



HAL
open science

Métabolismes spécialisés d'éponges méditerranéennes du genre *Haliclona* Grant, 1836

Marie-Aude Tribalat

► **To cite this version:**

Marie-Aude Tribalat. Métabolismes spécialisés d'éponges méditerranéennes du genre *Haliclona* Grant, 1836. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4072 . tel-01478772

HAL Id: tel-01478772

<https://theses.hal.science/tel-01478772v1>

Submitted on 28 Feb 2017

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 NICE-SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences

Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales et Appliquées

THÈSE

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences

de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Chimie

présentée et soutenue par

Marie-Aude TRIBALAT

Métabolismes spécialisés d'éponges méditerranéennes du genre
Haliclona Grant, 1836

Thèse dirigée par Olivier THOMAS

soutenue le 14 octobre 2016

Jury :

Monsieur Erwan POUPON (Professeur, Université Paris Sud)	Rapporteur
Monsieur Gérard CULIOLI (Maître de Conférence, Université de Toulon)	Rapporteur
Madame Nathalie BONTEMPS (Maitre de Conférence, Université de Perpignan)	Examineur
Madame Cécile SABOURAUD (Professeur, Université Nice Sophia Antipolis)	Président
Monsieur Olivier THOMAS (Professeur, National University of Ireland, Galway)	Directeur de thèse

Remerciements

A Olivier Thomas pour m'avoir permis de réaliser ces trois ans de doctorat, pour les discussions exaltées sur les différentes problématiques proposées et pour les différents projets qui m'ont permis de voyager et de rencontrer différents collaborateurs du monde scientifique en général.

A Gérard Culioli et Erwan Poupon pour avoir accepté de lire ce manuscrit et de le rapporter

A Cécile Sabouraud et Nathalie Bontemps pour avoir accepté de faire partie du jury qui évalue ces travaux.

A François Mesnard et Ophélie Fliniaux pour m'avoir orientée et soutenue dans mon parcours étudiant jusqu'à ces travaux de thèse.

A Eva Ternon pour son amitié, son soutien, son aide, nos grandes discussions.

A Melody Maloubier pour ces trois années passées ensemble, les jours « avec » et les jours « sans » et surtout pour tous les bons moments.

A Gaëlle Creff pour sa gentillesse et pour m'avoir accueillie chez elle.

A Stéphane Greff pour son aide et ses explications lors de l'utilisation du spectromètre de masse de la plateforme métabolomique à Marseille.

A Christophe Vieira pour sa gentillesse et son aide dans le traitement des données métabolomiques.

A Grégory Genta-Jouve pour sa collaboration et la modélisation en dichroïsme.

A Roland Molinié et Jean-Xavier Fontaine pour leur collaboration et leurs explications dans l'étude métabolomique par RMN.

A Grace McCormack et Thierry Perez pour les échantillons qu'ils m'ont permis d'obtenir et leur aide quant aux questions taxonomiques.

Aux membres de l'équipe REL de l'AIEA à Monaco pour m'avoir accueillie, formée et encadrée durant plusieurs mois.

Aux différents collaborateurs biologistes avec qui j'ai travaillé sur les propriétés pharmacologiques des composés étudiés : Isabelle Mus-Veteau, Luis Botana et Gilles Pages.

A tous les membres de l'équipe avec lesquels j'ai travaillé de près ou de loin : Kevin Calabro, Daniel Rodrigues, Aurélie Barats, Christophe Den Auwer, Hervé Michel, Jean-Pierre Goudour.

Aux membres de l'Institut de Chimie de Nice avec qui j'ai eu l'occasion de travailler que ce soit pour mes travaux de thèse ou pour les enseignements.

A mes stagiaires préférées pour leur travail et leur gentillesse : Erika Garcia, Rime Ganfoud, Maimiti Garavano, Elaheh Lofti, Sanda Ravlic.

A ma famille et ma belle-famille, pour leur soutien sans faille, leur confiance et l'aide logistique qu'elles m'ont apportés.

A mes amis qui m'ont toujours soutenue au cours de ces années de travail.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	11
A. LA CHIMIE DES EPONGES.....	13
1. <i>Métabolisme primaire</i>	13
2. <i>Métabolisme spécialisé</i>	13
3. <i>Une biosynthèse complexe</i>	14
B. LA CHIMIE AU SECOURS DE LA TAXONOMIE	15
C. LE CAS PARTICULIER DU GENRE <i>HALICLONA</i>	18
1. <i>Classification des éponges du genre Haliclona</i>	18
2. <i>Chimie des éponges du genre Haliclona</i>	19
D. OBJECTIFS DE THESE	28
CHAPITRE 1: METABOLOMES D'EPONGES MEDITERRANEENNES DU GENRE HALICLONA.....	31
A. <i>HALICLONA (RHIZIONERA) SARAI</i> (PULITZER-FINALI, 1969).....	31
1. <i>Métabolites spécialisés isolés d'Haliclona (Rhizionera) sarai</i>	31
2. <i>Etude chimique de l'éponge Haliclona (Rhizionera) sarai</i>	33
3. <i>Evaluation de l'activité anti-oxydante des saraiïnes</i>	44
B. <i>HALICLONA (HALICHOCLONA) FULVA</i> (TOPSENT, 1893).....	50
1. <i>Métabolites spécialisés isolés d'Haliclona (Halichoclona) fulva</i>	50
2. <i>Etude chimique de l'éponge Haliclona (Halichoclona) fulva</i>	54
3. <i>Etude de l'activité anti-tumorale de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diyonoïque (36)</i>	63
C. <i>HALICLONA (SOESTELLA) MUCOSA</i> (GRIESSINGER, 1971).....	67
1. <i>Métabolites spécialisés isolés d'Haliclona (Soestella) mucosa</i>	67
2. <i>Etude chimique de l'éponge Haliclona (Soestella) mucosa</i>	70
D. <i>HALICLONA (HALICHOCLONA) MAGNA</i> (VACELET, 1969).....	78
1. <i>Métabolites spécialisés d'éponges marines profondes</i>	79
2. <i>Etude chimique de l'éponge Haliclona (Halichoclona) magna</i>	79
E. CONCLUSION.....	87
CHAPITRE 2: DE LA CHIMIOTAXONOMIE A LA PHYLOMETABOLOMIQUE DES HAPLOSCLERIDES : LE CAS DU GENRE HALICLONA.....	89
A. METABOLOMIQUE ET PHYLOGENIE.....	89
1. <i>Métabolomique : De la technique</i>	89
2. <i>...à la problématique scientifique</i>	92

B.	MISE AU POINT DE LA METHODE ANALYTIQUE.....	93
1.	<i>Méthode d'extraction</i>	93
2.	<i>Méthodes d'analyse</i>	97
3.	<i>Traitement de données</i>	100
4.	<i>Reproductibilité du processus dans son ensemble</i>	103
C.	ETUDES MÉTABOLOMIQUES SPATIO-TEMPORELLES D'ÉPONGES <i>HALICLONA FULVA</i> ET <i>HALICLONA MUCOSA</i> 116	
1.	<i>Etudes temporelles</i>	116
2.	<i>Etudes géographiques</i>	119
3.	<i>Validation de méthode</i>	121
D.	ETUDE PHYLOMETABOLOMIQUE SUR 11 ESPECES DU GENRE <i>HALICLONA</i>	123
1.	<i>Analyse par UHPLC-ESI-Q-TOF</i>	123
2.	<i>Analyse par RMN</i>	125
3.	<i>Analyse par couplage des données issues des analyses par UHPLC-ESI-Q-TOF et RMN</i>	127
E.	CONCLUSION.....	132
CHAPITRE 3 : ETUDE DU METABOLISME SPECIALISE DES SARAÏNES PRODUITES PAR <i>HALICLONA SARAI</i>		135
A.	GENERALITES SUR LES METHODES D'INVESTIGATION DES VOIES METABOLIQUES DE SPONGIAIRES	135
B.	VOIES DE BIOSYNTHESE DES ALCALOÏDES 3-AP.....	137
C.	METHODOLOGIES D'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIO-MARQUESET ANALYSES.....	140
1.	<i>Précurseurs radiomarqués et incorporation</i>	141
2.	<i>Extraction, fractionnement et purification</i>	142
D.	RESULTATS.....	144
E.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	154
1.	<i>Protocole expérimental et incertitudes</i>	154
2.	<i>Fractionnement et choix des molécules cibles</i>	156
3.	<i>Voies métaboliques, éponges et symbioses</i>	156
4.	<i>Perspectives</i>	158
CONCLUSION GENERALE		159
PERSPECTIVES		161
PARTIE EXPERIMENTALE		163
A.	OUTILS CHROMATOGRAPHIQUES.....	163
1.	<i>Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)</i>	163
2.	<i>Chromatographie sur Couche Mince (CCM)</i>	163
B.	OUTILS SPECTROSCOPIQUES.....	163

1.	<i>Spectrométrie de masse</i>	163
2.	<i>Spectrométrie UV-visible et dichroïsme circulaire</i>	164
3.	<i>Spectrométrie infra-rouge</i>	164
4.	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>	164
C.	ANALYSE POLARIMETRIQUE.....	164
D.	OUTILS DE RADIODETECTION.....	165
1.	<i>Détecteur à scintillation</i>	165
2.	<i>Radio-TLC</i>	165
3.	<i>β-Imager</i>	165
4.	<i>Précurseurs radioactifs</i>	166
E.	ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	166
1.	<i>Haliclona sarai</i>	166
2.	<i>Haliclona fulva</i>	166
3.	<i>Haliclona mucosa</i>	166
4.	<i>Haliclona magna</i>	166
5.	<i>Espèces du genre Haliclona étudiées par métabolomique</i>	166

Table des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Analyse Factorielle Multiple
CCM (TLC)	Chromatographie sur Couche Mince
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COSY	COrrélation SpectroscopY
DAD	Détecteur à barrettes de Diodes
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
ESI	ElectroSpray Ionization (Ionisation par électrospray)
FID	Free Induction Decay (Décroissance libre d'induction)
GC	Chromatographie Gazeuse (Gaz Chromatography)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bound Coherence
HRESIMS	High Resolution ElectroSpray Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse Haute Résolution par ElectroSpray)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infra-Rouge
LB	Line Broadening (Largeur de ligne)
SPE	Solid Phase Extraction (Extraction en Phase Solide)
MS	Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)
RG	Receptor Gain (Gain du récepteur)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance)
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	Ultra-Violets
VLC	Vacuum Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide sous Vide)

Introduction

Les éponges (Phylum Porifera, Grant, 1836) sont de fascinants organismes marins qui vivent fixés au fond des mers, à toutes les profondeurs (0-8000 mètres). Ces organismes benthiques et sessiles ne présentent aucun organe de défense et sont pourtant capable d'une survie exceptionnelle. En effet, les plus vieux fossiles d'éponges datent de -760 Ma, indiquant que ces organismes ont résisté aux grandes crises extinctives du Cambrien et du Crétacé¹. Le secret des éponges réside dans leur chimie très développée : ces organismes synthétisent des molécules complexes et originales qui jouent de nombreux rôles vis-à-vis de leur développement et leur survie.

La communauté internationale de chercheurs s'intéressant aux éponges reste pourtant très restreinte, et ce malgré la diversité des techniques et des savoirs employés à mieux comprendre ces organismes : biologie (taxonomie, biologie moléculaire, microbiologie, etc.) et chimie (biogéochimie, chimie des substances naturelles, écologie chimique). Si les éponges sont des laissés pour compte de l'océanographie moderne, leur importante implication dans le cycle des éléments nutritifs a récemment été révélée et ne peut être négligée^{2,3,4}. En effet, de par leur activité de filtreurs, les éponges absorbent tous les constituants de l'eau de mer d'une taille inférieure à 20 μm et les transforment avant de les expulser *via* leurs canaux exhalants. Mais il est vrai que ces vieux organismes sont particulièrement complexes à étudier, en particulier du fait de leur symbiose avec de nombreux microorganismes. Les communautés bactériennes symbiontes peuvent constituer jusqu'à 40 % du volume total des éponges et sont soupçonnées de jouer divers rôles : apports nutritifs supplémentaires, contribution à la production de métabolites spécialisés, renforcement de la rigidité du squelette et protection contre les UV solaires⁵. Du fait de cette association biologique, définir les contributions de chacun dans le fonctionnement du système éponge-microbiote constitue un véritable challenge.

En particulier, et ce malgré un véritable engouement pour l'étude de la chimie des substances naturelles depuis le milieu du 20^{ème} siècle, la compréhension de la (bio)chimie des spongiaires n'en est qu'à ses prémices. De nombreuses découvertes jalonneront très certainement le 21^{ème} siècle en termes de diversité métabolique, de compréhension de l'origine de cette chimie ou encore son rôle au sein de cet organisme surprenant.

¹ Li C.-W., Chen J.-Y. et Hua T.-E., Precambrian Sponges with Cellular Structures. *Science*, 1998. **279**(5352): p.879-882.

² Maldonado M., Ribes M. et van Duyl F.C., Chapter three - Nutrient fluxes through sponges: biology, budgets, and ecological implications, in *Advances in Marine Biology*, Becerro M.A, Uriz M.J., Maldonado M. et Xavier T, Editors. 2012, Academic Press. p.113-182.

³ De Goeij J.M., Van Oevelen D., Vermeij M.J., Osinga R., Middelburg J. J., de Goeij, A.F. et Admiraal, W., Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. *Science*, 2013. **342**(6154): p.108-110.

⁴ Tréguer P.J. et De La Rocha C.L., The world ocean silica cycle. *Annual review of marine science*, 2013. **5**: p.477-501.

⁵ Thacker R.W. et Freeman C.J., Chapter two - Sponge-microbe symbioses: Recent advances and new directions, dans *Advances in Marine Biology*, Becerro M.A, Uriz M.J., Maldonado M. et Xavier T, Editors. 2012, Academic Press. p. 57-111.

A. La chimie des éponges

1. Métabolisme primaire⁶

L'ensemble des êtres vivants a en commun un ensemble de voies métaboliques appelé métabolisme primaire aboutissant à la biosynthèse de métabolites primaires. Ces derniers sont synthétisés à partir des apports nutritifs et vont assurer les fonctions vitales chez tous les organismes vivants, telles que la croissance et la reproduction. Parmi ces métabolites, on retrouve les polysaccharides, les acides gras, les protéines et les acides nucléiques. Si les plantes biosynthétisent ces molécules à partir de composés inorganiques *via* la photosynthèse, les micro-organismes et les animaux utilisent les composés organiques obtenus des plantes pour les transformer selon leurs besoins.

Les métabolites primaires cités précédemment sont des polymères - hormis les acides gras-: les polysaccharides sont formés de différents oses simples, les protéines contiennent des acides aminés et les acides nucléiques sont synthétisés à partir de nucléotides. Au cours des différentes réactions chimiques de biosynthèse, ces molécules de base subissent des transformations qui permettent l'élaboration des métabolites primaires. Ceux-ci sont à leur tour les éléments de base pour la mise en place du métabolisme spécialisé.

2. Métabolisme spécialisé

Le métabolisme spécialisé, aussi appelé métabolisme secondaire, s'est développé au cours de l'évolution par les micro-organismes, les plantes et les animaux selon leurs besoins spécifiques. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites spécialisés ne sont donc pas communs à l'ensemble des êtres vivants. Ils sont soit le résultat d'une convergence évolutive c'est-à-dire la conséquence biologique de contraintes environnementales communes soit une homologie c'est-à-dire un caractère biologique résultant de l'évolution d'un ancêtre commun. Dans le second cas, ces métabolites peuvent alors être des marqueurs taxonomiques de choix.

L'intérêt croissant pour les produits naturels marins depuis les années 1970 a mis à jour plus de 6500 molécules produites par des éponges (donnée en constante évolution), qui représentent ainsi le phylum le plus prolifique en termes de composés bioactifs⁷. La plupart des familles chimiques des composés produits par ces organismes marins sont également présentes dans le milieu terrestre : stéroïdes, alcaloïdes, polyacétylènes, terpènes, phénols, peptides, *etc*^{8,9}. Néanmoins, les éponges ont développé des voies métaboliques originales conduisant à des composés encore jamais décrits dans le monde terrestre. Ces molécules à bioactivité plus ou moins marquée participent à la protection de l'éponge grâce à leurs propriétés antivirales, antifongiques et anti-inflammatoires. Ces propriétés pharmacologiques justifient

⁶ Dewick P.M., Medicinal Natural Products. 2002.

⁷ Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Report*, 2015. **32**(2): p. 116-211.

⁸ Laport M., Santos O. et Muricy G., Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2009. **10**(1): p. 86-105.

⁹ Mehbub M.F., Lei J., Franco C. et Zhang W., Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine drugs*, 2014. **12**(8): p. 4539-4577.

l'engouement scientifique pour leur exploitation dans le domaine médical : anticancéreux, antiviraux, antibiotiques, antifongiques, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs et neuro-protectifs^{10,11,12,13}. A ce jour, deux molécules dérivées de composés synthétisés par des éponges ont été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) comme anticancéreux. La cytarabine, analogue synthétique d'un nucléoside isolé de l'éponge *Cryptothethya crypta* (Cytosar-U[®]) permet de traiter certaines formes de leucémies aiguës et les lymphomes non-Hodgkiniens. L'éribuline (Halaven[®]) est un dérivé de l'halicondrine A, polyéther extrait de l'éponge *Halichondria okadai*, qui présente un pharmacophore reproduit synthétiquement permettant de traiter les cancers du sein résistants aux traitements existants sur le marché pharmaceutique.

D'un point de vue écologique, le principal rôle de ces composés serait de prévenir les infections au sein du tissu des éponges mais aussi d'établir une communication chimique avec son environnement direct^{14,15,16}. En effet, en l'absence d'organes spécifiques, les éponges utilisent la chimie de leur métabolisme spécialisé pour se défendre contre la prédation, signaler leur présence ou lutter pour l'occupation de l'espace¹⁷.

Si à ce jour plus de 6500 métabolites spécialisés ont été isolés et caractérisés chez les 8000 espèces de spongiaires identifiées, une immense diversité de composés reste à découvrir. Parmi les espèces étudiées, nombreuses sont celles issues d'environnements tropicaux (Caraïbes, Pacifique,...)^{11,12}. Les espèces de Méditerranée, aussi nombreuses soient-elles, sont encore à ce jour sous-représentées au sein des études ciblant la diversité métabolique des spongiaires. Afin de développer et d'approfondir les connaissances concernant la diversité métabolique des éponges en Méditerranée, les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont débuté par la description du métabolome de quatre espèces d'éponges prélevées entre le Golfe du Lion et la Mer de Ligurie.

3. Une biosynthèse complexe

Les métabolites spécialisés issus d'éponges appartiennent à diverses familles chimiques issues de voies métaboliques très différentes ainsi que de précurseurs variés. L'étude de ces voies de biosynthèse est complexe et une des premières questions posées à ce sujet est l'origine du ou des métabolites considérés. En effet, en raison de la symbiose des éponges avec de nombreux micro-organismes, les métabolites spécialisés étudiés peuvent être d'origine bactérienne, de l'éponge elle-même ou encore issus d'une collaboration entre les deux organismes¹⁸.

¹⁰ Jaspars, M., De Pascale D., Adersen J.H., Reyes F., Crawford A.D. et Ianora A., The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2016. **96**(1): p. 151-158.

¹¹ Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2014. **31**(2): p. 160-258.

¹² Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2011. **28**(2): p. 196-268.

¹³ Molinski T.F., Dalisy D.S., Lievens S.L. et Saludes J.P., Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, 2009. **8**(1): p. 69-85.

¹⁴ Paul V.J. et Puglisi M.P., Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports*, 2004. **21**(1): p. 189-209.

¹⁵ Puglisi M.P., Paul V.J. et Slattery M., Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural product reports*, 2014. **31**(11): p. 1510-1553.

¹⁶ Ternon, E., Zarate L., Chenesseau S., Croué J., Dumollard R. Suzuki M.T., et Thomas O.P., Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 29474.

¹⁷ Pawlik J.R., The chemical ecology of sponges on Caribbean reefs: natural products shape natural systems. *Bioscience*, 2011. **61**(11): p.888-898.

¹⁸ Lee Y.K., Lee J.-H. et Lee H.K., Microbial symbiosis in marine sponges. *Journal of microbiology-Seoul*, 2001. **39**(4): p. 254-264.

Les études portant sur les voies métaboliques spécialisées propres aux spongiaires ont jusqu'à présent révélé quatre grandes familles de voies de biosynthèse¹⁹ :

- La voie acétate qui permet la production des dérivés d'acides gras, des polyacétylènes et des polyketides,
- La voie mévalonate qui aboutit à la formation des terpènes et des stéroïdes,
- La voie du shikimate qui aboutit à des alcaloïdes dérivés de la tyrosine,
- Trois voies menant à des alcaloïdes dérivés d'acides aminés : les dérivés 3-AP, les dérivés guanidiniques et les dérivés pyrrole-imidazole.

Si certaines de ces voies sont bien décrites dans le milieu terrestre et notamment chez les végétaux⁶, elles ont, chez les éponges, de nombreuses spécificités.

La très vaste diversité chimiques des métabolites spécialisés des spongiaires et l'éventuelle participation des bactéries symbiontes de l'éponge dans la biosynthèse rend l'étude des voies métaboliques particulièrement complexes. Or, leur compréhension est importante à plusieurs égards :

- Avancées biotechnologiques : la découverte de métabolites d'intérêt pharmacologique n'a d'intérêt que si les molécules sont disponibles en quantité suffisante pour pouvoir être développées en essais cliniques puis en médicaments¹⁰. Cependant, il est très rare que ce type de composé soit isolé en quantités importantes et leur synthèse est souvent très complexe. La compréhension des mécanismes de biosynthèse de ces métabolites permet alors d'envisager leurs productions par des techniques de biotechnologies diverses ou par synthèse biomimétique.

- Biochimie et écologie : la description de l'ensemble des acteurs d'une voie biosynthétique (gènes, enzymes, précurseurs) permet par la suite d'étudier plus en détails leur évolution selon les contraintes environnementales ainsi que les rôles des métabolites résultant de ces voies métaboliques en modifiant celles-ci.

Dans ce contexte, l'étude des voies de biosynthèse d'alcaloïdes complexes isolés d'éponges méditerranéennes a constitué un des objectifs des travaux de thèse décrits dans ce manuscrit.

B. La chimie au secours de la taxonomie

La classification des éponges fait l'objet d'un remaniement important Dans le contexte difficile de la classification des éponges, la production de métabolites spécialisés originaux et variés semble être un atout de choix pour enrichir le panel de critères discriminant les éponges entre elles, en particulier dans le cas des Haplosclérides qui présentent de nombreux caractères polymorphiques³¹. En effet, ces molécules sont le reflet phénotypique de modifications génotypiques apparues au cours de l'évolution des porifères : les voies métaboliques menant aux différents métabolomes décrits chez les éponges ne sont pas uniquement une suite de réactions chimiques mais sont régies par de nombreuses enzymes codées par l'ADN⁶. Une voie de

¹⁹ Genta-Jouve G. et Thomas O.P., Chapter four - Sponge chemical diversity: From biosynthetic pathways to ecological roles, dans *Advances in Marine Biology*, Becerro M.A, Uriz M.J., Maldonado M. et Xavier T., Editors. 2012, Academic Press. p. 183-230.

biosynthèse commune à plusieurs éponges peut donc être un caractère phylogénétique très utile à la mise en place d'une classification et par conséquent, une famille chimique de métabolites spécialisés pourrait alors être un marqueur spécifique de choix pour établir l'appartenance ou non d'une éponge à un groupe taxonomique.

Quelques études sur différents groupes de spongiaires ont mis en avant l'utilisation de la chimiotaxonomie depuis les années 1990. En 1992, le genre *Agelas* a fait l'objet d'investigations combinant l'analyse expérimentale de 5 espèces et une étude bibliographique des composés précédemment isolés d'autres espèces de ce genre²⁰. Cette étude a également tenu compte de la description des familles de métabolites retrouvées chez *Agelas* dans d'autres groupes taxonomiques afin de valider leur utilisation en tant que caractère phylogénique. Enfin, une éventuelle utilité des dérivés d'acide pyrrole-2-carboxylique et de dérivés terpéniques dans la classification des éponges du genre *Agelas* a été mis en avant. Néanmoins, les lacunes et les erreurs d'identification des spécimens étudiés dans la bibliographie représentent une limite non négligeable à l'établissement de conclusions définitives par ce type d'études.

En 1999, Braekman et van Soest proposent une revue concernant le groupe des Porifères dans sa globalité²¹ et identifient certains métabolites comme marqueur taxonomiques à partir d'une analyse bibliographique. Parmi trente-huit marqueurs chimiques identifiés pour trente-cinq groupes taxonomiques, seuls vingt-deux sont vraisemblables dans la mesure où les seize autres sont également décrits dans d'autres groupes taxonomiques et ne sont donc pas exclusifs. En 2005, une étude chimiotaxonomique basée sur une analyse bibliographique des métabolites isolés d'éponges de l'ordre Halichondria (Demosponges) a été menée dans l'espoir d'identifier des marqueurs chimiques synapomorphiques caractéristiques des groupes taxonomiques composant cet ordre. Cette étude a révélé différentes familles métaboliques pouvant servir de marqueur, cependant l'utilisation de la chimie dans le cadre d'une analyse taxonomique doit être corrélée à l'utilisation d'autres marqueurs tels les critères biomoléculaires²².

Une revue récente, fruit d'une collaboration avec l'équipe de Grâce McCormack (NUI Galway) et parue *Planta Medica*²³ (cf. Publications) met en évidence deux familles de métabolites qui pourraient aider à préciser la classification au sein de l'ordre des Haplosclérides :

- Les alcaloïdes 3-alkylpyridiniques et 3-alkylpiperidiniques sont décrits presque exclusivement dans des éponges de l'ordre des Haplosclérides^{24,25}.
- Les polyacétylènes linéaires sont également caractéristiques de cet ordre²¹

²⁰ Braekman J.-C., Daloz D.S., Stoller C. et van Soest R.W.M., Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera • Demospongiae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1992. **20**(5): p. 417-431.

²¹ van Soest R. et Braekman J.C., Chemosystematics of Porifera: a review. *Memoirs of the Queensland Museum*, 1999.

²² Erpenbeck D. et van Soest R.W.M., A survey for biochemical synapomorphies to reveal phylogenetic relationships of halichondrid demosponges (Metazoa: Porifera). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005. **33**(6): p. 585-616.

²³ Tribalat M.-A., Marra M.-V., McCormack G. et Thomas O.P., Does the Chemical Diversity of the Order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongia) Fit with Current Taxonomic Classification?, *Planta Medica*, 2016, **82**, 843-856

²⁴ Andersen R.J., van Soest R.W.M. et Kong F., Chapter Three: 3-Alkylpiperidine alkaloids isolated from marine sponges in the order Haplosclerida, dans *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Pelletier S.W., Editor. 1996, Pergamon. p. 301-355.

²⁵ Becking L.E., Nakao Y., de Voogd N.J., van Soest R.W.M., Fusetani N. et Matsunaga S., Perplexing distribution of 3-alkylpyridines in Haplosclerid sponges. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Rio de Janeiro: Série Livros. Museu Nacional, 2007: p. 173-178.

Cette étude a pour but de souligner davantage les incohérences taxonomiques au sein de l'ordre complexe des Haplosclérides et de discuter de la corrélation possible entre la présence ou l'absence d'une de ces deux familles de métabolites et les marqueurs génétiques et morphologiques.

Ces quelques exemples montrent l'importance de s'intéresser au métabolisme des spongiaires pour trouver de nouveaux marqueurs spécifiques utilisables pour la classification des éponges. Cependant, de nombreuses améliorations sont encore à apporter aux méthodologies employées.

En effet, le groupe de Van Soest a identifié quelques difficultés à contourner pour une bonne utilisation de ces marqueurs chimiques ²⁶ :

- Un marqueur spécifique doit être présent chez tous les membres d'un taxon et absent de ceux qui n'appartiennent pas à ce taxon ce qui est rarement le cas des métabolites spécialisés.
- Le ou les composés choisis peuvent être une homoplasie c'est à-dire un caractère commun à différentes espèces mais qui n'est hérité d'un ancêtre commun.
- Les molécules peuvent être biosynthétisées par les microorganismes présents dans les éponges et ne reflètent donc pas un caractère propre aux spongiaires.
- L'identification de l'éponge est un travail réservé aux taxonomistes spécialistes des porifères, les erreurs d'identification ou le manque d'information rendent les études bibliographiques difficiles.
- La contamination entre deux ou plusieurs individus d'espèces différentes qui s'établissent très proches les uns des autres voire les uns sur les autres fausse également les potentiels résultats obtenus²⁷.

La perception de l'organisation des règnes végétal et animal a connu une avancée marquée ces dernières années grâce à l'apparition des approches « omics » telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique auxquelles sont venues s'ajouter plus récemment la métabolomique et la fluxomique^{28,29}. Ces différentes approches consistent en l'étude de l'ensemble des acteurs impliqués à différents niveaux cellulaires et subcellulaires et aboutissant à l'aménagement du phénotype d'un organisme³⁰. Certains des inconvénients de la chimiotaxonomie peuvent être évités par une approche expérimentale ayant recours à l'outil métabolomique permettant une approche globale et intégrée des échantillons choisis afin d'identifier des marqueurs spécifiques de chacune des espèces auxquelles ils appartiennent. Ce type d'investigation fait également partie des objectifs établis par ces travaux de thèse.

²⁶ Erpenbeck D. et van Soest R.W., Status and perspective of sponge chemosystematics. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(1): p. 2-19.

²⁷ Cárdenas, P., Who Produces Ianthelline? The arctic sponge *Stryphnus fortis* or its sponge epibiont *Hexadella dedruijferi*: a probable case of sponge-sponge contamination. *Journal of chemical ecology*, 2016, 42(4): p.339-347.

²⁸ Sumner L.W., Mendes P., Dixon R.A.. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 2003, 62, 817-836.

²⁹ Schripsema, J., 2009. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*, 2009, 21, 14-21.

³⁰ Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M., Saito, K.. Integrated omics approaches in plant systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13, 532-538.

C. Le cas particulier du genre *Haliclona*

1. Classification des éponges du genre *Haliclona*

D'un point de vue taxonomique, les éponges sont réparties en 4 classes principales dont la plus importante est celle des Demosponges (Demospongiae Sollas, 1885) pour laquelle sont décrites plus de 7 000 espèces à travers le monde (soit 81 % du phylum Porifera), et 50 nouvelles espèces sont découvertes par an en moyenne³¹. Celles-ci sont réparties en différentes sous-classes telles que celle des Hétéroscléromorphes (Heteroscleromorpha Cardenas, Perez & Boury-Esnault, 2012) dont un des ordres principaux est celui des Haplosclérides (Haplosclerida Topsent, 1928), objet de l'étude entreprise au cours de ces travaux de thèse. La classification systématique des éponges telle qu'elle a été établie à ses débuts n'était fondée que sur leurs caractères morphologiques, cytologiques et notamment l'agencement des spicules. Les spongiaires n'ayant pas d'organes définis et peu de types cellulaires, le panel de critères permettant leur classification était alors assez pauvre.

Depuis les années 1990, les taxonomistes se sont penchés sur d'autres critères tels que l'embryologie, la reproduction, la géographie ou encore les séquences génétiques pour classer les éponges²⁶. Cette taxonomie intégrative et l'avènement des techniques de biologie moléculaire ont permis la révision des différents groupes de spongiaires et notamment de celui des Demosponges. En particulier, la phylogénie au sein de l'ordre des Haplosclérides est largement controversée et plusieurs études portant sur des critères biomoléculaires (ADN ribosomiaux 18S et 28S, ARN mitochondriaux) ont été entreprises pour essayer d'éclaircir et de préciser leur classification. Ces études ont permis de confirmer que l'ordre des Haplosclérides est polyphylétique. En revanche elles n'ont pas permis à ce jour de résoudre définitivement la classification des différents sous-ordres et genres qui y sont contenus. Actuellement, cet ordre regroupe lui-même 6 familles taxonomiques : Calcifibrospongiidae Hartman, 1979, Callyspongiidae de Laubenfels, 1936, Chalinidae Gray, 1867, Niphatidae van Soest, 1980, Petrosiidae van Soest, 1980 et Phloeodictyidae Carter, 1882 (Figure 1)³².

³¹ Cárdenas, P., Pérez T. et Boury-Esnault N., Chapter two - Sponge systematics facing new challenges, dans *Advances in Marine Biology*, Becerro M.A, Uriz M.J., Maldonado M. et Xavier T, Editors. 2012, Academic Press. p. 79-209.

³² van Soest, R.W.M., *et al.* World Porifera database. 2015 [2016-05-10]; Disponible sur: <http://www.marinespecies.org/porifera>.

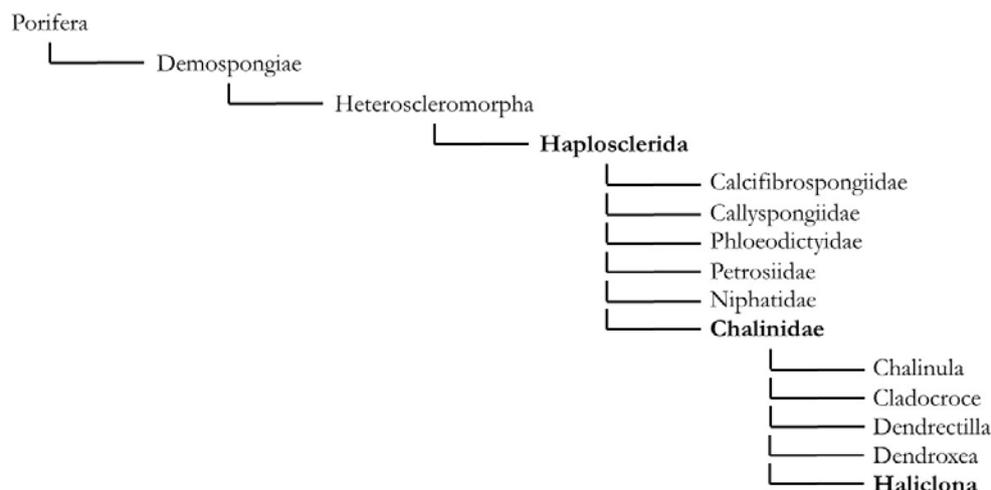


Figure 1 : Arbre taxonomique de la famille des Chaliniidae d'après World Porifera Database³²

Les travaux entrepris lors de ce doctorat sont portés sur la compréhension chimiotaxonomique de l'ordre des Haplosclérides dans son ensemble. Néanmoins, les études en laboratoire ont été focalisées, à plus petite échelle, sur des éponges du genre *Haliclona* appartenant à la famille des Chaliniidae et distribuées en Méditerranée et en Atlantique Nord-Est (Figure 1).

2. Chimie des éponges du genre *Haliclona*

Parmi les spongiaires producteurs de composés d'intérêt, ceux du genre *Haliclona* sont particulièrement importants, produisant une large diversité de métabolites spécialisés d'intérêt dont les principales familles chimiques sont exposées ci-après. (La description qui suit n'a pour but que de présenter quelques exemples et ne se veut en aucun cas exhaustive.)

• Stérois

Les composés stéroliques, tel le cholestérol, sont généralement décrits comme faisant partie du métabolisme primaire. En effet, leur présence est indispensable à la survie et au développement cellulaire. En outre, ils sont présents dans tous les organismes vivants sans distinction. Cependant un certain nombre de modifications au niveau de la chaîne latérale ou du cycle A indiquent la contribution de voies métaboliques spécialisées dans la biosynthèse de nombreux stérois issus des éponges. Cette origine biosynthétique n'est pas clairement établie, en effet les stérois présents dans les éponges peuvent provenir de 4 sources principales : synthèse *de novo* par l'éponge elle-même, synthèse *de novo* par les microsymbiontes de l'éponge en question, apports nutritifs et potentielles modifications de ces apports (notamment les phytoplanctons largement décrits pour leur variété de composés stéroliques)³³. Ainsi différents stérois originaux ont été isolés d'éponges du genre *Haliclona* depuis les années 1970 dont quelques exemples sont présentés ci-après.

³³ Elenkov I., Dragova B., Andreev S. et Popov S., 4 α -methyl sterols from the sponges *Haliclona cinerea* and *Haliclona flavescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997. **118**(1): p. 155-157.

En 1977, les premiers stérols de type C21 obtenus d'un organisme marin sont isolés de l'éponge *Haliclona rubens* prélevée au nord de la Jamaïque. Ces molécules sont analysées par GC-MS à partir de la fraction soluble dans le chloroforme de l'extrait méthanolique de l'éponge (Figure 2)³⁴

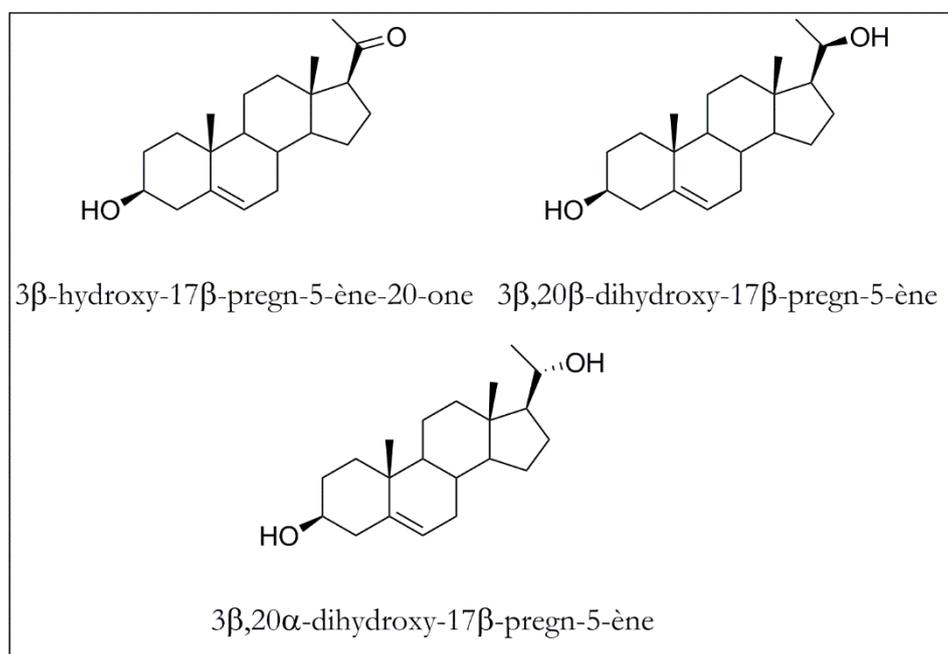


Figure 2 : Structure des stérols isolés de l'éponge *Haliclona rubens*²⁹.

En 1997, la présence de 4α-méthylstérols est mise en évidence dans les éponges *Haliclona cinerea* et *Haliclona flavescens* prélevées en Mer Noire. Ces composés sont relativement rares et cette étude réalisée par GC-MS et RMN en décrit 13 dans ces deux espèces, dont cinq n'ont jamais été décrits auparavant dans le monde marin et deux n'ont jamais été décrits auparavant dans la nature (Figure 3)³³.

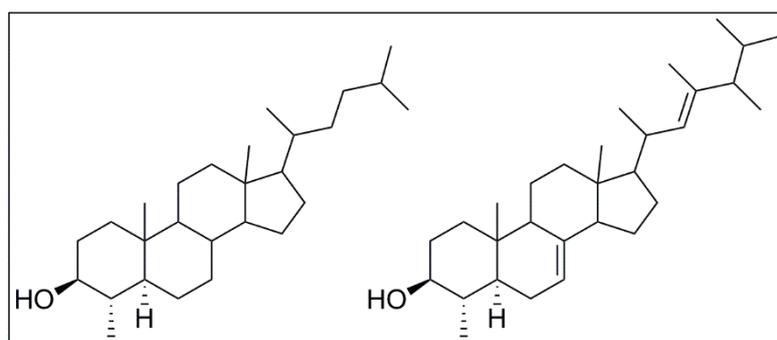


Figure 3 : Structures des deux nouveaux stérols décrits dans *Haliclona cinerea* et *Haliclona flavescens*³³

En 2013, une étude de l'éponge *Haliclona crassiloba* révèle la présence dans cette éponge prélevée en Mer de Chine de quatre nouveaux stérols nommés halicrastérols associés à des analogues déjà connus (Figure 4). Les composés isolés de cette espèce ont été testés sur différentes souches bactériennes (*Escherichia coli*,

³⁴ Ballantine J.A., Williams K et Burke B.A., Marine sterols IV. C21 sterols from marine sources. Identification of pregnane derivatives in extracts of the sponge *Haliclona rubens*. *Tetrahedron Letters*, 1977. **18**(18): p. 1547-1550.

Klebsiella pneumoniae, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) contre lesquelles certains de ces stérols ont montré une activité modérée³⁵.

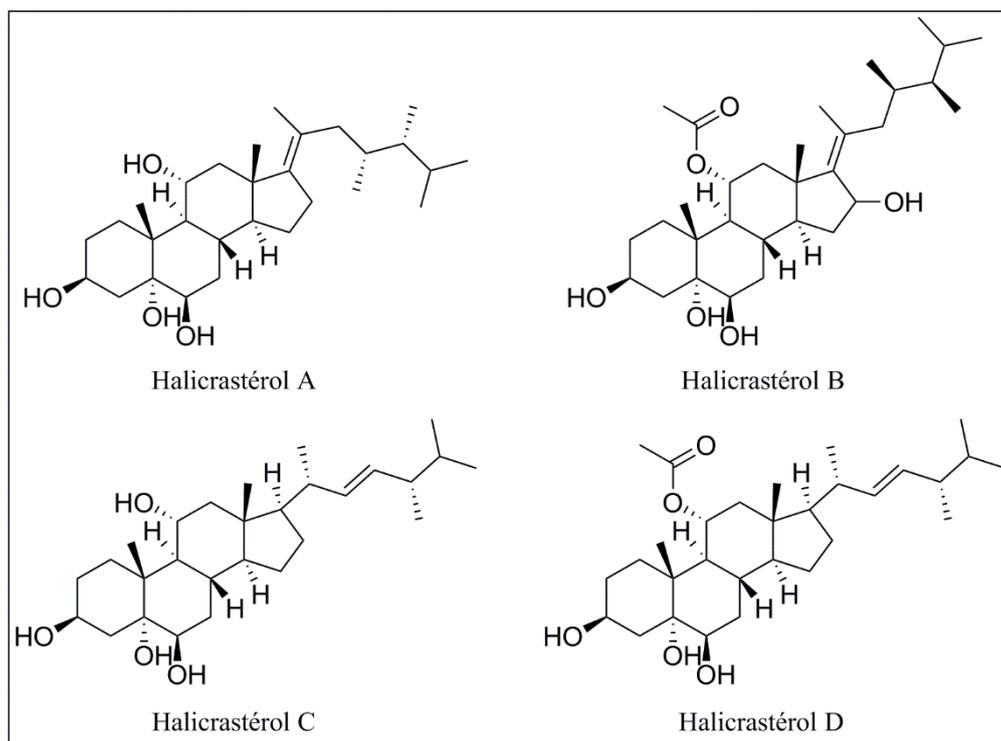


Figure 4 : Structures des 4 nouveaux stérols isolés d'*Haliclona crassiloba*³⁵.

· Peptides

Comme pour les stérols, les peptides et protéines sont d'abord issus du métabolisme primaire. Cependant, certains peptides sont également issus de plusieurs voies métaboliques différentes leur conférant une structure et un potentiel pharmacologique originaux. D'un point de vue biosynthétique, ces composés ont également plusieurs origines possibles telles que l'éponge elle-même, les micro-organismes associés ou encore une association des deux. Ce n'est qu'à partir des années 2000 que quelques peptides originaux dont certains exemples sont présentés ci-dessous ont été isolés d'éponges du genre *Haliclona*. Les recherches qui ont abouti à l'isolement de ces molécules étaient davantage focalisées sur l'obtention de composés bio-actifs.

En 2000, une étude de fractionnement guidé par des essais de bio-activité révèle deux nouveaux hexapeptides cycliques présents dans un extrait aqueux d'*Haliclona nigra*, éponge prélevée dans l'océan Pacifique au nord de la Papouasie Nouvelle-Guinée. Ces deux peptides nommés haligramides A et B présentent une cytotoxicité vis-à-vis de différentes lignées cellulaires cancéreuses avec des IC₅₀ de l'ordre du μM (Figure 5)³⁶.

³⁵ Cheng Z.-B., Xiao H., Fan C.Q., Lu Y.N., Zhang G. et Yin S., Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassiloba*. *Steroids*, 2013. **78**(14): p. 1353-1358.

³⁶ Rashid M.A., Gustafson K.R., Boswell J.L. et Boyd M.R., Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptides from the marine sponge *Haliclona nigra*. *Journal of Natural Products*, 2000. **63**(7): p. 956-959.

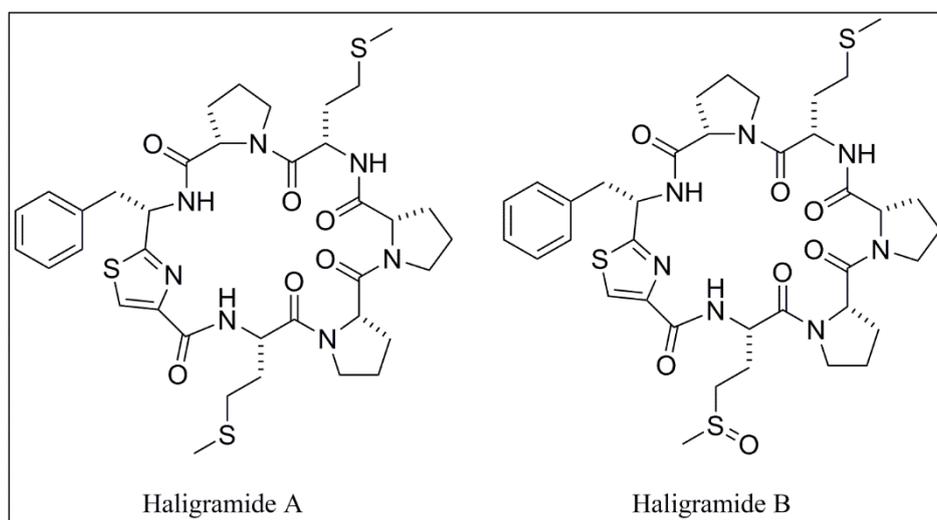


Figure 5 : Structures des deux nouveaux peptides isolés d'*Haliclona nigra*³⁶.

En 2004, le kendarimide A, peptide linéaire composé de 13 unités acides-aminés, est isolé de l'extrait méthanolique d'une éponge du genre *Haliclona* prélevée sur les côtes indonésiennes. A une concentration de l'ordre du μM , ce composé permet d'inhiber totalement la résistance de cellules carcinomiales au traitement par la colchicine (Figure 6)³⁷.

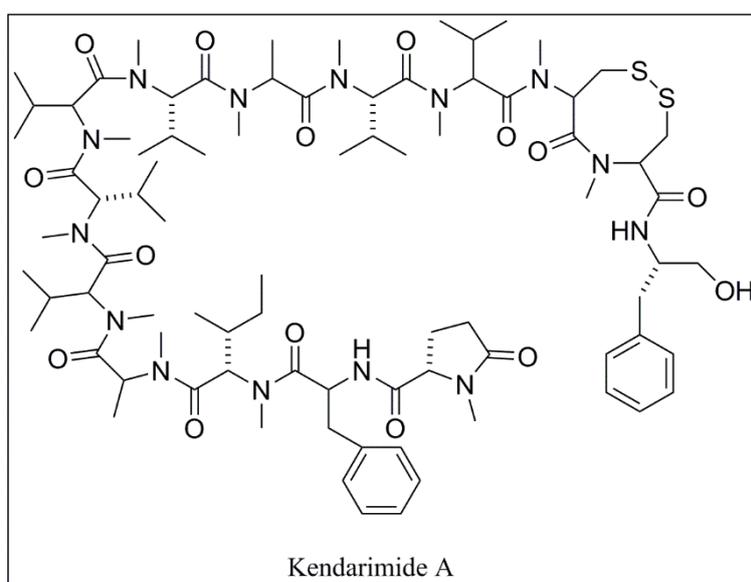


Figure 6 : Structure du kendarimide A isolé de l'éponge *Haliclona* sp.³⁷.

• Terpènes

Les composés terpéniques sont issus de deux voies métaboliques bien identifiées qui sont la voie du mévalonate et la voie du deoxyxylulose phosphate. Cette famille métabolique est composée d'une grande variété de molécules classées selon le nombre d'unités isopréniques (C_5) qui les compose. Ainsi les hémiterpènes ont un squelette de 5 carbones et les tétraterpènes un squelette de 40 carbones⁶.

³⁷ Aoki S., Cao L., Matsui K., Rachmat R., Akiyama S. et Kobayashi M., Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, 2004. **60**(33): p. 7053-7059.

Quelques composés issus de ces voies métaboliques ont été isolés d'éponges du genre *Haliclona* au cours des 30 dernières années et notamment des méroterpènes, molécules dont l'origine biosynthétique n'est pas uniquement isoprénique.

En 1999, une étude de screening sur 134 éponges de l'océan Pacifique (Palau) révèle l'activité inhibitrice vis-à-vis des kinésines de l'extrait méthanolique d'une éponge du genre *Haliclona*. De nouveaux composés terpéniques nommés adociasulfates sont alors décrits présentant une activité intéressante vis-à-vis de ces protéines microtubulaires à une concentration de l'ordre du mM (Figure 7)³⁸.

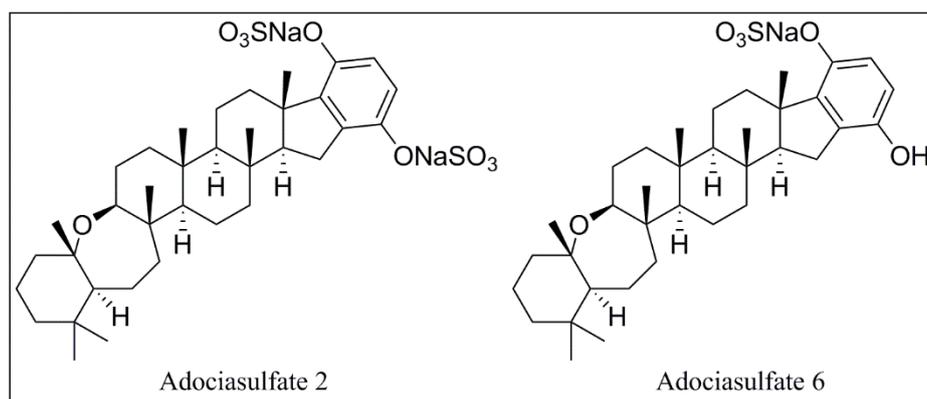


Figure 7 : Structures des adociasulfates 2 et 6 isolés de l'éponge *Haliclona* (aka. *Adocia*) sp.³⁸.

En 2012, les acides halicloïques A et B ont été isolés d'*Haliclona* (*Halichoelona*) sp., éponge prélevée dans l'océan Pacifique aux abords des côtes Philippines. Ces méroterpènes, présents dans l'extrait méthanolique, présentent une IC₅₀ de l'ordre du μ M vis-à-vis de l'indoleamine 2,3-dioxygénase, enzyme présente dans les cellules tumorales leur permettant de se soustraire à l'action des lymphocytes T (Figure 8)³⁹.

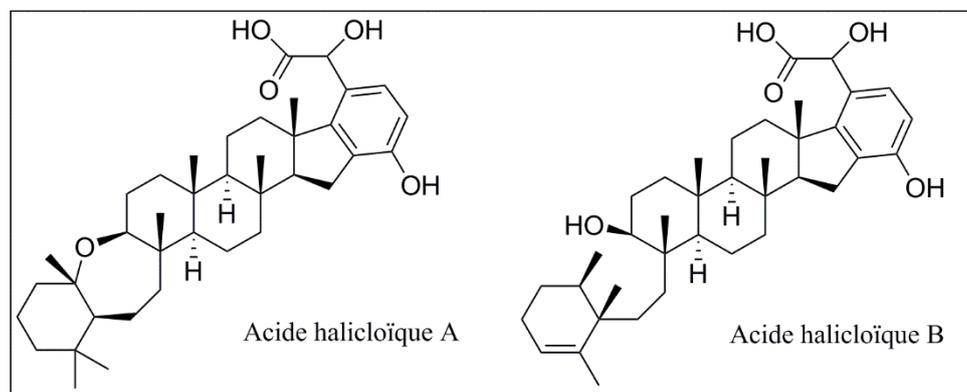


Figure 8 : Structures des acides halicloïques isolés d'*Haliclona* (*Halichoelona*) sp.³⁹.

• Polyacétylènes

Les composés acétyléniques sont des dérivés d'acides gras présentant une ou plusieurs triples liaisons. Cette famille de composés est largement retrouvée dans les éponges du genre *Haliclona* sous la forme de très

³⁸ Blackburn C.L., Hopmann C., Sakowicz R., Berdelis M.S., Goldstein L.S.B. et Faulkner J.D., Adociasulfates 1–6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 1999. **64**(15): p. 5565-5570.

³⁹ Williams D.E., Steino A., de Voogd N.J., Mauk G.A., Andersen R.J., Halicloic acids A and B isolated from the marine sponge *Haliclona* sp. collected in the Philippines inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Natural Products*, 2012. **75**(8): p. 1451-1458

longues chaînes carbonées (jusqu'à 47 carbones) présentant parfois un nombre élevé d'atomes d'oxygène ou encore un substitut halogéné ainsi que le montrent les exemples qui suivent.

En 1998, six nouveaux polyacétylènes présentant de nombreuses fonctions hydroxyles sont isolés de l'éponge *Haliclona osiris* prélevée dans l'océan Pacifique (Guam). Ces osirisynes, contenues dans l'extrait méthanol-dichlorométhane, présentent une activité cytotoxique avec une LC₅₀ de l'ordre du μM vis-à-vis de cellules leucémiques (Figure 9)⁴⁰.

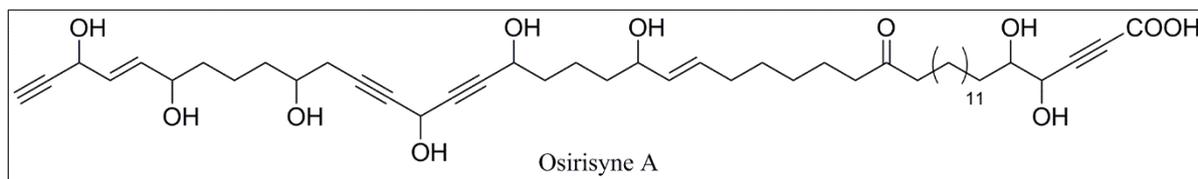


Figure 9 : Structure de l'osirisyne A isolée de l'éponge *Haliclona osiris*⁴⁰.

En 2003, douze polyacétylènes chlorés sont isolés à partir de l'extrait méthanolique de l'éponge *Haliclona lunisimilis* prélevée en Californie, neuf d'entre eux avaient déjà été décrits dans un nudibranche. Il semblerait que celui-ci utilise les composés produits par l'éponge pour augmenter ses défenses chimiques (Figure 10)⁴¹.

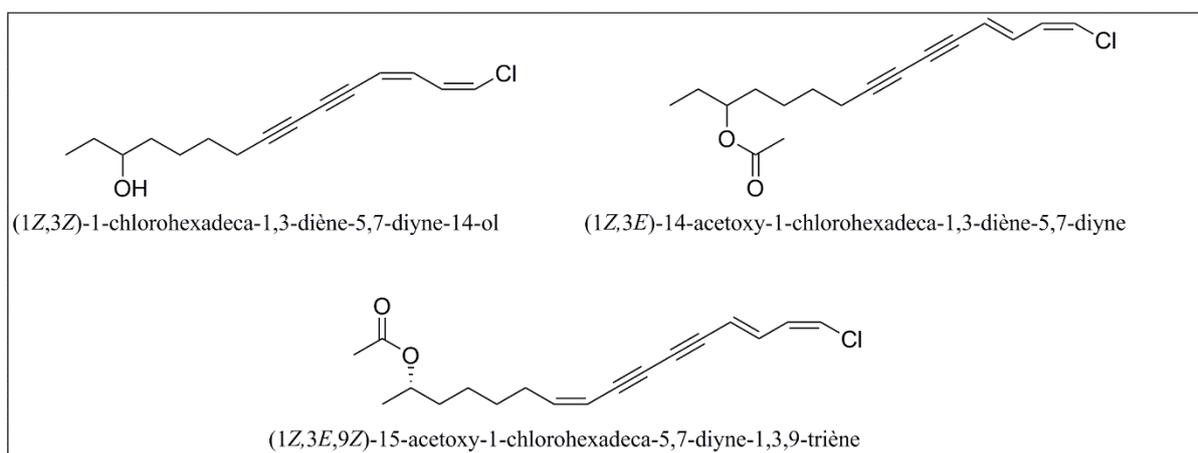


Figure 10 : Structures des nouveaux dérivés chlorés isolés de *Haliclona lunisimilis*⁴¹.

• Alcaloïdes 3-alkylP (3-AP)

Les éponges de l'ordre des Haplosclérides ont été largement décrites pour leur production de composés qualifiés d'alcaloïdes 3-alkylpyridiniques, 3-alkylpipéridiniques ou encore de sels 3-alkylpyridiniums. Avant de détailler les principaux composés de ce type décrits dans les éponges du genre *Haliclona*, quelques précisions quant à la dénomination de ces molécules sont à apporter.

Les alcaloïdes sont des bases organiques azotées largement décrites chez les végétaux et dans une moindre mesure chez les animaux et les micro-organismes. Un ou plusieurs atomes d'azotes sont présents dans ces molécules sous formes d'amines primaire, secondaire ou tertiaire ce qui leur confère un caractère

⁴⁰ Shin J., Seo Y., Cho K.W., Rho J-R., Paul V.J., Osirisynes A-F, highly oxygenated polyacetylenes from the sponge *Haliclona osiris*. *Tetrahedron*, 1998. **54**(30): p. 8711-8720.

⁴¹ de Jesus R.P. et Faulkner D.J., Chlorinated acetylenes from the San Diego sponge *Haliclona lunisimilis*. *Journal of Natural Products*, 2003. **66**(5): p. 671-674.

basique. Le degré de basicité de ces composés peut varier de manière importante selon la présence et la position d'autres groupes fonctionnels et certains alcaloïdes sont alors neutres. Certains alcaloïdes contenant des amines quaternaires sont également décrits dans la nature⁶.

Les composés décrits dans les éponges de l'ordre des Haplosclérides couvrent une grande variété de métabolites probablement issus d'une voie de biosynthèse commune. Cependant, ces molécules présentent des différences fonctionnelles importantes qui ne permettent pas de les regrouper toutes sous une seule dénomination. En effet, ces molécules présentent soit un cycle pyridinique, soit un cycle pipéridinique, ce qui permet de les classer en deux groupes distincts d'un point de vue fonctionnel bien que le second groupe soit probablement issu du premier d'un point de vue biogénétique. En revanche, elles ont en commun un groupement alkyl substituant ces cycles en position 3. Ces caractéristiques permettent de regrouper ces composés sous la dénomination de « alcaloïdes 3-AP » correspondant à alcaloïdes 3-alkylpyridiniques ou à alcaloïdes 3-alkylpipéridiniques.

Ces composés sont également classés selon le nombre de motifs 3-AP retrouvés dans la molécule et leur agencement ou non en macrocycles. Ainsi, en 1996, Andersen, van Soest et Kong décrivent la classification suivante²⁴:

- Monomères
- Oligomères
- Macrocycles bis-3-alkylpipéridiniques
- Macrocycles bisquinolizadinitiques et bis-1-oxaquinolizadinitiques
- Macrocycles présentant des cycles pipéridiniques liés
- Bis-3-alkylpipéridines condensées sans réarrangement du squelette
- Bis-3-alkylpipéridines condensées avec réarrangement du squelette

La plupart de ces groupes sont retrouvés dans les éponges du genre *Haliclona* comme le montrent les quelques exemples détaillés ensuite.

En 1978, l'oligomère halitoxine est isolé de l'extrait méthanolique des éponges *H. rubens*, *H. viridis* et *H. erina*. L'halitoxine correspond en réalité à différents polymères présentant la même unité structurale (qui est un sel d'alkylpyridinium) et dont le poids moléculaire peut être supérieur à 25000. Ces oligomères ont montré une activité antibiotique sur des bactéries Gram + telles que *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pyogenes* (Figure 11)⁴².

⁴² Schmitz F.J., Hollenbeak K.H. et Campbell D.C., Marine natural products: halitoxin, toxic complex of several marine sponges of the genus *Haliclona*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1978. **43**(20): p. 3916-3922.

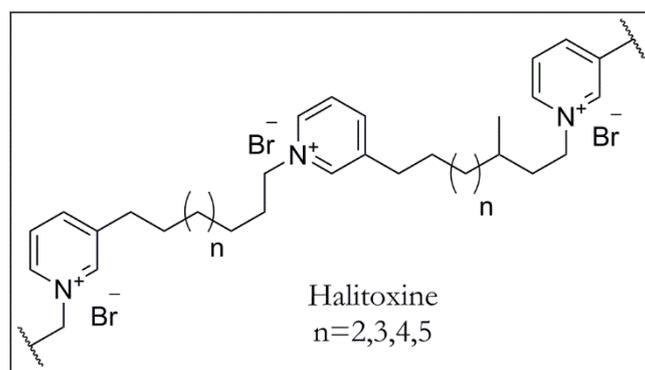


Figure 11 : Structure de l'unité de base des oligomères halitoxine isolés d'éponges du genre *Haliclona*⁴²

En 1986, la manzamine A (bis-3-alkylpiperidine condensée avec réarrangement du squelette) est isolée de l'extrait par acétate d'éthyle d'une éponge du genre *Haliclona* prélevée sur les côtes d'Okinawa. Cette étude avait pour but de trouver de nouveaux composés anticancéreux : la manzamine A présente une IC₅₀ de 0,07 nM sur la croissance de cellules leucémiques (Figure 12)⁴³.

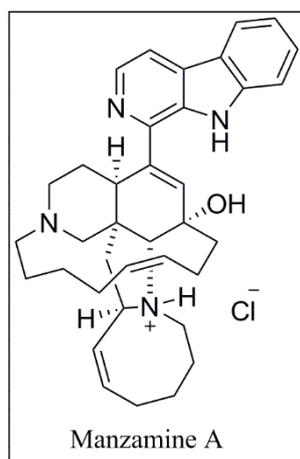


Figure 12 : Structure de la manzamine A isolée de l'éponge *Haliclona* sp.⁴³.

En 1989, trois nouveaux composés appelés saraines A, B et C (bis-3-alkylpiperidines condensées sans réarrangement du squelette) sont isolés de l'éponge *Reniera sarai* (*Haliclona sarai*) prélevée dans la baie de Naples. Ces molécules présentent une toxicité à l'encontre de différentes cibles testées (souris, puceron, mite, crevette) (Figure 13)⁴⁴.

⁴³ Sakai R., Higa T., Jefford C.W., Bernardinelli G., Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 1986. **108**(20): p. 6404-6405.

⁴⁴ Cimino G., Puliti R., Scognamiglio G., Spinella A. et Trivellone E., Amazing new alkaloid skeletons from the marine sponge *Reniera sarai*. *Pure and Applied Chemistry*, 1989. **61**(3): p. 535-538.

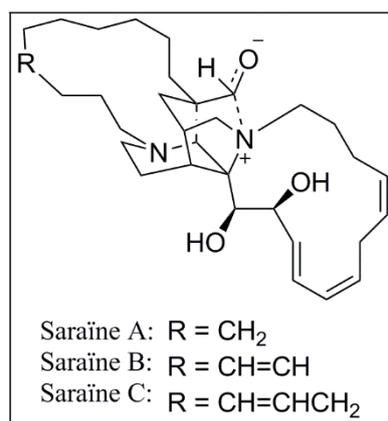


Figure 13 : Structures des saraines A, B et C isolées de l'éponge *Reniera sarai*⁴⁴.

Toujours en 1989, deux nouveaux composés cytotoxiques nommés haliclamine A et B (macrocycles bis-3-alkylpiperidiniques) sont isolés à partir d'un extrait éthanolique d'éponge du genre *Haliclona* prélevée au Japon (Figure 14)⁴⁵.

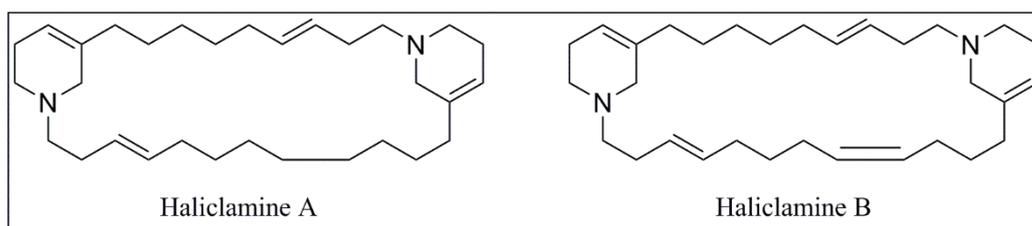


Figure 14 : Structures des haliclamines isolées de l'éponge *Haliclona* sp.⁴⁵.

En 1994, l'halicyclamine A (macrocycle présentant des cycles piperidiniques liés) est décrite à partir d'une éponge du genre *Haliclona* prélevée en Indonésie. A une concentration de l'ordre du nM, ce composé présente une activité inhibitrice de l'inosine monophosphate déshydrogénase, enzyme impliquée dans la prolifération cellulaire et cible des traitements anti-cancéreux (Figure 15)⁴⁶.

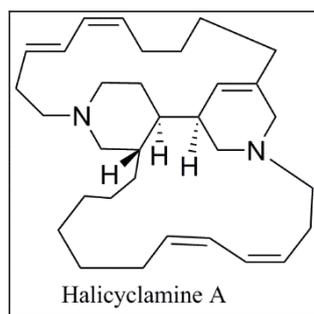


Figure 15 : Structure de l'halicyclamine A isolée de l'éponge *Haliclona* sp.⁴⁶.

A nouveau en 1994, cinq macrocycles bis-1-oxaquinolizadïniques dont un qui n'avait jamais été décrit auparavant ont été isolés de l'éponge *Haliclona exigua* prélevée dans l'océan Indien (Iles Andaman). L'extrait

⁴⁵ Fusetani N., Yasumuro K., Matsunaga S., Hirota H., Haliclamines A and B, cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*. *Tetrahedron Letters*, 1989. **30**(49): p. 6891-6894.

⁴⁶ Jaspars M., Pasupathy V. et Crews P., A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 1994. **59**(12): p. 3253-3255.

contenant la 3 α -methylaraguspongine C, les araguspongines C, D et E et la xestospongine D présentait une activité antibiotique à l'encontre de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (Figure 16)⁴⁷.

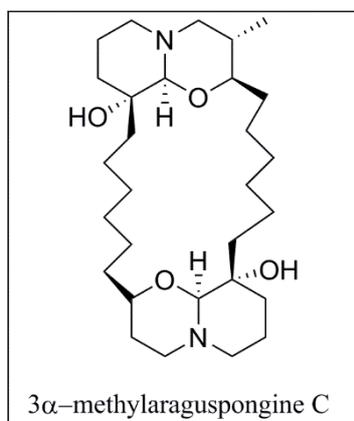


Figure 16 : Structure de la 3 α -methylaraguspongine C isolée pour la première fois de l'éponge *Haliclona exigua*⁴⁷.

Le genre *Haliclona* a été choisi tout d'abord pour la diversité chimique et l'intérêt des molécules déjà décrites dans ce groupe de spongiaires. Au-delà de la découverte de nouvelles molécules offertes par ce groupe de spongiaires, deux questions fondamentales sont posées par les caractéristiques chimiques de ces éponges :

- Comment expliquer une telle diversité chimique au sein d'un même groupe taxonomique ?
- Quels mécanismes biosynthétiques ont permis à ces éponges de produire des composés aussi complexes ?

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont pour objectif, si ce n'est de répondre définitivement à ces questions, d'apporter des éléments permettant d'étayer différentes hypothèses relatives à ces interrogations.

D. Objectifs de thèse

Ce travail de thèse traite de la chimie du métabolisme spécialisé des spongiaires du genre *Haliclona*, et ce à travers les questions suivantes :

- (1) Quelle diversité métabolique pour les espèces méditerranéennes *Haliclona sarai*, *Haliclona fulva*, *Haliclona mucosa* et *Haliclona magna* ?
- (2) Existe-t-il des marqueurs métaboliques qui pourraient aider à la classification de ces éponges ?
- (3) Quelles sont les origines biosynthétiques des saraines synthétisées par *Haliclona sarai* ?

Bien qu'elles portent sur le même objet d'étude, ces questions requièrent des approches différentes mais complémentaires. Afin de répondre à ces trois problématiques, diverses techniques de laboratoire ont été

⁴⁷ Venkateswarlu Y., Reddy M.V.R et Rao J.V., Bis-1-oxaquinolizidines from the sponge *Haliclona exigua*. *Journal of Natural Products*, 1994. 57(9): p. 1283-1285.

utilisées. La première question a été abordée *via* les techniques classiquement utilisées en chimie des produits naturels (HPLC-DAD–ELSD, RMN, MS, dichroïsme circulaire, *etc.*) pour l'isolement et la caractérisation des métabolites spécialisés. L'outil novateur qu'est la métabolomique a été employé pour répondre à la deuxième question : un protocole a été mis au point pour analyser les échantillons de onze espèces du genre *Haliclona* par spectrométrie de masse et RMN. Enfin, en collaboration avec l'AIEA, les origines biosynthétiques des saraines ont été étudiées *via* des expériences de feeding ayant recours à l'utilisation de précurseurs radiomarqués.

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres :

- Le chapitre I traite de la description du métabolome des éponges *Haliclona sarai*, *Haliclona fulva*, *Haliclona mucosa* et *Haliclona magna*.
- Le chapitre II constitue une étude phylométabolomique des éponges du genre *Haliclona*.
- Le chapitre III s'intéresse aux voies de biosynthèse menant aux saraines décrites chez *Haliclona sarai*.

Bien que la communauté de chercheurs s'intéressant aux spongiaires soit restreinte, un réseau important de spécialistes de divers domaines collaborent pour percer le mystère de ces organismes étonnants. Ainsi, une « Porifera list » a vu le jour ayant pour but de faciliter les échanges entre les chercheurs du domaine et cette communauté internationale se regroupe tous les quatre ans lors de la « Sponge Conference ». Plus particulièrement, l'intérêt croissant pour les produits naturels marins a amené de nombreux scientifiques à s'intéresser à ces organismes dans le but d'élucider les origines, les caractéristiques, les rôles et les applications de la chimie spécialisée au sein des éponges. Les chimistes des produits naturels marins se rassemblent autour de conférences internationales spécialisées comme la « Marine Natural Product Conference » à laquelle j'ai eu l'occasion de participer en 2013.

De façon plus régionale, mon travail s'inscrit aussi dans un contexte Européen avec de nombreux projets de recherche financés ces dernières décennies avec l'objectif de valoriser les métabolites spécialisés des spongiaires pour des applications biotechnologiques tel que le projet BAMMBO portant sur l'étude de différents organismes marins et notamment les éponges méditerranéennes *Crambe crambe*. Grâce à un financement Européen d'échange (Ulysse), nous avons pu développer une collaboration avec l'équipe de Grace McCormack (NUI Galway) qui avait pour objectif de répondre aux questions taxonomiques en suspens sur le genre *Haliclona* par l'association de données biologiques et chimique. Une revue parue dans *Planta Medica* permettant de décrire les premières idées et hypothèses à ce sujet est issue de cette collaboration.

Le travail développé au cours de cette thèse s'inscrit également dans un contexte national, pour preuve le financement PEPS Exomod du CNRS en 2014 qui avait pour objectif d'élucider les voies de biosynthèses des molécules saraines synthétisées par l'éponge *Haliclona sarai*. Ce projet, réalisé en collaboration avec Erwan Poupon du laboratoire BioCIS (Université Paris Sud) et l'AIEA (Laboratoire de RadioEcologie, REL à Monaco) a permis d'explorer davantage le métabolome d'*Haliclona sarai* et de mettre en place les investigations nécessaires à la compréhension des voies de biosynthèse des saraines par des expériences de

feeding en aquarium. De plus, par le biais d'un financement de la région PACA (Patched Work), une collaboration avec Isabelle Mus-Veteau de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS, Université de Nice Sophia-Antipolis) a permis le screening d'extraits de différentes éponges méditerranéennes pour leur activité sur le récepteur Patched. Une activité intéressante a été retenue pour les panicéines synthétisées par *Haliclona mucosa* et ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Oncotarget*. D'autres collaborations pour l'étude des propriétés pharmacologiques des métabolites spécialisés d'espèces méditerranéennes du genre *Haliclona* sont actuellement en cours avec Gilles Pages (INSERM) et le Centre Scientifique de Monaco (CSM) (Département de Biologie Médicale) et Luis Botana du Département de Pharmacologie de l'Université Vétérinaire (Université de Saint-Jacques de Compostelle).

Par ailleurs, les protocoles métabolomiques développés au cours de cette thèse s'inscrivent dans l'effort de recherche national sur la métabolomique à travers le réseau RFMF (Réseau de Fluxomique et de Métabolomique de France) auquel je participe activement (8èmes Journées Scientifiques 2014, Ecole Spectrométrie de Masse et Métabolomique 2014). Ce travail a également fait l'objet d'une présentation lors du 2^{ème} Symposium International AFERP (Association Française pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie)-STOLON (Enseignement, Recherche, Sciences Végétale et Fongique) en juillet 2015. Enfin, ces travaux ont été soutenus par la plateforme de métabolomique MALLABAR située à Marseille, dont la vocation principale est de permettre les études métabolomiques en milieu marin.

Chapitre 1 : Métabolomes d'éponges méditerranéennes du genre *Haliclona*

A. *Haliclona (Rhizionera) sarai* (Pulitzer-Finali, 1969)

L'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* fut d'abord décrite en 1961 par Sarà sous le nom de *Haliclona viscosa sensu Sarà*⁴⁸ puis renommée par Pulitzer-Finali en 1969 sous le nom de *Reniera sarai*⁴⁹. Cette éponge est décrite en Méditerranée et notamment dans la baie de Naples comme étant une espèce massive et pâle (Figure 17). Elle est retrouvée dans des grottes de 5 à 50 m de profondeur.



Figure 17 : Photographies de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* (Thierry Perez)

1. Métabolites spécialisés isolés d'*Haliclona (Rhizionera) sarai*

Les études portant sur la chimie de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* ont commencé dans les années 1970, cependant la complexité des composés produits par cette espèce n'a pas permis la publication des premières études structurales avant 1986⁵⁰.

Les premières molécules décrites sont les saraines 1, 2 et 3 (**1-3**) en 1986 et leurs isomères les isosaraines 1, 2 et 3 (**4-6**) en 1989 (Figure 18). L'élucidation structurale de ces molécules est réalisée grâce aux spectres obtenus par RMN et spectrométrie de masse^{44,51,52}. Ces composés sont issus de la fraction butanolique d'un extrait brut de l'éponge obtenu par acétone et nommé par ordre de polarité croissante. Ces composés sont caractérisés par leur structure particulière présentant cycle oxoquinolizidinique directement lié à un second cycle tétrahydropyridinique. Deux chaînes carbonées dont la longueur varie d'une molécule à l'autre lient également ces deux cycles. Malgré différentes études portant sur l'élucidation structurale de ces composés^{53,54,55,56}, celle-ci reste un véritable challenge en particulier en ce qui concerne la stéréochimie.

⁴⁸ Sarà M., La fauna di Poriferi delle grotte delle isole Tremiti. Studio ecologico e sistematico. Archivio zoologico italiano, 1961. **46**: p. 1-59.

⁴⁹ Pulitzer-Finali G., *Reniera sarai*, new name for *Haliclona viscosa* Sara, dans *Istituto di Zoologia dell' Università di Genova*. 1969. p. 97-101.

⁵⁰ Delpéch B., Chapter Four - The saraine alkaloids, dans *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, K. Hans-Joachim, Editor. 2014, Academic Press. p. 223-329.

⁵¹ Cimino G., De Rosa S., De Stefano S. et Sodano G., Marine natural products: new results from Mediterranean invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 1986. **58**(3): p. 375-386.

⁵² Cimino G., De Stefano S., Scognamiglio G., Sodano G. et Trivellone E., Saraines: A new class of alkaloids from the marine sponge *Reniera sarai*. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 1986. **95**(9-10): p. 783-800.

⁵³ Cimino G., Fontana A., Madaio A., Scognamiglio G. et Trivellone E., Application of two-dimensional shift correlated NMR techniques to the structure determination of an unusual marine alkaloid, isosaraine-2. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1991. **29**: p.327-332.

⁵⁴ Guo Y., Madaio A., Trivellone E., Scognamiglio G. et Cimino G., Further studies of alkaloids from *Reniera sarai*: Structures of saraine-3 and isosaraine-3; absolute stereochemistry of saraine-1 and saraine-2. *Tetrahedron*, 1996. **52**: p.14961-14974.

⁵⁵ Guo Y., Trivellone E., Scognamiglio G. et Cimino G., Absolute stereochemistry of isosaraine-1 and isosaraine-2. *Tetrahedron Letters*, 1998. **39**: p.463-466.

⁵⁶ Guo Y., Madaio A., Trivellone E., Scognamiglio G. et Cimino G., Structural and stereochemical studies of saraines: Macrocyclic alkaloids of the sponge *Reniera sarai*. *Tetrahedron*, 1996. **52**: p.8341-8348.

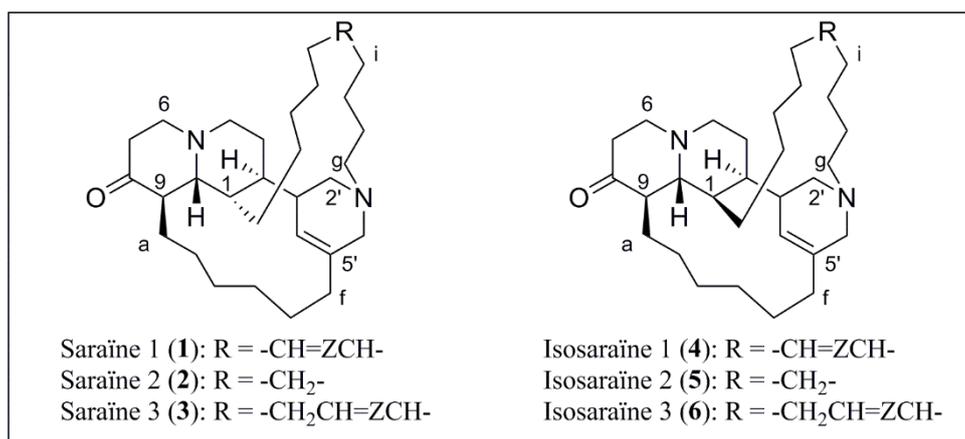


Figure 18 : Structures des saraines 1, 2 et 3 (1-3) et des isosaraines 1,2 et 3 (4-6) décrites à partir de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai*^{51,52}

Dès 1989, les saraines A, B et C (7-9) (Figure 19) sont décrites à leur tour⁵⁷. Elles présentent un noyau tricyclique avec une interaction peu commune entre une fonction aldéhyde et une amine tertiaire qui leur confère des particularités spectroscopiques^{58,59}. Comme pour les saraines 1 à 3, deux chaînes carbonées forment des macrocycles. Un dérivé di-acétylé de la saraine A (7) a été cristallisé permettant une étude cristallographique par rayon X et une description complète sans ambiguïté de cette seconde famille de composés. La saraine A (7) est le seul composé de ce groupe à avoir été synthétisé^{60,61,62}.

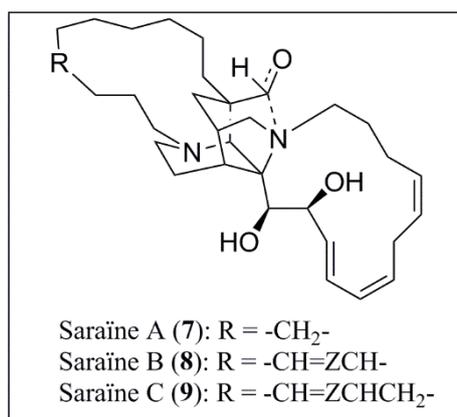


Figure 19 : Structures des saraines A, B et C (7-9) décrites à partir de l'éponge *Haliclona (Rhizionera)sarai*⁵⁷

Seules deux études ont été entreprises sur les propriétés biologiques des saraines. D'abord, les saraines 1 à 3 (1-3) et A à C (7-9) (principaux composés isolés de l'éponge) ont été testées en 1992 par Caprioli selon différents tests biologiques (cytotoxicité, propriétés antibactériennes et insecticides et activités

⁵⁷ Cimino G., Mattia C.A., Mazzarella L., Puliti R., Scognamiglio G., Spinella A. et Trivellone E., Unprecedented alkaloid skeleton from the mediterranean sponge *Reniera sarai*. X-ray structure of an acetate derivative of sarain-A. *Tetrahedron*, 1989. **45** : p.3863-3872.

⁵⁸ Cimino G., Scognamiglio G., Spinella A. et Trivellone E., Structural studies on saraine A. *Journal of Natural Products*, 1990. **53**: p.1519-1525.

⁵⁹ Defant A., Mancini I., Raspor L., Guella G., Turk T. et Sepčić K., New structural insights into saraines A, B, and C, macrocyclic alkaloids from the mediterranean sponge *Reniera (Haliclona) sarai*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011. **2011** : p3761-3767.

⁶⁰ Sisko J. et Weinreb S.M., Construction of the tricyclic core of the marine alkaloid sarain A. *The Journal of Organic Chemistry*, 1991. **56**: p.3210-3211.

⁶¹ Sisko J., Henry J.R et Weinreb S.M., Development of a strategy for synthesis of the unusual marine alkaloid sarain A. *The Journal of Organic Chemistry*, 1993. **58**: p.4945-4951.

⁶² Becker M.H., Chua P., Downham R., Douglas C.J., Garg N.K., Hiebert S., Jaroch S., Matsuoka R.T., Middleton J.A., Ng .W. et Overman L.E., Total synthesis of (-)-sarain A. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**: p.11987-12002.

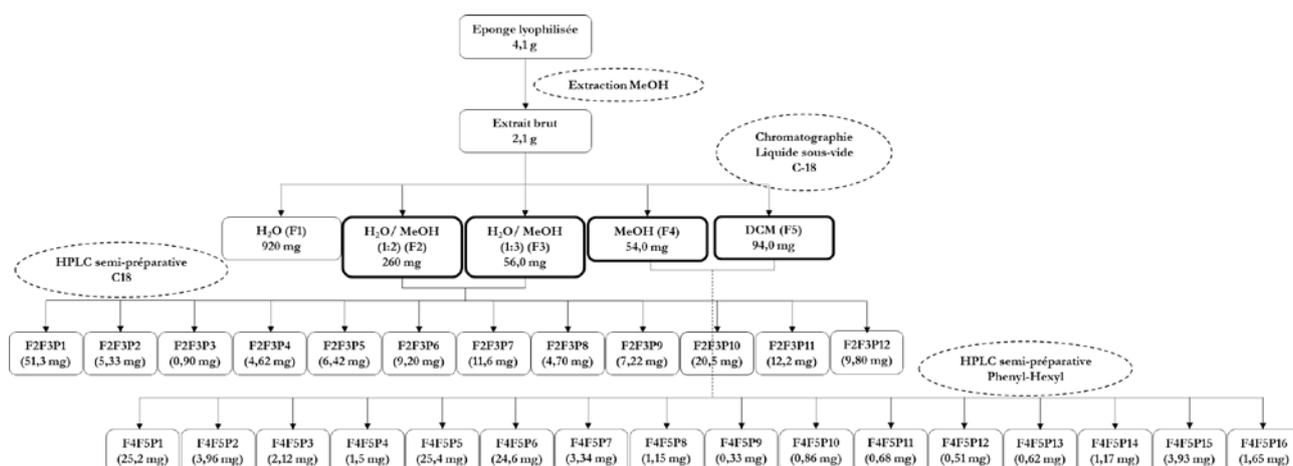


Figure 21 : Schéma de fractionnement et de purification de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai*

Les données obtenues par UHPLC-DAD (Figure 22) ont permis de regrouper les fractions F2 et F3 ainsi que les fractions F4 et F5 avant de procéder aux différentes étapes de purification. En effet, les quatre fractions présentaient des profils intéressants à étudier et leurs similitudes ont permis de les associer deux à deux.

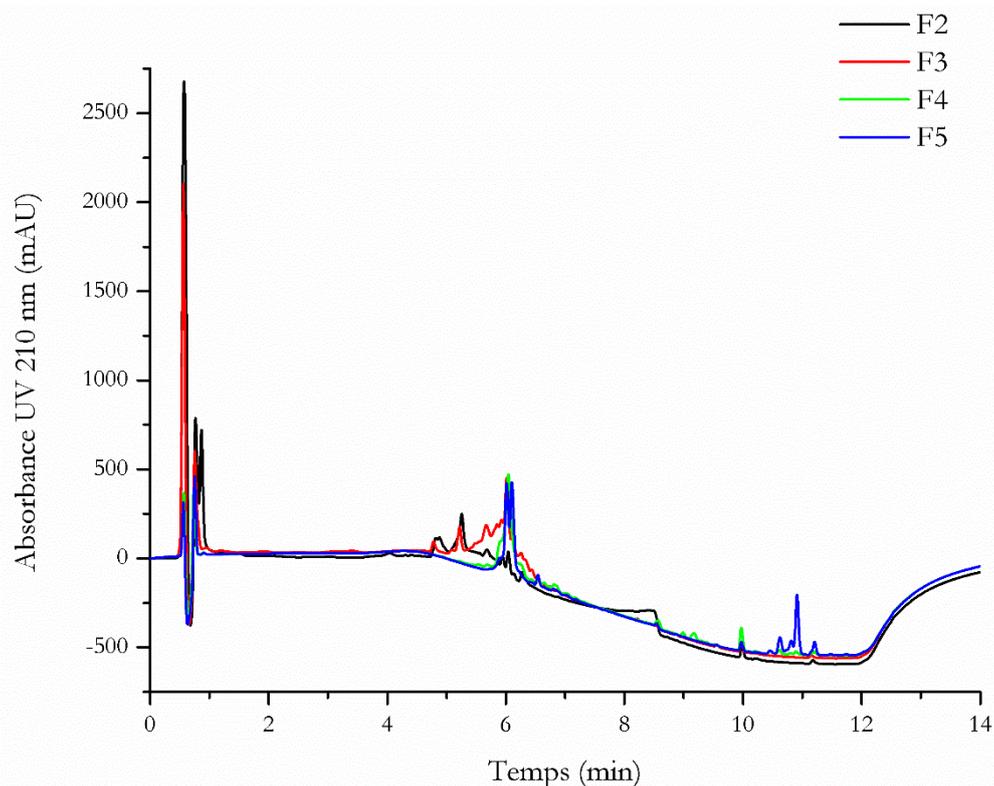


Figure 22 : Chromatogrammes UHPLC-DAD des différentes fractions F2 ($H_2O/MeOH$ 1:2), F3 ($H_2O/MeOH$ 1:3), F4 (MeOH) et F5 (DCM) obtenues du fractionnement de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai*. L'intensité en mAU à 210 nm est représentée en fonction du temps. Sur colonne phényl-hexyl UHPLC avec un gradient standard commençant à (90 H_2O : 10 ACN) jusqu'à (0 H_2O : 100 ACN) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de $0,5 mL \cdot min^{-1}$ et un volume d'injection de $5 \mu L$.

Les deux étapes de purification qui ont suivi ont permis d'obtenir 12 puis 16 pics. De la première purification, a été isolé un nouveau composé : le diméthyl-3-hydroxyheptanedioate (**10**) correspondant au pic F2F3P6. De la seconde purification, ont été isolées l'haliclamine C (**11**) correspondant au pic F4F5P3, la

saraïne 2 (**2**) correspondant au pic F4F5P5 et la saraïne 1 (**1**) correspondant au pic F4F5P6. La plupart des autres pics correspondaient à des mélanges isolés en faibles quantités et dont les repurifications étaient difficilement envisageables. Cependant, la saraïne A (**7**) a pu être isolée à hauteur de 15 mg à partir du pic F4F5P1 et la dihydrohaliclamine C (**12**) –nouveau composé– a été obtenue à hauteur de 2,1 mg du pic F4F5P2.

Avant de présenter les détails concernant l'élucidation structurale des différents composés, une renumérotation des saraïnes 1, 2 et 3 est proposée (Figure 23). Celle-ci est basée sur les hypothèses biosynthétiques qui seront présentées dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

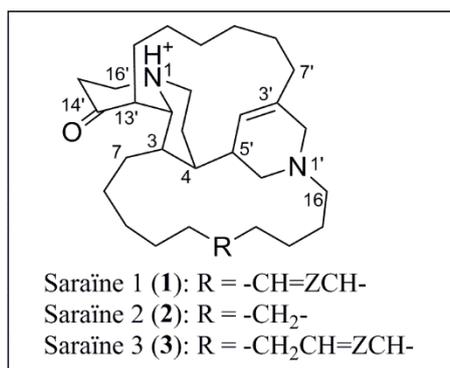


Figure 23 : Structure des saraïnes 1,2 et 3 (**1-3**) présentées avec une nouvelle proposition de numérotation.

- Saraïne 1 (**1**) et saraïne 2 (**2**) : L'élucidation structurale de ces composés a été réalisée par comparaison des résultats de RMN ¹H avec les données obtenues dans la littérature (Tableau 1). Ces deux composés présentent les mêmes déplacements chimiques en RMN en ce qui concerne la structure oxoquinolizidinique liée au cycle tétrahydropyridinique. La différence porte sur la chaîne latérale la plus longue qui ne comporte pas de double liaison dans le cas de la saraïne 2 (**2**) pour laquelle on ne retrouve alors pas les signaux des positions 13 et 14 indiquées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic F4F5P6 d'*Haliclona* (*Rhizionera*) *sarai* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la saraine 1 (1) (CDCl₃)⁵¹

Position	Saraine 1 (1) (CD ₃ OD)			Données bibliographiques (CDCl ₃)	
	δ_H (ppm)	m (J en Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	3,44		64,9	2,07	68,8
3	1,46		37,0	1,98	36,3
4	1,89		38,0	1,85	37,2
5	2,40; 2,13	br; d (14,3)	33,2	1,75	24,5
6	3,44		64,9	3,02; 2,57	46,3
13	5,56	m	133,8	5,42	130,3
14	5,53	m	128,4	5,42	129,3
17	3,36		56,1	2,40-2,36	56,6
2'	3,88; 3,60		53,4	3,10; 2,42	55,0
3'	-		135,8	-	135,9
4'	5,75	s	121,0	5,48	121,8
5'	2,94		39,8	2,36	40,4
6'	3,84; 2,69		52,3	2,65; 2,22	54,8
13'	2,61		48,7	2,35	52,9
14'	-		205,3	-	210,8
15'	3,06; 2,62		33,8	2,70; 2,20	38,7
16'	3,70; 3,57		51,3	3,15; 2,68	54,6

Les masses de ces deux composés ont été confirmées par les analyses de spectrométrie de masse haute résolution en ionisation positive : pour la saraine 1 m/z 467.4007 [M+H]⁺, 234.2049 [M+2H]²⁺ et pour la saraine 2 m/z 455.4010 [M+H]⁺, 228.2035 [M+2H]²⁺ (Figure 24).

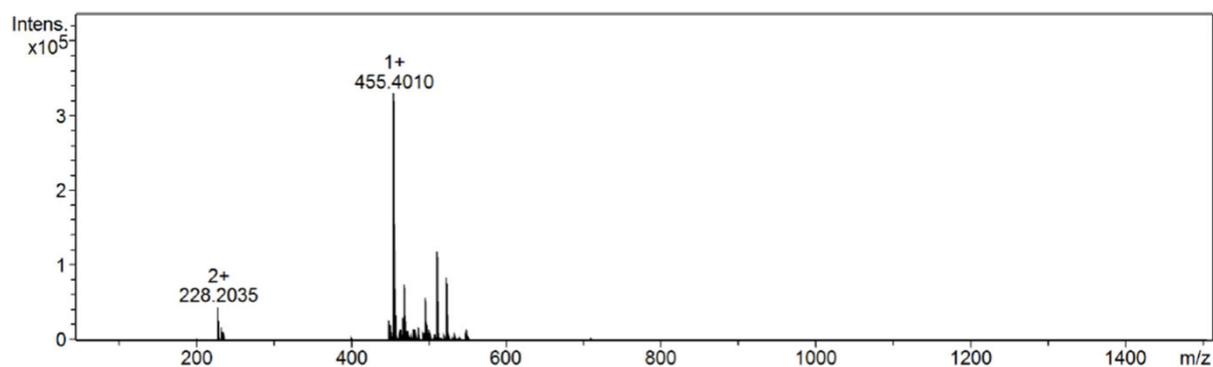


Figure 24 : Spectre de masse haute résolution de la saraine 2 (2) obtenu par électrospray en mode positif

Jusqu'à présent, la stéréochimie de la liaison 4-5' de ces saraines n'avait jamais été étudiée. Des analyses polarimétriques couplées à des expériences de modélisation réalisées par Grégory Genta-Jouve (Université Paris Descartes) ont alors été entreprises permettant d'élucider cette stéréochimie. Une modélisation DP4 basée sur la RMN du carbone de la saraine 2 (2) a permis d'identifier quel isomère est celui retrouvé naturellement (Figure 25). Les saraines 1, 2 et 3 ayant la même origine biosynthétique cette conformation a également été appliquée aux saraines 1 et 3 (Figure 25).

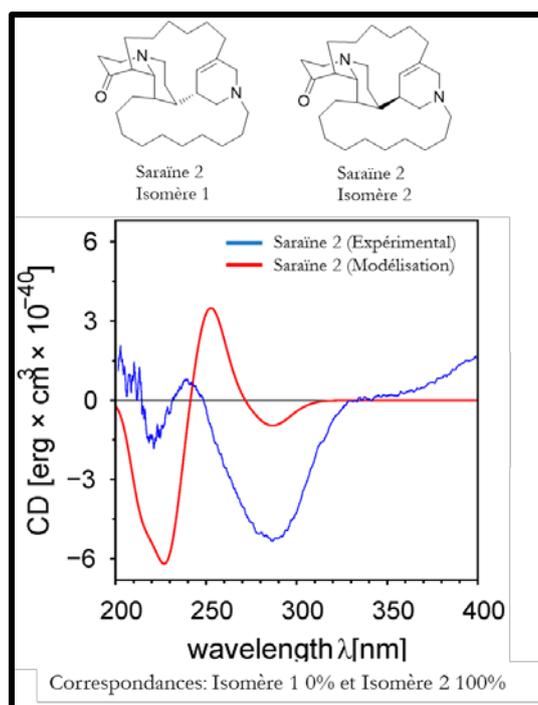


Figure 25 : Comparaison des données expérimentales obtenues par dichroïsme pour la saraine 2 avec les données de modélisation obtenues pour l'isomère 2 de la saraine 2.

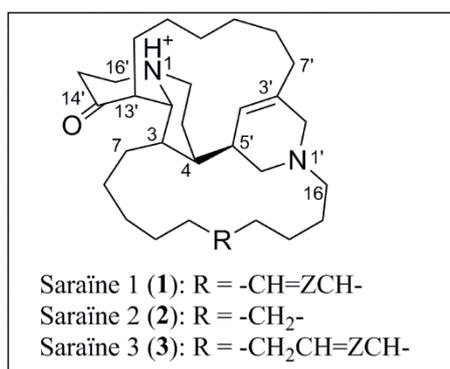


Figure 26 : Structures des saraines 1 à 3 (1-3) incluant la description de la stéréochimie de la liaison 4-5'.

• Saraine A (7). L'élucidation structurale de la saraine A est elle aussi basée sur la comparaison des déplacements chimiques des signaux obtenus par la RMN du proton avec ceux décrits dans la bibliographie (Tableau 2)^{57,58}. Les spectres de ces saraines sont très reconnaissables.

Tableau 2 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic F4F5P6 d'*Haliclona (Rhizionera) sarai* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la saraine A (7) (CDCl₃)^{57,58}

Position	Saraine A (7) (CD ₃ OD)		Données bibliographiques (CDCl ₃)	
	δ_H (ppm)	m (J en Hz)	δ_H (ppm)	m (J en Hz)
2	5,02	s	8,50	
3	-		-	
16	3,21; 3,04	m	3,00; 2,90	
2'	3,83	s	3,59	s
3'	-		-	
6'	3,70; 3,47	m	3,13; 2,81	
7'	4,57	s	4,22	s
8'	4,45	d (8,7)	4,10	d (7,9)
9'	5,80	q (8,2)	5,71	m
10'	6,55	dd (15; 11))	6,46	dd (15,8; 10,7)
11'	6,12	t (9,0)	6,03	t (10,6)
12'	5,73	dd (15; 8,2)	5,72	m
13'	3,55; 3,21	m	3,13; 2,50	
14'	5,35	br	5,20	m
15'	5,31	br	5,15	m
18'	3,14; 2,98	m	3,00; 2,58	

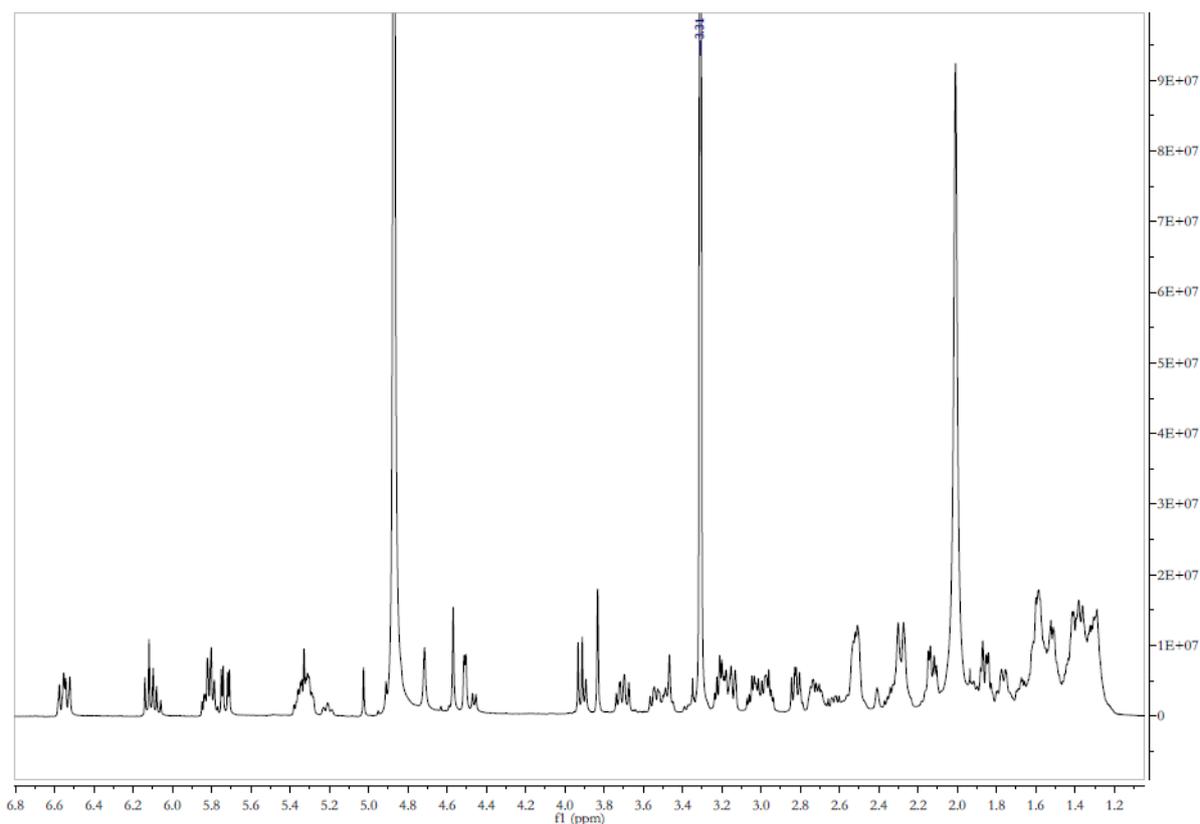


Figure 27 : Spectre ¹H de la saraine A (7) isolée de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* dans le CD₃OD.

L'analyse par spectrométrie de masse par électrospray en mode positif de la saraine A a permis de confirmer la taille de la molécule : m/z 511.3926 [M+H]⁺ (Figure 28).

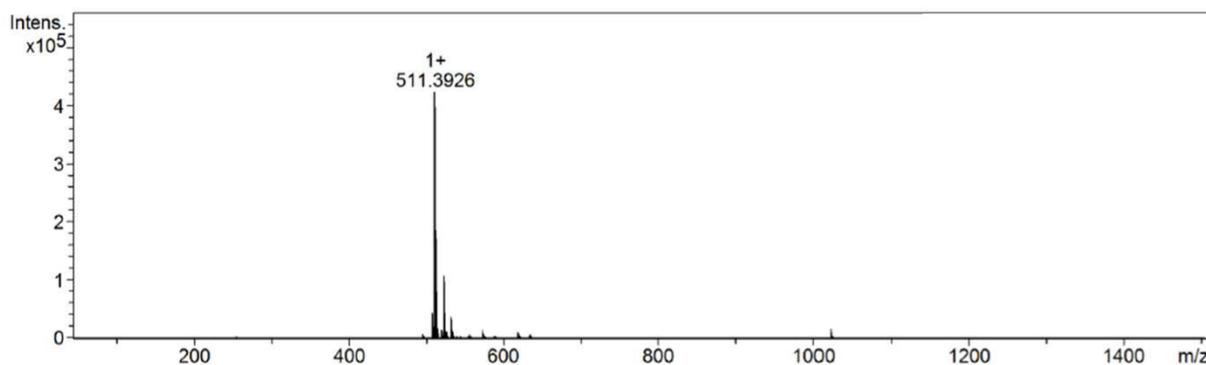


Figure 28 : Spectre de masse haute résolution de la saraine A (7) obtenu par électrospray en mode positif

• Diméthyl 3-hydroxyheptanedioate (10) (Figure 29). L'élucidation structurale de ce nouveau composé jamais décrit auparavant dans la nature, a été principalement basée sur les données RMN. Celles obtenues à partir de l'expérience ^1H sont reportées dans le Tableau 3. Le spectre HSQC a permis de déterminer la position des protons par rapport aux carbones et aux différents groupements fonctionnels. Ainsi, ce spectre montre la liaison entre le carbone à 71,1 ppm et le proton à 4,15 ppm ; ces déplacements chimiques indiquent la présence d'un groupement hydroxyle porté par ce carbone. Les corrélations entre le singulet à 3,73 ppm et le carbone à 52,2 ppm ainsi qu'entre le singulet à 3,66 ppm et le carbone à 51,8 ppm sont également mises en évidence indiquant la présence de deux groupements méthyl portés par des atomes d'oxygène. Les autres corrélations proposées par ce spectre sont celles indiquées dans le Tableau 3. Les spectres COSY et HMBC ont permis de finaliser l'élucidation structurale de cette molécule. Le spectre COSY révèle des corrélations entre le signal à 4,15 ppm correspondant à la position 3 et les signaux à 1,66 et à 1,77 ppm confirmées par les corrélations entre le proton à 4,15 ppm et les carbones respectifs à 34,4 ppm sur le spectre HMBC. Le signal 176,2 ppm est également corrélé au singulet à 3,73 ppm ainsi qu'au signal à 1,66 ppm sur le spectre HMBC. Ces informations permettent de proposer l'enchaînement entre la fonction ester qui porte un groupement méthyl, un groupement $-\text{CH}_2$ et le carbone portant la fonction hydroxyle. Le carbone à 175,5 ppm est corrélé avec le singulet à 3,66 ppm sur le spectre HMBC ainsi qu'au signal à 2,36 ppm. Ce dernier est lui-même corrélé au signal à 1,72 ppm sur le spectre COSY permettant de proposer l'autre partie de la molécule.

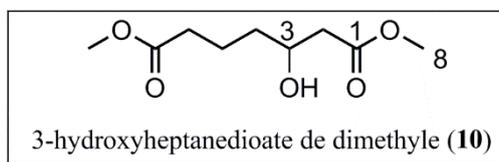


Figure 29 : Structure du 3-hydroxyheptanedioate de diméthyle (10).

Tableau 3 : Déplacements chimiques obtenus pour le pic F2F3P6 d'*Haliclona (Rhizoniera) sarai* (CD₃OD)

Position	Diméthyl-3-hydroxyheptanedioate (10)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	m	J (Hz)
1	176,2	-		
2	34,4	1,66	m	
3	71,1	4,15	m	
4	34,4	1,77	m	
5	25,5	1,72	m	
6	34,2	2,36	t	5,0
7	175,5	-		
8	52,2	3,73	s	
9	51,8	3,66	s	

Les résultats ensuite obtenus en spectrométrie de masse (Trappe à ions) ont permis de confirmer la taille de la molécule. Le composé a été analysé en infusion direct après un ajout de sels de lithium qui facilite l'ionisation de la molécule. L'ion obtenu est alors $[M+Li]^+$ dont m/z est égal à 197,33 correspondant au composé **10** ayant perdu un groupement méthyl et associé à l'ion lithium (Figure 30).

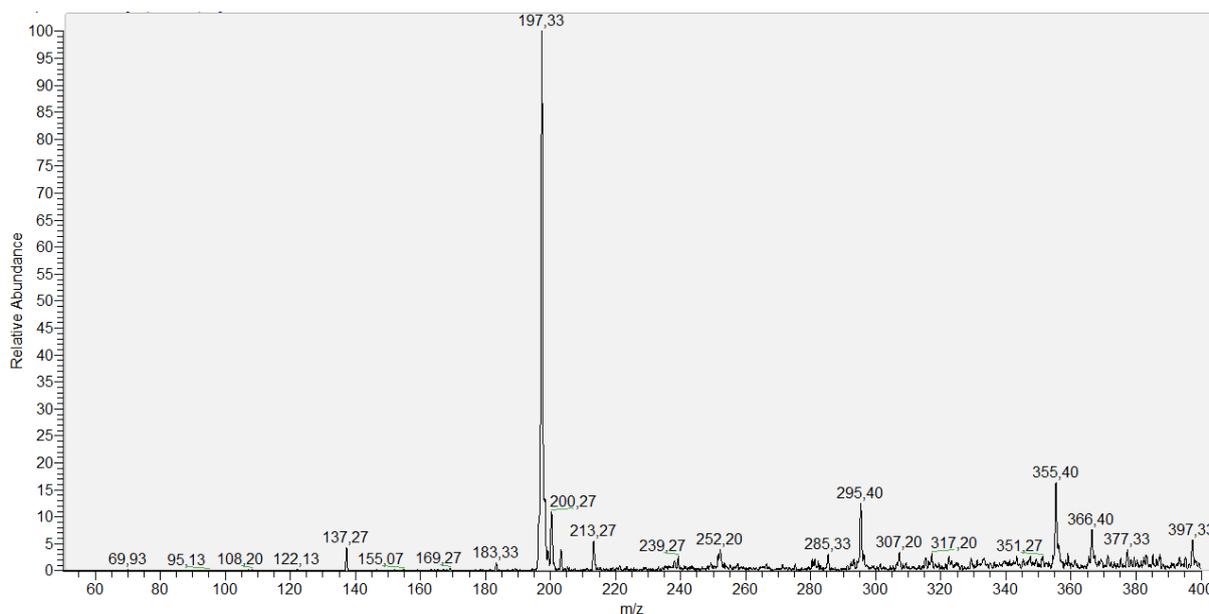


Figure 30 : Spectre de masse du diméthyl-3-hydroxyheptanedioate (**10**) obtenu par infusion directe du composé auquel étaient ajoutés de sels de lithium (Trappe à ions).

- Haliclamine C (**11**) (Figure 31). L'élucidation structurale de l'haliclamine C a été réalisée par comparaison avec les données bibliographiques du composé déjà isolé de l'éponge *Haliclona (Rhizoniera) viscosa*⁶⁶ (Tableau 4). La structure de la molécule a ensuite été confirmée par les corrélations obtenues sur les spectres COSY et HMBC. Le spectre COSY met en évidence les corrélations entre le signal à 5,71 ppm correspondant à la position 4 et les signaux à 2,10 ppm et 2,40 ppm correspondant respectivement aux positions 5 et 15'. Ce proton de la position 4 est également corrélé à ceux de la position 2 à 3,79 ppm et à 3,59 ppm. Ces derniers sont aussi corrélés avec un proton de la position 15' (2,40 ppm). Le spectre HMBC

⁶⁶ Volk C.A., Lippert H., Lichte E. et Köck M., Two new haliclamine from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2004. 2004(14): p. 3154-3158.

révèle la corrélation entre le proton à 2,10 ppm de la position 15' et les carbones des positions 3 et 4 respectivement à 133 et 120 ppm. Ce même proton est également corrélé avec le carbone de la position 2 à 52,6 ppm. Le proton de la position 16 à 1,46 ppm est aussi corrélé au carbone de la position 17 à 35,4 ppm.

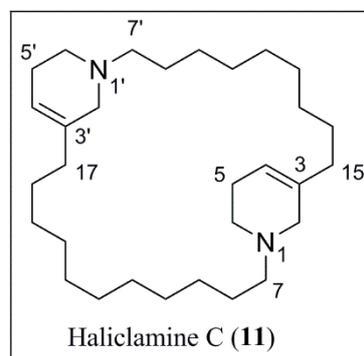


Figure 31 : Structure de l'haliclamine C (**11**) isolée des éponges *Haliclona viscosa* et *Haliclona sarai*

Tableau 4 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic F4F5P3 d'*Haliclona (Rhizionera) sarai* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour l'haliclamine C (**11**) (CDCl₃)⁶⁶

Position	Haliclamine C (11) (CD ₃ OD)			Données bibliographiques (DMSO)		
	δ_H (ppm)	m (J en Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	m (J en Hz)	δ_c (ppm)
1 (1')	-	-		10,66	br	(48)
2 (2')	3,79; 3,59	d(15,9)+d(15,9)	52,6	3,69 + 3,50	t(14,3)+d(14,3)	50,1
3 (3')	-	-	133	-	-	130,8
4 (4')	5,71	s	120	5,60	s	118,3
5 (5')	2,40; 2,48	br	23,1	2,36 + 2,27	br + br	21,3
6 (6')	3,52; 3,15	br	50,5	3,43 + 3,05	br + br	48,3
7 (7')	3,18	br	57,0	3,08	br	54,2
8 (8')	1,78	br	24,7	1,66	br	22,4
9-15 (9'-13')	1,40-1,30	superposition	superposition	1,2	superposition	superposition
16 (14')	1,45	br	28,3	1,35	superposition	26,3
17 (15')	2,10	t (7,42)	35,4	1,99	br	33,0

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en ionisation positive a permis de confirmer la taille de la molécule envisagée : m/z 443.3926 [M+H]⁺, 221.1809 [M+2H]²⁺.

• Dihydrohaliclamine C (12) (Figure 32): Les spectres RMN obtenus pour cette nouvelle molécule sont très proches de ceux obtenus pour l'haliclamine C (**11**) décrite précédemment. Cependant la symétrie de la molécule n'était pas respectée. Les déplacements chimiques obtenus pour ce composé dans le CD₃OD sont donnés dans le Tableau 5. A nouveau les spectres COSY et HMBC ont permis de proposer la structure de la molécule selon les corrélations présentées dans la Figure 33.

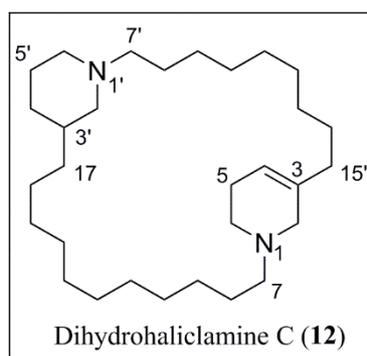


Figure 32 : Structure de la dihydrohaliclamine C (**12**) isolée de l'éponge *Haliclona (Rhizonera) sarai*

Tableau 5 : Déplacements chimiques obtenus pour le pic repurifié F4F5P2 d'*Haliclona (Rhizonera) sarai* (CD₃OD)

Position	Dihydrohaliclamine C (12) (CD ₃ OD)		
	δ_H (ppm)	m (J en Hz)	δ_c (ppm)
2	3,78; 3,57	d (16,6); m	52,5
3	-	-	133
4	5,70	s	120
5	2,49; 2,41	m; m	22,8
6	3,52; 3,15	m; m	50,2
7	3,05	br	58,5
8-16	1,30-1,48	br	23,0-30,8
17	2,09	t (6,15)	35,6
2'	3,54; 2,54	br	57,6
3'	1,78	br	35,2
4'	1,86; 1,20	br	29,6
5'	1,96; 1,76	br	23,7
6'	3,49; 2,84	br; t (br)	54,5
7'	3,18	br	56,7
8'	1,79	m	24,8
9'	1,41	br	26,8
10'-15'	1,30-1,48	br	23,0-30,8

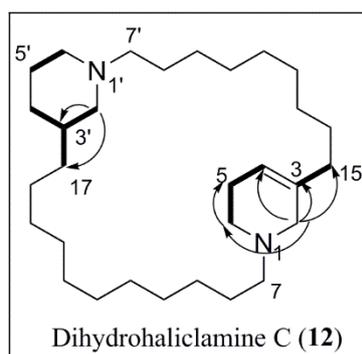


Figure 33 : Corrélations COSY ¹H-¹H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) de la dihydrohaliclamine C (**12**) dans le CD₃OD.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en ionisation positive a ensuite permis de confirmer la taille de la molécule : m/z 445.4518 [M+H]⁺, 223.2294 [M+2H]²⁺ (Figure 34). Les autres ions présents sur le spectre de masse correspondent à des impuretés encore non identifiées et indétectables en RMN.

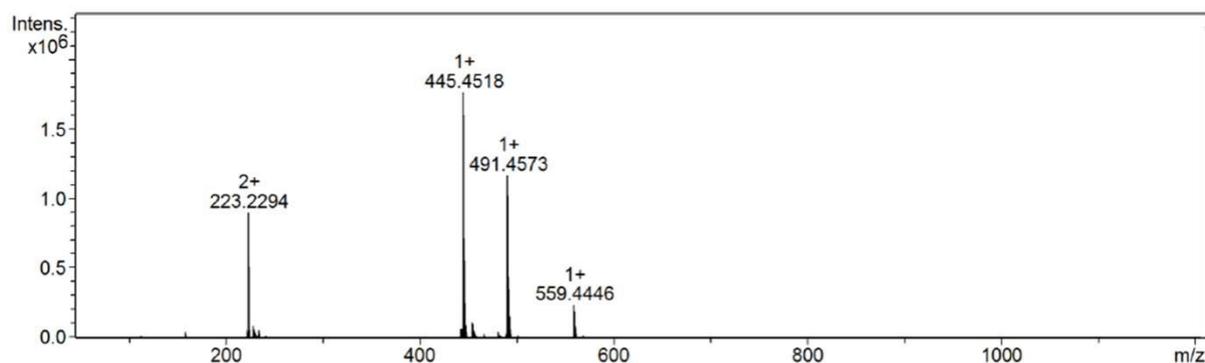


Figure 34 : Spectre de masse haute résolution de la dihydrohaliclamine C (**12**) obtenu par électrospray en mode positif

Si la (re)description du métabolome de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* a permis d'isoler à nouveau les saraines déjà décrites auparavant, elle a surtout permis la découverte de nouveaux composés pour certains déjà isolés d'autres éponges et pour d'autres jamais décrits dans la nature : l'haliclamine C (**11**) isolée de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) viscosa*, la dihydrohaliclamine C (**12**) et le diméthyl-3-hydroxyheptanedioate (**10**). Ces résultats permettent d'envisager trois problématiques :

- Quelles activités pharmacologiques présentent les saraines ?

Les saraines étaient jusqu'à présent assez bien décrites d'un point de vue chimique bien que ce soit les analyses de dichroïsme circulaire entrepris ici qui aient permis d'élucider la stéréochimie des saraines 1, 2 et 3 (**1-3**). En revanche, peu d'études ont été réalisées concernant les propriétés pharmacologiques de ces composés qui semblaient pourtant être prometteuses^{59,63}. L'activité anti-oxydante de ces saraines a donc été testée par la suite en collaboration avec Luis Botana (Département de Pharmacologie de la Faculté Vétérinaire de Saint-Jacques de Compostelle).

- Le genre *Haliclona* et les alcaloïdes 3-AP ?

Deux composés de type haliclamine ont été décrits de l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai*. La dihydrohaliclamine C (**12**) est un nouveau composé jamais isolé auparavant. En revanche, l'haliclamine C (**11**) a déjà été décrite dans l'éponge du même genre *Haliclona (Rhizionera) viscosa*⁶⁶. Cette même éponge contient également des composés de type sels d'alkylpyridinium^{67,68}. De plus les haliclamines A et B ont également été décrites à partir d'éponge du genre *Haliclona*⁴⁵. Ces similitudes entre espèces du même genre posent la question de l'utilisation de ces composés comme marqueurs chimiques pour ce groupe taxonomique. Cette problématique est largement développée dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

- Quels sont les secrets de la biosynthèse de ces saraines, composés si complexes ?

Lors des précédentes études sur les saraines différentes hypothèses ont été proposées concernant les mécanismes de biosynthèse permettant d'aboutir à ces composés. La description des haliclamines et du

⁶⁷ Volk C.A. et Köck M., Viscosamine: The first naturally occurring trimeric 3-alkyl pyridinium alkaloid. *Organic Letters*, 2003. **5**(20): p.3567-3569.

⁶⁸ Volk C.A. et Köck M., Viscosoline: new 3-alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2004. **2**(13): p.1827-1830.

diméthyl-3-hydroxyheptanedioate au sein de cet organisme suggère de nouvelles hypothèses concernant ces voies métaboliques. Le chapitre 3 de ce manuscrit propose une étude détaillée de ces hypothèses et la mise en place de différentes expérimentations dans l'optique de les valider.

3. Evaluation de l'activité anti-oxydante des saraines

Les expériences menées pour évaluer le potentiel pharmacologique des saraines ont été réalisées au département de pharmacologie de la faculté vétérinaire de Saint-Jacques de Compostelle par l'équipe de Luis Botana. Cette équipe travaille, entre autres, sur les mécanismes liés au stress oxydant et sur les molécules capables d'y remédier.

Les cellules neuronales sont particulièrement sensibles au stress oxydant est à l'origine de différentes pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale ou encore la maladie de Huntington⁶⁹. Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des saraines 1 et 2 (**1,2**) et A (**7**), des neuroblastes humains (SH-SY5Y) sont placés en culture et exposés pendant 6 h à de l'eau oxygénée à la concentration de 150 μM . Durant cette exposition, les composés testés sont également ajoutés au milieu à différentes concentrations : 10, 1, 0,1 et 0,01 μM . Le témoin positif utilisé est la vitamine E à la concentration de 25 μM . Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois. Différents tests ont ensuite été réalisés sur les cultures dans le but de visualiser l'impact de la présence des saraines sur les cellules exposées à un stress oxydant :

⁶⁹ Lin M.T. et Beal M.F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006. **443**: p. 787-795.

• Test de viabilité cellulaire au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium) (Figure 36).

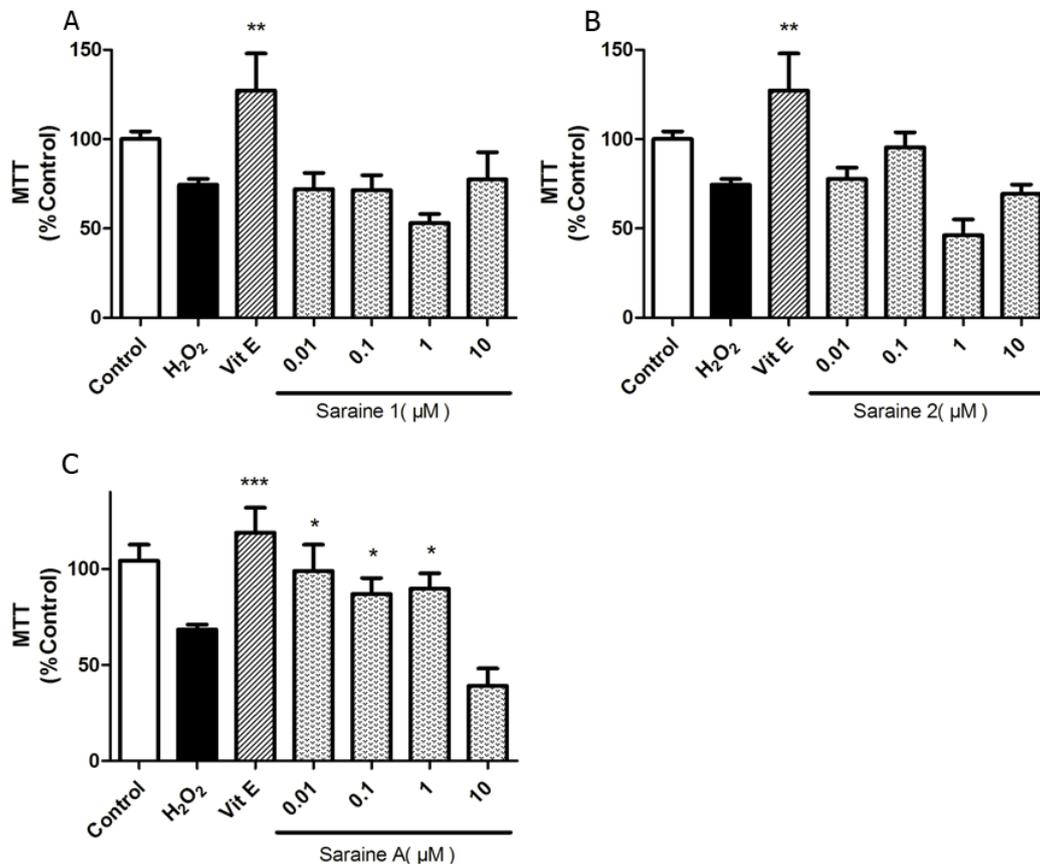


Figure 35 : Effet des saraines sur la survie cellulaire après une agression oxydante par H₂O₂. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec H₂O₂ 150 μM et les composés (0,01, 0,1, 1 et 10 μM) ou la vitamine E (25 μM) pendant 6 h. Les résultats sont présentés en pourcentage des cellules non-traitées et comparés aux cellules traitées par H₂O₂ 150 μM seule. **p*<0.05 et ***p*<0.01 (Test de Student). Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Ces résultats montrent que les saraines 1 (1) et 2 (2) ne présentent aucun effet protecteur vis-à-vis de la cytotoxicité induite par H₂O₂. En revanche, la saraine A (7) augmente de manière significative la viabilité cellulaire aux concentrations de 0,01, 0,1 et 1 μM.

• Mesure du potentiel membranaire mitochondrial par sonde TMRM (tetraméthylrhodamine méthyl ester) (Figure 36)

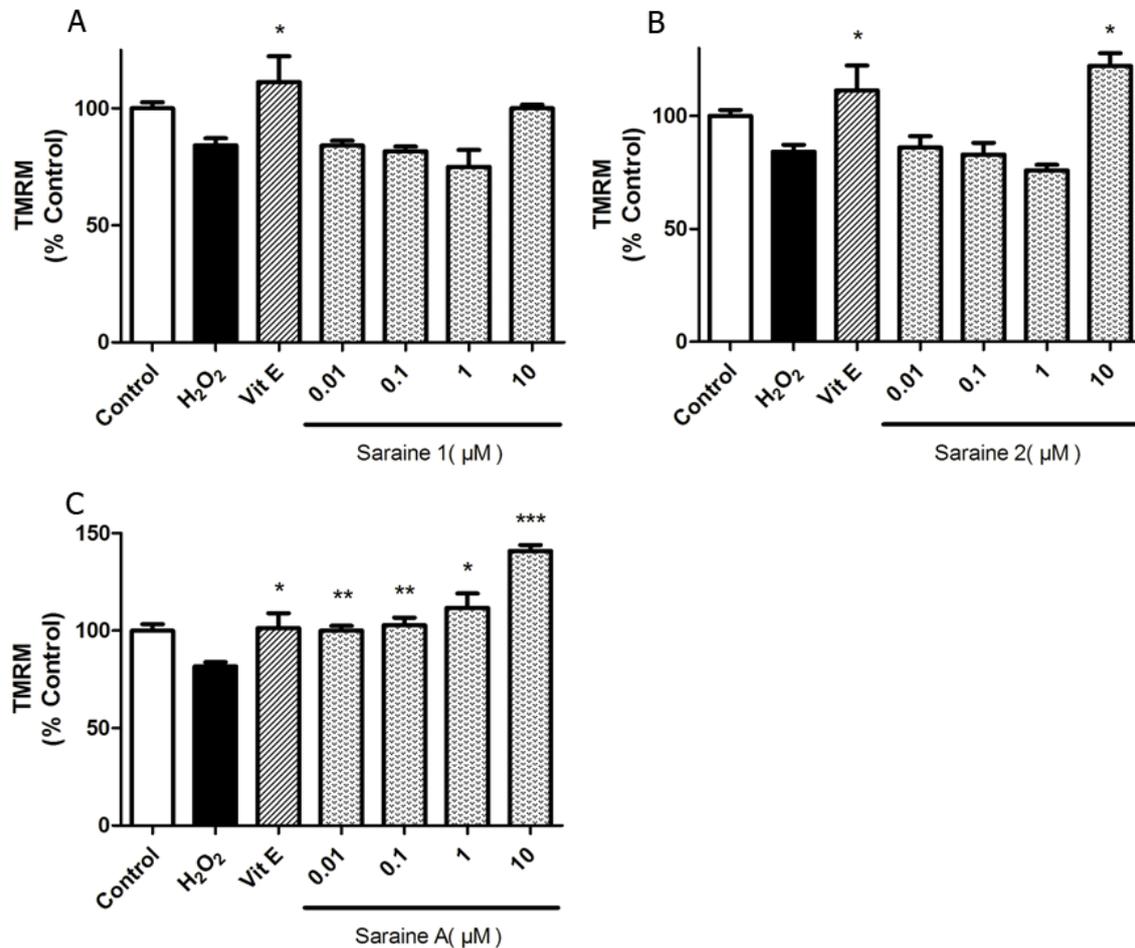


Figure 36 : Effet des saraines sur le potentiel membranaire mitochondrial mesuré par l'utilisation de TMRM. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec H₂O₂ 150 μM et les composés (0,01, 0,1, 1 et 10 μM) ou la vitamine E (25 μM) pendant 6 h. Les résultats sont présentés en pourcentage des cellules non-traitées et comparés aux cellules traitées par H₂O₂ 150 μM seule. **p*<0.05 et ***p*<0.01 (Test de Student). Les expériences ont été réalisées en triplicat.

A nouveau, les résultats montrent une activité mitigée des saraines. Le traitement par la saraine 1 (1) ne montre pas d'effet sur le potentiel membranaire. A la plus haute concentration (10 μM), la saraine 2 (2) permet d'augmenter ce potentiel membranaire. A toutes les concentrations testées, la saraine A (7) permet de restaurer le potentiel membranaire des cellules soumises à un stress oxydant. La mesure de ce potentiel membranaire permet d'évaluer l'état de santé des cellules ayant résisté au stress oxydant induit par H₂O₂. Ces résultats sont corrélés aux précédents puisque seule la saraine A (7) semble réellement présenter un effet protecteur des neuroblastes vis-à-vis de l'oxydation.

• Détermination du niveau intracellulaire des espèces réactives à l'oxygène (ROS) par l'utilisation de carboxy-H₂DCFDA (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate) (Figure 37)

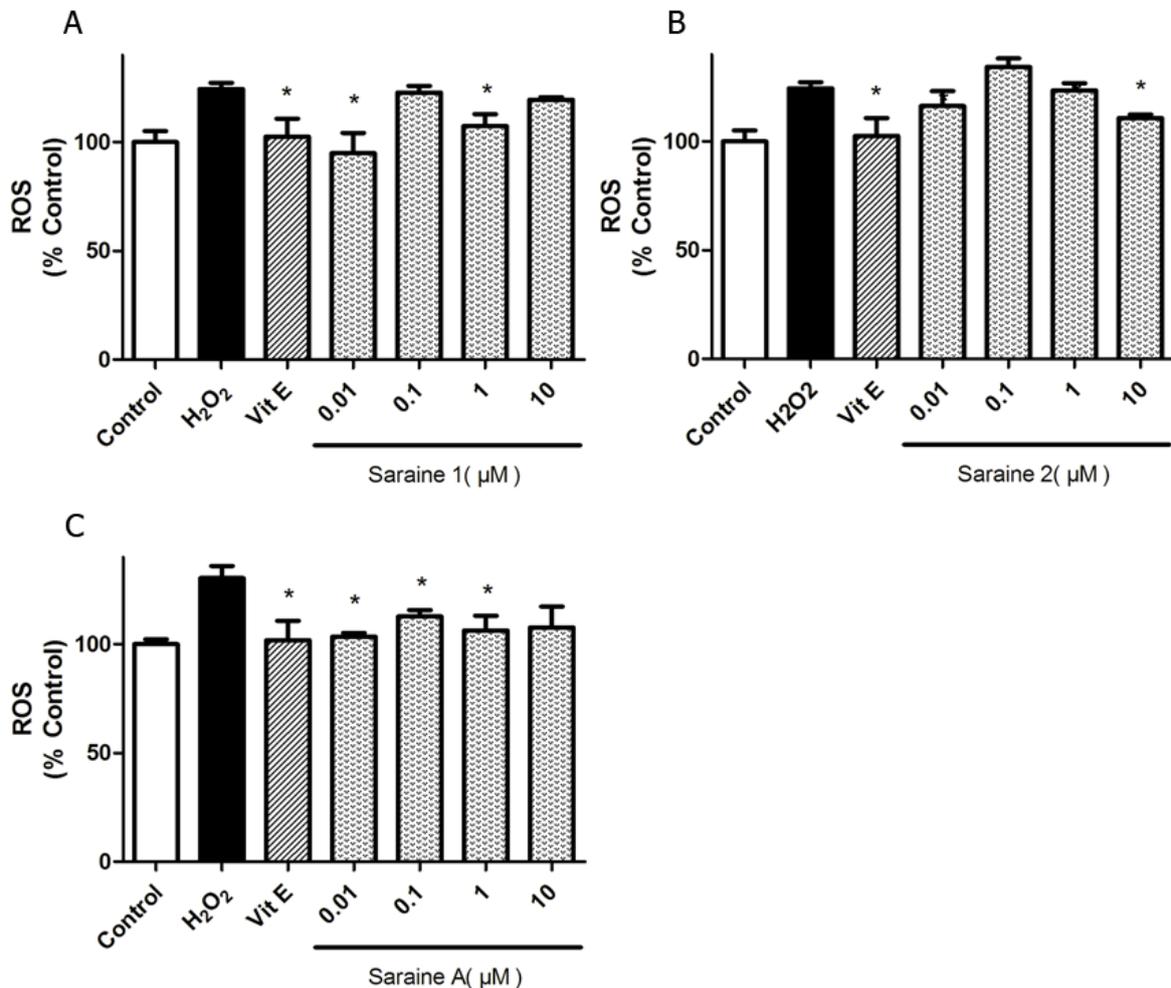


Figure 37 : Inhibition de la production de ROS par les saraines. Les niveaux de ROS ont été mesurés par carboxy-H₂DCFDA. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec H₂O₂ 150 µM et les composés (0,01, 0,1, 1 et 10 µM) ou la vitamine E (25 µM) pendant 6 h. Les résultats sont présentés en pourcentage des cellules non-traitées et comparés aux cellules traitées par H₂O₂ 150 µM seule. **p*<0.05 (Test de Student). Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Les ROS sont produites par les mitochondries dans les conditions physiologiques pour être utilisées dans différents processus biologiques. Exposées à un stress oxydant, les cellules produisent davantage de ces composés responsables de dommages importants au niveau cellulaire. La saraine 1 (1) permet la diminution des ROS à 0,01 et 1 µM et la saraine 2 (2) diminue les niveaux de ROS à 10 µM. La saraine A (7) montrent une baisse de la production de ROS à 0,01, 0,1 et 1 µM. A nouveau, ces résultats montrent un réel potentiel de la saraine A (7) comme protectrice vis-à-vis de l'oxydation cellulaire puisqu'elle permet la diminution de la production de ROS par les cellules exposées au stress oxydant. Les résultats obtenus pour les autres saraines sont moins évidents à interpréter.

- Mesure de la quantité de glutathion (GSH) (Figure 38)

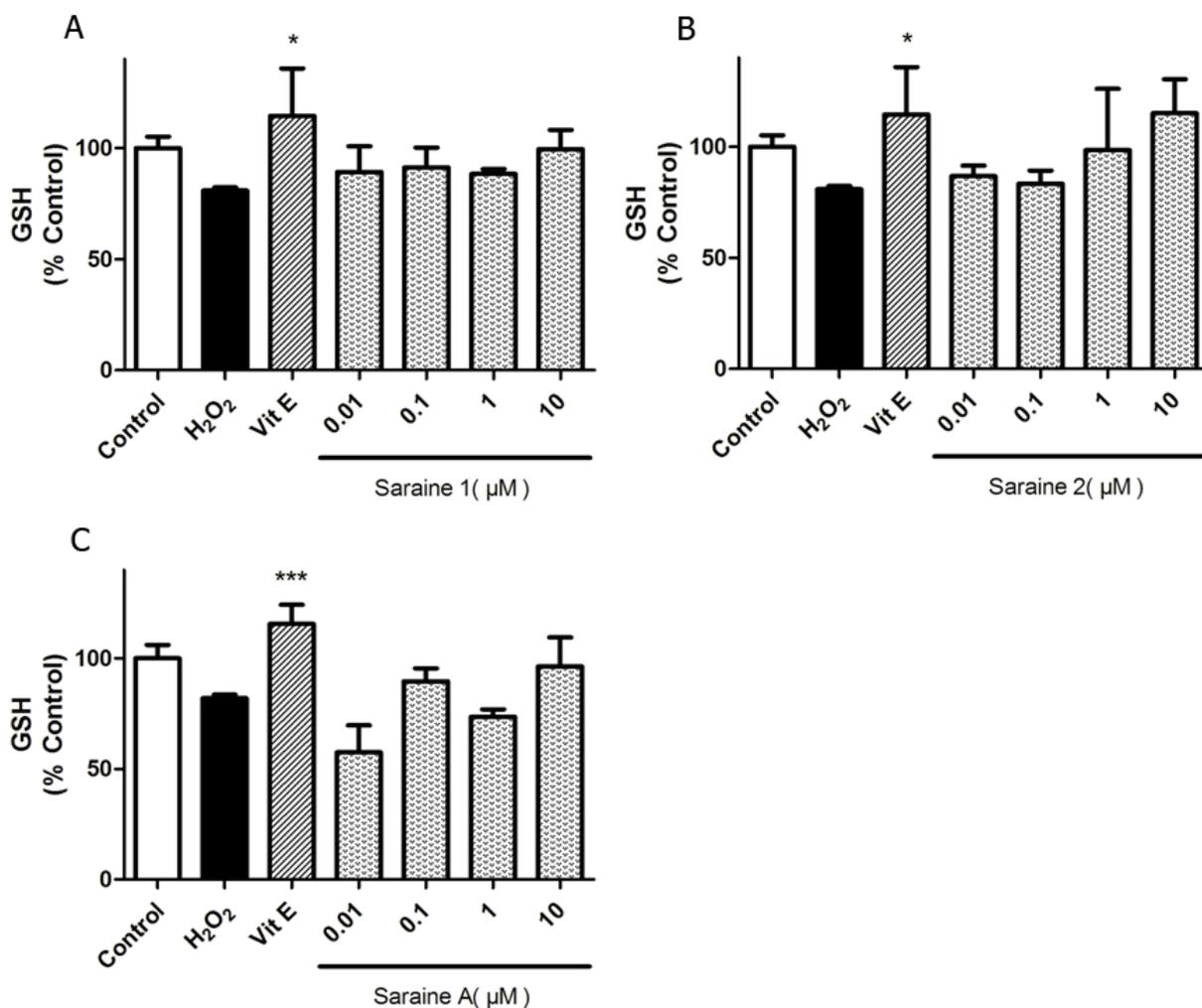


Figure 38 : Evaluation du contenu en GSH des cellules. Les niveaux de GSH ont été mesurés par ThioTracker Violet. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec H₂O₂ 150 μM et les composés (0,01, 0,1, 1 et 10 μM) ou la vitamine E (25 μM) pendant 6 h. Les résultats sont présentés en pourcentage des cellules non-traitées et comparés aux cellules traitées par H₂O₂ 150 μM seule. **p*<0.05 (Test de Student). Les expériences ont été réalisées en triplicat

Le glutathion fait partie des composés présents dans la cellule et permettant de contrer les effets du stress oxydant en diminuant les niveaux de ROS présents au niveau intracellulaire. Aucune des saraines testées ne semble avoir d'effet sur les quantités de glutathion présentes pour répondre au stress oxydant.

Mesure de l'expression du gène Nrf2 par WesternBlot (Figure 39).

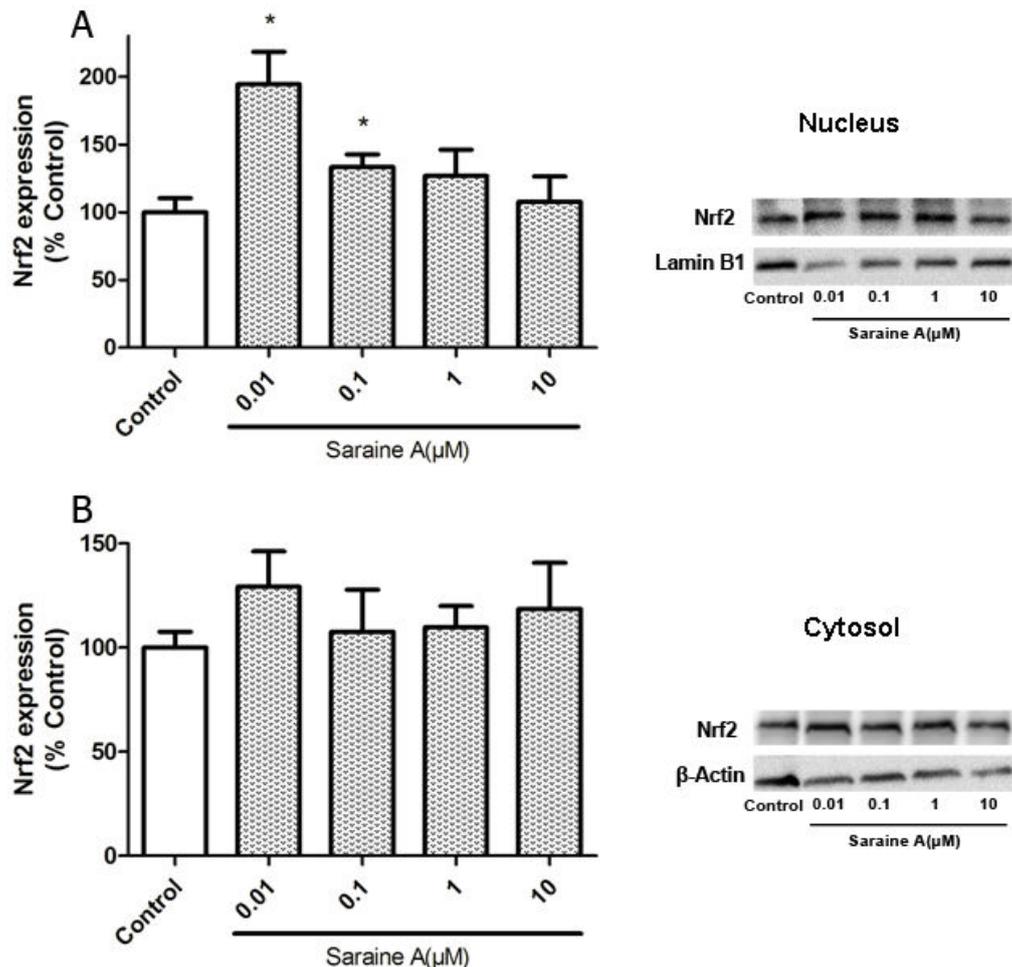


Figure 39 : Mesure de l'expression du gène Nrf2 par Western blot. Les cellules ont été incubées avec la saraine A (7) à 0,01, 0,1, 1 et 10 µM pendant 6 h. Les niveaux d'expression ont été mesurés dans le noyau (A) et dans le cytosol (B). L'intensité des bandes a été normalisée par la β-actine dans le cytosol et la lamine B1 dans le noyau. Les résultats sont présentés en pourcentage des cellules non-traitées.**p*<0.05 (Test de Student). Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Le gène Nrf2 est impliqué dans la régulation des systèmes antioxydants cellulaire. La mesure de son expression permet d'évaluer la potentialisation de son activité par la molécule testée. Au regard des résultats précédents, seule l'activité sur l'expression de ce gène de la saraine A (7) a été évaluée. Cette molécule permet l'augmentation significative de l'expression du gène Nrf2 dans le noyau aux concentrations de 0,01 et de 0,1 µM.

L'étude de l'activité pharmacologique des saraines vis-à-vis du stress oxydant révèle à nouveau le potentiel de la saraine A (7). En effet, les résultats obtenus par ces expériences permettent d'affirmer que ce composé présente un réel pouvoir antioxydant exercé par le biais de la voie métabolique Nrf2-ARE (Nuclear Related Factor 2 (Nrf2)-Antioxidant Response Element). En revanche, les saraines 1 (1) et 2 (2) n'ont pas montré d'activités anti-oxydantes puisque les concentrations auxquelles elles sont actives,

notamment sur l'augmentation du potentiel membranaire et la production de ROS, ont un effet négatif sur la viabilité cellulaire indiquant un mauvais fonctionnement mitochondrial.

B. *Haliclona (Halichocona) fulva* (Topsent, 1893)

L'éponge *Haliclona (Halichocona) fulva* a été décrite en 1893 par Topsent sous le nom de *Reniera fulva*, comme étant une éponge de consistance friable non visqueuse assez étendue sur les pierres, d'une couleur orange caractéristique (Figure 40)⁷⁰. Cette éponge est largement retrouvée dans les grottes semi-obscurées de Méditerranée, de la région Marseillaise jusqu'à la mer Adriatique⁷¹.



Figure 40 : Photographies de l'éponge *Haliclona (Halichocona) fulva* (Thierry Perez)

1. Métabolites spécialisés isolés d'*Haliclona (Halichocona) fulva*

L'étude du métabolome d'*Haliclona (Halichocona) fulva*, a fait l'objet de plusieurs publications depuis les années 1970, permettant l'identification de différentes familles de composés.

En 1977, cinq nouveaux acétylènes insaturés dont certains sont halogénés sont décrits dans des spécimens de la baie de Naples⁷² : réniérine-1 (**13**), réniérine-2 (**14**), débromoréniérine-1 (**15**), 18-dihydrouréniérine-1 (**16**) et 18-hydroxyuréniérine-2 (**17**) (Figure 41). Les quantités obtenues de ces composés proches n'ont pas permis un grand nombre d'analyse et l'élucidation structurale est basée sur les données RMN, IR et de spectrométrie de masse.

⁷⁰ Topsent E., Nouvelle série de diagnose d'éponges de Roscoff et de Banyuls, *Archives de zoologie expérimentale et générale 3^{ème} série*, 1893.

⁷¹ Griessinger J.-M., Etude des Renierides de Méditerranée (Demosponges, Haplosclerides). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (Zoologie)*, 1971: p. 97-182.

⁷² Cimino G. et De Stefano S., New acetylenic compounds from the sponge *Reniera fulva*. *Tetrahedron Letters*, 1977. **18**(15): p. 1325-1328.

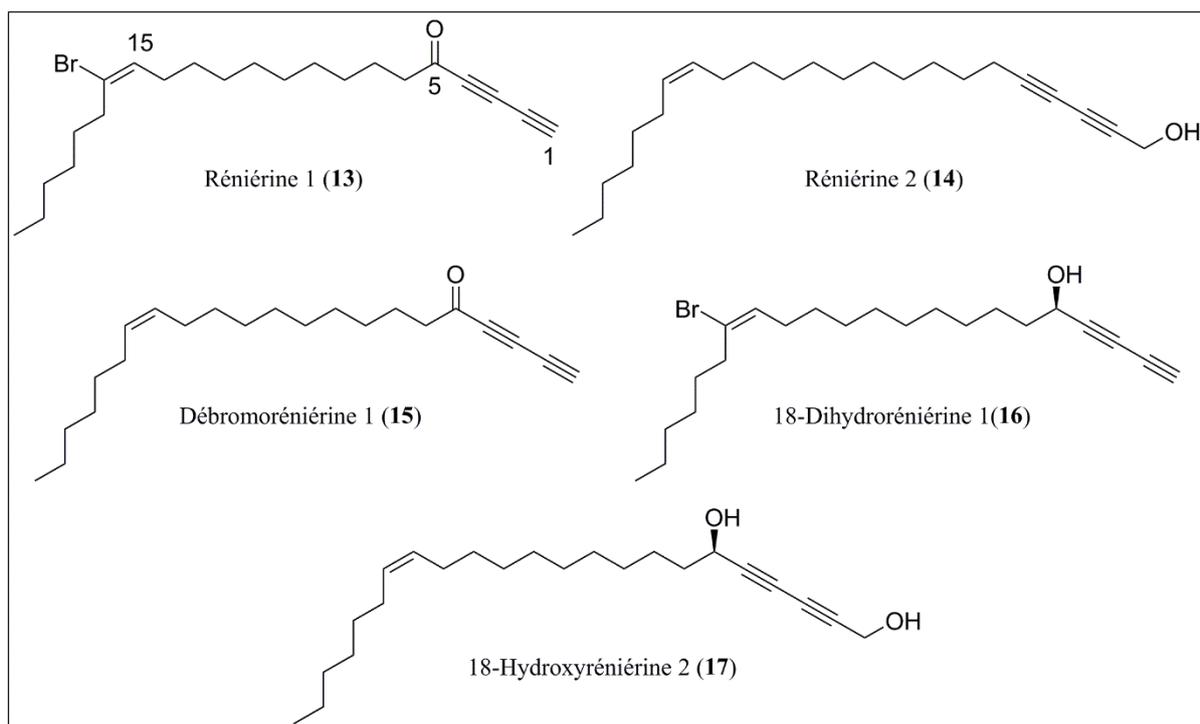


Figure 41 : Structures des réniérines décrites à partir de *Haliclona (Halichocona) fulva*⁷²

La deuxième étude concernant le métabolome d'*Haliclona (Halichocona) fulva* n'est publiée qu'en 1993⁷³ et décrit deux nouveaux sesquiterpènes nommés fulvanine 1 (18) et fulvanine 2 (19) (Figure 42) et quatre métabolites de la famille des panicéines précédemment décrits dans *Halichondria (Halichondria) panicea* (Pallas, 1766)⁷⁴: panicéine A hydroquinone (20), panicéine B2 (21), panicéine B3 (22) et panicéine C (23) (Figure 43).

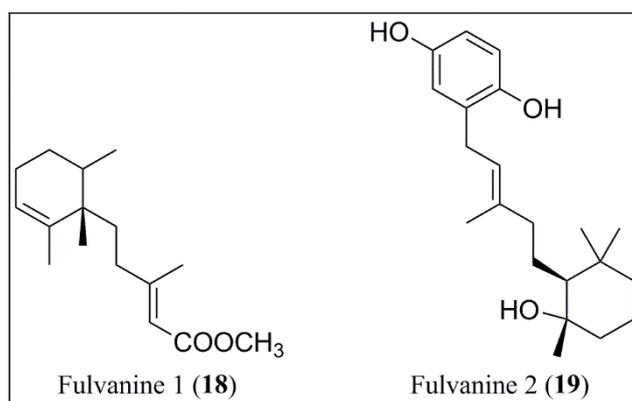


Figure 42 : Structures des fulvanines décrites à partir de *Haliclona (Halichocona) fulva*⁷³

⁷³ Casapullo A., Minale L. et Zollo F., Paniceins and related sesquiterpenoids from the Mediterranean sponge *Reniera fulva*. *Journal of Natural Products*, 1993, **56**(4): p. 527-533.

⁷⁴ Cimino G., De Stefano S. et Minale L., Paniceins, unusual aromatic sesquiterpenoids linked to a quinol or quinone system from the marine sponge *Halichondria panicea*. *Tetrahedron*, 1973, **29**(17): p. 2565-2570.

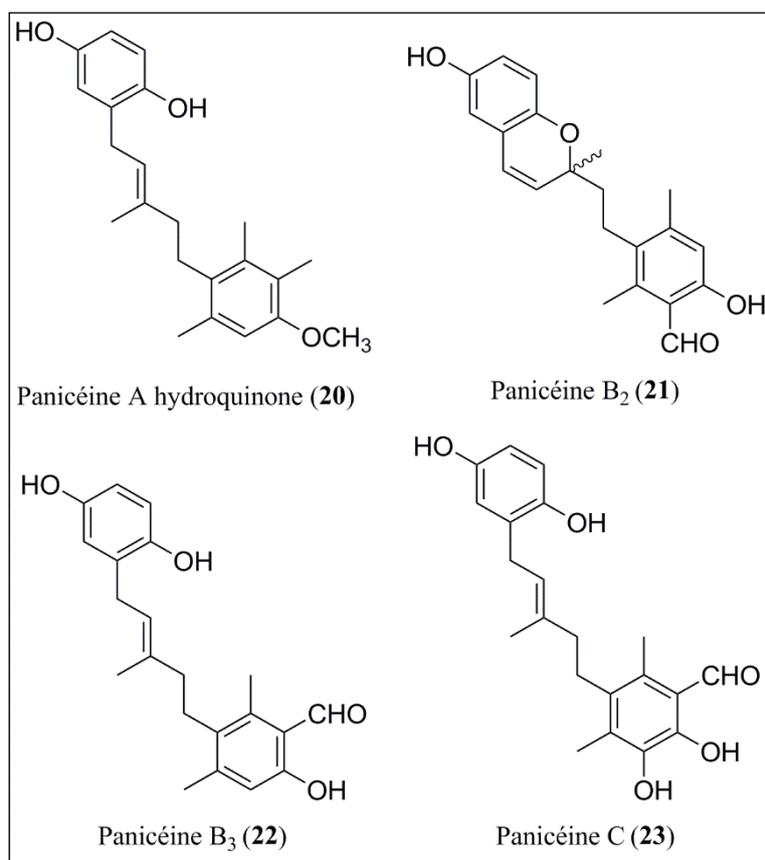


Figure 43 : Structures des panicéines décrites à partir de *Halichondria (Halichondria) panicea* et retrouvées dans *Haliclona (Halichocona) fulva*^{73,74}

En 1996, un spécimen d'*Haliclona (Halichocona) fulva* est récolté dans la baie d'Algerias en Espagne pour être étudié. Un nouveau composé de type polyacétylène, le fulvinol (**24**) (Figure 44), est alors identifié à partir d'une extraction à l'acétone⁷⁵. Ce composé présente une cytotoxicité à l'encontre de 4 lignées cellulaires tumorales (lymphomes, cancer du poumon, cancer du côlon et mélanome).

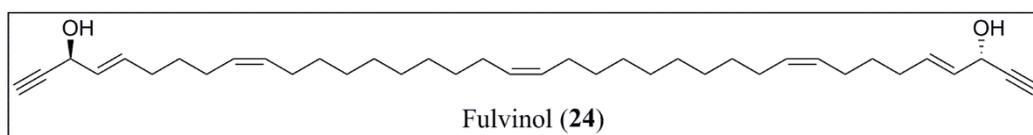


Figure 44 : Structure du fulvinol isolé de *Haliclona (Halichocona) fulva*⁷⁵

De nouveaux polyacétylènes sont ensuite décrits à partir de spécimens d'*Haliclona (Halichocona) fulva* prélevés en baie de Naples en 2012⁷⁶, dans lesquels sont également retrouvés les réniérines et le fulvinol (**24**) décrits précédemment. La fraction butanolique issue d'une extraction à l'acétone a été travaillée par différentes étapes chromatographiques après avoir révélé une activité biologique à l'encontre de la bactérie *Bacillus subtilis*. Ces travaux ont permis d'identifier 9 nouveaux métabolites appelés fulvynes A-I (**25-33**) (Figure 45).

⁷⁵ Ortega M.J., Zubía E., Carballo L.J. et Salvá J., Fulvinol, a new long-chain diacetylenic metabolite from the sponge *Reniera fulva*. *Journal of Natural Products*, 1996. **59**(11): p. 1069-1071.

⁷⁶ Nuzzo G., Ciavatta M.L., Villani G., Manzo E., Zanfardino A., Varcamonti M. et Gavagnin M., Fulvynes, antimicrobial polyoxygenated acetylenes from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. *Tetrahedron*, 2012. **68**(2): p. 754-760.

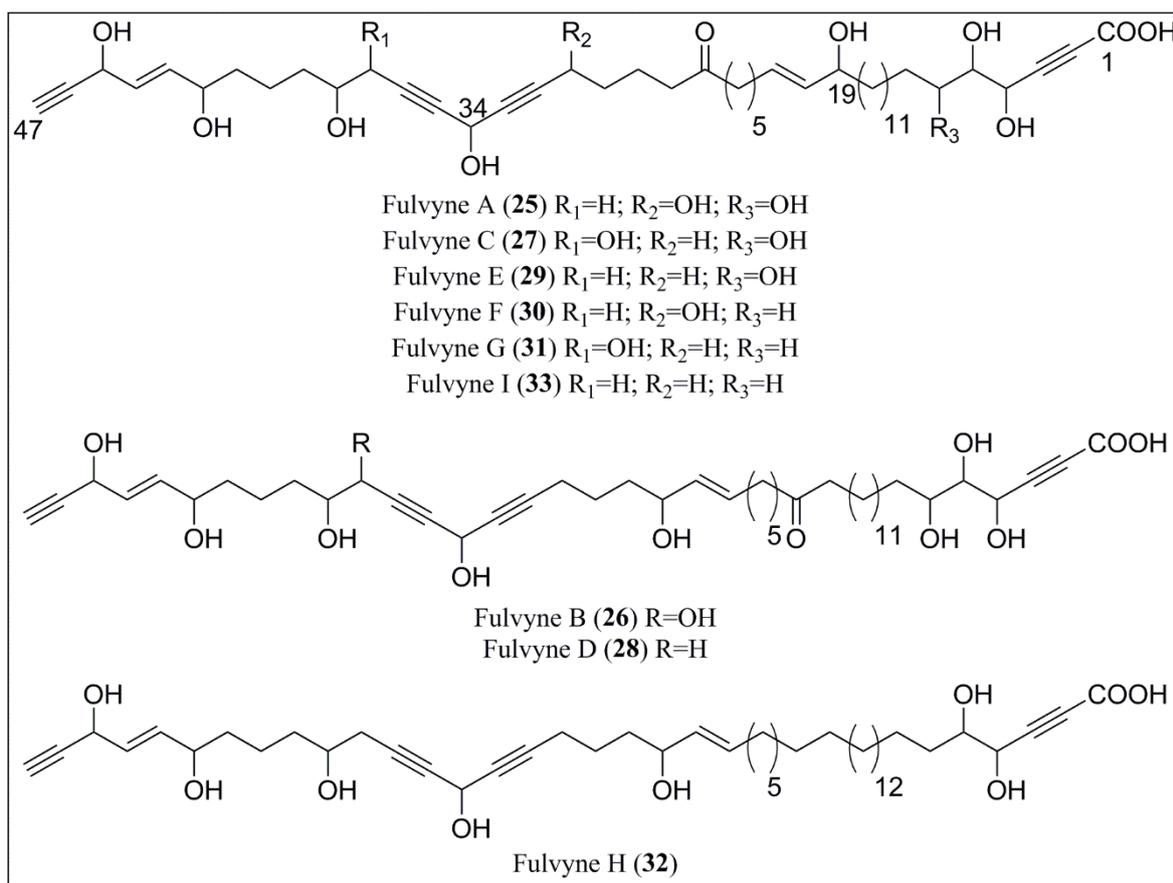


Figure 45 : Structure des fulvynes décrites à partir de *Haliclona (Halichoclona) fulva*⁷⁶

La dernière étude en date portant sur la chimie d'*Haliclona (Halichoclona) fulva* a permis, à partir de la fraction méthanolique de l'éponge, l'isolement et la description d'un diastéréoisomère de l'acide cladocroïque (**34**) : l'acide (2*S*, 3*R*)-cladocroïque (**35**) ou acide 3-epi-cladocroïque (Figure 46)⁷⁷.

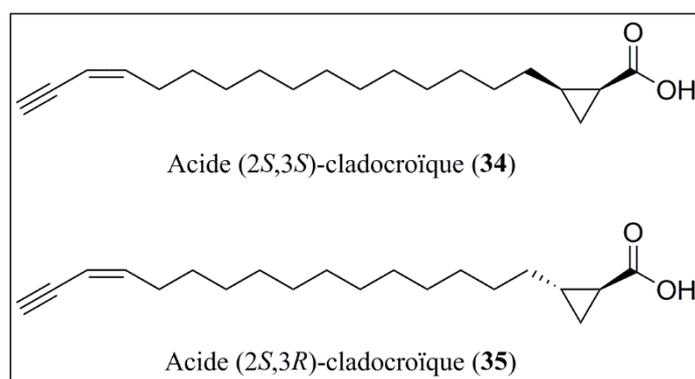


Figure 46 : Structure des acides cladocroïques isolés de *Haliclona (Halichoclona) fulva*⁷⁷

Si le métabolome d'*Haliclona (Halichoclona) fulva* semble à ce jour bien décrit, peu d'études concernant la bioactivité de ces composés ont été entreprises. En outre, l'isolement de panicéines à partir de cette éponge pose également la question de l'identification taxonomique des espèces prélevées. En effet, ces

⁷⁷ Genta-Jouve G. et Thomas O., Absolute configuration of the new 3-epi-cladocroic acid from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. *Metabolites*, 2013. 3(1): p. 24-32.

mérotérpènes n'ont jamais été retrouvés dans cette espèce notamment en présence des polyacétylènes (réniérines, fulvynes, fulvinol et acide cladocroïque) qui, *a contrario*, sont isolés des mêmes individus et sont probablement issus de voies métaboliques communes.

2. Etude chimique de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*

Différents individus d'*Haliclona (Halichoclona) fulva* ont été prélevés dans la rade de Villefranche-sur-Mer. Après lyophilisation, 85 g d'éponge broyée ont été extraits par un mélange MeOH/DCM (1 :1) pour obtenir 17,8 g d'extrait brut. Celui-ci a ensuite été fractionné sur VLC et soumis à différentes étapes de purification chromatographiques comme le décrit la Figure 47.

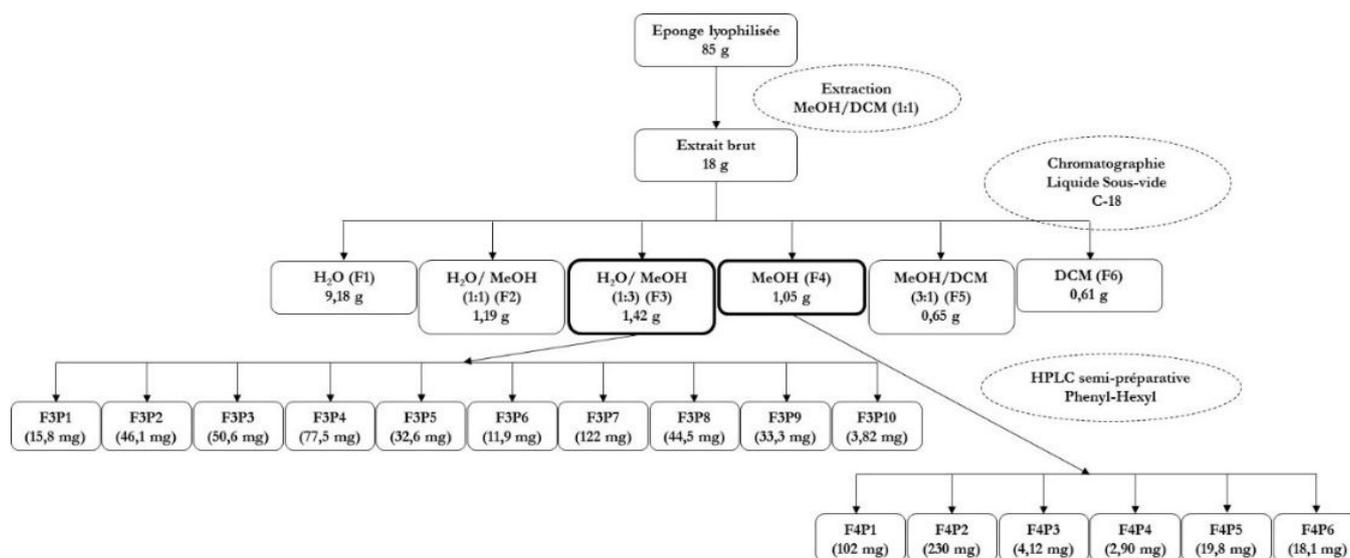


Figure 47 : Schéma de fractionnement et de purification de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*

Les données obtenues par UHPLC-DAD (Figure 48) et les analyses RMN (Figure 49) ont permis d'établir que les fractions F3 et F4 étaient les plus intéressantes à travailler, les fractions F2 et F5 contenant majoritairement des métabolites primaires tels des sucres ou des petits peptides très polaires et une quantité importante de sel pour F2 et des acides gras apolaires pour F5. Ces deux étapes de purification ont permis d'obtenir 16 pics dont la majorité étaient encore des mélanges (Figure 47) mais dont les analyses RMN ont permis d'identifier des composés de type fulvyne issus de la fraction 3 et des composés de type réniérine issus de la fraction 4.

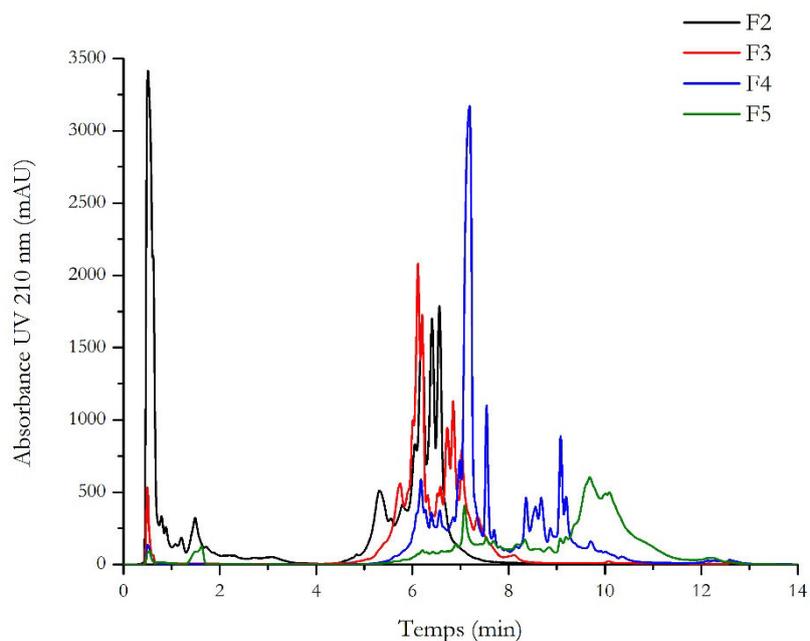


Figure 48 : Chromatogrammes UHPLC-DAD des différentes fractions F2 (H₂O/MeOH 1:1), F3 (H₂O/MeOH 1:3), F4 (MeOH) et F5 (MeOH/DCM 3:1) obtenues du fractionnement de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*. L'intensité en mAU à 210 nm est représentée en fonction du temps. Sur colonne phenylhexyl UHPLC avec un gradient standard commençant à (90 H₂O : 10 ACN) jusqu'à (0 H₂O : 100 ACN) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 5 μ L.

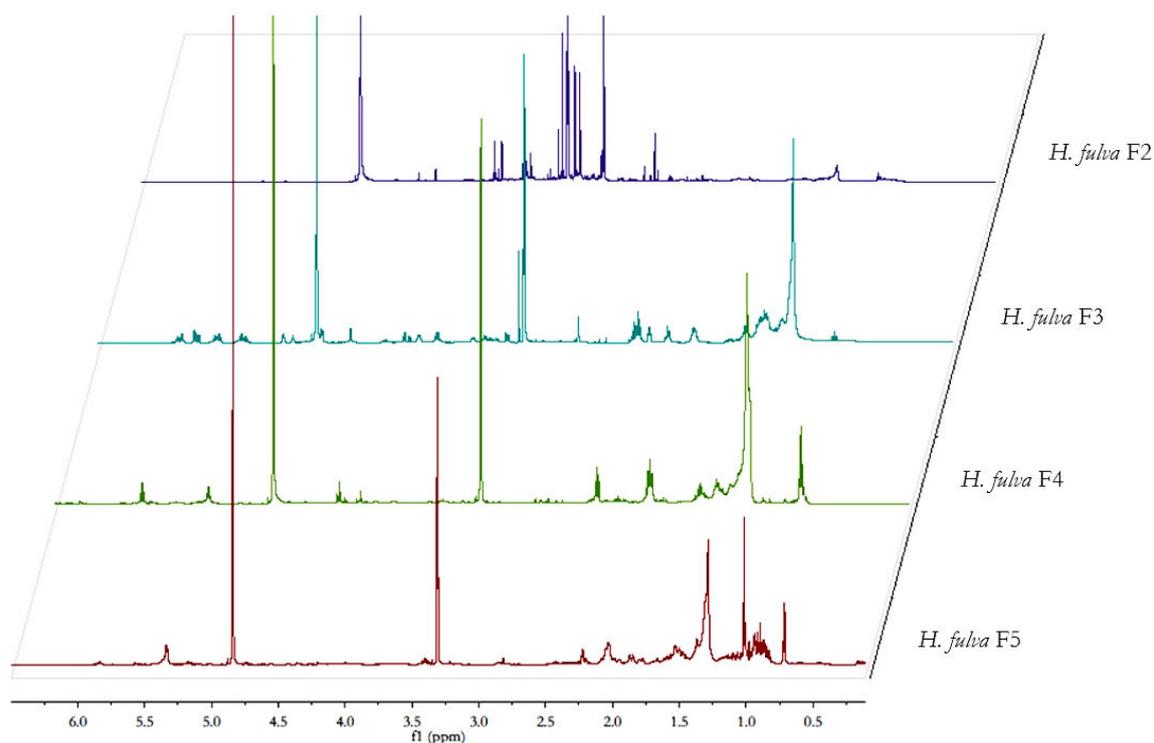


Figure 49 : Spectres RMN ¹H des différentes fractions F2 (H₂O/MeOH 1:1), F3 (H₂O/MeOH 1:3), F4 (MeOH) et F5 (MeOH/DCM 3:1) obtenues du fractionnement de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*. Les spectres sont obtenus dans le CD₃OD qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (3,31 ppm).

Les fulvynes sont caractérisées par leurs longues chaînes carbonées à 47 ou 48 carbones, ponctuées de fonctions cétone et alcool, de doubles et de triples liaisons leur conférant des signaux RMN caractéristiques et assez bien définis sur les spectres protons (Figure 50).

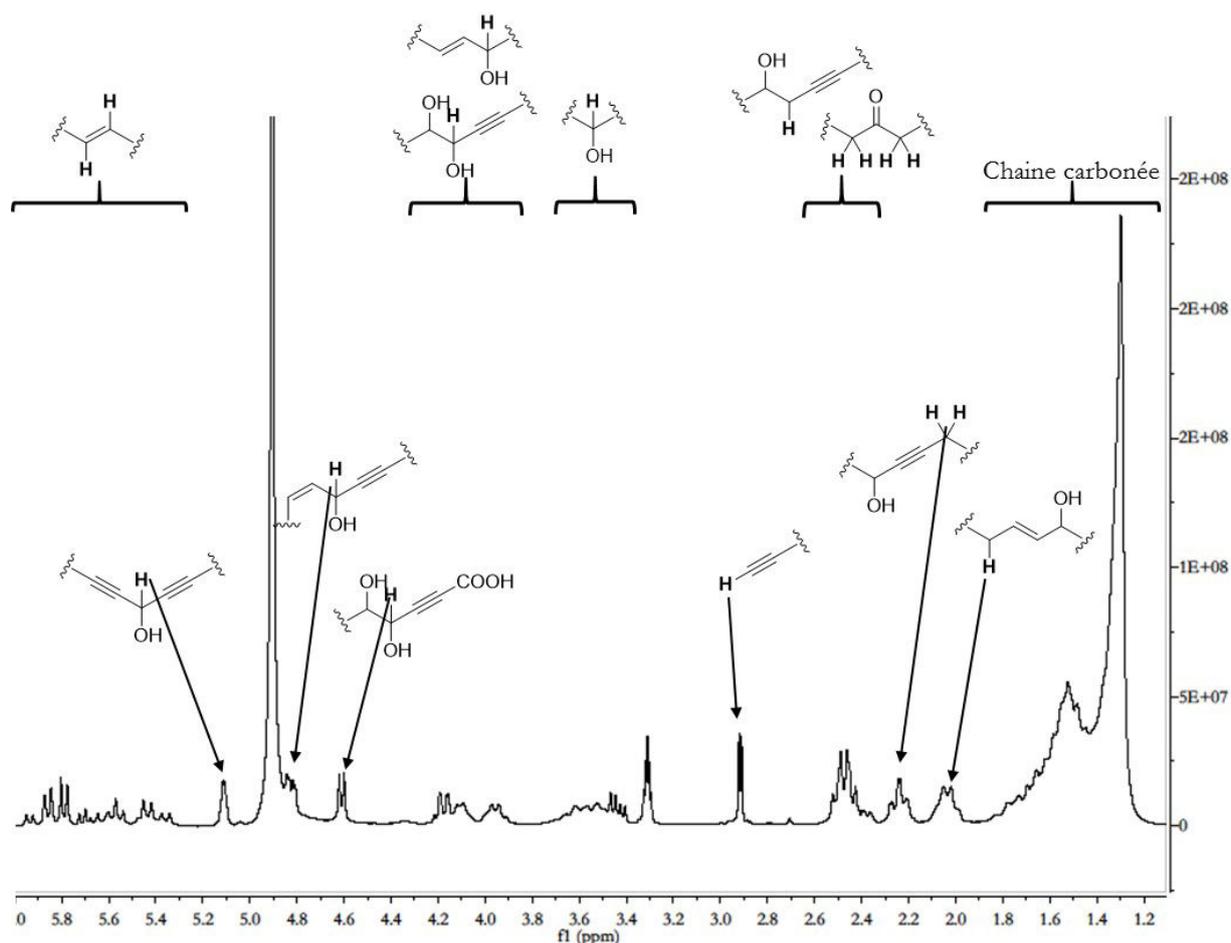


Figure 50 Spectre RMN ^1H du pic F3P4, mélange de fulvynes obtenu par purification de l'éponge *Haliclona* (*Halichoclona*) *fulva*. Le spectre est obtenu dans le CD_3OD qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (3,31 ppm).

Les réniérines, quant à elles, se présentent sous la forme de chaînes carbonées beaucoup plus courtes (22 ou 23 carbones) ponctuées d'une double liaison parfois substituée d'un brome, d'une fonction cétone ou d'une à deux fonctions alcool et de deux triples liaisons successives (Figure 41). Ces différentes fonctions permettent l'obtention de spectres ^1H RMN assez simples présentant des signaux caractéristiques dans le CDCl_3 ⁷².

Les étapes successives de purification décrites précédemment ont permis d'obtenir 3 composés purs de la fraction 3 (F3P4, F3P7 et F3P9) et 1 composé pur de la fraction 4 (F4P2). Les quantités de chacun de ces composés étaient suffisantes pour procéder à leur élucidation structurale. Les repurifications des pics contenant des mélanges dans la fraction 3 n'ont pas permis d'aboutir à des composés totalement purs ou en quantité suffisante. La plupart des pics de la fraction 4 ayant été identifiés comme appartenant à la famille des réniérines grâce à leurs spectres ^1H RMN n'ont pas pu être resolubilisés dans quelque solvant que ce soit (MeOH, CHCl_3 , benzène, pyridine, DMSO) pour approfondir leur identification.

· Fulvyne C (27) (F3P4)

Le spectre ^1H RMN du pic F3P4 est caractéristique des composés de la famille des fulvynes. Il présente 9 pics caractéristiques de protons liés à des carbones hydroxylés ($3,45 \text{ ppm} < \delta_{\text{H}} < 5,11 \text{ ppm}$) permettant d'orienter l'élucidation structurale vers les fulvynes A, B ou C. Les spectres ^{13}C et HSQC, et les données de la bibliographie permettent d'attribuer la plupart des signaux aux carbones correspondants hormis à ceux de la chaîne carbonée la plus longue (Tableau 6). Les spectres COSY et HMBC permettent ensuite de corrélérer les principales fonctions chimiques présentes entre elles (

Figure 51). Ces résultats permettent d'établir que le pic F3P4 est la fulvyne C (27). Cependant la chaîne carbonée n'est pas tout à fait élucidée et la spectrométrie de masse haute résolution précédée d'une ionisation par électrospray en mode négatif est utilisée pour confirmer la masse et donc la longueur de la chaîne carbonée. Le spectre de masse présente deux ions principaux dont les rapports m/z sont 827,4954 et 783,5044 correspondant respectivement à la fulvyne C (27) ayant perdu un proton et à la fulvyne C (27) ayant perdu un proton et la fonction acide carboxylique.

Tableau 6 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic F3P9 isolé d'*Haliclona (Halichocona) fulva* (CD_3OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la fulvyne C (27) (CD_3OD)⁷⁶.

Position	Fulvyne C (27)				Données bibliographiques ⁷³			
	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
4	4,62	d	4,2	65,1	4,67	d	4,2	65,1
5	3,45	dd	8,1; 4,2	78,6	3,47	dd	8,3; 4,2	78,4
6	3,60	td	8,2; 2,0	73,0	3,65	dt	8,3; 7,9	73,0
19	3,96	dd	13; 6,6	73,7	3,99	dt	7,0; 6,4	73,6
20	5,42	dd	15; 7,2	134	5,44	dd	15,2; 6,7	134,4
21	5,61	dt	15; 6,6	133	5,64	dt	15,2; 6,7	132,5
22	2,02	m		33,3	2,07	dt	6,7; 7,0	33,3
26	2,46	t	7,5	43,4	2,49	t	7,3	43,4
27				214				213,6
28	2,48	t	7,0	42,9	2,52	t	7,3	42,9
31	2,24	td	6,9; 1,6	19,1	2,27	dt	7,0; 1,6	19,1
32				79,4				79,5
33				84,8				84,8
34	5,11	d	1,6	52,5	5,14	d	1,6	52,5
37	3,52	m		75,5	4,20	d	6,4	75,5
38	4,17	dd	6,4; 1,3	67,2	3,57-3,53	m		67,2
42	4,10	m		72,4	4,15-4,11	m		72,4
43	5,89	dd	16; 6,3	136	5,92	dd	15,5; 6,0	136,3
44	5,76	dd	16; 5,6	131	5,79	dd	15,5; 5,4	130,5
45	4,82	br d	5,7	62,7	4,85			52,7
47	2,90	d	2,1	74,8	2,93	d	1,9	74,8

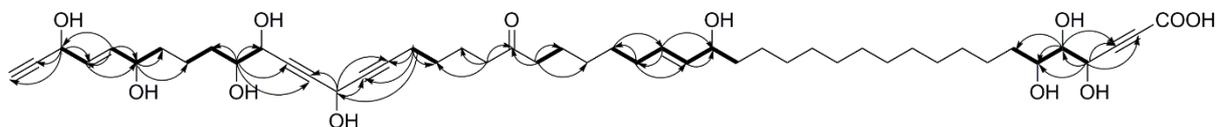


Figure 51 : Corrélations COSY ^1H - ^1H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) de la fulvyne C (27) dans le CD_3OD

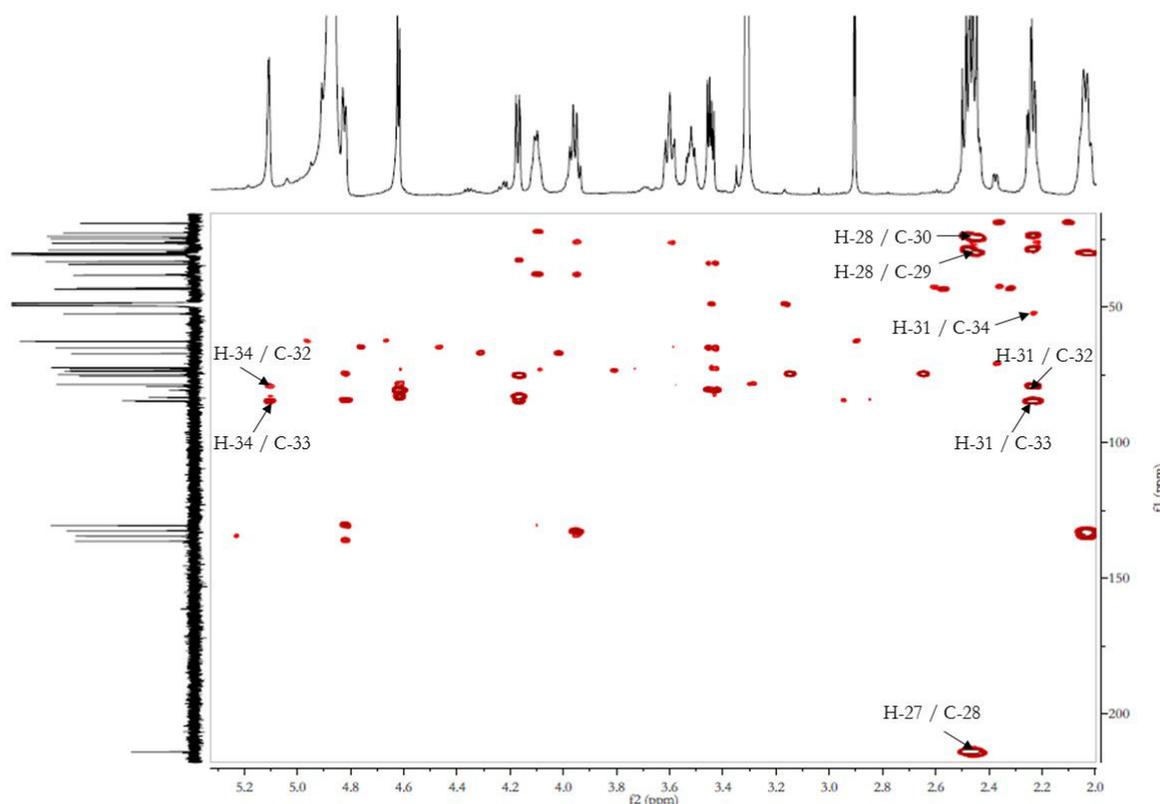


Figure 52 : Agrandissement du spectre RMN HMBC de la fulvyne C (27) obtenue par purification de l'éponge *Haliclona (Halichocona) fulva*. Les spectres sont obtenus dans le CD_3OD .

• Fulvyne D/E (28/29) (F3P7)

Le spectre ^1H RMN du pic F3P7 ne suffit pas à lui-seul à identifier totalement la fulvyne dont il s'agit puisqu'il correspond potentiellement à deux composés. En effet, il présente 8 protons liés à des fonctions alcool ($3,45 \text{ ppm} < \delta_{\text{H}} < 5,04 \text{ ppm}$) dont trois d'entre eux seulement sont corrélés à une triple liaison (δ_{H} 4,63 ppm, 4,82 ppm et 5,04 ppm) ce qui correspond aux isomères fulvyne D (28) et fulvyne E (29).

Le spectre de masse obtenu par électrospray en mode négatif permet de confirmer la masse des fulvynes D (28) et E (29) (Figure 53). L'ion dont le rapport m/z est égal à 811,5015 correspond au composé ayant perdu la fonction hydroxyle de l'acide carboxylique. Le second ion dont le rapport m/z est égal à 767,5110 correspond à la fulvyne D/E ayant perdu la fonction acide carboxylique ainsi qu'une fonction hydroxyle.

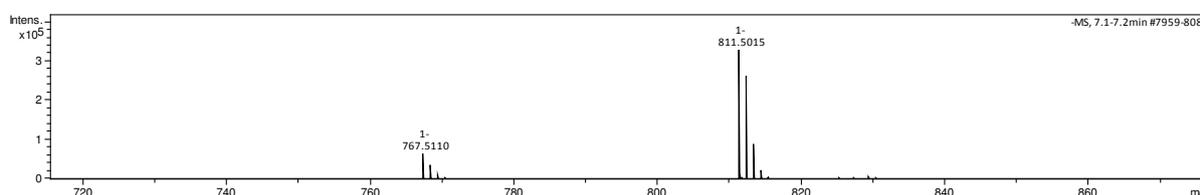


Figure 53 : Spectre de masse haute résolution de la fulvyne D/E (28/29) obtenu par électrospray en mode négatif

• Fulvyne I (33) (F3P9)

En ce qui concerne le pic F3P9, seul le spectre ^1H RMN suffit à déterminer de quelle fulvyne il s'agit. En effet, ce spectre met en évidence les signaux caractéristiques des protons situés en α de la fonction cétone

(2 triplets à 2,46 ppm et 2,48 ppm) et seulement 6 signaux de protons liés à des fonctions alcool (signaux situés entre 3,59 ppm et 5,04 ppm) ce qui correspond à la description bibliographique de la fulvyné I (**33**) (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic F3P9 d'*Haliclona* (*Halichoclona fulva* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la fulvyné I (33**) (CD₃OD)⁷⁶.**

Position	Fulvyné I (33)				Données bibliographiques			
	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
4	4,62	d	4,2	65,1	4,67	d	4,2	65,1
5	3,45	dd	8,1; 4,2	78,6	3,47	dd	8,3; 4,2	78,4
6	3,60	td	8,2; 2,0	73,0	3,65	dt	8,3; 7,9	73,0
19	3,96	dd	13; 6,6	73,7	3,99	dt	7,0; 6,4	73,6
20	5,42	dd	15; 7,2	134	5,44	dd	15,2; 6,7	134,4
21	5,61	dt	15; 6,6	133	5,64	dt	15,2; 6,7	132,5
22	2,02	m		33,3	2,07	dt	6,7; 7,0	33,3
26	2,46	t	7,5	43,4	2,49	t	7,3	43,4
27				214				213,6
28	2,48	t	7,0	42,9	2,52	t	7,3	42,9
31	2,24	td	6,9; 1,6	19,1	2,27	dt	7,0; 1,6	19,1
32				79,4				79,5
33				84,8				84,8
34	5,11	d	1,6	52,5	5,14	d	1,6	52,5
37	3,52	m		75,5	4,20	d	6,4	75,5
38	4,17	dd	6,4; 1,3	67,2	3,57-3,53	m		67,2
42	4,10	m		72,4	4,15-4,11	m		72,4
43	5,89	dd	16; 6,3	136	5,92	dd	15,5; 6,0	136,3
44	5,76	dd	16; 5,6	131	5,79	dd	15,5; 5,4	130,5
45	4,82	br d	5,7	62,7	4,85			52,7
47	2,90	d	2,1	74,8	2,93	d	1,9	74,8

- Acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) (F4P2) (Figure 54)

Ce composé a été isolé sous la forme d'un solide de couleur rouge foncé. Le premier spectre RMN ¹H dans le CD₃OD permet d'identifier une grande similitude avec la 18-dihydro-rénierine 1 mais l'absence du signal correspondant au proton acétylénique (singulet à 2,6 ppm) (Figure 55) est surprenante. Les spectres ¹³C, COSY, HSQC et HMBC permettent alors d'établir la structure du composé.

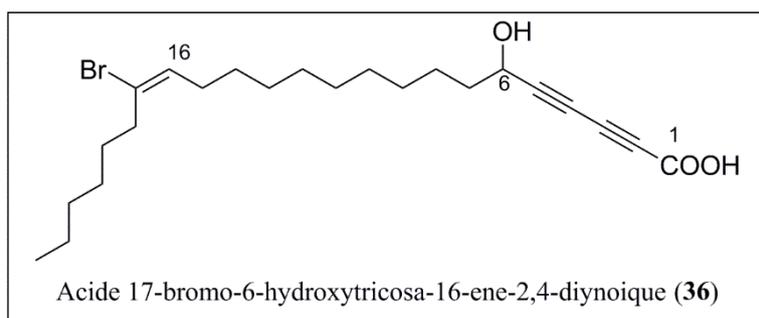


Figure 54 : Structure de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-ene-2,4-diynoïque (36) isolé de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*

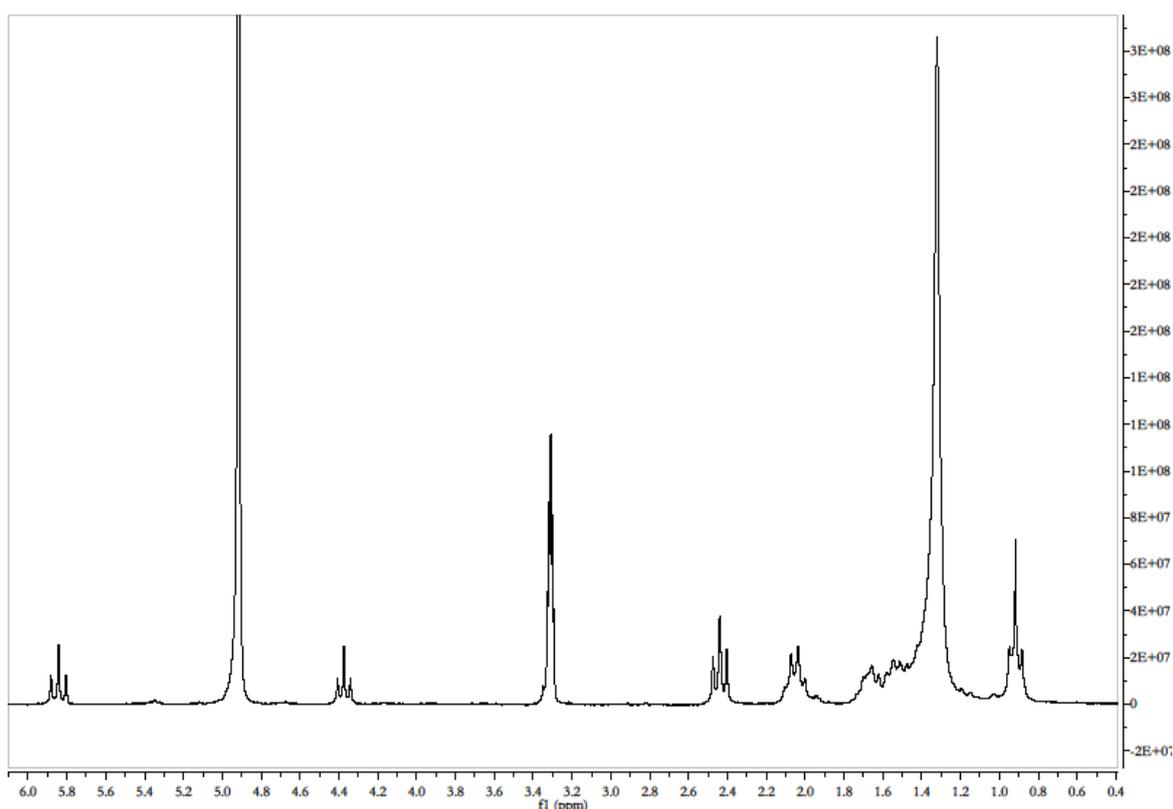


Figure 55 : Spectre ^1H RMN (CD_3OD) de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïc (36) isolé de l'éponge *Haliclona (Halichoclona) fulva*. Les spectres sont obtenus dans le CD_3OD qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (3,31 ppm).

Le spectre ^{13}C montre un carbone dont le déplacement chimique est de 159,7 ppm révélant une liaison $\text{C}=\text{O}$. Les déplacements chimiques caractéristiques des 4 autres carbones sp : 64,94 ppm (C-3), 68,60 ppm (C-4), 75,42 ppm (C-2) et 84,69 ppm (C-5) sont également mis en évidence sur le spectre ^{13}C . Le spectre HMBC montre que ces 5 carbones sont corrélés avec le triplet à 4,37 ppm. La présence d'un seul proton substituant une double liaison (δ_{H} 5,84 ppm) sur le spectre ^1H RMN sous-entend la présence d'une double liaison trisubstituée ce que le spectre ^{13}C RMN confirme par la présence de deux pics à 133,6 ppm et 126,9 ppm. Le faible déplacement chimique de ce dernier pic indique la présence du brome sur cette double liaison. Les spectres COSY et HMBC permettent ensuite d'établir deux fragments de la molécule décrite (Figure 56).

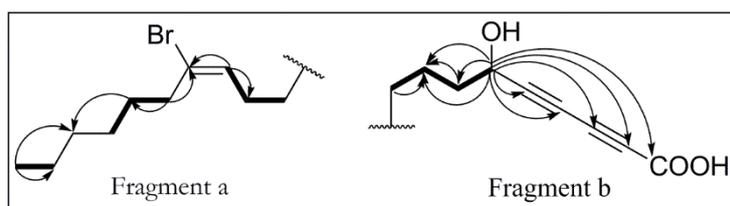


Figure 56 : Corrélations COSY ^1H - ^1H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) dans le CD_3OD .

Le spectre ^{13}C RMN présentant 23 pics avec le spectre de masse permettent alors de confirmer la structure complète de ce composé. Sa masse exacte théorique est 438,1770. Le brome naturel étant composé de deux isotopes, ^{79}Br et ^{81}Br , présents en quantités égales, le spectre de masse haute résolution obtenu par électrospray en ionisation négative met en évidence deux massifs isotopiques caractéristiques (Figure 57). Le premier massif présente un ion de rapport m/z égal à 437,17 correspondant à $[\text{M}-\text{H}]^-$ (pic monoisotopique) et un ion de rapport m/z égal à 439,17 correspondant au même ion que le précédent mais comprenant le ^{81}Br . De la même manière, le second massif isotopique présente deux pics de rapport m/z égaux à 393,18 et à 395,18 correspondant à la perte du groupement COOH . Ces dernières données permettant de confirmer les résultats obtenus par la RMN.

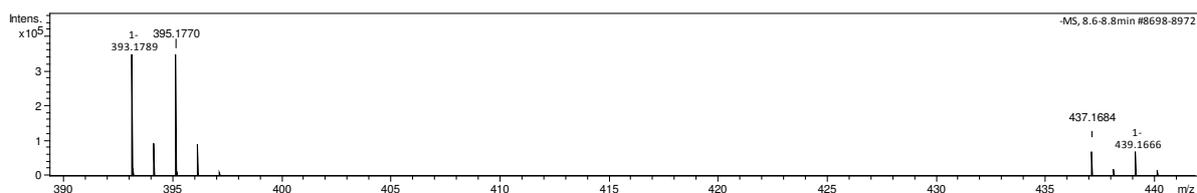


Figure 57 : Spectre de masse haute résolution de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) obtenu par électrospray en mode négatif.

La description de ce composé suggère une erreur dans la description chimique de l'éponge réalisée par l'équipe de Cimino en 1977. En effet, la 18-dihydro-réniérine 1 (**16**) correspond à l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) sans la fonction acide carboxylique. La description de cette molécule en 1977 comprend un proton acétylénique caractérisé par un singulet à 2,15 ppm sur les spectres protons en RMN et c'est ainsi pour toutes les autres molécules décrites lors de cette étude. Or bien qu'une seule molécule ait pu être totalement décrite ici, l'analyse par RMN du proton des autres pics issus de la même purification avait mis en évidence des composés de la même famille sous forme de mélanges mais pour lesquels aucun signal caractéristique de proton acétylénique n'apparaissait. De plus, les résultats obtenus par spectrométrie de masse montrent que la fonction acide carboxylique est facilement perdue au cours de ce type d'analyse donnant alors la masse de la 18-dihydro-réniérine 1 ce qui a alors pu induire des erreurs dans la description des composés à l'époque.

L'étude chimique entreprise sur l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *fulva* a permis de confirmer la présence des fulvynes et des réniérines dans cette espèce. Les longues chaînes carbonées ainsi que le motif triple liaison substituée par un acide carboxylique retrouvé dans ces deux familles de molécules suggèrent qu'elles sont issues d'une voie métabolique commune. Cette étude a également infirmé la présence de panicéines dans l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *fulva*. Les résultats qui avaient été présentés par Casapullo et son équipe

en 1993⁷⁹ étaient probablement dus à une erreur d'identification taxonomique de l'éponge étudiée ou à une contamination lors du prélèvement. Ce cas est caractéristique des difficultés rencontrées dans le cas des études chimiques des spongiaires.

L'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) a également été décrit pour la première fois dans cette éponge et correspond probablement à une correction de la structure décrite en 1977 pour la 18-dihydro-rénierine 1 (**16**). Les quantités obtenues de ce composé ont permis de développer une étude de son activité anti-tumorale décrite dans le paragraphe suivant.

3. Etude de l'activité anti-tumorale de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (36)

Dans le cadre d'une collaboration avec le centre scientifique de Monaco (CSM), l'activité antitumorale de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) a été testée.

Dans un premier temps, des manipulations *in vitro* sur différents types de cellules cancéreuses à savoir le poumon, le sein et le rein ont été mises en place ; les mêmes tests ont été réalisés sur des fibroblastes sains afin d'évaluer la cytotoxicité du composé (Figure 58). RA correspond à l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) et RI correspond à la fulvyne C (**27**) qui sert de contrôle négatif. Ces résultats préliminaires montrent que pour des concentrations de 0,05 à 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, le composé testé ne présente pas de cytotoxicité vis-à-vis des fibroblastes après 48 h d'incubation. En ce qui concerne les cellules cancéreuses de poumon, leur croissance est très ralentie à partir d'une concentration de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; cependant il n'y a pas d'effet-dose observé après 48 h d'incubation. Pour les cellules de cancer du sein, le composé est actif dès 0,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et un petit effet-dose est observé à partir de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Enfin, le composé testé a une activité sur les cellules cancéreuses de rein à partir d'une concentration de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et présente un effet-dose important jusqu'à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. En ce qui concerne la fulvyne qui sert de contrôle négatif ici, elle semble activer la prolifération cellulaire de tous les types de cellules étudiés.

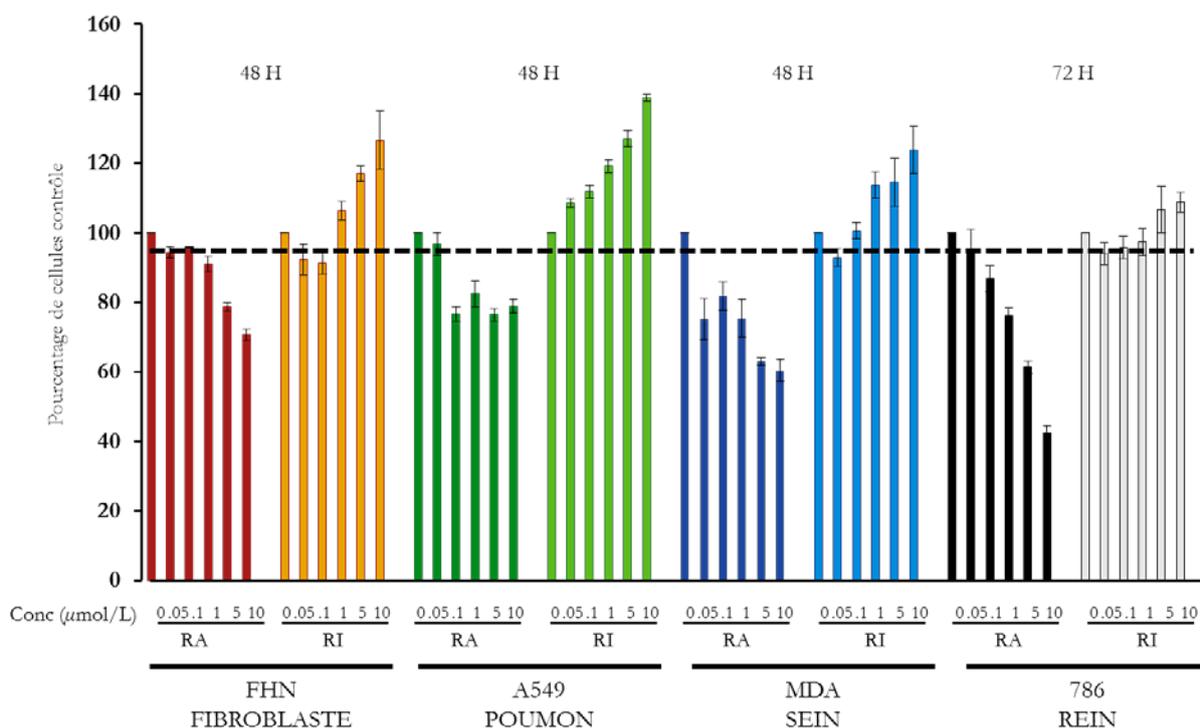


Figure 58 : Quantification du nombre de cellules vivantes (en pourcentage du nombre de cellules contrôle) issues de différentes souches cellulaires (fibroblastes, cellules cancéreuses de poumon, cellules cancéreuses de sein et cellules cancéreuses de rein) après application de différentes concentrations d'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diyonoïque (36).

Ces résultats préliminaires montrent que le composé testé (36) a une activité plus importante sur les cellules de cancer du sein et de cancer du rein avec des cinétiques différentes. En ce qui concerne les cellules de cancer du sein choisies, ce sont des cellules de cancer dits « triples négatifs ». Ces cancers du sein sont les plus agressifs avec des décès très rapides et pour lesquels il n'existe aucun traitement efficace à ce jour. Comme il existe plusieurs lignés de traitements actuels pour les cancers du rein, les expérimentations suivantes se sont alors focalisées sur les cancers du sein.

De nouvelles manipulations in vitro ont été réalisées sur les cancers du sein triples négatifs (TNBC). Le traitement actuel de ces cancers qui est plus compassionnel que réellement efficace est à base de taxol (paclitaxel aux USA et docétaxel en Europe). Comme un traitement novateur ne sera jamais utilisé seul le composé 38 a été testé en combinaison avec le docétaxel (Taxotère®). Afin de maximiser les effets des composés choisis, les manipulations ont cette fois été réalisées sur 72 h. Différentes concentrations de chacune des deux molécules ont été testées afin de trouver la dose la plus efficace (Figure 59).

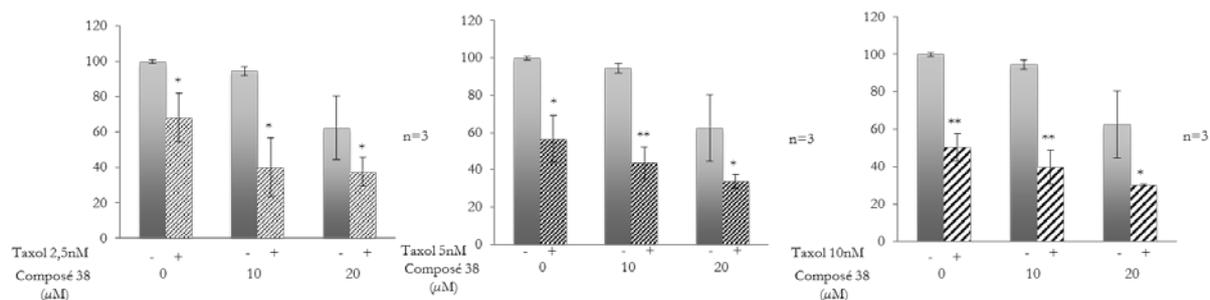


Figure 59 : Quantification du nombre de cellules MDA (cancer du sein) vivantes (en pourcentage du nombre de cellules contrôle) après application de 0, 10 ou 20 μM d'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-dienoïque (36) associés à 2,5, 5 ou 10 nM de taxol. Les expériences ont été réalisées en triplicats.

En combinant les deux molécules, un effet additif des traitements est observé. Après optimisation des doses de chacun des deux composés à 20 μM d'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-dienoïque (36) et à 5 nM de docétaxel, les résultats montrent que l'association des deux molécules est réellement cytotoxique alors que chacune des deux molécules appliquées séparément a une action seulement cytostatique (seulement 30 % de diminution de viabilité cellulaire) (Figure 60). Ces résultats sont illustrés par des images de microscopie optique montrant que presque toutes les cellules cancéreuses sont mortes après application des deux molécules (Figure 61).

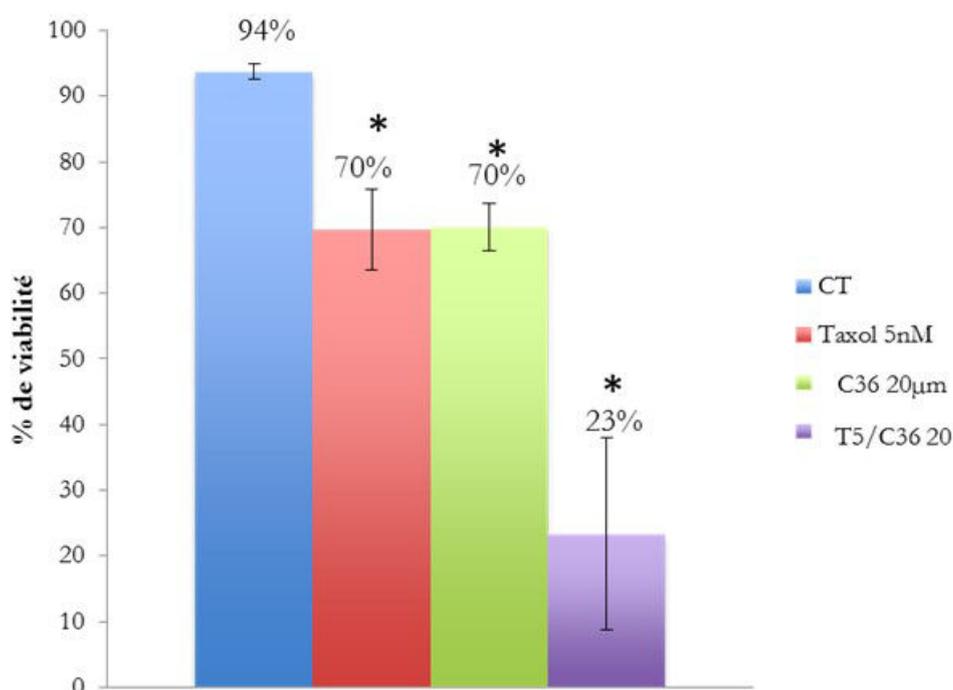


Figure 60 : Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules MDA après 72 h de traitement au docétaxel 5 nM seul, au composé 36 20 μM seul et à l'association des deux molécules. Les expériences ont été réalisées en triplicats.

MDA traitées 72h (objectif x5)

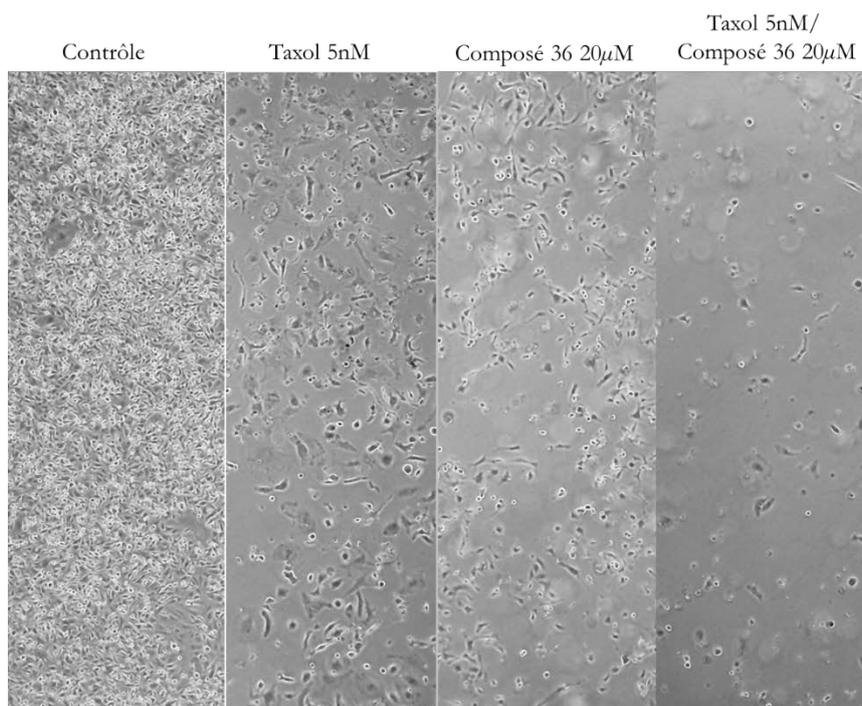


Figure 61 : Images en microscopie optique (objectif x5) des cultures de cellules MDA après 72h au docétaxel 5 nM seul, au composé 36 20 µM seul et à l'association des deux molécules.

Ces résultats in vitro prometteur ont conduit à la réalisation de manipulations in vivo sur de souris auxquelles ont été injectées 1 million de cellules cancéreuses en sous-cutanée afin de recréer une tumeur. Les souris ont ensuite été traitées par injection de 100 µg d'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) deux fois par semaine pendant un mois (Figure 62).

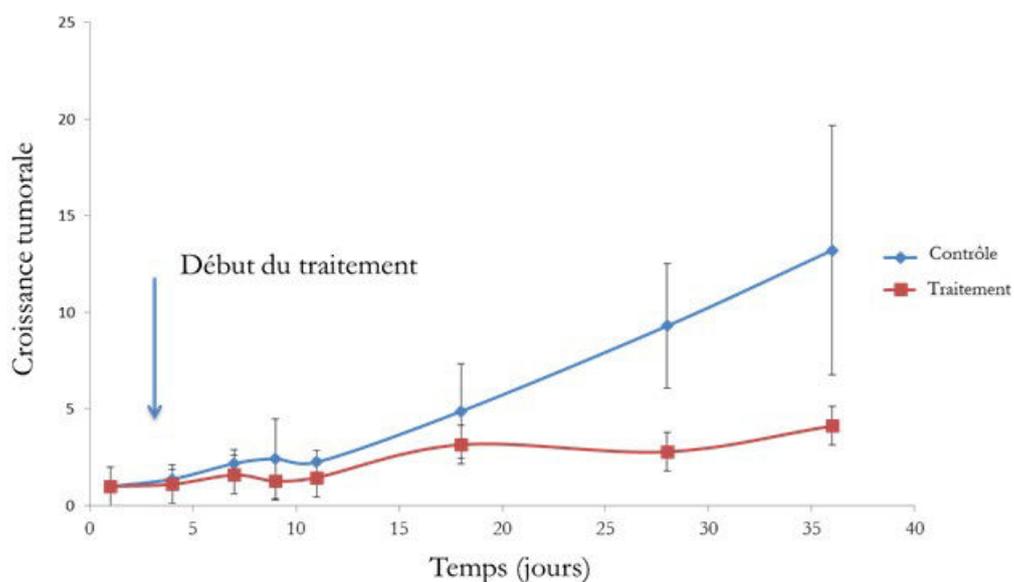


Figure 62 : Mesures de la croissance tumorale (cellules MDA) chez des souris contrôle (bleu) et chez des souris traitées par le composé 36 (100 µg) deux fois par semaine pendant un mois. Chaque mesure a été réalisée sur 6 souris.

Les résultats *in vivo* obtenus sur les cellules tumorales de cancer du sein triple négatif sont très prometteurs puisque la taille des tumeurs traitées semble significativement différente de celle des tumeurs non traitées. Cependant, il y a une grande variabilité au niveau de la taille des tumeurs qui ne permet pas de conclure définitivement sur la véritable efficacité du traitement par le composé **36**. D'autres manipulations seront à mettre en place pour valider ces résultats.

L'étude de l'activité anti-tumorale de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-dienoïque (**36**) a conduit à des résultats très concluants sur l'efficacité de cette molécule vis-à-vis du cancer du sein triple négatif. Ces résultats feront l'objet d'une publication.

C. *Haliclona (Soestella) mucosa* (Griessinger, 1971)

Haliclona (Soestella) mucosa, anciennement connue sous le nom de *Reniera mucosa*, est une éponge méditerranéenne décrite en 1971 par Griessinger⁷⁰. Rencontrée dans les grottes semi-obscurtes, elle se présente sous la forme d'une lame épaisse jaune crème recouvrant son substrat et sécrétant une quantité importante de mucus (Figure 63).

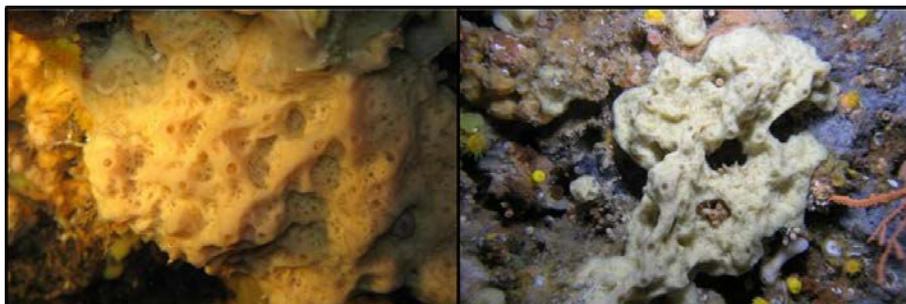


Figure 63 : Photographies de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa* (Thierry Perez)

1. Métabolites spécialisés isolés d'*Haliclona (Soestella) mucosa*

Les deux premières études du métabolome d'*Haliclona (Soestella) mucosa* datent des années 1990. En 1994, l'équipe de Javier Salva a travaillé sur un spécimen de cette espèce récolté au sud de l'Espagne⁷⁸. Une extraction à l'acétone puis différentes étapes de séparation en phase normale avaient alors permis de décrire 6 nouveaux composés de la famille des panicéines (Figure 64), 2 nouveaux composés de type cyclohexenones (Figure 65) et d'isoler 7 composés déjà décrits précédemment dans les éponges *Halichondria (Halichondria) panicea* (Pallas, 1766) (Figure 65)⁷⁴ et *Haliclona (Halichoclona) fulva* (Figure 42)⁷³.

⁷⁸ Zubía E.J., Ortega M. Carballo L.J. et Salvá J., Sesquiterpene hydroquinones from the sponge *Reniera mucosa*. *Tetrahedron*, 1994. **50**(27): p. 8153-8160.

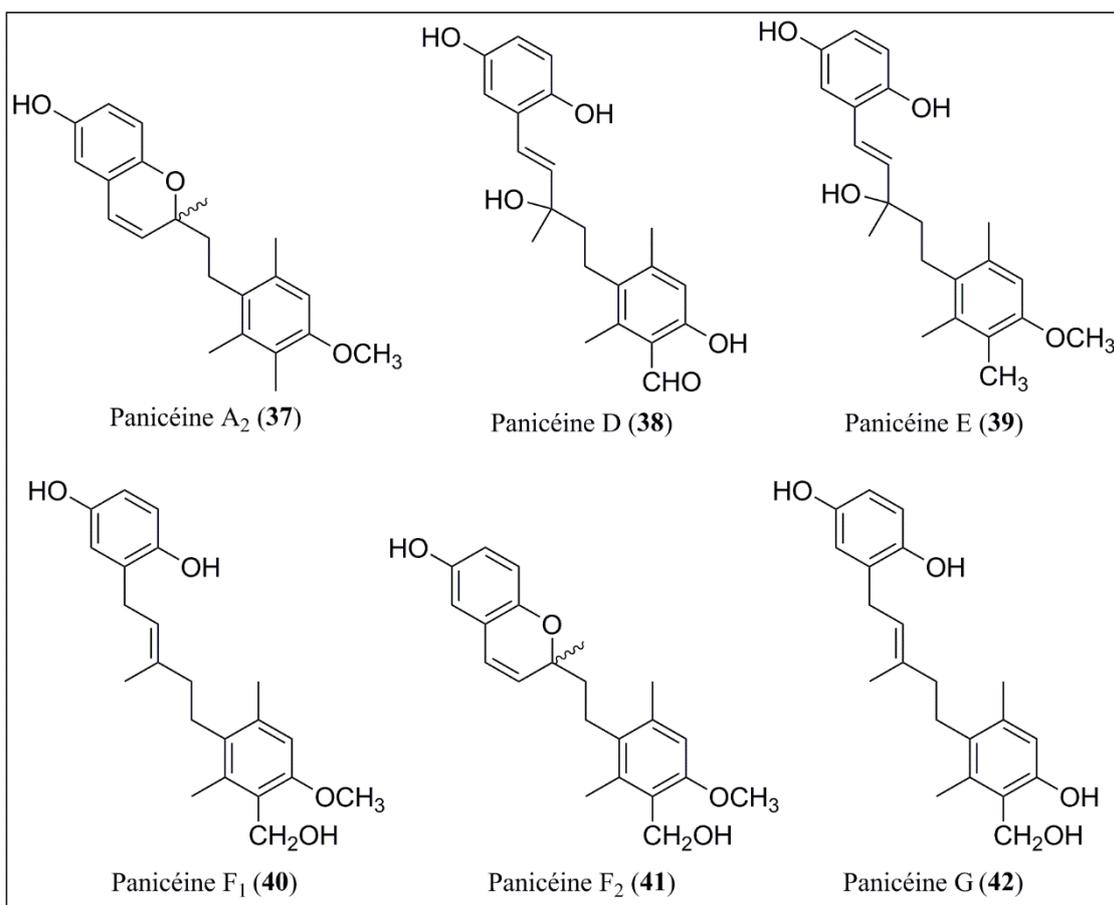


Figure 64 : Structure des panicéines décrites à partir de *Haliclona (Soestella) mucosa*⁷⁸

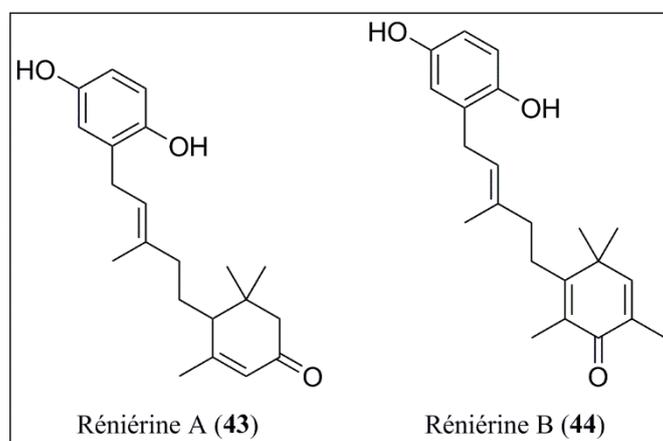


Figure 65 : Structures des réniérines décrites à partir de *Haliclona (Soestella) mucosa*⁷⁸

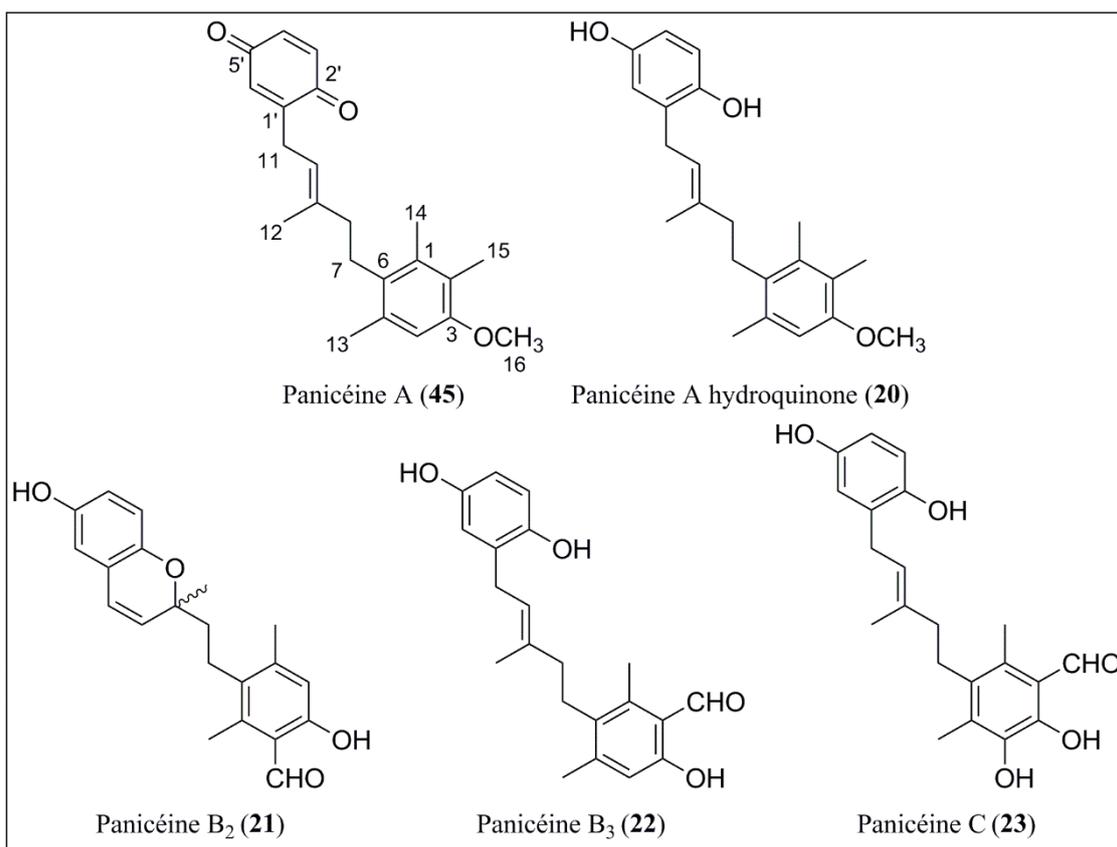


Figure 66 : Structures des panicéines décrites à partir de *Halichondria (Halichondria) panicea* et retrouvées dans *Haliclona (Soestella) mucosa*^{74,78}

En 1997, l'équipe italienne de Guido Cimino a travaillé sur différents spécimens méditerranéens d'*Haliclona (Soestella) mucosa* provenant des côtes espagnoles, françaises et italiennes⁷⁹. La fraction soluble dans l'éther après une extraction à l'acétone a été soumise à différentes étapes de purification chromatographique en phase normale, permettant de mettre en évidence par CCM puis RMN la présence d'un nouveau composé original de type eicosanoïde : la mucosine (46) (Figure 67). Quelle que soit la provenance des échantillons d'éponge, la mucosine a pu être isolée.

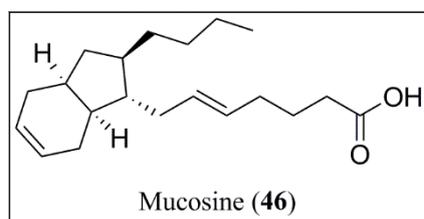


Figure 67 : Structure de la mucosine décrite à partir de *Haliclona (Soestella) mucosa*⁷⁹

En ce qui concerne la potentielle activité biologique de ces composés, seules les panicéines isolées en 1994 ont été testées sur quelques lignées cellulaires cancéreuses montrant une légère activité cytotoxique à leur encontre⁷⁸.

⁷⁹ Casapullo A., Scognamiglio G. et Cimino G., Mucosin: a new bicyclic eicosanoid from the mediterranean sponge *Reniera mucosa*. *Tetrahedron Letters*, 1997. **38**(20): p. 3643-3646.

En 2013, ces deux publications étaient les seules références à une étude chimique d'*Haliclona (Soestella) mucosa*, et bien que différents composés originaux aient pu être isolés de cette éponge, aucun travail d'investigation ne semblait avoir été entrepris pour approfondir les connaissances concernant leur potentiel pharmacologique.

2. Etude chimique de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa*

Afin d'étudier de manière plus approfondie l'ensemble du métabolome d'*Haliclona (Soestella) mucosa* et ses éventuelles activités pharmacologiques, deux approches ont été mises en place :

- Une méthode de screening d'extraits fractionnés de différentes éponges marines méditerranéennes sur une cible pharmacologique déterminée (Stage de Master 1 de Lucy Sauvard).
- Un procédé de purification « classique » de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa* afin d'aborder son métabolome dans sa globalité et de purifier des composés en quantités suffisantes pour approfondir d'éventuelles études pharmacologiques.

Ces deux démarches ont été mises en place en parallèle l'une de l'autre permettant d'obtenir des résultats complémentaires.

- a. Screening de métabolites d'éponges méditerranéennes pour leur activité sur la résistance multidrogue du récepteur Patched (Stage de Master 1 de Lucy Sauvard)

Le stage de Lucy Sauvard a été instauré dans le cadre d'une collaboration entre Olivier Thomas et Isabelle Mus-Veteau de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR 7275 CNRS, de l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

Cette équipe de l'IPMC travaille sur les phénomènes de multi-résistances observés dans les cellules cancéreuses traitées par chimiothérapie qui développent de nouveaux récepteurs transmembranaires de façon à bloquer l'entrée de l'agent thérapeutique dans la cellule malade et donc à empêcher son action. Plus particulièrement, le récepteur Patched est surexprimé dans les cellules souches de nombreux cancers⁸⁰, ce qui en fait une cible d'étude thérapeutique. En effet, en 2010, le brevet FR2011052927 / WO2012080630 est déposé dans le but de trouver de nouvelles molécules permettant de bloquer ce récepteur Patched et de restaurer alors l'efficacité d'anticancéreux tel que la doxorubicine (dxt)⁸¹.

C'est dans cette optique que des travaux de screening ont été réalisés portant sur 15 éponges méditerranéennes (*Cymbaxinella verrucosa* (Esper, 1794)⁸², *Cymbaxinella damicornis* (Esper, 1794), *Ircinia variabilis* (Schmidt, 1862), *Ircinia oros* (Schmidt, 1864), *Agelas oroides* (Schmidt, 1864), *Aphysina cavernicola* (Vacelet, 1959), *Haliclona (Soestella) mucosa*, *Phorbas topsenti* Vacelet & Perez, 2008, *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847, *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862, *Haliclona (Halichoelona) fulva*, *Crambe crambe* Schmidt, 1862, *Haliclona (Rhizoniera) sarai*, *Acanthella acuta* Schmidt, 1862, *Scopalina lophyropoda* Schmidt, 1862). Après lyophilisation et broyage, les

⁸⁰ Bidet M., Tomico A., Martin, P., Guizouarn H., Mollat P. et Mus-Veteau I., The Hedgehog receptor Patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance. *Molecular Cancer Research*, 2012. **10**(11): p. 1496-1508.

⁸¹ Mus-Veteau I. et Bidet M., Novel therapeutic strategies for improving an anticancer treatment. 2014, Google Patents.

⁸² Gazave E., Carteron S., Chenuil A., Richelle-Maurer E., Boury-Esnault N. et Borchellini C., Polyphyly of the genus *Axinella* and of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 2010. **57**(1): p. 35-47.

éponges ont été soumises à une extraction par un mélange de MeOH et DCM en proportions équivalentes. Les extraits ont ensuite été fractionnés sur SPE greffée C-18 selon 3 éluants : eau (F1), méthanol (F2) puis dichlorométhane (F3). Les profils UHPLC-DAD montrent que seules les fractions F2 et F3 contiennent des composés de polarités intéressantes pouvant être purifiés par la suite (Figure 68).

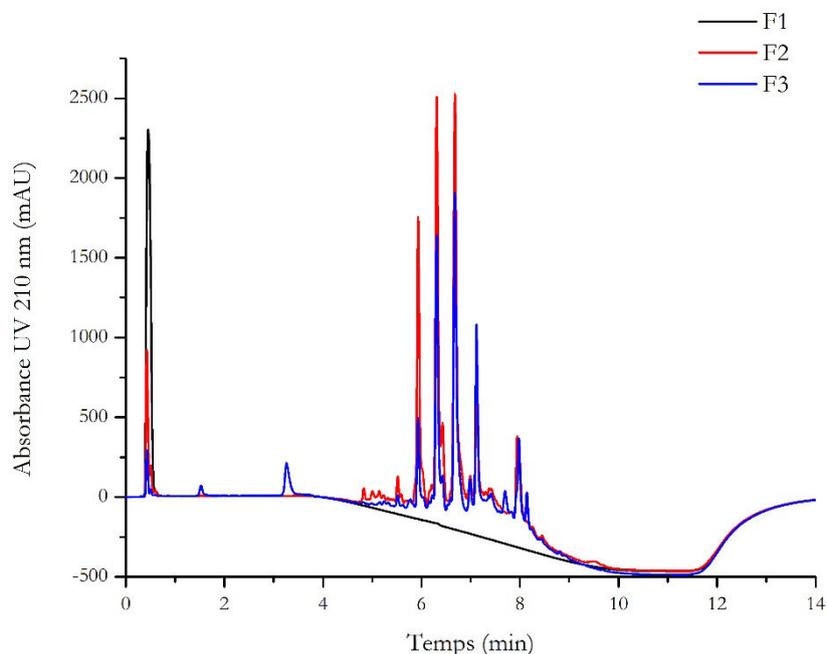


Figure 68 : Chromatogrammes UHPLC-DAD des différentes fractions (F1 : fraction eau, F2 : fraction méthanol et F3 : fraction dichlorométhane) obtenues de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa*. L'intensité en mAU à 210 nm est représentée en fonction du temps. Sur colonne phenyl-hexyl UHPLC avec un gradient standard commençant à (90 H₂O : 10 ACN : 0.1 TFA) jusqu'à (0 H₂O : 100 ACN : 0.1 TFA) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de 0,6 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 2 μ L.

Les fractions F2 et F3 obtenues à partir des 15 éponges étudiées sont alors testées à 10 μ g.mL⁻¹ dans le DMSO sur des cultures de levures surexprimant la protéine Patched et résistantes à la doxorubicine (dxr). Les résultats montrent que les fractions permettant une légère réapparition de l'activité de la doxorubicine à l'encontre des levures, sont celles issues des éponges *Haliclona (Soestella) mucosa* et *Haliclona (Rhizionera) sarai* (Figure 69).

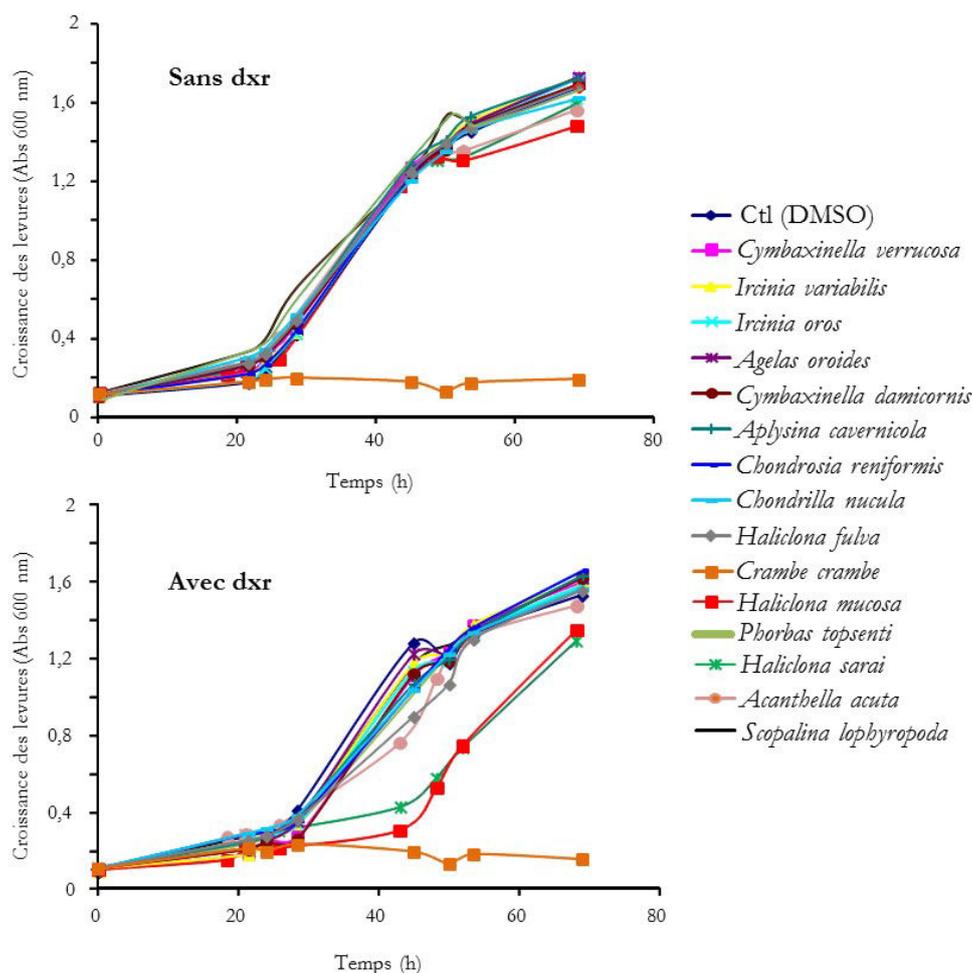


Figure 69 : Effet de 15 fractions d'éponges sur la résistance à la doxorubicine d'une levure exprimant Patched. La levure exprimant Patched a été cultivée sur des plaques 96 puits en présence de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de la fraction méthanolique de 15 éponges méditerranéennes (*Cymbaxinella verrucosa*, *Cymbaxinella damicornis*, *Ircinia variabilis*, *Ircinia oros*, *Agelas oroides*, *Aplysina cavernicola*, *Haliclona (Soestella) mucosa*, *Phorbas topsenti*, *Chondrosia reniformis*, *Chondrilla nucula*, *Haliclona (Halichoelona) fulva*, *Crambe crambe*, *Haliclona (Rhizoniera) sarai*, *Acanthella acuta*, *Scopalina lophyropoda*) préalablement solubilisée dans le DMSO, et en présence ou non de 10 μM de doxorubicine (dxr). Le DMSO a été utilisé comme contrôle pour mesurer la croissance de levure en absence des fractions de spongiaire. La croissance de levures a été mesurée par absorbance à 600 nm.

La suite de l'étude s'est portée prioritairement sur *Haliclona (Soestella) mucosa* en raison des résultats prometteurs que la fraction méthanolique obtenue de cette éponge présentait mais également en raison des quantités de matière première disponibles pour la purification des métabolites actifs de cette fraction.

b. Purification et identification des métabolites actifs de *Haliclona (Soestella) mucosa*

Afin d'identifier les métabolites responsables de l'activité pharmacologique présentée précédemment, 40.3 g d'éponge lyophilisée furent broyés puis extraits, fractionnés et purifiés selon les étapes représentées par la Figure 70.

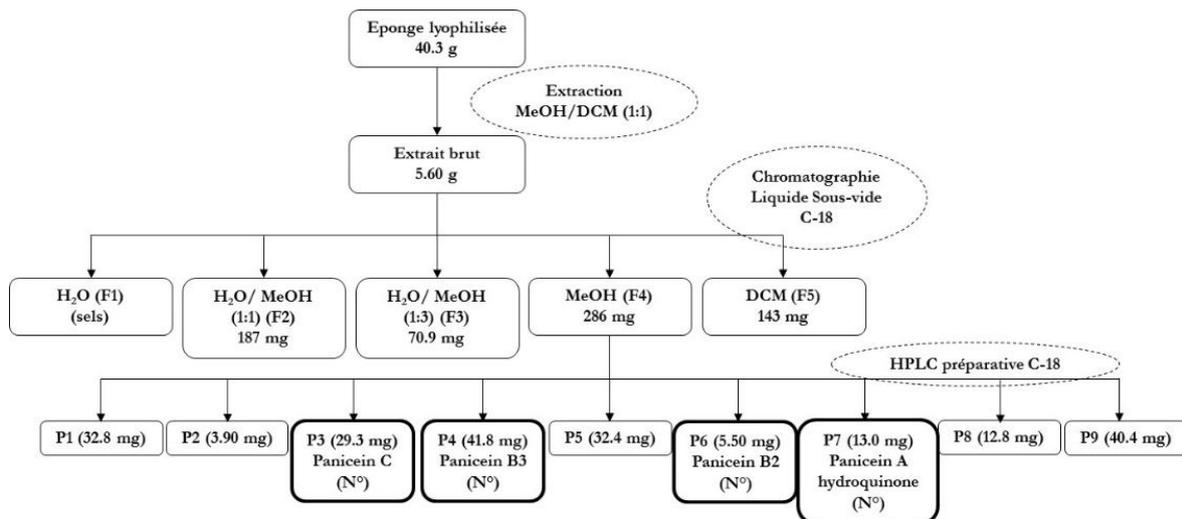


Figure 70 : Schéma de fractionnement et de purification de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa*

Après l'analyse des fractions F2, F3 et F4 par UHPLC-DAD-DEDL, nous avons choisi de travailler sur la purification de la fraction 4 qui présentait une masse importante et un profil chromatographique intéressant (Figure 71). Cette étape de purification a permis d'obtenir 9 pics qui ont chacun été testés sur la levure exprimant le récepteur Patched en présence ou en absence de doxorubicine permettant d'identifier lesquels de ces pics sont à l'origine de l'activité pharmacologique obtenue dans les résultats précédents. Les résultats ont montré que les pics P1, P3, P4, P6 et P7 permettent de restaurer l'activité pharmacologique de la doxorubicine à l'encontre de la levure surexprimant la protéine Patched (Figure 72).

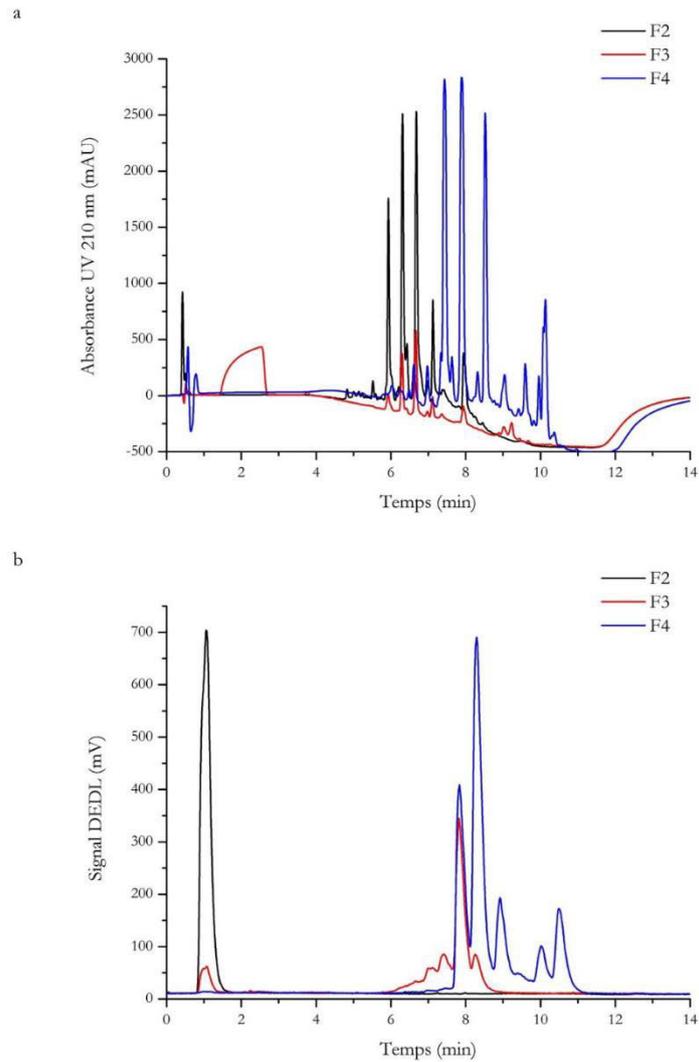


Figure 71 : Chromatogrammes UHPLC-DAD (a) et UHPLC-DEDL (b) des différentes fractions F2 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1 :1), F3 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1 :3) et F4 (MeOH) obtenues de l'éponge *Haliclona* (*Soestella*) *mucosa*. L'absorbance UV en mAU à 210 nm (a) et le signal en mV (b) sont représentés en fonction du temps. Sur colonne phenyl-hexyl UHPLC avec un gradient standard commençant à (90 H_2O : 10 ACN : 0.1 TFA) jusqu'à (0 H_2O : 100 ACN : 0.1 TFA) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et un volume d'injection de $5 \mu\text{L}$.

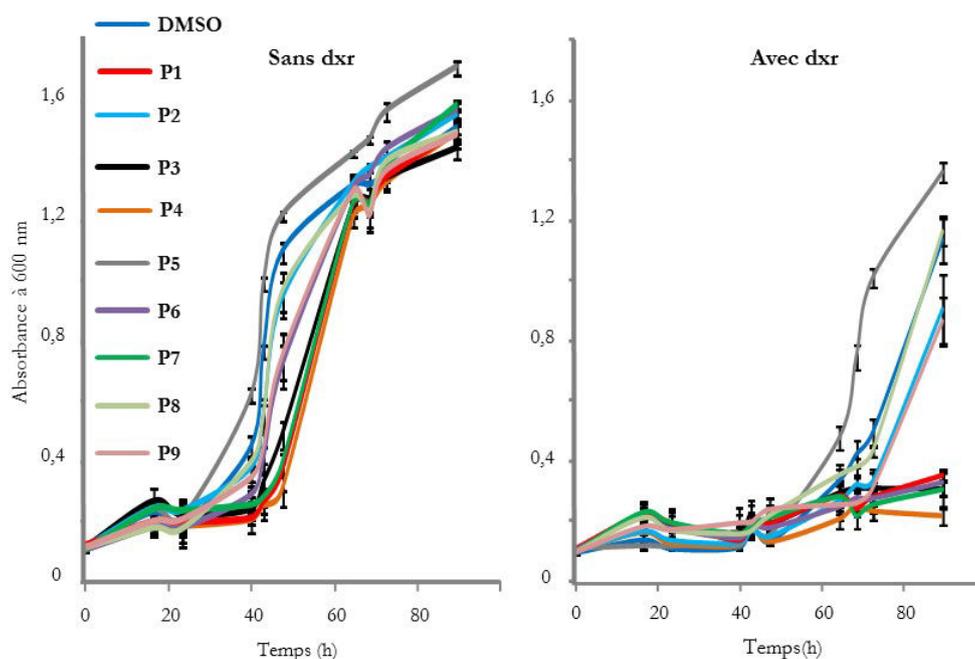


Figure 72 : Les composés purifiés de la fraction méthanolique de *Haliclona (Soestella) mucosa* ont été solubilisés dans le DMSO à 10 mg.mL⁻¹ et ajoutés à une concentration finale de 10 µg.mL⁻¹ au milieu de culture contenant ou non 10 µM de doxorubicine (dxr). DMSO à la dilution de 1/1000 correspondant à la quantité de DMSO ajoutée avec les composés purifiés a été utilisée dans les puits contrôles. La croissance de la levure a été mesurée par absorbance à 600 nm.

Les analyses RMN ont permis d'évaluer la pureté des pics testés ; seuls les pics P3, P4, P6 et P7 étaient purs à 95%. Par comparaison avec la bibliographie, ils ont alors pu être identifiés respectivement comme étant la panicéine C (**23**) (Figure 73), la panicéine B₃ (**22**) (Tableau 8), la panicéine B₂ (**21**) (Tableau 9) et la panicéine A hydroquinone (**20**) (Tableau 10).

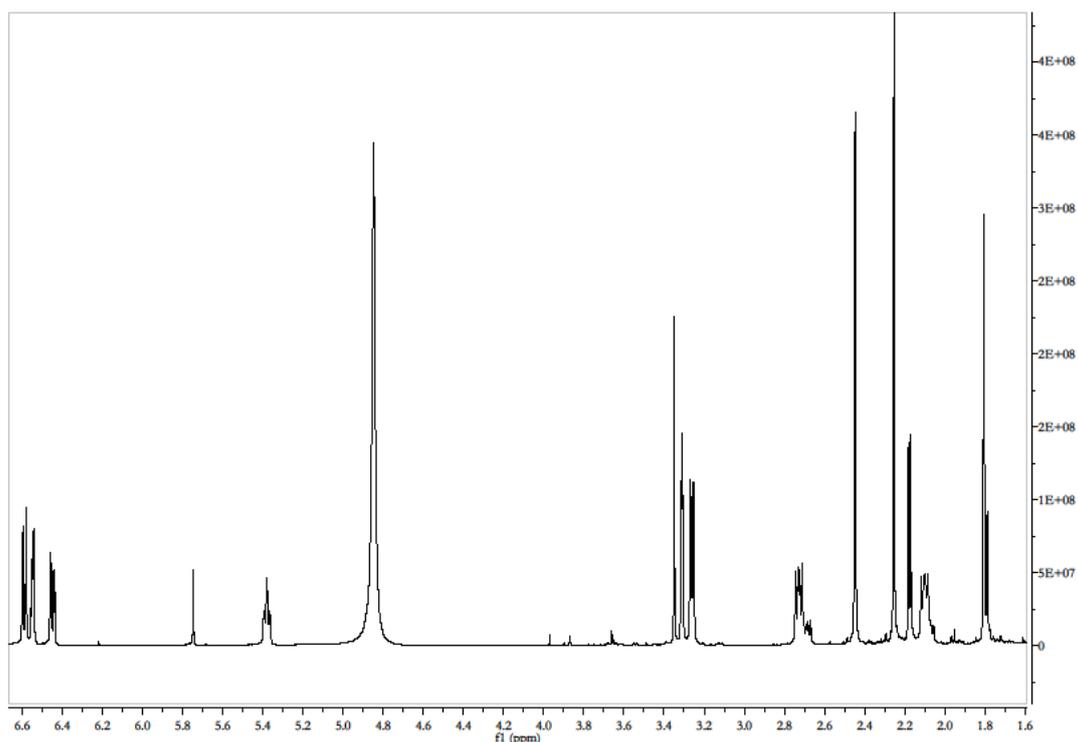


Figure 73 : Spectre RMN ^1H de la panicéine C (23) obtenue par purification de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa*. Les spectres sont obtenus dans le CD_3OD qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (3,31 ppm).

Tableau 8 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic P4 de la fraction méthanolique d'*Haliclona (Soestella) mucosa* (CD_3OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la panicéine B₃ (22) (CCl_4)⁷⁸

Position	Panicéine B ₃ (22)			Données bibliographiques		
	δ_{H} (ppm)	m	J (Hz)	δ_{H} (ppm)	m	J (Hz)
4	6,60	s		6,63	s	
7	2,76	m		2,78	m	
8	2,13	m		2,16	m	
10	5,38	t	7,0	5,42	t	7,4
11	3,26	d	7,5	3,30	d	7,4
12	1,82	s		1,85	s	
13	2,33	s		2,40	s	
14	2,54	s		2,56	s	
15	10,3	s		10,36	s	
3'	6,58	d	8,5	6,62	d	9,2
4'	6,45	dd	8,5; 3,0	6,49	dd	9,2; 3,3
6'	6,54	d	3,0	6,58	d	3,3

Tableau 9 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic P6 de la fraction méthanolique d'*Haliclona (Soestella) mucosa* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la panicéine B2 (21) (CCl₄)⁷⁸

Position	Panicéine B ₂ (21)			Données bibliographiques		
	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)
4	6,59	s		6,62	s	
7	2,77	m		2,80	m	
8	2,29	m		1,77	m	
10	6,37	d	10	6,42	d	10,1
11	5,73	d	10	5,77	d	10,1
12	1,42	s		1,46	s	
13	2,28	s		2,32	s	
14	2,51	s		2,55	s	
15	10,3	s		10,4	s	
3'	6,62	d	8,5	6,51	d	8,5
4'	6,56	dd	8,5; 3,0	6,60	dd	8,5; 3,0
6'	6,48	d	3,0	6,66	d	3,0

Tableau 10 : Comparaison des déplacements chimiques obtenus pour le pic P7 de la fraction méthanolique d'*Haliclona (Soestella) mucosa* (CD₃OD) avec les données bibliographiques obtenues pour la panicéine A hydroquinone (20) (CDCl₃)⁷⁸

Position	Panicéine A hydroquinone (20)			Données bibliographiques		
	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)	δ_H (ppm)	m	<i>J</i> (Hz)
4	6,56	s		6,60	s	
7	2,72	m		2,76	m	
8	2,09	m		2,14	m	
10	5,39	t	7,0	5,44	d	7,4
11	3,27	d	7,5	3,31	d	7,4
12	1,81	s		1,85	s	
13	2,29	s		2,33	s	
14	2,21	s		2,25	s	
15	2,09	s		2,13	s	
16	3,74	s		3,79	s	
3'	6,59	d	8,5	6,63	d	8,5
4'	6,45	dd	8,5; 3,0	6,49	dd	8,5; 2,8
6'	6,55	d	3,0	6,59	d	2,8

Par la suite, une analyse par UHPLC-HRESIMS en mode négatif a permis d'obtenir l'ion [M-H]⁻ de chacune des molécules et de confirmer leur masse à savoir m/z 355 pour la panicéine C (23) (Figure 74), m/z 339 pour la panicéine B3 (22), m/z 337 pour la panicéine B2 (21) et m/z 339 pour la panicéine A hydroquinone (20).

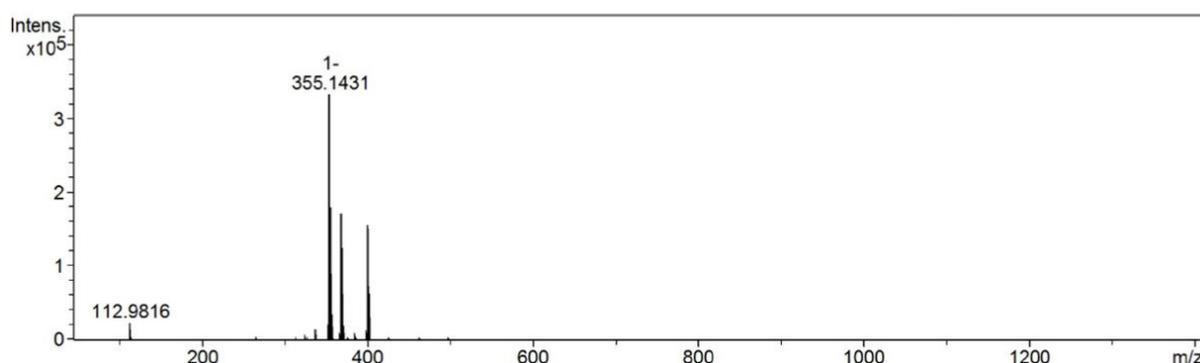


Figure 74 : Spectre de masse ESI(-) de la panicéine C (23) obtenue de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa*.

Les autres pics de la fraction méthanolique (P1, P2, P5, P8, P9) (Figure 70) ont été repurifiés par HPLC sur une colonne phenyl-hexyl. Malgré les quantités présentes au départ, cette dernière étape de purification n'a pas permis d'obtenir de composés en quantité suffisante pour pouvoir procéder aux différentes analyses nécessaires à l'identification.

Les travaux réalisés sur l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa* n'ont pas permis l'identification de composés nouveaux. En revanche, une étude pharmacologique approfondie a été mise en place permettant de mettre en évidence l'activité biologique de certaines panicéines déjà connues mais dont le potentiel bioactif n'avait été jusqu'alors que très peu étudié. Les résultats obtenus ont permis l'obtention d'un brevet européen et la publication d'un article dans le journal *Oncotarget*⁸³ (cf. Publications).

D. *Haliclona (Halichoelona) magna* (Vacelet, 1969)

L'éponge *Haliclona (Halichoelona) magna* est décrite sous le nom de *Reniera magna* en 1969 par Jean Vacelet⁸⁴. C'est une éponge blanche, de consistance ferme et cassante (Figure 75). Elle est retrouvée en Méditerranée dans des eaux profondes (au-delà de 130 m de profondeur).



Figure 75 : Photographie de l'éponge *Haliclona (Halichoelona) magna* (Agence des Aires Marines Protégées).

⁸³ Fiorini L., Tribalat M.A., Sauvard L., Cazareth J., Lalli E., Broutin I., Thomas O.P. et Mus-Veteau I., Natural paniceins from mediterranean sponge inhibit the multidrug resistance activity of patched and increase chemotherapy efficiency on melanoma cells. *Oncotarget*, 2015. **6**(26), 22282.

⁸⁴ Vacelet J., Eponges de la Roche du Large et de l'étage bathyal de Méditerranée (Récoltes de la soucoupe plongeante Cousteau et dragages). 1969: Éditions du Muséum.

1. Métabolites spécialisés d'éponges marines profondes

Du fait de la profondeur à laquelle *Haliclona (Halichocona) magna* est établie, il est difficile de la récolter, il n'y a donc à ce jour aucune publication décrivant le métabolome de cette éponge.

Les trois études réalisées précédemment sur des éponges *Haliclona* montrent également la diversité chimique rencontrée au sein de cet ancien genre taxonomique qui ne permet pas d'émettre quelque hypothèse que ce soit concernant le type de molécules que pourrait produire *Haliclona (Halichocona) magna*.

Une étude bibliographique ayant pour objet les éponges des eaux profondes ne permet pas non plus de mettre en évidence un type de métabolisme en particulier qui aurait pu être lié à l'habitat profond. En effet, tant au sein de l'ordre des Haplosclérides que dans le groupe des Porifères, les composés isolés des éponges de profondeurs sont de natures chimiques variées : alcaloïdes, polyacétylènes, terpènes, ou encore peptides⁸⁵.

2. Etude chimique de l'éponge *Haliclona (Halichocona) magna*

L'extraction de 5 g d'éponge lyophilisée par un mélange MeOH/ DCM (1 :1) a permis d'obtenir 1,3 g d'extrait brut soumis ensuite à différentes étapes de purification présentées dans la Figure 76.

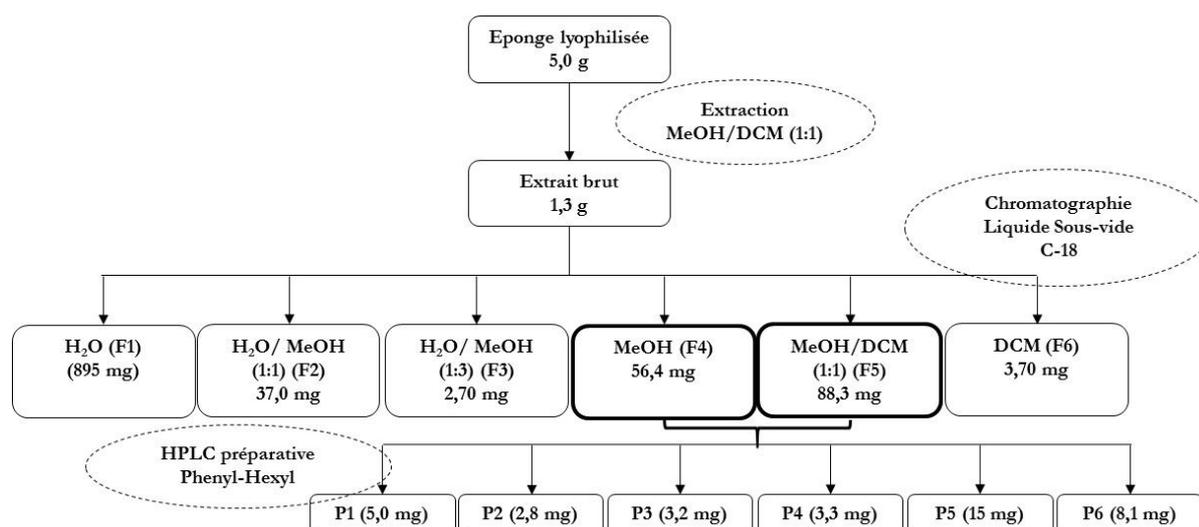


Figure 76 : Schéma de fractionnement et de purification de l'éponge *Haliclona (Halichocona) magna*

Les profils chromatographiques obtenus par l'analyse UHPLC-DAD (Figure 77) ont montré que les profils des fractions F4 et F5 étaient similaires, elles ont donc été regroupées et purifiées par HPLC préparative sur colonne phenyl-hexyl avec un système d'éluants contenant de l'eau et de l'acétonitrile permettant d'obtenir 6 pics. Après analyse RMN, les pics P2, P3 et P6 ont été repurifiés par HPLC analytique sur une colonne C-18 avec un système d'éluant composé d'eau et d'acétonitrile. Ces dernières étapes de purification ont permis l'obtention de 3 composés purs de la famille des stérols, précédemment décrits dans

⁸⁵ Skropeta D. et Wei L.Q., Recent advances in deep-sea natural products. *Natural Product Reports*, 2014. **31**(8): p. 999-1025

des espèces du genre *Calyx*: le 26,27-dinorcholest-5-en-23-yn-3 β -ol (**45**), le cholest-5-en-23-yn-3 β -ol (**46**)^{86,87} et le 5 α -calystanol (**47**)⁸⁸ (Figure 78).

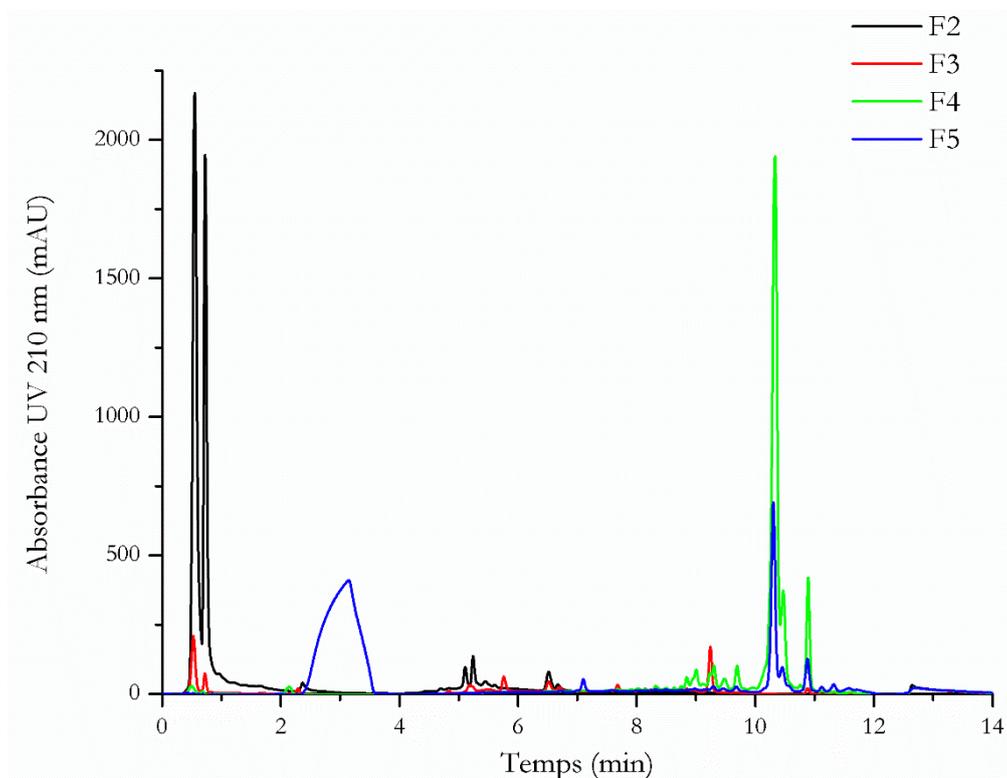


Figure 77 : Chromatogrammes UHPLC-DAD à 210 nm des fractions F2 (H₂O/MeOH 1 :1), F3 (H₂O/MeOH 1 :3), F4 (MeOH) et F5 (MeOH/DCM 1:1) obtenues du fractionnement de l'éponge *Haliclona* (*Halichocona*) *magna*. L'intensité en mAU à 210 nm est représentée en fonction du temps. Sur colonne phenyl-hexyl UHPLC avec un gradient standard commençant à (90 H₂O : 10 ACN) jusqu'à (0 H₂O : 100 ACN) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 5 μ L.

⁸⁶ Ha T.B.T. et Djerassi C., Minor and trace sterols in marine invertebrates. 62. Novel coprostanols with unusual side chains from the marine sponge *Calyx nicaensis*. *Steroids*, 1989. **53**(3): p. 487-499.

⁸⁷ Steiner E., Djerassi C., Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C. et Sica D., Isolation, structure determination and synthesis of new acetylenic sterols from the sponge *Calyx nicaensis*. *Helvetica Chimica Acta*, 1977. **60**(2): p. 475-481.

⁸⁸ Doss G.A. et Djerassi C., Sterols in marine invertebrates. 60. Isolation and structure elucidation of four new steroidal cyclopropenes from the sponge *Calyx podatypa*. *Journal of the American Chemical Society*, 1988. **110**(24): p. 8124-8128.

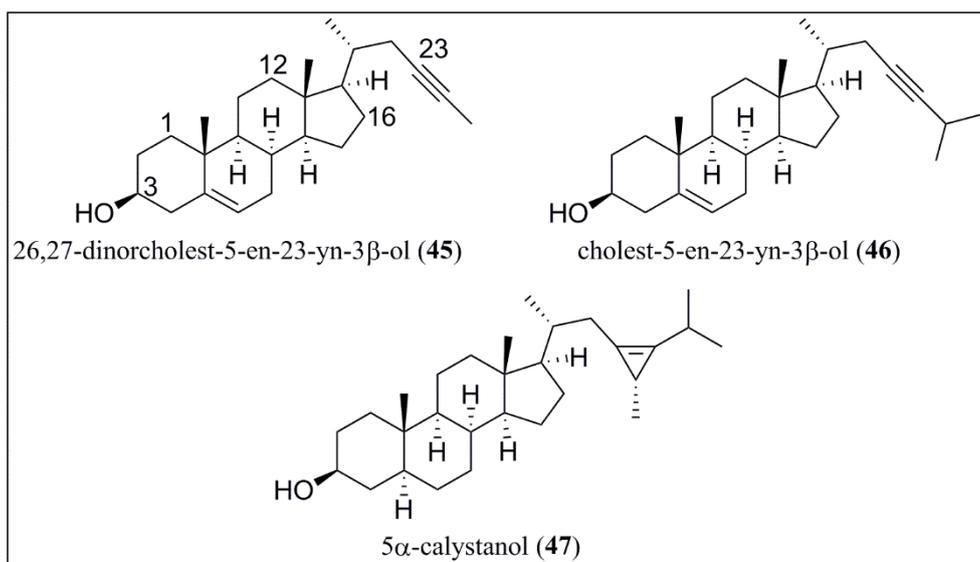


Figure 78 : Structure des stérols isolés de *Haliclona (Halichocona) magna*

L'élucidation structurale de ces composés a été réalisée principalement grâce aux différentes expériences RMN menées dans le CDCl_3 . La spectrométrie de masse puis la littérature ont ensuite permis de confirmer la structure des composés isolés.

Les spectres RMN du proton, du carbone 13 et l'HSQC ont d'abord permis d'établir la nature stéroliques des trois composés isolés grâce aux signaux suivants spécifiques de cette famille de composés :

- Un singulet intégrant pour 3 protons à 0,68 ppm correspondant au méthyle de la position 18 (Figure 79).
- Un singulet intégrant pour 3 protons entre 0,80 et 1,01 ppm correspondant au méthyle de la position 19 (Figure 79).
- Le couplage entre un multiplet intégrant pour 1 proton à 3,54 ppm et un carbone à 71,96 ppm correspondant à la fonction alcool des stérols (Figure 79, Figure 80).
- Les couplages entre 3 multiplets codant chacun pour un proton à 0,93 ppm, 1,03 ppm et 1,44 ppm et leurs carbones respectifs à 50,2 ppm, 56,8 ppm et 32,0 ppm correspondant respectivement aux positions 9, 14 et 8 (Figure 80, Figure 81).

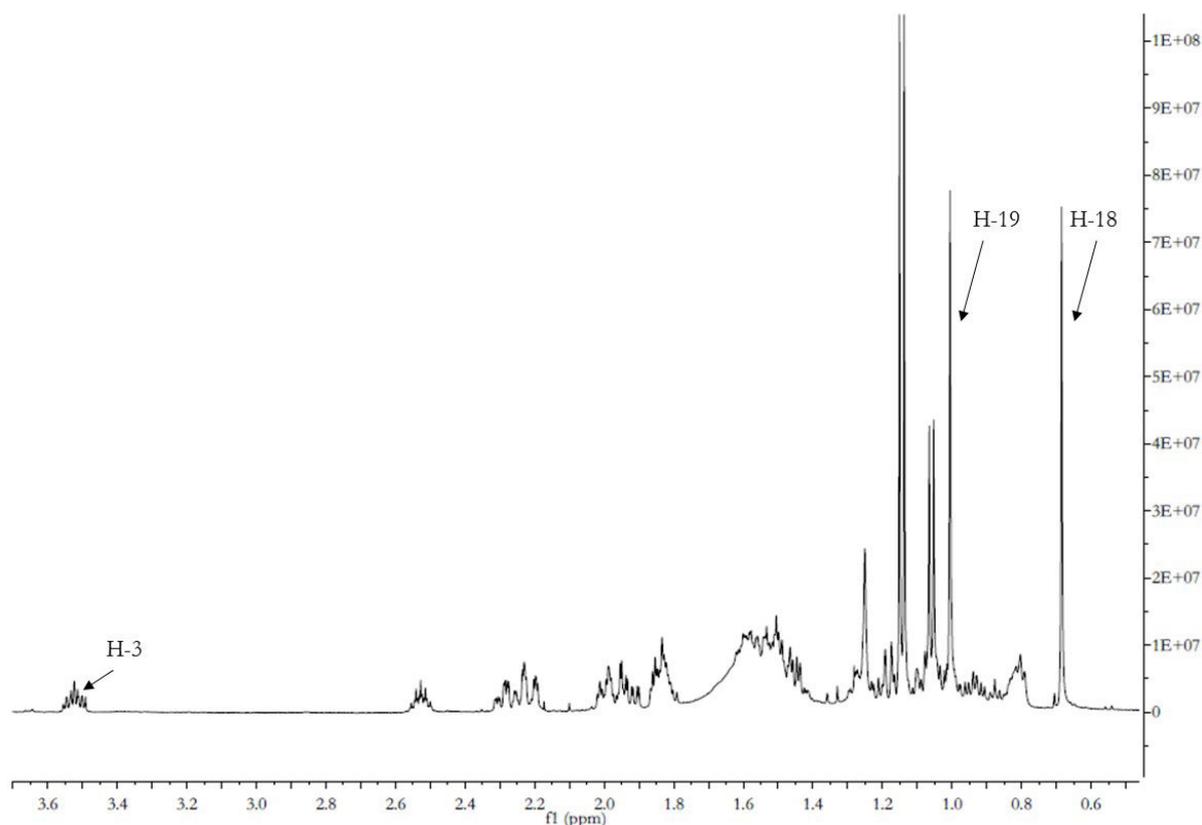


Figure 79 : Agrandissement du spectre RMN ^1H du cholest-5-en-2-yn-3 β -ol (46) obtenu par purification de l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *magna*. Les spectres sont obtenus dans le CDCl_3 qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (7,26 ppm).

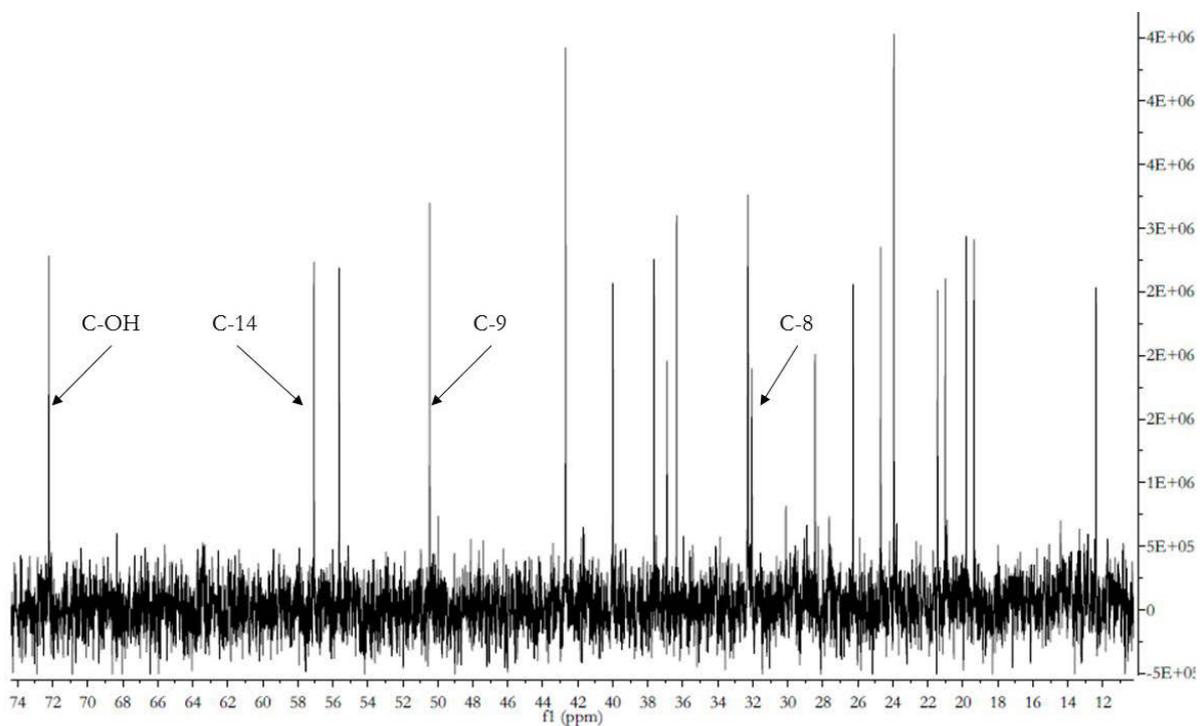


Figure 80 : Agrandissement du spectre RMN ^{13}C du cholest-5-en-2-yn-3 β -ol (46) obtenu par purification de l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *magna*. Les spectres sont obtenus dans le CDCl_3 qui permet également de calibrer les déplacements chimiques (77,16 ppm).

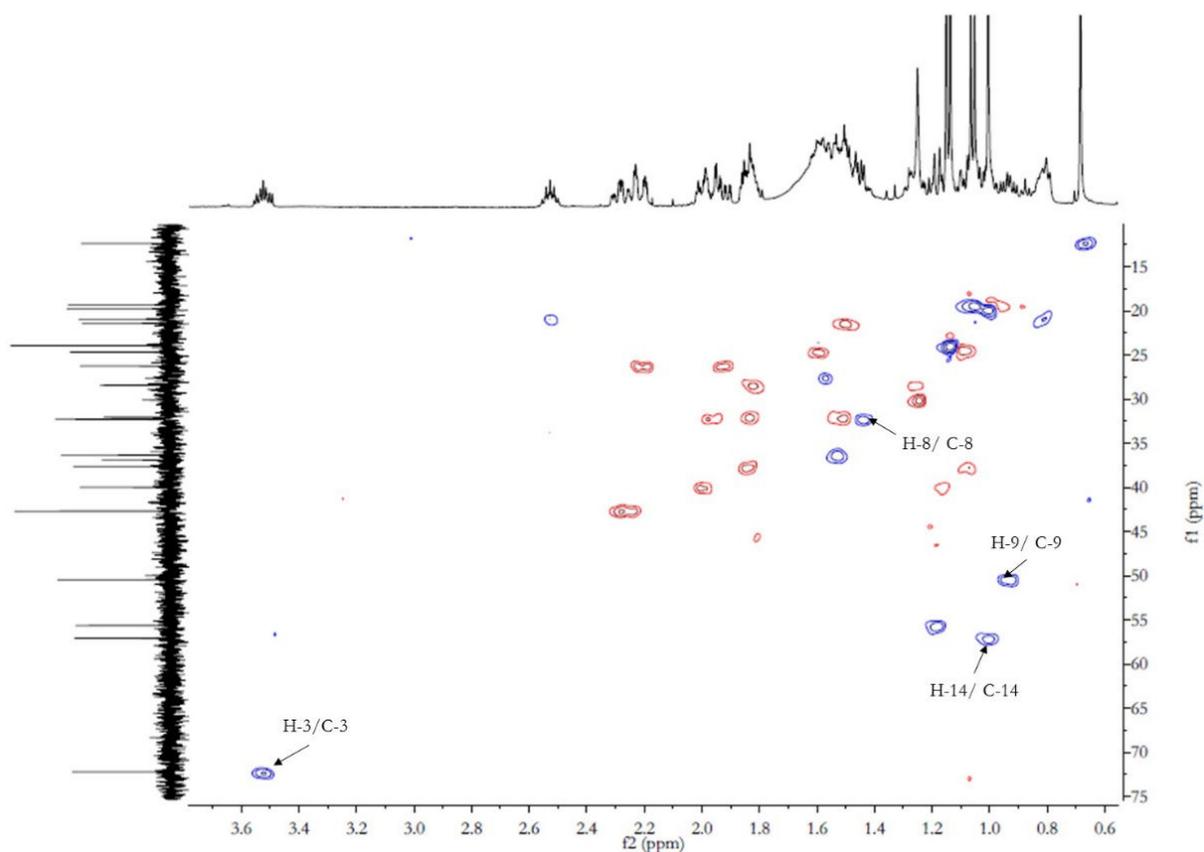


Figure 81 : Agrandissement du spectre RMN HSQC du cholest-5-en-2-yn-3 β -ol (**46**) obtenu par purification de l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *magna*. Les spectres sont obtenus dans le CDCl₃.

Pour le 26,27-dinorcholest-5-en-23-yn-3 β -ol (**45**) et le cholest-5-en-23-yn-3 β -ol (**46**), ces spectres indiquaient également la présence d'une double liaison avec un carbone quaternaire par la présence d'un signal à 140,9 ppm correspondant au carbone 6 et un signal à 121,8 ppm couplé à un proton résonnant à 5,35 ppm et correspondant au carbone 7. Le spectre COSY mettant en évidence un couplage entre ce proton à 5,35 ppm et des protons en position α d'un alcool a permis de s'assurer de la position de cette double liaison au niveau des carbones 6 et 7, position usuelle dans la molécule de cholestérol. En revanche cette double liaison n'apparaît pas sur les spectres du 5 α -calystanol (**47**).

Par la suite, les spectres COSY et HMBC, ont permis de confirmer la structure de base de type stérol mais surtout de déterminer la nature de la chaîne latérale pour chacun des 3 composés (Tableau 11). Leurs masses moléculaires ont ensuite été vérifiées par spectrométrie de masse et des analyses polarimétriques, par spectrométrie infrarouge et par spectrométrie UV ont permis de compléter les données connues concernant ces molécules.

Tableau 11 : Déplacements chimiques ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans le CDCl_3 des 3 stérols isolés de *Haliclona (Halichoclona) magna*

Position	26,27-dinorcholest-5-en-23-yn-3 β -ol (45)		cholest-5-en-23-yn-3 β -ol (46)		5 α -calystanol (47)	
	δ_{H} (m, J_{HH} Hz, I)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J_{HH} Hz, I)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J_{HH} Hz, I)	δ_{C} (ppm)
1	1,83; 1,05 (m, 2H)	37,4	1,85; 1,07 (m, 2H)	37,4	1,69; 1,71 (m, 2H)	37,1
2	180; 1,49 (m; 2H)	31,8	1,84; 1,51 (m, 2H)	32,1	1,24; 1,80 (m,2H)	31,7
3	3,51 (m; 1H)	71,8	3,52 (m, 2H)	71,9	3,57 (m, 1H)	71,5
4	2,26; 2,22 (m, 2H)	42,5	2,30; 2,26 (m, 2H)	42,3	1,27; 1,56 (m, 2H)	38,4
5	-	141	-	141	1,07 (m, 1H)	45,0
6	5,35 (m, 1H)	122	5,35 (m, 1H)	122	1,26; 1,83 (m, 2H)	28,4
7	1,99; 1,52 (m, 2H)	32,1	1,98; 1,54 (m, 2H)	31,8	1,64; 1,66 (m, 2H)	32,2
8	1,45 (m, 1H)	32,0	1,44 (m, 1H)	32,0	1,33 (m, 1H)	35,7
9	0,92 (m, 1H)	50,3	0,93 (m, 1H)	50,2	0,98 (m, 1H)	56,6
10	-	36,7	-	36,6	-	35,1
11	1,48 (m, 2H)	21,2	1,50 (m, 2H)	21,2	1,05; 1,57	24,4
12	1,98; 1,16 (m, 2H)	39,7	1,16; 2,01 (m, 2H)	39,7	1,10; 1,96	40,1
13	-	41,9	-	42,1	-	42,7
14	1,03 (m, 1H)	56,8	1,00 (m, 1H)	56,9	0,61 (m, 1H)	54,4
15	1,60; 1,09 (m, 2H)	24,4	1,59; 1,09 (m, 2H)	24,4	1,29; 1,48 (m 2H)	21,3
16	1,84; 1,28 (m, 2H)	28,2	1,83; 1,26 (m, 2H)	28,2	1,32; 1,87 (m, 2H)	28,9
17	1,18 (m, 1H)	55,3	1,18 (m, 1H)	55,4	1,13 (m, 1H)	55,9
18	0,68 (s, 3H)	12,1	0,67 (s, 3H)	12,2	0,66 (s, 3H)	12,3
19	0,97 (s, 3H)	19,5	1,01 (s, 3H)	19,5	0,80 (s, 3H)	12,5
20	1,52 (m, 1H)	36,0	1,53 (m, 1H)	36,1	1,63 (m, 1H)	35,1
21	1,06 (d, 6,5, 3H)	19,2	1,05 (d, 6,5, 3H)	19,1	0,94 (d, 7,0, 3H)	19,7
22	2,18; 1,92 (m, 2H)	26,1	1,92; 2,19 (m, 2H)	26,0	2,41; 2,19 (m, 2H)	31,8
23	-	78,1	-	78,1	-	115
24	-	76,7	-	87,7	-	124
25	1,79 (s, 3H)	37,0	2,53 (m, 1H)	20,8	2,69 (m, 1H)	26,6
26			1,14 (d, 7, 3H)	23,6	1,09 (d, 2,0, 3H)	21,1
27			1,14 (d, 7, 3H)	23,6	1,09 (d, 11, 3H)	21,4
24 ¹					2,16 (m, 1H)	31,1
24 ²					0,98 (d, 4,5, 3H)	21,7

• 26,27-dinorcholest-5-en-23-yn-3 β -ol (45)

La Figure 82 décrit les corrélations COSY ^1H - ^1H et HMBC révélées par les spectres RMN. Elles ont permis la validation du noyau stérol identifié grâce aux autres expériences et l'élucidation structurale de la chaîne latérale notamment grâce au couplage COSY entre H-20 et H-21 et aux couplages HMBC entre H-25 et C-24 et surtout entre H-25 et C-23 au travers d'une triple liaison. En effet, en plus des deux signaux typiques d'une liaison acétylène à 78,1 ppm (C-23) et 76,7 ppm (C-24), le signal carbone très blindé à 3,67 ppm (C-25) couplé à un singulet intégrant pour 3 protons à 1,76 ppm (H-25) sur le spectre HSQC suggère fortement la présence d'un groupement méthyl lié à une triple liaison.

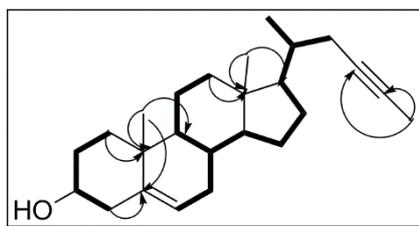


Figure 82 : Corrélations COSY ^1H - ^1H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) du 26,27-dinorcholest-5-en-23yn-3 β -ol dans le CDCl_3 .

La formule brute de ce composé $C_{25}H_{38}O$ a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution : m/z 353,1290 $[M+H]^+$. L'analyse polarimétrique a été réalisée dans le $CHCl_3$: $[\alpha]_D^{20} = -16,0$ (c 0,1). L'analyse UV a été réalisée dans un mélange MeOH/DCM (4 :1) : λ_{max} (ϵ) 222 nm (101). L'analyse infra-rouge a révélé 6 bandes principales : ν_{max}/cm^{-1} 3377 (O-H), 2110 ($C\equiv C$), 1645 ($C=C$), 1259 (C-H), 1022 (C-O), 800 (C-C).

· cholest-5-en-23-yn-3 β -ol (46)

De la même manière que pour la molécule précédente, la Figure 83 décrit les corrélations COSY 1H - 1H et HMBC révélées par la RMN pour le cholest-5-en-23-yn-3 β -ol indispensables à la compréhension structurale de cette molécule. En effet, l'étude préliminaire du spectre ^{13}C montre deux signaux à 78,1 ppm (C-23) et 78,7 ppm (C-24) suggérant la présence d'une triple liaison. Celle-ci est confirmée par les corrélations HMBC entre le proton H-22 et les carbones C-23 et C-24 ainsi qu'entre le proton H-26 et C-24. Le COSY 1H - 1H permet d'établir la position du groupement méthyl C-21 par la corrélation entre le doublet à 1,05 ppm correspondant aux 3 protons H-21 et le multiplet à 1,53 ppm correspondant à H-20. Le groupement isopropyl ainsi que sa position sont identifiés grâce aux couplages entre H-25 et H-26, H-25 et H-27 ainsi qu'entre H-26 et C-24.

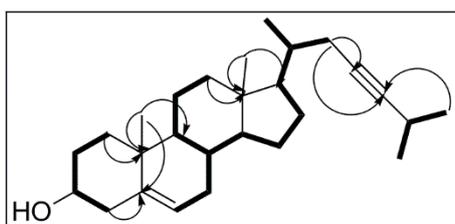


Figure 83 : Corrélations COSY 1H - 1H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) du cholest-5-en-23-yn-3 β -ol (46) dans le $CDCl_3$.

La masse moléculaire a été confirmée par GC-MS : m/z 383,1 $[M+H]^+$. L'analyse polarimétrique a été réalisée dans le $CHCl_3$: $[\alpha]_D^{20} = -37,3$ (c 0,1). L'analyse UV a été réalisée dans un mélange MeOH/DCM (4 :1) : λ_{max} (ϵ) 221 nm (99). L'analyse infra-rouge a révélé 6 bandes principales : ν_{max}/cm^{-1} 3357 (O-H), 2117 ($C\equiv C$), 1641 ($C=C$), 1257 (C-H), 1024 (C-O), 796 (C-C).

· 5 α -calystanol (47)

La Figure 84 présente les corrélations COSY 1H - 1H et HMBC qui ont permis de déterminer les détails de la structure stéroïdique de ce composé mais également la nature de sa chaîne latérale. Les premières indications utilisées sont le couplage COSY 1H - 1H entre le doublet à 0,94 ppm correspondant à H-21 et le multiplet à 1,63 ppm correspondant à H-20 ainsi que les couplages HMBC entre H-22 et C-24, H-22 et C-23, H-24 2 et C-23, H-24 2 et C-24 et H-26 et C-24 qui mettent entre autres en évidence la présence du cyclopropène (Figure 85).

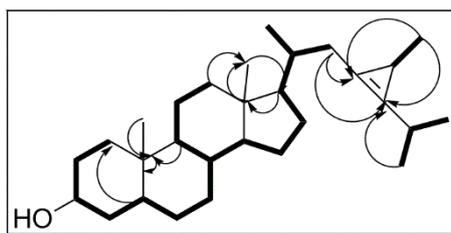


Figure 84 : Corrélations COSY ^1H - ^1H (liaisons en gras) et HMBC (flèches) du 5α -calystanol (47) dans le CDCl_3 .

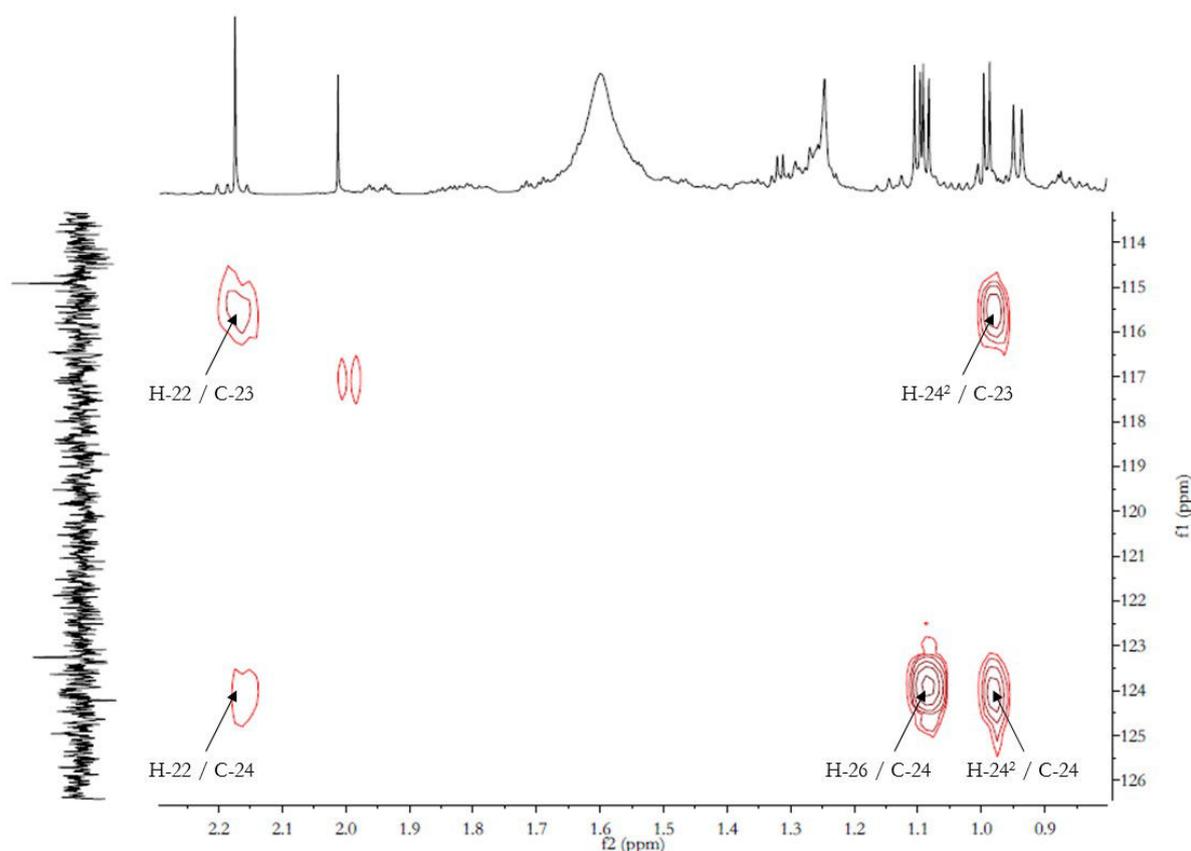


Figure 85 : Agrandissement du spectre RMN HMBC du 5α -calystanol (47) obtenu par purification de l'éponge *Haliclona* (*Halichoelona*) *magna*. Les spectres sont obtenus dans le CDCl_3 .

La corrélation indiquée par le spectre COSY ^1H - ^1H entre le doublet à 0,98 ppm intégrant pour 3 protons correspondant à H-24² et le multiplet à 2,16 ppm correspondant à H-24¹ met en évidence la présence d'un groupement méthyl porté par C-24¹. Ce spectre révèle également le couplage du multiplet à 2,69 ppm correspondant à H-25 avec deux doublets à 1,09 ppm intégrant chacun pour 3 protons et présentant des constantes de couplage différentes : 2 Hz pour H-27 et 11 Hz pour H-26. Ceci indique la présence du groupement isopropyl sur le carbone insaturé C-24. La délocalisation importante des électrons sur le cyclopropène explique les déplacements chimiques légèrement blindés des carbones de la double liaison à 114,9 ppm pour C-23 et 123,7 ppm pour C-24 mais également la différence des constantes de couplage du groupement isopropyl⁸⁹.

⁸⁹ Poulter C.D., Boikess R.S., Brauman J.I. et Winstein S., Shielding effects of a cyclopropane ring. *Journal of the American Chemical Society*, 1972. 94(7): p. 2291-2296.

La masse moléculaire a été confirmée par GC-MS : m/z 413,1 [M+H]⁺. L'analyse polarimétrique a été réalisée dans le CHCl₃ : $[\alpha]_D^{20} = -5,0$ (c 0,1). L'analyse UV a été réalisée dans un mélange MeOH/DCM (4 :1) : λ_{\max} (ε) 221 nm (1178). L'analyse infra-rouge a révélé 5 bandes principales : $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3315 (O-H), 1651 (C=C), 1257 (C-H), 1020 (C-O), 794 (C-C).

L'étude du métabolome de l'éponge *Haliclona* (*Halichoclona*) *magna* qui n'avait jamais été entreprise jusqu'à présent a révélé la présence de stérols originaux déjà décrits dans des éponges du genre *Calyx* retrouvées dans des eaux moyennement profondes (50 à 80 m)^{86,87,88}. Ces similitudes peuvent permettre de formuler différentes hypothèses :

Soit il y a eu erreur lors de l'identification taxonomique des éponges étudiées dans les années 1980 et alors l'éponge étudiée était déjà *Haliclona* (*Halichoclona*) *magna*, cependant il n'existe pas de réelle ressemblance entre ces éponges qui pourrait conduire à une telle confusion. Cette hypothèse est donc peu probable.

Soit ces éponges de grandes profondeurs sont amenées à produire des stérols originaux pour différentes raisons possibles. En effet, les phénomènes physiques tels que la température, la pression ou encore la luminosité peuvent avoir une influence sur le métabolisme mais surtout les nutriments de base à disposition ne sont pas les mêmes que pour les organismes vivant dans des eaux moins profondes. En effet, ces zones des profondeurs présentent des populations phytoplanctoniques différents de celles retrouvées en zones moins profondes, par conséquent le choix en acides gras, acides aminés et sucres permettant l'élaboration de métabolites plus complexes par la suite est moins important^{2,90,91,92}. La palette de composés originaux pouvant être produits par les porifères est donc moins importante. Ces molécules peuvent donc être produites par des organismes appartenant à des familles taxonomiques différentes sans pour autant être des marqueurs chimiques spécifiques dans la classification taxonomique malgré leur originalité ce qui correspond à une convergence évolutive.

E. Conclusion

La première partie de ces travaux de thèse a permis l'isolement de nouveaux composés et la mise en évidence de la bioactivité de composés déjà connus issus de 4 éponges du genre *Haliclona*. Ces résultats démontrent le grand potentiel des éponges à fournir des métabolites originaux et l'intérêt de travailler ces organismes bien qu'ils aient déjà été étudiés. Bien que trois des éponges que quatre aient déjà été étudiées auparavant, ce type d'approche permet de découvrir de nouveaux composés, d'approfondir les élucidations structurales mises en place auparavant (notamment pour la stéréochimie) et surtout d'explorer davantage les propriétés pharmacologiques de ces composés.

L'étude de l'éponge *Haliclona* (*Rhizionera*) *sarai* a permis la description exacte de la stéréochimie des saraines 1, 2 et 3 (**1-3**) qui n'avait jamais été réalisée auparavant. L'isolement de la saraine A (**7**) a débouché

⁹⁰ González H.E., Menschel E., Aparicio C. et Barria C., Spatial and temporal variability of microplankton and detritus, and their export to the shelf sediments in the upwelling area off Concepción, Chile (~36°S), during 2002–2005. *Progress in Oceanography*, 2007. **75**(3): p. 435-451

⁹¹ Arin L., Estrada M., Salat J. et Cruzado A., Spatio-temporal variability of size fractionated phytoplankton on the shelf adjacent to the Ebro river (NW Mediterranean). *Continental Shelf Research*, 2005. **25**(9): p. 1081-1095.

⁹² Mullin M.M., Plankton*, dans *Encyclopedia of Ocean Sciences (Second Edition)*, Steele J.H., Editor. 2001, Academic Press: Oxford. p. 453-454.

sur l'étude de son potentiel antioxydant se révélant très prometteur. Quant à la découverte de molécules nouvelles, elle permet de proposer de nouvelles hypothèses quant aux voies de biosynthèse menant aux saraïnes.

L'étude de l'éponge *Haliclona (Halichoelona) fulva* a mené à l'isolement des fulvynes déjà connues mais surtout à la caractérisation de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (**36**) qui met en évidence des erreurs de description des réniérines dans les années 1970. En outre ce composé a été testé *in vitro* puis *in vivo* pour ses propriétés anti tumorales dévoilant des résultats très intéressants vis-à-vis de cellules tumorales de cancer du sein triple négatif pour lesquels il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle.

L'étude l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa* n'a pas permis la description de nouveaux composés. En revanche l'isolement des panicéines a permis de tester leur activité inhibitrice sur le récepteur Patched responsable des phénomènes de résistance au traitement par le doxorubicine dans de nombreux cancers. Ces résultats ont été publiés dans le journal *Oncotarget* et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Enfin l'étude de l'éponge *Haliclona (Halichoelona) magna* dont la chimie n'avait jamais été étudiée a été réalisée permettant la caractérisation de trois stérols originaux déjà décrits dans des éponges du genre *Calyx*. Ces observations remettant en question la description taxonomique souvent absente des éponges étudiées pour leur métabolome.

L'étude du métabolome de ces éponges met encore une fois en avant la variabilité chimique retrouvée au sein d'un même groupe taxonomique. Ces résultats s'associent aux différentes publications concernant la remise en question de la classification des éponges de la famille des Haplosclérides par les techniques de biologie moléculaire. L'isolement de composés issus de ces différentes familles chimiques permet également d'avoir des standards des potentiels marqueurs chimiques révélés par une étude phylométabolomique mise en place dans la deuxième partie de ces travaux de thèse dans le but de tenter de répondre aux questions posées quant à la classification des spongiaires de la famille des Haplosclérides. La nécessité de cette étude est également soulignée par les potentielles erreurs d'identification taxonomique décelées dans le cas de l'étude d'*Haliclona fulva* et d'*Haliclona magna*.

Chapitre 2 : De la chimiotaxonomie à la phylométabolomique des Haplosclérides : le cas du genre *Haliclona*

A. Métabolomique et phylogénie

Dans le cadre de l'étude des produits naturels en général, l'étude systématique du métabolome d'un organisme selon l'approche décrite dans le chapitre 1 est la plus ancienne et la plus commune des techniques. Cette méthode et les résultats qui en découlent, restent indispensables à la description précise des métabolites produits par la nature. Cependant, pour comparer chimiquement des organismes entre eux que ce soit pour une étude écologique ou une étude taxonomique, ces approches sont assez limitées car très chronophages, peu quantitatives et incomplètes. Dans le cas de l'étude des Haplosclérides, et du genre *Haliclona* en particulier, les études chimiotaxonomiques réalisées dans le but de révéler des marqueurs chimiques propres à cette famille sont uniquement des études bibliographiques^{23,24,25} basées sur des descriptions du métabolome classiques. La principale limite de cette approche est le fait que d'une étude chimique à l'autre, les méthodes d'extractions et de purifications utilisées ne sont pas les mêmes ce qui a pour conséquence d'introduire des biais dans les interprétations des familles chimiques extraites. Une étude visant à mettre en évidence des marqueurs chimiques communs à un groupe taxonomique demande une vision plus globale du fonctionnement de l'organisme étudié, ce qui est proposé par la métabolomique. Dans un souci de différenciation lexicale, les études basées sur un travail bibliographique sont appelées chimiotaxonomie alors que celles faisant appel à la métabolomique seront désormais qualifiées de phylométabolomique. Ce chapitre se focalise sur la phylométabolomique de l'ordre des Haplosclérides, et du genre *Haliclona* en particulier, avec comme objectif de préciser la classification au sein de cet ordre.

1. Métabolomique : De la technique...

La métabolomique ambitionne l'étude de l'ensemble des métabolites présents dans un organe ou un organisme entier. Associée à la génomique et à la transcriptomique, la métabolomique représente un outil important utilisé dans les études de génomique fonctionnelle permettant d'identifier et d'expliquer la fonction des différents gènes et de définir les voies métaboliques ainsi que leurs modifications selon les conditions extérieures ou en cas de stress biotiques ou abiotiques⁹³. Ce type d'approche permet d'avoir une vision de l'organisme étudié sous forme d'un système intégré comprenant différentes voies métaboliques liées entre elles par différents précurseurs et différents types de régulations en amont ou en aval aboutissant à des phénotypes complexes et variés³⁰.

Une étude métabolomique peut être abordée de différentes manières selon le but recherché:

- Le profilage métabolique consiste à cibler une famille de composés présentant le même type de structures chimiques.

⁹³ Saito, K., Matsuda, F.. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, **61**, 463-489.

- La métabolomique envisage l'analyse du métabolome dans sa totalité sans restriction à un groupe de molécules en particulier et dans la mesure où les techniques d'analyses le permettent.

- L'empreinte métabolique ou « fingerprinting » permet d'établir une comparaison entre deux organismes par détermination de métabolites discriminants. Cette approche permet de repérer la ou les familles métaboliques susceptibles de subir des modifications d'un organisme à l'autre et d'approfondir l'étude par profilage métabolique.

La complexité principale des études métabolomiques réside dans la diversité structurale des métabolites rencontrés dans les organismes étudiés. D'une part, au sein d'un seul et même organisme, sont présents les métabolites primaires et les métabolites spécialisés et d'autre part à travers différents organismes il existe une grande variété chimique comme cela a été montré dans le chapitre 1 pour les éponges du genre *Haliclona* par exemple. Ces différents composés expriment non seulement des propriétés chimiques très différentes mais ils présentent également des activités biologiques et des localisations cellulaires variées, ce qui accentue la difficulté de leur analyse en une seule et même manipulation. En outre, les variations de concentrations (~10⁶ M) existant entre les différents types de métabolites compliquent davantage l'analyse du métabolome.

Du fait de la complexité de ces systèmes d'étude, les approches métabolomiques font intervenir diverses techniques d'analyses complémentaires entre elles : la chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV (CLHP-UV), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)^{93,94}. L'association de ces différents outils présentent chacun leurs avantages et inconvénients mais sont complémentaires et leur association permet d'embrasser l'ensemble du métabolome (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison des méthodes analytiques utilisées en métabolomique. L'échelle variant de – pour les désavantages majeurs à +++ pour les avantages majeurs⁹⁴.

	CLHP	GC-MS	LC-MS	MS ^a	RMN
Préparation d'échantillons	++	-	-	+	+++
Reproductibilité	-	+	-	+	+++
Quantification absolue	-	-	-	-	+++
Quantification relative	+	++	+	++	+++
Identification	+	++	++	++	++
Sensibilité	+	++	++	+++	-

La RMN et la MS sont les principales techniques analytiques utilisées actuellement dans les études métabolomiques. Quelle que soit la technique choisie, il est important que le protocole mis en place soit le plus reproductible possible d'un échantillon à l'autre et ce depuis la collecte jusqu'à l'analyse de celui-ci. Dans le cadre d'études écologiques portées sur la même espèce, ce paramètre est relativement facile à respecter, en revanche dans le cadre d'une étude phylogénétique portant sur des espèces différentes présentant une forte variabilité chimique cette contrainte est beaucoup plus difficile à prendre en compte.

⁹⁴ Verpoorte, R., Choi, Y.H., Mustafa, N.R., Kim, H.K.. Metabolomics: back to basics. *Phytochemistry reviews*, 2008, 7, 525-537.

La RMN (1D ou 2D) est une technique de choix en matière de profilage métabolique puisque c'est une technique non destructive, qu'elle est universelle, qu'elle ne nécessite pas une préparation d'échantillon complexe et que celui-ci peut être liquide ou solide⁹⁵. De plus, elle peut permettre l'identification de composés discriminants à l'aide de standards. Cependant sa sensibilité relativement basse (10^{-6} M) ne permet pas de cibler les métabolites présents en plus faibles quantités mais néanmoins importants et discriminants d'un point de vue métabolique. Si cette technique analytique a été largement utilisée aux débuts de la métabolomique, les recherches se sont tournées vers les techniques de spectrométrie de masse permettant d'obtenir des résultats très intéressants notamment sur les composés présents en très faibles quantités⁹⁶. Cette technique est alors très souvent couplée à une technique chromatographique gazeuse ou liquide.

Le couplage HPLC-MS exploite le fort pouvoir de séparation de la chromatographie liquide (traditionnellement utilisée avec un détecteur UV ou DAD) et la sensibilité et la haute précision de la spectrométrie de masse qui apportent des informations quantitatives et qualitatives sur les composés séparés au préalable. Les techniques d'ionisation les plus utilisées dans ce domaine sont l'électrospray (ESI) et l'impact électronique (IE)⁹⁶. Les techniques de détection sont multiples : les trappes à ions décrits comme des instruments polyvalents, les quadrupôles réputés pour leur performance sur une large gamme de composés, les analyseurs à temps de vol connus pour leur grande sensibilité dans le cadre d'analyse ciblée et les instruments à transformée de Fourier distingués par leur grand pouvoir de résolution et leur grande précision⁹⁷. La rapidité d'analyse par les techniques de chromatographie liquide modernes (développement des UHPLC) combinée avec la haute sensibilité, la précision et la résolution de la spectrométrie de masse, se révèlent essentielles pour l'analyse des matrices complexes obtenues dans le cadre d'études par métabolomique. Les couplages GC-MS permettent quant à eux d'étudier des molécules de poids moléculaire et de polarité plus faibles et dont la volatilité est plus élevée que celles ciblées par la LC-MS.

Quelle que soit la technique analytique utilisée, les données obtenues en métabolomique nécessitent un traitement bio-informatique pour extraire les données sous forme de matrice avant de les exploiter en biostatistiques. Cette étape couramment appelée « data-mining » est conditionnée par la problématique posée à l'origine de l'expérimentation. L'extraction des données spectrales obtenues par RMN et par MS est légèrement différente compte-tenu de la nature des données brutes. Pour la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide, le traitement de données tient compte du temps de rétention, du rapport m/z et de l'intensité des pics obtenus en fonction du type d'échantillon traité (blanc, échantillons et réplicats). Le réalignement de ces données pour obtenir des matrices selon différents paramètres définis à partir des

⁹⁵ Krishnan, P., Kruger, N.J., Ratcliffe, R.G.. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, 2005, **56**, 255-265.

⁹⁶ Viant, M.R. et Sommer U., Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. *Metabolomics*, 2012. **9**(S1): p. 144-158.

⁹⁷ Wang, Y. et Griffiths W.J., Chapter 1 Mass Spectrometry for Metabolite Identification, dans *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*, 2008, The Royal Society of Chemistry. p. 1-43.

spectres de masse est possible grâce à plusieurs programmes publiés dont les plus utilisés sont XCMS⁹⁸ et MZ-MINE⁹⁹ exploitables notamment sous R. Pour la spectroscopie par RMN du proton, les spectres obtenus doivent être réalignés puis découpés en « bin » afin de tenir compte finalement des déplacements chimiques et de l'intensité qui leur correspond pour chacun des échantillons¹⁰⁰. Les programmes permettant d'obtenir ces résultats sont plus rarement publiés^{101,102}.

Une fois les matrices obtenues, celles-ci peuvent être traitées séparément ou corrélées l'une à l'autre afin d'obtenir des résultats statistiques permettant de discriminer les échantillons entre eux selon des variables classées selon leur pouvoir discriminant. Les analyses les plus utilisées sont de type multivarié non-supervisé comme l'analyse en composante principale (ACP) ou l'analyse hiérarchique (HCA) ou supervisé telles que la régression des moindres carrés partielle (PLS) ou encore l'analyse de variance (ANOVA). Contrairement aux analyses non supervisées, les analyses supervisées tiennent compte de certaines informations fournies par le manipulateur relatives aux échantillons (classe de l'échantillon, données quantitatives ou qualitatives...)¹⁰⁰.

Pour la mise en place de chaque nouvelle étude métabolomique, l'ensemble du processus depuis la récolte d'échantillon jusqu'à l'analyse statistique doit faire l'objet d'une optimisation pointue adaptée à la problématique posée.

2. ...à la problématique scientifique

L'outil métabolomique est d'abord largement utilisé dans des domaines très appliqués comme en toxicologie (caractérisation de pathologie, domaine du médicament) et en écologie environnementale (impact des conditions environnementales sur les plantes, les animaux...).

Dans les cas des produits naturels notamment marin, la métabolomique permet de répondre à des problématiques variées :

- l'écologie chimique s'intéressant aux impacts environnementaux et aux interactions entre les organismes. Ce domaine a fait l'objet de nombreuses études tant dans le monde terrestre que dans le monde marin pour étudier l'impact de différents facteurs tels la température, le taux d'humidité, la qualité de l'air atmosphérique, la nutrition ou encore les rythmes circadiens sur le métabolisme des organismes¹⁰³. Bien que certaines limites existent notamment dans la mise en place du design expérimental et dans l'identification de

⁹⁸ Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R. et Siuzdak, G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 2006. **78**(3): 779-787.

⁹⁹ Katajamaa M., Miettinen J. et Orešič M., MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*, 2006. **22**(5): p.634-636.

¹⁰⁰ Nordstrom A., Chapter 11 Data Mining for Metabolomics, dans *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*, 2008, The Royal Society of Chemistry. p. 273-294.

¹⁰¹ Balayssac S., Déjean S., Lalande J., Gilard V. et Malet-Martino M., A toolbox to explore NMRmetabolomic data sets using the R environment. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2013. **126**: p.50-59

¹⁰² Sousa S.A.A., Magalhães A., Ferreira M.M.C., Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2013. **122**: p.93-102

¹⁰³ Bundy, J.G., Davey M.P. et Viant M.R., Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 2008. **5**(1): p. 3-21.

métabolites, cette technique prometteuse a permis de souligner des modifications métaboliques importantes induites par l'environnement et de mettre en évidence les métabolites impliqués dans ces mécanismes.

- l'étude de voies métaboliques et les effets de leurs modifications génétiques comme cela a été proposé sur des lignées de lins mutants pour la voie des phénylpropanoïdes par une étude HPLC-UV.¹⁰⁴

- la phylométabolomique permettant d'établir des liens entre différents taxons grâce à la chimie des produits naturels. Cette approche a été démontrée comme pertinente dans l'étude de 11 espèces du genre (houx) dont la classification en quatre groupes a pu être proposée par métabolomique par RMN 1D et 2D grâce à la discrimination de différentes familles de métabolites : des xanthines et des composés phénoliques (phénylpropanoïdes et flavonoïdes), des saponines avec une structure de type oleanane, des acides dicaffeoylquiniques et des saponines avec une structure de type ursane¹⁰⁵.

En ce qui concerne l'application de la métabolomique au domaine des éponges, peu d'études ont été publiées jusqu'à maintenant. En 2011, une étude basée sur l'empreinte métabolique de 10 espèces de la classe des Homoscléromorphes a permis de montrer l'intérêt de la métabolomique dans le processus de classification taxonomique. En effet, ces travaux réalisés par HPLC-DAD-ELSD-MS ont permis de mettre en évidence une grande similarité entre la classification obtenue à partir des techniques usuelles et la classification proposée par la métabolomique non ciblée¹⁰⁶.

Cette technique prometteuse et les multiples questions en suspens concernant la classification des Haplosclérides et plus particulièrement du genre *Haliclona* sont à l'origine des travaux présentés dans ce chapitre. Cette étude métabolomique non ciblée a été réalisée sur 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona* et présente la démarche dans son intégralité depuis la mise au point du protocole expérimental jusqu'à l'étude des variations inter- et intra-spécifiques des deux espèces *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa*.

B. Mise au point de la méthode analytique

Comme mentionné plus haut, la principale difficulté de cette étude métabolomique appliquée aux éponges du genre *Haliclona* réside en la mise en place d'un protocole commun applicable à des familles chimiques variées et présentant des propriétés très différentes les unes des autres. La première étape de ce travail a donc consisté en l'élaboration d'un protocole permettant d'obtenir des résultats les plus fiables possibles tout en tenant compte des diverses caractéristiques physico-chimiques des familles de substances naturelles rencontrées.

1. Méthode d'extraction

L'étude globale du processus d'extraction peut être résumée ainsi :

- Lyophilisation des éponges

¹⁰⁴ Renouard S., Tribalat M-A., Lamblin F., Mongelard G., Fliniaux O., Corbin C., Marosevic D., Pilard S., Demailly H. et Gutierrez L., RNAi-mediated pinoresinol lariciresinol reductase gene silencing in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed coat: Consequences on lignans and neolignans accumulation. *Journal of plant physiology*, 2014. **171**(15): p. 1372-1377.

¹⁰⁵ Kim H.K., Saifullah, Khan S., Wilson E.G., Kricun S.D., Meissner A., Goral S., Deelder A.M., Choi Y.H. et Verpoorte R., Metabolic classification of South American Ilex species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*, 2010. **71**(7): p. 773-84.

¹⁰⁶ Ivanišević J., Thomas O.P., Lejeune C., Chevaldonné P. et Pérez T., Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. *Metabolomics*, 2010. **7**(2): p. 289-304.

- Extraction de 250 mg d'éponge par 5 mL de solvant pendant 10 minutes aux ultrasons, centrifugation pendant 10 minutes à 2000 rpm puis récupération du surnageant. Cette étape est répétée 3 fois.

- Evaporation des 15 mL de surnageant pour obtenir l'extrait brut

- Etape permettant de s'affranchir des sels et des acides gras

Bien que cette méthode métabolomique soit non ciblée, elle a malgré tout été conçue pour étudier les métabolites spécialisés et s'affranchir le plus possible du métabolome primaire qui ne permet pas de différencier les espèces les uns des autres. L'optimisation de cette étape a été réalisée sur des échantillons d'*Haliclona fulva* et d'*Haliclona sarai* connus pour contenir des métabolites spécialisés de familles chimiques différentes, polyacétylènes et alcaloïdes respectivement, et plusieurs paramètres ont alors été pris en compte et testés :

- La polarité du solvant utilisé : afin de cibler majoritairement le métabolisme spécialisé et d'éviter de retrouver des quantités de sels trop importantes dans l'extrait brut, des solvants de polarité moyenne ont été choisis (Tableau 13).

Tableau 13 : Tableau indicatif des polarités relatives de différents solvants¹⁰⁷

Solvant	Formule brute	Polarité relative
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	0,006
Toluène	C ₇ H ₈	0,099
Ether	C ₄ H ₁₀ O	0,117
Acétate d'éthyle	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,228
Chloroforme	CHCl ₃	0,259
Pyridine	C ₅ H ₅ N	0,302
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	0,309
Acétone	C ₃ H ₆ O	0,355
Diméthylsulfoxyde	C ₂ H ₆ OS	0,444
Acétonitrile	C ₂ H ₃ N	0,460
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	0,506
2-propanol	C ₃ H ₈ O	0,546
Méthanol	CH ₄ O	0,762
Eau	H ₂ O	1,000

Quatre solvants différents ont été testés : un mélange MeOH/DCM, 50 :50 (v/v), un mélange H₂O/ACN, 20 :80 (v/v), de l'acétate d'éthyle pur et du méthanol pur. Les extraits bruts obtenus après extraction ont été pesés (Figure 86).

¹⁰⁷ Reichardt C., Solvents and Solvent Effects dans *Organic Chemistry*, Wiley-VCH Publishers, 3^{ème} édition., 2003.

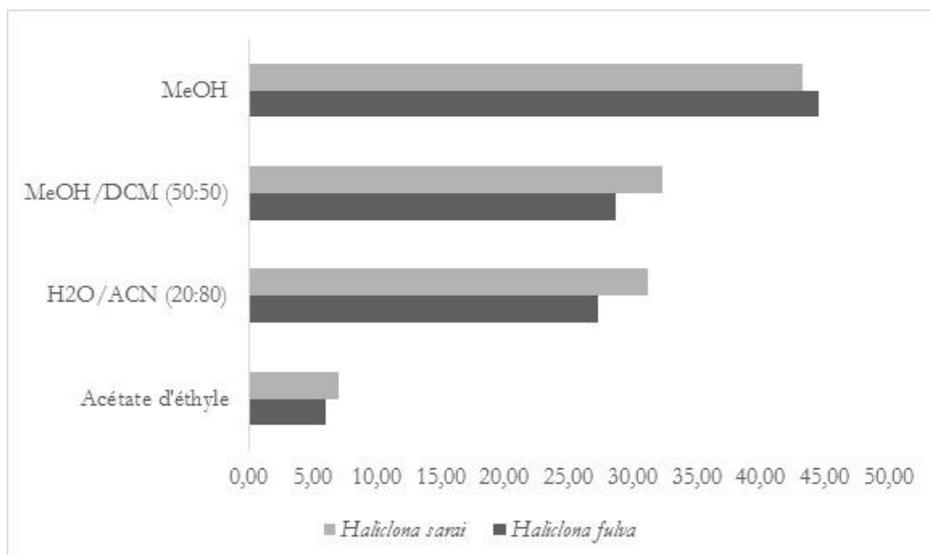


Figure 86 : Histogramme présentant la quantité d'extrait exprimée en pourcentage de masse d'éponge initiale pour *Haliclona fulva* et *Haliclona sarai* selon les quatre solvants testés pour l'extraction (acétate d'éthyle, H₂O/ACN (20 :80), MeOH/DCM (50 :50) et MeOH).

Les premiers résultats obtenus montrent que les pourcentages d'extraction ne varient pas selon l'espèce d'éponge traitée. L'acétate d'éthyle est très peu efficace en termes d'extraction avec une masse d'extrait brut inférieure à 10 % de la masse initiale. Le méthanol présente une capacité d'extraction en masse sèche entre 40 et 45 %, mais l'aspect visuel de l'extrait indique qu'il contient beaucoup de sels marins. Les deux mélanges testés présentent des capacités d'extraction relativement similaires comprises entre 27 et 33 %.

Malgré l'optimisation de la polarité du solvant, des sels sont toujours présents dans l'extrait brut comme le montrent les profils obtenus en UHPLC-DEDL (Figure 87). Des composés très apolaires du métabolisme primaire sont également retrouvés dans cet extrait. En effet, les investigations entreprises pour la description du métabolome de différentes éponges dans le chapitre 1 ont montré à plusieurs reprises que les pics apparaissant à la fin du chromatogramme correspondaient à des acides gras ou des stérols connus dans le métabolisme primaire. Afin de s'affranchir de ces composés non ciblés dans l'analyse du métabolome spécialisé, les extraits ont été repris dans 5 mL de MeOH et placé à 4 °C pendant 24 h afin de jouer sur une plus faible solubilité de ces composés à froid. A cette étape, le choix du solvant s'est porté sur le méthanol car tous les composés ciblés y sont solubles comme l'indiquent les résultats HPLC (Figure 87). L'utilisation de cartouches SPE a été envisagée mais jugée trop chronophage et affectant la reproductibilité. De plus les quantités d'extraits bruts obtenues étaient déjà très faibles et la SPE risquait de faire perdre davantage d'échantillon. Une fois les 24 h écoulées, la solution a été filtrée sur 0,45 µm. Après évaporation du solvant, l'extrait obtenu est repris dans 1 mL de méthanol pour être analysé.

Les différents extraits obtenus ont alors été analysés par UHPLC-DAD-DEDL afin de choisir le solvant le plus adapté à l'extraction de l'ensemble des composés ciblés (Figure 87). Les conditions d'analyse ont été optimisées au préalable à l'aide de standards de fulvynes, de saraines et de panicéines afin de s'assurer que tous les composés étaient détectés par cette méthode.

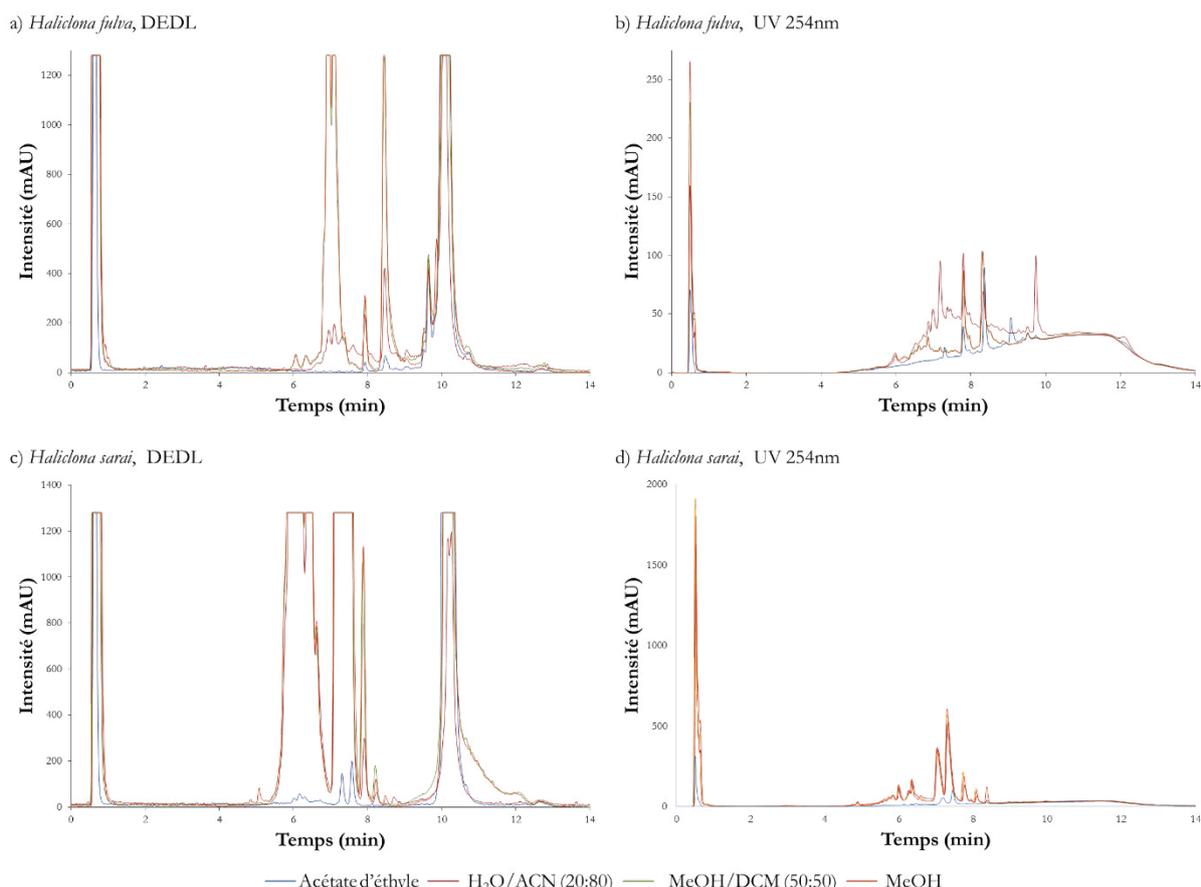


Figure 87 : Chromatogrammes des extraits obtenus pour *Haliclona fulva* (a, en DEDL ; b en UV à 254 nm) et *Haliclona sarai* (a, en DEDL, d en UV à 254 nm) avec les quatre solvants testés : acétate d'éthyle (bleu), H₂O/ACN (20 :80) (rouge), MeOH/DCM (50 :50) (vert) et MeOH (orange). Les analyses ont été réalisées sur une colonne phenyl-hexyl (10 mm×4,6 mm×1,8 μm) selon un gradient standard commençant à (90 H₂O : 10 ACN : 0,01 M formiate d'ammonium : 0,1 % acide formique) jusqu'à (0 H₂O : 100 ACN : 0,01 M formiate d'ammonium : 0,1 % acide formique) entre 2 et 10 minutes, avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 5 μL.

Les résultats obtenus montrent que l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile ne permettant pas d'extraire aussi efficacement les composés que le méthanol ou le mélange MeOH/DCM (50 :50). En effet, les chromatogrammes bleu et rouge obtenus par DEDL montrent des intensités plus faibles que celles obtenues sur les chromatogrammes vert et orange. Dans le cas d'*Haliclona sarai*, ces résultats sont confirmés par les chromatogrammes obtenus par UV à 254 nm. Dans le cas d'*Haliclona fulva* ces résultats ne sont confirmés que pour l'acétate d'éthyle cependant, les autres longueurs d'onde non présentées ici ne montrent pas de différences majeures entre les extractions à l'acétonitrile et celles au méthanol ou au mélange MeOH/DCM (50 :50).

Les extraits obtenus au méthanol ou avec le mélange MeOH/DCM (50 :50) ne montrent pas de différences majeures et le choix du solvant à utiliser s'est porté sur le mélange MeOH/DCM (50 :50) qui permet d'extraire moins de sels que le méthanol seul.

2. Méthodes d'analyse

Une fois l'extrait obtenu, l'analyse métabolomique se poursuit par l'étape analytique permettant l'obtention des données métabolomiques à proprement parler. Deux méthodes d'analyse complémentaires ont été envisagées : l'UHPLC-MS et la RMN dont il a également fallu optimiser les paramètres. Après l'étape de filtration sur $0,45\ \mu\text{m}$, $100\ \mu\text{L}$ de la solution sont prélevés filtrés sur $0,2\ \mu\text{m}$ et ajoutés à $900\ \mu\text{L}$ de MeOH pour être analysés par UHPLC-MS. L'autre partie de la solution est évaporé afin de reprendre la totalité de l'extrait restant dans $1\ \text{mL}$ de CD_3OD pour être analysée par RMN.

a. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les premiers paramètres abordés lors de l'optimisation de cette technique sont ceux de la chromatographie liquide qui avaient déjà été optimisés en couplage avec une détection en UV (Figure 87). L'ensemble des analyses a donc été réalisé sur une colonne Machery-Nagel Nucleodur® Phenyl-hexyl ($10\ \text{mm} \times 4,6\ \text{mm} \times 1,8\ \mu\text{m}$). Deux éluants sont utilisés au cours de ces analyses : l'éluant A contient de l'eau milli-Q additionnée de $0,01\ \text{M}$ de formiate d'ammonium et $0,1\ \%$ d'acide formique et l'éluant B contient de $95\ \%$ d'acétonitrile, $5\ \%$ d'eau milli-Q, $0,1\ \%$ d'acide formique et $0,01\ \text{M}$ de formiate d'ammonium. Le temps d'analyse a été rallongé par rapport aux analyses précédentes afin de séparer au mieux les composés. Finalement le gradient utilisé est celui présenté dans la Figure 88.

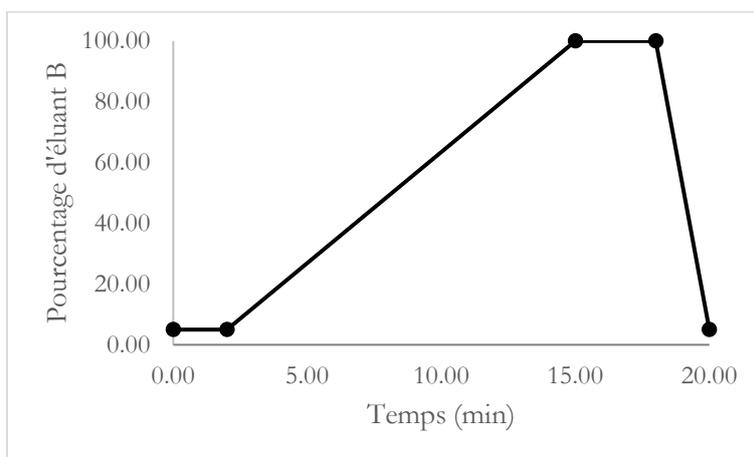


Figure 88 : Evolution du pourcentage d'éluant B utilisé pour l'analyse métabolomique par UHPLC-MS

Concernant l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse Q-TOF, la variété chimique des différents échantillons à analyser rendait l'opération délicate. En effet, les familles de métabolites étudiées ne s'ionisent pas de la même façon et il a donc fallu trouver un compromis afin de détecter un maximum de ces composés sans pour autant que ce soit la méthode de choix pour chacun d'entre eux. Tous les extraits ont été analysés en ionisation positive et négative selon deux séries différentes afin de couvrir de façon la plus large possible l'ensemble du métabolome¹⁰⁸. Par la suite, les données obtenues en mode positif et en mode négatif seront traitées comme deux jeux de données différents. Afin de choisir les paramètres les mieux adaptés, l'optimisation a été réalisée sur des composés représentatifs de la variabilité chimique des

¹⁰⁸ Dunn W. B. et Ellis, D. I., Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005. **24**(4), 285-294.

éponges du genre *Haliclona* et disponibles en standards grâce au travail de purification –chapitre1- : de sarâines, fulvynes et panicéines, Les paramètres retenus sont présentés dans la Figure 89 pour le mode positif et dans la Figure 90 pour le mode négatif. La taille des métabolites secondaires ciblés étant comprises entre m/z égal à 300 et m/z égal à 850, la gamme de masse est choisie de 50 à 1200.

The figure displays three screenshots of the instrument control software interface, showing optimized parameters for positive ion mode analysis.

Top Screenshot: Save Spectra and Line Spectra Calculation

- Save Spectra: Save Line and Profile Spectra, Save Line Spectra Only, Save Profile Spectra Only, Save no Spectra
- Segment Parameter: Mark as Calibration Segment
- Line Spectra Calculation: Active, Use Maximum Intensity
- Absolute Threshold (per 1000 sum.): 5 cts.
- Absolute Threshold: 25 cts.
- Peak Summation Width: 2 pts.
- Ion Polarity: positive
- Scan Mode: MS
- Mass Range: From 50 to 1200 m/z
- Rolling Average: On, 3 x 2.00 Hz
- Buttons: Apply, Both Polarities, All Segments

Middle Screenshot: Source Parameters

- Source: ESI
- End Plate Offset: 500 V
- Capillary: 2500 V
- Nebulizer: 44.0 psi
- Dry Gas: 12.0 l/min
- Dry Temp: 200 °C
- Divert Valve: Valve Head 6 Port, Position Source 1-2, Waste 1-6
- Ion Polarity: positive
- Scan Mode: MS
- Mass Range: From 50 to 1200 m/z
- Rolling Average: On, 3 x 2.00 Hz
- Buttons: Apply, Both Polarities, All Segments

Bottom Screenshot: Transfer and MS/MS Parameters

- Transfer: Stepping, Mode Basic
- Funnel 1 RF: 200.0 Vpp, Funnel 2 RF: 200.0 Vpp
- isCID Energy: 0.0 eV, Hexapole RF: 50.0 Vpp
- Quadrupole Ion Energy: 4.0 eV, Low Mass: 50.00 m/z
- Collision Cell Collision Energy: 4.0 eV, Pre Pulse Storage: 6.0 μs
- Always: Collision RF 200.0 to 700.0 Vpp, Transfer Time 20.0 to 70.0 μs, Timing 50 to 50 %
- MS/MS only: Collision Energy 100 to 100 %, Timing 50 to 50 %
- Ion Polarity: positive
- Scan Mode: MS
- Mass Range: From 50 to 1200 m/z
- Rolling Average: On, 3 x 2.00 Hz
- Buttons: Apply, Both Polarities, All Segments

Figure 89 : Paramètres optimisés pour l'analyse des échantillons par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif

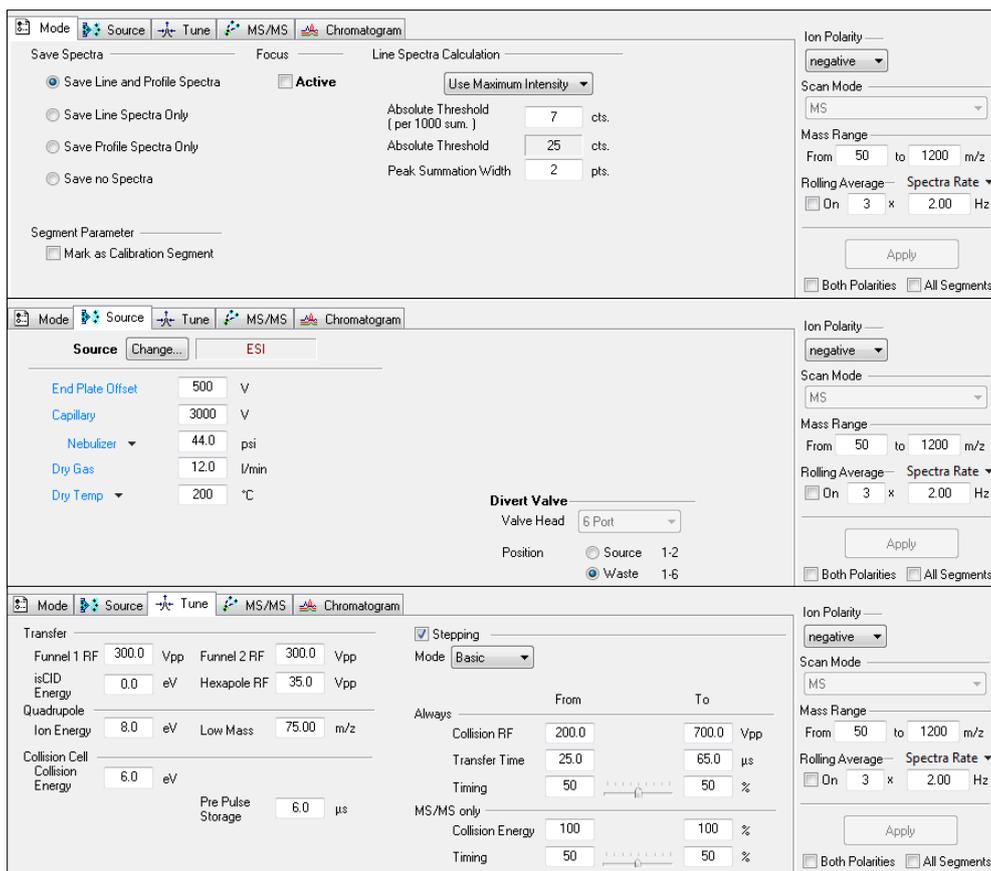


Figure 90 : Paramètres optimisés pour l'analyse des échantillons par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif

Avant chaque série d'analyses, l'instrument a été calibré grâce à la solution de calibration suivante : 50 mL d'un mélange H₂O/isopropanol (50/50) auxquels sont ajoutés 0,5 mL NaOH 1 M, 75 μL acide acétique et 25 μL acide formique.

De façon à s'affranchir des variations de performance analytique de l'instrument au cours de l'analyse des séries, des pools analytiques (Quality Control QC) ont été constitués contenant en proportions égales chacun des échantillons de la série. Ces pools ont été injectés régulièrement au cours de la série de façon à vérifier la reproductibilité des analyses dans le temps. Les échantillons ont été injectés de manière aléatoire au cours de chacune des séries.

b. Résonance magnétique nucléaire

Les analyses RMN du proton ont été réalisées dans le CD₃OD sur la totalité de l'extrait restant après prélèvement d'un échantillon pour l'analyse par UHPLC-MS. Afin de calibrer les spectres par la suite, du TMS a été ajouté comme étalon interne à chaque échantillon à hauteur de 0,1 % (v/v). Les paramètres d'acquisition utilisés sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Paramètres utilisés pour l'analyse des échantillons par RMN

Séquence	Paramètres d'acquisition	
¹ H		
	Mode d'acquisition	DQD
	Angle de basculement	90°
	Nombre de points (TD)	66 K
	Nombre de scans (ns)	80
	Fenêtre spectrale (SW)	30 ppm
	Temps d'acquisition (AQ)	2,2 sec
	Delai de relaxation (D1)	1,0 sec

3. Traitement de données

Le traitement des données obtenus en métabolomique se déroule en deux parties : une première étape de « pré-processing » permettant de transformer les données brutes en matrices exploitables pour la seconde étape de traitement de données biostatistiques. Les étapes de « pré-processing » sont propres à chaque technique d'analyse utilisée.

a. Spectrométrie de masse et XC-MS sous R

Les chromatogrammes obtenus au cours des différentes séries d'analyse ont ensuite été convertis au format .cdf afin de transformer les données brutes obtenues en matrices de données. Cette étape a été réalisée grâce au package « xcms » du logiciel de traitement de données R¹⁰⁹. L'utilisation de cet outil comprend plusieurs étapes :

- Déconvolution des signaux obtenus en fonction de différents paramètres à optimiser : la largeur des pics chromatographiques, la fenêtre de variation d'une masse entre deux scans et l'intensité minimum des pics. L'acquisition des données grâce à un spectre de masse haute résolution permet d'utiliser la méthode « centWave » lors de cette étape.
- Regroupement des pics similaires à travers les différents échantillons en définissant une proportion d'échantillon de chaque sous-groupe devant contenir les pics, la largeur des pics chromatographiques et le nombre minimum d'échantillon devant contenir le pic.
- Réalignement des pics les uns par rapport aux autres en fonction des variations de temps de rétention à travers les échantillons
- Nouvelle étape de regroupement après la correction des temps de rétention pour éviter que certains pics ne soient répartis dans deux groupes différents : les paramètres utilisés précédemment peuvent être modifiés dans le but d'affiner le groupement des pics
- Réintégration du signal pour certaines zones chromatographiques : après la seconde étape de regroupement de pics, il peut manquer des pics pour certains échantillons soit parce qu'ils 'ont pas été détectés dans les étapes précédentes soit parce que le métabolite en question est absent de cet échantillon.

¹⁰⁹ Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R. et Siuzdak G., XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 2006. **78**(3): p. 779-787.

Cette étape permet de réintégrer la zone chromatographique en question afin de déterminer l'absence ou la présence du pic recherché.

- Génération d'une matrice à deux entrées : échantillons et variables de type « m/z , temps de rétention » et pour lesquelles on obtient une intensité.

Dans le cadre des analyses menées sur les éponges du genre *Haliclona*, cette étape a été optimisée de sorte que le nombre de variables ne soit pas trop élevé sans pour autant que les résultats finaux ne soient altérés. Le script utilisé est le suivant :

- `xset0<-xcmsSet(method="centWave", peakwidth=c(5,15), ppm=25, prefilter =c(3,20000))`
- `xset1<-group(xset0,bw=30,minfrac=0.3,minsamp=2)`
- `xset2<-retcor(xset1, method="obiwarp", plottype="deviation", profStep=0.1)`
- `xset3<- group(xset2, bw=10,minfrac=0.5,minsamp=1)`
- `xset4<-fillPeaks(xset3)`
- `reporttab<-diffreport(xset4,"Echantillons","Blancs","Pools",50,metlin=0.15, h=480,w=640)`

Une fois la matrice obtenue, une correction des intensités obtenues pour les échantillons est réalisée en fonction des coefficients de variation calculés sur l'ensemble des pools pour un pic donné ($CV_{\max} = 50$). Ainsi les variations instrumentales apparues au cours de la série d'analyse sont corrigées. Les données obtenues en mode positif et en mode négatif ont par la suite été considérées comme deux jeux de données différents.

b. Résonance Magnétique Nucléaire et extraction de données sous MatLab (travaux réalisés en collaboration avec Roland Molinié et Jean-Xavier Fontaine, EA 3900 BIOPI, Université de Picardie Jules Verne)

De la même façon que pour la spectrométrie de masse, le traitement des données brutes en RMN nécessite différentes étapes. Deux logiciels sont utilisés : Topspin® pour la calibration des spectres et MatLab® pour l'extraction de données.

Sous Topspin® les signaux (FID) sont traités de la façon suivante :

- Transformée de Fourier "automatique": référence à 0 ppm et phase "automatique"
- Calcul "automatique" du signal sur bruit et de la largeur à mi-hauteur de la référence (TMSP) sur l'ensemble des spectres. Cette étape permet d'avoir une idée de la qualité du spectre, le but est d'avoir une largeur à mi-hauteur inférieur à 0,8 Hz et un rapport signal sur bruit le plus important possible.
- Export des spectres sous format ascii

Sous Matlab®, les spectres au format ascii sont importés et traités selon les étapes suivantes :

- Correction des spectres en fonction du RG
- Correction de la ligne de base avec l'algorithme AirPLS¹¹⁰

¹¹⁰ Gan F., Ruan G. et Mo J. Baseline correction by improved iterative polynomial fitting with automatic threshold. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Journal* 2006. **82**, 59–65

- Découpage intelligent des spectres en bin avec l'algorithme DAB: Dynamic Adaptive Binning¹¹¹
- Intégration des signaux en fonction du DAB réalisé précédemment : suppression des zones de l'eau, du méthanol, du TMS ($< 0,6$ ppm) et de la zone > 10 ppm) et suppression des intégrations inférieures à 2 fois le bruit (mesuré entre 0,5-0,3 ppm et 9,5-10 ppm)
- Génération d'une matrice à deux entrées : échantillons et variables de type déplacement chimique en ppm auxquels correspond une intensité.

c. Analyse en Composante Principale, Classification Hiérarchique et Analyse Factorielle Multiple sous R

Une fois les matrices de données obtenues, différentes analyses peuvent être réalisées. Dans le cadre des analyses des différentes espèces d'éponge du genre *Haliclona*, les jeux de données simples étudiés séparément ont été analysés sous R par Analyse en Composante Principale (ACP). Afin de coupler les résultats entre eux (modes positif et négatif en spectrométrie de masse et données de RMN), une Analyse Factorielle Multiple a été mise en place. Cette méthode permet d'associer l'ensemble des données obtenues par des techniques différentes en donnant un poids différent aux variables selon le jeu de données dont elles sont issues. Les résultats sont présentés soit par un cercle des corrélations soit par une classification ascendante hiérarchique (package FactoMineR)¹¹². Ces méthodes permettent dans un premier temps d'obtenir des résultats pour les données obtenues par chacune des techniques séparément et de présenter les résultats de deux manières différentes. Afin d'interpréter et de valider ces résultats, des ellipses de confiance sont représentées sur le cercle des corrélations permettant de vérifier la significativité de la séparation de chacun des groupes avec 95 % de certitude. L'interprétation de ces résultats quant à la corrélation existante ou non entre les variables est réalisée à l'aide de la Table 1.

Table 1 : Quantile à 95 % du pourcentage d'inertie des deux premières dimensions de 10000 ACP obtenues avec des variables indépendantes d'après FactoMineR¹¹³

¹¹¹ Anderson P.E, Mahle G.A., Doom T.E., Reo N.V., DelRaso N.J., Raymer M.L., Dynamic adaptive binning: An improved quantification technique for NMR spectroscopic data. *Metabolomics* 2011. **7**, 179–190.

¹¹² Lê S., Josse J. et Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 2008. **25**

¹¹³ Husson F., Josse J. et Le S., FactoMineR [2016-08-04] ; disponible sur http://www.factominer.free.fr/doc/tutorial_2010_PCA.pdf

Nombre d'individus	Nombre de variables					
	40	50	75	100	150	200
5	66,4	64,7	62,0	60,5	58,5	57,4
10	40,1	38,0	35,0	33,2	31,0	29,8
15	31,1	29,0	26,0	24,3	22,4	21,2
20	26,2	24,3	21,4	19,8	18,0	16,9
25	23,3	21,4	18,6	17,0	15,2	14,2
30	21,1	19,3	16,6	15,1	13,4	12,5
35	19,6	17,8	15,2	13,7	12,1	11,1
40	18,4	16,6	14,1	12,7	11,1	10,2
45	17,4	15,7	13,2	11,8	10,3	9,4
50	16,6	14,9	12,5	11,1	9,6	8,7
100	12,5	11,0	8,9	7,7	6,4	5,7

4. Reproductibilité du processus dans son ensemble

Après optimisation des différentes étapes du processus métabolomique, une série d'analyse a été réalisée afin de valider la reproductibilité du processus dans sa globalité. Pour ce faire, trois individus d'*Haliclona fulva* (HF 1, 2 et 3) et trois individus d'*Haliclona mucosa* (HM 1, 2 et 3) ont été divisés en 4 ou 6 échantillons (A, B, C, D, E, F) chacun afin de vérifier qu'ils étaient bien discriminés les uns par rapport aux autres grâce à la méthode établie.

Dans un premier temps, les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF et par RMN ont été analysées manuellement afin de vérifier la détection des métabolites secondaires déjà connus pour les deux éponges étudiées. Cette première étape a permis de vérifier que les chromatogrammes et les spectres contiennent les informations liées à ces métabolites spécialisés en accord avec les connaissances acquises dans le chapitre 1 de ces travaux.

Les analyses par UHPLC-ESI-Q-TOF ont été réalisées sur l'ensemble des échantillons issus des trois individus de chacune des deux espèces *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa*. L'étude des chromatogrammes et des spectres obtenus de ces échantillons met en évidence différentes informations :

- Pour les deux espèces étudiées, la superposition des chromatogrammes (Base Peak Chromatogram ou BPC) des échantillons issus d'un même individu indique une grande reproductibilité des résultats du point de vue des temps de rétention ainsi que des intensités (Figure 91, Figure 92). Ces chromatogrammes montrent aussi la persistance après extraction et dessalage de composés très polaires élués avant deux minutes. Cependant, tous les autres composés majoritaires sont élués entre 6 et 14 min zone correspondant généralement aux composés issus du métabolisme secondaire. Ce résultat permet de valider la méthode d'extraction utilisée car bien que certains composés non désirés soient encore présents, ils n'empêchent pas l'analyse des métabolites ciblés dans cette étude c'est-à-dire le métabolome secondaire.

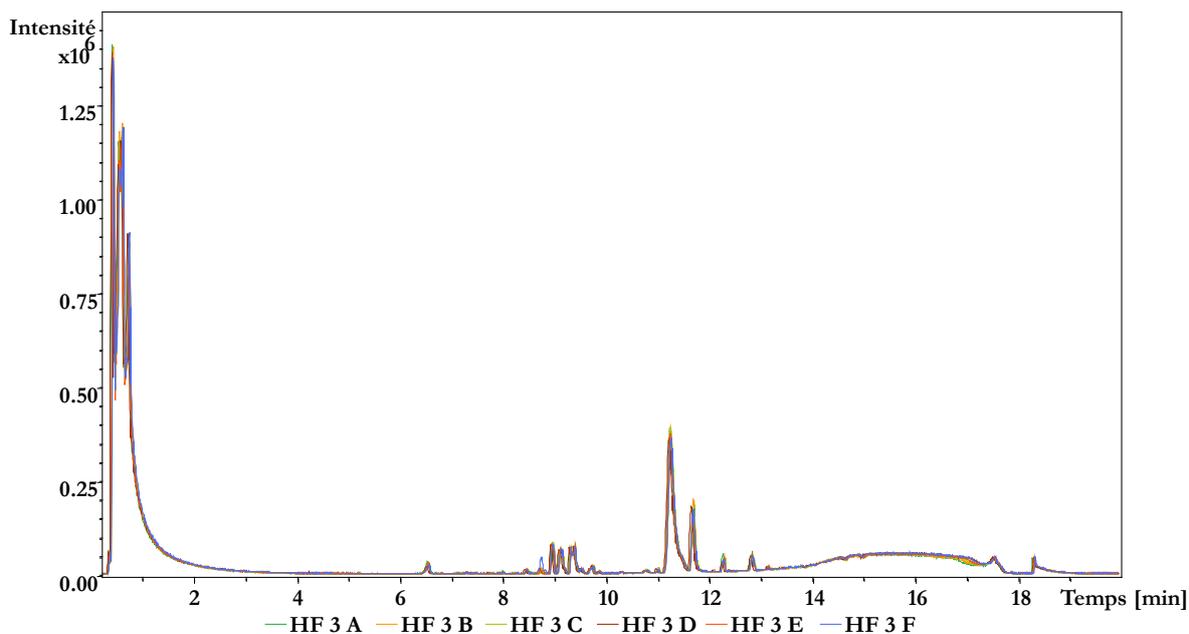


Figure 91 : Superposition des chromatogrammes (BPC) obtenus de l'analyse par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif des six échantillons de l'individu 3 de l'espèce *Haliclona fulva*.

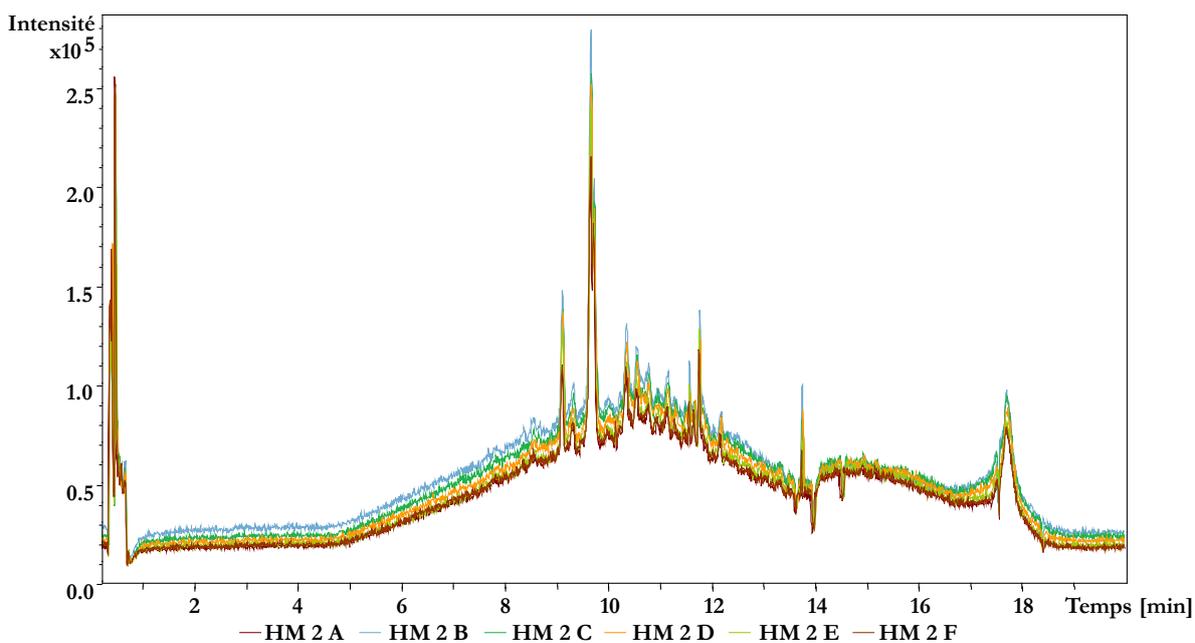


Figure 92 : Superposition des chromatogrammes (BPC) obtenus de l'analyse par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif des six échantillons de l'individu 2 de l'espèce *Haliclona mucosa*.

- Pour l'espèce *Haliclona fulva*, ces analyses n'ont pas permis de vérifier formellement la détection des composés décrits dans le chapitre 1. En effet, en extrayant les chromatogrammes correspondant aux masses connues des fulvynes C (27) et E (29) et de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque (36) à partir de chromatogrammes de type BPC, les résultats ne sont pas concluants probablement à cause de l'éluion simultanées de plusieurs composés proches ce qui rend la lecture des spectres difficiles. Cependant, plusieurs massifs isotopiques caractéristiques des molécules bromées ont été retrouvés dans ces analyses permettant de confirmer la présence de métabolites de type réniérines.

• Pour l'espèce *Haliclona mucosa*, ces premières analyses ont permis de valider la détection des panicéines A hydroquinone (**20**), B₂ (**21**), B₃ (**22**) et C (**23**) de masses respectives : m/z 339, m/z 337, m/z 339 et m/z 355 (Figure 93). L'extraction des chromatogrammes correspondant aux masses connues de ces composés a permis de retrouver les spectres exacts correspondant à ces composés comme dans l'exemple de la panicéine C (**23**) (Figure 94).

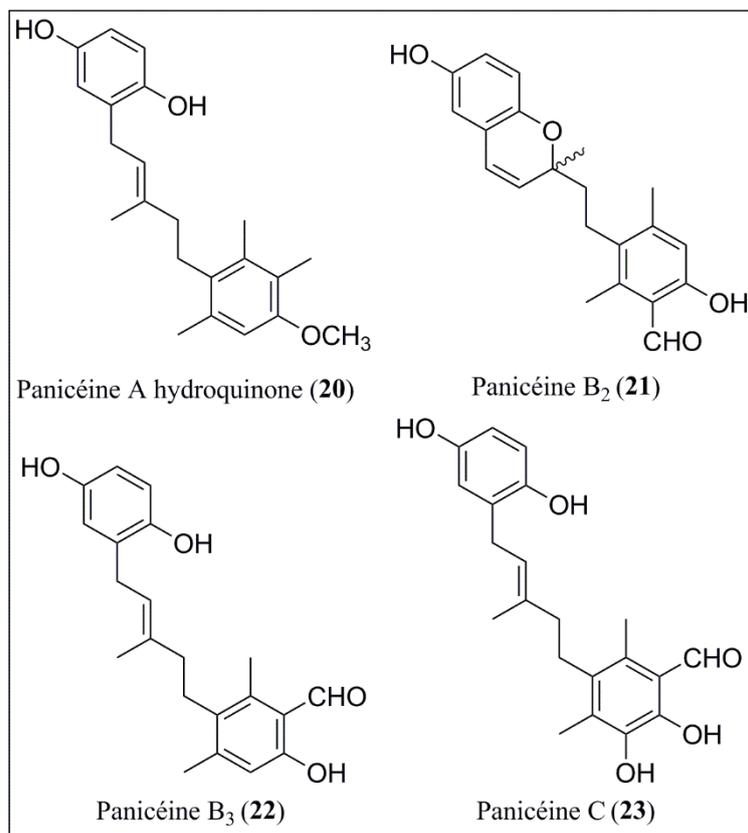


Figure 93 : Structures des panicéines identifiées dans les extraits de l'éponge *Haliclona (Soestella) mucosa* obtenus par le procédé d'extraction mis au point en vue d'une étude métabolomique

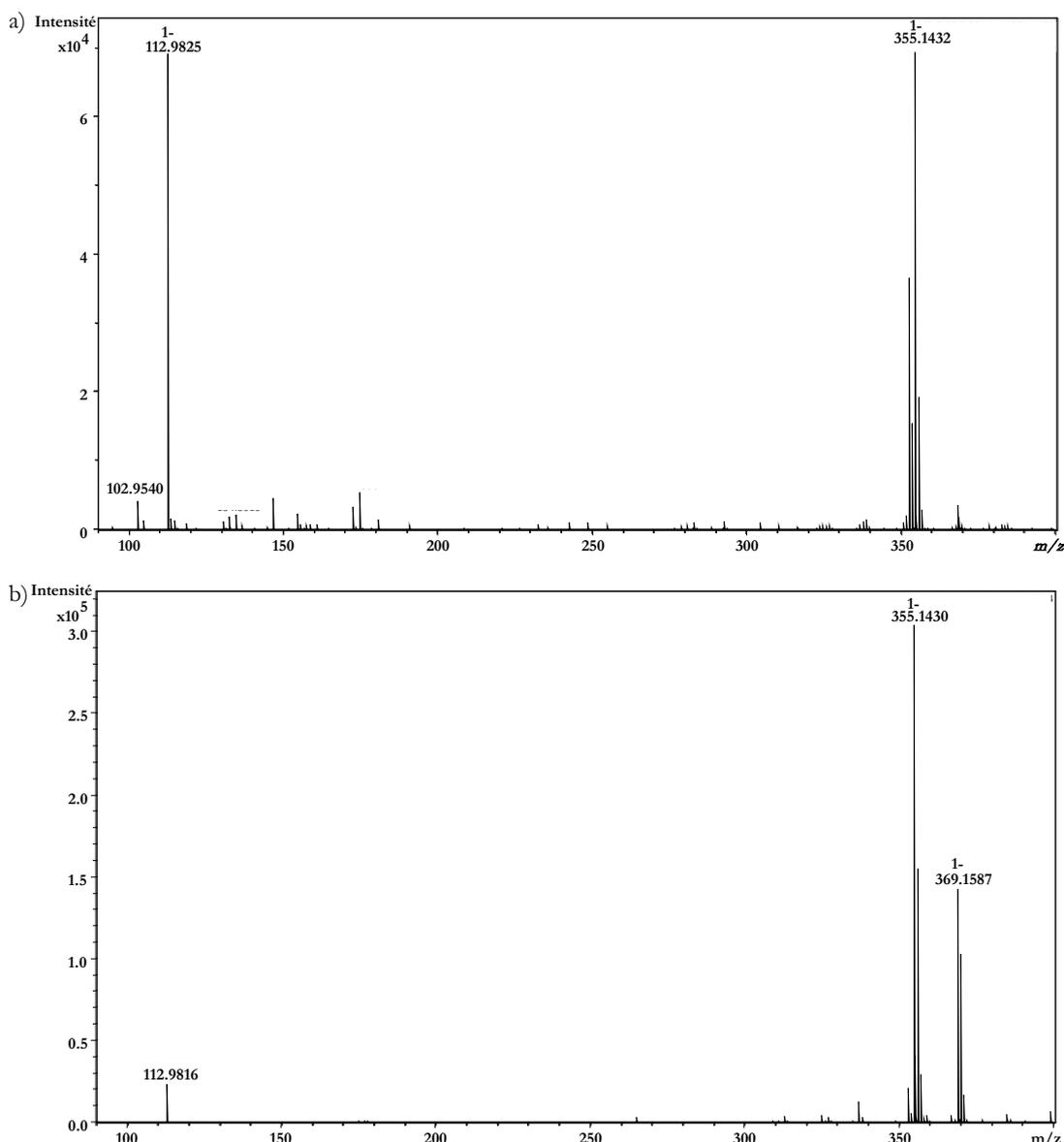


Figure 94 : Spectres de masse de la panicéine C (27) issus de l'analyse par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif de l'extrait d'*Haliclona mucosa* (a) et du standard de panicéine C (27) isolé dans le chapitre 1 (b).

Les analyses RMN ¹H ont été réalisées sur les 6 échantillons issus de l'individu 2 de l'espèce *Haliclona fulva* (Figure 96, Figure 97) et sur les échantillons issus de l'individu 3 de l'espèce *Haliclona mucosa* (Figure 99, Figure 100). Ces données permettent de montrer la reproductibilité du processus d'extraction et d'analyse par RMN d'un point de vue qualitatif pour les deux espèces travaillées.

En ce qui concerne l'espèce *Haliclona fulva*, les intensités des pics de l'échantillon 1 sont plus importantes que celles des autres échantillons (facteur 3), cependant tous les pics sont présents d'un échantillon à l'autre ce qui permet de valider la reproductibilité d'un point de vue qualitatif. Ces analyses permettent également de vérifier la détection des composés décrits dans le chapitre 1 de ces travaux de thèse. En effet, les doublets de doublet caractéristiques des fulvynes sont identifiés entre 6 et 5,4 ppm (position 43 et 44) ainsi que les singulets à 4,8 ppm (position 34) et les doublets à 4,6 ppm (position 3) (Figure 95). Les signaux

caractéristiques des réniérines sont nettement moins clairement identifiables car leur intensité est faible en comparaison des autres signaux.

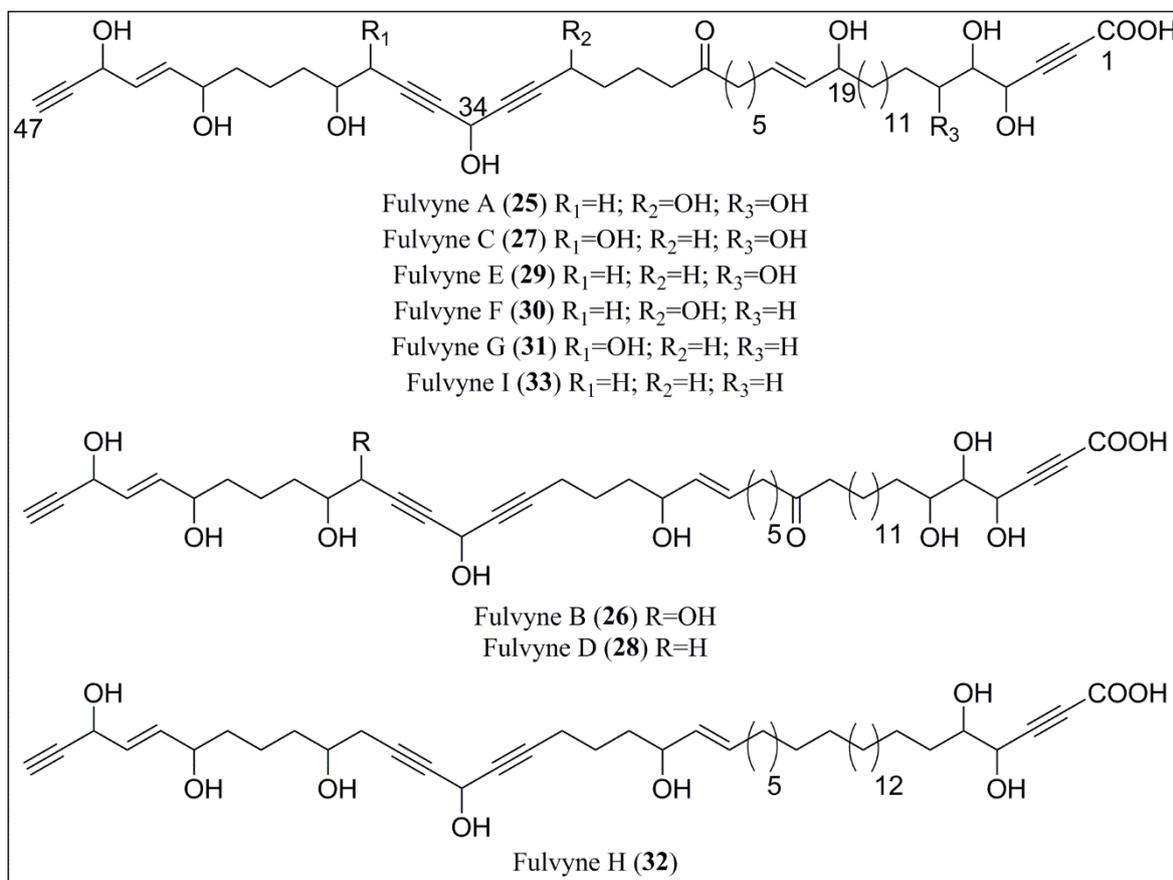


Figure 95 : Structure des fulvynes décrites à partir de *Haliclona (Halichoclona) fulva*

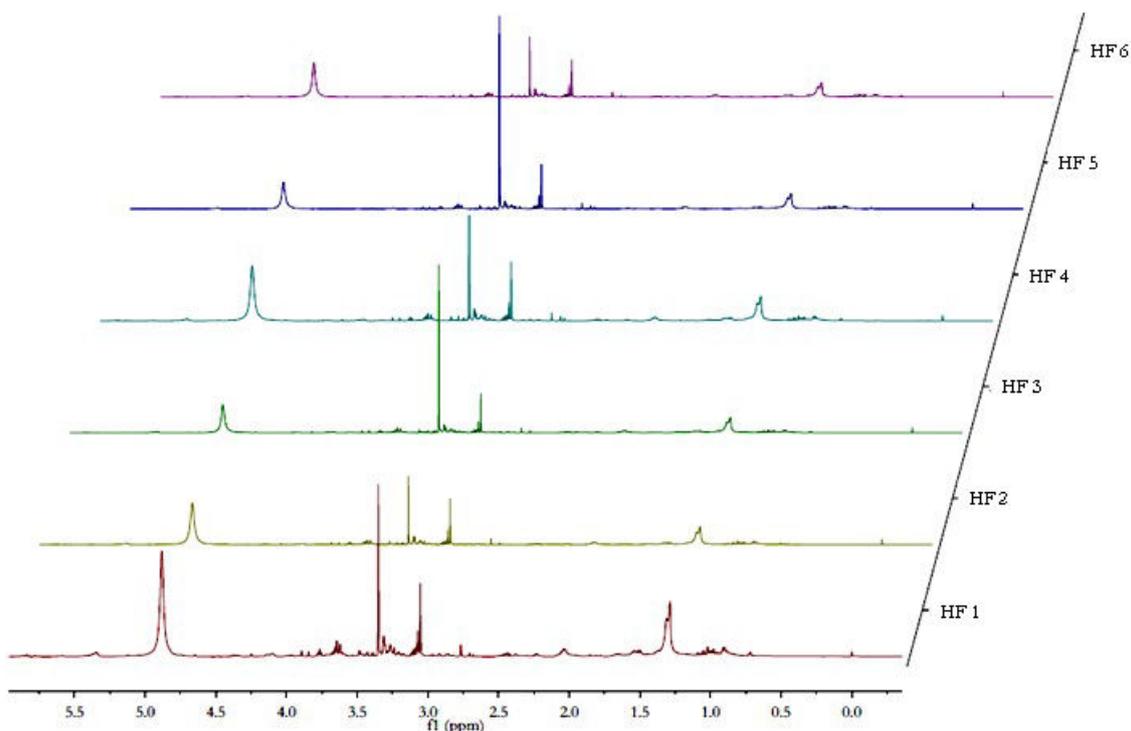


Figure 96 : Agrandissement des spectres RMN ^1H entre 6,0 ppm et -0,2 ppm des extraits des 6 échantillons issus de l'individu 2 de l'espèce *Haliclona fulva*. Les intensités des pics sont normalisées par rapport au pic du TMS à 0 ppm.

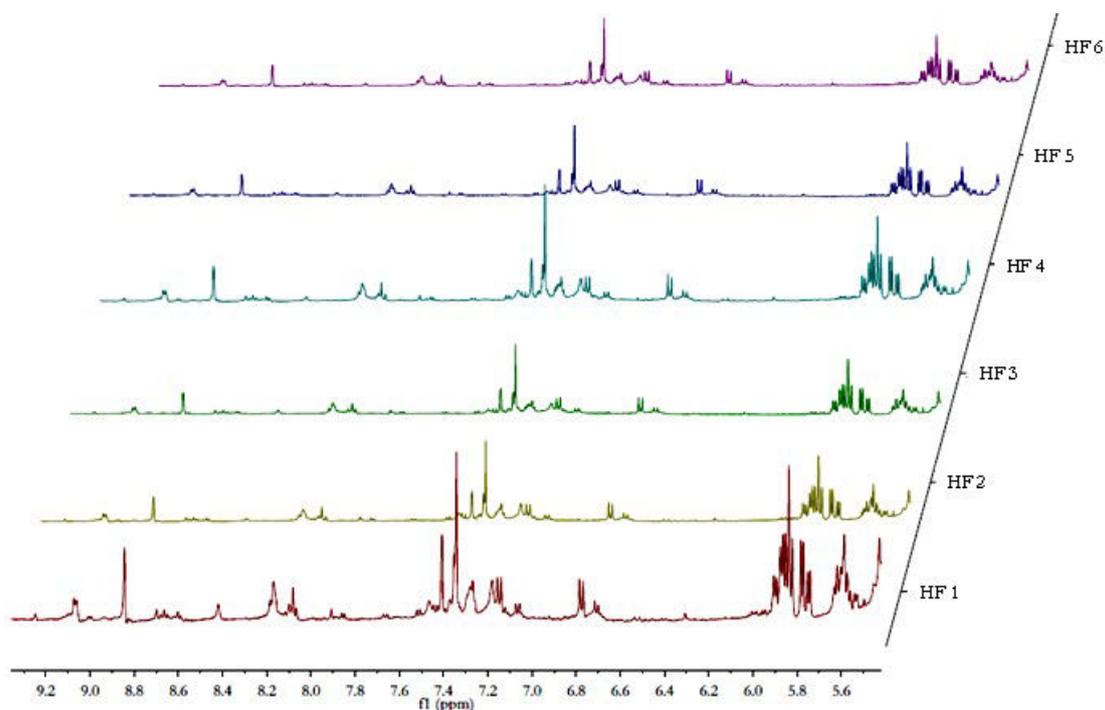


Figure 97 : Agrandissement des spectres RMN ^1H entre 9,4 ppm et 5,4 ppm des extraits des 6 échantillons issus de l'individu 2 de l'espèce *Haliclona fulva*. Les intensités des pics sont normalisées par rapport au pic du TMS à 0 ppm.

Les spectres RMN ^1H des extraits obtenus de l'individu 3 d'*Haliclona mucosa* montrent une bonne reproductibilité analytique tant d'un point de vue qualitatif que d'un point de vue quantitatif. A nouveau, les pics caractéristiques des panicéines décrites dans le premier chapitre de ces travaux sont identifiables : les

doublets de doublet entre 6,7 et 6,4 ppm (positions 3', 4' et 5'), les singulets à 6,60 ppm (position 4) et les singulets à 10,3 ppm (position 15) (Figure 98).

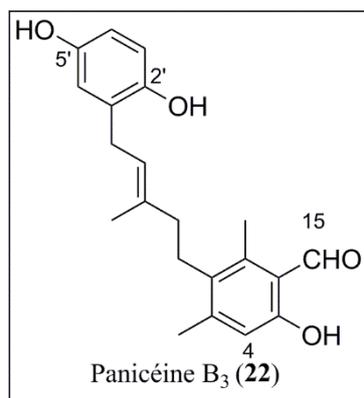


Figure 98 : Exemple de la panicéine B₃ (24) dont les signaux sont mis en évidence dans l'extrait d'*Haliclona* (*Soestella*) *mucosa* analysé par métabolomique.

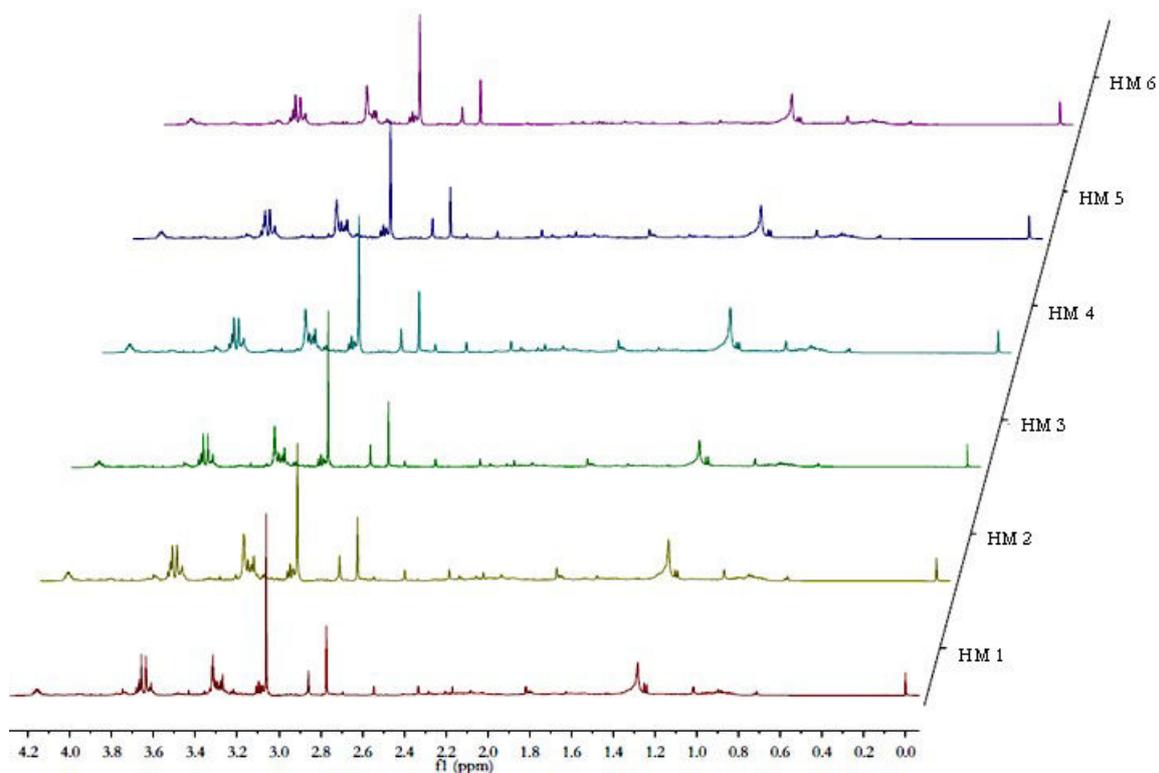


Figure 99 : Agrandissement des spectres RMN ¹H entre 4,2 ppm et 0,0 ppm des extraits des 6 échantillons issus de l'individu 3 de l'espèce *Haliclona mucosa*. Les intensités des pics sont normalisées par rapport au pic du TMS à 0 ppm.

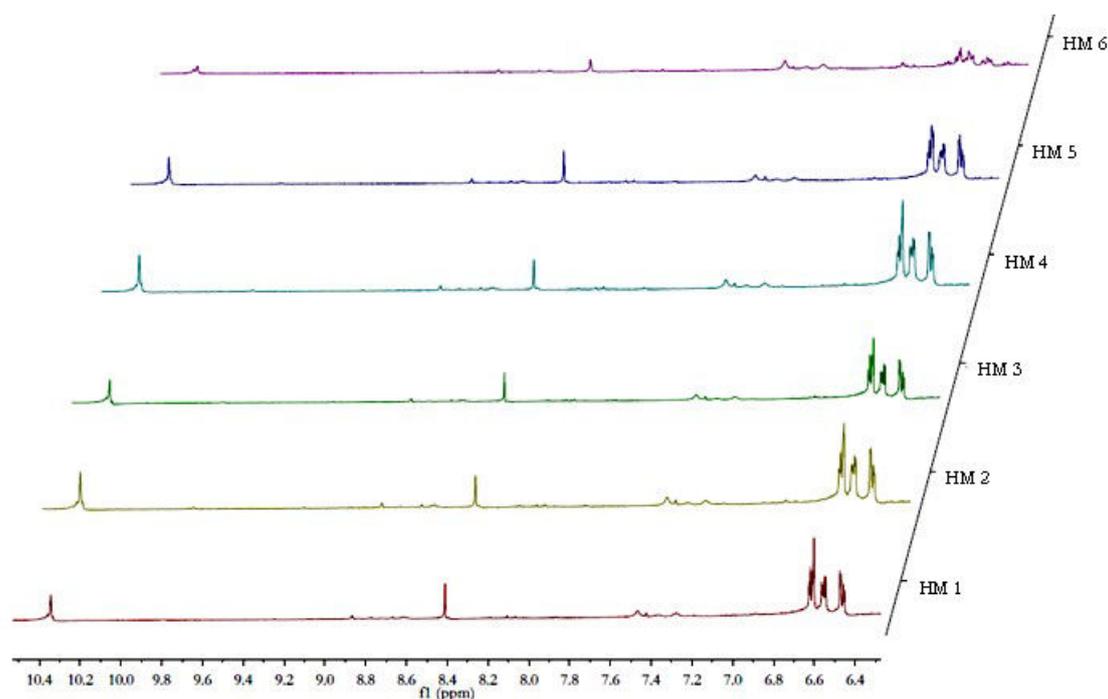


Figure 100 : Agrandissement des spectres RMN ^1H entre 10,4 ppm et 6,4 ppm des extraits des 6 échantillons issus de l'individu 3 de l'espèce *Haliclona mucosa*. Les intensités des pics sont normalisées par rapport au pic du TMS à 0 ppm.

Une ACP a ensuite été réalisée pour chaque espèce à partir des données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif et en mode négatif.

La validité du processus de traitement des données par XMCS est validé par le bon alignement des QC au sein de l'ACP (centrés) pour les deux espèces étudiées *Haliclona fulva* ou pour *Haliclona mucosa*. Dans un souci de lisibilité des figures, les pools ont été retirés des plots ACP. Les ellipses de confiance représentées sur chacun des graphiques permettent de vérifier la significativité de la séparation de chacun des groupes avec 95 % de certitude.

Haliclona fulva. Les cercles des corrélations obtenu à partir des ACP réalisées sur les échantillons des trois individus d'*Haliclona fulva* montrent que les échantillons de chacun des individus sont bien regroupés entre eux et que les groupes d'échantillons sont bien séparés les uns des autres (modes positif et négatif) (Figure 101, Figure 102). En mode positif, ces résultats sont expliqués à 49,45 % par les deux premières dimensions ; compte-tenu du nombre d'échantillons étudiés (16) et du nombre de variables utilisées (102), ce pourcentage d'inertie supérieur à 24,3 % (Table 1) indique que plusieurs variables sont corrélées entre elles que ce soit de manière positive ou négative et que celles-ci permettent bien de discriminer les échantillons entre eux. De la même manière, en mode négatif, les résultats sont expliqués à 49,34 % par les deux premières dimensions ; ce résultat supérieur à 24,3 % (pour 16 échantillons et 133 variables, Table 1) valide à nouveau la cohésion des variables entre elles et la cohérence des résultats.

Haliclona fulva: Validation de méthode,
ACP issue des données obtenues en mode positif

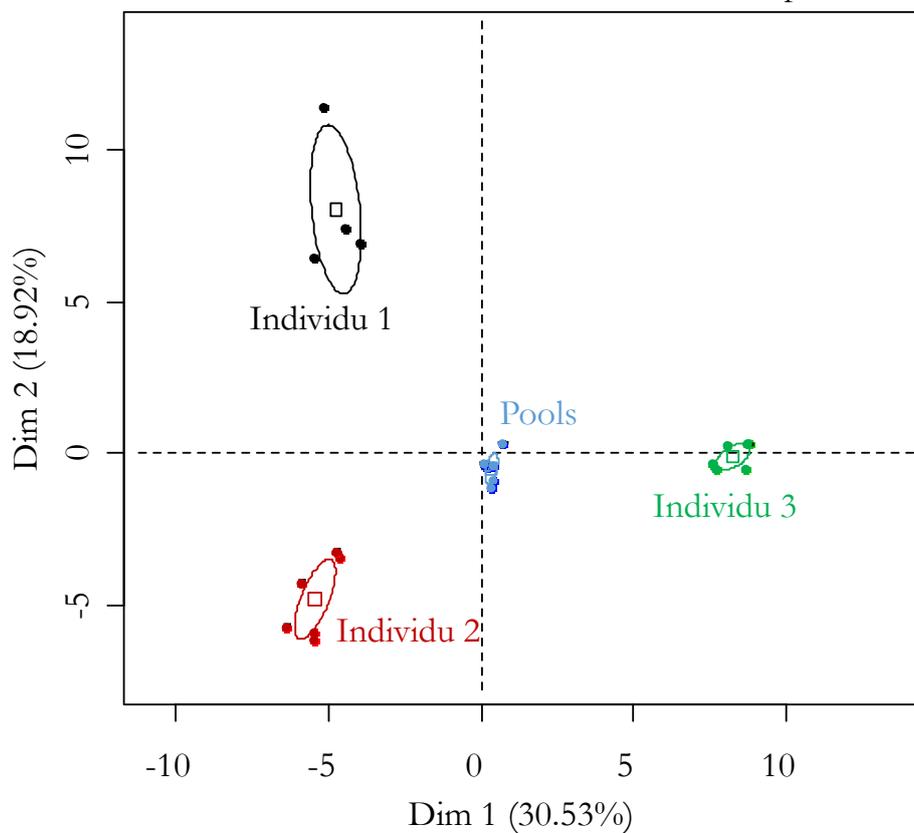


Figure 101 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'ACP réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona fulva* afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Haliclona fulva: Validation de méthode,
ACP issue des données obtenues en mode négatif

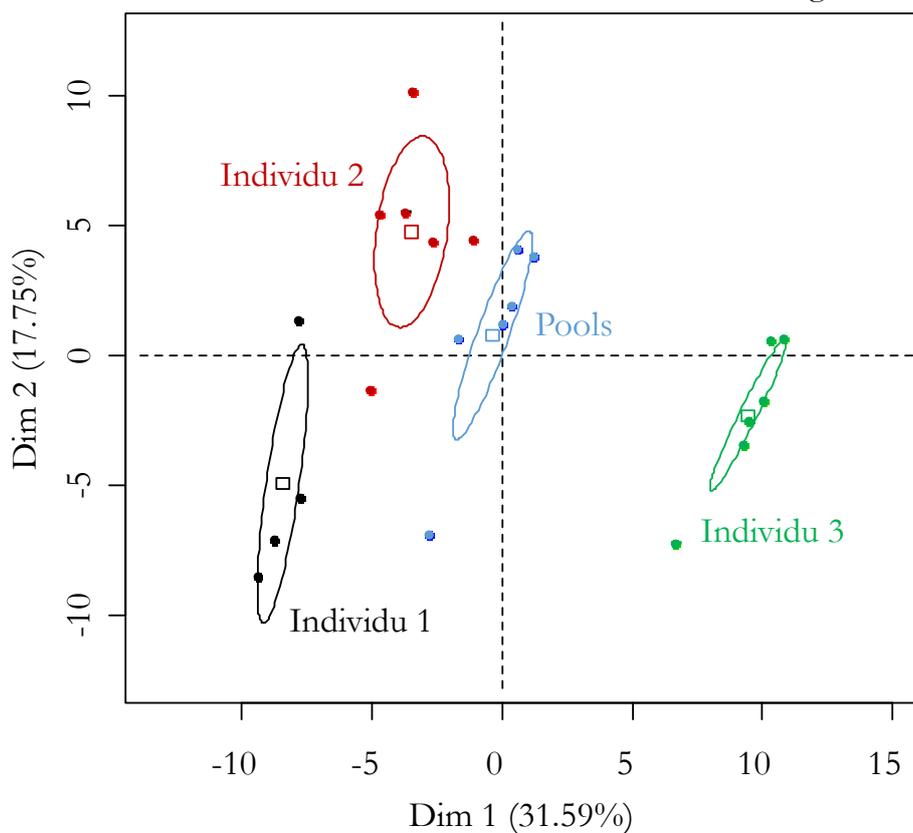


Figure 102 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'ACP réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona fulva* afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Mode positif vs mode négatif. Si les résultats obtenus en mode positif et en mode négatif, montrent que la méthode utilisée permet bien de séparer les groupes d'échantillons, la comparaison de ces résultats entre eux indique que les deux modes ne séparent pas ces échantillons de la même façon. En effet, la position des groupes d'échantillons sur les axes représentés par les deux premières dimensions n'est pas la même selon le mode utilisé indiquant que les variables permettant la discrimination des échantillons ne sont pas les mêmes. En effet, le mode positif permet l'ionisation et donc la détection des composés capables de capter un proton ou un groupement chimique chargé positivement alors que le mode négatif permet la détection des composés pouvant perdre un proton¹⁰⁸. Les familles chimiques de composés ciblés par chacun de ces deux modes sont alors différentes et leurs analyses dans le cadre d'une étude métabolomique non ciblée sont complémentaires. Afin de coupler ces données et de donner le même poids à toutes les informations une AFM (Analyse Factorielle Multiple) est réalisée sur les deux jeux de données. Les résultats obtenus sont à nouveau présentés sous la forme d'un cercle des corrélations à deux dimensions (Figure 103).

Haliclona fulva. Validation de méthode, AFM issue des données obtenues en mode négatif et en mode positif

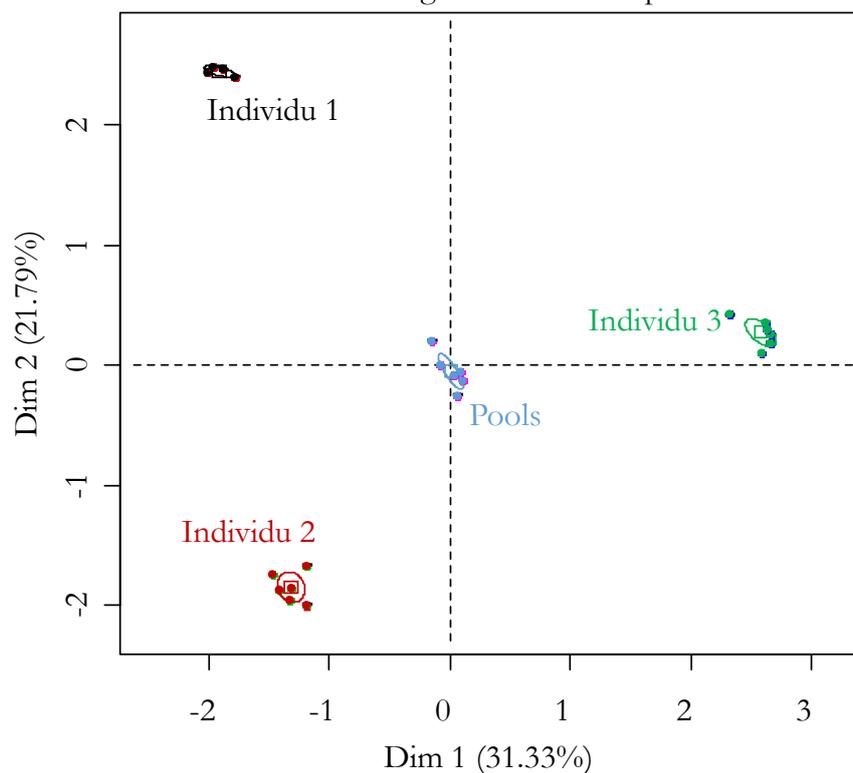


Figure 103 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona fulva* afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

L'analyse factorielle multiple réalisée sur les échantillons d'*Haliclona fulva* à partir des données obtenues en spectrométrie de masse permet à nouveau une très bonne discrimination des échantillons. En effet, les trois individus d'*Haliclona fulva* sont bien séparés et chaque groupe est moins étendu que dans les ACP présentées auparavant pour chacun des modes. De plus, cette séparation des groupes est expliquée à 53,12 % par les deux premières dimensions ce qui indique une bonne corrélation des variables discriminantes entre elles. Cette méthode permet d'obtenir de meilleurs résultats que les ACP réalisées précédemment grâce à l'association de données complémentaires.

Haliclona mucosa. De la même manière que pour *Haliclona fulva*, les cercles des corrélations obtenus à partir des ACP réalisées sur les échantillons des trois individus d'*Haliclona mucosa* montrent que les échantillons de chacun des individus sont bien regroupés entre eux et que les groupes d'échantillons sont bien séparés les uns des autres (Figure 104, Figure 105). Les résultats obtenus en mode positif pour 16 échantillons et 119 variables sont expliqués à 56,72 % par les deux premières dimensions et les résultats obtenus en mode négatif pour 16 échantillons et 127 variables sont expliqués à 56,63 % par les deux premières dimensions. Ces résultats indiquent que dans les deux modes étudiés il existe une corrélation importante entre les variables discriminantes.

Haliclona mucosa: Validation de méthode,
ACP issue des données obtenues en mode positif

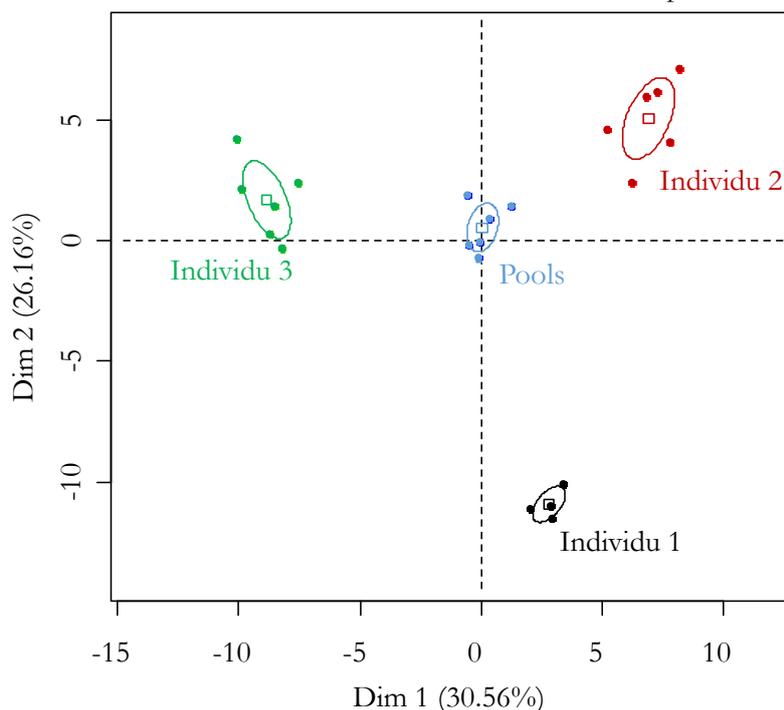


Figure 104 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'ACP réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona mucosa* afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Haliclona mucosa: Validation de méthode,
ACP issue des données obtenues en mode négatif

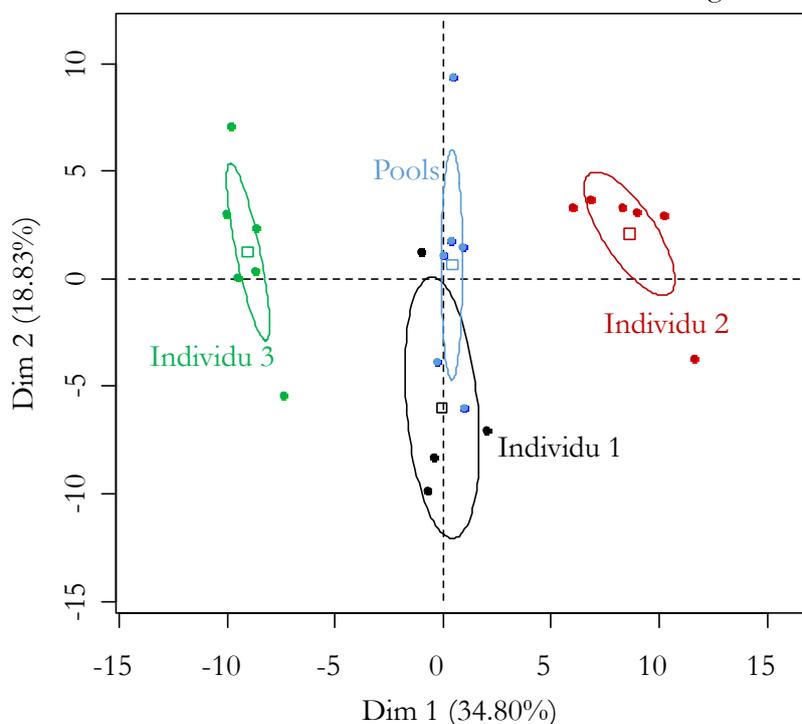


Figure 105 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'ACP réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode négatif sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona*

mucosa afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

De la même manière que pour *Haliclona fulva*, une AFM a été réalisée sur les échantillons issus de trois individus d'*Haliclona mucosa* afin de corrélérer les résultats obtenus par spectrométrie de masse (Figure 106). A nouveau, cette méthode permet une bonne séparation des groupes d'échantillons expliquée à 56,33 % par les deux premières dimensions. L'étendue de chacun des groupes est aussi plus faible que dans les ACP simples présentées précédemment.

Haliclona mucosa: Validation de méthode, AFM issue des données obtenues en mode négatif et en mode positif

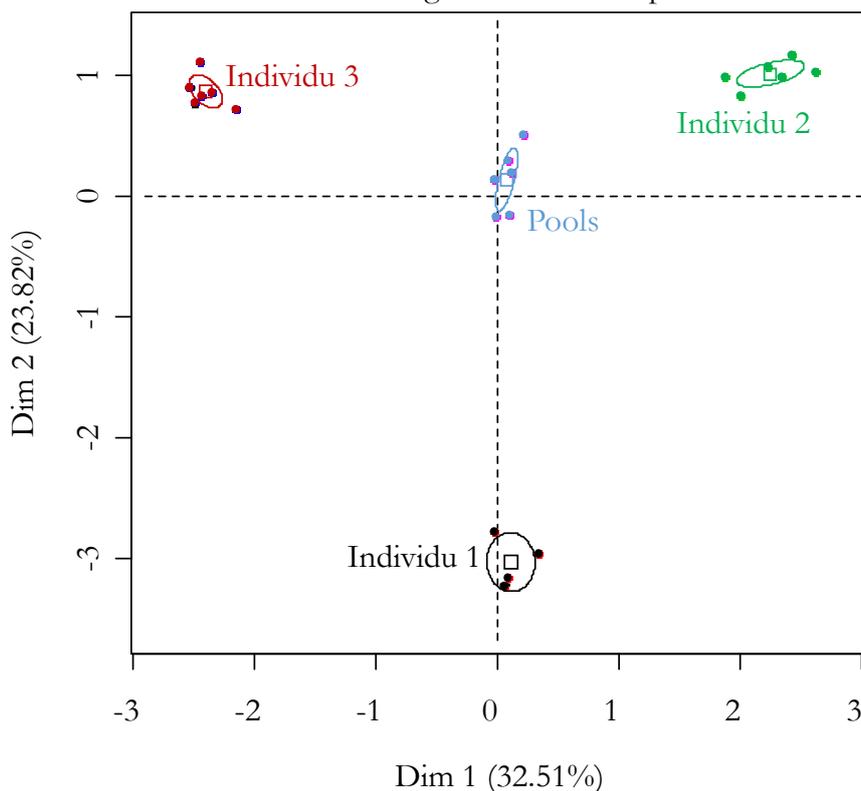


Figure 106 : Agrandissement du cercle des corrélations conçu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF sur les échantillons issus des trois individus d'*Haliclona mucosa* afin de valider le processus métabolomique mis au point. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Validation de méthode et AFM. Les résultats de cette première étape présentée ci-dessus permettent de montrer la robustesse de l'étude métabolomique établie puisque d'un point de vue analytique, les résultats montrent une bonne reproductibilité des profils chromatographiques et des spectres obtenus pour un même individu dont six échantillons ont été extraits puis analysés indépendamment les uns des autres. En outre, les résultats d'ACP obtenus à partir de ces données analytiques montrent la capacité de cette méthode à séparer plusieurs individus d'une même espèce de spongiaire et donc à détecter des différences assez fines au niveau du métabolome de ces individus. Les analyses multifactorielles sont très intéressantes afin de coupler les données et c'est ainsi que les résultats qui suivront seront présentés. La validation de ce procédé permet alors d'envisager la comparaison de différentes espèces par une étude phylométabolomique. Au

préalable, la variabilité du métabolisme secondaire des deux espèces en lien avec leur environnement a été étudiée afin d'évaluer l'éventuel impact des saisons et de la distribution géographique sur les aspects qualitatifs et quantitatifs de ce métabolisme.

C. Etudes métabolomiques spatio-temporelles d'éponges *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa*

L'étude phylométabolomique envisagée sur les 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona* prélevées en mer Méditerranée et en océan Atlantique nord-est sous-entend des périodes et lieux de collecte variés. Ces conditions environnementales divergentes peuvent induire un biais dans l'interprétation des données métabolomiques du fait de l'influence des conditions environnementales sur le métabolisme secondaire des éponges¹¹⁴. Récemment plusieurs études réalisées par une approche métabolomique sur des organismes marins ont montré l'impact important des variations environnementales sur les profils métaboliques obtenus. Une étude menée sur des dinoflagellés du genre *Symbiodinium*¹¹⁵ par GC-MS a mis en évidence l'impact des variations de température et d'intensité lumineuses sur le contenu en sucres et en acides gras des organismes étudiés. Une seconde étude portée sur une espèce de corail, *Pocillopora damicornis*¹¹⁶, afin d'étudier l'impact du changement climatique par une approche métabolomique non-ciblée a montré des variations importantes du métabolisme primaire lors de l'exposition de ces organismes à des conditions de stress. Afin de s'affranchir de ce biais potentiel, des études métabolomiques spatio-temporelles ont été réalisées sur des éponges *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa* afin de vérifier que la variabilité intra-spécifique au cours du temps et selon la localisation était bien inférieure à la variabilité inter-spécifique.

1. Etudes temporelles

Afin d'évaluer les variations métaboliques avec les saisons, une étude temporelle a été réalisée sur *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa*. Pour chacune des deux espèces choisies, six individus ont été prélevés chaque mois pendant un an d'avril 2014 à mars 2015 dans la rade de Villefranche. Le protocole décrit précédemment a alors été appliqué à l'ensemble de ces échantillons. Les AFM sont représentées sous forme d'un cercle des corrélations (Figure 107, Figure 108). Les résultats obtenus sont expliqués par les deux premières dimensions à 18,99 % pour *Haliclona fulva* et à 21,50 % pour *Haliclona mucosa*. Chaque jeu de données comportant 72 échantillons et respectivement 216 et 226 variables, ces pourcentages sont révélateurs d'une forte corrélation entre les variables des échantillons (supérieur à 8,7 %, Table 1).

¹¹⁴ Becerro M.A. et Paul V.J., Effects of depth and light on secondary metabolites and cyanobacterial symbionts of the sponge *Dysidea granulosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 2004. **280**: p.115-128.

¹¹⁵ Klueter A., Crandall J.B., Archer F.I., Teece M.A. et Coffroth M.A., Taxonomic and environmental variation of metabolite profiles in marine dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*. *Metabolites*, 2015. **5**(1): p.74-99.

¹¹⁶ Sogin E.M., Putnam H.M., Anderson P.E. et Gates R.D., Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. *Metabolomics*, 2016. **12**(4), p.1-12.

Haliclona fulva: Etude temporelle

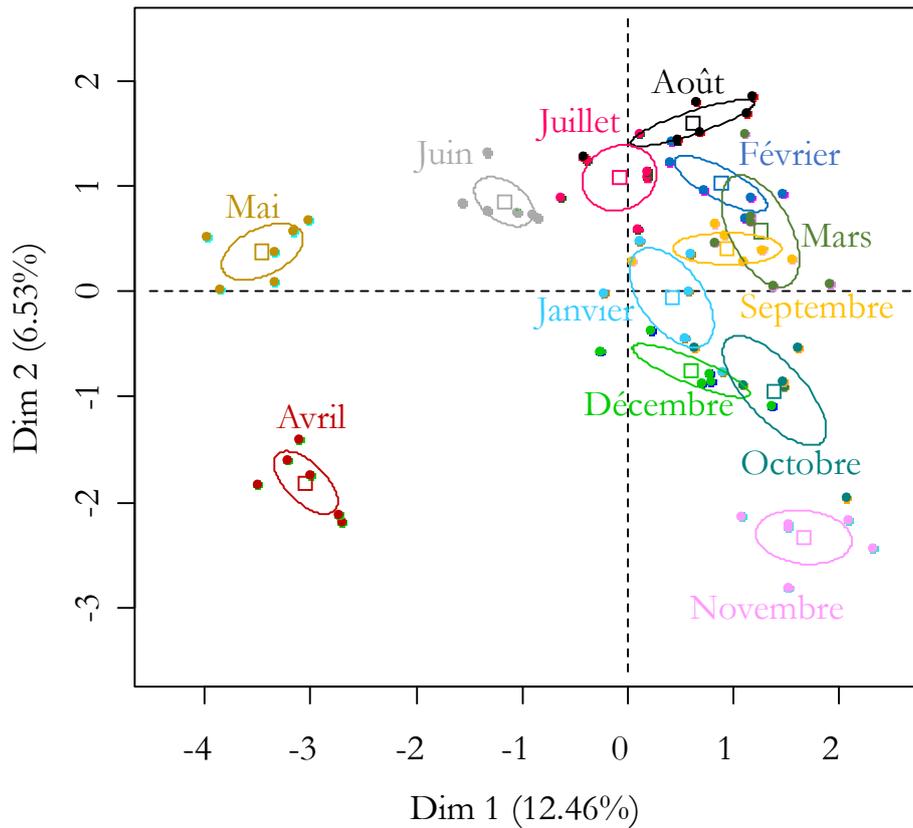


Figure 107 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons d'*Haliclona fulva* prélevés mensuellement pendant un an. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiances à 95 %.

Dans le cas de l'éponge *Haliclona fulva*, les différents mois de l'année sont relativement bien séparés les uns des autres laissant apparaître un « cycle » annuel. En effet, les mois d'avril et mai sont nettement séparés des autres mois et également l'un de l'autre sur la gauche du cercle. Les mois de juin, juillet et août se suivent ensuite en montant vers la droite de la représentation, puis les mois de septembre, octobre et novembre se suivent à nouveau en descendant vers le bas de la figure. Les mois d'hiver, décembre, janvier, février et mars reviennent alors au niveau du mois de septembre.

Haliclona mucosa: Etude temporelle

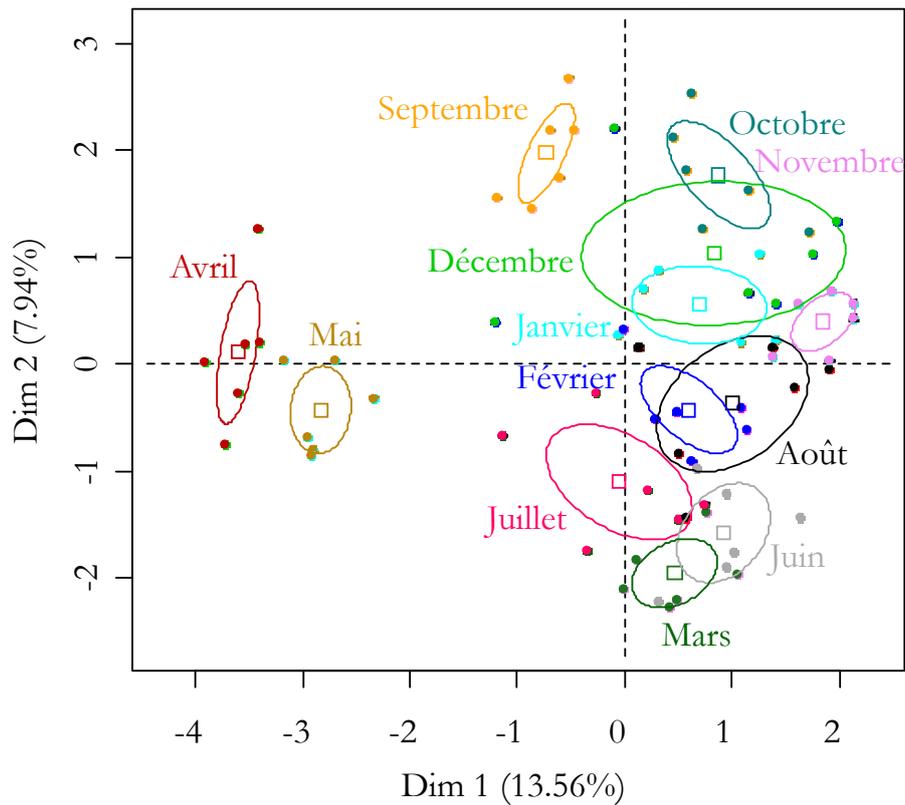


Figure 108 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons d'*Haliclona mucosa* prélevés mensuellement pendant un an. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiances à 95 %.

Dans le cas de l'éponge *Haliclona mucosa*, si les différents mois de l'année sont également relativement bien séparés, il est beaucoup plus difficile de laisser apparaître un « cycle » annuel. Cependant, comme pour *Haliclona fulva*, les mois d'avril et mai sont très bien séparés des autres mois et également l'un de l'autre.

Métabolisme des spongiaires et bloom phytoplanctonique. Les données exploitées montrent que pour les deux éponges étudiées les différents mois de l'année sont assez bien séparés ce qui peut s'expliquer par les variations environnementales de type température, luminosité, nutriments...etc. Les groupes d'échantillons prélevés en avril et en en mai sont proches l'un de l'autre et clairement distincts des échantillons prélevés à d'autres périodes. Les variables permettant la discrimination des échantillons des mois d'avril et mai sont en cours d'identification, cependant il est déjà établi qu'elles sont différentes pour les deux espèces ce qui permet d'affirmer que les variations métaboliques observées sont bien dues au métabolisme de l'éponge et non à un organisme environnant ou au milieu environnant. Le fait que le phénomène observé se reproduise de la même manière sur deux espèces d'éponge différentes et prélevées au même endroit implique qu'il peut être expliqué par des modifications métaboliques dues aux conditions environnementales. De plus, les mêmes observations ont été réalisées sur des échantillons de l'éponge *Crambe crambe* prélevés au même endroit lors de travaux réalisés au sein du laboratoire par Eva Ternon. Les études portées sur les modifications annuelles phytoplanctoniques en Méditerranée montrent une

augmentation de la chlorophylle a totale corrélée à d'autres pigments caractéristiques des diatomées, dinoflagellées, chrysophytes et prymnesiophytes en mars et en avril pendant la période du bloom phytoplanctonique¹¹⁷. Bien que l'origine des ressources nutritives des éponges ne soit pas clairement établie, il semble que le carbone organique dissout et les organismes bactériens et picoplanctoniques représentent la majeure partie de leur alimentation. Les modifications environnementales impliquées par les variations saisonnières du phytoplancton jouent probablement un rôle important au niveau du métabolisme primaire et par conséquent au niveau du métabolisme spécialisé des spongiaires. Ce phénomène explique la discrimination des échantillons des mois d'avril et mai par rapport aux autres mois de l'année tant pour *Haliclona fulva* que pour *Haliclona mucosa*.

Cycle biologique. Le phénomène observé pour les mois d'avril et mai peut aussi être expliqué par le cycle biologique des éponges et les périodes de reproduction. En effet, le métabolisme est fortement remanié pendant ces périodes et l'allocation des ressources s'en trouve modifié souvent au détriment du métabolisme secondaire¹¹⁸. Cette hypothèse est plus difficile à confirmer car aucune données n'est disponible quant aux cycles biologiques des deux éponges et aux périodes auxquelles la reproduction se déroule.

2. Etudes géographiques

Afin d'évaluer les variations métaboliques pour une espèce donnée en fonction de son lieu de prélèvement, une étude géographique à petite échelle a été réalisée sur *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa*. Tous les échantillons ont été prélevés au mois d'août 2014 afin de s'affranchir du biais lié aux éventuelles variations temporelles.

Pour *Haliclona fulva*, 3 échantillons ont été prélevés à Monaco, 6 échantillons dans la Rade de Villefranche, 3 échantillons à la Grotte de Jarre et 1 échantillon au Riou Caramasseigne. Bien que d'un point de vue statistique l'utilisation d'un seul échantillon n'est pas valable, l'échantillon prélevé au Riou Caramasseigne a été conservé afin de voir s'il se rapprochait ou non des autres lieux testés. Le cercle des corrélations permettant de représenter les résultats obtenus par AFM sur les données acquises par spectrométrie de masse sur ces échantillons montre que la discrimination des groupes est expliquée à 46,54 % par les deux premières dimensions (Figure 109). Le nombre de variables étant supérieur à 200 et le nombre d'individus égal à 14, ce résultat indique une bonne corrélation entre les variables permettant la discrimination de ces groupes (supérieur à 29,8 %, Table 1). Bien que tous ces échantillons aient été prélevés en Méditerranée, les groupes d'échantillons se distinguent nettement les uns des autres. En ce qui concerne le riou Caramasseigne, il est difficile de valider statistiquement la position de ce groupe étant donné qu'un seul échantillon a été prélevé. Les différences métaboliques observées entre les trois autres groupes d'échantillons peuvent s'expliquer par une influence différenciée des conditions environnementales qui

¹¹⁷ Marty J. C., Chiavérini J., Pizay M. D. et Avril B., Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED time-series station (1991–1999). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2002. **49**(11): p.1965-1985.

¹¹⁸ Ivanisevic J., Thomas O.P., Pedel L., Pénez N., Ereskovsky A.V., Culioli G. et Pérez T., Biochemical trade-offs: evidence for ecologically linked secondary metabolism of the sponge *Oscarella balibalo*. *PLoS One*, 2011. **6**(11), e28059.

varient d'un endroit à l'autre : exposition aux pollutions anthropiques, aux courants, aux variations climatiques, etc.

Haliclona fulva: Etude géographique

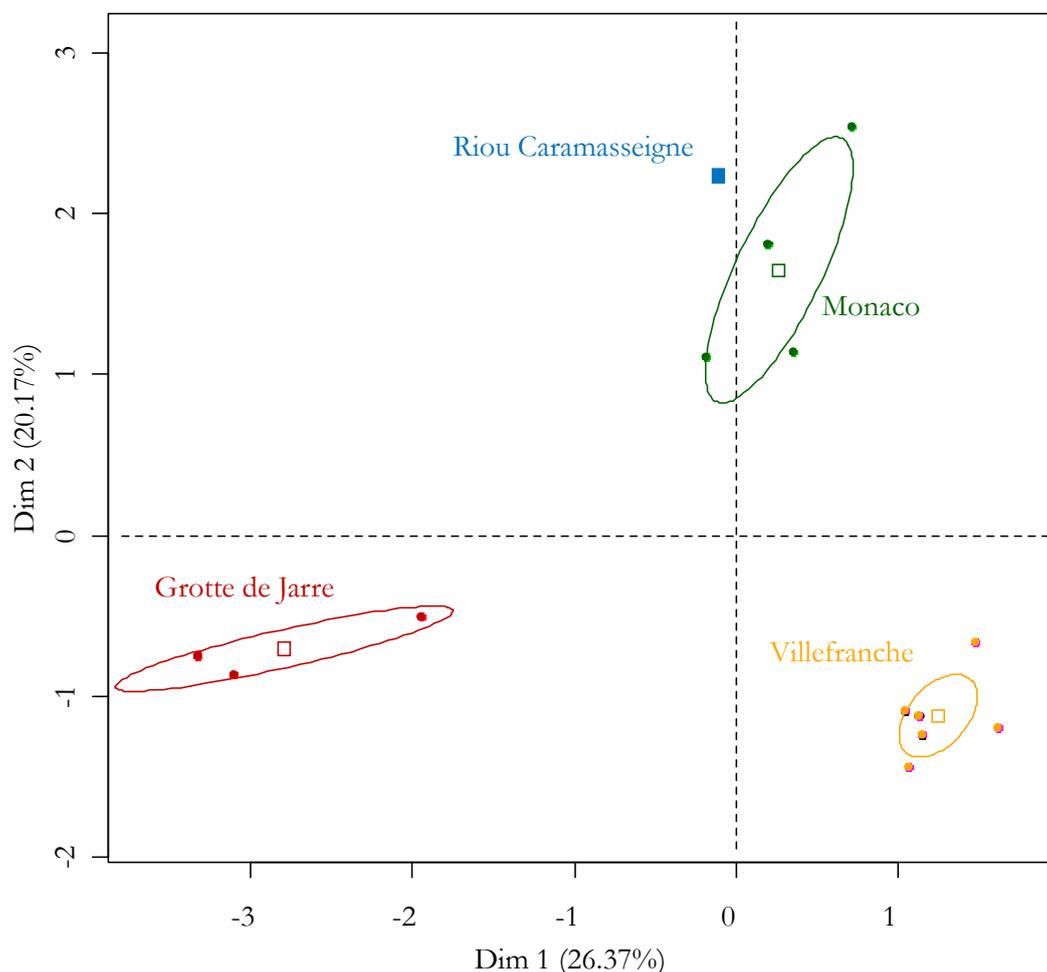


Figure 109 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons d'*Haliclona fulva* prélevés dans différentes zones de Méditerranée. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Pour *Haliclona mucosa*, 6 échantillons ont été prélevés dans la Rade de Villefranche, 4 échantillons à la Grotte de Jarre et 3 échantillons au Riou Caramasseigne. Le cercle des corrélations permettant de représenter les résultats obtenus par AFM sur les données acquises par spectrométrie de masse sur ces échantillons montre que la discrimination des groupes est expliquée à 51,41 % par les deux premières dimensions (Figure 110). Le nombre de variables étant supérieur à 200 et le nombre d'individus égal à 13, ce résultat indique une bonne corrélation entre les variables permettant la discrimination de ces groupes (supérieur à 29,8 %, Table 1). Comme pour l'espèce *Haliclona fulva*, ces résultats mettent en évidence une nette séparation des échantillons prélevés dans les trois zones différentes bien que celles-ci soient toutes situées en mer Méditerranée Nord-Occidentale.

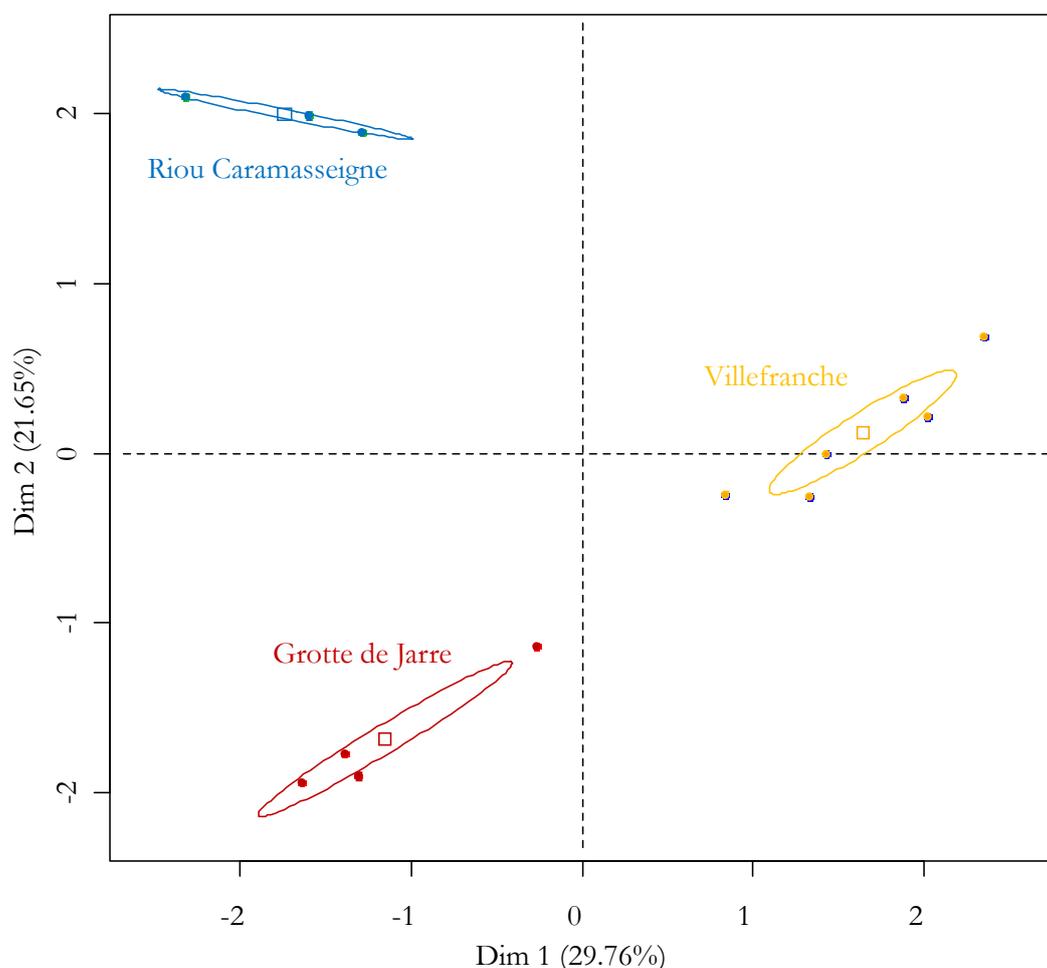


Figure 110 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons d'*Haliclona mucosa* prélevés dans différentes zones de Méditerranée. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiances à 95 %.

Les données analysées montrent à nouveau la même tendance pour les deux espèces. Bien que les variables fortement corrélées aux dimensions 1 et 2 ne soient pas identifiables, elles sont différentes pour les deux espèces. Comme pour l'étude temporelle, cette observation indique que les différences observées entre les groupes d'échantillons pour chacune des espèces correspondent à des modifications métaboliques propres à chaque espèce en réponse à leur environnement et non à l'environnement lui-même.

Impact environnemental. Les résultats obtenus par ces études spatio-temporelles pour les deux espèces étudiées montrent une influence non négligeable des conditions environnementales sur le métabolome spécialisés des éponges. Il apparait donc nécessaire de vérifier que la variabilité intra-spécifique liée aux conditions environnementales permet malgré tout de discriminer entre elles deux espèces différentes dans le cadre d'une l'étude phylométabolomique.

3. Validation de méthode

Afin de montrer que la variabilité inter-spécifique est plus importante que la variabilité intra-spécifique, tous les échantillons étudiés précédemment ont été analysés au sein d'une seule et même série.

L'agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur ces échantillons montrent que la discrimination des groupes *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa* l'un par rapport à l'autre est expliquée à 54,28 % par les deux premières dimensions (Figure 111). Compte-tenu du nombre de variables égal à 188 et du nombre d'échantillons supérieur à 100, ce pourcentage indique une forte corrélation entre les variables de chacun des groupes (supérieur à 6,4 %, Table 1). La figure met en évidence une nette séparation des échantillons issus de chacune des deux espèces. Ce résultat indique que malgré les variations métaboliques dues aux conditions environnantes, deux espèces différentes sont nettement séparées par le procédé métabolomique utilisé.

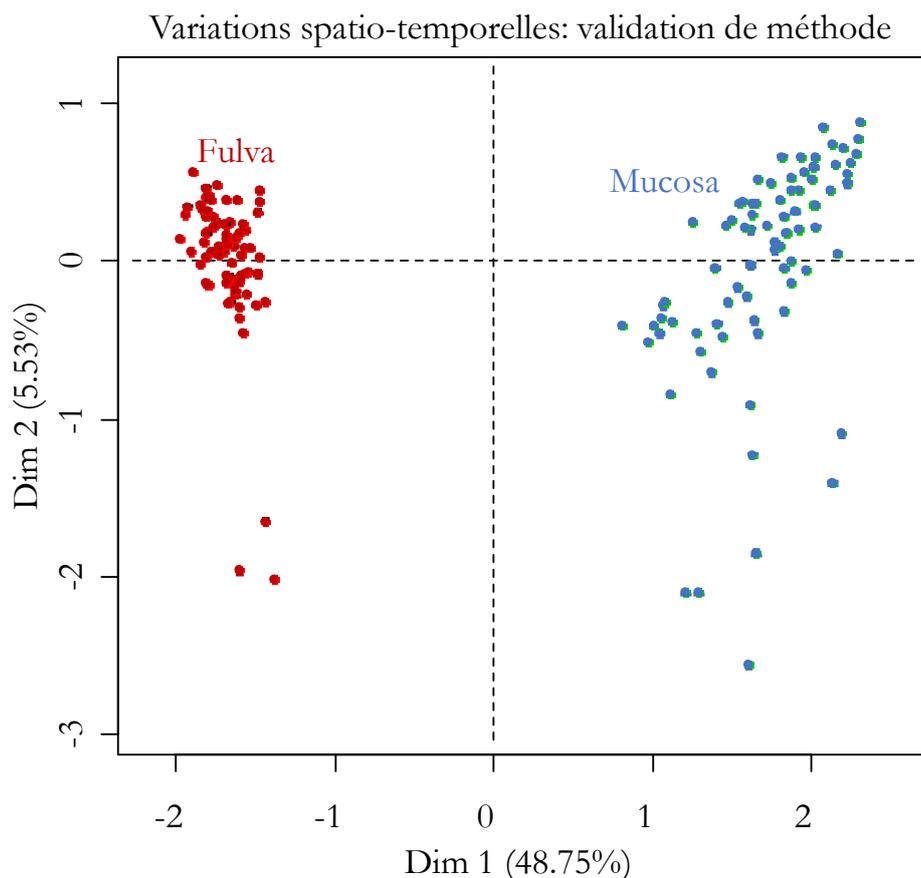


Figure 111 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons d'*Haliclona fulva* et d'*Haliclona mucosa* prélevés dans différentes zones de Méditerranée tout au long de l'année.

Ce protocole n'a été validé que par la spectrométrie de masse car toutes les analyses RMN n'ont pas pu être réalisées sur l'ensemble des échantillons.

L'ensemble des analyses détaillées précédemment permet de valider la méthode choisie pour l'étude phylométabolomique mise en place sur 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona*. Le premier but de cette étude est de vérifier que la variabilité interspécifique est plus importante que la variabilité intraspécifique. Cependant elle a permis de révéler des résultats très prometteurs tant du point de vue de la variabilité géographique que de la variabilité temporelle pour chacune des espèces, résultats qu'il serait intéressants de

retravailler par métabolomique de façon peut-être plus ciblée sur les familles de métabolites de chacune des deux espèces et en notamment en couplant la RMN à la spectrométrie de masse.

D. Etude phylométabolomique sur 11 espèces du genre *Haliclona*

L'étude phylométabolomique des éponges du genre *Haliclona* a été mise en place afin de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les nouvelles données de biologie moléculaire et les données métaboliques de ces organismes. En effet, la classification taxonomique actuelle des éponges du genre *Haliclona* et plus largement de l'ordre des Haplosclérides basée uniquement sur des caractères morphologiques est obsolète. Dans le cadre de la collaboration mise en place avec Grace McCormack (NUI Galway) le choix des échantillons s'est porté sur des espèces du genre *Haliclona* d'origine méditerranéenne et irlandaise, zones où les espèces étaient facilement accessibles pour les deux équipes impliquées. L'objectif de cette étude est de proposer une nouvelle classification grâce à une approche intégrative qui s'appuie sur différents types de données incluant les données métaboliques. Le protocole mis en place et validé au début de ce chapitre fournit des données chimiques issues d'analyses par spectrométrie de masse (ionisation positive et négative) et par résonance magnétique nucléaire qui sont deux techniques complémentaires. Dans la partie qui suit, les données obtenues par ces deux techniques analytiques ont d'abord été étudiées séparément puis une analyse multifactorielle a été réalisée sur l'ensemble des données.

1. Analyse par UHPLC-ESI-Q-TOF

Cette première partie de l'étude phylométabolomique a permis d'analyser des espèces méditerranéennes : 6 échantillons d'*Haliclona (Soestella) mucosa*, 6 échantillons d'*Haliclona (Halichoelona) fulva*, 5 échantillons d'*Haliclona (Rbizionera) sarai*, 3 échantillons d'*Haliclona (Reniera) mediterranea*, 1 échantillon d'*Haliclona (Gellius) lacazei*, 1 échantillon d'*Haliclona (Halichoelona) magna* et des espèces Irlandaises : 1 échantillon d'*Haliclona (Haliclona) simulans*, 9 échantillons d'*Haliclona (Rbizionera) indistincta*, 8 échantillons d'*Haliclona (Haliclona) oculata*, 5 échantillons d'*Haliclona (Rbizionera) viscosa*, 5 échantillons d'*Haliclona (Haliclona) cinerea*. Les espèces présentes en un seul exemplaire ont été analysées trois fois. L'ensemble des données obtenues en mode positif et en mode négatif ont été analysées par analyse factorielle multiple. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un cercle des corrélations (Figure 112) et sont expliqués à 26,61 % par les deux premières dimensions.

Etude phylométabolomique sur 11 éponges du genre *Haliclona*
par UHPLC-ESI-Q-TOF

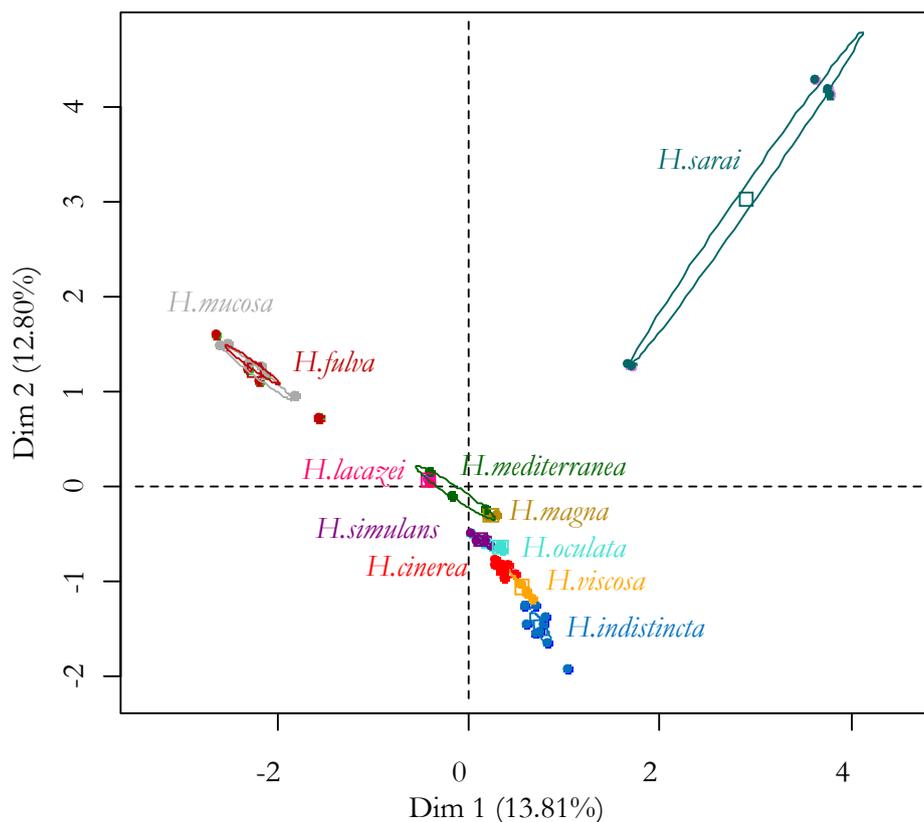


Figure 112 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF à partir des échantillons de 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona*. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Prédominance et variabilité de l'espèce *Haliclona sarai*. Ces résultats sont fortement influencés par les échantillons de l'espèce *Haliclona sarai* qui présentent une variabilité intra-spécifique importante en fonction du lieu où ils ont été prélevés : les trois points les plus en haut à droite sont des échantillons prélevés dans la rade de Villefranche en février et juin 2015 et les deux points en bas sur la gauche de l'ellipse correspondante sont des échantillons prélevés en août 2014 à Monaco. Cette variabilité intra-spécifique est plus importante que la variabilité inter-spécifique obtenue entre les autres espèces d'éponges. De plus, que ce soit selon la dimension 1 ou selon la dimension 2, les 10 premières variables discriminantes correspondent aux saraiïnes décrites dans le chapitre 1. Ces composés s'ionisent très facilement en mode positif et l'analyse des chromatogrammes montrent que les pics correspondants présentent une intensité saturant le détecteur (Figure 113). Ces intensités ne sont retrouvées sur aucun chromatogramme issu de l'analyse des autres espèces choisies comme pour l'exemple d'*Haliclona viscosa* présenté.

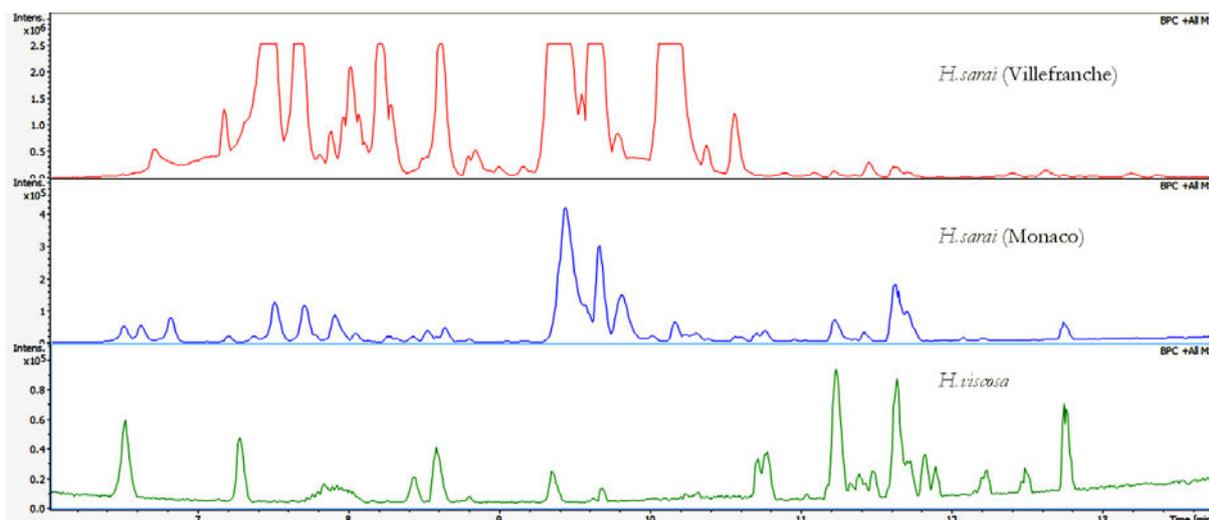


Figure 113 : Chromatogrammes (BPC) obtenus des analyses par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif sur un échantillon d'*Haliclona sarai* prélevé dans la rade de Villefranche (rouge), un échantillon d'*Haliclona sarai* prélevé à Monaco (bleu) et un échantillon d'*Haliclona viscosa* prélevé en Irlande (vert).

Exploitation complexe des résultats. De ce fait les résultats obtenus pour les autres espèces sont très peu exploitables puisque les groupes d'échantillons semblent « écrasés » en bas de la figure. De plus, les variables largement dominantes provenant toutes du groupe d'échantillons d'*Haliclona sarai*, la projection des autres échantillons sur ces deux dimensions s'avère très mauvaise et ne permet pas la séparation correcte des différentes espèces. Cette observation est confirmée par le fait que les échantillons des espèces *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa* sont tous regroupés alors qu'ils sont issus de l'échantillonnage utilisé précédemment pour démontrer la validité de la méthode, étude dans laquelle ils étaient alors très bien discriminés les uns par rapport aux autres.

Spectrométrie de masse et phylométabolomique. Ces résultats remettent en question la validité du protocole utilisé quant à la problématique posée. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse est dépendante de la capacité des composés étudiés à s'ioniser, elle est donc utilisable pour des études métabolomiques ciblant des espèces présentant des métabolomes similaires comme dans le cas des Homoscléromorphes qui constitue un petit groupe taxonomique d'éponges¹⁰⁶ ou celui de *Parazoanthus axinellae* pour lequel ce sont deux morphotypes qui ont été étudiés présentant vraisemblablement un métabolome similaire¹¹⁹. Cependant dans le cas présent, les propriétés d'ionisation des molécules produites par les espèces étudiées sont trop différentes pour obtenir un résultat exploitable.

2. Analyse par RMN

Afin d'obtenir des données complémentaires à celles obtenues par spectrométrie de masse une série d'échantillons a également été analysée par RMN ¹H : 6 échantillons d'*Haliclona (Soestella) mucosa*, 6 échantillons d'*Haliclona (Halichocona) fulva*, 3 échantillons d'*Haliclona (Rbizionera) sarai*, 3 échantillons d'*Haliclona (Reniera) mediterranea*, 1 échantillon d'*Haliclona (Gellius) lacazei*, 1 échantillon d'*Haliclona*

¹¹⁹ Cachet N., Genta-Jouve G., Ivanisevic J., Chevalloné P., Sinniger F., Culioli G., Pérez T. et Thomas O.P., Metabolomic profiling reveals deep chemical divergence between two morphotypes of the zoanthid *Parazoanthus axinellae*. *Scientific Reports*. 2015, 5: 8282.

(*Haliboclonā*) *magna*, 1 échantillon d'*Haliclona* (*Haliclona*) *simulans*, 3 échantillons d'*Haliclona* (*Rhizionera*) *indistincta*, 3 échantillons d'*Haliclona* (*Haliclona*) *oculata*, 3 échantillons d'*Haliclona* (*Rhizionera*) *viscosa*, 3 échantillons d'*Haliclona* (*Haliclona*) *cinerea*. Les résultats obtenus par ACP sont présentés sous forme d'un cercle des corrélations (Figure 114) et sont expliqués à 34,65 % par les deux premières dimensions.

Etude phylométabolomique sur 11 éponges
du genre *Haliclona* par RMN

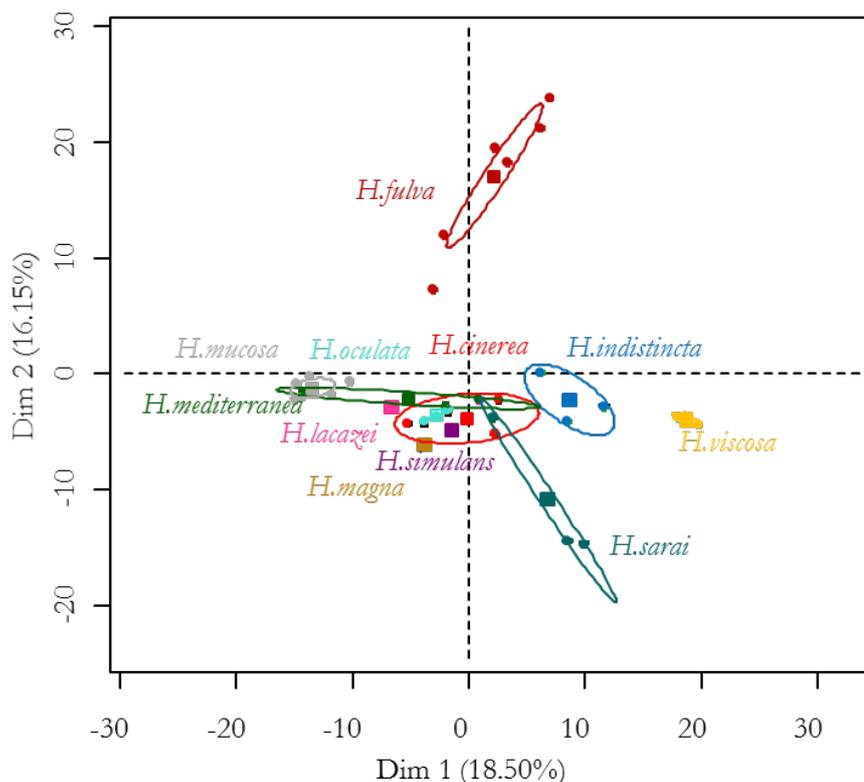


Figure 114 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'ACP réalisée sur les données obtenues par RMN à partir des échantillons de 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona*. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiance à 95 %.

Les résultats obtenus par l'analyse RMN des mêmes échantillons que ceux analysés par spectrométrie de masse permettent d'obtenir une répartition et une séparation des groupes d'échantillons totalement différentes sur le cercle des corrélations. Quelques espèces sont très bien séparées les unes des autres :

- *Haliclona viscosa* présente des échantillons très bien regroupés et très bien séparés sur la droite de la figure.
- *Haliclona fulva* présente une variabilité interindividuelle assez importante mais reste néanmoins bien séparée des autres espèces et notamment d'*Haliclona mucosa* avec laquelle elle est totalement confondue par les analyses par spectrométrie de masse.
- *Haliclona sarai* présente à nouveau une variabilité interindividuelle importante comme pour les résultats obtenus par spectrométrie de masse, ce qui ne permet pas de bien séparer ce groupe des autres espèces d'éponges.

- *Haliclona indistincta* montre des individus assez regroupés entre eux mais la séparation avec les autres espèces est relativement faible.

- *Haliclona mucosa* est caractérisée par une très faible variabilité interindividuelle mais elle est regroupée avec l'espèce *Haliclona mediterranea* qui présente quant à elle une grande variabilité interindividuelle.

Pour toutes les autres espèces, il n'est pas possible de distinguer les groupes les uns des autres bien que les individus de chacune des espèces soient bien regroupés entre eux.

Si l'information analytique obtenue par RMN est très différente de celle obtenue par spectrométrie de masse, elle n'est néanmoins pas beaucoup plus informative. La détection des composés par RMN ne dépend pas de leurs propriétés physico-chimiques à proprement parler comme c'est le cas par l'ionisation en électrospray qui dépend de la capacité des composés à s'ioniser. Cependant la détection par RMN va dépendre très fortement de la concentration des composés dans l'échantillon c'est-à-dire qu'un composé en faible concentration mais présentant de bonnes capacités d'ionisation sera détecté par spectrométrie de masse et non par RMN. *A contrario*, un composé en concentration élevée mais présentant de mauvaises capacités d'ionisation sera bien détecté en RMN et non par spectrométrie de masse.

Dans le cas de cette étude phylométabolomique portant sur des espèces présentant des métabolomes très différents, les deux premières approches envisagées montrent effectivement les avantages et inconvénients de chacune des deux techniques d'analyse utilisées. Celles-ci permettent de cibler les métabolites de manières différentes et sont donc complémentaires. Il semble alors que le maximum de cohérence dans les résultats obtenus sera issu d'un couplage de l'ensemble des données issues des deux méthodes analytiques.

3. Analyse par couplage des données issues des analyses par UHPLC-ESI-Q-TOF et RMN

Le couplage des données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF et par RMN est réalisé par analyse multifactorielle sur tous les échantillons analysés précédemment par RMN. Les résultats sont présentés sous la forme d'un cercle des corrélations et sont expliqués à 27,71 % par les deux premières dimensions (Figure 115). Compte-tenu du nombre de variable égal à 778, ce pourcentage est signe d'une corrélation relativement importante entre les différentes variables.

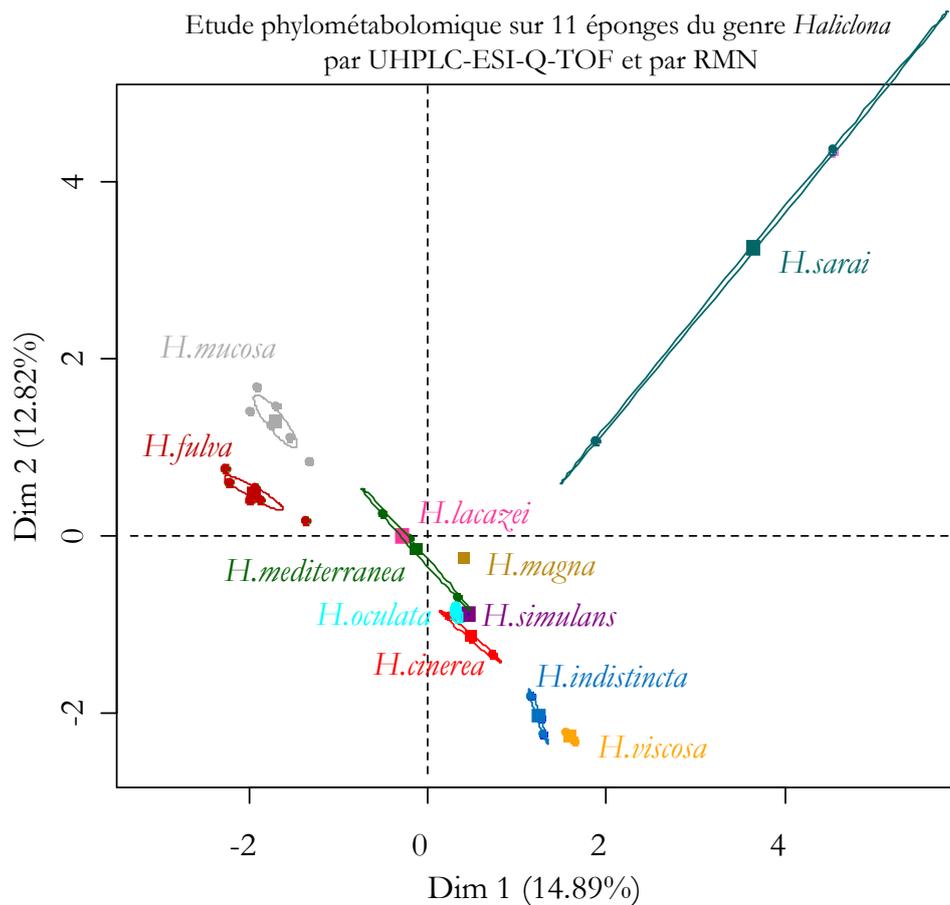


Figure 115 : Agrandissement du cercle des corrélations obtenu à partir de l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF et RMN à partir des échantillons de 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona*. Les ellipses représentées sont des ellipses de confiances à 95 %.

L'association des données issues des deux techniques analytiques semble éclaircir un peu les résultats obtenus. En effet, le cercle des corrélations présenté ci-dessus montre des groupes d'échantillons mieux séparés que dans les deux études indépendantes présentées précédemment :

- *Haliclona sarai* présente toujours un groupe d'individus très dispersé et très séparés des autres espèces selon les deux dimensions. Ce phénomène implique encore le regroupement des autres espèces qui sont alors moins bien projetées sur ces deux dimensions.
- *Haliclona viscosa* et *Haliclona indistincta* sont deux groupes proches l'un de l'autre tout en restant séparés et présentant des individus bien regroupés entre eux.
- *Haliclona fulva* et *Haliclona mucosa* sont deux groupes également proches l'un de l'autre mais bien séparés et dont la variabilité interindividuelle est faible. Ces espèces s'opposent aux deux précédentes selon les deux dimensions discriminantes. Cette figure permet de souligner qu'ici ces deux espèces sont bien distinctes l'une de l'autre contrairement aux résultats obtenus uniquement avec les données de spectrométrie de masse mais aussi que *Haliclona mucosa* est bien séparée du groupe *Haliclona mediterranea* dont elle était proche dans les résultats obtenus uniquement avec les données de RMN.

• *Haliclona oculata* et *Haliclona cinerea* présentent également des individus bien regroupés entre eux et semblent très proches l'une de l'autre. Cependant cette observation est délicate car ces deux espèces sont peu distinctes du reste des espèces.

En ce qui concerne *Haliclona magna*, *Haliclona simulans* et *Haliclona lacazei*, il est très difficile d'établir une observation étant donné qu'un seul individu a été analysé pour chacune de ces espèces. De plus elles sont très proches voire confondues avec le groupe *Haliclona mediterranea* dont les trois individus sont assez dispersés et qui est complètement centré sur la figure indiquant qu'il ne se distingue des autres groupes selon aucune des deux dimensions.

Apport du couplage des données. L'association des données issues de deux méthodes analytiques différentes permet d'obtenir des résultats plus exhaustifs que ceux présentés pour chacune des méthodes séparément. Cette étude intégrative permet d'étudier les différentes espèces choisies selon l'ensemble des données chimiques qu'elles peuvent fournir. Peu d'études métabolomiques comparant la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire ont été mises en œuvre jusqu'à présent. Une étude portant sur les métabolites secondaires de la racine de réglisse propose la comparaison de la GC-MS, la LC-MS et de la RMN¹²⁰. Les résultats obtenus montrent de grandes similitudes dans la capacité de la LC-MS et de la RMN à discriminer les échantillons selon leur espèce. Cependant, cette étude souligne aussi le grand pouvoir de discrimination de la RMN par des métabolites présents en concentrations élevées dans les échantillons. Cette observation a également été mise en évidence dans une récente étude portant sur des coraux du genre *Sarcophyton*. La RMN et l'UHPLC-MS ont également été utilisées afin de discriminer les échantillons selon leur espèce et le lieu de leur prélèvement (Mer Rouge *vs* aquarium) et la RMN se révèle particulièrement efficace sur les métabolites primaires présents en quantités importantes, en revanche les métabolites secondaires en faibles concentrations sont mieux détectés par l'UHPLC-MS qui est cependant moins robuste¹²¹. Si les observations décrites dans ces publications confirment celles réalisées au cours de l'étude sur les éponges du genre *Haliclona*, jamais les données n'ont été associées entre elles pour réaliser les analyses multivariées.

Les analyses obtenues par l'association des données de SM et de RMN permettent de proposer une classification hiérarchique en vue de proposer une classification taxonomique de ces espèces (Figure 116).

¹²⁰ Farag M.A., Porzel A. et Wessjohann L.A., Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry*, 2012. **76**: p.60-72.

¹²¹ Farag M.A., Porzel A., Al-Hammady M.A., Hegazy M.E.F., Meyer A., Mohamed T.A., Westphal H. et Wessjohann L.A., Soft corals biodiversity in the Egyptian Red Sea: a comparative MS and NMR metabolomics approach of wild and aquarium grown species. *Journal of Proteome Research*, 2016. **15**: p.1274-1287.

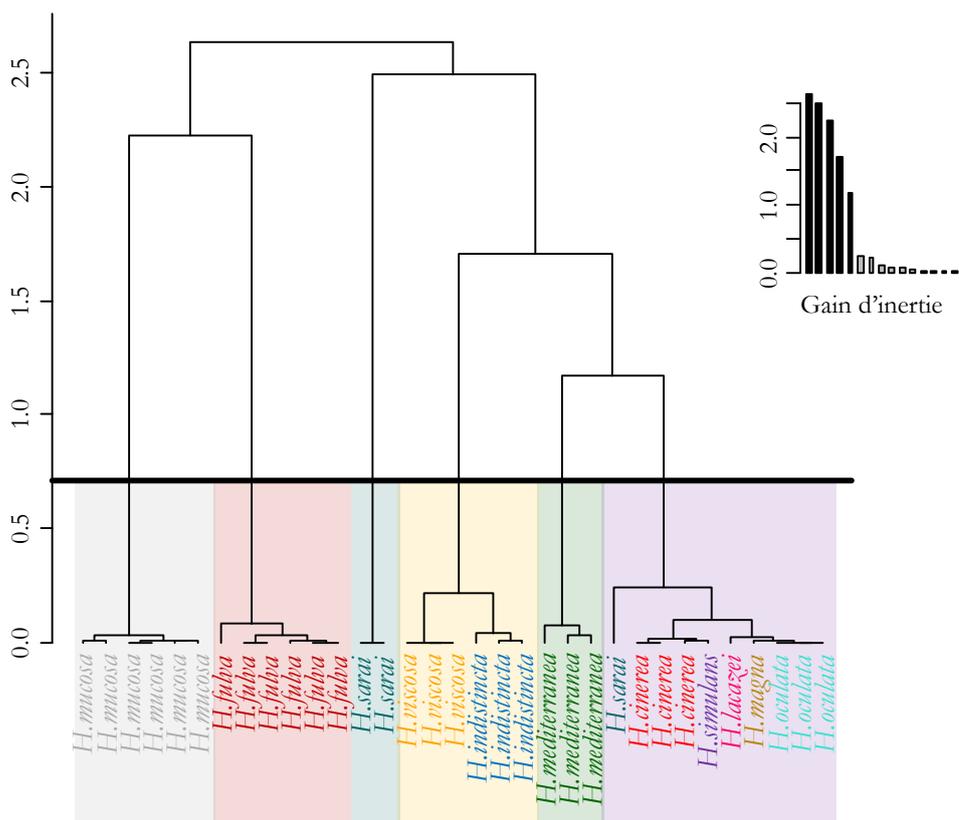


Figure 116 : Classification hiérarchique ascendante basée sur l'AFM réalisée sur les données obtenues par UHPLC-ESI-Q-TOF et RMN à partir des échantillons de 11 espèces d'éponges du genre *Haliclona*.

La classification ascendante hiérarchique obtenue à partir des données exploitées précédemment par analyse factorielle multiple permet d'obtenir une séparation des éponges en cinq groupes statistiquement différents les uns des autres du point de vue de leur métabolome. *Haliclona (Soestella) mucosa* (gris), *Haliclona (Halichoelona) fulva* (rouge) et *Haliclona (Remiera) mediterranea* (vert) représentent chacune un groupe, c'est-à-dire qu'elles ne semblent être liées aux autres espèces. *Haliclona (Rbizionera) viscosa* et *Haliclona (Rbizionera) indistincta* sont classées dans un seul groupe (jaune). *Haliclona (Rbizionera) sarai* forme un groupe distinct (bleu) avec deux des individus de l'espèce, le dernier individu fait partie du dernier groupe (violet) regroupant *Haliclona (Haliclona) cinerea*, *Haliclona (Haliclona) oculata*, *Haliclona (Haliclona) simulans*, *Haliclona (Gellius) lacazei* et *Haliclona (Halichoelona) magna*.

Corrélation avec la classification en sous-genres. Au regard de ces résultats, il semblerait que les caractéristiques métaboliques des éponges observées par MS et RMN soit plus ou moins en accord avec la classification en sous-genres déjà établie. En effet, les espèces *Haliclona viscosa* et *Haliclona indistincta* appartenant au sous-genre *Rbizionera* sont classées dans le même groupe et relativement proche du groupe formé par deux échantillons d'*Haliclona sarai*, espèce appartenant au même sous-genre. De même, les espèces *Haliclona cinerea*, *Haliclona oculata* et *Haliclona simulans* appartenant au sous-genre *Haliclona* sont classées dans le même groupe ; néanmoins *Haliclona lacazei* et *Haliclona magna* appartenant à deux autres sous-genres sont également classées dans ce groupe. *Haliclona mucosa*, seule espèce représentant le sous-genre *Soestella*, est classée dans un groupe bien distinct, ce qui est également le cas d'*Haliclona mediterranea* seule espèce

représentant le sous-genre *Reniera*. En ce qui concerne, l'espèce *Haliclona fulva* classée dans un groupe distinct des autres, elle appartient au sous-genre *Haliboclonia* et est bien séparée d'*Haliclona magna*, autre espèce représentante du même sous-genre. Ces observations mettent en évidence une certaine cohérence entre les résultats obtenus et la classification actuelle, cependant la position de certaines espèces ne permettent pas de confirmer ces corrélations.

Echantillonnage et interprétation. Si ces résultats sont si peu évidents à interpréter, c'est aussi en raison de l'échantillonnage faiblement représentatif du genre *Haliclona* dans sa globalité. En effet, la première difficulté de cette étude a été d'obtenir plusieurs spécimens de différentes espèces en quantités suffisantes pour pouvoir être analysés. Pour certaines espèces comme *Haliclona mucosa* ou *Haliclona fulva*, cet objectif était relativement simple à atteindre car ce sont des espèces présentes en quantités importantes en Méditerranée Nord-occidentale à faible profondeur où les conditions de prélèvements sont relativement aisées. Pour d'autres espèces comme *Haliclona sarai* ou *Haliclona simulans*, la quantité de spécimens présents en milieu naturel est très faible ce qui n'a pas permis d'obtenir un échantillonnage convenable. Dans le cas des espèces *Haliclona magna* et *Haliclona lacazei*, ce sont les conditions de prélèvement en grande profondeur qui rendent la tâche difficile et n'ont pas permis d'obtenir plus d'un spécimen. D'un point de vue statistique, il est délicat d'établir une conclusion quant aux trois espèces dont un seul individu a été analysé. De plus, le genre *Haliclona* est subdivisé en sept sous-genres qui ne sont pas tous représentés dans cette étude et de nombreuses espèces du genre n'appartiennent à aucun des sous-genres. Afin d'avoir une vision globale de cette classification et d'identifier de potentiels marqueurs chimiques il faudra prélever davantage d'espèces pour procéder à nouveau à ce type d'étude.

Variabilité intraspécifique : incertitude analytique ou erreur d'identification ? L'étude temporelle et géographique menées sur les espèces *Haliclona mucosa* et *Haliclona fulva* ont permis de valider les méthodes de prélèvement dans la mesure où l'on a pu vérifier que la variabilité intra-spécifique est inférieure à l'inter-spécifique : elle ne devrait donc pas influencer une étude phytométabolomique. Néanmoins, l'importante influence de la répartition géographique d'*Haliclona sarai* sur son métabolisme secondaire interroge sur l'appartenance de tous les échantillons prélevés à cette même espèce. En effet, les dérives analytiques mises en lumière au cours de ce travail (i.e. ionisation différenciée par UHPLC-ESI-Q-TOF en mode positif) ne peuvent expliquer à elles seules les différences observées pour *Haliclona sarai*. Il est possible que des erreurs d'identifications selon les critères taxonomiques usuels lors des échantillonnages soient à l'origine de ces résultats.

Phylométabolomique, chimiotaxonomie : quels obstacles ? L'étude phylométabolomique mise en place dans ces travaux de thèse montre des résultats préliminaires intéressants qui méritent d'être approfondis. En effet, la classification proposée présente quelques similitudes avec la classification taxonomique actuelle. Cependant, beaucoup d'informations font encore défaut telle que la nature des variables explicatives dont l'analyse par spectrométrie de masse n'a pu aboutir. Cette identification de variables est complexe à mettre en place en raison de la méconnaissance des métabolites synthétisés par chacune des espèces disponibles.

Les études chimiotoxonomiques réalisées sur les Haplosclérides avaient jusqu'alors révélés deux familles principales de marqueurs : les alcaloïdes 3-AP et les polyacétylènes^{23,24,25}. Or, les résultats proposés par l'étude phylométabolomique mise en place ici montrent au-moins cinq groupes et ce uniquement pour le genre *Haliclona*. L'espèce *Haliclona fulva* décrite dans le chapitre 1 comme productrice de polyacétylènes est classée seule dans un groupe ne révélant pas les polyacétylènes comme des molécules communes à plusieurs espèces. En ce qui concerne les alcaloïdes 3-AP, l'espèce *Haliclona viscosa* a été décrite pour sa production d'haliclamines et de 3-alkylpyridinium, elle est cependant bien séparée de l'espèce *Haliclona sarai* par la méthode présentée alors que celle-ci produit également des sels d'alkylpyridinium et des haliclamines. Il semblerait alors qu'au sein même du groupe chimique des alcaloïdes 3-AP plusieurs sous-groupes de marqueurs existent.

Ce type d'étude permet d'appliquer exactement la même procédure à toutes les espèces étudiées et de couvrir un maximum de métabolites contrairement à la chimiotoxonomie qui est basée sur des études bibliographiques portant sur des investigations réalisées de manières différentes. Malgré les limites de cette méthode phylométabolomique mises en évidence auparavant, il est indéniable que l'identification de marqueurs métaboliques permettant d'enrichir le panel de critères de classification taxonomique doit passer par une étude métabolomique. Pour cela, la description préalable de ces composés est indispensable à l'enrichissement des bases de données existantes sur les métabolites marins (MarinLit) et les découvertes quotidiennes de nouvelles espèces d'organismes et marins et de nouvelles molécules contribuent à cet enrichissement.

E. Conclusion

La démarche expérimentale envisagée pour l'étude phylométabolomique des éponges du genre *Haliclona* ainsi que les résultats qui en ont découlé sont sources de nombreuses découvertes :

- **Mise en place et validation d'une méthode applicable à la problématique posée.** La problématique proposée à l'origine de cette étude phylométabolomique quant à la possibilité d'intégrer différents types de données chimiques a permis le développement du protocole métabolomique proposé dans ce chapitre. Le processus décrit et validé a permis d'obtenir différents résultats répondant à la question posée au départ et soulevant de nouvelles interrogations. Si différentes limites existent quant à l'utilisation de ce protocole, elles relèvent davantage des échantillons auxquels il est appliqué qui présentent une variabilité chimique importante que du protocole en lui-même.

Les résultats obtenus par cette méthode mettent en évidence l'importance de coupler les données obtenues par la spectrométrie de masse avec une ionisation en mode positif et en mode négatif et par la résonance magnétique nucléaire. En effet, même si certaines informations sont probablement redondantes, il est manifeste que compte-tenu de l'extrême variabilité chimique des échantillons ces informations sont avant tout complémentaires.

- **Discrimination spatio-temporelle des échantillons issus de deux espèces d'éponge du genre *Haliclona*.** Dans le but de démontrer que la variabilité intraspécifique est plus faible que la variabilité

interspécifique quels que soient la saison et le lieu de prélèvement, deux études spatio-temporelles ont été entreprises sur *Haliclona mucosa* et *Haliclona fulva*. Outre le fait que ces études ont permis de montrer que le protocole était applicable quelles que soient les conditions de prélèvement des échantillons, elles ont aussi révélé des différences mensuelles et géographiques importantes pour les deux espèces choisies. L'analyse des variables discriminantes étant toujours en cours, l'interprétation de ces résultats n'est pas encore aboutie. Cependant, un impact environnemental sur le métabolisme des organismes marins est flagrant et soulève de nouvelles questions en terme d'écologie environnementale : la taxonomie d'un individu donné doit-elle être décrite en prenant en considération son lieu de prélèvement ?

- **Proposition de groupes taxonomiques selon la discrimination métabolique des espèces.** A l'origine de cette expérimentation, la collaboration avec l'équipe de Grace MacCormack (NUI, Galway) promettait également des données de types taxonomique et génomique. Le but était, à l'image d'une récente publication réalisée sur l'impact du réchauffement climatique sur différents invertébrés marins, de réaliser une étude intégrative à partir de données chimiques et biologiques. En effet, deux équipes anglaises ont montré l'intérêt d'utiliser des données de types MS et RMN associées à des données de type transcriptomique afin d'expliquer les résultats obtenus par les deux premières techniques. Malheureusement, les données biologiques sur les éponges du genre *Haliclona* n'ont pas pu être obtenues à partir des échantillons choisis. Les résultats décrits dans ce chapitre nous permettent de proposer un arbre taxonomique semblant être corrélé avec la classification actuelle en sous-genre des différentes espèces. Néanmoins, il est évident que la comparaison voire l'association des données chimiques avec des données de biologie moléculaire auraient permis une validation plus formelle des résultats.

Chapitre 3 : Etude du métabolisme spécialisé des saraines produites par *Haliclona sarai*

A. Généralités sur les méthodes d'investigation des voies métaboliques de spongiaires

Suite à la découverte de nombreux métabolites d'intérêt produits par les spongiaires, ces organismes sont rapidement devenus des sujets importants pour l'étude des voies de biosynthèse. Si les études du génome, du transcriptome, du protéome et du métabolome ont toutes leur rôle à jouer dans l'identification taxonomique d'une espèce, c'est que ces quatre entités sont intimement liées dans le fonctionnement d'une cellule et donc d'un organisme. En ce qui concerne les voies métaboliques, celles-ci sont initiées par la présence de plusieurs gènes (génome), codant pour différentes enzymes (transcriptome et protéome) permettant la production de métabolites variés (métabolome). Les méthodes d'investigations de ces voies de biosynthèse sont donc multiples selon l'approche envisagée.

Depuis le début des années 2000, les méthodes d'étude des voies de biosynthèse ont considérablement évolué grâce à l'avènement des outils de biologie moléculaire et en particulier des méthodes de séquençage du génome¹²². Dans le cas des spongiaires dont le fonctionnement biologique relève d'une symbiose complexe avec différents micro-organismes, ces techniques peuvent permettre de répondre à la question récurrente du niveau d'implication de ces micro-organismes dans la biosynthèse des composés d'intérêt. Cependant ces méthodes sont aujourd'hui réservées à l'étude des voies métaboliques initiées par les gènes PKS et NRPS bien décrites qui aboutissent à la formation de polycétides et qui sont utilisées pour produire des composés à haute valeur ajoutée par biotechnologie¹²³. L'accès à ces connaissances du domaine de la biologie moléculaire nécessite différentes étapes préalables dont certaines relèvent du domaine de la chimie.

En ce qui concerne les familles chimiques de molécules dont les origines métaboliques sont totalement inconnues, les premières manipulations à réaliser sont des expériences de « feeding » par des précurseurs hypothétiques marqués. Les différentes hypothèses proposées sont élaborées à partir de la description du métabolome en amont comprenant les métabolites d'intérêt et d'éventuels intermédiaires de biosynthèse. Une fois les origines métaboliques identifiées, la description des procédés biochimiques mis en jeu au cours des voies de biosynthèse peut être envisagée aboutissant ensuite à la description des gènes responsables de ces voies métaboliques.

Le marquage des précurseurs se fait principalement avec les éléments suivants : le carbone-14 (¹⁴C) et le tritium (³H) dont la présence est révélée par la suite par ses propriétés radioactives ou l'oxygène 17 (¹⁷O), le deutérium (²H), l'azote 15 (¹⁵N) et le carbone 13 (¹³C) qui sont détectés par la RMN et la MS. Un des obstacles rencontrés inhérent à l'étude des voies de biosynthèse est le phénomène de dilution isotopique

¹²² Lane A.L. et Moore B.S., A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. *Natural Product Report*, 2011. **28**(2): p. 411-28.

¹²³ Weissman K.J., Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology. *Natural Product Reports*, 2016. **33**: p.203

induit par l'incorporation dans le métabolisme primaire des petites molécule-précurseurs au détriment du métabolisme secondaire initialement ciblé¹²⁴.

Dans le cadre de manipulations *in vivo*, la détection de radio-traceurs est plus sensible que la détection d'isotopes stables par RMN ou spectrométrie de masse¹²⁵. Deux outils sont utilisés pour la détection de la radioactivité : le radio-TLC permettant de détecter les zones radioactives sur des surfaces planes telles les plaques de chromatographie sur couche mince et dont le seuil de sensibilité est de 0,2 nCi et le β -imager qui permet de détecter la radioactivité au sein d'organes et dont la sensibilité est de l'ordre du pCi¹²⁶. L'utilisation d'un détecteur β à scintillation a aussi été envisagée cependant il a été mis en évidence au cours des travaux de Grégory Genta-Jouve que cette technique était beaucoup moins sensible que les deux précédentes. De plus son utilisation est beaucoup plus polluante car c'est une technique qui génère beaucoup de déchets de part l'utilisation de quantités importantes de liquide scintillant.

Grâce à leur activité filtrante, les éponges prélèvent les composés dissous ainsi que les particules de petite taille (bactérie, petit phytoplancton) dans leur milieu. Les expériences de feeding consistent à introduire dans le milieu de vie des éponges les précurseurs marqués soit sous forme dissoute soit encapsulés dans des liposomes qu'elles sont susceptibles d'incorporer^{127,128}. La principale difficulté dans la mise en place de ces expérimentations est la nécessité d'obtenir des taux d'incorporation suffisamment élevés pour pouvoir être détectés alors que le métabolisme des spongiaires est relativement lent ; il est donc nécessaire de maintenir les organismes le plus longtemps possible (au-moins un mois) en vie en aquarium, tâches relativement difficile compte-tenu de la sensibilité de ces organismes aux changements de conditions. Afin de remédier à cette difficulté, certaines expériences ont été menées sur des cultures cellulaires de spongiaires. Cependant cette alternative ne permet pas de conserver la symbiose entre l'éponge et les micro-organismes avec lesquels elle vit, ce qui influe considérablement sur le métabolisme et par conséquent sur la véracité des résultats obtenus.

Malgré les difficultés rencontrées, quelques études ont abouti à des résultats prometteurs concernant notamment la biosynthèse d'alcaloïdes marins par les spongiaires ou par leurs symbiontes¹²⁸. Récemment, la voie de biosynthèse de l'oroidine à partir de la lysine et de la proline a été décrite dans l'éponge *Cymbaxinella damicornis*^{82,129}. Cette expérience a été menée sur des organismes maintenus en aquarium jusqu'à 38 jours et mis en contact avec des précurseurs marqués au ¹⁴C dissous dans l'eau environnante.

¹²⁴ Genta-Jouve G. et Thomas O.P., Biosynthesis in marine sponges: the radiolabelling strikes back. *Phytochemistry Reviews*, 2012. **12**(3): p. 425-434.

¹²⁵ Wang Y-G., Morinaka B.I., Reyes J.C.P., Wolff J.J., Romo D. et Molinski T.F., Synthesis of 7-¹⁵N-Oroidin and Evaluation of Utility for Biosynthetic Studies of Pyrrole-Imidazole Alkaloids by Microscale ¹H-¹⁵N HSQC and FTMS. *Journal of Natural Products*, 2010. **73**(3): p. 428-434.

¹²⁶ Barthe N., Chatti K., Coulon P., Maîtrejean S. et Basse-Cathalinat B., Recent technologic developments on high-resolution beta imaging systems for quantitative autoradiography and double labelling applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2004. **527**(1-2): p. 41-45.

¹²⁷ Garson M.J., Biosynthetic studies on marine natural products. *Natural Products Report*, 1988.

¹²⁸ Garson M.J., The biosynthesis of marine natural products. *Chemical Review*, 1993. **93**: p. 1699-1733.

¹²⁹ Genta-Jouve G., Cachet N., Holderith S., Oberhaensli F., Teyssié J.L., Jeffrey R., Al Mourabit A. et Thomas O.P., New insight into marine alkaloid metabolic pathways: Revisiting oroidin biosynthesis. *A European Journal of Chemical Biology*, 2011. **12**: p. 2298-2301.

B. Voies de biosynthèse des alcaloïdes 3-AP

Les alcaloïdes 3-AP spécifiques de certaines éponges du groupe Haplosclerida n'ont pas trouvé d'équivalents dans le monde terrestre que ce soit dans le règne végétal ou dans le règne animal. Les voies métaboliques liées à leur production sont donc très mal connues à l'heure actuelle.

Différentes hypothèses ont été proposées notamment par Cimino⁵⁸ et Jaspars¹³⁰ qui se basaient sur la structure des molécules et par l'équipe de Marazano^{131,132} qui se basait sur des expériences de synthèses biomimétiques. Ces observations ont abouti à une voie de biosynthèse hypothétique en deux temps : une partie « pré-cyclisation » présente chez toutes les éponges produisant des alcaloïdes 3-AP et une partie « post-cyclisation » présente uniquement chez les éponges produisant des alcaloïdes 3-AP plus complexes (Schéma 1)²⁴. La seconde partie de ces voies métaboliques aboutit à la formation de monomères 3-AP par cyclisation et oligomérisation, et dans certains cas un métabolisme alternatif engendre des composés bien plus complexes comme dans le cas des saraines. Les précurseurs potentiels, proposés sont l'ammoniac et des unités aldéhydiques en C3 et C10 issues du métabolisme primaire. Aucune investigation expérimentale n'a été publiée à ce jour pour appuyer les hypothèses proposées pour les mécanismes biosynthétiques impliqués dans la production de ces composés chez les éponges.

En revanche, la production d'un monomère, l'haminol, par un nudibranche a été réalisée grâce à une expérience de feeding¹³³ qui a permis de mettre en évidence l'implication de l'acide nicotinique dans ces voies de biosynthèse (Schéma 2). Bien qu'il n'y ait aucune certitude quant à la similitude possible entre cette voie métabolique décrite chez un nudibranche et les voies métaboliques des spongiaires, cette expérience propose de nouvelles hypothèses. De plus, la description de composés de type haliclamine dans le chapitre 1 accentue l'utilisation de telles hypothèses. Cependant l'origine biosynthétique de cet acide nicotinique n'a pas été étudiée. Ce composé est présent dans toutes les cellules procaryotes et eucaryotes car il est le précurseur des co-enzymes NAD - NADP⁺ indispensables à de nombreuses réactions d'oxydo-réduction intracellulaires. Ce cycle pyridinique est synthétisé à partir du L-tryptophane chez les animaux, du L-aspartate chez les plantes et de l'un de ces deux acides-aminés chez les bactéries selon l'espèce considérée^{134,135}.

¹³⁰ Jaspars M., Pasupathy V. et Crews P., A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 1994. **59**(12): p. 3253-3255.

¹³¹ Gil L., Gateau-Olesker A., Marazano C. et Das B.C., 3-Alkyl 1,6-dihydropyridines from 3-alkyl 5,6-dihydro-pyridinium salts. Implications in the biosynthesis of some macrocyclic marine alkaloids. *Tetrahedron Letters*, 1995. **36**(5): p. 707-710.

¹³² Hourcade S., Ferdenzi A., Retailleau P., Mons S. et Marazano C., First model reactions towards the synthesis of sarain A core skeleton based upon a biogenetic scenario. *European Journal of Organic Chemistry*, 2005. **2005**(7): p. 1302-1310.

¹³³ Cutignano A., Tramice A., De Caro S., Villani G., Cimino G. et Fontana A., Biogenesis of 3-alkylpyridine alkaloids in the marine mollusc *Haminoea orbignyana*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003. **42**(23): p. 2633-2636.

¹³⁴ Roje S., Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 2007. **68**(14): p. 1904-1921.

¹³⁵ Kurnasov O., Goral V., Colabroy K., Gerdes S., Anantha S., Osterman A. et Begley T.P., NAD Biosynthesis: Identification of the Tryptophan to Quinolinate Pathway in Bacteria. *Chemistry & Biology*, 2003. **10**(12): p. 1195-1204.

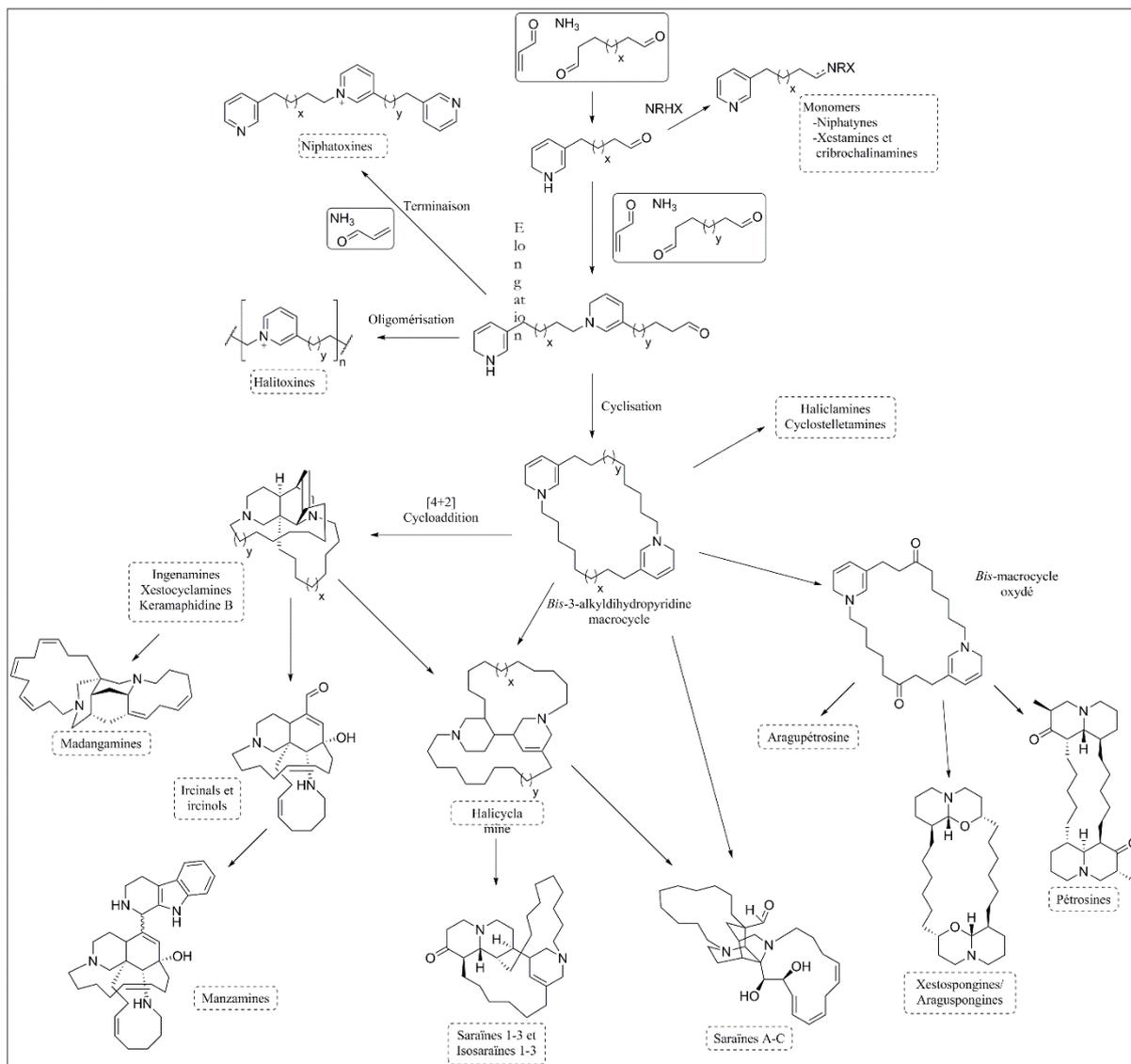


Schéma 1 : Hypothèses expliquant les voies de biosynthèse menant aux alcaloïdes 3-AP décrits dans les éponges de l'ordre des Haplosclérides.

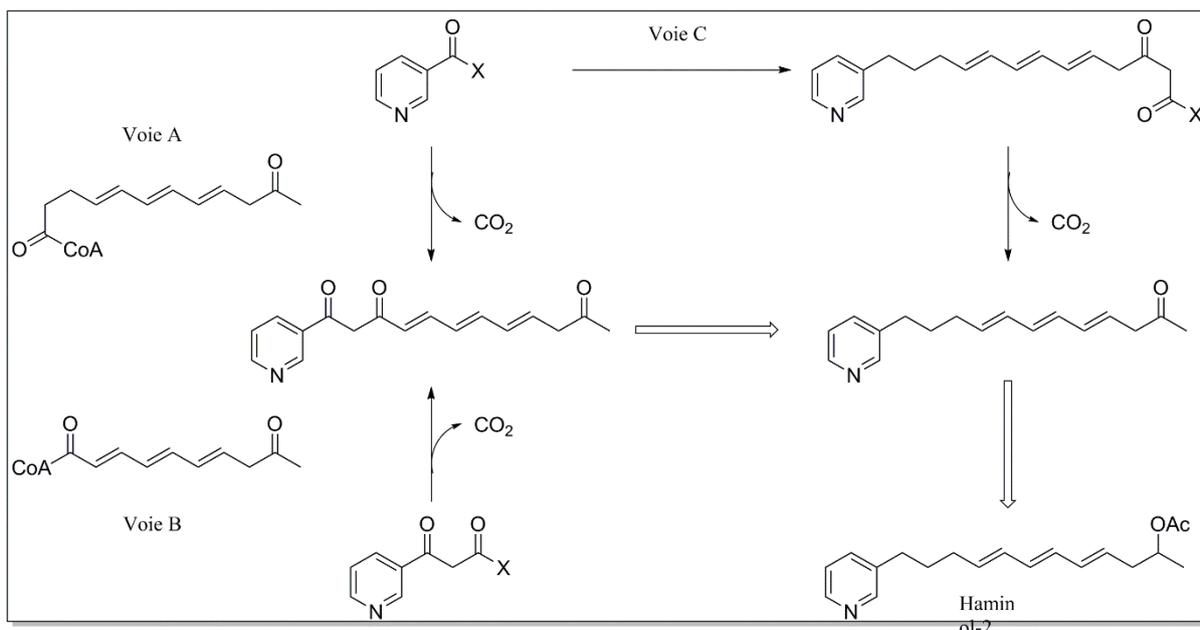


Schéma 2 : Hypothèses de voies de biosynthèse du haminol-2 (dérivé 3-alkylpyridinique), basées sur des études utilisant le [1-¹³C]-acide acétique et l'acide nicotinique comme précurseurs. X pour -OH ou un résidu équivalent du point de vue métabolique.

Dans le cas particulier des saraines, la description de composés de type haliclamine dans *Haliclona sarai* dans le premier chapitre a permis de conforter les hypothèses proposées quant aux intermédiaires de biosynthèse à l'origine de la seconde partie de ces voies métaboliques (« post-cyclisation »). De nouvelles propositions de voies métaboliques sont proposées dans le Schéma 3, à l'origine des expérimentations décrites dans cette troisième partie de ces travaux de thèse.

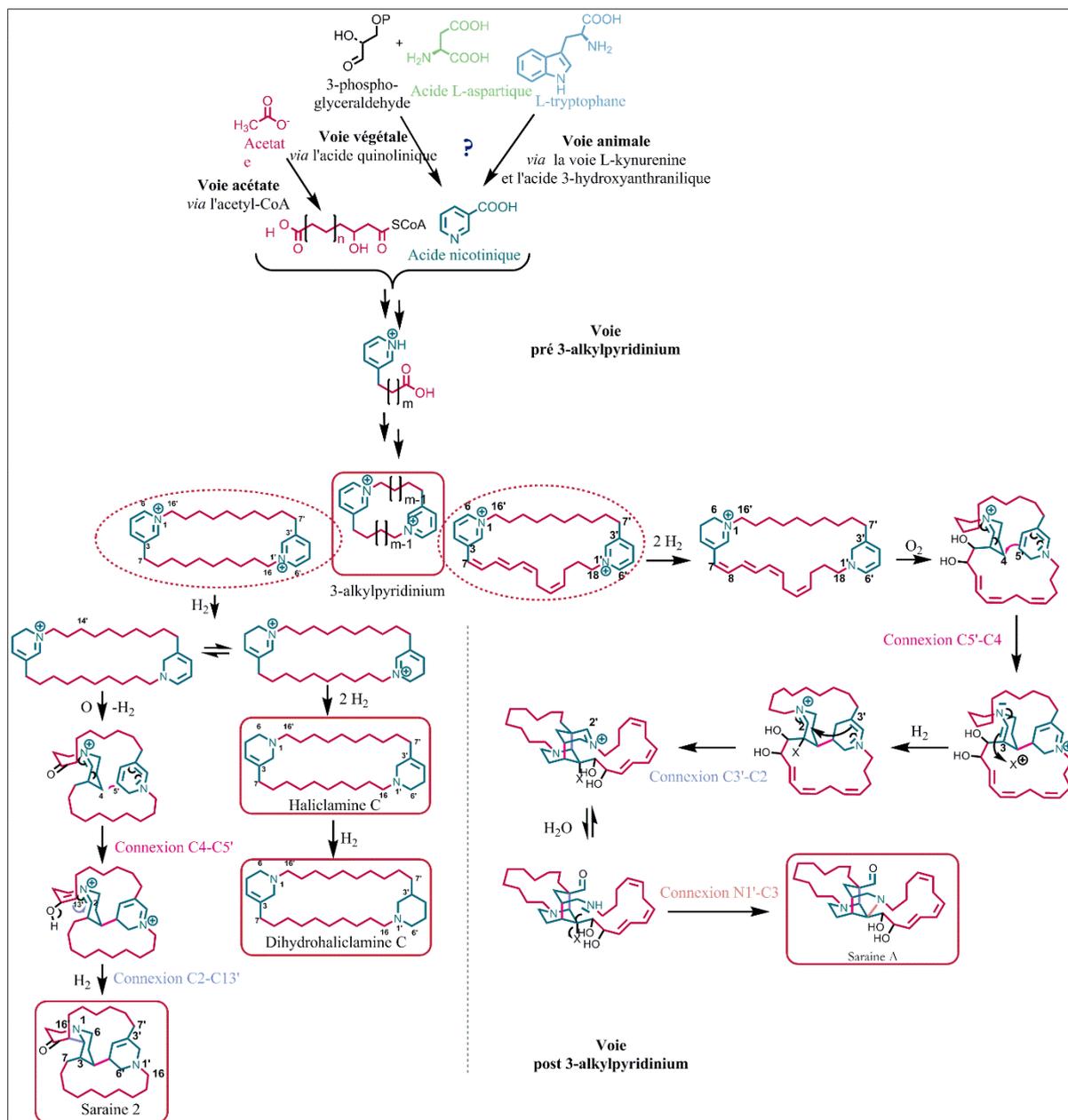


Schéma 3 : Hypothèses concernant la voie de biosynthèse des saraines dans l'éponge *Haliclona sarai*

C. Méthodologies d'incorporation de précurseurs radio-marqués et analyses

Le protocole expérimental mis en place pour l'étude de la voie de biosynthèse des saraines se déroule en deux étapes : l'incorporation et la purification. Des étapes intermédiaires de comptage et d'analyse ponctuent l'ensemble du processus.

Les expériences d'incorporation des précurseurs radio-marqués par les éponges en aquarium se sont déroulées au sein des laboratoires de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) à Monaco. Les expériences d'extraction, de purification et de comptage qui ont suivi se sont déroulées à l'Institut de Chimie de Nice et au CEA (Laboratoire IBITECS, sous la responsabilité de Vincent Dives). Le protocole élaboré s'inspire de l'étude sur l'oroidine menée dans les mêmes laboratoires¹²⁹. Les expérimentations

d'incorporation ont été réalisées en deux temps selon deux protocoles légèrement différents pour des raisons d'organisation expérimentale.

1. Précurseurs radiomarqués et incorporation

Les quatre précurseurs hypothétiques présentés dans le Schéma 3 comme pouvant être à l'origine de la voie métabolique des alcaloïdes 3-alkylpyridiniques puis des saraines, à savoir l'acétate, le tryptophane, l'aspartate (dans un premier temps) et l'acide nicotinique (dans un second temps), ont été testés. L'acide nicotinique est marqué en position 2 du cycle pyridinique le tryptophane est marqué en position 3 du noyau indolique et les 2 autres précurseurs utilisés sont marqués sur l'ensemble de la molécule au carbone 14. Pour chacun des 4 précurseurs testés, 3 réplicats d'éponge ont été utilisés, placés dans un aquarium commun de 70 L et isolés les uns des autres dans des boîtes en plastique ouvertes de 800 mL (Figure 117). L'aquarium a été placé à l'abri de la lumière et en circuit ouvert avec un débit d'environ 2 L.min⁻¹. Les éponges ont été nourries avec du phytoplancton toutes les 48 à 72 h. Après une semaine d'adaptation des éponges à cet environnement, les expériences de « feeding » ont débuté. L'aquarium a été vidé, de sorte qu'il ne reste de l'eau que dans les boîtes en plastique afin de faire les ajouts de précurseur dans des petits volumes séparément les uns des autres.

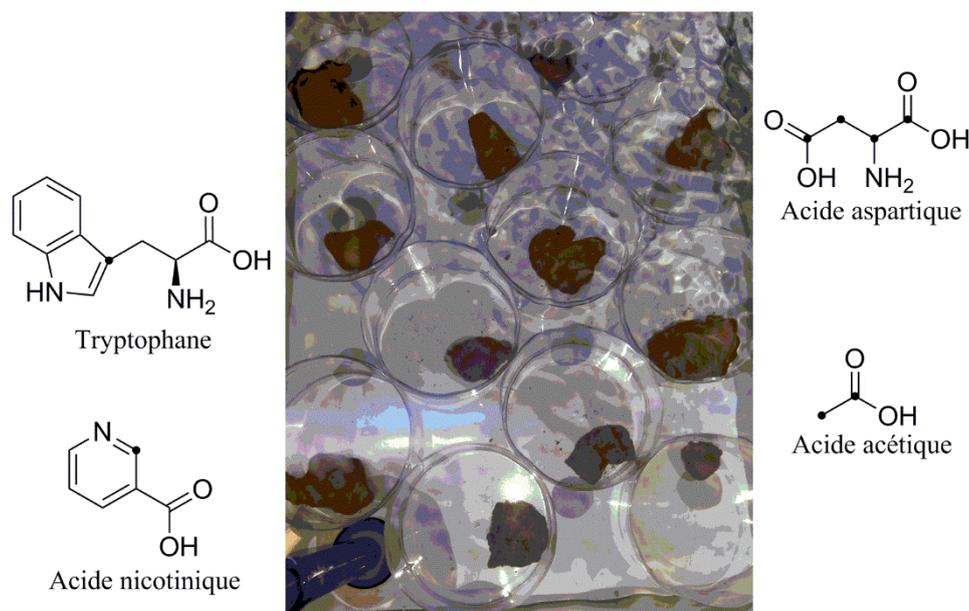


Figure 117 : Illustration de l'installation des différents individus de l'espèce *Haliclona sarai* en aquarium pour l'expérience d'incorporation des précurseurs marqués ¹⁴C (•).

Acétate, tryptophane et acide aspartique

Des ajouts d'acétate de 3,7.10³ Bq soit 0,1 μCi ont été pratiqués en raison des quantités disponibles. Pour le tryptophane et l'acide aspartique les ajouts ont été de 3,7.10⁴ Bq soit 1 μCi. Une fois les précurseurs ajoutés, les éponges ont été maintenues en circuit fermé pendant 8 h, puis le circuit a été à nouveau ouvert pendant 40 h. Cette manipulation a été réalisée 10 fois (7 fois pour l'acétate) sur une durée de trois semaines puis les éponges sont restées en aquarium une semaine de plus afin qu'elles puissent métaboliser les derniers

ajouts. Au deuxième jour de manipulation, un des spécimens d'éponge utilisé pour tester le précurseur acétate est mort, cette partie de l'expérience a alors été réalisée en double.

Acide nicotinique

Pour l'acide nicotinique les ajouts ont été de $3,7 \cdot 10^4$ Bq soit 1 μ Ci. Une fois les ajouts réalisés, les éponges ont été maintenues en circuit fermé pendant 16 h, puis le circuit a été à nouveau ouvert pendant 8 h. Cette manipulation a été réalisée 10 fois sur une durée de deux semaines puis les éponges sont restées en aquarium une semaine de plus afin qu'elles puissent métaboliser les derniers ajouts. Pour cette étape d'incorporation de l'acide nicotinique, chaque boîte en plastique était nettoyée avant chaque phase de mise en contact de l'éponge avec le précurseur. A la fin de l'expérimentation précédente et lors de la décontamination du matériel utilisé, il a été mis en évidence une importante quantité de radioactivité sur la paroi de ces boîtes laissant supposer l'apparition d'un biofilm bactérien capable d'incorporer les composés radio-marqués. Cette observation a permis d'instaurer cette étape de nettoyage pour la seconde expérience.

Au cours de ces phases d'incorporation, une première étape de comptage par compteur beta a été réalisée afin d'évaluer la quantité de précurseur incorporée par chacune des éponges. Afin d'avoir une valeur contrôle, pour chaque précurseur une boîte vide a été placée en aquarium dans laquelle des ajouts ont été réalisés comme pour les boîtes contenant les éponges. Les techniques de mesure sont détaillées dans la troisième partie de ce paragraphe.

2. Extraction, fractionnement et purification

Une fois les phases d'incorporation réalisées, toutes les éponges sont traitées de la même façon. Elles sont congelées dans l'azote liquide puis lyophilisées. Une fois sèches, elles sont extraites par dix fois leur masse de méthanol pendant 10 min aux ultrasons puis centrifugées pendant 15 min à 3000 rpm. Cette opération est répétée 3 fois et les surnageants récupérés après chaque centrifugation sont regroupés et évaporés afin d'obtenir les extraits bruts. Ceux-ci sont ensuite repris dans 2 mL d'eau et déposés sur SPE (HR-X® Macherey-Nagel) pour être séparés en quatre fractions : F1 (H₂O, 5 volumes), F2 (ACN/H₂O, 7 :3, 4 volumes), F3 (ACN, 4 volumes) et F4 (DCM/MeOH, 9 :1, 3 volumes).

Ce protocole de fractionnement a été optimisé au préalable à l'Institut de Chimie Biomoléculaire de Naples avec l'aide de l'équipe d'Angelo Fontana. Ce procédé permet d'obtenir les sarâines de type A, B et C (7-9) dans la fraction 2 et les sarâines de type 1, 2 et 3 (1-3) dans les fractions 3 et 4 majoritairement comme le montrent les analyses HPLC-MS présentées dans la Figure 118.

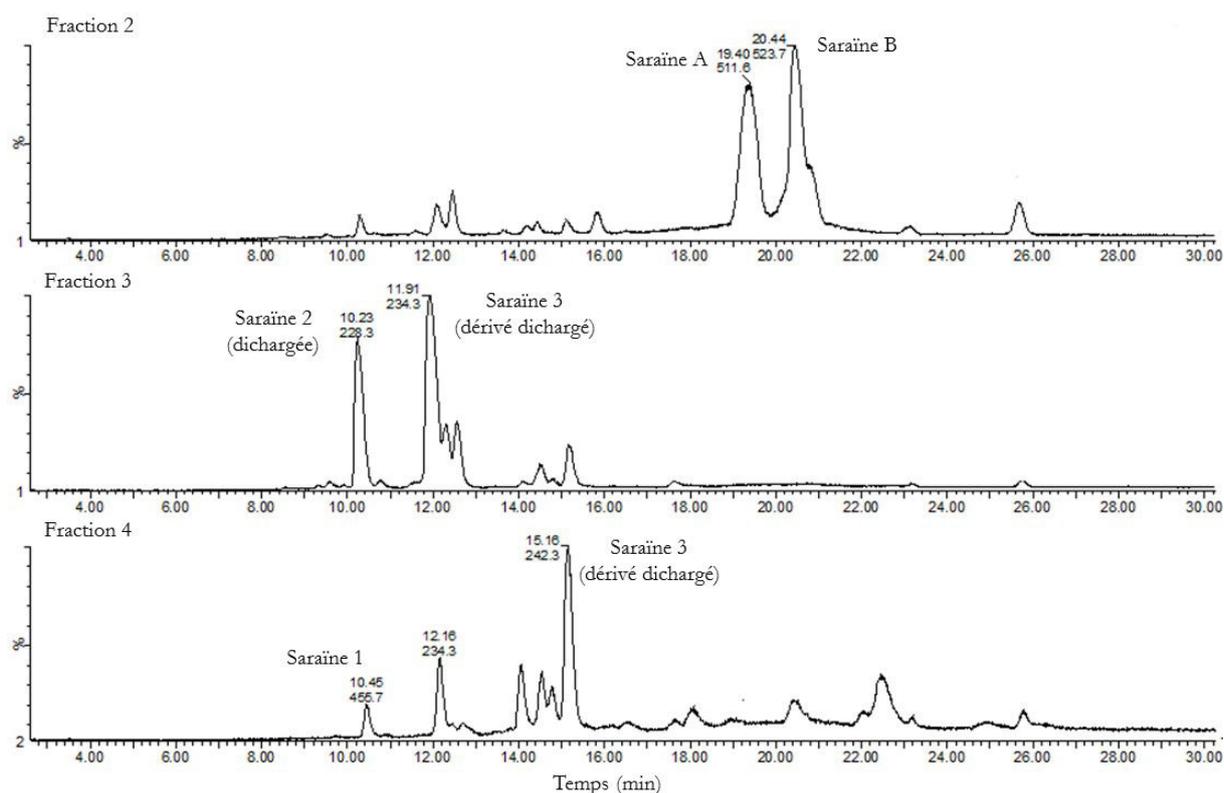


Figure 118 : Chromatogrammes HPLC-MS des fractions 2, 3 et 4 obtenus d'un échantillon d'*Haliclona sarai* utilisé pour optimiser le protocole de fractionnement. Ces résultats sont obtenus par électrospray positif à la suite d'une élution sur une colonne Luna phenyl-hexyl (250 mm×4,6 mm×5 µm) avec un mélange eau (+acide formique 0,05 %) et méthanol selon les proportions de méthanol suivantes : de 0 à 15 min, un gradient de 40 à 80 %, de 15 à 25 min, un plateau à 80 %, de 15 à 40 min un gradient de 80 à 95 % puis un rinçage de la colonne jusqu'à 70 min avec 100 % de méthanol.

Suite à ce fractionnement sur cartouches SPE, deux types d'analyse ont été réalisées sur les fractions obtenues : une mesure de radioactivité par radio-TLC et une analyse qualitative par CCM. Ces méthodes de mesure et d'analyses sont détaillées dans la troisième partie de ce paragraphe.

A la suite de ces résultats préliminaires et compte-tenu du temps imparti et des infrastructures disponibles, seules deux (sur trois) des fractions 2 disponibles pour chacun des précurseurs testés ont été purifiées par HPLC-UV : les éponges B et C pour les précurseurs acétate et tryptophane, les éponges A et B pour l'acide aspartique, et les éponges A et C pour l'acide nicotinique. Une première purification a été réalisée sur colonne semi-préparative de type phenyl-hexyl. Les éluants étaient l'eau et l'acétonitrile, chacun contenant 0,025 % d'acide acétique et étaient utilisés dans les proportions suivantes: une phase isocratique de 5 min à 47 % d'acétonitrile, un gradient de 5 à 20 min permettant d'atteindre 52 % d'acétonitrile et finalement une phase isocratique de 10 min à 52 %. Cette première étape a permis d'obtenir 9 pics pour chacune des fractions étudiées. Une seconde étape de purification a ensuite été appliquée aux pics 5 et 6 sur une colonne analytique de type C18 avec les mêmes éluants que précédemment. Cette repurification a été réalisée en mode isocratique pour chacun des deux pics isolés précédemment selon les proportions suivantes : pour le pic 5, 40 % d'acétonitrile ont été utilisés et pour le pic 6, 42 % d'acétonitrile ont été utilisés.

Afin d'identifier chacun des pics purifiés par RMN, les différentes étapes de purification ont été appliquées à un individu « contrôle » n'ayant pas été soumis au protocole d'incorporation et n'étant donc pas radiomarké.

D. Résultats

a. Maintien de l'éponge *Haliclona sarai* en aquarium

Plusieurs individus de l'espèce *Haliclona sarai* ont été maintenus en vie *ex situ* pendant 45 jours dans l'obscurité afin de reproduire leurs conditions de vie naturelle (grottes profondes). A plusieurs reprises, différents paramètres révélateurs de la « santé » de l'aquarium ont été mesurés à savoir la saturation en oxygène, le pH, la température, le taux de nitrites, le taux de nitrates et le taux d'ammoniac. Ces paramètres sont restés stables et identiques à ceux des conditions de vie de l'éponge *in situ* tout au long des manipulations. Bien que durant les premiers jours d'adaptation à l'aquarium certains individus n'aient pas survécu, la plupart des organismes utilisés étaient en bon état général à la fin des expérimentations malgré les différents stress appliqués et notamment les périodes en circuit fermé. A noter que si l'isolement de toute source lumineuse a eu pour effet d'améliorer l'état général des éponges, le régime phytoplanctonique n'a eu lui aucune influence visible.

b. Absorption des précurseurs par les éponges

La première étape de l'étude des voies de biosynthèse par l'utilisation de radio-isotopes est l'incorporation des précurseurs hypothétiques par l'organisme étudié. Dans le cas des éponges, la mise en contact avec les molécules étudiées est relativement simple puisqu'il suffit de faire les ajouts de précurseurs dans l'eau environnante qui sera filtrée par le spongiaire. Cependant, selon le type de composé utilisé, il n'est pas certain que l'éponge le filtre et l'incorpore ; il peut aussi être rejeté dans le milieu ou encore adsorbé à la surface de l'organisme ou sur les parois des aquariums.

Afin d'évaluer la quantité absorbée de chacun des précurseurs testés dans le cadre de l'étude de la voie de biosynthèse des sarainés, des prélèvements d'eau de mer ont été réalisés immédiatement après l'ajout du précurseur radiomarké dans le milieu et juste avant de placer à nouveau l'aquarium en circuit ouvert. Ces prélèvements ont ensuite été analysés grâce à un détecteur à scintillation. La différence entre les mesures réalisées au début et à la fin de chaque phase d'incorporation permet d'estimer l'absorption du précurseur par l'éponge avec laquelle il est en contact. Ces mesures ont également été réalisées sur des boîtes ne contenant pas d'éponges et servant de contrôles. Les dix mesures réalisées ont été additionnées afin d'obtenir la quantité totale de radioactivité exprimée en picocuries utilisée par le milieu au cours de cette étape d'incorporation aussi bien dans les boîtes vides que dans les boîtes contenant les éponges (Figure 119). Ces quantités mesurées ont également été exprimées en pourcentage de la quantité totale ajoutée dans chacun des milieux au cours de l'expérience (Figure 120).

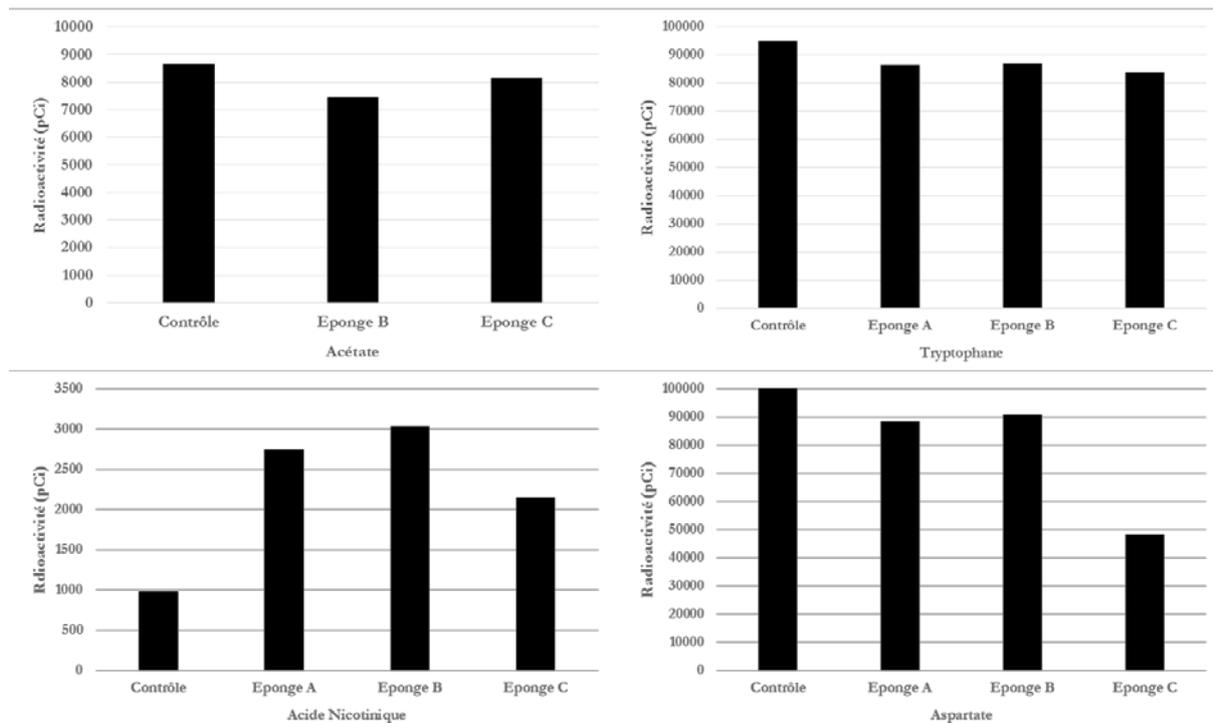


Figure 119 : Histogrammes représentant la quantité de radioactivité exprimée en picocuries ayant été utilisée dans le milieu au cours des 10 phases d'incorporation. Ces résultats sont exprimés pour les contrôles et les éponges des chacun des quatre précurseurs étudiés.

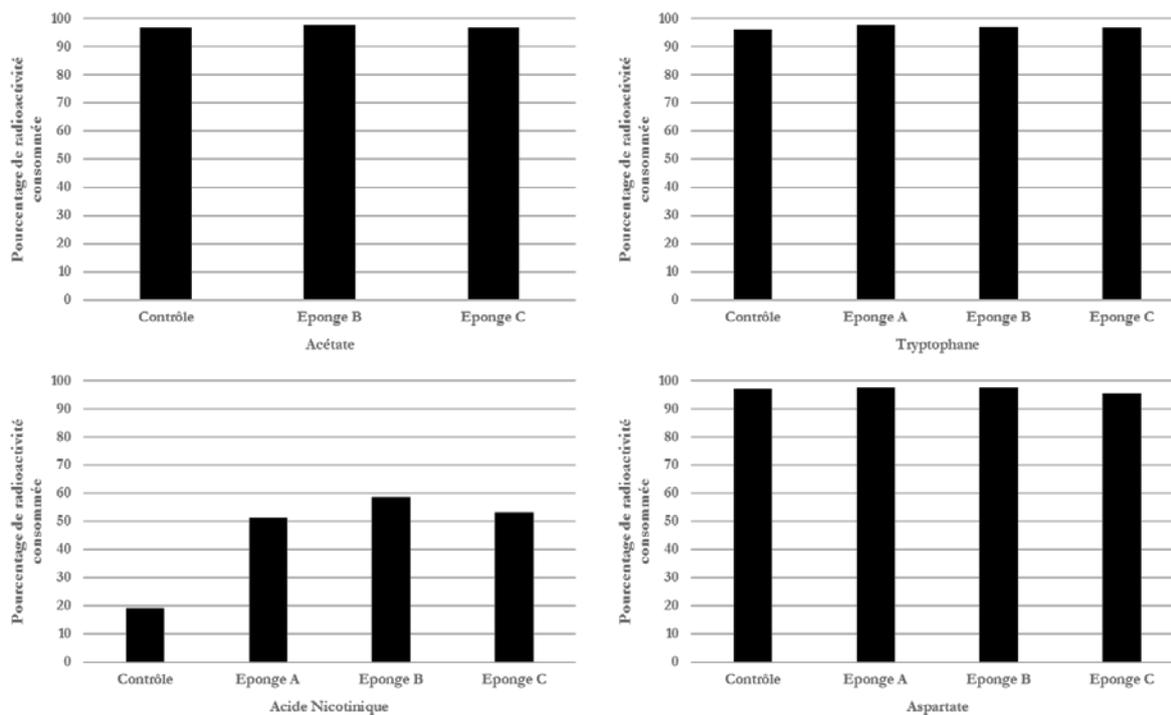


Figure 120 : Histogrammes représentant le pourcentage de la quantité totale de radioactivité ajoutée dans chacune des boîtes ayant été utilisé dans le milieu au cours des 10 phases d'incorporation. Ces résultats sont exprimés pour les contrôles et les éponges de chacun des quatre précurseurs étudiés.

Les histogrammes présentés ci-dessus sont sources de nombreuses informations. En ce qui concerne les expériences menées sur l'acétate, le tryptophane et l'aspartate, les mesures ne montrent pas de différence

majeure entre la quantité de radioactivité absorbée dans les milieux contrôles et celle absorbée dans les milieux contenant les éponges. Dans les trois cas, la quantité consommée dans chacun des milieux correspond à la totalité de la radioactivité ajoutée à chaque étape. Les résultats obtenus pour l'acide nicotinique montrent que les milieux contenant les éponges ont consommé 2 à 3 fois plus de matière radioactive que le milieu contrôle. Cette consommation correspond en moyenne à 55 % de la quantité de radioactivité initiale pour les milieux contenant les éponges et à 20 % pour le milieu contrôle.

Les quantités absorbées pour l'acétate, le tryptophane et l'aspartate dans les boîtes contrôles semblent aberrantes étant donnée l'absence d'éponge dans ces milieux. Cependant, lors de la décontamination de ces boîtes en fin d'expérience, les différentes phases de comptage permettant de s'assurer de la propreté du matériel ont révélé de grandes quantités de radioactivité sur les parois des boîtes. Il a alors été avancé qu'un microfilm bactérien se développait à la surface des boîtes et incorporant les composés radio-marqués placés dans le milieu au détriment de l'éponge. Ces observations ont permis d'intégrer lors des expériences menées sur l'acide nicotinique une étape de nettoyage de chaque boîte contenant les milieux avant chaque ajout de précurseur. En effet, les micro-organismes présents à la surface des boîtes ont la capacité d'incorporer les précurseurs ajoutés faussant les mesures de quantités de radioactivité utilisée réellement par les éponges.

Les résultats présentés par les histogrammes précédents confirment l'hypothèse du développement d'un microfilm bactérien interférant avec l'absorption des précurseurs par l'éponge. En effet, la quantité absorbée dans les boîtes contrôles diminue de 100 % dans les boîtes contrôles des trois premiers précurseurs testés à 20 % dans la boîte contrôle de l'acide nicotinique. En outre, dans les milieux contenant les éponges, la quantité absorbée évolue de 100 % pour les trois premiers précurseurs testés à 55 % pour l'acide nicotinique. Si ces résultats permettent d'estimer une absorption de l'acide nicotinique par les éponges d'environ 35 %, ils ne permettent que d'estimer les quantités d'acétate, de tryptophane et d'aspartate absorbées par les spécimens d'*Haliclona sarai* à environ 1 %.

Les résultats exprimés en picocuries montrent également une différence d'un facteur 10 entre les quantités de tryptophane et d'aspartate absorbées variant de 75000 à 95000 pCi et celles d'acétate et d'acide nicotinique variant de 2000 à 9000 pCi (pour rappel, la quantité d'acétate utilisée était 10 fois moins importante que pour les autres précurseurs). Effectivement, la quantité maximale d'acide nicotinique absorbée par le milieu contenant une éponge est de 3000 pCi correspondant à 60 % de la quantité présente dans le milieu et laissant supposer que l'éponge ne peut en absorber davantage en 16 h. Cette observation permet également d'espérer que les éponges mises en présence des trois autres précurseurs en quantités plus importantes auront pu absorber suffisamment de précurseur radio-marqué pour pouvoir l'incorporer dans leur métabolisme.

En considérant le pourcentage de matière radioactive absorbée dans le milieu contrôle et la masse sèche d'éponge correspondante, les résultats obtenus pour l'acide nicotinique peuvent être exprimés en picocuries par gramme d'éponge (Figure 121).

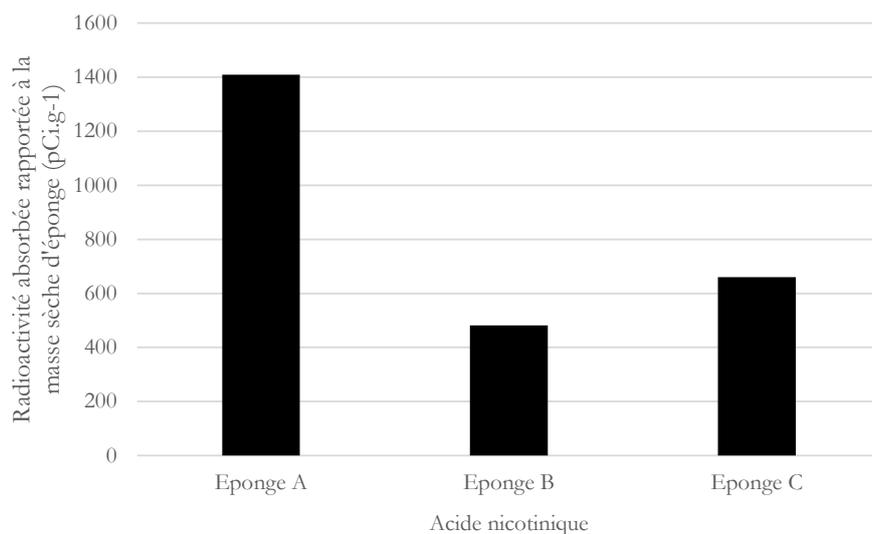


Figure 121 : Histogramme présentant la quantité de radioactivité exprimée en picuries absorbée par les trois éponges utilisées pour tester le précurseur acide nicotinique rapportée à leurs masses sèches respectives.

Une fois les mesures de radioactivité absorbée rapportées à la masse sèche d'éponge, les résultats montrent une variabilité importante de l'absorption d'une éponge à l'autre variant d'un facteur 3,5. Ces variations observées peuvent être expliquées par l'état de santé de chacune des éponges qui n'est peut-être pas toujours le même entraînant des modifications de leurs débits de filtration et de leurs capacités à incorporer le composé radio-marqué.

c. Incorporation des précurseurs dans les différentes fractions

Après la première étape d'incorporation, l'étude de la voie de biosynthèse des saraines se poursuit par l'analyse chimique des composés issus des voies métaboliques ayant pour origine les précurseurs testés. Cette deuxième étape consiste en l'extraction méthanolique de l'éponge sèche puis au fractionnement sur SPE de l'extrait obtenu selon le protocole décrit précédemment permettant d'obtenir quatre fractions de polarité décroissante (1, 2, 3 et 4). A la suite de ce processus, de nouvelles mesures de radioactivité sont réalisées sur chacune des fractions afin de vérifier la présence de radioactivité dans celles contenant les saraines. Les mesures sont réalisées au radio-TLC sur des fractions n'ayant pas été soumises à migration de façon à concentrer l'activité afin de la détecter aisément. La quantité de fraction déposée est de 2 mg pour tous les échantillons de sorte que la lecture des résultats obtenus est facilitée (Figure 122). Les fractions de l'échantillon C du précurseur acétate n'ont pas pu être mesurées ainsi que les fractions 1 (aqueuses) des échantillons du précurseur acide nicotinique.

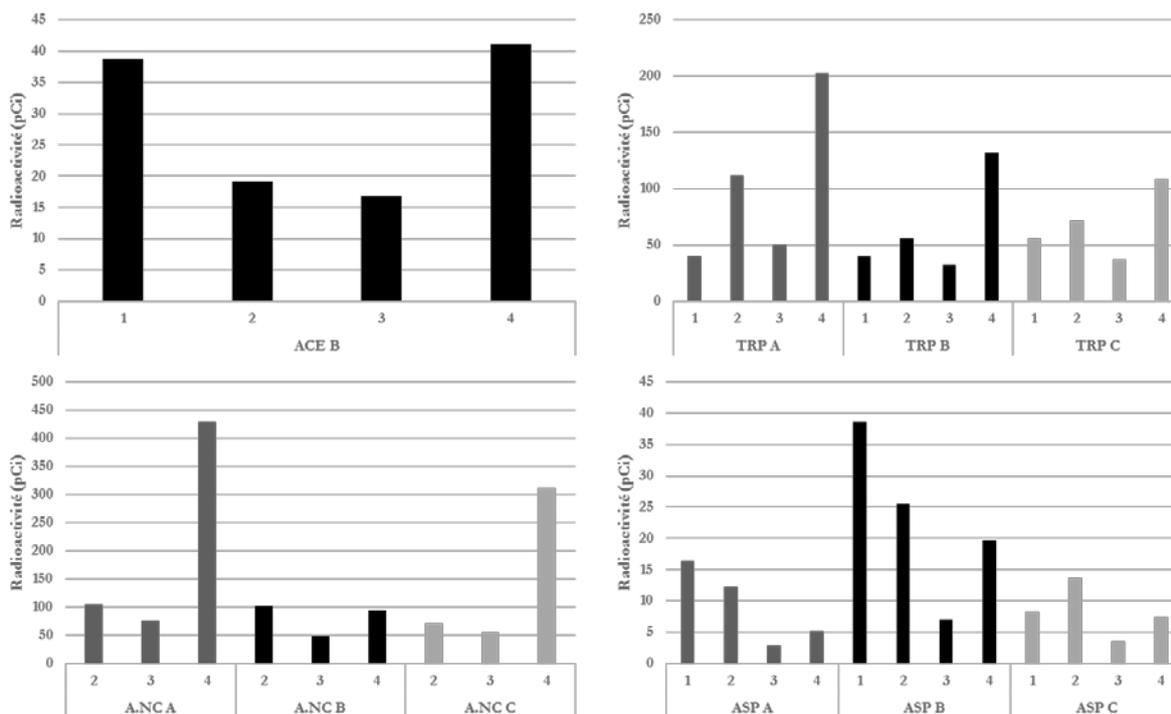


Figure 122 : Histogrammes représentant la quantité de radioactivité exprimée en picocuries mesurée pour 2 mg de chacune des fractions 1,2,3 et 4 des trois réplicats de spongiaires A, B et C utilisés pour l'étude des quatre précurseurs : acétate (ACE), tryptophane (TRP), acide nicotinique (A. NC) et aspartate (ASP).

Comme expliqué auparavant, les études préliminaires réalisées à Naples avec l'équipe d'Angelo Fontana ont montré que les saraines de type A, B et C étaient retrouvées dans la fraction 2 et que les saraines de type 1, 2 et 3 étaient retrouvées majoritairement dans la fraction 4. Les haliclamines, potentiels intermédiaires de biosynthèse, décrites dans la première partie de ce manuscrit pour la première fois dans *Haliclona sarai* n'ont pas été recherchées lors de ces expériences préliminaires et compte-tenu de la méthode utilisée pour les purifier, il a été admis qu'elles devaient se trouver dans la fraction 2.

Les mesures de radioactivité dans chacune des fractions pour chacun des précurseurs testés apportent de nombreuses informations. Une des hypothèses proposées est que l'acide nicotinique est à l'origine de la voie de biosynthèse des saraines, or dans la nature, deux précurseurs sont à l'origine de l'acide nicotinique : le tryptophane chez les animaux et l'acide aspartique chez les végétaux. Ces deux précurseurs ont donc été testés en supposant que celui des deux qui ne serait pas incorporé servirait de témoin négatif. Comme cela a été montré précédemment, les éponges ont été mises en contact avec des quantités équivalentes de ces deux précurseurs (Figure 119), or les résultats obtenus par radio-TLC montrent que sur l'ensemble des fractions, la quantité de tryptophane incorporée est 3 à 5 fois plus élevée que celle d'aspartate. En outre, dans le cas de l'aspartate, dans deux des éponges sur trois, environ 50 % soit la majorité de la quantité absorbée est retrouvée dans la fraction aqueuse (fraction 1) qui ne contient aucune molécule d'intérêt. En revanche, dans le cas du tryptophane, les quantités incorporées sont comprises entre 40 et 50 % de la quantité totale dans les fractions 4 et entre 20 et 30 % dans les fractions 2. Ces résultats préliminaires semblent donc montrer que l'acide aminé précurseur de ces voies de biosynthèse est le tryptophane.

En ce qui concerne le précurseur acétate, le manque de données rend difficile l'interprétation des résultats obtenus. Environ 70 % de la quantité totale incorporée sont répartis équitablement entre les fractions 1 et 4 laissant supposer que ce précurseur est incorporé dans les saraines de type 1, 2 et 3 (fraction 4) et qu'une partie de la quantité absorbée par l'éponge n'a pas été incorporée dans ces voies métaboliques (fraction 1). De plus, les quantités mises en présence de l'éponge au cours de l'étape d'incorporation étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées pour les autres précurseurs, il en résulte donc des quantités incorporées beaucoup moins importantes et plus difficiles à détecter.

Dans le cas de l'acide nicotinique, les mesures n'ont pas été réalisées sur les fractions 1. Cependant, les quantités incorporées dans les fractions 4 pour les éponges A et C d'environ 425 et 310 pCi respectivement laissent supposer que celui-ci a été incorporé dans les saraines de type 1, 2 et 3.

A la suite des mesures effectuées au radio-TLC sur les fractions, celles-ci ont été soumises à une analyse par CCM et la révélation des composés migrés a été réalisée au réactif de Dragendorff qui permet de mettre en évidence les amines tertiaires et dans une moindre mesure les amines secondaires par une coloration orange à marron. Afin d'évaluer la présence ou non des composés ciblés, des standards de ceux-ci ont été soumis au même protocole afin d'établir leur temps de rétention. Pour chaque standard utilisé, deux dépôts ont été effectués, un avec le standard seul et un autre avec un standard de lysine (L) marqué ubiquitairement au ^{14}C afin de vérifier qu'aucune modification du facteur de rétention (R_f) ne pouvait être liée à la présence d'un composé marqué ajouté. Ainsi, la saraine 1 (**1**) (S1), la saraine A (**7**) (SA) et l'haliclamine C (**12**) (HC) ont été soumises à ce protocole d'analyse par CCM (Figure 123).

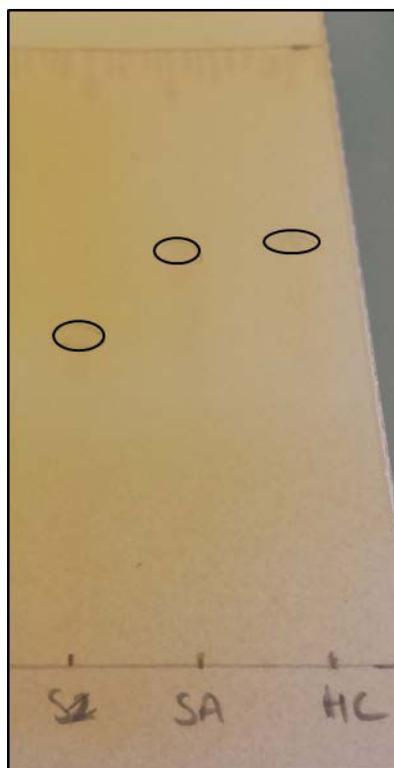


Figure 123 : Photographie de la plaque CCM avec les dépôts de saraine 1 (**1**) (S1), de saraine A (**7**) (SA) et d'haliclamine (**11**) (HC) ayant été soumis à migration pendant 2 h dans un éluant contenant 6 volumes de butanol, 2 volumes d'acide acétique et 2 volumes d'eau et révélés par le réactif de Dragendorff.

Ce premier résultat obtenu par CCM et révélation au réactif de Dragendorff permet d'évaluer une zone dans laquelle les composés d'intérêt migrent mais ne permet d'identifier précisément le composé en question. En effet, la saraine 1 (**1**) qui présente un Rf de 0,55 est relativement bien séparée des deux autres composés, en revanche la saraine A (**7**) qui présente un Rf de 0,68 et l'haliclamine C (**11**) qui présente un Rf de 0,69 sont trop proches l'une de l'autre pour être séparées convenablement dans un mélange. Cependant ces données permettent d'estimer la présence ou non des composés d'intérêt dans les fractions étudiées par CCM (Figure 124).

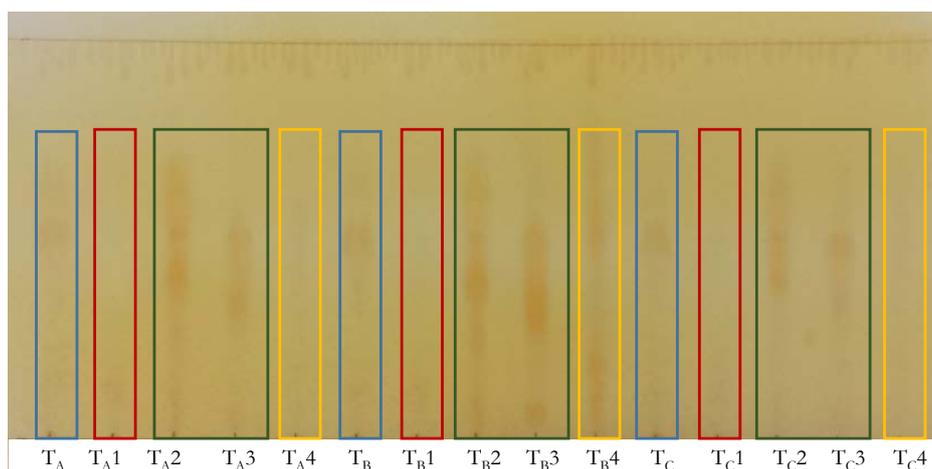


Figure 124 : Photographie de la plaque CCM avec les échantillons issus des éponges ayant été mises en contact avec le tryptophane radiomarqué : les extraits bruts encadrés en bleu (T_A , T_B et T_C), les fractions 1 encadrées en rouge, les fractions 2 et 3 encadrées en vert et les fractions 4 encadrées en jaune. Ces dépôts ont été soumis à migration pendant 2 h dans un éluant contenant 6 volumes de butanol, 2 volumes d'acide acétique et 2 volumes d'eau et révélés par le réactif de Dragendorff.

Les analyses CCM réalisées sont très reproductibles et seules celles réalisées sur les échantillons obtenus des éponges mises en contact avec le tryptophane sont donc présentées. Ces analyses montrent de très faibles traces d'alcoïdes dans les extraits bruts (encadrés bleus). Ceux-ci contenant beaucoup de sels marins, il est souvent difficile de mettre en évidence les autres composés qu'ils contiennent qui sont alors trop dilués. En revanche, l'analyse des fractions apporte différentes informations. En effet, les fractions aqueuses (fractions 1, encadrés rouges) réalisées pour éliminer ces sels ne contiennent aucune trace d'alcoïdes. Les fractions 2 et 3 (encadrés verts) contiennent des alcoïdes présentant des rapports frontaux correspondant à ceux des standards analysés auparavant. Les fractions 4 (encadrés jaunes) ne semblent pas contenir beaucoup d'alcoïdes puisque seule une fraction sur les trois exposées présente des tâches orange caractéristiques.

Pour tous les précurseurs étudiés, les résultats préliminaires présentés ci-dessus permettent d'avoir une idée plus précise quant aux hypothèses envisagées. Cependant, seule l'analyse des composés purifiés peut permettre d'établir avec certitude l'incorporation ou non des précurseurs étudiés dans les composés d'intérêt.

d. Incorporation des précurseurs dans les saraïnes de type A

Suite aux résultats obtenus à partir des fractions et compte-tenu du temps imparti, seules les fractions 2 de deux des éponges utilisées pour chaque précurseur ont été purifiées. Bien que ce ne soit pas ces fractions qui semblent avoir incorporé le plus de précurseurs radioactifs, elles contenaient potentiellement deux types de molécules à savoir les haliclamines, potentiels intermédiaires de la voie de biosynthèse, et les saraïnes de type A, B et C (7-9), produits finaux de cette voie de biosynthèse. De plus, les analyses CCM montrent que comparativement aux fractions 4, ce sont les fractions 2 qui semblent contenir les plus grandes quantités de composés d'intérêt. Cette purification permettait donc de cibler deux types de composés différents et deux étapes de la voie de biosynthèse étudiée en une seule purification.

Celle-ci a été réalisée en deux étapes. La première étape sur colonne semi-préparative de type phenylhexyl a permis d'obtenir 9 pics pour chaque fraction 2 étudiée. Le même procédé de purification ayant été appliqué à un spécimen d'*Haliclona saraï* non soumis à l'étape d'incorporation et donc ne contenant pas de composés radioactifs, les 9 pics ont pu être analysés par RMN afin d'identifier les composés d'intérêt. Les analyses réalisées sur ces 9 pics n'ont pas révélé la présence de composés de type haliclamine en revanche les pics 5 et 6 étaient des mélanges de saraïnes de type A, B ou C.

La seconde étape de purification a consisté en la repurification des pics 5 et 6 sur une colonne analytique de type C18. Cette étape a permis d'obtenir des composés purs et de s'affranchir des potentielles contaminations radioactives qui auraient pu fausser les résultats. A la suite de ces deux étapes, deux composés purs ont été obtenus pour chacune des fractions 2 purifiées : la saraïne A (7) obtenue à partir du pic 5 (Figure 125) et un autre composé de la même famille obtenu à partir du pic 6 (Figure 126). Les masses obtenues selon l'individu purifié étaient comprises entre 0,7 mg et 5,6 mg pour la saraïne A et entre 1,2 mg et 6,6 mg pour le second composé.

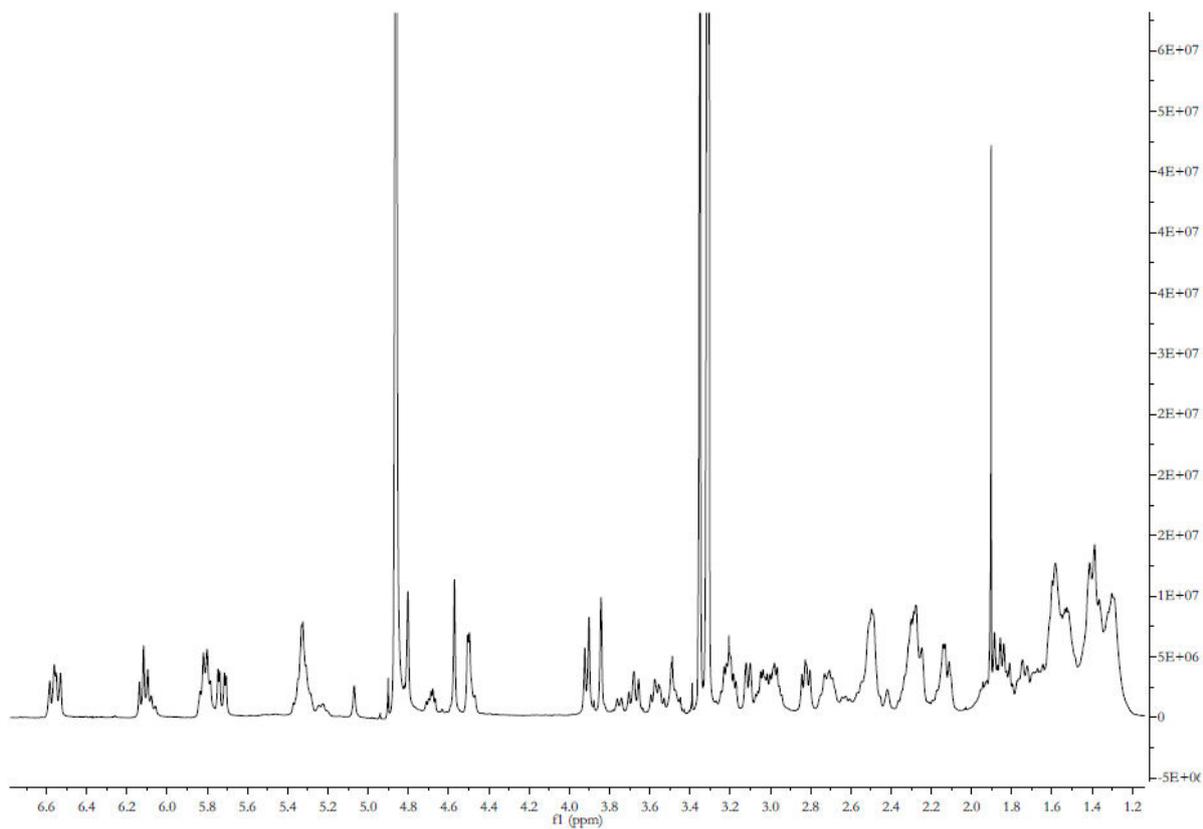


Figure 125 : Spectre RMN ^1H de la saraine A (7) purifiée à partir de l'éponge *Haliclona sarai* selon le protocole appliqué pour l'étude des voies de biosynthèse.

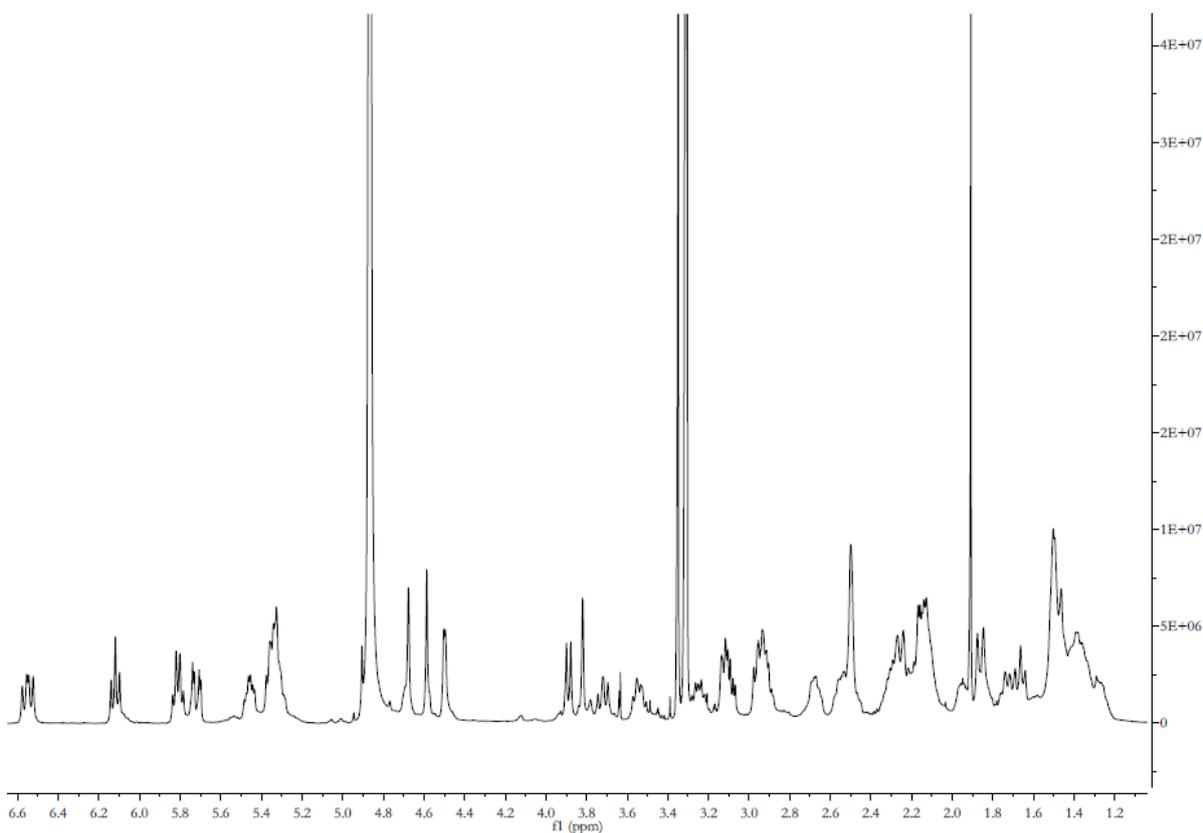


Figure 126 : Spectre RMN ^1H de la saraine C (9) purifié à partir de l'éponge *Haliclona sarai* selon le protocole appliqué pour l'étude des voies de biosynthèse.

Le spectre RMN ^1H du second composé isolé permet d'établir qu'il s'agit de la saraïne C (9). D'un point de vue biosynthétique, les investigations n'ont donc été menées que sur des composés de type saraïnes A, B ou C qui sont issus des mêmes voies métaboliques.

Afin de vérifier si les composés purifiés avaient incorporé tout ou partie des précurseurs hypothétiques testés, 0,5 mg de chacun d'entre eux ont été déposés sur plaque de silice afin de mesurer la quantité de radioactivité présente dans chacun d'entre eux grâce au β -imager, environ dix fois plus sensible que le radio-TLC. Après 93 h d'acquisition et un traitement mathématique visant à augmenter les contrastes, les résultats obtenus sont très approximatifs (Figure 127).

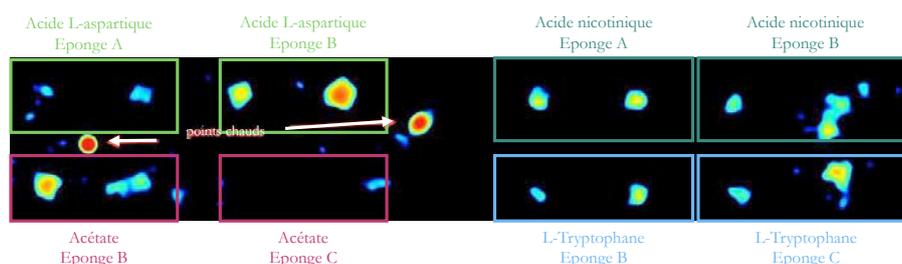


Figure 127 : Image d'acquisition au β -imager après traitement mathématique permettant d'augmenter le contraste des couleurs. Pour chacun des précurseurs testés, deux éponges *Haliclona sarai* ont été purifiées permettant chacune l'obtention de deux pics soit 4 dépôts par précurseur.

Avant d'analyser les résultats pour chacun des précurseurs, deux précisions sont à apporter. Tout d'abord, les dépôts d'étalon réalisés au CEA n'ont pas permis d'étalonner la mesure afin de mesurer les quantités de radioactivité présentes pour chacun des dépôts. En effet, il semblerait que, malgré des dépôts en plusieurs étapes, les tâches soient trop étendues et que la radioactivité soit diluée à leurs surfaces. Ensuite, deux points chauds ne correspondant à aucun dépôt sur la plaque sont apparus lors des mesures, signes d'une potentielle contamination lors des différentes manipulations de la plaque de silice.

Les observations établies à la lecture de ces résultats ne peuvent être que visuelles puisque l'étalonnage n'a pas pu être réalisé. Pour le précurseur acide aspartique, les deux pics issus de l'éponge B semblent avoir incorporé des précurseurs radioactifs alors que pour ceux issus de l'éponge A l'incorporation est moins évidente. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats obtenus sur les fractions par les mesures au radio-TLC qui montraient pour ce précurseur des quantités incorporées par l'éponge B 2,5 fois plus importantes que celles incorporées par l'éponge A (Figure 121).

Dans le cas du précurseur acétate, les pics issus de l'éponge B apparaissent lors des mesures ce qui n'est pas le cas des pics issus de l'éponge C. A nouveau, ces résultats concordent avec ceux obtenus lors des mesures au radio-TLC de la radioactivité présente dans les différentes fractions puisque les fractions de l'éponge C n'avaient pas pu être détectées contrairement à celles de l'éponge B.

En ce qui concerne les précurseurs acide nicotinique et tryptophane, les intensités observées sont les mêmes pour tous les dépôts des deux précurseurs testés. Une fois encore ces résultats sont en accord avec les précédents résultats présentés par les analyses au radio-TLC des différentes fractions qui mettaient en

évidence des quantités incorporées dans les fractions 2 de ces deux précurseurs comprises entre 50 et 100 pCi pour 2 mg de fraction déposée (Figure 122).

En revanche, les quantités incorporées dans les fractions 2 des éponges mises en contact avec les précurseurs acétate et acide aspartique étaient comprises entre 15 et 25 pCi pour 2 mg de fraction déposée (Figure 122). Or les résultats obtenus après analyse au β -imager, les intensités obtenues pour les dépôts des éponges B avec ces deux précurseurs semblent plus importantes que celles obtenues avec les dépôts correspondant aux précurseurs acide nicotinique et tryptophane (Figure 127).

E. Discussion et perspectives

Les résultats exposés ci-dessus ne permettent pas d'apporter une réponse claire quant à l'élucidation de la voie de biosynthèse des saraines. Néanmoins, ces premières approches permettent d'évaluer les failles du protocole utilisé et d'envisager les hypothèses biosynthétiques avancées sous un autre angle.

1. Protocole expérimental et incertitudes

- **Maintien des éponges en aquarium.** L'étape d'incorporation des précurseurs par les éponges peut être considérée comme la plus critique de ce protocole. En effet, les spécimens d'*Haliclona sarai* doivent être maintenus en vie *ex situ*, expérimentation dont les paramètres n'ont jamais été décrits auparavant. A ces incertitudes, s'ajoutent les conditions inhérentes à l'expérience d'incorporation qui consistent à modifier les conditions de vie de l'éponge, déjà potentiellement perturbée, d'une part en fermant le circuit d'eau de mer et d'autre part en ajoutant des composés marqués au carbone 14 dans le milieu.

- **Etat de santé des éponges.** D'un point de vue biologique, si les paramètres mesurés dans l'aquarium (température, saturation en oxygène, nitrites, nitrates et ammoniac) n'ont pas révélé d'anomalie majeure, le seul critère d'évaluation de la santé des éponges est l'appréciation visuelle du manipulateur. Ni la capacité de filtration des éponges, ni leur équilibre métabolique ne peuvent être mesurés. Dans l'idéal, il eut fallu utiliser un voire plusieurs spécimens d'éponge placés dans les mêmes conditions et pour lesquels les taux de productions de métabolites secondaires auraient été mesurés et comparés à ceux obtenus d'individus *in situ* afin d'éliminer la variable « condition *ex situ* » des potentiels facteurs d'échec. Cette approche est difficilement envisageable compte-tenu de la complexité de la purification des saraines qui ne permet pas d'obtenir des résultats véritablement quantitatifs d'une purification à l'autre.

- **Développement bactérien.** De plus, il s'est avéré au vu des résultats de comptage lors de la première partie concernant l'acétate, le tryptophane et l'aspartate que l'aptitude des éponges à absorber les composés marqués n'était pas mesurable puisque ce n'est qu'à la fin de cette première expérience d'incorporation lors des étapes de décontamination qu'a été mise en évidence la présence en quantité importante de carbone 14 sur les parois des boîtes dans lesquelles été placées les éponges. Suite à ce résultat, lors de la seconde expérience d'incorporation pour l'acide nicotinique, les boîtes ont été systématiquement nettoyées avant les ajouts de précurseurs radio-marqués. Il s'est alors avéré que les quantités incorporées lors de chaque ajout était moins importantes que lors de la première expérience et que les étapes de décontamination n'ont pas mis en évidence la présence de carbone 14 sur les parois en fin de manipulation.

Bien que ces deux phases de résultats aient été obtenues avec des précurseurs différents et ne sont donc pas à proprement parlé des réplicats, elles permettent de proposer l'hypothèse du développement d'un microfilm bactérien sur les parois des boîtes. Ces micro-organismes absorberaient eux aussi une partie des précurseurs radio-marqués ajoutés interférant alors avec l'absorption de ceux-ci par les éponges¹³⁶.

- **Impact de la fermeture du circuit.** Lors des expériences menées pour étudier la biosynthèse de l'oroïdine par *Cymbacxinella damicornis*, un seul ajout de précurseur de $3,7 \cdot 10^4$ Bq soit 1 μ Ci avait été réalisé en début de manipulation correspondant à une période en circuit fermé de 16 h puis l'éponge avait été maintenue en aquarium jusqu'à 38 jours après cet ajout de façon à procéder à la métabolisation des précurseurs¹²⁹. Dans le cas de l'étude de la biosynthèse des saraines, les éponges ont été maintenues en aquarium jusqu'à 45 jours après le premier ajout, en revanche d'autres ajouts ont été réalisés entre temps. La répétition de cette manipulation laissant les éponges en circuit fermé plusieurs heures tous les jours ou tous les deux jours est une source de stress supplémentaire pour les individus qui pourrait impliquer une modification de leur métabolisme. En effet, il est nécessaire que le milieu dans lequel les éponges sont placées soit bien oxygéné et que les particules nutritives puissent rester en suspension dans le milieu ce qui n'est pas le cas lorsque le circuit est fermé¹³⁷. En outre, la quantité de précurseur ajoutée sur l'ensemble de l'expérience est dix fois plus importante que celle utilisée dans le cas de l'étude de la biosynthèse de l'oroïdine, ce qui avait initialement pour but d'augmenter les taux d'incorporation et donc de faciliter la détection, cependant il se peut aussi que la répétition des manipulations et la quantité de précurseurs aient influencé négativement leur absorption et leur métabolisation par les éponges.

- **Période d'incorporation.** Aucune étude n'apporte d'informations quant au temps nécessaire à la production des saraines par *Haliclona sarai* à partir des précurseurs obtenus dans le milieu. Finalement, les éponges ont eu 45 jours pour métaboliser le premier ajout de précurseur et seulement une semaine pour le dernier ajout. Ce temps de métabolisation est probablement trop court compte-tenu du fait que les éponges sont décrites comme ayant un métabolisme très lent. L'accumulation des métabolites secondaires qu'elles produisent s'établit sur plusieurs années et non en quelques semaines ou même mois¹²⁷. Par conséquent, même si les précurseurs ajoutés ont bien été incorporés dans la voie de biosynthèse étudiée, les composés qui en sont directement issus et donc radio-marqués sont dilués dans le stock accumulé par l'éponge durant des années, c'est le phénomène de dilution isotopique¹²⁷. Ce phénomène est amplifié par le fait que les précurseurs proposés sont potentiellement incorporés dans 6 à 9 composés différents : les saraines A, B et C, les saraines 1, 2 et 3 et les isosaraines 1, 2 et 3. Ce problème n'était pas rencontré dans les cas de l'étude sur l'oroïdine qui est le seul composé présent en fin de voie métabolique.

¹³⁶ Ferguson R.L. et Sunda W.G., Utilization of amino acids by planktonic marine bacteria: Importance of clean technique and low substrate additions, *Limnology and oceanography*, 1984. **29**(2): p. 258-274.

¹³⁷ Carballo J.L., Yañez B., Zubía E., Ortega M.J et Vega C., Culture of explants from the sponge *Mycale cecilia* to obtain bioactive mycalazal-type metabolites. *Marine Biotechnology*, 2010. **12**(5): p. 516-525.

2. Fractionnement et choix des molécules cibles

En dépit d'une approche expérimentale présentant de nombreuses imperfections, les résultats obtenus après fractionnement montrent qu'il y a tout de même eu incorporation métabolique de tous les précurseurs notamment dans les fractions 4 et dans une moindre mesure dans les fractions 2 et 3, correspondant aux fractions contenant les métabolites ciblés. En raison des impératifs de temps, toutes les fractions ne pouvaient être travaillées et les fractions 2 de chacun des précurseurs ont été choisies pour être soumises à purification par HPLC-UV. En effet, si ces fractions ne présentaient pas les meilleurs résultats en termes d'incorporation (mesures au radio-TLC) en comparaison aux fractions 4, leurs analyses par CCM et Dragendorff montraient des quantités importantes de composés azotés d'intérêt potentiel. De plus, il avait été montré que ces fractions contenaient les saraines A, B et C dont l'intérêt pharmacologique a été démontré dans la première partie de ces travaux de thèse et il était fortement supposé qu'elles contiennent également les composés de type haliclamine. Cela permettait donc de cibler deux types de molécules à différentes positions de la voie de biosynthèse présumée : les haliclamines, intermédiaires de cette voie, et les saraines A, B et C, produits finaux de la voie métabolique étudiée. Or il s'est avéré lors des purifications par HPLC-UV, que les haliclamines n'ont pas été retrouvées et que seules deux saraines ont pu être purifiées en quantité suffisante pour être identifiées et analysées au β -imager. Ces résultats ne prouvent cependant pas que les haliclamines ne sont pas présentes dans ces fractions, en effet ces composés n'absorbent que très peu en UV et par conséquent il est difficile de les obtenir avec ce seul outil⁶⁶.

Afin de compléter ces résultats et d'obtenir des analyses plus complètes, les purifications des fractions 3 et 4 sont à envisager afin d'observer l'incorporation des précurseurs au niveau des saraines 1, 2 et 3. De plus, toutes les fractions 2 n'ayant pas été travaillées, une nouvelle purification pourrait permettre de cibler davantage les haliclamines en retravaillant au préalable des fractions non marquées avec un DEDL afin de cibler les temps de rétention de ces composés.

3. Voies métaboliques, éponges et symbioses

Les aléas rencontrés au cours de l'expérimentation ont malgré tout permis d'obtenir des résultats après l'analyse au β -imager qui restent cependant difficilement interprétables. En effet, l'absence d'étalonnage ne permet pas d'avoir d'idée précise quant aux quantités de radioactivités détectées. De plus, la présence de deux points chauds certainement dus à des contaminations et plus intenses que les dépôts réalisés semblent indiquer que les quantités déposées restent relativement faibles. Les seules interprétations réalisables sont donc très relatives.

Si il était attendu que l'acétate et l'acide nicotinique soient incorporés dans cette voie de biosynthèse, les résultats concernant l'aspartate et le tryptophane sont plus surprenants. En effet, l'hypothèse initiale indiquait que soit le tryptophane soit l'aspartate serait incorporé indiquant une seule origine de l'acide nicotinique (Schéma 4, Schéma 5); or il semble que les deux précurseurs le soient. Cependant, les résultats au β -imager pour chacun des précurseurs sont à observer avec beaucoup de précautions :

- Pour l'aspartate et l'acétate, ils ne sont pas reproductibles puisqu'un seul des deux réplicats montre une incorporation de ^{14}C .
- Pour le tryptophane et l'acide nicotinique, bien que reproductibles (visuellement), ils montrent des intensités très faibles et qui ne sont peut-être pas significatives.

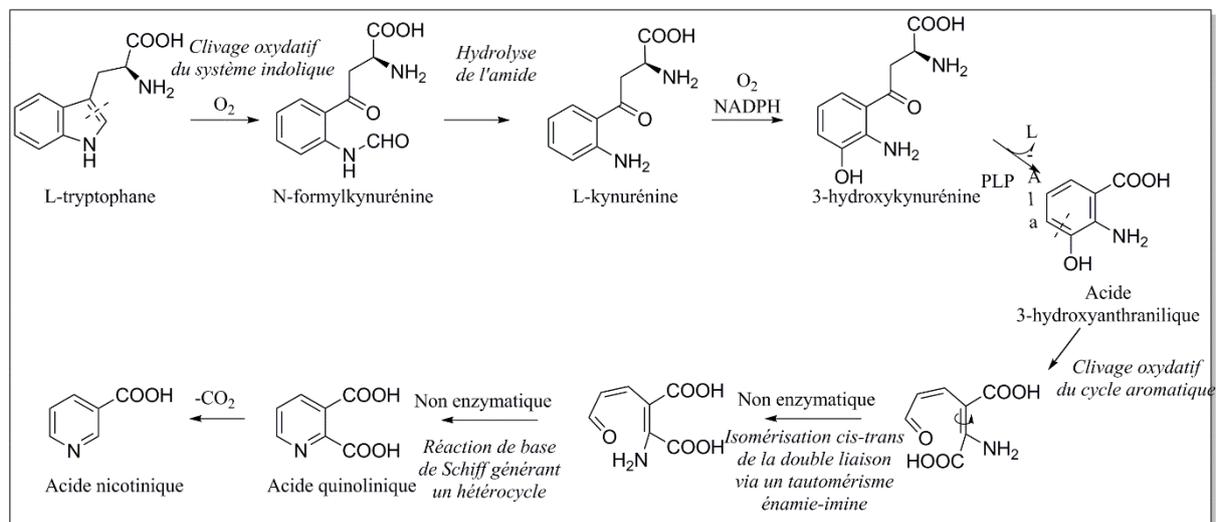


Schéma 4 Voie de biosynthèse de l'acide nicotinique à partir du tryptophane⁶.

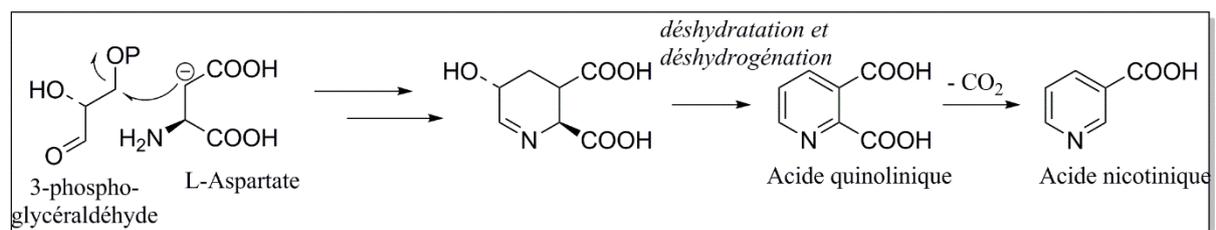


Schéma 5 : Voie de biosynthèse de l'acide nicotinique à partir de l'aspartate⁶.

En considérant que ces quatre précurseurs sont incorporés dans les saraines de type A, B et C, plusieurs explications peuvent être avancées pour interpréter ces résultats. D'une part, bien qu'une manipulation avec de l'acétate marqué au carbone 13 permettrait de confirmer la localisation des carbones marqués dans les saraines, l'acétate est probablement à l'origine des chaînes carbonées des molécules ciblées dans cette étude. D'autre part l'hypothèse de l'acide nicotinique comme origine biosynthétique des saraines semble également être confirmée bien que cela ne corresponde pas aux hypothèses proposées dans la littérature par les données chimiques sur les alcaloïdes 3-AP produits par les Haplosclérides²⁴.

Les résultats concernant la voie utilisée pour obtenir l'acide nicotinique restent cependant complexes à analyser. En effet, l'hypothèse initiale reposait sur le fait que soit le tryptophane soit l'aspartate serait à l'origine de cet acide nicotinique. Ce résultat aurait également permis d'émettre une hypothèse sur l'origine animale, végétale ou bactérienne de celui-ci. Les résultats présentés supposent qu'au-moins deux organismes sont à l'origine de l'acide nicotinique utilisé puisque les deux précurseurs sont incorporés. Considérant l'implication potentielle des bactéries symbiotiques de l'éponge dans ces voies de biosynthèse ainsi que la capacité d'*Haliclona sarai* à incorporer de l'acide nicotinique provenant du milieu environnant, il est à envisager que les organismes à l'origine de ce précurseur soient les bactéries symbiotiques utilisant l'aspartate

et/ou le tryptophane selon les espèces présentes. L'éponge synthétiserait ensuite les saraines à partir de l'acide nicotinique fourni par les symbiontes via les composés de type haliclamine qui n'ont malheureusement pas pu être (ré)isolés au cours de ces expériences. Ces observations expliqueraient la présence de ce type de voies métaboliques chez le nudibranche *Haminoea orbignyana* qui obtiendrait lui aussi l'acide nicotinique des bactéries environnantes.

Dans ce cas, ces voies de biosynthèse ont-elles réellement été mises en place au cours de l'évolution pour produire des dérivés 3-AP ou sont-elles le résultat de mécanismes visant à métaboliser l'acide nicotinique afin de l'éliminer ou tout du moins de le détoxifier pour les organismes concernés ? Si la première hypothèse est la vraie, il semblerait que l'éponge *Haliclona (Rhizionera) sarai* ait su mettre à profit cette contrainte en développant davantage de voies métaboliques permettant d'aboutir aux saraines qui présentent un potentiel pharmacologique important.

4. Perspectives

Les premières manipulations à envisager sont celles à mener sur les fractions qui n'ont pas été purifiées afin d'une part d'essayer d'obtenir les haliclamines dans les fractions 2 restantes et d'autre part de purifier les saraines de type 1, 2 et 3 pour y observer l'incorporation ou non des précurseurs utilisés. Cependant, compte-tenu des premiers résultats préliminaires exposés dans ce travail, il est peu probable que ces seules expérimentations suffisent à apporter des réponses claires.

Suite à la discussion proposée ci-dessus, d'autres manipulations peuvent donc être envisagées. Afin de confirmer les résultats avec des composés marqués au carbone 14, ces expériences devront être menées à nouveau en aquarium malgré les biais que ce type d'aménagement peut engendrer concernant les relations symbiotiques. Afin de pallier le phénomène de dilution isotopique, ces expériences devront être menées sur des périodes les plus longues possibles. Une récente étude a également démontré que des métabolites spécialisés de type alcaloïde étaient stockés dans des cellules sphéruleuses de *Crambe crambe*¹⁶. En cas de stress généré par pression sur l'éponge, ces sphérules sont relarguées dans l'eau environnante par l'éponge avec les stocks de métabolites qu'elles contiennent. Il serait alors intéressant d'envisager de stresser les spécimens d'*Haliclona sarai* avant de commencer les manipulations d'incorporation afin d'éliminer les stocks de molécules déjà accumulées et de stimuler leur production. Cette manipulation supplémentaire permettrait d'obtenir une concentration de composés marqués plus importante. Dans le cadre de manipulations telles que celles-ci, l'étude et la comparaison des populations bactériennes au sein d'*Haliclona sarai* sur des spécimens *in situ* et *ex situ* pourraient permettre la validation ou non de cette méthode utilisée.

Une fois les résultats obtenus avec des composés marqués au carbone 14, il reste à identifier quelles places prennent les carbones marqués au sein des saraines. Pour ce faire, le recours aux précurseurs marqués au carbone 13 est indispensable. Ces manipulations peuvent alors être envisagées *in situ* afin d'être biologiquement les plus proches possible des conditions de vie de l'éponge¹²⁸.

Conclusion générale

La seule classe des Haposcélérides étudiée au cours de cette thèse reflète la variété et la complexité des produits naturels issus des spongiaires et plus largement issus du monde marin. La biochimie de ces organismes complexes et robustes soulève de nombreuses questions tant d'un point de vue fondamental que appliqué: quels composés pour une espèce donnée? Quelles sont leurs origines biosynthétiques? Pourquoi leur biosynthèse est spécifique d'une espèce? Quelles applications pour les humains? Permettent-ils une classification taxonomique?

La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes (bio)chimiques nécessitent plusieurs niveaux de lecture faisant appel à des approches et des techniques variées (i.e. outils spectroscopiques, chromatographie liquide et gazeuse, radiomarquage).

Les problématiques variées (isolement, biosynthèse, phytométabolomique) pouvant être traitées *via* ces outils sont d'apparence distincte mais sont en fait intimement liées comme le montre les trois chapitres de ce manuscrit. En effet, le chapitre 1 propose une approche « classique » de la chimie des produits naturels permettant l'étude du métabolome spécialisé d'un organisme dans sa globalité et la description des éventuelles activités biologiques des molécules qui en sont issues. Ce sont ces premiers résultats qui permettent de poser les deux problématiques à l'origine des chapitres 2 et 3. La description du métabolome de différentes éponges issues du même groupe taxonomique et révélant une telle diversité chimique pose d'abord la question de l'apport d'une approche phylométabolomique dans la résolution de la classification des éponges actuellement si controversée (Chapitre 2). La complexité de ce métabolome pose ensuite la question des voies métaboliques développées par les éponges qui synthétisent ces composés nécessaires à leur survie.

Grâce aux techniques de chimie traditionnelles, la première partie de ces travaux de thèse a permis de visiter et/ou revisiter le métabolome de quatre éponges du genre *Haliclona*. Différents composés nouveaux ou déjà décrits ont pu être isolés permettant quelques avancées en termes de description de leur métabolome :

- Les composés nouveaux ont été isolés des éponges *Haliclona (Rbizionera) sarai* (NOM?), *Haliclona (Halichoclona) magna* (stéroïdes),
- L'élucidation structurale des saraines 1, 2 et 3 (*Haliclona (Rbizionera) sarai*) et des composés de type réniérine (*Haliclona (Halichoclona) fulva*) ont permis respectivement de caractériser leur stéréochimie et de mettre en évidence des erreurs dans leurs descriptions structurales.

D'un point de vue pharmacologique, l'isolement de ces différentes molécules a été accompagné d'une évaluation de leur potentiel bioactif :

- En collaboration avec l'équipe de Luis Botana (Université de Saint-Jacques de Compostelle), une activité antioxydante de la saraine A a été révélée. Une publication décrivant ces résultats est en cours de rédaction.

- En collaboration avec le Centre Scientifique de Monaco (CSM) et Gilles Pages (Université de Nice Sophia-Antipolis), l'activité antitumorale de l'acide 17-bromo-6-hydroxytricoso-16-en-2,4-diynoïque sur des cellules de cancers du sein triple négatif a été mise en évidence par des expériences *in vitro* puis *in vivo*. Les résultats obtenus de ces expérimentations seront également publiés.

- En collaboration avec l'équipe d'Isabelle Mus-Veteau (Université de Nice Sophia-Antipolis), les panicéines déjà décrites auparavant ont été testées pour leur activité biologique sur le récepteur Patched impliqué dans les phénomènes de résistance aux médicaments des cellules cancéreuses. A nouveau, les résultats très prometteurs issus de ces travaux ont été valorisés par le dépôt d'un brevet et une publication dans le journal *Oncotarget*.

L'utilisation des techniques traditionnelles de chimie des produits naturels reste très utile comme en attestent ces résultats. En effet, la mise à jour de composés nouveaux, l'évaluation de leur potentiel pharmacologique (et celles de composés déjà connus mais parfois négligés) montre l'intérêt de continuer à travailler les produits naturels issus de spongiaires. Un des obstacles majeurs quant à l'emploi de ces techniques réside dans les faibles quantités d'éponges disponibles et par conséquent de métabolites. En particulier, le développement de l'aspect pharmacologique de ces molécules requiert de grandes quantités qui auraient pu être fournies par une synthèse chimique classique si les métabolites des spongiaires n'étaient pas si complexes. Dans ce contexte, de nombreux développements biotechnologiques (élevage, biomimétisme) ont été entrepris et nécessitent encore de nombreux développements.

L'étude des voies métaboliques menant aux métabolites spécialisés fait partie de ces développements nécessaires. Dans ce contexte, des expériences de « feeding » des éponges *Haliclona sarai* ont permis de mettre en évidence que les saraines sont synthétisées à partir de l'acide nicotinique, lui-même fourni par les bactéries environnantes de l'éponge. Ces expérimentations sont les premières entreprises sur ces voies métaboliques particulières et viennent remettre en cause les hypothèses proposées par les différents spécialistes de ces métabolites dans les années 90 qui proposaient l'ammoniac et des unités en C3 comme précurseurs de ces voies de biosynthèse. Ces premiers résultats très prometteurs permettent d'envisager différentes hypothèses concernant les mécanismes enzymatiques mis en jeu au sein de l'éponge et par voie de conséquence d'envisager les descriptions enzymatiques puis transcriptomiques et enfin génomiques de ces voies de biosynthèse. En effet, une description des gènes à l'origine des saraines permettrait d'envisager leur production par le biais des biotechnologies, levant toutes difficultés de productions à grande échelle.

La dernière problématique de ce manuscrit associe la diversité chimique des éponges du genre *Haliclona* préalablement décrite et l'outil innovant qu'est la métabolomique dans l'optique de répondre aux problèmes récurrents de classification des spongiaires. Cette nouvelle question a nécessité le développement analytique de l'ensemble du processus métabolomique nécessaire pour obtenir les données permettant de répondre aux interrogations taxonomiques. Si des études chimiotaxonomiques avaient déjà été décrites au sujet des Haploclérides elles étaient toutes basées sur une approche bibliographique. Les travaux proposés ici décrivent une nouvelle approche dénommée phylométabolomique et reposant sur l'expérimentation et l'outil métabolomique. Les résultats obtenus par cette technique sont très prometteurs puisque la

classification phylométabolomique obtenue semble être corrélée avec la classification en sous-genres actuelles des éponges du genre *Haliclona*. Comme pour toutes nouvelles approches en développement, les différentes limites mises en évidence lors de ce travail ne permettent pas d'établir de conclusions définitives. Parmi ces limites, on peut citer le faible nombre d'échantillons disponibles en raison des difficultés de prélèvement ou du faible nombre de spécimens disponibles. La seconde limite réside dans la méconnaissance des métabolomes en général, et en particulier de celui des 11 espèces étudiées qui ne permet pas pour le moment d'identifier de véritables marqueurs chimiques taxonomiques. La troisième limite est l'obsolescence de la classification actuelle des spongiaires et l'absence de résultats de type génomique et ou transcriptomique avec lesquels les données obtenues auraient pu être comparées. S'il n'est pas possible de remédier à tous ces obstacles, certains d'entre eux pourraient être considérablement réduits, notamment *via* l'association avec des techniques issues des omics.

Perspectives

Dans un monde scientifique en perpétuel renouvellement tant du point de vue technique que du point de vue problématique, l'étude des spongiaires sous leurs différents aspects s'inscrit dans les domaines d'avenir. Les connaissances au sujet des éponges sont en constante augmentation, promettant de nouvelles découvertes tant d'un point de vue pharmacologique que d'un point de vue écologique.

Eponges : les pharmacies de demain ?

Ces organismes représentent une source importante de nouvelles molécules potentiellement utilisables en thérapeutique, avec notamment l'implication de certains de ces composés dans le traitement de maladies pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle que peu ou pas de traitements comme la maladie d'Alzheimer ou certains cancers particulièrement agressifs. Ces maladies en progression constante nécessitent le développement de nouveaux médicaments et les spongiaires pourraient être une source d'inspiration. Cet espoir placé dans les éponges est d'autant plus grand que de nouvelles espèces sont décrites chaque année, chacune portant son propre panel de métabolites spécialisés qui pourraient être utilisés dans le traitement des pathologies de demain. Néanmoins, un long travail de développement biotechnologique est préalablement requis afin d'aboutir à une production de composés nécessaires et suffisantes pour ce type d'application. Différentes revues ont mis en évidence l'intérêt des éponges en terme de potentiel pharmacologique^{9,10,138}.

Dans le cas particulier des éponges étudiées au cours de cette thèse, un rôle pharmacologique de certaines molécules isolées a été mis en évidence. Cependant, la compréhension des mécanismes biosynthétiques à l'origine des saraines en particulier est encore floue. A noter que ces processus métaboliques n'ont pas été étudiés pour les autres composés décrits, ce qui constitue une perspective. L'approche de l'étude des voies de biosynthèse par « feeding » doivent être plus largement employées afin de décrire ces voies métaboliques

¹³⁸ Sipkema D., Franssen M.C.R., Osinga R., Tramper J. et Wijffels R.H., Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 2005. 7: p.142-162.

pour dans un second temps produire les composés d'intérêt à moyen et à long termes via des procédés biotechnologiques (organismes recombinants par exemple).

Eponges et taxonomie

La classification des spongiaires fait actuellement l'objet de questionnements au sein de la communauté scientifique. En particulier, le groupe taxonomique auquel appartiennent les éponges étudiées au cours de cette thèse révèle une diversité chimique importante posant alors la question de l'utilisation de la chimie comme marqueur taxonomique. En ce qui concerne le genre *Haliclona*, l'étude phylométabolomique entreprise a abouti à d'intéressantes observations qui nécessitent d'être confirmées par des analyses biologiques de type microscopique, génomique ou encore transcriptomique. De plus, le protocole mis au point dans ce cadre présente quelques imperfections qui nécessitent de nouvelles optimisations tels les étapes d'extraction ou les paramètres de spectrométrie de masse. Il serait également nécessaire d'approfondir l'identification des métabolites permettant de discriminer les différents groupes taxonomiques en étudiant en détail le métabolome de toutes les espèces par les techniques utilisées dans le chapitre 1. Cette identification sera aussi possible en approfondissant l'utilisation des outils à disposition notamment en spectrométrie de masse avec les bases de données.

L'exploration de ce type de techniques permet d'envisager leur application à d'autres problématiques plus fondamentales telles l'écologie chimique ou l'écologie environnementale des spongiaires.

Eponges : quels rôles écologiques ?

Le protocole développé dans le cadre de l'étude phylométabolomique s'est révélé très efficace pour discriminer les échantillons issus d'une même espèce d'éponge en fonction de leur saison ou de leur lieu de prélèvement. Ces résultats indiquent que le métabolisme des éponges est très largement influencé par les conditions environnementales de leur milieu.

Dans les contextes de réchauffement climatique et d'acidification des océans, il m'apparaît intéressant de développer davantage ce type d'approche métabolomique afin d'évaluer l'impact des évolutions environnementales sur ces spongiaires qui ont résisté à d'importantes modifications du climat par le passé. La caractérisation des voies métaboliques modifiées par les conditions environnementales pourrait également permettre d'établir le rôle des métabolites spécialisés qui en découlent.

Jusqu'à présent le rôle joué par ces métabolites spécialisés au sein de l'éponge n'a pas été clairement établi. La métabolomique associée à des expériences d'écologie (mise en contact d'organismes compétiteurs) pourrait également un moyen de comprendre les mécanismes d'interactions entre différents organismes et le rôle des métabolites produits par ceux-ci¹³⁹.

¹³⁹ Kuhlisch, C. et Pohnert, G., Metabolomics in chemical ecology. *Natural product reports*, 2015. **32**(7): p.937-955.

Partie expérimentale

A. Outils chromatographiques

1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Quatre chaînes CLHP ont été utilisées pour l'analyse et la purification des extraits :

- UCLHP Dionex ultimate 3000 pilotées par le logiciel Chromeleon et constituée des modules suivants :
 - deux pompes ternaires contenues dans un seul module
 - un passeur d'échantillons
 - un four à colonne
 - un détecteur à barrettes de diodes
 - un détecteur évaporatif à diffusion de lumière 380 Agilent
- CLHP Jasco pilotée par le logiciel ChromNAV et constituée des modules suivants :
 - deux pompes PU-2087 Plus
 - un module de communication LC-Net II/ADC
 - un détecteur UV mono-longueur d'onde
 - un détecteur évaporatif à diffusion de lumière
- CLHP Waters pilotée par le logiciel Empower et constituée des modules suivants :
 - une pompe 600E
 - un injecteur automatique 717 plus
 - un détecteur à barrettes de diodes 996
 - un détecteur évaporatif à diffusion de lumière sedex 55
- CLHP Jasco pilotée par le logiciel ChromNAV et constituée des modules suivants :
 - une pompe PU-2087 Plus
 - un module de communication LC-Net II/ADC
 - un détecteur UV mono-longueur d'onde

2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Pour chaque précurseur, 0,5 mg de chacune des fractions ont été déposés sur une plaque de silice. L'éluant de migration utilisé était composé de six volumes de butanol, deux volumes d'acide acétique et deux volumes d'eau. La révélation des composés migrés sur la plaque a été obtenue par l'utilisation de réactif de Dragendorff spécifique des alcaloïdes.

B. Outils spectroscopiques

1. Spectrométrie de masse

- a. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse (GC-MS)

Pour obtenir les spectres de masse des composés analysés par GC-MS, un spectromètre de masse IonTrap ITQ900 ThermoScientific 3D couplé à une chromatographie gazeuse Trace ThermoQuest a été utilisé. Les échantillons ont été injectés à l'aide d'un injecteur automatique Thermo AI300 sur une colonne Phenomenex Zebron ZB5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) avec de l'hélium comme gaz vecteur.

b. Spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide (UPLC-ESI-MS)

Les analyses UPLC-ESI-MS ont été menées sur un système UHPLC Thermo Ultimate 3000 comprenant une pompe LPG3400 RS, un détecteur à barrette de diode 3000 et un spectromètre Q-TOF Bruker Impact II.

c. Spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide (HPLC-ESI-MS)

Les analyses HPLC-ESI-MS menées à Naples ont été réalisées sur un système HPLC Waters Alliance couplé à un spectromètre Q-TOF Waters.

2. Spectrométrie UV-visible et dichroïsme circulaire

Les spectres UV et CD ont été obtenus grâce à un spectropolarimètre JASCO J-810 dans une cuve de 10 mm de largeur avec les paramètres suivants : vitesse de scan 50 nm.min⁻¹, résolution 2 nm et 5 accumulations sur des échantillons solubilisés dans l'acétonitrile.

3. Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge ont été obtenus entre 4000 et 400 cm⁻¹ (résolution 2 cm⁻¹, 64 scans par spectre) sur un spectromètre Tensor 27 (Bruker) équipé d'un module diamant ATR DurasmpIR à 9 réflexions avec un échantillon sec.

4. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker Avance 500 MHz.

Les solvants deutérés (CDCl₃ δ_H 7,26 ppm, δ_C 77,1 ppm ; CD₃OD δ_H 3,31 ppm δ_C 49,0 ppm ; D₂O δ_H 4,70 ppm) ont été fournis par Euriso-top. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au solvant deutéré utilisé comme talon interne. Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hz et leur multiplicité est indiquée par les abréviations suivantes :

- s (singulet)
- d (doublet)
- t (triplet)
- q (quadruplet)
- m (multiplet)

C. Analyse polarimétrique

Les rotations optiques des échantillons ont été mesurées par un polarimètre Perkin Elmer modèle 343 en mode « rotation optique » à 20 °C, à la longueur d'onde de 589 nm et avec une ouverture normale. Les échantillons ont été dilués dans l'acétonitrile.

D. Outils de radiodétection

1. Détecteur à scintillation

Les prélèvements d'eau de mer réalisés au cours de l'étape d'incorporation de précurseurs radio-marqués, ont été analysés par un détecteur à scintillation TriCarb Perkin Elmer grâce au liquide à scintillation Ultima Gold LSC Cocktail®. Cette première étape de comptage pour évaluer le pourcentage d'incorporation des précurseurs par les éponges est réalisée à l'AIEA à l'aide d'un détecteur à scintillation. Immédiatement après la mise en contact du précurseur avec l'éponge, 1 mL d'eau est prélevé dans la boîte dans laquelle se trouve l'éponge et est placé dans 9 mL de liquide scintillant. Un second prélèvement est réalisé à la fin de la période d'incorporation. La différence entre les deux prélèvements permet d'obtenir la quantité de précurseur absorbée par l'éponge en cpm. Celle-ci est alors transformée en μCi et rapportée à la masse totale d'éponge sèche.

2. Radio-TLC

La radioactivité des plaques CCM sur lesquelles ont été déposées les fractions obtenues après fractionnement sur SPE des extraits bruts afin d'évaluer l'incorporation des précurseurs a été mesurée au Radio-TLC RITA Star (Raytest). Pour chaque précurseur, 2 mg de chacune des fractions sont déposés sur une plaque de silice et la mesure est réalisée sur les dépôts non soumis à migration. La mesure en valeur absolue de radioactivité a été établie après réalisation d'une courbe d'étalonnage à partir de proline marquée ubiquitairement au ^{14}C (Figure 128).

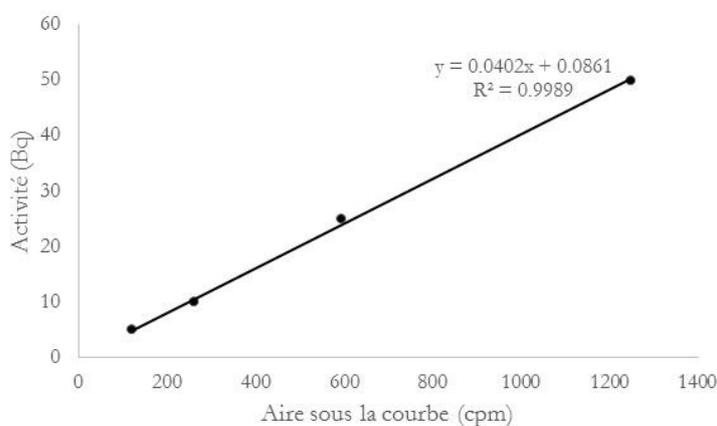


Figure 128 : Courbe d'étalonnage du radio-TLC par l'utilisation d'un standard de proline marqué ubiquitairement au ^{14}C .

3. β -Imager

Les dépôts sur plaque CCM des pics purs obtenus après purification ont été analysés au β -Imager (CEA) afin d'évaluer la quantité de radioactivité qu'ils contenaient. Après caractérisation des pics obtenus par RMN après repurification, 500 μg de chacun d'entre eux ont été déposés sur plaque de silice afin d'être comptés (Figure 129). Pour chaque précurseur testé, il y avait finalement deux individus purifiés permettant l'obtention de deux composés chacun soit quatre dépôts par précurseur. Des dépôts d'étalon de 0,001 nCi et de 0,05 nCi ont été réalisés. L'acquisition a duré 93 h.



Figure 129 : Photographie de la plaque de silice sur laquelle ont été déposés chacun des pics à analyser au β -imager.

4. Précurseurs radioactifs

Les quatre précurseurs radioactifs étudiés ont été achetés au laboratoire Hartmann Analytic. Les activités spécifiques pour chacun d'entre eux étaient les suivantes :

- Acétate [$U-^{14}C$] 106 mCi.mmol⁻¹
- L-tryptophane [side chain- $3-^{14}C$] 55 mCi.mmol⁻¹
- L-acide aspartique [$U-^{14}C$] 280 mCi.mmol⁻¹
- Acide nicotinique [$2-^{14}C$] 53 mCi.mmol⁻¹

E. Echantillons biologiques

1. *Haliclona sarai*

Les individus d'*Haliclona sarai* utilisés pour l'étude du métabolome (Chapitre 1), ont été prélevés dans la baie de Villefranche-sur-Mer (Alpes-Maritimes, France) à une profondeur d'environ 30 m en février 2013.

Les individus d'*Haliclona sarai* utilisés pour l'étude des voies de biosynthèse des saraines (Chapitre 3), ont été prélevés dans la baie de Villefranche-sur-Mer à une profondeur d'environ 40 m en novembre 2014.

2. *Haliclona fulva*

Les individus d'*Haliclona fulva* utilisés pour l'étude du métabolome (Chapitre 1), ont été prélevés dans la baie de Villefranche-sur-Mer à une profondeur d'environ 25 m à l'entrée d'une grotte en septembre 2013.

3. *Haliclona mucosa*

Les individus d'*Haliclona mucosa* utilisés pour l'étude du métabolome (Chapitre 1), ont été prélevés dans la baie de Villefranche-sur-Mer à une profondeur d'environ 25 m à l'intérieur d'une grotte en octobre 2013.

4. *Haliclona magna*

Les individus d'*Haliclona magna* utilisés pour l'étude du métabolome (Chapitre 1), à La Ciotat (Bouches-du-Rhône, France) en octobre 2014 par l'équipe de Thierry Perez.

5. Espèces du genre *Haliclona* étudiées par métabolomique

Les éponges utilisées pour les expérimentations de phylométabolomique ont été prélevées selon les conditions détaillées dans le Tableau 15 : Tableau récapitulatif des différents prélèvements d'éponges réalisés pour les expériences de phylométabolomique..

Les prélèvements ont été réalisés par l'équipe de Grace McCormack en Irlande, l'équipe de Thierry Perez dans la région marseillaise et l'équipe d'Olivier Thomas dans la baie de Villefranche-sur-Mer.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des différents prélèvements d'éponges réalisés pour les expériences de phylométabolomique.

· Gurraig	N 53° 11' 21,984"	O 9° 24' 5,04"
· Cassidaigne	N 43°11'24,2"	E 5°31'54,88"
· 3 PP	N 43° 9,79'	E 5° 35,97'
· Villefranche-sur-Mer	N 43° 41' 30,0"	E 7° 19' 11,9"
· Monaco	N 43° 43' 34,9"	E 7° 25' 15,2"
· Grotte de Jarre	N 43° 11' 52,0"	E 5° 21' 53,8"
· Riou Caramasseigne	N 43° 10' 19,3"	E 5° 23' 37,4"

Publications

Does the Chemical Diversity of the Order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongia) Fit with Current Taxonomic Classification?

Authors

Marie-Aude Tribalat¹, Maria V. Marra², Grace P. McCormack², Olivier P. Thomas^{1,3}

Affiliations

¹ Géoazur UMR Université Nice Sophia Antipolis-CNRS-IRD-OCA, Valbonne, France

² National University of Ireland Galway, Zoology, School of Natural Sciences, University Road, Galway, Ireland

³ National University of Ireland Galway, Marine Biodiscovery, School of Chemistry, University Road, Galway, Ireland

Key words

- sponges
- Haplosclerida
- alkaloids
- polyacetylenic
- chemotaxonomy

Abstract

Sponges and their associated microbiota are well known to produce a large diversity of natural products, also called specialized metabolites. In addition to their potential use in the pharmaceutical industry, these rather species-specific compounds may help in the classification of some particular sponge groups. We review herein compounds isolated from haplosclerid sponges (Class Demospongia, Order Haplosclerida) in order to

help in the revision of this large group of marine invertebrates. We focus only on 3-alkylpyridine derivatives and polyacetylenic compounds, as these two groups of natural products are characteristic of haplosclerid species and are highly diverse. A close collaboration between chemists and biologists is required in order to fully apply chemotaxonomical approaches, and whenever possible biological data should include morphological and molecular data and some insight into their microbial abundance.

Introduction

Sponges (Phylum Porifera) are sessile invertebrates distributed in most aquatic ecosystems. In marine areas like the Caribbean Sea, they may represent the largest substrate cover and/or the largest organic biomass of living organisms, thus contributing significantly to several nutrient cycles due to their outstanding filtering capabilities [1,2]. In addition, during their long evolutionary history, most, if not all, of the diverse species of this group (>8000 described species to date) together with their associated microbiota have developed unique metabolic pathways leading to a huge diversity of natural products, also called specialized metabolites [3]. Taxonomic classification in this particular group of marine invertebrates is still highly challenging due to a paucity of morphological characters and a discrepancy between molecular and morphological data in many cases. For this reason, biochemical information has been recently used as a complementary tool (particularly within the framework of targeted or untargeted metabolomic approaches), leading to the recent concept of integrative systematics [4].

Within the Class Demospongiae, sponges belonging to the Order Haplosclerida are considered among the most prolific sources of bioactive

marine natural products, including alkaloids, polyacetylenes, or terpene derivatives. This group is also one of the most diverse of the sponge groups in terms of numbers of species and habitats, and its members also have few distinguishing morphological characteristics. The current classification of the order as outlined in *Systema Porifera*, based primarily on morphology, is comprised of three suborders [two marine (Haplosclerina and Petrosina) and one freshwater (Spongillina)]. The marine suborders together comprise six families; Callyspongiidae, Chalinidae, Niphatiidae, Petrosiidae, Phloeodictyidae, and Calcifibrospongiidae [5]. Analysis of sterol chemistry had indicated possible difficulties with their classification [6], suggesting patterns of relatedness that did not agree with morphological data, while in contrast, a review of 3-alkylpiperidine alkaloids appeared to agree with the current classification [7]. Subsequent molecular phylogenetic studies reveal an evolutionary history that is not completely compatible with *Systema Porifera*, indicating that the freshwater sponges belong elsewhere in the Demospongiae, and that while the marine Haplosclerida do form a clade, the suborders and the families (where there is enough data) are polyphyletic [8]. For this reason, a reassessment of the Order Haplosclerida is underway by multiple research groups, as an assessment of chemical

received Nov. 29, 2015
revised March 8, 2016
accepted March 22, 2016

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-105879>
Published online May 2, 2016
Planta Med 2016; 82: 843–856
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Grace P. McCormack
Ryan Institute
School of Natural Sciences
National University of Ireland
University Road
Galway
Ireland
Phone: + 35 3 91 49 23 21
Fax: + 35 3 91 49 45 35
grace.mccormack@nuigalway.ie

Correspondence

Prof. Olivier P. Thomas
School of Chemistry
National University of Ireland
University Road
Galway
Ireland
Phone: + 35 3 91 49 35 63
Fax: + 35 3 91 49 55 76
olivier.thomas@nuigalway.ie

diversity may help in the development of a robust integrative classification of the group and, in return, current systematic studies in this group may also direct the search for related compounds of interest.

This review will focus on two major classes of specialized metabolites found in the Order Haplosclerida (3-alkylpyridine derivatives and polyacetylene derivatives) and will discuss them in view of the currently accepted classification for five of the six families described in *Systema Porifera* [5], with no compound being reported so far from sponges of the sixth family Calcifibrospongiidae [9]. Sterols and fatty acids have been reported for some members of this group in 1994 [6], and the large chemical diversity produced by this prolific sponge group was last collated in 1996 for 3-alkylpiperidine derivatives [7]. This review is not aimed to be exhaustive but discusses representatives of 3-alkylpyridine derivatives and polyacetylene derivatives. Given that they are both widely distributed amongst haplosclerid species, are largely restricted to this group, and are rather unique in the field of natural products, we consider that focusing our review on these two chemical families provides ample information to help identify discrepancies in the classification, areas for focus in the construction of a revised integrative classification and valuable avenues for future research focus.

Major issues with publishing descriptions of compounds from species that have not been fully identified will become apparent. This issue is relevant not only for the group of marine sponges included here, but for any organism of interest for bioprospecting. Accompanying morphological identification with a DNA sequence is a highly recommended way forward (in addition to deposition of a specimen voucher in a respected institute/museum). We intend this review to encourage better connections between chemists and biologists in an effort to identify novel compounds of interest while also striving to understand the origins and evolution of the same. A solid taxonomic description and classification will help in the rational collection of closely related species that will produce a large diversity of analogues of a targeted natural product family. Greater collaborative efforts will therefore increase avenues for identification of bioactive compounds, increase the likelihood of finding exploitable sources and perhaps even a biotechnological route for production. Knowledge of the complex comparative chemistry will assist in unravelling the controversial systematics specifically within the Order Haplosclerida, but will also lead to fruitful considerations in terms of chemotaxonomy within the phylum itself (Porifera, the sponges).

Distribution of Simple 3-Alkylpyridine Derivatives in the Haplosclerida

Several 3-alkylpyridine derivatives have been isolated from the Haplosclerida, including in some cases the coupling of one or more similar moieties. This group of compounds is differentially distributed across Niphatidae, Callyspongiidae, Chalinidae, and Petrosiidae, but they are not yet reported from confirmed members of the Phloeodictyidae. The presence/absence of these classes of compounds in haplosclerid sponges are summarized in **Table 1**.

Family Niphatidae

Within the family Niphatidae, an outstanding diversity of alkaloids has been isolated from members of the genus *Amphimedon*. Monomers of 3-alkylpyridines named hachijodines E–G as well as glycosylated monomers named amphimedosides A–E were isolated from *Amphimedon* sp. collected off Hachijo-Jima Island (Japan; **Fig. 1**) [10,11]. Additional mono- and dimers, pyrinodemins B–I, were reported from *Amphimedon* sp. found in the same area (Nakijin, Okinawa) along with a high number of dimers bearing a hydroxylamine moiety, starting with the bis-3-alkylpyridine derivative pyrinodemin A and nakinadines A–F (with a β -aminoacid) [12–16]. All of the compounds mentioned were found to exhibit cytotoxicity. *Niphates* sp. yielded some mono-3-alkylpyridine derivatives named niphatynes A–B, again from the Northwestern Pacific (Fiji; **Fig. 2**) [17], and Kobayashi's group more recently described some very close analogues named niphatines A–H from a Japanese sponge of the same genus (**Fig. 2**) [18,19]. Pyrinadines A–G have been isolated from *Cribrochalina* sp., also from the Japanese coast (**Fig. 2**) [20,21]. It is not known if the two *Amphimedons* or *Niphates* sp. mentioned here are the same species or two separate species in each case given that the specimens were collected in the same geographical area. Comparison of the specimen vouchers from the various studies will have to be performed to confirm if this is the case and preferably also comparison of DNA sequences.

It would appear that simple mono- and bis-3-alkylpyridine derivatives are restricted to species belonging to the genera *Amphimedon*, *Cribrochalina*, and *Niphates*, all belonging to the family Niphatidae (**Table 1**). While molecular data confirms that certain *Niphates* and *Amphimedon* species are related to each other, the position of *Cribrochalina* and *Pachychalina* in relation to other members of the Niphatidae family remains unresolved [22]. As more focus is placed on resolving haplosclerid taxonomy, and compounds are isolated from more fully described species, it will be interesting to confirm if this pattern remains.

Also, within the family Niphatidae, a dimeric cyclostelletamine (3-alkylpyridiniums) was isolated from the Northwestern Pacific sponge *Amphimedon compressa* [23]. Complex mixtures of polymeric halitoxins were isolated from several species present in the Northern Caribbean (*Haliclona rubens*, *H. viridis* and *H. erina*) that later were classified as *A. compressa*, *Amphimedon viridis*, and *Amphimedon erina* (**Fig. 3**) [24]. Later, analogous and bioactive polymers named amphitoxins were isolated as major constituents of *A. compressa* from the Caribbean [25,26]. Some trimeric 3-alkylpyridinium salts named niphatoxins A–B were isolated from *Niphates* sp. collected in the Red Sea by Talpir et al. (**Fig. 3**) [27]. No DNA sequence has been generated yet for *A. erina*, and while molecular data does not cluster *A. compressa* and *A. viridis* directly together, they are both placed in the same subgroup (Clade C), and are thus related to each other and with *Niphates* species [8,22]. The chemical content of the Southwestern Atlantic (Brazil) sponge *Pachychalina alcaloidifera* also includes the presence of antimicrobial and antimycobacterial cyclostelletamines A–K (**Fig. 3**) [28,29]. In addition, C–C and C–N bis- and tris-3-alkylpyridinium derivatives named pachychalines A–C were isolated from *Pachychalina* sp. collected in the Northwestern Atlantic (Caribbean; **Fig. 3**) [30]. Relationships of these *Pachychalina* species to each other and to other Haplosclerida have not yet been resolved using morphological and molecular data.

Table 1 Distribution of 3-alkylpyridine derivatives and polyacetylenic compounds within Haplosclerida sponges.

	3-Alkyl-pyridine	3-Alkyl-pyridiniums	Simple C4–C5' bis-3-alkylpiperidine	Complex C4–C5' bis-3-alkylpiperidine	Manzamines	Polyacetylenes
Callyspongiidae						
<i>Arenosclera brasiliensis</i>			X			
<i>Callyspongia fistularis</i>						X
<i>Callyspongia pseudoreticulata</i>						X
<i>Callyspongia ridleyi</i>		X				
<i>Callyspongia siphonella</i>						X
<i>Callyspongia truncata</i>						X
<i>Callyspongia</i> sp.		X				X
<i>Siphonochalina</i> sp.						X
Chalinidae						
<i>Haliclona densaspicula</i>				X		
<i>Haliclona fulva</i>						X
<i>Haliclona osiris</i>						X
<i>Haliclona sarai</i>				X		
<i>Haliclona viscosa</i>		X	X			
<i>Haliclona</i> (<i>Haliclona</i>)						X
<i>Haliclona</i> sp.	X	X	X		X	X
<i>Haliclona</i> (<i>Reniera</i>)		X		X		
Niphatidae						
<i>Amphimedon</i> sp.	X	X	X		X	
<i>Cribrachalina dura</i>						X
<i>Cribrachalina vasculum</i>						X
<i>Cribrachalina</i> sp.	X					
<i>Niphates lunisimisis</i>						X
<i>Niphates</i> sp.	X	X				X
<i>Pachychalina alcaloidifera</i>		X	X	X		
<i>Pachychalina</i> sp.		X				
Petrosiidae						
<i>Acanthostrongylophora ingens</i>			X		X	
<i>Acanthostrongylophora</i> sp.					X	
<i>Neopetrosia exigua</i>			X			
<i>Neopetrosia proxima</i>			X			
<i>Neopetrosia seriata</i>			X			
<i>Petrosia corticata</i>						X
<i>Petrosia ficiformis</i>						X
<i>Petrosia solida</i>						X
<i>Petrosia strongylata</i>						X
<i>Petrosia volcano</i>						X
<i>Petrosia</i> (<i>Strongylophora</i>)						X
<i>Petrosia</i> sp.						X
<i>Xestospongia muta</i>						X
<i>Xestospongia testudinaria</i>						X
<i>Xestospongia</i> sp.					X	X
Phloeodictyidae						
<i>Oceanapia triangulata</i>						X
<i>Oceanapia</i> sp.						X

Family Callyspongiidae

Alkylation at the nucleophilic nitrogen N-1 of the pyridine leading to 3-alkylpyridinium salts is observed in some species of this family. A tris-3-alkylpyridine derivative called niphatoxin C was found in *Callyspongia* sp. from the Western Pacific (Northwestern Australia), while Buchanan et al. showed the presence of 3-alkylpyridinium polymeric salts from *Callyspongia* (*Toxochalina*) *ridleyi* also collected in the Western Pacific (Papua New Guinea; ● Fig. 4) [31]. These compounds with MW between 5 and 6 kDa cause an irreversible membrane potential depolarization.

In some particular cases, 3-alkylpyridiniums are functionalized through reduction of the aromatic ring leading to highly reactive iminium/enamines intermediates that most commonly lead to the coupling of two units through a C-4/C-5' bond. This function

to connect the two chemical moieties is highly specific and the capability is present only in Haplosclerida and within this group in only a small number of species. The presence of this enzymatic capacity is likely to have phylogenetic significance and thus represents a link between chemistry and taxonomy. Within the family Callyspongiidae, Torres et al. [32] described the arenosclerins A, B, and C but also haliclonacyclamine E, macrocyclic bis-3-alkylpiperidine derivatives from the Southwestern Pacific sponge *Arenosclera brasiliensis* (● Fig. 5) [32]. Inversion of configurations at several asymmetric centers is intriguing and suggests a non-specificity of the enzymes involved. Later, the same authors reported some antibacterial activities of arenosclerins but also some cytotoxic activities against tumoral cell lines [33]. *Arenosclera* as a member of the family Callyspongiidae is a genus well

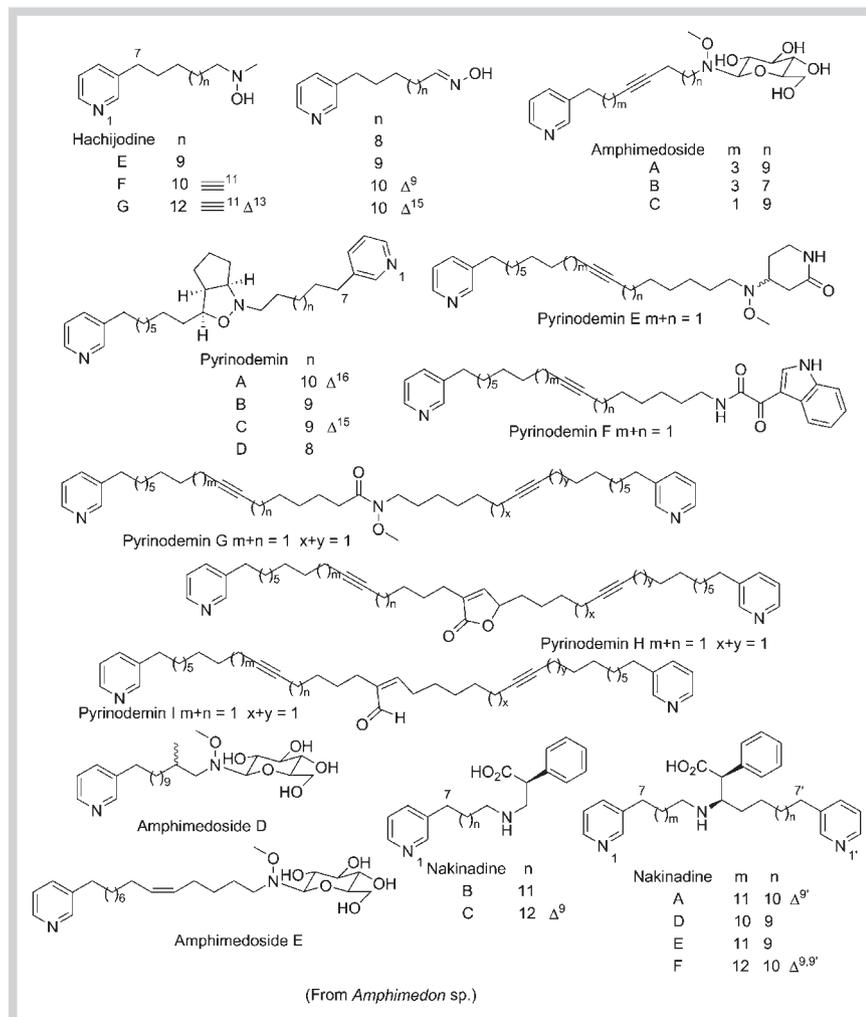


Fig. 1 3-Alkylpyridine derivatives isolated from the species *Amphimedon* sp. (Niphatidae)

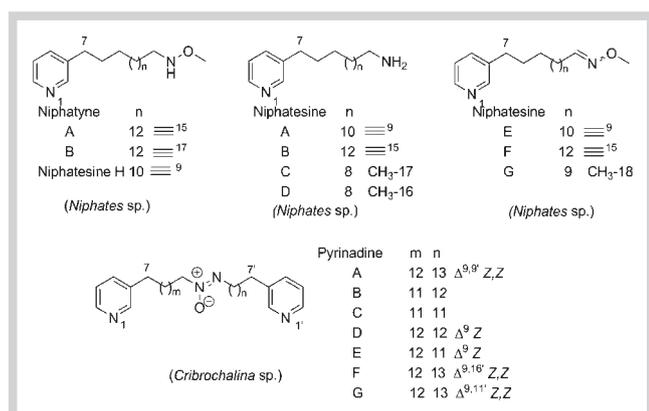


Fig. 2 3-Alkylpyridine derivatives isolated from the species *Cribrochalina* sp. and *Niphates* sp. (Niphatidae).

separated from *Haliclona* (Chalinidae) where bis-3-alkylpiperidines are more commonly found. However, recent molecular studies suggest that members of the Callyspongiidae family are closely related to the type species of *Haliclona* including the only *Arenosclera* species so far sequenced (*Arenosclera heroni*) [8,22,34].

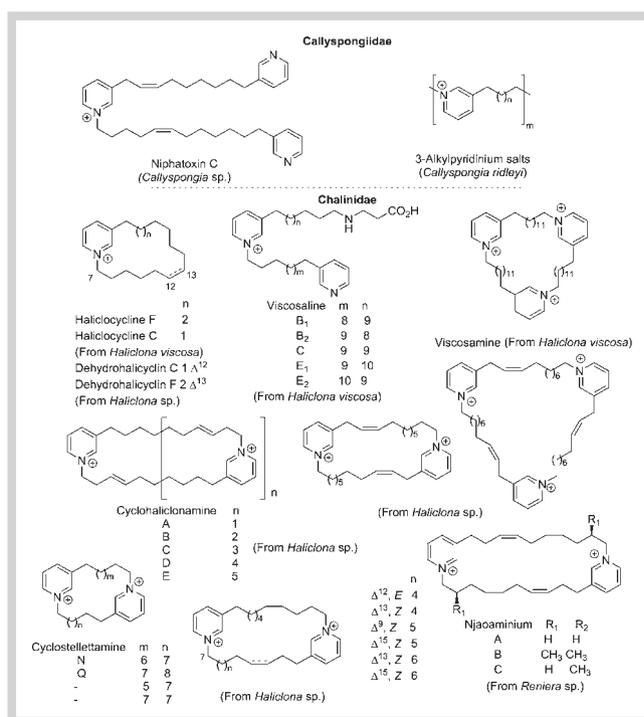


Fig. 3 3-Alkylpyridinium salts isolated from Niphatidae sponges.

amines A–D were isolated from another *Haliclona* sp. in the Western Pacific (Australia; ● Fig. 5) [58,59]. These compounds were found to be cytotoxic, but also displayed antibacterial and antifungal properties [54].

There are some taxonomic connections between the families Chalinidae and Niphatidae that are currently under investigation, but are relevant to the organization of this review. Very few C-4/C-5' connected bis-3-alkylpiperidine derivatives have been isolated from the Niphatidae family, but include oxidized analogues of halicyclamines identified in *Amphimedon* sp. from the North-western Pacific (Japan; ● Fig. 5) [60] and some bis-3-alkylpiperidine alkaloids identified from *Pachychalina alcaloidifera*, namely haliclonacyclamine F and arenosclerins D and E (● Fig. 5) [61]. However, *H. viscosa* mentioned above is more related via molecular data to species of *Niphates* than it is to the type species of *Haliclona* (Stephens, unpublished PhD thesis, National University of Ireland, Galway). Some of the Australian *Haliclona* also cluster with *Niphates* species rather than the type *Haliclona* species, meaning that this group of compounds may end up being more characteristic of Niphatidae than the Chalinidae in time, and make better sense of the distribution of these specific derivatives.

Family Petrosiidae

A large diversity of alkaloids has been described from sponges of the genus *Acanthostrongylophora*, but only a small number of simple bis-3-alkylpiperidines. Garson's group isolated a derivative named acanthocyclamine A from *Acanthostrongylophora ingens* collected from the Western Pacific (Indonesia; ● Fig. 7) [62]. Nakagawa et al. [63] first isolated Xestospongins A–D from the Northwestern Pacific (Japan) sponge *Xestospongia exigua* that was subsequently renamed *Neopetrosia exigua* (● Fig. 7). Araguspungines A–H are stereoisomers of these compounds isolated from *Xestospongia* sp. collected in the same area [64]. An additional xestospongine analogue was further isolated from *Xestospongia* sp. collected in the Southwestern Pacific (New Caledonia) [65]. Some macrocyclic bis-3-alkylpiperidine named araguspongines C and D, but also xestospongine D, were also isolated from *N. exigua* collected in the Northeastern Indian Ocean (India; ● Fig. 7), while Araguspungine M was isolated from this species collected in Palau and a dimethyl analogue of xestospongine C was also isolated from this species from the Northwestern Pacific [66–68]. Wei et al. [69] isolated the C-4/C-5' connected neopetrosiamine A from a related species from the Caribbean, i.e., *Neopetrosia proxima* (● Fig. 7). This compound was shown to exhibit cytotoxic bioactivities, and the relatedness of the two *Neopetrosia* species is evident also from molecular data [22]. Later, xestoproxamines were described from the same Caribbean sponge (*N. proxima*) [70]. Petrosins A and B isolated from *Petrosia seriata* collected in the Western Pacific (Indonesia) are unique reports of 3-alkylpiperidine derivatives from this genus (● Fig. 7) [71,72]. This sponge has been renamed as *Neopetrosia seriata* and two separate pieces of DNA evidence (a short piece of the 28 S ribosomal RNA gene and a region of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 gene) place this species with another but unnamed *Petrosia* species [8]. The relationships of both species to other *Petrosia* or *Neopetrosia* or indeed any other Haplosclerida currently remain unresolved.

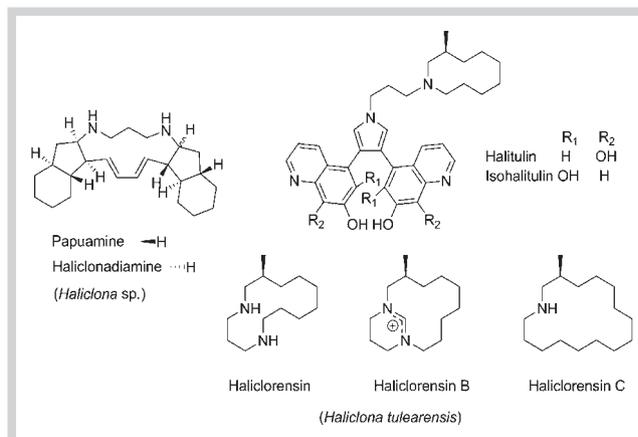


Fig. 6 Polyamines from Chalinidae sponges.

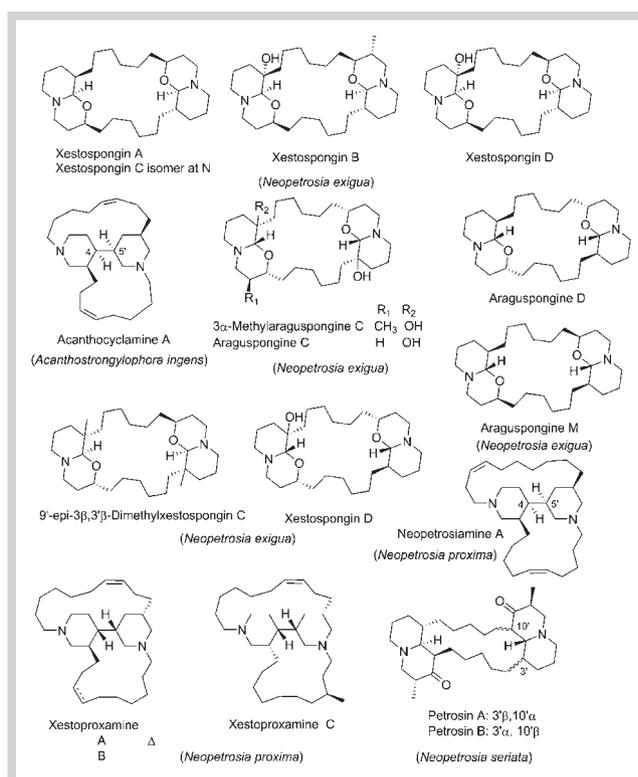


Fig. 7 Simple 3-alkylpiperidines isolated from Petrosiidae sponges.

Distribution of Complex 3-Alkylpiperidine Derivatives in the Haplosclerida

▼ The complexity of 3-alkylpiperidine derivatives culminates with the biosynthesis of outstanding complex molecules, most of them including the C-4/C-5' but also additional C-C connections and then becoming real cage compounds. Many such compounds are present in members of Chalinidae and Niphatidae families, which, as mentioned above, require reassessment, e.g., some *Haliclona* should be renamed and are more closely related to members of the Niphatidae family. Hence, they are treated here in a separate section. Saraines 1–3 and A–C were isolated from the Northern Mediterranean sponge *Haliclona (Rhizoniera) sarai*

(● Fig. 5) [73,74]. Both piperidine cycles are also connected through the C-4/C-5' bond, but in the case of saraines A–C, other connections were established between both cycles. A large array of biological activities have been described for these compounds [75]. Finally a bis-3-alkylpiperidine derivative called haliclona A was isolated from *Haliclona* sp. in the Northwestern Pacific (Korea) [76]. Just like saraines A–C, this compound exhibits a C-2/C-3' bond and one of the piperidines has been opened, maybe after oxidation/hydrolysis processes.

An unusual connection with a quinoline aromatic ring on one alkyl chain is characteristic of the njaoamines A–H isolated from the same *Reniera* sp. as the njaoaminiums in the Western Indian Ocean (● Fig. 8) [77,78]. In these compounds, both piperidine cycles are connected through C-4/C-5' as before but also through a second C-3/C-2' connection. Densanins were isolated from *Haliclona densaspicula* in the shallow waters of the Northwestern Pacific (Japan) [79]. They are highly complex pyrrole alkaloids, but their biosynthesis may originate from a common bis-3-alkylpiperidine group through contraction of a piperidine. We still observe the usual C-4/C-5' connection between both cycles. Complex bis-3-alkylpiperidine alkaloids ingenamine G and madangamine F have been isolated from the Southwestern Atlantic sponge *Pachychalina alcaloidifera*, a species currently placed in the family Niphatidae via morphology (● Fig. 8) [28,61,80]. Preliminary molecular data suggest that *H. sarai* is actually more closely related to species of *Niphatidae* than to the *Haliclona* species (*H. oculata*). Much more work relating to morphology, DNA, and chemical evidence is again needed to understand the origin and development of such compounds. Despite the complexity of the chemistry in *P. alcaloidifera*, the authors were not able to isolate more advanced derivatives belonging to the manzamine alkaloids from this sponge.

In some cases, the opening of one piperidine ring can lead to condensation of aromatic rings through Pictet–Spengler condensation. This is the case for the well-known manzamines A and B that maintain the C-4/C-5' connection and which were first isolated from *Haliclona* sp. in the Northwestern Pacific (Japan; ● Fig. 9) [81,82]. Manzamine C, isolated in the same study, lacks the 3-alkylpiperidine parts but keeps the β -carboline. These compounds are among the most promising natural antiparasitic and antitumoral compounds to date [83]. A close analogue called manzamine Y was isolated later from a similar sponge (● Fig. 9) [84]. At the same time, similar compounds named keramamimes A and B were isolated from *Pellina* sp. [85]. However, its taxonomic status has not been clearly confirmed and it may be the same *Haliclona* species mentioned above. The structure of keramamine B has subsequently been revised and corresponds to manzamine F, a structure much more consistent with biosynthetic hypotheses (● Fig. 9) [86].

A large diversity of manzamine alkaloids has also been isolated from the family Niphatidae and especially from one *Amphimedon* species. First, 6-hydroxymanzamine and 3,4-dihydromanzamine were isolated from *Amphimedon* sp. in the Northwestern Pacific (Japan) (● Fig. 9) [87]. Keramaphidin B is a plausible biogenetic precursor of the bis-3-alkylpiperidine parts of manzamine [88], while keramaphidin C and keramamine C [89] are precursors of manzamine C (● Fig. 9), and irlinols are antipode of the putative biosynthetic precursor of the manzamines [90]. Tetrahydro- β -carbolines manzamines H and L were isolated from the same species of *Amphimedon* (● Fig. 9) [91] and additional manzamines were isolated later: 3,4-dihydromanzamine J, 3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A and manzamine M [92]. Finally, manz-

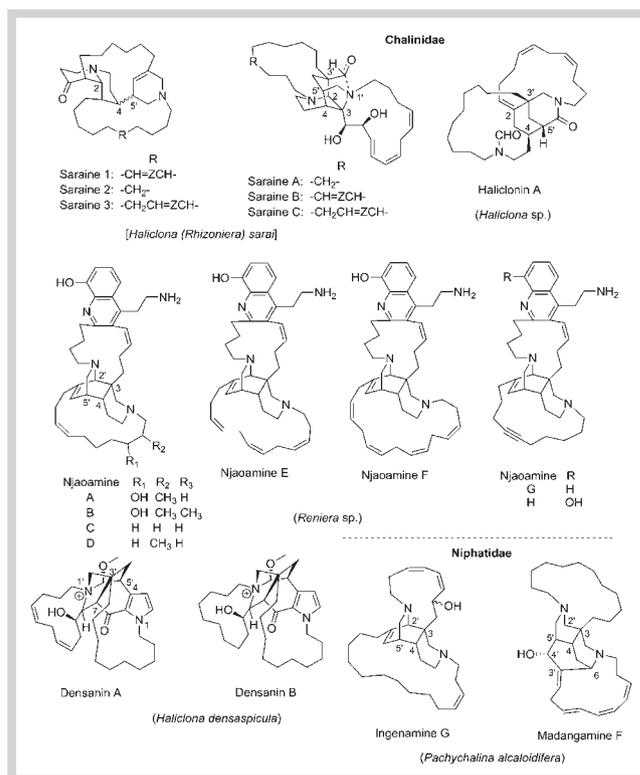


Fig. 8 Complex bis-3-alkylpiperidines from Chaliniidae sponges.

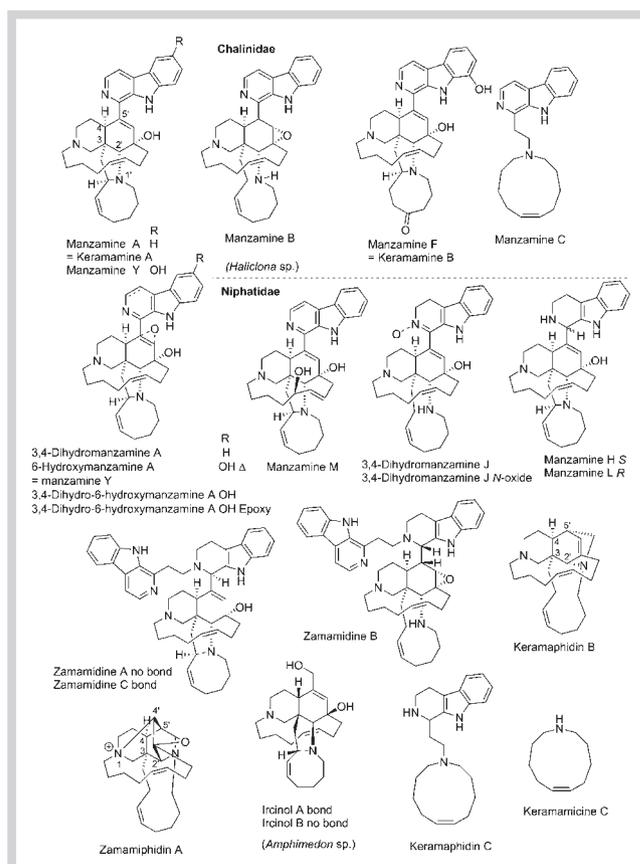


Fig. 9 Manzamine alkaloids isolated from Chaliniidae and Niphatidae sponges.

amine derivatives condensed with a second β -carboline unit gave a name to the zamamidines, but also 3,4-dihydropyridazine J *N*-oxide and 3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A [93]. Finally a derivative of keramaphidin B named zamamiphidin A was isolated from the same *Amphimedon* sp. (● Fig. 9) [94].

Isolated from *Acanthostrongylophora* sp., a sponge currently placed in the family Petrosiidae and collected in the Northwestern Pacific, are quite a number of manzamines, i.e., ircinal A, ircinal A, 12,28-oxaircinal A, manzamine A, manzamine A *N*-oxide, 3,4-dihydropyridazine A *N*-oxide, and 8-hydroxymanzamine A as well as manzamine B, 8-hydroxymanzamine B, manzamine E, 12,34-oxamanzamine E, and both 6-hydroxy derivatives, 12,28-oxamanzamine E, manzamine F, manzamine J, 8-hydroxymanzamine J, manzamine X, 6-deoxymanzamine X, and acantholactone (● Fig. 10) [95–97]. It is important to notice here that the extraordinary complex dimer named *neo*-kauluamine was isolated from this sponge but had also been isolated previously from a species belonging to a new genus (and as yet undescribed) within the Petrosiidae family [98]. The huge pharmacological potential of these compounds showing antimicrobial and antialzheimer activities has been demonstrated [91]. Other researchers demonstrated the presence of manzamine A and its 8-hydroxy derivative as well as a highly original series of acanthomanzamines A–E and additional manzamine derivatives like acantholactam and pre-*neo*-kauluamine (● Fig. 11) from *A. ingens* collected in the same area [99–101]. Two precursors of manzamine alkaloids were isolated from *Xestospongia* sp. collected in the Western Pacific (Papua New Guinea) and the structure of xestocyclamine A was later revised (● Fig. 11) [102, 103]. Finally, a large chemical diversity of complex bis-3-alkylpiperidines was isolated from *Xestospongia ingens* (Petrosiidae) collected in the Western Pacific (Papua New Guinea). It is worth noting here that the name of this sponge is no longer accepted and instead refers to *A. ingens* already mentioned previously. Ingenamine A was first isolated [104] and then ingamines A and B [105], madangamine A [106], and other analogues (● Fig. 11) [107]. The unique alkaloid 8-hydroxymanzamine A was isolated from *Pachypellina* sp. (Phloedictyidae) but this species was later assigned to the same unnamed genus from the Petrosiidae family mentioned above [98, 108].

Distribution of Polyacetylenic Derivatives across the Haplosclerida

It has been impossible to find a chemical and logical classification of the polyacetylenic compounds produced by members of the Haplosclerida and the chemical structures do not give valuable information for identification of key enzymes leading to their synthesis. A pattern, however, does emerge linking *either* alkaloid or polyacetylene pathways in each species but never both (● Table 1). Therefore, we report on a selection of compounds from this group in view of the taxonomic classification of the species in question as we did for the alkaloids.

A large diversity of polyacetylenes, mostly from the aikupikanyne group, was isolated from *Callyspongia* species, including *Callyspongia truncata*, *Callyspongia pseudoreticulata*, and *Callyspongia fistularis* (Callyspongiidae) [109–115]. Previously classified as *Siphonochalina* (also Callyspongiidae), *C. truncata* and *Callyspongia siphonella* uniquely produce polyacetylenic derivatives [116–118]. The change of genus indicates the difficulty with identifying haplosclerid sponges via morphological methods alone.

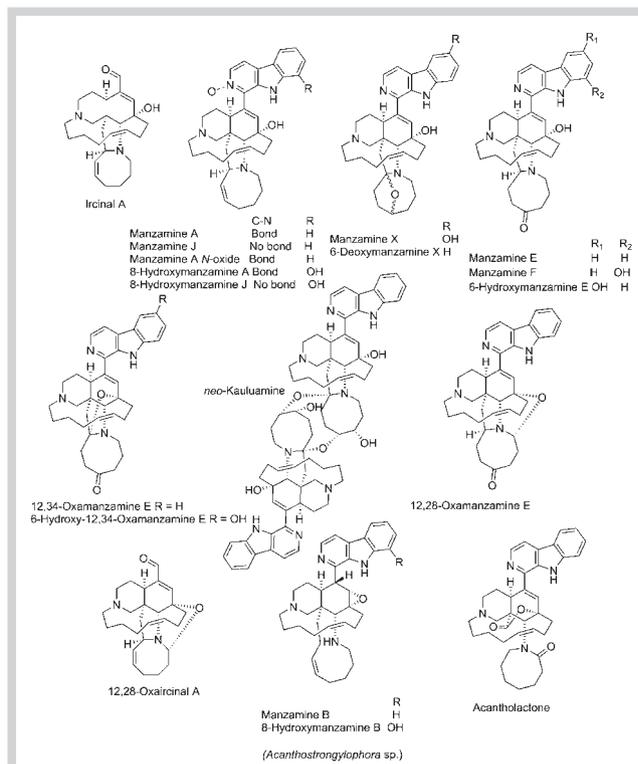


Fig. 10 Manzamine alkaloids from the sponge *Acanthostrongylophora* sp. (Petrosiidae).

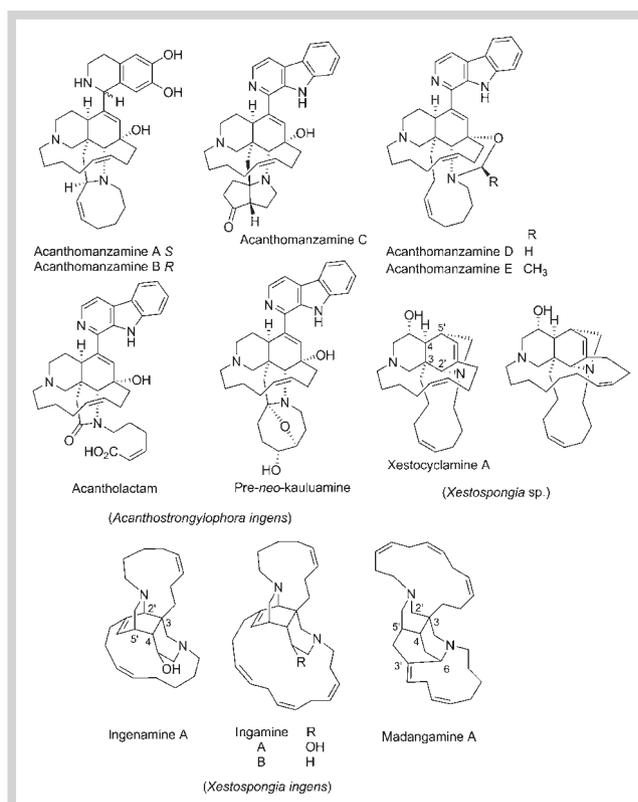


Fig. 11 Manzamine alkaloids from sponges *A. ingens* and *Xestospongia* (Petrosiidae).

From Chalinidae sponges, several renierins followed by fulvinol and the polyhydroxylated fulvynes were isolated from the Mediterranean sponge *Haliclona (Halichocona) fulva* [119–121]. Some polyacetylenes were also isolated from *Haliclona* sp. collected in the Western Pacific (Palau) while polyhydroxylated osirisynes were isolated from *H. (Reniera) osiris* collected in the Northwestern Pacific (China) [122, 123]. Other compounds from unidentified *Haliclona* species include Haliclonyne [124], lembehynes (Northwestern Pacific, Japan) [125, 126], Halycinones A and B [127] (Western Pacific, Micronesia), and brominated derivative [128]. *Adocia* sp. provided adocycetylenes A–D, and while this genus is now accepted as *Haliclona (Haliclona)* [129], it is likely that the genus *Adocia* will be re-erected in the near future (McCormack, unpublished data). How many different species are included in the above list and what their actual final classification will be is therefore as yet unknown and needs attention.

Among the family Niphatidae, the genus *Cribrochalina* has provided a large diversity of polyacetylenic compounds. Duryne was first isolated from *C. dura* collected in the Northwestern Atlantic (Bahamas) [130], while the Caribbean sponge *C. vasculum* afforded several simple acetylenic alcohols, including vasculyne [131–134]. Nepheliosyne B was isolated from *Niphates* sp. collected in the Western Pacific (New Caledonia) [135], and chlorinated acetylenic compounds were isolated from *Haliclona lunisimisis*, later renamed *Niphates lunisimisis* de Jesus & Faulkner [136].

The family Petrosiidae has yielded a large diversity of polyacetylenic products, mostly from sponges of the genus *Petrosia*, a genus that, unfortunately, also needs taxonomic revision. The Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis* has afforded a large panel of polyacetylenic derivatives, including petroformynes 1–10 [137–144], while petrosolic acid was later isolated from *Petrosia* sp. from the red sea [145]. Aztequynols A and B were isolated from a Caribbean *Petrosia* sp. [146]. Northwestern Pacific species from this genus have generated many compounds, including Petrosynol and petrosynone isolated from *Petrosia* sp., [147], brominated derivatives from *P. (Petrosia) volcano* [148], corticatic acids A–E from *P. (Strongylophora) corticata* [149, 150], petrocortynes A–H and petrosiacetylenes A–D and other analogues from *Petrosia* sp. collected in Korea [151–157], strongylodiols from *P. (Strongylophora)* sp. [158, 159], polyacetylene carboxylic acids [160], neopetroformynes A–D and later miyakosynes A–F [161, 162], petroacetylene from *P. (Petrosia) solida* [163], and finally, petrosiols A–E from *P. (Strongylophora) strongylata* [164].

Research focused on another petrosid genus led to the isolation of some polyacetylenic compounds from the Caribbean sponge *Xestospongia muta* [165], while several brominated derivatives were isolated from *Xestospongia testudinaria* from the Southwestern Pacific (Australia) [166–168]. Other compounds isolated from *Xestospongia* sp. include unsaturated fatty acids [169], melynones A–C [170], a polyhydroxylated derivative named nepheliosyne A analogous to fulvynes and osirisynes [171], and brominated unsaturated fatty acids [172].

With regard to the family Phloedictyidae, their unique isolated compounds were polyacetylenic derivatives, triangulynes A–H and pellynols A–D from the Western Pacific sponge (New Caledonia) *Oceanapia triangulate* [173, 174], and another polyacetylene from *Oceanapia* sp. [175]

Integrating Chemistry and Biology



A large diversity of novel compounds of interest have been isolated from haplosclerid sponges and this group is likely to be a focus of continued efforts in this area for the foreseeable future given the diversity of species and habitats available providing a huge diversity of chemicals in turn. This review provides tantalizing insights into possible patterns of shared structures and biosynthetic pathways between species. However, real insights are hampered by the fact that most species included have not been identified to species and have not been included in any modern phylogenetic study. It is important to convey to chemists about the ever-changing world of taxonomic classification given the new methods being employed, including phylogenetic analysis of DNA sequence data. This is never truer than for haplosclerid sponges. There is an urgent need to revisit the studied sponges to place them in the new phylogenetic classification (including patterns of ancestry and descent between species) being built for demosponges. Only an approach of fully identifying sponges at the species level for analysis of chemistry will provide real additional value to the usual tools of systematics, thus contributing significantly to integrative taxonomy. Marine natural chemists should work tightly with taxonomic specialists (including specifically a phylogenetic approach) of each group in order to publish relevant data. For example, some species groups, i.e., of unidentified *Haliclona* and *Xestospongia* species, produce alkaloids but also polyacetylenic compounds, which prevents us from reaching any clear conclusion regarding patterns of distribution of specific compounds across taxonomic groups. However, once understood, the presence of each family of compounds could help significantly in a proper classification and avoid misinterpretation of species identification/classification.

From **Table 1**, several clues are provided for assisting sponge classification. First of all, the presence of both polyacetylenic and alkaloid compounds have never been reported in a single species. Both biosynthetic genes/pathways cannot, therefore, be present in a species. This observation leads us to suggest a clear separation between species producing alkaloids and species producing polyacetylenes. For example, *C. ridleyi* is the only known species of the genus *Callyspongia* that does not produce polyacetylenic compounds. In the same way, only one species of *Cribrochalina* sp. was found to produce alkaloids. This could lead to a clear revision of the taxonomy of these sponges. Finally, *Neopetrosia* species were found to produce alkaloids, while *Petrosia* species produce only polyacetylenic compounds. However, these two genera are currently placed in the same family, Petrosiidae, indicating that revision is required at different levels of the taxonomic hierarchy.

One undefined species of *Cribrochalina* (Niphatidae) produces only 3-alkylpyridine derivatives. Simple alkylation at the nitrogen atom of the pyridine leads to 3-alkylpyridiniums that can polymerize. Only the species of *Callyspongia* (Callyspongiidae), *Niphates*, and *Pachychalina* (Niphatidae) seem to stop the biosynthesis at this step for this group of alkaloids. Because these genera are distinct, revisiting the voucher samples could help to identify similarities between these species. The subsequent ability of some species to reduce the aromatic rings enabling a C-4/C-5' connection between two cycles is shared by several species, including *Arenosclera brasiliensis* (Callyspongiidae) and *H. viscosa* (Chalinidae). Contrary to other families, members of Callyspongiidae seem unable to develop more complex alkaloids. In the same way, *Neopetrosia* (Petrosiidae) species only produce simple

bis-3-alkylpiperidine derivatives. *Neopetrosia* could be hypothesized then to be closer to some *Callyspongia* sponges, and recent phylogenetic classification suggests that some *Neopetrosia* are placed within the same major clade as *Callyspongia* (Clade A) [8, 21]. Much more complex alkaloids are produced by few species distributed in several families, which also raises questions regarding the reliability of the classification. *H. densaspicula*, *H. sarai*, a *Reniera* sp. (Chalinidae), and *Pachychalina alcaloidifera* (Niphatidae) are able to produce complex alkaloids, but no manzamines have been isolated from these species. It appears that clearly this ability should gather some *Haliclona* species. As for the extremely complex alkaloid manzamines, members of the genera *Acanthostrongylophora* (Petrosiidae), *Haliclona* (Chalinidae), and *Amphimedon* (Niphatidae) were found to produce them. These compounds are not characteristic of the Petrosiidae, as most species of this family produce only polyacetylenes.

A diversity of polyacetylenic compounds is found distributed across all of the five families of Haplosclerida included so far and their patterns of occurrence should trigger careful examination of the studied species. For example, four *Callyspongia* species (Callyspongiidae) produce compounds very similar to two *Haliclona* species (Chalinidae), two *Cribochalina* species, and one *Niphates* species (Niphatidae), but most of the polyacetylenic compounds are really representative of *Petrosia* and *Xestospongia* genera (Petrosiidae). Recent molecular phylogenies suggest that *Callyspongia* and some *Haliclona* fall into one major clade (Clade A) at the base of which appears *Cribochalina* [8, 22]. *Niphates* species fall into a distantly related clade, also with some *Haliclona* (Clade C), while species from *Petrosia* and *Xestospongia* are distributed across multiple clades (but distinct from the aforementioned genera) and are poorly represented on phylogenetic trees drawn from molecular data as yet [8, 22].

The value of a chemosystematics approach for haplosclerid sponges has been questioned in the past due to disagreement between patterns of chemical diversity and morphological classification [176]. With molecular data throwing light on possible evolutionary pathways in sponges, it is evident that the morphological classification is flawed and is likely to change, and this is especially true for the Haplosclerida. An additional concern could be the varying influence of microbes residing in sponge tissue, which may be responsible for some of the compounds isolated. A diversity of microbial sequences has been reported from some *Haliclona* species and *Xestospongia*, amongst others [177–180], even though these studies do not show the presence of microbes in the sponge tissue nor do they confirm the source of compounds of interest as being from sponge or microbial cells. Sponges filter feed and concentrate microbes and microbial constituents from their environment, and these elements will be present in approaches that only isolate DNA sequences from sponge cells (even though they may only represent food for the sponge). Therefore, the presence of many bacterial DNA sequences in sponges does not equate directly to a sponge-bacterial association or to the production of detectable levels of compounds of interest by said bacteria. Ultrastructural studies on Irish and Mediterranean *Haliclona* species (Marra, unpublished data) show extremely low numbers of bacterial cells in four species, while an association between one or very few bacteria is evident in three species and many bacterial species are evident in one. Consideration of such patterns in these and other species will also be required to truly understand how patterns of microbial diversity impact patterns of chemical diversity.

Conclusion

Our main conclusion is that chemical diversity does not fit with the current classification of this major group of marine sponges, but supports a clear revision of all the species of the Order Haplosclerida included in chemical publications taking into account the presence or absence of key enzymes leading to 3-alkylpyridine derivatives or polyacetylenes. Despite apparent discrepancies there are tantalizing insights that patterns of chemical diversity may well agree in good part with an updated classification that incorporates molecular and other data including morphology. Assessment of the possible bacterial origin of sponge-derived compounds should also be considered. Three other limitations to this approach are the existence of mistakes made in the identification of the species under investigation, a discrepancy between a classical taxonomic approach utilizing shared sponge morphological characters and the approach that uses molecular phylogenetic methods, and, thirdly, poor sampling of the huge diversity of sponges and the chemistry they contain. However, we believe that this review should help in the further development of an integrative approach between biology and chemistry for this group of sponges. The issues highlighted here are not restricted to the group of marine sponges included, but are relevant to all organisms that are of interest in the search for novel chemistry for whatever reason and where taxonomy is still unresolved. New advances in 'omics' sciences, and especially metabolomic approaches using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance with some characteristic signals, could quickly give important clues for integrative systematics.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Zhang F, Blasiak LC, Karolin JO, Powell RJ, Geddes CD, Hill RT. Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 4381–4386
- De Goeij JM, van Oevelen D, Vermeij MJA, Osinga R, Middelburg JJ, de Goeij AF, Admiraal W. Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. *Science* 2013; 342: 108–110
- Genta-Jouve G, Thomas OP. Sponge chemical diversity: from biosynthetic pathways to ecological roles. *Adv Mar Biol* 2012; 62: 183–230
- Cardenas P, Perez T, Boury-Esnault N. Sponge systematics facing new challenges. *Adv Mar Biol* 2012; 61: 79–209
- Van Soest RM, Hooper JA. Order Haplosclerida Topsent, 1928. In: Hooper JA, Van Soest RM, Willenz P, editors. *Systema Porifera – A guide to the classification of sponges*. New York: Springer US; 2002: 831–832
- Fromont J, Kerr S, Kerr R, Riddle M, Murphy P. Chemotaxonomic relationships within, and comparisons between, the orders Haplosclerida and Petrosida (Porifera: Demospongiae) using sterol complements. *Biochem Syst Ecol* 1994; 22: 735–752
- Andersen RJ, van Soest RWM, Kong F. 3-Alkylpiperidine alkaloids isolated from marine sponges in the order Haplosclerida. In: Pelletier SW, editor. *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. Oxford: Pergamon Press; 1996: 301–355
- Redmond NE, Raleigh J, van Soest RWM, Kelly M, Travers SAA, Bradshaw B, Vartia S, Stephens KM, McCormack GP. Phylogenetic relationships of the marine Haplosclerida (Phylum Porifera) employing ribosomal (28S rRNA) and mitochondrial *cox1*, *nad1* gene sequence data. *PLoS One* 2011; 6: e24344
- Van Soest RWM, Boury-Esnault N, Hooper JNA, Rützler K, de Voogd NJ, Alvarez de Glasby B, Hajdu E, Pisera AB, Manconi R, Schoenberg C, Janussen D, Tabachnick KR, Klautau M, Picton B, Kelly M, Vacelet J, Dohrmann M, Díaz MC, Cárdenas P. World Porifera database. Available

- at: <http://www.marinespecies.org/porifera>. Accessed September 1, 2015
- 10 Tsukamoto S, Takahashi M, Matsunaga S, Fusetani N, Van Soest RW. Hachijodines A–G: seven new cytotoxic 3-alkylpyridine alkaloids from two marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Amphimedon*. *J Nat Prod* 2000; 63: 682–684
 - 11 Takekawa Y, Matsunaga S, van Soest RW, Fusetani N. Amphimedosides, 3-alkylpyridine glycosides from a marine sponge *Amphimedon* sp. *J Nat Prod* 2006; 69: 1503–1505
 - 12 Hirano K, Kubota T, Tsuda M, Mikami Y, Kobayashi J. Pyrinodemins B–D, potent cytotoxic bis-pyridine alkaloids from marine sponge *Amphimedon* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000; 48: 974–977
 - 13 Tsuda M, Hirano K, Kubota T, Kobayashi J. Pyrinodemin A, a cytotoxic pyridine alkaloid with an isoxazolidine moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Lett* 1999; 40: 4819–4820
 - 14 Kubota T, Kura K, Fromont J, Kobayashi J. Pyrinodemins G–I, new bis-3-alkylpyridine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* 2013; 69: 96–100
 - 15 Kura K, Kubota T, Fromont J, Kobayashi J. Pyrinodemins E and F, new 3-alkylpyridine alkaloids from sponge *Amphimedon* sp. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 267–270
 - 16 Nishi T, Kubota T, Fromont J, Sasaki T, Kobayashi J. Nakinadines B–F: new pyridine alkaloids with a β -amino acid moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* 2008; 64: 3127–3132
 - 17 Quiñoà E, Crews P. Niphatynes, methoxylamine pyridines from the marine sponge, *Niphates* sp. *Tetrahedron Lett* 1987; 28: 2467–2468
 - 18 Kobayashi J, Zeng CM, Ishibashi M, Shigemori H, Sasaki T, Mikami Y. Niphatesines E–H, new pyridine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Niphates* sp. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1992; 11: 1291–1294
 - 19 Kobayashi J, Murayama T, Kosuge S, Kanda F, Ishibashi M, Kobayashi H, Ohizumi Y, Ohta T, Nozoe S, Sasaki T. Niphatesines A–D, new antineoplastic pyridine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Niphates* sp. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1990; 12: 3301–3303
 - 20 Kariya Y, Kubota T, Fromont J, Kobayashi J. Pyrinadines B–G, new bispyridine alkaloids with an azoxy moiety from sponge *Cribrochalina* sp. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 8415–8419
 - 21 Kariya Y, Kubota T, Fromont J, Kobayashi J. Pyrinadine A, a novel pyridine alkaloid with an azoxy moiety from sponge *Cribrochalina* sp. *Tetrahedron Lett* 2006; 47: 997–998
 - 22 Redmond NE, Morrow CC, Thacker RW, Diaz MC, Boury-Esnault N, Cárdenas P, Hajdu E, Lôbo-Hajdu G, Picton BE, Pomponi SA, Kayal E, Collins AG. Phylogeny and systematics of Demospongiae in light of new small-subunit ribosomal DNA (18 S) sequences. *Integr Comp Biol* 2013; 53: 388–415
 - 23 Xu NJ, Sun X, Yan XJ. A new cyclostelletamine from sponge *Amphimedon compressa*. *Chin Chem Lett* 2007; 18: 947–950
 - 24 Schmitz FJ, Hollenbeak KH, Campbell DC. Marine natural products: halitoxin, toxic complex of several marine sponges of the genus *Haliclona*. *J Org Chem* 1978; 43: 3916–3922
 - 25 Thompson MN, Gallimore WA, Townsend MM, Chambers NA, Williams LA. Bioactivity of amphitoxin, the major constituent of the Jamaican sponge *Amphimedon compressa*. *Chem Biodivers* 2010; 7: 1904–1910
 - 26 Albrizio S, Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S, Pawlik JR. Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *J Nat Prod* 1995; 58: 647–652
 - 27 Talpir R, Rudi A, Ilan M, Kashman Y. Niphatoxin A and B; two new ichthyo- and cytotoxic tripyridine alkaloids from a marine sponge. *Tetrahedron Lett* 1992; 33: 3033–3034
 - 28 De Oliveira JH, Grube A, Köck M, Berlinck RG, Macedo ML, Ferreira AG, Hajdu E. Ingenamine G and cyclostelletamines GI, K, and L from the new Brazilian species of marine sponge *Pachychalina* sp. *J Nat Prod* 2004; 67: 1685–1689
 - 29 De Oliveira JH, Selegim MH, Timm C, Grube A, Köck M, Nascimento GG, Martins ACT, Silva EG, de Souza AO, Minarini PR. Antimicrobial and antimycobacterial activity of cyclostelletamine alkaloids from sponge *Pachychalina* sp. *Mar Drugs* 2006; 4: 1–8
 - 30 Laville R, Thomas OP, Berrue F, Reyes F, Amade P. Pachychalines A–C: novel 3-alkylpyridinium salts from the marine sponge *Pachychalina* sp. *European J Org Chem* 2008; 2008: 121–125
 - 31 Buchanan MS, Carroll AR, Addepalli R, Avery VM, Hooper JNA, Quinn RJ. Niphatoxin C, a cytotoxic tripyridine alkaloid from *Callyspongia* sp. *J Nat Prod* 2007; 70: 2040–2041
 - 32 Torres YR, Berlinck RG, Magalhães A, Schefer AB, Ferreira AG, Hajdu E, Muricy G. Arenosclerins A–C and haliclonacyclamine E, new tetracyclic alkaloids from a Brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. *J Nat Prod* 2000; 63: 1098–1105
 - 33 Torres YR, Berlinck RG, Nascimento GG, Fortier SC, Pessoa C, de Moraes MO. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicol* 2002; 40: 885–891
 - 34 Thacker RW, Hill AL, Hill MS, Redmond NE, Collins AG, Morrow CC, Spicer L, Carmack CA, Zappe ME, Pohlmann D, Hall C, Diaz MC, Bangalore PV. Nearly complete 28 S rRNA gene sequences confirm new hypotheses of sponge evolution. *Integr Comp Biol* 2013; 53: 373–387
 - 35 Schmidt G, Timm C, Koeck M. Haliclocyclin C, a new monomeric 3-alkylpyridinium alkaloid from the arctic marine sponge *Haliclona viscosa*. *Z Naturforsch B* 2011; 66: 745–748
 - 36 Timm C, Volk C, Sasse F, Köck M. The first cyclic monomeric 3-alkylpyridinium alkaloid from natural sources: identification, synthesis, and biological activity. *Org Biomol Chem* 2008; 6: 4036–4040
 - 37 Schmidt G, Timm C, Grube A, Volk CA, Köck M. Viscosamines B(1,2) and E(1,2): challenging new 3-alkylpyridinium alkaloids from the marine sponge *Haliclona viscosa*. *Chemistry* 2012; 18: 8180–8189
 - 38 Volk CA, Köck M. Viscosamine: the first naturally occurring trimeric 3-alkylpyridinium alkaloid. *Org Lett* 2003; 5: 3567–3569
 - 39 Teruya T, Kobayashi K, Suenaga K, Kigoshi H. Cyclohaliclonamines A–E: dimeric, trimeric, tetrameric, pentameric, and hexameric 3-alkylpyridinium alkaloids from a marine sponge *Haliclona* sp. *J Nat Prod* 2006; 69: 135–137
 - 40 Casapullo A, Pinto OC, Marzocco S, Autore G, Riccio R. 3-Alkylpyridinium alkaloids from the pacific sponge *Haliclona* sp. *J Nat Prod* 2009; 72: 301–303
 - 41 Lee Y, Jang KH, Jeon JE, Yang WY, Sim CJ, Oh KB, Shin J. Cyclic Bis-1, 3-dialkylpyridiniums from the sponge *Haliclona* sp. *Mar Drugs* 2012; 10: 2126–2137
 - 42 Damodaran V, Ryan JL, Keyzers RA. Cyclic 3-alkylpyridinium alkaloid monomers from a New Zealand *Haliclona* sp. marine sponge. *J Nat Prod* 2013; 76: 1997–2001
 - 43 Laville R, Genta-Jouve G, Urda C, Fernandez R, Thomas OP, Reyes F, Amade P. Njaoaminiums A, B, and C: cyclic 3-alkylpyridinium salts from the marine sponge *Reniera* sp. *Molecules* 2009; 14: 4716–4724
 - 44 Laville R, Amade P, Thomas OP. 3-Alkylpyridinium salts from Haplosclerida marine sponges: isolation, structure elucidations, and biosynthetic considerations. *Pure Appl Chem* 2009; 81: 1033–1040
 - 45 Baker BJ, Scheuer PJ, Shooley JN. Papuamine, an antifungal pentacyclic alkaloid from a marine sponge, *Haliclona* sp. *J Am Chem Soc* 1988; 110: 965–966
 - 46 Fahy E, Molinski TF, Harper MK, Sullivan BW, Faulkner DJ, Parkanyi L, Clardy J. Haliclonadiamine, an antimicrobial alkaloid from the sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron Lett* 1988; 29: 3427–3428
 - 47 Kashman Y, Koren-Goldshlager G, Gravalos MDG, Schleyer M. Halitulins, a new cytotoxic alkaloid from the marine sponge *Haliclona tulearensis*. *Tetrahedron Lett* 1999; 40: 997–1000
 - 48 Sorek H, Rudi A, Aknin M, Gaydou EM, Kashman Y. Isohalitulins and halicloreinsins B and C, three marine alkaloids from *Haliclona tulearensis*. *J Nat Prod* 2010; 73: 456–458
 - 49 Heinrich MR, Kashman Y, Spittler P, Steglich W. Revision of the structure of halicloreinsin to (S)-7-methyl-1,5-diazacyclotetradecane and confirmation of the new structure by synthesis. *Tetrahedron* 2001; 57: 9973–9978
 - 50 Koren-Goldshlager G, Kashman Y, Schleyer M. Halicloreinsin, a novel diamino alkaloid from the marine sponge *Haliclona tulearensis*. *J Nat Prod* 1998; 61: 282–284
 - 51 Fusetani N, Yasumuro K, Matsunaga S, Hirota H. Haliclamines A and B, cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*. *Tetrahedron Lett* 1989; 30: 6891–6894
 - 52 Schmidt G, Timm C, Kock M. New haliclamines E and F from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Org Biomol Chem* 2009; 7: 3061–3064
 - 53 Volk CA, Lippert H, Lichte E, Köck M. Two new haliclamines from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Eur J Org Chem* 2004; 2004: 3154–3158
 - 54 Cychon C, Schmidt G, Mordhorst T, Koeck M. Structure elucidation of submilligram quantities of natural products – application to haliclamines G and H from the Arctic marine sponge *Haliclona viscosa*. *Z Naturforsch B* 2012; 67: 944–950

- 55 Jaspars M, Pasupathy V, Crews P. A tetracyclic diamine alkaloid, halicyclamine A, from the marine sponge *Haliclona* sp. *J Org Chem* 1994; 59: 3253–3255
- 56 Arai M, Liu L, Fujimoto T, Setiawan A, Kobayashi M. DedA protein relates to action-mechanism of halicyclamine A, a marine spongean macrocyclic alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Mar Drugs* 2011; 9: 984–993
- 57 Arai M, Sobou M, Vilchéze C, Baughn A, Hashizume H, Pruksakorn P, Ishida S, Matsumoto M, Jacobs jr. WR, Kobayashi M. Halicyclamine A, a marine spongean alkaloid as a lead for anti-tuberculosis agent. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 6732–6736
- 58 Charan RD, Garson MJ, Brereton IM, Willis AC, Hooper JNA. Haliclona-cyclamines A and B, cytotoxic alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron* 1996; 52: 9111–9120
- 59 Clark RJ, Field KL, Charan RD, Garson MJ, Brereton M, Willis AC. The haliclona-cyclamines, cytotoxic tertiary alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron* 1998; 54: 8811–8826
- 60 Matsunaga S, Miyata Y, van Soest RW, Fusetani N. Tetradehydrohalicyclamine A and 22-Hydroxyhalicyclamine A, new cytotoxic bis-piperidine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *J Nat Prod* 2004; 67: 1758–1760
- 61 De Oliveira JH, Nascimento AM, Kossuga MH, Cavalcanti BC, Pessoa CO, Moraes MO, Macedo ML, Ferreira AG, Hajdu E, Pinheiro US. Cytotoxic alkylpiperidine alkaloids from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *J Nat Prod* 2007; 70: 538–543
- 62 Dewi AS, Hadi TA, Fajarningsih ND, Blanchfield JT, Bernhardt PV, Garson MJ. Acanthocyclamine A from the Indonesian marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Aust J Chem* 2014; 67: 1205–1210
- 63 Nakagawa M, Endo M, Tanaka N, Gen-Pei L. Structures of xestospongins A, B, C and D, novel vasodilative compounds from marine sponge, *Xestospongia exigua*. *Tetrahedron Lett* 1984; 25: 3227–3230
- 64 Kobayashi M, Kawazoe K, Kitagawa I. Araguspungines B, C, D, E, F, G, H, and J, new vasodilative bis-1-oxaquinolizidine alkaloids from an Okinawan marine sponge, *Xestospongia* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1989; 37: 1676–1678
- 65 Quirion JC, Sevenet T, Husson HP, Weniger B, Debitus C. Two new alkaloids from *Xestospongia* sp., a New Caledonian sponge. *J Nat Prod* 1992; 55: 1505–1508
- 66 Venkateswarlu Y, Reddy MVR, Rao JV. Bis-1-oxaquinolizidines from the sponge *Haliclona exigua*. *J Nat Prod* 1994; 57: 1283–1285
- 67 Liu H, Mishima Y, Fujiwara T, Nagai H, Kitazawa A, Mine Y, Kobayashi H, Yao X, Yamada J, Oda T. Isolation of araguspungine M, a new stereoisomer of an araguspungine/xestospongine alkaloid, and dopamine from the marine sponge *Neopetrosia exigua* collected in Palau. *Mar Drugs* 2004; 2: 154–163
- 68 Li Y, Qin S, Guo YW, Gu YC, van Soest RW. 9'-Epi-3 β , 3' β -dimethylxestospongins C, a new macrocyclic diamine alkaloid from the Hainan sponge *Neopetrosia exigua*. *Planta Med* 2011; 77: 179–181
- 69 Wei X, Nieves K, Rodriguez AD. Neopetrosiamine A, biologically active bis-piperidine alkaloid from the Caribbean sea sponge *Neopetrosia proxima*. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 5905–5908
- 70 Morinaka BI, Molinski TF. Xestoproxamines A–C from *Neopetrosia proxima*. Assignment of absolute stereostructure of bis-piperidine alkaloids by integrated degradation-CD analysis. *J Nat Prod* 2011; 74: 430–440
- 71 Braekman JC, Daloze D, Cimino G, Trivellone E. 2D-NMR study of petrosins: Revised structure for petrosin-A. *Bull Soc Chim Belg* 1988; 97: 519–524
- 72 Braekman JC, Daloze D, Defay N, Zimmermann D. Petrosin-A and -B, two new bis-quinolizidine alkaloids from the sponge *Petrosia seriata*. *Bull Soc Chim Belg* 1984; 93: 941–944
- 73 Defant A, Mancini I, Raspor L, Guella G, Turk T, Sepčić K. New structural insights into saraines A, B, and C, macrocyclic alkaloids from the mediterranean sponge *Reniera (Haliclona) sarai*. *Eur J Org Chem* 2011; 2011: 3761–3767
- 74 Cimino G, Stefano SD, Scognamiglio G, Sodano G, Trivellone E. Sarains: A new class of alkaloids from the marine sponge *Reniera sarai*. *Bull Soc Chim Belg* 1986; 95: 783–800
- 75 Caprioli V, Cimino G, de Giulio A, Madaio A, Scognamiglio G, Trivellone E. Selected biological activities of saraines. *Comp Biochem Physiol B* 1992; 103: 293–296
- 76 Jang KH, Kang GW, Jeon JE, Lim C, Lee HS, Sim CJ, Oh KB, Shin J. Haliclona A, a new macrocyclic diamide from the sponge *Haliclona* sp. *Org Lett* 2009; 11: 1713–1716
- 77 Sorek H, Rudi A, Benayahu Y, Kashman Y. Njaoamines G and H, two new cytotoxic polycyclic alkaloids and a tetrahydroquinolone from the marine sponge *Neopetrosia* sp. *Tetrahedron Lett* 2007; 48: 7691–7694
- 78 Reyes F, Fernández R, Urda C, Francesch A, Bueno S, de Eguilior C, Cuevas C. Njaoamines A–F, new cytotoxic polycyclic alkaloids from the haplosclerid sponge *Reniera* sp. *Tetrahedron* 2007; 63: 2432–2438
- 79 Hwang BS, Oh JS, Jeong EJ, Sim CJ, Rho JR. Densanins A and B, new macrocyclic pyrrole alkaloids isolated from the marine sponge *Haliclona densaspicula*. *Org Lett* 2012; 14: 6154–6157
- 80 Cavalcanti BC, Sombra CML, de Oliveira JH, Berlink RG, de Moraes MO, Pessoa C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 147: 409–415
- 81 Sakai R, Kohmoto S, Higa T, Jefford CW, Bernardinelli G. Manzamine B and C, two novel alkaloids from the sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron Lett* 1987; 28: 5493–5496
- 82 Sakai R, Higa T, Jefford CW, Bernardinelli G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *J Am Chem Soc* 1986; 108: 6404–6405
- 83 Ashok P, Ganguly S, Murugesan S. Manzamine alkaloids: isolation, cytotoxicity, antimalarial activity and SAR studies. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1781–1791
- 84 Kobayashi M, Chen YJ, Aoki S, In Y, Ishida T, Kitagawa I. Four new β -carboline alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp. and *Haliclona* sp. *Tetrahedron* 1995; 51: 3727–3736
- 85 Nakamura H, Deng S, Kobayashi J, Ohizumi Y, Tomotake Y, Matsuzaki T, Hirata Y. Keramamine-A and -B, novel antimicrobial alkaloids from the Okinawan marine sponge *Pellina* sp. *Tetrahedron Lett* 1987; 28: 621–624
- 86 Ichiba T, Sakai R, Kohmoto S, Saucy G, Higa T. New manzamine alkaloids from a sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron Lett* 1988; 29: 3083–3086
- 87 Kobayashi J, Tsuda M, Kawasaki N, Sasaki T, Mikami Y. 6-Hydroxymanzamine A and 3, 4-dihydromanzamine A, new alkaloids from the Okinawan marine sponge *Amphimedon* sp. *J Nat Prod* 1994; 57: 1737–1740
- 88 Kobayashi J, Tsuda M, Kawasaki N, Matsumoto K, Adachi T. Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp.: A plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids. *Tetrahedron Lett* 1994; 35: 4383–4386
- 89 Tsuda M, Kawasaki N, Kobayashi J. Keramaphidin C and keramamine C plausible biogenetic precursors of manzamine C from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron Lett* 1994; 35: 4387–4388
- 90 Tsuda M, Kawasaki N, Kobayashi J. Ircinols A and B, first antipodes of manzamine-related alkaloids from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron* 1994; 50: 7957–7960
- 91 Tsuda M, Inaba K, Kawasaki N, Honma K, Kobayashi J. Chiral resolution of (\pm)-keramaphidin B and isolation of manzamine L, a new β -carboline alkaloid from a sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* 1996; 52: 2319–2324
- 92 Watanabe D, Tsuda M, Kobayashi J. Three new manzamine congeners from *Amphimedon* sponge. *J Nat Prod* 1998; 61: 689–692
- 93 Takahashi Y, Kubota T, Fromont J, Kobayashi J. Zamamidines A and B, new manzamine alkaloids from the sponge *Amphimedon* species. *Org Lett* 2008; 11: 21–24
- 94 Kubota T, Kamijyo Y, Takahashi-Nakaguchi A, Fromont J, Gonoï T, Kobayashi J. Zamamiphidin A, a new manzamine related alkaloid from an Okinawan marine sponge *Amphimedon* sp. *Org Lett* 2013; 15: 610–612
- 95 Rao KV, Kananah N, Wahyuno S, Tekwani BL, Schinazi RF, Hamann MT. Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. *J Nat Prod* 2004; 67: 1314–1318
- 96 Rao KV, Donia MS, Peng J, Garcia-Palmero E, Alonso D, Martinez A, Medina M, Franzblau SG, Tekwani BL, Khan SI. Manzamine B and E and ircinal A related alkaloids from an Indonesian *Acanthostrongylophora* sponge and their activity against infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases. *J Nat Prod* 2006; 69: 1034–1040
- 97 Wahba AE, Fromentin Y, Zou Y, Hamann MT. Acantholactone, a new manzamine related alkaloid with an unprecedented δ -lactone and ϵ -lactam ring system. *Tetrahedron Lett* 2012; 53: 6329–6331
- 98 El Sayed KA, Kelly M, Kara UAK, Ang KKH, Katsuyama I, Dunbar DC, Khan AA, Hamann MT. New manzamine alkaloids with potent activity against infectious diseases. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 1804–1808

- 99 Samoylenko V, Khan SI, Jacob MR, Tekwani BL, Walker LA, Hufford CD, Muhammad I. Bioactive (+)-manzamine A and (+)-8-hydroxymanzamine A tertiary bases and salts from *Acanthostrongylophora ingens* and their preparations. *Nat Prod Commun* 2009; 4: 185–192
- 100 Furusato A, Kato H, Nehira T, Eguchi K, Kawabata T, Fujiwara Y, Losung F, Mangindaan RE, de Voogd NJ, Takeya M. Acanthoanzamines A–E with new manzamine frameworks from the marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Org Lett* 2014; 16: 3888–3891
- 101 El-Desoky AH, Kato H, Eguchi K, Kawabata T, Fujiwara Y, Losung F, Mangindaan RE, de Voogd NJ, Takeya M, Yokosawa H. Acantholactam and pre-neo-kaulamine, manzamine-related alkaloids from the Indonesian marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *J Nat Prod* 2014; 77: 1536–1540
- 102 Rodríguez J, Crews P. Revised structure of xestocyclamine A and description of a new analogue. *Tetrahedron Lett* 1994; 35: 4719–4722
- 103 Rodríguez J, Peters BM, Kurz L, Schatzman RC, McCarley D, Lou L, Crews P. An alkaloid protein kinase C inhibitor, xestocyclamine A, from the marine sponge *Xestospongia* sp. *J Am Chem Soc* 1993; 115: 10436–10437
- 104 Kong F, Andersen RJ, Allen TM. Ingenamine, a novel pentacyclic alkaloid from the marine sponge *Xestospongia ingens*. *Tetrahedron Lett* 1994; 35: 1643–1646
- 105 Kong F, Andersen RJ, Allen TM. Ingamines A and B, new cytotoxic alkaloids from the marine sponge *Xestospongia ingens*. *Tetrahedron* 1994; 50: 6137–6144
- 106 Kong F, Andersen RJ, Allen TM. Madangamine A, a novel cytotoxic alkaloid from the marine sponge *Xestospongia ingens*. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 6007–6008
- 107 Kong F, Andersen RJ. Ingenamine alkaloids isolated from the sponge *Xestospongia ingens*: Structures and absolute configurations. *Tetrahedron* 1995; 51: 2895–2906
- 108 Ichiba T, Corgiat JM, Scheuer PJ, Kelly-Borges M. 8-Hydroxymanzamine A, a β -carboline alkaloid from a sponge, *Pachypellina* sp. *J Nat Prod* 1994; 57: 168–170
- 109 Umeyama A, Nagano C, Arihara S. Three novel C21 polyacetylenes from the marine sponge *Callyspongia* sp. *J Nat Prod* 1997; 60: 131–133
- 110 Youssef DTA, Yoshida WY, Kelly M, Scheuer PJ. Polyacetylenes from a Red Sea sponge *Callyspongia* species. *J Nat Prod* 2000; 63: 1406–1410
- 111 Nakao Y, Uehara T, Matunaga S, Fusetani N, van Soest RWM. Callyspongynic acid, a polyacetylenic acid which inhibits α -glucosidase, from the marine sponge *Callyspongia truncata*. *J Nat Prod* 2002; 65: 922–924
- 112 Braekman JC, Daloz D, Devijver C, Dubut D, van Soest RWM. A new C-20 polyacetylene from the sponge *Callyspongia pseudoreticulata*. *J Nat Prod* 2003; 66: 871–872
- 113 Youssef DTA, van Soest RWM, Fusetani N. Callyspongamide A, a new cytotoxic polyacetylenic amide from the Red Sea sponge *Callyspongia fistularis*. *J Nat Prod* 2003; 66: 861–862
- 114 Youssef DT, van Soest RWM, Fusetani N. Callyspongensols A–C, new cytotoxic C22-polyacetylenic alcohols from a Red Sea sponge, *Callyspongia* species. *J Nat Prod* 2003; 66: 679–681
- 115 Umeyama A, Matsuoka N, Mine R, Nakata A, Arimoto E, Matsui M, Shoji N, Arihara S, Takei M, Hashimoto T. Polyacetylene diols with anti-proliferative and driving Th1 polarization effects from the marine sponge *Callyspongia* sp. *J Nat Med* 2010; 64: 93–97
- 116 Rotem M, Kashman Y. New polyacetylenes from the sponge *Siphonochalina* sp. *Tetrahedron Lett* 1979; 20: 3193–3196
- 117 Tada H, Yasuda F. Siphonodiols, a new polyacetylenic metabolite from the sponge *Siphonochalina truncate*. *Chem Lett* 1984; 13: 779–780
- 118 Ayyad SE, Angawy R, Saqer EA, Badria FA. Cytotoxic polyacetylenes from the Red Sea sponge *Siphonochalina siphonella*. *Z Naturforsch C* 2014; 69: 117–123
- 119 Cimino G, de Stefano S. New acetylenic compounds from the sponge *Reniera fulva*. *Tetrahedron Lett* 1977; 18: 1325–1328
- 120 Ortega MJ, Zubía E, Carballo JL, Salvá J. Fulvinol, a new long-chain diacetylenic metabolite from the sponge *Reniera fulva*. *J Nat Prod* 1996; 59: 1069–1071
- 121 Nuzzo G, Ciavatta ML, Villani G, Manzo E, Zanfardino A, Varcamonti M, Gavagnin M. Fulvynes, antimicrobial polyoxygenated acetylenes from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. *Tetrahedron* 2012; 68: 754–760
- 122 Williams DH, Faulkner DJ. Three new acetylenes from the Palauan sponge *Haliclona* sp. *J Nat Prod* 1996; 59: 1099–1101
- 123 Shin J, Seo Y, Cho KW, Rho JR, Paul VJ. Osirisynes A–F, highly oxygenated polyacetylenes from the sponge *Haliclona osiris*. *Tetrahedron* 1998; 54: 8711–8720
- 124 Chill L, Miroz A, Kashman Y. Haliclonyne, a new highly oxygenated polyacetylene from the marine sponge *Haliclona* species. *J Nat Prod* 2000; 63: 523–526
- 125 Aoki S, Matsui K, Tanaka K, Satari R, Kobayashi M. Lembehynes A, a novel neurotogenic polyacetylene, from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron* 2000; 56: 9945–9948
- 126 Aoki S, Matsui K, Wei H, Murakami N, Kobayashi M. Structure-activity relationship of neurotogenic spongean acetylene alcohols, lembehynes. *Tetrahedron* 2002; 58: 5417–5422
- 127 Zhou GX, Molinski T. Long-chain acetylenic ketones from the Micronesian sponge *Haliclona* sp. Importance of the 1-yn-3-ol group for antitumor activity. *Mar Drugs* 2003; 1: 46–53
- 128 Aratake S, Trianto A, Hanif N, de Voogd N, Tanaka J. A new polyunsaturated brominated fatty acid from a *Haliclona* sponge. *Mar Drugs* 2009; 7: 523–527
- 129 Kobayashi M, Mahmud T, Tajima H, Wang W, Aoki S, Nakagawa S, Mayumi T, Kitagawa I. Marine natural products. XXXVI. Biologically active polyacetylenes, adociacetylenes A, B, C, and D, from an Okinawan marine sponge of *Adocia* sp. *Chem Pharm Bull* 1996; 44: 720–724
- 130 Wright AE, McConnell OJ, Kohmoto S, Lui MS, Thompson W, Snader KM. Duryne, a new cytotoxic agent from the marine sponge *Cribrachalina dura*. *Tetrahedron Lett* 1987; 28: 1377–1379
- 131 Gunasekera SP, Faircloth GT. New acetylenic alcohols from the sponge *Cribrachalina vasculum*. *J Org Chem* 1990; 55: 6223–6225
- 132 Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Pansini M. Further bioactive acetylenic compounds from the caribbean sponge *Cribrachalina vasculum*. *J Nat Prod* 1992; 55: 1275–1280
- 133 Hallock YF, Cardellina JH, Balaschak MS, Alexander MR, Prather TR, Shoemaker RH, Boyd MR. Antitumor activity and stereochemistry of acetylenic alcohols from the sponge *Cribrachalina vasculum*. *J Nat Prod* 1995; 58: 1801–1807
- 134 Dai JR, Hallock YF, Cardellina JH, Boyd MR. Vasculyne, a new cytotoxic acetylenic alcohol from the marine sponge *Cribrachalina vasculum*. *J Nat Prod* 1996; 59: 88–89
- 135 Legrave N, Hamrouni-Buonomo S, Dufies M, Guérineau V, Vacelet J, Auberger P, Amade P, Mehiri M. Nepheliosyne B, a new polyacetylenic acid from the new caledonian marine sponge *Niphates* sp. *Mar Drugs* 2013; 11: 2282–2292
- 136 De Jesus RP, Faulkner DJ. Chlorinated acetylenes from the San Diego sponge *Haliclona lunisimilis*. *J Nat Prod* 2003; 66: 671–674
- 137 Castiello D, Cimino G, de Rosa S, de Stefano S, Sodano G. High molecular weight polyacetylenes from the nudibranch *Peltodoris actromaculata* and the sponge *Petrosia ficiformis*. *Tetrahedron Lett* 1980; 21: 5047–5050
- 138 Cimino G, Crispino A, de Rosa S, de Stefano S, Sodano G. Polyacetylenes from the sponge *Petrosia ficiformis* found in dark caves. *Experientia* 1981; 37: 924–926
- 139 Cimino G, de Giulio A, de Rosa S, de Stefano S, Sodano G. Further high molecular weight polyacetylenes from the sponge *Petrosia ficiformis*. *J Nat Prod* 1985; 48: 22–27
- 140 Cimino G, de Giulio A, de Rosa S, di Marzo V. High molecular weight polyacetylenes from *Petrosia ficiformis*: Further structural analysis and biological activity. *Tetrahedron Lett* 1989; 30: 3563–3566
- 141 Cimino G, de Giulio A, de Rosa S, di Marzo V. Minor bioactive polyacetylenes from *Petrosia ficiformis*. *J Nat Prod* 1990; 53: 345–353
- 142 Guo Y, Gavagnin M, Trivellone E, Cimino G. Absolute stereochemistry of petroformynes, high molecular polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Tetrahedron* 1994; 50: 13261–13268
- 143 Guo Y, Gavagnin M, Trivellone E, Cimino G. Further structural studies on the petroformynes. *J Nat Prod* 1995; 58: 712–722
- 144 Guo Y, Gavagnin M, Salierno C, Cimino G. Further petroformynes from both Atlantic and Mediterranean populations of the sponge *Petrosia ficiformis*. *J Nat Prod* 1998; 61: 333–337
- 145 Isaacs S, Kashman Y, Loya S, Hizi A, Loya Y. Petrosynol and petrosolic acid, two novel natural inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus from *Petrosia* sp. *Tetrahedron* 1993; 49: 10435–10438
- 146 Guerriero A, Debitus C, Laurent D, d'Ambrosio M, Pietra F. Aztèquynol A, the first clearly defined, C-branched polyacetylene and the analogue Aztèquynol B. Isolation from the tropical marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron Lett* 1998; 39: 6395–6398

- 147 Fusetani N, Shiragaki T, Matsunaga S, Hashimoto K. Bioactive marine metabolites XX. Petrosynol and petrosynone, antimicrobial C30 polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* sp.: Determination of the absolute configuration. *Tetrahedron Lett* 1987; 28: 4313–4314
- 148 Fusetani N, Li HY, Tamura K, Matsunaga S. Antifungal brominated C18 acetylenic acids from the marine sponge, *Petrosia volcano* Hoshino. *Tetrahedron* 1993; 49: 1203–1210
- 149 Li H-Y, Matsunaga S, Fusetani N. Corticatic acids A–C, antifungal acetylenic acids from the marine sponge, *Petrosia corticata*. *J Nat Prod* 1994; 57: 1464–1467
- 150 Nishimura S, Matsunaga S, Shibasaki M, Suzuki K, Harada N, Naoki H, Fusetani N. Corticatic acids D and E, polyacetylenic geranylgeranyl-transferase type I inhibitors, from the marine sponge *Petrosia corticata*. *J Nat Prod* 2002; 65: 1353–1356
- 151 Shin J, Seo Y, Cho KW. Five new polyacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia*. *J Nat Prod* 1998; 61: 1268–1273
- 152 Seo Y, Cho KW, Rho J-R, Shin J, Sim CJ. Petrocortynes and petrosiacetylenes, novel polyacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia*. *Tetrahedron* 1998; 54: 447–462
- 153 Kim JS, Lim YJ, Im KS, Jung JH, Shim CJ, Lee CO, Hong J, Lee H. Cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* sp. *J Nat Prod* 1999; 62: 554–559
- 154 Lim YJ, Lee CO, Hong J, Kim DK, Im KS, Jung JH. Cytotoxic polyacetylenic alcohols from the marine sponge *Petrosia* species. *J Nat Prod* 2001; 64: 1565–1567
- 155 Lim YJ, Park HS, Im KS, Lee CO, Hong J, Lee MY, Kim DK, Jung JH. Additional cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* species. *J Nat Prod* 2001; 64: 46–53
- 156 Lee YJ, Yoo SJ, Kang JS, Yun J, Shin HJ, Lee JS, Lee HS. Cytotoxic petrosiacetylenes from the marine sponge *Petrosia* sp. *Lipids* 2013; 48: 87–91
- 157 Juan YS, Lee CC, Tsao CW, Lu MC, El-Shazly M, Shih HC, Chen YC, Wu YC, Su JH. Structure elucidation and cytotoxic evaluation of new polyacetylenes from a marine sponge *Petrosia* sp. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 16511–16521
- 158 Watanabe K, Tsuda Y, Hamada M, Omori M, Mori G, Iguchi K, Naoki H, Fujita T, van Soest RW. Acetylenic strongylodiols from a *Petrosia* (Strongylophora) Okinawan marine sponge. *J Nat Prod* 2005; 68: 1001–1005
- 159 Watanabe K, Mori G, Iguchi K, Suzuki M, van Soest RW. Nine acetylenic alcohols isolated from the Okinawan marine sponge of the genus *Petrosia* (Strongylophora). *Nat Prod Res* 2007; 21: 710–720
- 160 Okamoto C, Nakao Y, Fujita T, Iwashita T, van Soest RWM, Fusetani N, Matsunaga S. Cytotoxic C47-polyacetylene carboxylic acids from a marine sponge *Petrosia* sp. *J Nat Prod* 2007; 70: 1816–1819
- 161 Ueoka R, Ise Y, Matsunaga S. Cytotoxic polyacetylenes related to petroformyne-1 from the marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron* 2009; 65: 5204–5208
- 162 Hitora Y, Takada K, Okada S, Matsunaga S. Miyakosynes A–F, cytotoxic methyl branched acetylenes from a marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron* 2011; 67: 4530–4534
- 163 Ohta S, Ogawa T, Ohta E, Ikeuchi T, Kamemura K, Ikegami S. Petroacetylene, a new polyacetylene from the marine sponge *Petrosia solida* that inhibits blastulation of starfish embryos. *Nat Prod Res* 2013; 27: 1842–1847
- 164 Horikawa K, Yagyu T, Yoshioka Y, Fujiwara T, Kanamoto A, Okamoto T, Ojika M. Petrosiols A–E, neurotrophic diyne tetraols isolated from the Okinawan sponge *Petrosia strongylata*. *Tetrahedron* 2013; 69: 101–106
- 165 Schmitz FJ, Gopichand Y. (7E,13Z,15Z)-14,16-dibromo-7,13,15-hexadecatrien-5-ynoic acid. A novel dibromo acetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia muta*. *Tetrahedron Lett* 1978; 19: 3637–3640
- 166 Quinn RJ, Tucker DJ. A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron Lett* 1985; 26: 1671–1672
- 167 Quinn RJ, Tucker DJ. Further acetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J Nat Prod* 1991; 54: 290–294
- 168 Bourguet-Kondracki ML, Rakotoarisoa MT, Martin MT, Guyot M. Bioactive bromopolyacetylenes from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron Lett* 1992; 33: 225–226
- 169 Hirsh S, Carmely S, Kashman Y. Brominated unsaturated acids from the marine sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron* 1987; 43: 3257–3261
- 170 Quiñoà E, Crews P. Melynes, polyacetylene constituents from a Vanuatu marine sponge. *Tetrahedron Lett* 1988; 29: 2037–2040
- 171 Kobayashi J, Naitoh K, Ishida K, Shigemori H, Ishibashi M. Nepheliosyne A, new C47 acetylenic acid from the okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *J Nat Prod* 1994; 57: 1300–1303
- 172 Brantley SE, Molinski TF, Preston CM, DeLong EF. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine spongebacteria association. *Tetrahedron* 1995; 51: 7667–7672
- 173 Dai JR, Hallock YF, Cardellina JH, Gray GN, Boyd MR. Triangulynes A–H and triangulynic acid, new cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Pellina triangulata*. *J Nat Prod* 1996; 59: 860–865
- 174 Fu X, Abbas SA, Schmitz FJ, Vidavsky I, Gross ML, Laney M, Schatzman RC, Cabuslay RD. New acetylenic metabolites from the marine sponge *Pellina triangulata*. *Tetrahedron* 1997; 53: 799–814
- 175 Matsunaga S, Okada Y, Fusetani N, van Soest RWM. An antimicrobial C14 acetylenic acid from a marine sponge *Oceanapia* species. *J Nat Prod* 2000; 63: 690–691
- 176 Erpenbeck D, van Soest RWM. Status and perspective of sponge chemosystematics. *Mar Biotechnol* 2007; 9: 2–19
- 177 Montalvo NF, Hill RT. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 7207–7216
- 178 Trindade-Silva AE, Rua C, Silva GGZ, Dutilh BE, Moreira APB, Edwards RA, Hajdu E, Lobo-Hajdu G, Vasconcelos AT, Berlinck RGS, Thompson FL. Taxonomic and functional microbial signatures of the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *PLoS One* 2012; 7: e39905
- 179 Khan ST, Musarrat J, Alkhedhairi AA, Kazuo S. Diversity of bacteria and polyketide synthase associated with marine sponge *Haliclona* sp. *Ann Microbiol* 2014; 64: 199–207
- 180 Jasmin C, Anas A, Nair S. Bacterial diversity associated with *Cinachyra cavernosa* and *Haliclona pigmentifera*, cohabiting sponges in the Coral Reef Ecosystem of Gulf of Mannar, Southeast Coast of India. *PLoS One* 2015; 10: e0123222

Natural paniceins from mediterranean sponge inhibit the multidrug resistance activity of Patched and increase chemotherapy efficiency on melanoma cells

Laura Fiorini¹, Marie-Aude Tribalat², Lucy Sauvard^{1,2}, Julie Cazareth¹, Enzo Lalli¹, Isabelle Broutin³, Olivier P. Thomas^{2,4}, Isabelle Mus-Veteau¹

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, Valbonne, France

²Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, Faculté des Sciences, Nice, France

³Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR 8015, CNRS - Faculte de Pharmacie, Paris, France

⁴Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale, UMR 7263, CNRS, IRD, Université Aix-Marseille, Université Avignon, Station Marine d'Endoume, Marseille, France

Correspondence to:

Olivier P. Thomas, **e-mail:** olivier.thomas@unice.fr

Isabelle Mus-Veteau, **e-mail:** mus-veteau@ipmc.cnrs.fr

Keywords: Patched, chemotherapy resistance, natural sponge compounds, drug efflux antagonist, cancer

Received: March 15, 2015

Accepted: May 20, 2015

Published: June 01, 2015

ABSTRACT

Multidrug resistance has appeared to mitigate the efficiency of anticancer drugs and the possibility of successful cancer chemotherapy. The Hedgehog receptor Patched is a multidrug transporter expressed in several cancers and as such it represents a new target to circumvent chemotherapy resistance. We report herein that paniceins and especially panicein A hydroquinone, natural meroterpenoids produced by the Mediterranean sponge *Haliclona (Soestella) mucosa*, inhibit the doxorubicin efflux activity of Patched and enhance the cytotoxicity of this chemotherapeutic agent on melanoma cells *in vitro*. These results are supported by the molecular docking performed on the structure of the bacterial drug efflux pump AcrB and on the Patched model built from AcrB structure. Docking calculations show that panicein A hydroquinone interacts with AcrB and Patched model close to the doxorubicin binding site. This compound thus appears as the first antagonist of the doxorubicin efflux activity of Patched. The use of inhibitors of Patched drug efflux activity in combination with classical chemotherapy could represent a novel approach to reduce tumor drug resistance, recurrence and metastasis.

INTRODUCTION

The Hedgehog (Hh) signaling pathway regulates body patterning and organ development during embryo development. In adults, the Hh pathway is mainly quiescent with the exception of roles in tissue maintenance and repair, and its inappropriate reactivation has been linked to several human cancers. Activation of Hh signaling occurs when Hh binds to its receptor Patched, causing the translocation of GLI1/2A into the nucleus to activate target genes such as snail, bcl2 and cyclin D, leading to proliferation, EMT and cell survival [1]. Indeed, aberrant activation of the Hh signaling has been identified

in many aggressive cancers (breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic cancers, melanoma or multiple myeloma [2, 3]), in particular in cells exhibiting resistance to chemotherapeutic agents such as cancer stem cells or tumor initiating cells. Recently, Yue and collaborators showed that the Hh signaling is critical for lung squamous cell carcinomas (SCC) recurrence, metastasis and resistance to chemotherapy, suggesting that inhibition of the Hh pathway is a potential therapeutic strategy for the treatment of lung SCC patients [4]. Several studies have shown that antagonizing the Hh signaling receptor Smoothed (Smo) could provide a way to interfere with tumorigenesis and tumor progression [2, 5–8].

Vismodegib, designed to selectively inhibit Hh signaling by targeting Smo, is a first-in-class investigational oral medicine for basal-cell carcinoma treatment [2, 9]. It has been reported that autocrine expression of Hh morphogens such as Sonic Hedgehog (Shh) is required for growth of some cancers [10, 11], and stromal cell-derived Shh can also activate the Hh pathway in tumors [12]. A Shh-specific monoclonal antibody (5E1) has been shown to inhibit the growth of several tumors, including small-cell lung carcinoma, by preventing Shh binding to its receptor Patched [13]. Moreover, the use of an antibody directed against one of the Patched extracellular domains involved in the interaction with Shh as well as peptides designed to compete with Shh for binding to Patched were shown to inhibit proliferation of pancreatic cancer cells [14, 15]. In addition to targeting tumors that have hyperactive Hh pathway themselves, antagonists of the Hh pathway could also affect growth of tumors that use Hh ligands to induce angiogenesis [16, 17] or recruit other types of stromal cells. Because adults can tolerate inhibition of the Hh pathway [18], specific inhibition of Hh signaling offers an efficient treatment for diverse cancers originating from aberrant Hh pathway activation.

Two different genes (*Patched 1* and *Patched 2*) encode homologues of the Drosophila Hh morphogen receptor Patched. Mice deficient in *Patched 2* are viable, but develop alopecia and epidermal hypoplasia and have increased tumor incidence in the presence of a mutant allele of *Patched 1*. Loss of *Patched 1*, in turn, results in complete activation of the Hh pathway, suggesting that *Patched 1* is the functional ortholog of Drosophila Patched [1]. The expression of Patched 1, here referred as Patched, is induced upon activation of the Hh pathway in several cancers: lung, breast, basal cells of the skin, melanoma, prostate, colon, brain [2, 19, 20] and myeloid leukemia [21, 22]. Moreover, recent studies propose Patched as an early marker of gastric and thyroid cancers [23, 24].

We recently discovered that the Hh receptor Patched has a drug efflux activity and contributes to the resistance of cancer cells to some chemotherapeutic agents [25]. Indeed, human Patched expressed in yeast conferred resistance to several chemotherapeutic agents used to treat metastatic cancers (doxorubicin, methotrexate, temozolomide, 5-FU) and increases doxorubicin efflux. This yeast model has been extended to fibroblasts (often used to study Hh signaling) and human cancer cell lines which endogenously express Patched such as melanoma cell lines. The presence of Shh, the ligand of Patched which induces Patched internalization and degradation, was shown to increase the accumulation of doxorubicin into these cells and its cytotoxicity. Altogether, these results suggest that the Hh receptor Patched participates to chemotherapy resistance, and they prompted us to propose Patched as a new target for anti-cancer therapy. Discovering compounds able to inhibit the drug efflux activity of Patched would then lead to an increase in the efficiency of chemotherapy and thus to a reduction

of the risk of metastasis and recurrence for patients with cancers expressing Patched. We then generated innovative yeast- and cell-based screenings to identify molecules able to inhibit the drug efflux activity of Patched. For this purpose, we decided to screen natural compounds produced by marine sponges commonly found in the Mediterranean Sea. Indeed, sponge natural products have already been identified as promising and original leads for therapeutic applications [26–28], and the high biodiversity of marine sponges growing in the diverse Mediterranean ecosystems is a guarantee of a large chemodiversity, enabling us to explore a significant volume of a “bioactive” chemical space. In the present study, we show that four known paniceins isolated from the species *Haliclona (Soestella) mucosa* [29] significantly inhibit the resistance to the chemotherapeutic agent doxorubicin of yeast expressing human Patched. One of these compounds, namely panicein A hydroquinone (1), enhances the accumulation and the cytotoxicity of doxorubicin for two melanoma cell lines, and we show that these effects are due to the inhibition of Patched doxorubicin efflux activity.

RESULTS

Paniceins isolated from the sponge *Haliclona (Soestella) mucosa* are inhibitors of the resistance to doxorubicin of yeast expressing Patched

In a previous study, we showed that the expression of human Patched allowed yeast to grow in the presence of a concentration of doxorubicin (dxr) that inhibits the growth of control yeast, indicating that Patched confers resistance to dxr [25]. From these results, we developed a screening test in 96-well plates to identify compounds capable of inhibiting the resistance of yeast expressing human Patched to dxr. First, the methanolic fractions of fifteen representative Northwestern Mediterranean sponges (*Cymbaxinella verrucosa* [30], *Cymbaxinella damicornis*, *Ircinia variabilis*, *Ircinia oros*, *Agelas oroides*, *Aplysina cavernicola*, *Haliclona (Soestella) mucosa*, *Phorbas topsenti*, *Chondrosia reniformis*, *Chondrilla nucula*, *Haliclona (Halichoelona) fulva*, *Crambe crambe*, *Haliclona (Rhizoniera) sarai*, *Acanthella acuta*, *Scopalina lophyropoda*) were obtained after C18 Solid Phase Extraction (SPE) of a MeOH/DCM 1:1 extract of each sponge. These fractions were subsequently dissolved in DMSO and added at a final concentration of 10 µg/mL to yeast expressing Patched in a medium supplemented or not with dxr (Figure 1). The methanolic fraction obtained from the sponge *Crambe crambe* completely repressed the growth of yeast expressing Patched even in the absence of dxr and appeared to be cytotoxic for yeast. The methanolic fractions obtained from *Haliclona (Soestella) mucosa* and *Haliclona (Rhizoniera) sarai* were the only that clearly inhibit the growth of yeast expressing Patched in the presence of

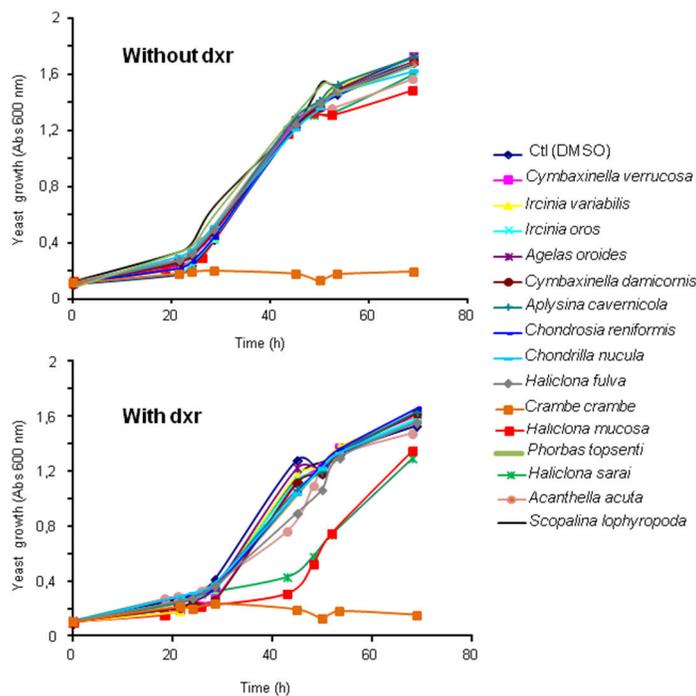


Figure 1: Effect of fifteen sponge fractions on the resistance of yeast expressing Patched to doxorubicin. Yeast expressing Patched were grown in 96 well plates in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ of the methanolic fractions of fifteen Mediterranean sponges (*Cymbaxinella verrucosa*, *Cymbaxinella damicornis*, *Ircinia variabilis*, *Ircinia oros*, *Agelas oroides*, *Aplysina cavernicola*, *Haliclona (Soestella) mucosa*, *Phorbas topsenti*, *Chondrosia reniformis*, *Chondrilla nucula*, *Haliclona (Halichoelona) fulva*, *Crambe crambe*, *Haliclona (Rhizoniera) sarai*, *Acanthella acuta*, *Scopalina lophyropoda*) beforehand dissolved in DMSO, and in the presence or the absence of 10 μM of dxr. DMSO was used as control for yeast growth in the absence of the sponge fraction. The growth of yeast was measured by absorbance at 600 nm.

dxr without significant effect in the absence of dxr. We decided to focus our study on the methanolic fraction obtained from *Haliclona (Soestella) mucosa* (Figure 2a) which significantly inhibited the resistance of yeast expressing Patched to dxr with only a small effect on basal yeast growth (in the absence of dxr) (Figure 2b). In order to identify the compounds responsible for this bioactivity, the methanolic fraction obtained from *Haliclona (Soestella) mucosa* was purified by C_{18} preparative HPLC to yield 9 peaks (P1-P9) (Supplementary Figure 1). Compounds present in these collected peaks were added singly to the yeast growth medium in the presence or in the absence of dxr. Five of these peaks (namely P1, P3, P4, P6 and P7) were shown to strongly inhibit the resistance to dxr of yeast expressing Patched (Figure 2c). The effects of P2 and P9 on yeast growth were lower, and P8 had no effect. Surprisingly, peak P5 increased yeast growth in the presence of dxr suggesting that this compound enhances yeast resistance to dxr. Comparison of the NMR data of these peaks with literature allowed the identification of four compounds P3, P4, P6 and P7 and confirmed their purity (>95%) (Supplementary Figure 2), while the other peaks remained unidentified because they were found as complex mixtures. The identified compounds are meroterpenoids members of the panicein family, namely panicein A hydroquinone (1, P7) [31], panicein B2 (2, P6), panicein B3 (3, P4), and panicein

C (4, P3) [32] (Figure 3). Dose-responses of these compounds on the growth of yeast expressing Patched in the presence of dxr have been performed providing IC_{50} values of about 1 μM for 1, 2 μM for 2, 0.8 μM for 3 and 4.9 μM for 4 (Figure 4).

Panicein A hydroquinone increases the cytotoxicity of doxorubicin on melanoma cells

An analysis extracted from Human Protein Atlas website (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000185920-PTCH1/cancer>) shows that the protein Patched is expressed in several cancers and in particular in melanoma, which exhibit a strong expression of Patched and no expression in healthy tissue (Supplementary Figure 3a). Data from the cancer microarray database and web-based data-mining platform ONCOMINE (<https://www.oncomine.org/>) [33] indicate that Patched mRNAs are expressed in biopsies from 83 melanoma samples over 154, both in primary site and in metastasis (Supplementary Figure 3b). Therefore, two melanoma cell lines were chosen to measure the effect of paniceins purified from *Haliclona (Soestella) mucosa* on dxr cytotoxicity. The MEWO cell line is derived from a melanoma metastatic site (lymph node tissue), and the A375 cell line is derived from a human malignant melanoma and carries the BRAFV600E mutation. These two cell lines express the protein Patched

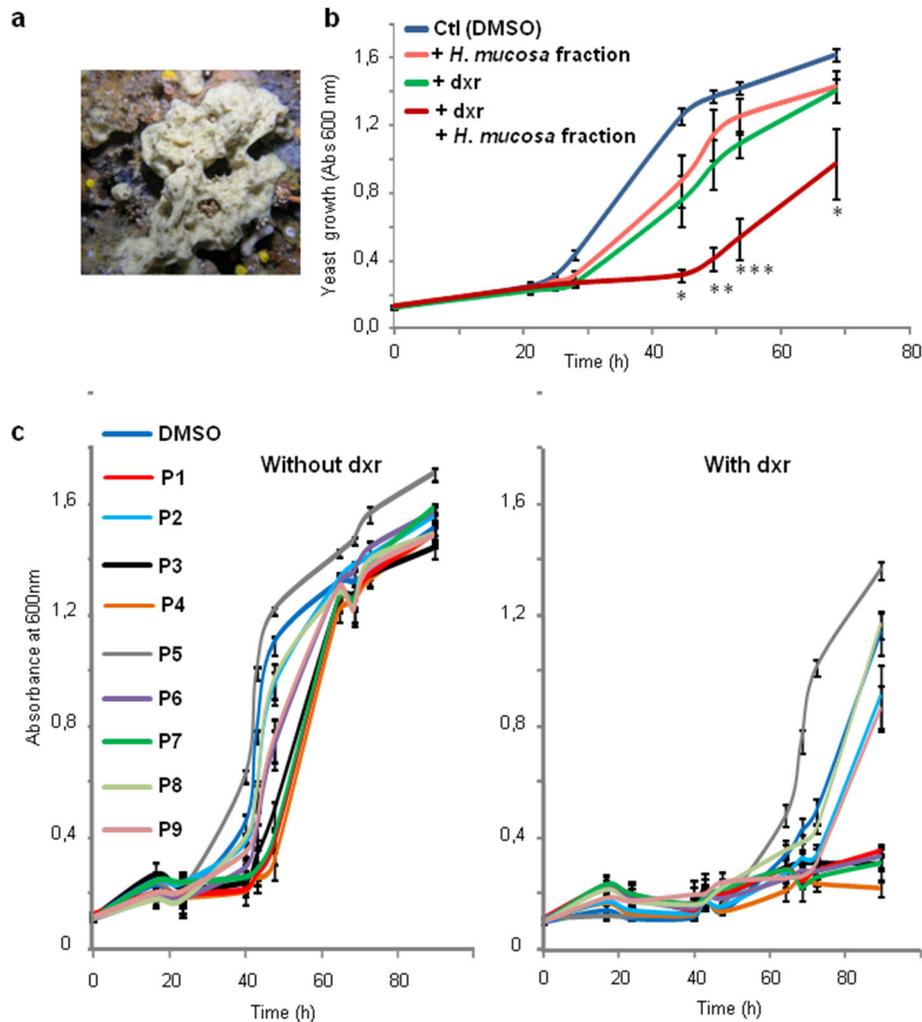


Figure 2: *Haliclona mucosa* extract inhibits resistance of yeast expressing Patched to doxorubicin. **a.** Picture of the sponge *Haliclona mucosa*. **b.** Yeast expressing Patched were grown in 96 well plates in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the methanolic fraction of *Haliclona mucosa* crude extract dissolved in DMSO and in the presence or in the absence of 10 μM of dxr. DMSO at a dilution of 1/1000 corresponding to the amount of DMSO added with the sponge extracts was used in the control wells. The growth of yeast was measured by absorbance at 600 nm. The results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments and were analyzed using the Student *t*-test in which significance is attained at $P < 0.05$ (*) (**: $P < 0.005$, ***: $P < 0.0005$) in comparison with the growth of yeast in the presence of dxr and DMSO. **c.** Compounds purified from *Haliclona mucosa* methanolic fraction were dissolved in DMSO at 10 mg/mL and added at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to the growth medium containing or not 10 μM of dxr. DMSO at a dilution of 1/1000 corresponding to the amount of DMSO added with the purified sponge fractions was used in the control wells. The growth of yeast was measured by absorbance at 600 nm. The results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments.

as shown by western-blotting and immunofluorescent labeling (Supplementary Figure 3c).

Cells were treated separately with the four paniceins 1–4, with or without dxr, during 24 hours before cell viability measurement (Figure 5). The average of experiments indicated that compound 1 strongly increased cell mortality induced by dxr on MEWO cells (5 to 8 times) and on A375 cells (2 to 3 times). Dose-responses of Panicein A hydroquinone (1) on cell viability have been performed providing IC₅₀ values in the presence of dxr of about 5 μM and 20 μM on MEWO and A375 cells respectively, while in the absence of dxr, this molecule was weakly cytotoxic with IC₅₀ superior to 30 μM .

Flow cytometry experiments carried out using Annexin V and DAPI labeling indicated that the addition of 1 to dxr treatment significantly increased the percentage of cells in apoptosis both for MEWO and A375 cells (Figure 6). These data are in good agreement with the dxr cytotoxicity increase effect of this compound.

Panicein A hydroquinone inhibits doxorubicin efflux

Western blot analysis performed on MEWO or A375 cells treated during 24 hours with compound 1 or with DMSO indicated that the treatment with panicein A hydroquinone had no effect on Patched expression

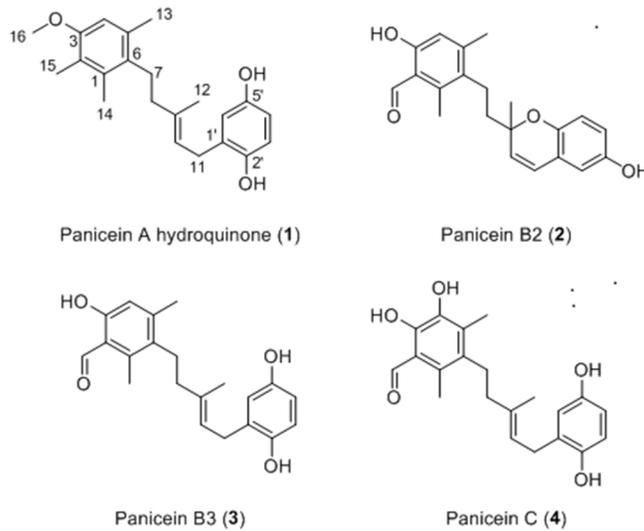


Figure 3: Structure of paniceins isolated and identified from *Haliclona (Soestella) mucosa*. 1. was identified as panicein A hydroquinone, 2. was identified as panicein B2, 3. was identified as panicein B3, 4. was identified as panicein C.

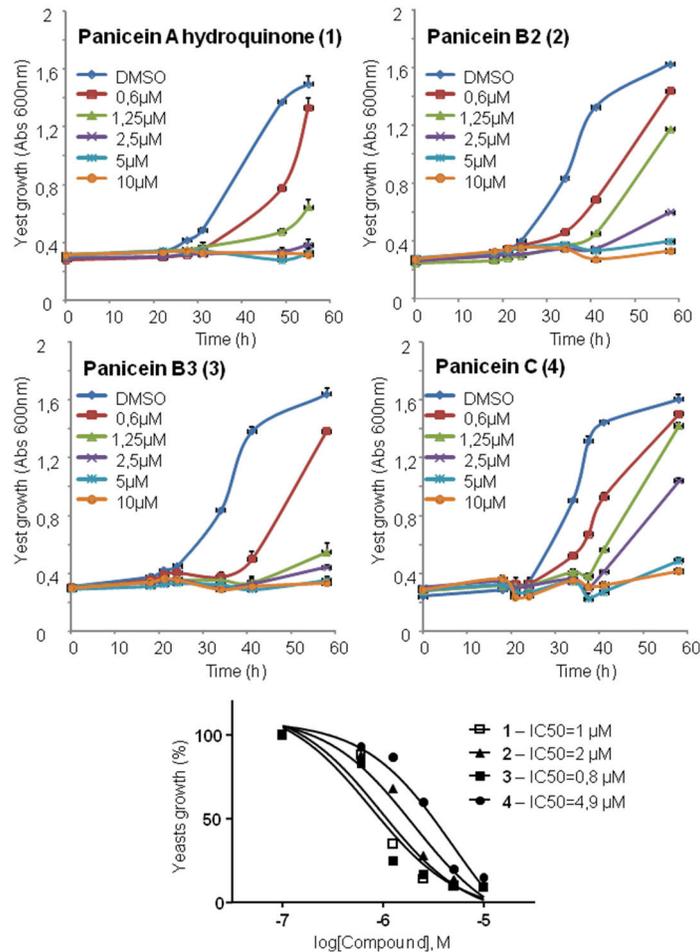


Figure 4: Panicein compounds purified from *Haliclona mucosa* inhibit resistance of yeast expressing Patched to doxorubicin. Yeast expressing Patched were grown in 96 well plates. Panicein compounds purified from *Haliclona mucosa* methanolic fraction and dissolved in DMSO at 50 mg/mL were added at increasing concentrations to the growth medium containing 10 μ M of dxr. DMSO at a dilution of 1/1000 was used in the control wells. The growth of yeasts was measured by absorbance at 600 nm. The results shown are the mean \pm SEM of four wells. IC_{50} were calculated using nonlin fit of log-dose vs response from Graph Pad Prism software.

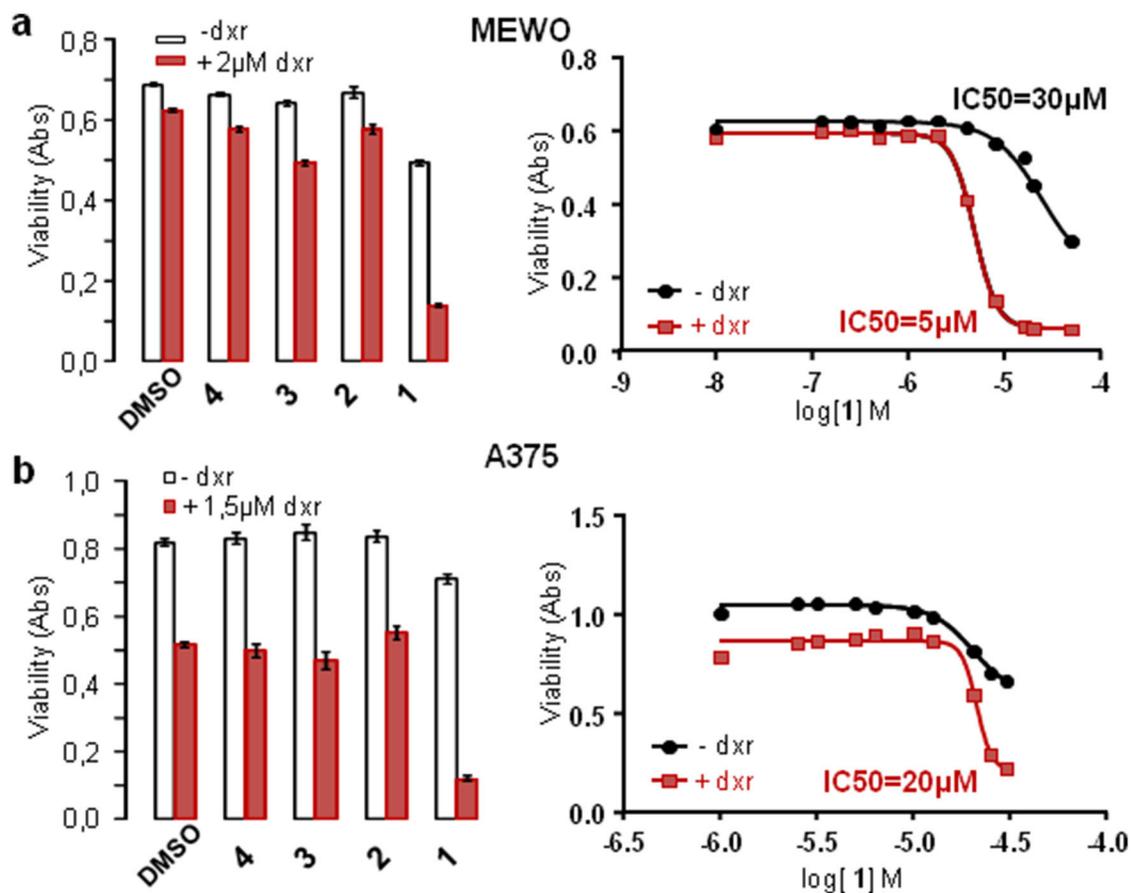


Figure 5: Panicein A hydroquinone increases doxorubicin cytotoxicity on melanoma cells. Melanoma cell lines were treated with paniceins (10 μM MEWO and 25 μM for A375 (left histograms) or increasing concentrations for IC₅₀ measurements (right part)) or DMSO (control), with (red) or without (white) dxr. Cell viability was measured after 24 h treatment. IC₅₀ were calculated from the mean of at least three experiments for each cell line using nonlin fit of log-dose vs response from Graph Pad Prism software.

or degradation in these cells (Supplementary Figure 4). Then, we hypothesized that the effect of 1 on the resistance and the cytotoxicity of dxr could be due to the inhibition of Patched dxr efflux activity. We took advantage of the natural fluorescence properties of dxr [34] to carry out dxr efflux measurements. Melanoma cells were loaded with dxr and fixed for loading control or incubated with efflux buffer containing DMSO (efflux control) or compound 1. Cells were fixed after 30 min and analyzed using cell imaging (Figure 7a). Fluorescence intensity quantification showed that dxr intracellular concentration was significantly higher (about 25%) when 1 was present in the efflux buffer for both A375 and MEWO cells. These results suggest that 1 inhibits dxr efflux from these melanoma cells.

In order to demonstrate that compound 1 inhibits dxr efflux by acting on Patched, we compared dxr efflux from yeast expressing Patched and control yeast. 2-deoxy-D-glucose was added in buffer during dxr loading and efflux in order to de-energize yeast and inhibit ATP-binding cassette (ABC) transporters which also contribute to dxr efflux in

yeast. This enabled us to selectively study the dxr efflux activity of Patched. Dxr fluorescence measured in yeast expressing Patched after efflux in buffer containing DMSO was significantly lower than that measured in control yeast, consistently with the dxr efflux activity of Patched already described [25] (Figure 7b). Dxr concentration of yeast expressing Patched was significantly higher when 1 was present in the efflux buffer, unlike compounds 3 and 4 which exhibited no significant effect (Figure 7b). Results analysis indicated that 1 inhibited about 40% of the dxr efflux activity of Patched. None of these compounds have a significant effect on the dxr fluorescence of control yeasts. These results suggest that compound 1 is able to inhibit the dxr efflux activity of Patched. This was confirmed using yeast expressing a mutant of Patched: PatchedVXXXV. We previously described that the drug efflux activity of Patched was coupled to the proton motive force similarly to the bacterial efflux pumps from the RND family [35]. The GXXXD motif that corresponds to the proton transfer pathway in the RND bacterial drug efflux pumps is highly conserved in the fourth putative transmembrane segment of Patched [25, 36, 37]. We replaced glycine (G)

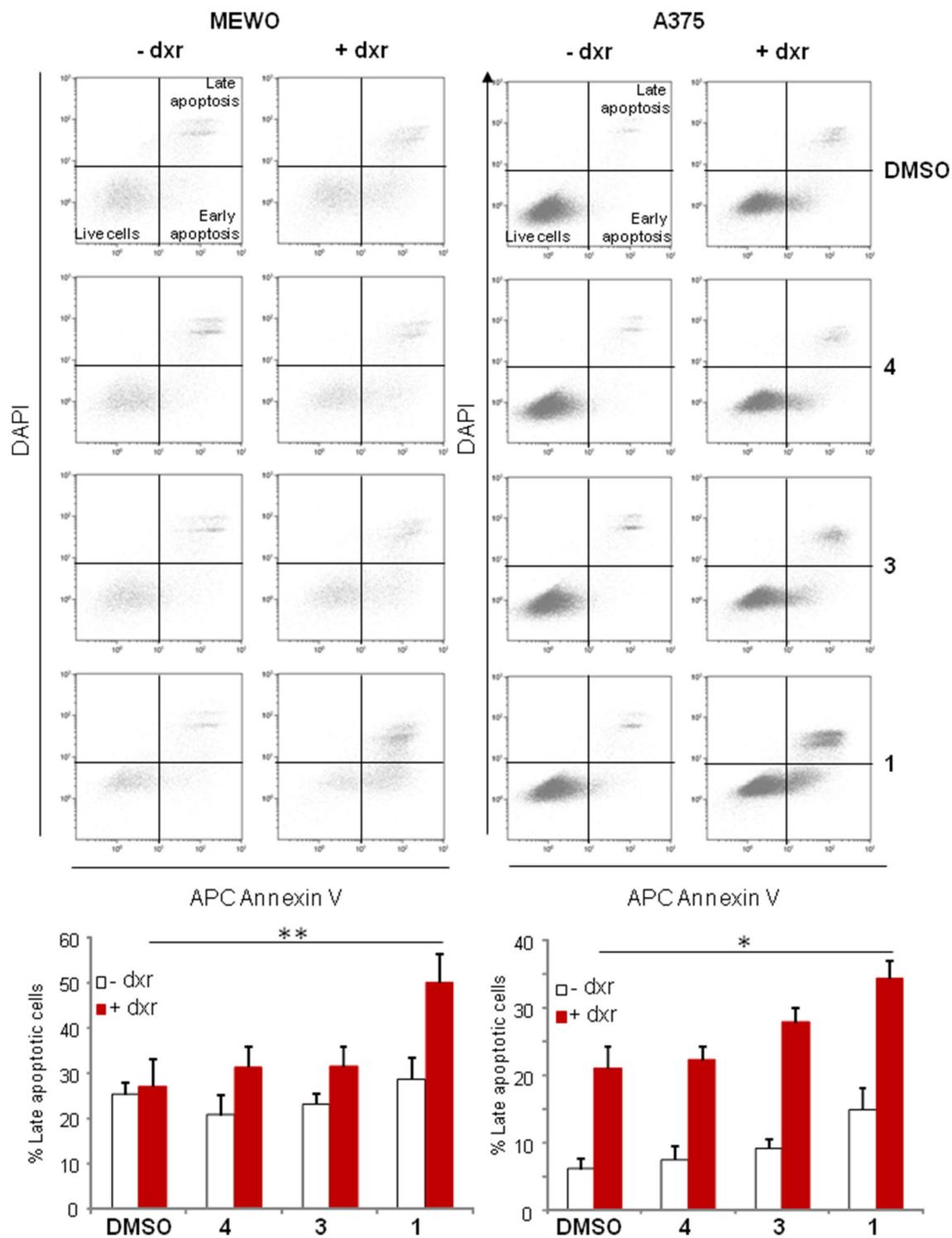


Figure 6: Panicein A hydroquinone strongly increases the number of apoptotic melanoma cells. Cells were sampled after 24 h treatment with DMSO, paniceins and/or dxr, and apoptosis determined via AnnexinV and DAPI co-staining. Cells in early apoptosis are AnnexinV positive and DAPI negative, and cells in late apoptosis are AnnexinV and DAPI double positive. Histogram represents the mean percentage (\pm SEM) of cells in late apoptosis from three independent experiments and were analyzed using the Student *t*-test in which significance is attained at $P < 0.05$ (*) (**: $P < 0.005$).

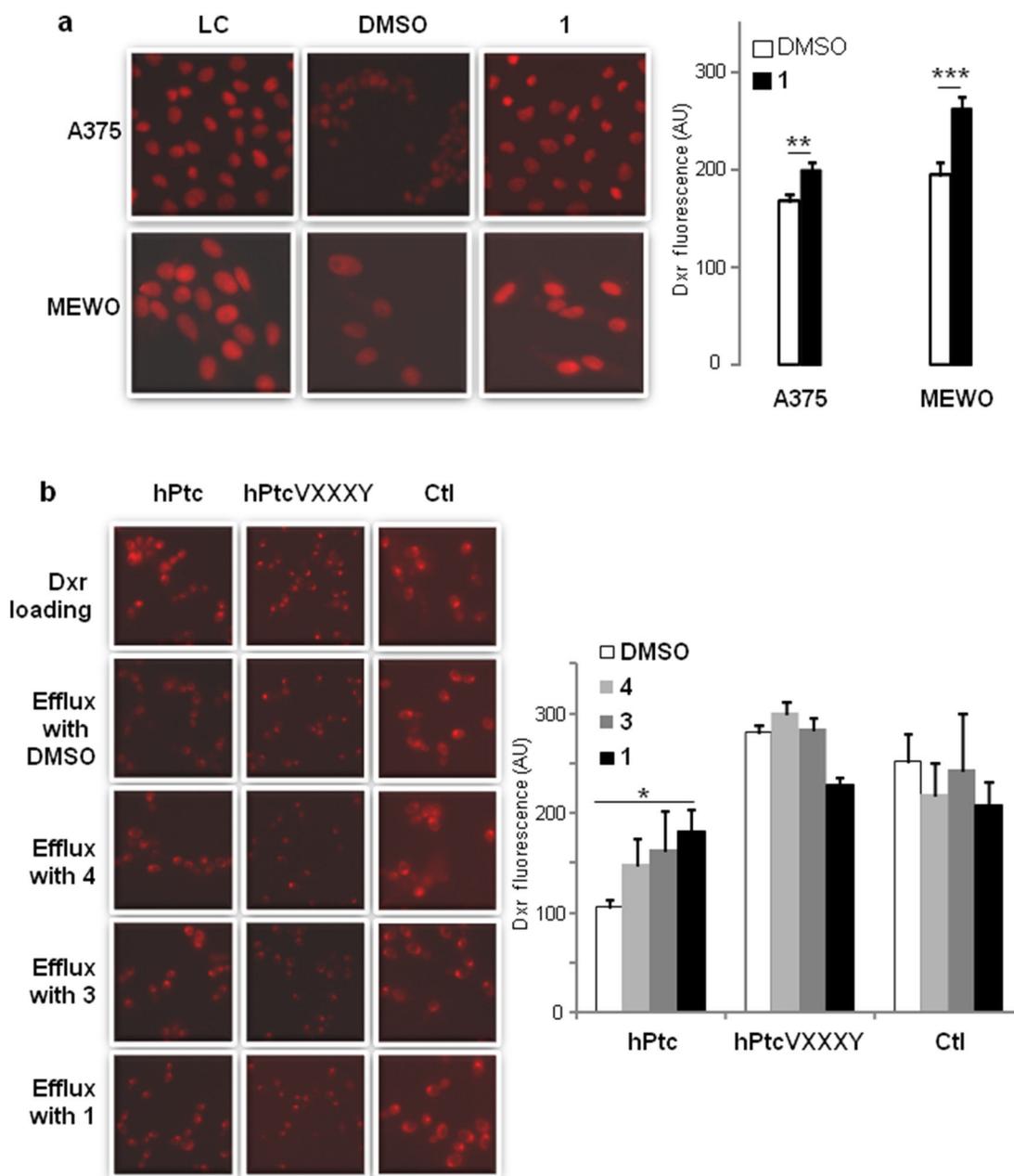


Figure 7: Paniceins inhibit doxorubicin efflux. **a.** MEWO and A375 cells were incubated for 2 hours with dxr and immediately fixed for dxr loading control (LC), or incubated 30 min with buffer supplemented with DMSO or 10 μ M of 1 and immediately fixed. Intracellular dxr fluorescence (red) was visualized by epi-fluorescence with 40X magnification. **b.** Yeast expressing wild-type Patched, mutant Patched G509VD513Y (VXXXY), and control yeast were incubated with dxr for 2 hours and immediately fixed for dxr loading control (LC), or resuspended in buffer supplemented with DMSO or paniceins 10 min and fixed. Samples were deposited on cover-slips and intracellular dxr fluorescence (red) was visualized by epi-fluorescence with 63X magnification. Histograms represent the intracellular dxr fluorescence quantification which was carried out using Image J software on more than 30 cells or yeasts from 3 different fields for each condition on 3 independent experiments. The results were analyzed using the Student *t*-test in which significance between dxr fluorescence in cells after efflux in the presence of DMSO (in white) or of 1 (in black) is attained at $P < 0.05$ (*) (**: $P < 0.005$, ***: $P < 0.0005$).

in position 509 by a valine (V) and aspartic acid (D) in position 513 by a tyrosine (Y), and we observed that yeast expressing PatchedVXXXY are less resistant to growth inhibition by dxr than yeast expressing wild-type Patched [25]. According to these previous observations, yeast expressing PatchedVXXXY contained significantly more

dxr after efflux than yeast expressing wild-type Patched (Figure 7b). The concentration of dxr in yeast expressing PatchedVXXXY was comparable to that in control yeast, confirming that the double mutation inhibited the dxr efflux activity of Patched. As expected, the presence of compounds 1, 3 or 4 in the efflux buffer had no effect on the

dxr concentration of yeast expressing PatchedVXXXY in contrast to yeast expressing wild-type Patched (Figure 7b). These results support the hypothesis that panicein A hydroquinone (1) inhibits the dxr efflux activity of Patched.

Panicein A hydroquinone presents a strong docking cluster close to the doxorubicin binding site of AcrB

The different programs used for Patched model building converged to the models built with the drug efflux pumps from the RND family (AcrB, MexB, CusA) despite sequence identities between Patched and these proteins lower than 18% (36% of sequence similarity between human Patched and *E. coli* AcrB). The transmembrane region is the most conserved one. In particular, the sequence ⁵⁰⁹GVGVD⁵¹³, corresponding to the proton transfer pathway, is perfectly aligned in all the models built (Figure 8a). The final Patched model results mainly from the structure of *Escherichia coli* AcrB as evidenced from the structural superposition (Figure 8b). The docking of two panicein molecules (1 and 4) was carried out on the

structure of this RND transporter. Among the numerous AcrB structures present in the Protein Data Bank (PDB), the highest resolution one obtained without darpin nor substrate (PDB code 2GIF; [38]) was chosen as template and the results were compared with the AcrB structure in complex with dxr (PDB code: 2DR6; [39]). Those structures consist of three protomers, each of which has a different conformation corresponding to one of the three functional states of the transport cycle. The dxr bound substrate was found in the periplasmic domain of only one of the three protomers. The voluminous binding pocket is aromatic and allows multi-site binding. For binding of 4, the analysis shows 79 distinct conformational clusters of low probability, the largest population being as small as 3. More interestingly, docking of 1 led to 41 conformational clusters, the largest population attaining 16. This strong probability cluster is localized close to the dxr binding site, upstream of the dxr position relative to the entry of the binding pocket (Figure 8c). As this binding pocket has been modeled in Patched, the AcrB-1 and -4 clusters were superposed on the Patched model (Figure 8d). It results that 1 is predicted to interact with Patched in a similar

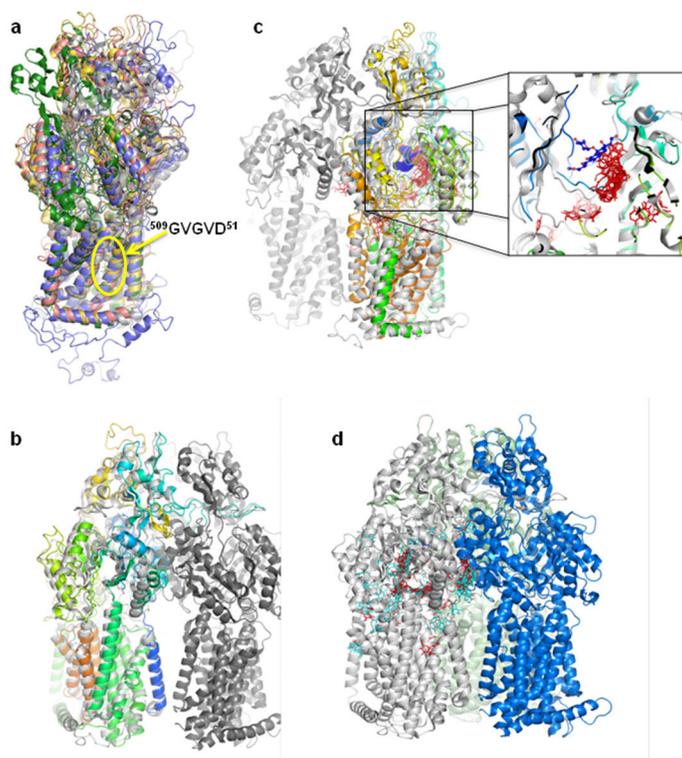


Figure 8: Panicein A hydroquinone presents a strong docking cluster close to the doxorubicin binding site in AcrB structure and in Patched structural model. **a.** Superposition of the different models obtained for human Patched. The transmembrane domain is consistent between the different results, especially the residues GVGVD taking part of the proton transfer. **b.** Monomer of the final selected Patched model superposed on the AcrB structure. The trimer of AcrB is colored in three different greys, the Patched model is in rainbow color. **c.** Panicein A hydroquinone / AcrB docking results. All the panicein A hydroquinone possible positions are presented. The zoom corresponds to an enlargement of the dxr binding pocket. The proteins structures are colored as in (b), dxr is in blue, panicein A hydroquinone is in red. **d.** AcrB docking results of panicein C (light blue) and panicein A hydroquinone (red) presented on a monomer of the AcrB structure. The three monomers are colored in light grey, light green, and blue.

way as dxr binds to AcrB. Then it could be hypothesized that dxr and panicein A hydroquinone could compete by reaching similar binding sites in Patched. This is in good agreement with the inhibition of dxr efflux observed in the presence of panicein A hydroquinone.

DISCUSSION

Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon of resistance of tumors to chemically unrelated anticancer drugs, and is one of the most formidable challenges in the field of cancer chemotherapy [40, 41]. Multidrug resistance can have many causes such as alterations in DNA repair, defective regulation of apoptotic gene expression, enhanced intracellular drug detoxification, but the most common mechanism is the efflux of cytotoxic drugs by membrane transporters. In human, most of the multidrug transporters belong to the large ATP-binding cassette (ABC) transporter super family of membrane proteins from which P-glycoprotein (P-gp) was the first member to be identified [42–44]. Many inhibitors of P-gp have been tested in clinical trials to assess their pharmacological potential. Unfortunately, most of them have failed because they displayed non-specific toxicity [45].

Emerging data from many human tumors have shown that the chemotherapy-resistant phenotype of cancer cells correlates with the activation of Hedgehog (Hh) signaling, and that the Hh pathway regulates cancer stem cells or tumor initiating cells [21, 22, 46, 47]. As an example, Hh signaling is often activated in melanomas and might have a critical role in determining the stem-like characteristics of melanoma initiating cells, contributing to the acquisition of a more undifferentiated and aggressive state through a process similar to reprogramming [48, 49]. The Hh receptor Patched being a Hh target gene, this membrane protein is over-expressed in many recurrent and metastatic tumors such as breast, lung, colorectal, ovarian, prostate cancers or melanoma, as shown by the data extracted from the Human Protein Atlas web site presented in Supplementary Figure 3. We recently discovered that Patched is a multidrug efflux pump that transports different chemotherapeutic agents out of cells, and particularly doxorubicin, using the proton motive force like the bacterial multidrug efflux pumps from the RND family [25]. This is a real breakthrough which suggests that the Hh receptor Patched participates to the resistance to chemotherapy of cancer cells, and allows proposing Patched as a new target for anti-cancer therapy. In contrast to ABC transporters such as P-gp which are ubiquitously expressed, Patched is expressed in adults more specifically in cancer cells. Therefore, inhibitors of Patched drug efflux activity should display less non-specific toxicity than P-gp inhibitors. We then designed innovative screening tests to identify molecules able to inhibit the drug efflux activity of Patched. Compounds extracted from Mediterranean sponges are among the chemical molecules screened to date. Our results show that

some natural compounds isolated from the Mediterranean sponge *Haliclona (Soestella) mucosa* inhibit the resistance to the chemotherapeutic agent doxorubicin (dxr) conferred to yeast by the expression of human Patched. Four of these compounds have been identified as meroterpenoids named paniceins, and correspond to panicein A hydroquinone (1), panicein B2 (2), panicein B3 (3) and panicein C (4). We observed that 1 strongly enhanced the dxr cytotoxicity on melanoma cells and increased the number of apoptotic cells in the presence of dxr, while this molecule showed low cytotoxicity by itself. Dxr fluorescence quantification performed on melanoma cells evinced that treatment with 1 increased dxr intracellular concentration. Similar experiments performed on yeast expressing Patched showed that 1 inhibits the dxr efflux activity of Patched. These data are supported by the fact that 1 has no effect on yeast expressing a mutant of Patched which does not transport dxr or on control yeast. The docking realized on the structure of the *E. coli* drug efflux pump AcrB and the structural model of Patched indicated that 1 has a strong probability of interacting close to the dxr binding site, suggesting that this molecule could prevent dxr efflux. Our results suggest that 1 increases the cytotoxic effect of dxr by inhibiting the efflux activity of Patched. The four paniceins identified in our study have already been assayed for cytotoxicity against tumoral cell lines [31]. These molecules were shown to exhibit moderate cytotoxicity above the micromolar range with 1 being the most selective against CCRF-CEM leukemia cells (with a growth inhibitory power (GI_{50}) of 7.8 μM , a cytostatic effect (TGI) of 25 μM and a cytotoxic effect (LC_{50}) less than to 25 μM). These previous observations together with our present results underline the therapeutic potential of these compounds. The high reactivity of the hydroquinone could hamper the direct use of paniceins as therapeutic agents. However, other terpene quinones from marine origin, e.g. avarol or ilimaquinone [50], have also been shown to exhibit a wide range of interesting bioactivity. In the case of paniceins, this is the first report of a strong therapeutic potential. Moreover, due to the quite easy access to organic synthesis of these molecules [51], slight modifications of the hydroquinone could enhance the bioactivity and interest of panicein analogues as therapeutic agents. In a more general context, these studies underline the importance to assess the biological effects of already known natural substances on a large array of biological targets and the key chemical features of marine natural products [52].

Taken together, our results evidence that panicein A hydroquinone (1) isolated from the Mediterranean sponge *Haliclona (Soestella) mucosa* is the first inhibitor of the dxr efflux activity of Patched. The increase of dxr cytotoxicity induced by panicein A hydroquinone on two melanoma cell lines provides evidence for the relevance of Patched as a therapeutic target in a subset of melanoma, and suggests that the use of inhibitors of Patched drug efflux activity

in combination with classical chemotherapy may be a good approach to circumvent tumor drug resistance and to increase cytotoxicity of chemotherapy toward cancer stem cells and the corresponding differentiated tumor cells. This multimodal strategy may represent a breakthrough and the next challenge in cancer treatment.

MATERIALS AND METHODS

Chemical procedure

Methanol (MeOH, CHROMASOLV for HPLC), dichloromethane (DCM, CHROMASOLV for HPLC), acetonitrile (ACN, CHROMASOLV for HPLC) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma. CD₃OD for NMR was purchased from Eurisotop. Bulk RP-C18 solid phase was Polygoprep 60–50 purchased from Macherey-Nagel. HPLC purification was performed on a Jasco system equipped with an interface Jasco LC-Net II/ADC, a Jasco UV-2075 Plus detector, two Jasco PU 2087 Plus pumps and an ELSD Sedex 85 detector from SEDERE. NMR spectra were recorded at 25°C on a Bruker Avance 500 spectrometer at 500 MHz (¹H). Chemical shifts are reported in ppm using residual CD₃OD (δ3.31 for ¹H) as internal reference.

Biological material

Cymbaxinella verrucosa, *Ircinia variabilis*, *Ircinia oros*, *Agelas oroides*, *Cymbaxinella damicornis*, *Aplysina cavernicola*, *Haliclona (Soestella) mucosa*, *Phorbas topsenti*, *Chondrosia reniformis*, *Chondrilla nucula*, *Haliclona (Halichoelona) fulva*, *Crambe crambe*, *Haliclona (Rhizoniera) sarai*, *Acanthella acuta*, *Scopalina lophyropoda* sponge individuals (max 10 g wet weight) were collected by hand using SCUBA diving in a cave at Villefranche-sur-Mer (France) at depths ranging from 10 or 20 m, and kept frozen until used.

Human melanoma cell lines MEWO and A375 were purchased from ATCC. The two cell lines were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, at 37°C in a 5% CO₂/95% air water-saturated atmosphere.

K699 *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain (Mata, ura3, and leu 2–3, kindly donated by R. Arkowitz) were transformed with the following expression vector: pYEP-hPatched-MAP (giving yeast expressing human Patched), pYEP-mMyo-MAP (for control), or pYEP-hPatchedG509VD513Y-MAP (giving yeast expressing mutant PatchedVXXXXY), and grown as described [35] at 18°C until optical density (OD) at 600 nm reached 5 to 7.

Extraction and purification

For the first screening of sponge extracts, sponge samples (5–10 g wet weight) were freeze dried and then ground to obtain a dry powder which was extracted with

a mixture of DCM/MeOH (1:1, v/v) in an ultrasonic bath to obtain an extract after concentration under reduced pressure. This extract was fractionated by Solid Phase Extraction (Strata® C18-E, 2 g, Phenomenex) with a step gradient of H₂O, MeOH and DCM (14 mL each).

To identify the compounds responsible for the bioactivity, 40.3 g of the freeze-dried sponge *Haliclona (Soestella) mucosa* was extracted with a mixture of DCM/MeOH (1:1, v/v) (400 mL) during 15 min in an ultrasonic bath and the supernatant was collected. This step was repeated twice to finally give 5.6 g of extract after concentration under reduced pressure. The extract was fractionated by RP-C18 vacuum liquid chromatography with solvents of decreasing polarity to obtain 5 fractions: H₂O (F1), H₂O/MeOH 1:1 (F2), H₂O/MeOH 1:3 (F3), MeOH (F4) and DCM (F5) (500 mL each). Fraction F4 was purified by C₁₈ preparative HPLC (19 mm × 250 mm × 5 μm, Xselect CSH from Waters) with an isocratic elution with H₂O/ACN/TFA (30:70:0.1) during 18 min leading to 9 pure compounds P1 to P9 (Supplementary Figure 1). Four of them were identified as panicein A hydroquinone (1, P7, 13.0 mg), panicein B2 (2, P6, 5.50 mg), panicein B3 (3, P4, 41.8 mg), and panicein C (4, P3, 29.3 mg) (Supplementary Figure 2).

Panicein A hydroquinone (1): ¹H NMR (CD₃OD) δ6.59 (d, 1H, H-3'), 6.56 (s, 1H, H-4), 6.55 (d, 1H, H-6'), 6.45 (dd, 1H, H-4'), 5.39 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H-10), 3.74 (s, 3H, H-16), 3.27 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz H-11), 2.72 (m, 2H, H-7), 2.29 (s, 3H, H-13), 2.21 (s, 3H, H-14), 2.09 (m, 2H, H-8), 2.09 (s, 3H, H-15), 1.81 (s, 3H, H-12).

Panicein B2 (2): ¹H NMR (CD₃OD) δ10.33 (s, 1H, H-15), 6.62 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.59 (s, 1H, H-4), 6.56 (dd, 1H, *J* = 8.5, 3.0 Hz, H-4'), 6.48 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H-2'), 6.37 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H-11), 5.73 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H-10), 2.77 (m, 2H, H-7), 2.51 (s, 3H, H-14), 2.28 (s, 3H, H-13), 1.42 (s, 3H, H-12), 1.29 (m, 2H, H-8).

Panicein B3 (3): ¹H NMR (CD₃OD) δ10.34 (s, 1H, H-15), 6.60 (s, 1H, H-4), 6.58 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 6.54 (s, 1H, *J* = 3.0 Hz, H-6'), 6.45 (dd, 1H, *J* = 8.5, 3.0 Hz, H-4'), 5.38 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H-10), 3.26 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11), 2.76 (m, 2H, H-7), 2.54 (s, 3H, H-14), 2.33 (s, 3H, H-13), 2.14 (m, 2H, H-8), 1.82 (s, 3H, H-12).

Panicein C (4): ¹H-NMR (CD₃OD) δ10.33 (s, 1H, H-15), 6.59 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 6.54 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H-6'), 6.45 (dd, 1H, *J* = 8.5, 3.0 Hz, H-4'), 5.39 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz H-10), 3.27 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-11), 2.76 (m, 2H, H-7), 2.48 (s, 3H, H-14), 2.27 (s, 3H, H-13), 2.13 (m, 2H, H-8), 1.82 (s, 3H, H-12).

Effect of sponge methanolic and purified fractions on the resistance of yeast expressing Patched to doxorubicin

Yeast expressing Patched were grown in 10 mL of minimal medium (supplemented with 2% of glucose and aminoacids cocktail without leucine) at 30°C. Yeast

were pre-cultured at 30°C in the same medium to $OD_{600} = 1-2$, and diluted in rich medium containing 2% of glucose in 96-well plates. Methanolic or purified fractions were dissolved in DMSO at 10 mg/mL and added in all wells at 10 µg/mL (1/1000 dilution) or other final concentrations (for IC₅₀ measurements), doxorubicin (dxr) (10 µM final concentration) was added in half of the wells. DMSO at a dilution of 1/1000 corresponding to the amount of DMSO added with sponge extracts or compounds was added in the control wells. We checked that this amount of DMSO had no effect on yeast growth in the absence or in the presence of dxr (not shown). Plates were incubated at 18°C on a shaker at 1250 rpm (microtitre plate shaker SSL5 Stuart) and absorbance at 600 nm was recorded for about 72 h. IC₅₀ were calculated using online fit of log-dose vs response from Graph Pad Prism software.

Effect of sponges purified fractions on doxorubicin cytotoxicity on melanoma cells

MEWO and A375 melanoma cells were seeded on 96-well plates and grown 48 h in complete DMEM medium to achieve 60% to 70% confluence. Medium was then removed and replaced with 100 µL/well of complete DMEM medium containing the compounds of interest at defined concentration or DMSO as control. After 2 h, 100 µL of complete DMEM medium containing dxr was added in half of the wells to obtain 2 or 1.5 µM dxr. 100 µL of complete DMEM medium without dxr was added in the other half of the plate. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂/95% air water-saturated atmosphere. After 24 h, plates were incubated 3 h at 37°C with 100 µL/wells of neutral red (NR) solution (50 µg/mL in DMEM). After a rapid wash with cold PBS, plates were gently tapped several times on absorbent paper. Cells were solubilized with 100 µL of a solution containing 1% acetic acid, 49% H₂O, 50% ethanol by vortexing 3 min at 700 rpm and the absorbance at 600 nm was measured. IC₅₀ were calculated from the mean of at least three experiments for each cell line using online fit of log-dose vs response from Graph Pad Prism software.

Protein quantification

Protein concentrations were determined by the Bradford method using a Bio-Rad kit.

SDS-PAGE and western-blotting

Total RIPA extracts from melanoma cells were prepared. Samples were separated on 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) using standard techniques. After 1 hr at room temperature (RT) in blocking buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 45 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, and 4% non-fat milk), nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Patched antiserum (Ab39266 from Abcam 1/1000) and

monoclonal mouse anti-βtubulin antibody (Sigma; 1/1000). After 3 washes, membranes were incubated 45 min with anti-mouse (1:5000) or anti-rabbit (1:3000) immunoglobulin coupled to horseradish peroxidase (Dako). Detection was carried out with an ECL kit (Millipore) on a Las3000 (Fuji).

Immuno-labelling

Cells were seeded on cover slips in 12-well plates and allowed to grow to 80% confluence. Cells were washed twice with PBS and fixed 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) and then incubated in PBS supplemented with 0.1% Tween and 1% BSA for 1 h to permeabilize the cells and block non-specific protein-protein interaction. Cells were then incubated with anti-Patched antibody (Ab39266 from Abcam 1/200) overnight at 4°C. Cells were washed with PBS/0.1%BSA before incubation with the secondary antibody (Alexa Fluor 494 goat anti-rabbit IgG, (red)) at 1/200 dilution for 1 h at RT. DAPI was used to stain the cell nuclei (blue). Cells were observed by epifluorescence microscopy (Axioplan2 imaging from Zeiss coupled to a cool SNAP HQ from Roper Scientific) using an objective Plan NeoFluar 40x /1.3.

Drug efflux measurements

For dxr incorporation in melanoma cells, the protocol was adapted from Bidet *et al.* [25]. Cells were seeded on cover slips in 12-well plates and allowed to grow to 80% confluence. Cover slips were incubated 2 h at 37°C and 5% CO₂ with 10 µM of dxr in physiological buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) protected from light and quickly rinsed with phosphate buffer (pH 7.4). One cover slip of each cell line was immediately fixed 10 min with 4% PFA for dxr loading control. The other cover slips were incubated with physiological buffer supplemented with DMSO or 10 µM of paniceins 30 min under gentle shaking at 37°C and 5% CO₂ protected from light, and immediately fixed with 4% PFA. Cells were observed by epi-fluorescence microscopy (λ_{ex}: 485 nm, λ_{em}: 600 nm) (Axioplan2 imaging from Zeiss coupled to a cool SNAP HQ from Roper Scientific) using an objective Plan NeoFluar 40x /1.3.

For dxr incorporation in yeast, yeast expressing Patched, mutant Patched (PatchedVXXXXY), or control yeast were washed with cold water, resuspended at an OD_{600} of 10 in Hepes–NaOH buffer (pH 7.0) supplemented with 5 mM of 2-deoxy-D-glucose to inhibit glycolysis and de-energize yeast, and incubated with 10 µM dxr for 2 h at 4°C in the cold room on a rotating wheel in the dark. Yeasts were centrifuged and the supernatant was removed. One sample was immediately fixed with 4% PFA for dxr loading control. The other samples were resuspended in Hepes–NaOH buffer (pH 7.0) containing 5 mM of 2-deoxy-D-glucose supplemented with DMSO or 10 µM

of paniceins, and incubated 10 min at 25°C with gentle shaking in a Benchmark Multi-therm shake protected from light. Samples were centrifuged for 1 min at 18,000 g, supernatants were removed and yeast were fixed with 4% PFA. 10 µL of each sample were deposited on a cover slip and observed by epi-fluorescence microscopy (λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 600 nm) using an objective Plan NeoFluar 63x/0.7–1.25 Iris.

Quantification of dxr intracellular fluorescence was carried out using Image J software on more than 30 cells or yeasts from 3 different fields for each condition. The results were analyzed using the Student *t*-test in which significance is attained at $P < 0.05$.

Apoptosis measurement

Apoptosis measurements were carried out using Annexin V conjugated to allophycocyanin (APC) (BD Pharmingen) and DAPI labeling. Cells were cultivated in 6 well-plates to 50% confluence, and treated or not with paniceins and/or dxr for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were washed twice with cold PBS and dissociated by incubation with PBS containing 2% EDTA 5 to 10 min at 37°C and 5% CO₂. After centrifugation, cells were resuspended with 100 µL of Annexin V binding buffer (BD Pharmingen) and incubated with 2.5 µL of APC Annexin V and/or 3 µL of DAPI (5 mg/mL) 15 min at 25°C in the dark. 100 to 200 µL of binding buffer was added to each tube and flow cytometry analysis was carried out within 1 h using a LSR II Fortessa de BD (BD Biosciences). The untreated population was used to define the basal level of apoptotic and dead cells. The percentage of cells that have been induced to undergo apoptosis was then determined by subtracting the percentage of apoptotic cells in the untreated population from percentage of apoptotic cells in the treated population. Cells in the late stages of apoptosis have a damaged membrane and stain positive for DAPI as well as for APC Annexin V.

Patched 3D model

Three-dimensional models of Patched were designed by using three different programs: the web modeling pipeline @TOME-2 (<http://atome.cbs.cnrs.fr/AT2B/meta.html>) [53], Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) [54] and I-TASSER (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [55, 56], the winner of the last CASP competitions (Critical Assessment for Structural Prediction) [57]. For the @TOME-2 model building, the first step consists in a fold-recognition search and issues with a sequence alignment with proteins whose structures have been solved and deposited in the Protein Data Bank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). A careful analysis of this sequence alignment is then performed, leading to the removing of several protein structures from the data to be used for the second step. The second module of @TOME

then run MODELLER (<https://salilab.org/modeller/>) [58] for model building. Concerning Phyre2 and I-TASSER, the two programs were used without manual intervention nor geometry refinement.

These different trials for Patched model building revealed mainly membrane protein transporters from the RND family (AcrB, MexB, CusA) but some other unrelated protein structures were also suggested that differed between the three programs results (like for example an helicase (PDB code 4F91; [59]), or the translocon-associated membrane protein SecDF (PDB code 3AQP; [60]). Even if the three different programs were mainly used with the automatic procedures, each possible resulting model was analyzed, and all those with low sequence coverage and/or percentage of identity with the target used lower than 10% were omitted. In addition it was verified that the location of the transmembrane segments was compatible with the prediction of TM performed by HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), TOPPRED (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>) and TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), and that the GXXXD motif corresponding to the proton transfer sequence was localized in a transmembrane segment. It has also been verified that the sequence duplication of human Patched corresponds to structure duplication in the model.

The use of several programs for cross validation was motivated by the low sequence identities between human Patched and the proteins used in the model building, 17% with CusA, 18% with AcrB (36% of sequence similarity), 18.4% with MexB, 19% with Czca, 16% with Mtrd, all pertaining to the RND proteins family. Even if those values are not high, it has to be noticed that for example the sequence identity between AcrB and CusA that share the same structure (RMSD = 4.2Å on 823 aligned Ca atoms), is only 21%. Even if differences exist between the models issued from the different programs, especially in the extracellular domain, they all model the same portion of Patched sequence, from 94 to 1183. The transmembrane region is the most conserved one; in particular the sequence ⁵⁰⁹GVGVD⁵¹³, corresponding to the proton transfer pathway, is perfectly aligned in all the models (Figure 8a). A separate analysis of the N- and C-terminal domains of Patched was performed with PONDR [61] predicting those two domains as being mainly disordered. The final Patched model, corresponding to the second model proposed by I-Tasser, results mainly from the structure of AcrB as evidenced from structural superposition (Figure 8b).

Docking

The docking of two panicein molecules (1 and 4) on the 2.9 Å resolution AcrB structure (PDB code 2GIF; [38]) was performed using AutoDock [62]. For each molecule seven active torsions were chosen. Several runs were performed using a grid search of 126 points in each direction

with a grid spacing of 0.44 Å, localized on one of the three monomers forming the functional trimeric AcrB unit, the one in the loose state permitting the entry of molecules in the groove. For each calculation, 100 genetic algorithm runs were performed with a population size of 150. The docking of 4 on AcrB led to 79 distinct conformational clusters, the largest population being as small as 3. For docking of 1, 41 conformational clusters were found out of the 100 runs, the largest population attaining 16. This cluster of 16 ranks at the 4th lowest binding energy level, but close to the first one that is only composed of 3 different poses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Doghman and C. Ruggiero for critical reading of the manuscript. This work was supported by funding from the CNRS (PEPS Exomod), the PACA Region (PatchedWork project) and the foundation France Cancer to I. Mus-Veteau and O.P. Thomas. L. Fiorini was supported by grants from the CNRS and the PACA Region. M.-A. Tribalat was supported by the French MESR. I. Broutin's group is supported by funding from the CNRS and by ANR-11-BS07-019. E. Lalli's group is supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the « Investments for the Future » LABEX SIGNALIFE # ANR-11-LABX-0028-01.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008; 22:2454–2472.
2. Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30:303–312.
3. Chung JH, Bunz F. A loss-of-function mutation in PTCH1 suggests a role for autocrine hedgehog signaling in colorectal tumorigenesis. *Oncotarget.* 2013; 4:2208–2211.
4. Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng HH, Jin JQ, Luh TM, Giroux-Leprieur E, Mo M, Zheng Q, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014; 33:34.
5. Justilien V, Fields AP. Molecular pathways: novel approaches for improved therapeutic targeting of hedgehog signaling in cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:505–513.
6. Mimeault M, Rachagani S, Muniyan S, Seshacharyulu P, Johansson SL, Datta K, Lin MF, Batra SK. Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer. *Oncotarget.* 2015; 6:3887–3903.

7. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D. Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35:237–246.
8. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med.* 2013; 19:1410–1422.
9. Basset-Seguín N, Sharpe HJ, de Sauvage FJ. Efficacy of Hedgehog Pathway Inhibitors in Basal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2015; .
10. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature.* 1997; 389:876–881.
11. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* 2004; 431:707–712.
12. Becher OJ, Hambardzumyan D, Fomchenko EI, Momota H, Mainwaring L, Bleau AM, Katz AM, Edgar M, Kenney AM, Cordon-Cardo C, et al. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 2008; 68:2241–2249.
13. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003; 422:313–317.
14. Nakamura M, Kubo M, Yanai K, Mikami Y, Ikebe M, Nagai S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M. Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Res.* 2007; 27:3743–3747.
15. Nakamura M, Tanaka H, Nagayoshi Y, Nakashima H, Tsutsumi K, Ohtsuka T, Takahata S, Tanaka M, Okada H. Targeting the hedgehog signaling pathway with interacting peptides to Patched-1. *J Gastroenterol.* 2012; 47:452–460.
16. Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med.* 2001; 7:706–711.
17. Nagase T, Nagase M, Machida M, Fujita T. Hedgehog signalling in vascular development. *Angiogenesis.* 2008; 11:71–77.
18. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science.* 2002; 297:1559–1561.
19. Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, Foresta U, Mitsiades CS, Rossi M, Todoerti K, et al. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 2012; 120:5002–5013.

20. Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, Yu MC, Hsiao HI, Chang FY. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma. *Oncotargets Ther.* 2013; 7:79–86.
21. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.* 2009; 458:776–779.
22. Queiroz KC, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Aberson HL, Ferreira CV, Peppelenbosch MP, Spek CA. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* 2010; 29:6314–6322.
23. Saze Z, Terashima M, Kogure M, Ohsuka F, Suzuki H, Gotoh M. Activation of the sonic hedgehog pathway and its prognostic impact in patients with gastric cancer. *Dig Surg.* 2012; 29:115–123.
24. Xu X, Ding H, Rao G, Arora S, Saclarides CP, Esparaz J, Gattuso P, Solorzano CC, Prinz RA. Activation of the Sonic Hedgehog pathway in thyroid neoplasms and its potential role in tumor cell proliferation. *Endocr Relat Cancer.* 2012; 19:167–179.
25. Bidet M, Tomico A, Martin P, Guizouarn H, Mollat P, Mus-Veteau I. The Hedgehog receptor patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance. *Mol Cancer Res.* 2012; 10:1496–1508.
26. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2014; 31:160–258.
27. Yang C, Li Q, Li Y. Targeting nuclear receptors with marine natural products. *Mar Drugs.* 2014; 12:601–635.
28. Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol.* 2012; 19:85–98.
29. Zubia E, Ortega MJ, Carballo JL, Salva J. Sesquiterpene hydroquinones from the sponge *Reniera mucosa*. *Tetrahedron.* 1994; 50:8153–8160.
30. Gazave E, Carteron S, Chenuil A, Richelle-Maurer E, Boury-Esnault N, Borchiellini C. Polyphyly of the genus *Axinella* and of the family *Axinellidae* (Porifera: Demospongiae). *Mol Phylogenet Evol.* 2010; 57:35–47.
31. Casapullo A, Minale L, Zollo F. Paniceins and related sesquiterpenoids from the Mediterranean sponge *Reniera fulva*. *J Nat Prod.* 1993; 56:527–533.
32. Cimino G, De Stefano S, Minale L. Paniceins, unusual aromatic sesquiterpenoids linked to a quinol or quinone system from the marine sponge *Halichondria panicea*. *Tetrahedron.* 1973; 29:2565–2570.
33. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia.* 2004; 6:1–6.
34. Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotherapeutic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm.* 2010; 7:1959–1973.
35. Bidet M, Joubert O, Lacombe B, Ciantar M, Nehme R, Mollat P, Bretillon L, Faure H, Bittman R, Ruat M, et al. The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One.* 2011; 6:e23834.
36. Guan L, Nakae T. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2001; 183:1734–1739.
37. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature.* 2002; 418:892–897.
38. Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, Pos KM. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science.* 2006; 313:1295–1298.
39. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature.* 2006; 443:173–179.
40. Ribacka C, Pesonen S, Hemminki A. Cancer, stem cells, and oncolytic viruses. *Ann Med.* 2008; 40:496–505.
41. Zinzi L, Contino M, Cantore M, Capparelli E, Leopoldo M, Colabufo NA. ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse. *Front Pharmacol.* 2014; 5:163.
42. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:361–398.
43. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:219–234.
44. Eckford PD, Sharom FJ. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev.* 2009; 109:2989–3011.
45. Lopez D, Martinez-Luis S. Marine natural products with P-glycoprotein inhibitor properties. *Mar Drugs.* 2014; 12:525–546.
46. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66:6063–6071.
47. Sims-Mourtada J, Opendaker LM, Davis J, Arnold KM, Flynn D. Taxane-induced hedgehog signaling is linked to expansion of breast cancer stem-like populations after chemotherapy. *Mol Carcinog.* 2014; doi: 10.1002/mc.22225.
48. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz IAA. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:5895–5900.
49. Santini R, Pietrobono S, Pandolfi S, Montagnani V, D'Amico M, Penachioni JY, Vinci MC, Borgognoni L,

- Stecca B. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene*. 2014; 33:4697–4708.
50. Gordaliza M. Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Mar Drugs*. 2010; 8:2849–2870.
51. Davis CJ, Hurst TE, Jacob AM, Moody CJ. Microwave-mediated Claisen rearrangement followed by phenol oxidation: a simple route to naturally occurring 1,4-benzoquinones. The first syntheses of verapliquinones A and B and panicein A. *J Org Chem*. 2005; 70:4414–4422.
52. Vinothkumar S, Parameswaran PS. Recent advances in marine drug research. *Biotechnol Adv*. 2013; 31:1826–1845.
53. Pons JL, Labesse J. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:W485–491.
54. Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*. 2009; 4:363–371.
55. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9:40.
56. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010; 5:725–738.
57. Moulton J, Fidelis K, Kryzhanovych A, Schwede T, Tramontano A. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)—round x. *Proteins*. 2014; 82:1–6.
58. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2006; Chapter 5:Unit 5.6. doi: 10.1002/0471250953.
59. Santos KF, Jovin SM, Weber G, Pena V, Luhrmann R, Wahl MC. Structural basis for functional cooperation between tandem helicase cassettes in Brr2-mediated remodeling of the spliceosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:17418–17423.
60. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassilyev DG, Kohno T, Maturana AD, et al. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*. 2011; 474:235–238.
61. Romero P, Obradovic Z, Kissinger C.R, Villafranca J.E, Dunker A.K. Identifying Disordered Regions in Proteins from Amino Acid Sequences. In I.E.E.E. International Conference on Neural Networks. 1997; :90–95.
62. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009; 30:2785–2791.

Métabolismes spécialisés d'éponges méditerranéennes du genre *Haliclona* Grant, 1836

Marie-Aude Tribalat, Thèse de doctorat, 2016

RESUME

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreuses études ont décrit les spongiaires comme de formidables ressources de produits naturels originaux. Ces découvertes ont attisé la curiosité de nombreux scientifiques issus de domaines variés (chimie, biochimie, biologie moléculaire) qui mettent leurs connaissances en commun afin de comprendre le fonctionnement de ces animaux si particuliers. Les travaux envisagés dans ce manuscrit portent sur les éponges du genre *Haliclona* issu de l'ordre des Haplosclérides. En effet, ce groupe taxonomique révèle des familles de molécules très particulières, notamment les alcaloïdes 3-AP et les polyacétylènes, qui présentent un potentiel pharmacologique à exploiter. En outre la diversité chimique retrouvée au sein de ce genre remet en question la validité de la classification actuelle des Haplosclérides déjà discutée par les données de biologie moléculaire. L'intérêt particulier porté à ces composés originaux concerne également les voies métaboliques permettant d'aboutir à leur biosynthèse. Ainsi les alcaloïdes 3-AP ne trouvant aucun équivalent notamment dans le monde terrestre, la description de leur voie de biosynthèse n'a alors été envisagée que sous forme d'hypothèses. Afin d'éclaircir les différentes problématiques posées par ce groupe de spongiaires, les études menées pendant ce doctorat ont fait appel à des méthodes et techniques variées tels que les méthodes d'extraction et d'analyses de la chimie des produits naturels classique, l'outil récent qu'est la métabolomique ou encore les expériences de « feeding » et l'utilisation de composés radio-marqués.

Mots-clés : éponges, *Haliclona*, produits naturels, métabolomique, voies de biosynthèse, chimie analytique

Specialized metabolisms of Mediterranean sponges of genus *Haliclona* Grant, 1836

Marie-Aude Tribalat, PhD Thesis, 2016

ABSTRACT

Since about fifty years, several studies described sponges as astounding resources of original natural products. These discoveries aroused scientist's curiosity in various areas (chemistry, biochemistry, molecular biology) and to understand these animal's functioning, they share their knowledge. The proposed work in this manuscript, focus on sponges of genus *Haliclona* from the order Haplosclerida. Indeed, this taxonomic group reveal peculiar chemical families, including 3-AP alkaloids and polyacetylenic compounds, displaying pharmacological potential to be exploited. Besides, chemical diversity encountered in this genus challenge the actual classification of Haplosclerida group already disputed by biomolecular data. The particular interest in these original compounds also concerns metabolic pathways leading to their biosynthesis. In this way, 3-AP alkaloids, which don't have any equivalent particularly in terrestrial area, the description of their biosynthesis pathway was only considered by hypothesis. To resolve various problematics proposed by this sponges' group, studies conducted through this PhD appeal to several methods and technics like usual natural products chemistry extraction and analytical technics, recent tool named metabolomic or feeding experiments with radiolabelled compounds.

Key-words: sponges, *Haliclona*, natural products, metabolomic, biosynthesis pathways, analytical chemistry