HAL
open science

Recherche de molecules naturelles bioactives issues de la biodiversite marine de la zone sud-ouest de l'ocean Indien

Emmanuel Pichon

To cite this version:

Emmanuel Pichon. Recherche de molecules naturelles bioactives issues de la biodiversite marine de la zone sud-ouest de l'ocean Indien. Biologie moléculaire. Université de la Réunion, 2016. Français. NNT : 2016LARE0018 . tel-01393381

HAL Id: tel-01393381

https://theses.hal.science/tel-01393381v1

Submitted on 14 Dec 2016

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 23 Septembre 2016

Par

Emmanuel PICHON

Recherche de molécules naturelles bioactives issues de la biodiversité marine 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	:		
Rapporteurs		Michel FREDERICH	Professeur, Université de Liège
		Olivier GROVEL	Maitre de conférences H.D.R, Université de Nantes
Examinateurs		Isabelle GRONDIN	Maitre de conférences H.D.R, Université de La Réunion
		Jacqueline SMADJA	Professeur Emérite, Université de La Réunion

La moindre chose contient un peu d'inconnu.
Trouvons-le

Guy de Maupassant

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.

Elle a été soutenue financièrement par l'**Europe**, l'**ANR** (Agence Nationale de la Recherche) et La **Région Réunion** dans le cadre :

- du programme d'actions **FEDER** (Fonds Européen de Développement Régional) soutenant le 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*).
- du programme **ERA-NET NETBIOME** (NETworking tropical and subtropical BIodiversity research in OuterMost regions and territories of Europe in support of sustainable development, Edition 2010) soutenant le projet **POMARE** (*Polynesian, Mayotte's, Reunion's marine benthic invertebrates : interactions and chemodiversity evaluation for a sustainable use*).

Je remercie La Région Réunion pour m'avoir accordé une allocation régionale de recherche.

Je tiens par ailleurs à adresser mes remerciements aux directeurs successifs du LCSNSA, le Professeur Bertrand ILLIEN qui m'a ouvert les portes de son laboratoire depuis mon stage de Master 1, et le Professeur Anne Bialecki, actuelle directrice du LCSNSA. Merci de m'avoir offert de bonnes conditions de travail, pour l'accomplissement de ces travaux de thèse.

Je remercie aussi le directeur de l'ICSN, Monsieur Max MALACRIA pour m'avoir permis de réaliser deux missions au sein de ce prestigieux établissement au cours de la période octobre 2013 à Décembre 2014.

J'adresse également mes remerciements et mon respect à ma directrice de thèse, le Professeur Anne BIALECKI, du LCSNSA qui m'encadre et qui m'a permis de découvrir la chimie marine depuis mon stage de Master 2. Je lui suis très reconnaissant pour sa gentillesse,

son sens de l'écoute, sa disponibilité, et sa volonté d'offrir à ses étudiants les meilleures conditions de travail possibles. Un grand merci également pour m'avoir permis d'assister à l'école thématique du CNRS « SUBNAT-2014 » *Chimie des Substances Naturelles pour la biologie – Approches méthodologiques et Innovation*.

Je remercie mon co-directeur de thèse, le Directeur de Recherche Ali AL-MOURABIT de l'ICSN, qui m'a offert à deux reprises, la possibilité de réaliser une grande partie de mes travaux de thèse dans son laboratoire. Il m'a conseillé et aidé aussi bien sur le plan scientifique que logistique. Merci à lui de m'avoir aidé à trouver un logement durant mes deux séjours à l'ICSN ainsi que d'avoir été mon garant pour ce logement. Je lui adresse en outre toute ma reconnaissance pour m'avoir permis en tant que directeur du groupement de recherche BIOCHIMAR, d'assister à l'école thématique du CNRS « SUBNAT-2014 » *Chimie des Substances Naturelles pour la biologie – Approches méthodologiques et Innovation*.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du jury :

- Monsieur Michel FREDERICH, Professeur à l'Université de Liège (Laboratoire de pharmacognosie). Je voudrais lui exprimer ma gratitude d'une part, pour l'honneur qu'il me fait d'être rapporteur de mes travaux de thèse, et d'autre part, pour avoir procédé à la réalisation des tests d'activité anti-paludique.
- Monsieur Olivier GROVEL, Maître de conférences H.D.R. de l'Université de Nantes (*Institut Universitaire Mer et Littoral* (IUML), FR3473 CNRS, *Groupe Mer-Molécules-Santé* MMS / EA 2160). Merci d'avoir accepté sans hésiter d'évaluer mon travail et d'en être le rapporteur.
- Madame Isabelle GRONDIN, Maître de conférences H.D.R. de l'Université de La Réunion (LCSNSA). Je lui suis très sincèrement reconnaissant d'avoir accepté d'être membre du jury.
- Madame Jacqueline SMADJA, Professeur Emérite de l'Université de La Réunion (LCSNSA). Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour ses encouragements, pour avoir examiné ce travail et pour l'honneur qu'elle me fait de participer au Jury de thèse.

Je remercie par ailleurs chaleureusement le Directeur de Recherche Cécile DEBITUS de l'IRD de Tahiti (Equipe *Etude intégrée des métabolites secondaires* (EIMS), UMR 241 *Ecosystèmes Insulaires Océaniens* (EIO)) sans qui le projet POMARE n'aurait pas vu le jour. Merci à elle et sa doctorante Tepoerau MAI pour la réalisation des tests QSI sur *Vibrio Harveyi*.

Je remercie aussi très sincèrement le Professeur Claire HELLIO et sa doctorante Rozenn TREPOS pour la réalisation des tests d'activité antimicrobienne. Merci à toutes deux pour leur accueil et pour avoir eu la patience de m'apporter quelques notions de microbiologie lors d'un stage de deux mois que j'ai effectué au sein de leur Laboratoire : le *laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin* (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM).

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

Je remercie Céline MORIOU pour son aide précieuse et son soutien à chacun de mes séjours à l'ICSN ainsi que pour sa disponibilité et les moments de rire que l'on a partagés.

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

- le service CLHP, particulièrement Odile THOISON, Franck PELISSIER et Nathalie HUE ;
- le service RMN, particulièrement Karim HAMMAD et Jean-Francois GALLARD ;
- le service de Spectrométrie de Masse.

Je tiens à remercier également le Docteur Nicole de VOOGD du Museum d'Histoire Naturelle *Naturalis* de Leiden, pour l'identification des organismes marins étudiés au cours de cette thèse.

Je remercie les plongeurs professionnels Stéphan AUBERT, Jean-Pierre BELLANGER et Philippe PROST pour les collectes des organismes marins. Merci également à la Préfecture de Mayotte et en particulier à M. Christophe MICHELOT pour nous avoir délivré une autorisation de collecte d'invertébrés marins à Mayotte.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler notamment les doctorants : Pierre-Eric CAMPOS, Emmanuelle GROS, Emmanuelle DORLA, Julien HOARAU, Alexandre CHEN-YEN-SU, Keshika MAHADEO et Sophie TECHER ; mais aussi les stagiaires, en particulier Marie ROCA, Charlotte LEMAN-LOUBIERE et Delphine SAVENAY pour leur travail au sein du projet POMARE, mais aussi pour leur bonne humeur et leur sérieux

Un grand merci aussi à Mathilde CORBIN pour son écoute, sa gentillesse et sa disponibilité, ainsi que pour nos moments de fou rire.

Merci aussi aux membres du Conseil des étudiants de l'ICSN : Audrey DUMOULIN, Laure-Anne PEYRAT, Laura FOURMOIS, Nathan BERTHELOT, Nelson PEREIRA, Yannick EVENO, pour m'avoir accueilli au sein du CEI et pour nos moments partagés.

Je remercie aussi Vida TERZIC pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier du fond du cœur les personnes que j'ai pu rencontrer en Métropole, et qui sont de véritables amis pour moi : Delphine, Agnès, Nicolas, Julien, Céline

Un merci du fond du cœur à mon père pour ses encouragements, à ma mère pour avoir toujours été à mes côtés, à ma sœur et sa petite fille Ashanty. Merci à la famille !

Enfin je tiens à remercier très sincèrement Brice ainsi que sa maman Sylviane pour leur soutien.

Liste des abréviations

Abréviations spécifiques aux activités biologiques

A549 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome pulmonaire)
AI-2 : auto inducer 2
ABTS$^{\bullet}$: sel d'ammonium de l'acide 2,2'- azinobis-3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique
ATCC : american type culture collection
CI_{50} : concentration inhibitrice médiane
CE : concentration efficace
CMI : concentration minimale inhibitrice
CAI-1 : vibrio cholerae auto inducer 1
DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle
EOA : espèce oxygénée activée
FRAP : ferric ion reducing antioxidant parameter
HAI-1 : harveyi auto inducer-1
HCT-116 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du colon)
Hela : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du col de l'utérus)
HepG2 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du foie)
HEY : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer des ovaires)
HT29 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (adénocarcinome colorectal)
K562 : lignée leucémique humaine
KB : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome buccal)
L1210 : lignée leucémique murine
LoVo : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du colon)
MCF7 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du sein)
MDA-MB-231 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du sein)
NSCLC-N6 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du poumon)
ORAC : oxygen radical absorbance capacity
P388 : lignée leucémique murine
PLA2 : phospholipases A2
PXR : pregnane x receptor NR112
PP1 : protéine phosphatse-1
QSI : quorum sensing inhibitory
SK-OV3 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer des ovaires)
TRAP : total radical-trapping antioxidant parameter
U373MG : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du cerveau)
UT-7 : lignée leucémique humaine
WEHI 164 : lignée cellulaire cancéreuse murine (fibrosarcome murin)

Abréviations spécifiques à la chimie

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
AF : acide formique
ASE : extraction accélérée par solvant
br : signal large
C-18 : silice greffée par des groupements octadécyles
c : concentration

CCM	: chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	: chloroforme deutéré
CLHP	: chromatographie liquide à haute performance
CLMP	: chromatographie liquide moyenne pression
COSY	: correlation spectroscopy
DAD	: détecteur à barrettes de diodes
DCM	: dichlorométhane
d	: doublet
dd	: doublet de doublet
ddd	: doublet de doublet de doublet
dddd	: doublet de doublet de doublet de doublet
DEDL	: détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DEPT	: distorsionless enhancement by polarization transfer
DMSO-D6	: diméthylsulfoxide deutéré
dq	: doublet de quadruplé
dqt	: doublet de quintuplé
δ_H	: déplacement chimique du proton
δ_C	: déplacement chimique du carbone
ESI^+	: ionisation electrospray mode positif
ESI^-	: ionisation electrospray mode négatif
H_2O_2	: eau oxygénée
HMBC	: heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC	: heteronuclear single quantum coherence
IR	: infrarouge
J	: constante de couplage
MeOD	: méthanol deutéré
m	: multiplet
MeOH	: méthanol
PAD	: détecteur à barrettes de photodiode
ppm	: partie par million
q	: quadruplé
qt	: quintuplé
RMN (1D, 2D)	: résonance magnétique nucléaire (une dimension, deux dimensions)
ROS	: reactive oxygen species
RP-18	: reverse phase C18
s	: singulet
SM	: spectrométrie de masse
SMHR	**:** spectrométrie de masse haute résolution
t	: triplet
UV	: ultra-violet

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **3**

LISTE DES ABREVIATIONS **7**

SOMMAIRE **9**

INTRODUCTION GENERALE **13**

CHAPITRE I : CONTEXTE DE L'ETUDE **21**

I.1 Le projet de recherche BIOMOL TCN 22

I.2 Le projet de recherche POMARE 29

CHAPITRE II : SELECTION DES INVERTEBRES MARINS **37**

II.1 Collecte et identification des invertébrés marins 38

II.2 Extraction des invertébrés marins 39

II.2.1 Principe 39

II.2.2 Résultats 39

II.3 Le criblage chimique 39

II.3.1 Principe 39

II.3.2 Résultats et discussion 40

II.4 Le criblage biologique 45

II.4.1 Principe 45

II.4.2 Recherche d'activité cytotoxique 45

II.4.3 Recherche d'activité antipaludique 47

II.4.4 Recherche d'activité antioxydante 49

II.4.5 Recherche d'activité inhibitrice du quorum sensing (antibiofilm) 51

II.5 Sélection des invertébrés marins 53

CHAPITRE III : ETUDE DE L'EPONGE *Plakortis kenyensis (Pulitzer-Finali, 1993)* **56**

III.1 Eléments bibliographiques 56

III.1.1 Localisation du genre *Plakortis* (Schulze, 1880) 56

III.1.2 Position systématique et description du genre *Plakortis* (Schulze, 1880) 56

III.1.3 Cas particulier de l'espèce *Plakortis kenyensis* (Pulitzer-Finali, 1993) : localisation et description morphologique 57

III.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Plakortis* (Pulitzer-Finali, 1993) 58

III.1.4.1 Les acides carboxyliques et dérivés d'acides gras 58

III.1.4.2 Les peroxydes cycliques et peroxylactones 59

III.1.4.3 Les glycosides 63

III.1.4.4 Les alcaloïdes 64

III.2 Etude chimique de l'éponge *Plakortis kenyensis* de Madagascar 65

III.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites **PK1** et **PK2** 65

III.2.2 Elucidation structurale des métabolites **PK1** et **PK2** 67

III.2.2.1 Elucidation structurale du *Plakortolide E* 67

III.2.2.2 Elucidation structurale de l'acide andavadoïque 68

III.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés 69

III.3.1 L'activité antipaludique 69

III.3.2 L'activité antifouling 71

III.3.2.1 Méthode 1 : Activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants 71

III.3.2.2 Méthode 2 : Activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine 72

III.3.3 Discussion 74

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'EPONGE *Theonella swinhoei (Gray, 1868)* **80**

IV.1 Eléments bibliographiques 81

IV.1.1 Localisation du genre *Theonella* (Gray, 1868) 81

IV.1.2 Position systématique et description du genre *Theonella* (Pulitzer-Finali, 1993) 81

IV.1.3 Cas particulier de l'espèce *Theonella swinohei* (Gray, 1868): localisation et description morphologique 82

IV.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Theonella* (Gray, 1868) 83

IV.1.4.1 Les sesquiterpènes 83

IV.1.4.2 Les polyacétylènes 84

IV.1.4.3 Les stérols 85

IV.1.4.4 Les macrolides 86

IV.1.4.5 Les peptides 88

IV.1.4.6 Composés phosphorés atypiques 93

IV.2 Etude chimique de l'éponge *Theonella swinohei* de Madagascar 94

IV.2.1 Fractionnement et isolement du métabolite **TS1** 94

IV.2.2 Elucidation structurale du métabolite **TS1** 97

IV.3 Evaluation de l'activité biologique du métabolite isolé 99

IV.3.1 L'activité antipaludique 99

IV.3.2 L'activité antifouling 100

IV.3.2.1 Méthode 1 : Activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants 100

IV.3.2.2 Méthode 2 : Activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine 101

IV.3.3 Discussion 102

CHAPITRE V : ETUDE DE L'EPONGE *Haliclona (Reniera) fascigera (Hentschel, 1912)* 105

V.1 Eléments bibliographiques 106

V.1.1 Localisation du genre *Haliclona* (Grant, 1836) 106

V.1.2 Position systématique et description du genre *Haliclona* (Grant, 1836) 106

V.1.3 Cas particulier de l'espèce *Haliclona (Reniera) fascigera* (Hentschel, 1912): localisation et description morphologique 107

V.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Haliclona* (Grant, 1836) 108

V.1.4.1 Les alcaloïdes 109

V.1.4.2 Les polyacétylènes 111

V.1.4.3 Les stéroïdes 114

V.1.4.4 Autres métabolites 115

V.2 Etude chimique de l'éponge *Haliclona fascigera* de Mayotte 119

V.2.1 Fractionnement et isolement du métabolite **HF1** 119

V.2.2 Elucidation structurale du métabolite **HF1** 120

V.3 Evaluation de l'activité biologique du métabolite isolé 123

V.3.1 L'activité antipaludique 124

V.3.2 L'activité antifouling : activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine 124

V.3.3 Discussion 125

CHAPITRE VI : ETUDE DE L'EPONGE *Fascaplysinopsis reticulata* (Hentschel, 1912) 128

VI.1 Eléments bibliographiques 129

VI.1.1 Localisation du genre *Fascaplysinopsis* (Hentschel, 1912) 129

VI.1.2 Position systématique et description du genre *Fascaplysinopsis* (Bergquist, 1980) 129

VI.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Fascaplysinopsis* (Bergquist, 1980) 130

VI.1.3.1 Les terpènes 130

VI.1.3.2 Les alcaloïdes 132

VI.1.3.3 Les macrolides 134

VI.2 Etude chimique de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* de Mayotte 136

VI.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites **FR1-FR8** 136

VI.2.2 Elucidation structurale des métabolites **FR1-FR8** 138

VI.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés 154

VI.3.1 L'activité antipaludique 154

VI.3.2 L'activité antifouling 155

VI.3.3 Discussion 157

CONCLUSION GENERALE **168**

PARTIE EXPERIMENTALE **175**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **198**

LISTE DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES ORGANIGRAMMES **216**

ANNEXE I : Liste des invertébrés marins étudiés **222**

ANNEXE II : Données spectrales des composes de structure nouvelle isoles des éponges : *Haliclona fascigera* & *Fascaplysinopsis reticulata* **231**

INTRODUCTION GENERALE

Le mot « *biodiversité* », contraction de « *diversité biologique* », a été créé en 1985. Il est généralement assimilé à la diversité spécifique, soit l'ensemble des espèces vivantes : bactéries, protistes (unicellulaires), champignons, végétaux et animaux d'un milieu. Pour le biologiste, la biodiversité se définit sur trois niveaux: les diversités génétique, organismique et écologique autrement dit les gènes, les espèces et les écosystèmes.

Quatre grandes problématiques sont aujourd'hui abordées autour du terme « biodiversité » :

1. l'étude des mécanismes biologiques fondamentaux permettant d'expliquer la diversité des espèces et leurs spécificités, c'est à dire les mécanismes de la spéciation et de l'évolution ;
2. les approches plus récentes et prometteuses en matière d'écologie fonctionnelle et de biocomplexité, incluant l'étude des flux de matière et d'énergie et les grands cycles biogéochimiques ;
3. les travaux sur la nature au service de l'humanité pour ses capacités à fournir des éléments nutritionnels, des substances à haute valeur ajoutée (médicaments, produits cosmétiques…) ou encore à offrir des modèles plus simples et originaux pour la recherche fondamentale et finalisée, afin de résoudre des questions agronomiques ou biomédicales ;
4. la mise en place de stratégies de conservation pour préserver et maintenir un patrimoine naturel constituant un héritage naturellement attendu pour les générations futures.

Une biodiversité marine considérable

Tous les êtres vivants dans leur forme actuelle sont le résultat d'une histoire évolutive contrainte par les variables physico-chimiques de leur environnement. Ainsi, on distinguera la biodiversité terrestre de la biodiversité marine. Cette dernière demeure encore mal connue. En effet, moins de 20 % du fond des mers ont été explorés alors qu'ils représentent près des trois-quarts de la surface terrestre. Au dernier pointage, 274 000 espèces marines étaient recensées, soit 15 % du nombre d'espèces décrites à ce jour sur Terre. Toutefois, on estime que les océans constituent une réserve de biodiversité équivalente ou supérieure à celle des forêts tropicales. Et cette grande profusion de la vie marine, comparée à la vie terrestre, vient pour l'essentiel du fait que la vie marine est plus ancienne : elle remonte à quelque 3,8 milliards d'années contre seulement 400 millions d'années pour les espèces terrestres. La vie marine a

donc eu le temps de connaître une évolution beaucoup plus poussée. Elle est en outre, par de nombreux aspects, différente de celle des terres émergées. Les océans sont en premier lieu, beaucoup plus stables que les environnements terrestres et favorisent moins les effets « niches » : les espèces marines ne représentent que 10% environ de celles qui sont connues aujourd'hui. Mais cette stabilité a, à l'inverse, favorisé le maintien des très nombreuses formes d'organisation (phylums), dont un grand nombre n'est retrouvé que dans les océans. Le milieu marin se distingue par ailleurs du milieu terrestre par tout un ensemble de contraintes physico-chimiques d'organisations tridimensionnelles complexes qui encadre chaque organisme. A titre d'exemple, citons la pression, l'absence de lumière aux très grandes profondeurs, les îlots chimiosynthétiques près des fumeurs abyssaux[1] ou tout simplement la composition chimique de l'eau de mer. Les organismes marins vivent dans une solution saline complexe qui renferme la quasi-totalité des 92 éléments naturels, dont certains sont fortement présents dans l'eau de mer mais beaucoup moins ou seulement à l'état de traces dans l'eau douce ou sur terre : chlore, brome, iode, soufre, magnésium...

Une chimiodiversité marine remarquable

Dans le milieu marin, la chimiodiversité qui s'intéresse aux métabolites primaires et secondaires des organismes vivants, est en parfait accord avec la biodiversité. A biodiversité (en phylums) considérable correspond en effet une chimiodiversité remarquable tant quantitativement que qualitativement. Compte tenu de la composition chimique de l'eau de mer, il n'est pas surprenant que les organismes marins incorporent dans leurs métabolites primaires ou secondaires en plus des éléments « normaux » que sont le carbone, l'oxygène, l'hydrogène et l'azote, certains autres éléments plus spécifiques. C'est en particulier le cas des éléments « majeurs » (% > 10ppm) comme le chlore, le soufre et le brome mais également des éléments un peu moins abondants comme le bore, le silicium, l'iode et l'arsenic. La plupart de ces éléments sont absents ou rarement présents dans les métabolites des organismes dulçaquicoles[2] ou terrestres. En outre, le milieu marin est depuis des millénaires le théâtre d'incessantes luttes entre proies et prédateurs, colonisateurs et colonisés. Il facilite

[1] Proches des dorsales océaniques, en raison de la tectonique des plaques, des sources hydrothermales se forment. On parle de fumeurs. Ces cheminées éjectent des jets brûlants de plus de 350 °C. Ceux-ci peuvent être blancs ou noirs, en fonction du fluide qu'ils éjectent. Les fumeurs noirs contiennent du soufre, du fer et du manganèse. Ce sont des lieux remarquables, riches en biodiversité et qui contrastent avec l'immensité des plaines océaniques, froides et obscures.

[2] Qui vit en eau douce.

l'établissement de barrières chimiques : des substances organiques facilement diffusées et dispersées réduisant la valeur nutritive des tissus, au goût désagréable, toxiques ou anti-colonisantes. Ce milieu est ainsi très riche en substances allélochimiques[3] de tous genres, des plus simples, comme l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, aux plus complexes, comme certains alcaloïdes, pseudopeptides ou autres macrolides. Les animaux sessiles (éponges, coraux, gorgones, ascidies ..., vivant fixés à leur substrat) possèdent une étonnante capacité de synthèse de médiateurs chimiques impliqués dans la défense et la compétition interspécifique. D'un point de vue écologique, la plupart de ces animaux sont semblables aux végétaux : ils sont le plus souvent incapables de produire une réponse comportementale face à une agression mais sont pourvus de protection physique ou chimique, ou de caractéristiques morphologiques qui leur permettent de filtrer les UV, ou de se protéger des prédateurs, compétiteurs et autres organismes pathogènes. La biodiversité marine est la source d'une formidable diversité chimique qui mobilise depuis les années 60, un nombre croissant d'équipes de recherche dans le monde.

Une valorisation multiple de la chimiodiversité marine

La biodiversité marine, à même de fournir des molécules très originales sans équivalent terrestre (plantes ou micro-organismes terrestres), a suscité un vif engouement chez les chercheurs. Leurs travaux sur les métabolites marins sont en général menés dans des perspectives de valorisation. Deux secteurs sont particulièrement concernés : celui de la santé et celui de l'écologie chimique.

❖ *Secteur de la santé*

Nombreuses sont les molécules isolées de la mer présentant des activités biologiques *in vitro* : antivirale, antitumorale, immunomodulatrice, antibiotique, antifongique, anti-inflammatoire, anticoagulante, inhibitrice enzymatiques ; ces molécules peuvent aussi agir au niveau du système cardiovasculaire ou du système nerveux. L'industrie pharmaceutique et cosmétique a dès lors fondé beaucoup d'espoirs sur les « médicaments de la mer ». Outre le très grand nombre de molécules issus du milieu marin en phase d'essais précliniques, on compte à ce jour, 13 molécules d'origine marine ou dérivées en phase d'essais cliniques I, II ou III et quatre médicaments (Mayer A.M.S. *et al*., 2010). Ces derniers sont : la cytarabine

[3] Substances chimiques, qui agissent sur d'autres individus d'espèces différentes (interspécifiques) pour modifier leur comportement (parasitisme, prédation, symbiose, etc.).

(Cytosar-U®), la vidarabine (Vira-A®), le ziconotide (Prialt®), tous trois approuvés par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration, FDA) et la Trabectédine (Yondelis®, ET-743) dont la mise sur le marché a été autorisée par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA).

La cytarabine (cytosine arabinosyle ou cytosine arabinoside, *Ara-C*) (**1**) est un nucléoside pyrimidique de synthèse dérivé de la spongothymidine isolée de l'éponge *Tethya crypta* des Caraïbes. Ce composé commercialisé par les Laboratoires Bedford et Enzon, a reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA en 1969 sous le nom de Cytosar-U®. Il est indiqué pour le traitement de la leucémie lymphoïde[4], aiguë de la leucémie myéloïde[5] chronique en phase blastique[6] lymphoïde et de l'érythroleucémie[7].

La vidarabine (arabinofuranosyladénine ou adénine arabinoside, *Ara-A*) (**2**) est une purine nucléoside dérivée de la spongouridine isolée de l'éponge *Tethya crypta* et couramment obtenue de la souche *Streptomyces antibioctus*. Ce composé commercialisé par la Société King Pharmaceuticals (http://www.kingpharm.com), a reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA en 1976 sous le nom de Vira-A ®. Il est indiqué pour le traitement des kératoconjonctivites[8] virales et des kératites herpétiques[9] épithéliales[10] causées par le virus *Herpes simplex* de type 1 et 2.

Le ziconotide (**3**) est l'équivalent synthétique de l'ω-conotoxine, peptide formé de 25 acides aminés isolé du venin du mollusque *Conus magus* récolté aux Philippines. Ce composé commercialisé par la Société Elan Corporation, a reçu une autorisation de mise sur le marché

---

[4] Maladie cancéreuse du sang (leucémie), caractérisée par la prolifération de lymphocytes.

[5] Maladies du sang caractérisée par une production excessive et persistante au sein de la moelle osseuse des globules blancs (ou leucocytes).

[6] La maladie évolue de manière classique en trois phases:

- *la phase chronique :* se déroule sur plusieurs années, si le patient n'est pas traité. La proportion des globules blancs anormaux et défectueux dans la moelle osseuse est encore relativement réduite; celle des cellules complètement immatures, appelées blastes, n'est que de 10%. Le nombre de plaquettes sanguines ainsi que celui de leurs cellules précurseurs sont souvent encore normaux à ce stade.
- *la phase d'accélération* : la formation de leucocytes ne cesse de s'accroître et l'on commence à observer la présence de nombreuses cellules très immatures (blastes) dans l'hémogramme. La très forte augmentation du nombre de cellules leucémiques dans la moelle osseuse perturbe fortement la production de globules rouges (érythrocytes) qui servent au transport du sang et celle de plaquettes sanguines (thrombocytes) qui sont impliquées dans le processus de coagulation sanguine.
- *la crise blastique* : l'état du patient est très sérieux et sa vie est en danger. La prolifération des cellules leucémiques dans la moelle osseuse est devenue complètement incontrôlable, de sorte que la production de globules blancs et de plaquettes sanguines capables de remplir leur mission est de plus en plus réduite. De nombreuses cellules très immatures (blastes) se répandent dans le sang.

[7] Forme rare de leucémie aigüe myéloïde.

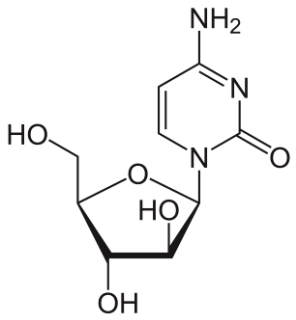
[8] Infection qui se traduit par une double inflammation ; de la conjonctive et de la cornée de l'œil. Elle est souvent due à des bactéries (*Moraxella bovis* par exemple), mais des virus peuvent aussi être impliqués.

[9] Infection virale de la cornée de l'œil causée par le virus de l'*Herpès simplex*.

[10] Les cellules épithéliales sont les cellules qui forment l'épithélium. Il s'agit d'un tissu organique dit de "revêtement" car il recouvre la surface externe ou interne de divers organes.

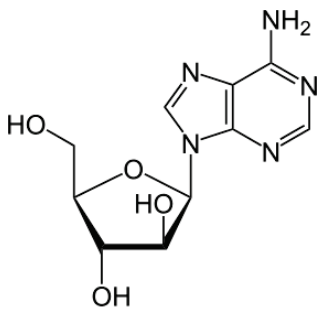
par la FDA en 2004 puis par l'EMA en 2005 sous le nom de Prialt®. Il est indiqué pour le traitement des douleurs chroniques par voie inthratécale[11]. Il s'agit d'un anti-douleur très puissant, environ mille fois plus actif que la morphine, administré aux patients atteints de cancer ou du sida pour lesquels une thérapie par voie inthratécale est appliquée.

La trabectidine (*ET-743*) (**4**) est un alcaloïde tétraisoquinoline d'origine marine isolé pour la première fois du tunicier *Ecteinascidia turbinata* des Caraïbes et de la Mer Méditerranée. Ce composé commercialisé par la Société Pharmamar, a reçu une autorisation de mise sur le marché par par l'EMA en 2007 puis en 2009, sous le nom de Yondelis®. Il s'agit d'un agent anticancéreux indiqué pour le traitement du sarcome des tissus mous et des cancers ovariens.



Cytarabine, Ara-C (Cytosar-U®) (**1**)

Anticancéreux

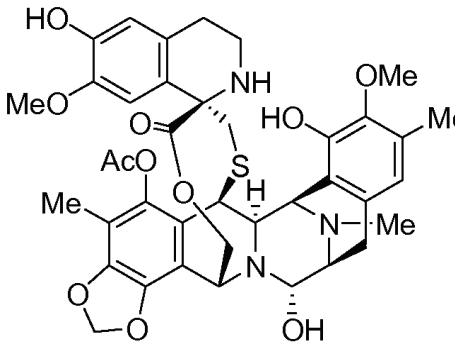


Vidarabine, Ara-A (Vira-A®) (**2**)

Antiviral, Ophtalmique

Ziconotide (Prialt®) (**3**)

Anti-douleur



Trabectédine, ET-743 (Yondelis®) (**4**)

Anticancéreux

[11] Voie d'administration directe dans le liquide céphalo-rachidien.

❖ *Secteur de l'écologie chimique*

Les changements globaux qui touchent notre planète ne se limitent pas à des modifications du climat ou de la composition de l'atmosphère. Ils affectent également toute la dynamique du vivant en perturbant les écosystèmes et les espèces qui les constituent. Ces effets ont un impact notamment sur les interactions entre les espèces ou entre les individus d'une même espèce, interactions pourtant primordiales pour le maintien des communautés et écosystèmes où la médiation chimique joue une place prépondérante. La mise en place de stratégies de conservation pour préserver et maintenir un patrimoine naturel passe donc aussi par une meilleure connaissance des interactions chimiques dans le monde vivant autrement dit par l'écologie chimique. Cette dernière est une science interdisciplinaire en plein essor qui allie science de terrain et expérimentations en laboratoire et qui bénéficie des avancées technologiques majeures dans les domaines des sciences du vivant (ex : Omiques) et de la chimie des substances naturelles. Cette science permet de mieux décrypter le « langage universel » de la nature et aussi de répondre à des problématiques actuelles de fonctionnement des organismes et des écosystèmes dans le contexte de changement global. En mer, plus encore que sur terre, les systèmes de communication chimique constituent un élément indispensable dans l'établissement des relations intra- et interspécifiques. Ceci est d'autant plus vrai que parmi les organismes marins plusieurs milliers d'espèces sont sessiles (invertébrés marins notamment) et dépourvues d'organe de la vision. Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau conditionnent en effet les différences de mode de vie entre milieu marin et milieu terrestre. En mer, la vie fixée est possible et favorable. De plus, la fonction vectrice de l'eau, où s'exercent diffusion et dispersion avec une grande facilité, favorise les phénomènes de communication chimique.

Outre le questionnement du fonctionnement des organismes et des écosystèmes, l'écologie chimique permet également de s'intéresser à d'autres problématiques comme celle du biofouling. Le biofouling est le processus par lequel tout substrat immergé dans l'eau de mer est sujet à une colonisation rapide par un large spectre d'organismes vivants. Il se déroule en trois étapes, intervenant successivement ou en parallèle :

1. L'adsorption de matière organique dissoute sur le substrat ;
2. La colonisation par des procaryotes et des eucaryotes unicellulaires ;
3. L'établissement de larves d'invertébrés marins et de spores d'algues.

D'un point de vue économique, les organismes marins colonisateurs sont une cause de problèmes drastiques à l'encontre de la plupart des activités humaines liées au monde marin

(marine marchande et militaire, aquaculture, plateforme de forage, etc). En raison des nombreux dégâts environnementaux provoqués par l'utilisation de revêtements dits « antifouling » ou « antisalissures » à base de biocides composés de cuivre, d'étain (triaryl- ou trialkylétain) ou de zinc, les scientifiques se sont penchés sur la recherche de solutions plus respectueusement de l'environnement. Dans ce contexte, les organismes marins riches en métabolites secondaires utilisés pour leur défense contre les micro-organismes et les macro-organismes représentent une source prometteuse en vue de la production de molécules actives en « antifouling » et non toxiques vis-à-vis d'espèces non ciblées.

Les travaux de thèse

Les enjeux économiques et environnementaux de la chimiodiversité marine présentés ci-dessus, constituent les deux piliers des programmes de recherche BIOMOL TCN et POMARE dans lesquels sont impliqués entre autres, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA, Université de La Réunion) et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette (ICSN, CNRS). Les travaux de thèse exposés dans ce mémoire et réalisés au LCSNSA et à l'ICSN s'inscrivent pleinement dans les programmes BIOMOL TCN et POMARE ; l'objectif étant la recherche de molécules d'origine marine, à haute valeur ajoutée dans les domaines de la santé (molécules à activité anticancéreuse, antivirale, antipaludique, anti-oxydante) et de l'environnement (molécules à activité antifouling).

Ce mémoire s'articule autour de six chapitres :

- Le premier chapitre situera le contexte des travaux de thèse en présentant les financeurs, les objectifs et les partenaires de chacun des programmes de recherche : BIOMOL TCN et POMARE.
- Le deuxième chapitre mettra l'accent sur le choix stratégique des organismes marins étudiés au cours de la thèse.
- Les troisième, quatrième, cinquième et sixième chapitres seront consacrés aux travaux menés respectivement sur les éponges *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera* et *Fascaplysinopsis reticulata*. Seront développés dans chacun de ces chapitres :
    - des éléments bibliographiques relatifs au genre étudié : position géographique, position systématique et description, travaux chimiques antérieurs ;
    - les travaux chimiques menés sur chacune des éponges ;
    - la valorisation des molécules isolées et identifiées.

CHAPITRE I

CONTEXTE DE L'ETUDE

Parmi les organismes de recherche acteurs de la biodiversité de la zone Sud-Occidentale de l'Océan Indien et en faveur de sa sauvegarde, l'Université de La Réunion a inscrit prioritairement dans sa stratégie de recherche « *La valorisation et la protection de la biodiversité terrestre et marine* ». Sa position stratégique au cœur de la zone Ouest de l'Océan Indien est un atout indéniable ; elle offre des conditions de recherches exceptionnelles pour l'observation et l'étude de la biodiversité. Implanté à l'Université de La Réunion, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA), par ses études sur la chimiodiversité menées sur les plantes, les invertébrés marins et les micro-organismes, contribue activement au développement de cette thématique de recherche privilégiée. Le laboratoire se consacre plus précisément à l'extraction, au fractionnement, à l'isolement, à l'identification et à la production de molécules d'intérêt à finalités pharmacologique, cosmétique, parfumistique et alimentaire (colorants, arômes). Ces études sont réalisées de manière à comprendre les écosystèmes dans un cadre écologique et environnemental. Ces travaux, certes initiés par de profondes motivations sanitaire et économique (recherche de nouvelles substances actives), s'inscrivent aussi dans un contexte écologique (recensement des espèces végétales et marines ; études chimiotaxonomiques pour une meilleure connaissance de la biodiversité insulaire ; meilleure compréhension des relations inter-espèces entre invertébrés marins et micro-organismes par exemple). Cette connaissance et donc reconnaissance contribuent à la gestion spécifique de notre patrimoine unique au monde.

Concernant plus particulièrement la chimie marine, le LCSNSA prend ses marques dans le domaine depuis le début des années 90. Les compétences développées au sein du LCSNSA, lui ont valu d'être impliqué dans deux projets scientifiques au cours de la période 2012-2016: le projet de recherche BIOMOL TCN (FEDER) et le projet de recherche POMARE (ERA-NET, NET-BIOME), deux projets dans lesquels s'inscrivent nos travaux de thèse.

I.1 Le projet BIOMOL TCN

Le 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*) soutenu par l'Europe et La Région Réunion (FEDER : Fonds Européen de Développement Régional) et mené par le LCSNSA entre 2012 et 2014,

avait pour objectif la découverte de :

- nouveaux candidats médicaments,
- nouveaux composés ayant des propriétés préventives à l'égard de certaines pathologies,
- nouveaux compléments alimentaires pour la prévention nutritionnelle et physiologique,
- nouveaux actifs en cosmétologie.

Le projet s'est donc attaché dans un premier temps à l'évaluation des propriétés biologiques, d'extraits de plantes et d'invertébrés marins de la zone Sud-Ouest de L'Océan Indien. Plusieurs activités biologiques ont été ciblées :

La cytotoxicité sur les cellules cancéreuses KB (carcinome buccal)

Les tests de cytotoxicités sont liés à la problématique du cancer. Ils sont en effet réalisés sur différentes souches cancéreuses, afin de trouver de nouvelles molécules potentiellement anticancéreuses et sélectives.

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anormale de cellules au sein d'un tissu de l'organisme. Le cancer est dû à une grave perturbation des voies de signalisation de la mort cellulaire programmée qui contrôle le développement des tissus et leur matien. Lors d'un stade avancé du cancer, des métastases se forment par migration des cellules malignes dans le corps, pour former d'autres tumeurs aussi appelées néoplasmes. 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.

En 2015, on estime à environ 149 000 personnes, dont 85 000 hommes et 63 000 femmes, mourant du cancer par an en France, soit 411 personnes chaque jour. Ce sont les cancers du sein et de la prostate les plus meurtriers. Chaque année, on détecte environ 350 000 nouveaux cas de cancers en France (www.unicancer.fr). De ce fait, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuse est un enjeu crucial.

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

L'activité antivirale sur :

- **Le virus du Chikungunya** (souche 899)

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.

- **L'entérovirus type 71** (souche BrCr)

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.

- **Le rhinovirus type 14** (phénotype sauvage)

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.

L'activité antipaludique

Le paludisme reste aujourd'hui encore l'une des plus grandes problématiques des pays des zones tropicales et en voie de développement dans le domaine médical et pharmaceutique.

Le paludisme, du latin *paludis*, signifiant « marais », est aussi appelé malaria, de l'italien *mal'aria*, signifiant « mauvais air ». Il s'agit d'une maladie infectieuse transmise par un parasite du genre *Plasmodium*. Cette maladie, véhiculée par le moustique femelle du genre *Anophèle*, est transmise lors de la piqure de celui-ci. Les principaux 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. Dans le monde, il existe 4 espèces de *Plasmodium* capables d'induire la maladie : *Plasmodium ovale*, *vivax*, *malariae* et *falciparum*. Le plus étudié est *Plasmodium falciparum*, car il peut engendrer un paludisme souvent mortel.

Avec plus de 200 millions de cas répertoriés dans le monde, le paludisme se concentre essentiellement dans les zones tropicales et humides. L'Afrique subsaharienne connaît la plus importante épidémie de paludisme, notamment du fait du manque de moyen, du climat favorable et des autorités rapidement dépassées. D'autres zones du monde jusqu'ici épargnées commencent à être colonisées par des moustiques porteurs du parasite : Sud de l'Europe, Asie, Amérique latine, Moyen Orient, et ce, en raison du réchauffement climatique, de la mondialisation et de l'introduction accidentel de moustiques porteur du parasite. Enfin, il a été observé une forme de résistance aux antipaludiques. 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 recherche de nouveaux antipaludiques est nécessaire.

L'activité antioxydante

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme *via* la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA) tels que les radicaux RS^- (thiyl); O^{2-} (anion superoxyde); RO^- (radical alkoxyle); ROO^- (radical peroxyde avec R = substrat organique); mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (chimiquement instables) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet ($^1O_2$).

Le rôle de ces EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration.

Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours

duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule.

Toutefois, formées en trop grande quantité, les EOA deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies.

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires.

Tous ces effets délétères montrent la nécessité d'augmenter l'apport en antioxydants afin de rétablir les capacités de défense naturelle de l'organisme.

On distingue deux sources d'antioxydants :

L'une est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs d'enzymes antioxydantes.

L'autre est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. On assiste donc depuis quelques années au développement de nombreux produits antioxydants (alicaments, compléments alimentaires, médicaments, crèmes de soin apaisantes, antiradicalaires, anti-âges...) contenant dans certains cas des molécules complexes d'origine naturelle en polyphénols, flavonoïdes, anthocyanosides, caroténoïdes…

La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) et superoxydes ($O_2^{\bullet}$) (Ricardo da Silva J.M *et al*., 1991, Rice-Evans C.A *et al*., 1995 ; Burda S. et Oleszek W., 2001 ; Antolovich M. *et al*., 2002 ; Bartosz G., 2003). Plusieurs tests sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $ROO^{\bullet}$ par les tests ORAC (Oxygen

Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva J.M. *et al*., 1991) ; les ions ferriques par le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie I.F. et Strain J., 1996) ; ou les radicaux ABTS$^{\bullet}$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re R. *et al*., 1999) ; ainsi que le test utilisant le radical libre DPPH$^{\bullet}$ (diphényl-picrylhydrazyle) (Sharma Om P. et Bhat T.K., 2009).

Concernant plus particulièrement les invertébrés marins étudiés dans le cadre du projet BIOMOL TCN, les études réalisées antérieurement aux travaux de la thèse ont permis de déceler **87 extraits actifs** (toutes activités confondues) sur un total de 194 extraits testés. Les résultats obtenus sont détaillés ci-après.

Nombre d'espèces étudiées	: 100
Nombre d'extraits testés	: 194
Nombre d'extraits à activité cytotoxique	: 64
Nombre d'extraits à activité antivirale	: 8 (*anti-chikungunya*)
Nombre d'extraits à activité antipaludique	: 48
Nombre d'extraits à activité antioxydante	: 13

Certains des extraits actifs peuvent présenter plusieurs activités à la fois.

BIOMOL TCN a réuni six équipes complémentaires dont trois locales, une nationale et deux internationales. Les tâches ont été réparties selon les compétences de chaque équipe :

<u>Partenaire 1</u> (P1) :

Le **Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments** (**LCSNSA**) de l'Université de La Réunion, **porteur du projet** et chargé de :

- la collecte des invertébrés marins
- l'extraction des plantes et invertébrés marins,
- l'évaluation des activités antioxydante,
- la chimie des extraits de plantes et d'invertébrés marins.

<u>Partenaire 2</u> (P2) :

L'**UMR C_53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical** (**UMR PVBMT**) de l'Université de La Réunion, chargé de :

- la collecte des espèces végétales,
- l'identification des espèces végétales.

<u>Partenaire 3</u> (P3) :

Le **Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité** (**GEICO**) de l'Université de La Réunion, chargé de :

- la réalisation de tests complémentaires pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

<u>Partenaire 4</u> (P4) :

L'**Institut de Chimie des Substances Naturelles** (**ICSN**-CNRS) de Gif-sur-Yvette, chargé de :

- l'évaluation de la cytotoxicité,
- la chimie des extraits de plantes et d'invertébrés marins,
- la synthèse biomimétique des molécules bioactives.

<u>Partenaire 5</u> (P5) :

Le **Laboratoire de Pharmacognosie - Institut de Pharmacie** (**LP-IP**) de l'Université de Liège, chargé de :

- l'évaluation de l'activité antipaludique,
- la phytochimie des extraits de plantes.

<u>Partenaire 6</u> (P6) :

Le **Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie de l'Institut Rega pour la Recherche Médicale** de l'Université Catholique de Louvain (**KU-LEUVEN**), chargé de :

- l'évaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale.

I.2 Le projet POMARE

Le projet **POMARE** (*Polynesian, Mayotte's, Reunion's marine benthic invertebrates : interactions and chemodiversity evaluation for a sustainable use*) entre dans le cadre du Programme Era-Net-Netbiome 2010 et est soutenu par l'Agence Nationale de La Recherche (ANR) et La Région Réunion. Ce projet mené entre 2012 et 2016, est ciblé sur les ressources benthiques animales marines (spongiaires principalement) de la Polynésie française, de Mayotte et de La Réunion.

Les objectifs de ce projet sont (1) de caractériser la biodiversité marine par des méthodes de métabolomique, de séquençage et de conservation durable du patrimoine génétique ainsi que (2) de rechercher des molécules d'intérêt pour l'environnement et la santé humaine. Les principaux enjeux de ce projet sont donc :

- La connaissance du patrimoine naturel et sa conservation durable;
- L'élucidation des interactions entre les éponges et leur environnement microbien pour des applications en aquaculture mais aussi en santé humaine ;
- La recherche des voies de production durable de composés bioactifs d'origine marine sur la base de synthèses et hémi-synthèses biomimétiques.

Les activités biologiques ciblées pour la recherche de composés naturels, semi-synthétiques et synthétiques d'intérêt pour l'environnement et la santé humaine sont, comme pour le projet BIOMOL TCN (§ II.1) :

- **La cytotoxicité sur les cellules cancéreuses KB et du mélanome murin**
- **L'activité antioxydante**

Mais aussi :

- **L'activité antifouling et d'inhibition du quorum sensing**

L'appellation biofouling, ou salissure biologique, représente l'ensemble du processus de colonisation de toute surface immergée (qu'elle soit vivante ou inerte) par des organismes vivants. Ce processus a été pour la première fois décrit en 1943 par Claude Zobell suite à l'observation de la présence de bactéries aquatiques ; plus nombreuses sur la surface solide contenant l'échantillon qu'en suspension. En fonction du stade d'avancement du processus de la colonisation, on distingue :

- ***Le microfouling, ou fouling primaire :*** les organismes impliqués dans la colonisation sont alors des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les diatomées, les microalgues ou les larves d'invertébrés.
- ***Le macrofouling, ou fouling secondaire :*** les organismes impliqués dans la colonisation sont dans ce cas des macro-organismes tels que les macroalgues et les invertébrés (bivalves, tuniciers, coquillages…). Ce phénomène s'observe généralement dans un second temps après le microfouling.

Contrairement au milieu dulcicole où il constitue un phénomène secondaire, le biofouling est très important en milieu marin. La colonisation sur toute surface immergée, non protégée s'y produit inévitablement. La richesse et la diversité en bactéries, en phytoplancton et en zooplancton en sont probablement les raisons principales. Le biofouling constitue en outre un aspect primordial de la compétition entre les organismes marins. Les végétaux et animaux sessiles, qui doivent trouver un substrat dur pour se développer, s'établissent soit sur le fond, soit sur d'autres organismes : dans ce cas, ils sont appelés épiphytes (pour les végétaux) ou épibiontes (pour les animaux). Les organismes colonisés sont alors amenés à se défendre afin de maintenir un accès suffisant à la lumière et aux nutriments, nécessaires à leur survie.

Le mécanisme d'adhésion des salissures marines est décrit comme une succession d'évènements indépendants, chaque étape n'étant pas indispensable à l'autre (Figure 1) (Dalton H.M., et March P.E., 1998; Lejeune P., 2003) :

Etape 1 : Adsorption en quelques minutes de fragments organiques (essentiellement des fragments protéiques et osidiques) et minéraux (sels) sur une surface vierge constituant un film conditionnant (ou film primaire).

Etape 2 : Colonisation par des bactéries et des micro-algues de la surface plus ou moins conditionnée jusqu'à former une structure tridimensionnelle appelée biofilm.

Etape 3 : Adhésion des macroorganismes sur le biofilm.

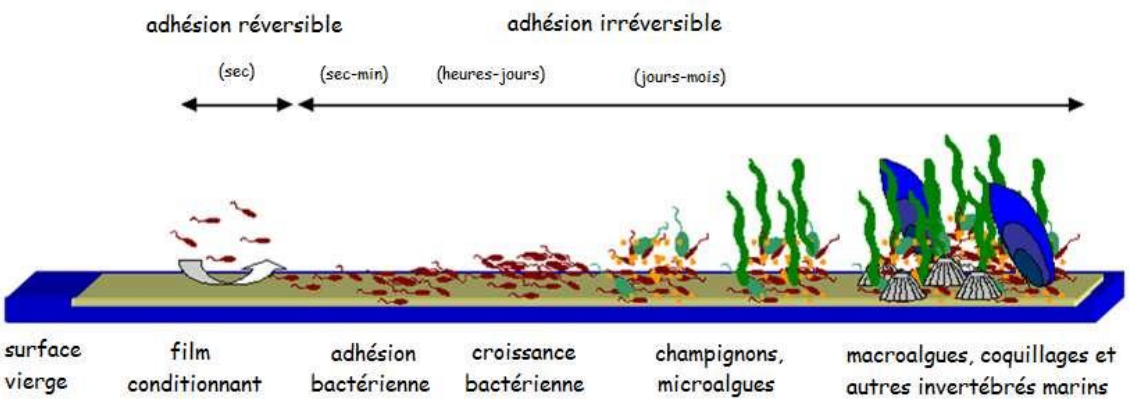


Figure 1 : *Schéma de formation du biofouling en milieu marin (Haras D., 2005).*

Le biofilm bactérien représente une étape prépondérante du processus de colonisation des surfaces immergées. L'étude de ce phénomène est complexe en raison notamment de l'hétérogénéité des milieux (Tolker-Nielsen T. *et al*., 2000). Cette hétérogénéité se situe aussi bien au niveau structural selon que le biofilm ait été formé par une seule espèce ou plusieurs espèces, avec variation de l'épaisseur de cette couche et de l'organisation interne du biofilm, qu'au niveau des surfaces colonisées (supports divers). Cette diversité de formation serait l'un des éléments clés de leur robustesse face aux agents antimicrobiens et autres agressions (Singh P.K. *et al*., 2002). Cette étude nécessite de l'interdisciplinarité : microbiologie, génétique, physico-chimie de surface…L'approche par la génétique et la biologie moléculaire a permis un grand progrès dans la compréhension des mécanismes de formation et de développement des biofilms. Cette approche consiste à cribler des souches mutantes selon leur potentiel à former des biofilms. Après caractérisation des gènes mutés, on peut identifier des molécules mais surtout des voies d'activations moléculaires impliquées dans la formation et le développement des biofilms, notamment concernant la communication des bactéries entre elles au sein du biofilm. L'ensemble de ces signaux est regroupé sous le terme de « Quorum Sensing » (QS - « Quorum » : seuil ; « Sensing » : détection). Le QS représente le mécanisme qui permet aux bactéries de percevoir la densité de population bactérienne et de coordonner une réponse à cette information *via* la régulation de certains gènes (Fuqua W.C. *et al*., 1994). Ce mécanisme comprend trois étapes (Daniels R. *et al*., 2004) :

Etape 1 : Une molécule, l'auto-inducteur, est sécrétée en permanence par les bactéries. A une concentration constitutive. Cette molécule diffuse librement dans le milieu et peut passer à travers la paroi et la membrane bactériennes.

Etape 2 : Lorsque la population est plus importante, la concentration en auto-inducteur augmente. A grande concentration, cet auto-inducteur forme un complexe avec un facteur de transcription présent normalement dans la bactérie.

Etape 3 : Le complexe facteur de transcription/auto-inducteur formé, active un gène. Ceci induit la production d'un signal qui confère à la population de nouvelles propriétés. Propriétés qui varient selon l'espèce de bactéries, la nature de l'auto-inducteur, le gène activé. Il peut s'agir de la luminescence, de la virulence ou encore de la formation d'un biofilm.

Les biofilms sont présents sur toutes les interfaces et leur étude est commune à différents domaines d'applications (santé, agroalimentaire, écologie marine, industries du traitement des eaux, …). Selon le domaine étudié, les modèles de formation de biofilm *in vitro* diffèrent selon la nature de la bactérie, ainsi que de celle de la surface et du milieu. Le biofilm le plus étudié aujourd'hui est certainement celui de *Pseudomonas aeruginosa*, responsable des infections nosocomiales rencontrées dans le milieu hospitalier, mais aussi ceux de *Staphyloccocus aureus* et *S. epidermis*, bactéries à Gram positif, également pathogènes. Les recherches menées sur les biofilms dentaires concernent des bactéries du genre *Streptococcus* et celles menées sur le biofilm marin concernent des microorganismes des genres *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* ou *Vibrio*.

Concernant plus précisément les biofilms marins, s'établissant sur toutes les surfaces immergées non protégées, qu'elles soient vivantes ou inertes, tout ouvrage humain placé dans le milieu marin pendant un temps suffisamment long subit donc inévitablement ce phénomène. Ce phénomène n'est pas sans conséquence ; elles sont non seulement d'ordre économique mais aussi d'ordre écologique :

Impact économique

Le biofouling se produit en particulier sur les coques des bateaux, les pipelines, les structures portuaires, les installations liées à l'aquaculture, les membranes des usines de dessalement, les systèmes de refroidissement des usines ou encore sur toutes sortes de matériels scientifiques immergés. Dans le cas des navires, le biofouling entraîne une augmentation de la rugosité de la surface, et donc des forces de friction lors du déplacement dans l'eau, ainsi qu'une surcharge due à la biomasse. Ceci conduit à une réduction de la vitesse et donc à un accroissement de la consommation en carburant. Dans le cas des matériels scientifiques, les biofilms induisent une dérive des mesures réalisées par des capteurs

océanographiques immergés, comme les détecteurs optiques, les caméras sous-marines, les capteurs de mesures de pH, de température, de substances toxiques Enfin, plus généralement, les salissures marines peuvent avoir des effets sur les matériaux eux-mêmes en altérant leurs propriétés originelles : c'est le cas de la corrosion qui est accélérée, on parle alors de biocorrosion ou biodégradation.

Impact écologique

La présence du biofouling sur les installations humaines présente également un impact écologique. En effet, outre les désagréments économiques inhérents à la présence de biofouling sur les coques de bateaux, ces surfaces peuvent être le vecteur d'une dissémination des organismes à grande échelle, conduisant ainsi des espèces invasives à perturber profondément certains écosystèmes dont l'équilibre est fragile. En effet, les espèces se développant sur les coques de bateaux sont transportées et leur développement peut être favorisé vis-à-vis des espèces natives lors de leur établissement dans des milieux pollués.

Pour toutes ces raisons économiques et écologiques, protéger les surfaces immergées par un revêtement anti-fouling s'avère donc indispensable. Ainsi, dans le milieu marin, des peintures antisalissures (antifouling) ont été développées pour contrôler la prolifération de ces espèces colonisatrices sur les navires et certaines surfaces artificielles. Or, les revêtements très efficaces à base d'oxydes de tributylétain, couramment utilisés à partir des années 70, ont été totalement interdits par l'IMO (International Maritime Organization) en 2008 du fait de leur importante toxicité vis-à-vis d'espèces non-ciblées, principalement des mollusques. Pour cette raison, de nombreux travaux sont actuellement dédiés à la recherche de substances actives en antifouling et non-toxiques pour l'environnement marin. La recherche d'une alternative à ces peintures devient donc un enjeu majeur et plusieurs approches ont été abordées pour trouver de nouvelles solutions plus respectueuses de l'environnement (Chambers L.D. *et al*., 2006).

Parmi les différentes voies de recherche, on notera plus particulièrement l'approche bioinspirée. L'objectif d'une telle méthode consiste à s'inspirer des moyens de défense utilisés par les organismes marins, en particulier les organismes sessiles, qui apparaissent peu colonisés, et de tenter de les reproduire. Deux principaux types de mécanismes de défense peuvent être observés :

- ***La défense chimique :*** de nombreux organismes benthiques produisent des métabolites secondaires ayant pour but de repousser les organismes épiphytes, ou du moins de réguler leur colonisation. Les composés répertoriés dans la littérature pour leur activité antifouling

témoignent d'une grande diversité chimique : ce sont des terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, méroditerpènes), des composés aromatiques, des dérivés lipidiques, des composés halogénés, des oses ou des alcaloïdes. Les petites molécules semblent être une très bonne source d'inhibiteurs du quorum sensing mais sont trop souvent peu étudiées (Villa F. *et al*., 2013).

- ***La défense physique :*** en plus des techniques de défense basées sur la présence d'épines, il a été démontré que la microtopographie de la surface présentait une importance considérable dans la lutte de ces organismes contre les espèces colonisatrices.

L'approche biomimétique selon le mécanisme de défense chimique aura toutefois pour contrainte la difficulté de trouver une molécule naturelle présentant (1) une activité antifouling à large spectre, (2) une faible toxicité vis-à-vis des organismes non-ciblés et (3) une structure chimique simple en vue de sa production à grande échelle. De même, repousser de nombreux organismes de taille et de mode de colonisation différents à l'aide d'une microarchitecture de surface donnée selon le principe de défense physique, n'est pas un objectif aisé.

POMARE a réuni six équipes complémentaires dont deux d'Outre-Mer, deux nationales et deux internationales. Les tâches ont été réparties selon les compétences de chaque équipe :

<u>Partenaire 1</u> (P1) :

Le laboratoire **Etude Intégrée Des Métabolites Secondaires** (**EIMS**) de l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens, Polynésie Française, France, **porteur du projet** et chargé de :

- la collecte des invertébrés marins de la zone Pacifique,
- l'évaluation de la cytotoxicité et de l'activité QSI,
- la chimie des invertébrés marins collectés dans le Pacifique.

<u>Partenaire 2</u> (P2) :

Le **Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments** (**LCSNSA**) de l'Université de La Réunion, La Réunion, France, chargé de :

- la collecte des invertébrés marins de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien,
- l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits,
- la chimie des invertébrés marins collectés dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien.

<u>Partenaire 3</u> (P3) :

The **Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis** (**NATURALIS**), Leiden, Pays-Bas, chargé de :

- l'identification des spongiaires,
- étude de la communauté microbienne des spongiaires.

<u>Partenaire 4</u> (P4) :

The **School of Biological Sciences** (**SOB**), de l'Université de Portsmouth (UOP), Royaume-Uni, chargé de :

- l'évaluation des activités antifouling.

<u>Partenaire 5</u> (P5) :

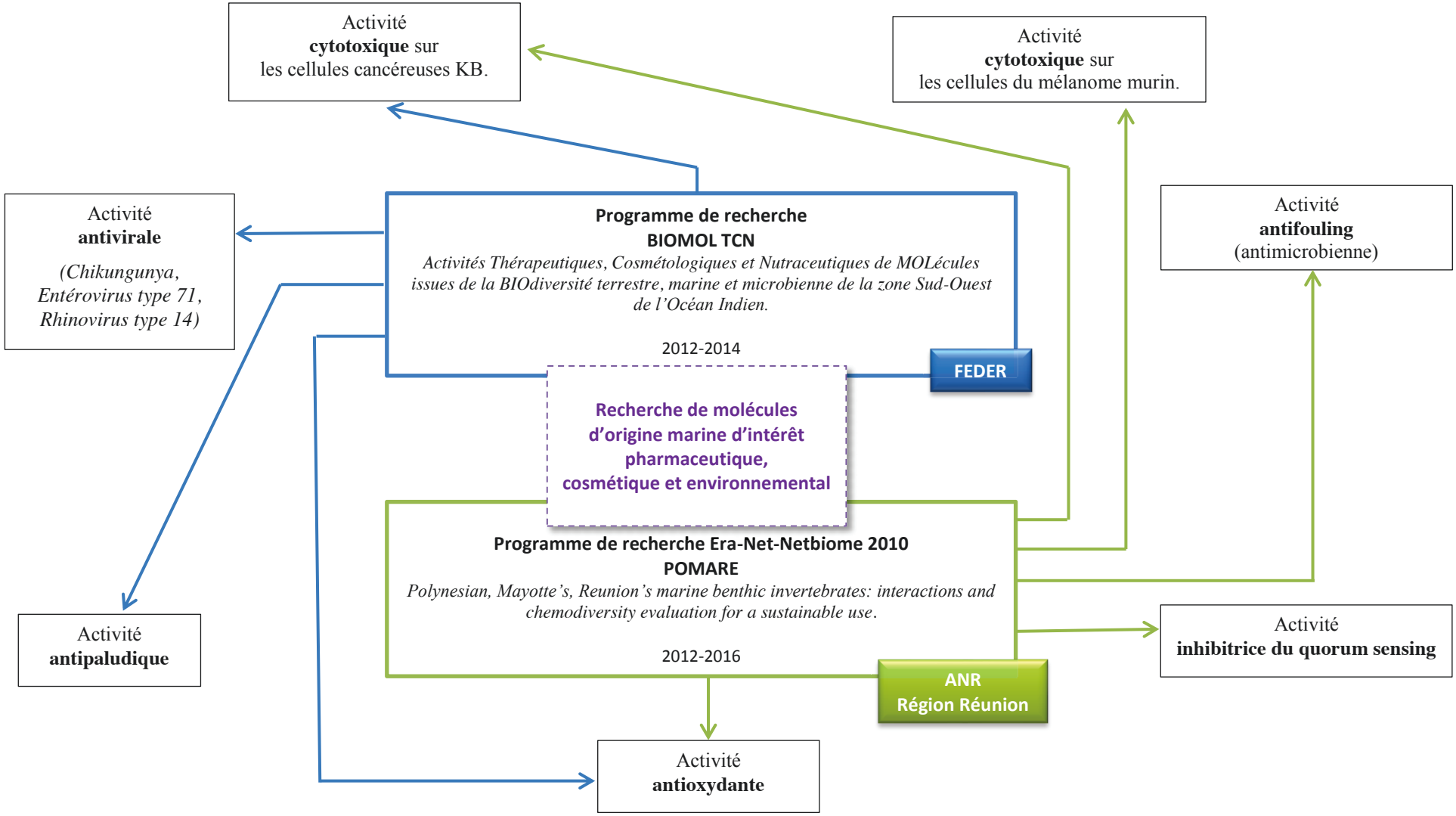
L'**Institut de Chimie des Substances Naturelles** (**ICSN**-CNRS) de Gif-sur-Yvette, France, chargé de :

- l'évaluation de la cytotoxicité,
- la chimie des d'invertébrés marins collectés dans le Pacifique et l'Océan Indien,
- la synthèse biomimétique des molécules bioactives.

<u>Partenaire 6</u> (P6) :

Le **Laboratoire Biomolécule : Conception, Isolement, Synthèse** (**BioCIS**) UMR CNRS 8076 de l'Université Paris XI, France, chargé de :

- l'évaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale.



Organigramme 1 : *Objectifs des programmes BIOMOL TCN et POMARE*

CHAPITRE II

SELECTION DES INVERTEBRES MARINS

II.1 Collecte et identification des invertébrés marins

Parmi l'ensemble des invertébrés marins collectés dans le cadre des projets BIOMOL TCN et POMARE, 4 éponges collectées en 2011 dans le Sud-Ouest de l'île de Madagascar et 38 espèces d'éponges ainsi qu'une ascidie collectées en 2013 dans le Sud-Ouest de Mayotte ont été retenues pour ces travaux de thèse ; certaines espèces pouvant être représentées par plusieurs échantillons (Figure 2 ; Annexe 1).

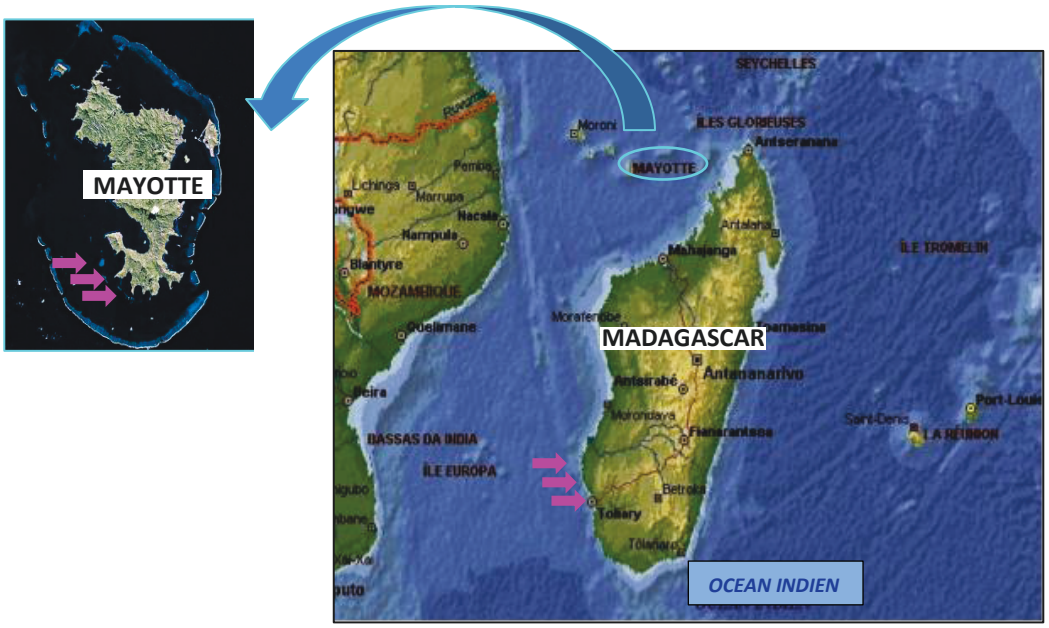


Figure 2 : *Zone de collecte des invertébrés marins sélectionnés* (Crédit Google Maps).

Les éponges provenant de Madagascar, ont été identifiées par le Directeur de Recherche CNRS **Jean Vacelet**, de l'*Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale* (IMBE, UMR Université Aix-Marseille / CNRS 7263 / IRD 237 / Université d'Avignon). Les invertébrés marins issus de Mayotte ont, quant à eux, été identifiés par le Docteur **Nicole de Voogd** du Museum d'Histoire Naturelle *Naturalis* de Leiden (Pays-Bas).

Des échantillons de références de tous les organismes ont été conservés au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) ainsi qu'au Museum d'Histoire Naturelle de Marseille (pour les organismes de Madagascar) et au Museum d'Histoire Naturelle Naturalis de Leiden (pour les organismes de Mayotte).

II.2 Extraction des invertébrés marins

II.2.1 Principe

Chacun des 43 invertébrés marins collectés a été lyophilisé et extrait au moyen soit d'une macération à froid, soit d'une extraction par ASE (Extraction Accélérée par Solvant). Le choix du mode d'extraction était fonction du projet et des contraintes méthodologiques imposées :

- pour le **projet BIOMOL TCN**, il a été retenu la **macération à froid**,
- pour le **projet POMARE**, l'**extraction accélérée par solvant** (ASE) a été privilégiée.

Les deux modes d'extraction utilisent le même mélange de solvant : Dichlorométhane/Méthanol (50/50 V/V).

II.2.2 Résultats

Les rendements en extraits bruts ont été calculés par rapport à la masse de matière sèche de l'organisme. Ces rendements sont donnés dans l'annexe 1.

II.3 Le criblage chimique

II.3.1 Principe

Chaque extrait brut est ensuite soumis à une analyse chimique préliminaire utilisant différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques :

- **La Chromatographie Liquide à Haute Performance (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 (ou signature chimique). Pour chaque éponge, plusieurs signatures chimiques ont été obtenues par l'emploi simultané de trois détecteurs :

- Un détecteur à barrettes de diodes (DAD) 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-quantitatives 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 Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^{1}H)**

Les spectres RMN^{1}H (500 MHz) des extraits bruts ont été réalisés dans du méthanol et/ou du chloforme deutéré.

Les données analytiques obtenues pour chaque extrait sont comparées à celles d'une banque de données en ligne (Marinlit), permettant la sélection d'organismes à travailler selon la nature chimique des composés présents connus ou inconnus. En outre, pour cette thèse, la nouveauté des substances chimiques, ainsi que la « simplicité » du profil chimique ont été privilégiées.

II.3.2 Résultats et Discussion

Suite au criblage chimique réalisé, 7 éponges, toutes collectées au large des côtes mahoraises ont été sélectionnées : *Crella cyathophora*, *Dragmacidon coccineum*, *Fascaplysinopsis reticulata*, *Haliclona fascigera*, *Hyrtios erectus*, *Liosina paradoxa* (forme encroûtante) et *Neopetrosia* sp.2 (Figure 3).

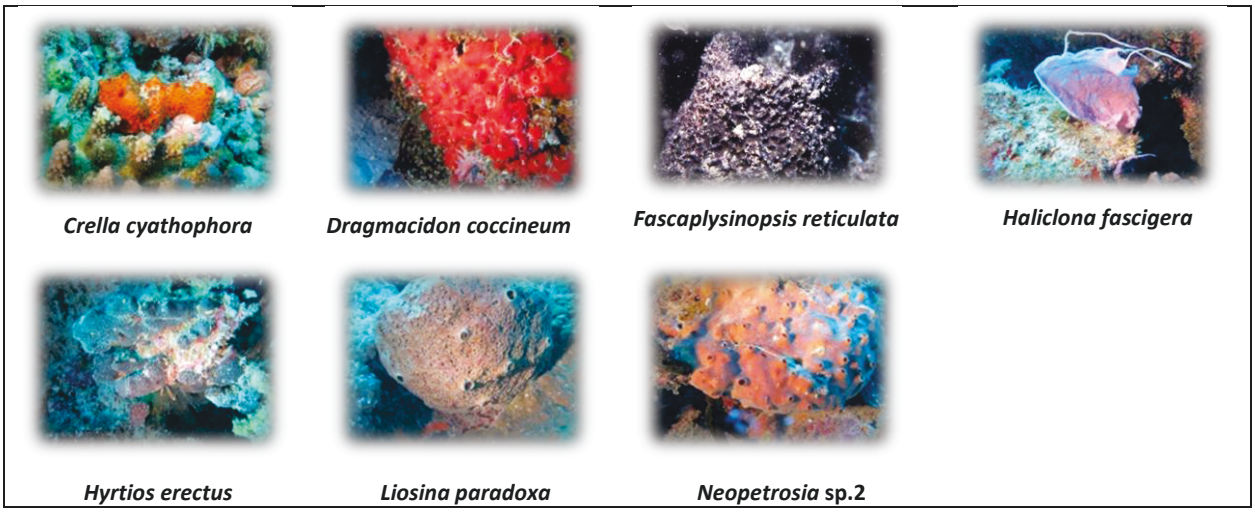
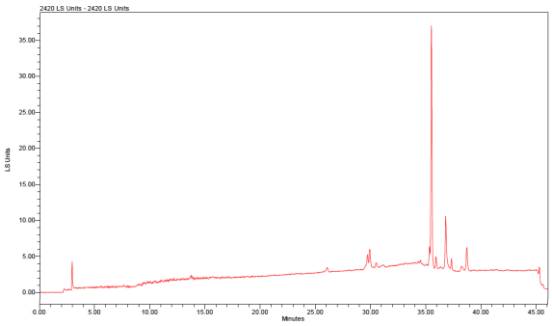
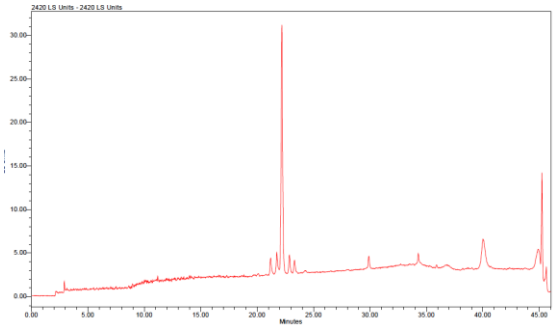


Figure 3 : *Eponges sélectionnées pour leur composition chimique*.

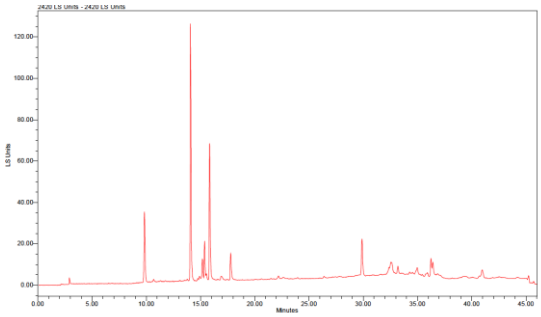
Les analyses par CLHP-SM couplées aux données de la littérature selon la base de données marine « MarinLit » ont montré en effet que les extraits bruts de toutes ces éponges étaient constitués de composés dont les masses moléculaires laissaient présumer la présence de structures nouvelles. En outre, les chromatogrammes obtenus par CLHP-DAD, DEDL et Corona (Figure 4) ont montré que les extraits bruts de *Crella cyathophora*, *Dragmacidon coccineum*, *Haliclona fascigera* et *Hyrtios erectus* étaient constitués d'un composé nettement majoritaire. Les profils obtenus pour *Fascaplysinopsis reticulata*, *Liosina paradoxa* et *Neopetrosia* sp. dénotent quant à eux des compositions en molécules diverses plus importantes avec, notamment la présence de composés bromés pour l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata*, de composés relativement polaires pour *Neopetrosia* sp. et de composés polaires pour l'éponge *Liosina paradoxa*.



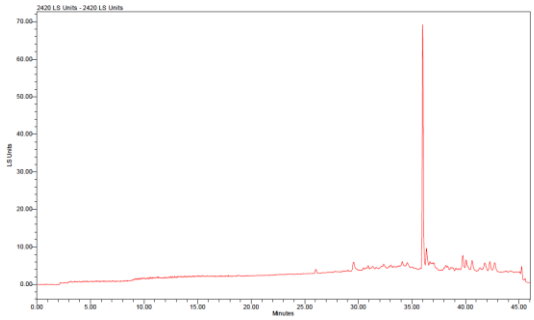
Crella (Grayella) cyathophora MAY13 158



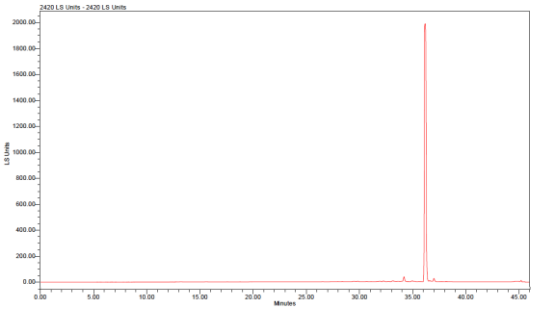
Dragmacidon coccineum MAY13 046



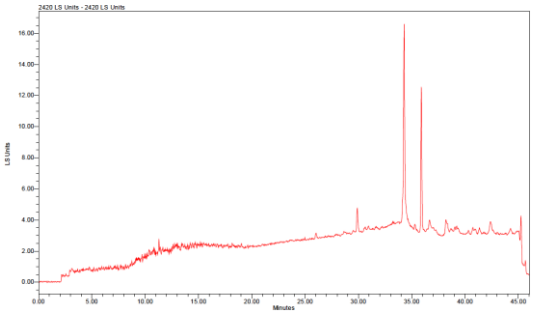
Fascaplysinopsis reticulata MAY13 187



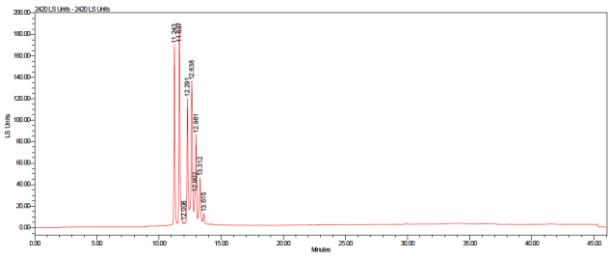
Haliclona fascigera MAY13 054



Hyrtios erectus MAY13 143

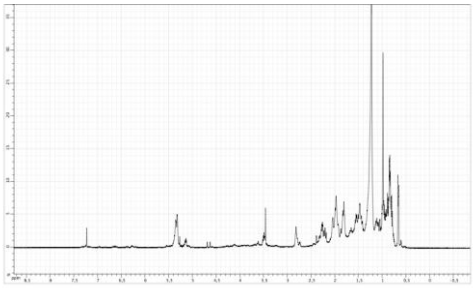


Liosina paradoxa (forme encroutante) MAY13 152

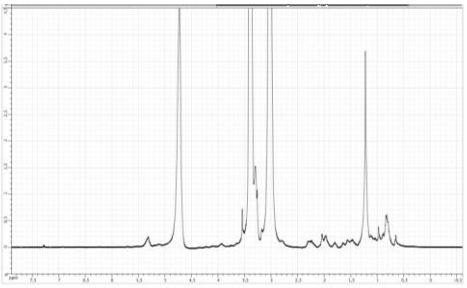


***Neopetrosia* sp.2** MAY13 048

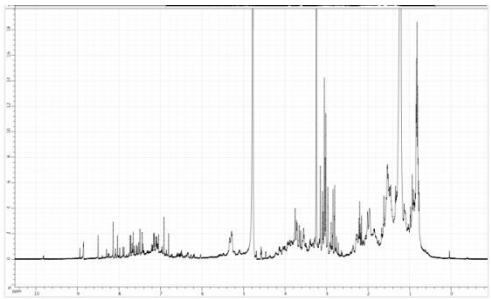
Figure 4 : *Profils CLHP-DEDL des 7 éponges sélectionnées.*



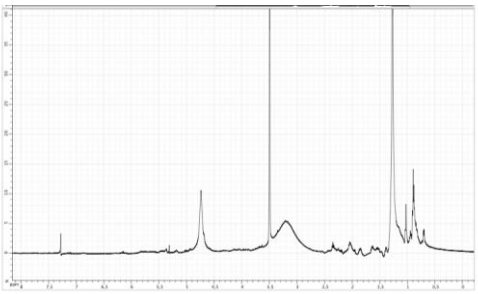
Crella (Grayella) cyathophora MAY13 158 ($CDCl_3$)



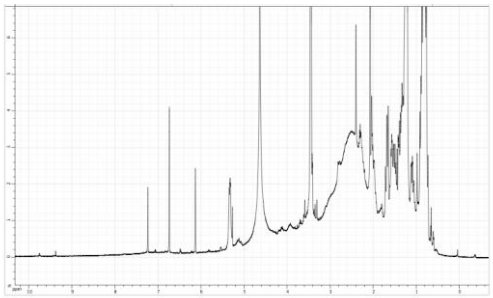
Dragmacidon coccineum MAY13 046 ($CDCl_3$)



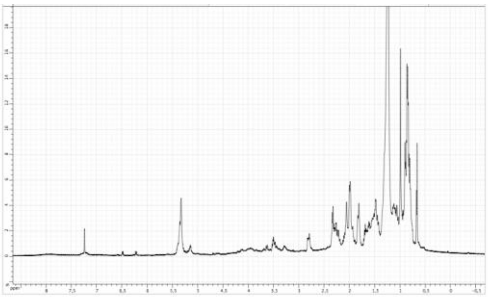
Fascaplysinopsis reticulata MAY13 187 (MeOD)



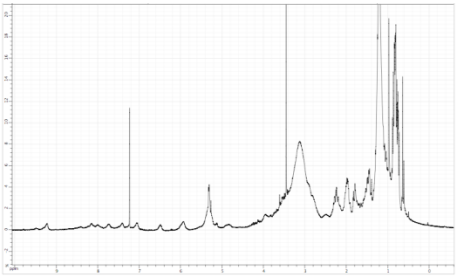
Haliclona fascigera MAY13 054 ($CDCl_3$)



Hyrtios erectus MAY13 143 ($CDCl_3$)



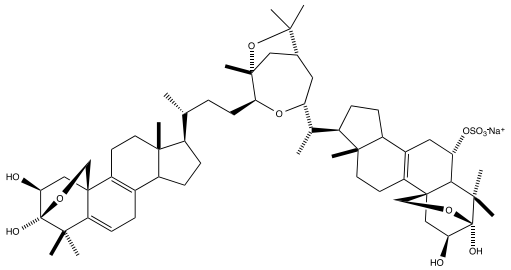
Liosina paradoxa (forme encroutante) MAY13 152 ($CDCl_3$)



***Neopetrosia* sp.2** MAY13 048 ($CDCl_3$)

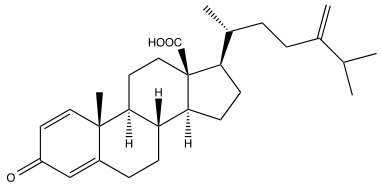
Figure 5 : *Profils RMN ^1H des 7 éponges sélectionnées.*

Les analyses RMN^{1}H des extraits bruts (Figure 5) ont révélé la présence de composés apolaires, notamment de longues chaînes hydrocarbonées (δ_H 1-3 ppm) pour les éponges *Crella (Grayella) cyathophora, Dragmacidon coccineum, Haliclona fascigera, Liosina paradoxa (forme encroutante).* Concernant plus précisément les éponges *Crella (Grayella) cyathophora* et *Liosina paradoxa (forme encroûtante)*, la présence de stérols majoritaires est clairement identifiable sur les spectres proton (δ_H 1-3 ppm, δ_H 3,5 ppm, δ_H 5,5 ppm). L'éponge *Crella (Grayella) cyathophora* est d'ailleurs connue pour contenir des stérols et des dimères de stérols comme la crellastatine A (D'Auria M.V. *et al*., 1998) ou encore l'acide norsélique C (Ma W.S. *et al*., 2009). Ces analyses permettent de supposer la présence de composés somme la crellastatine A, un dimère de stérol dans lequel est incorporé un atome de soufre. L'acide norsélique C est un inhibiteur du protozoaire responsable de la leishmaniose à de très faible concentration.



Crellastatine A

Crella cyathophora
(D'Auria M.V. *et al*., 1998)



Acide norsélique C

Crella cyathophora
(Ma W.S. *et al*. 2009)

Les spectres RMN^{1}H des éponges *Neopetrosia* sp.2 et *Hyrtios erectus*, font apparaître la présence de chaînes hydrocarbonées (δ_H 1-3 ppm), mais aussi de fonctions polaires (δ_H 3-4 ppm, δ_H 9 ppm) ainsi que des cycles aromatiques (7-10 ppm). Enfin, l'analyse du spectre RMN^{1}H de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* permet de mettre en évidence la présence de cycles aromatiques et d'atomes d'azote (3 ppm, 8-9 ppm).

II.4 Le criblage biologique

II.4.1 Principe

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 cinquante invertébrés marins sélectionnés ont été testés pour leurs activités cytotoxique, antipaludique, antioxydante et antifouling. Le choix des tests appliqués aux extraits bruts s'est fait en fonction des objectifs des projets BIOMOL TCN ou POMARE auxquels ils appartenaient.

II.4.2 Recherche d'activité cytotoxique

- ***Les tests de cytotoxicité sur cellules KB ont été réalisés sous la direction du Docteur Thierry Cresteil puis par Jérôme Bognon à l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette), France.***
- ***Les tests de cytotoxicité sur cellules de mélanome murin ont été réalisés sous la direction du Directeur de Recherche Cécile Debitus à l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens à l'Université de Polynésie Française, France.***

Les tests de cytotoxicité sur cellules KB (carcinome buccal) ont permis de mettre en évidence 21 éponges inhibant cette lignée cancéreuse humaine. Sur ces 21 éponges, 17 proviennent d'éponges du projet POMARE, 4 du projet BIOMOL TCN (Annexe 1). Les résultats exposés Figure 6 s'expriment en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire calculé pour une concentration en extrait brut de 10 µg/mL. Ne sont présents sur la figure 4 que les éponges ayant présenté une cytotoxicité sur cellules KB supérieure à 70% d'inhibition.

Les activités les plus importantes (> 95%) ont été observées pour 12 éponges : *Axinella aff donnani* (99%), *Callyspongia* sp.4 (98%), *Biemna laboutei* (98), *Haliclona* sp.1 (99%), *Hyrtios erectus* (99%), *Neopetrosia* sp.2 (98%), *Neopetrosia* sp.3 (100%), *Oceanapia globosa* (100% MAY13 141), *Phyllospongia papyraceae* (97%), *Plakinastrella* sp. (99%), *Plakortis kenyensis* (97%) et *Theonella swinhoei* (98%) (Figure 7).

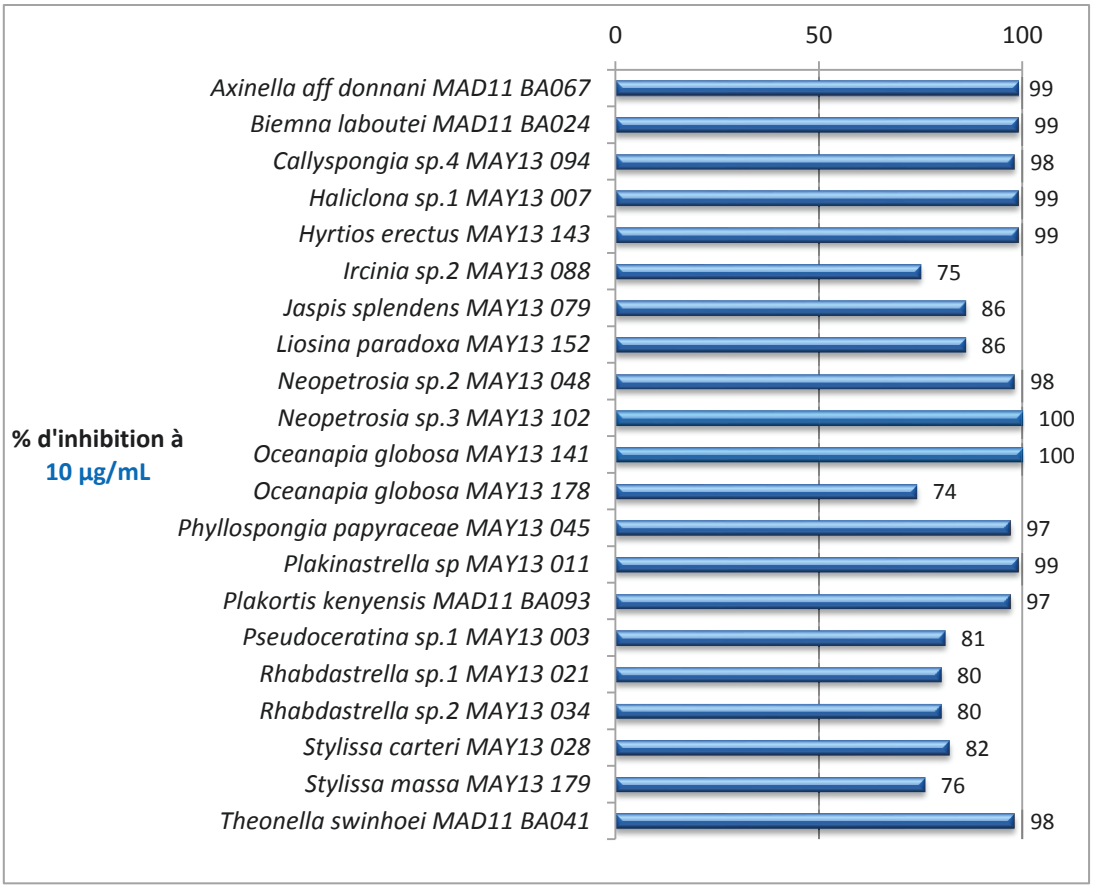


Figure 6 : *Cytotoxicité des 22 éponges les plus actives : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB.*

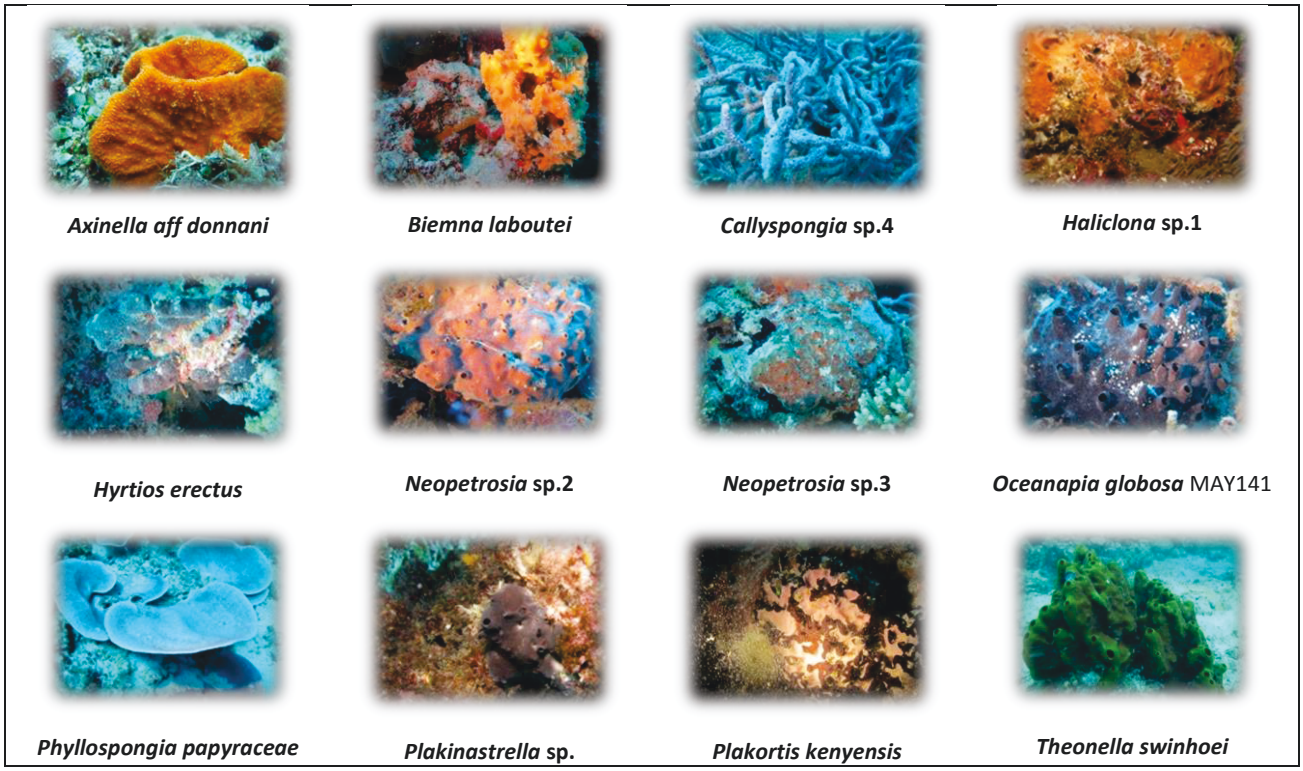


Figure 7 : *Principales éponges sélectionnées pour leur cytotoxicité sur la lignée cancéreuse KB.*

Le test de cytotoxicité sur les cellules de mélanome murin a uniquement été appliqué aux éponges du programme POMARE. Quatre d'entre elles ont montré une activité inhibitrice de la croissance de ces cellules cancéreuses. Les résultats exposés Figure 8 s'expriment en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire calculé pour une concentration en extrait brut de 10 µg/mL. Ne sont présents sur le graphique que les extraits bruts présentant des activités cytotoxiques sur mélanome murin supérieure à 60% d'inhibition.

Parmi les 4 éponges actives (Figure 9), la plus forte cytotoxicité vis-à-vis des cellules du mélanome a été observée pour l'éponge *Rhabdastrella* sp.2 (83% d'inhibition à 10 µg/mL).

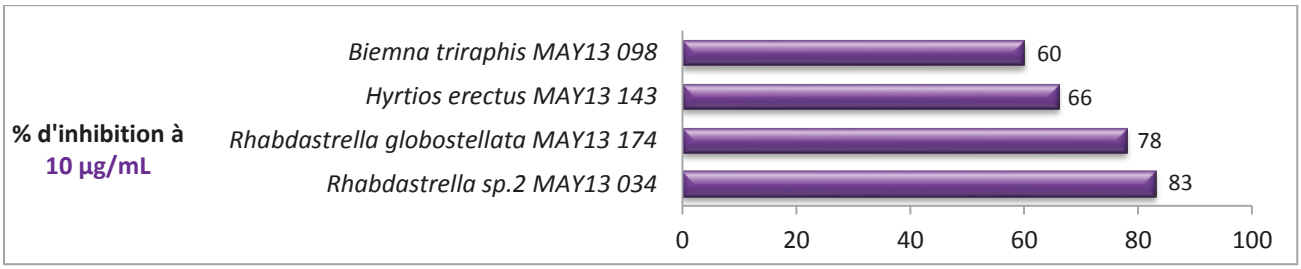


Figure 8 : *Cytotoxicité des 4 éponges les plus actives : inhibition de la croissance des cellules de mélanome murin.*

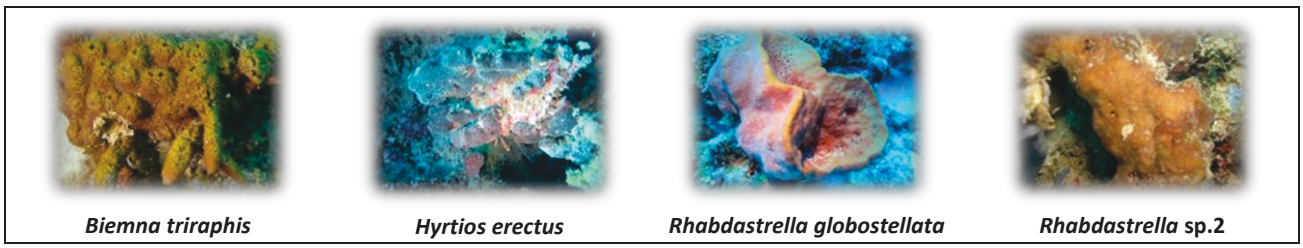


Figure 9 : *Eponges sélectionnées pour leur cytotoxicité sur les cellules de mélanome murin.*

II.4.3 Recherche d'activité antipaludique

- ***Les tests d'activité antipaludique ont été réalisés sous la direction du Professeur Michel Frédérich au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège, Belgique.***

L'activité antipaludique a été évaluée *in vitro* à travers l'activité anti-proliférative sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7). Ce test a été réalisé uniquement sur les 4 extraits bruts des éponges collectées dans le cadre du projet BIOMOL TCN. Les résultats 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 pour les espèces des genres *Axinella*, *Biemna* et *Plakortis* et à 5 µg/mL pour l'espèce du genre *Theonella* (Figure 10);
- La CI_{50} ou concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire (Figure 11).

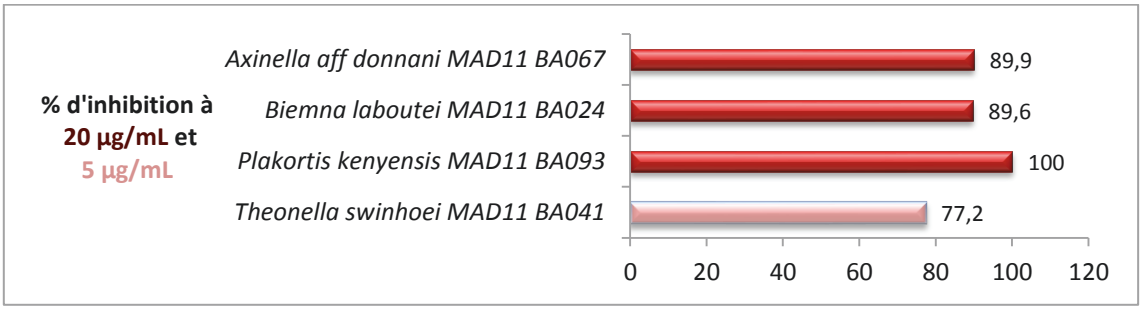


Figure 10 : *Activité antiplasmodium des 4 éponges les plus actives : inhibition de la croissance de P. falciparum.*

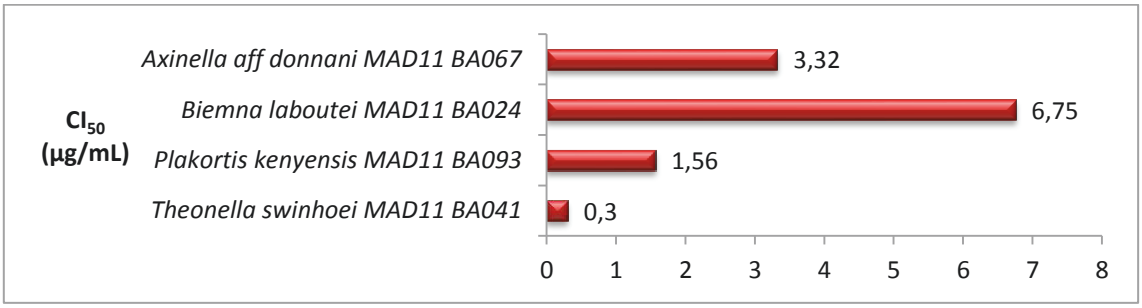


Figure 11 : *Activité antiplasmodium des 4 éponges les plus actives : concentration inhibant 50% de la croissance de P. falciparum.*

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

Tableau I : *Interprétation des résultats du test antiplasmodium.*

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	Excellent

Les cinq éponges testées présentent des activités antipaludiques remarquables (bonnes à excellentes) (Figure 12). Elles constituent donc des sources potentielles de molécules à activité antipaludique.

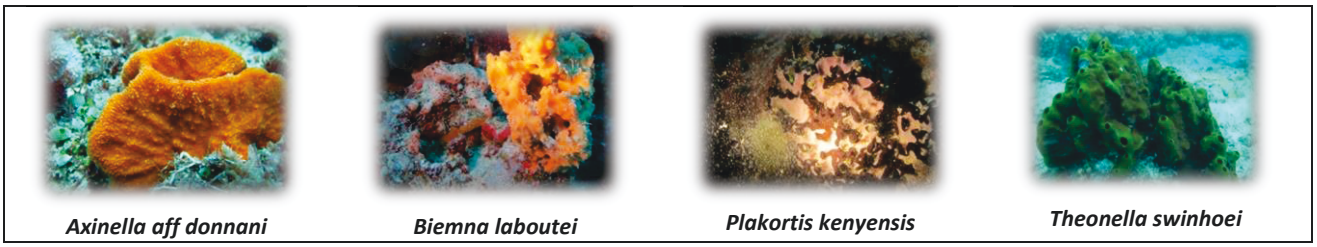
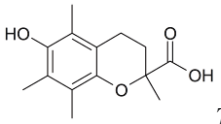


Figure 12 : *Eponges sélectionnées pour leur activité antiplasmodium.*

II.4.4 Recherche d'activité antioxydante

- ***Les tests d'activité antioxydante ont été réalisés au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Université de La Réunion, France.***

Dans le cadre des programmes BIOMOL TCN et POMARE, deux tests antioxydants ont été adaptés et appliqués aux extraits bruts des organismes marins : les tests FRAP et ABTS. Les résultats d'activité antioxydante sont exprimés par rapport à une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connue sous le nom de Trolox qui est un analogue hydrosoluble de la vitamine E. Les résultats sont donc exprimés en µM Equivalent Trolox/mg d'extrait.



Trolox

Parmi les 45 extraits bruts d'organismes marins testés pour leur activité antioxydante, 9 éponges ont montré une activité remarquable (Figures 13, 14).

Les résultats obtenus montrent que les activités antioxydantes détectées au moyen des tests FRAP et ABTS ne sont pas forcément similaires. En effet, si pour les éponges *Dactylospongia* sp., *Fascaplysinopsis reticulata*, *Hyrtios erectus*, *Ircinia* sp.2 et *Scopalina hapalia*, les activités antioxydantes évaluées en µM Equivalent Trolox / mg d'extrait sont relativement proches ; pour les éponges *Biemna laboutei*, *Haliclona* sp.1, *Neopetrosia* sp.2 et *Neopetrosia* sp.3 en revanche, les activités sont fortement éloignées. Pour ces quatre dernières

éponges, les molécules actives n'ont donc pas la même capacité à piéger les radicaux ABTS• que les ions ferriques.

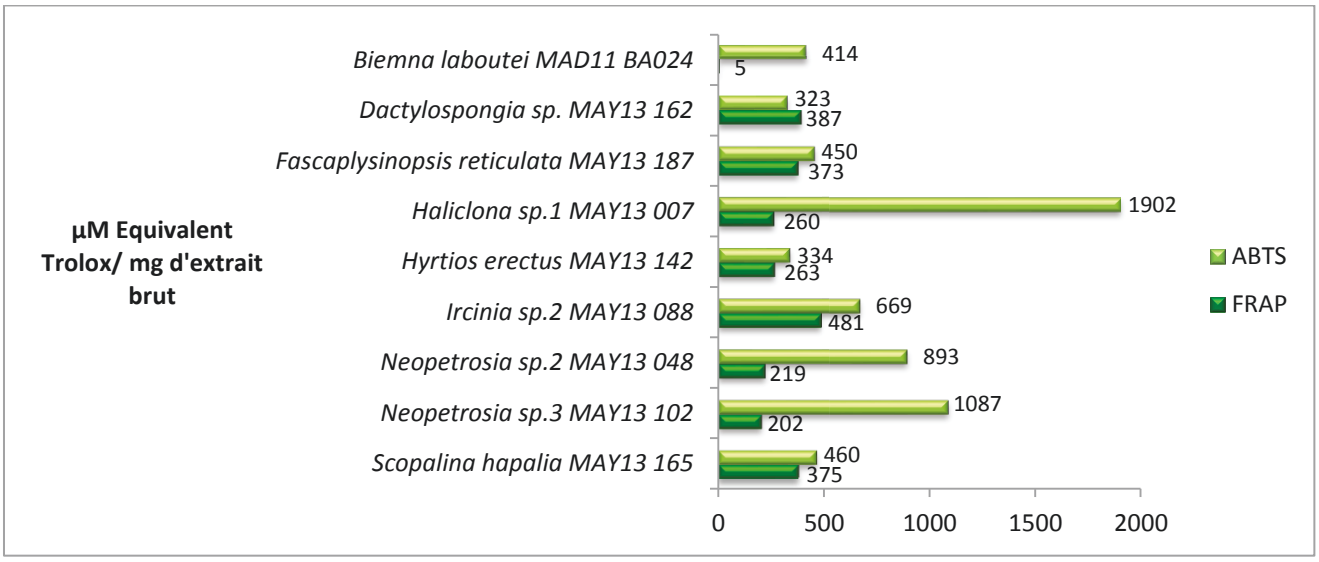


Figure 13 : *Activité antioxydante des 8 éponges les plus actives*.

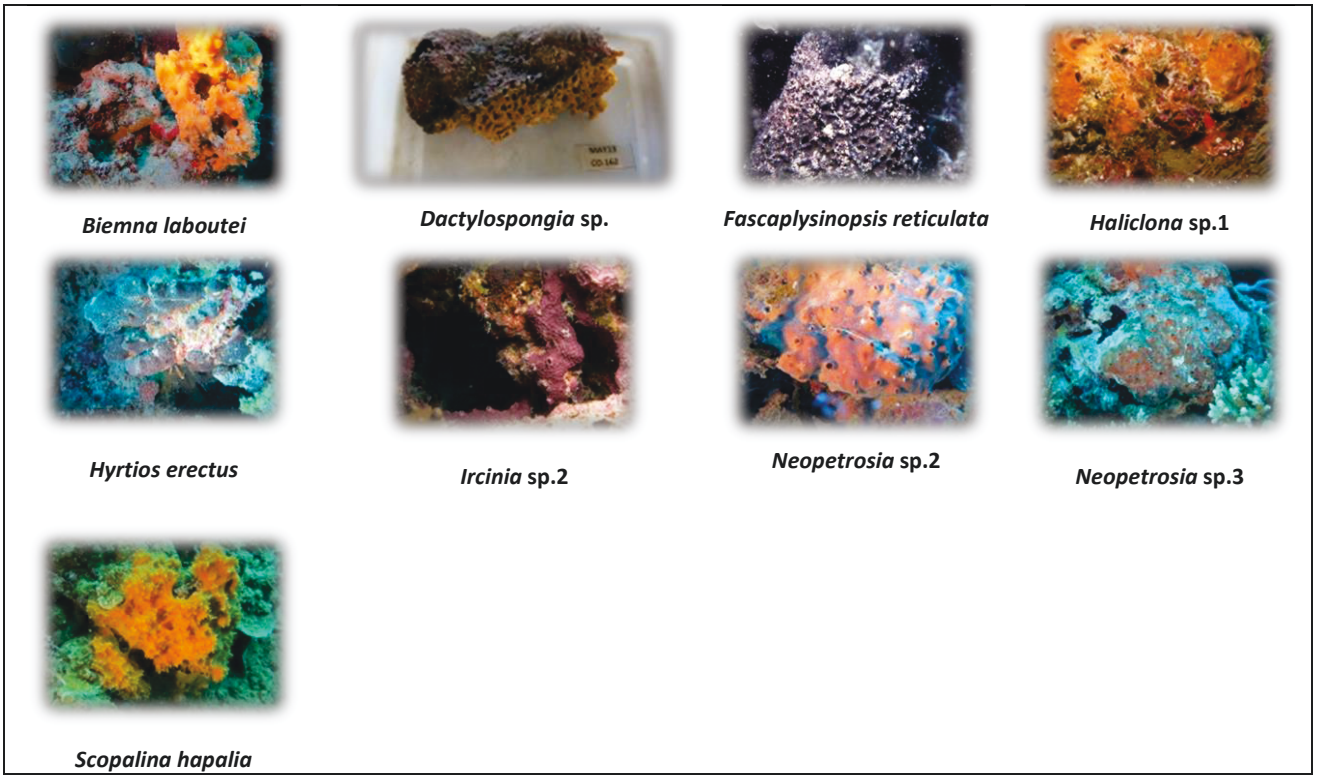


Figure 14 : *Eponges sélectionnées pour leur activité antioxydante*.

II.4.5 Recherche d'activité inhibitrice du quorum sensing (antibiofilm)

- ***Les tests d'activité QSI ont été réalisés sous la direction du Directeur de Recherche Cécile Debitus par l'équipe EIMS (Etude Intégrée Des Métabolites Secondaires) de l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens.***

La recherche de nouveaux antifouling naturels est l'un des objectifs principaux du Projet POMARE. Dans le cadre de ce projet, la stratégie adoptée pour la recherche d'antifouling repose sur la recherche de molécules pouvant inhiber le quorum sensing de la bactérie marine *Vibrio harveyi*. Cette dernière est une bactérie Gram-négative bioluminescente, en forme de bâtonnet, mobile (*via* un flagelle mobile), éventuellement anaérobie, halophile, doté d'un métabolisme respiratoire et fermentaire. Se développant à des températures entre 4 et 35°C, *Vibrio harveyi* se rencontre principalement dans les eaux tropicales, dans les sédiments et associées à des organismes hôtes. Cette bactérie est responsable de vibriose causant la mort de larves de crevettes (Austin B. et Zhang X.H., 2006) et d'huîtres perlières provoquant des anomalies de biominéralisation sur celles-ci (Ogimura T. *et al*., 2012). Plusieurs voies de quorum sensing contrôlant entre autre l'expression de la bioluminescence et la formation de biofilm chez les différentes espèces de *Vibrio* ont été identifiées (Bassler B.L. *et al*., 1993).

Il a été montré que chez la bactérie *Vibrio harveyi*, l'activation du quorum sensing pouvait être réalisée par trois molécules auto-inductrices : harveyi auto inducer-1 (HAI-1), cholerae auto inducer 1 (CAI-1) et auto inducer 2 (AI-2) (Figure 15).

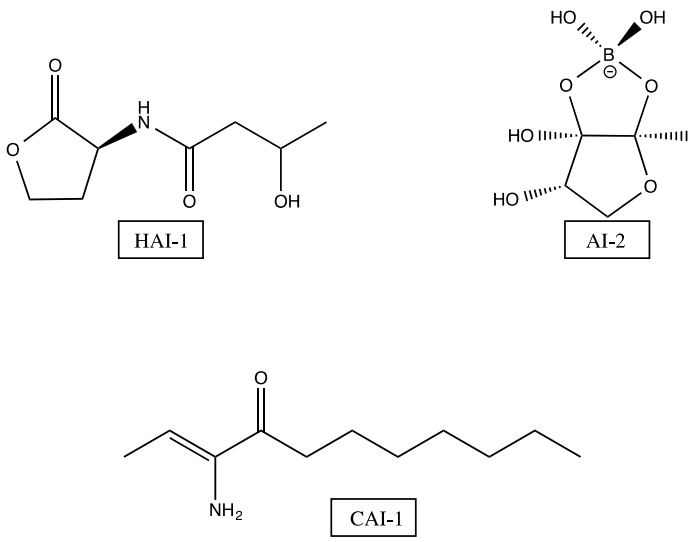


Figure 15 : *Molécules auto-inductrices rencontrées chez Vibrio harveyi*.

Ces molécules auto-inductrices, sont produites par LuxN pour HAI-1, cholerae quorum sensing sensor kinase/phosphatase (CqsS) pour CAI-1, et enfin par LuxP (qui active également le récepteur de l'histidine kinase LuxQ) pour AI-2. Ces trois voies d'activation du quorum sensing chez *Vibrio harveyi*, active par un même signal la protéine LuxU, qui permet l'activation du gène LuxR. Le gène LuxR, encode le facteur de transcription du quorum sensing contrôlant entre autre l'expression de la luciférase, permettant l'expression de la luminescence. (Mai T. *et al*., 2015).

Le test mis en place par l'équipe EIMS (Etude Intégrée Des Métabolites Secondaires) de l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens (IRD) est un test d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi* en boite de Pétri. Il a été mené sur l'ensemble des extraits d'invertébrés marins du projet POMARE. Les résultats exprimés en mm représentent le diamètre d'inhibition de la bioluminescence. Le test est considéré comme positif lorsque ce diamètre est supérieur à 8 mm pour une concentration en extrait de 1 mg. Les extraits présentant une inhibition supérieure à 12 mm sont ensuite testés à une concentration de 0,5 mg/disque.

Ce test a permis de sélectionner 3 éponges : *Crella cyatophora*, *Stylissa massa* et *Stylissa carteri* de Mayotte pour leur action inhibitrice de la bioluminescence de *Vibrio harveyi* (Figures 16, 17).

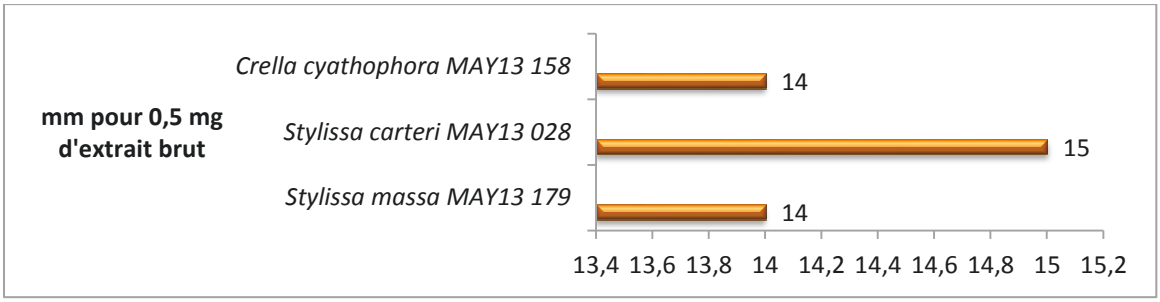


Figure 16 : *Activité inhibitrice de la bioluminescence de la bactérie marine Vibrio harveyi des 3 éponges actives.*

Figure 17 : *Eponges sélectionnées pour leur activité inhibitrice de la bioluminescence de la bactérie marine Vibrio harveyi.*

Il est à remarquer qu'au cours de ce test, a également été mis en évidence l'activité antibactérienne de l'éponge *Pseudoceratina* sp.1 (MAY13 003) inhibant la croissance de la bactérie *Vibrio harveyi* (Diamètre d'inhibition : 13-17 mm / 0,5 mg d'extrait brut).

II.5 Sélection des invertébrés marins

Le tableau II est un récapitulatif les données acquises au cours des criblages chimiques et biologiques menés sur les extraits bruts des 43 espèces d'invertébrés marins étudiés (certaines espèces pouvant être représentées par plusieurs échantillons).

Sur les 43 espèces testées et selon nos tests et nos conditions de criblage :

- ***13 sont dépourvus d'intérêt chimique et d'activité biologique :***

Amphimedon sp. ; *Callyspongia* sp.3 ; *Cystodytes violinctus* ; *Haliclona atra* ; *Haliclona* sp.3 ; *Ircinia* sp.1 ; *Lamellosidae herbacea ; Liosina paradoxa* (forme tubulaire) ; *Mykodermia granulatum* ; *Neopetrosia* sp.1 ; *Petrosia microxea* ; *Svenzea* sp. ; *Theonella* sp.1.

- ***5 allient à la fois intérêt chimique et activité biologique :***

Crella cyathophora ; *Fascaplysinopsis reticulata* ; *Hyrtios erectus* ; *Liosina paradoxa* (encroutante) ; *Neopetrosia* sp.2.

- ***2 présentent un intérêt chimique uniquement :***

Dragmacidon coccineum ; *Haliclona fascigera*.

- ***10 montrent une activité biologique sur 2 ou 3 cibles testés et présentent donc un réel intérêt pour la recherche de molécules bioactives :***

Axinella aff. donani ; *Biemna laboutei* ; *Haliclona* sp.1 ; *Ircinia* sp.2 ; *Neopetrosia* sp.3 ; *Plakortis kenyensis* ; *Rhabdastrella* sp.2 ; *Stylissa carteri* ; *Stylissa massa* ; *Theonella swinhoei*.

Afin d'affiner le choix des organismes à étudier, une recherche bibliographique a été menée sur chacun des genres ou espèces d'éponges figurant dans les deux derniers groupes. Les espèces pour lesquelles n'apparaissent dans la littérature que, peu de données sur la composition chimique ou sur la recherche de molécules bioactives, ont donc été retenues.

Ainsi, dans le cadre de ces travaux de thèse, les espèces suivantes ont été étudiées :

- *Crella cyatophora*
- *Fascaplysinopsis reticulata*
- *Haliclona fascigera*
- *Liosina paradoxa* (forme encroûtante)
- *Plakortis kenyensis*
- *Theonella swinhoei*

Les résultats les plus pertinents ayant été obtenus pour *Fascaplysinopsis reticulata*, *Haliclona fascigera*, *Plakortis kenyensis* et *Theonella swinhoei*, seuls les travaux portant sur ces éponges seront exposés dans ce mémoire.

Il est à noter par ailleurs que ces travaux de thèse ont été également renforcés par les travaux de stagiaires (M2 et Ingénieur) portant sur :

- *Dragmacidon coccineum* (Charlotte Leman-Loubière, Etudiante, 5ème année d'ingénieur, 2014)
- *Neopetrosia* sp.2 (Charlotte Leman-Loubière, Etudiante, 5ème année d'ingénieur, 2014)
- *Hyrtios erectus* (Delphine Savenay, Etudiante, M2 Chimie analytique, 2015)

Tableau II : *Bilan des criblages chimique et biologiques*

Echantillon		Criblage chimique	Criblage biologique				
			Cytotoxicité KB	Cytotoxicité leucémie	Activité antipaludique	Activité antioxydante	Activité antifouling
Amphimedon sp	MAY13 161						
Axinella aff. donnani	MAD11 BA067		■		■		
Biemna laboutei	MAD11 BA024		■		■	■	
Biemna sp.1	MAY13-148						
Biemna sp.2	MAY13-085						
Biemna triraphis	MAY13 0938			■			
Callyspongia sp. 3	MAY13 043						
Callyspongia sp. 4	MAY13 094		■				
Crella cyathophora	MAY13 158	■					■
Cystodytes violatinctus	MAY13 070						
Dactylospongia sp.	MAY13 162					■	
Dragmacidon coccineum	MAY13 046	■					
	MAY13 083	■					
	MAY13 100	■					
	MAY13 176	■					
Fascaplysinopsis reticulata	MAY13 187	■				■	
Haliclona atra	MAY13 018						
Haliclona fascigera	MAY13 054	■					
Haliclona sp. 1	MAY13 007		■			■	
Haliclona sp. 3	MAY13 099						
Hyrtios erectus	MAY13 143	■	■	■		■	
Ircinia sp. 1	MAY13 026						
Ircinia sp. 2	MAY13 088		■			■	
Jaspis splendens	MAY13 079		■				
Lamellodysidae herbacea	MAY13 069						
Liosina paradoxa (tubulaire)	MAY13 019						
Liosina paradoxa (encroûtante)	MAY13 152	■	■				
Myrmekioderma granulatum	MAY13 170						
Neopetrosia sp. 1	MAY13 012						
Neopetrosia sp. 2	MAY13 048	■	■			■	
Neopetrosia sp. 3	MAY13 102		■			■	
Oceanapia globosa	MAY13 141		■				
	MAY13 127						
	MAY13 178		■				
Petrosia microxea	MAY13 066						
Phyllospongia papyracea	MAY13 045		■				
Plakinastrella sp.	MAY13 011		■				
Plakortis kenyensis	MAD11 BA093		■		■		
Pseudoceratina sp. 1	MAY13 003		■				
Rhabdastrella globostellata	MAY13 174			■			
Rhabdastrella sp. 1	MAY13 021		■				
Rhabdastrella sp. 2	MAY13 031		■	■			
Scopalina hapalia	MAY13 165					■	
Stylissa carteri	MAY13 028		■				■
Stylissa massa	MAY13 179		■				■
Svenzea sp.	MAY13 120						
Theonella sp. 1	MAY13 015						
Theonella swinhoei	MAD11 BA041		■		■		

■ Test positif

CHAPITRE III

ETUDE DE L'EPONGE
Plakortis kenyensis (Pulitzer-Finali, 1993)

III.1 Eléments bibliographiques

III.1.1 Localisation du genre *Plakortis* (Schulze, 1880)

Les éponges du genre *Plakortis* sont présentes dans tous les océans à l'exception des Océans Arctique et Antarctique. On les retrouve aussi bien dans l'Océan Pacifique (Micronésie, Japon, Iles Fidji, Papouasie Nouvelle-Guinée...), l'Océan Indien (Côtes Ouest de l'Australie, Côtes Est du Kenya, Canal du Mozambique...), et l'Océan Atlantique (Brésil, Belize, Mer des Caraïbes…), que dans la Mer Méditerranée, la Mer Adriatique et la Mer Rouge. (www.marinespecies.org)

III.1.2 Position systématique et description du genre *Plakortis* (Schulze, 1880)

- **Position systématique** (www.marinespecies.org)

Le genre *Plakortis* appartient à la famille des Plakinidae (ordre des Homosclerophorida), qui comprend 8 genres différents : *Corticium* (Schmidt, 1862), *Placinolopha* (Topsent, 1897), *Plakina* (Schulze, 1880), *Plakinastrella* (Schulze, 1880), *Plakortis* (Schulze, 1880), *Plakostrella* (Gazave, Lapébie, Ereskovsky, Vacelet, Renard, Cardenas & Borchiellini, 2012), *Tetralophophora* (Rützler, Piantoni, Van Soest, Diaz, 2014), *Tetralophosa* (Gazave, Lapébie, Ereskovsky, Vacelet, Renard, Cardenas & Borchiellini, 2012).

Royaume :	Animal
Phylum :	Porifera
Classe :	Homoscleromorpha
Ordre :	Homosclerophorida
Famille :	Plakinidae
Genre :	*Plakortis*

- **Description morphologique** (Muricy G. et Díaz M.-C., 2002).

Les éponges du genre *Plakortis*, sont des éponges encroûtantes pouvant être fines ou massives, et dont le squelette est formé de spicules de type diod (50-200 µm) accompagnés de spicules de type triod en quantité variable. Des calthropes déformés peuvent être trouvés chez

certaines espèces. D'autres espèces peuvent avoir des microrhabdes (5-20 µm) parsemés dans tout le corps de façon régulière. Le système aquifère est un intermédiaire entre le système de type sylleibide et le système de type leuconoïde, avec des chambres choanocytaires réparties régulièrement autour des orifices inhalants de l'éponge. Les cavités ectosomiques de type inhalant et les cavités basales de type exhalant sont généralement présentes. Le squelette est confus, dense, sans spécialisation ectosomique ou de différentiation dans la répartition des spicules.

III.1.3 Cas particulier de l'espèce *Plakortis kenyensis* (Pulitzer-Finali, 1993): localisation et description morphologique

- **Localisation** (www.marinespecies.org)

L'éponge *Plakortis kenyensis*, identifiée par Pulitzer-Finali en 1993, se retrouve sur la côte Est de l'Afrique, proche des côtes du Kenya. Il n'est pas à exclure que cette éponge se retrouve aussi bien dans le canal du Mozambique que sur les côtes Ouest de Madagascar. Elle se situe généralement entre 10 et 30 m de profondeur.

- **Description morphologique** (Pulitzer-Finali G., 1993)

L'éponge *Plakortis kenyensis* (Figure 18), est une éponge massive irrégulière (45*25*15 mm), avec des oscules de 3 mm de diamètre. Cette éponge de consistance ferme présente une surface de couleur chamois crémeux. Les spicules de type diode, mesurent 80-260 * 2-7 µm. Quelques rares spicules de type triode peuvent également être observés avec des tailles de l'ordre de 30-60 µm.

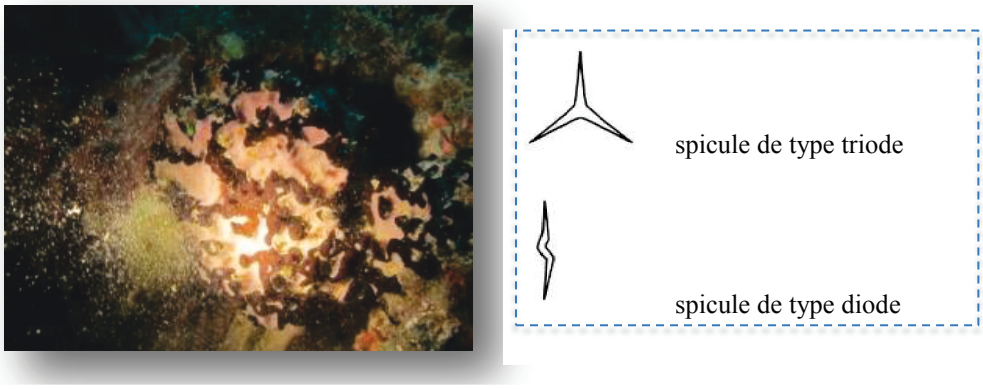


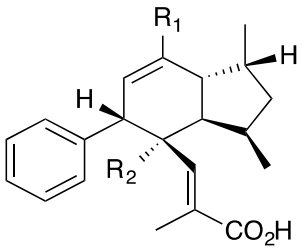
Figure 18: *Photographie in situ de Plakortis kenyensis (Crédit LCSNSA).*

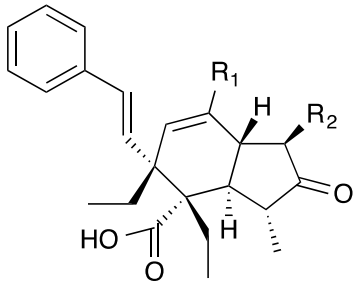
III.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Plakortis* (Pulitzer-Finali, 1993)

Parmi les éponges de la famille des Plakinidae, plusieurs genres ont fait l'objet de recherche sur leur composition chimique, notamment les genres *Corticium*, *Plakina*, *Plakinastrella* et *Plakortis*. Concernant plus précisément les espèces du genre *Plakortis,* les métabolites décrits dans la littérature sont principalement des dérivés d'acides gras atypiques, des peroxydes cycliques, des peroxylactones, des glycosides terpéniques et des alcaloïdes.

III.1.4.1 Les acides carboxyliques et dérivés d'acides gras

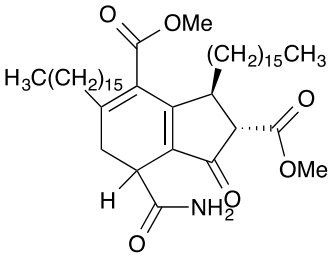
Les éponges du genre *Plakortis* se caractérisent comme plusieurs autres éponges de la famille des Plakinidae par une composition chimique riche en acides carboxyliques et dérivés d'acides gras singuliers (Tsukamoto S. *et al*., 1992 ; Kobayashi J. *et al*., 1993 ; Takeuehi S. *et al*., 1995 ; Schmidt E.W. et Faulkner D.J., 1996 ; Qureshi A. *et al*., 1999 ; Berrué F. *et al*., 2005b ; Kubota T. *et al*., 2013 ; Tanaka N. *et al*., 2015). A titre d'exemples, la **plakoténine** (**P1**) et ses dérivés, **l'homo** et la **nor-plakoténine** (**P2** et **P3**) (Qureshi A. *et al*., 1999), isolés de *Plakortis lita* sont trois acides carboxyliques au squelette atypique constitué d'un cycle benzénique rattaché à un bicycle. Il a été démontré que la plakoténine présentait une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires L1210 (leucémie murine) et KB (carcinome buccal humain). De même, de l'éponge *Plakortis zyggompha*, ont été isolés **l'acide isospiculoïque A** (**P4**) ainsi que ses dérivés les **acides nor-** et **dinor-isospiculoïque A** (**P5** et **P6**) (Berrué F. *et al*., 2005b) qui se caractérisent par la présence d'une fonction carbonyle sur le pentacycle et une élongation de la chaîne latérale entre le groupement phényle et le bicycle. L'acide isospiculoïque A (**P4**) et l'acide nor-isospiculoïque A (**P5**) se sont avérés tous deux cytotoxiques envers les lignées cellulaires cancéreuses A549 (poumon) et HT29 (colon). Les **manzaménones** sont également des dérivés d'acides gras atypiques, de forme bicyclique ou spiro, rattachés ou non à un cycle avec la présence de longues chaînes hydrocarbonées substituées sur le bicyclique. Dans le genre *Plakortis*, ils sont présents sous différents dérivés comme les **manzaménones J**, **K** et **P** (**P7-P9**), ainsi qu'un trimère, la **manzaménone O** (**P10**) (Takeuehi S. *et al*., 1995 ; Tanaka N. *et al*., 2013, 2015). Ce dernier présente une activité antibactérienne sur la souche *Micrococcus luteus*, et antifongique sur les souches *Aspergillus niger* et *Trichophyton mentagrophytes*. Enfin, notons la présence du (2*Z*,6*R*,8*R*,9*E*)-3,6-époxy-4,6,8-triéthyl-2,4,9-dodécatriénoate de méthyle (**P11**), ester méthylique d'acides gras isolé de *Plakortis halichondrioides* (Schmidt E.W. et Faulkner J.D., 1996).



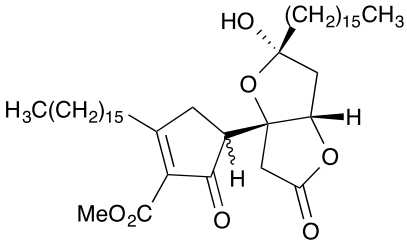


plakoténine (**P1**) R_1 = Me, R_2 = Et
homo-plakoténine (**P2**) R_1 = Et, R_2 = Et
nor-plakoténine (**P3**) R_1 = R_2 = Me

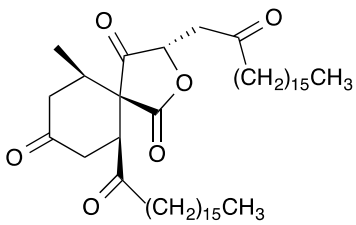
acide isopiculoïque A (**P4**) R_1 = R_2 = Et
acide nor-spiculoïque A (**P5**) R_1 = Et, R_2 = Me
acide dinor-spiculoïque A (**P6**) R_1 = R_2 = Me



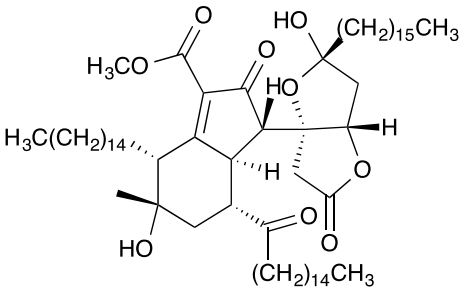
manzaménone J (**P7**)



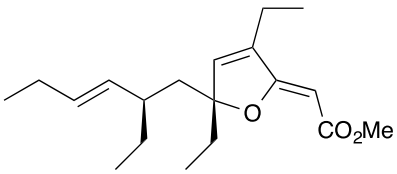
manzaménone K (**P8**)



manzaménone P (**P9**)



manzaménone **O** (**P10**)

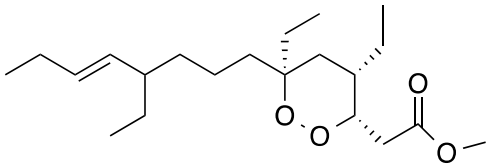


(2*Z*,6*R*,8*R*,9*E*)-3,6-epoxy-4,6,8-triéthyl-2,4,9-dodécatriénoate de méthyle (**P11**)

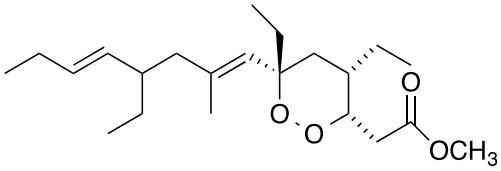
III.1.4.2 Les peroxydes cycliques et peroxylactones

Le genre *Plakortis*, ainsi que le genre *Plakinastrella* sont des genres connus pour produire de nombreux métabolites de types peroxydes cycliques et/ou peroxylactones. Ces métabolites ne sont pour autant pas propres à la famille des Plakinidae, ni même à l'ordre des Homosclerophorida. Le premier composé d'origine marine, isolé de cette famille est la **chondrilline**, isolée pour la première fois d'une l'éponge du genre *Chondrilla* (Wells R.J., 1976 ; Casteel D.A., 1992). Les peroxydes cycliques de *Plakortis* présentent un cycle à 5 ou 6 atomes comprenant la fonction peroxyde et rattaché à une longue chaîne hydrocarbonée saturée ou non, mono- polysubstituée ou non. La série des **plakortides**, en est un excellent exemple. On compte pas moins de 20 plakortides isolés des éponges du genre *Plakortis* (Patil

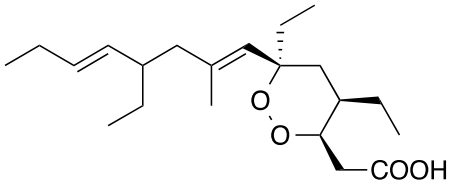
A.D. *et al*., 1996a ; Berrué F. *et al*., 2005a ; Harrison B. et Crews P., 1998 ; Fattorusso E. *et al*., 2000 ; Hu J.-F. *et al*. 2001 ; Jimènez M. *et al*., 2003 ; Feng Y. *et al*., 2010 ; Jamison M. T. *et al*., 2016). Citons entre autres, les **plakortides F, G** et **H** (**P12-P14**), tous trois isolés de *Plakortis halichondrioides* et dont l'activité stimulatrice du muscle cardiaque par activation de la pompe ATPase (SR-Ca^{2+}) a été démontrée (Patil A.D. *et al*., 1996a).



plakortide F (**P12**)

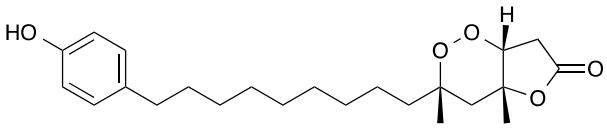


plakortide G (**P13**)

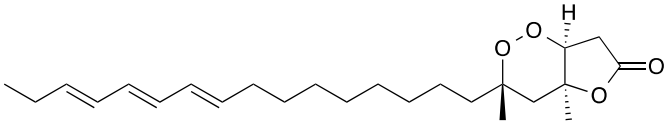


plakortide H (**P14**)

La série des **plakortolides** est une série de peroxylactones constitués d'un bicycle formé d'un cycle à 6 atomes contenant une fonction peroxyde et d'un cycle à 5 atomes contenant une fonction lactone. Le bicycle est relié à un phényle terminal ou non, par une longue chaîne hydrocarbonée saturée ou non, mono-, polysubstitué ou non. 5 plakortolides ont été à ce jour isolées du genre *Plakortis* (Davidson B.S. 1991 ; Varoglu M. *et al*., 1995 ; Rudi A. *et al*., 2003 ; Jiménez-Romero C. *et al*., 2010). A titre d'exemple, citons le **plakortolide H** (**P15**) isolé de *Plakortis aff. simplex* (Rudi A. *et al*., 2003) et le **plakortolide J** (**P16**) isolé de *Plakortis halichondrioides* (Jiménez-Romero C. *et al*., 2010). Soulignons que le plakortolide H (**P15**) a montré non seulement une activité antipaludique (inhibition de la croissance de *Plasmodium falciparum*) mais aussi anti-tuberculeuse (inhibition de la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*).

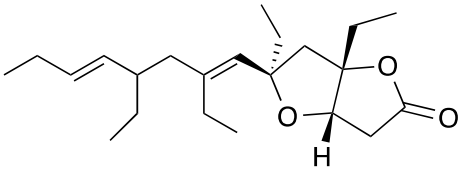


plakortolide H (**P15**)

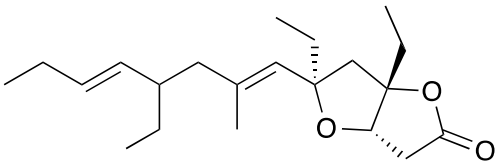


plakortolide J (**P16**)

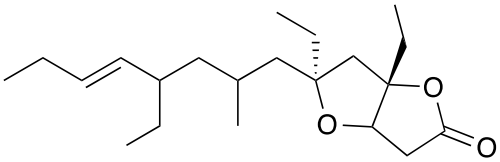
Les **plakortones** sont une classe de peroxylactones qui présentent un bicycle constitué de deux cycles à 5 atomes, dont l'un contient un atome d'oxygène et l'autre une fonction lactone. Comme les plakortides, ces composés sont substitués par une chaîne hydrocarbonée saturée ou non, mono- polysubstituée ou non. Du genre *Plakortis*, sont actuellement connues 7 plakortones (Patil A.D. *et al*., 1996b ; Cafieri F. *et al*., 1999 ; Gochfeld D.J. et Hamann M.T., 2001). La **plakortone A** (**P17**) par exemple, a été isolée de l'éponge *Plakortis halichondrioides* (Patil A.D *et al*., 1996b). Son activité stimulatrice du muscle cardiaque par activation de la pompe ATPase (SR-Ca^{2+}) a été démontrée. Les **plakortones B-F** (**P18-P22**) ont quant à elles été isolées de l'éponge *Plakortis simplex* (Cafieri F. *et al*., 1999). Toutes ont montré une activité cytotoxique envers la lignée cancéreuse WEHI 164 provenant d'un fibrosarcome murin. Enfin, la **plakortone G** (**P23**), isolée d'une éponge du genre *Plakortis* de la Jamaïque, s'est avérée active sur le parasite *Plasmodium faciparum* (Gochfeld D.J. et Hamann M.T., 2001).



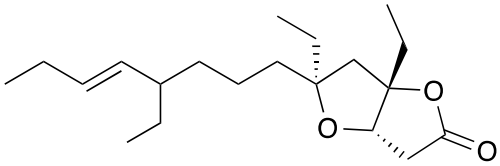
plakortone A (**P17**)



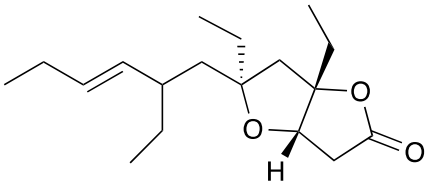
plakortone B (**P18**)



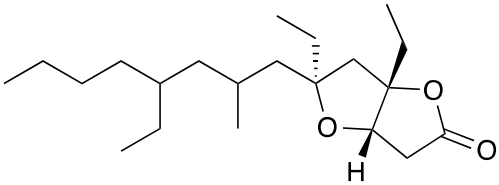
plakortone C (**P19**)



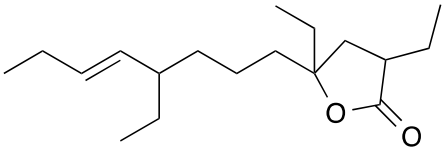
plakortone D (**P20**)



plakortone E (**P21**)

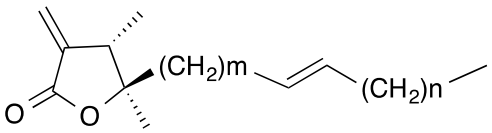


plakortone F (**P22**)

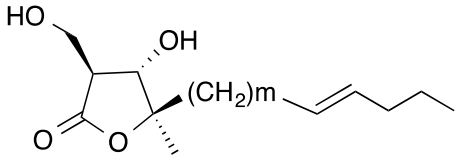


plakortone G (**P23**)

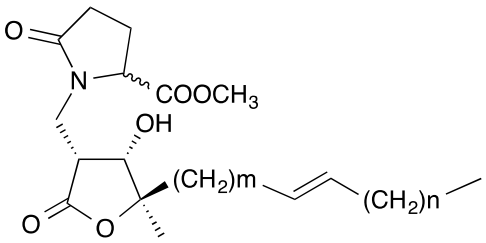
Les **amphiastérines** sont une nouvelle classe de γ-méthylènelactones cytotoxiques, caractérisées par la présence d'un cycle à 5 atomes contenant la fonction lactone, d'une double liaison en C-3 du cycle. Le cycle étant substitué par une longue chaîne grasse mono- ou polyinsaturée. A ce jour, 17 amphiastérines (**P24-P39**) ont été isolées de l'éponge *Plakortis quasiamphiaster* (Zampella A. *et al*., 2001). Les amphiastérines A3 (**P26**), B2 (**P29**) et C2 (**P33**) se sont avérées cytotoxiques envers la lignée cellulaire cancéreuse NSCLC-N6 (poumon).



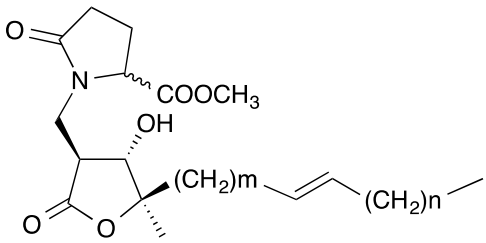
amphiastérine A1 (**P24**) m = 31, n = 9
amphiastérine A2 (**P25**) m = 35, n = 9
amphiastérine A3 (**P26**) m = 31, n = 9 chaîne saturée
amphiastérine A4 (**P27**) m = 35, n = 9 chaîne saturée



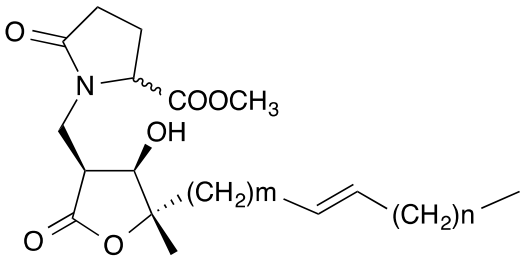
amphiastérine B1 (**P28**) m = 10
amphiastérine B2 (**P29**) m = 12
amphiastérine B3 (**P30**) m = 16
amphiastérine B4 (**P31**) m = 10 chaîne saturée



amphiastérine C1 (**P32**) m = 3, n = 9
amphiastérine C2 (**P33**) m = 5, n = 9
amphiastérine C3 (**P34**) m = 3, n = 9 chaîne saturée
amphiastérine C4 (**P35**) m = 5, n = 9 chaîne saturée



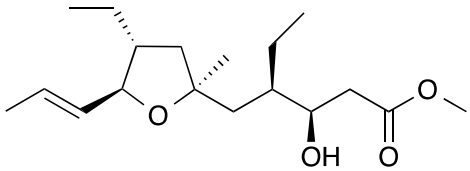
amphiastérine D1 (**P36**) m = 3, n = 9
amphiastérine D2 (**P37**) m = 5, n = 9
amphiastérine D3 (**P38**) m = 5, n = 9 chaîne saturée



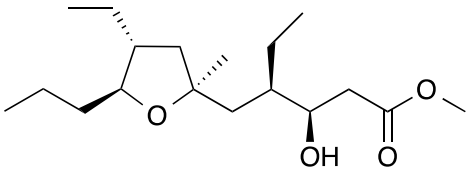
amphiastérine E1 (**P39**) m = 3, n = 9

Les **plakortéthers**, série d'esters méthyliques cytotoxiques, sont des composés isolés de l'éponge *Plakortis simplex*. Ces composés sont constitués d'un tétrahydrofurane substitué en 2, 4 et 5. Le carbone en position 2 est substitué par une chaîne hydrocarbonée substituée et se terminant par une fonction ester. Sept plakortéthers ont été isolés de l'éponge *Plakortis*

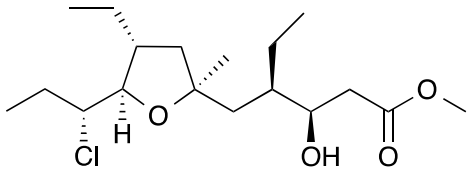
simplex : les plakortéthers A-G (**P40-P46**) (Campagnuolo C. *et al*., 2002). Le **plakortéther C** est un des rares composés chloré de la famille des Plakinidae.



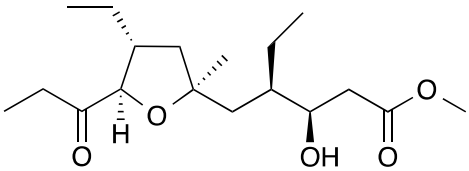
plakortéther A (**P40**)



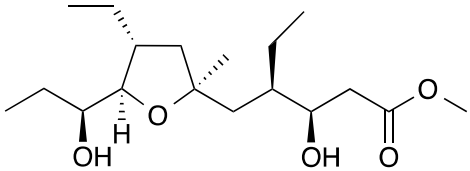
plakortéther B (**P41**)



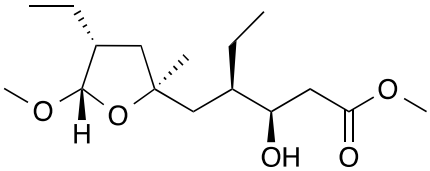
plakortéther C (**P42**)



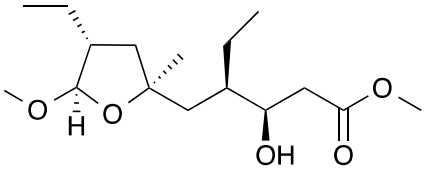
plakortéther D (**P43**)



plakortéther E (**P44**)



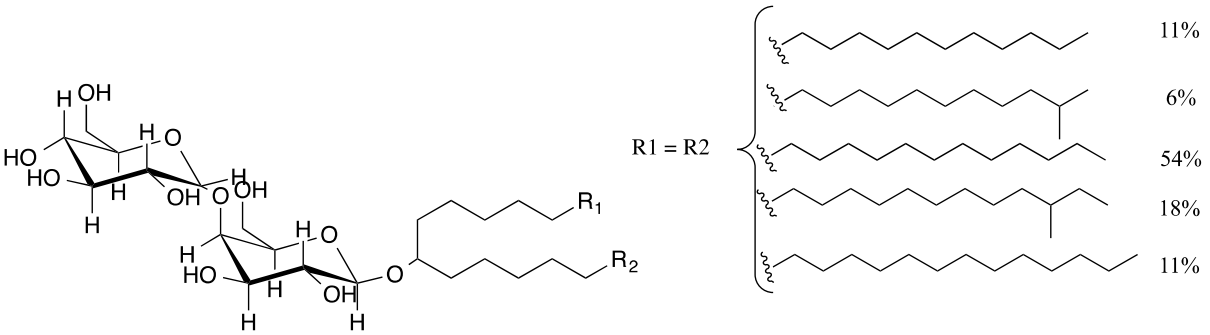
plakortéther F (**P45**)



plakortéther G (**P46**)

III.1.4.3 Les glycosides

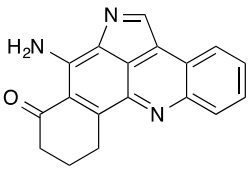
Les **glycosides** issus du genre *Plakortis* sont présents en faible quantité, surtout rencontrés chez l'éponge *Plakortis simplex* collectée aux Caraïbes (Constantino V. *et al*., 1999 ; 2000 ; 2001).Ces glycosides sont formés d'une longue chaîne hydrocarbonée (le plus souvent 5 ou 7 atomes de carbone), reliée à un ou plusieurs xyloses ou dans le cas des **simplexides** à un glucose et un galactose. Les **simplexides** (**P47**) se sont révélés être des candidats potentiels de médicaments immunosuppresseurs (Constantino V. *et al*, 1999).



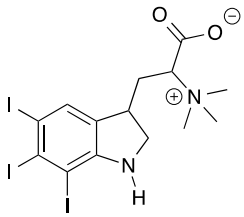
simplexides (**P47**)

III.1.4.3 Les alcaloïdes

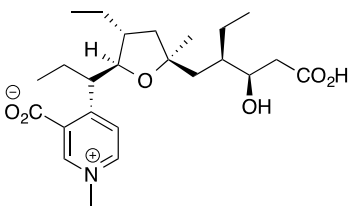
De certaines espèces du genre *Plakortis* ont été isolés également 15 alcaloïdes, pour la plupart atypiques (Inman W.D. *et al*., 1990 ; Robert R.W. *et al*., 1990 ; Smith J.C. *et al*., 1997 ; Campagnuolo C. *et al*., 2003a,b ; Borelli F. *et al*., 2004 ; Ralifo P. *et al*., 2007 ; Davis R.A. *et al*., 2013). C'est le cas de la famille des **plakinidines A-E** (Inman W.D. *et al*., 1990 ; Robert R.W. *et al*., 1990 ; Smith J.C. *et al*., 1997 ; Ralifo P. *et al*., 2007). Ces composés sont des dérivés de la pyrroloacridine. Il est à noter que les plakinidines ne sont pas spécifiques aux éponges du genre *Plakortis* ; ils ont été également isolés d'autres organismes marins comme les ascidies : c'est le cas de la plakinidine D (**P48**) isolée d'ascidies du genre *Didemnum* (Ford P.W. et Davidson B.S., 1997 ; Smith. C.J. *et al*., 1997). Par ailleurs, l'isolement des **plakohypaphorines**, à partir de l'éponge *Plakortis simplex* des Caraïbes, a permis de mettre en évidence des composés azotés dérivés du tryptophane, pouvant présenter sur le cycle benzénique un, deux voire trois atomes d'iode (Borelli F. *et al*., 2004). La **plakohypaphorine E** (**P49**), par exemple, est le premier alcaloïde indolique d'origine naturelle portant trois atomes d'iode. Enfin, il a été isolé de la même éponge un alcaloïde présentant un noyau pyrimidium, la **simplakidine A** (**P50**) (Campagnuolo V. *et al*., 2003a).



plakinidine D (**P48**)



plakohypaphorine E (**P49**)



simplakidine A (**P50**)

III.2 Etude chimique de l'éponge *Plakortis kenyensis* de Madagascar

L'étude chimique de l'éponge *Plakortis kenyensis* collectée à Madagascar a permis l'obtention de deux métabolites majoritaires (**PK1** et **PK2**), connus et dont le squelette présente un peroxyde cyclique. 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.

III.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites PK1 et PK2

L'isolement des métabolites secondaires majoritaires de l'éponge *Plakortis kenyensis* décrit ci-après, est illustré dans la figure 19.

950 mg de l'extrait brut de *Plakortis kenyensis* ont été fractionnés par filtration sur gel de Sephadex LH20. L'élution a été réalisée au moyen d'un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante. Cela a permis l'obtention de 6 fractions F1-F6. Les analyses par CLHP-Corona-DAD-SM des 6 fractions obtenues montrent pour les fractions F2 à F4, des profils chromatographiques semblables avec deux métabolites majoritaires **PK1** et **PK2** de masse *m/z* 388,2 et 376,2 respectivement.

Ces fractions F2 à F4 ont donc été rassemblées (F234) et soumises à un autre fractionnement par filtration sur gel de Sephadex LH20. L'élution a été réalisée au moyen d'un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante selon le protocole appliqué précédemment. Six nouvelles fractions ont été obtenues. Un contrôle des fractions par CLHP-Corona-DAD-SM des 6 fractions a permis de rassembler les fractions F234-3 et F234-4, aux profils chromatographiques semblables et enrichies en composés majoritaires PK1 et PK2.

Une troisième filtration sur gel Sephadex LH20 des fractions F234-3 et F234-4 rassemblées (F234-34), a permis l'obtention de 6 fractions. Suite au contrôle de ces 6 fractions par CLHP-Corona-DAD-SM, la fraction F234-34-2 riche en **PK1** et **PK2** a été sélectionnée et soumise à un fractionnement par CLMP en phase normale éluée par un gradient isohexane/acétate d'éthyle. Ce fractionnement a permis de récupérer 64 fractions.

Les deux composés majoritaires **PK1** et **PK2** ont finalement été obtenus suite à une dernière purification des fractions F234-34-2a et F234-34-2j par CLHP-UV (210 nm) analytique sur colonne en phase inverse (Atlantis T3, C18 analytique phase inverse, 4,6 × 150 mm, 5 µm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide acétique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

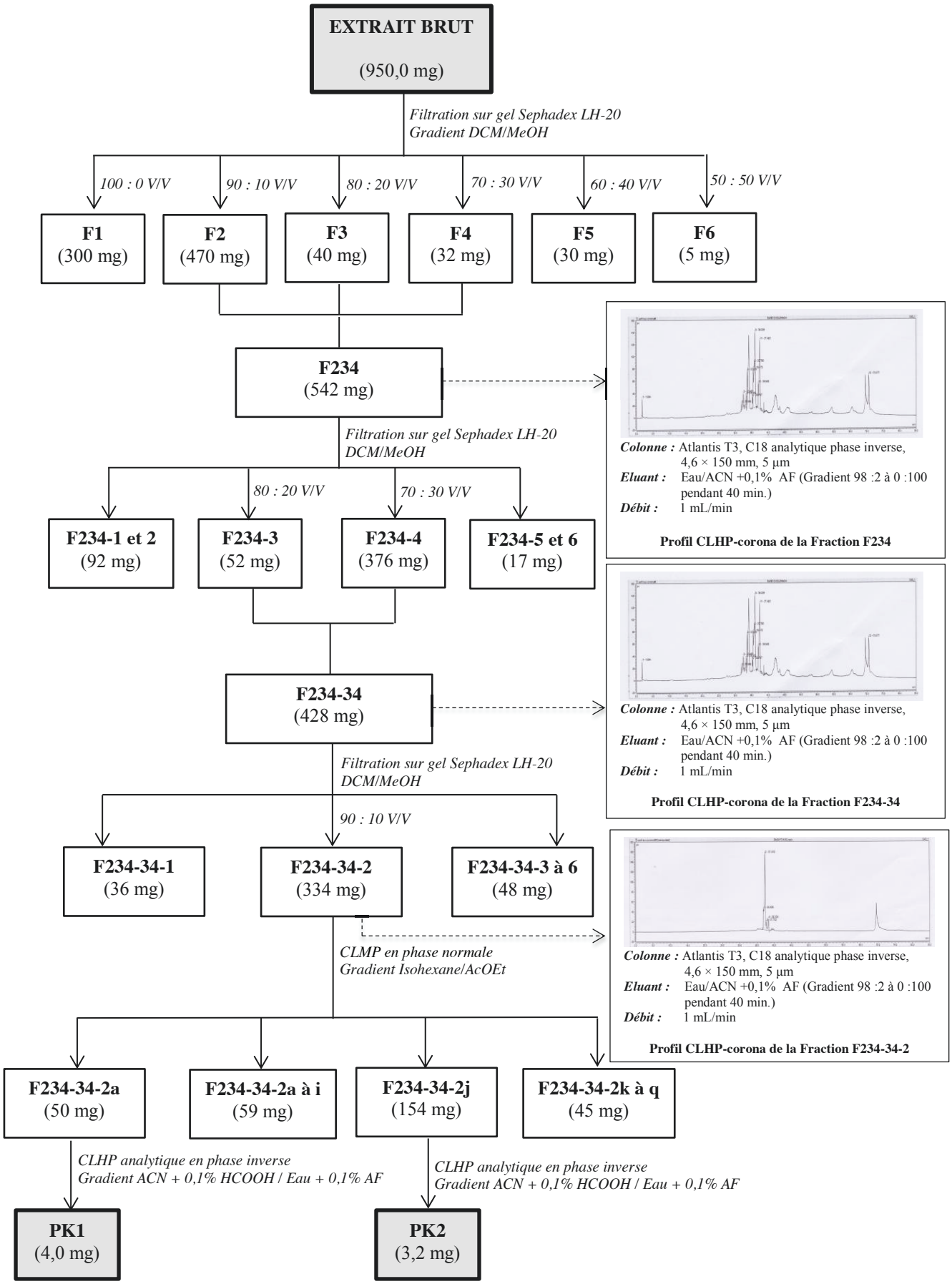


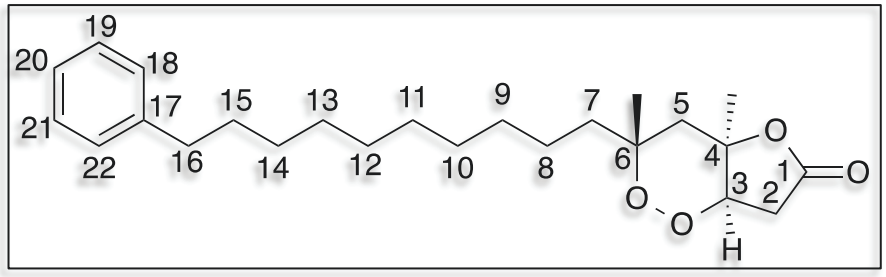
Figure 19 : *Fractionnement de Plakortis kenyensis pour l'obtention des métabolites **PK1** et **PK2**.*

III.2.2 Elucidation structurale des métabolites PK1 et PK2

PK1 et **PK2** ont été identifiés comme étant respectivement le plakortolide E et l'acide andavadoïque, deux composés connus, isolés pour la première fois d'une éponge du genre *Plakortis* des Iles Fidji pour **PK1** (Varoglu M. *et al*., 1995) et de *Plakortis aff. simplex* de Madagascar pour **PK2** (Rudi A. *et al*., 2003). L'identification de ces 2 métabolites a été réalisée par comparaison des données spectrales expérimentales à celles de la littérature, à savoir :

- le spectre de masse haute résolution (SMHR)
- le spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^{1}H).

III.2.2.1 Elucidation structurale du *Plakortolide E*



plakortolide E (**PK1**)

Le composé **PK1** ($[\alpha]_D^{25}$ + 9,97 (*c* 0,5 mg/100 mL DCM)) a été isolé sous forme d'une pâte brune. Son spectre de masse SMHR en mode ESI$^+$ a révélé un ion moléculaire à 388,2611 correspondant à la formule brute $C_{24}H_{36}O_4$ (calculée : *m/z* 388,5412) et proche de la valeur donnée dans la littérature pour le plakortolide E (*m/z* 388,2613, Varoglu M. *et al*., 1995) et le plakortolide I (388, 2662, Yong K. W. L. *et al*., 2012)

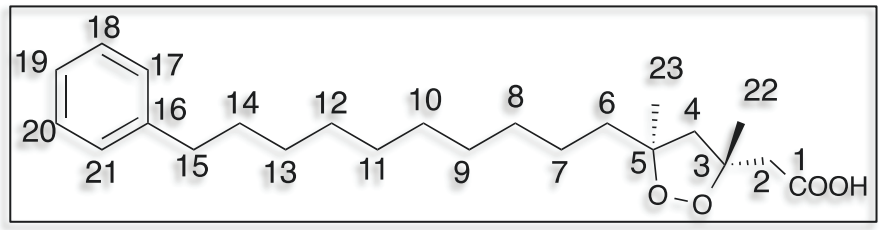
En outre, la comparaison de son spectre RMN ^{1}H avec les données de la littérature (Tableau III), permet d'attribuer à **PK1** la structure du plakortolide E et non celle du plakortolide I. Les déplacements chimiques observés à δ_H 7,20 - 7,25 ppm sont caractéristiques du cycle aromatique monosubstitué (H-18 à H-22) de la structure des plakortolides. De même, les déplacements chimiques δ_H 2,55-2,93 ; 4,19 ; 2,09-2,15 ; 1,35 ; 1,44 typiques des plakortolides, signalent la présence du bicycle peroxyde-lactone (H-2,2', H-3, H-5,5', H-23 et H-24).

Tableau III : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H du plakortolide E (300 MHz, $CDCl_3$) et du plakortolide I de la littérature (Varoglu M. et al., 1995 ; Yong K. W. L. et al., 2012) à ceux observés pour* ***PK1*** *(500 MHz, $CDCl_3$).*

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (*J* en Hz)		
	Littérature		**Observés**
	Plakortolide E	Plakortolide I	
1	-		-
2, 2'	2,55-2,93 (dd)	2,59-2,91 (dd, 6,0 ; 18,6)	2,70-2,91 (dd, *8,7* ; *15,6*)
3	4,19 (dd)	4.49 (d, 6,0)	4,44 (dd, *8,5 ; 12,3*)
4	-	-	-
5, 5'	2,09-2,15 (AB)	1,66-2,28 (d, 15,3)	1,71-2,17 (dd, 8,6 ; *14,3*)
6	-	-	-
7, 7'	1,29-1,61 (br m)	1,75 (m)	1,25-1,50 (br m)
8-14	1,29 (br)	1,27-1,30 (m)	1,25 (br)
15	1,55 (m)	1,57 (m)	1,58 (m)
16	2,60 (t)	2,60 (t, 7,8)	2,60 (t, *7,8*)
18-20-22	7,18 (m)	7,19 (m)	7,20 (m)
19-21	7,26 (m)	7,27 (m)	7,25 (m)

Enfin, le pouvoir rotatoire obtenu expérimentalement ($[\alpha]_D^{25}$ + 9,97 (*c* 0,5 mg/100 mL DCM)) se rapproche davantage de celui du plakortolide E ($[\alpha]_D^{25}$ + 10,0 (*c* 0,09 mg/100 mL DCM)) que de celui du plakortolide I ($[\alpha]_D^{25}$ + 8,0 (*c* 0,0173 mg/100 mL $CHCl_3$)) donnés dans la littérature (Varoglu M. *et al*., 1995 ; Rudi A. *et al*., 2003).

III.2.2.2 Elucidation structurale de l'acide andavadoïque



acide andavadoïque (**PK2**)

Le composé **PK2** ($[\alpha]_D^{25}$ = +33,52 (*c* 0,1 g/100 mL DCM)) a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle. La spectrométrie SMHR en mode ESI$^+$ de **PK2** a révélé un ion moléculaire à *m/z* 376,2611, correspond à la formule brute $C_{23}H_{36}O_4$ (calculée 376,5305). Cette donnée expérimentale est en adéquation avec les données de la littérature relatives à l'acide andavadoïque (*m/z* 376,26130, Rudi A. *et al*., 2003).

Par ailleurs, la comparaison de ces spectres RMN ^{1}H avec celles de la littérature permet d'attribuer à **PK2** la structure de l'acide andavadoïque (Tableau IV). On relèvera en particulier les déplacements chimiques observés à δ_H 7,10 - 7,20 ppm caractéristiques du cycle aromatique monosubstitué (H-16 à H-21) de la structure de l'acide andavadoïque. De même, les déplacements chimiques δ_H 2,20-2,37 ; 7,07 ; 1,28 signalent la présence du cycle 1,2-dioxalane (H-4,4', H-23, H-22) de l'acide andavadoïque.

Tableau IV : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de l'acide andavadoïque de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) (Rudi A. et al., 2003) à ceux observés pour* ***PK2*** *(500 MHz, $CDCl_3$).*

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (*J* en Hz)	
	Littérature	**Observés**
1	-	-
2-2'	2,53-2,80 (dd)	2,67-2,71 (dd, *7,5* ; *12,5*)
3	-	-
4-4'	2,20-2,37 (dd)	2,20-2,37 (dd, *8,3 ; 14,4*)
5	-	-
6	1,70 (m)	1,70 (m)
7	1,50 (m)	1,50 (m)
8-13	1,20 (br)	1,20 (m)
14	1,54 (m)	1,54 (m)
15	2,53 (m)	2,53 (t, *7,6*)
16	-	-
17-19-21	7,10 (m)	7,10 (m)
18-20	7,20 (m)	7,20 (m)
22	1,22 (s)	1,22 (s)
23	1,40 (s)	1,40 (s)

Enfin, le pouvoir rotatoire obtenu expérimentalement ($[\alpha]_D^{25}$ = +33,52 (*c* 0,1 g/100 mL DCM)) pour PK2, proche de celui de l'acide andavadoïque donné dans la littérature ($[\alpha]_D^{25}$ = +34,7 (*c* 0,004 $CHCl_3$)), vient confirmer l'élucidation structurale et laisse supposer une stéréochimie identique à celle déterminée par Rudi et son équipe en 2003.

III.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés

Les deux composés isolés ont été testés pour leurs activités antipaludique et antifouling.

- **L'activité antipaludique** a été évaluée à travers l'action antiproliférative de **PK1** et **PK2**, sur le parasite *Plasmodium falciparum*.

- **L'activité antifouling** a été évaluée selon deux méthodes :
  1. L'activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants.
  2. L'activité inhibitrice de la croissance/adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine.

III.3.1. L'activité antipaludique

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antipaludique ont été réalisés sous la direction du Professeur Michel Frédérich au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège, Belgique.

L'extrait brut de *Plakortis kenyensis* ayant révélé une activité antiproliférative *in vitro* remarquable (CI_{50} = 1,56 µg/mL, Chapitre II et Annexe I) sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7), les deux composés majoritaires de cette éponge, le plakortolide E (**PK1**) et l'acide andavadoïque (**PK2**), ont donc été également évalués pour leur activité antiplasmodium *in vitro* contre *Plasmodium falciparum*.

❖ ***Résultats du test***

Avec des CI_{50} inférieures à 5 µg/mL, soit de 1,53 ± 0,39 µg/mL et 1,67 ± 0,36 µg/mL pour le plakortolide E (**PK1**) et l'acide andavadoïque (**PK2**) respectivement (Tableau V), ces deux métabolites présentent une excellente activité antiplasmodium par inhibition de la croissance parasitaire et peuvent être considérés en conséquence comme des agents antipaludiques potentiels. La présence des motifs peroxyde et lactone sur ces deux molécules suggère un mécanisme d'action rappelant celui de l'artémisine qui présente des ressemblances structurale et fonctionnelle.

Tableau V : *Activité antiplasmodium du plakortolide E (**PK1**) et de l'acide andavadoïque (**PK2**) isolés de Plakortis Kenyensis.*

Métabolites	CI_{50} (µg/mL)
plakortolide E (**PK1**)	1,53 ± 0,39
acide andavadoïque (**PK2**)	1,67 ± 0,36

III.3.2. L'activité antifouling

III.3.2.1 Méthode 1 : Activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antifouling (QSI) ont été réalisés sous la direction du Directeur de Recherche Cécile Debitus par l'équipe EIMS (Etude Intégrée Des Métabolites Secondaires) de l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens, France.

Bien que l'éponge *Plakortis kenyensis* ne fasse pas partie des éponges étudiées dans le cadre du programme POMARE et donc que son extrait brut n'ait pas été testé pour son activité QSI sur la bactérie bioluminecente *Vibrio harveyi*, les deux métabolites isolés ont été soumis au test d'activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* (souche sauvage BB120) et ses souches mutantes : JAF 375 (Activation de CAI-1), JMH 597 (Activation de AI-2), JMH 612 (Activation de HAI-1). L'application du test à chacune de ces souches mutantes permet de déterminer la voie d'activation du *quorum sensing* par laquelle agissent les produits purs (*cf*. Chapitre II §II.4.5).

❖ ***Résultats du test***

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VI. Pour le plakortolide E (**PK1**), nous observons une très bonne activité inhibitrice de la luminescence sur le mutant JAF 375 (retard de 260 min) ainsi que sur la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 230 min). Sur les mutants JMH 597 et JMH 612, nous observons également un retard de la luminescence mais avec un temps de décalage inférieur à 200 min. Il est à noter par ailleurs, que le plakortolide E présente un effet bactériostatique sur la souche mutante JMH 597.

L'acide andavadoïque (**PK2**) quant à lui, possède une très bonne activité inhibitrice de la luminescence sur la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 270 min) ainsi que sur les souches mutantes JAF 375 (retard de 270 min) et JMH 597 (retard de 200 min). Sur la souche mutante JMH 612, nous observons également un retard de la luminescence mais avec un temps de décalage inférieur à 200 min.

Tableau VI : *Activité QSI du plakortolide E (**PK1**) et de l'acide andavadoïque (**PK2**) isolés de Plakortis kenyensis sur la bactérie bioluminescente Vibrio harveyi et ses souches mutantes : JAF 375, JMH 597, JMH 612.*

Souche	Observations	Plakortolide E (PK1)	Acide andavadoïque (PK2)
***Vibrio haveyi* (souche sauvage BB120)**	Effet observé sur l'absorbance	Non	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	230	270
Mutant Δ375	Effet observé sur l'absorbance	Non	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	260	270
Mutant Δ597	Effet observé sur l'absorbance	Bactériostatique	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	170	200
Mutant Δ612	Effet observé sur l'absorbance	Non	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	120	190

* T < 100 min. : modérément actif ; T ≥ 100 min. : bien actif ; Inhibition totale : très actif

III.3.2.2 Méthode 2 : Activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sous la direction du Professeur Claire Hellio au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France.

Les travaux menés sur la compréhension des différentes étapes du mécanisme du biofouling (*cf.* Chapitre I) ont apporté un éclairage important sur les possibilités de contrôle de ce processus de colonisation des surfaces immergées. Ce contrôle peut être réalisé aussi bien aux étapes du microfouling (formation du biofilm) qu'aux étapes du macrofouling. Concernant plus particulièrement le microfouling, plusieurs moyens de contrôle peuvent être proposés notamment l'usage de molécules d'origine naturelle à activités :

- Antibactérienne et antifongique vis-à-vis de souches bactériennes et de champignons marins. Ces microorganismes forment les colonisateurs primaires et leur inhibition est d'un grand intérêt pour la lutte contre les autres stades du fouling.
- Antialgale envers les micro-algues connues pour leur implication dans le phénomène de fouling. L'étude de l'activité anti-algale est d'un intérêt d'autant plus grand que ces organismes sont parmi les espèces les plus difficiles à éliminer.

Dans le cadre des présents travaux, il a été choisi d'évaluer les molécules isolées pour leur activité antibactérienne. Des tests d'inhibition de la croissance et de l'adhésion ont été appliqués à **PK1** et **PK2** isolés de *Plakortis kenyensis* sur 5 souches de bactéries marines provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Roseobacter litoralis, Shewanella putrefaciens, Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus* (Tableau VII).

Tableau VII : *Souches bactériennes marines utilisées.*

Bactéries marines	Numéro de code*	Aéro/anaérobie	Gram	Particularités
Roseobacter litoralis	49566	Aérobie	négatif	- Mobile
Shewanella putrefaciens	8071	Aéro-anaérobie	négatif	- Capable d'adhérer et de réduire un support métallique - Pathogène
Vibrio carchariae	35084	Aéro-anaérobie	négatif	- Découverte récente
Vibrio natrigens	14048	Aéro-anaérobie	négatif	- Retrouvée dans les boues des estuaires - Croissance rapide - Non pathogène - Forme des biofilms
Vibrio proteolyticus	53559	Aéro-anaérobie	Négatif	- Mobile - Pathogène - Forme des biofilms

* Collection ATCC : American Type Culture Collection

❖ *Résultats des tests*

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VIII. Les métabolites **PK1** et **PK2** n'ont montré aucun potentiel d'activité antifouling par inhibition de la croissance et de l'adhésion des souches bactériennes sélectionnées.

Tableau VIII: *Activité antibactérienne de **PK1** et **PK2** isolés d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus.*

Souches bactériennes	**Inhibition de la croissance** CMI (µg/mL)	**Inhibition de l'adhésion** CMI (µg/mL)	**Activation de la croissance** CE (µg/mL)	**Activation de l'adhésion** CE (µg/mL)
		PK1		
Shewanellia putrefaciens	-	-	-	0,1
Roseobacter littoralis	-	-	10	1
Vibrio carchariae	-	-	10	1
Vibrio natrigens	-	-	-	1
Vibrio proteolyticus	-	-	-	100
		PK2		
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,01	0,01
Roseobacter littoralis	-	-	1	100
Vibrio carchariae	-	-	0,1	-
Vibrio natrigens	-	-	-	100
Vibrio proteolyticus	-	-	-	-

III.3.3 Discussion

Choisie pour sa cytotoxicité envers la lignée cellulaire KB et son activité antipaludique (Annexe 1), l'éponge *Plakortis kenyensis* s'est avérée avoir une composition en métabolites secondaires plutôt simple comprenant principalement, deux peroxydes cycliques connus, le plakortolide E et l'acide andavadoïque. Tous deux ont montré :

- une activité antipaludique ;
- une activité inhibitrice du *quorum sensing* de la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* et de ses souches mutantes JAF 375, JMH 597, JMH 612 ;
- aucune activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion des souches bactériennes marines testées.

Figure 20 : *Métabolites isolés de Plakortis kenyensis : Bilan structure/activité.*

Les données de la littérature montrent que les peroxydes cycliques sont caractéristiques des éponges du genre *Plakortis* (Davidson B.S., 1991 ; Varoglu M. *et al*., 1995 ; Patil A.D. *et al*., 1996a ; Berrué F. *et al*., 2005a ; Harrison B. et Crews P., 1998 ; Fattorusso E. *et al*., 2000 ; Hu J.-F. *et al*., 2001 ; Jimènez M. *et al*., 2003 ; Feng Y. *et al*., 2010 ; Jiménez-Romero C. *et al*., 2010 ; Rudi A. *et al*., 2003) et *Plakinastrella* (Horton P.A. *et al*., 1994 ; Yong K.W.L. *et al*., 2010 ; Perry T.L. *et al*., 2001 ; Chen Y. *et al*., 2001 ; Yong K.W.L. *et al*., 2011 ; Festa C. *et al*., 2013a). Plus de 56 peroxydes cycliques ont en effet été isolés de ces deux genres d'éponges ; la plupart d'entre eux se révélant biologiquement actifs. Ce sont, entre autre, des agents antimicrobiens, ichthyotoxiques, anti-neuroinflammatoires ou encore anti-tumoraux (Casteel D.A., 1992, 1999 ; Rahm F. *et al*., 2004 ; Dembitsky V.M. *et al*., 2007 ; Thomas T.R.A. *et al*., 2010). Le plakortolide E par exemple, s'est avéré cytotoxique envers deux lignées cellulaires cancéreuses (mélanome et sein) (Varoglu M. *et al*., 1995). De même, l'acide andavadoïque a montré une activité cytotoxique remarquable (de l'ordre du submicromolaire) sur 13 lignées cellulaires cancéreuses (Rudi A. *et al*., 2003). Toutefois, ce manque de sélectivité peut constituer un inconvénient.

Il a été récemment mentionné dans la littérature qu'un nombre important de ces polycétides étaient également actifs contre les parasites protozoaires : *Plasmodium falciparum*, *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma brucei brucei*, et *Trypanosona cruzi* (Kossuga M.H. *et al*., 2008 ; Taglialatela-Scafati O. *et al*., 2010 ; Feng Y. *et al*., 2010). Il s'agit principalement de polycétides dont le squelette inclus un peroxyde cyclique à six atomes (1,2-dioxane) ou un peroxyde cyclique à cinq atomes (1,2-dioxolane) (Blunt J.W. *et al*., 2010). Le tableau IX reprend l'ensemble des polycétides isolés d'éponges du genre *Plakortis* ayant été évalués, comme le plakortolide E et l'acide andavadoïque, pour leur activité anti-plasmodiale.

Un intérêt tout particulier a été porté par quelques chercheurs à la relation structure-activité antiplasmodique des polycétides endoperoxydes d'éponges du genre *Plakortis*. Ces travaux concernent plus particulièrement les polycétides de type 1,2-dioxane dont la formule générale est donnée à la figure 21. La configuration des deux centres stéréogéniques C-3 et C-6 n'a pas été spécifiée car plusieurs configurations ont été mentionnées dans la littérature parfois même pour des polycétides de type 1,2-dioxane isolés de la même éponge.

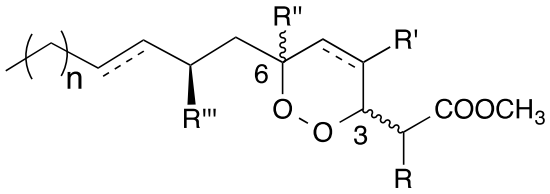


Figure 21 : *Structure schématique des polycétides endoperoxydes isolés d'éponges du genre Plakortis.*

Parmi les travaux réalisés, l'étude de la plakortine **P70** (R = H, R' = β-CH_2CH_3, R'' = α-CH_3, R''' = CH_2CH_3, *n* =1) particulièrement active contre les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*, et de ses dérivés naturels ou hémi-synthétiques, a conduit à une proposition de mécanisme d'action de cette famille de polycétides de type 1,2-dioxane (Fattorusso E. *et al*., 2000, 2002 ; Campagnuolo C. *et al*., 2005 ; Fattorusso C. *et al*., 2006 ; Tagliatela-Scafari O. *et al*., 2010 ; Slack R.D. *et al*., 2012). Le mécanisme proposé comprend en premier lieu une interaction entre l'atome d'oxygène O1 de l'endoperoxyde et le fer (II) d'une hèmeprotéine. Il en résulte alors la formation d'une espèce radicalaire toxique dont le centre radicalaire est placé sur l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species). Cette espèce radicalaire subit ensuite un réarrangement intramoléculaire pour conduire à la formation d'une nouvelle espèce radicalaire responsable de l'activité antimalarique dont le radical est localisé sur l'un des carbones de la chaîne latérale : C-9 pour la plakortine **P70** et C-13 pour la dihydroplakortine **P55** (Figure 22).

Le mécanisme proposé a été par la suite confirmé par Chianese *et al*. à partir d'une étude conformationnelle menée par modélisation moléculaire sur la plakortine **P70**, la dihydroplakortine **P55** et les endoperoxydes **P56** à **P61**. Cette étude structure-activité a permis d'expliquer la différence de réactivité observée entre les dérivés incluant un cycle 1,2-diox-4-éne (les plus actifs, **P56-P58**) et les dérivés possédant un cycle 1,2-dioxane (les moins actifs, **P59-P61**). Elle a également apporté un éclairage sur la forte réactivité de la plakortine **P70** et de la dihydroplakortine **P55** comprenant non pas un cycle 1,2-dioxane mais 1,2-diox-4-ène.

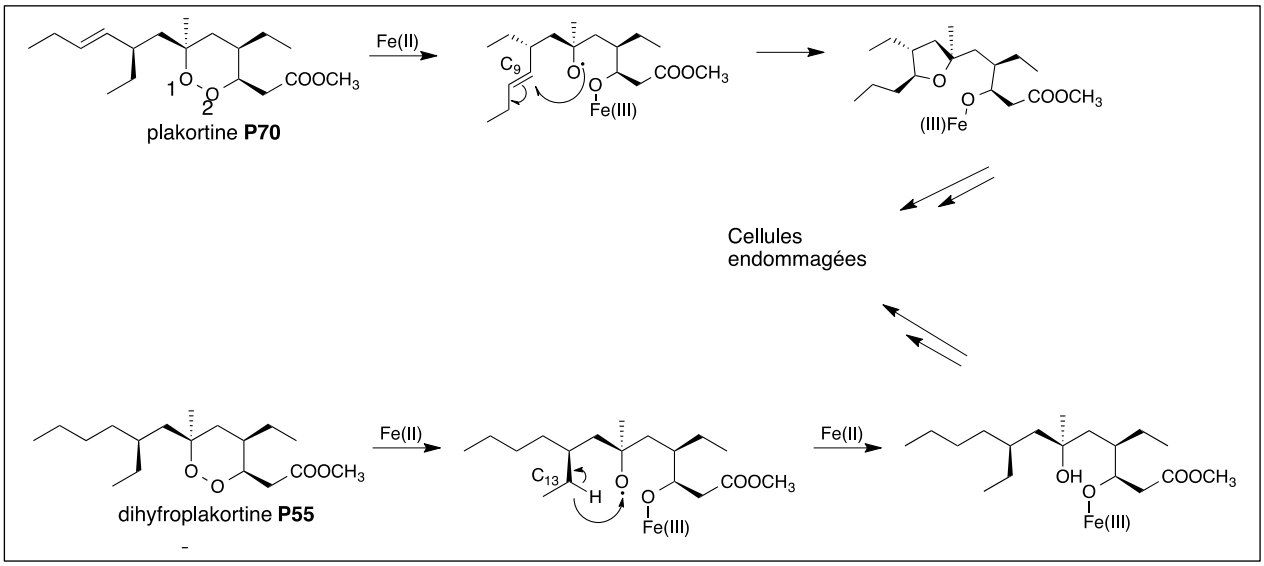
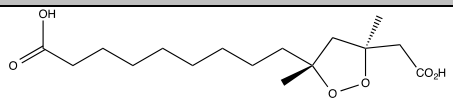
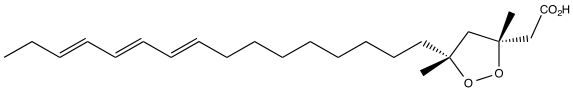
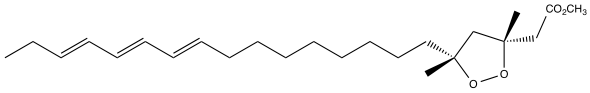
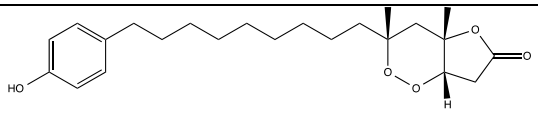
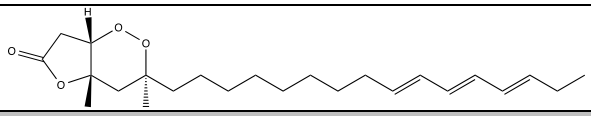
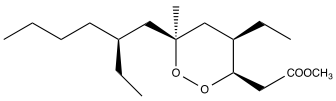
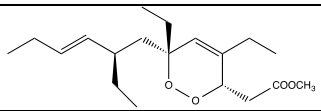
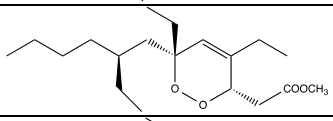
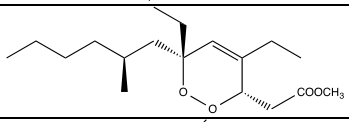
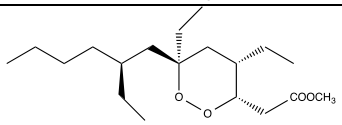
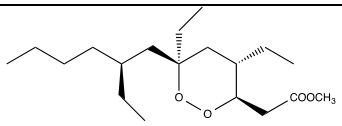
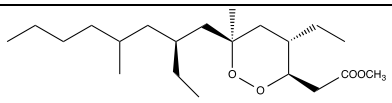
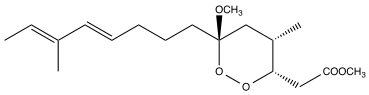


Figure 22 : *Proposition d'un mécanisme d'action antimalarique de la plakortine **P70** et de la dihydroplakortine **P55**. (Chianese G. et al., 2014)*

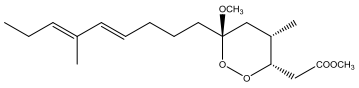
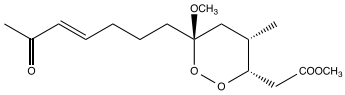
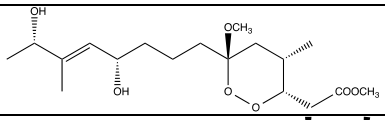
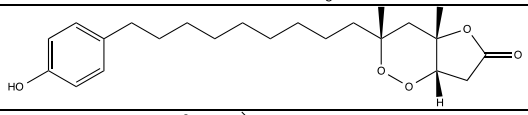
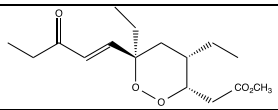
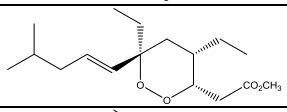
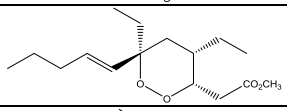
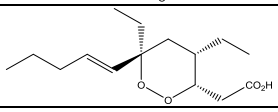
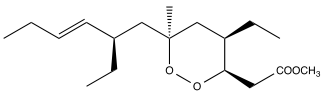
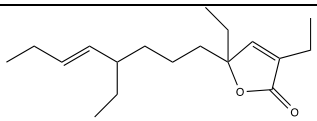
Enfin, la littérature fait également mention des manadoperoxydes **P62-P65**, dérivés peroxycétals (R'' = OCH_3) isolés de *Plakortis simplex* (Fattorusso C. *et al*., 2010). Les différentes configurations relatives des manadoperoxydes et la présence d'un substituant méthoxy en C-6, réduisent considérablement pour le fer (II) de l'hèmeprotéine, l'accessibilité aux atomes d'oxygène de l'endoperoxyde. En conséquence, l'activité antimalariale s'en retrouve nettement diminuée. En revanche, les manadoperoxydes se révèlent fortement actifs vis-à-vis d'autres parasites protozoaires à savoir *Trypanosoma brucei brucei* (Chianese G. *et al*., 2012, Chianese G. *et al*., 2013). Cette activité est étroitement reliée aux structures des groupements R et R' (R = CH_3, R' = H : aucune activité ; R = H, R' = CH_3 : forte activité).

Tableau IX : *Activité antimalariale in vitro de peroxydes cycliques isolés d'éponges du genre Plakortis.*

	Nom de la molécule	Structure	CI_{50} [a] (µg/mL)	Références
Plakortis halichondrioides				
P51	Acide épiplakinidioïque		W2 : 0,3	Jiménez-Romero C. *et al*., 2000
P52	Acide épiplakinique F		W2 : 3	Jiménez-Romero C. *et al*., 2000
P53	Ester méthylique de l'acide épiplakinique F		W2 : 4	Jiménez-Romero C. *et al*., 2000
P54	Plakortolide F		W2 : > 0	Jiménez-Romero C. *et al*., 2000
P16	Plakortolide J		W2 : > 10	Jiménez-Romero C. *et al*., 2000
Plakortis simplex				
P55	Dihydroplakortine		D10 : 0,350 W2 : 0,238 D10 : 0,28 W2 : 0,14	Fattorusso E. *et al*., 2002 Chianese G. *et al*., 2014
P56	Endoperoxyde 1		D10 : 1,26 W2 : 0,94	Chianese G. *et al*., 2014
P57	Endoperoxyde 2		D10 : 1,32 W2 : 0,88	Chianese G. *et al*., 2014
P58	Endoperoxyde 3		D10 : 0,55 W2 : 0,49	Chianese G. *et al*., 2014
P59	Endoperoxyde 4		D10 : 2,03 W2 : 1,63	Chianese G. *et al*., 2014
P60	Endoperoxyde 5		D10 : NA [b] W2 : 3,74	Chianese G. *et al*., 2014
P61	Endoperoxyde 6		D10 : 1,82 W2 : 1,46	Chianese G. *et al*., 2014
P63	Manadoperoxyde A		D10 : 2,24 W2 : 1,22	Fattorusso C. *et al*., 2010

[a] CI_{50} : Concentration inhibitrice médiane de la croissance du parasite *Plasmodium falciparum* (souches Chloroquino sensibles CQ-S, D6 et CQ-S10 ; souche chloroquino-resistante CQ-R, W2).
Les données de la littérature ont toutes été converties en µg/mL afin de faciliter les analyses comparatives.
[b] NA : Non Actif.

Tableau IX : *(Suite)*

	Nom de la molécule	Structure	CI_{50} [a]	Références
Plakortis simplex *(suite)*				
P63	Manadoperoxyde B		D10 : 2,30 W2 : 1,25	Fattorusso C. *et al*., 2010
P64	Manadoperoxyde C		D10 : 1,43 W2 : 0,73	Fattorusso C. *et al*., 2010
P65	Manadoperoxyde D		D10 : 3,73 W2 : 2,85	Fattorusso C. *et al*., 2010
P12	Plakortide F		D6 : 0,480 W2 : 0,390	Gochfeld D.J. et Hamman M.T., 2001
P66	Plakortide I		W2 : 0,570	Hu J.F. *et al*., 2001
P67	Plakortide J		NA [b]	Hu J.F. *et al*., 2001
P68	Plakortide K		NA [b]	Hu J.F. *et al*., 2001
P69	Plakortide L		NA [b]	Hu J.F. *et al*., 2001
P70	Plakortine		D10 : 0,39 W2 : 0,23 D10 : 0,27 W2 : 0,12	Fattorusso E. *et al*., 2002 Chianese G. *et al*., 2014
P23	Plakortone G		D6 : 4,20 W2 : >4,76	Gochfeld D.J. et Hamman M.T., 2001

[a] CI_{50} : Concentration inhibitrice médiane de la croissance du parasite *Plasmodium falciparum* (souches Chloroquino sensibles CQ-S, D6 et CQ-S10 ; souche chloroquino-resistante CQ-R, W2).
Les données de la littérature ont toutes été converties en *µ*g/mL afin de faciliter les analyses comparatives.
[b] NA : Non Actif.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'EPONGE
Theonella swinhoei (Gray, 1868)

IV.1 Eléments bibliographiques

IV.1.1 Localisation du genre *Theonella* (Gray, 1868)

Les éponges du genre *Theonella* sont des éponges présentes dans tous les océans du Monde, à l'exception des Océans Arctique et Antarctique. Ces éponges peuvent ainsi être rencontrées dans l'Océan Indien (Zanzibar, Côte Est de l'Afrique, Madagascar, Inde, Australie, …), l'Océan Pacifique (Indonésie, Philippines, Micronésie…), l'Océan Atlantique (Les Caraïbes, Maroc, …), la Mer Rouge (Arabie saoudite, Golfe d'Aqaba,…), et enfin la Mer Méditerranée. (www.marinespecies.org)

IV.1.2 Position systématique et description du genre *Theonella* (Pulitzer-Finali, 1993)

- **Position systématique** (www.marinespecies.org)

Le genre *Theonella* appartient à la famille des Theonellidae (ordre des Tetractinellida), qui comprend 5 genres différents : *Discodermia* (du Bocage, 1869), *Manihinea* (Pulitzer-Finali, 1993), *Racodiscula* (Zittel, 1878), *Siliquariaspongia* (Hoshino, 1981), *Theonella* (Gray, 1868).

Royaume :	Animal
Phylum :	Porifera
Classe :	Demospongiae
Sous-Classe	Heteroscleromorpha
Ordre :	Tetractinellida
Sous-Ordre	Astrophorina
Famille :	Theonellidae
Genre :	*Theonella*
Synonymes :	*Rhachella* (Sollas, 1888)

- **Description morphologique** (Pisera A. et Levi C., 2002)

Les éponges de la famille des *Theonellidae*, sont présentes aussi bien en eaux profondes que peu profondes. Elles sont polymorphes : elles peuvent être fines encroûtantes, massives irrégulières, cylindriques, branchues, en forme de vase ou encore claviformes, avec

ou sans cavité axiale. Concernant le squelette, ces éponges se caractérisent par la présence de spicules ectosomiques allant du type phyllotriaène au type discotriaène, de tétraclones choanosomiques ainsi que de microsclères tels que les acanthorhabdes, les pseudosphérasters et/ou les microxes, et/ou les streptasters/amphiasters.

Les genres de cette famille se différencient au niveau des spicules ectosomiques et des microsclères. Le genre *Theonella*, par exemple, se caractérise par la présence de spicules ectosomiques allant du type phyllotriaène au type discotriaène et de microsclères de type acanthorabdes.

IV.1.3 Cas particulier de l'espèce *Theonella swinhoei* (Gray, 1868): localisation et description morphologique

- **Localisation** (www.marinespecies.org)

L'éponge *Theonella swinohei*, identifiée par Gray en 1868, a été trouvée essentiellement dans l'Océan Indien et la Mer rouge. Quelques spécimens ont toutefois été récoltés au niveau des côtes chinoises et de certaines îles de l'Océan Pacifique. Dans l'Océan Indien plus spécifiquement, cette espèce a été aperçue en particulier à Madagascar, sur les Côtes Est de l'Afrique, dans le canal du Mozambique, aux Seychelles, en Inde et en Australie (Grande Barrière de Corail). Cette éponge se situe généralement entre 0 et 20 m de profondeur.

- **Description morphologique** (Pisera A. et Levi C., 2002)

L'éponge *Theonella swinohei*, est une éponge petite, massive, en forme de vase avec une large base à partir de laquelle elle est fixée au substrat rocheux. Elle présente une cavité axiale étroite et profonde. L'éponge mesure entre 3,5 cm de haut et 4,4 cm de large ; les parois mesurent environs 6 mm d'épaisseur. Un unique grand oscule (1 x 0,7 cm de large), est localisé en son centre conduisant à une cavité qui se rétrécie rapidement. L'extérieur de l'éponge est recouvert de crêtes irrégulières. Les spicules ectosomiques sont des phyllotriaènes avec un très petit rhabde ; ils peuvent avoir des clades relativement longs et très effilés, ou au contraire, relativement massifs et plats dans les différentes parties de l'éponge. Ceux présentant des clades étroits sont davantage présents au niveau des zones inhalantes de la surface externe de l'éponge, alors que ceux possédant des clades massifs se

retrouvent principalement sur la surface interne du vase. Les phyllotriaènes ont un diamètre de 460 à 560 µm. De nombreux microsclères sont présents sur la membrane dermique entre les phyllotriaènes, et dans les lacunes sous-dermique. Les microsclères en forme d'épine sont droits mais le plus souvent courbés, parfois à 90°. Le squelette choanosomique est composé de desmes tétraclones réguliers qui peuvent être lisses ou à tubercules. Ils mesurent approximativement 325-360 µm.

Figure 23: *Photographie in situ de Theonella swinhoei (Crédit LCSNSA).*

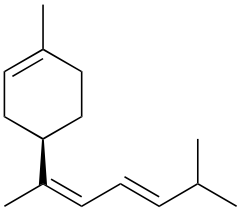
IV.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Theonella* (Gray, 1868)

Les éponges de l'ordre des Tetractinellida, sont riches en métabolites secondaires bioactifs. Pas moins de 350 métabolites secondaires ont été isolés d'éponges de cet ordre. La très grande majorité d'entre eux (près de 300) proviennent des genres *Theonella* et *Discodermia* (Kornprobst J.M., 2005). Concernant plus spécifiquement les éponges du genre *Theonella*, la littérature fait principalement mention de sesquiterpènes, de polyacétylènes, de stérols, de macrolides, de peptides, et de divers composés phosphorés atypiques.

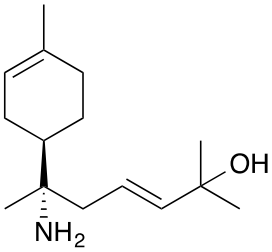
IV.1.4.1 Les sesquiterpènes

On compte à ce jour 7 sesquiterpènes isolés du genre *Theonella* (Nakamura H. *et al*., 1984 ; Kitagawa I. *et al*., 1993). Ces composés sont tous des dérivés de la **théonelline** (**T1**), un sesquiterpène hydrocarboné isolé de l'éponge *Theonella swinhoei* (Nakamura H. *et al*., 1984). Ces dérivés diffèrent de la théonelline dont le squelette est de type bisabolane, par la présence de substituants sur la chaîne latérale ou sur le cycle à 6. L'**aminobisabolénol** (**T2**) par exemple, porte des fonctions amine et alcool sur la chaîne latérale (Kitagawa I. *et al*.,

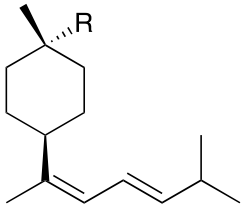
1993). La **théonelline isothiocyanate** (**T3**) et la **théonelline formamide** (**T4**) quant à elles, se caractérisent par la présence sur le cycle, d'une fonction thiocyanate pour la première et formamide pour la seconde (Nakamura H. *et al*., 1984).



théonelline (**T1**)



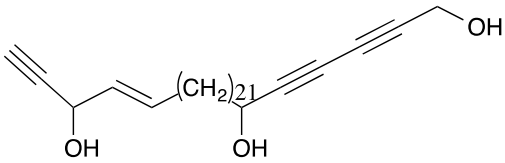
aminobisabolénol (**T2**)



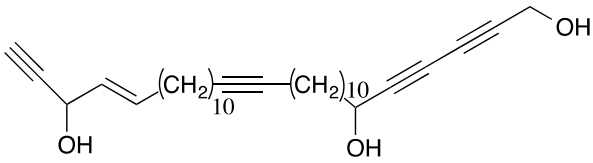
théonelline isothiocyanate (**T3**) R = SCN
théonelline formamide (**T4**) R = NHCHO

IV.1.4.2 Les polyacétylènes

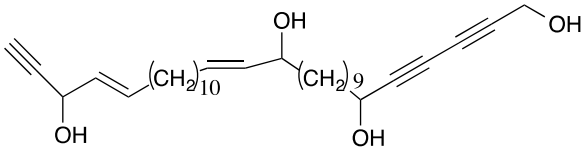
Les données de la littérature font très peu mention de la présence de polyacétylènes dans les éponges du genre *Theonella*. A notre connaissance, seuls les travaux de Fu X. *et al*. (1999) révèlent la présence de polyacétylènes dans une éponge de ce genre. De cette éponge, collectée dans les Etats fédérés de Micronésie, les auteurs ont isolés quatre polyacétylènes de structures connues ; il s'agit des mélynes A et B et des pellynols C et D (Fu X. *et al*., 1997). Les quatre autres étaient de structures nouvelles et ont été nommées **pellynols E-H** (**T5** - **T8**).



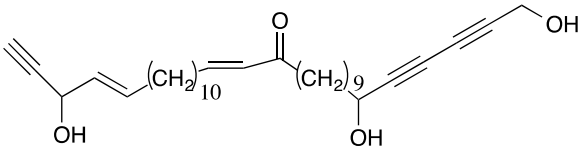
pellynol E (**T5**)



pellynol F (**T6**)



pellynol G (**T7**)



pellynol H (**T8**)

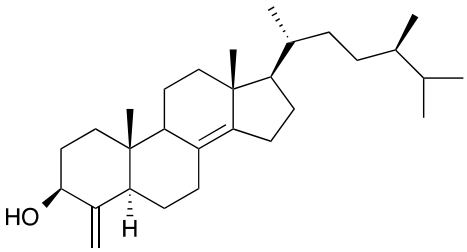
Les polyacétylènes sont présents de façon récurrente chez les éponges de l'ordre des Haplosclerida, au point d'en faire un critère de chimiotaxonomie pour cet ordre (Kornprobst J.M., 2005). Leur présence dans les éponges du genre *Theonella* n'appartenant pas à cet ordre, soulève donc la question de l'origine de ces polyacétylènes : sont-ils synthétisés par l'éponge ou les micro-organismes associés ?

IV.1.4.3 Les stérols

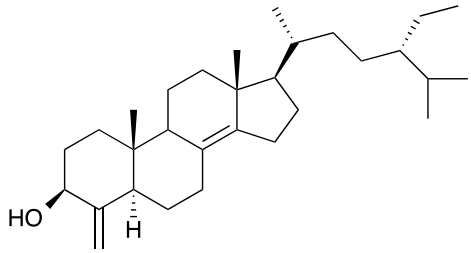
Plus de 16 publications sont consacrées aux stérols des éponges du genre *Theonella* (Kobayashi M. *et al*., 1992 ; Sugo Y. *et al*., 1995 ; Umeyama A. *et al*., 1997 ; Qureshi A. et Faulkner D.J., 2000 ; Angawi R.F. *et al*., 2009 ; Zhang H.J. *et al*., 2010 ; Chini M.G. *et al*., 2011 ; Festa C. *et al*., 2011a ; Sepe V. *et al*., 2011 ; Guo J.K. *et al*., 2012 ; De Marino S. *et al*., 2012 ; Di Micco S. *et al*., 2013 ; Festa C. *et al*., 2014 ; Gong J. *et al*., 2014 ; Mencarelli A. *et al*., 2014 ; Sepe V. *et al*., 2014). Il s'agit pour la très grande majorité d'entre eux de 4-méthylènestérols tels que le **conicastérol** (**T9**) isolé de *Theonella conica* et le **théonellastérol** (**T10**) isolé de *Theonella swinhoei* (Kho E. *et al*., 1981). La présence de ces stérols particuliers mise en évidence dans des dinoflagellés symbiotiques (Kornprobst J.M., 2005) pose comme pour les polyacétylènes, la question de l'origine biosynthétique de ces métabolites : sont-ils synthétisés par l'éponge ou les micro-organismes associés ?

Deux dimères de stérols, le **bisconicastérone** (**T11**) et le **bisthéonellastérone (T12)** isolés de *Theonella swinhoei*, ont également été mentionnés dans la littérature (Inouye Y. *et al*., 1994 ; Kobayashi M. *et al*., 1992).

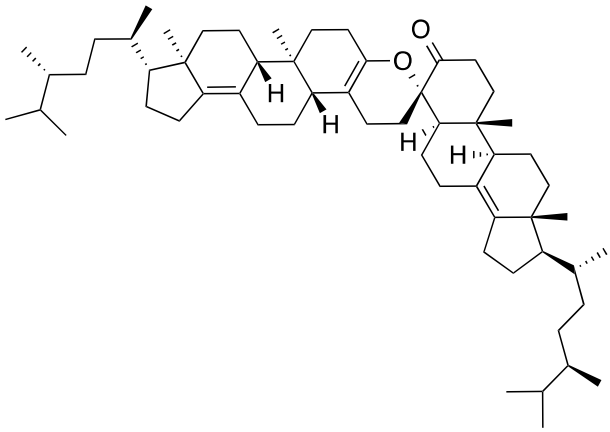
Enfin, les **salomonstérols A** et **B** (**T13** et **T14**) sont deux stérols sulfatés en C-2, C-3, C-23 et C-24 isolés de l'éponge *Theonella swinhoei* par l'équipe de Festa C. *et al*. (2011a). Les stérols sulfatés sont assez communs chez les éponges et les échinodermes. Ils sont bien souvent dotés d'activités biologiques. Ils peuvent en effet montrer des activités antivirale, antifongique, antifouling ou encore peuvent avoir une action spécifique sur des cibles enzymatiques. Concernant plus particulièrement les salomonstérols A et B, selon Festa C. *et al*. (2011a), il s'agirait d'antagonistes du récepteur nucléaire humain PXR (Pregnane X Receptor, NR1I2). Ce dernier module l'expression de plusieurs familles de gènes impliquées dans des voies de détoxification de l'organisme. Ainsi, des agonistes affins et spécifiques de ce récepteur pourraient être utilisés pour protéger l'organisme des effets néfastes dus à l'accumulation d'agents toxiques endogènes et exogènes. Par ailleurs, ces antagonistes permettraient également de traiter certains cancers ou d'éviter des interactions médicamenteuses.



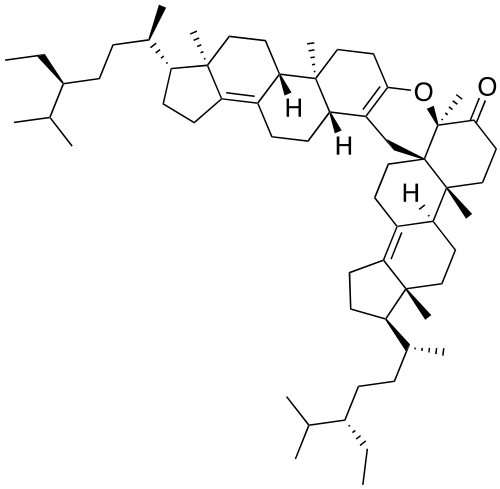
conicastérol (**T9**)



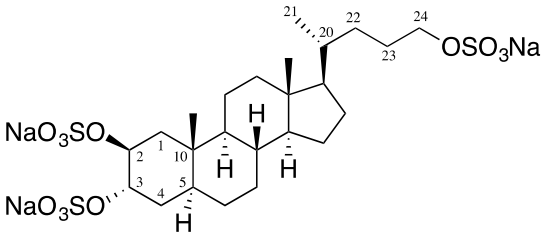
théonellastérol (**T10**)



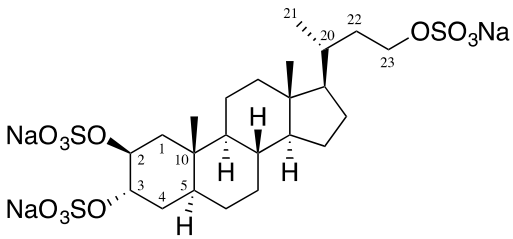
bisconicastérone (**T11**)



bisthéonellastérone (**T12**)



salomonstérol A (**T13**)



salomonstérol B (**T14**)

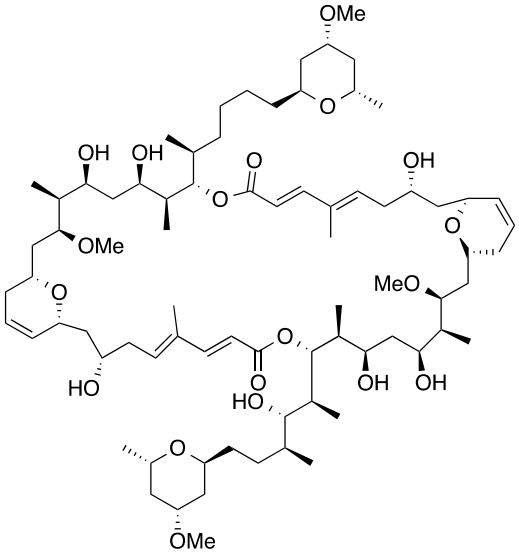
IV.1.4.4 Les macrolides

Pas moins de 20 macrolides ont été isolés des éponges du genre *Theonella* (Carmely S. et Kashman Y., 1985 ; Kobayashi M. *et al*., 1989 ; Tanaka J. *et al*., 1990 ; Tsukamoto S. *et al*., 1991 ; Todd J.S. *et al*., 1992 ; Kobayashi J. *et al*., 1993 ; Kondo K. *et al*., 1994 ; Sato M. *et al*., 1998 ; Mitsui-Saito M. *et al*., 2003 ; Edrada R.A. *et al*, 2002 ; Youssef D.T.A. et Mooberry S.L. 2006 ; De Marino S. *et al*., 2011 ; Nozawa K. *et al*., 2013 ; Sinisi A. *et al*., 2013a). Ce sont en général des macrolactones, dotées pour la plupart, d'activité biologique. L'exemple le plus connu est le **swinholide A** (**T15**) et son monomère le **préswinholide A**

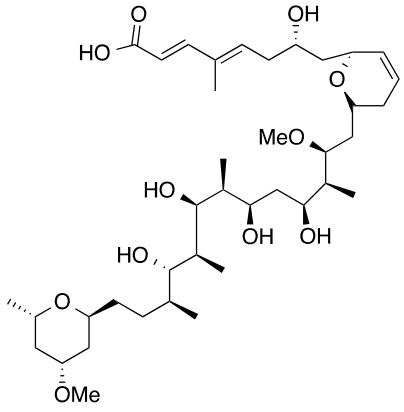
(**T16**), tous deux isolés de l'éponge *Theonella swinhoei* (Carmely S. et Kashman Y., 1985 ; Kobayashi M. *et al*., 1989 ; Doi M. *et al*., 1991 ; Todd J.S. *et al*., 1992). Le swinholide A, tout d'abord présenté comme une macrolactone à 22 éléments, a par la suite été identifié par rayons X comme étant une dilactone dont le cycle est constitué de 44 atomes Son activité cytotoxique sur plusieurs lignées cancéreuses a été étudiée et mentionnée dans la littérature à plusieurs reprises (Doi M. *et al*., 1991 ; Kobayashi M. *et al*., 1994a ; Bubb M.R. *et al*., 1995 ; Sinisi A. *et al*., 2013a). Les activités biologiques intéressantes du swinholide A, ont suscité l'intérêt de chercheurs et conduit à sa synthèse totale (Paterson I. et Cumming J.G. 1992 ; Paterson I. et Smith J.D., 1992 ; Patron A.P. *et al*., 1994 ; Nakata T. *et al*., 1994 ; Paterson I. *et al*., 1994 ; Richter P.K. *et al*., 1994 ; Paterson I. *et al*., 1995 ; Mulzer J. et Meyer F. 1995 ; Nagasawa K. *et al*., 1996 ; Nicolaou K.C. *et al*., 1996 ; Keck G.E. et Lundquist G.D. 1999 ; Shin I. et Krische M.J. 2015).

Bon nombre de dérivés du swinholide A ont été par la suite isolés d'éponges du genre *Theonella :* les swinholides B-K (Kobayashi M. *et al*., 1990 ; Tsukamoto S. *et al*., 1991 ; Youssef D.T.A. et Mooberry S.L. 2006 ; De Marino S. *et al*., 2011 ; Sinisi A. *et al*., 2013a) et les isoswinholides A et B (Kobayashi M. *et al*., 1990 ; Tsukamoto S. *et al*., 1991 ; Sinisi A. *et al*., 2013a). Ces composés ont montré une activité cytotoxique significative sur les cellules cancéreuses KB (*nasopharynx humain* - swinholides B, C, D, E, F, G, J), L1210 (*leucémie murine* - swinholides D, E, F, G), HCT-116 (*colon humain* - swinholide I) sur les cellules HepG2 (*foie humain* - swinholides A, B, D, K et isoswinholide A). Le swinholide I a montré en outre une activité antifongique remarquable sur le champignon *Candida albicans*.

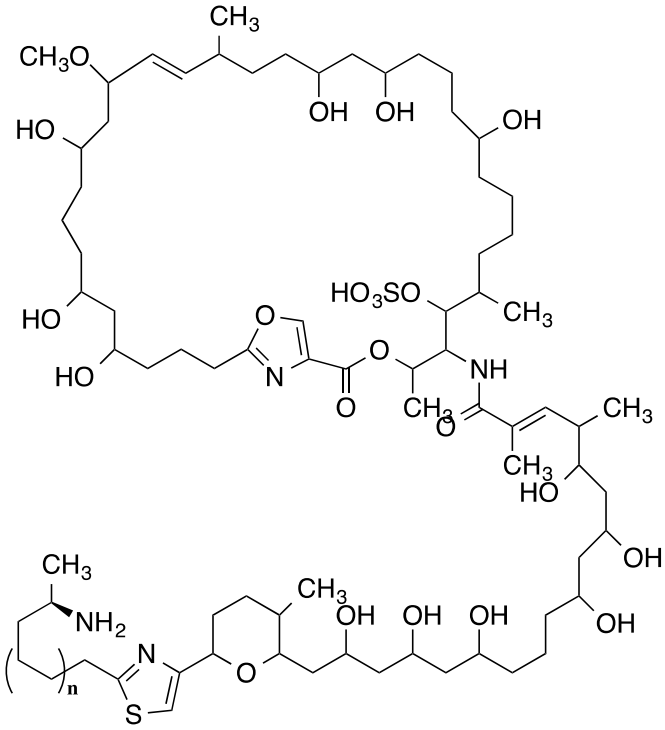
D'autres macrolides comme les **théonézolides A-C** (**T17-T19**), possédant des groupements oxazoles, et sulfate dans le cycle lactonique ont été également isolés du genre *Theonella* (Kobayashi J. *et al*., 1993 ; Kondo K. *et al*., 1994 ; Sato M. *et al*., 1998 ; Nozawa K. *et al*., 2013).



swinholide A (**T15**)



préswinholide A (**T16**)



théonézolide A (**T17**) n = 1
théonézolide B (**T18**) n = 2
théonézolide C (**T19**) n = 3

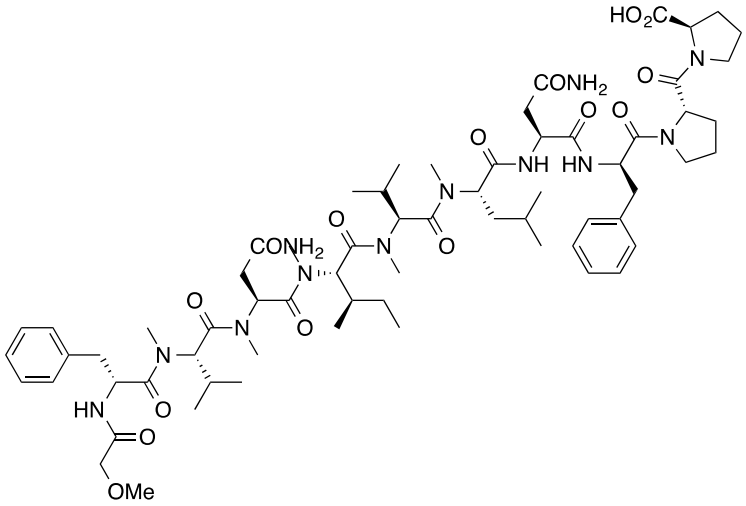
IV.1.4.5 Les peptides

Les éponges du genre *Theonella* sont connues pour leur richesse en peptides, cyclopeptides et depsipeptides. Ces peptides, cyclopeptides et depsipeptides présentent bien souvent des structures atypiques avec notamment l'incorporation d'acides aminés non

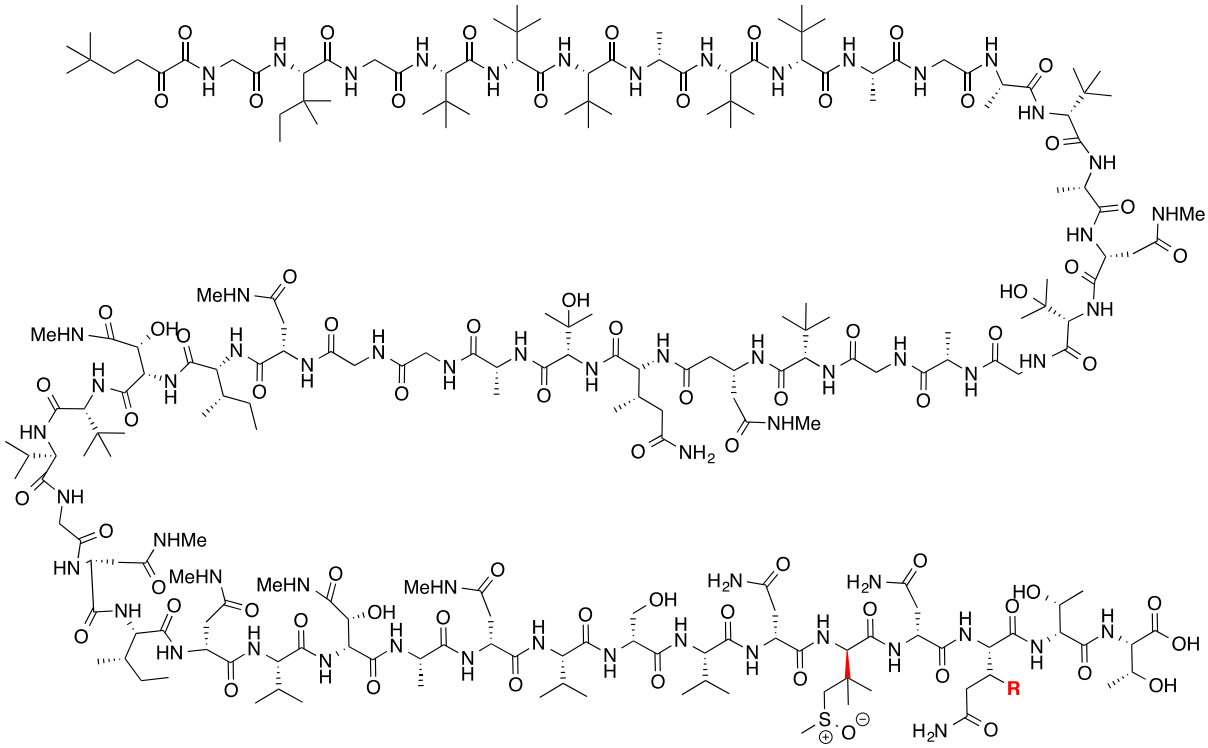
conventionnels comme les α-aminoacides de la série D ou les β-aminoacides. Ces derniers également retrouvés dans des cyanobactéries, laissent supposer un possible échange chimique entre l'éponge et les cyanobactéries qui lui sont associées (Kornprobst J.M., 2005). Aucune étude scientifique toutefois n'a pu prouver l'existence de cet « échange ».

❖ *Les peptides linéaires*

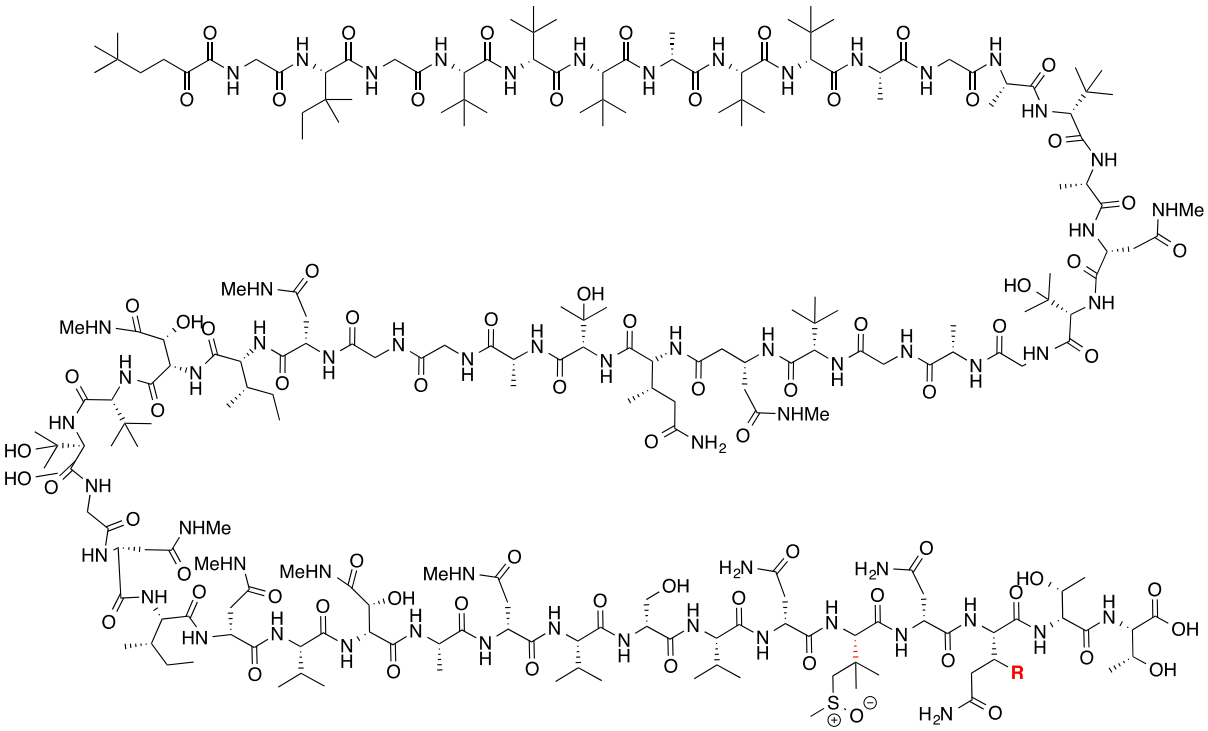
13 peptides linéaires bioactifs ont été isolés des éponges du genre *Theonella* (Fusetani N. *et al*., 1991a ; Hamada T. *et al*., 1994, 2004 ; Nakao Y. *et al*., 1999, 2000 ; Araki T. *et al*., 2005 ; Fusetani N. *et al*., 1999). A titre d'exemple, citons les peptides linéaires de très grand poids moléculaire tels le **koshikamide A_1** (**T20**) cytotoxique envers la lignée cellulaire leucémique murine P388 (Fusetani N. *et al*., 1999) ou encore les **polythéonamides A-C** (**T21-T23**) fortement cytotoxiques envers la lignée cellulaire leucémique murine L1210 (Hamada T. *et al*., 1994, 2004).



koshikamide A_1 (**T20**)



polythéonamide A (**T21**) R = H



polythéonamide B (**T22**) R = H
polythéonamide C (**T23**) R = CH_3

❖ ***Les cyclopeptides***

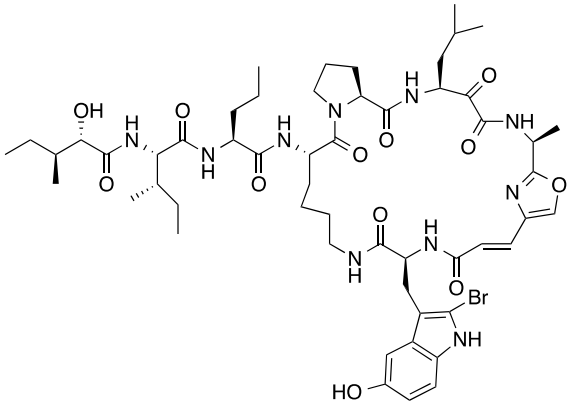
Les peptides cycliques (59) retrouvés en plus grand nombre par rapport aux les peptides linéaires (14), sont sous forme de structures penta-, hexa-, hepta- ou octapeptides. Pas moins de 28 publications décrivent des cyclopeptides isolés du genre *Theonella* (Matsunaga S. *et al*., 1989 ; Fusetani N. *et al*., 1991b ; Kobayashi J. *et al*., 1991 ; de Silva D.E. *et al*., 1992 ; Itagaki F. *et al*., 1992 ; Bewley C.A. et Faulkner D.J., 1994 ; Gulavita N.K. *et al*., 1994 ; Kobayashi J. *et al*., 1995 ; Matsunaga S. et Fusetani N. 1995 ; Nakao Y. *et al*., 1995 ; Bonnington L.S. *et al*., 1997 ; Schmidt E.W. *et al*., 1997 ; Nakao Y. *et al*., 1998 ; Schmidt E.W. et Faulkner D.J. 1998 ; Schmidt E.W. *et al*., 1998 ; Uemoto H. *et al*., 1998 ; Tsuda M. *et al*., 1999b ; Erdogan I. *et al*., 2000 ; Wegerski C.J. *et al*., 2007 ; Festa C. *et al*., 2009 ; Plaza A. *et al*., 2010 ; Festa C. *et al*., 2011b, 2012, 2013b ; Fukuhara K. *et al*., 2015).

Le **kéramamide E** (**T24**) (Kobayashi J. *et al*., 1995), la **motuporine** (**T25**) (de Silva D.E. *et al*., 1992) ou encore le **théonégramide** (Bewley C.A. et Faulkner D.J., 1994) sont trois exemples de cyclopeptides isolés d'éponges du genre *Theonella*.

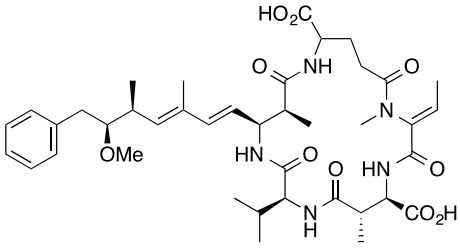
Le **kéramamide E** (**T24**) isolé conjointement avec ses analogues les kéramamides G, H, J d'une éponge du genre *Theonella* du Japon, présente la particularité d'inclure dans son système cyclique, un cycle oxazolique et plusieurs acides aminés inhabituels. Ce composé présente par ailleurs une cytotoxicité envers les lignées cellulaires L1210 (leucémie murine) et KB (carcinome buccal humain) bien plus élevée que celles observées pour ses analogues G, H et J.

La **motuporine** (**T25**) est un cyclopentapeptide isolé d'une éponge du genre *Theonella* collectée dans les eaux de Papouasie-Nouvelle-Guinée. Cette molécule a montré une activité inhibitrice remarquable sur la protéine phosphatase-1 (PP1). Elle présente également une forte cytotoxicité *in vitro* sur les lignées cellulaires cancéreuses P388 (leucémie murine), A549 (poumon), HEY (ovaires), LoVo (colon), MCF7 (sein) et U373MG (cerveau).

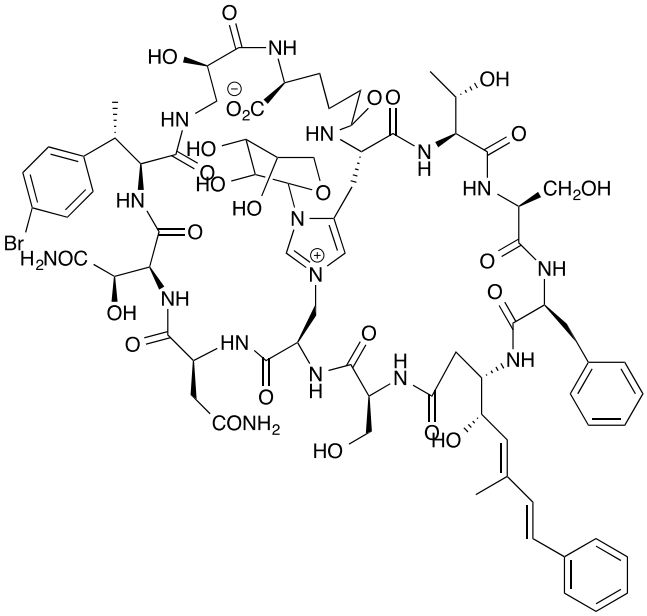
Le **théonégramide** (**T26**) est un glycopeptide antifongique isolé de *Theonella swinhoei* des Philippines.



kéramamide E (**T24**)



motuporine (**T25**)

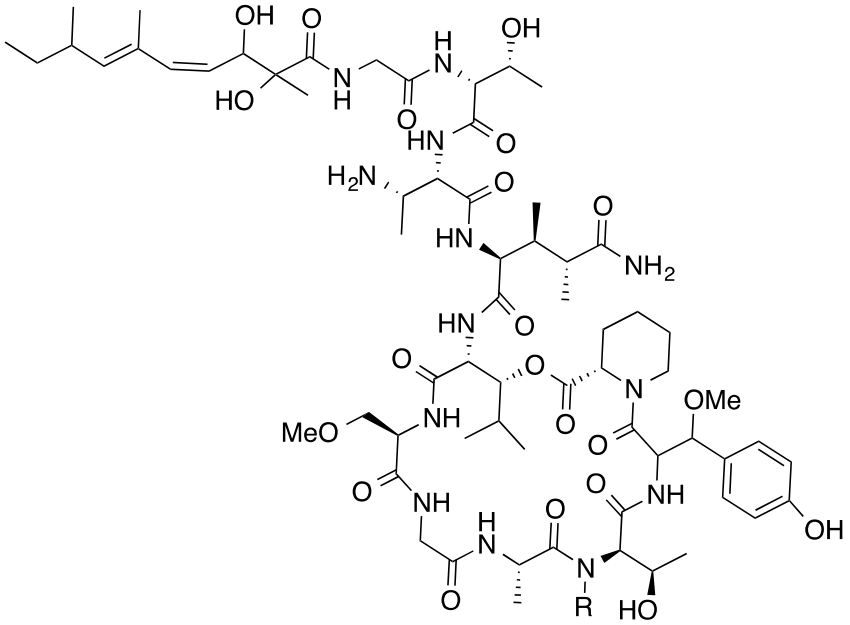


théonégramide (**T26**)

❖ ***Les depsipeptides***

Vingt et un depsipeptides ont été isolés d'éponges du genre *Theonella* (Kitagawa I. *et al*., 1986 ; Nakamura H. *et al*., 1986 ; Kitagawa I. *et al*., 1990 ; Kobayashi M. *et al*., 1994b ; Clark D.P. *et al*., 1998 ; Ford P.W. *et al*., 1999 ; Roy M.C. *et al*., 1999 ; Tsuda M. *et al*., 1999a ; Roy M.C. *et al*., 2000 ; Okada Y. *et al*. 2002 ; Oku N. *et al*., 2005; Ratnayake A.S. *et al*., 2006 ; Araki T. *et al*., 2008 ; Sinisi A. *et al*., 2013b). Ces depsipeptides constitués d'un cycle comprenant 16 à 37 atomes, présentent la particularité d'être constitués de nombreux acides aminés atypiques, comme la chloro-isoleucine, l'acide 4-amino-3,5-dihydroxyhexanoïque, la *N*-formylleucine ou encore la diméthylglutamine, la β-méthoxytyrosine, l'acide 2,3-diaminobutanoïque et l'acide 2-aminobut-2-énoique.

A titre d'exemple, citons les **papuamides A-D** isolées de *Theonella mirabilis* et *Theonella swinhoei* de Papouasie-Nouvelle-Guinée (Ford P.W. *et al*., 1999). En plus de la glycine, de l'alanine et de la thréonine, ces peptides sont constitués d'aminoacides inhabituels tels que la 3,4-diméthylglutamine, la β-méthoxytyrosine, la 3-méthoxyalanine, l'acide 2,3-diaminobutanoïque ou l'acide 2-aminobut-2-énoïque. De plus, les papuamides A-D sont les premiers dérivés peptidiques marins à contenir les résidus 3-hydroxyleucine et homoproline. Ces peptides présentent une autre particularité : une chaîne acide 2,3-dihydroxy-2,6,8-triméthyldéca-(4*Z*,6*E*)-diénoïque reliée à l'extrémité *N*-terminale du résidu glycine. Enfin, Ford P.W. *et al*. (1999) ont montré que les **papuamides A** (**T27**) et **B** (**T28**) inhibent l'infection des cellules lymphoblastoïdes T humaines par le virus HIV-1_{RF}. La **papuamide A** (**T25**) est par ailleurs cytotoxique envers un large panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines.

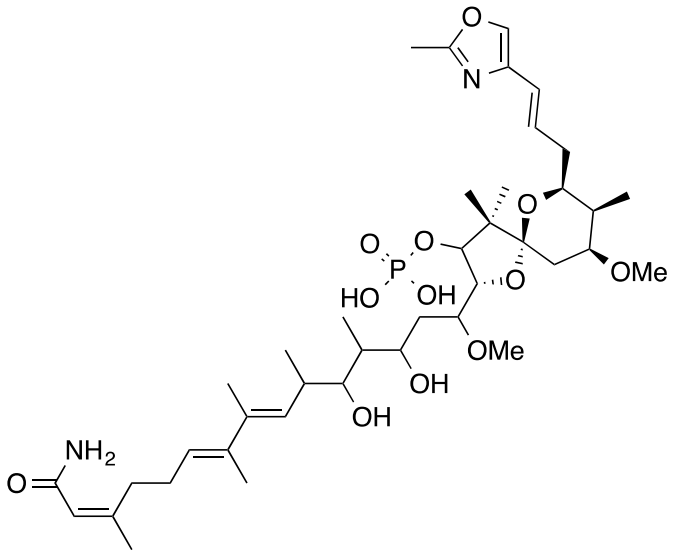


papuamide A (**T27**) R = CH_3
papuamide B (**T28**) R = H

IV.1.4.6 Composés phosphorés atypiques

Une éponge de l'espèce *Theonella swinhoei* de Papousie-Nouvelle-Guinée, a permis la découverte d'un composé phosphoré atypique : le **swinhoeiamide A** (**T29**) (Edrada R.A. *et al*., 2002). Ce composé est un analogue des calyculinamides A et B isolés de l'éponge *Lamellomorpha strongylata* de Nouvelle-Zélande (Dumdei E.J. *et al*., 1997) et des clavosines

A-C isolées de l'éponge *Myristra clavosa* de Palau (Fu X. *et al*., 1998). Ces composés sont connus comme inhibiteurs de la protéine-sérine/thréonine phosphatase. Concernant plus particulièrement le swinhoeiamide A, Edrada R.A. *et al*. (2002) ont démontré son activité insecticide sur les jeunes larves de *Spodoptera littoralis*, insecte polyphage ravageur ainsi que son activité antifongique sur les souches de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*.



swinhoeiamide A (**T29**)

IV.2 Etude chimique de l'éponge *Theonella swinhoei* de Madagascar

L'étude chimique de l'éponge *Theonella swinhoei* collectée à Madagascar a permis l'obtention d'un composé majoritaire (**TS1**) : un macrolide polyoxygéné connu. Les techniques d'isolement et de purification, ainsi que l'élucidation structurale de ce composé sont exposées ci-après.

IV.2.1 Fractionnement et isolement du métabolite TS1

L'isolement du composé majoritaire de l'éponge *Theonella swinhoei* décrit ci-après, est illustré dans la figure 24.

970 mg de l'extrait brut de *Theonella swinhoei* ont été fractionnés par filtration sur gel de Sephadex de LH20. L'élution a été réalisée au moyen d'un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante. Cela a permis l'obtention de 6 fractions.

Les analyses par CLHP-Corona-DAD-SM des 6 fractions obtenues montrent pour les fractions F2, F3 et F4, des profils chromatographiques semblables, assez riches en métabolites secondaires avec une masse *m/z* 1389,7 pour le composé majoritaire **TS1**.

Les fractions F2, F3 et F4 ont donc été rassemblées (F234) et soumises à un autre fractionnement par filtration sur gel de Sephadex LH20. L'élution a été réalisée au moyen d'un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante selon le protocole appliqué précédemment. Six nouvelles fractions ont été obtenues. Un contrôle des fractions par CLHP-DEDL-PAD-SM des 6 fractions a permis de rassembler les fractions F234-4 et F234-5, aux profils chromatographiques semblables et enrichies en composé majoritaire **TS1**.

Une troisième filtration sur gel Sephadex LH20 des fractions F234-4 et F234-5 rassemblées (F234-45), a permis l'obtention de 4 fractions. Suite au contrôle de ces 4 fractions par CLHP-Corona-DAD-SM, la fraction F234-45-4 riche en **TS1** a été sélectionnée et soumise à un fractionnement par CLMP en phase normale éluée par un gradient isohexane/acétate d'éthyle. Ce fractionnement a permis de récupérer 20 fractions (F234-45a à t).

Le composé majoritaire **TS1** a finalement été obtenu suite à une dernière purification de la fraction F234-45-4b par CLHP-UV (280 nm) analytique sur colonne en phase inverse (Atlantis T3, C18 analytique phase inverse, 4,6 × 150 mm, 5 µm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

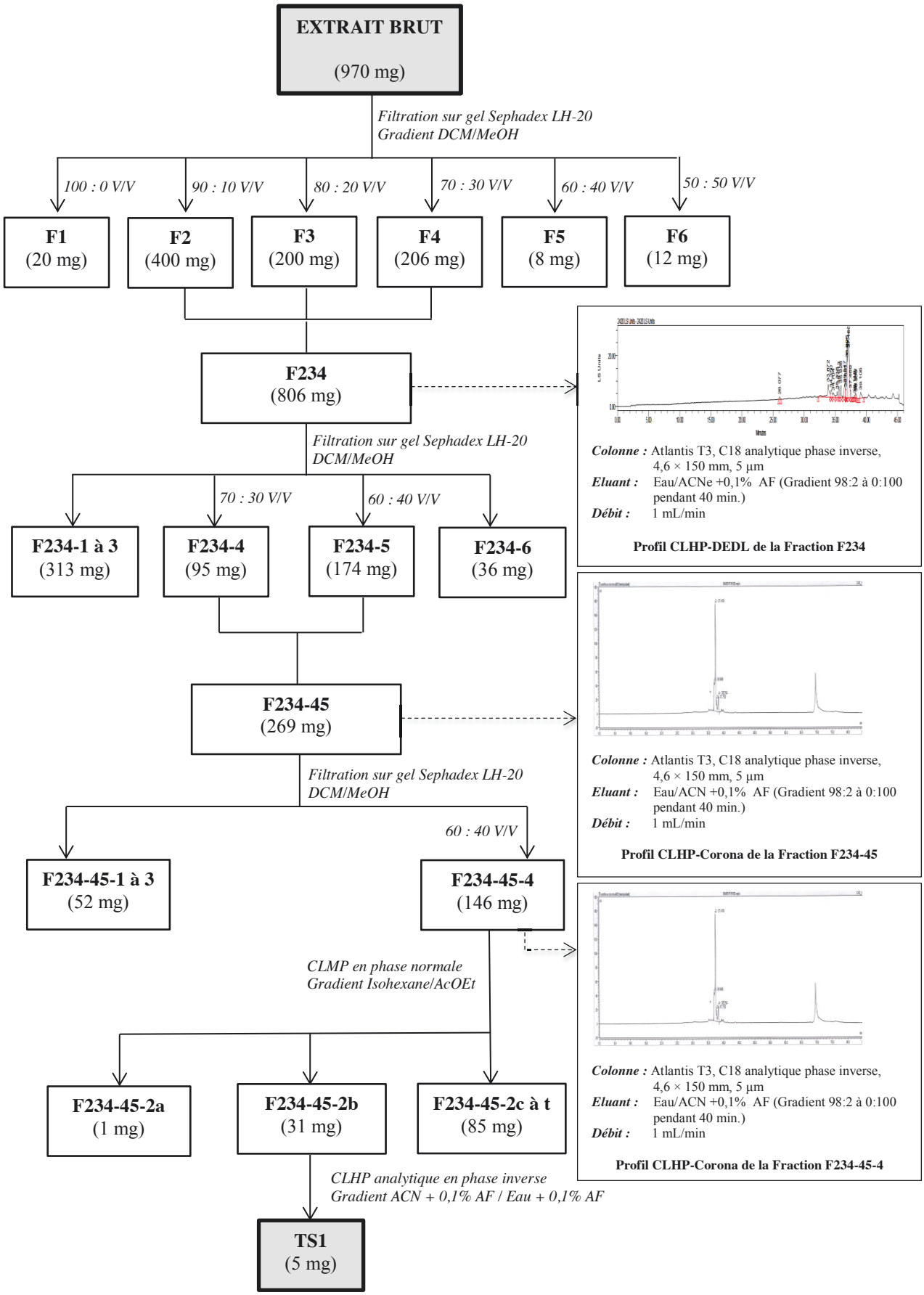
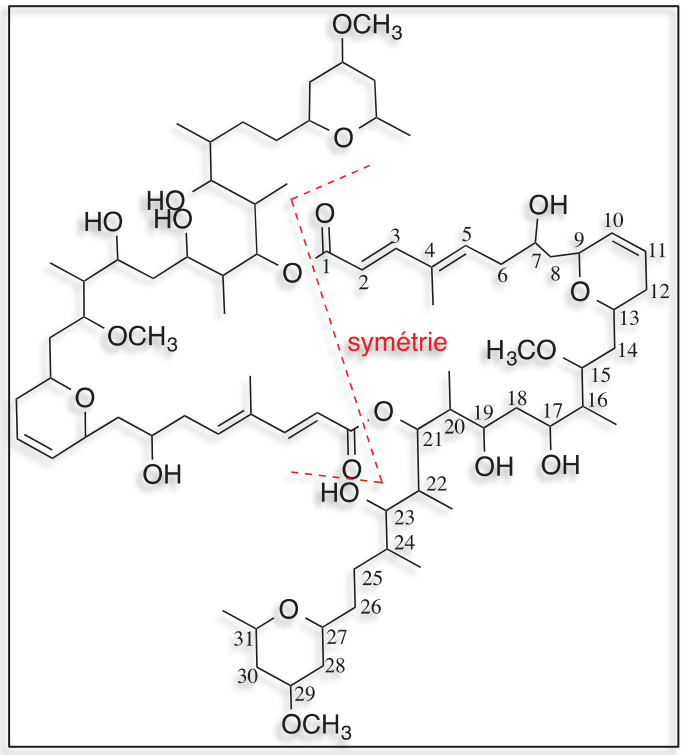


Figure 24 : *Fractionnement de Theonella swinhoei pour l'obtention du métabolite **TS1**.*

IV.2.2 Elucidation structurale du métabolite TS1



swinholide A (**TS1**)

TS1 a été identifié comme étant le swinholide A, composé connu et isolé de l'éponge *Theonella swinhoei* de la Mer Rouge (Carmely S. et Kashman Y., 1985) mais aussi du Japon. (Kobayashi M. *et al*., 1989). L'identification de ce métabolite a été réalisée par comparaison de ses données spectrales en masse haute résolution et RMN, expérimentales à celles de la littérature :

Le composé **TS1** ($[\alpha]_D^{25}$ - 64,7° (*c* 0,5 mg/100 mL DCM)) a été isolé sous forme d'une pâte brune. Son spectre de masse HRMS en mode ESI^+ a révélé un ion moléculaire à 1388,7482 correspondant à la formule brute $C_{78}H_{132}O_{20}$ (calculée : *m/z* 1388,8738) et proche de la valeur donnée dans la littérature pour le swinholide A (*m/z* 1388,9311, Kobayashi M. *et al*., 1989).

En outre, la comparaison des spectres RMN ^{1}H du composé isolé avec les données de la littérature (Tableau X), permet d'attribuer à **TS1** la structure du swinholide A. Le swinholide A étant une molécule parfaitement symétrique, seuls les déplacements chimiques de la moitié des atomes (H-1 à H-31) sont donnés dans le tableau X.

Tableau X **:** *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H du swinholide A de la littérature (500 MHz, $CDCl_3$) (Kobayashi M. et al., 1989) à ceux observés pour* ***TS1*** *(500 MHz, $CDCl_3$).*

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (*J* en Hz)	
	Littérature	**Observés**
1	-	-
2	5,79 (d)	5,79 (d, *15,6*)
3	7,58 (d)	7,58 (d, *15,8*)
4	-	-
4-Me	1,83 (s)	1,79 (s)
5	6,08 (dd)	6,07 (dd, *3,4* ; *6,3*)
6	2,18 (brd) - 2,46 (ddd)	2,16 (d, *13,5*) - 2,44 (ddd, *4,8 ; 10,2 ; 13,7*)
7	4,14 (br dd)	4,14 (br dd, *6,7 ; 7,8*)
8	1,58 (m) - 1,63 (m)	1,58 (m) -1,63 (m)
9	4,51 (br d)	4,49 (br d, *8,5*)
10	5,69 (br dd)	5,69 (br dd, *8,5* ; *10,4*)
11	5,78 (br d)	5,78 (br d, *14,9*)
12	1,82 (m) - 2,27 (br d)	1,82 (m) - 2,27 (m)
13	3,86 (m)	3,80 (m)
14	1,46 (ddd) - 2,14 (ddd)	1,46 (ddd, *5,2 ; 9,8 ; 12,3*) - 2,14 (m)
15	4,01 (m)	3,99 (m)
15-OMe	3,35 (s)	3,35 (s)
16	1,68 (m)	1,68 (m)
16-Me	0,81 (d)	0,81 (d, *6,6*)
17	3,83 (dd)	3,80 (dd, *3,7 ; 8,5*)
18	1,62 (m) - 1,69 (m)	1,62 (m) - 1,69 (m)
19	3,98 (m)	3,97 (m)
20	1,75 (dq)	1,75 (dqt, *7,2 ; 10,5 ; 14,2 ; 53,2*)
20-Me	0,97 (d)	0,97 (d, *6,7*)
21	5,36 (d)	5,35 (d, *10,9*)
22	1,95 (m)	1,95 (m)
22-Me	0,84 (d)	0,84 (d, *6,8*)
23	3,12 (d)	3,12 (d, *10,7*)
24	1,65 (m)	1,65 (m)
24-Me	0,99 (d)	0,99 (d, *6,6*)
25	1,27 (m) - 1,38 (m)	1,27 (m) -1,38 (m)
26	1,30 (m) -1,90 (m)	1,30 (m) -1,90 (m)
27	4,02 (m)	4,02 (m)
28	1,60 (m) - 1,82 (m)	1,60 (m) - 1,82 (m)
29	3,53 (dddd)	3,53 (q, *7,7 ; 9,7 ; 14,2 ; 18,3*)
29-OMe	3,33 (s)	3,33 (s)
30	1,18 (ddd) -1,96 (m)	1,18 (ddd, *5,3 ; 9,7 ; 12,5*) - 1,96 (ddd, *5,3 ; 9,7 ; 12,5*)
31	3,69 (ddq)	3,69 (q, *6,4 ; 10,2 ; 15,5 ; 19,2*)
31-Me	1,20 (d)	1,20 (d, *6,7*)

IV.3 Evaluation de l'activité biologique du métabolite isolé

Le swinholide A (**TS1**) a été testé pour ses activités antipaludique et antifouling.

- **L'activité antipaludique** a été évaluée à travers l'action antiproliférative de **TS1**, sur le parasite *Plasmodium falciparum*.
- **L'activité antifouling** a été évaluée selon deux méthodes :
  1. L'activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants.
  2. L'activité inhibitrice de la croissance/adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine.

IV.3.1. L'activité antipaludique

❖ ***Principe du test***

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

L'extrait brut de *Theonella swinhoei* ayant révélé une activité antiproliférative *in vitro* remarquable (CI_{50} = 0,30 µg/mL, Chapitre II et Annexe I) sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7), le composé majoritaire de cette éponge, le swinholide A, a donc été également évalué pour son activité antiplasmodium *in vitro* contre *Plasmodium falciparum*.

❖ ***Résultats du test***

Avec une CI_{50} de 4,73 ± 2,02 µg/mL (Tableau XI), le swinholide A présente une excellente activité antiplasmodium et peut être considéré en conséquence comme un agent antipaludique potentiel.

Tableau XI : *Activité antiplasmodium du swinholide A isolé de Theonella swinhoei.*

Métabolites	CI_{50} (µg/mL)
swinholide A (**TS1**)	4,73 ± 0,02

IV.3.2. L'activité antifouling

IV.3.2.1 Méthode 1 : Activité QSI sur la bactérie bioluminescente *Vibrio haveyi* et ses mutants

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antifouling ont été réalisés sous la direction du Directeur de Recherche Cécile Debitus par l'équipe EIMS (Etude Intégrée Des Métabolites Secondaires) de l'UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens, France.

Bien que l'éponge *Theonella swinhoei* ne fasse pas partie des éponges étudiées dans le cadre du programme POMARE et donc que son extrait brut n'ait pas été testé pour son activité QSI sur la bactérie bioluminecente *Vibrio harveyi*, le composé majoritaire, le swinholide A (**TS1**), a été soumis au test d'activité QSI sur la bactérie *Vibrio harveyi* (souche sauvage BB120) et ses souches mutantes : JAF 375 (Activation de CAI-1), JMH 597 (Activation de AI-2), JMH 612 (Activation de HAI-1). L'application du test à chacune de ces souches mutantes permet de déterminer la voie d'activation du *quorum sensing* par laquelle agit le produit pur (*cf*. Chapitre II §II.4.5).

❖ ***Résultats du test***

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau XII. Le swinholide A (**TS1**) a montré une très bonne activité inhibitrice de la luminescence sur la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 260 min). Sur les mutants JAF 375, JMH 597 et JMH 612, un retard de la luminescence inférieur à 200 minutes a été observé (120, 140 et 110 min respectivement). Au cours de ces tests, le swinholide A a montré une activité bactériostatique à 500 min sur le mutant 375.

Tableau XII: *Activité QSI du swinholide A (**TS1**) isolé de Theonella swinhoei sur la bactérie bioluminescente Vibrio harveyi et ses souches mutantes : JAF 375, JMH 597, JMH 612.*

Souche	Observations	Swinholide A (TS1)
Vibrio haveyi **(souche sauvage BB120)**	Effet observé sur l'absorbance	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	260
Mutant Δ375	Effet observé sur l'absorbance	Oui - Bactériostatique
	Retard observé sur la luminescence	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	120
Mutant Δ597	Effet observé sur l'absorbance	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	140
Mutant Δ612	Effet observé sur l'absorbance	Non
	Retard observé sur la luminescence	Oui
	Temps de décalage de la luminescence (min)*	110

* T < 100 min. : modérément actif ; T ≥ 100 min. : bien actif ; Inhibition totale : très actif

IV.3.2.2 Méthode 2 : Activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sous la direction du Professeur Claire Hellio au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France.

Comme évoqué au chapitre III (§ III.3.2.2) pour les métabolites **PK1** et **PK2**, il a été choisi d'évaluer l'activité antifouling du swinholide A (**TS1**) isolé de *Theonella swinhoei* à travers son activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion sur 5 souches de bactéries marines provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Roseobacter litoralis*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus*.

❖ ***Résultats des tests***

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau XIII. Le métabolite **TS1** montre une très bonne activité inhibitrice de la croissance (CMI : 0,01µg/mL) de la bactérie *Vibrio natrigens*. Il est en revanche un bon activateur de la croissance et de l'adhésion des quatre autres souches bactériennes testées.

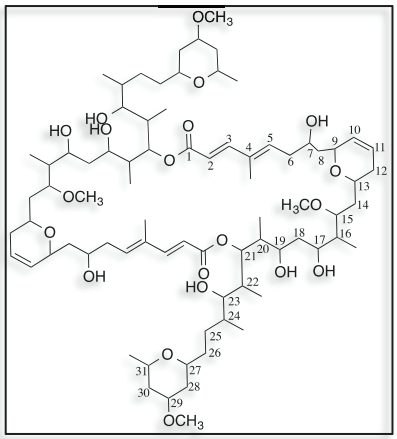
Tableau XIII: *Activité antibactérienne de **TS1** isolé d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus.*

Souches bactériennes	**Inhibition de la croissance** CMI (µg/mL)	**Inhibition de l'adhésion** CMI (µg/mL)	**Activation de la croissance** CE (µg/mL)	**Activation de l'adhésion** CE (µg/mL)
		TS1		
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,01	0,01
Roseobacter littoralis	-	-	0,1	0,01
Vibrio carchariae	-	-	0,01	0,01
Vibrio natrigens	0,01	-	-	-
Vibrio proteolyticus	-	-	0,1	0,1

IV.3.3 Discussion

Choisie pour sa cytotoxicité envers la lignée cellulaire KB et son activité antipaludique (Chapitre II et Annexe 1), l'éponge *Theonella swinhoei* collectée sur les côtes malgaches est marquée par la présence majoritaire du swinholide A, comme c'est le cas également pour les éponges *Theonella swinhoei* de la Mer Rouge (Carmely S. et Kashman Y., 1985) et du Japon. (Kobayashi M. *et al*., 1989). Les travaux réalisés ont montré que ce macrolide, déjà connu pour son activité cytotoxique sur plusieurs lignées cancéreuses (Doi M. *et al*., 1991 ; Kobayashi M. *et al*., 1994a ; Bubb M.R. *et al*., 1995) est également doté de propriétés :

- antipaludique ;
- inhibitrice du *quorum sensing* de la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* ;
- bactériosatique sur la souche mutante JAF 375 de *Vibrio harveyi*.



swinholide A (TS1)

- *Activité antiplasmodiale.*
- *Activité QSI sur Vibrio harveyi*
- *Activité bactériosatique sur la souche mutante JAF 375 de Vibrio harveyi*

Figure 25 : *Métabolite isolé de Theonella swinhoei : Bilan structure/activité.*

L'origine biosynthétique du swinholide A produit par *Theonella swinhoei* a été étudiée par Bewley *et al*. (1996) à partir d'une espèce récoltée à Palau (Iles Carolines). Les chercheurs ont montré que l'éponge contenait deux types de symbiontes, l'un vivant dans l'ectosome, la couche externe de l'éponge, et l'autre dans l'endosome où, même à faible profondeur, la photosynthèse ne peut se produire, faute de lumière. L'endosome contient des bactéries filamenteuses non photosynthétiques qui produisent le théopalauamide, un glycopeptide bicyclique, et l'ectosome contient exclusivement les cyanobactéries *Aphanocapsa feldmanni*, qui produisent le swinholide A.

La présence du swinholide A dans l'éponge *Theonella swinhoei* de la Mer Rouge, du Japon et de Madagascar peut amener à considérer ce composé comme marqueur chimiotaxonomique de l'espèce. Toutefois, d'un point de vue chimiotaxonomique, l'utilisation des molécules biosynthétisées par les micro-organismes associés aux éponges peut être contestable. En effet, s'il est permis de supposer que l'association de l'éponge et de ses bactéries endosymbiotiques est stable, il n'en est plus de même pour les cyanobactéries ectosomales. Le swinholide A par exemple, produit par les cyanobactéries *Aphanocapsa feldmanni* vivant dans l'ectosome, n'a pas été retrouvé dans un spécimen de *Theonella swinhoei* collecté aux Philippines. En revanche, sa présence a été relevée dans une éponge très différente, du genre *Ircinia*.

CHAPITRE V

ETUDE DE L'EPONGE
Haliclona (Reniera) fascigera (Hentschel, 1912)

V.1 Eléments bibliographiques

V.1.1 Localisation du genre *Haliclona* (Grant, 1836)

Les éponges du genre *Haliclona* sont des éponges présentes dans tous les océans du Monde, de l'Arctique jusqu'en Antarctique. Pour l'Océan Arctique, il a été prélevé des éponges jusqu'au Royaume-Uni ; il n'est toutefois pas à exclure la possibilité d'en rencontrer dans des eaux plus froides. Ces éponges peuvent ainsi être rencontrées dans l'Océan Indien (côte Est de l'Afrique, Maldives, Australie, Iles Kerguelen …), l'Océan Pacifique (Indonésie, Corée du Sud, Micronésie…), l'Océan Atlantique (Les Caraïbes, Archipel des Açores, Archipel des Canaries, Afrique du Sud …) ou encore en Mer Méditerranée (Grèce, Corse, Mer Adriatique…) (www.marinespecies.org)

V.1.2 Position systématique et description du genre *Haliclona* (Grant, 1836)

- **Position systématique** (www.marinespecies.org)

Le genre *Haliclona* (*Reniera*) appartient à la famille des Chalinidae (ordre des Haplosclerida), qui comprend 5 genres différents, *Chalinula* (Schmidt, 1868), *Cladocroce* (Topsent, 1892), *Dendrectilla* (Pulitzer-Finali, 1983), *Dendroxea* (Griessinger, 1971), *Haliclona* (Grant, 1836).

Royaume :	Animal
Phylum :	Porifera
Classe :	Demospongiae
Sous-Classe	Heteroscleromorpha
Ordre :	Haplosclerida
Famille :	Chalinidae
Genre :	*Haliclona (Reniera)*
Synonymes :	*Pellinula* (Czerniavsky, 1880) *Protoschmidtia* (Czerniavsky, 1880) *Tedaniella* (Czerniavsky, 1880)

Notons que le genre *Reniera* est depuis 1984 rattaché au genre *Haliclona* en raison de leur forte similitude morphologique (Ridley S.O., 1984).

- **Description morphologique** (Griessinger J.M., 1971 ; Bergquist P.R. et Warne K.P., 1980)

La famille des Haliclonidae est l'une des deux familles qui composent l'ordre des Haplosclerida. La seconde étant celle des Renieridae.

Il semble que les taxonomistes aient beaucoup de mal à classer les éponges de cette famille. Les critères de classification restent en effet très vagues dans la mesure où ces éponges montrent une grande diversité morphologique et possèdent peu de caractères macroscopiques spécifiques : les mégasclères sont toujours des oxes et leur taille varie considérablement d'une espèce à l'autre. Leur forme cependant pourrait constituer un critère taxonomique.

Le genre *Haliclona* appartient à la famille des Haliclonidae. Il a été créé pour l'espèce *Haliclona oculata* (Pallas) dans une étude de physiologie puis abandonné dans un travail de classification par Grant en 1861. La systématique de ce genre comme pour toutes les éponges de la famille des Haliclonidae est en effet particulièrement délicate. On caractérise toutefois ce genre à l'aide des observations :

- au niveau des spicules par des oxes petits, réguliers entre eux en taille et en forme,

- au niveau de la charpente par un réseau organisé à densité spiculaire réduite où la spongine joue un rôle important. Elle peut avoir un grand développement dans les parties âgées où elle forme de véritables fibres.

Même si ces critères morphologiques sont bien souvent insuffisants, ils doivent néanmoins être complétés par des données histologiques.

V.1.3 Cas particulier de l'espèce *Haliclona (Reniera) fascigera* (Hentschel, 1912): localisation et description morphologique

- **Localisation** (www.marinespecies.org)

L'éponge *Haliclona* (*Reniera*) *fascigera* a été observée principalement dans les Océans Indien et Pacifique.

- **Description morphologique** (Nicole de Voogd)

L'éponge *Haliclona (Reniera) fascigera* (Figure 26) est constituée de tubes longs et fragiles parfois évasés. Sa surface est très lisse et sa couleur d'un bleu vif tirant sur le violet. Le squelette ectosomal est un squelette isodictyal réticulé tangentiellement ; le squelette choanosomal est formé par une réticulation unispiculaire, unie par de la spongine au niveau des nœuds des spicules. Les oxes très minces et effilés, quelque peu courbes, ont pour dimensions : 60-*71*-79 x 2-*3*-4 µm (min - *moyenne* - max). Les premiers spécimens d'*Haliclona (Reniera) fascigera* décrits ont été observés dans la zone Pacifique notamment la Grande Barrière de Corail en Autralie. Le spécimen collecté à Mayotte et étudié dans le cadre de nos travaux, présente des oxes légèrement plus petits que ceux des premiers spécimens décrits (72-*80*-82 x 3-*3,5*-4 µm) mais ces dimensions restent dans la moyenne des dimensions rencontrées pour les oxes de cette espèce.

Figure 26: *Photographie in situ de Haliclona (Reniera) fascigera (Crédit LCSNSA).*

V.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Haliclona* (Grant, 1836)

L'étude de la composition chimique des éponges du genre *Haliclona* (*Reniera*), a conduit à l'isolement et l'identification de 285 molécules, soit la quasi-totalité des molécules isolées de la famille des Chalinidae. On relèvera pour ce genre, une très grande diversité de familles chimiques : majoritairement des alcaloïdes et des polyacétylènes, mais aussi des stéroïdes. Notons également la présence plus rare de sesquiterpènes, de cyclopeptides et depsipeptides, d'hydroquinones et de macrolides.

V.1.4.1 Les alcaloïdes

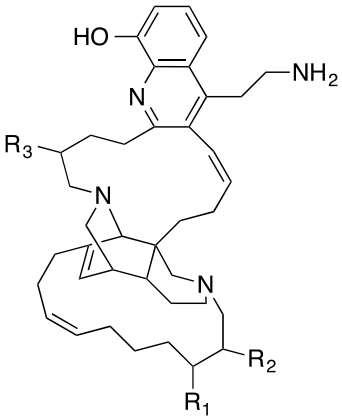
Le genre *Haliclona* est connu pour sa richesse en alcaloïdes. On compte à ce jour 83 alcaloïdes isolés du genre *Haliclona* (Frincke J.M. et Faulkner D.J., 1982 ; Cimino G. *et al*., 1986 ; Sakai R. *et al*., 1986, 1987 ; Baker B.J. *et al*., 1988 ; Fahy E. *et al*., 1988 ; Cimino G. *et al*., 1989a,b ; Fusetani N. *et al*., 1989a,b ; Cimino G. *et al*., 1990, 1991 ; Jaspars M. *et al*., 1994 ; Venkateswarlu Y. *et al*., 1994 ; Kobayashi M. *et al*., 1995 ; Charan R.D. *et al*., 1996 ; Guo Y. *et al*., 1996a,b ; Kobayashi J. *et al*., 1997 ; Sepcic K. *et al*., 1997 ; Clark R.J. *et al*., 1998 ; Guo Y. *et al*., 1998a,b ; Koren-Goldshlager G. *et al*., 1998 ; Parameswaran P.S. *et al*., 1998 ; Kashman Y. *et al*., 1999 ; Torres Y.R. *et al*., 2000 ; El Sayed K.A. *et al*., 2001 ; Heinrich M.R. *et al*., 2001 ; Saito N. *et al*., 2001 ; Volk C.A. et Kock M., 2003 ; Volk C.A. *et al*., 2004 ; Teruya T. *et al*., 2006 ; Reyes F. *et al*., 2007 ; Timm C. *et al*., 2008 ; Arai M. *et al*., 2009 ; Casapullo A. *et al*., 2009 ; Jang K.H. *et al*., 2009 ; Limna Mol V.P. *et al*., 2009 ; Schmidt G. *et al*., 2009 ; Mudianta I.W. *et al*., 2010 ; Sorek H. *et al*., 2010 ; Schmidt G. *et al*., 2011 ; Cychon C. *et al*., 2012 ; Hwang B.S. *et al*., 2012 ; Schmidt G. *et al*., 2012 ; Damodaran V. *et al*., 2013 ; Molinski T.F. *et al*., 2013). Bon nombre d'entre eux sont des alkylpyridines ou alkylpypéridines présentant des systèmes polycycliques complexes. Leur présence répétée dans les éponges de l'ordre des Haplosclerida, font d'eux des marqueurs chimiotaxonomiques potentiels de cet ordre (Andersen, R.J. *et al*., 1996). A titre d'exemple, les **njaoamines A-F** (**H1-H6**) isolées d'une éponge du genre *Reniera* de Tanzanie(Reyes F. *et al*., 2007) sont des alcaloïdes constitués d'un système polycyclique azoté et de deux ponts carbonés. L'un d'entre eux étant impliqué dans la formation d'un squelette 8-hydroxyquinoline, élément structurel particulier sans précédent. Ces 6 molécules se sont montrées fortement cytotoxiques envers les lignées cellulaires cancéreuses H-T29 (colon), A-549 (poumon) et MDA-MB-231 (sein).

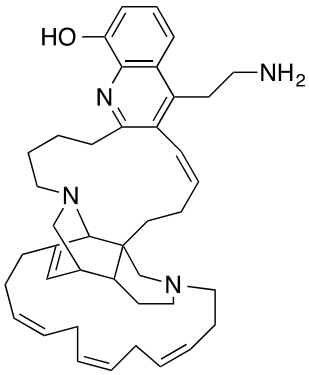
Un autre exemple est celui des **manzamines A-C** (**H7-H9**), trois β-carbolines (amines aromatiques tricycliques) isolées d'une éponge du genre *Haliclona* collectée au Japon (Sakai R. *et al*., 1986, 1987). Dans le cas des manzamines A et B, le système aromatique tricyclique est relié à un complexe pentacyclique sans précédent dans la nature ; dans le cas de la manzamine C, le système aromatique tricyclique est lié à un macrocycle à 11 éléments également sans précédent dans la nature. Très courants dans les plantes terrestres (Allen J.R.F. et Holmstedt B.R., 1980), les alcaloïdes de type β-carboline sont également bien représentés dans le milieu marin. Leur présence a en effet été mentionnée dans d'autres organismes marins tels que les éponges des genres *Amphimedon* (Tsuda M. *et al*., 1996), *Ircinia* (Kondo K. *et al*., 1992) et *Xestospongia* (Ichiba T., 1988 ; Kobayashi M. *et al*., 1995 ;

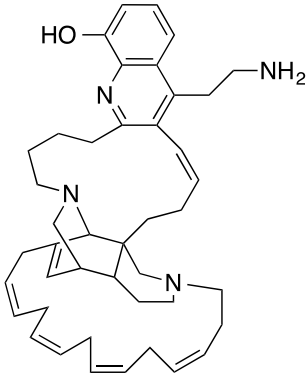
Edrada R.A. *et al*., 1996), le dinoflagellé *Noctiluca miliaris* (Inoue, S. *et al*., 1980) ou encore deux ascidies du genre *Eudistoma* (Kobayashi J. *et al*., 1984 ; Rinehart K.L.J.R. *et al*., 1984 ; Kobayashi J. *et al*., 1986). Sakai R. *et al*. (1986, 1987) ont par ailleurs, mis en évidence l'activité cytotoxique des manzamines A-C envers la lignée cellulaire cancéreuse P388 (Leucémie).

Les sels de 3-alkylpyridinium sont également un groupe d'alcaloïdes caractéristiques des éponges du genre *Haliclona* et plus largement de l'ordre des Haplosclerida. Ces alcaloïdes sont connus pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et cytotoxiques (Oku, N. *et al*., 2004 ; De Oliveira J.H.H.L. *et al*., 2006 ; Timm C. *et al*., 2008). Il s'agit de composés contenant un ou plusieurs cycles pyridiniques substitués en 3 par des chaînes linéaires de longueur variable, saturées ou insaturées, ramifiées ou non. Ces composés peuvent être monomères ou polymères, linéaires ou cycliques. Les **déhydrohaliclocyclines C et F** (**H10 - H11**) par exemple ont été isolés d'une éponge du genre *Haliclona* de Nouvelle Zélande (Damodaran V. *et al*., 2013). Ces sels de 3-alkylpyridinium monomères et cycliques présentent la particularité d'avoir une chaîne carbonée insaturée. Testés pour leur activité antibactérienne sur *Enterococcus faecalis* (bactérie Gram-positive) et antifongique sur *Candida albicans*, aucune inhibition de croissance significative n'a été relevée.

D'autres hétérocycles tétra-, penta-, et hexacycliques contenant deux atomes d'azote ont été caractérisés dans plusieurs éponges de l'ordre des Haplosclerida et plus particulièrement du genre *Haliclona*. Les **haliclamines A-B** (**H12-H13**) (Fusetani N. *et al*., 1989b), l'**halicyclamine A** (**H14**) (Jaspars M. *et al*., 1994) ou encore les **haliclonacyclamines A-B** (**H15-H16**) (Charan R.D. *et al*., 1996) sont autant d'exemples de diamines formées à partir de deux pipéridines.



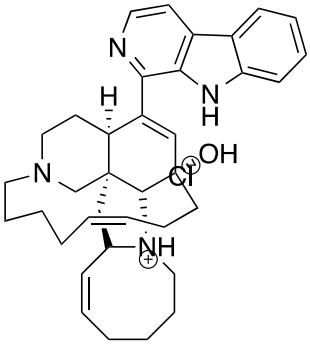




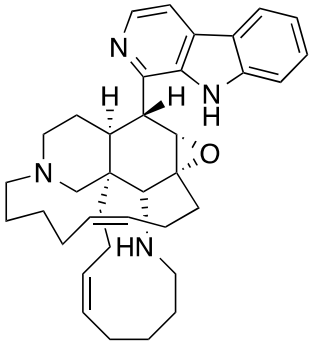
njaoamine A (**H1**) R_1 = OH, R_2 = Me, R_3 = H
njaoamine B (**H2**) R_1 = OH, R_2 = Me, R_3 = H
njaoamine C (**H3**) R_1 = OH, R_2 = Me, R_3 = H
njaoamine D (**H4**) R_1 = OH, R_2 = Me, R_3 = H

njaoamine E (**H5**)

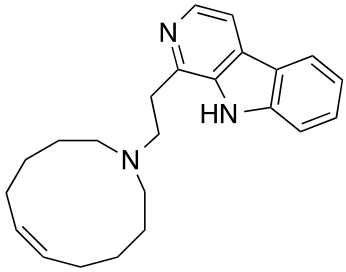
njaoamine F (**H6**)



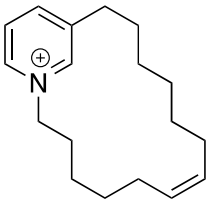
manzamine A (**H7**)



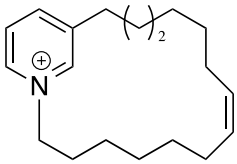
manzamine B (**H8**)



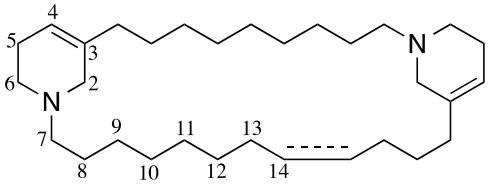
manzamine C (**H9**)



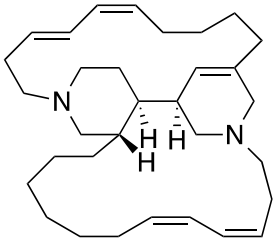
déhydrohaliclocycline C (**H10**)



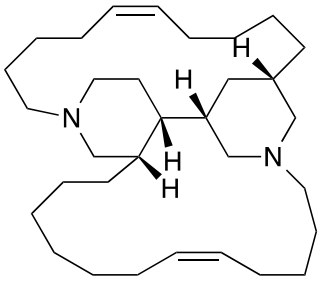
déhydrohaliclocycline F (**H11**)



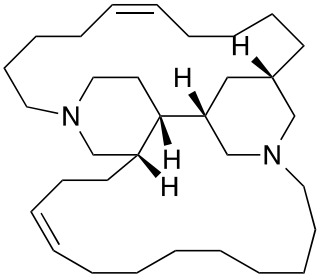
haliclamine A (**H12**) /
haliclamine B (**H13**) Δ14



halicyclamine A (**H14**)



haliclonacyclamine A (**H15**)



haliclonacyclamine B (**H16**)

V.1.4.2 Les polyacétylènes

Dans le milieu marin, les éponges constituent la principale source de polyacétylènes. Il s'agit de molécules contenant une ou plusieurs triples liaisons et se différenciant par la longueur de leur chaîne carbonée, par la présence de substituants (halogènes, hydroxyle, céto) ainsi que par la présence de double liaisons *cis*/*trans* conjuguées ou non. Les polyacétylènes

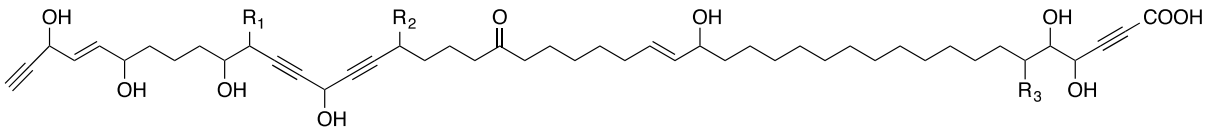
sont présents plus spécifiquement dans les genres *Petrosia*, *Xestospongia*, *Cribochalina*, *Spinochalina*, *Haliclona* et *Callyspongia*. Concernant le genre *Haliclona*, 8 publications sont consacrées à l'isolement et l'identification de polyacétylènes (Cimino G. et De Stefano S., 1977 ; Ortega M.J. *et al*., 1996 ; Williams D.H. et Faulkner D.J., 1996 ; Shin J. *et al*., 1998 ; Chill L., *et al*., 2000 ; Aoki S. *et al*., 2002 ; De Jesus R.P. et Faulkner D.J., 2003 ; Nuzzo G. *et al*., 2012). A titre d'exemple, citons les **fulvynes A-I** (**H17-H25**) isolées d'*Haliclona fulva* collectée dans le Golf de Naples (Nuzzo G. *et al*., 2012). Ces polyacétylènes hautement fonctionnalisés sont caractérisés par une longue chaîne alkyle linéaire portant une fonction acétylénique terminale, une fonction acide propargylique, un alcool diacétylénique, plusieurs groupes hydroxyle et une fonction cétone. La configuration des carbones asymétriques des fulvynes demeure indéterminée en raison de la très grande réactivité de ces molécules. Toutes les fulvynes ont montré par ailleurs une activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (souche bactérienne résistante au chloramphénicol).

De l'éponge *Haliclona lunisimilis* de Point Loma en Californie, a été isolée une série de 6 **polyactéylènes chlorés** se caractérisant par un chlore terminal et deux triples liaisons (De Jesus R.P. et Faulkner D.J., 2003) :

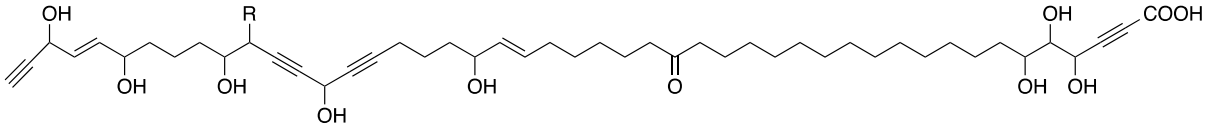
- (1*Z*,3*E*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-15-ol (**H26**),
- (1*Z*,3*Z*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-15-ol,
- (1*E*,3*E*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-15-ol,
- (1*Z*,3*E*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-14-ol,
- (1*Z*,3*Z*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-14-ol,
- (1*Z*,3*E*)-1-chlorohexadéca-1,3-diène-5,7-diyn -14-ol.

Ces polyacétylènes ont été retrouvés dans le nudibranche doridien *Diaulula sandiegensis*, prédateur de l'éponge *Haliclona lunisimilis*. Dès lors, il a été supposé que les polyacétylènes chlorés produits par l'éponge se concentrent dans le nudibranche qui les assimile puis les utilise à son profit comme moyen de défense contre ses propres prédateurs.

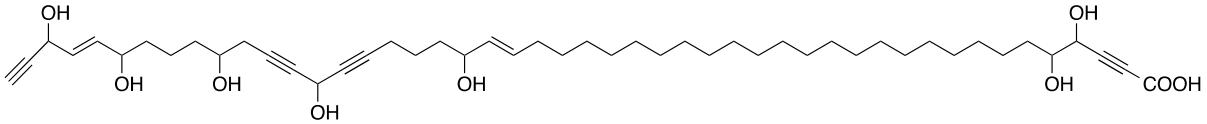
D'une éponge du genre *Haliclona* d'Indonésie ont été isolés 3 polyacétylènes, les **lembéhynes A-C** (**H27-H29**) se caractérisant par un groupement terminal 1-yn-3-ol (Aoki S. *et al*., 2002). Ces trois composés ont montré une activité neuritogénique *in vitro* sur les cellules de neuroblastome murin, Neuro 2A. A partir de ces 3 polyacétylènes et de quelques analogues synthétisés, une étude structure-activité a été menée. Il a été montré que l'activité neuritogénique était influencée par la longueur de la chaîne carbonée et était indépendante des insaturations de cette chaîne. La configuration du carbone C-3 portant la fonction alcool est également un facteur influençant l'activité biologique : une configuration 3*R* confère une activité plus importante qu'une configuration 3*S*.



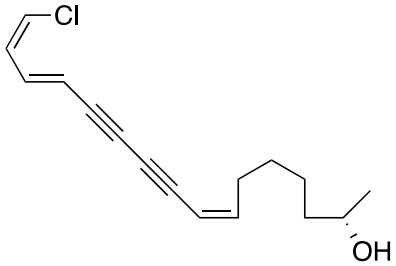
fulvyne A (**H17**) R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH
fulvyne C (**H19**) R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
fulvyne E (**H21**) R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
fulvyne F (**H22**) R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H
fulvyne G (**H23**) R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H
fulvyne I (**H25**) R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H



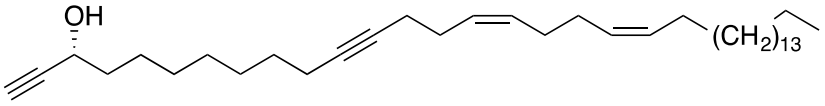
fulvyne B (**H18**) R=OH
fulvyne D (**H20**) R=H



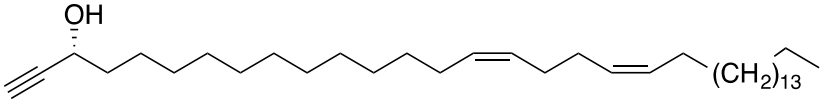
fulvyne H (**H24**)



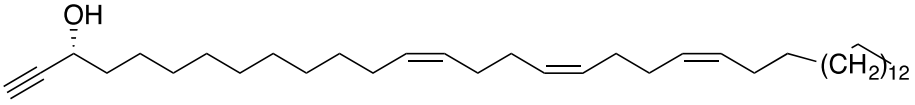
(1*Z*,3*E*,9*Z*)-1-chlorohexadéca-1,3,9-triène-5,7-diyn-15-ol (**H26**)



lembéhyne A (**H27**)



lembéhyne B (**H28**)



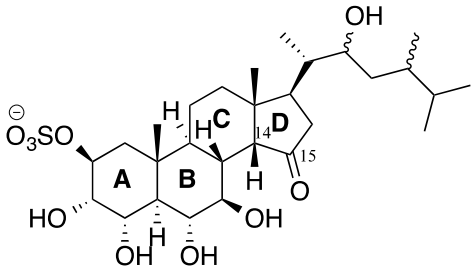
lembéhyne C (**H29**)

V.1.4.3 Les stéroïdes

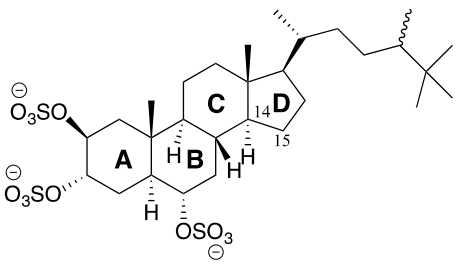
A ce jour, 11 publications sont consacrées aux stérols et stéroïdes des éponges du genre *Haliclona (Reniera)* (Ballantine J.A. *et al*., 1977 ; Zielinski J. *et al*., 1982 ; Findlay J.A. et Patil A.D., 1985 ; Seldes A.M. *et al*., 1985 ; Sperry S et Crews P. 1997 ; Elenkov I *et al*., 1999 ; Fu X. *et al*., 1999 ; Gallimore W.A. *et al*., 2001 ; Yu S. *et al*., 2006 ; Cheng Z.B. *et al*., 2013 ; Viegelmann C *et al*., 2014). Ces travaux ont bien souvent conduit à la découverte de stérols ou stéroïdes de structure originale. Citons par exemple les deux stérols sulfatés : le dérivé sulfaté de l'**haliclostanone** (**H30**) et le dérivé sulfaté de l'**halistanol** (**H31**) isolés d'une éponge du genre *Haliclona* d'Indonésie (Sperry S. et Crews P., 1997). Outre la présence de la fonction sulfate portée par le carbone C-2, l'haliclostanone sulfate se distingue également par la présence d'une jonction C/D *cis*, d'un proton H-14β et d'une fonction cétone en C-15. Peu de stérols d'origine naturelle présentent ces caractéristiques. A titre d'exemple, peuvent être mentionnés le contignastérol isolé de *Petrosia contignata* (Burgoyne D.L. *et al*., 1992) ou encore les xestobergstérols A, B et C isolés de *Xestospongia bergquistia* (Shoji N., *et al*., 1992).

L'étude chimique de l'éponge *Haliclona oculata* collectée à proximité de l'île d'Haina (Chine) a conduit à l'isolement de 6 stérols non conventionnels en raison de leurs systèmes tétracycliques modifiés : des A-norstérols (**H32-H37**) résultant de la régression du cycle A en méthylcyclopentane (Yu S. *et al*., 2006).

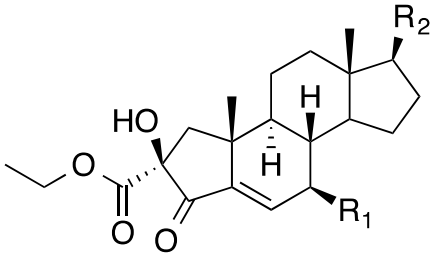
Enfin, les **halicrastérols A-D** (**H38-H41**), sont 4 stérols polyhydroxylés isolés de l'éponge *Haliclona crassilobata*, éponge commune du Sud de la Mer de Chine (Cheng Z.-B. *et al*., 2013). Les halicrastérols A et B sont de rares exemples de stéroïdes présentant une double liaison entre les carbones C17 et C20. La plupart des stéroïdes polyhydroxylés présentant des activités biologiques, les halicrastérols ont en conséquence été testés pour leurs activités antibactérienne et antifongique. Seul l'halicrastérol D a montré une activité modérée sur des souches bactériennes à Gram positif.



Dérivé sulfaté de l'haliclostanone sulfate (**H30**)



Dérivé sulfaté de l'halistanol (**H31**)



2-éthoxycarbonyl-2*β*-hydroxy-A-nor-ergosta-5,24(28)-dién-4-one (**H32**) R_1 = H R_2 =

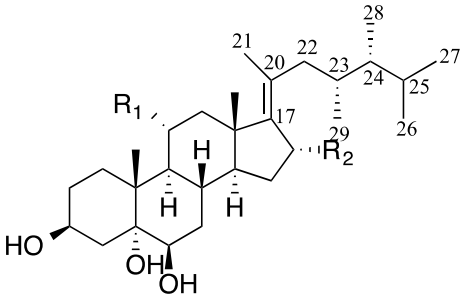
2-éthoxycarbonyl-24-éthyl-2*β*-hydroxy-A-nor-cholesta-5-én-4-one (**H33**) R_1 = H R_2 =

2-éthoxycarbonyl-2*β*,7*β*-dihydroxy-A-nor-ergosta-5,24(28)-dién-4-one (**H34**) R_1 = OH R_2 =

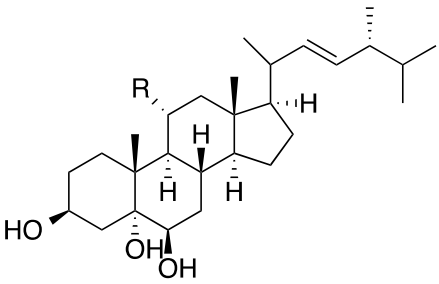
2-éthoxycarbonyl-2*β*,7*β*-dihydroxy-A-nor-cholesta-5-én-4-one (**H35**) R_1 = OH R_2 =

2-éthoxycarbonyl-2*β*,7*β*-dihydroxy-24-méthyl-A-nor-cholesta-5,22(*E*)-dién-4-one (**H36**) R_1 = OH R_2 =

2-éthoxycarbonyl-2*β*,7*β*-dihydroxy-A-norcholesta-5,22(*E*)-dién-4-one (**H37**) R_1 = OH R_2 =



halicrastérol A (**H38**) R_1 = OH, R_2 = H
halicrastérol B (**H39**) R_1 = OAc, R_2 = OH



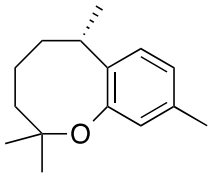
halicrastérol C (**H40**) R = OH
halicrastérol D (**H41**) R = OAc

V.1.4.4 Autres métabolites

Outre les alcaloïdes, les polyacétylènes, les stéroïdes, on retrouve chez les éponges du genre *Haliclona* (*Reniera*), divers autres métabolites secondaires :

❖ ***Les sesquiterpènes***

Parmi les 9 sesquiterpènes isolés du genre *Haliclona* (*Reniera*), 8 sont des hydroquinones sesquiterpéniques isolés de l'éponge *Reniera Mucosa* collectée dans le Sud de l'Espagne (Zubia E. *et al*., 1994), le neuvième est l'**hélianane** (**H42**) un sesquiterpène hétérocyclique isolé de l'éponge *Haliclona fascigera* d'Indo-Pacifique (Harrison B. et Crews P., 1997). Ce métabolite secondaire se caractérise par l'association d'un cycle benzénique et d'un éther cyclique à 8 membres.



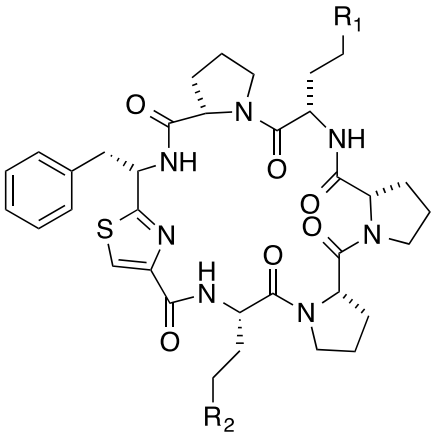
hélianane (**H42**)

❖ ***Les cyclopeptides et depsipeptides***

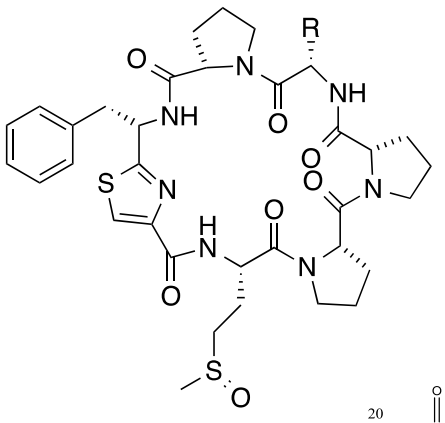
Sept cyclopeptides et deux depsipeptides ont été à ce jour isolés des éponges du genre *Haliclona* (*Reniera*) (Rashid M.A. *et al*., 2000 ; Guan L.L. *et al*., 2001 ; Randazzo A. *et al*., 2001 ; Ciasullo L. *et al*., 2002 ; Monica C.D. *et al*., 2002 ; Sera Y. *et al*., 2002, 2003).

Parmi les cyclopeptides, citons les **haligramides A** et **B** (**H43** et **H44**), deux hexacyclopeptides cytotoxiques soufrés isolés de l'éponge *Haliclona nigra* (Rachid M.A. *et al*., 2000) ; ou encore **le waiakéamide** (**H45**) et son **dérivé sulfoné** (**H46**) isolés d'une éponge du genre *Haliclona* des îles Palaos (Océanie, Océan pacifique). Ces deux hexacyclopeptides montrent une activité répulsive sur la moule bleue, *Mytilus edulis galloprovincialis*, autrement dit une activité antifouling (Sera Y. *et al*., 2003).

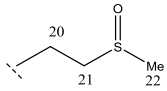
Parmi les dépsipeptides, les **halipeptines A** et **B** (**H47-H48**) sont deux composés cycliques isolés d'une éponge du genre *Haliclona* collectée au large de l'île de Vanuatu (Pacifique) (Randazzo A. *et al*., 2001). L'halipeptine A a été testée pour ses activités cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses SK-OV3 (ovaire) et L1210 (leucémie murine), antifongique et antivirale. Aucun résultat significatif n'a été retenu. Ce composé en revanche a montré *in vivo* une activité anti-inflammatoire très intéressante, 40 à 130 fois plus importante que celle des médicaments anti-inflammatoires classiques : indométhacine ou naproxen (tout du moins dans les conditions opératoires mises en œuvre).



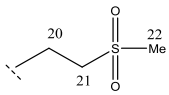
haligramide A (**H43**) $R_1 = R_2 =$ S-Me
haligramide B (**H44**) $R_1 =$ S-Me, $R_2 =$ SO-Me

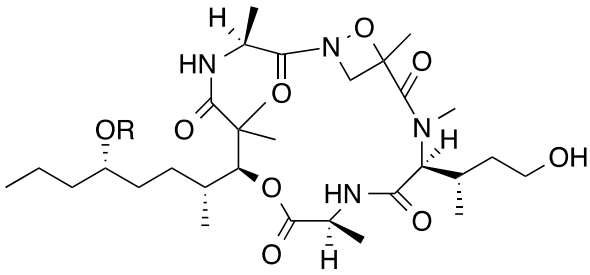


waiakéamide (**H45**) R =



Dérivé sulfoné du waiakéamide (**H46**) R =



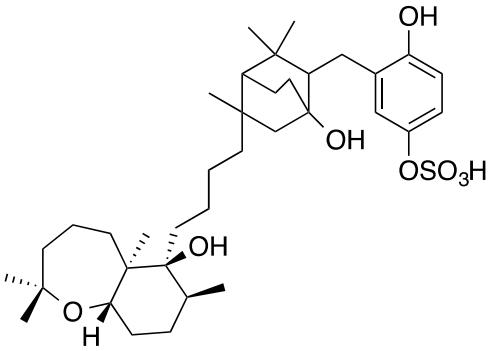


halipeptine A (**H47**) R = Me
halipeptine B (**H48**) R = H

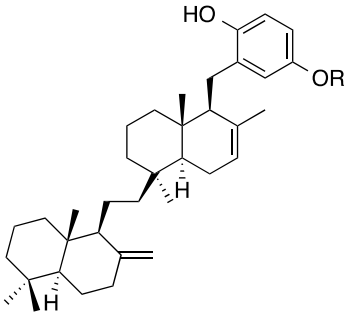
❖ ***Les hydroquinones***

Les hydroquinones sont une autre classe de métabolites secondaires retrouvée dans le genre *Haliclona* (*Reniera*). On compte à ce jour 6 dérivés hydroquinoniques isolés d'éponges du genre *Haliclona* (*Reniera*) (Mcintyre D.E. *et al*., 1979 ; Zubia E. *et al*. 1994 ; Bokesch H.R. *et al*., 2002 ; West L.M. et Faulkner D.J., 2006). A titre d'exemple, le dérivé hydroquinonique pentacyclique sulfaté **phuklona** (**H49**), a été isolé d'une espèce collectée près de l'île de Phuket en Thaïlande (Bokesch H.R. *et al*., 2002). Ce composé est constitué d'un squelette carboné triterpénique relié à un noyau hydroquinonique sulfaté. Le composé **H49** a montré une faible activité cytoprotectrice contre le Virus de l'Immunodéfiscience Humaine (VIH).

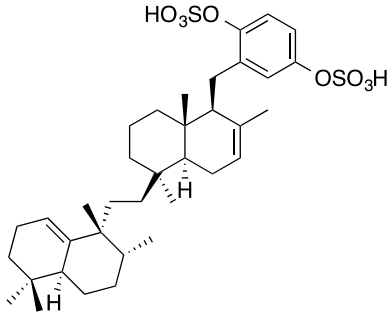
L'**adociaquinol** (**H50**), l'**adociasulfate 11** (**H51**) et l'**adociasulfate 12** (**H52**) sont trois autres dérivés triterpéniques reliés à un noyau hydroquinonique (West L.M. et Faulkner D.J., 2006). Ces composés hexacycliques ont été isolés d'une espèce des îles Palaos (Océanie, Océan pacifique). Ils n'ont montré aucune activité cytotoxique contre la lignée cellulaire HCT-116 (colon).



dérivé sulfaté du phuklona (**H49**)



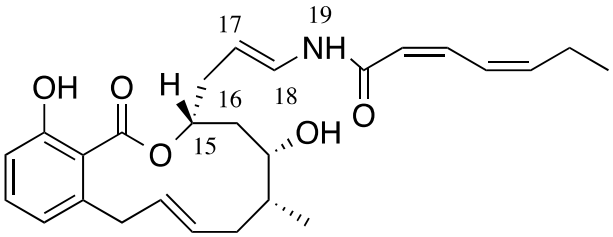
adociaquinol (**H50**) R = H
adociasulfate 11 (**H51**) R = SO_3H



adociasulfate 12 (**H52**)

❖ ***Les macrolides***

Les macrolides isolés du genre *Haliclona* sont extrêmement rares. Seuls les **salicylihalamides A** et **B** (**H53** et **H54**), deux agents antitumoraux potentiels, isolés d'une *Haliclona* du Sud-Ouest de l'Australie ont été mentionnés dans la littérature (Erickson K.L. *et al*., 1997).



salicylihalamides A (**H53**)
salicylihalamides B (**H54**) (17Z)

V.2 Etude chimique de l'éponge *Haliclona fascigera* de Mayotte

L'étude chimique de l'éponge *Haliclona fascigera* collectée à Mayotte a conduit à l'isolement de l'**acide gras majoritaire de structure nouvelle** (**HF1**).

V.2.1 Fractionnement et isolement du métabolite HF1

Le schéma de fractionnement du composé majoritaire de l'éponge *Haliclona fascigera* décrit ci-après, est illustré dans la figure 27.

L'extrait brut d'*Haliclona fascigera* (440 mg) a été fractionné sur colonne ouverte en phase inverse (RP-18). L'élution a été effectuée au moyen de deux gradients ; un gradient eau/méthanol suivi d'un gradient méthanol/dichlorométhane. Neuf fractions ont été récupérées.

La présence du composé **HF1** (*m/z* 348,2821) a été détectée dans les fractions F6, F7 et F8 grâce à une analyse par CLHP-DEDL-PAD-SM des 9 fractions obtenues.

Les fractions F6, F7 et F8 ont donc été rassemblées (F678) et soumises à un autre fractionnement par CLHP semi-préparative en phase inverse sur une colonne de type C-18 et couplée à un détecteur (UV 201 nm). L'élution a été réalisée au moyen d'un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

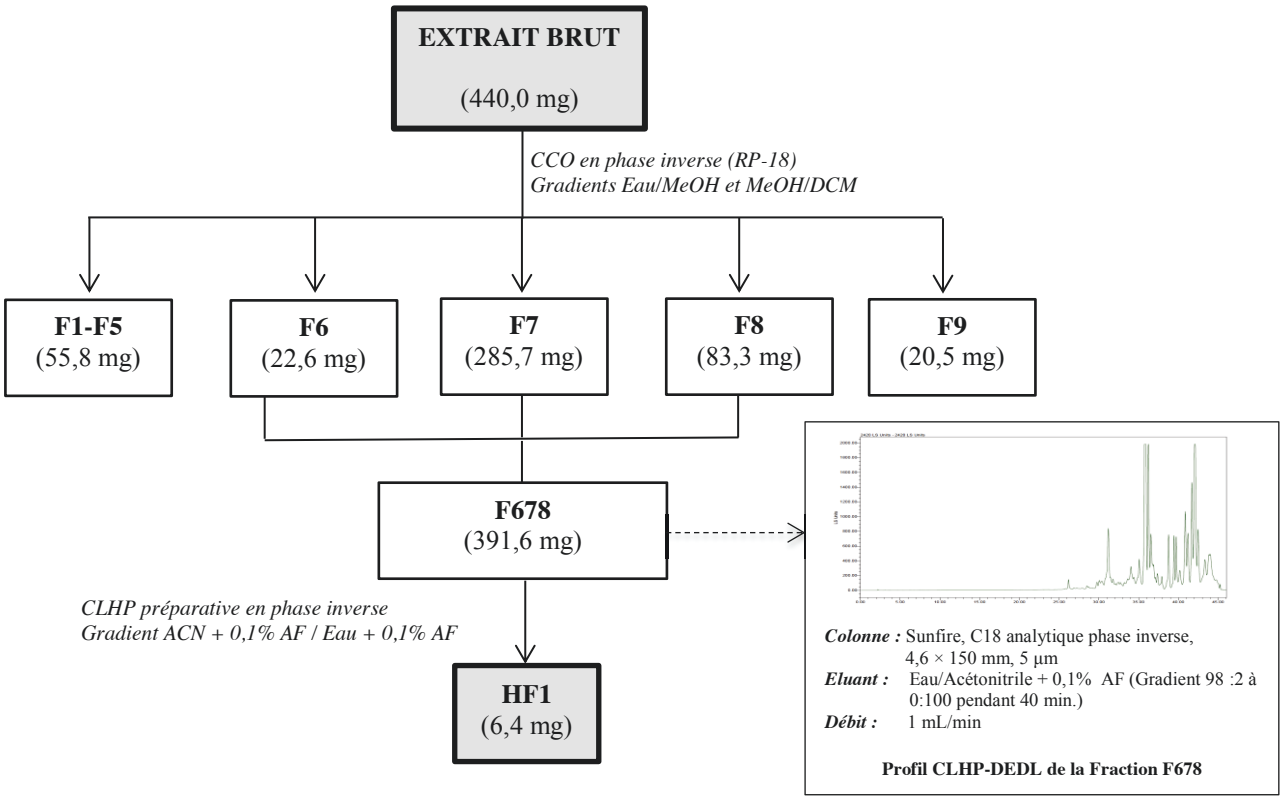


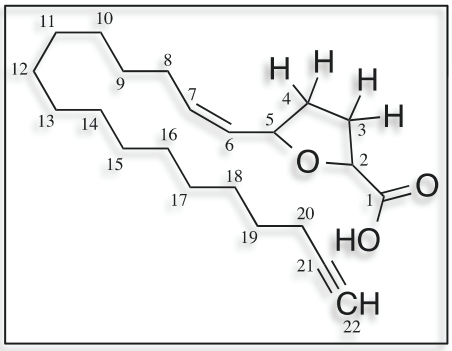
Figure 27 : *Fractionnement d'Haliclona fascigera pour l'obtention du métabolite **HF1***.

V.2.2 Elucidation structurale du métabolite HF1

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **HF1** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- l'infrarouge (IR),
- la masse haute résolution (HRMS) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif (ESI^+)
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135), bidimensionnelle homonucléaire (COSY ^1H-^1H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, IR, RMN ^1H et ^{13}C du composé **HF1** sont consignés dans l'annexe II.1.



Composé nouveau

acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (**HF1**)

D'aspect huileux et de couleur verdâtre, le composé **HF1** ($[\alpha]^{25}_{D}$ = - 10,5 (*c* 0,5 mg/100mL DCM) présente un spectre HMRS en mode ESI$^-$ avec un ion moléculaire à *m/z* 348,2821 en accord avec la formule brute $C_{22}H_{36}O_3$, (valeur calculée 348,5203). Le nombre d'insaturation calculé à partir de la formule brute du composé est de cinq.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C (Tableau XIV, Figure 28) couplée à l'IR met en évidence la présence de :

- 15 méthylènes (δ_C 18,80 ; 27,99 ; 28,12 ; 28,71 ; 28,97 ; 29,33-29-89 ; 30,45 ; 33,04 ppm pour C-20, C-19, C-8 ; C-9 ; C-18 ; C-10-C17 ; C-3 et C-4 respectivement) dont deux portant des protons non équivalents H-3 (δ_H 2,10) / H-3' (δ_H 2,43) et H-4 (δ_H 1,69) / H-4' (δ_H 2,10).
- 2 méthines proches d'un hétéroatome (δ_C 76,40, 77,56 ppm pour C-2 et C-5 respectivement),
- 2 carbones d'une double liaison disubstitués (δ_C 128,79 ; 134,50 ppm pour C-6 et C-7 respectivement),
- 2 carbones d'une triple liaison terminale (δ_C 68,28 ; 85,65 ppm pour C-22 et C-21 respectivement), IR à 2100 cm^{-1}
- 1 carbone d'une fonction acide carboxylique (δ_C 174,12).

Cette première approche met en évidence 4 insaturations (1 liaison éthylénique, 1 liaison acétylénique et 1 fonction carbonyle). L'insaturation restante est attribuée à la présence d'un cycle.

Les corrélations hétéronucléaires longue distance permettent de mettre en évidence la présence d'un oxacyclobutane. Il s'agit :

- des corrélations HMBC entre H-3/H-3' (δ_H 2,10 et 2,43) et C-2 (δ_C 76,40), entre H-3/H-3' (δ_H 2,10 et 2,43) et C-4 (δ_C 33,04), entre H-4/H-4' (δ_H 1,69 et 2,10) et C-3 (δ_C 30,45), entre H-4/H-4' (δ_H 1,69 et 2,10) et C-5 (δ_C 77,56) ;
- des corrélations COSY entre H-3/H-3' (δ_H 2,10 et 2,43) et H-4/H-4' (δ_H 1,69 et 2,10).

Les corrélations hétéronucléaires longue distance HMBC et COSY montrent clairement que le tétrahydrofurane est substitué sur les positions C-2 et C-5 :

- Les corrélations HMBC entre C-1 (δ_C 174,12) et H-2 (δ_H 4,55) indiquent que C-2 porte une fonction acide carboxylique.
- Les corrélations HMBC entre H-5 (δ_H 4,88) et C-6 (δ_C 128,79) et entre H-7 (δ_H 5,55) et C-6 (δ_C 128,79), ainsi que les corrélations COSY entre H-5 (δ_H 4,88) et H-6 (δ_H 5,40) et entre H-7 (δ_H 5,55) et H-6 (δ_H 5,40) indiquent que C-5 est relié aux carbones éthyléniques C-6 et C-7. La constante de couplage J entre H-6 et H-7 (J=10,8Hz) a permis d'attribuer la géométrie *cis* à la double liaison.

Les expériences COSY et HMBC ont en outre conduit à l'enchaînement de carbones C-18 à C-22. Sur le spectre COSY on observe les corrélations entre H-18 (δ_H 1,35) et H-19 (δ_H 1,50), entre H-19 (δ_H 1,50) et H-20 (δ_H 2,15) et entre H-20 (δ_H 2,15) et H-22 (δ_H 1,90). Sur le spectre HMBC, les corrélations entre H-18 (δ_H 1,35) et C-19 (δ_C 27,99), entre H-20 (δ_H 2,15) et C-19 (δ_C 27,99) ainsi qu'entre H-19 (δ_H 1,50) et C-20 (δ_C 18,80) et entre H-22 (δ_H 1,90) et C-20 (δ_C 18,80), suggèrent bien l'enchaînement indiqué sur la figure 28.

L'enchaînement linéaire des 10 groupements CH_2 restants a été relié d'une part au carbone éthylénique C-7 et d'autre part au méthylène C-18 grâce aux corrélations COSY entre H-8 (δ_H 2,10) et H-7 (δ_H 5,55) d'une part et entre H-18 (δ_H 1,35) et H10-17 (δ_H 1,24) d'autre part.

Enfin, la détermination des configurations relatives et absolues des carbones C-2 et C-5 est en cours. L'étude configurationnelle actuellement menée repose sur la comparaison des spectres RMN expérimentaux et théoriques (théorie de la fonctionnelle et de la densité).

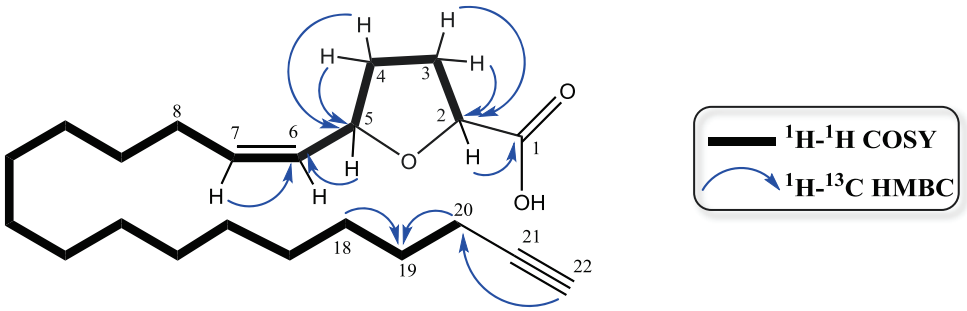


Figure 28 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **HF1**.*

Tableau XIV : *Données de la RMN 1D et 2D pour **HF1** enregistrées dans $CDCl_3$ à 500 MHz.*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	δ_C	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	-	174,12	-	-
2	4,55 (t, *7,4*)	76,40	3, 3'	1, 3
3	2,10 (m) ; 2,43 (m)	30,45	4, 4', 2	1, 2, 4
4	1,69 (m) ; 2,10 (m)	33,04	3, 3', 5	3, 5, 6, 7
5	4,88 (q, *5,2* ; *8,4*)	77,56	4, 4', 6	4, 6
6	5,40 (t, *10,4*)	128,79	5, 7	7, 8
7	5,55 (q, *7,3* ; *10,6*)	134,50	8, 6	5, 6, 9
8	2,10 (m)	28,12	7, 9	6, 7
9	1,35 (m)	28,71	8, 10-17	7, 10-17
10-17	1,24 (m)	29,33-29,89	9, 18	9, 10-17, 18
18	1,35 (m)	28,97	10-17, 19	10-17
19	1,50 (m)	27,99	18, 20	18, 20, 21
20	2,15 (m)	18,80	19, 22	18, 21, 22
21	-	85,65	-	-
22	1,90 (t, *2,6*)	68,28	20	-

V.3 Evaluation de l'activité biologique du métabolite isolé

Le composé **HF1** a été testé pour ses activités antipaludique et antifouling.

- **L'activité antipaludique** a été évaluée à travers l'action antiproliférative de **HF1**, sur le parasite *Plasmodium falciparum*.
- **L'activité antifouling** a été évaluée à travers l'activité inhibitrice de la croissance/adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine.

V.3.1. L'activité antipaludique

❖ ***Principe du test***

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

L'activité antipaludique du composé majoritaire **HF1** de l'éponge *Haliclona fascigera* a été évaluée *in vitro* à travers l'activité anti-proliférative sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7).

❖ ***Résultats du test***

Avec une CI_{50} de 29,76 ± 5,92 µg/mL (Tableau XV), **HF1** ne présente pas d'activité antiplasmodium intéressante.

Tableau XV : *Activité antiplasmodium du métabolite HF1 isolé d'Haliclona fascigera.*

Métabolites	CI_{50} (µg/mL)
HF1	29,76 ± 5,92

V.3.2. L'activité antifouling : activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine

❖ ***Principe du test***

Les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sous la direction du Professeur Claire Hellio au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France.

Comme évoqué au chapitre III (§ III.3.2.2) pour les métabolites **PK1** et **PK2**, il a été choisi d'évaluer l'activité antifouling du métabolite **HF1** isolé d'*Haliclona fascigera* à travers son activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion sur 5 souches de bactéries marines provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Roseobacter litoralis, Shewanella putrefaciens, Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus*.

❖ ***Résultats des tests***

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau XVI. Le métabolite **HF1** n'a montré aucune activité d'inhibition de la croissance et de l'adhésion des souches bactériennes sélectionnées. Il ne présente donc aucun potentiel d'activité antifouling.

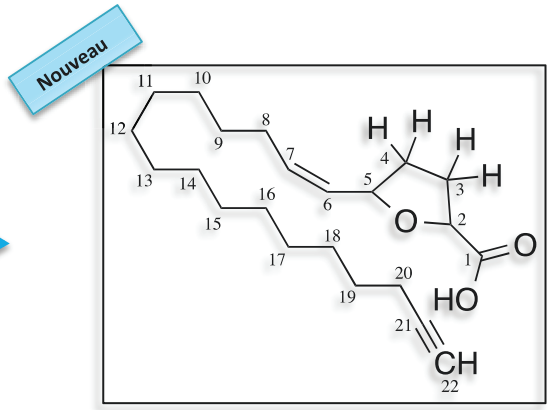
Tableau XVI: *Activité antibactérienne de **HF1** isolé d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus.*

Souches	**HF1**			
	Inhibition de la croissance CMI (µg/mL)	**Inhibition de l'adhésion** CMI (µg/mL)	**Activation de la croissance** CE (µg/mL)	**Activation de l'adhésion** CE (µg/mL)
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,1	100
Roseobacter littoralis	-	-	100	-
Vibrio carchariae	-	-	100	10
Vibrio natrigens	-	-	100	1
Vibrio proteolyticus	-	-	0,1	100

V.3.3 Discussion

Choisie pour la simplicité de sa composition chimique, l'éponge *Haliclona fascigera*, collectée dans le récif corallien de Mayotte, est marquée par la présence majoritaire de l'acide gras **HF1**, isolé et identifié pour la première fois. Ce composé n'a montré aucune activité :

- anti-paludique ;
- antifouling (activité antibactérienne).



acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (HF1)

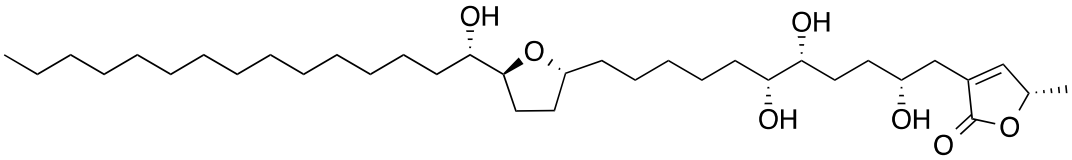
Figure 29 : *Métabolite isolé d'Haliclona fascigera : Bilan structure/activité.*

Composé majoritaire de l'extrait brut d'*Haliclona fascigera*, **HF1** est probablement un constituant membranaire de cette éponge. Sa structure inhabituelle (présence d'un tétrahydrofurane et d'une fonction acétylénique) contribue à élargir le groupe des acides gras de structure originale biosynthétisés par les organismes marins et plus précisément par les éponges. De ces dernières en effet, à côté des acides gras polyinsaturés classiques, incluant ceux des séries n-6 et n-3, de nouveaux acides gras ont été isolés :

- ✓ insaturés de type non malonique (c'est-à-dire avec des doubles liaisons séparées par plus d'un méthylène) ;
- ✓ mono-insaturés et ramifiés ;
- ✓ acétyléniques (halogénés ou non) ;
- ✓ oxygénés avec des fonctions hydroxyle, méthoxyle et acétoxyle additionnelles ;
- ✓ halogénés (chlore, brome).

De tels acides gras inhabituels ne peuvent provenir, pour une large part, que de voies de biosynthèse originales par rapport à celle bien élucidées dans d'autres organismes et microorganismes. Peu d'information est actuellement disponible sur ces acides gras inhabituels, sur leur possible rôle dans les membranes cellulaires, ou encore leur biogénèse (Barnathan G., 2010). Concernant la biogénèse de ces acides gras particuliers, l'une des hypothèses avancées est qu'il pourrait s'agir à l'origine d'acides gras saturés issus du métabolisme primaire de l'organisme et synthétisés par le complexe multifonctionnel acide gras synthase. Ces acides gras saturés sous l'influence d'enzymes seraient ensuite modifiés. Ainsi, les groupes vinylique et acétylénique seraient formés sous l'action des enzymes désaturase et acétylénase ; l'oxydation et la bromination seraient provoquées quant à elles par la bromoperoxydase et le peroxyde d'hydrogène (Jiang *et al*., 2011).

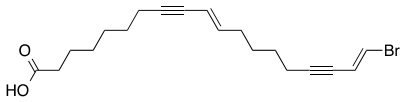
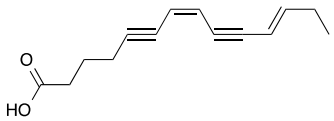
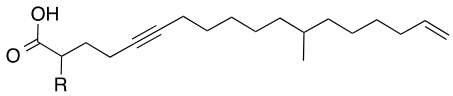
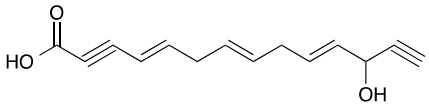
HF1 vient s'ajouter au groupe des acides gras acétyléniques retrouvés dans de nombreuses éponges des genres *Petrosia*, *Xestospongia*, *Oceanapia*, *Steletta* et *Pellina* (Quinn R.J. et Tucker D.J., 1985 ; Hirsch S.C. *et al*., 1987 ; Fu X. *et al*., 1997 ; Pharm N.B. *et al*. , 1999 ; Matsunaga S. *et al*., 2000 ; Lee H.S. *et al*., 2003 ; Zhao Q. *et al*., 2003 ; Dembitsky V.M., 2006) (Tableau XVII). Aucun d'entre eux en revanche, ne présente comme c'est le cas pour **HF1**, un tétrahydrofurane dans sa structure. Ce type de composé a en revanche déjà été isolé de plantes. Citons par exemple la famille des montalicines avec la **montalicine A** (**H55**).



montalicine A (**H55**)

Il est à souligner par ailleurs qu'il n'est pas rare que les acides gras acétyléniques soient dotés d'activités biologiques intéressantes telles que les activités antibactérienne et antifongique (Matsunaga S. *et al*., 2000) ou encore cytotoxique (Lee H.S. *et al*., 2003 ; Zhao Q. *et al*., 2003).

Tableau XVII: *Exemples d'acides gras acétyléniques isolés d'éponges*.

Source	Acide Gras	Référence
Xestospongia testudinaria		Pharm N.B. *et al*., 1999
Oceanapia sp.		Matsunaga S. *et al*., 2000
Steletta sp.	 R=H ;R=OCH_3	Lee H.S. *et al*., 2003
Pellina triangulata		Fu X. *et al*., 1997

CHAPITRE VI

ETUDE DE L'EPONGE
Fascaplysinopsis reticulata (Hentschel, 1912)

VI.1 Eléments bibliographiques

VI.1.1 Localisation de l'espèce *Fascaplysinopsis reticulata* (Hentschel, 1912)

Fascaplysinopsis reticulata est principalement présente dans la zone Océan Indien (Zanzibar, Côte Est de l'Afrique), en Indonésie, en Australie (Grande Barrière de corail) ainsi qu'en Mer Rouge (www.marinespecies.org).

VI.1.2 Position systématique et description de l'espèce *Fascaplysinopsis reticulata* (Hentschel, 1912)

- **Position systématique** (www.marinespecies.org).

Le genre *Fascaplysinopsis* appartient à la famille des Thorectidae (ordre des Dictyoceratida). ***Fascaplysinopsis reticulata* est l'unique espèce du genre *Fascaplysinopsis* répertoriée**.

Royaume :	Animal
Phylum :	Porifera
Classe :	Demospongiae
Sous-Classe :	Keratosa
Ordre :	Dictyoceratida
Famille :	Thorectidae
Sous-Famille :	Thorectinae
Genre :	*Fascaplysinopsis*
Synonymes :	*Aplysinopsis*, (Lendenfeld, 1888)

- **Description morphologique** (Cook S.C., 2007 ; Helmy T. *et al*., 2004)

Fascaplysinopsis reticulata est une éponge de couleur noire, présentant des fibres blanches à sa surface. Le Choanosome, est quant à lui de couleur marron. Massive, irrégulière, cette éponge peut atteindre 15 cm de hauteur. Sa surface est hérissée de conules d'une taille moyenne de 2 mm de hauteur ; elle présente par ailleurs un réseau de fibres superficielles dures et, est recouverte par endroit de sable sédimenté. La texture de l'éponge

est ferme, difficile à compresser et à déchirer. Le squelette de l'éponge présente des fibres primaires épaisses, fasciculées, mêlées de détritus et de coquilles de foraminifères et de gastéropodes. Ces fibres présentes à la surface sont larges, avec un diamètre compris entre 200 et 280 µm. Les fibres secondaires quant à elles ne renferment pas de détritus ou de coquilles ; elles mesurent entre 30 et 145 µm. Fibres primaires et secondaires forment un réseau de fibres solides présent sur toute la surface et reliant les conules entre eux.

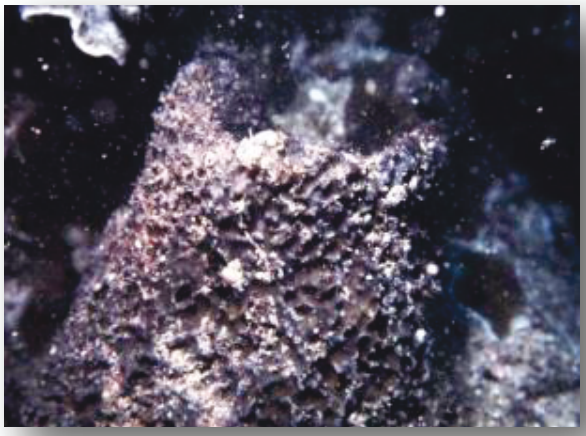


Figure 30: *Photographie in situ de Fascaplysinopsis reticulata (Crédit LCSNSA).*

VI.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Fascaplysinopsis* (Bergquist, 1980)

Les éponges de l'ordre des Dictyoceratida, sont riches en métabolites secondaires bioactifs. Plus de 300 métabolites secondaires ont été isolés d'éponges de cet ordre. Parmi ceux-ci, près de 52 molécules proviennent du genre *Fascaplysinopsis* (Kornprobst J.M., 2005). Ces molécules peuvent être regroupées en 3 grandes familles chimiques : les terpènes, les alcaloïdes et les macrolides.

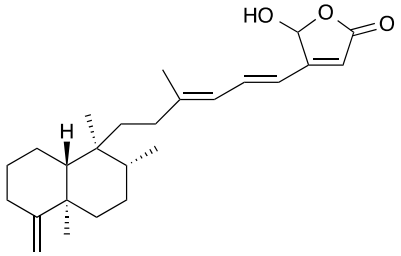
VI.1.3.1 Les terpènes

On compte à ce jour 5 terpènes isolés du genre *Fascaplysinopsis* (Jimenez C. *et al*., 1991a,b ; Schmidt E.W. et Faulkner D.J., 1996a). Ces composés sont tous des sesterterpènes. Toutefois, on distinguera d'une part le **palauolide (F1)** et **palauolol (F2)** constitués tous deux d'un système bicyclique et d'une lactone reliés de part et d'autre d'une chaîne carbonée formée de deux unités isopréniques ; et d'autre part, les **réticulatines A** et **B** et la

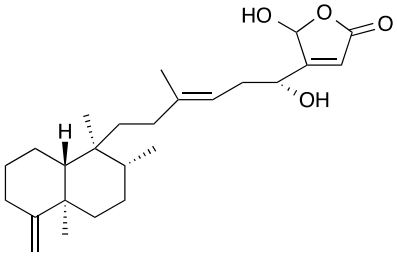
fascaplysine B (**F3-F5**), trois sels dérivés de la β-carboline constitués d'un alcaloïde cationique et d'un sesterterpène anionique.

La littérature fait par ailleurs mention des activités biologiques dont seraient dotés ces sesterterpènes :

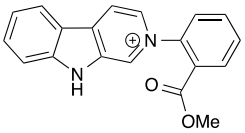
- Le palauolide (**F1**) et le palauolol (**F2**) présentent une activité anti-inflammatoire évaluée à travers leur activité inhibitrice de la phospholipase A2 isolée du venin d'abeille. Les phospholipases A2 (PLA2) ont été identifiées comme des enzymes particulièrement abondantes dans les venins de serpents et d'abeille et le suc pancréatique où elles jouent un rôle digestif évident, doublé d'un rôle toxique dans le premier cas. Concernant la PLA2 de type II, ou PLA2 « sécrétoire » (sPLA2), celle-ci serait produite en réponse à des stimuli inflammatoires. Le Palauolol (**F2**) possède en outre une activité antibactérienne modérée sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.
- Les sesterterpènes-alcaloïdes **F3** et **F5** présentent des activités antivirales et antibactériennes remarquables



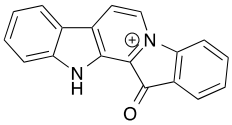
palauolide (**F1**)



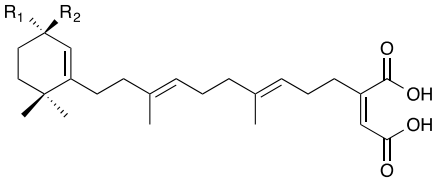
palauolol (**F2**)



cation 1



cation 2



anion 1 $R_1 = R_2 = O$
anion 2 $R_1 = H$, $R_2 = H$

réticulatine A (**F3**) : cation 1 et anion 1
réticulatine B (**F4**) : cation 1 et anion 2
fascaplysine B (**F5**) : cation 2 et anion 1

VI.1.3.2 Les alcaloïdes

Vingt et un alcaloïdes ont été isolés de l'espèce *Fascaplysinopsis reticulata* (Jimenez C. *et al*., 1991a,b ; Segraves N.L. *et al*., 2003, 2004 ; Wang Q. *et al*., 2015).

La plupart de ces alcaloïdes sont des dérivés de la fascaplysine (**F6**), un pentacycle 12*H*-pyrido[1,2-a';3,4-b']diindole. Ces dérivés parfois bromés peuvent être regroupés en trois classes :

- **La classe 1** comprend tous les composés de type pentacyclique. Cette classe se divise elle-même en trois sous-classes en fonction du système conjugué pentacyclique :
  - ***Sous-classe 1a*** est représentée par la fascaplysine (**F6**)
  - ***Sous-classe 1b*** est représentée par l'homofascaplysine A (**F7**)
  - ***Sous-classe 1c*** est représentée par l'homofascaplysine B (**F8**)

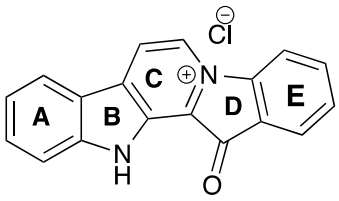
Les classes 2 et 3 regroupent quant à elles, les structures tétracycliques de type β-carboline. Elles se distinguent par le degré d'oxydation de leur cycle C.

- **La classe 2** est représentée par la réticulatine (**F9**)
- **La classe 3** est représentée par la sécofascaplysine A (**F10**)

Selon Segraves N.L. *et al*. (2004), tous ces composés ont une origine biosynthétique commune et seraient issus de l'association de deux **tryptophanes** (**F13**).

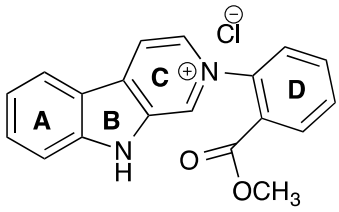
Ils ont par ailleurs suscité beaucoup d'intérêt en raison de leurs multiples bioactivités (Segraves N.L. *et al*., 2003, 2004). La fascaplysine (**F6**) par exemple, présente des activités antibactérienne, antifongique, antivirale, antipaludique et cytotoxique envers différentes lignées cancéreuses.

Récemment, une paire d'alcaloïdes hétérocycliques de type quinoline-imidazole, la **(+) et (-)-spiroréticulatine** (**F11** et **F12**) a été isolée de *Fascaplysinopsis reticultata* (Wang Q. *et al*., 2015). Ces 2 alcaloïdes sont constitués d'une unité *N*-carbaldéhyde-1,2-dihydrogénquinoline et d'une unité 1,3-diméthyl-imidazolidine-2,4-dione, toutes deux reliées par un carbone chiral spiro. Ces composés résulteraient de la fusion du **tryptophane** (**F13**) et de la **1,3-diméthylurée** (**F14**). **F11**, **F12** et leur mélange racémique ne présentent aucune activité cytotoxique envers les lignées cellulaires cancéreuses K562 (leucémie), A549 (poumon) et Hela (utérus). En revanche, **F11**, **F12** et leur mélange racémique montrent une activité immunosuppressive remarquable évaluée à travers leur activité inhibitrice de la production de l'interleukine 2 (IL2). Cette dernière est une hormone leukocytotrophique contribuant à la réponse naturelle du corps à une infection microbienne, à savoir la stimulation de la prolifération lymphocytaire.



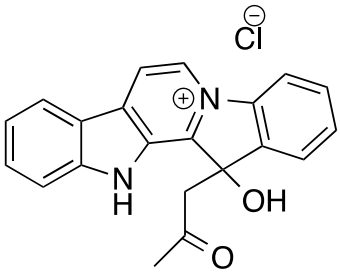
Classe 1a

fascaplysine (**F6**)



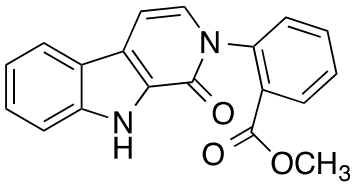
Classe 2

réticulatine (**F9**)



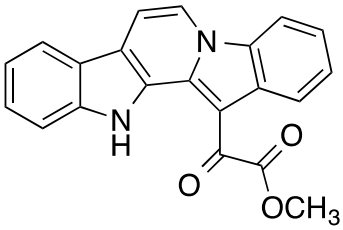
Classe 1b

homofascaplysine A (**F7**)



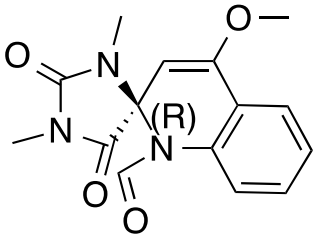
Classe 3

sécofascaplysine (**F10**)

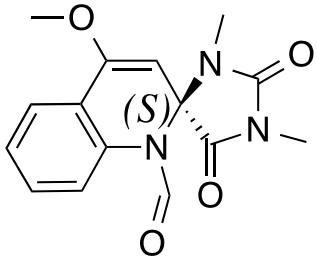


Classe 1c

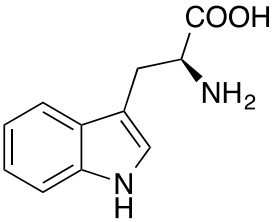
homofascaplysine B (**F8**)



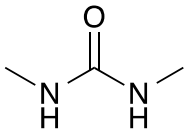
(+)-(*R*)- spiroréticulatine (**F11**)



(-)-(*S*)-spiroréticulatine (**F12**)



tryptophane (**F13**)



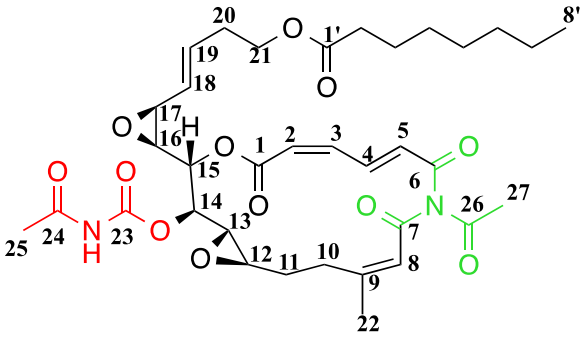
1,3-diméthylurée (**F14**)

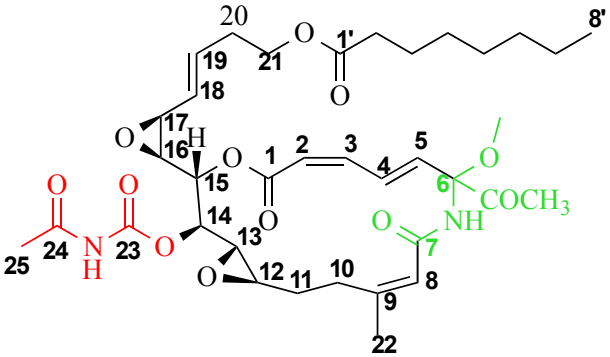
VI.1.3.3 Les macrolides

Fascaplysinopsis sp. récupérée au large de Madagascar est l'unique spécimen du genre *Fascaplysinopsis* duquel ont été isolés des macrolides (Bishara A. *et al*., 2008a,b,c, 2009a,b, 2010, 2012 ; DeGruyter J.N. et Maio W.A., 2014). Pas moins de 16 macrolides azotés ont été isolés de différents lots de cette éponge. On distingue 4 groupes de macrolides en fonction de leur squelette :

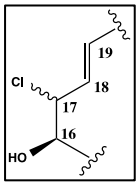
- les **salarines A-J** (**F15-F24**), macrolides cycliques à 17 éléments, marqués par la présence d'une fonction acétylcarbamate ;
- les **tuléarines A-C** (**F25-F27**)**,** macrolides cycliques à 18 éléments se distinguant à l'exception de la tuléarine C par une fonction carbamate rarement rencontrée dans les produits naturels ;
- les **taumycines A** et **B** (**F28**, **F29**), lipodepsipeptides cycliques à 12 éléments ;
- la **tausalarine C** (**F30**), bismacrolide combinant les squelettes de la salarine A et d'un précurseur de la taumycine A.

Les squelettes des 16 métabolites présentent de grandes similitudes avec ceux de métabolites issus de microorganismes tels que la madangolide et la laingolide A isolées de la cyanobactérie *Lyngbia bouillonii* (Klein D. *et al*., 1996, 1999). Cette particularité laisse supposer que ces métabolites proviendraient des microorganismes associés plutôt que de l'éponge elle-même. En faveur de cette hypothèse, il a d'ailleurs été observé une variation de la composition chimique de *Fascaplysinopsis* sp. en fonction du lieu de collecte. Tous les métabolites isolés ont été évalués pour leur activité cytotoxique envers les lignées cellulaires leucémiques K562 et UT-7. La grande majorité d'entre eux se sont avérés actifs : les salarines A, C, D, E, H, J, la tuléarine A, la taumycine A et la tausalarine C.

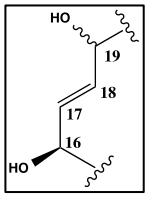




salarine D (**F18**)
salarine E (**F19**) C(6)=O

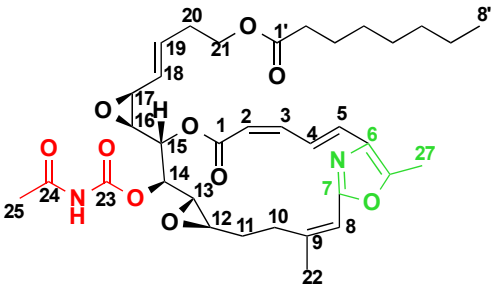


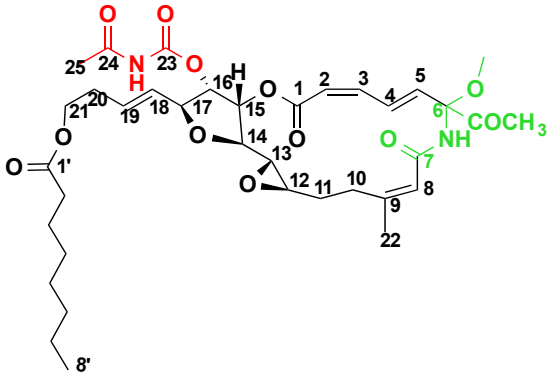
F20 & F21



F22 & F23

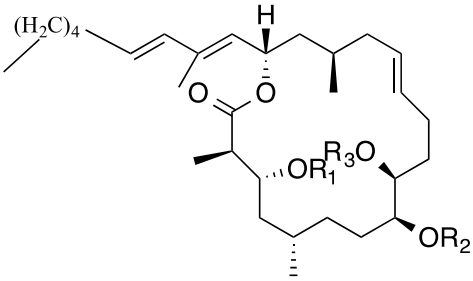
salarine A (**F15**)
salarine G (**F21**) 16-hydroxy-17-chloro
salarine H (**F22**) 16,19-dihydroxy-17-ène

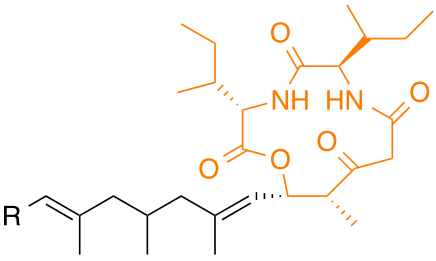




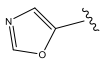
salarine C (**F17**)
salarine F (**F20**) 16-hydroxy-17-chloro
salarine I (**F23**) 12,13,16,19-tétraol-17-ène

salarine B (**F16**)
salarine J (**F24**) C(6) = O

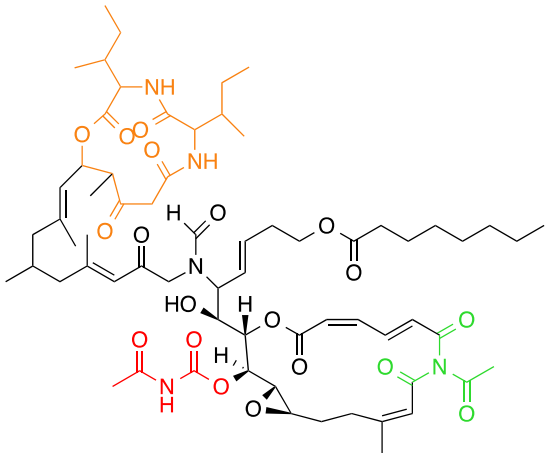




tuléarine A (**F25**) R_1, R_3 = H, R_2 = $CONH_2$
tuléarine B (**F26**) R_1, R_2 = $CONH_2$, R_3 = H
tuléarine C (**F27**) R_1, R_2, R_3 = H

taumycine A (**F28**) 

taumycine B (**F29**) R = COOH



tausalarine C (**F30**)

VI.2 Etude chimique de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* de Mayotte

L'étude chimique de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* collectée à Mayotte a conduit à l'obtention de huit composés. Cinq de ces composés sont nouveaux : **FR2**, **FR3**, **FR6, FR7** et **FR8** ; les trois autres sont des composés connus, mais isolés d'autres genres d'éponges : **FR1**, **FR4** et **FR5**. Ces composés sont des alcaloïdes, tous dérivés du tryptophane. Les techniques d'isolement et de purification, ainsi que l'élucidation structurale de ces composés sont exposées ci-après.

VI.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites FR1-FR8

L'isolement des composés de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* décrit ci-après, est illustré dans la figure 31.

L'extrait brut de *Fascaplysinopsis reticulata* (2,91 g) a été fractionné sur colonne ouverte en phase inverse (RP-18). L'élution a été effectuée au moyen de deux gradients ; un gradient eau/méthanol suivi d'un gradient méthanol/dichlorométhane. Douze fractions ont été récupérées.

La présence de ces composés a été détectée dans les fractions F1-F7 grâce à une analyse par CLHP-DEDL-SM-PAD des 12 fractions obtenues.

Les fractions F1-F7 ont donc été soumises chacune à un autre fractionnement par CLHP semi-préparative en phase inverse sur une colonne de type C-18 et couplée à un détecteur PAD (280, 254, 210 nm). L'élution a été réalisée au moyen d'un gradient eau + 0,1% acide acétique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

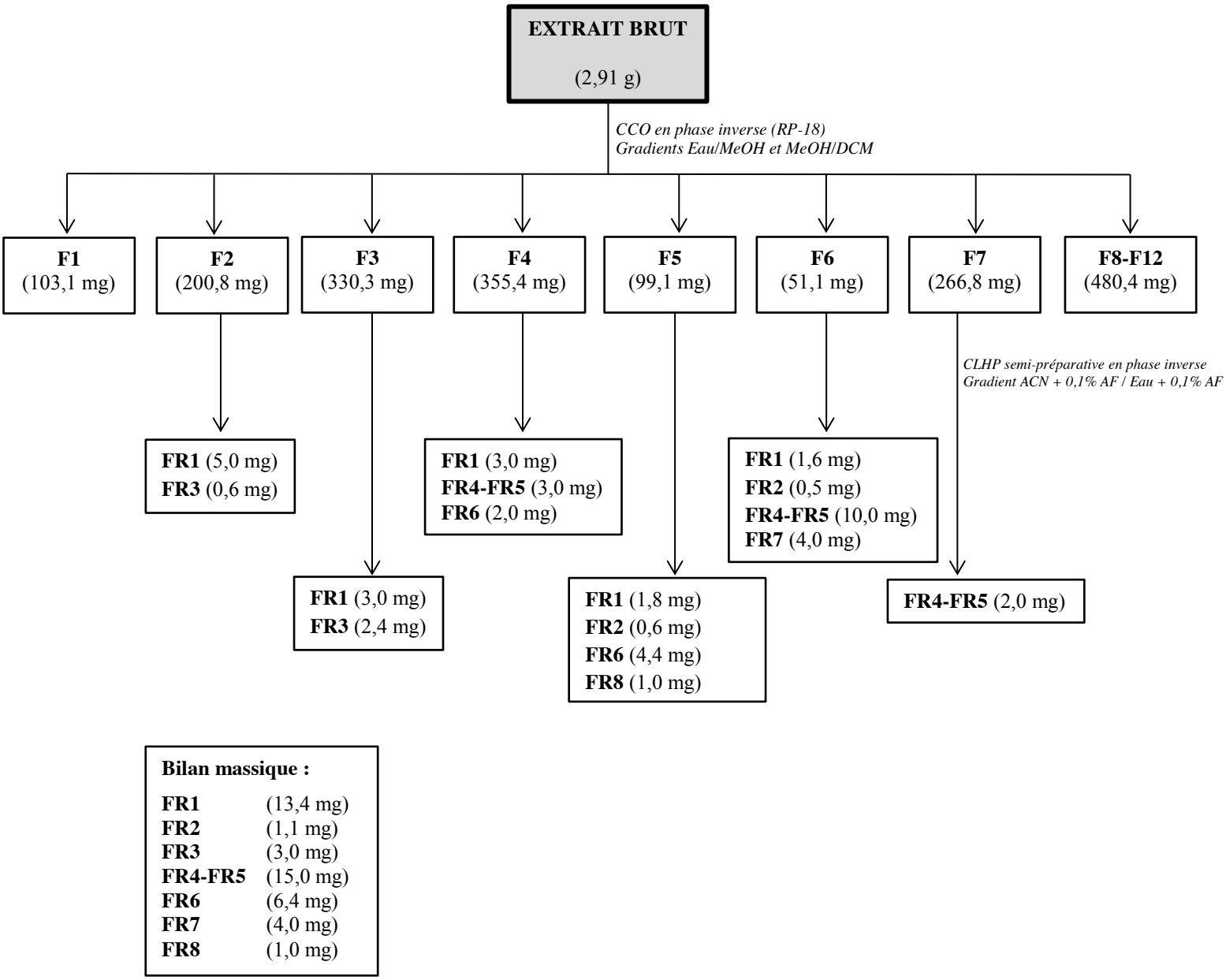
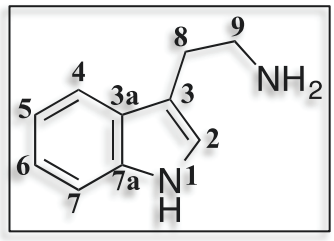


Figure 31 : *Fractionnement de Fascaplysinopsis reticulata pour l'obtention des métabolites **FR1**-**FR8**.*

VI.2.2 Elucidation structurale des métabolites FR1-FR8

➢ Métabolite FR1



tryptamine (**FR1**)

FR1 a été identifié comme étant la **tryptamine**. Cette dernière est constituée d'un noyau indolique auquel est rattachée une fonction éthylamine en C-3. Ses dérivés, les tryptamines, forment un groupe de substances psychotropes hallucinogènes naturelles ou de synthèse. Ils agissent sur les récepteurs à la sérotonine[1] du système nerveux central (Shulgin A. et Shulgin A. 1997). On les retrouve dans de nombreuses plantes voire chez certains animaux.

L'identification de **FR1**, obtenu sous forme d'un solide blanc, a été réalisée par comparaison des données spectrales expérimentales à celles de la littérature, à savoir :

- le spectre de masse haute résolution (SMHR équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif ESI^+) ;
- le spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H).

Le spectre de masse ESI^+ a révélé un ion moléculaire à 160,2430 correspondant à la formule brute $C_{10}H_{12}N_2$ (valeur calculée : *m/z* 160,2425) et proche de la valeur donnée dans la littérature pour la tryptamine (*m/z* 160,2157) (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; www.chemicalbook.com).

La comparaison des analyses spectrales RMN ^1H du composé isolé avec les données de la littérature (Tableau XVIII) a permis de conforter l'hypothèse de structure avancée par l'analyse en SMHR et d'attribuer à **FR1** la structure de la tryptamine.

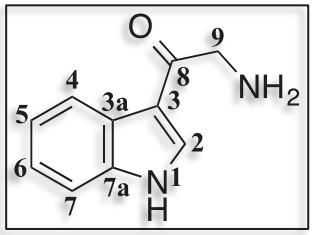
[1] La sérotonine ou 5-hydroxy-tryptamine (5-HT), a été mise en évidence dans le système nerveux central des mammifères il y a une quarantaine d'années. Très vite, la démonstration de l'hétérogénéité de la distribution de la 5-HT au niveau cérébral a conduit à suggérer que cette amine y jouait le rôle de neuromédiateur. Aujourd'hui, il est clairement établi que les neurones qui synthétisent et libèrent la 5-HT (les neurones sérotoninergiques) participent au contrôle de nombreuses fonctions centrales telles que le rythme veille-sommeil, la prise alimentaire, la nociception, la thermorégulation, l'activité sexuelle, etc. De plus, des altérations de la transmission sérotoninergique centrale sont associées à diverses affections psychiatriques et/ou neurologiques, en particulier la dépression et l'anxiété sous leurs différentes formes, les démences (y compris la maladie d'Alzheimer), etc. Cette pluralité d'interventions de la 5-HT au niveau central a conduit à postuler que ce neuromédiateur agissait sur plusieurs types de récepteurs dans les membranes des cellules cibles des neurones sérotoninergiques.

Tableau XVIII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la tryptamine de la littérature (400 MHz, DMSO-D_6) (http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_61-54-1_1HNMR.htm) à ceux observés pour* ***FR1*** *(500 MHz, CD_3OD).*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	
	Littérature	**Observés**
2	7,13	7,18 (s)
3	-	-
3a	-	-
4	7,52	7,58 (d, *8,2*)
5	6,97	7,13 (dd, *7,5* ; *14,7*)
6	7,06	7,05 (dd, *7,5* ; *14,7*)
7	7,35	7,38 (d, *8,2*)
7a	-	-
8	2,83	3,23 (dd, *6,4* ; *13,5*)
9	2,77	3,12 (dd, *6,4* ; *13,5*)
H-N1	10,8	-

➢ Métabolite FR2



Composé nouveau

8-oxo-tryptamine (**FR2**)

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **FR2** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif (ESI^+),
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^{1}H, ^{13}C, DEPT 135) et bidimensionnelle, homonucléaire (COSY ^{1}H-^{1}H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^{1}H-^{13}C)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **FR2** sont consignés dans l'annexe II.2

D'aspect huileux et de couleur rouge, le composé **FR2** présente un spectre SMHR en mode ESI^+ avec un ion moléculaire à *m/z* 174,2136, en accord avec la formule brute $C_{10}H_{10}N_2O$, (valeur calculée 174,2133). Le nombre d'insaturation calculé à partir de la formule brute du composé est de sept.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (Tableau XIX, Figure 32) met en évidence la présence :

- d'un noyau indolique caractérisé par les déplacements chimiques des carbones C-2, C-3, C-3a, C-4, C-5, C-6, C-7, et C-7a (δ_C 135,09 ; 115,05 ; 126,64 ; 122,65 ; 123,69 ; 124,93 ; 113,14 ; 138,05 ppm respectivement) et du proton H-2 (δ_H 8,27).
- d'un méthylène proche d'une fonction amine (δ_C 45,41 ppm et δ_H 4,41 pour C-9 et H-9 respectivement).
- d'un carbone d'une fonction cétone (δ_C 187,53).

Cette première approche met bien en évidence les 7 insaturations précédemment calculées : les 4 liaisons éthyléniques du noyau indolique, les 2 cycles du noyau indolique et 1 fonction carbonyle de la fonction cétone.

Les corrélations hétéronucléaires longue distance ont permis par ailleurs de confirmer la présence du noyau indolique. Il s'agit :

- Des corrélations COSY entre H-4 (δ_H 8,24), H-5 (δ_H 7,23), H-6 (δ_H 7,29) et H-7 (δ_H 7,49) conduisant à l'enchaînement des carbones C-4 (δ_C 122,65) à C-7 (δ_C 113,14).
- Des corrélations HMBC entre le proton H-2 (δ_H 8,27) et les carbones C-3 (δ_C 115,05), C-3a (δ_C 126,64) et C-7a (δ_C 138,05) ; le proton H-5 (δ_H 7,23) et les carbones C-3a (δ_C 126,64) et C-7 (δ_C 113,14) ; le proton H-6 (δ_H 7,29) et les carbones C-4 (δ_C 122,65) et C-7a (δ_C 138,05) ; le proton H-7 (δ_H 7,49) et les carbones C-5 (δ_C 123,69) et C-3a (δ_C 126,64).

Enfin, les corrélations HMBC entre le proton H-2 (δ_H 8,27) et le carbone C-8 (δ_C 187,53) d'une part, et entre les protons H-9 (δ_H 4,417) et le carbone C-8 (δ_C 187,53) d'autre part, indiquent que le cycle indolique est substitué en C-3. Ce dernier porte le carbonyle C-8, lui-même relié au méthylène CH_2-9 proche de la fonction amine.

FR2 a été nommé :
8-oxo-Tryptamine.

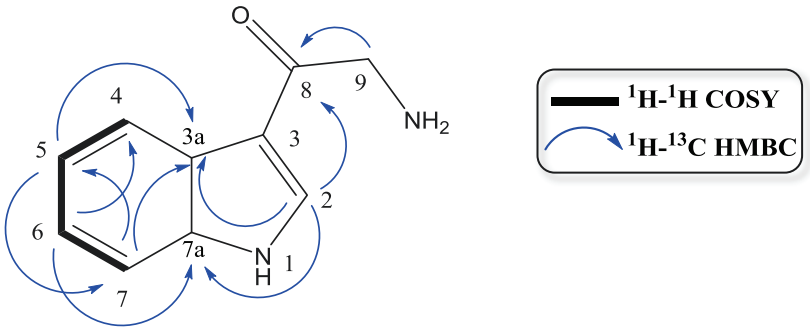


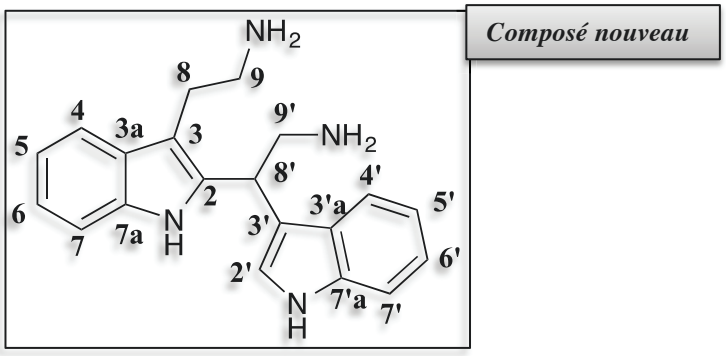
Figure 32 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR2**.*

Tableau XIX : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR2** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz.*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	**COSY** (^{1}H-^{1}H)	**HMBC** (^{1}H-^{13}C)
2	8,27 (s)	135,09	-	3, 3a, 7a, 8
3	-	115,05	-	-
3a	-	126,64	-	-
4	8,24 (d, *7,7*)	122,65	5	6, 7a
5	7,23 (dd, *7,3* ; *15,0*)	123,69	4, 6	3a, 7
6	7,29 (dd, *7,3* ; *15,0*)	124,93	5, 7	4, 7a
7	7,49 (d, *7,7*)	113,14	6	3a, 5
7a	-	138,05	-	-
8	-	187,53	-	-
9	4,41 (s)	45,41	-	8
H-N1	-	-	-	-

➢ Métabolite FR3



6,6'-bis-(débromo)-gelliusine F (**FR3**)

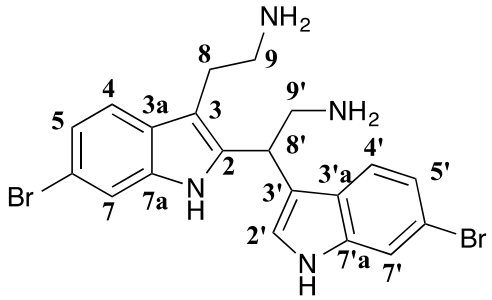
Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **FR3** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode négatif (ESI^-),
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135) et bidimensionnelle, homonucléaire (COSY ^1H-^1H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, RMN ^1H et ^{13}C du composé **FR3** sont consignés dans l'annexe II.3.

FR3 a été isolé sous forme d'une huile de couleur marron. Le SMHR en mode ESI^- de **FR3** a révélé un ion moléculaire à *m/z* 318,0141, soit une formule moléculaire brute $C_{20}H_{22}N_4$ (valeur calculée 318,0138). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de douze.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^1H de ce composé avec les données de la littérature permet d'attribuer à **FR3** une structure dérivée de la gelliusine F (Tableau XX). La gelliusine F est un alcaloïde bis-indolique bromé constitué de deux unités 6-bromotryptamine reliées par les carbones C-2 et C-8'. Ce composé a été isolé pour la première fois d'une éponge du genre *Orina* de Nouvelle Calédonie (Bifulco G. *et al*., 1995).



gelliusine F

Tableau XX : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la gelliusine F de la littérature (CD_3OD, 500 MHz) (Bifulco G. et al., 1995) à ceux observés pour le composé **FR3** (CD_3OD, 500 MHz).*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	
	Littérature	**Observés**
2	-	-
3	-	-
3a	-	-
4	7,51 (d)	7,55 (d, *7,8*)
5	7,20 (dd)	7,36 (m)
6	-	7,14 (m)
7	7,60 (d)	7,06 (m)
7a	-	-
8	3,27 (m)	3,24 (m)
9	3,00 (m), 3,07 (m)	3,00 (m)
2'	7,38 (s)	7,27 (s)
3'	-	-
3'a	-	-
4'	7,56 (d)	7,59 (d, *7,8*)
5'	7,17 (dd)	7,39 (m)
6'	-	7,15 (m)
7'	7,58 (d)	7,06 (m)
7'a	-	-
8'	5,16 (dd)	5,11 (t, *8,6*)
9'	3,69 (m) - 3,84 (m)	3,67 (m) - 3,83 (m)
H-N1	-	-
H-N1'	-	-

FR3 se distingue de la gelliusine F par l'absence des atomes de brome en C-6 et C-6' sur chacun des motifs tryptamine. Cela se traduit par la présence de 2 protons aromatiques supplémentaires sur le spectre RMN^{1}H de **FR3** : H-6 (δ_H 7,14) et H-6' (δ_H 7,15). La présence de CH-6 et CH-6' dans chacun des noyaux indoliques est confirmé par (Tableau XXI, Figure 33) :

- Les corrélations COSY entre H-6 (δ_H 7,14), H-5 (δ_H 7,36) et H-7 (δ_H 7,06) d'une part et entre H-6' (δ_H 7,15), H-5' (δ_H 7,39) et H-7' (δ_H 7,06) d'autre part.

- Les corrélations HMBC entre le proton H-6 (δ_H 7,14) et les carbones C-4 (δ_C 118,90) et C-7a (δ_C 135,30) d'une part, le proton H-6' (δ_H 7,15) et les carbones C-4' (δ_C 119,32) et C-7'a (δ_C 137,94) d'autre part.

FR3 a été nommé :
6,6'-bis-(débromo)-Gelliusine F.

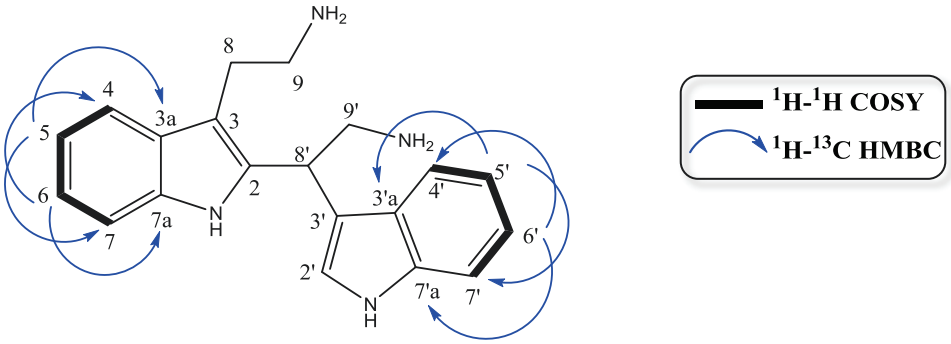


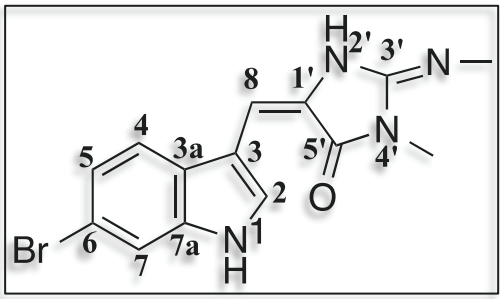
Figure 33 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR3**.*

Tableau XXI : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR3** enregistrées dans CD_3OD à 300 MHz.*

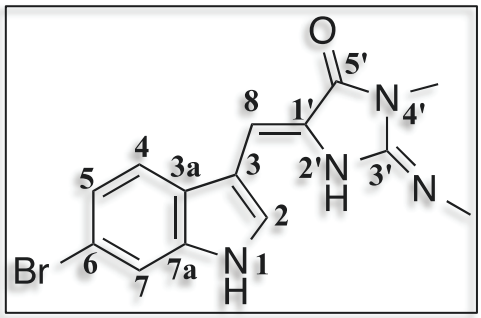
Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	δ_C	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
2	-	124,02	-	-
3	-	113,82	-	-
3a	-	127,46	-	-
4	7,55 (d, *7,8*)	118,90	5	6, 7a
5	7,36 (m)	112,60	4, 6	3a, 7
6	7,14 (m)	123,13	5, 7	4, 7a
7	7,06 (m)	120,89	6	3a, 5
7a	-	135,30	-	-
8	3,24 (m)	23,90	9	2, 3, 3a, 9
9	3,00 (m)	41,52	8	3, 8
2'	7,27 (s)	124,02	-	3', 3'a, 7'a,
3'	-	113,68	-	-
3'a	-	129,14	-	-
4'	7,59 (d, *7,8*)	119,32	5'	6', 7'a
5'	7,39 (m)	112,88	4', 6'	3'a, 7'
6'	7,15 (m)	123,26	5', 7'	4', 7'a
7'	7,06 (m)	120,69	6'	3'a, 5'
7'a	-	137,94	-	-
8'	5,11 (t, *8,6*)	34,56	9'	2', 3', 3'a, 9'
9'	3,83-3,67 (m)	44,44	8'	3, '8'
H-N1	-	-	-	-
H-N1'	-	-	-	-

➢ Métabolites FR4-FR5



(*E*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR4**)



(*Z*)-6-Bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR5**)

Le mélange **FR4-FR5** a été identifié comme étant formé des stéréoisomères **(*E*)-** et **(*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine.** L'isolement et l'identification de ces molécules ont été réalisés pour la première fois par Guella G. *et al*. (1989) lors de l'étude d'un alcyon du genre *Dendrophyllia*.

L'identification de **FR4** et **FR5** obtenus sous forme d'un mélange huileux de couleur jaune, a été réalisée par comparaison des données spectrales expérimentales à celles de la littérature, à savoir :

- le spectre de masse haute résolution (SMHR équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif ESI^+)
- le spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H).

Le spectre SMHR en mode ESI^+ présente des pics de masse à *m/z* 332,0421 et 334,0421 (ratio 50,5:49,5). Ces deux pics de masse indiquent la présence d'un atome de Br dans la structure, et est compatible avec la formule brute $C_{14}H_{13}BrN_4O$ (valeur calculée : *m/z*

332,0418 et 334,0419). Ces valeurs sont proches de celles données dans la littérature pour la (*E*)- et la (*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (Guella G. *et al*., 1989).

La comparaison des analyses spectrales RMN ^{1}H du mélange isolé avec les données de la littérature (Tableau XXII) a permis de confirmer l'hypothèse de l'identification avancée par la SMHR pour **FR4** et **FR5**.

Tableau XXII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la (E)- et la (Z)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-N-méthyl-aplysinopsine de la littérature (500 MHz, DMSO-D_6) (Guella G. et al., 1989) à ceux observés pour* ***FR4-FR5*** *(500 MHz, DMSO-D_6).*

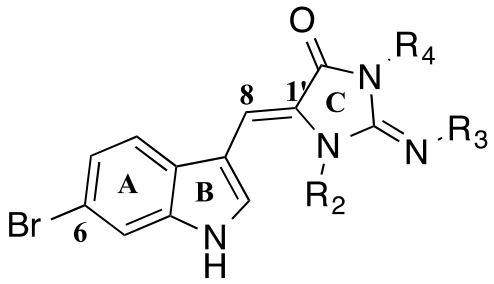
Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H			
	Littérature		Observés	
	(Z)	(*E*)	(Z)	(*E*)
2	8,26 (s)	8,89 (s)	8,25 (s)	8,89 (s)
3	-	-	-	-
3a	-	-	-	-
4	8,01 (d, *8,5*)	7,79 (d, *8,5*)	8,01 (d, *8,5*)	7,79 (d, *8,5*)
5	7,18 (dd, *1,8 ; 8,5*)	7,20 (dd, *1,8 ; 8,5*)	7,18 (dd, *1,6 ; 8,5*)	7,20 (dd, *1,6 ; 8,5*)
6	-	-	-	-
7	7,59 (s)	7,59 (s)	7,60 (s)	7,60 (s)
7a	-	-	-	-
8	6,73 (s)	7,00 (s)	6,73 (s)	7,00 (s)
1'	-	-	-	-
3'	-	-	-	-
5'	-	-	-	-
H-N1	11,60 (s)	11,55 (s)	11,61 (s)	11,58 (s)
H-N2'	7,40 (s)	7,40 (s)	7,41 (s)	7,41 (s)
CH_3-NC3'	3,02 (s)	3,05 (s)	3,03 (s)	3,06 (s)
CH_3-N4'	2,98 (s)	2,85 (s)	2,98 (s)	2,86 (s)

La (*E*)- et la (*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine sont des dérivés de l'aplysinopsine. Cette dernière a été isolée pour la première fois en 1977 de l'éponge *Aplysinopsis reticulata* (Kazlauskas R. *et al*., 1977 ; Baker J.T. et Wells R.J., 1981).

Les stéréoisomères (*E*)- et (*Z*)-6-bromo-2'-de-méthyl-3'-*N*-méthylaplysinopsine diffèrent de l'aplysinopsine par (Figure 34) :

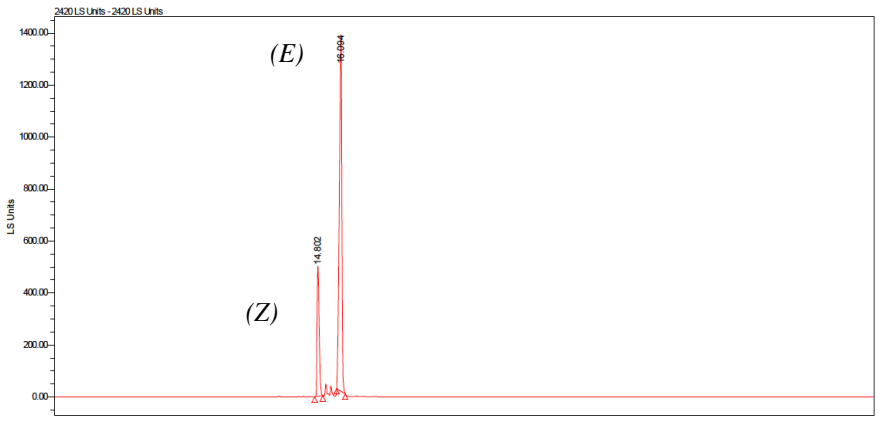
- la présence d'un brome en position 6,
- la position des substituants méthyle du cycle à 5 atomes.



Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	Stéréochimie C-8 = C-1'
aplysinopsine	H	CH_3	H	CH_3	(*E*)
(*E*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine	Br	H	CH_3	CH_3	(*E*)
(*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine	Br	H	CH_3	CH_3	(*Z*)

Figure 34 : *Structures de l'aplysinopsine et des stéréoisomères (E/Z)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-N-méthyl-aplysinopsine.*

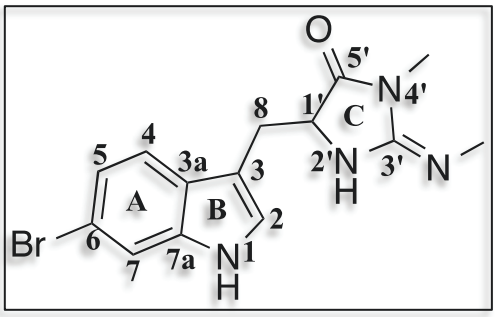
L'impossibilité de séparer chacun des stéréoisomères s'explique par le fait qu'il existe un équilibre entre les deux formes (*Z*) et (*E*). Selon Guella G. *et al*. (1989), le mélange à l'état naturel serait plus riche en isomère (*Z*) ((*Z*/*E*) = 95:5). Par photoisomérisation, il deviendrait plus riche en isomère (*E*) ((*Z*/*E*) = 1:3). Cette réaction présente la particularité d'être réversible. En effet, placé dans l'obscurité, à température ambiante pendant plusieurs jours, ou à 60°C pendant 2h, le mélange (*Z*/*E*) = 1:3 retrouve les proportions initiales du mélange ((*Z*/*E*) = 95:5). Selon Guella G. *et al*. (1989), ce déplacement d'équilibre s'expliquerait par le fait que l'isomère (*Z*) serait thermodynamiquement plus stable mais photochimiquement plus labile. Le mélange **FR4-FR5** a quant à lui été isolé avec les proportions (*Z*/*E*) = 1:3 ; proportions déterminées par combinaison des données RMN et CLHP-DEDL (Figure 35).



colonne : Waters Sunfire C18 4,6*150 mm
éluant : Eau/ACN + 0,1 % AF (95:5 isocratique puis gradient 95:5 à 0:100)
débit : 1 mL/min

Figure 35 : *Profil CLHP-DEDL du mélange **FR4-FR5** isolé de Fascaplysinopsis reticulata.*

➢ Métabolite FR6



Composé nouveau

6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**)

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **FR6** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif (ESI^+),
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135) et bidimensionnelle, homonucléaire (COSY ^1H-^1H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, RMN ^1H et ^{13}C du composé **FR6** sont consignés dans l'annexe II.4.

FR6, a été isolé sous forme d'une huile de couleur jaune ($[\alpha]_D^{25} = 0$ (*c* 0,5 mg/100mL MeOH). Le SMHR en mode ESI^+ de **FR6** présente des pics de masse à *m/z* 334,3452 et 336,3453 (ratio 50,5:49,5) indiquant la présence d'un atome de Br dans la structure, soit une formule brute $C_{14}H_{15}BrN_4O$ (valeurs calculées : *m/z* 334,3450-336,3455). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de neuf.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^1H de ce composé avec les données de la littérature permet d'attribuer à **FR6** une structure proche de celle des stéréoisomères (*E*)- et (*Z)*-6-bromo-2'-déméthyl-3'-N-méthyl-Aplysinopsine (**FR4-FR5**).

FR6 se distingue de **FR4-FR5** par l'absence de la double liaison entre C-8 et C-1' ; il appartient donc au groupe des 1',8-dihydroaplysinopsines. Cela se traduit par la présence de 2

protons supplémentaires sur le spectre RMN^{1}H de **FR6** : H-8 (δ_H 4,60) et H-1' (δ_H 3,35). L'absence de la double liaison entre C-8 et C-1' est confirmée par (Tableau XXIII, Figure 36) :

- Les corrélations COSY entre H-8 (δ_H 4,60) et H-1' (δ_H 3,35).
- Les corrélations HMBC entre le proton H-2 (δ_H 7,12) et le carbone C-8 (δ_C 61,74) d'une part, et le proton H-1' (δ_H 3,35) et les carbones C-8 (δ_C 61,74) et C-5' (δ_C 173,64) d'autre part.

FR6 a été nommé :
6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine.

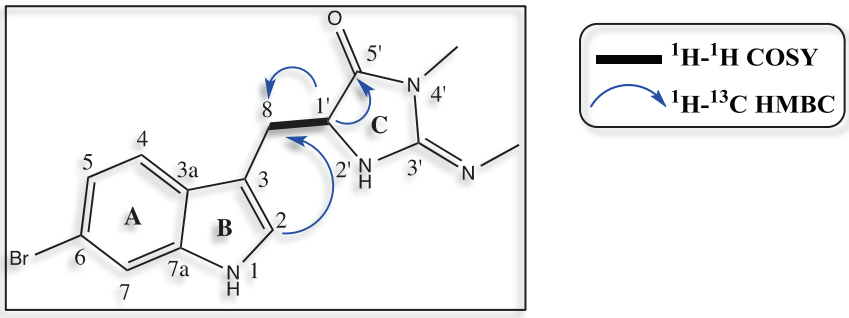


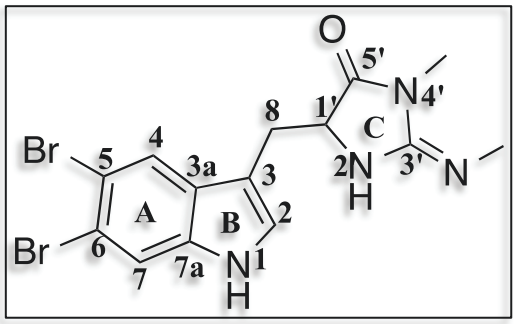
Figure 36 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite FR6*.

Tableau XXIII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR6** enregistrées dans CD_3OD à 300 MHz.*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	δ_C	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
2	7,12 (s)	126,54	-	3, 3a, 7a, 8
3	-	107,22	-	-
3a	-	127,06	-	-
4	7,52 (d, *1,8*)	121,22	5	6, 7a
5	7,14 (d, *1,6*)	123,42	4	3a, 7
6	-	115,95	-	-
7	7,49 (s)	115,56	-	3a, 5
7a	-	137,94	-	-
8	4,63 (br t, *4,9*)	61,94	1'	-
1'	3,35 (m)	25,98	8	5', 8
3'	-	157,21	-	-
5'	-	173,64	-	-
H-N1	-	-	-	-
H-N2'	-	-	-	-
CH_3-NC3'	2,91 (s)	25,81	-	3'
CH_3-N4'	2,87 (s)	29,24	-	3', 5'

Métabolite FR7



Composé nouveau

5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**)

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **FR7** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode négatif (ESI^-),
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135) et bidimensionnelle, homonucléaire (COSY ^1H-^1H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, RMN ^1H et ^{13}C du composé **FR7** sont consignés dans l'annexe II.5.

Le composé **FR7** a été isolé sous forme d'une huile de couleur jaune ($[\alpha]_D^{25} = 0$ (*c* 0,5 mg/100 mL MeOH). Son spectre de masse ESI enregistré en mode négatif se caractérise par la présence de trois pics de masse : *m/z* 412,4232, 414,4234 et 416,4233 (ratio 1:2:1) indiquant la présence de deux atomes de Br dans la structure, soit une formule brute $C_{14}H_{14}Br_2N_4O$ (valeurs calculées : 412,4230 ; 414,4190 ; 416,4230). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de neuf.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^1H de ce composé avec celles du composé **FR6** (Tableau XXIV) permet d'attribuer à **FR7** une structure proche de celle de **FR6**.

FR7 se distingue de **FR6** par la présence d'un deuxième atome de brome sur le carbone C-5. Cela se traduit par :

- l'absence du proton H-5 sur le spectre RMN^{1}H de **FR7** ;
- l'absence de corrélation HMBC entre H-5 et C-3a visible sur le spectre HMBC de **FR6** ;
- une diminution du déplacement chimique de C-5 (δ_C 123,23 pour **FR6** ; δ_C 116,90 pour **FR7**).

La position de C-5 est par ailleurs déterminée par le couplage HMBC entre H-7 (δ_H 7,69) et C-5 (δ_C 116,90).

FR7 a été nommé :
5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine.

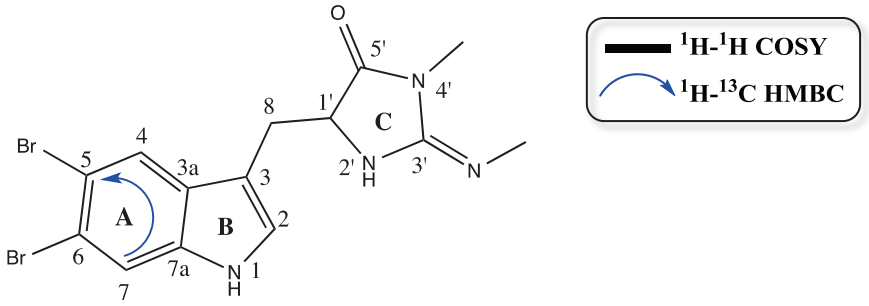


Figure 37 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR7**.*

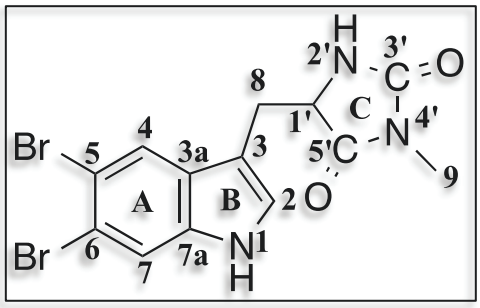
Tableau XXIV : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR7** enregistrées dans CD_3OD à 600 MHz.*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H *	δ_C	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
2	7,16 (s)	126,64	-	3, 3a, 7a, 8
3	-	108,97	-	-
3a	-	129,80	-	-
4	7,98 (s)	123,52	-	6, 7a
5	-	116,90	-	-
6	-	115,87	-	-
7	7,69 (s)	117,40	-	3a, 5
7a	-	137,50	-	-
8	4,59 (br t, *5,3*)	61,40	1'	-
1'	3,75 (m)	28,22	8	3, 8
3'	-	157,90	-	-
5'	-	175,81	-	-
H-N1	-	-	-	-
H-N2'	-	-	-	-
CH_3-NC3'	2,86 (s)	25,40	-	3'
CH_3-N4'	2,94 (s)	28,90	-	3', 5'

* Déplacements chimiques enregistrés à 500 MHz

➢ Métabolite FR8



Composé nouveau

5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**)

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification du métabolite **FR8** :

- la spectroscopie ultraviolette (UV),
- la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) équipée d'une source d'ionisation par électronébulisation placée en mode positif (ESI^+),
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H, ^{13}C, DEPT 135) et bidimensionnelle, homonucléaire (COSY ^1H-^1H) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC (^1H-^{13}C)).

Les résultats des analyses réalisées sont présentés ci-après. Les spectres UV, RMN ^1H et ^{13}C du composé **FR8** sont consignés dans l'annexe II.6.

Le composé **FR8** a été isolé sous forme d'une huile de couleur jaune ($[\alpha]_D^{25} = 0$ (*c* 0,5 mg/100 mL MeOH). Son spectre de masse ESI enregistré en mode positif se caractérise par la présence de trois pics de masse : *m/z* 398,4112, 400,4112 et 402,4112 (ratio 1:2:1) indiquant la présence de deux atomes de Br dans la structure, soit une formule brute $C_{13}H_{10}Br_2N_3O_2$ (valeurs calculées : 399,4110, 401,4112, 403,4114). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de neuf.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^1H de ce composé (Tableau XXV) avec les données spectrales du composé **FR7** (Tableau XXIV) permet d'attribuer à **FR8** une structure proche de celle de **FR7.**

Ces deux composés se distinguent par le degré d'oxydation de la fonction 2-aminoimidazoline du cycle C : la fonction *N*-méthyl-imine de **FR7** a été remplacée par une fonction cétone dans **FR8**. Cela se traduit par :

- l'absence de la fonction *N*-méthyl-imine CH_3-NC3' sur les spectres RMN C^{13} et RMN^{1}H de **FR8** (fonction caractérisée par les déplacements chimiques δ_C 25,40 et δ_H 2,86 pour **FR7**) ;
- la présence des nouvelles corrélations HMBC entre les protons CH_3-N4' (δ_H 2,79) et les carbones C-3' (δ_C 169,03) et C5' (δ_C 188,22) visibles sur le spectre HMBC de **FR8**.

FR8 a été nommé :
5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-Dihydroaplysinopsine.

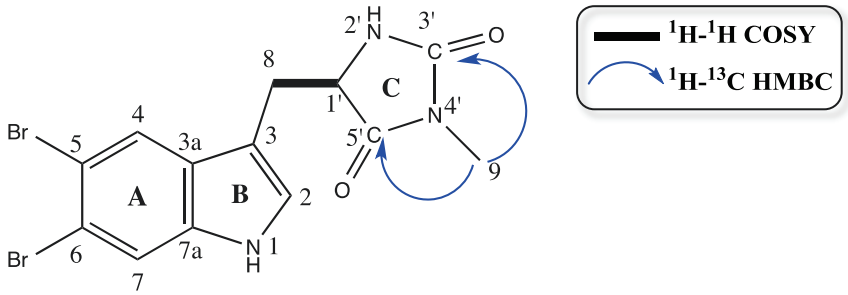


Figure 38 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR8**.*

Tableau XXV : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR8** enregistrées dans CD_3OD à 600 MHz.*

Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_H	δ_C	COSY	HMBC (^{1}H-^{13}C)
2	7,13 (s)	127,84	-	3, 3a, 7a,
3	-	109,51	-	-
3a	-	130,23	-	-
4	7,99 (s)	124,49	-	3, 6, 7a
5	-	114,68	-	-
6	-	117,20	-	-
7	7,63 (s)	117,40	-	3a, 5
7a	-	137,58	-	-
8	4,35 (t, *4,5*)	63,23	1'	2, 3, 3a
1'	3,19 (m)	27,87	8	3, 8
3'	-	169,03	-	-
5'	-	188,22	-	-
H-N1	-	-	-	-
H-N2'	-	-	-	-
CH_3-N4'	2,79 (s)	28,9	-	3', 5'

VI.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés

Les composés **FR1, FR2, FR3, FR4-FR5, FR6, FR7** et **FR8** ont été testés pour leurs activités antipaludique et antifouling.

- **L'activité antipaludique** a été évaluée à travers l'action antiproliférative des métabolites isolés, sur le parasite *Plasmodium falciparum*.
- **L'activité antifouling** a été évaluée à travers l'activité inhibitrice de la croissance/adhésion de 5 souches bactériennes d'origine marine.

VI.3.1. L'activité antipaludique

❖ ***Principe du test***

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

L'activité antipaludique des composés **FR1, FR2, FR3, FR4-FR5, FR6, FR7** et **FR8** de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* a été évaluée *in vitro* à travers leur activité anti-proliférative sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7).

❖ ***Résultats du test***

Les résultats des tests menés sur les 8 composés isolés, sont rassemblés dans le Tableau XXVI. Avec des CI_{50} inférieures à 15 µg/mL, **FR2**, le mélange **FR4-FR5** et **FR7**, montrent une bonne activité antiplasmodium. Ils peuvent donc être considérés comme des agents antipaludiques potentiels.

Tableau XXVI : *Activité antiplasmodium des métabolites isolés de Fascaplysinopsis reticulata*.

Métabolites	CI_{50} (µg/mL)
FR1	23,80 ± 7,22
FR2	**8,81** ± 3,27
FR3	*Non actif*
FR4-FR5	**7,98** ± 2,37
FR6	35,97 ± 11,42
FR7	**11,59** ± 2,10
FR8	14,17 ± 3,17

VI.3.2. L'activité antifouling

❖ ***Principe***

Les tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sous la direction du Professeur Claire Hellio au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France.

Comme évoqué au chapitre III (§ III.3.2.2) pour les métabolites **PK1** et **PK2**, il a été choisi d'évaluer l'activité antifouling des molécules isolées de *Fascaplysinopsis reticulata* (**FR1, FR2, FR3, FR4-FR5, FR6, FR7** et **FR8**) à travers leur activité inhibitrice de la croissance et de l'adhésion sur 5 souches de bactéries marines provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection): *Roseobacter litoralis, Shewanella putrefaciens, Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus*.

❖ ***Résultats***

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau XXVII. Ces résultats permettent de classer les métabolites isolés de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* en 3 catégories :

- Les métabolites activateurs exclusifs de la croissance et/ou de l'adhésion des 5 souches bactériennes testées : **FR2**, **FR3, FR4-FR5**
- Les métabolites activateurs ou inhibiteurs selon la souche bactérienne testée, de la croissance et/ou de l'adhésion : **FR1**, **FR7** et **FR8**
- Les métabolites inhibiteurs exclusifs de la croissance et/ou de l'adhésion des 5 souches bactériennes testées : **FR6**

FR1, **FR7**, **FR8** et tout particulièrement **FR6** constituent donc des molécules à activité antifouling potentielle.

- ✓ **FR1** inhibe la croissance de *Vibrio carchariae*.
- ✓ **FR6** inhibe la croissance de *Shewanellia putrefaciens*, la croissance et l'adhésion de *Vibrio natrigens* ainsi que l'adhésion de *Vibrio carchariae*.
- ✓ **FR7** inhibe la croissance de *Vibrio natrigens*.
- ✓ **FR8** inhibe la croissance de *Vibrio natrigens* ainsi que la croissance et l'adhésion de *Roseobacter littoralis*.

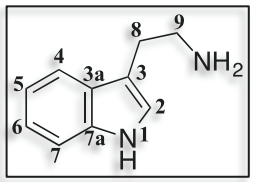
Tableau XXVII: *Activité antibactérienne de* ***FR1, FR2, FR3, FR4-FR5, FR6, FR7*** *et* ***FR8*** *isolés de Fascaplysinopsis reticulata sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus.*

Souches bactériennes	**Inhibition de la croissance** CMI (µg/mL)	**Inhibition de l'adhésion** CMI (µg/mL)	**Activation de la croissance** CE (µg/mL)	**Activation de l'adhésion** CE (µg/mL)
FR1				
Shewanellia putrefaciens	-	-	1	1
Roseobacter littoralis	-	-	-	10
Vibrio carchariae	1	-	-	-
Vibrio natrigens	-	-	-	100
Vibrio proteolyticus	-	-	-	100
FR2				
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,01	-
Roseobacter littoralis	-	-	0,1	-
Vibrio carchariae	-	-	-	-
Vibrio natrigens	-	-	100	-
Vibrio proteolyticus	-	-	0,01	-
FR3				
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,01	-
Roseobacter littoralis	-	-	10	-
Vibrio carchariae	-	-	100	0,1
Vibrio natrigens	-	-	-	0,01
Vibrio proteolyticus	-	-	0,01	-
FR4-FR5				
Shewanellia putrefaciens	-	-	-	100
Roseobacter littoralis	-	-	1	100
Vibrio carchariae	-	-	-	-
Vibrio natrigens	-	-	-	-
Vibrio proteolyticus	-	-	0,1	-
FR6				
Shewanellia putrefaciens	100	-	-	-
Roseobacter littoralis	-	-	-	-
Vibrio carchariae	-	100	-	-
Vibrio natrigens	0,01	100	-	-
Vibrio proteolyticus	-	-	-	-
FR7				
Shewanellia putrefaciens	-	-	0,1	0,1
Roseobacter littoralis	-	-	-	-
Vibrio carchariae	-	-	-	10
Vibrio natrigens	1	-	-	-
Vibrio proteolyticus	-	-	-	1
FR8				
Shewanellia putrefaciens	-	-	-	0,01
Roseobacter littoralis	1	0,01	-	-
Vibrio carchariae	-	-	-	0,01
Vibrio natrigens	0,01	-	-	-
Vibrio proteolyticus	-	-	-	0,1

VI.3.3 Discussion

Choisie pour l'originalité de sa composition chimique, l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata,* collectée dans le récif corallien de Mayotte, est marquée par la présence de 8 alcaloïdes (**FR1** - **FR8**) dont 5 présentent la particularité d'être bromés (**FR4-FR5**, **FR6**, **FR7**, **FR8**) et 5 sont de structures nouvelles (**FR2**, **FR3**, **FR6**, **FR7**, **FR8**) (Figure 39). Tous les alcaloïdes isolés ont été testés pour leurs activités antipaludique et antifouling (antimicrobienne). On retiendra :

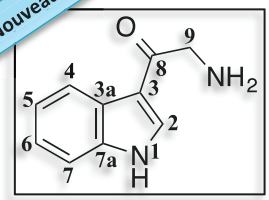
- **FR2**, le mélange **FR4-FR5** et **FR7**, pour leur activité antiplasmodium.
- **FR1**, **FR7**, **FR8** et tout particulièrement **FR6** pour leur activité antibactérienne.



tryptamine (**FR1**)

- *Activité antibactérienne sur Vibrio carchariae.*

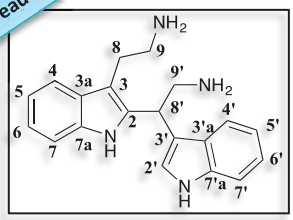
Nouveau



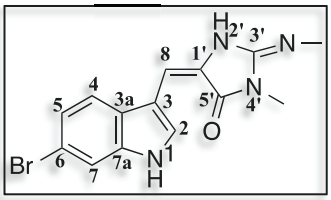
8-oxo-tryptamine (**FR2**)

- *Activité antiplasmodiale.*

Nouveau



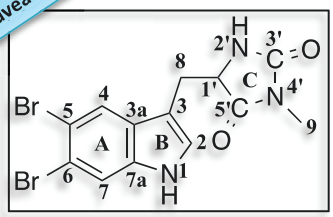
6,6'-bis-(débromo)-gelliusine F (**FR3**)



(*E*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR4**)

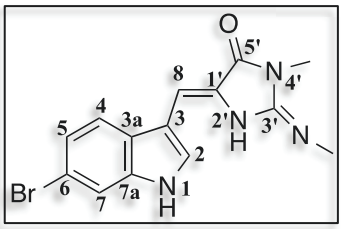
- *Activité antiplasmodiale.*

Nouveau



5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**)

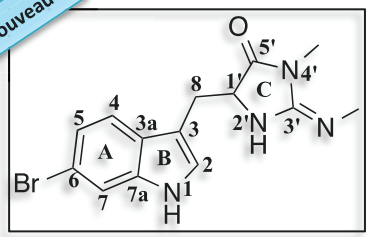
- *Activité antibactérienne sur :*
  - ✓ *Roseobacter littoralis*
  - ✓ *Vibrio natrigens*



(*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR5**)

- *Activité antiplasmodiale.*

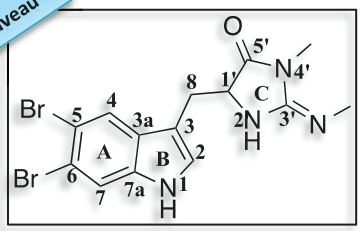
Nouveau



6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**)

- *Activité antibactérienne sur :*
  - ✓ *Shewanellia putrefaciens*
  - ✓ *Vibrio carchariae*
  - ✓ *Vibrio natrigens*

Nouveau



5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**)

- *Activité antiplasmodiale.*
- *Activité antibactérienne sur :*
  - ✓ *Vibrio natrigens*

Figure 39 : *Métabolites isolés de Fascaplysinopsis reticulata : Bilan structure/activité.*

Comme la majorité des alcaloïdes isolés du genre *Fascaplysinopsis* (§ VI.1.3.2), les 8 alcaloïdes identifiés (**FR1-FR8**) sont des dérivés du tryptophane (**F13**), acide aminé constitué d'un noyau indolique. Les alcaloïdes **FR4**, **FR5**, **FR6**, **FR7** et **FR8** appartiennent en outre au groupe des aplysinopsines. Ces dernières sont des dérivés de l'aplysinopsine (**A1**), un alcaloïde tricyclique isolé pour la première fois en 1977 d'une éponge du genre *Thorecta* (finalement reclassée dans le genre *Aplysinopsis*). Actuellement, on compte un peu moins d'une trentaine d'analogues de l'aplysinopsine (**A2-A27**) isolés d'éponges mais aussi de coraux durs (scléractiniaires), d'anémones de mer et de nudibranches du Pacifique, d'Indonésie, des Caraïbes et de Méditerranée (Tableau XXVIII, Figure 40).

❖ ***Structure et stéréochimie des aplysinopsines***

D'un point de vue structurale, l'aplysinopsine et ses analogues se différencient par :

- Le nombre (0, 1 ou 2) et la position (C-5, C-6) d'atomes de brome sur le squelette indolique (cycles A et B).
- Le degré d'oxydation du cycle C ainsi que le nombre (1, 2 ou 3) et la position de groupements méthyle sur ce cycle.
- La présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones C-8 et C-1' ainsi que sa stéréochimie (*E*/*Z*).
- La présence ou l'absence de groupes hydroxyle, méthoxyle ou éthoxyle en C-1'.
- Un petit nombre d'analogues (**A24 - A27**) ont par ailleurs une structure dimérique.

Concernant plus particulièrement les aplysinopsines présentant une double liaison entre les carbones C-8 et C-1', les deux isomères géométriques (*E*) et (*Z*) sont en général isolés sous forme de mélange. Selon Guella *et al*. (1988), le ratio (*E*/*Z*) peut-être déterminé à partir des données de la RMN : le couplage hétéronucléaire ^{1}H-^{13}C entre H-8 et C-5' de l'isomère (*E*) ($J \approx 10Hz$) est en effet plus grand que celui de l'isomère (*Z*) ($J \approx 4Hz$). De plus, il a été observé par Guella *et al*. (1989), que le 6-bromo-4'-déméthyl-3'-*N*-méthylaplysinopsine (**A9**) isolé du corail *Dendrophillia* sp. sous forme d'un mélange (*E*/*Z*, 5:95) pouvait subir une photoisomérisation conduisant à un mélange plus riche en isomère (*E*). Cette réaction de photoisomérisation est par ailleurs réversible. En effet, le mélange placé à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant plusieurs jours, ou à 60°C pendant 2 heures, retrouve sa composition initiale. A partir de cette expérience, Guella *et al*. (1989) ont démontré que dans le cas des aplysinopsines méthylées en position 2', l'isomère (*E*) est

thermodynamiquement et photochimiquement plus stable que l'isomère (*Z*) ; alors que dans le cas des aplysinopsines pour lesquelles N'2 porte un hydrogène ou tout simplement un doublet, l'isomère (*Z*) est thermodynamiquement plus stable et phytochimiquement plus labile que l'isomère (*E*).

La stéréochimie des aplysinopsines peut être d'une grande importance d'un point de vue pharmacologique. Par exemple l'isomère (*E*) de la méthylaplysinopsine (**A7**) montre un effet sur la neurotransmission plus grand que l'isomère (*Z*).

❖ *Activités biologiques des aplysinopsines*

L'aplysinopsine et ses analogues ont attiré l'attention de nombreux chercheurs en raison de leurs multiples activités biologiques et pharmacologiques. On notera en particulier leurs activités antinéoplasique (*i.e*. antiprolifératif des cellules cancéreuses), antipaludique (*i.e*. antiplasmodiale), antimicrobienne mais aussi et surtout leur possible utilisation en tant qu'antidépresseurs par leur action modulatrice sur le système nerveux central (Tableau XXVIII). Les aplysinopsines (**FR4 - FR8**) isolées de *Fascaplysinopsis reticulata* viennent compléter la liste des aplysinopsines bioactives.

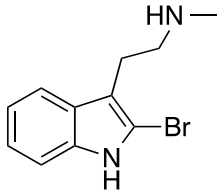
Le mélange (*E*)- et (*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR4-FR5**) ainsi que la 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**) (Figure 39) renforcent le nombre d'aplysinopsines à activité antiplasmodiale. Six aplysinopsines isolées de l'éponge *Smenospongia aurea* (**A2** - **A5**, **A7** et **A11**) ont en effet été testées pour leur activité antimalariale *in vitro* (Hu J.F. *et al*., 2002). Trois d'entre elles, l'isoplysine (**A2**), la 6-bromo-2'-dé-*N*-méthylaplysinopsine (**A4**) et la 6-bromoaplysinopsine (**A5**) ont montré une activité inhibitrice remarquable de la croissance du clone D6 de *Plasmodium falciparum* (CI_{50} = 0,97 ; 1,1 et 0,34 µg/mL respectivement pour **A2**, **A4** et **A5**).

La 6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**), la 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**) et la 5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**) (Figure 39) viennent quant à elles renforcer le nombre d'aplysinopsines à activité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne des aplysinopsines a été mise en évidence pour la première fois par Tymiak A.A. et Rinehart K.L. (1985) : le mélange de la 6-bromoaplysinopsine (**A5**) et de la 6-bromo-4'-dé-*N*-méthylaplysinopsine (**A6**) a en effet montré une faible activité inhibitrice de la

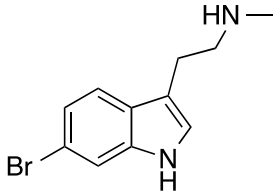
croissance de la bactérie *Bacillus subtilis*. En revanche, aucune activité sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus cerevisiae* et *Penicillium atrovenetum* n'a été détectée pour ce mélange. Dans une autre étude menée par Gulati *et al*. (1993), l'aplysinopsine (**A1**) et la 6-bromo-aplysinopsine (**A5**) ont été testées pour leurs activités antibactérienne, antifongique et antivirale. L'inhibition de la croissance du champignon *Trichophyton mentagrophytes* par l'aplysinopsine (**A1**) a été la seule activité détectée. En 2000, Koh E.G.L. et Sweatman H. ont réalisé un screening consistant à tester l'activité antimicrobienne d'un extrait brut du corail *Tubastreae faulkneri* sur différentes souches microbiennes d'origine marine : *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Alteromonas rubra*, *Synechococcus* sp. et *Staphylococcus aureus*. Toutes ces bactéries marines ont été choisies car elles sont potentiellement présentes dans l'environnement naturel du corail étudié et peuvent donc induire un mécanisme de défense chez ce corail. Dans un premier temps, le screening réalisé, a montré que l'extrait méthanolique de *Tubastreae faulkneri* présentait une activité inhibitrice sur l'ensemble des souches testées hormis celle de *V. parahaemolyticus*. Dans un deuxième temps, l'étude de la composition chimique de cet extrait a révélé qu'il était constitué à 72% de dérivés de l'aplysinopsine : la 6-bromo-2'-dé-*N*-méthylaplysinopsine (**A4**), la 6-bromoaplysinopsine (**A5**) et le dimère **A27**. Les trois composés isolés se sont avérés actifs contre *Synechococcus* sp. Enfin, en 2005, Segraves N.L. et Crews P. ont évalué l'activité antimicrobienne de 5 aplysinopsines (**A12 - A16**) sur *Staphylococcus aureus*. Ces analogues de l'aplysinopsine, isolés des éponges indonésiennes *Thorectandra* sp. et *Smenospongia* sp., ont montré, par comparaison avec le standard de référence, la vancomycine (CMI = 0,625 µg/mL), une activité inhibitrice faible à modérée avec des CMI comprises entre 6,25 et 100 µg/mL.

L'activité antimicrobienne évaluée sur les alcaloïdes **FR1-FR8** isolés de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* avait pour objectif la recherche de potentiels antifouling. A ce jour, la littérature fait mention de 35 alcaloïdes d'origine marine ayant des propriétés antifouling. Parmi ces alcaloïdes, 20 ont été isolés d'éponges marines, notamment des genres *Pseudoceratina*, *Agelas, Callyspongia* et *Haliclona* (Hertiani T. *et al*., 2010 ; Mudianta I.W. *et al*., 2010 ; Thirionet I. *et al*., 2006 ; Wang G.Y.S. *et al*., 1996), 6 proviennent de champignon des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (He F. *et al*., 2012, 2013 ; Nong X.H. *et al*., 2014 ; Zheng C.J. *et al*., 2013), 3 ont été isolés d'une gorgogne du genre *Paramuricea* (Penez N. *et al*., 2011) et 6 du tunicier *Clavelina picta* (Raub M.F. et Cardellina J.H., 1992). Seulement 2 alcaloïdes référencés présentent, comme les métabolites **FR1-FR8,** un noyau

indolique : la 2-bromo-*N*-méthyltryptamine et la 6-bromo-*N*-méthyltryptamine isolées toutes deux de la gorgogne *Paramuricea* sp..



2-bromo-*N*-méthyltryptamine



6-bromo-*N*-méthyltryptamine

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des métabolites **FR1-FR8** a permis d'émettre quelques hypothèses quant à la relation structure-activité antimicrobienne :

- Les composés **FR1**, **FR2** et **FR3** non bromés, n'appartenant pas au groupe des aplysinopsines et constitués uniquement du noyau indolique, ne présentent pas d'activité antimicrobienne hormis la tryptamine (**FR1**) vis-à-vis de la souche *Vibrio carchariae*. ***La présence d'atomes de brome et d'un système tricyclique type aplysinopsine semblent donc deux éléments favorables à l'activité antimicrobienne.***
- Parmi les dérivés de l'aplysinopsine (**FR4-FR8**), seules les dihydroaplysinopsines **FR6**, **FR7** et **FR8** présentent une activité antimicrobienne. ***L'absence d'une double liaison entre les carbones C8 et C1' pourrait donc être un facteur clé de l'activité antimicrobienne.***
- Parmi les dihydroaplysinopsines **FR6-FR8**, l'activité inhibitrice de la croissance des bactéries est plus importante et moins sélective pour **FR6**, monobromé en C-6, que celle de **FR7** et **FR8** dibromés en C-5 et C-6. ***La présence d'un second atome de brome en C-5 conduirait donc à une plus grande sélectivité de l'activité antimicrobienne.***
- Enfin, parmi les dihydroaplysinopsines dibromées, l'activité antimicrobienne de **FR8** est plus importante que celle de **FR7**. Ces deux structures se différencient par la présence supplémentaire d'une fonction carbonyle en C3' pour FR8. ***Le degré d'oxydation du cycle C aurait donc également une influence sur l'activité antimicrobienne des aplysinopsines.***

❖ *Rôle écologique des aplysinopsines*

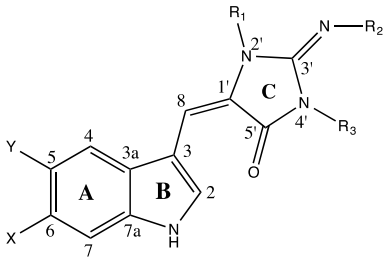
Les aplysinopsines (Figure 40) appartiennent au groupe des métabolites secondaires. Elles ne participent donc pas aux fonctions primaires de l'organisme et ne sont pas considérées comme nécessaires à leur survie. Elles participent en revanche très certainement aux interactions de l'organisme producteur avec son environnement et sont utilisées en réponse aux facteurs biotiques et abiotiques. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à leur rôle écologique.

Hypothèse 1 : L'activité antinéoplasique mise en évidence pour certaines aplysinopsines (Tableau XXVIII) reflète en réalité leur capacité à inhiber la division cellulaire. Cette particularité pourrait aider l'organisme producteur d'aplysinopsines, à inhiber la croissance des espèces entrant en compétition avec lui pour l'occupation de l'espace. Cela a été démontré pour le corail *Tubastreae faulkneri* capable d'inhiber le développement des larves des coraux voisins (Koh E.G.L. et Sweatman H, 2000).

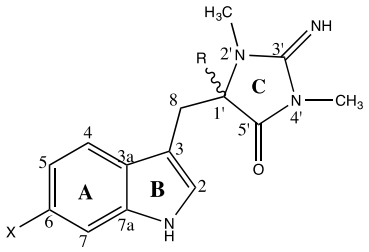
Hypothèse 2 : L'activité modulatrice du système nerveux central démontrée pour certaines aplysinopsines (Tableau XXVIII) serait pour l'organisme un atout dans la lutte contre les prédateurs. Leur affinité pour le récepteur 5-HT_{2C} par exemple, régulant la consommation alimentaire chez les mammifères (Hu J.F. *et al*., 2002) pourrait provoquer un ralentissement de la prise de nourriture des prédateurs. Leur affinité pour le récepteur 5-HT_{2A} impliqué dans la physiopathologie de la dépression (Hu J.F. *et al*., 2002), pourrait quant à elle, être à l'origine d'un effet sédatif sur les prédateurs.

Hypothèse 3 : Les aplysinopsines auraient également un rôle majeur dans la mise en place de relations symbiotiques. Cela a été prouvé par les travaux de Murata M. *et al*., 1986, portant sur les relations symbiotiques de l'anémone de mer *Radianthus kuekenthali* et du poisson clown *Amphiprion perider*. L'étude a montré que les aplysinopsines isolées de l'anémone de mer stimulaient le poisson clown. En effet, ce dernier se met à nager en présence de dihydroaplysinopsines ou à effectuer des mouvements en dent de scie en présence d'aplysinopsines présentant une double liaison entre les carbone C-8 et C-1'. En absence d'aplysinopsines, le poisson reste immobile.

Hypothèse 4 : Enfin, les aplysinopsines accumulées dans les tissus pourraient également être des agents antimicrobiens, permettant à l'organisme de se défendre contre les invasions microbiennes. Seule l'étude de Koh E.G.L. et Sweatman H (2000) portant sur le corail dur *Tubastreae faulkneri* et son activité antibactérienne vis-à-vis de bactéries issues de son environnement naturel, a tenté de vérifier cette hypothèse.

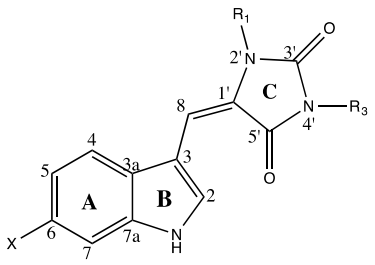


	Composés	X	Y	R_1	R_2	R_3
A1	aplysinopsine	H	H	CH_3	H	CH_3
A2	isoplysine A	H	H	CH_3	CH_3	H
A3	2'-dé-*N*-méthylaplysinopsine	H	H	H	H	CH_3
A4	6-bromo-2'-dé-*N*-méthylaplysinopsine	Br	H	H	H	CH_3
A5	6-bromoaplysinopsine	Br	H	CH_3	H	CH_3
A6	6-bromo-4'-dé-*N*-méthylaplysinopsine	Br	H	CH_3	H	H
A7	méthylaplysinopsine	H	H	CH_3	CH_3	CH_3
A8	4'-déméthyl-3'-*N*-méthylaplysinopsine	H	H	H	CH_3	CH_3
A9	6-bromo-4'-déméthyl-3'-*N*-méthylaplysinopsine	Br	H	H	CH_3	CH_3
A10	5,6-dibromo-2'-déméthylaplysinopsine	Br	Br	H	H	CH_3
A11	*N*-3'-éthylaplysinopsine	H	H	CH_3	CH_2CH_3	CH_3

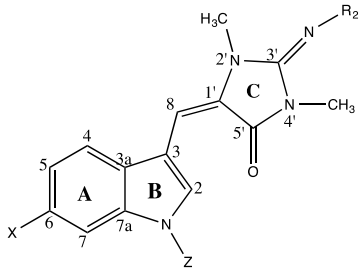


	Composés	X	R
A12	1',8-dihydroaplysinopsine	H	H
A13	6-bromo-1',8-dihydro-aplysinopsine	Br	H
A14	6-bromo-1'-hydroxy-1',8-dihydroaplysinopsine	Br	OH
A15	6-bromo-1'-méthoxy-1',8-dihydroxyaplysinopsine	Br	OCH_3
A16	6-bromo-1'-éthoxy-1',8-dihydroxyaplysinopsine	Br	OCH_2CH_3

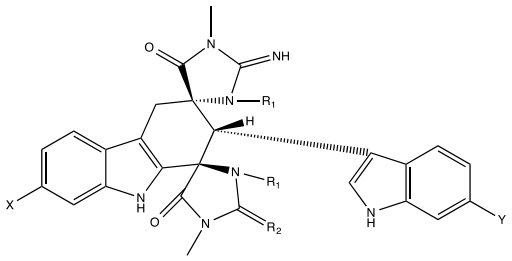
Figure 40 : *Aplysinosines isolées d'organismes marins.*



	Composés	X	R_1	R_3
A17	3'-déimino-3'-oxo-aplysinopsine	H	CH_3	CH_3
A18	6-bromo-3'-déimino-3'-oxoaplysinopsine	Br	CH_3	CH_3
A19	3'-déimino-2',4'-bis(déméthyl)-3'-oxo-aplysinopsine	H	H	H
A20	6-bromo-3'-déimino-2',4'-bis(déméthyl)-3'-oxoaplysinopsine	Br	H	H



	Composés	X	Z	R_2
A21	*N*-propionylaplysinopsine	H	$COCH_2CH_3$	H
A22	6-bromo-*N*-propionylaplysinopsine	Br	$COCH_2CH_3$	H
A23	*N*-méthylaplysinopsine	H	CH_3	H



Composé **24:** X = Br, Y = Br, R_1 = H, R_2 = NH
Composé **25:** X = H, Y = Br, R_1 = CH_3, R_2 = NH
Composé **26:** X = H, Y = H, R_1 = CH_3, R_2 = NH
Composé **27:** X = H, Y = H, R_1 = CH_3, R_2 = O

Figure 40 *Aplysinosines isolées d'organismes marins*. (*Suite*)

Tableau XXVIII: *Origine et bioactivités des aplysinopsines.*
(Bialonska D. et Zjawiony J.K., 2009)

Aplysinopsine	Sources	Bioactivité
A1	*Aplysina* sp., Eponge, Japon *Astroides calycularis,* Corail dur, Méditerranée *Dercitus* sp., Eponge, Caraïbes *Dictyoceratida* (ordre), Eponges, - *Radianthus kuekenthali*, Anémone de mer, Japon *Smenospongia aurea*, Eponge, Caraïbes *Smenospongia* sp., Eponge, Indo-Pacifique *Thorecta* sp., Eponge, Grande Barrière, Australie *Tubastraea aurea,* Corail dur, Japon *Tubastraea faulkneri,* Corail dur, Australie *Tubastraea* sp., Corail dur, Philippines *Tubastraea* sp., Corail dur, Japon *Verongula rigida*, Eponge, Floride *Verongia spengelli*, Eponge, Floride	o Anticancéreux o Antimicrobien o Inhibiteur de la croissance des œufs d'oursins o Impliqué dans la symbiose d'une anémone de mer et de son poisson clown
A2	*Aplysina* sp., Eponge, Japon *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque	o Anticancéreux o Antiplasmodiale
A3	*Dendrophyllia* sp., Corail dur, Philippines *Dercitus* sp., Eponge, Caraïbes *Phestilla melanobrachia*, Mollusque *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque *Tubastrea coccinea,* Corail dur, Hawaii *Verongula rigida*, Eponge, Floride	
A4	*Dercitus* sp., Eponge, Caraïbes *Tubastrea coccinea,* Corail dur, Hawaii *Phestilla melanobrachia*, Mollusque *Dendrophyllia* sp., Corail dur, Philippines *Tubastraea faulkneri,* Corail dur, Australie *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque *Hyrtios erecta*, Eponge, Japon	o Modulateur des récepteurs de la sérotonine o Antiplasmodiale o Inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (nNOS)
A5	*Tubastrea coccinea*, Corail dur, Hawaii *Smenospongia aurea*, Eponge, Caraïbes *Astroides calycularis,* Corail dur, Méditerranée *Radianthus kuekenthali*, Anémone, Japon *Tubastraea faulkneri,* Corail dur, Australie *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque *Smenospongia aurea*, Eponge, Floride	o Modulateur des récepteurs de la sérotonine o Antiplasmodiale o Impliqué dans la symbiose d'une anémone de mer et de son poisson clown
A6	*Smenospongia aurea*, Eponge, Caraïbes	
A7	*Aplysinopsis reticulata*, Eponge, Australie *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque	o Antidépresseur : inhibiteur de la monoamine oxydase
A8	*Dendrophyllia* sp., Corail dur, Philippines *Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque	
A9	*Dendrophyllia* sp., Corail dur, Philippines	
A10	*Hyrtios erecta*, Eponge, Japon	o Inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (nNOS)
A11	*Smenospongia aurea*, Eponge, Jamaïque	o Modulateur des récepteurs de la sérotonine

Tableau XXVIII: *Origine et bioactivités des aplysinopsines*. (*Suite*)
(Bialonska D. et Zjawiony J.K., 2009)

Aplysinopsine	Sources	Bioactivité
A12	*Radianthus kuekenthali*, Anémone, Japon *Thorectandra* sp., Eponge, Indo-Pacifique *Tubastrea coccinea,* Corail dur, Hawaii	o Impliqué dans la symbiose d'une anémone de mer et de son poisson clown
A13	*Radianthus kuekenthali*, Anémone, Japon *Thorectandra* sp., Eponge, Indo-Pacifique *Tubastrea coccinea,* Corail dur, Hawaii	o Antimicrobien
A14	*Thorectandra* sp., Eponge, Indo-Pacifique	o Antimicrobien
A15	*Thorectandra* sp., Eponge, Indo-Pacifique	o Antimicrobien
A16	*Thorectandra* sp., Eponge, Indo-Pacifique	o Antimicrobien
A17	*Thorecta sp*., Eponge, Australie *Tubastraea* sp., Corail dur, Philippines	
A18	*Astroides calycularis,* Corailx dur, Méditerranée *Tubastraea* sp., Corail dur, Philippines	
A19	*Leptopsammia pruvoti*, Corail dur, France	
A20	*Leptopsammia pruvoti*, Corail dur, France *Smenospongia aurea*, Eponge, Caraïbes	
A21	*Astroides calycularis,* Corail dur, Méditerranée	
A22	*Astroides calycularis,* Corail dur, Méditerranée	
A23	*Aplysina* sp., Eponge, Japon	
A24	*Tubastraea faulkneri,* Corail dur, Australie	o Antimicrobien
A25	*Tubastraea* sp., Corail dur, Japon	
A26	*Tubastraea* sp., Corail dur, Japon	
A27	*Tubastraea* sp., Corail dur, Japon	

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse et reportés dans ce manuscrit sont le fruit d'une collaboration entre spécialistes de différentes disciplines scientifiques : la chimie, la systématique des éponges et la microbiologie.

Le principal objectif de cette thèse, au caractère interdisciplinaire, concernait l'étude de 4 éponges issues de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (Mayotte, Madagascar) : *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera* et *Fascaplysinopsis reticulata*.

Les travaux entrepris comprenaient :

- D'une part, l'étude chimique de ces éponges à savoir l'isolement, l'identification et la caractérisation de leurs métabolites secondaires ;
- Et d'autre part, la valorisation des molécules isolées dans les secteurs de la santé et de l'environnement *via* l'évaluation de leurs activités :
  - cytotoxique sur les lignées cancéreuses KB et du mélanome murin,
  - antipaludique,
  - antifouling, c'est à dire inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de 5 souches de bactéries marines : *Roseobacter litoralis, Shewanella putrefaciens, Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus*.
  - inhibitrice du quorum sensing (QSI) de la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* et de ses souches mutantes JAF 375, JMH 597, JMH 612.

L'étude chimique de l'éponge ***Plakortis kenyensis*** a conduit à l'isolement de deux peroxydes cycliques connus isolés d'éponges du genre *Plakortis* : le plakortolide E (**PK1**) et l'acide andavadoïque (**PK2**). Ces deux composés ont montré :

- ***Une activité antipaludique***.

A l'image de nombreux autres peroxydes cycliques isolés des éponges du genre *Plakortis*, ceux-ci possèdent une activité inhibitrice remarquable de la croissance du parasite *Plasmodium falciparum* avec une CI_{50} (µg/mL) de 1,53 ± 0,39 pour le plakortolide E (**PK1**) et de 1,67 ± 0,36 pour l'acide andavadoïque (**PK2**). **PK1** et **PK2** peuvent donc être considérés comme des agents antipaludiques potentiels.

- ***Une activité inhibitrice du quorum sensing de la bactérie marine bioluminescente Vibrio harveyi et de ses souches mutantes***.

Le plakortolide E (**PK1**) possède en effet une très bonne activité inhibitrice de la luminescence sur la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 230 min) et sur la souche mutante JAF 375 (retard de 260 min). Sur les mutants JMH 597 et JMH 612, le retard observé de la luminescence est moindre, avec un temps de décalage inférieur à 200 min. Il est à noter par ailleurs, que le plakortolide E (**PK1**) présente également un effet bactériostatique sur la souche mutante JMH 597.

L'acide andavadoïque (**PK2**) quant à lui, possède une très bonne activité inhibitrice de la luminescence sur la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 270 min) ainsi que sur les souches mutantes JAF 375 (retard de 270 min) et JMH 597 (retard de 200 min). Sur la souche mutante JMH 612, le retard observé de la luminescence est moindre avec un décalage inférieur à 200 min.

L'étude chimique de l'éponge ***Theonella swinhoei*** a conduit à l'isolement de son composé majoritaire, appartenant à la famille des macrocycles polyoxygénés : le swinholide A (**TS1**). Ce macrolide isolé à plusieurs reprises de l'éponge *Theonella swinhoei* est un marqueur chimique de cette espèce et est connu notamment pour son activité cytotoxique sur plusieurs lignées cancéreuses. Les travaux menés au cours de cette thèse, ont démontré pour la première fois que le swinholide A (**TS1**) présente aussi :

- ***Une activité antipaludique***.

Le swinholide A (**TS1**) montre en effet une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}, µg/mL) de la croissance du parasite *Plasmodium falciparum* de 4,73 ± 0,02.

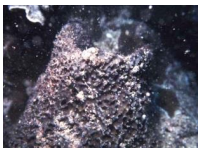
- ***Une activité inhibitrice du quorum sensing de la bactérie marine bioluminescente Vibrio harveyi et de ses souches mutantes***.

Le swinholide A (**TS1**) présente une très bonne activité inhibitrice de la luminescence de la souche sauvage de *Vibrio harveyi* (retard de 260 min). Sur les mutants JAF 375, JMH 597 et JMH 612 en revanche, le retard de la luminescence observé est inférieur à 200 minutes. Au cours de ces tests, le swinholide A a révélé également une activité bactériostatique à 500 min sur le mutant 375.

- ***Une activité antifouling***.

  Le métabolite **TS1** a montré une activité antibactérienne sélective vis-à-vis des souches bactériennes marines *Roseobacter litoralis*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio natrigens* et *Vibrio proteolyticus*. Ce métabolite inhibe en effet la croissance (CMI : 0,01µg/mL) de la bactérie *Vibrio natrigens*. Il est en revanche un bon activateur de la croissance et de l'adhésion des cinq autres souches bactériennes testées.

L'étude chimique de l'éponge ***Haliclona fascigera*** a conduit à l'isolement de son composé majoritaire : l'acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (**HF1**). Il s'agit d'un acide gras nouveau, de structure originale avec la présence d'un oxacyclobutane et d'une fonction acétylénique terminale. Si les acides gras acétyléniques sont retrouvés dans de nombreuses éponges des genres *Petrosia*, *Xestospongia*, *Oceanapia*, *Steletta* et *Pellina*, aucun d'entre eux en revanche, ne présente comme c'est le cas pour **HF1**, un oxacyclopropane dans sa structure. **HF1** n'a par ailleurs montré aucune activité biologique recherchée.



Enfin, l'étude chimique de l'éponge ***Fascaplysinopsis reticulata*** a permis l'isolement de 8 alcaloïdes indoliques dérivés d'un acide α-aminé, le tryptophane :

- la tryptamine (**FR1**),
- la 8-oxo-tryptamine (**FR2**),
- la 6,6'-bis-(débromo)-gelliusine F (**FR3**),
- le mélange (*E*/*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-aplysinopsine (**FR4**-**FR5**),
- le 6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**),
- le 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**),
- le 5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**).

Cinq d'entre eux présentent la particularité d'être bromés (**FR4-FR5**, **FR6**, **FR7**, **FR8**) et cinq sont de structures nouvelles (**FR2**, **FR3**, **FR6**, **FR7**, **FR8**). Les alcaloïdes **FR4**, **FR5**, **FR6**, **FR7** et **FR8** sont plus précisément des dérivés de l'aplysinopsine, alcaloïde tricyclique isolé pour la première fois en 1977 d'une éponge du genre *Thorecta* (finalement reclassée dans le genre *Aplysinopsis*). On compte aujourd'hui un peu moins d'une trentaine d'analogues de l'aplysinopsine isolés d'éponges mais aussi de coraux durs (scléractiniaires),

d'anémones de mer et de nudibranches du Pacifique, d'Indonésie, des Caraïbes et de Méditerranée. Ces 8 alcaloïdes ont montré des activités biologiques intéressantes :

- ***Une activité antipaludique***.

  Avec des CI_{50} inférieures à 15 µg/mL, **FR2**, le mélange **FR4-FR5** et **FR7**, montrent une bonne activité antiplasmodium. Ils peuvent donc être considérés comme des agents antipaludiques potentiels.

- ***Une activité antifouling***.

  - **FR1**, **FR7**, **FR8** et tout particulièrement **FR6** constituent des molécules à activité antifouling potentielle.
  - **FR1** inhibe la croissance (CMI 1 µg/mL) de *Vibrio carchariae*.
  - **FR6** inhibe la croissance (CMI 100 µg/mL) de *Shewanellia putrefaciens*, la croissance (CMI 0,01 µg/mL) et l'adhésion (CMI 100 µg/mL) de *Vibrio natrigens* ainsi que l'adhésion (CMI 100 µg/mL) de *Vibrio carchariae*.
  - **FR7** inhibe la croissance (CMI 1 µg/mL) de *Vibrio natrigens*.
  - **FR8** inhibe la croissance (CMI 0,01 µg/mL) de *Vibrio natrigens* ainsi que la croissance (CMI 1 µg/mL) et l'adhésion (CMI 0,01 µg/mL) de *Roseobacter littoralis*.

Au regard des résultats obtenus au cours de nos travaux de thèse, plusieurs pistes d'étude, pour une réelle valorisation des molécules isolées, pourraient être examinées :

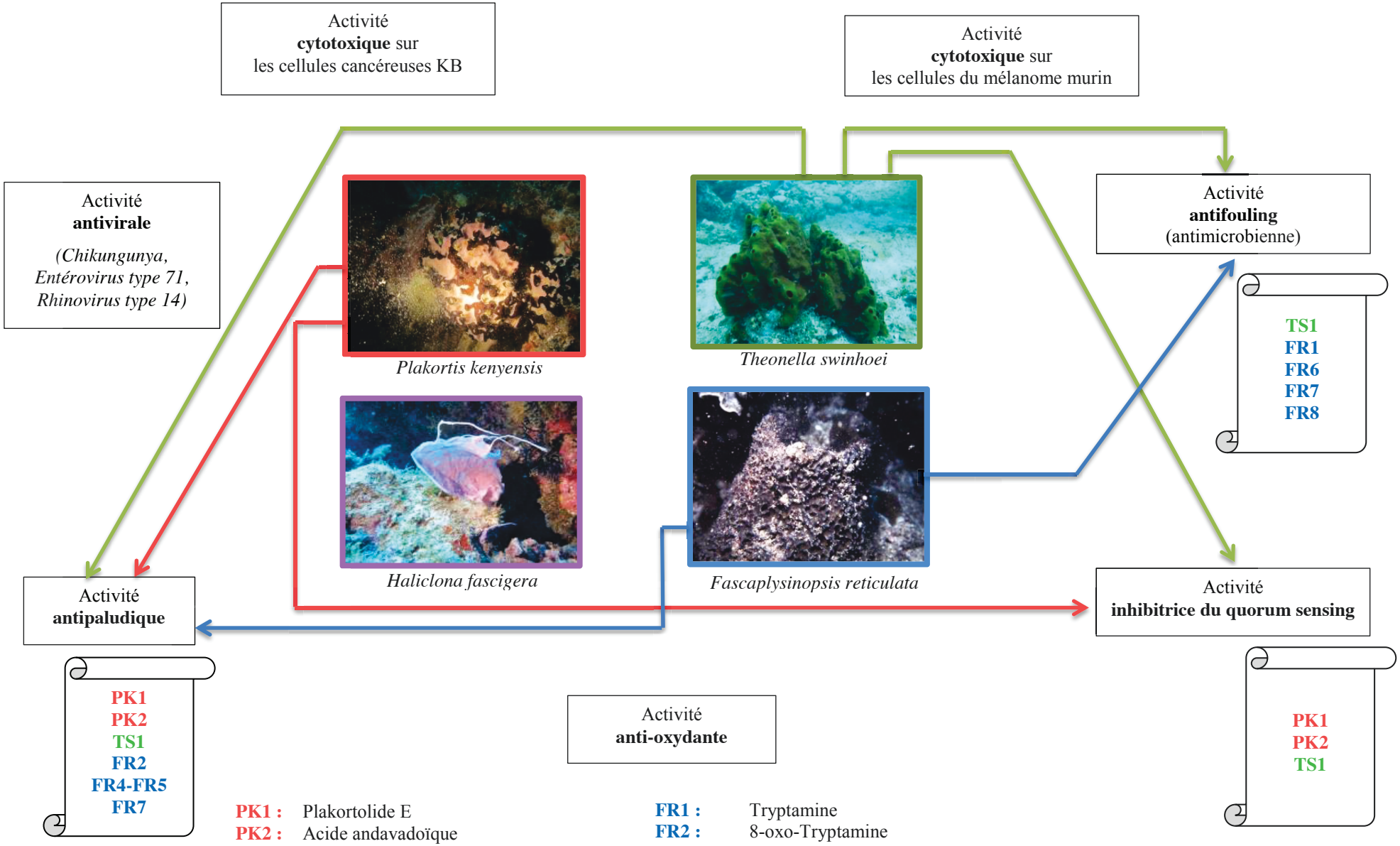
Piste 1 : L'activité antipaludique.

Il pourrait être envisagé l'étude de la relation structure-activité des peroxydes cycliques isolés du genre *Plakortis* dont le plakortolide E (**PK1**) et l'acide andavadoïque (**PK2**) qui constituent un réel espoir pour la recherche de molécules antipaludique.

Piste 2 : L'activité antifouling.

Les biofilms bactériens représentent une des étapes pionnières dans l'établissement des salissures marines, suivie par la colonisation des algues et des organismes supérieurs, ou dans l'installation de maladies chroniques difficilement soignables. L'enjeu majeur, aujourd'hui, est d'empêcher l'établissement des biofilms en agissant

sur les primo-colonisateurs des surfaces. Ainsi, le plakortolide E (**PK1**), l'acide andavadoique (**PK2**) et le swinholide A (**TS1**) présentant une activité QSI sur la souche bactérienne bioluminescente *Vibrio harveyi* et ses souches mutantes ainsi que les alcaloïdes isolés de *Fascaplysinopsis reticulata* présentant une activité antimicrobienne sur des souches de bactéries marines constituent de potentiels agents antifouling. Il s'agit à présent de confirmer et approfondir les premiers résultats obtenus en élargissant par exemple le spectre d'action des molécules antibactériennes aux bactéries à Gram-positif et aux micro-algues. Il serait intéressant de réaliser également des tests dans les conditions réelles du fouling. Par la suite, des études de formulation pourront être réalisées afin d'adapter les molécules dont l'activité antifouling est avérée, à une utilisation comme peinture et éventuellement cibler d'autres applications soit dans le domaine médical (instruments médicaux, de biomatériaux, cathéters, prothèses, implants) soit dans le domaine de l'agroalimentaire (fabrication de revêtements, de contenants et d'emballages).



PK1 : Plakortolide E
PK2 : Acide andavadoïque
TS1: Swinholide A
HF1: Acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque

FR1 : Tryptamine
FR2 : 8-oxo-Tryptamine
FR3 : 6,6'-bis-(débromo)-Gelliusine F
FR4-FR5 : (*E*/*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-Aplysinopsine
FR6 : 6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine
FR7 : 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine
FR8 : 5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-Dihydroaplysinopsine

Organigramme 2 : *Bilan Eponges / Molécules / Activités*

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Procédures générales

I.1 Les solvants et les réactifs

I.1.1 Les solvants

Les extractions et les premiers fractionnements sur colonnes chromatographiques ouvertes, ont été réalisés au moyen de solvants (Fischer Scientific et Acros Organics) à 99% de pureté. Les séparations par CLHP ont été réalisées à l'aide de solvants de qualité CLHP ou 100% de pureté (SDS). L'utilisation d'eau milliQ a été préconisée pour les premiers fractionnements et ceux par CLHP.

I.1.2 Les réactifs

- Acide acétique (pour CLHP) : Sigma Aldrich
- Acide acétique glacial : Fisher Scientific
- Acide formique : Sigma Aldrich
- Acide sulfurique concentré : Fisher Scientific
- Acide tartrique : Acros Organics
- Aldéhyde anisique : Acros Organics
- Cholestérol : Janssen Chimica
- Iodure de potassium : Sigma Aldrich
- Vanilline : Sigma Aldrich

I.2 Les techniques d'extraction des éponges

I.2.1 La lyophilisation

La lyophilisation des éponges avant extraction a été réalisée au moyen de deux lyophilisateurs :

- Lyophilisateur Cosmos -80°C CRYOTEC
- Lyophilisateur Crios -80°C CRYOTEC

I.2.2 L'extraction accélérée par solvant

L'extraction accélérée par solvant des éponges lyophilisées a été réalisée au moyen d'un extracteur automatisé Dionex ASE 300.

I.3 Les techniques chromatographiques

I.3.1 Chromatographie sur couche Mince (CCM)

Les CCM analytiques ont été effectuées sur plaque de gel de silice (SI60-F_{254}, Merck) de 0,2 mm d'épaisseur. Différents mélanges d'éluant ont été utilisés pour la migration des plaques CCM :

- Isohexane/AcOEt 20:80 (v/v)
- Isohexane/AcOEt 80:20 (v/v)
- DCM/MeOH 90:10 (v/v)
- DCM/MeOH 95:5 (v/v)

Les plaques ont été révélées sous UV (λ= 254 et 365 nm), puis par pulvérisation de différents réactifs : vanilline sulfurique, anisaldéhyde et Dragendorff, préparés selon les modes opératoires suivants (Tableau XXIX).

Tableau XXIX: *Révélateurs utilisés pour les CCM.*

Réactifs	Préparation/Application	Substances Détectées
Anisaldéhyde	Mélanger dans l'ordre 0,5 mL d'aldéhyde anisique avec 10 mL d'acide acétique (CH_3COOH) glacial, 85 mL de méthanol et 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) conc. Pulvériser, puis révéler en chauffant.	Réactif polyvalent
Vanilline sulfurique	2 g de vanilline sont ajoutés à 98 mL d'éthanol et 5 mL d'acide sulfurique concentré. C'est un réactif polyvalent. Révéler en chauffant (100°C pendant 5-10 min.)	Réactif polyvalent
Dragendorff	***Solution A :*** Dissoudre 0,85 g de nitrate basique de bismuth, 10g d'acide tartrique dans 40 mL d'eau. ***Solution B :*** Dissoudre 16 g d'iodure de potassium (KI) dans 40 mL d'eau. Au moment de l'emploi, mélanger 5 mL de solution A + 5 mL de solution B + 100 mL d'eau + 20 g d'acide tartrique. Révéler par pulvérisation (Vis : orange)	Alcaloïdes

I.3.2 Chromatographie liquide sur Colonnes Ouvertes (CCO)

Les CCO ont été réalisées dans des colonnes en verre de diamètre interne 4,5 cm ou 2,5 cm en utilisant soit de la silice (Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 70-230 Mesh) soit de la Sephadex® LH20 (25-100 µm, Sigma Aldrich).

I.3.3 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP)

Les séparations par CLMP ont été effectuées au moyen d'un système Sepacore® (Buchi) 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*36 mm, remplie de gel de silice (Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 70-230 Mesh).

I.3.4 Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les CLHP ***analytiques*** ont été réalisées sur trois systèmes différents :

- Une chaîne analytique Alliance Waters® 2695, pilotée par le logiciel Empower™ 2, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de photodiodes PAD (190-600 nm, Waters 2998), (2) un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Waters 2420), et (3) un spectromètre de masse SM (Waters Micromass ZQ 2000).
- Une chaîne analytique Dionex Ultimate 3000 (Thermo scientific), pilotée par le logiciel Chroméléon, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de diodes DAD (190-600 nm) (Thermo scientific), et (2) un détecteur d'aérosols chargés Corona équipé d'un générateur de diazote de type Alliance (Thermo scientific).
- Une chaîne analytique Agilent 1100 series, pilotée par le logiciel Chemstation, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de photodiodes PAD (190-600 nm) (Serie Agilent 1100 G1315B) et (2) un spectromètre de masse SM (Serie Agilent 1100 G1956A) équipé d'un générateur d'azote de type Claino.

Les colonnes analytiques utilisées ont été les suivantes :

- La colonne Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm.
- La colonne Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm.

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

- 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 ont été les suivantes :

- La colonne Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10*150 mm
- La colonne Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 15*120 mm

I.4 Analyses physiques et spectrales des composés

I.4.1 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.

I.4.2 La spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption IR ont été mesurés sur un spectromètre Perkin Elmer spectrum 100 FT-IR.

I.4.3 La spectroscopie de masse haute résolution (SMHR)

Les spectres de masse haute résolution en Ionisation Electrospray (mode positif ESI^+ ou mode négatif ESI^-) ont été réalisés sur un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT Premier XE, Waters). Les échantillons ont été solubilisés dans du MeOH ou de l'ACN selon leur solubilité, et 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→0:100 pendant 7min) était de 0,3 $mL.min^{-1}$.

I.4.4 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN proton (^{1}H) et carbone (^{13}C) ont été réalisés sur les appareillages Bruker Ultrashield Avance 300 MHz, 500 MHz et 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. Les constantes de couplages *J* sont exprimées en Hertz. L'attribution des signaux se fait comme suit : *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *qt* (quintuplet), *m* (multiplet), *dd* (doublet de doublet), *ddd* (doublet de doublet de doublet), *br* (signal large) 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), avec l'utilisation du logiciel NMR Notebook.

II. Etude chimique des éponges

II.1 Collecte

A l'exception des éponges *Theonella* sp. et *Plakortis kenyensis* collectées en Décembre 2011 dans le Sud-Ouest de Madagascar aux lieux-dits Baie des Assassins et Dos de la Baleine, toutes les éponges étudiées dans le cadre de cette thèse proviennent de la collecte du Mai 2013, réalisée dans le Sud-Ouest de Mayotte. Après la collecte, les éponges étudiées (Annexe 1) ont été étiquetées et conservées au congélateur (- 20°C) jusqu'à leur extraction.

II.2 Extraction

II.2.1 Extraction par macération à froid

Les éponges préalablement décongelées, sont découpées en morceaux de 1 cm * 1 cm environ ; après congélation à -80°C, les morceaux sont lyophilisés, pesés, et placés dans un mélange MeOH/DCM (1:1 v/v), puis AcOEt. L'ensemble est laissé à macérer à température ambiante pendant 2 × 12 heures pour le mélange MeOH/DCM et 1 × 12 heures pour l'AcOEt.

Après filtration par gravité sur papier filtre, les différents solvants sont évaporés sous vide. Les extraits bruts obtenus sont alors pesés et conservés au froid.

II.2.2 Extraction accélérée par solvant (ASE)

Les éponges préalablement décongelées, sont découpées en morceaux de 1 cm * 1 cm environ ; après congélation à -80°C, les morceaux sont lyophilisés, pesés, et placés dans les cellules d'ASE de volume 34 mL. Trois extractions ont été réalisées selon les conditions opératoires données dans le tableau XXX :

- Une première extraction au moyen de 85 mL d'eau afin d'éliminer les sels contenus dans l'éponge.
- Une deuxième et une troisième extraction au moyen d'un mélange DCM/MeOH (50:50 v/v). Entre ces deux extractions la cellule est retournée.

Les phases organiques de la deuxième et troisième extraction sont ensuite réunies, filtrées sur papier filtre (Whatman), puis évaporées sous pression réduite. L'extrait « sec » est repris dans du DCM, puis dans du MeOH. L'ensemble est centrifugé. Le surnageant est prélevé et évaporé sous pression réduite. L'extrait brut obtenu est alors pesé et conservé au froid.

Tableau XXX: *Conditions d'utilisation de l'ASE.*

Paramètres ASE	
Température	45°C
Nombre de cycle	5
Temps de pause	5 minutes/cycle
Flush Volume	100%
Temps de purge	120 sec.
Pression moyenne	100 bar

II.2.3 Bilan des extractions des invertébrés marins étudiées

Le bilan des extractions réalisées sur l'ensemble des invertébrés marins est donné dans l'annexe 1.

II.3 Réalisation des signatures chimiques

Chaque extrait brut d'éponges a été soumis à :

- Une analyse RMN ^{1}H réalisée dans $CDCl_3$ ou dans CD_3OD, et enregistrée sur un spectromètre Bruker Ultrashield Avance 300 MHz.
- Une analyse CLHP réalisée dans les conditions suivantes :

Colonne	:	Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm. Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm.
Eluant	:	H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient	:	98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (35 min)
Débit	:	1 $mL.min^{-1}$
Détection	:	UV PAD/DEDL/SM

II.4 Fractionnement, isolement, purification des différentes éponges

II.4.1 Cas de l'éponge *Plakortis kenyensis*

Les étapes de fractionnement 1 à 5 présentées ci-après ont fait l'objet d'un suivi par :

- CCM de silice, éluées avec un mélange iso-hexane / acétate d'éthyle 80:20 et 20:80 (V/V). Les plaques ont été révélées aux UV254, avant pulvérisation des révélateurs : anisaldéhyde et Dragendorff.
- CLHP DAD/Corona/SM analytique réalisée selon les conditions suivantes :

Colonne	:	Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant	:	H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient	:	98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (35 min)
Débit	:	1 $mL.min^{-1}$
Détection	:	UV DAD/Corona/SM

❖ **<u>Fractionnement 1</u>**

L'extrait brut de *Plakortis kenyensis* (950,0 mg) obtenu par macération au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de Sephadex ® LH20, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne	:	L = 50 cm ; d.i. = 4,5 cm
Phase stationnaire	:	Sephadex LH20
Volume des fractions	:	25 mL
Gradient d'élution	:	MeOH/DCM 100:0 → 50:50

Cela a permis de récupérer 6 fractions : **F1** (300,0 mg), **F2** (470,0 mg), **F3** (40,0 mg), **F4** (32,0 mg), **F5** (30,0 mg) et **F6** (5,0 mg).

❖ **Fractionnement 2**

En raison de leurs profils CCM et CLHP identiques, les fractions **F2**, **F3** et **F4** ont été réunies en une seule fraction **F234** (542,0 mg) et soumises à une filtration sur gel de Sephadex LH20 selon les conditions suivantes :

Colonne	:	L = 50 cm ; d.i. = 4,5 cm
Phase stationnaire	:	Sephadex LH20
Volume des fractions	:	25 mL
Gradient d'élution	:	MeOH/DCM 100:0 → 50:50

Ceci a permis l'obtention de 6 fractions : **F234-1** (1,0 mg), **F234-2** (90,0 mg), **F234-3** (52,0 mg), **F234-4** (376,0 mg), **F234-5** (10,0 mg) et **F234-6** (7,0 mg).

❖ **Fractionnement 3**

En raison de leurs profils CCM et CLHP identiques, les fractions **F234-3**, **et F234-4** ont été réunies en une seule fraction **F234-34** (428,0 mg) et soumises à une filtration sur gel de Sephadex LH20 selon les conditions suivantes :

Colonne	:	L = 50 cm ; d.i. = 2,5 cm
Phase stationnaire	:	Sephadex LH20
Volume des fractions	:	25 mL
Gradient d'élution	:	MeOH/DCM 100:0 → 50:50

Ceci a permis l'obtention de 6 fractions : **F234-34-1** (36,0 mg), **F234-34-2** (334,0 mg), **F234-34-3** (30,0 mg), **F234-34-4** (9,0 mg), **F234-34-5** (7,0 mg) et **F234-34-6** (2,0 mg).

❖ **Fractionnement 4**

La fraction **F234-34-2** (334,0 mg), riche en **PK1** et **PK2** a été soumise au fractionnement par Chromatographie Liquide Moyenne Pression (**CLMP**) selon les conditions suivantes :

Colonne	:	L = 46 cm ; d.i. = 3,6 cm
Phase stationnaire	:	Gel de silice
Eluant	:	Isohexane/AcOEt

Volume des fractions : 18 mL
Gradient d'élution : 80:20 (5 min.) ; 80:20 → 0:100 (95 min.)
Débit : 10 mL/min.

Ce fractionnement a permis l'obtention de 17 fractions : **F234-34-2a** (50,0 mg), **F234-34-2b** (5,0 mg), **F234-34-2c** (11,0 mg), **F234-34-2d** (2,0 mg), **F234-34-2e** (3,0 mg), **F234-34-2f** (23,0 mg), **F234-34-2g** (1,0 mg), **F234-34-2h** (4,0 mg), **F234-34-2i** (10,0 mg), 1 **F234-34-2j** (154,0 mg), **F234-34-2k** (5,0 mg), **F234-34-2l** (1,0 mg), **F234-34-2m** (2,0 mg), **F234-34-2n** (26,0 mg), **F234-34-2o** (6,0 mg), **F234-34-2p** (2,0 mg), **F234-34-2q** (3,0 mg).

❖ **Fractionnement 5**

Les fractions **F234-34-2a** (50 mg) et **F234-34-2j** (154,0 mg) ont permis l'obtention des deux composés majoritaires purs : le plakortolide E (**PK1**, 3,2 mg) et l'acide andavadoïque (**PK2**, 4,0 mg) respectivement, après purification par CLHP analytique selon les conditions suivantes :

Colonne : Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 65:35 (5 min) ; 65:35 → 0:100 (60 min)
Débit : 1 $mL.min^{-1}$
Détection : UV (210 nm)

II.4.2 Cas de l'éponge *Theonella swinhoei*

Les étapes de fractionnement 1, 3, 4, 5 présentées ci-après ont fait l'objet d'un suivi par :

- CCM de silice, éluées avec un mélange iso-hexane / acétate d'éthyle 80:20 et 20:80 (V/V). Les plaques ont été révélées aux UV254, avant pulvérisation des révélateurs : anisaldéhyde et Dragendorff.
- CLHP UV DAD/Corona/SM réalisée selon les conditions suivantes :

Colonne : Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (35 min)
Débit : 1 $mL.min^{-1}$
Détection : UV DAD/Corona/SM

L'étape de fractionnement 2 présentée ci-après a fait l'objet d'un suivi par :

- CLHP UV PAD/DEDL/SM réalisée selon les conditions suivantes :

Colonne : Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (35 min)
Débit : 1 $mL.min^{-1}$
Détection : UV PAD/DEDL/SM

❖ Fractionnement 1

L'extrait brut de *Theonella swinhoei* (970,0 mg) obtenu par macération au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH, a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de Sephadex ® LH20, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 50 cm ; d.i. = 4,5 cm
Phase stationnaire : Sephadex LH20
Volume des fractions : 25 mL
Gradient d'élution : MeOH/DCM 100:0 → 50:50

Cela a permis de récupérer 6 fractions : **F1** (20,0 mg), **F2** (400,0 mg), **F3** (200,0 mg), **F4** (206,0 mg), **F5** (8,0 mg) et **F6** (12,0 mg).

❖ Fractionnement 2

En raison de leurs profils CCM et CLHP identiques, les fractions **F2**, **F3** et **F4** ont été réunies en une seule fraction **F234** (806,0 mg) et soumises à une filtration sur gel de Sephadex LH20 selon les conditions suivantes :

Colonne : L = 50 cm ; d.i. = 4,5 cm
Phase stationnaire : Sephadex LH20
Volume des fractions : 25 mL
Gradient d'élution : MeOH/DCM 100:0 → 50:50

Ceci a permis l'obtention de 6 fractions : **F234-1** (10,0 mg), **F234-2** (43,0 mg), **F234-3** (260,0 mg), **F234-4** (95,0 mg), **F234-5** (174,0 mg) et **F234-6** (36,0 mg).

❖ Fractionnement 3

En raison de leurs profils CCM et CLHP identiques, les fractions **F234-4**, **et F234-5** ont été réunies en une seule fraction **F234-45** (269,0 mg) et soumises à une filtration sur gel de Sephadex LH20 selon les conditions suivantes :

Colonne	:	L = 50 cm ; d.i. = 2,5 cm
Phase stationnaire	:	Sephadex LH20
Volume des fractions	:	25 mL
Gradient d'élution	:	MeOH/DCM 100:0 → 60:40

Ceci a permis l'obtention de 4 fractions : **F234-45-1** (2,0 mg), **F234-45-2** (30,0 mg), **F234-45-3** (20,0 mg), **F234-45-4** (146,0 mg).

❖ Fractionnement 4

La fraction **F234-45-4** (146,0 mg), riche en **TS1** a été soumise au fractionnement par **CLMP** selon les conditions suivantes :

Colonne	:	L = 46 cm ; d.i. = 3,6 cm
Phase stationnaire	:	Gel de silice
Eluant	:	Isohexane/AcOEt
Volume des fractions	:	18 mL
Gradient d'élution	:	80:20 (5 min.) ; 80:20 → 0:100 (95 min.)
Débit	:	10 mL/min.

Ce fractionnement a permis l'obtention de 17 fractions : **F234-45-4a** (1,0 mg), **F234-45-4b** (31,0 mg), **F234-45-4c** (1,0 mg), **F234-45-4d** (2,0 mg), **F234-45-4e** (3,0 mg), **F234-45-4f** (4,0 mg), **F234-45-4g** (1,0 mg), **F234-45-4h** (4,0 mg), **F234-45-4i** (10,0 mg), 1 **F234-45-4j** (5,0 mg), **F234-45-4k** (5,0 mg), **F234-45-4l** (12,0 mg), **F234-45-4m** (5,0 mg), **F234-45-4n** (5,0 mg), **F234-45-4o** (6,0 mg), **F234-45-4p** (2,0 mg), **F234-45-4q** (4,0 mg), **F234-45-4r** (1,0 mg), **F234-45-4s** (11,0 mg), **F234-45-4t** (4,0 mg)**.**

❖ Fractionnement 5

La fraction F**234-45-4b** (31,0 mg) a permis l'obtention du composé majoritaire connu : le swinholide A (**TS1**, 5 mg), après purification par CLHP analytique selon les conditions suivantes :

Colonne	:	Atlantis T3 RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant	:	H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF

Gradient : 65:35 (5 min) ; 65:35 → 0:100 (60 min)
Débit : 1 mL.min^{-1}
Détection : UV (280 nm)

II.4.3 Cas de l'éponge *Haliclona fascigera*

❖ **Fractionnement 1**

L'extrait brut d'*Haliclona fascigera* (440,0 mg) obtenu par ASE au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH, a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de RP-18, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 10 cm ; d.i. = 15 cm
Phase stationnaire : RP-18
Volume des fractions : 28 mL
Gradient d'élution : Eau/MeOH/DCM 100:0:0 ; 75:25:0 ; 50:50:0 ; 25:75:0 ; 0:100:0 ; 0:75:25 ; 0:50:50 ; 0:25:75 ; 0:0:100.

Cela a permis de récupérer 9 fractions : **F1** (4,1 mg), **F2** (28,0 mg), **F3** (10,7 mg), **F4** (4,2 mg), **F5** (8,8 mg), **F6** (22,6 mg), **F7** (285,7 mg), **F8** (83,3 mg), **F9** (20,5 mg).

Un contrôle des fractions par CLHP-DEDL-PAD-SM a été effectué selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (40 min)
Débit : 1 mL.min^{-1}
Détection : DEDL/PAD/SM

❖ **Fractionnement 2**

Les fractions **F6**, **F7**, **F8**, riches en **HF1**, ont été rassemblées en une fraction **F678** (391,6 mg), puis soumises à un fractionnement par CLHP préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 10*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 90:10 (5 min) ; 90:10 → 0/100 (20 min)
Débit : 10 mL.min^{-1}
Détection : UV (201 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention du composé **HF1** (6,4 mg), dont la pureté a été contrôlée en CLHP analytique selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (40 min)
Débit : 1 $mL.min^{-1}$
Détection : DEDL/PAD/SM

II.4.4 Cas de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata*

Les étapes de fractionnement 1 à 7 présentées ci-après ont fait l'objet d'un suivi par :

- CLHP PAD/DEDL/SM réalisée selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (40 min)
Débit : 1 $mL.min^{-1}$
Détection : PAD/DEDL/SM

❖ **<u>Fractionnement 1</u>**

L'extrait brut de *Fascaplysinopsis reticulata* (2,91 g) obtenu par ASE au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH, a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de RP-18, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 10 cm ; d.i. = 15 cm
Phase stationnaire : RP-18
Volume des fractions : 30 mL
Gradient d'élution : Eau/MeOH/DCM 100:0:0 ; 90:10:0 ; 80:20:0 ; 70:30:0 ; 60:40:0 ; 50:50:0 ; 25:75:0 ; 0:100:0 ; 0:75:25 ; 0:50:50 ; 0:25:75 ; 0:0:100.

Cela a permis de récupérer 12 fractions : **F1** (103,1 mg), **F2** (200,8 mg), **F3** (330,3 mg), **F4** (355,4 mg), **F5** (99,1 mg), **F6** (51,1 mg), **F7** (266,8 mg), **F8** (59,4 mg), **F9** (163,0 mg), **F10** (159,7 mg), **F11** (87,5 mg), **F12** (10,8 mg).

❖ **<u>Fractionnement 2</u>**

La fraction **F2** a permis l'obtention des composés **FR1** (5,0 mg) et **FR3** (0,6 mg) purs après un fractionnement par CLHP préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 10*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 90:10 (5 min) ; 90:10 → 0/100 (20 min)
Débit : 10 $mL.min^{-1}$
Détection : UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

❖ **Fractionnement 3**

La fraction **F3** a permis l'obtention des composés **FR1** (3,0 mg) et **FR3** (2,4 mg) purs après un fractionnement par CLHP préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 10*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (45 min)
Débit : 10 $mL.min^{-1}$
Détection : UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

❖ **Fractionnement 4**

La fraction **F4** a permis l'obtention des composés **FR1** (3,0 mg), **FR4-FR5** (3,0 mg) et **FR6** (2,0 mg) purs après un fractionnement par CLHP préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 10*150 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (45 min)
Débit : 10 $mL.min^{-1}$
Détection : UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

❖ **Fractionnement 5**

La fraction **F5** a permis l'obtention des composés **FR1** (1,6 mg), **FR2** (0,8 mg), **FR6** (4,4 mg) et **FR8** (1,0 mg) purs après un fractionnement par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 15*120 mm
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 90:10 (5 min) ; 90:10 → 0/100 (20 min)
Débit : 4,5 $mL.min^{-1}$
Détection : UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

❖ Fractionnement 6

La fraction **F6** a permis l'obtention des composés **FR1** (1,6 mg), **FR2** (0,5 mg), **FR4-FR5** (10,0 mg) et **FR7** (4,0 mg) purs après un fractionnement par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

Colonne	**:**	Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 15*120 mm
Eluant	**:**	H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient	**:**	98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (45 min)
Débit	**:**	4,5 $mL.min^{-1}$
Détection	**:**	UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

❖ Fractionnement 7

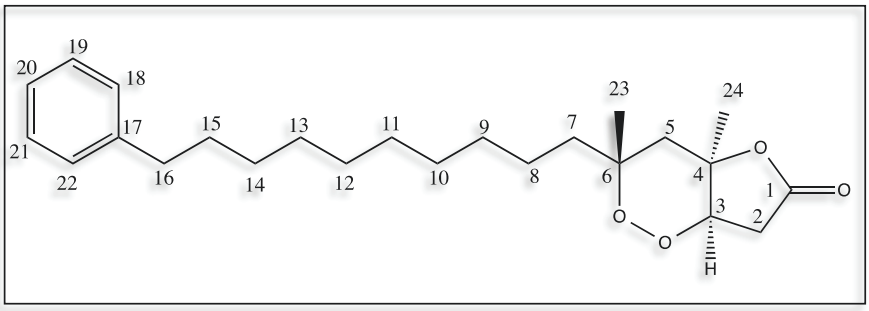
La fraction **F7** a permis l'obtention des composés **FR4-FR5** (2,0 mg) purs après un fractionnement par CLHP préparative selon les conditions suivantes :

Colonne	**:**	Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 10*150 mm
Eluant	**:**	H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient	**:**	98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (45 min)
Débit	**:**	10 $mL.min^{-1}$
Détection	**:**	UV (280 nm, 254 nm, 210 nm)

III. Caractéristiques physiques et spectrales des produits isolés

III.1 Cas de l'éponge *Plakortis kenyensis*

❖ Plakortolide E (PK1)



Aspect : Pâte brune

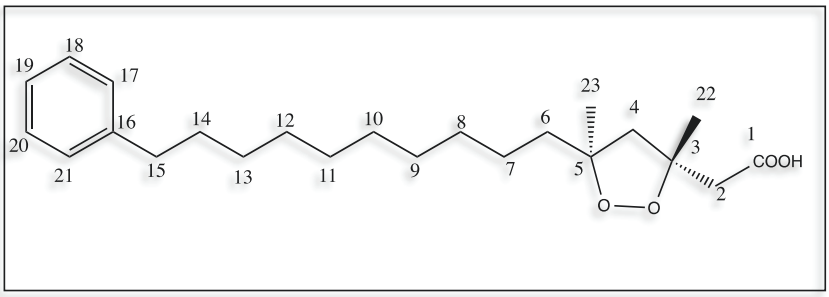
Formule brute : $C_{24}H_{36}O_4$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 388,2611 (valeur calculée pour $C_{24}H_{36}O_4$: *m/z* 388,5412)

$[\alpha]_D^{25}$ + 9,97 (*c* 0,5 mg/100 mL, DCM)

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 2,70-2,91 (H2, H2', dd, *8,7*, *15,6*), 4,44 (H3, dd, *8,5*, *12,3*), 1,71-2,17 (H5, H5', dd, *8,6*, *14,3*), 1,25-1,50 (H7, H7', br m), 1,25 (H8-H14, br), 1,58 (H15, m), 2,60 (H16, t, *7,8*), 7,20 (H18, H20, H22, m), 7,25 (H19, H21, m)

❖ Acide andavadoïque (PK2)



Aspect : huile jaune pâle

Formule brute : $C_{23}H_{36}O_4$

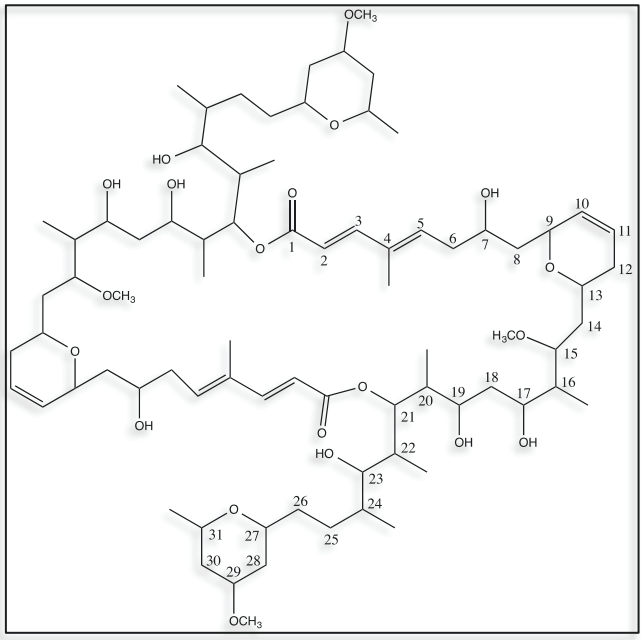
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 376, 2611 (calculée pour $C_{23}H_{36}O_4$: *m/z* 376,5305)

$[\alpha]_D^{25}$ = +33,52 (*c* 0,5 mg/100 mL, DCM)

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 2,67-2,71 (H2, H2', dd, *7,5*, *12,5*), 2,20-2,37 (H4, H4', dd, *8,3*, *14,4*), 1,70 (H6, m), 1,50 (H7, m), 1,20 (H8-H13, m), 1,54 (H14, m), 2,53 (H15, t, *7,6*), 7,10 (H17, H19, H21, m), 7,20 (H18, H20, m), 1,22 (H22, s), 1,40 (H23, s)

III.2 Cas de l'éponge *Theonella swinhoei*

❖ Swinholide A (TS1)



Aspect : pâte brune

Formule brute : $C_{78}H_{132}O_{20}$

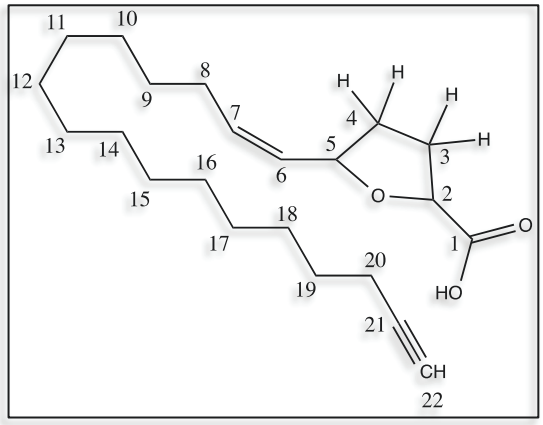
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 1388,7482 (calculée pour $C_{78}H_{132}O_{20}$, 1388,8738)

$[\alpha]_D^{25}$: -64,7° (*c* 0,5 mg/100 mL, DCM)

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,79 (H2, d, *15,6*), 7,58 (H3, d, *15,8*), 1,79 (4-Me, s), 6,07 (H5, dd, *3,4, 6,3*), 2,16 (H6, d, *13,5*), 2,44 (H6', ddd, *4,8, 10,2, 13,7*), 4,14 (H7, br dd, *6,7, 7,8*), 1,58-1,63 (H8, m), 4,49 (H9, brd, *8,5*), 5,69 (H10, brdd, *8,5, 10,4*), 5,78 (H11, brd, *14,9*), 1,82-2,27 (H12, m), 3,80 (H13, m), 1,46 (H14, ddd, 5,2, 9,8, 12,3), 2,14 (H14', m), 3,99 (H15, m), 3,35 (15-OMe, s), 1,68 (H16, m), 0,81 (16-Me, d, *6,6*), 3,80 (H17, dd, *3,7, 8,5*), 1,62-1,69 (H18, m), 3,97 (H19, m), 1,75 (H20, dqt, *7,2, 10,5, 14,2, 53,2*), 0,97 (20-Me, d, *6,7*), 5,35 (H21, d, *10,9*), 1,95 (H22, m), 0,84 (22-Me, d, *6,8*), 3,12 (H23, d, *10,7*), 1,65 (H24, m), 0,99 (24-Me, d, *6,6*), 1,27-1,38 (H25, m), 1,30-1,90 (H26, m), 4,02 (H27, m), 1,60-1,82 (H28, m), 3,53 (H29, q, *7,7, 9,7, 14,2, 18,3*), 3,33 (29-OMe, s), 1,18 (H30, ddd, *5,3, 9,7, 12,5*), 1,96 (H30', ddd, *5,3, 9,7, 12,5*), 3,69 (H31, q, *6,4, 10,2, 15,5, 19,2*), 1,20 (31-Me, d, *6,7*)

III.3 Cas de l'éponge *Haliclona fascigera*

❖ Acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (HF1)



Aspect : huile verdâtre

Formule brute : $C_{22}H_{36}O_3$

SMHR (ESI$^-$) : *m/z* 348,2821 (calculée pour $C_{22}H_{36}O_3$, 348,5203)

$[\alpha]_D^{25}$: - 10,5 (*c* 0,5 mg/100 mL, DCM)

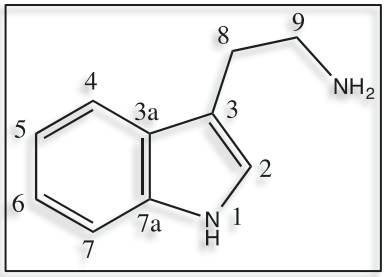
IR (ν_{max} cm^{-1}) : 2957, 2924, 2854, 2100, 1128, 1270, 1072, 1039

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 4,55 (H2, t, *7,4*), 2,10 -2,43 (H3, H3', m), 1,69-2,10 (H4, H4', m), 4,88 (H5, q, *5,2*, *8,4*), 5,40 (H6, t, *10,4*), 5,55 (H7, q, *7,3, 10,6*), 2,10 (H8, m), 1,35 (H9, m), 1,24 (H10-H17, m), 1,35 (H18, m), 1,50 (H19, m), 2,15 (H20, m), 1,90 (H22, t, *2,6*)

RMN ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$), δ ppm : 174,12 (C1), 76,40 (C2), 30,45 (C3), 33,04 (C4), 77,56 (C5), 128,79 (C6), 134,50 (C7), 28,12 (C8), 28,71 (C9), 29,33-29,89 (C10-C17), 28,97 (C18), 27,99 (C19), 18,80 (C20), 85,65 (C21), 68,28 (C22)

III.4 Cas de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata*

❖ Tryptamine (FR1)



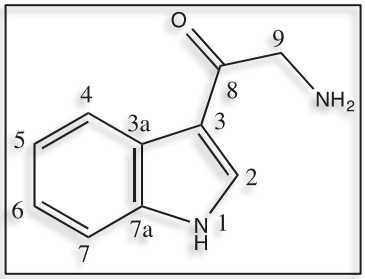
Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{10}H_{12}N_2$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 160,2430 (calculée pour $C_{10}H_{12}N_2$, 160,2425)

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,18 (H2, s), 7,58 (H4, d, *8,2*), 7,13 (H5, dd, *7,5, 14,7*), 7,05 (H6, dd, *7,5, 14,7*), 7,38 (H7, d, *8,2*), 3,12 (H8, dd, *6,4, 13,5*), 3,23 (H9, dd, *6,4, 13,5*).

❖ 8-oxo-Tryptamine (FR2)



Aspect : huile rouge

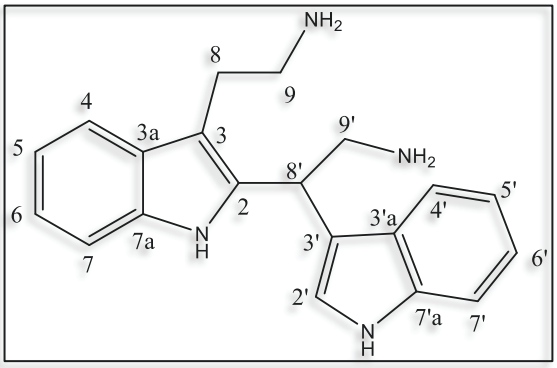
Formule brute : $C_{10}H_{10}N_2O$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 174,2136 (calculée pour $C_{10}H_{10}N_2O$, 174,2133)

RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,27 (H2, s), 8,24 (H4, d, *7,7*), 7,23 (H5, dd, *7,3, 15,0*), 7,29 (H6, dd, *7,3, 15,0*), 7,49 (H7, d, *7,7*), 4,41 (H9, s)

RMN ^{13}C (600 MHz, CD_3OD), δ ppm : 135,09 (C2), 115,05 (C3), 126,64 (C3a), 122,65 (C4), 123,69 (C5), 124,93 (C6), 113,14 (C7), 138,05 (C7a), 187,53 (C8), 45,41 (C9)

❖ 6,6'-bis-(débromo)-Gelliusine F (FR3)



Aspect : huile marron

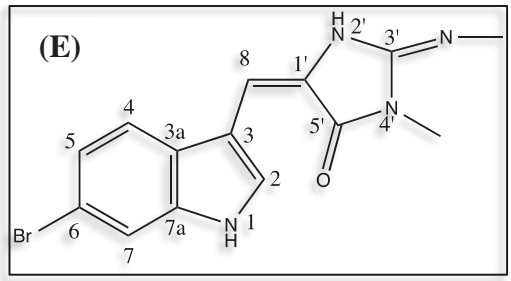
Formule brute : $C_{20}H_{22}N_4$

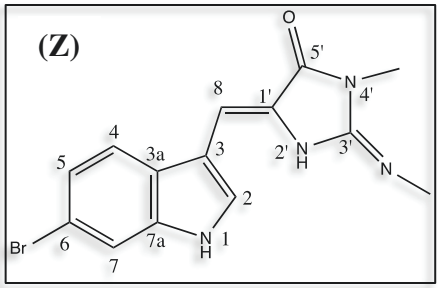
SMHR (ESI⁻) : *m/z* 318,0141 (calculée pour $C_{20}H_{22}N_4$, 318,0138)

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,55 (H4, d, *7,8*), 7,36 (H5, m), 7,14 (H6, m), 7,06 (H7, m), 3,24 (H8, m), 3,00 (H9, m), 7,27 (H2', s), 7,59 (H4', d, *7,8*), 7,39 (H5', m), 7,15 (H6', m), 7,06 (H7', m,), 5,11 (H8', t, *8,6*), 3,83-3,67 (H9', m)

RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD), δ ppm : 124,02 (C2), 113,82 (C3), 127,46 (C3a), 118,90 (C4), 112,60 (C5), 123,13 (C6), 120,89 (C7), 135,30 (C7a), 23,90 (C8), 41,52 (C9), 124,02 (C2'), 113,68 (C3'), 129,14 (C3'a), 119,32 (C4'), 112,88 (C5'), 123,26 (C6'), 120,69 (C7'), 137,94 (C7'a), 34,56 (C8'), 44,44 (C9')

❖ (*E*/*Z*)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-Aplysinopsine (FR4-FR5)





Aspect : huile jaune

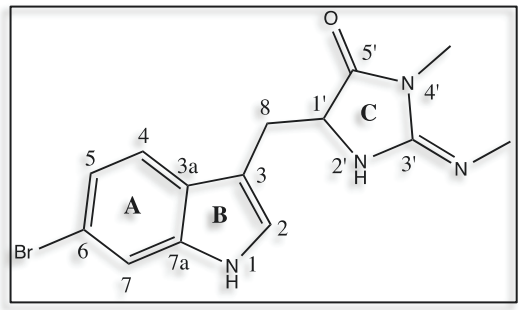
Formule brute : $C_{14}H_{13}BrN_4O$

SMHR (ESI⁺) : *m/z* 332,0421-334,0421 (ratio 50,5:49,5, calculée pour $C_{14}H_{13}BrN_4O$, 332,0418-334,0419)

RMN ^{1}H (isomère *Z*, 500 MHz, DMSO-$_{d6}$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,25 (H2, s), 8,01 (H4, d, *8,5*), 7,18 (H5, dd, *1,6*, *8,5*), 7,60 (H7, s), 6,73 (H8, s), 11,61 (H-N1, s), 7,41 (H-N2', s), 3,03 (CH_3-NC3', s), 2,98 (CH_3-N4', s)

RMN ^{1}H (isomère *E*, 500 MHz, DMSO-$_{d6}$), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,89 (H2, s), 7,79 (H4, d, *8,5*), 7,20 (H5, dd, *1,6*, *8,5*), 7,60 (H7, s), 7,00 (H8, s), 11,58 (H-N1, s), 7,41 (H-N2', s), 3,06 (CH_3-NC3', s), 2,86 (CH_3-N4', s)

❖ 6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine (FR6)



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{14}H_{15}BrN_4O$

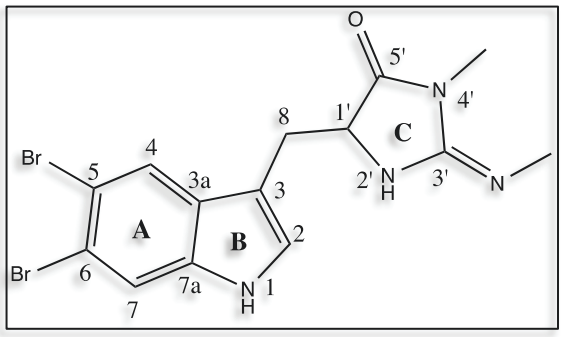
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 334,3452-336,3453 (ratio : 50,5:49,5 ; calculée pour $C_{14}H_{15}BrN_4O$, 334,3450-336,34553)

$[\alpha]_D^{25}$: 0,00 (*c* 0,5 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,12 (H2, s), 7,52 (H4, d, *1,8*), 7,14 (H5, d, *1,6*), 7,49 (H7, s), 4,63 (H8, br t, *4,9*), 3,35 (H1', m), 2,91 (CH_3-NC3', s), 2,87 (CH_3-N4', s)

RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD), δ ppm : 126,54 (C2), 107,22 (C3), 127,06 (C3a), 121,22 (C4), 123,42 (C5), 115,95 (C6), 115,56 (C7), 137,94 (C7a), 61,94 (C8), 25,98 (C1'), 157,21 (C3'), 173,64 (C5'), 25,81 (CH_3-NC3'), 29,24 (CH_3-N4')

❖ 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine (FR7)



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{14}H_{14}Br_2N_4O$

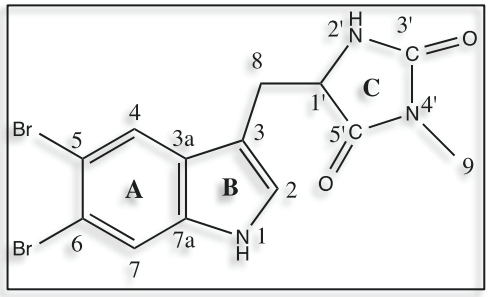
SMHR (ESI⁻) : *m/z* 412,4232-414,4234-416,4233 (ratio 1:2:1, calculée pour $C_{14}H_{14}Br_2N_4O$, 412,4230-414,4190-416,4230)

$[\alpha]_D^{25}$: 0,00 (*c* 0,5 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,16 (H2, s), 7,98 (H4, s), 7,69 (H7, s), 4,59 (H8, br t, *5,3*), 3,75 (H1', m,), 2,86 (CH_3-NC3', s), 2,94 (CH_3-N4', s)

RMN ^{13}C (600 MHz, CD_3OD), δ ppm : 126,64 (C2), 108,97 (C3), 129,80 (C3a), 123,52 (C4), 116,90 (C5), 115,87 (C6), 117,40 (C7), 137,50 (C7a), 61,40 (C8), 28,22 (C1'), 157,90 (C3'), 175,81 (C5'), 25,40 (CH_3-NC3'), 28,9 (CH_3-N4')

❖ 5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-Dihydroaplysinopsine (FR8)



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{13}H_{11}Br_2N_3O_2$

SMHR (ESI⁺) : *m/z* 398,4112-400,4112-402,4112 (ratio 1:2:1, calculée pour $C_{13}H_{11}Br_2N_3O_2$, 399,4110-401,4112-403,4114)

$[\alpha]_D^{25}$: 0,00 (*c* 0,5 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,13 (H2, s), 7,99 (H4, s), 7,63 (H7, s), 4,35 (H8, t, *4,5*), 3,19 (H1', m), 2,79 (CH_3-N4', s).

RMN ^{13}C (600 MHz, CD_3OD), δ ppm : 127,84 (C2), 109,51 (C3), 130,23 (C3a), 124,49 (C4), 114,68 (C5), 117,20 (C6), 117,40 (C7), 137,58 (C7a), 27,87 (C8), 63,23 (C1'), 169,03 (C3'), 188,22 (C5'), 28,90 (C9)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Publications et ouvrages et chapitres d'ouvrages (ordre alphabétique)

Allen J.R.F., Holmstedt B.R. [1980] The simple β-carboline alkaloids. ***Phytochemistry***, **19**, 1573-1582

Andersen R.J.,Van Soest R.W.M., Kong F., Pelletier S.W. [1996] Alkaloids: chemical and biological perspectives. ***Pergamon***, New York, **10**, 301-355

Angawi R.F., Calcinai B., Cerrano C., Dien H.A., Fattorusso E., Scala F., Taglialatela-Scafati O. [2009] Dehydroconicasterol and Aurantoic acid, a chlorinated polyene derivative, from the Indonesian sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **72**, 2195-2198

Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. [2002] Methods for testing antioxidant activity. ***Analyst***, **127**, 183-198

Aoki S., Matsui K., Wei H., Murakami N., Kobayashi M. [2002] Structure-activity relationship of neuritogenic spongean acetylene alcohols, lembehynes. ***Tetrahedron***, **58**, 5417-5422

Austin B., Zhang X.-H. [2006] *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. ***Letters in Applied Microbiology***, **43**, 119-124

Arai M., Ishida S., Setiawan A., Kobayashi M. [2009] Haliclonacyclamines, tetracyclic alkylpiperidine alkaloids, as anti-dormant mycobacterial substances from a marine sponge of *Haliclona* sp. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, **57**, 10, 1136-1138

Araki T., Matsunaga S., Fusetani N. [2005] Koshikamide A_2, a cytotoxic linear undecapeptide isolated from a marine sponge of *Theonella* sp. ***Bioscience Biotechnology and Biochemistry***, **69**, 7, 1318-1322

Araki T., Matsunaga S., Nakao Y., Furihata K., West L., Faulkner D.J., Fusetani N. [2008] Koshikamide B, a cytotoxic peptide lactone from a marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of Organic Chemistry***, **73**, 7889-7894

Baker B.J., Scheuer P.J., Shoolery J.N. [1988] Papuamine, an antifungal pentacyclic alkaloid from a marine sponge, *Haliclona* sp. ***Journal of the American Chemical Society***, **110**, 3, 965-966

Baker J.T., Wells R.J. [1981] Biologically active substances from Australian marine organisms. ***Natural Products Reports***, 281-318

Ballantine J.A., Williams K., Burke B.A. [1977] Marine sterols IV. C_{21} sterols from marine sources. Identification of pregnane derivatives in extracts of the sponge *Haliclona rubens*. ***Tetrahedron Letters***, **18**, 1547-1550

Barnathan G. [2010] Acides gras inhabituels des organisms marins: une illustration de la biodiversité moléculaire marine. ***Oleagineux Corps Gras Lipides***, **17**, 4, 238-250

Bartosz G. [2003] Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. ***Revue de génie industriel***, **9**, 5-21

Bassler B.L., Wright M., Showalter R.E., Silverman M.R. [1993] Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. ***Molecular Microbiology***, **9**, 773-786

Benzie I.F., Strain J. [1996] The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. ***Analytical Biochemistry,*** **239**, 70-76

Bergquist P.R., Warne K.P. [1980] The marine fauna of New Zealand: Porifera, Demospongiae, Part 3 (Haplosclerida and Nepheliospongida). ***New Zealand Oceanographic Institute Memoir,*** **87**, 1-77

Bergquist P.R. [1980] The ordinal and subclass classification of the Demospongiae (Porifera); appraisal of the present arrangement, and proposal of a new order. ***New Zealand Journal of Zoology***, **7**, 1, 1-6

Berrué F., Thomas O.P., Funel-Le Bon C., Reyes F., Amade P. [2005a] New bioactive cyclic peroxides from the Caribbean marine sponge *Plakortis zyggompha*. ***Tetrahedron***, **61**, 11843-11849

Berrué F., Thomas O.P., Fernández R., Amade P. [2005b] *Iso*-, *nor*-, and *dinor*-spiculoic acids A, polyketides from the marine sponge *Plakortis zyggompha*. ***Journal of Natural Products***, **68**, 4, 547-549

Bewley C.A., Faulkner D.J. [1994] Theonegramide, an antifungal glycopeptide from the Philippine lithistid sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Organic Chemistry***, **59**, 17, 4849-4852

Bialonska D., Zjawiony J.K. [2009] Aplysinopsins - Marine indole alkaloids: chemistry, bioactivity and ecological significance. ***Marine drugs***, **7**, 2, 166-183

Bifulco G., Bruno I., Riccio R., Lavayre J., Bourdy G. [1995] Further brominated bis- and tris-indole alkaloids from the deep-water New Caledonian marine sponge *Orina* sp. ***Journal of Natural Products***, **58**, 1254-1260

Bishara A., Rudi A., Aknin M., Neumann D., Ben-Califa N., Kashman Y. [2008a] Salarin C, a new cytotoxic sponge-derived nitrogenous macrolide. ***Tetrahedron Letters***, **49**, 4355-4358

Bishara A., Rudi A., Aknin M., Neumann D., Ben-Califa N., Kashman Y. [2008b] Taumycins A and B, two bioactive lipodepsipeptides from the Madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp. ***Organic Letters***, **10**, 4307-4309

Bishara A., Rudi A., Aknin M., Neumann D., Ben-Califa N., Kashman Y. [2008c] Salarins A and B and tulearin A: New cytotoxic sponge-derived macrolides. ***Organic Letters***, **10**, 153-156

Bishara A., Rudi A., Goldberg I., Aknin M., Kashman Y. [2009a] Tulearins A, B, and C; structures and absolute configurations. ***Tetrahedron Letters***, **50**, 3820-3822

Bishara A., Rudi A., Goldberg I., Aknin M., Neumann D., Ben-Califa N., Kashman Y. [2009b] Tausalarin C: A new bioactive marine sponge-derived nitrogenous bismacrolide. ***Organic Letters***, **11**, 3538-3541

Bishara A., Rudi A., Aknin M., Neumann D., Ben-Califa N., Kashman Y. [2010] Salarins D-J, seven new nitrogenous macrolides from the madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp. ***Tetrahedron***, **66**, 4339-4345

Bishara A., Ben-Califa N., Kashman Y., Neumann D. [2012] Salarin C, a member of the salarin superfamily of marine compounds, is a potent inducer of apoptosis. ***Investigational New Drugs***, **30**, 98-104

Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H., Northcote P.T., Prinsep M.R. [2010] Marine natural products. ***Natural Product Reports***, **27**, 165-237

Bokesch H.R., Stull A.C., Pannell L.K., McKeea T.C., Boyda M.R. [2002] A new pentacyclic sulfated hydroquinone from the marine sponge *Haliclona* sp. ***Tetrahedron Letters***, **43**, 3079-3081

Bonnington L.S., Tanaka J., Higa T., Kimura J., Yoshimura Y., Nakao Y., Yoshida W.Y., Scheuer P.J. [1997] Cupolamide A: a cytotoxic cyclic heptapeptide from two samples of the sponge *Theonella cupola*. ***Journal of Organic Chemistry***, **62**, 7765-7767

Borrelli F., Campagnuolo C., Capasso R., Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O. [2004] Iodinated indole alkaloids from *Plakortis simplex* - new plakohypaphorines and an evaluation of their antihistamine activity. ***European Journal of Organic Chemistry***, **15**, 3227-3232

Bubb M.R., Spector I., Bershadsky A.D., Korn E.D. [1995] Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. ***Journal of Biological Chemistry***, **270**, 8, 3463-3466

Burda S., Oleszek W. [2001] Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, **49**, 2774-2779

Burgoyne D.L., Andersen R.J., Allen T.M. [1992] Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the unnatural 14B configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* Thiele, 1899. ***Journal of Organic Chemistry***, **57**, 525-528

Cafieri F., Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O., Ianaro A. [1999] Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. Determination of stereochemistry of plakortin. Isolation and stereostructure of three plakortin-related compounds. ***Tetrahedron***, **55**, 7045-7056

Campagnuolo C., Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O., Ianaro A., Pisano B. [2002] Plakortethers A-G: a new class of cytotoxic plakortin-derived metabolites. ***Journal of Organic Chemistry***, **1**, 61-69

Campagnuolo C., Fattorusso C., Fattorusso E., Ianaro A., Pisano B., Taglialatela-Scafati O. [2003a] Simplakidine A, a unique pyridinium alkaloid from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. ***Organic letters***, **5**, 5, 673-676

Campagnuolo C., Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O. [2003b] Plakohypaphorines A-C, iodine-containing alkaloids from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. ***Journal of Organic Chemistry***, **2**, 284-287

Campagnuolo C., Fattorusso E., Romano A., Taglialatela-Scafati O., Basilico N., Parapini S., Taramelli D. [2005] Antimalarial polyketide cycloperoxides from the marine sponge*Plakortis simplex*. ***European Journal of Organic Chemistry***, **2005**, 23, 5077-5083

Carmely S., Kashman Y. [1985] Structure of swinholide-A, a new macrolide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron Letters***, **26**, 4, 511-514

Casapullo A., Pinto O.C., Marzocco S., Autore G., Riccio R. [2009] 3-Alkylpyridinium alkaloids from the pacific sponge *Haliclona* sp. ***Journal of Natural Products***, **72**, 301-303

Casteel D.A. [1992] Peroxy natural products. ***Natural Product Reports***, **9**, 289-312

Casteel D.A. [1997] Antimalarial agents, in ***Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery***, edition Wolff M.E., Wiley, New York

Casteel D.A. [1999] Peroxy natural products. ***Natural Product Reports***, **16**, 55-73

Chambers, L.D., Stokes K.R., Walsh F.C., Wood R.J.K. [2006] Modern approaches to marine antifouling coatings. ***Surface and Coatings Technology***, **201**, 6, 3642-3652

Charan R.D., Garson M.J., Brereton I.M., Willis A.C., Hooper J.N.A. [1996] Haliclonacyclamines A and B, cytotoxic alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp. ***Tetrahedron***, **52**, 9111-9120

Chen Y., Killday K.B., McCarthy P.J., Schimoler R., Chilson K., Selitrennikoff C., Pomponi S.A., Wright A.E. [2001] Three new peroxides from the sponge *Plakinastrella* Species. ***Journal of Natural Product***, **64**, 262-264

Cheng Z.-B., Xiao H., Fan C.-Q., Lu Y.-N., Zhang G., Yin S. [2013] Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassiloba*. ***Steroids***, **78**, 1353-1358

Chianese G., Fattorusso E., Scala F., Teta R., Calcinai B., Bavestrello G., Dien H.A., Kaiser M., Tasdemir D., Taglialatela-Scafati O. [2012] Manadoperoxides, a new class of potent antitrypanosomal agents of marine origin. ***Organic and Biomolecular Chemistry***, **10**, 7197-7207

Chianese G., Persico M., Yang F., Lin H.-W., Guo Y.-W., Basilico N., Parapini S., Taramelli D., Taglialatela-Scafati O., Fattorusso C. [2014] Endoperoxide polyketides from a Chinese *Plakortis simplex*: Further evidence of the impact of stereochemistry on antimalarial activity of simple 1,2-dioxanes. ***Bioorganic and Medecinal Chemistry***, **22**, 4572–4580

Chill L., Miroz A., Kashman Y. [2000] Haliclonyne, a new highly oxygenated polyacetylene from the marine sponge *Haliclona* Species. ***Journal of Natural Products***, **63**, 523-526

Chini M.G., Jones C.R., Zampella A., D'Auria M.V., Renga B., Fiorucci S., Butts C.P., Bifulco G. [2011] Quantitative NMR-derived interproton distances combined with quantum mechanical calculations of ^{13}C chemical shifts in the stereochemical determination of conicasterol F, a nuclear receptor ligand from *Theonella swinhoei*. ***Journal of Organic Chemistry***, **77**, 1489-1496

Ciasullo L., Casapullo A., Cutignano A., Bifulco G., Debitus C., Hooper J., Gomez-Paloma L., Riccio R. [2002] Renieramide, a cyclic tripeptide from the Vanuatu sponge *Reniera* n. sp. ***Journal of Natural Products***, **65**, 407-410

Cimino G., De Stefano S. [1977] New acetylenic compounds from the sponge *Reniera fulva*. ***Tetrahedron Letters***, 15, 1325-1328

Cimino G., De Stefano S., Scognamiglio G., Sodano G., Trivellone E. [1986] Sarains: a new class of alkaloids from the marine sponge *Reniera sarai*. ***Bulletin des sociétés chimiques Belges***, **95**, 9-10, 783-800

Cimino G., Matha C.A., Mazzarella L., Puliti R., Scognamiglio G., Spinella A., Trivellone E. [1989a] Unprecedented alkaloid skeleton from the mediterranean sponge *Reniera sarai:* x-ray structure of an acetate derivative of sarain-A. ***Tetrahedron***, **45**, 12, 3863-3872

Cimino G., Spinella A., Trivellone E. [1989b] Isosarain-1: a new alkaloid from the mediterranean sponge *Reniera sarai*. ***Tetrahedron Letters***, **30**, 1, 133-136

Cimino G., Scognamiglio G., Spinella A., Trivellone E. [1990] Structural studies on saraine A. ***Journal of Natural Products***, **53**, 6, 1519-1525

Cimino G., Fontana A., Madaio A., Scognamiglio G., Trivellone E. [1991] Application of two-dimensional shift correlated NMR techniques to the structure determination of an unusual marine alkaloid, Isosaraine-2. ***Magnetic Resonance in Chemistry***, **29**, 327-332

Clark D.P., Carroll J., Naylor S., Crews P. [1998] An antifungal cyclodepsipeptide, cyclolithistide A, from the sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Organic Chemistry***, **63**, 8757-8764

Clark R.J., Field K.L., Charan R.D., Garson M.J., Brereton I.M.,Willis A.C. [1998] The Haliclonacyclamines, cytotoxic tertiary alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp. ***Tetrahedron***, **54**, 8811-8826

Cook S.C. [2007] Clarification of dictyoceratid taxonomic characters, and the determination of genera. pp. 265-274. *In*: Custódio M.R., Lôbo-Hajdu G., Hajdu E., Muricy G. (eds) ***Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability***, Museu Nacional, Rio de Janeiro,

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M., Ianaro A. [1999] Glycolipids from sponges. VII. simplexides, novel immunosuppressive glycolipids from the caribbean sponge *Plakortis simplex*. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry letters***, **9**, 2, 271-276

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M. Ianaro A. [2000] Glycolipids from sponges. Part 8: Plakopolyprenoside from the marine sponge *Plakortis simplex*. An improved procedure for isolation of glycolipids as peracetyl derivatives. ***Tetrahedron***, **56**, 1393-1395

Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C., Mangoni A. [2001] Plaxyloside from the marine sponge *Plakortis simplex*: an improved strategy for NMR structural studies of carbohydrate chains. ***Journal of Organic Chemistry***, 4457-4462

Cychon C., Schmidt G., Mordhorst T., Köck M. [2012] Structure elucidation of submilligram quantities of natural products. Application to haliclamines G and H from the Arctic marine sponge *Haliclona viscosa*. ***Zeitschrift für Naturforschung***, **67b**, 944-950

Dalton H.M., March P.E. [1998] Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. ***Environmental Biotechnology***, 252-255

Damodaran V., Ryan J.L., Keyzers R.A. [2013] Cyclic 3-Alkyl pyridinium alkaloid monomers from a New Zealand *Haliclona* sp. marine sponge. ***Journal of Natural Products***, **76**, 1997−2001

Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. [2004]. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. ***FEMS Microbiology Reviews***. **28**, 261-289

D'Auria M.V., Giannini C., Zampella A., Minale L., Debitus C., Roussakis C. [1998] Crellastatin A: a cytotoxic bis-steroid sulfate from the Vanuatu marine sponge *Crella* sp. ***Journal of Organic Chemistry*, 63**, 21, 7382-7388

Davidson B.S. [1991] Cytotoxic five-membered cyclic peroxides from a *Plakortis* sponge. ***Journal of Organic Chemistry***, **56**, 6722-6724

Davis R.A., Duffy S., Fletcher S., Avery V.M., Quinn R.J. [2013] Thiaplakortones A-D: Antimalarial thiazine alkaloids from the Australian marine sponge *Plakortis lita*. ***Journal of Organic Chemistry***, **78**, 9608-9613

DeGruyter J.N., Maio W.A. [2014] The taumycin A macrocycle: asymmetric total synthesis and revision of relative stereochemistry. ***Organic Letters***, **16**, 5196-5199

De Jesus R. P., Faulkner D. J. [2003] Chlorinated acetylenes from the San Diego sponge *Haliclona lunisimilis*. ***Journal of Natural Products***, **66**, 671-674

De Marino S., Festa C., D'Auria M.V., Cresteil T., Debitus C., Zampella A. [2011] Swinholide J, a potent cytotoxin from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Marine Drugs***, **9**, 1133-1141

De Marino S., Ummarino R., D'Auria M.V., Chini M.G., Bifulco G., D'Amore C., Renga B., Mencarelli A., Petek S., Fiorucci S., Zampella A. [2012] 4-Methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge are natural pregnane-X-receptor agonists and farnesoid-X-receptor antagonists that modulate innate immunity. ***Steroids***, **77**, 484-495

Dembitsky V.M. [2006] Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. ***Lipids***, **41**, 883-924

Dembitsky V.M., Gloriozova T.A., Poroikov V.V. [2007] Natural peroxy anticancer agents. ***Medicinal Chemistry***, **7**, 6, 571-589

De Oliveira J.H.H.L., Seleghim M.H.R., Timm C., Grube A., Köck M., Nascimento G.G.F., Martins A.C.T., Silva E.G.O., De Souza A.O., Minarini P.R.R., Galetti F.C.S., Silva C.L., Hajdu E., Berlinck R.G.S. [2006] Antimicrobial and antimycobacterial activity of cyclostellettamine alkaloids from sponge *Pachychalina* sp. ***Marine Drugs***, **4**, 1-8

De Silva E.D., Williams D.E., Andersen R.J., Klix H., Holmes C.F.B., Allen T.M. [1992] Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* Gray. ***Tetrahedron Letters***, **33**, 12, 1561-1564

Di Micco S., Renga B., Carino A., D'Auria M.V., Zampella A., Riccio R., Fiorucci S., Bifulco G. [2013] Structural insights into estrogen related receptor-β modulation: 4-methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge as the first example of marine natural antagonists. ***Steroids***, **80**, 51–63

Doi M., Ishida T., Kobayashi M., Kitagawa I. [1991] Molecular conformation of swinholide A, a potent cytotoxic dimeric macrolide from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei:* X-ray crystal structure of its diketone derivative. ***Journal of Organic Chemistry***, **56**, 3629-3632

Dumdei E.J., Blunt J.W., Munro M.H.G., Pannell L.K. [1997] Isolation of calyculins, calyculinamides, and swinholide H from the New Zealand deep-water marine sponge *Lamellomorpha strongylata*. ***Journal of Organic Chemistry***, **62**, 2636-2639

Edrada R.A., Proksch P., Wray V., Witte L., Muller W.E.G., Van soest R.W.M. [1996] Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. ***Journal of Natural Products***, **59**, 1056-1060

Edrada R. A., Ebel R., Supriyono A., Wray V., Schupp P., Steube K., Van Soest R., Proksch P. [2002] Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivative from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **65**, 8, 1168-1172

Elenkov I., Popov S., Andreev S. [1999] Sterols from two Black Sea sponges (*Haliclona* sp.). ***Comparative Biochemistry and Physiology***, **123**, 357-360

El Sayed K.A., Kelly M., Kara U.A.K., Ang K.K.H., Katsuyama I., Dunbar D.C., Khan A.A., Hamann M.T. [2001] New manzamine alkaloids with potent activity against infectious diseases. ***Journal of the American Chemical Society***, **123**, 1804-1808

Erdogan I., Tanaka J., Higa T. [2000] Two cyclic hexapeptides from the marine sponge *Theonella cupola*. ***Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences***, **25**, 7-10

Erickson K.L., Beutler J.A., Cardellina J.H., Boyd M.R. [1997] Salicylihalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. ***Journal of Organic Chemistry***, **62**, 8188-8192

Fahy E., Molinski T.F., Harper M.K., Sullivan B.W., Faulkner D.J., Parkanyi L., Clardy J. [1988] Haliclonadiamine, an antimicrobial alkaloid from the sponge *Haliclona* sp. ***Tetrahedron Letters***, **29**, 28, 3427-3428

Fattorusso C., Campiani G., Catalanotti B., Persico M., Basilico N., Parapini S., Taramelli D., Campagnuolo C., Fattorusso E., Romano A., Taglialatela-Scafati O. [2006] Endoperoxide derivatives from marine organisms. 1,2-dioxanes of the plakortin family as novel antimalarial agents. ***Journal of Medicinal Chemistry***, **49**, 24, 7088-7094

Fattorusso C., Persico M., Calcinai B., Cerrano C., Parapini S., Taramelli D., Novellino E., Romano A., Scala F., Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O. [2010] Manadoperoxides A-D from the Indonesian sponge *Plakortis* cf. *simplex*. Further Insights on the structure-activity relationships of simple 1,2-dioxane antimalarials. ***Journal of Natural Product***, **73**, 1138-1145

Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O., Di Rosab M., Ianarob A. [2000] Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. Part 3:1 Isolation and stereostructure of novel bioactive cycloperoxides and diol analogues. ***Tetrahedron***, **56**, 7959-7967

Fattorusso E., Parapini S., Campagnuolo C., Basilico N., Taglialatela-Scafati O., Taramelli D. [2002] Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, **50**, 883-888

Feng Y., Davis R.A., Sykes M., Avery V.M., Camp D., Quinn R.J. [2010] Antitrypanosomal cyclic polyketide peroxides from the Australian marine sponge *Plakortis* sp. ***Journal of Natural Products***, **73**, 4, 716-719

Festa C., De Marino S., Sepe V., Monti M.C., Luciano P., D'Auria M.V., Debitus C., Bucci M., Vellecco V., Zampella A. [2009] Perthamides C and D, two new potent anti-inflammatory cyclopeptides from a Solomon Lithistid sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron***, **65**, 10424-10429

Festa C., De Marino S., D'Auria M.V., Bifulco G., Renga B., Fiorucci S., Petek S., Zampella A. [2011a] Solomonsterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from a marine source endowed with a PXR agonistic activity. ***Journal of Medicinal Chemistry***, **54**, 401-405

Festa C., De Marino S., Sepe V., D'Auria M.V., Bifulco G., Andrés R., Terencio M. C., Payá M., Debitus C., Zampella A. [2011b] Perthamides C-F, potent human antipsoriatic cyclopeptides. ***Tetrahedron***, **67**, 7780-7786

Festa C., De Marino S., D'Auria M.V., Monti M.C., Bucci M., Vellecco V., Debitus C., Zampella A. [2012] Anti-inflammatory cyclopeptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron***, **68**, 2851-2857

Festa C., De Marino S., D'Auria M.V., Taglialatela-Scafati O., Deharo E., Petek S., Zampella A. [2013a] New antimalarial polyketide endoperoxides from the marine sponge *Plakinastrella mamillaris* collected at Fiji Islands. ***Tetrahedron***, **69**, 3706-3713

Festa C., De Marino S., Sepe V., D'Auria M.V., Bifulco G., Debitus C., Bucci M., Vellecco V., Zampella A. [2013b] Solomonamides A and B, new anti-inflammatory peptides from *Theonella swinhoei*. ***Organic Letters***, **13**, 6, 1532-1535

Festa C., De Marino S., D'Auria M.V., Bifulco G., Renga B., Fiorucci S., Petek S., Zampella A. [2014] Solomonsterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from a marine source endowed with a PXR agonistic activity. ***Journal of Medicinal Chemistry***, **54**, 401-405

Findlay J.A., Patil A.D. [1985] Novel sterols from the finger sponge *Haliclona oculata*. ***Canadian Journal of Chemistry***, **63**, 2406-2410

Ford P.W., Davidson B.S. [1997] Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloid from the ascidian *Didemnum rubeum*. ***Journal of Natural Product***, **60**, 10, 1051-1053

Ford P.W., Gustafson K.R., McKee T.C., Shigematsu N, Maurizi L.K., Pannell L.K.,Williams D.E., De Silva E.D., Lassota P., Allen T.M.,Van Soest R., Andersen R.J., Boyd M.R. [1999] Papuamides A-D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. ***Journal of the American Chemical Society***, **121**, 5899-5909

Frincke J.M., Faulkner D.J. [1982] Antimicrobial metabolites of the sponge *Reniera* sp. ***Journal of the American Chemical Society***, **104**, 265-269

Fu X., Abbas S.A., Schmitz F.J., Vidavsky I., Gross M.L., Laney M., Schatzman R. C., Cabuslay R. D. [1997]

New acetylenic metabolites from the marine sponge *Pellina triangulata*. ***Tetrahedron***, **53**, 799-814

Fu X., Schmitz F.J., Kelly-Borges M., McCready T.L., Holmes C.F.B. [1998] Clavosines A-C from the marine sponge *Myriastra clavosa*: Potent cytotoxins and inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. ***Journal of Organic Chemistry***, **63**, 22, 7957-7963

Fu X., Schmitz F.J., Kelly M. [1999] Swinholides and new acetylenic compounds from an undescribed species of *Theonella* sponge. ***Journal of Natural Product***, **62**, 1336-1338

Fukuhara K., Takada K., Okada S., Matsunaga S. [2015] Nazumazoles A-C, cyclic pentapeptides dimerized through a disulfide bond from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Organic Letters***, **17**, 2646-2648

Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. [1994] Quorum sensing in bacteria - the luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. ***Journal of Bacteriology***, **176**, 269-275

Fusetani N., Yasumuro K., Matsunaga S., Hirota H., Kawai H., Natori T. [1989a] New cytotoxic compounds from marine sponges. ***Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yosh***, **31**, 340-347

Fusetani N., Yasumuro K., Matsunaga S., Hirota H. [1989b] Haliclamines A and B, cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*. ***Tetrahedron Letters***, **30**, 49, 6891-6894

Fusetani N., Nakao Y., Matsunaga S. [1991a] Nazumamide A, a thrombin-inhibitory tetrapeptide, from a marine sponge, *Theonella* sp. ***Tetrahedron Letters***, **32**, 48, 7073-7074

Fusetani N., Sugawara T., Matsunaga S., Hirota H. [1991b] Orbiculamide A: a novel cytotoxic cyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of the American Chemical Society***, **113**, 20, 7811-7812

Fusetani N., Warabi K., Nogata Y., Nakao Y., Matsunaga S., van Soest R.R.M. [1999] Koshikamide A_1, a new cytotoxic linear peptide isolated from a marine sponge, *Theonella* sp. ***Tetrahedron Letters***, **40**, 4687-4690

Gallimore W.A., Kelly M., Scheuer P.J. [2001] Gelliusterols A-D, new acetylenic sterols from a sponge, *Gellius* species. ***Journal of Natural Products***, **64**, 741-744

Gochfeld D.J., Hamann M.T. [2001] Isolation and biological evaluation of filiformin, Plakortide F, and Plakortone G from the Caribbean sponge *Plakortis* sp. ***Journal of Natural Product***, **64**, 1477-1479

Gong J., Sun P., Jiang N., Riccio R., Lauro G., Bifulco G., Li T.-J., Gerwick W.H., Zhang W. [2014] New steroids with a rearranged skeleton as (h)P300 inhibitors from the sponge *Theonella swinhoei*. ***Organic Letters***, **16**, 2224-2227

Grant, R.E. [1984] Animal Kingdom. pp. 107-118. *In*: Todd R.B. (Ed.), ***The cyclopaedia of anatomy and physiology***. Volume 1., Sherwood, Gilbert, and Piper: London.

Gray, J.S. [1868] Note on *Theonella*, a new genus of coralloid sponges from Formosa. Proceedings of the ***Zoological Society of London***, **3**, 565-566

Griessinger J.M. [1971] Etude des Réniérides de méditerranée. (Démosponges Haplosclérides). ***Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle***, ***3° série***, N°3, Zoologie 3, 97-181

Guan L.L., Sera Y., Adachi K., Nishida F., Shizuri Y. [2001] Isolation and evaluation of nonsiderophore cyclic peptides from marine sponges. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, **283**, 4, 2001

Guella G., Mancini I., Zibrowius H., Pietra F. [1988] Aplysinopsin-type alkaloids from scleractinian corals of Dendrophylliidae. Configurational-assignment criteria, stereospecific synthesis and photoisomerisation. ***Helvetica Chimica Acta***, **71**, 773-781

Guella G., Mancini I., Zibrowius H., Pietra F. [1989] Aplysinopsin-type alkaloids from *Dendrophyllia* sp., a scleractinian coral of the family Dendrophylliidae of the Philippines. Facile photochemical (*Z*/*E*). ***Helvetica Chimica Acta***, **72**, 1444-1450

Gulati D., Chauhan P.M.S., Bhakuni R.P., Bhakuni D.S. [1993] A new synthesis of aplysinopsin, a marine alkaloid and its analogues and their biological activities. ***Indian Journal of Chemistry***, **33**, 4-9

Gulsvita N.K., Pomponi S.A., Wright A.E., Yarrood D., Sills M.A. [1994] Isolation and structure elucidation of Perthamide B, a novel peptide from the sponge *Theonella* sp. ***Tetrahedron Letters***, **35**, 31, 6815-6818

Guo J.-K., Chiang C.-Y., Lu M.-C., Chang W.-B., Su J.-H. [2012] 4-Methylenesterols from a sponge *Theonella swinhoei*. ***Marine Drugs***, **10**, 1536-1544

Guo Y., Madaio A., Trivellone E., Scognamiglio G., Cimino G. [1996a] Further studies of alkaloids from *Reniera sarai:* structures of saraine-3 and isosaraine-3; absolute stereochemistry of saraine-1 and saraine-2. ***Tetrahedron***, **52**, 47, 14961-14974

Guo Y., Madaio A., Trivellone E., Scognamiglio G., Cimino G. [1996b] Structural and stereochemical studies of Saraines: macrocyclic alkaloids of the sponge *Reniera sarai*. ***Tetrahedron***, **52**, 24, 8341-8348

Guo Y., Trivellone E., Scognamiglio G., Cimino G. [1998a] Misenine, a novel macrocyclic alkaloid with an unusual skeleton from the Mediterranean sponge *Reniera* sp. ***Tetrahedron***, **54**, 541-550

Guo Y., Trivellone E., Scognamiglio G., Cimino G. [1998b] Absolute stereochemistry of isosaraine-1 and isosaraine-2. ***Tetrahedron Letters***, **39**, 463-466

Hamada T., Sugawara T., Matsunaga S., Fusetani N. [1994] Polytheonamides, unprecedented highly cytotoxic polypeptides, from the marine sponge *Theonella swinhoei*. Isolation and component amino acids. ***Tetrahedron Letters,*** **35**, 5, 719-720

Hamada T., Matsunaga S., Yano G., Fusetani N. [2004] Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. ***Journal of the American Chemical Society***, **127**, 1, 110-118

Haras D. [2005] Biofilms et altérations des matériaux: de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. ***Matériaux & Techniques***, **93**, 27-41

Harrison B., Crews P. [1997] The structure and probable biogenesis of helianane, a heterocyclic sesquiterpene, from the Indo-Pacific sponge *Haliclona fascigera*. ***Journal of Organic Chemistry***, **62**, 2646-2648

Harrison B., Crews P. [1998] Cyclic polyketide peroxides and acyclic diol analogues from the sponge *Plakortis lita*. ***Journal of Natural Products***, **61**, 8, 1033-1037

He F., Liu Z., Yang J., Fu P., Peng J., Zhu W.M., Qi S.H. [2012] A novel antifouling alkaloid from halotolerant fungus *Penicillium* sp. ***Tetrahedron Letters***, **53**, 2280-2283

He F., Han Z., Peng J., Qian P.Y., Qi S.H. [2013] Antifouling indole alkaloids from two marine derived fungi. ***Natural Products Communication***, **8**, 329-332

Heinrich M.R., Kashman Y., Spiteller P., Steglich W. [2001] Revision of the structure of haliclorensin to (*S*)-7-methyl-1,5- diazacyclotetradecane and confirmation of the new structure by synthesis. ***Tetrahedron***, **57**, 9973-9978

Helmy T., El Serehy H., Mohamed S.Z., Van Soest R.W.M., [2004] Description and classification of dictyoceratid sponges from the northern Red Sea. ***Beaufortia***, **54**, 6, 81-91.

Hertiani T., Edrada-Ebel R., Ortlepp S. [2010] From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. ***Bioorganic Medicinal Chemistry***, **18**, 1297-1311

Hirsch S.C., Carmely S., Kashman Y. [1987] Brominated unsaturated acids from the marine sponge *Xestospongia* sp. ***Tetrahedron***, **43**, 3257-3261

Horton P.A., Longley R.E., Kelly-Borges M., McConnell O.J. [1994] New cytotoxic peroxylactones from the marine sponge, *Plakinastrella onkodes*. ***Journal of Natural Products***, **57**, 10, 1374-1381

Hu J.F., Gao H.F., Kelly M., Hamann M.T. [2001] Plakortides I-L, four new cyclic peroxides from an undescribed Jamaican sponge *Plakortis* sp. (Homosclerophorida, Plakinidae). ***Tetrahedron***, **57**, 9379-9383

Hu J.F., Schetz J.A., Kelly M., Peng J.-N., Ang K.K.H., Flotow H., Yan Leong C., Ng S.B., Buss A.D., Wilkins S.P., Hamann M.T. [2002] New antiinfective and human 5-HT_2 receptor binding natural and semisynthetic compounds from the Jamaican sponge *Smenospongia aurea*. ***Journal of Natural Products***, **65**, 476-480.

Hwang B.S., Oh J.S., Jeong E.J., Sim C.J., Rho J.R. [2012] Densanins A and B, new macrocyclic pyrrole alkaloids isolated from the marine sponge *Haliclona densaspicula*. **Organic letters**, **14**, 24, 6154-6157

Ichiba T., Sakai R., Kohmoto S., Saucy G., Higa T. [1988] New manzamine alkaloids from a sponge of the genus *Xestospongia*. ***Tetrahedron Letters***, **29**, 3083-3086

Inman W.D., O'Neill-Johnson M., Crews P. [1990] Novel marine sponge alkaloids. 1. Plakinidine A and B, anthelmintic active alkaloids from a *Plakortis* sponge. ***Journal of the American Chemical Society***, **112**, 1, 1-4

Inoue S., Okada K., Tanino H., Kakoi H., Goto T. [1980] Trace characterization of the fluorescent substances of a dinoflagellate, *Noctiluca miliaris*. ***Chemistry Letters***, **3**, 297-298

Inouye Y., Sugo Y., Kusumi T., Fusetani N. [1994] Structure and absolute sterochemistry of bisconicasterone from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Chemistry Letters***, **23**, 419-420

Itagaki F., Shigemori H., Ishibashi M., Nakamura T., Sasaki T., Kobayashi J. [1992] Keramamide F, a new thiazole-containing peptide from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Tetrahedron Letters*, 40**, 4687-4690

Jamison M.T., Dalisay D.S., Molinski T.F. [2016] Peroxide natural products from *Plakortis zyggompha* and the sponge association *Plakortis halichondrioides-Xestospongia deweerdtae*: Antifungal activity against *Cryptococcus gattii*. ***Journal of Natural Product***, **79**, 5, 555-563

Jang K.H., Kang G.W., Jeon J., Lim C., Lee H.-S., Sim C.J., Oh K.-B., Shin J. [2009] ***Organic letters***, **11**, 8 1713-1716

Jaspars M., Pasupathy V., Crews P. [1994] A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. ***Journal of Organic Chemistry***, **59**, 3253-3255

Jiang W., Liu D., Deng Z., De Voogd N.J., Proksch P., Lin W. [2011] Brominated polyunsaturated lipids and their stereochemistry from the Chinese marine sponge *Xestospongia testudinaria*. ***Tetrahedron*, 67**, 58-68

Jimenez C., Quinoa E., Adamczeski M., Hunter L. M., Crews P. [1991a] Novel sponge derived amino acids. 12. Tryptophan derived pigments and accompanying sesterterpenes from *Fascaplysinopsis reticulata*. ***Journal of Organic Chemistry***, **56**, 3403-3410

Jimenez C., Quinoa E., Crews P. [1991b] Novel marine sponge alkaloids 3. β-Carbolinium salts from *Fascaplysinopsis reticulata*. ***Tetrahedron Letters***, **32**, 1843-1846

Jiménez M., Garzón S.P., Rodríguez A.D. [2003] Plakortides M and N, bioactive polyketide endoperoxides from the caribbean marine sponge *Plakortis halichondrioides*. ***Journal of Natural Product***, **66**, 5, 655-661

Jiménez-Romero C., Ortiz I., Vicente J., Vera B., Rodríguez A.D., Nam S., Jove R. [2010] Bioactive cycloperoxides isolated from the Puerto Rican sponge *Plakortis halichondrioides*. ***Journal of Natural Product***, **73**, 1694-1700

Kashman Y., Koren-Goldshlager G., Gravalos M.D.G., Schleyer M. [1999] Halitulin, a new cytotoxic alkaloid from the marine sponge *Haliclona tulearensis*. ***Tetrahedron Letters***, **40**, 997-1000

Kazlauskas R., Murphy P.T., Quinn R.J., Wells R.J. [1977] Aplysinopsin, a tryptophan derivative from a sponge (*Aplysinopsis* or *Thorecta* genus). ***Tetrahedron Letters***, 61-64

Keck G.E., Lundquist G.D. [1999] Synthetic studies toward the total synthesis of swinholide. Stereoselective construction of the C-19-C-35 subunit. ***Journal of Organic Chemistry***, **64**, 12, 4482-4491

Kho E., Imagawa D.K., Rohmer M., Kashman Y., Djerassi C. [1981] Sterols in marine invertebrates 22. Isolation and structure elucidation of conicasterol and theonellasterol, two new 4-methylene sterols from the Red Sea sponges *Theonella conica* and *Theonella swinhoei*. ***Journal of Organic Chemistry***, **46**, 1836-1839.

Koh E.G.L., Sweatman H. [2000] Chemical warfare among scleractinians: bioactive natural products from *Tubastraea faulkneri* Wells kill larvae of potential competitors. ***Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***, **251**, 14-160

Kitagawa I., Kobayashi M., Lee N.K., Shibuya H., Kawata Y., Sakiyama F. [1986] Structure of Theonellapeptolide ID, a new bioactive peptolide from an Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin,*** **34**, 6, 2664-2667

Kitagawa I., Lee N.K., Kobayashi M., Shibuya H. [1990] Marine natural products. XXV. Biologically active tridecapeptide lactones from the okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*, structure of theonellapeptolide. ***Tetrahedron***, **47**, 12/13, 2169-2180

Kitagawa I., Yoshioka N., Kamba C., Yoshikawa M., Hamamoto Y. [1993] Four new bisabolene-type aminosesquiterpenes from an Okinawan marine sponge *Theonella* sp (Theonellidae). ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, **35**, 928-931

Klein D., Braekman J.C., Daloze D., Hoffmann L., Castillo G., Demoulin V. [1996] Laingolide, a novel 15-membered macrolide from *Lyngbya bouillonii* (Cyanophyceae). ***Tetrahedon Letters***, **37**, 7519-7520

Klein D., Braekman J.C., Daloze D., Hoffmann L., Castillo G., Demoulin V. [1999] Madangolide and Laingolide A, Two Novel Macrolides from *Lyngbya bouillonii* (Cyanobacteria). ***Journal of Natural Products***, **62**, 934-936

Kobayashi J., Harbour G.C., Gilmore J., Rinehart K.L.J.R. [1984] Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, and Q, bromo-, hydroxy-, pyrrolyl-, and 1-pyrrolinyl-β-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. ***Journal of the American Chemical Society***, **106**, 5, 1526-1528.

Kobayashi J., Nakamura H., Ohizumi Y., Hirata Y. [1986] Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the Okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. ***Tetrahedron letters***, **27**, 10, 1191-1194

Kobayashi J., Sato M., Murayama T., Ishibashi M., Walchi M.R., Kanai M., Shoji J., Ohizumi Y. [1991] Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of Chemistry Society***, 1050-1052

Kobayashi J., Kondo K., Ishibashi M., Walchli M. R., Nakamura T. [1993] Theonezolide A: a novel polyketide natural product from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of the American Chemical Society,*** **115**, 15, 6661-6665

Kobayashi J., Tsukamoto S., Takeuchi S., Ishibashi M. [1993] Manzamenones G and H, new dimeric fatty-acid derivatives from the Okinawan marine sponge *Plakortis* Sp. ***Tetrahedron***, **49**, 27, 5955-5960

Kobayashi J., Itagaki F., Shigemori I., Takao T., Shimonishi Y. [1995] Keramamides E, G, H, and J, new cyclic peptides containing an oxazole or a thiazole ring from a *Theonella* sponge. ***Tetrahedron***, **51**, 9, 2525-2532

Kobayashi J., Watanabe D., Kawasaki N., Tsuda M. [1997] Nakadomarin A, a novel hexacyclic manzamine-related alkaloid from *Amphimedon* sponge. ***Journal of Organic Chemistry***, **62**, 9236-9239

Kobayashi M., Tanaka J., Katori T., Matsuura M., Kitagawa I. [1989] Structure of swinholide A, a potent cytotoxic macrolide from the okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron Letters***, **30**, 22, 2963-2966

Kobayashi M., Tanaka J., Katori T., Matsuura M., Yamashita M., Kitagawa I. [1990] Marine natural products. XXII. The absolute stereostructure of swinholide A, a potent cytotoxic dimeric macrolide from the Okinawan marine sponge. *Theonella swinhoei*. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, **38**, 2409-2418

Kobayashi M., Kawazoe K., Katori T., Kitagawa I. [1992] 2 New 3-keto-4-methylene steroids, theonellasterone & conicasterone, & a Diels-Alder type dimeric steroid bistheonellasterone, from *Theonella swinhoei*. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, **40**, 1773-1778

Kobayashi M., Kawazoe K., Okamoto T., Sasaki T., Kitagawa I. [1994a] Marine natural products. XXXI Structure-activity correlation of a potent cytotoxic dimeric macrolide swinholide A, from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*, and its isomers. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42**, 1, 19-26

Kobayashi M., Kanzaki K., Katayama S., Ohashi K., Okada H., Ikegami S., Kitagawa I. [1994b] Marine natural products. XXXIII Theonellapeptolide IId, a new tridecapeptide lactone from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, 42, 7, 1410-1415

Kobayashi M., Chen Y.J., Aoki S., In Y., Ishida T., Kitagawa I. [1995] Four new beta-carboline alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp and *Haliclona* sp. ***Tetrahedron***, **51**, 3727-3736

Kondo K., Shigemori H., Kikuchi Y., Ishibashi M., Sasaki T., Kobayashi J. [1992] Ircinals A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. ***Journal of Organic Chemistry***, **57**, 2480-2483

Kondo K., Ishibashi M., Kobayashi J. [1994] Isolation and structures of Theonezolides B and C from the okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Tetrahedron***, **50**, 28, 8355-8362

Koren-Goldshlager G., Kashman Y., Schleyer M. [2005] Haliclorensin, a novel diamino alkaloid from the marine sponge *Haliclona tulearensis*. ***Journal of Natural Products***, **61**, 282-284

Kornprobst J.-M. [2005] Substances naturelles d'origine marine, Tome 2 : Chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Editions Tec et Doc, Paris

Kossuga M.H., Nascimento A.M., Reimão J.Q., Tempone A.G., Taniwaki N.N., Veloso K., Ferreira A.G., Cavalcanti B.C., Pessoa C., Moraes M.O., Mayer A.M.S., Hajdu E., Berlinck R.G.S. [2008] Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* Collected in Brazil. ***Journal of Natural Product***, **71**, 334-339

Kubota T., Ishiguro Y., Takahashi-Nakaguchi A., Fromont J., Gonoi T., Kobayashi J. [2013] Manzamenones L-N, new dimeric fatty-acid derivatives from an Okinawan marine sponge *Plakortis sp*. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***, **23**, 244-247

Lee H.S., Rho J.R., Sim C.J., Shin J. [2003] New acetylenic acids from a sponge of the genus *Stelletta*. ***Journal of Natural Products***, **66**, 566-568

Lejeune P. [2003] Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. ***Trends in microbiology***, **11**, 4, 179-184

Liaw C.-C., Chang F.-R., Chen S.-L., Wu C.-C., Lee K.-H., Wu Y.-C. [2005] Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, **13**, 4767-4776

Limna Mol V.P., Raveendran T.V., Parameswaran P.S. [2009] Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). ***International Biodeterioration & Biodegradation***, **63,** 67-72

Ma W. S., Mutka T., Vesley B., Amsler M.O., McClintock J.B., Amsler C.D., Perman J.A., Singh M.P., Maiese W.M., Zaworotko M.J., Kyle D.E., Baker B.J. [2009] Norselic acids A-E, highly oxidized anti-infective steroids that deter mesograzer predation, from the Antarctic sponge *Crella* sp. ***Journal of Natural Product*, 72**, 12, 1842–1846

Mai T., Tintillier F., Lucasson A., Moriou C., Bonno E., Petek S., Magré K., Al Mourabit A., Saulnier D., Debitus C. [2015] Quorum sensing inhibitors from *Leucetta chagosensisv* Dendy, 1863. ***Letters in Applied Microbiology***, **61**, 311-317

Matsunaga S., Fusetani N., Hashimoto K., Walchli M. [1989] Theonellamide F, a novel antifungal bicyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of the American Chemical Society***, **111**, 2582-2588

Matsunaga S., Fusetani N. [1995] Theonellamides A-E, cytotoxic bicyclic peptides, from a marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of Organic Chemistry***, **60**, 5, 1177-1181

Matsunaga S., Okada Y., Fusetani N., Van Soest R.W.M. [2000] An antimicrobial C14 acetylenic acid from a marine sponge *Oceanapia* species. ***Journal of Natural Products***, **63**, 690-691

Mayer A.M., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman D.J., Potts B. C., Shuster D.E. [2010] The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. ***Trends in Pharmalogical Sciences***, **31**, 6, 255-265

McIntyre D.E., Faulkner D.J., Van Engen D., Clardy J. [1979] Renierone, an antimicrobial metabolite from a marine sponge. ***Tetrahedron Letters***, **43**, 4163-4166

Mencarelli A., D'Amore C., Renga B., Cipriani S., Carino A., Sepe V., Perissutti E., D'Auria M.V., Zampella A., Distrutti E., Fiorucci S. [2014] Solomonsterol A, a marine pregnane-x-receptor agonist, attenuates inflammation and immune dysfunction in a mouse model of arthritis. ***Marine Drugs***, **12**, 36-53

Mitsui-Saitoa M., Ohkuboa S., Obaraa Y., Yanagisawab T., Kobayashi J., Ohizumia Y., Nakahata N. [2003] Theonezolide A, a novel marine macrolide, induces drastic shape change in rabbit platelets by reorganization of microtubules. ***Thrombosis Research***, **108**, 133-138

Molinski T.F., Biegelmeyer R., Stout E.P., Wang X., Frota J.M.L.C., Henriques A.T. [2013] Halisphingosines A and B, modified sphingoid bases from *Haliclona tubifera*. Assignment of configuration by circular dichroism and van't Hoff's principle of optical superposition. ***Journal of Natural Products***, **76**, 374-381

Monica C.D., Randazzo A., Bifulco G., Cimino P., Aquino M., Izzo I., De Riccardisc F., Gomez-Palomaa L. [2002] Structural revision of halipeptins: synthesis of the thiazoline unit and isolation of halipeptin C. ***Tetrahedron Letters***, **43**, 5707-5710

Mudianta I.W., Katavic P.L., Lambert L.K., Hayes P.Y., Banwell M.G., Munro M.H.G., Bernhardt P.V., Garson M.J. [2010] Structure and absolute configuration of 3-alkylpiperidine alkaloids from an Indonesian sponge of the genus *Halichondria*. ***Tetrahedron***, **66**, 2752-2760

Mulzer J., Meyer F., Buschmann J., Luger P. [1995] Asymmetric-synthesis of the C26-C32 tetrahydropyran moiety of swinholide A by hetero-diels-alder reaction. ***Tetrahedron letters***, **36**, 20, 3503-3506

Murata M., Miyagawa-Kohshima K., Nakanishi K., Naya Y. [1986] Characterization of compounds that induce symbiosis between sea anemone and anemone fish. ***Science***, **234**, 585-587

Muricy G., Diaz M.C. [2002] Order Homosclerophorida Dendy, 1905. Family Plakinidae Schulze, 1880. pp. 71-82. *In*: Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M. (Eds) ***Systema porifera: a guide to the classification of sponges***, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York

Nagasawa K., Shimizu I., Nakata T. [2002] Total synthesis of preswinholide A: Stereoselective synthesis of the C11-C23 segment. ***Tetrahedron letters***, **37**, 38, 6881-6884

Nakamura H., Kobayashi J., Mitsubishi-Kasei Y.O., Hirata Y. [1984] Novel bisasolene-type sesquiterpenoids with a conjugated diene isolated from the okinawan sea sponge *Theonella* cf. *swinhoei*. ***Tetrahedron Letters***, **25**, 47, 5401-5404

Nakamura H., Kobayashi J., Nakamura Y., Ohizumi Y., Kondo T., Hirata Y. [1986] Theonellamine B, a novel peptidal Na, K-Atpase inhibitor, from an Okinawan marine sponge of the genus *Theonella*. ***Tetrahedron Letters***, **27**, 36, 4319-4322

Nakao Y., Matsunaga S., Fusetani N. [1995] Three more cyclotheonamides, C, D, and E, potent thrombin inhibitors from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry***, **3**, 8, 1115-1122

Nakao Y., Oku N., Matsunaga S., Fusetani N. [1998] Cyclotheonamides E2 and E3, new potent serine protease inhibitors from the marine sponge of the genus *Theonella*. ***Journal of Natural Products***, **61**, 667-670

Nakao Y., Masuda A., Matsunaga S., Fusetani N. [1999] Pseudotheonamides, serine protease inhibitors from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of the American Chemical Society***, **121**, 2425-2431

Nakao Y., Fujita M., Warabi K., Matsunaga S., Fusetani N. [2000] Miraziridine A, a novel cysteine protease inhibitor from the marine sponge *Theonella* aff. *mirabilis*. ***Journal of the American Chemical Society***, **122**, 10462-10463

Nakata T., Komatsu T., Nagasawa K., Yamada H., Takahashi T. [1994] Synthetic study of marine macrolide swinholide A stereocontrolled synthesis of the C11-C23 segment. ***Tetrahedron letters***, **35**, 44, 8225-8228

Nicolaou K.C., Ajito K., Patron A.P., Khatuya H., Richter P.K., Bertinato P. [1996] Total Synthesis of swinholide A. ***Journal of the American Chemical Society***, **118**, 3059-3060

Nong X.-H., Zhang X.-Y., Xu X.-Y., Sun Y.-L., Qi S.-H. [2014] Alkaloids from *Xylariaceae* sp., a marine-derived fungus. ***Natural Products Communication***, **9**, 467-475

Nozawa K., Tsuda M., Tanaka N., Kubota T., Fukushi E., Kawabata J., Kobayashi J. [2013] Stereochemistry of Theonezolides A-C. ***Tetrahedron Letters***, **54**, 783-787

Nuzzo G., Ciavatta M.L., Villani G., Manzo E., Zanfardino A., Varcamonti M., Gavagnin M. [2012] Fulvynes, antimicrobial polyoxygenated acetylenes from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. ***Tetrahedron***, **68**, 754-760

Ogimura T., Futami K., Katagiri T., Maita M., Gonçalves A.T., Endo M. [2012] Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria. ***Aquaculture***, **78**, 1255-1262

Okada Y., Matsunaga S., Van Soest R.W.M., Fusetani N. [2002] Nagahamide A, an antibacterial depsipeptide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Organic Letters***, **4**, 18, 3039-3042

Oku N., Nagai K., Shindoh N., Terada Y., Van Soest R.W.M., Matsunaga S., Fusetani N. [2004] Three new cyclostellettamines, which inhibit histonedeacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. ***Biooganic Medicinal Chemistry Letters***, **14**, 2617-2620

Oku N., Krishnamoorthy R., Benson A.G., Ferguson R.L., Lipton M.A., Phillips L.R., Gustafson K.R., McMahon J.B. [2005] Complete stereochemistry of Neamphamide A and absolute configuration of the *β*-Methoxytyrosine residue in papuamide B. ***Journal of Organic Chemistry***,**70**, 6842-6847

Ortega M.J., Zubía E., Carballo J.L., Salva J. [1996] Fulvinol, a new long-chain diacetylenic metabolite from the sponge *Reniera fulva*. ***Journal of Natural Products***, **59**, 1069-1071

Parameswaran P.S., Naik C.G., Kamat S.Y. [1998] Renieramycins H and I, two novel alkaloids from the sponge *Haliclona cribricutis*. ***Indian Journal of Chemistry***, **37**, 1258-1263

Paterson I., Cumming J.G. [1992] A stereocontrolled synthesis of a C19-C32/C17-C30 segment for swinholide A and misakinolide A, cytotoxic dimeric macrolides from *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron letters***, **33**, 20, 2847-2850

Paterson I., Smith J.D. [1992] Stereocontrolled synthesis of a C1-C15 segment for the marine macrolides, swinholide A and scytophycin C: use of a vinylogous Mukaiyama aldol reaction. ***Journal of Organic Chemistry***, **57**, 3261-3264

Paterson I., Smith J.D., Ward R.A., Cumming J.G. [1994] Total synthesis of (-)-preswinholide A. ***Journal of the American Chemical Society***, **116**, 6, 2615-2616

Paterson I., Ward R.A., Smith J.D., Cumming J.G., Yeung K.S. [1995] The total synthesis of swinholide A. Part 3: A stereocontrolled synthesis of (-)-pre-swinholide A. ***Tetrahedron***, **51**, 34, 9437-9466

Patil A.D., Freyer A.J., Carte B., Johnson R.K., Lahouratate P. [1996a] Plakortides, novel cyclic peroxides from the sponge *Plakortis halichondrioides*: activators of cardiac SR-CA^{2+}-pumping ATPase. ***Journal of Natural Products***, **59**, 3, 219-223

Patil A.D., Freyer A.J., Bean M.F., Carte B.K., Westley J.W., Johnson R.K. Lahouratate P. [1996b] The plakortones, novel bicyclic lactones from the sponge *Plakortis halichondrioides*: activators of cardiac SR-Ca^{2+}-Pumping ATPase. ***Tetrahedron***, **52**, 2, 377-394

Patron A.P., Richter P.K.P.K., Tomaszewski M.J., Miller R.A., Nicolaou K.C. [1994] A convergent approach to swinholide A. Stereoselective construction of the C3-C17 fragment of swinholide A. ***Journal of the Chemical Society***, **9**, 1147-1150

Penez N., Culioli G., Perez T., Briand J.F., Thomas O.P., Blache Y. [2011] Antifouling properties of simple indole and purine alkaloids from the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. ***The Journal of Natural Products***, **74**, 2304-2308

Perry T.L., Dickerson A., Khan A.A., Kondru R.K., Beratan D.N., Wipf P., Kelly M., Hamann M.T. [2001] New peroxylactones from the Jamaican sponge *Plakinastrella onkodes*, with inhibitory activity against the AIDS opportunistic parasitic infection *Toxoplasma gondii*. ***Tetrahedron***, **57**, 1483-1487

Pham N.B., Butler M.S., Hooper J.N.A., Moni R.W., Quinn R.J. [1999] Isolation of xestosterol esters of brominated acetylenic fatty acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. ***Journal of Natural Products***, **62**, 1439-1442

Pisera A., Lévi C. [2002] Family Theonellidae Lendenfeld, 1903. pp. 327-337. *In*: Hooper J.N.A. & Van Soest R.W.M. (Eds.) ***Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. 1***, Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

Plaza A., Bifulco G., Masullo M., Lloyd J.R., Keffer J.L., Colin P.L., Hooper J.N.A., Bell L.J., Bewley C.A. [2010] Mutremdamide A and koshikamides C-H, peptide inhibitors of HIV-1 entry from different *Theonella* species. ***Journal of Organic Chemistry***, **75**, 4344-4355

Pulitzer-Finali G. [1993] A collection of marine sponges from East Africa. ***Annales Museo Civico Storia Naturale Giacomo Doria***, **89**, 247-350

Quinn R.J., Tucker D.J. [1985] A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. ***Tetrahedron Letters***, **26**, 1671-1672

Qureshi A., Stevenson C.S., Albert C.L., Jacobs R.S., Faulkner D.J. [1999] Homo- and norplakotenin, new carboxylic acids from the palauan sponge *Plakortis lita*. ***Journal of Natural Products***, **62**, 1205-1207

Qureshi A., Faulkner D.J. [2000] 7α-Hydroxytheonellasterol, a cytotoxic 4-methylene sterol from the Philippines sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **63**, 841-842

Rahm F., Hayes P.Y., Kitching W. [2004] Metabolites from marine sponges of the genus *Plakortis*. ***Heterocycles***, **64**, 1, 523-575

Ralifo P., Sanchez L., Gassner N.C., Tenney K., Lokey R.S., Holman T.R., Valeriote F.A., Crews P. [2007] Pyrroloacridine alkaloids from *Plakortis quasiamphiaster*: Structures and Bioactivity. ***Journal of Natural Product***, **70**, 95-99

Randazzo A., Bifulco G., Giannini C., Bucci M., Debitus C., Cirino G., Gomez-Paloma L. [2001] Halipeptins A and B: two novel potent anti-inflammatory cyclic depsipeptides from the Vanuatu marine sponge *Haliclona* species. ***Journal of the American Chemical Society***, **123**, 10870-10876

Rashid M.A., Gustafson K.R., Boswell J.L., Boyd M.R. [2000] Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptides from the marine sponge *Haliclona nigra*. ***Journal of Natural Products***, **63**, 956-959

Ratnayake A.S., Bugni T.S., Feng X., Harper M.K., Skalicky J.J., Mohammed K.A., Andjelic C.D., Barrows L. R., Ireland C.M. [2006] Theopapuamide, a cyclic depsipeptide from a papua New Guinea Lithistid sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **69**, 1582-1586

Raub M.F., Cardellina J.H. [1992] The piclavines, antimicrobial indolizidines from the tunicate *Clavelina picta*. ***Tetrahedron Letters***, **33**, 2257-2260

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. [1999] Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloriza tion assay. ***Free Radical Biology and Medicine*** **26**, 1231-1237

Reyes F., Fernández R., Urda C., Francesch A., Bueno S., De Eguilior C., Cuevas C. [2007] Njaoamines A-F, new cytotoxic polycyclic alkaloids from the haplosclerid sponge *Reniera* sp. ***Tetrahedron***, **63**, 2432-2438

Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. [1991] Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** **39**, 549-1552

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bram ley P.M., Pridham J.B. [1995] The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. ***Free Radical Research***, **22**, 375-383

Richter P.K., Tomaszewski M.J., Miller R., Patron A.P., Nicolaou K.C. [1994] Stereoselective construction of the C18-C32 fragment of swinholide A. ***Journal of the Chemical Society***, 1151-1152.

Ridley S.O. [1984]. Spongiidae. Report on the Zoological Collections made in the Indo-Pacific Ocean during the voyage of H.M.S. "Alert" 1881-1882

Rinehart K.L.J.R., Kobayashi J., Harbour G.C., Hughes R.G.J.R., Mizsak S.A., Scahill T.A. [1984] Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. ***Journal of the American Chemical Society***, **106**, 5, 1524-1526

Robert R.W., Mayne C.L., Ireland C.M., Brinen L.S., Clardy J. [1990] Plakinidines: cytotoxic alkaloid pigments from the Fijian sponge *Plakortis* sp. ***Tetrahedron Letters***, **31**, 23, 3271-3274

Roy M.C., Ohtani I.I., Tanaka J., Higa T., Satari R. [1999] Barangamide A, a new cyclic peptide from the Indonesian sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron Letters***, **40,** 5373-5376

Roy M.C., Ohtani I.I., Ichiba T., Tanaka J., Sataric R., Higa T. [2000] New cyclic peptides from the Indonesian sponge *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron***, **56**, 9079-9092

Rudi A., Afanii R., Gravalos L.G., Aknin M., Gaydou E., Vacelet J., Kashman Y. [2003] Three new cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis aff simplex*. ***Journal of Natural Products***, **66**, 682-685

Saito N., Sakai H., Suwanborirux K., Pummangura S., Kubo A. [2001] C13 NMR spectral assignment of 5-hydroxy-1,5-imino-3-benzazocin-4,7,10-trione derivatives: the revised structure of renieramycin H. ***Heterocycles***, **55**, 21-28

Sakai R., Higa T., Jefford C.W., Bernardinelli G. [1986] Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. ***Journal of the American Chemical Society***, **108**, 20, 6404-6405

Sakai R., Kohmoto S., Higa T., Jefford C.W., Bernardinelli G. [1987] Manzamine B and C, two novel alkaloids from the sponge *Haliclona* sp. ***Tetrahedron Letters***, **28**, 45, 5493-5496

Sato M., Takeuchi S., Ishibashi M., Kobayashl J. [1998] Studies on stereochemistry of theonezolides A-C: determination of absolute stereochemistry of the C4-C17 fragment. ***Tetrahedron***, **54**, 4819-4826

Schmidt E.W., Faulkner D.J. [1996] Palauolol, a new anti-inflammatory sesterterpene from the sponge *Fascaplysinopsis* sp. from Palau. ***Tetrahedron Letters***, **37**, 3951-3954

Schmidt E.W., Faulkner D.J. [1996] Absolute configuration of methyl *(2Z,6R,8R,9E)-3,6-epoxy-4,6,8-triethyl-*2,4,9-dodecatrienoate from the sponge *Plakortis halichondrioides*. ***Tetrahedron Letters***, **37**, 6681-668

Schmidt E.W., Harper M.K., Faulkner D.J. [1997] Mozamides A and B, cyclic peptides from a Theonellid sponge from Mozambique. ***Journal of Natural Products***, **60**, 779-782

Schmidt E.W., Bewley C.A., Faulkner D.J. [1998] Theopalauamide, a bicyclic glycopeptide from filamentous bacterial symbionts of the Lithistid sponge *Theonella swinhoei* from Palau and Mozambique. ***Journal of Organic Chemistry***, **63**, 1254-1258

Schmidt E.W., Faulkner D.J. [1998] Microsclerodermins C-E, antifungal cyclic peptides from the Lithistid marine sponges *Theonella* sp. and *Microscleroderma* sp. ***Tetrahedron***, **54**, 3043-3056

Schmidt G., Timm C., Köck M. [2009] New haliclamines E and F from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. ***Organic Biomolecules Chemistry***, **7**, 3061-3064

Schmidt G., Timm C., Köck M. [2011] Haliclocyclin C, a new monomeric 3-Alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic marine sponge *Haliclona viscosa*. ***Zeitschrift für Naturforschung***, **66b**, 745-748

Schmidt G., Timm C., Grube A., Volk C. A., Köck M. [2012] Viscosalines $B_{1,2}$ and $E_{1,2}$: challenging new 3-alkyl pyridinium alkaloids from the marine sponge *Haliclona viscosa*. ***Chemistry. A European Journal***, **18**, 8180-8189

Segraves N.L., Lopez S., Johnson T.A., Said S.A., Fu X., Schmitz F.J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A., Crews P. [2003] Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla - *Fascaplysinopsis* sponges and *Didemnum* tunicates. ***Tetrahedron Letters***, **44**, 3471-3475

Segraves N.L., Robinson S.J., Garcia D., Said S.A., Fu X., Schmitz F.J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A., Crews P. [2004] Comparison of fascaplysin and related alkaloids: A study of structures, cytotoxicities, and sources. ***Journal of Natural Products***, **67**, 783-792

Segraves N.L., Crews P. [2005] Investigation of brominated tryptophan alkaloids from two Thorectidae sponges: *Thorectandra* and *Smenospongia*. ***Journal of Natural Products***, **68**, 1484-1488

Seldes A.M., Rovirosa J., San Martin A., Gros E.G. [1985] A new sterol from the sponge *Haliclona chilensis* (Thiele). ***Birkhiuser Verlag***, **41**, 34-35

Sepčić K., Guella G., Mancini I., Pietra F., Serra M.D., Menestrina G., Tubbs K., Maček P., Turk T. [2012] Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. ***Journal of Natural Products***, **60**, 991-996

Sepe V., Ummarino R., D'Auria M.V., Chini M.G., Bifulco G., Renga B., D'Amore C., Debitus C., Fiorucci S., Zampella A. [2011] Conicasterol E, a small heterodimer partner sparing farnesoid X receptor modulator endowed with a pregnane X receptor agonistic activity, from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Medicinal Chemistry***, **55**, 84-93

Sepe V., D'Amore C., Ummarino R., Renga B., D'Auria M.V., Novellino E., Sinisi A., Taglialatela-Scafati O., Nakao Y., Limongelli V., Zampella A., Fiorucci S. [2014] Insights on pregnane-x-receptor modulation. Natural and semisynthetic steroids from *Theonella* marine sponges. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, **73**, 126-134

Sera Y., Adachi K., Fujii K., Shizuri Y. [2002] Isolation of haliclonamides: new peptides as antifouling Substances from a marine sponge Species, *Haliclona*. ***Marine Biotechnology***, **3**, 441-446

Sera Y., Adachi K., Fujii K., Shizuri Y. [2003] A new antifouling hexapeptide from a Palauan sponge, *Haliclona* sp. ***Journal of Natural Products***, **66**, 719-721

Sharma Om P., Bhat T.K. [2009] DPPH antioxidant assay revisited. ***Food chemistry***, **113**, 4, 1202

Shin I., Krische M.J. [2015] Formal synthesis of Premisakinolide A and C19-C32 of swinholide A *via* site-selective C-H allylation and crotylation of unprotected diols. ***Organic Letters***, **17**, 4686-4689

Shin J., Seo Y., Cho K.W., Rho J.-R., Paul V.J. [1998] Osirisynes A-F, highly oxygenated polyacetylenes from the sponge *Haliclona osiris*. ***Tetrahedron***, **54**, 8711-8720

Shoji N., Umeyama A., Shin K., Takeda K., Arihara S., Kobayashi J., Takei M. [1992] Two unique pentacyclic steroids with *cis* C/D ring junction from *Xestospongia bergquistia* Fromont, powerful inhibitors of histamine release. ***Journal of Organic Chemistry***, **57**, 2996-2997

Shulgin A., Shulgin A., [1997] ***TIHKAL (Tryptamines I Have Known and Loved) The Continuation***, 804 pages, Transform Press,U.S.

Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J. [2002] A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. ***Letters to Nature***, **417**, 552-555

Sinisi A., Calcinai B., Cerrano C., Dien H.A., Zampella A., D'Amore C., Renga B., Fiorucci S., Taglialatela-Scafati O. [2013a] Isoswinholide B and swinholide K, potently cytotoxic dimeric macrolides from *Theonella swinhoei*. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry***, **21**, 5332-5338

Sinisi A., Calcinai B., Cerrano C., Dien H. A., Zampella A., D'Amore C., Renga B., Fiorucci S., Taglialatela-Scafati O. [2013b] New tridecapeptides of the theonellapeptolide family from the Indonesian sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Organic Chemistry***, ***9***, 1643-1651

Slack R.D., Jacobine A.M.; Posner G.H. [2012] Antimalarial peroxides: advances in drug discovery and design. ***Medicinal Chemistry Communications***, **3**, 281-297

Smith C.J., Venables D.A., Hopmann C., Salomon C.E., Jompa J., Tahir A., Faulkner D.J., Ireland C.M. [1997] Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloid from two ascidians of the genus *Didemnum*. ***Journal of Natural Products***, **60**, 1048-1050

Sorek H., Rudi A., Aknin M., Gaydou E.M., Kashman Y. [2010] Isohalitulin and Haliclorensins B and C, three marine alkaloids from *Haliclona tulearensis*. ***Journal of Natural Products***, **73**, 456-458

Sperry S., Crews P. [1997] Haliclostanone sulfate and Halistanol sulfate from an Indo-Pacific *Haliclona* sponge. ***Journal of Natural Products***, **60**, 29-32

Sugo Y., Inouye Y., Nakayama N. [1995] Structures of nine oxygenated 4-methylene sterols from Hachijo marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Steroids***, **60**, 738-742

Taglialatela-Scafati O., Fattorusso E., Romano A., Scala F., Barone V., Cimino P., Stendardo E., Catalanotti B., Persico M., Fattorusso C. [2010] Insight into the mechanism of action of plakortins, simple 1,2-dioxane antimalarials. ***Organic Biomolecules Chemistry***, **8**, 4, 846-856

Takeuehi S., Kikuehi T., Tsukamoto S., Ishibashi M., Kobayashi J. [1995] Three new oxylipins related to 3,6 dioxo-4-docosenoic acid from Okinawan marine sponges, *Plakortis* sp. ***Tetrahedron***, **51**, 21, 5979-5986

Tanaka J., Higa T., Kobayashi M., Kitagawa I. [1990] Marine Natural Products. XXIV. The absolute stereostructure of Misakinolide A, a potent cytotoxic dimeric macrolide from an Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, **38**, 11, 2967-2970

Tanaka N., Asai M., Takahashi-Nakaguchi A., Gonoi T., Fromont J., Kobayashi J. [2013] Manzamenone O, new trimeric fatty acid derivative from a marine sponge *Plakortis sp*. ***Organic letters***, **15**, 10, 2518-2521

Tanaka N., Asai M., Kusama T., Fromont J., Kobayashi J. [2015] Three new oxylipins from an Okinawan marine sponge *Plakortis sp*. ***Tetrahedron letters***, **56**, 1388-1391

Teruya T., Kobayashi K., Suenaga K., Kigoshi H. [2006] Cyclohaliclonamines A-E: dimeric, trimeric, tetrameric, pentameric, and hexameric 3-alkyl pyridinium alkaloids from a marine sponge *Haliclona* sp. ***Journal of Natural Products***, **69**, 135-137

Thomas T.R.A., Kavlekar D.P., LokaBharathi P.A. [2010] Marine drugs from sponge microbe association a review. ***Marine Drugs***, **8**, 4, 1417-1468

Thirionet I., Daloze D., Braekman J.C. [2006] 5-Bromoverongamine, a novel antifouling tyrosine alkaloid from the sponge *Pseudoceratina* sp. ***Natural Products Letters***, **12**, 209-214

Timm C., Volk C., Sasse F., Köck M. [2008] The first cyclic monomeric 3-alkylpyridinium alkaloid from natural sources: identification, synthesis and biological activity. ***Organic Biomolecules Chemistry***, **6**, 4036-4040

Todd J. S., Alvi K.A., Crews P. [1992] The isolation of a monomeric carboxylic acid of swinholide A from the indo-pacific sponge. *Theonella swinhoei*. ***Tetrahedron Letters***, **33**, 441-442.

Tolker-Nielsen T., Brinch U.C., Ragas P.C., Andersen J.B., Jacobsen C.S., Molin S. [2000] Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. ***Journal of bacteriology***, **182**, 22, 6482-6489

Torres Y.R., Berlinck R.G.S., Magalhães A., Schefer A.B., Ferreira A.G., Hajdu E., Muricy G. [2000] Arenosclerins A-C and haliclonacyclamine E, new tetracyclic alkaloids from a Brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. ***Journal of Natural Products***, **63**, 1098-1105

Tsuda M., Inaba K., Kawasaki N., Honma K., Kobayashi J. [1996] Chiral resolution of (±)-keramaphidin B and isolation of manzamine L, a new β-carboline alkaloid from a sponge *Amphimedon* sp. ***Tetrahedron***, **52**, 2319-2324

Tsuda M., Shimbo K., Kubota T., Mikami Y., Kobayashi J. [1999a] Two theonellapeptolide congeners from marine sponge *Theonella* sp. ***Tetrahedron***, **55**, 10305-10314

Tsuda M., Ishiyama H., Masuko K., Takao T., Shimonishi Y., Kobayashi Y. [1999b] Keramamides M and N, two new cyclic peptides with a sulfate ester from *Theonella* sponge. ***Tetrahedron***, **55**, 12543-12548

Tsukamoto S., Ishibashi M., Sasaki T., Kobayashi J. [1991] New congeners of swinholides from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. ***Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*** 1, 3185-3188

Tsukamoto S., Takeuchi S., Ishibashi M., Kobayashi J. [1992] Manzamenones A-F from the okinawan marine sponges *Plakortis* sp : Novel dimeric fatty acid derivatives possessing a bicyclo[4.3.0]nonane skeleton. ***Journal of Organic Chemistry***, **57**, 19, 5255-5260

Tymiak A.A., Rinehart K.L. [1985] Constituents of morphologically similar sponges. ***Tetrahedron***, **41**, 1039-1047

Uemoto H., Yahiro Y., Shigemori H., Tsuda M., Takao T., Shimonishi Y., Kobayashi J. [1998] Keramamides K and L, new cyclic peptides containing unusual tryptophan residue from *Theonella* sponge. ***Tetrahedron***, **54,** 6719-6724

Umeyama A., Shoji N., Enoki M., Arihara S. [1997] Swinhosterols A-C, 4-methylene secosteroids from the marine sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **60**, 296-298

Varoglu M., Peters B.M., Crews P. [1995] The structures and cytotoxic properties of polyketide peroxides from a *Plakortis* sponge. ***Journal of Natural Products***, **58**, 1, 27-36

Venkateswarlu Y., Reddy M.V.R., Rao J.V. [1994] Bis-1-oxaquinolizidines from the sponge *Haliclona exigua*. ***Journal of Natural Products***, **57**, 9,1283-1285

Viegelmann C., Parker J., Ooi T., Clements C., Abbott G., Young L., Kennedy J., Dobson A. D. W., Edrada-Ebel R. [2014] Isolation and identification of antitrypanosomal and antimycobacterial active steroids from the sponge *Haliclona simulans*. ***Marine Drugs***, **12**, 2937-2952

Villa F., Remelli W., Forlani F., Gambino M., Landini P., Cappitelli F. [2013] Effects of chronic sub-lethal oxidative stress on biofilm formation by *Azotobacter vinelandii*. ***Biofouling***, **28**, 823-833.

Volk C.A., Lippert H., Lichte E., Köck M. [2004] Two new Haliclamines from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. ***European Journal of Organic Chemistry***, 3154-3158

Volk C.A., Köck M. [2003] Viscosamine: The first naturally occurring trimeric 3-alkyl pyridinium alkaloid. ***Organic letters***, **5**, 20, 3567-3569

Wang G.Y.S., Crews P. [1996] Geodisterol, a novel polyoxygenated sterol with an aromatic A ring from the tropical marine sponge *Geodia* sp. ***Tetrahedron Letters***, **37**, 8145-8146

Wang Q., Tang X., Luo X., De Voogd N.J., Li P., Li G. [2015] (+)- and (-)-Spiroreticulatine, a pair of unusual spiro bisheterocyclic quinoline-imidazole alkaloids from the South China Sea sponge *Fascaplysinopsis reticulata*. ***Organic Letters***, **17**, 3458-3461

Wegerski C.J., Hammond J., Tenney K., Matainaho T., Crews P. [2007] A serendipitous discovery of isomotuporin-containing sponge populations of *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **70**, 89-94

Wells R.J. [1976] A novel peroxyketal from a sponge. ***Tetrahedron Letters***, **17**, 2367-2368

West L.M., Faulkner D.J. [2006] Hexaprenoid hydroquinones from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. ***Journal of Natural Products***, **69**, 1001-1004

Williams D.H., Faulkner D.J. [1996] Three new acetylenes from the Palauan sponge *Haliclona* sp. ***Journal of Natural Products***, **59**, 1099-1101

Yong K.W.L., De Voss J.J., Hooper J.N.A., Garson M.J. [2010] Configurational assignment of cyclic peroxy metabolites provides an insight into their biosynthesis: isolation of plakortolides, seco-plakortolides, and plakortones from the Australian marine sponge *Plakinastrella clathrata*. ***Journal of Natural Product***, **74**, 194-207

Yong K.W.L., Lambert L.K., Hayes P.Y., De Voss J.J., Garson M.J. [2011] Oxidative processes in the Australian marine sponge *Plakinastrella clathrata*: Isolation of plakortolides with oxidatively modified side chains. ***Journal of Natural Product***, **75**, 351-360

Yong K.W.L., Barnych B., De Voss J.J., Vatèle J-M., Garson M.J. [2012] Plakortolide Stereochemistry Revisited: The checkered history of plakortolides E and I. ***Journal of Natural Product***, **75**, 1792-1797

Youssef D.T.A., Mooberry L.S. [2006] Hurghadolide A and Swinholide I, potent actin-microfilament disrupters from the red sea sponge *Theonella swinhoei*. ***Journal of Natural Products***, **69**, 154-157

Yu S., Deng Z., Proksch P., Lin W. [2006] Oculatol, oculatolide, and A-nor sterols from the sponge *Haliclona oculat*a. ***Journal of Natural Products***, **69**, 1330-1334

Zampella A., Giannini C., Debitus C., D'Auria M.V. [2001] Amphiasterins: a new family of cytotoxic metabolites from the marine sponge *Plakortis quasiamphiaster*. ***Tetrahedron***, **57**, 257-263

Zhang H.-J., Yi Y.-H., Lin H.-W. [2010] Oxygenated 4-methylidene sterols from the south China Sea sponge *Theonella swinhoei*. ***Helvetica Chimica Acta***, **93**, 1120-1126

Zhao Q., Lee S.Y., Hong J., Lee C.O., Im K.S., Sim C.J., Lee D.S., Jung J.H. [2003] New acetylenic acids from the marine sponge *Stelletta* species. ***Journal of Natural Products***, **66**, 408-411

Zheng C.J., Shao C.L., Wu L.Y., Chen M., Wang K.L., Zhao D.L., Sun X.P., Chen G.Y., Wang C.Y. [2013] Bioactive phenylalanine derivatives and cytochalasins from the soft coral-derived fungus, *Aspergillus elegans*. ***Marine Drugs***, **11**, 2054-2068

Zielinski J., Milkova T., Popov S., Marekov N., Djerassi C. [1982] Minor and trace sterols in marine invertebrates. Isolation and structure elucidation of 24-methyl-5α-cholesta-7,9, 24(28)-trien-3β-ol, the first naturally occurring $\Delta^{7,9}$ unsaturated marine sterol. ***Steroids***, **39**, 6, 675-680

Zobell C.E. [1943] The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol., 46(1), 39-56

Zubia E., Ortega M.J., Carballo J.L., Salva J. [1994] Sesquiterpene hydroquinones from the sponge *Reniera mucosa*. ***Tetrahedron***, **50**, 27, 8153-8160

Sites Internet (ordre alphabétique des pages d'accueil)

www.chemicalbook.com

www.chemicalbook.com/SpectrumEN_61-54-1_1HNMR.htm

www.marinlit.fr

www.marinespecies.org

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

www.unicancer.fr

LISTES DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES ORGANIGRAMMES

Liste des figures

Figure 1 : *Schéma de formation du biofouling en milieu marin* 31

Figure 2 : *Zone de collecte des invertébrés marins sélectionnés* 38

Figure 3 : *Eponges sélectionnées pour leur composition chimique* 41

Figure 4 : *Profils CLHP-DEDL des 7 éponges sélectionnées* 42

Figure 5 : *Profils RMN ^{1}H des 7 éponges sélectionnées* 43

Figure 6 : *Cytotoxicité des 22 éponges les plus actives : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB* 46

Figure 7 : *Principales éponges sélectionnées pour leur cytotoxicité sur la lignée cancéreuse KB* 46

Figure 8 : *Cytotoxicité des 4 éponges les plus actives : inhibition de la croissance des cellules de mélanome murin* 47

Figure 9 : *Eponges sélectionnées pour leur cytotoxicité sur les cellules de mélanome murin* 47

Figure 10 : *Activité antiplasmodium des 4 éponges les plus actives : inhibition de la croissance de P. falciparum* 48

Figure 11 : *Activité antiplasmodium des 4 éponges les plus actives : concentration inhibant 50% de la croissance de P. falciparum* 48

Figure 12 : *Eponges sélectionnées pour leur activité antiplasmodium* 49

Figure 13 : *Activité antioxydante des 8 éponges les plus actives* 50

Figure 14 : *Eponges sélectionnées pour leur activité antioxydante* 50

Figure 15 : *Molécules auto-inductrices rencontrées chez Vibrio harveyi* 51

Figure 16 : *Activité inhibitrice de la bioluminescence de la bactérie marine Vibrio harveyi des 3 éponges actives* 52

Figure 17 : *Eponges sélectionnées pour leur activité inhibitrice de la bioluminescence de la bactérie marine Vibrio harveyi* 52

Figure 18 : *Photographie in situ de Plakortis kenyensis* 57

Figure 19 : *Fractionnement de Plakortis kenyensis pour l'obtention des métabolites **PK1** et **PK2*** 66

Figure 20 : *Métabolites isolés de Plakortis kenyensis : Bilan structure/activité* 74

Figure 21 : *Structure schématique des polycétides endoperoxydes isolés d'éponges du genre Plakortis* 76

Figure 22 : *Proposition d'un mécanisme d'action antimalarique de la plakortine **P22** et de la dihydroplakortine **P6*** 77

Figure 23 : *Photographie in situ de Theonella swinhoei* 83

Figure 24 : *Fractionnement de Theonella swinhoei pour l'obtention du métabolite **TS1*** 96

Figure 25 : *Métabolite isolé de Theonella swinhoei : Bilan structure/activité* 103

Figure 26 : *Photographie in situ de Haliclona (Reniera) fascigera* 108

Figure 27 : *Fractionnement d'Haliclona fascigera pour l'obtention du métabolite **HF1*** 120

Figure 28 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **HF1*** 123

Figure 29 : *Métabolite isolé d'Haliclona fascigera : Bilan structure/activité* 125

Figure 30 **:** *Photographie in situ de Fascaplysinopsis reticulata* 130

Figure 31 : *Fractionnement de Fascaplysinopsis reticulata pour l'obtention des métabolites **FR1**-**FR8*** 137

Figure 32 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR2*** 141

Figure 33 **:** *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR3*** 144

Figure 34 **:** *Structures de l'aplysinopsine et des stéréoisomères (E/Z)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-N-méthyl-aplysinopsine* 147

Figure 35 **:** *Profil CLHP-DEDL du mélange **FR4**-**FR5** isolé de Fascaplysinopsis reticulata* 147

Figure 36 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR6*** 149

Figure 37 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR7*** 151

Figure 38 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **FR8*** 153

Figure 39 : *Métabolites isolés de Fascaplysinopsis reticulata : Bilan structure/activité* 158

Figure 40 : *Aplysinosines isolées d'organismes marins* 164

Liste des tableaux

Tableau I : *Interprétation des résultats du test antiplasmodium* 48

Tableau II : *Bilan des criblages chimique et biologiques* 55

Tableau III : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H du plakortolide et du plakortolide I de la littérature à ceux observés pour **PK1** (500 MHz, $CDCl_3$)* 68

Tableau IV : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de l'acide andavadoïque de la littérature (400 MHz, $CDCl_3$) à ceux observés pour **PK2** (500 MHz, $CDCl_3$)* 69

Tableau V : *Activité antiplasmodium du plakortolide E (**PK1**) et de l'acide andavadoïque (**PK2**) isolés de Plakortis kenyensis* 70

Tableau VI : *Activité QSI du plakortolide E (**PK1**) et de l'acide andavadoïque (**PK2**) isolés de Plakortis kenyensis sur la bactérie bioluminescente Vibrio harveyi et ses souches mutantes : JAF 375, JMH 597, JMH 612* 72

Tableau VII : *Souches bactériennes marines utilisées* 73

Tableau VIII : *Activité antibactérienne de **PK1** et **PK2** isolés d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus* 74

Tableau IX : *Activité antimalariale in vitro de peroxydes cycliques isolés d'éponges du genre Plakortis* 78

Tableau X : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H du swinholide A de la littérature (500 MHz, $CDCl_3$) à ceux observés pour **TS1** (500 MHz, $CDCl_3$)* 98

Tableau XI : *Activité antiplasmodium du swinholide A isolé de Theonella swinhoei* 99

Tableau XII : *Activité QSI du swinholide A (**TS1**) isolé de Theonella swinhoei sur la bactérie bioluminescente Vibrio harveyi et ses souches mutantes : JAF 375, JMH 597, JMH 612* 101

Tableau XIII : *Activité antibactérienne de **TS1** isolé d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus* 102

Tableau XIV : *Données de la RMN 1D et 2D pour HF1 enregistrées dans $CDCl_3$ à 500MHz* 123

Tableau XV : *Activité antiplasmodium du métabolite HF1 isolé d'Haliclona fascigera* 124

Tableau XVI : *Activité antibactérienne de **HF1** isolé d'Haliclona fascigera sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus* 125

Tableau XVII : *Exemples d'acides gras acétyléniques isolés d'éponges* 127

Tableau XVII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de la tryptamine de la littérature (400 MHz, DMSO-D_6) à ceux observés pour **FR1** (500 MHz, CD_3OD)* 139

Tableau XIX : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR2** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz* 141

Tableau XX : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de la gelliusine F de la littérature (CD_3OD, 500 MHz) à ceux observés pour le composé **FR3** (CD_3OD, 500 MHz)* 143

Tableau XXI : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR3** enregistrées dans CD_3OD à 300MHz* 144

Tableau XXII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de la (E)- et la (Z)-6-bromo-2'-déméthyl-3'-N-méthyl-aplysinopsine de la littérature (500 MHz, DMSO-D_6) à ceux observés pour **FR4-FR5** (500 MHz, DMSO-D_6)* 146

Tableau XXIII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR6** enregistrées dans CD_3OD à 300 MHz* 149

Tableau XXIV : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR7** enregistrées dans CD_3OD à 600 MHz* 151

Tableau XXV : *Données de la RMN 1D et 2D pour **FR8** enregistrées dans CD_3OD à 600 MHz* 153

Tableau XXVI : *Activité antiplasmodium des métabolites isolés de Fascaplysinopsis reticulata* 154

Tableau XXVII : *Activité antibactérienne de **FR1, FR2, FR3, FR4-FR5, FR6, FR7** et **FR8** isolés de Fascaplysinopsis reticulata sur les bactéries marines Shewanellia putrefaciens, Roseobacter littoralis, Vibrio carchariae, Vibrio natrigens et Vibrio proteolyticus* 156

Tableau XXVIII: *Origine et bioactivités des aplysinopsines* 166

Tableau XXIX : Révélateurs utilisés pour les CCM 177

Tableau XXX : Conditions d'utilisation de l'ASE 181

Liste des organigrammes

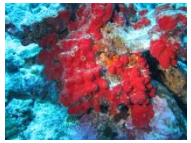
Organigramme 1 : *Objectifs des programmes BIOMOL TCN et POMARE* 36
Organigramme 2 : *Bilan Eponges / Molécules / Activités* 174

ANNEXE I

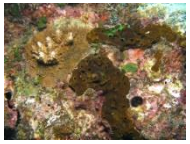
LISTE DES INVERTEBRES MARINS ETUDIES

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
Amphimedon sp		**MAY13 161**	**Mayotte** Kani tip 12°57.624' S 45°04.697' E 10 m	Aucune activité détectée	16,3	0,804	4,9	ASE
Axinella aff. donnani		**MAD11 BA067**	**Madagascar** Baie des Assassins 22°13.025 S 43°13.577 E	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50}=3,32 µg/mL	89,6	5,303	5,9	Macération
Biemna laboutei		**MAD11 BA024**	**Madagascar** Dos de la baleine 22°14.857 S 43°10.892 E	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50}=6,75 µg/mL **Activité antioxydante** ABTS : 414 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 5 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	37,1	2,911	7,8	Macération
***Biemna* sp.1**		**MAY13 148**	**Mayotte** 12°58.860 S 45°05.025 E 15-20 m	Aucune activité détectée	8,5	0,879	10,3	Macération*
***Biemna* sp.2**		**MAY13 085**	**Mayotte** Chira Le Poe reef 12°58.021' S 45°03.778' E 20 m	Aucune activité détectée	8,5	0,879	10,3	Macération*
Biemna triraphis		**MAY13 098**	**Mayotte** 12°56.388' S 45°03.247' E 9-18 m	**Cytotoxicité sur cellules de mélanome murin** % inhibition à 10 µg/mL : 60%	8,5	0,879	10,3	Macération*

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
***Callyspongia* sp. 3**		**MAY13 043** **MAY13 059**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m Pointe Sud 13°00.375' S 45°08.250' E 10-15 m	Aucune activité détectée	11,6	0,381	3,3	ASE
***Callyspongia* sp. 4**		**MAY13 093, 094**	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 20-24 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 98%	8,4	0,3	3,6	ASE
Crella cyathophora		**MAY13 158**	**Mayotte** Lagon, Face à la Passe Boueni 12°55.198' S 44°59.492' E 3-4 m	**Activité antifouling: Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 13-15 mm/0,5mg d'extrait brut	17,5	0,303	1,7	ASE
Cystodytes violatinctus		**MAY13 070**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m	Aucune activité détectée	15,3	0,289	1,9	ASE
***Dactylospongia* sp.**		**MAY13 162**	**Mayotte** Passe Bateau 12°58.653' S 44°58.949' E 15-17 m	**Activité antioxydante** ABTS : 324 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 387 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	15,0	0,229	1,5	ASE

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
Dragmacidon coccineum		**MAY13 046**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.592' S 44°58.005' E 10-12 m	Aucune activité détectée	18,0	0,600	3,3	ASE
		MAY13 083	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.265' S 44°58.126' E 22-27 m	Aucune activité détectée	25,7	1,190	4,6	ASE
		MAY13 100	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 4 m	Aucune activité détectée	20,9	1,200	3,9	ASE
		**MAY13 176**	**Mayotte** Grande passe de l'ouest 12°48.356' S 44°57.793' E 15 m	Aucune activité détectée	17,5	0,754	4,3	ASE
Fascaplysinopsis reticulata		**MAY13 187**	**Mayotte** Passe Bateau 12°58.653' S 44°58.949' E 15-17 m	**Activité antioxydante** ABTS : 450 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 373 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	28,0	0,146	0,5	ASE
Haliclona atra		**MAY13 018**	**Mayotte** Ranikiki 12°56.470' S 45°04.305' E 10-15 m	Aucune activité détectée	15,4	1,13	7,3	Macération*
Haliclona fascigera		**MAY13 054**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m	Aucune activité détectée	15,0	0,424	2,8	ASE

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
***Haliclona* sp. 1**		**MAY13 007**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99% **Activité antioxydante** ABTS : 1901 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 260 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	12,1	0,100	0,8	ASE
***Haliclona* sp. 3**		**MAY13 099**	**Mayotte** 12°56.388' S 45°03.247' E 9-18 m	Aucune activité détectée	7,7	0,207	2,7	ASE
Hyrtios erectus		**MAY13 143**	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 15-20 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99% **Cytotoxicité sur cellules de mélanome murin** % inhibition à 10 µg/mL : 66% **Activité antioxydante** ABTS : 340 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 263 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	10,0	1,000	10,0	Macération*
***Ircinia* sp. 1**		**MAY13 026**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	Aucune activité détectée	13,5	0,525	3,9	ASE
***Ircinia* sp. 2**		**MAY13 088**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.265' S 44°58.126' E 22-27 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 75% **Activité antioxydante** ABTS : 669 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 481 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	17,3	0,493	2,8	ASE
Jaspis splendens		**MAY13 079**	**Mayotte** Pointe Sud 13°00.375' S 45°08.250' E 10-15 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 86%	27,7	0,493	1,8	ASE

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
Lamellodysidae herbacea		**MAY13 069**	**Mayotte** Pointe Sud 13°00.375' S 45°08.250' E 10-15 m	Aucune activité détectée	16,3	1,160	7,1	Macération*
Liosina paradoxa (Forme tubulaire)		**MAY13 019**	**Mayotte** Ranikiki 12°56.470' S 45°04.305' E 10-15 m	Aucune activité détectée	18,0	0,396	2,2	ASE
Liosina paradoxa (Forme encroutante)		**MAY13 152**	**Mayotte** 12°58.860 S 45°05.025 E 15-20 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 86%	20,5	0,202	1,0	ASE
Myrmekioderma granulatum		**MAY13 170**	**Mayotte** Kani tip 12°57.624' S 45°04.697' E 12 m	Aucune activité détectée	11,0	140	1,3	ASE
***Neopetrosia* sp. 1**		**MAY13 012**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	Aucune activité détectée	13,3	3,170	23,8	Macération*
***Neopetrosia* sp. 2**		**MAY13 048**	**Mayotte** Chira Le Poe reef 12°58.021' S 45°03.778' E 20 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 98% **Activité antioxydante** ABTS : 893 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 219 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	22,8	0,897	3,9	ASE

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
***Neopetrosia* sp. 3**		**MAY13 102**	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 18-20 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100% **Activité antioxydante** ABTS : 1087 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 203 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	13,4	0,37	2,8	ASE
Oceanapia globosa		**MAY13 141**	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 22 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100%	20,2	0,680	3,4	ASE
		MAY13 127	**Mayotte** Passe Sada 12°54.141' S 44°57.862' 20 m	Aucune activité détectée	9,20	0,60	6,5	Macération*
		MAY13 178	**Mayotte** Grande passe de l'Ouest 12°48.356' S 44°57.793' E 32 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 74%	7,3	0,678	9,3	Macération*
Petrosia microxea		**MAY13 066, 077**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.265' S 44°58.126' E 22-27 m	Aucune activité détectée	13,3	0,207	1,6	ASE
Phyllospongia papyracea		**MAY13 045**	**Mayotte** Passe Boueni 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 97%	12,0	1,0	8,3	Macération*

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
***Plakinastrella* sp.**		**MAY13 011**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99%	15,7	0,796	5,1	ASE
Plakortis kenyensis		**MAD11 BA093**	**Madagascar** Dos de la baleine 22°14.886 S 43°10.829 E	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 97% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50}=1,56 µg/mL	185,7	2,668	1,4	Macération
***Pseudoceratina* sp. 1**		**MAY13 003**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 81% **Activité antibiotique: inhibition de la croissance de *Vibrio harveyi*** 13-17 mm/0,5mg d'extrait brut	15,8	0,478	3,0	ASE
Rhabdastrella globostellata		**MAY13 174**	**Mayotte** Grande passe de l'Ouest 12°48.356' S 44°57.793' E 32 m	**Cytotoxicité sur cellules de mélanome murin** % inhibition à 10 µg/mL : 78%	14,0	0,933	6,7	ASE
***Rhabdastrella* sp. 1**		**MAY13 021**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 10 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 80%	16,1	1,1	6,8	ASE
***Rhabdastrella* sp. 2**		**MAY13 031**	**Mayotte** Ranikiki (coral reef) 12°56.470' S 45°04.305' E 10-15 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 80% **Cytotoxicité sur cellules de mélanome murin** % inhibition à 10 µg/mL : 83%	20,1	1,0	5,0	ASE

Organismes		Numéro d'échantillon	Localisation	Activité biologique	Extraction			
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rdt (%)	Technique d'extraction
Scopalina hapalia		**MAY13 165**	**Mayotte** Kani tip 12°57.624' S 45°04.697' E 2-10 m	**Activité antioxydante** ABTS : 460 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL FRAP : 375 µM Equivalent Trolox à 1 mg/mL	26,6	0,525	2,0	ASE
Stylissa carteri		**MAY13 028**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 82% **Activité antifouling: Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 14-16 mm/0,5mg d'extrait brut	11,6	0,314	2,7	ASE
Stylissa massa		**MAY13 179**	**Mayotte** N'Gouja 12°57.784' S 45°02.806' E 1,5-2 m	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 76% **Activité antifouling: Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 13-15 mm/0,5mg d'extrait brut	12,9	0,800	6,2	ASE
***Svenzea* sp.**		**MAY13 120**	**Mayotte** Rocchi 12°59.536' S 45°03.183' E 10-20 m	Aucune activité détectée	18	2,1	11,7	Macération*
***Theonella* sp. 1**		**MAY13 015**	**Mayotte** Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	Aucune activité détectée	12,1	0,174	1,4%	ASE
Theonella swinhoei		**MAD11 BA041**	**Madagascar** Baie des Assassins 22°13.025 S 43°13.577 E	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 98% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50}=0,30 µg/mL	212,5	1,229	0,6	Macération

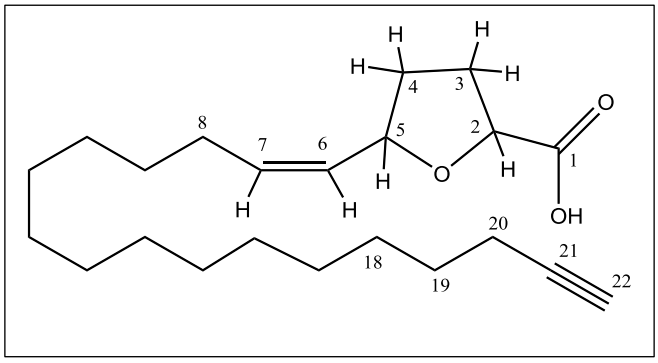
ANNEXE II

DONNEES SPECTRALES DES COMPOSES DE STRUCTURE NOUVELLE ISOLES DES EPONGES :

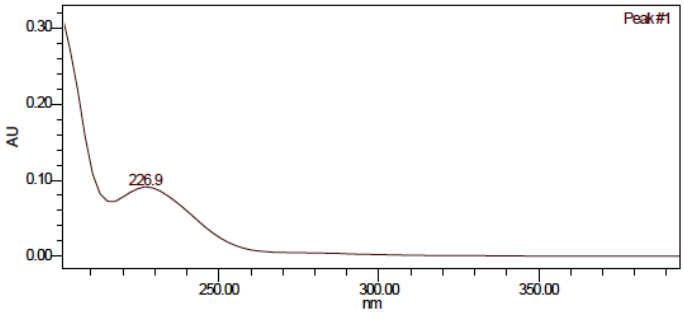
Haliclona fascigera & Fascaplysinopsis reticulata

ANNEXE II.1

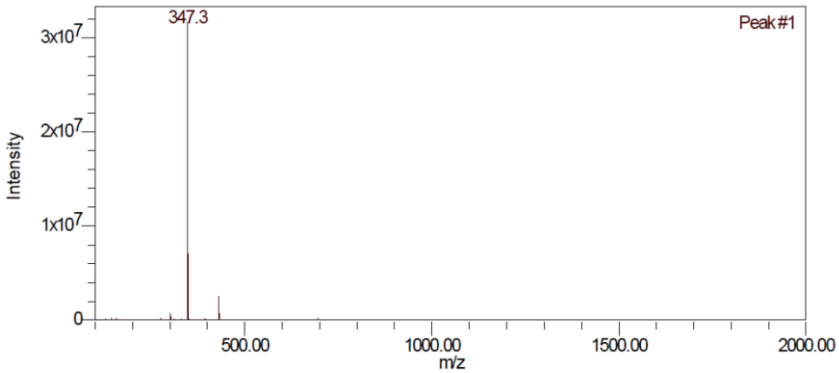
Données spectrales du composé HF1 isolé de l'éponge Haliclona fascigera



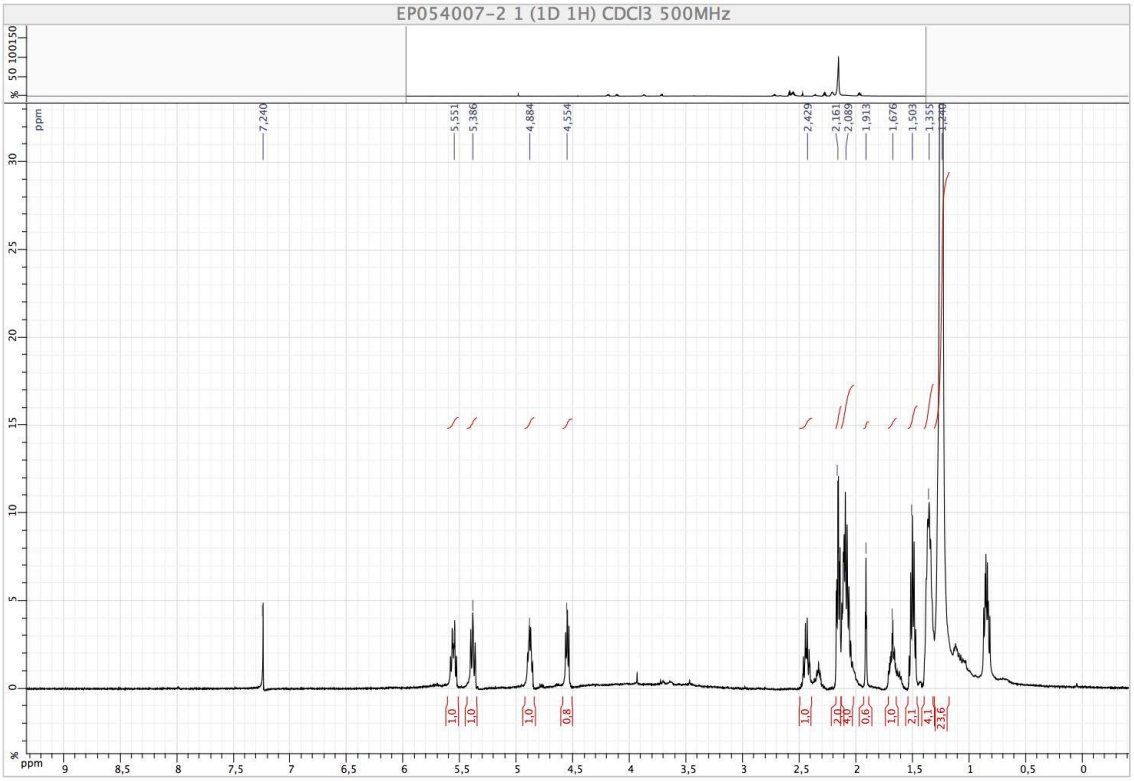
Acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (HF1)



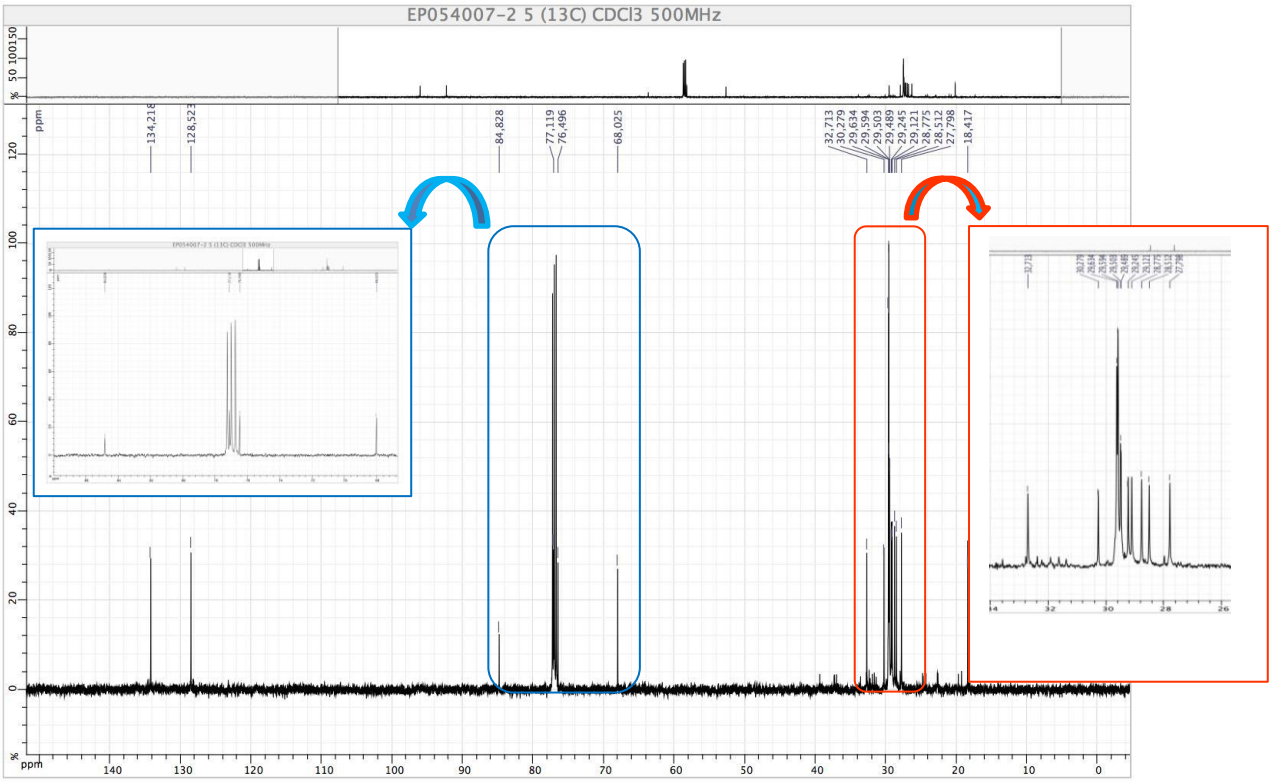
Spectre UV du composé **HF1**



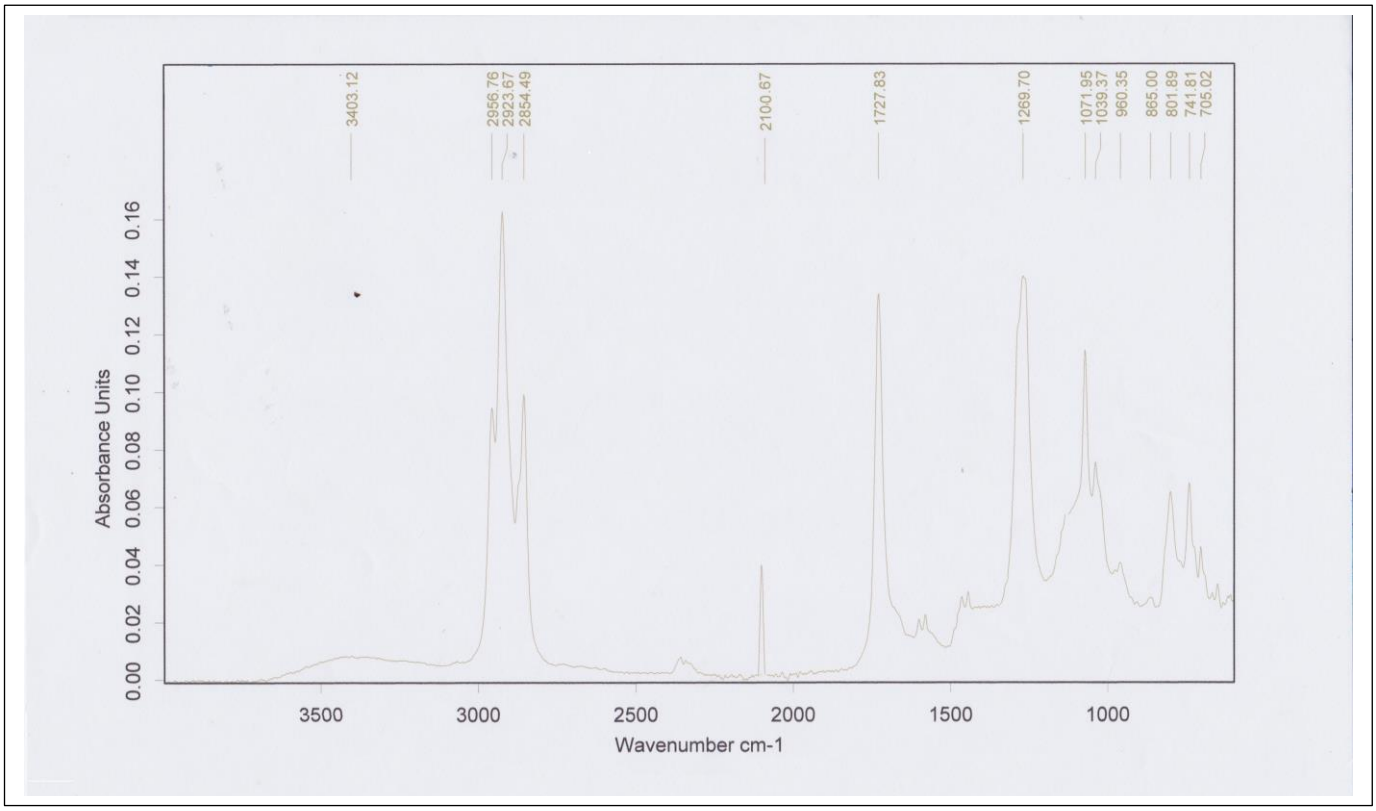
Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^-$) du composé **HF1**



Spectre RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) du composé **HF1**



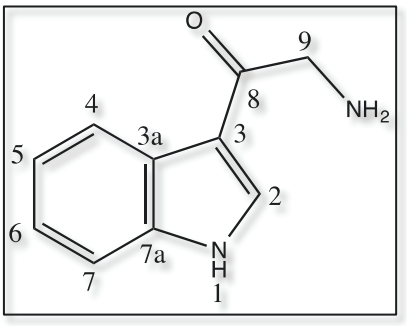
Spectre RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz) du composé **HF1**



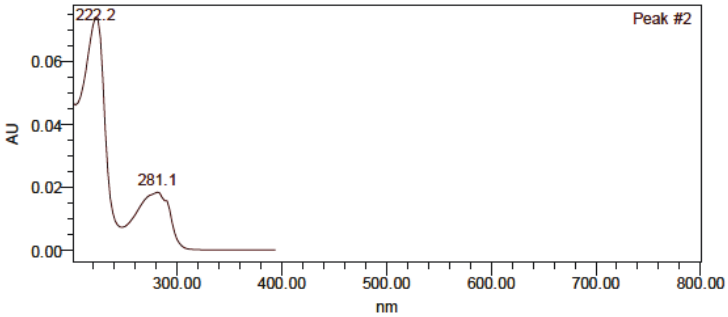
Spectre IR du composé **HF1**

ANNEXE II.2

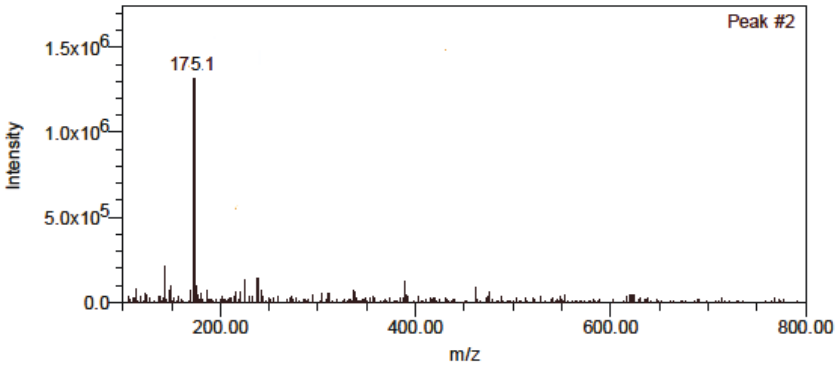
Données spectrales du composé FR2 isolé de l'éponge Fascaplysinopsis reticulata



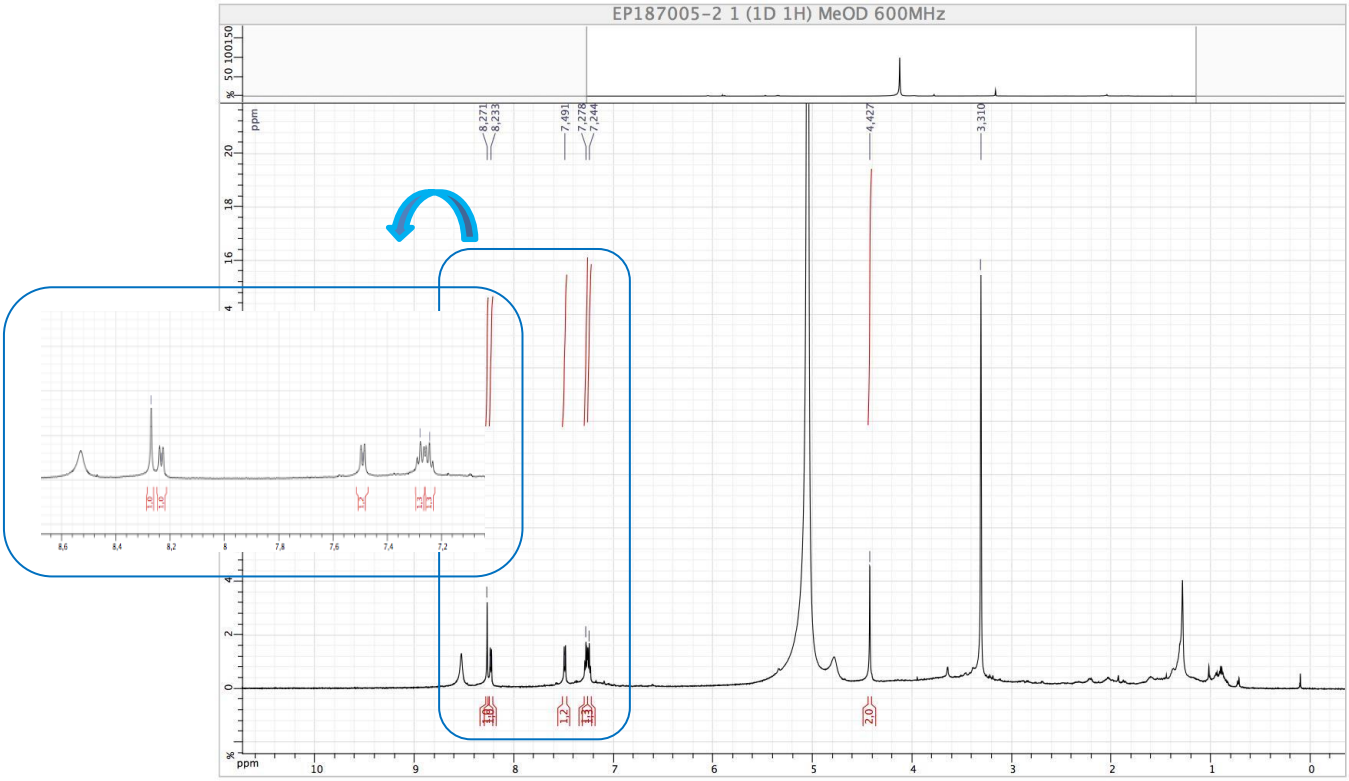
8-oxo-Tryptamine (FR2)



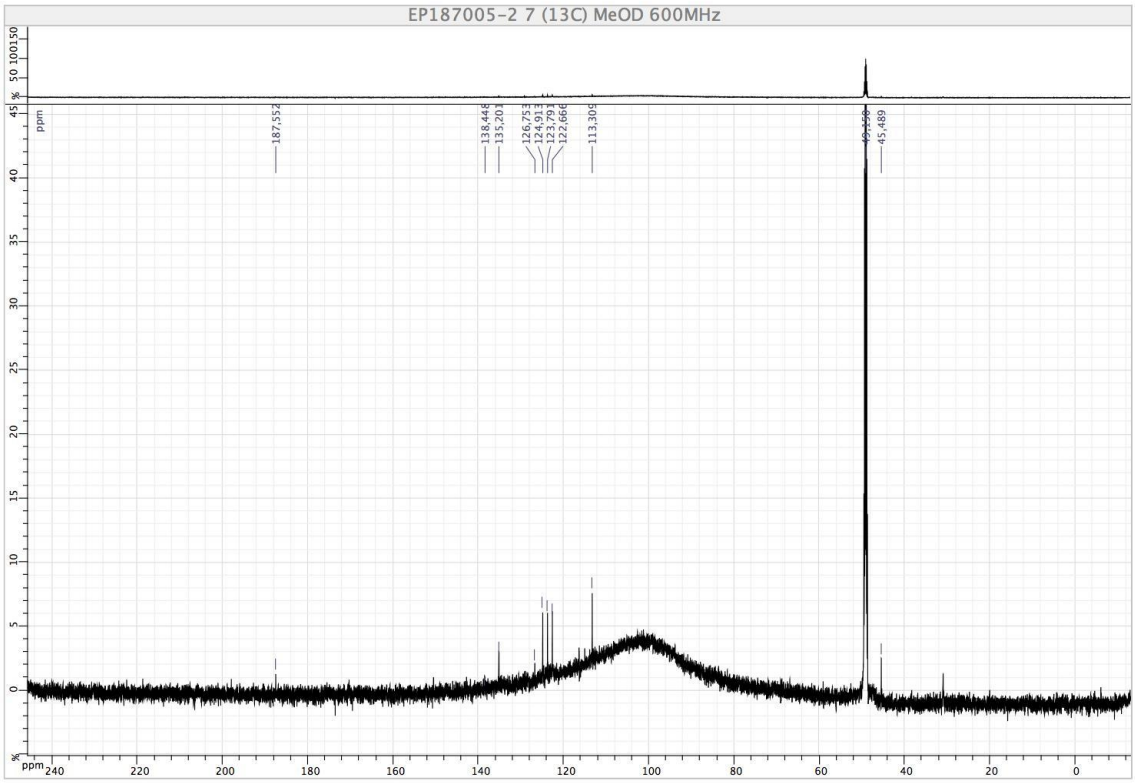
Spectre UV du composé **FR2**



Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^+$) du composé **FR2**



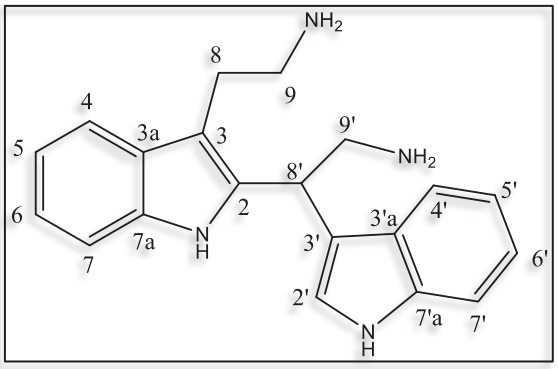
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz) du composé **FR2**



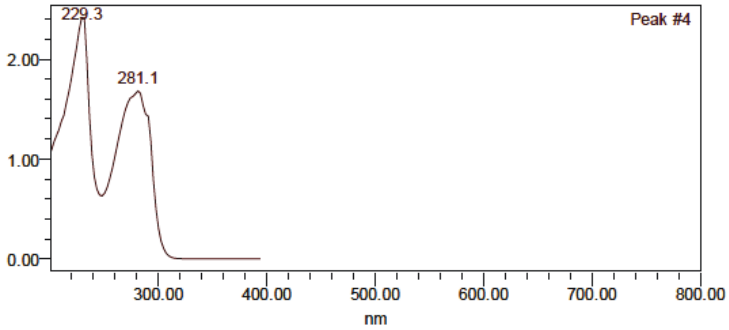
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 600 MHz) du composé **FR2**

ANNEXE II.3

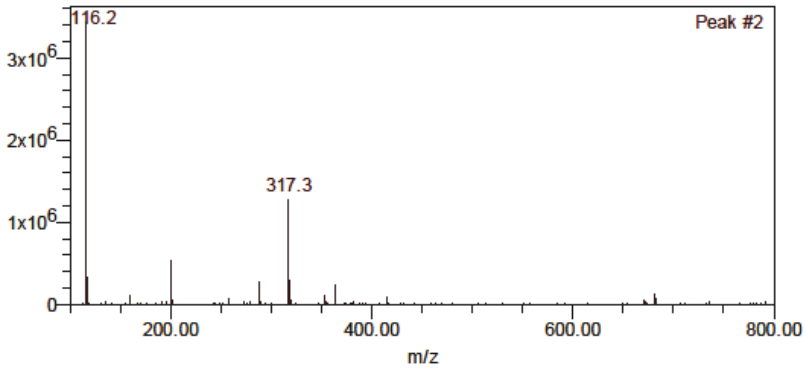
Données spectrales du composé FR3 isolé de l'éponge Fascaplysinopsis reticulata



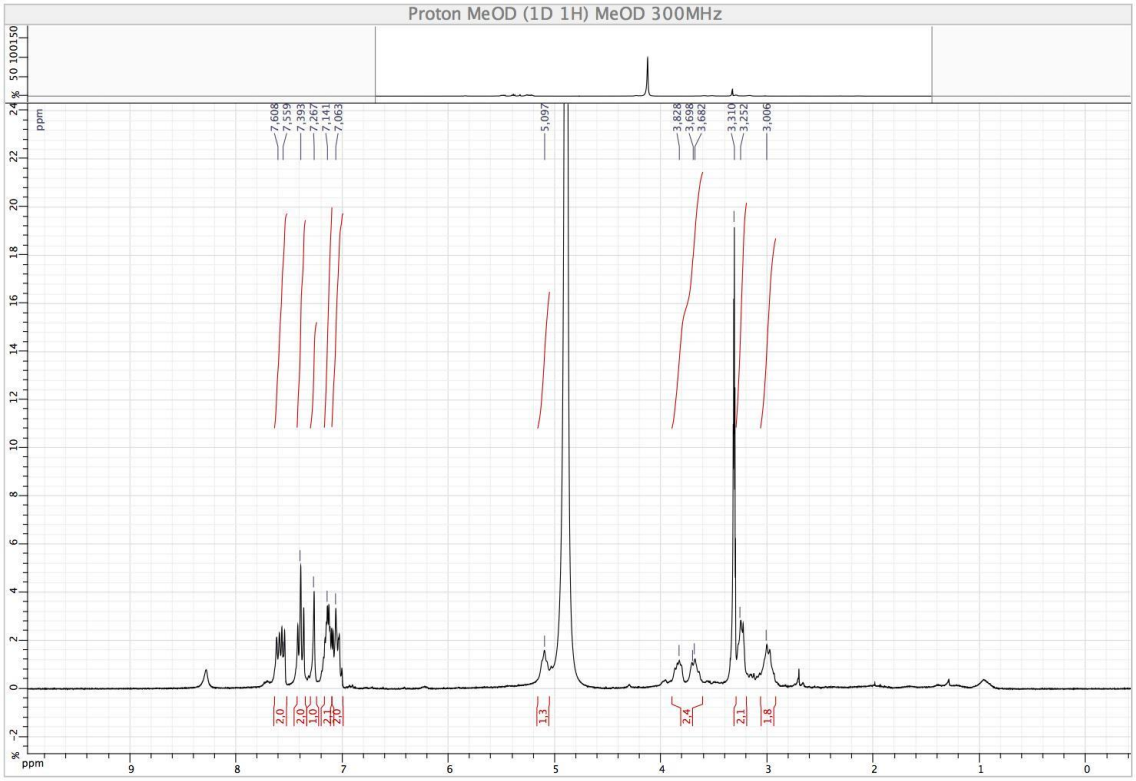
6,6'-bis-(débromo)-Gelliusine F (FR3)



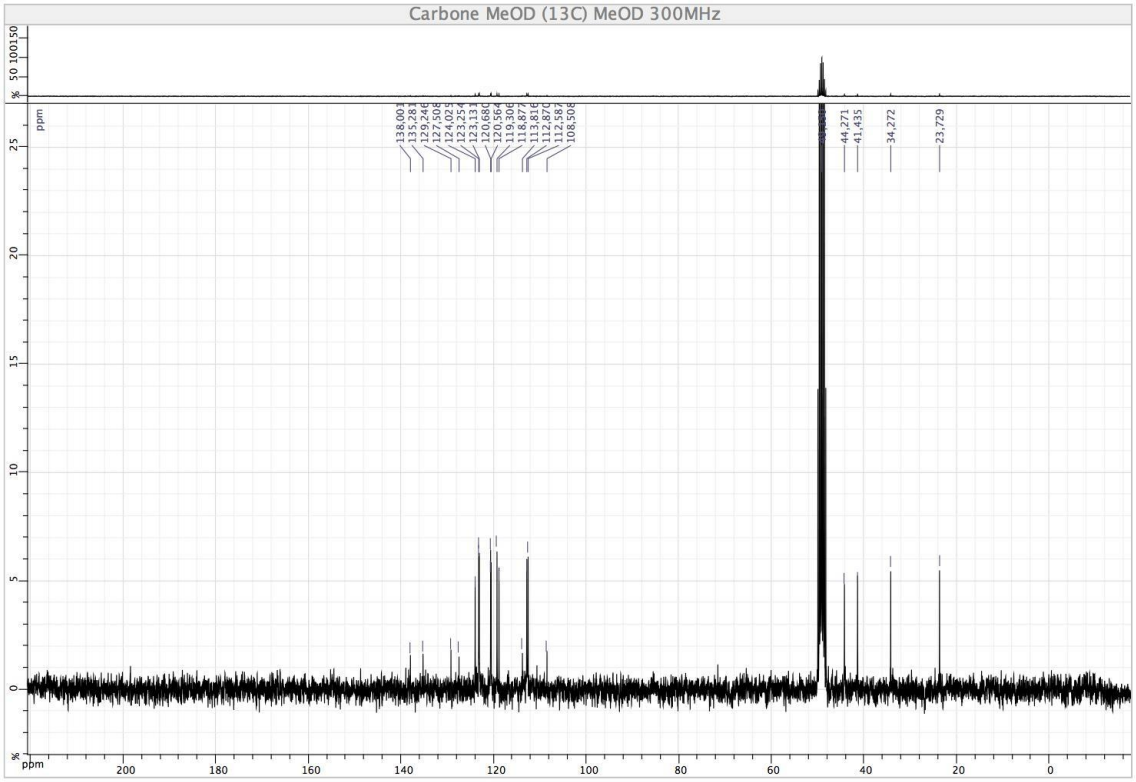
Spectre UV du composé **FR3**



Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^-$) du composé **FR3**



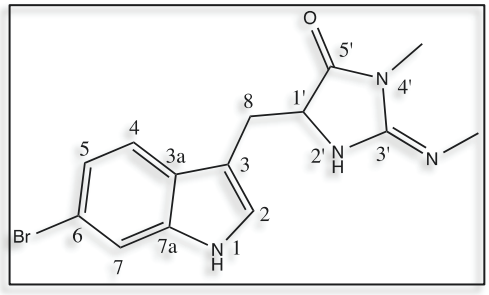
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) du composé **FR3**



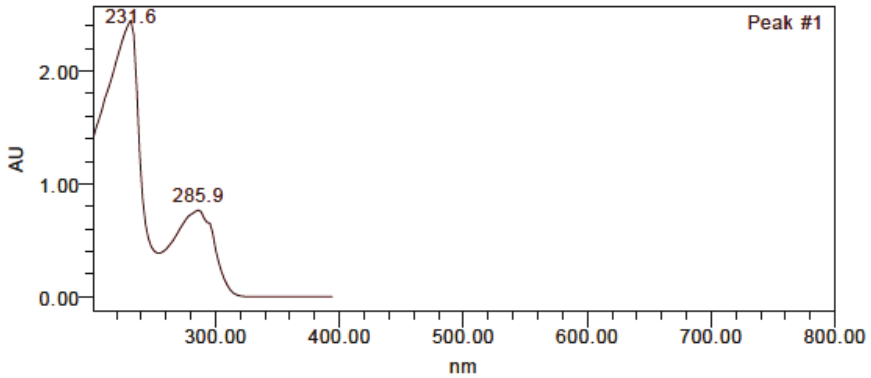
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 300 MHz) du composé **FR3**

ANNEXE II.4

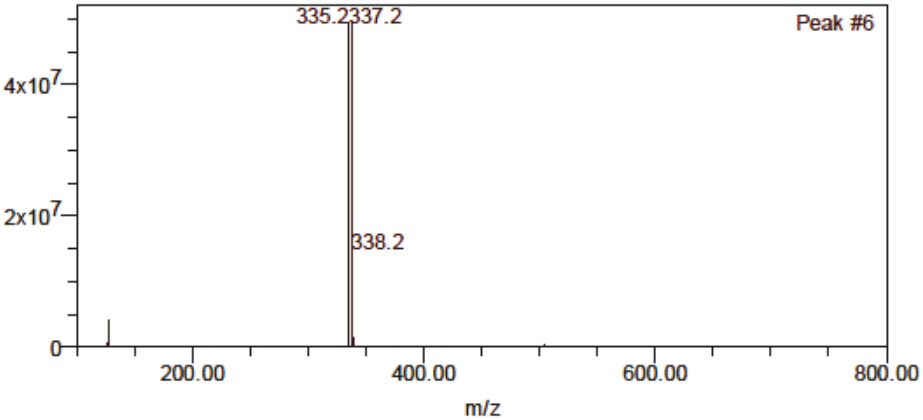
Données spectrales du composé FR6 isolé de l'éponge Fascaplysinopsis reticulata



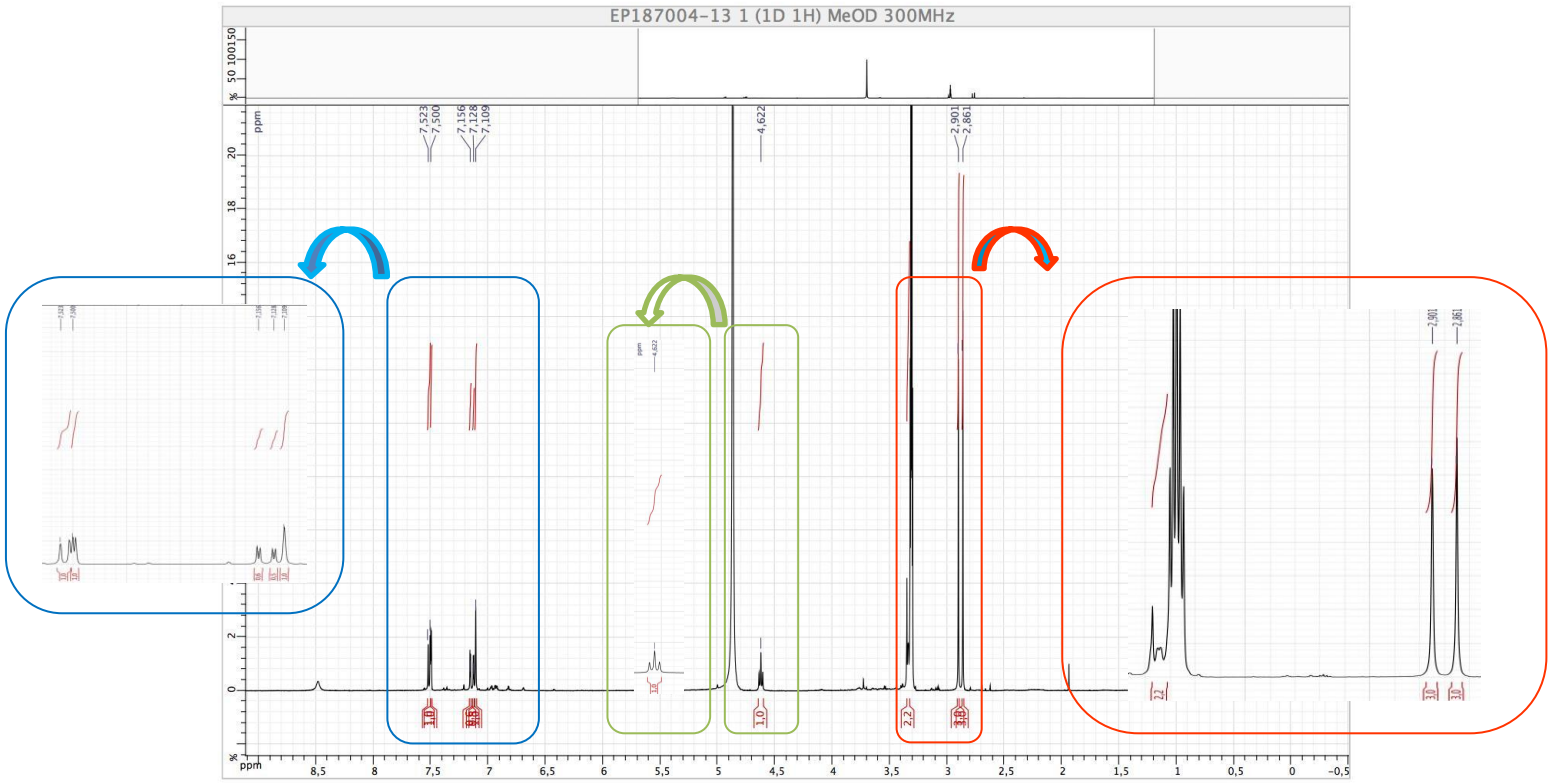
6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine (FR6)



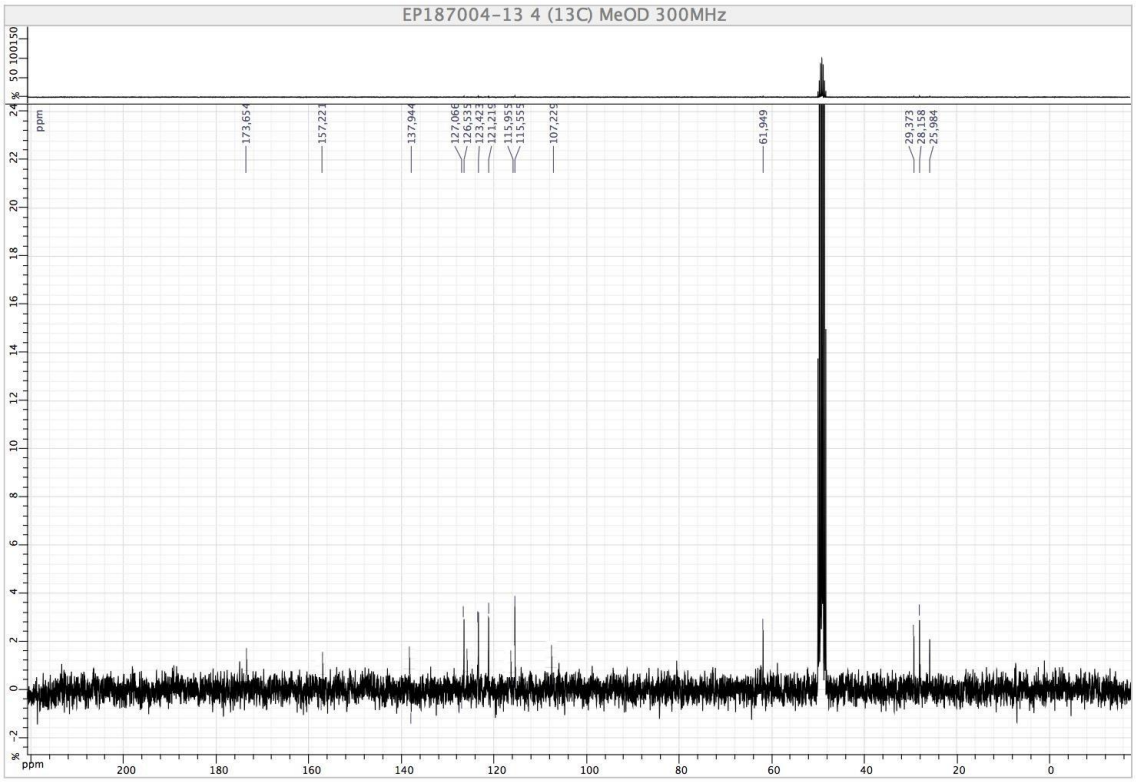
Spectre UV du composé **FR6**



Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI^+) du composé **FR6**



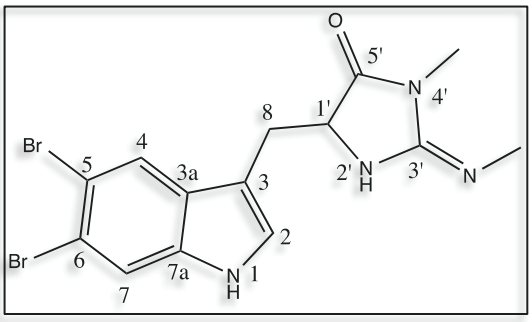
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) du composé **FR6**



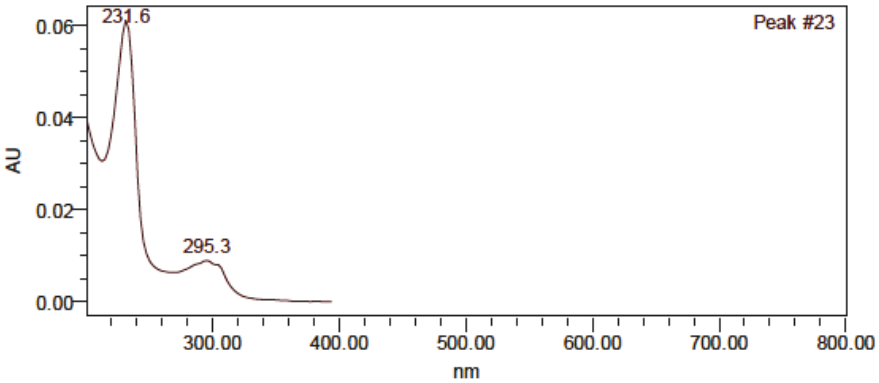
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 300 MHz) du composé **FR6**

ANNEXE II.5

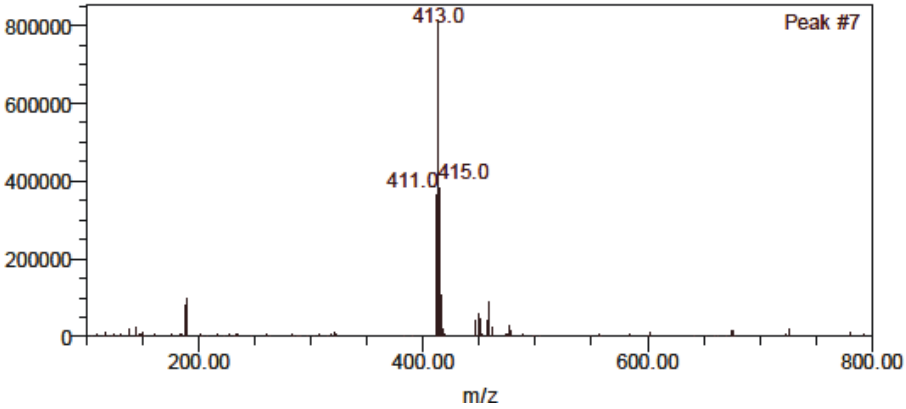
Données spectrales du composé FR7 isolé de l'éponge Fascaplysinopsis reticulata



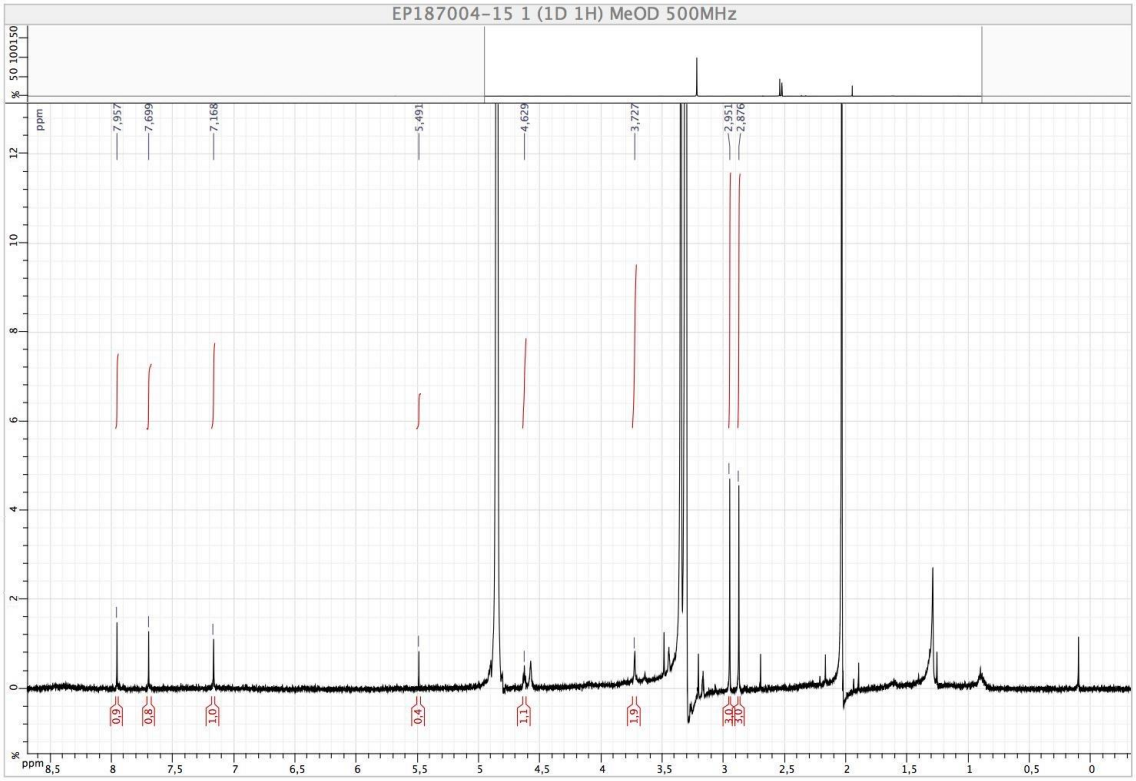
5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-Dihydroaplysinopsine (FR7)



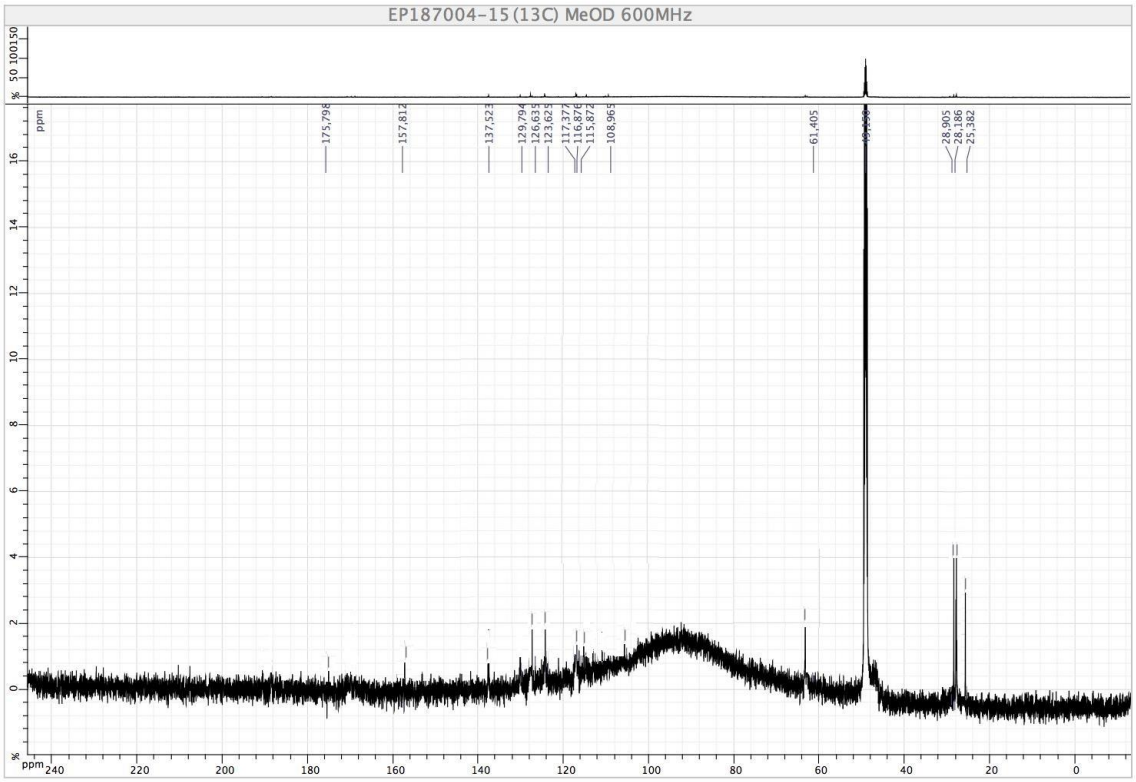
Spectre UV du composé **FR7**



Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^-$) du composé **FR7**



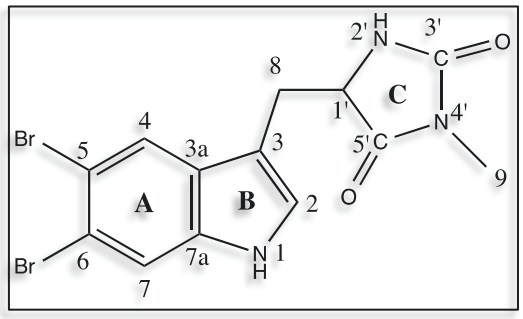
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du composé **FR7**



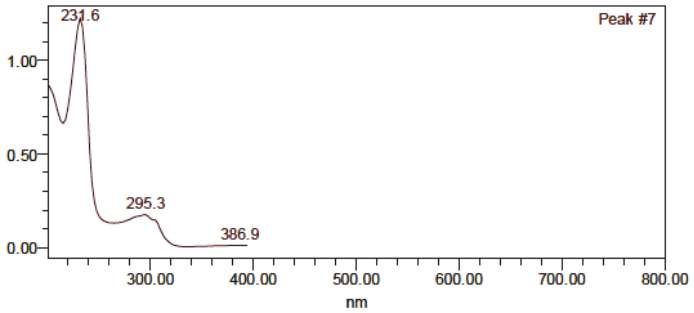
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 600 MHz) du composé **FR7**

ANNEXE II.6

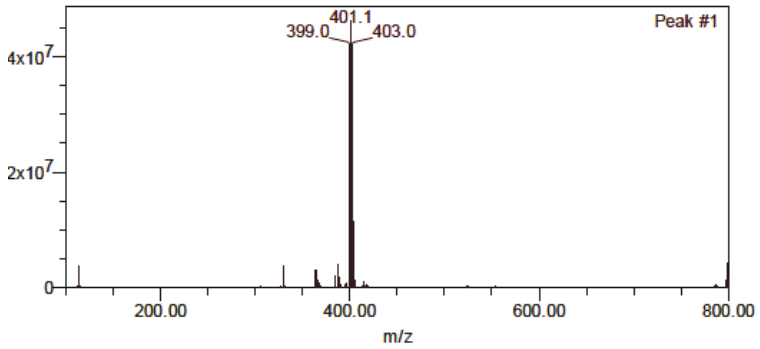
Données spectrales du composé FR8 isolé de l'éponge Fascaplysinopsis reticulata



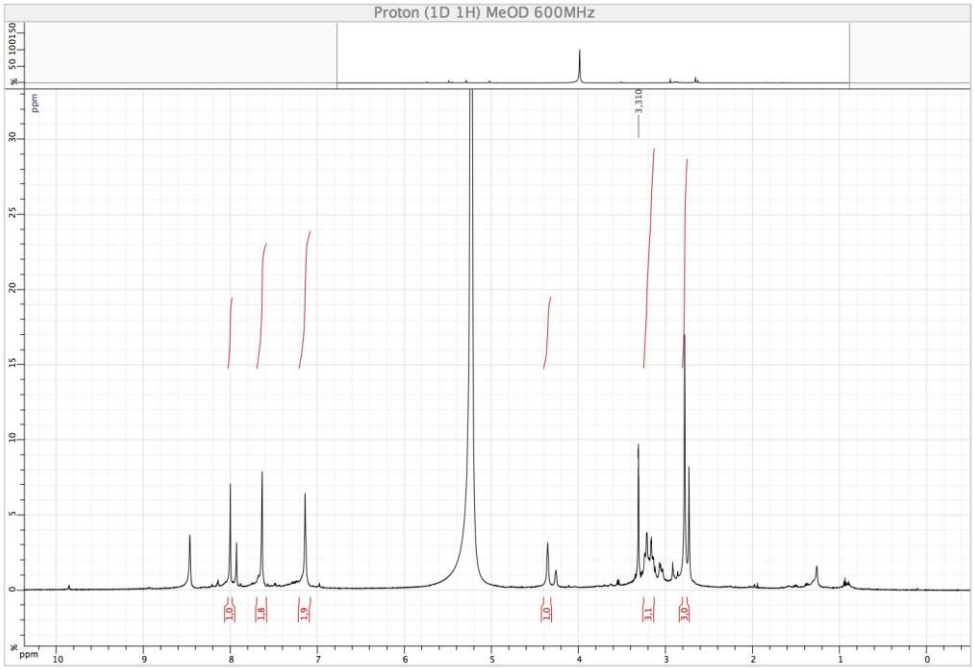
5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-Dihydroaplysinopsine



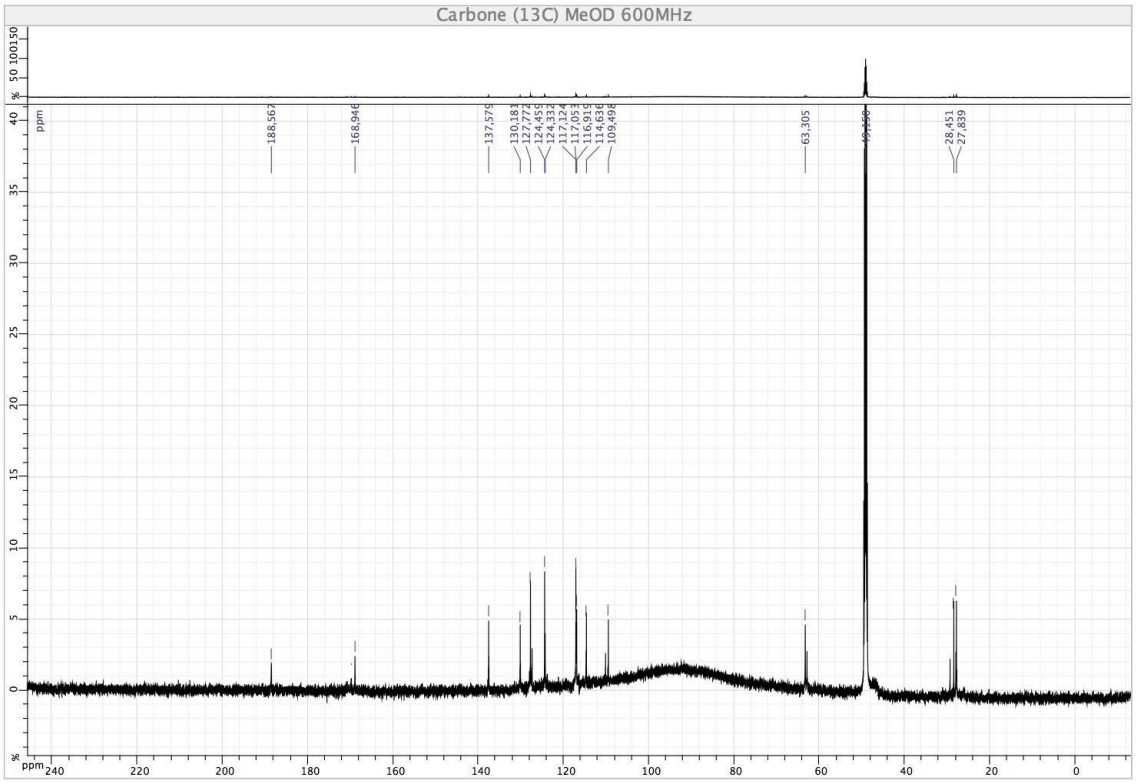
Spectre UV du composé **FR8**



Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^-$) du composé **FR8**



Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz) du composé **FR8**



Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 600 MHz) du composé **FR8**

Résumé :

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit portent sur l'étude de quatre éponges marines issues de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien : *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera* et *Fascaplysinopsis reticulata*. Les travaux entrepris comprenaient l'étude chimique de ces éponges incluant l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires par différentes techniques chromatographiques (CLMP, CLHP…) et spectroscopiques (UV-visible, HRMS, RMN 1D et 2D…). Douze métabolites secondaires ont été isolés de ces éponges dont six de structures nouvelles, à savoir : l'acide 2,5-époxydocosan-6-én-21-ynoïque (**HF1**), un acide gras atypique isolé de l'éponge *Haliclona fascigera* ; la 8-oxo-tryptamine (**FR2**), la 6,6'-*bis*-(débromo)-gelliusine F (**FR3**), la 6-bromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**), la 5,6-dibromo-2'-déméthyl-3'-*N*-méthyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**) et la 5,6-dibromo-3'-déimino-2'-déméthyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**), cinq alcaloïdes indoliques isolés de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata*. La valorisation des molécules isolées a ensuite été envisagée *via* l'évaluation de leurs activités biologiques. Parmi les douze molécules isolées, sept ont montré une activité antipaludique, trois une activité inhibitrice du quorum sensing de la bactérie bioluminescente *Vibrio harveyi* et cinq une activité anti-microfouling par inhibition de l'adhésion et/ou de la croissance de souches microbiennes marines.

Mots clés : Océan Indien, Eponges marines, *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera*, *Fascaplysinopsis reticulata,* métabolites secondaires, activité antipaludique, activité anti-microfouling, activité inhibitrice du quorum sensing, activité antimicrobienne.

Summary

The work described in this manuscript concerns four sponges from the South-West Indian Ocean: *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera* and *Fascaplysinopsis reticulata*. The chemical study of the sponges including extraction, isolation and identification of secondary metabolites was undertaken using various chromatographic (MPLC, HPLC ...) and spectroscopic (UV-visible, HRMS, 1D and 2D NMR ...) techniques. Twelve secondary metabolites including six new molecules were isolated from these sponges. The new molecules are: 2,5-époxydocosan-6-en-21-ynoic acid (**HF1**) an unusual fatty acid isolated from the sponge *Haliclona fascigera*; 8-oxo-tryptamine (**FR2**), 6,6'-*bis* (debromo)-gelliusine F (**FR3**), 6-bromo-2'-demethyl-3'-*N*-methyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR6**), 5,6-dibromo-2'-demethyl-3'-*N*-methyl-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR7**) and 5,6-dibromo-3'-deimino-2'-demethyl-3'-oxo-1',8-dihydroaplysinopsine (**FR8**), five indole alkaloids isolated from the sponge *Fascaplysinopsis reticulata*. The biological activities of the isolated molecules were then evaluated. Among the twelve isolated molecules, seven were active against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, three were identified as inhibitors of the quorum sensing-regulated bioluminescence in *Vibrio harveyi* and five, showing marine bacterial adhesion and/or growth inhibition, exhibited potential anti-microfouling activity.

Keywords : Indian Ocean, Marine sponges, *Plakortis kenyensis*, *Theonella swinhoei*, *Haliclona fascigera*, *Fascaplysinopsis reticulata,* secondary metabolites, antimalarial activity, anti-microfouling activity, quorum sensing inhibitors, antimicrobial activity.

POLE RECHERCHE
Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Pichon Emmanuel, en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 31/08/2016

Signature :

VALIDATION

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.