

UNIVERSITE RENNES 1

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Rapport de Stage Recherche

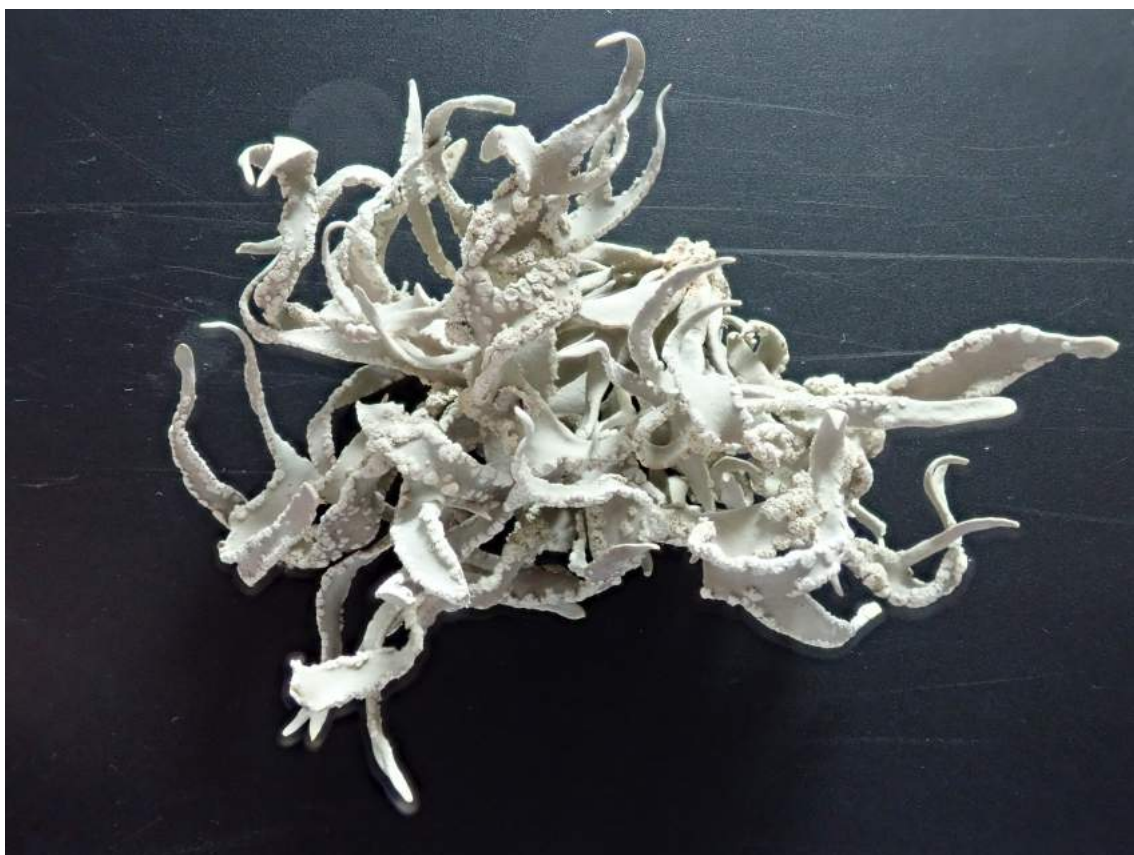
Mémoire présenté par : Olivier BERRY

Titre : "Profilage métabolique comparatif de spécimens de *Roccella*"

Travail réalisé du 07/06/2019 au 19/07/2019

Sous la responsabilité du Professeur Joël BOUSTIE et du Docteur Françoise LOHÉZIC-LE
DÉVÉHAT.

Au sein du laboratoire COInt, Equipe "Produits Naturels, Synthèses Chimiques, Molécules"



Sommaire

1	Matériels et méthodes	13
1.1	Matériel lichénique	13
1.1.1	Sites de récoltes	13
1.1.2	Espèces étudiées	14
1.1.3	Réactions thallines	17
1.2	Préparation des échantillons	18
1.3	Extractions	19
1.4	Analyse des extraits	19
1.4.1	Préparation des échantillons	19
1.4.2	Chromatographie sur couche mince	19
1.4.3	HPLC-UV-DEDL-MS	21
2	Résultats	23
2.1	Taux d'extraction	23
2.2	Chromatographie sur couche mince (CCM)	24
2.2.1	<i>Roccella fuciformis</i>	25
2.2.2	<i>Roccella phycopsis</i>	26
2.2.3	<i>Roccella montagnei</i>	28
2.2.4	<i>Roccella applanata</i>	31
2.3	HPLC-UV-DEDL-MS	33
2.3.1	Résultats pour les témoins	33
2.3.2	<i>Roccella fuciformis</i>	33

2.3.3	<i>Roccella phycopsis</i>	35
2.3.4	<i>Roccella montagnei</i>	37
2.3.5	<i>Roccella applanata</i>	44
3	Discussion	47
3.1	Solvants utilisés	47
3.2	Méthode analytique	47
4	Conclusion	49

Table des figures

1	Structure de l'orcinol. Le bêta orcinol présente un groupement méthyle en bêta (1,3-Dihydroxy-2,5-diméthyl benzène).	11
2	Principales familles chimiques issues de la voie des polymalonates-polyacétates chez les lichens. A : Anthraquinones ; B : Xanthones ; C : Didepsides ; D : Depsidones ; E : Dibenzofuranes	12
1.1	Carte des environs de Madagascar montrant l'emplacement des Îles, photos aériennes ou satellites des îles concernées.	14
1.2	Photo d'un spécimen de <i>R. phycopsis</i> Ach. du laboratoire.	15
1.3	Photo d'un spécimen de <i>R. fuciformis</i> du laboratoire.	15
1.4	Photo d'un spécimen de <i>R. montagnei</i> Bél. reçu au laboratoire	16
1.5	Photo d'un spécimen de <i>R. applanata</i> reçu au laboratoire	17
1.6	Représentation du protocole de découpe des différentes parties de thalle.	18
1.7	Schéma général de la répartition des solutions aux concentrations de 5mg/mL et 1mg/mL.	20
1.8	Gradient de composition de la phase mobile pour un run de 48 min	22
2.1	Représentation graphique des taux d'extraction obtenus avec les spécimens dans leur ensemble.	23
2.2	Représentation graphique des taux d'extraction obtenus avec les parties de thalles. E : entier ; B : basal ; M : médian ; A : apical	24
2.3	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.fuciformis</i> après migration en "C", en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.	25

2.4	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.fuciformis</i> après migration dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2, en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.	26
2.5	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.phycopsis</i> Ach., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.	27
2.6	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.phycopsis</i> Ach., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.	28
2.7	Profils CCM obtenus avec les thalles de <i>R.montagnei</i> Bél. en entier selon les différents sites de récolte. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.	29
2.8	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.montagnei</i> Bél., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.	30
2.9	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R.montagnei</i> Bél., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.	31
2.10	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R. applanata</i> . La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans le solvant C.	32
2.11	Profils CCM obtenus avec le thalle de <i>R. applanata</i> en entier. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.	32
2.12	Schéma représentant la découpe de <i>R. fuciformis</i> . Les composés sont représentés par des blocs de couleur.	33
2.13	Chromatogrammes obtenus par détection UV et DEDL, des parties du thalle de <i>R. fuciformis</i>	34
2.14	Chromatogramme de masse obtenu avec le thalle complet de <i>R. fuciformis</i>	34
2.15	Chromatogramme de masse obtenu avec les parties du thalle complet <i>R. fuciformis</i> (Fuci B, M et A).	35
2.16	Chromatogrammes obtenus avec le thalle de <i>R. phycopsis</i> par détection UV et DEDL.	35

2.17	Chromatogramme de masses obtenu avec le thalle de <i>R. phycopsis</i> . 1 : acide lécanorique (m/z 317,0 et 167,0 par perte d'un fragment acide orsellinique); 2 et 3 : orsellinyl-montagnétols.	36
2.18	Chromatogrammes de masse obtenu avec les différentes parties du thalle de <i>R. phycopsis</i>	37
2.19	Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de <i>R. montagnei</i> d'Europa en détection UV et DEDL.	37
2.20	Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de <i>R. montagnei</i> d'Europa en détection UV et DEDL. Agrandissement sur les pics.	38
2.21	Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de <i>R. montagnei</i> de Glorieuse. . .	38
2.22	Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de <i>R. montagnei</i> de Juan de Nova en détection UV et DEDL.	39
2.23	Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de <i>R. montagnei</i>	39
2.24	Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de <i>R. montagnei</i> , agrandissement sur une portion du chromatogramme montrant les pics de faibles intensité pouvant correspondre aux orsellinyl-montagnétols.	40
2.25	Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de <i>R. montagnei</i> montrant les pic détectés à 23 min.	40
2.26	Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de <i>R. montagnei</i> . Composé détecté dans la partie apicale du thalle.	41
2.27	Chromatogrammes de masse obtenus avec les parties du thalle JdN419 de <i>R. montagnei</i>	41
2.28	Chromatogrammes de masse obtenus avec les thalles EE300 et EE309 de <i>R. montagnei</i> . Le montagnétole est détecté à 25,7 min.	42
2.29	Chromatogrammes de masse obtenus avec les thalles GE450 et GE486 de <i>R. montagnei</i> . Le montagnétole est détecté à 25,7 min pour le thalle GE486.	42
2.30	Chromatogrammes UV et DEDL obtenus avec le thalle ST141 de <i>R. montagnei</i> provenant de Sao Tomé.	43
2.31	Chromatogramme de masses obtenu avec le thalle ST141 de <i>R. montagnei</i> provenant de Sao Tomé.	44
2.32	Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de <i>R. applanata</i> en détection UV et DEDL.	45
2.33	Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de <i>R. applanata</i> en détection UV et DEDL. Acide orsellinique élué rapidement.	45

2.34	Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de <i>R. applanata</i> en détection UV et DEDL. Les pics correspondant à l'acide lécanorique et aux orsellinyl-montagnetols sont peu intenses comparés à celui de l'érythrine.	46
2.35	Chromatogramme de masse obtenu avec le thalle complet de <i>R. applanata</i>	46
1	Migration des témoins et de l'atranorine. L'atranorine sert de référence pour le calcul des rapports frontaux.	53
2	Chromatogrammes de masses de <i>Roccella phycopsis</i>	54
3	Chromatogrammes de masses des parties basale, médiane et apicale de <i>Roccella phycopsis</i>	54
4	Chromatogrammes de masses des différentes parties du thalle de <i>Roccella fuciformis</i>	55
5	Chromatogrammes de masses des parties basale, médiane et apicale du thalle JdN419 (<i>Roccella montagnei</i>).	55
6	Chromatogramme de masses de <i>Roccella applanata</i>	56

Liste des tableaux

1.1	Réactions thallines en théorie observées avec les espèces de <i>Roccella</i> étudiées	18
4.1	Tableau récapitulatif de la présence (vert) ou l'absence (rouge) des composés détectés.	49
2	Localisation, récolteur, support, référence du récolteur, code attribué.	57
3	Référence attribuée à chaque échantillon, masse de l'échantillon puis de l'extrait, taux d'extraction. Ex : pour le thalle JdN419, il y a étude du thalle complet (JdNE419), de sa partie basale (JdNB419), médiane (JdNM419) et apicale (JdNA419).	58
4	Témoins utilisés pour les analyses. La famille chimique et la structure sont données, le mode de révélation, et les espèces chez qui il est possible de les trouver.	59
5	Valeurs des <i>Rf</i> relatifs des témoins par rapport à l'atranorine.	60
6	Valeurs des rapports frontaux des témoins dans la phase mobile DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.	60
7	<i>Rf</i> obtenus avec les différentes parties du thalle de <i>R.fuciformis</i>	60
8	<i>Rf</i> obtenus avec les différentes parties du thalle de <i>R.phycopsis</i>	61
9	<i>Rf</i> obtenus avec les différentes parties du thalle de <i>R.montagnei</i>	61
10	<i>Rf</i> obtenus avec les thalles complets de <i>R.montagnei</i>	62
11	Temps de rétention UV, DEDL puis de masse des témoins.	62
12	L'ensemble des pics <i>m/z</i> des parties de <i>R.phycopsis</i> est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée.	63
13	L'ensemble des pics <i>m/z</i> des parties de <i>R.fuciformis</i> est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée.	63

- 14 L'ensemble des pics m/z des parties de *R.montagnei* (JdN419) est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée. 64

Introduction

Les lichens sont des organismes résultant de la symbiose entre un fungus hétérotrophe appelé mycobionte et un organisme autotrophe appelé photobionte. Le photobionte est une algue verte microscopique ou une cyanobactérie ; parfois une association de ces deux derniers (Honegger (1993)). La classification taxonomique repose sur le mycobionte car c'est lui qui effectue la reproduction sexuée au sein de l'organisme. Récemment, a été mise en évidence l'existence d'une flore, bactérienne et/ou fongique, vivant avec l'association primaire (Cardinale et al. (2006)), ayant un rôle protecteur antifongique ou antibactérien, cet ensemble constituant un holobionte. Cet holobionte se présente sous différentes formes, et possède des propriétés extraordinaires puisque ces espèces dites pionnières sont capables de vivre dans des conditions extrêmes et de coloniser de nombreuses formes de substrats. Ces différentes propriétés font penser qu'il existe, à travers la symbiose, des molécules originales, dotées de propriétés biologiques intéressantes.

Les caractéristiques physiologiques des lichens, notamment leur inertie, leur immobilité ou encore le fait que la symbiose héberge d'autres partenaires, vont de paire avec des voies de biosynthèse, aboutissant à une diversité importante de métabolites spécialisés.

Ce travail a été construit à partir d'une demande extérieure de comparaison de la composition chimique de thalles de *Roccella montagnei*. Ces thalles ont été récoltés sur plusieurs îles selon un gradient latitudinal.

Le laboratoire possède un herbier de lichen à partir duquel sont conduites les différentes expérimentations. Deux espèces de *Roccella* ont ainsi été ajoutées à l'étude, *Roccella phycopsis* et *Roccella fuciformis*, endémiques des côtes Atlantiques du Sud de l'Angleterre au Maroc.

L'objectif de ce travail est de savoir si au sein d'une même espèce (*Roccella montagnei*), la composition chimique est variable selon la localisation. Les specimens bretons de *Roccella* permettent également d'étudier les relations chimiques entre ces différentes espèces.

L'autre but de l'étude est de décrire la répartition des métabolites au sein du thalle. Afin de répondre à cette question, les thalles de chacune des espèces sont découpés de façon à étudier les parties basales, médianes et apicales.

Les molécules retrouvées dérivent de l'orcinol ou du bêta-orcinol (Figure 1).

Le mycobionte produit à partir d'acyl-CoA et des polyketide synthetases, des polyacétates de tailles

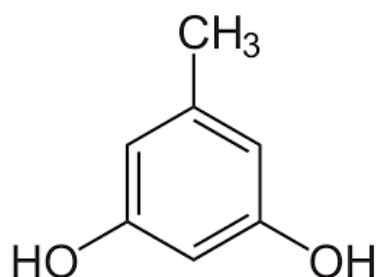


FIGURE 1 – Structure de l’orcinol. Le bêta orcinol présente un groupement méthyle en bêta (1,3-Dihydroxy-2,5-dimethyl benzene).

variables, qui après condensation forment des dérivés monoaromatiques (depsides), des quinones (figure 2,A) ou encore des xanthones (figure 2,B). Les composés monoaromatiques peuvent réagir de différentes manières. Les depsides formant des ponts ester sont les didepsides (figure 2,C). Un didepside peut également subir une éthérification, donnant alors une depsidone (figure 2,D). La première hypothèse de formation du pont diphenyléther par couplage oxydant a été émise en 1944 (Seshadri (1944)) et démontrée comme une voie de biosynthèse possible des depsidones en 1960. Des travaux plus récents mettent en évidence une corrélation entre l’expression des clusters de gènes, incluant des polykétides synthétases, et de métabolites particuliers (Armaleo et al. (2011)). Ces travaux viennent appuyer les efforts d’équipes travaillant sur des schémas de synthèse biomimétiques (Elix et al. (1987)).

D’autres types de liaisons peuvent intervenir, liant entre eux des atomes de carbones, comme chez les dibenzofuranes (figure 2,E) (présentent une liaison éther et une liaison C-C issue d’un couplage oxydant), les depsones (présentent une liaison ester et une liaison C-C issue d’un couplage oxydant).

L’intérêt de ces différentes classes de molécules, pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives, tient en partie du fait de la diversité des substituants aux squelettes principaux, avec de nombreuses activités biologiques potentielles. Par exemple l’acide usnique, isolé par Knop en 1844 (Knop (1844)) possédant de nombreuses activités *in vitro* (?), est également un bon candidat pour l’obtention de nouvelles molécules par hémisynthèse (groupements propices à la substitution).

Nous ferons donc dans un premier temps des extractions dans l’acétone, puis nous étudierons les profils chimiques avec des techniques dont les champs d’application et les sensibilités sont variables : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) et Spectrométrie de Masse (SM).

Les extraits bruts de thalles complets seront réalisés en triplicats, permettant l’analyse statistique des profils de fragmentation obtenus avec un spectromètre de masse haute résolution. On pourra alors construire les réseaux moléculaires.

Cette dernière étape est possible grâce à la collaboration du Dr LE POGAM-ALLUARD de l’équipe BioCIS de l’Université Paris Sud (CNRS). Son expertise est un apport intéressant au projet puisque le Dr LE POGAM-ALLUARD a effectué sa thèse au sein de l’UMR CNRS 6226, appliquant des tech-

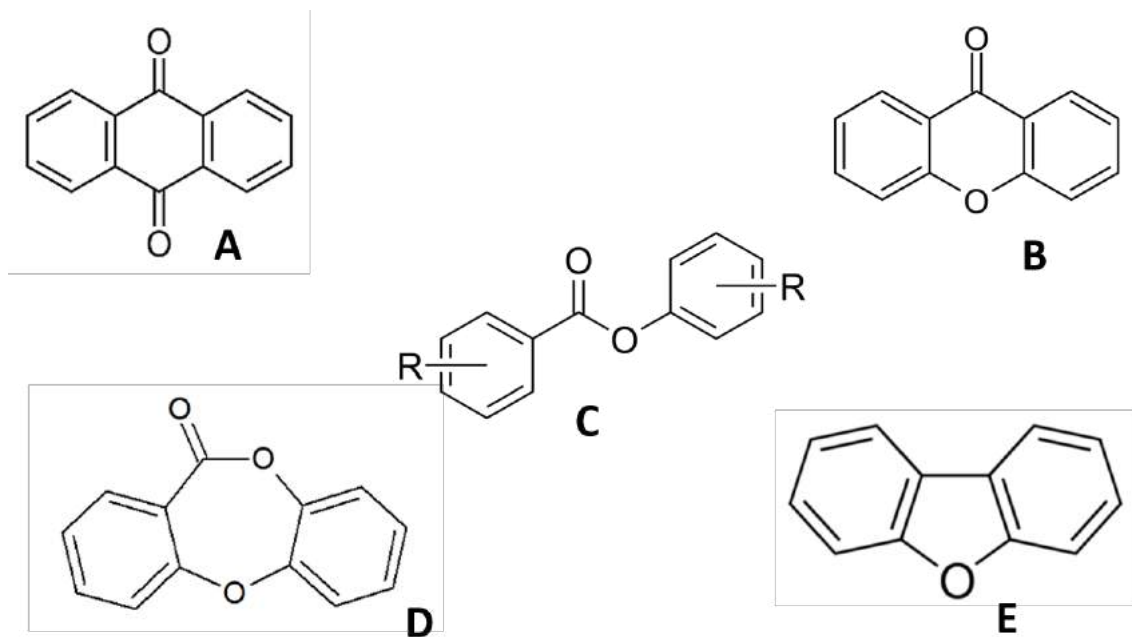


FIGURE 2 – Principales familles chimiques issues de la voie des polymalonates-polyacétates chez les lichens. A : Anthraquinones ; B : Xanthones ; C : Didepsides ; D : Depsidones ; E : Dibenzofuranes

niques d'analyse innovantes pour décrire la chimie des lichens. Le Dr LE POGAM-ALLUARD analysera les extraits bruts en spectrométrie de masse haute résolution.

Chapitre 1

Matériels et méthodes

1.1 Matériel lichénique

Quatre espèces de *Roccella* ont été étudiées : *Roccella montagnei* Bél. et *Roccella applanata* venant des îles Eparses, *Roccella phycopsis* Ach. et *Roccella fuciformis* provenant du littoral breton. La taxonomie est la suivante :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomytota

Sous-phylum : Pezizomycotina

Classe : Arthoniomycetes

Ordre : Arthoniales

Famille : Roccellaceae

Genre : Roccella DC.

1.1.1 Sites de récoltes

Un total de 10 specimens ont été récoltés, dont 7 pour la seule espèce de *R. montagnei*. Les Îles Eparses constituent un ensemble d'îles présentes dans le canal du Mozambique et dans l'Océan Indien (Figure 1.1). Au cours d'une mission d'inventaire du Muséum National d'Histoire Naturelle, Mr Poncet Rémy a récolté les thalles sur les îles de Juan de Nova, Glorieuse et Europa.

A chaque thalle est attribué un code faisant mention de la référence attribuée par Mr PONCET. Le code est enrichi lorsque plusieurs échantillons sont préparés à partir d'un seul thalle. Ces informations et celles sur le lieu précis de récolte, le support sur lequel le prélèvement est effectué, les références du récolteur et codes attribués sont disponibles dans le Tableau 1 en annexe.

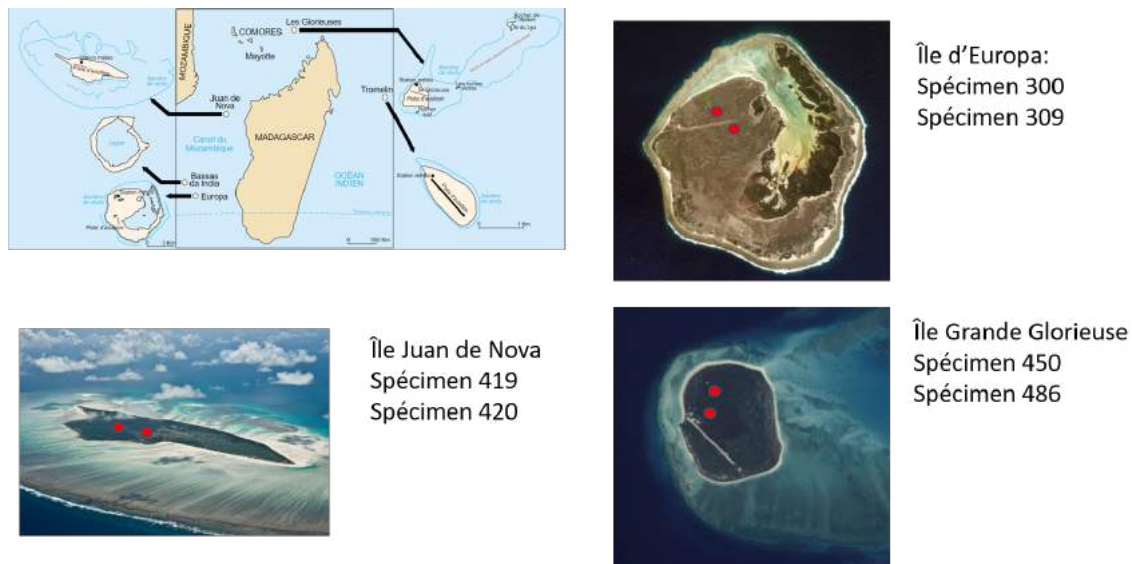


FIGURE 1.1 – Carte des environs de Madagascar montrant l’emplacement des Îles, photos aériennes ou satellites des îles concernées.

1.1.2 Espèces étudiées

Roccella phycopsis

Ce champignon lichénisant vit en Macaronésie, sur les côtes de la partie Ouest de la Méditerranée, et sur les côtes atlantiques de l’Angleterre au Maroc. Il est principalement saxicole, vivant sur rochers et falaises, plus rarement corticole (Roux and Coll. (2017)). Il a un thalle fruticuleux dressé, ne dépassant pas en général 5 centimètres, gris-mauve. Les lanières sont cylindriques, parfois un peu aplanies. La surface présente des fovea ou bien paraît quasiment lisse. C’est une des quelques espèces de *Roccella* qui a une médulle de couleur jaune (Figure 1.2), permettant une identification aisée (Gavériaux (a)). La répartition de l’espèce semble étroitement liée au mode de reproduction asexué, les soralies sont en effet fréquentes, blanchâtres et globuleuses, et rarement associées à des apothécies, qui sont alors noires et discoïdes. Il n’a pas été décrit de spécimen présentant seulement des apothécies (Tehler et al.).

Roccella fuciformis

Roccella fuciformis présente la même répartition que *Roccella phycopsis*. Il est également principalement saxicole, retrouvé sur rochers et falaises (Tehler et al.). Thalle fruticuleux pendant jusqu’à 20cm, gris à mauve ou brunâtre, possède des lanières aplaties, pouvant atteindre 1,5 cm de large. La surface est d’aspect variable, lisse ou bien parcourue de fovea. Les soralies sont blanchâtres, peu saillantes, planes à un peu convexes. Les apothécies noires et sessiles sont très rares, marginales ou faciales. La médulle est blanche dans le crampon (Tehler et al., Gavériaux (b)). La photo reprenant les principales caractéristique se trouve Figure 1.3.

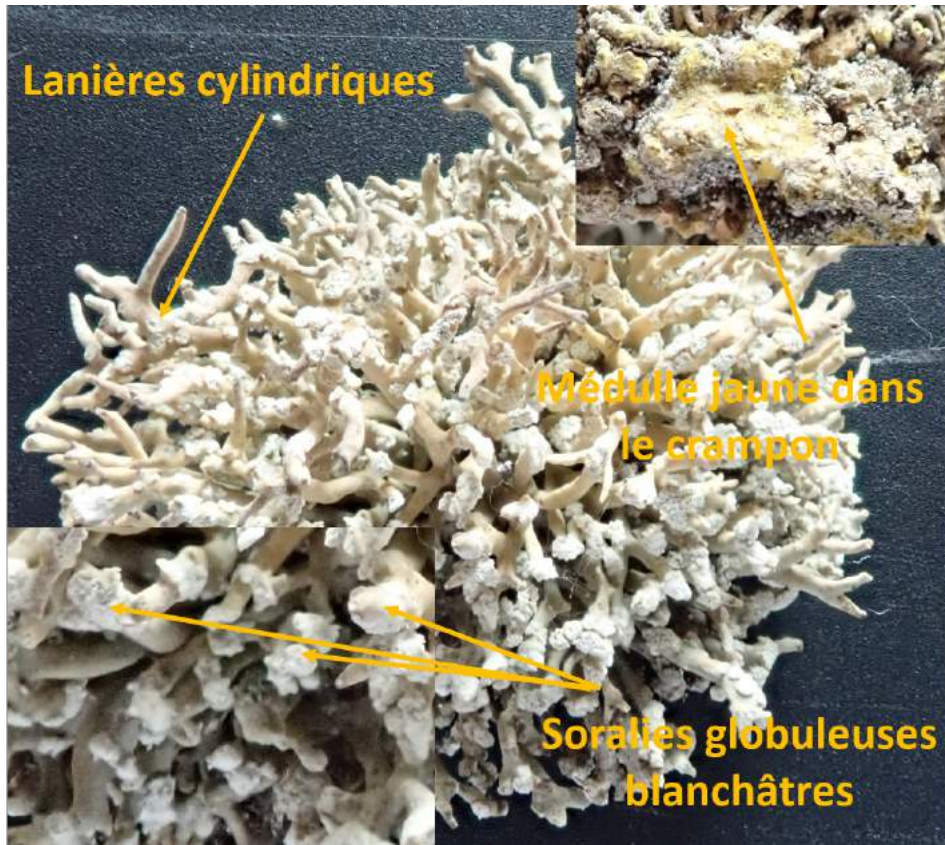


FIGURE 1.2 – Photo d'un spécimen de *R. phycopsis* Ach. du laboratoire.

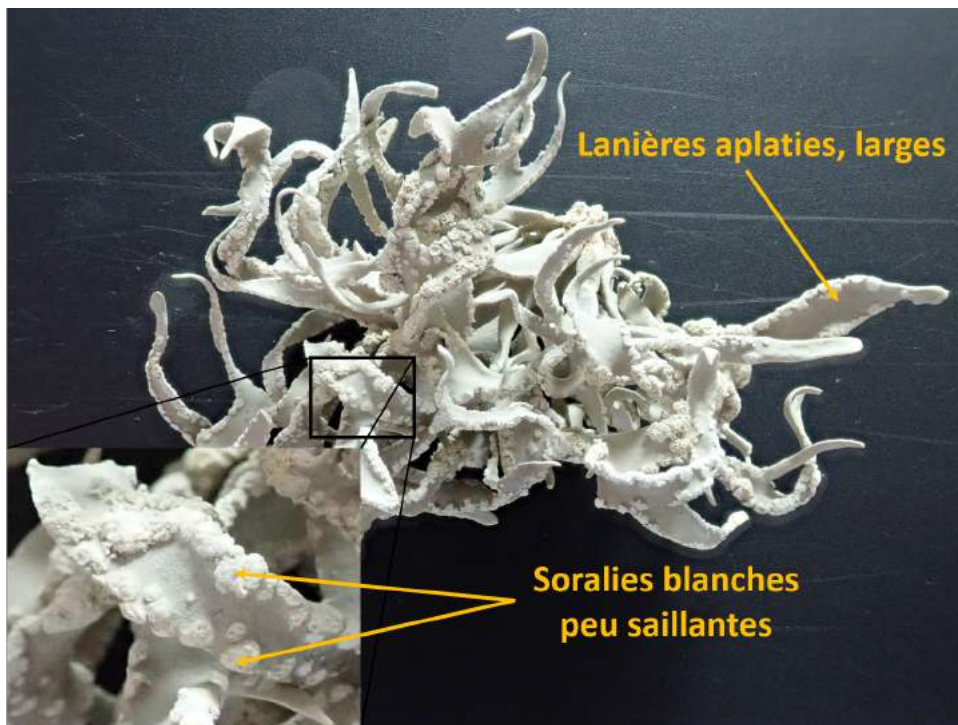


FIGURE 1.3 – Photo d'un spécimen de *R. fuciformis* du laboratoire.

Roccella montagnei

Roccella montagnei a été décrite la première fois par Charles Bélanger dans "Voyages aux Indes-Orientales, par le Nord de L'Europe, les provinces du Caucase, la Géorgie, l'Arménie et la Perse...Pendant les années 1825-1829.". Cette espèce a une très grande distribution (Asie, Océanie, Afrique), allant des côtes Indonésiennes, en passant par l'Inde et le Sri Lanka, sur les côtes du Yémen, la côte Africaine depuis la pointe de l'Afrique en passant par le cap de Bonne-Espérance et remonte sur le versant Atlantique, jusqu'en République Démocratique du Congo. L'espèce est le plus souvent corticole et pousse sur les arbres et arbustes côtiers. Bélanger décrit indifféremment les spécimens fertiles et sorédiés, puis Awasthi les distingue en 1981 (Awasthi (1981)). Enfin, Tehler et son équipe, considérant la variabilité génétique des différents spécimens et l'homogénéité chimique et morphologique de ces derniers, réunissent les deux types de spécimens au sein du "complexe montagnei (Tehler and Irestedt (2007)). Une photo d'un spécimen reçu au laboratoire est en photo Figure 1.4.

La morphologie caractéristique de l'espèce est la suivante, retrouvée à l'observation à la loupe (Tehler et al. (2010)) :

- Thalle à branches pendantes ou érigées, aplaties voire en lanières, 5 à 15 cm de long, grisâtres.
- Surface variable : lisse, ou bien parcourue de fovea, ou encore d'aspect froissé.
- Présence de soralies, rarement associées sur le spécimen avec les apothécies; ou présence d'apothécies, rarement associées aux soralies.
- Médulle blanche byssoïde¹, blanchâtre zébrée de brun ou de noir.



FIGURE 1.4 – Photo d'un spécimen de *R. montagnei* Bél. reçu au laboratoire

1. En référence à l'organisation en filaments partiellement enchevêtrés du byssus des mollusques, qui leur permet de s'accrocher à leur substrat.

Roccella applanata

Roccella applanata est une espèce endémique du Sud/Sud-Ouest de Madagascar. C'est un corticole qui pousse sur les arbres et arbustes côtiers de cette région (Tehler et al. (2010)).

Le thalle est pendant ou érigé faisant jusqu'à 15 cm de long, ses lanières sont aplaties, atteignant jusque 3 centimètres de large (Figure 1.5). Il est grisâtre ou vert-gris. La surface est lisse ou présente quelques rares fovea. Il ne présente pas de soralies, mais des apothécies sessiles. La médulle est blanche, sauf dans le crampon où elle prend une couleur brune.



FIGURE 1.5 – Photo d'un spécimen de *R. applanata* reçu au laboratoire

1.1.3 Réactions thallines

Utilisées avec la détermination morphologique du lichen, elles permettent l'identification et peuvent donner une idée des classes de composés chimiques présents. Les produits utilisés sont l'hypochlorite de sodium notée « C », ainsi que la potasse, notée « K ». Le cortex et la médulle sont testés, les résultats mentionnent si une réaction est positive, et si tel est le cas, décrivent la couleur associée ainsi que sa persistance ou fugacité (?). L'identification ayant été assurée au préalable par Rémy PONCET, un seul spécimen de *R. montagnei* est testé.

Les résultats prévisibles pour les spécimens de *Roccella* étudiés sont réunis dans le Tableau 1.1 suivant :

Espèce	Partie à l'épreuve	K	C
<i>Roccella montagnei</i>	Cortex	K-	C+ rouge
	Médulle	K-	C-
<i>Roccella phycopsis</i>	Cortex	K- ou K+ rougeâtre	C+ rouge
	Soralies		C-
<i>Roccella fuciformis</i>	Cortex		C- parfois faiblement rougeâtre
	Soralies	K+ jaunâtre	C+ rouge
<i>Roccella applanata</i>	Cortex	K-	C+ rouge
	Médulle	K-	C-

TABLE 1.1 – Réactions thallines en théorie observées avec les espèces de *Roccella* étudiées

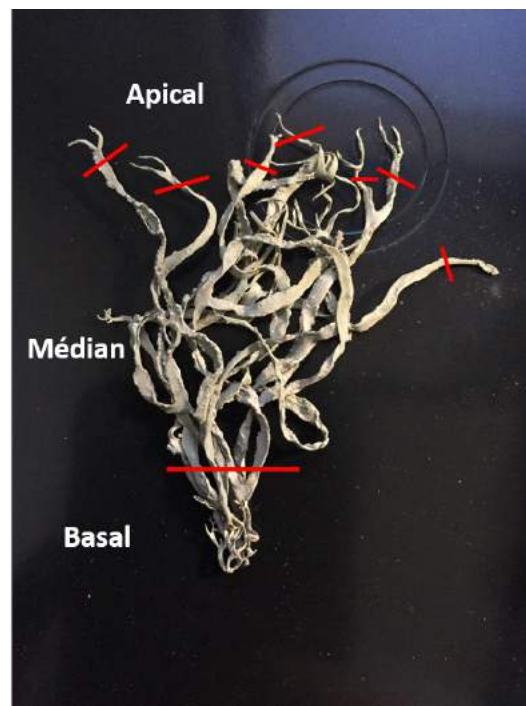


FIGURE 1.6 – Représentation du protocole de découpe des différentes parties de thalle.

1.2 Préparation des échantillons

Pour chaque espèce (sauf *R. applanata*) un spécimen a été :

- Conservé entier, de la base à la partie apicale. Le code attribué à l'échantillon est alors le code du spécimen auquel on ajoute la lettre E.
- Sectionné en 3 parties (Figure 1.6) : basale (B), médiane (M), apicale (A). Les parties apicales et basales sont discernées par l'absence de soralies.

Ces opérations sont réalisées à l'aide de pince, ciseaux et scalpel, à l'aide d'une loupe binoculaire. La liste des échantillons obtenus est visible dans le tableau 2 (annexe).

1.3 Extractions

Les thalles préalablement préparés (Cf paragraphe au-dessus) ont été broyés au mortier et pilon, parfois avec l'aide d'azote liquide, pesés, puis extraits par 4 fois 2 mL d'acétone qualité HPLC à l'aide du robot Heidolph Synthesis 1 avec les paramètres suivants :

- Agitation : 1000 r.p.m.
- Température : 35°C
- Durée : 45 min

Entre deux extractions l'acétone est évaporée avec le robot Speed Vac® Concentrator SPD121P de Thermo Savant.

Le calcul du taux d'extraction est fait avec la formule suivante :

$$T = \left(\frac{m_e}{m_i}\right) * 100$$

Avec :

T : taux d'extraction

m_e : masse extraite

m_i : masse initiale

1.4 Analyse des extraits

1.4.1 Préparation des échantillons

Les extraits secs sont dissous dans de l'acétone qualité HPLC pour une part, et dans le tétrahydrofurane lorsque la concentration à obtenir ne permet pas une solubilisation complète de l'échantillon. Les analyses en HPLC-UV-DEDL-MS sont faites sur des solutions à 1 mg/mL, et les échantillons envoyés à Paris sont réalisés à une concentration de 5 mg/mL (Figure 1.6)

Une première série d'extraits secs a été solubilisée dans le tétrahydrofurane pour obtenir les solutions à 5mg/mL. Cinq extraits ont été dissous à l'acétone pour une même concentration, il s'agit des échantillons de thalles entiers suivants : Phyco E, Fuci E, JdNE420, GE450, EE309. Tous les échantillons (à 5 comme à 1mg/mL) sont filtrés à travers une membrane de nylon ayant des pores de 0,45µm.

1.4.2 Chromatographie sur couche mince

La phase stationnaire est un gel de silice déposée sur feuille d'aluminium (plaques MERCK 60 F254). Le dépôt des extraits à 1mg/mL est réalisé de manière automatisée grâce au robot CAMAG

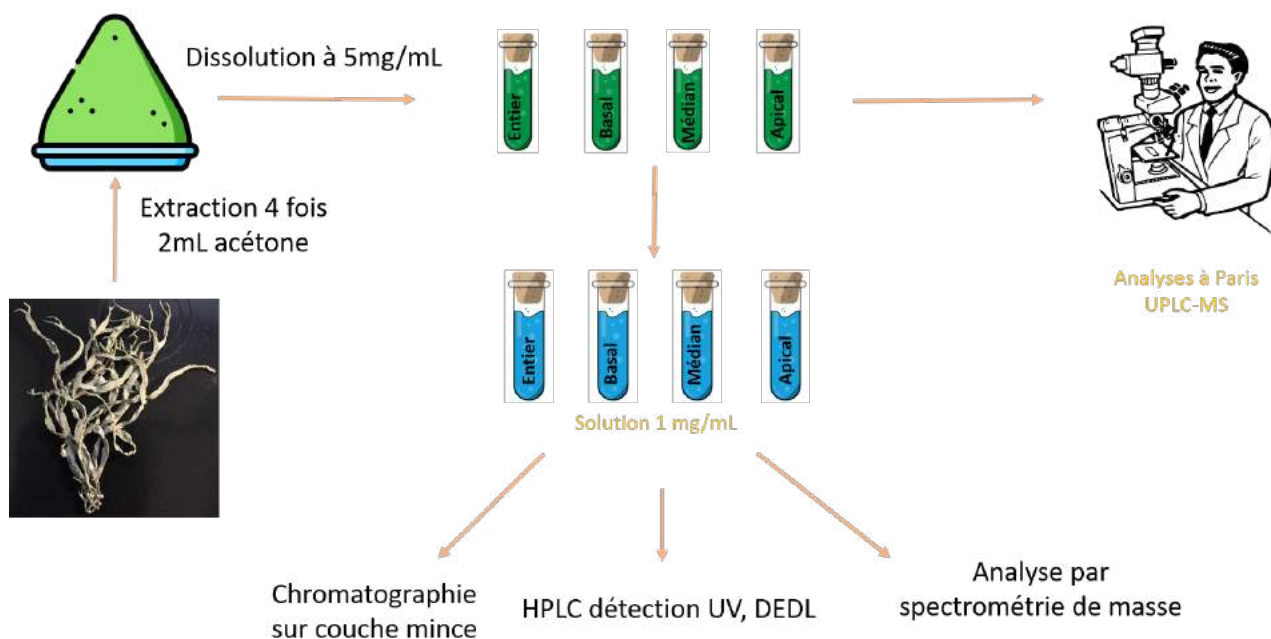


FIGURE 1.7 – Schéma général de la répartition des solutions aux concentrations de 5mg/mL et 1mg/mL.

Automatic TLC Sampler 4. Une fois les échantillons déposés, la plaque est plongée dans une cuve saturée en vapeur d'acide acétique à 60% pendant 10 min. La migration se fait en « solvant C » composé de toluène : acide acétique 70 : 30 (Elix (2014)). Un deuxième mélange de solvant est utilisé comme phase mobile, après obtention des premiers résultats à la chromatographie liquide. Il est composé de dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AcOEt) et acide acétique dans les proportions volume/volume respectives 60/40/2. La polarité plus importante du solvant permet une étude complémentaire avec une migration différente de celle obtenue avec le premier solvant. La révélation se fait d'abord visuellement, puis à l'UV à 254nm et à 365nm. Enfin, certaines structures n'absorbant pas en UV, la révélation est faite également après pulvérisation d'anisaldéhyde sulfurique puis chauffage. Pour la migration en solvant "C", les R_f sont calculés relativement à la distance de migration de l'atranorine, pour s'affranchir des différences de distances de migration entre les plaques, avec la formule suivante :

$$Rf_X = \frac{d_X}{d_A}$$

Avec :

Rf_X : rapport frontal de la substance X

d_X : distance de migration de la substance X

d_A : distance de migration de l'atranorine

Les témoins sont choisis car ont déjà été détectés dans les différentes espèces de Roccella étudiées et sont répertoriés en Annexe Tableau 3. Le choix du solvant C tient compte des différences de migration des substances. Les témoins choisis pour le mélange DCM/AcOEt/Acide acétique sont l'acide

orsellinique, l'acide lécanorique, l'érythrine, le montagnéol et enfin l'acide rocellique.

1.4.3 HPLC-UV-DEDL-MS

Matériel utilisé à Paris

Les contacts des chercheurs du laboratoire avec d'autres laboratoires de pharmacognosie permettent de travailler ponctuellement avec des expertises extérieures.

Le Dr LE POGAM-ALLUARD Pierre a contribué au projet en conduisant les analyses par spectrométrie de masse haute résolution (UPLC-MS²).

Matériel utilisé à Rennes

Les échantillons passent successivement à travers une colonne de silice greffée en C18 de 10 cm (apolaire) avec une granulométrie de 5 micromètres, et devant le détecteur à barrette de diode (UV). A sa sortie de la colonne d'HPLC, l'échantillon passe dans un spectromètre de masse Advion Simple Quad (MS) et devant un détecteur de diffusion de la lumière (DEDL).

- Le volume injecté est de 10 microlitres, soit une masse de 10 microgrammes injectée avec une solution à 1mg/mL.
- La phase mobile polaire est un mélange de deux solvants, A et B :
- Solvant A : acétonitrile + 0,1% ac. formique
- Solvant B : eau (HPLC) +0,1% ac. formique
- Pompée au travers de la colonne sous forme d'un gradient indiqué en figure 1.7 ci-dessous.
- La pompe utilisée est le modèle LC-20AD
- Le débit utilisé est de 0,5 mL/min.
- La source de radiation lumineuse est une lampe à deutérium de modèle SPD-M20A. Le récepteur est une barrette à photodiodes, la détection s'effectue de 190 à 400 nm.
- Le seuil retenu pour considérer un pic est fixé à 1% par rapport à l'aire totale des pics.

Le mode d'ionisation est un électrospray (ESI). Le liquide est chargé négativement (mode ESI négatif, H-) avec une différence de potentiel de 3500 Volts. Lorsque le pic n'a pas de correspondance avec les témoins, une recherche est faite dans un fichier du laboratoire répertoriant des composés lichéniques et leur masse molaire.

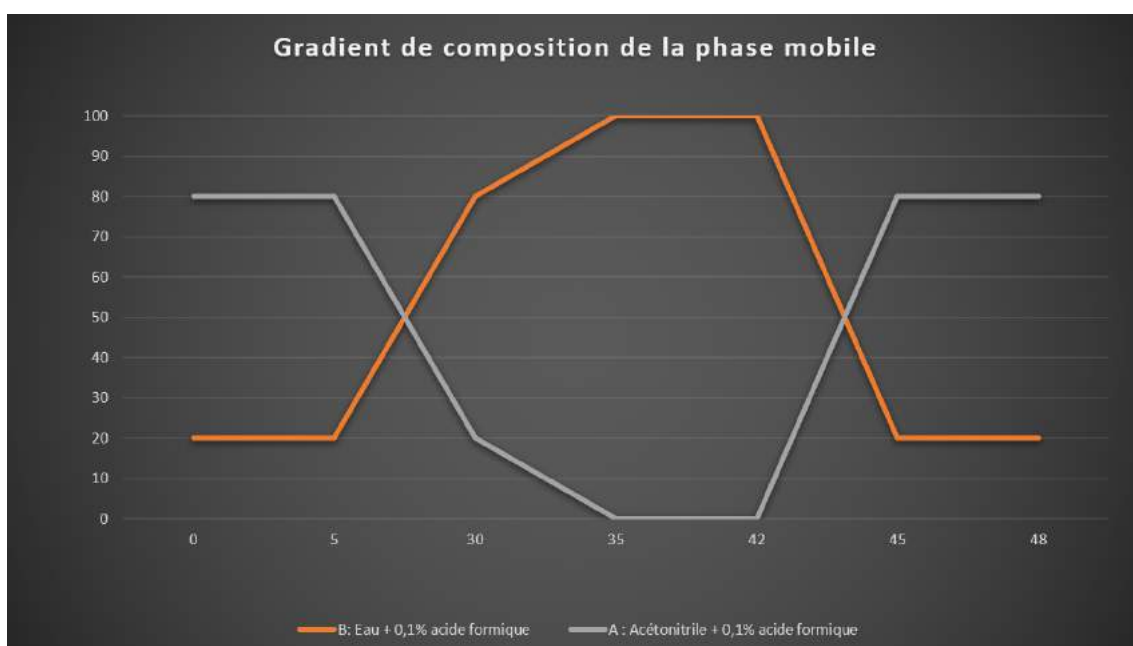


FIGURE 1.8 – Gradient de composition de la phase mobile pour un run de 48 min

Chapitre 2

Résultats

2.1 Taux d'extraction

Les taux d'extraction obtenus avec chacun des échantillons sont consignés dans le tableau II en annexe. Les taux d'extraction pour les thalles entiers sont représentés graphiquement sur la figure 2.1. Ceux des échantillons correspondant aux différentes parties de thalles sont présentés dans la figure 2.2.

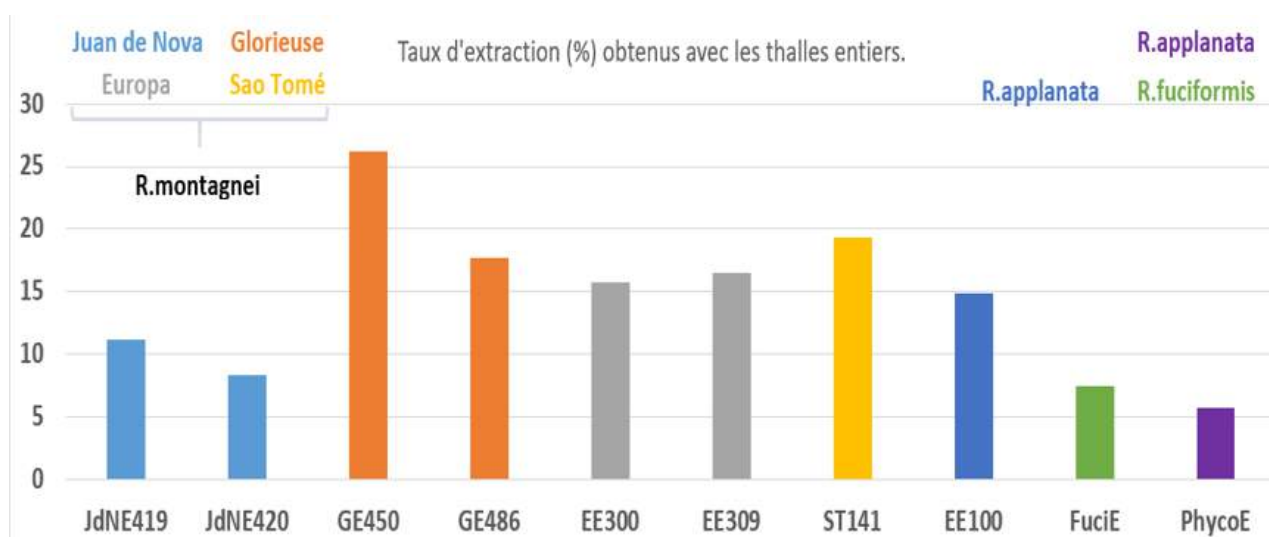


FIGURE 2.1 – Représentation graphique des taux d'extraction obtenus avec les spécimens dans leur ensemble.

Les taux d'extraction varient entre 5 et 26%. Cette dernière valeur paraît élevée au regard des taux de rendement classiquement observés (5 à 15% environ).

Un écart d'environ 18% est observé entre les échantillons JdNE420 et GE450. Plusieurs explications sont possibles. La pesée a peut être été faite avant séchage complet des extraits, ajoutant une masse artificielle, ou bien il existe une réelle différence de composition chimique.

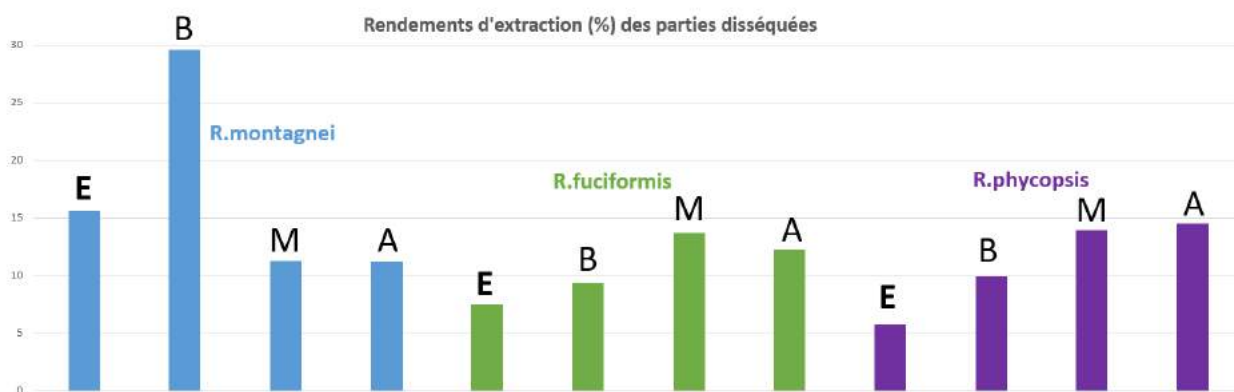


FIGURE 2.2 – Représentation graphique des taux d'extraction obtenus avec les parties de thalles. E : entier ; B : basal ; M : médian ; A : apical

Les taux d'extraction varient de 6% à 30%. Cette dernière valeur paraît aberrante au regard des taux d'extraction habituellement rencontrés (5 à 15%).

Les taux d'extraction selon les parties de thalles varient semblablement de la même façon pour *R. phycopsis* et *R. fuciformis*, sans qu'on puisse tirer de conclusion. Ainsi la partie médiane du thalle pourrait être celle qui contient le plus de métabolites.

Le thalle de Juan de Nova, JdN419, a un profil de taux d'extraction différent de celui des deux autres espèces. Cependant, le taux obtenu avec la partie basale du thalle paraît très élevée et peu vraisemblable.

2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Rocella applanata et *Rocella phycopsis* présentent un profil similaire aux profils obtenus avec les thalles de *Rocella montagnei*. Les profils obtenus avec *Rocella fuciformis* sont franchement différents.

Néanmoins, si des différences sont visibles entre les profils de thalles récoltés pour une même espèce sur une même île (*R. montagnei*), cela peut être dû à la différence de méthode de solubilisation. Le même biais est présent lorsque sont comparés les profils des thalles entiers de *R. fuciformis* et de *R. phycopsis* (solubilisation à l'acétone) et les profils de leurs parties respectives (échantillons repris au tétrahydrofurane). Les témoins en solvant C sont séparés. Le tableau des rapports frontaux est en annexe Tableau 4.

2.2.1 *Roccella fuciformis*

Roccella fuciformis a un profil qui se démarque des autres. Il n'y a pas de composés révélés à 365nm et les migrations des composés sont plus importantes qu'avec les autres espèces de *Roccella* dans le solvant standard "C". Le profil du thalle complet présente 8 spots (Figure 2.3).

Les parties basale et médiane du thalle ont le même profil, tandis que la partie apicale présente deux marques supplémentaires dont on ne trouve pas de correspondance avec les témoins.

Juste au dessus des lignes de dépôt se trouve une marque retrouvée dans tous les échantillons (sauf la partie basale). Colorée en rouge à l'anisaldéhyde sulfurique, il s'agit de l'érythrine, un des composés majoritaires chez *Roccella*.

Les Rf obtenus relativement à l'atranorine sont répertoriés dans le Tableau 5 en annexe.

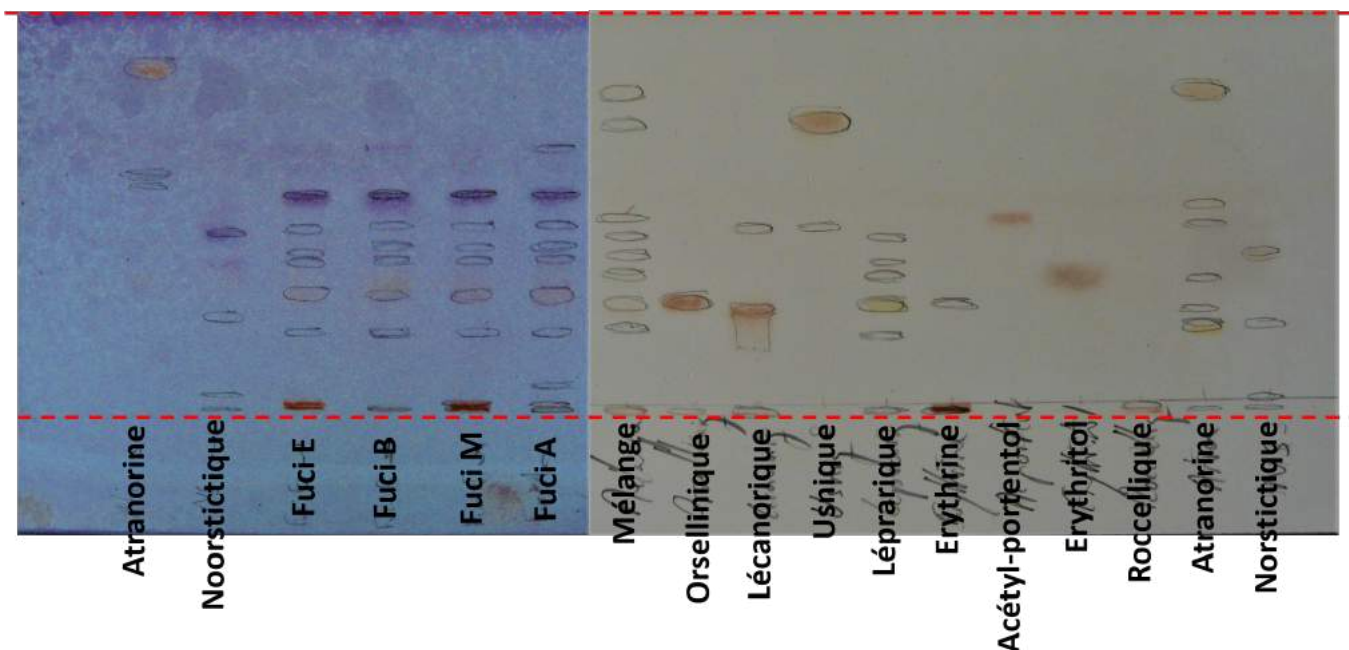


FIGURE 2.3 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. fuciformis* après migration en "C", en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique.

L'utilisation du solvant alternatif, plus polaire (Figure 2.4), permet de dévoiler 9 spots, soit un de plus qu'en solvant "C". Là où les conditions de réalisation de la CCM en solvant "C" ne permettent que de conclure à la présence d'érythrine, on retrouve ici en plus une correspondance avec l'acide orsellinique. Les parties du thalle sont différentes, mais comme avec le thalle complet, on ne détecte pas l'acide lécanorique. La partie apicale du thalle est la plus riche, avec 10 spots, puis viennent la partie médiane avec 9 spots et basale avec 7 spots. Le deuxième composé le plus rapidement élué n'est pas révélé aux UV, mais à l'anisaldéhyde sulfurique, avec une coloration mauve.

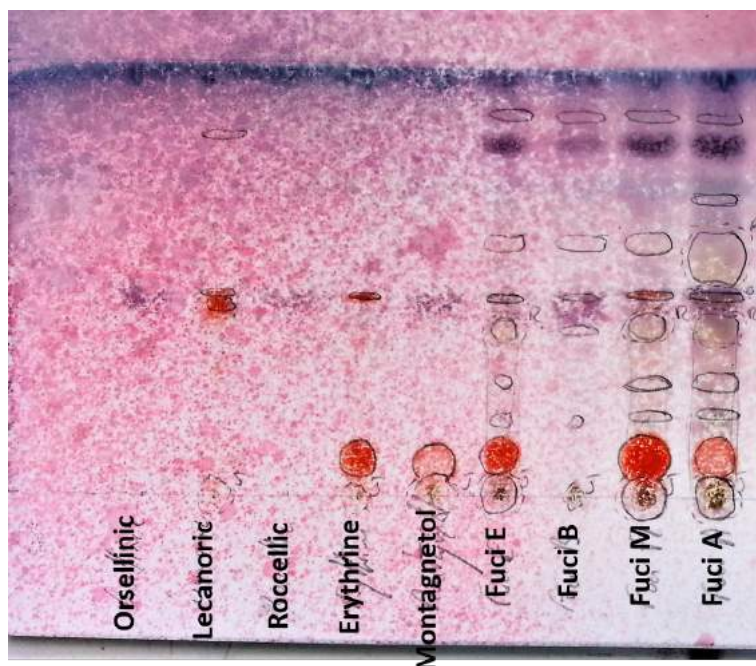


FIGURE 2.4 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R.fuciformis* après migration dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2, en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique.

2.2.2 *Roccella phycopsis*

Dans le solvant C chez *R. phycopsis*, les profils chimiques des parties de thalles sont les mêmes (Figure 2.5), tandis que le profil obtenu avec le thalle dans son ensemble est différent. Cela peut être dû à une différence de réaction avec le solvant utilisé pour reprendre les extraits secs. En effet les échantillons Phyco B, Phyco M et Phyco A ont été repris dans le tétrahydrofurane, et l’échantillon Phyco E dans l’acétone. Cette CCM détecte 5 spots en tout, et 4 dans chacun des échantillons de *R. phycopsis*.

Le tableau présentant les Rf obtenus se trouve en annexe Tableau 6.

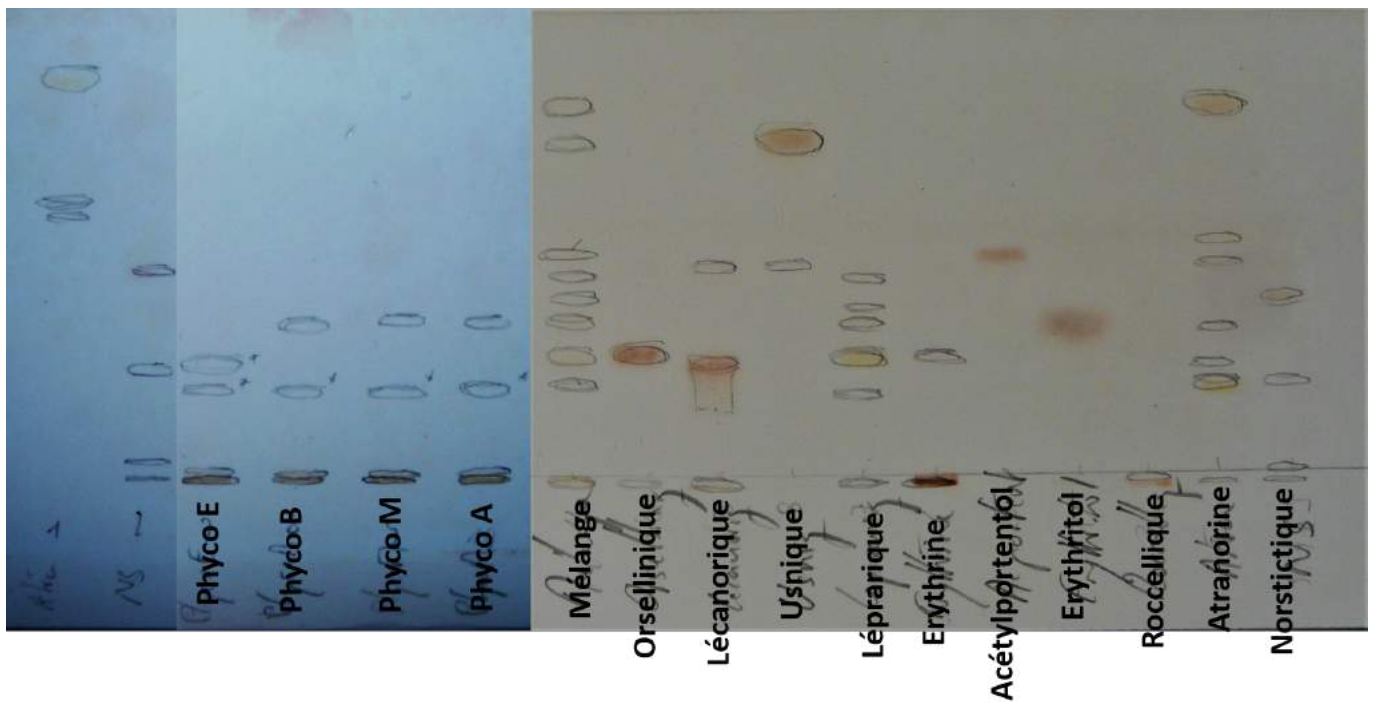


FIGURE 2.5 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R.phycopsis* Ach., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique.

La migration sur la plaque obtenue avec le second solvant est bien plus informative, puisque sont détectés 7 spots dans l’échantillon Phyco E correspondant au thalle complet, 6 dans Phyco B, 5 dans Phyco M et 7 dans Phyco A (Figure 2.6). Au total, 8 composés sont détectés (un composé est différent entre les profils du thalle entier et de la partie apicale du thalle).

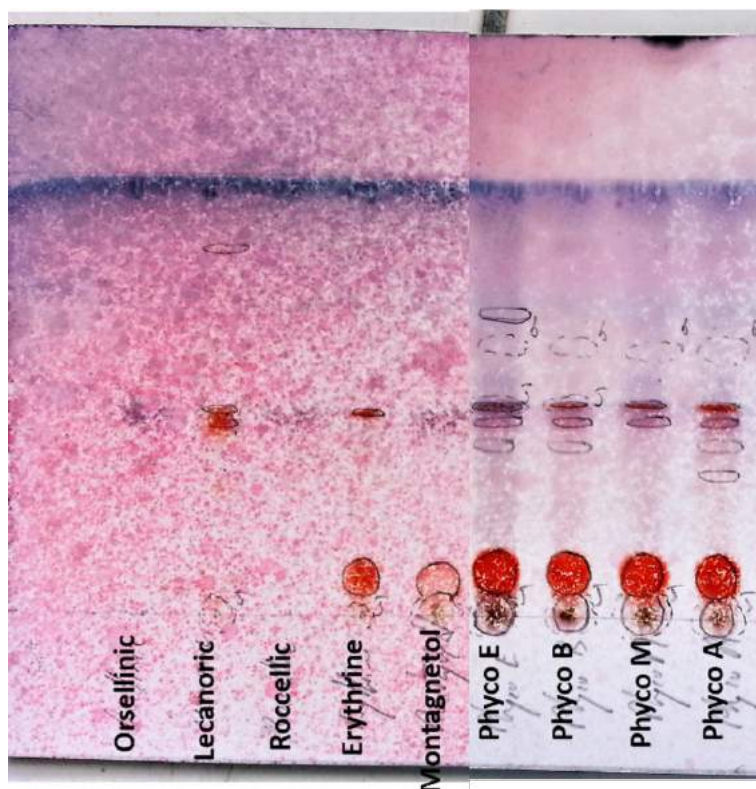


FIGURE 2.6 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. phycopsis* Ach., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.

2.2.3 *Roccella montagnei*

Les résultats du profilage par CCM en fonction du lieu de récolte des thalles de *R. montagnei* est présenté ci dessous. Avec le solvant C (Figure 2.7), sur Europa, le profil d’EE309 est le plus complet, montrant 6 spots, dont 3 sont révélées uniquement lorsque l’on éclaire la plaque à 365nm, et 1 autre est révélée à 254nm possédant le plus grand Rf. Après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique, deux tâches rouges très proches apparaissent, correspondant au dépôt et à une substance migrant à peine.

Par comparaison avec les témoins, on conclut à la présence d’érythrine juste au-dessus du dépôt. Aucun témoin n’est révélé qu’à la longueur d’onde de 365nm.

Le profil d’EE300 est amputé d’un composé, avec 5 marques dont 1 seule est révélée à 365nm, deux à 254nm possédant les plus grands Rf, et l’ensemble de deux tâches rouges au niveau du dépôt. On conclut donc à un profil différent mais possédant également l’érythrine.

Cette différence peut être due à une différence de traitement lors de la solubilisation.

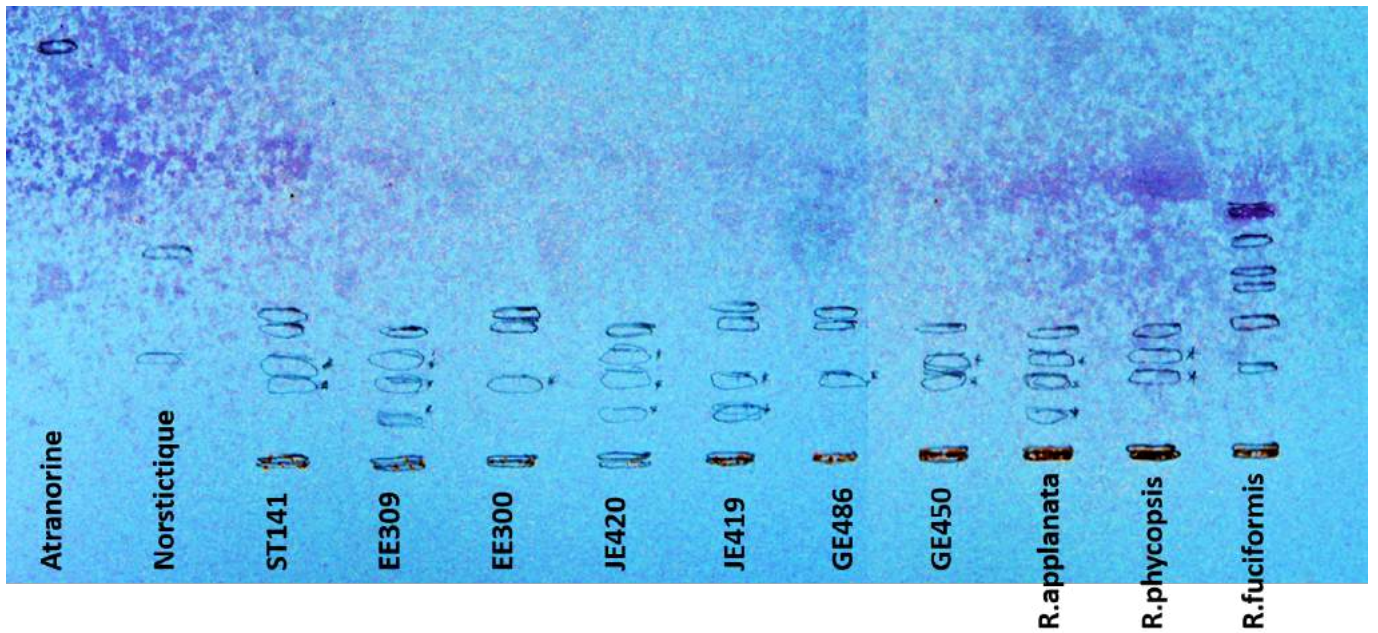


FIGURE 2.7 – Profils CCM obtenus avec les thalles de *R. montagnei* Bél. en entier selon les différents sites de récolte. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique.

De même que sur Europa (EE309 et EE300), les profils obtenus sur Juan de Nova (JE420 et JE419) sont différents, et il y a présence d’érythrine. Le même résultat est visible avec les thalles de Glorieuse (GE450 et GE486), qui ont des profils différents mais possédant tous les deux de l’érythrine (Figure 2.8).

Le thalle de Sao Tomé (échantillon ST141) présente un profil similaire à ceux retrouvés sur les îles Eparses, avec 6 marques dont 2 révélées à 365nm, 2 à 254nm et 2 tâches rougeâtre au niveau du dépôt.

Les Rf des thalles complets sont présentés en tableau 8 en Annexe.

Les parties du thalle présentent le même profil que le thalle dans son ensemble, à la seule différence de la partie apicale pour laquelle une seule tâche rougeâtre est visible juste au-dessus de la ligne de dépôt. Les Rf sont présentés en tableau 7 en Annexe.

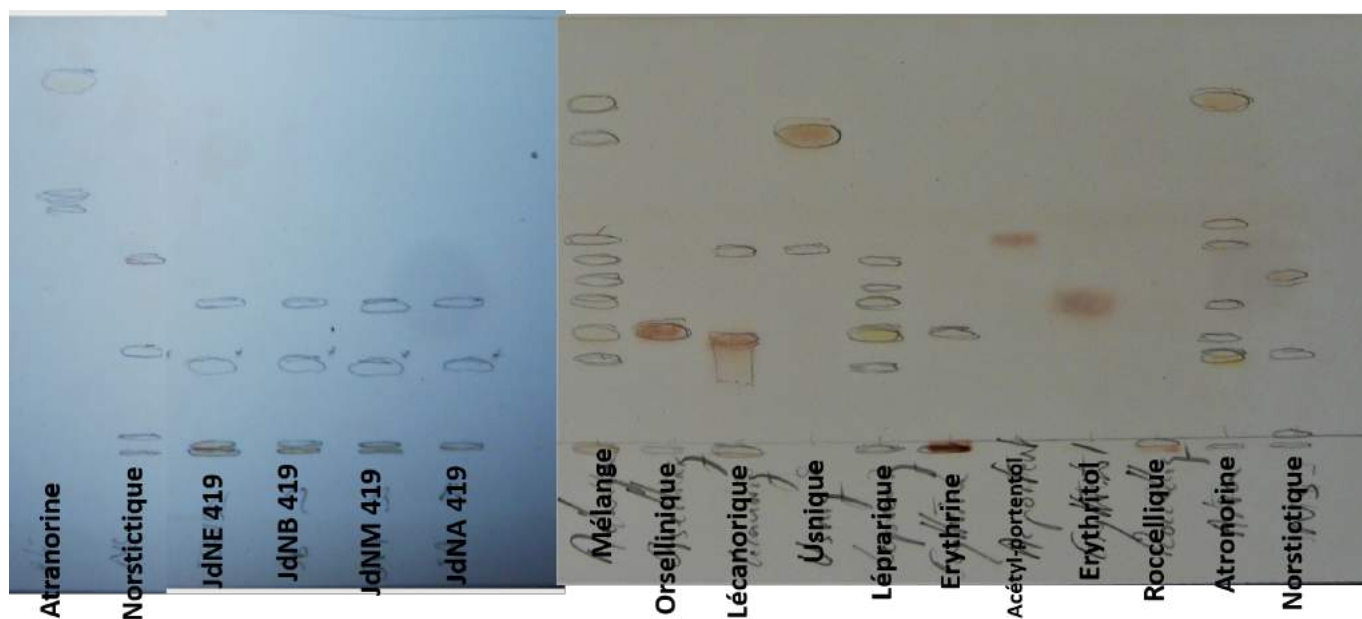


FIGURE 2.8 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. montagnei* Bél., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique.

On conclut à la présence d’érythrine. En effet, il n’y a pas de témoins n’absorbant qu’à 365nm, et la tâche au Rf le plus élevé n’a pas de correspondance chez les témoins. Elle présente un Rf similaire à celui de l’acide léprarique, mais n’est pas mise en exergue après pulvérisation à l’ANS.

L’utilisation du deuxième solvant complète ces premières informations (Figure 2.9). L’échantillon EE 309 présente en effet ici 9 spots soit 3 de plus qu’avec la migration en solvant "C". Le profil d’EE 300 est composé de 8 spots. Dans les deux cas sont retrouvés en plus de l’érythrine l’acide lécanorique l’acide orsellinique. Cette information est retrouvée pour les autres profils de *R. montagnei* des îles Eparses. On note que l’échantillon GE 486 présente tous les spots correspondant aux témoins absorbant en UV. En plus des composés précédents, on détecte également le montagnétol.

Les échantillons GE 450, EE 309 et JdNE420 ont un spot entre l’acide orsellinique et l’acide lécanorique. Cette différence n’est malheureusement pas vérifiable car ces échantillons sont ceux qui ont été repris à l’acétone et non au tétrahydrofurane.

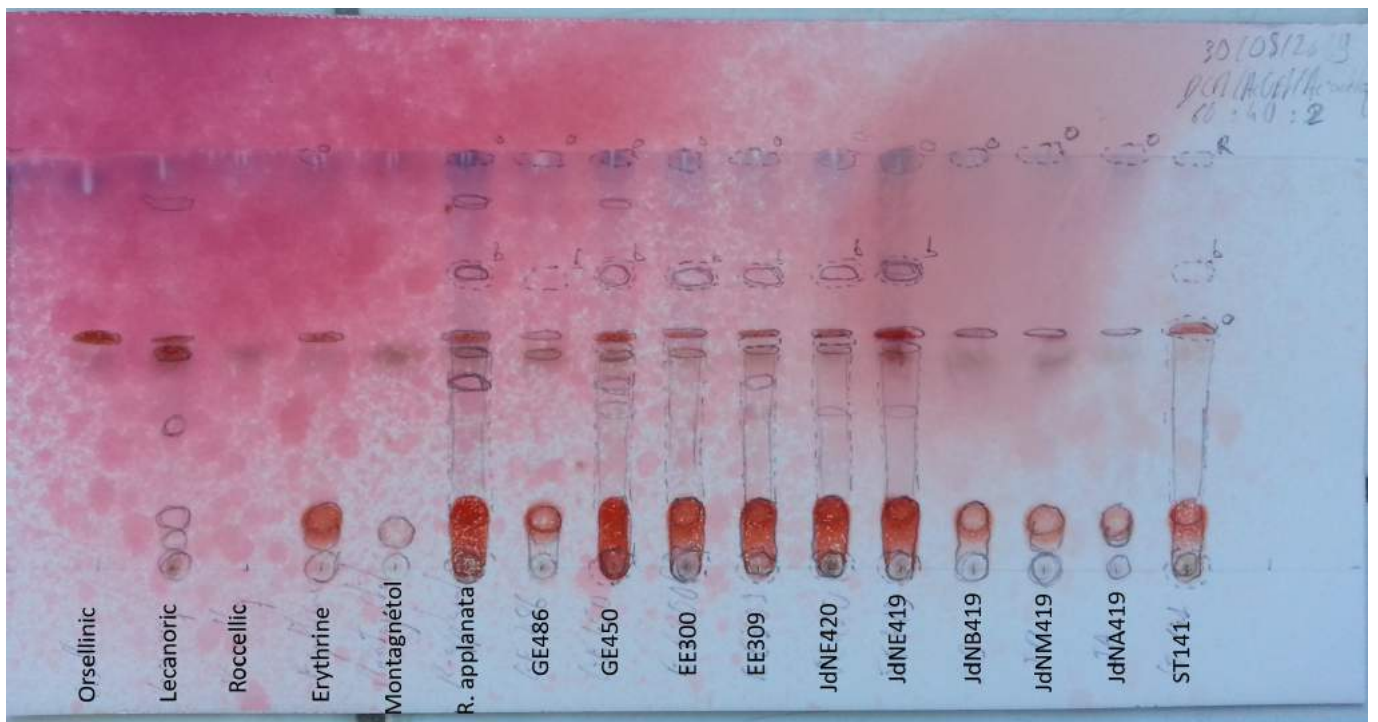


FIGURE 2.9 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. montagnei* Bél., en entier et pour ses différentes parties. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.

2.2.4 *Roccella applanata*

Dans le solvant C, *R. applanata* présente X spots, dont un spot rouge à l’ANS, qui migre peu, correspondant à l’érythrine (Figure 2.10).

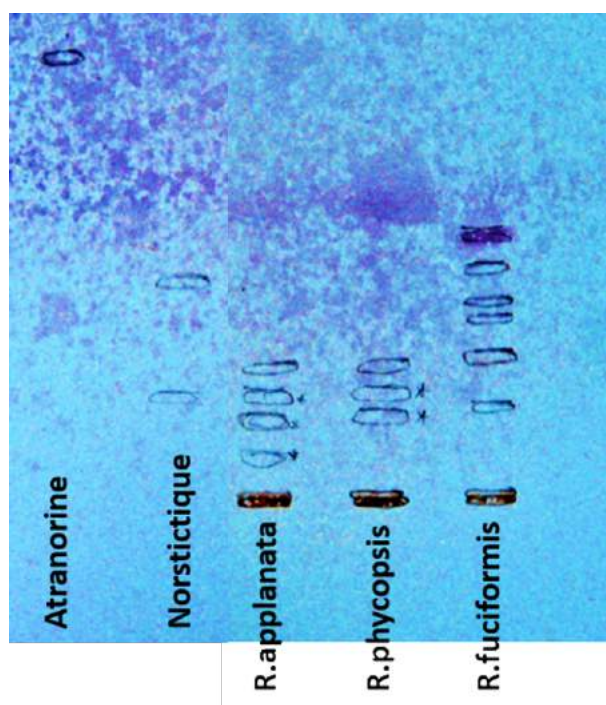


FIGURE 2.10 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. applanata*. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans le solvant C.

Avec le second solvant le profil CCM est plus complet avec 8 spots (Figure 2.11). On retrouve l’érythrine, l’acide orsellinique et l’acide lécanorique. Les 5 autre spots correspondent à des composés avec lesquelles on ne peut pas faire de lien.

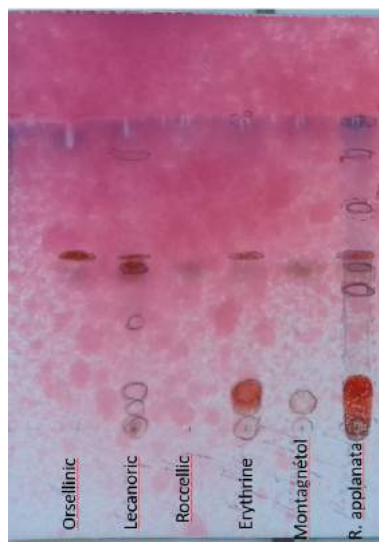


FIGURE 2.11 – Profils CCM obtenus avec le thalle de *R. applanata* en entier. La migration des témoins est donnée pour comparaison. La photo est obtenue après pulvérisation à l’anisaldéhyde sulfurique. La migration se fait dans DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.

2.3 HPLC-UV-DEDL-MS

2.3.1 Résultats pour les témoins

Les résultats pour les témoins sont présentés en annexe (Tableau 9).

2.3.2 *Roccella fuciformis*

Quatre molécules sont détectées dans le thalle complet. Deux paraissent majoritaires, l'érythrine avec un tr de 15 min et l'acide lécanorique avec un tr de 18,75 min. Un troisième composé est détecté au DEDL à 23,5 min et n'absorbe pas en UV. Le dernier absorbe les UV et est détecté avec un tr de 27,5 min. On note l'absence d'acide roccellique, pourtant retrouvé dans l'espèce habituellement.

Les mêmes composés majoritaires sont répartis dans les différentes parties du thalle (Figure 2.8). On ne détecte pas l'érythrine dans la partie apicale, mais un composé qui paraît spécifique, n'absorbant pas dans l'UV et retrouvé uniquement au DEDL, à 23,5 min. Le composé détecté dans le thalle complet en photométrie UV à un tr de 27,5 min n'apparaît pas dans la partie médiane. Cette dernière présente aussi sa particularité puisqu'on retrouve un composé absorbant dans les UV à 36,25 min.

Ces informations sont résumées à l'aide du schéma suivant (Figure 2.7).

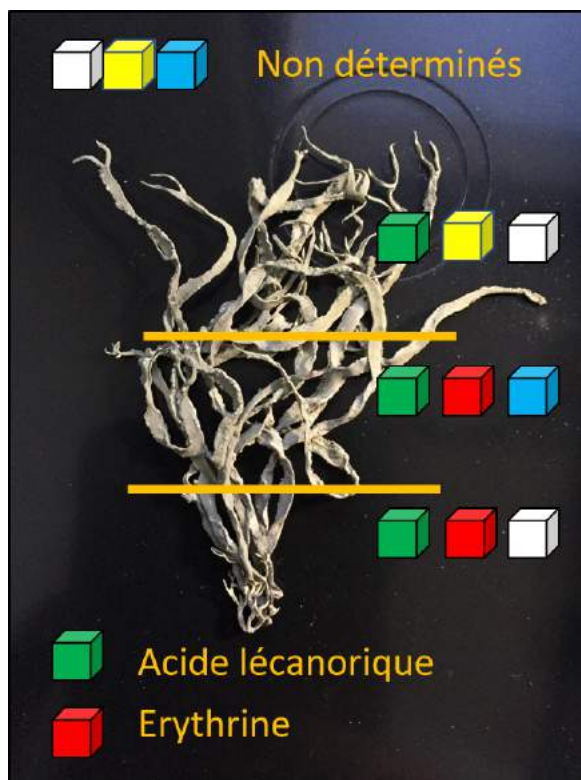


FIGURE 2.12 – Schéma représentant la découpe de *R. fuciformis*. Les composés sont représentés par des blocs de couleur.

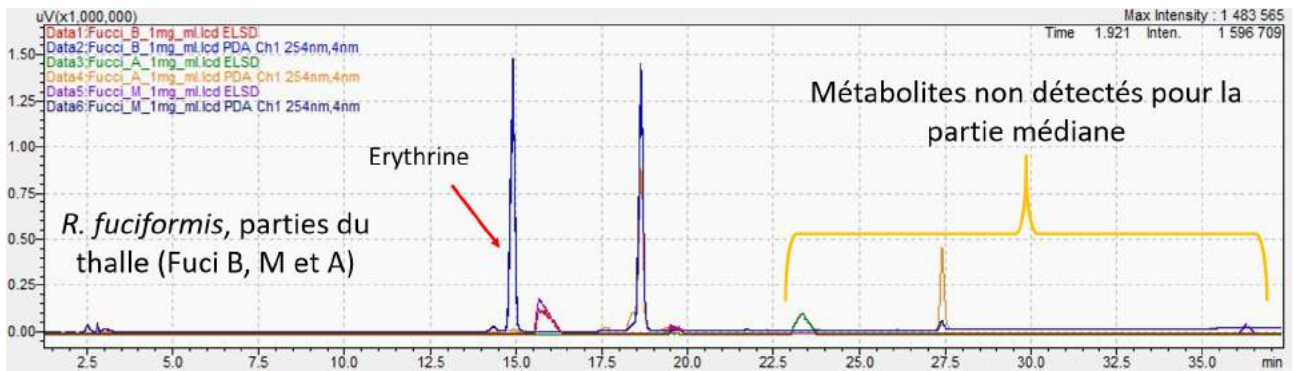


FIGURE 2.13 – Chromatogrammes obtenus par détection UV et DEDL, des parties du thalle de *R. fuciformis*.

Chez *R. fuciformis*, on ne détecte pas en spectrométrie de masse l'acide roccelique, ni dans le thalle complet, ni dans les parties du thalle, mais un rapport m/z différent, égal à 381,0 pour un même temps de rétention (Figure 2.9). Deux autres substances indéterminées se situent à 3,46 min ($m/z = 167,0$) et 22,9 min. L'érythrine et l'acide lécanorique sont normalement détectés dans les parties basales et médiane, mais comme la détection UV le laisse penser, l'érythrine est en très faibles quantités dans la partie apicale.

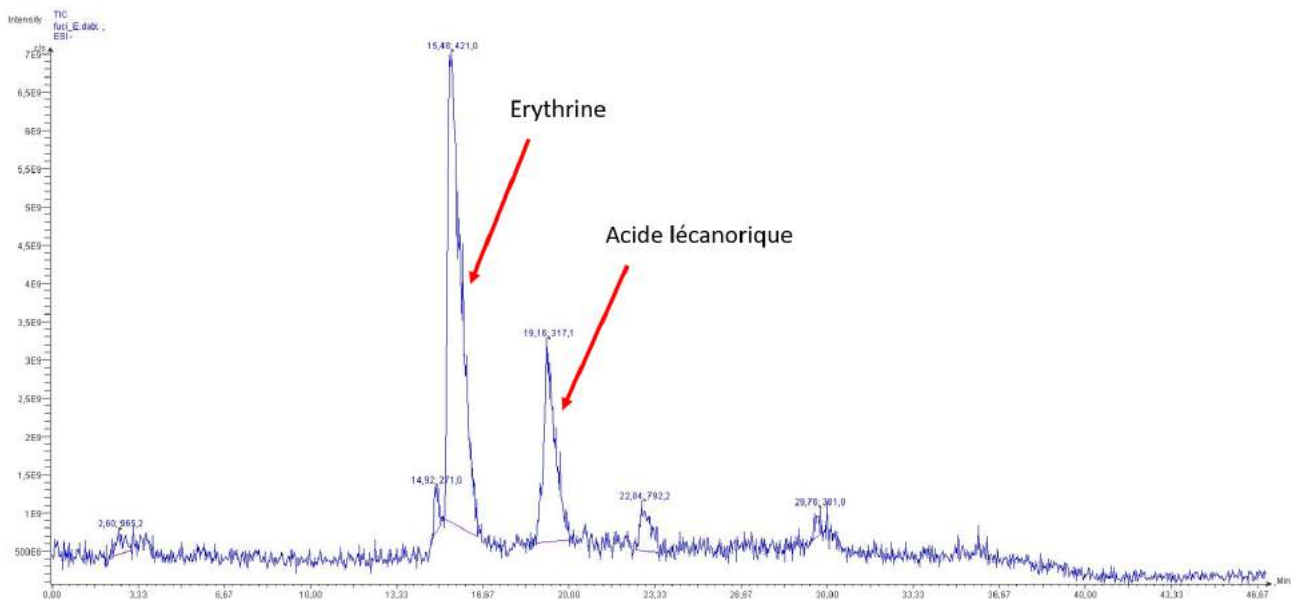


FIGURE 2.14 – Chromatogramme de masse obtenu avec le thalle complet de *R. fuciformis*.

Le chromatogramme de masse de la partie apicale est différent des deux autres (Figure 2.10).

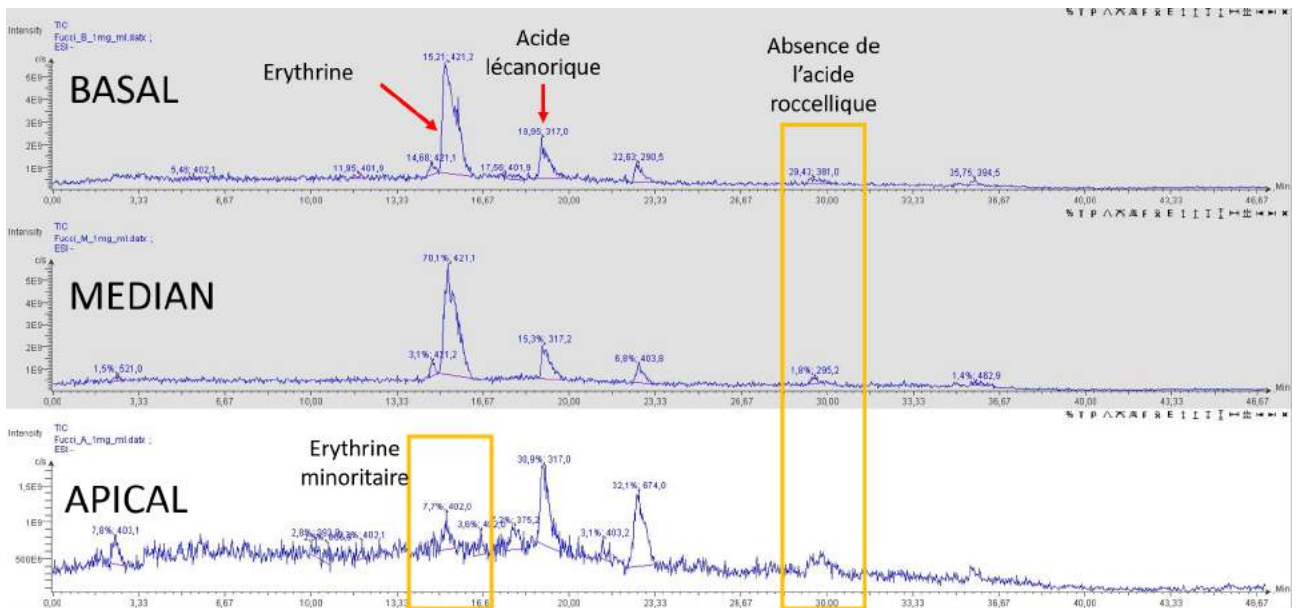


FIGURE 2.15 – Chromatogramme de masse obtenu avec les parties du thalle complet *R. fuciformis* (Fuci B, M et A).

Les intensités sont plus faibles, cela peut être dû à un problème de quantité injectée (erreur de dilution ou autre). Plusieurs pics avec des m/z sans correspondance sont présents (voir tableau 11 en Annexe)

2.3.3 *Rocella phycopsis*

Chez *Rocella phycopsis*, la détection DEDL et UV retrouve de l'érythrine dans toutes les parties du thalle, et la détection par mesure de l'absorbance retrouve l'acide lécanorique dans toutes les parties. L'acide roccellique n'est pas retrouvé dans la partie apicale (Figure 2.11)



FIGURE 2.16 – Chromatogrammes obtenus avec le thalle de *R. phycopsis* par détection UV et DEDL.

Chez *R. phycopsis* sont détectés l'érythrine, l'acide lécanorique et l'acide roccellique, ainsi qu'une substance indéterminée, qui ressort à 3,46 min (m/z = 166,9) (Figure 2.12).

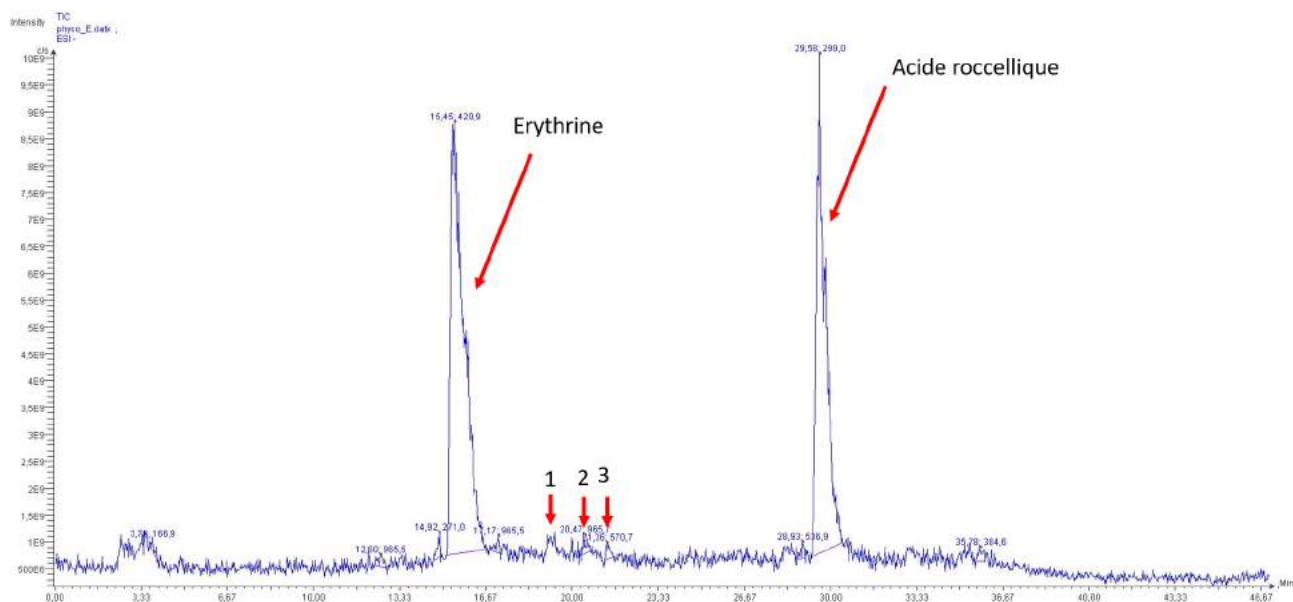


FIGURE 2.17 – Chromatogramme de masses obtenu avec le thalle de *R. phycopsis*. 1 : acide lécanorique (m/z 317,0 et 167,0 par perte d'un fragment acide orsellinique); 2 et 3 : orsellinyl-montagnétols.

Le même chromatogramme de masse présente des pics presque confondus avec le bruit, entre l'érythrine et l'acide lécanorique. Le premier à 19,3 min est celui de l'acide lécanorique (m/z 167,0). Le second et le troisième, à 20,5 min et 21,4 min correspondent au même rapport m/z de 421,0 et peuvent correspondre à des orsellinyl-montagnétols.

L'érythrine et l'acide lécanorique sont retrouvés dans toutes les parties du thalle, comme l'acide roccellique. La partie basale a un pic à 20,5 min avec un rapport m/z de 343,1 min qui ne correspond pas à un métabolite connu chez *R. phycopsis*. L'orsellinyl-montagnétol peut être présent dans la partie apicale du thalle avec un tr de 21,33 min et un rapport m/z de 421,3.(2.13). Les autres pics correspondent à des métabolites inconnus, mais les trois parties semblent comporter des molécules différentes.

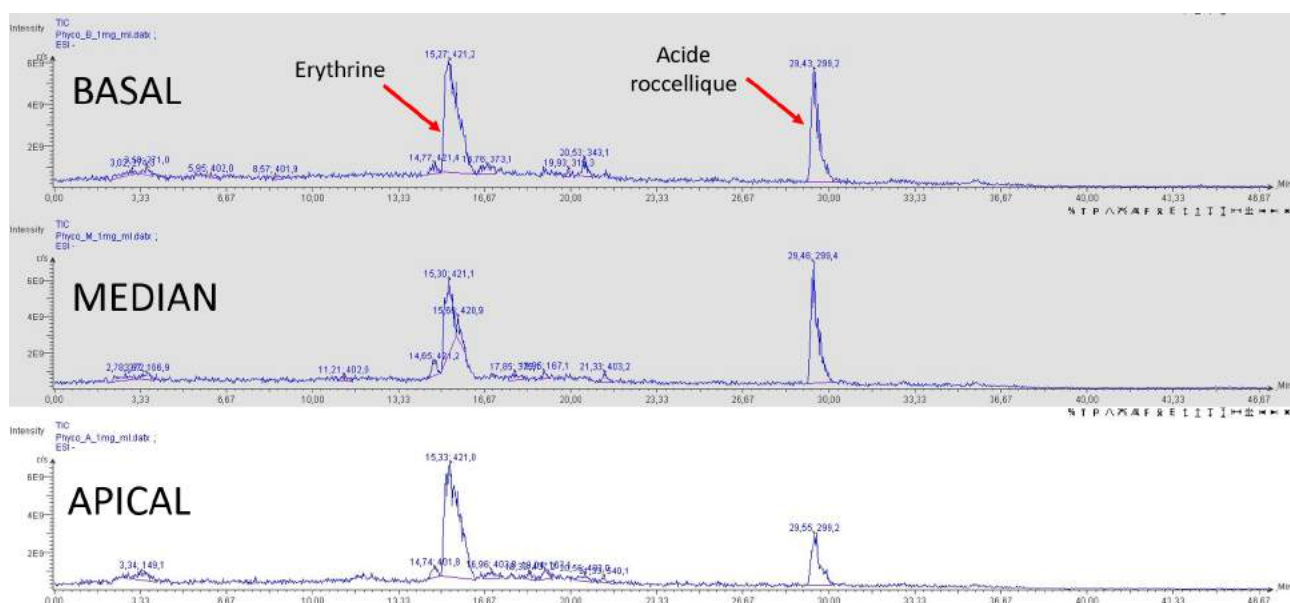


FIGURE 2.18 – Chromatogrammes de masse obtenu avec les différentes parties du thalle de *R. phyco-sis*.

Plusieurs pics ont des rapports m/z sans correspondance avec les témoins dont 1 qui sort à 3,3 min avec la valeur de 167,1 (Tableau 10 en Annexe).

2.3.4 *Rocella montagnei*

Sur Europa sont détectés deux métabolites majoritaires, l'érythrine et l'acide rocellique en détection UV et DEDL (Figure 2.14).

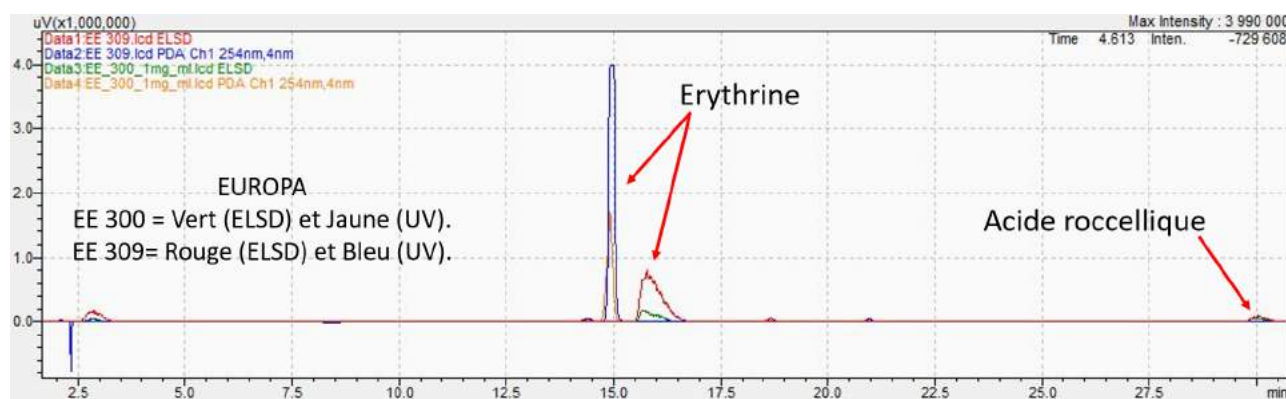


FIGURE 2.19 – Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de *R. montagnei* d'Europa en détection UV et DEDL.

En changeant d'échelle, on peut également voir un pic en absorption UV à 18,7 min qui peut correspondre à l'acide lécanorique (Figure 2.15). Enfin, à 20,1 min et 21 min sont détectés de petits pics. Les données de spectrométrie de masse permettent d'associer des valeurs de m/z à ces pics. Le

pic aux environs de 20 min a une valeur de m/z de 421,0 associée à un orsellinyl-montagnetol, il en est de même du pic à 21,0 min. Ces pics sont retrouvés pour les deux thalles d'Europa.

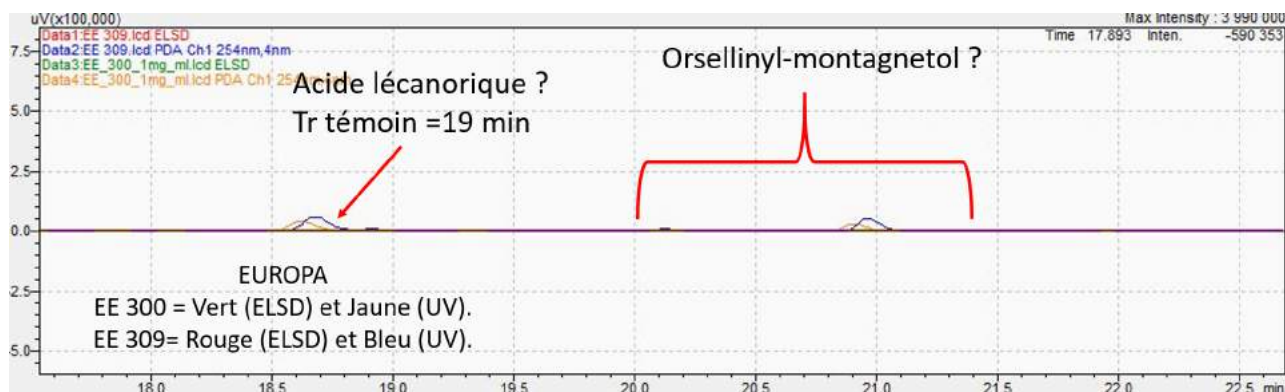


FIGURE 2.20 – Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de *R. montagnei* d'Europa en détection UV et DEDL. Agrandissement sur les pics.

Les profils en absorbance UV et DEDL sont similaires sur Glorieuse : sont détectés l'érythrine et l'acide roccellique (ce dernier n'est pas détecté chez GE486), l'acide lécanorique en moindres quantités et les mêmes pics à 20,1 et 21 min que dans les thalles d'Europa. L'acide orsellinique est détecté pour GE 486 à 5,2 min (Figure 2.15).

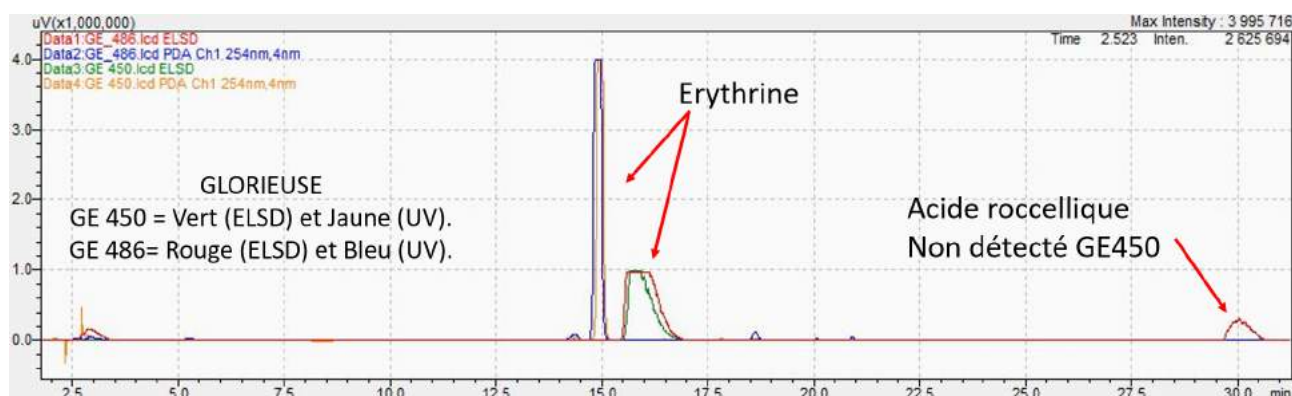


FIGURE 2.21 – Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de *R. montagnei* de Glorieuse.

Pour Juan de Nova (Figure 2.17 et Figure 2.18), en UV sont détectés l'érythrine et l'acide lécanorique dans les deux thalles, on ne détecte pas d'acide roccellique dans le thalle JdN420.

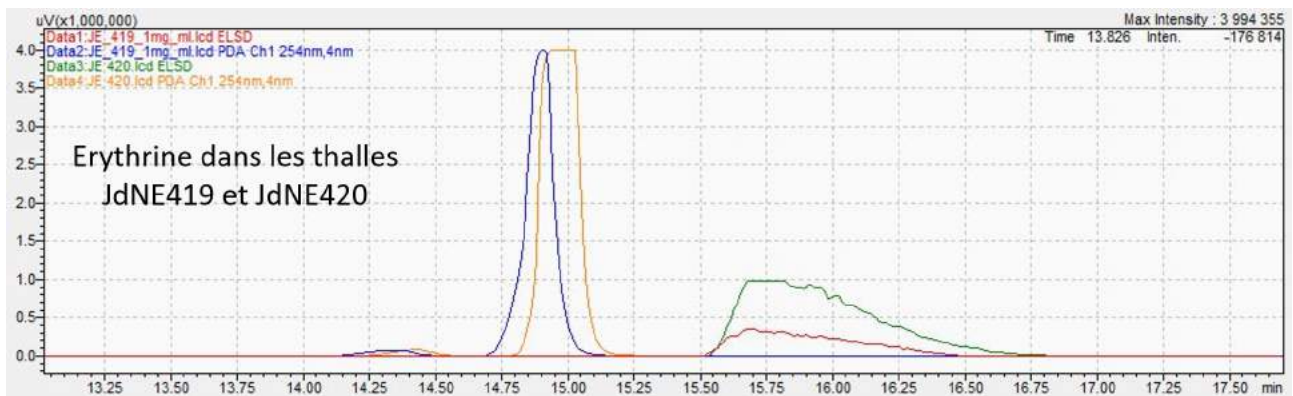


FIGURE 2.22 – Chromatogramme obtenu avec les thalles complets de *R. montagnei* de Juan de Nova en détection UV et DEDL.

Les profils obtenus en UV et en DEDL sont différents pour les parties du thalle de *R. montagnei*. En UV l'érythrine est retrouvée dans toutes les parties du thalle, mais l'acide lécanorique l'est seulement pour les parties apicales et basales et de façon plus importante dans la partie apicale que dans la partie basale. (Figure 2.18).

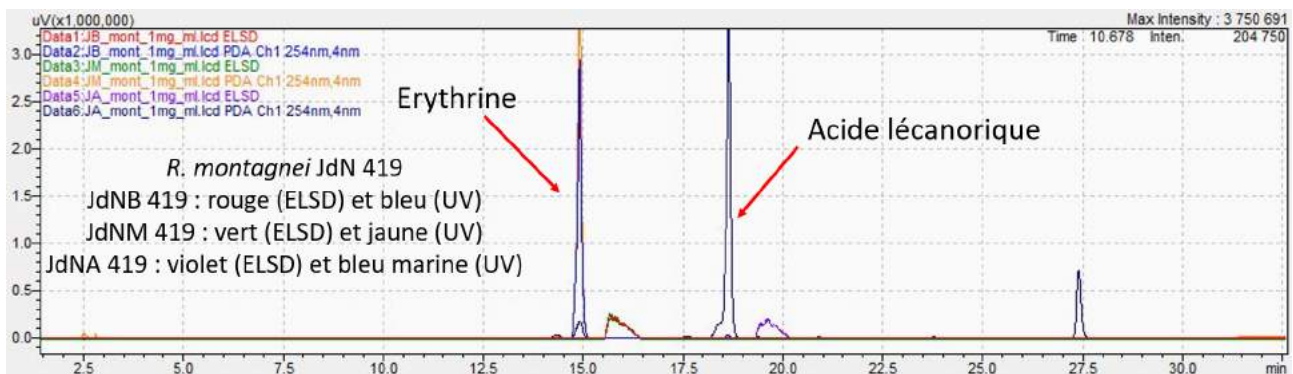


FIGURE 2.23 – Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de *R. montagnei*.

La concentration obtenue par séparation des parties du thalle permet de voir plus de composés dans les parties que dans les thalles complets. Ainsi on trouve plusieurs nouveaux pics, dont deux à 20,1 et 21,0 min pour les parties médiane et basale (Figure 2.19), pouvant correspondre aux orsellinyl-montagnetols.

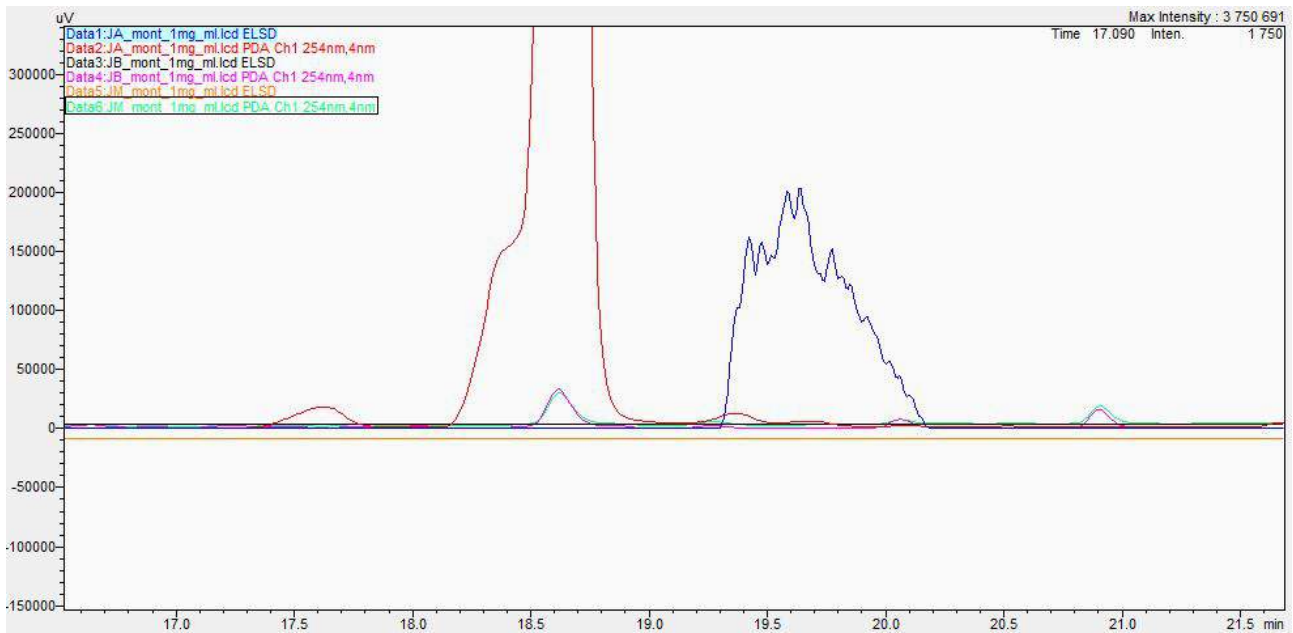


FIGURE 2.24 – Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de *R. montagnei*, agrandissement sur une portion du chromatogramme montrant les pics de faibles intensité pouvant correspondre aux orsellinyl-montagnetols.

Pour la partie apicale sont en plus détectés un pic en DEDL à 23,30 min et un pic en UV à 23,75 min (Figure 2.20). Enfin est détecté un composé en absorbance UV à 27,5 min, dans la partie apicale (Figure 2.21).

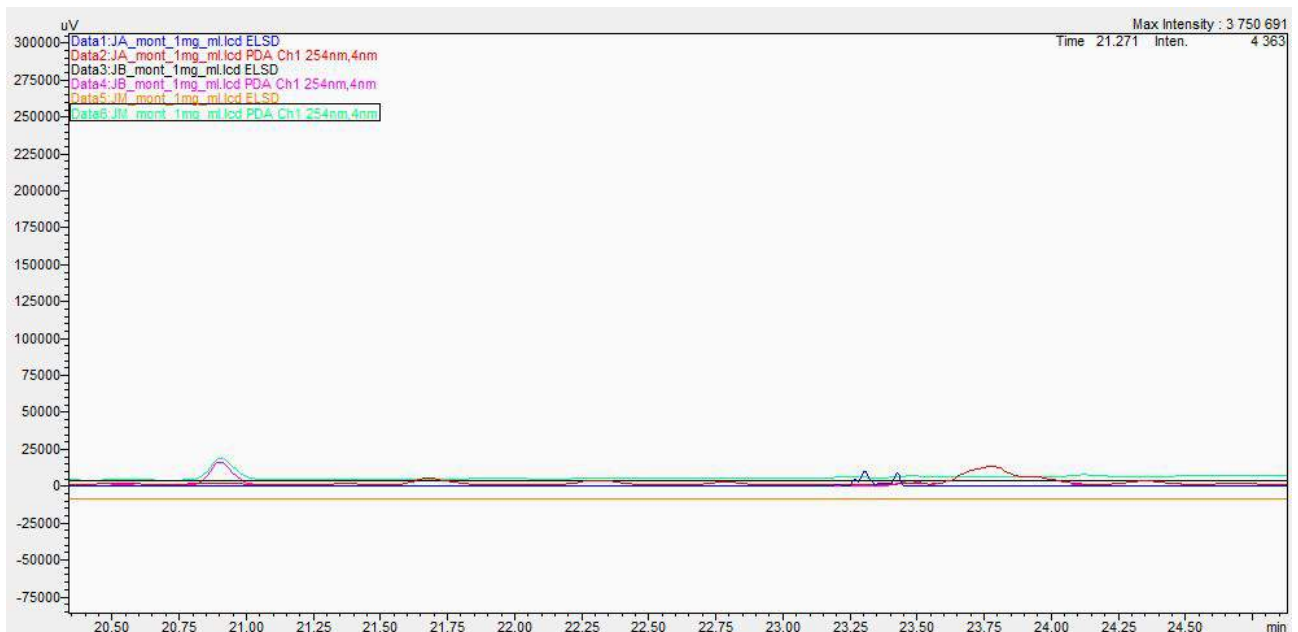


FIGURE 2.25 – Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de *R. montagnei* montrant les pic détectés à 23 min.

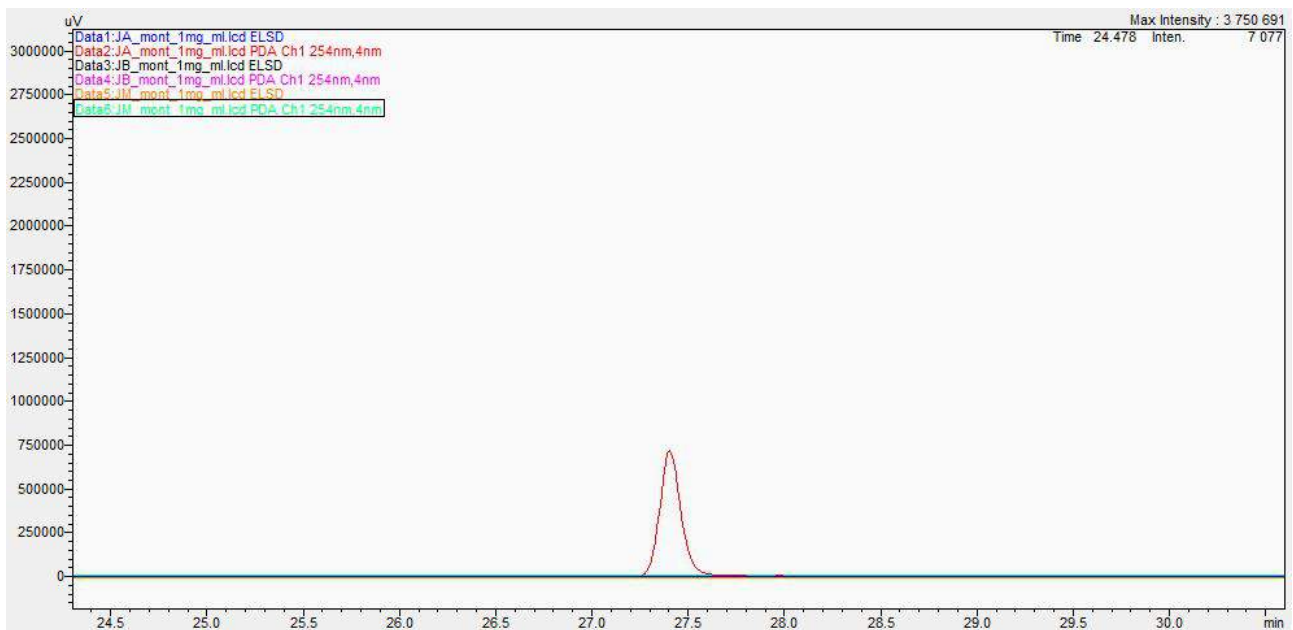


FIGURE 2.26 – Chromatogrammes obtenus avec les parties du thalle JdN419 de *R. montagnei*. Composé détecté dans la partie apicale du thalle.

En spectrométrie de masse les parties du thalle JdN419 (Figure 2.22) montrent que l'érythrine et l'acide lécanorique sont présents dans toutes les parties, alors que l'orsellinyl-montagnétol et l'acide roccellique sont absents de la partie apicale.

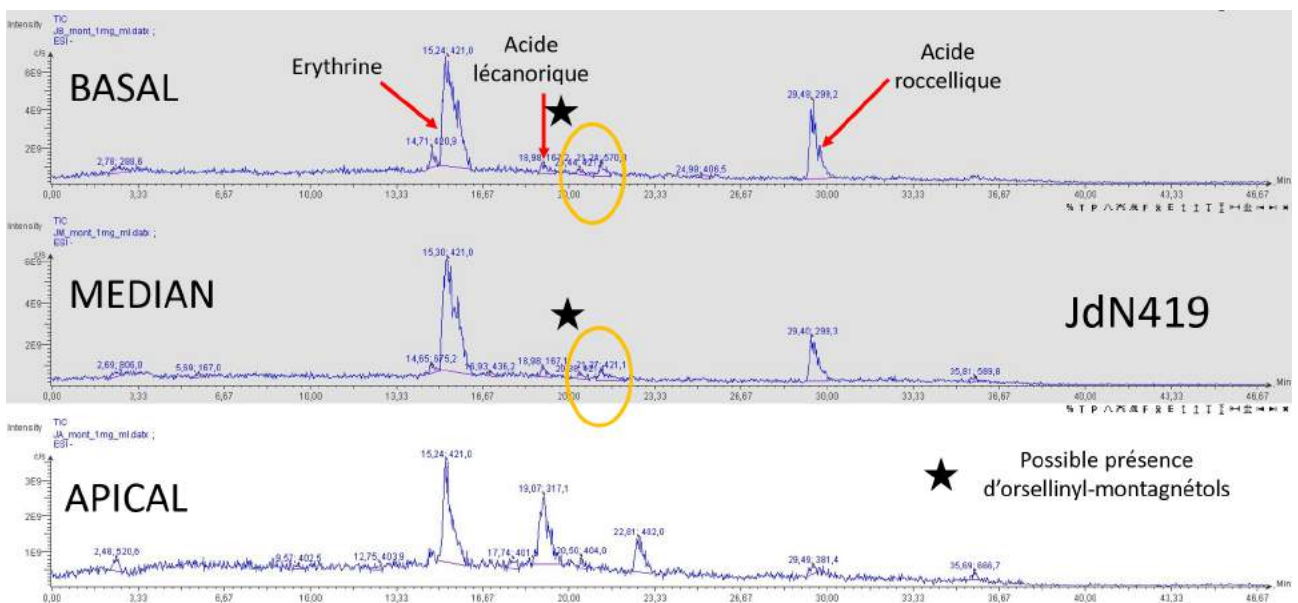


FIGURE 2.27 – Chromatogrammes de masse obtenus avec les parties du thalle JdN419 de *R. montagnei*.

La spectrométrie de masse retrouve l'érythrine, l'acide lécanorique et l'acide roccellique dans les thalles de *R. montagnei* d'Europe et Glorieuse. Le montagnétol n'est pas détecté pour l'île de Juan de Nova, que ce soit dans le thalle JdN419 ou dans JdN420, tandis qu'il l'est pour Glorieuse (dans

GE486) et Europa (EE300 et EE309), à un temps de rétention de masse de 25,7 min (Figures 2.23 et 2.24). Les thalles d'Europa ont deux pics avec pour m/z 421,0 aux tr de 20,6 min et 21,5 min pouvant correspondre aux orsellinyl-montagnétols. Ces deux derniers pics sont retrouvés également dans le thalle GE486 pour glorieuse, tandis qu'un seul est détecté dans GE450.

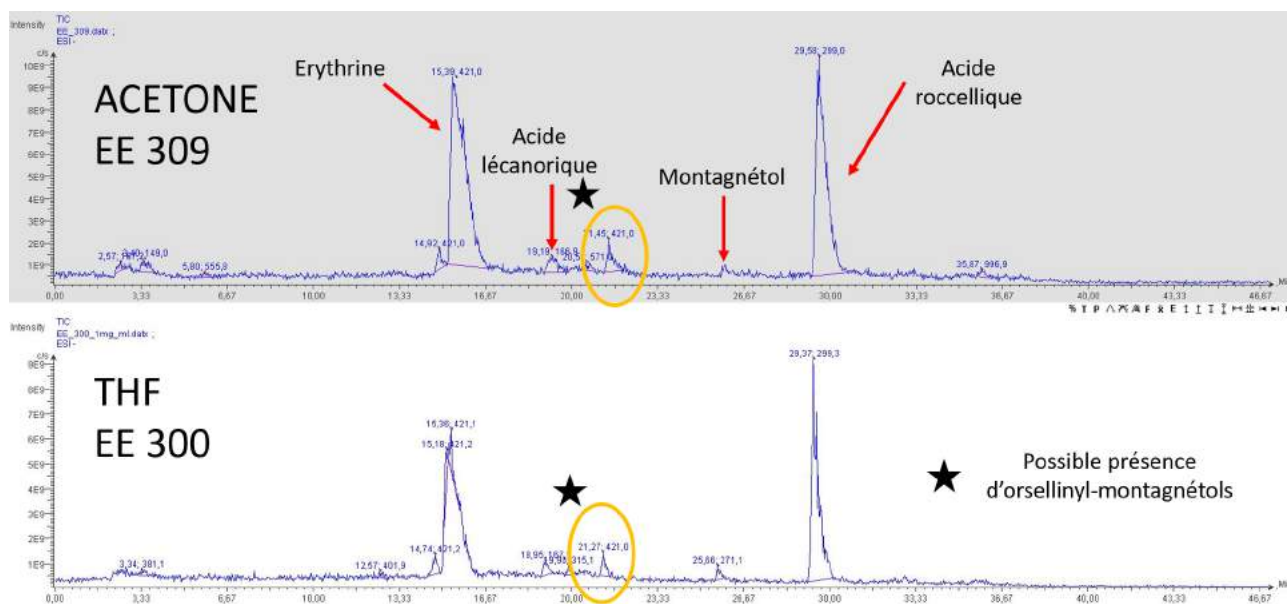


FIGURE 2.28 – Chromatogrammes de masse obtenus avec les thalles EE300 et EE309 de *R. montagnei*. Le montagnétol est détecté à 25,7 min.

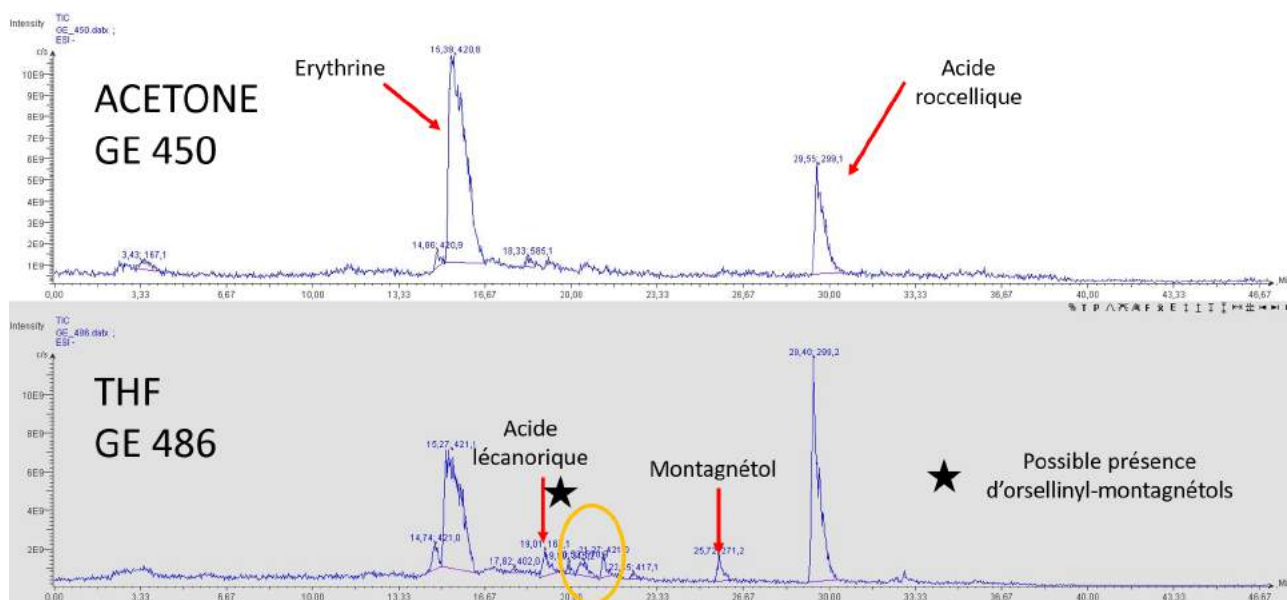


FIGURE 2.29 – Chromatogrammes de masse obtenus avec les thalles GE450 et GE486 de *R. montagnei*. Le montagnétol est détecté à 25,7 min pour le thalle GE486.

Thalle de *R. montagnei* de Sao Tomé (ST141)

Le thalle de *R. montagnei* provenant de l'île de Sao Tomé est traité à part car est détectée, que ce soit par UV, DEDL ou bien à la spectrométrie de masse, une richesse chimique plus importante que pour les thalles des îles Eparses.

En effet le spectre UV permet de voir 9 composés majoritaire et au moins 8 composés minoritaires. Le chromatogramme obtenu par diffusion de la lumière est également plus riche que ceux des autres thalles de la même espèce. Ainsi 8 pics sont détectés au DEDL, dont 4 n'ont pas de lien avec les pics UV détectés, ce qui pousse le total de composés majoritaires du thalle à 13 (Figure 2.25).

On détecte via ces chromatogrammes, l'acide orsellinique, l'érythrine, l'acide lécanorique et l'acide roccellique. Entre l'érythrine et l'acide roccellique, les pics aux tr de 20,1 et 21,0 min font penser aux orsellinyl-montagnétols. Le pic à 21,0 min présente une intensité importante et le pic DEDL à environ +1 min pourrait lui correspondre. Un composé est détecté en UV à 24,5 min avec un pic en DEDL à environ +1 min. Par comparaison avec le temps de rétention de masse du montagnétol (tr de masse de 25,6 min), on peut supposer que le pic en UV à 24,5 min correspond au montagnétol. Si ce pic correspond bien à ce composé, la différence avec les autres thalles de *R. montagnei* en termes de concentration, est très importante.

Entre le pic de l'orsellinyl-montagnétol à 21,0 min et celui du composé inconnu à 24,5 min se trouve un pic DEDL, sans absorbance en UV associée, à 23,75 min.

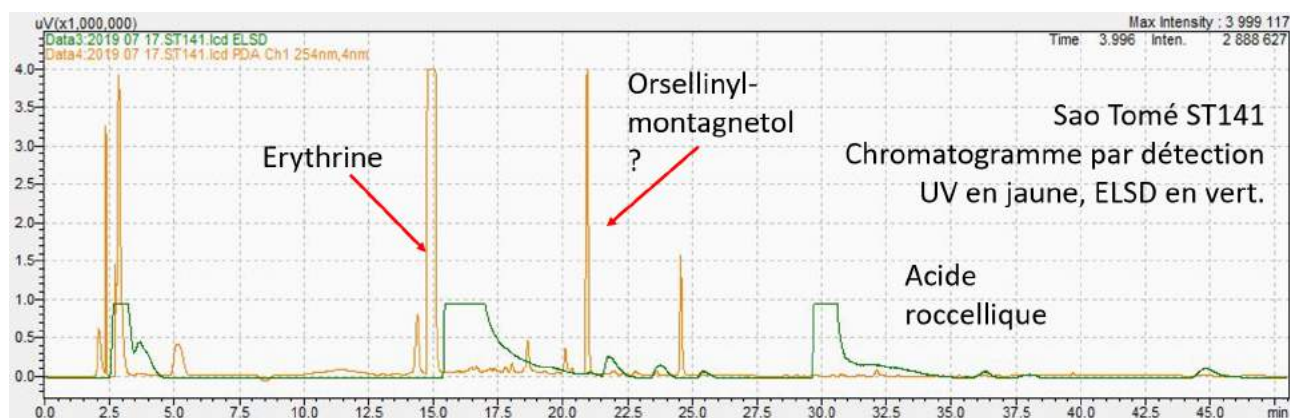


FIGURE 2.30 – Chromatogrammes UV et DEDL obtenus avec le thalle ST141 de *R. montagnei* provenant de Sao Tomé.

Le spectre de masse est également riche, présente au moins 14 pics. On y retrouve avec des correspondance en UV l'acide orsellinique, l'érythrine, l'acide lécanorique, un m/z de 421,0 à 21,5 min pouvant correspondre à l'orsellinyl-montagnétol, le montagnétol avec un rapport m/z de 271,2, ainsi que plusieurs pics dont les rapports m/z n'ont pas de correspondance avec les témoins ou la base de données du laboratoire (Figure 2.26).

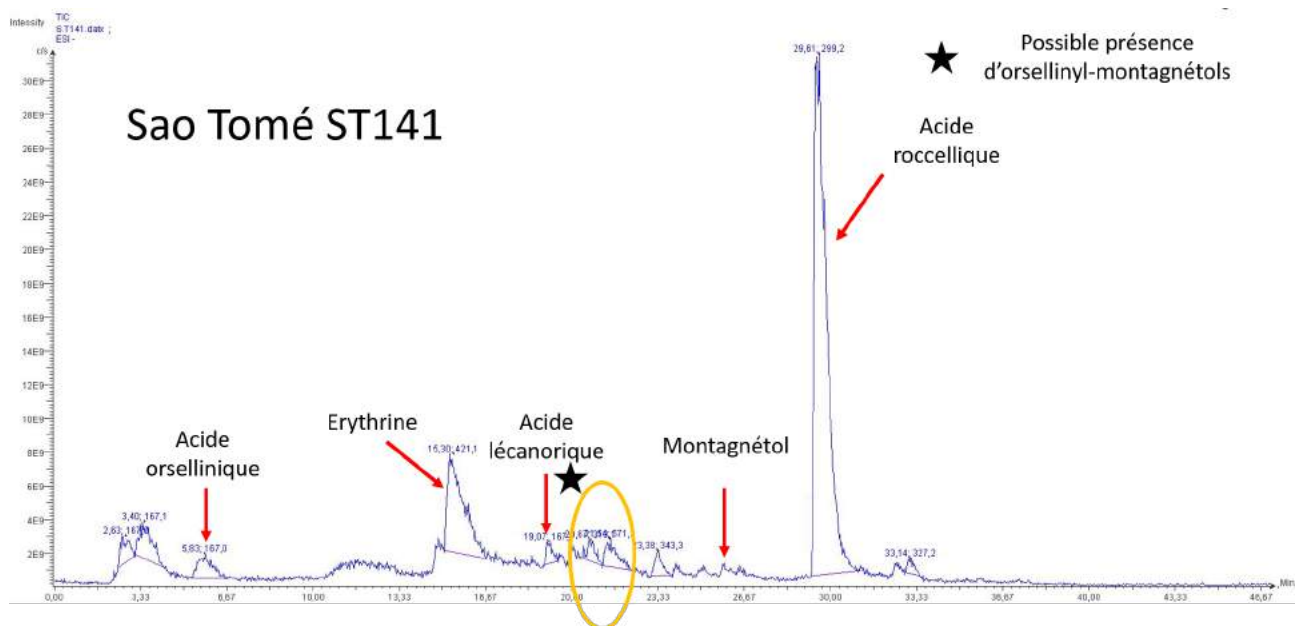


FIGURE 2.31 – Chromatogramme de masses obtenu avec le thalle ST141 de *R. montagnei* provenant de Sao Tomé.

2.3.5 *Rocella applanata*

Le profil UV de *R. applanata* présente 8 pics (Figure 2.27). Le profil DEDL en présente 2, que l'on peut relier aux composés déjà détectés par UV. On note l'absence d'acide roccellique, ce qui est habituel chez cette espèce (inclure réf). Sont présents l'acide orsellinique avec un tr d'environ 5 min, l'érythrine à 15 min, l'acide lécanorique à 18,5 min et les pics pouvant correspondre aux orsellinyl-montagnétols aux tr 20,1 et 21,0 min (Figures 2.28 et 2.29).

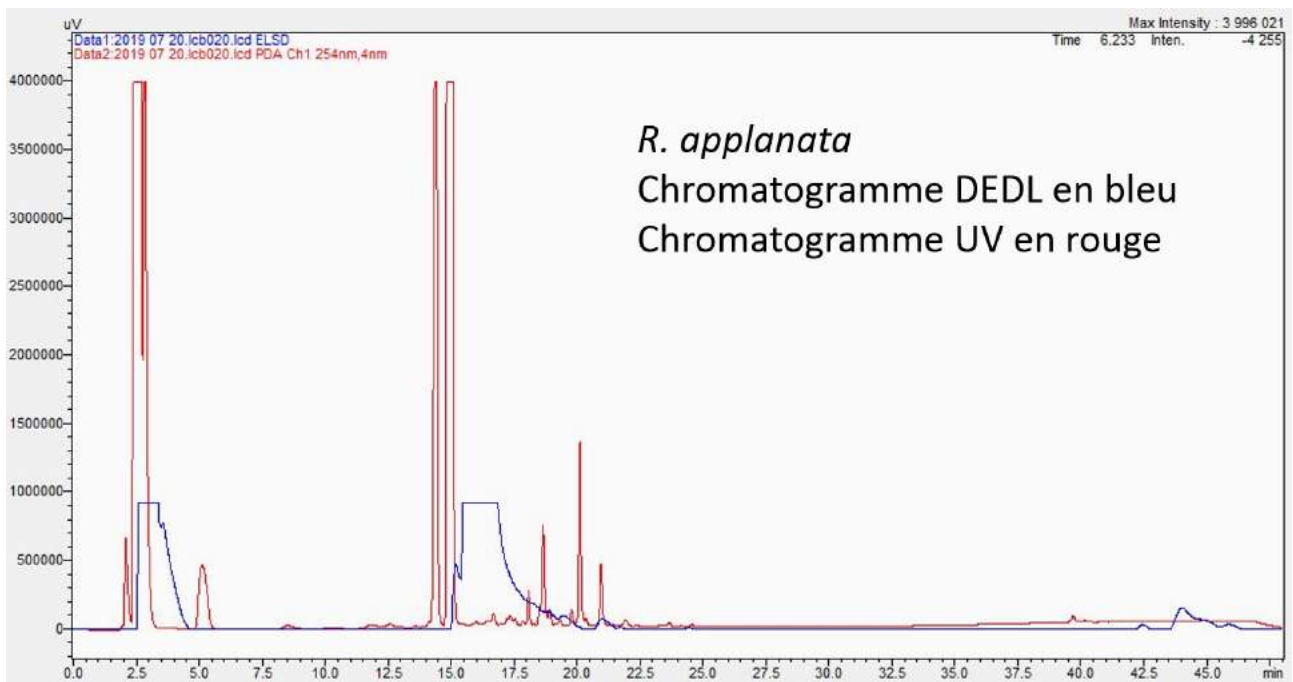


FIGURE 2.32 – Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de *R. applanata* en détection UV et DEDL.

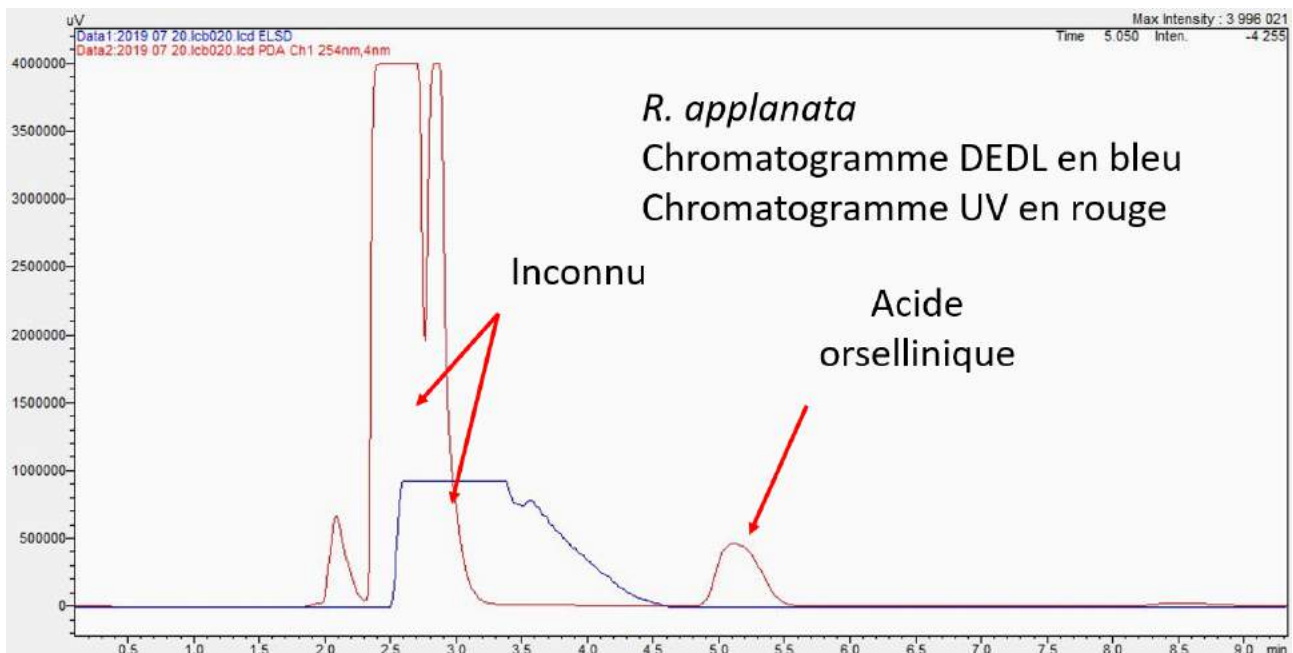


FIGURE 2.33 – Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de *R. applanata* en détection UV et DEDL. Acide orsellinique élué rapidement.

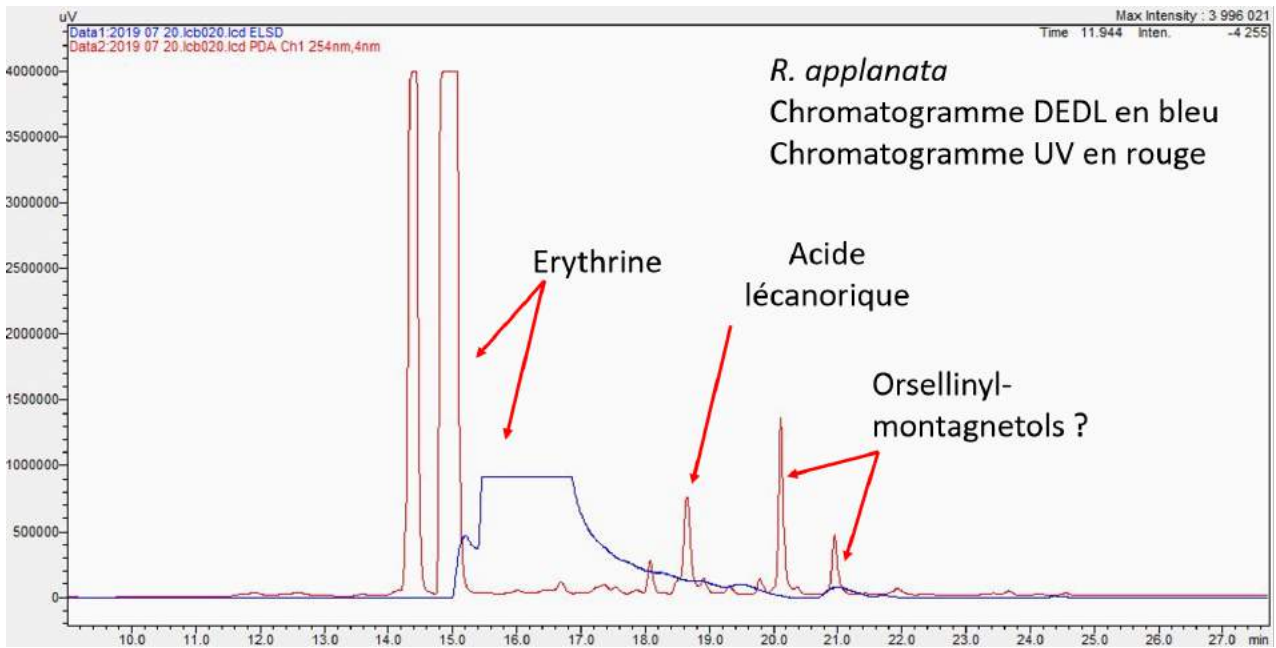


FIGURE 2.34 – Chromatogramme obtenu avec le thalle complet de *R. applanata* en détection UV et DEDL. Les pics correspondant à l'acide lécanorique et aux orsellinyl-montagnétols sont peu intenses comparés à celui de l'érythrine.

La spectrométrie de masse permet de retrouver l'acide orsellinique en début d'éluion, suivi de l'érythrine, et l'acide lécanorique (Figure 2.17). Des pics n'ont pas de correspondance avec les témoins :

- 22,40 min avec un rapport m/z 397.
- 23,90 min avec un rapport m/z 411.3.
- 25,60 min avec un rapport m/z 425.3.
- 26,90 min avec un rapport m/z 439.1.

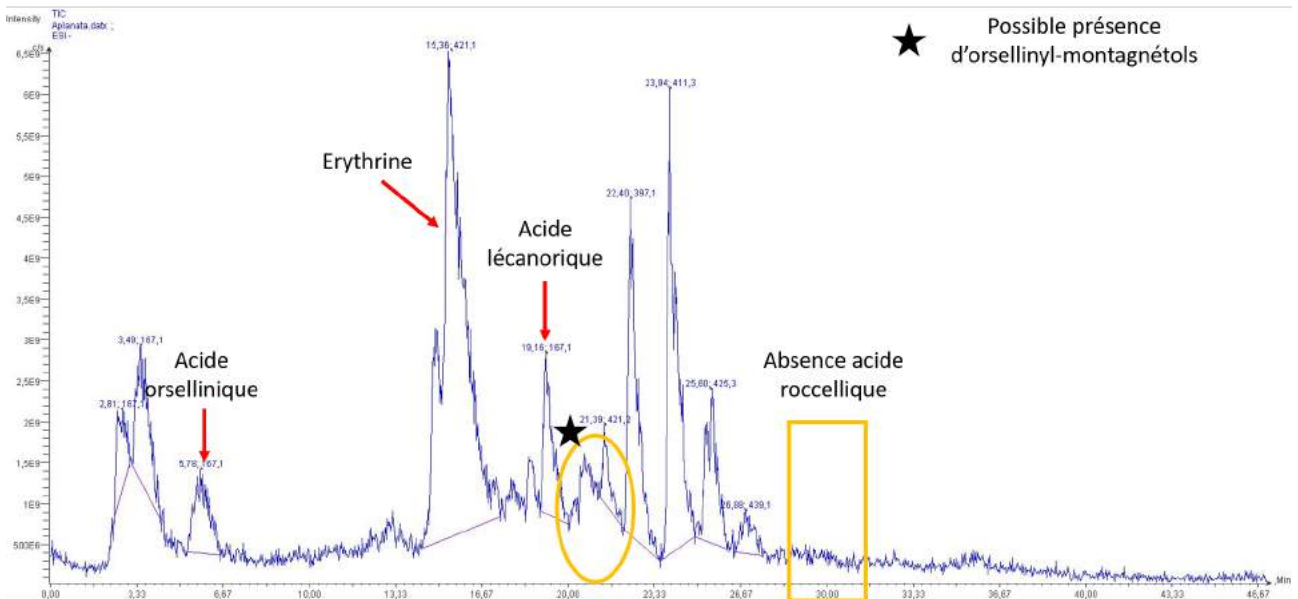


FIGURE 2.35 – Chromatogramme de masse obtenu avec le thalle complet de *R. applanata*.

Chapitre 3

Discussion

3.1 Solvants utilisés

L'extraction à l'aide d'acétone permet de réunir des composés dans une large gamme de polarités et se prête donc bien au profilage chimique car est peu sélective. Lorsqu'il n'a pas été possible de reprendre les premiers échantillons à l'aide d'acétone, le tétrahydrofurane a été utilisé. Dans le but de comparer les profils chimiques de différentes espèces ou de différents thalles au sein d'une même espèce, il a donc été introduit un biais. La différence décelée n'est alors pas obligatoirement une différence de composition chimique. Le tétrahydrofurane peut être responsable de l'oxydation de composés lichéniques non saturés, avec une possible perte des capacités d'absorption de la lumière UV par exemple.

3.2 Méthode analytique

Dans tout ce travail, la standardisation a été un problème, notamment pour la lecture des chromatogrammes de masse. Le choix du seuil au-delà duquel un signal est considéré comme pic est arbitraire, se fait par la lecture comparative des différents spectres, et donc ne découle pas d'une démarche prenant en compte les caractéristiques techniques de l'appareil. La chromatographie sur couche mince en conditions standardisées a montré sa capacité à différencier les profils des différentes espèces, mais n'a pas été suffisamment performante pour déceler des différences entre les lichens d'une même espèce. En effet, les profils CCM des différents spécimens de *Roccella montagnei* bien que différents, ne permettent pas de conclure à une différence réelle. Certains de ces extraits ont été repris dans le tétrahydrofurane, pouvant induire un traitement chimique différentiel avec les extraits repris dans l'acétone.

Il apparaît difficile et peu utile d'améliorer les performances de la CCM. En effet, la concentration utilisée pour les dépôts est déjà grande (5mg/mL), la solubilisation n'étant pas facile au-delà. De

plus l'étude de l'extrait brut se heurte aux différences de concentration en métabolites des différentes parties de thalle ou des différentes couches de cellules composant le lichen. L'amélioration des performances passe donc par une multiplication des manipulations avec une consommation plus importante du lichen.

La chromatographie liquide haute performance permet la détection d'un nombre plus important de métabolites que la chromatographie sur couche mince, lorsqu'elle est couplée aux deux méthodes de détection. Selon les cas, la détection UV et DEDL différencie ou non les parties de thalle.

Certains métabolites sont détectés par spectrométrie de masse sans être détectés par la mesure de l'absorbance des rayonnements UV, et pourtant possèdent des groupements permettant cette interaction avec les rayons lumineux. Afin de pallier aux différences de sensibilités des appareils, il faudrait augmenter la concentration des solutions d'extraits bruts, afin de détecter un maximum de métabolites en UV. Le risque est de moins bien détecter les métabolites minoritaires par spectrométrie de masse, leur signal devenant relativement plus faible.

Chapitre 4

Conclusion

Durant ce stage ont été comparé par différentes méthodes séparatives, les profils chimiques de plusieurs espèces de *Roccella*, ainsi que de plusieurs spécimens de l'espèce *Roccella montagnei*.

Le tableau suivant récapitule les informations récoltées sur les différentes espèces avec les différentes méthodes d'analyse. Il ne tient donc pas compte des différences entre thalles d'une même espèce ni entre les thalles d'une même île et moins encore des différences de sensibilités des différentes méthodes d'analyse. De plus ne sont pas inclus les témoins non retrouvés dans les thalles ou les composés retrouvés dans le genre *Roccella* mais non disponibles sous forme de témoin.

Néanmoins on peut déjà relever une anomalie, comme l'absence d'acide roccelique chez *R. fuciformis*. La présence d'orsellinyl-montagnétols chez *R. phycopsis* et *R. applanata*, en absence de montagnétol peut s'expliquer de plusieurs façons.

Les thalles de *Roccella montagnei* ne présentent pas de différence significative selon le lieu de récolte pour les Îles Eparses. En effet, même si une différence est visible sur les profils CCM voire même sur les profils UV/DEDL ou de spectrométrie de masse, les différences de traitement des échantillons (tétrahydrofurane ou acétone) et l'étude de seulement deux thalles, ne permettent pas de conclure. Ainsi même si l'on ne retrouve pas de montagnétol dans les thalles de l'île de Juan de Nova, cela ne signifie pas pour autant qu'aucun thalle de cette île n'en possède. Le thalle issu de l'île de Sao Tomé paraît quand même être très différent. Une étude avec 3 thalles de chaque île et sans introduction de biais devrait permettre de conclure statistiquement.

La différence entre les espèces semble être présente, encore qu'il faille le confirmer avec la réalisa-

TABLE 4.1 – Tableau récapitulatif la présence (vert) ou l'absence (rouge) des composés détectés.

	<i>R. montagnei</i>	<i>R. applanata</i>	<i>R. fuciformis</i>	<i>R. phycopsis</i>
Acide orsellinique	vert	vert	vert	vert
Acide lécanorique	vert	vert	vert	vert
Erythrine	vert	vert	vert	vert
Montagnétol	vert	rouge	rouge	rouge
Orsellinyl-montagnétols	vert	vert	rouge	vert
Acide roccelique	vert	rouge	rouge	vert

tion de triplicats.

L'utilisation de techniques avancées telles que l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse ont permis de détecter des métabolites discriminant et de différencier les profils de parties de lichen là où la CCM ne fait pas forcément la distinction. Cela est essentiellement attribuable à une différence de sensibilité.

Ces analyses ponctuelles ne permettent pas de faire l'analyse statistique de vraisemblance des différents profils chimiques. Une analyse avec triplicats permettrait d'y remédier.

Durant ce stage, j'ai compris le besoin de s'organiser et la nécessité de faire appel aux différents membres du laboratoire pour évoluer dans un projet. Ce sont également mes premières manipulations, et bien que simples, je suis content d'avoir enfin mis la main dans le gant. Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur pédagogie et la grande patience dont ils ont su faire preuve. Je mesure la chance que j'ai eu de commencer la recherche en laboratoire avec cette équipe et tâcherai de ne pas oublier les clés qui m'ont été données.

Bibliographie

Armaleo, D., X. Sun, and C. Culberson

2011. Insights from the first putative biosynthetic gene cluster for a lichen depside and depsidone. *Mycologia*, 103(4) :741–754.

Awasthi, D. D.

1981. The Typification of *Roccella montagnei*. *The Bryologist*, 84(2) :216.

Cardinale, M., A. M. Puglia, and M. Grube

2006. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities : Lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(3) :484–495.

Elix, J., U. Jenie, and J. Parker

1987. A Novel Synthesis of the Lichen Depsidones Divaronic Acid and Stenosporonic Acid, and the Biosynthetic Implications. *Australian Journal of Chemistry*, 40(8) :1451.

Elix, J. A.

2014. *A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances.*, third edition. Canberra : Published by the author.

Gavériaux, J.-P.

. *Roccella phycopsis* - Fiche descriptive.

Gavériaux, J.-P.

. *Roccella fuciformis*.

Honegger, R.

1993. Developmental biology of lichens. *New Phytologist*, 125(4) :659–677.

Knop, W.

1844. Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten. *Journal für Praktische Chemie*, 31(1) :196–208.

Roux, C. and Coll.

2017. *Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France Métropolitaine. 2ème édition revue et augmentée (2017).*, volume 1. Association Française de Lichénologie (A.F.L.), Fontainebleau.

Seshadri, T. R.

1944. A theory of biogenesis of lichen depsides and depsidones. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 20(1) :1–14.

Tehler, A., Å. Dahlkild, P. Eldenäs, and G. B. Feige

. The phylogeny and taxonomy of Macaronesian, European and Mediterranean *Roccella* (Roccellaceae, Arthoniales). *Symb. Bot. Ups.*, P. 25.

Tehler, A. and M. Irestedt

2007. Parallel evolution of lichen growth forms in the family Roccellaceae (Arthoniales, Ascomycota). *Cladistics*, 23(5) :432–454.

Tehler, A., M. Irestedt, M. Wedin, and D. Ertz

2010. The Old World *Roccella* species outside Europe and Macaronesia : taxonomy, evolution and phylogeny. *Systematics and Biodiversity*, 8(2) :223–246.

Tableaux et figures

Figures

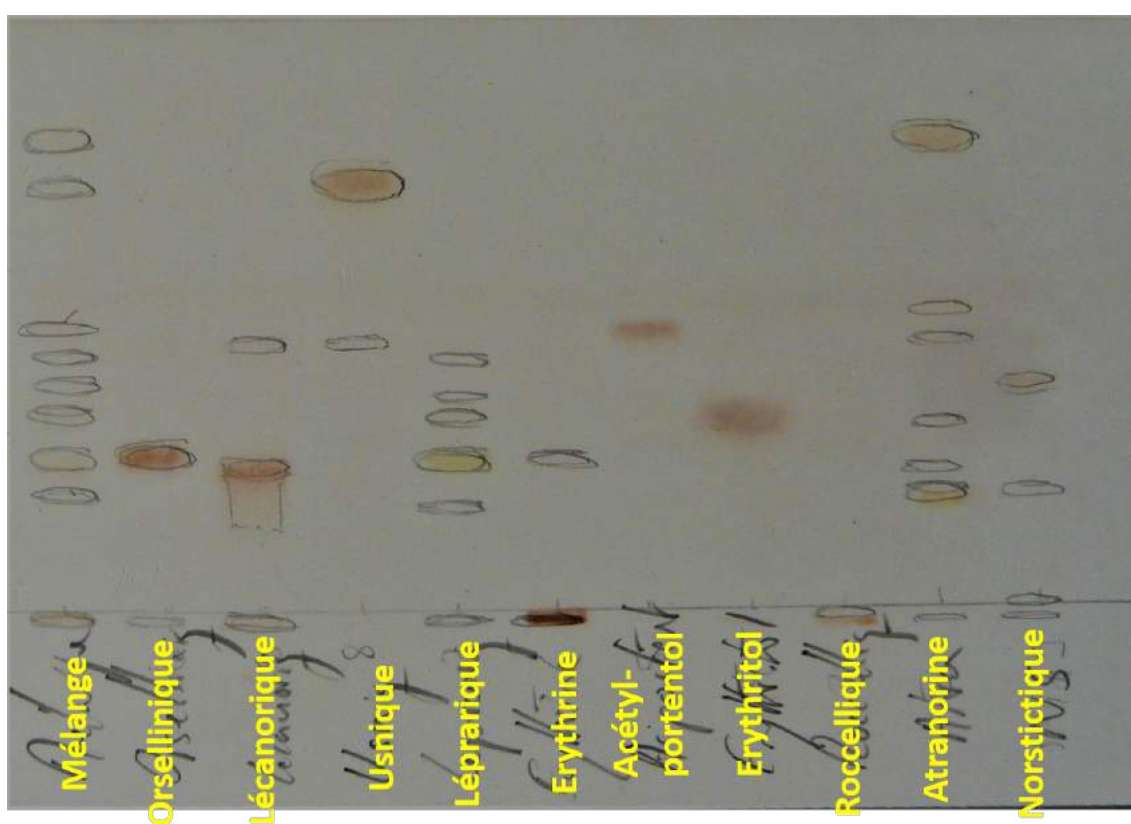


FIGURE 1 – Migration des témoins et de l’atranorine. L’atranorine sert de référence pour le calcul des rapports frontaux.

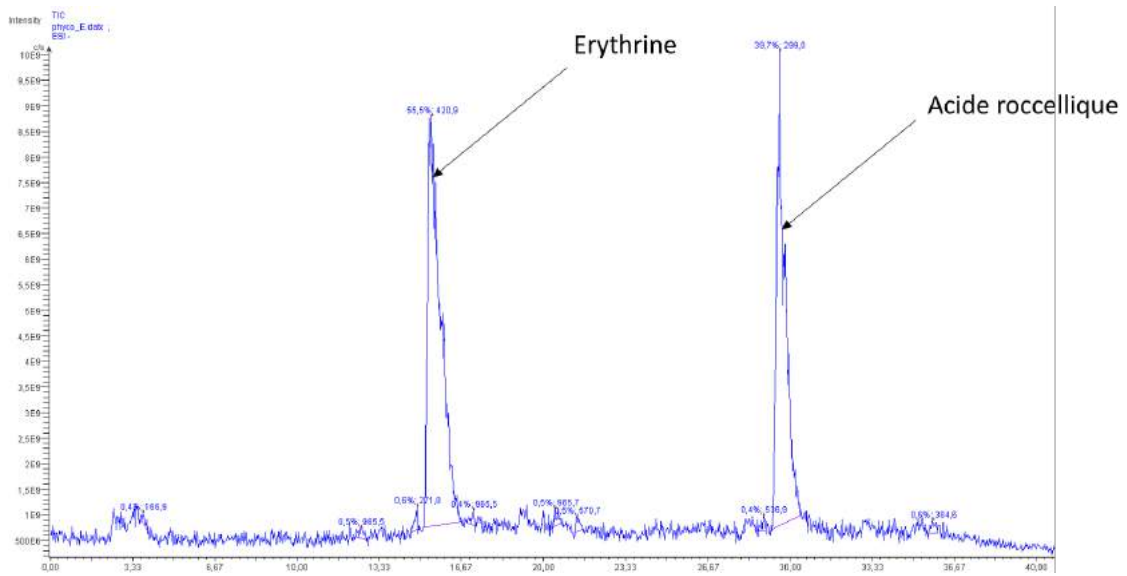


FIGURE 2 – Chromatogrammes de masses de *Rocella phycopsis*.

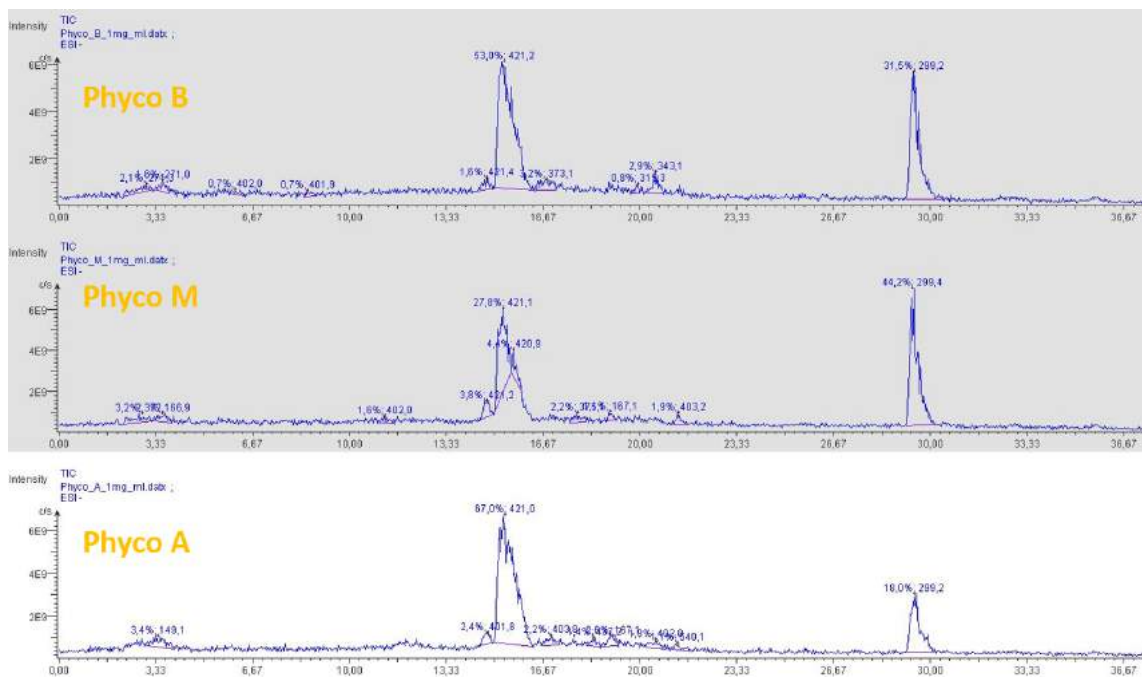


FIGURE 3 – Chromatogrammes de masses des parties basale, médiane et apicale de *Rocella phycopsis*.

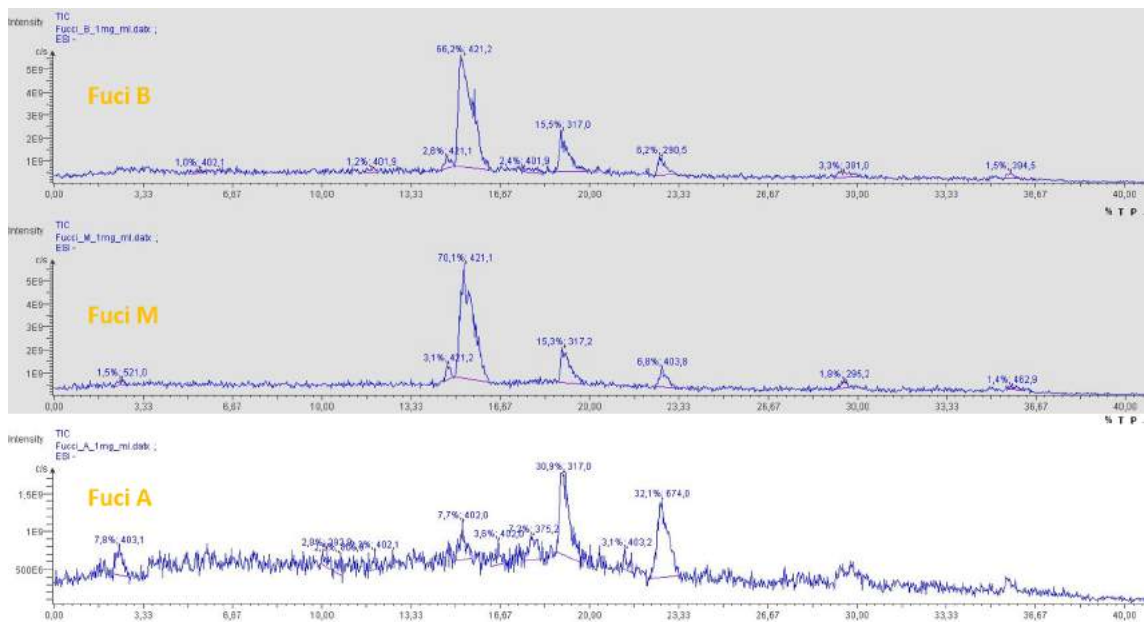


FIGURE 4 – Chromatogrammes de masses des différentes parties du thalle de *Rocella fuciformis*.

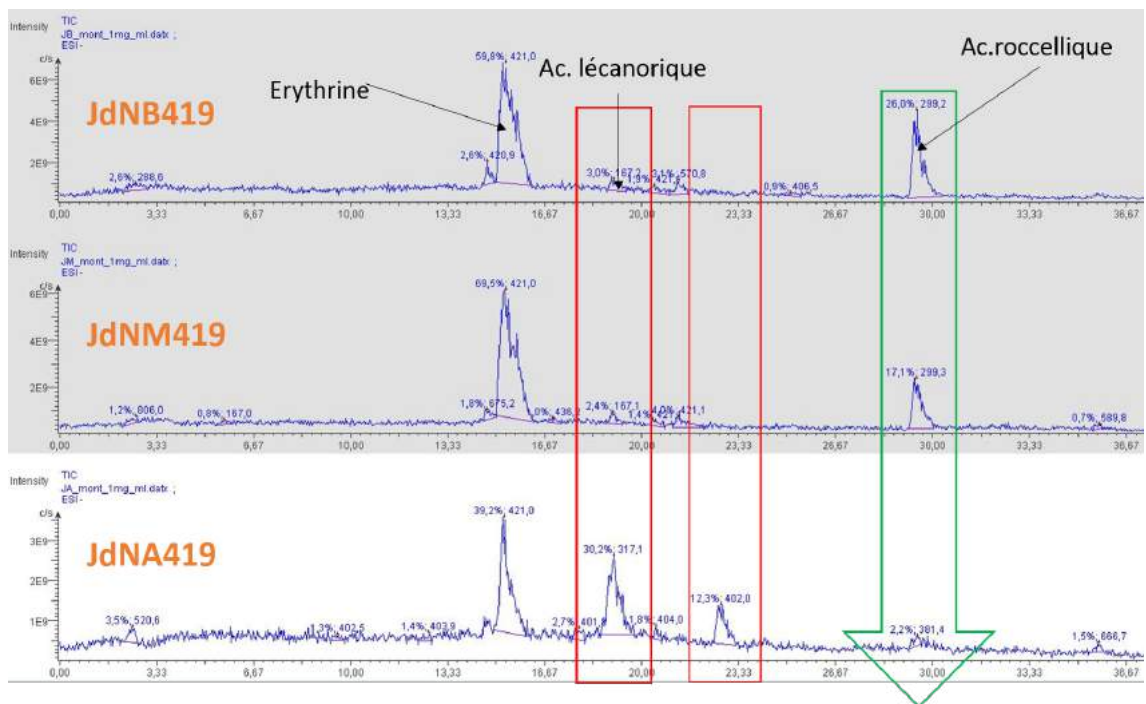


FIGURE 5 – Chromatogrammes de masses des parties basale, médiane et apicale du thalle JdN419 (*Rocella montagnei*).

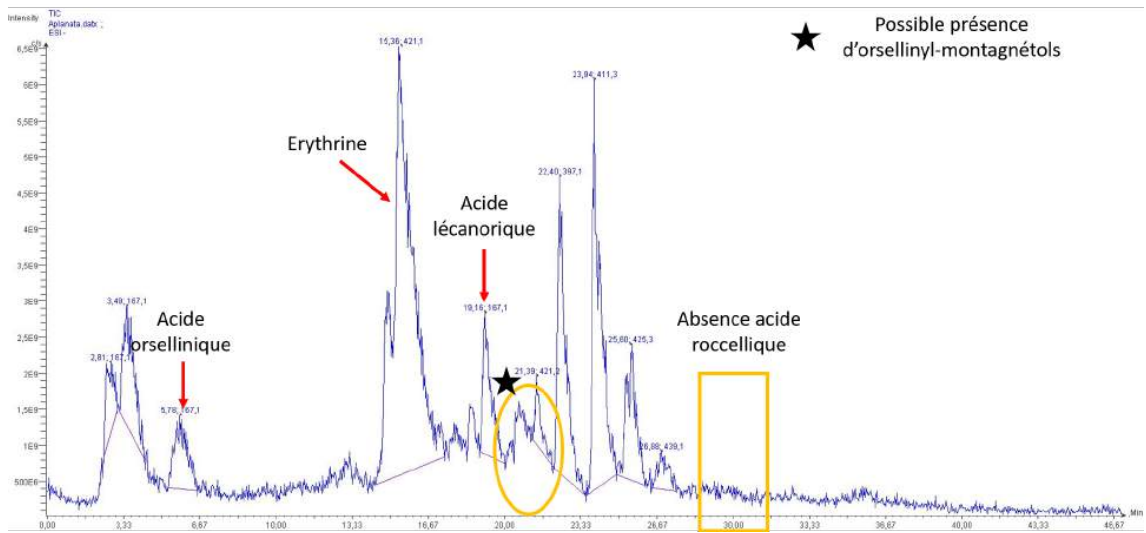


FIGURE 6 – Chromatogramme de masses de *Rocella applanata*.

Tableaux

TABLE 2 – Localisation, récolteur, support, référence du récolteur, code attribué.

Espèce	Localisation	Récolteur	Support	Référence	Code
<i>R. montagnei</i> Bél.	Europa 37K 639431 7526507	Rémy PONCET	<i>Suriana maritima</i> L.	300	E300
	Europa 37K 637225 7527286		<i>Suriana maritima</i> L.	309	E309
	Glorieuse 38L 749666 8718798		<i>Casuarina equisetifolia</i> L.	450	G450
	Glorieuse 38L750752 8719798		<i>Casuarina equisetifolia</i> L.	486	G486
	Juan de Nova 38K 257467 8113584		<i>Suriana maritima</i> L.	419	JdN419
	Juan de Nova 38K 257490 8113609		<i>Suriana maritima</i> L.	420	JdN420
	Sao Tomé 0°19'33,13" N 6°30'29,16" E		Phorophyte non identifié	141	ST141
	<i>R. fuciformis</i>		Ploumanac'h (Côtes d'Armor)	Joël BOUSTIE et Martin GRUBE	
<i>R. phycopsis</i>	Place des Chevrets, Saint Malo (Ille et Vilaine)	Joël BOUSTIE		JB/05/72	Phyco
<i>R. applanata</i>	Europa	Rémy PONCET	<i>Guetarda speciosa</i> L.	Europa 20190410-6	E100

TABLE 3 – Référence attribuée à chaque échantillon, masse de l'échantillon puis de l'extrait, taux d'extraction. Ex : pour le thalle JdN419, il y a étude du thalle complet (JdNE419), de sa partie basale (JdNB419), médiane (JdNM419) et apicale (JdNA419).

Code thalle	Echantillon et référence attribuée	Masse de l'échantillon avant extraction	Masse de l'extrait (mg)	Taux d'extraction(%)
E300	Entier : EE300	137,6	21,7	15,8
E309	Entier : EE309	128,1	21,1	16,5
G450	Entier : GE450	144,7	37,9	26,2
G486	Entier : GE486	90,4	16,0	17,7
JdN419	Entier : JdNE419	164,7	25,8	15,7
	Basal : JdNB419	92,5	27,4	29,6
	Médian : JdNM419	105,1	11,8	12,2
	Apical : JdNA419	72,6	8,1	11,2
JdN420	Entier : JdNE420	247,3	20,7	8,4
ST141	Entier : STE141	156,8	30,4	19,4
Fuci	Entier : Fuci E	765,2	57,0	7,4
	Basal : Fuci B	83,5	7,8	9,3
	Médian : Fuci M	454,6	62,3	13,7
	Apical : Fuci A	193,6	23,8	12,3
Phyco	Entier : Phyco E	566,3	32,7	5,8
	Basal : Phyco B	167,2	16,6	9,9
	Médian : Phyco M	181,5	25,3	13,9
	APical : Phyco A	249,5	36,3	15,5
E100	Entier : EE100	174,6	26,0	14,9

TABLE 4 – Témoins utilisés pour les analyses. La famille chimique et la structure sont données, le mode de révélation, et les espèces chez qui il est possible de les trouver.

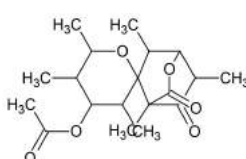
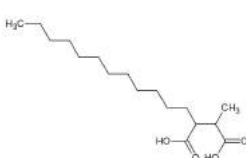
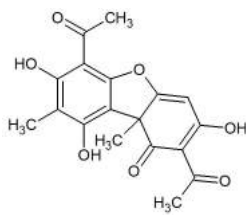
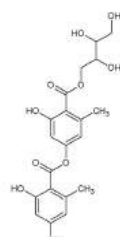
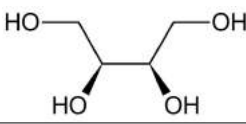
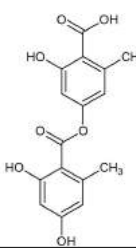
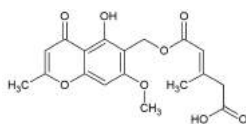
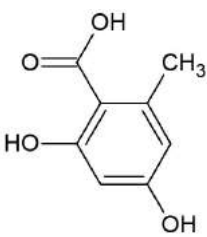
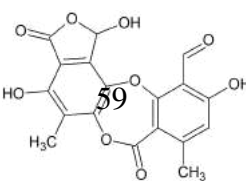
Témoïn	Famille chimique	Structure	Révélation	Espèce(s) concernée(s)
Acétyl-portentol	Autres		ANS	<i>R.fuciformis</i>
Acide roccellique	Acide aliphatique		ANS	<i>R.fuciformis</i> <i>R.phycopsis</i>
Acide usnique	Dibenzofurane		UV	<i>R.montagnei</i>
Erythrine	Didepside		UV	<i>R.fuciformis</i> <i>R.phycopsis</i> <i>R.montagnei</i>
Erythritol	Polyol		ANS	<i>R.montagnei</i>
Acide lécanorique	Didepside		UV	<i>R.fuciformis</i> <i>R.phycopsis</i>
Acide léprarique	Chromone		UV	<i>R.fuciformis</i>
Acide orsellinique	Depside		UV	<i>R.phycopsis</i> <i>R.montagnei</i>
Acide norstictique	Depsidone		UV	Aucun, témoïn CCM référence

TABLE 5 – Valeurs des R_f relatifs des témoins par rapport à l'atranorine.

Témoin	Rf relatif à l'atranorine
Atranorine (5,9cm)	1
Acétyl-portentol	0,49
Acide roccellique	NA
Acide usnique	0,75
Erythrine	0,02
Erythritol	0,34
Acide lécanorique	0,27
Acide léprarique A	0,45
Acide léprarique B	0,39
Acide léprarique C	0,36
Acide léprarique D	0,27
Acide léprarique E	0,19
Acide orsellinique	0,28

TABLE 6 – Valeurs des rapports frontaux des témoins dans la phase mobile DCM/AcOEt/Acide acétique 60/40/2.

Témoin	Rf
Acide orsellinique	0,54
Acide lécanorique	0,51
Erythrine	0,12
Montagnéol	0,08

TABLE 7 – R_f obtenus avec les différentes parties du thalle de *R.fuciformis*.

Fuci A :	Rf	Correspondance
A	0,64	Indéterminé
B (jaune)	0,52	Acétyl-portentol ?
C	0,46	Indéterminé
D	0,41	Indéterminé
E (jaune)	0,37	Erythritol ?
F (jaune)	0,28	Orsellinique ?
G	0,19	Indéterminé
H	0,06	Indéterminé
I	0,02	Erythrine
J (orangé)	0	

TABLE 8 – *Rf* obtenus avec les différentes parties du thalle de *R.phycopsis*.

Phyco E	Rf	Correspondance
A (365nm)	0,233	Indéterminé
B (365 nm)	0,192	Indéterminé
C	0,017	Erythrine ?
D (dépôt orangé)	0	
Phyco B		
A	0,325	Erythritol ?
B (365nm)	0,183	Indéterminé
C	0,017	Erythrine ?
D (dépôt orangé)	0	
Phyco M		
A	0,333	Erythritol ?
B (365nm)	0,183	Indéterminé
C	0,017	Erythrine ?
D (dépôt orangé)	0	
Phyco A		
A	0,333	Erythritol ?
B (365nm)	0,183	Indéterminé
C	0,017	Erythrine ?
D (dépôt orangé)	0	

TABLE 9 – *Rf* obtenus avec les différentes parties du thalle de *R.montagnei*.

JdNB419	Rf
A	0,33
B (365nm)	0,2
C	0,02
D (Dépôt)	0
JdNM419	Rf
A	0,33
B (365nm)	0,19
C	0,02
D (Dépôt)	0
JdNA419	Rf
A	0,33
B (365nm)	0,19
C	0,02

TABLE 10 – *Rf* obtenus avec les thalles complets de *R.montagnei*.

ST141		Rf	
A		0,28	
B		0,25	
C (365nm)		0,18	
D (365nm)		0,15	
E		0,02	
F (dépôt)		0	

EE309		Rf		EE300		Rf	
A		0,26		A		0,28	
B (365nm)		0,21		B		0,26	
C (365nm)		0,16		C (365nm)		0,15	
D (365nm)		0,09		D		0,02	
E		0,02		E (dépôt)		0	
F (dépôt)		0					

JdNE420		Rf		JdNE419		Rf	
A		0,26		A		0,3	
B (365nm)		0,2		B		0,27	
C (365nm)		0,16		C (365nm)		0,16	
D (365nm)		0,09		D (365nm)		0,1	
E		0,02		E		0,02	
F (Dépôt)		0		F (Dépôt)		0	

GE 486		Rf		GE 450		Rf	
A		0,28		A		0,28	
B		0,26		B		0,19	
C (365nm)		0,15		C		0,15	
D (Dépôt)		0		D		0,02	
				E (Dépôt)		0	

TABLE 11 – Temps de rétention UV, DEDL puis de masse des témoins.

Temps de rétention UV (min)	Temps de rétention DEDL(min)	Temps de rétention de masse(min)	Témoin
NA	30,07	29,62	Acide roccellique
30,04	31,08	30,5	Acide usnique
14,94	15,72	15,27	Erythrine
19,01	19,43	19,12	Acide lécanorique
18,7	19,44	18,8	Acide léprarique
5,15	6	5,79	Acide orsellinique
NA	29,63	29,01	Acide norstictique

TABLE 12 – L'ensemble des pics m/z des parties de *R.phycopsis* est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée.

Temps de m/z	Valeur m/z	Composé	Phyco B	Phyco M	Phyco A
3,3	167,1	Inconnu	Vert	Vert	Vert
11,23	402,0	Inconnu	Rouge	Vert	Rouge
15,30	421,1	Erythrine	Vert	Vert	Vert
16,77	373,1	Inconnu	Vert	Rouge	Rouge
16,97	556,0	Inconnu	Rouge	Vert	Rouge
17,85	375,1	Inconnu	Rouge	Vert	Rouge
18,42	437,2	Inconnu	Rouge	Rouge	Vert
19,00	167,1	Ac.lécanorique	Vert	Vert	Vert
20,55	343,1	Ac.usnique ?	Vert	Rouge	Rouge
	402,0	Inconnu	Rouge	Rouge	Vert
21,30	403,2	Inconnu	Rouge	Vert	Rouge
	540,1 et 421,1	Orsellinyl- montagnétol ?	Rouge	Rouge	Vert
29,40	299,2	Ac.rocellique	Vert	Vert	Vert

TABLE 13 – L'ensemble des pics m/z des parties de *R.fuciformis* est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée.

Temps de m/z	Valeur m/z	Composé	Fuci B	Fuci M	Fuci A
2,44	403,1	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
	521,0	Indéterminé	Rouge	Vert	Rouge
5,45	402,1	Indéterminé	Vert	Rouge	Rouge
10,17	393,9	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
10,65	805,9	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
11,98	402,1	Indéterminé	Vert	Rouge	Vert
15,30	421,1	Erythrine	Vert	Vert	Vert
16,61	402,0	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
17,56	401,9	Indéterminé	Vert	Rouge	Rouge
17,93	375,2	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
19,05	317,0 (pas 167)	Ac. Lécanorique	Vert	Vert	Vert
21,39	403,2	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
22,72	674,0	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
	403,8	Indéterminé	Rouge	Vert	Rouge
	290,5	Indéterminé	Vert	Rouge	Rouge
29,66	381	Indéterminé	Vert	Rouge	Vert
	295	Indéterminé	Rouge	Vert	Rouge
35,65	520,7	Indéterminé	Rouge	Rouge	Vert
	462,9	Indéterminé	Rouge	Vert	Rouge
	394,5	Indéterminé	Vert	Rouge	Vert

TABLE 14 – L'ensemble des pics m/z des parties de *R. montagnei* (JdN419) est répertorié avec les trois chromatogrammes de masse. La correspondance est ensuite établie avec les témoins, et la présence (vert) ou absence (rouge) dans la partie du thalle est signalée.

Temps de m/z	Valeur m/z	Composé	JdNB419	JdNM419	JdNA419
2,55		Inconnu			
5,66	167,0	Ac. Orsellinique			
15,3	421,0	Erythrine			
17,85	401,8	Inconnu			
19,02	167,1 ou 317,1	Ac. Lécanorique			
20,45	404,0	Inconnu			
	421,1	Orsellinyl-montagnetol			
21,27	421,1	Orsellinyl-montagnetol			
22,73	402,0	Inconnu			
25,12	406,5	Inconnu			
29,45	299,2	Ac. Roccellique			
	381,4	Inconnu			
35,74	666,7	Inconnu			