituants de type phénoxazine (Achenbach et Blumm 1991). Le spectre Raman de l'extrait est, en effet, très semblable à celui de la cinnabarine, ce qui suggère que celle-ci en est le composé majoritaire (De Oliveira *et al.* 2007). Ces données viennent valider les conclusions qui avaient été tirées plusieurs années auparavant, attribuant

à la cinnabarine la place de molécule principale (Gripenberg 1958; Cavill *et al.* 1959), devant l'acide cinnabarinique (Gripenberg *et al.* 1957) et le tramesanguin (Gripenberg 1963). Il a été rapporté que les spécimens de *P. cinnabarinus* retrouvés dans l'hémisphère nord contiennent de la cinnabarine, de l'acide cinnabarinique ainsi que du tramesanguin (Dias et Urban 2009). Pour les spécimens retrouvés en Australie, une nouvelle phénoxazone s'ajoute à ce mélange de molécules : la pycnoporine ou 2-amino-9-méthoxyméthanol-3-oxo-3*H*-phénoxazine-9-carboxylique acid (figure 7) (Dias et Urban 2009). Celle-ci a été isolée et caractérisée avec succès, mais sa configuration relative ou absolue n'a pu être déterminée à l'heure actuelle en raison d'une dégradation rapide après la purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Dias et Urban 2009). L'étude de Dias et Urban a été la première à réaliser l'élucidation structurale complète de la cinnabarine, de l'acide cinnabarinique et du tramesanguin par résonance magnétique nucléaire (RMN) en une et deux dimensions. Le manque de solubilité de ce genre de molécules dans la plupart des solvants organiques rend difficile l'isolation et l'identification structurale (Dias et Urban 2009).

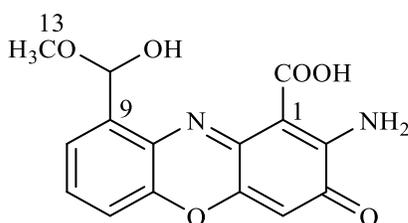


Figure 8. Structures de la pycnoporine dans *P. cinnabarinus*.

- Les stérols

En plus des pigments de type phénoxazine-3-one, plusieurs molécules au squelette triterpénique ont été isolées dans l'espèce pantropicale *Pycnoporus sanguineus* (Correa *et al.* 2006). Dans l'extrait à l'hexane du champignon, de nature plus apolaire, l'ergostérol représente le composé majoritaire (figure 8) (De Oliveira *et al.* 2007). L'endoperoxyde d'ergostérol, ou ergosterol-5,8-endoperoxyde, a également été isolé et caractérisé dans cette espèce (figure 8) (Correa *et al.* 2006; De Oliveira *et al.* 2007). Pour l'espèce *P. cinnabarinus*,

le peroxyde d'ergostérol a aussi été identifié dans l'un des spécimens étudiés (Dias et Urban 2009). En effet, le fractionnement de l'extrait éthanolique du champignon a permis l'isolation de cette molécule de la famille des stérols, déjà connue de la littérature.

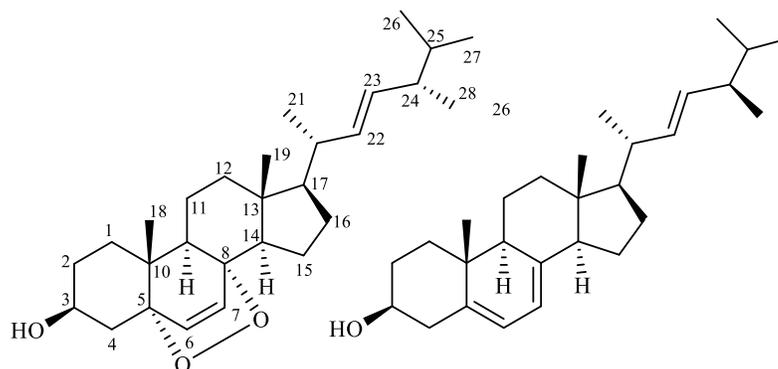


Figure 9. Structures de l'endoperoxyde d'ergostérol (gauche) et de l'ergostérol (droite).

- Les coibanoles

Récemment, un groupe de recherche du Panama a identifié une nouvelle classe de molécules présentes dans le filtrat de culture de *Pycnoporus sanguineus* (Molinar *et al.* 2012). Il s'agit des coibanoles, correspondant à la combinaison de deux unités isopréniques et d'un fragment de nature non terpénique, illustrés à la figure 9. Trois nouvelles structures de ce type ont ainsi été isolées et caractérisées. Ces molécules inédites sont des cétones α,β -insaturées et sont considérées comme des terpènes issus de deux grandes voies biosynthétiques.

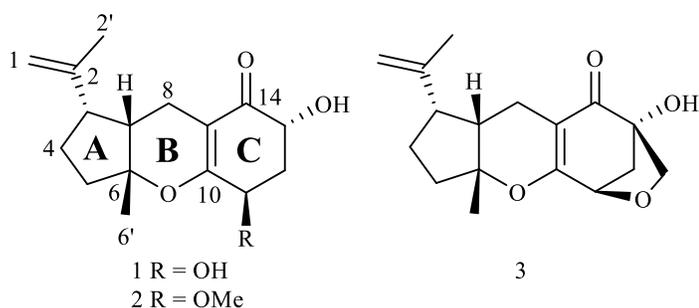


Figure 10. Structures des coibanoles isolées de *Pycnoporus sanguineus*.

- Les laccases

Plusieurs enzymes connues sous le nom de laccases peuvent être produites par les espèces du genre *Pycnoporus*, soient *P. cinnabarinus*, *P. sanguineus* et *P. coccineus* (Oda *et al.* 1991; Esposito *et al.* 1993). En effet, les trois membres du genre sont reconnus pour être de prodigieux producteurs de ces enzymes oxydantes (Le Roes-Hill *et al.* 2009). En plus d'une chaîne protéique multi-cuivré, celles-ci sont également constituées d'une section saccharidique (Claus 2004). Les laccases appartiennent à la catégorie d'enzymes oxydases contenant des centres cuivre (Eggert 1997). Les laccases présentes dans *P. cinnabarinus* sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide cinnabarinique (Eggert *et al.* 1995; Eggert 1997). Elles catalysent effectivement la réaction de condensation, ou dimérisation oxydative, de l'acide 3-hydroxyanthranlique (3-HAA) pour former cette phénoxazone (Eggert 1997; Le Roes-Hill *et al.* 2009). Elles permettent également la dégradation de la lignine par *P. cinnabarinus* et sont les seules phénoloxidasés présentes (Temp et Eggert 1999).

Utilisations

De façon ancestrale, vers le 19^{ème} siècle, les aborigènes du désert d'Australie utilisaient les espèces du genre *Pycnoporus* pour traiter plusieurs affections buccales. On pense notamment à des maux de bouches, candidoses buccales infantiles, ulcères ou directement sur les lèvres endolories ou comme anneau de dentition pour soulager les douleurs liées à la pousse des dents (Lepp 2013). *P. sanguineus* était également utilisé en médecine populaire par les tribus indigènes des Amériques et d'Afrique, où on lui attribuait des vertus dans le traitement de nombreuses maladies (Smânia *et al.* 1995; Smânia Jr *et al.* 2003). Certaines communautés campagnardes de l'état de Santa Catarina, dans le sud du Brésil, ont également rapporté l'utilisation de cette espèce pour soulager certaines lésions cutanées (Smânia *et al.* 1995).

De façon plus actuelle, on utilise les espèces du genre *Pycnoporus*, dans plusieurs industries (Basar 2007). En effet, les laccases produites par ces champignons sont utilisées dans le secteur des pâtes et papiers, du textile et de l'alimentaire. Elles sont impliquées dans les processus de décoloration ou de détoxification de certains procédés (Couto et Herrera 2006; Riva 2006). Les laccases, seules phénoloxidasés présentes dans *P. cinnabarinus*, permettent

la dégradation efficace de la cellulose, l'hémicellulose ainsi que la lignine (Temp et Eggert 1999; Geng *et al.* 2004; Kües et Rühl 2011). De plus, cette espèce produit le métabolite 3-HAA ayant un rôle de médiateur dans le processus d'oxydation de substrats non phénoliques par les laccases (Eggert *et al.* 1997).

Activités biologiques

Des activités antibiotiques sur plusieurs souches de bactéries ont été rapportées pour les espèces du genre *Pycnoporus* (Bose 1946; Lemberg 1952; Smânia *et al.* 1995). En 1946, l'activité antimicrobienne de *P. sanguineus* a été étudiée sur des souches de *Salmonella spp.* (Bose 1946). Ces expérimentations ont permis de conclure que ce champignon était actif contre *Salmonella Typhi* et *Staphylococcus aureus*. L'extrait à l'acétone de *P. sanguineus*, obtenu via une extraction par Soxhlet, possède effectivement une activité antibactérienne intéressante contre *S. aureus* (Smânia *et al.* 1995). Des zones d'inhibition de 22 mm pour 2,5 mg d'extrait et de 10 mm pour 0,25 mg ont été observées après 18 heures d'incubation (Smânia *et al.* 1995). Après fractionnement, une fraction fortement suspectée de contenir de la cinnabarine montrait une activité antibactérienne 2,8 fois plus élevée que l'extrait de départ (Smânia *et al.* 1995). Les travaux de Smânia Jr *et al.* (Smânia Jr *et al.* 2003) ont démontré que la cinnabarine, isolée des espèces *P. sanguineus* et *P. cinnabarinus*, possédait des activités antibactérienne, antifongique et antivirale. De plus, une étude de Correa *et al.* (Correa *et al.* 2006) a démontré, pour des extraits de *P. sanguineus*, une activité antiparasitaire sur *Leishmania*, un parasite protozoaire humain. Des concentrations efficaces médianes (CE₅₀) de 7,3 et 0,82 µg·mL⁻¹ ont été mesurées pour les extraits à l'hexane et à l'acétone, respectivement (Correa *et al.* 2006). Toutefois, ces mêmes extraits ont aussi démontré une activité cytotoxique élevée, avec des concentrations létales (LC₅₀) de 39,2 et 8,5 µg·mL⁻¹ (Correa *et al.* 2006).

D'autre part, l'acide cinnabarinique et autres dérivés dans le genre *Pycnoporus* permettent de protéger efficacement contre les effets néfastes des radicaux générés par les rayons ultraviolets (UV) et les attaques par les bactéries (Eggert 1997).

Finalement, l'endoperoxyde d'ergostérol, isolé de l'extrait à l'acétone de *P. sanguineus*, a causé une inhibition complète des amastigotes à une concentration de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en présentant une toxicité plus faible que l'extrait de départ (Correa *et al.* 2006).

Les études approfondies de l'équipe de Dias et Urban ont permis la découverte de multiples activités biologiques pour des extraits bruts de *P. cinnabarinus* (Dias et Urban 2009). Une activité cytotoxique modérée contre les cellules de leucémie murine (P388) a été observée pour tous les extraits testés. L'extrait le plus actif possède une IC_{50} de $7,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Certains extraits ont également démontré une activité antivirale contre les virus de l'*Herpes simplex* de type 1 et la *Polio* de type 1. Des activités antifongique et antimicrobienne sélectives ont également été observées sur les souches *Candida albicans* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition de 2 et 3 mm, respectivement (Dias et Urban 2009). Les cinq composés isolés de l'espèce *P. cinnabarinus* – la cinnabarine, l'acide cinnabarinique, le tramesanguin, la pycnoporine et le peroxyde d'ergostérol – ont également démontré une cytotoxicité contre les cellules de leucémie murine (P388) avec des IC_{50} entre 13 et $44 \mu\text{M}$.

De plus, des fluides de culture concentrés de *P. cinnabarinus* ont démontré une activité antibiotique contre quelques souches bactériennes (Eggert *et al.* 1995; Eggert 1997). En effet, une concentration inhibitrice minimale (MIC) sur la souche bactérienne la plus sensible, le genre *Streptococcus*, de l'ordre de $0,02$ à $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a pu être mesurée (Eggert 1997). D'autres groupes de recherche ont également mesuré de puissantes activités bactériostatique et bactéricide d'extraits bruts de *P. cinnabarinus* contre les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Díaz-Godínez *et al.* 2016). Une activité insecticide sur les larves de *Diatraea magnifactella*, une foreuse de la canne à sucre, a également été mesurée par la mort de celles-ci en à peine 72 heures et leur rigidité en 96 heures après injection de l'extrait (Díaz-Godínez *et al.* 2016).

B. ASPECT SYNTHÈSE POUR LA PRÉPARATION DES PHÉNOXAZONES

Intérêt de synthèse des phénoxazones

La découverte du ou des composés responsables de l'activité cytotoxique de *P. cinnabarinus* mène à une impasse : celle de se procurer du matériel de départ en quantité suffisante pour isoler la molécule d'intérêt à des fins thérapeutiques. Étant donné l'abondance plutôt faible des espèces du genre pour la cueillette, il serait fort intéressant d'avoir une alternative pour la synthèse de leurs constituants. Si l'un de ces composés devait se rendre en phase préclinique ou clinique, une synthèse en laboratoire à plus grande échelle serait nécessaire. Aussi, les problèmes de solubilité rencontrés avec les phénoxazones pourraient être grandement améliorés par la synthèse de dérivés porteurs de sections hydrophiles. De plus, la synthèse de chaque composé individuellement permettrait de faire une étude plus approfondie de son champ d'action biologique. Les standards offerts sur le marché sont très coûteux ou n'existent tout simplement pas au moment d'écrire ces lignes. C'est pour toutes ces raisons que la synthèse efficace des molécules de type phénoxazone présente un intérêt scientifique très grand.

Obtention de l'acide cinnabarinique par voie enzymatique

L'acide cinnabarinique (AC) est obtenu par la dimérisation oxydative de deux molécules de 3-HAA (figure 10). Certains métaux de transition et systèmes biologiques possédant une activité enzymatique catalysent cette réaction (Christen et Stocker 1992). Les laccases sont des enzymes produites par l'espèce *P. cinnabarinus* (Göçenoglu et Pazarlioglu 2014), qui produit également 3-HAA (Li *et al.* 2001). En ces conditions, AC se forme dans une réaction d'oxydation à six électrons (Eggert 1997). L'enzyme cinnabarinatase synthase permet elle aussi, en présence du précurseur, la production d'acide cinnabarinique (Ogawa *et al.* 1983a; Le Roes-Hill *et al.* 2009). Les ions manganèse peuvent également agir comme stimulateur pour la réaction enzymatique à une concentration de $123 \pm 3 \mu\text{M}$ (Ogawa *et al.* 1983a).

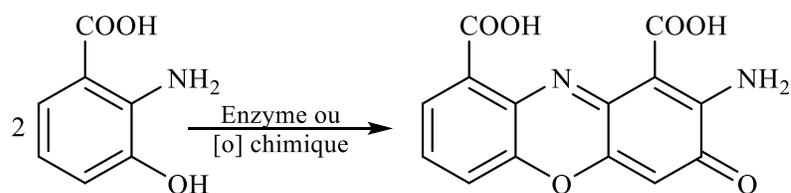


Figure 11. Représentation générale de la synthèse de l'acide cinnabarinique.

Obtention de l'acide cinnabarinique par voie chimique

La synthèse de l'acide cinnabarinique à partir de 3-HAA peut également être réalisée de manière non enzymatique. La présence d'espèces oxygénées actives ou de métaux de transition comme catalyseurs de la réaction est donc nécessaire (Eggert *et al.* 1995). En effet, il est connu que 3-HAA est facilement oxydé par l'oxygène moléculaire pour produire AC comme produit prédominant (Ogawa *et al.* 1983b). L'oxydation en deux étapes passe par la formation d'une imine qui se condense ensuite avec la deuxième molécule d'acide 3-hydroxyanthranilique pour former l'acide cinnabarinique en libérant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Ogawa *et al.* 1983a; Dykens *et al.* 1987; Ishii *et al.* 1990; Manthey *et al.* 1990).

CHAPITRE III.
MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. MATÉRIEL

Champignons

P. cinnabarinus (Jacq.) P. Karst. 1881 a été récolté au mois de juin 2015 au Saguenay Lac-Saint-Jean, secteur Laterrière, sur la ZEC Mars-Moulin dans la MRC du Fjord-du-Saguenay. Les coordonnées géographiques précises sont : 48.116360, -70.982821. Un spécimen Voucher, numéro QFB-26795, a été déposé à l'Herbier René-Pomerleau de Québec.

Solvants, réactifs et standards

Tous les solvants utilisés sont de grade ACS, sauf lors des analyses HPLC qui sont de grade HPLC (Fisher Scientific) et filtrés sur des filtres de 47 mm en nylon de 0,45 μm (GVS Main Magna™, Fisher Scientific). L'eau (H_2O) est toujours distillée et déminéralisée. Les réactifs et standards proviennent majoritairement de chez Sigma-Aldrich et Toronto Research Chemical (TRC).

Chromatographie sur couche mince (CCM)

En phase normale, les plaques SiliaPlate™ TLC Plates – Aluminium (Al) Backed Silica (épaisseur de 200 μm) proviennent de chez SiliCycle UltraPure SILICA GELS. En phase inverse, des plaques SiliaPlate™ TLC Plates – Aluminium (Al) Backed C18 (13%) (épaisseur de 200 μm) ont été utilisées. Les plaques préparatives en phase normale SiliaPlate™ TLC Plates – Glass (G) Silica (épaisseur de 1000 μm) proviennent du même fournisseur. Les plaques CCM ont été visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) et photographiées avec un cabinet Chromato-Vue® C-75 (UVP) opéré avec le logiciel Doc-ItLS. Elles ont ensuite été révélées par la pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 20 % v.v⁻¹ préparée dans du méthanol (MeOH) de grade ACS puis chauffées 10 minutes dans un four Heratherm™ (Thermo Scientific) à 100 °C. Cette manipulation permet de révéler la présence de composés triterpéniques qui prennent une couleur allant du rose au pourpre après le chauffage.

Chromatographie liquide à basse pression

Un système de chromatographie liquide à basse pression de marque Büchi composé d'une unité de contrôle C-620, d'un collecteur de fractions C-660, de deux modules de pompes C-605, d'un photomètre UV C-635 et opéré avec le logiciel SepacoreControl (version 1.0.3000.1) a permis la purification de plusieurs extraits ou fractions. Des cartouches SiliaSep™ Flash Cartridges Silica d'une capacité de 4 à 80 g et provenant de chez SiliCycle UltraPure SILICA GELS ont été utilisées. Lorsque nécessaire, de la silice ZEOCHEM® Silicagel ZEOprep 60 ECO 40-63 µm (Canadian Life Science) a été préparée dans une colonne en verre de 46 cm de longueur et 5 cm de diamètre interne (Büchi).

Chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS)

Un système de chromatographie liquide à haute performance 1100 Series (Agilent Technologies) composé d'un compartiment à colonnes G1316A, d'un échantillonneur automatique G1313A, d'une pompe isocratique avec cabinet à solvant G1310A munit d'un dégazeur G1322A (série 1200), couplé à un spectromètre de masse avec source multimode G1956B et opéré avec le logiciel LC/MSD ChemStation a permis les analyses. La phase stationnaire est une colonne Kinetex Biphenyl 100 Å 250 x 4,6mm 5 µm (Phenomenex). Pour la plupart des analyses, le gradient allait de 60 % à 100 % en MeOH de grade HPLC dans l'H₂O déminéralisée, tous deux acidifiés avec 0,1 % d'acide formique (AF), en 35 minutes et suivi d'un lavage à 100 % MeOH pendant 10 minutes. Le débit était de 1 mL·min⁻¹, les injections de 20 µL et les longueurs d'onde d'analyse de 230, 254, 280, 300 et 435 nm. Le mode d'ionisation négatif a été utilisé pour les analyses en spectrométrie de masse. Les échantillons ont été filtrés sur des filtres pour seringue de 0,45 µm 13 mm PTFE (Canadian Life Science). Pour les extraits, une concentration de 10 mg·mL⁻¹ a été préparée, pour les fractions, de 5 mg·mL⁻¹, et de 1 - 2,5 mg·mL⁻¹ pour les produits purs et les standards.

Chromatographie liquide à haute performance à l'échelle préparative (HPLC-prep)

Un système Prominence (Shimadzu) composé d'un collecteur de fractions FRC-10A, d'un détecteur à barrette de diode (DAD) SPD-M20A, d'un échantillonneur automatique SIL-

10AP, de deux pompes LC-20AP équipées d'unités de dégazage DGU-20A 5R et opéré avec le logiciel RealTime Analysis Shimadzu HPLC-system a permis la séparation. La phase stationnaire était une colonne Kinetex Biphenyl 100 Å 250 x 21,2 mm 5 µm (Phenomenex). Pour la séparation, le gradient allait de 70 à 100 % en MeOH de grade HPLC dans l'H₂O déminéralisée, tous deux acidifiés avec 0,1 % d'AF, en 40 minutes et suivi d'un lavage à 100 % MeOH pendant 10 minutes. Le débit était de 10 mL·min⁻¹, les injections de 250 à 750 µL et les longueurs d'onde d'analyse de 200 à 600 nm. Des fractions de 10 mL ont été récoltées. Les échantillons ont été préparés à une concentration approximative de 50 mg·mL⁻¹ et filtrés sur des filtres pour seringue de 0,45 µm avant l'injection.

Spectrométrie de masse haute résolution (HR-ESI-MS)

Les analyses de masse exacte par spectrométrie de masse haute résolution ont été effectuées en collaboration avec NanoQAM. Le spectromètre est un 6210 TOF-MS (Agilent Technologies) utilisé avec un mode d'ionisation par électronébuliseur (ESI).

Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

Un système 7890A (Agilent Technologies) composé d'un spectromètre de masse 5975C inert XL EI/CI MSD avec un détecteur triple-axe, d'un échantillonneur GC 80, d'une colonne HP-5ms (30 m x 250 µm x 0,25 µm) et opéré avec le logiciel Enhanced ChemStation MSD a permis les analyses. La température initiale était de 60 °C pour 2 minutes, puis a été augmentée jusqu'à 250 °C à 3 °C·min⁻¹, puis jusqu'à 300 °C avec une rampe de 15 °C·min⁻¹. Cette dernière température a été gardée pour 20 minutes pour redescendre ensuite à 100 °C avec une rampe de 45 °C·min⁻¹. Le débit de gaz était de 19,00 mL·min⁻¹, le débit de purge du septum de 3,0 mL·min⁻¹ et le débit de la colonne de 1,000 mL·min⁻¹. La rampe de température pour l'analyse des acides gras lors de la saponification est la suivante : la température initiale est de 100 °C pour 2 minutes, puis augmente à raison de 3 °C·min⁻¹ pour atteindre 280 °C et y rester pendant 10 minutes. La température de l'injecteur est de 250 °C et celle du détecteur de 280 °C. Le volume d'injection est de 3 µL.

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Un système de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier Cary 630 FTIR (Agilent Technologies) munit d'un module pour réflectance totale atténuée (ATR) et opéré avec le logiciel MicroLab PC a permis les analyses.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Un spectromètre de résonance magnétique nucléaire Advance 400 (Bruker) (400,13 MHz pour ^1H et 100,61 MHz pour ^{13}C) équipé d'une sonde QNP de 5 mm a permis l'acquisition de spectres 1D (^1H , ^{13}C , DEPT et APT) et 2D (^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC et NOESY). Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en ppm par rapport au TMS. Les constantes de couplage (J) des spectres RMN ^1H sont exprimées en hertz (Hz).

Autres appareils

Une balance analytique New Classic MF MS304S/03 (METTLER TOLEDO) a permis la pesée des échantillons et réactifs et un bain à ultrasons FS220D (Fisher Scientific) a été utilisé pour homogénéiser et aider à la solubilisation. Une centrifugeuse AllegraTM X-22R (Beckman Coulter) a permis une meilleure séparation des phases dans certaines situations. Des évaporateurs rotatifs Rotavapor R-210 (Büchi) munis d'un bain chauffant B-491 ont permis l'évaporation des solvants organiques sous pression réduite. Pour l'eau et le diméthylsulfoxyde (DMSO), c'est un lyophilisateur FreeZone¹² (LabConco) avec un Bulk Tray Dryer muni d'une pompe (LabConco) qui a permis la sublimation des solvants aqueux.

B. MÉTHODES

Tel que discuté précédemment, la sélection du champignon a été réalisée à partir des données obtenues lors du criblage de plusieurs champignons, comestibles ou non, provenant de la forêt boréale (Plourde, 2016). De cette étude, l'extrait à l'hexane et à l'éthanol de l'espèce *P. cinnabarinus* a été sélectionné comme point de départ au présent projet de maîtrise.

Extraction des composés actifs

Préparation de la matière fongique

Dans un premier temps, les spécimens de champignons ont été congelés et séchés au lyophilisateur afin d'éliminer toute trace d'humidité résiduelle. Cette masse sèche présentant une texture liégeuse a ensuite été pesée à l'aide d'une balance analytique, puis broyée en utilisant un moulin à café en acier inoxydable pour obtenir une matière mousseuse orange.

Choix du solvant d'extraction

L'optimisation des conditions d'extraction des composés actifs du champignon a été effectuée par Lydia Genthon dans le cadre de son projet de Master 2. À partir des données obtenues précédemment (Plourde, 2016), celle-ci a effectué une extraction à reflux avec différents solvants sur une petite quantité de matière. Les solvants testés sont l'hexane (hex), l'éthanol (EtOH) à 95% et un mélange EtOH : H₂O (50 : 50). Tel qu'il sera discuté dans le chapitre suivant, c'est le mélange EtOH : H₂O (50 : 50) qui a été sélectionné pour toutes les extractions subséquentes. La répétition de l'extraction à quatre reprises permet d'augmenter significativement les rendements.

Extraction à reflux

La masse sèche de champignons, pesée et broyée, a été transférée dans un ballon en verre borosilicaté de grosseur appropriée (5 L). Une quantité suffisante du mélange EtOH : H₂O (50 : 50) a ensuite été ajoutée pour couvrir le matériel fongique. Cette suspension a été chauffée à reflux pendant 1h30 puis amenée à refroidir légèrement. Une filtration à chaud sur Büchner avec un papier-filtre Whatman #4 a été réalisée pour obtenir un extrait liquide. La masse humide de champignons a ensuite été remise dans le ballon et l'extraction à reflux répétée à trois autres reprises en suivant les mêmes procédures. Les quatre filtrats ont été combinés, évaporés à sec sur un évaporateur rotatif et séchés sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel. Cet extrait sec a finalement été pesé et le rendement d'extraction calculé, en divisant la masse sèche d'extrait obtenue par la masse sèche de champignon de départ, puis en multipliant le résultat par 100.

Les six premiers extraits ont été déposés sur CCM dans un milieu chloroforme (CHCl_3) : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF puis révélés avec H_2SO_4 , analysés par HPLC et GC-MS et soumis aux tests d'activité biologique. Ces derniers seront détaillés plus loin dans ce chapitre. Le dernier extrait, obtenu plus tard pendant le projet, a été extrait et analysé indépendamment en suivant les mêmes procédures.

Travaux de fractionnement et d'isolation sur l'extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus*

Fractionnement grossier de l'extrait brut par une extraction liquide-liquide

Un fractionnement grossier visant à séparer l'extrait brut (SF01117A) en grandes catégories de molécules a été réalisé avec les solvants suivants : hexane, dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AcOEt) et 1-butanol (BuOH). La masse sèche d'extrait (11,1 g) a été solubilisée dans un volume minimum d' H_2O (environ 150 mL). Afin de favoriser une extraction maximale avec chaque solvant, plusieurs petits volumes de solvant ont été utilisés, dans une ampoule à extraction en verre de volume approprié. Pour l'hexane et le DCM, ce sont 12 volumes de 50 mL qui ont été utilisés, jusqu'à observer un épuisement de la phase aqueuse. Pour l'AcOEt, six volumes ont été suffisants et pour BuOH, huit volumes. L'utilisation d'une centrifugeuse a permis une séparation plus visible des phases qui ont été récoltées avec une pipette Pasteur. Lors de l'extraction avec l'AcOEt et suite à la centrifugation, un dépôt a été observé dans le culot des tubes. Par curiosité, celui-ci a été récolté. Lors de cette même extraction, une émulsion s'est formée entre l'AcOEt et l' H_2O et ce, malgré la centrifugation. Les trois phases ont donc été récoltées de façon indépendante.

Au total, ce sont sept fractions, nommées SF01125A à D, 126A, 127A et 129A, qui ont été obtenues, évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 11). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique.

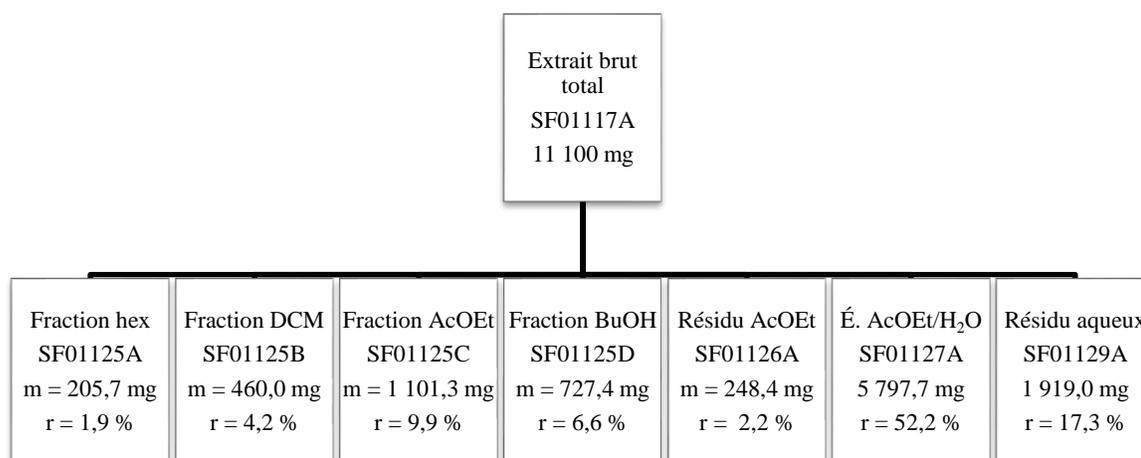


Figure 12. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait brut total (SF01117A).

Travaux de purification sur le résidu acétate d'éthyle issu de l'extraction liquide-liquide

Une purification fine par chromatographie liquide à haute performance préparative a été réalisée sur le résidu acétate d'éthyle (SF01126A). Les conditions de séparation ont été optimisées à partir de la méthode HPLC analytique et sont présentées à la section précédente. La masse sèche de la fraction (69,1 mg) a été solubilisée dans un minimum d'EtOH 95 % (environ 1 mL), puis additionnée de quelques gouttes d'eau pour améliorer la solubilité. Le surnageant a été filtré et le filtre nettoyé avec de l'EtOH (environ 300 µL). Plusieurs injections ont été effectuées dans ces conditions. Étant donné les problèmes de solubilité et le manque d'intensité sur le chromatogramme, l'acétone et le DMSO ont également été testés pour la solubilisation de l'échantillon. Le DMSO a été sélectionné pour les injections subséquentes sur HPLC préparative.

La combinaison des fractions similaires a conduit à cinq fractions majeures (figure 12) nommées SF01139A à E. Ces fractions ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 13). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu CHCl₃ : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF puis révélées avec H₂SO₄, analysées par HPLC, mais n'ont pu être toutes soumises aux tests d'activité biologique en raison d'une masse insuffisante. Seulement la fraction D a été

soumise aux tests d'activité biologique, analysée par RMN dans du DMSO deutéré (DMSO- d_6) et par spectrométrie de masse à haute résolution.

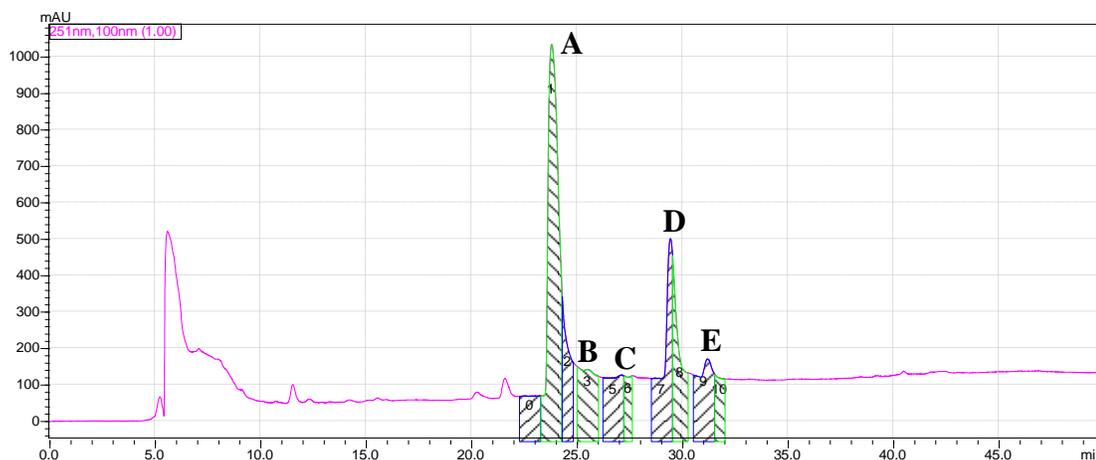


Figure 13. Chromatogramme illustrant les fractions récoltées en HPLC préparative pour la purification du résidu AcOEt (SF01126A).

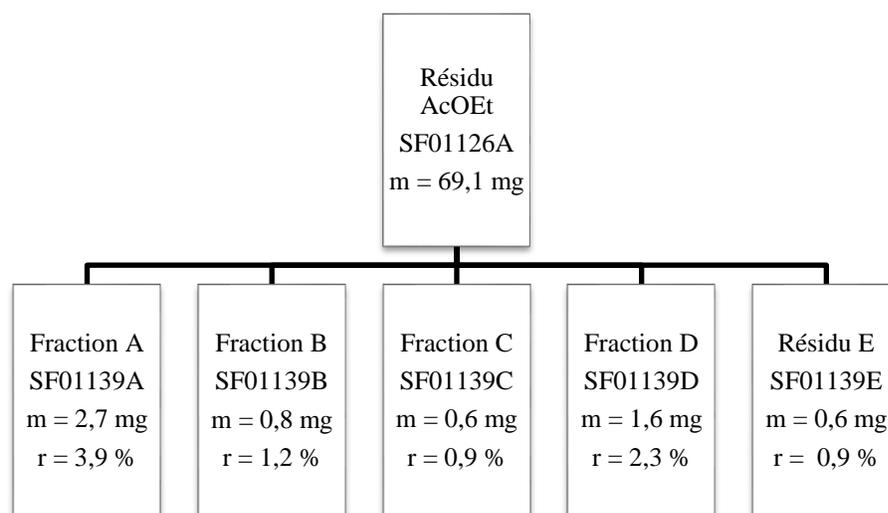


Figure 14. Schéma de fractionnement et rendements de purification en HPLC préparative sur le résidu AcOEt (SF01126A).

Travaux de fractionnement sur le résidu aqueux issu de l'extraction liquide-liquide

Un fractionnement du résidu aqueux (SF01129A) a été réalisé sur une colonne ouverte de gel de silice (90 g) de 45 cm de longueur et 3 cm de diamètre. La masse sèche de la fraction (910,7 mg) a été solubilisée dans le $CHCl_3$, puis déposée sur la colonne au moyen d'un dépôt

solide, ou « *dry-pack* », à base de silice. L'élution a été effectuée en utilisant un gradient par paliers avec des mélanges CHCl_3 : MeOH (100 : 1), (50 : 1) et (20 : 1) suivi d'un lavage de la colonne avec du MeOH. Tous les solvants ont été additionnés de 0,1 % d'AF. Des tubes d'environ 12 mL ont été récoltés, analysés par CCM (un tube sur deux) en utilisant un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF et 20 μL d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

Les tubes présentant des taches de rapport frontal (R_f) semblables ont été combinés pour obtenir huit fractions, nommées SF01154A à H, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 14). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique.

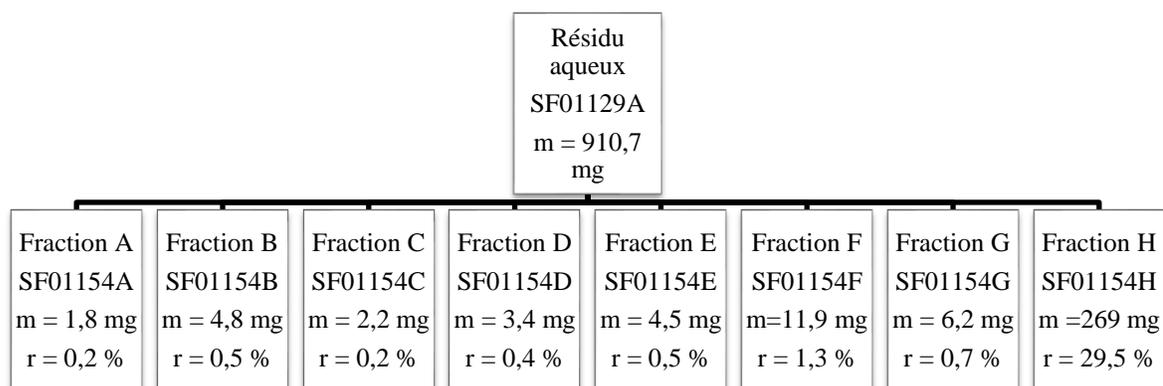


Figure 14. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice ouverte sur le résidu aqueux (SF01129A).

Travaux de fractionnement sur l'émulsion AcOEt-H₂O issue de l'extraction liquide-liquide
Étant donné la nature et l'abondance de l'émulsion AcOEt-H₂O (SF01127A), une extraction liquide-liquide avec l'AcOEt a été effectuée. La masse sèche de la fraction (3,6694 g) a été solubilisée dans l'H₂O (environ 1 L), puis extraite dans une ampoule à extraction en verre de grosseur appropriée. Au total, six volumes de 500 mL d'AcOEt ont été utilisés, jusqu'à observer un épuisement de la phase aqueuse.

Les phases organiques ont été combinées, évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 15). La phase aqueuse résiduelle a été congelée puis séchée au lyophilisateur pour obtenir une masse sèche. Les deux fractions, nommées SF01170A et B, ont été déposées sur CCM dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique.

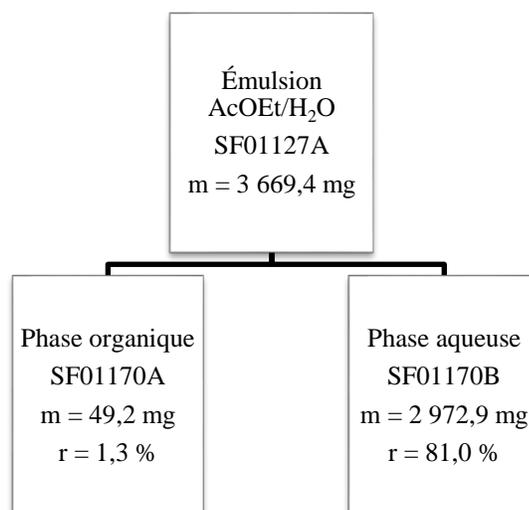


Figure 15. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour l'extraction liquide-liquide sur l'émulsion AcOEt-H₂O (SF01127A).

Travaux de fractionnement sur la fraction butanol issue de l'extraction liquide-liquide

Un fractionnement de la fraction butanol (SF01125D) a été réalisé sur une colonne de silice (cartouche de 80 g) par chromatographie liquide à basse pression avec détection à 254 nm. La masse sèche de la fraction (619,8 mg) a été solubilisée dans le mélange de départ CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 10 : 0,1), puis déposée sur la colonne au moyen d'un « *dry-pack* » à base de silice. L'élution a été effectuée en utilisant un gradient par paliers avec des mélanges CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 5 : 0,1), (55 : 7 : 0,5), (55 : 10 : 0,5), (50 : 15 : 1), (55 : 25 : 5) et (26 : 14 : 3) pour environ 20 minutes chacun, suivi d'un lavage de la colonne avec du MeOH. Le débit était de 40 mL·min⁻¹. Des tubes de 20 mL ont été récoltés, analysés par CCM

(sommet des pics visibles à 254 nm) en utilisant un milieu CHCl_3 : MeOH : H_2O (26 : 14 : 3) et 25 μL d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

Les tubes présentant des taches de R_f semblables ont été combinés pour obtenir 12 fractions, nommées SF01174A à L, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 16). Celles-ci ont été déposées sur CCM, dans des milieux CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 7 : 0,5) et (55 : 25 : 5), puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique.

Travaux de purification sur la fraction dichlorométhane issue de l'extraction liquide-liquide

Un fractionnement de la fraction dichlorométhane (SF01125B) a été réalisé sur une colonne de silice (cartouche de 80 g) par chromatographie liquide à basse pression avec détection à 254 nm. La masse sèche de la fraction (436,3 mg) a été solubilisée dans l'acétone puis déposée sur la colonne au moyen d'un « *dry-pack* » à base de silice. L'élution a été effectuée en utilisant un gradient CHCl_3 : MeOH allant de 0 à 5 % de MeOH en 1h30, suivi d'un pré-lavage de la colonne avec 10 % MeOH pendant 30 minutes puis d'un lavage avec du MeOH. Le débit était de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Des tubes de 20 mL ont été récoltés, analysés par CCM (un tube sur trois) en utilisant un milieu CHCl_3 : MeOH (25 : 1) avec 0,1 % d'AF et 50 μL d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

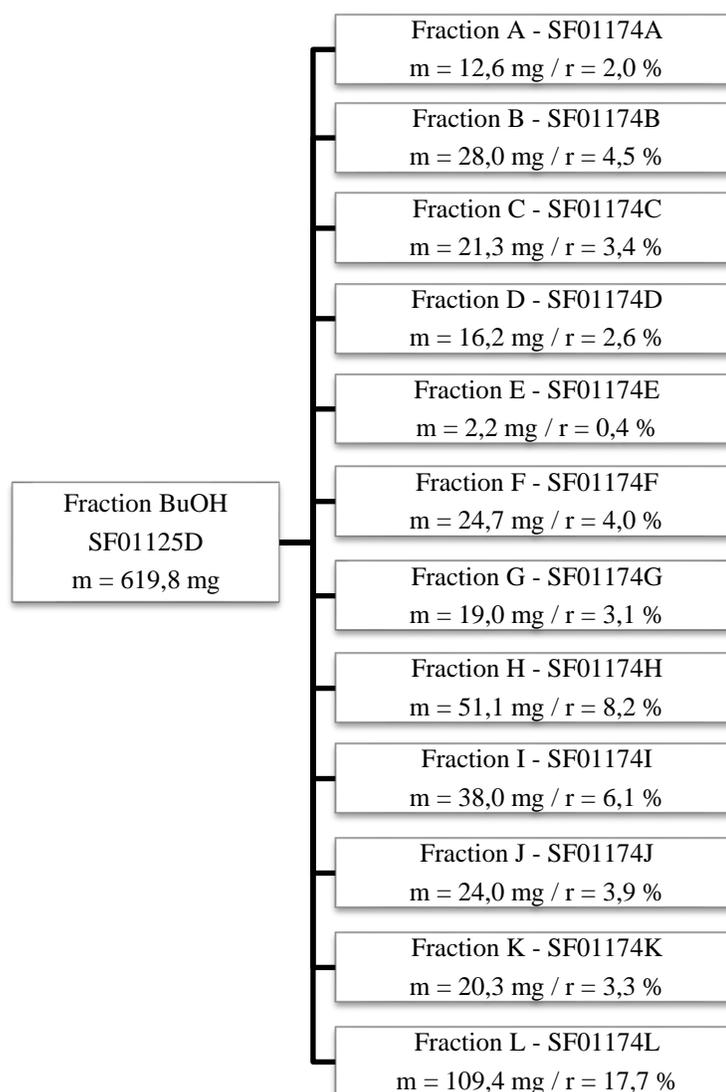


Figure 16. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction BuOH (SF01125D).

Les tubes présentant des taches de R_f semblables ont été combinés pour obtenir huit fractions, nommées SF02015A à H, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 17). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans des milieux CHCl_3 (100 %) et CHCl_3 : MeOH (25 : 1), puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique. Les fractions A, B et C ont été analysées par GC-MS.

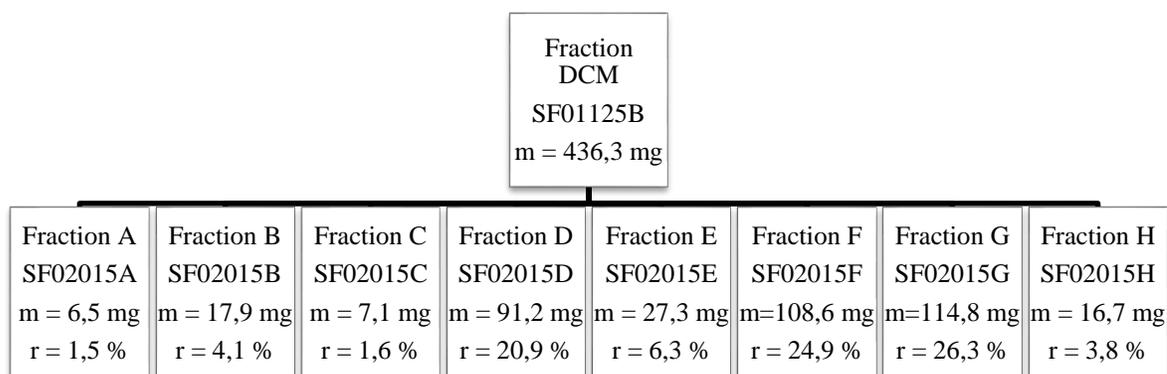


Figure 17. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction DCM (SF01125B).

Travaux de fractionnement et d'isolation d'un second extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus*

Fractionnement grossier de l'extrait brut par chromatographie liquide à basse pression

Un fractionnement du second extrait brut (SF01176A) a été réalisé sur une colonne de gel de silice (400 g) de 46 cm de longueur et 5 cm de diamètre interne par chromatographie liquide à basse pression avec détection à 254 nm. La masse sèche d'extrait (7,6568 g) a été solubilisée dans le CHCl_3 puis déposée sur la colonne au moyen d'un « *dry-pack* » à base de silice. L'élution a débuté avec du CHCl_3 (100 %) pour 25 minutes, puis avec un gradient par paliers avec des mélanges CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 0,5 : 0,1), (55 : 3 : 0,1), (55 : 5 : 0,1) et (55 : 10 : 0,1) pour environ 50 minutes chacun. La colonne a ensuite été lavée avec du MeOH. Le débit était de $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Des tubes de 20 mL ont été récoltés, analysés par CCM (sommets des pics visibles à 254 nm) en utilisant des milieux CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 0,5 : 0,1) et (55 : 3 : 0,1) et 50 μL d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

Les tubes présentant des taches de R_f semblables ont été combinés pour obtenir 12 fractions, nommées SF01186A à L, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 18). Celles-ci ont été déposées sur CCM, dans des milieux CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 0,5 : 0,1) et (55 : 3 : 0,1), puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique. La fraction C a également été analysée par GC-MS.

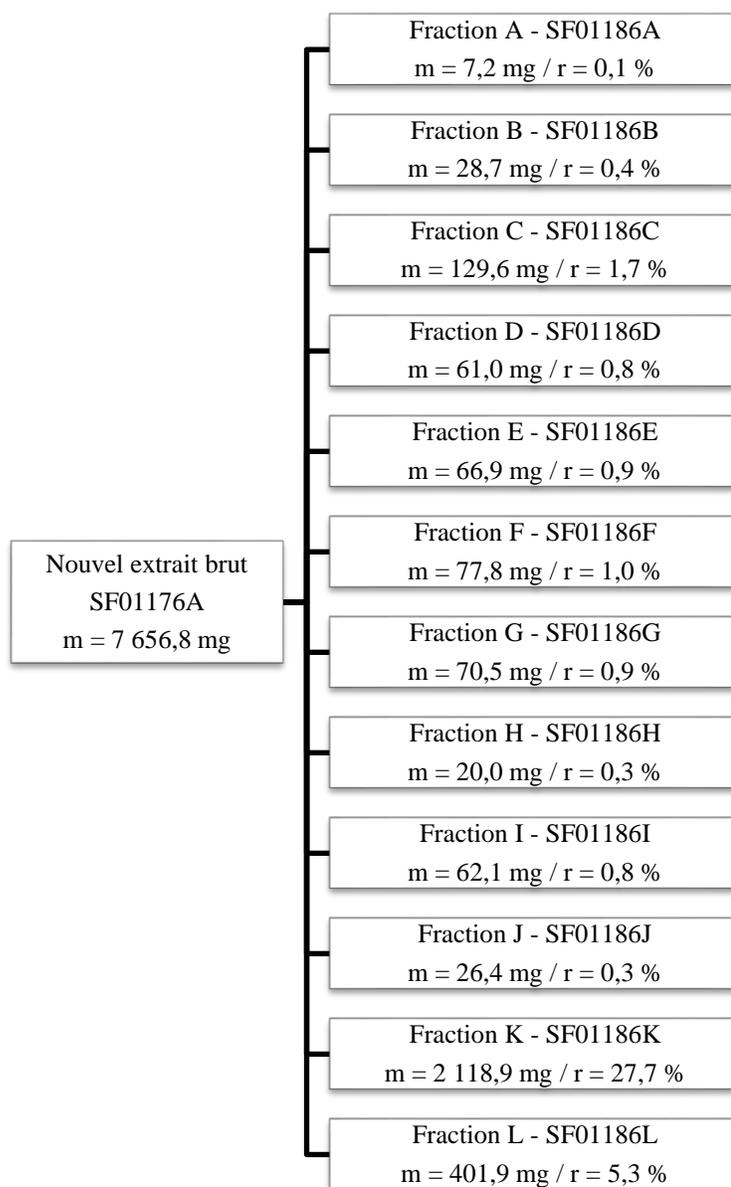


Figure 18. Schéma de fractionnement et rendements de séparation pour la colonne de silice à basse pression sur le second extrait brut (SF01176A).

La fraction SF01186C a été purifiée successivement sur une colonne de silice (cartouche de 80 g) par chromatographie liquide à basse pression avec détection à 254 nm. La masse sèche de la fraction (126,3 mg) a été solubilisée dans l'acétone, puis déposée sur la colonne au moyen d'un « *dry-pack* » à base de silice. L'élution a été effectuée en utilisant un gradient Hex : AcOEt allant de 10 à 50 % d'AcOEt en 1 h, suivi d'un lavage de la colonne avec

AcOEt. Le débit était de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Des tubes de 20 mL ont été récoltés, analysés par CCM (un tube sur trois) en utilisant un milieu Hex : AcOEt (7 : 3) et $50 \mu\text{L}$ d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

Les tubes présentant des taches de R_f semblables ont été combinés pour obtenir cinq fractions, nommées SF01197A à E, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 19). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu Hex : AcOEt (7 : 3), puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et GC-MS et soumises aux tests d'activité biologique. Les fractions B et C ont été analysées par RMN dans du CDCl_3 . La fraction C a également été soumise aux tests d'activité biologique et analysée par spectrométrie de masse à haute résolution.

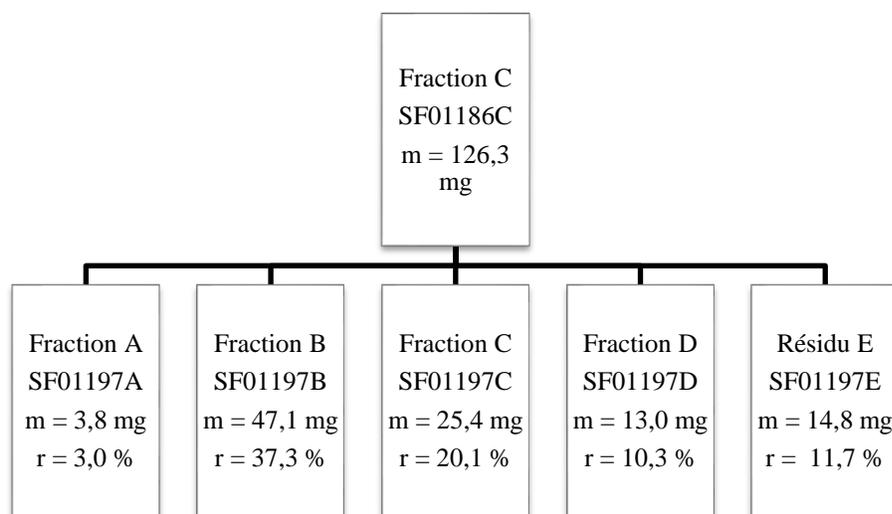


Figure 19. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01186C.

La fraction SF01197B a été purifiée successivement sur une colonne de silice (cartouche de 12 g) par chromatographie liquide à basse pression avec détection à 254 nm. La masse sèche de la fraction (49,1 mg) a été solubilisée dans l'acétone, puis déposée sur la colonne au moyen d'un « *dry-pack* » à base de silice. L'élution a été effectuée en utilisant un gradient Hex : AcOEt allant de 0 à 20 % d'AcOEt en 1 h, suivi d'un lavage de la colonne avec 30 % d'AcOEt

pendant 15 minutes, puis d'un second lavage avec AcOEt. Le débit était de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Des tubes de 20 mL ont été récoltés, analysés par CCM (un tube sur trois) en utilisant des milieux Hex : AcOEt (7 : 3) et (9 : 1) et 50 μL d'échantillon puis révélés avec H_2SO_4 .

Les tubes présentant des taches de R_f semblables ont été combinés pour obtenir cinq fractions, nommées SF02009A à E, qui ont été évaporées à sec sur un évaporateur rotatif et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 20). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu Hex : AcOEt (7 : 3) et analysées par HPLC-MS. Seule la fraction C a été soumise aux tests d'activité biologique et analysée par RMN dans du CDCl_3 , par HPLC-MS, GC-MS et par spectrométrie de masse à haute résolution (masse insuffisante pour les autres fractions).

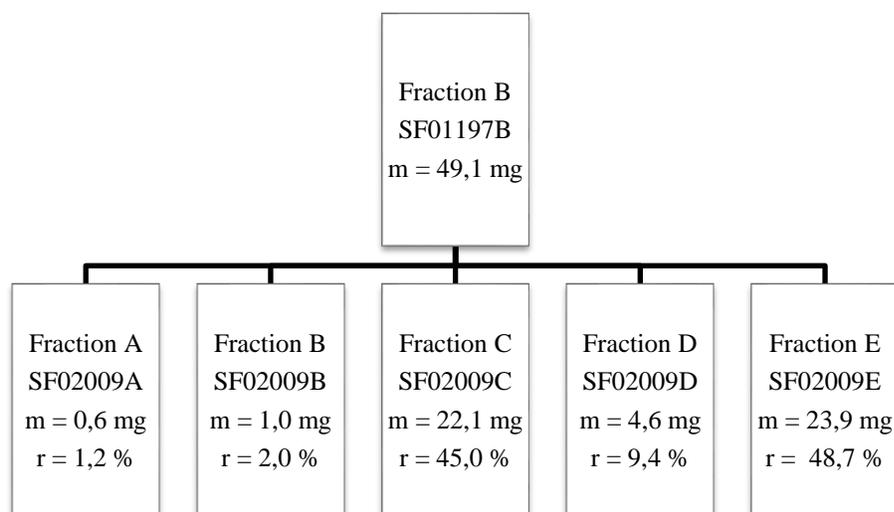


Figure 20. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour la colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01197B.

Le précipité issu du « *dry-pack* » (SF01189A) de la chromatographie liquide à basse pression du second extrait brut a été analysé par différentes approches. Des tests de solubilité ont d'abord été tentés. Après solubilisation satisfaisante dans le DMSO et analyse par HPLC-MS, une analyse RMN dans du DMSO-d₆ a été tentée. Une analyse par FTIR solide a ensuite permis de détecter la présence de silice. Une filtration sur coton dans une seringue de plastique a permis d'en retirer une grande partie. Le produit obtenu a été lyophilisé et la fraction obtenue, nommée SF02011A (figure 21), a été caractérisée par FTIR solide, analysée par HPLC-MS, spectrométrie de masse à haute résolution et RMN dans du DMSO-d₆, puis soumise aux tests d'activité biologique.

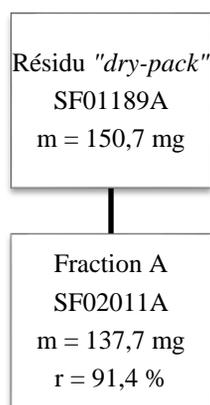


Figure 21. Schéma de filtration et rendement pour la filtration sur coton du résidu du « *dry-pack* » (SF01189A).

Les fractions SF01186F et SF02015E ont été combinées pour obtenir la fraction SF02023A qui a été purifiée par chromatographie sur couche mince préparative dans un milieu CHCl₃ : MeOH (15 : 1). La plaque a d'abord été éluée complètement dans le milieu afin de la laver. La masse sèche de la fraction (104,6 mg) a été solubilisée dans un volume minimum d'acétone (700 µL), puis déposée sur la ligne de base (dépôt de 10 cm). Les bandes d'intérêt ont été grattées à l'aide d'une spatule, solubilisées dans l'acétone, passées au bain à ultrasons, puis filtrées sur un lit de coton et de sable afin d'en retirer la silice.

Les huit fractions, nommées SF02025A à G, ont été évaporées à sec à l'aide d'un jet d'air et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel (figure 22). Celles-ci ont été déposées sur CCM dans un milieu CHCl_3 : MeOH (15 : 1) puis révélées avec H_2SO_4 , analysées par HPLC-MS et soumises aux tests d'activité biologique. La fraction A a également été analysée par RMN dans du $\text{DMSO}-d_6$ et par spectrométrie de masse à haute résolution.

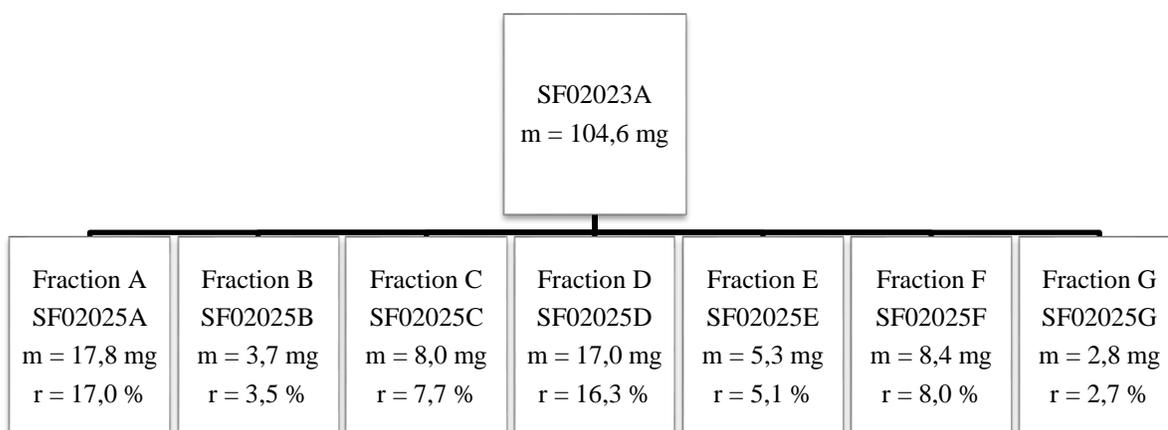


Figure 22. Schéma de fractionnement et rendements de purification pour chromatographie sur couche mince préparative sur la fraction SF02023A.

La fraction SF02025F a été saponifiée et estérifiée afin de permettre l'analyse des acides gras, en raison des soupçons quant à sa nature lipidique. L'échantillon (2,0 mg) a été pesé dans un ballon de 15 mL puis une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,5 N additionnée de 5 μL d' H_2O (1 mL) a été ajoutée. La solution a été chauffée à reflux à 60 °C sous agitation jusqu'à homogénéité. Une solution méthanolique de trifluorure de bore (BF_3) à 10 % (1 mL) a été ajoutée. Le mélange a été amené à ébullition (100 °C) pour 3 minutes puis laissé refroidir. Le contenu du ballon a été transféré dans une ampoule à extraction contenant 20 mL d'hexane et 20 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl). La phase aqueuse a ensuite été extraite une deuxième fois avec 20 mL d'hexane puis les phases organiques ont été combinées, séchées avec du sulfate de magnésium (MgSO_4) et filtrées sur papier filtre. La solution a été injectée telle quelle sur GC-MS.

Évaluation de l'activité cytotoxique des extraits, fractions et composés isolés

Pour chacun des extraits, fractions et composés isolés pendant les travaux de fractionnement, un suivi de la cytotoxicité a été effectué. Ces tests ont été effectués sur deux lignées de cellules cancéreuses incluant le carcinome pulmonaire humain (A549) et l'adénocarcinome colorectal humain (DLD-1), obtenues de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Tel qu'énoncé précédemment, il est souhaitable que les échantillons présentent une sélectivité plus grande pour les cellules cancéreuses comparativement aux lignées saines. La sélectivité est donc évaluée parallèlement en mesurant la toxicité sur une lignée cellulaire saine, un fibroblaste cutané humain (WS-1). Pour réaliser les tests, l'échantillon à différentes concentrations est incubé pendant 48 heures en présence de 5 000 cellules de chacune des lignées testées. La dilution de l'échantillon à différentes concentrations et l'impact de ces solutions sur la croissance cellulaire permet de déterminer l'IC₅₀, soit la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de la croissance cellulaire. Après ce délai, l'activité métabolique de chacun des puits est mesurée par le test de réduction de la résazurine, tel que décrit par O'Brien (O'Brien *et al.* 2000). En effet, les mitochondries des cellules réduisent la résazurine non fluorescente en résorufine fluorescente laquelle est proportionnelle à la quantité de cellules. Conséquemment, plus il y a de cellules viables dans le milieu, plus la fluorescence sera élevée. La lecture de la fluorescence est faite avec un lecteur de plaques 96 puits Fluoroskan Ascent™ FL (ThermoFisher Scientific), en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm (O'Brien *et al.* 2000). La cytotoxicité a également été évalué à l'aide du test de Hoescht qui permet de quantifier l'ADN cellulaire, lequel est proportionnel au nombre de cellules. Le surnageant est d'abord retiré des puits de la plaque 96 puits. Les cellules sont ensuite lysées afin de libérer le contenu en ADN et ainsi permettre au Hoescht de s'intercaler efficacement entre les bases de l'ADN. Par ce processus, le réactif devient fluorescent (Rago *et al.* 1990). Une mesure de la fluorescence est ensuite réalisée à l'aide d'un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent™ FL (ThermoFisher Scientific), celle-ci étant proportionnelle au nombre de cellules. L'IC₅₀ est ensuite déterminée à partir des courbes doses-réponses obtenues. L'étoposide agit à titre de témoin positif pour les tests de potentiel cytotoxique.

Synthèse de l'acide cinnabarinique

L'acide cinnabarinique (AC) a été synthétisé par la condensation oxydative de 2 molécules de 3-HAA (Fazio *et al.* 2012). Tout d'abord, de l'oxyde de manganèse (IV) (MnO_2) (648 mg, 6,33 mmoles) a été ajouté à une solution de 3-HAA (250 mg, 1,58 mmoles) dans le MeOH (117,5 mL), sous agitation et à température pièce (figure 23). Les produits de la réaction ont été suivis par CCM (3-HAA : 20 % CH_2Cl_2 : MeOH, AC : BuOH : $\text{CH}_3\text{COOH}_{\text{glacial}}$: H_2O (4 : 1 : 2)). Après une semaine, le réactif de départ était toujours présent, mais la réaction a été arrêtée. De la triéthylamine (TEA) (486 mg, 4,75 mmoles) a été ajoutée et le mélange agité pour 10 minutes. Le mélange réactionnel a été filtré sur Célite 521 et lavé à plusieurs reprises avec du MeOH. La solution méthanolique a été concentrée sous pression réduite sur un évaporateur rotatif, diluée avec 20 mL d' H_2O puis acidifiée à $\text{pH} \approx 1-2$ avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 10 % $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$. Le solide rouge foncé formé a été filtré sur Büchner puis lavé à l'eau (3·5 mL) et à l'éther (2·20 mL).

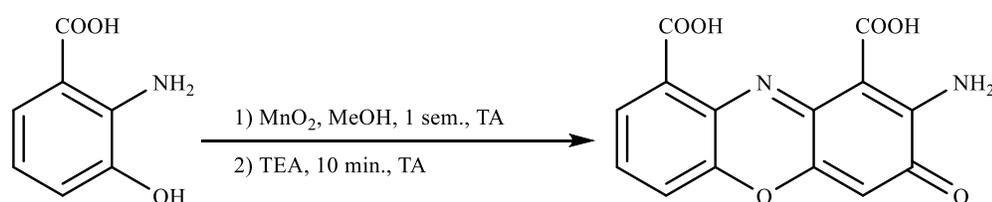


Figure 22. Formation de l'acide cinnabarinique.

Le produit récolté, nommé SF01152A, a été évaporé à sec à l'aide d'un jet d'air et séché sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel. Celui-ci a été analysé par HPLC-MS, RMN dans du $\text{DMSO}-d_6$ afin de valider sa structure et soumis aux tests d'activité biologique.

À partir de ce schéma réactionnel, on peut facilement imaginer la synthèse des autres dérivés phénoxaxones par la condensation de 3-HAA avec un dérivé possédant la fonction chimique requise. Toutefois, l'utilisation de deux molécules de départ différentes peut occasionner un mélange de plusieurs produits de réaction. Une voie de synthèse différente a été envisagée pour la cinnabarine. Cette approche, présentée à l'annexe 2, implique l'utilisation de AC

comme produit de départ. Il est également possible d'envisager l'utilisation de cette nouvelle stratégie pour obtenir d'autres dérivés de phénoxazones.

Réaction de phénoxazones avec le chlorure de fluorénylméthoxycarbone

Afin de changer les propriétés chimiques des molécules de type phénoxazone, et ainsi améliorer leur séparation au sein d'un mélange, une protection avec le chlorure de fluorénylméthoxycarbone (Fmoc-Cl) a été tentée (Gawande et Branco 2011). D'abord, le Fmoc-Cl (157,7 mg, 3,6 mmoles) a été ajouté à une solution de l'extrait brut (SF01176A) (50,3 mg, \approx 1 mmole) dans 1,5 mL d'un mélange EtOH : H₂O (3 : 1) (figure 24). Le mélange a été chauffé à reflux à 60 °C pendant 4 h et les produits de la réaction ont été suivis par CCM dans un milieu CHCl₃ : MeOH (10 : 1) + 0,1 % AF. Le mélange réactionnel a été acidifié à pH \approx 4-5 avec une solution d'HCl 1 M, sur glace, puis extrait à l'AcOEt (4·10 mL).

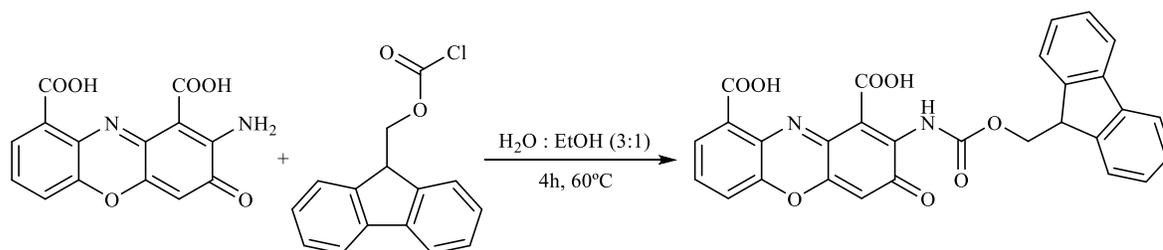


Figure 23. Protection de l'acide cinnabarinique avec Fmoc-Cl.

Les phases organiques ont été combinées (SF02004A), évaporées à sec à l'aide d'un jet d'air et séchées sur pompe à vide pour éliminer toute trace de solvant résiduel. La phase aqueuse (SF02005A) a été congelée, puis séchée au lyophilisateur pour obtenir une masse sèche. La fraction A a été analysée par HPLC-MS.

CHAPITRE IV.
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

A. RENDEMENTS ET ACTIVITÉS ANTICANCÉREUSES DES EXTRAITS DE *P. CINNABARINUS*

Choix du solvant d'extraction

Afin de déterminer celui qui offrait une meilleure extraction des composés actifs, les trois extraits de *P. cinnabarinus* obtenus avec différents solvants ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines. Un échantillon est considéré fortement actif si l'IC₅₀ est inférieure à 10 µg·mL⁻¹, modérément actif entre 10 et 49 µg·mL⁻¹ et faiblement actif pour des valeurs d'IC₅₀ entre 50 et 100 µg·mL⁻¹. Les activités biologiques obtenues sont présentées dans le tableau 3 et on remarque que les extraits éthanoliques et hydroéthanoliques montrent une forte activité cytotoxique avec des IC₅₀ variant entre 1,56 et 3,3 µg·mL⁻¹ sur les cellules cancéreuses (A-549 et DLD-1), selon le type de test effectué. Par contre, l'extrait hexanique est considéré modérément actif avec des IC₅₀ entre 11,0 et 30 µg·mL⁻¹. Le facteur de sélectivité est calculé en divisant l'IC₅₀ obtenue sur la lignée saine (WS-1) par celle des lignées cancéreuses (A-549 ou DLD-1). Pour tous les solvants testés, on remarque une sélectivité plus marquée pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (WS-1) avec des rapports variant entre 2 et 36. En fonction de ces résultats, le mélange EtOH : H₂O (50 : 50) a été choisi comme solvant pour toutes les extractions subséquentes puisque l'extrait hydroéthanolique est le plus actif avec une IC₅₀ <1,6 µg·mL⁻¹ sur A-549 et un facteur de sélectivité d'environ 36.

Tableau 3. Activité cytotoxique des différents extraits aux solvants

	Résazurine			Hoechst		
	A-549*	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Hexane	19 ± 3	30 ± 4	59 ± 10	11,0 ± 0,6	25 ± 3	67 ± 12
EtOH:H₂O 50:50	<1,6	1,77 ± 0,06	10 ± 4	<1,6	1,83 ± 0,09	56 ± 6
EtOH 95 %	<1,6	2,1 ± 0,2	7 ± 1	1,94 ± 0,10	3,3 ± 0,2	12,8 ± 0,7
Etoposide	0,56 ± 0,06	1,4 ± 0,3	10 ± 4	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3	6,1 ± 1,0

*Toutes les IC₅₀ sont exprimées en µg·ml⁻¹, sauf pour l'étoposide (µM).

Rendements des extractions de champignons

Pendant le projet, plusieurs lots différents de *P. cinnabarinus* ont été reçus. Avec la méthode d'extraction sélectionnée, de bons rendements ont été obtenus. Tel qu'illustré au tableau 4, des rendements d'extraction entre 12 et 20 % ont été obtenus pour chacune des extractions.

Tableau 4. Rendements d'extraction des différents lots de *P. cinnabarinus* en utilisant un mélange EtOH : H₂O (50 : 50)

Échantillon	Description	Masse de champignons (g)	Masse d'extrait (g)	Rendement (%)
SF01013A	Extrait brut #1	18,0	2,1618	12,0
SF01035A	Extrait brut #2	12,1841	1,9453	16,0
SF01029A	Extrait brut #3	11,7998	2,0746	17,6
SF01065A	Extrait brut #4	3,7139	0,7180	19,3
SF01065B	Extrait brut #5	12,6571	2,0826	16,5
SF01067A	Extrait brut #6	26,2965	4,2213	16,1
SF01176A	Extrait brut #7	71,8	9,7568	13,6

Les six premiers lots de champignons ont été extraits de façon indépendante dans le but de vérifier si des différences majeures en matière de composition chimique existaient entre les lieux de cueillette. Les analyses par HPLC et CCM ont permis de démontrer que la composition chimique des différents lots était similaire. Par conséquent, les six différents extraits ont été combinés pour obtenir l'extrait brut total, SF01117A, afin d'obtenir une masse de matériel nécessaire au fractionnement bioguidé par l'activité biologique. Le spectre d'absorption de celui-ci a été mesuré par spectroscopie UV par un balayage des longueurs d'onde de 190 à 1100 nm. Le maxima d'absorption expérimental se situe vers 468 nm, contrairement aux données de la littérature qui le fixe autour de 435 nm (Dias et Urban 2009). Un autre lot de *P. cinnabarinus* a été reçu et extrait en cours de projet, correspondant à l'extrait #7.

Les trois premiers extraits bruts ont été élués sur CCM avec un standard commercial d'acide cinnabarinique (figure 25). La comparaison des rapports frontaux (R_f) permet d'associer la tache caractéristique de ce dernier à une tache de même R_f présente dans les trois premiers extraits. Cette comparaison suggère que l'acide cinnabarinique est présent dans les extraits.

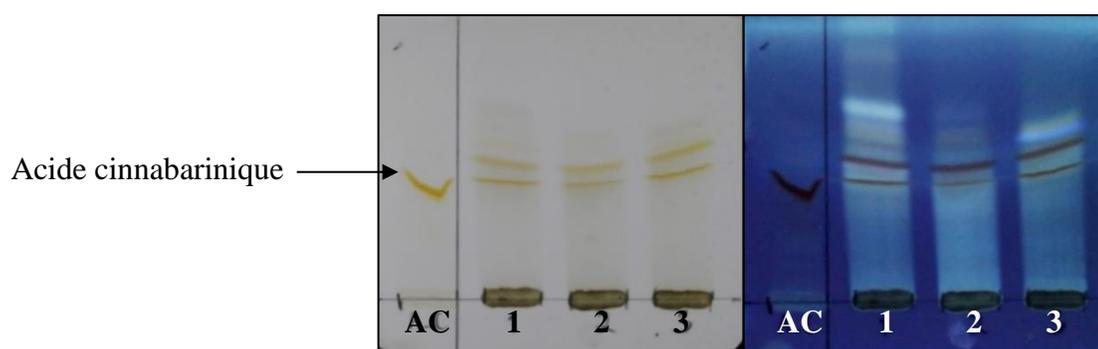


Figure 24. CCM comparative des trois premiers extraits bruts avec AC (à gauche sur la plaque) dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF et révélée avec H_2SO_4 .

Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm (droite).

Les extraits bruts de *P. cinnabarinus* ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines (tableau 5). Pour tous les extraits, on remarque une forte activité cytotoxique avec des valeurs d' IC_{50} inférieures à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les lignées cellulaires cancéreuses. De manière générale, les extraits présentent une plus grande cytotoxicité envers la lignée A-549 avec des IC_{50} variant entre $<0,8$ et $5,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Finalement, les extraits semblent beaucoup moins cytotoxiques envers les cellules saines WS-1. En effet, en comparant les facteurs de sélectivité des échantillons sur les cellules saines par rapport aux lignées cancéreuses, on observe un facteur entre 5 et 32 sur la lignée A-549 et entre 3 et 7 sur DLD-1. Les extraits #1 et #7 sont les plus actifs, avec une valeur d' $\text{IC}_{50} < 0,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sur A-549 pour le test de Hoescht. L'extrait # 6, se démarque du lot avec son activité cytotoxique plus faible que les autres.

Tableau 5. Activité cytotoxique des extraits bruts de *P. cinnabarinus*

	Résazurine			Hoechst		
	A-549*	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Extrait #1	1,10 ± 0,04	3,6 ± 0,3	13 ± 2	<0,8	3,6 ± 0,4	25 ± 3
Extrait #2	2,7 ± 0,2	8,6 ± 0,5	33 ± 4	1,86 ± 0,06	9,7 ± 0,7	38 ± 6
Extrait #3	1,07 ± 0,05	4,0 ± 0,2	13 ± 2	0,85 ± 0,04	3,9 ± 0,3	14,1 ± 0,5
Extrait #4	1,40 ± 0,09	6,3 ± 0,6	16 ± 3	0,97 ± 0,09	5,7 ± 0,7	16,7 ± 1,0
Extrait #5	1,55 ± 0,08	5,0 ± 0,3	15 ± 2	1,40 ± 0,03	5,5 ± 0,4	20 ± 3
Extrait #6	5,2 ± 0,4	19 ± 2	55 ± 6	3,9 ± 0,1	18,5 ± 0,9	47 ± 1
Étoposide				1,2 ± 0,5	2,2 ± 0,4	>50
Brut total	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,5	17 ± 4	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,8	20 ± 3
Étoposide				5,0 ± 0,7	2,9 ± 0,4	11 ± 2
Extrait #7	1,03 ± 0,04	3,2 ± 0,2	8,7 ± 0,4	<0,8	2,2 ± 0,2	9,5 ± 0,3
Étoposide				0,60 ± 0,08	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

B. FRACTIONNEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSÉS RESPONSABLES DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DE L'EXTRAIT HYDROÉTHANOLIQUE DE *P. CINNABARINUS*

Fractionnement grossier de l'extrait brut total par une extraction liquide-liquide

L'extrait brut total (SF01117A) résultant de la combinaison des six premiers extraits a été fractionné grossièrement par une extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante. Sans tenir compte de l'émulsion formée entre l'AcOEt et l'eau, une grande majorité de la masse s'est retrouvée dans le résidu aqueux ce qui peut s'expliquer par une plus grande abondance de composés polaires dans l'extrait ou un manque de solubilité dans les solvants d'extraction utilisés. Une masse totale de 10,46 g a été obtenue pour les sept fractions, pour un rendement global d'extraction de 94,2 % (voir figure 13). Sur les CCM récapitulatives, on observe un épuisement des composés situés en haut de la plaque, les plus apolaires, à mesure que les composés polaires s'enrichissent (figure 26). En effet, les phénoxazones, correspondant aux taches rougeâtres au milieu de la plaque, s'intensifient

avec l'augmentation de la polarité des solvants. Leur solubilité partielle dans la plupart des solvants explique le fait qu'on les retrouve dans toutes les fractions.

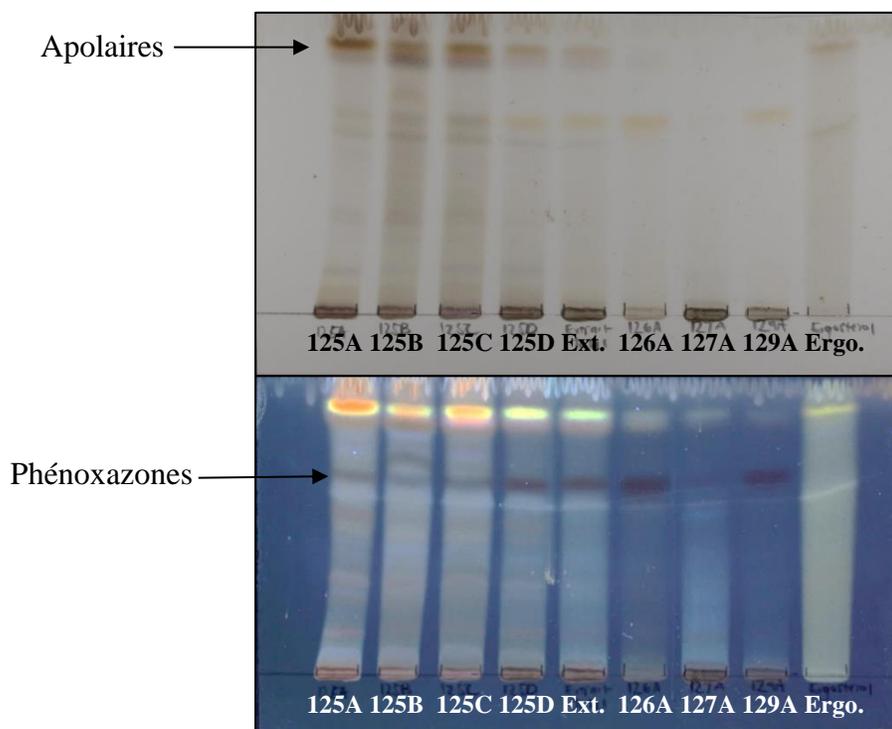


Figure 25. CCM récapitulative des sept fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'extrait brut total (SF01117A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH (10 : 1) avec 0,1 % d'AF et révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (haut) et à 365 nm (bas).

L'activité cytotoxique des fractions issues de l'extraction liquide-liquide a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses et saines (tableau 6). Pour la plupart, on note une forte activité cytotoxique, avec des valeurs d' IC_{50} inférieures à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tandis que quelques-unes sont considérées comme modérément actives (hexane et AcOEt) et une seule comme faiblement active (émulsion AcOEt- H_2O). Ce sont les résidus AcOEt et aqueux ainsi que la fraction DCM qui sont les trois fractions les plus actives, respectivement. D'une manière générale, on remarque une activité cytotoxique plus élevée sur la lignée A-549, celle du carcinome pulmonaire humain, par rapport à DLD-1, l'adénocarcinome colorectal humain. Des facteurs de sélectivité variant entre 1 et 16 ont été obtenus pour tous les échantillons, sur les deux lignées cancéreuses et pour les deux tests. On remarque toutefois que la sélectivité

globale de cette série est légèrement inférieure à celle des extraits bruts, qui présentaient des rapports entre 3 et 32. Le résidu AcOEt est la plus active des fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'extrait brut total, avec une IC_{50} de $0,106 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sur A-549 pour le test de réduction de la résazurine et un facteur de sélectivité entre 9 et 16.

Tableau 6. Activité cytotoxique des sept fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'extrait brut total (SF01117A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549*	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Brut total	$2,7 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,5$	17 ± 4	$4,4 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,8$	20 ± 3
Frac. Hex	15 ± 4	31 ± 7	51 ± 8	32 ± 4	24 ± 5	68 ± 9
Frac. DCM	$1,7 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,9$	16 ± 2	$1,7 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	18 ± 3
Frac. AcOEt	22 ± 4	33 ± 2	44 ± 10	22 ± 5	29 ± 3	50 ± 7
Frac. BuOH	$6,4 \pm 0,1$	9 ± 2	43 ± 4	8 ± 1	10 ± 1	38 ± 5
Résidu AcOEt	$0,106 \pm 0,009$	$0,16 \pm 0,02$	$1,4 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,03$	$2,4 \pm 0,2$
É. AcOEt-H₂O	39 ± 8	99 ± 1	> 100	54 ± 9	66 ± 11	> 100
Résidu aqueux	$0,38 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,8$	$0,78 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,1$
Étoposide				$5,0 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,4$	11 ± 2

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Travaux de purification sur le résidu acétate d'éthyle de l'extraction liquide-liquide

La suite des travaux a donc été réalisée avec le résidu AcOEt, lequel est le plus actif. Une purification fine par chromatographie liquide haute performance préparative sur colonne biphenyle avec un gradient MeOH : H₂O a été effectuée. L'optimisation des conditions utilisée en HPLC analytique a permis de développer une méthode permettant une séparation adéquate des pics d'intérêt (figure 12). Tel que discuté précédemment, l'échantillon présentait des problèmes de solubilité. Le DMSO permettait une bonne solubilité de l'échantillon et l'obtention d'une intensité améliorée sur les chromatogrammes. Malgré tout, de très faibles masses ont été obtenues suite à la purification. Sur les 69,1 mg de départ, seulement 6,3 mg ont été récoltés pour les cinq fractions, pour un pourcentage de récupération de 9,12 %. Le problème de solubilité des molécules de type phénoxazone est bien connu et

pourrait expliquer leur faible solubilité dans la phase mobile et le faible faible pourcentage de récupération.

Les données en HPLC analytique de certains standards ont permis d'associer le pic A à la cinnabarine, le pic D à l'acide cinnabarinique et le pic E au tramesanguin, en se basant sur les temps de rétention déjà connus (figure 12). Les fractions A et D ont été analysées par RMN, mais l'acquisition de spectres suffisamment intenses pour A n'a pas été possible. La caractérisation de la fraction E par RMN n'a pas été tentée. Des données RMN interprétables ont été obtenues pour le pic D, qui a été identifié comme étant l'acide cinnabarinique (figure 6), et dont la caractérisation sera discutée plus loin. Les fractions issues de la HPLC préparative sur le résidu AcOEt, sauf la fraction D, n'ont pas été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines, en raison des masses obtenus trop faibles.

Acide cinnabarinique ou 2-amino-3-oxo-3*H*-phenoxaine-1,9-dicarboxylic acid : poudre rouge orangé (1,6 mg, 0,01 % de l'extrait brut); HR-ESI-MS m/z 301,0452 $[M+H]^+$, $C_{14}H_8N_2O_6$; HPLC-ESI-MS $[M-H]^-$ m/z = 299, 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9,73 (s, 1H, 2-NH_a), 8,83 (s, 1H, 2-NH_b), 7,95 (d, J = 5,4 Hz, 1H, H-8), 7,78 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H-6), 7,61 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H-7), 6,62 (s, 1H, H-4). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) : ND (Dias et Urban 2009; Fazio *et al.* 2012); IR (ATR, cristal de diamant) ν_{max} 3363, 2918, 2849, 1721, 1563, 1366, 1305, 1148, 1087 cm^{-1} (Dias et Urban 2009).

Travaux de fractionnement sur le résidu aqueux de l'extraction liquide-liquide

La deuxième fraction la plus active de la série, le résidu aqueux, a été fractionnée par colonne ouverte de gel de silice avec un gradient $CHCl_3$: MeOH, tous deux additionnés d'acide formique. Une masse totale de 303,8 mg a été récoltée pour les huit fractions, ce qui représente un faible pourcentage de récupération de 33,4 %. On peut expliquer ce résultat par le caractère polaire du résidu aqueux. En effet, les composés de cette fraction sont très polaires et peuvent interagir d'une manière irréversible avec l'adsorbant. Il n'y a pas eu d'étape subséquente de séparation en raison de cette perte importante de produit.

Les fractions issues de la colonne de silice ouverte sur le résidu aqueux ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines (tableau 7). Toutes les fractions présentent une forte activité cytotoxique, avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 7 µg·ml⁻¹ sur les deux lignées cancéreuses et pour les deux tests. D'une manière générale, on constate une activité cytotoxique plus marquée sur la lignée A-549 par rapport à DLD-1. Des facteurs de sélectivité variant entre 1 et 20 ont été obtenus pour tous les échantillons. La sélectivité est généralement plus élevée pour la lignée A-549. Encore une fois, les fractions considérées comme les plus actives de cette série sont celles correspondant à des éluants polaires donc plus riches en MeOH. Les composés les plus actifs du résidu aqueux semblent se retrouver dans les fractions F et G qui ont des IC₅₀ <0,8 µg·ml⁻¹.

Tableau 7. Activité cytotoxique des huit fractions issues de la séparation par colonne de silice ouverte du résidu aqueux (SF01129A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Résidu aq.	1,11 ± 0,05	1,56 ± 0,02	3,7 ± 0,3	<0,781	1,07 ± 0,07	9 ± 1
Fraction B	5,9 ± 0,4	6,9 ± 0,1	12 ± 1	4,8 ± 0,3	5,55 ± 0,10	11 ± 1
Fraction C	1,21 ± 0,04	1,69 ± 0,06	3,17 ± 0,08	<0,781	2,0 ± 0,2	9 ± 2
Fraction D	3,0 ± 0,2	4,3 ± 0,3	9,5 ± 0,9	2,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,7 ± 0,9
Fraction E	1,42 ± 0,06	2,11 ± 0,04	7,4 ± 0,5	1,01 ± 0,10	2,7 ± 0,3	20 ± 5
Fraction F	<0,8	<0,8	0,85 ± 0,05	<0,8	<0,8	<0,8
Fraction G	<0,8	<0,8	<0,8	<0,8	<0,8	<0,8
Fraction H	3,5 ± 0,4	5,5 ± 0,6	16 ± 4	3,0 ± 0,2	11,9 ± 0,9	28 ± 2
Étoposide				0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,4	>50

*Toutes les IC₅₀ sont exprimées en µg·ml⁻¹, sauf pour l'étoposide (µM).

Travaux de fractionnement sur l'émulsion AcOEt-H₂O de l'extraction liquide-liquide

Étant donné l'abondance et la nature de l'émulsion AcOEt-H₂O, une extraction liquide-liquide a été envisagée pour en séparer les composés hydrophiles et hydrophobes. Une masse de 3,02 g a été obtenue pour les deux phases, pour un rendement d'extraction de 82,4 %. La

CCM récapitulative confirme l'efficacité de l'extraction, puisqu'on observe la présence d'une molécule au squelette phénoxazone dans la phase organique (AcOEt), qui ne se retrouve plus dans la phase aqueuse.

L'activité cytotoxique des deux phases issues de l'extraction liquide-liquide sur l'émulsion AcOEt-H₂O a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses et saines (tableau 8). La phase organique montre une forte activité cytotoxique de l'ordre de 4 µg·ml⁻¹ sur A-549. Sur DLD-1, on observe des IC₅₀ plus élevées. En ne tenant compte que de la lignée A-549, des facteurs de sélectivité de plus de 10 ont été obtenus. La fraction AcOEt ne représente que 1,34 % de la masse de départ de l'émulsion.

Tableau 8. Activité cytotoxique des deux fractions issues de l'extraction liquide-liquide sur l'émulsion AcOEt-H₂O (SF01127A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Émulsion AcOEt-H₂O	>100	>100	>100	96 ± 9	>100	>100
Phase organique	4,2 ± 0,4	17 ± 2	54 ± 2	4,4 ± 0,3	13 ± 1	42 ± 5
Phase aqueuse	73 ± 6	>100	>100	60 ± 5	>100	>100
Étoposide				0,60 ± 0,08	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2

*Toutes les IC₅₀ sont exprimées en µg·ml⁻¹, sauf pour l'étoposide (µM).

Travaux de fractionnement sur la fraction butanol de l'extraction liquide-liquide

La fraction butanol a été fractionnée par colonne de silice à basse pression avec un système de solvant CHCl₃ : MeOH : H₂O. Une masse totale de 268,34 mg a été récoltée pour les 12 fractions, pour un rendement de séparation plutôt faible de 43,3 %. Encore une fois, il semble y avoir des problèmes d'adsorption irréversible avec la phase stationnaire. Il n'y a pas eu d'étapes de séparation successive sur les fractions obtenues, en raison de masses trop faibles.

Les fractions issues de cette purification ont tout de même été testées pour leur cytotoxicité (tableau 9). La fraction E n'a pas été testée en raison d'une masse insuffisante de produit.

Encore une fois, l'activité cytotoxique est nettement plus marquée sur la lignée A-549 en plus des facteurs de sélectivité pouvant aller jusqu'à 19 pour cette lignée. On peut affirmer que les fractions C, D et F expliquent en bonne partie l'activité de la fraction butanol, avec des IC_{50} entre $<0,8$ et $3,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour A-549 et entre 1,7 et $13,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour DLD-1. Les facteurs de sélectivité varient entre 9 et 19 sur A-549 et entre 3 et 7 sur DLD-1 pour ces trois fractions. La fraction C est la plus active de la série, avec une IC_{50} entre $<0,8$ et $2,42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur les deux lignées cancéreuses, en plus d'un facteur de sélectivité entre 4 et 15.

Tableau 9. Activité cytotoxique des 12 fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression sur la fraction BuOH (SF01125D)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Frac. BuOH	$6,4 \pm 0,8$	26 ± 2	71 ± 7	$3,40 \pm 0,09$	$16,6 \pm 0,4$	48 ± 1
Frac. A	58 ± 6	72 ± 2	>100	37 ± 3	48 ± 2	73 ± 7
Frac. B	20 ± 2	27 ± 2	29 ± 3	$15,1 \pm 0,3$	$17,7 \pm 0,6$	29 ± 13
Frac. C	$0,81 \pm 0,03$	$2,42 \pm 0,08$	$9,5 \pm 0,8$	$<0,781$	$1,7 \pm 0,1$	12 ± 1
Frac. D	$3,3 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,3$	$30,1 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,4$	26 ± 2
Frac. F	$3,8 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,5$	35 ± 2	$2,3 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,5$	27 ± 3
Frac. G	14 ± 2	42 ± 1	>100	$10,8 \pm 1,0$	31 ± 2	60 ± 1
Frac. H	>100	>100	>100	43 ± 4	>100	>100
Frac. I	>100	>100	>100	47 ± 5	>100	>100
Frac. J	56 ± 1	>100	>100	25 ± 3	93 ± 8	>100
Frac. K	50 ± 2	>100	>100	26 ± 3	71 ± 2	>100
Frac. L	$3,8 \pm 0,4$	20 ± 2	56 ± 3	$3,2 \pm 0,2$	12 ± 1	36 ± 5
Étoposide				$0,60 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Travaux de purification sur la fraction dichlorométhane de l'extraction liquide-liquide

La fraction dichlorométhane a été fractionnée par colonne de silice à basse pression avec du CHCl_3 et du MeOH. Une masse totale de 390,1 mg a été récoltée pour les huit fractions, pour un rendement de séparation de 89,3 %. Les interactions moins prononcées avec la phase stationnaire polaire, étant donné le caractère apolaire de cette fraction, pourraient expliquer le rendement de séparation plus élevé que les précédents. La fraction E a été combinée avec une autre de profil chimique semblable afin d'obtenir une masse plus élevée. Le fractionnement de cette nouvelle fraction sera discuté ultérieurement. Il n'y a pas eu d'étape de séparation successive pour les autres fractions, en raison de masses assez faibles en plus d'une composition chimique complexe.

L'activité cytotoxique des fractions issues de la colonne de silice à basse pression sur la fraction dichlorométhane a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses et saines (tableau 10). Les fractions les plus actives sont moyennement polaires, tout comme pour la fraction butanol. Dans cette série, pour la première fois, l'activité cytotoxique est comparable entre les lignées A-549 et DLD-1, même que certaines fractions sont plus actives sur DLD-1. Les facteurs de sélectivité suivent également cette tendance, avec des valeurs pouvant aller jusqu'à 19 sur les deux lignées. On peut affirmer que les fractions E et F expliquent en bonne partie l'activité de la fraction dichlorométhane, avec des IC_{50} entre 1,1 et 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour A-549 et entre 1,4 et 5,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour DLD-1. Les facteurs de sélectivité varient entre 9 et 19 sur A-549 et entre 7 et 14 sur DLD-1 pour ces deux fractions. La fraction E est la plus intéressante, avec une IC_{50} entre 1,1 et 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur les deux lignées cancéreuses et un facteur de sélectivité entre 8 et 19.

Tableau 10. Activité cytotoxique des huit fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression sur la fraction DCM (SF01125B)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Fraction DCM	2,3 ± 0,3	3,2 ± 0,1	28 ± 3	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,2	33 ± 1
Fraction A	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Fraction B	>50	>50	>50	42 ± 3	29,2 ± 0,6	>50
Fraction C	>50	>50	>50	31 ± 3	26 ± 3	>50
Fraction D	24 ± 2	19 ± 2	29 ± 1	12,4 ± 0,1	15 ± 2	36 ± 5
Fraction E	1,4 ± 0,1	1,42 ± 0,06	12 ± 2	1,10 ± 0,09	1,5 ± 0,1	21 ± 2
Fraction F	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,1	38 ± 3	3,2 ± 0,2	5,8 ± 0,4	39 ± 2
Fraction G	>50	>50	>50	43 ± 5	41 ± 10	>50
Fraction H	50 ± 4	40 ± 1	>50	24 ± 2	36 ± 5	>50
Étoposide	6,8 ± 0,4	4,6 ± 0,4	16 ± 2	1,9 ± 0,1	5,1 ± 0,6	>50

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Fractionnement grossier du second extrait brut par chromatographie liquide à basse pression

Le second extrait brut, obtenu à partir d'un nouveau lot de *P. cinnabarinus*, a été fractionné grossièrement par colonne de silice à basse pression avec un système CHCl_3 : MeOH : H_2O . Une masse totale de 3,07 g a été récoltée pour les 12 fractions, pour un rendement de séparation assez faible de 40,1 %. Sur les CCM récapitulatives, on observe une bonne séparation entre les constituants polaires et apolaires de l'extrait (figure 27). À mesure que les composés polaires migrent, vers la fraction F, on remarque une tendance de ceux-ci à traîner, en raison des interactions plus marquées avec la phase stationnaire polaire (figures 27 et 28).

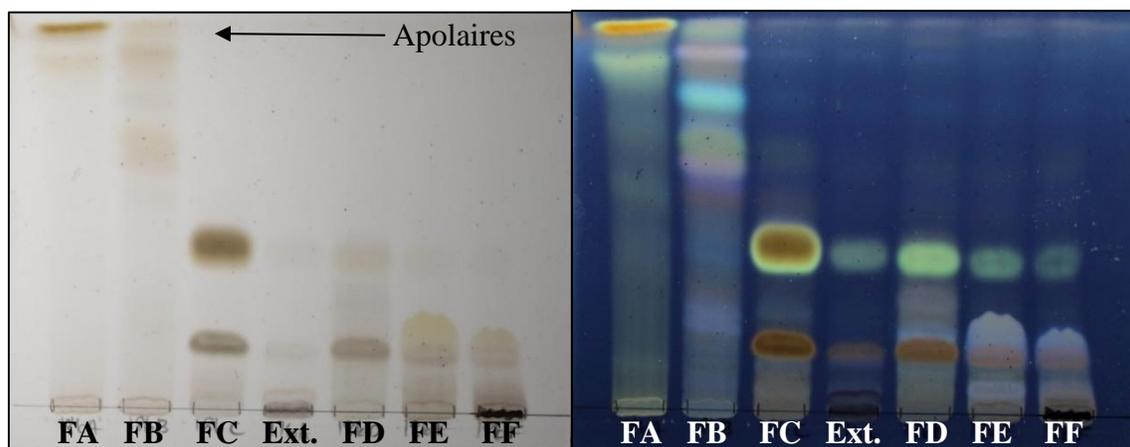


Figure 26. CCM récapitulative des fractions A à F issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 0,5 : 0,1) révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm.

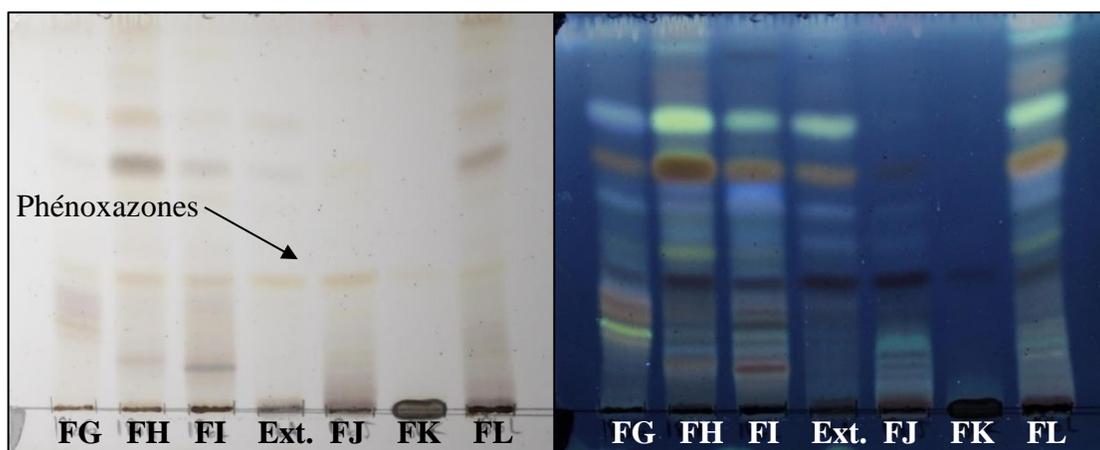


Figure 27. CCM récapitulative des fractions G à L issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A) dans un milieu CHCl_3 : MeOH : H_2O (55 : 3 : 0,1) révélée avec H_2SO_4 . Visionnement dans le visible (gauche) et à 365nm.

Les fractions issues de la colonne de silice à basse pression sur le second extrait brut ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines (tableau 11). Les fractions F, G, H, I, J et L présentent les plus fortes activités cytotoxiques. En

comparant les profils CCM (figures 27 et 28) aux valeurs d'IC₅₀, on remarque un lien entre la présence d'une tache sur la ligne de base et l'activité cytotoxique. En effet, les fractions les plus actives (F, G, H, I et J) présentent toutes cette marque. Cette tache n'est pas présente dans la fraction E, qui n'est pas active. Certaines fractions issues du second extrait brut, fractionné différemment de l'extrait brut total précédent, ont un facteur de sélectivité inférieur à 1, ce qui signifie qu'elles présentent plus de toxicité sur les cellules saines par rapport aux lignées cancéreuses. Ce phénomène est observé pour la première fois dans le cadre du présent projet, puisque généralement les échantillons testés sont plus toxiques envers les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines. Mis à part ceux-ci, les facteurs de sélectivité varient entre 0 et 8, ce qui est nettement inférieur aux résultats obtenus avec le premier extrait brut (facteur de sélectivité entre 3 et 32). On peut attribuer aux fractions F, H, I et J l'activité cytotoxique du second extrait brut, puisqu'elles présentent des IC₅₀ entre <0,8 et 1,29 µg·ml⁻¹ sur A-549, et entre <0,8 et 1,63 µg·ml⁻¹ sur DLD-1, avec des facteurs de sélectivité entre 1 et 8.

Tableau 11. Activité cytotoxique des 12 fractions issues de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Ext. brut	1,20 ± 0,07	1,56 ± 0,02	3,7 ± 0,2	<0,8	1,61 ± 0,10	8 ± 1
Frac. A	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Frac. B	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Frac. C	28 ± 8	29 ± 5	15 ± 3	51 ± 5	34 ± 2	36 ± 3
Frac. D	28 ± 3	9,6 ± 0,9	27 ± 3	22 ± 2	11 ± 1	30 ± 3
Frac. E	64 ± 3	55 ± 5	61 ± 10	53 ± 4	60 ± 5	55 ± 7
Frac. F	<0,8	1,08 ± 0,03	3,5 ± 0,3	<0,8	1,07 ± 0,06	2,7 ± 0,3
Frac. G	3,8 ± 0,4	2,4 ± 0,3	12 ± 1	1,48 ± 0,10	3,0 ± 0,2	12 ± 1
Frac. H	1,29 ± 0,06	1,63 ± 0,03	3,6 ± 0,4	<0,8	1,6 ± 0,1	6 ± 1
Frac. I	0,8 ± 0,008	1,01 ± 0,02	1,62 ± 0,07	<0,8	0,94 ± 0,08	1,4 ± 0,2
Frac. J	<0,8	0,89 ± 0,01	1,92 ± 0,06	<0,8	<0,8	2,6 ± 0,6
Frac. K	41 ± 4	56 ± 7	>100	16 ± 1	55 ± 6	>100
Frac. L	1,29 ± 0,07	2,07 ± 0,09	4,4 ± 0,4	1,01 ± 0,08	2,1 ± 0,1	8,2 ± 0,8
Étoposide				0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,4	>50

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Fractionnement par chromatographie liquide à basse pression de la fraction SF01186C

La fraction SF01186C (figure 27) a été purifiée par colonne de silice à basse pression avec un système Hex : AcOEt. Une masse totale de 104,1 mg a été obtenue pour les cinq fractions, pour un rendement de purification satisfaisant de 82,4 %. Le caractère apolaire de la fraction explique ce rendement de purification élevé, minimisant les interactions avec la phase stationnaire polaire.

La fraction C issue de cette purification a semblé relativement pure et a donc été analysée par RMN. Les données spectrales ont permis de déceler la présence d'un squelette de composé stéroïdien, correspondant au peroxyde d'ergostérol (figure 8), et dont la caractérisation sera discutée plus loin.

Peroxyde d'ergostérol ou 5 α ,8 α -epidioxy-22*E*-ergosta-6,22-dien-3 β -ol : poudre blanche jaunâtre (25,4 mg, 0,3 % de l'extrait brut); HR-ESI-MS m/z 429, 3368 [M+H]⁺, C₂₈H₄₄O₃; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,49 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-7), 6,23 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-6), 5,21 (dd, J = 15,2, 7,5 Hz, 1H, H-23), 5,13 (dd, J = 15,3, 8,0 Hz, 1H, H-22), 3,96 (td, J = 11,3, 5,6 Hz, 1H, H-3), 0,99 (d, J = 6,5 Hz, 3H, H-21), 0,90 (d, J = 6,8 Hz, 3H, H-28), 0,87 (s, 3H, H-19), 0,83 (s, 3H, H-27), 0,81 (s, 3H, H-26), 0,80 (s, J = 3,1 Hz, 3H, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 135,4 (C-22), 135,2 (C-6), 132,3 (C-23), 130,7 (C-7), 82,2 (C-8), 79,4 (C-5), 66,4 (C-3), 56,2 (C-17), 51,7 (C-14), 51,1 (C-9), 44,6 (C-13), 42,8 (C-24), 39,7 (C-20), 39,3 (C-12), 37,0 (C-10), 36,9 (C-4), 34,7 (C-1), 33,1 (C-25), 30,1 (C-2), 28,7 (C-16), 23,4 (C-15), 20,9 (C-21), 20,6 (C-11), 20,0 (C-27), 19,6 (C-26), 18,2 (C-19), 17,6 (C-28), 12,9 (C-18) (Wei-Guang *et al.* 1994; De Queiròz *et al.* 2001; Yue *et al.* 2001; Krzyczkowski *et al.* 2009; Seo *et al.* 2009).

L'activité cytotoxique de quatre des cinq fractions issues de la colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01186C a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses et saines (tableau 12). En effet, comme la fraction B a été purifiée plus finement, il a été impossible de la soumettre aux tests de cytotoxicité. Les fractions obtenues sont moyennement à faiblement cytotoxiques, à l'exception de la fraction D. Celle-ci, correspondant au lavage à l'AcOEt, montre une valeur d'IC₅₀ <0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur la lignée A-549 pour le test de réduction de la résazurine. Toutefois, à l'égard des résultats obtenus pour le test de Hoescht et la lignée DLD-1, cette donnée semble erronée. Il serait intéressant de mener de plus amples investigations ou d'effectuer un test statistique afin de valider cette observation.

Tableau 12. Activité cytotoxique de quatre des cinq fractions issues de la purification par colonne de silice à basse pression sur la fraction SF01186C

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Frac. A	>50	>50	>50	40 ± 1	>50	>50
Frac. C	17 ± 1	16 ± 1	14 ± 1	14,4 ± 0,6	15,9 ± 0,4	16 ± 1
Frac. D	<0,4	>50	>50	>50	>50	>50
Frac. E	22,8 ± 0,2	12,0 ± 0,6	11,8 ± 0,9	12,2 ± 0,5	11,0 ± 0,7	11,3 ± 0,6
Étoposide				<0,977	1,4 ± 0,5	2,7 ± 0,5

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Fractionnement par chromatographie liquide à basse pression de la fraction SF01197B

La fraction B issue de la séparation précédente a donc été purifiée par colonne de silice à basse pression avec un système Hex : AcOEt dans le but d'en isoler l'ergostérol. Une masse totale de 52,2 mg a été obtenue pour les cinq fractions, pour un rendement de purification de 106,3 %. Ceci s'explique par le déversement accidentel du produit de départ dont la récupération aurait pu entraîner la solubilisation d'impuretés pouvant surestimer le rendement.

À l'issue de cette purification, la fraction SF02009C obtenue semblait correspondre à l'ergostérol. Afin de valider ces suppositions, celle-ci a été éluee avec un standard commercial d'ergostérol dans le but d'en comparer les rapports frontaux (figure 29). Après révélation avec H_2SO_4 , la tache correspondant à l'ergostérol a été associée à une tache dans la fraction C par comparaison des R_f . Celui-ci correspond à la tache mauve présente avant la révélation.

L'analyse par chromatographie sur couche mince de la fraction C (à gauche sur la plaque) révèle la présence d'impuretés dont une tache majoritaire à un R_f plus élevé. Cette tache est également présente dans le standard d'ergostérol, à une intensité moindre, ce qui laisse présager qu'il pourrait s'agir d'un produit de dégradation de celui-ci.

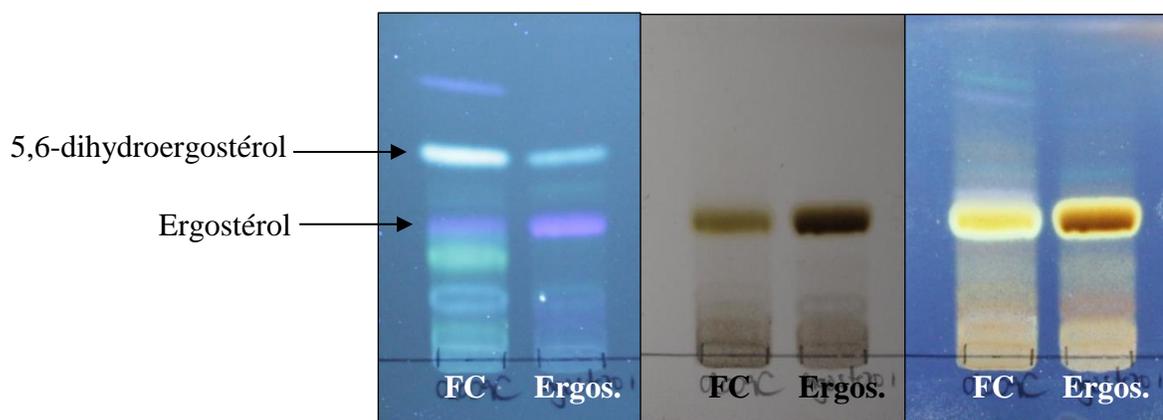


Figure 29. CCM comparative de la fraction SF02009C avec l'ergostérol dans un milieu Hex : AcOEt (7 : 3) sans révélation (gauche) et révélée avec H_2SO_4 (milieu et droite).

Visionnement à 365 nm (gauche et droite) et dans le visible (milieu).

La fraction C a été analysée par RMN, mais le spectre carbone donnait l'impression d'un dédoublement des pics. En effet, 45 carbones ont été dénombrés, alors que seulement 28 sont attendus pour l'ergostérol. Quelques groupes de recherche ont également rencontré ce problème, isolant à la fois l'ergostérol et un composé similaire, étant donné la difficulté à séparer ces deux molécules (Halsall et Sayer 1959; Cambie et Le Quesne 1966). Ce mélange a été nommé néostérol et correspond à un mélange d'ergostérol et de 5,6-dihydroergostérol (Barton et Cox 1948). Tous les déplacements chimiques caractéristiques de l'ergostérol ont été validés sur le spectre de la fraction C par comparaison avec les données de la littérature (Seo *et al.* 2009; Li *et al.* 2015). La comparaison et la superposition des spectres RMN¹³C de celle-ci et du standard commercial d'ergostérol sont présentées à l'annexe 3. Il est donc possible d'affirmer que cette fraction contient bien de l'ergostérol, un métabolite secondaire retrouvé dans certains champignons médicinaux (Li *et al.* 2015). Les 17 pics n'appartenant pas à l'ergostérol ont été associés aux déplacements chimiques caractéristiques du 5,6-dihydroergostérol, par comparaison avec les données de la littérature (figure 30) (Seo *et al.* 2009).

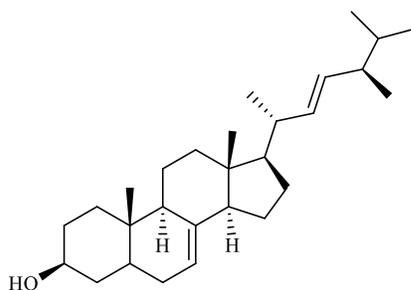


Figure 28. Structure du 5,6-dihydroergostérol.

Les hypothèses émises par les analyses RMN ont été corroborées par l'analyse en GC-MS de la fraction SF02009C. Le chromatogramme présente deux pics de masse de $m/z = 396,3$ et $398,4$ pouvant correspondre aux molécules en question. La banque de données MS suggérait également ces deux molécules, avec une correspondance (« match ») de 884 et 856, respectivement. Sur le chromatogramme, on constate la proximité des composés d'intérêt et le manque de résolution entre les deux pics correspondants. Les données en spectrométrie de masse ont cependant permis de bien identifier ces deux composés (figure 31).

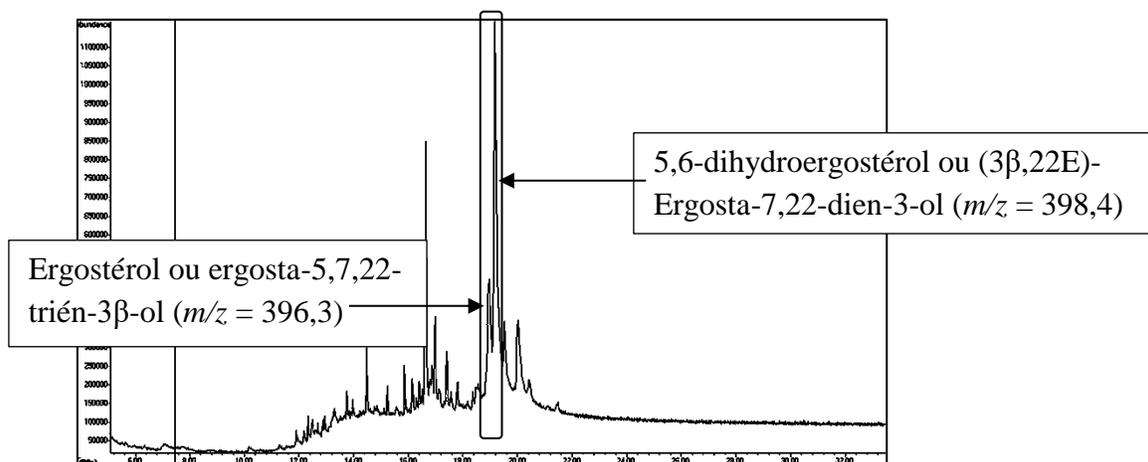


Figure 29. Chromatogramme GC-MS de la fraction SF02009C.

En raison des masses obtenues insuffisantes, les fractions issues de la colonne de silice à basse pression sur SF01197B n'ont pas pu être testées pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines. La fraction C et le standard commercial d'ergostérol ont toutefois été testés au niveau biologique (tableau 13). On constate l'absence

d'activité de l'ergostérol synthétique sur les lignées cancéreuses testées (A-549 et DLD-1), mais aussi sur la lignée saine (WS-1), avec des valeurs d'IC₅₀ >100 µM. Un groupe de recherche ayant également évalué la cytotoxicité de l'ergostérol, isolé et synthétique, sur des cellules du cancer du sein humain et murin ont obtenu des activités plus intéressantes sur ces lignées (Li *et al.* 2015). La fraction C présente toutefois une activité cytotoxique modérée avec des IC₅₀ entre 7 et 23 µg·ml⁻¹ sur les lignées cancéreuses et saines. Pour le test de réduction de la résazurine, on constate une absence de sélectivité pour les lignées cancéreuses par rapport aux cellules saines. Pour le test de Hoescht, il s'agit d'un facteur d'environ 2 à 3. À la lueur de ces observations, on peut penser que l'activité modérée de la fraction SF02009C est attribuable à la présence du 5,6-dihydroergostérol, ou une autre impureté minoritaire, étant donné l'absence d'activité cytotoxique de l'ergostérol sur les lignées malignes testées.

Tableau 13. Activité cytotoxique de la fraction SF02009C et du standard commercial d'ergostérol

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
SF02009C	23 ± 4	13 ± 2	13 ± 2	13 ± 2	7 ± 1	22 ± 5
Ergostérol	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Étoposide	6,8 ± 0,4	4,6 ± 0,4	16 ± 2	1,9 ± 0,1	5,1 ± 0,6	>50

*Toutes les IC₅₀ sont exprimées en µg·ml⁻¹, sauf pour l'ergostérol et l'étoposide (µM).

Filtration du précipité de la colonne de silice à basse pression

Un précipité issu du « *dry-pack* » a été récupéré lors de la purification du second extrait brut par colonne de silice à basse pression en utilisant un système CHCl₃ : MeOH : H₂O. Ce produit a présenté une forte activité cytotoxique, en plus d'un facteur de sélectivité d'environ 2 à 3 selon les lignées testées (tableau 14).

Tableau 14. Activité cytotoxique du précipité issu de la séparation par colonne de silice à basse pression du second extrait brut (SF01176A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Extrait brut	1,20 ± 0,07	1,56 ± 0,02	3,7 ± 0,2	<0,8	1,61 ± 0,10	8 ± 1
Précipité	<0,8	0,96 ± 0,02	2,2 ± 0,1	<0,8	0,9 ± 0,1	2,8 ± 0,6
Étoposide				0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,4	>50

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

Le chromatogramme du précipité en solution dans le DMSO montre la présence majoritaire de cinnabarine à un temps de rétention (t_r) de 31,95 minutes correspondant à un ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ à $m/z = 285,1$ en HPLC-ESI-MS. Le spectre infrarouge révèle certaines vibrations caractéristiques associées au squelette phénoxazone, mais également la présence d'une vibration Si-O-Si à $1021,1 \text{ cm}^{-1}$, ce qui laisse présager la présence de silice. Le résidu a donc été solubilisé dans le DMSO puis filtré sur coton. Une masse de 137,7 mg a été obtenue, pour un rendement de filtration satisfaisant de 91,4 %. Le produit obtenu a été analysé par RMN, et identifié comme étant la cinnabarine (figure 6), dont la caractérisation sera discutée plus loin.

Cinnabarine ou 2-amino-9-(hydroxyméthyl)-3-oxo-3H-phénoxazine-1-carboxylic acid : poudre rouge orangé (137,7 mg, 1,8 % de l'extrait brut); HR-ESI-MS m/z 287,0674 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$; HPLC-ESI-MS $m/z = 285,1$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,60 (s, 1H, 2-NH_a), 8,77 (s, 1H, 2-NH_b), 7,55 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-7), 7,52 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H-8), 7,48 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-6), 6,62 (s, 1H, H-4), 4,88 (s, 2H, H-12). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 177,7 (C-3), 168,7 (C-11), 152,1 (C-2), 150,7 (C-10a), 146,8 (C-4a), 142,0 (C-5a), 137,8 (C-9), 129,3 (C-7), 126,9 (C-9a), 123,7 (C-8), 114,5 (C-6), 104,9 (C-4), 92,2 (C-1), 58,9 (C-12) (Dias et Urban 2009); IR (ATR, cristal de diamant) ν_{max} 3373, 3268, 2917, 2853, 1681, 1653, 1594, 1471, 1307, 1200, 1089 cm^{-1} (Dias et Urban 2009).

Séparation de la fraction SF02023A par chromatographie sur couche mince préparative

Les fractions SF01186F et SF02015E ont été combinées dû à leur composition chimique similaire, pour donner la fraction SF02023A. Cette dernière a été fractionnée par CCM préparative sur silice dans un système CHCl_3 : MeOH. Une masse totale de 63,0 mg a été obtenue pour les sept fractions, pour un rendement acceptable de 60,2 %.

Les fractions A, E, F et G issues de cette séparation ont semblé relativement pures sur la CCM récapitulative et ont donc été analysées par RMN. Les fractions E, F et G paraissent majoritairement constituées d'acides gras considérant la grande abondance de protons de type méthylène ($-\text{CH}_2$)_n- vers 1,25 ppm et de carbones aliphatiques entre 10 et 35 ppm (Parker *et al.* 2014). La fraction A ne présente toutefois pas les mêmes caractéristiques spectrales. Malgré une intensité modérée sur les spectres RMN, on constate que certains déplacements chimiques sont caractéristiques des molécules au squelette phénoxazone. Celle-ci a donc été envoyée pour une analyse RMN sur un appareil à plus haute fréquence (600 MHz) à l'école de biologie de la *Georgia Institute of Technology* à Atlanta afin d'en élucider la structure. La fraction A a donc été identifiée comme étant la cinnabarine, à partir des données spectrales en RMN¹H et RMN¹³C.

La fraction F a été saponifiée, estérifiée puis analysée par GC-MS dans le but de confirmer sa nature glycéridique. Le chromatogramme de l'échantillon traité présente quelques pics majoritaires. Le plus intense est associé à un pic d'ion moléculaire de 396,4, mais la superposition des spectres de masse ne concorde pas avec l'ergostérol. En effet, par comparaison avec la banque de données MS, on constate que la superposition des spectres expérimental et théorique n'est pas parfaite. Le deuxième plus intense, présentant un pic d'ion moléculaire de 279,1, correspond à un phtalate, toujours selon la banque. Le troisième plus intense, correspond à l'ester méthylique de l'acide palmitique, ou l'ester de méthyle de l'acide hexadécanoïque, avec un pic d'ion moléculaire de 270,1. Ce dernier pic suggère que la saponification de la fraction F a fonctionné et que l'acide palmitique, libre ou lié, est présent dans *P. cinnabarinus* (figure 32). Les autres pics ne présentent pas d'intérêt vu leur faible intensité.

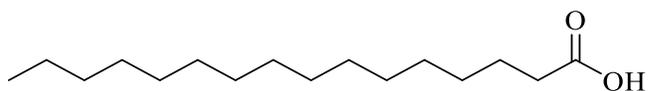


Figure 30. Structure de l'acide palmitique ou acide hexadécanoïque.

Les fractions issues de la chromatographie sur couche mince préparative sur la fraction SF02023A ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines (tableau 15). La fraction de départ ainsi que la fraction A, la plus polaire, présentent une activité cytotoxique élevée avec des valeurs d'IC₅₀ entre <0,391 et 5,9 µg·ml⁻¹, et des facteurs de sélectivité entre 1 et 8. Les autres fractions sont considérées comme moyennement à faiblement actives avec des IC₅₀ entre 15,1 et >50 µg·ml⁻¹ et des facteurs de sélectivité allant de 1 à 2. Pour une majorité d'échantillons dans cette série, on constate une activité cytotoxique plus marquée sur la lignée A-549 par rapport à DLD-1. On remarque également une diminution de l'activité cytotoxique à mesure que la polarité des fractions diminue, phénomène également observé auparavant. L'activité de la fraction de départ est donc attribuable à la cinnabarine, correspondant à la fraction A.

Tableau 15. Activité cytotoxique des sept fractions issues de la séparation par chromatographie sur couche mince préparative sur la fraction SF02023A

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
SF02023A	2,4 ± 0,6	5,9 ± 0,8	19 ± 1	2,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	17 ± 1
Frac. A	0,82 ± 0,05	0,52 ± 0,02	1,21 ± 0,04	<0,4	<0,4	1,19 ± 0,06
Frac. B	18 ± 2	23 ± 4	44 ± 3	15,1 ± 0,9	26,6 ± 0,7	37 ± 3
Frac. C	20 ± 3	34,3 ± 0,5	49,2 ± 0,3	20,0 ± 0,5	24,1 ± 0,7	36 ± 2
Frac. D	45 ± 2	34 ± 3	48,8 ± 0,5	28 ± 1	28 ± 2	35 ± 2
Frac. E	>50	42 ± 4	>50	38 ± 1	39 ± 2	>50
Frac. F	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Frac. G	37 ± 4	>50	>50	42 ± 2	>50	>50
Étoposide				<0,977	1,4 ± 0,5	2,7 ± 0,5

*Toutes les IC₅₀ sont exprimées en µg·ml⁻¹, sauf pour l'étoposide (µM).

Identification des composés isolés

Tréhalose

Le tréhalose (figure 33), ou 2-(hydroxyméthyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxyméthyl)tetrahydropyran-2-yl]oxy-tetrahydropyran-3,4,5-triol, a été isolé dans le cadre d'un projet de recherche précédent sous forme de cristaux jaunâtres (62,0 mg, 1,95 % de l'extrait brut). Le spectre HR-ESI-MS a démontré la présence d'un ion $[M+Na]^+$ à m/z 365,1063 suggèrent une formule moléculaire de $C_{12}H_{22}O_{11}$. La structure a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à partir des données de la littérature (Pfeffer *et al.* 1979). Le tréhalose est un disaccharide naturel abondant dans la nature. En effet, on en a fait l'isolation d'algues, de bactéries, de champignons, d'insectes, d'invertébrés et de levures, en plus de certaines plantes vasculaires et quelques plantes à fleurs (Elbein 1974). Le tréhalose présente des activités régulatrices au sein du métabolisme des champignons en plus de jouer un rôle comme source d'énergie (Elbein 1974). Celui-ci a déjà été isolé et identifié dans *Coriolus sanguineus* Fr., correspondant à *P. cinnabarinus*. En effet, la séparation d'un extrait aqueux du champignon sur une colonne de charbon et de Célite (ratio 1 : 1) avait permis d'isoler cette molécule sous sa forme hydratée par élution avec de l'éthanol aqueux (6-8 %) suite au retrait préalable des pigments (Cambie et Le Quesne 1966).

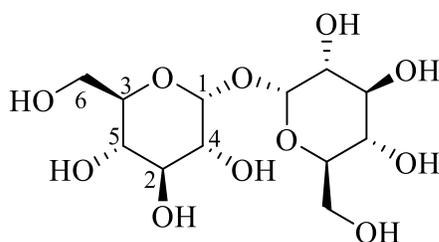


Figure 31. Structure du tréhalose ou α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside.

Acide cinnabarinique

La formule moléculaire de l'acide cinnabarinique, isolé sous forme de poudre rouge orangé, a été confirmée avec les données en spectrométrie de masse, tel qu'énoncé précédemment. La structure a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à partir des données de la littérature (Dias et Urban 2009; Fazio *et al.* 2012). Le spectre 1H NMR a démontré la présence

de signaux dus à trois groupements CH aromatiques à δ 7,95 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, H-8), 7,78 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-6) et 7,61 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H-7), un groupement CH aromatique isolé à δ 6,62 (s, 1H, H-4) et deux groupements NH échangeables à δ 9,73 (s, 1H, 2-NH_a) et 8,83 (s, 1H, 2-NH_b). Les protons labiles des groupements acide carboxylique et alcool secondaire n'ont pas été détectés. Le spectre infrarouge a suggéré la présence de fonctions amines et hydroxyles (3363 cm^{-1}) et carbonyles (1721 et 1563 cm^{-1}) (Dias et Urban 2009).

L'acide cinnabarinique a déjà été isolé et identifié dans *P. cinnabarinus* à partir d'un extrait à l'EtOH 100 %. L'extrait brut a été fractionné par chromatographie liquide sur gel de silice et la fraction 100 % AcOEt a démontré la présence de cette phénoxaxone sous forme d'une huile orangée (Dias et Urban 2009).

Peroxyde d'ergostérol

La formule moléculaire du peroxyde d'ergostérol, isolé sous forme de poudre blanche jaunâtre, a été confirmée avec les données en spectrométrie de masse, tel qu'énoncé précédemment. La structure a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à partir des données de la littérature (Wei-Guang *et al.* 1994; De Queiròz *et al.* 2001; Yue *et al.* 2001; Krzyczkowski *et al.* 2009; Seo *et al.* 2009). Le spectre ^1H NMR a démontré la présence d'un composé stéroïdique par la présence, entre autres, de six signaux dus à des groupements CH₃ à δ 0,99 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, H-21), 0,90 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, H-28), 0,87 (s, 3H, H-19), 0,83 (s, 3H, H-27), 0,81 (s, 3H, H-26) et 0,80 (s, $J = 3,1$ Hz, 3H, H-18), un proton géminale à un groupement hydroxyle à δ 3,96 (td, $J = 11,3, 5,6$ Hz, 1H, H-3) et des protons alcéniques à δ 6,49 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-7), 6,23 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-6), 5,21 (dd, $J = 15,2, 7,5$ Hz, 1H, H-23) et 5,13 (dd, $J = 15,3, 8,0$ Hz, 1H, H-22). Le spectre ^{13}C NMR a démontré, entre autres, la présence de quatre carbones alcéniques à δ 135,4 (C-22), 135,2 (C-6), 132,3 (C-23), 130,7 (C-7) ainsi que deux carbones quaternaires liés à un atome d'oxygène à δ 82,2 (C-8) et 79,4 (C-5), suggérant la présence d'un dérivé de l'ergostérol et d'une fonction peroxyde.

Le peroxyde d'ergostérol est une molécule au squelette stéroïdique ayant déjà été isolé de plusieurs espèces de champignons (comestibles, médicinaux ou microscopiques), levures,

plantes, éponge, coraux mous ou microalgues halotolérantes (Krzyczkowski *et al.* 2009). De plus, celui-ci a déjà été isolé et identifié dans *P. cinnabarinus* à partir d'un extrait à l'EtOH 100 %. La fraction AcOEt, obtenue par partition de solvant avec l'eau, avait été fractionnée successivement par chromatographie sur gel de silice et le peroxyde d'ergostérol avait été isolé sous forme d'une huile jaune pâle (Dias et Urban 2009).

Cinnabarine

La formule moléculaire de la cinnabarine, isolée sous forme de poudre rouge orangé, a été confirmée avec les données en spectrométrie de masse, tel qu'énoncé précédemment. La structure a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à partir des données de la littérature (Dias et Urban 2009). Le spectre ^1H NMR a démontré la présence de signaux dus à un groupement CH_2 déblindé à δ 4,88 (s, 2H, H-12), trois groupements CH aromatiques à δ 7,55 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-7), 7,52 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H-8) et 7,48 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-6), un groupement CH aromatique isolé à δ 6,62 (s, 1H, H-4) et deux groupements NH échangeables à δ 9,60 (s, 1H, 2-NH_a) et 8,77 (s, 1H, 2-NH_b). Les protons labiles des groupements acide carboxylique et alcool secondaire n'ont pas été détectés. Le spectre ^{13}C NMR a indiqué, entre autres, la présence de signaux dus à un groupement carbonyle à δ 177,7 (C-3), à un groupement carboxylique à δ 168,7 (C-11) et à un groupement CH_2 lié à un atome d'oxygène à δ 58,9 (C-12). Le spectre infrarouge a suggéré la présence de fonctions amines et hydroxyles (3373 et 3268 cm^{-1}), carbonyles (1681 et 1653 cm^{-1}) et d'un système cyclique insaturé (1594 cm^{-1}) (Dias et Urban 2009).

La cinnabarine a déjà été isolée et identifiée dans *P. cinnabarinus* à partir d'un extrait au Soxhlet à l'acétone. Une purification par HPLC en phase inverse a permis d'obtenir la cinnabarine sous forme d'une huile rougeâtre, le tramesanguin ainsi que la pycnoporine (Dias et Urban 2009).

Activité cytotoxique des composés isolés

Tout d'abord, les valeurs d'IC₅₀ obtenues en μM (tableau 16) pour les composés isolés dans *P. cinnabarinus* ont été converties en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à l'aide de la masse molaire (tableau 17). Cette conversion permet de les comparer en fonction des critères de la National Cancer Institute selon lesquels un échantillon est considéré actif si son IC₅₀ est inférieure à $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, modérément actif entre 10 et $49\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et faiblement actif avec des valeurs entre 50 et $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Il est également possible de comparer les valeurs avec celles des extraits de départ, dont un rappel est fait dans le tableau 18.

Tableau 16. Activité cytotoxique des quatre composés isolés exprimée en μM

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Tréhalose	>100	>100	>100	89 ± 12	>100	>100
Acide cinnabarinique	$13,9 \pm 0,6$	20 ± 1	>50	11 ± 1	13 ± 2	>50
Peroxyde d'ergostérol	56 ± 3	40 ± 6	$49,2 \pm 0,8$	43 ± 4	40 ± 7	54 ± 4
Cinnabarine	16 ± 2	17 ± 2	>50	10 ± 1	14 ± 2	>50
Étoposide	$6,8 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,4$	16 ± 2	$1,9 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,6$	>50

Tableau 17. Activité cytotoxique des quatre composés isolés convertie en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Tréhalose	>34,2	>34,2	>34,2	$30,5 \pm 4,1$	>34,2	>34,2
Acide cinnabarinique	$4,2 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,3$	>15	$3,3 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,6$	>15
Peroxyde d'ergostérol	24 ± 1	17 ± 3	$21,1 \pm 0,3$	18 ± 2	17 ± 3	23 ± 2
Cinnabarine	$4,6 \pm 0,6$	$4,9 \pm 0,6$	>14	$2,9 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,6$	>14

Tableau 18. Rappel des activités cytotoxiques des extraits bruts (SF01117A et SF01176A)

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
Brut total	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,5	17 ± 4	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,8	20 ± 3
Etoposide				5,0 ± 0,7	2,9 ± 0,4	11 ± 2
Second extrait	1,03 ± 0,04	3,2 ± 0,2	8,7 ± 0,4	<0,781	2,2 ± 0,2	9,5 ± 0,3
Étoposide				0,60 ± 0,08	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2

*Toutes les IC_{50} sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sauf pour l'étoposide (μM).

De tous les composés testés, ce sont la cinnabarine et l'acide cinnabarinique qui sont les plus intéressants en terme d'activité cytotoxique. Le potentiel anticancéreux de ces molécules a été comparé avec leurs extraits de départ respectifs (tableau 18). La cinnabarine présente une forte activité cytotoxique avec des valeurs d' IC_{50} entre 2,9 et 4,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur les deux lignées testées et un facteur de sélectivité entre 3 et 5 (tableau 17). Dans la littérature, la cinnabarine présente une activité antitumorale élevée. En effet, une IC_{50} de 13 μM , correspondant à 3,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a été mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009). L'activité cytotoxique de l'acide cinnabarinique est également considérée comme élevée avec des valeurs d' IC_{50} entre 3,3 et 6,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur les deux lignées testées et un facteur de sélectivité entre 3 et 5 (tableau 17). Dans la littérature, l'acide cinnabarinique présente une cytotoxicité modérée. En effet, une IC_{50} supérieure à 44 μM , correspondant à >13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a été mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009). En comparant les valeurs d' IC_{50} de la cinnabarine et de l'acide cinnabarinique isolés avec celles obtenues pour les extraits de départ respectifs, on constate que celles-ci sont similaires. Les extraits bruts semblent toutefois présenter un potentiel anticancéreux légèrement plus élevé ainsi qu'une sélectivité accrue. Il est important de mentionner que ces observations ne tiennent pas compte de la teneur en acide cinnabarinique et en cinnabarine dans les extraits de départ. Un dosage adéquat de ces composés permettrait une meilleure comparaison entre les résultats obtenus. Les deux phénoxazones isolées dans le cadre du projet expliquent donc en partie l'activité cytotoxique et la sélectivité d'un extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus*.

L'activité cytotoxique du peroxyde d'ergostérol est considérée comme modérée à faiblement active avec des valeurs d'IC₅₀ entre 17 et 24 µg·mL⁻¹ sur les lignées cancéreuses (tableau 17). Dans la littérature, la toxicité de cette molécule a toutefois été démontrée sur une multitude de lignées cancéreuses humaines et murine (Jong et Donovan 1989). Sa cytotoxicité serait toutefois attribuable à la conversion du peroxyde d'ergostérol en ergostérol, libérant une certaine quantité de peroxydes toxiques (Nam *et al.* 2001). Le peroxyde d'ergostérol isolé n'explique donc pas l'activité cytotoxique et la sélectivité d'un extrait de *P. cinnabarinus*.

C. SYNTHÈSE

Synthèse de l'acide cinnabarinique

La synthèse de l'acide cinnabarinique a été réalisée avec succès à partir de la méthode de Fazio *et al.* (Fazio *et al.* 2012). Le rendement obtenu pourrait toutefois être amélioré par une optimisation des conditions réactionnelles. Des analyses par HPLC-MS et RMN ont permis de confirmer la structure du produit de synthèse à partir des données de la littérature et des données obtenues précédemment dans le cadre du projet.

Acide cinnabarinique : poudre rouge foncé (89,1 mg, $r = 36,4 \%$); HPLC-ESI-MS $m/z = 301,0 [M+H]^+$; C₁₄H₈N₂O₆, tr = 21 min; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) $\delta = 9,72$ (s, 1H, COOH), 8,82 (s, 1H, COOH), 7,98-7,92 (m, 1H, H-8), 7,77 (dd, $J = 8,3, 1,1$ Hz, 1H, H-6), 7,60 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-7), 6,61 (s, 1H, H-4). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆, ppm) $\delta = 178,0$ (C-3), 169,0 (C-11), 166,2 (C-12), 152,4 (C-2), 150,4 (C-10a), 147,5 (C-4a), 142,3 (C-5a), 129,0 (C-9a), 128,7 (C-7), 127,7 (C-8), 126,1 (C-9), 120,1 (C-6), 104,8 (C-4), 92,6 (C-1) (figure 6) (Fazio *et al.* 2012).

L'acide cinnabarinique de synthèse a été testé pour sa capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses et saines. Les valeurs ont été comparées avec l'acide cinnabarinique isolé de *P. cinnabarinus* et avec le standard commercial.

Tableau 19. Activité cytotoxique de l'acide cinnabarinique (AC) synthétique, standard et isolé de *P. cinnabarinus* exprimée en μM

	Résazurine			Hoechst		
	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
AC synthétique	27 \pm 8	47 \pm 5	>100	22 \pm 3	35 \pm 2	90 \pm 9
AC isolé	13,9 \pm 0,6	20 \pm 1	>50	11 \pm 1	13 \pm 2	>50
AC standard	89 \pm 7	151 \pm 10	>200	127 \pm 12	148 \pm 24	187 \pm 7
Étoposide	2,2 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5	10 \pm 2	<0,391	1,9 \pm 0,4	3,1 \pm 0,5

On remarque une activité cytotoxique élevée à moyenne pour l'acide cinnabarinique synthétique, avec une activité plus marquée sur la lignée A-549. Des valeurs d'IC₅₀ de 27 et 22 μM ont été obtenues sur cette dernière, ainsi que des facteurs de sélectivité entre 2 et 4. L'acide cinnabarinique isolé du champignon a une activité cytotoxique plus élevée que le synthétique, avec des valeurs d'IC₅₀ entre 13,9 et 11 μM sur A-549 et un facteur de sélectivité entre 3 et 5. Cette dernière observation suggère qu'une impureté minoritaire issue du fractionnement, de nature non déterminée à l'heure actuelle, pourrait potentialiser l'activité cytotoxique de l'acide cinnabarinique isolé. Pour ce qui est du standard commercial, c'est celui qui a l'activité cytotoxique la moins élevée des trois, avec des valeurs d'IC₅₀ entre 89 et 127 μM . De plus, un facteur de sélectivité entre 1 et 2 est observé. De manière générale, l'acide cinnabarinique, isolé et synthétique, est considéré comme modérément actif, avec une activité cytotoxique plus marquée sur la lignée A-549 que sur DLD-1, et des facteurs de sélectivité entre 1 et 5.

CHAPITRE V.
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal du projet consistait en l'identification et la caractérisation du ou des composés responsables de l'activité cytotoxique d'un extrait hydroéthanolique de *Pycnoporus cinnabarinus*. Le fractionnement de l'extrait brut a permis d'isoler et d'identifier quatre composés : la cinnabarine, l'acide cinnabarinique, le peroxyde d'ergostérol ainsi que le tréhalose. Les tests de potentiel anticancéreux ont permis de démontrer que l'activité cytotoxique ainsi que la sélectivité de l'extrait hydroéthanolique de *P. cinnabarinus* sont attribuables en partie aux molécules de type phénoxazone. Ces résultats sont cohérents avec l'activité cytotoxique de quelques molécules de cette famille ayant déjà été documentée dans la littérature. Le développement d'un système de solvants permettant de solubiliser adéquatement l'extrait tout en étant compatible avec le milieu biologique présenterait un grand défi, étant donné les problèmes de solubilité connus de ce genre d'extrait.

Il est également probable que les propriétés anticancéreuses sélectives de l'extrait du champignon résultent d'un effet de synergie entre l'acide cinnabarinique et la cinnabarine, ou en combinaison avec d'autres molécules présentes. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet synergique de ces deux composés. D'autres lignées cancéreuses pourraient également être testées, étant donné la différence notable d'activité entre les lignées A-549 et DLD-1, qui ont été utilisées dans le cadre du projet. À première vue, c'est le carcinome pulmonaire humain (A-549) qui présente un plus grand potentiel que l'adénocarcinome colorectal humain (DLD-1) pour le développement d'un agent anticancéreux plus sélectif pour une utilisation en chimiothérapie. Des essais *in vivo* sur un modèle murin (souris) ainsi que des tests de mécanismes d'action permettraient d'obtenir de plus amples renseignements sur leur potentiel antitumoral ainsi que sur le mode d'action des phénoxazones. D'autre part, le peroxyde d'ergostérol, le néostérol ainsi que le tréhalose n'expliquent pas l'activité cytotoxique sélective d'un extrait de *P. cinnabarinus*. Malgré que les molécules isolées soient déjà connues de la littérature scientifique et identifiées comme présentes dans *P. cinnabarinus*, les résultats du projet permettent de fournir des données spectrales plus récentes pour certaines de ces molécules.

L'objectif secondaire du projet était la synthèse totale de certaines molécules déjà identifiées dans *P. cinnabarinus* afin de les obtenir en plus grande quantité. Étant donné la faible abondance du champignon dans la nature et les quantités minimales de phénoxazones isolées, l'utilisation de ces composés pour le développement préclinique d'un agent anticancéreux est difficilement envisageable. L'obtention de celles-ci par voie de synthèse permettrait donc de pallier le problème d'approvisionnement. La synthèse efficace de l'acide cinnabarinique par la condensation de deux molécules d'acide 3-hydroxyanthranilique, sans optimisation ni purification, est une première étape prometteuse. Toutefois, comme cette molécule est symétrique, la synthèse de la cinnabarine ou du tramesanguin pourrait présenter plus de difficultés étant donné leur asymétrie. Une optimisation des conditions réactionnelles ainsi que l'inhibition des peroxydes formés pendant la réaction permettraient certainement d'augmenter les rendements. Deux voies de synthèse hypothétique pour la cinnabarine et ses dérivés sont proposées dans l'annexe 2, en se basant sur ces résultats prometteurs. La synthèse en laboratoire serait également l'occasion d'améliorer l'hydrosolubilité des phénoxazones par la synthèse de dérivés afin de faciliter leur formulation. Ces résultats préliminaires donnent de l'espoir quant au potentiel de développement d'un agent anticancéreux plus sélectif. En effet, ceux-ci permettent de constater qu'il est possible de contourner les obstacles majeurs par voie de synthèse, soient la faible abondance des phénoxazones dans *P. cinnabarinus* ainsi que leur solubilité moindre.

RÉFÉRENCES

- Achenbach H et Blumm E. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus*. Pycnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Archiv der Pharmazie, 324 : 3–6.
- Barton DHR et Cox JD. 1948. The Application of the Method of Molecular Rotation Differences to Steroids. Part VI. neoSterol. Journal of the Chemical Society, 1357–1358.
- Basar TF. 2007. Evolutionary engineering of *Pycnoporus sanguineus* for pigment production. Istanbul Technical University, 91 p.
- Bose SR. 1946. Antibiotics in a Polyporus (*Polystictus sanguineus*). Nature, 158 : 292–296.
- Bruyneel F, Enaud E, Billottet L, Vanhulle S et Marchand-Brynaert J. 2008. Regioselective Synthesis of 3-Hydroxyorthanilic Acid and Its Biotransformation into a Novel Phenoxazinone Dye by Use of Laccase. European Journal of Organic Chemistry, 72–79.
- Cambie RC et Quesne PW Le. 1966. Chemistry of Fungi. Part III. Constituents of *Coriolus sanguineus* Fr. Journal of the Chemical Society, 72–74.
- Cavill GWK, Ralph BJ, Tetaz JR et Werner RL. 1953. The Chemistry of Mould Metabolites. Part I. Isolation and Characterisation of a Red Pigment from *Coriolus sanguineus* (Fr.). Journal of the Chemical Society, 525–529.
- Cavill GWK, Clezy PS, Tetaz JR et Werner RL. 1959. The Chemistry of Mould Metabolites - III. Structure of Cinnabarin (polystictin). Tetrahedron, 5 : 275–280.
- Christen S et Stocker R. 1992. Simultaneous Determination of 3-Hydroxyanthranilic and Cinnabarinic Acid by High-Performance Liquid Chromatography with Photometric or Electrochemical Detection. Analytical Biochemistry, 200 : 273–279.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. Micron, 35 : 93–96.
- Correa E, Cardona D, Quiñones W, Torres F, Franco AE, Vélez ID, Robledo S et Echeverri F. 2006. Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. Phytotherapy Research, 20 : 497–499.
- Couto SR et Herrera JLT. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnology Advances, 24 : 500–513.
- Després J. 2008. Champignons comestibles du Québec : les connaître, les déguster. Waterloo, 207 p.
- Dhawan S, Lal R, Hanspal M et Kuhad RC. 2005. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Bioresource Technology, 96 : 1415–1418.

Dias DA et Urban S. 2009. HPLC and NMR Studies of Phenoxazone Alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Natural Product Communications*, 4 : 489–498.

Díaz-Godínez G, Téllez-Téllez M, Rodríguez A, Obregón-Barbosa V, Acosta-Urdapilleta MDL et Villegas E. 2016. Enzymatic, Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* Grown Separately in an Airlift Reactor. *BioResources*, 11 : 4186–4200.

Dykens JA, Sullivan SG et Stern A. 1987. Oxidative reactivity of the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, cinnabarinic acid, quinolinic acid and picolinic acid. *Biochemical Pharmacology*, 36 : 211–217.

Eggert C. 1997. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological Research*, 152 : 315–318.

Eggert C, Temp U et Eriksson K-EL. 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters*, 407 : 89–92.

Eggert C, Temp U, Dean JFD et Eriksson K-EL. 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Letters*, 376 : 202–206.

Elbein AD. 1974. The Metabolism of α,α -Trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30 : 227–256.

Esposito E, Innocentini-Mei LH, Ferraz A, Canhos VP et Durán N. 1993. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. *Journal of Biotechnology*, 29 : 219–228.

Fazio F, Lionetto L, Molinaro G, Bertrand HO, Acher F, Ngomba RT, Notartomaso S, Curini M, Rosati O, Scarselli P, Marco R Di, Battaglia G, Bruno V, Simmaco M, Pin JP, Nicoletti F et Goudet C. 2012. Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology*, 81 : 643–656.

Gawande MB et Branco PS. 2011. An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media. *Green Chemistry*, 13 : 3355–3359.

Geng X, Jung H et Li K. 2004. Degradation of Wood and Pulp by Three Fungi, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trichophyton rubrum* LKY-7 and *Trichophyton rubrum* LSK-27. *American Chemical Society*, 139–151.

Gerber NN. 1968. Phenoxazinones by oxidative dimerization of aminophenols. *Canadian Journal of Chemistry*, 46 : 790–792.

Gilbertson RL et Ryvarden L. 1987. *North American Polypores*.

- Göçenoglu A et Pazarlioglu N. 2014. Cinnabarinic acid: Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 42 : 281–290.
- Gripenberg J. 1951. Fungus Pigments I. Cinnabarin, a Colouring Matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. *Acta Chemica Scandinavica*, 5 : 590–595.
- Gripenberg J. 1958. Fungus Pigments VIII. The Structure of Cinnabarin and Cinnabarinic Acid. *Acta Chemica Scandinavica*, 12 : 603–610.
- Gripenberg J. 1963. Fungus Pigments XIII. Tramesanguin, the Pigment of *Trametes cinnabarina* var. *sanguinea* (L.) Pilat. *Acta Chemica Scandinavica*, 17 : 703–708.
- Gripenberg J, Honkanen E et Patoharju O. 1957. Fungus Pigments V. Degradations of Cinnabarin. *Acta Chemica Scandinavica*, 11 : 1485–1492.
- Gunde-Cimerman N. 1999. Medicinal Value of the Genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 : 69–80.
- Halsall TG et Sayer GC. 1959. The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds. Part XXXV. Some Non-acidic Constituents of *Polyporus pinicola*, Fr. *Journal of the Chemical Society*, 2031–2036.
- Ishii T, Iwahashi H, Sugata R, Kido R et Fridovich I. 1990. Superoxide Dismutases Enhance the Rate of Autoxidation of 3-Hydroxyanthranilic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276 : 248–250.
- Jong S-C et Donovan R. 1989. Antitumor and Antiviral Substances from Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 34 : 183–262.
- Kim S-Y et Jung HS. 2002. Cladistic analysis of the Polyporaceae using morphological characters. *Mycotaxon*, 82 : 295–314.
- Krzyczkowski W, Malinowska E, Suchocki P, Kleps J, Olejnik M et Herold F. 2009. Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chemistry*, 113 : 351–355.
- Kües U et Rühl M. 2011. Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes - What for? *Current Genomics*, 12 : 72–94.
- Lebrun D et Guérineau A-M. 1988. Champignons du Québec et de l'Est du Canada. Ville Saint-Laurent, 288 p.
- Lemberg R. 1952. Nitrogenous pigments from the fungus *Coriolus sanguineus* (*Polystictus cinnabarinus*). *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 30 :

271–278.

Lepp H. 2013. Aboriginal use of fungi. Consulté le 27 octobre 2016, <http://www.anbg.gov.au/fungi/aboriginal.html>

Li K, Horanyi PS, Collins R, Phillips RS et Eriksson K-EL. 2001. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 : 301–307.

Li X, Wu Q, Xie Y, Ding Y, Du WW, Sdiri M et Yang BB. 2015. Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth *in vitro* and *in vivo* by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget*, 6 : 17832–17846.

Mallavadhani U V., Sudhakar AVS, Satyanarayana KVS, Mahapatra A, Li W et vanBreemen RB. 2006. Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chemistry*, 95 : 58–64.

Manthey MK, Pyne SG et Truscott RJW. 1988. Autoxidation of 3-Hydroxyanthranilic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, 53 : 1486–1488.

Manthey MK, Pyne SG et Truscott RJW. 1990. Mechanism of reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034 : 207–212.

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V et Pizzoferrato L. 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65 : 477–482.

Martínez ÀT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A et Río JC Del. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology*, 8 : 195–204.

McNeil R. 2007. Champignons du Québec et de l'est du Canada. Waterloo, 431 p.

Molinar E, Rios N, Spadafora C, Elizabeth Arnold A, Coley PD, Kursar TA, Gerwick WH et Cubilla-Rios L. 2012. Coibanoles, a new class of meroterpenoids produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Tetrahedron Letters*, 53 : 919–922.

Nam KS, Jo YS, Kim YH, Hyun JW et Kim HW. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, 69 : 229–237.

Newman DJ et Cragg GM. 2012. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75 : 311–335.

Nobles MK et Frew BP. 1962. Studies in Wood-inhabiting Hymenomycetes V. The Genus

Pycnoporus Karst. Canadian Journal of Botany, 40 : 987–1016.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European Journal of Biochemistry, 267 : 5421–5426.

Oda Y, Adachi K, Aita I, Ito M, Aso Y et Igarashi H. 1991. Purification and Properties of Laccase Excreted by *Pycnoporus coccineus*. Agricultural and Biological Chemistry, 55 : 1393–1395.

Ogawa H, Nagamura Y et Ishiguro I. 1983a. Cinnabarinic Acid Formation in Malpighian Tubules of the Silkworm, *Bombyx mori* - Participation of Catalase in Cinnabarinic Acid Formation in the Presence of Manganese Ion. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 364 : 1059–1066.

Ogawa H, Nagamura Y et Ishiguro I. 1983b. Cinnabarinic Acid Formation in Malpighian Tubules of the Silkworm, *Bombyx mori*: Reaction Mechanism of Cinnabarinic Acid Formation in the Presence of Catalase and Manganese Ions. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 364 : 1507–1518.

Oliveira LFC De, Hyaric M Le, Berg MM, Almeida M V. de et Edwards HGM. 2007. Raman spectroscopic characterization of cinnabarin produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Journal of Raman Spectroscopy, 38 : 1628–1632.

Ooi VEC. 2000. Medicinally important fungi. Science and cultivation of edible fungi, 1&2 : 41–51.

Ooi VEC et Fang L. 1999. A Review of Pharmacological Activities of Mushroom Polysaccharides. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1 : 195–206.

Parker T, Limer E, Watson AD, Defernez M, Williamson D et Kemsley EK. 2014. 60 MHz ¹H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. Trends in analytical chemistry, 57 : 147–158.

Pfeffer PE, Valentine KM et Parrish FW. 1979. Deuterium-Induced Differential Isotope Shift carbon ¹³NMR. 1. Resonance Reassignments of Mono- and Disaccharides. Journal of the American Chemical Society, 101 : 1265–1274.

Plourde P. 2016. Valorisation des champignons forestiers nordiques par l'étude de leur composition chimique et de leur activité biologique pour des applications pharmaceutiques et cosméceutiques. Université du Québec à Chicoutimi, 131 p.

Queiròz JH De, A. Barbosa LC De, Carvalho MR et Howarth OW. 2001. Complete ¹H and ¹³C-NMR signal assignments of ergosterol peroxide isolated from *Aspergillus versicolor*. Science & Engineering Journal, 10 : 14–17.

- Rago R, Mitchen J et Wilding G. 1990. DNA Fluorometric Assay in 96-Well Tissue Culture Plates Using Hoechst 33258 after Cell Lysis by Freezing in Distilled Water. *Analytical Biochemistry*, 191 : 31–34.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 24 : 219–226.
- Roes-Hill M Le, Goodwin C et Burton S. 2009. Phenoxazinone synthase: what's in a name? *Trends in Biotechnology*, 27 : 248–258.
- Ryvarden L et Johansen I. 1980. A preliminary polypore flora of East Africa. *Fungiflora*, Oslo, 636 p.
- Schatz A, Schatz V, Adelson LM et Trelawny GS. 1956. Spectrophotometric studies of *Polyporus cinnabarinus* and *Polyporus sanguineus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 83 : 136–140.
- Seo HW, Hung TM, Na M, Jung HJ, Kim JC, Choi JS, Kim JH, Lee H-K, Lee I, Bae K, Hattori M et Min BS. 2009. Steroids and Triterpenes from the Fruit Bodies of *Ganoderma lucidum* and their Anti-complement Activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32 : 1573–1579.
- Smânia A, Delle Monache F, Smânia EFA, Gil ML, Benchetrit LC et Cruz FS. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45 : 177–181.
- Smânia Jr A, Marques CJS, Smânia EFA, Zanetti CR, Carobrez SG, Tramonte R et Loguercio-Leite C. 2003. Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, 17 : 1069–1072.
- Société canadienne du cancer. 2017. Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer. Consulté le 14 décembre 2017, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=qc>
- Sullivan G et Henry ED. 1971. Occurrence and Distribution of Phenoxazinone Pigments in the Genus *Pycnoporus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60 : 1097–1098.
- Takusagawa F, Carlson RG et Weaver RF. 2001. Anti-Leukemia Selectivity in Actinomycin Analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9 : 719–725.
- Téllez-Téllez M, Villegas E, Rodriguez A, Acosta-Urdapilleta ML, O'Donovan A et Diaz-Godinez G. 2016. Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphere*, 7 : 1500–1525.

Temp U et Eggert C. 1999. Novel Interaction between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 : 389–395.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P et McPhail AT. 1971. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93 : 2325–2327.

Wasser SP et Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical review in immunology*, 19 : 65–96.

Wei-Guang M, Xing-Cong L, De-Zu W et Chong-Ren Y. 1994. Ergosterol peroxides from *Cryptoporus volvatus*. *Acta Botanica Yunnanica*, 16 : 196–200.

Yue J-M, Chen S-N, Lin Z-W et Sun H-D. 2001. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, 56 : 801–806.

ANNEXE 1.

**REVUE DE LITTÉRATURE : L'ACIDE CINNABARINIQUE –
ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET DÉRIVÉS CONNUS**

1. INTRODUCTION

Les phénoxazones, ou phénoxazinones, sont une classe de molécules présentes dans plusieurs organismes vivants et produits d'origine naturelle. Ces hétérocycles possèdent une structure de base tricyclique de type iminoquinone (Bruyneel *et al.* 2012), par la présence simultanée d'une fonction imine et cétone (figure 1). Celle-ci, en position 3, permet de les différencier des phénoxazines, des composés structurellement proches. Un atome d'oxygène est également au centre de ce système à trois cycles (Hendrich *et al.* 2006).

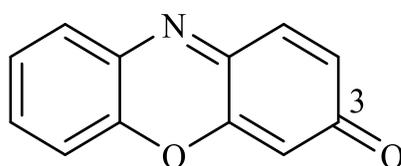


Figure 1. Représentation générale des phénoxazin-3-ones.

Le noyau phénoxazone a été identifié dans une variété de systèmes biologiques différents (Eggert *et al.* 1995; Le Roes-Hill *et al.* 2009). Ce chromophore est effectivement produit par plusieurs organismes vivants, dont les insectes, les champignons et certains marsupiaux d'Australie, sous forme de pigments (Eggert *et al.* 1995). Lorsqu'il y a présence d'une fonction amine libre en position 2, on parle plutôt de 2-amino-phénoxazinones. Celles-ci (figure 2), ainsi que certains de leurs dérivés, ont d'abord été retrouvées dans certains animaux invertébrés et mollusques puis ont été isolées de champignons et actinobactéries (Gerber *et al.* 1983). Les 2-amino-phénoxazones sont également responsables de l'intense couleur rouge-orangé caractéristique des champignons du genre *Pycnoporus*, soient les espèces *cinnabarinus*, *coccineus* et *sanguineus* (Eggert *et al.* 1995; Eggert 1997a). La distribution des pigments de ce type au sein des espèces dépend de l'espèce et de la saison (Dias et Urban 2009).

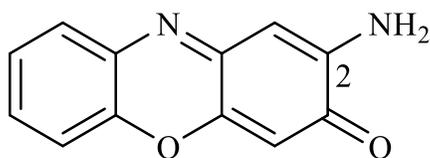


Figure 2. Représentation générale des 2-amino-phénoxazinones.

Plusieurs méthodes nous permettent de déterminer la structure de cette classe de molécules singulière. Les spectroscopies infrarouge (IR) et Raman, la réduction polarographique, certaines méthodes de modification ou de dégradation chimiques de la structure ou la résonance magnétique nucléaire (RMN) en sont quelques-unes (Schatz *et al.* 1956; Gripenberg *et al.* 1957; Cavill *et al.* 1961). Étant donné la présence d'un système cyclique possédant un degré élevé de conjugaison, la spectroscopie UV-visible nous permet également de mesurer le spectre d'absorption et d'observer des maxima caractéristiques de la structure 2-amino-phénoxazinone aux alentours de 425-441 nm et 230 nm (Gerber 1966).

Plusieurs activités biologiques ont déjà été répertoriées pour cette classe de molécules. Le noyau phénoxazone fait partie d'un mécanisme de protection des tissus des mammifères contre les dommages causés par l'oxydation (Eggert *et al.* 1995). On accorde aussi à ce groupe de molécule une activité anti-proliférative (Christen *et al.* 1992). Le squelette tricyclique des phénoxazones est retrouvé dans plusieurs agents antibiotiques (Le Roes-Hill *et al.* 2009). En effet, on isole fréquemment ce type de molécule de nombreux champignons, bactéries ou de sources invertébrées (Bruyneel *et al.* 2012). L'antibiotique de type 2-amino-phénoxazinone le plus étudié à l'heure actuelle est la dactinomycine, ou actinomycine D (Smânia Jr *et al.* 2003), un agent anticancéreux commercial (figure 3). On observe effectivement la présence du chromophore caractéristique auquel sont attachés deux pentapeptides cycliques (Eggert 1997a).

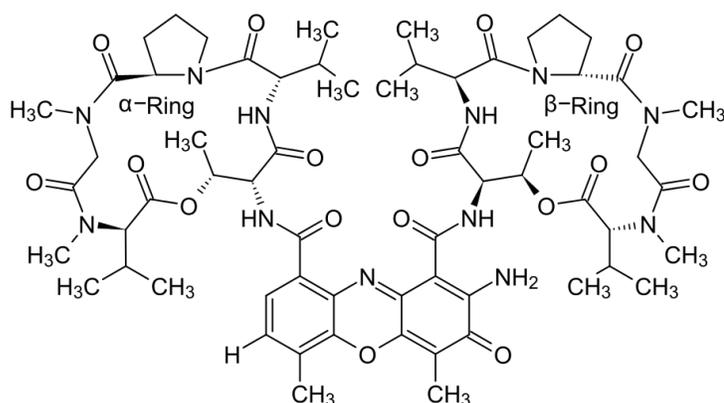


Figure 3. Structure de la dactinomycine (actinomycine D).

C'est le noyau phénoxazone et ses propriétés intercalantes des acides nucléiques que l'on soupçonne responsable de l'activité biologique importante des antibiotiques de ce type. En effet, certains groupements présents sur la structure ont la capacité de se lier précisément à des fragments de l'ADN par liaisons hydrogène ce qui permet une intercalation efficace entre des paires de bases spécifiques. Les phénoxazones sont donc des candidats intéressants comme agents antibiotique ou anticancéreux en raison de cette propriété (Le Roes-Hill *et al.* 2009). Certaines études ont d'ailleurs déjà prouvé le potentiel de certaines molécules de ce genre sur plusieurs lignées de cellules malignes *in vitro* (Kato *et al.* 2006; Shirato *et al.* 2007a, 2007b). Les propriétés antivirales des phénoxazinones ont également été démontrées par des tests sur le cytomégalovirus humain (HCMV) et sur les types 1 et 2 du virus de l'herpès (HSV-1 et -2) (Hayashi *et al.* 2008). En effet, ce squelette influence la réplication des virus par la perturbation de la bicouche phospholipidique de leur membrane ou de celle des cellules. La modification des propriétés de la phase lipidique induite par les phénoxazines et leurs dérivés pourrait expliquer cette activité biologique (Hendrich *et al.* 2006).

Plusieurs méthodes de synthèse, enzymatiques ou non, mènent à l'obtention du noyau phénoxazone et une multitude de ses dérivés. La réaction d'*o*-aminophénols (figure 4) ou de structures apparentées, en présence d'hémoglobine de source bovine, permet d'obtenir une grande diversité structurale (Hayashi *et al.* 2008). La réaction de condensation oxydative d'*o*-aminophénols est également catalysée par l'enzyme phénoxazinone synthase, ou PHS (Le

Roes-Hill *et al.* 2009), et par le cytochrome *c* ou la cytochrome oxydase (Christen *et al.* 1992). Pour obtenir chimiquement ces composés, un oxydant chimique de transfert d'électrons est nécessaire, par exemple l'air (Gerber *et al.* 1983). Les métaux de transition, particulièrement le Mn^{2+} , sont aussi d'excellents catalyseurs de la dimérisation oxydative d'*o*-aminophénols (Christen *et al.* 1992).

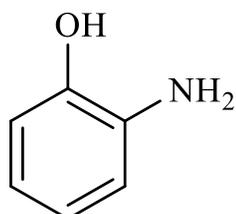


Figure 4. Structure générale des *o*-aminophénols.

L'acide cinnabarinique est un pigment alcaloïde dérivé de la structure 2-amino-phénoxazinone possédant également de multiples activités biologiques. La présente revue de littérature couvrira donc l'acide cinnabarinique et ses propriétés chimiques, ses différentes activités biologiques répertoriées ainsi que les dérivés connus de sa structure.

2. L'ACIDE CINNABARINIQUE

L'acide cinnabarinique, ou 2-amino-3-oxo-3*H*-phenoxazine-1,9-dicarboxylic acid, est un pigment de type phénoxazone et de formule chimique C₁₄H₈N₂O₆ (figure 5). La présence caractéristique de deux groupements acide carboxylique en positions 1 et 9 lui confère un caractère acide plus marqué que ses analogues.

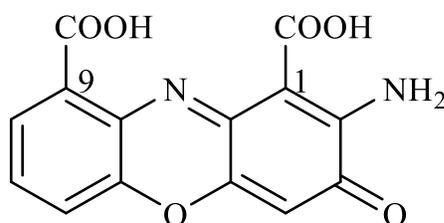


Figure 5. Structure de l'acide cinnabarinique.

Il peut être isolé de *Pycnopus cinnabarinus* sous forme d'huile orangée semi-pure (Dias et Urban 2009). On le retrouve aussi dans les autres espèces du genre *Pycnopus* (Eggert *et al.* 1995), soient *coccineus* et *sanguineus* (Gripenberg *et al.* 1957; De Oliveira *et al.* 2007). Sa masse moléculaire calculée est de 300.202 g·mole⁻¹. Il est donc possible d'observer un ion [M+H]⁺ à m/z = 301 en spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (ESI-MS) (Dias et Urban 2009). En spectroscopie UV-visible, il est possible d'observer les maximas d'absorption caractéristique au noyau phénoxazone (Schatz *et al.* 1956; Gripenberg *et al.* 1957; Chung *et al.* 1978; Eggert *et al.* 1995). Malgré son absorbance marquée à 450 nm dû à la résonance de sa structure, l'acide cinnabarinique n'émet pas beaucoup de fluorescence (Iizuka *et al.* 2010). La spectroscopie infrarouge (IR) permet la confirmation des fonctions hydroxyles et amine ainsi que la présence de groupements carbonyles. La confirmation finale de la structure est réalisée à l'aide des spectres de résonance magnétique (1D et 2D) permettant une confirmation structurale sans équivoque de l'acide cinnabarinique (Dias et Urban 2009).

2.1. Obtention par voie de synthèse

L'acide cinnabarinique (AC) est obtenu par la dimérisation oxydative de deux molécules d'acide 3-hydroxyanthranilique (3HAA) (figure 6). Certains métaux de transition et systèmes biologiques possédant une activité enzymatique catalysent cette réaction (Christen et Stocker 1992). Les laccases sont des enzymes produites par l'espèce *Pycnopus cinnabarinus* (Göçenoglu et Pazarlioglu 2014), qui produit également 3HAA (Li *et al.* 2001). En ces conditions, AC se forme dans une réaction d'oxydation à six électrons (Eggert 1997b). L'enzyme cinnabarinatase synthase permet également, en présence du précurseur, la production d'acide cinnabarinique (Ogawa *et al.* 1983a; Le Roes-Hill *et al.* 2009). Les ions manganèse agissent également comme stimulateur pour la réaction enzymatique à une concentration de 123±3 µM (Ogawa *et al.* 1983a). La synthèse de l'acide cinnabarinique à partir de l'acide 3-hydroxyanthranilique peut également procéder de manière non enzymatique. La présence d'espèces oxygénées actives ou de métaux de transition comme catalyseurs de la réaction est donc nécessaire (Eggert *et al.* 1995). En effet, il est connu que

3HAA est facilement oxydé par l'oxygène moléculaire pour produire AC comme produit prédominant (Ogawa *et al.* 1983b). L'oxydation en deux étapes passe par la formation d'une imine qui se condense ensuite avec la deuxième molécule d'acide 3-hydroxyanthranilique pour former l'acide cinnabarinique et libérer du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Ogawa *et al.* 1983a; Dykens *et al.* 1987; Ishii *et al.* 1990; Manthey *et al.* 1990).

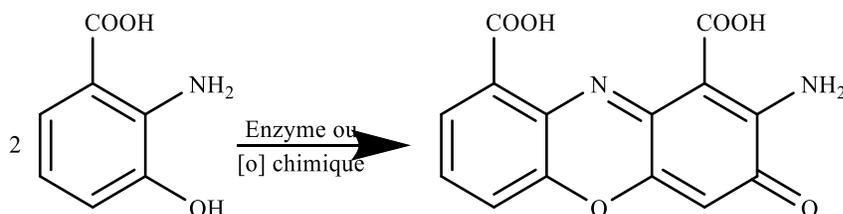


Figure 6. Schéma réactionnel général de la synthèse de l'acide cinnabarinique.

2.2. Activités biologiques

En raison de la structure phénoxazinone caractéristique de l'acide cinnabarinique et des diverses activités biologiques répertoriées pour cette classe de molécules, celui-ci possède également un large éventail de propriétés biologiques intéressantes.

Agent antitumoral

L'acide cinnabarinique possède une activité antitumorale modérée. En effet, une IC₅₀ supérieure à 44 µM a été mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009).

Agent antibactérien

Une mesure de l'activité antibactérienne de l'acide cinnabarinique à différentes températures d'incubation a permis de mettre en évidence son activité contre des souches de *Staphylococcus aureus*. À des températures entre 25 et 40 °C, des zones d'inhibitions entre 3.0 et 4.5 mm ont été mesurées tandis qu'aucune zone n'a été observée à plus haute température. En effet, il a été déterminé qu'à une température supérieure à 40 °C, cette activité antibactérienne disparaît totalement. Ce phénomène est dû à la destruction des liens

–COOH à température élevée, entraînant la perte de la structure caractéristique de l'acide cinnabarinique qui lui confère ses propriétés antibactériennes (Göçenoglu et Pazarlioglu 2014). On lui attribue aussi une activité sur plusieurs bactéries à Gram positif du genre *Streptococcus* (Liu 2005). Une autre étude sur une variété de souches bactériennes (*K. pneumoniae*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* ainsi que les groupes B, D, F et G du genre *Streptococcus*) a également mis en évidence cette propriété (Eggert 1997b). En effet, celle-ci suggère une activité antibactérienne de l'acide cinnabarinique sur toutes les souches testées, mais une plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif par rapport aux lignées à Gram négatif.

Agent antioxydant

Il est connu que le processus inflammatoire se produit par l'activation des phagocytes menant à une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ceux-ci contribuent à provoquer des dommages oxydatifs aux cellules ou aux tissus pouvant mener à de l'inflammation ainsi qu'à certaines maladies (cancer, athérosclérose, etc.). Certains métabolites de la voie métabolique de la kynurénine, notamment l'acide 3-hydroxyanthranilique, ont une action concrète sur l'inhibition des radicaux peroxydes, faisant d'eux des antioxydants biologiques potentiellement importants (Christen *et al.* 1990). L'étude de Christen *et al.* (1990) suggère que cette capacité antioxydante élevée pourrait s'expliquer par la dimérisation spontanée de deux molécules de 3-HAA en acide cinnabarinique en présence de radicaux libres. Une autre étude corrobore cette théorie voulant que l'activité de l'acide 3-hydroxyanthranilique est attribuable en partie à la formation d'acide cinnabarinique (Zollner 1976).

Ligand endogène AHR augmentant la production de IL-22

Dans une étude visant à faire un criblage des métabolites du tryptophane en aval de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) pouvant agir comme des ligands AHR (« aryl hydrocarbon receptor »), les cellules productrices d'IL-22 ont été utilisées comme cible (Lowe *et al.* 2014). L'IDO est une enzyme permettant la dégradation du tryptophane par la voie métabolique de la kynurénine et possédant des fonctions dans l'immunité cellulaire. Cette voie métabolique est activée en cas de neuroinflammation (Fazio *et al.* 2012).

L'interleukine 22 (IL-22), quant à elle, est une puissante médiatrice de la réponse inflammatoire cellulaire. L'étude de Lowe *et al.* (2014) a pu démontrer que l'acide 3-hydroxyanthranilique a la capacité de promouvoir la production d'IL-22 dans les cellules stimulées. Toutefois, celui-ci n'est pas un ligand AHR mais bien le précurseur de ce genre de ligand. Il est donc encore démontré que l'activité biologique de l'acide 3-hydroxyanthranilique provient de son oxydation en son dimère, l'acide cinnabarinique, en solution (Christen *et al.* 1992) et en culture cellulaire (Hiramatsu *et al.* 2008). L'acide cinnabarinique a donc été testé individuellement afin de vérifier sa capacité à se lier et activer ce type de récepteur *in vitro*. Ce métabolite endogène de la voie métabolique de la kynurénine a effectivement pu être identifié comme un ligand AHR pouvant augmenter la production d'IL-22, autant dans les cellules humaines que chez la souris. Des concentrations aussi faibles qu'1nM ont démontré une augmentation significative de la production d'interleukine 22 (Lowe *et al.* 2014).

Inducteur de l'apoptose dans les thymocytes et les cellules T

Les métabolites du tryptophane, notamment l'acide 3-hydroxyanthranilique, sont reconnus comme de puissants inducteurs de l'apoptose dans les cellules T (lymphocytes T) (Fallarino *et al.* 2002). On sait aussi que 3HAA s'oxyde facilement en son dimère cyclique, l'acide cinnabarinique, en présence d'oxygène (Ogawa *et al.* 1983b). Dans une étude récente, il a été prouvé que le AC généré à partir de l'acide 3-hydroxyanthranilique possède une activité 10 fois plus élevée que son précurseur pour induire l'apoptose des thymocytes. En effet, une concentration optimale de 30-50 μM d'acide cinnabarinique produit une induction maximale de la fragmentation de l'ADN. À fragmentation égale, une concentration de 300-500 μM d'acide 3-hydroxyanthranilique est nécessaire pour produire le même effet (Hiramatsu *et al.* 2008). 3HAA acquiert donc des propriétés comme inducteur de l'apoptose par son oxydation en son dimère cyclique. Hiramatsu *et al.* (2008) sont les premiers à avoir identifié l'acide cinnabarinique comme un puissant inducteur de l'apoptose, autant dans les thymocytes que les lymphocytes T. Il a aussi été proposé que l'acide cinnabarinique ainsi que son homologue structural, l'actinomycine D, induisent l'apoptose cellulaire de manière semblable (Hiramatsu *et al.* 2008).

Métabolite endogène jouant un rôle dans la réponse immunitaire

L'activité démontrée de l'acide cinnabarinique comme inducteur de l'apoptose des cellules T (Hiramatsu *et al.* 2008) en fait un candidat intéressant comme stimulus pour la régulation de la réponse auto-immune dans les modèles animaux de neuroinflammation (Fazio *et al.* 2014). L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal de maladie démyélinisante du système nerveux central (CNS) imitant la sclérose en plaques, est couramment utilisée en laboratoire sur des souris. Une étude a fait la preuve qu'en administrant l'acide cinnabarinique de façon prophylactique, c'est-à-dire avant le début de l'EAE, une dose de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ réussit à prévenir complètement l'apparition des symptômes associés à cette maladie. À une dose 10 fois plus petite, soit de $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, seulement 28.6 % des souris traitées démontrent des symptômes de la maladie (Fazio *et al.* 2014). L'étude de Fazio *et al.* (2014) a démontré l'efficacité de l'acide cinnabarinique à prévenir les signes cliniques du modèle de sclérose en plaques lorsqu'injecté avant l'apparition des premiers symptômes. Un traitement dès l'apparition de ceux-ci, dit thérapeutique, ne produit aucun effet. Une injection prophylactique d'acide cinnabarinique préviendrait également les dommages à la myéline ainsi que l'accumulation de cellules migratoires au cerveau et dans la moelle épinière (Fazio *et al.* 2014).

3. LES DÉRIVÉS DE L'ACIDE CINNABARINIQUE

L'acide cinnabarinique présente des similitudes structurales avec quelques molécules. Ces dérivés sont différents en un seul point : l'état d'oxydation du substituant présent en position X (figure 7) (Eggert *et al.* 1995). En effet, la partie de droite de la structure de type phénoxazone reste la même d'un dérivé à l'autre (figure 7). Toutefois, cette légère différence dans la structure peut avoir une grande influence sur les propriétés chimiques.

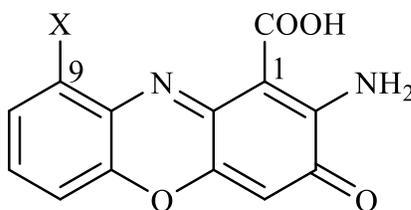


Figure 7. Représentation générale des dérivés de l'acide cinnabarinique.

3.1. La cinnabarine

La cinnabarine, ou 2-amino-9-(hydroxyméthyl)-3-oxo-3*H*-phénoxazine-1-carboxylique acid, est un pigment de type phénoxazone dérivé de l'acide cinnabarinique et de formule chimique $C_{14}H_{10}N_2O_5$ (figure 8). On remarque en position 9 la présence d'un alcool secondaire en remplacement de la fonction acide carboxylique. Ceci explique le caractère moins acide de la cinnabarine par rapport à l'acide cinnabarinique (Gripenberg *et al.* 1957).

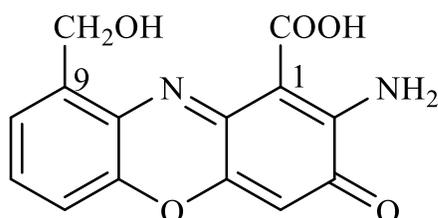


Figure 8. Structure de la cinnabarine.

Elle peut être isolée de *Pycnopus cinnabarinus* sous forme d'huile rougeâtre (Dias et Urban 2009) et de *Pycnopus sanguineus*, avec six autres pigments (Smânia Jr *et al.* 2003). En raison de sa formule chimique, on lui attribue une masse moléculaire calculée de 286.217 g·mole⁻¹. Il est donc possible d'observer un ion $[M+H]^+$ à $m/z = 287$ en spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray (ESI-MS) (Dias et Urban 2009). En spectroscopie UV-visible, il est possible d'observer les maxima d'absorption caractéristiques du noyau phénoxazone (Schatz *et al.* 1956; Gripenberg *et al.* 1957; Chung *et al.* 1978; Eggert *et al.* 1995). La spectroscopie infrarouge (IR) permet la confirmation des fonctions hydroxyles, amine et carbonyles ainsi que la présence d'un système cyclique insaturé. La confirmation finale de la structure est réalisée à l'aide des spectres de résonance magnétique (1D et 2D) permettant une confirmation structurale sans équivoque de la cinnabarine (Dias et Urban 2009). Dias et Urban (2009) ont été les premiers à effectuer la confirmation de la structure par la spectroscopie RMN à deux dimensions.

La cinnabarine possède une activité antibactérienne connue depuis 1945 sur certaines bactéries à Gram négatif (Bose 1945; Lemberg 1952). Depuis, plusieurs équipes de

chercheurs ont étendu leurs recherches à plusieurs autres souches bactériennes (Smânia *et al.* 1995, 1998). Dans l'étude de Smânia *et al.* (1998), plusieurs bactéries de sources alimentaires (*B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhimurium*, et *S. aureus*) ont été testées. L'activité antibactérienne la plus élevée a été observée sur *Bacillus cereus* et *Leuconostoc plantarum* avec une inhibition complète à une concentration de cinnabarine de $0,0625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dans une autre étude de Smânia *et al.* (1995), l'activité de la cinnabarine sur toutes les souches de bactéries testées (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmoella typhi*, *Staph. Aureus* ainsi que les groupes A, B, C et G du genre *Streptococcus*) a été prouvée. Ces deux études suggèrent une activité antibactérienne sur toutes les souches testées, d'origine alimentaire ou non, mais une plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif par rapport aux lignées à Gram négatif (Smânia *et al.* 1995, 1998). L'activité antivirale *in vitro* de la cinnabarine sur le virus de la rage a aussi été démontrée par une réduction de moitié de l'infection par le virus à des concentrations non-cytopathiques (Smânia Jr *et al.* 2003). L'activité antitumorale de la cinnabarine suscite également l'intérêt avec une IC_{50} de $13 \text{ }\mu\text{M}$ mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009).

3.2. Le tramesanguin

Le tramesanguin, ou 2-amino-9-formyl-3-oxo-3*H*-phénoxazine-1-carboxylic acid, est un pigment de type phénoxazone dérivé de l'acide cinnabarinique et de formule chimique $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_5$ (figure 9). On remarque en position 9 la présence d'un aldéhyde en remplacement de la fonction acide carboxylique.

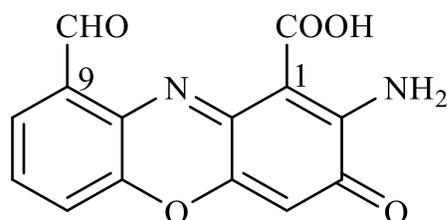


Figure 9. Structure du tramesanguin.

On peut en faire l'isolation de *Pycnopus cinnabarinus* sous forme d'huile rouge-orangé (Dias et Urban 2009). Il fait aussi partie des pigments minoritaires de l'espèce *sanguineus* (Gripenberg 1963). En raison de sa formule chimique, on lui attribue une masse moléculaire calculée de 284.203 g·mole⁻¹. Il est donc possible d'observer un ion [M+H]⁺ à m/z = 285 en spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray (ESI-MS) (Dias et Urban 2009). En spectroscopie UV-visible, il est possible d'observer les maxima d'absorption caractéristiques au noyau phénoxazone (Schatz *et al.* 1956; Gripenberg *et al.* 1957; Chung *et al.* 1978; Eggert *et al.* 1995). La spectroscopie infrarouge (IR) permet la confirmation des fonctions hydroxyle, amine ainsi que la présence de groupements carbonyles. La confirmation finale de la structure est réalisée à l'aide des spectres de résonance magnétique (1D et 2D) permettant une confirmation structurale sans équivoque du tramesanguin (Dias et Urban 2009). Dias et Urban (2009) ont été les premiers à effectuer la confirmation de la structure par la spectroscopie RMN à deux dimensions.

Le tramesanguin possède une activité antitumorale modérée avec une IC₅₀ > 44 µM mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009). Au meilleur de mes connaissances, aucune autre activité biologique n'a été répertoriée à l'heure actuelle pour le tramesanguin.

3.3. La pycnoporine

La pycnoporine, ou 2-amino-9-(hydroxy(méthoxy)méthyl)-3-oxo-3*H*-phénoxazine-1-carboxylic acid, est un pigment de type phénoxazone dérivé de l'acide cinnabarinique et de formule chimique C₁₅H₁₂N₂O₆ (figure 10). On remarque en position 9 la présence d'un groupement hydroxy(méthoxy)méthyle en remplacement de la fonction acide carboxylique.

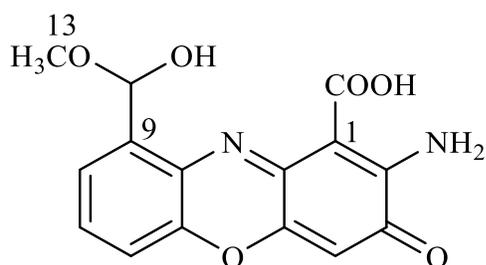


Figure 10. Structure de la pycnoporine.

On peut en faire l'isolation de *Pycnoporus cinnabarinus* sous forme d'huile rouge-orangé (Dias et Urban 2009). En raison de sa formule chimique, on lui attribue une masse moléculaire calculée de $316.240 \text{ g}\cdot\text{mole}^{-1}$. Il est donc possible d'observer un ion $[M+H]^+$ à $m/z = 317.0773$ en spectrométrie de masse haute résolution avec une ionisation par électrospray (HRESI-MS) (Dias et Urban 2009). On peut également retrouver les maximas d'absorption en spectroscopie UV-visible caractéristiques au noyau phénoxazone (Schatz *et al.* 1956; Gripenberg *et al.* 1957; Chung *et al.* 1978; Eggert *et al.* 1995). La spectroscopie infrarouge (IR) permet la confirmation des fonctions hydroxyle, amine ainsi que la présence de groupements carbonyles. La confirmation de la structure est réalisée à l'aide des spectres de résonance magnétique (1D et 2D) mais la configuration relative ou absolue n'a pu être déterminée dû à la dégradation du produit après la purification par HPLC (Dias et Urban 2009).

La pycnoporine possède une activité antitumorale modérée avec une IC_{50} de $36 \mu\text{M}$ mesurée lors de tests *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie murine (Dias et Urban 2009). Au meilleur de mes connaissances, aucune autre activité biologique n'a été répertoriée à l'heure actuelle pour la pycnoporine.

4. TRAVAUX EFFECTUÉS AU LASEVE

4.1. Synthèse de l'acide cinnabarinique

La synthèse de l'acide cinnabarinique a été adaptée de la méthode de Fazio *et al.* (2012). De l'oxyde de manganèse(IV) (648 mg, 6,33 mmole) a été ajouté à une solution d'acide 3-hydroxyanthranilique (250 mg, 1,58 mmole) dans le méthanol (117,5 mL) sous agitation magnétique à température pièce. Les produits de la réaction ont été suivis par CCM (20 % CH₂Cl₂ : MeOH pour 3-HAA; BuOH : CH₃COOH_{glacial} : H₂O 4 : 1 : 2 pour AC). Après 1 semaine, le réactif de départ était toujours présent, mais la réaction a été arrêtée. De la triéthylamine (486 mg, 4,75 mmole) a été ajoutée et le mélange agité pour 10 minutes. Le mélange réactionnel a été filtré sur Célite 521 et lavé à plusieurs reprises avec du méthanol. La solution méthanolique a été concentrée sous pression réduite, diluée avec 20 mL d'eau déminéralisée puis acidifiée à pH \approx 1-2 avec HCl 10 % m/v. Le solide rouge foncé formé a été filtré sur Buchner puis lavé à l'eau (3 x 5 mL) et à l'éther (2 x 20 mL). Le solide présent sur le filtre a été récupéré, séché à l'air et sous vide. Une masse de 89,1 mg d'acide cinnabarinique (rendement de 36,4%) a été obtenue et identifié par RMN sans purification : ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ = 9,72 (s, 1H, COOH), 8,82 (s, 1H, COOH), 7,98-7,92 (m, 1H, H-8), 7,77 (dd, J = 8,3, 1,1 Hz, 1H, H-6), 7,60 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-7), 6,61 (s, 1H, H-4). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ = 178,0 169,0, 166,2, 152,4, 150,4, 147,5, 142,3, 129,0, 128,7, 127,7, 126,1, 120,1, 104,8, 92,6.

4.2. Activités biologiques

À la lueur des activités biologiques répertoriées dans la littérature, un criblage complet des différents tests offerts au laboratoire LASEVE a été tenté sur un standard d'acide cinnabarinique. L'activité antibactérienne obtenue sous forme d'IC₅₀ et de MIC sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* après 24 h est supérieure à 200 μ M, ce qui est surprenant par rapport à ce qui a déjà été rapporté. Pour ce qui est de l'activité cytotoxique, l'acide cinnabarinique s'est avéré non- ou faiblement actif (IC₅₀ entre 89 et 151 μ M) sur les cellules du carcinome du poumon (A-549) ou de l'adénocarcinome du côlon (DLD-1). Une

activité légèrement plus marquée a été observée sur A-549 par rapport à DLD-1. Une légère sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux lignées saines (WS-1) a également été constatée. Une IC_{50} de $30 \pm 12 \mu\text{M}$ lors des tests d'activité anti-inflammatoire a été mesurée. Une inhibition maximale de 103,6 % de la production d'oxyde nitrique (NO) correspondant à une concentration de $160 \mu\text{M}$ d'acide cinnabarinique a été observée. À $80 \mu\text{M}$, on observait plutôt une inhibition intéressante de 49,6%. Les résultats aux tests antioxydant cellulaire et ORAC ont montré des résultats forts intéressants. En effet, l' IC_{50} du test antioxydant cellulaire est aussi faible que $2,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Pour ce qui est du test ORAC, les résultats en équivalents Trolox sont de $6,330 \pm 0,620 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$. Ce résultat est supérieur au résultat du Trolox lui-même, qui se situe à $5,160 \pm 0,127$. Les résultats « maison » aux différents tests d'activités biologiques nous permettent d'affirmer avec certitude que l'acide cinnabarinique est effectivement un bon agent antioxydant en plus d'avoir des propriétés intéressantes en tant qu'agent anti-inflammatoire. Toutefois, les activités antibactérienne et anticancéreuse élevées trouvées dans la littérature n'ont pas pu être observées lors de ces tests.

5. CONCLUSION

La présente revue de littérature a permis de mettre en évidence l'omniprésence des phénoxazones et leurs dérivés dans une multitude d'organismes vivants et de produits d'origine naturelle. Plusieurs méthodes de caractérisation analytique et chimique ont rendu possible la confirmation de leur structure particulière. Leur vaste champ d'action au niveau biologique en fait d'excellents candidats comme agent thérapeutique. Certaines phénoxazinones sont d'ailleurs déjà utilisées comme médicament dans le traitement du cancer. L'acide cinnabarinique, une phénoxazone principalement isolée du champignon *Pycnoporus*, présente lui aussi des caractéristiques pharmacologiques surprenantes. C'est un agent antitumoral modéré *in vitro* et antibactérien à des températures inférieures à 40°C . L'acide cinnabarinique joue un rôle crucial dans l'inhibition des radicaux peroxy endogènes, faisant de lui un antioxydant biologique intéressant. Ce métabolite endogène a été identifié comme un ligand AHR augmentant la production d'IL-22. C'est aussi un

inducteur de l'apoptose dans les thymocytes et les cellules T donc un candidat intéressant pour la régulation de la réponse auto-immune dans les modèles animaux de neuroinflammation. En effet, l'efficacité de l'acide cinnabarinique à prévenir les signes cliniques lors d'un traitement prophylactique de la maladie a été démontrée. Les dérivés de l'acide cinnabarinique sont structuralement très proches. Toutefois, leurs propriétés biologiques n'ont pas encore été étudiées autant en profondeur. On sait que la cinnabarine est un agent antibactérien, antiviral et antitumoral très intéressant. Le tramesanguin et la pycnoporine présentent une activité antitumorale modérée et aucune autre activité biologique répertoriée à l'heure actuelle.

6. RÉFÉRENCES

Bose SR. 1945. Anti-bacterial Action of « Polyporin » against Typhoid, Cholera. Dysentery and B. coli. *Nature*, 3954 : 171.

Bruyneel F, Dive G et Marchand-Brynaert J. 2012. Non-symmetrically substituted phenoxazinones from laccase-mediated oxidative cross-coupling of aminophenols: an experimental and theoretical insight. *Organic & biomolecular chemistry*, 10 : 1834–1846.

Cavill GWK, Clezy PS et Whitfield FB. 1961. The chemistry of mould metabolites. Part IV. Reductive acetylation and reoxidation of some phenoxazin-3-ones. *Tetrahedron*, 12 : 139–145.

Christen S et Stocker R. 1992. Simultaneous Determination of 3-Hydroxyanthranilic and Cinnabarinic Acid by High-Performance Liquid Chromatography with Photometric or Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 200 : 273–279.

Christen S, Peterhans E et Stocker R. 1990. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 : 2506–2510.

Christen S, Southwell-Keely PT et Stocker R. 1992. Oxidation of 3-Hydroxyanthranilic Acid to the Phenoxazinone Cinnabarinic Acid by Peroxyl Radicals and by Compound I of Peroxidases or Catalase. *Biochemistry*, 31 : 8090–8097.

Chung KS, Shim MJ et Kim BK. 1978. Studies on the Constituents of Higher Fungi of Korea(XI). *Archives of Pharmacal Research*, 1 : 33–40.

Dias DA et Urban S. 2009. HPLC and NMR Studies of Phenoxazone Alkaloids from

Pycnoporus cinnabarinus. Natural Product Communications, 4 : 489–498.

Dykens JA, Sullivan SG et Stern A. 1987. Oxidative reactivity of the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, cinnabarinic acid, quinolinic acid and picolinic acid. Biochemical Pharmacology, 36 : 211–217.

Eggert C. 1997a. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. Microbiological research, 152 : 315–318.

Eggert C. 1997b. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. Microbiological Research, 152 : 315–318.

Eggert C, Temp U, Dean JFD et Eriksson K-EL. 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. FEBS Letters, 376 : 202–206.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC et Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death and Differentiation, 9 : 1069–1077.

Fazio F, Lionetto L, Molinaro G, Bertrand HO, Acher F, Ngomba RT, Notartomaso S, Curini M, Rosati O, Scarselli P, Marco R Di, Battaglia G, Bruno V, Simmaco M, Pin JP, Nicoletti F et Goudet C. 2012. Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors. Molecular Pharmacology, 81 : 643–656.

Fazio F, Zappulla C, Notartomaso S, Busceti C, Bessede A, Scarselli P, Vacca C, Gargaro M, Volpi C, Allegrucci M, Lionetto L, Simmaco M, Belladonna ML, Nicoletti F et Fallarino F. 2014. Cinnabarinic acid, an endogenous agonist of type-4 metabotropic glutamate receptor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Neuropharmacology, 81 : 237–243.

Gerber NN. 1966. Phenazines and Phenoxazinones from Some Novel Nocardiaceae. Biochemistry, 5 : 3824–3829.

Gerber NN, Yale HL, Taber WA, Kurobane I et Vining LC. 1983. Structure and syntheses of texazone, 2-(*N*-methylamino)-3*H*-phenoxazin-3-one-8-carboxylic acid, an actinomycete metabolite. The Journal of antibiotics, 36 : 688–694.

Göçenoglu A et Pazarlioglu N. 2014. Cinnabarinic acid: Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional properties. Journal of Biological Chemistry, 42 : 281–290.

Gripenberg J. 1963. Fungus Pigments XIII. Tramesanguin, the Pigment of *Trametes cinnabarina* var. *sanguinea* (L.) Pilat. Acta Chemica Scandinavica, 17 : 703–708.

Gripenberg J, Honkanen E et Patoharju O. 1957. Fungus Pigments V. Degradations of Cinnabarin. *Acta Chemica Scandinavica*, 11 : 1485–1492.

Hayashi K, Hayashi T et Tomoda A. 2008. Phenoxazine Derivatives Inactivate Human Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus-1, and Herpes Simplex Virus-2 In Vitro. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106 : 369–375.

Hendrich AB, Stańczak K, Komorowska M, Motohashi N, Kawase M et Michalak K. 2006. A study on the perturbation of model lipid membranes by phenoxazines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14 : 5948–5954.

Hiramatsu R, Hara T, Akimoto H, Takikawa O, Kawabe T, Isobe K-I et Nagase F. 2008. Cinnabarinic Acid Generated from 3-Hydroxyanthranilic Acid Strongly Induces Apoptosis in Thymocytes through the Generation of Reactive Oxygen Species and the Induction of Caspase. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103 : 42–53.

Iizuka H, Obata K, Yajima T, Ichiba H et Fukushima T. 2010. Development of a fluorimetric detection method for cinnabarinic acid using ortho-tolyl hydrazine as the derivatization reagent. *Biomedical Chromatography*, 24 : 231–234.

Ishii T, Iwahashi H, Sugata R, Kido R et Fridovich I. 1990. Superoxide Dismutases Enhance the Rate of Autoxidation of 3-Hydroxyanthranilic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276 : 248–250.

Kato S, Shirato K, Imaizumi K, Toyota H, Mizuguchi J, Odawara M, Che X-F, Akiyama S, Abe A et Tomoda A. 2006. Anticancer effects of phenoxazine derivatives combined with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on pancreatic cancer cell lines, KLM-1 and MIA-PaCa-2. *Oncology Reports*, 15 : 843–848.

Lemberg R. 1952. Nitrogenous pigments from the fungus *Coriolus sanguineus* (*Polystictus cinnabarinus*). *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 30 : 271–278.

Li K, Horanyi PS, Collins R, Phillips RS et Eriksson K-EL. 2001. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 : 301–307.

Liu J-K. 2005. N-Containing Compounds of Macromycetes. *Chemical Reviews*, 105 : 2723–2744.

Lowe MM, Mold JE, Kanwar B, Huang Y, Louie A, Pollastri MP, Wang C, Patel G, Franks DG, Schlezinger J, Sherr DH, Silverstone AE, Hahn ME et McCune JM. 2014. Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production. *PLOS ONE*, 9 : 1–15.

Manthey MK, Pyne SG et Truscott RJW. 1990. Mechanism of reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034 : 207–212.

Ogawa H, Nagamura Y et Ishiguro I. 1983a. Cinnabarinic Acid Formation in Malpighian Tubules of the Silkworm, *Bombyx mori* - Participation of Catalase in Cinnabarinic Acid Formation in the Presence of Manganese Ion. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 364 : 1059–1066.

Ogawa H, Nagamura Y et Ishiguro I. 1983b. Cinnabarinic Acid Formation in Malpighian Tubules of the Silkworm, *Bombyx mori*: Reaction Mechanism of Cinnabarinic Acid Formation in the Presence of Catalase and Manganese Ions. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 364 : 1507–1518.

Oliveira LFC De, Hyaric M Le, Berg MM, Almeida M V. de et Edwards HGM. 2007. Raman spectroscopic characterization of cinnabarin produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38 : 1628–1632.

Roes-Hill M Le, Goodwin C et Burton S. 2009. Phenoxazinone synthase: what's in a name? *Trends in Biotechnology*, 27 : 248–258.

Schatz A, Schatz V, Adelson LM et Trelawny GS. 1956. Spectrophotometric studies of *Polyporus cinnabarinus* and *Polyporus sanguineus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 83 : 136–140.

Shirato K, Imaizumi K, Abe A et Tomoda A. 2007a. Phenoxazine Derivatives 2-Amino-4,4 α -dihydro-4 α -phenoxazine-3-one and 2-Aminophenoxazine-3-one-Induced Apoptosis through a Caspase-Independent Mechanism in Human Neuroblastoma Cell Line NB-1 Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30 : 331–336.

Shirato K, Imaizumi K, Abe A et Tomoda A. 2007b. Phenoxazine derivatives induce caspase-independent cell death in human glioblastoma cell lines, A-172 and U-251 MG. *Oncology Reports*, 17 : 201–208.

Smânia A, Delle Monache F, Smânia EFA, Gil ML, Benchetrit LC et Cruz FS. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45 : 177–181.

Smânia E de FA, Smânia Júnior A et Loguercio-Leite C. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Revista de Microbiologia*, 29 : 317–320.

Smânia Jr A, Marques CJS, Smânia EFA, Zanetti CR, Carobrez SG, Tramonte R et Loguercio-Leite C. 2003. Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, 17 : 1069–1072.

Zollner H. 1976. Effects of cinnabarinic on mitochondrial respiration. *Biochemical Pharmacology*, 25 : 643–648.

ANNEXE 2.

VOIE HYPOTHÉTIQUE DE SYNTHÈSE DE LA CINNABARINE ET AUTRES PHÉNOXAZONES

1. INTRODUCTION

Il a précédemment été discuté de l'intérêt d'effectuer la synthèse totale de molécules au squelette phénoxazone. En effet, celles-ci possèdent plusieurs propriétés biologiques connues, mais sont présentes en faible abondance dans les espèces du genre *Pycnoporus*. Un intérêt accru pour certaines de leurs propriétés apporterait une problématique liée à l'obtention des molécules. À l'heure actuelle, la synthèse de l'acide cinnabarinique a été réalisée avec succès par quelques groupes de recherches (Fazio *et al.* 2012; Pasceri *et al.* 2013), et également dans nos laboratoires. Celui-ci est toutefois vendu sous forme de standard, mais son coût est assez élevé. La synthèse en laboratoire permet donc une économie monétaire et une autosuffisance liée à l'approvisionnement. La cinnabarine a également été synthétisée en laboratoire, il y a quelques décennies (Weinstein et Brattesani 1967). Toutefois, celle-ci et les autres phénoxazones connues ne sont pas disponibles sur le marché. La réussite d'une telle synthèse s'avère un défi de taille, mais aux retombées scientifiques intéressantes. Une meilleure caractérisation de ce type de molécules, et la capacité à les produire en laboratoire seraient une grande avancée en vertu de leurs propriétés biologiques multiples. Deux voies de synthèse totale de la cinnabarine sont donc proposées. La première se base sur le principe connu de la condensation oxydative d'aminophénols, par lequel est synthétisé AC, pour obtenir les molécules d'intérêt. La deuxième débute avec l'acide cinnabarinique, qui est modifié chimiquement pour obtenir les dérivés phénoxazones voulus.

2. LA SYNTHÈSE DE LA CINNABARINE À TRAVERS LES ANNÉES

Une équipe de recherche s'est intéressée à la synthèse de la cinnabarine, ainsi que d'autres molécules au squelette phénoxazone (Weinstein et Brattesani 1967). Par la condensation oxydative de deux molécules d'aminophénols ayant les fonctions chimiques désirées, quatre molécules sont obtenues : la cinnabarine, l'acide cinnabarinique, ainsi que deux autres dérivés au noyau phénoxazone. Lorsqu'une quantité équimolaire d'acide 3-hydroxyanthranilique (3-HAA) et d'alcool 2-amino-3-hydroxybenzyle, en solution dans l'EtOH, est mise en présence de *p*-benzoquinone à l'air, on obtient le mélange de molécules présenté à la figure 1.

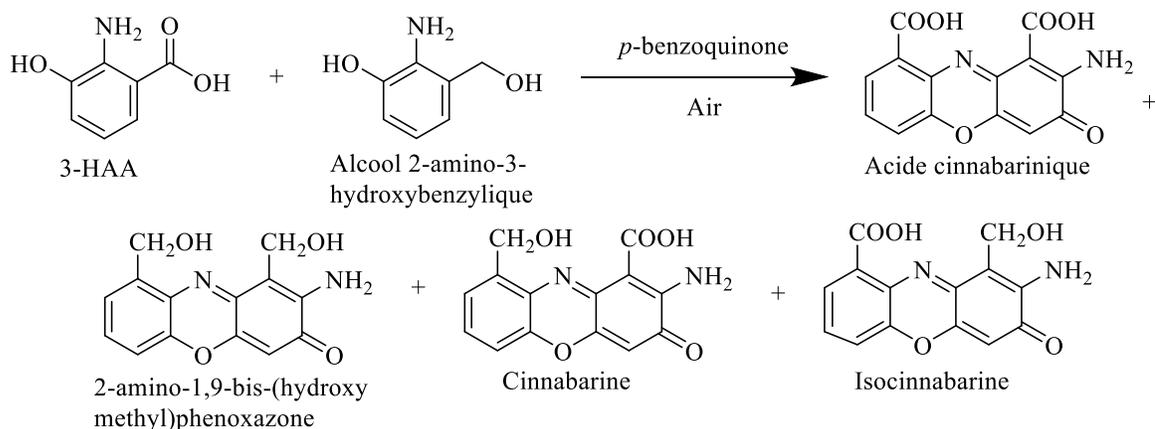


Figure 1. Schéma réactionnel de la synthèse de Weinstein et Brattesani (1967).

Un lavage du mélange réactionnel avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à 5 % permet d'obtenir AC. Le résidu est ensuite séparé sur une colonne d'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) pour obtenir le dialcool, ainsi qu'une trace d'isocinnabarine. La cinnabarine d'intérêt est obtenue par une séparation chromatographique de la bande brun foncé résiduelle sur une colonne d'oxyde de magnésium (MgO). La structure a été confirmée par une conversion en *o*-acétylcinnabarine, molécule déjà connue de la littérature. De façon logique, il est suggéré que le ratio équimolaire initial d'aminophénols permettrait d'obtenir une quantité équivalente des quatre phénoxazones. Toutefois, en raison de considérations stériques, de chélation interne ou de stabilité différente des intermédiaires réactionnels, la réalité révèle une légère supériorité de la forme dialcool.

3. CONDENSATION OXYDATIVE D'AMINOPHÉNOLS

La première stratégie proposée se base sur le principe connu de la condensation oxydative d'aminophénols, par lequel est synthétisé AC, pour obtenir les molécules d'intérêt. Par modification chimique préalable de 3-HAA pour obtenir les fonctions chimiques désirées, ou en se procurant les standards d'aminophénols disponibles, il est possible d'obtenir la cinnabarine, le tramesanguin, et bien d'autres phénoxazones.

Condensation de deux molécules d'acide 3-hydroxyanthranilique

Tel que discuté précédemment, la synthèse de l'acide cinnabarinique par la condensation oxydative de deux molécules d'acide 3-hydroxyanthranilique (3-HAA), en présence d'oxyde de manganèse (IV) (MnO_2) et dans le méthanol, a fonctionné dans nos laboratoires avec un rendement d'environ 36 % (figure 2) (Fazio *et al.* 2012). En 2014, une équipe de recherche a tenté une expérience similaire en utilisant le diacétoxyiodobenzène pour remplacer MnO_2 et a obtenu un précipité fin rouge, lavé avec MeOH, avec un rendement d'environ 30 % (Lowe *et al.* 2014). Il est aussi possible de faire réagir l'acide anthranilique en présence de 1,4-benzoquinone, ou *p*-benzoquinone, dans l'éthanol chaud pour obtenir de l'acide cinnabarinique sans purification subséquente (Pasceri *et al.* 2013). De façon analogue, d'autres chercheurs ont obtenu AC sous forme d'un précipité brun, lavé avec EtOH puis recristallisé dans le diméthylformamide (DMF), par la réaction de 3-HAA avec la *p*-benzoquinone dans l'EtOH (Manthey *et al.* 1990). À ma connaissance, la synthèse la plus ancienne de l'acide cinnabarinique remonte à 1977. L'acide 3-hydroxyanthranilique, en solution dans le DMF aqueux, était mis en présence de phosphate de sodium (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4) et de MnO_2 , puis ajouté à une solution de sulfate ferreux (FeSO_4) pour obtenir un précipité rouge vif, lavé à l' H_2O et correspondant à AC avec une pureté d'environ 95 % (Savage et Prinz 1977). Toutes ces études portent à croire que la condensation oxydative symétrique d'aminophénols est efficace. Qu'en est-il de la condensation asymétrique de ce type de molécules?

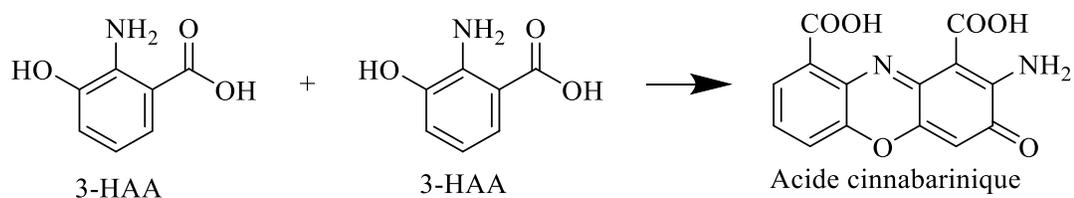


Figure 2. Schéma réactionnel de la formation de AC par la condensation oxydative de 2 molécules de 3-HAA.

Condensation de 3-HAA avec l'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique

Théoriquement, pour obtenir la cinnabarine, l'acide 3-hydroxyanthranilique doit être mis en présence d'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique, dans les mêmes conditions que pour la préparation de l'acide cinnabarinique (figure 3). Pour se faire, une fonction alcool secondaire doit donc remplacer l'acide carboxylique sur 3-HAA. L'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique est en vente sous forme de standard (CAS 18274-82-3), mais peut aussi être préparé à partir de l'acide 3-hydroxyanthranilique. La condensation de deux molécules différentes d'aminophénols peut toutefois laisser place à la formation de produits de réaction indésirables, qui seraient éliminés par une purification du mélange réactionnel.

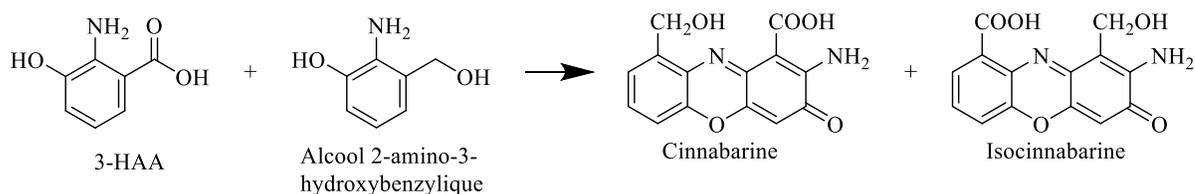


Figure 3. Formation de la cinnabarine par condensation de 3-HAA avec l'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique.

Formation de l'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique

Pour obtenir l'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique à partir de 3-HAA, la fonction carboxyle est convertie en ester méthylique puis réduite avec LiAlH_4 pour former l'alcool secondaire. Afin d'éviter une étape de synthèse, le 2-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle est également disponible sous forme de standard (CAS 17672-21-8). La méthylation de l'acide carboxylique en utilisant un excès de diazométhane étheré, dans le méthanol, suivi d'une purification sur colonne de silice avec un mélange CHCl_3 : AcOEt 9 : 1 permet d'obtenir l'ester méthylique en question (Gerber 1968). Celui-ci est ensuite traité avec LiAlH_4 puis purifié sur colonne de silice avec AcOEt pour obtenir des cristaux blancs d'alcool 2-amino-3-hydroxybenzylique (Gerber 1968). La méthylation de 3-HAA est également possible avec du bicarbonate de potassium (KHCO_3) et de l'iodométhane (CH_3I), en solution dans le DMF anhydre, suivi de l'extinction de la réaction à l' H_2O (Pasceri *et al.* 2013). Suite à

l'acidification du mélange réactionnel, celui-ci est extrait à l'AcOEt et la phase organique est séchée puis purifiée par colonne Flash pour obtenir le 2-amino-3-hydroxybenzoate de méthyle, qui pourra ensuite être réduit avec LiAlH_4 (Pasceri *et al.* 2013).

Condensation de 3-HAA avec le 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde

Le principe est le même pour l'obtention du tramesanguin, où l'acide 3-hydroxyanthranilique doit être mis en présence du 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde, toujours de manière hypothétique (figure 4). Dans ce cas, une fonction aldéhyde doit donc remplacer l'acide carboxylique sur 3-HAA. Le 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde est en vente sous forme de standard (CAS 1004545-97-4), mais peut aussi être préparé à partir de l'acide 3-hydroxyanthranilique.

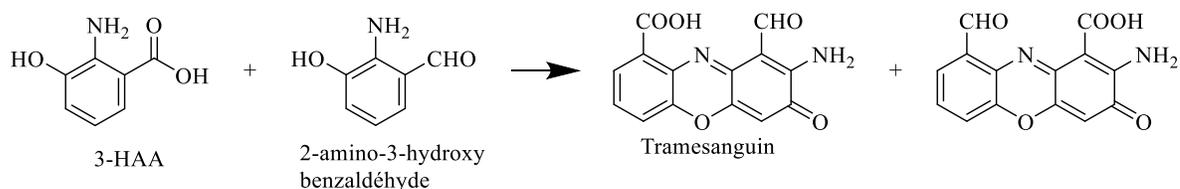


Figure 4. Formation du tramesanguin par la condensation de 3-HAA avec le 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde.

Formation du 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde

Comme il n'existe pas de littérature pour la préparation du 2-amino-3-hydroxybenzaldéhyde à partir de 3-HAA, la préparation sera inspirée de celle énoncée précédemment. La formation de l'ester de méthyle procédera donc de la même manière. La réduction de cet ester pour former un aldéhyde aura lieu dans le MeOH à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ avec le DIBAL-H (Boukouvalas 2015).

4. TRANSFORMATION DE L'ACIDE CINNABARINIQUE EN DÉRIVÉ PHÉNOXAZONE

La deuxième stratégie de synthèse proposée débute avec l'acide cinnabarinique, étant donné la facilité relative à l'obtenir avec un assez bon rendement. Par une série de modifications

chimiques, il est possible d'obtenir les fonctions chimiques désirées en position 9, et donc les dérivés phénoxazones correspondants.

Étape de protection stratégique

En synthèse organique, il est parfois judicieux d'utiliser des groupements protecteurs en position stratégique. Ceux-ci ont la capacité d'empêcher certains groupements de réagir en bloquant leur site actif, par exemple. D'autres, de par leur grosseur, orientent la réaction sur un site particulier ou dans une stéréochimie donnée. Les fonctions chimiques pouvant être protégées sont les alcools, carbonyles, acides carboxyliques, amines, thiols, etc. (Boukouvalas 2015). Pour être considérés comme de bons groupements protecteurs, ceux-ci doivent avoir la capacité de protéger adéquatement tout en pouvant être retirés de façon efficace (rendement > 90 %), en plus d'avoir une bonne stabilité dans les conditions de réaction subséquentes (Boukouvalas 2015).

Protection de l'amine libre avec le chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle

Le chlorure de 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc-Cl) est de plus en plus utilisé comme groupement protecteur pour les amines primaire et secondaire, et tout spécialement en synthèse peptidique pour la protection d'acides aminés (figure 5) (Gawande et Branco 2011). Avec leurs fonctions carboxyle et amine primaire cohabitantes, les molécules de type phénoxazone présentent des similarités structurales avec les acides aminés, d'où l'intérêt à tenter l'utilisation du groupement Fmoc.

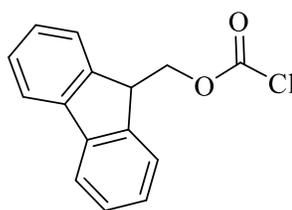


Figure 5. Structure du chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc-Cl).

La grosseur imposante du Fmoc, combinée à la proximité de l'amine libre par rapport au groupement acide carboxylique, a démontré un potentiel intéressant. En protégeant l'amine en position 2 avec le groupement fluorénylméthoxycarbone, il est supposé que l'acide carboxylique voisin serait moins accessible en raison de l'encombrement stérique encouru. La rotation de celui-ci entraverait également l'accès des réactifs à cette position. Il est donc présumé que l'ajout du Fmoc désavantagerait la réaction du groupement carboxyle en position 1, et favoriserait par le fait même celui en position 9, ou du moins permettrait la formation majoritaire du composé d'intérêt. Une protection en milieu aqueux avec des conditions réactionnelles douces et sans la présence de catalyseur, d'une variété d'amines aliphatiques et aromatiques, d'acides aminés, d'aminoalcools et d'aminophénols, a été proposée par le groupe de Gawande et Branco (2011). Cette étude a permis de déterminer des conditions de réaction optimales pour une variété de molécules en fonction de leur structure. En se basant sur la nature des dérivés au squelette phénoxazone, il est supposé que le mélange de solvant H₂O : EtOH 3 : 1 serait le plus approprié, à 60 °C, et pour une durée de 4 h (figure 6).

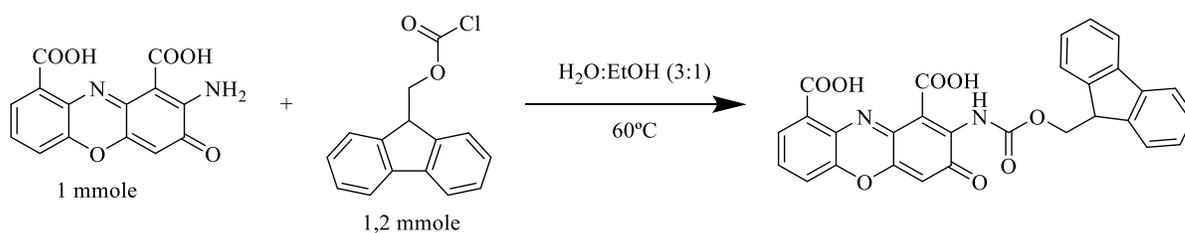


Figure 6. Schéma réactionnel proposé de la protection de l'acide cinnabarinique avec Fmoc-Cl.

Protection de l'amine libre avec le chloroformiate de benzyle

Pour les mêmes considérations stériques que le Fmoc, le chloroformiate de benzyle (Cbz-Cl), ou chlorocarbonate de benzyle, pourrait agir à même titre pour protéger l'amine libre en position 2 (figure 7). Toutefois, l'encombrement stérique engendré par l'ajout du groupement Cbz est moindre par rapport au groupement fluorénylméthoxycarbone. L'utilisation du groupement carboxybenzyle est très fréquente en synthèse peptidique, afin de diminuer de

façon réversible la réactivité de l'amine libre, sans toutefois affecter le lien peptidique (Loeuillet 2014).

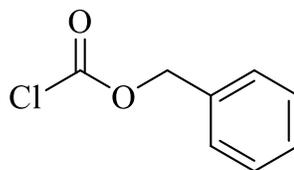


Figure 7. Structure du chloroformiate de benzyle (Cbz-Cl).

La protection avec le chlorocarbonate de benzyle a lieu en milieu aqueux biphasique légèrement basique dans le THF, à température pièce, et pour une durée de 1h30 (figure 8) (Common Organic Chemistry; Ministère de l'éducation nationale 2012; Loeuillet 2014). La basicité du milieu permet la conservation du caractère nucléophile de l'amine.

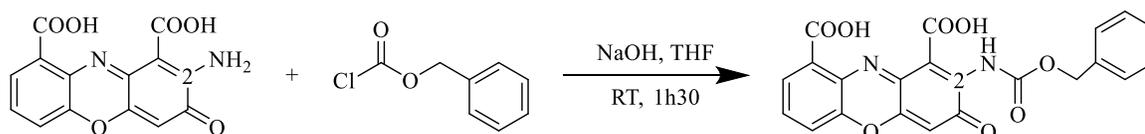


Figure 8. Schéma réactionnel proposé de la protection de l'acide cinnabarinique avec Cbz-Cl.

Protection du groupement carboxyle voisin d'une amine avec la benzylamine

Une alternative à la protection de l'amine libre est l'ajout d'un groupement protecteur sur le groupement carboxyle lui-même. Toutefois, étant donné la présence de deux acides carboxyliques sur l'acide cinnabarinique, la protection doit être sélective. En 2002, une équipe de chercheurs a développé une stratégie visant à protéger et activer simultanément le groupement carboxyle en α ou β d'une amine libre avec la benzylamine (figure 9) (Van Leeuwen *et al.* 2002).

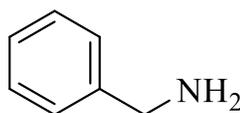


Figure 9. Structure de la benzylamine.

La première étape est l'introduction d'un groupement dichlorométhylsilane (Me_2SiCl_2) pour former l'intermédiaire de réaction cyclique silylé illustré à la figure 10. Ensuite, la benzylamine est ajoutée et l'acide cinnabarinique-benzylamide est formé, en toute spéculation. Toutes les étapes sont effectuées à température pièce, dans la pyridine, qui agit à titre de solvant et de base pour prévenir l'accumulation d'HCl dans le milieu réactionnel. Il est toutefois essentiel de s'assurer de la bonne solubilité du produit de départ dans le solvant de réaction, une solubilité moindre entraînant une diminution du rendement ou, tout simplement, l'absence de réaction (Van Leeuwen *et al.* 2002). L'utilisation de cette approche avec des molécules ayant des fonctions carboxyle et amines libres positionnées en β diminue légèrement les rendements. En effet, la formation de l'intermédiaire réactionnel à 6 membres est plus difficile et celui-ci est moins réactif que son homologue à 5 membres (Van Leeuwen *et al.* 2002).

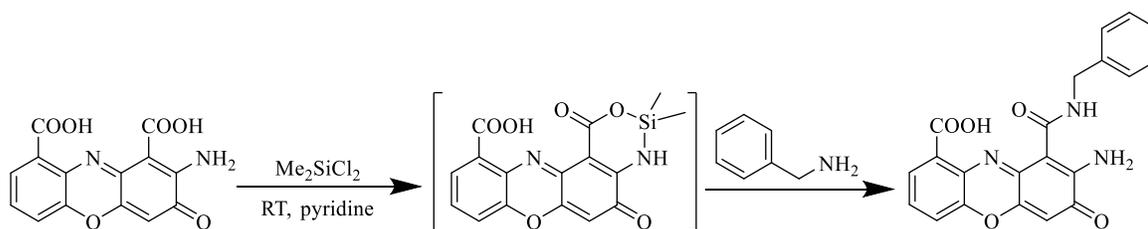


Figure 10. Schéma réactionnel proposé de la protection de l'acide cinnabarinique avec la benzylamine.

Protection simultanée des groupements carboxyle et amine libre

La protection simultanée des fonctions amine libre et acide carboxylique orientées en position β serait le scénario idéal. L'inhibition de tous les sites potentiellement réactifs, autre que celui en position 9, permettrait d'obtenir une sélectivité complète. Toutefois, à l'heure actuelle, aucune stratégie n'a été trouvée dans la littérature pour réussir cet exploit.

Transformation du groupement carboxyle pour améliorer sa réactivité

Afin de faciliter la réduction de l'acide carboxylique en position 9, la transformation en une fonction chimique plus facilement réductible permet de créer des conditions réactionnelles

plus douces et sélectives. L'utilisation de réactif puissant capable de réduire de telles fonctions, par exemple LiAlH_4 , diminuerait ainsi la sélectivité de la réaction. C'est pourquoi la formation d'un ester de méthyle ou d'un halogénure d'acide à partir d'un acide carboxylique est une option envisagée.

Formation d'un chlorure d'acyle

Pour convertir un acide carboxylique en chlorure d'acyle (COCl), ou chlorure d'acide, le chlorure de thionyle (SOCl_2) ou le chlorure d'oxalyle ($(\text{COCl})_2$) sont de bons candidats (figure 11). Le trichlorure ou le pentachlorure de phosphore (PCl_3 et PCl_5) sont également des réactifs possibles, en milieu acide. L'avantage qu'offre cette voie de synthèse est la facilité à réduire le groupement COCl avec le borohydrure de sodium (NaBH_4), un hydrure doux et sélectif pour ce type de fonction chimique (Boukouvalas 2015). Il est bien de mentionner que le groupement Fmoc est stable avec SOCl_2 , et moyennement avec la triéthylamine (Et_3N) et la pyridine.

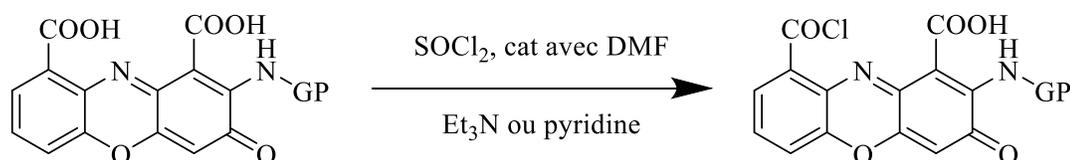


Figure 11. Schéma réactionnel proposé pour la transformation de l'acide carboxylique en chlorure d'acide avec SOCl_2 .

Formation d'un ester de méthyle

Comme le chlorure d'acide est un réactif plus difficile à éliminer suite à la réaction, la transformation de la fonction carboxyle en ester de méthyle s'avère une avenue plus intéressante (figure 12). Tel que discuté précédemment, celle-ci peut se faire avec un mélange d'iodométhane (CH_3I) et d'hydrure de sodium (NaH), de CH_3I et de bicarbonate de potassium (KHCO_3), par traitement avec un excès de diazométhane étheré ou dans une solution méthanolique d'acide sulfurique (H_2SO_4).

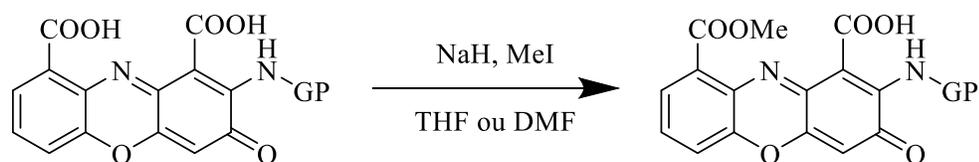


Figure 12. Schéma réactionnel proposé de la formation d'un ester de méthyle à partir de l'acide carboxylique.

Méthylation de l'acide cinnabarinique sans groupement protecteur

Une tentative de méthylation, sans passer par une étape de protection, est également envisageable (figure 13). Sans être 100 % sélective, celle-ci permet la formation de l'ester de méthyle le moins encombré dans un ratio 4 : 1, par réaction avec une solution méthanolique d'acide sulfurique (H_2SO_4) (Danishefsky *et al.* 1979).

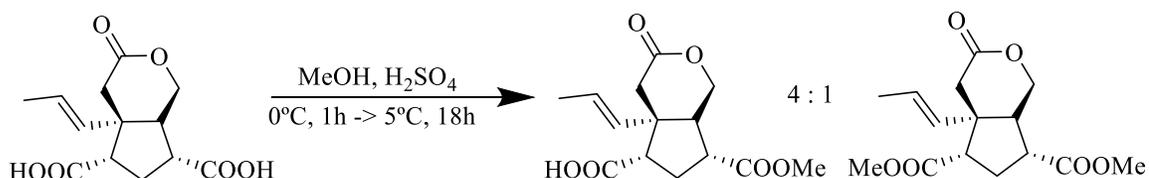


Figure 13. Méthylation de la fonction acide carboxylique avec MeOH en conditions acides (Danishefsky *et al.* 1979).

Dans le cas de l'acide cinnabarinique, il est supposé que l'acide carboxylique en position 9, le moins encombré, serait formé de façon majoritaire (figure 14). Cette hypothèse est également valide dans le cas où l'amine voisine serait protégée par un groupement volumineux, causant de l'encombrement stérique, et orientant favorablement la réaction en position 9.

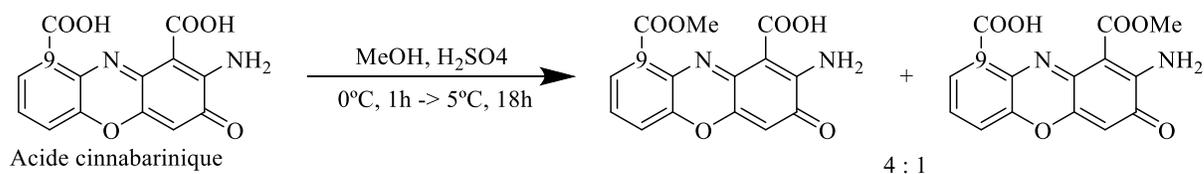


Figure 14. Schéma réactionnel proposé de méthylation de AC avec MeOH en conditions acides.

Réduction de l'ester méthylique en alcool secondaire pour former la cinnabarine

Afin de réduire l'ester méthylique en position 9 en un alcool secondaire, et ainsi former la cinnabarine, les hydrures sont de bons candidats.

Réduction du chlorure d'acyle avec le borohydrure de sodium

Le borohydrure de sodium, ou NaBH_4 , est un réducteur doux, c'est-à-dire qu'il est assez sélectif (Boukouvalas 2015). Il est utilisé notamment pour réduire les chlorures d'acyle, les aldéhydes ainsi que les cétones (Boukouvalas 2015). Les solvants de prédilection pour la réaction sont les alcools (MeOH et EtOH), l' H_2O , le DMSO et le diglyme (Boukouvalas 2015). Une telle réaction est illustrée à la figure 15.

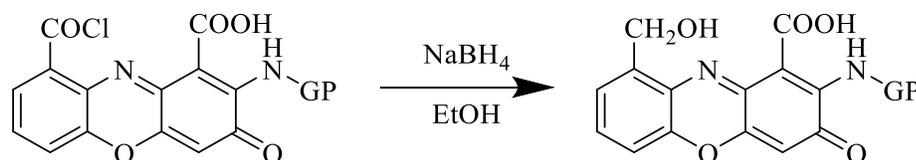


Figure 15. Schéma réactionnel proposé pour la réduction du chlorure d'acyle en alcool secondaire.

Réduction de l'ester de méthyle avec l'hydrure d'aluminium et de lithium

L'hydrure d'aluminium-lithium, LiAlH_4 , quant à lui, est réputé pour être un réactif plus puissant, donc moins sélectif (Boukouvalas 2015). Il a tendance à réduire tout, sauf les alcènes et les alcynes non conjugués qui sont plutôt inertes en sa présence (Boukouvalas 2015). Cette réaction est illustrée à la figure 16.

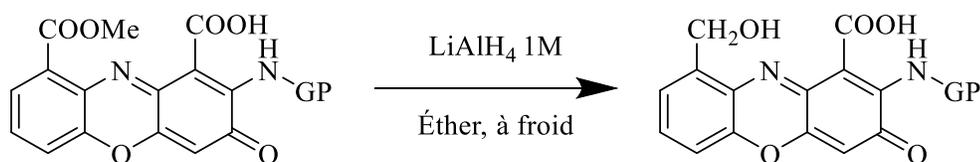


Figure 16. Schéma réactionnel proposé pour la réduction de l'ester de méthyle en alcool secondaire.

Réduction de l'ester méthylique en aldéhyde pour former le tramesanguin

Afin de réduire l'ester méthylique en position 9 en un aldéhyde, et ainsi former le tramesanguin, c'est l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) qui est tout indiqué (figure 17). En effet, celui-ci réagit préférentiellement avec les esters et les groupements nitriles pour former un aldéhyde (Boukouvalas 2015). La réaction se fait à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, dans le MeOH.

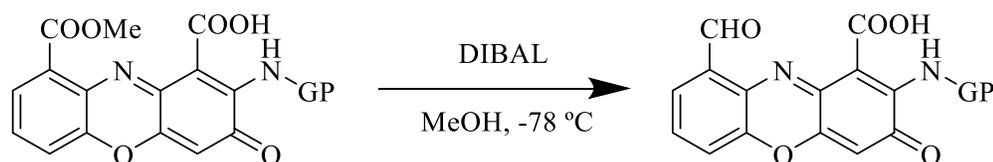


Figure 17. Schéma réactionnel proposé de la réduction de l'ester méthylique en aldéhyde.

Étape de déprotection de l'amine pour obtenir les phénoxazones

L'étape finale de cette stratégie de synthèse est la déprotection de l'amine pour former la molécule d'intérêt ayant maintenant la fonction chimique désirée en position 9 (figure 18).

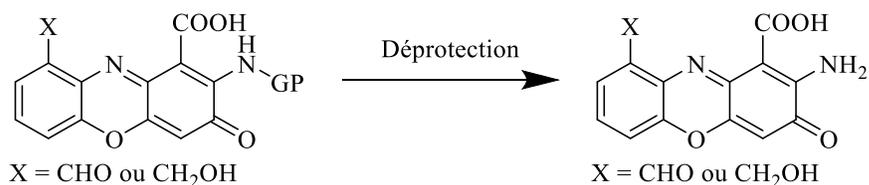


Figure 18. Schéma réactionnel global de déprotection pour obtenir les phénoxazones.

Déprotection du groupement fluorénylméthoxycarbonyle

Le groupement Fmoc est stable en conditions acides, et labile en conditions basiques (Gawande et Branco 2011). Dans un contexte de synthèse peptidique sur support solide, celui-ci est retiré par deux traitements successifs de 10 minutes avec de la pipéridine à 20 % dans le DMF. De telles conditions pourraient donc s'appliquer pour la synthèse de phénoxazones, en effectuant quelques modifications techniques.

Déprotection du groupement carboxybenzyle

Le groupement Cbz peut être retiré avec de l'hydrogène gazeux, à température pièce et dans le méthanol, en présence de palladium sur charbon (Pd/C) (Common Organic Chemistry). Cette réaction provoque une décarboxylation spontanée, donc le dégagement de CO₂, et permet d'obtenir l'amine libre de départ et du toluène. Il est également possible de retirer le groupement par traitement avec de l'acide chlorhydrique concentré (HCl conc.), à température pièce (Common Organic Chemistry).

Synthèse globale des phénoxazones au départ de l'acide cinnabarinique

La synthèse globale proposée de la cinnabarine et du tramesanguin à partir de l'acide cinnabarinique débute par une étape de protection de l'amine libre, ou de la fonction carboxyle, afin d'orienter la réaction en position 9 (figure 19). La transformation de l'acide carboxylique à cette position en chlorure d'acide ou en ester de méthyle permet d'améliorer sa réactivité face à la réduction subséquente. Cette étape permet d'obtenir les fonctions désirées en position 9, soit l'alcool secondaire ou l'aldéhyde. La déprotection de l'amine ou de la fonction carboxyle permet l'obtention des molécules d'intérêt, soient la cinnabarine et le tramesanguin, respectivement.

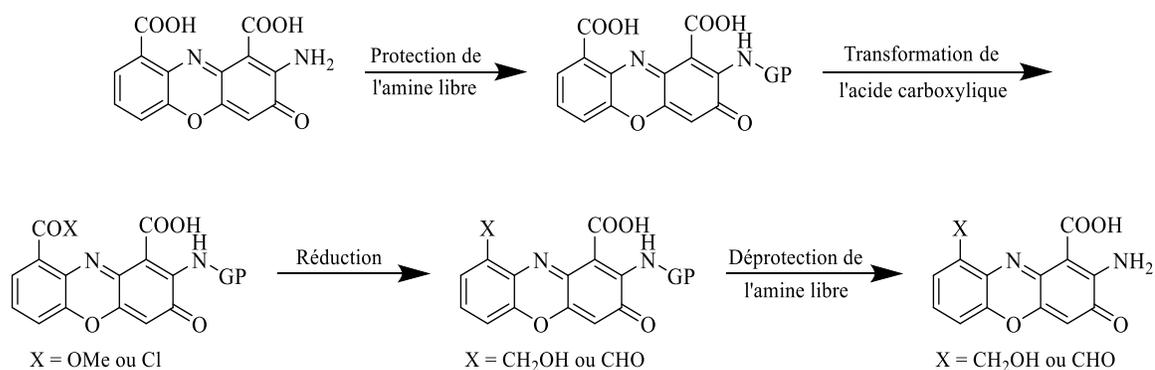


Figure 19. Synthèse totale proposée de la cinnabarine et du tramesanguin à partir de l'acide cinnabarinique

5. RÉFÉRENCES

Boukouvalas J. 2015. Synthèse organique. Québec, 157 p.

Common Organic Chemistry. CommonOrganicChemistry.com. Consulté le 3 avril 2017, http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Cbz_Protection/Cbz_Protection_In dex.htm

Danishefsky S, Hiramama M, Gombatz K, Harayama T, Berman E et Schuda PF. 1979. Total Synthesis of *dl*-Pentalenolactone. *Journal of the American Chemical Society*, 101 : 7020–7031.

Fazio F, Lionetto L, Molinaro G, Bertrand HO, Acher F, Ngomba RT, Notartomaso S, Curini M, Rosati O, Scarselli P, Marco R Di, Battaglia G, Bruno V, Simmaco M, Pin JP, Nicoletti F et Goudet C. 2012. Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology*, 81 : 643–656.

Gawande MB et Branco PS. 2011. An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media. *Green Chemistry*, 13 : 3355–3359.

Gerber NN. 1968. Phenoxazinones by oxidative dimerization of aminophenols. *Canadian Journal of Chemistry*, 46 : 790–792.

Leeuwen SH Van, Quaedflieg PJLM, Broxterman QB et Liskamp RMJ. 2002. Synthesis of amides from unprotected amino acids by a simultaneous protection-activation strategy using dichlorodialkyl silanes. *Tetrahedron Letters*, 43 : 9203–9207.

Loeuillet D. 2014. Synthèse peptidique : A. La chimie des acides α -aminés. *Bull Un Phys*, 108 : 219–237.

Lowe MM, Mold JE, Kanwar B, Huang Y, Louie A, Pollastri MP, Wang C, Patel G, Franks DG, Schlezinger J, Sherr DH, Silverstone AE, Hahn ME et McCune JM. 2014. Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production. PLOS ONE, 9 : 1–15.

Manthey MK, Pyne SG et Truscott RJW. 1990. Mechanism of reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen. Biochimica et Biophysica Acta, 1034 : 207–212.

Ministère de l'éducation nationale. 2012. Ressources pour le lycée général et scientifique - Synthèse d'un édulcorant. 11 p.

Pasceri R, Siegel D, Ross D et Moody CJ. 2013. Aminophenoxazinones as Inhibitors of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Synthesis of Exfoliazone and Chandrananimycin A. Journal of Medicinal Chemistry, 56 : 3310–3317.

Savage N et Prinz W. 1977. Cinnabarinat Synthase from Baboon (*Papio ursinus*) liver. Identity with catalase. Biochemical Journal, 161 : 551–554.

Weinstein B et Brattesani DN. 1967. Heterocyclic Compounds . VII . The Synthesis of Cinnabarin (I). Notes, 4 : 151–152.

ANNEXE 3.

SPECTRES RMN

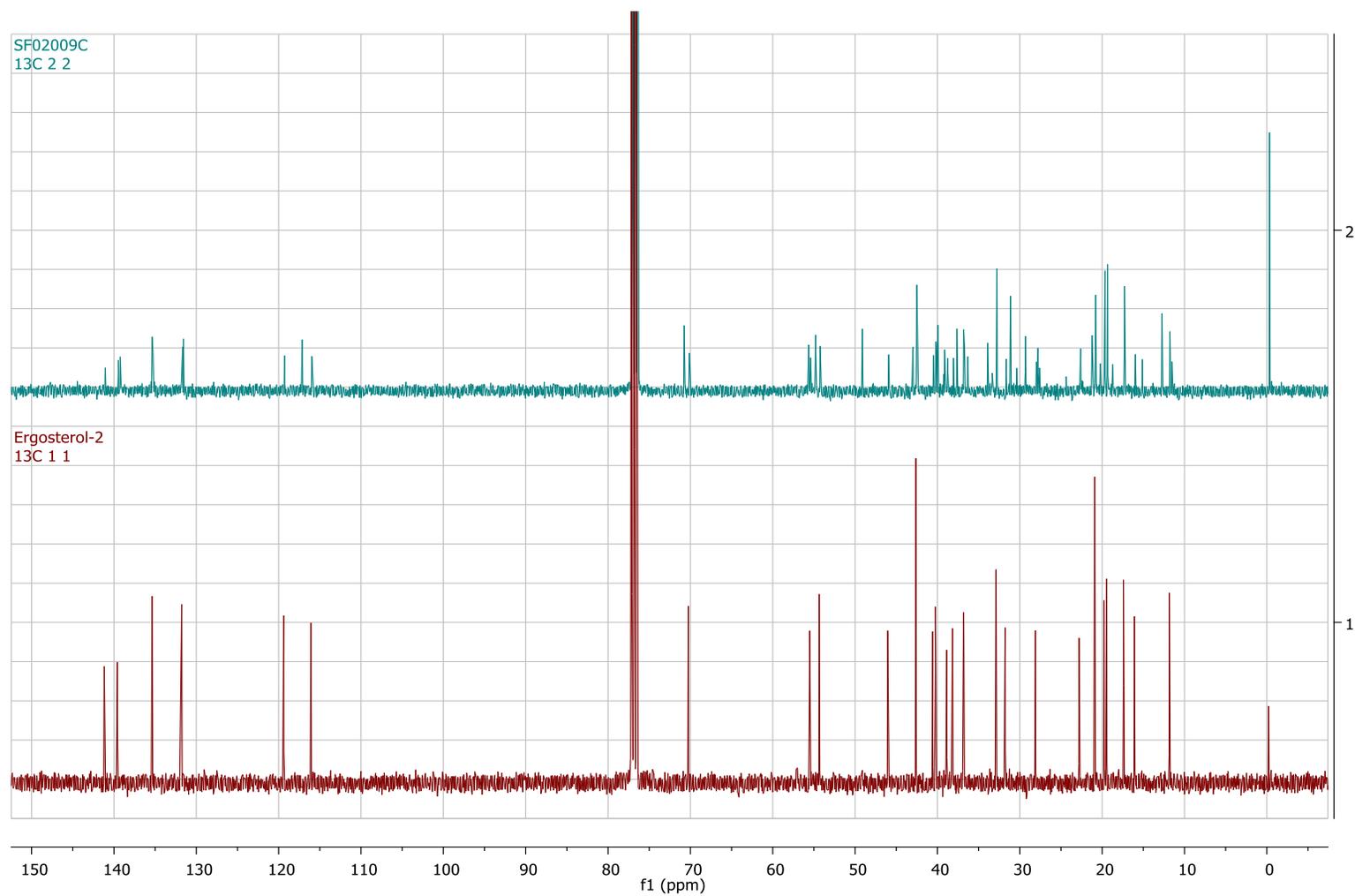


Figure 1. Comparaison des spectres RMN de la fraction SF02009C (haut) et du standard d'ergostérol (bas).

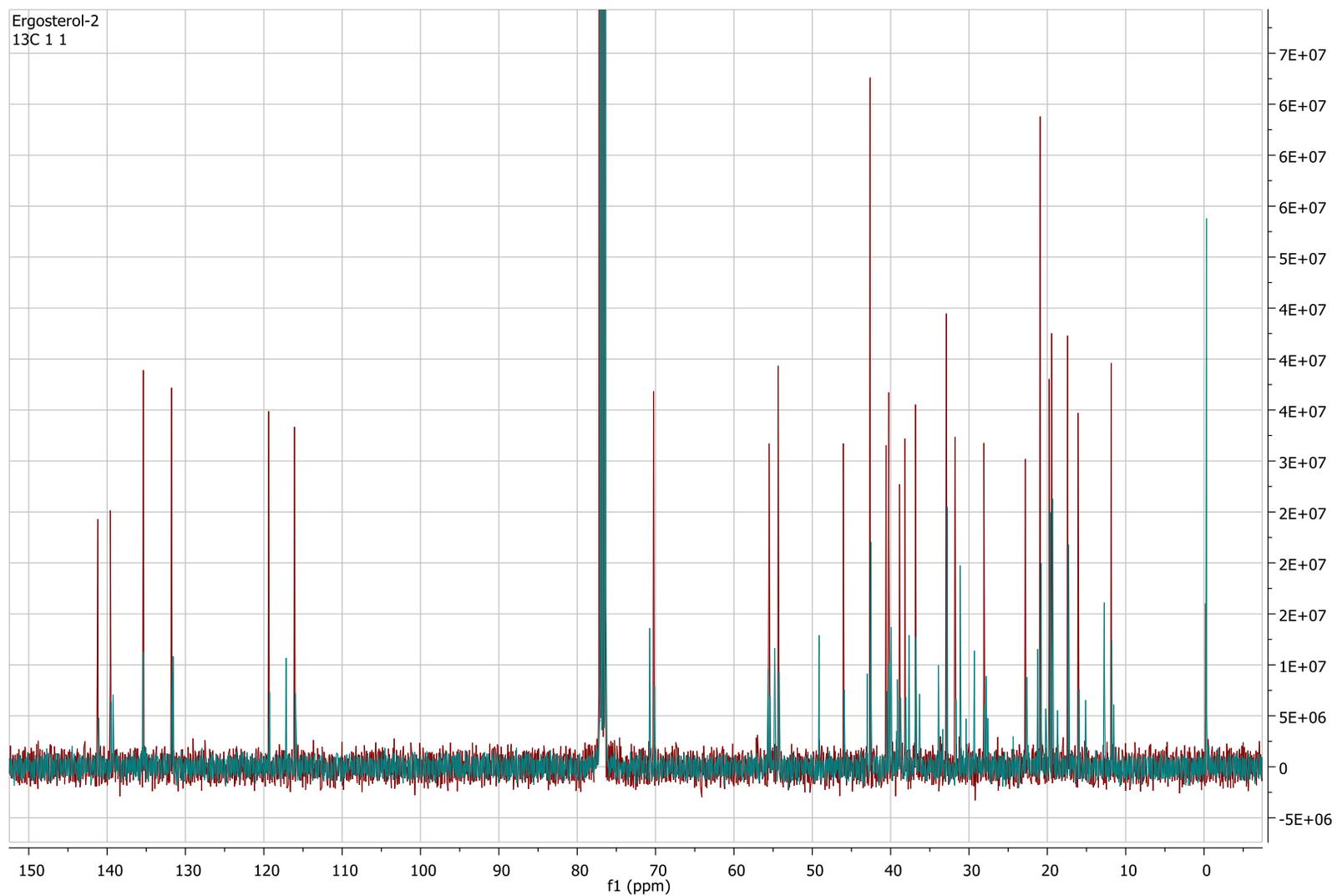


Figure 2. Superposition des spectres RMN de la fraction SF02009C (bleu turquoise) et du standard d'ergostérol (rouge).