HAL
open science

Isolement, identification et synthèse biomimétique de métabolites secondaires issus d'invertébrés marins de la zone sud-ouest de l'océan Indien

Emmanuelle Gros

To cite this version:

Emmanuelle Gros. Isolement, identification et synthèse biomimétique de métabolites secondaires issus d'invertébrés marins de la zone sud-ouest de l'océan Indien. Cristallographie. Université de la Réunion, 2013. Français. NNT : 2013LARE0005 . tel-01130134

HAL Id: tel-01130134

https://theses.hal.science/tel-01130134v1

Submitted on 11 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 10/10/2013

par

Emmanuelle GROS

Isolement, identification et synthèse biomimétique de métabolites secondaires issus d'invertébrés marins de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien

Directrice de thèse	Anne BIALECKI	Professeur, Université de La Réunion
Co-directeur de thèse	Ali AL-MOURABIT	Directeur de Recherche, ICSN-CNRS
Composition du jury :		
Président :	Maurice AKNIN	Professeur, Université de La Réunion
Rapporteurs :	Michel FREDERICH	Professeur, Université de Liège
	Erwan POUPON	Professeur, Université Paris-Sud
Examinateurs :	Bertrand ILLIEN	Professeur, Université de La Réunion
	Yoel KASHMAN	Professeur, Université de Tel Aviv
	Jacqueline SMADJA	Professeur Emérite, Université de La Réunion
Membre invité :	Jean VACELET	Directeur de Recherche CNRS Emérite, UMR 6540-DIMAR

« Quelques plongées profondes ont révélé la vie là où on la pensait impossible, mais ce n'est qu'un début ; quelque chose de beaucoup plus grand réside dans ces ténèbres, qui nous attend silencieusement. »

Hugo Verlomme, Coups de folie en mer.

A ma famille

Avant-propos

Mes travaux de recherche réalisés depuis la deuxième année de Master ont donné lieu à deux publications [P], trois affiches [A], et deux communications orales [C] :

2010

[P1] M. Aknin, E. Gros, J. Vacelet, Y. Kashman, A. Gauvin-Bialecki; Sterols from the Madagascar Sponge *Fascaplysinopsis* sp., *Mar. Drugs* **2010**, *8* (12), 2961-2975; doi:10.3390/md8122961

[A1] E. Gros ; M. Aknin, Y. Kashman, A. Gauvin-Bialecki
Etude chimique de l'éponge Fascaplysinopsis sp. de la zone Sud-Ouest de de l'Océan Indien : intérêts pharmacologique et écologique.
5èmes rencontres Qualitropic, Sainte Marie, La Réunion (02 décembre 2010).

2012

[A2] E. Gros, A. Gauvin-Bialecki, B. Illien
Theoretical Study of a new molecule isolated from the essential oil of Dodonea viscosa.
International Conference on Pure and Applied Chemistry (ICPAC 2012), Maurice (06-02 juillet 2012).

[C1] E. Gros, A. Gauvin-Bialecki, A. Al-Mourabit
Métabolites secondaires issus de l'éponge marine Biemna laboutei.
AG4 des journées du GDR-BioChiMar, ICSN Gif sur Yvette (10 décembre 2012). Communication orale.

2013

[P2] E. Gros, A. Al-Mourabit, M-T. Martin, J. Sorres, J. Vacelet, M. Frederich, M. Aknin, Y. Kashman, A. Gauvin-Bialecki; Netamines H-N, tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *biemna laboutei* and their antimalarial activity, en cours d'écriture pour soumission à *J. Nat. Prod.*

[C2] E. Gros, A. Gauvin-Bialecki, A. Al-Mourabit, B. Illien
Absolute configuration of a new alkaloid.
Virtual Conference on Computational Chemistry (VCCC-2013), Maurice (01-31 août 2013). Conférence virtuelle.

[A3] E. Gros, A. Al-Mourabit, M-T. Martin, J. Sorres, M. Frédérich, M. Aknin, Y. Kashman, A. Bialecki
Isolation, identification and purification of potent antitumor and antiplasmodial secondary metabolites from the marine sponge Biemna laboutei.
MaNaPro 2013- XIV International Symposium on Marine Natural Products (15-20 septembre 2013).

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de deux équipes, l'équipe du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de La Réunion, et l'équipe de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) de Gif-sur-Yvette, d'octobre 2010 à septembre 2013. Elle a été en outre soutenue financièrement par :

- Le programme d'actions FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) et la Région Réunion dans le cadre du projet BIOMOL TCN (Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de MOLécules issues de la BIOdiversité terrestre, marine et microbienne de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien).
- L'Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de la Réunion qui m'a accordé un contrat doctoral, ainsi qu'une aide pour participer à la 8th European Conference of Marine Natural Product, en Espagne en septembre 2013, au cours de laquelle j'ai eu l'opportunité de présenter mes résultats.
- Le groupement de recherche BioChiMar, dirigé par Ali Al-Mourabit, qui m'a accordé une bourse pour participer à la conférence précédemment citée.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux directeurs successifs du LCSNSA, le Professeur Jacqueline SMADJA qui m'a ouvert les portes de son laboratoire depuis mon stage de Master 1, et le Professeur Bertrand ILLIEN, directeur actuel du LCSNSA, qui m'a également initiée à la modélisation moléculaire durant cette dernière année de thèse. Merci de m'avoir offert de bonnes conditions pour l'accomplissement de ce travail.

Je remercie aussi les deux directeurs de l'ICSN, Messieurs David CRICH et Max MALACRIA pour m'avoir permis de réaliser trois missions au sein de ce prestigieux établissement.

J'adresse également mes remerciements et mon respect le plus profond à ma directrice de thèse, le Professeur Anne BIALECKI, du LCSNSA qui m'encadre depuis mes travaux de master. Je lui suis très reconnaissante pour sa gentillesse, son sens de l'écoute, et sa volonté d'offrir à ses étudiants les meilleures conditions de travail possibles.

Je remercie mon co-directeur de thèse, le Directeur de Recherche Ali AL-MOURABIT de l'ICSN, qui m'a accueilli dans son laboratoire à plusieurs reprises, de m'avoir conseillée et aidée sur plusieurs plans. Je lui adresse ma reconnaissance pour m'avoir fait revenir à l'ICSN pendant un peu plus de deux mois afin que je puisse terminer mon travail d'extraction.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du jury :

- Au Professeur Erwan POUPON de l'Université Paris-Sud (UMR 8076 Biocis), rapporteur de ma thèse, qui a accepté sans hésiter d'évaluer mon travail.
- Le Professeur Michel FREDERICH de l'Université de Liège (Laboratoire de pharmacognosie) d'avoir accepté de juger ce travail et d'être rapporteur de ma thèse. Un grand merci également pour la réalisation des tests d'activité anti-paludique.
- Le Professeur Maurice AKNIN du LCSNSA, membre du jury, pour m'avoir permis d'entreprendre cette thèse en me confiant l'étude de huit éponges collectées lors de missions qu'il a dirigées en 2009 et 2011 à Madagascar.
- Le Professeur Yoel KASHMAN, de l'Université de Tel-Aviv (School of Chemistry), pour avoir financé les collectes des éponges, et pour avoir accepté nonobstant son emploi du temps très chargé, d'assister à cette soutenance de thèse à La Réunion et de faire partie du jury.
- Le Directeur de Recherche CNRS Emérite Jean VACELET, de l'UMR 6540-DIMAR (Diversité, évolution et écologie fonctionnelle marine). Je voudrais lui exprimer ma gratitude d'une part, pour l'honneur qu'il me fait d'être présent à mon jury de thèse, et d'autre part, pour avoir procédé à l'identification des éponges étudiées.

Le travail développé dans cette thèse doit beaucoup aux efforts de Thanh Binh NGUYEN qui m'a encadré durant la réalisation de la partie synthétique de cette thèse. Je remercie également Céline MORIOU et Ludmila ERMOLENKO qui m'ont aidée et soutenue à chacun de mes séjours à l'ICSN.

J'exprime toute ma gratitude à Marie-Thérèse MARTIN pour sa gentillesse et sa collaboration, ô combien précieuse, pour l'analyse en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des molécules isolées.

Je suis également reconnaissante envers les précieux services techniques de l'ICSN:

- le service CLHP, particulièrement Odile THOISON, Franck PELISSIER et Suzanna RAMOS
- le service RMN;
- le service de Spectrométrie de Masse.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés par Thierry CRESTEIL et Geneviève AUBERT de l'ICSN, que je remercie.

Mes sincères remerciements s'adressent également au Docteur Pieter LEYSEN et à son équipe de l'Université Catholique de Louvain (Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie de l'Institut Rega pour la recherche médicale) pour la réalisation des tests antiviraux.

Je remercie les plongeurs professionnels Stéphan AUBERT et Jean-Pierre BELLANGER, ainsi que le club de plongée Salary Diving, dirigé par Frédéric LUCAS, pour les collectes des organismes marins en 2009 et 2011 à Madagascar. Un merci tout particulier à Stéphan Aubert pour la réalisation des photographies sous-marines et des cartes marines.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler au sein du LCSNSA, particulièrement à Sophie TECHER avec qui j'ai partagé de nombreux moments.

Un grand merci à Jonathan SORRES qui m'a encadrée et conseillée lors du travail d'extraction, je lui dois beaucoup.

Je remercie également tous ceux que j'ai connus à l'ICSN, je pense bien sûr aux membres de l'équipe 43 mais aussi à ceux de l'équipe 09, avec qui j'ai pu partager des rires, des cafés et bien plus encore. Un merci tout particulier à Alice, pour sa gentillesse et sa joie de vivre.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont été d'un soutien certain lors de mes séjours en Métropole : Maya, Nadia, Laurent, Johanna, Christel, Cyrille, Alexandra, Cédric, Nicolas et Puri.

Enfin, un merci du fond du cœur à ma grand-mère qui croit en moi depuis 26 ans, à mon père pour ses encouragements, à ma mère pour avoir toujours été à mes côtés quoiqu'il arrive, à mes beaux-parents, à mes frères et sœur. Merci à la famille !

Merci à Sébastien, pour tout.

Liste des abréviations

Abréviations, sigles et acronymes spécifiques aux activités biologiques

A549 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome pulmonaire)
AGS : lignée cellulaire cancéreuse humaine (adénocarcinome gastrique)
CE_{50} : concentration efficace médiane
CI_{50} : concentration inhibitrice médiane
DE_{50} : dose efficace médiane
DI_{50} : dose infectieuse médiane
DL_{50} : dose létale médiane
HeLa : lignée cellulaire cancéreuse humaine (adénocarcinome du col de l'utérus)
HT29 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (adénocarcinome colorectal)
Intestine-407 : lignée cellulaire épithéliale intestinale
K562 : lignée leucémiques humaine
KB : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome buccal)
L1210 : lignée leucémique murine
MDA-MB-231 : lignée cellulaire cancéreuse humaine du sein (adénocarcinome métastasique du sein)
SH-SY5Y : lignée cellulaire cancéreuse humaine (neuroblastome : tumeur maligne solide extra-crânienne)

Abréviations spécifiques à la chimie

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire
2,5-diméthoxyTHF : 2,5-diméthoxytétrahydrofurane
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
AF : acide formique
APCI : ionisation chimique positive à pression atmosphérique
Boc : tert-butoxycarbonyle
C18 : silice greffée par des groupements octadécyles
CCM : chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$: chloroforme deutéré
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CLMP : chromatographie liquide moyenne pression
COSY : correlation spectroscopy
DCE : dichroïsme circulaire électronique
DCM : dichlorométhane
DEDL : détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DEPT : distorsionless enhancement by polarization transfer
DMF : *N*-*N*-diméthylformamide
ESI^+ : ionisation 'electrospray' (mode positif)
eV : electron volt
Hept : hetpane
HMBC : heteronuclear multiple bond connectivity
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
HSQC : heteronuclear single quantum coherence
IR : infrarouge
J : constante de couplage
MeOD : méthanol deutéré
MeOH : méthanol
NOESY : nuclear overhauser effect spectroscopy
PAD : détecteur à barrettes de photodiode
Pd/C : palladium sur charbon
Réf : référence
RMN (1D, 2D) : résonance magnétique nucléaire (une dimension, deux dimensions)
ROESY : rotative overhauser effect spectroscopy
SM : spectrométrie de masse
TA : température ambiante
TFA : acide trifluoroacétique
t_R : temps de rétention
UPLC : ultra performance liquid chromatography
UV : ultra-violet

Sommaire

Avant-propos **4**

Remerciements **5**

Liste des abréviations **9**

Sommaire **10**

Introduction générale **13**

Chapitre I : Eléments bibliographiques **21**

I.1 Localisation du genre *Biemna* 21

I.2 Position systématique et description du genre *Biemna* (Gray, 1867) 21

I.3 Cas particulier de l'espèce *Biemna laboutei* : localisation et description morphologique 22

I.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Biemna* 23

I.4.1 Les stérols 23

I.4.2 Les alcaloïdes pyridoacridiniques 25

I.4.3 Les alcaloïdes guanidiniques tricycliques 28

Chapitre II : Isolement et caractérisation structurale de métabolites issus de l'éponge *Biemna laboutei* **37**

II.1 Collecte et identification 37

II.2 Extraction et criblage chimique par CLHP-PAD-DEDL-SM et RMN ^{1}H 39

II.3 Etude chimique de l'éponge *Biemna laboutei* 43

II.3.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires 43

II.3.2 Caractérisation structurale des métabolites secondaires 47

II. 3. 3 Bilan de l'étude chimique de *Biemna laboutei* 86

II. 4 Détermination de la configuration absolue de molécules 87

II.4.1 Introduction à la modélisation moléculaire 87

II.4.2 Principe 88

II.4.3 Détails des calculs 89

II.4.4 Résultats de l'étude du DCE des nétamines I (58) et J (59) 92

II.4.5 Conclusion 107

Chapitre III : Valorisation : intérêts chimiotaxonomique et biologique 110

III.1 Intérêt chimiotaxonomique 110

III.1.1 Introduction 110

III.1.2 Variation spatiale et temporelle de l'expression métabolique de *Biemna laboutei* 111

III.1.3 Etude chimiotaxonomique 114

III.4.1 Conclusion 117

III.2 Intérêt biologique : Activités biologiques des extraits bruts et des produits purs de *Biemna laboutei* 119

II.2.1 Introduction 119

III.2.2 Cytotoxicité 119

III.2.3 Activité antivirale 121

III.2.4 Activité antipaludique 123

III.2.4 Conclusion 126

Chapitre IV : Synthèse biomimétique d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques 129

Introduction 129

IV.1 Eléments bibliographiques 130

IV.1.1 Hypothèses de biogénèse 130

IV.1.2. Synthèses des alcaloïdes guanidiniques tricycliques. 133

IV.2 Vers de nouvelles stratégies de synthèse du noyau tricyclique des batzelladines. 138

IV.2.1 Introduction 138

IV.2.2 Préparation des réactifs 140

IV.2.3 Stratégie n°1 : Addition de la guanidine sur une dicétone α,β-insaturée 142

IV.2.4 Stratégie n°2 : Addition du cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine 145

IV.2.5 Stratégie n°3 : Utilisation de la 2-aminopyrimidine comme source de guanidine. 149

IV.3 Conclusion 152

Conclusion générale 154

Références bibliographiques 184

Liste des figures 192

Liste des tableaux 194

Liste des schémas 196

Liste des annexes 197

Annexes 199

Introduction générale

Alliant biodiversité remarquable et chimiodiversité exceptionnelle, les océans offrent aux chimistes des champs d'immenses investigations. La recherche de nouveaux médicaments ainsi que la protection et conservation de la biodiversité sont deux des domaines de prédilection des chercheurs, qui, naturellement, ont inspirés ces travaux de thèse. Dans cette introduction seront abordées, en premier lieu, des généralités sur l'intérêt de la chimie marine dans le domaine de la santé humaine, et dans celui de la « santé » des écosystèmes, puis seront exposés le contexte de l'étude ainsi que les objectifs de ces travaux de thèse.

De l'intérêt de la chimie marine…

- **La santé humaine**

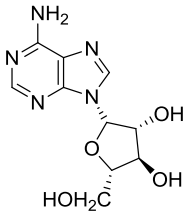
Les substances naturelles représentent depuis des millénaires une source immense et inépuisable de principes actifs importants en écologie chimique et ayant des vertus thérapeutiques. Aujourd'hui encore, plus de 60% des médicaments sont issus soit de substances naturelles, soit de dérivés ou d'analogues, soit encore de molécules synthétisées sur le modèle des substances naturelles [1]. Parmi les anticancéreux approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) de 1940 à 2010, 74,9% sont directement issus ou inspirés de la nature [2]. Les substances naturelles constituent en outre des outils moléculaires pour l'exploration des fonctions biologiques régissant le monde du vivant, permettant la découverte de récepteurs, la compréhension du cycle cellulaire, la mise en évidence de cibles comme la tubuline, etc. L'étude de leur voie de biosynthèse aiguise également la curiosité des chimistes organiciens qui y voient une source d'inspiration pour la conduite de synthèses biomimétiques. De plus, les nouvelles technologies et le développement de techniques de criblages à haut débit, assistées par des logiciels mathématiques, ont permis, à la recherche, d'atteindre un rythme et des résultats encore impossibles et impensables, il y a quelques années.

Outre l'intérêt qu'elles suscitent pour la recherche de nouveaux médicaments, les substances naturelles sont également convoitées dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire, de l'agriculture, de la bactériologie, des biocarburants, ou encore de

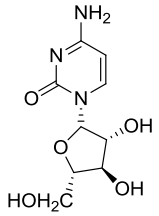
l'environnement (biorémédiation, biofouling). La recherche dans le domaine des substances naturelles font de la chimie organique une discipline clé.

Il existe aujourd'hui trois principales sources de substances naturelles: les plantes, les microorganismes terrestres et marins et les invertébrés marins ; toutefois il faut souligner que le monde marin, contrairement au milieu terrestre n'en est qu'à ses débuts en termes d'études d'exploration et d'exploitation. Comment expliquer, dès lors, le retard de la chimie et de la pharmacologie marine par rapport à la phytochimie et à la phytopharmacie? La principale raison réside très certainement dans la difficulté de pénétration du milieu marin par l'Homme. Par conséquent, il a fallu attendre les progrès de la plongée sous-marine, au cours de la première moitié du XXème siècle, pour pouvoir explorer convenablement les fonds marins. La seconde raison, corollaire à la première est que l'éthnobotanique n'a pas d'équivalent dans le milieu marin. Ainsi, les Chinois à l'instar des populations d'Europe, utilisaient les écorces de saule pour soigner les états fébriles ; l'étude chimique de ces écorces a conduit à la découverte de l'aspirine. Ces mêmes indiens utilisaient les feuilles de coca comme stimulant longtemps avant la découverte de la cocaïne. Malheureusement, il n'y a pratiquement aucun exemple de ce type en pharmacologie marine. En effet, à notre connaissance, en dehors du *Pen Ts'ao*, pharmacopée chinoise publiée 2800 ans avant Jésus-Christ [3], il n'existe aucune autre pharmacopée faisant référence aux algues, aux invertébrés marins ou aux poissons.

Ce n'est donc que vers les années 1950 que l'intérêt pharmaceutique pour les invertébrés marins est réellement né, grâce à la découverte des nucléosides spongothymidine et spongouridine dans l'éponge marine *Cryptotethia crypta* [4, 5], dont le nom actuel est *Tectitethya crypta*, inspiratrices de l'antiviral Ara-A (**1**) et de l'anticancéreux Ara-C (**2**). Les chimistes estiment alors que ce milieu est très prometteur pour la découverte de molécules originales et à activités biologiques diverses à effet puissant.



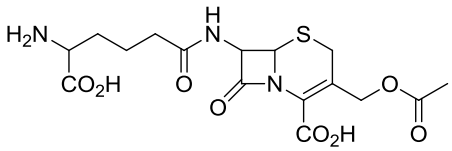
Ara-A (vidarabine)(**1**)



Ara-C (cytatarabine) (**2**)

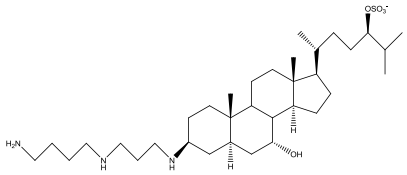
Depuis, les recherches en chimie marine se sont effectivement révélées fructueuses puisqu'un certain nombre de molécules sont déjà commercialisées ou sont en dernière phase des essais cliniques.

- Dans le domaine des antibiotiques, la Céphalosporine C (**3**), issue d'un champignon semi-marin, *Cephalosporium acremonium,* aux propriétés antistaphylococciques [3] peut être citée.

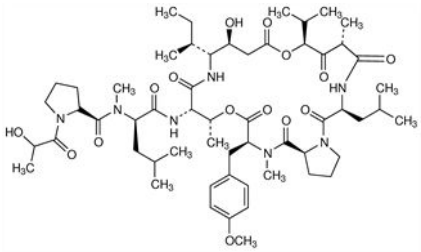


Céphalosporine C (**3**)

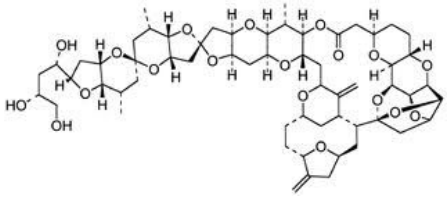
- Dans le domaine des anticancéreux, la squalamine (**4**), molécule provenant de l'estomac de requin *Sualus acanthias*, inhibe l'angiogenèse et la prolifération de cellules endothéliales. Les didemnines (**5**) isolées du tunicier *Didemnum solidum* qui, outre leur activité antivirale, inhibent le cycle cellulaire en phase G1 (elles freinent la synthèse de l'ADN et de l'ARN). Les halichondrines comme la B6 (**6**), extraites de l'éponge, *Halichondria okaida,* sont actives sur les souris atteintes de mélanomes ou de leucémies [3]. Ce sont ces halichondrines qui ont inspirées la synthèse d'un dérivé très proche appelé mésylate d'Eribuline, inhibiteur des microtubules commercialisé en 2010.



Squalamine (**4**)

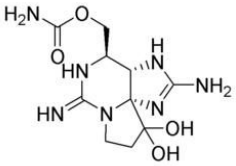


Didemnine B (**5**)

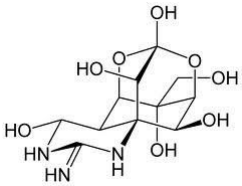


Halichondrine B (**6**)

- Les toxines sont également un groupe de molécules très intéressant, en effet, la saxitoxine (**7**) isolée d'une microalgue du genre *Gonyaulax* bloque la conduction nerveuse. La tétradotoxine (**8**) isolée des viscères et des glandes sexuelles du poisson globe au Japon s'est avérée être un antiémétique puissant, mais c'est son pouvoir anesthésiant qui a suscité le plus d'intérêt [1].



Saxitoxine (**7**)



Tétrodotoxine (**8**)

- Il existe encore beaucoup d'autres molécules recouvrant une large palette d'activités biologiques : anti-inflammatoire, analgésique, immunosuppresseur ou antimalarique.

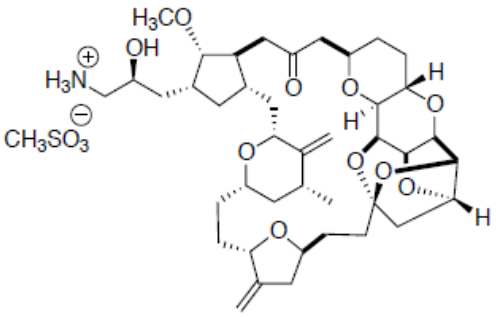
En une quarantaine d'année, plus de 18 000 molécules nouvelles ont été caractérisées. Un nombre croissant d'équipes de recherches et de grands groupes pharmaceutiques ont étudié et explorent encore ce gisement de molécules originales, sans équivalent avec des molécules isolées du milieu terrestre, et encore peu exploitées. Singulièrement, la majorité des molécules marines susceptibles d'être utilisées dans le domaine de la santé sont destinées au traitement des cancers.

Certains pourraient alors se demander pourquoi continuer à chercher de nouvelles molécules actives ? Assurément, les médicaments déjà sur le marché sont efficaces, mais cette efficacité peut être atténuée avec le temps, c'est le cas des

antibiotiques. Il faut, par conséquent en permanence, trouver des molécules ayant une activité similaire voire même supérieure, avec moins d'effets secondaires indésirables. De plus, les chercheurs estiment que deux tiers environ des maladies attendent encore un traitement satisfaisant, c'est particulièrement le cas de nombreux cancers et des infections virales.

Les molécules bioactives issues des substances naturelles montrent parfois une toxicité qui rend impossible leur utilisation en pharmacologie. Grâce à la chimie de synthèse, des molécules, ayant pour base la structure de la molécule naturelle, ont pu être synthétisées, avec cependant une toxicité moindre voire une activité plus grande et/ou plus spécifique.

Un exemple récent de molécule de synthèse est celui de l'Halaven™, médicament du laboratoire EISAI Europe, indiqué en monothérapie dans le traitement des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, autorisé par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en 2011. Le principe actif, appelé mésylate d'Eribuline (**9**), inhibiteur des microtubules, est une molécule synthétique appartenant à la famille des halichondrines, macrolides de polyéther d'origine marine [2, 6].



Mésylate d'Eribuline (**9**)

❖ La santé des écosystèmes

C'est depuis le Sommet de la terre sur l'environnement et le développement, organisé à Rio de Janeiro en juin 1992 par les Nations Unies que le terme « biodiversité » est sorti des laboratoires du Vivant pour partir à la conquête des autres Sciences (politiques, sociales, …) et du grand public. La signature de la Convention Internationale sur la diversité biologique devra assurer non seulement la protection des espèces, mais

aussi celle des écosystèmes, du patrimoine génétique et de l'utilisation durable des ressources naturelles. Cependant, en 2005, le *Millenium Ecosystem Assessment*, mécanisme d'expertise le plus performant en matière d'estimation de l'érosion de la biodiversité a évalué le taux de disparition actuel des espèces à au moins 1 000 fois plus que le rythme naturel attendu. La destruction et la pollution des écosystèmes, la surexploitation des stocks, la dissémination anarchique d'espèces invasives et le changement climatique global sont extrêmement impactant en environnement marin.

Les ressources vivantes de l'Océan sont immenses et diverses. D'elles dépendent l'avenir en matière de climat, d'alimentation ou encore d'énergie. Il faut donc identifier, exploiter raisonnablement mais aussi gérer durablement ces ressources.

Les enjeux que représentent les études chimiques des organismes marins sont très importants non seulement pour la découverte de nouveaux médicaments, mais aussi pour une meilleure compréhension des écosystèmes. Cette compréhension est fondée sur la connaissance des constituants chimiques, de leur répartition, de leurs activités, de leurs cibles biologiques, de leur rôle et de leur fonction écologique comme effecteurs dans les processus liés à la biodiversité (communication et protection contre les prédateurs et les pathogènes). Les études chimiques constituent une contribution indispensable à la résolution de questions fondamentales comme par exemple celles concernant les interactions entre espèces et milieux, l'indication des variations environnementales, la compréhension de la biodiversité à l'échelle moléculaire, la compréhension de la réactivité moléculaire, ou encore la biosynthèse.

Les travaux de thèse : contexte et objectifs

Depuis une quinzaine d'année, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) s'investit dans l'extraction, l'isolement et l'identification de nouveaux métabolites secondaires bioactifs issus du milieu marin. Ces travaux, certes initiés par une profonde motivation économique (recherche de nouvelles substances actives), s'inscrivent aussi dans un contexte écologique (études chimiotaxonomiques pour une meilleure connaissance de la biodiversité insulaire). Ils sont en outre consacrés de façon stratégique aux invertébrés marins de la zone Sud-Ouest

de l'Océan Indien, véritable hotspot de la biodiversité, et pour laquelle les investigations chimiques restent encore très timides.

Consacrés à l'étude chimique de l'éponge *Biemna laboutei* de Madagascar, les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont eu pour objectif de poursuivre et de renforcer les investigations du LCSNSA en chimie marine. Ils ont été soutenus par le programme d'actions FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) et la Région Réunion dans le cadre du projet BIOMOL TCN (Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de MOLécules issues de la BIOdiversité terretre, marine et microbienne de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien). Ce projet, porté par le LCSNSA est axé sur la recherche de substances bioactives naturelles bénéfiques pour la santé et le bien-être de l'Homme. Il est mené en partenariat avec cinq laboratoires ou instituts régionaux, nationaux et internationaux. Trois d'entre eux ont été fortement impliqués dans la réalisation des travaux de thèse présentés dans ce mémoire :

- L'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette, CNRS, France,
- Le Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Interfacultaire de Recherche sur le Médicament (CIRM), Université de Liège, Belgique,
- L'Institut Rega pour la recherche médicale, Université Catholique de Louvain (Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie) Belgique.

Ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre constitue une revue des données bibliographiques concernant principalement les éponges du genre *Biemna* et les études chimiques qui leur sont associées.

Le second chapitre est une synthèse des travaux portant sur l'extraction, l'isolement et l'identification d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolés de l'éponge *Biemna laboutei* de Madagascar.

Le troisième chapitre est consacré à la valorisation des molécules isolées *via* d'une part l'évaluation de leur activité biologique (cytotoxicité, activité antipaludique, …) et d'autre part, leur utilisation pour des études chimiotaxonomiques.

Le quatrième enfin, sera dédié au travail de synthèse organique visant à réaliser le squelette des alcaloïdes guanidiniques tricycliques par voie biomimétique.

Chapitre I

Eléments bibliographiques

I.1 Localisation du genre *Biemna*

Les éponges du genre *Biemna* sont principalement localisées dans le Nord Est de l'Atlantique, au Japon, en Indonésie et dans l'Ouest de l'Océan Indien [7].

I.2 Position systématique et description du genre *Biemna* (Gray, 1867)

❖ Position systématique

Avec cinq autre genres (*Desmacella*, *Dragmatella*, *Microtylostylifer*, *Neofibularia* et *Sigmaxinella*), le genre *Biemna* appartient à la famille des Desmacellidae (ordre Poecilosclerida) [8].

Royaume: Animal
Phylum: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordre: Poecilosclerida
Sous-ordre: Mycalina
Famille: Desmacellidae
Genre: *Biemna*

Synonymes : Allantophora (Whitelegge, 1907)
[Toxemma] (De Laubenfels, 1936)
Toxemna (Hallmann, 1917)

Toutefois, en 2013, une nouvelle classification a été proposée - mais encore non acceptée officiellement dans World Porifera Database - par Morrow et collaborateurs [8] avec un nouvel ordre Biemnida regroupant *Biemna* et *Neofibularia*, deux genres causant des dermatites.

❖ Description

Comme la majorité des éponges de la famille des Desmacellidae, les éponges du genre *Biemna* sont en général toxiques, elles provoquent des dermatites au contact de la peau. Elles peuvent être massives, en forme de coupe ou encore tubulaires, de surface

irrégulière. Leur squelette choanosomique est plumeux ou plumo-réticulé avec un développement variable de fibres de spongine contenant des spicules de types (subtylo)-styles de taille unique, parfois remplacés par des oxes. Le squelette ectosomique est constitué de mégasclères disposés en brosse ce qui confère à la surface de l'éponge un aspect hirsute ; les microsclères sont de multiples formes : sigma, raphide, microxe, cemmata microstrongyleou encore sphérique. Le squelette est formé de spongine et de spicules.

On compte aujourd'hui près de 55 éponges du genre *Biemna* réparties dans tous les océans, à des profondeurs variables.

I.3 Cas particulier de l'espèce *Biemna laboutei* : localisation et description morphologique

❖ Localisation

Biemna laboutei est une éponge marine aux propriétés toxiques récemment identifiée par John N.A. Hooper en 1996 [9], causant des dermatites, comme les *Neofibularia* qui sont taxonomiquement proches (famille des Desmacellidae). Elle est le plus souvent localisée entre 20 et 40 mètres de profondeur, sur des zones sablonneuses, avec parfois un courant fort. Elle peut être rattachée à des coraux morts ou à des rochers et vivre en association avec le corail *Dendronephthya*, l'algue *Halimeda* ou d'autres éponges.

❖ Description morphologique

Biemna laboutei est une éponge orange, dressée, arborescente, ayant des ramifications tubulaires pouvant atteindre 13 cm de hauteur, 15 cm de largeur et 30 cm de long. Chaque tubulure est traversée par des canaux subectosomaux jusqu'à l'apex pour se terminer par un oscule relativement petit (1,5 - 4 mm de diamètre), surmonté de conules pointues. Sa surface est non poreuse. L'éponge vivante possède une texture compressible, élastique, caoutchouteuse. Son squelette est formé de collagène et de fibres de spongine.

I.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Biemna*

Trois familles de composés ont été isolées à ce jour du genre *Biemna*, les stérols, les alcaloïdes pyridoacridiniques, et les alcaloïdes guanidiniques tricycliques. Chacune de ces trois familles de composés font l'objet d'un point détaillé ci-après.

I.4.1 Les stérols

I.4.1.1 Généralités

Les invertébrés marins et essentiellement les éponges constituent une source abondante de stérols à structures originales. La plupart n'ayant pas leur équivalent chez les animaux et les végétaux terrestres. Ces stérols peuvent avoir, par exemple, une position particulière de leurs insaturations, un polycyle non conventionnel (19-nor ou A-norstérol) ou une chaîne latérale très courte (2 à 3 atomes de carbone). Il existe également des chaînes latérales portant un cyclopropane ou un cyclopropène ou encore une alkylation au niveau des carbones C-22 ou C-23. Enfin, certains stéroïdes peuvent présenter un noyau et/ou une chaîne latérale oxygénée.

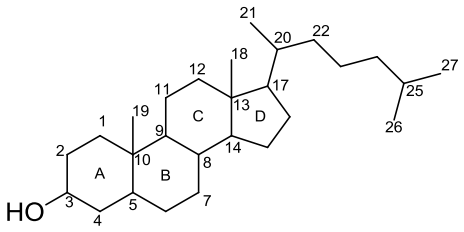
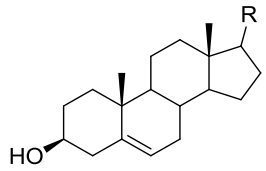


Figure 1 : Squelette de base des stérols.

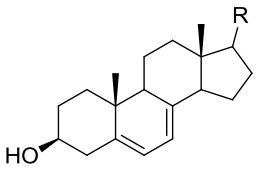
I.4.1.2 Stérols isolés d'éponges du genre *Biemna*

Pour le genre *Biemna*, peu de travaux ont été réalisés sur leur composition stérolique. On trouve, en premier lieu, les travaux de Delseth et collaborateurs [10] qui ont isolé de l'éponge *Biemna fortis*, onze stérols aux noyaux mono-(**10-15**), di-(**16-18**) et tri-insaturés (**19**,**20**) (Tableau I).

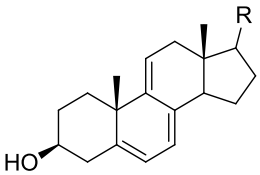
Tableau I : Stérols isolés d'éponges du genre *Biemna*.



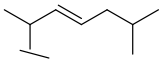
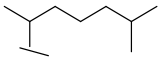
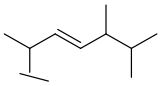
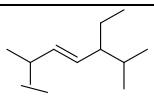
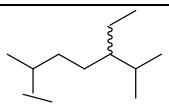
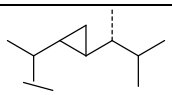
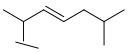
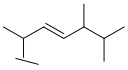
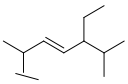
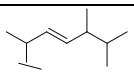
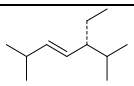
Δ^{5}



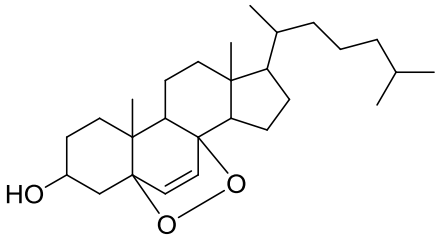
$\Delta^{5,7}$



$\Delta^{5,7,9(11)}$

Noyau	Chaîne latérale (R)	Nom
Δ^{5}		Cholesta-5,22-dién-3β-ol (**10**) (Déhydrocholestérol)
Δ^{5}		Cholest-5-én-3β-ol (**11**) (Cholestérol)
Δ^{5}		(22*E*)-Méthylcholesta-5,22-dién-3β-ol (**12**) (Brassicastérol)
Δ^{5}		(22*E*,24*R*)-Ethylcholesta-5,22-dién-3β-ol (**13**) (Poriferastérol)
Δ^{5}		24ξ-Ethylcholest-5-én-3β-ol (**14**)
Δ^{5}		(22*R*, 23*R*,24*R*)-22,23-Méthylène-23,24-diméthylcholest-5-én-3β-ol (**15**) (Gorgostérol)
$\Delta^{5,7}$		Cholesta-5,7,22-trién-3β-ol (**16**)
$\Delta^{5,7}$		(22*E*)-Méthylcholesta-5,7,22-trién-3β-ol (**17**) (Ergostérol)
$\Delta^{5,7}$		(22*E*,24*R*)-Ethylcholesta-5,7,22-trién-3β-ol (**18**)
$\Delta^{5,7,9(11)}$		(22*E*)-Méthylcholesta-5,7,9(11),22-tétraén-3β-ol (**19**)
$\Delta^{5,7,9(11)}$		24ξ-Ethylcholesta-5,7,9(11),22-tétraén-3β-ol (**20**)

Puis en 2008, Bensemhoum [11] isolèrent de l'éponge *Biemna fortis* un 5α,8α-épidioxystérol (**21**).



5α,8α-épidioxy-24(S)-éthylcholest-6-én-3β-ol (**21**)

Les 5α,8α-épidioxystérols sont une famille de composés d'intérêt pharmacologique. De nombreuses activités antivirale ou anticancéreuse en particulier leur sont attribuées [12–18].

Il faut toutefois souligner que l'origine de ces composés dans les éponges a fait l'objet de recherches et que la question partage les scientifiques. Certains, en effet, associent la présence des 5α,8α-épidioxystérols à celle des stérols $\Delta^{5,7}$. Ces stérols oxygénés seraient le résultats d'une photo-oxydation de stérols $\Delta^{5,7}$ au cours de l'extraction et de l'isolement des composés [19, 20]. D'autres chercheurs affirment qu'au contraire, les épidioxystérols seraient naturellement présents dans l'invertébré marin et qu'ils pourraient provenir de la transformation *in vivo* de stérols alimentaires [21]. Par ailleurs, en faveur de cette seconde hypothèse, mes travaux de Master 2 ont montré que la présence d'antioxydants naturels dans l'éponge permettrait de prévenir la photo-oxydation des stérols $\Delta^{5,7}$ [22].

I.4.2 Les alcaloïdes pyridoacridiniques

I.4.2.1 Généralités

Les pyridoacridines sont extraites de mollusques marins, d'éponges et d'ascidies. Actuellement, plus d'une centaine de composés hétéroaromatiques polycycliques appartenant à cette famille sont connus [23], notamment pour leurs nombreuses activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne [24, 25].

Les pyridoacridines naturelles sont basées sur le squelette pyrido[2,3,4-kl]acridine. La structure de base est donc un tétracycle aromatique plan. Plusieurs composés de cette famille dérivent de l'imino-quinone correspondante représentée dans la Figure 2.

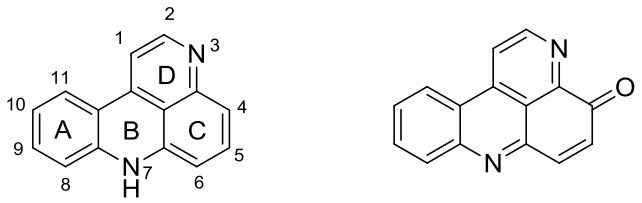


Figure 2 : Squelettes des alcaloïdes marins pyrido[2,3,4-kl]acridine.

I.4.2.2 Alcaloïdes pyridoacridiniques isolés d'éponges du genre *Biemna*

Les alcaloïdes pyridoacridiniques isolés d'éponges du genre *Biemna* et leurs activités biologiques sont récapitulés dans le Tableau II.

Les premiers alcaloïdes pyridoacridiniques isolés du genre *Biemna* ont été identifiés en 1993 par l'équipe de Zeng en 1993 [26]. Un total de cinq alcaloïdes avaient alors été répertoriés: la méridine (**22**), la 11-hydroxyascididémine (**23**) et l'eudistone A (**24**), toutes trois connues et précédemment isolées des ascidies *Amphicarpa meridiana, Leptoclinides* sp. et *Eudistoma* sp. ; la biemnadine (**25**) et la 8,9-dihydro-11-hydroxyascididémine (**26**), sont quant à elles, deux structures nouvelles. Ces deux dernières structures montreraient une activité cytotoxique *in vitro* contre le carcinome KB épidermoide humain, avec des CI_{50} de 1,73 et 0,209 µg/mL respectivement et contre le lymphome murin L1210 avec des CI_{50} de 4,29 et 0,675 µg/mL respectivement.

En 2003, Aoki et collaborateurs isolèrent de *Biemna fortis*, collectée dans l'archipel Nusa Tenggara en Indonésie, quatre molécules parmi lesquelles :

- la biemnadine (**25**),
- la 9-hydroxybenzo[*b*]pyrido[4,3,2-*de*][1,10]phénanthrolin-8(8H)-one (**27**),
- la 9-aminobenzo[*b*]pyrido[4,3,2-*de*][1,10]phénanthrolin-8(8H)-one (**28**) ;

mais aussi un alcaloïde alors isolé pour la première fois, la labuamine A (**29**) [27]. Ces alcaloïdes montrent une activité neuritogène à des concentrations comprises entre 0,03 et 3 µM.

En 2011, Ueoka et collaborateurs [28] isolèrent trois molécules d'une éponge du genre *Biemna*, la *N*-méthylisocystodamine (**30**), la *N*-méthoxyméthylisocystodamine (**31**) et l'isocystodamine (**28**) qui est en fait la 9-aminobenzo[*b*]pyrido[4,3,2-*de*][1,10]phénanthrolin-8(8H)-one. Ces composés induisent une différenciation cellulaire des cellules leucémiques K562, avec une DE_{50} de 5 nM pour chacun.

Tableau II : Alcaloïdes pyroacridiniques isolés d'éponges du genre *Biemna*.

Eponges (Origine)	**Métabolites** Structure et nom	**Activités biologiques**	**Réf.**
Biemna sp. (Japon)	Méridine (**22**)	-	[26]
Biemna sp. (Japon)	11-Hydroxyascididémine (**23**)	-	[26]
Biemna sp. (Japon)	Eudistone A (**24**)	-	[26]
Biemna sp. (Japon) *Biemna fortis* (Indonésie)	Biemnadine (**25**)	➢ Activité cytotoxique contre le carcinome KB épidermoide humain (CI_{50} = 1,73 µg/mL) ➢ Activité contre le lymphome murin L1210 (CI_{50} = 4,29 µg/mL) ➢ Activité neuritogène à des concentrations comprises entre 0,03 et 3 µM	[26] [27]
Biemna sp. (Japon)	8,9-Dihydro-11-hydroxyascididémine (**26**)	➢ Activité cytotoxique contre le carcinome KB épidermoide humain (CI_{50} = 0,21 µg/mL) ➢ Activité contre le lymphome murin L1210 (CI_{50} = 0,67 µg/mL)	[26]
Biemna fortis (Indonésie)	9-Hydroxybenzo[*b*]pyrido[4,3,2-*de*][1,10]phénanthrolin-8-(8*H*)-one (**27**)	➢ Activité neuritogène à des concentrations comprises entre 0,03 et 3 µM	[27]
Biemna fortis (Indonésie) *Biemna* sp. (Japon)	9-Aminobenzo[*b*]pyrido[4,3,2-*de*][1,10]phénanthrolin-8(8*H*)-one (**28**) (renommée Isocystodamine)	➢ Activité neuritogène à des concentrations comprises entre 0,03 et 3µM ➢ Activité inductrice d'une augmentation de l'acétylcholine ➢ Activité inductrice d'une différenciation cellulaire des cellules leucémiques K562 (DE_{50} = 5 nM)	[27] [28]
Biemna fortis (Indonésie)	Labuamine A (**29**)	➢ Activité neuritogène à des concentrations comprises entre 0,03 et 3µM	[27]
Biemna sp. (Japon)	*N*-Méthylisocystodamine (**30**)	➢ Activité inductrice d'une différenciation cellulaire des cellules leucémiques K562 (DE_{50} = 5 nM)	[28]
Biemna sp. (Japon)	*N*-Méthoxyméthylisocystodamine (**31**)	➢ Activité inductrice d'une différenciation cellulaire des cellules leucémiques K562 (DE_{50} = 5 nM)	[28]

I.4.3 Les alcaloïdes guanidiniques tricycliques

I.4.3.1 Généralités sur les alcaloïdes guanidiniques

Les composés guanidiniques sont présents naturellement chez les microorganismes terrestres et marins, chez les invertébrés marins et terrestres ou encore chez les végétaux supérieurs. Ce sont des composés particulièrement intéressants en raison de leurs multiples activités biologiques (cytotoxicité, activité antifongique et antibactérienne) [29, 30]. Pour cette raison, de nombreuses voies synthétiques sont continuellement répertoriées dans la littérature [31]. Certains alcaloïdes guanidiniques de synthèse présentent par ailleurs un réel intérêt, agissant comme catalyseurs, comme édulcorants puissants, comme substances mimétiques de nucléotides, de sucres, de lipides et de peptides. Ces composés se retrouvent souvent incorporés dans des structures bi-, tri-, voire pentacycliques.

I.4.3.2 Alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolées du genre *Biemna*: les nétamines

En 2006, Sorek et ses collaborateurs [32] travaillaient sur l'éponge *Biemna laboutei* de Madagascar. Six nouvelles molécules au squelette tricyclique guanidinique en ont été isolées. Il s'agit des nétamines A à G (**32-38**) dont la cytotoxicité sur trois lignées cellulaires cancéreuses a été évaluée : poumons (A549), colon (HT29) et sein (MDA-MB231) (Tableau III). Parmi les molécules les plus actives, on retiendra en particulier les nétamines C et D.

Tableau III : Nétamines A-G isolées de *Biemna laboutei.*

Métabolites Structure et nom	Activité biologique	Réf.
Nétamine A (**32**)	-	[32]
Nétamine B (**33**)	-	[32]
Nétamine C (**34**)	➢ Activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses: A549, HT29 et MDA-MB231 (CI_{50} = 4,3 ; 2,4 ; 2,6 µM respectivement)	[32]
Nétamine D (**35**)	➢ Activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses: A549, HT29 et MDA-MB231 (CI_{50} = 6,6 ; 5,3 ; 6,3 µM respectivement)	[32]
Nétamine E (**36**)	-	[32]
Nétamine F (**37**)	-	[32]
Nétamine G (**38**)	-	[32]

I.4.3.3 Alcaloïdes guanidiniques et tricycliques similaires aux nétamines : les ptilocaulines et les mirabilines

❖ **Origine et activités biologiques**

Les nétamines appartiennent à la classe rare des hétérocycles (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène tricycliques, dont le squelette présenté dans la Figure 3 ci-

après a déjà été rencontré dans la littérature, chez les ptilocaulines et les mirabilines (Tableau IV).

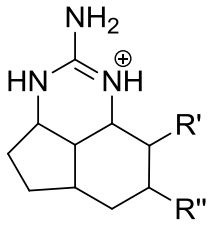


Figure 3 : Squelette des hétérocycles (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène tricycliques.

Par ailleurs, ces molécules guanidiniques tricycliques sont reconnues aujourd'hui pour leur large palette d'activités biologiques. Le Tableau IV reprend l'ensemble des alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolés d'éponges et leurs activités biologiques démontrées.

Tableau IV : Alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolés d'éponges, similaires aux nétamines.

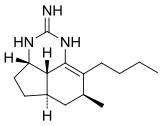
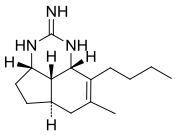
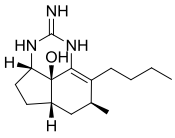
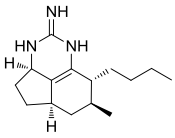
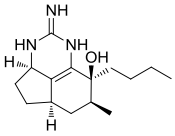
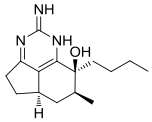
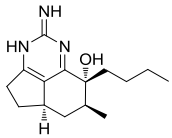
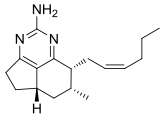
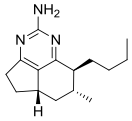
Eponges (origine)	**Métabolites** Structure et nom	**Activités biologiques**	**Réf.**
Ptilocaulis aff. *P. spiculifer* (Caraïbes) *Monanchora arbuscula* (Brésil) *Monanchora unguifera* (Jamaïque)	 Ptilocauline (**39**)	➢ Activité cytotoxique sur la lignée leucémique L1210 (DI_{50} = 0,39 µg/mL) ➢ Activité antimicrobienne, CI_{50} (µg/mL) sur *S. pyogenes,* 3,9; *S. pneumoniae,* 15,6; *S. faecalis, S.aureus, E. coli* 62,5	[33] [34] [35]
Ptilocaulis aff. *P. spiculifer* (Caraïbes) *Monanchora arbuscula* (Brésil) *Monanchora unguifera* (Jamaïque)	 Isoptilocauline (**40**)	➢ Activité cytotoxique sur la lignée leucémique L1210 (DI_{50} =1,4 pg/mL) ➢ Activité antimicrobienne, CI_{50} (µg/mL) S. *pyogenes,* 25; *S. pneumoniae* et *S. aureus,* 100; *S. faecalis* et *E. coli,* >loo.	[33] [36] [35]
Monanchora arbuscula (Brésil)	 8b-Hydroxyptilocauline (**41**)	-	[34]
Batzella sp. (Bahamas)	 8a,8b-Déshydroptilocauline (**42**) (renommée 7-épinéoptilocauline)	-	[37]
Batzella sp. (Bahamas)	 8a,8b-Déshydro-8-hydroxyptilocauline (**43**) (renommée 8α-hydroxy-7-épinéoptilocauline)	-	[37]
Batzella sp. (Bahamas) *Monanchora unguifera* (Jamaïque)	 1,8a;8b,3a-Didéshydro-8-hydroxyptilocauline(**44**) (renommée 8α-hydroxymirabiline B)	➢ Activité contre le parasite du paludisme, *Plasmodium falciparum* (CI_{50} = 3,8 µg/mL) en mélange avec 1,8a;8b,3a-didéhydro-8α-hydroxyptilocauline	[37] [38]
Monanchora unguifera (Jamaïque)	 1,8a;8b,3a-Didéhydro-8α-hydroxyptilocauline (**45**) (renommée 8β-hydroxymirabiline B)	➢ Activité contre le parasite du paludisme, *Plasmodium falciparum* (CI_{50} = 3,8 µg/mL) en mélange avec 1,8a;8b,3a-didéhydro-8β-hydroxyptilocauline	[38]
Arecholina mirabilis (Australie)	 Mirabiline A (**46**)	-	[39]
Arecholina mirabilis (Australie) *Batzella* sp. (Bahamas)	 Mirabiline B (**47**)	➢ Activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans* (CI_{50} = 7,0 µg/mL) ➢ Activité antiprotozoaire sur *Leishmania donovani* (CI_{50} =17,0 µg/mL)	[39] [38]

Tableau IV (suite)

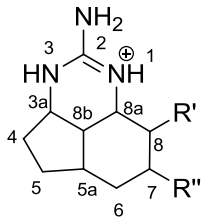
Arecholina mirabilis (Australie) *Clathria* sp. (Australie)	Mirabiline C (**48**)	-	[39] [40]
Arecholina mirabilis (Australie)	Mirabiline D (**49**)	-	[39]
Arecholina mirabilis (Australie)	Mirabiline E (**50**)	-	[39]
Arecholina mirabilis (Australie) *Clathria* sp. (Australie)	Mirabiline F (**51**)	-	[39] [40]
Clathria sp. (Australie)	Mirabiline G (**52**)	➢ Activité antimicrobienne	[40, 41]
Clathria sp. (Australie)	Mirabiline H (**53**)	➢ Activité cytotoxique faible (DL_{50} > 30 µM) sur les lignées cellulaires SH-SY5Y, AGS, HT29 et Intestine-407	[40]
Clathria sp. (Australie)	Mirabiline I (**54**)	➢ Activité cytotoxique faible (DL_{50} > 30 µM) sur les lignées cellulaires SH-SY5Y, AGS, HT29 et Intestine-407	[40]
Clathria sp. (Australie)	Mirabiline J (**55**)	➢ Activité cytotoxique faible (DL_{50} > 30 µM) sur les lignées cellulaires SH-SY5Y, AGS, HT29 et Intestine-407	[40]

❖ Nomenclature révisée

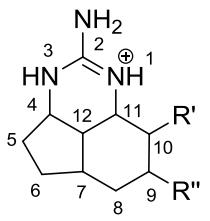
Numérotation du squelette tricyclique

Plusieurs numérotations ont été adoptées pour le squelette des alcaloïdes guanidiniques tricycliques (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène « a » et « b ». Dans un souci d'homogénéité et de continuité dans ce mémoire, la numérotation « a » (Figure 4)

adoptée dans la publication de Sorek et collaborateurs [32], traitant de l'isolement des premières nétamines de *Biemna laboutei* a été reprise.



Numérotation « a »



Numérotation « b »

Figure 4 : Numérotations rencontrées dans la bibliographie pour les ptilocaulines/mirabilines/nétamines.

Noms révisés de quelques composés

Yu *et al* [42] ont décidé dans leur publication de renommer plus justement certaines des molécules. La 8a,8b-déshydroptilocauline (**42**) a le même degré d'oxydation que la ptilocauline, par conséquent le préfixe « déshydro » n'était pas approprié. De plus ces deux composés sont épimères en C-7. Elle a été donc renommée **7-**épinéoptilocauline, le préfixe « néo » servant d'indication pour la double liaison en C-8a et C-8b, car le préfixe « iso » était déjà utilisé pour indiquer une double liaison entre C-7 et C-8.

Pour les mêmes raisons, la 8a,8b-déshydro-8-hydroxyptilocauline (**43**) est renommée 8α-hydroxy-7-épinéoptilocauline.

Les 1,8a;8b,3a-didéshydro-8β-hydroxyptilocauline et 1,8a;8b,3a-didéshydro-8α-hydroxyptilocauline furent également renommées respectivement 8α-hydroxymirabiline B et 8β -hydroxymirabiline B.

❖ Configuration absolue de la ptilocauline

En 1984, la ptilocauline (**39**) [33] a été synthétisée par Snider et collaborateurs [43], ce qui a permis de conclure que les protons H-5a et H-8b étaient *cis*. La synthèse réalisée par Walts en 1985 viendra étayer ce résultat, puisqu'elle aura permis d'établir la configuration absolue de la ptilocauline [44]. En s'appuyant sur ces travaux, toutes les molécules appartenant à cette famille seront présentées par la suite avec la configuration de C-5 pour laquelle H-5a est en *β*.

❖ Stéréochimie revue de quelques nétamines

En 2008, l'équipe de Yu s'intéresse à la synthèse de plusieurs alcaloïdes tricycliques à guanidines isolés d'éponges, en particulier celles des nétamines E (**36**), et G (**38**) [42]. Pour ces deux nétamines, la synthèse a permis la détermination de leur configuration absolue. Ainsi, Yu et collaborateurs ont montré que les chaînes latérales de ces alcaloïdes auraient en réalité une configuration *trans* et non *cis,* comme cela avait été décrit dans la publication d'origine [32]. En approfondissant leur étude sur la stéréochimie des alcaloïdes tricycliques, Yu et collaborateurs sont également parvenus à déterminer la stéréochimie des nétamines A (**32**) et C (**34**) : leurs chaînes latérales auraient une configuration *trans* également.

La Figure 5 présente un récapitulatif des molécules tricycliques guanidiniques isolées, classées selon leur aromaticité, avec les molécules renommées et leurs configurations relatives revues.

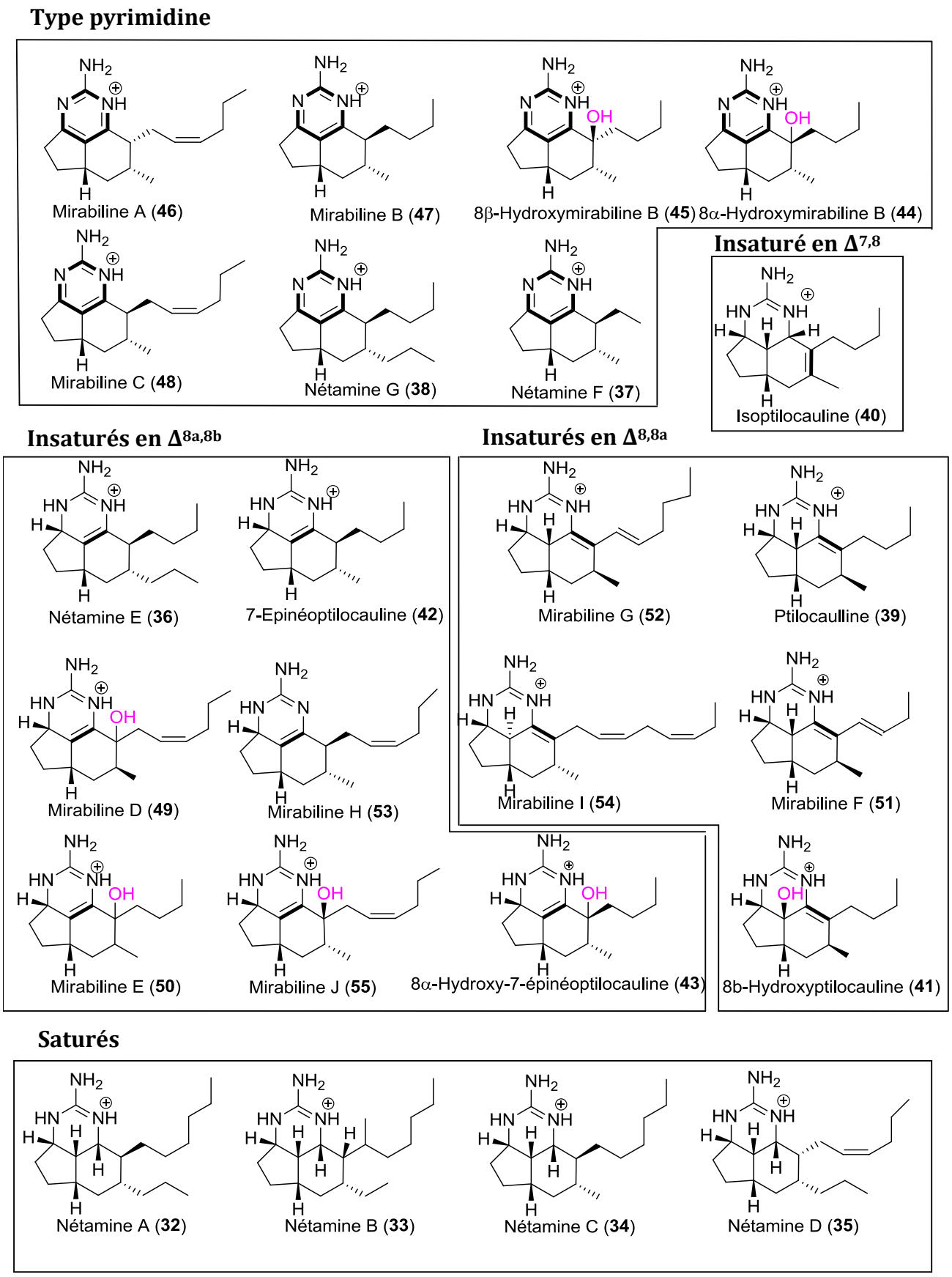


Figure 5 : Récapitulatif des alcaloïdes guanidiniques tricycliques naturels : ptilocaulines/mirabilines/nétamines.

Chapitre II

Isolement et caractérisation structurale de métabolites issus de l'éponge *Biemna laboutei*

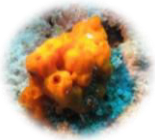
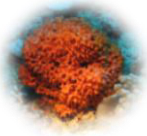
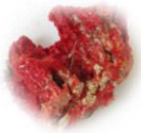
II.1 Collecte et identification

Au début de ces travaux de thèse, huit éponges collectées en 2009, dans la baie de Salary sur la côte Sud-Ouest de Madagascar (Figure 6), avaient été sélectionnées pour une étude de leur composition chimique.

Figure 6 : Zone de collecte des huit éponges étudiées (Crédit Google Map).

Ces éponges listées (Tableau V) ont été identifiées par le Directeur de Recherche CNRS Jean Vacelet, de la station biologique d'Endhoume à Marseille. Des échantillons de référence ont tous été conservés à DIMAR dans cette même station et au Museum d'Histoire Naturelle de Marseille (MHNM) pour *Biemna laboutei* qui va concerner notre étude chimique approfondie.

Tableau V : Liste des huit éponges sélectionnées pour l'étude de leur composition chimique.

n°	Systématique	Photographie	Point GPS Profondeur	n° de référence DIMAR	 MHNM
1	***Biemna laboutei*** Hooper, 1996 Famille : Desmacellidae Ordre : Poecilosclerida		22°30.952 S 43°12.558 E 25-30 m	SA09-071	MHNM162421
2	***Stylissa carteri*** Dendy, 1889 Famille Dictyonellidae Ordre : Halichondrida		22°31.822 S 43°12.939 E 25-27 m	SA09-93	-
3	***Clathria (Clathria) foliascens*** Vacelet & Vasseur, 1971 Famille : Microcionidae Ordre : Poecilosclerida		22°30.952 S 43°12.558 E 30 m	SA09-102	-
4	***Axinella donnani*** Bowerbank, 1873 Famille : Axinellidae Ordre : Halichondrida		22°31.988 S 43°13.036 E 30 m	SA09-103	-
5	***Haliclona polypoides*** Vacelet, Vasseur & Lévi, 1976 Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida		22°31.988 S 43°13.036 E 30 m	SA09-107	-
6	***Clathria dichela sensu*** (Vacelet, Vasseur & Lévi, 1976) Famille : Microcionidae Ordre : Poecilosclerida		22°31.822 S 43°12.939 E 25-27 m	SA09-112	-
7	***Acanthella cavernosa*** Dendy, 1922 Famille : Dictyonellidae Ordre : Halichondrida		22°32.015 S 43°13.508 E 25 m	SA09-140	-
8	***Strongylamma arenosa*** Vacelet & Vasseur, 1971 Famille : Tedaniidae Ordre : Poecilosclerida		22°32.015 S 43°13.508 E 17-20 m	SA09-127	-

II.2 Extraction et criblage chimique par CLHP-PAD-DEDL-SM et RMN ^{1}H

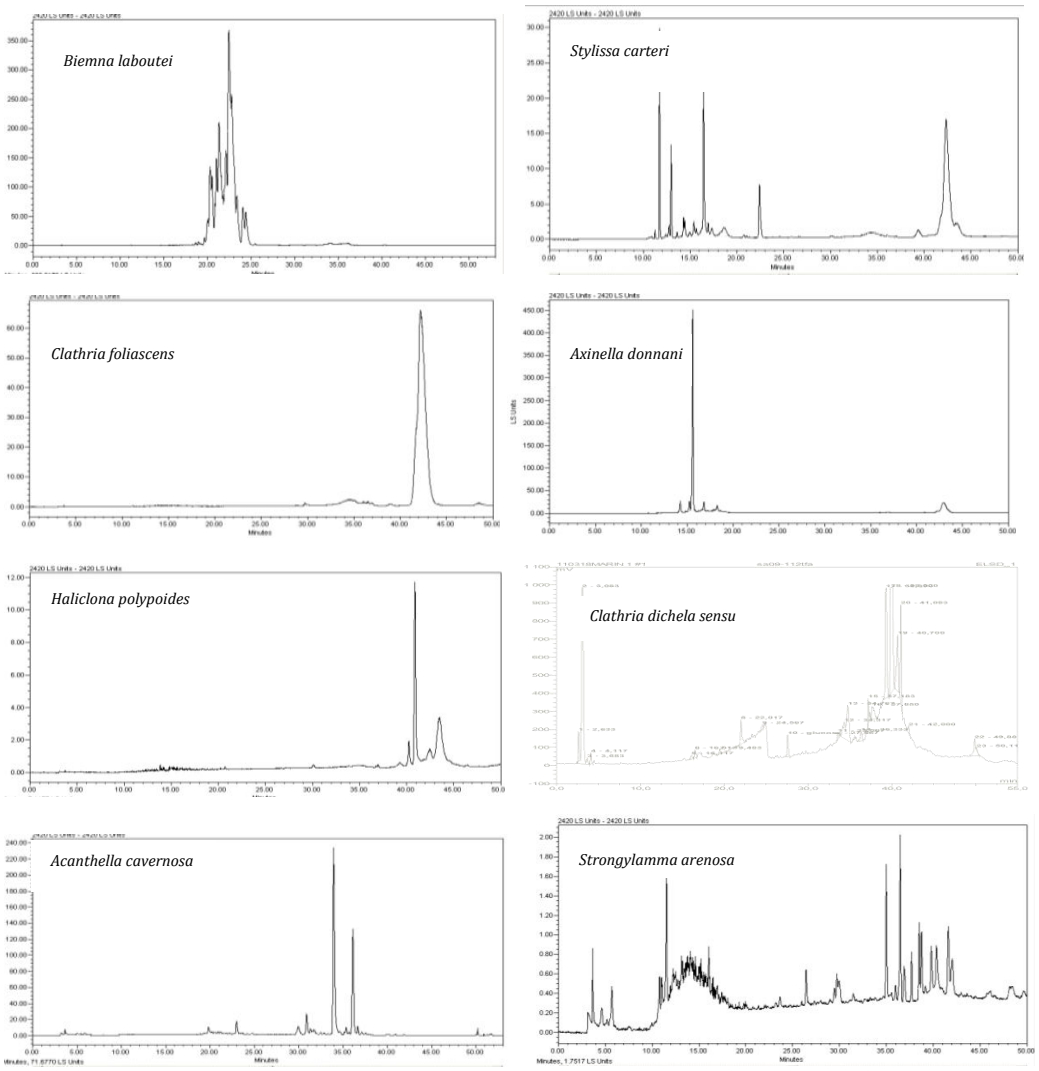
Chacune des huit éponges sélectionnées a été lyophilisée puis extraite par macération à froid au moyen d'un mélange de DCM/MeOH : 1/1.

❖ CLHP

Les extraits bruts obtenus ont été analysés dans un premier temps par CLHP sur colonne chromatographique de polarité élevée (silice greffée C18), afin de comparer leurs profils chromatographiques (ou signature chimique). Pour chaque éponge, plusieurs signatures chimiques ont été obtenues par l'emploi simultané de trois détecteurs :

- Un détecteur à barrettes de photodiodes (PAD) qui permet d'obtenir une mesure simultanée sur toute l'étendue du spectre UV-visible (entre 200 et 900 nm).
- Un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) qui permet l'analyse de composés exempts de chromophores ou faiblement ionisables. Ce type de détection, s'il ne donne pas d'informations structurales, permet l'obtention d'indications semi-quantitative et conduit à l'obtention d'un chromatogramme donnant la proportion relative de chaque analyte.
- Un spectromètre de masse (SM) à ionisation chimique positive (APCI) donnant accès à la masse des composés.

La Figure 7 représente les signatures chimiques résultant du couplage CLHP-DEDL des huit extraits étudiés à l'aide du gradient allant de 98:2 à 0:100 du mélange Eau/ACN (+0,1 % AF).



Colonne : Waters Sunfire C18 4,6*150 mm
Eluant : Eau/ACN + 0,1% AF (98:2 isocratique puis gradient 98:2 à 0:100)
Débit : 1 mL/min
Dilution : 3 mg/mL

Figure 7 : Comparaison des profils CLHP-DEDL des huit éponges sélectionnées.

❖ RMN ^{1}H

Ces analyses ont ensuite été complétées par une comparaison des spectres RMN^{1}H des extraits bruts réalisés dans du méthanol deutéré, ou dans du chloforme deutéré pour *Biemna laboutei* et *Acanthella cavernosa* (Figure 8).

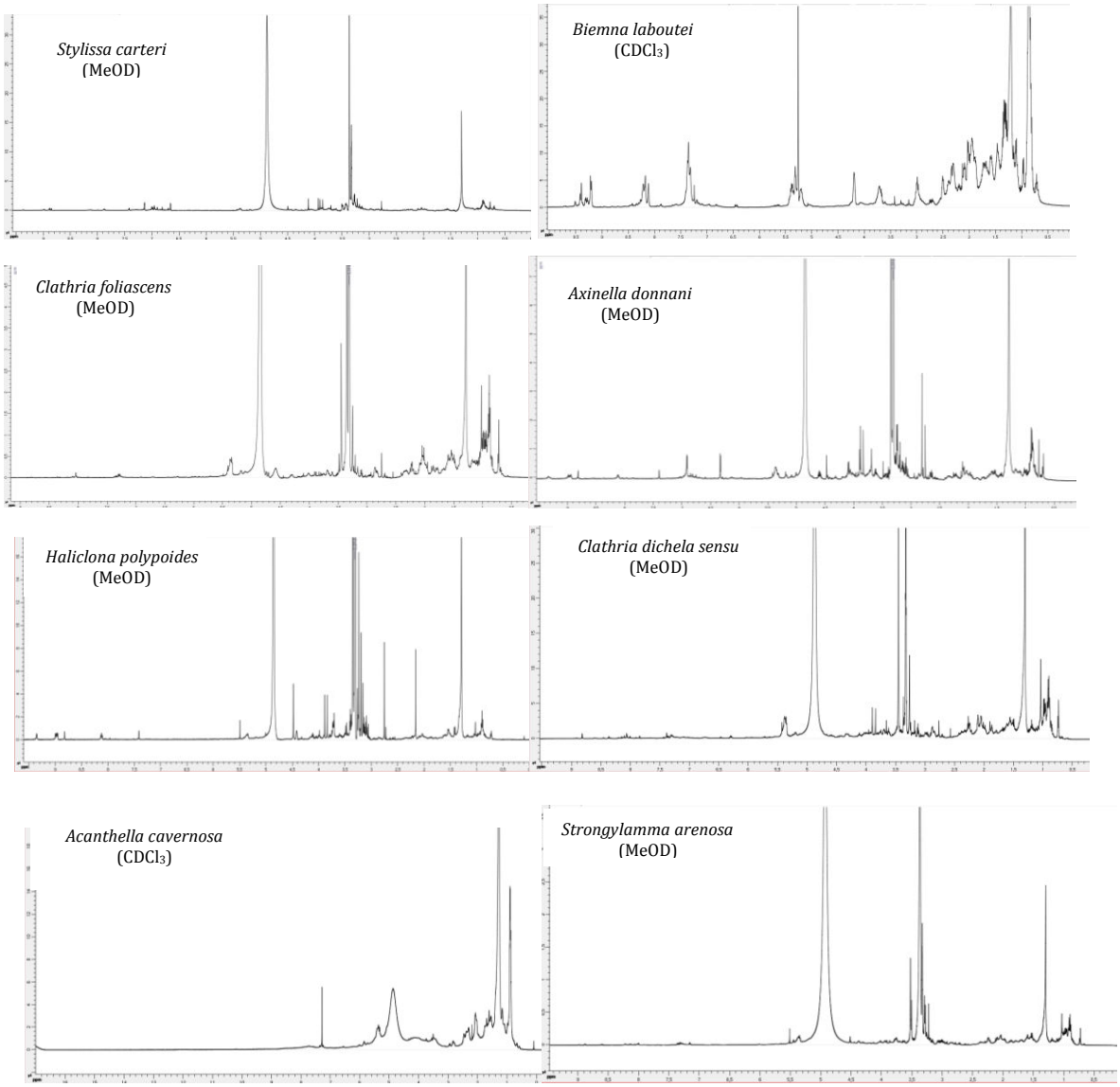


Figure 8 : Comparaison des spectres RMN ^{1}H des huit éponges sélectionnées.

❖ Bibliographie

Chaque genre d'éponge a également fait l'objet d'une étude bibliographique préliminaire, afin d'avoir un aperçu des travaux précédemment entrepris sur chacun d'eux (Tableau VI). Il faut souligner que l'éponge *Stylissa carteri* a d'abord été positionnée dans le genre *Acanthella*, sous le nom de *Acanthella carteri Dendy*, fortement étudiée pour sa composition chimique.

Tableau VI : Nombre de publications en fonction de chaque genre d'éponges à étudier.

Genre	Nombre de publications
Biemna	6
Stylissa	>15
Clathria	>15
Axinella	>15
Haliclona	>15
Acanthella	>15
Strongylamma	0

❖ Sélection de l'éponge à étudier

La corrélation des données CLHP-UV-DEDL-SM, RMN ^{1}H et bibliographiques a conduit à la sélection de l'éponge *Biemna laboutei*.

Le chromatogramme CLHP-UV-DEDL-SM de cet extrait révèle un nombre important de métabolites, polaires, ayant des masses comprises entre *m/z* 246 et 304, pour la plupart non référencées parmi les molécules isolées du genre *Biemna*.

Le spectre proton révèle principalement la présence d'une série de composés pouvant appartenir à la classe des alcaloïdes. En effet des signaux apparaissent entre δ_H 3,7 et 4,3 ppm, indiquant la présence d'hétéroatomes et éventuellement d'atomes d'azotes. D'autres déplacements chimiques entre δ_H 5,2 et 5,5 ppm indiquent la présence de protons éthyléniques.

Malgré les études chimiques référencées pour le genre *Biemna* (six publications), l'étude chimique de *Biemna laboutei* a été choisie en raison de son riche profil qui pouvait conduire à des composés nouveaux.

II.3 Etude chimique de l'éponge *Biemna laboutei*

L'étude chimique de l'éponge *Biemna laboutei* (Figure 9) a conduit à l'isolement et à l'identification de 18 alcaloïdes guanidiniques possédant tous un squelette tricyclique (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène. Parmi ces composés, cinq sont de structures connues : les mirabilines A (**46**), C (**48**), F (**51**) et J (**55**) et douze de structures nouvelles. Ces derniers ont été nommés nétamines H-S (**57-68**).

Pour chacun des métabolites isolés, sont exposées dans un premier temps, les techniques d'isolement et de purification, puis dans un second temps, leur élucidation structurale.

Figure 9 : Photographie *in situ* de *Biemna laboutei.*

II.3.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires

A partir de l'extrait brut de *Biemna laboutei* déjà obtenu précédemment, les métabolites secondaires ont été isolés par combinaison des techniques classique de la Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP) et Haute Performance (CLHP) ;

Le fractionnement a été suivi par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), détecteur à barrettes de photodiodes (PAD) ou détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) combinés au système CLHP.

II.3.1.1 Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait brut de *Biemna laboutei* (87 g) a été fractionné sur colonne de silice normale par CLMP. L'élution a été effectuée avec quatre systèmes de solvants :

isohexane/AcOEt (95:5), isohexane/AcOEt (85:15), AcOEt (100) et AcOEt/MeOH (70:30) permettant de récupérer quatre fractions (F1-F4) (Figure 10).

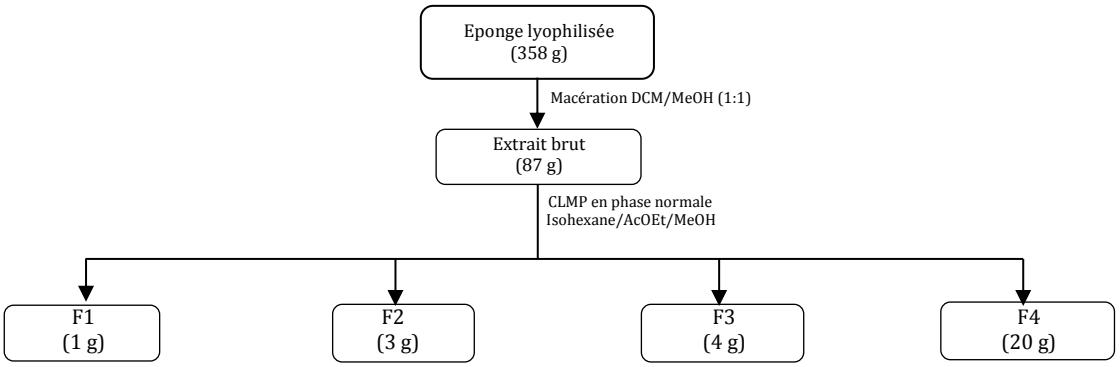
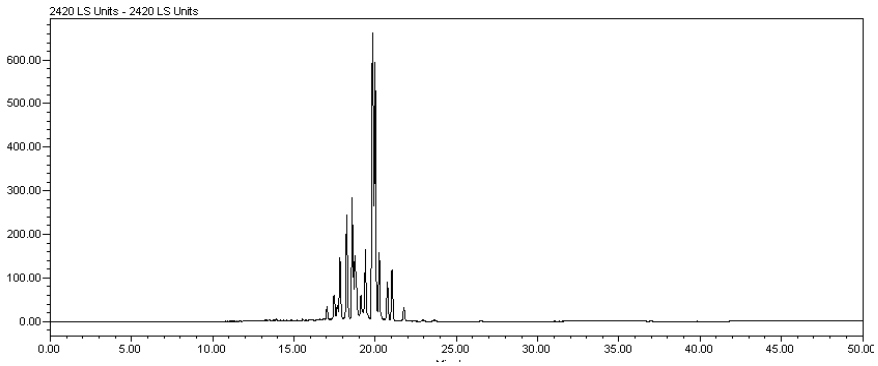


Figure 10 : Extraction et premier fractionnement de *Biemna laboutei.*

Les analyses CCM puis CLHP-PAD-DEDL-SM des fractions F1 à F4 montrent une richesse en métabolites secondaires de la fraction méthanolique F4 (20g) avec des masses *m/z* comprises entre 246 et 304 (Figure 11).

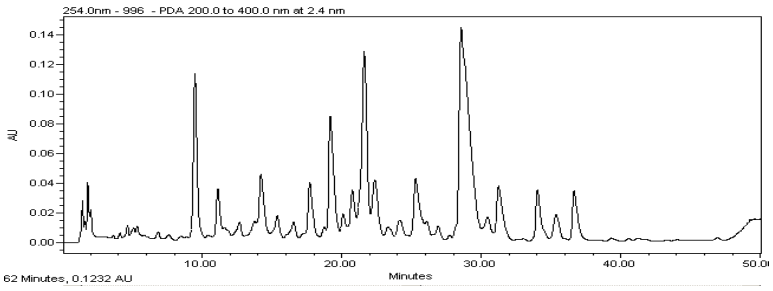


Colonne : Waters Sunfire C18 4,6*150 mm
Eluant : Eau/ACN + 0,1 % AF (75:25 isocratique puis gradient 75:25 à 0:100)
Débit : 1 mL/min

Figure 11 : Profil CLHP-DEDL de la fraction méthanolique F4 de *Biemna laboutei.*

II.3.1.2 Isolement de la mirabiline F et des nétamines K, L, M, N, O, P, R, S

360 mg de la fraction F4 ont été traités par CLHP préparative en phase inverse sur une colonne de type C-18 et couplée à un détecteur PAD (Figure 12) pour conduire à 16 fractions (F4-1A à F4-1M) (Figure 13).



Colonne : Waters Sunfire C18 4,6*150 mm
Eluant : Eau/MeOH +0,1% AF (55 :45 isocratique puis gradient 55 :45 à 30 :70)
Débit : 1 mL/min

Figure 12 : Profil CLHP-PAD (254 nm) optimisé de la fraction méthanolique de *Biemna laboutei.*

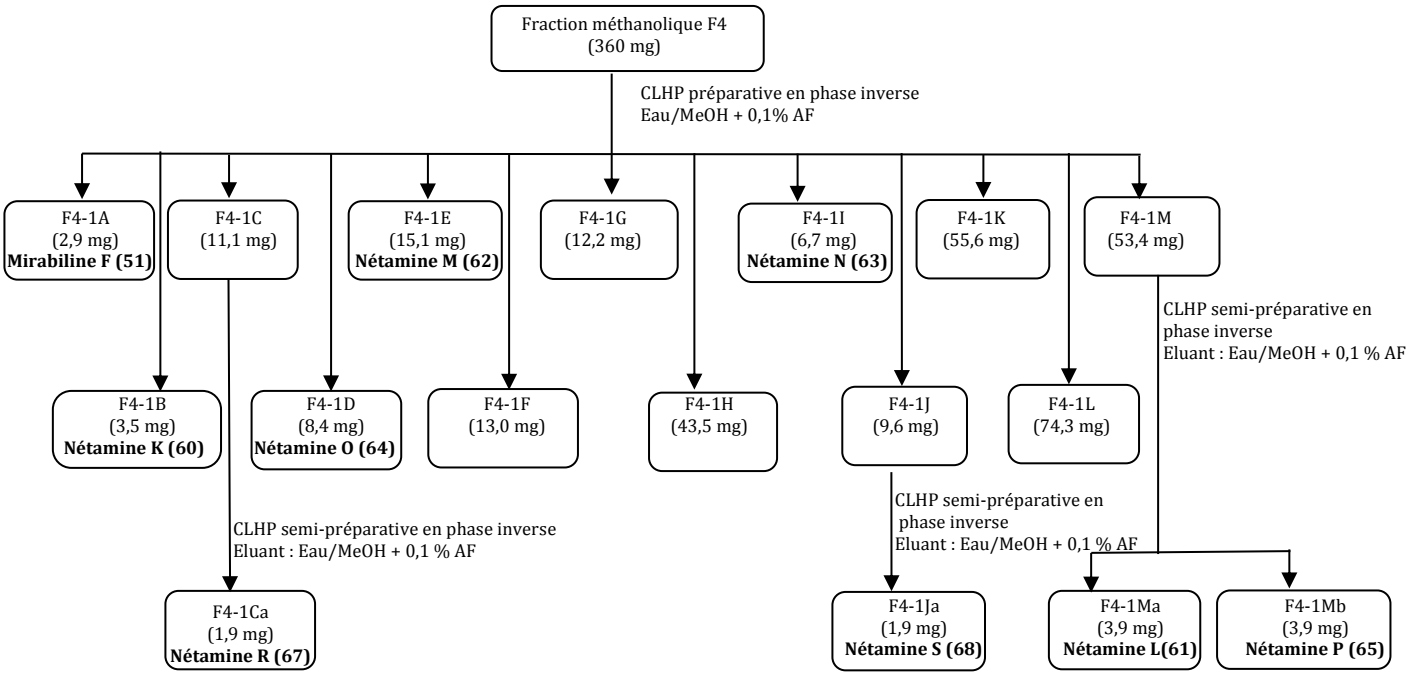


Figure 13 : Traitement de la fraction méthanolique F4 pour l'obtention de la mirabiline F et des nétamines K, L, M, N, O, P, R et S.

Les fractions F4-1A, B, D, E et I contiennent respectivement la mirabiline F (**51**) et les nétamines K (**60**), O (**64**), M (**62**) et N (**63**) pures. Les fractions F4-1C et J contiennent respectivement les nétamines R (**67**) et S (**68**) en présence de composés minoritaires. Elles ont donc été purifiées par CLHP-UV préparative en phase inverse pour obtenir ces composés purs. La fraction F4-1M contient les nétamines L (**61**) et P (**65**) en mélange. Cette fraction a donc été traitée de nouveau en CLHP préparative, conduisant ainsi à l'isolement des composés **65** et **61** purs.

II.3.1.3 Isolement des mirabilines A et C et des nétamines G, H, I et J

4,05 g de la fraction méthanolique ont été fractionnés par chromatographie Flash sur colonne de silice normale L'élution réalisée avec les systèmes de solvants Hept/AcOEt puis AcOEt/MeOH en gradient a permis de récupérer 13 fractions (F4-2A à F4-2M). La fraction F4-2E a été sélectionnée pour un second fractionnement par CLHP-PAD préparative en phase normale. Une élution à partir d'un mélange Eau/MeOH a conduit à l'obtention de sept fractions : F4-2Ea à F4-2Eg. Les fractions F4-2Ea, b, d, f et g renferment respectivement la nétamines J (**59**), les mirabilines A (**46**) et C (**48**) et les nétamines I (**58**), H (**57**). La fraction F4-2Ee a quant à elle été de nouveau fractionnée par CLHP-PAD en phase inverse pour conduire à la nétamine G (**38**). Les fractionnements sont décrits (Figure 14).

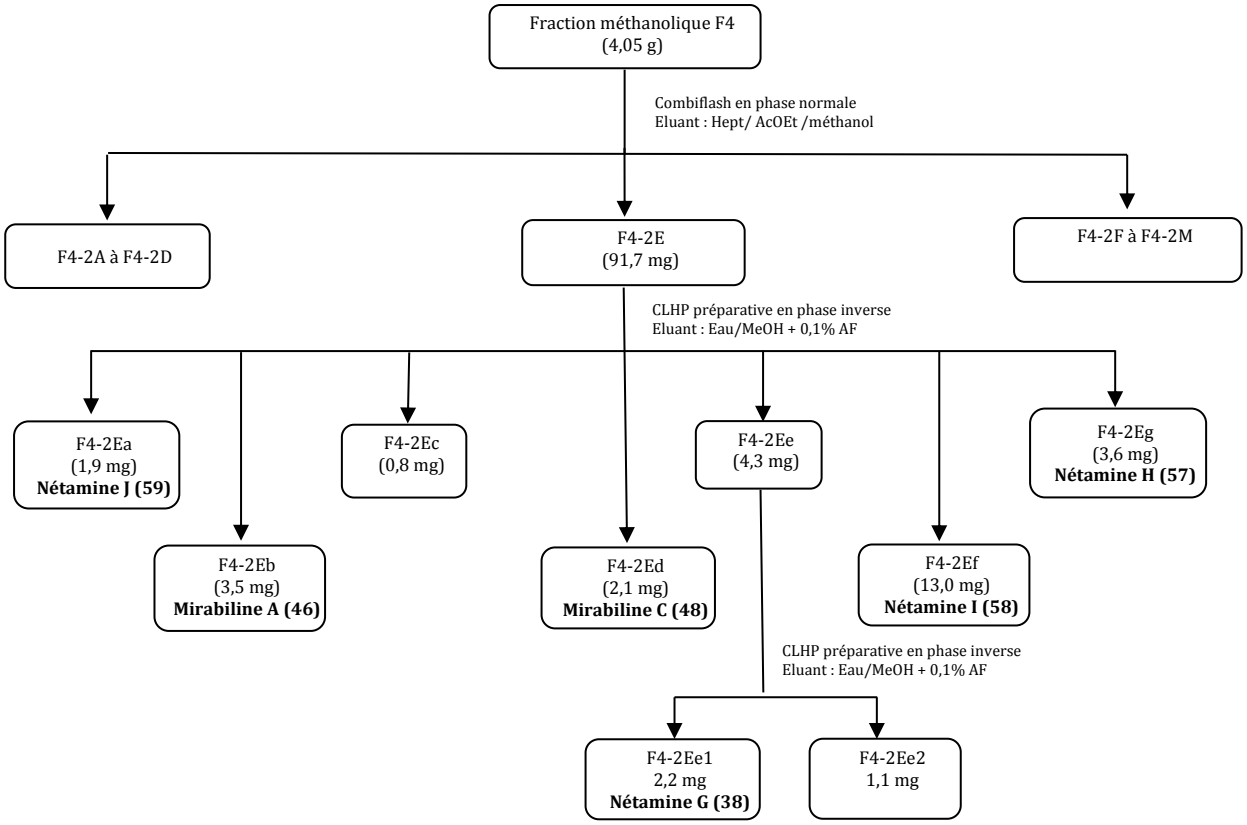


Figure 14 : Traitement de la fraction méthanolique F4 pour l'obtention des mirabilines A et C et des nétamines G, H, I et J.

II.3.1.4 Isolement de la mirabiline J et des nétamines E et Q

Une deuxième partie de la fraction méthanolique F4 (2,6 g) a été chromatographié par CLMP en phase inverse. Le mélange Eau/MeOH a conduit à l'obtention de 12 fractions

(F4-3A à F4-3L). Les purifications successives des fractions F4-3E et F4-3J ont permis d'isoler la mirabiline J (**55**) et les nétamines E (**36**) et Q (**66**).

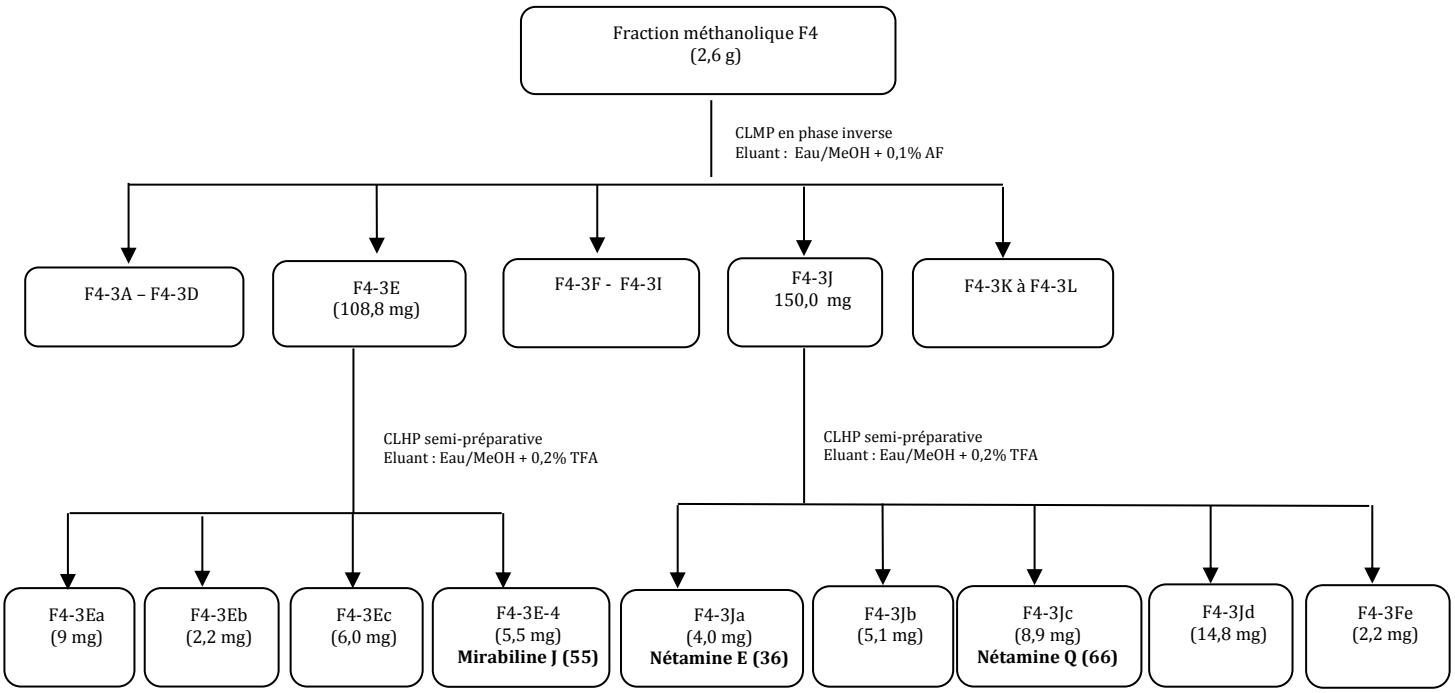


Figure 15 : Traitement de la fraction méthanolique pour l'obtention de la mirabiline J et des nétamines E et Q.

II.3.2 Caractérisation structurale des métabolites secondaires

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification des 18 métabolites isolées : l'ultraviolette (UV), l' infrarouge (IR), la masse haute résolution (HRMS) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif (ESI^+) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135), bidimensionnelle homonucléaire (COSY ^1H-^1H, NOESY, ROESY) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C et ^1H-^{15}N)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Le choix de les traiter par type de structure et en fonction des insaturations du système tricyclique, à savoir, dans un premier temps, l'analyse structurale des alcaloïdes guanidiniques à noyau aromatique type pyrimidine, puis celle des alcaloïdes guanidiniques insaturés en $\Delta^{8,8a}$ et enfin celle des alcaloïdes guanidiniques insaturés en $\Delta^{8,8b}$.

Cette démarche appliquée dans un souci de clarté présente l'avantage de faciliter la comparaison des résultats au sein d'un même groupe de composés.

Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C de l'ensemble des produits isolés des nétamines H-S sont consignés dans les Annexes 1 à 39.

II.3.2.1 Alcaloïdes guanidiniques à noyau aromatique type pyrimidine

Parmi les molécules isolées, six d'entre elles présentent un noyau aromatique de type pyrimidine (Figure 16). Trois sont des composés déjà connus : les mirabilines A (**46**) et C (**48**) et la nétamine G (**38**) ; trois sont de structures nouvelles : les nétamines H (**57**), I (**58**) et J (**59**).

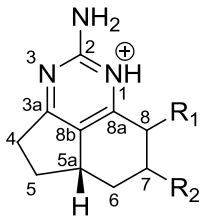


Figure 16 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau aromatique type pyrimidine.

En raison de leur système tricyclique identique, ces six composés présentaient des données spectrales proches :

- Des spectres UV semblables avec des maximums d'absorbance à 202, ~234 et ~304 nm (Figure 17).

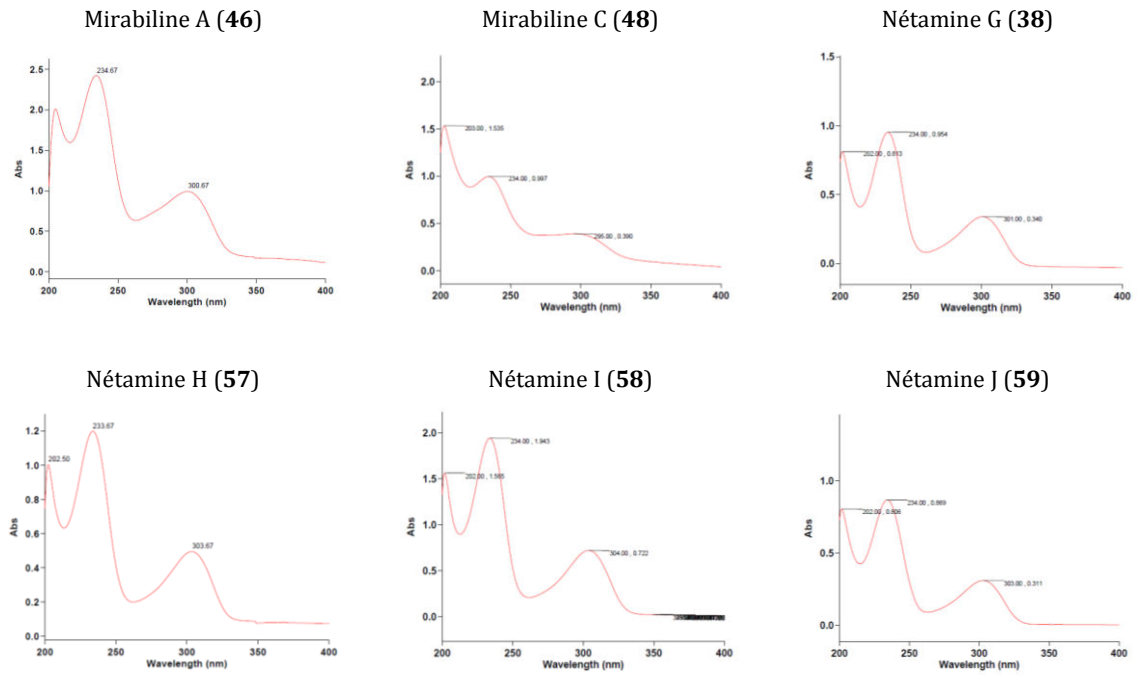


Figure 17 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques pyrimidiniques.

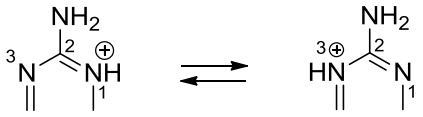
- Des spectres RMN ^{13}C avec de fortes similitudes notamment au niveau du cycle pyrimidinique (Tableau VII).

Tableau VII : Déplacements chimiques ^{13}C caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques pyrimidiniques dans MeOD.

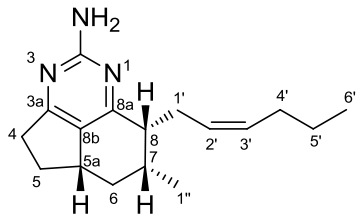
Position	δ_C (ppm)			
	Mirabiline A (46)	**Nétamine H (57)**	**Nétamine I (58)**	**Nétamine J (59)**
2	164,5	164,6	164,4	164,7
3a	176,4	176,5	176,4	176,3
8a	166,9	167,0	166,8	167,4
8b	126,3	127,5	126,8	127,5

Le tableau VII n'inclut pas les données relatives à la mirabiline C (**48**). Le spectre RMN ^{13}C de cette molécule connue n'a en effet pas été enregistré.

- Par ailleurs, il est à noter que ces molécules isolées en milieu acide ont été analysées sous leurs formes protonées, le proton pouvant être relié aussi bien à l'azote en position 1 qu'à celui se trouvant en position 3.



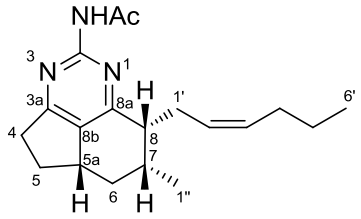
❖ Elucidation structurale de la mirabiline A (46)



Mirabiline A (**46**)

Le composé **46** ($[\alpha]_D^{25}$ +2,85 (*c* 1,30 g/100 mL)) a été isolé sous forme d'une huile marron. Son spectre de masse HRMS en mode ESI$^+$ a révélé un ion moléculaire à 272,2132 correspondant à la formule brute $C_{17}H_{26}N_3$ (valeur calculée : *m/z* 272,2127).

La comparaison du spectre RMN ^{1}H du composé isolé avec celui de la littérature pour la mirabiline A, déjà isolée sous forme *N*-acétylée, laisse supposer que **46** a pour structure celle de la mirabiline A (Tableau VIII). Cette mirabiline acétylée a été isolée pour la première fois en 1996 d'une éponge australienne, *Arenochalina mirabilis* [39]. Ce produit ayant été isolé uniquement sous sa forme *N*-acétylée (**56**), aucune donnée spectroscopique n'est disponible pour sa forme libre. L'acétylation de **46** a alors été tentée sans résultat. Le composé **46** s'est, en effet, décomposé avec les conditions d'acétylation appliquées.



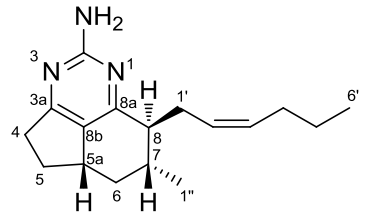
Mirabiline A *N*-acétylée (**56**)

Aussi, une étude approfondie des spectres RMN bidimensionnels du composé **46** a permis de conforter notre première identification. L'étude du spectre NOESY en particulier révèle des corrélations entre les protons H-5a (δ_H 2,84 ppm), H-7 (δ_H 2,10 ppm) et H-8 (δ_H 2,70 ppm) en accord avec une stéréochimie identique à celle de la mirabiline A, à savoir *cis* pour les chaînes latérales.

Tableau VIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline A *N*-acétylée de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [39] à ceux de la mirabiline A (**46**) libre isolée (500 MHz, $CDCl_3$).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature (forme acétylée)	**Observés** (forme libre)
3a	-	-
4	2,99 (dd, 17,0 ; 8,2)	3,05 (m)
5	1,59 (ddd, 17,0 ; 11,7 ; 7,1)	1,61 (m)
	2,40 (ddd, 11,9 ; 7,1 ; 6,8)	2,44 (m)
5a	2,97 (dddd, 11,7 ; 11,7 ; 6,8 ; 5,6)	2,97 (m)
6	1,84 (ddd, 12,7 ; 5,6 ; 2,6)	1,84 (m)
7	2,20 (dddq, 11,7 ; 5,4 ; 2,6 ; 7,1)	2,15 (m)
8	2,88 (ddd, 5,7 ; 5,5 ; 5,4)	2,77 (m)
8a	-	-
8b	-	-
1'	2,31 (ddd, 15,1 ; 6,7 ; 5,5)	2,42 (m)
	2,45 (ddd, 15,1 ; 6,7 ; 5,7)	2,69 (m)
2'	5,10 (br dt, 11,0, 6,7)	5,14 (m)
3'	5,25 (br dt, 11,0 ; 6,8)	5,35 (m)
4'	1,91 (m)	1,90 (m)
5'	1,29 (dtq, 1,9 ; 7,3 ; 7,3)	1,28 (m)
6'	0,85 (t, 7,3)	0,84 (m)
1''	1,11 (d, 7,1)	1,12 (m)

❖ Elucidation structurale de la mirabiline C (48)



Mirabiline C (**48**)

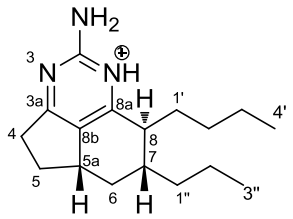
Le composé **48** ($[\alpha]_D^{25}$ +10,00, *c* 0,10 g/100 mL) a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. L'étude de son spectre HRMS obtenu en mode ESI⁺ indique la présence d'un ion moléculaire à *m/z* 272,2174 compatible avec la formule brute $C_{17}H_{26}N_3$ (calculée 272,2127).

La confrontation des analyses spectrales RMN ^{1}H de ce composé avec les données de la littérature permet d'attribuer à **48** la structure de la mirabiline C (Tableau IX). Cette mirabiline C a été isolée d'éponges marines d'Australie sous deux formes. Une première fois, en 1996, sous sa forme *N*-acétylée, de l'éponge *Arenochalina mirabilis* [39] ; une seconde fois, en 2010, sous sa forme libre, de l'éponge *Clathria* sp. [40].

Tableau IX : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline C (**48**) de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [40] et à ceux observés (500 MHz, $CDCl_3$).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature	**Observés**
3a	-	-
4	3,03 (m)	3,05 (m)
	2,76 (dd, 8,2, 17,8)	2,78 (m)
5	2,48 (m)	2,48 (m)
	1,62 (m)	1,62 (m)
5a	2,93 (m)	2,93 (m)
6	2,10 (brt, 4,0)	2,10 (m)
	0,95 (m)	0,94 (m)
7	1,92 (m)	1,91 (m)
8	2,59 (m)	2,60 (m)
8a	-	-
8b	-	-
1'	2,99 (m)	3,00 (m)
	2,65 (m)	2,64 (m)
2'	5,09 (bdddd, 7,4, 10,9, 7,4)	5,06 (m)
3'	5,44 (bdddd, 7,4, 10,9, 7,4)	5,45 (m)
4'	2,01 (q, 7,4)	2,02 (m)
5'	1,32 (dd, 7,4, 14,4)	1,32 (m)
	0,88 (t, 7,3)	0,87 (t, 7,3)
1''	1,14 (d, 6,8)	1,12 (d, 6,7)

❖ Elucidation structurale de la nétamine G (38)



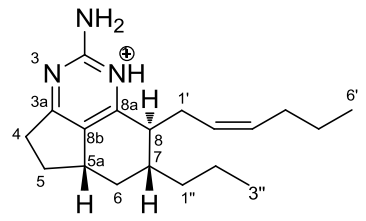
Nétamine G (**38**)

Le composé **38** ($[\alpha]^{25}_{D}$ = 18,02 (*c* 0,20 g/100mL)) est isolé sous forme d'une huile jaune pâle. La spectrométrie HRMS en mode ESI$^+$ de **38** a révélé un ion moléculaire à *m/z* 274,2271, soit une formule moléculaire brute $C_{17}H_{28}N_3$ (calculée 274,2283). L'analyse des données de la spectrométrie de masse d'une part, et de la RMN ^{1}H d'autre part (Tableau X), a permis d'identifier le composé **38** comme étant la nétamine G précédemment isolée de *Biemna laboutei* de Madagascar par Sorek et collaborateurs en 2006 [32].

Tableau X : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la nétamine G de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) et ceux observés pour (**38**) (500 MHz, $CDCl_3$).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature	**Observés**
3a	-	-
4	2,65 (dd, -)	2,65 (m)
	2,95 (m)	2,95 (m)
5	1,55 (m)	1,55 (m)
	2,40 (m)	2,40 (m)
5a	2,90 (m)	2,90 (m)
6	0,88 (m)	0,88 (m)
	2,22 (m)	2,22 (m)
7	1,75 (m)	1,75 (m)
8	2,35 (m)	2,35 (m)
8a	-	-
8b	-	-
1'	1,76 (m)	1,76 (m)
	2,04 (m)	2,04 (m)
2'	1,12 (m)	1,12 (m)
	1,31 (m)	1,31 (m)
3'	1,31 (m)	1,31 (m)
4'	0,89 (t, -)	0,89 (m)
1''	1,27 (m)	1,27 (m)
	1,58 (m)	1,58 (m)
2''	1,31(m)	1,31 (m)
	1,50 (m)	1,50 (m)
3''	0,96 (t, -)	0,96 (m)

❖ Elucidation de la nétamine H (57)



Nétamine H (**57**)

D'aspect huileux et de couleur brune, le composé **57** ($[\alpha]^{25}_{D}$ = +54,58 (*c* 1,20 g/100mL) présente un spectre HMRS en mode ESI⁺ avec un ion moléculaire à *m/z* 300, 2448 en accord avec la formule brute $C_{19}H_{30}N_3$ (calculée 300,2440). Le nombre d'insaturation calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{19}H_{29}N_3$) est de sept.

Comme pour les mirabilines A (**46**) et C (**48**) et la nétamine G (**38**), l'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N (Tableau XI) met en évidence la présence d'un système tricyclique guanidinique incluant un hétérocycle de type pyrimidine :

- 3 méthylènes (δ_C 34,2 ; 34,5 ; 37,1 ppm pour C-5, C-4 et C-6 respectivement),
- 3 méthines (δ_C 38,9 ; 39,8 ; 46,5 ppm pour C-5a, C-7 et C-8 respectivement),
- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 127,5 ; 167,0 ppm pour C-8b et C-8a respectivement),
- carbone quaternaire d'une fonction imine (δ_C 176,6 ppm pour C-3a),
- carbone guanidinique (δ_C 164,6 ppm pour C-2),
- 3 atomes d'azote (δ_N 78,1 ; 235,7 et 240,5 ppm respectivement pour N-2 ; N-3 et N-1), visibles sur les spectres HSQC et HMBC ^{1}H-^{15}N (DMF, 600 MHz).

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires longue distance HMBC indiquent clairement que le système tricyclique est substitué, sur les carbones en position C-7 (δ_C 39,8 ppm) et C-8 (δ_C 46,5 ppm), par deux groupements alkyles comprenant un total de neuf atomes de carbone : deux groupes CH_3 (δ_C 14,3 et 14,9 ppm) ; 5 groupes CH_2 (δ_C 21,6 ; 24,0 ; 29,4 ; 30,8 et 38,2 ppm) et 2 groupes CH de type sp² (δ_C 126,7 et 133,1 ppm). Comme pour les mirabilines A (**46**) et C (**48**), l'une des chaînes alkyles est une chaîne (*Z*)-hexényle. La géométrie (*Z*) de la double liaison a été confirmée par la corrélation NOESY détectée entre les deux protons oléfiniques H-2' (δ_H 5,18 ppm) et H-3' (δ_H 5,39

ppm). Le second groupe alkyle est donc un groupe propyle. Ce substituant propyle a été déterminé d'une part, grâce aux corrélations COSY observées entre H-3'' (δ_H 1,31 ppm) et H-2''(δ_H 1,31 et 1,51 ppm) et entre H-2'' et H-1'' (δ_H 1,29 et 1,65 ppm). Deux informations supplémentaires apportées par les spectres bidimensionnels permettent de positionner le motif propyle sur le carbone C-7 : la corrélation COSY entre H-1'' (δ_H 1,29 et 1,65 ppm) et H-7 (δ_H 1,79 ppm) et la corrélation HMBC entre H-6 (δ_H 0,90 ppm) et C-1'' (δ_C 38,2 ppm) (Figure 18). En conséquence le groupe hexényle a été positionné sur le carbone C-8.

Enfin, concernant la stéréochimie relative des deux chaînes latérales hexényle et propyle, l'expérience NOESY a permis les positionner en *trans*. En effet, une corrélation très nette est observée entre les protons H-5a et H-7 (δ_H 2,85 et 1,79 ppm respectivement), en revanche aucune corrélation n'est observée entre ces deux protons et H-8 (δ_H 2,36 ppm).

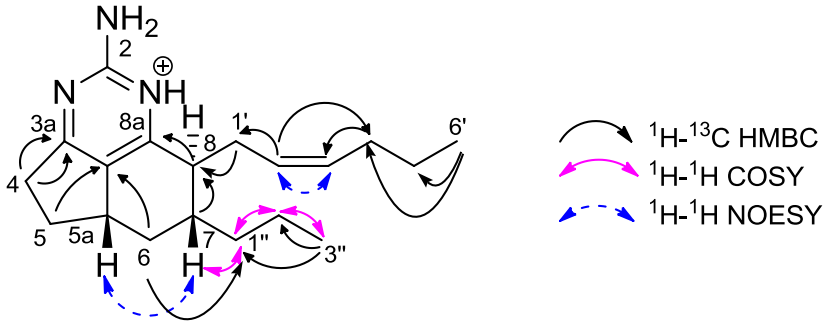


Figure 18 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine H (**57**).

La stéréochimie de **57** a été par la suite confirmée par transformation chimique. Une hydrogénation catalytique a en effet été réalisée sur la nétamine H (Schéma 1). Le spectre RMN ^{1}H du produit obtenu est identique à celui de la nétamine A (**32**), composé isolé de *Biemna laboutei* en 2006 [32] et dont la stéréochimie *trans* a été révisée par Yu *et al* en 2008 [42].

Tableau XI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine H (**57**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

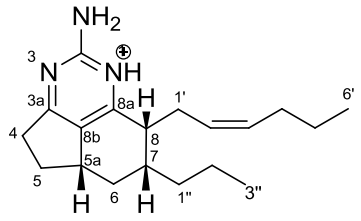
Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	164,6	-	-
2-NH_2	6,45*	-	-	-
3-N	-	-	-	-
3a	-	176,5	-	-
4	2,56	34,5	5	3a, 8b
	2,92			
5	1,54	34,2	4, 5a	3a, 8b
	2,39			
5a	2,85	38,9	5, 6	4
6	0,78	37,1	5a, 7	8b
	2,20			
7	1,79	39,8	6, 8, 1''	8
8	2,36	46,5	7	8a, 6
8a	-	167,0	-	-
8b	-	127,5	-	-
1'	2.64	29,4	2'	8, 8a
	2,78			
2'	5,18	126,7	1', 3'	1', 4'
3'	5,39	133,1	2', 4'	
4'	2,03	30,8	3', 5'	3'
5'	1,33	24,0	4', 6'	4'
6'	0,90	14,3	5'	4', 5'
1''	1,29	38,2	7, 2''	6
	1,65			
2''	1,31	21,5	1'', 3''	1''
	1,51			
3''	0,95	14,9	2''	1'', 2''

* Déplacement chimique enregistré dans le DMF

Nétamine H (**57**) Nétamine A (**32**)

Schéma 1 : Hydrogénation de la nétamine H (**57**) en nétamine A (**32**).

❖ Elucidation structurale de la nétamine I (58)



Nétamine I (**58**)

Le composé **58** nommée nétamine I a été isolé sous forme d'une huile marron ($[\alpha]_D^{25}$ s'élève à +0,47 (*c* 4,06 g/100 mL)). Son spectre HRMS (ESI$^+$) présente un pic de masse à *m/z* 300,2444 soit une formule brute $C_{19}H_{30}N_3$ (calculée 300,2440), comme pour la nétamine H (**57**) précédemment décrite.

Les données RMN ^{13}C du composé **58** (Tableau XII) montrent de fortes similitudes avec celles de la nétamine H (**57**) à l'exception des signaux attribués aux carbones C-5a, C-6, C-7, C-8, C-2', C-3' et C-1''. Leurs déplacements chimiques varient respectivement de δ_C 38,9 ; 37,1 ; 39,8 ; 46,5 ; 126,7 ; 133,1 et 38,2 ppm à δ_C 40,4 ; 33,6 ; 41,5 ; 42,9 ; 131,2 ; 129,3 et 36,8 ppm. L'analyse détaillée des spectres RMN bidimensionnels de **58** révèle cependant que **58** et **57** présentent la même structure plane.

Une expérience NOESY menée sur le composé **58** a montré des corrélations entre les protons H-5a (δ_H 2,90 ppm), H-7 (δ_H 2,02 ppm) et H-8 (δ_H 2,82 ppm) indiquant ainsi que ces trois protons se positionnent sur la même face du plan moyen de la molécule. Les deux chaînes latérales hexényle et propyle rattachées respectivement aux carbones C-8 et C-7 présentent donc la configuration *cis* et non *trans* comme c'est le cas pour la nétamine H (**57**). En outre, les distances théoriques calculées sur Chem3D entre H-7 et H-8 sont en accord avec les corrélations observées sur les spectres NOESY :

- ✓ 2,2 Å pour l'isomère *cis*, proximité spatiale qui justifie la corrélation NOESY observée entre H-7 et H-8 pour la nétamine I (**58**) ;
- ✓ 3,0 Å pour l'isomère *trans*, éloignement spatial qui justifie l'absence de corrélation NOESY pour la nétamine H (**57**) [42].

Par ailleurs, comme pour la nétamine H (**57**), une géométrie *Z* de la double liaison entre C-2' et C-3' du motif hexényle, a été attribuée à la nétamine I (**58**). Il est à noter

cependant, que contrairement à la nétamine H, cette géométrie n'a pu être déduite de corrélations NOESY entre les protons éthyléniques H-2' et H-3' en raison du fort recouvrement de leurs signaux. Cette géométrie *Z* a été attribuée grâce aux corrélations NOESY observées dans le DMF entre les protons H-1' et H-4' (Figure 19).

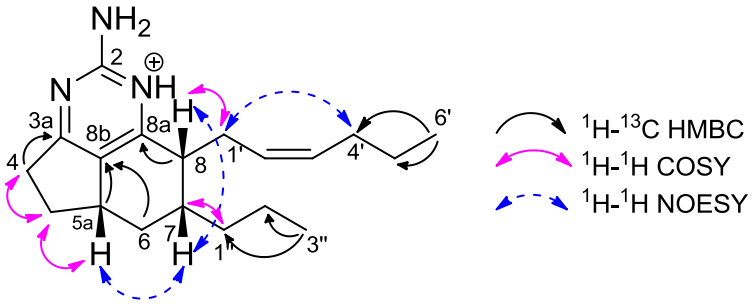


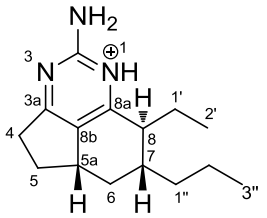
Figure 19 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine I (**58**).

Tableau XII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine I (**58**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	164,4	-	-
2-NH$_2$	6,50*	-	-	-
3-N	-	-	-	-
3a	-	176,4	-	-
4	1,51	34,7	5	3a, 8b
	2,36			
5	2,59	34,8	4, 5a	3a, 8b
5a	2,90	40,4	5, 6	3a, 8b
6	1,24	33,6	5a, 7	8b, 2''
	1,87			
7	2,02	41,5	6, 8	-
8	2,82	42,9	7	7, 8a
8a	-	166,8	-	-
8b	-	126,8	-	-
1'	2,25	29,0	8, 2'	8, 8a
	2,54			
2'	5,23	131,2	1', 3'	5'
3'	5,24	129,3	2', 4'	1'
4'	1,89	30,6	3', 5'	3'
5'	1,28	23,9	4', 6'	4'
6'	0,86	14,3	5'	5',4'
1''	1,41	36,8	7, 2''	-
	1,58			
2''	1,46	21,9	1'', 3''	6
3''	0,97	14,8	2''	1'', 2''

*Déplacement chimique enregistré dans le DMF

❖ Elucidation structurale de la nétamine J (59)



Nétamine J (**59**)

Le composé **59** a été isolé sous la forme d'une huile jaune pâle ($[\alpha]_D^{25}$ = +47,74 (*c* 0,53 g/100 mL). Le spectre HRMS de ce composé en mode ESI$^+$ conduit à l'observation d'un ion moléculaire à *m/z* 246,1976 compatible avec la formule brute $C_{15}H_{24}N_3$ (calculée : *m/z* 246,1970). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{15}H_{23}N_3$) est de six.

L'analyse des données RMN a permis de construire sans équivoque le noyau tricyclique de la molécule incluant un hétérocycle type pyrimidine (Tableau XIII):

- 3 méthylènes (δ_C 34,2 ; 34,4 ; 37,4 ppm respectivement pour C-5, C-4 et C-6),
- 3 méthines (δ_C 38,8 ; 39,4 ; 47,2 ppm respectivement pour C-5a, C-7 et C-8),
- 2 carbones de doubles liaisons trisubstitués (δ_C 127,5 ; 167,4 ppm respectivement pour C-8b et C-8a),
- carbone quaternaire d'une fonction imine (δ_C 176,3 ppm par C-3a),
- carbone guanidinique (δ_C 164,7 ppm pour C-2),
- 3 atomes d'azote (δ_N 78,3 ; 240,5 et 235,3 ppm respectivement pour N-2, N-3 et N-1).

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC indiquent que le système tricyclique est substitué en position C-7 (δ_C 39,4 ppm) et C-8 (δ_C 47,2 ppm) par deux groupements alkyles :

- ✓ Un groupement propyle en C-7, comme pour les nétamines H (**57**) et I (**58**)
- ✓ Un groupement éthyle en C-8, à la différence des nétamines H (**57**) et I (**58**) qui portent un motif hexényle en C-8.

Le motif éthyle a été déterminé grâce à la carte HMBC ^{1}H-^{13}C sur laquelle peuvent être observées des corrélations entre les protons H-2' (δ_H 0,79 ppm) du carbone méthylénique C-2' et les carbones C-1' (δ_C 24,4 ppm) et C-8 (δ_C 47,2 ppm) (Figure 20).

En outre, les corrélations observées sur le spectre NOESY positionnent les protons H-5a (δ_H 2,90 ppm) et H-7 (δ_H 1,79 ppm) sur une même face du plan moyen de la molécule et H-8 (δ_H 2,28 ppm) sur la face opposée. Les deux chaînes latérales, éthyle et propyle ont, en conséquence, une configuration *trans* (Figure 20).

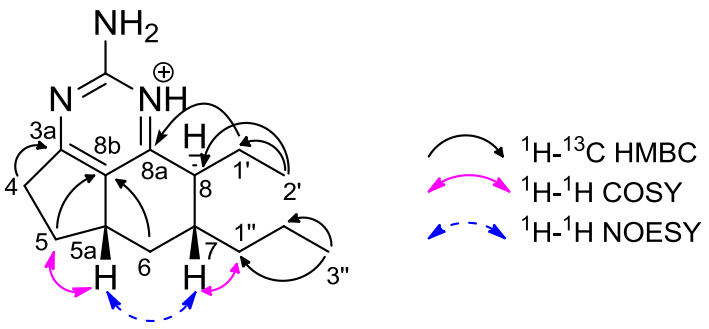


Figure 20 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine J (**59**).

Tableau XIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine J (**59**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	164,7	-	-
2-NH$_2$	6,43*	-	-	-
3-N	-	-	-	-
3a	-	176,3	-	-
4	2,57	34,4	5	3a, 8b
	2,93			
5	1,53	34,2	5a, 4	3a,8b
	2,40			
5a	2,90	38,8	5, 6	4
6	0,78	37,4	5a, 7	8b
	2,21			
7	1,79	39,4	6, 8, 1''	
8	2,28	47,2	7, 1'	1'
8a	-	167,4	-	-
8b	-	127,5	-	-
1'	1,79	24,4	8, 2'	2', 8a
	2,13			
2'	0,79	9,8	1'	1'
1''	1,26	38,4	7, 2''	3''
2''	1,33	21,4	1'', 3''	3''
	1,54			
3''	0,96	14,9	2''	2'',1''

*Déplacement chimique enregistré dans le DMF

II.3.2.2 Alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$

Parmi les molécules isolées, cinq d'entre elles présentent un noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ (Figure 21). L'une des structures est connue. Il s'agit de la mirabiline F (**51**); quatre sont de structures nouvelles : les nétamines K (**60**), L (**61**), M (**62**) et N (**63**).

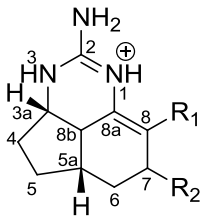


Figure 21 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$.

En raison de leur système tricyclique identique, ces cinq composés présentent des données spectrales très similaires :

- Des spectres UV semblables avec des maximums d'absorbance à 202 et ~232 nm (Figure 22).

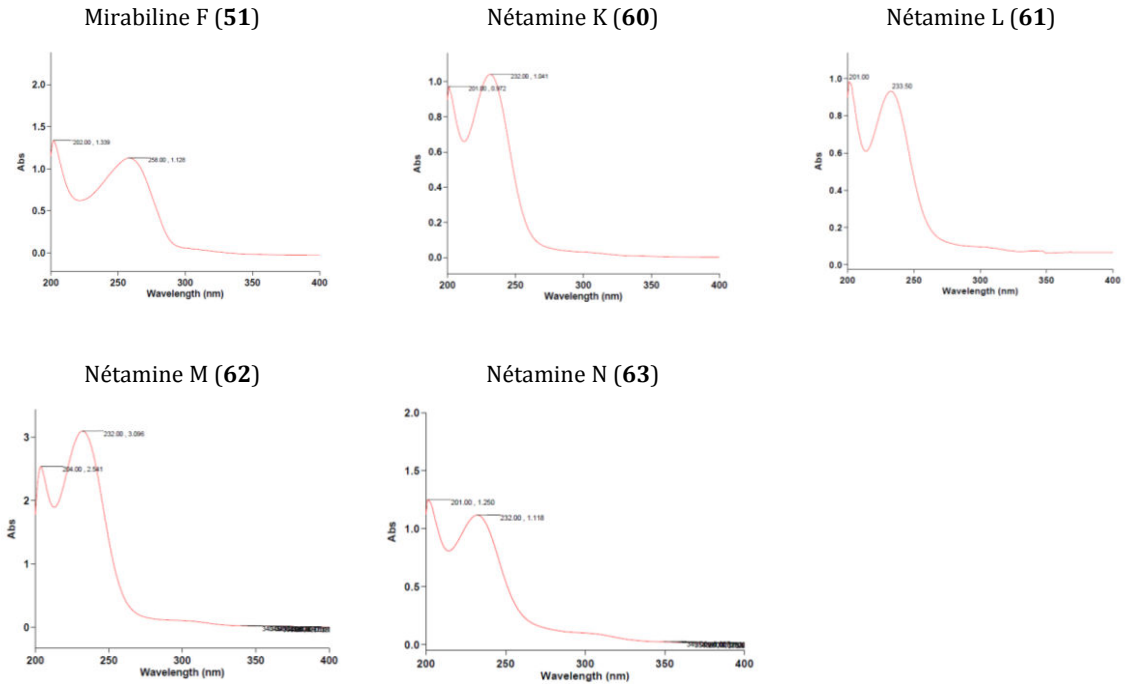


Figure 22 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8,8a}$.

- Des spectres RMN ^{13}C avec de fortes similitudes notamment au niveau des carbones C-3a, C-8 et C-8a (Tableau XIV).

Tableau XIV : Déplacements chimiques ^{13}C caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ dans MeOD.

Position	δ (ppm)			
	Nétamine K (60)	**Nétamine L (61)**	**Nétamine M (62)**	**Nétamine N (63)**
3a	55,0	55,1	55,1	55,1
8	129,3	127,0	127,2	128,2
8a	122,7	123,4	123,2	122,9
8b	37,5	37,9	37,6	37,4

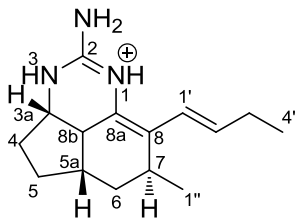
- Des spectres RMN ^{1}H similaire au niveau des protons H-3a et H-8b (δ_H ~3,80 ppm et ~2,62 ppm respectivement) (Tableau XV).

Tableau XV : Déplacements chimiques 1H caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ dans MeOD.

Position	δ_H (ppm)			
	Nétamine K (60)	**Nétamine L (61)**	**Nétamine M (62)**	**Nétamine N (63)**
3a	3,80	3,82	3,83	3,80
8	2,60	2,62	2,62	2,62

Comme pour la série des alcaloïdes guanidiniques tricycliques au noyau type pyrimidine, ces molécules ont été isolées en milieu acide et donc analysées sous leur forme protonée.

❖ Elucidation structurale de la mirabiline F (51)



Mirabiline F (**51**)

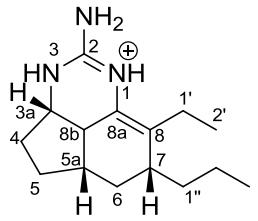
Le composé **51** ($[\alpha]^{25}_{D}$ = +13,13 (*c* 0,53 g/100 mL) a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. La spectrométrie HRMS en mode ESI$^+$ de **51** a révélé un ion moléculaire à *m/z* 246,1958 soit une formule moléculaire brute $C_{15}H_{24}N_3$ (calculée 246,1970).

L'analyse des données de la spectrométrie de masse d'une part, et de la RMN ^{1}H d'autre part (Tableau XVI), a permis d'identifier le composé **51** comme étant la mirabiline F. Cette mirabiline a été isolée une première fois en 1996, sous sa forme *N*-acétylée d'une éponge australienne nommée *Arenochalina mirabilis* [39], puis isolée de nouveau sous sa forme libre d'une éponge du genre *Clathria* [32].

Tableau XVI : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline F de la littérature (600 MHz, $CDCl_3$) [40] à ceux observés (**51**) (500 MHz, $CDCl_3$).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature	**Observés**
3a	3,76 (brs)	3,77 (m)
4	1,99 (m)	2,00 (m)
	1,49 (m)	1,49 (m)
5	2,16 (m)	2,19 (m)
	1,73 (m)	1,71 (m)
5a	2,48 (m)	2,46 (m)
6	1,99 (m)	1,99 (m)
	1,64 (m)	1,63 (m)
7	2,72 (m)	2,71 (m)
8b	2,57 (m)	2,56
1'	6,22 (d, 15,5)	6,35 (m)
2'	5,71 (dt, 6,4 ; 15,5)	5,71 (m)
3'	2,16 (m)	2,19 (m)
4'	1,01 (t, 7,2)	1,03 (t, 7,2)
1''	1,18 (d, 7,2)	1,17 (d, 7,2)

❖ Elucidation de la nétamine K (60)



Nétamine K (**60**)

D'aspect huileux et de couleur marron, le composé **60** ($[\alpha]_D^{25}$ = +45,00 (*c* 0,10 g/100 mL) dont le spectre HMRS en mode ESI$^+$ affiche un ion moléculaire à *m/z* 248,2119 a une formule brute de $C_{15}H_{26}N_3$ (calculée 248,2127). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{15}H_{25}N_3$) est de cinq.

L'analyse des données de la RMN mono et bidimensionnelle ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N (Tableau XVII) met en évidence la présence d'un système tricyclique guanidinique incluant un noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$:

- 3 méthylènes (δ_C 37,2 ; 27,7 ; 29,5 ppm pour C-4, C-5 et C-6 respectivement,
- 4 méthines (δ_C 55,0 ; 35,5 ; 36,6 et 37,5 ppm pour C-3a, C-5a, C-7 et C-8b respectivement),
- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 129,3; 122,7 ppm pour C-8 et C-8a respectivement),
- carbone guanidinique (δ_C 153,4 ppm pour C-2)

- 3 atomes d'azote (δ_N 71,0 ; 87,8 et 98,3 ppm respectivement pour N-2 ; N-3 et N-1), visibles sur les spectres HSQC et HMBC ^{1}H-^{15}N (DMF, 600 MHz).

Par ailleurs, les corrélations COSY et HMBC indiquent clairement que le système tricyclique est substitué aux positions C-7 (δ_C 36,6 ppm) et C-8 (δ_C 129,3 ppm) par deux groupements alkyles comprenant un total de cinq atomes de carbone : deux groupes CH_3 (δ_C 13,6 et 14,5 ppm) et 3 groupes CH_2 (δ_C 22,0 ; 22,6 et 36,5 ppm). Le premier groupe alkyle relié au carbone 8 est un groupe éthyle. Il a été établi à l'aide des corrélations HMBC entre H-2' (δ_H 1,03 ppm) et les carbones C-1' (δ_C 22,0 ppm) et C-8 (δ_C 129,3 ppm). Le second groupe alkyle est un groupe propyle. Ce substituant propyle a été déterminé grâce aux corrélations COSY observées de H-3'' (δ_H 0,96 ppm) à H-6 (1,60 et 1,90 ppm). Une corrélation HMBC entre le proton H-7 (δ_H 2,21 ppm) et C-8 (δ_C 129,3 ppm) ont permis de relier ces deux atomes.

Enfin, l'expérience NOESY révèle des corrélations entre H-3a (δ_H 3,80 ppm) et H-8b (δ_H 2,60 ppm), entre H-8b (δ_H 2,60 ppm) et H-5a (δ_H 2,52 ppm), et entre H-5a et H-7 (δ_H 2,21 ppm). De ces informations, on peut en déduire que les protons H-3a, H-5a, H-7 et H-8b se trouvent sur la même face du plan moyen de la molécule (Figure 23).

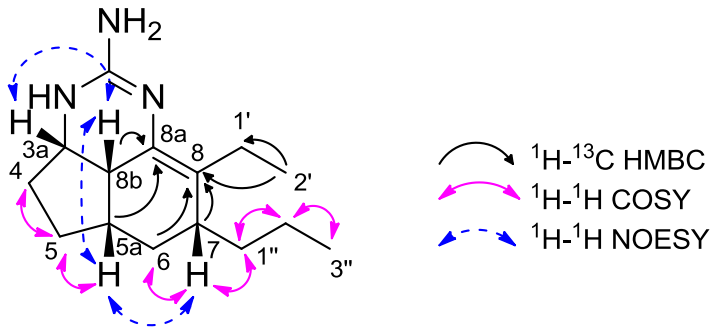
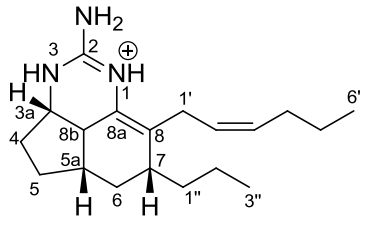


Figure 23 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine K (**60**).

Tableau XVII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine K (**60**) enregistrées dans MeOD à 600 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	153,4	-	-
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	3,80	55,0	8b, 4	5, 8a
4	1,45	37,2	3a, 5	-
	1,99			
5	1,64	27,7	4, 5a	5a, 8b
	1,77			
5a	2,52	35,5	5, 6	8a
6	1,60	29,5	5a, 7	8
	1,90			
7	2,21	36,6	6, 1''	8
8	-	129,3	-	-
8a	-	122,7	-	-
8b	2,60	37,5	3a	8a
1'	2,21	22,0		2'
2'	1,03	13,6	1'	8
1''	1,32	36,5		-
	1,68		7	
2''	1,34	22,6	1''	1''
	1,57			
3''	0,96	14,5	2''	2'', 1''

❖ Elucidation structurale de la nétamine L (61)



Nétamine L (**61**)

Le composé **61** ($[\alpha]^{25}_{D}$ = +44,79 (*c* 1,46 g/100mL)) affiche un ion moléculaire à *m/z* 302,2592 sur son spectre HMRS en mode ESI$^+$, ce qui est en accord avec la formule brute $C_{19}H_{32}N_3$ (calculée 302,2591). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{19}H_{31}N_3$) est de six.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (Tableau XVIII) met en évidence la présence d'un système tricyclique guanidinique au noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$:

- 3 méthylènes (δ_C 33,2 ; 27,6 ; 28,8 ppm pour C-4, C-5 et C-6 respectivement,
- 3 méthines (δ_C 55,1 ; 35,5 ; 37,0 ppm pour C-3a, C-5a et C-7 respectivement),

- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 127,0 ; 123,4 ppm pour C-8 et C-8a respectivement),
- carbone guanidinique (δ_C 153,4 ppm pour C-2)

Les corrélations hétéronucléaires COSY et HMBC indiquent que le système tricyclique est substitué aux positions C-7 (δ_C 37,0 ppm) et C-8 (δ_C 127,0 ppm) par deux groupements alkyles comprenant un total de neuf atomes de carbone : deux groupes CH_3 (δ_C 14,4 et 14,6 ppm) ; 5 groupes CH_2 (δ_C 22,6; 23,9; 27,4; 30,8 et 36,3 ppm) et 2 groupes CH de type sp^2 (δ_C 127,9 et 132,8 ppm). Comme pour les mirabilines A (**46**), C (**48**) et les nétamines H (**57**) et I (**58**), l'une des chaînes alkyles est une chaîne (*Z*)-hexényle dont l'enchaînement de C-1' à C-6' a été déterminé par des corrélations COSY (Figure 24). La géométrie *cis* de la double liaison a été confirmée par la corrélation NOESY détectée entre les deux protons oléfiniques H-2' (δ_H 5,24 ppm) et H-3' (δ_H 5,50 ppm). Le second groupe alkyle est un groupe propyle. Il a été déterminé grâce aux corrélations COSY observées d'une part entre les protons H-3'' (δ_H 0,93 ppm) et H-2'' (δ_H 1,31 et 1,57 ppm) et d'autre part, entre les protons H-2'' et H-1'' (δ_H 1,31 et 1,67 ppm). Deux informations supplémentaires apportées par les spectres bidimensionnels permettent de positionner ce motif propyle sur le carbone C-7 (δ_C 37,0 ppm): la corrélation COSY entre H-1'' (δ_H 1,31 et 1,67 ppm) et H-7 (δ_H 2,19 ppm) et la corrélation HMBC entre H-6 (δ_H 1,86 ppm) et C-1'' (δ_C 36,3 ppm) (Figure 24).

Enfin, concernant la configuration des carbones méthiniques C-3a, C-5a, C-7 et C-8b, l'analyse NOESY a permis de les positionner sur la même face du plan moyen de la molécule. Le spectre NOESY montre en effet une corrélation entre H-3a (δ_H 3,82 ppm)/ H-8b (δ_H 2,62 ppm), et H-8b/H-5a (δ_H 2,53 ppm). Par ailleurs, la position relative de H-5a et H-7 est établie de façon indirecte, à travers une corrélation entre H-5a/H-6 (δ_H 1,86 ppm) puis H-6/ H-7 (Figure 24).

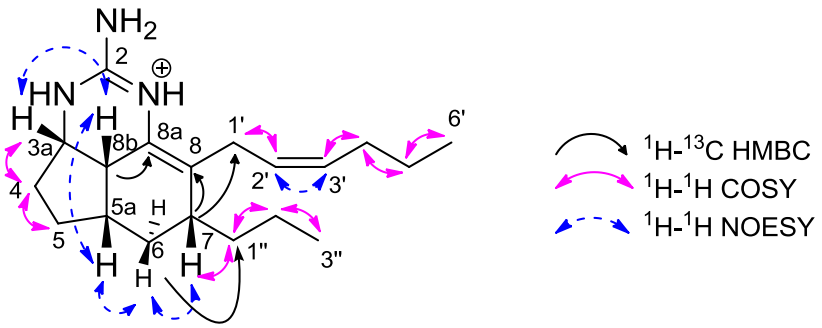
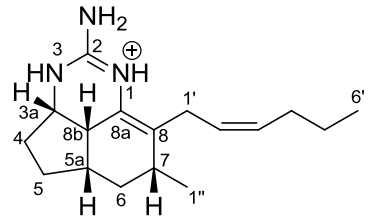


Figure 24 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine L (**61**)

Tableau XVIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine L (**61**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2		153,4		
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	3,82	55,1	8b, 4	8a
4	1,47	33,2	3a, 5	8b
	2,00			
5	1,79	27,6	5a, 4	5a
5a	2,53	35,5	8b, 6, 5	6, 5
6	1,86	28,8	7, 5a	7, 5a
7	2,19	37,0	1'', 6	8, 6, 1'
8	-	127,0	-	-
8a	-	123,4	-	-
8b	2,62	37,9	3a, 5a	8a, 4
1'	3,03	27,4	2'	2', 7
	2,90			
2'	5,24	127,9	3', 1'	4', 1'
3'	5,50	132,8	4', 2'	4'
4'	2,10	30,8	5', 3'	6', 5', 3'
5'	1,44	23,9	6', 4'	6', 4'
6'	0,93	14,4	5'	5', 4'
1''	1,31	36,3	7, 2''	2'', 3''
	1,67			
2''	1,31	22,6	1'', 3''	1'', 3''
	1,57			
3''	0,93	14,6	2''	2'', 1''

❖ Elucidation structurale de la nétamine M (62)



Nétamine M (**62**)

Le composé **62** a été isolé sous la forme d'une huile jaune pâle ($[\alpha]_D^{25}$ = +111,35 (*c* 4,01 g/100 mL)). Son spectre HRMS réalisé en mode ESI$^+$ a conduit à l'observation d'un ion moléculaire à *m/z* 274,2281 compatible avec la formule brute $C_{17}H_{28}N_3$ (calculée : *m/z* 274,2283). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{17}H_{27}N_3$) est de six.

Le noyau tricyclique incluant un noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ de ce composé grâce à a pu être établi grâce à une analyse des spectres RMN mono- et bidimensionnels (Tableau XIX):

- 3 méthylènes (δ_C 33,1 ; 28,0 ; 34,6 ppm respectivement pour C-4, C-5 et C-6),
- 3 méthines (δ_C 55,1 ; 35,6 ; 31,7 et 37,6 ppm respectivement pour C-3a, C-5a, C-7 et C-8b),
- 2 carbones de doubles liaisons trisubstitués (δ_C 127,2 ; 123,2 ppm respectivement pour C-8 et C-8a),
- carbone guanidinique (δ_C 154,8 ppm pour C-2).

Il restait encore à attribuer sept carbones, dont deux carbones éthyléniques C-2' et C-3'' (δ_C 127,9 et 132,7 ppm respectivement) et deux méthyles (C-6' et C-1'' (δ_C 14,3 et 21,4 ppm respectivement). Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC indiquent que le système tricyclique est substitué en position C-7 (δ_C 31,7 ppm) et C-8 (δ_C 127,2 ppm) par deux groupements alkyles. Les corrélations HMBC de H-1'' (δ_H 1,19 ppm) vers C-6 (δ_C 34,6 ppm) et C-8 (δ_C 127,2 ppm) ont en premier lieu permis de placer un groupe méthyle en C-7 et de relier ce dernier carbone à C-8. Il reste donc six carbones formant un motif hexényle, dont l'enchaînement en C-8 à C-6' a été déterminé grâce aux corrélations COSY et HMBC (Figure 25). La géométrie (*Z*) de la double liaison a été déduite grâce au spectre NOESY affichant une corrélation en H-2' (δ_H 2,23 ppm) et H-3' (δ_H 5,40 ppm).

Enfin, les corrélations observées sur le spectre NOESY réalisé dans du DMF acidifié positionnent, les protons H-5a ; H-7 ; H-8b et H-3a (δ_H 2,53 ; 2,36 ; 2,62 et 3,83 ppm) du même côté du plan moyen de la molécule grâce à des corrélations entre H-3a et H-8b puis H-8b et H-5a, et enfin H-5a et H-7.

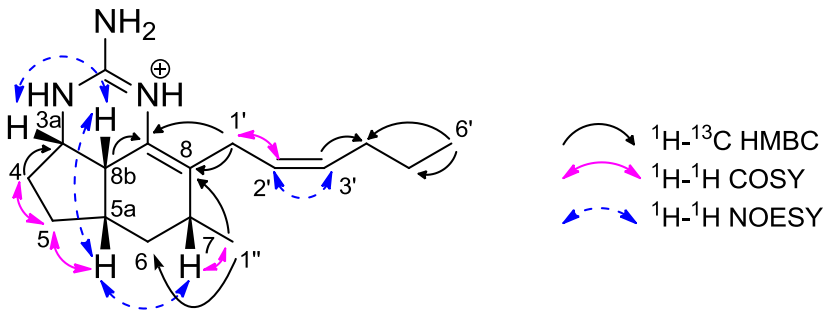
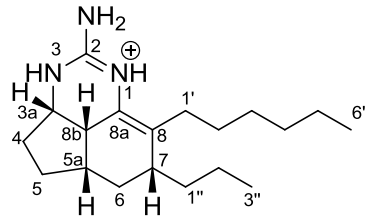


Figure 25 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine M (**62**).

Tableau XIX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine M (**62**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	154,8	-	-
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	3,83	55,1	4	4
4	1,48	33,1	3a, 5	3a, 8b
	2,02			
5	1,63	28,0	4, 5a	6
	1,77			
5a	2,53	35,6	5, 6	6
6	1,47	34,6	5a, 7	5a, 5, 1''
	2,00			
7	2,36	31,7	6, 1''	1''
8	-	127,2	-	-
8a	-	123,2	-	-
8b	2,62	37,6	-	8a, 3a
1'	2,92	27,2	2'	8, 8a
	2,97			
2'	5,23	127,9	1', 3'	4'
3'	5,49	132,7	2', 4'	4'
4'	2,11	30,7	3', 5'	2', 3', 5', 6'
5'	1,43	23,9	4', 6'	4', 6'
6'	0,95	14,3	5'	5', 4'
1''	1,19	21,4	7	6, 7, 8

❖ Elucidation structurale de la nétamine N (63)



Nétamine N (**63**)

La nétamine N (**63**) a été isolée sous forme d'une huile marron ($[\alpha]_D^{25}$ = +4,29 (*c* 0,56 g/100 mL)). Son spectre HRMS (ESI$^+$) présente un pic de masse à *m/z* 304,2768 soit une formule brute $C_{19}H_{34}N_3$ (calculée 304,2753) et cinq insaturations (calculées à partir de la formule $C_{19}H_{33}N_3$ correspondant à la forme neutre du composé).

Les données RMN ^{13}C du composé **63** (Tableau XX) montrent de fortes similitudes avec celles de la nétamine L (**61**) à l'exception des signaux attribués aux carbones C-6, C-7, C-1', C-2', C-3' et C-4'. Leurs déplacements chimiques varient respectivement de

δ_C 28,8 ; 37,0 ; 27,4 ; 127,9 ; 132,8 et 30,8 à δ_C 29,9 ; 36,8 ; 29,7 ; 30,7 ; 28,9 et 33,2 ppm. L'analyse détaillée des spectres RMN bidimensionnels de **63** révèle ainsi que ces deux composés présentent, outre le noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$, des chaînes latérales de même longueur, entièrement saturées. Toutefois, du fait du recouvrement des signaux des protons, l'attribution de leur position sur la chaîne n'a pu être déterminée de manière sûre. Pour y remédier, nous avons alors réalisé une simulation sur ChemSketch (Tableau XXI). Cette simulation a permis l'attribution de la position des carbones de la chaîne hexyle, avec cependant une incertitude quant à la position des carbones en position 1', 2' et 3' (Tableau XX).

Simulation sur ChemSketch

Il s'agit d'un outil de dessin de structures chimiques qui, à l'aide d'une banque de données spectrales, peut prédire des déplacements chimiques qui se trouvent associés aux atomes d'une molécule dessinée. Ces programmes sont basés sur un algorithme de prédiction développé par ACD (Advanced Chemistry Development) en conjonction avec des bases de données de résultats expérimentaux contrôlés et compilés, issus de la littérature.

Une expérience NOESY menée sur le composé **63** a montré des corrélations entre les protons H-3a (δ_H 3,80 ppm) et H-8b (δ_H 2,62 ppm), H-8b et H-5a (δ_H 2,52 ppm) indiquant ainsi que ces trois protons se positionnent sur la même face du plan moyen de la molécule. La configuration relative de C-7 a été déterminée de manière indirecte, par une corrélation entre H-6 (δ_H 1,91 ppm) et les protons H-5a et H-7. Ces corrélations indiquent que H-7 se trouve sur la même face que les protons H-3a, H-5a et H-8b (Figure 26).

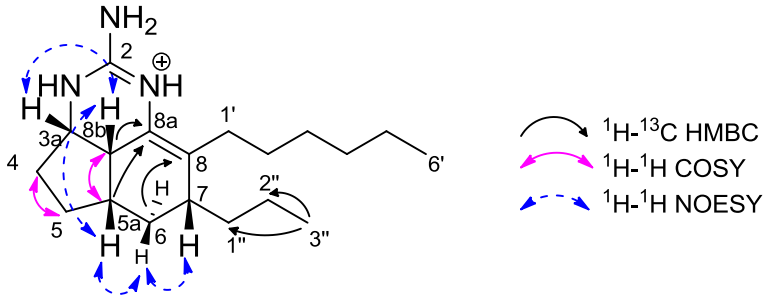


Figure 26 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine N (**63**).

Tableau XX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine N (**63**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	153,2	-	-
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	3,80	55,1	4, 8b	4
4	1,45	33,2	3a, 5	--
	1,99			
5	1,63	27,9	4, 5a	-
	1,78			
5a	2,52	35,6	5, 8b	8a
6	1,58	29,9	7	8
	1,91			
7	2,19	36,8	6, 1''	1''
8	-	128,2	-	-
8a	-	122,9	-	-
8b	2,62	37,4	3a, 5a	8, 8a, 3a
1'	1,44*	29,7ǂ	-	2'
2'	1,29*	30,7ǂ	-	-
3'	2,17*	28,9ǂ	-	-
4'	1,34	33,2	6'	6'
5'	1,34	23,9	6'	6'
6'	0,92	14,5	4', 5'	4', 5'
1''	1,32	36,6	7	7
	1,67			
2''	1,56	22,6	3''	3''
3''	0,96	14,6	2''	1'', 2''

*,ǂ Signaux interchangeables

Tableau XXI : Prédiction ACD des déplacements chimiques liés aux atomes de la nétamine N (**63**).

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2		143,3
3a	3,75	52,9
4	1,58	32,8
	1,88	
5	1,87	26,5
	1,94	
5a	2,16	32,7
6	1,43	33,0
	1,69	
7	2,44	38,6
8		135,3
8a		135,0
8b	2,62	39,90
1'	2,24	31,3
2'	1,46	27,7
3'	1,35	29,2
4'	1,35	32,6
5'	1,38	22,9
6'	0,89	14,7
1''	1,37	34,7
	1,50	
2''	1,29	20,3
3''	0,91	14,2

II.3.2.3 Alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8a, 8b}$

Parmi les molécules isolées, sept d'entre elles présentent un noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ (Figure 27). Deux des structures sont connues. Il s'agit de la mirabiline J (**55**) et de la nétamine E (**36**); cinq structures sont nouvelles : les nétamines O (**64**), P (**65**), Q (**66**), R (**67**) et S (**68**).

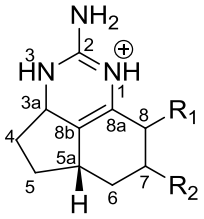


Figure 27 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8a, 8b}$.

En raison de leur système tricyclique identique, ces sept composés montrent des données spectrales proches :

- Des spectres UV semblables avec des maximums d'absorbance à 202 et ~240 nm (Figure 28).

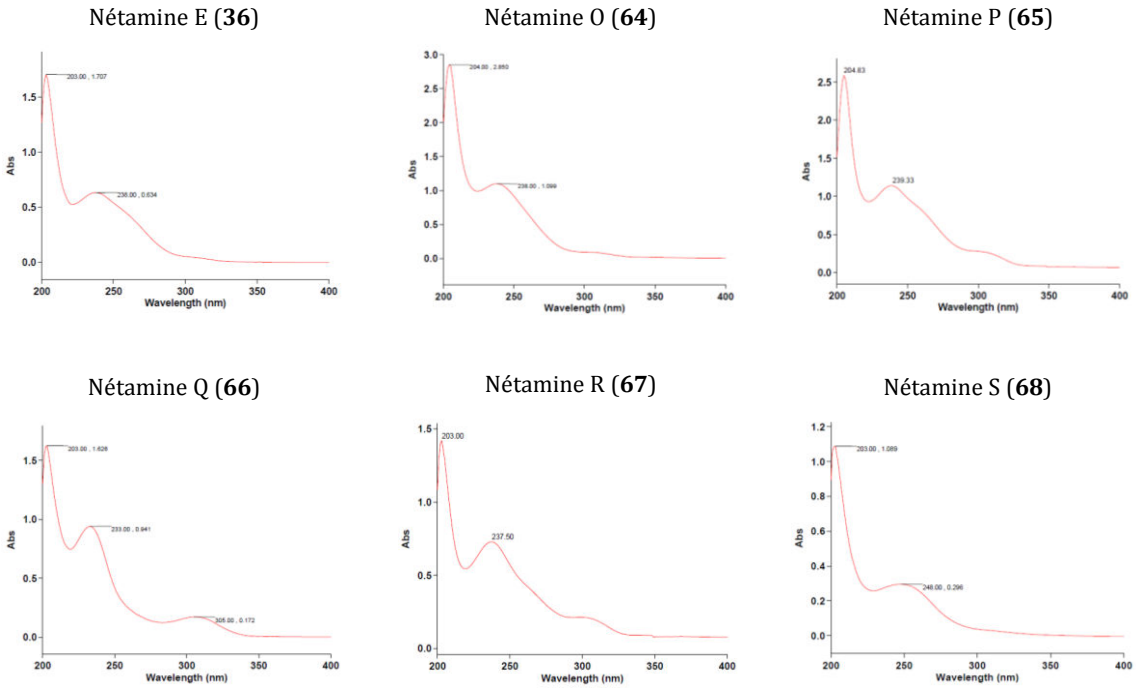


Figure 28 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a, 8b}$.

- Des spectres RMN ^{13}C similaires notamment au niveau des carbones C-2, C-3a, C-8a et C-8b (Tableau XXII).

Tableau XXII : Déplacements chimiques des carbones caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a,\,8b}$.

Position	δ_C (ppm)				
	Nétamine E (36)	**Nétamine O (64)**	**Nétamine P (65)**	**Nétamine Q (66)**	**Nétamine R (67)**
2	154,7	154,3	159,7	154,4	154,8
3a	54,1	53,0	54,2	53,0	54,0
8a	128,8	129,4	128,6	129,5	128,4
8b	119,7	120,6	120,0	120,7	120,0

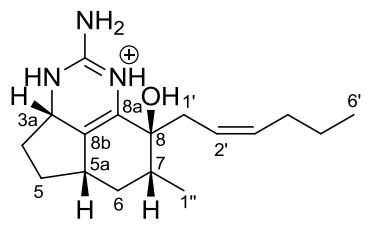
- Des spectres RMN ^{1}H similaires au niveau des protons H-3a (δ_H ~4,25 ppm) (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Déplacements chimiques des protons caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a,\,8b}$.

Position	δ_H (ppm)				
	Nétamine E (36)	**Nétamine O (64)**	**Nétamine P (65)**	**Nétamine Q (66)**	**Nétamine R (67)**
3a	4,27	4,25	4,28	4,25	4,27

Par ailleurs, il est à noter que ces molécules isolées en milieu acide ont été analysées sous leurs formes protonées.

❖ Elucidation structurale de la mirabiline J (55)



Mirabiline J (**55**)

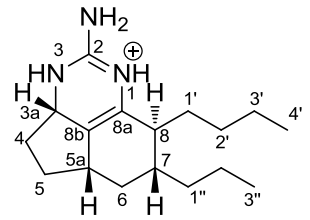
Le composé **55** ($[\alpha]_D^{25}$ = +78,4 (*c* 0,18 g/100 mL)) est isolé sous forme d'une huile marron. Son spectre de masse HRMS en mode ESI$^+$ a révélé un ion moléculaire à 290,2238 correspondant à la formule brute $C_{17}H_{28}N_3O$ (calculée : *m/z* 290,2232).

Le spectre RMN ^{1}H du composé isolé **55** est identique à celui de la mirabiline J (Tableau XXIV), isolée en 2010 d'une éponge du genre *Clathria* d' Australie [40].

Tableau XXIV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline J de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [40] à ceux observés (**55**) (600 MHz, $CDCl_3$).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature	**Observés**
3a	3,67 (brs)	3,65 (m)
4	2,02 (m)	2,00 (m)
	1,36 (m)	1,36 (m)
5	1,83 (m)	1,83 (m)
	1,58 (m)	1,58 (m)
5a	2,29 (m)	2,29 (m)
6	2,12 (m)	2,11 (m)
	1,56 (m)	1,56 (m)
7	2,41 (m)	2,41 (m)
8	-	-
8a	-	-
8b	-	-
1'	2,96 (m)	2,96 (m)
	2,79 (m)	2,79 (m)
2'	5,12 (brs)	5,10 (m)
3'	5,42 (brs)	5,41 (m)
4'	2,02 (m)	2,02 (m)
5'	0,90 (t, 7,1)	0,88 (t, 7,2)
1''	1,16 (d, 6,9)	1,16 (d, 6,9)

❖ Elucidation structurale de la nétamine E (36)



Nétamine E (**36**)

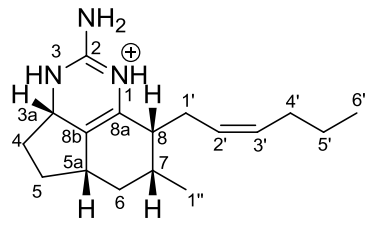
Le composé **36** est une substance ($[\alpha]_D^{25}$ = +37,00 (*c* 0,10 g/100mL)) isolée sous forme d'une huile jaune pâle. La spectrométrie HRMS en mode ESI$^+$ de **36** a révélé un ion moléculaire à *m/z* 276,2441, soit une formule moléculaire brute $C_{17}H_{30}N_3$ (calculée 276,2440).

L'analyse des données de la spectrométrie de masse d'une part, et de la RMN ^{1}H d'autre part (Tableau XXV), a permis d'identifier le composé **36** comme étant la nétamine E précédemment isolée de *Biemna laboutei* de Madagascar par Sorek et collaborateurs en 2006 [32].

Tableau XXV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la nétamine E de la littérature (500 MHz, MeOD) [32] à ceux observés (500 MHz, MeOD).

Position	δ_H (multiplicité, *J* Hz)	
	Littérature	**Observés**
3a	4,29 (m)	4,27 (m)
4	1,70 (m)	1,68 (m)
	2,22 (m)	2,20 (m)
5	1,30 (m)	1,32 (m)
	2,05 (m)	2,00 (m)
5a	2,45 (m)	2,40 (m)
6	0,80 (m)	0,78 (m)
	2,15 (m)	2,12 (m)
7	1,60 (m)	1,59 (m)
8	1,98 (m)	1,95 (m)
8a	-	-
8b	-	-
1'		1,63 (m)
	1,70 (m)	1,72 (m)
2'		1,17 (m)
	1,25 (m)	1,25 (m)
3'	1,38 (m)	1,35 (m)
4'	0,95 (m)	0,93 (m)
1''	1,25 (m)	1,19 (m)
	1,55 (m)	
2''	1,35 (m)	1,30 (m)
	1,50 (m)	1,50 (m)
3''	0,95 (m)	0,94 (m)

❖ Elucidation structurale de la nétamine O (64)



Nétamine O (**64**)

Le composé **64** a été isolé sous la forme d'une huile jaune pâle ($[\alpha]_D^{25}$ = +61,58 (*c* 1,33 g/100 mL)). L'étude de ce composé par spectrométrie de masse haute résolution en mode ESI$^+$ conduit à l'observation d'un ion moléculaire à *m/z* 274,2271 compatible avec la formule brute $C_{17}H_{28}N_3$ (calculée : *m/z* 274,2283). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{17}H_{27}N_3$) est de six.

L'analyse des données de la RMN (Tableau XXVI) a permis de construire le noyau tricyclique du composé incluant un noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$:

- 3 méthylènes (δ_C 34,1 ; 34,2 ; 30,9 ppm respectivement pour C-4, C-5 et C-6),
- 4 méthines (δ_C 53,0 ; 38,8 ; 34,8 ; 39,9 ppm respectivement pour C-3a ; C-5a, C-7 et C-8),

- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 129,4 ; 120,6 ppm respectivement pour C-8a et C-8b),
- carbone guanidinique (δ_C 154,3 ppm pour C-2),
- 3 atomes d'azote (δ_N 103,4 ; 78,1 ;89,1 ppm respectivement pour N-1, N-2 et N-3).

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC indiquent que le système tricyclique est substitué en position C-7 (δ_C 34,8 ppm) et C-8 (δ_C 39,9 ppm) par deux groupements alkyles :

- ✓ Un groupement méthyle en C-7
- ✓ Un groupement hexényle en C-8

Le groupement méthyle C-1'' (δ_C 19,4 ppm ; δ_H 1,07 ppm) a été positionné sur le carbone C-7 grâce aux corrélations HMBC relevées entre les protons H-1'' (δ_H 1,07 ppm) et les carbones C-7 (δ_C 34,8 ppm) et C-8 (δ_C 39,9 ppm). L'enchaînement C-2' (δ_H 5,38 ppm) à C-6' (δ_H 0,92 ppm) a été déterminé de proche en proche, grâce à la carte COSY et aux corrélations HMBC représentées Figure 29. Comme pour toutes les chaînes hexényles précédemment décrites (*cf.* composés **46**, **57**, **58**, **61** et **62**), la géométrie de la double liaison est *cis*, une corrélation entre les protons H-1' (δ_H 2,28 ppm) et H-4' (δ_H 2,00 ppm) observée en ROESY est en effet spécifique d'une double liaison de géométrie *cis*.

Les corrélations observées sur le spectre ROESY positionnent en outre les protons H-3a (δ_H 4,25 ppm), H-5a (δ_H 2,48 ppm), H-7 (δ_H 2,02 ppm) et H-8 (δ_H 2,33 ppm) du même côté du plan moyen de la molécule (Figure 29). En effet les protons H-3a et H-5a sont corrélés entre eux, puis H-5a est corrélé avec H-7 qui lui-même, est corrélé au proton H-8. Les deux chaînes latérales, méthyle et hexényle ont en conséquence une stéréochimie *cis* (Figure 29).

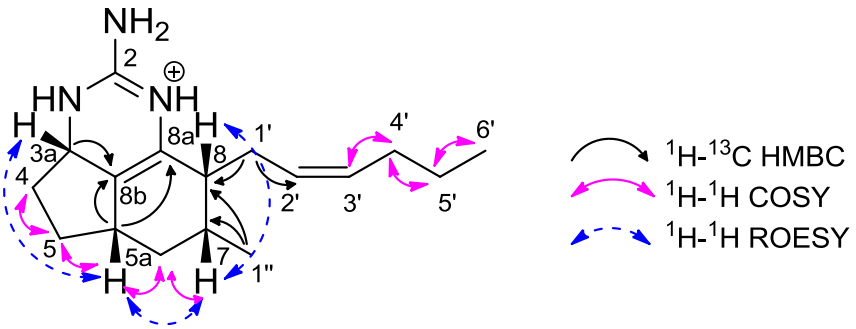


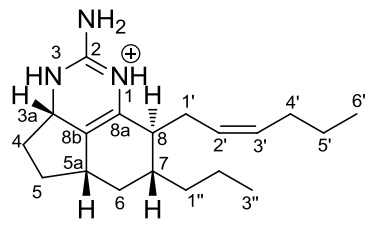
Figure 29 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine O (**64**).

Tableau XXVI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine O (**64**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	12,10*	-	-	-
2	-	154,3	-	-
2-NH2	6,49*	-	-	-
3-NH	9,85*	-	-	-
3a	4,25	53,0	-	8b, 5
4	2,24	34,1	5	8b
5	1,20	34,2	4, 5a	8b, 3a
	1,73			
5a	2,48	38,8	5, 6	5, 8a, 8b
6	1,22	30,9	5a, 7	-
7	2,02	34,8	6, 1''	1', 1''
8	2,33	39,9	-	1', 1''
8a	-	129,4	-	-
8b	-	120,6	-	-
1'	2,28	26,9	8	8, 8a, 2'
2'	5,38	129,1	3'	3'
3'	5,40	131,8	2', 4'	4',5'
4'	2,00	30,7	3',5'	3', 6'
5'	1,38	23,9	4', 6'	3', 6'
6'	0,92	14,3	5'	4', 5'
1''	1,07	19,4	7	7, 8

*Déplacements chimiques enregistrés dans le DMF

❖ Elucidation structurale de la nétamine P (65)



Nétamine P (**65**)

Le composé **65** a été isolé sous la forme d'un solide blanc amorphe ($[\alpha]_D^{25}$ = +219,04 (*c* 1,46 g/100 mL)). Son spectre HRMS (ESI+) présente un pic de masse à *m/z* 302,2600 soit comme pour la nétamine L (**61**) précédemment décrite une formule brute $C_{19}H_{32}N_3$ (calculée 302,2596)). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{19}H_{31}N_3$) est de six.

L'analyse des données de la RMN a permis de construire le noyau tricyclique de la molécule incluant un noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$ (Tableau XXVII):

- 3 méthylènes (δ_C 34,0 ; 30,3 ; 36,3 ppm respectivement pour C-4, C-5 et C-6),
- 4 méthines (δ_C 54,2 ; 37,6 ; 38,9 ; 42,2 ppm respectivement pour C-3a, C-5a, C-7 et C-8),

- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 128,6 et 120,0 ppm respectivement pour C-8a et C-8b),
- carbone guanidinique (δ_C 159,7 ppm pour C-2),
- 3 atomes d'azote (δ_N 79,1 ; 89,1 et 102,2 ppm respectivement pour N-2, N-3 et N-1) mis en évidence par HSQC et HMBC ^{1}H-^{15}N enregistrés dans le DMF.

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC indiquent que le système tricyclique est substitué en position C-7 (δ_C 38,9 ppm) par un propyle et en C-8 (δ_C 42,2 ppm) par un groupement hexényle.

Le motif propyle a été déduit par une analyse des corrélations COSY de proche en proche des protons H-3'' (δ_H 0,93 ppm) à H-7 (δ_H 1,54 ppm) (Figure 31). L'enchaînement des carbones C-8 (δ_C 42,2 ppm) à C-6' (δ_C 14,3 ppm) incluant le motif hexényle a été déterminé de manière univoque grâce aux analyses COSY et HMBC (Figure 30). Une corrélation NOESY entre les protons H-2' (δ_H 5,30 ppm) et H-3' (δ_H 5,50 ppm) indique une configuration *cis* de la double liaison éthylénique.

Enfin, l'étude du spectre NOESY, enregistré dans le DMF, a mis en exergue une corrélation entre les protons H-3a (δ_H 4,28 ppm) et H-5a (δ_H 2,39 ppm), ainsi qu'une corrélation entre les protons H-5a et H-7 (δ_H 1,54 ppm) les positionnant sur une même face du plan moyen de la molécule. En revanche, aucune corrélation n'a permis d'affirmer que le proton H-8 (δ_H 1,99 ppm) y était inclut. Il a été déduit, en conséquence, que les deux chaînes latérales présentent une stéréochimie *trans* (Figure 30).

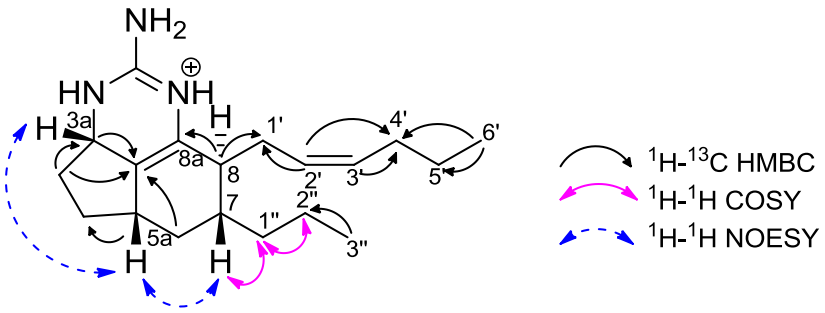


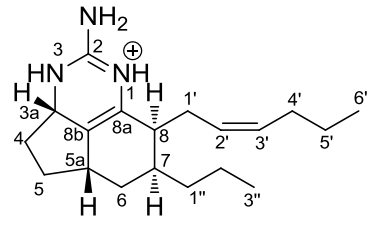
Figure 30 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine P (**65**).

Tableau XXVII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine P (**65**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	11,65*	-	-	-
2	-	159,7	-	-
2-NH2	6,42*	-	-	-
3-NH	9,63*	-	-	-
3a	4,28	54,2	4	8b, 4
4	1,67	34,0	5	8b
	2,20			
5	1,31	30,3	4, 5a	4, 5a, 6
	2,00			
5a	2,39	37,6	5, 6	5, 8a, 8b
6	2,11	36,3	5a, 7	5, 5a, 7, 8, 8b
	0,76			
7	1,54	38,9	6, 1''	1', 1''
8	1,99	42,2	-	8a, 1'
8a	-	128,6	-	-
8b	-	120,0	-	-
1'	2,34	27,2	8, 2'	8, 8a, 2'
	2,55			
2'	5,30	125,9	1', 3'	1', 4'
3'	5,50	133,7	2', 4'	4'
4'	2,06	30,9	3',5'	2', 6'
5'	1,40	24,0	4', 6'	6'
6'	0,93	14,3	5'	4', 5'
1''	1,20	37,4	7	3''
	1,61			
2''	1,28	21,6	1'', 3''	1''
	1,50			
3''	0,93	14,9	2''	1'', 2''

* Déplacements chimiques enregistrés dans le DMF

❖ Elucidation structurale de la nétamine Q (66)



Nétamine Q (**66**)

Le composé **66** nommé nétamine Q, a été isolé sous forme d'un solide blanc amorphe ($[\alpha]^{25}_{D}$ = +18,33 (*c* 0,30 g/100 mL)). Son spectre HRMS (ESI+) présente un pic de masse à *m/z* 302,2578 soit comme pour la nétamine P (**65**) précédemment décrite une formule brute $C_{19}H_{32}N_3$ (calculée 302,2596).

Les données RMN ^{13}C du composé **66** (Tableau XXVIII) montrent de fortes similitudes avec celles de la nétamine P (**65**) à l'exception des signaux attribués aux carbones C-6, C-8, C-2', C-3' et C-1''. Leurs déplacements chimiques varient respectivement de δ 36,3 ; 42,2 ; 125,9 ; 133,7 ; 37,4 ppm pour la nétamine P (**65**) à δ 32,5 ; 40,2 ; 129,0 ; 131,8 ; 36,6 ppm pour la nétamine Q (**66**). L'analyse détaillée des spectres RMN bidimensionnels a finalement démontrée que le composé **66** avait une structure plane et une géométrie *cis* du motif hexényle relié au carbone C-8, identiques à celles de la nétamine P (**65**). Seules les corrélations observées sur le spectre NOESY ont pu départager ces deux structures (Figure 31).

L'expérience NOESY menée sur le composé **66** montre des corrélations entre les protons H-3a (δ_H 4,25 ppm) et H-5a (δ_H 2,47 ppm) d'une part et les protons H-7 (δ_H 2,39 ppm) et H-8 (δ_H 1,86 ppm) d'autre part, ce qui laisse à penser que les deux chaînes latérales du composé **66** présentent une stéréochimie *cis* et non *trans* comme c'est le cas pour la nétamine P (**65**). On peut souligner par ailleurs que, contrairement aux autres nétamines dont les chaînes latérales sont de configuration *cis*, la nétamine Q (**66**) ne présente pas les quatre protons méthiniques H-3a, H-5a, H-7 et H-8 sur une même face du plan moyen de la molécule (Figure 31).

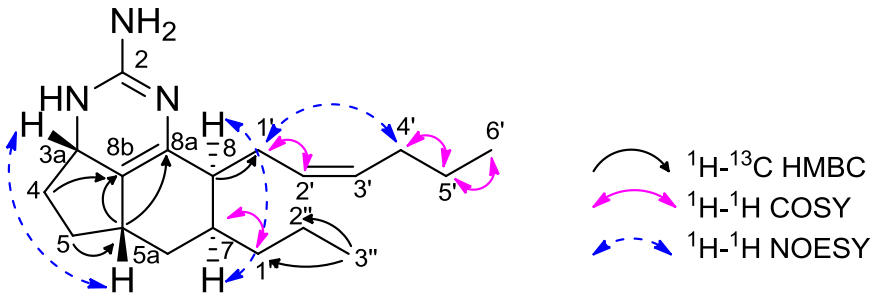
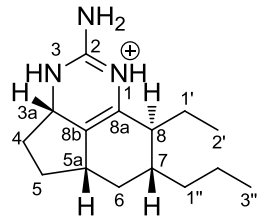


Figure 31 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine Q (**66**).

Tableau XXVIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine Q (**66**) enregistrées dans MeOD à 600 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	154,4	-	-
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	4,25	53,0	4	4
4	1,73 2,24	34,1	3a, 5	3a, 5
5	1,22	31,1	4	4, 5a
5a	2,47	38,9	6β	6 β
6	1,18 1,81	32,5	-	7, 8b
7	2,39	38,4	8	8, 1'
8	1,86	40,2	7	1', 1''
8a	-	129,5	-	1', 7
8b	-	120,7	-	7, 6 β
1'	2,26	27,1	2'	7, 8, 2'
2'	5,38	129,0	1', 3'	1'
3'	5,40	131,8	2', 4'	4'
4'	2,00	30,7	3', 5'	3'
5'	1,38	24,0	4', 6'	6'
6'	0,91	14,3	5'	5'
1''	1,31 1,44	36,6	2''	8, 2'', 3''
2''	1,41	21,8	1'', 3''	3''
3''	0,95	14,7	2''	2''

❖ Elucidation structurale de la nétamine R (67)



Nétamine R (**67**)

Le composé **67** a été isolé sous la forme d'une huile jaune pâle ($[\alpha]_D^{25}$ = +18,00 (*c* 0,10 g/100 mL)). L'étude de ce composé par HRMS en mode ESI⁺ conduit à l'observation d'un ion moléculaire à *m/z* 248,2146 compatible avec la formule brute $C_{15}H_{26}N_3$ (calculée : *m/z* 248,2127). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé non protoné (soit $C_{15}H_{25}N_3$) est de cinq.

L'analyse des données de la RMN (Tableau XXIX) a permis par ailleurs, de construire le noyau tricyclique insaturé en $\Delta^{8a,8b}$ avec :

- 3 méthylènes (δ_C 34,1 ; 30,4 ; 36,5 ppm respectivement pour C-4, C-5 et C-6),
- 4 méthines (δ_C 54,0 ; 37,6 ; 37,7 et 42,9 ppm respectivement pour C-3a, C-5a, C-7 et C-8),
- 2 carbones de doubles liaisons trisubstituées (δ_C 128,4 ; 120,0 ppm respectivement pour C-8a et C-8b),
- carbone guanidinique (δ_C 154,8 ppm pour C-2).

Les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC indiquent de plus que le système tricyclique est substitué en position C-7 (δ_C 37,7 ppm) par un groupement propyle, et en C-8 (δ_C 42,9 ppm) par un groupement éthyle comme pour les nétamines J (**59**) et K (**60**).

Le motif propyle a été établi grâce aux corrélations HMBC relevées entre H-3'' (δ_H 0,94 ppm) et C-1'' (δ_C 37,4 ppm). Le motif éthyle a été déduit grâce à la carte COSY indiquant des corrélations entre les protons H-1' (δ_H 1,75 ppm)/H-2' (δ_H 0,81 ppm) et H-1'/H-8 (δ_H 1,96 ppm) (Figure 32).

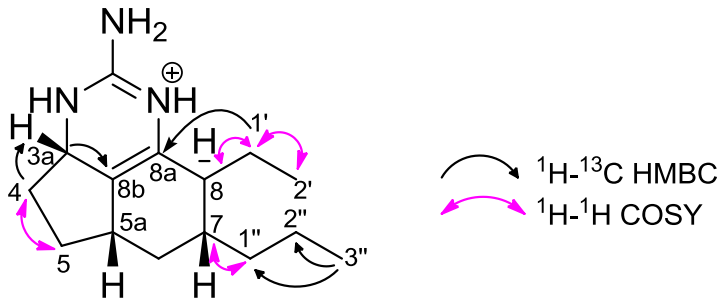


Figure 32 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine R (**67**).

La détermination de la stéréochimie relative de la molécule n'a pas été possible par NOESY et ROESY. En effet, malgré plusieurs tentatives d'analyses, aucun spectre obtenu n'a été exploitable. Il a alors été envisagé de pallier ce problème par une approche empirique. En raison du nombre de nétamines identifiées et de stéréochimie relative établie, il a été, en effet proposé de déterminer la configuration relative des carbones de la nétamine R par comparaison des déplacements chimiques des protons portés par les carbones asymétriques avec ceux des autres nétamines au noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$ (Tableau XXX).

Concernant tout d'abord la configuration des carbones C-3a et C-5a, elle a été déterminée par le calcul des différences des déplacements chimiques associés à H-3a et H-5a. La nétamine R présentant comme les autres nétamines E, O, P et Q une différence

faible ($\Delta\delta$ = ± 0,08 ppm), il en a été déduit que la stéréochimie des carbones C-3a et C-5a de la nétamine R est identique à celle des nétamines E, O, P et Q.

Concernant à présent la stéréochimie des carbones C-7 et C-8, elle a été déterminée par le calcul de la différence des déplacements chimiques associés à H-7 et H-8. . Pour ces deux protons, le calcul montre une différence $\Delta\delta$ comprise entre 0,1 et 0,8 ppm pour les nétamines O et Q présentant des chaînes latérales *cis*, et une différence $\Delta\delta$ < ± 0,04 ppm pour les nétamines E et P présentant des chaînes latérales *trans*. Il a été déduit que cette nétamine R présente une stéréochimie *trans* des chaînes latérales, comme pour les nétamines E et P.

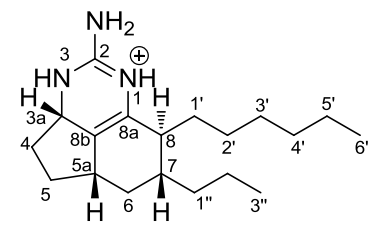
Tableau XXIX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine R (**67**) enregistré dans MeOD à 500 MHz.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	-	154,8	-
2-NH_2	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	4,27	54,0	4	8b
4	1,68	34,1	3a, 5	8b
	2,19			
5	1,27	30,4	4, 5a	6
	1,99			
5a	2,40	37,6	5, 6	6
6	0,77	36,5	5a	5, 5a, 7
	2,08			
7	1,57	37,7	8, 1''	6
8	1,96	42,9	7, 1'	2'
8a	-	128,4	-	-
8b	-	120,0	-	-
1'	1,75	21,3	8, 2'	8a, 2'
2'	0,81	8,5	1'	8, 1'
1''	1,18	37,4	7, 2''	3''
2''	1,32	21,4	1'', 3''	3''
3''	0,94	14,8	2''	2''

Tableau XXX : Comparaison des déplacements chimiques des protons méthiniques des nétamines E (**36**), O-R (**64-67**) à noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$.

Position	δ_H (ppm)				
	Nétamine E (36)	**Nétamine O (64)**	**Nétamine P (65)**	**Nétamine Q (66)**	**Nétamine R (67)**
3a	**4,27**	**4,25**	**4,28**	**4,25**	**4,27**
5a	**2,40**	**2,48**	**2,39**	**2,47**	**2,40**
7	**1,59**	2,02	**1,54**	2,39	**1,57**
8	**1,95**	2,33	**1,99**	1,86	**1,96**

❖ Elucidation structurale de la nétamine S (68)



Nétamine S (**68**)

La nétamine S (**68**) a été isolée sous forme d'une huile marron pâle ($[\alpha]_D^{25}$ = +20,00 (*c* 0,10 g/100 mL)). Son spectre HRMS (ESI$^+$) présente un pic de masse à *m/z* 304,2748 soit une formule brute $C_{19}H_{34}N_3$ (calculée 304,2753) et cinq insaturations (calculé à partir de la formule $C_{19}H_{33}N_3$ correspondant à la forme neutre du composé).

Les données RMN ^{13}C du composé **68** (Tableau XXXI) montrent de fortes similitudes avec celles de la nétamine P (**65**) à l'exception des signaux attribués aux carbones C-1', C-2', C-3' et C-4'. Leurs déplacements chimiques varient respectivement de δ_C 27,2 ; 125,9 ; 133,7 et 30,9 à δ_C 29,1 ; 25,2 ; 31,1 et 33,1 ppm. Cette analyse comparative montre tout simplement que la nétamine P (**65**) et le composé **68** présentent la même structure à l'exception de la chaîne latérale portée par le carbone C-8 : insaturée pour la nétamine P (double liaison entre C-2' et C-3'), elle est saturée pour la nétamine Q.

L'expérience NOESY a montré en outre des corrélations entre les protons H-3a (δ_H 4,27 ppm) et H-5a (δ_H 2,41 ppm), et entre les protons H-5a et H-7 (δ_H 1,58 ppm), indiquant ainsi que ces trois protons se positionnent sur la même face du plan moyen de la molécule. En revanche, l'absence de corrélation entre H-7 et H-8 (δ_H 1,95 ppm) laisse supposer que H-8 se trouve sur l'autre face (Figure 33).

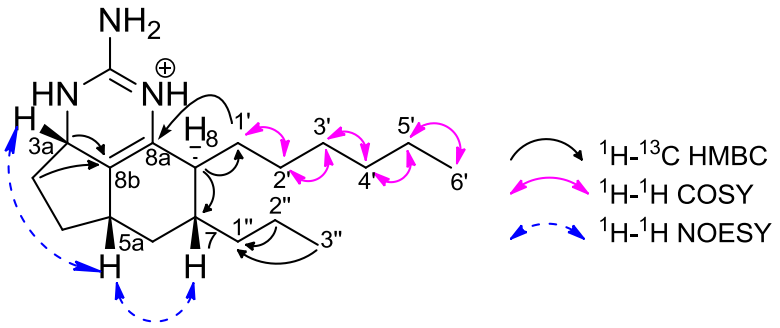
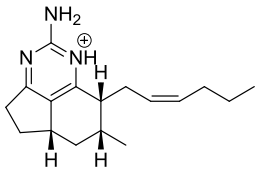


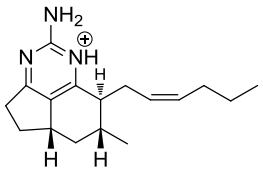
Figure 33 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine S (**68**).

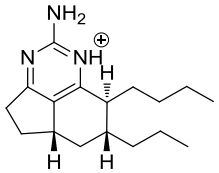
Tableau XXXI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine S (**68**) enregistrées dans MeOD à 500 MHz.

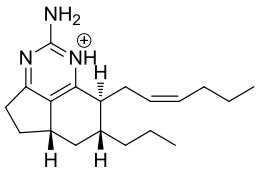
Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1-NH	-	-	-	-
2	-	154,7	-	-
2-NH$_2$	-	-	-	-
3-NH	-	-	-	-
3a	4,27	54,1	4	4
4	1,67	34,0	3a, 5	3a, 5
	2,19			
5	2,00	30,4	4	4, 5a
5a	2,41	37,7	6	6 β
6	0,77	36,6	-	
	2,12			7, 8b
7	1,58	38,4	8, 1''	8, 1'
8	1,95	42,3	7, 1'	1', 1''
8a	-	128,8		1', 7
8b	-	119,7		7, 6 β
1'	1,62	29,1	8	7, 8, 2'
	1,71			
2'	1,18	25,2	-	1'
	1,26			
3'	1,32	31,1	-	4'
4'	1,31	33,1	-	3'
5'	1,32	23,8	6'	6'
6'	0,90	14,5	5'	5'
1''	1,19	37,4	7	8, 2'', 3''
2''	1,30	21,4	3''	3''
	1,49			
3''	0,94	14,8	2''	2''

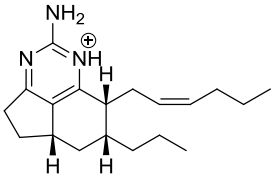
Alcaloïdes guanidiniques à noyau aromatique type pyrimidine

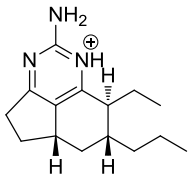

Mirabiline A (**46**)


Mirabiline C (**48**)

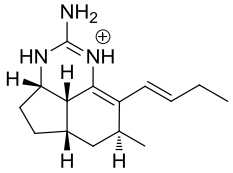

Nétamine G (**38**)

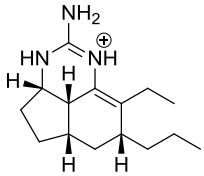

Nétamine H (**57**)

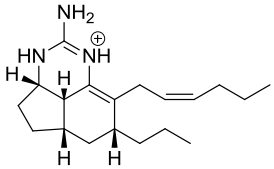

Nétamine I (**58**)

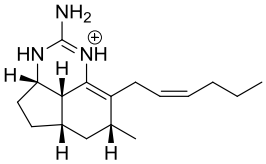

Nétamine J (**59**)

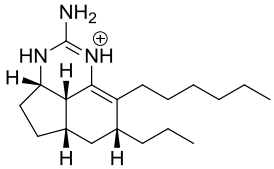
Alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$


Mirabiline F (**51**)

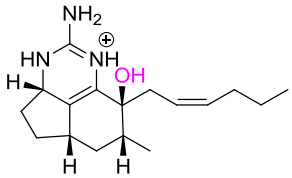

Nétamine K (**60**)

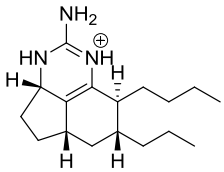

Nétamine L (**61**)

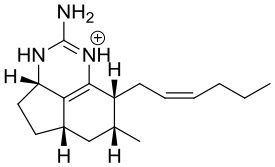

Nétamine M (**62**)

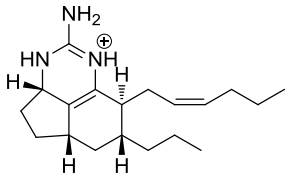

Nétamine N (**63**)

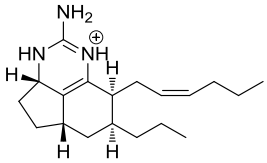
Alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$

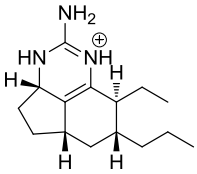

Mirabiline J (**55**)


Nétamine E (**36**)


Nétamine O (**64**)


Nétamine P (**65**)


Nétamine Q (**66**)


Nétamine R (**67**)

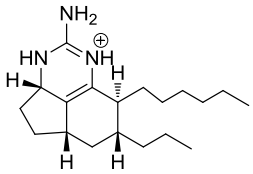

Nétamine S (**68**)

Figure 34 : Molécules isolées de *Biemna laboutei*, classées en fonction de l'insaturation de leur système tricyclique.

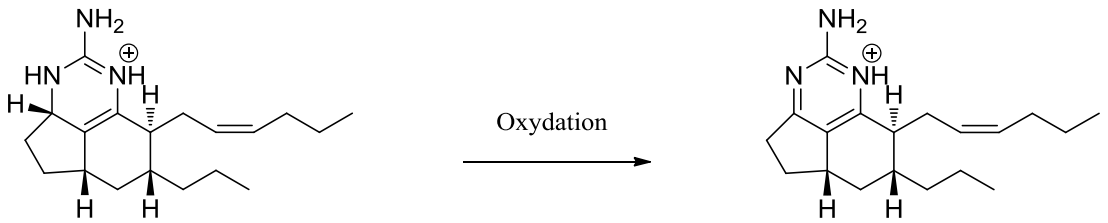
II. 3. 3 Bilan de l'étude chimique de *Biemna laboutei*

L'étude de l'éponge *Biemna laboutei* a permis l'isolement de 18 composés appartenant à la famille des alcaloïdes guanidiniques tricycliques de type nétamine/ptilocauline/mirabiline, classés selon l'insaturation du noyau tricyclique :

- ⇨ le noyau pyrimidinique (6 composés isolés, dont 3 nouveaux)
- ⇨ l'insaturation en $\Delta^{8,8a}$ (5 composés isolés, dont 4 nouveaux)
- ⇨ l'insaturation en $\Delta^{8a,8b}$ (7 composés isolés, dont 5 nouveaux)

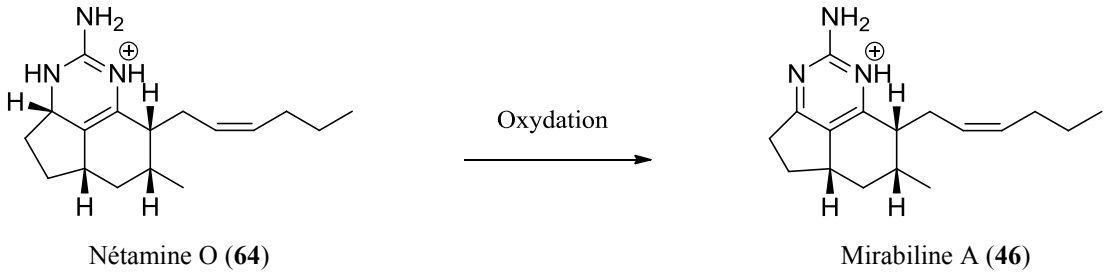
Il faut souligner par ailleurs que la séparation de ces 18 alcaloïdes a été particulièrement délicate en raison, non seulement de leurs masses moléculaires très proches voire identiques, mais aussi de leur polarité voisine et donc de leurs temps de rétention très proches lors des purifications par CLHP. Cette particularité a rendu difficile la déréplication.

Un autre point important, à souligner également, concerne l'origine des nétamines pyrimidiniques. En effet, l'altération de certains composés isolés a été observée malgré toutes les précautions prises lors du travail d'isolement (stockage des produits à -20°C sous Argon). Il s'agit de la nétamine P (**65**) qui s'est oxydée en nétamine H (**57**) (Schéma 3) et de la nétamine O (**64**) qui s'est oxydée en mirabiline A (**46**) (Schéma 4). Ces observations laissent à penser que ces dernières seraient le fruit d'oxydations de nétamines insaturées en $\Delta^{8a,8b}$ ou de nétamines saturées :



Nétamine P (**65**) Nétamine H (**57**)

Schéma 2 : Oxydation de la nétamine P (**65**) en nétamine H (**57**).



Nétamine O (**64**) Mirabiline A (**46**)

Schéma 3 : Oxydation de la nétamine O (**64**) en mirabiline A (**46**).

II. 4 Détermination de la configuration absolue de molécules

L'objectif de ce chapitre est dédié à la détermination des configurations absolues des nouvelles molécules isolées. Les travaux de modélisation moléculaire ont été réalisés sous la direction de Bertrand Illien, Professeur au LCSNSA de l'Université de La Réunion.

II.4.1 Introduction à la modélisation moléculaire

La configuration absolue d'une molécule est une caractéristique structurale fondamentale, elle peut être nécessaire pour la compréhension d'une activité biologique ou d'autres propriétés. Bien souvent, la détermination de la configuration absolue de certaines molécules est un challenge pour les scientifiques. En effet, malgré les différents moyens « traditionnellement » utilisés pour y parvenir (la synthèse stéréo-contrôlée d'un énantiomère donné et la mesure de son pouvoir rotatoire ainsi que la cristallographie [45]) la spectroscopie de dichroïsme circulaire reste une technique relativement peu chère, nécessitant moins de moyens. Elle mesure la différence des coefficients d'absorption pour les deux lumières polarisées circulairement droite et gauche. Le dichroïsme circulaire dit électronique (DCE) utilise la lumière des domaines UV et visible (impliquant des transitions électroniques de la molécule).

Avec le développement de la modélisation moléculaire quantique, il est désormais possible de prédire de façon théorique les spectres DCE de molécules de configurations données. La comparaison du spectre théorique et du spectre expérimental donne accès à la configuration absolue de la molécule. Seule la taille des molécules et la présence d'un grand nombre de conformères peuvent limiter l'utilisation des méthodes quantiques en raison des temps de calcul trop grands. En outre, cette technique nécessitant peu de matière, est compatible avec la chimie des substances naturelles dans laquelle les quantités de produits isolés sont de l'ordre du milligramme.

Ces dernières années, la détermination des configurations absolues de nombreuses molécules par comparaison des spectres de DCE issus de calculs de chimie quantique à ceux des spectres expérimentaux ont été réalisés [46–48]. La méthode de chimie quantique la plus utilisée aujourd'hui semble être la méthode TDDFT (pour Time-Dependent Density Functionnal Theory ou théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps) car elle présente un rapport performance/coût favorable par rapport aux méthodes plus classiques d'interaction de configurations.

II.4.2 Principe

Le calcul de DCE dépend de la conformation de la molécule, il n'est pas suffisant de considérer le minimum global, il faut prendre en compte toutes les contributions de DCE des conformères ayant une population significative à 298 K. L'étude a commencé par un stéréoisomère choisi arbitrairement, dont les nombreuses conformations possibles ont été générées manuellement et optimisées par une méthode semi-empirique (PM6). Les conformères, ainsi trouvés, ont été ré-optimisés à un niveau de théorie plus élevé (ωB97XD) avec la prise en compte des effets du solvant. Un calcul des fréquences de vibration de chaque conformère est réalisé pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle. Ensuite, les transitions électroniques de plus basses énergies des conformères les plus stables en énergies (compris dans un écart de 3 kcal/mol) ont été calculées avec la prise en compte des effets de solvant. L'ensemble de ces résultats, pondéré selon Boltzmann, permet d'obtenir un spectre UV-visible théorique pouvant être comparé au spectre expérimental. Cette comparaison a été utilisée pour calibrer ensuite le spectre de DCE calculé. En effet, d'une façon générale, la méthode ωB97XD surestime souvent les énergies de transition singulet de type $\pi \rightarrow \pi^*$ à l'origine (en général) des premières bandes d'absorption UV-visible [49]. L'écart d'énergie entre la première bande d'absorption expérimentale et théorique a été calculé et retranché sur le spectre UV théorique pour prendre en compte l'erreur systématique de la méthode utilisée et ainsi améliorer la concordance entre le spectre UV-visible théorique et celui issu de l'expérience. Cette calibration est assez facile à réaliser sur le spectre UV-visible car en général, les énergies et les intensités des transitions électroniques changent peu d'un conformère à l'autre. En revanche, les intensités de DCE dépendent principalement de ces conformations. Ensuite, un spectre de DCE, pondéré selon Boltzmann, est calculé et

décalé avec la même énergie que dans le cas du spectre UV-visible correspondant. Une comparaison avec le spectre de DCE expérimental est ensuite effectuée. Bringmann *et al.* [50] furent les premiers à utiliser cette façon de procéder pour les spectres UV-visible et ceux de DCE.

II.4.3 Détails des calculs

L'ensemble des calculs quantiques a été réalisé à l'aide du programme *Gaussian 09* [51]. La méthode semi-empirique PM6 [52] utilisée pour la recherche de tous les conformères possibles est une méthode semi-empirique paramétrée pour reproduire la géométrie, le moment dipolaire, l'énergie de première ionisation et l'enthalpie de formation.

- ωB97XD [53] est une fonctionnelle de la densité hybride de cinquième génération prenant en compte des effets de dispersion qui semble être efficace aussi bien pour l'optimisation de géométrie [54] que pour la simulation de spectre UV-visible [49, 55].
- La base 6-31+G** comprend des fonctions de polarisation (**) sur tous les atomes pour tenir compte de la déformation du nuage atomique dans la molécule et des fonctions diffuses sur les atomes lourds (tous sauf H). Les fonctions diffuses (+) permettent de mieux décrire les paires d'électrons libres et peuvent être importantes pour décrire des liaisons hydrogène, sinon elles ont souvent peu d'effet sur la géométrie.
- SMD (Solvent Model Density) est un modèle d'effet de solvant où la densité électronique du soluté (calculée par la mécanique quantique) interagit avec une description continue du solvant. Le solvant est dans ce cas représenté comme un milieu diélectrique avec des tensions de surface à l'interface soluté-solvant [56]. Comme les mesures de spectres UV-visible et de DCE ont été réalisées dans le méthanol, le modèle SMD a été utilisé pour simuler ce solvant au niveau des optimisations de géométrie et des calculs de spectres UV-visible et de DCE.

Pour toutes les intégrations numériques, une grille de points, plus dense (UltraFineGrid) que celle par défaut (FineGrid) de Gaussian 09, a été utilisée pour que les résultats obtenus deviennent insensibles au changement d'origine du système de coordonnées.

Un calcul des fréquences de vibration de chaque conformère a permis de vérifier qu'il s'agissait de minimum sur la surface d'énergie potentielle (absence de fréquence

imaginaire). Les fréquences de vibration calculées dans l'approximation harmonique sont surestimées par rapport à l'expérience avec la méthode ωB97XD/6-31+G**. Un facteur 0,971 a été appliqué aux fréquences harmoniques pour calculer la correction vibrationnelle d'énergie au point zéro et pour calculer les termes vibrationnels dépendant de la température dans l'enthalpie libre. Ce facteur 0,971 a été optimisé en minimisant la différence entre la correction d'énergie au point zéro calculée et les valeurs expérimentales pour un ensemble de 15 petites molécules organiques suivant la procédure de Alecu et collaborateurs [57].

Les transitions électroniques singulets de plus basses énergies ont ensuite été calculés par TDDFT avec la méthode ωB97XD/6-31++G** où un jeu de fonctions diffuses a été ajoutée sur les atomes d'hydrogène. Cet ajout vise à donner plus de flexibilité à la base de fonctions pour le calcul des transitions électroniques.

En mécanique quantique, la quantité décrivant l'absorption UV-visible liée à une transition électronique entre l'état fondamental 0 et un état excité k est la force d'oscillateur f_{0k}[1]. Elle est proportionnelle au produit de la fréquence de la transition électronique ν_{0k} par le carré du moment dipolaire électrique de la transition considérée $\left|\langle 0|\mu|k\rangle\right|^2$ avec m_e la masse de l'électron et h la constante de Planck.

Équation 1

$$f_{0k} = \frac{8\pi^2 m_e \nu_{0k}}{3h}\left|\langle 0|\mu|k\rangle\right|^2$$

Les forces d'oscillateur f_{0k} *calculées* ont été converties dans l'unité du coefficient d'extinction ε par association à des fonctions gaussiennes centrées aux fréquences respectives ν_{0k} des transitions électroniques. Le spectre UV résulte de la superposition de ces gaussiennes (Équation 2) [58]. Une demi-largeur à 1/e fois la hauteur de la gaussienne Δσ = 0,2 eV a été utilisée.

[1] La force d'oscillateur pour une transition électronique donnée est une quantité sans unité proportionnelle à l'aire sous sa bande d'absorption.

Équation 2

$$\varepsilon(\nu) = \frac{N_A e^2}{4 m_e c \varepsilon_0 \ln(10)} \sum_k f_{0k} \frac{\exp\left(-\left(\frac{\nu - \nu_{0k}}{\Delta\sigma}\right)^2\right)}{\Delta\sigma\sqrt{\pi}}$$

N_A :nombre d'Avogadro
ε_0 : permittivité diélectrique du vide
c : célérité de la lumière dans le vide
e : charge d'un électron
f_{0k} : force d'oscillateur entre l'état fondamental (0) et l'état excité k

La quantité, décrivant le dichroïsme circulaire, qui peut être calculée par la mécanique quantique est la force rotatoire[2]. Elle correspond à la partie imaginaire du produit scalaire des moments dipolaire électrique μ et dipolaire magnétique M entre l'état fondamental 0 et un état excité k pour une transition électronique donnée de nombre d'onde $\bar{\nu}_{0k}$ (Équation 3).

Équation 3

$$R_{0k} = \mathrm{Im}\left\{\langle 0|\mu|k\rangle . \langle k|M|0\rangle\right\}$$

Les spectres DCE expérimentaux ont pour ordonnées $\Delta\varepsilon$ (*i. e.* la différence entre les coefficients d'extinction molaire de la lumière polarisée à droite et à gauche). D'une façon analogue au spectre UV-visible, les forces rotatoires calculées R_{0k} sont transformées en unité de $\Delta\varepsilon$ en associant à chaque force rotatoire une fonction gaussienne de même $\Delta\sigma$ que celle utilisée pour le calcul des spectres UV. Ainsi l'expression de $\Delta\varepsilon$ au nombre d'onde $\bar{\nu}$ est donnée par l'Équation 4 [58].

Équation 4 (unités cgs [centimètre-gramme-seconde])

$$\Delta\varepsilon(\bar{\nu}) = \frac{1}{2{,}2964810^{-39}} \sum_k \bar{\nu}_{0k} R_{0k} \frac{\exp\left[-\left(\frac{\bar{\nu} - \bar{\nu}_{0k}}{\Delta\sigma}\right)^2\right]}{\Delta\sigma\sqrt{\pi}}$$

Le spectre de DCE moyen, obtenu par pondération selon la statistique de Boltzmann des spectres de DCE des conformères, est ensuite décalé d'une même énergie que celle utilisée pour le spectre UV [50].

[2] La force rotatoire pour une transition électronique donnée est une quantité proportionnelle à l'aire sous la bande de DCE correspondante.

L'étude du spectre UV du conformère le plus stable permet de mettre en lumière la localisation des orbitales moléculaires les plus impliquées dans les transitions électroniques de plus fortes intensités.

II.4.4 Résultats de l'étude du DCE des nétamines I (58) et J (59)

II.4.4.1 Configuration absolue de la nétamine I (58)

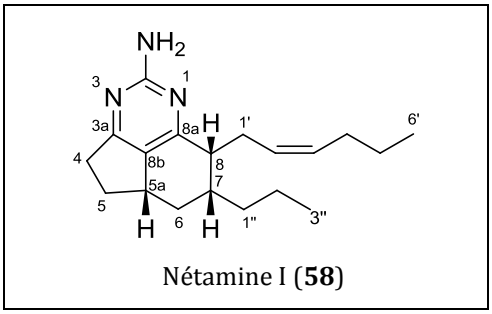


Figure 35 : Structure de la nétamine I (**58**) proposée par RMN.

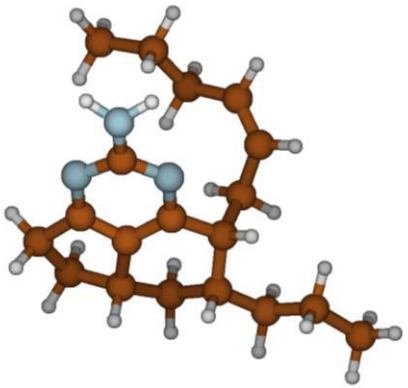
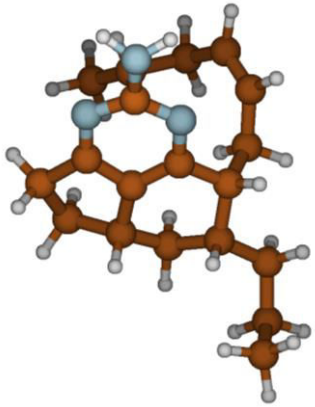
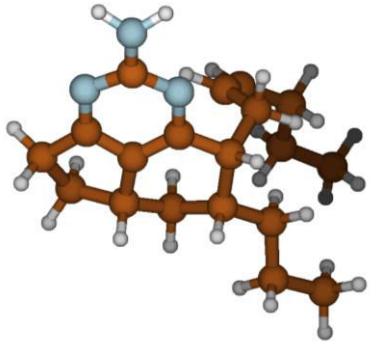
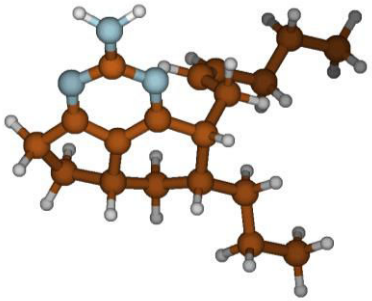
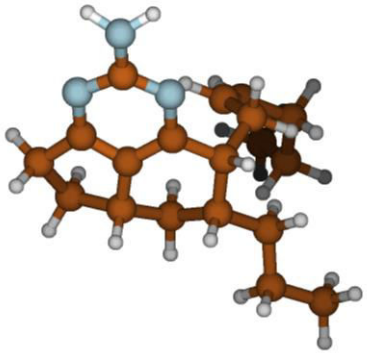
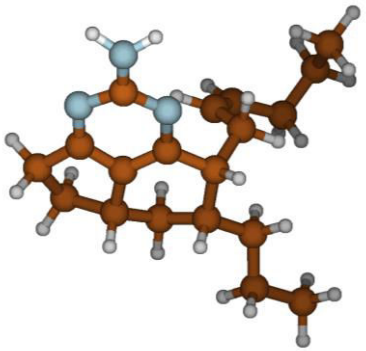
A partir d'une trentaine de géométries de départ différentes, 23 conformères de la nétamine I ont été optimisés. Seuls 17 de ces conformères ont des énergies relatives inférieures à 3 kcal.mol^{-1} dont 6 présentent une population supérieure ou égale à 5 % à 298 K. Ces derniers sont représentés dans le Tableau XXXII. Ils diffèrent par la position relative des deux chaînes latérales en position 7 et 8.

Les transitions électroniques de plus basses énergies des 17 conformères ont été calculées et les spectres UV obtenus pondérés selon la statistique de Boltzmann. Le spectre UV moyen résultant a ensuite été décalé de -0,583 eV (+38 nm sur le premier λ_{max} du spectre théorique) pour tenir compte de la surestimation des énergies de transition électronique singulet calculées par la méthode ωB97XD (Figure 37). Suite au décalage du spectre théorique sur la longueur d'onde de la première bande d'absorption expérimentale (λ_{max} = 304 nm), il existe une meilleure concordance à l'expérience pour la position des 2ième et 3ième bandes d'absorption théoriques, respectivement +6 et -5 nm par rapport à l'expérience (Figure 38).

Les bandes d'absorption du spectre UV théorique, sortant à 304 et 240 nm correspondent chacune à une seule transition électronique π→π* se situant sur le cycle pyrimidinique. La bande d'absorption à 197 nm est liée au recouvrement de plusieurs transitions électroniques. Celle qui possède la plus forte valeur de ε_{max} est une transition π→π* localisée au niveau de la double liaison éthylénique. (Figure 39 et Figure 40).

De la même manière, les spectres de DCE calculés des 17 conformères sont pondérés selon la loi de Boltzmann et le spectre résultant est décalé de -0,583 eV. Les spectres de DCE des différents conformères s'avèrent très différents les uns des autres et dépendent principalement de la position relative des chaînes latérales. (Figure 41).

Tableau XXXII : Conformères les plus stables de la nétamine I (**58**) ayant une population ≥ 5%.

	c1	c6	c11
			
ΔG (kcal/mol)	1,26	1,23	0
Population	5 %	5 %	42 %
	c14	**c23**	**c25**
			
ΔG (kcal/mol)	0,93	1,03	0,58
Population	9 %	7 %	16 %

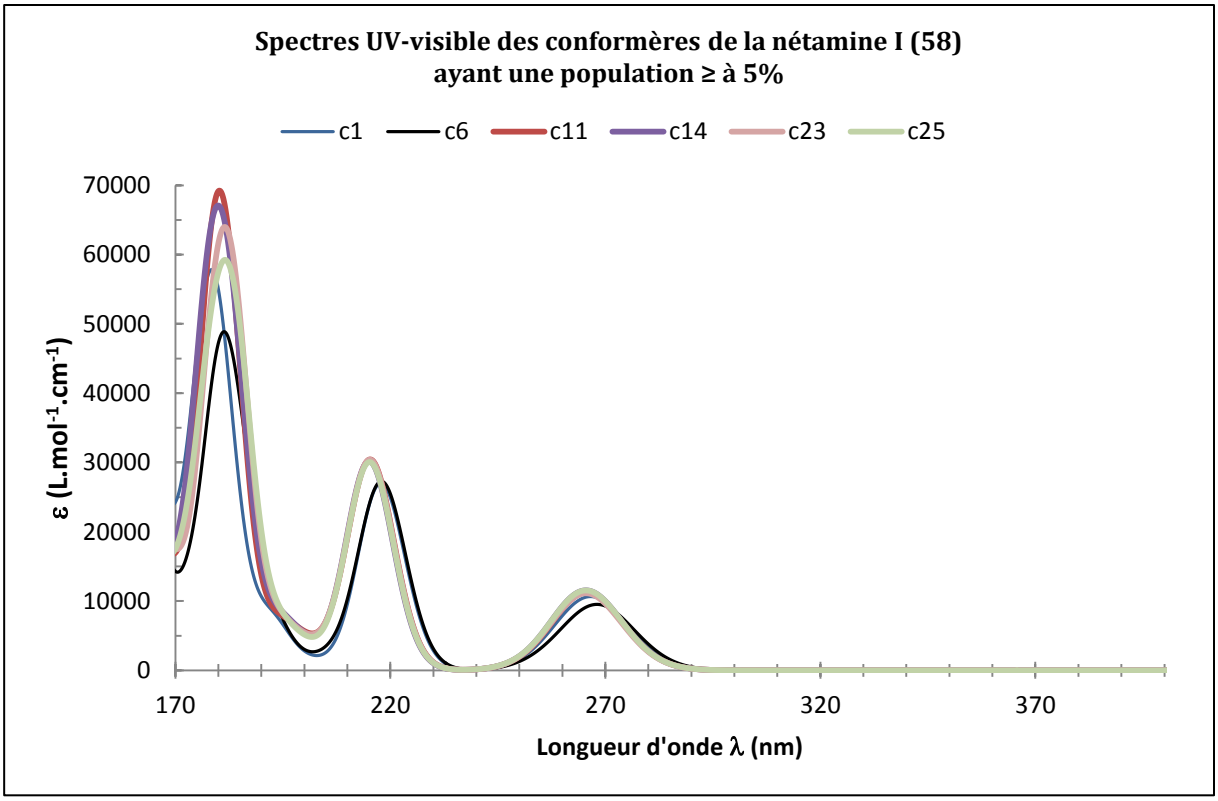


Figure 36 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la molécule nétamine I (**58**).

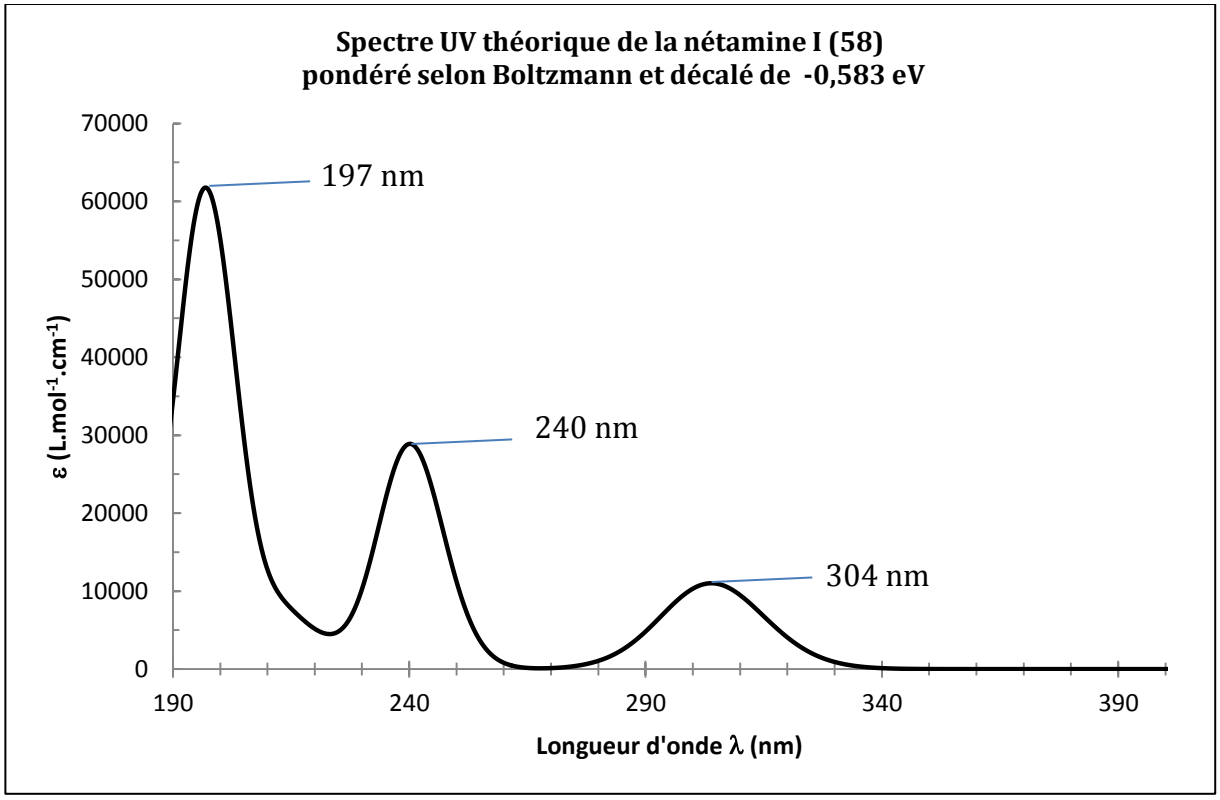


Figure 37 : Spectre UV théorique de la nétamine I (**58**) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,583 eV.

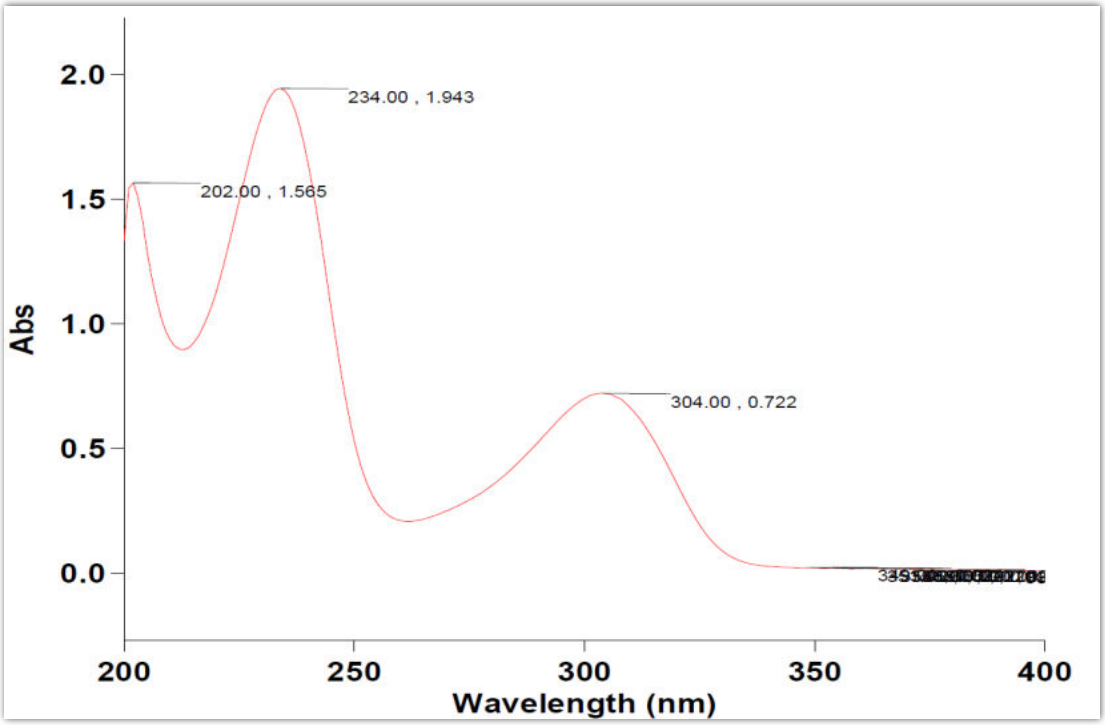


Figure 38 : Spectre UV expérimental de la nétamine I (**58**).

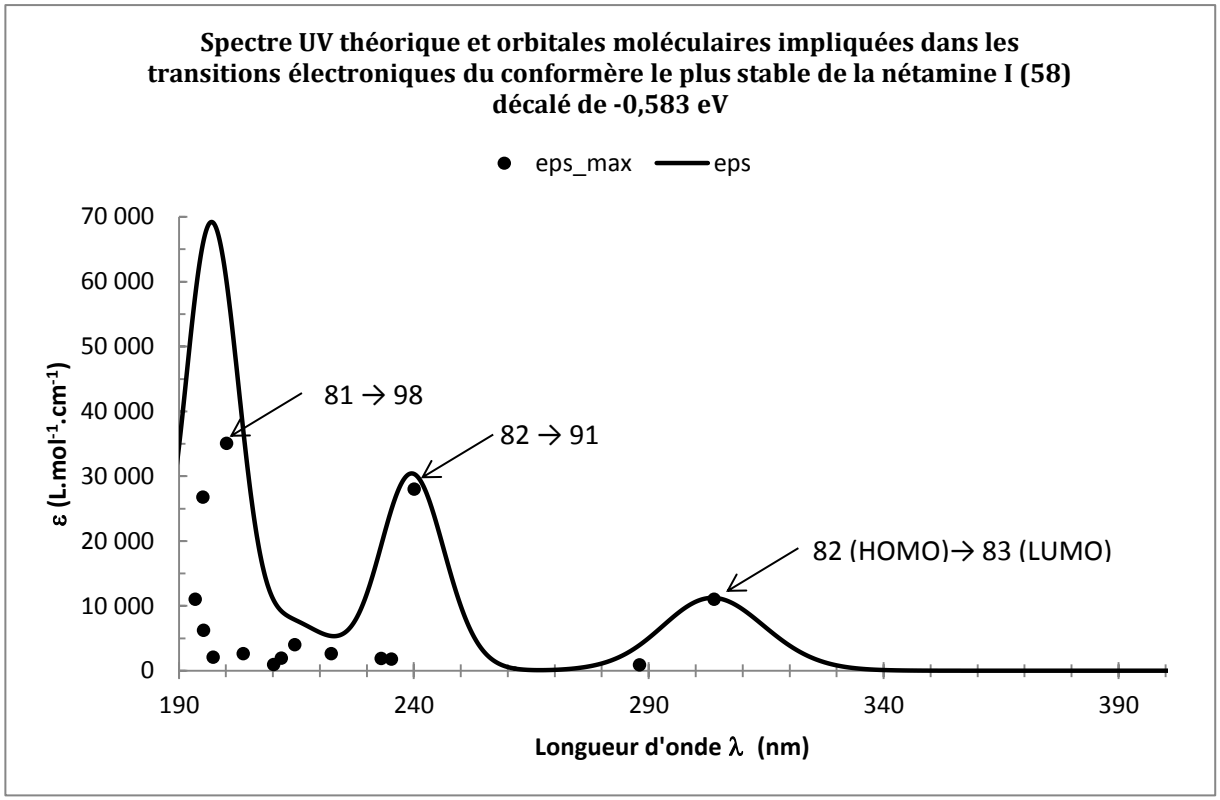


Figure 39 : Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine I (**58**).

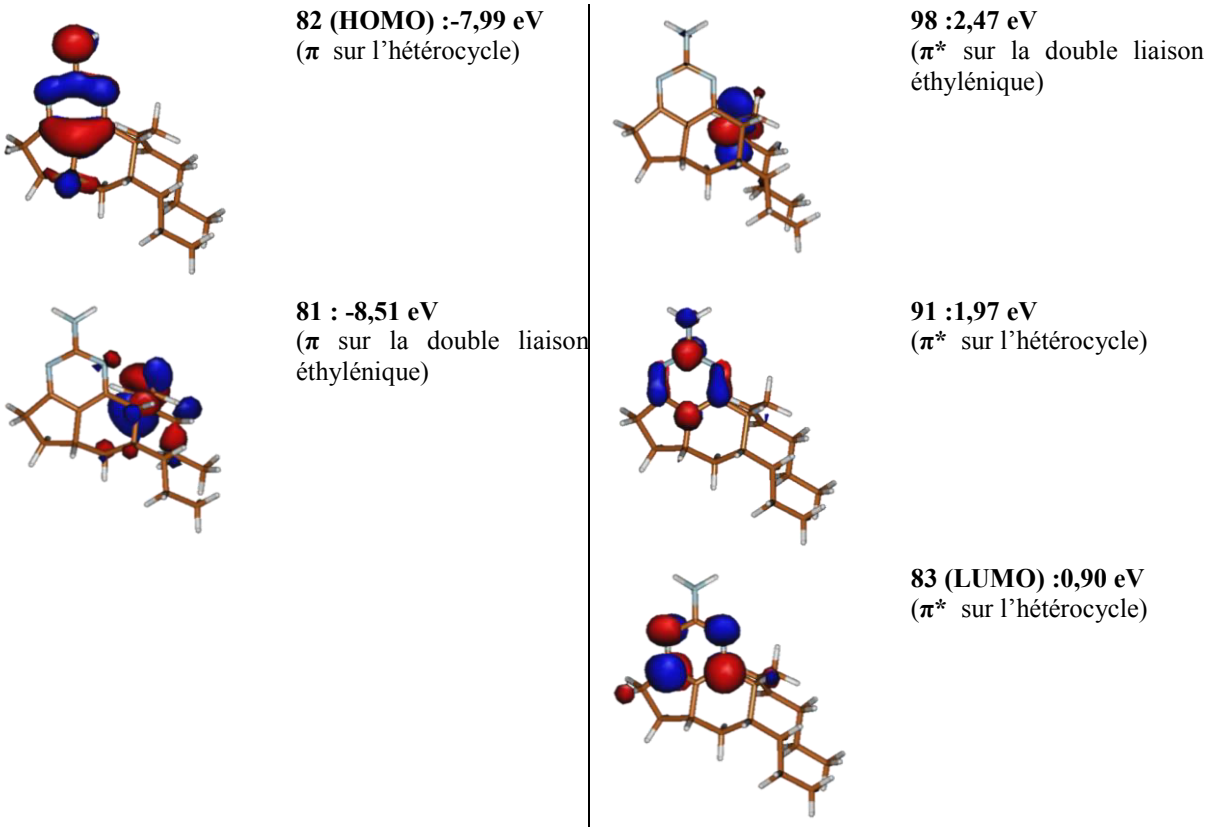


Figure 40 : Orbitales moléculaires principalement impliquée dans le spectre UV du conformère le plus stable de la nétamine I (**58**).

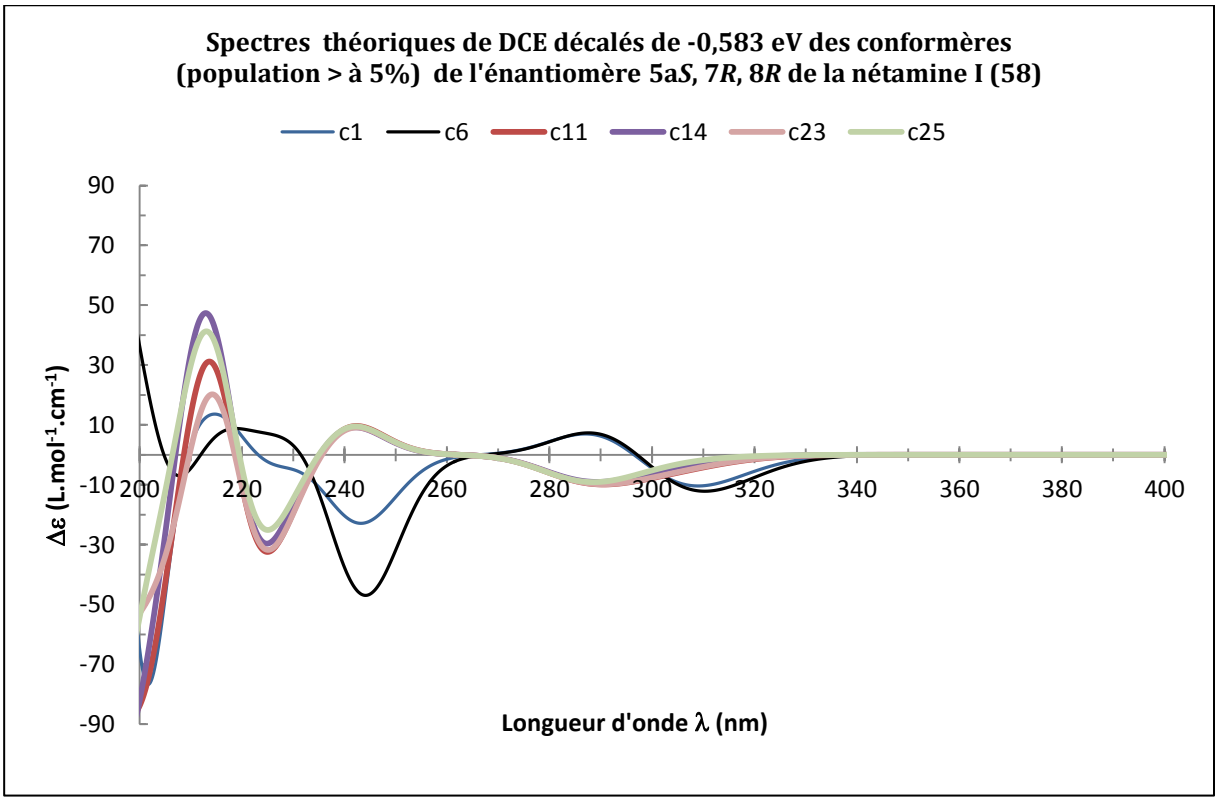


Figure 41 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*R* de la nétamine I (**58**).

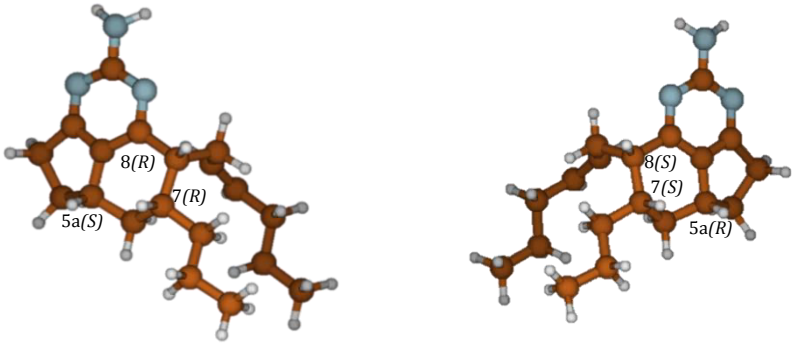


Figure 42 : Enantiomères (5a*S*, 7*R*, 8*R)* et (5a*R*, 7*S*, 8*S*) de la nétamine I (**58**).

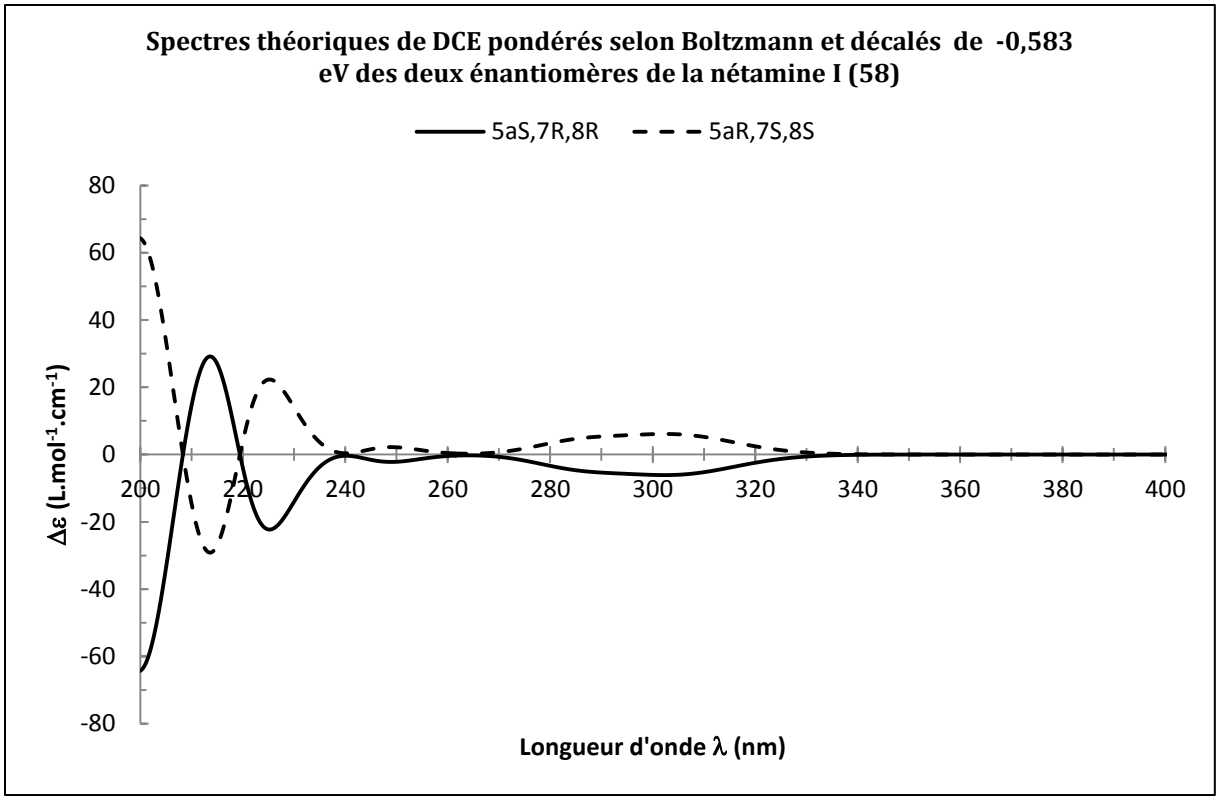


Figure 43 : Spectres théoriques de DCE des énantiomères de la nétamine I (**58**).

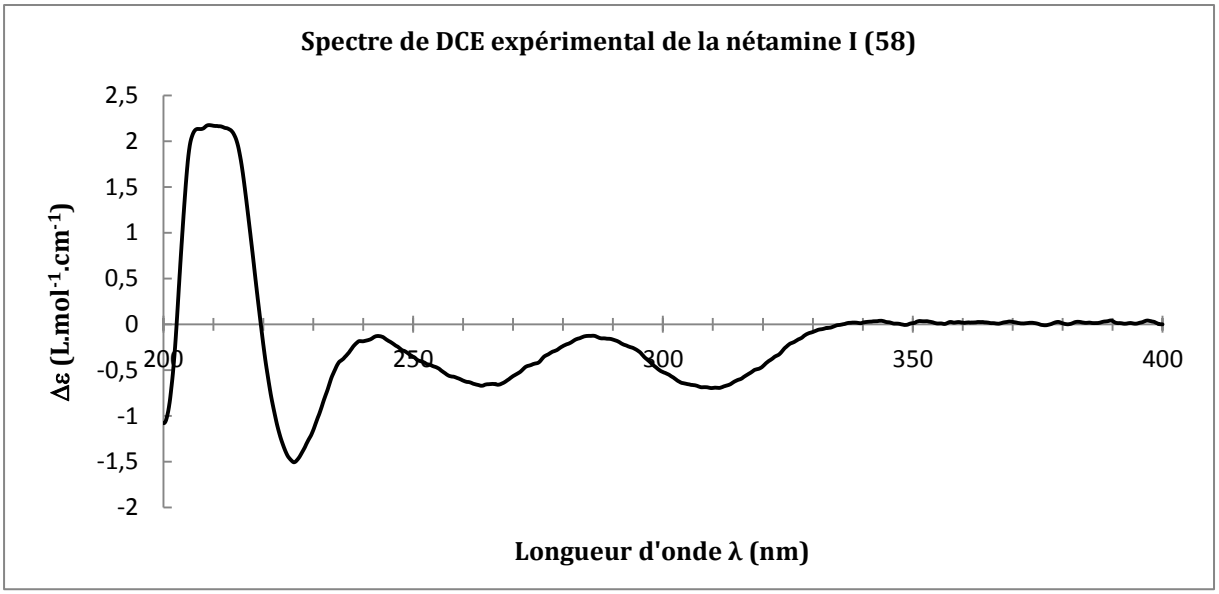


Figure 44 : Spectre de DCE expérimental de la nétamine I (**58**).

Tableau XXXIII : Effets Cotton expérimentaux et calculés (énantiomère (5a*S*, 7*R*, 8*R*)) de la nétamine I (**58**). (+ = EC positif, - = EC négatif et les chiffres sont des longueurs d'onde en nm)

Expérimental	**Calculés (5a*S*,7*R*,8*R*)**
208 +	214+
224 –	225 –
263 –	249 –
308 –	302 – (minimum très plat)

Le Tableau XXXIII ci-dessus regroupe les différents effets Cotton (EC) expérimentaux et calculés (énantiomère (5a*S*, 7*R*, 8*R*)). Il existe un assez bon accord théorie-expérience concernant la longueur d'onde des EC les plus intenses (208 + et 224 –). Après 240 nm l'adéquation entre les courbes de DCE expérimentale (Figure 44) et calculée (Figure 43) est approximative, mais la courbe calculée présente globalement des Δε négatifs en accord avec l'expérience. Ainsi, la comparaison des spectres théoriques de DCE des deux énantiomères (Figure 42) de la nétamine I avec le spectre de DCE expérimental indique que cette molécule possède très probablement la configuration (**5a*S*, 7*R*, 8*R***) (Figure 45).

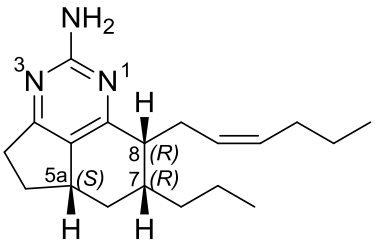


Figure 45 : Configuration absolue de la nétamine I (**58**).

II.4.4.2 Configuration absolue de la nétamine J (59)

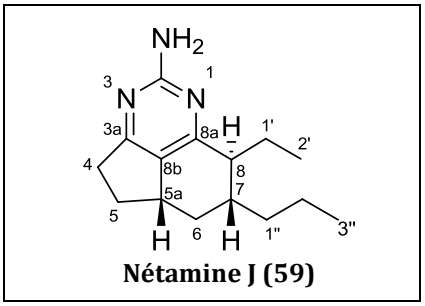


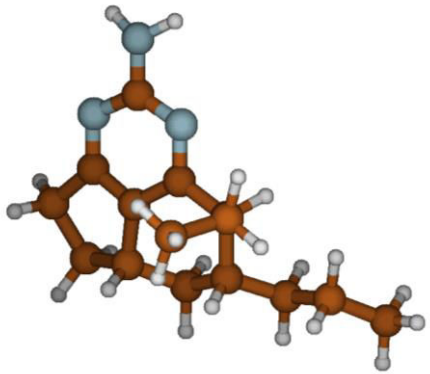
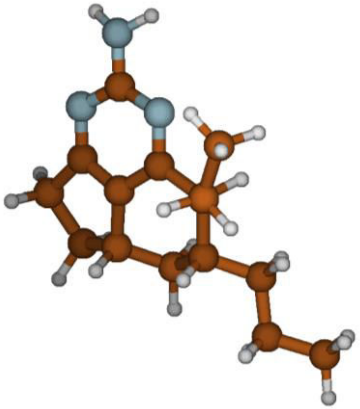
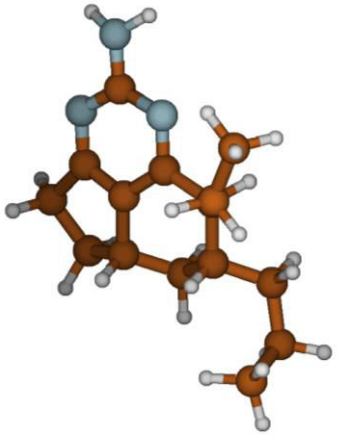
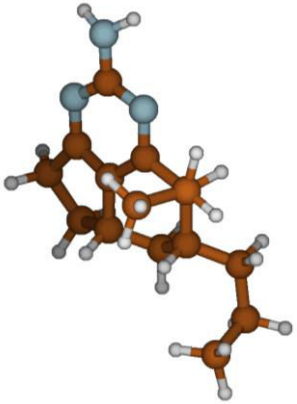
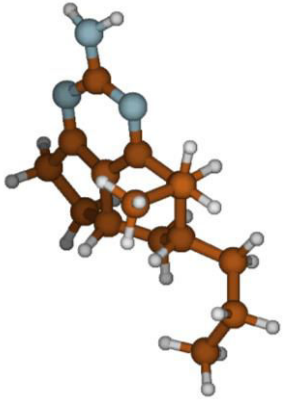
Figure 46 : Structure de la nétamine J (**59**) proposée par RMN.

Les spectres UV et DCE de la nétamine J ont été calculés selon le même protocole que celui utilisé pour la nétamine I. Après avoir cherché les conformères de ce composé, seules les 11 formes les plus stables, ayant une énergie relative inférieure à 3 kcal.mol^{-1} (dont les cinq plus stables sont regroupées dans le Tableau XXXIV), ont été soumises aux calculs des états excités afin de pouvoir établir leur spectre UV théorique (Figure 47). Le spectre UV moyen obtenu (Figure 48) par pondération des spectres UV des conformères selon Boltzmann a été décalé de -0,597 eV (+38,6 nm sur le premier λ_{max} du spectre théorique) pour une meilleure concordance avec le spectre UV expérimental (Figure 49). Suite à ce décalage, un écart de 5 nm à l'expérience est observé pour les deux dernières bandes d'absorption (202 et 234 nm).

Les bandes d'absorption du spectre UV théorique, sortant à 303, 239, et 197 nm correspondent à des transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$. Elles se situent sur le cycle pyrimidinique (Figure 50 et Figure 51).

Contrairement à la nétamine I, les spectres de DCE des conformères de la nétamine J s'avèrent relativement proches les uns des autres (Figure 52).

Tableau XXXIV: Conformères stables de la nétamine J (**59**) ayant une population ≥ 5%.

	c1	c2	c5
			
ΔG (kcal/mol)	0,71	1,31	1,36
Population de Boltzmann	17 %	6 %	6 %
	c6	c9	
			
ΔG (kcal/mol)	0,00	1,25	
Population de Boltzmann	56 %	7%	

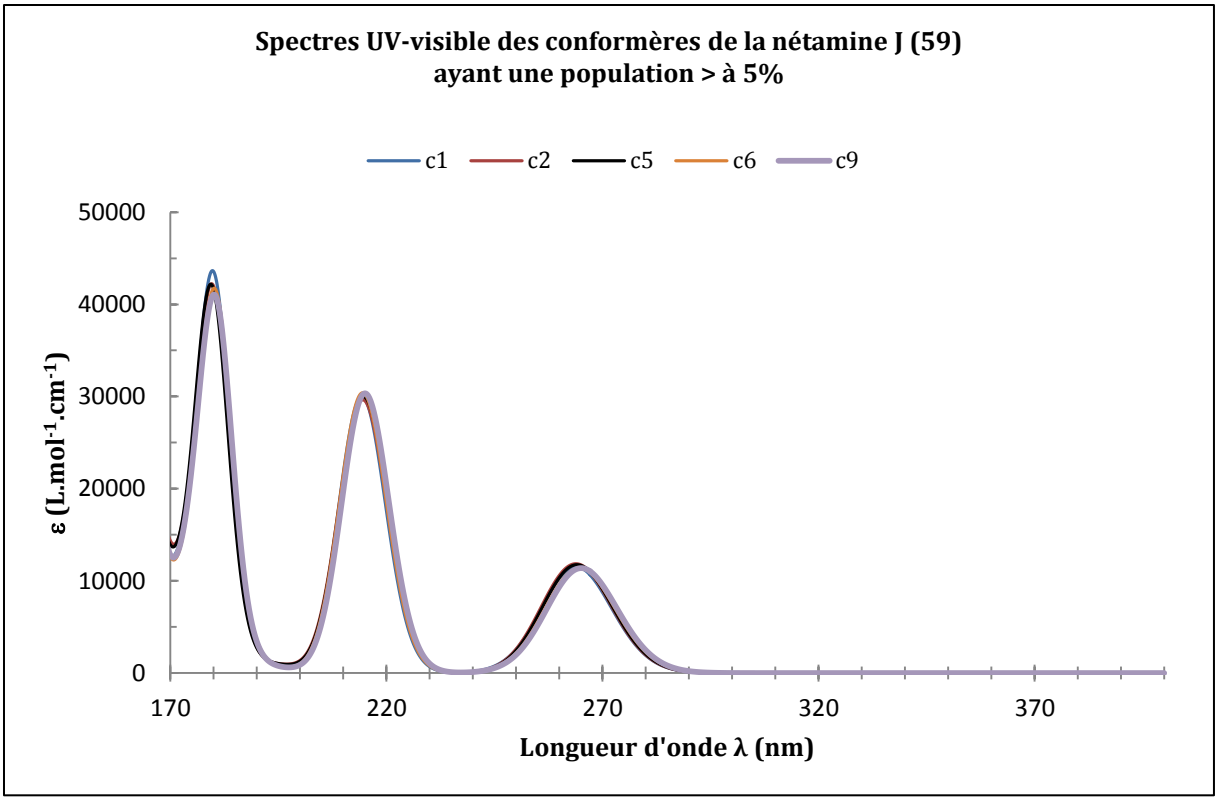


Figure 47 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine J (**59**).

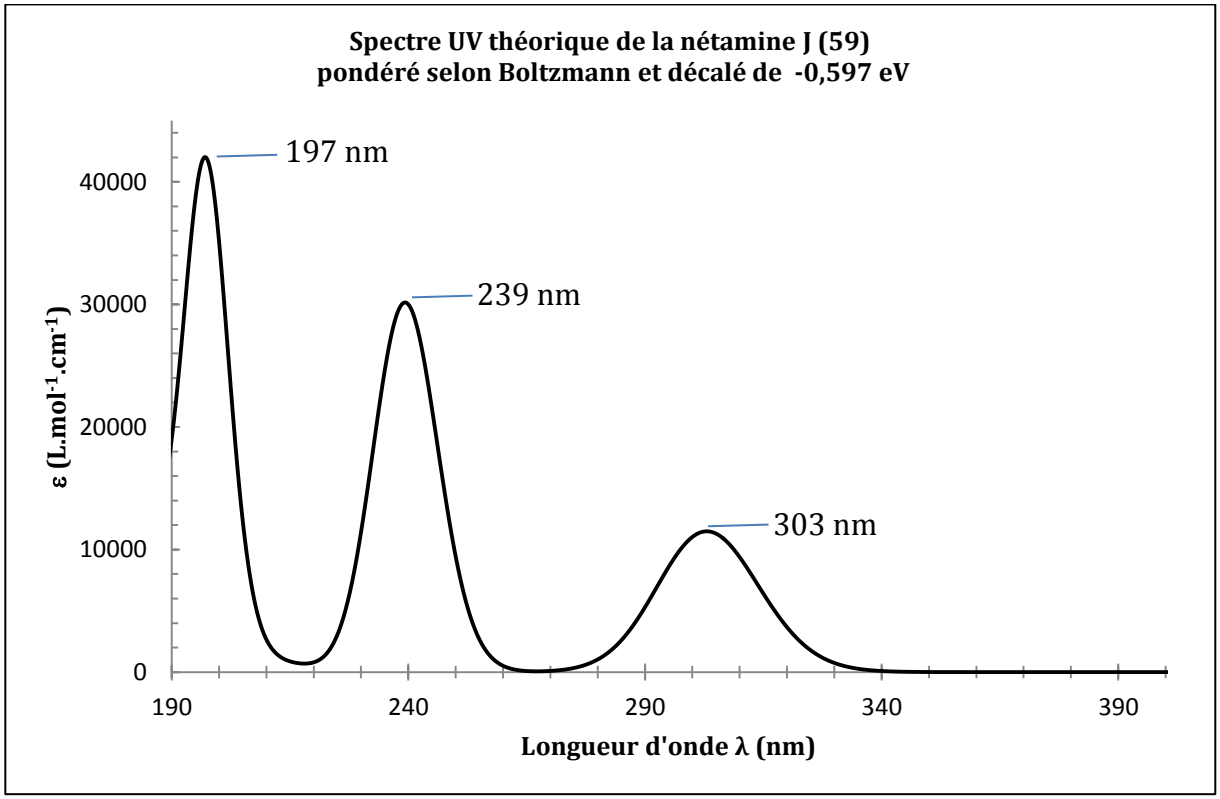


Figure 48 : Spectre UV théorique de la nétamine J (**59**).

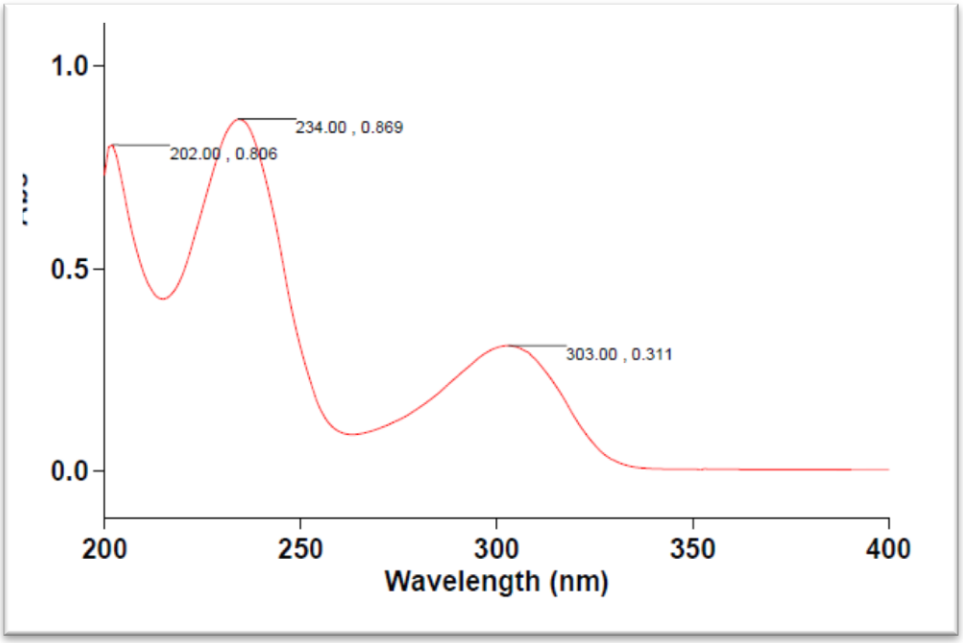


Figure 49 : Spectre expérimental de la nétamine J (**59**).

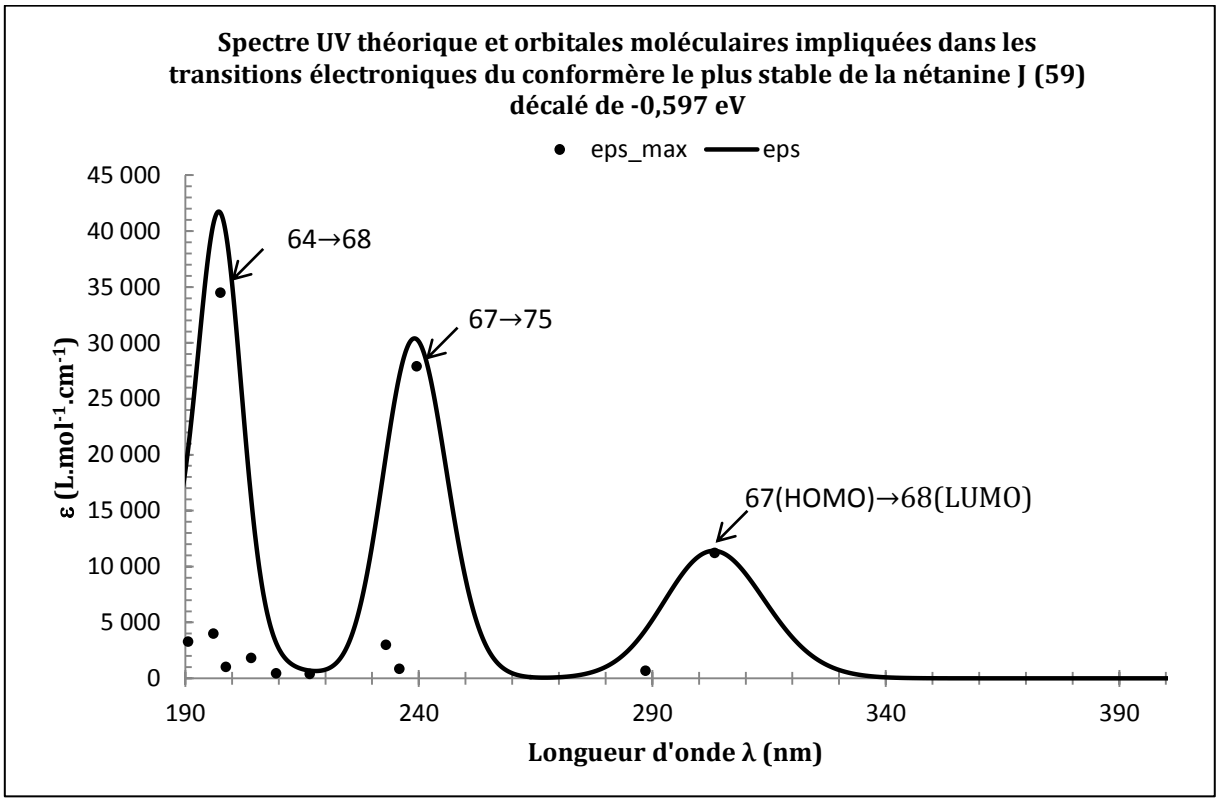


Figure 50 : Spectre UV théorique et transition électronique du conformère le plus stable de la nétamine J (**59**).

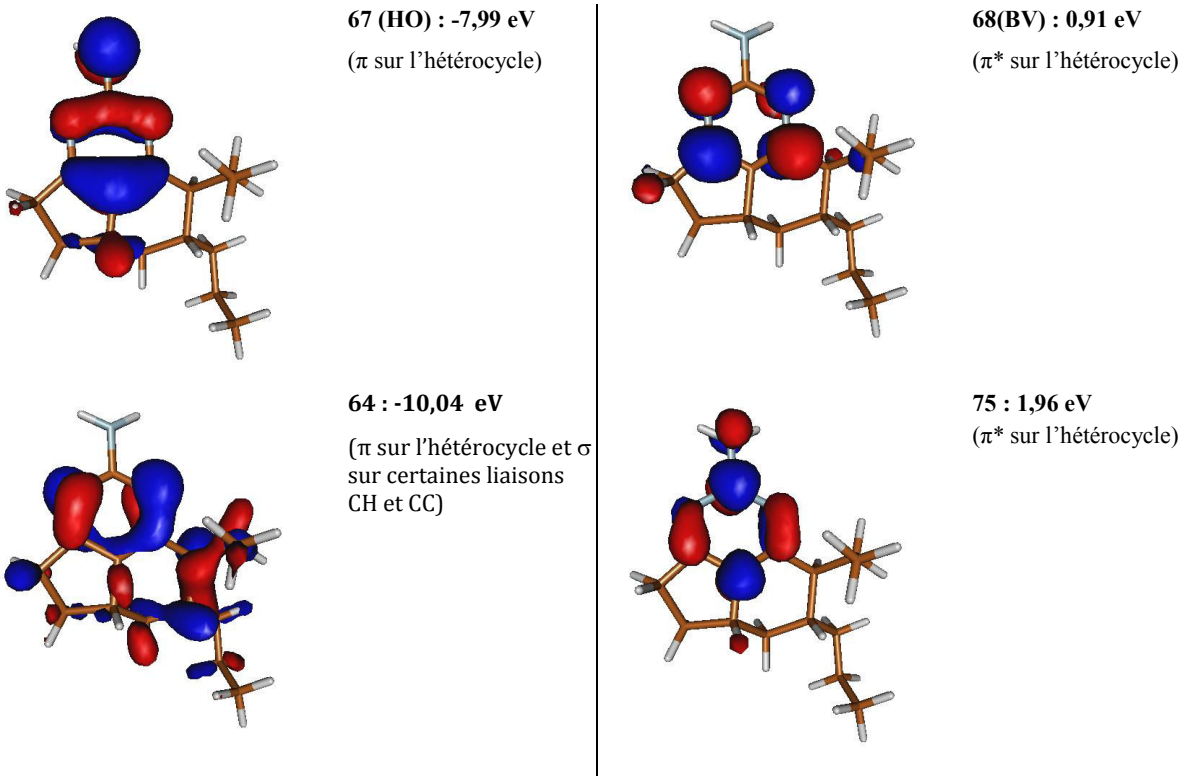


Figure 51 : Orbitales moléculaires principalement impliquées dans le spectre UV.

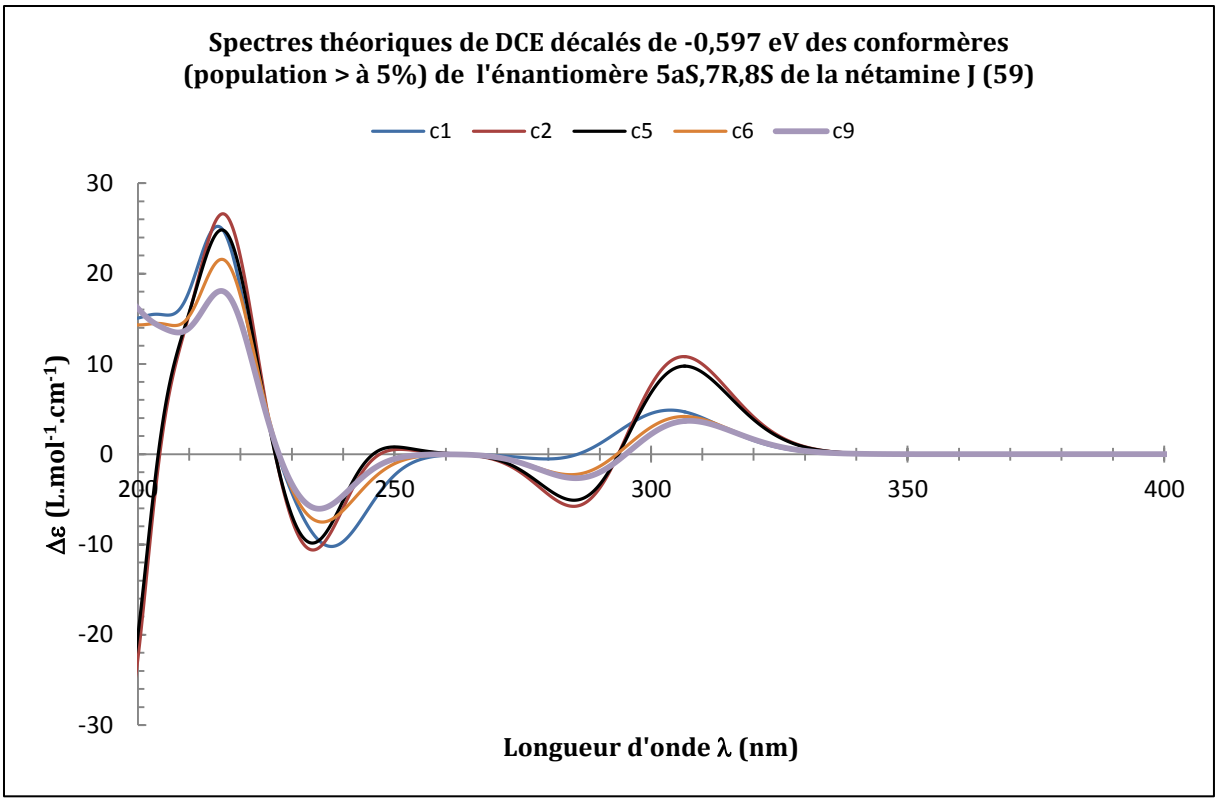


Figure 52 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère (5a*S*, 7*R*, 8*S)* de la nétamine J (**59**).

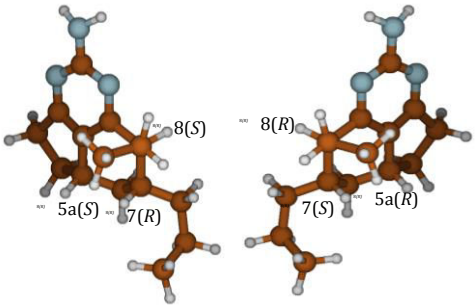


Figure 53 : Enantiomères (5a*S*, 7*R*, 8*S*) et (5a*R*, 7*S*, 8*R*) de la nétamine J (**59**).

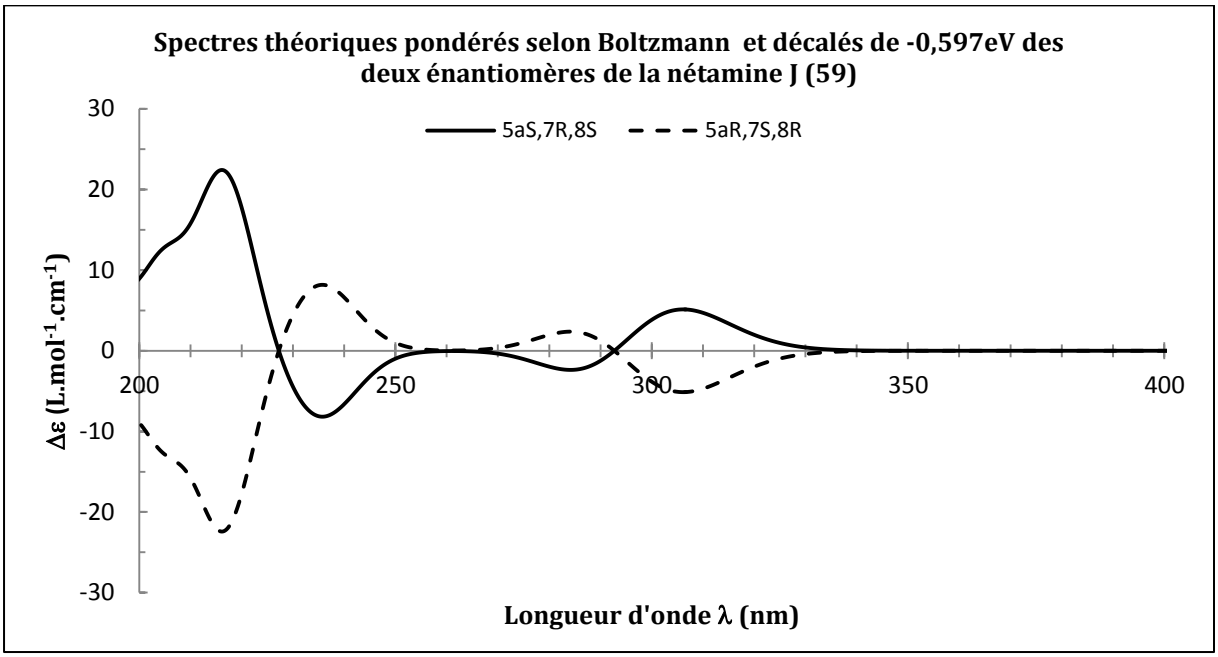


Figure 54 : Spectres théoriques de DCE des deux énantiomères de la nétamine J (**59**).

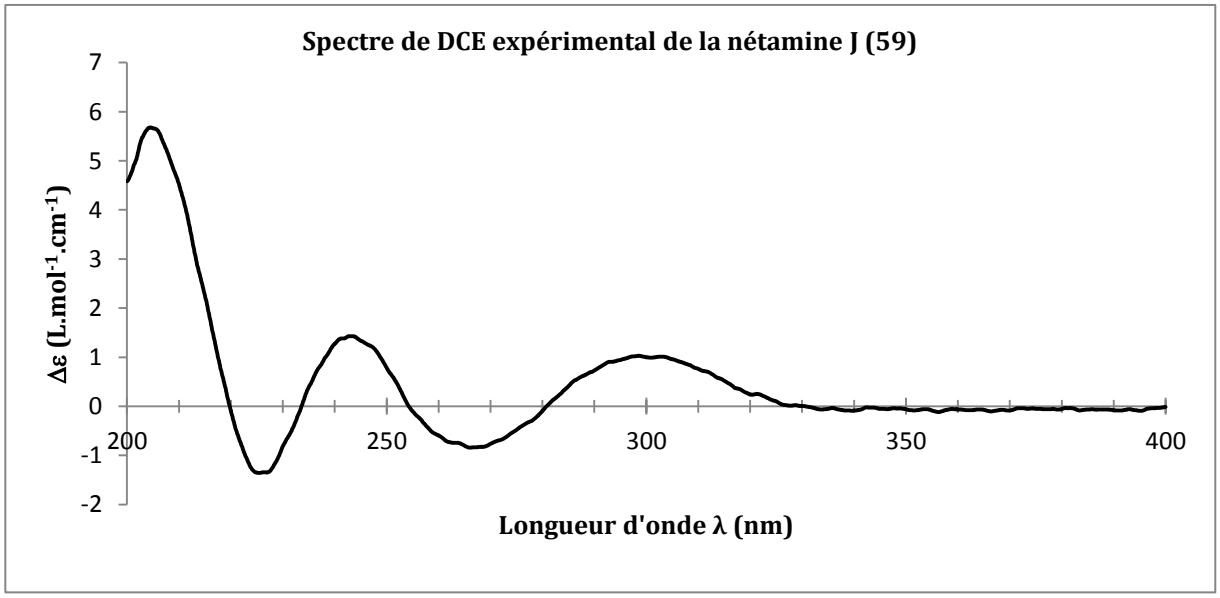


Figure 55 : Spectre de DCE expérimental de la nétamine J (**59**).

Tableau XXXV : Effets Cotton expérimentaux et calculés (énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*S*)
(+ = EC positif, - = EC négatif et les chiffres sont des longueurs d'onde en nm)

Expérimentaux	**Calculés (5a*S*, 7*R*, 8*R*)**
205 +	216+
225 –	236 –
243 +	pas de maximum (sauf sur c2 et c5 vers 250, Figure 52)
266 –	284 –
299 +	306 +

La comparaison des spectres théoriques de DCE des deux énantiomères de la nétamine J (Figures 53 et 54) avec le spectre de DCE expérimental (Figure 55) montre que cette molécule possède probablement la configuration **(5a*S*, 7*R*, 8*S*)** (Figure 56).

Le tableau comparatif des effets Cotton calculés et expérimentaux indique que la méthode théorique employée ne permet pas de retrouver un EC (Effet Cotton) positif vers 243 nm bien qu'il existe un EC positif très faible pour les conformères c2 et c5 vers 250 nm (Tableau XXXV) (Figure 52). De plus, ce comparatif semble indiquer que le décalage calculé, par comparaison des spectres UV théorique et expérimental (-0,597 eV) et appliqué au spectre de DCE théorique, a été surestimé de 7 à 11 nm.

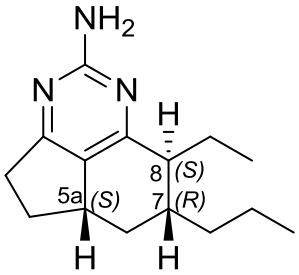


Figure 56 : Configuration absolue de la nétamine J (**59**).

II.4.5 Conclusion

La comparaison des spectres théoriques et expérimentaux a permis de proposer les configurations absolues pour les nétamines I et J : 5a*S*, 7*R*, 8*R* et 5a*S*, 7*R*, 8*S* respectivement.

Les géométries, les spectres UV et de DCE théoriques des conformères ont été calculés en prenant en compte l'effet du solvant (méthode SMD) dans le cadre d'une méthode de fonctionnelle de la densité récente (ωB97XD). L'étude conduisant à de nombreuses formes possibles, il est indispensable de produire des spectres UV et surtout de DCE moyens pondérés selon la probabilité d'apparition de chaque conformation à température ambiante. En effet, les intensités des spectres de DCE varient de façon importante d'un conformère à l'autre alors que celles des spectres UV sont relativement stables et donc similaires. La comparaison des spectres UV calculé et expérimental a conduit à proposer un décalage du spectre UV théorique pour une meilleure concordance avec l'expérience. Cette valeur de décalage, qui vise à supprimer l'erreur produite par ωB97XD dans ses énergies de transitions électroniques, a été ensuite appliquée au spectre de DCE théorique pour la même raison. Cependant, la concordance entre la position en longueur d'onde des effets Cotton dans les spectres théoriques et expérimentaux n'est que semi-quantitative et partielle comme bien souvent dans ce type d'étude.

Plusieurs pistes existent pour essayer d'améliorer la qualité des spectres théoriques :

- La présence de 2 chaînes carbonées comportant jusqu'à 6 carbones (nétamine I) augmente de façon importante le nombre de degrés de libertés dans la géométrie de chaque molécule. Tous les conformères les plus probables n'ont certainement pas été trouvés. La recherche systématique de tous les conformères possibles par une méthode de type Monte-Carlo ou de dynamique moléculaire devrait permettre d'augmenter le nombre de conformères ayant une population significative à température ambiante.
- Le changement de méthodes pour la simulation des spectres UV et de DCE a été également tenté. La méthode de fonctionnelle de la densité CAM-B3LYP [59] sur une autre molécule de la série a été appliquée, les résultats obtenus sont en fait très proches de la méthode ωB97XD utilisée. Un banc d'essai

récent de fonctionnelles de la densité [60] suggère d'utiliser des fonctionnelles telles que B3LYP ou PBE0 pour la simulation de spectres UV et de DCE de molécules courantes.

Pour la suite du travail, les spectres DCE de toutes les nouvelles molécules isolées de *Biemna laboutei* devront être calculés.

Chapitre III

Valorisation : intérêts chimiotaxonomique et biologique

Après les étapes de purification et de caractérisation structurale des métabolites secondaires de *Biemna laboutei*, il a été envisagé dans un deuxième temps leur valorisation en :

- systématique *via* une approche chimiotaxonomique ;
- recherche de molécules d'intérêt thérapeutique par la réalisation de plusieurs tests d'activités biologiques.

III.1 Intérêt chimiotaxonomique

III.1.1 Introduction

Les métabolites secondaires sont les produits de voies de biosynthèse complexes qui sont caractéristiques des capacités d'expression des organismes indiquant différents niveaux de la classification : ordre, genre ou encore espèce [3]. Ils peuvent par conséquent constituer des critères de détermination des organismes vivants et permettre une classification au niveau correspondant, voire entre différentes populations d'une espèce. Cet exercice qui consiste à établir une correspondance entre la composition chimique (présence ou absence de produits) des espèces vivantes et leur classification systématique (taxonomie) est appelée ***chimiotaxonomie***.

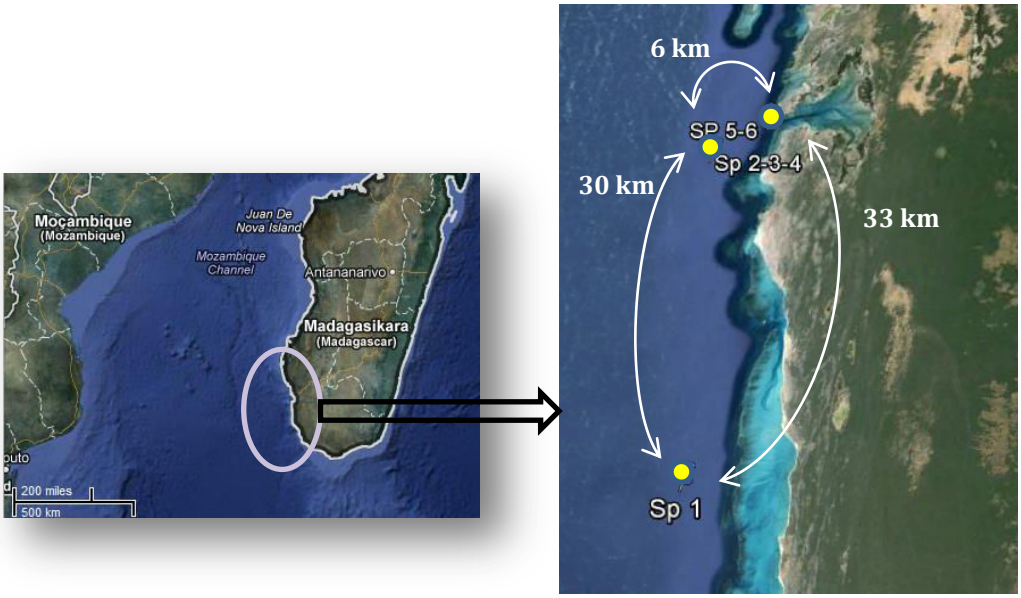
Par ailleurs, l'étude de la chimiodiversité en relation avec l'origine géographique des organismes et/ou les conditions environnementales peut permettre d'évaluer les capacités d'adaptation d'une espèce. La présence plus ou moins importante de certains métabolites secondaires chez les organismes peut, en effet, résulter de l'induction de voies métaboliques exprimées en fonction de conditions environnementales biotiques (ex : la communauté microbienne) ou abiotique (ex : la température). La métabolomique, ou analyse de la production de métabolites secondaires globale ou ciblée sur des familles de molécules pertinentes, peut, par conséquent, se révéler être un indicateur de spéciation (chimiotaxonomie) ou d'adaptation (écologie chimique).

Cette double possibilité d'utilisation de l'expression métabolique (Evolution de l'espèce d'une part, et classification systématique d'autre part) a été mise à profit dans le cadre de l'étude de l'éponge *Biemna laboutei*. Dans un premier temps en effet, la variation (ou stabilité) spatiale et temporelle de la production métabolique de *Biemna laboutei* a

été observée. Puis, dans un second temps, l'utilisation des métabolites secondaires de *Biemna laboutei* en tant que marqueurs chimiotaxonomiques a été discutée.

III.1.2 Variation spatiale et temporelle de l'expression métabolique de *Biemna laboutei*

Biemna laboutei a fait l'objet d'un échantillonnage multiple sur la côte Sud-Ouest de Madagascar. Trois zones de collecte ont été étudiées : la *Baie de Salary* en octobre 2009, le *Dos de la baleine* et la *Baie des assassins* en décembre 2011. Un total de six spécimens a été collecté sur ces trois sites (Figure 57, Tableau XXXVI).



Sp 1 : spécimen 1
Sp 2-3-4 : spécimens 2,3 et 4
Sp 5-6 : spécimens 5 et 6

Figure 57 : Zone d'échantillonnage de *Biemna laboutei* (crédits Google map).

Tableau XXXVI : Date et lieu de collecte des six spécimens de *Biemna laboutei* étudiés.

	Date de collecte	Lieu de collecte	Point GPS	Profondeur
Spécimen 1	Octobre 2009	Baie de Salary	22°30.952 S 43°12.558 E	25-30 m
Spécimen 2	Décembre 2011	Dos de la baleine	22°14.857 S 43°10.892 E	24-28 m
Spécimen 3	Décembre 2011	Dos de la baleine	22°14.857 S 43°10.892 E	24-28 m
Spécimen 4	Décembre 2011	Dos de la baleine	22°14.857 S 43°10.892 E	24-28 m
Spécimen 5	Décembre 2011	Baie des Assassins	22°13.025 S 43°13.577 E	10-15 m
Spécimen 6	Décembre 2011	Baie des Assassins	22°13.025 S 43°13.577 E	14-20 m

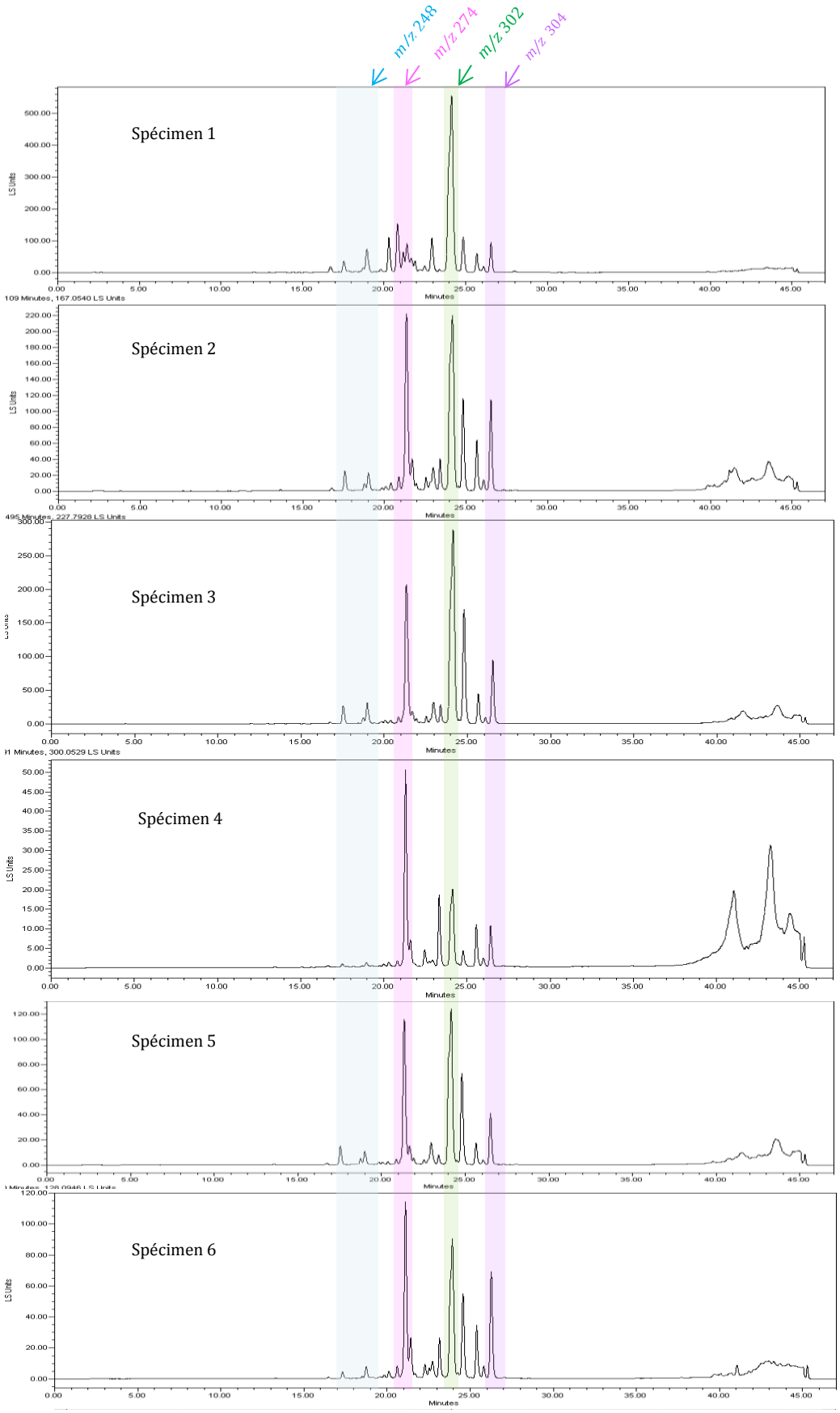
Les six spécimens ont été extraits par un mélange DCM/MeOH (1/1 v/v). Les extraits ont ensuite été analysés par CLHP-PAD-DEDL-SM afin d'en dresser un profil chimique que l'on nommera « signature chimique ». L'analyse comparative des signatures

chimiques (Figure 58) montre d'un point de vue qualitatif, de fortes similitudes, notamment dans la zone comprise entre 15 et 30 minutes correspondant aux métabolites polaires isolés : les alcaloïdes guanidiniques tricycliques. On relèvera en particulier pour tous les échantillons la présence des pics à :

- 18 min, de masse moléculaire *m/z* 248 qui pourrait correspondre à la nétamine K (**60**) ou à la nétamine R (**67**) ;
- 21 min, de masse moléculaire *m/z* 274 qui pourrait correspondre à la nétamine M (**62**) ou à la nétamine O (**64**) ;
- 24 min, de masse moléculaire *m/z* 302 qui pourrait correspondre à la nétamine L (**61**), P (**65**) ou Q (**66**) ;
- 26 min, de masse moléculaire *m/z* 304 qui pourrait correspondre entre autre à la nétamine H (**57**) ou I (**58**).

D'un point de vue quantitatif en revanche, quelques différences significatives peuvent être observées. Par exemple, à l'exception du spécimen n°1 collectée dans la Baie de Salary, l'ensemble des échantillons renferme le(s) composé(s) de masse moléculaire *m/z* 274 (t_R= 21 min) en forte proportion. De même, le(s) composé(s) de masse moléculaire *m/z* 302 (t_R= 24 min) serai(en)t majoritaire(s) pour l'ensemble des spécimens à l'exception du spécimen 4 collecté au Dos de la baleine dont le pic majoritaire est à 21 min (*m/z* 274).

En conclusion, l'éponge *Biemna laboutei* de Madagascar présente, quel que soit le lieu (Baie de Salary/Dos de la baleine/Baie des assassins) et la date (2009/2011) de collecte, une composition en alcaloïdes guanidiniques stable d'un point de vue qualitatif. Toutefois, les zones de collecte n'étant pas très éloignées (33 km tout au plus), il serait intéressant de poursuivre ces investigations dans des zones géographiques plus éloignées, afin d'approfondir ces résultats.



Colonne : Waters Sunfire C18 4,6*150 mm
Eluant : Eau/MeOH + 0,1% AF (70:30 isocratique puis gradient 70:30 à 0:100)
Débit : 1 mL/min

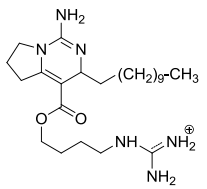
Figure 58 : Profils CLHP- DEDL des extraits bruts de *Biemna laboutei* de Madagascar.

III.1.3 Etude chimiotaxonomique

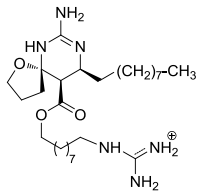
L'éponge *Biemna laboutei* ayant montré une bonne stabilité de sa composition en alcaloïdes guanidiniques tricycliques, ces composés ont alors été considérés comme éléments clés dans la recherche de marqueurs chimiotaxonomiques. Une étude bibliographique exhaustive sur les alcaloïdes guanidiniques tricycliques (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène (Tableau IV p.31) a montré que les molécules de cette famille ont toutes été isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida : *Batzella* sp. [33, 61], *Monanchora arbuscula* [34], *Clathria* sp. [40], *Arenochalina mirabilis* [39] et *Biemna laboutei* [32]. Il faut souligner que l'éponge *Ptilocaulis* aff. *P. spiculifer*, de laquelle ont été isolés pour le première fois la ptilocauline (**39**) et l'isoptilocauline (**40**), avait été, dans un premier temps, identifiée comme une éponge appartenant à la famille des Axinellidae, de l'ordre des Halichondrida [33]. Par la suite, une révision taxonomique a proposé de reclasser cette éponge parmi les éponges du genre *Batzella* de l'ordre des Poecilosclerida [34].

Par ailleurs, élargissant le champ des investigations à d'autres alcaloïdes guanidiniques polycycliques, il apparaît que certaines éponges de l'ordre des Poecilosclerida sont également riches en composés guanidiniques bi-, tri- et pentacycliques.

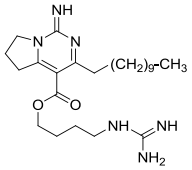
Parmi ces composés guanidiniques, on distingue en premier lieu les alcaloïdes guanidiniques bicycliques telles que les crambines A (**69**) et B (**70**) isolées par Berlinck et collaborateurs d'une éponge *Crambe crambe* de Méditerranée [62]. Ces composés ont été renommés crambescines et leur structure révisée par Jares-Erijman et collaborateurs [63]. La didéhydrocrambine A (**71**) est également un alcaloïde guanidinique bicyclique isolé d'une éponge du genre *Monanchora* [64] (Figure 59).



Crambine A (**69**)
(renommée crambescine A)



Crambine B (**70**)
(renommée crambescine B)



Déhydrocrambine A (**71**)

Figure 59 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques bicycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida.

La famille des alcaloïdes guanidiniques polycycliques isolés d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida, comprend également des alcaloïdes guanidiniques au squelette tricyclique tels que les batzelladines A-E (**72-76**) et les batzelladines F-I (**77-80**) isolés de deux éponges du genre *Batzella* ; la première provenant des Bahamas [65]; la seconde de Jamaïque [61] Ces structures ont ensuite été révisées par Snider et collaborateurs [66]. Les batzelladines J-N (**81-86**) ont, quant à elles, été isolées d'éponges *Monanchora unguifera* des Caraïbes [35, 67], la déhydrobatzelladine C (**87**) de l'éponge *Monanchora arbuscula* de Bélize [68] et les mérobatzelladines (**88-89**)proviennent d'une éponge du genre *Monanchora* du Japon [69] (Figure 60).

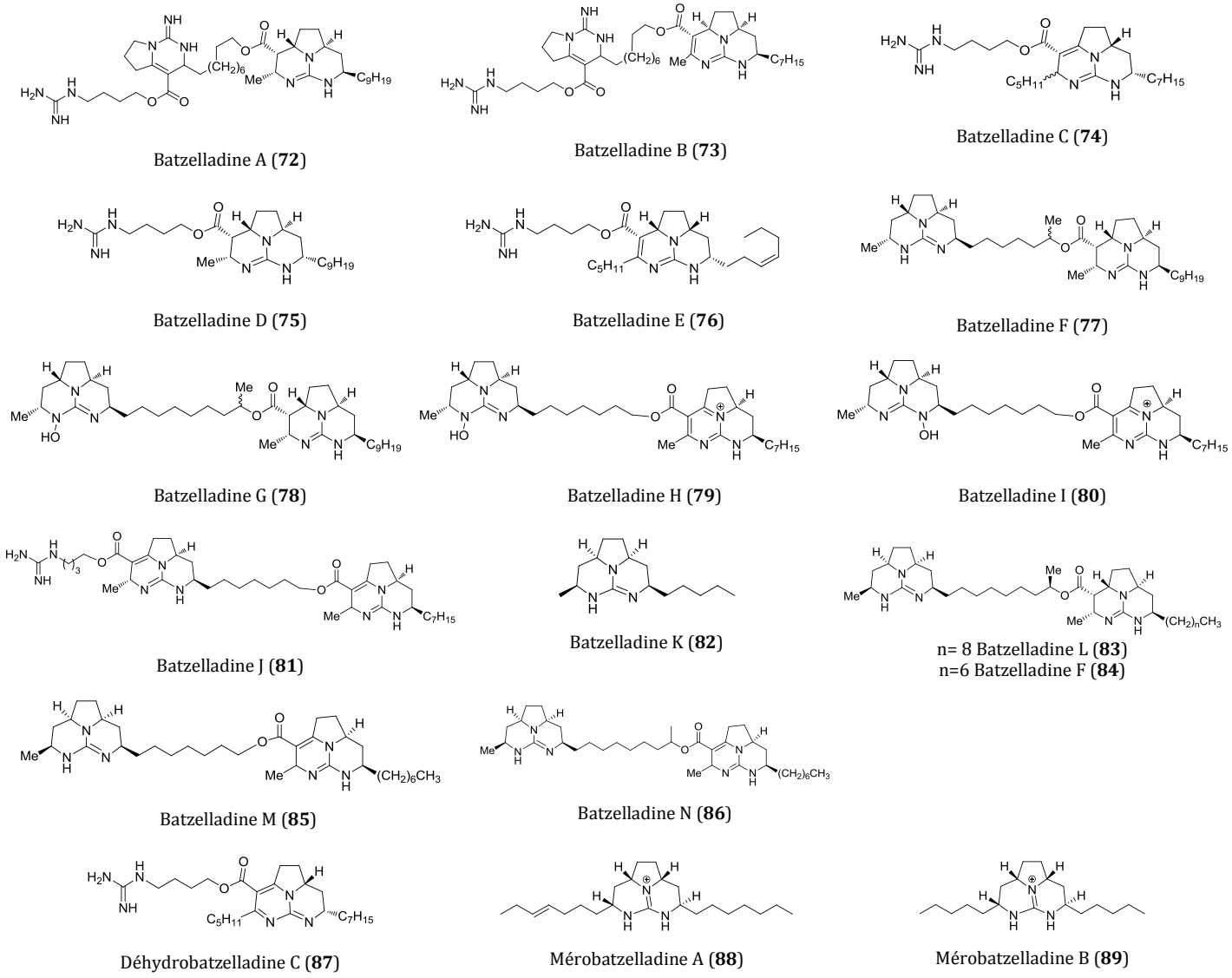


Figure 60 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida.

Enfin, parmi les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques, isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida, la ptilomycaline A (**90**) a été la première de la série, isolée par

Kashmann et collaborateurs, d'une éponge du genre *Batzella* des Caraïbes, et d'une éponge du genre *Hemimycale* de la Mer Rouge [70]. Plusieurs analogues ont ensuite été découverts : la ptilomycaline D (**98**), des crambescidines (**91-97**) et (**99-103**), des isocrambescidines (**104-107**) et des monanchocidines (**111-115**) isolées des éponges *Crambe crambe* [71–74], *Monanchora arbuscula* [75], *M. dianchora* [76], *M. unguiculata* [64, 68]et *M. pulchra* [77, 78]. Il s'agit de façon générale d'alcaloïdes guanidiniques pentacycliques reliés à un motif spermidine ou hydroxy-spermidine par un ω-hydroxyacide gras. Ces composés diffèrent par la longueur de la chaîne hydroxyacide et par la présence (ou l'absence) d'un groupe hydroxy en C-13 sur le système pentacyclique et/ou sur le motif spermidine (Figure 61).

Il est à noter par ailleurs que des alcaloïdes guanidiniques pentacycliques ont également été isolés d'étoiles de mer de Nouvelle-Calédonie : la ptilomycaline A (**90**), la crambescidine 800 (**91**), la fromiamycaline (**108**) et la céléromycaline (**109**) [79]. Les alcaloïdes guanidiniques **90**, **91** et **108** ont été isolés de *Fromia nonilis;* les composés **90**, **91** et **109** ont été retrouvés dans *Celerina heffernani*. Toutefois, il est fortement soupçonné que leur présence chez les étoiles de mer soit d'origine alimentaire.

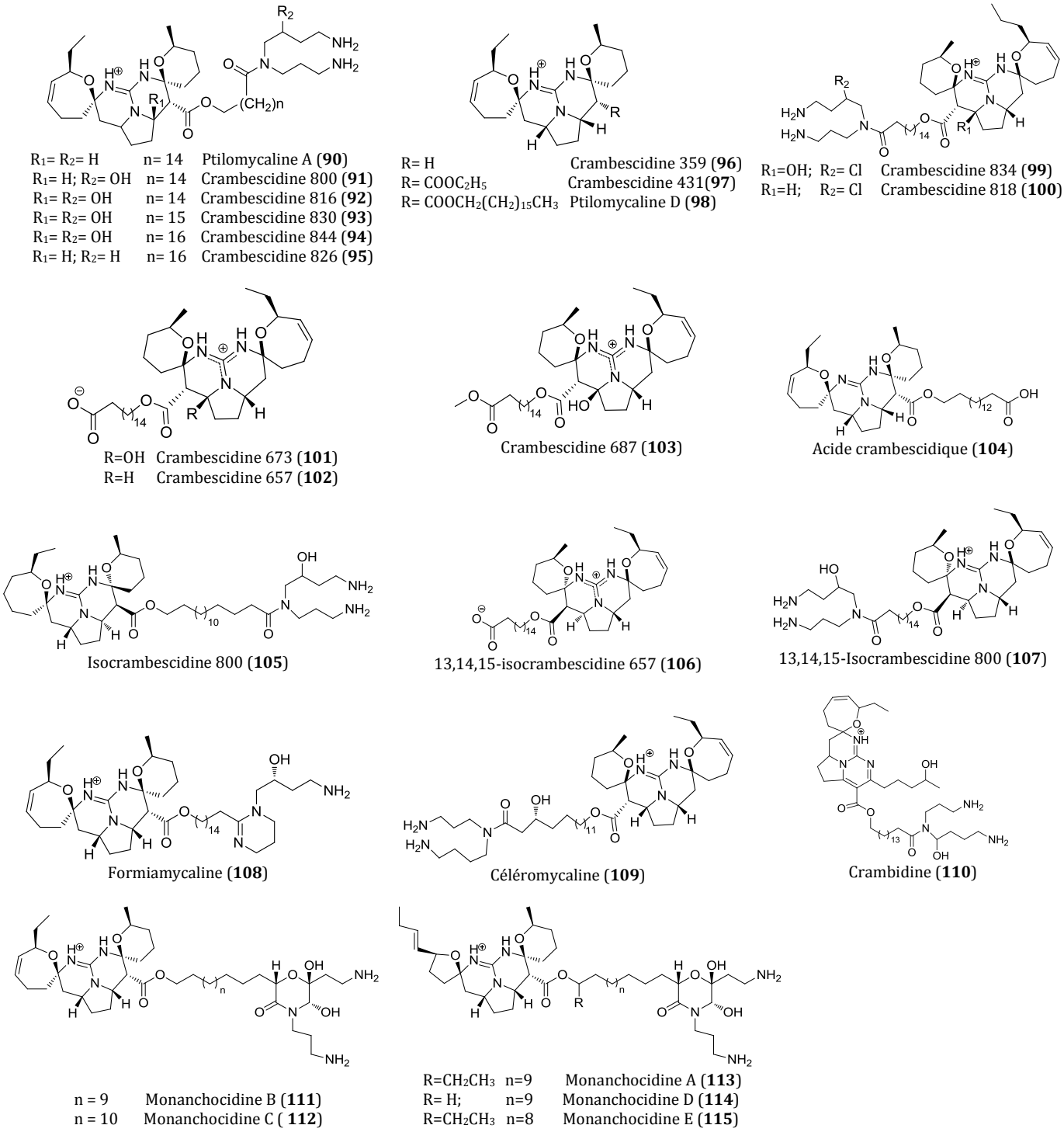


Figure 61 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques pentacycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida.

III.4.1 Conclusion

Les travaux réalisés ont montré en premier lieu que *Biemna laboutei* présentait une composition chimique en fonction de la date et du lieu de collecte, *a priori*, constante d'un point de vue qualitatif et quelque peu variable d'un point de vue quantitatif. Ces

travaux ont démontré également que les alcaloïdes polycycliques de type guanidine (bi-, tri- et pentacyclique) seraient issus d'un métabolisme propre à un nombre limité de genres : *Arenochalina, Batzella, Biemna, Crambe, Clathria, Hemymicale* et *Monanchora,* appartenant tous à l'ordre des Poecilosclerida (Figure 62). A ce stade de l'étude, il n'est pas possible d'affirmer que les alcaloïdes guanidiniques polycycliques soient des marqueurs chimiotaxonomiques de l'ordre des Poecilosclerida. En effet cet ordre est l'un des plus étendus chez les Demosponges et ne comprend pas moins de 25 familles reconnues. Se limiter à l'échelle de la famille, semble également difficile car les sept genres répertoriés appartiennent à six familles différentes. Il existe donc presqu'autant de genres que de familles concernées par la présence de ces alcaloïdes. Des investigations complémentaires plus approfondies sont donc nécessaires pour conclure de façon plus pertinente.

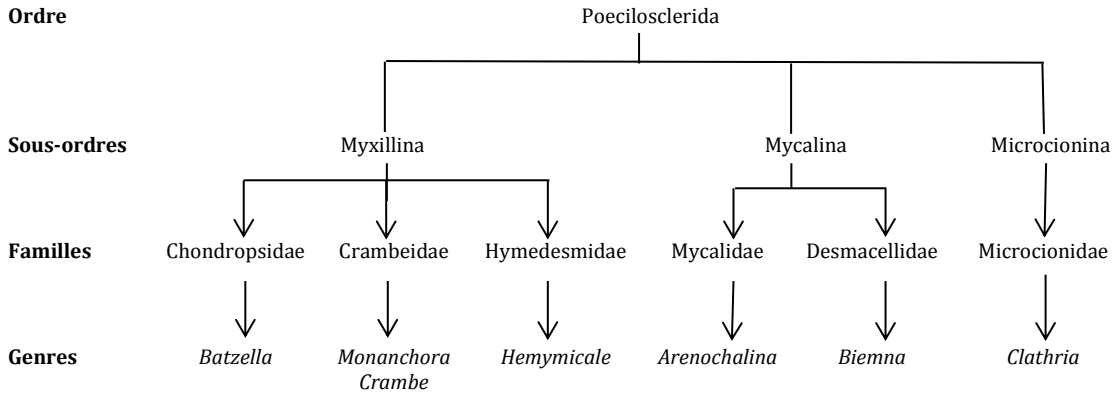


Figure 62 : Phylogénie des éponges contenant des alcaloïdes guanidiniques polycycliques.

III.2 Intérêt biologique : Activités biologiques des extraits bruts et des produits purs de *Biemna laboutei*

II.2.1 Introduction

Dans la recherche de nouveaux principes actifs d'origine marine, l'une des premières étapes clés est de sélectionner des organismes d'intérêt, par un criblage biologique réalisé sur les extraits bruts de ces organismes. Dans cette optique, les extraits bruts des huit éponges étudiées ont été testés pour leur activité cytotoxique, antivirale et antipaludique. Les résultats obtenus ont ensuite été approfondis, par l'évaluation de l'activité biologique des métabolites purs isolés de l'une des huit éponges sélectionnées : *Biemna laboutei* (Figure 63).

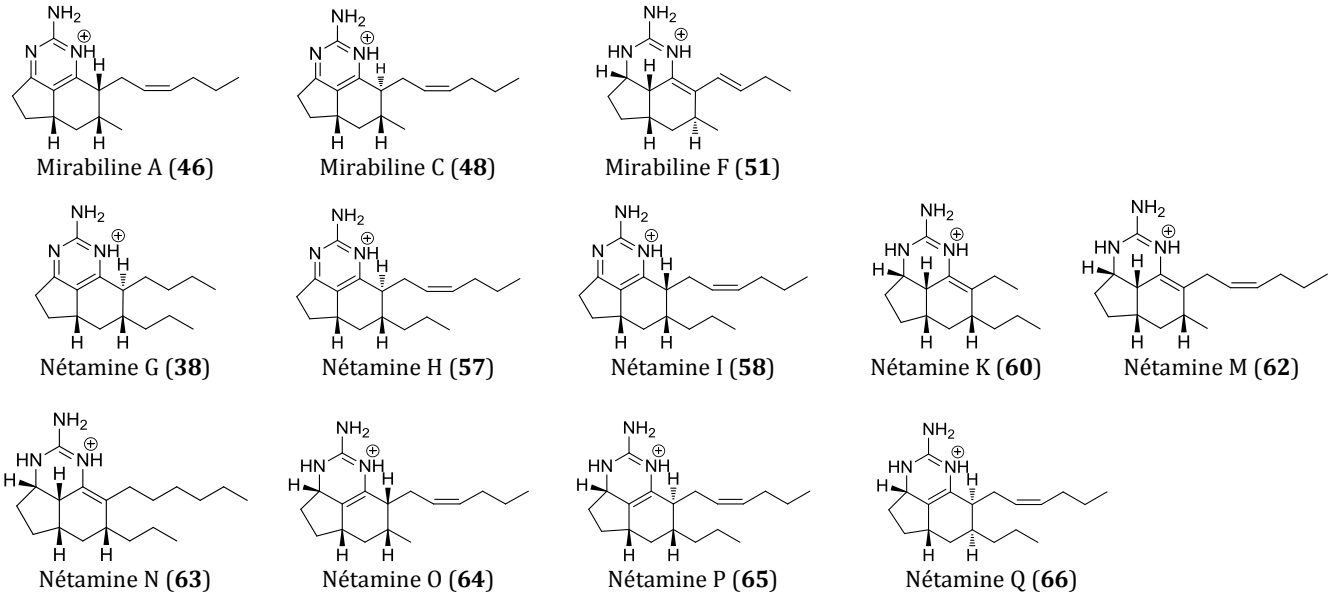


Figure 63 : Molécules pures testées pour leurs activités biologiques.

III.2.2 Cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés par Geneviève Aubert dans l'équipe du Directeur de Recherche Thierry Cresteil de l'ICSN de Gif-sur-Yvette (CNRS), France.

❖ Généralités

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anormale de cellules au sein d'un tissu de l'organisme. Les métastases se forment par migration des cellules malsaines dans le corps, pour former une tumeur maligne aussi appelée néoplasme. Lors de la division cellulaire, les cellules cancéreuses peuvent supplanter ou

détruire les cellules saines. Le cancer est une pathologie pouvant avoir plusieurs origines :

- infectieuse par contamination des virus (le papillomavirus humain est souvent un facteur du cancer du col de l'utérus), des bactéries ou des parasites
- endogène, provenant de l'organisme, due à une défaillance génétique
- exogène, c'est-à-dire provoqué par des substances extérieures à l'organisme telles que le tabac, l'alcool, les rayonnements UV.

La cytotoxicité, ciblant des cellules cancéreuses, reste un moyen de découverte de nouvelles molécules intéressantes même si les résultats de certains tests requièrent des études complémentaires.

❖ Résultats

Afin de mettre en évidence des propriétés potentiellement antitumorales, la cytotoxicité de l'extrait brut DCM/MeOH de chacune des huit éponges étudiées a été évaluée, sur les cellules cancéreuses KB (carcinome buccal). Les résultats s'expriment en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire calculé pour une concentration en extrait brut de 10 µg/mL (Figure 64).

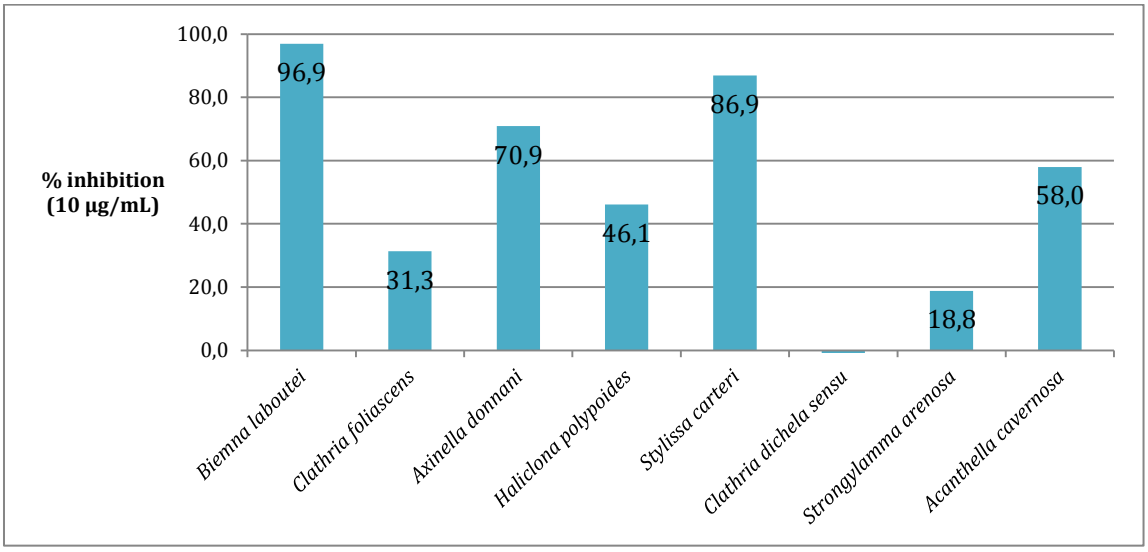


Figure 64 : Cytotoxicité des extraits bruts des huit éponges étudiées : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB.

L'activité cytotoxique est significative lorsque pour une concentration à 10 µg/mL, un pourcentage d'inhibition supérieur à 80 est relevé ; c'est le cas pour les éponges *Stylissa carteri* (86,9 %) et *Biemna laboutei* (96,9 %).

Au vu de ces résultats, les métabolites isolés en quantité suffisante (les mirabilines A, C, F et les nétamines G, H, I, K, M, N, O, P et Q) ont, par la suite, été testés et leur concentration capable d'inhiber 50 % de la croissance cellulaire (CI_{50}) calculée.

A l'issue de ces tests, il apparaît que seules les nétamines M (**62**), N (**63**), O (**64**), et Q (**66**) présentent une activité cytotoxique remarquable à 10^{-5} M. Cependant, à une concentration de 10^{-6} M, seule la nétamine M a conservé une activité moyenne avec un pourcentage d'inhibition à 54±5 et une CI_{50} évaluée à 1,0 µM (Tableau XXXVII).

Tableau XXXVII : Cytotoxicité des nétamines M, N, O et Q.

Métabolites	**% d'inhibition**	
	***c* = 10^{-5} M**	***c* = 10^{-6} M**
Nétamine M (**62**)	100±1	54±5
Nétamine N (**63**)	99±1	0±8
Nétamine O (**64**)	99±1	0±10
Nétamine Q (**66**)	100±1	0±2

La toxicité des molécules étant considérée comme modérée, voire nulle, en dessous d'une concentration de l'ordre du micromolaire, cela signifie que les nétamines N, O et Q présentant une cytotoxicité à 10^{-5} M vraisemblablement pas exploitables en oncologie. En revanche, la non cytotoxicité leur donne une chance pour d'autres activités biologiques telles que antivirale et antiparasitaire.

III.2.3 Activité antivirale

Les tests d'activités antivirales ont été réalisés par l'équipe du Professeur Johan Neyts et du Docteur Pieter Leyssen, du laboratoire de virologie et de chimiothérapie de l'Institut Rega pour la Recherche Médicale de l'Université Catholique de Louvain, Belgique.

Pour l'évaluation de l'activité anti-virale des extraits bruts des huit éponges étudiées, parmi les multiples souches virales possibles, trois ont été sélectionnées :

- le virus du Chikungunya (souche 899),
- l'entérovirus type 71 (souche BrCr),
- le rhinovirus type 14 (phénotype sauvage).

III.2.3.1 Le virus du Chikungunya

- **Généralités**

Le Chikungunya (en swahili « celui qui marche courbé ») est une maladie transmise par des moustiques du genre *Aedes*. Dans la majorité des cas, la maladie cause d'abord de la fièvre puis des douleurs articulaires et musculaires, accompagnées d'éruption cutanée. En 2005-2006, une épidémie importante de chikungunya a touché l'Océan Indien, notamment les îles de La Réunion, Maurice, Seychelles et Mayotte, frappant plus de 300 000 personnes et faisant connaître la pathologie au grand public. Depuis une dizaine d'années, de nombreux laboratoires se sont alors attachés à chercher des solutions afin de combattre cette maladie, soit en développant de nouveaux agents répulsifs de moustiques, soit en trouvant des nouveaux principes actifs capable d'agir sur le virus.

- **Résultats**

Aucun extrait brut n'a montré d'activité anti-chikungunya remarquable.

III.2.3.2 Les entérovirus 71

- **Généralités**

Les entérovirus sont associés à diverses maladies affectant l'Homme. Parmi celles-ci, le poliovirus constitue la plus importante d'un point de vue historique. Les entérovirus sont la cause d'épidémies de grande ampleur. Ils touchent principalement les enfants de moins de 15 ans et sont transmissibles par contact. Les deux dernières épidémies qui ont frappé la Malaisie en 1997 et Taïwan en 1998, ont été meurtrières. Les syndromes pieds-mains-bouches, méningites, paralysies flasques, œdèmes pulmonaires hémorragiques comptent parmi les maladies potentiellement engendrées par cet entérovirus, avec souvent des complications neurologiques. Il existe peu de traitements connus pour être efficaces. Les entérovirus 71 sont par ailleurs caractérisés par une grande diversité génétique. Trois génotypes, dénommées A, B et C ont été décrits. Le génotype A ne comprend qu'un seul membre, la souche prototype de l'entérovirus 71 BrCr-CA-70, isolée en Californie en 1970. Le génotype B a circulé de 1972 à 1988 aux Etats-Unis, en 1994 en Colombie, et en

Malaisie durant l'épidémie de 1997. Il est intéressant de noter que ce génotype B n'est plus isolé aux Etats-Unis depuis 1988 alors qu'il continue de circuler dans les autres régions du monde. Le génotype C circule depuis 1985 aux Etats-Unis, au Canada, en Australie et en Chine.

- **Résultats**

Les tests ont été menés sur la souche BrCr. Aucune activité n'a été décelée parmi les éponges étudiées.

III.2.3.3 Les rhinovirus

- **Généralités**

Les rhinovirus sont les agents responsables de la majorité des infections des voies aériennes supérieures bénignes, habituellement appelées rhumes. La transmission de ces virus se fait par contact direct ou par voie aérienne. Généralement, ils provoquent des infections bénignes. Toutefois, ils sont parfois responsables d'infections sévères, en particulier chez des patients asthmatiques ou chez les très jeunes enfants. Ces infections respiratoires hautes sont une des premières causes d'absentéisme dans les pays tempérés industrialisés, elles représentent donc un coût non négligeable pour la société.

- **Résultats**

Les tests menés sur le rhinovirus type 14 n'ont donné aucun résultat notable.

III.2.4 Activité antipaludique

Les tests d'activité antipaludique ont été réalisés par l'équipe du Professeur Michel Frédérich du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège, Belgique.

- **Généralités**

Le paludisme, aussi appelé malaria est une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'Homme par la piqure d'un moustique, l'*anophèle*

femelle. Parmi les espèces de *Plasmodium*, quatre sont capables d'induire la maladie. Il s'agit des espèces *Plasmodium ovale, vivax, malariae* et *falciparum*. Cette dernière est la plus répandue et la plus virulente. Les premiers symptômes - fièvre, maux de tête, frissons et vomissements - apparaissent au bout de sept jours ou plus (généralement 10 à 15 jours) après la piqûre de moustique infectante. S'il n'est pas traité dans les 24 heures, le paludisme causé par *P. falciparum* en particulier peut évoluer vers une affection sévère souvent mortelle. Avec plus de 200 millions de cas répertoriés dans le monde, le paludisme demeure la parasitose la plus importante et concerne majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes, principalement en Afrique subsaharienne. Toutefois, l'Asie, l'Amérique latine et, dans une moindre mesure, le Moyen-Orient et certaines parties de l'Europe sont également affectés. La résistance aux antipaludiques est un problème récurrent. En effet, concernant particulièrement *P. falciparum*, cette espèce a montré une résistance aux précédentes générations de médicaments à la chloroquine ou à la sulfadoxine-pyriméthamine, et un début de résistance à l'artémisinine, principe actif essentiellement présent dans les médicaments antipaludiques sur le marché. C'est pourquoi la quête perpétuelle de nouveaux antipaludiques est donc nécessaire.

❖ Résultats

L'activité antipaludique a été évaluée *in vitro* à travers l'activité anti-proliférative sur le parasite *Plasmodium falciparum* (Figure 65 et Figure 66). Ce test a été réalisé dans un premier temps sur les huit extraits brut des éponges étudiées. Les résultats synthétisés dans la Figure 65 font apparaître pour chacun des extraits testés, deux valeurs :

- Le pourcentage d'inhibition de la croissance du *Plasmodium* évalué pour une concentration de l'extrait à 20 µg/mL (Figure 65);
- La CI_{50} ou concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire (Figure 66).

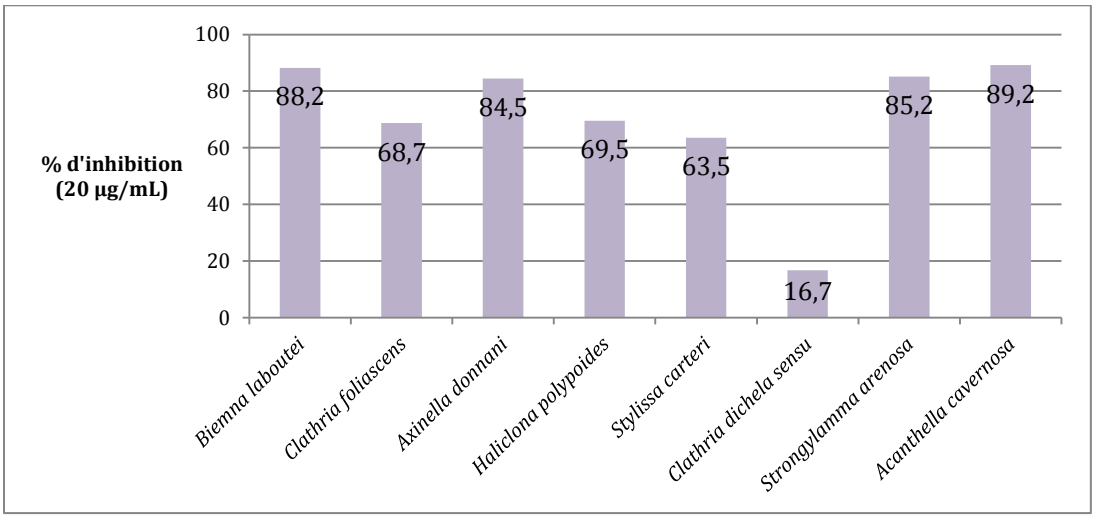


Figure 65 : Activité antiplasmodique des extraits bruts des huit éponges étudiées : inhibition de la croissance de *P. falciparum*.

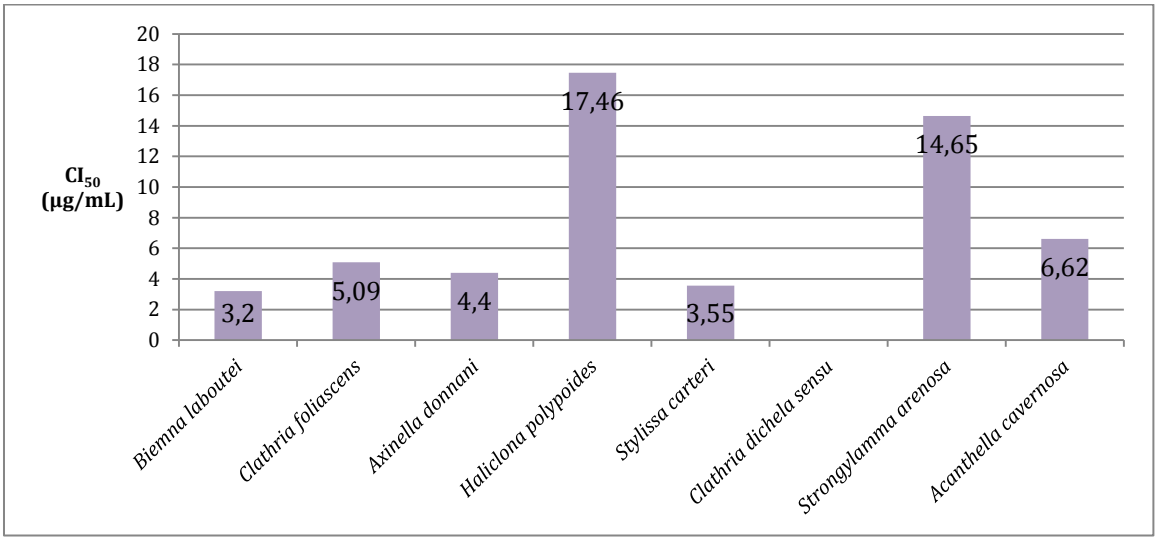


Figure 66 : Activité antiplasmodique des extraits bruts des huit éponges étudiées : concentration inhibant 50% de la croissance de *P. falciparum.*

Les résultats les plus significatifs sont ceux qui allient un pourcentage d'inhibition élevé (>70 %) à une CI_{50} faible (< 5 µg/mL) (Tableau XXXVIII).

Tableau XXXVIII : Interprétation des résultats du test antiplasmodique.

Résultat	Interprétation
Inhibition de l'activité parasitaire	
> 70% à 5 µg/mL	Excellent
> 70% à 20 µg/mL	Bon
45> >70% à 20 µg/mL	Moyen
30> >45% à 20 µg/mL	Faible
CI_{50}	
15 µg/mL	Mauvais
< 15 g/mL	Bon
≤ 5 µg/mL	Ecellent

Quatre extraits se sont démarqués, ceux de *Clathria foliascens*, *Axinella donnani*, *Stylissa carteri* et *Biemna laboutei* affichant des CI_{50} de 5,1 ; 4,4 ; 3,5 et 3,2 µg/mL respectivement associées à des pourcentages d'inhibition supérieur à 70 % pour une concentration de 20 µg/mL.

Ces résultats forts intéressants ont donné des raisons d'espérer que les nétamines isolées de *Biemna laboutei* pouvaient induire cette activité anti-plasmodique. Pour le savoir, le test a été réalisé sur les molécules isolées de l'éponge en quantité suffisante (Tableau XXXIX). Trois molécules se sont démarquées : les nétamines K (**60**), O (**64**) et Q (**66**) avec des CI_{50} inférieure à 5 µg/mL.

Tableau XXXIX : Activité anti-*plasmodium* des molécules isolées de *Biemna laboutei.*

Métabolites	**CI_{50}** (µg/mL)
Mirabiline A (**46**)	~25
Mirabiline C (**48**)	13,6
Mirabiline F (**51**)	5,59
Nétamine G (**38**)	19,6
Nétamine H (**57**)	9,24
Nétamine I (**58**)	11,1
Nétamine K (**60**)	**0,612**
Nétamine N (**63**)	10,6
Nétamine O (**64**)	**4,66**
Nétamine P (**65**)	9,86
Nétamine Q (**66**)	**2,53**

III.2.4 Conclusion

Parmi les activités biologiques recherchées chez les huit éponges extraites, les activités cytotoxique et antiplasmodiale ont souligné le potentiel bioactif de l'éponge *Biemna laboutei.* Ces résultats viennent en outre confirmer le choix de l'étude de cette éponge (*cf.* II.2), dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives.

Quatre molécules pourraient déjà se positionner en tant que « lead » :

- ✓ La nétamine M (**62**) pour son activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses KB (CI_{50} = 1,0 µg/mL).
- ✓ Les nétamines O (**64**), Q (**66**) et tout particulièrement K (**60**), actives contre le parasite *P. falciparum*, responsable du paludisme (CI_{50}= 4,66 ; 2,53 et 0,62 µg/mL respectivement).

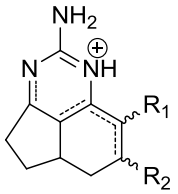
En revanche, même si ces quatre molécules permettent de justifier les activités des extraits bruts, il est fort probable que la forte activité des extraits bruts soit imputable soit à un effet de synergie, soit à la présence d'autres produits minoritaires non isolés dans cette étude.

Chapitre IV

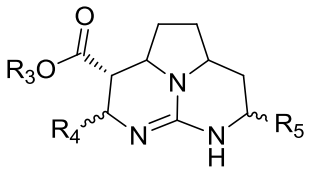
Synthèse biomimétique d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques

Introduction

D'une manière générale, les alcaloïdes guanidiniques polycycliques, ont intéressées et intéressent encore les chercheurs en raison de leur large spectre d'activités biologiques telles que les activités cytotoxiques, antifongiques, antivirales ou encore antiparasitaires. Ainsi les alcaloïdes guanidiniques tricycliques types ptilocaulines/mirabilines/nétamines (**32-68**) et batzelladines (**72-82**) ont fait l'objet d'une attention toute particulière autour des questions de leurs voies de biosynthèse d'une part, et, de leur synthèse biomimétique d'autre part.



Squelette des nétamines



Squelette des batzelladines

Les voies de synthèse proposées pour les alcaloïdes guanidiniques tricycliques sont, comme pour beaucoup d'autres substances naturelles, bien souvent inspirées des voies de biosynthèses hypothétiques. Cette branche de la synthèse chimique, qui consiste à mimer la nature en s'inspirant des hypothèses de biogenèse, est connue sous l'appellation « synthèse biomimétique ».

Dans ce chapitre IV, consacré à la synthèse suivant une approche biomimétique de ce type de composés, seront exposés dans un premier temps des éléments bibliographiques relatifs à la biogenèse et à la synthèse de ces alcaloïdes. Puis, seront décrites trois nouvelles stratégies de synthèses vers le noyau polycyclique et guanidinique de cette famille de molécules. Il est important de noter que l'objectif dans le cadre de cette thèse est d'explorer la réactivité de précurseurs proposés ou inspirés de la littérature. La réactivité supposée ou avérée de ces précurseurs est considérée significative pour la biosynthèse et la synthèse biomimétique.

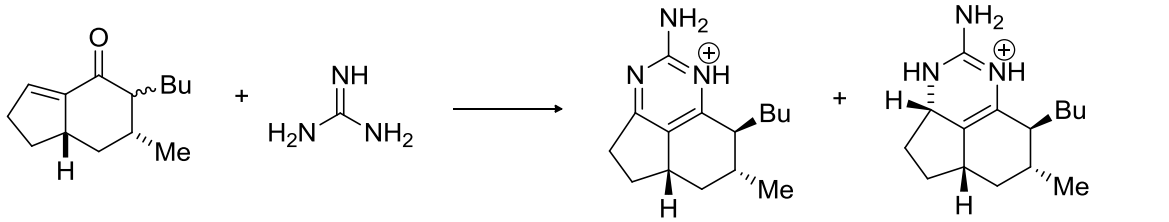
IV.1 Eléments bibliographiques

IV.1.1 Hypothèses de biogénèse

A ce jour, deux équipes de chercheurs se sont penchées sur les voies de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques types ptilocaulines/mirabilines/nétamines.

IV.1.1.1 Hypothèses de biogenèse proposées par Yu et collaborateurs.

Une proposition de voie de biosynthèse a été évoquée en 2008 par Yu et collaborateurs [42], inspirée des travaux de Snider et collaborateurs [43, 80]. Ces chercheurs se sont intéressés en premier lieu à la mirabiline B (**47**) et à la 7-épinéoptilocauline (**42**) biosynthétisées, selon une première hypothèse, par addition de la guanidine **117** sur l'indénone **116**. Cette hypothèse exploite la double addition de la simple guanidine sur l'énone de la partie terpénique. La synthèse de la mirabiline B (**47**) et de la 7-épinéoptilocauline (**42**) est réalisée par ces auteurs avec un rendement de 50 % sur la dernière étape.



116 **117** Mirabiline B (**47**) 7-Epinéoptilocauline (**42**)

Schéma 4 : Première hypothèse de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposée par Yu et collaborateurs [42].

Bien que cette idée ait abouti à la synthèse de la mirabiline, elle atteint ses limites en raison de l'existence d'autres métabolites de cette famille où l'arrangement de la partie terpénique est différent. Un précurseur flexible dont la réactivité aboutirait à un schéma multidirectionnel s'est avéré nécessaire. Yu et collaborateurs ont alors émis une seconde hypothèse afin de proposer une voie de biosynthèse universelle pour la ptilocauline (**39**), l'isoptilauline (**40**), la 7-épinéoptilocauline (**42**) et même les batzelladines (Schéma 6) [42]. L'addition conjuguée de la guanidine sur la bis-énone **118** - ouverte cette fois-ci - donnerait un énolate de guanidinium **119** qui, par une addition de Michael intramoléculaire, donnerait une cyclopentanedione **120**. Une suite de réactions (aldolisation, déshydratation, épimérisation) conduirait au squelette tricyclique guanidinique **123**. La réduction de **123** pour former la ptilocauline (**39**), l'isoptilocauline

(**40**), et la 7-épinéoptilocauline (**42**) constitue probablement l'étape clé de cette voie de biosynthèse. Par ailleurs, la tautomérie du proton pourrait convertir l'énolate de guanidinium (**119**) en cétone guanidinique (**121**). L'addition intramoléculaire de cette guanidine conjuguée pourrait former une pyrrolidine **122**. La formation de l'ion imminium suivie d'une réduction 1,2 donnerait alors la batzelladine K (**82**) (Schéma 5).

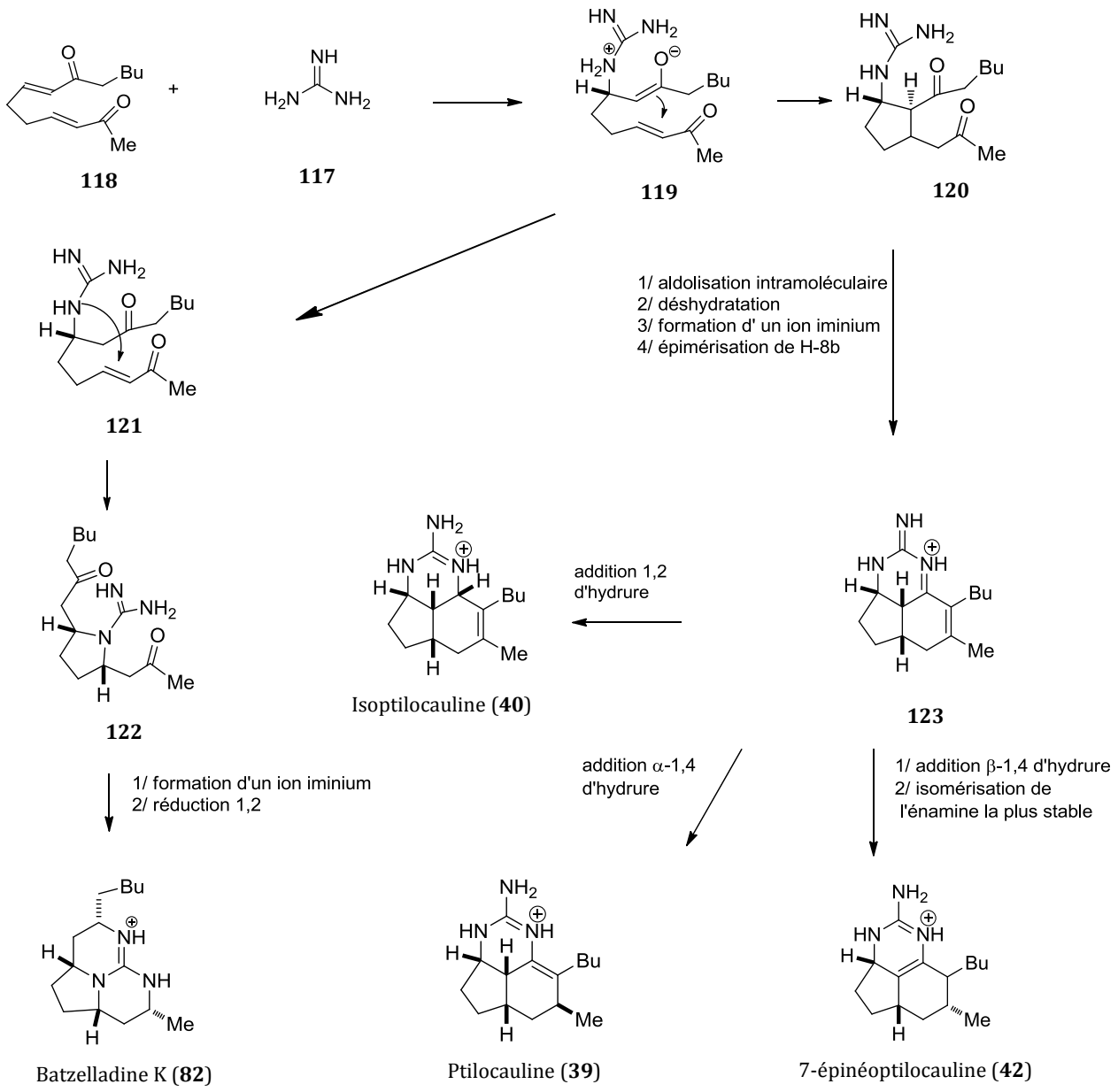
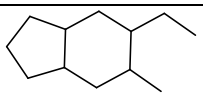
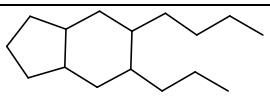
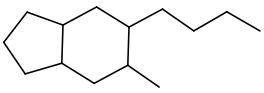
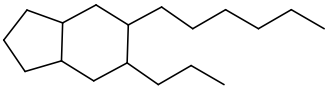
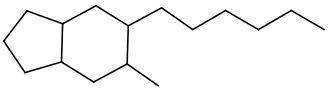
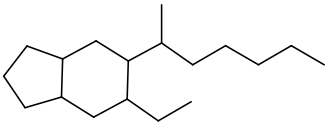
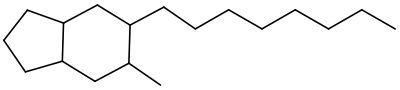


Schéma 5 : Deuxième voie de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposée par Yu et collaborateurs [42].

IV.1.1.2 Hypothèses de biogenèse proposées par El-Naggar et collaborateurs [40].

En 2010, El-Naggar et collaborateurs [40] se sont également penchés sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques ptilocaulines/mirabilines/ nétamines. Selon eux, le squelette (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène de ces alcaloïdes cycliques présenterait des caractéristiques structurales communément associées aux polycétides. Pour chacune de ces molécules tricycliques alors connues, les chercheurs ont proposé différents motifs polycétidiques pouvant être à l'origine de leur biosynthèse. Ces polycétides comprendraient d'une part des chaînes carbonées de longueur variable, avec parfois des ramifications et d'autre part, six, sept, huit ou neuf motifs acétate (Tableau XL).

Tableau XL : Motifs polycétidiques précurseurs des alcaloïdes guanidiniques tricycliques types ptilocaulines/mirabilines/nétamines.

Squelettes carbonés des motifs polycétidiques	Alcaloïdes guanidiniques associés
	• Nétamine F (**37**)
	• Nétamines G (**38**) et E (**36**)
	• Mirabiline B (**47**), E (**50**), F (**51**) • 8a-Hydroxymirabiline B (**44**) • 8b-Hydromirabiline B (**45**) • 7-Epinéoptilocauline (**42**) • 8a-Hydroxy-7-épinéoptilocauline (**43**) • Isoptilocauline (**40**), ptilocauline (**39**) • 8b-Hydroxyptilocauline (**41**)
	• Nétamines A (**32**) et D (**35**)
	• Mirabilines A (**46**), C (**48**), D (**49**), G (**52**), H (**53**), J (**55**) • Nétamine C (**34**)
	• Nétamine B (**33**)
	• Mirabiline I (**54**)

A partir de ces polycétides, la voie de biosynthèse menant aux alcaloïdes guanidiniques tricycliques doit comprendre des étapes clés de cyclisation et d'addition d'une guanidine afin de générer l'hétérocycle azoté. En s'appuyant sur les travaux de synthèse de Yu et collaborateurs, l'équipe d'El-Naggar émet l'hypothèse selon laquelle la configuration relative initiale de la cétone *α,β*-insaturée précurseur, ainsi que les migrations possibles de la double liaison de l'énamine hétérocyclique engendreraient une inter-conversion entre les squelettes $\Delta^{7,8}$, $\Delta^{8,8a}$ et $\Delta^{8a,8b}$ qui permettrait la formation des différentes stéréochimies observées chez les alcaloïdes guanidiniques tricycliques (Schéma 6). Enfin, des étapes d'oxydation ou de réduction permettraient d'aboutir aux noyaux pyrimidiniques ou à leur équivalent saturé respectivement.

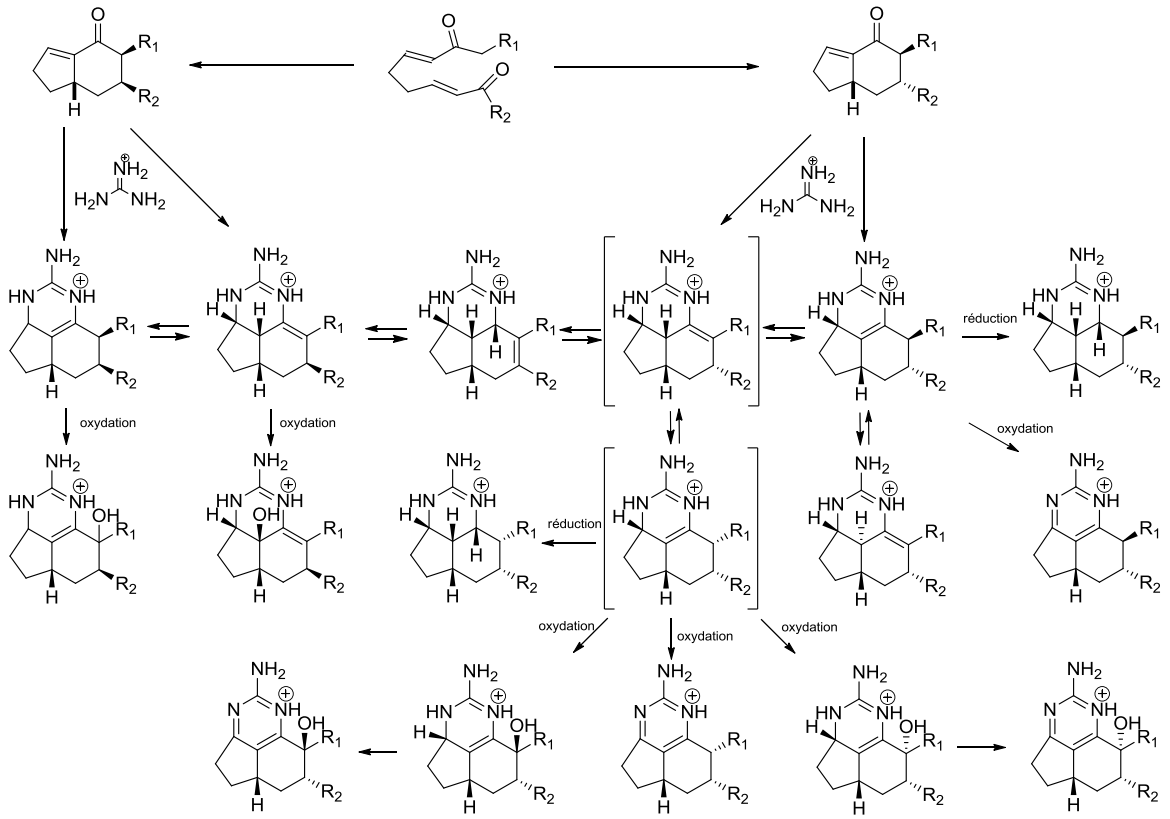


Schéma 6 : Voies de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposées par El-Naggar et collaborateurs [40].

IV.1.2. Synthèses des alcaloïdes guanidiniques tricycliques.

IV.1.2.1 Synthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques type ptilocaulines/ mirabilines/nétamines

❖ Synthèse de la ptilocauline (39)

La première synthèse d'alcaloïde guanidinique tricyclique fut celle de la ptilocauline, réalisée en 1983 par addition conjuguée d'une énone bicyclique (**127**). Cette énone bicyclique a d'abord été synthétisée par addition conjuguée du butylacétoacétate de *tert*-butyle (**124**) sur le crotonaldéhyde, suivie d'une aldolisation pour aboutir à la cyclohexanone (**125**). Enfin cette cyclohexanone, convertie en indénone **127** *via* le composé **126**, est mise en présence de guanidine (**117**), dans du benzène au reflux (Schéma 7) [43, 80]. Le traitement par l'acide nitrique a ensuite permis d'obtenir la ptilocauline (**39**).

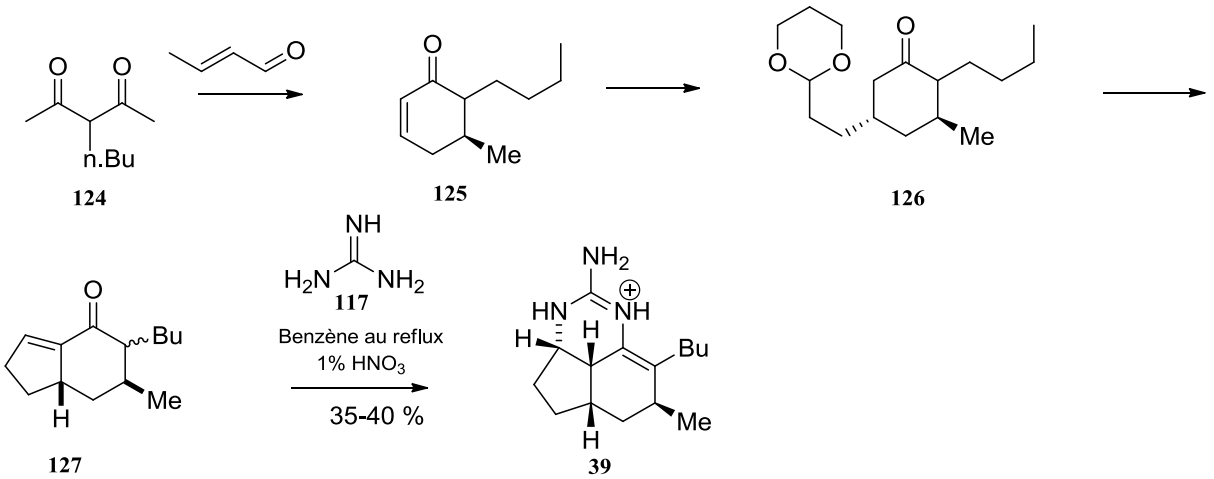


Schéma 7 : Voie de synthèse de la ptilocauline (**39**) selon Snider et collaborateurs [43, 80].

Peu de temps après, une seconde méthode de synthèse a été envisagée par Roush et collaborateurs [44, 81]. Cette synthèse débutait par la préparation d'une aminocétone (**128**) transformée dans un deuxième temps en alcaloïde guanidinique tricyclique par condensation avec du 1-guanyl-3,5-diméthylpyrazole (GDMP)(**129**) (Schéma 8).

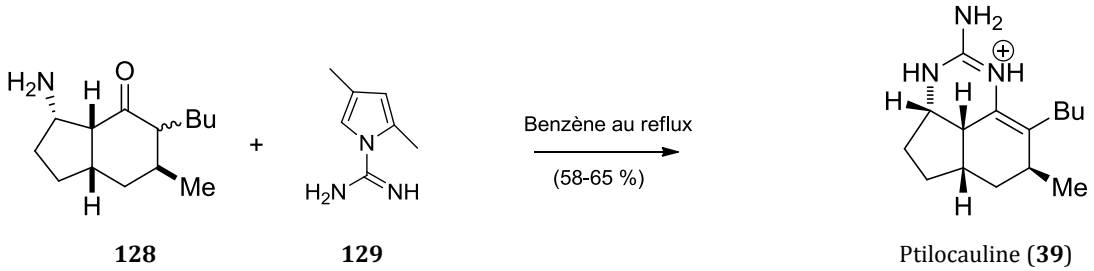


Schéma 8 : Voie de synthèse de la ptilocauline (**39**) proposée par Roush et collaborateurs [44, 81].

Depuis, plusieurs méthodes de synthèse de cette molécule ont été inspirées de celles décrites ci-dessus [82–86].

❖ Synthèse de la 7-épiptilocauline (130), de la 7-épinéoptilocauline (42) et de la mirabiline B (47)

En 1986, Hassner et collaborateurs [87] parviennent à synthétiser la 7-épiptilocauline (**130**) à partir d'un mélange de l'hexahydroindénone **116** et de la guanidine (**117**) dans les mêmes conditions que celles appliquées par Snider et collaborateurs [43] (Schéma 9).

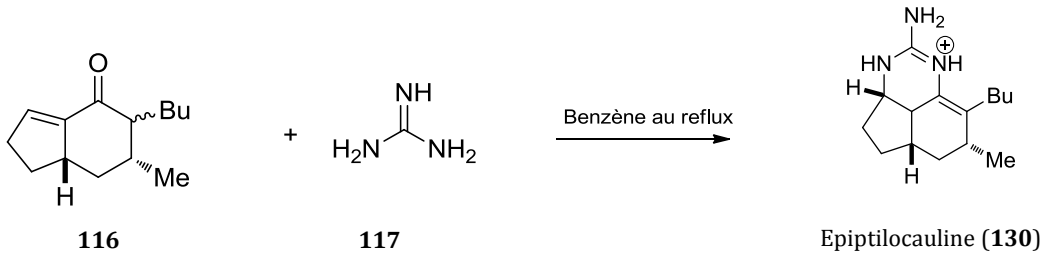


Schéma 9 : Voie de synthèse de la 7-épiptilocauline proposée par Hassner et collaborateurs [87].

Dans leur publication de 2008 [42], Yu et collaborateurs ont comparé les déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C obtenus dans le $CDCl_3$ pour la 7-épiptlocauline (**130**) synthétisée par Hassner [87], à ceux obtenus dans MeOD pour la 7-épinéoptilocauline isolée onze ans plus tard, d'une éponge du genre *Batzella* sp. par Patil [37]. Ces déplacements chimiques étaient relativement proches, suggérant que la position de la double liaison du produit de synthèse de Hassner n'avait pas été correctement attribuée. Dans le but de déterminer de manière univoque si la réaction avec la guanidine donnait la 7-épiptilocauline (**130**) ou la 7-épinéoptilocauline (**42**), Yu et collaborateurs ont réalisé la synthèse de l'hexahydroindénone **116** énantiopure (*trans/cis* : 4/1) en six étapes. Ils sont ensuite parvenus à synthétiser en présence d'acide nitrique (1 %) et de méthanol à 85 °C, dans un tube scellé, la 7-épinéoptilocauline (**42**) et la 3a,7-bisépiptilocauline (**131**) (Schéma 10). Des analyses RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **42** synthétisé, réalisé dans le MeOD d'une part, et le $CDCl_3$ d'autre part, ont permis de confirmer que l'épiptilocauline obtenue par Hassner et l'épinéoptilocauline isolée par Patil sont en fait un unique et même composé. En revanche, chauffées à 130-140 °C pendant 4 h, l'hexahydroindénone **116** et la guanidine (**117**) produisent la mirabiline B (**47**) et le tricycle saturé (**132**). La mirabiline B (**47**) peut également être produite par oxydation de la 7-épinéoptilocauline (**42**) en présence de MnO_2 (Schéma 10).

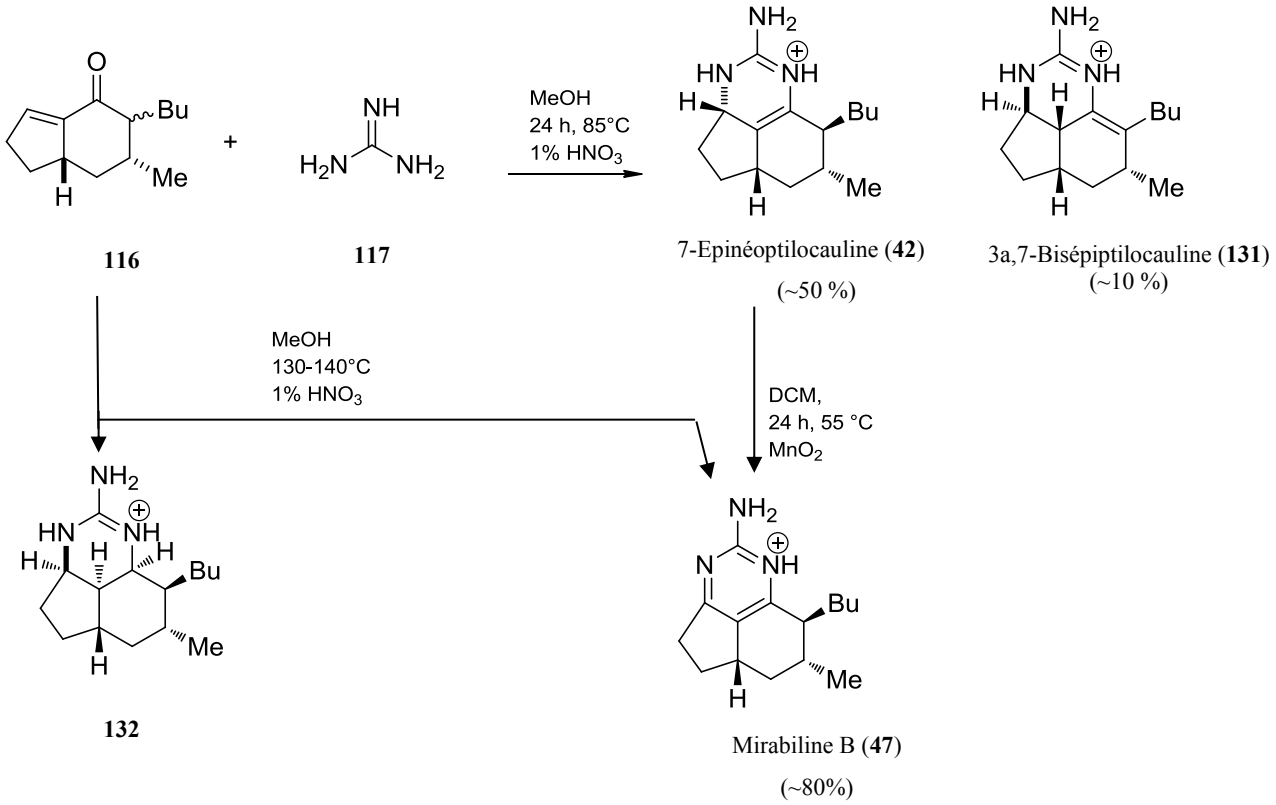


Schéma 10: Voie de synthèse de la 7-épinéoptilocauline (**42**) et de la mirabiline B (**47**) selon Yu et collaborateurs [42].

IV.1.2.2 Synthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques type batzelladines.

La synthèse totale des batzelladines est un challenge pour les chimistes organiciens en raison de leur grand nombre de stéréocentres. Plusieurs tentatives de synthèse du squelette guanidinique des batzelladines ont été réalisées, à travers différentes stratégies [88–92].

Dans la plupart des synthèses proposées, les premières étapes sont consacrées à la formation d'un type de précurseur diénone.

Selon la voie de synthèse proposé par Snider et collaborateurs [88, 93, 94] (Schéma 11), la diénone **135** est formée par condensation d'un aldéhyde **133** avec l'acétoacétate de méthyle suivant la condensation de Knoevenagel. La synthèse se poursuit par une addition de la *O*-méthylisourée, suivie d'un traitement par de l'acétate d'ammonium dans du méthanol saturé à l'ammoniac pour introduire l'azote manquant et aboutir à un tricycle azoté (**139** et **140**). Enfin, une réduction de ce tricycle avec du

cyanoborohydrure de sodium en présence de phosphate de sodium (tampon) fournit la portion tricyclique de la batzelladine (**141**).

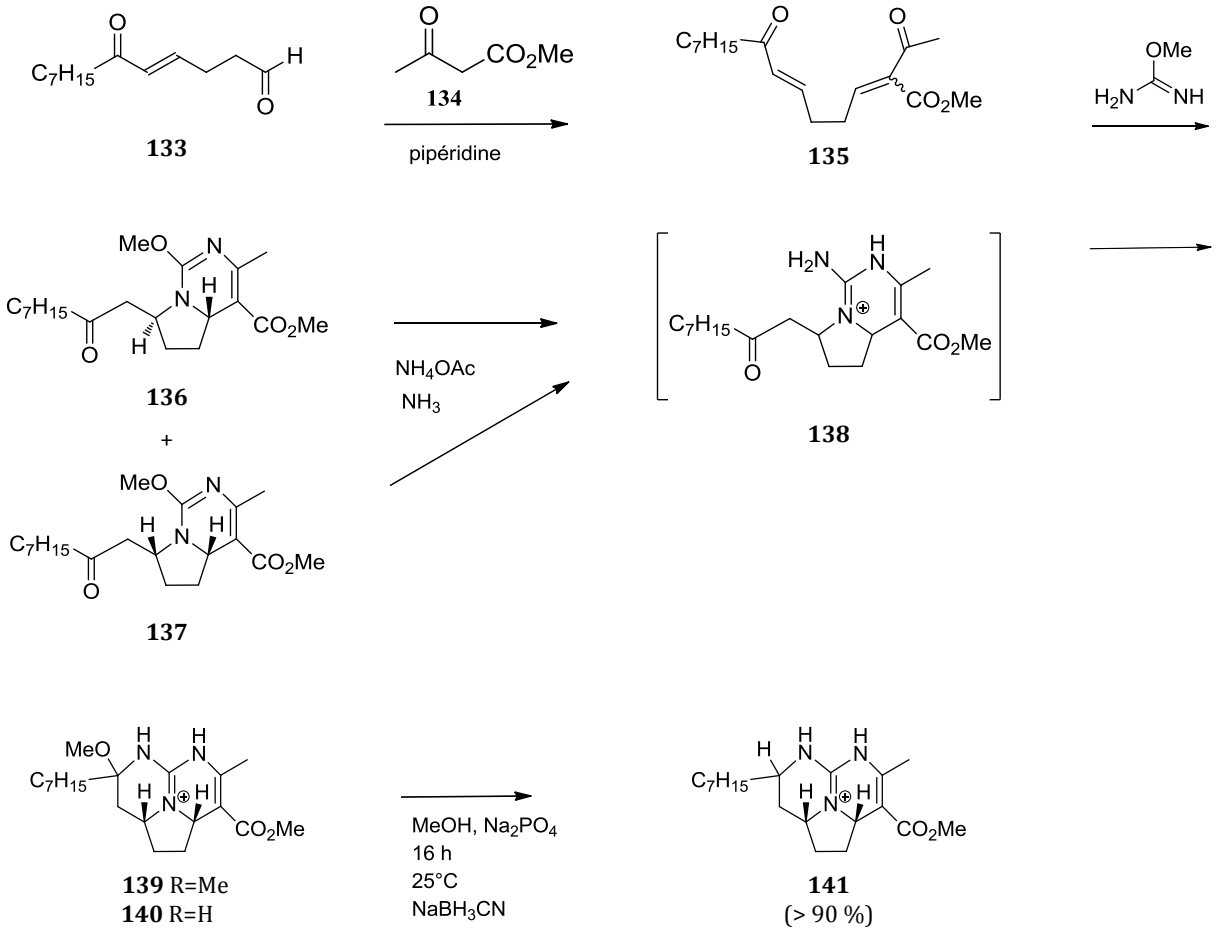


Schéma 11 : Voie de synthèse du motif batzelladine selon Snider et collaborateurs [93].

Selon une autre voie de synthèse proposée par Black et collaborateurs [89, 91, 92] (Schéma 12), la diénone **145** est produite par une réaction de Wittig en faisant réagir le phosphorane **142** avec du *n*-butyl lithium, suivie d'une réaction d'alkylation avec de l'iodooctane pour former le phosphorane **143**. Ce dernier réagit avec le succinaldéhyde (3 éq.) pour former l'aldéhyde **144**. La diénone **145** est enfin formée par réaction du produit **144** sur le phophorane **142** (1 éq.). Une fois la diénone obtenue, celle-ci est traitée avec de la guanidine (**117**) (1 éq.), dans le DMF, suivi d'une réduction par $NaBH_4$. Après acidification et traitement de la solution par une solution de $NaBF_4$ saturée, le squelette tricyclique de la Batzelladine (**146**) est obtenu. Cette voie de synthèse a d'ailleurs inspiré les travaux de Ahmed et collaborateurs qui ont synthétisé la batzelladine K suivant une procédure similaire [95].

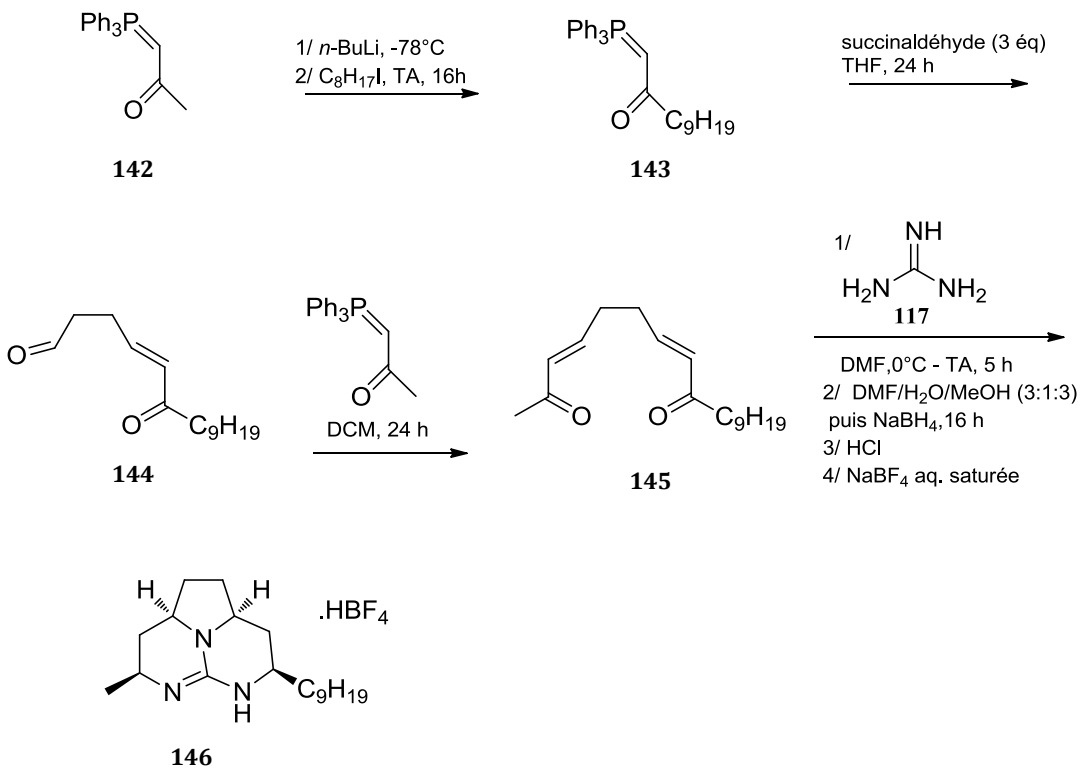


Schéma 12 : Voie de synthèse du motif batzelladine selon Black et collaborateurs [91].

Bien d'autres synthèses ont été décrites dans la littérature pour la formation du noyau guanidinique des batzelladines, cependant, étant éloignées des voies de synthèse envisagées dans le cadre de cette thèse, elles ne seront pas abordées ici [96–100].

IV.2 Vers de nouvelles stratégies de synthèse du noyau tricyclique des batzelladines.

IV.2.1 Introduction

Dans un but de simplification, l'obtention du noyau tricyclique guanidinique des batzelladines est ciblée dans cette partie. La synthèse adoptée utilise des réactions multicomposants de manière directe ou séquentielle. Les trois voies de synthèse envisagées ont été inspirées de la littérature pour à la fois aboutir au précurseur et au noyau polycyclique autour de la guanidine. Le schéma général est résumé ci-après (Schéma 13).

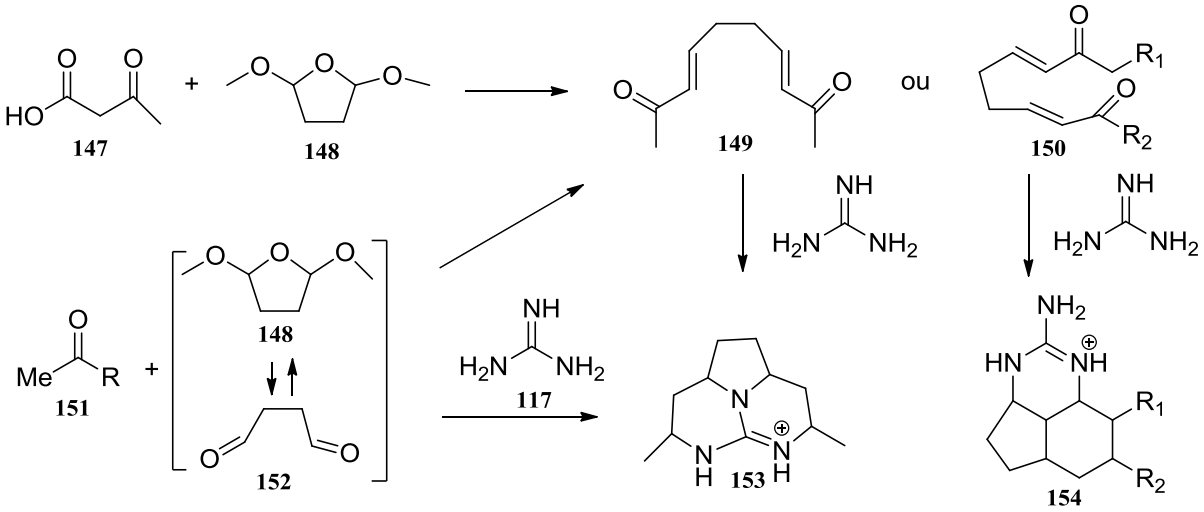


Schéma 13 : Schéma général des voies de synthèse envisagées menant au précurseur et au noyau polycylique.

Stratégiquement, une rétrosynthèse avec trois variantes impliquant des réactifs différents a été proposée :

- Tout d'abord, *via* l'addition de la guanidine sur une dicétone α,β-insaturée (ou cétone α,β-insaturée dimérique) :

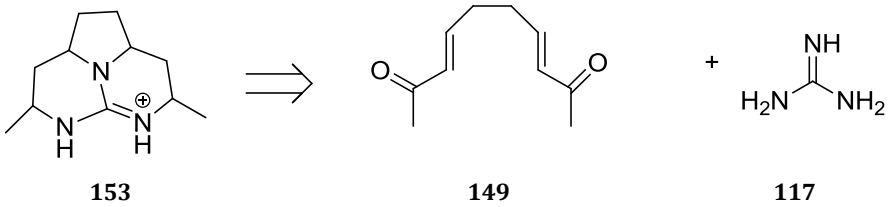


Schéma 14 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de guanidine sur une dicétone α,β-insaturée.

- Puis, *via* l'addition du cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine afin de générer la guanidine et déclencher la polycylisation intramoléculaire :

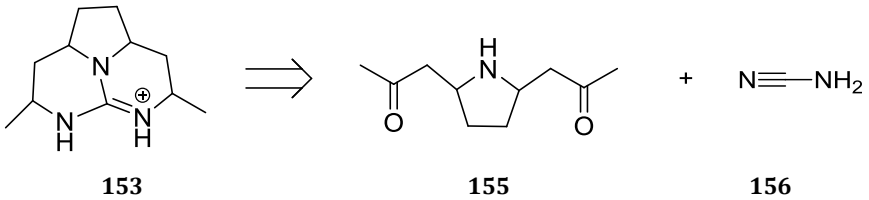


Schéma 15 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine.

- Enfin, *via* la déprotonation de la guanidine qui serait introduite sous forme d'aminopyrimidine connue :

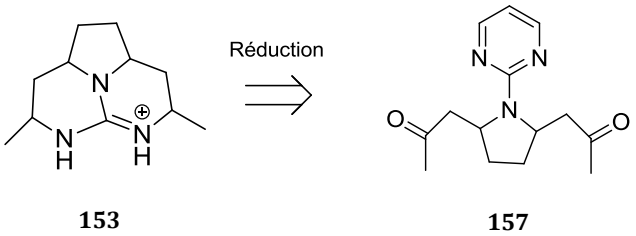


Schéma 16 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine.

IV.2.2 Préparation des réactifs

Dans le but de synthétiser la dicétone *α,β*-insaturée, deux réactifs sont nécessaires. L'acide acétoacétique et le succinaldéhyde.

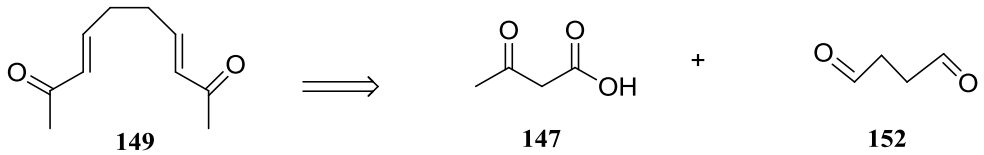


Schéma 17 : Schéma rétrosynthétique de la dicétone *α,β*-insaturée.

Les composés **147** et **152** ont été préparés à partir des produits commerciaux.

IV.2.2.1 L'acide acétoacétique ou acide 3-oxobutanoique

Deux méthodes de synthèse ont été testées.

- **A partir de l'ester méthylique de l'acide acétoacétique**

L'acide acétoacétique (**147**) a été produit par saponification selon la méthode de Bradley et collaborateurs, à partir de soude et d'acétoacétate de méthyle (**158**) [101] (Schéma 18). Le rendement obtenu, pour cette synthèse, n'était cependant pas très élevé, de l'ordre de 53 %.

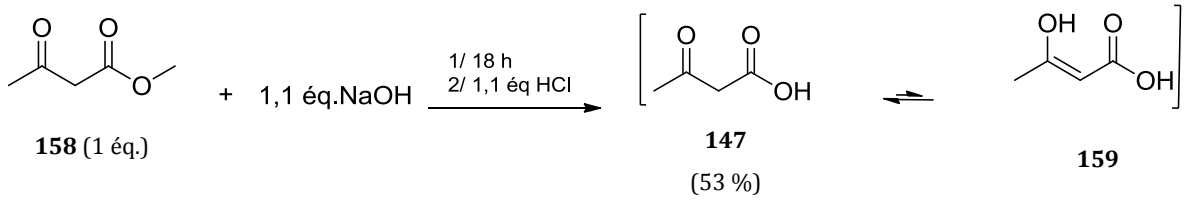


Schéma 18 : Accès à l'acide acétoacétique selon Bradley et collaborateurs [101].

❖ A partir de l'ester *tert*-butylique de l'acide acétoacétique

La seconde méthode adoptée a été celle d'Ohta et collaborateurs. Elle consistait à produire l'acide acétoacétique (**147**) en faisant réagir du TFA avec du *tert*-butylacétoacétate (**160**) pendant une nuit [102] (Schéma 19).

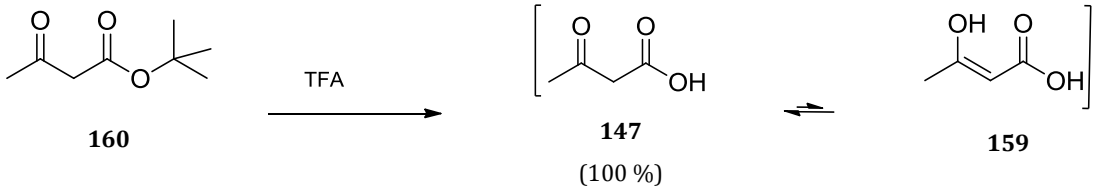


Schéma 19 : Accès à l'acide acétoacétique selon Ohta et collaborateurs **[102]**.

Le rendement de cette synthèse était alors bien meilleur et s'élevait à 98 %. Il faut souligner toutefois que l'acide acétoacétique est fortement hygroscopique et se dégrade très facilement pour former du CO_2 et de l'acétone (Schéma 20). Pour cette raison, il a été synthétisé chaque semaine, selon les besoins, et conservé sous argon à - 20°C quelques jours seulement.

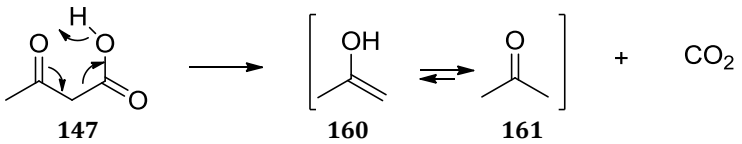


Schéma 20 : Dégradation de l'acide acétoacétique par décarboxylation.

IV. 2.2.2 Le succinaldéhyde

Dans la majorité des méthodes décrites, le 2,5-diméthoxytétrahydrofuranne (2,5-diméthoxyTHF) (**148**) a été utilisé directement en tant que précurseur. Il présentait le double avantage d'être, non seulement, disponible en grande quantité et à faible coût, mais aussi d'être plus stable que le succinaldéhyde (**152**). Ce dernier a néanmoins été

quelque fois synthétisé, afin de comparer les rendements de certaines réactions effectuées à l'origine avec le 2,5-diméthoxyTHF. Pour cela, le diméthoxyTHF (**148**) a été hydrolysé en présence de l'acide chlorhydrique [103] (Schéma 21). Le succinaldéhyde (**152**) a ensuite été purifié par distillation avec un rendement de 41 %, puis conservé à - 20 °C avant utilisation.

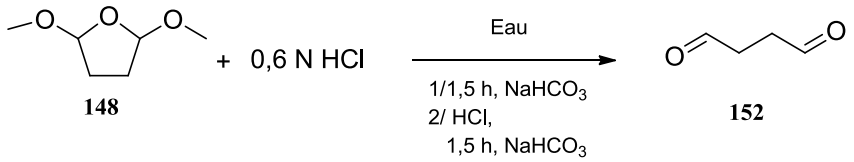


Schéma 21 : Accès au succinaldéhyde selon Mueller et collaborateurs [103].

IV.2.3 Stratégie n°1 : Addition de la guanidine sur une dicétone α,β-insaturée

IV.2.3.1 Préparation de la cétone α,β-insaturée dimérique.

La stratégie de synthèse envisagée passait nécessairement par l'étape préliminaire de la préparation d'une cétone α,β-insaturée dimérique. Bien que la synthèse de ce composé ait été déjà réalisée par une réaction de Wittig [89, 91], d'autres voies de synthèse ont été imaginées afin de permettre l'addition de la guanidine directement dans le milieu réactionnel, sans passer par une étape de purification. L'objectif étant en effet de mettre en place une synthèse multicomposants conduisant au motif tricyclique des batzelladines.

- **Première méthode**

Il a été envisagé en premier lieu l'addition nucléophile de deux équivalents d'acide acétoacétique (**147**) avec un équivalent de 2,5-diméthoxyTHF (**148**) (Schémas 22 et 23). Cette méthode n'avait encore jamais été proposée dans la littérature.

La mise en réaction de **148** et **147** dans l'eau en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) a abouti à un mélange réactionnel complexe. Le produit désiré **149** a été isolé avec un rendement extrêmement faible de 1,2 %.

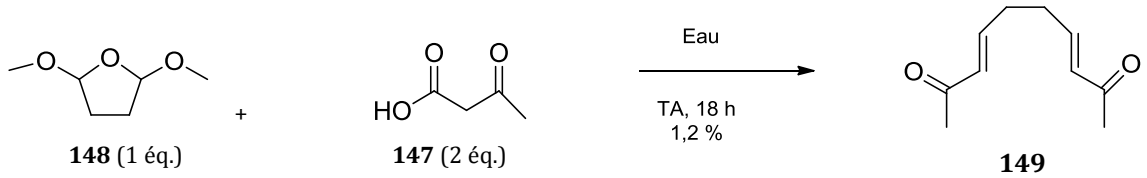


Schéma 22 : Voie de synthèse d'une cétone α,β-insaturée dimérique : première méthode.

Le mécanisme de la réaction montre en effet que plusieurs issues sont possibles et que la réactivité très riche des deux espèces mises à réagir peut aboutir à un mélange inexploitable.

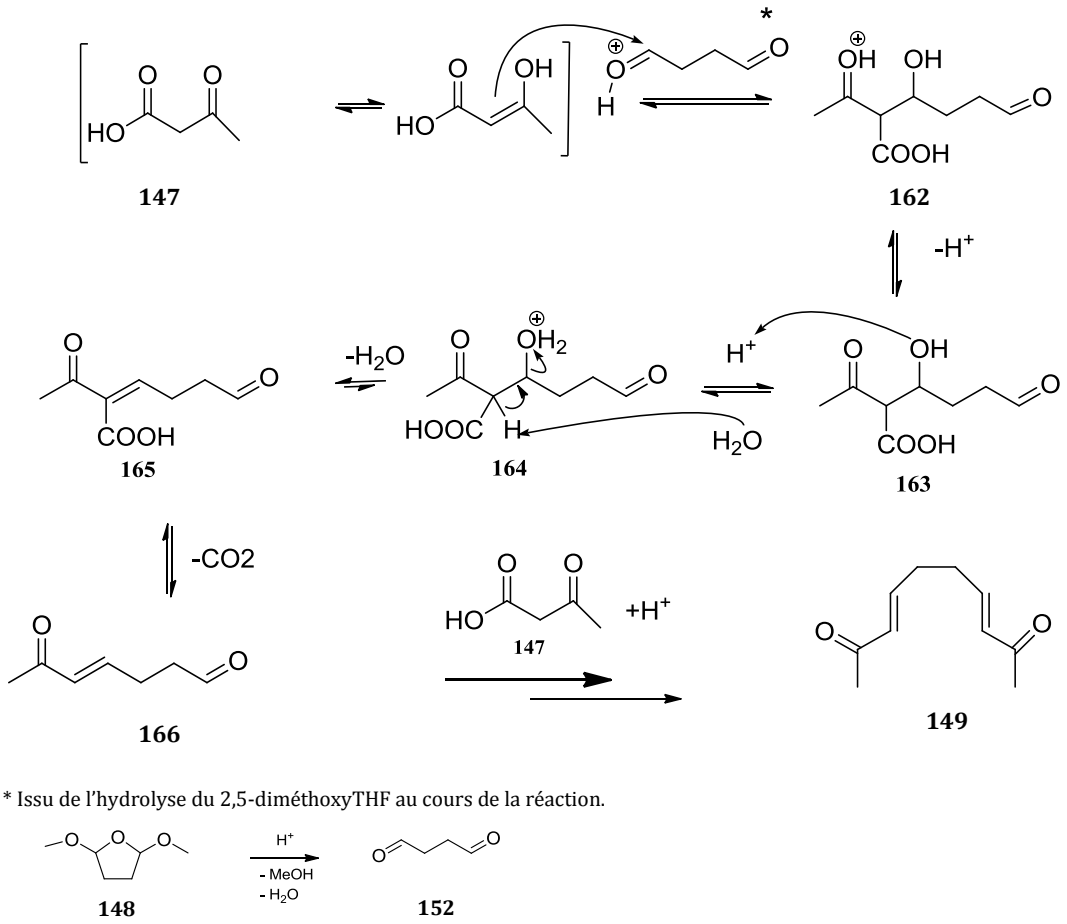


Schéma 23: Mécanisme proposé pour l'obtention d'une cétone α,β-insaturée dimérique par addition de l'acide acétoacétique sur le 2,5-diméthoxyTHF .

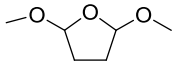
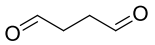
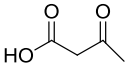
Plusieurs paramètres de la réaction ont été changés afin d'améliorer le rendement :

- En prélevant l'acide acétoacétique instable, directement du milieu réactionnel sans passer par l'étape de purification et de conservation.
- En changeant de solvants : l'eau a été remplacée par le MeOH, le DCM, ou le DMF.

- En utilisant différentes bases comme catalyseurs : guanidine, pyridine, pipéridine, triéthylamine.
- En utilisant HCl pour activer la formation du succinaldéhyde.
- En faisant varier la température.

Cependant, aucune de ces tentatives n'a permis d'aboutir aux résultats escomptés. L'ensemble des essais réalisés sont présentés dans le Tableau XLI.

Tableau XLI : Différentes conditions opératoires appliquées en vue d'améliorer le rendement de la synthèse de la cétone α,β-insaturée dimérique.

Réactifs			Solvant	Catalyseur	Durée/T°	Rdt
 **148**	 **152**	 **147**				
1,25 éq	-	1 éq	Eau	Guanidine	TA/16 h	-
1,25 éq	-	1 éq	Eau	Chlorhydrate de guanidine	TA/16 h	-
-	1 éq	2 éq	Eau	-	TA/16 h	-
1 éq	-	2 éq	Eau	-	TA/16 h	-
1 éq	-	2 éq	MeOH	-	TA/16 h	-
-	1 éq	2 éq	DCM	Pipéridine	50°C/16 h	-
-	1 éq	2 éq	DMF anhydre	Guanidine/ Pipéridine	TA/16 h	6 %
1 éq	-	3,8 éq	Eau	-	TA/16 h	1,2 %
1,5 éq	-	1 éq	Eau	-	TA/16 h	-
-	3 éq	1 éq	Eau	-	TA/16 h TA/16 h	-
-	1 éq	3 éq	Eau	Pipéridine	TA/16 h	-
-	1 éq	3 éq	DMF anhydre	Chlorhydrate de guanidine	TA/16 h	-
-	1 éq	2 éq	DCM	Pipéridine	0°C/16 h	-

Le meilleur rendement (6 %) a été obtenu pour les conditions suivantes : 2 équivalents d'acide acétoacétique, 1 équivalent de succinaldéhyde, 0,8 équivalent de guanidine et 0,1 équivalent de pipéridine dans du DMF. Dans certains cas, il est arrivé que le produit final soit celui de la monoaddition (**166**).

❖ Deuxième méthode

Devant les faibles rendements obtenus par la méthode précédente, une seconde voie de synthèse a alors été envisagée. Il s'agissait d'élaborer la diénone **149** par réaction entre l'acétone (**161**) et le 2,5-diméthoxyTHF (**148**) (ou le succinaldéhyde **152**) dans l'eau (Schéma 24). D'autres solvants ont été utilisés, tels que l'acétone, le DCM ou encore

le MeOH. Des essais ont également été réalisés en chauffant le milieu réactionnel à 45°C, en acidifiant le milieu ou encore en introduisant un catalyseur (pipéridine).

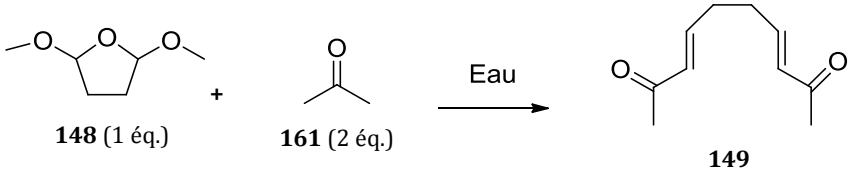


Schéma 24 : Voie de synthèse d'une cétone α,β-insaturée dimérique : deuxième méthode

Cette méthode n'a cependant pas abouti au résultat escompté. La faible réactivité observée résulte probablement de la faible acidité des hydrogènes en α de la fonction carbonyle de l'acétone (pKa = 20).

IV.2.3.2 Addition de la guanidine sur la dicétone α,β-insaturée

A partir de la cétone α,β-insaturée dimérique préparée, l'obtention du squelette tricyclique des batzelladines a alors été envisagé par réaction avec la guanidine (Schéma 25).

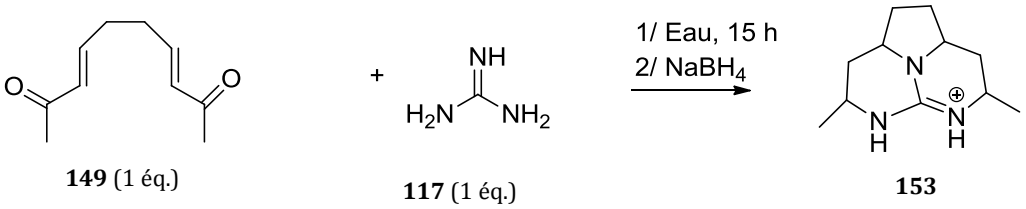
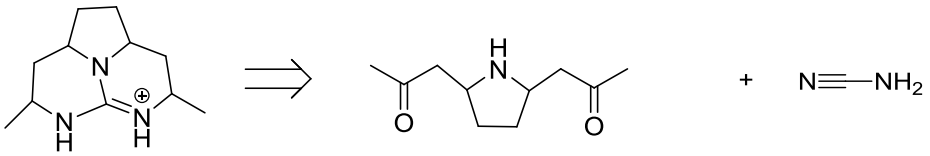


Schéma 25 : Tentative de formation du squelette tricyclique des batzelladines par addition de la guanidine sur une cétone α,β-insaturée dimérique.

Aucune des conditions opératoires appliquées n'a, jusqu'à ce jour, pu mener à l'obtention du noyau tricyclique des batzelladines. La difficulté de préparation du produit clé **149** a été le facteur limitant pour ces études de réactivité.

IV.2.4 Stratégie n°2 : Addition du cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine

La stratégie de synthèse n°2 est basée a été inspirée des travaux de Snider et collaborateurs [93] qui ont montré que l'addition d'un dérivé de la guanidine telle que la *O*-méthylisourée permettait la formation d'une énamine (Schéma 11 p. 139). Il a été dès lors imaginé de réaliser l'addition du cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine afin de former le squelette tricyclique des batzelladines (Schéma 26).



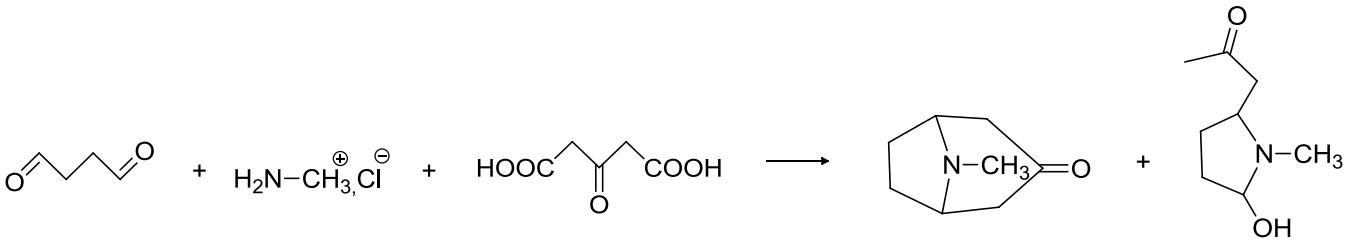
153 **155** **156**

Schéma 26 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine.

Cette méthode nécessitait au préalable la préparation d'un dérivé de la pyrrolidine.

IV.2.4.1 Préparation d'un dérivé de la pyrrolidine

Cette approche a été inspirée des travaux Stoll et collaborateurs en 1954 [104] et de ceux de Schöpf et Lehmann en 1985 [105]. Ces derniers sont parvenus à synthétiser des dérivés pyrrolidiniques par une voie similaire à celle de la tropinone décrite par Robinson en 1917 [106]. Après attaque nucléophile d'une amine primaire sur l'un des deux carbonyles du succinaldéhyde (**152**) (ou du 2,5-diméthoxyTHF (**148**)) puis sur le second carbonyle, l'énol de l'acide 1,3-acétonedicarboxylique (**168**) est condensé avec l'imine formée, selon la réaction de Mannich. Une seconde réaction de Mannich vient ensuite fermer le second cycle. Enfin, une dernière étape de décarboxylation donne la tropinone (**169**) et ses dérivés tel que le composé (**170**) (Schéma 27).



152 **167** **168** **169** **170**

Schéma 27 : Voie de synthèse de la tropinone et de ses dérivés selon Schöpf et collaborateurs [105].

Dans le but de former en une seule étape la pyrrolidine **155**, il a été, tout d'abord, envisagé de faire réagir un équivalent de 2,5-diméthoxyTHF (**148**), deux équivalents d'acide acétoacétique (**147**) et un équivalent de chlorhydrate d'ammonium (Schéma 28).

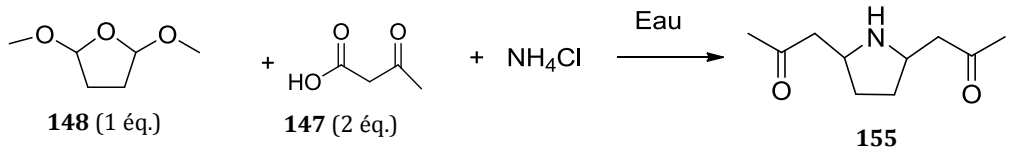


Schéma 28 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique **155**.

Dans le cas où la source d'azote est un ammonium, il n'a pas été possible d'obtenir le produit **155**, même en substituant le chlorhydrate d'ammonium par de l'acétate d'ammonium. Toutefois, ce résultat était quelque peu prévisible car la classe de l'amine joue, *a priori,* un rôle déterminant dans cette réaction. La synthèse de la tropinone nécessite, en effet, une amine primaire et l'emploi d'un sel d'ammonium ne semble pas être adéquat.

Cette voie de synthèse a donc été modifiée en utilisant une source d'azote sous forme protégée comme la benzylamine.

- ✓ **Etape n°1 : Formation du noyau pyrrolidinique**

Cette première étape consistait à faire réagir du 2,5-diméthoxyTHF (**148**), de l'acide acétoacétique (**147**) et de la benzylamine (**171**) afin d'aboutir à la formation du composé **172** (Schéma 28).

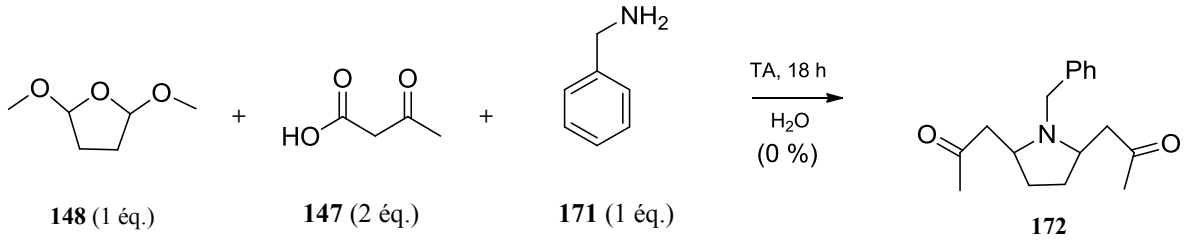


Schéma 29 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique **172**.

L'utilisation des conditions opératoires énoncées précédemment n'ont pas permis d'aboutir au composé **172** désiré. Plusieurs autres essais reportés dans le Tableau XLII ont donc été tentés. Le meilleur rendement (37 %) a alors été obtenu en utilisant un équivalent de 2,5-diméthoxyTHF, deux équivalents d'acide acétoacétique, 0,5 équivalent de benzylamine et 0,5 équivalent de chlorhydrate de benzylamine, la réaction se produisant à température ambiante pendant 16 heures dans de l'eau.

Tableau XLII : Conditions opératoires appliquées pour l'amélioration du rendement du dérivé pyrrolidinique **172.**

148	**152**	**147**	**171**	**173**	**172** Rdt (%)
-	1éq	2 éq	-	1 éq	5
1éq	-	2,8 éq	-	1 éq	22
1 éq	-	2 éq	-	1 éq	23
1 éq	-	3 éq	0,5 éq	0,5 éq	29
1 éq	-	3 éq	-	1 éq	30
1 éq	-	2 éq	0,5 éq	0,5 éq	37

L'obtention de la pyrrolidine **172** avec un rendement de 37 % permet d'envisager la déprotection.

✓ **Etape n°2 : Hydrogénolyse**

L'hydrogénolyse du composé **172** a été envisagée dans un premier temps en présence de Pd/C et d'un donneur d'hydrogène, l'acide formique, pour obtenir l'amine secondaire **155** (Schéma 30). Trois températures ont été testées : 20 °C, 40 °C et 100 °C. Les rendements obtenus s'élevaient respectivement à 4, 7 et 41 %. La température semble donc jouer un rôle dans l'avancement de la réaction.

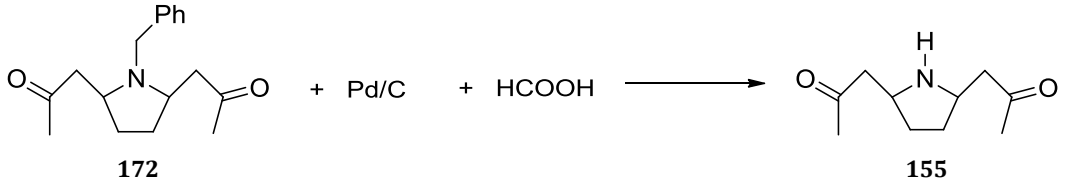


Schéma 30 : Hydrogénolyse du dérivé pyrrolidinique du produit **155.**

IV.2.4.2 Addition du cyanamide sur le dérivé de la pyrrolidine (155) en un pot à partir de 172.

L'hydrogénolyse du composé **172** ayant abouti à la formation du composé **155** désiré, il a dès lors été imaginé de modifier les conditions opératoires en ajoutant au milieu réactionnel du cyanamide afin d'aboutir directement au composé **174**. La réaction d'hydrogénolyse du composé **172** a donc été envisagée en présence de Pd/C en tant que

catalyseur, d'acide formique comme donneur d'hydrogène et de cyanamide pour aboutir directement à la formation de la guanidine **174** (Schéma 31).

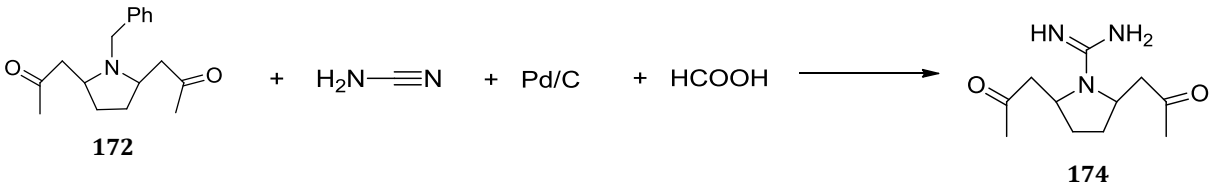


Schéma 31 : Voie de synthèse du composé **174.**

Le spectre RMN du proton ^{1}H et l'analyse HMRS du brut réactionnel obtenu n'ont pas permis de conclure à la présence du produit attendu.

IV.2.5 Stratégie n°3 : Utilisation de la 2-aminopyrimidine comme source de guanidine.

IV.2.5.1 Préparation du noyau pyrrolidinique

Comme pour la stratégie n°2, cette dernière voie de synthèse a été inspirée des publications de Stoll et collaborateurs [104] et de Schöpf et collaborateurs [105]. Dans ces publications, les auteurs ont réalisé une réaction multicomposants, menant aux dérivés de la tropinone par condensation d'une cétone, d'un dialdéhyde et d'une amine primaire (Schéma 27).

Afin d'obtenir un motif pyrrolidinique, il a alors été envisagé de faire réagir un équivalent de 2,5-diméthoxyTHF (**148**), deux équivalents d'acide acétoacétique (**147**) et deux équivalents de 2-aminopyrimidine (**175**) pendant une nuit à température ambiante (Schéma 32). Le mécanisme de cette synthèse est détaillé dans le Schéma 33. Le composé **157** a alors été obtenu avec un rendement de 30 %.

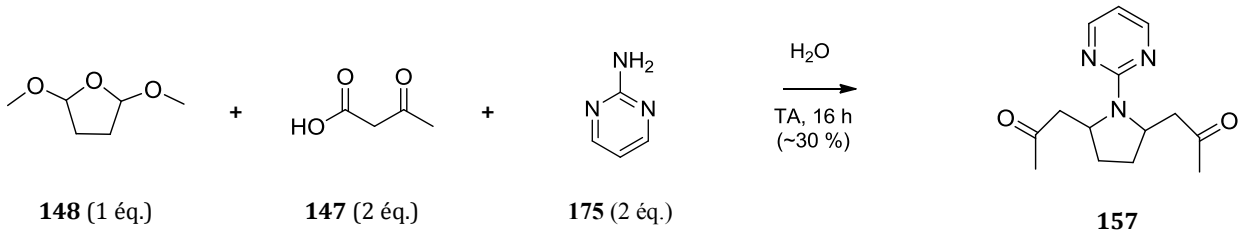


Schéma 32 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique **157**.

Afin d'améliorer ce rendement, les conditions opératoires ont été revues. Il est alors apparu, qu'en remplaçant le 2,5-diméthoxyTHF par le succinaldéhyde, un meilleur rendement était obtenu (48 %). En revanche, l'ajout d'acétate de sodium dans le milieu réactionnel n'a aucun intérêt puisque le produit **157** est dans ce cas synthétisé à 12 %. Le rôle de tampon de l'acétate de sodium était destiné à empêcher la protonation de l'amine et donc d'améliorer sa réactivité.

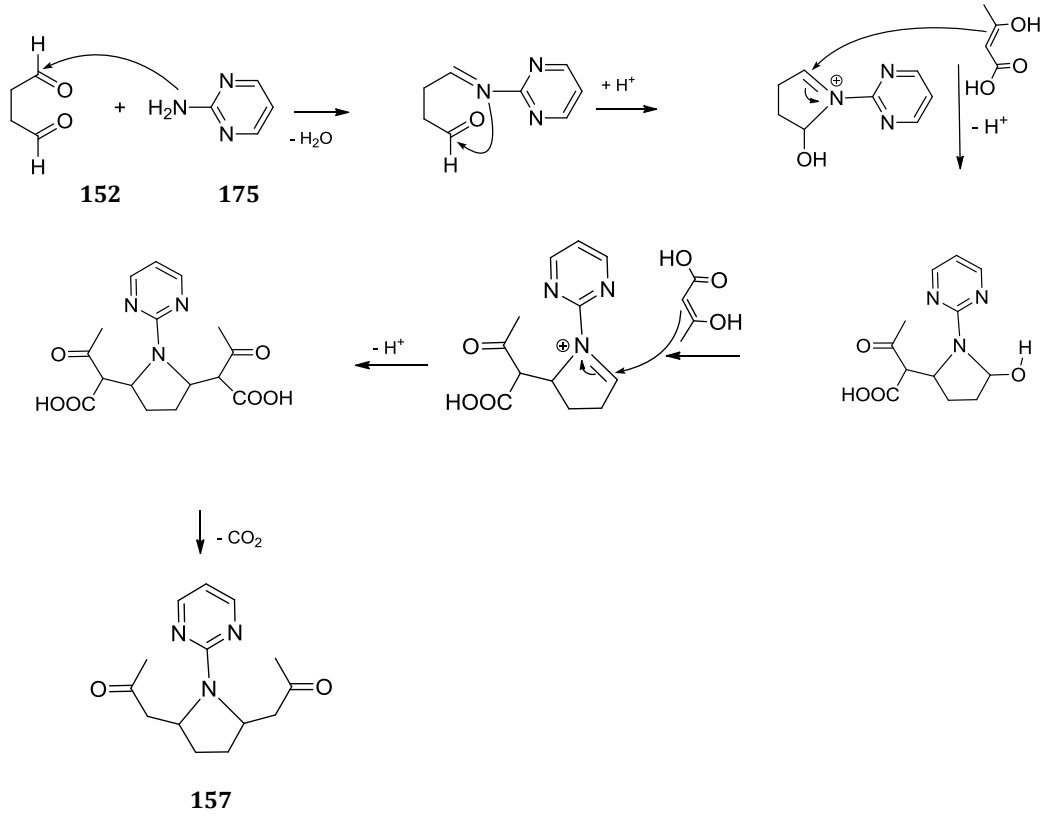


Schéma 33 : Mécanisme proposé pour la synthèse du composé **157.**

IV.2.5.2 Libération de guanidine de l'aminopyrimidine

La coupure de la pyrimidine pour libérer la guanidine libre peut se faire par l'action de l'hydroxylamine ou de l'hydrazine à reflux de l'éthanol comme décrit par Fajgelli et collaborateurs [107].

- **Première méthode**

Le composé **157** et l'hydrazine ont été mélangés pour réagir en espérant d'une part, ouvrir l'aminopyrimidine, et d'autre part, former des hydrazones à partir des deux

fonctions cétones et ainsi abouti au composé **176** [108]. Ce dernier conduirait après réduction, au composé **177,** qui après cyclisation intramoléculaire permettrait d'aboutir à la formation du composé **153** (Schéma 34).

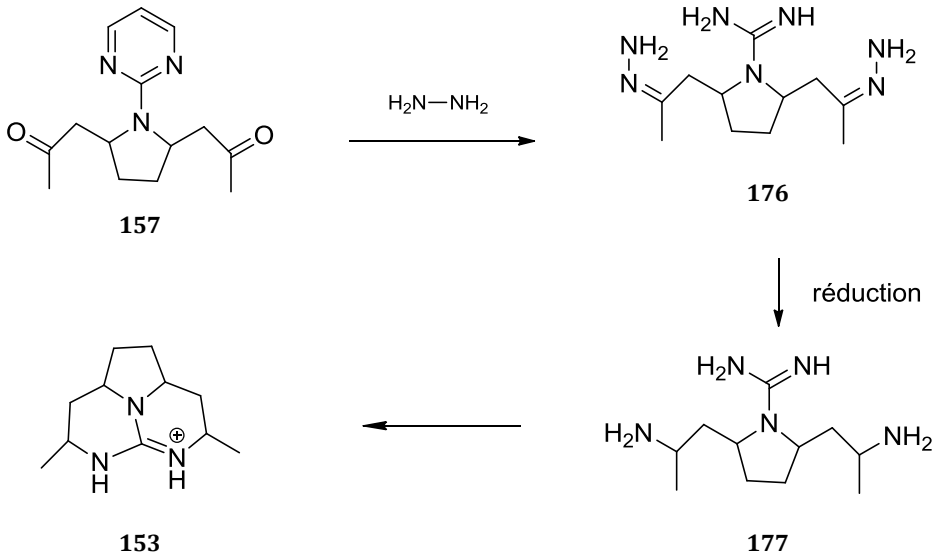


Schéma 34: Formation du noyau tricyclique des batzelladines par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine : première méthode.

Le composé **157** a été mis en présence d'hydrate et de chlorhydrate d'hydrazine en excès à 120 °C. Aucune trace du composé **177** désiré n'a été détectée. Un seul produit masse moléculaire *m/z* 195,1608, avec un rendement de 6 % a pu être isolé mais sa structure n'a pas été déterminée.

- **Deuxième méthode**

La deuxième voie de synthèse testée, consistait dans un premier temps à réduire les deux fonctions cétones de la pyrrolidine **157** à l'aide du cyanoborohydrure de sodium dans l'eau, à température ambiante, pour aboutir à la formation du composé **178** [109]. Puis dans un deuxième temps, réaliser la déprotection et la cyclisation du composé **178** en une seule étape à l'aide de l'hydrazine (Schéma 35). Le mélange obtenu au cours de la première étape, s'est avéré complexe et aucun produit raisonnablement pur n'a pu être isolé.

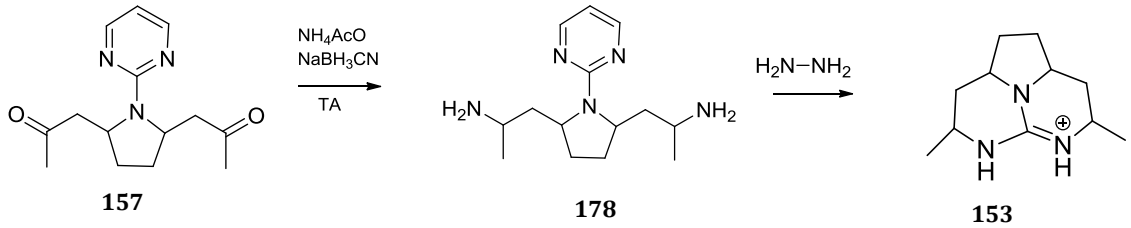


Schéma 35 : Formation du noyau tricyclique des batzelladines par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine : deuxième méthode.

IV.3 Conclusion

Les alcaloïdes guanidiniques tricycliques intéressent fortement les chercheurs. Depuis une vingtaine d'années, plusieurs voies de synthèses ont déjà été réalisées. Le challenge dans le travail présenté dans cette thèse consistait à synthétiser le motif des batzelladines, en se rapprochant des voies de biosynthèse existantes dans la nature, en un minimum d'étapes.

Trois voies de synthèse ont été envisagées dans ce chapitre, elles ont permis d'aboutir à :

- une dicétone α,β-insaturée (**149**), sur laquelle doit s'additionner une guanidine. Il existe dans la littérature, un procédé pour cette addition, toutefois l'objectif visé est de parvenir à synthétiser le motif batzelladine en un pot.

- un dérivé de la pyrrolidine (**155**), qui pourrait aboutir à la formation du motif batzelladine par addition du cyanamide, dans des conditions qu'il reste à déterminer.

- un dérivé de la pyrrolidine (**157**) porteur d'une guanidine protégée, sous la forme d'aminopyrimidine. Les conditions de déprotection de la guanidine devront être étudiées et testées.

Ces trois composés ont été synthétisés par des voies de synthèse inspirées de la littérature. Des travaux doivent encore être réalisés afin d'améliorer leur rendement d'une part, et de parvenir au produit attendu d'autre part, à l'aide d'une réaction multicomposants.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les travaux de thèse reportés dans ce mémoire sont le fruit d'une collaboration étroite entre spécialistes de différentes disciplines scientifiques : la chimie, la systématique et la biologie cellulaire. Plusieurs spécialités de la chimie ont par ailleurs été impliquées : la chimie analytique, la chimie de synthèse et la chimie théorique.

Le principal objectif de cette thèse, au caractère interdisciplinaire, concernait l'étude de l'éponge *Biemna laboutei* de Madagascar (zone Sud-Ouest de l'Océan Indien), connue pour sa toxicité et provoquant notamment des dermatites. Les travaux entrepris comprenaient en premier lieu, l'étude chimique de cette éponge incluant l'extraction, l'isolement et l'identification d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques. Puis, la valorisation des molécules isolées a été envisagée *via* l'évaluation de leur activité biologique (cytotoxicité, activité antipaludique, …) d'une part, et la réalisation d'une étude chimiotaxonomique d'autre part. Enfin, au cours de ces travaux de thèse, ont été explorées trois nouvelles stratégies de synthèse vers le squelette des alcaloïdes guanidiniques tricycliques, suivant une approche biomimétique.

L'étude chimique de l'éponge *Biemna laboutei* a tout d'abord conduit à l'isolement de dix-huit composés appartenant à la famille des alcaloïdes guanidiniques tricycliques de type ptilocauline/mirabiline/nétamine :

- ✓ six composés à noyau pyrimidinique dont trois nouveaux,
- ✓ cinq composés avec une insaturation en $\Delta^{8,8a}$ dont quatre nouveaux,
- ✓ sept composés avec une insaturation en $\Delta^{8a,8b}$ dont cinq nouveaux.

Un total de douze nouveaux composés a donc été identifié sur les dix-huit isolés. Plusieurs méthodes chromatographiques (CLMP, CLHP…) et spectroscopiques (UV-visible, HRMS, RMN 1D et 2D…) ont été nécessaires à la réalisation de cette première partie.

Il faut, cependant, souligner que la séparation de ces dix-huit alcaloïdes a été particulièrement délicate lors des purifications par CLHP en raison de leurs masses moléculaires très proches voire identiques, de leur polarité voisine et donc de leurs temps de rétention très proches.

Par ailleurs, afin de conforter le travail d'élucidation structurale menée par RMN,

les calculs de modélisation moléculaire ont été appliqués à deux des composés isolés, les nétamines I (**58**) et J (**59**). Pour cela, les configurations absolues ont été déterminées par la comparaison des géométries et des spectres théoriques et expérimentaux (UV et de DCE) en prenant en compte l'effet du solvant (méthode SMD) dans le cadre d'une méthode de fonctionnelle de la densité récente (ωB97XD). La comparaison des spectres UV calculé et expérimental a conduit à proposer un décalage du spectre UV théorique pour une meilleure concordance avec l'expérience afin de supprimer l'erreur produite par ωB97XD dans ses énergies de transitions électroniques. Ces calculs ont ainsi permis d'attribuer respectivement la configuration 5a*S*, 7*R*, 8*R* à la nétamine I et 5a*S*, 7*R*, 8*S* à la nétamine J.

La valorisation écologique et biologique des métabolites isolés de l'éponge *Biemna laboutei* a ensuite été envisagée sous deux volets :

D'une part, par le biais d'une étude chimiotaxonomique. Ces travaux ont en effet montré que les alcaloïdes polycycliques (bi-, tri- et pentacyclique) de type guanidinique seraient issus d'un métabolisme propre à un nombre limité de genres : *Arenochalina, Batzella, Biemna, Crambe, Clathria, Hemymicale* et *Monanchora,* appartenant tous à l'ordre des Poecilosclerida. Cependant, il n'a pas été possible d'affirmer que les alcaloïdes guanidiniques polycycliques soient des marqueurs chimiotaxonomiques de l'ordre des Poecilosclerida car cet ordre avec plus de 25 familles reconnues, est l'un des plus étendus chez les Demosponges. Il semble, en outre, difficile de se limiter à l'échelle de la famille car les sept genres répertoriés appartiennent à six familles différentes. Il existe donc quasiment autant de genres que de familles concernées par la présence de ces alcaloïdes. Des investigations complémentaires plus approfondies sont donc nécessaires pour conclure de façon plus pertinente.

D'autre part, par l'évaluation du potentiel bioactif qui a mis en évidence les activités cytotoxique et antiplasmodiale de quatre des molécules isolées:

- ✓ la nétamine M (**62**) pour son activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses KB avec une CI_{50} de 1,0 µg/mL.
- ✓ les nétamines O (**64**), Q (**66**) et tout particulièrement K (**60**), actives contre le parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme avec respectivement une CI_{50} de 4,66 ; 2,53 et 0,62 µg/mL pour chacune d'elles.

Enfin, les résultats des travaux de synthèse biomimétique abordés dans le dernier chapitre ont abouti à l'obtention de résultats préliminaires permettant la synthèse d'un précurseur guanidinique protégé très avancé (**157**) en une seule étape à parti du 2,5-diméthoxyTHF, d'acide acétoacétique et de la 2-aminopyrimidine avec 30-48 % de rendement.

L'étude de *Biemna laboutei* a mis en évidence la très grande richesse de cette éponge, en métabolites aux structures originales et propriétés pharmacognosiques prometteuses. Ces travaux laissent entrevoir de nouvelles perspectives de recherche pour :

▸ *L'élucidation structurale des nétamines isolées.*

L'étude des dichroïsmes circulaires appliquée aux nétamines I (**58**) et J (**59**) afin de déterminer leurs configurations absolues par comparaison des géométries et des spectres théoriques et expérimentaux (UV et de DCE), pourrait, à présent, être appliquée à toutes les molécules nouvellement isolées de *Biemna laboutei*.

▸ *L'élaboration de nouveaux anticancéreux et antipaludiques*.

Au regard des tests d'activités biologiques réalisées *in vitro* sur les nétamines isolées, il conviendrait à présent de mener des investigations approfondies sur les molécules les plus actives : les nétamines K (**60**), M (**62**), O (**64**) et Q (**66**), qui constituent un réel espoir pour la recherche de molécules anticancéreuses et antipaludiques.

▸ *La compréhension de l'origine biosynthétique des nétamines.*

Cela concerne plus particulièrement les nétamines à noyau pyrimidinique. Au cours du travail d'extraction et d'isolement, s'est posée en effet la question de l'origine de ces composés. Certaines observations laissent à penser que ces dernières seraient le fruit d'oxydations de nétamines insaturées en $\Delta^{8a,8b}$ ou de nétamines saturées comme c'est le cas pour la nétamine P (**65**) qui s'est oxydée en nétamine H (**57**) et la nétamine O (**64**) qui s'est oxydée en mirabiline A (**46**) après isolement et purification.

▸ *La synthèse biomimétique du motif batzelladine.*

Les travaux préliminaires de biosynthèse proposés dans ce mémoire permettent d'envisager une étude systématique faisant appel en particulier à différentes guanidines

diversement protégées. La perspective étant d'arriver à une synthèse polyvalente ciblant plusieurs produits naturels (de type alcaloïdes tricycliques guanidiniques) qui ne varient finalement que par la taille de la chaîne carbonée polycétidique et par la chimiosélectivité de la réaction.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

I. Procédures générales

I.1 Les solvants

Des solvants (Fisher Scientific, et Acros Organics) de pureté 99 % ont été utilisés pour les extractions et les premiers fractionnements, puis des solvants de qualité CLHP ou 100 % (SDS) pour les séparations ultérieures. L'eau employée lors des séparations CLHP est de l'eau milliQ.

Pour la synthèse organique, les réactions et les purifications ont été réalisées à l'aide des solvants (Acros Organics et SDS) de pureté 99 % ont été utilisés.

I.2 Techniques chromatographiques

I.2.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les CCM analytiques ont été effectuées sur plaques de gel de silice (Si60-F_{254}, Merck) de 0,2 mm d'épaisseur ou sur plaques gel de silice greffée C18 (RP-18 F_{254s}, Merck) de 0,25 mm d'épaisseur, sur support d'aluminium.

Les CCM préparatives ont été réalisées sur plaques de gel de silice (Si60-F_{254}, Merck) de 0,5 mm d'épaisseur, sur support de verre.

Différents mélanges d'éluants ont été utilisés pour la migration :

- Isohexane/AcOEt 1:1 (v/v)
- DCM/MeOH 90:10 (v/v) + 0, 1 % NH_4OH
- DCM/MeOH 95:5 (v/v) + 0, 1 % NH_4OH
- Hept/AcOEt 50:50 (v/v) + 0,1 % AF
- AcOEt/MeOH 95:5 (v/v) + 0,1 % NH_4OH

Les plaques ont été révélées sous UV (λ = 254 et 365 nm), puis par pulvérisation de différents réactifs : vanilline sulfurique, ninhydrine, Liebermann-Burchard, préparés selon les modes opératoires suivants :

• ***Réactif à la vanilline*** : 2 g de vanilline sont ajoutés à 98 mL d'éthanol et 5 mL d'acide sulfurique concentré. C'est un réactif polyvalent, il permet de révéler après chauffage (100°C pendant 5-10 min) les cétones, les composés carbonylés, les phénols, ou encore les terpènes.

• ***Réactif à la Ninhydrine*** : 0,3 g de ninhydrine sont ajoutés à 100 mL de *n*-butanol et 3 mL d'acide acétique. Ce réactif permet de révéler les amino-acides.

• ***Réactif de Liebermann-Burchard*** : Dans un bain de glace, 5 mL d'anhydride acétique et 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont additionnés doucement à 50mL d'éthanol absolu. Par chauffage (100°C pendant 5-10 min), il permet de révéler les triterpènes et stéroides.

I.2.2 Chromatographie liquide sur Colonnes Ouvertes (CCO)

Toutes les CCO ont été réalisées dans des colonnes en verre de diamètre interne 1,2 cm ou 3,6 cm en utilisant de la silice (35-70 µm - SDS 60 ACC).

I.2.3 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP)

Les séparations par CLMP ont été réalisées :

- Soit au moyen du système Sepacore® (Büchi) muni d'un collecteur de fractions C-660, d'un programmateur de pompe C-615 et de deux modules de pompes C-605 en utilisant une colonne de dimension 460 x 36 mm, remplie de gel de silice (Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 70-230 Mesh).
- Soit au moyen du système CombiFlash® Companion® en utilisant :
  - Des colonnes prépackées en phase normale Redisep® Si60 12g, 40g ou 120g (35-70 μm Teledyne Isco),
  - Des colonnes prépackées en phase inverse Redisep® C18 130g (40-63 μm - Teledyne Isco).

I.2.4 Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les CLHP ***analytiques*** ont été réalisées sur une chaîne analytique Alliance Waters® 2695, pilotée par le logiciel Empower™ 2, couplée en série à un détecteur UV à barrette de photodiodes PAD (190-600 nm, Waters 2998), à un spectromètre de masse SM (Waters Micromass ZQ 2000), et à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Waters 2420). Les colonnes analytiques utilisées sont les suivantes :

- Waters SunFire Shield RP 18 (5 μm), 4,6*150 mm
- Waters SunFire Shield RP 18 (5 μm), 3,0*150 mm

- Kinetex C-18 (5 μm), 4,6*100 mm

Les CLHP ***semi-préparatives*** et ***préparatives*** ont été réalisées sur

- Le système Auto prep Waters 600 System Controller pilotée par le logiciel MassLynx. Elle est équipée d'une pompe binaire (Waters 600) et d'un injecteur automatique d'échantillons (Sample Manager Waters 2700). Elle est couplée en série à un détecteur UV à barrette de photodiode PAD (190-600 nm, Waters 996) et à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Waters 2424).
- Le système manuel équipé d'une pompe Waters 600, d'un détecteur UV Waters 2487, d'un système d'injection rhéodyne ® et piloté par le logiciel MassLynx.

Les colonnes préparatives et semi-préparatives utilisées sont :

- Waters Sunfire Shield RP 18 (5 μm) 19*150 mm
- Waters Sunfire Shield RP 18 (5 μm) 10*150 mm
- Waters Atlantis C18 T3 (5 μm) 19*150 mm

I.3 Analyses physiques et spectrales des composés

- **Le pouvoir rotatoire :** les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D$ ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Anton Paar MCP 300. Les expériences ont été réalisées avec une cuve de 300 µL, aux températures, concentrations et solvants indiqués.

- **Spectroscopie UV-Visible :** les spectres UV ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre Cary 100 Scan controllé par le logiciel Cary WinUV.

- **Spectroscopie InfraRouge (IR) :** les spectres d'absorption IR ont été mesurés sur un spectromètre Perkin Elmer spectrum 100 FT-IR.

- **Spectroscopie de masse haute résolution (HRMS) :** les spectres de masse haute résolution (HRMS) en Ionisation Electrospray (mode positif ESI^+) ont été réalisés sur un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT Premier XE, Waters). Les échantillons solubilisés dans le MeOH et ont été injectés dans l'appareil de masse *via* le système Waters Acquity UPLC équipé d'une colonne Waters BEH C18 (1,7 μm), 2,1*50 mm. Le débit de la phase mobile (H_2O/ACN, 95:5→95:5 (0,5'), 95:5 →0:100 (7')) a été fixé à 0,3 $mL.min^{-1}$.

- **La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :** les spectres RMN proton (^{1}H) et carbone (^{13}C) ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker Ultrashield Avance 300 MHz, Avance 500 MHz ou 600 MHz. Les déplacements chimiques (δ), exprimés en partie par million (ppm), ont été référencés sur les pics de solvants : **CD_3OD** δ_H 3,31 et δ_C 49,15, **$CDCl_3$** δ_H 7,27 et δ_C 77,00, **DMF-$_{d7}$** δ_H 8,03 et δ_C 163,1. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz. L'attribution des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet), td (triplet de doublet). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D ^{1}H, ^{13}C et DEPT-135, associées aux expériences 2D ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC, ^{1}H-^{15}N HMBC, ^{1}H-^{1}H NOESY et ^{1}H-^{1}H ROESY, en utilisant le logiciel NMR Notebook.

- **Le dichroïsme circulaire électronique (DCE) :** les spectres de dichroïsme circulaire ont été obtenus à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J-810. Les échantillons ont été solubilises dans le méthanol de qualité CLHP grade.

II. Etude chimique des éponges

II.1 Collecte

Les éponges étudiées ont été collectées en octobre 2009 dans la Baie de Salary, et en décembre 2011 dans la Baie des Assassins, au Sud-Ouest de Madagascar. Elles ont été conservées au congélateur jusqu'à leur extraction.

II.2 Extraction

Les éponges préalablement décongelées, sont découpées en morceaux de 1 cm x 1 cm environ, puis lyophilisées, pesées, et placées dans un mélange MeOH/DCM (1:1 ; v/v). L'ensemble est laissé à macérer pendant 3 x 12 heures à température ambiante. Le mélange obtenu est ensuite filtré par gravité sur papier filtre. Le solvant récupéré est ensuite évaporé sous vide. Les extraits bruts obtenus sont pesés et conservés au froid (Tableau XLIII).

Tableau XLIII : Bilan des extractions

Eponge	Masse de matière sèche (g)	Volume du solvant d'extraction (mL)	Masse de l'extrait brut (g)	Rendement (%)
Haliclona polypoides	76	900	11,91	15,7
Strongylamma arenosa	398	4100	23,3	6,3
Axinella donnani	88	950	30,3	34,4
Stylissa carteri	94	1000	15,4	16,4
Clathria dichela sensu	22	260	3,0	13,5
Clathria foliascens	100	1100	17,3	17,3
Acanthella cavernosa	28	360	6,6	23,7
Biemna laboutei	358	4000	87,0	24,3

II.3 Réalisation des signatures chimiques

Chaque extrait d'éponge est soumis :

↳ à une analyse RMN ^{1}H réalisée dans $CDCl_3$ ou MeOD, et enregistrée sur un spectromètre Bruker Ultrashield Avance 500 MHz.

↳ à une analyse CLHP réalisée dans les conditions suivantes :

Colonne : Sunfire C18 prep, 4,6 x 150 mm (5 μm)
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5') ; 98:2→0/100 (35')
Débit : 17 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD/DEDL/SM (ESI$^+$)

II.4 Fractionnement, isolement et purification des nétamines de l'éponge *Biemna laboutei*

II.4.1 Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait brut de *Biemna laboutei* a été fractionné à deux reprises (40 g puis 47 g) sur colonne de silice normale par CLMP (Büchi). Les conditions opératoires sont listées ci-dessous :

Colonne : Gel de silice Si60, 36 x 460 mm
Eluant : Isohexane/AcOEt/MeOH
Gradient : 95:5:0 (25') ; 85:15:0 (25') ; 0:100:0 (35') ; 0:30:70 (35')
Débit : 18 mL.min^{-1}

L'élution effectuée avec quatre systèmes de solvants : isohexane/AcOEt (95:5), isohexane/AcOEt (85:15), AcOEt (100) et AcOEt/MeOH (70:30), a permis de récupérer quatre fractions (F1 à F4) dont les masses totales sont respectivement : 1, 3, 4 et 20 g.

II.4.2 Isolement de la mirabiline F (51) et des nétamines K (60), L (61), M (62), N (63), O (64), P (65), R (67), S (68)

360 mg de la fraction F4 ont été traités par CLHP préparative en phase inverse pour conduire à 16 fractions (F4-1A à F4-1M). Les conditions opératoires sont les suivantes :

Colonne : Sunfire C18 prep, 19 x 150 mm (5 μm)
Eluant : Eau / MeOH + 0,1 % AF
Gradient : 55:45 (4') ; 55:45→30:70 (45')
Débit : 17 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD (254 nm)

- Les **fractions F4-1A, B, D, E et I** contiennent respectivement la **mirabiline F** (**51**) (2,9 mg) et les **nétamines K** (**60**) (3,5 mg), **O** (**64**) (8,4 mg), **M** (**62**) (15,1 mg) et **N** (**63**) (6,7 mg) pures.

- La **fraction F4-1C** (11,1 mg) contient la **nétamine R** (**67**) en présence de composés minoritaires. Elle a alors été purifiée par CLHP-UV préparative en phase inverse pour obtenir ce composé pur (1,9 mg).

  Colonne : Sunfire C18 prep 10 x 150 mm (5 μm)
  Eluant : Eau/ MeOH + 0,1 % AF
  Gradient : 52:48 (1') ; 52:48→48:52 (12')
  Débit : 4,7 mL.min^{-1}
  Détection : UV PAD (254 nm)

- La **fraction F4-1J** (9,6 mg) contient la **nétamine S** (**68**) en présence de composés minoritaires. Elle a donc été purifiée par CLHP-UV préparative en phase inverse pour obtenir ce composé pur (1,9 mg).

  Colonne : SunFireC18 19*150 mm (5 μm)
  Eluant : Eau/ MeOH + 0,1% AF
  Gradient : 45:55 (3') ; 45:55→30:70 (15')
  Débit : 17 mL.min^{-1}
  Détection : UV PAD (254 nm)/ DEDL

- La **fraction F4-1M** (53,4 mg) contient les **nétamines L** (**61**) et **P** (**65**) en mélange. Cette fraction a alors été travaillée de nouveau en CLHP-UV préparative, conduisant ainsi à l'isolement des composés **65** (3,9 mg) et **61** (3,9 mg) purs.

Colonne : SunFireC18 prep 19*150 mm (5 μm)
Eluant : Eau/ MeOH + 0,1% AF
Gradient : 45:55 (3') ; 45:55→30:70 (23')
Débit : 17 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD (254 nm)

II.4.3 Isolement des mirabilines A (46) et C (48) et des nétamines G (38), H (57), I (58) et J (59)

4,05 g de la fraction méthanolique ont été fractionnés par chromatographie Flash sur colonne de silice normale (système Combiflash® Companion®). L'élution réalisée avec les systèmes de solvants Hept/AcOEt puis AcOEt/MeOH en gradient a permis de récupérer 13 fractions (F4-2A à F4-2M).

Colonne : Redisep® Si60 120 g (35-70 μm)
Eluant : Hept / AcOEt / MeOH + 0,1% AF
Gradient : 100:0:0 (2') ; 100:0:0→98:2:0 (20') ;
0:100:0→0:95:5 (7') ; 0:95:5 →0:0:100 (10')
Débit : 30 mL.min^{-1}

Chaque fraction obtenue a fait l'objet d'une analyse par CLHP en phase inverse, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Kinetex C18 4,6*100 mm (5 μm)
Eluant : Eau / MeOH + 0,1% AF
Gradient : 52:48 (1') ; 52:48→27:73 (20') ; 27:73→0:100 (30')
Débit : 1 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD-DEDL-SM

A l'issue de cette analyse par CLHP, la **fraction F4-2E** a été sélectionnée pour un second fractionnement par CLHP-PAD préparative en phase normale. Une élution à partir d'un mélange Eau/MeOH a conduit à l'obtention de sept fractions : F4-2Ea à F4-2Eg.

Colonne : SunFire C18 19*150 mm (5 μm)
Eluant : H_2O/ MeOH + 0,1% AF
Gradient : 49:51 (21') ; 49:51→27:73 (28') ; 27:73→0:100 (40')
Débit : 13 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD-DEDL-SM

- Les **fractions F4-2Ea, b, d, f** et **g** renferment respectivement la **nétamine J** (**59**) (1,9 mg), les **mirabilines A** (**46**) (3,5 mg) et **C** (**48**) (2,1 mg) et les **nétamines I** (**58**) (13,0 mg), **H** (**57**) (3,6 mg) pures.

- La **fraction F4-2Ee** (91,7 mg) a été de nouveau fractionnée par CLHP-PAD en phase inverse pour conduire à la **nétamine G** (**38**) (2,2 mg) pure.

Colonne : SunFire C18 19*150 mm (5 μm)
Eluant : H_2O / MeOH + 0,1% AF
Gradient : 40:60 (1') ; 40:60→32:68 (16')
Débit : 17 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD-DEDL-SM

II.4.4 Isolement de la mirabiline J (55) et des nétamines E (36) et Q (66)

2,6 g de la fraction méthanolique F4 ont été fractionnés par CLMP en phase inverse (système Combiflash® Companion®). L'élution réalisée avec le système de solvant Eau/MeOH a conduit à l'obtention de 12 fractions (F4-3A à F4-3L).

Colonne : Redisep® C18 40-63 μm (130g)
Eluant : H_2O / MeOH + 0,1% AF
Gradient : 65:35 (5') ; 65:35→25:75 (60') ;
25:75→0:100 (75') ; 0:100 (85') ;
Débit : 29 mL.min^{-1}
Détection : UV (254 nm)

Chaque fraction obtenue a fait l'objet d'une analyse par CLHP en phase inverse, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : SunFire C18 4,6*150 mm (5 μm)
Eluant : H_2O/MeOH + 0,1% AF
Gradient : 55:45 (4') ; 55:45→30:70 (45')
Débit : 1 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD-DEDL-SM

A l'issue de cette analyse par CLHP, deux fractions ont été sélectionnées :

- La **fraction F4-3E** (108,7 mg) de laquelle a été isolée la **mirabiline J** (**55**) (5,5 mg) après un fractionnement par CLHP-UV préparative mené selon les conditions suivantes :

Colonne : SunFire C18 10*150 mm (5 µm)
Eluant : Eau/ MeOH + 0,2% TFA
Gradient : 45:55→32:68 (20')
Débit : 4,8 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD

- La **fraction F4-3J** de laquelle ont été isolées les **nétamines E** (**36**) (4,0 mg) et **Q** (**66**) (8,9 mg) après purification par CLHP-UV préparative en phase inverse.

Colonne : SunFire C18 10*150 mm (5 µm)
Eluant : Eau / MeOH + 0,2% TFA
Gradient : 25:75 (16')
Débit : 5 mL.min^{-1}
Détection : UV PAD

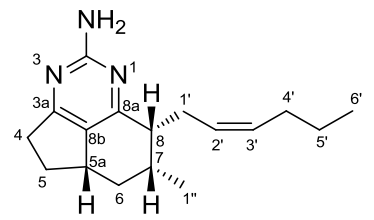
II.5 Hydrogénation des nétamines H et I à l'aide de l'appareil de Paars

Dans un flacon, 2 mg de produit sont dilués dans 2 mL de méthanol. Après ajout de 6 mg de palladium sur charbon (10%), le flacon est refermé. Il est d'abord mis sous vide puis sous H_2. Après 4 heures, le contenu du flacon est alors filtré sur célite puis concentré à sec sous vide. La masse obtenue pour la nétamine A (**32**) issue de l'hydrogénation de la nétamine H (**57**) est de 2,5 mg. Le produit résultant de l'hydrogénation de la nétamine I est obtenu avec une masse de 3,0 mg. Il est à noter que les rendements de ces hydrogénations sont supérieurs à 100 % en raison de particules de célite passées avec les produits lors de la filtration.

II.6 Caractéristiques physiques et spectrales des produits isolés

Les composés isolés de *Biemna laboutei* ont été classés ci-après par ordre alphabétique.

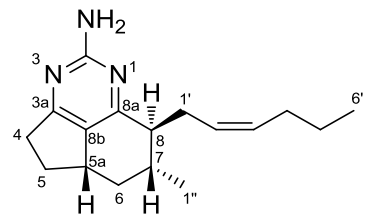
Mirabiline A (46)



Mirabiline A (**46**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{17}H_{26}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 272,2132 (calculée pour $C_{17}H_{26}N_3$, 272,2127)
$[\alpha]_D^{25}$ + 2,85 (*c* 1,30, DCM)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (2,00), 235 (2,40), 301 (1,00) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), ***δ*** (ppm) **:** 5,35 (m, H3'); 5,14 (m, H2'); 2,96 (mn H5a); 2,95 (m, H4); 2,82 (m, H8); 2,48 (m, H5); 2,46 (m, H1'); 2,26 (m, H1'); 2,23 (m, H7); 1,90 (m, H4'); 1,87 (m, H6); 1,62 (m, H5); 1,25 (m, H5'); 1,12 (m, H1''); 0,83 (m, H6').

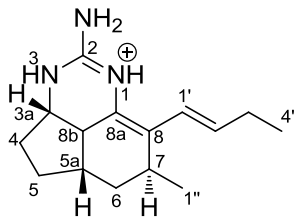
Mirabiline C (48)



Mirabiline C (**48**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{17}H_{26}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 272,2174 (calculée pour $C_{17}H_{26}N_3$, 272,2127)
$[\alpha]_D^{25}$ + 10,00 (*c* 0,10, DCM)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,53), 234 (0,99), 295 (0,39) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), ***δ*** (ppm) **:** 5,45 (m, H3'); 5,06 (m, H2'); 3,05 (m, H4); 3,00 (m, H1'); 2,93 (m, H5a); 2,78 (m, H4); 2,64 (m, H1'); 2,60 (m, H8); 2,48 (m, H5); 2,10 (m, H6) ; 2,02 (m, H4'); 1,91 (m, H7); 1,62 (m, H5); 1,32 (m, H5'); 1,12 (d, 6,7 Hz, H1''); 0,94 (m, H6); 0,87 (t, 7,3 Hz, H6').

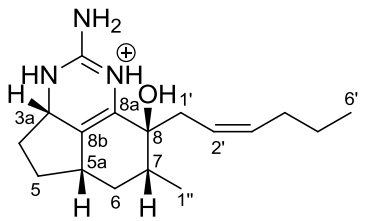
Mirabiline F (51)



Mirabiline F (**51**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{15}H_{24}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 246,1958 (calculée pour $C_{15}H_{24}N_3$, 246,1970)
$[\alpha]_D^{25}$ + 13,13 (*c* 0,53, DCM)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (1,34), 258 (1,13) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) ***δ*** (ppm) **:** 6,35 (m, H1'); 5,71 (m, H2'); 3,77 (m, H3a); 2,71 (m, H7); 2,56 (m, H8b); 2,46 (m, H5a); 2,19 (m, H5); 2,19 (m, H3'); 2,00 (m, H4); 1,99 (m, H6); 1,71 (m, H5); 1,63 (m, H6); 1,49 (m, H4); 1,17 (d, 7,2 Hz, H1'' 1,03 (t, 7,2 Hz, H4').

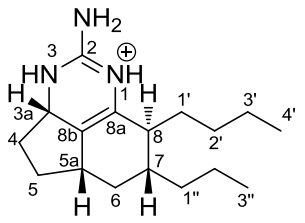
Mirabiline J (55)



Mirabiline J (**55**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{17}H_{28}N_3O$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 290,2238 (calculée pour $C_{17}H_{28}N_3O$, 290,2232)
$[\alpha]_D^{25}$ + 78,04 (*c* 0,18, DCM)
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), ***δ*** (ppm) **:** 5,41 (m, H3'); 5,10 (m, H2'); 3,65 (m, H3a); 2,96 (m, H1'); 2,79 (m, H1'); 2,41 (m, H7); 2,29 (m, H5a); 2,11 (m, H6); 2,02 (m, H4'); 2,00 (m, H4); 1,83 (m, H5); 1,58 (m, H5); 1,56 (m, H6); 1,36 (m, H4); 1,16 (d, 6,9 Hz, H1''); 0,88 (t, 7,2 Hz, H5').

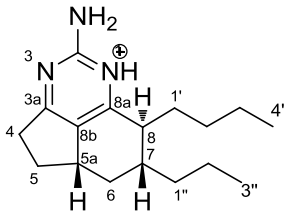
Nétamine E (36)



Nétamine E (**36**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{17}H_{30}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 276,2441 (calculée pour $C_{17}H_{30}N_3$, 276,2440)
$[\alpha]_D^{25}$ + 37,00 (*c* 0,10, DCM)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,71), 238 (0,63) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), ***δ*** (ppm) **:** 4,27 (m, H3a); 2,40 (m, H5a); 2,20 (m, H4); 2,12 (m, H6); 2,00 (m, H5); 1,95 (m, H8); 1,72 (m, H1'); 1,68 (m, H4); 1,63 (m, H1'); 1,59 (m, H7); 1,50 (m, H2''); 1,35 (m, H3'); 1,32 (m, H5); 1,30 (m, H2''); 1,25 (m, H2'); 1,19 (m, H1''); 1,17 (m, H2'); 0,94 (m, H3''); 0,93 (m, H4'); 0,78 (m, H6).

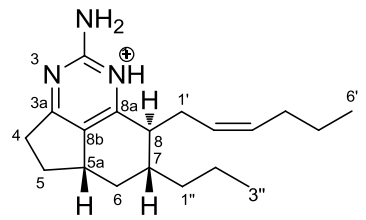
Nétamine G (38)



Nétamine G (**38**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{17}H_{28}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 274,2271 (calculée pour $C_{17}H_{28}N_3$, 274,2283)
$[\alpha]_D^{25}$ + 18,02 (*c* 0,20, DCM)
UV (MeOH) **:** λ_{max} (log ε) 202 (0,81), 234 (0,95), 301 (0,34) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), ***δ*** (ppm) **:** 2,95 (m, H4); 2,90 (m, H5a); 2,65 (m, H4); 2,40 (m, H5); 2,35 (m, H8); 2,22 (m, H6); 2,04 (m, H, H1'); 1,76 (m, H1'); 1,75 (m, H7); 1,58 (m, H1''); 1,55 (m, H5); 1,50 (m, H2''); 1,31 (m, H2''); 1,31 (m, H2'); 1,31 (m, H3'); 1,27 (m, H1''); 1,12 (m, H2'); 0,96 (m, H3''); 0,89 (m, H4'); 0,88 (m, H6).

Nétamine H (57)

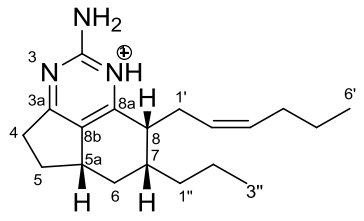


Nétamine H (**57**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{19}H_{30}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 300.2448 (calculée pour $C_{19}H_{30}N_3$, 300,2440)
$[\alpha]_D^{25}$ + 54,58 (*c* 1,20, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (1,00), 234 (1,20), 303 (0,50) nm
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 2956, 2870,1587
RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,39 (m, 1H, H3'); 5,18 (m, 1H, H2'); 2,64 (m, 1H, H1'); 2,92 (m, 1H, H4); 2,85 (m, 1H, H5a); 2,78 (m, 1H, H1'); 2,56 (m, 1H, H4); 2,39 (m, 1H, H5); 2,36 (m, 1H, H8); 2,20 (m, 1H, H6); 2,03 (m, 2H, H4'); 1,79 (m, 1H, H7); 1,65 (m, 1H, H1''); 1,54 (m, 1H, H5); 1,51 (m, 1H, H2'', H2''); 1,33 (m, 2H, H5'); 1,31 (m, 1H, H2''); 1,29 (m, 1H, H1''); 0,95 (m, 3H, H3''); 0,90 (m, 3H, H6'); 0,78 (m, 1H, H6).
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 176,5 (C3a); 167,0 (C8a); 164,6 (C_2); 133,1 (C3'); 127,5 (C8b); 126,7 (C2'); 46,5 (C8); 39,8 (C7); 38,9 (C5a); 38,2 (C1''); 37,1 (C6); 34,5 (C4); 34,2 (C5); 30,8 (C4'); 29,4 (C1'); 24,0 (C5'); 21,5 (C2''); 14,9 (C3''); 14,3 (C6').

*Le spectre **NOESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine I (58)



Nétamine I (**58**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{19}H_{30}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 300,2444 (calculée pour $C_{19}H_{30}N_3$, 300,2440)
$[\alpha]_D^{25}$ + 0,47 (*c* 4,06, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (1,57), 234 (1,94), 304 (0,72) nm

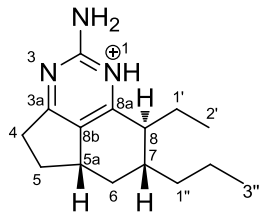
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 3408, 1570

RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,24 (m, 1H, H3'); 5,23 (m, 1H, H2'); 2,90 (m, 1H, H5a); 2,82 (m, 1H, H8); 2,59 (m, 2H, H5); 2,54 (m, 1H, H1'); 2,36 (m, 1H, H4); 2,25 (m, 1H, H1'); 2,02 (m, 1H, H7); 1,89 (m, 2H, 4'); 1,87 (m, 1H, H6); 1,58 (m, 1H, 1''); 1,51 (m, 1H, H4); 1,46 (m, 2H, H2''); 1,41 (m, 1H, H1''); 1,28 (m, 2H, H5'); 1,24 (m, 1H, H6); 0,97 (t, 7,0 Hz, 3H, H3''); 0,86 (t, 7,4 Hz, 3H, H6').

RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 176,4 (C3a);166,8 (C8a); 164,4 (C2); 131,2 (C2'); 129,3 (C3'); 126,8 (C8b); 42,9 (C8); 41,5 (C7); 40,4 (C5a); 36,8 (C1''); 34,8 (C5); 34,7 (C4); 33,6 (C6); 30,6 (C4'); 29,0 (C1'); 23,9 (C5'); 21,9 (C2'');14,8 (C3''); 14,3 (C6').

*Le spectre **NOESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine J (59)



Nétamine J (**59**)

Aspect : huile jaune pâle

Formule brute : $C_{15}H_{24}N_3$

HRMS (ESI$^+$) : $[M]^+$ m/z 246,1976 (calculée pour $C_{15}H_{24}N_3$, 246,1970)

$[\alpha]_D^{25}$ + 47,74 (*c* 0.53, MeOH)

IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 3322, 2954, 1589

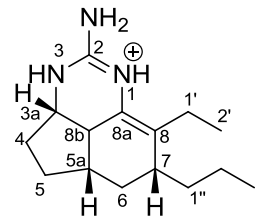
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (0,81), 234 (0,87), 303 (0,31) nm

RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 2,93 (m, 1H, H4); 2,90 (m, 1H, H5a); 2,57 (m, 1H, H4); 2,40 (m, 1H, H5); 2,28 (m, 1H, H8); 2,21 (m, 1H, H6); 2,13 (m, 1H, H1'); 1,79 (m, 1H, H7); 1,79 (m, 1H, H1'); 1,54 (m, 1H, H2''); 1,53 (m, 1H, H5); 1,33 (m, 1H, H2''); 1,26 (m, 2H, H1''); 0,96 (t, 7,1 Hz, 3H, H3''); 0,79 (t, 7,5 Hz 3H, H2'); 0,78 (m, 1H, H6).

RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 176,3 (C3a);167,4 (C8a);164,7 (C2);127,5 (C8b);47,2 (C8);39,4 (C7);38,8 (C5a);38,4 (C1'');37,4 (C6);34,4 (C4);34,2 (C5);24,4 (C1');21,4 (C2'');14,9 (C3'');9,8 (C2').

*Le spectre **NOESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine K (60)

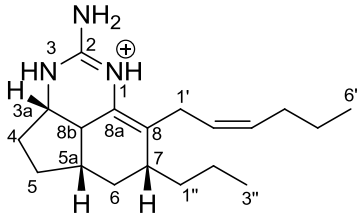


Nétamine K (**60**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{15}H_{26}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 248,2119 (calculée pour $C_{15}H_{26}N_3$, 248,2127)
$[\alpha]_D^{25}$ + 45,00 (*c* 0,1, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 1681, 1202
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 201 (0,97), 232 (1,04) nm
RMN ^{1}H (600 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 3,80 (m, 1H, H3a); 2,60 (m, 1H, H8b); 2,52 (m, 1H, H5a); 2,21 (m, 2H, H7); 2,21 (m, 1H, H1'); 1,99 (m, 1H, H4); 1,90 (m, 1H, H6); 1,77 (m, 1H, H5); 1,68 (m, 1H, H1''); 1,64 (m, 1H, H5); 1,60 (m, 1H, H6); 1,57 (m, 1H, H2''); 1,45 (m, 1H, H4); 1,34 (m, 1H, H2''); 1,32 (m, 1H, H1''); 1,03 (t, 7,2 Hz 3H, H2'); 0,96 (t, 7,0 Hz, 3H, H3'').
RMN ^{13}C (600 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 153,4 (C2); 129,3 (C8); 122,7 (C8a); 55,0 (C3a); 37,5 (C8b); 37,2 (C4); 36,6 (C7); 36,5 (C1''); 35,5 (C5a); 29,5 (C6); 27,7 (C5); 22,6 (C2''); 22,0 (C1'); 14,5 (C3''); 13,6 (C2').

*Le spectre **ROESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine L (61)



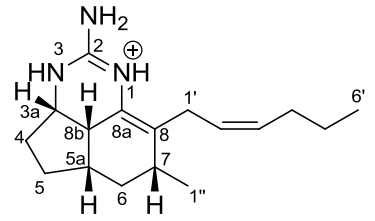
Nétamine L (**61**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{19}H_{32}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 302,2592 (calculée pour $C_{19}H_{32}N_3$, 302,2591)
$[\alpha]_D^{25}$ +44,79 (*c* 1,46, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 3262, 1643
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (1,42), 232 (1,15) nm

RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,50 (m, 1H, H3'); 5,24 (m, 1H, H2'); 3,82 (m, 1H, H3a); 3,03 (m, 1H, H1'); 2,90 (m, 1H, H1'); 2,62 (m, 1H, H8b); 2,53 (m, 1H, H5a); 2,19 (m, 1H, H7); 2,10 (m, 2H, H4'); 2,00 (m, 1H, H4); 1,86 (m, 2H, H6); 1,79 (m, 2H, H5); 1,67 (m, 1H, H1''); 1,57 (m, 1H, H2''); 1,47 (m, 1H, H4); 1,44 (m, 2H, H5'); 1,31 (m, 1H, H1''); 1,31 (m, 1H, H2''); 0,93 (m, 3H, H3'') ; 0,93 (m, 3H, H6').
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 153,4 (C2); 132,8 (C3'); 127,9 (C2'); 127,0 (C8); 123,4 (C8a); 55,1 (C3a); 37,9 (C8b); 37,0 (C7); 36,3 (C1''); 35,5 (C5a); 33,2 (C4); 30,8 (C4'); 28,8 (C6); 27,6 (C5); 27,4 (C1'); 23,9 (C5'); 22,6 (C2''); 14,6 (C3''); 14,4 (C6').

*Le spectre **ROESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

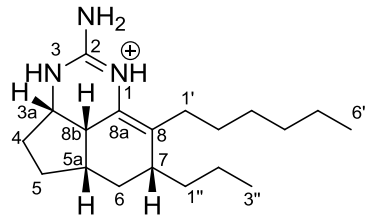
Nétamine M (62)



Nétamine M (**62**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{17}H_{28}N_3$
HRMS (ESI$^+$) : $[M]^+$ m/z 274,2281 (calculée pour $C_{17}H_{28}N_3$, 274,2283)
$[\alpha]_D^{25}$ + 111,35 (*c* 4,01, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 2979, 1580
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 202 (0,86), 233 (0,82) nm
RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,49 (m, 1H, H3'); 5,23 (m, 1H, H2'); 3,83(m, 1H, H3a); 2,97 (m, 1H, H1'); 2,92 (m, 1H, H1'); 2,62 (m, 1H, H8b); 2,53 (m, 1H, H5a); 2,36 (m, 1H, H7); 2,11 (m, 2H, H4'); 2,02 (m, 1H, H4); 2,00 (m, 1H, H6); 1,77 (m, 1H, H5); 1,63 (m, 1H, H5); 1,48 (m, 1H, H4); 1,47 (m, 1H, H6); 1,43 (m, 2H, H5'); 1,19 (d, 7,4Hz, 3H, H1''); 0,95 (t, 7,4 Hz, 3H, H6').
RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 154,8 (C2); 132,7 (C3'); 127,9 (C2'); 127,2 (C8); 123,2 (C8a); 55,1 (C3a); 37,6 (C8b); 35,6 (C5a); 34,6 (C6); 33,1 (C4); 31,7 (C7); 30,7 (C4'); 28,0 (C5); 27,2 (C1'); 23,9 (C5'); 21,4 (C1''); 14,3 (C6').

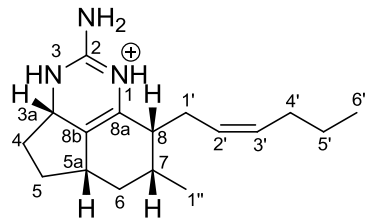
Nétamine N (63)



Nétamine N (**63**)

Aspect : huile marron
Formule brute : $C_{19}H_{34}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 304,2768 (calculée pour $C_{19}H_{34}N_3$, 304,2753)
$[\alpha]_D^{25}$ + 4,29 (*c* 0,56, MeOH)
IR(ν_{max} cm^{-1}) **:** 2931, 1681, 1599
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 201 (1,25), 232 (1,2) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 3,80 (m, 1H, H3a); 2,62 (m, 1H, H8b); 2,52 (m, 1H, H5a); 2,19 (m, 1H, H7); 2,17 (m, 2H, H3'); 1,99 (m, 1H, H4); 1,91 (m, 1H, H6); 1,78 (m, 1H, H5); 1,67 (m, 1H, H1''); 1,63 (m, 1H, H5); 1,58 (m, 1H, H6); 1,56 (m, 2H, H2''); 1,45 (m, 1H, H4); 1,44 (m, 2H, H1'); 1,34 (m, 2H, H4'); 1,34 (m, 2H, H5'); 1,32 (m, 1H, H1''); 1,29 (m, 2H, H2'); 0,96 (t, 7,0 Hz, 3H, H3''); 0,92 (m, 3H, H6').
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 153,2 (C2); 128,2 (C8); 122,9 (C8a); 55,1 (C3a); 37,4 (C8b); 36,8 (C7); 36,6 (C1''); 35,6 (C5a); 33,2 (C4); 33,2 (C4'); 30,7 (C2'); 29,9 (C6); 29,7 (C1'); 28,9 (C3'); 27,9 (C5); 23,9 (C5'); 22,6 (C2''); 14,6 (C3''); 14,5 (C6').

Nétamine O (64)



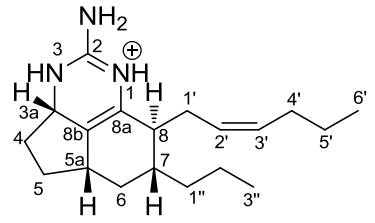
Nétamine O (**64**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{17}H_{28}N_3$
HRMS (ESI⁺) : $[M]^+$ m/z 274,2271 (calculée pour $C_{17}H_{28}N_3$, 274,2283)
$[\alpha]_D^{25}$ + 61,58 (*c* 1,33, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 2990, 1599
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 201 (1,12), 234 (0,95), 302 (0,28) nm

RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,40 (m, 1H, H3'); 5,38 (m, 1H, H2'); 4,25 (m, 1H, H3a); 2,48 (m, 1H, H5a); 2,33 (m, 2H, H8); 2,28 (m, 1H, H1'); 2,24 (m, 2H, H4); 2,02 (m, 1H); 2,00 (m, 2H, H4'); 1,73 (m, 1H, H5); 1,38 (m, 2H, H5'); 1,22 (m, 2H, H6); 1,20 (m, 1H, H5); 1,07 (d, 7,0 Hz, 3H, H1''); 0,92 (t, 7,1 Hz, 3H, H6').
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 154,3 (C2); 131,8 (C3'); 129,4 (C8a); 129,1 (C2'); 120,6 (C8b); 53,0 (C3a); 39,9 (C8); 38,8 (C5a); 34,8 (C7); 34,2 (C5); 34,1 (C4); 30,9 (C6); 30,7 (C4'); 26,9 (C1'); 23,9 (C5'); 19,4 (C1''); 14,3 (C6').

*Le spectre **ROESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine P (65)

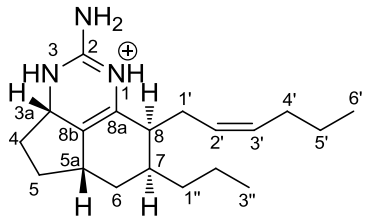


Nétamine P (**65**)

Aspect : solide blanc
Formule brute : $C_{19}H_{32}N_3$
HRMS (ESI$^+$) : $[M]^+$ m/z 302,2600 (calculée pour $C_{19}H_{32}N_3$, 302,2596)
$[\alpha]_D^{25}$ +219,04 (*c* 1,46 g/100 mL)
IR(ν_{max} cm^{-1}) **:** 3290, 1646
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,87), 235 (0,56) nm
RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,50 (m, 1H, H3'); 5,30 (m, 1H, H2'); 4,28 (m, 1H, H3a); 2,55 (m, 1H, H1'); 2,39 (m, 1H, H5a); 2,34 (m, 1H, H1'); 2,20 (m, 1H, H4); 2,11 (m, 2H, H6); 2,06 (m, 2H, H4'); 2,00 (m, 1H, H5); 1,99 (m, 1H, H8); 1,67 (m, 1H, H4); 1,61 (m, 1H, H''); 1,54 (m, 1H, H7); 1,50 (m, 1H, H2''); 1,40 (m, 2H, H5'); 1,31 (m, 1H, H5); 1,28 (m, 1H, H2''); 1,20 (m, 1H, H1''); 0,93 (m, 3H, H3''); 0,93 (m, 3H, H6').
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 159,7 (C2); 133,7 (C3'); 128,6 (C8a); 125,9 (C2'); 120,0 (C8b); 54,2 (C3a); 42,2 (C8); 38,9 (C7); 37,6 (C5a); 37,4 (C1''); 36,3 (C6); 34,0 (C4); 30,9 (C4'); 30,3 (C5); 27,2 (C1'); 24,0 (C5'); 21,6 (C2''); 14,9 (C3''); 14,3 (c6').

*Le spectre **NOESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine Q (66)

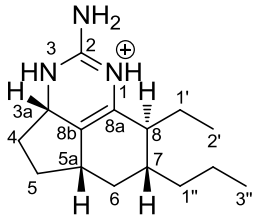


Nétamine Q (**66**)

Aspect : huile jaune pâle
Formule brute : $C_{19}H_{32}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 302,2578 (calculée pour $C_{19}H_{32}N_3$, 302,2596)
$[\alpha]_D^{25}$ 18,33 (*c* 0,30, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 3300, 1648
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,63), 233 (0,94), 305 (0,17) nm
RMN ^{1}H (600 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 5,40 (m, 1H, H3'); 5,38 (m, 1H, H2'); 4,25 (m, 1H, H3a); 2,47 (m, 1H, H5a); 2,39 (m, 1H, H7); 2,26 (m, 2H, H1'); 2,24 (m, 1H, H4); 2,00 (m, 2H, H4'); 1,86 (m, 1H, H8); 1,81 (m, 1H, H6); 1,73 (m, 1H, H4); 1,44 (m, 1H, H1''); 1,41 (m, 2H, H2''); 1,38 (m, 2H, H5'); 1,31 (m, 1H, H1''); 1,22 (m, 2H, H5); 1,18 (m, 1H, H6); 0,95 (t, 6,9 Hz, 3H, H3'').; 0,91 (t, 7,3 Hz, 3H, H6').
RMN ^{13}C (600 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 154,4 (C2); 131,8 (C3'); 129,5 (C8a); 129,0 (C2'); 120,7 (C8b); 53,0 (C3a); 40,2 (C8); 38,9 (C5a); 38,4 (C7); 36,6 (C1''); 34,1 (C4); 32,5 (C6); 31,1 (C5); 30,7 (C4'); 27,1 (c1'); 24,0 (C5'); 21,8 (C2''); 14,7 (C3''); 14,3 (C6').

*Le spectre **NOESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine R (67)



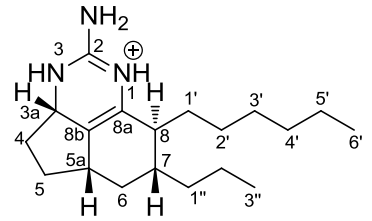
Nétamine R (**67**)

Aspect : huile transparente
Formule brute : $C_{15}H_{26}N_3$
HRMS (ESI+) : $[M]^+$ m/z 248,2146 (calculée pour $C_{15}H_{26}N_3$, 248,2127)
$[\alpha]_D^{25}$ +18,00 (*c* 0,10 , MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1}) **:** 3300, 1650
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,71), 238 (0,63)nm

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 4,27(m, 1H, H3a); 2,40 (m, 1H, H5a); 2,19 (m, 1H, H4); 2,08 (m, 1H, H6); 1,99 (m, 1H, H5); 1,96 (m, 1H, H8); 1,75 (m, 2H, H1'); 1,68 (m, 1H, H4); 1,57 (m, 1H, H7); 1,32 (m, 2H, H2''); 1,27 (m, 1H, H5); 1,18 (m, 2H, H1''); 0,94 (t, 7,1 Hz, 3H, H3''); 0,81 (t, 7,6 Hz, 3H, H2'); 0,77 (m, 1H, H6).
RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 154,8 (C2); 128,4 (C8a); 120,0 (C8b); 54,0 (C3a); 42,9 (C8); 37,7 (C7); 37,6 (C5a); 36,5 (C6); 37,4 (C1''); 34,1 (C4); 30,4 (C5); 21,4 (C2''); 21,3 (C1'); 14,8 (C3''); 8,5 (C2').

*Le spectre **ROESY** a été réalisé dans le DMF (600 MHz)*

Nétamine S (68)

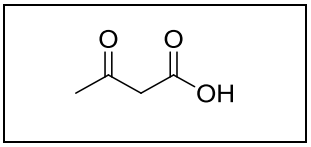


Nétamine S (**68**)

Aspect : huile marron pâle
Formule brute : $C_{19}H_{34}N_3$
HRMS (ESI$^+$) : $[M]^+$ m/z 304,2748 (calculée pour $C_{17}H_{26}N_3$, 304,2753)
$[\alpha]_D^{25}$ +20,00 (*c* 0,10, MeOH)
IR (ν_{max} cm^{-1})**:** 3300, 1650
UV (MeOH) λ_{max} (log ε) **:** 203 (1,09), 248 (0,30)nm
RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 4,27 (m, 1H, H3a); 2,41 (m, 1H, H5a); 2,19 (m, 1H, H4); 2,12 (m, 1H, H6); 2,00 (m, 2H, H5); 1,95 (m, 1H, H8); 1,71 (m, 1H, H1') ; 1,67 (m, 1H, H4); 1,62 (m, 1H, H1'); 1,58 (m, 1H, H7); 1,49 (m, 1H, H2''); 1,32 (m, 2H, H3'); 1,32 (m, 2H, H5'); 1,31 (m, 2H, H4'); 1,30 (m, H, H2''); 1,26 (m, 1H, H2'); 1,19 (m, 2H, H1''); 1,18 (m, 1H, H2'); 0,94 (m, 3H, H3''); 0,90 (m, 3H, H6'); 0,77 (m, 1H, H6).
RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD), ***δ*** (ppm) **:** 154,7 (C2); 128,8 (C8a); 119,7 (C8b); 54,1 (C3a); 42,3 (C8); 38,4 (C7); 37,7 (C5a); 37,4 (C1''); 36,6 (C6); 34,0 (C4); 33,1 (C4'); 31,1 (C3'); 30,4 (C5); 29,1 (C1'); 25,2 (C2'); 23,8 (C5'); 21,4 (C2''); 14,8 (C3''); 14,5 (C6').

III. Synthèse du squelette tricyclique des batzelladines

III.1 Synthèse de l'acide acétoacétique 147



L'acide acétoacétique (**147**) a été synthétisé selon deux méthodes, l'une est proposée par Bradley et collaborateurs [101], l'autre par Otah et collaborateurs [102].

Méthode 1 [101]

Une solution d'hydroxyde de sodium (3,88 g, 97,2 mmol) dans de l'eau (77 mL) et ajoutée à de l'acétoacétate de méthyle (10 g, 86,1 mmol) à température ambiante pendant 20 minutes. La réaction est mise sous agitation pendant 18 heures. La solution est ensuite stoppée avec du sulfate d'ammonium (70 g) puis acidifiée lentement avec une solution concentrée d'acide chlorhydrique (2 mL) dans de l'eau (25 mL) dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est extrait par du diéthyl éther (6x20 mL). Les phases organiques obtenues sont réunies puis séchées sur sulfate de magnésium, et concentré sous pression réduite pour fournir le composé **147** (4,71 g, 54 %) sous forme d'un liquide incolore.

Méthode 2 [102]

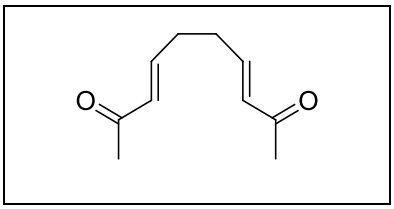
Le *tert* butylacétoacétate (4,75 g) est dilué dans 15 mL de TFA, la solution est placée sous agitation durant 16 heures à température ambiante. Le TFA est ensuite évaporé (en mélange azéotrope avec du benzène) sous pression réduite pour donner le composé **147** (3,0 g, 98 %).

Aspect : liquide jaunâtre

Formule brute : $C_4H_6O_3$

RMN ^{1}H (500 mHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 4,97 (s, 1H- énol), 3,47 (s, 2H-cétone), 2,24 (s, 3H-cétone), 1,93 (s, 3H-énol)

III.2 Synthèse du composé 149



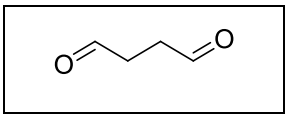
6 mmol d'acide acétoacétique sont mis en présence de 3 mmol de succinaldéhyde, 2,4 mmol de guanidine et 0,6 mmol de pipéridine dans 5 mL de DMF anhydre. Après 16 heures sous agitation, de l'eau et du méthanol sont ajoutés (1 mL et 4 mL respectivement) au mélange réactionnel, qui est ensuite extrait avec du DCM (5*6 mL). L'extrait évaporé sous pression réduite est purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH, 99:1 + 0,2 % NH_4OH). Le composé **149** est alors obtenu, avec un rendement de 6 % (30,1 mg).

Formule brute : $C_{10}H_{14}O_2$

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 6,75 (dt, 2H, 15,9 Hz) ; 6,08 (d, 2H, 15,8 Hz) ; 2,39 (m, 4H) ; 2,23 (s, 6H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 198,4 ; 145,9 ; 132,0 ; 30,8 ; 27,2.

III.3 Synthèse du succinaldéhyde 152



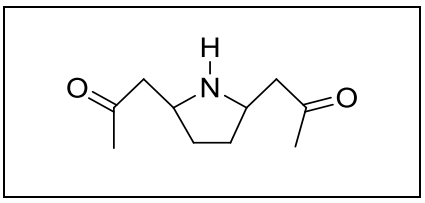
Le succinaldéhyde (**152**) a été synthétisé selon la méthode de Mueller et collaborateurs [103].

Un mélange de 2,5-diméthoxytétrahydrofurane (39,2 g, 296,7 mmol) et une solution à 0,6 N d'acide chlorhydrique (HCl) (237 mL) est mis sous agitation pendant 1,5 heure. Le mélange est neutralisé par $NaHCO_3$ (12,4 g, 148,0 mmol) et extrait par du DCM (3x70 mL). La phase aqueuse est acidifiée par une solution d'HCl concentrée (15 mL), et mis sous agitation pendant 1,5 heure, neutralisé avec $NaHCO_3$ (15,0 g), puis extrait avec du DCM (3x70 mL). Cette séquence d'acidification, neutralisation et extraction est répétée 2 fois de plus. Les phases organiques collectées sont séchées sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$), évaporées sous vide. Une distillation sous vide de la solution donne le succinaldéhyde (10,5 g, 41%) sous forme d'un liquide incolore.

Aspect : liquide incolore

Formule brute : $C_4H_6O_2$

III.4 Synthèse du composé 155



Sous argon, de l'acide formique (15 mL) est ajouté sur le composé **155** (1,0 g, 3,66 mmol). Le mélange est placé sous argon, puis du Pd/C y est ajouté (0,6 g, 10%). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 100°C pendant 20 heures. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et concentrée sous pression réduite pour fournir le composé **155** (0,28 g, 41 %).

Aspect : liquide brun

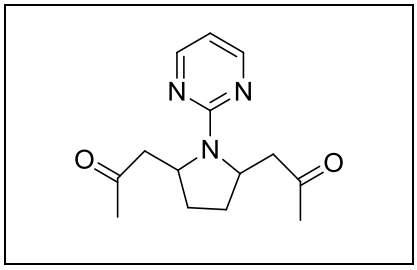
Formule brute : $C_{10}H_{17}NO_2$

HRMS (ESI+) : $[M+H]^+$ *m/z* 184,1340 (calculée 184,1338).

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 3,82 (m, 2H) ; 3,20 (td, 18,2Hz, 7,0 Hz, 2H) ; 2,82 (dt, 4,8 Hz, 18,4 Hz, 2H) ; 2,28 (s, NH), 2,10 (s, 6H) ; 1,70 (m, 2H) ; 1,62 (m, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 206,1 ; 55,1 ; 45,3 ; 30,0 ; 28,9.

III.5 Synthèse du composé 157



Dans 4 mL d'eau, 3 mmol (396,0 mg) de 2,5-diméthoxyTHF, 6 mmol (612,2 mg) d'acide acétoacétique et 6 mmol de 2-aminopyrimidine (94,1 mg) sont ajoutés. Après 16 heures sous agitation, à température ambiante, le mélange réactionnel est extrait par 5x3 mL de DCM. Le résidu est ensuite purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH, 99/1 + 0,1 %

NH_3 puis DCM/MeOH, 98/2 + 0,1 % NH_3). Le composé **157** est obtenu avec un rendement de 30 % (235,0 mg).

Aspect : cristal blanc

Formule brute : $C_{14}H_{19}N_3O_2$

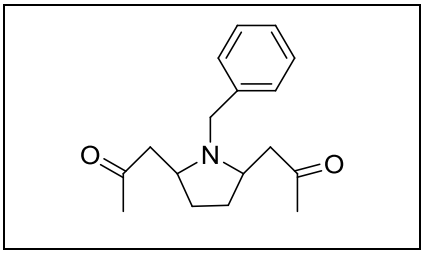
Point de Fusion : 65°C

HRMS (ESI+) : $[M+H]^+$ *m/z* 262,1453 (calculée 262,1556)

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 8,09 (d, 4,8 Hz, 2H) ; 6,32 (t, 4,8 Hz, 1H) ; 4,31 (m, 2H), 3,10 (m, 2H), 2,31 (m, 2H), 2,00 (s, 6H) ; 1,56 (m, 4H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) **:** 207,5 ; 160,0 ; 157,3 ; 109,8 ; 55,0 ; 48,7 ; 30,3 ; 29,8.

III.6 Synthèse du composé 172



Un mélange équimolaire (1,4 mmol) de 2,5-diméthoxyTHF et d'hydrate de benzylamine est ajouté à 4 mmol d'acide acétoacétique dans 2 mL d'eau. Après 16 heures sous agitation, à température ambiante, le mélange réactionnel est extrait avec du DCM (5x6 mL) puis séché sur $MgSO_4$. L'extrait est ensuite évaporé sous pression réduite et purifié sur colonne se silice (DCM/MeOH : 99:1 + 0,1 % NH_4OH) pour obtenir le composé **172** (114 mg, 30 %).

Aspect : liquide brun

Formule brute : $C_{17}H_{23}NO_2$

HRMS (ESI+) : $[M+H]^+$ *m/z* 274, 1811 (calculée 274,1807).

RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD), δ (ppm) : 7,31 (m, 5H) ; 3,75 (s, 2H) ; 3,11 (m, 2H) ; 2,62 (dd, 2H, 4,3 Hz, 16,4 Hz) ; 2,37 (dd, 2H, 16,4 Hz, 8,6 Hz) ; 2,00 (s, 6H), 1,95 (m, 2H) ; 1,40 (m , 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD), δ (ppm) **:** 210,8 ; 140,6; 130,5; 129,3; 128,2 ; 62,0; 58,7; 51,0 ; 30,8 ; 30,7.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Lew, M.; Hung-Wen, L., Natural products of therapeutic importance, ***Compr. Nat. Prod. II***, 2010, ***2***, 623–650.

[2] Newman, D. J.; Cragg, G. C., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, ***J. Nat. Prod.***, 2012, ***75***, 311–335.

[3] Kornprobst, J.-M., *Substances naturelles d'origine marine*; Ed. Tec&Doc., Lavoisier Londres Paris New York, Tome 1 et Tome 2, 2005.

[4] Bergman, W.; Feeney, R. J., The isolation of a new thymine pentoside from sponges, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1950, ***72***, 2809–2810.

[5] Bergman, W.; Feeney, R. J., Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges, ***J. Org. Chem.***, 1951, ***16***, 981–987.

[6] Halaven, Eribulin. ***Eur. Med. Agency*** EMA/27541/2011.

[7] World register of Marine Species: http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=131897.

[8] (a)Hadju, E.; VanSoest, R. W. M., Family Desmacellidae Ridley & Dendy, 1886, Systema porifera: a guide to the classification of sponges. Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow), 2002, 642–650. (b) Morrow C.C., Redmond N.E., Picton B.E., Thacker R.W., Collins A.G., Maggs C.A., Sigwart J.D. & Allcock A.L.. Molecular Phylogenies Support Homoplasy of Multiple Morphological Characters Used in the Taxonomy of Heteroscleromorpha (Porifera: Demospongiae), Integrative and Comparative Biology, ***2013***.

[9] Hooper, J. N. A., A toxic Biemna from Madagascar (Demospongiae: Poecilosclerida), ***Bulletin de l'Institut Royal des sciences Naturelles de Belgique***, 1996, ***66***, 123–133.

[10] Delseth, C.; Kashman, Y.; Djerassi, C., Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol and its 24ξ-ethyl homolog, two new marine sterols from the Red Sea sponge Biemna fortis, ***Helv. Chim. Acta***, 1979, ***62***, 2037–2045.

[11] Bensemhoum, J.; Bombarda, I.; Aknin, M.; Vacelet, J.; Gaydou, E. M., 5α, 8α-Epidioxysterol from the marine sponge *Biemna triraphis* Topsent, ***Nat. Prod. Com.***, 2008, ***3***, 843.

[12] Gauvin, A.; Aknin, M.; Faure, R.; Gaydou, E.-M., Isolation of bioactive 5α,8α-epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*, ***Can. J. Chem***, 2000, ***78***, 986–992.

[13] Ioannou, E.; Abdel-Razik, A. F.; Zervou, M.; Christofidis, D.; Alexi, X.; Vagias, C.; Alexis, M. N., 5α,8α-Epidioxysterols from the gorgonian Eunicella cavolini and the ascidian Trididemnum inarmatum: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity, ***Steroids***, 2009, ***74***, 73–80.

[14] Cateni, F.; Doljak, B.; Zacchigna, M.; Anderluh, M.; Piltaver, A.; Scialinoe, G.; Banfi, E., New biologically active epidioxysterols from *Stereum hirsutum*, ***Bioorg. Med. Chem. Lett.***, 2007, ***17***, 6330–6334.

[15] Marquez, F. D. M.; Robledo, R. S. M.; Martinez, M. A., Antileishmanial epidioxysterols from extracted from extracted sterols of the Colombian marine sponge *Ircinia campana*, ***Porifera research: innovation and substainability***, 2007.

[16] Wang, F.; Fang, Y.; Zhang, M.; Lin, A.; Zhu, T.; Gu, Q.; Zhu, W., Six new ergosterols from the marine-derived fungus *Rhizopus* sp., ***Steroids***, 2008, ***73***, 19–26.

[17] Pan, M.-H.; Huang, Y.-T.; Chang, C.-I.; Ho, C.-T.; SunPan, B., Apoptotic-inducing epidioxysterols identified in hard clam (*Meretrix lusoria*), ***Food Chemistry***, 2007, ***102***, 788–795.

[18] Bourriche, A.; Charrouf, M.; Chaib, N.; Bennamara, A.; Bontemps, N.; Francisco, C., Isolation and bioactivities of epidioxysterol from the tunicate *Cynthia savignyi*, ***Il Farmaco***, 2000, ***55***, 492–494.

[19] Elenkov, T.; Milkova; Andreev, S.; Popov, S., Sterol composition and biosynthesis in the Black Sea sponge *Dysidea fragilis*, ***Comp. Biochem. Physiol.***, 1994, ***107b***, 547–551.

[20] Arreguín-Espinosa, R.; Arreguín, B.; Hernández-Santoyo, A.; Rodriguez-Romero, A., Sterol composition and biosynthesis in the sponge *Spheciospongia vesparia*, ***J. Chem. Biotechnol.***, 1998, ***72***, 245–248.

[21] Jimenez, C.; Quinoa, E.; Castedo, L.; Riguera, R., The dietary origin of epidioxysteroids in *Actinia equine* a carbon-14 incorporation experiment, ***J. Nat. Prod.***, 1989, ***52***, 619–622.

[22] Aknin, M.; Gros, E.; Vacelet, J.; Kashman, Y.; Gauvin-Bialecki, A., Sterols from the Madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp., ***Mar. Drugs***, 2010, ***8***, 2961–2975.

[23] Skyler, D.; Heathcock, C. H., The pyridoacridine family tree: A useful scheme for designing synthesis and predicting undiscovered natural products, ***J. Nat. Prod.***, 2002, ***65***, 1573–1581.

[24] Plubrukarn, A.; Davidson, B. S., Arnoamines A and B, new cytotoxic pentacyclic pyridoacridine alkaloids from the ascidian *Cystodytes* sp, ***J. Org. Chem.***, 1998, ***63***, 1657–1659.

[25] Bontemps, N.; Bry, D.; Lopez-Legentil, S.; Simon-Levert, A.; Long, C.; Banaigs, B., Structures and antimicrobial activities of pyridoacridine alkaloids isolated from different chromotypes of the ascidian *Cystodytes dellechiajei*, ***J. Nat. Prod.***, 2010, ***73***, 1044–1048.

[26] Zeng, C.-M.; Ishibashi, M.; Matsumoto, K.; Nakaike, S.; Kobayashi, J., Two new polycyclic aromatic alkaloids from the okinawan marine sponge *Biemna* sp., ***Tetrahedron***, 1993, ***49***, 8337–8342.

[27] Aoki, S.; Wei, H.; Matsui, K.; Rachmat, R.; Kobayashi, M., Pyridoacridine alkaloids inducing neuronal differentiation in a neuroblastoma cell line, from marine sponge *Biemna fortis*, ***Bioorg. Med. Chem.***, 2003, ***11***, 1969–1973.

[28] Ueoka, R.; Ise, Y.; Okada, S.; Matsunaga, S., Cell differentiation inducers from a marine sponge Biemna sp., ***Tetrahedron***, 2011, ***67***, 6679–6681.

[29] Chevolot, L., *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*; P. J. Scheuer, 1981; Vol. 4 Ch.2 Guanidine derivatives.

[30] Berlinck, R. G. S., Natural guanidine derivatives, ***Nat. Prod. Rep.***, 2002, ***19***, 617–649.

[31] Heys, L.; Moore, C. G.; Murphy, P. J., The guanidine metabolites of Ptilocaulis spiculifer and related compounds; isolation and synthesis, ***Chem. Soc. Rev***, 2000, ***29***, 57–67.

[32] Sorek, H.; Rudi, A.; Gueta, S.; Reyes, F.; Martin, M. J.; Aknin, M.; Gaydou, E.; Vacelet, J.; Kashman, Y., Netamines A-G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*, ***Tetrahedron***, 2006, ***62***, 8838–8843.

[33] Harbour, G. C.; Tymiak, A. A.; Rinehart, K. L.; Shaw, P. D.; Hughes, R. G.; Mizsak, S. A.; Coats, J. H.; Zurenko, G. E.; Li, L. H.; Kuentzel, S. L., Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the caribbean sponge *Ptilocaulis aff. P. spiculifer* (Lamarck, 1814), ***J. Am. Chem. Soc.***, 1981, ***103***, 5604–5606.

[34] Tavares, R.; Daloze, D.; Braekman, J. C.; Hadju, E.; Van Soest, R. W. M., 8b-Hydroxyptilocaulin, a new guanidine alkaloid from the sponge *Monanchora arbuscula*, ***J. Nat. Prod.***, 1995, ***58***, 1139–1142.

[35] Gallimore, W. A.; Kelly, M.; Scheuer, P. J., Alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*, ***J. Nat. Prod.***, 2005, ***68***, 1420–1423.

[36] Kossuga, M. H.; Lira, S. P.; Nascimento, A. M. ; Gambardella, M.T. P. ; Berlinck, R. G. S.; Torres, Y. R.; Nascimento, G. G. F.; Pimenta, E. F., Silva, M., Otávio H. ; Oliva,T. ; Oliva G.; Tempone, A.G. ; Melhem, M.S. C.; De Souza A. O., Galetti ; F. C. S.; Silva ; C. L.; Cavalcanti, B. ; Pessoa, C. O.; Moraes, M. O.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Rocha, R. M., Solamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora Arbuscula, Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*, ***Quim. Nova***, 2007, ***30***, 1194–1202.

[37] Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Offen, P.; Bean, M. F.; Johnson, R. K., Three new tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Batzella* sp., ***J. Nat. Prod.***, 1997, ***60***, 704–707.

[38] Hua, H.; Peng, J.; Fronczek, F. R.; Kelly, M.; Hamann, M. T., Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*, ***Bioorg. Med. Chem.***, 2004, ***12***, 6461–6464.

[39] Barrow, R. A.; Murray, L. M.; Lim, T. K.; Capon, R. J., Mirabilins (A-F): New alkaloids from a southern australian marine sponge, *Arenochalina mirabilis*, ***Aus. J. Chem.***, 1996, ***49***, 767–773.

[40] El-Naggar, M.; Conte, M.; Capon, R. J., Mirabilins revisited: polyketide alkaloids from a southern australian marine sponge, *Clathria* sp., ***Org. Biomol. Chem.***, 2010, ***8***, 407.

[41] Capon, R. J.; Miller, M.; Rooney, F., Mirabilin G: A New alkaloid from a southern australian marine sponge, *Clathria* Species, ***J. Nat. Prod.***, 2001, ***64***, 643–644.

[42] Yu, M.; Pochapsky, S. S.; Snider, B. B., Synthesis of 7-epineoptilocaulin, mirabilin b, and isoptilocaulin. a unified biosynthetic proposal for the ptilocaulin and batzelladine alkaloids. synthesis and structure revision of netamines E and G, ***J. Org. Chem.***, 2008, ***73***, 9065–9074.

[43] Snider, B. B.; Faith, W. C., Total Synthesis of (±)- and (-)-Ptilocaulin, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1984, ***106***, 1443–1445.

[44] Walts, A. E.; Roush, W. R., A stereorational total synthesis of (-)-ptilocaulin, ***Tetrahedron***, 1985, ***41***, 3463–3478.

[45] Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Hitora, Y.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Rissanen, K.; Fujita, M., X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes, ***Nature***, 2013, ***495***, 461–467.

[46] Stephens, P. J.; McCann, D. M.; Devlin, F. J.; Smith, A. B., Determination of the absolute configurations of natural products *via* density functional theory calculations of optical rotation, electronic circular dichroism, and vibrational circular dichroism: the cytotoxic sesquiterpene natural products quadrone, suberosenone, suberosanone, and suberosenol A acetate, ***J. Nat. Prod.***, 2006, ***69***, 1055–1064.

[47] Caccamese, S.; Barrano, G. B.; Alajarin, M.; Bonillo, B.; Vidal, A.; Bruno, G.; Mazzeo, G.; Rosini, C., Determination of the absolute configuration of the enantiomers of dihydroquinolines, isolated by chiral chromatography, by non empirical analysis of circular dichroism spectra and X-ray analysis, ***Tetrahedron: Asymmetry***, 2011, ***22***, 270–276.

[48] Claps, M.; Parrinello, N.; Saa, C.; Varela, J. A.; Caccamese, S.; Rosini, C., Assignment of the absolute configuration of (+)5,5',6,6'-tetrahydro-7,70-spiro[7H-cyclopenta[b]pyridine], a new inherently chiral spiropyridine, by a nonempirical analysis of its circular dichroism spectrum, ***Tetrahedron: Asymmetry***, 2006, ***17***, 1387–1393.

[49] Jacquemin, D.; Perpète, E.; Ciofini, I.; Adamo, C., Assessment of the ωB97 family for excited-state calculations, ***Theor. Chem. Acc.***, 2011, ***128***, 127–136.

[50] Bringmann, G.; Bruhn, T.; Maksimenka, K.; Hemberger, Y., The assignment of absolute stereostructures through quantum chemical circular dichroism calculations, ***Eur. J. Org. Chem***, 2009, 2717–2727.

[51] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Montgomery, Jr., J. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Izmaylov, A. F.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Rendell, A.; Bakken, V., Gaussian 09 Revision B. 01, ***Gaussian, Inc.: Wallingford***, 2010.

[52] Stewart, J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements, ***J. Mol. Model.***, 2007, ***13***, 1173–1213.

[53] Chai, J. D.; Head-Gordon, M., Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections, ***Phys. Chem. Chem. Phys.***, 2008, ***10***, 6615–6620.

[54] Minenkov, Y.; Singstad, A.; Occhipinti, G.; Jensen, V. R., The accuracy of DFT-optimized geometries of functional transition metal compounds: a validation study of catalysts for olefin metathesis and other reactions in the homogeneous phase, ***Dalton Trans.***, 2012, ***41***, 5526–5541.

[55] Jacquemin, D.; Brémond, E.; Planchat, A.; Ciofini, I.; Adamo, C., TD-DFT vibronic couplings in anthrquinones: from basis set and functional benchmarks to application for industrial dyes, ***J. Chem. Theory Comput.***, 2011, ***7***, 1882–1892.

[56] Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G., Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tension, ***J. Phys. Chem. B.***, 2009, ***113***, 6378–6396.

[57] Alecu, I. M.; Zheng, J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G., Computational thermochemistry: scale factor databases and scale factors for vibrational frequencies obtained from electronic model chemistries, ***J. Chem. Theory Comput.***, 2010, ***6***, 2872–2887.

[58] Stephens, P. J.; Harada, N., ECD cotton effect approximated by the gaussian curve and other methods, ***Chirality***, 2010, ***22***, 229–233.

[59] Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C., A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP), ***Chem. Phys. Lett.***, 2004, ***393***, 51–57.

[60] Laurent, A. D.; Jacquemin, D., TD-DFT benchmarks: a review, ***Int. J. Quantum Chem.***, 2013, ***113***, 2019–2039.

[61] Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Taylor, P. B.; Carté, B.; Zuber, G.; Johnson, R. K.; Faulkner, D. J., Batzelldines F-I, novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inducers of p56lck-CD4 dissociation, ***J. Org. Chem.***, 1997, ***62***, 1814–1819.

[62] Berlinck, R. G. .; Braekman, J. C.; Daloze, D.; Bruno, I.; Riccio, R.; Rogeau, D.; Amade, P., Crambidines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*, ***J. Nat. Prod.***, 1992, ***55***, 528–532.

[63] Jares-Erijman, E. A.; Ingrum, A. L.; Sun, F.; Rinehart, K. L., On the structures of crambescidins B and C1, ***J. Nat. Prod.***, 1993, ***56***, 2186–2188.

[64] Chang, L.; Whittaker, N.; Bewley, C. A., Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: New polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. That inhibit HIV-1 fusion, ***J. Nat. Prod.***, 2003, ***66***, 1490–1494.

[65] Patil, A.; Kumar, N. V.; Kokke, W. C.; Bean, M. F.; Freyer, A. J.; De Brosse, C.; Mai, S.; Truneh, A.; Faulkner, D. J.; Carte, B.; Breen, A. L.; Hertzberg, R. P.; Johnson, R. K.; Westley, J. W.; Potts, B. C. M., Novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding, ***J. Org. Chem.***, 1995, ***60***, 1182–1188.

[66] Snider, B. B.; Busuyek, M. V., Revision of the stereochemistry of Batzelldine F. Approaches to the tricyclic hydroxyguanidine moiety of batzelldines G, H, and I, ***J. Nat. Prod.***, 1999, ***62***, 1707–1711.

[67] Hua, H.-M.; Peng, J.; Dunbar, D. C.; Schinazi, R. F.; Andrews, A. G. de C.; Cuevas, C.; Garcia-Fernandez, L. F.; Kelly, M.; Hamann, M. T., Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens, ***Tetrahedron***, 2007, ***63***, 11179–11188.

[68] Braekman, J. C.; Daloze, D.; Tavares, R.; Hadju, E.; Van Soest, R. W. M., Novel polycyclic guanidine alkaloids from two marine sponges of the genus *Monanchora*, ***J. Nat.Prod.***, 2000, ***63***, 193–196.

[69] Takishima, S.; Ishiyama, A.; Iwatsuki, M.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Omura, S.; Kobayashi, H.; VanSoest, R. W. M.; Matsunaga, S., Merobatzelladines A and B, anti-infective tricyclic guanidines from a marine sponge Monanchora sp., ***Org. Lett.***, 2009, ***11***, 2655–2658.

[70] Kashman, Y.; Hirsh, S.; McConnell, O. J.; Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kakisawa, H., Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1989, ***111***, 8925–8926.

[71] Jares-Erijman, E. A.; Sakai, R.; Rinehart, K. L., Crambescidins: New Antiviral and Cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*, ***J. Org. Chem.***, 1991, ***56***, 5712–5715.

[72] Jares-Erijman, E. A.; Ingrum, A. L.; Carney, J. R.; Rinehart, K. L.; Sakai, R., Polycyclic guanidine-containing compounds from the mediterranean sponge *Crambe crambe*: the structure of 13,14,15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins, ***J. Org. Chem.***, 1993, ***58***, 4805–4808.

[73] Berlinck, R. G. .; Braekman, J. C.; Daloze, D.; Bruno, I.; Riccio, R.; Ferri, S.; Spampinato, S.; Speroni, E., Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca++ channel blocker activity of the crambescidin 816, ***J. Nat. Prod.***, 1993, ***56***, 1007–1015.

[74] Rinehart, K. L.; Shi, J.-G.; Sun, F., U.S. Patent 6,028,077, 2000.

[75] Tavares, R.; Daloze, D.; Braekman, J. C.; Hadju, E.; Muricy, G.; Van Soest, R. W. M., Isolation of crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera), ***Biochem. Syst. Ecol.***, 1994, ***22***, 645–646.

[76] Bensemhoum, J.; Bombarda, I.; Aknin, M.; Vacelet, J.; Gaydou, E., Ptilomycalin D, a polycylic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora*, ***J. Nat. Prod.***, 2007, ***70***, 2033–2035.

[77] Guzii, A. G.; Makarieva, T. N.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Kuzmich, A. S.; Dyshlovoy, S. A.; Krasokhin, V. B.; Stronik, V. A., Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra*, ***Org. Lett.***, 2010, ***12***, 4292–4295.

[78] Makarieva, T. N.; Tabakmaher, K. M.; Guzii, A. G.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Shubina, L. K.; Kuzmich, A. S.; Lee, H.-S.; Stonik, V. A., Monanchocidins B-E: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra*, ***J. Nat. Prod.***, 2011, ***74***, 1952–1958.

[79] Palagiano, E.; De Marino, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Zollo, F., Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani*, ***Tetrahedron***, 1995, ***51***, 3675–3682.

[80] Snider, B. B.; Faith, W. C., The total synthesis of (±)-ptilocaulin, ***Tetrahedron Lett.***, 1983, ***24***, 861–864.

[81] Roush, W. R.; Walts, A. E., Total synthesis of (-)-ptilocaulin, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1984, ***106***, 721–723.

[82] Uyehara, T.; Furuta, T.; Kabawawa, Y.; Yamada, J.-i.; Kato, T.; Yamamoto, Y., Total synthesis of (±)-ptilocauline on the basis of formal bridgehead substitution and photochemical [1,3] acyl migration of a bicycle[3.2.2]non-6-en-2-one system, ***J. Org. Chem.***, 1988, ***53***, 3669–3673.

[83] Uyehara, T.; Furuta, T.; Kabasawa, Y.; Yamada, J.-i; Kato, T., Total synthesis of (±)-ptilocaulin starting from tropolone, ***Chem.Commun.***, 1986, 539–540.

[84] Asaoka, M.; Sakurai, M.; Takei, H., Total synthesis of (+)-ptilocaulin, ***Tetrahedron Lett.***, 1990, ***31***, 4759–4760.

[85] Cossy, J.; BouzBouz, S. A, A short access to (+)-ptilocaulin, ***Tetrahedron Lett.***, 1996, ***37***, 5091–5094.

[86] Schellhaas, K.; Schmalz, H.-G.; Bats, J. W., Chiral[n^6-arène-Cr(CO)$_3$]complexe as synthetic building blocks: a short enantioselective total synthesis of (+)-ptilocaulin, ***Chem. Eur. J.***, 1998, ***4***, 57–66.

[87] Hassner, A.; Murthy, K. S. K., Stereoselective synthesis of ptilocaulin and its 7-epimer, ***Tetrahedron Lett.***, 1986, ***27***, 1407–1410.

[88] Snider, B. B.; Chen, J.; Patil, A. D.; Freyer, A. J., Synthesis of the tricyclic portions of batzelladines A, B and D. revision of the stereochemistry of batzelladines A and D, ***Tetrahedron Lett.***, 1996, ***37***, 6977–6980.

[89] Black, G. P.; Murphy, P. J.; Walshe, N. D. A.; Hibbs, D. E.; Hursthouse, M. B.; Malik, K. M. A., A short synthetic route to the tricyclic guanidinium core of the batzelladine alkaloids, ***Tetrahedron Lett.***, 1996, ***37***, 6943–6946.

[90] Elliott, M. C.; Long, M. S., Studies towards the total synthesis of batzelladine A: synthesis of model pyrrolo[1,2-c]pyrimidine, ***Tetrahedron Lett.***, 2002, ***43***, 9191–9194.

[91] Black, G. P.; Murphy, P. J.; Walshe, N. D. A., A short synthetic route to the tricyclic guanidinium core of the batzelladine alkaloids, ***Tetrahedron***, 1998, ***54***, 9481–9488.

[92] Black, G. P.; Murphy, P. J.; Thornhill,, A. J.; Walshe, N. D. A.; Zanetti, C., Synthesis of the left hand unit of batzelladine F; revision of the reported relative stereochemistry, ***Tetrahedron***, 1999, ***55***, 6547–6554.

[93] Snider, B. B.; Shi, Z., Biomimetic synthesis of the central tricyclic portion of ptilomycalin A, ***Tetrahedron Lett.***, 1993, ***34***, 2099–2102.

[94] Snider, B. B.; Chen, J., Synthesis of batzelladine E and its E isomer, ***Tetrahedron Lett.***, 1998, ***39***, 5697–5700.

[95] Ahmed, N.; Brahmbhatt, K. G.; Singh, I. P.; Bhutani, K. K., Total synthesis of (±)-batzelladine K: A biomimetic approach, ***Synthesis***, 2010, ***15***, 2567–2570.

[96] Arnold, M. A.; Day, K. A.; Duron, S. G.; Gin, D. Y., Total synthesis of (+)-batzelladine A and (-)-batzelladine D *via* [4+2]-annulation of vinyl carbodiimides with *N*-alkyl imines, ***J. Am. Chem. Soc.***, 2006, ***128***, 13255–13260.

[97] Cohen, F.; Overman, L. E., Enantioselective total synthesis of the batzelladine F and definition of this structure, ***J. Am. Chem. Soc.***, 2006, ***128***, 2604–2608.

[98] Cohen, F.; Overman, L. E., Evolution of a strategy for the synthesis of structurally complex batzelladine alkaloids. Enantioselective total synthesis of the proposed structure of batzelladine F and structural revision, ***J. Am. Chem. Soc.***, 2006, ***128***, 2594–2603.

[99] Collins, S. K.; McDonald, A.; Overman, L. E.; Rhee, Y. H., Enantioselective total synthesis of (-)-dehydrobatzelladine C, ***Org. Lett.***, 2004, ***6***, 1253–1255.

[100] Nagasawa, K.; Georgieva, A.; Koshino, H.; Nakata, T.; Kita, T.; Hashimoto, Y., Total synthesis of crambescidin 359, ***Org. Lett.***, 2002, ***4***, 177–180.

[101] Bradley, P. A.; Dack, K. N.; Marsh, I. R., 11/408 286, April 2006.

[102] Ohta, S.; Tsujimura, A.; Okamoto, M., Use of β-ketocarboxylic Acids for syntheses of 6-substituted 4-hydroxy-2-pyrones and acyclic β-diketones, ***Chem. Pharm. Bull.***, 1981, ***29***, 2762–2768.

[103] Mueller, R.; Yang, J.; Duan, C.; Pop, E.; Zhang, L. H.; Huang, T.-B.; Denisenko, A.; Denisko, O. V.; Oniciu, D. C.; Bisgaier, C. L.; Pape, M. E.; Freiman, C. D.; Goetz, B.; Cramer, C. T.; Hopson, K. L.; Dasseux, J.-L. H., Long hydrocarbon chain ether diols and ether diacids that favorably alter lipid disorders *in vivo*, ***J. Med. Chem.***, 2004, ***47***, 5183–5197.

[104] Stoll, A.; Jucker, E.; Lindenmann, A., Über Synthesen von Tropan- und 6-Alkoxy-tropan-Derivaten mit aromatischen bzw. heterozyklischen Substituenten am Stickstoff-Atom, ***Helv. Chim. Acta***, 1954, 649.

[105] Schöpf, C.; Lehmann, G., Die Synthese des Tropinons, Pseudopelletierins, Lobelanins und verwandter Alkaloide unter physiologischen Bedingungen, ***Justus Liebigs: Annalen der Chemie***, 1985, ***518***, 1–37.

[106] Robinson, R., LXIII.- A synthesis of tropinone, ***J. Chem. Soc., Trans.***, 1917, ***111***, 762–768.

[107] Fajgelli, S.; Stanovnik, B.; Tisler, M., Transformations of N-heteroarylformamidines. a novel synthesis of imidazo[2,1-b]thiazole and imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives, ***Heterocycles,*** 1986, 379–386.

[108] Biel, J. H.; Drukker, A. E.; Mitchell, T. F.; Sprengeler, E. P.; Nuhfer, P. A.; Conway, A. C.; Horita, A., Central Stimulants. Chemistry and Structure-Activity Relationships of Aralkyl Hydrazines, ***Aralkyl hydrazines: Structure-reactivity relationships***, 1959, 2805–2814.

[109] Mattson, R. J.; Pham, K. M.; Leuck, D. J.; Cowen, K. A., An improved method for reductive alkylation of amines using titanium (IV) isopropoxide and sodium cyanoborohydride, ***J. Org. Chem.***, 1990, ***55***, 2554–2558.

Listes des figures, tableaux, schémas et annexes

Liste des figures

Figure 1 : Squelette de base des stérols. 23
Figure 2 : Squelettes des alcaloïdes marins pyrido[2,3,4-kl]acridine. 25
Figure 3 : Squelette des hétérocycles (5,6,8b)-triazaperhydroacénaphtylène tricycliques. 30
Figure 4 : Numérotations rencontrées dans la bibliographie pour les ptilocaulines /mirabilines /nétamines. 33
Figure 5 : Récapitulatif des alcaloïdes guanidiniques tricycliques naturels : ptilocaulines/mirabilines/ nétamines. 35
Figure 6 : Zone de collecte des huit éponges étudiées (Crédit Google Map). 37
Figure 7 : Comparaison des profils CLHP-DEDL des huit éponges sélectionnées. 40
Figure 8 : Comparaison des spectres RMN ^{1}H des huit éponges sélectionnées. 41
Figure 9 : Photographie *in situ* de *Biemna laboutei.* 43
Figure 10 : Extraction et premier fractionnement de *Biemna laboutei.* 44
Figure 11 : Profil CLHP-DEDL de la fraction méthanolique F4 de *Biemna laboutei.* 44
Figure 12 : Profil CLHP-PAD (254 nm) optimisé de la fraction méthanolique de *Biemna laboutei.* 45
Figure 13 : Traitement de la fraction méthanolique F4 pour l'obtention de la mirabiline F et des nétamines K, L, M, N, O, P, R et S. 45
Figure 14 : Traitement de la fraction méthanolique F4 pour l'obtention des mirabilines A et C et des nétamines G, H, I et J. 46
Figure 15 : Traitement de la fraction méthanolique pour l'obtention de la mirabiline J et des nétamines E et Q. 47
Figure 16 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau aromatique type pyrimidine. 48
Figure 17 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques pyrimidiniques. 49
Figure 18 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine H (57). 54
Figure 19 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine I (58). 57
Figure 20 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine J (59). 59
Figure 21 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$. 60
Figure 22 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8,8a}$. 60
Figure 23 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine K (60). 63
Figure 24 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine L (61) 65
Figure 25 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine M (62). 67
Figure 26 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine N (63). 69
Figure 27 : Squelette des alcaloïdes guanidiniques à noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$. 71
Figure 28 : Spectres UV des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a,8b}$. 71
Figure 29 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine O (64). 75
Figure 30 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine P (65). 77
Figure 31 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine Q (66). 79
Figure 32 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine R (67). 81
Figure 33 : Corrélations RMN 2D clés de la nétamine S (68). 84
Figure 34 : Molécules isolées de *Biemna laboutei*, classées en fonction de l'insaturation de leur système tricyclique. 85
Figure 35 : Structure de la nétamine I (58) proposée par RMN. 92
Figure 36 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la molécule nétamine I (58). 95

Figure 37 : Spectre UV théorique de la nétamine I (58) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,487 eV. 95
Figure 38 : Spectre UV expérimental de la nétamine I (58). 96
Figure 39 : Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine I (58). 96
Figure 40 : Orbitales moléculaires principalement impliquée dans le spectre UV du conformère le plus stable de la nétamine I (58). 97
Figure 41 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*R* de la nétamine I (58). 97
Figure 42 : Enantiomères (5a*S*, 7*R*, 8*R)* et (5a*R*, 7*S*, 8*S*) de la nétamine I (58). 98
Figure 43 : Spectres théoriques de DCE des énantiomères de la nétamine I (58). 98
Figure 44 : Spectre de DCE expérimental de la nétamine I (58). 99
Figure 45 : Configuration absolue de la nétamine I (58). 100
Figure 46 : Structure de la nétamine J (59) proposée par RMN. 100
Figure 47 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine J (59). 102
Figure 48 : Spectre UV théorique de la nétamine J (59). 102
Figure 49 : Spectre expérimental de la nétamine J (59). 103
Figure 50 : Spectre UV théorique et transition électronique du conformère le plus stable de la nétamine J (59). 103
Figure 51 : Orbitales moléculaires principalement impliquées dans le spectre UV. 104
Figure 52 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère (5a*S*, 7*R*, 8*S)* de la nétamine J (59). 104
Figure 53 : Enantiomères (5a*S*, 7*R*, 8*S*) et (5a*R*, 7*S*, 8*R*) de la nétamine J (59). 105
Figure 54 : Spectres théoriques de DCE des deux énantiomères de la nétamine J (59). 105
Figure 55 : Spectre de DCE expérimental de la nétamine J (59). 105
Figure 56 : Configuration absolue de la nétamine J (59). 106
Figure 57 : Zone d'échantillonnage de *Biemna laboutei* (crédits Google map). 111
Figure 58 : Profils CLHP- DEDL des extraits bruts de *Biemna laboutei* de Madagascar. 113
Figure 59 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques bicycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida. 114
Figure 60 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida. 115
Figure 61 : Exemples d'alcaloïdes guanidiniques pentacycliques isolées d'éponges de l'ordre des Poecilosclerida. 117
Figure 62 : Phylogénie des éponges contenant des alcaloïdes guanidiniques polycycliques. 118
Figure 63 : Molécules pures testées pour leurs activités biologiques. 119
Figure 64 : Cytotoxicité des extraits bruts des huit éponges étudiées : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB. 120
Figure 65 : Activité antiplasmodique des extraits bruts des huit éponges étudiées : inhibition de la croissance de *P. falciparum*. 125
Figure 66 : Activité antiplasmodique des extraits bruts des huit éponges étudiées : concentration inhibant 50% de la croissance de *P. falciparum.* 125

Liste des tableaux

Tableau I : Stérols isolés d'éponges du genre *Biemna*. 24

Tableau II : Alcaloïdes pyroacridiniques isolés d'éponges du genre *Biemna*. 27

Tableau III : Nétamines A-G isolées de *Biemna laboutei*. 29

Tableau IV : Alcaloïdes guanidiniques tricycliques isolés d'éponges, similaires aux nétamines. 31

Tableau V : Liste des huit éponges sélectionnées pour l'étude de leur composition chimique. 38

Tableau VI : Nombre de publications en fonction de chaque genre d'éponges à étudier. 42

Tableau VII : Déplacements chimiques ^{13}C caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques pyrimidiniques dans MeOD. 49

Tableau VIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline A *N*-acétylée de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [39] à ceux de la mirabiline A (46) libre isolée (500 MHz, $CDCl_3$). 50

Tableau IX : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline C (48) de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [40] et à ceux observés (500 MHz, $CDCl_3$). 51

Tableau X : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la nétamine G de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) et ceux observés pour (38) (500 MHz, $CDCl_3$). 52

Tableau XI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine H (57) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 55

Tableau XII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine I (58) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 57

Tableau XIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine J (59) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 59

Tableau XIV : Déplacements chimiques ^{13}C caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ dans MeOD. 60

Tableau XV : Déplacements chimiques 1H caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques à noyau insaturé en $\Delta^{8,8a}$ dans MeOD. 61

Tableau XVI : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline F de la littérature (600 MHz, $CDCl_3$) [40] à ceux observés (51) (500 MHz, $CDCl_3$). 62

Tableau XVII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine K (60) enregistrées dans MeOD à 600 MHz. 64

Tableau XVIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine L (61) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 66

Tableau XIX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine M (62) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 68

Tableau XX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine N (63) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 70

Tableau XXI : Prédiction ACD des déplacements chimiques liés aux atomes de la nétamine N (63). 70

Tableau XXII : Déplacements chimiques des carbones caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a,8b}$. 72

Tableau XXIII : Déplacements chimiques des protons caractéristiques des alcaloïdes guanidiniques tricycliques insaturés en $\Delta^{8a,8b}$. 72

Tableau XXIV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la mirabiline J de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) [40] à ceux observés (55) (600 MHz, $CDCl_3$). 73

Tableau XXV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la nétamine E de la littérature (500 MHz, MeOD) [32] à ceux observés (500 MHz, MeOD). 74

Tableau XXVI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine O (64) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 76
Tableau XXVII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine P (65) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 78
Tableau XXVIII : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine Q (66) enregistrées dans MeOD à 600 MHz. 80
Tableau XXIX : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine R (67) enregistré dans MeOD à 500 MHz. 82
Tableau XXX : Comparaison des déplacements chimiques des protons méthiniques des nétamines E (36), O-R (64-67) à noyau insaturé en $\Delta^{8a,8b}$ 82
Tableau XXXI : Données de la RMN 1D et 2D pour la nétamine S (68) enregistrées dans MeOD à 500 MHz. 84
Tableau XXXII : Conformères les plus stables de la nétamine I (58) 94
Tableau XXXIII : Effets Cotton expérimentaux et calculés (énantiomère (5a*S*, 7*R*, 8*R*)) de la nétamine I (58). 99
Tableau XXXIV : Conformères stables de la nétamine J (59). 101
Tableau XXXV : Effets Cotton expérimentaux et calculés (énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*S*) 106
Tableau XXXVI : Date et lieu de collecte des six spécimens de *Biemna laboutei* étudiés. 111
Tableau XXXVII : Cytotoxicité des nétamines M, N, O et Q. 121
Tableau XXXVIII : Interprétation des résultats du test antiplasmodique. 125
Tableau XXXIX : Activité anti-*plasmodium* des molécules isolées de *Biemna laboutei.* 126
Tableau XL : Motifs polycétidiques précurseurs des alcaloïdes guanidiniques tricycliques 132
Tableau XLI : Différentes conditions opératoires appliquées en vue d'améliorer le rendement de la synthèse de la cétone α,β-insaturée dimérique. 144
Tableau XLII : Conditions opératoires appliquées pour l'amélioration du rendement du dérivé pyrrolidinique 172. 148
Tableau XLIII : Bilan des extractions 163

Liste des schémas

Schéma 1 : Hydrogénation de la nétamine H (57) en nétamine A (32). 55
Schéma 2 : Oxydation de la nétamine P (65) en nétamine H (57). 86
Schéma 3 : Oxydation de la nétamine O (64) en mirabiline A (46). 87
Schéma 4 : Première hypothèse de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposée par Yu et collaborateurs [42]. 130
Schéma 5 : Deuxième voie de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposée par Yu et collaborateurs [42]. 131
Schéma 6 : Voies de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques tricycliques proposées par El-Naggar et collaborateurs [40]. 133
Schéma 7 : Voie de synthèse de la ptilocauline (39) selon Snider et collaborateurs [43, 80]. 134
Schéma 8 : Voie de synthèse de la ptilocauline (39) proposée par Roush et collaborateurs [44, 81]. 134
Schéma 9 : Voie de synthèse de la 7-épiptilocauline proposée par Hassner et collaborateurs [87]. 135
Schéma 10 : Voie de synthèse de la 7-épinéoptilocauline (42) et de la mirabiline B (47) selon Yu et collaborateurs [42]. 136
Schéma 11 : Voie de synthèse du motif batzelladine selon Snider et collaborateurs [93]. 137
Schéma 12 : Voie de synthèse du motif batzelladine selon Black et collaborateurs [91]. 138
Schéma 13 : Schéma général des voies de synthèse envisagées menant au précurseur et au noyau polycylique. 139
Schéma 14 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de guanidine sur une dicétone α,β-insaturée. 139
Schéma 15 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine. 139
Schéma 16 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine. 140
Schéma 17 : Schéma rétrosynthétique de la dicétone *α,β*-insaturée. 140
Schéma 18 : Accès à l'acide acétoacétique selon Bradley et collaborateurs [101]. 141
Schéma 19 : Accès à l'acide acétoacétique selon Ohta et collaborateurs [102]. 141
Schéma 20 : Dégradation de l'acide acétoacétique par décarboxylation. 141
Schéma 21 : Accès au succinaldéhyde selon Mueller et collaborateurs [103]. 142
Schéma 22 : Voie de synthèse d'une cétone α,β-insaturée dimérique : première méthode. 143
Schéma 23: Mécanisme proposé pour l'obtention d'une cétone α,β-insaturée dimérique par addition de l'acide acétoacétique sur le 2,5-diméthoxyTHF 143
Schéma 24 : Voie de synthèse d'une cétone α,β-insaturée dimérique : deuxième méthode 145
Schéma 25 : Tentative de formation du squelette tricyclique des batzelladines par addition de la guanidine sur une cétone α,β-insaturée dimérique. 145
Schéma 26 : Schéma rétrosynthétique du motif batzelladine *via* l'addition de cyanamide sur un dérivé de la pyrrolidine. 146
Schéma 27 : Voie de synthèse de la tropinone et de ses dérivés selon Schöpf et collaborateurs [105]. 146
Schéma 28 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique 155. 147
Schéma 29 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique 172. 147
Schéma 30 : Hydrogénolyse du dérivé pyrrolidinique du produit 155. 148
Schéma 31 : Voie de synthèse du composé 174. 149
Schéma 32 : Voie de synthèse du dérivé pyrrolidinique 157. 149
Schéma 33 : Mécanisme proposé pour la synthèse du composé 157. 150
Schéma 34 : Formation du noyau tricyclique des batzelladines par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine : première méthode. 151
Schéma 35 : Formation du noyau tricyclique des batzelladines par réduction d'un dérivé de la pyrrolidine : deuxième méthode. 152

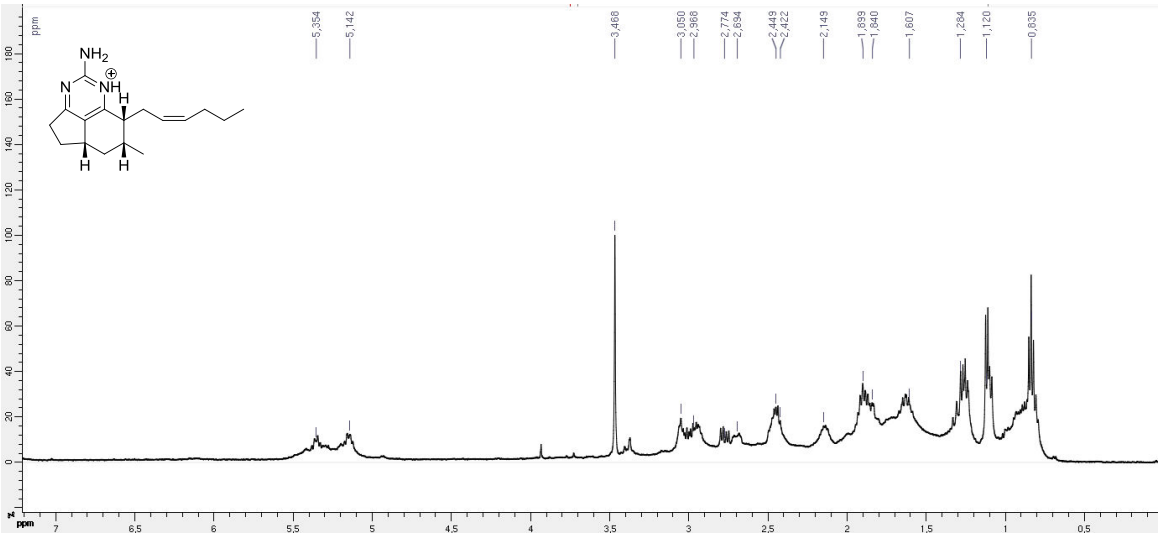
Liste des annexes

Annexe 1 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline A. 199
Annexe 2 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) de la mirabiline A. 199
Annexe 3 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline C. 200
Annexe 4 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la mirabiline C. 200
Annexe 5 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline F. 201
Annexe 6 : Spectre RMN ^{1}H(500 MHz, MeOD) de la nétamine E. 201
Annexe 7 : Spectre RMN ^{1}H(500 MHz, MeOD) de la nétamine G. 202
Annexe 8 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) de la nétamine H. 202
Annexe 9 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine H. 203
Annexe 10 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine H. 203
Annexe 11 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine I. 204
Annexe 12 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine I. 204
Annexe 13 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD) de la nétamine I. 205
Annexe 14 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine J. 205
Annexe 15 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine J. 206
Annexe 16 : Spectre RMN^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine J. 206
Annexe 17 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine K. 207
Annexe 18 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine K. 207
Annexe 19 : Spectre RMN ^{13}C (600 MHz, MeOD) de la nétamine K. 208
Annexe 20 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine L. 208
Annexe 21 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine L. 209
Annexe 22 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de la nétamine L. 209
Annexe 23 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine M. 210
Annexe 24 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine M. 210
Annexe 25 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD) de la nétamine M. 211
Annexe 26 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine N. 211
Annexe 27 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine N. 212
Annexe 28 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de la nétamine N. 212
Annexe 29 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine O. 213
Annexe 30 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine O. 213
Annexe 31 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) de la nétamine O 214
Annexe 32 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine P. 214
Annexe 33 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine P 215
Annexe 34 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 600 MHz) de la nétamine P 215
Annexe 35 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 600 MHz) de la nétamine Q 216
Annexe 36 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 600 MHz) de la nétamine Q 216
Annexe 37 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine R 217
Annexe 38 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine R 217
Annexe 39: Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 300 MHz) de la nétamine R 218
Annexe 40 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine S 218
Annexe 41 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) de la nétamine S. 219

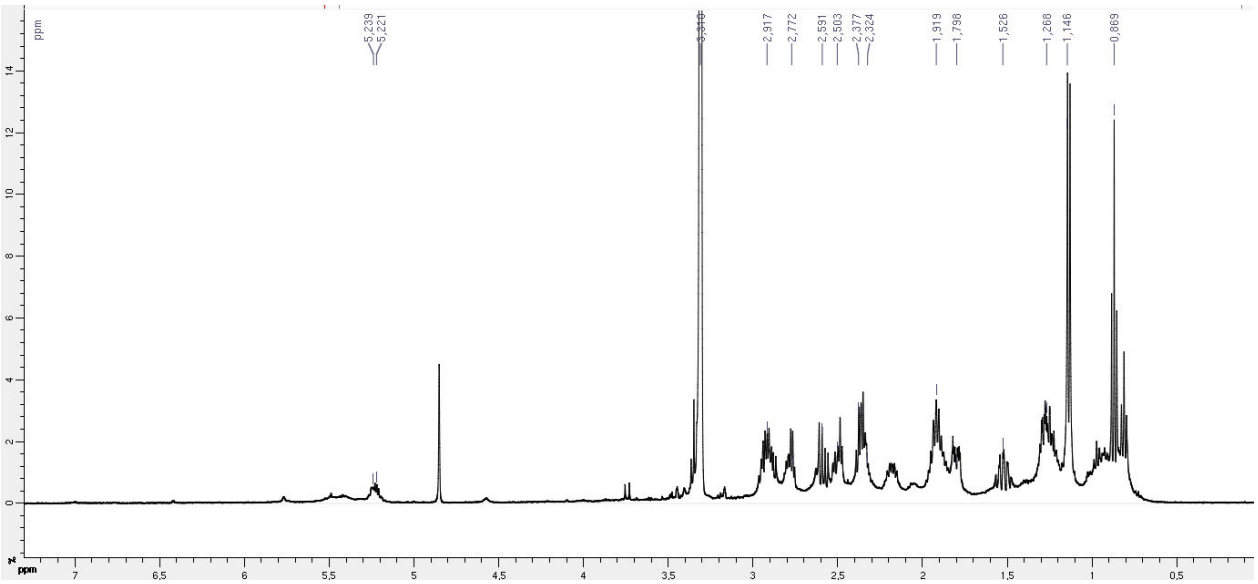
Annexes

Mirabiline A (46)

Annexe 1 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline A.

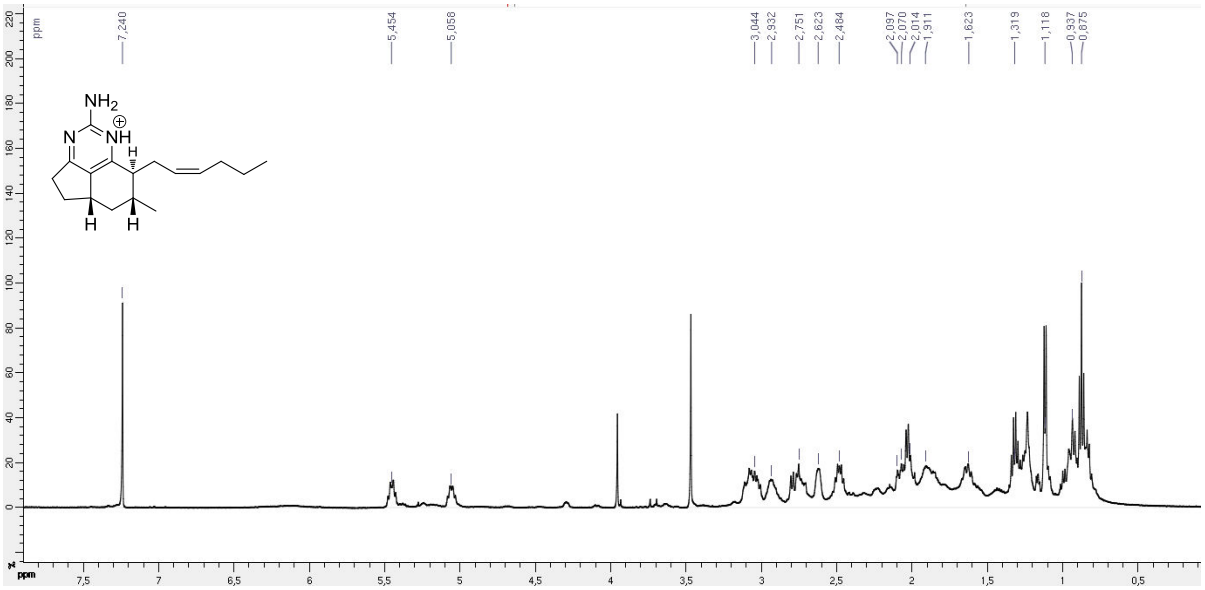


Annexe 2 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) de la mirabiline A.

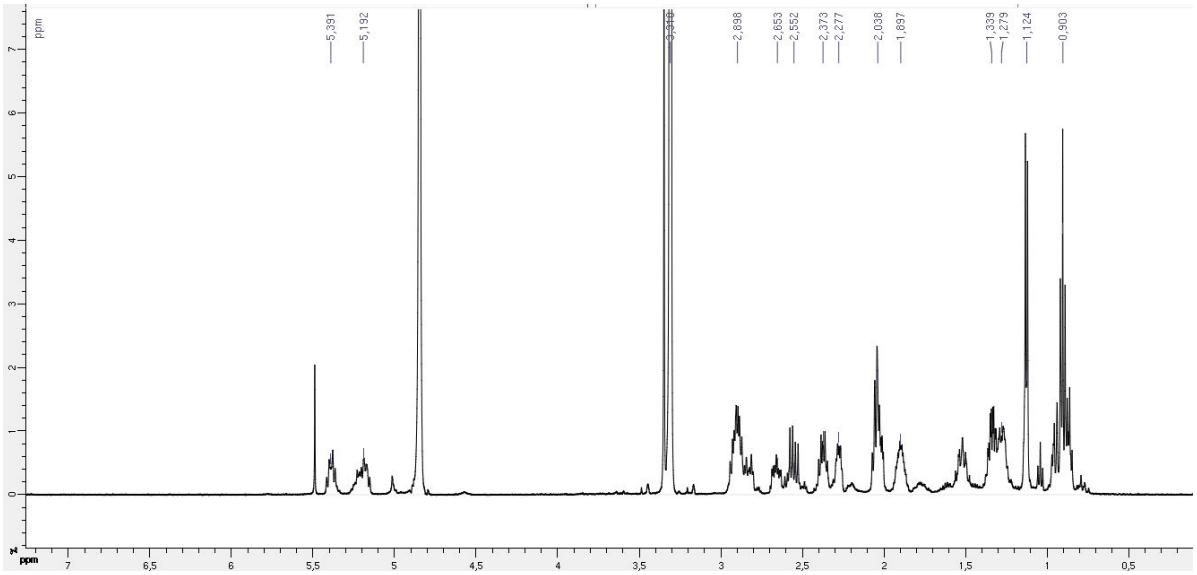


Mirabiline C (48)

Annexe 3 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline C.

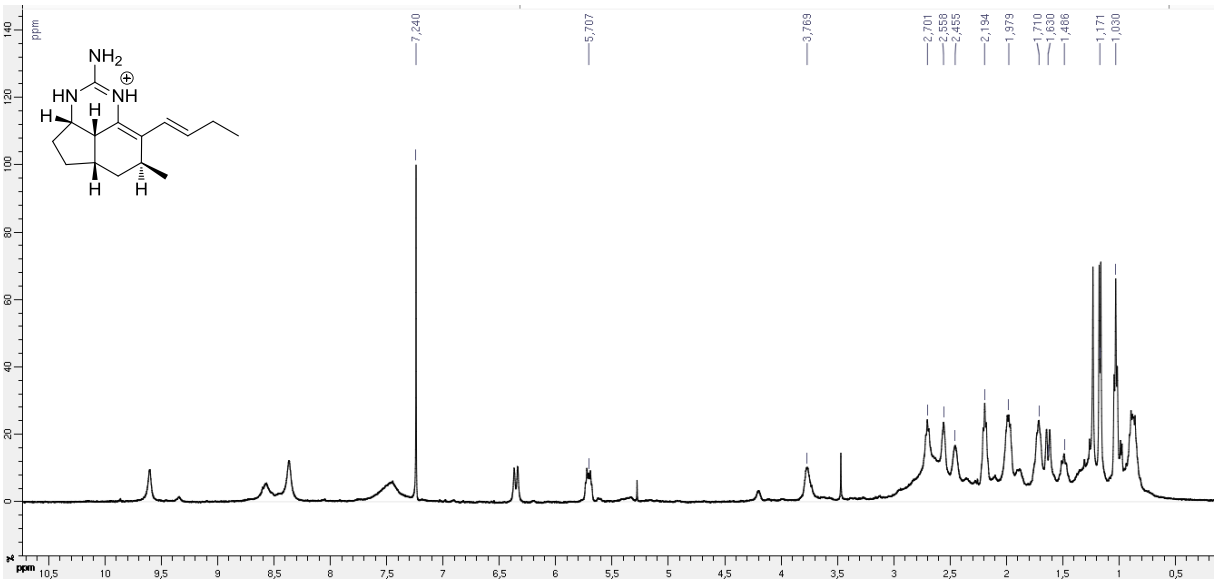


Annexe 4 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la mirabiline C.



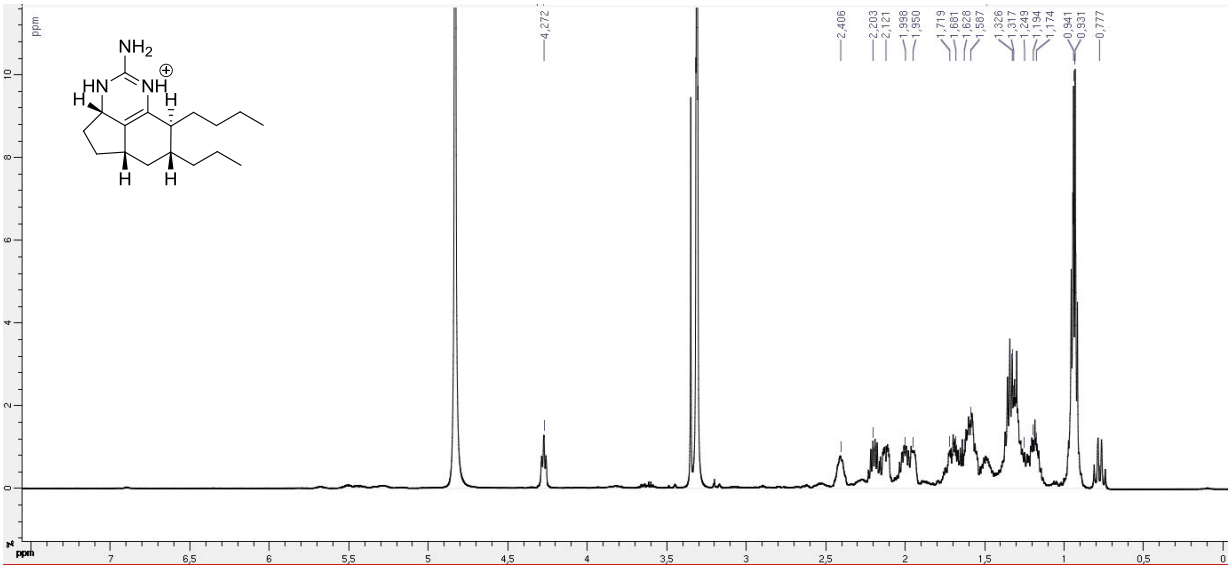
Mirabiline F (51)

Annexe 5 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la mirabiline F.



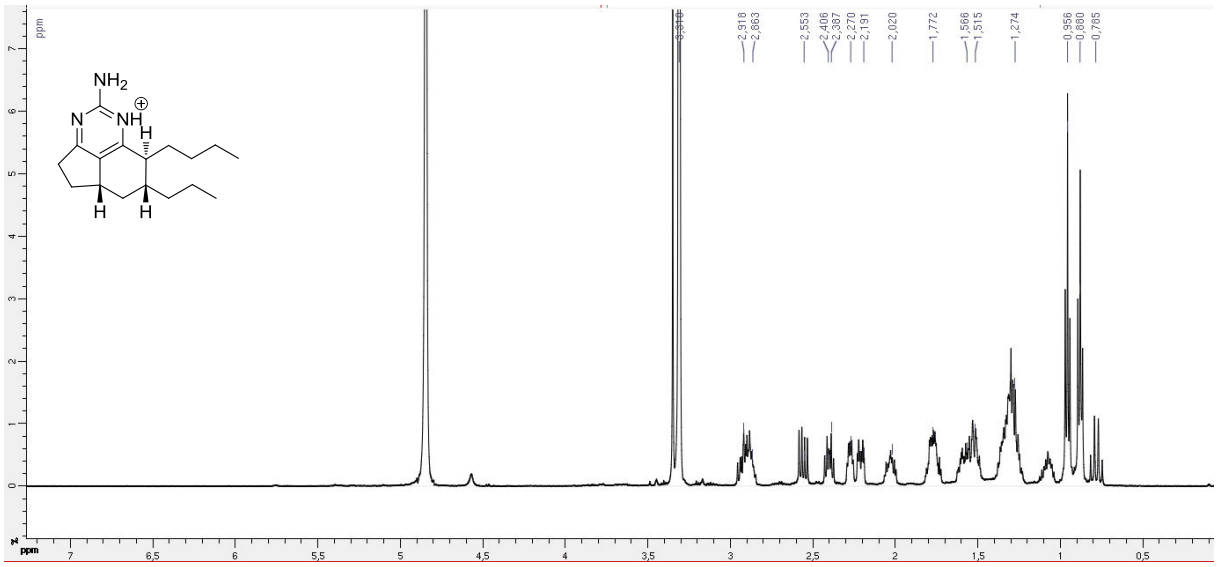
Nétamine E (36)

Annexe 6 : Spectre RMN ^{1}H(500 MHz, MeOD) de la nétamine E.



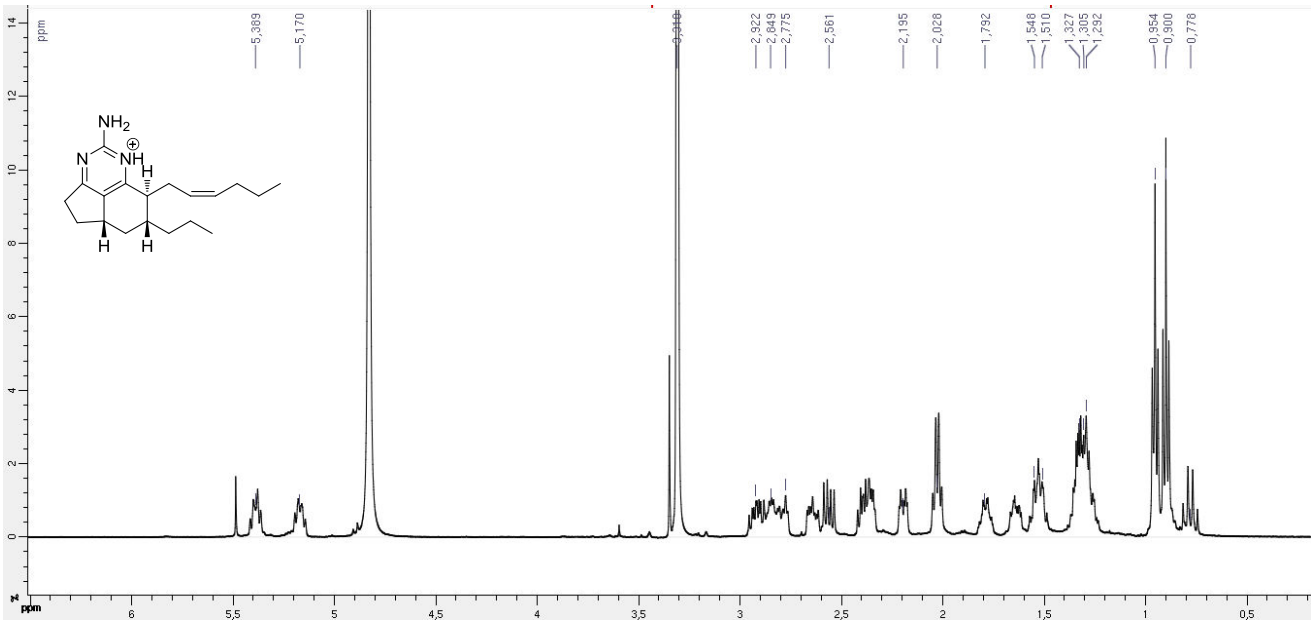
Nétamine G (38)

Annexe 7 : Spectre RMN ^{1}H(500 MHz, MeOD) de la nétamine G.

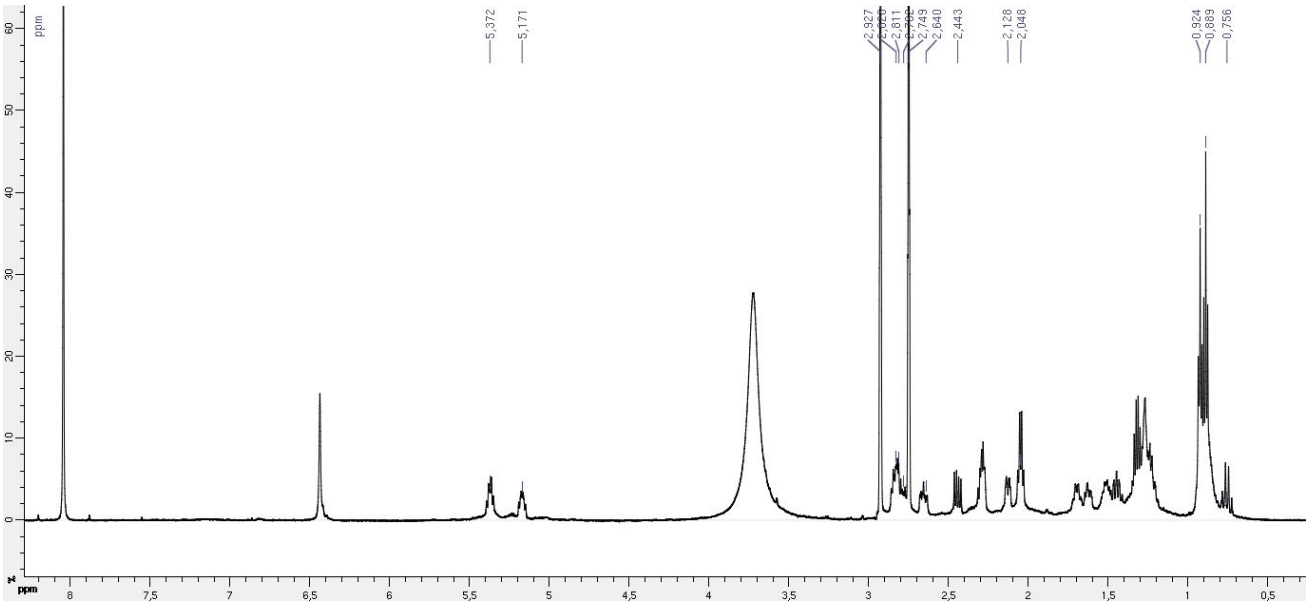


Netamine H (57)

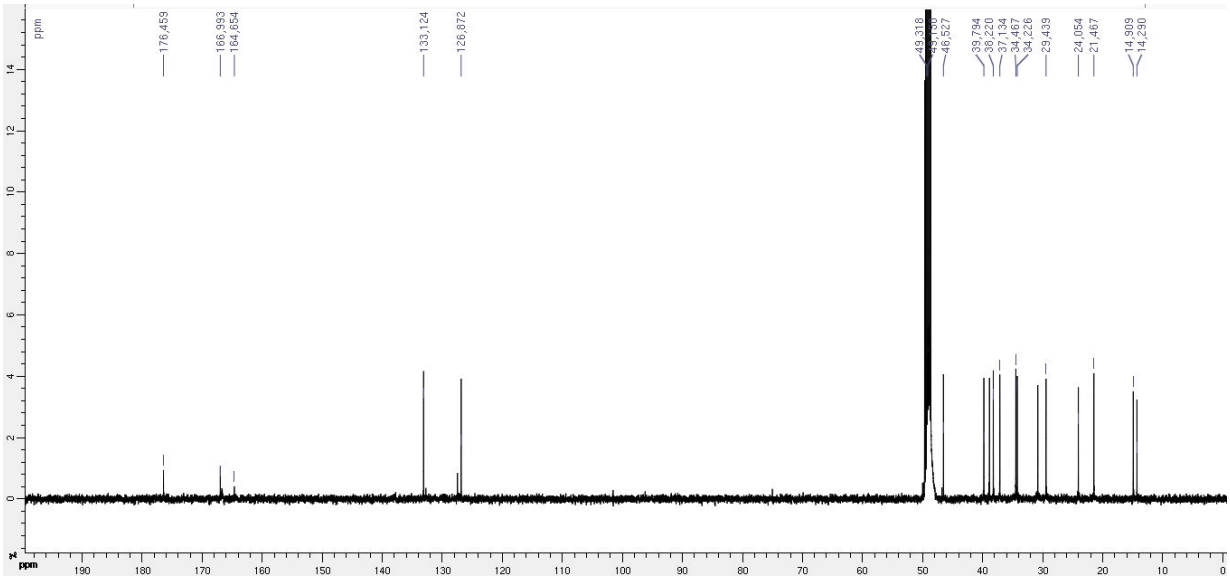
Annexe 8 : Spectre RMN ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) de la nétamine H.



Annexe 9: Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine H.

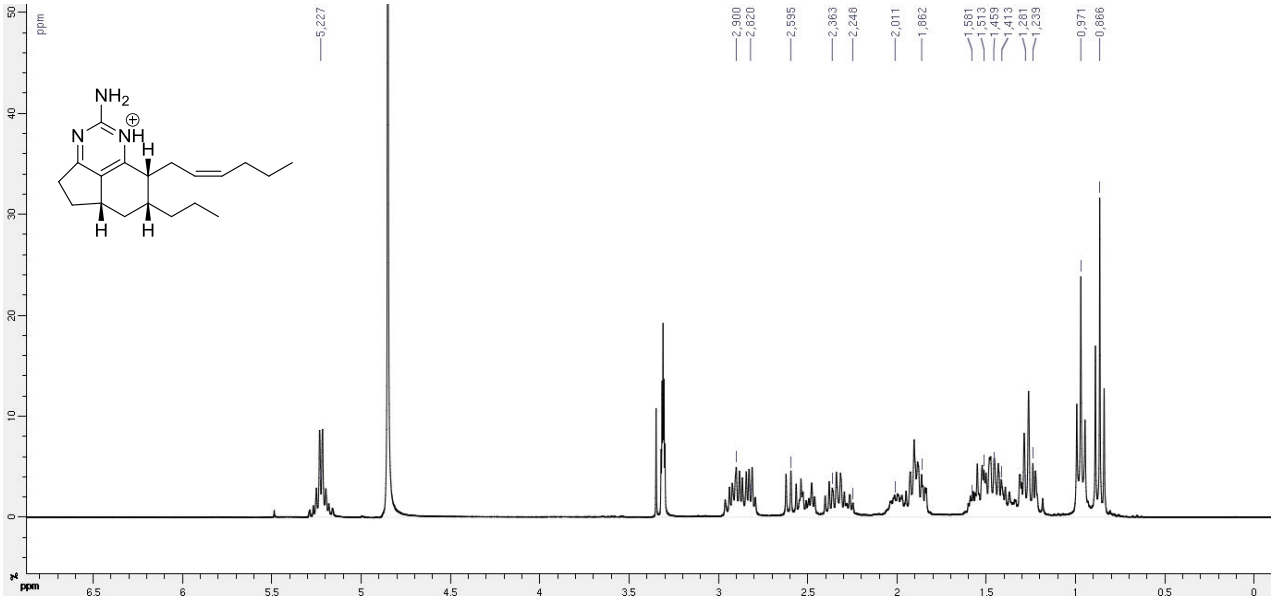


Annexe 10 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine H.

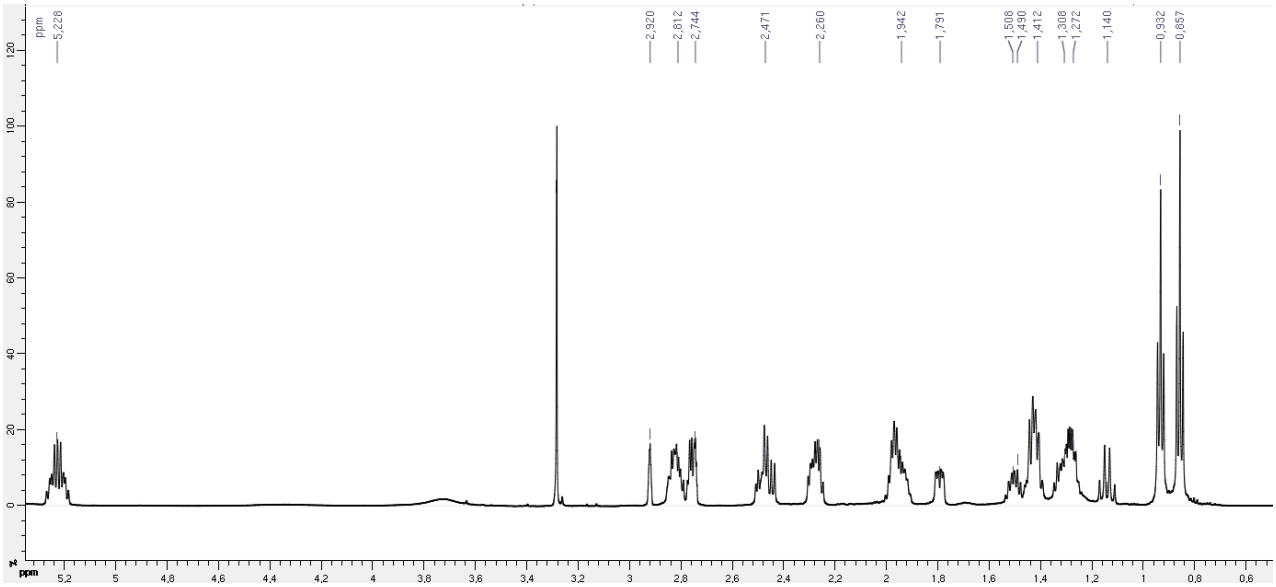


Netamine I (58)

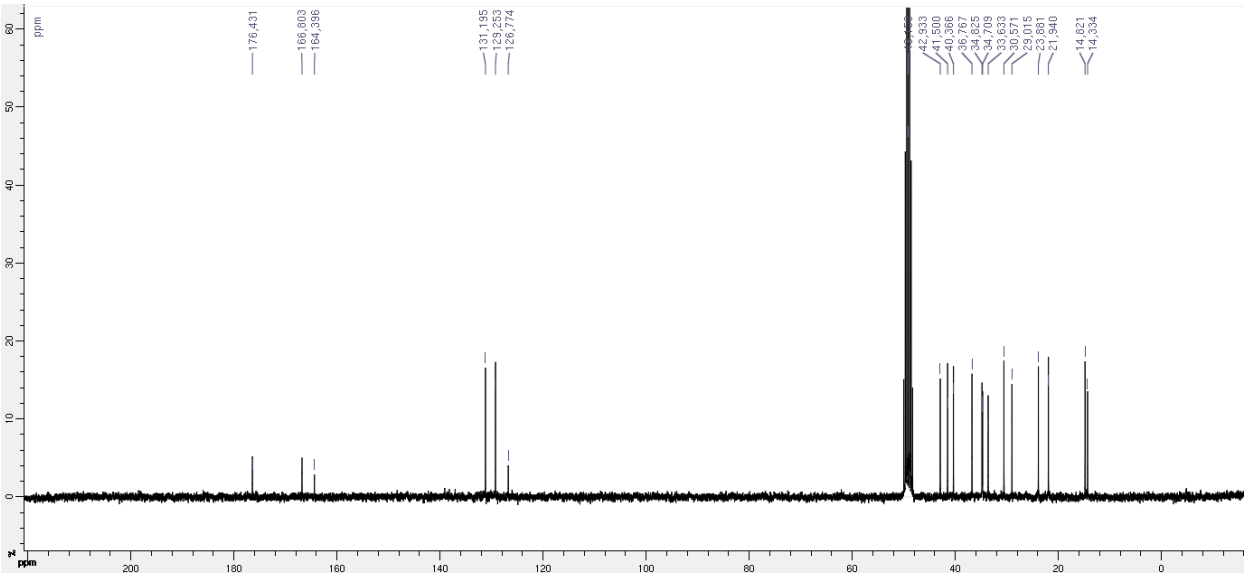
Annexe 11 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine I.



Annexe 12 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine I.

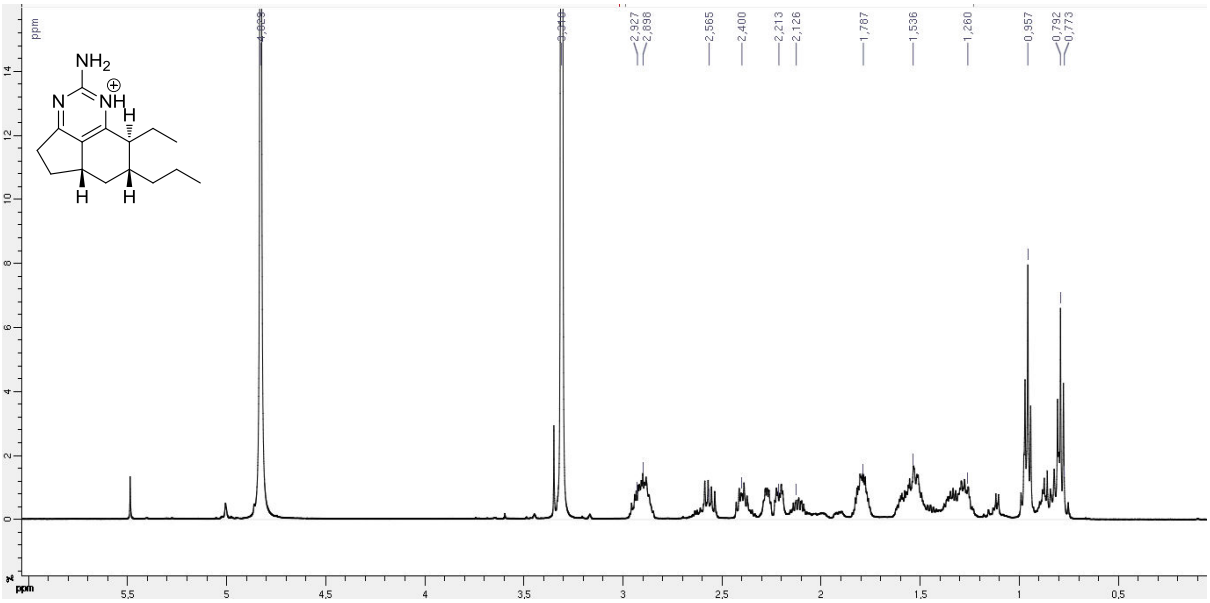


Annexe 13 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD) de la nétamine I.

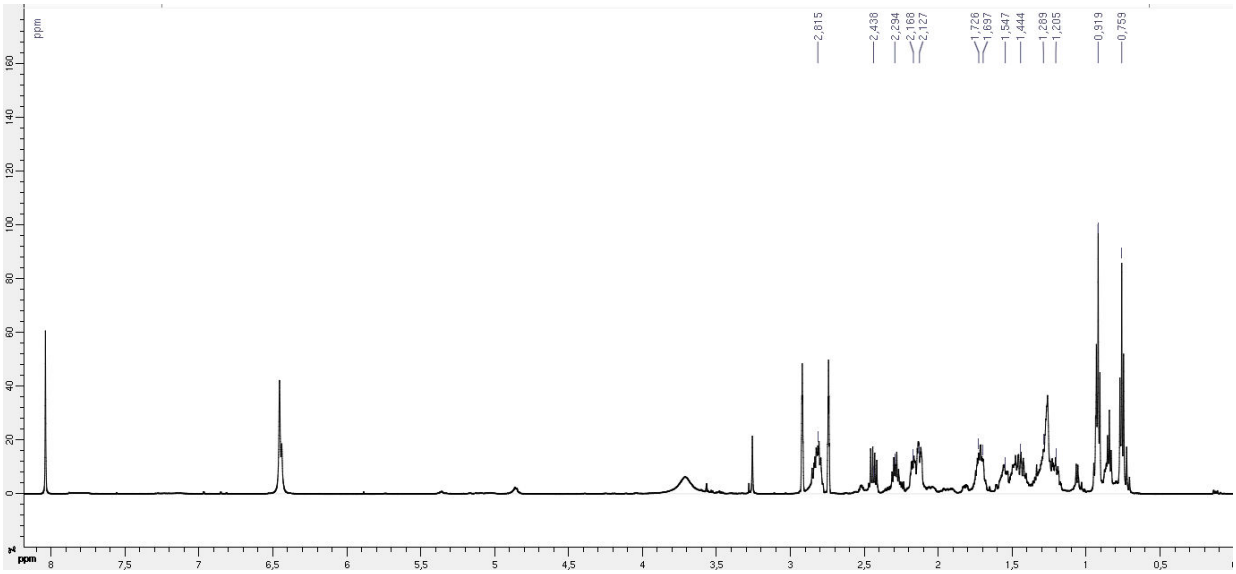


Netamine J (59)

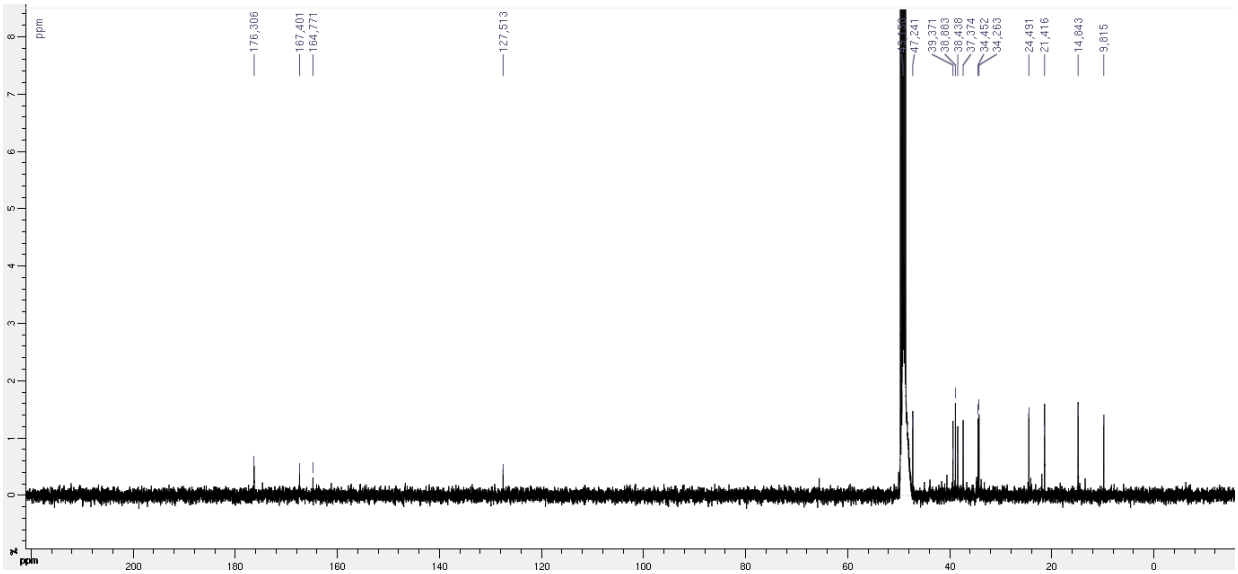
Annexe 14 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine J.



Annexe 15 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine J.

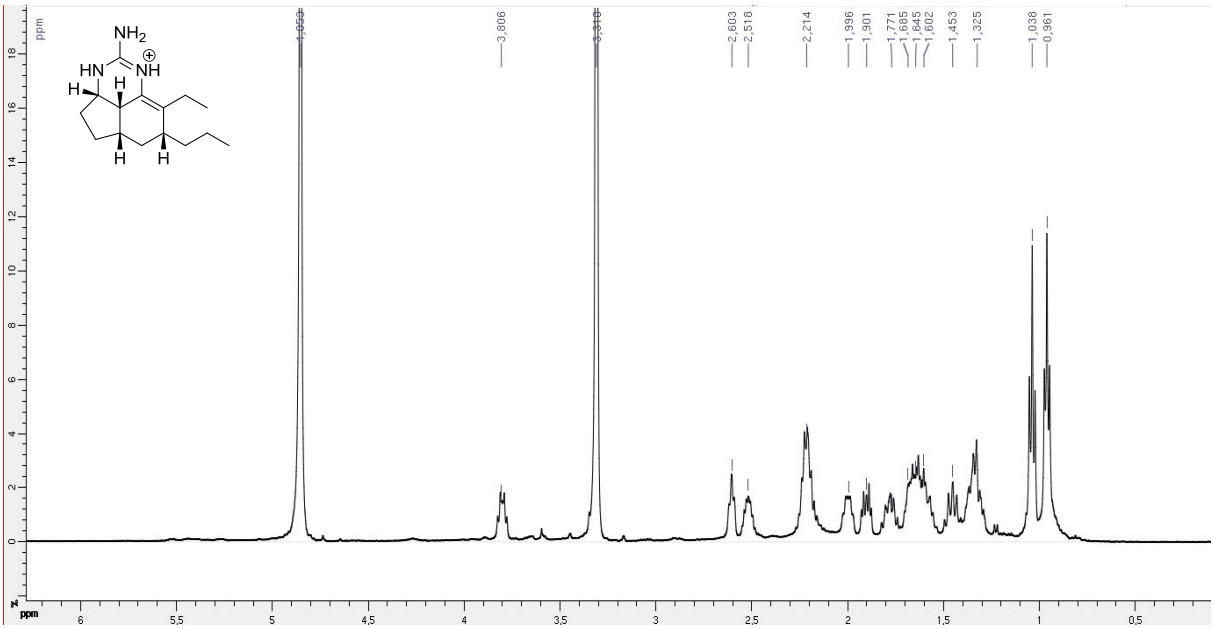


Annexe 16 : Spectre RMN^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine J.

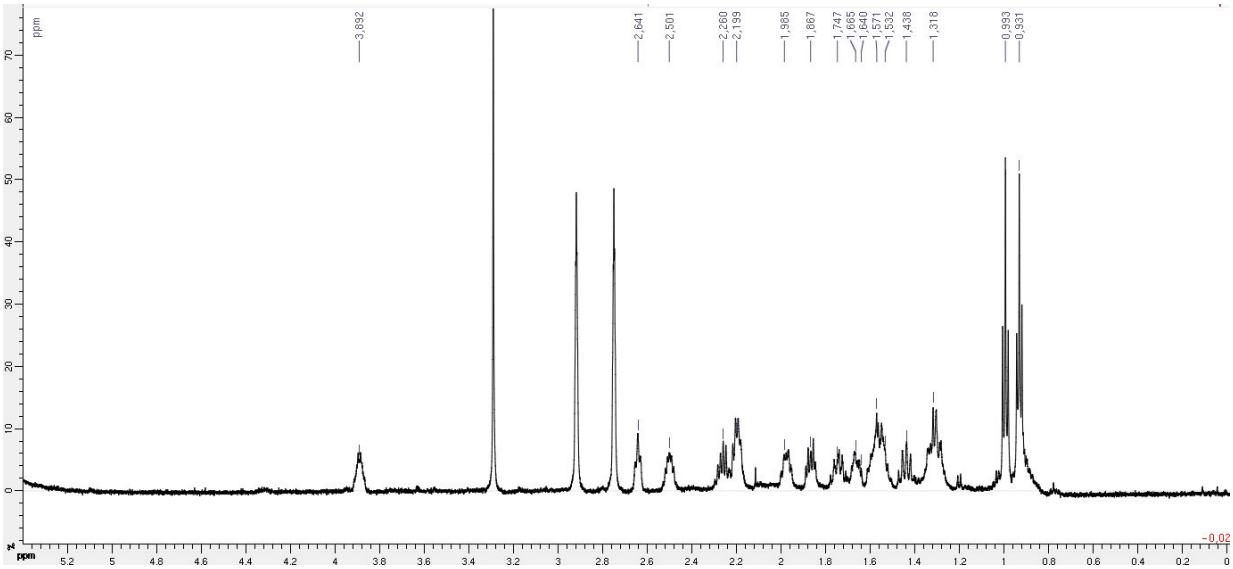


Netamine K (60)

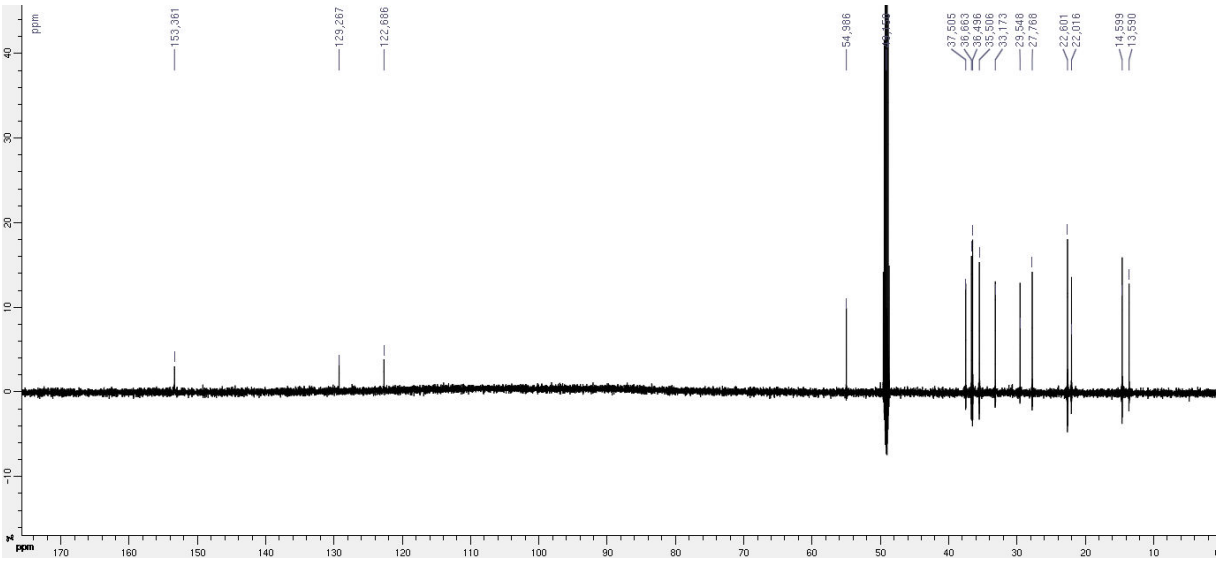
Annexe 17 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) de la nétamine K.



Annexe 18 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine K.

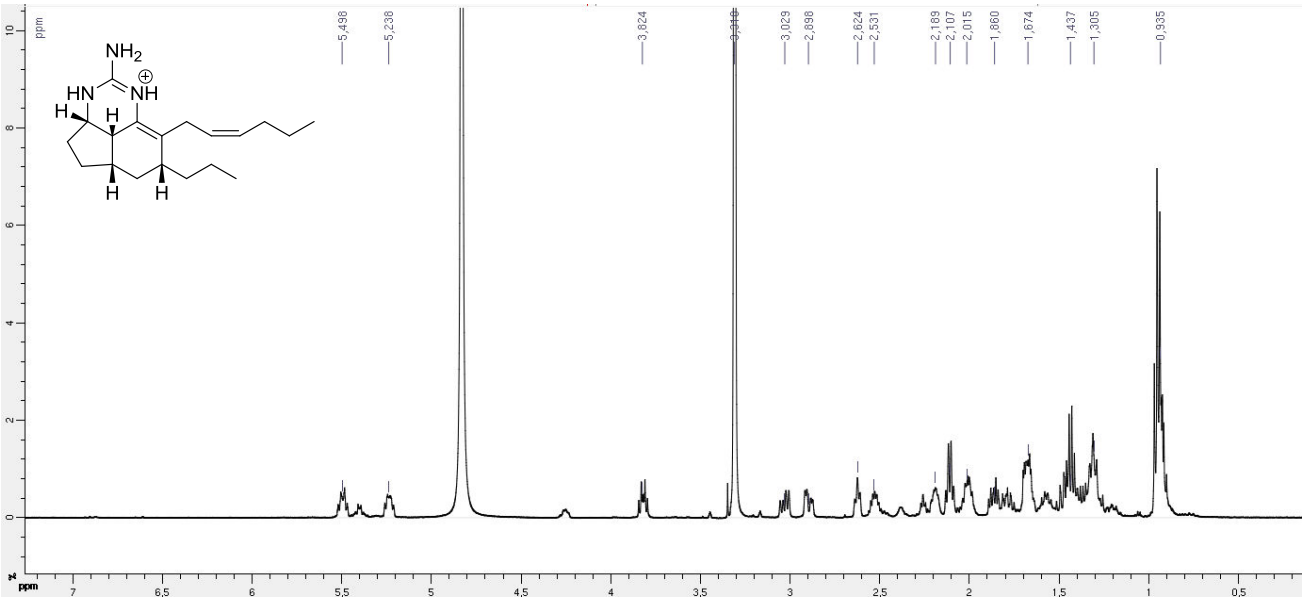


Annexe 19 : Spectre RMN ^{13}C (600 MHz, MeOD) de la nétamine K.

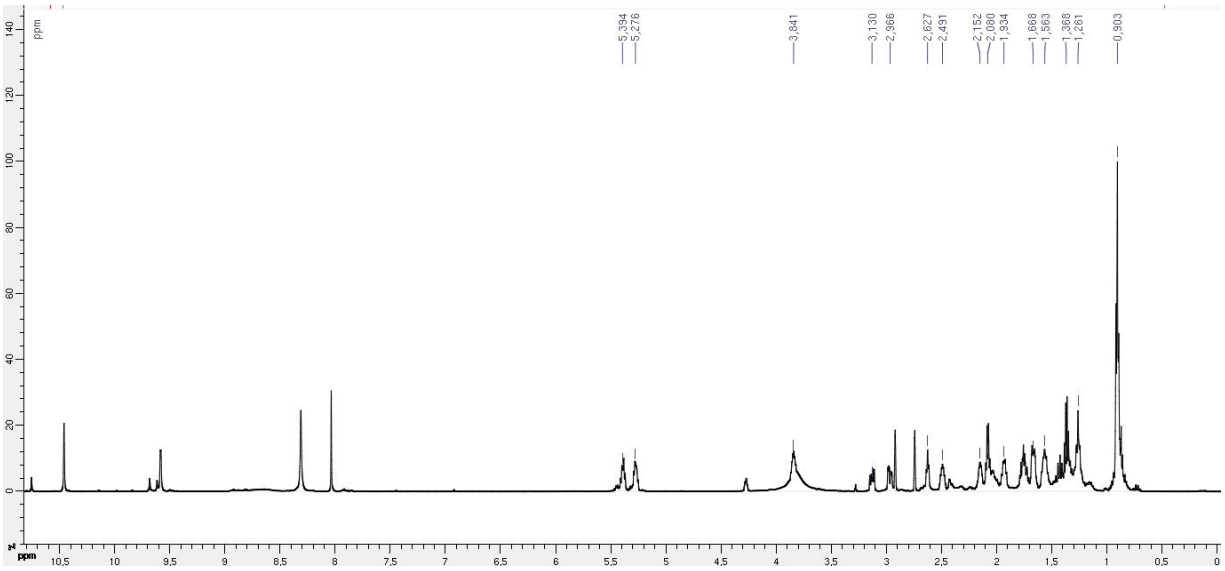


Netamine L (61)

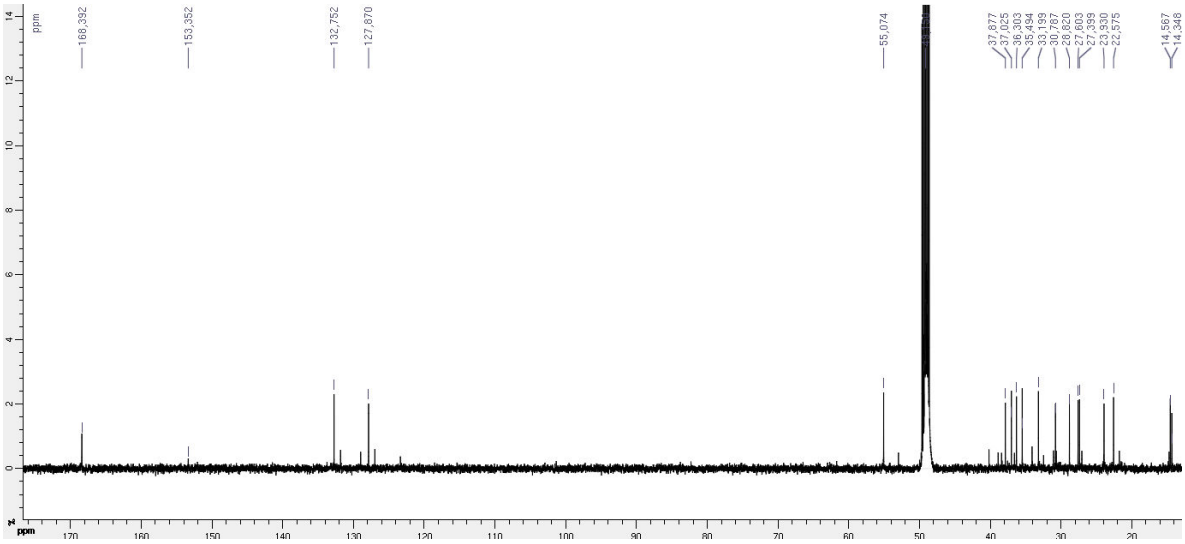
Annexe 20 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine L.



Annexe 21: Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine L.

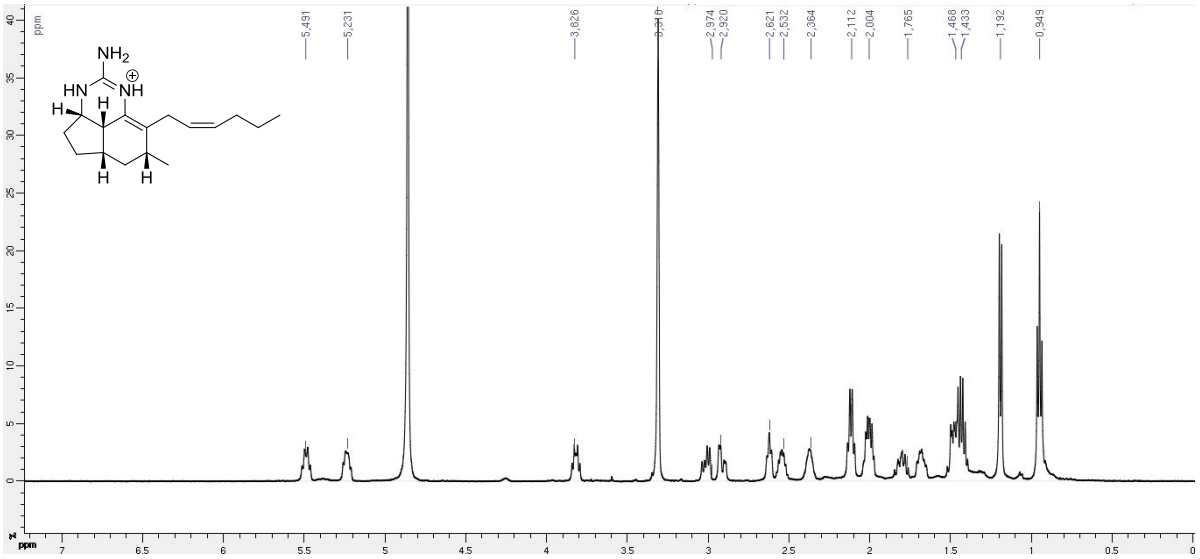


Annexe 22 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de la nétamine L.

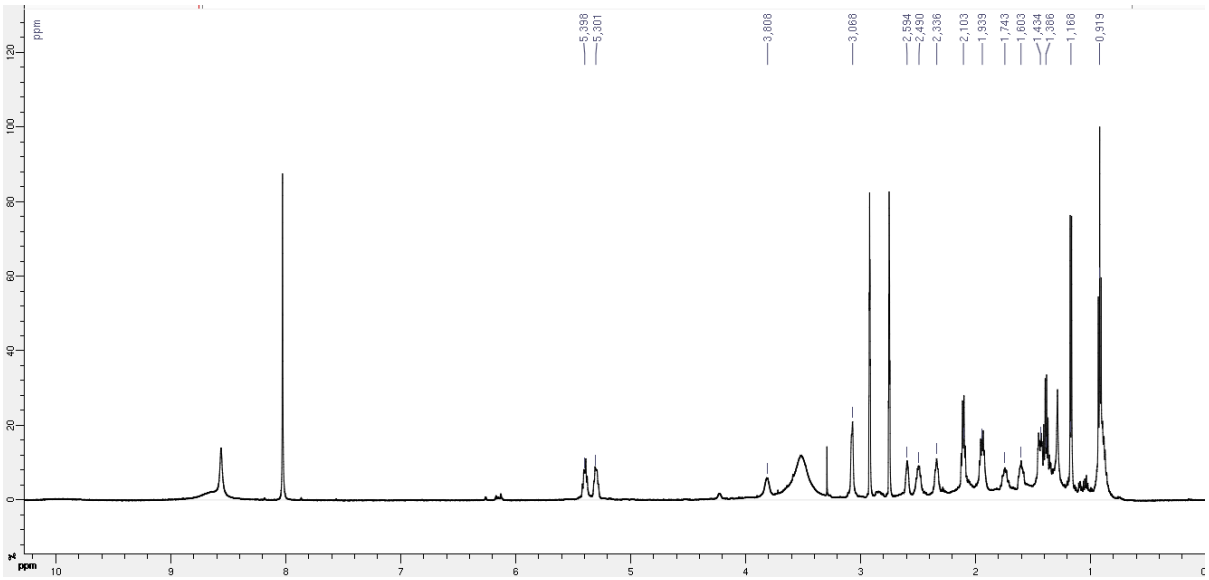


Netamine M (62)

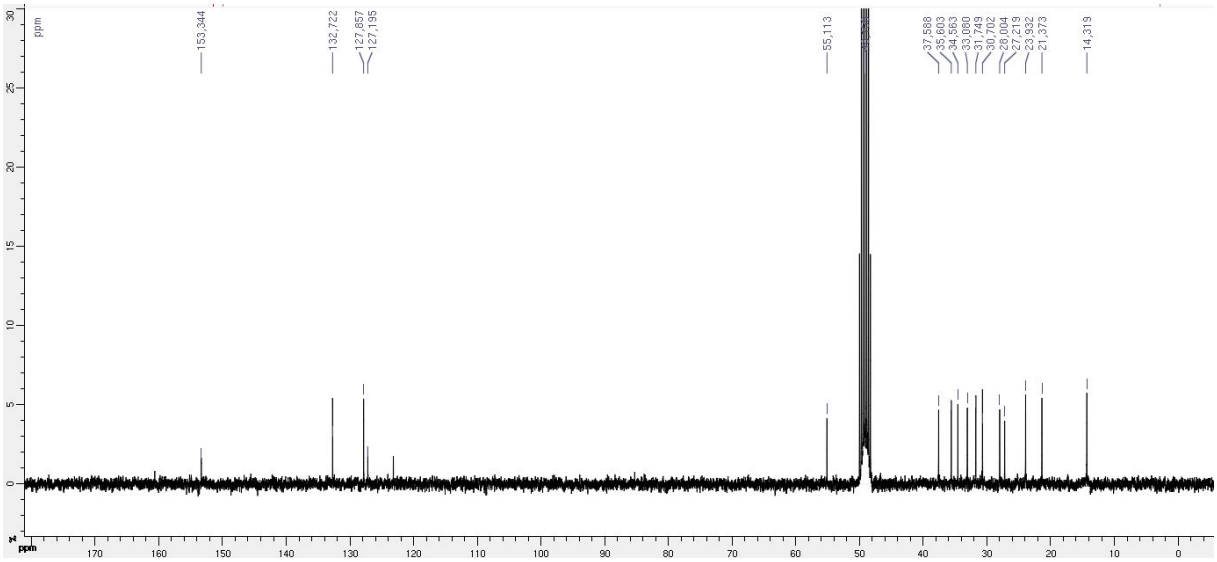
Annexe 23 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine M.



Annexe 24 : Spectre RMN ^{1}H (600 MHz, DMF) de la nétamine M.

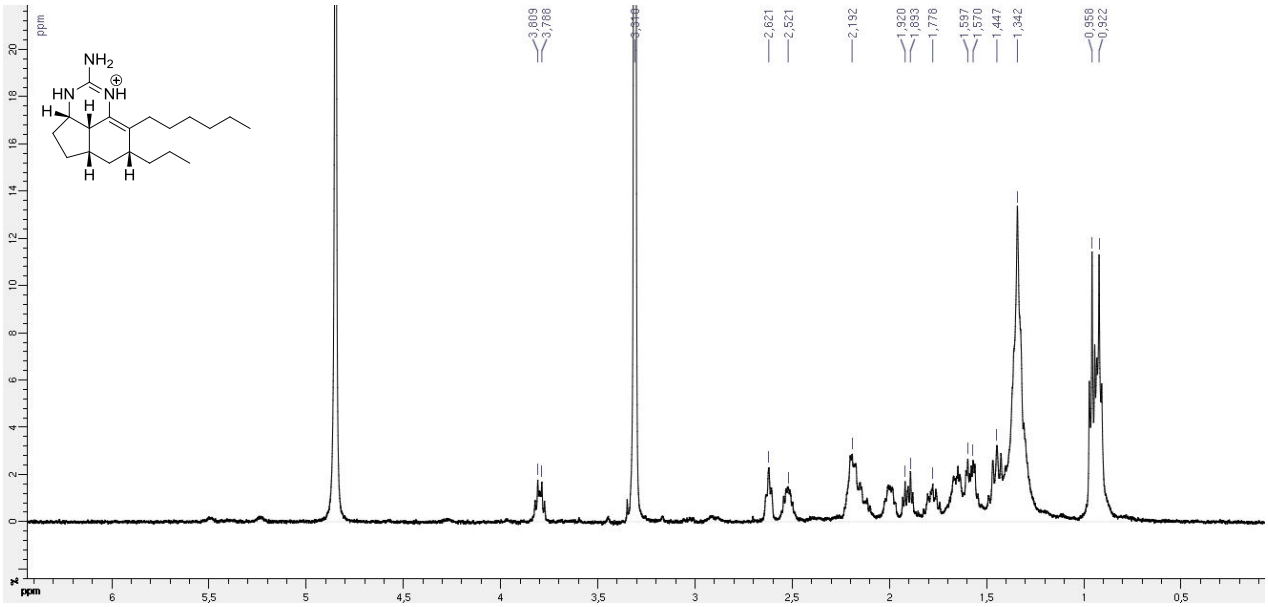


Annexe 25 : Spectre RMN ^{13}C (300 MHz, MeOD) de la nétamine M.

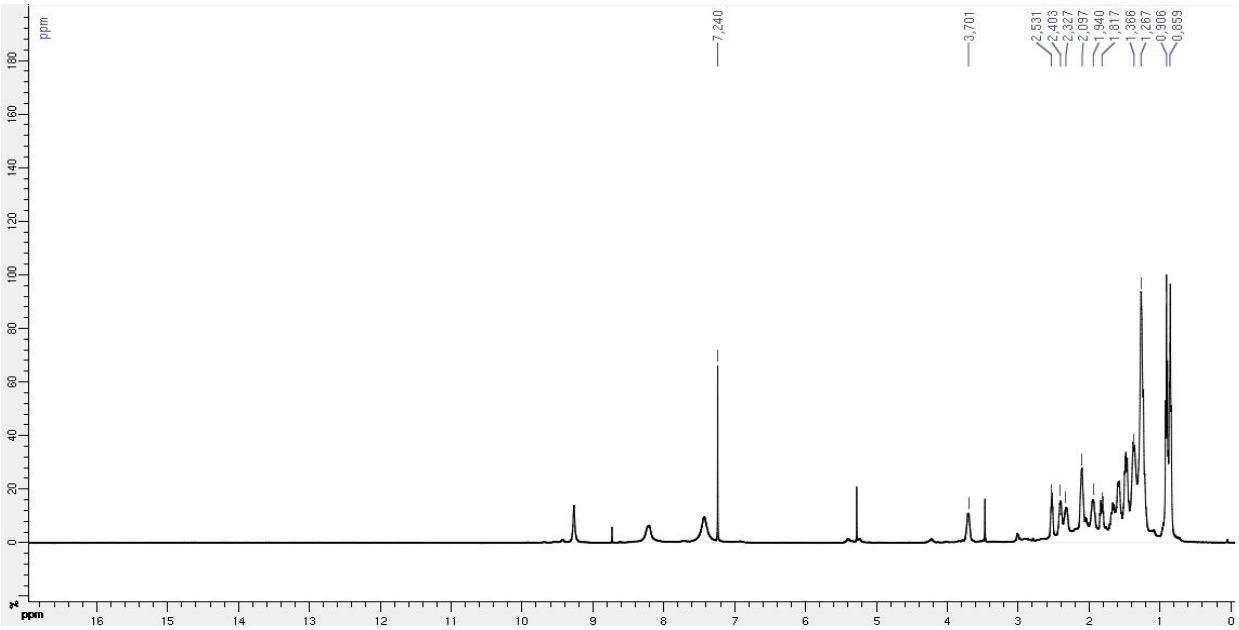


Netamine N (63)

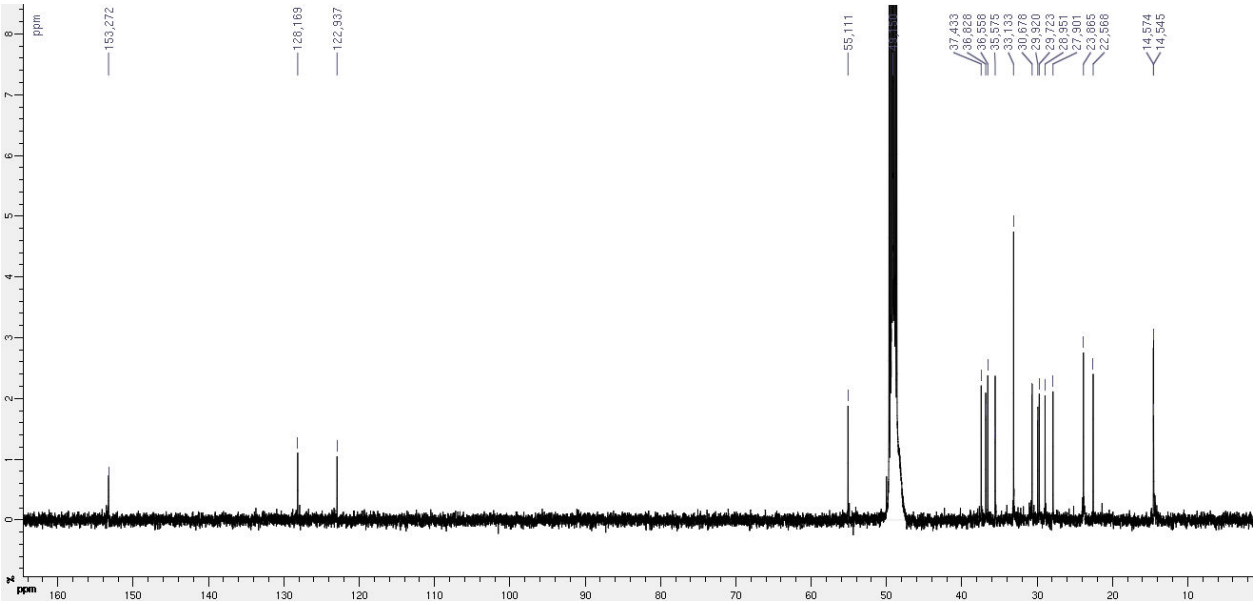
Annexe 26 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, MeOD) de la nétamine N.



Annexe 27 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de la nétamine N.

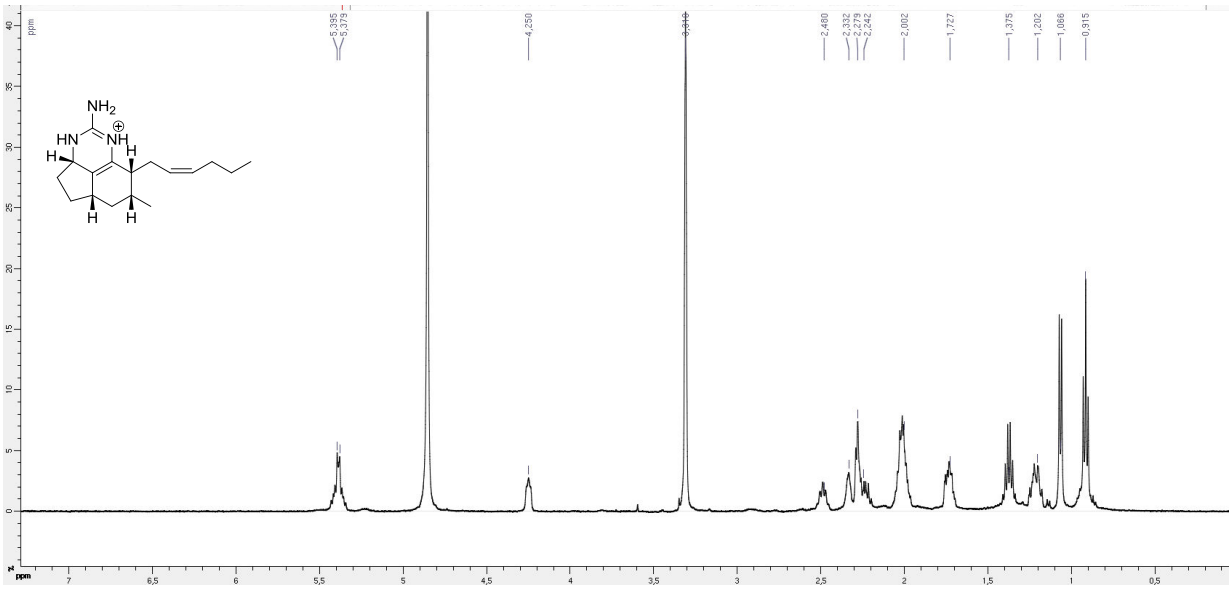


Annexe 28 : Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) de la nétamine N.

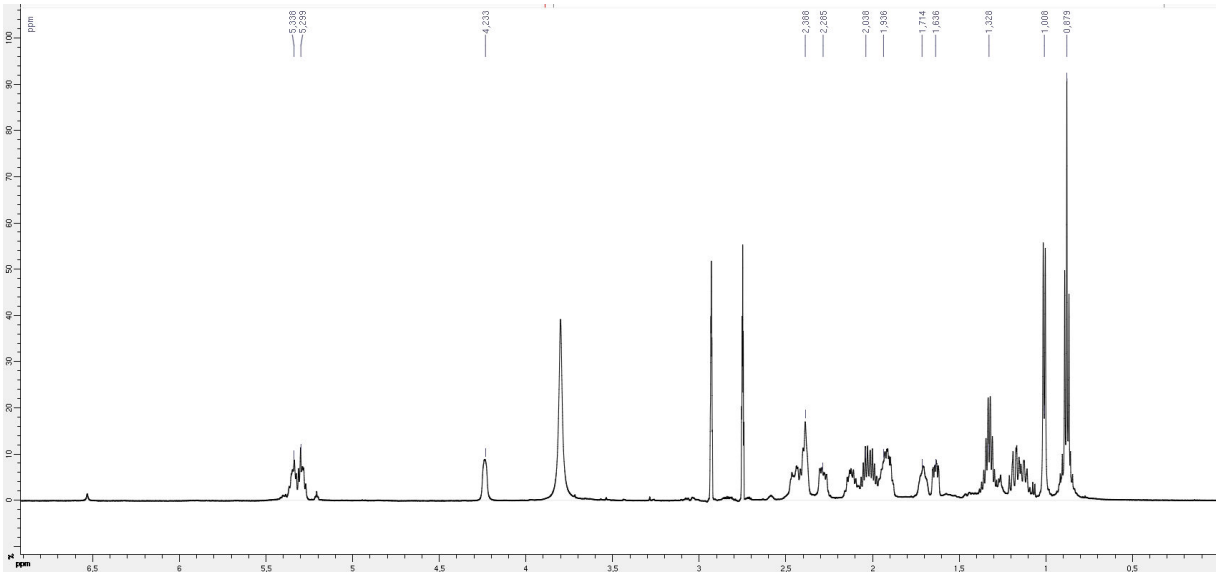


Nétamine O (64)

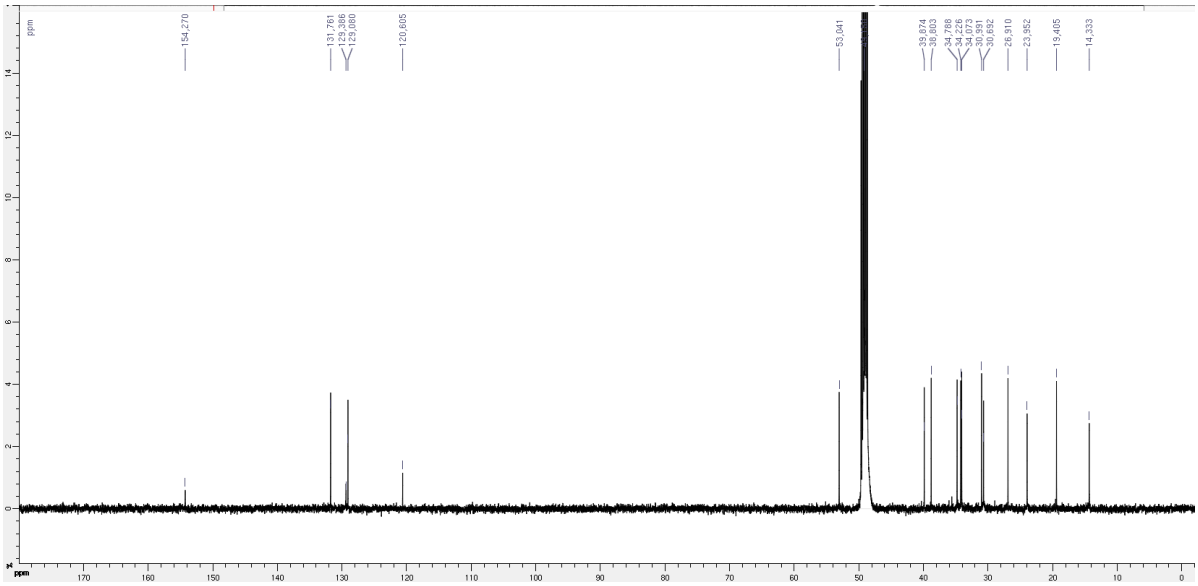
Annexe 29 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine O.



Annexe 30 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine O.

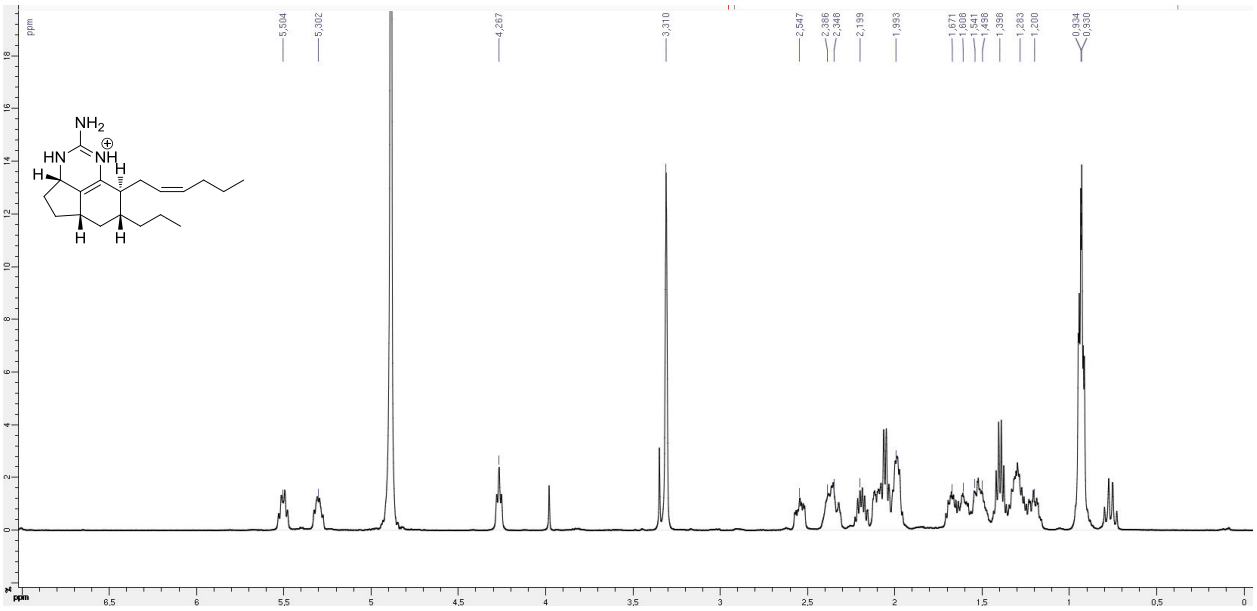


Annexe 31 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) de la nétamine O.

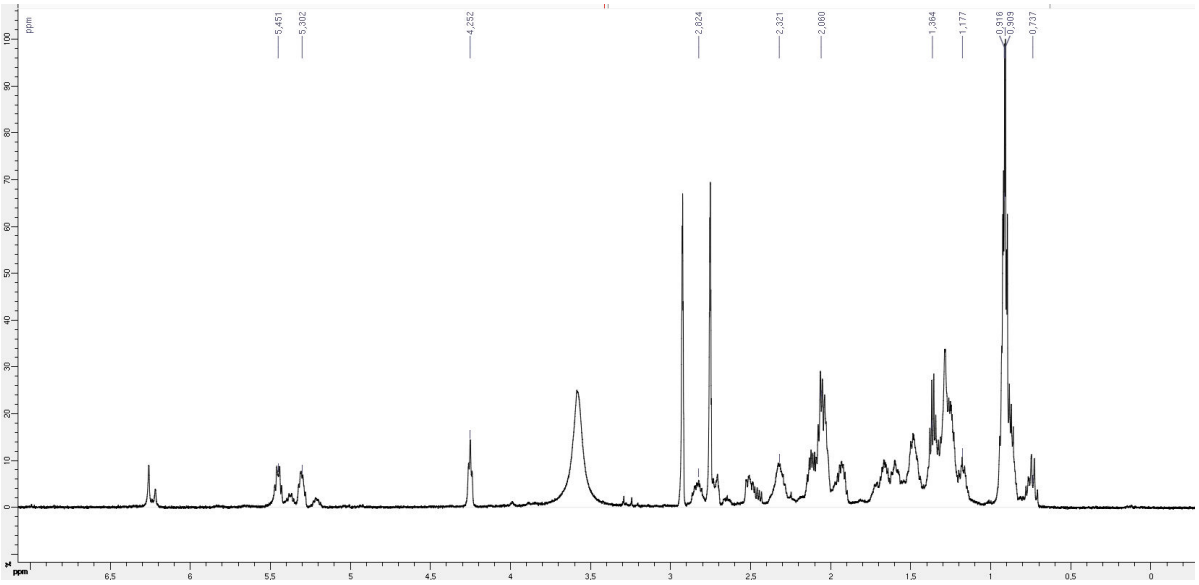


Nétamine P (65)

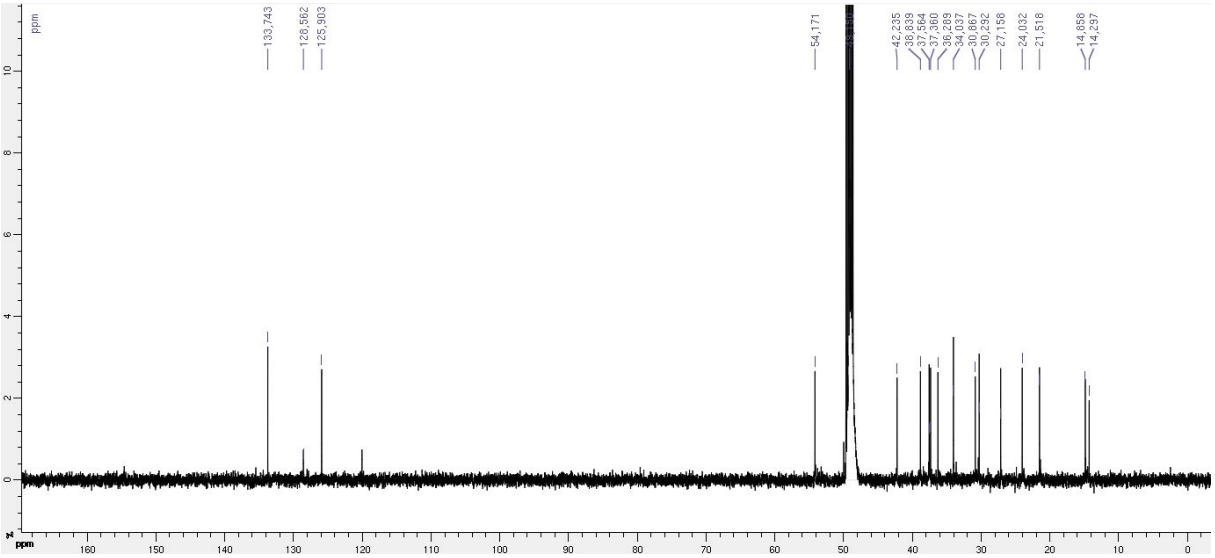
Annexe 32 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine P.



Annexe 33 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine P.

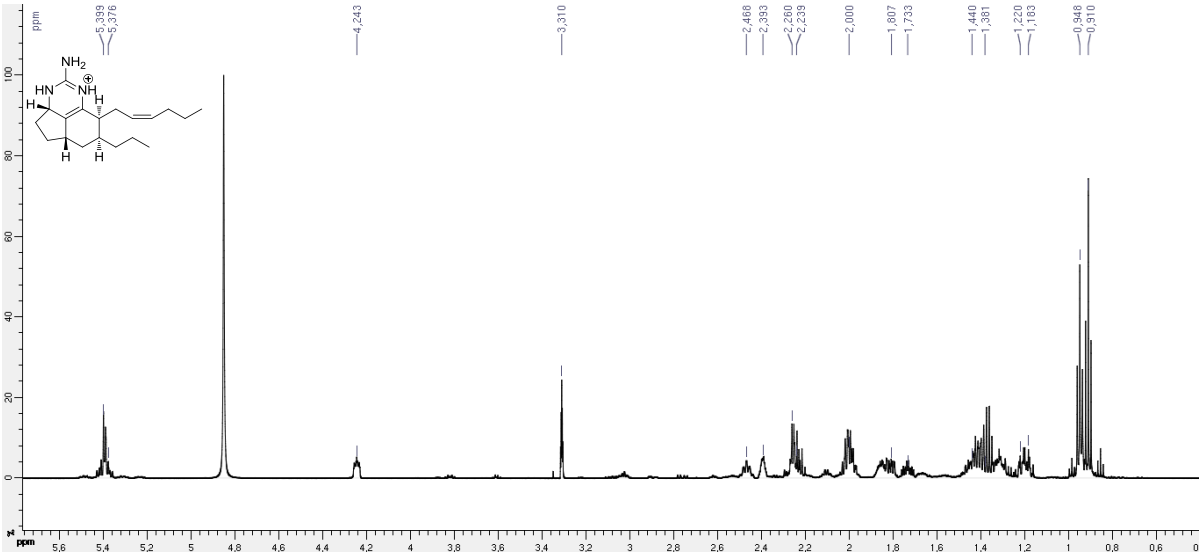


Annexe 34 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 600 MHz) de la nétamine P.

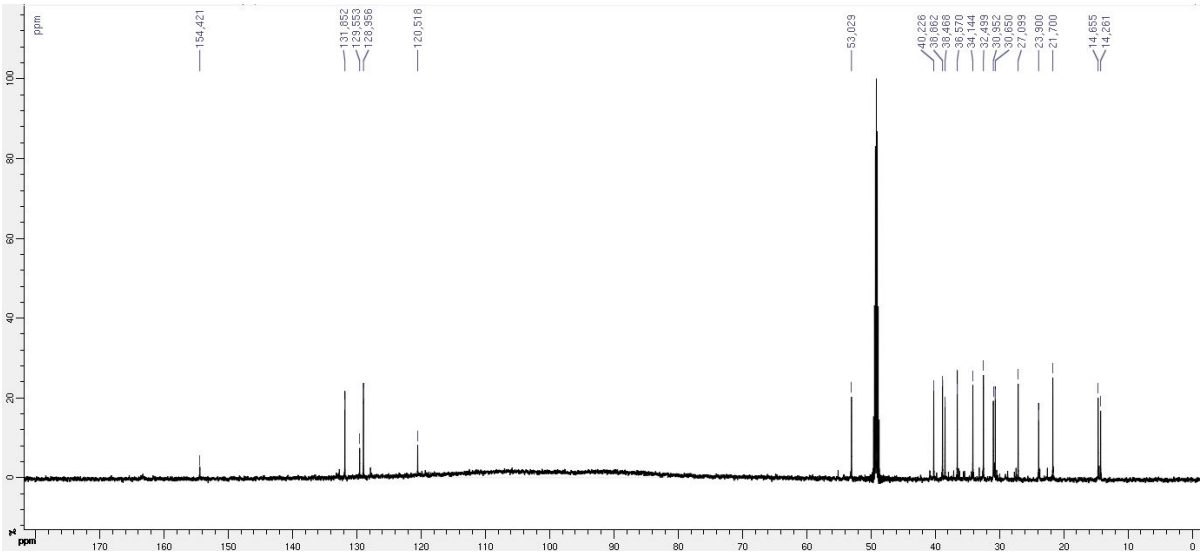


Nétamine Q (66)

Annexe 35 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 600 MHz) de la nétamine Q.

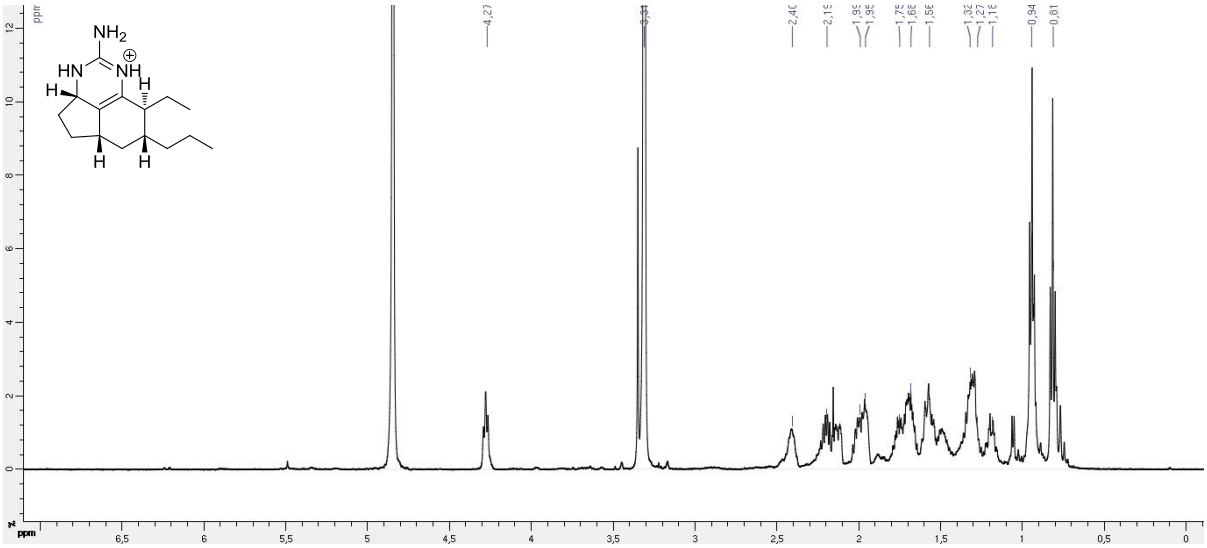


Annexe 36 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 600 MHz) de la nétamine Q.

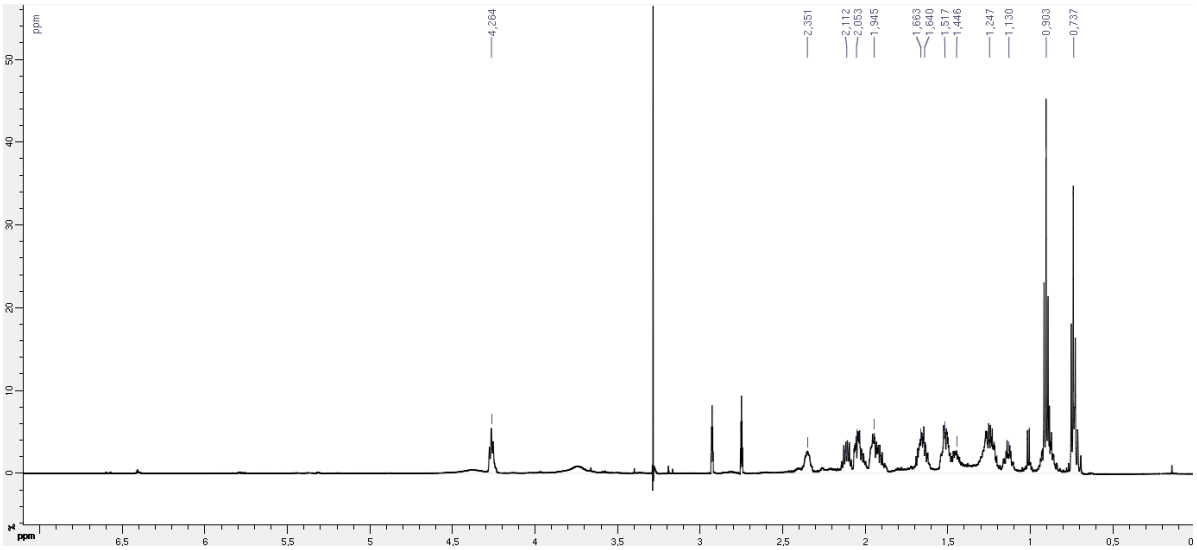


Nétamine R (67)

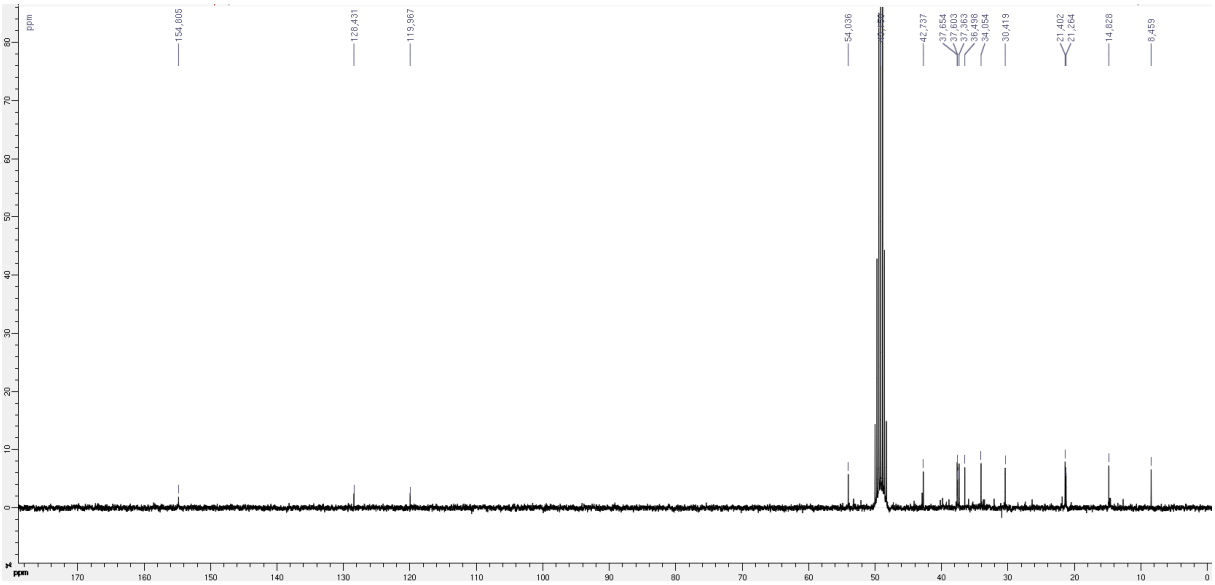
Annexe 37 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine R.



Annexe 38 : Spectre RMN ^{1}H (DMF, 600 MHz) de la nétamine R.

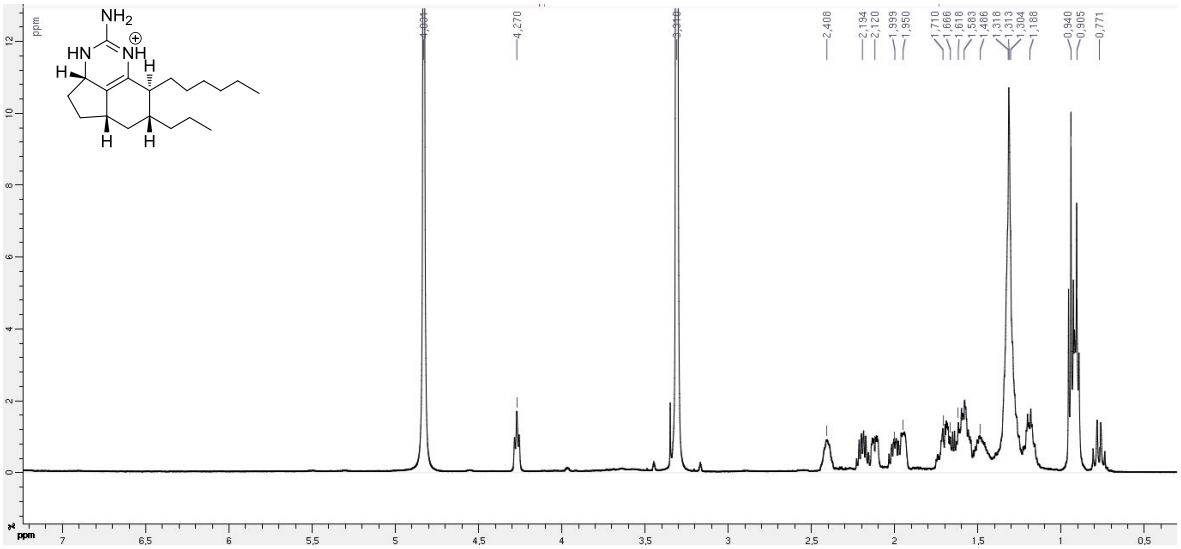
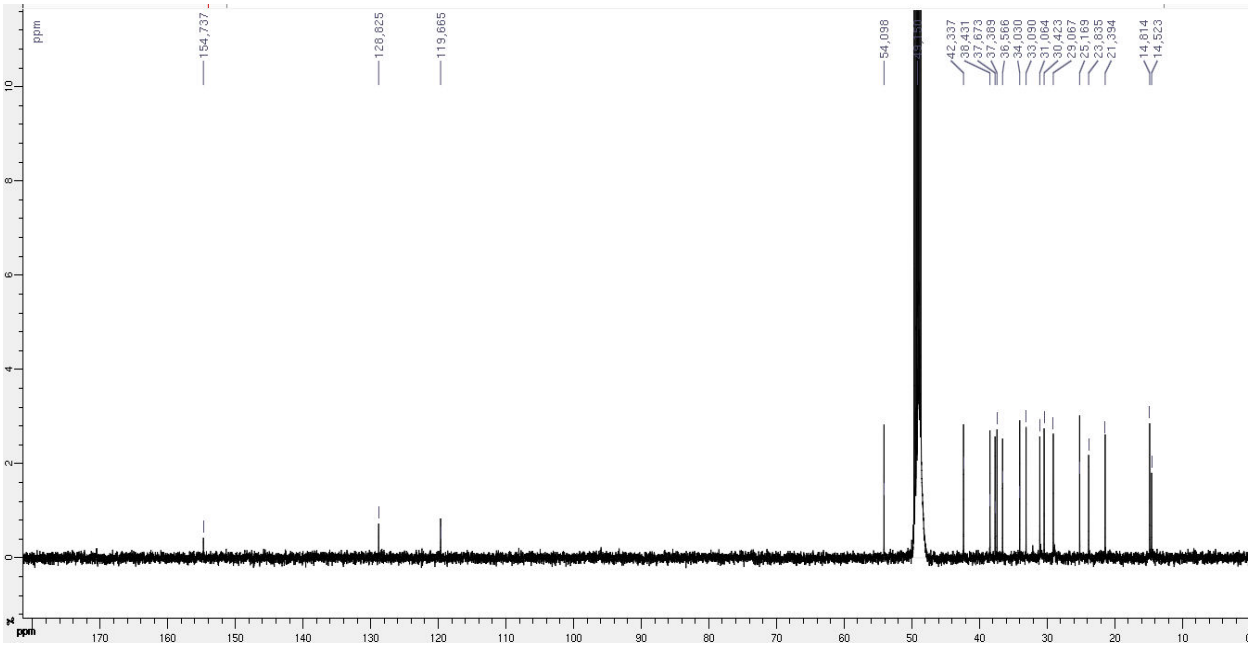


Annexe 39 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 300 MHz) de la nétamine R.



Nétamine S (68)

Annexe 40 : Spectre RMN ^{1}H (MeOD, 500 MHz) de la nétamine S.



Annexe 41 : Spectre RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) de la nétamine S.