



HAL
open science

Inhibiteurs du Quorum Sensing de *Vibrio harveyi* issus d'éponges de Polynésie française

Tepoerau Mai

► **To cite this version:**

Tepoerau Mai. Inhibiteurs du Quorum Sensing de *Vibrio harveyi* issus d'éponges de Polynésie française. Sciences agricoles. Université de la Polynésie Française, 2016. Français. NNT : 2016POLF0003 . tel-01484857

HAL Id: tel-01484857

<https://theses.hal.science/tel-01484857v1>

Submitted on 7 Mar 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.



UNIVERSITÉ DE LA POLYNÉSIE FRANÇAISE

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE

ED 469

UMR EIO

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Tepoerau MAI

le 25 Mai 2016

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Polynésie française en

Département : **Sciences**

Discipline : **CNU N°31 Chimie théorique, physique, analytique**

Spécialité : **Chimie des substances naturelles**

Inhibiteurs du *Quorum Sensing* de *Vibrio harveyi* issus d'éponges de Polynésie française

Sous la direction de : Cécile DEBITUS

JURY

Fabienne GUERARD

Professeur des Universités, IUEM (UMR 6539 LEMAR), Brest

Rapporteur

Erwan POUPON

Professeur des Universités, Université Paris-Sud / Paris-Saclay (UMR 8076 BioCIS), Paris

Rapporteur

Nabila GAERTNER-MAZOUNI

Professeur des Universités, UPF (UMR 241 EIO), Tahiti

Présidente du jury

Raimana HO

Ingénieur de recherche, UPF (UMR 241 EIO), Tahiti

Examineur

Jérémy VIDAL-DUPIOL

Cadre de recherche, Ifremer (UMR 241 EIO), Tahiti

Examineur

Cécile DEBITUS

Directeur de recherche, IRD (UMR 241 EIO), Tahiti

Directrice de thèse

Résumé de la thèse

La résistance bactérienne induite par l'utilisation massive d'antibiotiques en aquaculture, conduit à la recherche de nouveaux modes de traitement, des traitements anti-virulents et non toxiques. Différentes stratégies sont étudiées parmi lesquelles l'inhibition d'un système de régulation : le *quorum sensing*. *Vibrio harveyi* est une bactérie pathogène en aquaculture qui régule sa bioluminescence et la production de protéines de virulence par l'intermédiaire du *quorum sensing*. L'étude des éponges *Leucetta chagosensis*, *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp. 2110 collectées en Polynésie française, a permis l'isolement de huit métabolites secondaires dont quatre nouveaux : l'isonaamine D, le bis-isonaamidine A-Zn, la leucettamine D et le tuamotuolol. Leurs effets et leurs modes d'action ont été évalués sur deux phénotypes contrôlés par le *quorum sensing* chez *V. harveyi*: la bioluminescence et la production de métalloprotéases. Trois molécules ont ainsi montré une activité inhibitrice du *quorum sensing* de *V. harveyi* : l'isonaamine D, l'isonaamidine A et l'ilimaquinone.

Table des matières

Résumé de la thèse	1
Préface	4
Liste des publications et communications scientifiques	5
Remerciements	6
1. INTRODUCTION	8
1. Situation géographique et économique de la Polynésie française	9
1.1. L'aquaculture en Polynésie française.....	9
1.2. Les limites de l'aquaculture en Polynésie française.....	10
2. Les maladies en aquaculture	11
3. Traitement des maladies en aquaculture	12
4. Objectifs de ce travail	13
2. ETAT DE L'ART.....	15
1. Le <i>quorum sensing</i>	16
1.1. Généralités	16
1.2. Le <i>quorum sensing</i> de <i>Vibrio harveyi</i>	18
1.3. L'inhibition du <i>quorum sensing</i>	24
2. Les éponges marines	29
2.1. Généralités	29
2.2. Les éponges marines en Polynésie française	32
3. Composition chimique des ordres Dictyoceratida	34
3.1. Les terpènes	35
3.2. Les méroterpènes.....	38
3.3. Les dérivés des acides aminés.....	40
3.4. Les molécules atypiques.....	41
4. Composition chimique des éponges calcaires	41
4.1. Les alcaloïdes	41
4.2. Les alcènes	47
4.3. Les macrolides	47
3. ETUDE CHIMIQUE : extraction et isolement	49
1. Etude de <i>Cacospongia</i> sp. 2110.....	50
1.1. Travaux antérieurs sur le genre <i>Cacospongia</i>	50
1.2. Etude chimique de <i>Cacospongia</i> sp. 2110	53
1.3. Conclusion et discussion.....	55
2. Etude de <i>Dysidea</i> sp. 2669.....	56
2.1. Travaux antérieurs sur le genre <i>Dysidea</i>	56

2.2.	Etude chimique de <i>Dysidea</i> sp. 2669	60
2.3.	Conclusion et discussion	69
3.	Etude de <i>Leucetta chagosensis</i> (Dendy, 1993)	72
3.1.	Travaux antérieurs sur le genre <i>Leucetta</i>	72
3.2.	Etude chimique de <i>L. chagosensis</i>	73
3.3.	Conclusion et discussion	85
4.	ETUDE BIOLOGIQUE : évaluation des activités biologiques	87
1.	Effet des composés sur la bioluminescence de <i>V. harveyi</i>	88
1.1.	Matériels et méthodes	88
1.2.	Résultats	92
2.	Effet des composés sur la virulence de <i>V. harveyi</i>	106
2.1.	Matériels et Méthodes	106
2.2.	Résultats	107
3.	Discussion et Conclusion	108
4.	Tableau récapitulatif	116
5.	PARTIE EXPERIMENTALE	117
1.	Etude chimique	118
1.1.	Matériels	118
1.2.	Méthodes	119
2.	Etude biologique	126
2.1.	Matériels	126
2.2.	Méthodes	127
6.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
7.	ANNEXES	140
	Spectres RMN	141
	Spectres RMN de l'isonaamidine A	141
	Spectres RMN de l'isonaamine A	142
	Spectres RMN de l'isonaamine D	143
	Spectres RMN du bis-isonaamidine A-Zn	146
	Spectres RMN de la leucettamine D	151
	Spectres RMN du tuamotuolol	154
	Spectres RMN de l'ilimaquinone	157
	Spectres RMN de la faspaplysine	158
	Gammed'étalonnage fluorescence/ activité métalloprotéases	159
	Article scientifique	160



POMARE
MARINE BENTHIC INVERTEBRATES

Préface

Ce travail de thèse a été effectué à l'IRD et à l'IFREMER (UMR 241-EIO) dans le cadre du projet POMARE¹ de l'eranet Netbiome, en collaboration avec les partenaires 6 (CNRS-ICSN), et 7 (université de Paris-Sud) de ce projet. J'ai été accueillie pendant 10 mois dans l'équipe du Dr Ali Al-Mourabit (ICSN-CNRS) afin d'approfondir l'étude chimique de l'éponge *Leucetta chagosensis*. Ce travail a fait l'objet par la suite d'une publication scientifique de rang A dans « Letters of applied microbiology », publiée en « Editor's choice ». Les travaux sur les deux autres éponges étudiées, *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp. 2110, ont été effectués à l'IRD-centre de Polynésie française avec l'aide analytique du Dr Mehdi A. Bennidir (UMR BioCIS, Université Paris-Sud / Paris-Saclay) pour la réalisation des analyses spectrales des molécules.

Tous les tests biologiques des métabolites isolés ont été réalisés à l'IFREMER (COP-Tahiti) sous l'encadrement du Dr Denis Saulnier. Les premiers protocoles expérimentaux des tests sur la bioluminescence de *Vibrio harveyi* ont été mis au point en parallèle de ce travail de thèse, au laboratoire, dans le cadre du diplôme EPHE de Florent TINTILLIER, lors du lancement du projet, et ont été affinés par la suite, tout au long du projet (nombre de réplicats, conditions d'incubation...).

¹ <https://pomare.ird.fr/>

Liste des publications et communications scientifiques

Communications orales et poster

- Poster (*Prix du meilleur poster*) : « Isolement de composés inhibiteurs du *quorum sensing* de *V. harveyi* issus d'éponges marines de la Polynésie française », Doctoriales de l'Université de Polynésie française 2013
- Communication orale (congrès international) : « Pomare project : first results on marine *quorum sensing* inhibitors », Rendez-vous de Concarneau : where industry meets Science in marine biotechnology, 9-10 Novembre 2014
- Communication orale (*Prix de la meilleure perspective de valorisation économique*) : « Principes actifs de *Leucetta chagosensis* », Doctoriales de l'Université de Polynésie française 2015

Publications scientifiques

T. Mai, F. Tintiller, A. Lucasson, C. Moriou, E. Bonno, S. Petek, K. Magre, A. Al-Mourabit, D. Saulnier, C. Debitus, Quorum sensing inhibitors from *Leucetta chagosensis*. *Letters of applied microbiology*, 2015, **61**: 311-317. (*Editor's choice*)

Mai T., Toullec J., Bennidir M. A., Aliotti E., Tintillier F., Folcher E., Petek S., Hall K., Hooper J., Besson M., Soulet S., Schmitt N., Saulnier D., Lecchini D., Debitus C., Chemical defenses of a Pacific Island *Dysidea* species, *J. Chem Ecol* en cours

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, les Pr. E. Poupon et F. Guérard qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Pr. N. Gaertner-Mazouni, le Dr. J. Vidal-Dupiol et le Dr. R. HO qui ont accepté d'être les examinateurs de ce travail. Mauruuru roa.

Je remercie ensuite ma directrice de thèse C. Debitus qui m'a donné l'opportunité de réaliser un doctorat, sur un sujet appliqué à la Polynésie française. Merci de m'avoir fait l'honneur de travailler à tes côtés, de m'avoir poussée à dépasser mes limites et d'avoir fait en sorte que ce doctorat se déroule dans les meilleures conditions de travail.

Je remercie l'UMR EIO et sa directrice N. Gaertner-Mazouni, l'école doctorale du Pacifique, les instituts de recherche dans lesquelles j'ai travaillé : l'IRD, l'Ifremer et l'ICSN (CNRS) ainsi que leurs directeurs respectifs actuels : A. Gabillon, M. Taquet, B. Beliaeff et A. Marinetti.

J'exprime ma gratitude au Dr Ali Al-mourabit et son équipe (C. Moriou, B. Nguyen, L. Ermolenko et les doctorants). Je vous remercie de m'avoir apportée un encadrement de qualité et mis à ma disposition tous les outils nécessaires au bon accomplissement de mon travail.

Je remercie le Dr D. Saulnier (de l'Ifremer de Polynésie française) pour m'avoir encadrée lors de la réalisation des tests biologiques et sa disponibilité.

Je remercie le Dr S. Petek pour son encadrement, sa disponibilité et pour son implication dans l'animation scientifique de l'IRD durant ma première année.

Je remercie le Dr M. A. Beniddir (de l'université Paris Sud), pour son aide pour les analyses spectrales des terpènes et ses conseils.

Je remercie T. Suchard (de l'ILM) pour m'avoir permis d'effectuer des analyses spectroscopiques dans son laboratoire.

Je remercie les stagiaires et VSC qui ont participé à la mise au point des tests biologiques: F. Tintiller, M. Beaudet, A. Lucasson, L. Castano, E. Aliotti et K. Magré.

Je remercie S. Van Wynsberge pour son aide sur les analyses statistiques des tests biologiques.

Je remercie G. Remoissenet, R. David et Christophe pour les informations sur la situation de l'aquaculture en Polynésie française.

Je remercie l'équipe EIMS et le personnel de l'IRD (C. Ollier, E. Bonno, L. Florian, N. Maihota, F. Hale, Teva, Justin et Rose) pour la bonne ambiance au centre.

Je remercie le personnel de l'école doctorale en particulier C. Thomazet et V. Maraetefau pour leur disponibilité et leur sympathie.

Enfin je remercie mes proches.

A Gif, l'équipe des « coureurs du midi »: Karim, Véronique, Elvina et Pierre-Eric et le groupe de salsa (Didier, Léonore, Nelson et Benoît).

Aux « anciens » du bureau: Vaimiti « personnel coach » merci pour tes précieux conseils sur les présentations orales, Florent pour l'ambiance au labo, Nicolas J. Martin « Monsieur HPLC » toujours présent pour m'aider avec mes fuites de colonnes, Fanny (et Patea) merci pour votre amitié et ma Mareva, mon amie. Mauruuru roa.

Les « nouveaux » au centre Hirohiti et Mathieu pour les mots d'encouragement.

Et les « derniers » thésards Tiffany, Nicolas et Simon, vous m'avez permis de garder le moral jusqu'à la fin, merci.

Je remercie mon parrain et S. Van Wynsberge qui ont relu une partie de ce manuscrit (et ceux qui se sont proposés sans jamais rien recevoir).

Enfin je remercie ma famille, ma sœur, ma mère et mon père.

1.INTRODUCTION

1. Situation géographique et économique de la Polynésie française

La Polynésie française est un territoire d'outre-mer français, situé dans l'océan Pacifique à 4230 km au sud d'Hawaï (Etats-Unis), à 6630 km au sud-ouest de Los-Angeles (Etats-Unis) et à 6127 km de Sydney (Australie). Elle est composée de 118 îles regroupées en 5 archipels : Tuamotu, Australes, Société, Marquises et Gambiers (Figure 1).

La zone économique exclusive (ZEE) de la Polynésie française couvre une surface de 5 millions de km² soit 40% de la ZEE de la France. Cette superficie essentiellement maritime représente un atout économique pour la Polynésie française.

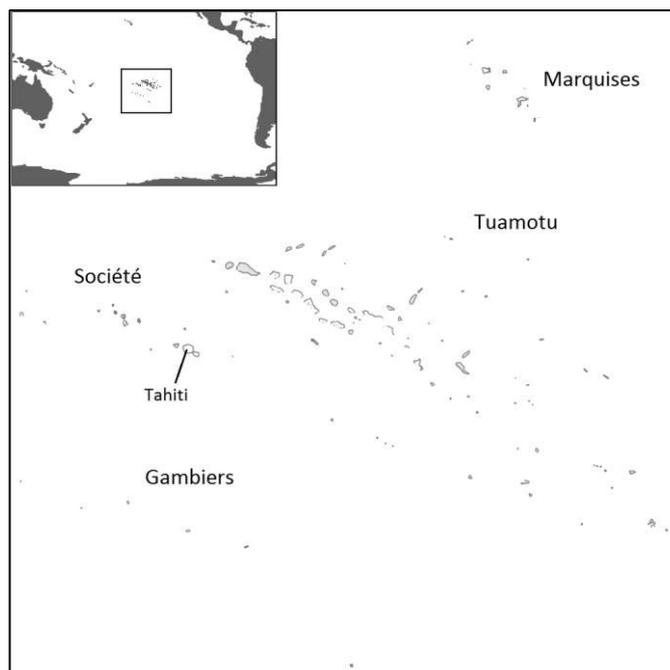


Figure 1 : Carte de la Polynésie française

L'économie de la Polynésie française se porte en grande partie sur le secteur maritime : l'économie bleue. Celle-ci s'organise autour de deux types de ressources : les ressources du large (pêche hauturière et côtière) et les ressources du lagon (perliculture, pêche lagonaire, aquaculture) [Fenua Economie, 2015].

Les ressources du lagon contribuent pour au moins un quart des apports alimentaires des produits de la mer et génèrent près de 9 milliards de valeur exportée grâce en grande partie à la perliculture. La plupart de ces ressources sont encore peu exploitées mais possèdent de nombreux atouts de développement économique comme l'aquaculture.

1.1. L'aquaculture en Polynésie française

En Polynésie française, l'aquaculture (autre que la perliculture) se concentre sur trois filières : l'élevage de crevettes *Litopenaeus stylirostris* (en bassin de terre), l'élevage du poisson *Platax orbicularis* (en cage dans le lagon) et l'aquaculture récifale (collecte de

naissains, élevage de bénitiers pour l'aquariophilie). Son chiffre d'affaire s'élève à 110 millions de francs mais sa production ne satisfait que 13 % du marché local.

L'aquaculture a débuté en 1985 par l'élevage de crustacés (crevettes et chevrettes). A ses débuts, la production était seulement de 7 tonnes, 30 ans plus tard, en 2014, la production de crustacés atteint 89 tonnes.

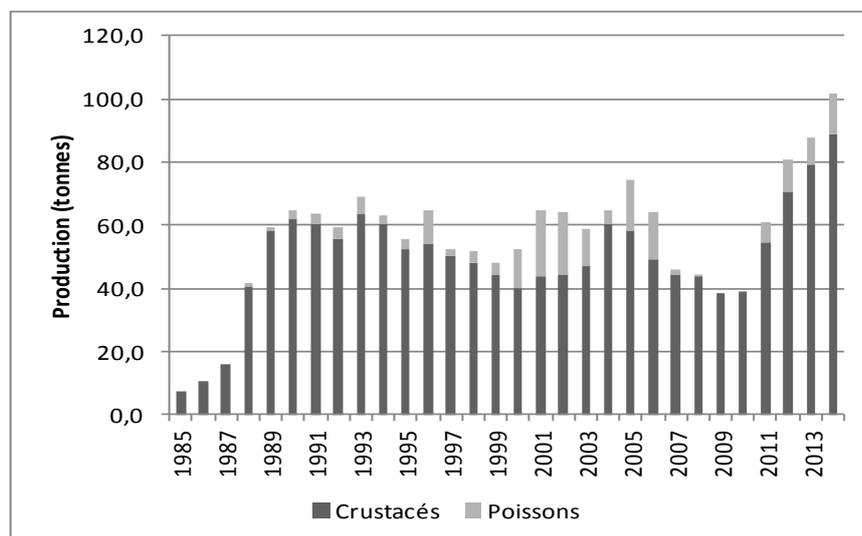


Figure 2 : Production aquacole total en tonnes (crustacés et poissons)- Source DRMM²

Actuellement la filière la plus importante est celle de la crevette bleue *L. stylirostris*, avec 6 fermes en activité. En 2014, le chiffre d'affaire s'élevait à 170 millions XPF, soit 1,4 millions d'euros. En pisciculture, l'élevage du *Platax orbicularis* a débuté seulement en 2011, et en 2014, les 4 fermes produisaient 12,8 tonnes de poissons engendrant ainsi un chiffre d'affaire de 18 millions XPF (soit 150 000 €) (source DRMM).

1.2. Les limites de l'aquaculture en Polynésie française

L'aquaculture est un secteur émergent en Polynésie française. De nombreuses contraintes telles que la disponibilité de réserves foncières, le manque de maîtrise des techniques de productions ou d'exploitation de nouvelles espèces, ainsi que des problèmes sanitaires limitent son développement [Fenua économie, 2015].

Au vu d'un développement durable de l'aquaculture, un accompagnement scientifique continu est piloté par la Direction des Ressources Marines et Minières (DRMM) en collaboration avec le centre Ifremer de Polynésie française. Leurs missions consistent en la gestion et la préservation des ressources, le transfert des connaissances scientifiques aux

² DRMM : Direction des ressources marines et minières

professionnels, la prévention et la protection sanitaire, ainsi que le contrôle de la qualité de la perle.

2. Les maladies en aquaculture

La souche de crevette *L. stylirostris* élevée en Polynésie française est exempte de toutes les maladies à déclaration obligatoire à l'organisation mondiale de la santé animale. Par contre en pisciculture, le suivi pathologique a conduit à l'identification de deux agents pathogènes importants d'origine bactérienne : *Tenacibaculum maritimum* et *Vibrio harveyi*. Ces deux bactéries associées entraînent des septicémies chez les juvéniles de platex durant la phase de grossissement. La mort est précédée d'une perte d'appétit, de l'apparition de tâches blanches sur le poisson et d'un état de léthargie (figure 3).



Figure 3 : Tâches blanches chez le *Platax orbicularis* entourées en pointillés blancs (source DRMM)

La première bactérie, *V. harveyi* (type gram-négatif) appartient à la famille Vibrionaceae. Cette famille de bactéries est souvent responsable de septicémies dans les élevages de crustacés, en particulier le genre *Vibrio* [Brock et al. 1990].

Tableau 1 : Classification de l'espèce *Vibrio harveyi*

Ordre	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Vibrionale
Famille	Vibrionaceae
Genre	<i>Vibrio</i>
Espèce	<i>harveyi</i> (Johnson and Shunk 1936)
Synonymes	<i>Achromobacterium harveyi</i> <i>Lucibacterium harveyi</i> <i>Beneckeia harveyi</i> <i>Vibrio carchariae</i>

En Nouvelle-Calédonie par exemple, deux pathologies saisonnières d'origine bactérienne affectent les élevages de *L. stylirostris* : le « syndrome d'hiver », associé au pathogène *V. penaeicida*, et le « syndrome d'été » causé par *V. nigripulchritudo*.

V. harveyi vit principalement dans des eaux de mers chaudes, sous forme planctonique ou fixé à des surfaces abiotiques, constituant des biofilms ou en symbiose avec des animaux marins. Elle est bioluminescente et aérobique.

V. harveyi est connue pour être pathogène en aquaculture et présentée comme une bactérie opportuniste. Comme la plupart des bactéries opportunistes, elle est saprophyte hétérotrophe et constitue une part importante de la microflore dans l'eau de mer, des sédiments, des poissons et des crustacés. Elle devient pathogène lors de mauvaises conditions environnementales du bassin d'élevage (température élevée, mauvaise qualité de l'eau, faible apport en oxygène) ou lorsque l'hôte est stressé (surpopulation dans le bassin, capture ou manipulation du poisson) ou encore quand son système de défense est endommagé.

V. harveyi est un pathogène de vertébrés (poissons) et d'invertébrés marins (abalones, crevettes, concombres de mer) (tableau 2). Les symptômes varient en fonction de l'organisme. Il a été reporté de nombreux cas de mortalité en particulier de crevettes de la famille des Pénéides. Chez les poissons, elle entraîne des maladies vasculaires, des gastroentérites et des lésions oculaires, tandis que chez les crevettes, elle provoque la maladie de la « vibriose lumineuse » [Austin & Zhang 2006].

Tableau 2 : Liste non exhaustive de maladies causées par *Vibrio harveyi* sur des vertébrés et des invertébrés [Austin & Zhang, 2006]

Hôte	Maladie
VERTEBRES	
Carangue crevalle (<i>Caranx hippos</i>)	Lésion cutanée
Poissons d'autres espèces	Gastroentérite, lésion oculaire
Cardeau d'été (<i>Paralichthys dentatus</i>)	Nécrose entérique, ulcère
Requin gris (<i>Carcharhinus plumbeus</i>)	Maladie vasculaire, ulcère dermique
Requin citron (<i>Negaprion brevirostris</i>)	Maladie vasculaire
INVERTEBRES	
Abalone japonaise	Tâches blanches
Crevette pénéide	Vibriose lumineuse
Concombre de mer (<i>Holothurie scabra</i>)	Ulcération cutanée
Crevette <i>Litopenaeus vannamei</i>	Syndrome des yeux rouges

En perliculture, deuxième secteur économique de la Polynésie française, ce pathogène entraîne des défauts de biominéralisation de *Pinctada margaritifera*. La bactérie est introduite dans le sac perlier lors de la greffe et entraîne une inflammation autour du nucléus [Ogimura et al. 2012].

3. Traitement des maladies en aquaculture

La gestion des infestations de micro-organismes épibiontes s'effectue soit par traitement de l'eau, ou par l'utilisation de produits chimiques. L'eau peut être traitée pour améliorer sa qualité par microfiltration, et par traitement aux ultra-violets pour limiter l'introduction de matière organique dans le milieu. La procédure standard utilisée en larviculture de crevettes pénéides est le traitement par antibiotiques qui contrôlent les épibiontes microbiens et d'autres agents causant les septicémies. Les antibiotiques utilisés sont le chloramphenicol

(0,5-10 ppm, d'usage interdit en Europe depuis 1994), la nitrofurazone (1-5 ppm), l'oxytetracycline (100 ppm), la néomycine (10 ppm) ou la streptomycine (1-4 ppm). D'autres solutions chimiques peuvent être utilisées comme le vert de malachite [Brock et al. 1990].

Les maladies d'origine bactérienne représentent un facteur limitant en aquaculture. Les antibiotiques restent le moyen le plus efficace pour combattre ce type d'infection. Leur utilisation est limitée par les doses journalières admissibles, et l'utilisation massive d'antibiotiques a conduit à l'émergence de bactéries résistantes dans les eaux d'élevages mais également dans l'animal lui-même. Si la chimiothérapie représente un moyen de traitement rapide et efficace, la mise en évidence de bactéries résistantes est un signe précurseur d'importants problèmes sanitaires et économiques. Désormais la recherche s'oriente vers des alternatives thérapeutiques visant à éviter l'apparition de résistances des bactéries aux traitements et à augmenter la durée d'utilisation de l'antibiotique et diminuer les doses utilisées. Différentes stratégies sont étudiées parmi lesquelles l'utilisation de probiotiques [Moriarty 1999] ou l'inhibition de facteurs de virulence par l'inhibition des facteurs de transcription, ou l'inhibition du *quorum sensing* [Aleksun & Levy 2004] [Brooks & Brooks 2014] [Tang & Zhang 2014].

Le *quorum sensing* (QS) est un mécanisme de régulation densité-dépendante chez les bactéries, de types gram-négatif et gram-positif. Le QS se caractérise par la capacité d'une bactérie à déceler la quantité de cellules d'une communauté bactérienne et à contrôler de façon coordonnée l'expression de différents gènes contrôlant par exemple la sécrétion de protéines de virulence, la bioluminescence ou la formation de biofilms [W. C. Fuqua et al. 1994].

4. Objectifs de ce travail

Un criblage d'extraits d'organismes marins (ascidies, alcyonaires, éponges) provenant de différentes campagnes d'inventaires faunistiques menées par l'IRD en Polynésie française, a été effectué sur l'inhibition de la bioluminescence de *V. harveyi*.

Ces organismes marins fixés au substrat et exposés au milieu, en particulier les spongiaires, produisent des métabolites secondaires afin d'éloigner les prédateurs, d'empêcher leur colonisation, d'étendre leur territoire ou encore de se protéger contre différents agents pathogènes. Les métabolites secondaires sont des molécules chimiques qui ne sont pas essentielles au développement de ces organismes mais participent à leur défense ou à la communication chimique interorganismes.

Dans ce contexte, mon travail de thèse vise à isoler et caractériser des métabolites secondaires capables d'inhiber le *quorum sensing* de *V. harveyi*. J'ai été amenée d'une part

à isoler et identifier les métabolites secondaires d'éponges collectées en Polynésie française ayant montré une activité inhibitrice de la bioluminescence de *V. harveyi*, et d'autre part à tester l'activité biologique de ces molécules isolées sur le QS de *V. harveyi*.

La synthèse de ces travaux présentée ici débute par un état de l'art puis une présentation des résultats obtenus lors de l'isolement des métabolites secondaires d'éponges de Polynésie française, suivie de l'étude de l'effet des métabolites isolés sur le QS de *V. harveyi*, et enfin une conclusion générale reprendra tous les résultats obtenus ainsi que les perspectives.

2. ETAT DE L'ART

1. Le quorum sensing

1.1. Généralités

Le mécanisme du *Quorum sensing* (QS) fut étudié pour la 1^{ère} fois en 1970 par le Dr H. K. Nealson [Nealson *et al.* 1970], qui proposait un système de contrôle de la bioluminescence de *Photobacterium fischeri*, qu'il appela « autoinduction ». Plus tard, en 1994, le Dr P. Greenberg [Fuqua *et al.* 1994] propose la nouvelle appellation « *Quorum sensing* » (QS). « *Quorum* » définit la population bactérienne seuil à atteindre afin d'activer ce mécanisme et « *sensing* » la détection par les bactéries de ce seuil.

Le QS se caractérise par la capacité d'une bactérie à déceler la quantité de cellules d'une communauté bactérienne et à contrôler de façon coordonnée l'expression de différents gènes contrôlant par exemple la sécrétion de protéines de virulence, la bioluminescence ou la formation de biofilms. Dans la littérature, on assimile ce mécanisme à un type de communication entre cellules bactériennes [Waters & Bassler 2005] [Atkinson & Williams 2009].

1.1.1. La régulation du quorum sensing

La régulation du *quorum sensing* s'effectue par le biais de signaux extracellulaires appelés auto-inducteurs (AIs). La bactérie produit le signal chimique, le libère vers l'extérieur puis le détecte quand il est en concentration suffisante. La concentration en AI augmente proportionnellement au nombre de bactéries dans le milieu. Les bactéries activent le QS lorsque la densité bactérienne est élevée et atteint une concentration seuil en AI.

Les auto-inducteurs sont produits dans la cellule puis diffusés vers l'extérieur. Quand la concentration en AIs atteint un seuil suffisant, ils se lient aux récepteurs. Ce complexe « AI-récepteur » permet alors la régulation de l'expression de gènes du régulon du QS [Tang & Zhang 2014].

1.1.2. Les auto-inducteurs chez des bactéries gram-négatives

Les bactéries gram-négatives communiquent au moyen de deux types d'auto-inducteurs : (1) de petites molécules signal : les acyl-homosérinelactones (Figure 4) et (2) de dérivés du S-adénosylméthionine (SAM) (Figure 6).

Une acyl homosérinelactone (acyl-HSL) se compose d'une γ -lactone et d'une chaîne acylée reliées par une fonction amide. On les trouve principalement chez des bactéries à gram-négatif notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Sinorhizobium* et *Vibrio* spp. ainsi que chez une seule gram-positive *Exiguobacterium* sp.. D'une espèce à une autre, le noyau homosérinelactone (HSL) reste inchangé, seule la longueur de la chaîne carbonée varie entre 4 et 18 carbones et peut comporter des insaturations et/ou être substituée par un groupe hydroxyle ou une fonction cétone en position C-3.

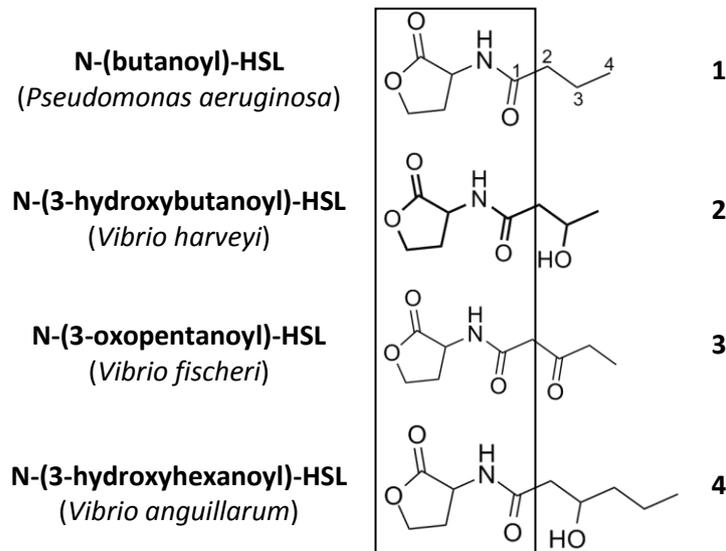


Figure 4 : Exemples d'auto-inducteurs de type homosérinelactone (HSL, encadré) de bactéries à gram-négatif (1) *Pseudomonas aeruginosa*, (2) *Vibrio harveyi*, (3) *Vibrio fischeri* et (4) *Vibrio anguillarum*

La longueur de la chaîne carbonée et la présence de substituants influencent la solubilité, la diffusibilité et la stabilité de l'acyl-HSL. De manière générale, la solubilité et la diffusibilité diminuent avec la longueur de la chaîne carbonée alors que la stabilité augmente. Ainsi l'acyl-HSL de *V. harveyi*, substituée par une fonction alcool en C-4 sera plus soluble dans le milieu et aura plus de facilité à sortir et entrer dans la cellule bactérienne par rapport à l'acyl-HSL de *P. aeruginosa* composé de douze carbones, transporté par une pompe à efflux transmembranaire [Tang & Zhang 2014].

1.1.3. Le système de régulation chez des bactéries gram-négatives

Un système de régulation du QS se compose d'une protéine AI-synthase associée à un récepteur cytoplasmique. L'AI-synthase synthétise l'auto-inducteur dans le cytoplasme, l'AI sort et rentre dans la cellule bactérienne par transport passif puis se lie au récepteur. Le récepteur contrôle l'expression de gènes du QS et la rétroactivation de l'AI-synthase [Teng et al. 2011].

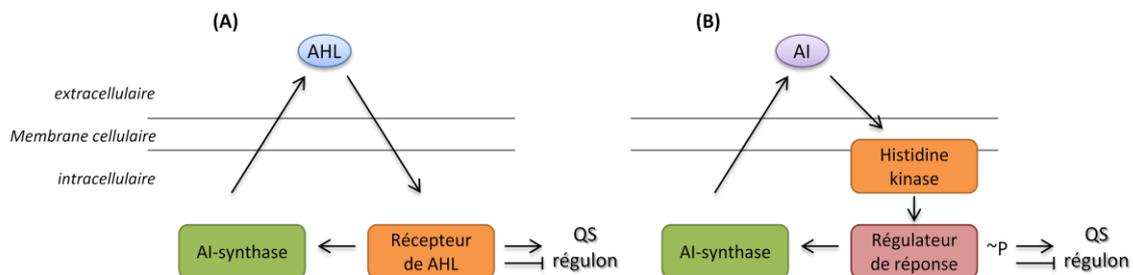


Figure 5 : Système de régulation chez des bactéries gram-négatives. (A) Système du type LuxI/ LuxR (B) Système à deux composantes. AHL : acyl-homosérinelactone, AI : Autoinducteur [Rutherford & Bassler, 2012]

Dans le cas des AHLs de *V. fischeri*, le circuit de régulation se compose de deux protéines LuxI et LuxR. Le gène *luxI* code pour l'AHL-synthase : la protéine LuxI, responsable de la synthèse de l'auto-inducteur. Le gène *luxR* code pour le récepteur LuxR, facteur de

transcription. Ainsi l'AHL lié à la protéine LuxR active la transcription de gènes régulés par le QS (Figure 5(A)).

D'autres AIs utilisent un récepteur à deux domaines. Une protéine transmembranaire : l'histidine kinase et un régulateur de réponse (Figure 5 (B)).

1.2. Le quorum sensing de *Vibrio harveyi*

La régulation du QS de *Vibrio harveyi* se fait par trois systèmes en parallèle, contrôlés respectivement par trois signaux chimiques ou auto-inducteurs : *Harveyi* Autoinducteur-1 (HAI-1), Autoinducteur-2 (AI-2) et *Cholerae* Autoinducteur-1 (CAI-1) (Figure 6). *V. harveyi* active trois phénotypes via le QS : la bioluminescence, la formation de biofilms et la sécrétion de protéines de virulence [Henke & Bassler 2004b].

1.2.1. Les auto-inducteurs de *V. harveyi*

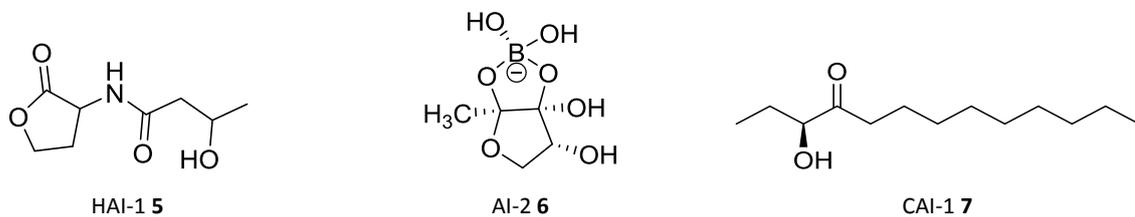


Figure 6 : Structures chimiques des auto-inducteurs de *V. harveyi* : HAI-1 (Harveyi Auto-Inducteur-1), AI-2 (Auto-inducteur-2), CAI-1 (Cholerae Auto-inducteur-1)

Système 1 : *Harveyi* autoinducteur 1 (HAI-1) (5) est une N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homosérine lactone [Cao & Meighen 1989]. Elle est synthétisée par la protéine LuxM et détectée par LuxN. Cet auto-inducteur est spécifique à *V. harveyi* et est proche de celui de *V. parahaemolyticus*.

Système 2 : La molécule signal AI-2 (6) de *V. harveyi* est un furanosyl borate diester. Cette molécule dérive du 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (appelé aussi DPD) et est synthétisée par une enzyme largement présente chez les bactéries : LuxS [Schauder et al. 2001]. L'enzyme LuxS synthétise la DPD qui subit un réarrangement spontané et forme des dérivés de la DPD, présents en équilibre sous les deux formes par inter-conversion (Figure 7). Ce groupe de molécules forme la famille AI-2. Les bactéries produisent leur propre signal AI-2 et sont capables de répondre aux signaux des autres bactéries grâce à l'inter-conversion des AI-2 dans le milieu, suggérant ainsi pour cette famille de molécules un moyen de communication inter-espèces.

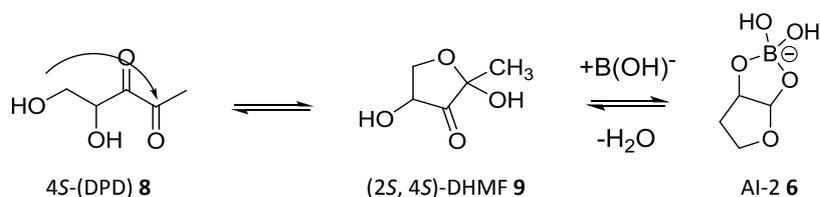


Figure 7 : Biosynthèse de l'auto-inducteur AI-2 de *V. harveyi* à partir du précurseur (4S)-4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD)

Chez *V. harveyi*, AI-2 est un furanosyl borate diester qui est détecté par un récepteur à deux domaines, LuxPQ. Lux P est le domaine de liaison et LuxQ active l'expression du QS.

Système 3 : *Cholerae* autoinducteur-1 (CAI-1) (7), est une (S)-3-hydroxytridecan-4-one. On le trouve dans plusieurs espèces du genre *Vibrio*, telles que *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. furnisii*, *V. anguillarum*, et uniquement chez ce genre auquel cet AI semble spécifique à ce jour. Il est synthétisé par CqsA et détecté par CqsS.

Tableau 3 : Synthèse du système de régulation de *V. harveyi*

Systèmes	Système 1	Système 2	Système 3
Autoinducteur	HAI-1	AI-2	CAI-1
AHL-synthase	LuxM	LuxS	CqsA
Récepteur	LuxN	LuxPQ (2 domaines)	CqsS
Répartition micro-organismes	<i>V. harveyi</i>	Inter espèce	Genre <i>Vibrio</i>

1.2.2. Le système de régulation du quorum sensing de *Vibrio harveyi*

Les récepteurs des AIs permettent la régulation du QS grâce à leur capacité à agir en tant que kinase (transférase qui catalyse l'ajout d'un phosphate) et phosphatase (retire un phosphate). La régulation se réalise dans le cytoplasme et fait intervenir quatre protéines : une protéine cytoplasmique LuxU, une protéine régulatrice LuxO, une protéine chaperone Hfq et le régulateur de réponse LuxR.

A faible densité bactérienne, les récepteurs fonctionnent comme une protéine kinase. Ils s'auto-phosphorylent et transfèrent le phosphate à la protéine cytoplasmique LuxU. A son tour, LuxU transfère le phosphate à une protéine régulatrice LuxO. Le complexe LuxO-P, en interaction avec un facteur de transcription sigma-54, active la transcription de gènes qui codent pour des ARNs de régulation (sARN). Ces ARNs, avec la protéine chaperonne Hfq, déstabilisent l'ARNm qui code la protéine LuxR, activateur de la transcription de l'opéron luciférase *luxCDABEG*. Par conséquent les gènes du QS ne sont pas activés (Figure 8).

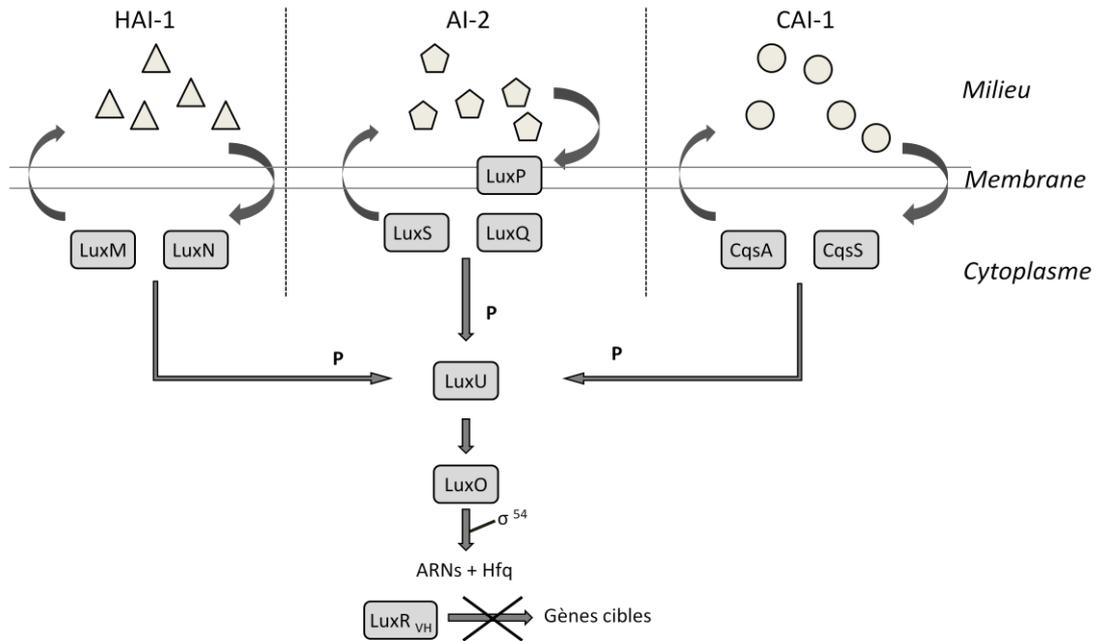


Figure 8 : Schéma de la régulation du quorum sensing de *V. harveyi* à faible densité bactérienne [Natrah et al, 2011]

A forte densité bactérienne, les AHLs se lient aux récepteurs. Dans ces conditions, les récepteurs agissent comme des phosphatases. En absence de phosphate, LuxO est inactive, et permet donc la traduction de LuxR_{VH} ARNm. Le régulateur active ainsi la transcription des gènes cibles (Figure 9).

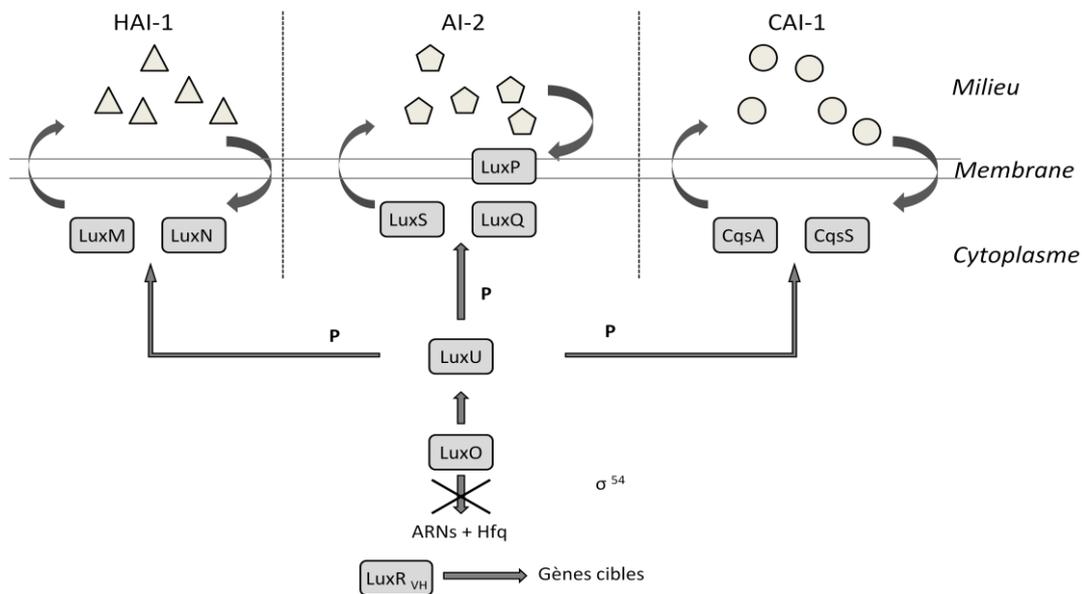


Figure 9 : Schéma de la régulation du quorum sensing de *V. harveyi* à forte densité bactérienne [Natrah et al, 2011]

1.2.3. Les phénotypes régulés de *Vibrio harveyi*

Le Quorum Sensing régule chez *V. harveyi* des gènes qui contrôlent la bioluminescence [Bassler et al. 1993] et des facteurs de virulence [Ruwandepika et al. 2012].

1.2.3.1. La bioluminescence

La bioluminescence ou « lumière du vivant » est l'émission de lumière visible des organismes vivants. La réaction de bioluminescence nécessite 4 composés : la protéine luciférase, la flavine mononucléotide réduite : FMNH₂, un aldéhyde à longue chaîne (co-facteur) et de l'oxygène moléculaire.

Chaque bactérie possède une luciférase particulière. Celle de *V. harveyi* est un dimère de masse moléculaire 79 000, formé de deux sous-unités différentes, α (poids moléculaire 42 000) et β (37 000). La sous unité α possède l'activité catalytique et permet la liaison du substrat et la β permet la régulation de la réaction. La luciférase est une oxydase à multiples fonctions, elle catalyse en même temps l'oxydation de l'aldéhyde et du FMNH₂ (Figure 10).

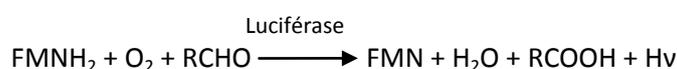


Figure 10 : Réaction chimique d'oxydation de l'aldéhyde et du FMNH₂ par la luciférase

La flavine se combine à la luciférase, l'ensemble réagit avec l'oxygène pour former un complexe oxydé. Ceci entraîne la conversion de la luciférine en oxyluciférine excitée énergétiquement et instable. Cette dernière retourne à l'état stable en émettant un photon. La longueur d'onde du photon émis (et donc la couleur de la luminescence, 470nm < λ_{max} < 505 nm) dépend de la structure du complexe.

Les luciférases perdent leur activité à des températures élevées et des pH s'éloignant de la neutralité (pour *V. harveyi* : pH < 6,0 et pH > 9,5).

La luminescence se mesure dans l'obscurité à l'aide d'un photo-multiplicateur et est exprimée en unité de lumière relative (ULR).

La régulation de la bioluminescence s'effectue par auto-induction (*quorum sensing*). Ceci a été démontré chez des bactéries marines : *V. fischeri* et *V. harveyi* [Nealson *et al.* 1970]. *V. harveyi* régule sa bioluminescence par le gène *luxCDABEGH*. Les gènes *luxA* et *luxB* codent pour la luciférase, l'un pour la sous-unité α et l'autre pour la β. Les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent pour l'aldéhyde à longue chaîne. Enfin *luxG* et *luxH* codent pour les protéines qui synthétisent la flavine [Bassler *et al.* 1993].

1.2.3.2. Les facteurs de virulence

Un facteur de virulence est un trait exprimé par une bactérie lors de l'infection [Aleksun & Levy 2004]. Lors d'une infection, la bactérie produit des facteurs d'adhésion. Une fois la bactérie fixée, elle entre dans la cellule, puis se multiplie en formant des micro-colonies voire des biofilms. Après sa prolifération dans l'hôte, elle procède à son infection en sécrétant des toxines avant de sortir de l'hôte. Ces différentes étapes impliquent l'expression de facteurs de virulence permettant au pathogène d'infecter et d'endommager l'hôte en

affectant la mobilité, l'adhésion, la dégradation de l'hôte, l'acquisition de fer ou sa protection.

1.2.3.2.1. La formation de biofilms

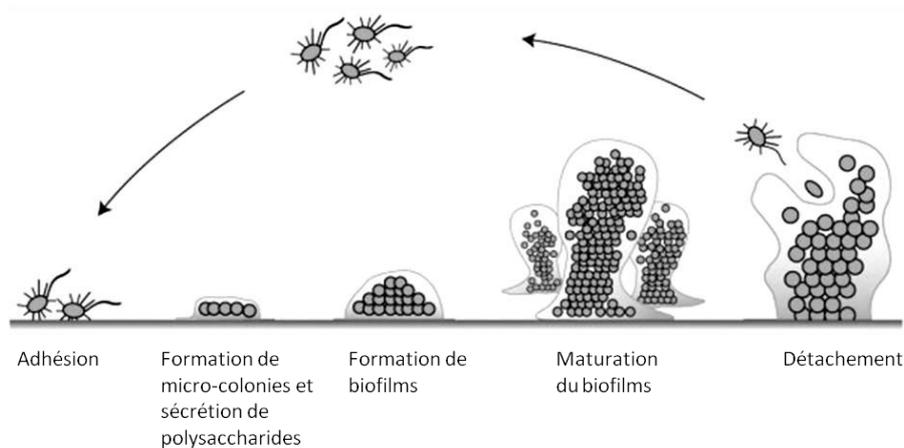


Figure 11 : Schéma d'une formation de biofilm par des bactéries

Un biofilm est un réseau de micro-organismes plus ou moins organisé fixés sur une surface, et constitué d'un seul ou plusieurs types de micro-organismes enveloppés de polysaccharides. La formation des biofilms débute par une phase d'adhésion grâce à deux facteurs de virulence membranaires : le flagelle (qui assure le déplacement des bactéries) et les pilis (qui leur permettent de se fixer). La bactérie se déplace jusqu' à l'hôte à l'aide de son flagelle puis se fixe aux tissus de l'hôte grâce aux pilis (adhésines), situés à la surface de la cellule bactérienne.

L'adhérence sur l'hôte se poursuit par la sécrétion de polysaccharides extracellulaires (EPS) par la bactérie. Les EPS forment une capsule autour de la membrane bactérienne et permet sa protection contre les défenses immunitaires (phagocytes) de l'hôte. Dans un biofilm, la survie des micro-organismes est favorisée : il permet aux bactéries d'accéder aux nutriments et d'assurer une protection contre les agressions extérieures telles que les détergents ou les antimicrobiens.

Une fois ces étapes effectuées, la bactérie procède à la sécrétion de toxines qui déclenchent la maladie.

1.2.3.2.2. L'activité enzymatique

Les enzymes lytiques permettent de cliver des molécules ou de former des pores dans des membranes cellulaires. Elles sont produites par de nombreux pathogènes, les plus connues en aquaculture sont les chitinases, les protéases, les lipases et les hémolysines.

La chitinase est une enzyme hydrolytique qui s'attaque aux liaisons glycosidiques des molécules de chitine, un polymère présent dans le zooplancton, phytoplancton et

l'exosquelette des crustacés. La chitinase clive la chitine en oligosaccharides utilisables par la bactérie comme source de carbone favorisant ainsi sa prolifération. Elle permet aussi aux micro-organismes d'hydrolyser l'exosquelette de crustacés, comme l'épicuticule des crabes.

Les protéases regroupent les enzymes digestives de protéines synthétisées par l'hôte. Les métalloprotéases représentent le facteur de virulence le plus employé par les vibrios, et fonctionnent en présence d'un ion métallique, comme par exemple le zinc Zn^{2+} .

Les lipases sont des enzymes actives à l'interface eau-lipide où elles clivent les chaînes triacylglycérol en acide gras et glycérol. Elles jouent un rôle dans la dégradation de tissus comme par exemple les phospholipases qui clivent les membranes lipidiques. Les phospholipases sont régulées négativement par le QS.

L'hémolysine est une protéine capable de lyser spécifiquement la membrane des globules rouges. Il a été rapporté également une activité cytotoxique, entérotoxique et cardiotoxique de ces enzymes. Chez *V. harveyi*, le gène *vhh* de l'hémolysine est contrôlé par l'autoinducteur AI-2 [Ruwandeeepika *et al.* 2011].

1.2.3.2.3. L'infection

Un système de sécrétion transporte des facteurs de virulence. Les différentes voies de sécrétion sont classées de type I à IV. Un système de sécrétion est utilisé par des bactéries gram-négatives comme une seringue, avec laquelle elles libèrent dans le cytosol de l'hôte les exotoxines, facteurs de virulence. Le système de sécrétion type III de *V. harveyi* fonctionne à faible densité en auto-inducteurs de la même façon que *V. parahaemolyticus* [Henke & Bassler 2004].

Un sidérophore est un chélateur de fer qui permet de puiser le fer présent dans l'environnement, lié à des protéines ou cellules sanguines, et nécessaire au bon développement du pathogène. Chez *V. harveyi*, la production de sidérophores est contrôlée par le QS par le biais de LuxO et σ^{54} [Lilley & Bassler 2000].

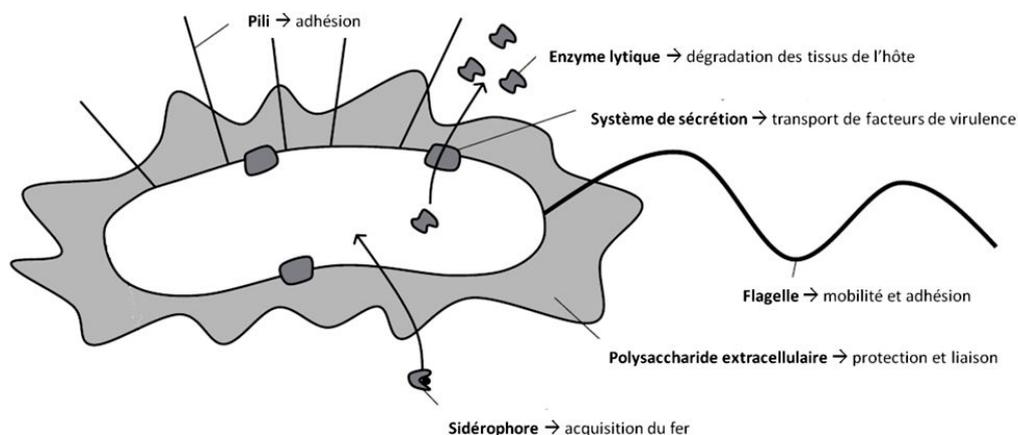


Figure 12 : Schéma des facteurs de virulence de bactéries pathogènes

1.2.3.3. La régulation des facteurs de virulence chez *V. harveyi*

La virulence de *V. harveyi* est associée à la production de protéines extra-cellulaires (caséinase, phospholipase, protease) [Soto-Rodriguez et al. 2012], à la production d'hémolysines [Liu et al. 1996], à la formation de biofilms et à la production de sidérophore [Won & Park 2008] [Austin & Zhang 2006].

Le QS intervient dans la régulation de la plupart de ces facteurs de virulence : le système de sécrétion de type III [Henke & Bassler 2004a], la production de métalloprotéases [Mok et al. 2003] [Ruwandeeepika et al. 2011] et la formation de biofilms [Natrah et al. 2011].

La production de métalloprotéases régulée par le gène *vhp*, est contrôlée par les trois voies du QS de *V. harveyi* [Ruwandeeepika et al. 2011]. Ces gènes sont exprimés lorsque la concentration en auto-inducteur est élevée. Dans certains cas, une concentration élevée en auto-inducteur diminue l'expression de facteurs de virulence comme le système de sécrétion de type III [Natrah et al. 2011].

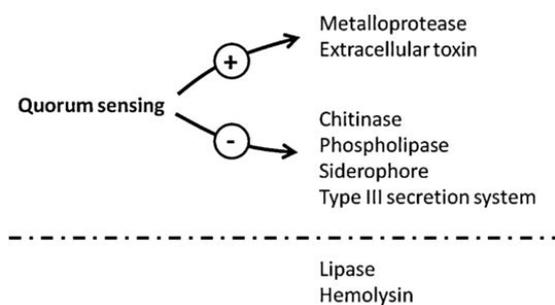


Figure 13 : Régulation des facteurs de virulence par le quorum sensing [Natrah et al. 2011]

1.3. L'inhibition du quorum sensing

La résistance bactérienne induite par l'utilisation massive d'antibiotiques, conduit à la recherche de nouveaux modes de traitement, notamment de traitements anti-virulents et non toxiques. La prolifération bactérienne étant indépendante du QS, ceci conduit à utiliser l'inactivation du QS comme stratégie de lutte afin d'empêcher l'expression de certains phénotypes, comme la régulation de facteurs de virulence ou la formation de biofilms. *V. harveyi*, pathogène en aquaculture, peut présenter des résistances à de nombreux antibiotiques pour lesquels les doses à utiliser sont importantes : par exemple les CMI (concentration minimum d'inhibition) pour la streptomycine, l'érythromycine et la sulphadiazine sont respectivement de 100, 75 et >100 µg.ml⁻¹ [Abraham 2004].

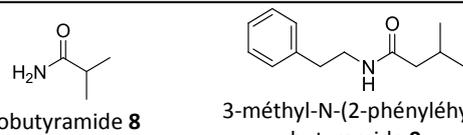
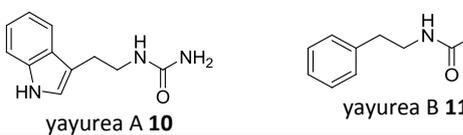
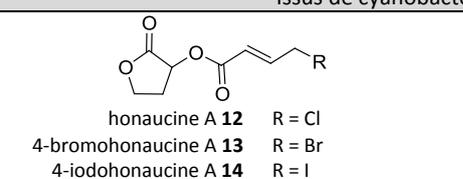
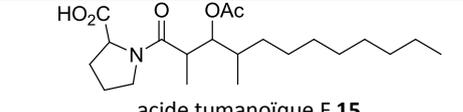
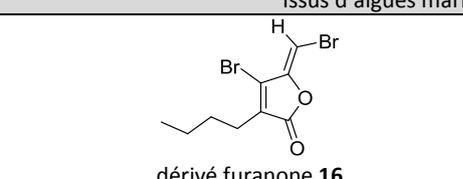
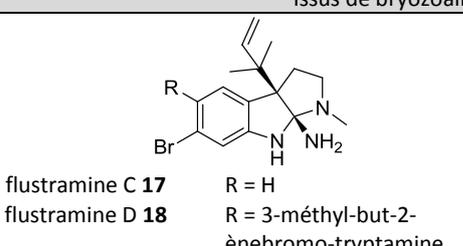
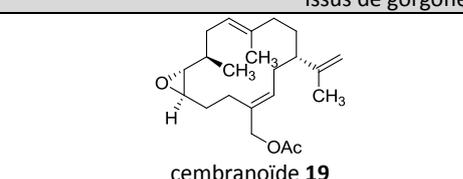
Dans la littérature deux appellations sont utilisées pour parler de l'inactivation du QS : les inhibiteurs du QS (QSI) et les agents quorum quenching (QQ). Le terme QSI a été utilisé pour la première fois afin de décrire l'inhibition par de petites molécules antagonistes des auto-inducteurs, et le QQ pour parler de la dégradation enzymatique des signaux AHL, comme par exemple les lactonases ou les phospholipases.

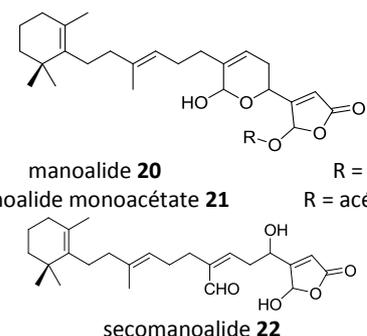
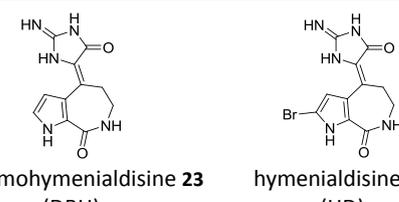
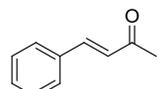
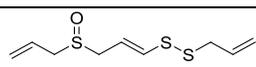
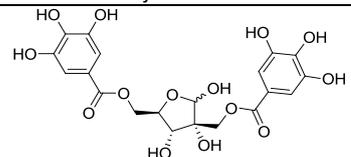
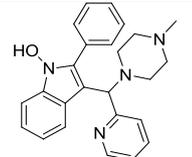
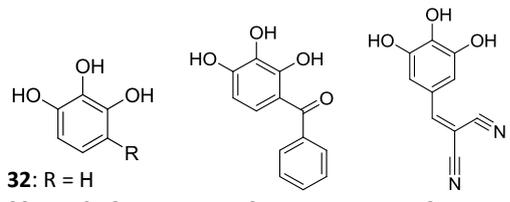
L'inactivation du QS peut s'effectuer de quatre façons différentes [Defoirdt et al. 2004] :

- par inhibition de la biosynthèse des AIs,
- par modification des AIs (par clivage enzymatique ou modification chimique),
- par l'utilisation d'antagonistes des AIs,
- par inhibition de l'activité des récepteurs.

Des inhibiteurs du QS de bactéries gram négatives sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Inhibiteurs du *quorum sensing* d'origine naturelle ou synthétique

Espèce d'origine	Structure du QSI	Mode d'action	Référence
Issus de bactéries			
<i>Halobacillus salinus</i>	 <p>Isobutyramide 8 3-méthyl-N-(2-phényléthyl)-butyramide 9</p>	Antagoniste HSL de <i>Vibrio</i> sp. CE ₅₀ (9) = 44 μM (BB120) CE ₅₀ (9) = 93 μM (JB525)	[Teasdale et al. 2009]
<i>Staphylococcus delphini</i>	 <p>yayurea A 10 yayurea B 11</p>	LuxN <i>V. harveyi</i>	[Chu et al. 2013]
Issus de cyanobactéries			
<i>Leptolyngbya crossbyana</i>	 <p>honaucine A 12 R = Cl 4-bromohonaucine A 13 R = Br 4-iodohonaucine A 14 R = I</p>	Inhibition de la bioluminescence de BB120 Cl (14) = 1,3 μM	[Kalia 2013]
<i>Blennothrix cantharidosmum</i>	 <p>acide tumanoïque F 15</p>	Inhibition de la bioluminescence (compétiteur du signal)	[F. Natrah et al. 2011]
Issus d'algues marines			
<i>Delisea pulchra</i>	 <p>dérivé furanone 16</p>	Antagoniste Bioluminescence et production de toxines chez <i>V. harveyi</i> et biofilms LuxR et LuxS	[Givskov et al. 1996] [Manefield et al. 2000] [Rasmussen et al. 2000] [Rasch et al. 2004]
Issus de bryozoaires			
<i>Flustra folicea</i>	 <p>flustramine C 17 R = H flustramine D 18 R = 3-méthyl-but-2-ènebromo-tryptamine</p>	Antagoniste d'AHL C (17) = 63 μM C (18) = 52 μM	[Peters et al. 2003]
Issus de gorgones			
<i>Pseudoplexaura flagellosa</i> et <i>Eunicea knighti</i>	 <p>cembranoïde 19</p>	<i>V. harveyi</i> et LuxR	[Tello et al. 2013]

Issus d'éponges marines			
<i>Luffariella variabilis</i>	 <p>manoalide 20 R = H manoalide monoacétate 21 R = acétate secomanalide 22</p>	Réduction d'AHL	[Skindersoe et al. 2008]
<i>Axinella</i> sp.	 <p>débromohymenialdisine 23 (DBH) hymenialdisine 24 (HD)</p>	Inhibiteur de LuxR : (HD) CIM = 0,2 µM LasR : (HD) CIM = 15 µM Anti fouling : (HD) CE ₅₀ = 99 µM (DHD) CE ₅₀ = 563 µM	[Dobretsov et al. 2011] [Feng et al. 2013]
Issus de plantes terrestres			
Plusieurs plantes	 <p>cinnaldéhyde 25</p>	Inhibition de la bioluminescence (par la voie AI-2) Inhibition de la virulence de <i>V. harveyi</i> , LuxR	[Brackman et al. 2008] [Pande et al. 2013]
<i>Allium sativum</i>	 <p>ajoène 26</p>	LuxR, antagoniste	
<i>Hamamelis virginiana</i>	 <p>hamamelitannin 27</p>	Inhibe le QS de <i>Staphylococcus</i> (régulateur RNAIII et formation de biofilms)	
Molécules de synthèse			
	 <p>28</p>	Cl ₅₀ = 10 µM Réduit l'activité de la synthase LuxI <i>E. coli</i>	
	 <p>30 31</p>	Inhibiteur de AI-2 (souche MM32) Cl ₅₀ (30) = 9 ± 2 µM Cl ₅₀ (31) = 4 ± 1 µM	[Ni et al. 2008a]
	 <p>32: R = H 33: R = CHO 34 35</p>	Inhibiteur de AI-2 (souche MM32) Cl ₅₀ (32) = 2 ± 1 µM Cl ₅₀ (33) = 4 ± 1 µM Cl ₅₀ (34) = 4 ± 2 µM Cl ₅₀ (35) = 3 ± 1 µM	[Ni et al. 2008b]
Autres			
	Acide linoléique, acide oléique, acide palmitique, acide stéarique	Inhibiteur d'AI-2 (souche BB170) C = 0,1 à C = 10 mM	[Widmer et al. 2007]

Deux phénéthylamides issus de la bactérie *Halobacillus salinus* inhibent la bioluminescence de *V. harveyi* en imitant l'acyl homosérine lactone HAI-1. Sans effet sur la croissance bactérienne en dessous de 200 µg.ml⁻¹, ces deux molécules inhibent également par l'inhibition du QS la synthèse de la violacéine, pigment sécrété par *Chromobacterium violaceum*, et d'une protéine fluorescente verte chez *Escherichia coli* [Teasdale et al. 2009].

De nombreux métabolites secondaires issus de cyanobactéries sont dotés d'activité inhibitrice du QS. Par exemple, *Blennothrix cantharidosmum*, à partir duquel a été isolé l'acide tumanoïque F (**15**) qui agit comme compétiteur de AHLs et inhibe la bioluminescence de *V. harveyi* [Natrah et al. 2011].

L'algue marine rouge *Delisea pulchra*, synthétise des furanones halogénées qui jouent un rôle dans la défense contre la colonisation bactérienne. Des activités antifouling et antimicrobiennes ont ainsi été mises en évidence. Les furanones antagonistes des AHLs se lient aux récepteurs grâce à leur fonction furanone similaire à celle de la lactone des AHLs et bloquent ainsi l'expression de la protéine LuxR [Givskov et al. 1996]. Une série de dérivés de furanones synthétiques inhibe le QS de plusieurs bactéries. Des tests effectués sur des larves nauplii de crevettes *Macrobrachium rosenbergii* et des truites arc-en-ciel (10, 15 et 18g), à différentes concentrations de furanones montrent une augmentation de leur survie en présence de *V. harveyi* à une concentration en molécule active de 1 µM [Pande et al. 2013].

Le cinnamaldéhyde, présent chez plusieurs plantes terrestres, réduit la production des AHLs et l'AI-2 de *V. harveyi*. Il est capable de diminuer l'activité de liaison de LuxR sur l'ADN [Brackman et al. 2008]. Il diminue également la mortalité des crevettes *Macrobrachium rosenbergii* infectées par des pathogènes du genre *Vibrio*. Par exemple, la survie des larves de crevettes de *Macrobrachium rosenbergii* en présence *V. harveyi* est augmentée à des concentrations en cinnamaldéhyde comprises entre 1 µM et 10 µM [Pande et al. 2013].

La honaucine A (**12**), isolée de la cyanobactérie *Leptolyngbya crossbyana*, a été identifiée comme inhibiteur de la luminescence de *V. harveyi* (souche BB120). L'analogue synthétique honaucine A (**12**) montre une meilleure activité, grâce à la modification de l'halogène en position 4 : 4-bromohaunocine A (**13**) et 4-iodobromohonaucine A (**14**) [Kalia 2013].

Les flustramines C (**17**) et D (**18**) isolées du bryzoaire *Flustra foliacea* ont montré une activité inhibitrice du QS des souches bactériennes pKR-C12 et pAS-C8 de *P. putida*, de pSB403 d'*E. coli* ainsi que de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. La flustramine C diminue à 63 µM 50 % de l'activité des souches pKR-C12 de *P. putida* et pSB403 d'*E. coli*, ainsi que l'activité protéase de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. La flustramine D diminue l'activité de la souche pSB403 d'*E. coli* à 50µM [Peters et al. 2003].

L'éponge marine *Luffariella variabilis* produit des métabolites secondaires de type sesterterpenoïdes. Trois composés majoritaires en ont été isolés : le manoalide (**20**), son sel monoacétate (**21**) et le sécomanoalide (**22**). Ils inhibent les systèmes LuxR de *V. fischeri* et de *P. aeruginosa*, avec des CI_{50} respectives de 0.658 μ M, 1.123 μ M, 1.11 μ M sur la souche PAO1 TN5_LAS [Skindersoe et al. 2008].

2. Les éponges marines

2.1. Généralités

Les éponges marines (phylum Porifera) appartiennent au groupe des métazoaires dans lequel elles sont considérées comme les animaux les plus primitifs. Elles ne possèdent ni tissus différenciés, ni organes, ni système nerveux, digestif ou circulatoire, ni gonades. Les spongiaires se composent d'une multitude de cellules, possédant chacune une structure et une fonction spécifique.

Exclusivement aquatiques (eau de mer ou eau douce), ces animaux vivent fixés sur des substrats durs et inertes (roches, épaves de navire, sédiments denses, mollusques, crustacés...). Elles filtrent l'eau pour se nourrir à travers de petits orifices (pores). L'eau pénètre par les ostias puis ressort par l'oscule grâce au mouvement des choanocytes (cellules à flagelles), qui absorbent également les nutriments et l'oxygène de l'eau. Une éponge marine se compose d'une double paroi cellulaire, le pinacoderme (extérieur) et le choanoderme (intérieur). Entre les deux, le mésophyle contient des fibres de collagène (protéine structurale) dans lequel se trouvent différents types de cellules comme les archéocytes capables de se transformer en n'importe quel type de cellule et des sclérocytes qui vont produire des éléments minéraux du squelette, appelés spicules.

Le phylum des spongiaires comprend les éponges calcaires (classe des Calcarea et Calcarea), les démosponges, les hexactinellides et les éponges siliceuses. Les éponges siliceuses sont représentées par les hexactinellides (éponges dites de verre, vivant en eaux profondes ou froides) et les démosponges. Une classe d'éponges, les archéocyathes a disparu au début du Cambrien. La phylogénie moléculaire a permis récemment l'émergence d'une nouvelle classe, les homoscléromorphes [Gazave et al. 2012]. Ces différentes classes se différencient par la nature de leur squelette constitué soit d'une matrice organique composée de fibres de spongine, ou d'une matrice minérale composée de spicules de carbonate de calcium ou calcite (CaCO_3), ou de silice (SiO_2). Les hexactinellides ne possèdent que des spicules de silice, alors que les Calcarea ne sécrètent que des spicules de calcite. Les démosponges et les homoscléromorphes ont un squelette plus diversifié, constitué respectivement de silice et/ou de fibres de spongine, et de silice ou de calcite.

Les éponges marines vivent à toutes les profondeurs, des rivages aux fosses abyssales dans les eaux chaudes ou froides. Leur prolifération dépend essentiellement de la richesse des eaux en nutriments. La solubilité de la silice diminuant avec la température, les éponges siliceuses sont majoritairement présentes dans des eaux profondes et des mers polaires. Les éponges calcaires sont au contraire plus diversifiées dans les eaux peu profondes. Les conditions hydrodynamiques influent aussi sur la nature et la répartition des éponges : dans des zones à fort courant et agitées, les éponges sont majoritairement encroûtantes, mais la

grande plasticité de ces organismes leur permet souvent de s'adapter aux différentes conditions environnementales.

2.1.1. Les éponges calcaires

Les éponges calcaires, connues aussi sous le nom de Calcispongiae, se composent de deux sous-classes : Calcaronea et Calcinea. Ce nom provient de la nature de leur squelette composé de spicules de calcaires. Dans le phylum Porifera, elles représentent seulement 8% des espèces.

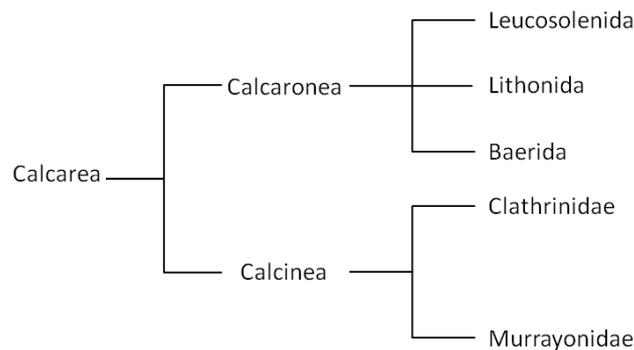


Figure 14 : Classification simplifiée des éponges calcaires

Les Calcarea colonisent tous les océans. Elles ont été exclusivement collectées sur des plateaux continentaux à des profondeurs inférieures ou égales à 200 mètres.

En chimie, cette classe est la moins étudiée. Les études chimiques se portent essentiellement sur les genres *Leucetta* et *Clathrina* de la sous-classe Calcinea. Ces genres sont particulièrement riches en alcaloïdes de type amino-2 imidazole et se composent également d'acide gras, de lipides, de stérols, de peptides et de macrolides. Les activités mises en évidence sont essentiellement tournées vers la santé humaine dans le domaine des anticancéreux et des antibiotiques.

2.1.2. Les démosponges

En 2011, 83% des éponges marines appartiennent à la classe des démosponges. Dépourvus de spicules de silice, certains squelettes sont formés d'un mélange de spongine et de spicules de calcaire, d'autres ne secrètent que des spicules de calcaire, et une famille d'éponge de l'ordre Homoscleromorpha (Oscarellidae) est dépourvue de squelette. Les trois sous-classes de démosponges regroupent des spongiaires selon leur mode de reproduction : les démosponges ovipares (sous classe Tetractinomorpha) et les démosponges vivipares (sous classes Ceractinomorpha et Homoscleromorpha). Les Homoscleromorpha se différencient des Ceractinomorpha par leur squelette à spicules mégasclères et microsclères non différenciés.

De nature ubiquiste, les démosponges colonisent toutes les mers du monde et s'adaptent à toutes les profondeurs. Certaines espèces sont présentes en eaux douces (rivières et lacs). Le lac Baïkal, par exemple, profond de 1740 m, est connu pour sa faune particulière de spongiaires.

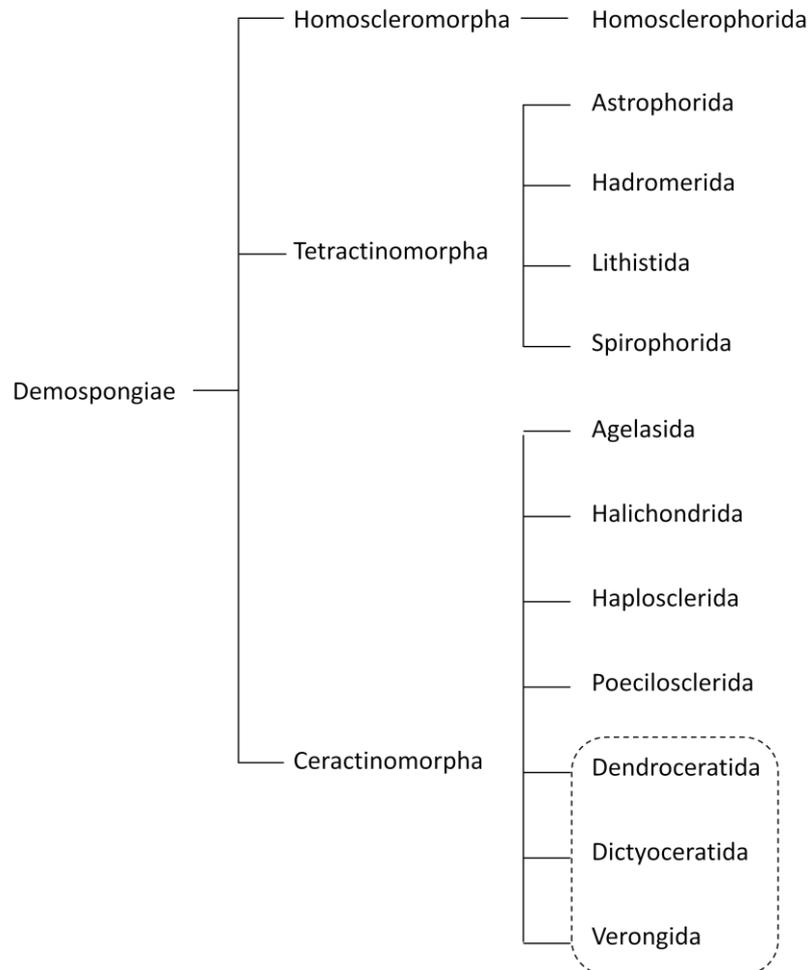


Figure 15 : Classification simplifiée des Demosponges. Encadré : démosponges composés uniquement de fibres de spongine.

La spongine, produite par des spongocytes, est un collagène fibrillaire qui confère à l'éponge une consistance souple et élastique telle que l'éponge naturelle de bain commercialisée. Trois ordres de la sous-classe des Ceractinomorpha (Dendroceratida, Dictyoceratida et Verongida) ont un squelette composé uniquement de fibres de spongine. En chimie, ces organismes sont restés longtemps les plus étudiés par les chimistes. Dans les années 1975, ces trois ordres comptaient 2000 composés isolés, soit la moitié des molécules isolées du phylum Porifera, avec majoritairement des terpènes pour les ordres Dendroceratida et Dictyoceratida. Dans ces deux ordres, d'autres types de métabolites secondaires sont également présents : des dérivés azotés (pyrroles, indoles, quinoléines, peptides, depsipeptides) et/ou des dérivés aromatiques bromés.

Fixés, se nourrissant par filtration de l'eau environnante, sans moyens de défenses autre que leurs éventuels spicules, les spongiaires produisent des métabolites. Ces métabolites secondaires sont produits par l'éponge elle-même, par les micro-organismes associés (bactéries, cyanobactéries, microalgues), ou encore sont le résultat des interactions éponge-micro-organismes, mais aussi de réarrangements chimiques spontanés.

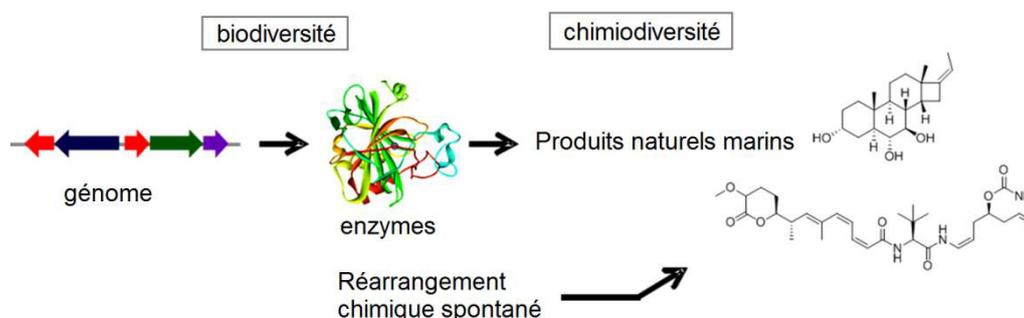


Figure 16 : De la biodiversité à la chimiodiversité marine

Leur biodiversité et leur « écodiversité » font des porifères une source de substances naturelles remarquable possédant des structures originales, et présentant un large éventail d'activités biologiques sur des modèles de tests diversifiés (cellules, bactéries, virus, inflammation, système nerveux...) concernant essentiellement la santé humaine. Environ 5% seulement des travaux sont consacrés à l'importance de ces molécules pour les organismes eux-mêmes dans leur milieu (écologie chimique).

2.2. Les éponges marines en Polynésie française

La Polynésie française se situe dans une région de faible biodiversité terrestre et marine avec cependant un taux d'endémisme important par rapport à d'autres îles du Pacifique (Fiji, Salomon ...). La répartition globale de la diversité des éponges (Figure 17) montre que la Polynésie française a été peu étudiée jusqu'en 2012.

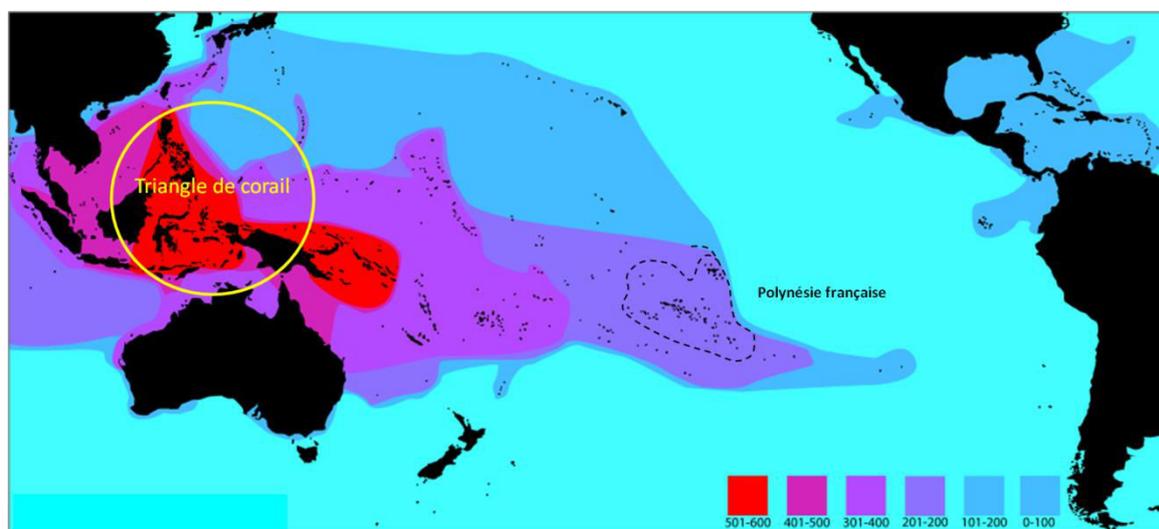


Figure 16 : Dispersion de la biodiversité des coraux scléractiniaires dans le Pacifique (d'après Véron, [Veron et al. 2009])

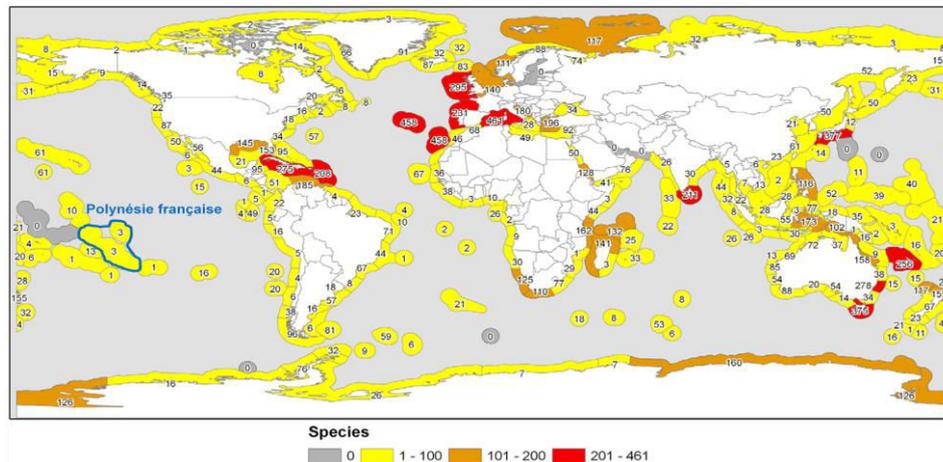


Figure 17 : Diversité mondiale des Porifères [Van Soest et al. 2012]

En 1977, Jean Vacelet a décrit cinq éponges des genres *Lelapiella*, *Lepidoleucon*, *Plectroninia*, *Murrayona* et *Astrosclera*, récoltées à Moorea (Iles de la Société) et Takapoto (Tuamotu) [Vacelet 1977]. Un produit anti-microbien, la puupehenone, a été publié en 1982 à partir de l'éponge *Heteronema eubamna* récoltée à Tahiti et Moorea [Amade et al. 1982]. En 2002, Wörheide étudie la distribution et la phylogénie moléculaire de *Leucetta chagosensis* dans le Pacifique, travail comportant deux sites de récolte en Polynésie française, à Moorea et Rangiroa (Tuamotu) [Wörheide et al. 2002].

L'équipe de chimie des biomolécules marines de l'IRD (actuellement partie de l'équipe « Etude Intégrée des Métabolites Secondaires » de l'UMR EIO) a pour mission d'étudier les invertébrés marins de la Polynésie française, plus particulièrement les spongiaires, spécialité de l'équipe. Dans un premier temps, un recensement global des éponges marines de la Polynésie française a été effectué en cinq campagnes de collecte (Figure 18) qui ont permis d'explorer 222 stations, de récolter plus de 600 échantillons. Plus de 180 espèces ont été identifiées lors de cet inventaire.

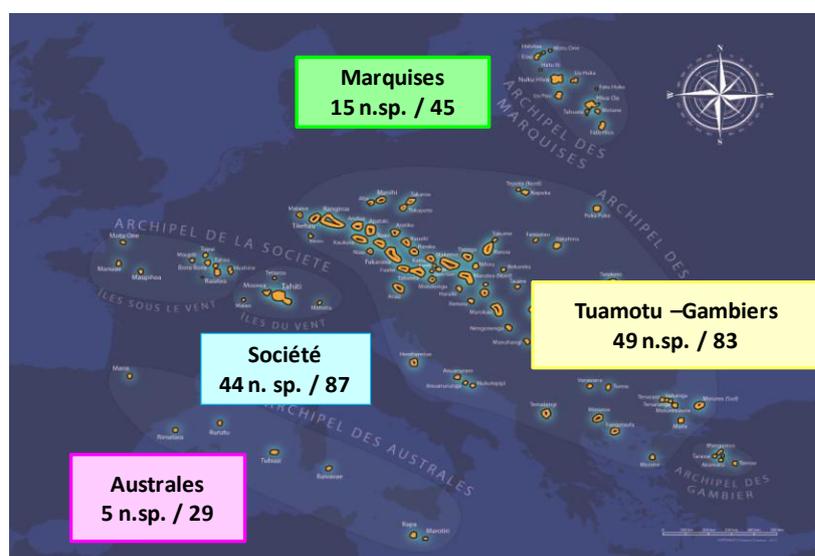


Figure 18 : Diversité des Porifères en Polynésie française recensées par l'IRD (n. sp : nouvelles espèces)

La faune des différents archipels permet de distinguer une faune majoritairement phototrophe (éponges majoritairement associées à des microalgues ou cyanobactéries) pour les îles présentant des récifs coralliens (barrières ou atolls) et hétérotrophe pour les îles Marquises [Hall *et al.* 2013] dont les eaux sont chargées en plancton et apports terrigènes. Les arrangements faunistiques de ces archipels reflètent bien la géomorphologie et les biotopes distincts des différents types d'îles.

3. Composition chimique des ordres Dictyoceratida³

Les ordres Dictyoceratida et Dendroceratida appartiennent à la sous-classe Ceractinomorpha des Démospouges. Les principaux métabolites secondaires isolés de ces ordres sont des terpènes, des méroterpènes (terpènes issus de deux voies de biogenèse) et des alcaloïdes. On y trouve également d'autres types de molécules caractéristiques comme par exemple des dérivés aromatiques halogénés [Mehub *et al.* 2016].

Certains terpènes des ordres Dendroceratida et Dictyoceratida ont été classés par Bergquist et Well (1983), classement présenté dans la figure 19 [Kornprobst, 2005].

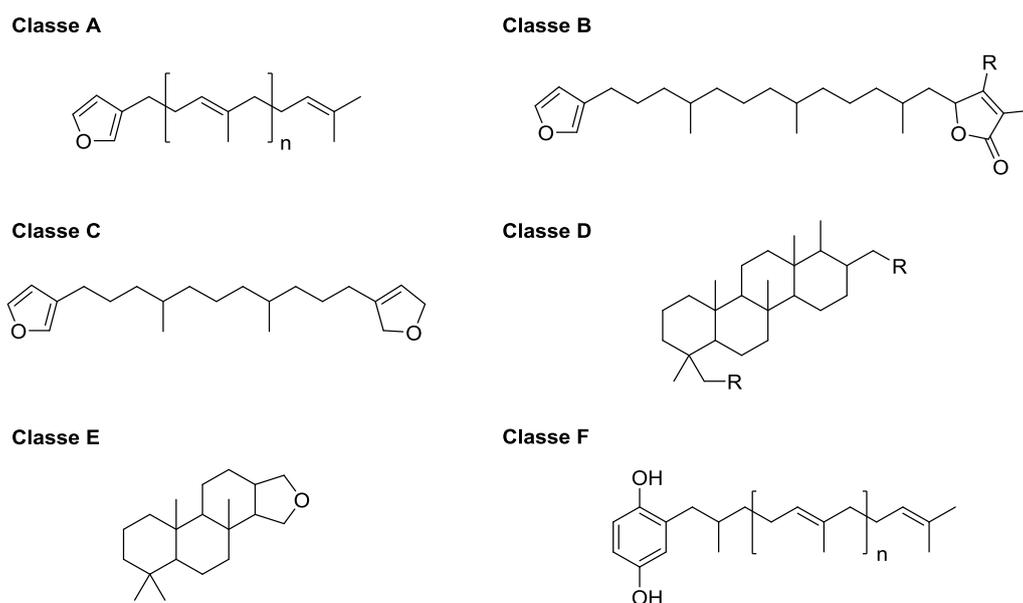


Figure 19 : Classement des terpènes de Bergquist et Well (1983) : Furanoterpènes (Classe A à C), Diterpènes tétra- et tricycliques (Classe D et E), Polyprénylhydroquinones (Classe E).

Les classes A, B et C regroupent les sesquiterpènes de type furanoterpène, les diterpènes tétracycliques, les diterpènes tricycliques et la dernière, la classe E, les polyprénylhydroquinones.

³ La bibliographie de la composition chimique des Démospouges et des éponges calcaires est basée sur la base de données en ligne Marinlit® (abonnement IRD) et du livre de J.-M. Kornprobst. Dans le cas de données issues directement de publications, les références sont citées.

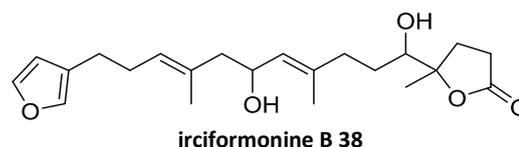
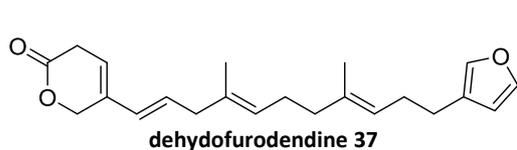
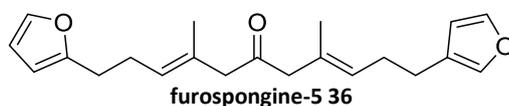
Ce classement ne prend pas en considération la totalité des terpènes isolés des Dendroceratida et des Dictyoceratida. D'autres structures terpéniques proviennent de ces deux ordres, des sesquiterpènes (à 15 atomes de carbones), des diterpènes (à 20 atomes de carbones) et des sesterterpènes (à 25 atomes de carbones) diversement substitués.

3.1. Les terpènes

Ce chapitre est principalement consacré aux terpènes de type furanoterpènes, aux diterpènes et aux sesterterpènes isolés des ordres Dictyoceratida.

3.1.1. Les furanoterpènes

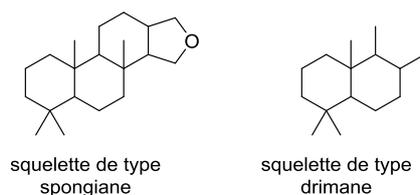
Les furanoterpènes : parmi les furanoterpènes (classes A, B, C), on retrouve de nombreux dérivés de l'acide tétronique (classe B) et de furanoterpènes à 21 carbones.



Parmi les composés appartenant à cette famille de molécules, on peut citer par exemple la furospongine-5 (**36**), un furanoterpène à 21 carbones isolé de *Spongia officinalis*. Cette molécule possède une faible activité cytotoxique $ED_{50} = 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (soit $15 \mu\text{M}$) [Garrido et al. 1997]. On peut citer également le déhydrofurodendine (**37**), un furanoterpène substitué par une pyranone isolé d'une espèce du genre *Lendenfeldia*. Ce composé a montré une activité inhibitrice de la transcriptase inverse du virus VIH ($3,2 \mu\text{M} < CI_{50} < 5,6 \mu\text{M}$) [Chill et al. 2004]. Enfin, l'irciformonine B (**38**), dérivé de l'acide tétronique, possède une activité cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses : K 562 ($CI_{50} = 7,8 \mu\text{M}$), DCD ($CI_{50} = 0,04 \mu\text{M}$) et HepG2 et Hep3B ($CI_{50} = 1,0$ et $6,4 \mu\text{M}$) [Su et al. 2011] impliquées respectivement dans la myéloïde chronique, le cancer du colon et du foie.

3.1.2. Les diterpènes

Le squelette des diterpènes peut être de type spongiane (représentés par la classe E) ou drimane.



Diterpènes de type spongiane

Particulièrement fréquents dans l'ordre des Dictyoceratida, les terpènes de type spongiane ont été principalement isolés du genre *Spongia*.

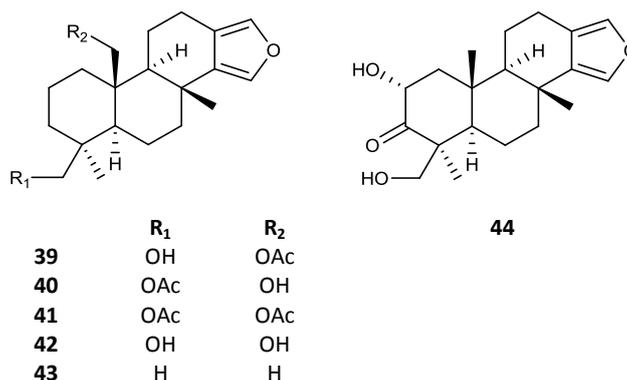
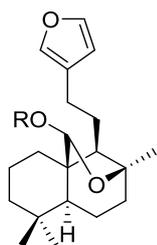


Figure 20 : Exemples de diterpènes de la classe E isolés d'éponges du genre *Spongia*

Dans cette famille, une série de molécules (**39** à **43**) a été isolée d'une espèce non identifiée de *Spongia*. Ces molécules ont montré une activité antagoniste de l'hormone thyroïdienne, hormone impliquée dans la transmission neuronale de signaux, avec des CI₅₀ respectives de 23 µM, 70 µM, 400 µM, 600 µM et 1 mM [Carroll et al. 2008]. Trois composés isolés de *Spongia officinalis* ont montré une activité antimicrobienne sur *Sptaphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sphaericus* [Gonzales et al. 1984]. Un autre spongiaire de ce genre a fourni un diterpène du même type, substitué par un carbonyle en position C-3, l'isospongiadiol (**44**), qui a montré une activité cytotoxique à CI₅₀ = 5 µg.ml⁻¹ (soit 15 µM) et antivirale à CI₅₀ = 2 µg.ml⁻¹ (soit 6 µM) [Kohmoto et al. 1987].

Autres diterpènes

Les diterpènes de squelette hydro-carboné différent du spongiane ont été isolés des genres *Cacospongia* et *Luffariella* (Thorectidae), ainsi que des genres de *Dactylospongia* (Spongiidae). La plupart présentent un squelette de type drimane comme le luakuliide A (**46**) qui présente une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire leucémique HL-60 à des CI₅₀ = 22 µM et CI₅₀ = 44 µM [Barber et al. 2015].



luakuliide : R = Me **45**
luakuliide A : R = H **46**

3.1.3. Les sesterterpènes

Les sesterterpènes isolés des ordres Dictyoceratida et Dendroceratida ont un squelette carboné de type scalarane (classe D) ou d'autres squelettes connus (pyronane, drimane ou pimarane) substitués de chaînes isoprénoides plus ou moins longues comportant des fonctions acides, esters ou lactones.

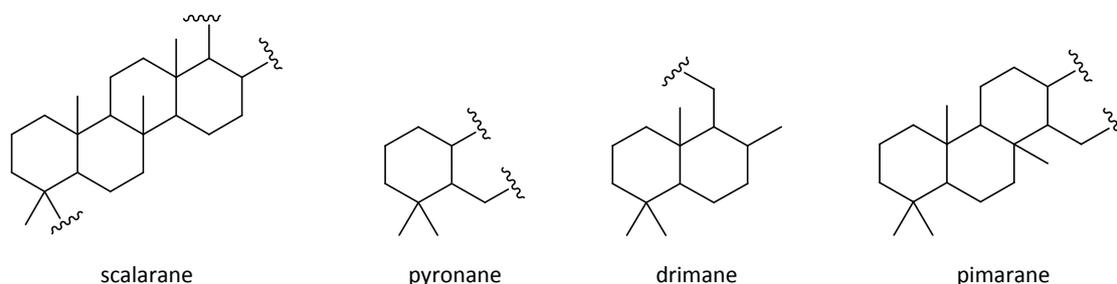
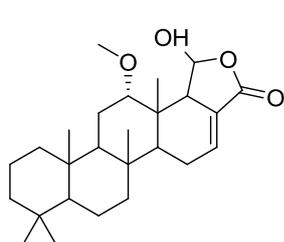


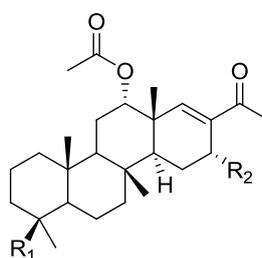
Figure 21 : Structure hydrocarbonée de squelettes de sesterpènes de l'ordre Dictyoceratida

Sesterterpènes de type scalarane

Les sesterterpènes de la famille du scalarane sont peu fréquents parmi les Dendroceratida. Dans les éponges Dictyoceratida, les genres Spongiidae et Thorectidae renferment principalement ces terpènes. L'équipe de Jaspars a décrit les composés de type scalarane comme un critère chimiotaxonomique de la famille Spongiidae [Kornprobst, 2015].



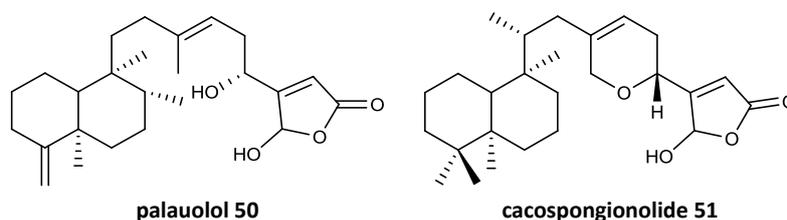
scalarine **47**



	R1	R2
phyllospongine A 48	CH ₃	CH ₃ COO
phyllospongine B 49	CH ₂ CH ₃	CH ₃ COO

La scalarine (**47**) isolée de *Cacospongia scalaris* (Thorectidae) est le premier composé isolé ayant le squelette carboné de type scalarane [Fattorusso et al. 1972]. Les phyllospongines A (**48**) et B (**49**), récemment isolées de *Phyllospongine lamellosa*, possèdent des activités cytotoxiques sur trois lignées cellulaires humaines HCT-116, HePG-2, MCF-7

respectivement impliquées dans les cancers du colon, du foie et du sein. Ces molécules présentent également des activités antimicrobiennes sur des bactéries à gram-positif et à gram-négatif [Hassan et al. 2015].



Le palaulol (**50**), un dérivé du drimane et isolé d'une espèce de *Fascaplysinopsis*, est doté d'une activité anti-inflammatoire [Schmidt & Faulkner 1996]. Le cacospongionolide (**51**), isolé de *Fasciospongia cavernosa*, inhibe la prolifération des cellules cancéreuses T47D, A431, HeLa, HCT116 impliquées respectivement dans les cancers du sein, de la peau, du cerveau et du colon [De Stefano et al. 2012]. Le manoalide (**20**) isolé de *Luffariella variabilis* présente des propriétés antibiotique, anti-inflammatoire, un inhibiteur la phospholipase A2 comme le paluolol (**50**) et est un inhibiteur du *quorum sensing* [De Silva & Scheuer 1980] [Biochem 1989] [Skindersoe et al. 2008].

Outre cette diversité de fonctions chimiques « classiques » plus ou moins oxydées, les sesterterpènes dérivés de type pimarane, drimane ou pyronane peuvent de plus contenir du soufre.

3.2. Les méroterpènes

Un méroterpène est une molécule formée d'un terpène relié à une structure aromatique. La biosynthèse des méroterpènes s'effectuent par deux voies de biogénèse. Le squelette sesquiterpénique peut être linéaire (classe E) ou cyclique. La forme cyclique est souvent un drimane ou un *friedo*-drimane. La présence d'une double liaison peut être observée en position C3-C4, C5-C6, C7-C8 ou en C5-C10 ou d'une insaturation exocyclique en position C4. La partie aromatique peut être une quinone, une hydroquinone ou une aminoquinone.

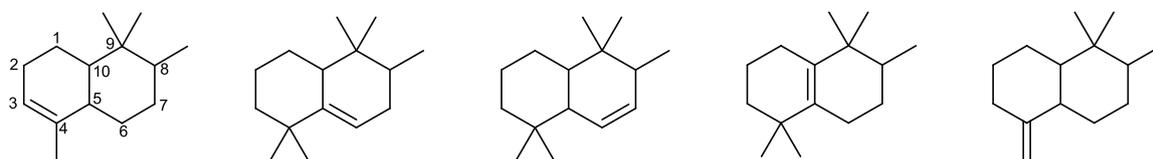
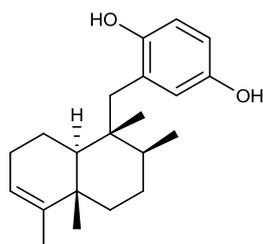
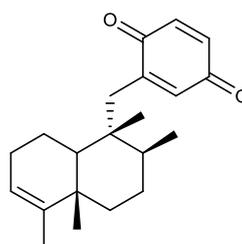


Figure 22 : Différents structures de drimane dans les méroterpènes

Les méroterpènes sont principalement issus de l'ordre Dycioceratida, en particulier du genre *Dysidea*.



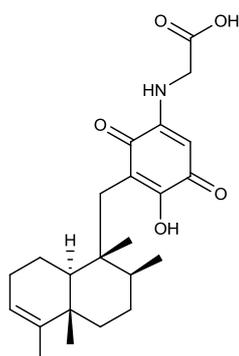
avarol 52



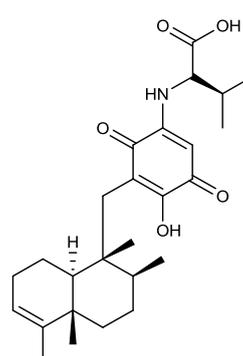
avarone 53

L'avarol (**52**) et l'avarone (**53**), premiers exemples de sesquiterpènes/quinone, ont été isolés de *Dysidea avara*. Ces deux méroterpènes possèdent de nombreuses activités biologiques incluant des activités cytotoxique, anti-inflammatoire, anti-psoriasique, anti-microbienne, anti-oxydante, anti-aggrégation plaquettaire et anti-VIH [Aktaş et al. 2010]. Ce manque de sélectivité est du à la fonction diphenol/quinone. Plusieurs dérivés de l'avarol et de l'avarone ont été isolés d'autres éponges du genre *Dysidea* [Gordaliza et al., 2010].

Parmi les sesquiterpènes connus, on peut citer la nakijiquinone A (**54**), le premier exemple de sesquiterpène aminoquinonique, isolé d'une éponge de la famille des *Spongidae*. Les nakijiquinones A (**54**) et B (**55**) possèdent une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires L-1210 ($9 \mu\text{M} < \text{CI}_{50} < 20 \mu\text{M}$) et KB ($3 \mu\text{M} < \text{CI}_{50} < 19 \mu\text{M}$) [Kobayashi et al. 1995].

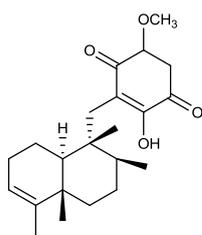


nakijiquinone A 54

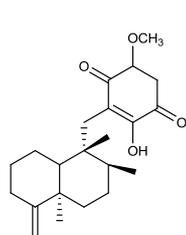


nakijiquinone B 55

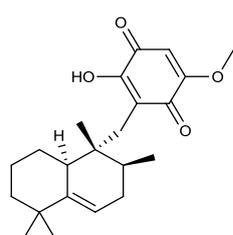
L'étude d'une espèce du genre *Hyrtios* a conduit à l'isolement de l'isospongiaquinone (**56**) qui a montré une activité toxique sur des larves d'*Artemia* à une dose létale médiane $\text{DL}_{50} = 5 \mu\text{M}$ [Salmoun et al. 2000]. La 5-épi-ilimaquinone (**57**) a été isolée de l'espèce *Hyrtios tubulatus* et possède aussi une activité toxique sur larves d'*Artemia* à $\text{DL}_{50} = 11 \mu\text{M}$ [Salmoun et al. 2000]. Le neomamanuthaquinone (**59**) (isomère du mamanuthaquinone (**58**)), a été isolé d'une espèce de *Dactylospongia* et a montré une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire cancéreuse du sein (BC) à $24 \mu\text{M}$ [Yong et al. 2008].



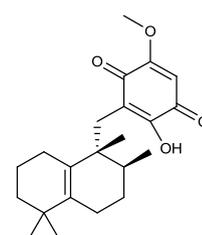
isospongiaquinone 56



5-épi-ilimaquinone 57



mamanuthaquinone 58



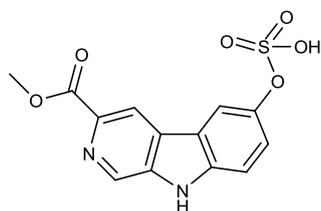
neomamanuthaquinone 59

Les méroterpènes sont fréquents chez les espèces du genre *Dactylospongia* étudiées en Polynésie française. Leurs diversités sont liées à la fonctionnalisation de la partie quinonique [Boufridi et al. 2012].

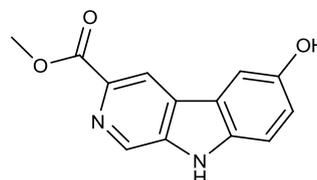
3.3. Les dérivés des acides aminés

Des alcaloïdes dérivés du tryptophane ou de la tryptamine sont rencontrés dans les Dictyoceratida. Leur fonctionnalisation est caractéristique du milieu marin, avec la présence de soufre sous différentes formes, et de brome. Leur structure peut être simple (indoles ou beta-carbolines) ou plus complexe avec la substitution d'hétérocycles.

Les variabines A (**60**) et B (**61**) isolées de *Luffariella variabilis* sont des alcaloïdes de type β -carboline. La variabine A est le premier alcaloïde de type β -carboline sulfaté isolé d'organisme marin. La variabine B inhibe la chymotrypsine du protéasome à 16 μ M et l'interaction protéasome Ubc13-Uev1A à 20 μ M [Sakai et al. 2014].

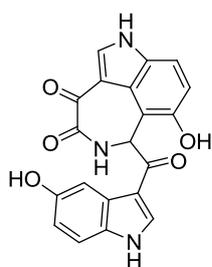


variabine A 60

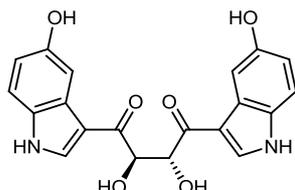


variabine B 61

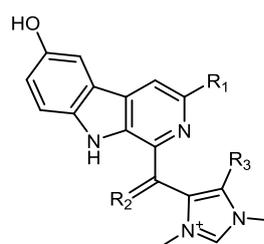
Les hyrtimomines F à K (**62-67**) isolées d'une éponge du genre *Hyrtios* de Okinawa, sont antifongiques sur *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* à des concentrations comprises 11 et 21 μ M [Tanaka et al. 2014].



hyrtimomine F 62



hyrtimomine G 63



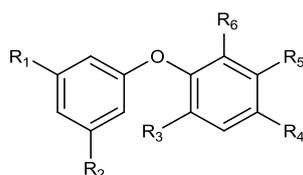
hyrtimomine I-K

		R ₁	R ₂	R ₃
H	64	COOH	H ₂	X
I	65	COOH	O	H
J	66	COOH	O	X
K	67	H	O	X

X =

3.4. Les molécules atypiques

Les métabolites décrits précédemment sont majoritaires dans l'ordre Dictyoceratida. D'autres familles de molécules ont également été isolées de cet ordre telles que des dérivés aromatiques bromés ou des macrolides. La présence d'éthers diphénoliques polybromés chez les *Dysidea*, souvent isolés en grande quantité, est remarquable [Erpenbeck *et al.* 2012]. Ils sont aussi décrits dans le genre *Phyllospongia*. En industrie, ils sont utilisés comme retardateur de flammes [Srikanth Reddy *et al.* 2012]. Cette famille de molécules possède des activités antimicrobiennes et cytotoxiques.

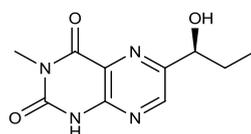


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	Br	Br	Br	Br	H	OH
2	Br	Br	Br	H	Br	OH

Par exemple, deux bromodiphényléthers isolés d'une espèce de *Dysidea* (composé 1 et 2) inhibent la croissance de cellules tumorales par le biais de l'inhibition de la T-cell-independent type 2 (Tie2) kinase à une concentration comprise entre 2 et 6 μM [Xu *et al.* 2005] (voir travaux antérieurs du genre *Dysidea*, section 3 2.2.1).

4. Composition chimique des éponges calcaires

Les métabolites secondaires des éponges calcaires sont principalement des alcaloïdes de type amino-2 imidazole. D'autres familles de molécules ont également été isolées des éponges calcaires telles que des acides gras, des lipides, des macrolides, des alcènes et des terpènes. Le premier alcaloïde isolé d'une éponge calcaire est la *leucettidine* (**68**). Depuis cette découverte qui a donné de l'intérêt à ces éponges, les éponges calcaires ont pris de l'importance dans la littérature.



leucettidine 68

4.1. Les alcaloïdes

Les études chimiques menées sur les éponges calcaires ont mené à l'isolement d'alcaloïdes appartenant à la famille des amino-2 imidazoles. Le classement de ces alcaloïdes

imidazoliques, isolés principalement des genres *Leucetta* et *Clathrina*, ont été classé par J. D.Sullivan selon quatre catégories reliées chimiquement entre elles (Figure 23) [Sullivan et al. 2009]: composés non fonctionnalisés sur l'imidazole (catégorie I), composés fonctionnalisés sur l'imidazole par un groupe hydantoïne (2,4-imidazolidinedione, Catégorie II), intermédiaire de catégorie III provenant d'une cyclisation et oxydations concomitantes, imidazole oxydé en imidazolone (catégorie IV).

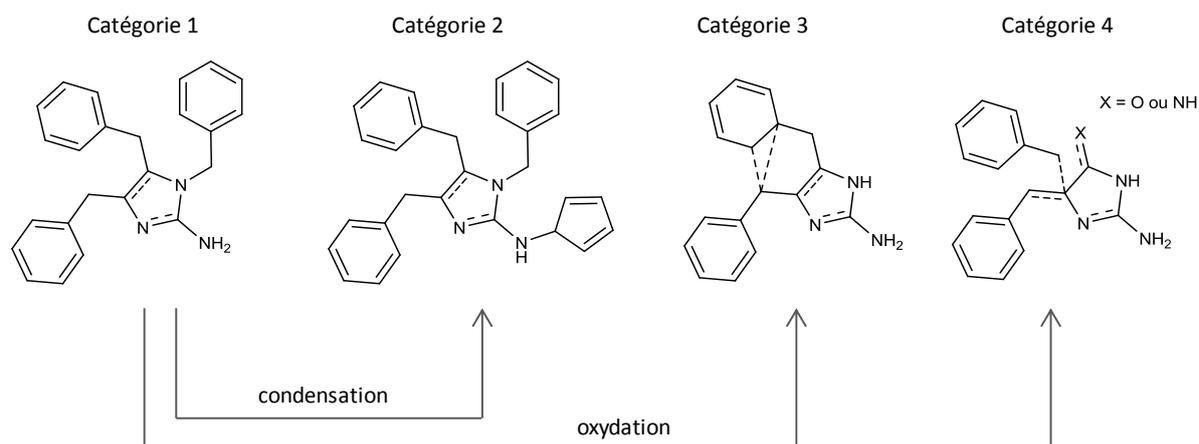
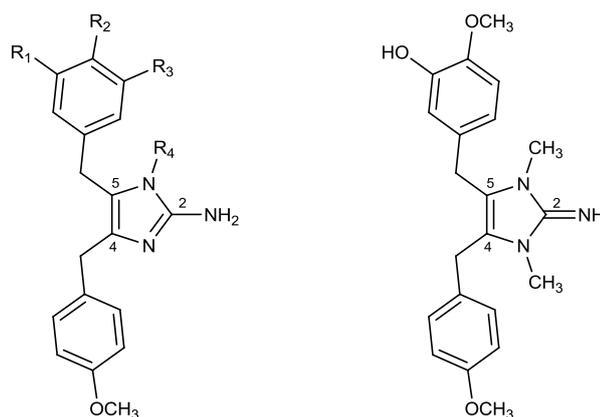


Figure 23 : Classement des alcaloïdes imidazoliques de type amino-2 imidazole des éponges du genre *Leucetta* selon Sullivan [Sullivan et al. 2009].

4.1.1. Catégorie I : exemple des naamines et des isonaamines

Les naamines : elles possèdent un cycle amino-2 imidazole substitué en position 4 et 5 par deux benzyles. Un des benzyles est méthoxylé et l'autre peut être *méta* ou *para* substitué par une fonction alcool ou un méthoxyle.

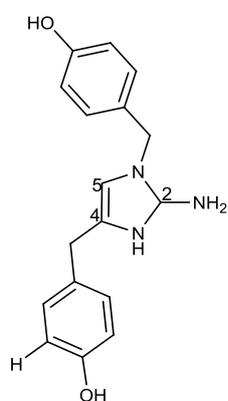


		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
naamine A	69	H	OH	H	CH ₃
naamine C	70	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
naamine D	71	H	OCH ₃	H	H
naamine E	72	OH	OCH ₃	OH	CH ₃
naamine F	73	H	OH	OCH ₃	CH ₃
naamine G	74	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃

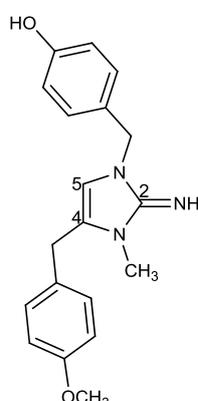
naamine B 75

Les naamines de A à G ont été isolées d'espèces de *Leucetta* collectées dans la Mer Rouge ou dans l'océan Pacifique (de l'Indonésie aux îles Fidji). La naamine G, isolée de *L. chagosensis*, possède une activité antifongique sur *Cladosporium herbarum* et des activités cytotoxiques sur le lymphome murin L5178Y et le carcinome cervical humain HeLa [Hassan et al. 2004]. Les naamines B et D ont une activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans* avec une concentration minimum d'inhibition CMI = 6,25 µg.ml⁻¹ (soit 17 µM pour la naamine B et 19 µM pour la naamine D). La naamine D est également un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase, avec une inhibition de 50% à une concentration de 1 mM [Dunbar et al. 2000].

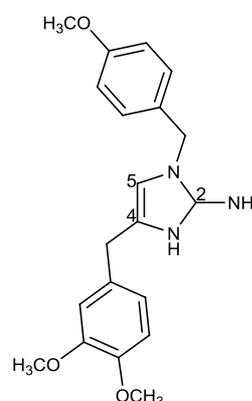
Les isonaamines : elles sont composées d'un cycle imidazolique substitué par deux benzyles en position N-1 et C-4. Trois isonaamidines ont été isolées de *L. chagosensis* : les isonaamines A, B et C (76-78).



isonaamine A 76



isonaamine B 77

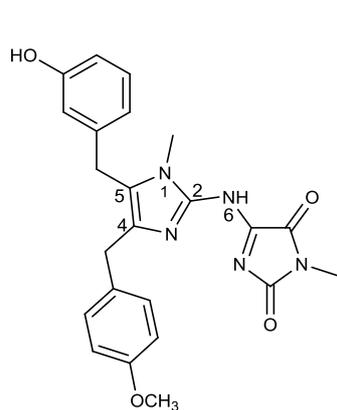


isonaamine C 78

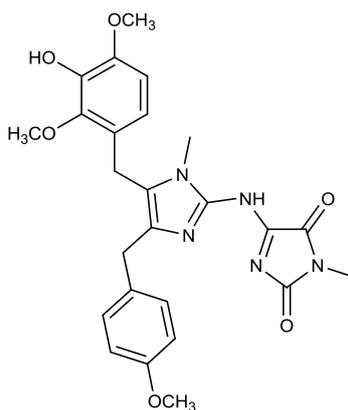
L'isonaamine C (78) est cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules tumorales humaines telles que HMO2 (hépatopancréas) ainsi que HepG2 et Huh7 (seins) avec des CI₅₀ comprises entre 1 µg ml⁻¹ et 7 µg ml⁻¹ (soit 3 µM et 20 µM) [Lima et al. 2011].

4.1.2. Catégorie II : exemple des naamidines et isonaamidines

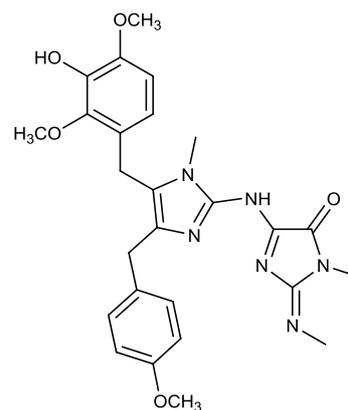
Les naamidines : elles possèdent un cycle imidazolique substitué par trois groupes : deux benzyles en position C-4 et C-5, et un groupement N-méthyl hydantoïne sur le N-6. Les naamidines A, H et I ont été isolées d'un échantillon indonésien (Sulawesi) de *L. chagosensis* [Carmely & Kashman 1987] [Tsukamoto *et al.*, 2007]. La naamidine I possède un groupe hydantoïne modifié, dont l'une de ses fonctions lactames est modifiée en guanidine.



naamidine A 79



naamidine H 80

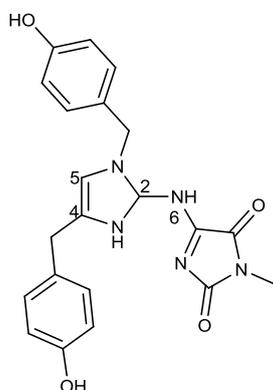


naamidine I 81

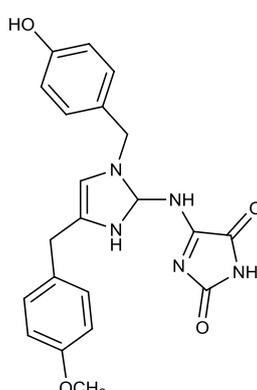
La naamidine A (**79**) possède de nombreuses activités biologiques : c'est un antagoniste du récepteur spécifique du facteur de croissance épidermique EGF et induit ainsi une inhibition totale de la synthèse d'ADN à 0,78 μM après 30h sur des cellules de carcinome squameux [James et al. 2003]. Les naamidines H et I révèlent une activité cytotoxique sur les lignées de cellules tumorales HeLa à des CI_{50} de 6 et 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 12 μM et 30 μM) [Tsukamoto et al., 2007].

Les isonaamidines : elles possèdent un structure proche de celle des naamidines : l' amino-2-imidazole est substitué par un groupement hydantoïne en position N-6, et substituée par des groupes benzyliques en position N-1 et C-4 *meta* ou *para*-substitués (par un phénol ou un méthoxy).

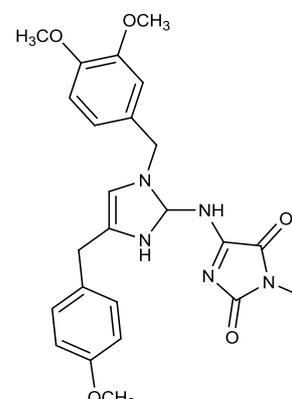
Les isonaamidines A, D et E (**82-84**) ont été isolées d'éponges du genre *Leucetta*, l'isonaamidine E ayant été isolée aussi d'un mollusque nudibranche prédateur [Carmely & Kashman 1987] [Carmely et al. 1989] [Fu et al. 1998] [Gross et al. 2002]. L'isonaamidine D (**83**) possède une modeste activité antifongique sur *Aspergillus niger* avec une CMI = 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (soit 247 μM) [Fu et al. 1998]. L'isonaamidine E est cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires : HMO2, HepG2, et Huh7 avec des CI_{50} entre 1,3 à 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (soit 3 μM et 15 μM) [Gross et al. 2002].



isonaamidine A 82

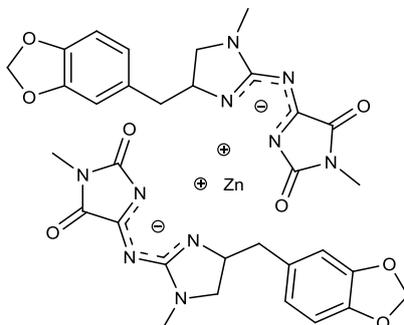


isonaamidine D 83



isonaamidine E 84

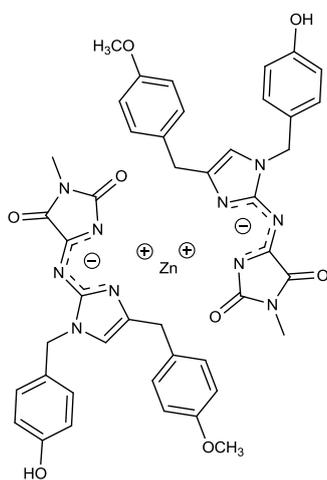
Les complexes de zinc : quelques dimères de ces composés sont formés par complexation d'un atome de zinc. Ils ont été décrits chez des espèces de *Leucetta* et *Clathrina*. Le premier exemple de complexe de zinc est un homodimère de la clathridine A (**85**) isolé de *Clathrina clathrus* [Ciminiello et al. 1989] [Alvi et al. 1993].



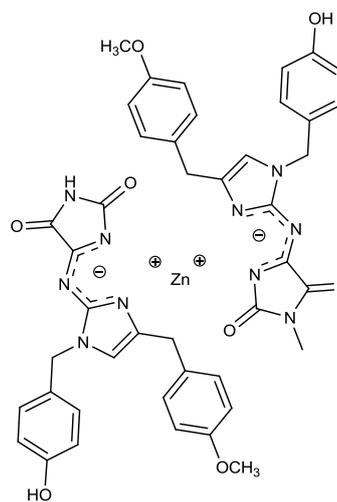
bis-clathridine A-Zn **85**

Chez *L. chagosensis*, on retrouve des complexes de naamidines et d'isonaamidines. Les premiers ont été isolés sous forme d'homodimères de la naamidine A (**86**) et de la naamidine G (**87**), mais également un hétérodimère des deux naamidines A et G (**88**) [Mancini et al. 1995].

Des complexes d'isonaamidines ont également été isolés, soit de deux monomères de même nature (isonaamidine B (**89**)) ou de monomères de nature différente (isonaamidines B et D (**90**)) [Fu et al. 1998].



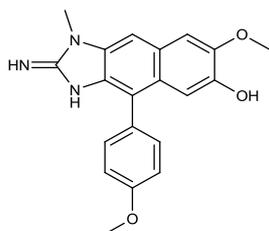
bis-isonaamidine B-Zn **89**



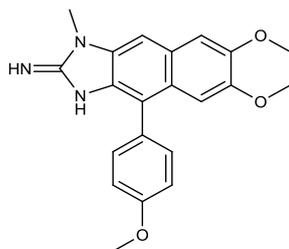
(isonaamidine B-isonaamidine D)-Zn **90**

4.1.3. Catégorie III

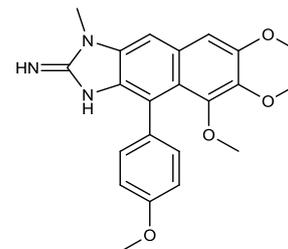
Les kealiinine A, B et C (**91–93**) ont été isolées d'une *Leucetta chagosensis* collectée au nord de Sulawesi en Indonésie. La kealiinine A (**91**) est toxique sur *Artemia* à une dose létale médiane de 20 µg.ml⁻¹ (soit DL₅₀ = 57 µM) [Hassan et al. 2004].



kealiinine A 91

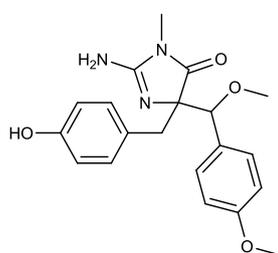


kealiinine B 92

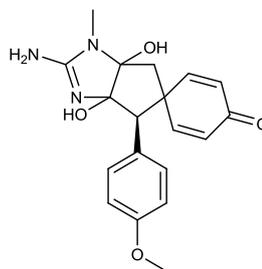


kealiinine C 93

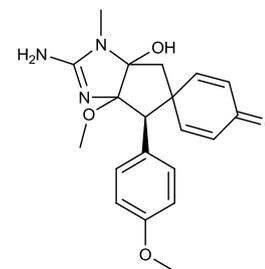
Trois amino-imidazoles chiraux ont été isolés d'une espèce du genre *Leucetta* collectée aux îles Fidji : la calcaridine A (**94**) et les spirocalcaridines A (**95**) et B (**96**) [Edrada et al. 2003]. Les spirocalcaridines semblent être les premiers exemples de composés spiro reliant un cyclodièneone à un cycle à cinq carbones.



calcaridine A 94



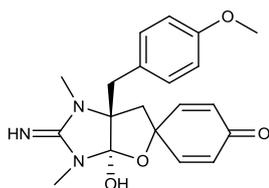
spirocalcaridine 95



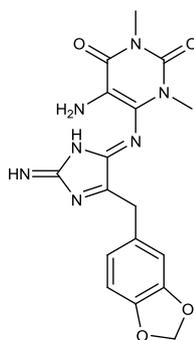
spirocalcaridine B 96

4.1.4. Alcaloïdes de la catégorie IV

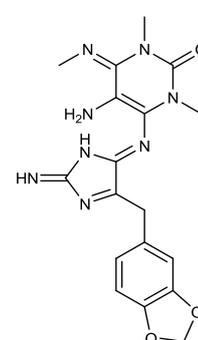
La spiroleucettadine (**97**) isolée d'une espèce du genre *Leucetta* collecté aux îles Fidji est le premier exemple de structure présentant un carbone spiro reliant un cyclodièneone à un oxolane [Ralifo & Crews 2004]. Le spiroleucettadine possède une activité antibactérienne sur *Enterococcus durans* à partir d'une concentration d'inhibition minimale de 6,25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (soit $\text{CIM}_{50} = 17 \mu\text{M}$).



spiroleucettadine 97



leucosolenamine A 98



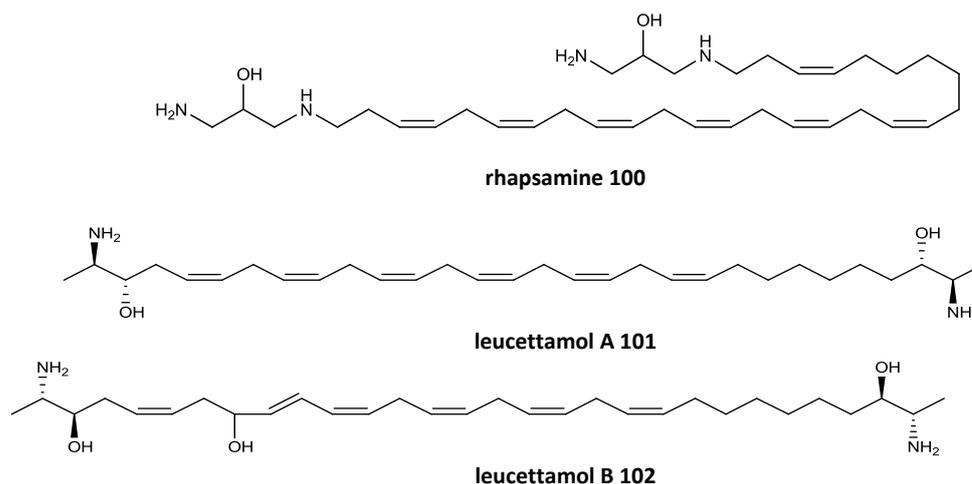
leucosolenamine B 99

Les leucosolenamines A (**98**) et B (**99**) ont été isolées d'une espèce du genre *Leucosolenia* collecté en Papouasie-Nouvelle-Guinée. La leucosolenamine A possède une activité

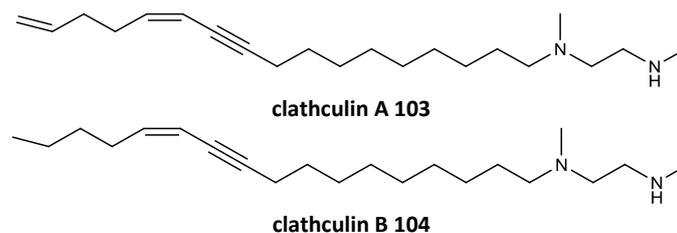
cytotoxique sur la lignée cellulaire C-38 d'adénocarcinome murin du colon à 180 µg/ disque [Ralifo et al. 2007].

4.2. Les alcènes

La rhapsamine (**100**) a été isolée de *Leucetta leptorhaphis* collectée au détroit de McMurdo en Antarctique. Cette chaîne lipidique a montré une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire KB à une dose létale DL = 1,8 µM [Jayatilake et al. 1997].



Les leucettamol A (**101**) et B (**102**) ont été isolés pour la première fois de *Leucetta microraphis*. Ils présentent tous deux une activité antibiotique sur *Bacillus subtilis*. La leucettamol A présente une activité anti-cancéreuse grâce à sa capacité à inhiber la protéine recombinante Ubc13-Uev1A à une concentration d'inhibition médiane $CI_{50} = 106 \mu\text{M}$ [Tsukamoto et al. 2008].

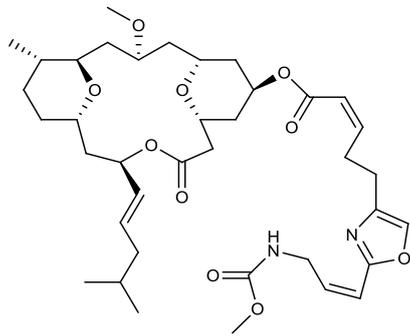


Les clathculin A (**103**) et B (**104**) isolés de *Clathrina aff. reticulum* collectée dans la baie de Sodwana (en Afrique du Sud) sont constitués d'une chaîne aliphatique contenant un 1,2-diaminoéthane.

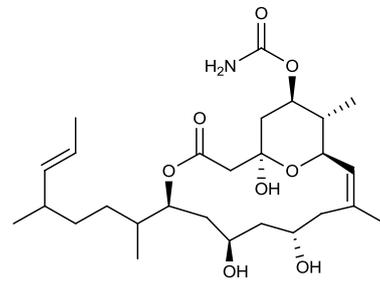
4.3. Les macrolides

Les leucascandrolides A (**105**) et B (**106**) ont été isolés de *Leucascandra caveolata* collectée sur la côte-est de la Nouvelle Calédonie. Le leucascandrolide A possède une activité cytotoxique à $CI_{50} = 0,05 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 0,07 µM) sur les lignées cellulaires KB et à $CI_{50} = 0,25$

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (soit $0,36 \mu\text{M}$) sur P388 ainsi qu'une activité antifongique sur *Candida albicans* [D'Ambrosio et al. 1996].



leucascandrolide A 105



leucascandrolide B 106

3. ETUDE CHIMIQUE :

extraction et isolement

Un criblage des extraits d'organismes marins provenant des différentes campagnes de prospection menées par l'IRD en Polynésie française a été effectué sur l'inhibition de la bioluminescence de *V. harveyi*. Environ 350 extraits ont été testés au laboratoire parmi lesquels 26 % environ ont montré une activité inhibitrice de la bioluminescence de cette bactérie [Tintillier, 2015]. Trois éponges marines ont ainsi été sélectionnées pour poursuivre l'étude chimique et isoler des inhibiteurs du *quorum sensing* de *V. harveyi* : *Cacospongia* sp. 2110⁴, *Dysidea* sp. 2669 et *Leucetta chagosensis*. Cette sélection a été effectuée sur des critères d'activité, mais aussi de taxonomie afin de rechercher la meilleure diversité de structures actives.

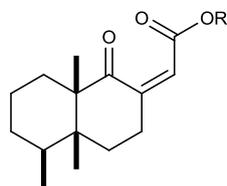
Dans une première partie est présenté le travail effectué sur l'isolement des molécules, et la deuxième partie est consacrée à leurs activités biologiques sur le QS.

1. Etude de *Cacospongia* sp. 2110

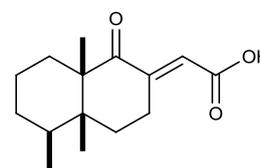
1.1. Travaux antérieurs sur le genre *Cacospongia*

Les sesterterpènes composent principalement les métabolites secondaires isolés du genre *Cacospongia*. Nombre d'entre eux sont antibiotiques, anti-appétant et cytotoxiques. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

1.1.1. Les sesterterpènes



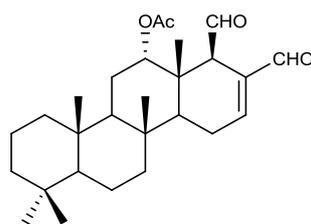
acide aignopsanoïque A 107 R = H
aignopsanoïque méthyl 108 R = CH₃



acide isoaignopsanoïque A 109

Trois sesterterpènes ont été isolés de *Cacospongia mycofijiensis* collecté en Papouasie Nouvelle Guinée : l'acide aignopsanoïque A (**107**), l'aignopsanoïque méthylé (**108**) et l'acide isoaignopsanoïque A (**109**). L'acide aignopsanoïque A (**107**) et l'aignopsanoïque méthylé (**108**) inhibent l'activité du parasite *Trypanosoma brucei* (responsable de la maladie du sommeil) aux concentrations d'inhibition médiane respectives $CI_{50} = 6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 24 μM) et 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 61 μM) [Johnson et al. 2009].

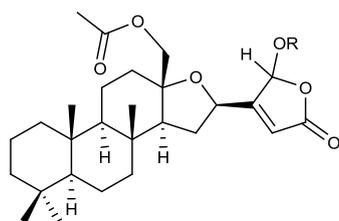
⁴ Les éponges sont identifiées à l'espèce quand elles sont connues et parfaitement décrites, ou dans le cas contraire, un N° d'OTU (operational taxonomic unit) leur est attribué [Hooper et al. 2013]



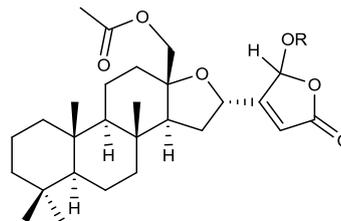
scalaradial 110

La scalarine (**47**) et le scalaradial (**110**) ont été isolés de *C. scalaris* [Fattorusso et al. 1972]. Le scalaradial permet à l'éponge de se défendre contre les prédateurs, notamment des nudibranches (*Glossodoris pallida*) ou des poissons grâce à son activité anti-appétante [Becerro et al. 1998]. Le scalaradial est également cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses T47D et HCT116 impliquées respectivement dans les cancers du sein et du colon [De Stefano et al. 2012].

Deux autres sesterterpènes de *Cacospongia* cf. *linteiformis* (des Caraïbes), les lintenolides A (**111**) et B (**112**) sont des anti-appétants à 30 µg par cm² de pastille de nourriture [Conte et al. 1994].

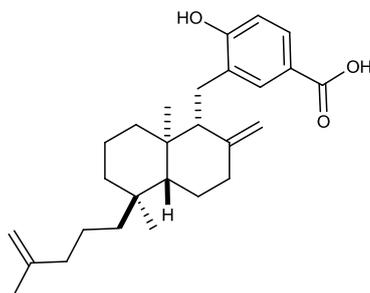


lintenolide A 111

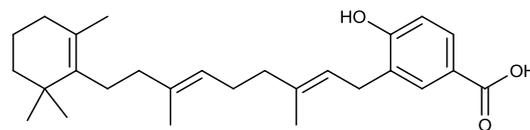


lintenolide B 112

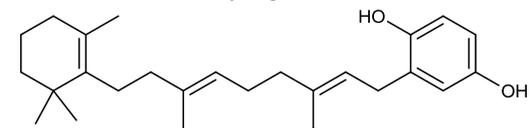
Des composés antibiotiques (**113-115**) sur *Staphylococcus epidermidis* ont été isolés d'une éponge du genre *Cacospongia*. L'acide isojaspic (**113**), cacospongine D (**114**), jaspaquinol (**115**) ont montré des activités antibiotiques à des concentrations minimum d'inhibition de respectivement 2,5 µg.ml⁻¹, 20 µg.ml⁻¹ et 5 µg.ml⁻¹ (soit 6,1 µM, 49 µM et 13,1 µM) [Rubio et al. 2007].



acide isojaspic 113

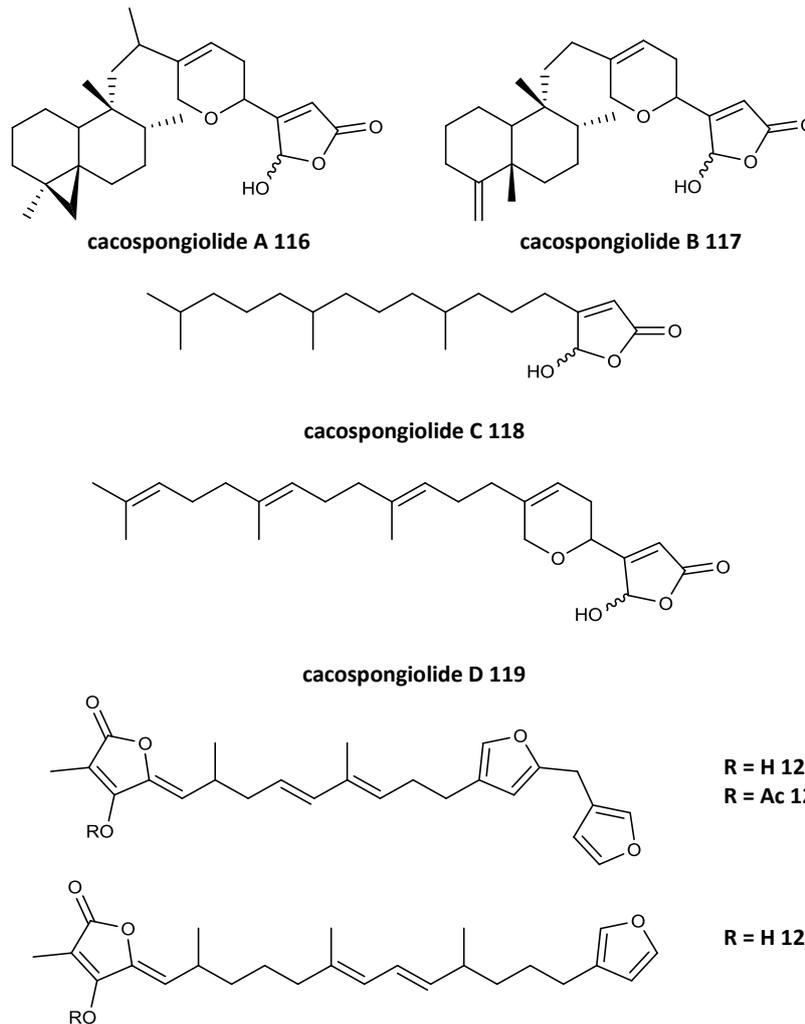


cacospongine D 114



jaspaquinol 115

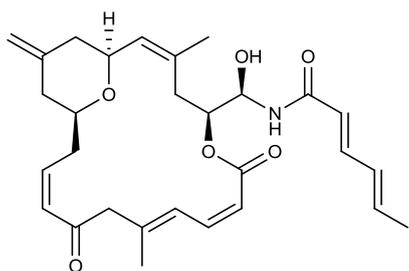
Les cacospongiolides A-D (**116-119**) ont été isolés de *Faciospongia cavernosa* (= *Cacospongia mollior*). Les cacospongiolides A (**116**), B (**117**) et D (**119**) ont montré des activités cytotoxiques [Ebada et al. 2010].



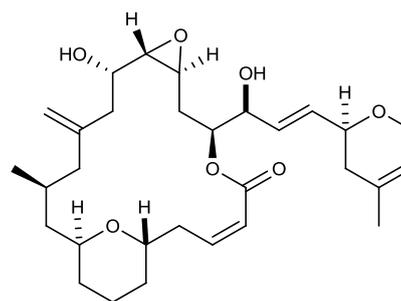
Les furanoterpène (**120**) et (**121**) de *C. scalaris* inhibent la division cellulaire des œufs d'étoile de mer et présentent une activité antibiotique sur *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* [Fusetani et al. 1984].

1.1.2. Les macrolides

Le zampanolide (**123**) isolé de *C. mycofijiensis* collecté au îles Tonga est un stabilisant de microtubule qui lui confère une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires HL-60 et 1A9 (carcinome ovarien) à respectivement $CI_{50} = 4,3$ nM et 14,3 nM [Field et al. 2009]. Le laulimalide (**124**) est un macrolide isolé de *C. mycofijiensis* pourvu d'une activité stabilisante des microtubules. C'est également un agent anticancéreux en phase préclinique [Newman & Crogg, 2004].



zampanolide 123



laulimalide 124

1.1.3. Présentation de l'éponge

Le genre *Cacospongia* appartient à la famille Thorectidae de l'ordre Dictyoceratida (classe des Démosponges). L'éponge étudiée porte le numéro OTU 2110. Sa couleur tend vers le jaune verdâtre (*in situ* et *ex situ*) et sa surface est hérissée.



Figure 24 : *Cacospongia* sp. 2110 *in situ*

1.2. Etude chimique de *Cacospongia* sp. 2110

1.2.1. Collecte de l'éponge

Le lot étudié P327 a été collecté à Rangiroa dans l'archipel des Tuamotu à la station TRAN09 (Figure 27).

1.2.2. Extraction et purification des composés de *Cacospongia* sp. 2110

Un isolement bioguidé a été effectué. Après une extraction hydro-alcoolique de 400 g de poudre lyophilisée du lot P327-TRAN09, l'extrait brut est partagé entre l'eau et le cyclohexane puis entre l'eau et le dichlorométhane. La purification du brut cyclohexane a conduit à 22 fractions dont 3 actives sur la luminescence de *V. harveyi* : les fractions 9 à 11. L'analyse en CLHP des trois fractions actives montre un pic à 11,7 minutes.

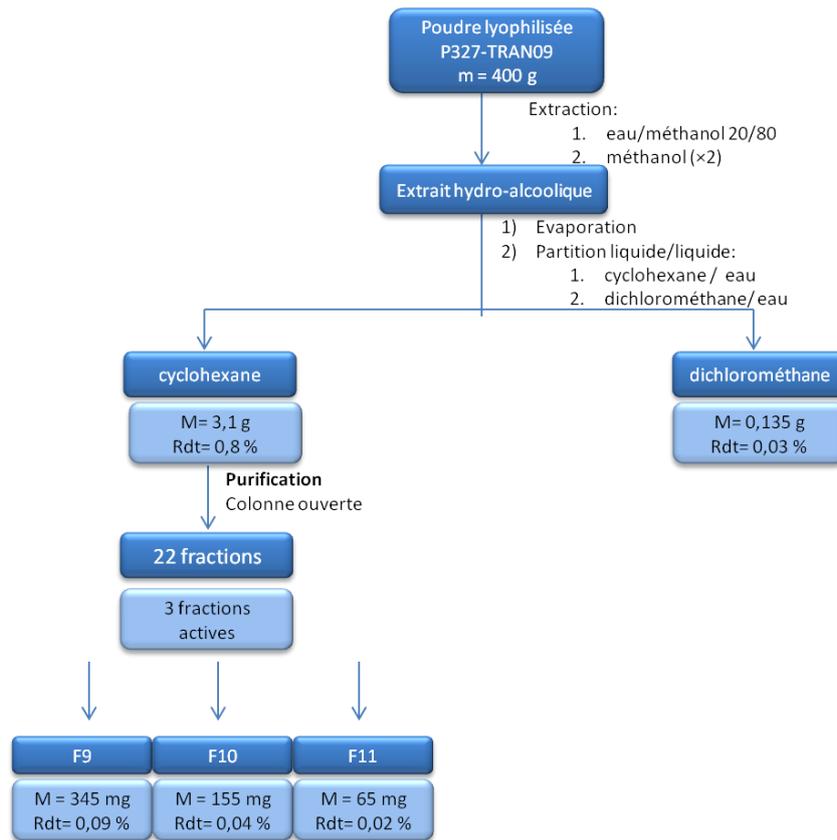
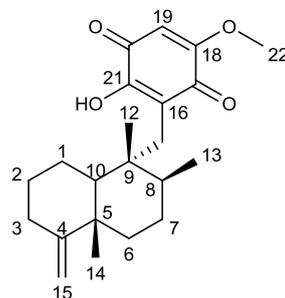


Figure 25 : Schéma de purification des molécules de *Cacospongia* sp. 2110

1.2.2.1. Etude de la molécule isolée

Le **composé C1** est un solide de couleur rouge. L'ion moléculaire à $[M+H]^+$ 359, 2208 correspond à la formule brute $C_{22}H_{30}O_4$. Après comparaison sur la base de données Marinlit® cette masse moléculaire permet de rapprocher la structure du composé isolé à celle de l'ilimaquinone.

Afin de confirmer la structure, les déplacements chimiques ^{13}C et 1H de cette molécule isolée de *Cacospongia* sp. sont comparés à la littérature (Tableau 5).



ilimaquinone 125

Tableau 5 : Comparaison des données ^{13}C et ^1H du composé C1 et de l'ilimaquinone (**125**)

position	ilimaquinone (125) CDCl ₃		Composé C1 CDCl ₃	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	2.08/ 1.42	23.34	1.42/2.08	23.56
2	1.84/ 1.16	28.11	1.17/ 1.86	29.02
3	2.29/ 2.05	33.13	2,33/ 2,05	33.35
4		160.69		160.91
5		40.63		40.99
6	1.49/ 1.32	36.82	1.51/ 1.36	37.04
7	1.37	28.8	1.39	28.33
8	1.14	38.25	1.14	38.4
9		43.5		43.72
10	0.74	50.3	0.79/ 0.75	50.54
11	2.51/ 2.45	32.52	2.52	32.75
12	0.82	17.52	0.85	17.73
13	0.96	18.01	0.97	18.23
14	1.02	20.73	1.04	20.95
15	4.43/ 4.41	102.66	4.44/ 4.43	102.87
16		117.49		117.74
17		182.2		182.24
18		161.9		162.14
19	5.83	102.17	5.85	102.38
20		182.51		182.74
21		153.49		153.7
22	3.84	57.01	3.86	57.22
23			7.47	
OH				

Les déplacements chimiques de la molécule de *Cacospongia* sp. sont similaires à ceux de l'ilimaquinone. Le **composé D1** est donc l'ilimaquinone (**125**).

1.3. Conclusion et discussion

L'ilimaquinone a été isolé pour la première en 1979 de *Hippospongia metachromia*. Elle est présente dans la majorité des espèces du genre *Dactylospongia* notamment en Polynésie française [Boufridi 2014]. L'ilimaquinone est un méroterpène composé d'un terpène bicyclique substitué d'une *para*-quinone.

L'ilimaquinone est cytotoxique sur de nombreuses lignées cellulaires : PC3 et LNCaP (cellules cancéreuses de la prostate), A549 (cellules cancéreuses du poumon), Hep3B (cellules cancéreuses du foie) et HCTT 116 [Gordaliza 2010] [Do et al. 2014]. L'ilimaquinone inhibe la phase G1 du cycle cellulaire et interagit avec les facteurs de transcription CHOP/GADD153. L'ilimaquinone possède également une activité anti-HIV et

fragmente l'appareil de Golgi. Elle est commercialisée par plusieurs fournisseurs comme outil pharmacologique.

2. Etude de *Dysidea* sp. 2669

Cette éponge a été sélectionnée pour l'étude de son activité inhibitrice du QS détectée sur l'extrait standardisé, malgré un léger effet antibiotique et qui présente aussi des activités inhibitrice de l'acétylcholinestérase et cytotoxique.

2.1. Travaux antérieurs sur le genre *Dysidea*

Le genre *Dysidea* appartient à la famille des Dysideidae de l'ordre des Dictyoceratida de la classe des Démosponges [www.marinespecies.org].

Ce genre est l'un des plus étudiés, avec plus de 500 composés isolés (source MarinLit®). Ces éponges sont présentes dans la Mer Rouge, l'océan Indien (Madagascar, Malindi au Kenya, Mozambique) et dans la zone indo-Pacifique [www.marinespecies.org].

Sa morphologie est très variable ce qui en rend l'identification difficile. La plupart des identifications s'appuie sur l'analyse chimique de l'éponge [Carballo et al. 2006].

En Polynésie française, l'échantillon étudié a été collecté dans les archipels de la Société, des Tuamotu et des Australes. L'espèce n'a pas été nommée, mais porte le N° d'OTU 2669 [Hooper et al. 2013]: c'est une démosponge encroûtante de couleur marron (Figure 26) [www.spongemaps.org].



Figure 26 *Dysidea* sp. 2669 in situ

La composition chimique du genre *Dysidea* est caractérisée par la présence de nombreux terpènes (en particulier des sesquiterpènes) [Gordaliza 2010] [Jiao, Xu, Gu, et al. 2015], des polybromodiphényl éthers (PBDEs) [Venkateswarlu et al. 1998] [Zhang et al. 2008] [Sionov et al. 2005] [Srikanth Reddy et al. 2012], et des alcaloïdes chlorés [Werner & Willie E 1977] [Kazlauskas et al. 1978] [Clark & Crews 1995] [Xiong Fu et al. 1998]. Dans ce genre, existent deux chimiotypes : des espèces qui produisent uniquement des PBDEs et celles qui produisent des alcaloïdes polychlorés et/ou des terpènes [Unson et al. 1994] [Erpenbeck et al. 2012].

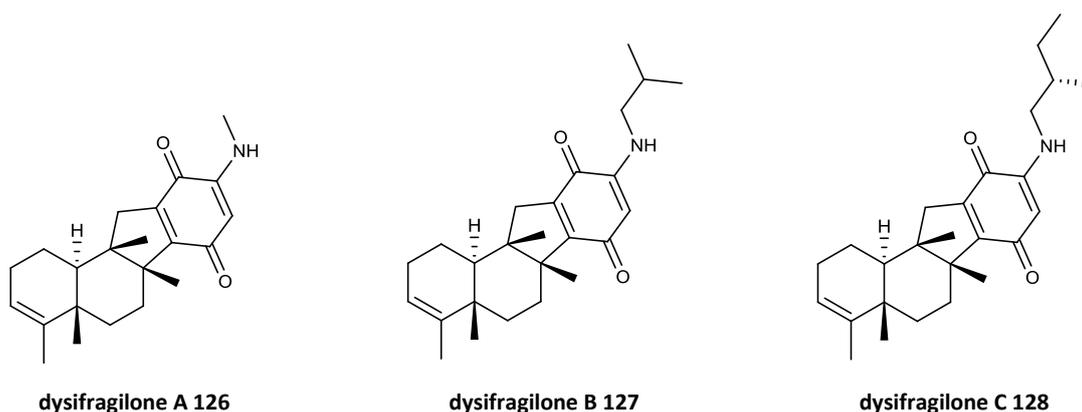
2.1.1. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes isolés du genre *Dysidea* se composent généralement d'un squelette de drimane substitué par une quinone ou un diphénol. Ces composés proviennent de deux voies de biogenèse, les voies du mévalonate (partie terpénique) et du shikimate (partie aromatique), et sont nommés méroterpènes [Genta-Jouve & Thomas 2012]. Cette famille de molécules est présente dans de nombreuses éponges de l'ordre des Dictyoceratida. D'après la revue de Marcos [Marcos et al. 2010], ces méroterpènes possèdent un large spectre d'activités biologiques telles que des activités anti-virales (VIH), anti-tumorales, cytotoxiques et anti-inflammatoires, ce manque de spécificité étant lié à la fonction quinone.

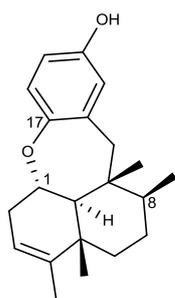
Le premier méroterpène isolé de cette famille est le composé majoritaire de *Dysidea avara* (récoltée en Méditerranée), l'avarol (**52**), co-isolé avec son analogue l'avarone (**53**). Ce composé aux nombreuses activités biologiques a fait l'objet de plus de 100 publications [Tommonaro et al. 2015].

Parmi les activités biologiques de l'avarol (**52**), on peut citer son activité inhibitrice modérée de l'acétylcholinestérase impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

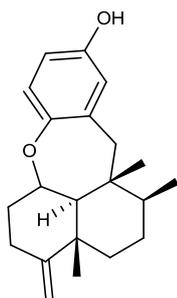
Parmi les sesquiterpènes actifs isolés récemment du genre *Dysidea*, on peut citer les sesquiterpènes aminoquinoniques isolés de *D. fragilis* : les dysifragilones A, B et C (**126-128**). Ces composés ont montré une activité inhibitrice de l'oxyde nitrique synthase avec respectivement des CI_{50} de 7 μ M, 10 μ M et 17 μ M [Jiao, Xu, Zhao, et al. 2015].



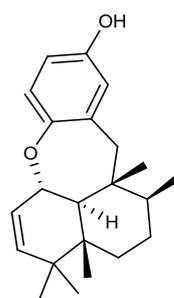
On peut également citer des molécules d'une autre famille de sesquiterpènes, les sesquiterpènes diphénoliques cyclisés comme par exemple les dysiquinols. Les dysiquinols A à D (**129 – 132**) ont été isolés de *D. avara* (collectée autour de l'île de Xisha, au sud de la Chine) [Jiao, Xu, Gu, et al. 2015]. Ces composés ont été testés sur la lignée cellulaire NCI-H929 (cellules cancéreuses du myélome) et la protéine NF κ B impliquée dans l'apoptose.



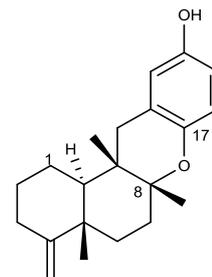
dysiquinol A 129



dysiquinol B 130



dysiquinol C 131

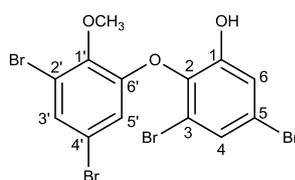


dysiquinol D 132

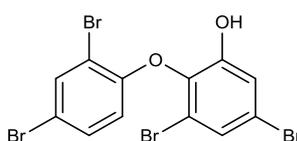
Parmi ces quatre composés, seul le dysiquinol D (**115**) a montré une activité cytotoxique ($CI_{50} = 2,81 \mu M$) et une activité inhibitrice de la protéine NF κ B ($CI_{50} = 0,81 \mu M$). Son activité inhibitrice de NF κ B serait liée à la cyclisation en C-8 du phénol en C-17, les autres étant cyclisés sur le carbone C-1 du drimane.

2.1.2. Les éthers diphenyl-bromés

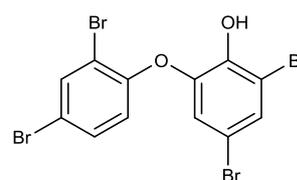
Les polybromophénols et les polybromodiphényl éthers (PBDEs) possèdent de nombreuses activités.



2-(2',4'-dibromophenoxy)-3,5-dibromophénol 133



2-(1',3'-dibromophenoxy)-3,5-dibromophénol 134



2-(2',4'-dibromophenoxy)-4,6-dibromophénol 135

Parmi ces composés présentant une activité biologique, on peut citer le 2-(2',4'-dibromophenoxy)-3,5-dibromophénol (**133**) isolé de *D. herbacea* (collectée sur les côtes du Zanzibar). Cette molécule possède des activités antifongiques modérées sur des espèces des genres *Candida* et *Aspergillus* (CMI comprises entre $3,7 \mu M$ et $15 \mu M$ [Sionov et al. 2005]).

On peut également citer le 2-(1',3'-dibromophenoxy)-3,5-dibromophénol (**134**) isolé d'une espèce non identifiée du genre *Dysidea* : cette molécule a montré une activité inhibitrice des protéines kinases sérine/ thréonine et tyrosine de *Streptomyces* 85 E et une activité antiproliférative sur la lignée cellulaire MCF-7 (lignée cellulaire tumorale mammaire), avec une $CI_{50} = 3 \mu M$ [Zhang et al. 2008].

Une autre espèce, *D. granulosa* collectée près de l'île de Lakshadweep (dans l'océan Indien), a permis l'isolement d'une molécule antibactérienne (**135**) sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes ou sensibles à la méthicilline, d'*Enterococcus* résistantes ou sensibles à la vancomycine, et une souche de *Bacillus* spp.. Ce composé est actif sur les

souches de *Staphylococcus* et *Enterococis* résistantes aux antibiotiques commercialisés avec des CMI comprises entre 0,24 μM et 5,03 μM [Shridhar et al. 2009]. Une équipe s'est intéressée à la synthèse de dérivés de cette molécule et l'évaluation de leur cytotoxicité. Ces dérivés et la molécule naturelle ont été testés sur les lignés cellulaires leucémiques HL-60 (cellules myéloïdes) et U937 (cellules lymphoïdes) et a permis de montrer que seule la molécule naturelle (2-(2',4'-dibromophenoxy)-4,6-dibromophénol) (**35**) est active à 38,8 μM (sur HL-60) et 45,3 μM (U937) [Srikanth Reddy et al. 2012].

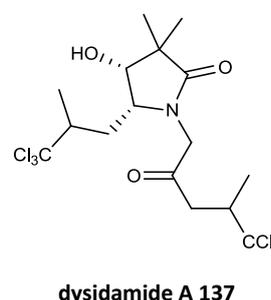
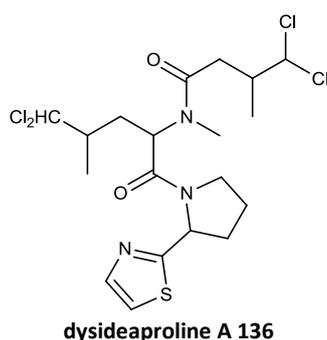
D'après les travaux de Unson *et al.*, les polybromodiphényl éthers proviennent d'un symbiote cyanobactérien *Oscillatoria spongelliae* [Unson et al. 1994].

2.1.3. Les alcaloïdes chlorés

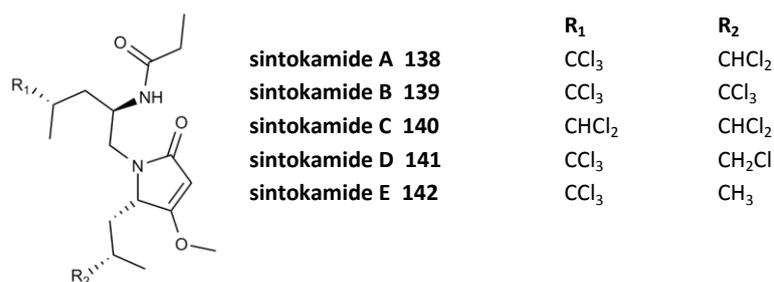
Le genre *Dysidea* renferme de nombreux composés chlorés : des peptides chlorés et des dicétopipérazines [Kazlauskas et al. 1978]. La plupart des acides aminés chlorés proviennent de la 5,5,5-trichloroleucine et ont été isolés d'éponges marines, de nudibranches (prédateurs d'éponges) et de cyanobactéries.

2.1.3.1. Les peptides chlorés

Les analogues d'acide aminés chlorés dérivent de la leucine. Ces composés tiendraient leur origine des cyanobactéries *Oscillatoria spongelliae* [Clark & Crews 1995] [Zhang et al. 2008]. Certaines molécules peuvent être substituées par un groupe dichloré, et parfois aussi d'un noyau thiazole comme par exemple dans la dysidéaproline A (**136**). Le dysidamide A (**137**), isolé d'un échantillon de *Lamellodysidea herbacea* de Mer Rouge, possède une activité neurotoxique sur deux lignées cellulaires du mésencéphale et du cortex murin à 1,70 μM [Sauleau et al. 2005].



Cinq dérivés chlorés, les sintokamides A-E (**138** – **142**) ont été isolés de *Dysidea* sp. collectée en Indonésie, mais un seul d'entre eux, le sintokamide A (**138**) possède une activité antagoniste du récepteur androgène de cellules cancéreuses de la prostate [Sadar et al. 2008].



Les dioxopipérazines chlorées sont des cyclopeptides issus de la condensation de deux acides aminés. Dans le genre *Dysidea*, les dioxopipérazines sont souvent chlorées. Le dysamide A (**143**) et B (**144**) par exemple sont substitués respectivement de groupes trichloré et dichloré. Les dysamides A et B ont montré des activités antibiotiques sur des bactéries des genres *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Escherichia* à 0,01 mg/ disque.



2.2. Etude chimique de *Dysidea* sp. 2669

2.2.1. Collecte des lots d'éponge marine

Cette éponge est présente dans les archipels des Tuamotu, de la Société et des Australes. Les lots étudiés ont été collectés dans l'archipel des Tuamotu : à Anuanuaro (TA02 : 20°25.394'S, 143°32.930'W) et à Rangiroa (TRAN06 : 14°55.927'S, 147°43.329'W et TRAN09 : 14°57.569'S, 147°38.039'W ; échantillons réunis), à des profondeurs comprises entre 45 et 70 mètres.

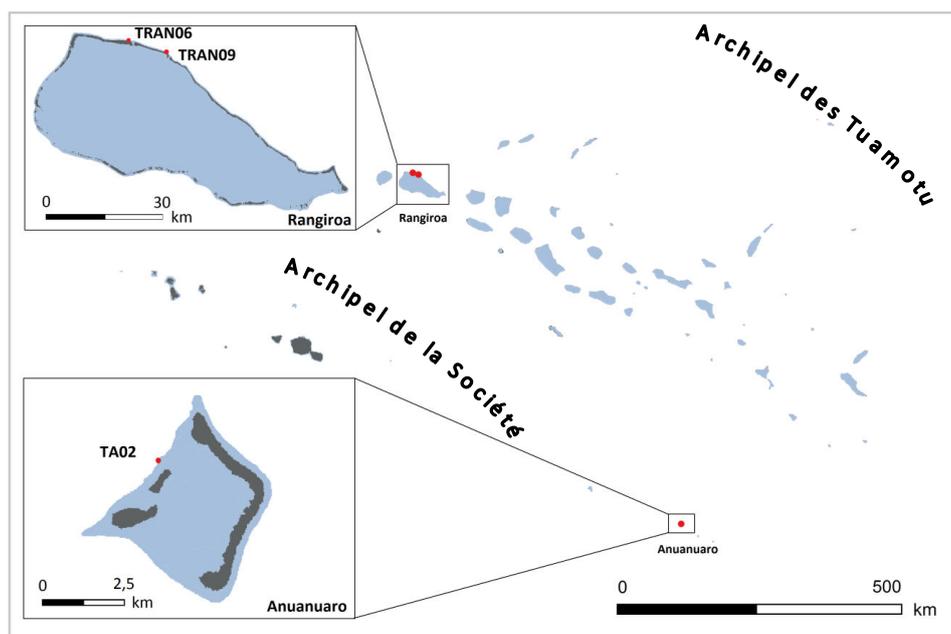


Figure 27 : Carte de localisation des sites de collectes (points rouges) des lots de *Dysidea* sp. 2669 étudiés

2.2.2. Comparaison de la diversité chimique des différents lots de l'éponge

Les poudres lyophilisées (m = 20 g) de chaque lot sont extraites sous agitation et à température ambiante, par un mélange éthanol / eau (80/20) puis de l'éthanol 80 %. L'extrait obtenu est évaporé puis séparé entre l'eau et le cyclohexane, puis entre l'eau et le chlorure de méthylène.

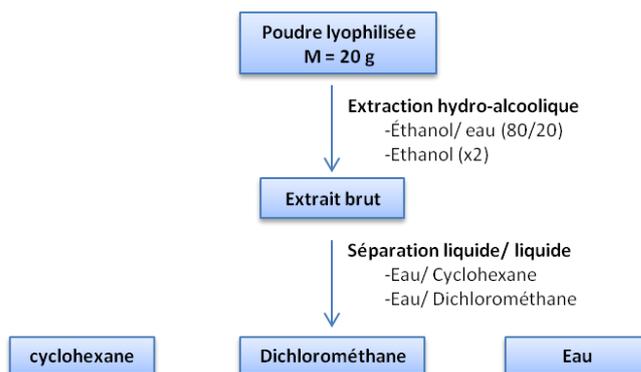


Figure 28 : Schéma d'extraction utilisé pour la comparaison chimique des lots de *Dysidea* sp.

Les extraits cyclohexanique et chlorométhylénique bruts de chaque lot sont analysés en chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase normale couplée aux détecteurs à diffusion de lumières (DDL) et à barrettes de diodes (UV).

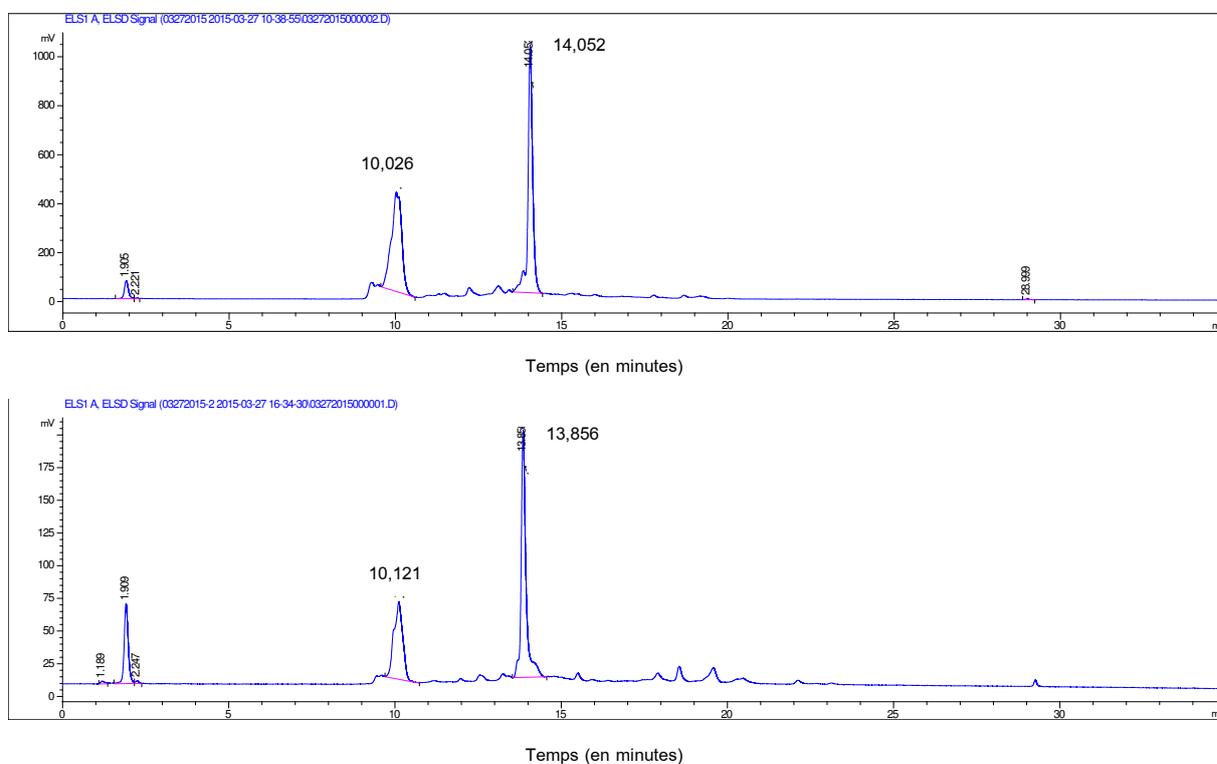


Figure 29 : Profil chromatographique par détection DDL des bruts cyclohexaniques des lots (A) P319-Rangiroa et (B) du lot P237-Anuanuaro

Les différents extraits bruts des lots collectés à Rangiroa et Anuanuaro présentent tous deux le même profil chromatographique. Les chromatogrammes des bruts cyclohexaniques présentés sur la Figure 29 montrent que deux composés majoritaires sont visibles par détection DDL aux temps de rétention (t_R) de 11 minutes et 14 minutes.

Le composé à $t_R = 11$ minutes n'absorbe pas en UV alors que celui à $t_R = 14$ minutes présente un spectre avec une absorbance maximale à $\lambda = 315$ nm.

2.2.3. Extraction et la purification des composés de *Dysidea* sp. 2669

La poudre lyophilisée du lot P237-TA02 de *Dysidea* sp. 2669 a été extraite par du méthanol sous agitation à température ambiante. Après évaporation sous vide du méthanol, l'extrait est partagé successivement entre l'eau et le cyclohexane, puis entre l'eau et le dichlorométhane.

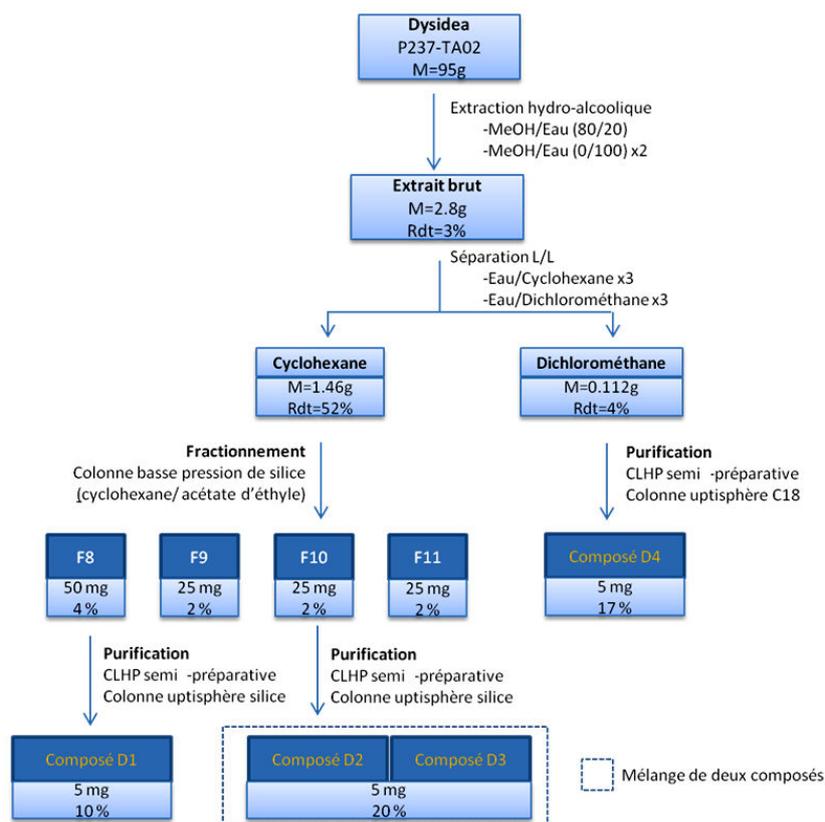


Figure 30 : Schéma de purification des molécules de *Dysidea* sp. 2669

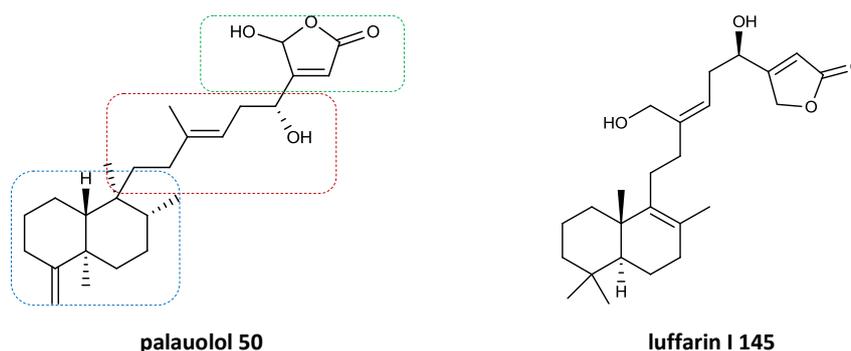
Il est à noter que les activités QSI et antibiotique de l'extrait standardisé obtenues sur le criblage sont retrouvées, mais dans des extraits différents, le brut cyclohexanique (QSI) et le brut chlorométhylénique (antibiotique).

Le fractionnement puis la purification du brut cyclohexanique ont conduit à l'isolement de 3 composés : une molécule purifiée et un mélange de deux composés qui n'ont malheureusement pas pu être séparés.

2.2.3.1. Etude des molécules isolées

Composé D1 (extrait cyclohexanique)

Le **composé D1** est un solide de couleur brune. La LC-MS en mode d'ionisation positif indique la présence d'un pic moléculaire à m/z 403,2865 compatible avec la formule brute $C_{25}H_{38}O_4$. Cette masse moléculaire permet de rapprocher la structure du composé D1 du palauolol (**50**) [Schmidt & Faulkner 1996] et de la luffarine I (**145**) [Butler & Capon 1992]. Le palauolol se compose d'une lactone, d'une chaîne aliphatique et d'un drimane (figure 25)



Le spectre RMN ^{13}C indique la présence d'un carbonyle caractéristique d'une lactone à 171 ppm (C-19), d'un hémiacétal à 97,8 ppm (C-25), et d'un carbone quaternaire à 168,7 ppm (C-17). L'analyse HMBC montre une corrélation du proton éthylénique à 6,08 ppm (H-25) avec le carbonyle à 171 ppm (C-19) et l'hémiacétal à 97,8 ppm (C-25).

Le composé D1 est donc constitué d'une lactone mono-substituée comme dans la structure du palauolol ((**50**) encadré vert). La comparaison des données 1H et ^{13}C avec le palauolol (**50**) confirme la structure de la lactone (Tableau 6) [Schmidt & Faulkner 1996].

Tableau 6 : Comparaison partielle des données 1H et ^{13}C du composé D1 (enregistré dans du $CDCl_3$) et du palauolol (enregistré dans du CD_3OD) [Schmidt & Faulkner 1996]. Les numéros (n°) 11 à 16 correspondent aux positions de la chaîne aliphatique et n° 17 à 19 à la lactone.

n°	Composé D1 $CDCl_3$		palauolol CD_3OD	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C
11	1,42	35,2	1,24/ 1,34	38,2
12	1,90/ 1,68	34,7	1,86/1,74	34,3
13		142		140,6
14	5,1 (J = 6,4 Hz)	116,9	5,21 (J = 6,5 Hz)	119,7
15	2,45	34,8	2,35/ 2,45	36
16	4,62 (J = 6 Hz)	68,2	4,54 (J = 5 Hz)	69,1
17		168,7		173
18	6,06	118,1	5,98	117,8
19		171		173
20	0,98 s	27,4	4,49	103,2
21	0,96 s	27,9	1,05	21,5
22	0,82/0,81 (J = 6,8 Hz)	16,3	0,81 (J = 6,5 Hz)	16,4
23	0,79 s	21,3	0,74	18,7
24	1,63 s	16,9	1,62	16,7
25	6,06 s	97,8	6,01	99,7

Le spectre RMN ^1H indique la présence d'un proton éthylénique à 5,1 ppm (H-14) et d'un méthyle déblindé à 1,63 ppm (H-24). Le spectre RMN ^{13}C montre un signal à 68,2 ppm (C-16) correspondant à un carbone lié à un oxygène et un carbone quaternaire déblindé à 142 ppm (C-13).

L'expérience COSY montre une corrélation entre le proton éthylénique à 5,1 ppm (H-14) et les protons à 2,45 ppm (H-15) ainsi qu'une corrélation du signal à 2,45 ppm (H-15) avec le proton à 4,62 ppm (H-16) (Figure 31. Fragment 1). Une autre corrélation entre le proton à 1,42 ppm avec le signal à 0,82 ppm est également mise en évidence (Figure 31. Fragment 2)

L'analyse HMBC présente une corrélation du méthyle à 1,63 ppm (H-24) avec les carbones à 116,9 ppm (C-14), à 34,8 (C-15) et le carbone quaternaire à 142 ppm (C-13).

L'analyse structurale et la comparaison du composé D1 au palauolol montre que le composé D1 possède d'une chaîne aliphatique substituée d'un hydroxyle comme dans le palauolol (carré rouge et Tableau 6).

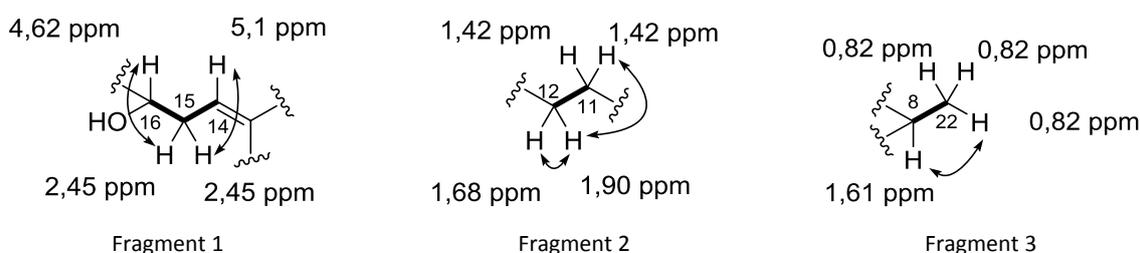


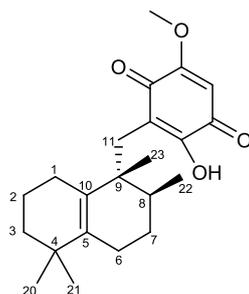
Figure 31 : Schéma des corrélations COSY du composé D1

Le spectre RMN ^1H indique la présence d'un *gem*-diméthyle sous forme de singulet à 0,98 et 0,96 ppm, d'un méthyle sous forme de singulet à 0,79 ppm et d'un méthyle sous forme de doublet à 0,82 ppm. Le spectre RMN ^{13}C montre la présence d'un carbone à 33,8 ppm, de deux carbones quaternaire à 34,6 ppm et 40,8 ppm, et d'un alcène à 132 ppm et 137,4 ppm suggérant la présence d'une double liaison tétrasubstituée.

En COSY, le méthyle à 0,82 ppm (H-22) corrèle au méthine à 1,61 ppm (H-8) (Figure 31, fragment 3). En HMBC les deux méthyles du *gem*-diméthyle corrèlent avec le carbone quaternaire à 34,6 ppm (C-4).

L'expérience HMBC présente une corrélation du proton à 0,79 ppm (H-23) avec les carbones du méthine à 33,8 ppm (C-8), du méthylène à 35,2 ppm (C-11) et de l'alcène à 132 ppm. La corrélation HMBC du proton à 0,98 (H-20) avec le carbone à 137,4 ppm (C-5) et la corrélation du méthyle à 0,79 ppm (H-23) avec le carbone à 132 ppm suggère l'emplacement de la double liaison en position C-5 et C-10.

Le composé D1 semble donc posséder un drimane avec une double liaison en C-5 et C-10 comme dans la structure du neomamanuthaquinone (**146**).



neomamanuthaquinone 146

La comparaison des données ^1H et ^{13}C du composé D1 avec celles du neomamanuthaquinone (**146**) (tableau 27) permet de confirmer la structure du drimane [Yong et al. 2008].

Tableau 7 : Comparaison des données ^1H et ^{13}C de la partie drimane du composé D1 et du neomamanuthaquinone [Yong et al. 2008]

n°	Composé D1 CDCl_3		neomamanuthaquinone 129 CDCl_3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	1.95	25.4	1.38/ 2.10	25.5
2	1.59	20.2	1.61	20
3	1.343/ 1.397	40.2	1.37/ 1.40	40
4		34.6		34.5
5		137.4		135
6	1.75/ 1.97	26.1	1.88/ 2.02	25.5
7	1.313/ 1.456	27.5	1.88/ 2.10	21.5
8	1.59	33.8	1.52	34.8
9		40.8		43
10		132		131.5

La structure finale du composé D1 apparaît être un nouvel analogue du palauolol (**50**) avec une chaîne ramifiée identique à celle du palauolol et un drimane insaturé en position C-5 et C-10 (

Figure 32).

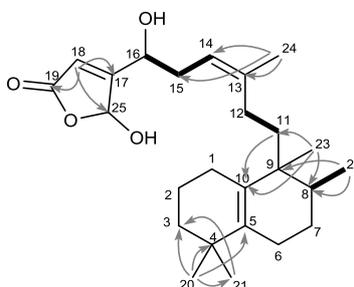


Figure 32 Structure chimique du composé D1 (**147**)

Tableau 8 : Données ^1H RMN et ^{13}C RMN, corrélations COSY et HMBC du composé D1 (**147**)

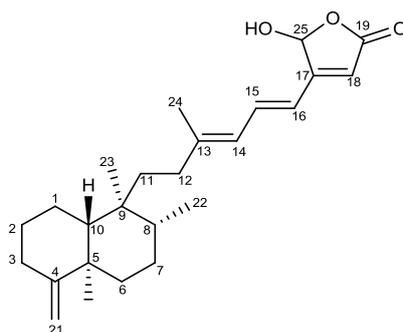
	^1H	^{13}C	COSY	HMBC
1	1,95	25,4		
2	1,59	20,2		
3	1,343/ 1,397	40,2		
4		34,6		
5		137,4		
6	1,75/ 1,97	26,1		
7	1,313/ 1,456	27,45		
8	1,61	33,8		
9		40,8		
10		132		
11	1,42 s	35,2	H-12	C-8/ C-9/ C-10
12	1,90/ 1,68	34,7	H-11	
13		142		
14	5,1 (J = 6,4 Hz)	116,9	H-15	C-24/ C-25
15	2,45	34,8	H-14/ H-16	
16	4,62 t (J = 6 Hz)	68,2	H-15	
17		168,7		
18	6.06	118,1		C-19 / C-18
19		171		
20	0,98 s	27,4		C-21/ C-4 / C-3/ C-5
21	0,96 s	27,9		C-20/ C-4 / C-3
22	0,82/0,81 d (J = 6,8 Hz)	16,3	H-8	C-11/ C-8/ C-9
23	0,79 s	21,3		C-8/ C-11/ C-12 / C-9/ C-10
24	1,63 s	16,9		C-15/ C-14/ C-13
25	6,06 s	97,8		

Ce nouveau composé D1 est nommé le **tuamotuolol (147)**.

Mélange du composé D2 et D3

La LC-MS en mode positif du produit D2 indique une masse moléculaire à m/z 385.2754 qui correspond à la formule $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_3$. Cette masse moléculaire correspond d'après la littérature au palauolide ().

Une comparaison du spectre RMN ^1H du **composé D2** et du palauolide (**148**) est effectuée dans le tableau 12 [Sullivan & Faulkner 1982].



palauolide 148

Tableau 9 : Données de RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé D2 et du palauolide [Sullivan & Faulkner, 1982]

position	Composé D2 CDCl_3		palauolide (148) CDCl_3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	1,46/ 1,50	21,9		21,5
2	1,25	29,7		28,5
3	2,13/ 2,28	33,1		33,6
4		160,5		160,2
5		40		39,8
6	1,6/ 1,51	37,3		36,2
7	1,43	27		27,3
8	1,47	36,8		36,5
9		39,3		39,2
10	1,08/ 0,97	48,7		48,5
11	1,25/ 1,54	31,9		36,2
12	1,99/ 1,87	33,9		32,9
13		150		162,4
14	5,96 (J = 10,8 Hz)	124,3	5,95 (J = 11 Hz)	124,3
15	7,15 (J = 15,2 Hz)	137,2	7,16 (J = 15,5 Hz)	137,3
16	6,27/ 6,32 (J = 15,6 Hz)	118,8	6,28 (J = 15,5 Hz)	118,8
17		161		150,2
18	5,85	114,7	5,83	114
19		170		172,2
20	4,51	102	4,51	102,4
21	1,05 (J = 3,2 Hz)	20,8	1,05	20,6
22	0,81 (J = 6 Hz)	16,0	0,82 (J = 7 Hz)	15,8
23	0,746	18,1	0,74	17,6
24	1,87/ 1,99	17,9	1,86	17,9
25	6,23	97,4	6,26	99,9

La comparaison du spectre de RMN ^1H du composé D2 avec les données de la littérature permet de conclure que le **composé D2** est le palauolide (**148**) [Nakamura *et al.*, 2003] (Tableau 9).

2.2.3.2. Etude de l'extrait chlorométhylénique

L'extrait brut chlorométhylénique inhibe la croissance bactérienne de *V. harveyi*. Un fractionnement bioguidé en CLHP sur colonne semi-préparative en phase inverse (C18, 5 µm, 10 × 150 mm) a permis l'isolement d'un produit majoritaire responsable de cette activité antibiotique sur *V. harveyi* et de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, détectée dans le cadre d'un projet de criblage enzymatique.

Composé D4

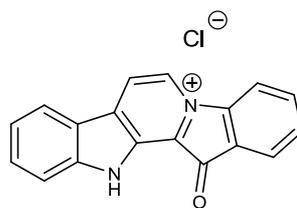
Le **composé D4** a été obtenu sous forme de poudre rouge amorphe. La HRESIMS-Qtof (en mode d'ionisation positif), indique un pic moléculaire à 271,0909 [M⁺] correspondant à la formule brute C₁₈H₁₁N₂O. Il présente des maxima d'absorption à 301, 262 et 213 nm. Dans la littérature, cette masse moléculaire correspond à un composé connu : la faspaplysine. Une comparaison des déplacements chimiques ¹H et ¹³C RMN du **composé D4** est effectuée avec ceux de la faspaplysine enregistrés dans du méthanol deutérié [Kirsch et al. 2000].

Tableau 10 : Comparaison des données de ¹H et ¹³C RMN du composé D4 et de la faspaplysine [Kirsch et al. 2000]

position	Composé D4 DMSO-d ₆		faspaplysine (149) CD ₃ OD	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1a		123,8		126,2
1	8,07 (J = 6,8 et 7,6 Hz)	125,6	8,11 (J = 1,3 et 7,5 Hz)	127,6
2	7,75 (J = 7,6 Hz)	131,3	7,8 (J = 0,9 et 7,5 Hz)	133,5
3	8,05/ 8,03 (J = 8 et 5,2 Hz)	137,0	8,03 (J = 1,3 et 8,0 Hz)	139,2
4	8,50/ 8,49 (J = 8 Hz)	115,6	8,37 (J = 8,0 Hz)	117,3
4a		146,9		149,4
6	9,64/ 9,63 (J = 4 Hz)	126,7	9,41 (J = 6,2 Hz)	128,4
7	9,18/ 9,17 (J = 4 Hz)	120,4	9 (J = 6,2 Hz)	121,9
7a		147,1		143,6
7b		119,5		121,9
8	8,59/ 8,57 (J = 6,8 Hz)	124,4	8,53 (J = 8,0 Hz)	125,9
9	7,56/ 7,54/ 7,53 (J = 6,8 et 7,6 Hz)	123,0	7,59 (J = 0,9, 7,1 et 8,0 Hz)	125,4
10	7,90/ 7,89 (J = 6,8 Hz)	134,3	7,94 (J = 1,3, 7,1 et 8,4 Hz)	136,7
11	7,84/ 7,82 (J = 7,6 Hz)	113,8	7,86 (J = 0,9 et 8,4 Hz)	115,4
11a		147,1		149,6
12	13,5			
12a		x		133,7
12b		x		124,1
13		x		183,9

Les déplacements chimiques des protons et des carbones du **composé D4** sont relativement proches de la littérature, avec néanmoins une légère différence liée aux

solvants utilisés pour l'enregistrement des spectres. On peut conclure que le **composé D4** est la faspaplysine (**149**).



faspaplysine 149

2.3. Conclusion et discussion

L'étude chimique de *Dysidea* sp. 2669 a conduit à l'isolement d'un alcaloïde et d'un sesterterpène dont un nouveau : la faspaplysine (**150**) et le composé D1 nommé tuamotuolol (**147**). Un mélange de deux composés n'a pas pu être séparé mais les spectres RMN 2D et la masse moléculaire ont permis de détecter la présence du palauolide.

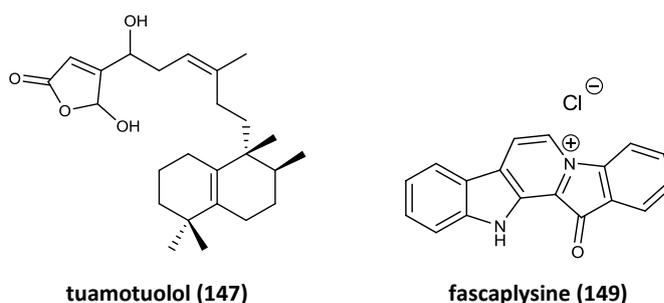


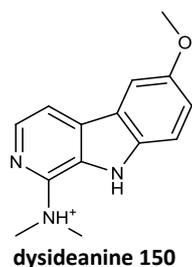
Figure 33 : Récapitulation des structures des composés isolés de *Dysidea* sp. 2669

Le palauolide (**148**) a été isolé pour la première fois d'une éponge non identifiée provenant de l'île de Palau [Sullivan & Faulkner 1982]. Sa structure chimique se rapproche de celle du manoalide (isolé de *Luffariella variabilis*) [De Silva & Scheuer 1980], des luffarines I-N (isolés de *Luffariella geometrica*) [Butler & Capon 1992] et du palauolol (isolé de *Facaplysinosia* sp.) [Schmidt & Faulkner 1996]. Jusqu'à présent ce type de sesterterpène avait été isolé d'éponges de la famille des Thorectidae de l'ordre Dictyoceratida, notre étude vient ainsi montrer leur présence dans la famille des Dysideidae. Le palauolide possède une activité anti-microbienne sur *B. subtilis* et *S. aureus* et inactive la phospholipase A2 à 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (soit 15 μM) [Schmidt & Faulkner 1996].

La faspaplysine (**150**) a été isolée pour la première fois d'une espèce du genre *Facaplysinosia* Bergquist (famille Thorectidae, ordre Dictyoceratida) collectée aux îles Fidji [Roll & Ireland 1988]. Dans la littérature cette molécule semble être spécifique de la famille Thorectidae collectées dans l'océan Pacifique. En effet trois genres de cette famille contiennent parmi leurs métabolites secondaires la faspaplysine: *Facaplysinosia* (îles

Fidji, Palau, Australie), *Hyrtios* (Fidji, Japon (Okinawa)) et *Thorectandra* (Palau). La faspaplysine a également été isolée d'un tunicier du genre *Didemnum* (Indonésie et Micronésie) [Segraves et al. 2004]. Notre étude sur *Dysidea* sp. 2669 permet de montrer la présence de la faspaplysine dans la famille des Dysideidae.

Un seul exemple d'alcaloïde bis-indolique a été reporté dans la littérature dans le genre *Dysidea*, la dysideanine B (**150**), pourvue d'une activité antibiotique sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Vibrio alginolyticus* [Ren et al. 2010].



Le sel β -carbolinium peut être neutralisé par un ion chlorure ou un acide [Segraves et al. 2003] [Segraves et al. 2004]. Par exemple l'ammonium de la faspaplysine A, isolée de *Faspaplysinoopsis reticulata* (iles Fidji) est neutralisé par un sesterterpène, l'anion diacide déshydroloffarielloïde (**151**) [Jimenez et al. 1991] (Figure 34). Dans le cas de la faspaplysine isolé de *Dysidea* sp. 2669 aucun contre ion de nature organique n'a été identifié, le spectre RMN ^1H indique seulement la présence de 11 protons attribués à la faspaplysine.

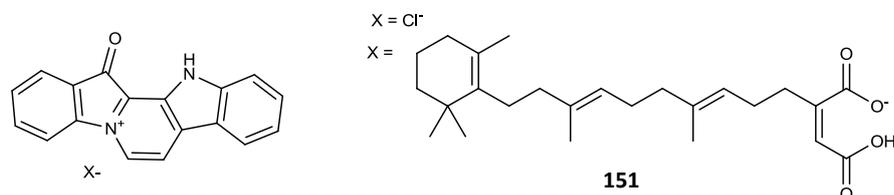


Figure 34 Structure chimique de la faspaplysine neutralisée par un ion chlore ou de l'anion diacide déshydroloffarielloïde

La faspaplysine est un composé cytotoxique sur un grand nombre de cellules tumorales [Segraves et al. 2003] [Shafiq et al. 2012] [Hamilton 2014] [Kumar et al. 2015], elle est capable de s'insérer dans l'ADN [Hörmann et al. 2001], d'inhiber la kinase CDK4 [Shafiq et al. 2012], la glycoprotéine-P et l'acétylcholinestérase [Bharate et al. 2012]. Ces propriétés lui confèrent ainsi divers activités biologiques notamment des activités anti-tumorale, anti-bactérienne, anti-parasitaire et anti-Alzheimer.

Le tuamotuolol isolé ici pour la première fois du brut cyclohexanique de l'extrait de *Dysidea* sp. 2669 est un analogue du palauolol. Il se différencie du palauolol par la structure de son drimane substitué d'une double liaison en position C-5 et C-10 comme le neomamanuthaquinone (**146**) [Yong et al. 2008].

La faspaplysine (**50**) et le palauolide (**148**) ont déjà été co-isolés d'une espèce appartenant au genre *Faspaplysinoopsis* [Schmidt & Faulkner 1996]. Afin de vérifier si les lots étudiés de

Dysidea sp. 2669 appartient bien au genre *Dysidea*, nous avons fait vérifier l'identification biologique des lots de *Dysidea*. Après vérification par le Dr John HOOPER (Queensland museum, Australia), les lots étudiés appartiennent bien au genre *Dysidea* et non *Fascaplysinopsis*. Notre étude pourrait alors remettre en question l'identification taxonomique de l'éponge *Fascaplysinopsis* sp. étudiée par Schmidt & Faulkner (1996).

3. Etude de *Leucetta chagosensis* (Dendy, 1993)

3.1. Travaux antérieurs sur le genre *Leucetta*

Leucetta chagosensis est une éponge calcaire. Elle appartient à la sous classe des Calcinea, à l'ordre Clathrinida et à la famille des Leucettidae. Elle a été décrite par Dendy en 1913 [Dendy 1913].

Cette éponge se présente sous forme semi-sphérique, avec de larges oscules permettant d'apercevoir la cavité gastrale. Sa surface est lisse. De consistance compacte et ferme mais friable, *L. chagosensis* est de couleur jaune-citron *in situ* (Figure 35).



Figure 35 *Leucetta chagosensis* (Dendy, 1913) *in situ* (photo C. Debitus)

Leucetta chagosensis est présente dans la zone indo-Pacifique (Figure 35). En Polynésie française, elle est commune sur les pentes externes des récifs barrières des îles de la Société et des Tuamotu, ainsi que dans le grand lagon de Rangiroa.

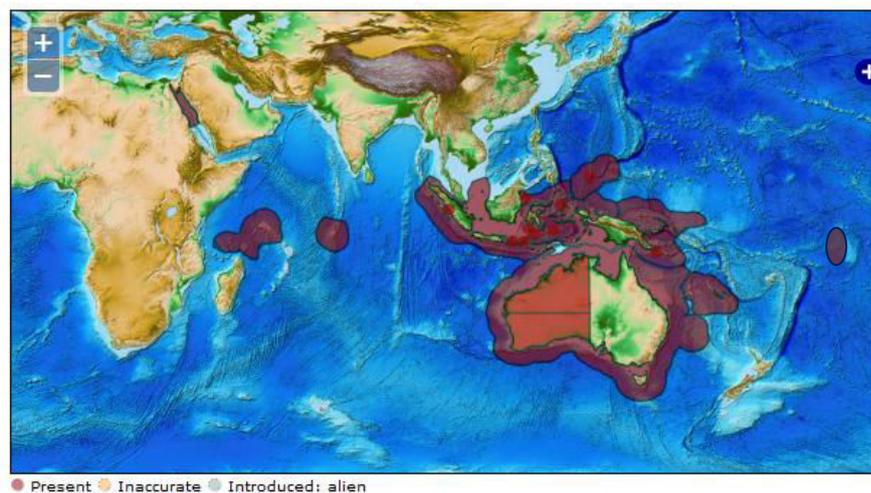


Figure 36 : Répartition géographique de *L. chagosensis* (Dendy, 1913) dans la zone indo-Pacifique indiqué en rouge (source : <http://www.marinespecies.org>)

Les travaux sur les métabolites secondaires du genre *Leucetta* constituent principalement l'étude des éponges calcaires. Les travaux antérieurs relatifs à ce genre ont été présentés au

début de ce manuscrit dans le paragraphe 4 de l'état de l'art : « Composition chimique des éponges calcaires ».

3.2. Etude chimique de *L. chagosensis*

3.2.1. Collecte de l'éponge

La collecte des éponges a été effectuée en août 2009 sur quatre sites de l'archipel de la Société : Bora Bora ($16^{\circ}28.773' S$, $151^{\circ}41.287' W$), Huahine ($16^{\circ}42.596' S$, $151^{\circ}02.640' W$), Raiatea ($16^{\circ}45.715' S$, $151^{\circ}30.194' W$) et Tahaa ($16^{\circ}38.882' S$, $151^{\circ}25.553' W$), puis en mai 2011 sur deux sites dans l'archipel des Tuamotu: Makemo ($16^{\circ}37.238' S$, $143^{\circ}34.182' W$) et Rangiroa ($15^{\circ}01.273' S$, $147^{\circ}52.122' W$).

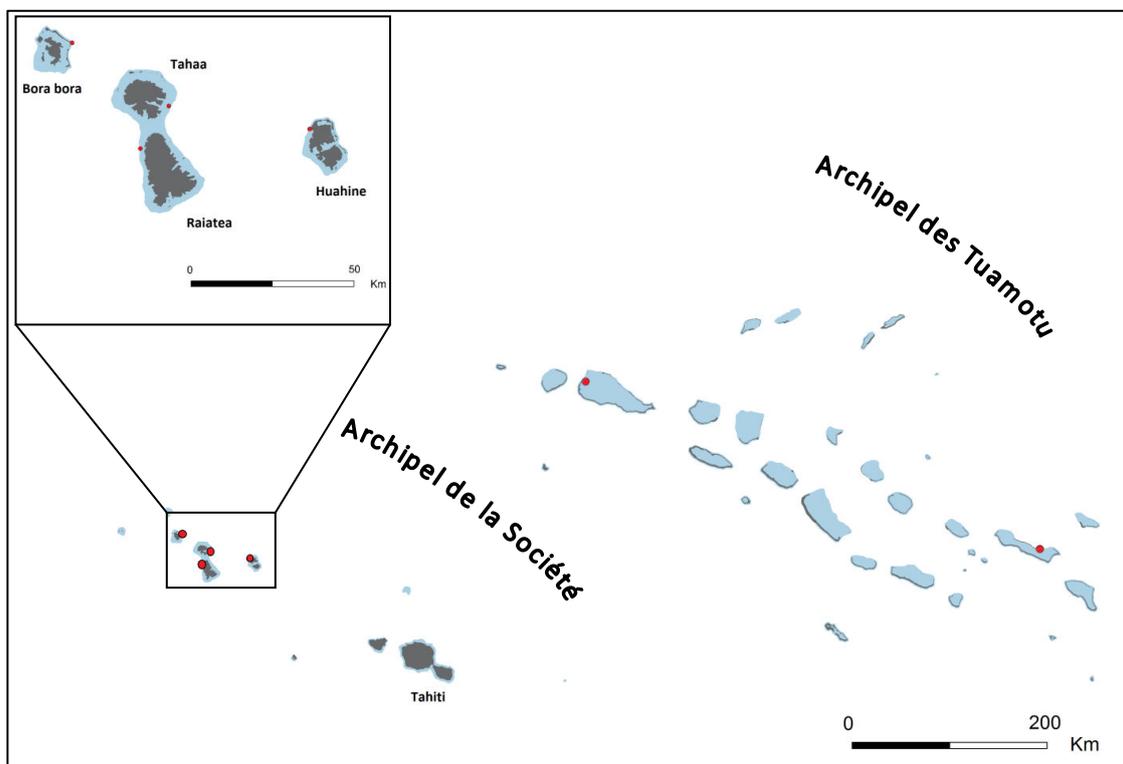


Figure 37 : Carte de localisation des sites de collectes (points rouges) des lots de *L. chagosensis* étudiés

3.2.2. Comparaison de la diversité chimique des différents lots de l'éponge

Les archipels de la Société et des Tuamotu sont éloignés d'environ 330 km. Une première étude chimique est effectuée afin de déterminer la diversité chimique des différents lots de *L. chagosensis* collectés dans ces deux archipels.

Un échantillon de poudre lyophilisée ($m = 20$ g) de chaque lot est extrait sous agitation magnétique et à température ambiante, par un mélange éthanol / eau (80/20), puis par de l'éthanol non dilué (96%). L'extrait obtenu est évaporé puis partagé entre l'eau et le chlorure de méthylène.

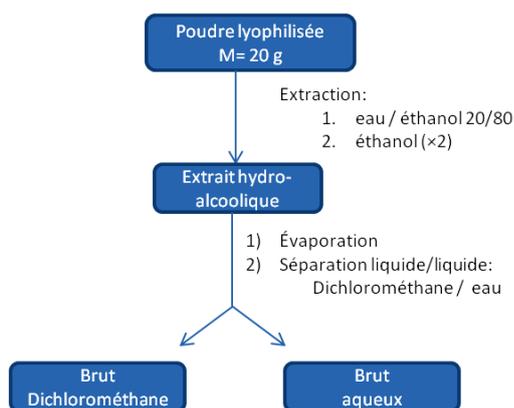


Figure 38 : Schéma d'extraction des bruts utilisé pour la comparaison chimique des lots de *L. chagosensis*

L'extrait brut chlorométhylénique de chaque lot est analysé en chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée aux détecteurs à diffusion de lumières (DDL), à barrette de diodes (UV) et à un spectromètre de masse à simple quadripôle (ZQ). Les profils DDL des lots sont ensuite comparés entre eux.

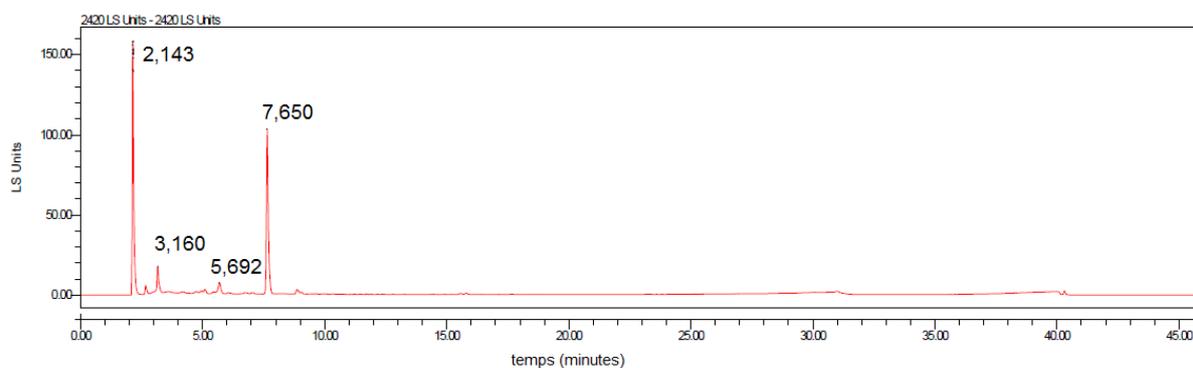


Figure 39 : Profil chromatographique par détection DDL du lot P30-SBB1 (archipel Société)

Les extraits des quatre lots des îles de la Société possèdent le même profil chimique. Un composé majoritaire est visible sur le chromatogramme par détection DDL à un temps de rétention (t_R) de 7,650 minutes (Figure 39). Le spectre UV de ce composé montre deux maximas d'absorbance à 230 et 276 nm et le spectre de masse indique un pic moléculaire $[M+H]^+ = 296$ (Figure 40).

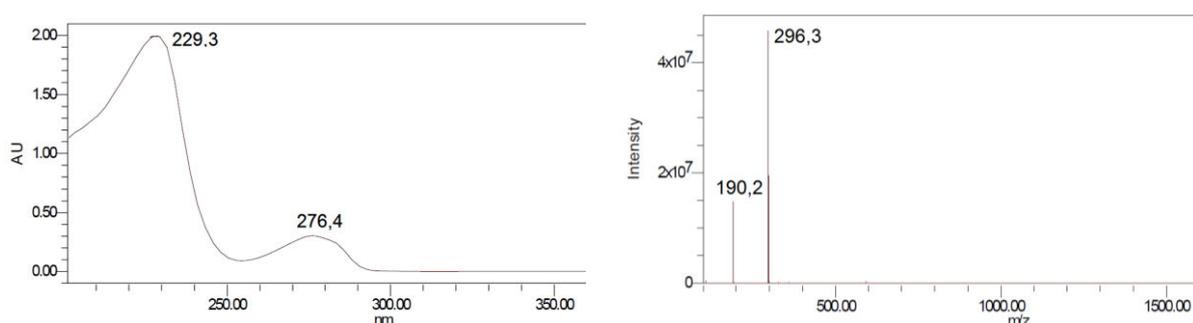


Figure 40 : Spectres de masse et UV du composé à $t_R = 7$ min

Concernant les échantillons des Tuamotu, les chromatogrammes possèdent également le signal à environ 7,7 min avec la même masse moléculaire et le même spectre UV (Figure 41).

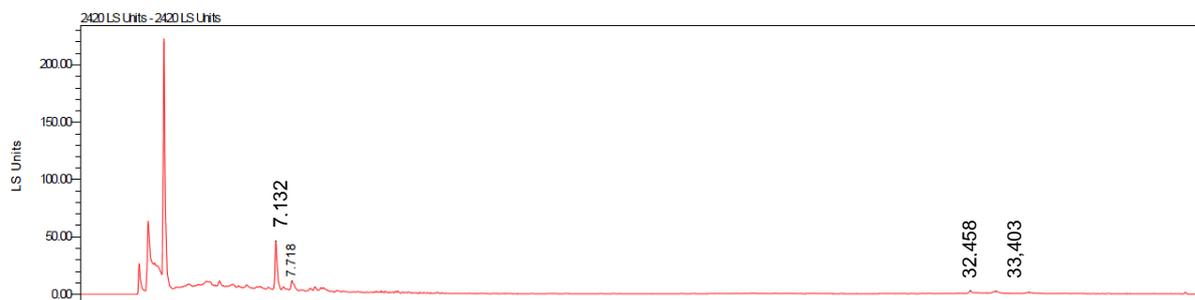


Figure 41 : Profil chromatographique par détection DDL du lot P266-TMAK04 (archipel des Tuamotu)

On peut remarquer qu'un seul échantillon se démarque des autres, le lot collecté à Rangiroa (P266-TRAN10). Ce lot est un peu plus riche en métabolites secondaires mais avec toujours la présence du composé à $t_R = 7,7$ min (Figure 42).

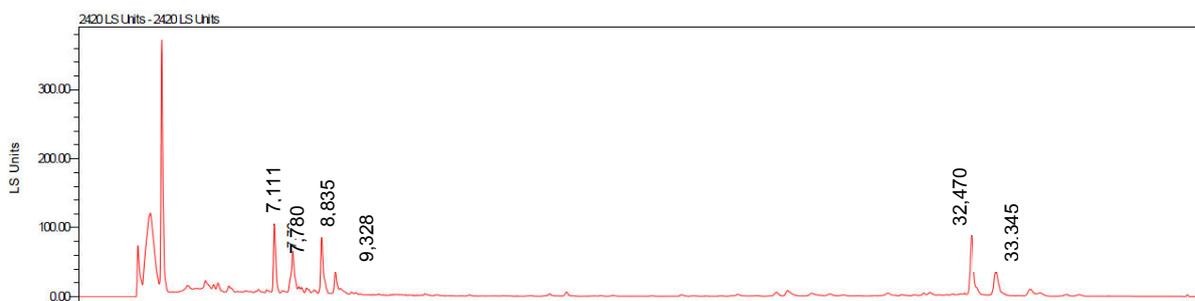


Figure 42 : Profil chromatographique par détection DDL du lot P266-TRAN10 (archipel des Tuamotu)

Les profils chimiques des lots des îles de l'archipel de la Société étant similaires, les poudres lyophilisées ont été regroupées afin d'obtenir suffisamment de matière première pour l'étude chimique.

3.2.3. L'extraction et la purification d'alcaloïdes imidazoliques

La poudre lyophilisée des différents lots de *L. chagosensis* collectés dans l'archipel de la Société a été extraite sous agitation magnétique à température ambiante par un mélange méthanol / eau 80/ 20, puis du méthanol. Après élimination du méthanol, le résidu aqueux est épuisé successivement par des solvants de polarité croissante : heptane, acétate d'éthyle et butanol (Figure 43).

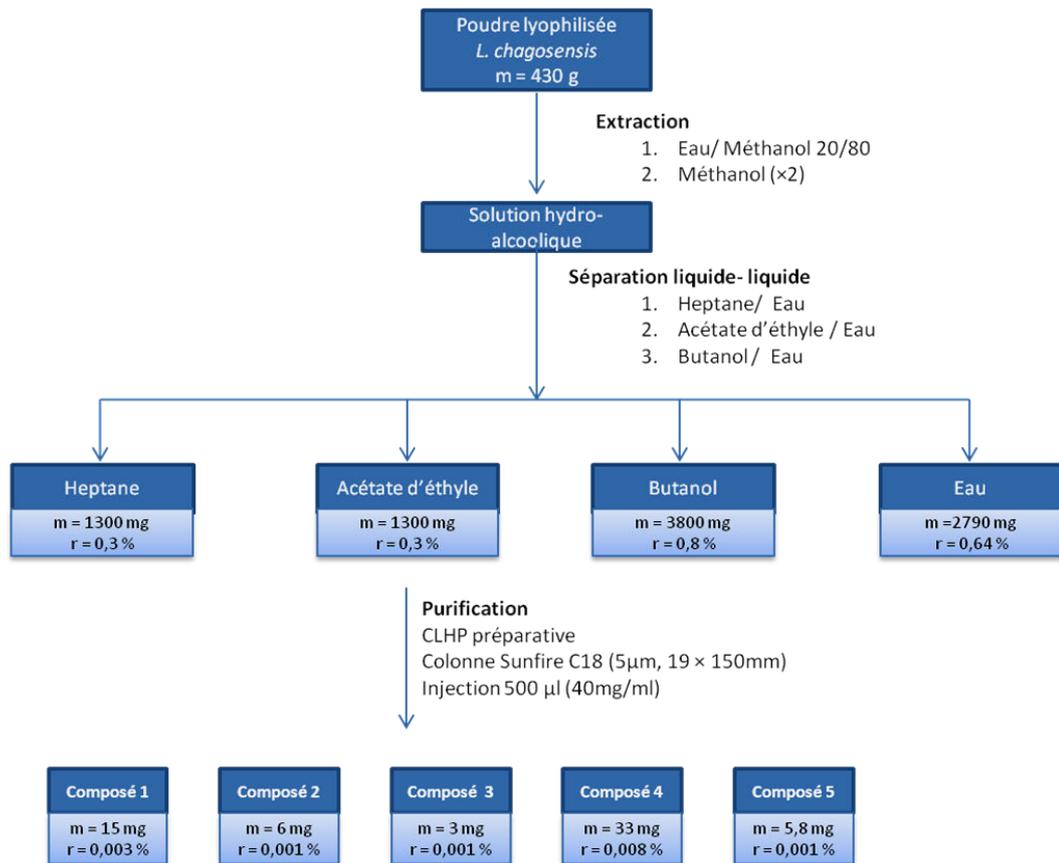


Figure 43 : Schéma de purification des molécules de *L. chagosensis*

Les extraits bruts acétate d'éthyle et butanol inhibent la bioluminescence de *V. harveyi*. L'extrait acétate d'éthyle est sélectionné pour la purification de ses métabolites secondaires car son profil chromatographique présente des composés relativement bien séparés (Figure 44).

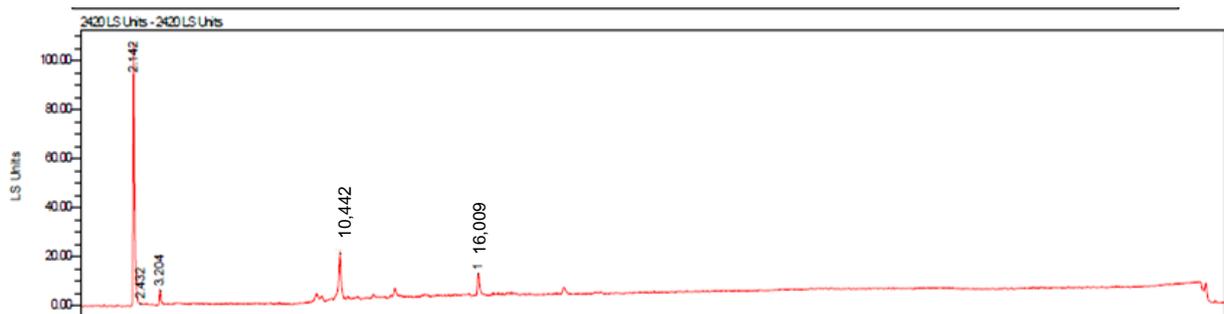


Figure 44 : Profil DDL du brut acétate d'éthyle issu de l'extraction de *L. chagosensis*

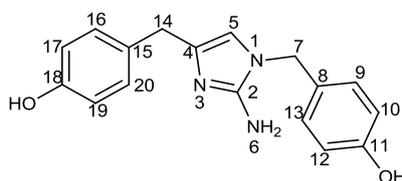
Cinq composés ont été isolés par CLHP préparative : deux molécules connues et un complexe de zinc parmi trois nouveaux composés.

3.2.4. Détermination de la structure des produits isolés

La structure des molécules connues a été déterminée par comparaison des données de spectrométrie de masse et de RMN avec la littérature. Les nouvelles structures ont été élucidées par l'analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY et HMBC.

Composé L1

Le **composé L1**, obtenu sous forme de poudre jaune, est le produit majoritaire de l'échantillon étudié. Le spectre HREIMS en mode positif montre un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 296,1409 répond à la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: ces données permettent de rapprocher cette molécule de l'isonaamine A (**76**). Par comparaison des déplacements chimiques des protons dans le DMSO de ce produit et de la littérature (produit de synthèse) [Molina et al. 1999] la structure de l'isonaamine A est confirmée pour cette molécule.



isonaamine A 76

Tableau 11 : Comparaison des données de ^1H RMN dans le DMSO- d_6 du composé L1 et de l'isonaamine A⁵

position	isonaamine A DMSO	Composé L1 DMSO
5	6,57 s	6,57 s
6	7,43 s	
7	4,89 s	4,88 s
9	7,14 d (J=8,6Hz)	7,12 d (J=7,5Hz)
10	6,76 d (J=8,6Hz)	6,75 d (J=7,5Hz)
12	6,76 d (J=8,6Hz)	6,75 d (J=7,5Hz)
13	7,14 d (J=8,6Hz)	7,12 d (J=7,5Hz)
14	3,63 s	3,63 s
16	7,02 d (J=8,5Hz)	7,01d (J=7,5Hz)
17	6,70 d (J=8,6Hz)	6,69 d (J=7Hz)
19	6,70 d (J=8,6Hz)	6,69 d (J=7Hz)
20	7,02 d (J=8,5Hz)	7,01 d (J=7,5Hz)

⁵ Etant donné l'hétérogénéité de la numérotation de ces composés dans la littérature, nous avons adopté la numérotation présente pour pouvoir comparer les données expérimentales et de la littérature.

Composé L2

La HRESIMS en mode positif du **composé L2** indique un pic moléculaire à m/z 310,1190 $[M+H]^+$. Son analyse permet d'établir une formule moléculaire de $C_{17}H_{16}N_3O_3$ (310,1192, calculé pour $C_{17}H_{16}N_3O_3$, $\Delta = 0,2$ ppm).

Le spectre de 1H RMN montre quatre doublets de constante de couplage $J = 8,5$ Hz correspondant aux deux protons aromatiques équivalents à δ_H 6,74 ppm, 6,78 ppm, 7,13 ppm et 7,82 ppm, et un singulet à δ_H 6,61 ppm attribué à un proton oléfinique, et de 2 protons benzyliques à δ_H 4,75 ppm.

Le spectre de ^{13}C RMN met en évidence la présence d'un carbonyle à δ_C 171,2 ppm. Sa position est établie grâce aux corrélations HMBC entre les protons benzyliques H-7 à δ_H 4,75 ppm d'une part et d'autre part entre le proton oléfinique H-14 à δ_H 6,61 ppm, avec ce carbone (Figure 45). Deux autres corrélations sont observées entre les protons aromatiques à δ_H 7,82 ppm (H-16 et H-20) et le carbone sp^2 à δ_C 116,5 ppm confortent cette hypothèse.

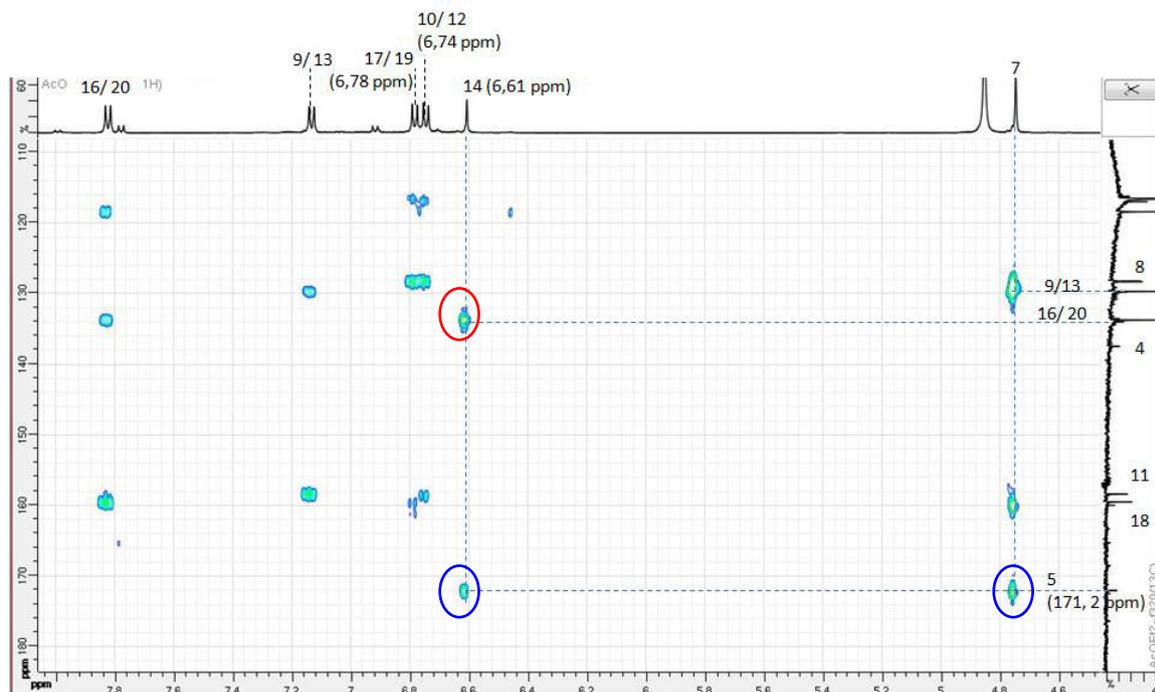


Figure 45 Spectre HMBC du composé L2 (dans CD_3OD) et principales corrélations observées des protons oléfinique H-14 et benzyliques H-7 avec le carbonyle C-5.

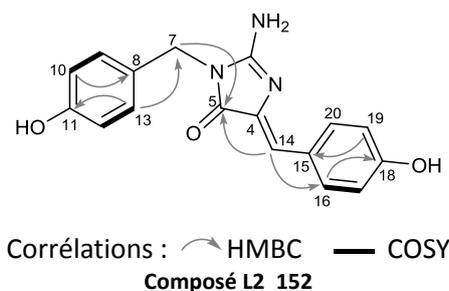


Figure 46 : Corrélations observées et structure proposée pour le Composé L2

Tableau 12 : Données ^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY et HMBC du composé L2 (dans CD_3OD)

position	^1H	^{13}C	COSY	HMBC
2		160		
4		137,5		1/ 2
5		171,2		2/ 1
7	4,75 s	43,3		5
8		128,3		3
9/ 13	7,13 d (J=8,5 Hz)	129,7	3	1/ 5
10/ 12	6,74 d (J=8,5 Hz)	116,5	5	4/ 3
11		158,4		5/ 3
15		128,2		4
14	6,61 s	118,4		6
16/ 20	7,82 d (J=8,5 Hz)	133,7	4	2/ 6
17/ 19	6,78 d (J=8,5 Hz)	116,7	6	3
18		159,5		6/ 4

La structure du **composé L2** n'a jamais été décrite auparavant dans la littérature. Cette nouvelle molécule comportant un noyau imidazolone est nommée leucettamine D (**152**).

Composé L3

Le **composé L3** est un solide de couleur rouge. La HRESIMS en mode d'ionisation positif indique la présence d'un pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 310,1563, compatible avec la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ (masse théorique 310,1556, $\Delta = 0,7$ ppm).

Les déplacements chimiques observés sur le spectre de RMN ^1H sont comparables au spectre de l'isonamine A. Ils présentent tous deux :

- 1 singulet à 6,26 ppm attribué au proton H-5 de l'imidazole
- 2 singulets à 4,76 ppm et à 3,62 ppm attribués aux protons benzyliques H-7 et H-14
- 4 doublets à 6,48 ppm ($J = 8,5$ Hz), 6,87 ppm ($J = 8,5$ Hz), 6,92 ppm ($J = 8$ Hz) et 7,08 ppm ($J = 8$ Hz) attribués aux protons aromatique H-17/ H-19, H-10/ H-12, H-16/ H-20 et H-9/ H-13.

Un méthyle supplémentaire observé sur le spectre du composé 3 à 3,79 ppm est attribué à un méthoxyle.

Tableau 13 : Données ^1H RMN, ^{13}C RMN, COSY et HMBC du composé L3 (dans CDCl_3)

poistion	^1H	^{13}C	COSY	HMBC
2		147,6		
4		137,1		
5	6,26 s	112,4	14	2/ 4/ 7
7	4,76 s	48,4	9/ 13	8
8		127,9		
9	7,08 d (J=8 Hz)	128,4	7/ 10/ 12	7/ 11
10	6,87 d (J=8,5 Hz)	112,4	9/ 13	8/ 11
11		159,7		
12	6,87 d (J=8,5 Hz)	112,4	9/ 13	8/ 11
13	7,08 d (J=8 Hz)	128,4	7/ 10/ 12	7/ 11
14	3,62 s	29,9	5	
15		131		17
16	6,92 d (J=8 Hz)	129,8	14/ 17/ 19	14/ 18
17	6,48 d (J=8,5 Hz)	115,8	16/ 20	15/ 18
18		155,2		
19	6,48 d (J=8,5 Hz)	115,8	16/ 20	15/ 18
20	6,92 d (J=8 Hz)	129,8	14/ 17/ 19	14/ 18
21	3,79 s	55,5		11

En COSY, une corrélation entre les protons aromatiques à 6,87 ppm (H-10/ H-12) et à 7,08 ppm (H-9/ H-13) est observée ainsi qu'une corrélation entre les protons à 6,48 ppm (H-17/ H-19) et à 6,92 ppm (H-16/H-20) (Figure 47).

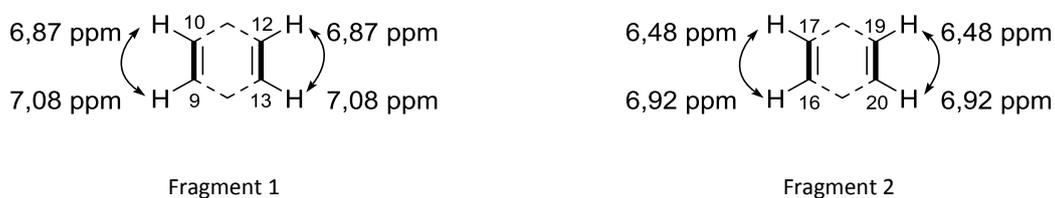


Figure 47 : Corrélations COSY du composé L3

Les corrélations en HMBC, du proton à δ_H 7,08 (H-9/ H-13) avec les carbones à δ_C 159,7 ppm (C-11) et à δ_C 48,4 ppm (C-7), et du proton à δ_H 6,87 ppm (H-10/ H-12) avec les carbones à δ_C 127,9 ppm (C-8) et à δ_C 159,7 ppm (C-11) permettent de positionner le fragment 1 (Figure 47) sur l'azote N-1 (Figure 49).

Les corrélations en HMBC, du proton à δ_H 6,48 (H-17/ H-19) avec les carbones à δ_C 131 ppm (C-15) et à δ_C 155,2 ppm (C-18) et du proton à δ_H 6,92 ppm (H-16/ H-20) avec les carbones à δ_C 29,9 ppm (C-14) et à δ_C 155,2 ppm (C-18) permettent de lier le fragment 2 (Figure 47) à l'imidazole en position 4 (Figure 49).

Le méthoxyle a pu être positionné sur le cycle aromatique grâce à la corrélation HMBC entre des protons méthoxyliques δ_H 3,79 et le carbone aromatique δ_C 159,7 (C-21) (Figure 49).

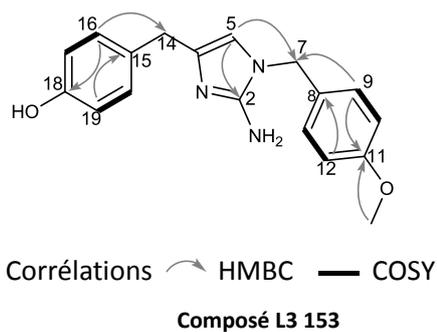


Figure 48 : Corrélations HMBC et COSY et structure proposée pour le composé L3

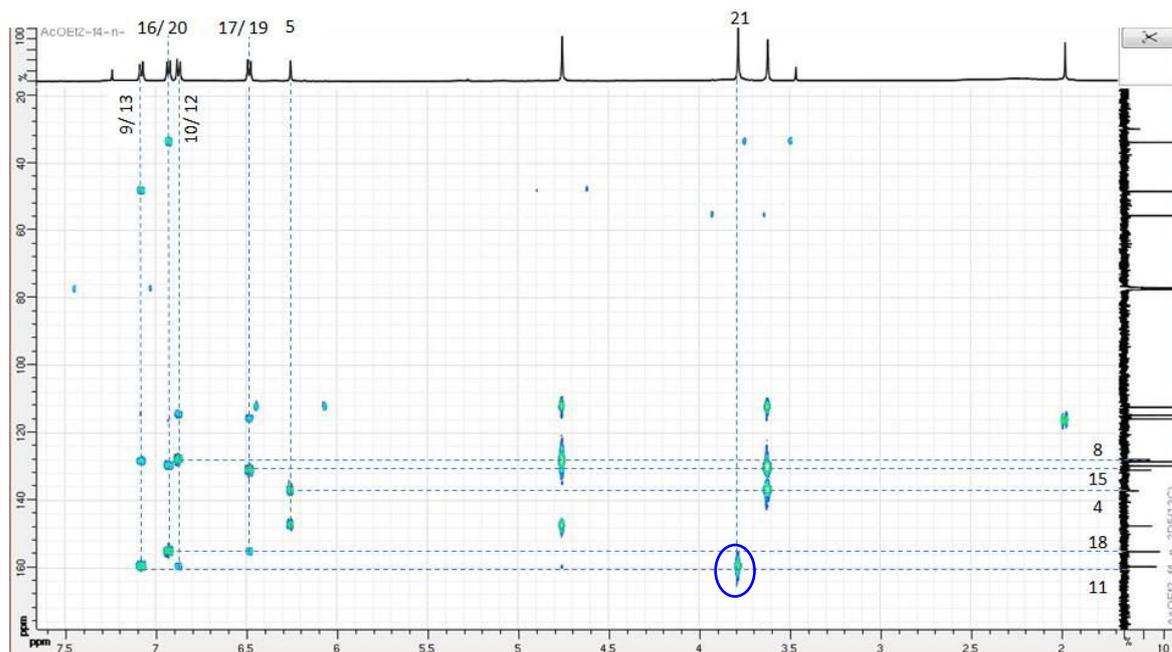
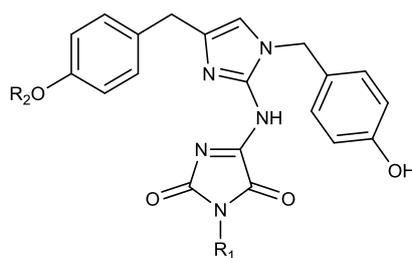


Figure 49 : Principales corrélations observées sur le spectre HMBC du composé L3 (CDCl₃)

Après vérification dans la littérature (bases de données Marinlit® et SciFinder®), la structure (**153**) proposée pour le **composé L3** apparaît nouvelle : cette molécule est nommée isonaamine D (**153**).

Composé L4

Le **composé L4** se présente sous forme de poudre jaune. La HRESIMS en mode positif de ce produit indique une masse moléculaire à $[M+H]^+$ m/z 406,1508 qui correspond à la formule C₂₁H₂₀N₅O₄. Cette masse moléculaire correspond d'après la littérature à deux composés, les isonaamidines A et D).



	R1	R2
isonaamidine A 154	CH ₃	H
isonaamidine D 155	H	CH ₃

Une comparaison des spectres RMN ¹H des deux molécules connues et du **composé L4** est effectuée (Tableau 14).

Tableau 14 : Données de ¹H RMN dans le CD₃OD du composé L4 et de l'isonaamidines A [Nakamura *et al.*, 2003] et l'isonaamidine D [Fu *et al.*, 1998]

position	isonaamidine A (153) CD ₃ OD	Composé 2 CD ₃ OD	isonaamidine D (154) CD ₃ OD
5	6,696 s	6,89 s	6,64 s
7	5,16 s	5,17 s	5,15 s
9	7,14 d (J = 8,6 Hz)	7,15 d (J = 8 Hz)	7,13 d (J = 8 Hz)
10	6,71 d (J = 8,8 Hz)	6,71 d (J = 6 Hz)	6,82 d (J = 8 Hz)
12	6,71 d (J = 8,8 Hz)	6,71 d (J = 6 Hz)	6,82 d (J = 8 Hz)
13	7,14 d (J = 8,6 Hz)	7,15 d (J = 8 Hz)	7,13 d (J = 8 Hz)
14	3,80 s	3,81 s	3,80 s
16	7,04 d (J = 8,8 Hz)	7,05 d (J = 7 Hz)	7,12 d (J = 8 Hz)
17	6,697 d (J = 8,6 Hz)	6,71 d (J = 6 Hz)	6,70 d (J = 8 Hz)
19	6,697 d (J = 8,6 Hz)	6,71 d (J = 6 Hz)	6,70 d (J = 8 Hz)
20	7,04 d (J = 8,8 Hz)	7,05 d (J = 7 Hz)	7,12 d (J = 8 Hz)
NMe	3,08 s	3,1s	-
OMe	-	-	3,74 s

Cette comparaison permet de conclure que le **composé L4** est l'isonaamidine A (**154**) [Nakamura *et al.*, 2003].

Composé L5

Le **composé L5** a été obtenu sous forme de solide de couleur marron. Le spectre de masse en mode positif montre un quintuplet à 873, 875, 877, 879 d'intensités respectives 100, 70, 42 et 5 (Figure 50). Ce massif isotopique est caractéristique de la présence d'un atome de zinc dans la molécule. La HRESIMS indique un pic de base à m/z 873,2109 [M+H]⁺ (873,2087, calculé pour C₄₂H₃₇N₁₀O₈⁶⁴Zn, Δ = 2,2 ppm).

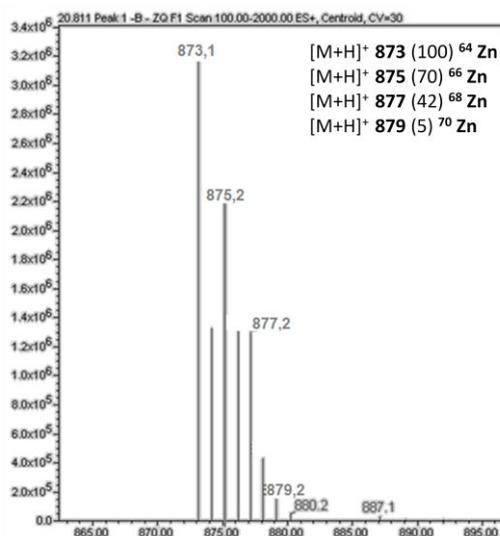


Figure 50 Spectre de masse du composé L5

Le spectre de RMN ^1H montre la présence de deux systèmes diastéréotopiques (Figure 54, encadrés en bleu) correspondant à deux protons benzyliques (H-7 à 5,23 et 5,36 ppm et H-14 à 3,15 et 3,53 ppm). Ce spectre indique également la présence de huit protons aromatiques sous forme d'un singulet à 7,23 ppm et de quatre doublets à 6,38, 6,46, 6,82 et 7,35 ppm (signaux encadrés en rouge sur la Figure 54), caractéristiques d'un imidazole substitué sur les positions N-1 et C-4. Il est donc suggéré que le zinc complexe deux molécules identiques.

Le spectre proton indique la présence d'un N-méthyle à 2,87 ppm. Le spectre ^{13}C montre la présence de deux carbonyles à 161,2 et 164,2 ppm. En HMBC, le signal à 2,87 ppm corrèle avec les signaux correspondant aux deux carbonyles. On peut ainsi conclure que la structure du monomère se compose d'un hydantoïne et appartient à la famille des isonaamidines.

Figure 51 : Données ^1H RMN et ^{13}C RMN, corrélations COSY et HMBC du composé L5 enregistrées dans le DMF-d₇

n°	^1H	^{13}C	COSY	HMBC
2		148,0		
4		136,7		
5	7,23 s	117,6	5	
7	5,23 et 5,36 d (J=8,4 Hz)	48,1	7	5/ 9/ 13/ 2/ 8
8		127,6		
9	7,35 d (J=8,4 Hz)	130	10/ 12	7
10	6,82 d (J=8,4 Hz)	115,7	9/ 13	11
11		158,2		9/ 10/ 12/ 13
12	6,82 d (J=8,4 Hz)	115,7	9/ 13	11
13	7,35 d (J=8,4 Hz)	130	10/ 12	7
14	3,15 et 3,53 d (J=16,8 Hz)	32,2	14	16/ 20/ 5
15			128,2	
16	6,38 d (J=8,4 Hz)	128,9	17/ 19	14
17	6,46 d (J=8,4 Hz)	115	16/ 20	18/ 15
18		156,5		17/ 19
19	6,46 d (J=8,4 Hz)	115	16/ 20	18/ 15
20	6,38 d (J=8,4 Hz)	128,9	17/ 19	14
21		154,6		26
23		164,2		
25		161,2		
26	2,87	24		25/ 23

Sur le spectre 2D COSY, une corrélation entre les protons aromatiques à 6,82 ppm (H-10/ H-12) et à 7,35 ppm (H-9/ H-13) est observée ainsi qu'une corrélation entre les protons à 6,46 ppm (H-17/ H-19) et à 6,38 ppm (H-16/ H-20) (Figure 52).



Figure 52 : Schéma des corrélations COSY du composé L5

Les corrélations en HMBC du proton à 7,35 (H-9/ H-13) avec le carbone à 48,1 ppm (C-7) et du proton à 6,82 ppm (H-10/ H-12) avec le carbone à 158,2 ppm (C-11) permettent de lier le fragment 1 (Figure 52) à l'azote N-1.

Les corrélations en HMBC, du proton à 6,46 (H-17/ H-19) avec les carbones à 128,9 ppm (C-15) et à 156,5 ppm (C-18) et du proton à 6,38 ppm (H-16/ H-20) avec le carbone à 32,2 ppm (C-14) permettent de lier le fragment 2 (Figure 52) en position 4 de l'imidazole (Figure 53)

Le monomère semble être une isonaamidine A, ce qui est confirmé par la présence d'un pic en HRESIMS à m/z 406,1500 : le **composé L5** est donc un complexe de zinc de l'isonaamidine A (**154**).

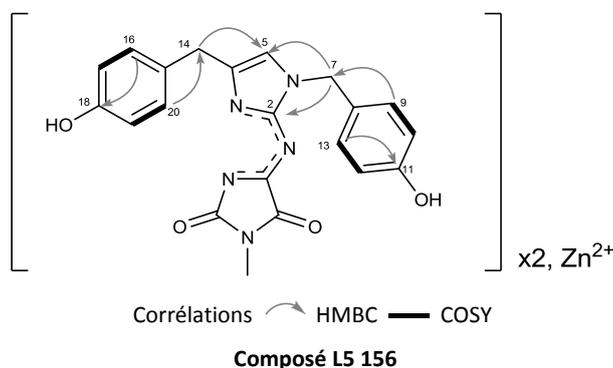


Figure 53 corrélations HMBC et COSY et structure du composé L5

Cette structure (**156**) est confirmée par la dimérisation *in vitro* de l'isonaamidine A naturelle (**composé L4**) en présence de sulfate de zinc qui fournit le **composé L5'** dont le spectre de ^1H RMN est superposable avec celui du produit naturel.

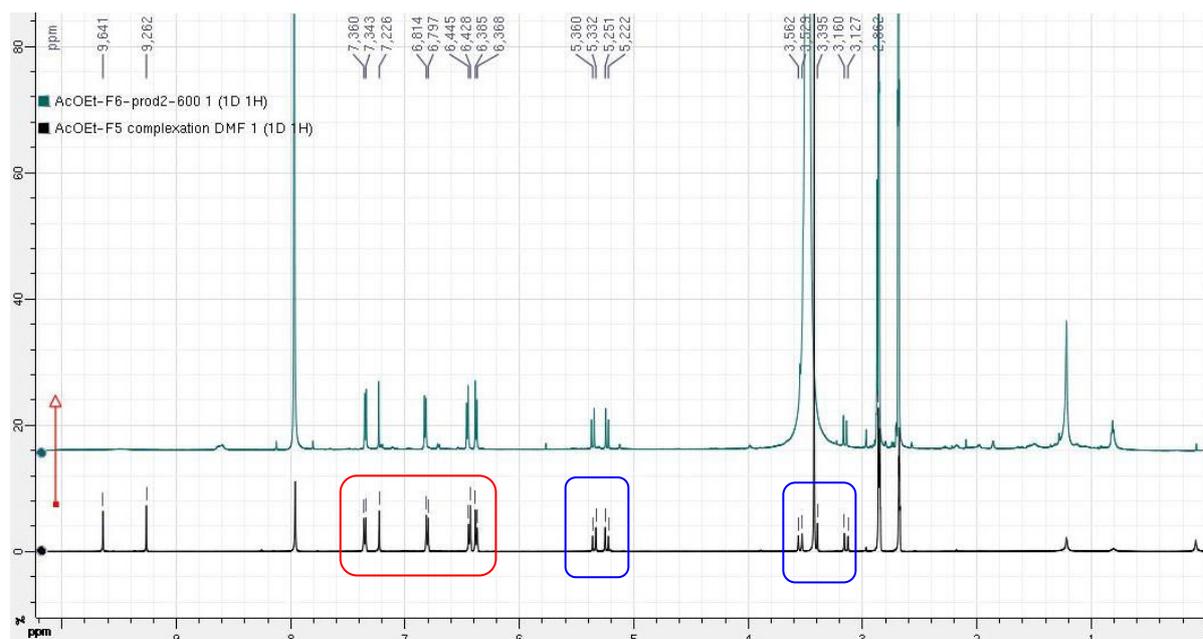


Figure 54 : Superposition des spectres de ^1H RMN (DMF-d_7) du composé 5 (vert) et du composé 5' héli-synthétique (noir). Encadré rouge présente les protons caractéristiques d'un imidazole substitués en position N-1 et C-4. Encadré bleu présente des protons diastéréotopiques.

3.3. Conclusion et discussion

L'étude chimique de *L. chagosensis* récoltée en Polynésie française a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes de type amino-2 imidazole, principaux constituants des métabolites secondaires du genre *Leucetta* [Sullivan et al. 2009] [Roué et al. 2012].

Trois molécules se sont avérées être nouvelles et deux composés ont été identifiés aux produits connus, l'isonaamine A et l'isonaamidine A, isolés pour la première fois de *L. chagosensis* collecté en Mer Rouge [Carmely et al. 1987].

L'isonaamine A (**76**) et l'isonaamidine A (**154**) sont les composés majoritaires de l'extrait brut acétate d'éthyle des lots de *L. chagosensis* étudiés, avec des rendements respectifs de 0,003 % et 0,008 % (rendement par rapport à la poudre). L'isonaamidine A (**154**) se différencie de l'isonaamine A (**76**) par la présence d'un groupe hydantoïne (2,4-imidazolidinedione). Leur biosynthèse est encore inconnue mais la méthode d'Ohta et de Van der Eycken a permis la synthèse de l'isonaamidine A et l'isonaamine A en respectivement 7 et 8 étapes (pour Ohta) et 2 étapes (pour Van der Eycken) [Nakamura et al. 2003]. L'isonaamine A a été également isolé d'un nudibranche *Notodoris citrine* mais aucune activité biologique n'a été décrite pour ces deux molécules jusqu'à maintenant.

La première molécule nouvelle a été nommée isonaamine D. Cette molécule est un dérivé O-méthylé de l'isonaamine A. La famille des isonaamines possède des activités anti-inflammatoires et cytotoxiques.

La leucettamine D (**152**) est constituée d'un noyau amino-2 imidazolone. Les autres composés de structures comparables, les leucettamines A et B isolées de *Leucetta microraphis* Haeckel [Chan et al. 1993], ne comportent pas de substituant benzylique. Ces composés simples ont aussi été trouvés dans des éponges des genres *Agelas* [Cafieri et al. 1996] et *Axinella* [Feng et al. 2013], et dans une ascidie des îles Fidji : *Polyandrocarpa* sp. [Davis et al. 2002].

Le complexe de zinc de l'isonaamidine A (**156**) a été isolé pour la première fois dans ce travail. D'autres complexes organométalliques d'imidazoles ont été trouvés auparavant dans des éponges calcaires des genres *Leucetta* et *Clathrina*, ainsi que dans une ascidie collectée aux îles Fidji [Ciminiello et al. 1989] [Mancini et al. 1995] [Alvi et al. 1993]. Les familles des naamidines, des isonaamidines et des clathridines semblent avoir une structure favorable à la chélation du Zinc. D'après Ciminiello et al. , ces ligands bidentés se lient au zinc par l'intermédiaire des azotes N-3 et N-22 [Ciminello et al. 1990].

La dimérisation de l'isonaamidine A s'est faite de façon spontanée, après ajout du $ZnSO_4$ dans du méthanol. L'isonaamidine A semblent donc être un bon chélateur de zinc. Parmi les complexes de zinc connus dans cette série de molécules, une seule activité biologique a été mise en évidence pour le complexe de la clathridine sur *Staphylococcus aureus* à 100 μg /disque [Roué et al. 2010].

Ces composés proviennent uniquement de l'éponge et non pas de micro-organismes associés à l'éponge [Roué et al. 2010].

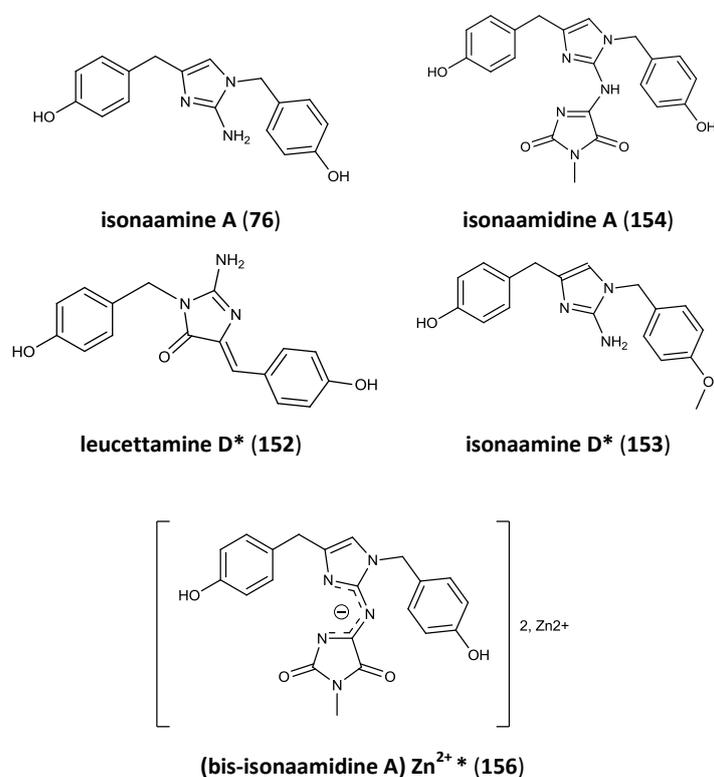


Figure 55 : Récapitulation des molécules isolées de *Leucetta chagosensis* (* = nouvelles molécules)

4. ETUDE BIOLOGIQUE : évaluation des activités biologiques

Les molécules isolées de *L. chagosensis*, *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp. 2110 (section 4.1, section 4.2-Figure 33, section 4.3-Figure 54) ont été testées sur le *quorum sensing* de *Vibrio harveyi*. Les tests biologiques sur le QS consistent à mettre en évidence d'éventuelles activités inhibitrices des molécules isolées sur deux phénotypes contrôlés par le QS: la bioluminescence [Bassler et al. 1993] et la virulence [Ruwandeeepika et al. 2011].

1. Effet des composés sur la bioluminescence de *V. harveyi*

L'influence des molécules isolées (ilimaquinone, isonaamine A, isonaamine D, isonaamidine A, bis-isonaamidine A-Zn et leucettamine D) sur la bioluminescence de *V. harveyi* est évaluée sur un test miniaturisé en mesurant la luminescence par spectrométrie, dans un milieu Marine Broth (MB) sur microplaque de 96 puits.

L'objectif de ce travail est double. Dans un premier temps, il s'agit (1) de déterminer l'effet des produits isolés sur la bioluminescence de *V. harveyi*. Une cinétique d'absorbance à 595 nm est réalisée en parallèle de la cinétique de luminescence afin de contrôler la croissance bactérienne. Le QS est un mécanisme de régulation dépendant de la densité bactérienne, à l'opposé des antibiotiques, l'inhibition du QS n'affecte pas la croissance bactérienne [Fuqua et al. 1994] [Bhardwaj et al. 2013] [Tang & Zhang 2014]. Dans le cas d'un produit inhibiteur de la luminescence dépourvu d'activité antibiotique, l'étape suivante est (2) de déterminer sur quelle voie du QS de *V. harveyi* agit le composé.

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Concentrations en produit testées

Les composés isolés des éponges sont testés à quatre concentrations différentes. Les composés de *L. chagosensis* ont été testés à 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Des concentrations plus élevées ont été testées pour l'ilimaquinone isolée de *Cacospongia* sp. (15,625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Dans chacun des cas, un blanc est également effectué sans molécule et constitue le témoin de l'expérience.

1.1.2. Souches bactériennes utilisées

Le test est réalisé sur quatre souches bactériennes de *V. harveyi*: une souche sauvage (BB120) [Bassler et al. 1997] et trois souches mutantes (JAF375, JMH597 et JMH612) [Freeman & Bassler 1999] [Henke et al 2004].

Les souches JAF375, JMH597 et JMH612 sont dites « doubles mutantes » ; elles ne possèdent qu'une seule voie d'activation du QS de *V. harveyi* (soit un seul récepteur actif) sur les trois voies existantes. L'utilisation de ces souches mutantes permet de déterminer sur quelle voie du QS le composé agit.

Tableau 15 : Tableau présentant les souches bactériennes utilisées et les voies d'activation du *quorum sensing* de *v. harveyi* qu'elles possèdent.

Souche bactérienne	LuxN (HAI-1)	LuxPQ (AI-2)	CqsS (CAI-1)
BB120	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE
JAF375	ABSENTE	ABSENTE	PRESENTE
JMH597	ABSENTE	PRESENTE	ABSENTE
JMH612	PRESENTE	ABSENTE	ABSENTE

1.1.3. Mesures d'absorbance et de luminescence

Les mesures de luminescence en Relative Light Unit (RLU) et d'absorbance (à DO = 595 nm) s'effectuent simultanément par spectrométrie. La cinétique d'absorbance est assimilée à la croissance bactérienne, et permet de vérifier que les composés testés n'affectent pas la croissance de la population bactérienne.

Les données d'absorbance et de luminescence ont été calculées à l'aide des équations 1 et 2:

$$A_{\text{bactérie}} = A_{\text{total}} - A_{\text{milieu}} - A_{\text{produit}} \quad (\text{Équation 1})$$

$$L_{\text{bactérie}} = L_{\text{total}} - L_{\text{milieu}} - L_{\text{produit}} \quad (\text{Équation 2})$$

Où A_{totale} et L_{total} correspondent à l'absorbance et la luminescence totales, A_{milieu} et L_{milieu} à l'absorbance et la luminescence du milieu, enfin A_{produit} et L_{produit} correspond à l'absorbance et la luminescence liées au composé testé.

Les valeurs d'absorbance et de luminescence des 10 premiers cycles (1 cycle = 10 minutes) et les valeurs d'absorbance et de luminescence de la population bactérienne ont été déduites des valeurs (i) d'absorbance et de luminescence totales (respectivement A_{totale} et L_{totale}) mesurées pour les puits test (bactérie et composé testé) ; (ii) l'absorbance et la luminescence du témoin milieu uniquement (respectivement A_{milieu} et L_{milieu}) ; et (iii) l'absorbance et la luminescence du produit testé (respectivement A_{produit} et L_{produit}) mesurées dans un puits contenant uniquement une solution de produit dans le milieu.

Pour chaque concentration en composé testé (cf. section 5.1.1.1), chaque souche bactérienne étudiée (cf. section 5.1.1.2), et chaque variable mesurée (Absorbance/Luminescence), les cinétiques sont réalisées en triplicats (composé isolé de *Cacospongia* sp., *Dysidea* sp. et *Darwinella* sp.) ou duplicats (composé isolé de *L. chagosensis*).

1.1.4. Analyses des données d'absorbance et de luminescence

Les cinétiques d'absorbance et de luminescence sont modélisées à l'aide d'une fonction logistique selon l'équation 3. Cette courbe de tendance est une sigmoïde qui permet d'exprimer l'abondance de la population bactérienne (ici via l'absorbance) ou sa luminescence en fonction du temps (t) et selon quatre paramètres : « r », « a », « b » et « K » [Kingsland 1982].

$$Y = \frac{(K-b)}{1+ae^{-rt}} + b \quad (\text{Équation 3})$$

Le paramètre K correspond aux valeurs maximales d'absorbance et de luminescence et correspond au « plateau » observé sur les cinétiques des deux variables. Le paramètre « r » (appelé « taux de croissance » de la population) représente la vitesse de croissance avec laquelle la population atteint sa valeur maximale (K). Enfin, les paramètres « a » et « b » contrôlent respectivement la forme de la sigmoïde (quasi-linéaire *versus* sigmoïde prononcée) et la valeur théorique d'absorbance au début de la croissance bactérienne (ordonné à l'origine).

Pour chacun des composés et concentrations testés (y compris les témoins sans produit), les paramètres du modèle logistique sont déterminés à l'aide de la fonction « *nls* » du package « *stat* » du logiciel R 3.1.0.

Dans notre cas, ces paramètres sont utilisés pour déterminer l'effet antibiotique des composés testés d'une part (avec les mesures d'absorbance) et le retard de la luminescence d'autre part (Figure 57).

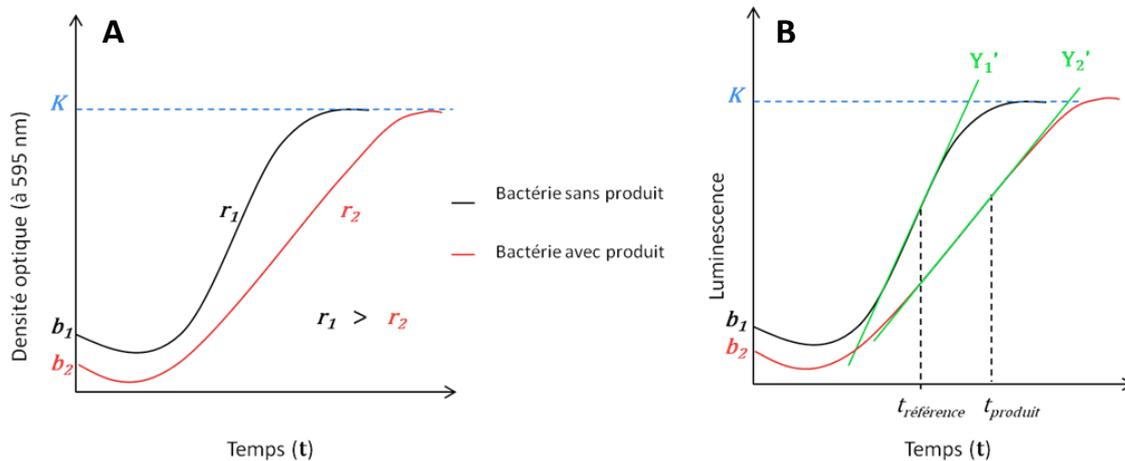


Figure 56 : Schéma théorique exposant deux courbes logistiques, respectivement avec et sans produit testé. (A) la cinétique de la densité optique est assimilée à la croissance bactérienne. Les paramètres a , b et r sont propres à chaque courbe tandis que le paramètre k est fixé et le même pour les deux courbes (B) la cinétique de la luminescence est assimilée à la bioluminescence bactérienne. Les points d'inflexion de chacune des courbes ($t_{référence}$ et $t_{produit}$) correspondent au temps pour lequel la pente (i.e., la dérivée de la fonction logistique, notée Y') est maximale (en vert).

L'effet du composé testé sur l'absorbance à 595 nm (assimilée à la croissance bactérienne) est déterminé (1) par comparaison des taux de croissance « r » en présence du composé testé à différentes concentrations (Figure 56.A). Le paramètre « r » représente dans notre cas la vitesse de croissance de la population bactérienne. Et par comparaison (2) de la valeur d'absorbance correspondant à la différence d'absorbance entre la fin de la cinétique ($t= 750$ min) et le début ($t= 0$ min).

L'effet des composés sur la luminescence est déterminé (1) par comparaison des points d'inflexions de chaque cinétique aux divers concentrations testées du composé testé, et (2) par comparaison des valeurs moyennes de luminescence au point d'inflexion du témoin et (3) par comparaison des retards de luminescence. Le point d'inflexion d'une courbe définit le temps (t) pour lequel la pente (i.e. la fonction logistique dérivée Y') est maximale (Figure

56). Le retard de luminescence R_{lum} correspond donc à la différence entre le point d'inflexion de la courbe du témoin (bactérie sans le composé testé, noté $t_{témoin}$) et le point d'inflexion de la courbe test (bactérie avec le composé testé, noté $t_{produit}$) selon l'équation 4. En particulier, une valeur positive pour R_{lum} indique que le produit testé retarde la bioluminescence de *V. harveyi*.

$$R_{lum} = t_{produit} - t_{témoin} \text{ (équation 4)}$$

Lorsque les cinétiques d'absorbance et de luminescence n'ont pas pu être suivies au cours du temps pour des raisons techniques (molécules issues de *L. chagosensis*), la densité optique à 595 nm est mesurée en fin de cinétique (à 350 minutes) uniquement [Tintiller, 2015].

1.1.5. Tests statistiques

Deux tests statistiques non paramétriques ont été utilisés : le test de Spearman et le test de Kruskal-Wallis. Le test de Spearman est utilisé lorsque le nombre de réplicat est de $n = 2$ (cas des composés isolés de *L. chagosensis*) et le test de Kruskal-Wallis pour $n = 3$ (cas des composés isolés de *Cacospongia* sp. et *Dysidea* sp.)

L'existence d'une relation entre l'absorbance et la concentration des composés testés est testée à l'aide du test de corrélation non paramétrique de Spearman (fonction « cor.test » dans R3.1.0.), dans le cas des composés issus de *L. chagosensis*. Un coefficient de corrélation de Spearman (nommé rho) qui n'est pas significativement différent de zéro suggère une absence de relation entre la concentration en produit et la croissance bactérienne, tandis qu'un coefficient de corrélation significativement différent de zéro (soit proche de 1 ou de -1) suggère un lien entre les deux variables. De plus une corrélation positive ($\rho > 0$) suggère que le produit accélère la croissance bactérienne, alors qu'une valeur négative ($\rho < 0$) suggère une inhibition de la croissance bactérienne par le produit testé.

Les données obtenues à différentes concentrations en composés testés sont comparées entre elles à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (fonction « kruskal.test » du package « pgirmess » du logiciel R 3.1.0) adapté pour les petits échantillons. Une p-value $< 0,05$ indique un effet significatif des composés testés sur la croissance bactérienne ou la luminescence, et inversement. Lorsqu'une différence significative d'absorbance ou de luminescence entre les concentrations testées est identifiée, un test post-hoc est effectué à l'aide de la fonction « kruskalmc » du package « pgirmess » afin de tester les différences deux à deux.

1.2. Résultats

1.2.1. Activité des molécules isolées de *L. chagosensis*

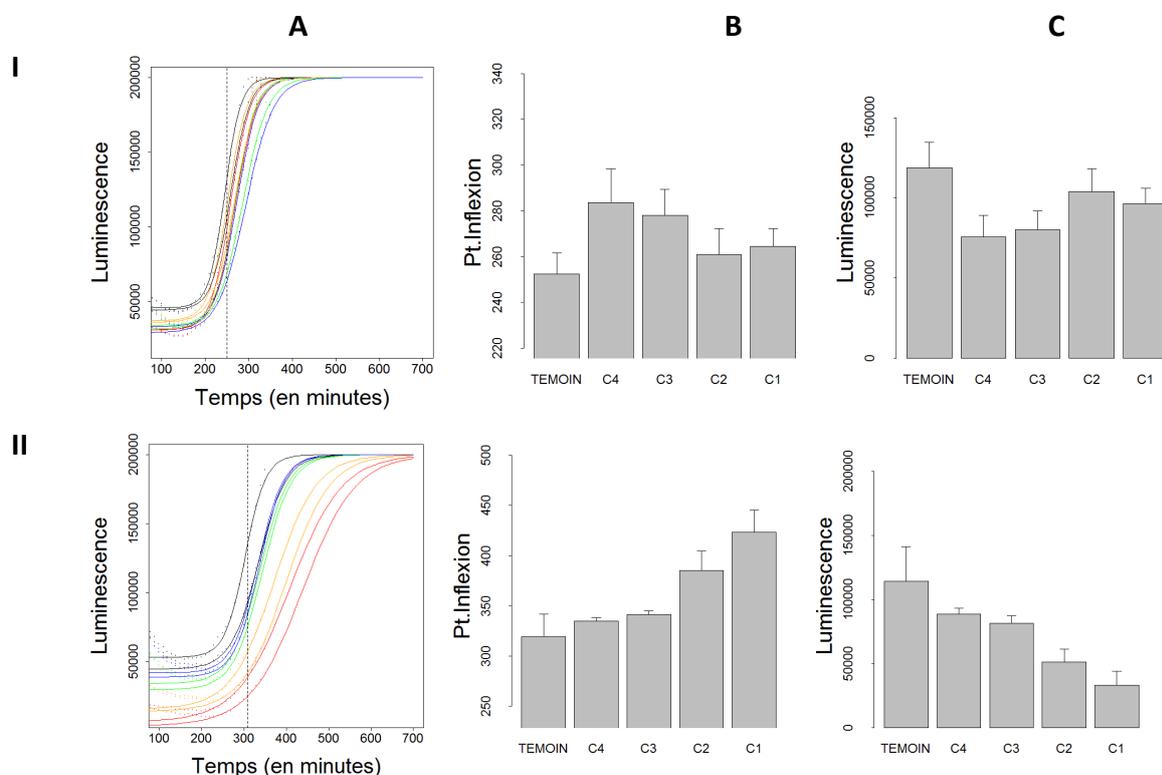
1.2.1.1. Effet sur la luminescence de la souche sauvage

L'effet des composés isolés de *L. chagosensis* sur *V. harveyi* a été mesuré dans un premier temps sur la souche sauvage de BB120. Sur cette souche, des cinétiques de luminescence contrastées ont été obtenues en présence de l'isonaamine A et son dérivé O-méthylé l'isonaamine D (Figure 57.I.A et Figure 57.II.A).

En présence de l'isonaamine A, les points d'inflexion des cinétiques de luminescence de la souche BB120 n'étaient pas significativement différents entre les concentrations testées (p-value > 0,05, Figure 57.I.B).

En présence de l'isonaamine D en revanche, des points d'inflexions significativement différents ont été obtenus entre les concentrations testées, avec des retards de luminescence dose dépendants (Figure 57.II.B). A titre d'exemple, les retards de luminescence s'élevaient à 66 minutes et 105 minutes aux concentrations 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivement (Figure 16).

Des résultats similaires ont été obtenus pour la luminescence mesurée au point d'inflexion du témoin (Figure 57.I.C et Figure 57.II.C) : des valeurs de luminescence plus faibles ont été obtenues aux concentrations en composé plus élevées.



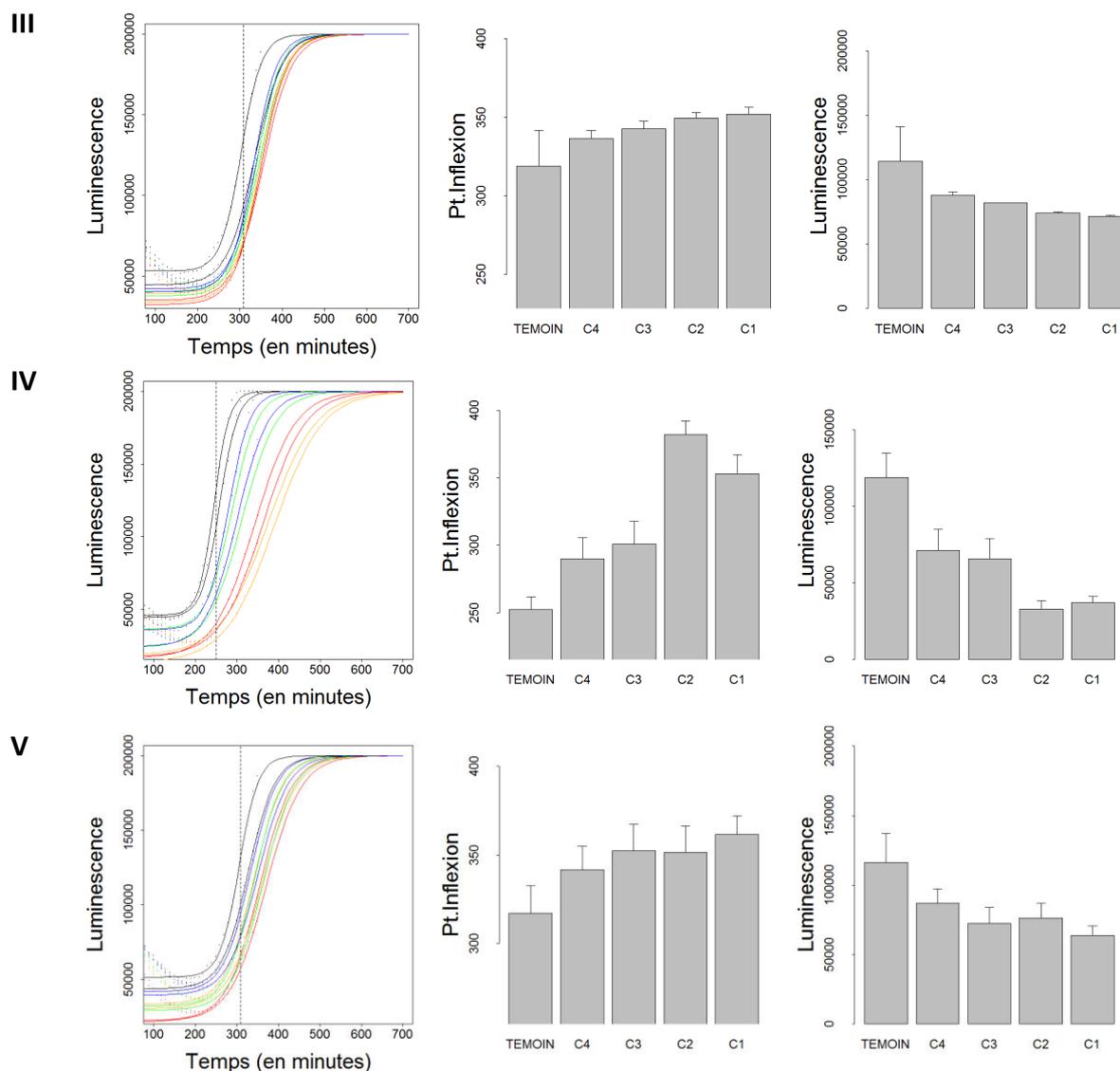


Figure 57 : (A) Cinétiques de luminescence de BB120, (B) Points d’inflexions des cinétiques de luminescence de BB120, et (C) valeurs de luminescence au point d’inflexion du témoin (représente en pointillé sur les encarts A), en présence de l’isonaamine A (I), l’isonaamine D (II) de bis-isonaamidine A-Zn (III) de l’isonaamidine A (IV) et de la leucettamine D (V) à 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (noir, « témoin »), 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (bleu, « C4 »), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (vert, « C3 »), 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (orange, « C2 ») et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (rouge, « C1 »).

Les résultats relatifs au complexe de zinc, le bis-isonaamidine A-Zn et son monomère, l’isonaamidine A sont présentés en Figure 57.III et Figure 57.IV : aucun effet significatif du bis-isonaamidine A-Zn sur la luminescence de la souche sauvage (BB120) de *V. harveyi* n’a pu être mis en évidence, quelle que soit la concentration testée (Figure 57.III). Des résultats similaires ont été obtenus pour la luminescence mesurée au point d’inflexion du témoin (Figure 57.III.C).

En revanche l’isonaamidine A induit un retard de luminescence de la souche BB120, avec des points d’inflexion tardifs aux fortes concentrations (Figure 57.IV.B); la différence par rapport au témoin est significative pour les concentrations de 10 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ avec respectivement des retards de 127 minutes et 101 minutes (Tableau 16).

En présence de la leucettamine D, aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur la luminescence de *V. harveyi* (Figure 57.V).

1.2.1.2. Effet sur la luminescence des mutants

Les composés ont ensuite été testés sur les doubles mutants ne possédant qu'un seul récepteur du *quorum sensing* de *V. harveyi*. Sur les mutants de *V. harveyi*, des retards de luminescence significatifs ont été obtenus en présence de deux composés isolés de *L. chagosensis*: l'isonaamine D et l'isonaamidine A (Figure 58, Figure 59 et Tableau 16).

En présence de l'isonaamine D, des points d'inflexions significativement différents du témoin ont été obtenus sur les trois mutants, en particulier sur la souche JAF375. Des résultats similaires ont été obtenus pour la luminescence, qui est diminuée lorsque la concentration en isonaamine D est augmentée ce qui se traduit par un retard de la luminescence de 66 minutes et 114 minutes à 10 µg.ml⁻¹ et 50 µg.ml⁻¹ respectivement (Figure 58, Tableau 16).

En présence de l'isonaamidine A, les valeurs de luminescence sont fortement diminuées voir nulles. Des retards de luminescence de 60 minutes et 80 minutes sur respectivement JAF375 et JMH612 ont été mis en évidence lorsque l'isonaamidine A est testé à 10 µg.ml⁻¹. Sur une cinétique de 350 minutes, une inhibition totale de la luminescence est constatée sur le mutant JMH597 à partir de 10 µg.ml⁻¹ en isonaamidine A (Figure 59, Tableau 16).

Tableau 16 : Retards de luminescence calculés par rapport au point d'inflexion du témoin en présence des composés isolés de *L. chagosensis* (testés à 1 µg.ml⁻¹, 5 µg.ml⁻¹, 10 µg.ml⁻¹, et 50 µg.ml⁻¹).

		retards de luminescence (en minutes)			
		BB120	JAF375	JMH597	JMH612
isonaamine A	1 µg.ml ⁻¹	31	25	41	30
	5 µg.ml ⁻¹	26	24	32	30
	10 µg.ml ⁻¹	8	13	9	19
	50 µg.ml ⁻¹	10	8	-16	11
isonaamine D	1 µg.ml ⁻¹	16	5	-4	34
	5 µg.ml ⁻¹	22	16	17	33
	10 µg.ml ⁻¹	66	66	54	69
	50 µg.ml ⁻¹	105	114	77	76
bis-isonaamidine A-Zn	1 µg.ml ⁻¹	18	6	-5	20
	5 µg.ml ⁻¹	24	6	2	32
	10 µg.ml ⁻¹	31	5	12	48
	50 µg.ml ⁻¹	33	9	19	41
isonaamidine A	1 µg.ml ⁻¹	37	10	27	28
	5 µg.ml ⁻¹	48	33	65	45
	10 µg.ml ⁻¹	127	60	inhibition	80
	50 µg.ml ⁻¹	101	48	inhibition	70
leucettamine D	1 µg.ml ⁻¹	25	42	33	46
	5 µg.ml ⁻¹	36	41	46	42
	10 µg.ml ⁻¹	35	36	63	28
	50 µg.ml ⁻¹	45	32	76	14

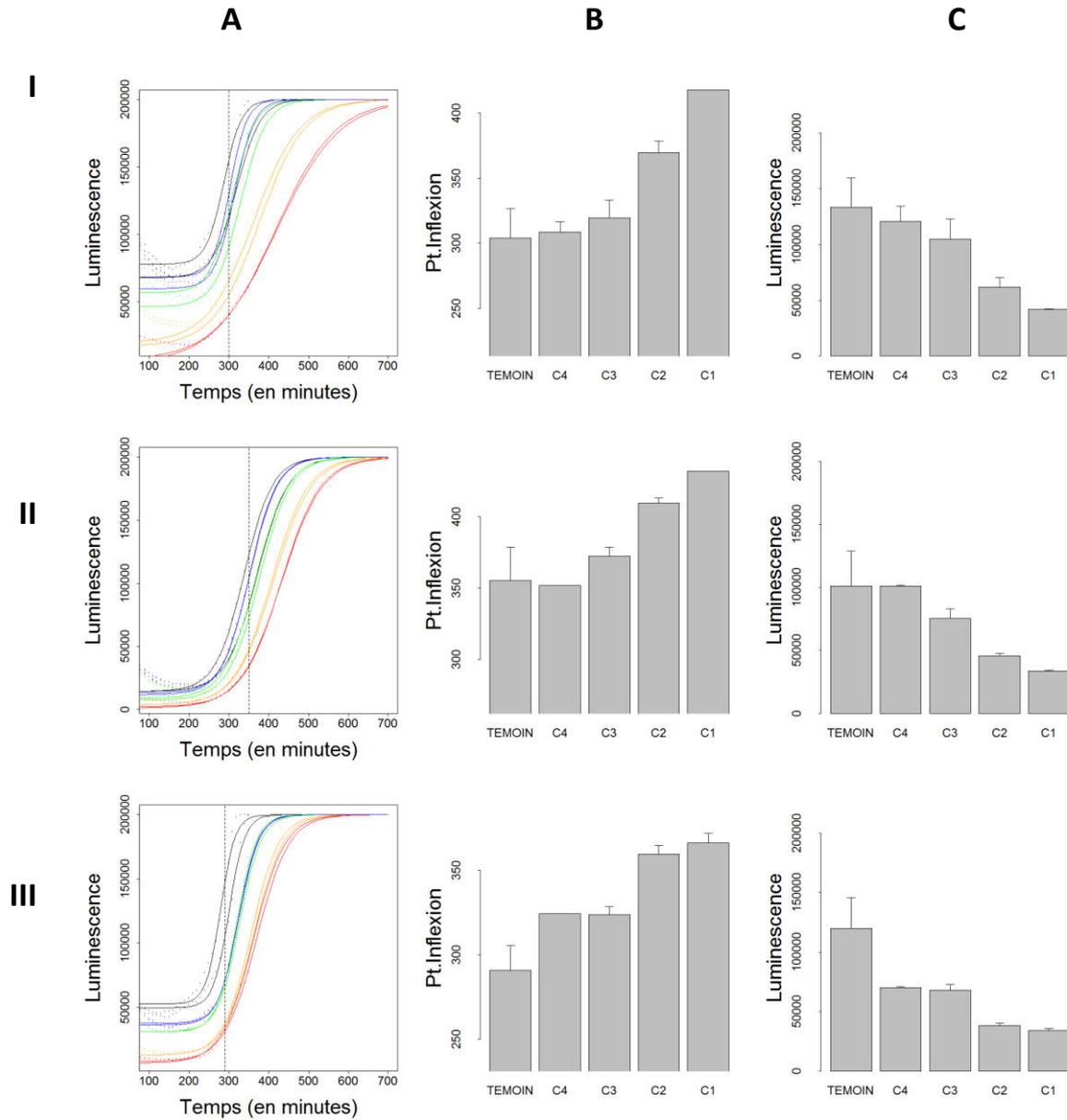


Figure 58 : Effet de l'isonaamine D sur les mutants JAF375 (I), JMH597 (II) et JMH612 (III). (A) Cinétiques de luminescence, (B) Points d'inflexions des cinétiques de luminescence, et (C) Valeurs de luminescence au point d'inflexion du témoin (représenté en pointillé sur les encarts A), en présence de l'isonaamine D à $0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (noir, « TEMOIN »), $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (bleu, « C4 »), $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (vert, « C3 »), $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (orange, « C2 ») et $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (rouge, « C1 »).

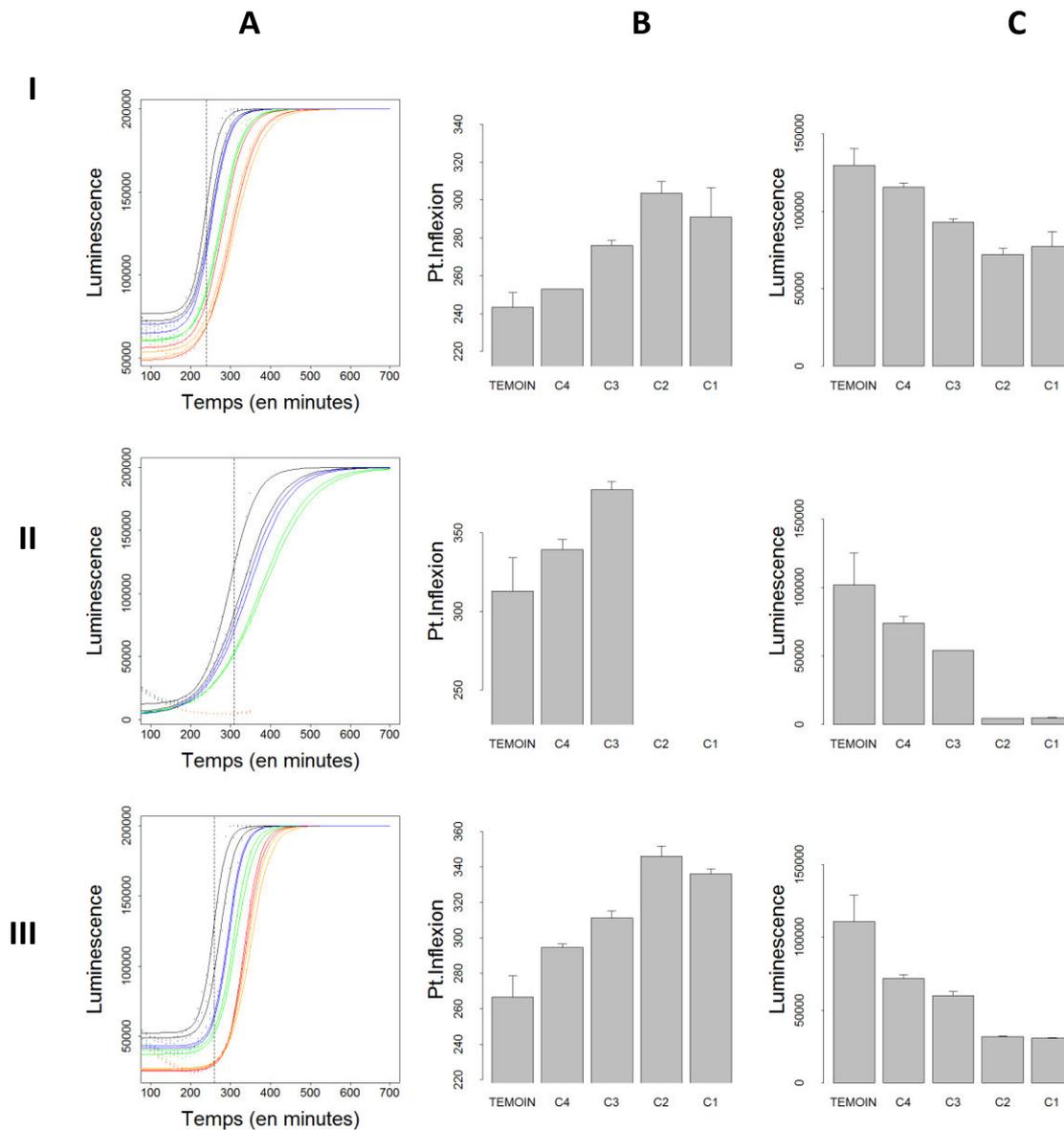


Figure 59 : Effet de l'isonamidine A sur les mutants JAF375 (I), JMH597 (II) et JMH612 (III). (A) Cinétiques de luminescence, (B) Points d'inflexions des cinétiques de luminescence, et (C) Valeurs de luminescence au point d'inflexion du témoin (représenté en pointillé sur les encarts A), en présence de l'isonaamine D à 0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (noir, « Témoin »), 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (bleu, « C4 »), 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (vert, « C3 »), 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (orange, « C2 ») et 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (rouge, « C1 »).

1.2.1.3. Effet sur la croissance bactérienne

Afin de voir si les retards ou l'inhibition de la luminescence de *V. harveyi* étaient liés à une activité anti-*quorum sensing* des composés testés, un contrôle de la toxicité des composés testés sur les bactéries a été effectué. Dans le cas des composés de *L. chagosensis* un test de corrélation a été réalisé entre l'absorbance à 595 nm et la concentration en molécule testée.

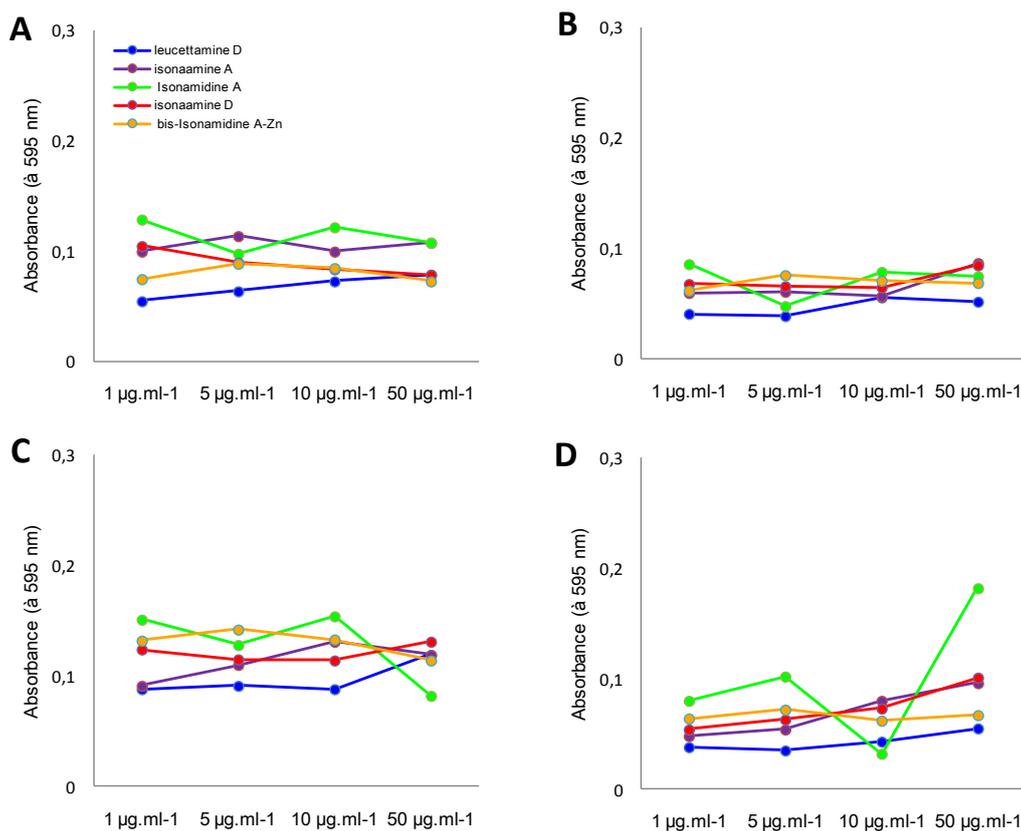


Figure 60 : Courbes de dose-réponse de la leucettamine D (bleu foncé), l'isonaamine A (rouge), l'isonaamidine A (vert), l'isonaamine D (violet) et le bis-isonaamidine A-Zn (bleu clair) sur l'absorbance (assimilée à la croissance bactérienne) de *V. harveyi*, (A) de la souche bactérienne sauvage BB120 (B) de la souche mutante JAF375 (C) de la souche mutante JMH597 (D) de la souche mutante JMH612.

Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les mesures d'absorbance en présence des composés testés et la concentration en composés ($p > 0,05$) quelle que soit la souche bactérienne considérée (Figure 60). Toutefois, des taux de corrélation négatifs relativement élevés en valeur absolue (mais non significatifs) ont été obtenus pour l'isonaamine A ($\rho = -0,4$) et l'isonaamidine A ($\rho = -0,7$) sur la souche naturelle BB120 et pour le bis-isonaamidine A-Zn sur les mutants JAF375 ($\rho = -0,6$) et JMH612 ($\rho = -0,5$) (Tableau 17).

Tableau 17 : Coefficients de corrélations de Spearman (ρ) obtenus entre la concentration en produits isolés de *L. chagosensis* et l'absorbance (assimilée à la croissance bactérienne).

Composés	BB120		JAF375		JMH597		JMH612	
	ρ	p -value						
leucettamine D	0	1	0,5	0,45	0,9	0,083	0,3	0,68
isonaamine A	-0,4	0,49	0,1	0,95	-0,3	0,68	0,7	0,23
isonaamidineA	-0,7	0,23	0,1	0,95	-0,1	0,95	0,4	0,52
isonaamine D	1	0,083	0,2	0,92	0,1	0,95	0,4	0,52
bis-isonaamidine A-Zn	-0,3	0,68	-0,6	0,35	0,6	0,35	-0,5	0,45

1.2.2. Activité des molécules isolées de *Dysidea* sp.

1.2.2.1. Effet sur la luminescence de la souche sauvage

Les composés isolés de *Dysidea* sp. (fascaplysine, tuamotuolol et le mélange (palauolide + composé D3) ont été testés à 50 µg.ml⁻¹ sur la souche sauvage BB120 : (1) aucun effet du tuamotuolol n'est constaté sur la luminescence de *V. harveyi* et (2) la fascaplysine et le mélange (palauolide + composé D3) inhibent la luminescence.

En présence du mélange (à 1 µg.ml⁻¹, 5 µg.ml⁻¹, 10 µg.ml⁻¹ et 50 µg.ml⁻¹), des retards de luminescence ont été mis en évidence avec des points d'inflexion et des valeurs de luminescence significativement différents du témoin à partir de 10 µg.ml⁻¹ (p < 0,05, Tableau 18 et Figure 61).

1.2.2.2. Effet sur la luminescence des mutants

De même sur les trois souches mutantes, des points d'inflexion significativement élevés par rapport au témoin ont été obtenus en présence du mélange pour une concentration de 50 µg.ml⁻¹ (p-value < 0,05, Tableau 18). Des retards de luminescence de 66 et 77 minutes ont été calculés respectivement pour les mutants JMH597 et JMH612 en présence du mélange à 50 µg.ml⁻¹.

Tableau 18 : Résultats du test de Kruskal-wallis relatif à l'influence du mélange (palauolide + composé D3) sur les points d'inflexion (pt. d'inflexion), la luminescence, le taux de croissance « r » et l'absorbance. En gras les p-value significatives (p < 0,05).

souche	p-value		p-value	
	pt. d'inflexion	luminescence	r	absorbance
BB120	0.013	0.011	0,023	0.095
JAF375	0.0094	0.0091	0.024	0.78
JMH597	0.011	0.011	0.0091	0.026
JMH612	0.012	0.012	0.080	0.059

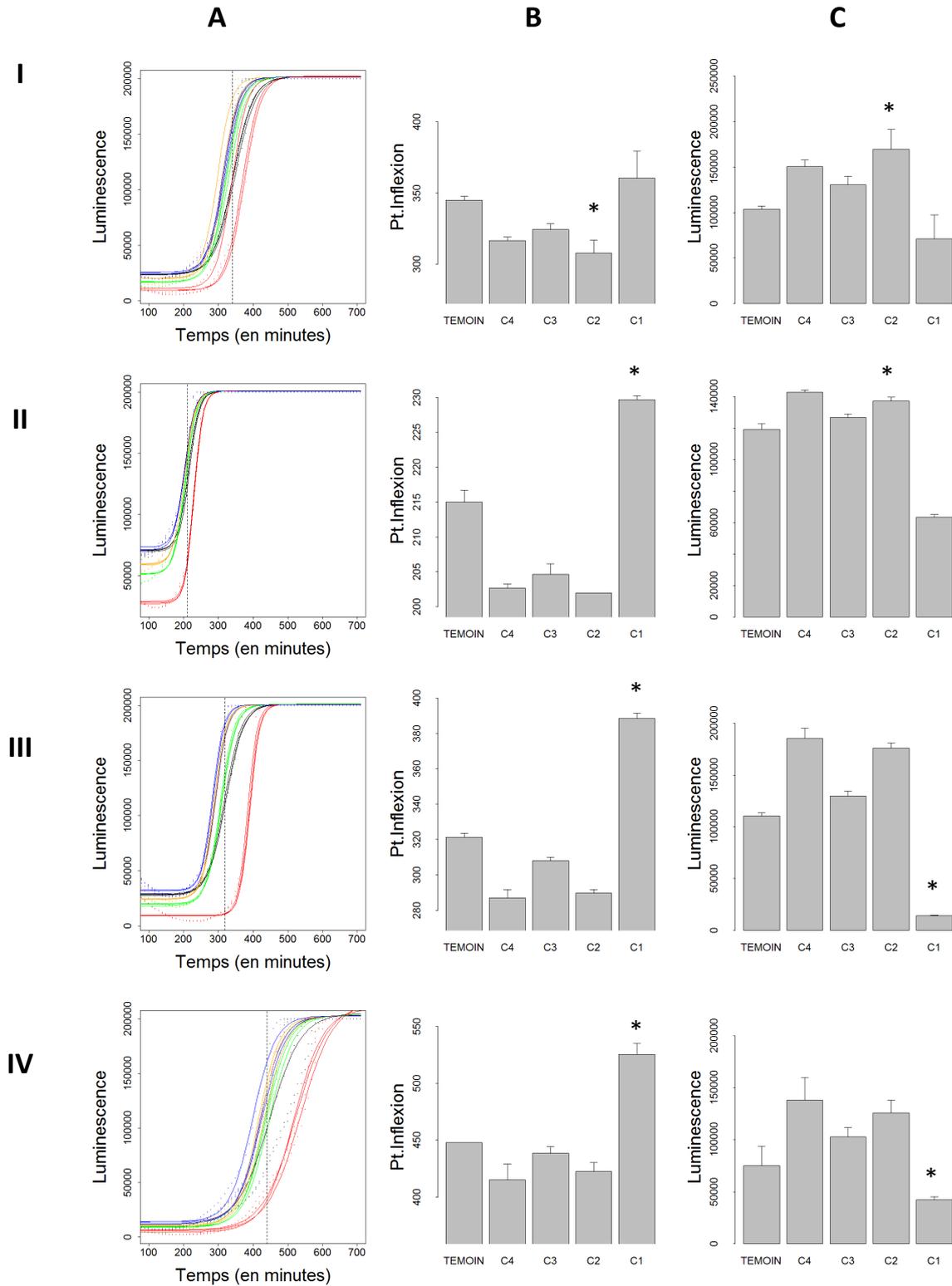


Figure 61 : Effet du mélange (palauolide + composé D3) sur les mutants BB120 (I), JAF375 (II), JMH597 (III) et JMH612 (IV). (A) Cinétiques de luminescence, (B) Points d'inflexion des cinétiques de luminescence, et (C) Valeurs de luminescence au point d'inflexion du témoin (représenté en pointillé sur les encarts A), en présence du mélange à 0 µg.ml⁻¹ (noir, « Témoin »), 1 µg.ml⁻¹ (bleu, « C4 »), 5 µg.ml⁻¹ (vert, « C3 »), 10 µg.ml⁻¹ (orange, « C2 ») et 50 µg.ml⁻¹ (rouge, « C1 »). Les barres représentent la valeur moyenne (± écart type) sur 3 réplicats. (* significatif selon Kruskal-Wallis)

1.2.2.1. Effet sur la croissance bactérienne

Aucun effet antibiotique n'a été mis en évidence en présence du mélange sur la croissance bactérienne des quatre souches de *V. harveyi* étudiées. Toutefois des taux de croissance significativement supérieurs au témoin en présence du tuamotuolol ont été obtenus à $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ sur les souches JAF375 et JMH597 (Tableau 18, Tableau 19, Figure 63).

Tableau 19 : Taux de croissances « r » moyens des souches bactériennes de *V. harveyi* en présence du mélange (palauolide + composé D3) à $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, et $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (taux de croissance moyenne)

Taux de croissance « r »				
	BB120	JAF375	JMH597	JMH612
TEMOIN	0,0083	0,0117	0,0079	0,0053
$1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	0,0092	0,0130	0,0100	0,0073
$5 \mu\text{g.ml}^{-1}$	0,0097	0,0123	0,0110	0,0080
$10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	0,0100	0,0133	0,0103	0,0075
$50 \mu\text{g.ml}^{-1}$	0,0107	0,0140	0,0127	0,0080

Les cinétiques de croissance bactérienne des souches de *V. harveyi* étudiées (sauvage et mutantes) ont été inhibées en présence de la fascaplysine à $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$. L'activité antibiotique de la fascaplysine a donc été évaluée en milieu solide sur des disques de 6 mm et sur d'autres souches bactériennes pathogènes en aquaculture : 02/041 (*V. aesturianus*), LGP32 (*V. splendidus*) TFA4 (*Tenacibaculum maritimum*). Sur les quatre souches testées, seule la croissance bactérienne de la souche TFA4 a été inhibée à $0,5 \mu\text{g}$ et $0,25 \mu\text{g}$ par disque en fascaplysine avec respectivement des diamètres d'inhibition de 11 mm et 18 mm (Figure 62).

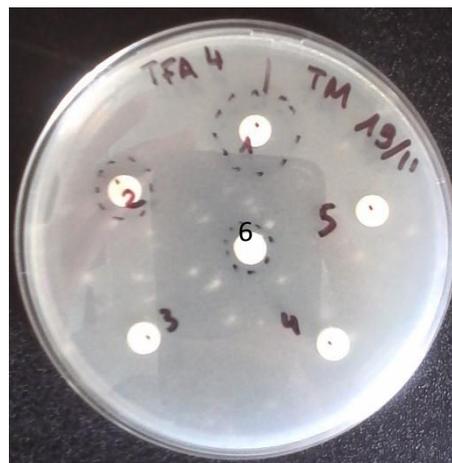


Figure 62 : Activité antibiotique de la fascaplysine sur la souche TFA4 (1) à $0,5 \mu\text{g}$, (2) $0,25 \mu\text{g}$, (3) $0,125 \mu\text{g}$ et (4) $0,0625 \mu\text{g}$

1.2.3. Activité de l'ilimaquinone isolé de *Cacospongia* sp. 2110

1.2.3.1. Effet sur la luminescence de la souche sauvage

L'ilimaquinone a montré sur la souche sauvage BB120 de *V. harveyi* une inhibition de la luminescence à 50 µg.ml⁻¹. Testée à différentes concentrations (à 15,325 µg.ml⁻¹, 31,25 µg.ml⁻¹, 62,5 µg.ml⁻¹ et 125 µg.ml⁻¹), des points d'inflexions et des valeurs de luminescence significativement différents du témoin (BB120 seul) ont été obtenus à partir de 125 µg.ml⁻¹ (Figure 64.I.B et I.C). Un retard de luminescence de 64 minutes a été calculé lorsque la concentration en ilimaquinone était de 125 µg.ml⁻¹ (Tableau 21).

Tableau 20 : Résultats du test de Kruskal-Wallis relatif à l'influence de l'ilimaquinone sur les points d'inflexion (pt. Inflexion), la luminescence, le taux de croissance « r » et l'absorbance. En gras les p-value significatives (p < 0,05).

souche	p-value		p-value	
	pt. d'inflexion	luminescence	r	absorbance
BB120	0,019	0,012	0,144	0,260
JAF375	0,049	0,048	0,015	0,035
JMH597	0,024	0,021	0,017	0,504
JMH612	0,028	0,026	0,057	0,024

1.2.3.2. Effet sur la luminescence des mutants

Des résultats similaires ont été obtenus sur les mutants de *V. harveyi* : des points d'inflexion et des valeurs de luminescence significativement différents à 125 µg.ml⁻¹ (p-value < 0,05), en particulier sur les souches JMH597 et JMH612 (p = 0,024 et p = 0,028 respectifs, Tableau 20). Les retards de luminescence calculés sur JMH597 et JMH612 étaient respectivement de 164 minutes et 67 minutes (Tableau 21).

Tableau 21 : Retards de luminescence en présence de l'ilimaquinone calculés par rapport au point d'inflexion du témoin.

	retards de luminescence (en minutes)			
	BB120	JAF375	JMH597	JMH612
15,625 µg.ml ⁻¹	22	0	15	5
31,25 µg.ml ⁻¹	34	0	44	5
62,5 µg.ml ⁻¹	47	6	125	40
125 µg.ml ⁻¹	64	26	164	67

1.2.3.3. Effet sur la croissance bactérienne

Les résultats sur les croissances bactériennes n'ont montré aucun taux de croissance inférieur à celui du témoin, donc aucune activité antibiotique de l'ilimaquinone quelque soit la souche bactérienne testée (Tableau 22). On peut néanmoins remarquer des vitesses de croissance bactérienne « r » significativement élevées par rapport au témoin sur les mutants

JAF375 et JMH597 aux concentrations les plus élevées en ilimaquinone : 62,5 µg.ml⁻¹ et 125 µg.ml⁻¹ (p value < 0,05, Tableau 20 et Tableau 22).

Tableau 22 : Taux de croissances « r » moyen des souches bactériennes de *V. harveyi* en présence de l'ilimaquinone à 15,325 µg.ml⁻¹, 31,25 µg.ml⁻¹, 62,5 µg.ml⁻¹ et 125 µg.ml⁻¹. (croissance moyenne ± erreur type)

	Taux de croissance "r"			
	BB120	JAF 375	JMH 597	JMH 612
Témoin	0,003 ± 0,0014	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,0002	0,005 ± 0,0007
15,625 µg.ml ⁻¹	0,004 ± 0,0004	0,006 ± 0,0004	0,007 ± 0,0002	0,007 ± 0,0003
31,25 µg.ml ⁻¹	0,004 ± 0,0008	0,007 ± 0,0002	0,007 ± 0,0002	0,007 ± 0,0002
62,5 µg.ml ⁻¹	0,004 ± 0,0009	0,007 ± 0,0001	0,008 ± 0,00009	0,007 ± 0,0002
125 µg.ml ⁻¹	0,005 ± 0,0011	0,006 ± 0,0002	0,009 ± 0,0002	0,007 ± 0,0002

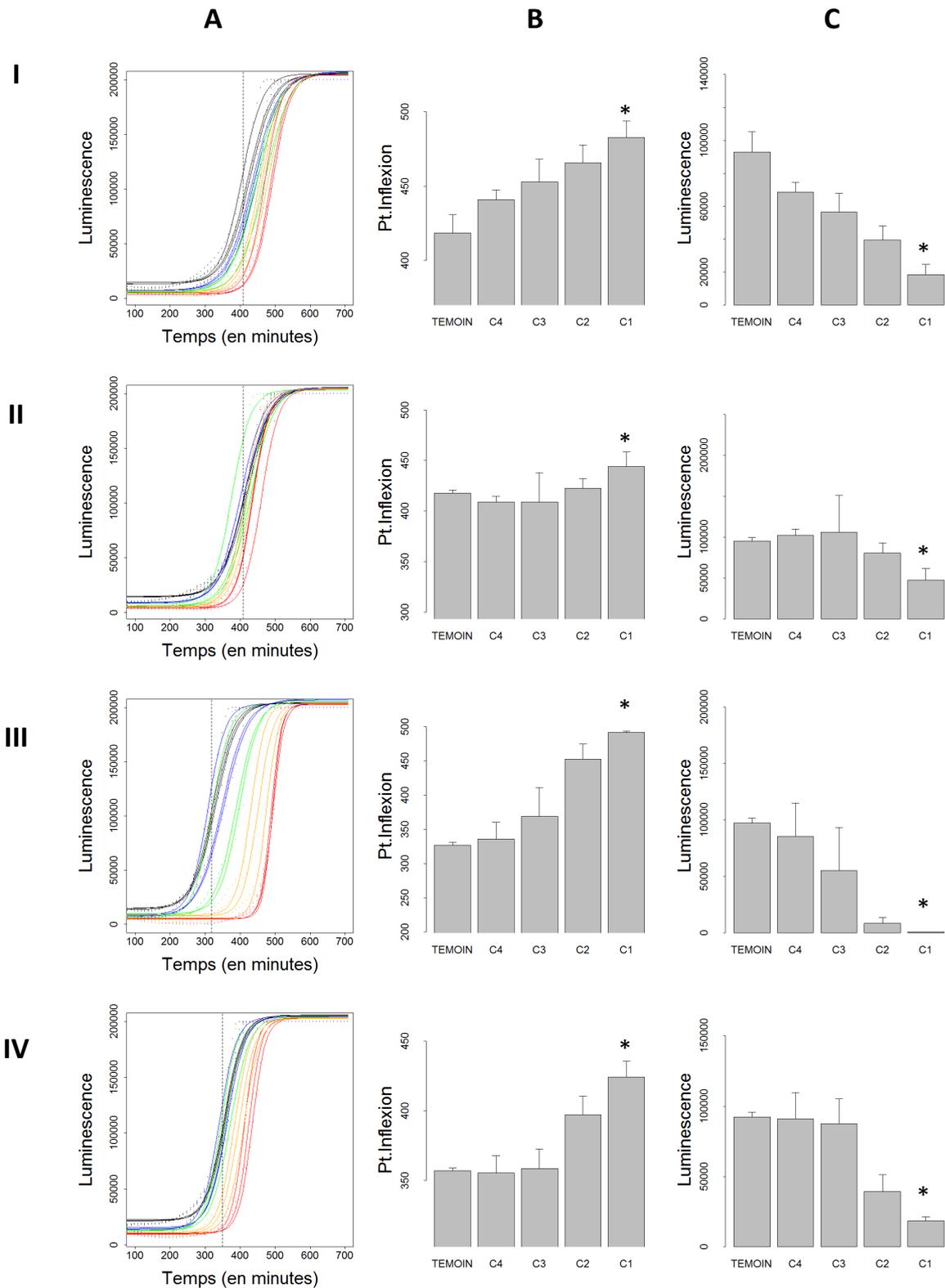


Figure 64 : Effet de l'ilimaquinone sur les mutants BB120 (I), JAF375 (II), JMH597 (III) et JMH612 (IV). (A) Cinétiques de luminescence, (B) Points d'inflexion des cinétiques de luminescence, et (C) Valeurs de luminescence au point d'inflexion du témoin (représenté en pointillé sur les encarts A), en présence de l'ilimaquinone à 0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (noir, « Témoin »), 15,625 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (bleu, « C4 »), 31,25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (vert, « C3 »), 62,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (orange, « C2 ») et 125 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (rouge, « C1 »). Les barres représentent la valeur moyenne (\pm écart type) sur 3 réplicats. (* significatif selon Kruskal-Wallis)

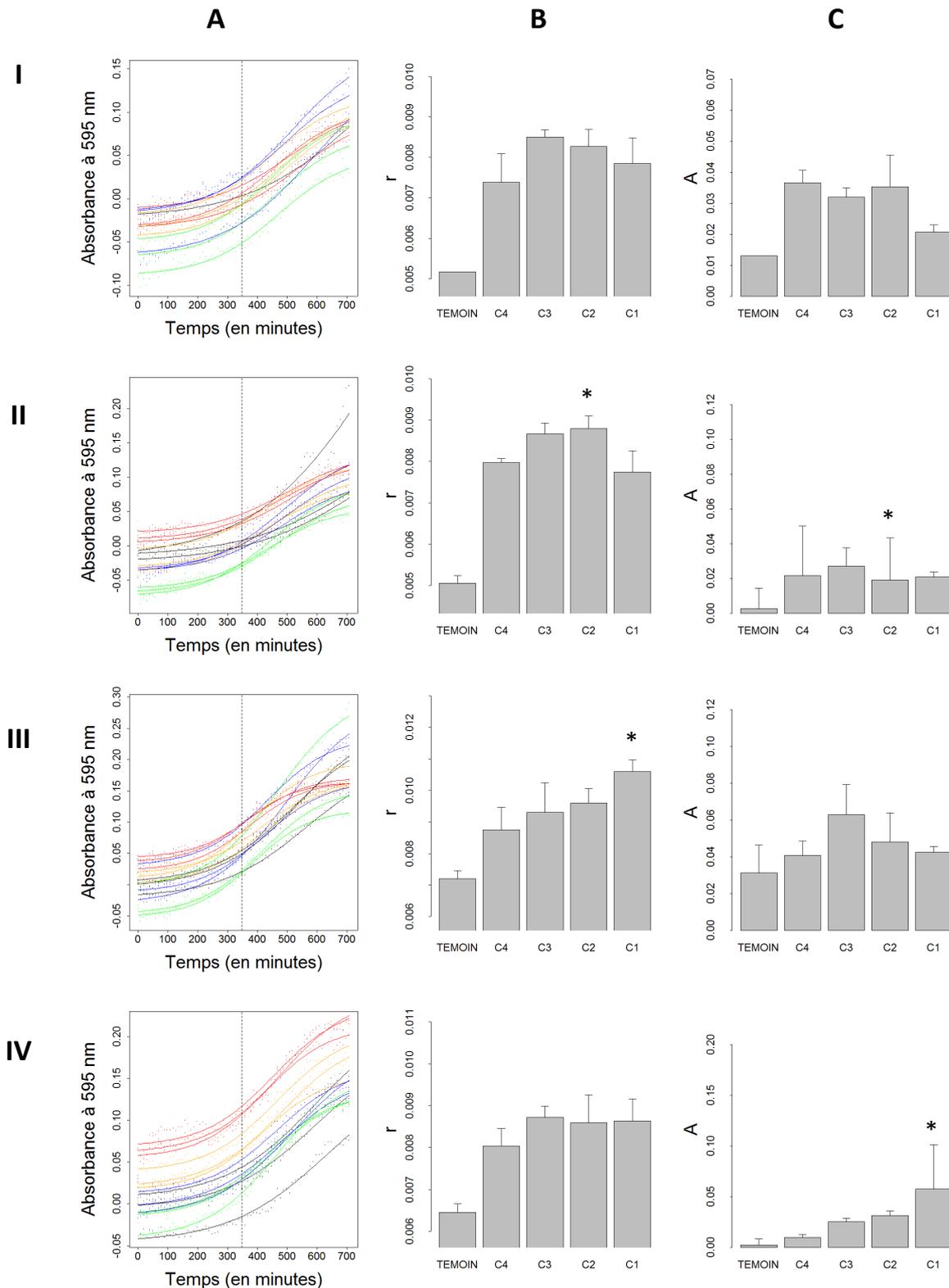


Figure 65 : Effet de l'ilimaquinone sur les mutants BB120 (I), JAF375 (II), JMH597 (III) et JMH612 (IV). (A) Cinétiques d'absorbance, (B) Taux de croissance et (C) Valeurs d'absorbance à 350 minutes (représenté en pointillé sur les encarts A), en présence de l'ilimaquinone à 0 µg.ml⁻¹ (noir, « Témoin »), 15,625 µg.ml⁻¹ (bleu, « C4 »), 31,25 µg.ml⁻¹ (vert, « C3 »), 62,5 µg.ml⁻¹ (orange, « C2 ») et 125 µg.ml⁻¹ (rouge, « C1 »). Les barres représentent la valeur moyenne (± écart type) sur 3 réplicats. (* significatif selon Kruskal-Wallis)

2. Effet des composés sur la virulence de *V. harveyi*

Le test d'inhibition de la bioluminescence a mis en évidence trois composés capables de retarder l'activation de la luminescence de *V. harveyi* : l'isonaamidine A et l'isonaamine D (isolés de *L. chagosensis*) ainsi que l'ilimaquinone (isolé de *Cacospongia* sp.). Ces produits ont donc été soumis à un test biologique complémentaire afin de déterminer leur influence sur la virulence de quatre souches bactériennes : BB120 (*V. harveyi*), 02/041 (*V. splendidus*), LGP32 (*V. aesturianus*) et TFA4 (*Tenacibaculum maritimum*). La virulence de ces souches bactériennes met en jeu des protéines extracellulaires : les métalloprotéases [De Decker et al. 2013a]. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'effet de l'isonaamine A, l'isonaamine D et l'ilimaquinone sur la production de métalloprotéases.

2.1. Matériels et Méthodes

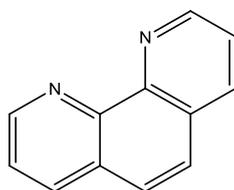
L'influence de l'isonaamidine A, l'isonaamine D et l'ilimaquinone sur la production de métalloprotéases des bactéries des genres *Vibrio* et *Tenacibaculum* est évaluée par un dosage des métalloprotéases par fluorescence.

2.1.1. Kit EnzCheck Gelatinase/ Collagenase

Le dosage des métalloprotéases est réalisé en utilisant le kit EnzCheck Gelatinase/ Collagenase. Le substrat de gélatine est conjugué à une fluorescéine (DQ gelatin) qui une fois hydrolysée, émet une fluorescence proportionnelle à la quantité de métalloprotéases dans le milieu.

2.1.2. Concentrations en produit testées

L'isonaamidine A, l'isonaamine D et l'ilimaquinone sont testées à 50 µg.ml⁻¹. L'*ortho*-phénanthroline (**157**) est utilisée comme inhibiteur témoin de l'activité protéolytique des métalloprotéases et testée à 12 mM. Pour chaque souche, un blanc sans produit est également effectué et constitue le témoin de l'expérience.



phénanthroline 157

2.1.3. Souches bactériennes utilisées

Les tests sont réalisés en duplicat sur quatre souches bactériennes pathogènes en aquaculture et capables de produire des métalloprotéases modulées par le QS : BB120 (*V. harveyi*), 02/041 (*V. splendidus*), LGP32 (*V. aesturianus*) [Garnier et al. 2007] et un

pathogène du genre *Tenacibaculum* isolé en Polynésie française TFA4 (*Tenacibaculum maritimum*). Le dosage des métalloprotéases est effectué sur les suspensions bactériennes après un temps de culture de 10 heures pour BB120, 6 heures pour la souche 02/041, et 15 heures pour les souches LGP32 et TFA4. Ce temps d'incubation a été déterminé après des tests préliminaires.

2.1.4. Mesures de fluorescence

Après ajout du substrat aux suspensions bactériennes en présence ou en absence de molécule à tester, les mesures de fluorescence sont effectuées à 3 heures. Comme indiqué par le fournisseur du kit de test, 2 heures sont nécessaires pour détecter une faible activité protéolytique de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ U.ml⁻¹. Une gamme d'étalonnage est effectuée afin de quantifier la valeur de la fluorescence en quantité de métalloprotéase (cf. annexes).

2.2. Résultats

Les résultats présentés dans la Figure 66 montrent l'activité métalloprotéase des suspensions bactériennes de BB120 (A), 02/041 (B), LGP32 (C) et TFA4 (D) : après 3h d'incubation avec le substrat (DQ Gelatin), en présence des composés isolés (ilimaquinone, isonaamine D et isonaamidine A) et d'un inhibiteur (*ortho*-phénanthroline).

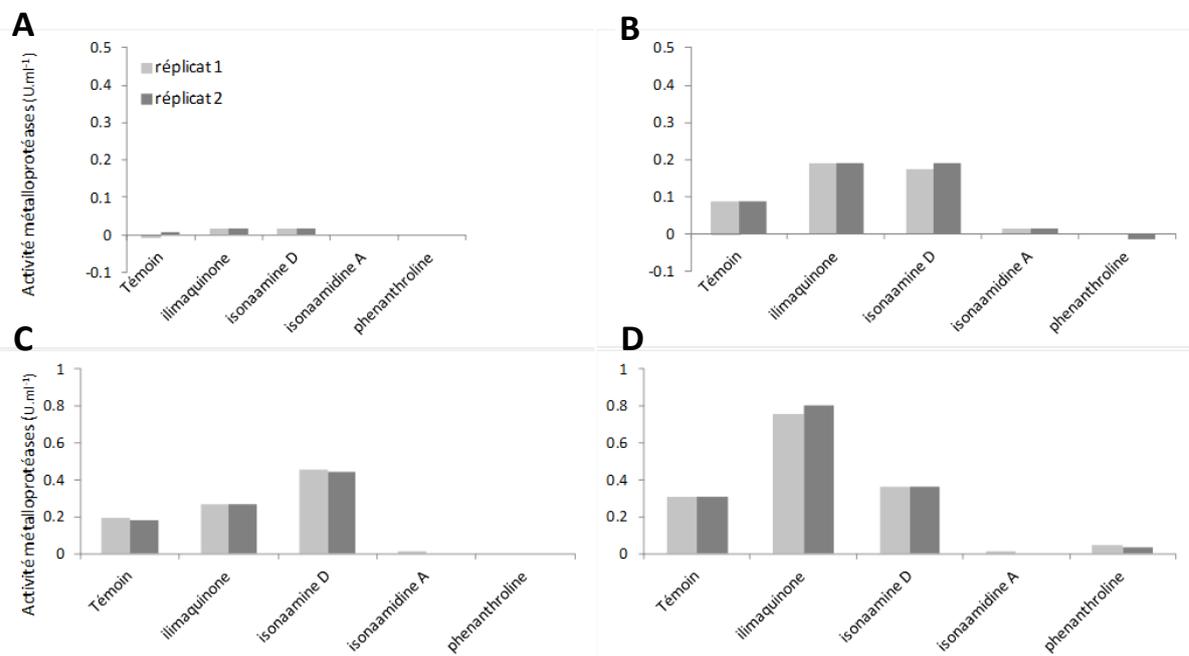


Figure 66 : Effet des composés isolés d'éponges (ilimaquinone, isonaamine D et isonaamidine A) et de la phénanthroline sur (A) la souche BB120 de *V. harveyi*, (B) la souche 02/041 de *V. splendidus*, (C) la souche LGP32 de *V. aesturianus* et (D) la souche TFA4 de *T. maritimum* après 3 heures d'incubations avec le substrat DQ Gelatin. Les données des 2 répliqués sont représentées sur les graphiques.

Les activités métalloprotéases des souches bactériennes en présence des molécules à tester ont été comparées à l'activité métalloprotéase du témoin. De faibles activités métalloprotéases ont été obtenues sur la souche BB120, soit $0,0079$ U.ml⁻¹ pour le témoin

(dix fois plus petite que le témoin de la souche 02/041). Les activités métalloprotéases des suspensions bactériennes témoins des souches 02/041, LGP32 et TFA4 atteignent des valeurs moyennes de respectivement 0,0869 U.ml⁻¹, 0,1896 U.ml⁻¹ et 0,3081 U.ml⁻¹.

Tableau 23 : Activités métalloprotéases des souches bactériennes BB120 (*V. harveyi*), 02/041 (*V. splendidus*), LGP32 (*V. aesturianus*) et TFA4 (*T. maritimum*) en présence de l'ilimaquinone, l'isonaamine D, l'isonaamidine A et le témoin d'inhibition de la production de métalloprotéases : la 1,10-phénanthroline. Les valeurs des 2 réplicats sont présentées dans le tableau.

	Activité métalloprotéases (U.ml ⁻¹)							
	<i>V. harveyi</i> (BB120)		<i>V. splendidus</i> (02/041)		<i>V. aesturianus</i> (LGP32)		<i>T. maritimum</i> (TFA4)	
Témoin	-0.0079	0.0079	0.0869	0.0869	0.1975	0.1817	0.3081	0.3081
ilimaquinone	0.0158	0.0158	0.1896	0.1896	0.2686	0.2686	0.7584	0.8058
isonaamine D	0.0158	0.0158	0.1738	0.1896	0.4582	0.4424	0.3634	0.3634
isonaamidine A	0	0	0.0158	0.0158	0.0158	0	0.0158	0
phénanthroline	0	0	0	-0.0158	0	0	0.0474	0.0316

L'activité métalloprotéase des souches 02/041, LGP32 et TFA4 diminue significativement en présence de l'isonaamidine A (Tableau 23), ce qui équivaut à une diminution de l'activité métalloprotéase d'environ -7%, -18% et -30% des souches 02/041, LGP32 et TFA4 (Tableau 24).

Tableau 24 : Différence d'activité métalloprotéases en pourcentage entre le témoin et la suspension bactérienne en présence des molécules testées. Une valeur négative correspond à une activité inhibitrice de la production de métalloprotéases. Les valeurs des 2 réplicats sont présentées dans le tableau.

	<i>V. harveyi</i> (BB120)		<i>V. splendidus</i> (02/041)		<i>V. aesturianus</i> (LGP32)		<i>T. maritimum</i> (TFA4)	
ilimaquinone	2%	1%	10%	10%	7%	9%	45%	50%
isonaamine D	2%	1%	9%	10%	26%	26%	6%	6%
isonaamidine A	1%	-1%	-7%	-7%	-18%	-18%	-29%	-31%
phenanthroline	1%	-1%	-9%	-10%	-20%	-18%	-26%	-28%

En revanche en présence de l'ilimaquinone et l'isonaamine D, les activités métalloprotéases des quatre souches étudiées (BB120, 02/041, LGP32 et TFA4) sont augmentées. Par exemple des activités métalloprotéases de 0,3634 U.ml⁻¹ et 0,7584 U.ml⁻¹ ont été obtenues pour respectivement l'isonaamine D et l'ilimaquinone sur TFA4, soit des augmentations d'environ 47% et 6% par rapport au témoin.

Ces résultats mettent en évidence une activité inhibitrice de l'activité métalloprotéases significatives de l'isonaamidine A sur les souches 02/041, LGP32 et TFA4.

3. Discussion et Conclusion

De nombreuses études ont mis en évidence le potentiel des métabolites secondaires en tant qu'inhibiteur du *quorum sensing* (QSI) notamment pour des applications en aquaculture [Rasmussen & Givskov 2006] [Dobretsov et al. 2009] [Defoirdt et al. 2004] [Natrash et al. 2011] [Kalia 2013]. Les inhibiteurs d'origine marine (éponges, cyanobactéries, algues...) ont

cependant été peu étudiés, ce qui nous a incité à étudier les éponges de Polynésie française afin de déterminer de nouvelles structures chimiques inhibitrices du *quorum sensing*.

L'étude des éponges *L. chagosensis*, *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp. 2110 collectées en Polynésie française, a permis l'isolement de métabolites secondaires capables de perturber le *quorum sensing* de *V. harveyi*.

Mise en évidence d'inhibiteurs du quorum sensing d'origine alcaloïdique (de type amino-2 imidazole) : étude de l'éponge *Leucetta chagosensis*

L'étude chimique de *L. chagosensis* a conduit à l'isolement et l'identification de 5 alcaloïdes de type amino-2-imidazole : l'isonaamine A (**76**), l'isonaamine D (**153**), l'isonaamidine A (**154**), le bis-isonaamidine A-Zn (**156**) et la leucettamine D (**152**) (Figure 55).

L'isonaamine A (**76**) et l'isonaamidine A (**154**) ont été isolées auparavant de *L. chagosensis* (collecté dans la Mer Rouge) [Carmely et al. 1989], et leur synthèse totale a été décrite [Ermolat'ev et al. 2008] [Nakamura et al. 2003] ce qui permet une production durable de ces composés. L'étude de leur activité biologique sur le *quorum sensing* est une première. Leurs activités antibiotiques et *quorum sensing* ont été évaluées sur *V. harveyi*.

Effet des composés sur la croissance de V. harveyi

L'activité antibiotique a été évaluée par mesure de l'absorbance en présence des cinq alcaloïdes isolés de *L. chagosensis* après 350 minutes. Aucune activité antibiotique significative n'a été mise en évidence grâce au test de corrélation de Spearman (p-value < 0.05, Tableau 17).

Effet des composés sur la luminescence de V. harveyi

La luminescence de *V. harveyi* s'est avérée être perturbée significativement en présence de deux alcaloïdes : l'isonaamine D (**153**) et l'isonaamidine A (**154**). L'isonaamine D (**153**) et l'isonaamidine A (**154**) entraînent des retards d'activation de la luminescence de *V. harveyi*. Des retards de luminescence d'environ 100 minutes ont été obtenus pour ces deux molécules testées respectivement à 152 μM (isonaamine D) et à 123 μM (isonaamidine A). Ces deux molécules n'ont aucun effet significatif sur la densité bactérienne : l'effet observé sur la luminescence peut donc bien être attribué à l'activité de l'isonaamine D et l'isonaamidine A sur la régulation du QS.

Les alcaloïdes de type amino-2 imidazole ont déjà été décrits comme des antibiofilms [Ermolat'ev et al. 2010], notamment des analogues de la naamine A (**69**) et l'isonaamine A (**76**) à des concentrations efficaces $\text{CE}_{50} > 34,8 \mu\text{M}$ [Linares et al. 2011]. La luminescence et

la formation de biofilms étant contrôlée par le QS, notre travail permet de confirmer l'activité de ce type d'alcaloïdes sur ce système de régulation.

Relations structure activité

La forme complexée de l'isonaamidine A (le bis-isonaamidine A-Zn²⁺ (**156**)) possède une activité négligeable comparée à celle de l'isonaamidine A. A 50 µg.ml⁻¹, le bis-isonaamidine A-Zn²⁺ provoque un retard d'activation de la luminescence de la souche BB120 de seulement 33 minutes contre 101 minutes pour l'isonaamidine A (Tableau 16). Le zinc complexe l'isonaamidine A par l'intermédiaire des azotes N-3 et N-8. Cette différence suggère l'importance des azotes basiques N-3 et N-8 pour l'activité biologique de cette molécule.

Le groupe méthoxyle positionné sur le carbone C-11 de l'isonaamine D semble également avoir de l'importance dans l'inhibition de la luminescence : sur la souche BB120, l'isonaamine D retarde l'activation de la luminescence de 105 minutes lorsqu'elle est testée à 50 µg.ml⁻¹ (soit 162 µM) alors que l'isonaamine A (dépourvu du méthoxyle) ne montre aucun effet sur la luminescence de *V. harveyi* (Tableau 16).

Détermination du mode action

Afin de déterminer le mode d'action de l'isonaamine D (**153**) et l'isonaamidine A (**154**), nous avons étudié leurs activités sur la luminescence de souches mutantes de BB120 ne possédant qu'un seul récepteur actif : JAF375 (CqsS actif), JMH597 (LuxP actif) et JMH612 (LuxN actif). Ces mutants permettent de préciser sur quelle voie du QS le composé testé peut agir.

L'isonaamine D (**153**) semble retarder préférentiellement l'activation de la luminescence de la souche JAF375 : le retard calculé au point d'inflexion du témoin est de 114 minutes lorsque l'isonaamine D (**153**) est testée à 162 µM (contre 77 et 76 minutes sur les deux autres mutants) (Tableau 16). Ce résultat suggère que l'isonaamine D (**153**) inhibe la luminescence *V. harveyi* par la voie contrôlée par CAI-1 et met en évidence un effet compétiteur entre l'isonaamine D et CAI-1 sur le récepteur CqsS.

L'autoinducteur CAI-1, identifié comme le 3-aminotridec-2-en-4-one (**7**), est présent chez de nombreuses espèces du genre *Vibrio* notamment *Vibrio cholerae* chez qui l'autoinducteur CAI-1 a été identifié pour la première fois. L'isonaamine D (**153**) pourrait être utilisé comme inhibiteur du QS des espèces du genre *Vibrio* ou être un modèle de synthèse organique de futurs antagonistes de la voie contrôlée par CAI-1.

En présence d'isonaamidine A (**154**), la luminescence de JMH597 est complètement inhibée à partir de 25 µM. A cette concentration aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur la croissance bactérienne de la souche. Ce résultat suggère une liaison non réversible de l'isonaamidine A (**154**) au récepteur LuxP bloquant le système de régulation du QS de *V.*

harveyi. Ce résultat permet de conclure que l'isonaamidine A (**154**) inhibe le QS de *V. harveyi* spécifiquement par l'intermédiaire de la voie contrôlée par l'auto-inducteur AI-2.

L'auto-inducteur AI-2 de *V. harveyi* est un furanosyl borate diester (**6**) de charge négative. Le récepteur LuxP se compose de deux arginines (Arg 215 et Arg 310) qui stabilisent, par des liaisons hydrogènes, la charge négative de AI-2 [Chen et al. 2002]. La densité de charge négative du noyau azoté de l'isonaamidine A pourrait être impliquée dans la liaison au récepteur LuxP, ce que vient conforter l'absence d'activité du dimère de zinc dans lequel ces électrons sont engagés dans la liaison ionique azote-Zn²⁺.

Parmi les antagonistes connus de la voie contrôlée par l'AI-2, des analogues de synthèse de l'acide boronique (**30**) et (**31**) ont montré une activité inhibitrice de la luminescence de *V. harveyi* pour des concentrations effectives inférieures à 100 µM [Ni et al. 2008a], ainsi que des dérivés du pyrrolalol (**32**) à (**35**) ayant une activité de 2 à 61 µM [Ni et al. 2008b]. Ces deux études utilisent la souche mutante MM32 de *V. harveyi* qui ne possède ni le récepteur luxN (associé à CAI-1) ni luxS (permettant la synthèse de AI-2). Il serait intéressant de tester l'isonaamidine A sur MM32 afin de confirmer son activité spécifique de la voie contrôlée par l'AI-2 et ainsi pouvoir comparer nos doses létales aux autres antagonistes.

L'hyménialdisine (**24**), un alcaloïde dont la structure chimique est constituée d'un hydantoïne comme l'isonaamidine A, inhibe LuxR et LasR à respectivement CIM = 0,2 µM et CIM = 15 µM et présente une activité antifouling à 563 µM (Tableau 4) [Dobretsov et al. 2011] [Feng et al. 2013]. Ce résultat suggère que l'hydantoïne est un motif structural favorable à l'interaction avec les récepteurs et la protéine LuxR impliqués dans la régulation du QS de *V. harveyi*.

Des alcaloïdes de type pyrrolo-indolique, les flustramines C (**17**) et D (**18**), ont été identifiés comme des antagonistes d'homosérinelactone à respectivement 63 µM et 51 µM [Peters et al. 2003]. Dans notre étude aucun des alcaloïdes de type amino-2 imidazole isolés n'a montré d'activité inhibitrice de la luminescence de JMH612 à des concentrations comprises entre 1 µM et 169 µM. On peut donc supposer que les alcaloïdes de type amino-2 imidazole ne permettent pas l'inhibition du QS via la voie contrôlée par l'homosérinelactone [N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone] (**5**), mais il faudrait pour le confirmer tester ces composés sur les souches modifiées pKR-C12 et pAS-C8 de *P. putida* et pSB403 de *E. coli* [Peters et al. 2003].

Les activités sur la production de métalloprotéases sur V. harveyi et d'autres pathogènes

Afin de valider l'activité inhibitrice du *quorum sensing* de l'isonaamine D (**153**) et l'isonaamidine A (**154**), leur activité sur la virulence ont été évaluée sur des souches

bactériennes productrices de métalloprotéases : BB120 (*V. harveyi*), 02/041 (*V. aesturianus*), LGP32 (*V. splendidus*) et TFA4 (*T. maritimum*).

Sur la souche BB120, aucune activité inhibitrice de la production de métalloprotéases n'a été mesurée en présence de l'isonaamine D (**153**) et l'isonaamidine A (**154**). Ce résultat suggère que (1) le blocage des récepteurs LuxP et CqsS n'a aucun impact sur la virulence de *V. harveyi* causée par des métalloprotéases ou (2) que la souche BB120 ne produit pas assez de métalloprotéases pour qu'une activité inhibitrice soit détectée. La 2^{ème} hypothèse semble plus admissible car d'après [Henke & Bassler 2004b], *V. harveyi* contrôle la luminescence, la sécrétion de type III et la production de métalloprotéases par l'intermédiaire de ses trois voies du QS. Il faudrait augmenter le temps d'incubation de la souche sauvage BB120 de *V. harveyi* (fixé dans notre étude à 10h) ou utiliser une autre souche de *V. harveyi* capable de produire des métalloprotéases plus rapidement.

Toutefois, les tests sur d'autres souches ont montré que l'isonaamidine A (**154**) et l'isonaamine D (**153**) perturbent la production de métalloprotéases. En effet l'isonaamidine A (**154**) inhibe la production de métalloprotéases des souches 02/041, LGP32 et TFA4 alors que l'isonaamine D (**153**) paraît plutôt favoriser l'activité métalloprotéase (Tableau 23).

L'isonaamine D (**153**) augmente respectivement de +8%, +26% et +4% la production de métalloprotéase des souches 02/041, LGP32 et TFA4, alors que l'isonaamidine A (**154**) diminue la production de métalloprotéases des souches 02/041, LGP32 et TFA4 respectivement de -11%, -22% et -38% à une concentration effective CE = 136 μ M (Tableau 23 et Tableau 24). L'isonaamidine A (**154**) semble donc avoir une activité anti-virulente sur les souches 02/041 de *V. aesturianus*, LGP32 de *V. splendidus* et TFA4 de *T. maritimum*.

Les souches 02/041 de *V. aesturianus* et LGP32 de *V. splendidus* partagent les mêmes voies du QS de *V. harveyi* [De Decker et al. 2013b]. La souche LGP32 possède les trois voies contrôlés par HAI-1, AI-2 et CAI-1. Alors que 02/041 présente les gènes *luxS*, *luxO*, *luxU* et *luxR* [De Decker et al. 2013a]. De même *T. maritimum* produit des acyl homosérine lactones [Romero et al. 2010]. Il apparaît donc que l'isonaamidine A inhibe efficacement le *quorum sensing* chez ces bactéries.

L'isonaamidine A inhibe le QS de *V. harveyi* et agit ainsi sur l'expression de deux phénotypes : la luminescence avec une concentration effective de 23 μ M et la production de métalloprotéases avec une CE = 136 μ M.

Mise en évidence d'inhibiteurs du quorum sensing d'origine terpénique: étude de *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp.

L'étude chimique des Démosponges de l'ordre des Dictyoceratida, *Dysidea* sp. 2669 et *Cacospongia* sp. 2110 a conduit à l'isolement de trois terpènes : l'ilimaquinone (**125**) (isolé de *Cacospongia* sp.), le tuamotuolol (**147**) et le mélange (palauololide + composé D2) (isolés de *Dysidea* sp. 2669). Deux terpènes ont montré un effet sur la luminescence de *V. harveyi* : l'ilimaquinone (**125**) et le mélange (palauolol + composé D2).

L'ilimaquinone (**125**) est une molécule connue pour ses nombreuses activités biologiques et sa synthèse a été étudiée. Sur le *quorum sensing*, l'ilimaquinone (**125**) affecte de façon significative la luminescence : des points d'inflexions et des valeurs de luminescence significativement différents du témoin (BB120 seul) ont été obtenus à partir de 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 349 μM). Un retard de luminescence de 64 minutes a été calculé lorsque la concentration en ilimaquinone était de 349 μM (Tableau 21).

Le mélange apparaît avoir un effet significatif sur la luminescence à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$).

Détermination du mode action

Les souches mutantes de *V. harveyi* ne possédant qu'un seul récepteur actif : JAF375 (CqsS actif), JMH597 (LuxP actif) et JMH612 (LuxN actif) ont permis de montrer un effet significatif de l'ilimaquinone (**125**) sur les souches JMH597 et JMH612 à 349 μM (KW, p -value $< 0,05$, Tableau 20), avec des retards de luminescence calculés sur JMH597 (AI-2) et JMH612 (HAI-1) respectivement de 164 minutes et 67 minutes (Tableau 21). Cette activité suggère que l'ilimaquinone (**125**) est un antagoniste non spécifique de 2 voies du QS contrôlées par les auto-inducteurs AI-2 et HAI-1.

La structure chimique de l'ilimaquinone n'est pas similaire à l'auto-inducteur HAI-1 désigné comme le N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homosérine lactone (**5**) [Cao & Meighen 1989] contrairement à la plupart des antagonistes des homosérinelactones [Geske et al. 2007] [Galloway et al. 2011] [Kalia 2013].

Les antagonistes les plus connus et les plus actifs de la voie du QS modulée par une homosérinelactone sont les dérivés bromés de furanones isolés de *Delisea pulchra* [Givskov et al. 1996]. Par exemple, une de ces molécules inhibe la luminescence de BB120 à $\text{CI}_{50} = 1,36 \mu\text{M}$ [Steenackers et al. 2010].

*Les activités sur la production de métalloprotéases sur *V. harveyi* et d'autres pathogènes*

L'activité sur la production de métalloprotéases de l'ilimaquinone (**125**) sur les souches BB120 (*V. harveyi*), 02/041 (*V. aesturianus*), LGP32 (*V. splendidus*) et TFA4 (*T. maritimum*) a été évaluée.

A 50 µg.ml⁻¹ (soit 154 µM), l'ilimaquinone (**125**) a montré une augmentation de +32% et +47% de l'activité métalloprotéase des souches BB120 et TFA4 (Tableau 23). Ce résultat suggère qu'un effet compétiteur des auto-inducteurs AI-2 et HAI-1, ne permet pas l'inhibition de la production de métalloprotéase. Il faudrait un antagoniste des trois voies pour bloquer l'expression des gènes qui contrôlent la production de métalloprotéases.

L'ilimaquinone (**125**) n'a montré aucune activité inhibitrice de la production de métalloprotéases mais uniquement une activité inhibitrice de la luminescence de *V. harveyi* significative à 349 µM, en agissant préférentiellement par les voies contrôlées par les autoinducteurs AI-2 et HAI-1.

Le rôle dans l'éponge et les futures applications en aquaculture

Les amino-2 imidazoles isolés de *L. chagosensis* et les terpènes isolés de *Dysidea* et *Cacospongia* n'ont révélé aucune activité antibiotique sur les souches étudiées de *V. harveyi*, de *V. aesturianus*, de *V. splendidus* et de *T. maritimum*. Ce résultat suggère que ces composés ne permettent pas à l'éponge de se défendre contre les vibrions mais plutôt d'empêcher la formation de biofilms par l'intermédiaire du *quorum sensing* [Linares et al. 2011], ou d'inhiber la production de protéines toxiques.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice de l'isonaamidine A (**154**) sur le *quorum sensing* de *V. harveyi* à des concentrations de l'ordre du micromolaire : 25 µM < CE < 136 µM. Il serait intéressant de tester son activité sur la formation de biofilms afin de confirmer son activité antifouling et son rôle dans l'éponge.

Dans le milieu naturel, l'isonaamidine A (**154**) peut être sous forme libre ou complexé au Zn²⁺. Ce résultat met en évidence une chélation stable et irréversible entre l'isonaamidine A et le zinc. Comme le propose Sullivan pour les autres analogues 2-aminoimidazoliques complexés, ces molécules (sous forme libre) seraient impliquées dans la défense de l'éponge contre des métallo-enzymes [Sullivan et al. 2009]. Cela suggère que l'isonaamidine diminue l'activité métalloprotéase des souches pathogènes en aquaculture (*V. aesturianus*, *V. splendidus* et *T. maritimum*) en complexant l'ion métallique nécessaire au fonctionnement de la métalloprotéase.

Les résultats obtenus sur l'isonaamidine A (**154**) suggère le potentiel de cette molécule en tant qu'anti-virulent de vibrions en aquaculture par exemple. Des essais *in vivo* sont en cours, visant à observer l'effet d'un extrait d'éponge fraîche sur le *Platex orbicularis*.

Mesures statistiques

L'interprétation de nos résultats s'est basée sur le test de Spearman, la courbe logistique et le test de Kruskal-Wallis.

La fiabilité du test de Spearman est faible dans le cas des mesures d'activité bactéricide des composés isolés de *L. chagosensis*, à cause du petit nombre de réplicats ($n = 2$). Il faudrait dans le futur augmenter le nombre de réplicats, ceux-ci étant toutefois limités par la quantité de produit pur disponible pour les tests biologiques.

Le modèle logistique (applicable lors d'une cinétique) permet grâce à ses paramètres une caractérisation rigoureuse de la croissance bactérienne et du retard de la luminescence. Elle est plus fiable lorsque la cinétique atteint un plateau (généralement obtenue vers 400 minutes).

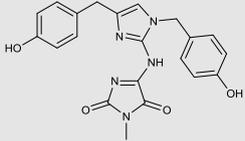
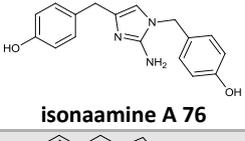
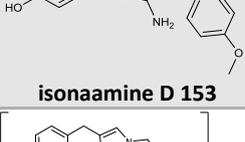
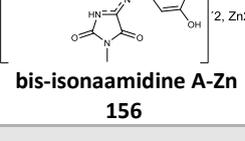
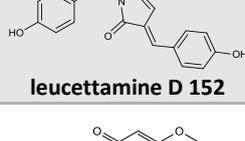
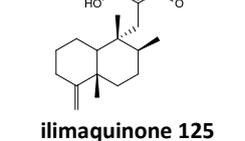
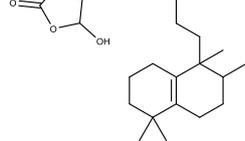
Le test de Kruskal-Wallis utilisé lors de l'interprétation des courbes logistiques a permis de déterminer les résultats significatifs. Il serait, là aussi, intéressant d'augmenter le nombre de réplicats afin de donner de la puissance au test.

Il est recommandé dans les futures manipulations de (1) effectuer les manipulations en 5-10 réplicats (2) suivre les cinétiques de façon continue et au minimum jusqu'à $t = 400$ minutes.

Ceci a permis d'optimiser le protocole du test en effectuant les manipulations sur un nombre plus important de réplicats et sur une durée plus importante (400 minutes) en utilisant un film stérile pour recouvrir les plaques et limiter l'évaporation. On note quand même à ce niveau que même sur un test miniaturisé, la quantité de produit naturel pur est limitante.

4. Tableau récapitulatif

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des activités des composés isolés sur : la croissance bactérienne de *V. harveyi*, la bioluminescence de *V. harveyi* et la production métalloprotéase de souches pathogènes en aquaculture. C : concentration, p : p-value, BB120 : souche sauvage, JAF375: CqsS/ CAI-1 actif, JMH597 : LuxPQ/ AI-2 actif, JMH612 : LuxN/ HAI-1 actif. *NT : Non Testé

Eponge étudiée	Composés	Croissance bactérienne	Luminescence	Métalloprotéase
<i>Leucetta chagosensis</i>	 <p>isonaamidine A 154</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	BB120 : retard JAF375 : retard JMH597 : inhibition totale (C >10 µg.ml ⁻¹) JMH612 : retard	Inhibiteur (à 55 µg.ml ⁻¹)
<i>Leucetta chagosensis</i>	 <p>isonaamine A 76</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	Pas d'effet (p > 0,05)	NT*
<i>Leucetta chagosensis</i>	 <p>isonaamine D 153</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	BB120 : retard JAF375 : pas d'effet JMH597 : retard JMH612 : retard	Augmente (à 55 µg.ml ⁻¹)
<i>Leucetta chagosensis</i>	 <p>bis-isonaamidine A-Zn 156</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	Pas d'effet (p-value > 0,05)	NT
<i>Leucetta chagosensis</i>	 <p>leucettamine D 152</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	Pas d'effet (p-value > 0,05)	NT
<i>Cacospongia</i> sp. 2110	 <p>ilimaquinone 125</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 125 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	BB120 : retard (C = 125 µg.ml ⁻¹ , p <0,05) JAF375 : retard (C = 125 µg.ml ⁻¹ , p <0,05) JMH597 : retard (C = 125 µg.ml ⁻¹ , p <0,05) JMH612 : retard (C = 125 µg.ml ⁻¹ , p <0,05)	Augmente (à 55 µg.ml ⁻¹)
<i>Dysidea</i> sp. 2669	 <p>fascaplysine 149</p>	Effet anitbiotique sur <i>V.harveyi</i> (p < 0,05) et TFA4 (à 55 µg.ml ⁻¹)	-	NT
<i>Dysidea</i> sp. 2669	 <p>tuamotuolol 147</p>	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C = 50 µg.ml ⁻¹)	Pas d'effet sur la luminescence de <i>V.harveyi</i> (C = 50 µg.ml ⁻¹)	
<i>Dysidea</i> sp. 2669	mélange	Pas d'effet cytotoxique sur <i>V.harveyi</i> (C < 50 µg.ml ⁻¹ , p < 0,05)	BB120 : retard (p <0,05) JAF375 : retard (p <0,05) JMH597 : retard (p <0,05) JMH612 : retard (p <0,05)	NT

5. PARTIE EXPERIMENTALE

1. Etude chimique

1.1. Matériels

1.1.1. Solvants

Des solvants de la marque BDH Prolabo ont été utilisés. Lors des extractions, des séparations liquide/liquide et des fractionnements, les solvants étaient de qualité technique ou NORMAPUR. Dans le cas des purifications en chromatographie liquide haute performance (CLHP), le solvant était de grade CHROMANORM. L'eau employée était de l'eau distillée ou de l'eau milliQ (pour les purifications sur CLHP).

1.1.2. Techniques de purification

1.1.2.1. Appareils de chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les chromatogrammes CLHP ont été réalisés sur trois appareils:

- (1) Une chaîne Agilent Technologies 1260 Infinity équipée d'un détecteur à barrette de diodes (Agilent G1315C) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (Agilent G4260C)
- (2) Waters 1695 Alliance équipé d'un détecteur à barrette de diodes (Waters 996), d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (Waters 2420) et d'un spectromètre de masse (Waters Micromasse ZQ 2000) (ICSN de Gif-sur-Yvette)
- (3) Waters 600 Alliance équipé d'un détecteur UV (Waters 2996) (ICSN de Gif-sur-Yvette)

Les chaînes CLHP (1) et (2) ont été utilisées pour des analyses et des purifications semi-préparatives alors que la chaîne CLHP (3) a été utilisée pour des purifications préparatives.

1.1.2.2. Les colonnes CLHP

Les colonnes CLHP utilisées sont les suivantes:

- (1) Colonne C18, Sunfire, Waters, analytique (5 μm , 4,6 x 100 mm), semi-préparative (5 μm , 10 x 100 mm) et préparative (5 μm , 19 x 150 mm).
- (2) Colonne C18, Uptisphere® Strategy, Interchim, analytique (5 μm , 4,6 x 100 mm), semi-préparative (5 μm , 10 x 100 mm)

1.1.2.3. Les colonnes à pression atmosphérique

- Les colonnes de chromatographies ouvertes sont réalisées en phase normale sur gel de silice de granulométrie 0,040-0,063 μm .

- Les SPE sont réalisés sur des cartouches prêtes à l'emploi CHROMABOND® de chez Machery-Nagel, à 1g de silice.

1.1.2.4. Les chromatographies sur couche mince (CCM)

Les chromatographies analytiques sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques de gel de silice (épaisseur 0,2 mm). Elles sont révélées aux UV (254 nm et 365 nm), à la vanilline sulfurique et au Dragendorff.

1.1.3. Analyses spectrales

1.1.3.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été effectués sur des appareils Burker avance 300, 500, 600 MHz en utilisant du méthanol- d_4 , du chloroforme, du diméthylformamide- d_7 et du diméthylsulfoxyde deutéré. Les spectres ont été calibrés selon les déplacements chimiques du solvant utilisé (Tableau 26).

Tableau 26 : Déplacements chimiques de référence des solvants utilisés

	δ_H	δ_C
CD ₃ OD	3.31	49.15
CDCl ₃	7.27	77.00
DMF- d_7	8.03	163.00
DMSO- d_6		

1.1.3.2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masses HRESIMS ont été effectués sur LCT Premier XE micromass.

1.2. Méthodes

1.2.1. Etude de *Dysidea* sp. 2669

1.2.1.1. Extraction et fractionnement

La poudre lyophilisée (m = 400 g) du lot P237-TA02 de *Dysidea* sp. 2669 collectée dans l'archipel des Tuamotu (station N° 2 effectuée sur l'atoll de Rangiroa) a été extraite par un mélange méthanol/ eau (80/20, V_{final} = 500 ml) sous agitation à température ambiante. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu de poudre est remis à agiter une 2^{ème} fois avec 500 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu est remis à agiter une 3^{ème} fois avec 500 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner.

Après évaporation sous vide du méthanol, l'extrait est partagé successivement entre l'eau et le cyclohexane (V = 500 ml), puis entre l'eau et le dichlorométhane (V = 500 ml). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis après filtration sur coton, le solvant est éliminé sous vide.

Les extraits bruts (cyclohexane et dichlorométhane) sont testés sur la luminescence de *V. harveyi*. L'extrait brut cyclohexanique s'est avéré inhiber la luminescence de *V. harveyi* et l'extrait brut dichlorométhane inhiber la croissance bactérienne de *V. harveyi*.

1.2.1.1.1. Fractionnement du brut cyclohexane

L'extrait brut cyclohexanique (m = 3,8 g) est fractionné en 21 fractions sur une colonne silice à pression atmosphérique par l'élution d'un mélange cyclohexane et acétate d'éthyle. La fraction F9 et F10 possèdent tous deux un composé majoritaire à un temps de rétention de 13 minutes et une activité inhibitrice de la luminescence de *V.harveyi*.

Tableau 27 : Bilan du fractionnement de l'extrait brut cyclohexanique issu de la séparation liquide/liquide de l'extrait hydroalcoolique de *Dysidea* sp. 2669

	Masse en mg	Rendement en %	Eluant Cyclo/AcOEt % AcOEt
1	34,3	0,9%	5%
2	6,2	0,2%	5%
3	14	0,4%	8%
4	14,2	0,4%	8%
5	0	0,0%	8%
6	22,1	0,6%	10%
7	11,6	0,3%	10%
8	10,3	0,3%	13%
9	24,6	0,7%	16%
10	11,8	0,3%	20%
11	15	0,4%	20%
12	9,7	0,3%	20%
13	14,7	0,4%	25%
14	8,6	0,2%	28%
15	10,4	0,3%	30%
16	5,3	0,1%	40%
17	13	0,3%	40-50%
18	18,7	0,5%	60%
19	9,4	0,3%	80%
20	5,9	0,2%	lavage AcOEt
21	196,4	5,2%	lavageDCM/MeOH 50/50

- **Purification de la fraction F8 (non active)**

La fraction F8 est purifiée par CLHP sur une colonne semi-préparative de silice uptisphère selon une méthode d'élution isocratique à 55/45 de cyclohexane/ acétate d'éthyle. Le **tuamotuolol** est ainsi isolé.

Contrôle analytique de la fraction F8

Le contrôle de la pureté du le **tuamotuolol** s'effectue par CLHP sur une colonne de silice analytique uptisphère selon la méthode d'élution suivante :

Tableau 28 : Méthode d'éluion de l'analyse de la fraction F8 du fractionnement de l'extrait brut cyclohexanique de *Dysidea* sp. 2669

Temps	%Cyclo	%AcOEt
5	95	5
35	10	90
45	10	90
46	95	5

Le temps de rétention du **tuamotuolol** est de 16 minutes.

Caractérisation physico-chimique

Tuamotuolol (composé D1) : solide brun : UV λ_{\max} 315 nm ; **RMN ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,85 (2H, m, H-1), 1,59 (2H, m, H-2), 1,34-1,40 (2H, m, H-3), 1,75-1,97 (2H, m, H-6), 1,31-1,46 (2H, m, H-7), 1,59 (1H, m, H-8), 1,42 (2H, s, H-11), 1,68- 1,90 (2H, m, H-12), 5,1 (1H, m, J = 6,4 Hz, H-14), 2,45 (2H, m, H-15), 4,62 (1H, t, J = 6 Hz, H-16), 6,06 (1H, s, H-18), 0,98 (3H, s, H-20), 0,96 (3H, s, H-21), 0,82 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-22), 0,79 (3H, s, H-23), 1,63 (3H, s, H-24), 6,06 (1H, s, H25) ; **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 400 MHz) δ 25,4 (s, C-1), 20,2 (s, C-2), 40,2 (s, C-3), 34,6 (s, C-4), 137,4 (s, C-5), 26,06 (s, C-6), 27,45 (s, C-7), 33,8 (s, C-8), 40,8 (s, C-9), 132 (s, C-10), 35,2 (s, C-11), 34,7 (s, C-12), 142 (s, C-13), 116,9 (s, C-14), 34,8 (s, C-15), 68,2 (s, C-16), 168,7 (s, C-17), 118,1 (s, C-18), 171 (s, C-19), 27,4 (s, C-20), 27,9 (s, C-21), 16,3 (s, C-22), 21,3 (s, C-23), 16,9 (s, C-24), 97,8 (s, C-25); (+) ESIMS m/z 402,2865 (calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_4$);

- **Purification de la fraction 9 (active)**

La fraction F9 est purifiée par CLHP sur une colonne semi-préparative de silice uptisphère selon une méthode d'éluion isocratique à 90/10 de cyclohexane/ acétate d'éthyle. Un mélange de deux composés est isolé dont un minoritaire par rapport à l'autre : le palauolol et le **composé D2** (de structure inconnue).

Contrôle analytique de la fraction F9

Le contrôle analytique s'effectue par CLHP sur une colonne analytique strategy silice, (150x10mm, 5 μm) couplée à un détecteur UV et DDL. L'éluion se fait par un mélange cyclohexane/ acétate d'éthyle selon le gradient suivant :

Tableau 29 : Méthode d'éluion de l'analyse de la fraction F9 du fractionnement de l'extrait brut cyclohexanique de *Dysidea* sp. 2669

Temps	%Cyclo	%AcOEt
5	95	5
35	10	90
45	10	90
46	95	5

Un seul pic est visible sur le chromatogramme à un temps de rétention du mélange (**palauolol** + **composé D2**) de 14 minutes.

Caractérisation physico-chimique

Palauololide : RMN ^1H (400 MHz ; CDCl_3) δ 1,46-1,50 (2H, m, H-1), 1,25 (2H, m, H-2), 2,13-2,28 (2H, m, H-3), 1,51-1,6 (2H, m, H-6), 1,43 (2H, m, H-7), 1,47 (1H, m, H-8), 1,08 (1H, m, H-10), 1,25-1,54 (2H, m, H-11), 1,87-1,99 (2H, m, H-12), 5,96 (1H, d, $J = 11$ Hz, H-14), 7,15 (1H, dd, $J = 15,2$ Hz, H-15), 6,29 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H-16), 5,85 (1H, s, H-18), 4,51 (2H, s, H-20), 1,05 (1H, m, H-21), 0,81 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-22), 0,75 (3H, m, H-23), 1,87-1,99 (3H, m, H-24), 6,23 (1H, s, H-25) ; (+) ESIMS m/z 385,2730 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Composé D2 : sa structure n'a pas pu être déterminée car sa masse était inférieure à 1 mg

1.2.1.2. Purification du brut dichlorométhane

Le composé majoritaire de l'extrait brut dichlorométhane est purifié par CLHP sur une colonne C18 semi-préparative uptishpère selon une méthode d'élution isocratique 70/30 de eau/ acétonitrile (+0,1% d'acide trifluoroacétique).

Contrôle analytique de la fascaplysine

Le contrôle analytique s'effectue par CLHP sur une colonne analytique C18 uptisphère strategy couplé à un détecteur UV et DDL. L'élution se fait par un mélange eau/ acétonitrile (+0,1% d'acide trifluoroacétique).

Tableau 30 : Méthode d'élution de l'analyse du produit obtenu par purification de l'extrait brut dichlorométhane de *Dysidea* sp. 2669

Temps	%Eau (+0,1 % TFA)	%ACN (+0,1 % TFA)
5	95	5
35	10	90
45	10	90
46	95	5

Le temps de rétention de la **fascaplysine** est de 16,5 minutes.

Caractérisation physico-chimique

Fascaplysine : solide rouge, UV λ_{max} (EtOH) 215, 262, 302, 413 nm RMN ^1H (400 MHz ; DMSO) δ 8,07 (1H, m, H-1), 7,75 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-2), 8,05 (1H, m, $J = 8$ Hz, H-3), 8,5 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-4), 9,64 (1H, d, $J = 4$ Hz, H-6), 9,18 (1H, d, $J = 4$ Hz, H-7), 8,59 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-8), 7,54 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, H-9), 7,90 (1H, m, $J = 6,8$ Hz, H-10) ; (+) ESIMS m/z 271,0886 $[\text{M}]^+$;

1.2.2. Etude de *Cacospongia* sp.

1.2.2.1. Extraction et fractionnement

La poudre lyophilisée ($m = 400$ g) du lot P327-TRAN09 de *Cacospongia* sp. collecté dans l'archipel des Tuamotu (station N° 9 effectuée sur l'atoll de Rangiroa) a été extraite par un mélange méthanol/ eau (80/20, $V_{\text{final}} = 800$ ml) sous agitation à température ambiante. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu de poudre est remis à agiter une 2^{ème} fois avec 800 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu est remis à agiter une 3^{ème} fois avec 800 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner.

Après évaporation sous vide du méthanol, l'extrait est partagé successivement entre l'eau et le cyclohexane ($V = 200$ ml), puis entre l'eau et le dichlorométhane ($V = 200$ ml). Les bruts sont ensuite évaporés à sec. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis après filtration sur coton le solvant est éliminé sous vide.

Les bruts (cyclohexane et dichlorométhane) sont testés sur la luminescence de *V. harveyi*. L'extrait brut cyclohexanique s'est avéré inhiber la luminescence de *V. harveyi*.

L'extrait brut cyclohexanique ($m = 3$ g) est fractionné en 16 fractions sur une colonne de silice à pression atmosphérique par l'élution d'un mélange cyclohexane et acétate d'éthyle. Les fractions F9, F10 et F11 possèdent toutes un composé majoritaire à un temps de rétention de 12 minutes et une activité inhibitrice de la luminescence de *V.harveyi*. Dans la fraction F9, le composé à 11,9 minutes est pur.

Tableau 31 : Bilan du fractionnement du brut cyclohexanique issu de la séparation liquide/liquide de l'extrait de *Cacospongia* sp.

	Masse en mg	Rendement en %	Eluant Cyclo/AcOEt % AcOEt
1	0.001%	0,1%	5%
2	0.026%	3,5%	10%
3	0.005%	0,6%	10%
4	0.030%	4,0%	10%
5	0.008%	1,1%	10%
6	0.012%	1,5%	15%
7	0.034%	4,6%	15%
8	0.071%	9,5%	15%
9	0.086%	11,5%	20%
10	0.039%	5,2%	25%
11	0.016%	2,2%	25%
12	0.013%	1,7%	25%
13	0.035%	4,6%	30%
14	0.007%	0,9%	35%
15	0.009%	1,2%	45%
16	0.006%	0,8%	60%

Contrôle analytique

Le contrôle analytique s'effectue par CLHP sur une colonne analytique Uptisphère strategy silice, (150x10mm, 5 µm) couplé à un détecteur UV et DDL. L'élution se fait par un mélange cyclohexane/ acétate d'éthyle selon le gradient suivant :

Tableau 32 : Méthode d'élution de l'analyse des fractions issues du fractionnement de l'extrait brut cyclohexanique de *Cacospongia* sp. 2110

Temps	%Cyclo	%AcOEt
5	90	10
35	10	90
45	10	90
46	90	10

Le temps de rétention de l'**ilimaquinone** est de 11,7 minutes.

Caractérisation physico-chimique de l'ilimaquinone

Ilimaquinone : poudre rouge, UV max 286 nm, RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ 1,42-2,08 (2H, m, H-1), 1,17-1,86 (2H, m, H-2), 2,33-2,05 (2H, m, H-3), 1,51/ 1,36 (2H, m, H-6), 1,39 (2H, m, H-7), 1,14 (1H, m, H-8), 0,79-0,75 (1H, m, H-10), 2,52 (1H, système AB, H-11), 0,85 (3H, m, H-12), 0,97 (3H, m, H-13), 1,04 (3H, m, H-14), 4,44-4,43 (2H, m, H-15), 5,85 (1H, s, H-19), 3,86 (1H, s, H-22), 7,47 (1H, s, OH) ;(+) ESIMS 359,2208 [M+H]⁺

1.2.3. Etude de *Leucetta chagosensis*

La poudre lyophilisée (m = 430 g) de lots de *Leucetta chagosensis* collectée dans l'archipel de la Société a été extraite par un mélange méthanol/ eau (80/20, V_{finale} = 850 ml) sous agitation à température ambiante. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu de poudre est remis à agiter une 2^{ème} fois avec 850 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner. Le résidu est remis à agiter une 3^{ème} fois avec 850 ml de méthanol pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Büchner.

Après évaporation sous vide du méthanol, l'extrait est partagé successivement entre l'eau et l'heptane (V = 200 ml), puis entre l'eau et l'acétate d'éthyle (V = 200 ml), enfin entre l'eau et le butanol (V = 200 ml). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis après filtration sur coton le solvant est éliminé sous vide.

Les extraits bruts sont testés sur la luminescence de *V. harveyi*. Les extraits bruts acétate d'éthyle et butanol se sont avérés inhiber la luminescence de *V. harveyi*.

1.2.4. Fractionnement du brut acétate d'éthyle

L'extrait brut cyclohexanique (m = 1,5 g) est fractionné par CLHP sur une colonne préparative Waters Sunfire couplé à un détecteur UV. L'élution se fait par un mélange eau/acétonitrile (+0,1% d'acide formique) selon le gradient suivant :

Temps	%Eau (+0,1 % AF)	%ACN (+0,1 % AF)
5	98	2
25	70	30
30	70	30

A l'issue du fractionnement, 9 fractions sont obtenues dont 5 composés purs.

	Masse en mg	Rendement en %
1	14,8	5%
2	0	0%
3	2,4	1%
4	0	0%
5	9,9	3%
6	6,1	2%
7	4	1%
8	70	22%
9	57,3	18%

Caractérisation physico-chimique des composés isolés

Isonaamine A : : solide jaune : UV λ_{max} (MeOH) 234, 276, 375 nm ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz) δ 7.15 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-9/13), 7.05 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-16/20), 6.71 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-10/12), 6.71 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-17/19), 6.89 (1H, s, H-5), 5.17 (2H, s, H-7), 3.81 (2H, s, H-14), 3.10 (3H, s, H-26) ; (+)ESIMS m/z 406.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 406.1508 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4$, 405.1515);

Isonaamine D : : solide rouge: UV λ_{max} (MeOH) 201 (ϵ 14908), 225 (8085), 367 (1696) nm; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3-d_1 , 500 MHz) δ 7.08 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-9/13), 6.92 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-16/20), 6.87 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10/12), 6.26 (1H, s, H-5), 4.76 (2H, s, H-7), 3.79 (2H, s, OCH_3), 3.62 (2H, s, H-14) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3-d_1) δ 159.7 (s, C-11), 155.2 (s, C-18), 147.6 (s, C-2), 137.1 (s, C-4), 131 (s, C-15), 129.8 (s, C-16/ C-20), 128.4 (s, C-9/C-13), 115.8 (s, C-17/C-19), 114.7 (s, C-10/C-12), 112.4 (s, C-5), 55.5 (s, C-21), 48.4 (s, C-7), 29.9 (s, C-14) ; (+) ESIMS m/z 310.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 310.1563 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$, 310.1556);

Isonaamidine A : UV λ_{max} (MeOH) 234, 276, 375 nm ; ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz) δ 7.15 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-9/13), 7.05 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-16/20), 6.71 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-10/12), 6.71 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-17-19), 6.89 (1H, s, H-5), 5.17 (2H, s, H-7), 3.81 (2H, s, H-14), 3.10 (3H, s, H-26) ; (+)ESIMS m/z 406.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 406.1520 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$);

Bis(isonaamidinato A)zinc (II) : solide brun: UV λ_{max} (MeOH) 202 (ϵ 93624), 225 (55971), 277 (10395), 364 (4579) nm; ^1H NMR (DMF- d_7 , 500 MHz) δ 7.34 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9/13), 7.23 (1H, s, H-5), 6.82 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-10/12), 6.45 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-17/19), 6.37 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-16/20), 5.36 (1H, d, $J = 14$ Hz, H-7b), 5.23 (1H, d, $J = 14$ Hz, H-7a), 3.53 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-14b), 3.15 (2H, d, $J = 16$ Hz H-14a), 2.94 (3H, s, H-26) ; (+)ESIMS m/z 406 (100), 873 (68), 875 (49), 877 (38), 879 (6) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 873.2107 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{N}_{10}\text{O}_8^{64}\text{Zn}$, 873.2087);

Leucettamine D : solide brun: UV λ_{max} (MeOH) 201 (ϵ 29844), 222 (19004), 283 (6592), 368 (18102) nm; ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 500 MHz) δ 7.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-16/20), 7.13 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9/13), 6.78 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-17/19), 6.74 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10/12), 6.61 (1H, s, H-14), 4.75 (2H, s, H-7) ; ^{13}C NMR (MeOD- d_4) δ 172.1 (s, C-5), 160 (s, C-2), 159.5 (s, C-18), 158.4 (s, C-11), 137.5 (s, C-4), 133.7 (s, C-16/ C-20), 129.7 (s, C-9/C-13), 128.2 (s, C-15), 128.3 (s, C-8), 118.4 (s, C-14), 116.7 (s, C-17/C19), 116.5 (s, C-10/C-12), 43.3 (s, C-7) ; (+)ESIMS m/z 310.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 310.1190 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$, 310.1192).

2. Etude biologique

2.1. Matériels

2.1.1. Mesures spectroscopiques

Les mesures de luminescence, d'absorbance et de fluorescence ont été réalisées sur un lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA doté d'un filtre « lens ». Ce filtre permet une lecture en temps réel de la luminescence. Le logiciel Mars assure les mesures de l'absorbance et de la luminescence en simultané.

Une microplaque 96 puits à fond transparent et de couleur blanche opaque autour de chaque puit a été utilisée pour permettre la double lecture sans contamination de la luminescence.

2.1.2. Milieux

- Milieu marine broth

Une masse $m = 40,20$ mg de « Milieu Marine Broth » (Difco, réf 273110) est dissoute dans 1 L d'eau distillée. La solution est ensuite autoclavée.

Composition : Peptone (5 g/l) ; Extrait de levure (1 g/l) ; Citrate de fer (0,1 g/l) ; NaCl (19,45 g/l) ; MgCl_2 (5,9 g/l) ; Na_2SO_4 (3,24 g/l) ; CaCl_2 (1,8 g/l) ; KCl (0,55 g/l) ; Na_2CO_3 (0,16 g/l) ;

KBr (0,08 g/l) ; SrCl₂ (0,034 g/l) ; H₃BO₃ (0,022 g/l) ; Na₂O₃Si (4 mg/l) ; NaF (2,4 mg/l) ; (NH₄)NO₃ (1,6 mg/l) ; Na₂HPO₄ (8 mg/l) ; eau distillée (qsp 1 litre).

- Milieu Lennox Broth 40 (LB40)

Des masses de 10 g de peptone et de 5 g d'extrait de levure sont dissoutes dans 1L d'eau de mer artificielle et autoclavés.

2.1.3. Souches bactériennes

Les souches bactériennes BB120 (souche sauvage), JAF375 (luxN::Cm^R luxQ::Kan^R), JMH597 (luxN::Tn5 cqsS::Cm^R), JMH612 (luxPQ::Tn5 cqsS::Cm^R) ont été obtenues du laboratoire de Bonnie Bassler (Département de Biologie Moléculaire, Université de Princeton) [Freeman & Bassler 1999] [Henke et al 2004]. Les souches mutantes proviennent de la souche sauvage BB120.

2.2. Méthodes

2.2.1. Test sur la bioluminescence de *V. harveyi*

La bactérie est mise en culture pendant au moins 24h en milieu liquide LB40 EMA. Cette suspension bactérienne est ensuite diluée à 1/200. Pour cela 50 µl sont dilués dans 10 ml de milieu Marine Broth puis incubée pendant 30 minutes sous agitation à 200 rpm à 27°C.

Les produits à tester sont solubilisés dans de l'éthanol. Un volume de 10 µl de produit est déposé sur une microplaque 96 puits afin d'être évaporé à température ambiante. Une fois la plaque sèche, 100 µl de milieu Marine Broth sont ajoutés dans tous les puits y compris ceux des témoins. La plaque recouverte d'un film plastique est ensuite mise dans une cuve à ultrason afin d'y être soniquée pendant 10 minutes.

Après les 10 min, 100 µl de milieu MB sont ajoutés dans les puits destinés aux témoins « milieu MB seul ». Dans tous les autres puits, sont ajoutés 100 µl de la solution bactérienne (diluée au 1/200^{ème}). Une fois, la plaque prête, un film plastique est positionné sur la plaque avant d'être mise au spectromètre.

Le spectromètre est programmé pour 12h de cinétique (soit 72 cycles de 10 minutes), avec une agitation double orbitale de façon discontinue avant chaque lecture.

2.2.1.1. Traitement des données

Le traitement des données s'est effectué sous le logiciel R (voir section4-1.1.4). La correction des données s'est effectuée en utilisant deux « blancs ».

Blancs :

« Milieu MB seul » : faire la moyenne des 10 premiers cycles (**blanc 1**)

« Produit+milieu » : faire la moyenne des 10 premiers cycles (**blanc 2**)

Equations :Témoïn – **blanc 1**Test – **blanc 2**

où « Témoïn » est la bactérie sans produit et « Test » est la bactérie avec le produit testé.

2.2.2. Tests biologiques dosage de métalloprotéases**2.2.2.1. Kit EnzChek Gelatinase/ Collagenase Assay**

- Préparation du substrat :

Le substrat de gélatine ($m = 1 \text{ mg}$) est dilué dans 1 ml d'eau distillée, afin d'obtenir une concentration de 1 mg.ml^{-1} . La solution est soniquée pendant 5 minutes.

- Préparation du réactif:

Un volume de 2 ml de tampon réactionnel (concentré dix fois) est dilué dans 18 ml d'eau distillée pour obtenir du réactif dilué au 1/10 ème.

- Préparation de l'enzyme :

L'enzyme *Clostridium collagenase* à 500 U est solubilisée dans 0,5 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 1000 U.ml^{-1} . Une dilution en cascade dans le tampon réactionnel est effectuée jusqu'à obtenir une concentration finale de $0,4 \text{ U.ml}^{-1}$ de solution enzymatique.

Pour cela 20 μl de la solution à 1000 U.ml^{-1} sont prélevés puis dilués dans 480 μl de tampon réactionnel afin d'obtenir une concentration de 40 U.ml^{-1} . Dix microlitres de la 2^{ème} solution sont dilués dans 990 μl de tampon réactionnel.

- Préparation de surnageant de métalloprotéases :

1) Préparation du produit à tester

Dans un tube eppendorf les produits à tester ($m = 264 \mu\text{g}$) sont solubilisés dans 4,8 ml de milieu MB puis la solution est mise à soniquer (**solution S1**).

2) Préparation de la suspension bactérienne

La bactérie est mise en culture pendant au moins 24h en milieu liquide LB40 EMA. Cette suspension bactérienne ($V = 250 \mu\text{l}$) est ensuite diluée au 1/20 dans une qsp 5 ml de milieu Marine Broth (**solution S2**).

3) Préparation du surnageant avec produit

Dans un tube falcon, 132 μl de la suspension bactérienne (**solution S2**) est ajoutée à 1,2 ml de produit solubilisé dans du milieu MB (**solution S1**) afin d'obtenir une solution bactérienne diluée au 1/200.

Après un temps de culture spécifique à chaque souche bactérienne (Tableau 33), 100 µl de Kanamycine est ajoutée, puis la solution est centrifugée pendant 10 minutes à 10000 rpm. Le surnageant est prélevé puis stocké à -20°C.

Tableau 33 : Temps de culture des suspensions bactériennes des souches bactériennes étudiées

Souches	Temps de culture
BB120	10h
02/041	6h
LGP32	15h
TFA4	15h

- Dosage des métalloprotéases

Le dosage des métalloprotéases est effectué sur une microplaque 96 puits. Dans un puit, 100 µl de surnageant (avec ou sans produit) y sont déposés puis 80 µl de tampon réactionnel et 20 µl de substrat gélatine (à 1 mg.ml⁻¹).

Dans le cas des tests en présence de la phénanthroline, dans un puit sont déposés 100 µl de surnageant (avec ou sans produit) puis 80 µl de tampon réactionnel et 20 µl de solution phénanthroline.

6. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, T., Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. *NAGA WorldFish Cent. Quart.*, 2004, **27**, pp. 28–31.
- Aktaş, N., Gözcelioğlu, B., Zang, Y., Lin, W., et al., Avarone and Avarol from the Marine Sponge *Dysidea avara* Schmidt from Aegean Coast of Turkey.pdf. *J. pharmaceutical Sci.*, 2010, **35**, pp. 119–123.
- Alekshun, M.N., & Levy, S.B., Targeting virulence to prevent infection: to kill or not to kill? *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, 2004, **1**, pp. 483–489.
- Alvi, K. a., Peters, B.M., Lisa, H.M., & Phillip, C., 2-Aminoimidazoles and their zinc complexes from indo-pacific leucetta sponges and notodoris nudibranchs. *Tetrahedron*, 1993, **49**, pp. 329–336.
- Amade, P., Pesando, D., & Chevolut, L., Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. *Mar. Biol.*, 1982, **70**, pp. 223–228.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A., Debitus, C., & Pietra, F., Leucascandrolide A, a new type of macrolide: the first powerfully bioactive metabolite of Calcareous sponges (*Leucascandra caveolata*, a new genus from the Coral Sea). *Helv. Chim. Acta*, 1996, **79**, pp. 51–60.
- Atkinson, S., & Williams, P., Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface*, 2009, **6**, pp. 959–978.
- Austin, B., & Zhang, X.-H., *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, **43**, pp. 119–124.
- Austin, B., & Zhang, X.-H., *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, **43**, pp. 119–124.
- Barber, J.M., Leahy, D.C., Miller, J.H., & Northcote, P.T., Luakuliides A-C, cytotoxic labdane diterpenes from a Tongan dictyoceratid sponge. *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, pp. 6314–6318.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., & Stevens, A.M., Cross-species induction of luminescence in the quorum- sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, pp. 4043–4045.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., & Silverman, M.R., Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.*, 1993, **9**, pp. 773–786.
- Becerro, M.A., Paul, V.J., & Starmer, J., Intracolony variation in chemical defenses of the sponge *Cacospongia* sp. and its consequences on generalist fish predators and the specialist nudibranch predator *Glossodoris pallida*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1998, **168**, pp. 187–196.
- Bharate, S.B., Manda, S., Joshi, P., Singh, B., et al., Total synthesis and anti-cholinesterase activity of marine-derived bis-indole alkaloid fascaplysin. *Med. Chem. Commun.*, 2012, **3**, pp. 1098–1103.
- Bhardwaj, A.K., Vinothkumar, K., & Rajpara, N., Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2013, **8**, pp. 68–83.
- Biochem, A., Luffolide , a novel anti-inflammatory terpene from the sponge *Luffariella* sp . Scripps Institution of Oceanography (A-O12F) and Department of Chemistry , University of California at San Diego , La Jolla (California 92093-0212 , USA), Department of Che. , 1989, **45**, pp. 388–390.
- Boufridi, A., *De l'étude d'éponges du genre Dactylospongia aux particularités chimiques des ilimaquinones*. Université Paris- Sud.
- Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., et al., Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiol.*, 2008, **8**, p. 149.
- Brock, J., Lightner, D., & Meyers, T.R., *Diseases of marine animals* K. Otto, ed.,
- Brooks, B.D., & Brooks, A.E., Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv. Drug Deliv.*

- Rev., 2014, **78**, pp. 14–27.
- Butler, M.S., & Capon, R.J., The luffarins (A-Z), novel terpenes from an Australian marine sponge, *Luffariella geometrica*. *Aust. J. Chem.*, 1992, **45**, pp. 1705–1743.
- Cafieri, F., Fattorusso, E., Mangoni, A., & Tagliatalata-Scafati, O., Dispacamides, anti-histamine alkaloids from Caribbean *Agelas* sponges. *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, pp. 3587–3590.
- Cao, J.G., & Meighen, E. a., Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, pp. 21670–21676.
- Carballo, J.L., Zubía, E., & Ortega, M.J., Biological and chemical characterizations of three new species of *Dysidea* (Porifera: Demospongiae) from the Pacific Mexican coast. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2006, **34**, pp. 498–508.
- Carmely, S., Ilanb, M., & Kashmana, Y., 2-Amino Imidazole Alkaloids From the Marine Sponge *Leucetta Chagosensis*. *Tetrahedron*, 1989, **45**, pp. 2193–2200.
- Carmely, S., & Kashman, Y., Naamines and naamidines, novel imidazole alkaloids from the calcareous sponge *Leucetta chagosensis*. *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, pp. 3003–3006.
- Carroll, A.R., Lamb, J., Moni, R., Hooper, J.N.A., et al., Spongian Diterpenes with Thyrotropin Releasing Hormone Receptor 2 Binding Affinity from *Spongia* sp. *Sect. Title Nonmamm. Biochem.*, 2008, **71**, pp. 884–886.
- Chan, G.W., Mong, S., Hemling, M.E., Freyer, a J., et al., New leukotriene B4 receptor antagonist: leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, pp. 116–121.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorselaer, A. Van, et al., Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, **415**, pp. 545–549.
- Chill, L., Rudi, A., Aknin, M., Loya, S., et al., New sesterterpenes from Madagascan *Lendenfeldia* sponges. *Tetrahedron*, 2004, **60**, pp. 10619–10626.
- Chu, Y.Y., Nega, M., Wölfle, M., Plener, L., et al., A New Class of Quorum Quenching Molecules from *Staphylococcus* Species Affects Communication and Growth of Gram-Negative Bacteria. *PLoS Pathog.*, 2013, **9**.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S., & Mangoni, A., Clathridine and its zinc complex, novel metabolites from the marine sponge *clathrina clathrus*. *Tetrahedron*, 1989, **45**, pp. 3873–3878.
- Clark, W.D., & Crews, P., A novel chlorinated ketide amino acid, Herbamide A, from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, pp. 1185–1188.
- Conte, M.R., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., et al., Lintenolides, new pentacyclic bioactive sesterterpenes from the caribbean sponge *Cacospongia* cf. *linteriformis*. *Tetrahedron*, 1994, **50**, pp. 849–856.
- Darshanee Ruwandeepika, H.A., Sanjeeva Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., et al., Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Rev. Aquac.*, 2012, **4**, pp. 59–74.
- Davis, R.A., Aalbersberg, W., Meo, S., Rocha, R.M. Da, et al., The isolation and synthesis of polyandrocarpamines A and B. Two new 2-aminoimidazolone compounds from the Fijian ascidian, *Polyandrocarpa* sp. *Tetrahedron*, 2002, **58**, pp. 3263–3269.
- De Decker, S., Reynaud, Y., & Saulnier, D., First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture*, 2013a, **392-395**, pp. 1–7.
- De Decker, S., Reynaud, Y., & Saulnier, D., First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture*, 2013b, **392-395**, pp. 1–7.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W., Disruption of bacterial quorum sensing: an

- unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 2004, **240**, pp. 69–88.
- Dendy, A., Report on the calcareous sponges collected by H.M.S “sealark” in the indian ocean. *Zoology*, 1913, **16**, pp. 1–5.
- Do, M.T., Na, M., Kim, H.G., Khanal, T., et al., Ilimaquinone induces death receptor expression and sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through activation of ROS-ERK/p38 MAPK-CHOP signaling pathways. *Food Chem. Toxicol.*, 2014, **71**, pp. 51–59.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., et al., Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*, 2011, **27**, pp. 893–905.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., & Paul, V., Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 2009, **25**, pp. 413–27.
- Dunbar, D., Rimoldi, J.M., Clark, A.M., Kelly, M., et al., Anti-Cryptococcal and Nitric Oxide Synthase Inhibitory Imidazole Alkaloids from the Calcareous Sponge *Leucetta cf chagosensis*. *Tetrahedron*, 2000, **56**, pp. 8795–8798.
- Ebada, S.S., Lin, W., & Proksch, P., Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: Occurrence and pharmacological significance. *Mar. Drugs*, 2010, **8**, pp. 313–346.
- Edrada, R.A., Stessman, C.C., & Crews, P., Uniquely modified imidazole alkaloids from a calcareous *Leucetta* sponge. *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, pp. 939–942.
- Ermolat’ev, D., Alifanov, V., Rybakov, V., Babaev, E., et al., A Concise Microwave-Assisted Synthesis of 2-Aminoimidazole Marine Sponge Alkaloids of the Isonaamines Series. *Synthesis (Stuttg.)*, 2008, **2008**, pp. 2083–2088.
- Ermolat’ev, D.S., Bariwal, J.B., Steenackers, H.P.L., De Keersmaecker, S.C.J., et al., Concise and diversity-oriented route toward polysubstituted 2-aminoimidazole alkaloids and their analogues. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2010, **49**, pp. 9465–9468.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Bonnard, I., Sutcliffe, P., et al., Evolution, radiation and chemotaxonomy of *Lamellodysidea*, a demosponge genus with anti-plasmodial metabolites. *Mar. Biol.*, 2012, **159**, pp. 1119–1127.
- Fattorusso, E., Magno, S., Santacroce, C., & Sica D., Scalarin, a new pentacyclic C-25 terpenoid from the sponge *Cacospongia scalaris*. *Tetrahedron*, 1972, **28**, pp. 5993–5997.
- Feng, D. qing, Qiu, Y., Wang, W., Wang, X., et al., Antifouling activities of hymenialdisine and debromohymenialdisine from the sponge *Axinella* sp. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2013, **85**, pp. 359–364.
- Field, J.J., Singh, A.J., Kanakkanthara, A., Halafihi, T., et al., Microtubule-stabilizing activity of zampanolide, a potent macrolide isolated from the Tongan marine sponge *Cacospongia mycofijiensis*. *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, pp. 7328–7332.
- Freeman, J. a, & Bassler, B.L., A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, pp. 665–677.
- Fu, X., Ferreira, M.L.G., Schmitz, F.J., & Kelly-borges, M., New Diketopiperazines from the Sponge *Dysidea chlorea*. *J. Nat. Prod.*, 1998, **67**, pp. 1226–1231.
- Fu, X., Schmitz, F.J., Tanner, R.S., & Kelly-Borges, M., New imidazole alkaloids and zinc complexes from the micronesian sponge *Leucetta cf. chagosensis*. *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, pp. 384–386.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., & Greenberg, E.P., MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria : the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst. *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, pp. 269–275.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., & Greenberg, E.P., Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, pp. 269–275.
- Fusetani, N., Kato, Y., Matsunaga, S., & Hashimoto, K., Bioactive marine metabolites V. Two new furanosesterterpenes inhibitors of cell division of the fertilized starfish eggs, from the marine

- sponge *Cacospongia scalaris*. *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, pp. 4941–4942.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., et al., Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.*, 2011, **111**, pp. 28–67.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., et al., Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.*, 2007, **53**, pp. 187–196.
- Garrido, L., Zubia, E., Ortega, M.J., & Salva, J., New furanoterpenoids from the sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**, pp. 794–797.
- Gazave, E., Lapebie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., et al., No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia*, 2012, **687**, pp. 3–10.
- Genta-Jouve, G., & Thomas, O.P., Sponge Chemical Diversity: from biosynthetic pathways to ecological roles. *Adv. Mar. Biol.*, 2012, **62**, pp. 183–230.
- Geske, G.D., O'Neill, J.C., & Blackwell, H.E., N-phenylacetanoyl-L-homoserine lactones can strongly antagonize or superagonize quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *ACS Chem. Biol.*, 2007, **2**, pp. 315–319.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., et al., Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bact.*, 1996, **178**, pp. 6618–6622.
- Gonzales, A.G., Estrada, D.M., Martin, J.D., Martin, V.S., et al., New antimicrobial diterpenes from the sponge *Spongia officinalis*. *Tetrahedron*, 1984, **40**, pp. 4109–4113.
- Gordaliza, M., Cytotoxic Terpene Quinones from Marine Sponges. *Mar. Drugs*, 2010, **8**, pp. 2849–2870.
- Gross, H., Kehraus, S., König, G.M., Woerheide, G., et al., New and biologically active imidazole alkaloids from two sponges of the genus *Leucetta*. *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, pp. 1190–1193.
- Hall, K. a., Sutcliffe, P.R., Hooper, J.N. a., Alencar, A., et al., Affinities of Sponges (Porifera) of the Marquesas and Society Islands, French Polynesia. *Pacific Sci.*, 2013, **67**, pp. 493–511.
- Hamilton, G., Cytotoxic Effects of Fascaplysin against Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Mar. Drugs*, 2014, **12**, pp. 1377–1389.
- Hassan, M.H.A., Rateb, M.E., Hetta, M., Abdelaziz, T.A., et al., Scalarane sesterterpenes from the Egyptian Red Sea sponge *Phyllospongia lamellosa*. *Tetrahedron*, 2015, **71**, pp. 577–583.
- Hassan, W., Edrada, R., Ebel, R., Wray, V., et al., New imidazole alkaloids from the Indonesian sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, pp. 817–822.
- Henke, J.M., & Bassler, B.L., Quorum Sensing Regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. , 2004a, **186**, pp. 3794–3805.
- Henke, J.M., & Bassler, B.L., Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 2004b, **186**, pp. 6902–6914.
- Hooper, J.N.A., Hall, K.A., Ekins, M., Erpenbeck, D., et al., Managing and sharing the escalating number of sponge “unknowns”: the sponge maps project. *Integr. Comp. Biol.*, 2013, **53**, pp. 473–481.
- Hörmann, A., Chaudhuri, B., & Fretz, H., DNA binding properties of the marine sponge pigment fascaplysin. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, **9**, pp. 917–921.
- James, R.D., Jones, D. a, Aalbersberg, W., & Ireland, C.M., Naamidine A intensifies the phosphotransferase activity of extracellular signal-regulated kinases causing A-431 cells to arrest in G1. *Mol. Cancer Ther.*, 2003, **2**, pp. 747–751.
- Jayatilake, G.S., Baker, B.J., & McClintock, J.B., Rhapsamine, a cytotoxin from the antarctic sponge *Leucetta leptorhaphis*. *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, pp. 7507–7510.

- Jiao, W.-H., Xu, T.-T., Gu, B.-B., Shi, G.-H., et al., Bioactive sesquiterpene quinols and quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *RSC Adv.*, 2015, **5**, pp. 87730–87738.
- Jiao, W.-H., Xu, T.-T., Zhao, F., Gao, H., et al., Dysifragilones A-C, Unusual Sesquiterpene Aminoquinones and Inhibitors of NO Production from the South China Sea Sponge *Dysidea fragilis*. *European J. Org. Chem.*, 2015, **5**, pp. 960–966.
- Jimenez, C., Quinoa, E., Adamczeski, M., Hunter, L.M., et al., Novel sponge derived amino acids. 12. Tryptophan derived pigments and accompanying sesterterpenes from *Fascaplysinopsis reticulata*. *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, pp. 3403–3410.
- Kalia, V.C., Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, pp. 224–245.
- Kazlauskas, R., Murphy, P.T., & Wells, R.J., A diketopiperazine derived from trichloroleucine from the sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Lett.*, 1978, **49**, pp. 4945–4948.
- Kingsland, S., The refractory model: the logistic curve and the history of population ecology. *Q. Rev. Biol.*, 1982, **57**, pp. 29–52.
- Kirsch, G., Köng, G.M., Wright, A.D., & Kaminsky, R., A new bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from the marine sponge *Hyrtios cf. erecta*. *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, pp. 825–829.
- Kobayashi, J., Madono, T., & Shigemori, H., Nakijiquinones C and D, new sesquiterpenoid quinones with a hydroxy amino acid residue from a marine sponge inhibiting c-erbB-2 kinase. *Tetrahedron*, 1995, **51**, pp. 10867–10874.
- Kumar, S., Guru, S.K., Pathania, A.S., Manda, S., et al., Fascaplysin Induces Caspase Mediated Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy Through the Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signaling Cascade in Human Leukemia HL-60 Cells. *J. Cell. Biochem.*, 2015, **116**, pp. 985–997.
- Lilley, B., & Bassler, B.L., Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol. Microbiol.*, 2000, **36**, pp. 940–954.
- Lima, H.M., Garcia-Barboza, B.J., Khatibi, N.N., & Lovely, C.J., Total syntheses of isonaamine C and isonaamidine e. *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, pp. 5725–5727.
- Linares, D., Bottzack, O., Pereira, O., Praud-Tabaris, a., et al., Designing 2-aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities: Structure-activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, pp. 6751–6755.
- Liu, P., Lee, K., & Chen, S., Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **22**, pp. 413–416.
- Mancini, I., Guella, G., Debitus, C., & Pietra, F., Novel Naamidine-Type alkaloids and mixed- Ligand Zinc (II) complexes from a Calcareous Sponge, *Leucetta sp.*, of the Coral Sea. *Helv. Chim. Acta*, 1995, **78**, pp. 1178–1184.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S. a., De Nys, R., et al., Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, pp. 2079–2084.
- Marcos, I.S., Conde, a., Moro, R.F., Basabe, P., et al., Quinone/Hydroquinone Sesquiterpenes. *Mini. Rev. Org. Chem.*, 2010, **7**, pp. 230–254.
- Mehub, M.F., Perkins, M. V., Zhang, W., & Franco, C.M.M., New marine natural products from sponges (Porifera) of the order Dictyoceratida (2001 to 2012); a promising source for drug discovery, exploration and future prospects. *Biotechnol. Adv.*, 2016, **in prep.**
- Mok, K.C., Wingreen, N.S., & Bassler, B.L., *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.*, 2003, **22**, pp. 870–81.
- Molina, P., Fresneda, P.M., & Sanz, M.A., Synthesis of Marine Alkaloids Isonaamine A, Dorimidazole A, and Preclathridine A. Iminophosphorane-Mediated Preparation of 2-Amino-1, 4-disubstituted Imidazoles from a -Azido Esters. *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, pp. 2540–2544.

- Moriarty, D.J.W., Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. , 1999.
- Nakamura, S., Kawasaki, I., Yamashita, M., & Ohta, S., 1-methyl-3-trimethylsilylparabanic acid as an effective reagent for the preparation of N-substituted (1-methyl-2,5-dioxo-1,2,5H-imidazolin-4-yl)-amines and its application to the total synthesis of isonaamidines A and C, antitumor imidazole alkaloids. *Heterocycles*, 2003, **60**, pp. 2540–2544.
- Natrah, F., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P., Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 2011, **13**, pp. 109–126.
- Natrah, F.M.I., Ruwandeepika, H. a D., Pawar, S., Karunasagar, I., et al., Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Vet. Microbiol.*, 2011, **154**, pp. 124–129.
- Nealson, K.H., Platt, T., & Hastings, J.W., Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *J. Bacteriol.*, 1970, **104**, pp. 313–322.
- Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., et al., Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008a, **369**, pp. 590–594.
- Ni, N., Chou, H.-T., Wang, J., Li, M., et al., Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008b, **369**, pp. 590–594.
- Ni, N., Choudhary, G., Li, M., & Wang, B., Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, pp. 1567–1572.
- Ogimura, T., Futami, K., Katagiri, T., Maita, M., et al., Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria. *Fish. Sci.*, 2012, **78**, pp. 1255–1262.
- Pande, G.S.J., Scheie, A.A., Benneche, T., Wille, M., et al., Quorum sensing-disrupting compounds protect larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* from *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 2013, **406-407**, pp. 121–124.
- Peters, L., Ko, G.M., Wright, A.D., Stackebrandt, E., et al., Secondary Metabolites of *Flustra foliacea* and Their Influence on Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, pp. 3469–3475.
- Ralifo, P., & Crews, P., A new structural theme in the imidazole-containing alkaloids from a calcareous *Leucetta* sponge. *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, pp. 9025–9029.
- Ralifo, P., Tenney, K., Valeriote, F.A., & Crews, P., A distinctive structural twist in the aminoimidazole alkaloids from a calcareous marine sponge: Isolation and characterization of leucosolenamines A and B. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, pp. 33–38.
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., et al., An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.*, 2004, **27**, pp. 350–9.
- Rasmussen, T.B., & Givskov, M., Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, **296**, pp. 149–161.
- Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., Eberl, L., et al., How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiol. Rev.*, 2000, **146**, pp. 3237–3244.
- Ren, S., Ma, W., Xu, T., Lin, X., et al., Two novel alkaloids from the South China Sea marine sponge *Dysidea* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2010, **63**, pp. 699–701.
- Roll, D.M., & Ireland, C.M., Fascaplysin, an unusual antimicrobial pigment from the marine sponge *Fascaplysinopsis* sp. *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, pp. 3276–3278.
- Romero, M., Avendano-Herrera, R., Magarinos, B., Camara, M., et al., Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, **304**, pp. 131–139.
- Roué, M., Domart-Coulon, I., Ereskovsky, A., Djediat, C., et al., Cellular localization of clathridimine,

- an antimicrobial 2-aminoimidazole alkaloid produced by the mediterranean calcareous sponge clathrina clathrus. *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, pp. 1277–1282.
- Roué, M., Quévrain, E., Domart-Coulon, I., & Bourguet-Kondracki, M.-L., Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, pp. 739–751.
- Rubio, B.K., Van Soest, R.W.M., & Crews, P., Extending the record of meroditerpenes from Cacospongia marine sponges. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, pp. 628–631.
- Ruwandeeepika, H.A.D., Bhowmick, P.P., Karunasagar, I., Bossier, P., et al., Quorum sensing regulation of virulence gene expression in *Vibrio harveyi* in vitro and in vivo during infection of gnotobiotic brine shrimp larvae. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2011, **3**, pp. 597–602.
- Sadar, M.D., Williams, D.E., Mawji, N.R., Patrick, B.O., et al., Sintokamides A to E, Chlorinated Peptides from the Sponge. *Org. Lett.*, 2008, **10**, pp. 4947–4950.
- Sakai, E., Kato, H., Rotinsulu, H., Losung, F., et al., Variabines A and B: new β -carboline alkaloids from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *J. Nat. Med.*, 2014, **68**, pp. 215–219.
- Salmoun, M., Devijver, C., Daloze, D., Braekman, J.C., et al., New sesquiterpene/quinones from two sponges of the genus *Hyrtilos*. *J Nat Prod*, 2000, **63**, pp. 452–456.
- Sauleau, P., Retailleau, P., Vacelet, J., & Bourguet-Kondracki, M.-L., Novel polychlorinated pyrrolidinones from the Red Sea marine sponge *Lamellodysidea herbacea*. *Tetrahedron*, 2005, **61**, pp. 955–963.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., & Bassler, B.L., The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.*, 2001, **41**, pp. 463–76.
- Schmidt, E.W., & Faulkner, D.J., Palauolol, a new anti-inflammatory sesterterpene from the sponge *Fascaplysinopsis* sp. from Palau. *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, pp. 3951–3954.
- Segraves, N.L., Lopez, S., Johnson, T. a., Said, S. a., et al., Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla - *Fascaplysinopsis* sponges and *Didemnum* tunicates. *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, pp. 3471–3475.
- Segraves, N.L., Robinson, S.J., Garcia, D., Said, S.A., et al., Comparison of fascaplysin and related alkaloids: a study of structures, cytotoxicities, and sources. *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, pp. 783–792.
- Shafiq, M.I., Steinbrecher, T., & Schmid, R., Fascaplysin as a specific inhibitor for CDK4: insights from molecular modelling. *PLoS One*, 2012, **7**, p. e42612.
- Shridhar, D.M.P., Mahajan, G.B., Kamat, V.P., Naik, C.G., et al., Antibacterial activity of 2-(2',4'-dibromophenoxy)-4,6-dibromophenol from *Dysidea granulosa*. *Mar. Drugs*, 2009, **7**, pp. 464–471.
- De Silva, E.D., & Scheuer, J., Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffarielle variabilise*. *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, pp. 1611–1614.
- Sionov, E., Roth, D., Sandovsky-Losica, H., Kashman, Y., et al., Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *J. Infect.*, 2005, **50**, pp. 453–460.
- Skindersoe, M.E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., et al., Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 2008, **10**, pp. 56–63.
- Van Soest, R.W.M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., et al., Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS One*, 2012, **7**, p. e35105.
- Soto-Rodríguez, S. a., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., et al., Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2012, **109**, pp. 307–317.
- Srikanth Reddy, T., Suryakiran, N., Narasimhulu, M., Ramesh, D., et al., Semi-synthesis and bio-

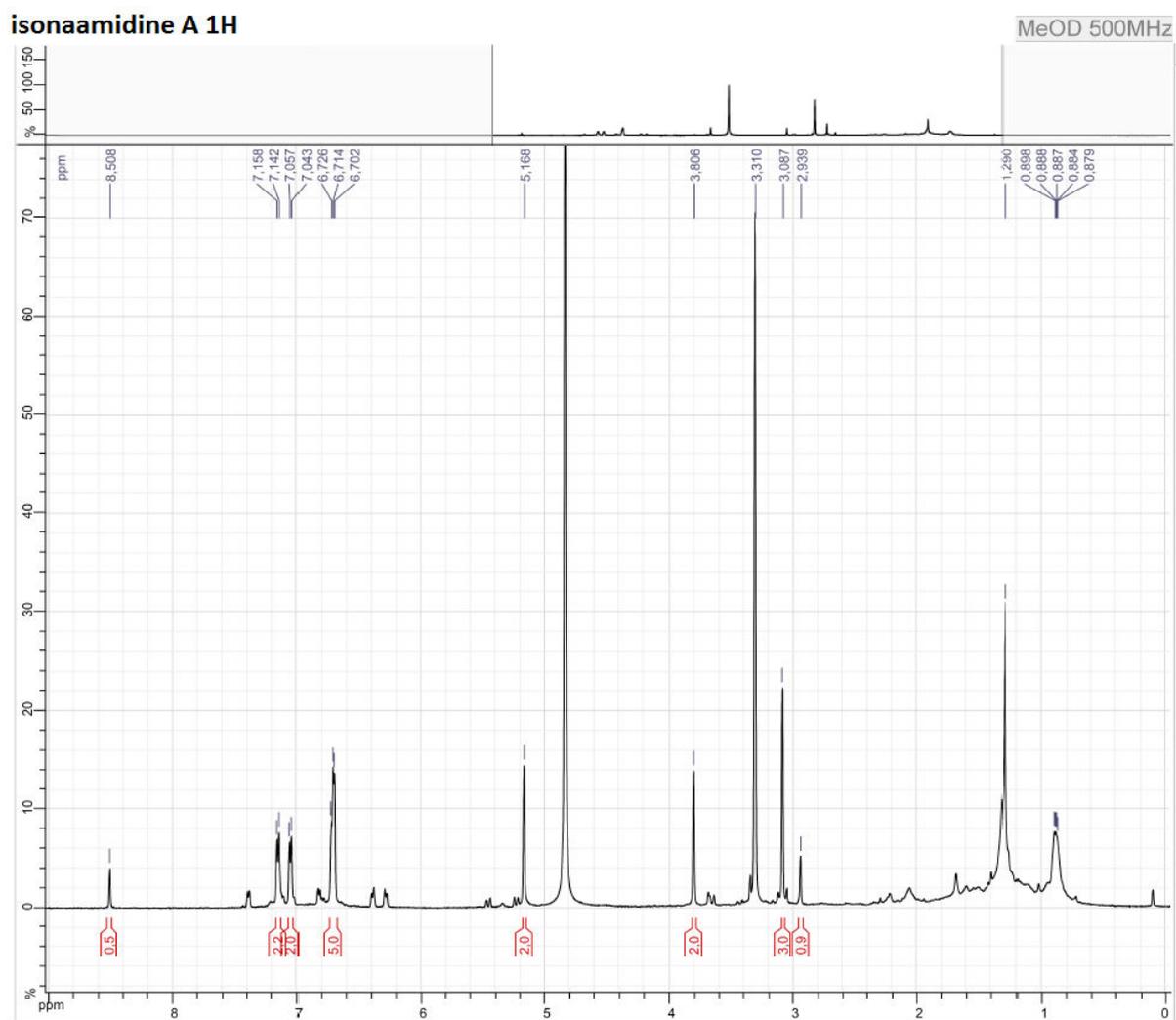
- evaluation of polybrominated diphenyl ethers from the sponge *Dysidea herbacea*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, pp. 4900–4906.
- Steenackers, H.P., Levin, J., Janssens, J.C., De Weerd, A., et al., Structure-activity relationship of brominated 3-alkyl-5-methylene-2(5H)-furanones and alkylmaleic anhydrides as inhibitors of *Salmonella* biofilm formation and quorum sensing regulated bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, pp. 5224–5233.
- De Stefano, D., Tommonaro, G., Malik, S.A., Iodice, C., et al., Cacospongionolide and Scalaradial, Two Marine Sesterterpenoids as Potent Apoptosis-Inducing Factors in Human Carcinoma Cell Lines. *PLoS One*, 2012, **7**, p. e33031.
- Su, J.H., Tseng, S.W., Lu, M.C., Liu, L.L., et al., Cytotoxic C 21 and C 22 terpenoid-derived metabolites from the sponge *Ircinia* sp. *J. Nat. Prod.*, 2011, **74**, pp. 2005–2009.
- Sullivan, B., & Faulkner, D.J., An antibacterial sesterterpene from a palauan sponge. *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, pp. 907–910.
- Sullivan, J.D., Giles, R.L., & Looper, R.E., 2-Aminoimidazoles from *Leucetta* Sponges: Synthesis and Biology of an Important Pharmacophore. *Curr. Bioact. Compd.*, 2009, **5**, pp. 39–78.
- Tanaka, N., Momose, R., Takahashi-Nakaguchi, A., Gono, T., et al., Hyrtimomines, indole alkaloids from Okinawan marine sponges *Hyrtios* spp. *Tetrahedron*, 2014, **70**, pp. 832–837.
- Tang, K., & Zhang, X.-H., Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Mar. Drugs*, 2014, **12**, pp. 3245–3282.
- Teasdale, M.E., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F., et al., Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75**, pp. 567–572.
- Tello, E., Castellanos, L., & Duque, C., Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, pp. 242–56.
- Teng, S.-W., Schaffer, J.N., Tu, K.C., Mehta, P., et al., Active regulation of receptor ratios controls integration of quorum-sensing signals in *Vibrio harveyi*. *Mol. Syst. Biol.*, 2011, **7**, p. 491.
- Tommonaro, G., Iodice, C., Abdel-hady, F.K., Guerriero, G., et al., Biodiversity & Endangered Species The Mediterranean Sponge *Dysidea avara* as a 40 Year Inspiration of Marine Natural Product Chemists. *J. Biodivers. Endanger. Species*, 2015, p. S1: S1.001.
- Tsukamoto, S., Kawabata, T., Kato, H., Ohta, T., et al., Naamidines H and I, cytotoxic imidazole alkaloids from the Indonesian marine sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, pp. 1658–1660.
- Tsukamoto, S., Takeuchi, T., Rotinsulu, H., Mangindaan, R.E.P., et al., Leucettamol A: a new inhibitor of Ubc13-Uev1A interaction isolated from a marine sponge, *Leucetta* aff. *microrhaphis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, pp. 6319–6320.
- Unson, M.D., Holland, N.D., & Faulkner, D.J., A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.*, 1994, **119**, pp. 1–11.
- Vacelet, J., Eponges Pharétronides actuelles et Sclérosponges de Polynésie française, de Madagascar et de la Réunion. *Bull. du Museum Natl. d'Histoire Nat.*, 1977, **44**, pp. 345–368–.
- Venkateswarlu, Y., Ramesh, P., & Reddy, N.S., Chemical and biological aspects of the sponge genus *Dysidea*, a review. *Nat. Prod. Sci.*, 1998, **4**, pp. 115–129.
- Veron, J.E.N., Devantier, L.M., Turak, E., Green, A.L., et al., Delineating the Coral Triangle. *Galaxea, J. Coral Reef Stud.*, 2009, **11**, pp. 91–100.
- Waters, C.M., & Bassler, B.L., Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, **21**, pp. 319–46.
- Werner, H., & Willie E, O., Dysidin, a novel chlorine containing natural product from the sponge

- Dysidea herbacea. *Helv. Chim. Acta*, 1977, **60**, pp. 660–669.
- Widmer, K.W., Soni, K.A., Hume, M.E., Beier, R.C., et al., Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to autoinducer-2 (AI-2). *J. Food Sci.*, 2007, **72**, pp. M363–M368.
- Won, K.M., & Park, S. Il, Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*, 2008, **285**, pp. 8–13.
- Worheide, G., Hooper, J.N.A., & Degnan, B.M., Phylogeography of western Pacific *Leucetta* “chagosensis” (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Mol. Ecol.*, 2002, **11**, pp. 1753–1768.
- Xu, Y.M., Johnson, R.K., & Hecht, S.M., Polybrominated diphenyl ethers from a sponge of the *Dysidea* genus that inhibit Tie2 kinase. *Bioorganic Med. Chem.*, 2005, **13**, pp. 657–659.
- Yong, K.W.L., Jankam, A., Hooper, J.N. a, Suksamrarn, A., et al., Stereochemical evaluation of sesquiterpene quinones from two sponges of the genus *Dactylospongia* and the implication for enantioselective processes in marine terpene biosynthesis. *Tetrahedron*, 2008, **64**, pp. 6341–6348.
- Yong, K.W.L., Jankam, A., Hooper, J.N.A., Suksamrarn, A., et al., Stereochemical evaluation of sesquiterpene quinones from two sponges of the genus *Dactylospongia* and the implication for enantioselective processes in marine terpene biosynthesis. *Tetrahedron*, 2008, **64**, pp. 6341–6348.
- Zhang, H., Skildum, A., Stromquist, E., Rose-Hellekant, T., et al., Bioactive polybrominated diphenyl ethers from the marine sponge *Dysidea* sp. *J. Nat. Prod.*, 2008, **71**, pp. 262–264.

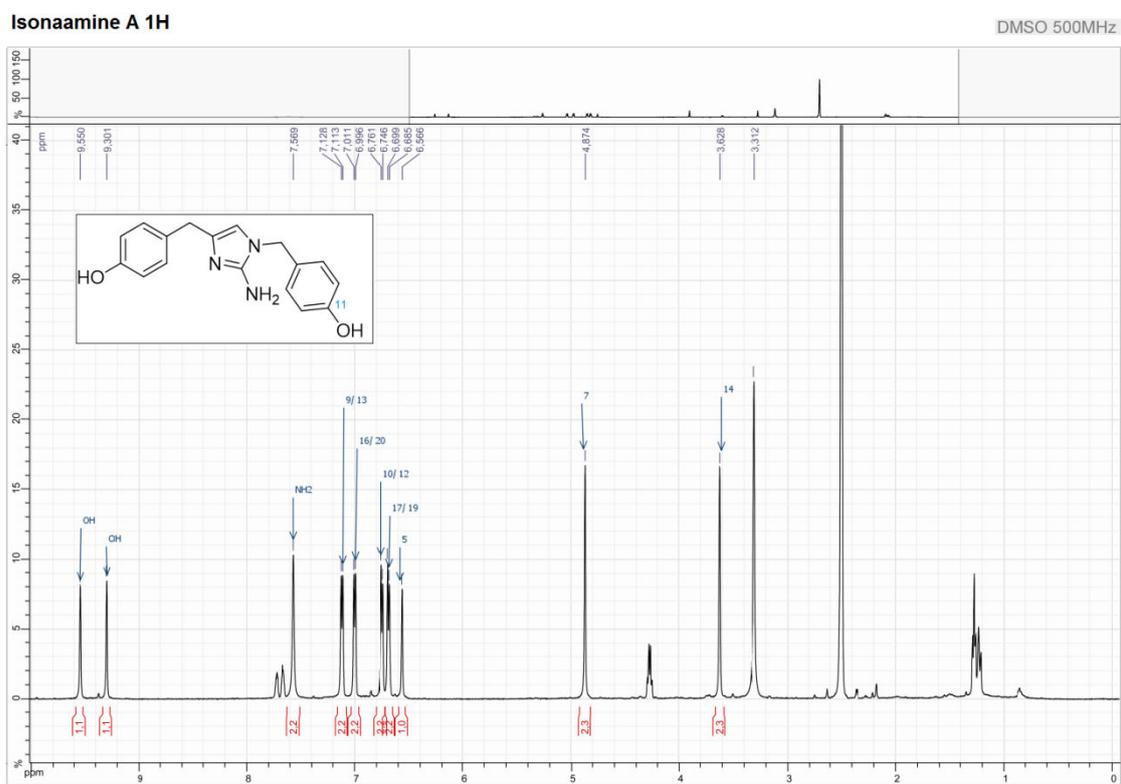
7. ANNEXES

Spectres RMN

Spectres RMN de l'isonaamidine A



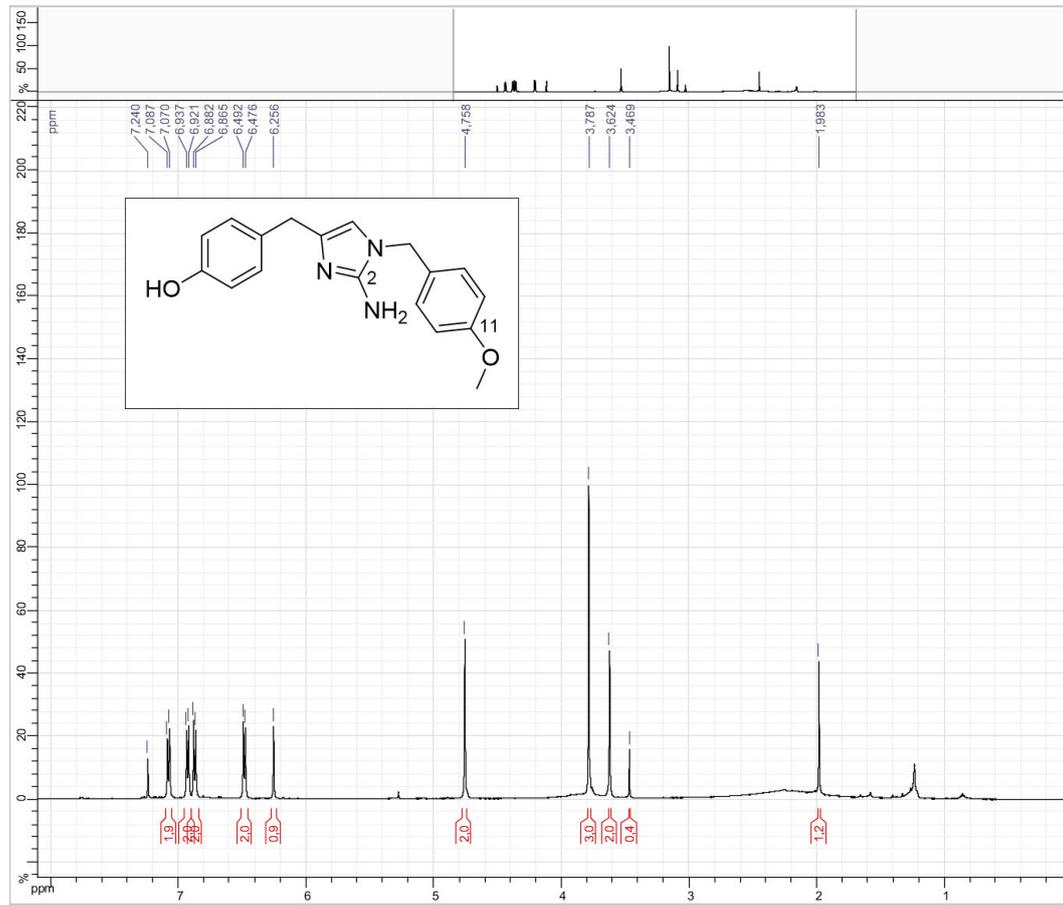
Spectres RMN de l'isonaamine A



Spectres RMN de l'isonaamine D

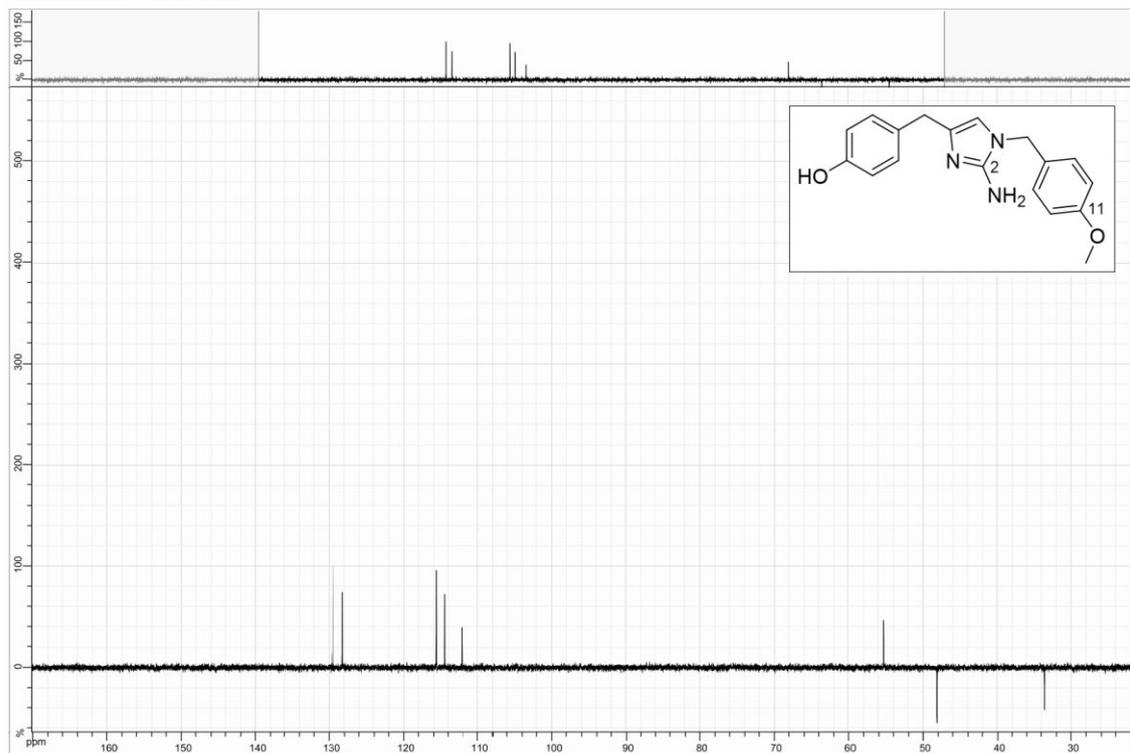
Isonaamine D 1H

CDCI3 500MHz

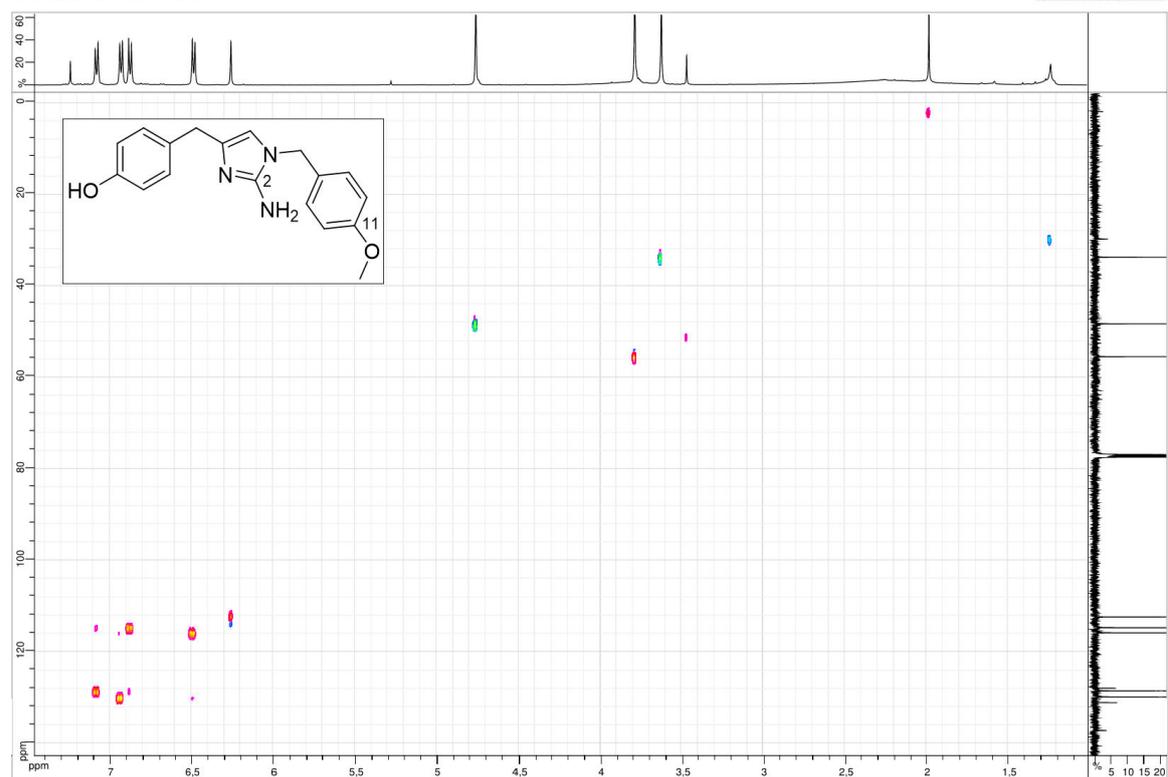


Isonaamine D C13-dept

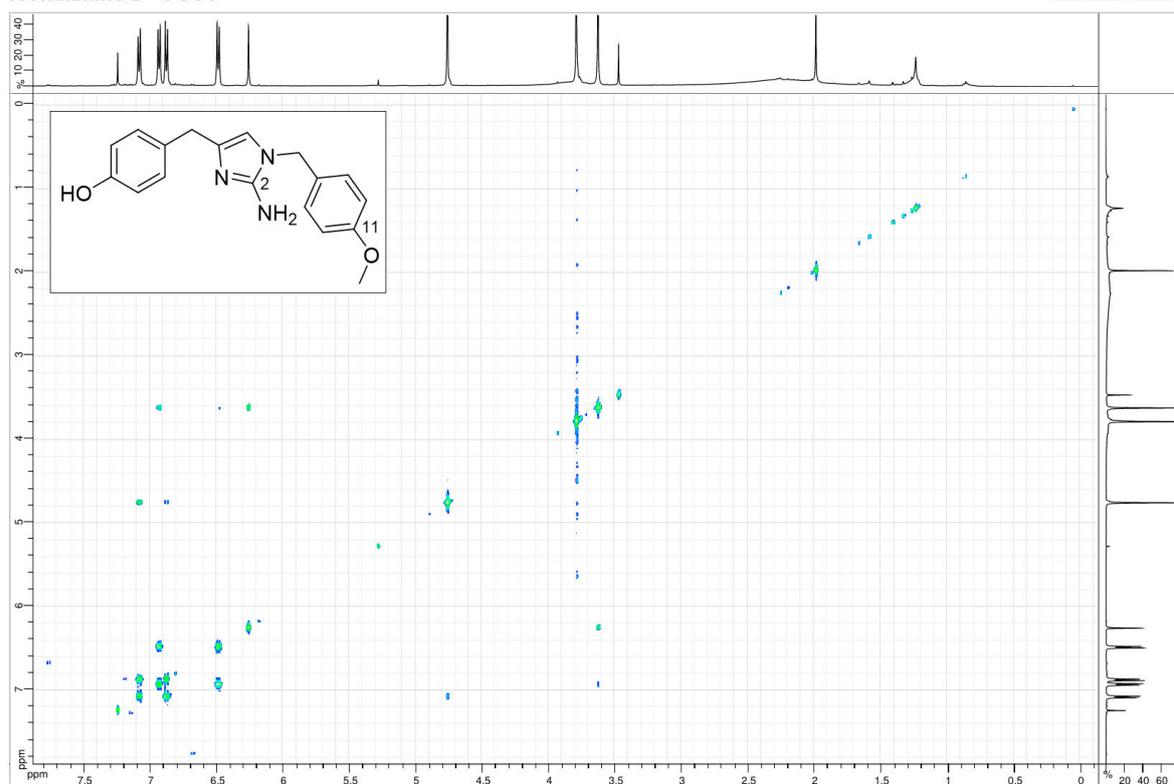
CDCI3 500MHz



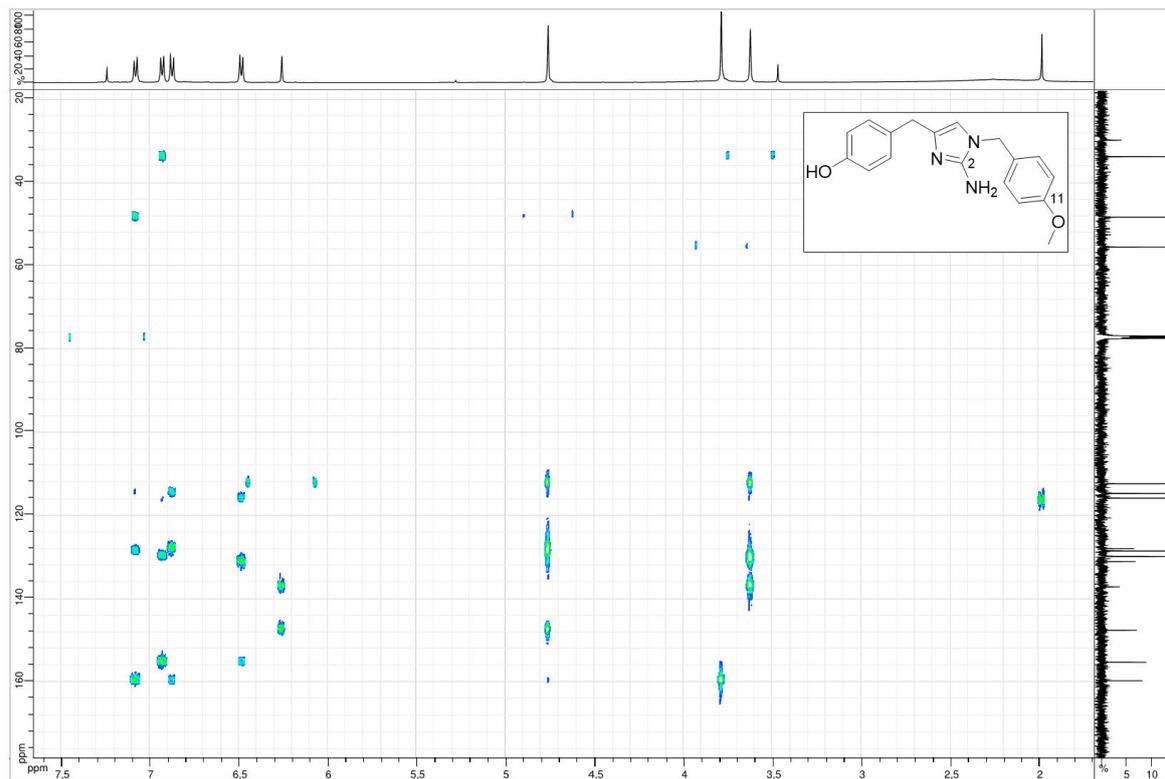
Isonaamine D HSQC

CDCl₃ 500MHz

Isonaamine D COSY

CDCl₃ 500MHz

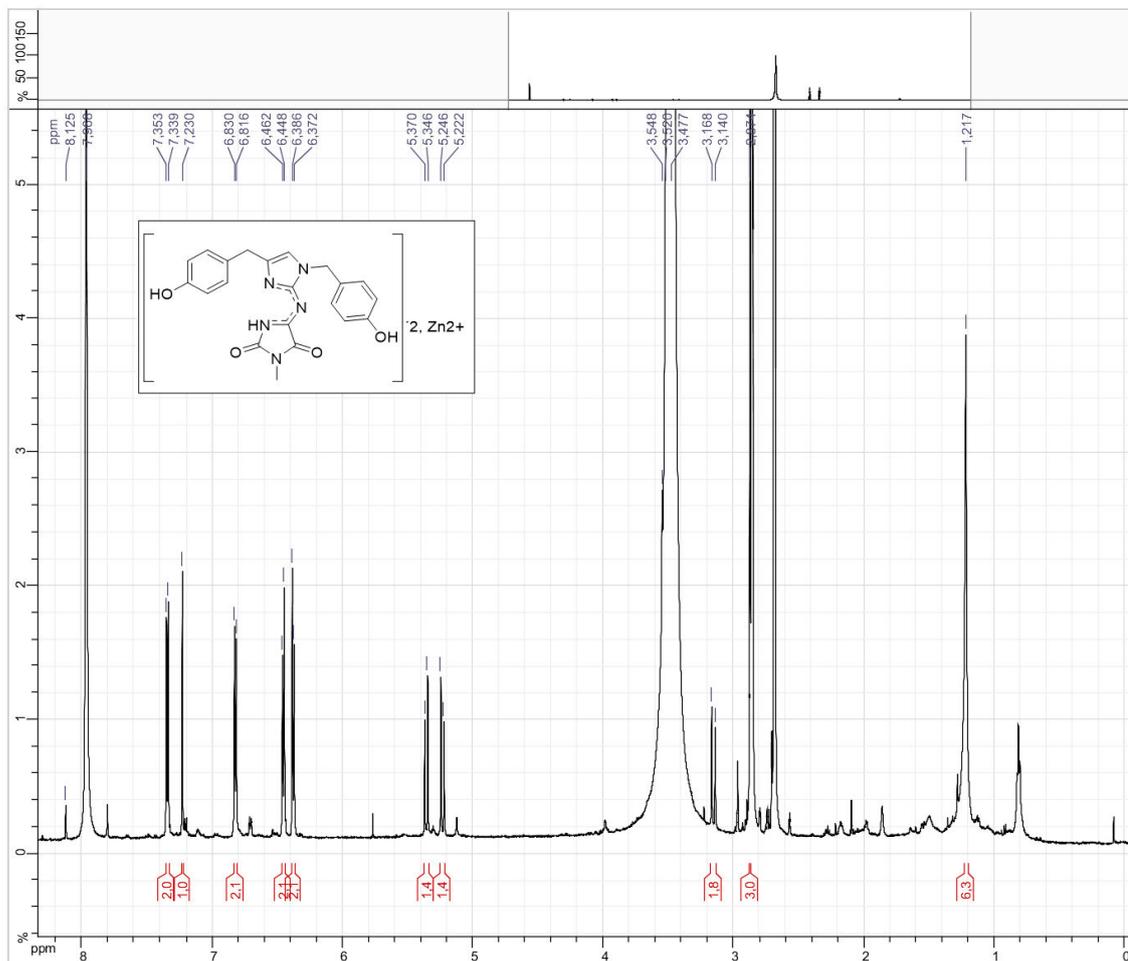
Isonaamine D HMBC

CDCl₃ 500MHz

Spectres RMN du bis-isonaamidine A-Zn

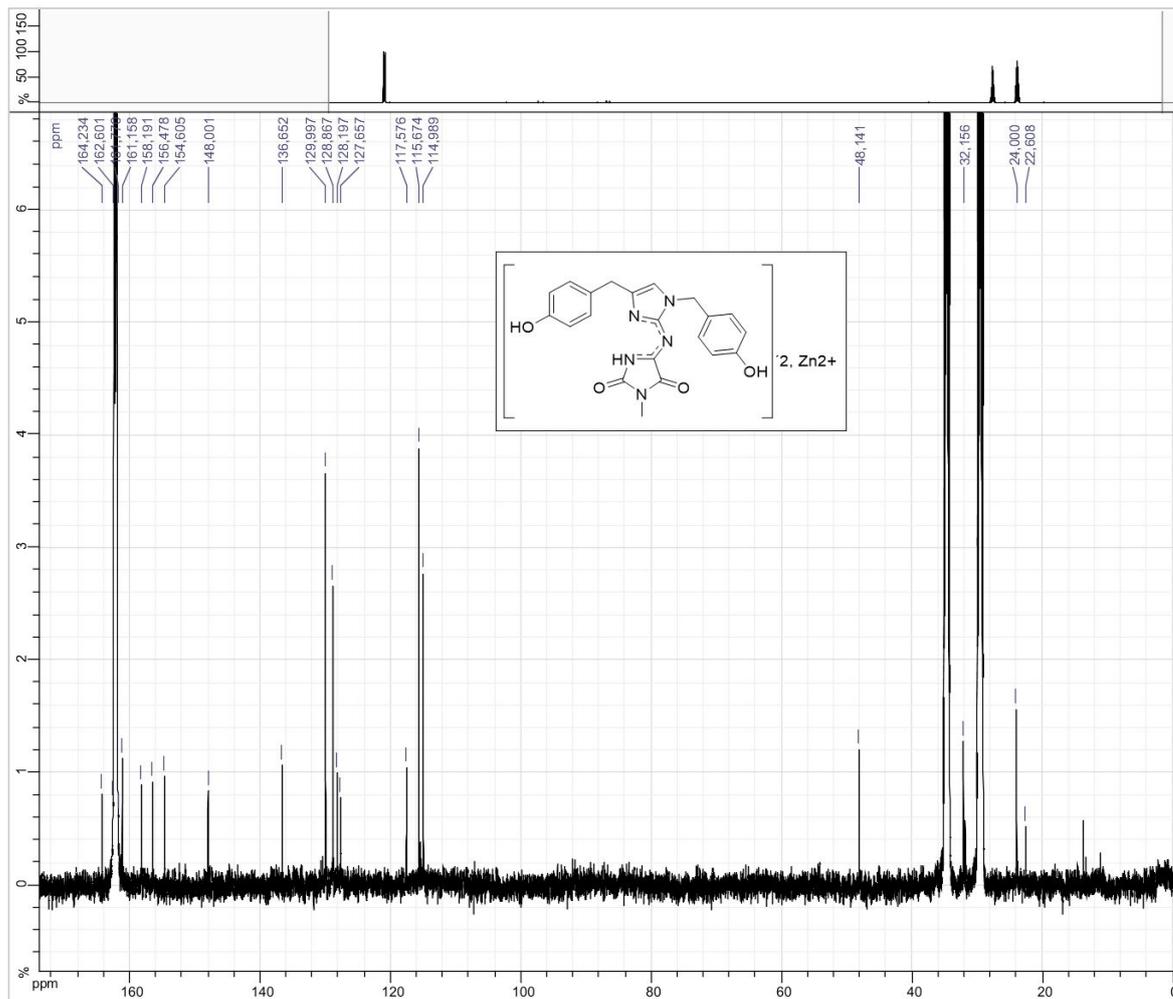
¹H bis-isonaamidine A-Zn

DMF 600MHz



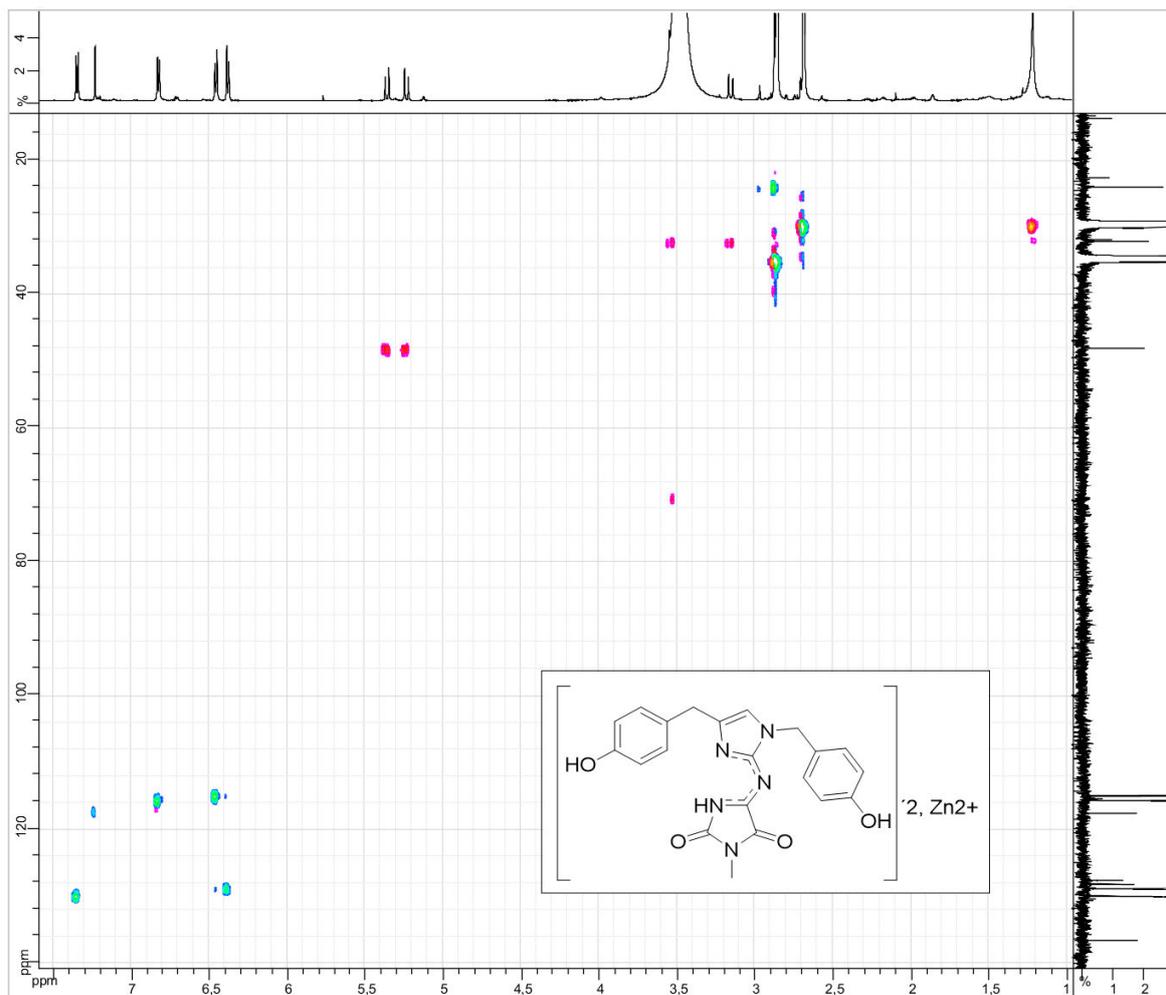
¹³C bis-isonaamidine A-Zn

DMF 600MHz



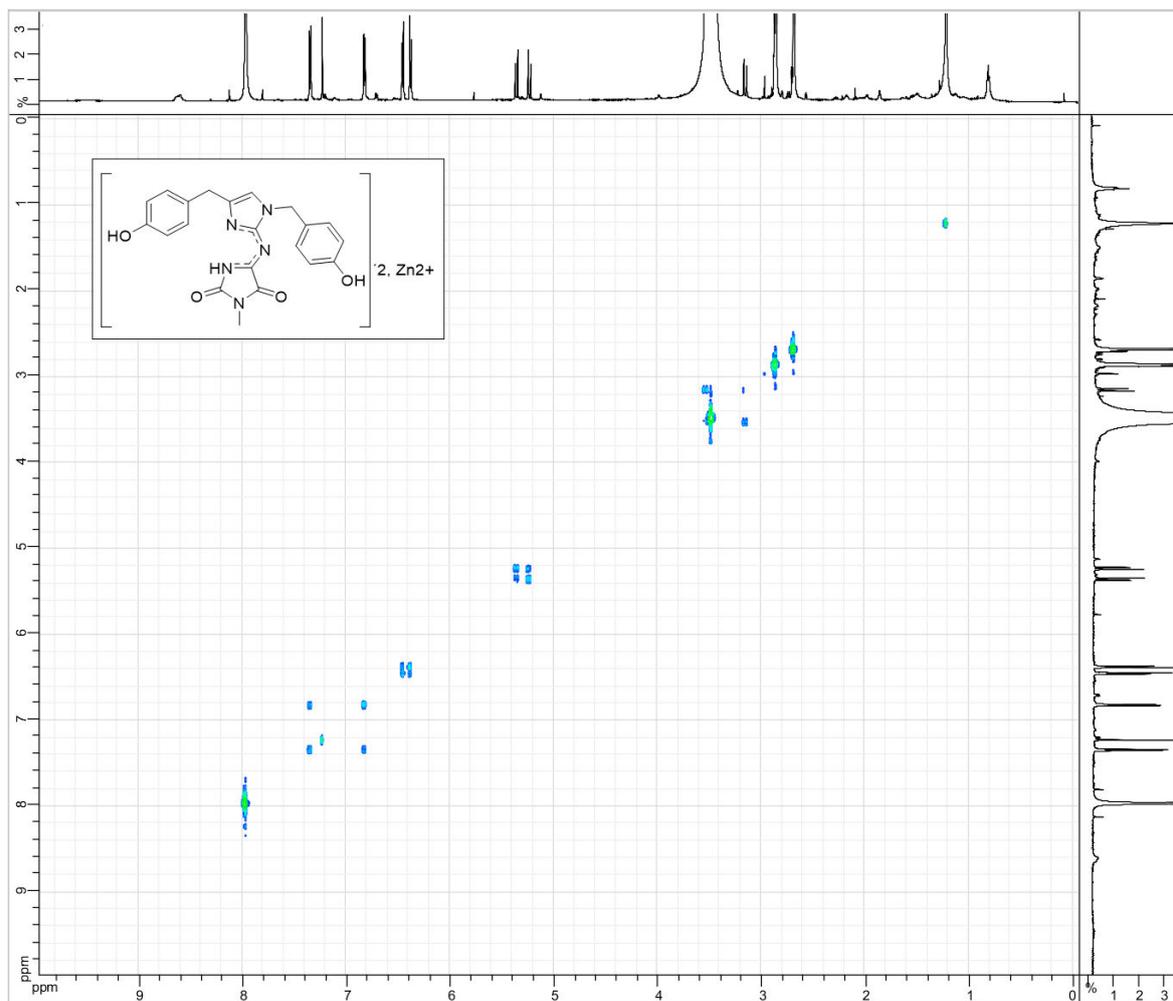
HSQC bis-isonaamide A-Zn

DMF 600MHz



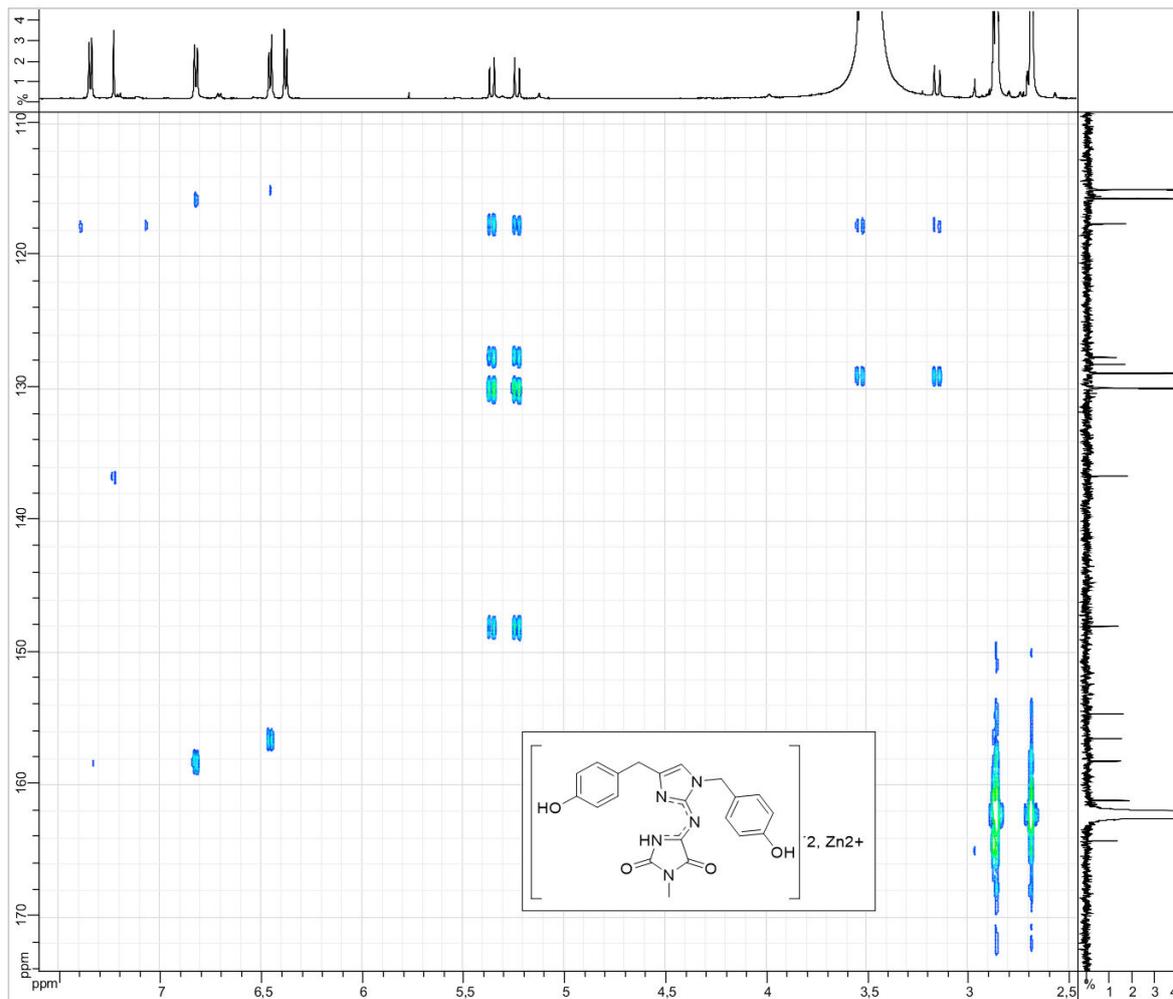
COSY bis-isonaamidine A-Zn

DMF 600MHz



bis-isonaamidine A-Zn HMBC

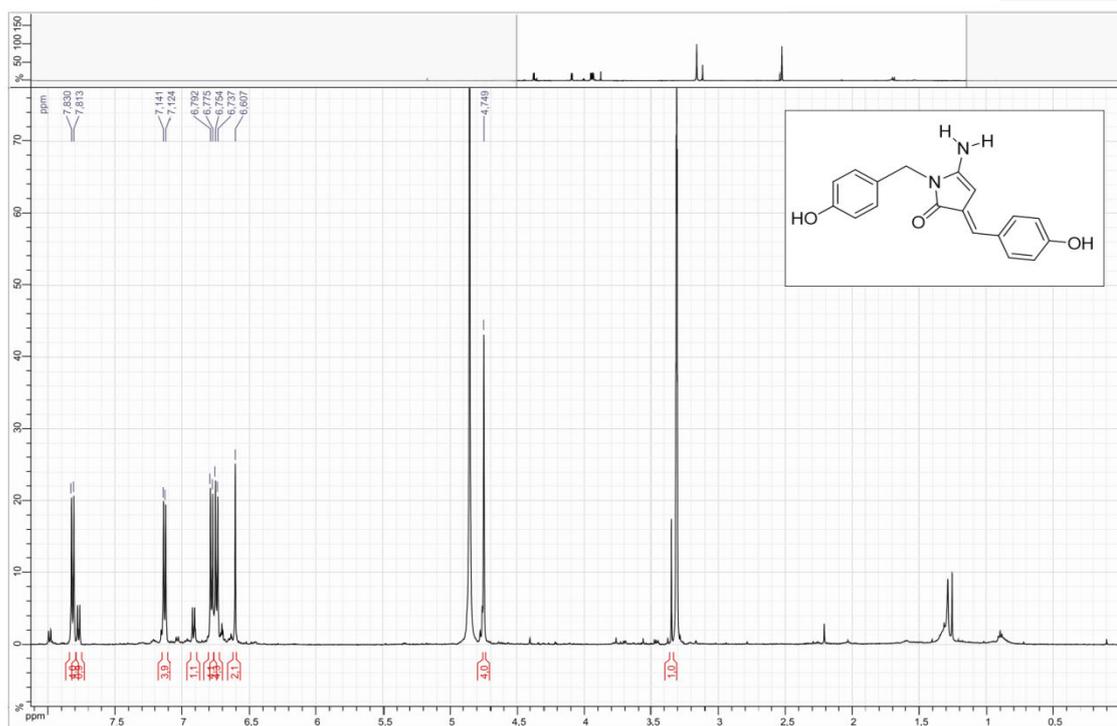
DMF 600MHz



Spectres RMN de la leucettamine D

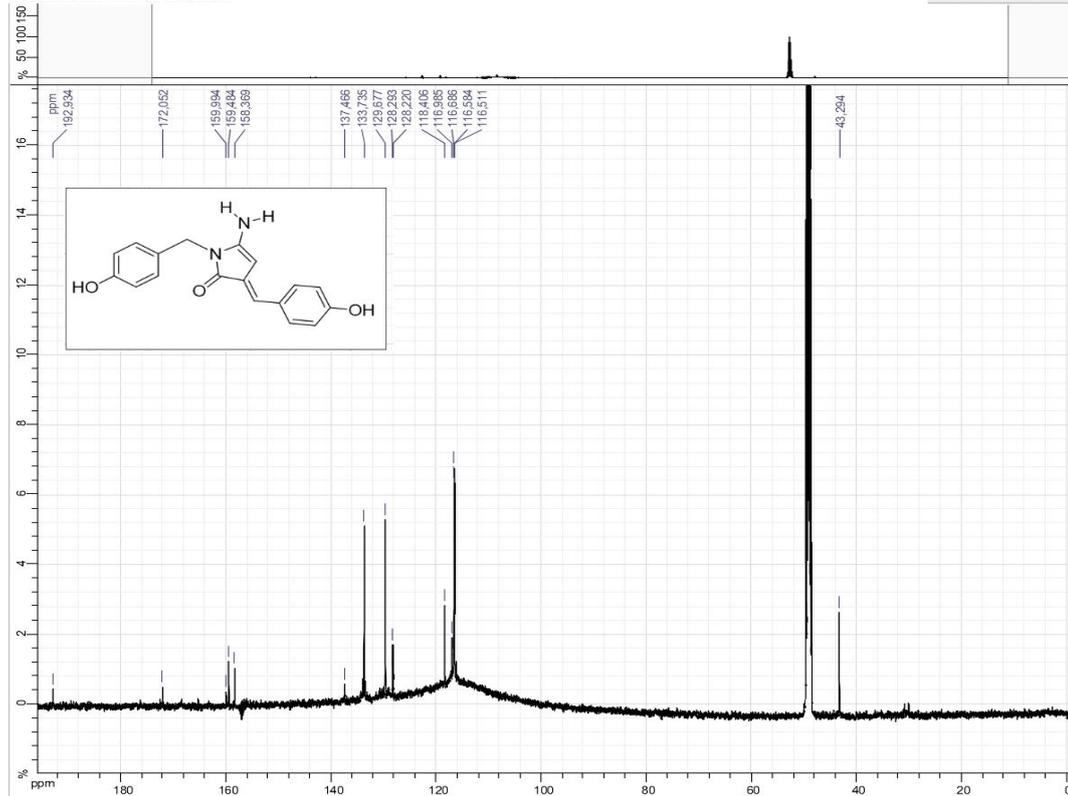
Leucettamine D 1H

MeOD 500MHz



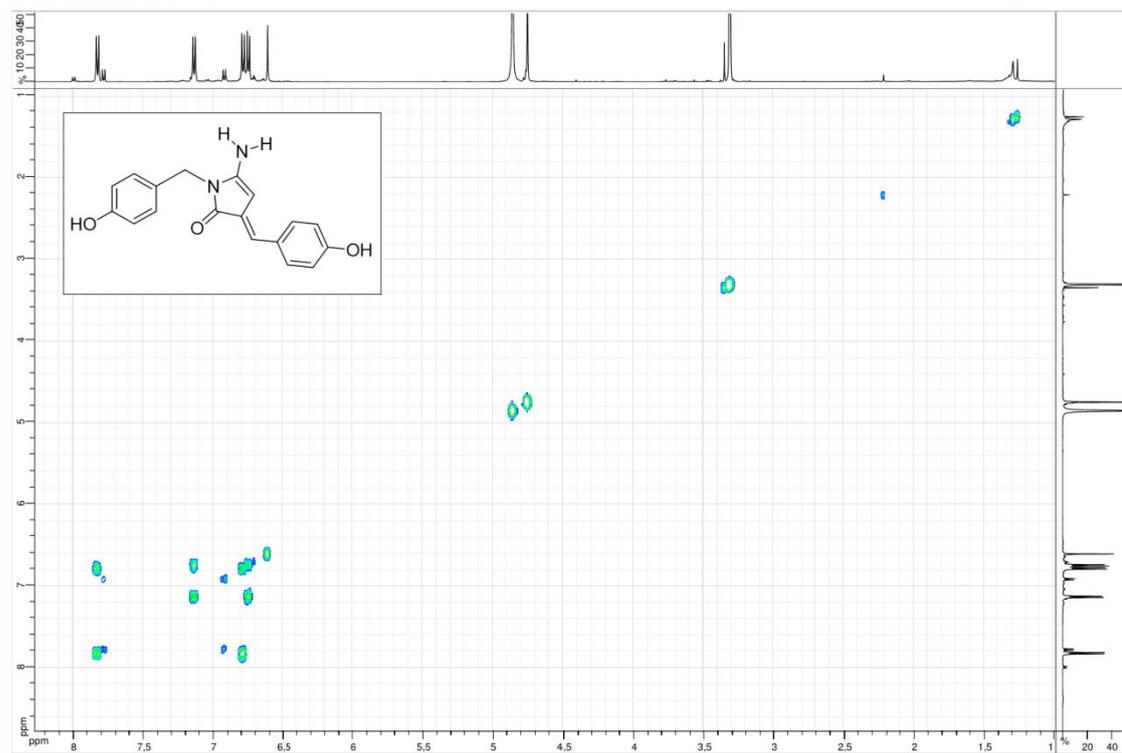
Leucettamine D 13C

MeOD 500MHz



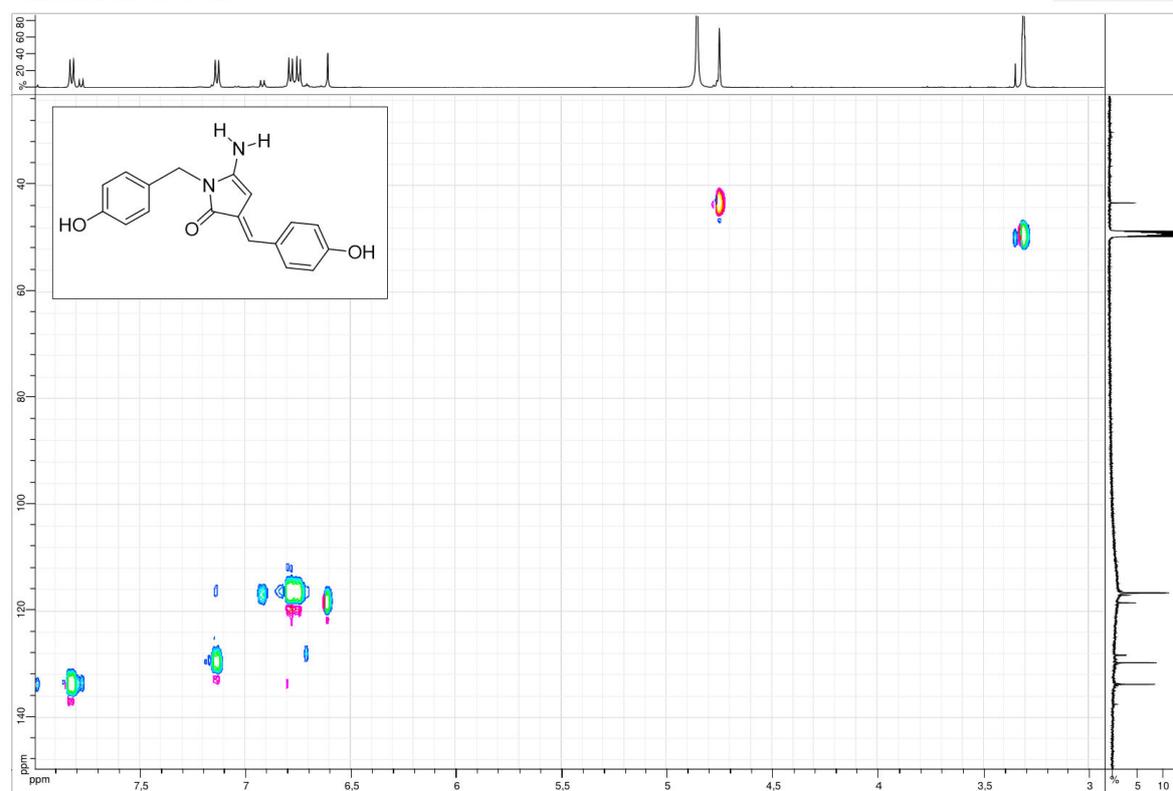
Leucettamine D COSY

MeOD 500MHz



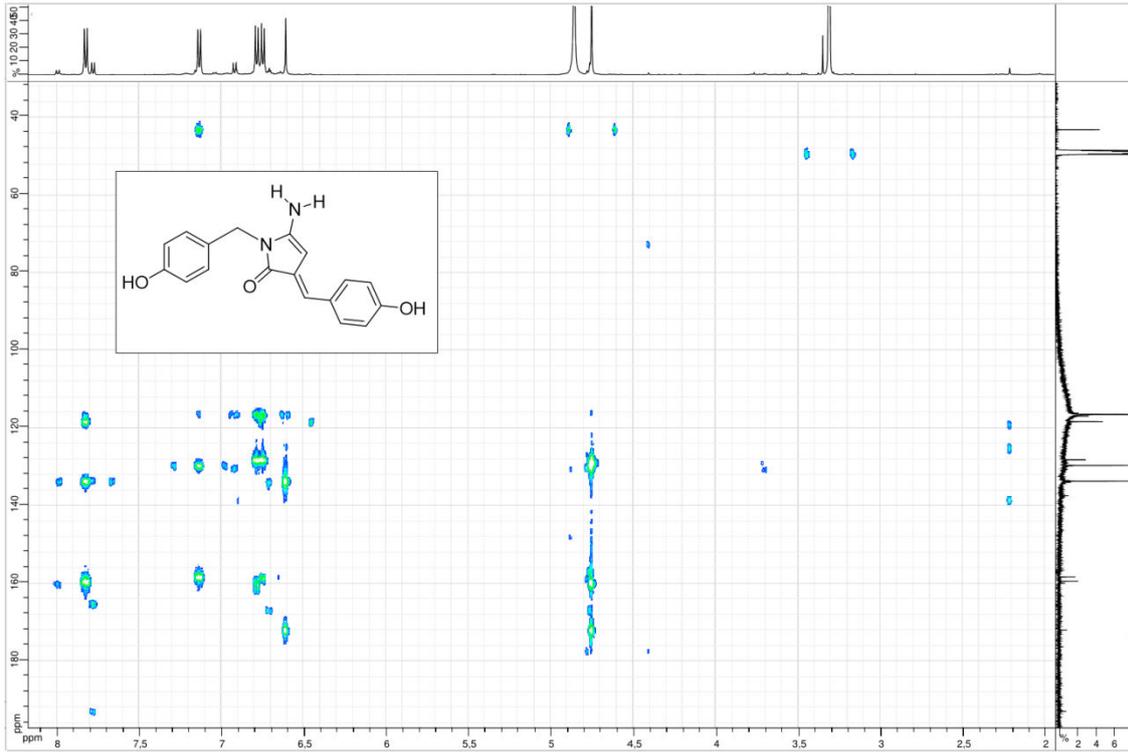
Leucettamine D HSQC

MeOD 500MHz



Leucettamine D HMBC

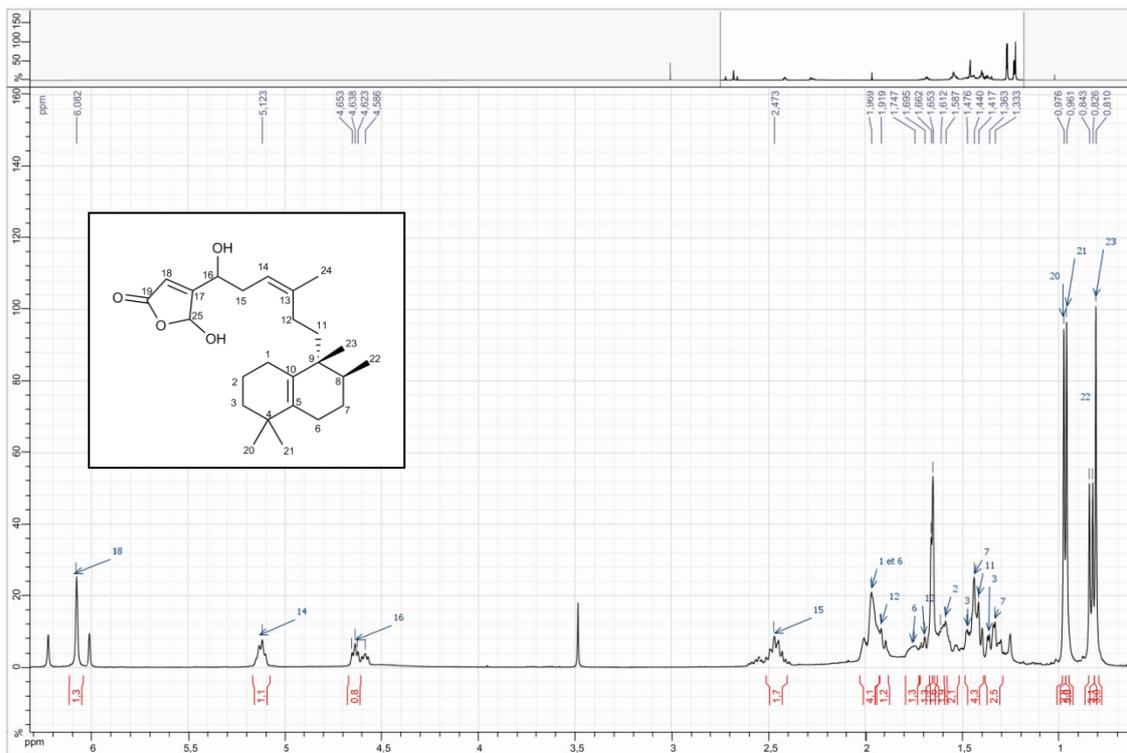
MeOD 500MHz



Spectres RMN du tuamotuolol

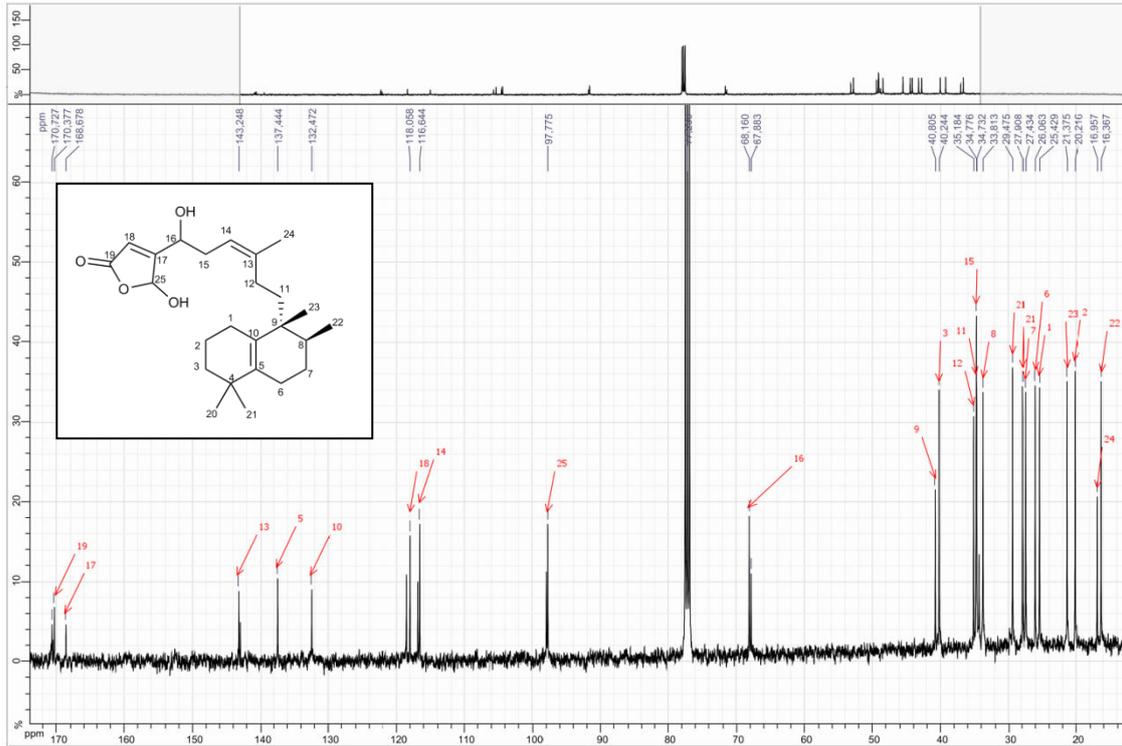
Tuamotuolol H1

CDCl3 400MHz



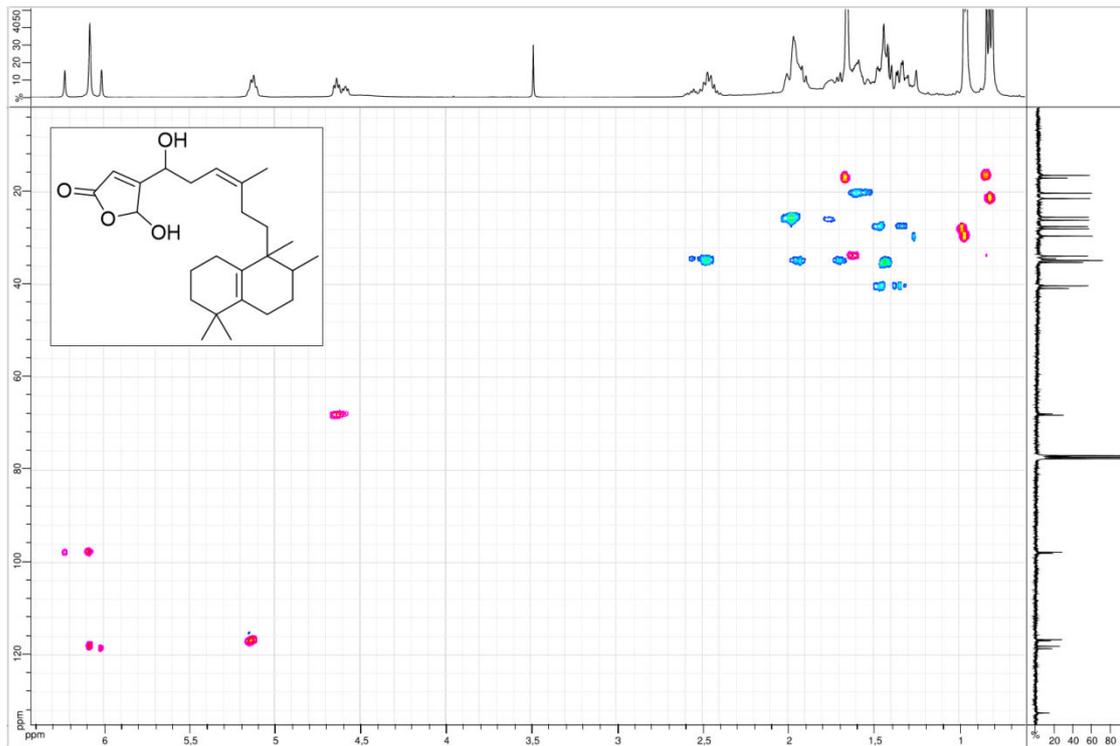
Tuamotuolol 13C

CDCI3 400MHz

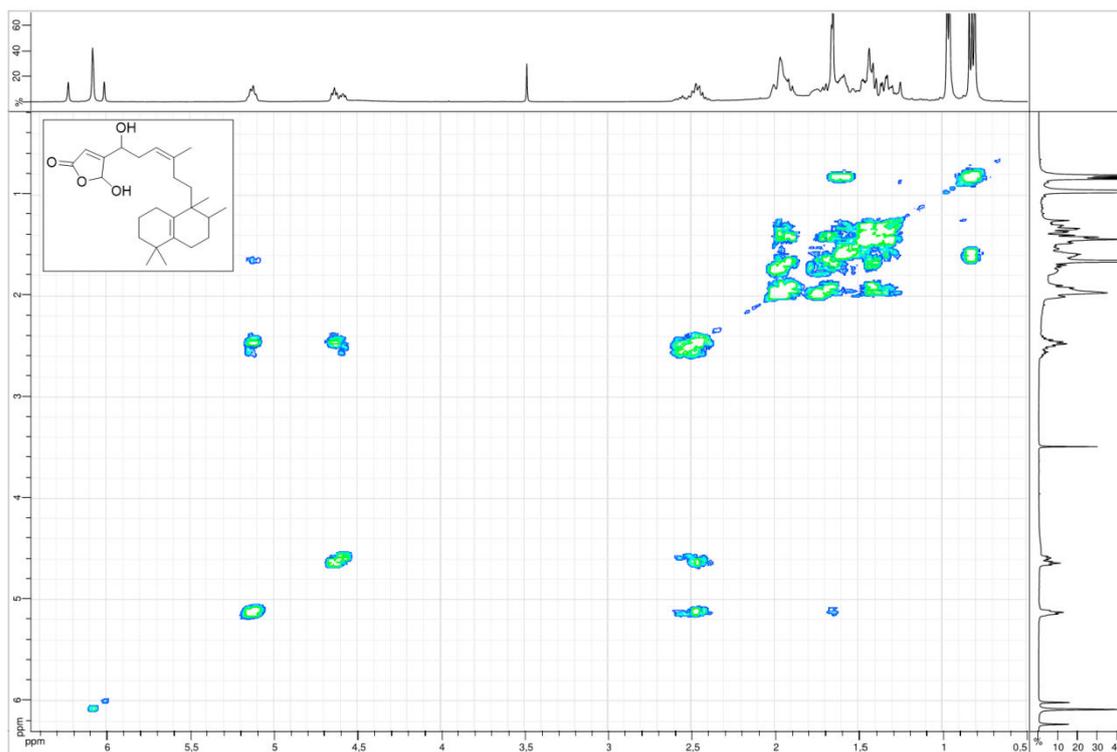


Tuamotuolol HSQC

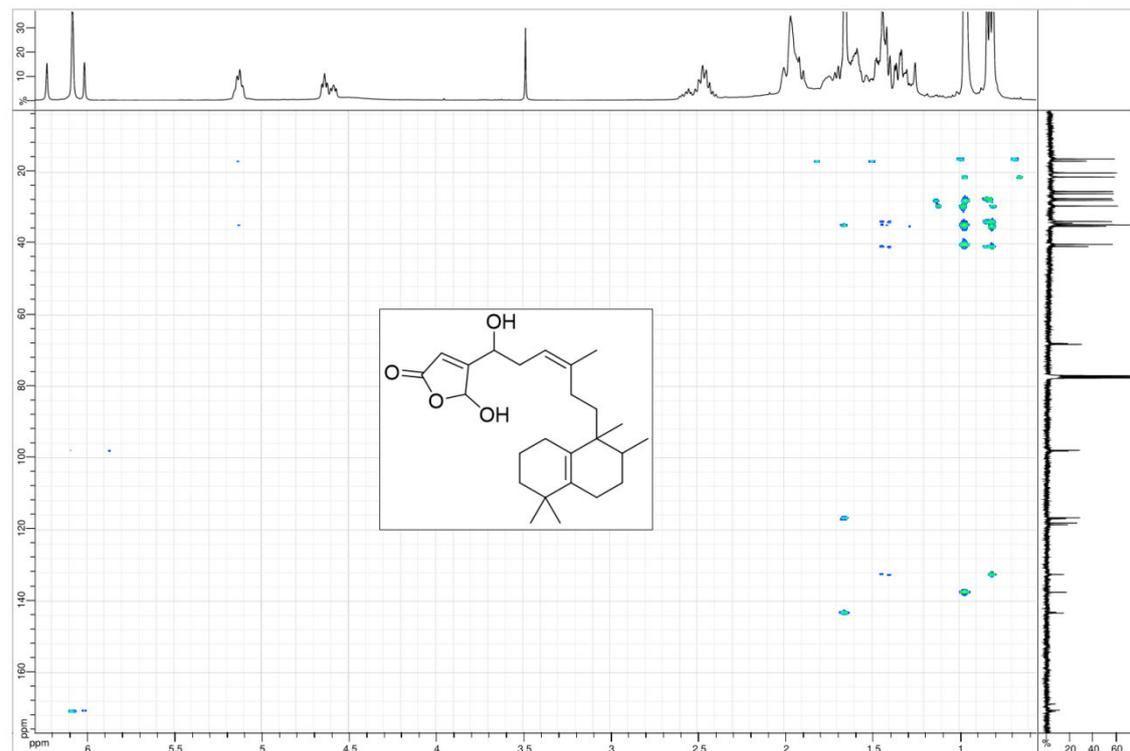
CDCI3 400MHz



Tuamotuolol COSY

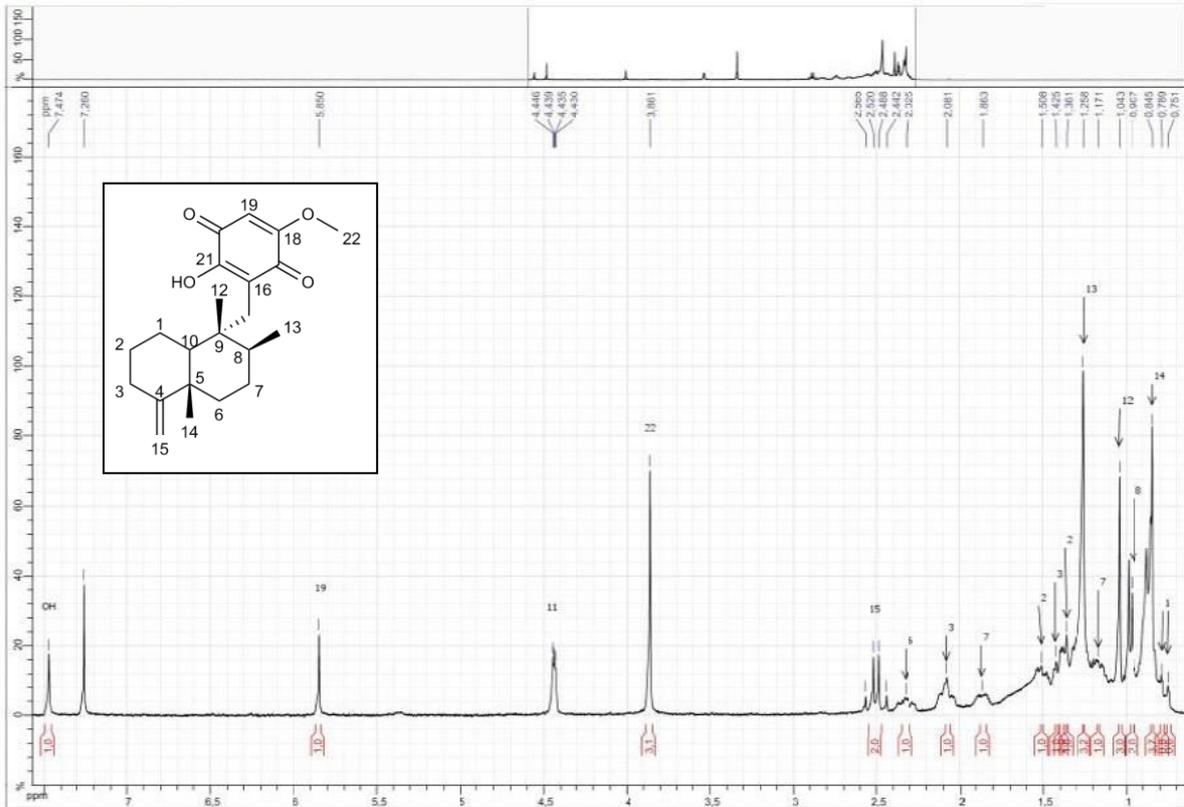
CDCl₃ 400MHz

Tuamotuolol HMBC

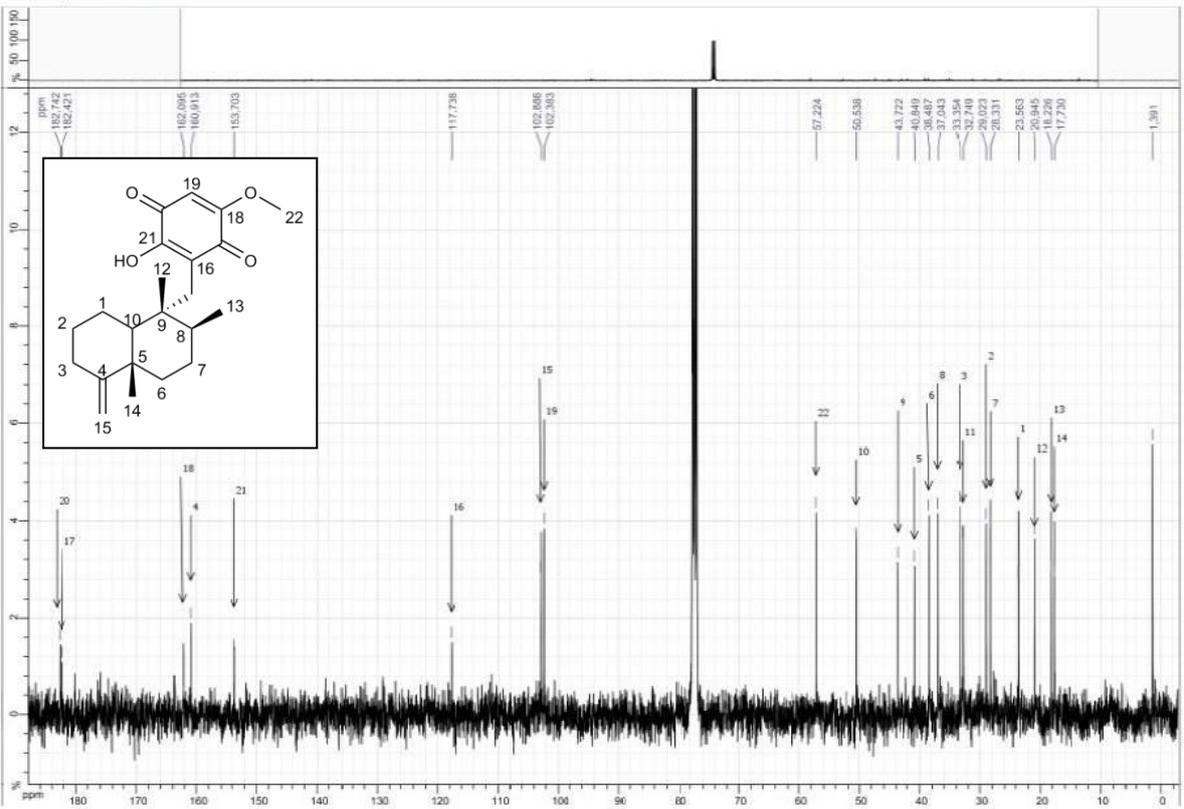
CDCl₃ 400MHz

Spectres RMN de l'ilimaquinone

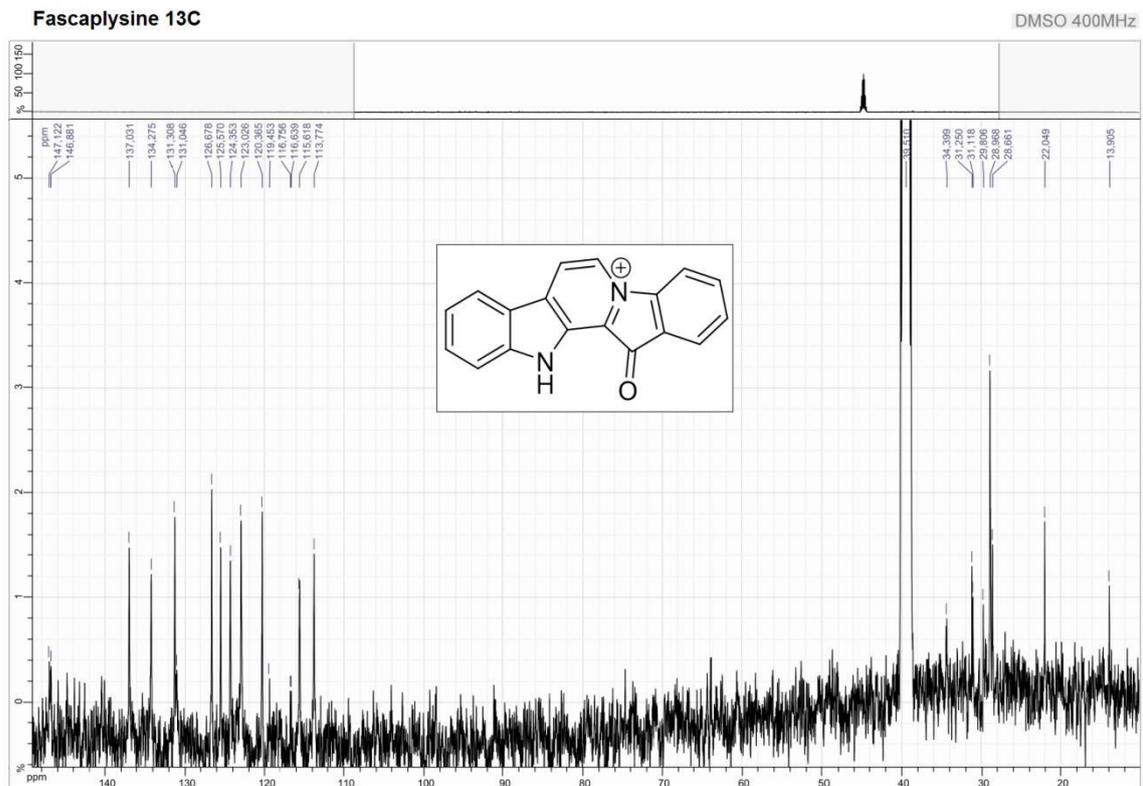
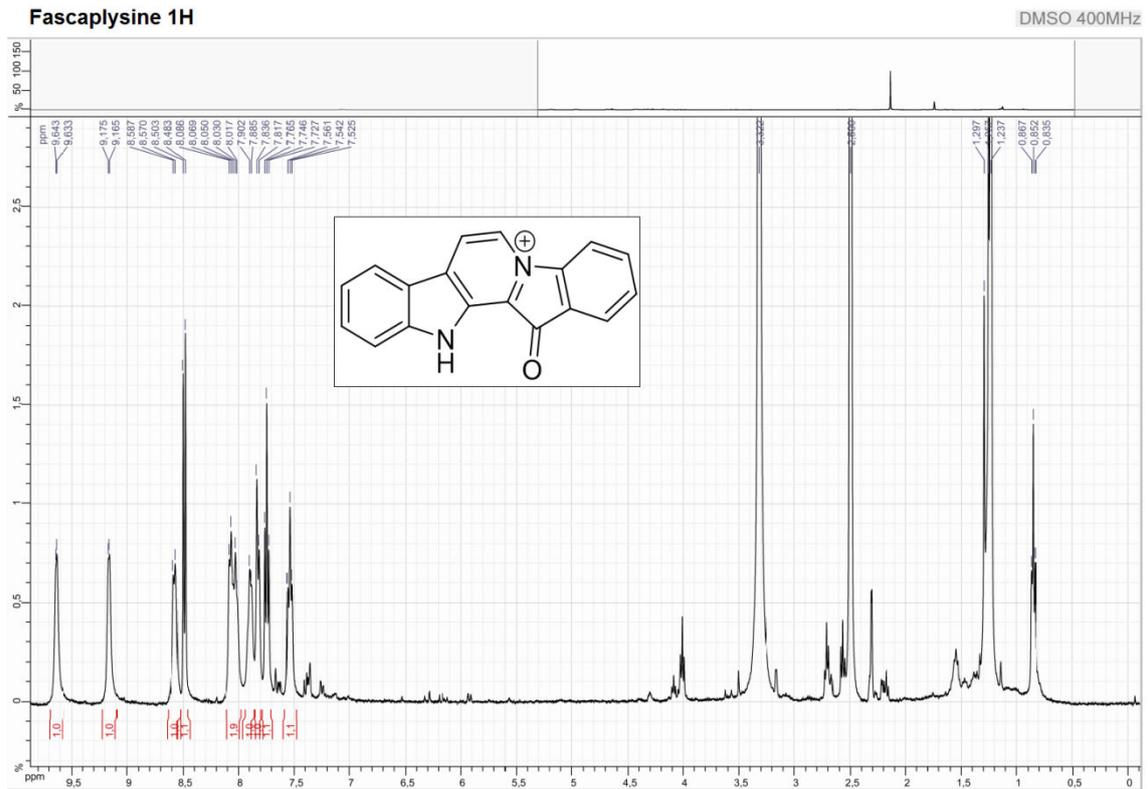
ilimaquinone 1H

CDCl₃ 400MHz

ilimaquinone 13C

CDCl₃ 400MHz

Spectres RMN de la fascaplysine



Gammed'étalonnage fluorescence/ activité métalloprotéases