HAL
open science

Biodiversité des invertébrés marins : de l'isolement à la modélisation moléculaire de métabolites secondaires pour la découverte de nouveaux candidats médicaments

Pierre-Éric Campos

To cite this version:

Pierre-Éric Campos. Biodiversité des invertébrés marins : de l'isolement à la modélisation moléculaire de métabolites secondaires pour la découverte de nouveaux candidats médicaments. Chimie analytique. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0007 . tel-01561205

HAL Id: tel-01561205

https://theses.hal.science/tel-01561205v1

Submitted on 12 Jul 2017

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

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

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 08/02/2017

par

Pierre-Eric CAMPOS

Biodiversité des invertébrés marins : de l'isolement à la modélisation moléculaire de métabolites secondaires pour la découverte de nouveaux candidats médicaments.

TOME I

Directeur de thèse :	Bertrand ILLIEN	Professeur, Université de La Réunion
Co-directrice de thèse :	Anne BIALECKI	Professeur, Université de La Réunion

Composition du jury :

Rapporteurs :	Grégory GENTA-JOUVE	MCF-HDR, Université de Paris-Descartes
	Emerson F. QUEIROZ	Professeur associé, Université de Genève
Examinateurs :	Michel FREDERICH	Professeur, Université de Liège
	Jacqueline SMADJA	Professeur Emerite, Université de La Réunion

La chimie doit être le flambeau
qui éclaire la médecine.

Claude-Louis Berthollet, 1779

Avant-propos

Les travaux de recherche réalisés lors de ce doctorat ont donné lieu à deux publications [P] soumises, un chapitre d'ouvrage [Ch] et deux posters [Po] :

[P1] P.E. Campos, J.L. Wolfender, E. F. Queiroz, L. Marcourt, A. Al-Mourabit, M. Frédérich, A. Bordignon, N. De Voogd, B. Illien, A. Gauvin-Bialecki, "Unguiculin A and ptilomycalin E-H, novel antimalarial guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora unguiculata.*" *Journal of Natural Products,* 2017, en ligne.

[P2] P.E. Campos, J.L. Wolfender, E. F. Queiroz, L. Marcourt, A. Al-Mourabit, N. De Voogd, B. Illien, A. Gauvin-Bialecki, "Amphimedonoic acid and psammaplysene E, novel brominated alkaloids from *Amphimedon* sp." Soumise à *Tetrahedron letters*

[Ch] A. Gauvin-Bialecki, M. Aknin, Y. Kashman, E. Gros, A. Al-Mourabit, P.E. Campos, M.E. Remanevy, B. Illien, "Bioactive molecules of marine invertebrates from South-West Indian Ocean: status and perspectives." *Crystallizing Ideas – The Role of Chemistry,* Springer, **2016**, *Chapitre 2*, 23 - 45.

[Po1] P.E. Campos, A. Al Mourabit, A. S. Sanchez, B. Illien, A. Gauvin-Bialecki, "Marine natural products: Isolation and identification of unknown secondary metabolites from the marine sponge *Monanchora unguiculata*." **23èmes Journées Jeunes Chercheurs – SCT "Société de Chimie Thérapeutique"**, 15-17 février 2016, Lille – France.

[Po2] P.E. Campos, E.F. Queiroz, L. Marcourt, P.M. Allard, K. Mahadeo, A. Al-Mourabit, M. Frédérich, N. De Voogd, J.L. Wolfender, B. Illien, A. Gauvin-Bialecki, "Isolation and identification of new secondary metabolites from the marine sponge *Monanchora unguiculata*." **9*th* joint natural products conference – GA "The Society for Medicinal Plant and Natural Product Research"**, 24-27 juillet 2016, Copenhague – Danemark.

Note au lecteur

Ce mémoire se compose de deux Tomes.

Afin de compléter le Tome I, nous avons rassemblé dans le Tome II un tableau récapitulatif des organismes collectés ainsi que l'ensemble des spectres non représentés lors de la caractérisation structurale des composés. Cette disposition présente l'avantage de pouvoir consulter en même temps le texte et la figure correspondante.

Dans le Tome I, les mots marqués d'un astérisque ont leur définition dans un lexique page 230.

Remerciements

Cette thèse a été menée au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de La Réunion. Elle a été soutenue financièrement par :

- Le programme d'actions FEDER (Fonds Européens de Développement Régional) et la Région Réunion dans le cadre du projet BIOMOL TCN (*Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de MOLécules issues de la BIOdiversité terrestre, marine et microbienne de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien*).

- L'Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de la Réunion qui m'a accordé un contrat doctoral ainsi qu'une aide à la mobilité.

Je tiens à remercier, en premier lieu, les Directeurs successifs du LCSNSA, les Professeurs Bertrand Illien et Anne Bialecki. Le Professeur Bertrand Illien, mon Directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans un premier temps en tant qu'ingénieur d'étude, puis par la suite en tant que doctorant. Je le remercie pour sa disponibilité, mais surtout d'avoir eu la patience de m'initier et de me former à la modélisation moléculaire. Merci pour les conseils, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Le Professeur Anne Bialecki, actuelle Directrice du LCSNSA, ma co-directrice de thèse, pour le soutien, les conseils mais surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ma thèse. Je les remercie tous deux de m'avoir offert de bonnes conditions de travail, que ce soit au sein de ce laboratoire mais également par le financement de missions au sein d'autres laboratoires.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du jury :

- Le Maître de Conférences – HDR Grégory Genta-Jouve, de l'Université de Paris-Descartes, de me faire l'honneur d'évaluer mon travail et d'avoir accepté d'en être le rapporteur.

- Le Professeur Emerson F. Queiroz, de l'Ecole de Pharmacie de Genève-Lausanne, d'être rapporteur de mes travaux de thèse. C'est une chance d'avoir pu travailler au sein de votre laboratoire, merci de me faire l'honneur de juger mon travail.

- Le Professeur Michel Frédérich, de l'Université de Liège (Laboratoire de Pharmacognosie), d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse et d'avoir encadré la réalisation des tests d'activité anti-paludique.

- Le Professeur Emérite Jacqueline Smadja, de l'Université de la Réunion (LCSNSA), pour m'avoir ouvert les portes de « son » laboratoire et pour m'avoir toujours donné son avis critique. Merci d'avoir examiné mon travail et de participer à mon Jury de thèse.

J'adresse mes remerciements au Professeur Max Malacria, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), pour m'avoir reçu au sein de son Institut. Mes remerciements s'adressent particulièrement au Directeur de Recherche Ali Al-Mourabit pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour les conseils et l'aide apportés lors de mon séjour au sein de l'ICSN.

Je tiens également à remercier Céline Moriou, pour m'avoir aidé tout au long de mon séjour à l'ICSN. Merci pour ton accueil, ta disponibilité et ta bonne humeur. Je suis également reconnaissant envers les services techniques de l'ICSN : le service CLHP, le service RMN et le service de Spectrométrie de Masse. Je n'oublie pas les membres de l'équipe 43 de l'ICSN et tous ceux qui ont fait de ce séjour un moment agréable, particulièrement Mathilde, Charlotte, Tepoerau et Karim, aussi bien pour les moments partagés au sein du labo que ceux à l'extérieur.

J'adresse mes remerciements au Professeur Jean-Luc Wolfender, Directeur de l'Unité de Recherche en Phytochimie et Produits Naturels Bioactifs (URPPNB) de l'Ecole de Pharmacie de Genève – Lausanne, pour m'avoir reçu au sein de son laboratoire. Je remercie également le Docteur Emerson Ferreira-Queiroz d'avoir facilité mon arrivée et m'avoir encadré tout au long de ce séjour. Je les remercie tous les deux pour leur bonne humeur, leur aide mais surtout pour les connaissances qu'ils m'ont apportées au cours de cette expérience.

Je tiens également à remercier Frédéric Borlat, pour avoir facilité mon accueil lors de ce séjour et Laurence Marcourt, remarquable spectroscopiste, pour la réalisation des spectres RMN et pour son aide lors de leurs interprétations.

Je tiens à remercier tous les doctorants et post-doctorants que j'ai rencontré à l'EGPL. Grâce à vous cette thèse a été un enrichissement professionnel mais aussi personnel. Merci à Davide d'avoir partagé sa paillasse mais surtout pour les blagues journalières ; Olivier et Joëlle, pour m'avoir formé sur les appareils et cela toujours avec le sourire ; Aymeric et Vincent pour les sorties sports qui permettaient de faire un break ; Pierre-Marie, pour m'avoir grandement aidé dans mes travaux de thèse. Merci à Quentin, Antonio, Lorenzo, Théo, Vera, Noémie, Mark, Assane, Nayara, Patricia, Constant, Adlin et Shuaizhen et à tous ceux que j'aurais oublié !

Je remercie mes collègues du LCSNSA, les enseignants, le personnel et les doctorants que j'ai côtoyé pendant ces trois ans. Patricia Clerc, ingénieur du LCSNSA, pour sa disponibilité, son écoute et son aide tout au long de ces trois ans. Le MCF Arnaud Marvillier et le MCF HDR Alain Shum Cheong Sing, pour la dose de bonne humeur quotidienne le midi. Et enfin, merci à Manue, Kesh, Eric, Graz, Ju, et David pour l'entraide et tous les moments passés ensemble, qui ont fait de ces trois années un moment agréable.

Merci à tous ceux qui m'ont permis de m'aérer l'esprit tout au long de ces trois ans ; Damien, François, Emilie, Paul, Marion, Céline, Coralie, Farid, Pablo et bien d'autres. Je tiens en particulier à remercier Greg, véritable ami, ainsi que Frédéric, Delphine, Apolline, Charles et Victorine, de m'avoir supporté et surtout d'avoir rendu mon séjour à l'ICSN beaucoup plus simple.

Merci également à Elodie, Davy, Laurent et Martine pour leur soutien et leur présence.

Et il y a des personnes à qui je dois tout, merci du fond du cœur à mes parents, pour m'avoir éduqué, aidé dans tout ce que j'entreprends et surtout toujours croire en moi.

Sommaire

Avant-propos **1**

Note au lecteur **1**

Remerciements **2**

Sommaire **5**

Liste des abréviations **9**

Introduction générale **11**

Chapitre I – Sélection des organismes marins **19**

I.1 Collecte et identification 21

I.2 Obtention des extraits bruts 22

I.3 Le criblage chimique 22

I.3.1 Principe 22

I.3.1 Résultats et Discussion 23

I.4 Le criblage biologique 27

I.4.1 Recherche d'activité cytotoxique 27

I.4.2 Recherche d'activité antipaludique 29

I.4.3 Recherche d'activités antivirales 32

I.4.4 Recherche d'activité antioxydante 34

I.5 Données bibliographiques 36

I.6 Organismes sélectionnés 38

Chapitre II – Etude de l'éponge *Monanchora unguiculata* (Dendy, 1922) **41**

II.1 Eléments bibliographiques sur *Monanchora unguiculata* (Dendy, 1922) 43

II.1.1 Localisation du genre *Monanchora* (Carter, 1883) 43

II.1.2 Position systématique et description du genre *Monanchora* (Carter, 1883) 43

II.1.3 Cas particulier de l'espèce *Monanchora unguiculata* (Dendy, 1922) : localisation et description morphologique 44

II.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Monanchora* (Carter, 1883) 45

II.1.4.1 Les stérols 45

II.1.4.2 Les sesterterpénoïdes 46

II.1.4.3 Les alcaloïdes 47

II.2 Etude chimique de l'éponge *Monanchora unguiculata* de Madagascar..... 53
II.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires..... 53
II.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires isolés..... 57
II.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite MU1..... 57
II.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite MU2..... 58
II.2.2.3 Elucidation structurale du métabolite MU3..... 60
II.2.2.4 Elucidation structurale du métabolite MU4..... 62
II.2.2.5 Elucidation structurale du métabolite MU5..... 63
II.2.2.6 Elucidation structurale du métabolite MU6..... 66
II.2.2.7 Elucidation structurale du métabolite MU7..... 69
II.2.2.8 Elucidation structurale des métabolites MU8 et MU9..... 72
II.2.3 Réseau moléculaire..... 76
II.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés..... 84
II.3.1 Activité antipaludique..... 84
II.3.2 Cytotoxicité sur cellules KB..... 85
II.4 Discussion..... 85
Chapitre III – Etude de l'éponge *Amphimedon* sp. (Duchassaing & Michelotti, 1864)..... 91
III.1 Eléments bibliographiques sur *Amphimedon sp.*..... 93
III.1.1 Localisation du genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)..... 93
III.1.2 Position systématique et description du genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)..... 93
III.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)..... 95
II.1.3.1 Les sesterterpénoïdes..... 95
II.1.3.2 Les macrolides..... 96
II.1.3.2 Les alcaloïdes..... 96
III.2 Etude chimique de l'éponge *Amphimedon* sp. de Madagascar..... 106
III.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires..... 106
III.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires isolés..... 107
III.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AS1..... 107
III.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite AS2..... 110
2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AS3..... 112
III.3 Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB des métabolites isolés..... 115
II.4 Discussion..... 115

Chapitre IV – Etude de l'éponge *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922) 119

IV.1 Eléments bibliographiques sur *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922) 121

IV.1.1 Localisation du genre *Aulospongus* (Norman, 1878) 121

IV.1.2 Position systématique et description du genre *Aulospongus* (Norman, 1878) 121

IV.1.3 Cas particulier de l'espèce *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922) : localisation et description morphologique 122

IV.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Aulospongus* (Norman, 1878) 124

IV.2 Etude chimique de l'éponge *Aulospongus gardineri* de Madagascar.....124

IV.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires 124

IV.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires 126

IV.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AG1 126

IV.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite AG2 128

IV.2.2.3 Elucidation structurale du métabolite AG3 128

IV.2.3 Réseau moléculaire 131

IV.3 Discussion 135

Chapitre V – Etude de molécules issues de la biodiversité marine par modélisation moléculaire 137

V.1 La modélisation moléculaire, un outil de caractérisation structurale 139

V.1.1 Intérêt du dichroïsme circulaire 139

V.1.2 Contexte de l'étude 141

V.2 Détermination de la configuration relative par la méthode DP4+ 143

V.2.1 Principe de la probabilité DP4+ 143

V.2.2 Méthodologie et détails des calculs DP4+ 146

V.2.3 Résultats 148

V.2.3.1 Résultats de la probabilité DP4+ pour les structures à noyaux pyrimidiniques 149

V.2.3.2 Résultats de la probabilité DP4+ pour les structures insaturées 8a-8b 151

V.3 Détermination de la configuration absolue par la chimie théorique 155

V.3.1 Méthodologie et détails des calculs 155

V.3.2 Recherches des différents conformères 157

V.3.3 Résultats 159

V3.3.1 Configuration absolue de la nétamine R 159

V.3.3.2 Configuration absolue de la nétamine P 164

V.3.3.3 Configuration absolue de la nétamine G 171

V.4 Discussion.....175

Conclusion générale et Perspectives **179**

Partie expérimentale **187**

I. Procédures générales 189

I.1 Les solvants et les réactifs 189

I.1.1 Les solvants 189

I.1.2 Les réactifs 189

I.2 Les techniques chromatographiques 189

I.2.1 Chromatographie sur couche Mince (CCM) 189

I.2.2 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP) 190

I.2.3 Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) 190

I.3 Analyses physiques et spectrales des métabolites 191

I.3.1 Le pouvoir rotatoire 191

I.3.2 La spectroscopie de masse haute résolution (SMHR) 191

I.3.3 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 191

II. Etude chimique des éponges 192

II.1 Collecte 192

II.2 Extraction 192

II.2.1 Extraction par macération à froid 192

II.2.2 Bilan des extractions des invertébrés marins étudiées 192

II.3 Réalisation des signatures chimiques 192

II.4 Fractionnement, isolement et purification des métabolites secondaires 193

II.4.1 Métabolites isolés de *Monanchora unguiculata* 193

II.4.2 Métabolites isolés d'*Amphimedon* sp. 197

II.4.3 Métabolites isolés d'*Aulospongus gardineri* 198

III. Caractéristiques physiques et spectrales des métabolites isolés 199

III.1 Métabolites isolés de *Monanchora unguiculata* 199

III.2 Métabolites isolés d'*Amphimedon* sp. 205

III.3 Métabolites isolés d'*Aulospongus gardineri* 207

Références bibliographiques **209**

Liste des figures et tableaux **223**

Lexique **230**

Liste des abréviations

Abréviations spécifiques aux activités biologiques

A498 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du rein)
A549 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome pulmonaire)
ACT : Thérapie Combinée à base d'Artémisinine
ABTS$^{\bullet}$: sel d'ammonium de l'acide 2,2'- azinobis-3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique
CC_{50} : Concentration Cytotoxique médiane
CE_{50} : Concentration Efficace médiane
CI_{50} : Concentration Inhibitrice médiane
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
$cPLA_2$: PhosphoLipase A_2 cytolysique
DU-145 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer de la prostate)
EOA : Espèce Oxygénée Activée
FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
HT29 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du colon)
Hela : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du col de l'utérus)
IC-2 : mastocytes murins
IGROV : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer des ovaires)
IS : Index de Sélectivité
KB : lignée cellulaire cancéreuse humaine (carcinome buccal)
L-562 : lignée leucémique humaine
L1210 : lignée leucémique murine
LoVo : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du colon)
LoVo-Dox : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du colon)
MIA-paca : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du pancréas)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P388 : lignée leucémique murine
PANC-1 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du pancréas)
PANCL : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du pancréas)
SK-BR3 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (cancer du sein)
SK-MEL-28 : lignée cellulaire cancéreuse humaine (mélanome)
$sPLA_2$: PhosphoLipase A_2 sécrétoire
TRPV1 : récepteur-canal ionique des vanilloïdes sensible à la chaleur nociceptive
VIH-1 : Virus de type 1 de l'Immunodéficience Humaine

Abréviations spécifiques à la chimie

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire spécifique
δC : déplacement chimique du carbone
δH : déplacement chimique du proton
ΔAbs : différence d'absorbance
Δε : coefficient d'extinction molaire
λ_{max} : longueur d'onde d'un maximum d'absorption
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
AF : acide formique
br : signal large
C-18 : silice greffée par des groupements octadécyles
c : concentration
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CD_3OD : méthanol deutéré
$CDCl_3$: chloroforme deutéré
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CLMP : Chromatographie Liquide Moyenne Pression
COSY : COrrelation SpectroscopY
d : doublet
DAD : détecteur à barrettes de diodes
DCE : Dichroïsme Circulaire Electronique
DCM : dichlorométhane
DCV : Dichroïsme Circulaire Vibrationnel
dd : doublet de doublet
ddd : doublet de doublet de doublet
ddt : doublet de doublet de triplet
DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DNP : Dictionary of Natural Products
dt : doublet de triplet
EC : Effet Cotton
ESI^+ : Ionisation ElectroSpray mode positif
ESI^- : Ionisation ElectroSpray mode négatif
GIAO : Gauge-Independent Atomic Orbital
GNPS : Global Natural Products Social Molecular Networking
HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
ISDB : *In Silico* DataBase
J : constante de couplage
LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m : multiplet
m/z **:** masse/charge
MeOH : méthanol
NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ppm : partie par million
q : quadruplet
quint : quintuplet
RMN (1D, 2D) : Résonance Magnétique Nucléaire (une dimension, deux dimensions)
RP-18 : reverse phase C18
s : singulet
SM : Spectrométrie de Masse
SMD : Solvent Model Density
SMHR : Spectrométrie de Masse Haute Résolution
TD-DFT : Time Dependent - Density Functional Theory (théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps)
TFA : Acide TriFluoroAcétique
TMS : TétraMéthylSiloxane
TOCSY : TOtal Correlated SpectroscopY
UV : UltraViolet
v/v : volume/volume

Introduction générale

Depuis toujours l'Homme essaie de tirer parti des substances naturelles de diverses manières, soit par le biais de la médecine traditionnelle, soit par d'autres voies. Les Hommes de Néandertal semblaient déjà utiliser les plantes pour leurs vertus thérapeutiques, il y a environ 60 000 ans ; Solecki R. S. (1975) est arrivé à cette conclusion après avoir retrouvé du pollen de huit plantes médicinales (dont l'achillée millefeuille, toujours utilisée de nos jours) dans un lieu de sépulture en Irak. Ces substances naturelles ont été mentionnées pour diverses autres utilisations, par exemple pour la chasse, avec l'utilisation du curare (West R., 1935) (extrait de lianes d'Amazonie comme *Chondodendron tomentosum* ou *Strychnos toxifera*) ou de la batrachotoxine (toxine sécrétée par une espèce d'amphibiens, *Phyllobates terribilis*) par des tribus amérindiennes (Daly J. W. *et al.*, 1978) ; mais également pour la cosmétique, avec l'utilisation par les italiennes de la Renaissance d'une pommade à base de belladone (*Atropa belladonna*) afin de dilater leurs pupilles dans un but esthétique (Gibson D. M., 1964).

L'utilisation de substances naturelles par l'Homme s'est surtout limitée à la biodiversité terrestre, en raison de son accessibilité, et cela même si la biodiversité marine est beaucoup plus riche. Si environ 200 000 espèces marines ont été à ce jour recensées, on estime cependant à plusieurs millions leur nombre total (www.developpement-durable.gouv.fr). Cette grande profusion de la vie marine par rapport à la vie terrestre vient du fait qu'elle remonte à 3,8 milliards d'années contre « seulement » 400 millions d'années pour les espèces terrestres. L'évolution de la vie marine est donc beaucoup plus avancée. A cela, rajoutons la présence de relations biologiques complexes et variées au sein du milieu marin comme la prédation, la symbiose, le parasitisme et la compétition interspécifique et intra-spécifique. Il en résulte une chimiodiversité très riche et différente de la chimiodiversité terrestre car elle est caractérisée par des paramètres physico-chimiques particuliers, comme de fortes pressions, l'absence totale de lumière, des salinités variables ou la relative abondance d'halogènes.

La zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (Madagascar, Les Comores, Maurice, Rodrigues, Les Seychelles, La Réunion, Mayotte et Les Iles Eparses), est l'un des Hotspots de la biodiversité terrestre et marine mondiale (www.developpement-durable.gouv.fr). En raison de son endémisme particulièrement élevé, cette zone est sans équivalent à l'échelle mondiale et, est donc d'une importance capitale pour les connaissances biologiques et chimiques. Cette richesse est cependant menacée en raison de la vulnérabilité de ces écosystèmes insulaires face aux impacts de l'Homme (Gray J. S., 2001 ; Robert C. M. *et al.*, 2002). Quelques organismes de recherche essaient de préserver la biodiversité de ce Hotspot et parmi ceux-ci, des laboratoires de recherche de l'Université de La Réunion ont fait de « la valorisation et la protection de la biodiversité terrestre et marine » l'un de leurs axes de recherches principaux (www.univ-reunion.fr). La position stratégique de l'Université de La Réunion au cœur de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien

est un atout indéniable ; elle offre des conditions de recherches exceptionnelles pour l'observation et l'étude de la biodiversité. Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA), par ses études sur la chimiodiversité menées aussi bien sur les plantes que les organismes marins, contribue activement au développement de cette thématique de recherche privilégiée.

C'est dans ce cadre que le LCSNSA a porté le projet BIOMOL TCN *« Activités Thérapeutiques, Cosmétologiques et Nutraceutiques de Molécules issues de la Biodiversité terrestre, marine et microbienne de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien ».* Ce projet, soutenu par l'Europe et La Région Réunion (FEDER : Fonds Européens de DEveloppement Régional), entre 2012 et 2014, a réuni six équipes complémentaires dont trois locales, une nationale et deux internationales. Les tâches ont été réparties selon les compétences de chaque équipe :

- Le **Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA)** de l'Université de La Réunion, porteur du projet.
- L'**UMR C_53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (UMR PVBMT)** de l'Université de La Réunion.
- Le **Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO)** de l'Université de La Réunion.
- L'**Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)** de Gif-sur-Yvette.
- Le **Laboratoire de Pharmacognosie - Institut de Pharmacie (LP-IP)** de l'Université de Liège.
- Le **Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie (KU-LEUVEN)** de l'Institut Rega pour la Recherche Médicale de l'Université Catholique de Leuven.

Le projet BIOMOL TCN avait pour objectif d'explorer cette biodiversité et cette chimiodiversité afin de trouver de :

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

Ce projet avait également pour objectif d'approfondir l'état de l'art actuel sur cette biodiversité et chimiodiversité afin de pouvoir ainsi la valoriser et la protéger. Le projet s'est donc attaché dans un premier temps à l'évaluation des propriétés biologiques, d'extraits de plantes et d'invertébrés marins de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien. Les travaux de recherche effectués

au cours de cette thèse et présentés dans ce manuscrit concernent uniquement la partie biodiversité marine de ce projet.

Les organismes marins étudiés sont des invertébrés (éponges*, ascidies* et coraux mous*) issus d'une collecte effectuée en 2012, aux Iles Mitsio, à Madagascar. Une première sélection de ces invertébrés marins a été réalisée au laboratoire. Chaque organisme a, en effet, été soumis à des protocoles standardisés d'extraction, puis à un criblage biologique afin d'évaluer différentes activités biologiques ciblées :

- La cytotoxicité sur les cellules cancéreuses KB (carcinome buccal),
- L'activité antipaludique,
- L'activité antivirale sur :
    - Le virus du Chikungunya (souche 899),
    - L'entérovirus type 71 (souche BrCr),
    - Le rhinovirus type 14 (phénotype sauvage),
- L'activité antioxydante.

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

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

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

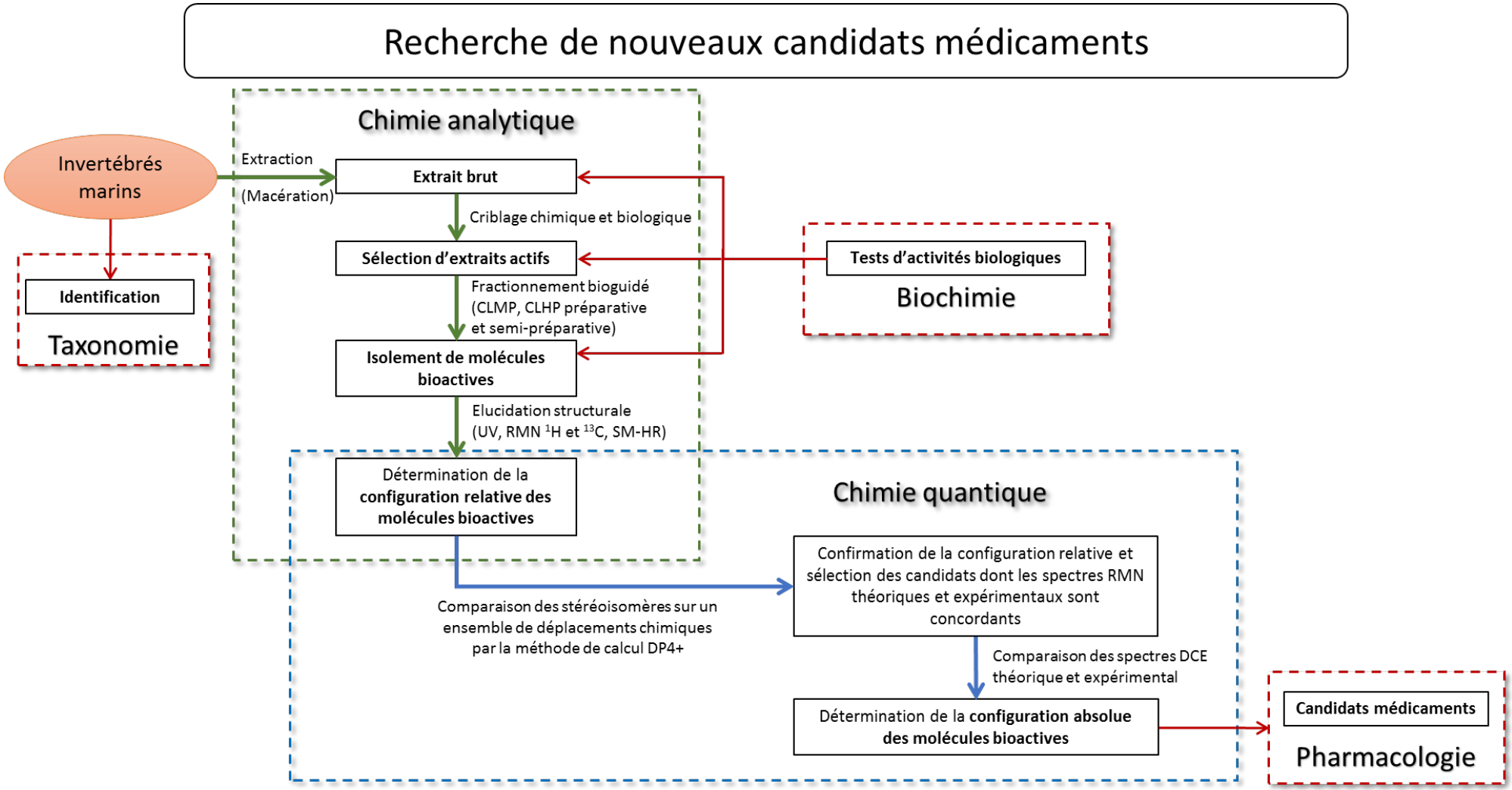
Les **travaux de thèse** exposés dans ce mémoire et réalisés au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA), à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS) et au Laboratoire de Phytochimie et Pharmacologie de l'Ecole de Pharmacie de Genève – Lausanne, s'inscrivent pleinement dans le programme BIOMOL TCN ; l'objectif étant la recherche de molécules d'origine marine, à haute valeur ajoutée dans le domaine de la santé (molécules à activité anticancéreuse, antivirale, antipaludique, antioxydante).

Cette recherche de molécules d'intérêt issues de la biodiversité marine implique deux grands axes (**Organigramme 1**) : la chimie analytique et la chimie quantique. La chimie quantique

venant en soutien de la chimie analytique dans la caractérisation structurale des molécules. Il est à noter, qu'en raison du temps imparti pour la réalisation de ces travaux de thèse et afin de pouvoir travailler chimie analytique et chimie quantique en parallèle, la partie sur la chimie quantique a été réalisée sur des molécules d'origine marine déjà isolées au sein du LCSNSA.

Ce mémoire s'articule autour de cinq chapitres :

- Le premier chapitre met l'accent sur le choix stratégique des organismes marins étudiés au cours de la thèse. Il concerne :
    - la collecte des organismes ;
    - le protocole d'extraction utilisé ;
    - la méthodologie, basée sur des critères chimiques, biologiques et bibliographiques ayant permis la sélection des organismes.
- Les deuxième, troisième et quatrième chapitres sont consacrés aux travaux menés respectivement sur les éponges *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp. et *Aulospongus gardineri*. Sont développés dans chacun de ces chapitres :
    - des éléments bibliographiques relatifs au genre étudié : position géographique, position systématique et description, travaux chimiques antérieurs ;
    - les travaux chimiques menés sur chacune des éponges, détaillant l'isolement et l'élucidation structurale des métabolites secondaires isolés ;
    - la génération d'un réseau moléculaire, outil facilitant la déréplication mais permettant également la génération d'hypothèses sur d'autres métabolites secondaires n'ayant pas étés isolés ;
    - la valorisation des molécules isolées et identifiées.
- Le dernier chapitre est consacré à la caractérisation par la chimie théorique, de molécules issues de la biodiversité marine, isolées dans le cadre du programme FEDER BIOMOL TCN. La modélisation moléculaire offrant des techniques complémentaires à la chimie analytique, sont abordées dans cette thèse :
    - une introduction détaillant le contexte de l'étude et l'intérêt de la chimie théorique en complément de la chimie analytique ;
    - une analyse de la configuration relative des molécules, déterminée par RMN, *via* un calcul de probabilité : DP4+ ;
    - la détermination des configurations absolues de trois molécules dont la configuration relative a été étayée par la chimie théorique.



Organigramme 1 : *Présentation des différentes étapes réalisées dans la thèse.*

Chapitre I

Sélection des organismes marins

Récif coralien – Mayotte, France
Crédit LCSNSA

I.1 Collecte et identification

60 échantillons ont été collectés au large des îles Mitsio, au Nord-Ouest de Madagascar (**Figure 1**), en 2012 dans le cadre du projet BIOMOL TCN. Trois types d'organismes ont été collectés, des éponges, des ascidies et des coraux mous. Ces organismes ont fait l'objet de ces travaux de thèse.

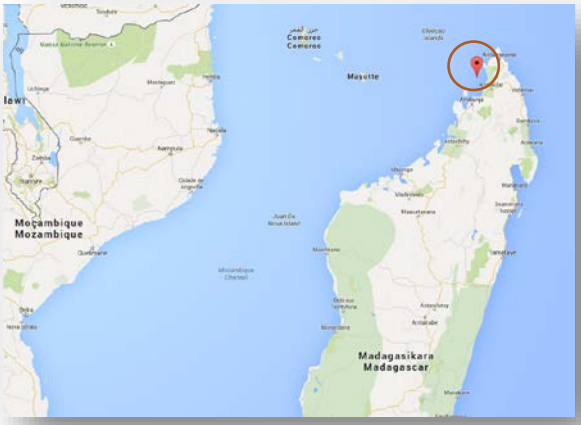


Figure 1 : *Zone de collecte des organismes étudiés (Crédit Google Map).*

Ces organismes listés dans l'Annexe 1 ont été identifiés par :

- Le Docteur **Nicole de Voogd** du Museum d'Histoire Naturelle *Naturalis* de Leiden (Pays-Bas) pour ce qui est des éponges.
- Le Professeur **Yehuda Benayahu** de l'Université de Tel Aviv (Israël) pour ce qui est des coraux mous.
- Les Professeurs **Anne Bialecki** et **Maurice Aknin** de l'Université de La Réunion (France) pour ce qui est des ascidies.

Au final, sur les 60 échantillons collectés, 26 espèces d'éponges, 11 espèces de coraux mous et 2 espèces d'ascidies ont été identifiés (une espèce peut être représentée par plusieurs échantillons). 2 échantillons d'ascidies, 3 échantillons de coraux mous et 5 échantillons d'éponges restent encore à identifier.

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

I.2 Obtention des extraits bruts

Afin d'obtenir les extraits bruts, les organismes congelés ont été découpés, puis extraits par macération dans un mélange dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v). Cette macération permet d'obtenir après filtration, un filtrat qui est récupéré puis évaporé afin d'obtenir l'extrait brut. Le rendement d'extraction a été calculé par rapport à la matière sèche extraite.

I.3 Le criblage chimique

I.3.1 Principe

➢ **Criblage chimique par CCM**

Les extraits bruts ont été, dans un premier temps, analysés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) en utilisant :

- Deux systèmes d'éluants, en fonction de la polarité des composés :
  - Isohexane/AcOEt 80/20
  - Isohexane/AcOEt 20/80
- Deux révélateurs différents :
  - L'anisaldéhyde sulfurique, qui est un révélateur universel
  - Dragendorff, révélateur spécifique aux alcaloïdes

➢ **Criblage chimique par CLHP-DAD-SM**

Dans un second temps, les extraits bruts ont été analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à deux types de détecteurs :

- Un détecteur à barrettes de photodiodes (DAD) qui permet de mesurer l'absorbance des composés sur l'ensemble du spectre UV-visible (entre 200 et 800 nm) simultanément. La spectrophotométrie à barrettes de diodes permet une saisie en trois dimensions des résultats (absorbance, longueur d'onde, temps). On peut donc comparer les spectres UV des solutés avec ceux stockés dans une base de données (MarinLit par exemple).

- Un spectromètre de masse (SM) à ionisation par electrospray chargé positivement (ESI^+), qui est une méthode « d'ionisation douce » par protonation, permettant ainsi, en général, d'obtenir un rapport masse sur charge (*m/z*) de type $[m+m_H]^+$. En soustrayant la masse d'un hydrogène, cela permet d'obtenir la masse monoisotopique des solutés et ainsi de faire une recherche dans les bases de données par masse.

- **Criblage chimique par RMN ^{1}H**

Un dernier criblage chimique est effectué par spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire de l'atome d'hydrogène (RMN ^{1}H). Les spectres des extraits bruts ont été réalisés dans du chloroforme deutéré ($CDCl_3$), ils sont ensuite comparés afin de repérer ceux possédant des signaux caractéristiques intéressants (liaison –NH par exemple).

I.3.1 Résultats et Discussion

Suite au criblage chimique réalisé, les 16 organismes suivants présentent au moins un profil chimique (CCM, CLHP ou RMN) intéressant : *Acanthella cavernosa* (CCM et CLHP), *Amphimedon* sp. (CLHP), *Aulospongus gardineri* (CLHP), *Biemna laboutei* (CLHP et RMN), *Callyspongia biru* (RMN), *Dragmacidon coccineum* ou *Ulosa rubra* (CCM), *Eudistoma* sp. (CCM et RMN), *Hemiasterella intermedia* (CLHP et RMN), *Jaspis diastra* (CCM, CLHP et RMN), *Lemnalia africana* (CCM), *Lemnalia madagascariensis* (CCM et RMN), *Monanchora unguiculata* (CCM, CLHP et RMN), *Pseudoceratina* sp. (CLHP et RMN), *Phyllospongia* sp. ou *Ledenfeldia* sp. (RMN), *Rhytisma fulvum fulvum* (CCM, CLHP et RMN) et *Stylissa carteri* (CLHP).

Parmi ces organismes, un premier tri a été effectué. En effet, deux de ces organismes ne sont pas clairement identifiés, il s'agit de l'éponge « *Dragmacidon coccineum* ou *Ulosa rubra* (TCN-M149) » et de l'éponge « *Phyllospongia* sp. ou *Ledenfeldia* sp. (TCN-M131) » ; Celles-ci ne seront donc pas étudiées. L'éponge *Biemna laboutei,* ayant déjà fait l'objet d'une thèse (Gros E., 2013) au sein du LCSNSA sur un spécimen également collecté à Madagascar, ne sera pas étudiée non plus.

Les 14 organismes restant n'ont pas pu être tous étudiés au laboratoire et par conséquent, certains ont été envoyés à l'un des partenaires du LCSNSA, le professeur Yoel Kashman, de l'Université de Tel Aviv (Israël). Il s'agit des éponges *Hemiasterella intermedia* (TCN-M147), *Jaspis diastra* (TCN-M137 et TCN-M169) et du corail mou *Rhytisma fulvum fulvum* (TCN-M163). Finalement, parmi les 16 organismes ressortant du criblage chimique, 10 ont été sélectionnés (**Figure 2**).

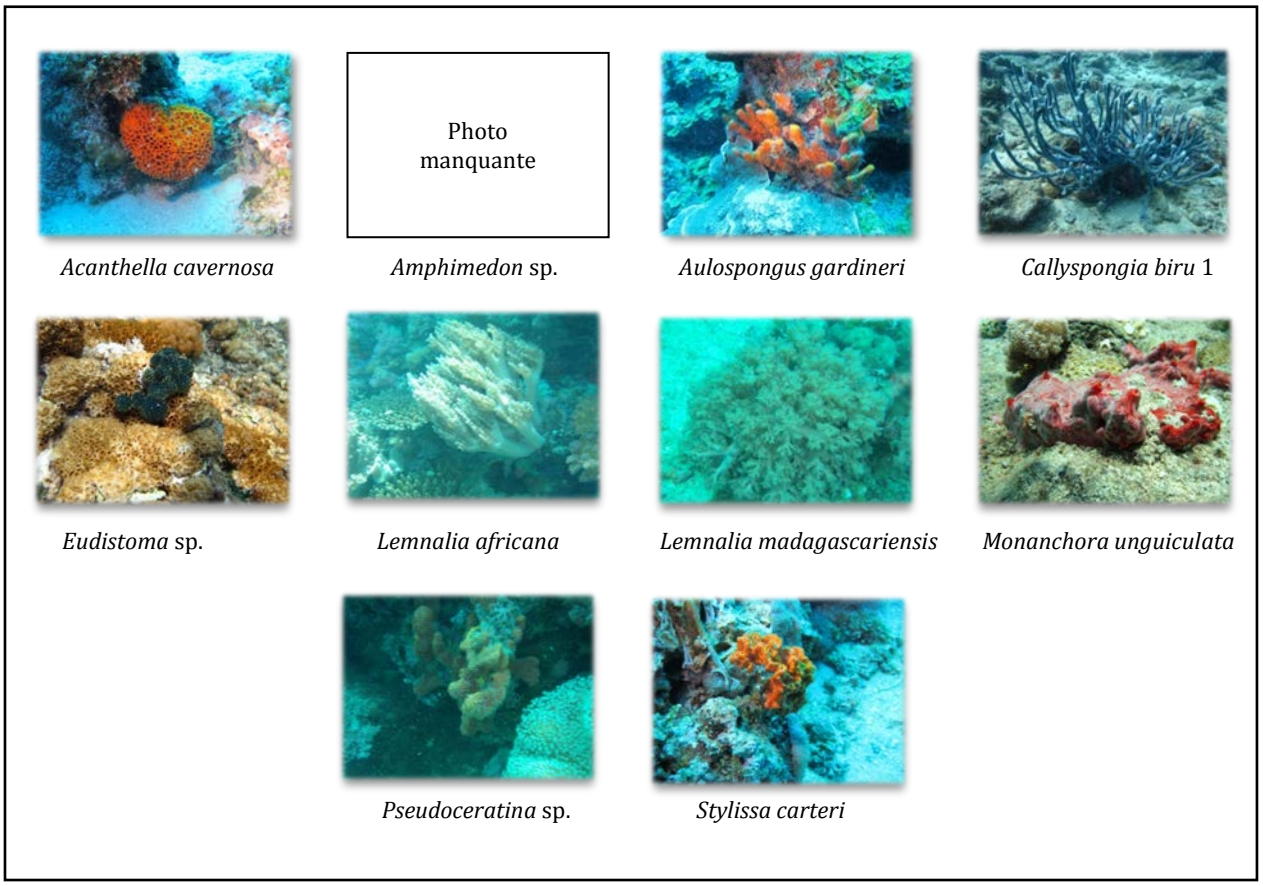
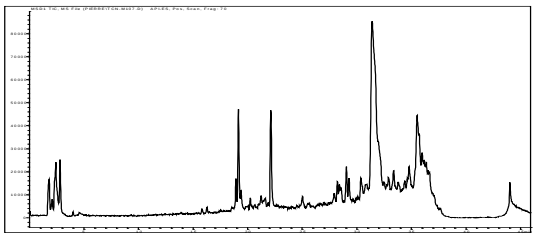
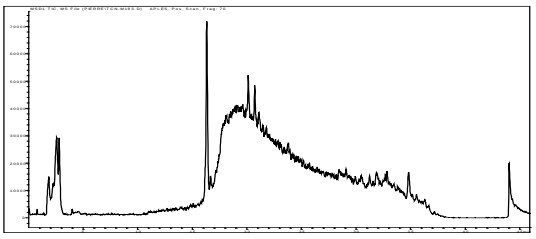


Figure 2 : *Organismes sélectionnés pour leur composition chimique.*

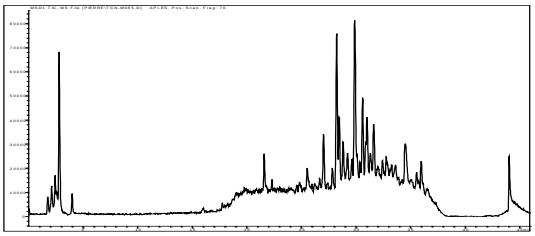
Les chromatogrammes obtenus par CLHP-DAD-SM (**Figure 3**) ont montré que les extraits bruts de *Acanthella cavernosa*, *Amphimedon* sp., *Callyspongia biru*, *Eudistoma* sp. et *Pseudoceratina* sp. étaient relativement « simples », c'est-à-dire constitués de quelques composés majoritaires. Les profils obtenus pour *Aulospongus gardineri, Lemnalia africana, Lemnalia madagascariensis, Monanchora unguiculata* et *Stylissa carteri* dénotent des compositions en molécules diverses plus importantes. On peut également noter que les éponges *Amphimedon* sp., *Pseudoceratina* sp., *Stylissa carteri* et l'ascidie *Eudistoma* sp. présentent notamment des composés bromés (intéressants car souvent associés à une activité cytotoxique), repérés sur le spectre SM par des massifs isotopiques caractéristiques, dus à l'abondance des isotopes du brome ^{79}Br (50,69%) et ^{81}Br (49,31%) ; l'éponge *Monanchora unguiculata*, comprend beaucoup de composés de masses impaires, souvent synonymes de composés azotés ; et l'éponge *Aulospongus gardineri*, est principalement constituée d'une famille de composés possédant un spectre UV singulier, présentant tous, les quatre mêmes maximums d'absorptions à λ_{max} 222, 261, 275 et 291 nm.



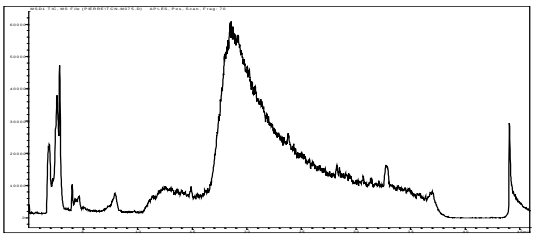
Acanthella cavernosa (TCN-M107)



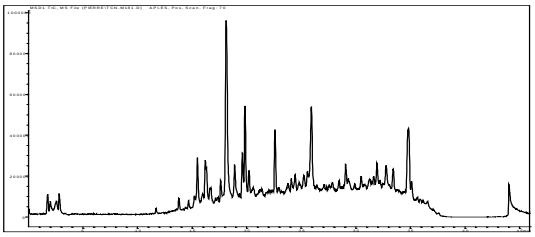
***Amphimedon* sp.** (TCN-M183)



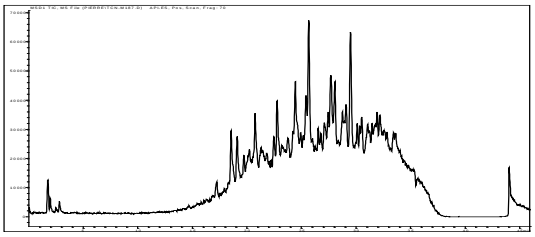
Aulospongus gardineri (TCN-M085)



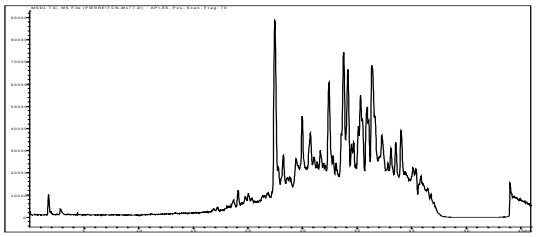
***Callyspongia biru* 1** (TCN-M075)



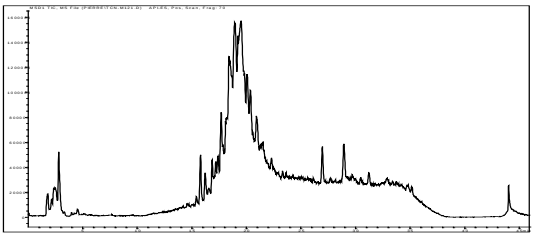
***Eudistoma* sp.** (TCN-M181)



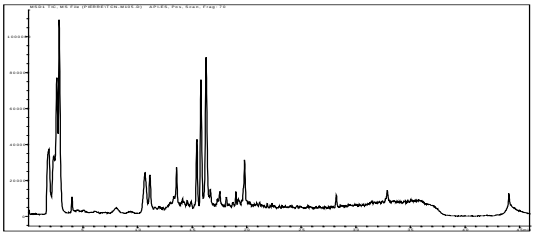
Lemnalia africana (TCN-M187)



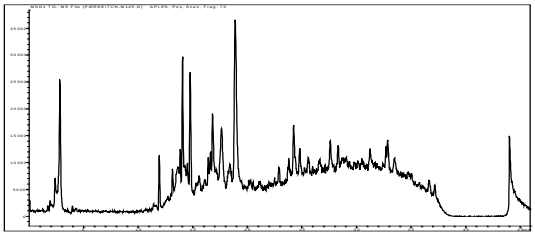
Lemnalia madagascariensis (TCN-M177)



Monanchora unguiculata (TCN-M121)



***Pseudoceratina* sp.** (TCN-M105)



Stylissa carteri (TCN-M145)

Figure 3 : *Profils CLHP-SM des 10 organismes sélectionnés.*

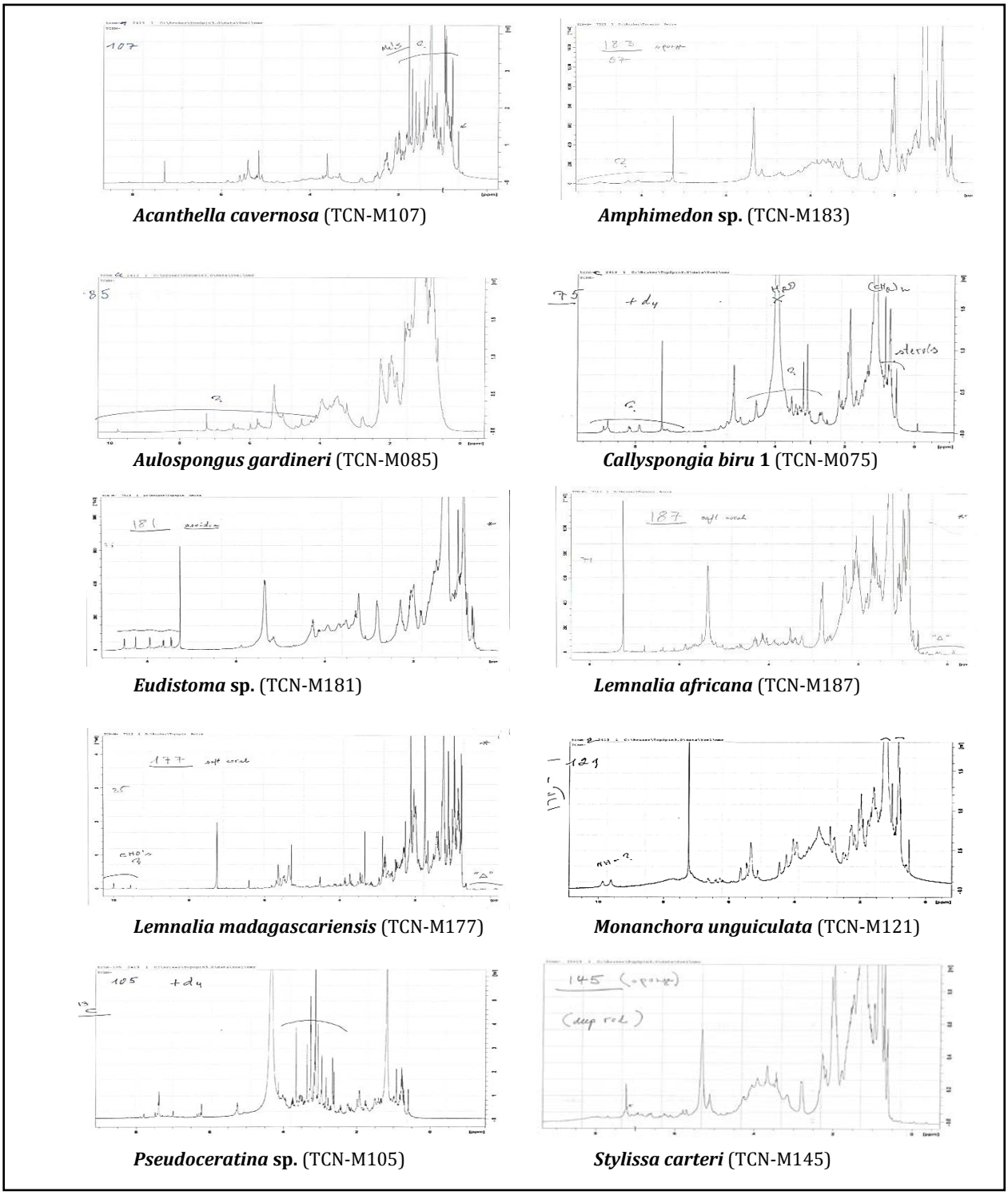


Figure 4 : *Profils RMN ¹H des 10 organismes sélectionnés.*

I.4 Le criblage biologique

Une des premières étapes clés dans la recherche de nouveaux candidats médicaments d'origine naturelle, est de sélectionner des organismes présentant un potentiel biologique intéressant. Cela passe par la réalisation d'un criblage biologique sur les extraits bruts de ces organismes. Le choix des tests, appliqués aux extraits bruts, s'est fait en fonction des objectifs du projet BIOMOL TCN et, c'est dans cette optique que les extraits bruts des soixante invertébrés marins collectés et extraits ont été testés pour leurs activités cytotoxique, antipaludique, antivirale (virus du chikungunya, enterovirus type 71 et rhinovirus type 14) et antioxydante.

I.4.1 Recherche d'activité cytotoxique

- ***Les tests de cytotoxicité sur cellules KB ont été réalisés sous la direction du Docteur Thierry Cresteil puis sous la direction de l'Ingénieur de Recherche Jérôme Bignon à l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette), France.***

- **La cytotoxicité sur les cellules cancéreuses KB (carcinome buccal)**

Le cancer est une des problématiques majeures de notre époque. En effet, en 2015, avec 385 000 nouveaux cas estimés et 149 500 décès estimés, liés à cette maladie, le cancer représente la première cause de mortalité en France. C'est environ un Français sur quatre qui sera, au cours de sa vie, touché par le cancer et tous seront affectés indirectement par la maladie d'un conjoint, d'un parent ou d'un ami (www.roche.fr, www.e-cancer.fr). De ce fait, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses est un enjeu crucial.

Sur le plan biologique, le cancer est une maladie qui résulte d'une prolifération anormale de cellules au sein d'un tissu de l'organisme. Cette prolifération est due à une grave perturbation des voies de signalisation de la mort cellulaire programmée qui contrôle le développement des tissus et a pour conséquence, lors de la division cellulaire, une supplantation ou une destruction des cellules saines par les cellules cancéreuses. Ces cellules malsaines peuvent, soit former une métastase et circuler dans le corps, soit former une tumeur maligne aussi appelée néoplasme. Le cancer est une pathologie pouvant avoir plusieurs origines :

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

C'est au vu de cette problématique que sont réalisés les tests de cytotoxicité. Ils sont, en effet, réalisés sur différentes souches cancéreuses, afin de rétablir la mort de ces cellules. Ces tests restent un moyen de découverte de nouvelles molécules intéressantes, potentiellement anticancéreuses et sélectives, même si les résultats de certains tests requièrent des études complémentaires.

- **Les résultats**

Les tests de cytotoxicité sur cellules KB (carcinome buccal) ont permis de mettre en évidence 15 organismes inhibant cette lignée cancéreuse humaine dont 12 éponges, 2 ascidies et un corail mou (**Figures 5** et **6**). Les résultats donnés dans la **Figure 5** s'expriment en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire calculé pour une concentration en extrait brut de 10 µg/mL. Ne sont présents sur celle-ci que les éponges ayant présenté une cytotoxicité sur cellules KB supérieure à 70% d'inhibition.

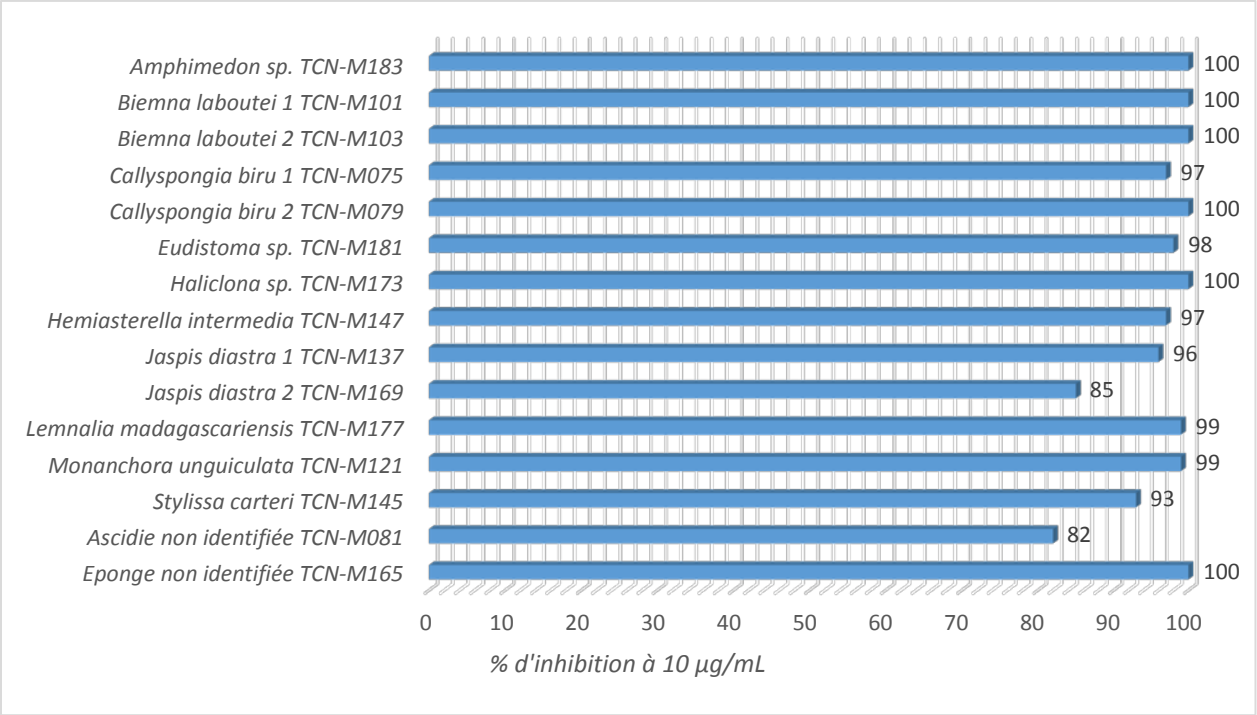


Figure 5 : *Cytotoxicité des 15 organismes les plus actifs : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB.*

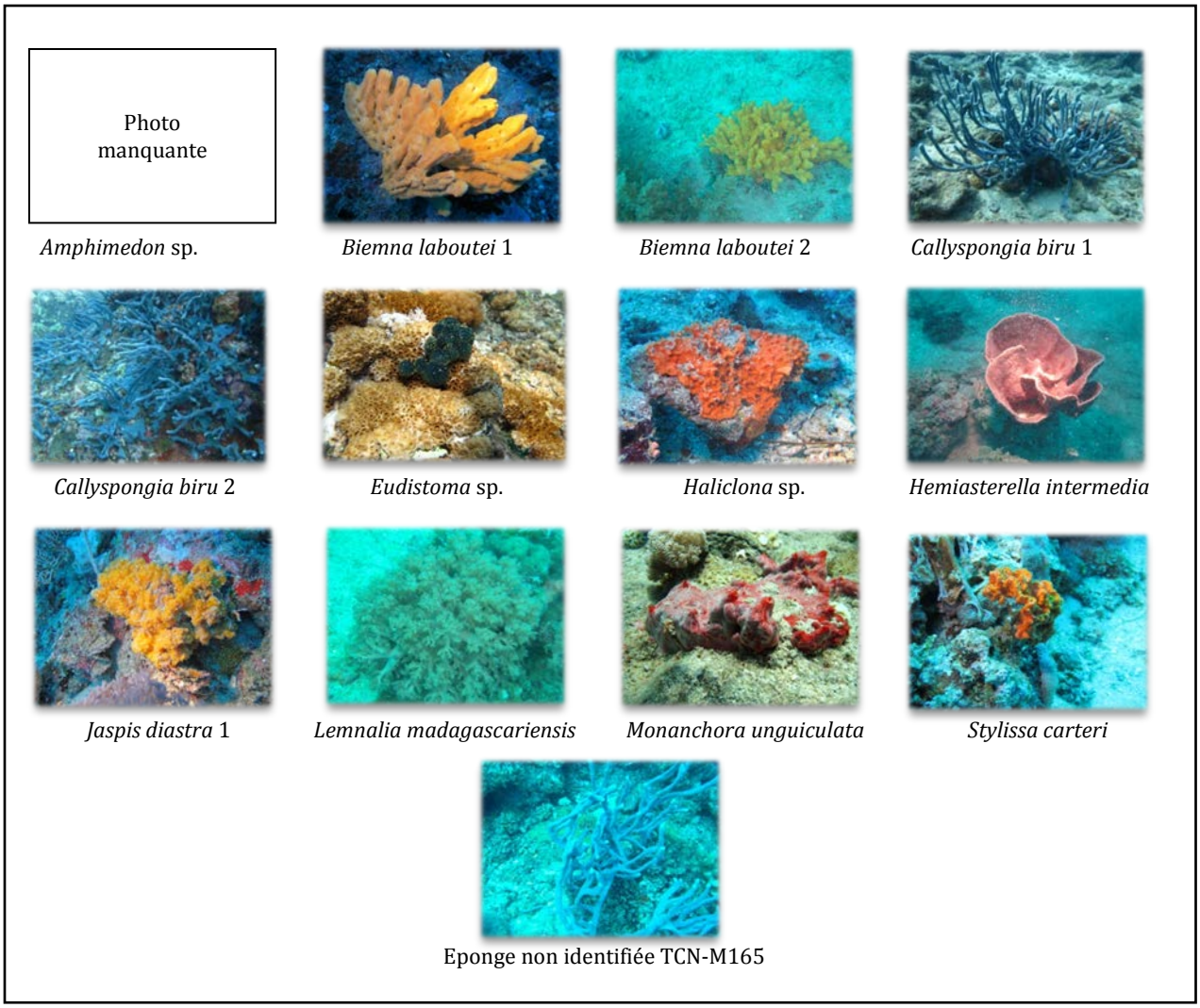


Figure 6 : *Principaux organismes sélectionnés pour leur cytotoxicité sur la lignée cancéreuse KB.*

I.4.2 Recherche d'activité antipaludique

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

- **L'activité antipaludique**

Selon les dernières estimations de l'OMS, publiées en décembre dernier, on a compté en 2015, 214 millions de cas de paludisme et 438 000 décès (www.who.int), cela en fait la maladie parasitaire la plus fréquente et la plus observée dans le monde. En 2015, 3,2 milliards de personnes environ, soit près de la moitié de la population mondiale, étaient exposées au risque de contracter le paludisme. La majorité des cas et des décès dus à cette maladie surviennent en Afrique subsaharienne, toutefois, l'Asie, l'Amérique latine et le Moyen-Orient sont également affectés. En 2015, 95 pays et territoires étaient confrontés à une transmission continue du

paludisme. Les enfants de moins de 5 ans risquent tout particulièrement de contracter l'infection, de tomber malades et de mourir; plus des deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge.

Egalement appelé malaria, le paludisme est une maladie infectieuse due à cinq espèces de parasites du genre *Plasmodium*, la plus étudiée étant *Plasmodium falciparum*, car c'est l'une des plus dangereuse. Ce parasite est transmis à l'Homme lors de piqures de moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. Les principaux symptômes, fièvre, maux de tête, frissons et vomissements, apparaîssent au bout de sept jours ou plus (généralement 10 à 15 jours) après la piqûre de moustique infectante. Ceux-ci peuvent souvent être difficiles à attribuer au paludisme, or si la maladie n'est pas traitée dans les 24 heures, le paludisme lié au parasite *Plasmodium falciparum* peut évoluer vers une affection sévère souvent mortelle.

Même si entre 2000 et 2015, l'incidence du paludisme a reculé chez les populations exposées de 37% à l'échelle mondiale tandis que le taux de mortalité a baissé de 60%, il est important de continuer à chercher des solutions à ce fléau qui pourrait connaître une résurgence due à trois problématiques :

- En raison du réchauffement climatique, de la mondialisation et de l'introduction accidentelle de moustiques porteurs du parasite, d'autres zones du monde jusque-là épargnées, commencent à être affectées.
- Ces dernières années, une résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes (insecticides couramment utilisés) a fait son apparition dans de nombreux pays. Cela affecte la lutte antivectorielle, qui est en grande partie responsable des succès obtenus contre le paludisme.
- La résistance aux antipaludiques est un problème récurrent. Cela avait déjà été le cas dans les années 1970 et 1980, où la résistance de *Plasmodium falciparum* aux précédentes générations de médicaments comme la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) s'était généralisée, inversant la tendance des progrès accomplis en matière de survie de l'enfant. Une résistance à l'artémisinine (principal antipaludique utilisé actuellement) a été signalée dans 5 pays du Bassin du Mékong. Dans certaines régions du Cambodge et de la Thaïlande, on observe même une multirésistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine et aux médicaments associés (Dondorp A. M. *et al.*, 2009 ; Dondorp A. M. *et al.*, 2010).

C'est pour apporter une solution à cet effet de résistance que les tests antipaludiques sont réalisés. La recherche de nouveaux antipaludiques étant le seul moyen de lutter contre cette résistance aux molécules actuellement utilisées.

- **Les résultats**

L'activité antipaludique a été évaluée *in vitro* à travers l'activité antiproliférative sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7) (Jansen, O. *et al*., 2012). Ces tests ont permis de mettre en évidence 7 organismes présentant une activité antipaludique, et ce sont toutes des éponges (**Figures 7** et **8**). Les résultats exposés dans la **Figure 7** expriment la CI_{50} c'est-à-dire la concentration inhibant 50% de la croissance du parasite *Plasmodium falciparum*.

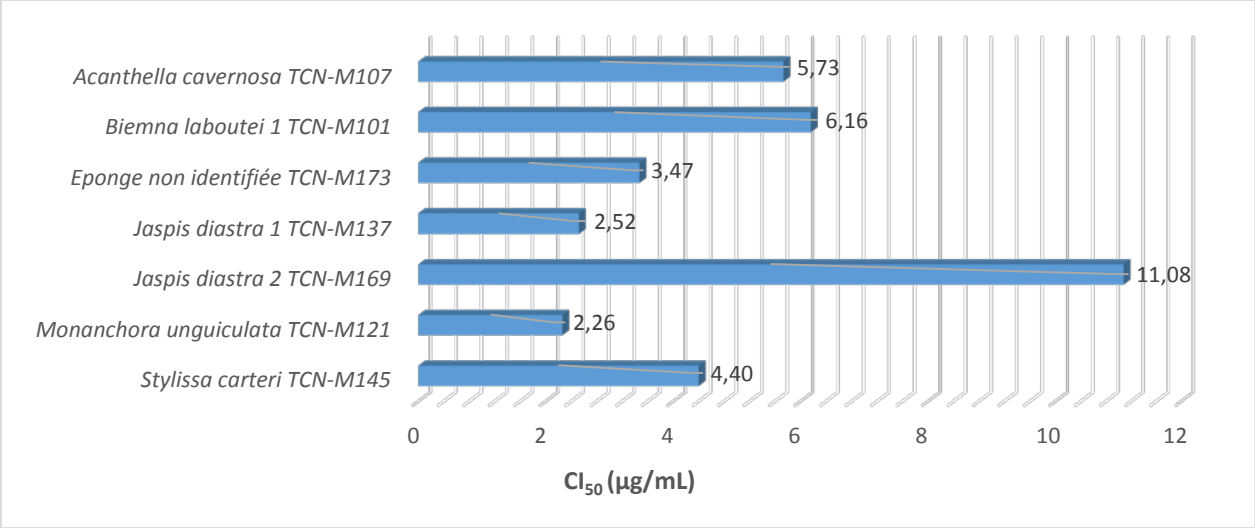


Figure 7 : *Activité antiplasmodium des organismes les plus actifs : concentration inhibant 50% de la croissance de Plasmodium falciparum.*

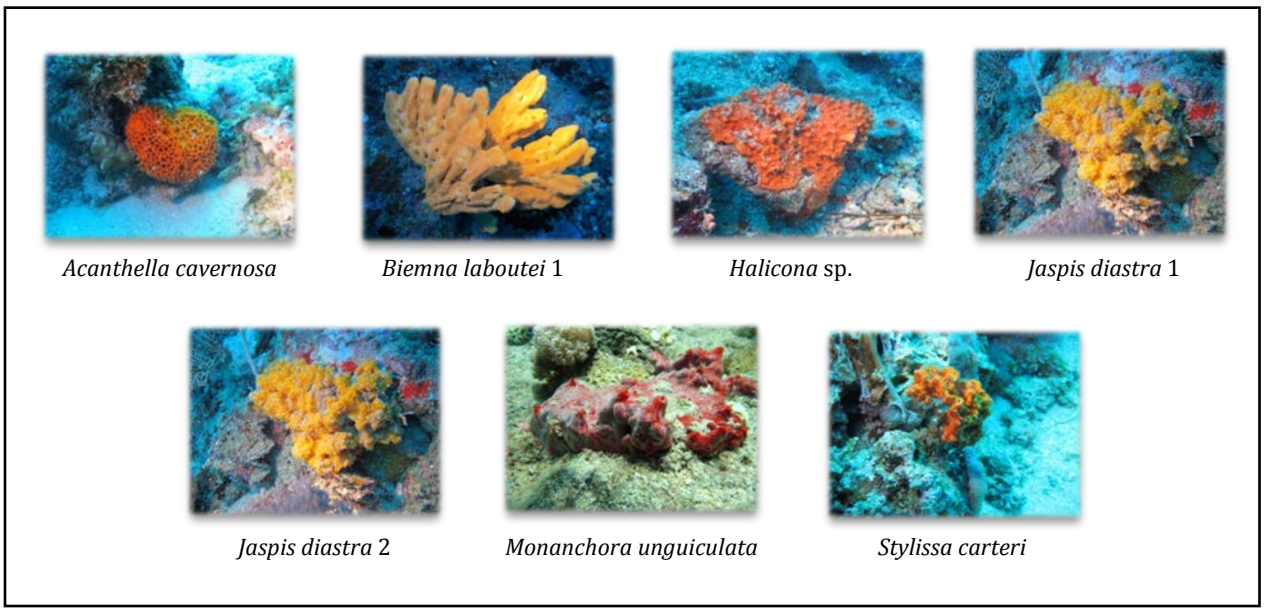


Figure 8 : *Principales éponges sélectionnées pour leur activité antiplasmodium.*

I.4.3 Recherche d'activités antivirales

- ***Les tests d'activité antipaludique ont été réalisés sous la direction du Professeur Peter Leyssen au Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie (KU-LEUVEN) de l'Institut Rega pour la Recherche Médicale de l'Université Catholique de Leuven.***

- **L'activité antivirale sur :**

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

Le chikungunya est une maladie virale transmise par des moustiques du genre *Aedes* et décrite pour la première fois dans le sud de la Tanzanie en 1952. Il s'agit d'un arbovirus* appartenant à la famille des Togaviridae, et au genre *Alphavirus*. Les infections humaines, sont restées peu nombreuses et très localisées (uniquement en Afrique et Asie du Sud-Est) pendant un certain nombre d'années, mais depuis les années 2000, on assiste régulièrement à des flambées importantes de la maladie qui s'est propagée à travers le monde touchant maintenant, l'Afrique, l'Asie du Sud-Est, l'Amérique, l'Océan Indien et même le sud de l'Europe. Au fil de ces épidémies, ce sont des millions de personnes qui sont touchées, par exemple, l'Inde, l'Indonésie, les Maldives, le Myanmar et la Thaïlande (1,9 millions de cas depuis 2005), l'Amérique et les Antilles (1,3 millions de cas entre 2013 et 2015) ou encore La Réunion (270 000 cas entre 2005 et 2007) (www.pasteur.fr, www.chikungunya.net, www.who.int).

Le nom de «chikungunya» vient de la langue makonde et signifie «devenir tordu», ce qui décrit l'apparence voûtée de ceux qui en sont affectés. Ceci est dû à l'arthralgie*, un des principaux symptômes avec également l'apparition brutale de fièvre. D'autres symptômes sont communs, notamment myalgies*, céphalées*, nausées, fatigue et éruptions cutanées. A l'heure actuelle, il n'existe pas de médicament contre cette maladie, le traitement est essentiellement symptomatique et c'est pour cela que depuis une dizaine d'années, de nombreux laboratoires se sont alors attachés à chercher des solutions afin de combattre cette maladie, soit en développant de nouveaux agents répulsifs de moustiques, soit en trouvant des nouveaux principes actifs capables d'agir sur le virus.

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

Les *Enterovirus* se distribuent partout dans le monde, circulant tout au long de l'année dans les régions tropicales et principalement en été et en automne dans les zones tempérées. Ils sont associés à diverses maladies affectant l'Homme, la plus connue étant la poliomyélite, provoqué par le *poliovirus*, maladie ayant handicapé ou tué plusieurs millions de personnes à travers le monde au cours des XIXième et XXième siècles. D'autres *Enterovirus* (*coxsackie*,

echovirus …) peuvent donner des maladies diverses, dont les principales sont la myalgie épidémique, les méningites lymphocytaires bégnines et la grippe estivale, mais peuvent également être à l'origine de troubles plus graves comme les péricardites*, pleurésies*, myocardites* ou encéphalites*. Ils touchent principalement les enfants de moins de 15 ans, sont transmissibles par contact et sont très résistants aux agents extérieurs. Il existe peu de traitements connus comme étant efficaces.

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

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

- **Les résultats**

L'activité antivirale a été évaluée *in vitro* à travers l'activité antiproliférative sur les virus CHIKV (souche 899), l'entérovirus type 71 (souche BrCr) et le rhinovirus type 14 (phénotype sauvage). Ces tests, réalisés selon le protocole décrit par Nothias-Scaglia L. F. *et al.*, 2015, ont permis de mettre en évidence 4 organismes présentant une activité antichikungunya, trois coraux mous et une éponge (**Figures 9** et **10**). Les tests sur les deux autres virus n'ont pas donné de résultats positifs. Les résultats exposés dans la **Figure 9** expriment la CE_{50}, c'est-à-dire la concentration efficace tuant 50% des cellules virales (virus CHIKV), mais aussi la CC_{50}, c'est-à-dire la concentration de la molécule réduisant de 50% la viabilité d'un stock de cellules infectées par le virus CHIKV, afin de définir un index de sélectivité I_S (ratio CC_{50}/CE_{50}). Pour l'éponge *Myrmekioderma granulatum* (TCN-M077), la CC_{50} n'a pas pu être déterminée car supérieure à 100 µg/mL et par conséquent, l'index de sélectivité I_S non plus.

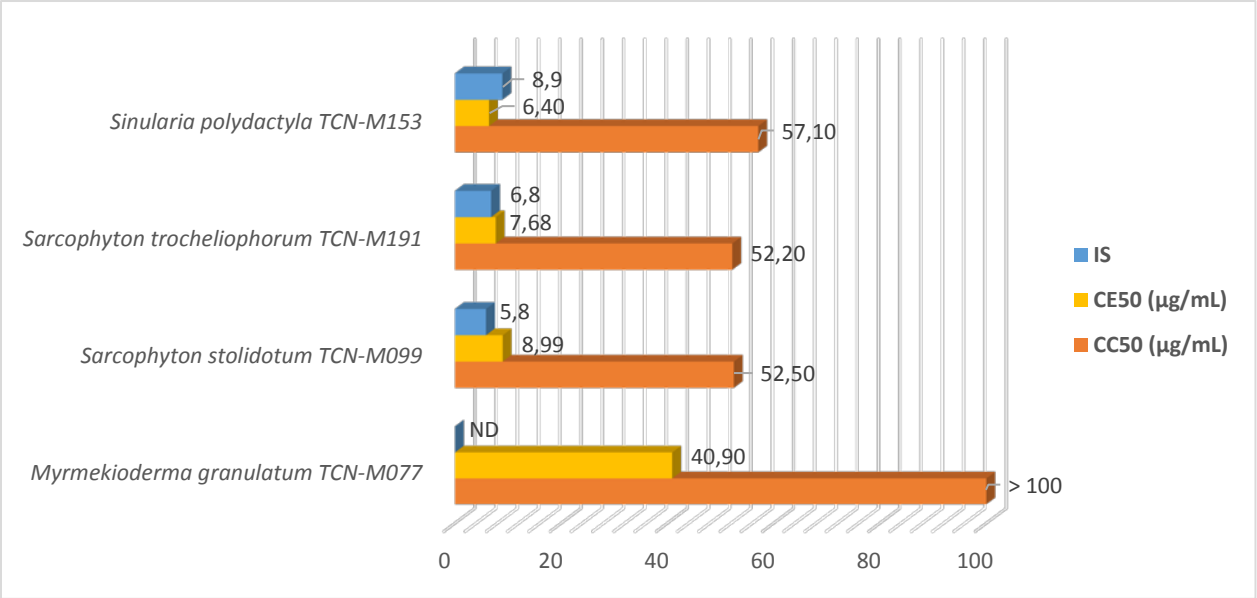


Figure 9 : *Activité antichikungunya des organismes les plus actifs.*

Myrmekioderma granulatum (TCN-M077)

Sarcophyton trocheliophorum

Sarcophyton stolidotum (TCN-M099)

Sinularia polydactyla

Figure 10 : *Eponges sélectionnées pour leur activité antichikungunya.*

I.4.4 Recherche d'activité antioxydante

- **L'activité antioxydante**

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

L'une des sources peut être apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes ou glutathion. On assiste donc depuis quelques années au développement de nombreux produits antioxydants (alicaments,

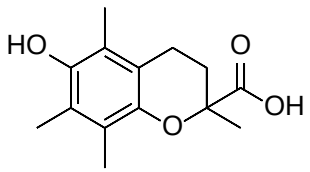
compléments alimentaires, médicaments, crèmes de soin apaisantes, antiradicalaires, anti-âges...) contenant dans certains cas des molécules complexes d'origine naturelle en polyphénols, flavonoïdes, anthocyanosides, caroténoïdes…

- **Les résultats**

L'activité antioxydante a été testée à travers deux tests, qui ont été adaptés et appliqués aux extraits bruts des organismes marins :

- Le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), mesurant la capacité de réduction des ions ferriques en ion ferreux des molécules testées (Benzie I.F. et Strain J., 1996).
- Le test ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), basé sur la capacité de neutralisation d'un radical – cation $ABTS^{\bullet+}$ des molécules testées (Re R. *et al.,* 1999).

Les résultats d'activité antioxydante sont exprimés par rapport à une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connue sous le nom de Trolox qui est un analogue hydrosoluble de la vitamine E. Les résultats sont donc exprimés en µM Equivalent Trolox/mg d'extrait.



Trolox

Parmi les 60 extraits bruts d'organismes marins testés, cinq extraits d'éponges ont montré une activité sur au moins un des deux tests (**Figures 11** et **12**). En revanche, seule le corail mou *Rhytisma fulvum fulvum* (TCN-M161 et TCN-M163) a montré une activité remarquable sur les deux tests. Pour chacun des organismes, les activités antioxydantes, évaluées en µM Equivalent Trolox / mg d'extrait diffèrent selon le test. Elles sont toutes supérieures pour le test ABTS. Les molécules actives de ces cinq organismes ont donc une capacité supérieure à piéger les radicaux ABTS• par rapport aux ions ferriques.

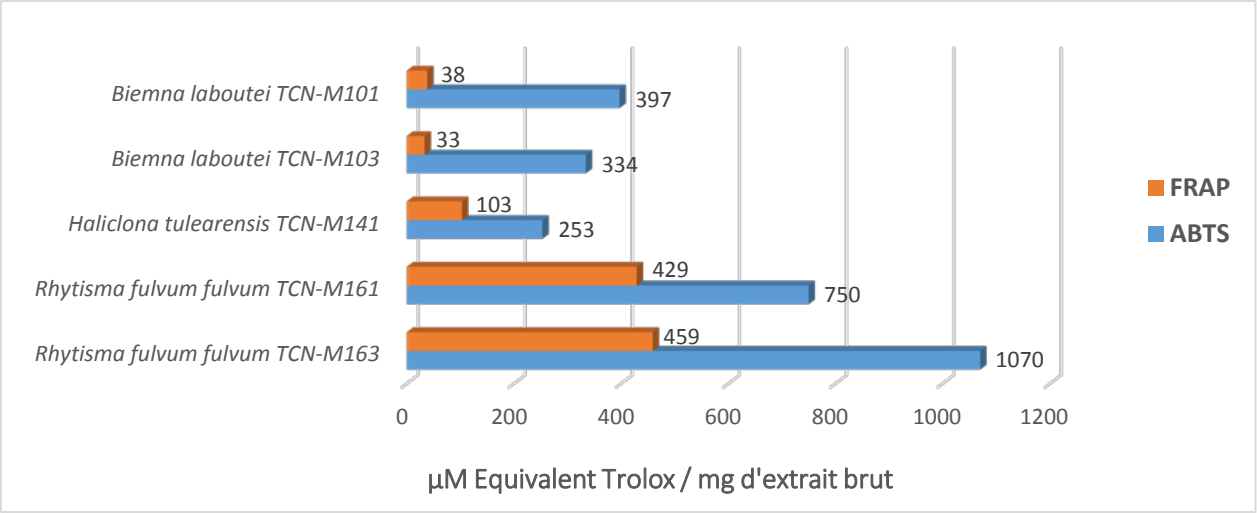


Figure 11 : *Activité antioxydante des 5 invertébrés marins les plus actifs.*

Rhytisma fulvum fulvum TCN-M161

Rhytisma fulvum fulvum TCN-M163

Figure 12 : *Corail mou sélectionné pour son activité antioxydante.*

I.5 Données bibliographiques

A l'exception des organismes déjà étudiés au laboratoire (*Biemna laboutei*) et des organismes confiés pour étude au Professeur Yoel Kashman (*Hemiasterella intermedia*, *Jaspis diastra* et *Rhytisma fulvum fulvum*), une étude bibliographique (**Tableau I**) a été menée sur le genre afin de relever le nombre de publications relatives à chaque genre ainsi que le nombre de molécules qui en ont été isolées. Le travail a donc été effectué sur 16 espèces regroupées en 13 genres : 9 genres d'éponges, 3 genres de coraux mous et 1 genre d'ascidie. Cela a permis d'avoir un aperçu des travaux déjà effectués sur chacun de ces organismes, et ainsi savoir si leur composition était déjà très étudiée.

Tableau I : *Nombre de publications et de composés isolés référencés dans la base de données MarinLit pour les 13 genres recensés.*

Type d'organisme	Genre	Nombre de publications	Nombre de composés isolés
Eponge	*Acanthella*	107	147
Eponge	*Amphimedon*	139	132
Eponge	*Aulospongus*	0	0
Eponge	*Callyspongia*	145	172
Ascidie	*Eudistoma*	159	114
Eponge	*Haliclona*	347	328
Corail mou	*Lemnalia*	45	100
Eponge	*Monanchora*	49	67
Eponge	*Myrmekioderma*	23	53
Eponge	*Pseudoceratina*	85	108
Corail mou	*Sarcophyton*	304	531
Corail mou	*Sinularia*	449	802
Eponge	*Stylissa*	56	64

Enfin, les analyses par CLHP-SM et RMN ^{1}H ont été couplées aux données de la littérature selon la base de données « MarinLit » afin de déterminer si les extraits bruts de tous ces organismes étaient constitués de composés dont les masses moléculaires laissaient présumer la présence de structures nouvelles. C'est le cas pour *Acanthella cavernosa*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri*, *Lemnalia africana, Lemnalia madagascariensis, Monanchora unguiculata* et *Stylissa carteri*.

Concernant les autres organismes :

- Les éponges *Callyspongia biru* et *Myrmekioderma granulatum* ne présentent pas un profil CLHP-SM vraiment exploitable. Il est donc difficile de relever des masses moléculaires pour les comparer à la littérature.
- L'éponge *Haliclona* sp., possède deux composés majoritaires de masse *m/z* 369,4 (ESI^{+}) pouvant correspondre à la **papuamine** (Baker B. J. *et al*., 1988) et à l'**haliclonadiamide** (Fahy E. *et al*., 1988), molécules isolées d'éponges du genre *Haliclona*.
- L'éponge *Pseudoceratina* sp., possède majoritairement des composés bromés ayant des masses pouvant correspondre aux bromotyrosines (molécules caractéristiques de l'ordre des Verongiida) comme notamment les **pseudocératinines A** et **B** et l'**aplysamine-2** (Benharref A. *et al*., 1996), molécules isolées de *Pseudoceratina verrucosa*.

- L'ascidie *Eudistoma* sp., possède des pics majoritaires pouvant correspondre à l'**eudistomine G**, **H** (Kobayashi J. *et al*., 1984), l'**eudistomine X** (Schupp P. *et al*., 2003) et l'**eudistalbine B** (Adesanya S. A. *et al*., 1992).
- Les coraux mous des genres *Sinularia* et *Sarcophyton* ont clairement été très étudiés. Pour *Sinularia polydactyla*, si l'on fait un recoupement entre l'analyse CLHP-SM et la base de données « MarinLit », le pic majoritaire de masse 349,2 (ESI^+) peut correspondre à 28 molécules isolées de coraux mous du genre *Sinularia*. Ces molécules sont toutes des diterpénoïdes. Il en est de même pour *Sarcophyton trocheliophorum*, dont le composé majoritaire a une masse de 303,2 (ESI^+) soit 21 molécules possibles, toutes des diterpénoïdes, isolées de coraux mous du genre *Sarcophyton*. Pour *Sarcophyton stolidotum*, les masses des composés majoritaires correspondent également à des diterpénoïdes.

I.6 Organismes sélectionnés

Une corrélation entre les données obtenues par le criblage chimique, le criblage biologique et les données bibliographiques menés sur les extraits bruts des 49 espèces d'invertébrés marins étudiés (certaines espèces pouvant être représentées par plusieurs échantillons) a été faite et a été représentée dans le ***Tableau II***.

Parmi les 49 espèces testées :

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

Biemna triraphis (TCN-M129), *Callyspongia* sp. (TCN-M133), *Callyspongia* sp. « black » (TCN-M083), *Didemnum molle* (TCN-M087, TCN-M089, TCN-M091, TCN-M095, TCN-M097), *Haliclona aff. fascigera* (TCN-M155), *Haliclona fascigera* (TCN-M123), *Haliclona polypoides* (TCN-M109), *Haliclona tulearensis* (TCN-M141), *Haliclona* sp. (TCN-M193), *Haliclona* sp. « black » (TCN-M179), *Leucetta* sp. (TCN-M143), *Liosina paradoxa* (TCN-M119), *Lobophytum depressum* (TCN-M159), *Mycale parishi* (TCN-M117), *Myrmekioderma granulatum* (TCN-M093 et TCN-M167), *Oceanapia globosa* (TCN-M125, *Sarcophyton stolidotum* (TCN-M135), *Sarcophyton subviride* (TCN-M157), *Sinularia crucita* (TCN-M185), *Sinularia humesi* (TCN-M175), *Sinularia notanda* (TCN-M189), Ascidie non identifiée 2 (TCN-M127), Coraux mous non identifiés 1, 2 et 3 (TCN-M115, TCN-M139, TCN-M171), Eponges non identifiées 1, 2 et 3 (TCN-M111, TCN-M113, TCN-M151).

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

Dragmacidon coccineum ou *Ulosa rubra* (TCN-M149), *Phyllospongia* ou *Ledenfeldia* (TCN-M131) et *Pseudoceratina* sp. (TCN-M105).

- **2 présentent à la fois un intérêt chimique et bibliographique :**

Aulospongus gardineri (TCN-M085) et *Lemnalia africana* (TCN-M187).

- **8 présentent uniquement un intérêt pour leurs activités biologiques mais pas d'intérêt chimique et bibliographique :**

Callyspongia biru (TCN-M079), *Haliclona* sp. (TCN-M173), *Myrmekioderma granulatum* (TCN-M077), *Sarcophyton stolidotum* (TCN-M099), *Sarcophyton trocheliophorum* (TCN-M191), *Sinularia polydactyla* (TCN-M153), Ascidie non identifiée 1 (TCN-M081) et Eponge non identifiée 4 (TCN-M165).

- **9 présentent à la fois un intérêt pour leurs activités biologiques et un intérêt chimique mais pas d'intérêt bibliographique :**

Biemna laboutei (TCN-M101, TCN-M103), *Callyspongia biru* (TCN-M075), *Eudistoma* sp. (TCN-M181), *Hemiasterella intermedia* (TCN-M147), *Jaspis diastra* (TCN-M137, TCN-M169) et *Rhytisma fulvum fulvum* (TCN-M161, TCN-M163).

- **5 présentent à la fois un intérêt pour leurs activités biologiques, un intérêt chimique et un intérêt bibliographique :**

Acanthella cavernosa (TCN-M107), *Amphimedon* sp. (TCN-M183), *Lemnalia madagascariensis* (TCN-M177), *Monanchora unguiculata* (TCN-M121) et *Stylissa carteri* (TCN-M145).

Les organismes présents dans ce dernier groupe sont donc ceux présentant le meilleur potentiel de nouveaux candidats médicaments. Ainsi, dans le cadre de ces travaux de thèse, les éponges *Monanchora unguiculata* et *Amphimedon* sp. ont été choisies.

- *Monanchora unguiculata* est l'organisme qui présente la meilleure activité antipaludique (CI_{50} 2,26 µg/mL) ainsi qu'une cytotoxicité sur cellule KB élevée (99% d'inhibition à 10 µg/mL). Son analyse par CLHP-SM (ESI^+) a également révélé la présence d'un composé majoritaire non répertorié dans la littérature (*m/z* 869,7).
- *Amphimedon* sp. est l'une des deux éponges identifiées n'ayant pas encore été étudiées au laboratoire (avec *Callyspongia biru*) et présentant la plus haute cytotoxicité sur cellule KB (100% d'inhibition à 10 µg/mL). Le profil CLHP-SM (ESI^+) a révélé la présence de composés polybromés, atypiques du genre *Amphimedon*.

Cependant, un autre organisme a également été retenu, il s'agit de l'éponge *Aulospongus gardineri,* dont le genre n'a fait l'objet d'aucune publication. Elle sera donc également étudiée afin d'enrichir l'état de l'art, totalement inexistant à son sujet.

Tableau II : *Bilan des criblages chimique et biologiques et des données bibliographiques.*

Echantillon		Criblage chimique	Criblage biologique				Données Bibliographiques
			Cytotoxicité KB	Activité antipaludique	Activité anti-chikungunya	Activité antioxydante	
Acanthella cavernosa	TCN-M107	■		■			■
Amphimedon sp.	TCN-M183	■	■				■
Aulospongus gardineri	TCN-M085	■					■
Biemna laboutei	TCN-M101	■	■	■			
	TCN-M103	■	■				
Biemna triraphis	TCN-M129						
Callyspongia biru	TCN-M075	■	■				
	TCN-M079		■				
Callyspongia sp.	TCN-M133						
Callyspongia sp. « black »	TCN-M083						
Didemnum molle	TCN-M087						
	TCN-M089						
	TCN-M091						
	TCN-M095						
	TCN-M097						
Dragmacidon coccineum ou *Ulosa rubra*	TCN-M149	■					
Eudistoma sp.	TCN-M181	■	■				
Haliclona aff. fascigera	TCN-M155						
Haliclona fascigera	TCN-M123						
Haliclona polypoides	TCN-M109						
Haliclona tulearensis	TCN-M141						
Haliclona sp.	TCN-M173		■	■			
	TCN-M193						
Haliclona sp. « black »	TCN-M179						
Hemiasterella intermedia	TCN-M147	■	■				
Jaspis diastra	TCN-M137	■	■	■			
	TCN-M169	■	■	■			
Lemnalia africana	TCN-M187	■					■
Lemnalia madagascariensis	TCN-M177	■	■				■
Leucetta sp.	TCN-M143						
Liosina paradoxa	TCN-M119						
Lobophytum depressum	TCN-M159						
Monanchora unguiculata	TCN-M121	■	■	■			■
Mycale parishi	TCN-M117						
Myrmekioderma granulatum	TCN-M077				■		
	TCN-M093						
	TCN-M167						
Oceanapia globosa	TCN-M125						
Phyllospongia ou *Ledenfeldia*	TCN-M131	■					
Pseudoceratina sp.	TCN-M105	■					
Rhytisma fulvum fulvum	TCN-M161	■				■	
	TCN-M163	■				■	
Sarcophyton stolidotum	TCN-M099				■		
	TCN-M135						
Sarcophyton subviride	TCN-M157						
Sarcophyton trocheliophorum	TCN-M191				■		
Sinularia crucita	TCN-M185						
Sinularia humesi	TCN-M175						
Sinularia notanda	TCN-M189						
Sinularia polydactyla	TCN-M153				■		
Stylissa carteri	TCN-M145	■	■	■			■
Ascidie non identifiée 1	TCN-M081		■				
Ascidie non identifiée 2	TCN-M127						
Corail mou non identifié 1	TCN-M115						
Corail mou non identifié 2	TCN-M139						
Corail mou non identifié 3	TCN-M171						
Eponge non identifiée 1	TCN-M111						
Eponge non identifiée 2	TCN-M113						
Eponge non identifiée 3	TCN-M151						
Eponge non identifiée 4	TCN-M165		■				

Chapitre II

Etude de l'éponge
Monanchora unguiculata (Dendy, 1922)

Monanchora unguiculata
crédit LCSNSA

II.1 Eléments bibliographiques sur *Monanchora unguiculata* (Dendy, 1922)

II.1.1 Localisation du genre *Monanchora* (Carter, 1883)

Les éponges du genre *Monanchora* sont principalement localisées dans l'Océan Indien (Canal du Mozambique, Seychelles, Mer des Laquedives, Golf du Bengale, Mer de Timor, Australie), l'Océan Pacifique (Mer jaune, Hawaï, Mer de Béring, Canada) et dans l'Océan Atlantique (Mer des Caraïbes, Golfe du Mexique, Brésil) (**Figure 13**) (www.marinespecies.org, www.iobis.org).

Figure 13 : *Lieux de collectes d'éponges du genre Monanchora (crédit geoportail.gouv.fr).*

II.1.2 Position systématique et description du genre *Monanchora* (Carter, 1883)

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

Avec trois autres genres, *Crambe* (Vosmaer, 1880), *Discorhabdella* (Dendy, 1924) et *Lithochela* (Burton, 1929), le genre *Monanchora* (Carter, 1883) appartient à la famille des Crambeidae (ordre Poecilosclerida).

Royaume: Animal
Phylum: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordre: Poecilosclerida
Famille: Crambeidae
Genre: *Monanchora*

Synonymes du genre *Monanchora* : *Amorphocladia* (Topsent, 1930)
Ectyobatzella (Burton & Rao, 1932)
Fasubera (de Laubenfels, 1936)
[Fasuberea] (Lévi, 1958)
Folitispa (de Laubenfels, 1936)
Neofolitispa (Bergquist, 1965)
Okadaia (de Laubenfels, 1936)

- **Description morphologique** (Van Soest R. W. M., 1990)

Le genre *Monanchora* a été érigé par Carter (1883) pour décrire une espèce récoltée dans le Sud-Ouest de l'Australie, *Monanchora clathrata* Carter, 1883. Ce genre, regroupant à l'heure actuelle 14 espèces d'éponges, est décrit comme possédant un squelette choanosomique* plumeux ou plumo-réticulé avec un développement important de fibres de spongine* contenant un faisceau irrégulier de mégasclères* siliceuses de types subtylostyles*. Le squelette ectosomique* est constitué de spicules* disposés en brosse. Ce genre possède également des microsclères* d'une ou plusieurs catégories de chèles* spatulées - unguifères qui ont tendance à avoir un tronc cannelé à l'état adulte.

II.1.3 Cas particulier de l'espèce *Monanchora unguiculata* (Dendy, 1922) : localisation et description morphologique

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

L'éponge *Monanchora unguiculata*, initialement décrite sous le nom d'*Amphilectus unguiculatus* par Dendy en 1922, a été répertoriée uniquement dans l'Océan Indien. Elle a été collectée aux Seychelles (Dendy A., 1922 ; Braeckman J. C. *et al.*, 2000), sur les côtes malgaches dans le Canal du Mozambique (Vacelet J. *et al.*, 1976) et aux Maldives dans la Mer des Laquedives (Meragelman K. M. *et al.*, 2004).

- **Description morphologique**

L'éponge *Monanchora unguiculata* (**Figure 14**) se présente sous une forme encroûtante, qui a tendance à rester relativement peu épaisse mais à s'étendre en surface. Elle peut être fixée sur des coraux morts. C'est une éponge très finement incrustante dont la surface est lisse et subglabre. Elle est de couleur rouge vif et a une texture douce avec une fine membrane dermique translucide facilement séparable.

Le squelette est constitué de faisceaux de spicules de types tylostyles*, partant du squelette choanosomique et allant dans le squelette ectosomique en formant des ramifications en forme de brosse subdermales.

- Mégasclères : minces tylostyles, droites avec des têtes généralement ovales assez bien développées ; s'amenuisant progressivement vers un apex très pointu, qui peut cependant être mucroné* ou émoussé. Leur taille varie de 0,32 à 0,0055mm.
- Microsclères : Isochèles de formes particulières et variables. Le tronc est habituellement fortement incurvé, non ailé, avec un nombre variable de dents en forme de griffe (unguifères) à chaque terminaison. Leur taille peut aller jusqu'à 0,03 mm avec un tronc d'environ 0,004 mm d'épaisseur (**Figure 15**).

Figure 14 : *Photographie in situ de Monanchora unguiculata (Crédit LCSNSA).*

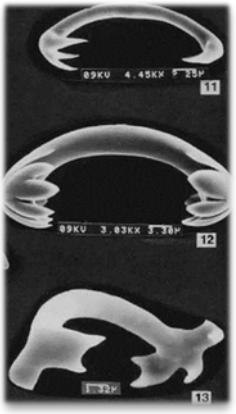


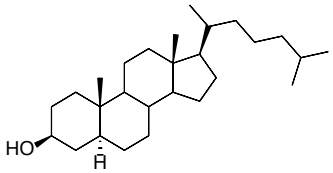
Figure 15 : *Photographie de microsclères unguifères de Monanchora unguiculata (crédit Van Soest R. W. M., 1990).*

II.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Monanchora* (Carter, 1883)

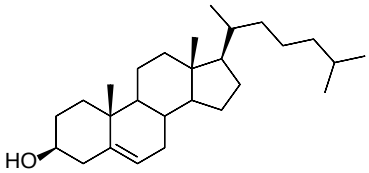
Les éponges de l'ordre des Poecilosclerida sont très riches en métabolites secondaires, en effet, environ 900 molécules ont été isolées d'éponges de cet ordre. Si l'on se concentre plus spécifiquement sur le genre *Monanchora*, à ce jour, 88 molécules en ont été isolées. La littérature fait mention de stérols, de sesterterpénoïdes, d'alcaloïdes pyroliques et d'alcaloïdes guanidiniques.

II.1.4.1 Les stérols

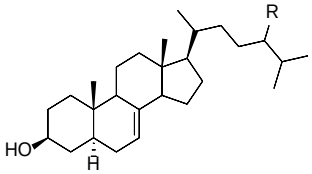
On compte à ce jour 8 stérols isolés du genre *Monanchora* (Santalova E. A. *et al.*, 2007). Ce sont tous des dérivés du **5α-cholestan-3β-ol** (**M1**), un stérol saturé isolé de l'éponge *Monanchora clathrata* (Santalova E. A. *et al.*, 2007). Ces dérivés diffèrent du 5α-cholestan-3β-ol par la présence d'insaturations dans le noyau tétracyclique et sur la chaîne isooctane ainsi que par la présence de groupements méthyles ou éthyles sur cette même chaîne.



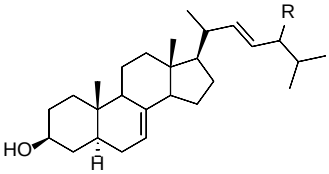
5α-cholestan-3β-ol (**M1**)



cholest-5-én-3β-ol (cholestérol) (**M2**)



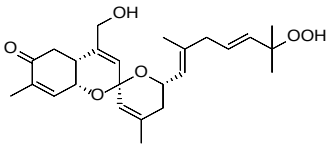
5α-cholest-7-én-3β-ol (**M3**) R = H
24ξ-méthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol (**M4**) R = CH_3
24ξ-éthyl-5α-cholest-7-én-3β-ol (**M5**) R = CH_2CH_3



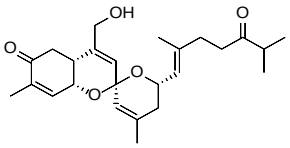
5α-cholesta-7,22*E*-dién-3β-ol (**M6**) R = H
24ξ-méthyl-5α-cholesta-7,22*E*-dién-3β-ol (**M7**) R = CH_3
24ξ-éthyl-5α-cholesta-7,22*E*-dién-3β-ol (**M8**) R = CH_2CH_3

II.1.4.2 Les sesterterpénoïdes

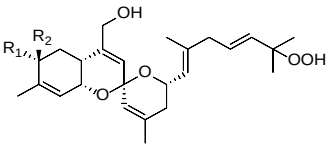
Les données de la littérature font très peu mention de la présence de sesterterpénoïdes dans les éponges du genre *Monanchora* ; 12 sesterterpénoïdes en ont été isolés. Seuls les travaux de Wang W. *et al*. (2013) sur l'éponge *Monanchora* sp. collectée en Corée du Sud dans la Mer jaune, relèvent leurs présences. Les auteurs ont isolés trois sesterterpénoïdes de structures connues ; il s'agit des **phorbakétals A, B et C** (Rho J. R. *et al.*, 2009) et neuf structures nouvelles, les **phorbakétals D - K** (**M9 – M16**) et la **phorbine A** (**M17**). Leur activité cytotoxiques sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses a été étudiée ; les phorbakétals H et I ont montré une activité cytotoxique significative sur les cellules cancéreuses A498 (*rein humain*) et la phorbine A a montré une activité cyctotoxique significative sur les cellules cancéreuses MIA-paca et PANC-1 (*pancréas humain*).



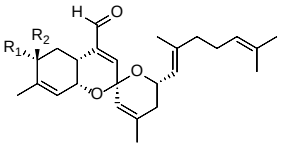
phorbakétal D (**M9**)



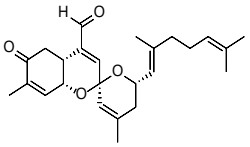
phorbakétal E (**M10**)



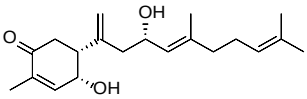
phorbakétal F (**M11**) R_1 = OAc ; R_2 = H
phorbakétal G (**M12**) R_1 = H ; R_2 = OAc



phorbakétal H (**M13**) R_1 = OH ; R_2 = H
phorbakétal J (**M15**) R_1 = OAc ; R_2 = H
phorbakétal K (**M16**) R_1 = H ; R_2 = OAc



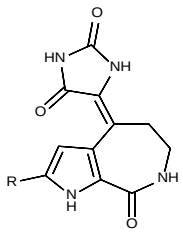
phorbakétal I (**M14**)



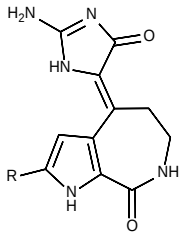
phorbine A (**M17**)

II.1.4.3 Les alcaloïdes

Les éponges du genre *Monanchora* sont connues pour leur richesse en alcaloïdes. A ce jour, pas moins de 71 alcaloïdes ont été isolés des éponges du genre *Monanchora* (Groszel G. *et al.,* 1994 ; Tavares R. *et al.*, 1995 ; Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999 ; Braeckman J. C. *et al.*, 2000 ; Chang N. F. *et al.*, 2003 ; Hua H. M. *et al.*, 2004 ; Meragelman K. M. *et al.*, 2004 ; Gallimore W. A. *et al.*, 2005 ; Bensemhoun J. *et al.*, 2007 ; Hua H. M. *et al.*, 2007 ; Laville R. *et al.*, 2009 ; Takishima S. *et al.*, 2009 ; Guzii A. G. *et al.*, 2010 ; Ferreira E. G. *et al.*, 2011 ; Makarieva T. N. *et al.*, 2011 ; Makarieva T. N. *et al.*, 2012 ; Guzii A. G. *et al.*, 2013 ; Makarieva T. N. *et al.*, 2013 ; Tabakmakher K. M. *et al.*, 2013 ; Makarieva T. N. *et al.*, 2014 ; Santos M. F. C. *et al.*, 2015 ; Tabakmakher K. M. *et al.*, 2015 ; El-Demerdash A. *et al.*, 2016). Seuls deux de ces alcaloïdes ne possèdent pas de motif guanidine, il s'agit d'alcaloïdes pyrroliques, l'**axynohydantoine** (**M18**) et le **débromoaxynohydantoine** (**M19**), isolés de *Monanchora* sp. collectée en Papouasie Nouvelle Guinée (Groszel G. *et al.,* 1994). Ceux-ci ont été isolés conjointement avec deux autres alcaloïdes pyrroliques qui eux possèdent un motif guanidine, l'**hyménialdisine** (**M20**) et le **débromohyménialdisine** (**M21**).

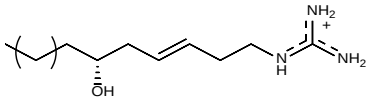


axynohydantoine (**M18**) R = Br
débromoaxynohydantoine (**M19**) R = H



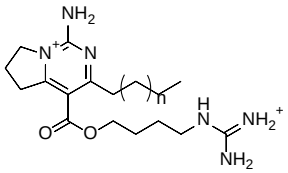
hyménialdisine (**M20**) R = Br
débromohyménialdisine (**M21**) R = H

Les composés guanidiniques sont naturellement présents chez différents organismes (microorganismes terrestres et marins, invertébrés marins et terrestres, végétaux supérieurs). Dans les éponges du genre *Monanchora*, ils sont majoritairement incorporés dans des structures bi-, tri-, et pentacycliques. Seulement trois alcaloïdes acycliques ont été isolés de *Monanchora pulchra* (Guzii A. G. *et al.*, 2013 ; Makarieva T. N. *et al.*, 2013), les **pulchranines A – C** (**M22 - M24**). La pulchranine A a montré une bonne activité analgésique, elle possède une activité inhibitrice sur le récepteur TRPV1 (CE_{50} 41,2 µM).

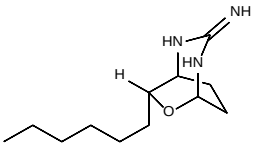


pulchranine A (**M22**) n = 5
pulchranine B (**M23**) n = 4
pulchranine C (**M24**) n = 3

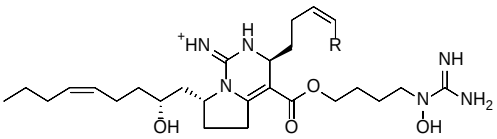
Douze alcaloïdes guanidiniques bicycliques ont été isolés d'éponges du genre *Monanchora*. Parmi ceux-ci, certains révèlent des activités biologiques intéressantes ; la **monanchorine** (**M27**), isolée de *Monanchora unguiculata* (Meragelman K. M. *et al.*, 2004), a montré une activité cytotoxique sur la lignée de mastocytes murins IC-2 (CI_{50} 11,3 µM) et la **monanlidine A** (**M30**), isolée de *Monanchora arbuscula* (Santos M. F. C. *et al.*, 2015), a révélé une activité antiparasitaire intéressante notamment contre *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania infantum* (CI_{50} 8 ; 2 µM respectivement).



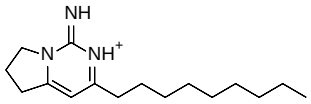
déhydrocrambine A (**M25**) n = 8
déhydrocrambescine A2 (**M26**) n = 6



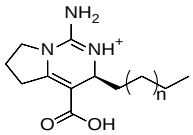
monanchorine (**M27**)



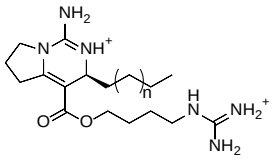
urupocidine A (**M28**) R = CH_3
urupocidine B (**M29**) R = $CH_2CH_2CH_3$



monalidine A (**M30**)

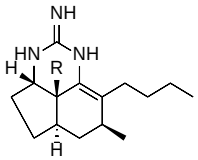


monanchoradine A (**M31**) n = 4
monanchoradine B (**M32**) n = 5
monanchoradine C (**M33**) n = 6

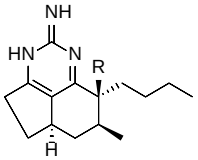


(-)-crambescine A2 392 (**M34**) n = 4
(-)-crambescine A2 392 (**M35**) n = 5
(-)-crambescine A2 392 (**M36**) n = 6

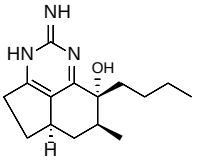
Pas moins de 28 alcaloïdes ayant une structure de type tricyclique (ou un motif tricyclique dimèrisé avec un autre motif bi- ou tricyclique) ont été isolés d'éponges appartenant au genre *Monanchora*. On retrouve ces structures dans deux éponges, *Monanchora arbuscula* (Braeckman J. C. *et al.*, 2000 ; Laville R. *et al.*, 2009 ; Ferreira E. G. *et al.*, 2011 ; Santos M. F. C. *et al.*, 2015), également connue sous l'ancienne dénomination, *Monanchora unguifera* (Hua H. M. *et al.*, 2004 ; Gallimore W. A. *et al.*, 2005 ; Hua H. M. *et al.*, 2007) et l'éponge *Monanchora* sp. (Takishima S. *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, on retrouve la **ptilocauline** (**M37**) (Gallimore W. A. *et al.*, 2005 ; Ferreira E. G. *et al.*, 2011) ainsi que six dérivés (**M38 – M43**). La **mirabiline B** (**M39**) possède des activités biologiques intéressantes comme une activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* (CI_{50} 7,0 µg/mL) et une activité antiprotozoaire contre *Leishmania donovani* (CI_{50} 17 µg/mL).



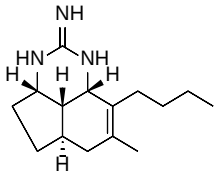
ptilocauline (**M37**) R = H
8β-hydroxyptilocauline (**M38**) R = OH



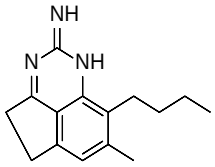
mirabiline B (**M39**) R = H
8β-hydroxymirabiline B (**M40**) R = OH



8α-hydroxymirabiline B (**M41**)

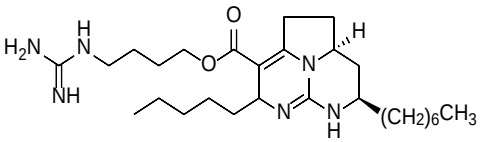


isoptilocauline (**M42**)

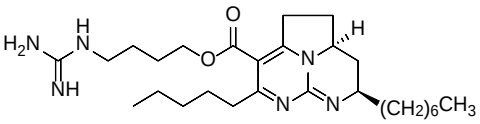


arbusculidine (**M43**)

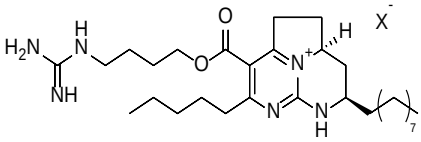
Les autres structures de type tricycliques sont toutes des batzelladines et dérivés. Parmi celles-ci, 10 d'entre elles ont un seul motif tricyclique (**M44 – M53**).



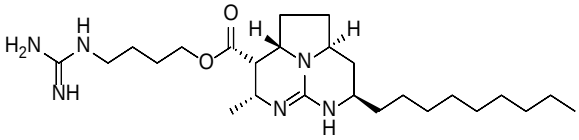
batzelladine C (**M44**)



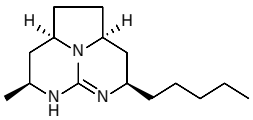
déhydrobatzelladine C (**M45**)



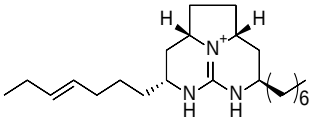
dihomodéhydrobatzelladine C (**M46**)



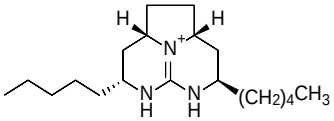
batzelladine D (**M47**)



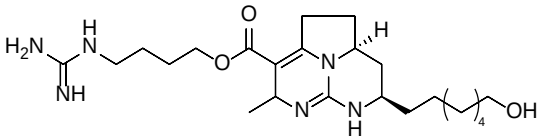
batzelladine K (**M48**)



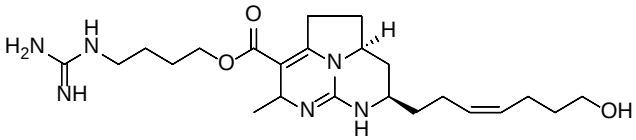
mérobatzelladine A (**M49**)



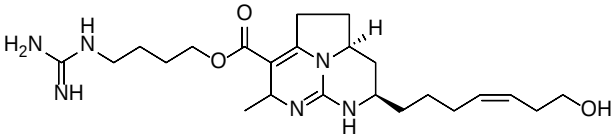
mérobatzelladine B (**M50**)



hémibatzelladine J (**M51**)

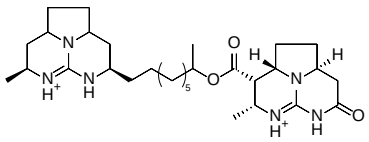


Δ^{19}-hémibatzelladine J (**M52**)

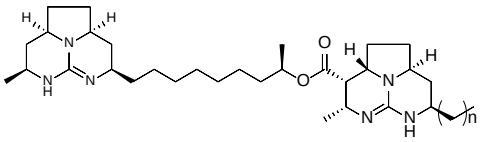


Δ^{20}-hémibatzelladine J (**M53**)

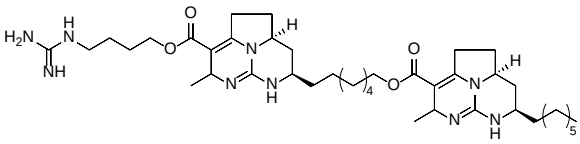
Sept des batzelladines isolées d'éponges appartenant au genre *Monanchora* possèdent deux motifs tricycliques (**M54 – M60**).



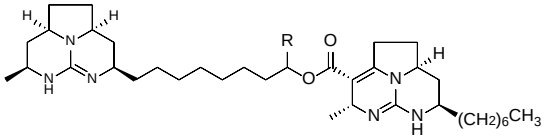
batzelladine A (**M54**)



batzelladine F (**M55**) n = 6
norbatzelladine L (**M56**) n = 7
batzelladine L (**M57**) n = 8

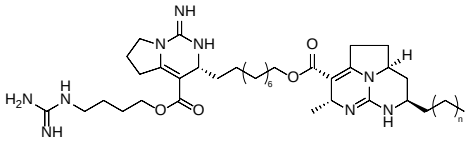


batzelladine J (**M58**)

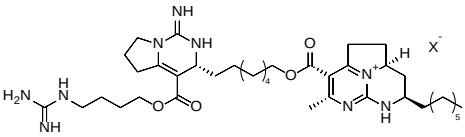


batzelladine M (**M59**) R = H
batzelladine N (**M60**) R = CH_3

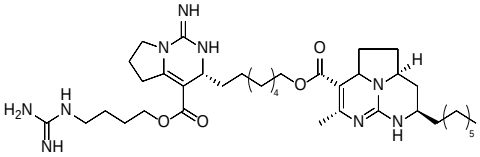
Les quatre autres dérivés de batzelladines possèdent un motif tricyclique associé à un motif bicyclique (**M61 – M64**)



norbatzelladine A (**M61**) n=6
dinorbatzelladine A (**M62**) n=5



dinordéhydrobatzelladine B (**M63**)



dinorbatzelladine B (**M64**)

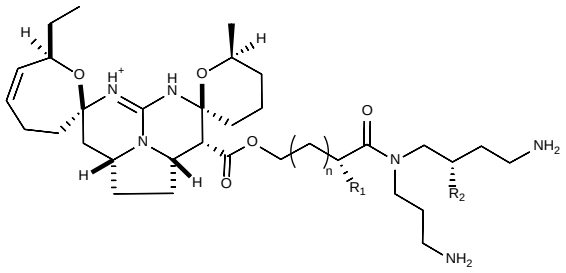
Un bon nombre de ces alcaloïdes de type tricycliques présentent des activités biologiques intéressantes. Nous pouvons notamment citer les **batzelladines C** (**M44**) et **L** (**M57**) et la **déhydrobatzelladine C** (**M45**), présentant des activités antiparasitaires envers *Plasmodium falciparum* et *Leishmania donovani* du même ordre de grandeur que les traitements antipaludiques (chloroquine et artémisinine) et antileishmania (pétamidine et amphotéricine B) actuels (**Tableau III**) (Hua H. M. *et al.*, 2007).

Tableau III : *Activités antiparasitaires des batzelladines C (M37) et L (M50) et de la déhydrobatzelladine C (M38).*

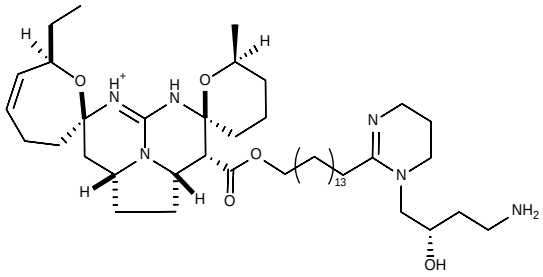
Molécule	*P. falciparum* clone D6 CI_{50} (ng/mL)	*P. falciparum* clone W2 CI_{50} (ng/mL)	*L. donovani* CI_{50} (µg/mL)
batzelladine C (**M44**)	90	110	5,5
batzelladine L (**M57**)	73	96	1,9
déhydrobatzelladine C (**M45**)	73	130	5,7
chloroquine	15,5	80	-
artémisinine	6,5	4,1	-
pétamidine	-	-	1,7
amphotéricine B	-	-	1,8

Certaines de ces molécules ont également montré une cytotoxicité intéressante sur lignées cellulaires cancéreuses comme par exemple les **batzelladines C** (**M44**), **L** (**M57**), **M** (**M59**) et **N** (**M60**) et la **déhydrobatzelladine C** (**M45**), cytotoxiques sur 11 lignées cellulaires cancéreuses : DU-145 (prostate), IGROV (ovaire), SK-BR3 (sein), SK-MEL-28 (mélanome), A549 (poumon), L-562 (leucémie), PANCL (pancréas), HT29, LOVO, LOVO-DOX (colon), HeLa (col de l'utérus) avec des CI_{50} de 0,2 à 5 µg/mL.

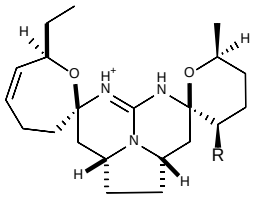
On compte à ce jour également 24 alcaloïdes pentacycliques isolés d'éponges du genre *Monanchora*. Ces composés sont caractéristiques des éponges de l'ordre des Poecilosclerida et même plus précisément de la famille des Crambeidae. En effet, seuls les travaux d'Othani I. *et al*. (1992) et de Palagiano E. *et al*. (1995) font référence à l'isolement de structures pentacycliques provenant d'organismes autres que ceux de la famille des Crambeidae. Othani I. *et al*. (1992) ont isolé la **ptilomycaline A** (**M65**) des éponges *Ptilocaulis spiculifer* et *Hemimycale* sp. Mais, après ré-examination, la taxonomie du spécimen de *Ptilocaulis aff. spiculifer* (collection Harbor Branch) a été réévaluée ; le spécimen semblerait être une éponge de l'ordre des Poecilosclerida du genre *Batzella* (Topsent, 1891). Il faut également signaler que deux éponges du genre *Hemimycale*, *Hemimycale ambigua* (Sarà, 1960) et *Hemimycale brevicuspis* (Topsent, 1892) ont été réattribuées comme étant *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). Palagiano E. *et al*. (1995) ont isolé de l'étoile de mer *Celerina heffernani,* la **ptilomycaline A** (**M65**), la **crambescidine 800** (**M66**) ainsi que la **céléromycaline** (**M67**) et de l'étoile de mer *Fromia monilis*, la **fromiamycaline** (**M70**).



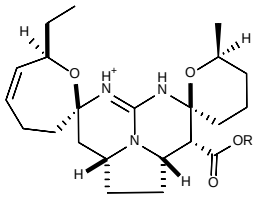
ptilomycaline A (**M65**) n = 13 ; $R_1 = R_2 = H$
crambescidine 800 (**M66**) n = 13 ; $R_1 = H$; $R_2 = OH$
céléromycaline (**M67**) n = 13 ; $R_1 = OH$; $R_2 = H$
crambescidine 786 (**M68**) n = 12 ; $R_1 = H$; $R_2 = OH$
crambescidine 814 (**M69**) n = 14 ; $R_1 = H$; $R_2 = OH$



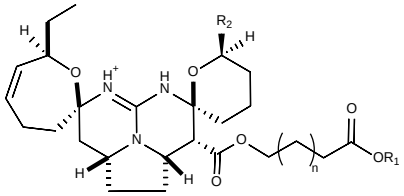
fromiamycaline (**M70**)



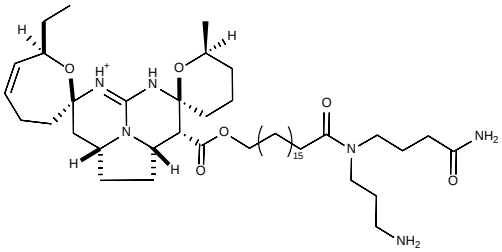
crambescidine 359 (**M71**) R = H
16*β*-hydroxycrambescidine 359 (**M72**) R = OH



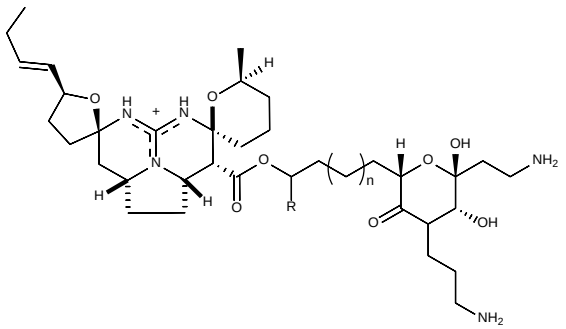
acide crambescidinique (**M73**) R = H
crambescidine 431 (**M74**) R = CH_2CH_3
ptilomycaline D (**M75**) R = $(CH_2)_{15}CH_3$



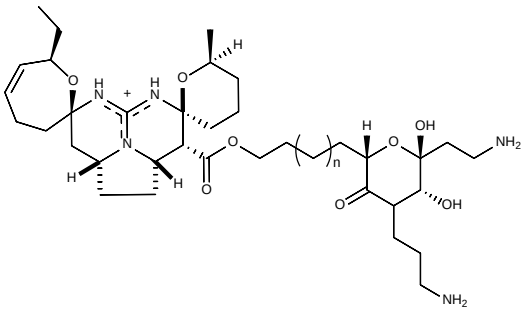
acide crambescidique (**M76**) n = 13 ; $R_1 = H$; $R_2 = CH3$
néofolitispate 1 (**M77**) n = 14 ; $R_1 = R_2 = CH_3$
néofolitispate 2 (**M78**) n = 13 ; $R_1 = R_2 = CH_3$
néofolistispate 3 (**M79**) n = 12 ; $R_1 = R_2 = CH_3$
acide norcrambescidique (**M80**) n = 13 ; $R_1 = R_2 = H$



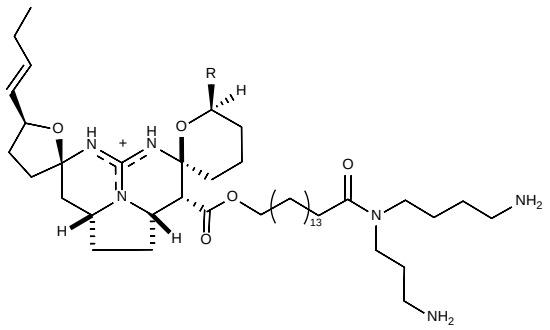
crambescidine 826 (**M81**)



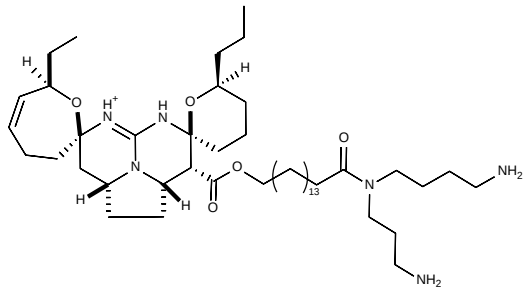
monanchocidine A (**M82**) R = CH_2CH_3 ; n = 11
monanchocidine D (**M85**) R = H ; n = 11
monanchocidine E (**M86**) R = CH_2CH_3 ; n = 10



monanchocidine B (**M83**) n = 11
monanchocidine C (**M84**) n = 12



monanchomycaline A (**M87**) R = $CH_2CH_2CH_3$
monanchomycaline B (**M88**) R = CH_3



monanchomycaline C (**M89**)

La plupart de ces alcaloïdes pentacycliques sont bioactifs. Ceux-ci sont pour la plupart cytotoxiques sur lignées cellulaires cancéreuses. Par exemple la **crambescidine 800** (**M66**) et la **ptilomycaline A** (**M65**) sont cytotoxiques sur 11 lignées cellulaires cancéreuses : DU-145 (prostate), IGROV (ovaire), SK-BR3 (sein), SK-MEL-28 (mélanome), A549 (poumon), L-562 (leucémie), PANCL (pancréas), HT29, LOVO, LOVO-DOX (colon), HeLa (col de l'utérus) avec des CI_{50} de 0,04 à 0,19 µg/mL. Ces deux molécules présentent également d'autres activités biologiques d'intérêt comme par exemple une activité antipaludique contre *Plasmodium falciparum* clone D6 et W2 (CI_{50} 0,1 µM pour les deux molécules sur les deux souches) ou encore une activité antivirale contre le virus humain VIH-1 (CE_{50} 0,01 µM pour la ptilomycaline A et 0,04 µM pour la crambescidine 800).

II.2 Etude chimique de l'éponge *Monanchora unguiculata* de Madagascar

L'étude chimique de l'éponge *Monanchora unguiculata* collectée à Madagascar a permis l'obtention de neuf composés (**MU1 – MU9**) : quatre composés connus, la crambescidine 359 (**MU1**), la crambescidine 800 (**MU2**), la fromiamycaline (**MU3**) et l'acide crambescidique (**MU4**) ainsi que cinq composés nouveaux, un alcaloïde guanidinique acyclique (**MU5**) et quatre composés guanidiniques pentacycliques (**MU6 – MU9**). Les techniques d'isolement et de purification, ainsi que l'élucidation structurale de ces composés sont exposées ci-après. L'isolement des molécules ayant était réalisée au moyen de solvants acidifiés (0,1% AF ou TFA), toutes les molécules ont été obtenues sous forme de sels.

II.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires

L'isolement des métabolites secondaires de l'éponge *Monanchora unguiculata* décrit ci-après, est illustré dans la **Figure 16**.

25,8 g de l'extrait brut dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v) de *Monanchora unguiculata* ont été fractionnés par CLMP sur une colonne de silice normale. L'élution a été réalisée au moyen d'un système de solvants de polarité croissante : isohexane 100 % ; isohexane / AcOEt 50/50 ; AcOEt 100 % ; AcOEt / méthanol 50/50 ; méthanol 100%. Cela a permis l'obtention de cinq fractions.

Les analyses par CCM et CLHP-DAD-SM des 5 fractions obtenues montrent que les fractions F1 et F2 sont majoritairement constituées de stérols et d'acides gras tandis que les fractions F3, F4 et F5 sont principalement constituées d'alcaloïdes avec deux composés majoritaires de masse *m/z* (ESI^+) 801,6 (**MU2**) et 869,7 (**MU6**).

- **Fractionnement de la fraction F3**

La fraction F3 (m = 1,911 g) a donc été soumise à un autre fractionnement par CLMP sur silice normale au moyen d'un gradient de solvant, isohexane/AcOEt/méthanol, de polarité croissante. Sept fractions ont ainsi été obtenues (F31 – F37). Un contrôle par CLPH-SM de ces sept fractions a montré que la fraction F36 (m = 619 mg), contenait le composé majoritaire **MU6**. Cette fraction a donc été sélectionnée et soumise à un troisième fractionnement par CLMP sur silice normale avec un gradient AcOEt/méthanol de polarité croissante. Trois fractions en ont été récupérées (F362 – F364). L'analyse par CLHP-SM de la fraction F363 a révélé la présence d'un mélange de deux composés, le composé **MU6** ainsi qu'un composé de masse *m/z* (ESI^+) 468,4 (**MU5**). Deux purifications successives ont été menées sur F363. Celles-ci ont été effectuées par CLHP-UV (205 nm) semi-préparative sur colonne en phase inverse (Waters Sunfire C18, 5 µm, 10 x 250 mm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Ces dernières purifications ont permis d'obtenir les deux composés **MU5** (m = 3,5 mg) et **MU6** (m = 14 mg).

- **Fractionnement de la fraction F4**

La fraction F4 (m = 3,168 g) a également été retravaillée. Elle a été soumise à un fractionnement par CLHP-UV (205 nm) préparative sur colonne en phase inverse (Waters Sunfire Préparative C18, 5 µm, 19 x 150 mm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Six fractions (F41 – F46) ont ainsi été collectées. F42 (m = 62 mg) a été fractionnée de nouveau par CLHP-UV (205 nm) sur colonne en phase inverse (Waters Sunfire C18, 5 µm, 10 x 250 mm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique pour donner quatre fractions (F421 – F424). La fraction F423 (m = 9 mg) contient le composé **MU1** (m = 5 mg), qui a été purifié par CLPH semi-préparative sur une colonne phase inverse (Waters Sunfire C18, 5 µm, 10 x 250 mm) éluée par un mélange de solvants isocratiques (35% ACN-H_2O + 0,1% TFA).

Un fractionnement par CLHP-UV semi-préparative sur colonne en phase inverse (Waters XBridge C18, 5 µm, 10 x 250 mm) a été effectué sur F43 (m = 245 mg) à l'aide d'un gradient de solvant eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique pour donner sept fractions (F431 – F437). La fraction F436 contient le composé **MU6** (m = 13 mg) pur. Les fractions F432, F433, F434 et F435 ont été rassemblées pour être travaillées de nouveaux par CLHP semi-préparative avec la même colonne mais en modifiant le pH ; un gradient eau + 0,1% TFA / acétonitrile + 0,1 % TFA a été utilisé. Cinq fractions ont été obtenues (F432a – F432e), F432d (m = 6 mg) étant un mélange des deux isomères **MU8** et **MU9** et F432e contenant le composé **MU6** (m = 9 mg) pur. F437 (m = 10 mg) a été purifiée selon la même méthode (CLHP semi-préparative, colonne Waters XBridge, ACN-H_2O +0,1% TFA), pour récupérer le composé **MU7** (2,7 mg).

La fraction F46 (m = 42 mg), qui contient le composé **MU4**, a également été soumis à une autre purification par CLHP-UV semi-préparative sur colonne en phase inverse (Phenomenex Gemini C18 5 µm, 10 x 250 mm) à l'aide d'un gradient de solvant eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. **MU4** pur a été obtenu à hauteur de 1,1 mg pur.

- **Fractionnement de la fraction F5**

La fraction F5 (m = 1,515 g) a été retravaillée par CLHP préparative sur colonne phase inverse (Waters Sunfire Préparative C18, 5 µm, 19 x 150 mm) éluée par un gradient eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % et 6 sous-fractions ont été collectées (F51 – F56). Les fractions F53 et F54, ayant un profil chromatographique proche, ont été rassemblées. Elles ont été soumises à un dernier fractionnement par CLHP semi-préparative sur colonne en phase inverse (Waters XBridge C18, 5 µm, 10 x 250 mm) avec un gradient eau + 0,1% TFA / acétonitrile + 0,1 % TFA. Trois sous-fractions ont ainsi été collectées (F53a – F53c), dont F53a contenant le composé **MU2** (m = 12 mg) et F53b contenant le composé **MU3** (2,6 mg).

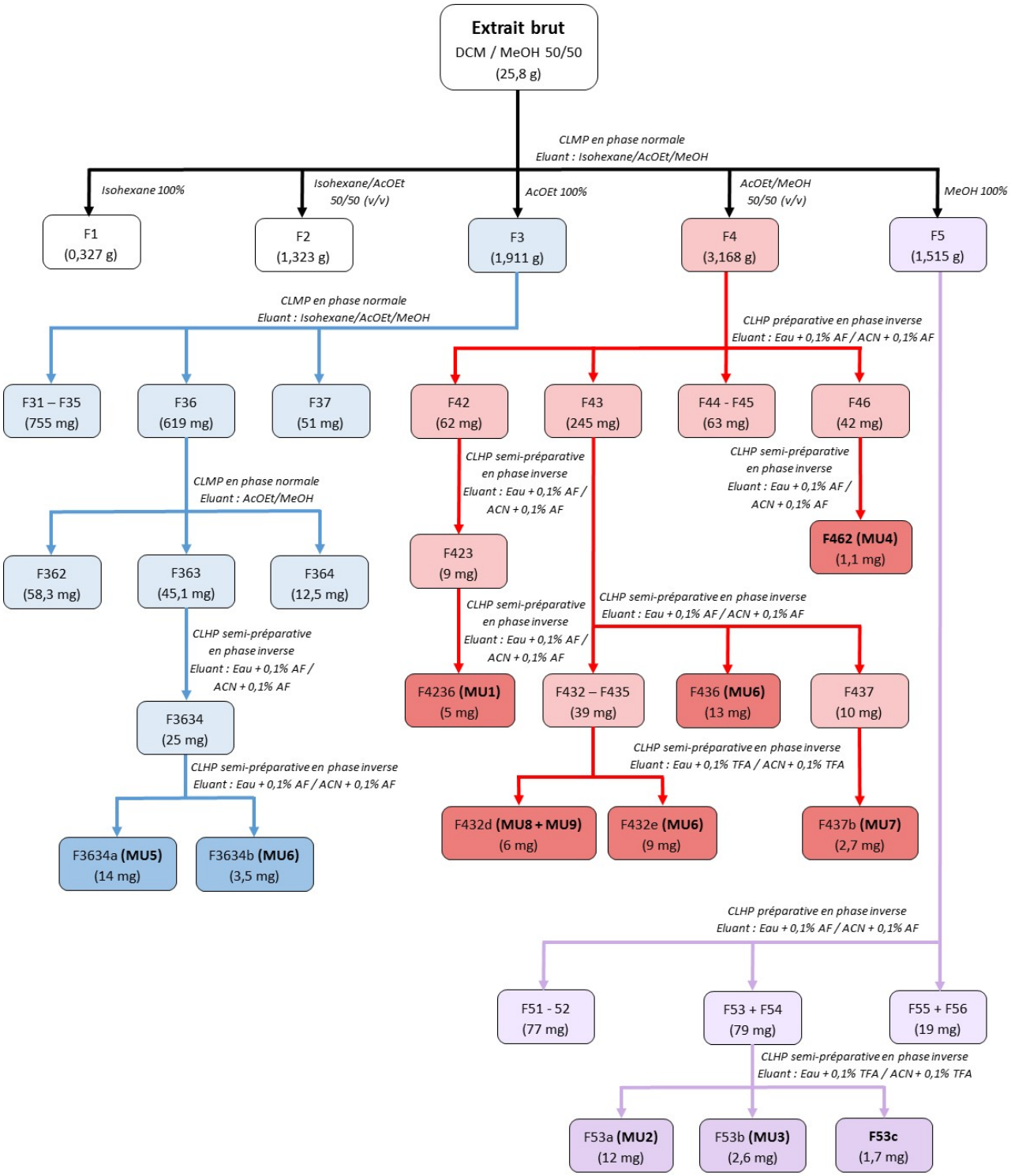


Figure 16 : *Fractionnement de Monanchora unguiculata pour l'obtention des métabolites **MU1** à **MU9**.*

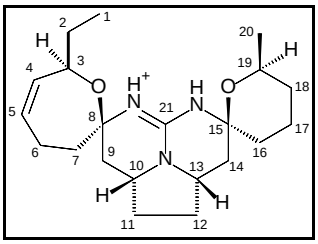
II.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires isolés

Les techniques spectrales classiques ont été employées pour l'identification des différents métabolites isolés :

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

Les résultats des analyses effectuées sont présentés ci-après. Les spectres RMN ^1H, ^{13}C et 2D des différents composés sont consignés dans l'annexe 2.

II.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite MU1



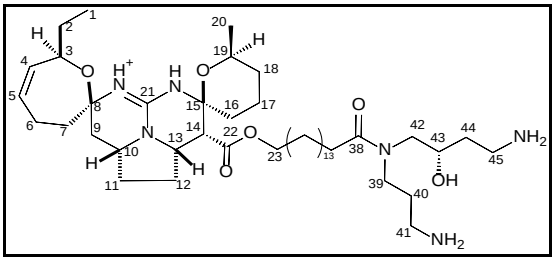
*crambescidine 359 (**MU1**)*

Le composé **MU1** a été isolé sous forme d'une huile incolore. Son spectre de masse SMHR en mode ESI^+ a révélé un ion moléculaire *m/z* à 360,26532 correspondant à la formule brute $C_{21}H_{34}N_3O_2^+$ (valeur calculée : m/z 360,2646) et proche de la valeur donnée dans la littérature pour la **crambescidine 359** (**M62**) (*m/z* 359,2567, Braeckman J. C. *et al.*, 2000). La comparaison de son spectre RMN ^1H avec les données disponibles dans la littérature (**Tableau IV**) a permis de conforter l'hypothèse de structure avancée par l'analyse en SMHR.

Tableau IV : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la crambescidine 359 (Braeckman J. C. et al., 2000) à ceux observés pour* ***MU1.***

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (mulitiplicité, *J* en Hz)	
	Littérature (600 MHz, $CDCl_3$)	**Observés (500 MHz, MeOD)**
1	0,81 (t, 7,3)	0,85 (t, 7,3)
2	1,50 (m) ; 1,42 (m)	1,46 (m)
3	4,49 (m)	4,35 (d, 11,0)
4	5,46 (d, 11,0)	5,51 (dt, 10,8 ; 2,0)
5	5,64 (dd, 11,0 ; 8,0)	5,72 (dd, 10,8 ; 7,5)
6	2,30 (m) ; 2,18 (m)	2,34 (m) ; 2,15 (dt, 17,4; 6,7)
7a	2,48 (m)	2,43 (t, 16,0)
7b	1,88 (m)	1,98 (dd, 14,0; 6,2)
8	-	-
9a	1,28 (dd, 13,0; 13,0)	1,47 (t, 12,4)
9b	2,53 (dd, 13,0, 5,0)	2,60 (dd, 12,9; 4,7)
10	3,98 (m)	4,04 (m)
11	2,27 (m) ; 1,65 (m)	2,32 (m) ; 1,69 (m)
12	2,27 (m) ; 2,16 (m)	2,32 (m) ; 1,71 (m)
13	3,98 (m)	4,04 (m)
14	2,16 (m) ; 1,42 (m)	2,15 (m) ; 1,52 (m)
15	-	-
16	1,75 (m) ; 1,57 (m)	1,75 (m) ; 1,59 (t, 12,4)
17	2,27 (m) ; 1,75 (m)	2,32 (m) ; 1,75 (m)
18	1,65 (m) ; 1,16 (m)	1,7 (m) ; 1,21 (m)
19	3,84 (m)	3,74 (m)
20	1,03 (d, 7,0)	1,08 (d, 6,2)
21	-	-

II.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite MU2



*crambescidine 800 (**MU2**)*

Le composé **MU2**, un des deux composés majoritaires, a été isolé sous forme d'une huile jaune. L'étude de son spectre SMHR obtenu en mode ESI$^+$ a révélé la présence d'un ion moléculaire à *m/z* 801,62323 compatible avec la formule brute $C_{45}H_{81}N_6O_6^+$ (valeur calculée : *m/z* 801,6218). Cet ion moléculaire correspond bien à une molécule mono-chargée de type $[m+H]^+$ en raison du deuxième pic du massif isotopique (^{13}C) de masse *m/z* 802,6262 ; cela est confirmé par la présence d'un pic à *m/z* 401,31567 correspondant à la forme dichargée de la molécule soit $[m+2H]^{2+}$, comme en atteste le second pic du massif isotopique à *m/z* 401,8172.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^{1}H de ce composé avec les données de la littérature (**Tableau V**) permet d'attribuer à **MU2** la structure de la **crambescidine 800** (**M66**).

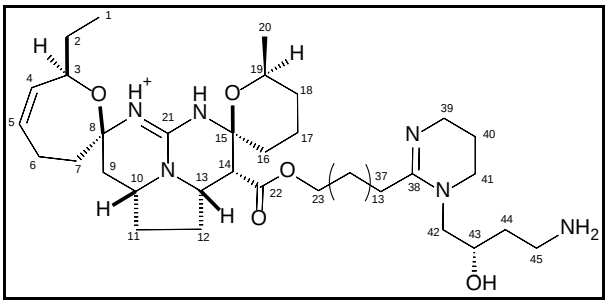
Celle-ci a été isolée pour la première fois en 1991 de l'éponge marine *Crambe crambe* par Jares-Erijman E. A. *et al*. (1991). Elle a, par la suite, été isolée plusieurs fois d'éponges appartenant au genre *Batzella* (Patil A. D. *et al*., 1995) et au genre *Monanchora* (Braeckman J. C. *et al*., 2000, Chang N. F. *et al.*, 2003 ; Hua H. M. *et al.*, 2007), ainsi que d'une étoile de mer, *Fromia monilis* (Palagiano E. *et al*. 1995).

Tableau V : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de la crambescidine 800 (Braeckman J. C. et al., 2000, Jares-Erijman E. A. et al., 1991) à ceux observés pour* ***MU2****.*

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (mulitiplicité, *J* Hz)		
	Littérature (600 MHz, $CDCl_3$)	**Littérature (300 MHz, MeOD)**	**Observés (500 MHz, MeOH)**
1	0,83 (t, 7,2)	(1)	0,85 (t, 7,1)
2a	1,48 (m)	(1)	1,46 (m)
2b	1,52 (m)	(1)	1,54 (dt, 7,1 ; 3,1)
3	4,49 (m)	(1)	4,44 (d, 9,8)
4	5,49 (dt, 10,5 ; 2,5)	(1)	5,50 (br d, 11,0)
5	5,67 (ddt, 10,5 ; 7,2 ; 2,5)	(1)	5,70 (br dd, 11,0 ; 7,6)
6a	2,16 (m)	(1)	2,14 (dt, 16,2 ; 6,5)
6b	2,34 (m)	(1)	2,41 (m)
7a	2,54 (m)	(1)	2,49 (m)
7b	1,92 (m)	(1)	1,91 (m)
8	-	(1)	-
9a	1,40 (t, 11,7)	(1)	1,41 (t, 12,6)
9b	2,56 (dd, 11,7 ; 3,6)	(1)	2,63 (dd, 12,9 ; 4,5)
10	4,02 (m)	(1)	4,03 (m)
11a	1,65 (m)	(1)	1,67 (m)
11b	2,27 (m)	(1)	2,31 (m)
12a	1,80 (m)	(1)	1,80 (m)
12b	2,27 (m)	(1)	2,31 (m)
13	4,30 (ddd, 10,0 ; 4,8 ; 4,9)	(1)	4,33 (dt, 9,6 ; 4,8)
14	2,94 (d, 4,8)	(1)	3,04 (d, 5,0)
15	-	(1)	-
16	Non attribué	(1)	Non attribué
17	Non attribué	(1)	Non attribué
18	Non attribué	(1)	Non attribué
19	3,93(m)	(1)	3,84 (m)
20	1,05 (d, 6,5)	(1)	1,08 (d, 6,2)
21	-	(1)	-
22	-	(1)	-
23	4,12 (m) ; 4,07 (m)	4,15 (m)	4,13 (m)
24	1,62 (m)	(1)	1,63 (m)
25-36	1,28 (m)	(1)	1,29 (m)
37		2,50 (m)	2,49 (m)
38	-	-	-
39	3,30 (m) ; 3,60 (m)	3,40 (m) ; 3,65 (m)	3,40 (m) ; 3,65 (m)
40	1,65 (m)	1,90 (m)	1,91 (m)
41	3,10 (m)	2,88 (m)	2,89 (m)
42	3,30 (m) ; 3,54 (m)	3,30 (m) ; 3,45 (m)	3,40 (m) ; 3,55 (m)
43	5,10 (m)	3,96 (m)	3,96 (m)
44	1,70 (m)	1,73 (m) ; 1,87 (m)	1,73 (m)
45	3,10 (m)	3,10 (m)	3,12 (m)

(1) *Déplacements chimiques non données par la littérature [Erijman E. A. et al., 1991]*

II.2.2.3 Elucidation structurale du métabolite MU3



*fromyamycaline (**MU3**)*

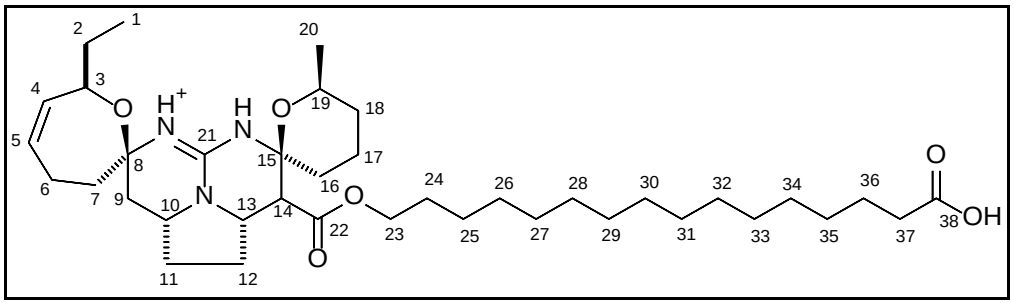
Le composé **MU3** a été isolé sous forme d'une huile jaune. L'étude de son spectre SMHR obtenu en mode ESI$^+$ a révélé la présence d'un ion moléculaire à *m/z* 783,60980 compatible avec la formule brute $C_{45}H_{79}N_6O_5^+$ (valeur calculée : *m/z* 783,6106). Cet ion moléculaire correspond bien à une molécule mono-chargée de type $[m+H]^+$ en raison du deuxième pic du massif isotopique (^{13}C) de masse *m/z* 784,61548 ; cela est confirmé par la présence d'un pic à *m/z* 392,30875 correspondant à la forme dichargée de la molécule soit $[m+2H]^{2+}$, comme en atteste le second pic du massif isotopique à *m/z* 392,81058.

La confrontation des analyses spectrales RMN ^1H de ce composé avec les données de la littérature (**Tableau VI**) permet d'attribuer à **MU3** la structure de la **fromiamycaline** (**M70**). Celle-ci a été isolée pour la première fois en 1991 de l'étoile de mer *Fromia monilis* par Palagiano E. *et al*. (1995). Elle a par la suite été isolée des éponges *Monanchora* sp. (Chang N. F. *et al.*, 2003) et *Monanchora arbuscula* (Laville R. *et al.*, 2009).

Tableau VI : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de la fromiamycaline (Palagiano E. et al., 1995) à ceux observés pour **MU3**.*

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (mulitiplicité, *J* en Hz)	
	Littérature (500 MHz, MeOD)	**Observés (500 MHz, MeOD)**
1	0,89 (t, 7,3)	0,85 (t, 7,2)
2	1,48 (m) ; 1,58 (m)	1,48 (m) ; 1,57 (m)
3	4,45 (brd, 10,3)	4,41 (brd, 10,3)
4	5,55 (brd, 10,5)	5,52 (brd, 11,0)
5	5,75 (brt, 9,5)	5,72 (brt, 7,5)
6	2,22 (m) ; 2,45 (m)	2,15 (m) ; 2,43 (m)
7	2,41 (m) ; 2,04 (dd, 13,4 ; 5,7)	2,39 (m) ; 1,98 (dd, 13,7 ; 6,1)
8	-	-
9	2,68 (dd) ; 1,45 (t)	2,65 (m) ; 1,42 (m)
10	4,08 (m)	4,06 (m)
11	2,32 (m) ; 1,60 (m)	2,29 (m) ; 1,60 (m)
12	2,38 (m) ; 1,85 (m)	2,34 (m) ; 1,82 (m)
13	4,38 (m)	4,36 (dt, 9,7 ; 5,5)
14	3,12 (d, 5,0)	3,08 (d, 5,0)
15	-	-
16	1,75 (m) ; 1,55 (m)	1,65 (m) ; 1,39 (m)
17	1,87 (m) ; 1,95 (m)	1,75 (m)
18	1,32 (m) ; 1,72 (m)	1,29 (m) ; 1,70 (m)
19	3,89 (m)	3,84 (m)
20	1,13 (d, 6,3)	1,10 (d, 6,1)
21	-	-
22	-	-
23	4,17 (t, 6,6)	4,14 (m)
24	1,63 (m)	1,65 (m)
25	1,32 (m)	1,32 (m)
26-34	1,32 (m)	1,32 (m)
35	1,32 (m)	1,32 (m)
36	2,1 (m)	1,66 (m)
37	2,80 (m)	2,75 (dt, 15,4 ; 8,0)
	2,52 (m)	2,50 (dd, 15,3 ; 7,3)
38	-	-
39	3,54 (m) ; 3,61 (m)	3,55 (m)
40	2,1 (m)	2,05 (m)
41	3,42 (m) ; 3,64 (m)	3,39 (m)
42	3,42 (dd, 14,0 ; 3,5) ;	3,60 (m)
	3,64 (dd, 14,0 ; 10,0)	3,35 (m)
43	4,08 (m)	4,04 (m)
44	1,88 (m) ; 1,78 (m)	1,84 (m) ; 1,74 (m)
45	3,16 (m)	3,12 (m)

II.2.2.4 Elucidation structurale du métabolite MU4



*acide crambescidique (**MU4**)*

Le composé **MU4** a été isolé sous forme d'une huile jaune. L'étude de son spectre SMHR obtenu en mode ESI^+ a révélé la présence d'un ion moléculaire à *m/z* 658,47943 compatible avec la formule brute $C_{38}H_{64}N_3O_6^+$ (valeur calculée : *m/z* 658,4790) et proche de la valeur donnée dans la littérature pour l'acide crambescidique (**M76**) (*m/z* 658,4781, Gallimore W. A. *et al.*, 2005) et pour le néofilitispate 3 (**M79**) (*m/z* 658, Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999).

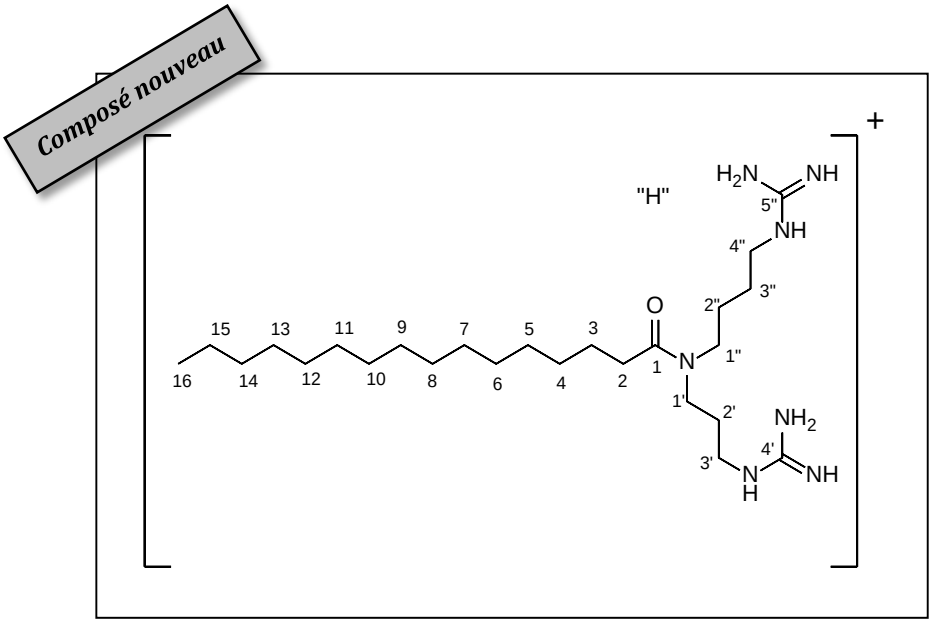
L'analyse de son spectre SM-SM révèle la perte d'un fragment de masse *m/z* 18, cette perte correspond à la perte d'une molécule d'H_2O, souvent observée pour les acides carboxyliques. L'analyse SM-SM tend vers l'hypothèse de l'acide crambescidique. La comparaison de son spectre RMN ^1H avec les données disponibles dans la littérature (**Tableau VII**) a permis de conforter l'hypothèse de structure avancée par l'analyse en SMHR et SM-SM, à savoir l'**acide crambescidique** (**M76**).

Il est a noté par ailleurs que la présence d'un singulet à 3,64 ppm sur le spectre RMN ^1H du composé **MU4** pourrait correspondre aux protons d'un groupement méthoxy. Ce singulet devrait alors intégrer pour 3H or, il n'intègre que pour 1,2H. Ce signal pourrait être attribué à un composé minoritaire détecté lors de l'analyse SMHR obtenu en mode ESI+ (*m/z* 672,4974), compatible avec la formule brute $C_{39}H_{66}N_3O_6^+$ (calculée : *m/z* 672,4952), correspondant à l'ester de méthyle de l'acide crambescidique, c'est-à-dire le néofolitispate 1 (Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999).

Tableau VII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H de l'acide crambescidique (Gallimore W. A. et al., 2005) à ceux observés pour* ***MU4.***

Position	δ_H, en ppm par rapport au TMS (mulitiplicité, *J* en Hz)	
	Littérature (500 MHz, MeOD)	**Observés (500 MHz, MeOD)**
1	0,85 (t, 7,3)	0,86 (t, 7,2)
2	1,46 (m)	1,48 (m)
3	4,41 (brd, 8,5)	4,40 (brd, 10,8)
4	5,50 (dt, 10,7 ; 2,0)	5,52 (brd, 10,9)
5	5,70 (brt)	5,72 (brt, 8,5)
6	2,16 (m)	2,17 (m)
7	2,43 (m) ; 1,94 (d, 13,2)	2,43 (m) ; 2,00 (dd, 13,9 ; 5,3)
8	-	-
9	2,62 (dd, 13,1 ; 4,8) 1,41 (d, 12,5)	2,65 (dd, 13,0 ; 4,7) 1,41 (m)
10	4,03 (m)	4,07 (m)
11	2,26 (m)	2,33 (m)
12	1,36 (m)	1,35 (m)
13	4,33 (dt, 9,2 ; 5,4)	4,36 (dt, 9,8 ; 5,9)
14	3,05 (d, 5,1)	3,09 (d, 4,9)
15	-	-
16	1,72 (m)	1,75 (m)
17	1,76 (m)	1,83 (m)
18	1,68 (m)	1,69 (m)
19	3,85 (m)	3,84 (m)
20	1,08 (d, 6,3)	1,10 (d, 6,2)
21	-	-
22	-	-
23	4,07 (dt, 10,9 ; 6,4) ; 4,18 (dt, 11,0 ; 6,4)	4,15 (t, 6,6)
24	1,63 (m)	1,64 (m)
25	1,59 (m)	1,60 (m)
26-35	1,29 (br s)	1,30 (br s)
36	1,36 (m)	1,30 (br s)
37	2,19 (t, 6,8)	2,27 (t, 7,1)
38	-	-

II.2.2.5 Elucidation structurale du métabolite MU5



*unguiculine A (**MU5**)*

D'aspect huileux et de couleur jaune, le composé **MU5** présente un spectre SMHR en mode ESI^+ avec un ion moléculaire à *m/z* 468,43820, en accord avec la formule brute $C_{25}H_{54}N_7O^+$ (valeur calculée : *m/z* 468,4384). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de trois.

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

- D'une chaîne carbonée aliphatique caractérisée par les déplacements chimiques des carbones C4 – C13 (δC 30,0 – 31,0), C14 (δC 33,0), C15 (δC 23,5), C16 (δC 14,2) et des protons H4 – H15 (δH 1,30) et H16 (δH 0,90).
- D'un carbone d'une fonction amide (δC 175,6)
- De deux carbones guanidiniques (δC 158,4)

Cette première approche met bien en évidence les 3 insaturations précédemment calculées : la fonction carbonyle de la fonction cétone et les deux fonctions imines des deux guanidines. Le composé **MU5** est donc linéaire et non cyclique.

Les corrélations hétéronucléaires longue distance (^1H – ^{13}C HMBC) semble indiquer que l'amide C-1 (δC 175,6) est substituée par 4 groupements méthylènes proche d'un azote (δC 43,8 ; 45,8 ; 46,0 ; 48,5) or, cela est impossible. En revanche, comme cela a été décrit par Othani I. *et al*. (1992) pour la ptilomycaline A, les amides tertiaires existent souvent sous forme de 2 rotamères. L'attribution a donc été faite en différenciant les rotamères **MU5a** et **MU5b**.

Pour le rotamère **MU5a** :

- Les corrélations hétéronucléaires (^1H – ^{13}C HMBC et ^1H – ^{13}C HSQC) montrent que l'amide C-1 est substitué par deux groupements méthylènes C-1' (δC 43,8 ; δH 3,41) et C-1" (δC 48,5 ; δH 3,37).
- Les corrélations homonucléaires (^1H – ^1H COSY) nous renseignent sur l'enchaînement des protons H-1' (δH 3,41), H-2' (δH 1,79) et H-3' (δH 3,15) corrélant respectivement avec les carbones C-1' (δC 43,8), C-2' (δC 28,0) et C-3' (δC 39,8) et des protons H-1" (δH 3,37), H-2" (δH 1,64), H-3" (δH 1,57) et H-4" (δH 3,21) corrélant respectivement avec les carbones C-1" (δC 48,5), C-2" (δC 26,9), C-3" (δC 26,8) et C-4" (δC 41,9). Les protons H-2" et H-3" ont des déplacements chimiques très proche, ce qui rend leur corrélation COSY difficilement visible car très proche de la diagonale. En revanche, leur position est confirmée par la corrélation HMBC entre H-3" et C-2".
- Les corrélations hétéronucléaires (^1H – ^{13}C HMBC) montrent que les protons H-3' sont corrélés avec C-4' (δC 158,4), le méthylène C-3' est donc relié à l'amine d'un groupement

guanidine. Il en est de même pour les protons H-4" qui sont corrélés avec C-5" (δC 158,4), le méthylène C-4" est donc relié à l'amine d'un groupement guanidine.

- Les analyses bidimensionnelles COSY et HMBC montrent que le carbonyle C-1 est relié à un groupement méthylène C-2 (δC 33,7 ; δH 2,38) lui-même relié à un second groupement méthylène C-3 (δC 26,4 ; δH 1,61). Le carbone C-3 est couplé aux protons caractéristiques d'une chaîne aliphatique, H-4 à H-15 (δH 1,30) se terminant par un groupement méthyle C-16 (δC 14,2 ; δH 0,90).
- Le nombre de méthylènes dans la chaîne aliphatique a pu être déterminé grâce à la masse de la molécule (*m/z* 468,43820) afin de correspondre avec la formule brute $C_{25}H_{54}N_7O^+$. Celle-ci est constituée de 14 carbones méthyléniques.

Pour le rotamère **MU5b**, le même raisonnement a été suivi. On peut ainsi observer quelques différences dans les déplacements chimiques des protons et des carbones du motif spermidine, c'est-à-dire des deux chaînes substituant l'amide. Ainsi, grâce aux analyses bidimensionnelles, COSY, HSQC et HMBC, les attributions suivantes ont pu être effectuées : C-1' (δC 46,0 ; δH 3,42), C-2' (δC 28,9 ; δH 1,89), C-3' (δC 39,5 ; δH 3,21), C-1" (δC 45,8 ; δH 3,37), C-2" (δC 26,9 ; δH 1,64), C-3" (δC 26,8 ; δH 1,57) et C-4" (δC 41,9 ; δH 3,21).

De structure nouvelle, **MU5** a été nommé **unguiculine A.**

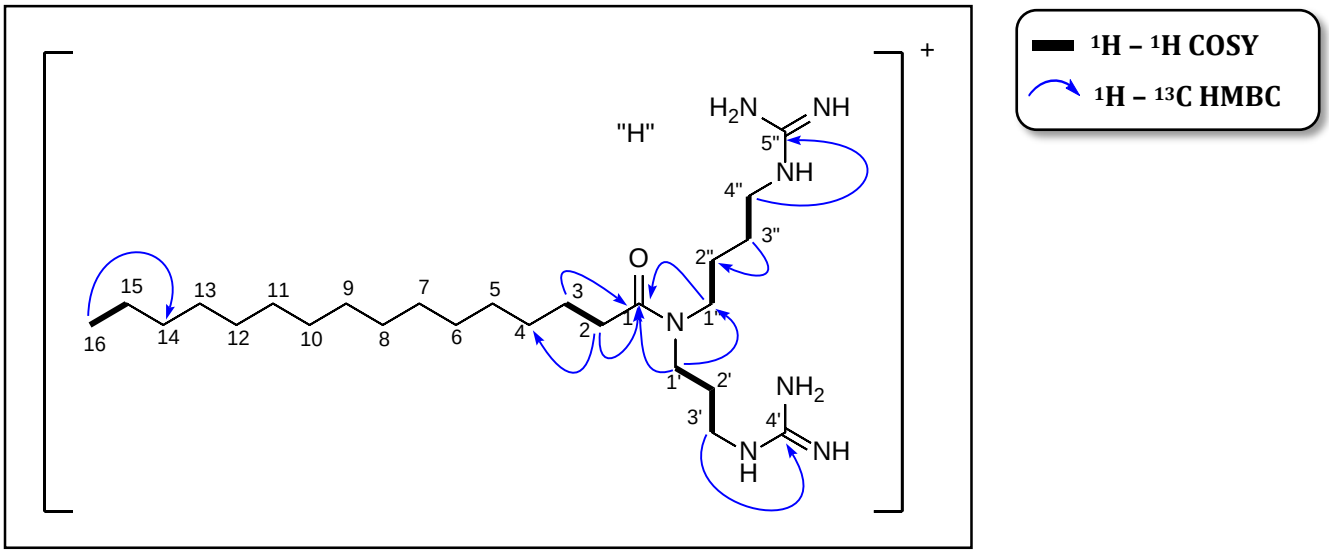


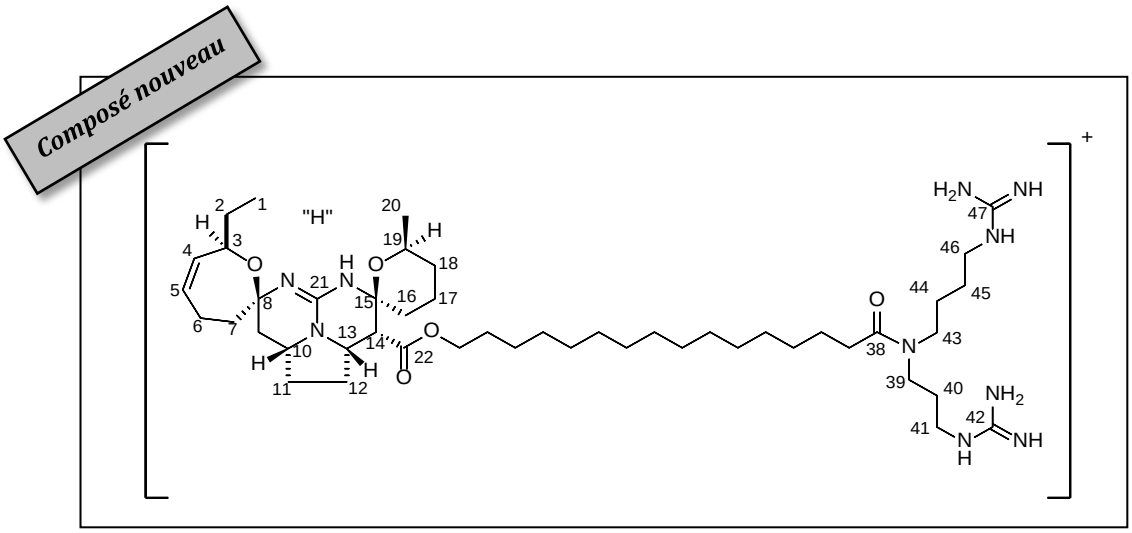
Figure 17 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU5**.*

Tableau VIII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **MU5** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1	175,6, C	-	-	-
2	33,7, CH_2	2,38 (t, 7,1)	H3	1, 3, 4
3	26,4, CH_2	1,61 (m)	H2	1, 2, 4
4 – 13	30,0 – 31,0, CH_2	1,30 (m)	-	-
14	33,0, CH_2	1,30 (m)	-	15, 16
15	23,5, CH_2	1,31 (m)	H16	14, 16
16	14,2, CH_3	0,90 (t, 6,9)	H15	14, 15
1'	43,8, CH_2 (MU5a)	3,41 (m) (MU5a)	H2'	1, 2', 3', 1"
	46,0, CH_2 (MU5b)	3,42 (m) (MU5b)		
2'	28,0, CH_2 (MU5a)	1,79 (quint, 6,8) (MU5a)	H1', H3'	1', 3'
	28,9, CH_2 (MU5b)	1,89 (quint, 7,0) (MU5b)		
3'	39,8, CH_2 (MU5a)	3,15 (t, 6,9) (MU5a)	H2'	1', 2', 4'
	39,5, CH_2 (MU5b)	3,21 (t, 6,8) (MU5b)		
4'	158,4, C	-	-	-
1"	48,5, CH_2 (MU5a)	3,37 (m) (MU5a)	H2"	1, 2"
	45,8, CH_2 (MU5b)	3,37 (m) (MU5b)		
2"	26,9, CH_2	1, 64 (m)	H1"	1"
3"	26,8, CH_2	1,57 (m)	H4"	2"
4"	41,9, CH_2	3,21 (t, 6,8)	H3"	2", 3", 5"
5"	158,4, C	-	-	-

II.2.2.6 Elucidation structurale du métabolite MU6



*ptilomycaline E (**MU6**)*

Le composé **MU6,** second composé majoritaire, isolé sous la forme d'une huile jaune, présente un spectre SMHR en mode ESI^+ avec un ion moléculaire à *m/z 8*69,67041, en accord avec la formule brute $C_{47}H_{85}N_{10}O_5^+$ (valeur calculée *m/z* : 869,6699). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 10.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (**Tableau IX**) met en évidence la présence de deux motifs distincts :

- Une structure pentacyclique (motif A) identique à la crambescidine 800 et la fromiamycaline (**Figure 18**), avec la présence de signaux caractéristiques comme :
    - La présence des deux groupements méthyles C-1 (δC 10,9 ; δH 0,87) et C-20 (δC 21,9 ; δH 1,10).
    - La présence des sept groupements méthynes C-3 (δC 72,2 ; δH 4,45), C-4 (δC 134,4 ; δH 5,52), C-5 (δC 131,2 ; δH 5,72), C-10 (δC 55,4 ; δH 4,06), C-13 (δC 53,9 ; δH 4,36), C-14 (δC 51,2 ; δH 3,06) et C-19 (δC 68,3 ; δH 3,87).
- Un motif spermidine relié à un amide et deux guanidines (motif B), identique à l'unguiculine A (**MU5**) (**Figure 18**), et comme pour celle-ci, présent sous forme de deux rotamères distincts. Ce motif est caractérisé par des signaux particuliers :
    - Le carbonyle de l'amide C-38 (δC 175,7).
    - Les deux carbones quaternaires des guanidines C-42 et C-47 (δC 158,7).
    - Quatre groupements méthylènes proche d'azotes pour chacun des deux rotamères :

        Pour MU6a, C-39 (δC 44,2 ; δH 3,42), C-41 (δC 40,1 ; δH 3,18), C-43 (δC 49,0 ; δH 3,40) et C-46 (δC 42,1 ; δH 3,23).

        Pour MU6b, C-39 (δC 46,1 ; δH 3,43), C-41 (δC 39,8 ; δH 3,23), C-43 (δC 46,3 ; δH 3,40) et C-46 (δC 42,1 ; δH 3,23).

Le motif A compte 7 insaturations et le motif B en compte 3. Ces deux parties de la molécule regroupent donc les 10 insaturations calculées précédemment.

En outre, les corrélations hétéronucléaires HMBC (^{1}H – ^{13}C) permettent de relier ces deux motifs entre eux par une chaîne carbonée aliphatique. Celle-ci est caractérisée par la présence d'un méthylène C-23 (δC 66,5 ; δH 4,14) couplé au carbonyle du groupement ester C22 (δC 170,1), et d'un méthylène C-37 (δC 33,9 ; δH 2,40) couplé au carbonyle du groupement amide C38. La chaîne ne possède pas de ramification, elle est uniquement composée de méthylènes présentant le même déplacement chimique C-25 – C-35 (δC 30,0 – 31,0 ; δH 1,31).

Le nombre de méthylènes dans la chaîne aliphatique a pu être déterminé grâce à la masse de la molécule (*m/z* 869,67041) afin de correspondre avec la formule brute $C_{47}H_{85}N_{10}O_5^+$. Celle-ci est constituée de 15 carbones méthyléniques.

De structure nouvelle mais proche de celle de la ptilomycaline A (**M58**), MU6 a été nommé **ptilomycaline E**.

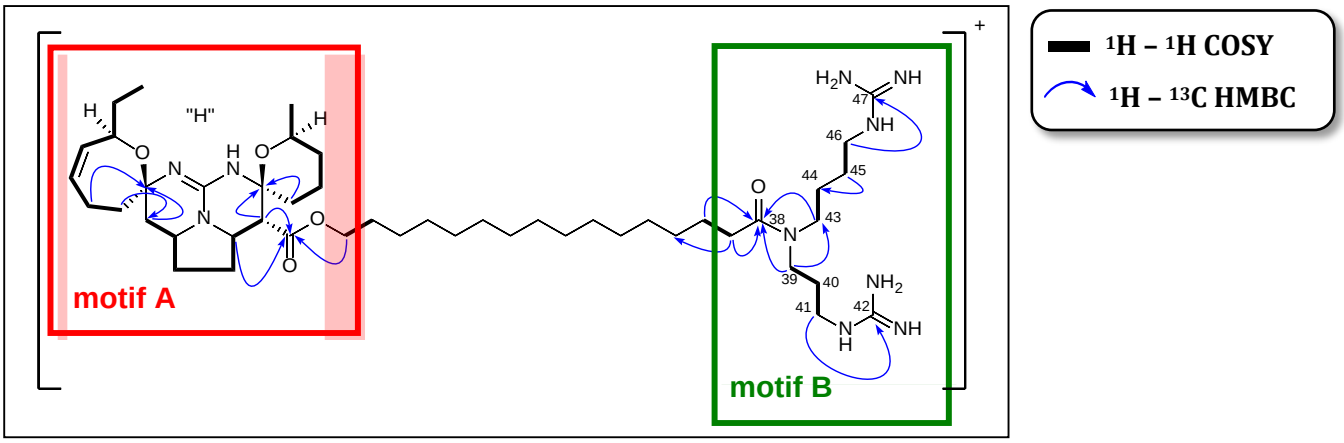


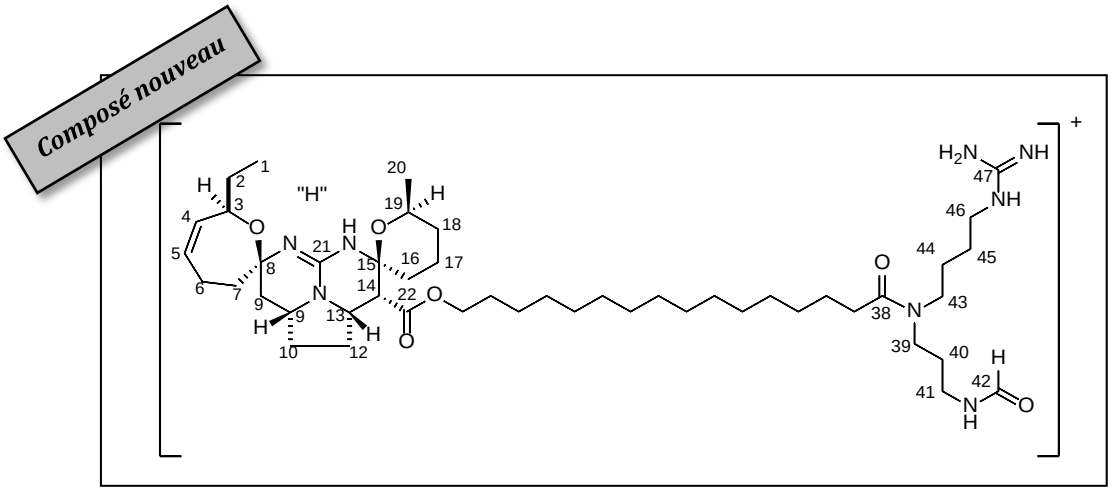
Figure 18 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU6**.*

Tableau IX : *Données de la RMN 1D et 2D pour **MU6** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	10,9, CH_3	0,87 (t, 7,3)	H2	2, 3
2	29,6, CH_2	1,47 (m)	H1, H3	1, 3, 4
3	72,2, CH	4,45 (brd, 9,4)	H2, H4	2
4	134,4, CH	5,52 (brd, 11,0)	H5	2, 3, 6
5	131,2, CH	5,72 (brdd, 9,9 ; 7,8)	H4, H6a	3, 6, 7
6	24,5, CH_2	2,17 (m) ; 2,46 (m)	H5, H7	4, 5, 7, 8
7	37,9, CH_2	2,00 (m) ; 2,49 (m)	H6	5, 6, 8, 9
8	85,1, C	-	-	-
9	37,8, CH_2	1,43 (m) ; 2,65 (dd, 13,0 ; 4,8)	H10	7, 8, 10
10	55,4, CH	4,06 (m)	H9, H11	-
11	31,5, CH_2	1,61 (m) ; 2,31 (m)	H10, H12	9, 10
12	27,6, CH_2	1,83 (m) ; 2,33 (m)	H11, H13	10, 11, 13, 14
13	53,9, CH	4,36 (dt, 9,2 ; 5,4)	H12, H14	12, 14, 22
14	51,2, CH	3,06 (d, 5,1)	H13, H15	13, 15, 16, 22
15	82,1, C	-	-	-
16	32,8, CH_2	1,72 (m)	H17	14, 15, 17
17	19,4, CH_2	1,78 (m) ; 2,00 (m)	H16, H18	16, 18
18	33,0, CH_2	1,28 (m) ; 1,72 (m)	H17, H19	17, 19, 20
19	68,3, CH_2	3,87, (m)	H18, H20	20
20	21,9, CH_3	1,10 (d, 6,2)	H19	18, 19
21	150,4, C	-	-	-
22	170,1, C	-	-	-
23	66,5, CH_2	4,14 (m)	H24	22, 24
24	27,0, CH_2	1,66 (m)	H23, H25	23
25 – 35	30,0 – 31,0, CH_2	1,31 (m)	-	-
36	26,7, CH_2	1,63 (m)	H35, H37	37, 38
37	33,9, CH_2	2,40 (m)	H36	36, 38
38	175,7, C	-	-	-
39	44,2, CH_2 (MU6a) 46,1, CH_2 (MU6b)	3,42 (m) (MU6a) 3,43 (m) (MU6b)	H40	38, 40, 41, 43
40	28,2, CH_2 (MU6a) 29,2, CH_2 (MU6b)	1,82 (m) (MU6a) 1,90 (m) (MU6b)	H39, H41	39, 41
41	40,1, CH_2 (MU6a) 39,8, CH_2 (MU6b)	3,18 (t, 6,7) (MU6a) 3,23 (m) (MU6b)	H40	39, 40, 42
42	158,7, C	-	-	-
43	49,0, CH_2 (MU6a) 46,3, CH_2 (MU6b)	3,40 (m) (MU6a) 3,40 (m) (MU6b)	H44	38, 44
44	27,1, CH_2	1,66 (m)	H43	43
45	27,1, CH_2	1,61 (m)	H46	44
46	42,1, CH_2	3,23 (m)	H45	44, 45, 47
47	158,7, C	-	-	-

II.2.2.7 Elucidation structurale du métabolite MU7



*ptilomycaline F (**MU7**)*

Le composé **MU7,** isolé sous la forme d'une huile jaune, présente un spectre SMHR en mode ESI$^+$ avec un ion moléculaire $[m+2H]^{2+}$ à *m/z* 428,32483 en accord avec la formule brute $C_{47}H_{84}N_8O_6^{2+}$, (valeur calculée : *m/z* 428,3255). Sous sa forme monochargée $[m+H]^+$, MU7 a une masse moléculaire calculée de *m/z* 855,6430. Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 10.

Comme pour **MU6**, l'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C (**Tableau X**) a mis en évidence la présence d'une structure pentacyclique (motif A) identique à celle de la crambescidine 800 et la fromiamycaline (**Figure 19**), avec la présence de signaux caractéristiques comme :

- La présence des deux groupements méthyles C-1 (δC 10,8 ; δH 0,85) et C-20 (δC 21,8 ; δH 1,10).
- La présence des sept groupements méthynes C-3 (δC 72,3 ; δH 4,45), C-4 (δC 134,3 ; δH 5,52), C-5 (δC 131,3 ; δH 5,72), C-10 (δC 55,6 ; δH 4,07), C-13 (δC 54,2 ; δH 4,36), C-14 (δC 50,7 ; δH 3,08) et C-19 (δC 68,4 ; δH 3,83).

En revanche, la structure de **MU7** diffère de celle de **MU6** au niveau de la seconde partie de la molécule (motif B). En effet, les corrélations hétéronucléaires ^{1}H – ^{13}C HMBC indiquent bien la présence d'un motif spermidine comme pour **MU6**, mais la chaîne propyle présente une fonction formamide et non plus un motif guanidine. Le méthylène H-41 (**MU7a** : δ_H 3,26 ; **MU7b** : δ_H 3,21) est corrélé avec un carbone tertiaire C-42 (**MU7a** : δ_C 164,0 ; **MU7b** : δ_C 163,9) et le proton H-42 (**MU7a** : δ_H 8,08 ; **MU7b** : δ_H 7,98), caractéristique d'un groupement formamide, est corrélé avec C-41 (**MU7a** : δ_C 36,5 ; **MU7b** : δ_C 36,6). Les déplacements chimiques et les corrélations de la chaîne butyle sont, identiques à ceux de la chaîne butyle de **MU6,** cette chaîne se termine donc par

un motif guanidine C-47 (δC 158,7). Enfin, les protons H-39 (δH 3,36) et H-43 (δH 3,36) sont corrélés avec le carbonyle du groupement amide C-38 (δC 175,7).

Les corrélations hétéronucléaires ^{1}H – ^{13}C HMBC permettent par ailleurs de relier les deux motifs A et B de la molécule entre elles par une chaîne carbonée aliphatique. Celle-ci est caractérisée par la présence d'un méthylène C-23 (δC 66,5 ; δH 4,14) couplé au carbonyle du groupement ester C22 (δC 170,2), et d'un méthylène C-37 (δC 34,0 ; δH 2,37) couplé au carbonyle du groupement amide C38. La chaîne ne possède pas de ramification, elle est uniquement composée de méthylènes présentant le même déplacement chimique C-25 – C-35 (δC 30,0 – 31,0 ; δH 1,31).

Le nombre de méthylènes dans la chaîne aliphatique a pu être déterminé grâce à la masse de la molécule (*m/z* 428,32483) afin de correspondre à la formule brute $C_{47}H_{84}N_8O_6^{2+}$. Celle-ci est constituée de 15 carbones méthyléniques, comme pour **MU6**.

De structure nouvelle, proche de celle de la ptilomycaline E (**MU6**), **MU7** a été nommé **ptilomycaline G**.

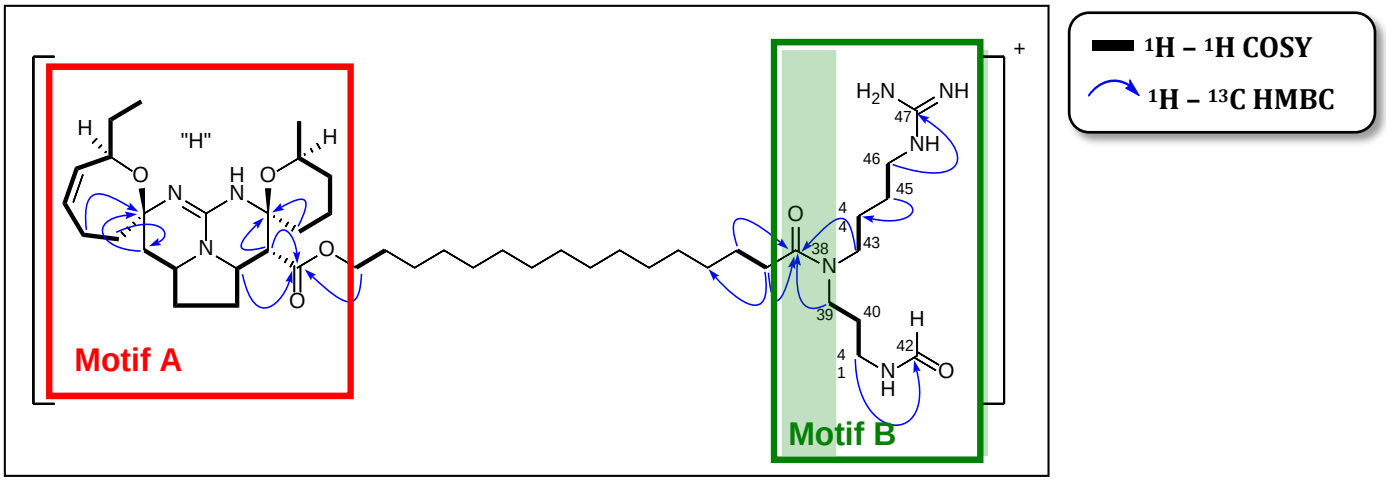


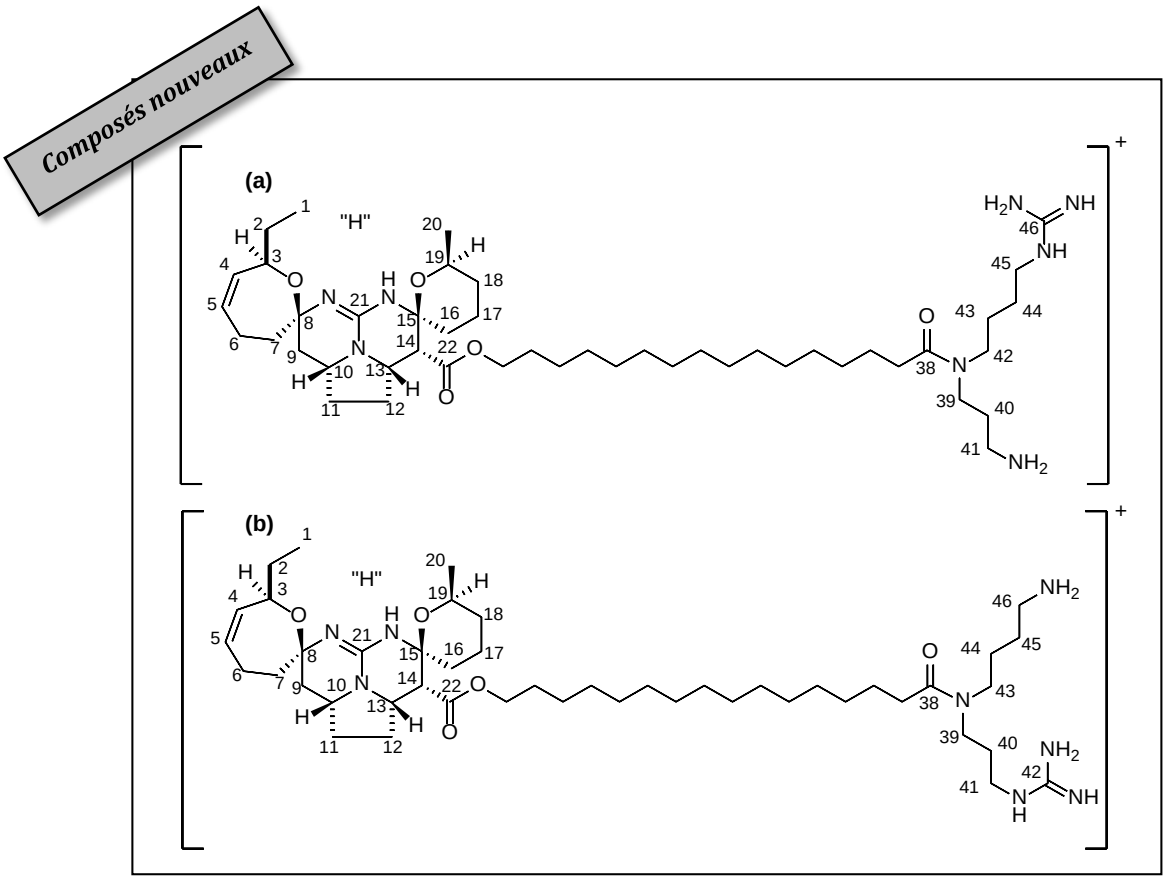
Figure 19 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU7**.*

Tableau X : *Données de la RMN 1D et 2D pour **MU7** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1	10,8, CH_3	0,85 (t, 7,3)	H2	2, 3
2	30,3, CH_2	1,47 (m) ; 1,56 (m)	H1, H3	1, 3, 4
3	72,3, CH	4,45 (brd, 9,5)	H2, H4	2
4	134,3, CH	5,52 (brd, 11,0)	H5	2, 3, 6
5	131,3, CH	5,72 (m)	H4, H6a	3, 6, 7
6	24,5, CH_2	2,16 (m) ; 2,44 (m)	H5, H7	4, 5, 7, 8
7	38,2, CH_2	2,00 (m) ; 2,36 (m)	H6	5, 6, 8, 9
8	85,1, C	-	-	-
9	37,8, CH_2	1,42 (m) ; 2,65 (dd, 12,9 ; 4,8)	H10	7, 8, 10
10	55,6, CH	4,07 (m)	H9, H11	-
11	31,4, CH_2	1,61 (m) ; 2,31 (m)	H10, H12	9, 10
12	27,5, CH_2	1,82 (m) ; 2,35 (m)	H11, H13	10, 11, 13, 14
13	54,2, CH	4,36 (dt, 9,5 ; 5,6)	H12, H14	12, 14, 22
14	50,7, CH	3,08 (d, 5,0)	H13, H15	13, 15, 16, 22
15	82,2, C	-	-	-
16	32,9 CH_2	1,70 (m)	H17	14, 15, 17
17	19,4, CH_2	1,82 (m) ; 1,77 (m)	H16, H18	16, 18
18	32,9, CH_2	1,29 (m) ; 1,70 (m)	H17, H19	17, 19, 20
19	68,4, CH2	3,83 (m)	H18, H20	20
20	21,8, CH_3	1,10 (d, 6,2)	H19	18, 19
21	150,4, C	-	-	-
22	170,2, C	-	-	-
23	66,5, CH_2	4,14 (m)	H24	22, 24
24	29,6, CH_2	1,66 (m)	H23, H25	23
25 – 35	30,0 – 31,0, CH_2	1,31 (m)	-	-
36	26,8, CH_2	1,60 (m)	H35, H37	37, 38
37	34,0, CH_2	2,37 (m)	H36	36, 38
38	175,7, C	-	-	-
39	46,9, CH_2	3,36 (m)	H40	38, 40, 41, 43
40	30,0, CH_2	1,82 (m)	H39, H41	39, 41
41	36,5, CH_2(MU7a) 36.6, CH_2 (MU7b)	3.26, t (6.8) (MU7a) 3.21, t (6.8) (MU7b)	H40	39, 40, 42
42	163.9, CH (MU7a) 164.0, CH (MU7b)	8,08, s (MU7a) 7.98, s (MU7b)	-	41
43	46,2, CH_2	3,36 (m)	H44	38, 44
44	25,8, CH_2	1,60 (m)	H43	43
45	27,1, CH_2	1,62 (m)	H46	44
46	42,1, CH_2	3,21 (m)	H45	44, 45, 47
47	158,7, C	-	-	-

II.2.2.8 Elucidation structurale des métabolites MU8 et MU9



*ptilomycaline G (**MU8**) **(a)** et ptilomycaline H (**MU9**) **(b)***

Les composés **MU8** et **MU9**, isolés sous la forme d'un mélange huileux jaune, sont des isomères de structures. Ils présentent un spectre SMHR en mode ESI$^+$ avec un ion moléculaire $[m+H]^+$ à *m/z* 827,64819 en accord avec la formule brute $C_{46}H_{83}N_8O_5^+$, (valeur calculée : *m/z* 827,6481). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute des composés est de 9.

Comme pour **MU6** et **MU7**, l'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C (**Tableaux XI** et **XII**) a mis en évidence la présence d'une structure pentacyclique (motif A) identique à la crambescidine 800 et la fromiamycaline (**Figures 20** et **21**), avec la présence de signaux caractéristiques comme :

- La présence des deux groupements méthyles C-1 (δC 10,7 ; δH 0,85) et C-20 (δC 21,7 ; δH 1,09).
- La présence des sept groupements méthynes C-3 (δC 72,1 ; δH 4,41), C-4 (δC 134,1 ; δH 5,51), C-5 (δC 131,1 ; δH 5,71), C-10 (δC 55,4 ; δH 4,06), C-13 (δC 54,0 ; δH 4,35), C-14 (δC 50,7 ; δH 3,07) et C-19 (δC 68,2 ; δH 3,83).

En revanche, la structure de **MU8** et **MU9** diffèrent au niveau de la seconde partie de la molécule (motif B).

- **Elucidation structurale de MU8**

Les corrélations homonucléaires COSY (^{1}H – ^{1}H) et hétéronucléaires HMBC (^{1}H – ^{13}C) indiquent bien la présence d'un motif spermidine comme pour **MU6**. Les déplacements chimiques et les corrélations de la chaîne butyle sont identiques à ceux de la chaîne butyle de **MU6,** cette chaîne se termine donc par un motif guanidine C-47 (δC 158,5). La différence se trouve au niveau de la chaîne propyle. L'analyse SMHR a permis de déterminer la formule brute de **MU8** et ainsi savoir que cette molécule possède un carbone, un oxygène et une insaturation en moins par rapport à **MU7**, ce qui correspond à la fonction carbonyle du groupement formamide de **MU7**. Le groupement méthylène C-41 (δC 38,0 ; δH 2,98) n'est, par ailleurs, corrélé avec aucun carbone tertiaire ou quaternaire ; cette chaîne ne se termine donc pas par un groupement guanidine ou formamide comme les deux molécules précédentes (**MU6** et **MU7**) mais par une amine primaire. Enfin, les protons H-39 (δH 3,42) et H-42 (δH 3,38) sont corrélés avec le carbonyle du groupement amide C-38 (δC 176,3).

Les corrélations hétéronucléaires HMBC (^{1}H – ^{13}C) permettent de relier les deux parties de la molécule entre elles par une chaine carbonée aliphatique. Celle-ci est caractérisée par la présence d'un méthylène C-23 (δC 66,4 ; δH 4,14) couplé au carbonyle du groupement ester C22 (δC 170,0), et d'un méthylène C-37 (δC 33,7 ; δH 2,39) couplé au carbonyle du groupement amide C38. La chaîne ne possède pas de ramification, elle est uniquement composée de méthylènes présentant le même déplacement chimique C-25 – C-35 (δC 30,0 – 31,0 ; δH 1,31).

Le nombre de méthylènes dans la chaîne aliphatique a pu être déterminé grâce à la masse de la molécule (*m/z* 827,64819) afin de correspondre avec la formule brute $C_{46}H_{83}N_8O_5^+$. Celle-ci est constituée de 15 carbones méthyléniques.

De structure nouvelle, proche de celles des ptilomycalines E (**MU6**) et F (**MU7**), **MU8** a été nommée **ptilomycaline G**.

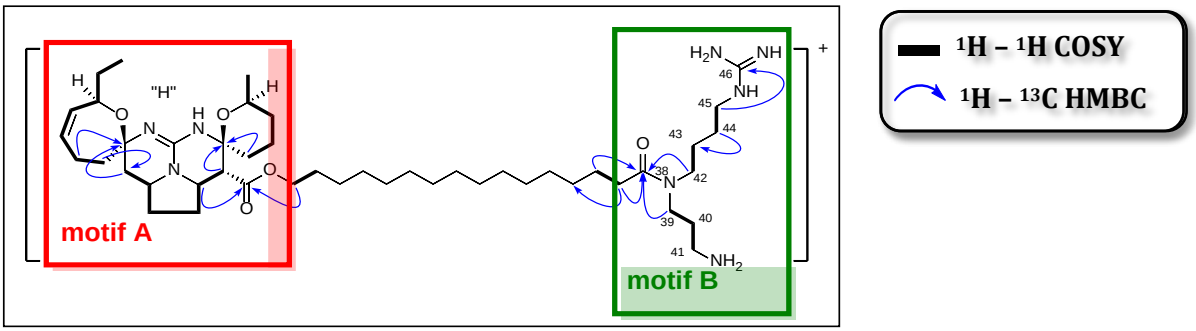


Figure 20 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU8**.*

Tableau XI : *Données de la RMN 1D et 2D pour **MU8** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	10,7, CH_3	0,85, (t, 7,3)	H2	2, 3
2	30,1, CH_2	1,46 (m) ; 1,55 (m)	H1, H3	1, 3, 4
3	72,1, CH	4,41 (brd, 10,3)	H2, H4	2
4	134,1, CH	5,51 (brd 10,9)	H5	2, 3, 6
5	131,1, CH	5,71 (m)	H4, H6a	3, 6, 7
6	24,3, CH_2	2,16 (m) ; 2,42 (m)	H5, H7	4, 5, 7, 8
7	38,0, CH_2	1,98 (m) ; 2,38 (m)	H6	5, 6, 8, 9
8	84,9, C	-	-	-
9	37,7, CH_2	1,42 (m) ; 2,64 (dd, 12,8 ; 4,7)	H10	7, 8, 10
10	55,4, CH	4,06 (m)	H9, H11	-
11	31,3, CH_2	1,60 (m) ; 2,30 (m)	H10, H12	9, 10
12	27,4, CH_2	1,81 (m) ; 2,32 (m)	H11, H13	10, 11, 13, 14
13	54,0, CH	4,35 (dt 9,7 ; 5,3)	H12, H14	12, 14, 22
14	50,7, CH	3,07 (d, 5,0)	H13, H15	13, 15, 16, 22
15	81,9, C	-	-	-
16	32,7, CH_2	1,70 (m)	H17	14, 15, 17
17	19,2, CH_2	1,82 (m) ; 1,76 (m)	H16, H18	16, 18
18	32,8, CH_2	1,28 (m) ; 1,70 (m)	H17, H19	17, 19, 20
19	68,2, CH2	3,83 (m)	H18, H20	20
20	21,7, CH_3	1,09 (d, 6,1)	H19	18, 19
21	150,3, C	-	-	-
22	170,0, C	-	-	-
23	66,4, CH_2	4,14 (m)	H24	22, 24
24	29,4, CH_2	1,65 (m)	H23, H25	23
25 – 35	30,0 – 31,0, CH_2	1,31 (m)	-	-
36	26,6, CH_2	1,60 (m)	H35, H37	37, 38
37	33,7, CH_2	2,39 (m)	H36	36, 38
38	176,3, C	-	-	-
39	46,1, CH_2 (8a) 43,0, CH_2 (8b)	3,42 (m) (8a) 3,46 (t, 6,5) (8b)	H40	38, 40, 41, 43
40	27,9, CH_2 (8a) 26,6, CH_2 (8b)	1,95 (m) (8a) 1,90 (m) (8b)	H39, H41	39, 41
41	38,0, CH_2 (8a) 37,9, CH_2 (8b)	2,98 (m) (8a) 2,88 (t, 6,9) (8b)	H40	39, 40
42	48,5, CH_2	3,38 (s)	H43	38, 43
43	26,6, CH_2	1,68 (m)	H42	42
44	26,8, CH_2	1,60 (m)	H45	43
45	42,0, CH_2	3,22 (m)	H44	43, 44, 46
46	158,5, C	-	-	-

➢ Elucidation structurale de MU9

Les corrélations homonucléaires COSY (^{1}H – ^{1}H) et hétéronucléaires HMBC (^{1}H – ^{13}C) indiquent bien la présence d'un motif spermidine comme pour **MU6**. Les déplacements chimiques et les corrélations de la chaîne propyle sont identiques à ceux de la chaîne propyle de **MU6,** cette chaîne se termine donc par un motif guanidine C-42 (δC 158,5). La différence se trouve au niveau de la chaîne butyle. L'analyse SMHR a permis de déterminer la formule brute de **MU9** et ainsi savoir que cette molécule possède un carbone, un oxygène et une insaturation en moins par rapport à **MU7**, ce qui correspond à la fonction carbonyle du groupement formamide de **MU7**. Le groupement méthylène C-46 (δC 40,2 ; δH 2,96) n'est, par ailleurs, corrélé avec aucun carbone tertiaire ou quaternaire ; cette chaîne ne se termine donc pas par un groupement guanidine ou formamide comme les deux molécules précédentes (**MU6** et **MU7**) mais par une amine primaire. Enfin, les protons H-39 (δH 3,40) et H-43 (δH 3,38) sont corrélés avec le carbonyle du groupement amide C-38 (δC 176,3).

Les corrélations hétéronucléaires HMBC (^{1}H – ^{13}C) permettent de relier les deux parties de la molécule entre elles par une chaîne carbonée aliphatique. Celle-ci est caractérisée par la présence d'un méthylène C-23 (δC 66,4 ; δH 4,14) couplé au carbonyle du groupement ester C22 (δC 170,0), et d'un méthylène C-37 (δC 33,7 ; δH 2,39) couplé au carbonyle du groupement amide C38. La chaîne ne possède pas de ramification, elle est uniquement composée de méthylènes présentant le même déplacement chimique C-25 – C-35 (δC 30,0 – 31,0 ; δH 1,31).

Le nombre de méthylènes dans la chaîne aliphatique a pu être déterminé grâce à la masse de la molécule (*m/z* 827,64819) afin de correspondre avec la formule brute $C_{46}H_{83}N_8O_5^+$. Celle-ci est constituée de 15 carbones méthyléniques.

De structure nouvelle, proche de celles des ptilomycalines E (**MU6**), F (**MU7**) et G (**MU8**), **MU9** a été nommé **ptilomycaline H**.

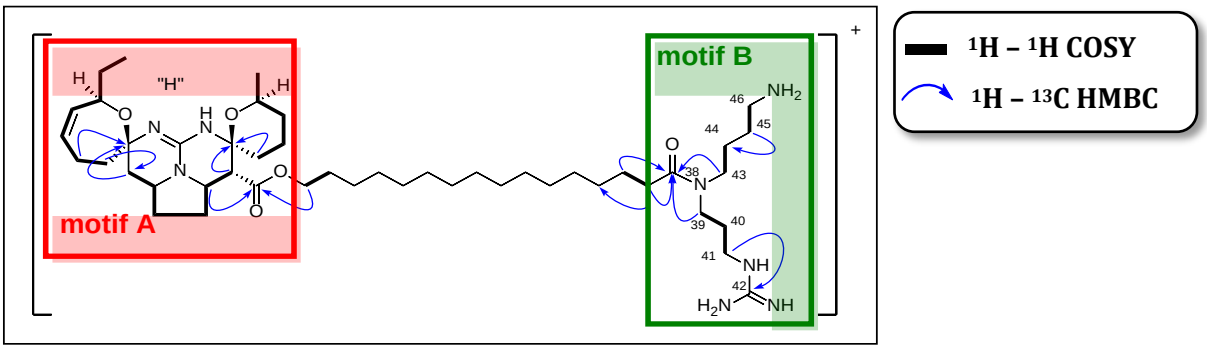


Figure 21 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU9**.*

Tableau XII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **MU9** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1	10,7, CH_3	0,85 (t, 7,3)	H2	2, 3
2	30,1, CH_2	1,46, (m) ; 1,55 (m)	H1, H3	1, 3, 4
3	72,1, CH	4,41 (brd, 10,3)	H2, H4	2
4	134,1, CH	5,51 (brd, 10,9)	H5	2, 3, 6
5	131,1, CH	5,71 (m)	H4, H6a	3, 6, 7
6	24,3, CH_2	2,16 (m) ; 2,42 (m)	H5, H7	4, 5, 7, 8
7	38,0, CH_2	1,98 (m) ; 2,38 (m)	H6	5, 6, 8, 9
8	84,9, C	-	-	-
9	37,7, CH_2	1,42 (m) ; 2,64 (dd, 12,8 ; 4,7)	H10	7, 8, 10
10	55,4, CH	4,06 (m)	H9, H11	-
11	31,3, CH_2	1,60 (m) ; 2,30 (m)	H10, H12	9, 10
12	27,4, CH_2	1,81 (m) ; 2,32 (m)	H11, H13	10, 11, 13, 14
13	54,0, CH	4,35 (dt, 9,7 ; 5,3)	H12, H14	12, 14, 22
14	50,7, CH	3,07 (d, 5,0)	H13, H15	13, 15, 16, 22
15	81,9, C	-	-	-
16	32,7, CH_2	1,70 (m)	H17	14, 15, 17
17	19,2, CH_2	1,82 (m) ; 1,76 (m)	H16, H18	16, 18
18	32,8, CH_2	1,28 (m) ; 1,70, (m)	H17, H19	17, 19, 20
19	68,2, CH2	3,83 (m)	H18, H20	20
20	21,7, CH_3	1,09 (d, 6,1)	H19	18, 19
21	150,3, C	-	-	-
22	170,0, C	-	-	-
23	66,4, CH_2	4,14 (m)	H24	22, 24
24	29,4, CH_2	1,65 (m)	H23, H25	23
25 – 35	30,0 – 31,0, CH_2	1,31 (m)	-	-
36	26,6, CH_2	1,60 (m)	H35, H37	37, 38
37	33,7, CH_2	2,39 (m)	H36	36, 38
38	176,3, C	-	-	-
39	49,1, CH_2 (9a) 43,9, CH_2 (9b)	3,40 (m)	H40	38, 40, 41, 43
40	29,0, CH_2 (9a) 28,0, CH_2 (9b)	1,89 (m) (9a) 1,80 (m) (9b)	H39, H41	39, 41
41	39,6, CH_2 (9a) 39,9, CH_2 (9b)	3,22 (m) (9a) 3,15 (t, 6,8) (9b)	H40	39, 40, 42
42	158,5, C	-	-	-
43	48,5, CH_2	3,38 (s)	H44	38, 44
44	25,7, CH_2	1,67 (m)	H43	43
45	26,7, CH_2	1,63 (m)	H46	44
46	40,2, CH_2	2,96 (m)	H45	44, 45

II.2.3 Réseau moléculaire

- **Le réseau moléculaire, un outil permettant la déréplication.**

Pour rechercher de nouveaux candidats médicaments à partir de produits naturels, le travail commence sur une matrice complexe : des extraits bruts contenant des centaines de composés. L'isolement et l'élucidation structurale de nouvelles molécules sont des tâches fastidieuses, l'idéal serait donc de pouvoir seulement se préoccuper de nouvelles molécules et de ne pas perdre du temps à réisoler et recaractériser des métabolites déjà décrits dans la littérature. Pour cela, une identification rapide des métabolites déjà décris peut être faite par comparaison des données spectrales expérimentales à des bases de données, cela s'appelle la déréplication

(Gaudêncio S. P. et Pereira F., 2015). Cette déréplication est une étape clé dans la découverte de nouveaux candidats médicaments à partir de matrices complexes.

La déréplication s'appuie sur les techniques analytiques permettant la caractérisation de matrices complexes ; et parmi celles-ci, l'introduction de la Chromatographie Liquide Ultrahaute Performance couplée à des détecteurs par Spectrométrie de Masse Haute Résolution a marqué une réelle avancée. Cette technique permet d'obtenir rapidement la formule brute des molécules présentes dans l'extrait et donne ainsi une information primordiale dans la comparaison avec des bases de données (Kind T. et Fiehn O., 2007). Néanmoins, cette information montre des limites ; la discrimination entre différents isomères ne peut pas être faite et d'autres données spectrales sont alors nécessaires pour permettre leur différentiation. La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) permet d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure des molécules par fragmentation de l'ion moléculaire puis d'une seconde analyse par spectrométrie de masse sur les fragments générés (Nielsen K. F. et Larsen T. O., 2015). Elle est donc plus dicriminante dans le processus de déréplication, cependant, comparer les milliers de spectres de masses acquis lors de l'analyse d'un extrait brut à une base de données manuellement serait trop fastidieux et c'est en ça que la création d'un réseau moléculaire a de l'intérêt.

Les réseaux moléculaires permettent d'organiser les spectres SM/SM d'un extrait donné en les comparant et en les regroupant en fonction de leur similitude *via* la mise en place d'une partition cosinus modifiée (Watrous J. *et al*., 2012). Les spectres SM/SM étant liés à la structure de la molécule, le réseau moléculaire est donc capable de regrouper les molécules en fonction de leurs similitudes structurales. Ces spectres sont alors comparés à ceux disponibles dans des bases de données (MassBank, Metlin, ReSpect, NIST, et les bases de données de la communauté Global Natural Products Social (GNPS)) regroupant des spectres SM/SM expérimentaux d'environ 20 000 composés ; mais également à ceux d'une base de données (ISDB) regroupant les spectres SM/SM *in silico* d'environ 200 000 composés (Allard P. M. *et al*., 2016).

Le processus de déréplication permet l'annotation de toutes les molécules (nœuds) présentes dans le réseau ayant un spectre SM/SM correspondant avec l'un des quelques 220 000 disponibles dans les bases de données. Le regroupement des molécules (cluster) en fonction de leur similitude structurale présente des avantages certains dans le processus de déréplication ; il permet par exemple d'évaluer la pertinence de la déréplication d'une molécule donnée au sein d'un cluster en comparant sa structure avec celles d'autres molécules du cluster. En effet, si une molécule dérépliquée appartient à un cluster regroupant un type de structures particulières, ce regroupement peut aider à identifier ses voisins dans le réseau en donnant une structure partielle de ceux-ci. Autre avantage de la déréplication grâce au réseau moléculaire, elle permet la recherche d'analogues de molécules bioactives. En effet, une fois une molécule possédant une

activité ciblée identifiée, ce regroupement permet d'isoler sélectivement les analogues de cette molécule afin d'évaluer les modulations de l'activité en fonction des modifications chimiques de la molécule et ainsi d'établir une corrélation structure/activité.

- **Déréplication et annotations des molécules présentes dans l'extrait brut de l'éponge *Monanchora unguiculata* de Madagascar.**

- **Déréplication à partir des bases de données contenant les spectres de masse expérimentaux et *in silico.***

L'analyse par CLUP-SM^2 de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* a permis la génération d'un réseau moléculaire sur GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (**Figure 22**). Une première comparaison a été faite entre les spectres SMHR-SMHR de l'extrait brut et les quelques 20 000 spectres expérimentaux référencés dans les bases de données ; il n'y a aucune correspondance pertinente (présence de structures déjà isolées du genre *Monanchora*). Cela peut-être dû au fait que ces bases de données sont essentiellement alimentées par des spectres de masses de molécules issues de la biodiversité terrestre. Une seconde comparaison a alors été faite entre les spectres SMHR-SMHR de l'extrait brut et les quelques 200 000 spectres *in silico* des molécules présentes dans la base de données DNP (Dictionary of Natural Products). Il y a correspondance avec une dizaine de molécules ayant déjà été isolées d'éponges du genre *Monanchora*, celles-ci sont regroupées dans 4 clusters (**Figures 22**, **23** et **24**). Parmi celles-ci, se trouvent la crambescidine 359 (**M71**), la crambescidine 800 (**M66**), la fromiamycaline (**M70**) et l'acide crambescidique (**M76**), les quatres molécules déjà décrites dans la littérature et ayant été isolées de l'éponge *Monanchora unguiculata* de Madagascar. En revanche pour la molécule de masse *m/z* 658,479, il y a une correspondance avec l'acide crambescidique (**M70**) mais également avec le néofolitispate 3 (**M79**). Le réseau moléculaire ne permet pas de discriminer ces isomères de structures.

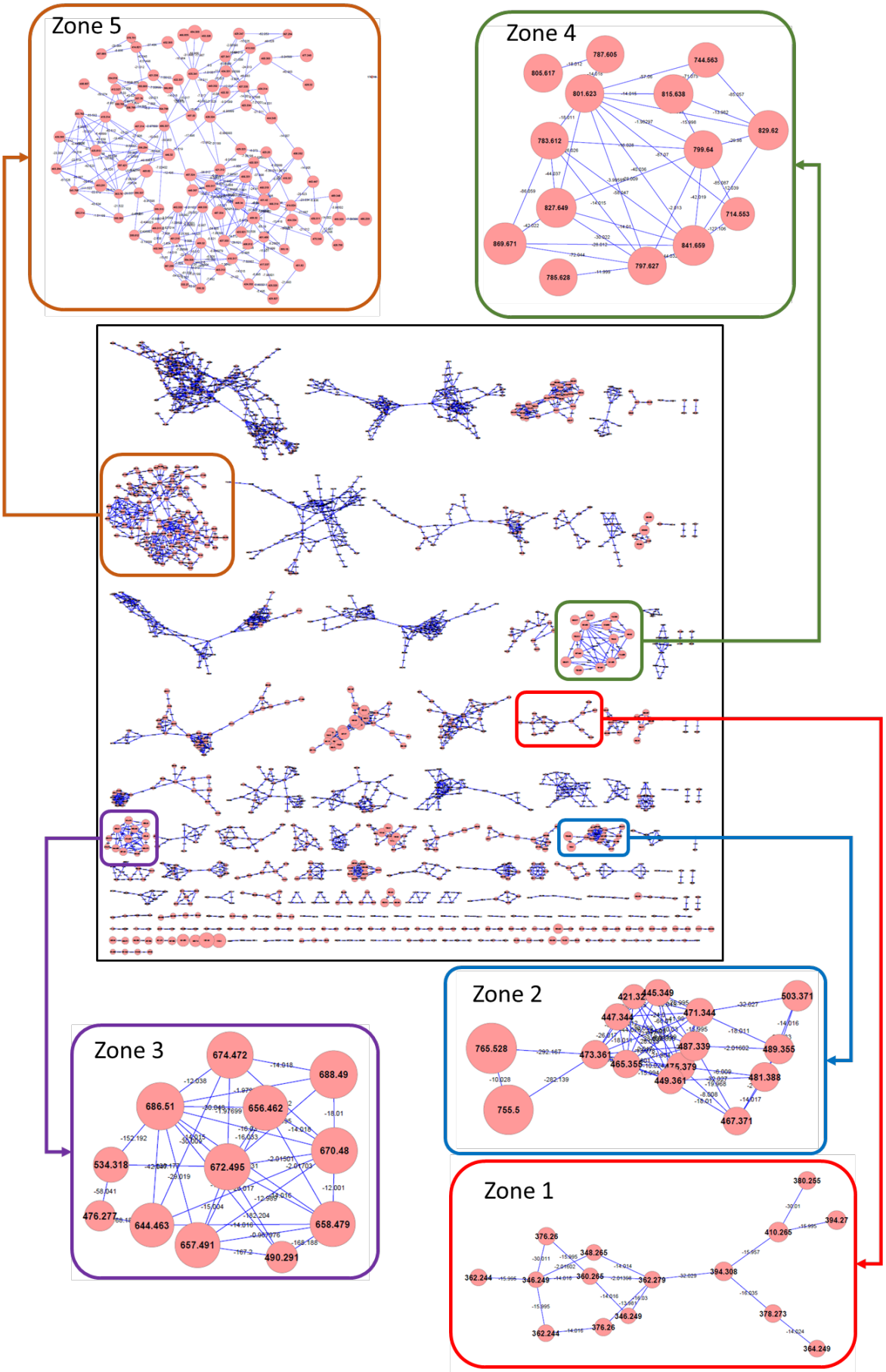


Figure 22 : *Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de Monanchora unguiculata.*

- **Annotation des molécules isolées.**

Parmi les molécules isolées, la crambescidine 800 (**M66**), la fromiamycaline (**M70**) ainsi que les ptilomycalines E (**MU6**), G (**MU8**) et H (**MU9**) se retrouvent bien dans le même cluster (**Figure 24**). Celles-ci ayant toutes une structure relativement proche (un motif pentacyclique et un motif spermidine reliés par une chaîne carbonée), il est logique de les retrouver dans le même cluster. Il est également cohérent de ne pas retrouver l'unguiculine A (**MU5**) dans ce cluster car cette molécule possède une structure différente (pas de motif pentacyclique). Celle-ci est bien présente dans le réseau généré mais se trouve dans un autre cluster, beaucoup plus petit, ne contenant que 6 molécules.

En revanche, cela semble étonnant de ne pas retrouver la ptilomycaline F (**MU7**) dans le même cluster que les ptilomycaline E, G et H car celle-ci possède une structure voisine. Cela peut s'expliquer par le fait que lors de l'analyse SMHR de la molécule isolée, l'abondance du pic moléculaire monochargé (*m/z* 855,6606) est très inférieure à celle du pic moléculaire dichargé (*m/z* 428,3284). Le pic moléculaire visible dans l'extrait brut est donc le pic dichargé, celui-ci est effectivement présent dans un autre cluster, regroupant les spectres SMHR-SMHR des formes dichargées d'analogues des crambescidines et des ptilomycalines (**Figure 25**).

Cela nous montre une des limites de la méthode. Le réseau moléculaire étant généré à partir des données brutes acquises lors de l'analyse CLUP-SMHR^2, certaines molécules présentes sous forme monochargées et dichargées peuvent être représentées dans deux clusters. L'idéal serait donc un retraitement de données (comme cela peut être fait sous MZmine), afin de tenir compte de la charge de la molécule avant la génération du réseau moléculaire sur GNPS. Ce traitement permettrait de simplifier le réseau (une masse pour une molécule) mais surtout d'être sûr que ce soit la masse *m/z* de la molécule monochargée qui soit comparée aux bases de données.

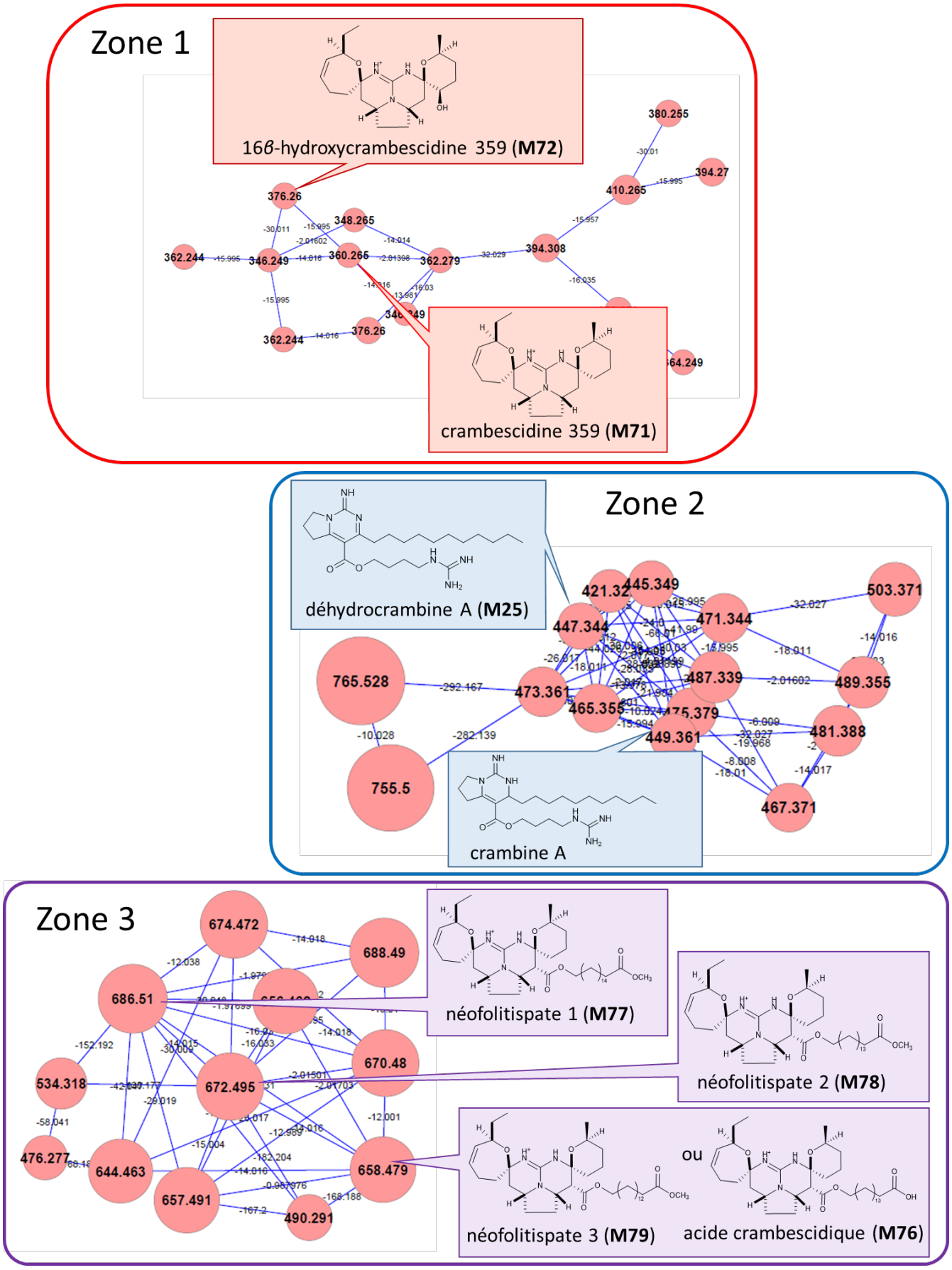


Figure 23 : *Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de Monanchora unguiculata : Zones 1, 2 et 3.*

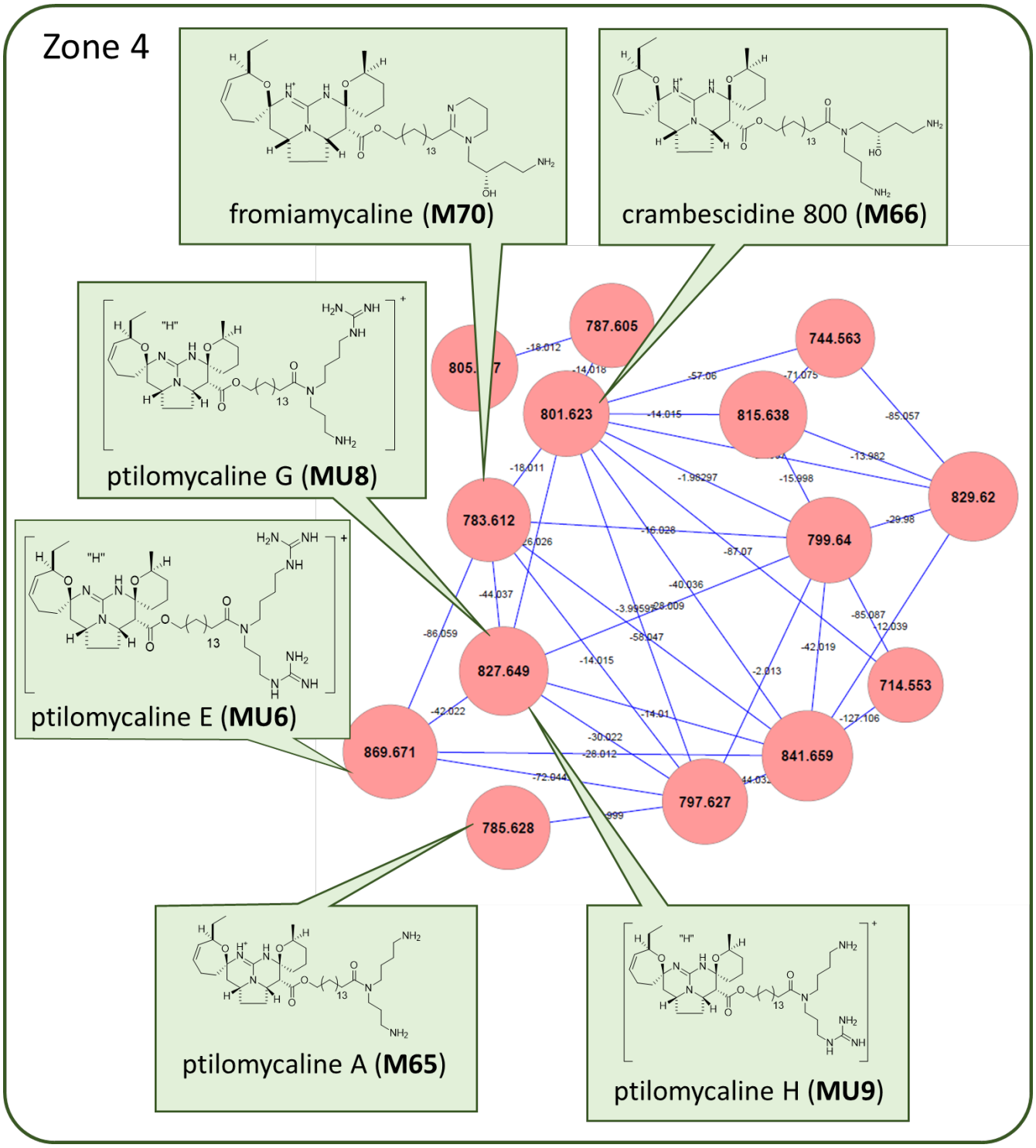


Figure 24 : *Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de Monanchora unguiculata : Zone 4.*

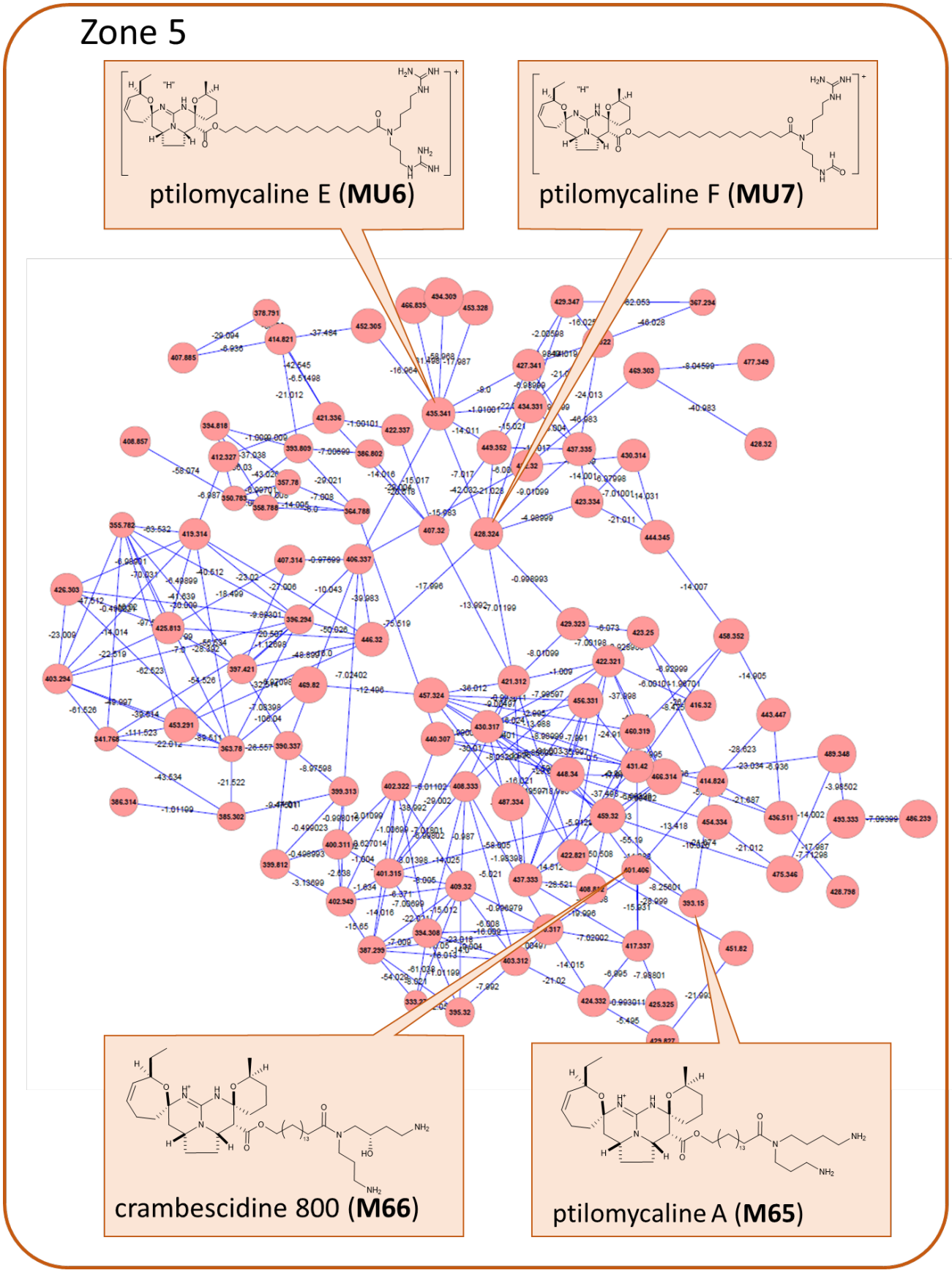


Figure 25 : *Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de Monanchora unguiculata : Zone 5.*

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

II.3.1 Activité antipaludique

- **Principe du test**

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

L'extrait brut de *Monanchora unguiculata* ayant révélé une activité antiproliférative *in vitro* intéressante (CI_{50} = 2,26 µg/mL, Chapitre I et Annexe I) sur le parasite *Plasmodium falciparum* (souche 3D7), les composés isolés de cette éponge, ont donc été également évalués pour leur activité antiplasmodium *in vitro* contre *Plasmodium falciparum*.

- **Résultats du test**

Avec des CI_{50} inférieures à 0,5 µg/mL, la crambescidine 800 (**M66**) (0,420 ± 0,017 µg/mL), la fromiamycaline (**M70**) (0,187 ± 0,023 µg/mL), la ptilomycaline E (**MU6**) (0,303 ± 0,112 µg/mL), la ptilomycaline F (**MU7**) (0,197 ± 0,012 µg/mL) et le mélanges des ptilomycalines G et H (**MU8** et **MU9**) (0,383 ± 0,040 µg/mL) (**Tableau XIII**) présentent une excellente activité antiplasmodium par inhibition de la croissance parasitaire et peuvent être considérés en conséquence comme des agents antipaludiques potentiels. Bien que l'artémisinine, principale molécule utilisée actuellement dans les traitements antipaludiques, présente une activité 50 à 100 fois plus élevée que les molécules isolées de *Monanchora unguiculata*, celles-ci sont intéressantes car leurs structures diffèrent totalement de celle de l'artémisinine. Ces molécules pourraient donc servir en « Thérapie combinée à base d'artémisinine (ACT)», qui est le seul traitement médical recommandé à ce jour par l'OMS. Ce mode thérapeutique combinant l'artémisinine à un autre agent antipaludéen vise à enrayer le phénomène de résistance de certaines souches de *Plasmodium* aux médicaments actuellement utilisés.

Tableau XIII : *Activité antiplasmodium des métabolites isolés de Monanchora unguiculata.*

Molécule	*P. falciparum* clone 3D7 CI_{50} (µg/mL)
crambescidine 359 (**M62**)	non testé
crambescidine 800 (**M51**)	0,420 (± 0,017)
fromiamycaline (**M61**)	0,187 (± 0,023)
acide crambescidique (**M67**)	non testé
unguiculine A (**MU5**)	6,043 (± 0,035)
pitolmycaline E (**MU6**)	0,303 (± 0,112)
pitolmycaline F (**MU7**)	0,197 (± 0,012)
pitolmycaline G + H (**MU8 + MU9**)	0,383 (± 0,040)
artémisinine	0, 0045 (± 0,0002)

II.3.2 Cytotoxicité sur cellules KB

- **Principe du test**

Les tests de cytotoxicité sur cellules KB ont été réalisés sous la direction du Docteur Thierry Cresteil puis sous la direction de l'Ingénieur de Recherche, Jérôme Bignon à l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette), France.

L'extrait brut de *Monanchora unguiculata* ayant révélé une cytotoxicité intéressante (99 % d'inhibition à 10 µg/mL, Chapitre I et Annexe I) sur les cellules KB, les composés isolés de cette éponge, ont donc été également évalués pour leur cytotoxicité sur cellules KB.

- **Résultats du test**

Avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire, certaines des molécules testées présentent une activité intéressante. La fromiamycaline (**M70**), la ptilomycaline E (**MU6**) et le mélange des ptilomycalines G et H (**MU8** et **MU9**) sont particulièrement actifs avec des CI_{50} respectives de 0,92 ; 0,74 et 0,76 µg/mL (**Tableau XIV**). L'acide crambescidique (**M76**) et l'unguiculine A (**MU5**) présentent des activités très modérées, CI_{50} de 5,80 et 3,59 µg/mL respectivement. L'acide crambescidique présentant le motif pentacyclique mais pas de motif spermidine et l'unguiculine A présentant un motif spermidine mais pas de motif pentacyclique, l'association de ces deux motifs semblent donc avoir un fort impact sur la cytotoxicité de ces molécules ; d'autant plus que toutes les autres molécules présentant l'association de ces deux motifs ont des CI_{50} comprisent entre 0,74 et 1,38 µg/mL.

Tableau XIV : *Cytotoxicité sur les cellules KB des métabolites isolés de Monanchora unguiculata.*

Molécule	Cellules KB CI_{50} (µg/mL)
crambescidine 359 (**MU1**)	-
crambescidine 800 (**MU2**)	1,05 (± 0,06)
fromiamycaline (**MU3**)	0,92 (± 0,09)
acide crambescidique (**MU4**)	5,80 (± 0,97)
unguiculine A (**MU5**)	3,59 (± 0,45)
pitolmycaline E (**MU6**)	0,74 (± 0,03)
pitolmycaline F (**MU7**)	1,38 (± 0,16)
pitolmycaline G + H (**MU8 + MU9**)	0,76 (± 0,04)

II.4 Discussion

L'éponge *Monanchora unguiculata* a été choisie non seulement pour ses activités biologiques, à savoir, sa cytotoxicité envers la lignée cellulaire KB (99 % d'inhibition à 10 µg/mL) et son activité antipaludique (CI_{50} 2,26 µg/mL), mais aussi en raison de la complexité de son profil

chimique présentant deux composés majoritaires dont le composé **MU6** non répertorié dans la littérature (*m/z* 869,7).

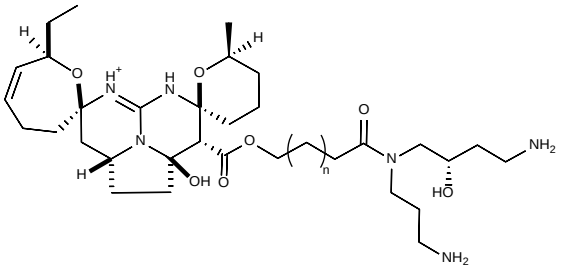
L'étude de cette éponge a permis l'isolement de 9 alcaloïdes guanidiniques : 4 de structures connues (**M66 ; M70 ; M71** et **M76**) et 5 de structures nouvelles (**MU5 – MU9**). Tous ces composés ont été testés pour leur cytotoxicité sur cellules KB et six d'entre eux pour leur activité antipaludique (**M66 ; M70 ; MU5 ; MU6 ; MU7** et le mélange **MU8 + MU9**). Les résultats suivants ont été obtenus :

- Une rapide analyse structure-activité laisse supposer que le motif spermidine associé au motif pentacyclique serait à l'origine de l'activité cytotoxique relevée. En effet, tous les alcaloïdes guanidiniques actifs (**M66**, **M70**, **MU6** – **MU9**) sont porteurs de ces deux motifs alors que **M71, M76** et **MU5** bien moins actifs, ne présentent pas cette association motif spermidine - motif pentacyclique. La présence d'une guanidine terminale semble augmenter la cytotoxicité (**MU6** et le mélange **MU8** + **MU9** plus cytotoxiques que **M66**) tandis que la présence d'un formamide terminal semble diminuer la cytotoxicité (**MU7** moins cytotoxique que le mélange **MU8** + **MU9**).
- **MU5** présente une activité antiplasmodium moyenne (CI_{50} 6,04 µg/mL) ; **M66**, **M70 MU6, MU7** ainsi que le mélange **MU8 + MU9** présentent, quant à eux, une excellente activité antiplasmodium (0,15 µg/mL < CI_{50} < 0,45 µg/mL). Le motif pentacyclique semble donc impliqué dans l'activité antiplasmodium.

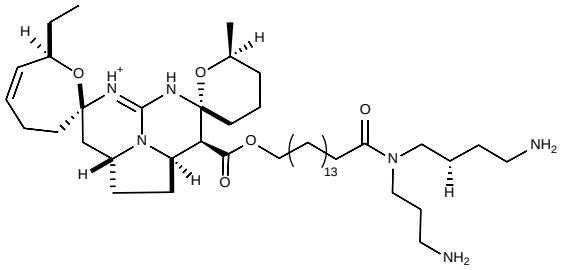
Les données de la littérature montrent que les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques sont caractéristiques des éponges appartenant à la famille des Crambeidae, et plus particulièrement aux genres *Crambe* (Vosmaer, 1880) et *Monanchora* (Carter, 1883). Seuls les travaux d'Othani I. *et al*. (1992), de Palagiano E. *et al*. (1995) et de Patil A. D. *et al*. (1995), font référence à l'isolement de structures pentacycliques provenant d'organismes autres que ceux de la famille des Crambeidae. Othani I. *et al*. (1992) ont isolé la ptilomycaline A (**M65**) des éponges *Ptilocaulis spiculifer* et *Hemimycale* sp.. Palagiano E. *et al*. (1995) ont isolé de l'étoile de mer *Celerina heffernani,* la ptilomycaline A, la crambescidine 800 (**M66**) ainsi que la céléromycaline (**M67**) et de l'étoile de mer *Fromia monilis*, la ptilomycaline A, la crambescidine 800 et la fromiamycaline (**M70**). Patil A. D. *et al*. (1995) ont isolé de l'éponge *Batzella* sp., la ptilomycaline A, la crambescidine 800 et la crambescidine 816 (**M90**). Hormis ces trois exemples, 33 des 34 alcaloïdes pentacycliques décrits dans la littérature ont été isolés d'éponges appartenannt à la famille des Crambeidae et peuvent donc être considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques de cette famille.

La génération d'un réseau moléculaire a permis de regrouper les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques présents dans l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* en trois cluster (**Figure 22**). Un premier contenant les dérivés de la crambescidine 359, un second contenant les dérivés de l'acide crambescidique et un dernier contenant les dérivés de la ptilomycaline (**Figure 24**). L'analyse des masses des composés présents dans ce cluster permet, en recoupant ces valeurs avec celles des composés décrits dans la littérature, de repérer la présence de composés déjà décrits ou de nouveaux composés. On peut supposer, par exemple, que les composés de masse *m/z* 787,6 et 815,6, correspondent respectivement aux crambescidines 786 (**M68**) et 814 (**M69**) isolées en 2016 (El-Demerdash A. *et al*., 2016) et non répertoriées à ce jour dans la base de données (ISDB). En revanche, certains de ces composés ont des masses non décrites dans la littérature. Il serait alors intéressant de se focaliser sur ces composés lors d'un prochain fractionnement guidé par masse (Azzollini A. *et al*., 2016). De plus, la position de ces molécules dans le cluster permet d'émettre une hypothèse quant à leur structure. Par exemple, le composé de masse *m/z* 797,6 étant relié à la fromiamycaline (**M70**), il en est probablement structurellement proche. La différence de masse de +14,015 peut-être expliqué par la présence d'un méthylène supplémentaire dans la chaîne carbonée. Il serait alors intéressant de générer un spectre SMHR/SMHR *in silico* de ce composé de masse *m/z* 797,6 afin de vérifier l'hypothèse de structure émise. Ainsi, le réseau moléculairees permet de simplifier la caractérisation structurale d'un nouveau composé lors de son isolement.

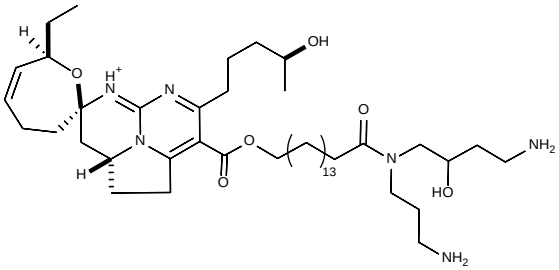
Les alcaloïdes guanidiniques dérivés de la ptilomycaline A, ayant démontré un large spectre d'activités biologiques, sont largement mentionnés dans la littérature, que ce soit dans le cadre de recherches de nouveaux dérivés naturels bioactifs ou encore pour la recherche de voies de synthèses possibles. Des études portant sur les relations structures-activités relatives à ces molécules sont également menées. Le **Tableau XV** regroupe les différents dérivés naturels de la ptilomycaline A, leurs activités biologiques, ainsi que l'existence ou non d'une voie de synthèse. Sont également représentés ci-dessous les 5 dérivés de la ptilomycaline A (**M90 – M94**) non référencés dans l'étude bibliographique du genre *Monanchora*.



crambescidine 816 (**M90**) n = 13
crambescidine 830 (**M91**) n = 14
crambescidine 844 (**M92**) n = 15



13,14,15-isocrambescidine 800 (**M93**)



crambidine (**M94**)

La ptilomycaline A (**M65**) et la crambescidine 800 (**M66**) sont les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques les plus couramment isolés et sont, par conséquent, les molécules les plus étudiées ; elles présentent des activités antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antileishmaniale et antimalariale. Leur synthèse totale a fait l'objet de plusieurs études et suite à cela, un brevet (WO2004028452 A2) a même été déposé concernant la synthèse totale du noyau pentacyclique. L'inconvénient principal de ces deux molécules vient du fait qu'elles sont cytotoxiques sur cellules normales Vero (Hua H. M., *et al.*, 2007). Cela est confirmé, pour la crambescidine 800, par le calcul d'un index de sélectivité (IS), paramètre donnant la marge de concentration d'utilisation d'une molécule. Il a été calculé en comparant la cytotoxicité sur cellules KB et l'effet inhibiteur sur *Plasmodium falciparum* : CI_{50} (KB) / CI_{50} (*Plasmodium falciparum*). Avec un index de sélectivité de 2,5, la crambescidine 800 ne présente pas d'activité sélective, elle ne peut donc pas être considérée comme un candidat médicament. La fromiamycaline (**M70**), molécule présentant la meilleure activité antipaludique possède un index de selectivité moyen (4,9) tandis que la ptilomycaline F (**MU7**), molécule légèrement moins active contre *Plasmodium falciparum* que la fromiamycaline possède un bon index de sélectivité (7,0). Il serait alors intéressant de tester la cytotoxicité sur cellules saines de ces deux molécules, afin de valider leur index de sélectivité et d'en faire de potentiels candidats médicaments.

Tableau XV *: Origine, bioactivités et existence d'une voie de synthèse des dérivés de la ptilomycaline A*

Molécule	Organismes	Lieux de collecte	Activités biologiques	Synthèse totale	Références
16*β*-hydroxycrambescidine 359 (**M72**)	*Monanchora arbuscula (unguifera)*	Jamaïque	-	-	Hua H. M. *et al.*, 2007
acide crambescidinique (**M73**)	*Monanchora ungiculata*	Male, Maldive	-	-	Meragelman K. M. *et al.*, 2004
acide crambescidique (**M76**)	*Monanchora arbuscula (unguifera)* *Monanchora dianchora* *Monanchora* sp.	Bocas del Toro, Panama Nosy Be, Madagascar Hiva Oa, Îles Marquises	Antitumorale	-	Coffey D. S. et al., 2000 Gallimore W. A. *et al.*, 2005 Bensemhoun J. *et al.*, 2007 El-Demerdash A. *et al.*, 2016
acide norcrambescidique (**M80**)	*Monanchora* sp.	Hiva Oa, Îles Marquises	Antitumorale	-	El-Demerdash A. *et al.*, 2016
céléromycaline (**M67**)	*Celerina heffernani*	Nouvelle-Calédonie, France	Antivirale	-	Palagiano E. *et al.* 1995
crambescidine 359 (**M71**)	*Monanchora unguiculata* *Monanchora* sp.	Îles Amirante, Seychelles Hiva Oa, Îles Marquises	-	oui	Braeckman J. C. *et al.*, 2000 Nagasawa K. *et al.*, 2002 El-Demerdash A. *et al.*, 2016
crambescidine 431 (**M74**)	*Monanchora unguiculata*	Îles Amirante, Seychelles	-	-	Braeckman J. C. *et al.*, 2000
crambescidine 786 (**M68**)	*Monanchora* sp.	Hiva Oa, Îles Marquises	Antitumorale	oui	Aron Z. D. *et al.*, 2004 El-Demerdash A. *et al.*, 2016
crambescidine 800 (**M66**)	*Crambe crambe* *Crambe crambe* *Celerina heffernani* *Fromia monilis* *Monanchora arbuscula (unguifera)* *Monanchora* sp. *Monanchora* sp. *Batzella* sp.	Majorque, Espagne Favignana, Italie Nouvelle-Calédonie, France Nouvelle-Calédonie, France Jamaïque Palau Hiva Oa, Îles Marquises Bahamas	Antivirale Antimicrobienne Antitumorale Antileishmaniale Antimalariale	oui	Jares-Erijman E. A. *et al.* 1991 Berlinck R. G. S. *et al.*, 1993 Palagiano E. *et al.* 1995 Patil A. D. *et al.*, 1995 Braeckman J. C. *et al.*, 2000 Coffey D. S. *et al.*, 2000 Chang N. F. *et al.*, 2003 Aron Z. D. et Overman L. E., 2004 Hua H. M. *et al.*, 2007 El-Demerdash A. *et al.*, 2016
crambescidine 814 (**M69**)	*Monanchora* sp.	Hiva Oa, Îles Marquises	Antitumorale	-	El-Demerdash A. *et al.*, 2016
crambescidine 816 (**M90**)	*Crambe crambe* *Crambe crambe* *Batzella* sp.	Majorque, Espagne Favignana, Italie Bahamas	Antivirale Antitumorale Inhibiteur calcique	-	Jares-Erijman E. A. *et al.* 1991 Berlinck R. G. S. *et al.*, 1993 Patil A. D. *et al.*, 1995
crambescidine 826 (**M81**)	*Monanchora* sp. *Monanchora* sp.	Palau Hiva Oa, Îles Marquises	Antivirale	-	Chang N. F. *et al.*, 2003 El-Demerdash A. *et al.*, 2016
crambescidine 830 (**M91**)	*Crambe crambe*	Majorque, Espagne	-	-	Jares-Erijman E. A. *et al.* 1991
crambescidine 844 (**M92**)	*Crambe crambe*	Majorque, Espagne	Antivirale Antitumorale	-	Jares-Erijman E. A. *et al.* 1991
crambidine (**M94**)	*Crambe crambe*	Favignana, Italie	-	oui	Berlinck R. G. S. *et al.*, 1993 Overman L. E. et Ho Rhee Y., 2005
fromiamycaline (**M70**)	*Fromia monilis* *Monanchora* sp. *Monanchora arbuscula (unguifera)*	Nouvelle-Calédonie, France Palau Martinique, France	Antivirale Antitumorale Antimalariale	-	Palagiano E. *et al.* 1995 Chang N. F. *et al.*, 2003 Laville R. *et al.*, 2009
13,14,15-isocrambescidine 800 (**M93**)	*Crambe crambe*	Favignana, Italie	-	oui	Berlinck R. G. S. *et al.*, 1993 Coffey D. S. *et al.*, 2000 Aron Z. D. et Overman L. E., 2004

Tableau XV *: Origine, bioactivités et existence d'une voie de synthèse des dérivés de la ptilomycaline A (suite)*

Molécule	Organismes	Lieux de collecte	Activités biologiques	Synthèse totale	Références
monanchocidine A (**M82**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Guzii A. G. *et al.*, 2010
monanchocidine B (**M83**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2012
monanchocidine C (**M84**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2011
monanchocidine D (**M85**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2011
monanchocidine E (**M86**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2011
monanchomycaline A (**M87**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	Antitumorale	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2012
monanchomycaline B (**M88**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	-	-	Makarieva T. N. *et al.*, 2012
monanchomycaline C (**M89**)	*Monanchora pulchra*	Ouroup, Russie	-	-	Tabakmakher K. M. *et al.*, 2013
néofolitispate 1 (**M77**)	*Monanchora (Neofolitispa) dianchora*	Iles Andaman, Inde	Antivirale	-	Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999
néofolitispate 2 (**M78**)	*Monanchora (Neofolitispa) dianchora*	Iles Andaman, Inde	Antivirale	oui	Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999 Coffey D. S. *et al.*, 2000
néofolitispate 3 (**M79**)	*Monanchora (Neofolitispa) dianchora*	Iles Andaman, Inde	Antivirale	-	Venkateswarlu Y. *et al.*, 1999
ptilomycaline A (**M65**)	*Hemimycale* sp. *Ptilocaulis spiculifer* *Monanchora arbuscula (unguifera)* *Monanchora arbuscula (unguifera)* *Monanchora arbuscula (unguifera)* *Celerina heffernani* *Fromia monilis* *Batzella* sp.	Mer Rouge Caraïbes Jamaïque Bocas del Toro, Panama Martinique, France Nouvelle-Calédonie Nouvelle-Calédonie Bahamas	Antivirale Antimicrobienne Antitumorale Antileishmaniale Antimalariale	oui	Othani I. *et al.*, 1992 Palagiano E. *et al.* 1995 Patil A. D. *et al.*, 1995 Aron Z. D. et Overman L. E., 2004 Gallimore W. A. *et al.*, 2005 Hua H. M. *et al.*, 2007 Laville R. *et al.*, 2009
ptilomycaline D (**M75**)	*Monanchora dianchora*	Nosy Be, Madagascar	-	-	Bensemhoun J. *et al.*, 2007
ptilomycaline E (**MU6**)	*Monanchora unguiculata*	Iles Mitsio, Magadascar	Antitumorale Antimalariale	-	
ptilomycaline F (**MU7**)	*Monanchora unguiculata*	Iles Mitsio, Magadascar	Antitumorale Antimalariale	-	
ptilomycaline G (**MU8**)	*Monanchora unguiculata*	Iles Mitsio, Magadascar	Antitumorale Antimalariale	-	
ptilomycaline H (**MU9**)	*Monanchora unguiculata*	Iles Mitsio, Magadascar	Antitumorale Antimalariale	-	

Chapitre III

Etude de l'éponge *Amphimedon* sp. (Duchassaing & Michelotti, 1864)

Amphimedon viridis
crédits Sven Zea, 2004, Bahamas

III.1 Eléments bibliographiques sur *Amphimedon sp.*

III.1.1 Localisation du genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)

Les éponges du genre *Amphimedon* ont une répartition ubiquitaire. On les retrouve principalement dans l'Océan Indien (Côte Kenyane, Côte australienne, Mer de Timor, Mer d'Arafura, Sri Lanka, Mer Rouge), dans l'Océan Atlantique (Golfe du Mexique, Mer des Caraïbes, Bermudes, Côte brésilienne, Côte argentine, Terre de Feu), dans l'Océan Pacifique (Mer de Chine Orientale, Micronésie, Fidji, Terre de Feu) et dans l'Océan Austral (Mer de Bellingshausen) (**Figure 26**). (www.iobis.org, www.marinespecies.org)

Figure 26 : *Lieu de collecte des éponges du genre Amphimedon (crédit geoportail.gouv.fr).*

III.1.2 Position systématique et description du genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)

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

Le genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864) appartient à la famille des Niphatidae (ordre Haplosclerida) qui contient huit autres genres : *Cribrochalina* (Schmidt, 1870), *Dasychalina* (Ridley & Dendy, 1886), *Gelliodes* (Ridley, 1884), *Haliclonissa* (Burton, 1932), *Hemigellius* (Burton, 1932), *Microxina* (Topsent, 1916), *Niphates* (Duchassaing & Michelotti, 1864) et *Pachychalina* (Schmidt, 1868).

Royaume: Animal
Phylum: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordre: Haplosclerida
Famille: Niphatidae
Genre: *Amphimedon*

Synonymes du genre *Amphimedon* : *Hemihaliclona* (Burton, 1937)
Haliclona (Amphimedon) (Duchassaing & Michelotti, 1864)

- **Description morphologique**

« Espèces diversiformes, non encroûtées, n'étant pas garnies de pinceaux fibreux qui les rendent hérissées. Leur surface est poreuse ou réticulée, leur intérieur spongieux ; plusieurs de ces espèces sont rouges ou rougeâtres, cependant il y en a une de verte, une autre violette, mais cette coloration peut être considérée comme dérivant du rouge. Parmi ces espèces il y en a qui, lorsqu'elles sont vivantes et qu'on les touche, occasionnent un prurit fort incommode. Chez les amphimédon les parties cornées du réseau sont plus ou moins atrophiées et disparaissent presque complètement chez certaines espèces. »

Duchassaing & Michelotti, 1864

Amphimedon est un genre difficile à reconnaître, possédant beaucoup de similitudes avec d'autres genres de la famille des Niphatidae comme *Pachychalina*, *Cribrochalina* ou *Niphates* (Helmy T. et Van Soest R. W. M., 2004). Les éponges du genre *Amphimedon* diffèrent par leur surface plus ou moins lisse, par l'arrangement des spicules et par leur squelette choanosomique. Ce sont des éponges, irrégulièrement massives, lamellées, flabelliformes, avec de nombreux oscules* répartis linéairement sur les bords ou dispersés sur les branches. Le squelette ectosomique est constitué d'un réseau tridimensionnel de fibres secondaires formant des mailles arrondies, recouvertes par une fine membrane. Le squelette choanosomique est constitué d'un réseau irrégulier, diffus, radialement plumeux de fibres multispiculaires primaires, irrégulièrement connecté par des fibres multispiculaires secondaires. La spongine est présente de manière abondante. Les mégasclères sont des oxes* possédant souvent des pointes modifiées ou strongylotes* (**Figure 27**). Il n'y a pas de microsclères (Desqueyroux-Faúndez R. et Valentine C., 2002).

Lors de la collecte, aucune photo *in situ* de cette éponge n'a été prise.

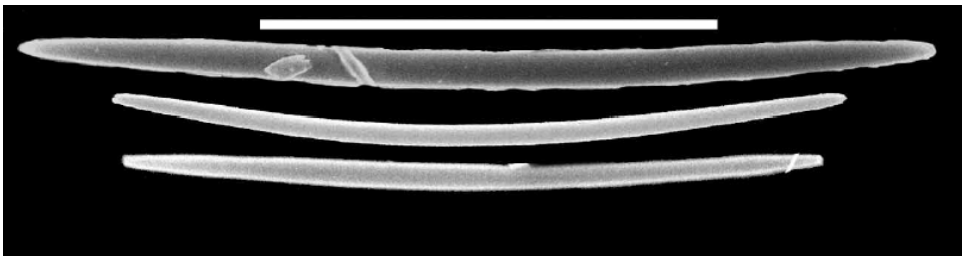


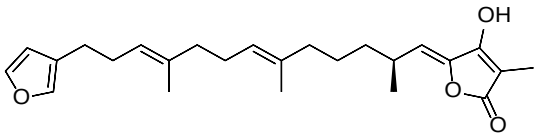
Figure 27 : *Photographie de mégasclères (oxes strongylotes) d'Amphimedon queenslandica (Hooper J. N. A. et Van Soest R. W. M., 2006).*

III.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864)

Les éponges de l'ordre des Haplosclerida sont très riches en métabolites secondaires. Plus de 1 800 métabolites secondaires ont été isolés d'éponges de cet ordre. Si l'on regarde les études menées à l'échelle des familles, ce sont les éponges appartenant aux familles des Petrosiidae (environ 800 molécules) et des Chalinidae (environ 400 molécules) les plus étudiées ; viennent ensuite les éponges appartenant à la famille des Niphatidae (environ 300 molécules). La très grande majorité des molécules isolées à ce jour des éponges de la famille des Niphatidae (environ 280) proviennent des genres *Amphimedon* (Duchassaing & Michelotti, 1864), *Cribrochalina* (Schmidt, 1870) et *Niphates* (Duchassaing & Michelotti, 1864). Concernant plus spécifiquement les éponges du genre *Amphimedon*, la littérature fait principalement mention de terpénoïdes, de macrolides et d'alcaloïdes.

II.1.3.1 Les sesterterpénoïdes

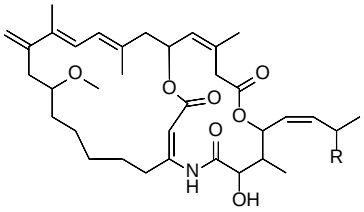
Seuls les travaux d'Ishibashi, M. *et al.* (1993) font référence à un sesterterpène isolé de l'éponge *Amphimedon* sp., la **variabiline** (**A1**). Celle-ci a démontré une activité anti-inflammatoire (*in vitro* et *in vivo*) intéressante, comme inhibiteur des phospholipases A_2 cytolysique ($cPLA_2$) et sécrétoire ($sPLA_2$), avec des CI_{50} respectives de 7,9 µM et de 6,9 µM. Cette inhibition permet le contrôle de la production d'acide arachidonique conduisant à une inhibition de la biosynthèse de médiateurs de l'inflammation (Escrig V. *et al.*, 1997)



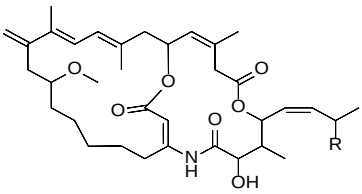
variabiline (**A1**)

II.1.3.2 Les macrolides

Les données de la littérature font très peu mention de la présence de macrolides dans les éponges du genre *Amphimedon*. Seuls les travaux d'Ovenden S. P. B. *et al*. (1999) y font référence ; ils révèlent la présence de quatre nouvelles lactames macrocycliques, les **amphilactames A – D** (**A2 – A5**), qui ont été isolées de deux éponges du genre *Amphimedon*, les **amphilactames A** (**A2**), **C** (**A4**) et **D** (**A5**) présentent une activité anti-nématode intéressante contre le nématode parasite *Haemonchus contortus*. Elles inhibent le développement larvaire au stade L1 mais ne présentent pas d'activité sur les œufs. Leur activité *in vitro* est comparable aux anthelminthiques commerciaux comme le lévamisole et le closantel.



amphilactame A (**A2**) R = H
amphilactame B (**A3**) R = CH_3



amphilactame C (**A4**) R = H
amphilactame D (**A5**) R = CH_3

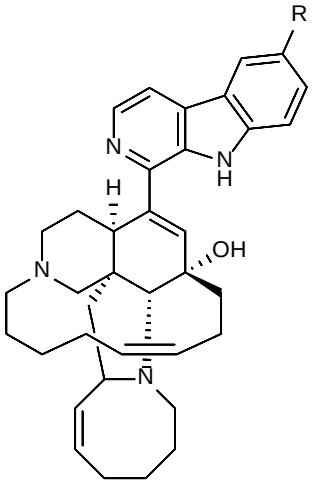
II.1.3.2 Les alcaloïdes

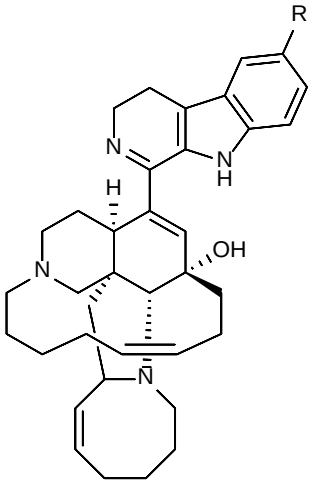
Les éponges du genre *Amphimedon* sont connues pour leur richesse en alcaloïdes. A ce jour, pas moins de 64 alcaloïdes ont été isolés des éponges du genre *Amphimedon* dont certains, ont montré des activités biologiques intéressantes (Schmitz F. J. *et al.,* 1983 ; Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Albrizio S. *et al.*, 1995 ; Tsuda M. *et al.*, 1996 ; Berlinck R. G. S. *et al.*, 1996 ; Chehade C. *et al.*, 1997 ; Kobayashi J. *et al.*, 1997 ; Mitchell S. S. *et al.*, 1997 ; Tsuda M. *et al.*, 1998 ; Watanabe D. *et al.*, 1998 ; Kobayashi J. *et al.*, 1999 ; Tsuda M. *et al.*, 1999 ; Hirano K. *et al.*, 2000 ; Tsukamoto S. *et al.*, 2000 ; Jeong S. J. *et al.*, 2003 ; Matsunaga S. *et al.*, 2004 ; Takekawa Y. *et al.*, 2006 ; Kubota T. *et al.*, 2007 ; Xu N. J. *et al.*, 2007 ; Nishi T. *et al.*, 2008 ; Takahashi Y. *et al.*, 2009 ; Yamada M. *et al.*, 2009 ; Sakurada T. *et al.*, 2010 ; Kura K. *et al.*, 2011 ; Kubota T. *et al.*, 2013 ; Kubota T. *et al.*, 2013).

- **Les manzanines et dérivés apparentés**

Les dérivés de la **manzanine A** (**A6**) (Sakai *et al*., 1986) sont des molécules caractéristiques des éponges de la famille des Haplosclerida ; en effet, à l'heure actuelle, seuls les travaux de Kondo *et al.* (1992) font référence à des dérivés de la manzanine provenant d'éponges non Haplosclerida, appartenant au genre *Ircinia* (Dictyoceratida). A ce jour, 19 dérivés de la

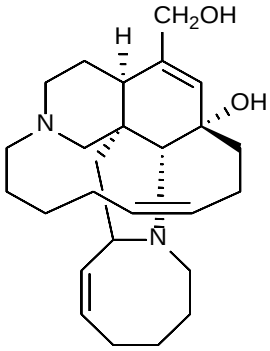
manzanine (**A7- A26**) ont été isolés d'éponges du genre *Amphimedon*, toutes collectées au Japon (Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1996 ; Kobayashi J. *et al.*, 1997 ; Tsuda M. *et al.*, 1998 ; Watanabe D. *et al.*, 1998 ; Takahashi Y. *et al.*, 2009 ; Yamada M. *et al.*, 2009 ; Kubota T. *et al.*, 2013). La majorité de ces composés présentent une activité cytotoxique sur diverses lignées cellulaires cancéreuses : leucémie murine L1210, leucémie murine P388 et carcinome buccal KB (**Tableau XVI**). Certains de ces composés présentent également d'autres activités biologiques. Par exemple, les **zamamidines A** (**A21**), **B** (**A22**), et **C** (**A23**), la **3,4-dihydromanzamine J *N*-oxyde** (**A25**) et la **manzamine A** (**A6**) possèdent des activités antiparasitaires contre *Trypanosoma brucei brucei* (GUTat 3.1) responsable de la maladie du sommeil (CI_{50} 1,04 ; 1,05 ; 0,27 ; 4,44 et 0,04 µg/mL respectivement) et contre *Plasmodium falciparum* (souche K1) responsable du paludisme (CI_{50} 7,16 ; 12,20 ; 0,58 ; 7,02 et 0,97 µg/mL respectivement). D'autres composés se sont révélés être antibactériens comme la **6-hydroxymanzamine A** (**A7**), la **3,4-dihydromanzamine A** (**A8**), la **3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A** (**A9**), la **ma'éganédine A** (**A17**) et la **manzamine M** (**A19**) présentant des CMI respectives sur *Sarcina lutea* de 1,25 ; 4,0 ; 6,3 ; 2,8 et 2,3 µg/mL. La **3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A** (**A9**), la **ma'éganédine A** (**A17**) et la **manzamine M** (**A19**) sont également actives sur *Corynebacterium xerosis* avec des CMI respectives de 3,1 ; 5,7 et 5,7 µg/mL.



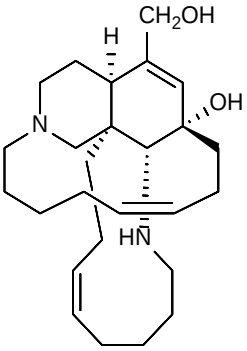


manzanine A (**A6**) R = H
6-hydroxymanzanine A (**A7**) R = OH

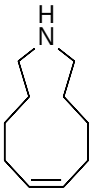
3,4-dihydromanzamine A (**A8**) R = H
3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A (**A9**) R = OH



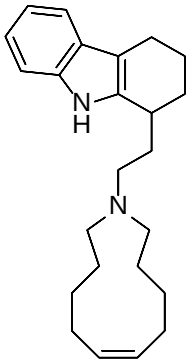
ircinol A (**A10**)



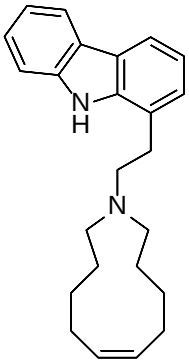
ircinol B (**A11**)



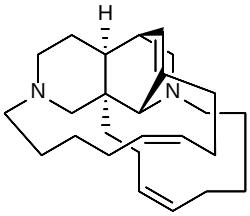
kéramaphidine C (**A12**)



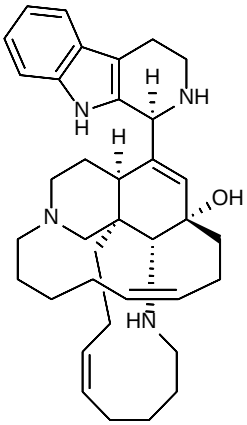
kéramamine C (**A13**)



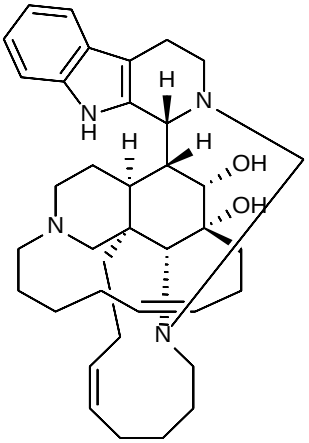
manzanine C (**A14**)



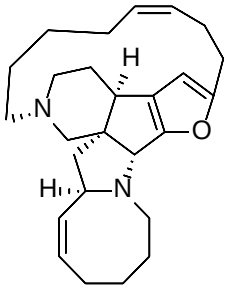
kéramaphine B (**A15**)



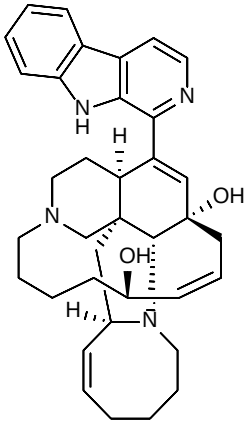
manzanine L (**A16**)



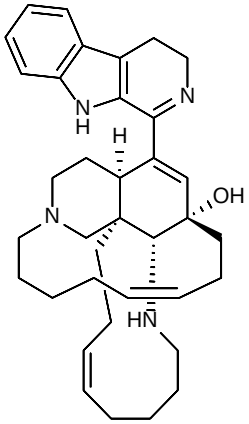
ma'éganédine A (**A17**)



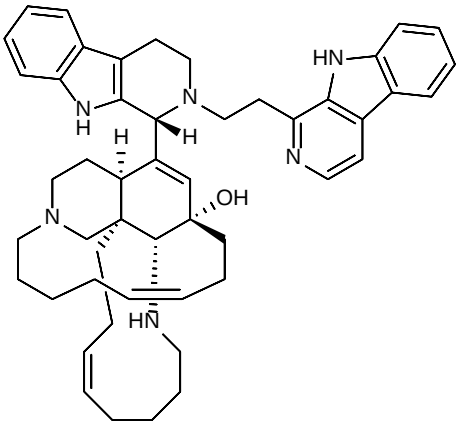
nakadomarine A (**A18**)



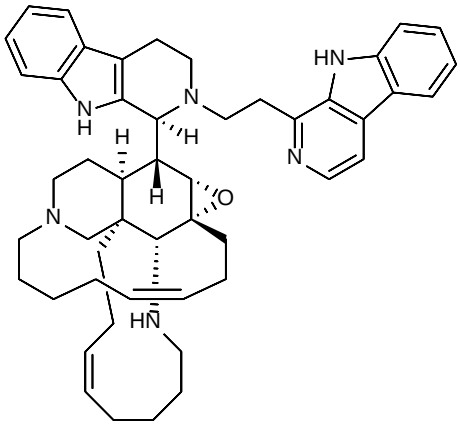
manzanine M (**A19**)



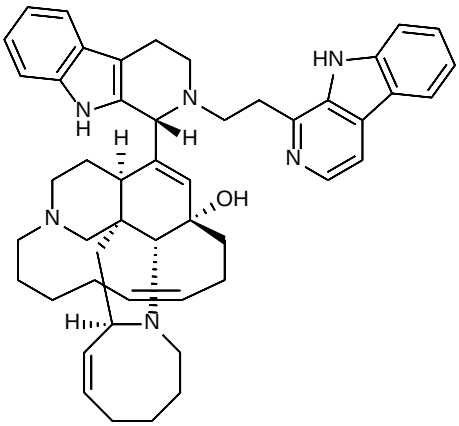
3,4-dihydromanzamine J (**A20**)



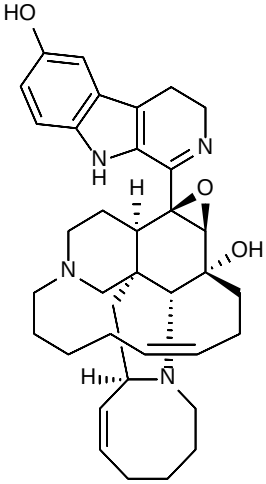
zamamidine A (**A21**)



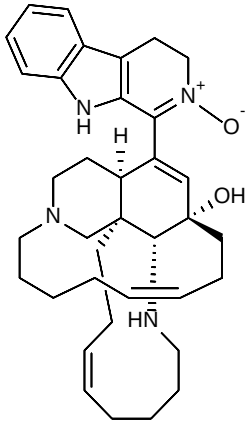
zamamidine B (**A22**)



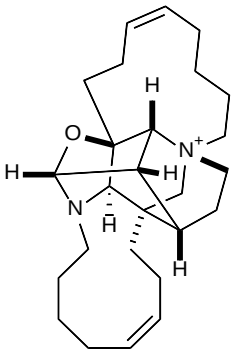
zamamidine C (**A23**)



3,4-dihydro-6-hydroxy-10,11-époxymanzamine A (**A24**)



3,4-dihydromanzamine J *N*-oxyde (**A25**)



zamamiphidine A (**A26**)

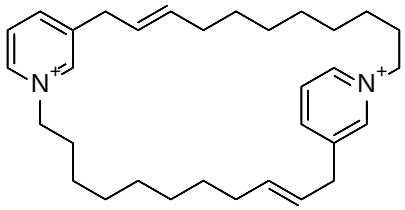
Tableau XVI *: Activités cytotoxiques des manzanines et dérivés*

Molécule	leucémie murine L1210 CI_{50} (µg/mL)	leucémie murine P388 CI_{50} (µg/mL)	carcinome buccal KB CI_{50} (µg/mL)
6-hydroxymanzanine A (**A7**)	1,5	-	2,5
3,4-dihydromanzamine A (**A8**)	0,048	-	0,61
3,4-dihydro-6-hydroxymanzamine A (**A9**)	0,3	-	-
ircinol A (**A10**)	2,4	-	6,1
ircinol B (**A11**)	7,7	-	9,4
kéramaphidine B (**A15**)	-	0,28	0,3
manzanine L (**A16**)	3,7	-	> 10
ma'éganédine A (**A17**)	4,4	-	-
nakadomarine A (**A18**)	1,3	-	-
manzanine M (**A19**)	1,4	-	-
3,4-dihydromanzamine J(**A20**)	0,5	-	-
zamamidine A (**A21**)	-	> 10	> 20
zamamidine B (**A22**)	-	> 10	> 20
zamamidine C (**A23**)	> 10	> 10	> 10
3,4-dihydro-6-hydroxy-10,11-époxymanzamine A (**A24**)	3,9	3,6	7,2
3,4-dihydromanzamine J *N*-oxyde (**A25**)	9,0	3,6	6,7
zamamiphidine A (**A26**)	> 10	-	> 10

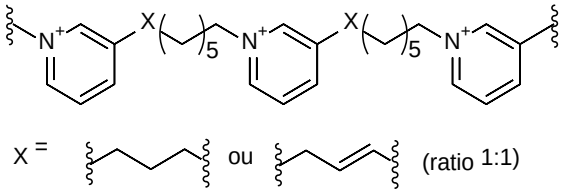
❖ Dérivés de la pyridine et sels de 3-alkylpyridinium

Les alcaloïdes majoritairement rencontrés dans les éponges du genre *Amphimedon* sont des alcaloïdes au noyau pyridinique. En effet, 32 alcaloïdes de type pyridinique ont été décrits au travers de 9 publications. Parmi ceux-ci, la **cyclostellettamine-8,8'-diène** (**A27**) (Xu N. J. *et al.*, 2007), isolée de l'éponge *Amphimedon compressa*, collectée en Floride dans le Golfe du Mexique. Cet alcaloïde serait probablement un précurseur dans la voix de biosynthèse des manzanines. Il s'agit par ailleurs d'un dimère d'un sel de 3-alkylpyridinium ayant montré des propriétés antibactériennes remarquables contre six bactéries, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, MRS et *Aspergillus fumigatus* avec des CI_{50} de 0,4 ; 1,3 ; 2,1 ; 2,5 ; 0,25 et 0,3 µg/mL respectivement. D'autres sels de pyridinium, mais de type polymères, ont également été isolés d'éponges du genre *Amphimedon*, l'**amphitoxine** (**A28**)

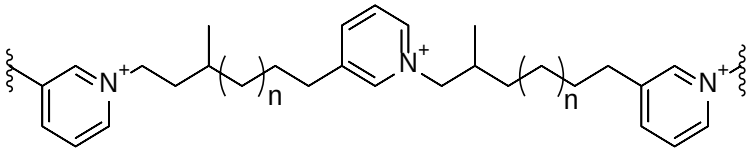
(Albrizio S. *et al.*, 1995), isolée d'*Amphimedon compressa*, collectée dans l'Océan Altantique, aux Bahamas et l'**halitoxine** (**A29**) (Berlinck R. G. S. *et al.*, 1996), isolée d'*Amphimedon viridis*, collectée dans l'Océan Atlantique, sur les côtes Brésiliennes. L'**halitoxine** (**A29**) possède une activité hémolytique dépendante de sa masse molaire (DE_{50} allant de 1 ng/mL à 1 µg/mL).



cyclostellettamine-8,8'-diène (**A27**)

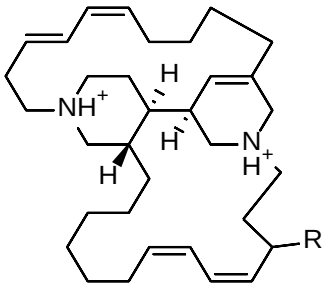


amphitoxine (**A28**) ; masse molaire 1 000 à 10 000 Da

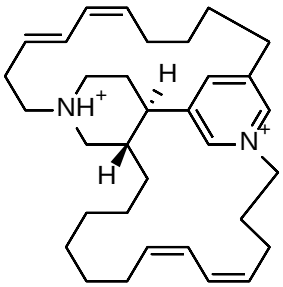


halitoxine (**A29**) n = 2, 3, 4, 5 ; masse molaire 500 à 5 000 Da

Les travaux de Matsunaga S. *et al.* (2004) sur une éponge du genre *Amphimedon*, collectée au sud du Japon, ont permis d'isoler trois alcaloïdes pipéridiniques, l'**halicyclamine A** (**A30**), la **tétradéhydrohalicyclamine A** (**A31**) et la **22-hydroxyhalicyclamine A** (**A32**). Ces trois molécules possèdent une activité cytotoxique sur les cellules leucémiques P388 avec des CI_{50} respectives de 0,45 ; 2,2 et 0,45 µg/mL.



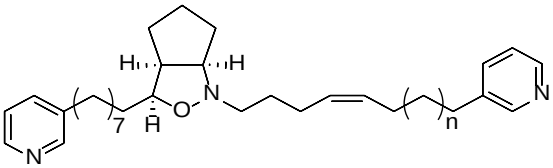
halicyclamine A (**A30**) R = H
22-hydroxyhalicyclamine A (**A32**) R = OH



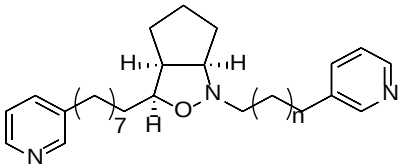
tétradéhydrohalicyclamine A (**A31**)

De nombreux autres dérivés neutres de la pyridine ont été isolés d'éponges du genre *Amphimedon*, ceux-ci sont particulièrement intéressants car généralement très toxiques. A titre d'exemple, nous pouvons citer les **pyrinodémines A – I** (**A33 – A41**) ainsi que leurs précurseurs, des alcaloïdes de type 3-alkylpyridine (**A43 – A48**) (Tsuda M. *et al.*, 1999 ; Hirano K. *et al.*, 2000 ; Kura K. *et al.*, 2011 ; Kubota T. *et al.*, 2013). Ces molécules ont été isolées de différentes éponges du genre *Amphimedon*, toutes collectées au Japon. Les **pyrinodémines A** (**A33**), **B** (**A34**), **C** (**A35**), **D** (**A36**), **E** (**A37**), **G** (**A39**) et **H** (**A40**) ont montré en particulier une activité cytotoxique sur

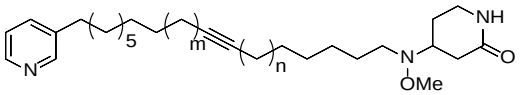
différentes lignées cellulaires cancéreuses. Un bilan des activités cytotoxiques des pyrinodémines est dressé dans le **Tableau XVII**.



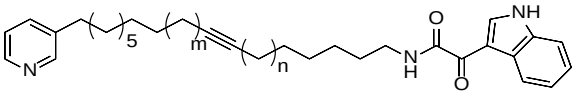
pyrinodémine A (**A33**) n = 7
pyrinodémine C (**A35**) n = 6



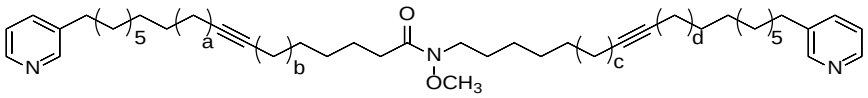
pyrinodémine B (**A34**) n = 11
pyrinodémine D (**A36**) n = 10



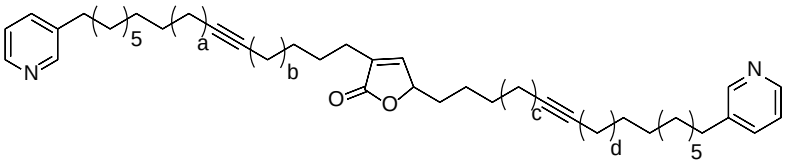
pyrinodémine E (**A37**) m + n = 1



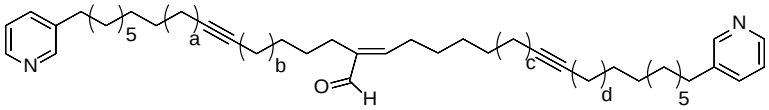
pyrinodémine F (**A38**) m + n = 1



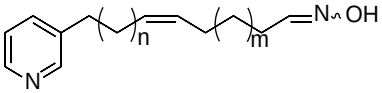
pyrinodémine G (**A39**) a + b = 1 ; c + d = 1



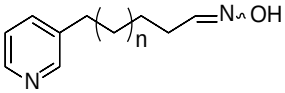
pyrinodémine H (**A40**) a + b = 1 ; c + d = 1



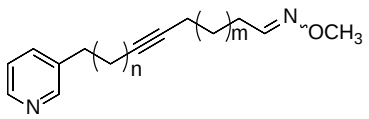
pyrinodémine I (**A41**) a + b = 1 ; c + d = 1



(11*Z*)-*N*-hydroxy-13-(3-pyridinyl)-1-tétradéc-11-énimine
(**A42**) n = 1 ; m =7
(5*Z*)-*N*-hydroxy-13-(3-pyridinyl)-1-tétradéc-5-énimine
(**A43**) n = 7 ; m = 1

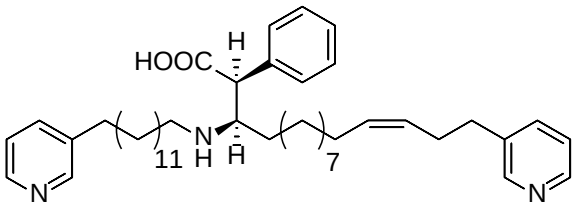


N-hydroxy-13-(3-pyridinyl)-1-tridécanimine
(**A44**) n = 9
N-hydroxy-12-(3-pyridinyl)-1-dodécanimine
(**A45**) n = 8

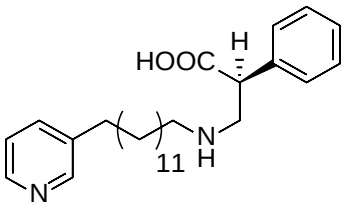


niphatésine F (**A46**) n = 7 ; m = 3
N-méthoxy-16-(3-pyridinyl)-6-hexadécyn-1-imine (**A47**) n = 8 ; m = 2

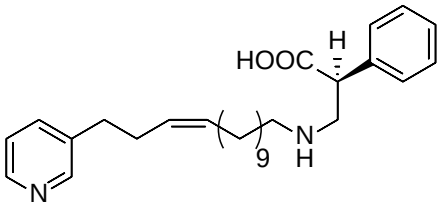
Ont également été isolés d'une éponge du genre *Amphimedon*, collectée au Japon, les **nakinadine A – F** (**A48 – A53**) (Kubota T. *et al.*, 2007 ; Nishi T. *et al.*, 2008). Seules les **nakinadines A** (**A48**), **B** (**A49**) et **C** (**A50**) ont montré une activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Ces activités sont répertoriées dans le **Tableau XVII**.



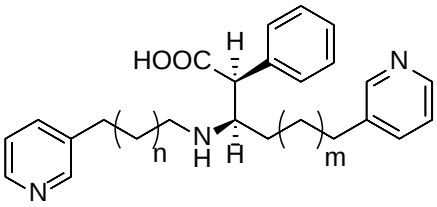
nakinadine A (**A48**)



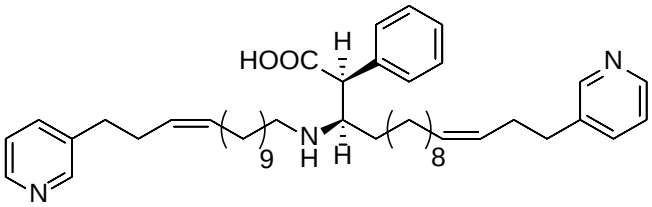
nakinadine B (**A49**)



nakinadine C (**A50**)

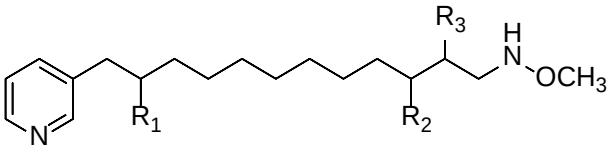


nakinadine D (**A51**) m = n = 10
nakinadine E (**A52**) m = 10 ; n = 11

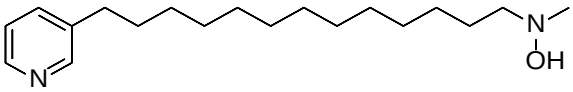


nakinamide F (**A53**)

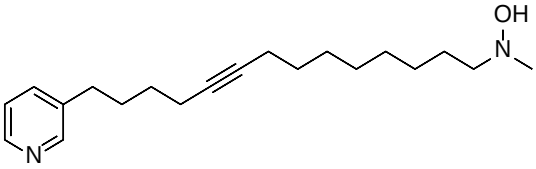
Les **hachijodines A – G** (**A54 – A60**) (Tsukamoto S. *et al.*, 2000) ont également été isolés d'une éponge du genre *Amphimedon*, collectée au Japon. Ces molécules ont montré une activité cytotoxique sur les cellules leucémiques murines P388. Les différentes CI_{50} sont listées dans le **Tableau XVII**.



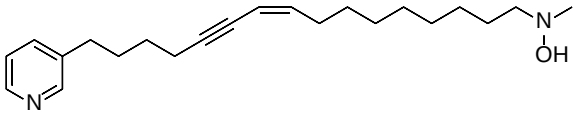
hachijodine A (**A54**) $R_1 = R_2 = R_3 = H$
hachijodine B (**A55**) $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = CH_3$
hachijodine C (**A56**) $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$
hachijodine D (**A57**) $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = H$



hachijodine E (**A58**)

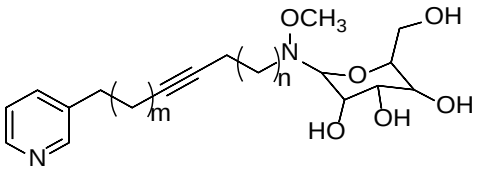


hachijodine F (**A59**)

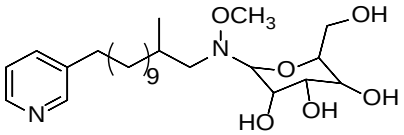


hachijodine G (**A60**)

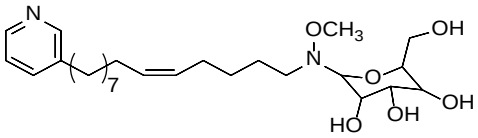
Toujours isolées d'une éponge du genre *Amphimedon* du Japon, les **amphimédosides A – E** (**A61 – A65**) (Takekawa Y. *et al.*, 2006). Si les **amphimédosides A** (**A61**) et **B** (**A62**) ont montré une cytotoxicité modérée sur cellules murines leucémiques, les **amphimédosides C** (**A63**), **D** (**A64**) et **E** (**A65**) en revanche possèdent une activité cytotoxique élevée sur ces mêmes cellules (**Tableau XVII**).



amphimédoside A (**A61**) m = 3 ; n = 9
amphimédoside B (**A62**) m = 3 ; n = 7
amphimédoside C (**A63**) m = 1 ; n = 9



amphimédoside D (**A64**)



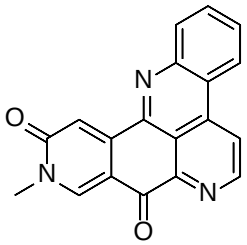
amphimédoside E (**A65**)

Tableau XVII : *Activités cytotoxiques des différents dérivés de la pyridines isolés des éponges du genre Amphimedon.*

Molécule	Leucémie murine L1210 CI_{50} (µg/mL)	Leucémie murine P388 CI_{50} (µg/mL)	Carcinome buccal KB CI_{50} (µg/mL)
pyrinodémine A (**A33**)	0,058	-	0,5
pyrinodémine B (**A34**)	0,07	-	0,5
pyrinodémine C (**A35**)	0,06	-	0,5
pyrinodémine D (**A36**)	0,08	-	0,5
pyrinodémine E (**A37**)	8,8	5,5	-
pyrinodémine F (**A38**)	> 10	> 10	-
pyrinodémine G (**A39**)	-	9,6	-
pyrinodémine H (**A40**)	-	2,5	-
pyrinodémine I (**A41**)	-	> 10	-
nakinadine A (**A48**)	1,3	-	2,5
nakinadine B (**A49**)	3,0	-	7,0
nakinadine C (**A50**)	5,0	-	> 10
nakinadine D (**A51**)	> 10	-	> 10
nakinadine E (**A52**)	> 10	-	> 10
nakinadine F (**A53**)	> 10	-	> 10
hachijodine A (**A54**)	-	2,2	-
hachijodine B (**A55**)	-	2,2	-
hachijodine C (**A56**)	-	2,2	-
hachijodine D (**A57**)	-	2,2	-
hachijodine E (**A58**)	-	2,3	-
hachijodine F (**A59**)	-	1,0	-
hachijodine G (**A60**)	-	1,0	-
amphimédoside A (**A61**)	-	> 10	-
amphimédoside B (**A62**)	-	> 10	-
amphimédoside C (**A63**)	-	5,0	-
amphimédoside D (**A64**)	-	0,45	-
amphimédoside E (**A65**)	-	2,2	-

❖ Alcaloïdes de type pyridoacridine

Les travaux de Schmitz F. J. *et al.* (1983) menés sur l'éponge *Amphimedon* sp., collectée dans l'Océan Pacifique, sont les seuls à ce jour à faire mention d'un alcaloïde de la famille des pyridoacridines isolé du genre *Amphimedon*, l'**amphimédine** (**A66**). Ce type de composés a des caractéristiques pigmentaires intéressantes, ils sont également cytotoxiques et agissent comme agent d'intercalation dans l'ADN (Molinski, 1993 ; Thale *et al.*, 2002).

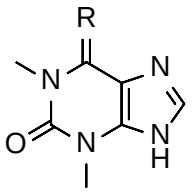


amphimédine A (**A66**)

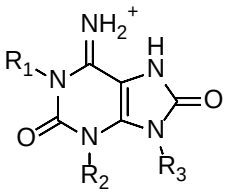
❖ Alcaloïdes puriques

Six des alcaloïdes isolés d'éponges appartenant au genre *Amphimedon* sont des purines. Hormis la **théophylline** (**A67**), isolée par Chehade C. *et al.* (1997) d'un spécimen d'*Amphimedon viridis* collecté sur les côtes brésiliennes, les cinq autres sont nouvelles. La **1,3-**

diméthylisoguanine (**A68**), a été isolée de deux éponges *Amphimedon viridis*, l'une collectée sur les côtes brésiliennes (Chehade C. *et al.*, 1997) et l'autre aux Bermudes (Mitchell S. S. *et al.*, 1997). Cette molécule a également été isolée sous la forme 1,3-diméthylisoguaninium d'*Amphimedon paraviridis* collectée dans la mer de Chine orientale (Jeong S. J. *et al.*, 2003). Les travaux de Sakurada T. *et al.* (2010) ont permis d'isoler quatre nouvelles purines, il s'agit de la **1,3-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A69**), la **1,9-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A70**), la **3,9-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A71**) et la **9-méthyl-8-oxoisoguanine** (**A72**).



théophylline (**A67**) R = O
1,3-diméthylisoguanine (**A68**) R = NH



1,3-diméthyl-8-oxoisoguanine (**A69**) $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = H$
1,9-diméthyl-8-oxoisoguanine (**A70**) $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$
3,9-diméthyl-8-oxoisoguanine (**A71**) $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = CH_3$
9-méthyl-8-oxoisoguanine (**A72**) $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$

III.2 Etude chimique de l'éponge *Amphimedon* sp. de Madagascar

L'étude chimique de l'éponge *Amphimedon* sp. collectée à Madagascar a permis l'obtention de trois composés (**AS1 – AS3**) : un composé connu, l'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (**AS1**), ainsi que deux composés nouveaux, deux alcaloïdes bromés, dérivés de la bromotyrosine (**AS2 – AS3**). Les techniques d'isolement et de purification, ainsi que l'élucidation structurale de ces composés sont exposées ci-après.

III.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires

L'isolement des métabolites secondaires de l'éponge *Amphimedon* sp. décrit ci-après, est illustré dans la **Figure 28**.

1,5 g de l'extrait brut dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v) de l'éponge ont été fractionnés par CLMP sur une colonne de silice normale. L'élution a été réalisée au moyen d'un système de solvants de polarité croissante : isoohexane 100 % ; isohexane / AcOEt 50/50 ; AcOEt 100 % ; AcOEt / méthanol 50/50 ; méthanol 100%. Cela a permis l'obtention de dix fractions (F1-F10).

Les analyses par CLHP-DAD-SM des 10 fractions obtenues montrent que les composés bromés ayant retenu notre attention lors de la sélection des organismes à travailler se trouvent dans les fractions F8, F9 et F10.

La fraction F9 contient le composé **AS3**, qui a été purifié par CLPH semi-préparative sur une colonne en phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 10 x 250 mm) à l'aide d'un gradient de solvant eau + 0,1% acide formique / méthanol + 0,1 % acide formique.

La fraction F10 a été soumise à un second fractionnement par CLHP semi-préparative sur colonne en phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 10 x 250 mm) avec un gradient eau + 0,1% acide formique / méthanol + 0,1 % acide formique. Quatorze sous-fractions ont ainsi été collectées (F101-F1014). Parmi celles-ci, F106 contient le composé **AS2** pur, F1013 le composé **AS3** et F1014 le composé **AS1** pur.

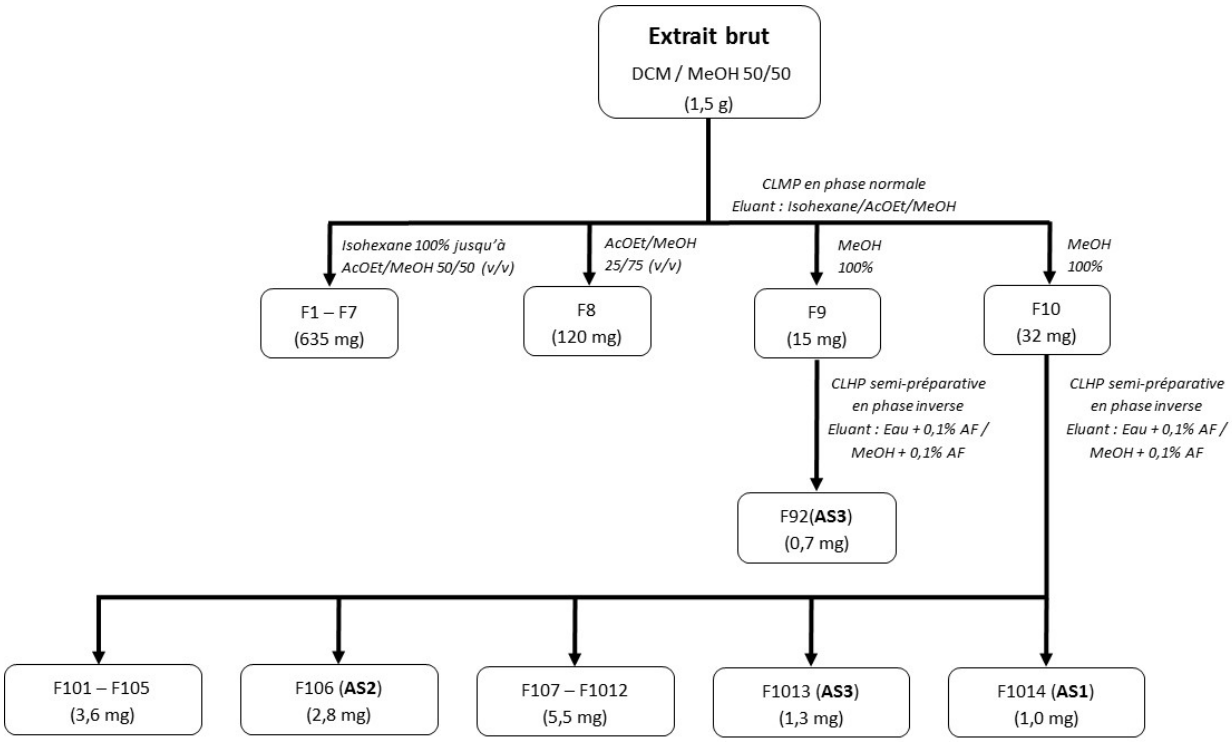
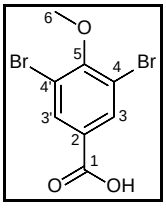


Figure 28 : *Fractionnement d'Amphimedon sp. pour l'obtention des métabolites **AS1** à **AS3**.*

III.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires isolés

III.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AS1



*acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (**AS1**)*

Le composé **AS1,** isolé sous la forme d'une huile incolore, présente un spectre SMHR en mode ESI^- avec un ion moléculaire $[m-H]^-$ à *m/z* 306,86111 (premier pic du massif isotopique) en accord avec la formule brute $C_8H_5Br_2O_3^-$, (valeur calculée : *m/z* 306,8611, avec l'isotope ^{79}Br). Le massif isotopique nous renseigne sur la présence de deux atomes de brome dans la molécule, en effet, celui-ci est constitué de trois pics *m/z* 306,86111 ; 308,85901 ; 310,85684 d'abondance relative respective de 53 ; 100 ; 48. Cela est dû aux deux isotopes du brome (^{79}Br et ^{81}Br) ayant une abondance naturelle respective de 50,7% et de 49,3%. Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 5.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (**Tableau XVIII**) révèle la présence :

- D'un noyau aromatique caractérisé par les déplacements chimiques des carbones C-3 (δC 134,7) ; C-4 (δC 118,0) ; C-5 (δC 156,6) et des protons H-3 (δH 8,12).
- D'un groupement méthoxy, caractérisé par le déplacement chimique du carbone C-6 (δC 60,8) et des protons H-6 (δH 3,87).
- D'un acide carboxylique, caractérisé par le déplacement chimique du carbone C-1 (δC 171,0).

Cette première approche met bien en évidence les 5 insaturations précédemment calculées : un cycle aromatique comptant pour 4 insaturations et une fonction carbonyle de l'acide carboxylique.

Pour **AS1**, aucune corrélation homonucléaire ^1H – ^1H de courte distance (^1H – ^1H COSY) n'a été observée. Le spectre RMN ^1H ne présente en effet que deux singulets. La structure de **AS1** a été établie à partir des corrélations hétéronucléaires longues distances (^1H – ^{13}C HMBC).

- H-3 (δH 8,12), proton aromatique intégrant pour 2, est corrélé avec C-3 (δC 134,7). Cela implique la présence de deux carbones C-3 identiques. L'hypothèse la plus probable au regard des déplacements chimiques est une symétrie dans le cycle aromatique et H-3 correspond à deux protons aromatiques équivalents.
- H-3 est corrélé avec C-4 (δC 118,0). En outre, le déplacement chimique de C-4 indque que ce dernier est substitué par un brome. Ainsi, afin de respecter la symétrie dans la molécule et en se référant à la formule brute ($C_8H_5Br_2O_3^-$), C-4 correspond à deux carbones quaternaires équivalents substitué chacun par un atome de brome.
- H-3 et H-6 (δH 3,87), sont corrélés avec C-5 (δC 156,6). Les protons H-6, intégrant pour 3 protons, ont un déplacement chimique caractéristique d'un groupement

méthoxy. Le carbone aromatique C-5 est donc substitué par un groupement méthoxy.

- H-3 est corrélé avec C-1 (δC 171,0) dont le déplacement chimique est caractéristique d'un acide carboxylique substituant le seul carbone aromatique restant, C-2. La corrélation entre H-3 et C-1 implique que le carbone C-2 soit en position ortho de C-3 afin que cette corrélation corresponde à un couplage ^{3}J.
- C-5 est donc en position méta par rapport à C-3. La corrélation sur le spectre HMBC entre H-3 et C-5 correspond alors à un couplage ^{3}J.

Le métabolite **AS1** semble donc être l'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque. Venkateswarlu Y. et Chavakula R. (1995), ont isolé pour la première fois ce métabolite de l'éponge *Psammaplysilla purpurea*. Par la suite, **AS1** a également été isolé de l'éponge *Aplysinella* sp. (Tian L.W. *et al*., 2014) mais les déplacements chimiques de ce métabolite ne sont pas décrits dans ces publications.

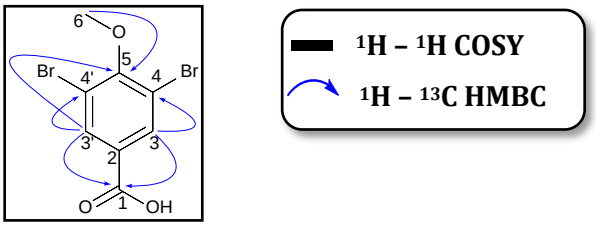


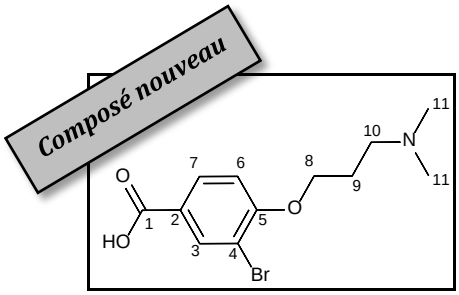
Figure 29 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS1**.*

Tableau XVIII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **AS1** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	171, C	-	-
2	-	-	-
3 – 3'	134,7, CH	8,12 (s)	1, 3, 3', 4, 4', 5
4 – 4'	118, C	-	-
5	156,6, C	-	-
6	60,8, CH_3	3,87 (s)	5

III.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite AS2



*acide amphimédonoïque (**AS2**)*

Le composé **AS2,** isolé sous la forme d'une huile jaune, présente un spectre SMHR en mode ESI+ avec un ion moléculaire $[m+H]^+$ à *m/z* 302,03882 en accord avec la formule brute $C_{12}H_{17}BrNO_3^+$, (valeur calculée : *m/z* 302,0386, avec l'isotope ^{79}Br). Le massif isotopique, *m/z* 302,03882, 304,03668 (abondance relative 100 et 98) du spectre de masse nous indique la présence d'un brome dans la molécule. Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 5.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (**Tableau XIX**) révèle la présence :

- D'un noyau aromatique caractérisé par les déplacements chimiques des carbones C-2 (δC 132,2) ; C-3 (δC 135,3) ; C-4 (δC 111,7) ; C-5 (δC 157,6) ; C-6 (δC 112,9) ; C-7 (δC 131,1) et des protons H-3 (δH 8,10) ; H-6 (δH 6,97) ; H-7 (δH 7,83).
- D'un acide carboxylique, caractérisé par le déplacement chimique du carbone C-1 (δC 172,6).
- De trois méthylènes consécutifs C-8 (δC 67,2 ; δH 4,21), C-9 (δC 25,9 ; δH 2,23) et C-10 (δC 56,7 ; δH 3,21).
- De deux groupements méthyles équivalents portés par un atome d'azote, C-11 (δC 43,9 ; δH 2,81).

Cette première approche met bien en évidence les 5 insaturations précédemment calculées : un cycle aromatique comptant pour 4 insaturations et une fonction carbonyle de l'acide carboxylique.

Les corrélations homonucléaires ^1H – ^1H COSY et les corrélations hétéronucléaires ^1H – ^{13}C HMBC ainsi que les constantes de couplages nous permettent de déterminer les substitutions du cycle aromatique :

- La corrélation COSY entre H-7 (δH 7,83) et H-6 (δH 6,97) permet de positionner C-6 en ortho de C-7.

- La constante de couplage (J = 1,9 Hz) entre H-3 (δH 8,10) et H-7 (δH 7,83) permet de positionner C-3 en méta de C-7 et l'absence de couplage entre H-3 (δH 8,10) et H-6 (δH 6,97) suggère que C-3 est en para de C-6.
- Le déplacement chimique de C-5 (δC 157,6), très déblindé, laisse supposer que celui-ci est substitué par un hétéroatome. De plus, H-8 (δH 4,21) est corrélé avec C-5 sur le spectre HMBC or les déplacements chimiques de H-8 et de C-8 (δC 67,2) sont caractéristique d'un méthylène substitué par un oxygène. C-5 est donc substitué par un groupement éther relié à C-8. Les corrélations HMBC entre H-3 (δH 8,10) et C-5, entre H-6 (δH 6,97) et C-5 et entre H-7(δH 7,83) et C-5 indiquent la position de C-5 sur le cycle.
- C-1 (δC 172,6) présente un déplacement chimique caractéristique d'un carbonyle d'une fonction acide carboxylique. Sur le spectre HMBC, les corrélations entre H-3 (δH 8,10) et C-1 et entre H-7 (δH 7,83) et C-1, ainsi que les corrélations HMBC entre H-6 (δH 6,97) et C-2 (δC 132,2) et entre H-7 et C-2 permettent de placer C-2 portant la fonction acide carboxylique, en ortho des carbones C-3 et C-7.
- Le déplacement chimique de C-4 (δC 111,7) laisse supposer que celui-ci est substitué par un brome. Les corrélations HMBC entre H-3 (δH 8,10) et C-4 et entre H-6 (δH 6,97) et C-4 indiquent que C-4 se trouve en ortho du carbone C-3 ; la position ortho du carbone C-6 étant déjà occupée par le groupement éther précédemment décrit.

Enfin, les corrélations COSY entre H-8 et H-9 et H-9 et H-10 permettent d'attribuer l'enchaînement des trois méthylènes C-8 (δC 67,2), C-9 (δC 25,9) et C-10 (δC 56,7). Les corrélations HMBC entre H-10 et C-11 et H-11 et C-11, permettent de positionner l'amine tertiaire, reliée à C-10 et substituée par deux méthyles équivalents C-11.

De structure nouvelle, **AS2** a été nommé **acide amphimédonoïque**.

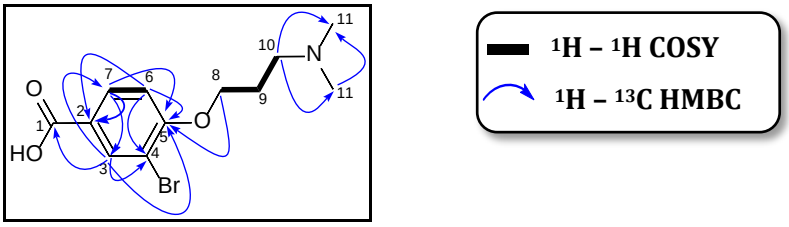


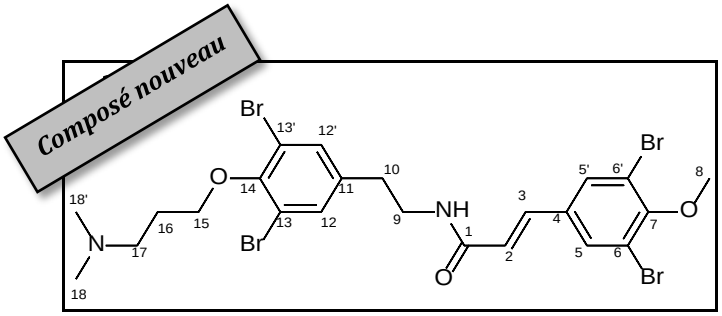
Figure 30 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS2**.*

Tableau XIX : *Données de la RMN 1D et 2D pour **AS2** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^1H-^1H)	HMBC (^1H-^{13}C)
1	172,6, C	-	-	-
2	132,2, C	-	-	-
3	135,3, CH	8,10 (d, 1,9)	-	1, 4, 5, 7
4	111,7, C	-	-	-
5	157,6, C	-	-	-
6	112,9, CH	6,97 (d, 8,5)	7	2, 4, 5
7	131,1, CH	7,83 (dd, 8,6 ; 2,0)	6	3, 5
8	67,2, CH_2	4,21 (t, 5,7)	9	5, 9
9	25,9, CH_2	2,23 (m)	8, 10	8, 10
10	56,7, CH_2	3,21 (t, 7,4)	9	8, 9, 11
11	43,9, CH_3	2,81 (s)	-	10, 11

2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AS3



*psammaplysène E (**AS3**)*

Le composé **AS3,** isolé sous la forme d'une huile incolore, présente un spectre SMHR en mode ESI+ avec un ion moléculaire $[m+H]^+$ à *m/z* 694,87579 en accord avec la formule brute $C_{23}H_{27}Br_4N_2O_3^+$, (valeur calculée : *m/z* 694,8750, avec l'isotope ^{79}Br). Le massif isotopique, *m/z* 694,87579, 696,87402, 698,87231, 700,87024, 702,86914 (abondance relative 16, 70, 100, 68 et 18) du spectre de masse, nous indique la présence de quatre bromes dans la molécule. Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 10.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C (**Tableau XX**) révèle la présence :

- De deux noyaux aromatiques caractérisés par les déplacements chimiques des carbones C-4 (δC 135,1) ; C-5 (δC 132,8) ; C-6 (δC 119,3) ; C-7 (δC 156,1) ; C-11 (δC 139,9) ; C-12 (δC 134,2) ; C-13 (δC 118,7) et C-14 (δC 152,3) et des protons H-5 (δH 7,79) et H-12 (δH 7,50).
- D'un amide, caractérisé par le déplacement chimique du carbone C-1 (δC 167,6).
- De deux méthynes caractéristiques d'un alcène, avec les carbones C-2 (δC 123,6) et C-3 (δC 138,1) et les protons H-2 (δH 6,52) et H-3 (δH 7,37).

- De deux méthylènes consécutifs C-9 (δC 41,5 ; δH 3,51) et C-10 (δC 34,9 ; δH 2,82).
- De trois méthylènes consécutifs C-15 (δC 71,6 ; δH 4,07), C-16 (δC 27,4 ; δH 2,15) et C-17 (δC 57,1 ; δH 3,07).
- D'un groupement méthyle porté par un éther C-8 (δC 60,9 ; δH 3,88).
- De deux groupements méthyles équivalents portés par une amine C-18 (δC 44,3 ; δH 2,63).

Cette première approche met bien en évidence les 10 insaturations précédemment calculées : les 2 cycles aromatiques comptant pour 4 insaturations chacun, une liaision éthylénique et une fonction carbonyle de l'amide.

Les corrélations COSY entre H-2 et H-3 nous permettent de les positionner côte à côte. Tous deux sont corrélés par ailleurs avec le carbonyle C-1 sur le spectre HMBC. Le déblindage de H-3 (δH 7,37) par rapport à H-2 (δH 6,52) suggère que H-2 est en position α du carbonyle et H-3 en position β. De plus, H-2 est corrélé avec le carbone du cycle aromatique C-4 (couplage ^{3}J) et H-3 est corrélé avec C-5 (couplage ^{3}J). Sur le spectre HMBC, H-5 est corrélé avec C-5, ce qui implique la présence de deux carbones C-5 équivalents, soit une symétrie dans le cycle aromatique. H-5 est corrélé avec C-6 (deux carbones équivalents pour respecter la symétrie) et C-7. Sur le spectre HMBC, il est observé une corrélation entre les protons du groupement méthoxy H-8 et le carbone C-7. Ce dernier est donc substitué par le groupement méthoxy. Les déplacements chimiques des deux carbones quaternaires C-6 (δC 119,3) indiquent que les deux carbones sont substitués par des atomes de brome.

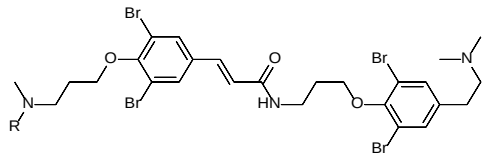
Sur le spectre HMBC, les protons méthyléniques H-9 sont corrélés avec le carbonyle C-1 ; C-9 est donc relié à l'amide. Par ailleurs, les corrélations COSY entre H-9 et H-10 permettent de les relier entre eux.

Enfin, les substitutions du second cycle aromatique ont pu être déterminées par les corrélations HMBC suivantes :

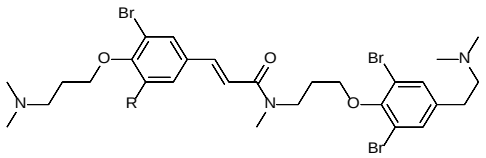
- H-9 avec C-11.
- H-10 avec C-12.
- H-12 avec C-10, C-13 et C14.
- H-15 avec C-14.

Pour terminer, les positions de C-15, C16 et C-17 ont été déterminées grâce aux corrélations COSY (H-15 avec H-16 et H-16 avec H-17). Les corrélations HMBC montrent que les protons méthyléniques H-17 sont corrélés avec C-18 et que les protons méthyliques H-18 sont corrélés avec C-18. Il y a donc deux carbones C-18 équivalent.

De structure nouvelle, proche de celles des **psammaplysènes A - D** (**A73** – **A76**) (Schroeder F. C. *et al.*, 2005 ; Buchanan M. S. *et al.*, 2007), **AS3** a été nommé **psammaplysène E**.



psammaplysène A (**A73**) R = CH_3
psammaplysène B (**A74**) R = H



psammaplysène C (**A75**) R = H
psammaplysène D (**A76**) R = Br

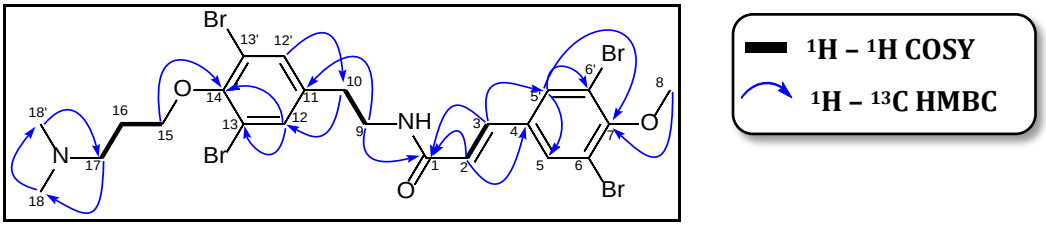


Figure 31 : *Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS3.***

Tableau XX : *Données de la RMN 1D et 2D pour **AS3** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	167,6, C	-	-	-
2	123,6, CH	6,52 (d, 15,7)	H3	1, 4
3	138,1, CH	7,37 (d, 15,7)	H2	1, 5
4	135,1, C	-	-	-
5 – 5'	132,8, CH	7,79 (s)	-	3, 5, 6, 7
6 – 6'	119,3, C	-	-	-
7	156,1, C	-	-	-
8	60,9, CH_3	3,88 (s)	-	7
9	41,5, CH_2	3,51 (t, 7,1)	H10	1, 10, 11
10	34,9, CH_2	2,82 (t, 7,0)	H9	9, 11, 12
11	139,9, C	-	-	-
12 – 12'	134,2, CH	7,50 (s)	-	10, 12, 13, 14
13 – 13'	118,7, C	-	-	-
14	152,3, C	-	-	-
15	71,6, CH_2	4,07 (t, 5,8)	H16	14, 16, 17
16	27,4, CH_2	2,15 (m)	H15, H17	15, 17
17	57,1, CH_2	3,07 (t, 7,3)	H16	-
18 – 18'	44,3, CH_3	2,63 (s)	-	17, 18

III.3 Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB des métabolites isolés.

- **Principe du test**

Les tests de cytotoxicité sur cellules KB ont été réalisés sous la direction du Docteur Thierry Cresteil puis sous la direction de l'Ingénieur de Recherche, Jérôme Bignon à l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette), France.

L'extrait brut de l'éponge *Amphimedon* sp. ayant révélé une cytotoxicité intéressante (100 % d'inhibition à 10 µg/mL, Chapitre I et Annexe I) sur les cellules KB, les composés isolés de cette éponge, ont donc été également évalués pour leur cytotoxicité sur cellules KB.

- **Résultats du test**

Avec des pourcentages d'inhibitions de 4 à 20% à une concentration de 10 µg/mL, les molécules testées ne présentent pas de cytotoxicité remarquable sur les cellules KB (**Tableau XXI**). En effet, cela signifie que leur CI_{50} sont supérieures à 10^{-5} g/mL alors que de manière générale, une molécule est potentiellement intéressante en oncologie lorsqu'elle présente une CI_{50} inférieure à 10^{-6} g/mL.

Tableau XXI : *Cytotoxicité sur les cellules KB des métabolites isolés d'Amphimedon sp.*

Molécule	% d'inhibition à 10 µg/mL
AS1	19,2 % (± 5,1)
AS2	4,5 % (± 3,8)
AS3	10,8 % (± 2,3)

II.4 Discussion

L'éponge *Amphimedon* sp. a été sélectionnée en raison de sa cytotoxicité sur cellule KB (100% d'inhibition à 10 µg/mL) et de son profil CLHP-SM (ESI^+). Ce dernier a révélé la présence de composés polybromés, ce qui est atypique pour le genre *Amphimedon*. En effet, aucun métabolite secondaire bromé n'a été rapporté dans la littérature pour ce genre. L'étude de cette éponge a permis l'isolement de 3 métabolites (**AS1 – AS3**) dont deux de structures nouvelles, deux alcaloïdes dérivés de la bromotyrosine (**AS2** et **AS3**). **AS1** est quant à lui un composé polybromophénolique connu, l'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque.

Les composés polybromophénoliques et les alcaloïdes dérivés de la bromotyrosine ne sont pas des molécules habituellement retrouvées chez les éponges appartenant à l'ordre des Haplosclerida. Seuls les travaux de Nicholas G. M. *et al*. (2001) et de Buchanan M. S. *et al*. (2007), ont révélé la présence de dérivés de la bromotyrosine dans des éponges autres que celles appartenant à l'ordre des Verongida. Nicholas G. M. *et al*. (2001) ont isolé quatre dérivés de la

bromotyrosine dans une éponge de l'ordre des Haplosclerida collectée en Australie, à savoir *Oceanapia* sp. Ces composés avaient été jusqu'alors retrouvés dans des éponges de l'ordre des Verongida et constituaient l'un des plus solides marqueurs chimiotaxonomique parmi les Porfira. Après une réexamination de l'échantillon de référence et une confirmation de l'identification de l'éponge, *Oceanapia* sp., Nicholas G. M. *et al*. (2001) ont conclu que la présence de ces molécules pouvait être expliquée par la coexistence d'une éponge de l'ordre des Verongida et de l'éponge du genre *Oceanapia* dans l'échantillon collecté. Buchanan M. S. *et al*. (2007) ont, quant à eux, isolé deux dérivés de la bromotyrosine, les psammaplysènes C (**M75**) et D (**M76**), d'une éponge, également collectée en Australie, appartenant à l'ordre des Poecilosclerida, à savoir, *Psammoclema* sp.. Il est alors légitime de se demander si ces composés sont spécifiques à l'ordre des Verongida ou s'ils sont le résultat d'une production de métabolites secondaires par des microorganismes.

En regardant plus attentivement la bibliographie, la plupart des spécimens d'éponges appartenant au genre *Amphimedon* ont été collectés au large du Japon (Ishibashi, M. *et al.,* 1993 ; Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Kobayashi J. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1994 ; Tsuda M. *et al.*, 1996 ; Kobayashi J. *et al.*, 1997 ; Tsuda M. *et al.*, 1998 ; Watanabe D. *et al.*, 1998 ; Kobayashi J. *et al.*, 1999 ; Tsuda M. *et al.*, 1999 ; Hirano K. *et al.*, 2000 ; Tsukamoto S. *et al.*, 2000 ; Jeong S. J. *et al.*, 2003 ; Matsunaga S. *et al.*, 2004 ; Takekawa Y. *et al.*, 2006 ; Kubota T. *et al.*, 2007 ; Nishi T. *et al.*, 2008 ; Takahashi Y. *et al.*, 2009 ; Yamada M. *et al.*, 2009 ; Kura K. *et al.*, 2011 ; Kubota T. *et al.*, 2013 ; Kubota T. *et al.*, 2013). Pour toutes ces éponges, le même type de composés a été isolé, à savoir un sesterterpène, la **variabiline** (**A1**), 54 alcaloïdes pyridiniques et un alcaloïde purique, la **1,3-diméthylisoguanine** (**A68**). En revanche, en se focalisant uniquement sur les éponges appartenant au genre *Amphimedon* collectées hors du Japon, aucun marqueur chimiotaxonomique relatif au genre *Amphimedon* n'est mis en évidence.

Schmitz F. J. *et al.* (1983) ont travaillé sur une éponge du genre *Amphimedon*, collectée dans l'Océan Pacifique (aucune information sur le lieu exact) et sont les seuls à ce jour à faire mention d'un alcaloïde de la famille des pyridoacridines, l'**amphimédine** (**A66**). Ovenden S. P. B. *et al*. (1999) ont travaillé sur deux éponges du genre *Amphimedon* provenant d'Australie et sont les seuls à avoir isolés des lactames macrocycliques, les **amphilactames A – D** (**A2 – A5**). Trois sels de 3-alkylpyridinium dimérisés ou polymérisés ont été isolés ; la **cyclostellettamine-8,8'-diène** (**A27**) isolée de l'éponge *Amphimedon compressa*, collectée en Floride dans le Golfe du Mexique (Xu N. J. *et al.,* 2007), l'**amphitoxine** (**A28**), isolée de la même espèce, collectée dans l'Océan Altantique, aux Bahamas (Albrizio S. *et al.*, 1995) et l'**halitoxine** (**A29**) isolée d'*Amphimedon viridis*, collectée dans l'Océan Altantique, au Brésil (Berlinck R. G. S. *et al.*, 1996). Enfin, six alcaloïdes puriques ont été mentionnés pour le genre *Amphimedon* :

- La **théophylline** (**A67**) et la **1,3-diméthylisoguanine** (**A68**), isolées d'un spécimen d'*Amphimedon viridis* collecté sur les côtes brésiliennes (Chehade C. *et al.,* 1997) ; Mitchell S. S. *et al.* (1997), ont également isolé la **1,3-diméthylisoguanine** (**A68**) d'un spécimen d'*Amphimedon viridis* collecté aux Bermudes.
- Les **1,3-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A69**), **1,9-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A70**), **3,9-diméthyl-8-oxoisoguanine** (**A71**) et **9-méthyl-8-oxoisoguanine** (**A72**), isolés de l'éponge *Amphimedon* sp., collecté au large des îles Palau (Sakurada T. *et al.,* 2010).

On peut donc en conclure que la composition chimique des éponges du genre *Amphimedon* est très dépendante du lieu de collecte.

L'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (**AS1**) a déjà été isolé des éponges *Psammaplysilla purpurea* et *Aplysinella* sp. (Venkateswarlu Y. et Chavakula R., 1995 ; Tian L.W. *et al*., 2014) mais plus généralement les composés polybromophénoliques sont des métabolites fréquemment isolés d'éponges appartenant au genre *Dysidea* et au genre *Lamellodysidea* (Sharma G. M. et Vig B., 1972 ; Norton R. S. *et al*., 1981 ; Carté B. et Faulkner D. J., 1981 ; Salva J. et Faulkner D. J. 1990 ; Fu X. *et al.*, 1995 ; Handayani D., *et al*., 1997 ; Bowden B. F. *et al*., 2000 ; Cameron G. M. *et al*., 2000 ; Utkina N. K. *et al*., 2001 ; Utkina N. K. *et al*., 2002 ; Agrawal M. S. *et al.*, 2005 ; Utkina N. K. *et al*., 2006 ; Hanif N. *et al*., 2007 ; Zhang H. *et al*., 2008 ; Calcul L. *et al*., 2009). Les éponges les plus étudiées sont *Dysidea chlorea* et *Dysidea herbacea,* actuellement reclassées *Lamellodysidea chlorea* et *Lamellodysidea herbacea*. Quelques composés polybromophénoliques ont également été reportés d'éponges appartenant au genre *Phyllospongia* (Carté B. et Faulkner D. J., 1981 ; Hattori T. *et al*., 2001 ; Liu H. *et al*., 2004). La plupart de ces études s'accorde à dire que la présence de ces composés polybromophénoliques est due à la relation symbiotique existante entre les éponges des genres *Dysidea, Lamellodysidea* et *Phyllospongia* et une cyanobactérie* filamenteuse, *Oscillatoria spongeliae* (Unson M. D. et Faulkner D. L., 1993 ; Thacker R. W. et Starnes S., 2003 ; Agrawal M. S. *et al.*, 2005). Unson M. D. *et al.*, (1994) ont étudié séparément une éponge *Dysidea herbacea* et son endosymbiote, la cyanobactérie *Oscillatoria spongeliae.* Les composés polybromophénoliques ont été retrouvés dans les cellules de la cyanobactérie mais pas dans celles de l'éponge. Ces molécules ne peuvent donc pas être un critère chimiotaxonomique des genres d'éponges *Dysidea, Lamellodysidea* et *Phyllospongia*.

Une des explications possibles de la présence d'alcaloïdes bromés et de polybromophénols dans l'éponge *Amphimedon* sp. étudiée pourrait donc être la présence d'une cyanobactérie vivant en symbiose avec l'éponge.

Chapitre IV

Etude de l'éponge *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922)

Aulospongus gardineri, Madagascar, 2012
Crédits LCSNSA

IV.1 Eléments bibliographiques sur *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922)

IV.1.1 Localisation du genre *Aulospongus* (Norman, 1878)

Les éponges du genre *Aulospongus* sont principalement localisées dans l'Océan Indien (Seychelles, Canal du Mozambique, Côte Kenyane, Côte Sud-Africaine, Golfe d'Aden, Sri-Lanka) mais certaines ont également été répertoriées dans l'Océan Atlantique (Côte Brésilienne, Cap Vert, Mer des Caraïbes) ainsi que dans l'Océan Pacifique (Golfe de Californie, Côte Mexicaine, Nouvelle Calédonie, Côte Australienne, Japon) (**Figure 32**) (www.marinespecies.org, www.iobis.org).

Figure 32 : *Lieux de collecte des éponges appartenant au genre Aulospongus (crédit geoportail.gouv.fr).*

IV.1.2 Position systématique et description du genre *Aulospongus* (Norman, 1878)

❖ **Position systématique**

Le genre *Aulospongus* (Norman, 1878) appartient à la famille des Raspailiidae (ordre Axinellida) qui contient également 22 autres genres : *Cyamon* (Gray, 1867), *Trikentrion* (Ehlers, 1870), *Waltherarndtia* (de Laubenfels, 1936), *Cantabrina* (Ferrer-Hernandez, 1914), *Echinodictyum* (Ridley, 1881), *Janulum* (de Laubenfels, 1936), *Lithoplocamia* (Dendy, 1922), *Plocamione* (Topsent, 1927), *Acantheurypon* (Topsent, 1927), *Ectyoplasia* (Topsent, 1931), *Endectyon* (Topsent, 1920), *Eurypon* (Gray, 1867), *Hymeraphia* (Bowerbank, 1864), *Raspaciona* (Topsent, 1936), *Raspailia* (Nardo, 1833), *Rhabdeurypon* (Vacelet, 1969), *Sollasella* (Lendenfeld, 1888), *Trachostylea* (Topsent, 1928), *Axechina* (Hentschel, 1912), *Ceratopsion* (Strand, 1928), *Thrinacophora* (Ridley, 1885).

Royaume: Animal
Phylum: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordre: Axinellida
Famille: Raspailiidae
Genre: *Aulospongus*

Synonymes du genre *Aulospongus* : *Aulospongiella* (Burton, 1956)
Haliphysema (sensu Bowerbank, 1873)
Hemectyonilla (Burton, 1959)
Heterectya (Hallmann, 1917)
Rhaphidectyon (Topsent, 1927)

❖ **Description**

Le genre *Aulospongus* a été érigé par Norman (1878) et décrit en premier lieu sous le nom de *Haliphysema*. Ce genre, regroupant à l'heure actuelle 16 espèces d'éponges, est décrit comme une Raspailiidae possédant des spicules de types rhabdostyles* de géométrie similaire mais d'au moins deux tailles différentes. Des plus grandes fibres, lisses ou partiellement épineuses, à base de spongine ; et des plus petites fibres, partiellement épineuses. Le squelette choanosomique est de structure plumeuse avec des spicules et des fibres amalgamées en faisceaux, plus ou moins compactées dans le squelette axial. Il devient de plus en plus plumeux en se rapprochant de la périphérie, produisant finalement une masse touffue, compartimentée ou de surface conuleuse. Les squelettes axiaux et extra-axiaux sont indifférenciés en dehors d'un plus grand amalgame de faisceaux fibreux dans l'axe.

IV.1.3 Cas particulier de l'espèce *Aulospongus gardineri* (Dendy, 1922) : localisation et description morphologique

❖ **Localisation**

Aulospongus gardineri est une éponge marine que l'on a localisée exclusivement dans l'Océan Indien. Elle a été répertoriée aux Seychelles et à Madagascar, dans le canal du Mozambique. On la trouve à une trentaine de mètres de profondeur.

❖ **Description morphologique**

Initialement décrite sous le nom de *Plumohalichondria gardineri* par Dendy en 1922, *Aulospongus gardineri* (**Figure 33**) est une éponge se présentant sous forme d'épaisses lamelles

sessiles* dressées, qui semble avoir grandie verticalement à partir d'une base étroite et allongée, fixée au substrat de manière discontinue. Les bords des lamelles sont étroits mais bien arrondis tandis que le milieu est beaucoup plus épais, principalement en raison d'un renflement d'un côté, ce qui peut indiquer une tendance à la prolifération. L'ensemble de la lamelle est un peu ondulée, et plus particulièrement sur le bord. La surface est presque lisse mais inégale et granuleuse. Les évents sont petits et discrets ; on en trouve quelques-uns en petits groupes irréguliers le long du bord des lamelles. La texture est compacte et solide, seulement légèrement compressible. Elle est de couleur gris jaunâtre.

Le squelette principal se compose de grosses colonnes plumeuses de grands et de petits spicules de types acanthostyles* (**Figure 34**), avec leurs bases ancrées dans la spongine. Ces colonnes sont parfois reliées par de courtes anastomoses* transversales, composées d'acanthostyles. Il semble n'y avoir aucun spicule se trouvant dans les axes des colonnes, mais un nombre considérable de styles* et d'oxes longs, minces et lisses, se trouvent parallèlement aux colonnes spiculaires dans la mésoglée*.

Il y a un squelette dermique particulier, composé de touffes radiées de longs et minces oxes, sortant hors de la surface pour la plus grande partie de leur longueur.

Spicules :

- Grands acanthostyles, épais, incurvés près de la base s'amenuisant progressivement vers un apex* très pointu. La base est habituellement légèrement tylote*. Les épines épaisses et recourbées, sont confinées à la partie distale du spicule, où elles sont abondantes et s'étendent de l'apex jusqu'à un tiers à la moitié de la longueur totale. Ces spicules mesurent environ 0,20 mm de long pour un diamètre maximum de 0,016 mm. Ce sont les spicules les plus abondantes dans cet organisme.
- Petits acanthostyles, de forme similaires aux grands mais mesurant habituellement 0,1 mm de long et 0,006 mm de diamètre, et avec les épines moins confinées à la partie distale.
- Très longs, minces et lisses styles ; légèrement incurvés, mesurant environ 1 mm de long et 0,012 mm de diamètre. Ils sont rares.
- Longs, minces et lisses oxes ; légèrement incurvés ; habituellement progressivement et finement pointu à une extrémité et émoussé de l'autre. Ils mesurent environ 0,45 mm de long et 0,007 mm de diamètre.
- Il n'y a pas de microslères.

Figure 33 : *Photographie in situ d'Aulospongus gardineri (Crédit LCSNSA).*

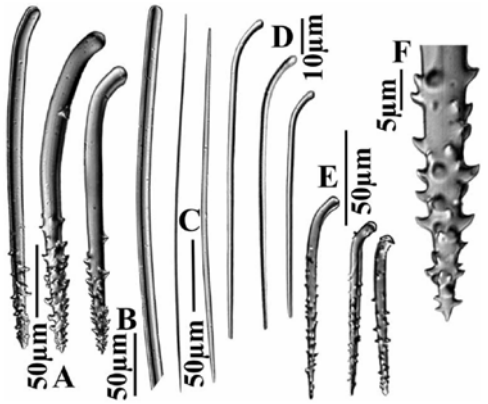


Figure 34 : *Photographie de spicules d'Aulospongus gardineri ; A, E et F : rhabdostyles (acanthostyles). B : Styles. C : Oxes. D. Rhabdostyles. (Crédit Hooper J. N. A. et al., 1999).*

IV.1.4 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Aulospongus* (Norman, 1878)

Les éponges de l'ordre des Axinellida ont fait l'objet de beaucoup d'études, en effet plus de 600 articles référençant plus de 800 molécules ont été publiés sur des éponges de cet ordre. Mais si l'on regarde à l'échelle des familles, ce sont les éponges de la famille des Axinellidae qui ont été majoritairement étudiées (environ 650 molécules) alors que près de 150 métabolites secondaires ont été isolés d'éponges de la famille des Raspailiidae. Cette dernière, pourtant, regroupe 23 genres différents. Parmi ceux-ci, les éponges du genre *Aulospongus,* qui sont regroupées en 16 espèces, n'ont fait l'objet d'aucune publication sur leur composition chimique.

IV.2 Etude chimique de l'éponge *Aulospongus gardineri* de Madagascar

L'étude chimique de l'éponge *Aulospongus gardineri* collectée à Madagascar a permis l'obtention de trois composés (**AG1 – AG3**) : deux composés connus, la *N,N*-lauroyldiéthanolamine (**AG1**) et la *N*-lauroyléthanolamine (**AG2**), ainsi qu'un composé nouveau (**AG3**), mais dont la caractérisation n'a été que partiellement effectuée car le composé, instable, s'est dégradé avant de pouvoir effectuer son élucidation structurale complète. Les techniques d'isolement et de purification, ainsi que l'élucidation structurale de ces composés sont exposées ci-après.

IV.2.1 Fractionnement et isolement des métabolites secondaires

L'isolement des métabolites secondaires de l'éponge *Aulospongus gardineri* décrit ci-après, est illustré dans la **Figure 35**.

2,3 g de l'extrait brut dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v) d'*Aulospongus gardineri* ont été fractionnés par CLMP sur une colonne de silice normale. L'élution a été réalisée au moyen d'un système de solvants de polarité croissante : isohexane 100 % ; isohexane / AcOEt 50/50 ; AcOEt 100 % ; AcOEt / méthanol 50/50 ; méthanol 100%. Cela a permis l'obtention de huit fractions (F1-F8).

Les analyses par CLHP-DAD-SM des 8 fractions obtenues montrent que les composés ayant retenu notre attention lors de la sélection des organismes à travailler se trouvent dans les fractions F5 à F8.

La fraction F8 contient les composés **AG1** et **AG3**, qui ont été purifiés par CLPH semi-préparative sur une colonne phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 10 x 250 mm) à l'aide d'un gradient de solvant eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique.

La fraction F7 contient le composé **AG1**, **AG2**, et **AG3** qui ont été purifiés par CLPH semi-préparative sur une colonne phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 10 x 250 mm) à l'aide d'un gradient de solvant eau + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

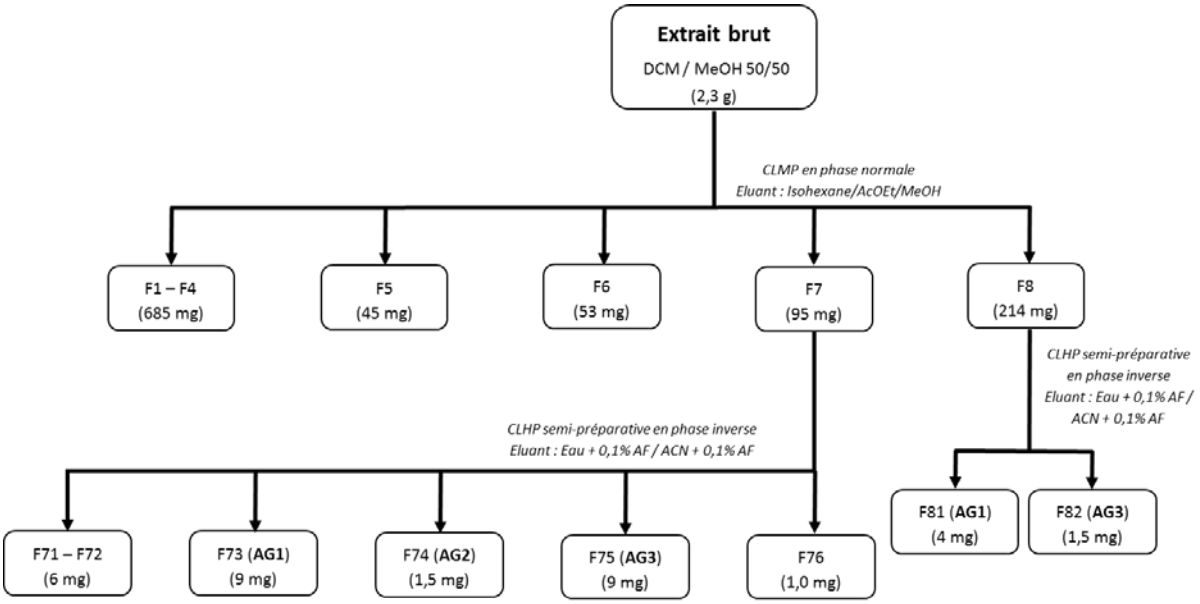
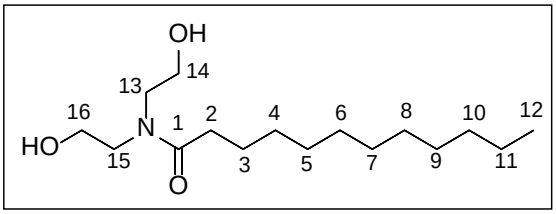


Figure 35 : *Fractionnement d'Aulospongus gardineri pour l'obtention des métabolites **AG1** à **AG3**.*

IV.2.2 Elucidation structurale des métabolites secondaires

IV.2.2.1 Elucidation structurale du métabolite AG1



*N,N-lauroyldiéthanolamine (**AG1**)*

D'aspect huileux et de couleur jaune, le composé **AG1** présente un spectre SMHR en mode ESI+ avec un ion moléculaire à *m/z* 288,25372, en accord avec la formule brute $C_{16}H_{34}NO_3^+$, (valeur calculée 288,2533). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 1.

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

- D'une chaîne carbonée aliphatique caractérisée par les déplacements chimiques des carbones C2 (δC 34,5), C3 (δC 26,1), C4 – C10 (δC 30 – 31), C11 (δC 23,6), C12 (δC 15,0) et des protons H2 (δH 2,40), H3 (δH 1,62), H4 – H11 (δH 1,30) et H12 (δH 0,88).
- D'un carbone d'une fonction amide C-1 (δC 176,6).
- De quatre méthylènes proches d'hétéroatomes C-13 (δC 53,1 ; δH 3,51), C-14 (δC 61,8 ; δH 3,80), C-15 (δC 51,5 ; δH 3,57) et C-16 (δC 62,7 ; δH 3,84).

Cette première approche met bien en évidence l'insaturation précédemment calculée avec la fonction carbonyle de la fonction amide. Le composé **AG1** est donc linéaire et non cyclique.

Les déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C des méthylènes C-14 (δC 61,8 ; δH 3,80) et C-16 (δC 62,7 ; δH 3,84) sont caractéristiques de méthylènes reliés à un oxygène (fonction hydroxyle dans le cas présent). Les déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C des méthylènes C-13 (δC 53,1 ; δH 3,51) et C-15 (δC 51,5 ; δH 3,57) sont caractéristiques de méthylènes reliés à un azote (fonction amide dans le cas présent). Les corrélations COSY entre H-13 et H-14 et entre H-15 et H-16 permettent de déterminer l'enchaînement des méthylènes comme deux chaînes éthanoliques possédant chacune une fonction hydroxyle terminale et les corrélations HMBC entre H-13 et C-1, H-13 et C-15, et entre H-15 et C-1 permettent de relier les deux chaînes éthanoliques à l'azote de la fonction amide.

Les corrélations COSY entre H-2 et H-3, H-3 et H-4, et entre H-11 et H-12 ainsi que les corrélations HMBC entre H2 et C-1 et H-3 et C-1 permettent quant à elles de déterminer la chaîne aliphatique linéaire. Le nombre de carbone dans la chaîne est déterminé grâce à la formule brute, soit 10 carbones méthyléniques.

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C du composé **AG1** ainsi que leur confrontation aux données spectrales (RMN ^{1}H et ^{13}C) de la littérature (**Tableau XXIII**) permettent d'attribuer à **AG1** la structure de la ***N,N*-lauroyldiéthanolamine**. Celle-ci a déjà été isolée d'une bactérie marine, *Streptomyces* sp. (Mondol A. M. M. *et al.*, 2014).

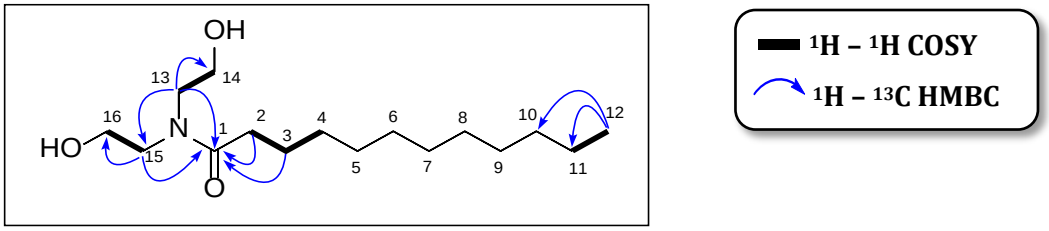


Figure 36 : *Corrélations RMN 2D clés de **AG1**.*

Tableau XXII : *Données de la RMN 1D et 2D de **AG1** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

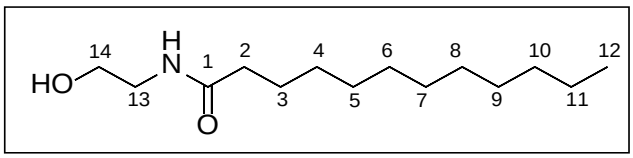
Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage J en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δC, type	δH	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	176,6, C	-	-	-
2	34,5, CH_2	2,40 (t, 7,7)	3	1, 3, 4
3	26,1, CH_2	1,62 (q, 7,4)	2, 4	1, 2, 4
4-10	30 – 31, CH_2	1,26 – 1,3 (m)	-	-
11	23,6, CH_2	1,29 (m)	12	-
12	15,0, CH_3	0,88 (t, 6,9)	11	10, 11
13	53,1, CH_2	3,51 (t, 5,1)	14	1, 14, 15
14	61,8, CH_2	3,80 (t, 5,2)	13	-
15	51,5, CH_2	3,57 (t, 4,7)	16	1, 13, 16
16	62,7, CH_2	3,84 (t, 4,8)	15	-

Tableau XXIII : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C de la N,N-lauroyldiéthanolamine (Mondol A. M. M. et al., 2014) à ceux observés pour **AG1**.*

Position	δH (ppm)		δC (ppm)	
	Littérature (MeOD)	**AG1 (500 MHz, MeOD)**	**Littérature (MeOD)**	**AG1 (500 MHz, MeOD)**
1	-	-	176,8, C	176,6, C
2	2,43 (t, 7,5)	2,40 (t, 7,7)	34,3, CH_2	34,5, CH_2
3	1,60 m	1,62 (q, 7,4)	26,7, CH_2	26,1, CH_2
4-10	1,29 – 1,32 (m)	1,26 – 1,3 (m)	23,8 – 33,2, CH_2	30 – 31, CH_2
11	1,29 – 1,32 (m)	1,29 (m)	23,8 – 33,2, CH_2	23,6, CH_2
12	0,89 (t, 7,0)	0,88 (t, 6,9)	14,5, CH_3	15,0, CH_3
13	3,54 (t, 6,0)	3,51 (t, 5,1)	52,7, CH_2	53,1, CH_2
14	3,69 (t, 5,5)	3,80 (t, 5,2)	60,9, CH_2	61,8, CH_2
15	3,49 (t, 6,0)	3,57 (t, 4,7)	50,3, CH_2	51,5, CH_2
16	3,67 (t, 5,5)	3,84 (t, 4,8)	61,0, CH_2	62,7, CH_2

IV.2.2.2 Elucidation structurale du métabolite AG2



*N-lauroyléthanolamine (**AG2**)*

D'aspect huileux et de couleur jaune, le composé **AG2** présente un spectre SMHR en mode ESI+ avec un ion moléculaire à *m/z* 244,22725, en accord avec la formule brute $C_{14}H_{30}NO_2^+$, (valeur calculée 244,2271). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 1.

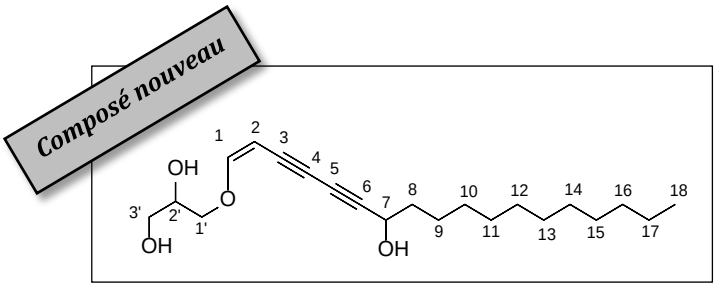
La confrontation des analyses spectrales RMN ^{1}H de **AG2** avec celles du *N,N*-lauroyldiéthanolamine (**AG1**) (**Tableau XXIV**) a permis l'élucidation structurale de la molécule. **AG2** diffère de **AG1** par la présence d'un amide secondaire, substituée par un seul groupement éthoxy. Il s'agit donc de la *N*-lauroyléthanolamine, composé synthétique (www.sigmaaldrich.com), isolé ici pour la première fois d'éponges marines.

Tableau XXIV : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de **AG1** et **AG2**.*

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

Position	δH AG1	δH AG2
1	-	-
2	2,40 (t, 7,7)	2,22 (t, 7,7)
3	1,62 (q, 7,4)	1,64 (q, 7,2)
4-11	1,26 – 1,30 (m)	1,26 – 1,3 (m)
12	0,88 (t, 6,9)	0,89 (t, 6,9)
13	3,51 (t, 5,1)	3,44 (m)
14	3,80 (t, 5,2)	3,75 (t, 4,5)
15	3,57 (t, 4,7)	-
16	3,84 (t, 4,8)	-

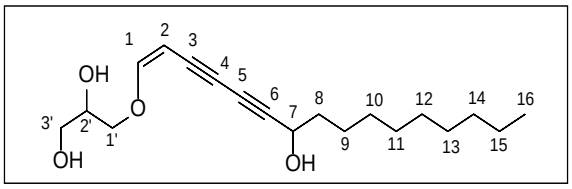
IV.2.2.3 Elucidation structurale du métabolite AG3



*(Z)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**)*

D'aspect huileux et de couleur jaune, le composé **AG3** présente un spectre SMHR en mode ESI+ avec un ion moléculaire à *m/z* 351,25290, en accord avec la formule brute $C_{21}H_{35}O_4^+$, (valeur calculée 351,2530). Le nombre d'insaturations calculé à partir de la formule brute du composé est de 5. Le composé **AG3** possède un spectre UV caractéristique avec des λ_{max} à 221,8 nm ; 260,8 nm ; 274,8 nm et 290,8 nm.

La confrontation des analyses spectrales UV et RMN ^{1}H de ce composé avec les données de la littérature permet d'attribuer à **AG3** une structure dérivée du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**Tableaux XXV** et **XXVI** respectivement). Il s'agit d'un étherlipide, constitué d'une unité glycérol reliée à une chaîne hydrocarbonée possédant un enchaînement alcène-alcyne-alcyne. Le (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol a été isolé pour la première fois d'une éponge du genre *Petrosia* de Nouvelle-Zélande (Perry, N. B. *et al.*, 1990).



(Z)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol

Tableau XXV : *Comparaison des spectres UV (λ_{max}) du (Z)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (Perry, N. B. et al., 1990) et de **AG3**.*

λ_{max} (nm)	
littérature	**AG3**
223	221,8
262	260,8
276	274,8
292	290,8

Tableau XXVI : *Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du (Z)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (Perry, N. B. et al., 1990) à ceux observés pour **AG3**.*

Position	δH (ppm)		δC (ppm)	
	littérature	AG3 (500 MHz, MeOD)	littérature	AG3 (500 MHz, MeOD)
1	6,52 (d, 6,4)	6,6 (d, 6,4)	161,6, CH	160,3, CH
2	4,53 (dd, 6,4 ; 0,8)	4,5 (d, 6,4)	84,36, CH	84,3, CH
3	-	-	nd	70,8*, C
4	-	-	nd	75,5*, C
5	-	-	nd	66,4*, C
6	-	-	nd	77,7* C
7	4,37 (td, 6,7 ; 0,8)	4,36 (m)	67,60, CH	67,3, CH
8	1,6 – 1,7 (m)	1,6 – 1,7 (m)	33,35, CH_2	23 – 30, CH_2
9 – 15	1,2 – 1,45 (m)	1,2 – 1,45 (m)	23 – 34, CH_2	23 – 30, CH_2
16	0,89 (t, 6,8)	1,2 – 1,45 (m)	14,72, CH_3	23 – 30, CH_2
17	-	1,2 – 1,45 (m)	-	23 – 30, CH_2
18	-	0,91 (t, 6,9)	-	14,2, CH_3
1'	4,04 (dd, 11,0 ; 4,3) 3,94 (dd, 11,0 ; 5,9)	4,02 (dd, 11,1 ; 4,4) 3,93 (dd, 10,9 ; 6,1)	76,29, CH_2	75,6, CH_2
2'	3,81 (m)	3,84 (m)	72,35, CH	71,8, CH
3'	3,45 – 3,65 (m)	3,59 (m)	64,05, CH_2	63,4, CH_2

** Les signaux peuvent être inversés.*
nd : non déterminé

Par ailleurs, la comparaison des formules brutes de **AG3** (formule brute : $C_{21}H_{34}O_4$) et du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (formule brute : $C_{19}H_{30}O_4$) indique que **AG3** se distingue par la longueur de sa chaîne carbonée ; **AG3** possède en effet deux groupements méthylènes supplémentaires.

Enfin, l'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C (**Tableau XXVII**) a permi de confirmer la structure du composé **AG3** par :

- Les corrélations COSY entre H-1 (δH 6,6 ppm) et H-2 (δH 4,5 ppm) ; entre H-17 (δH 1,2 ppm) et H-18 (δH 0,91 ppm) ; et entre H-1' (δH 3,93 ppm ; 4,02 ppm), H-2' (3,84 ppm) et H-3' (δH 3,59 ppm).
- Les corrélations HMBC entre H-1 et les carbones C-3 (δC 70,8 ppm) et C-4 (δC 75,5 ppm) ; et les corrélations HMBC entre H-2 et les carbones C-5 (δC 66,4 ppm) et C-6 (δC 77,7 ppm).

L'analyse des données SMHR et de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C du composé **AG3** ainsi que leur confrontation aux données spectrales (RMN ^{1}H et ^{13}C) de la littérature permettent d'établir que ce composé, de structure nouvelle, est le **(*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol**.

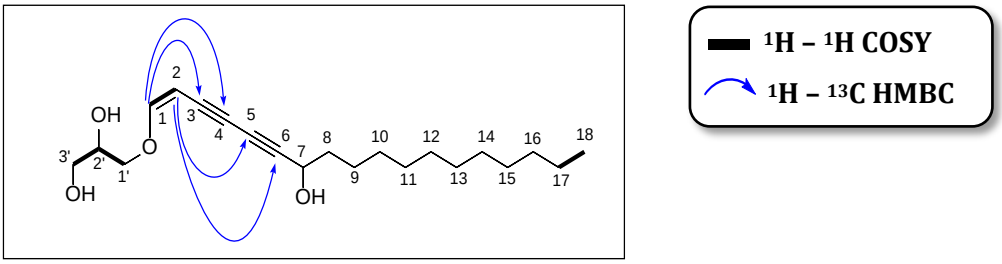


Figure 37 : *Corrélations RMN 2D clés de **AG3**.*

Tableau XXVII : *Données de la RMN 1D et 2D pour **AG3** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.*

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

Position	δC, type	δH	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	160,3, CH	6,6 (d, 6,4)	H2	2, 3, 4
2	84,3, CH	4,5 (d, 6,4)	H1	1, 5, 6
3	70,8*, C	-	-	-
4	75,5*, C	-	-	-
5	66,4*, C	-	-	-
6	77,7* C	-	-	-
7	67,3, CH	4.37 (m)	H2	-
8-17	23 – 30, CH_2	1,2 – 1,45 (m)	-	-
18	14,2, CH_3	0,91 (t, 6,9)	H17	17
1'	75,6, CH_2	4,02 (dd, 11,1 ; 4,4) 3,93 (dd, 10,9 ; 6,1)	H1'b, H2' H1'a, H2'	3' 2', 3'
2'	71,8, CH	3,84 (m)	H1'a, H1'b, H3'	1', 3'
3'	63,4, CH_2	3,59 (m)	H2'	-

* *Les signaux peuvent être inversés.*

IV.2.3 Réseau moléculaire

L'analyse par CLUP-SM^2 de l'extrait brut de l'éponge *Aulospongus gardineri* a permis la génération d'un réseau moléculaire sur GNPS. La déréplication de cet extrait brut s'est avérée difficile en raison de l'absence de données sur la composition chimique d'éponges appartenant au genre *Aulospongus* dans la littérature. La comparaison entre les spectres SMHR-SMHR de l'extrait brut et les quelques 220 000 spectres (expérimentaux et *in silico*) présents dans les bases de données est donc difficilement exploitable car aucun recoupement avec la bibliographie n'est possible.

Cependant, il est toutefois possible de noter la correspondance entre le spectre de masse expérimental de la molécule **AG1** de masse *m/z* 288,255 et le spectre *in silico* de la *N,N*-lauroyldiéthanolamine, précédemment isolée de bactéries marines, *Bacillus* sp. et *Streptomyces* sp. (Mondol, M.A.M. *et al.*, 2014). Il est également possible de noter la correspondance entre le spectre de masse expérimentale de la molécule **AG3** de masse *m/z* 323.221 et le spectre *in silico* du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG4**), molécule isolée

de l'éponge *Petrosia hebes* (Perry N. B. *et al.*, 1990). Ces deux correspondances tendent à confirmer l'élucidation structurale explicitée dans la partie précédente.

L'analyse du cluster contenant le (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs dérivés de ce composé. Celui-ci, de masse *m/z* 323,221 est relié à une molécule de masse *m/z* 337,236 (+ 14,015 soit +CH_2 ; **AG5**) ; une molécule de masse *m/z* 351,249 (+ 28,028 soit +CH_2CH_2 ; **AG3**) et une molécule de masse *m/z* 365,267 (+ 42,046 soit +$CH_2CH_2CH_2$; **AG6**). Ces molécules semblent donc uniquement être différenciées par la longueur de leur chaîne hydrocarbonée. La molécule de masse *m/z* 365,267 (**AG6**) est quant à elle reliée à une molécule de masse m/z 363,253 (- 2,014 soit –H_2 ; **AG7**) ; elle-même reliée à des molécules de masse 349,237 (- 14,016 soit –CH_2 ; **AG8**) ; 335,222 (- 28,031 soit –CH_2CH_2 ; **AG9**) et 321,206 (- 42,047 soit –$CH_2CH_2CH_2$; **AG10**). Sont également présents dans l'extrait brut, quatre dérivés déhydrogénés des quatre polyynes représentés dans la **Figure 39**. Le chromatogramme CLUP-SMHR (**Figure 40**) permet d'évaluer en outre les proportions relatives de chacun de ces composés dont l'identité a été avancée grâce au réseau moléculaire établi.

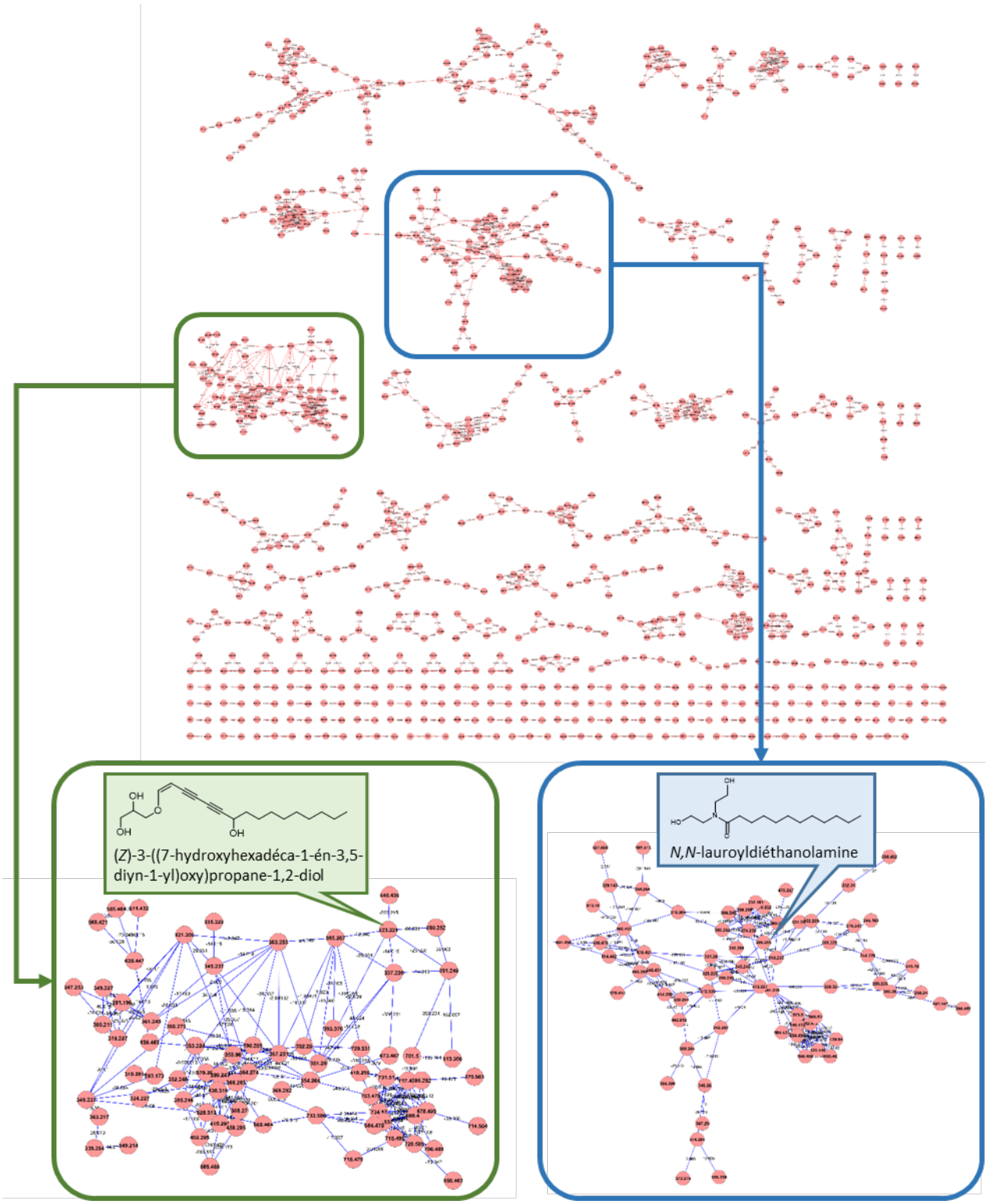


Figure 38 : *Déréplication de l'extrait brut de l'éponge Aulospongus gardineri à partir du réseau moléculaire*

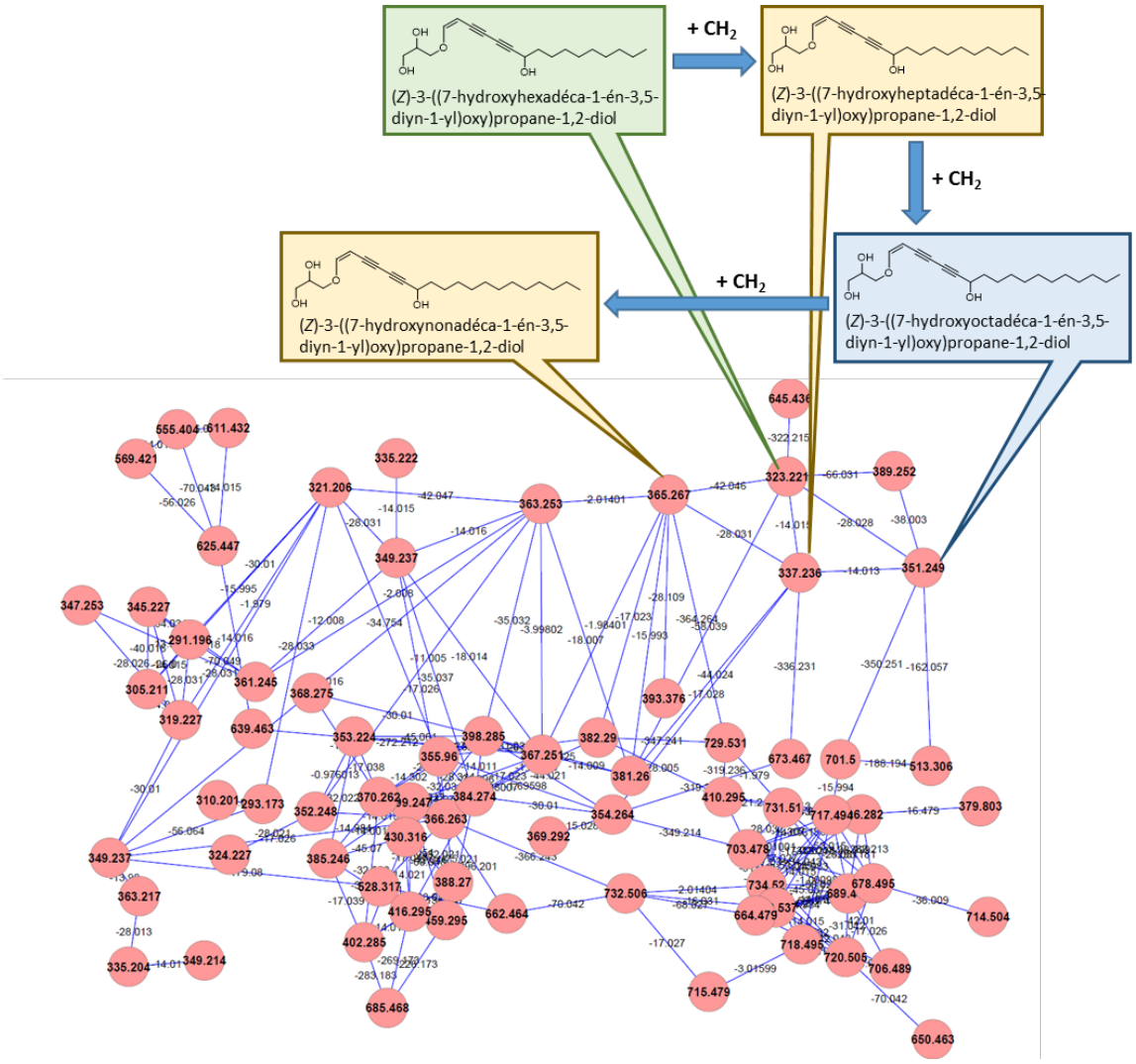


Figure 39 : *Cluster contenant les analogues du (Z)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol*

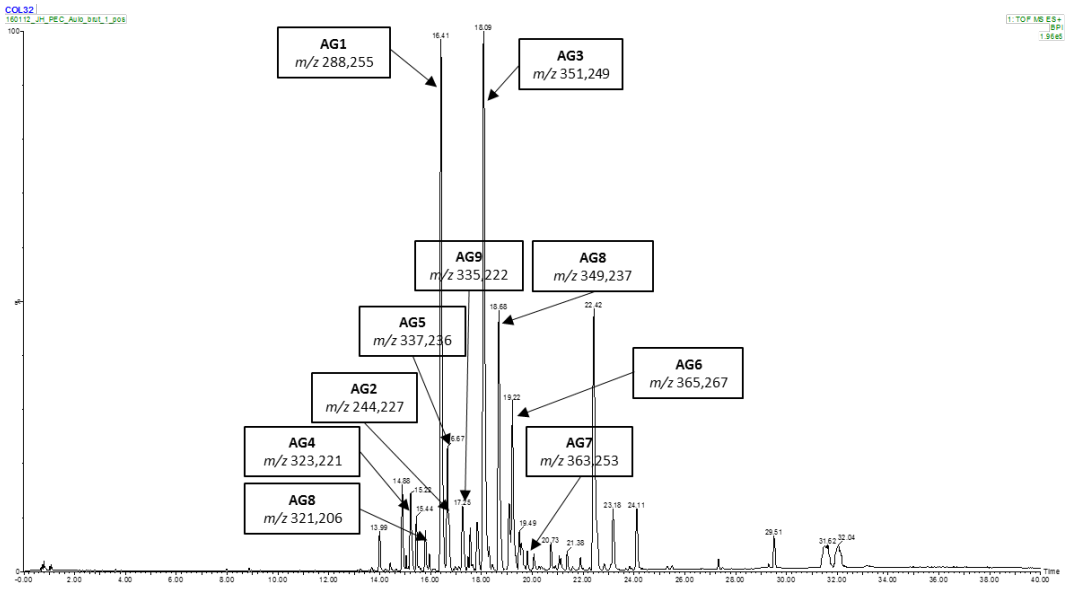


Figure 40 : *Déréplication de l'analyse CLUP-SMHR de l'extrait brut d'Aulospongus gardineri (TCN-M085)*

IV.3 Discussion

L'éponge *Aulospongus gardineri* a été sélectionnée non pas pour ses activités biologiques (elle n'en possédait aucune sur les quatre testées) mais pour l'absence de données dans la littérature sur sa composition chimique. L'étude de cette éponge au profil chimique complexe, a permis l'isolement et l'identification de 3 métabolites (**AG1 – AG3**). Un métabolite (**AG1**) déjà isolé d'une bactérie marine, un isolé pour la première fois d'éponges marines (**AG2**) et un de structure nouvelle (**AG3**). Elle a également permis la création d'un réseau moléculaire grâce auquel des hypothèses de structures pour 7 autres molécules (**AG4 – AG10**) ont été émises.

La *N,N*-lauroyldiéthanolamine (**AG1**) est une amide tertaire précédemment isolée de bactéries marines, *Bacillus* sp. et *Streptomyces* sp. (Mondol M. A. M. *et al*., 2014). On peut alors se questionner sur l'origine de cette molécule, est-elle métabolisée par l'éponge elle-même ou alors par les microorganismes associés ? La méthode d'extraction utilisée lors de cette étude ne permet pas de répondre à cette question, les métabolites de l'éponge mais également ceux des microorganismes associés étant extraits sans distinctions. La *N*-lauroyléthanolamine (**AG2**) n'a jamais été rapportée comme ayant déjà été extraite de bactéries marines mais l'on peut supposer que l'origine de ce métabolite dont la structure est proche de celle de **AG1** est la même que celle de **AG1**. Notons toutefois que ces deux molécules font partie du groupe des *N*-acyléthanolamines, qui est un groupe de lipides présents dans les membranes cellulaires de cellules animales et végétales. Elles peuvent donc tout aussi bien provenir des membranes cellulaires de l'éponge *Aulospongus gardineri.*

Le troisième composé isolé est un polyacétylène, le (*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**). De structure nouvelle, celui-ci se rapproche du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG4**), polyacétylène précédemment isolé de l'éponge *Petrosia hebes* (Perry N. B. *et al.*, 1990). Six polyacétylènes possédant comme **AG3** et **AG4** un système ène-yne-yne conjugué ont été isolés d'éponges appartenant au genre *Petrosia* (Perry N. B. *et al.*, 1990 ; Iguchi K. *et al.,* 1993). D'autres polyacétylènes, mais ayant un système ène-yne-ène conjugé ont également été isolés d'éponges appartenant au genre *Petrosia* (Seo Y. *et al.*, 1999). De façon générale, les dérivés polyacétyléniques sont très courants dans les éponges appartenant à l'ordre des Haplosclerida. Plus d'une centaine de dérivés en ont été isolés (Kornprobst J. M., 2005). Ces éponges, dans l'ensemble, ne sont pas apparentées à *Aulospongus gardineri* (famille et genre différents). *Raspailia pumila* et *Raspaila ramosa* sont les deux seules éponges appartenant à la même famille (Raspaillidae) que l'éponge *Aulospongus gardineri* desquelles ont été isolés des polyacétylènes ayant un système ène-yne-ène conjugué (Guella G. *et*

al., 1986 ; Guella G. *et al.*, 1987). Ces molécules sont considérées comme des constituants membranaires des éponges.

Le réseau moléculaire généré à également permis de mettre en évidence la présence de 6 autres polyacétylènes (**AG5 – AG10**) proches du (*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**) et du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG4**). Deux (**AG5** et **AG6**) différent uniquement par le nombre de méthylène dans la chaîne carbonée et les quatre autres (**AG7** – **AG10**) sont les formes déhydrogénées de **AG3**, **AG4**, **AG5** et **AG6**. Guella G. *et al.*, (1987), ont démontré la sensibilité de ces molécules une fois isolées. Lorsqu'elles ne sont pas en solutions, celles-ci s'oxydent rapidement au contact du dioxygène contenu dans l'air sous des conditions normales de pression et de température. Il y a une rupture de la double liaison reliée au glycérol pour donner le 1-*O*-formylglycérol et un aldéhyde. Cela explique donc la rapide dégradation du composé **AG3** que l'on a pu observer.

L'extrait brut de l'éponge *Aulospongus gardineri* semble donc être majoritairement composé de molécules étant des constituants membranaires des cellules de l'éponge, à savoir des polyacétylènes et des *N*-acyléthanolamines (**Figure 41**). L'extrait de cette éponge est donc assez pauvre en métabolites secondaires, ce qui peut expliquer l'absence de publication sur le genre *Aulospongus* et l'absence d'activités biologiques associées aux éponges de ce genre.

Figure 41 : *Métabolites isolés de l'éponge Aulospongus gardineri*

Chapitre V

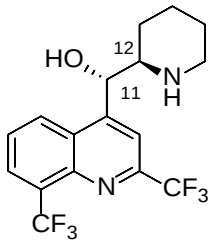
Etude de molécules issues de la biodiversité marine par modélisation moléculaire

Biemna laboutei, Madagascar, 2012
Crédits LCSNSA

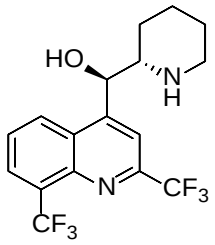
V.1 La modélisation moléculaire, un outil de caractérisation structurale

V.1.1 Intérêt du dichroïsme circulaire

La configuration absolue d'une molécule est une caractéristique structurale fondamentale. En effet, si deux énantiomères possèdent les mêmes propriétés chimiques (solubilité, point de fusion…), ils ne possèdent pas obligatoirement les mêmes propriétés biologiques. Par exemple, l'érythroméfloquine, médicament antipaludique (lariam), actuellement commercialisé sous forme d'un mélange racémique mais dont l'utilisation en prophylaxie* a fortement diminué en raison de ses effets secondaires. Dassonville-Klimpt A., *et al*. (2013), ont réussi à déterminer la configuration absolue des deux énantiomères grâce à une étude par cristallographie par diffraction des rayons X sur des monocristaux de chacun des énantiomères. Les deux énantiomères possèdent une activité antipalutique (Dassonville-Klimpt A., *et al*., 2013 ; Karle J. M., *et al*., 1993 ; Basco L. K., *et al.,* 1992), cependant, la **(11*R*, 12*S*)-érythro-(-)-méfloquine** (**E2**) est un agoniste du récepteur adénosine 100 à 400 fois plus efficace que la **(11*S*, 12*R*)-érythro-(+)-méfloquine** (**E1**). Cette affinité particulière de la **(11*R*, 12*S*)-érythro-(-)-méfloquine** (**E2**) est supposée être responsable des effets secondaires neuropsychiatriques (dépression et psychose) du lariam (Croft A. M. J. et World M. J., 1996 ; Shepard R.D. et Fletcher A., 1998).



(11*S*, 12*R*)-érythro-(+)-méfloquine (**E1**)



(11*R*, 12*S*)-érythro-(-)-méfloquine (**E2**)

Traditionnellement, deux moyens sont utilisés pour réussir à déterminer la configuration absolue d'une molécule, la mesure du pouvoir rotatoire spécifique d'un énantiomère donné après synthèse stéréo-controlée et la cristallographie aux rayons X. Malheureusement, ces méthodes ont toutes les deux des inconvénients, car une synthèse stéréo-contrôlée n'est pas toujours réalisable et la molécule ne se présente pas toujours sous forme cristallisée. La spectroscopie de dichroïsme circulaire (technique ne nécessitant pas de cristaux car réalisée en solution) se présente alors comme une technique alternative relativement peu coûteuse et nécessitant moins de moyens.

Elle est basée sur la mesure de la différence d'absorption des ondes polarisées circulairement à droite et à gauche (donc chirales) par le composé. *Via* la loi de Beer-Lambert,

cette différence d'absorbance (ΔAbs) peut être reliée à une différence de coefficient d'extinction molaire ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$) et il est ainsi possible d'obtenir un spectre $\Delta\varepsilon = f(\lambda)$.

Le dichroïsme circulaire est employé dans deux gammes d'ondes :

- dans le moyen infrarouge où il fait intervenir les vibrations de groupements atomiques et l'on parle de Dichroïsme Circulaire Vibrationnel (DCV). C'est une technique relativement récente. Les premiers appareillages commerciaux sont apparus à la fin du vingtième siècle (Monde K. *et al.*, 2003 ; Magyarfalvi G. *et al.*, 2011).
- Dans les domaines UV et visible impliquant des transitions électroniques de la molécule, on parle alors de Dichroïsme Circulaire Electronique (DCE) ou simplement de Dichroïsme Circulaire car cette technique est utilisée depuis les années 1960 (Velluz L. et Legrand M., 1965 ; Drake A. F., 1986).

La DCE et la DCV sont deux techniques complémentaires. Néanmoins, la réalisation d'un spectre DCV nécessite une concentration environ 10 fois supérieure à celle requise pour un spectre DCE, c'est pourquoi cette dernière méthode est toujours largement utilisée dans la chimie des substances naturelles où les quantités de produits isolés sont de l'ordre du milligramme.

Deux énantiomères ont des spectres d'ordonnées opposées (**Figure 42**).

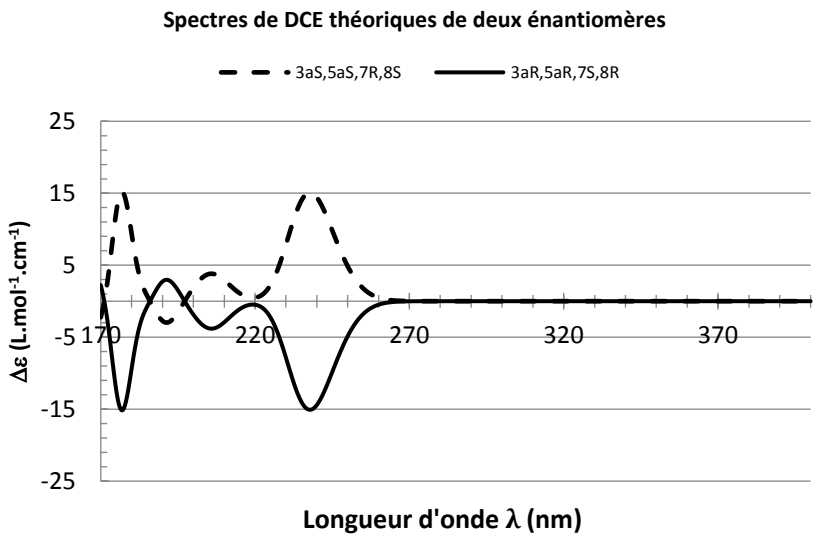


Figure 42 : *Exemple de spectres de Dichroïsme Circulaire (DC) de deux énantiomères*

Les avancées dans le domaine de la modélisation moléculaire quantique font qu'il est désormais possible de calculer de façon théorique les spectres DCE de molécules de configurations données. La comparaison entre ce spectre théorique et le spectre expérimental permet ainsi de déterminer la configuration absolue de la molécule. Ces dernières années, la détermination de la

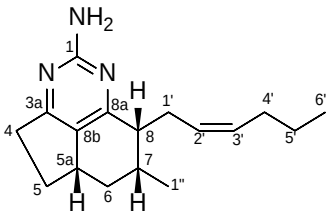
configuration absolue de nombreuses molécules a été possible grâce à cette méthode (Brittain H. G., 1998 ; Berova N. *et al*., 2000 ; Kobayashi N. *et al*., 2011 ; Dassonville-Klimpt A. *et al.*, 2013 ; Li L. *et al.*, 2013 ; Li Q. M. *et al.*, 2013 ; Zhu H. J. *et al*., 2014).

L'utilisation des méthodes quantiques peut cependant être limitée par la taille et la flexibilité des molécules qui peuvent engendrer des temps de calculs trop longs (de quelques heures à plusieurs jours avec la configuration du centre de calcul utilisé ; *cf*. **annexe V**) ou encore un très grand nombre de conformères (nétamine P, 573 conformères optimisés).

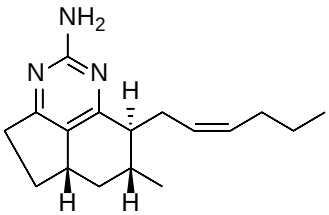
V.1.2 Contexte de l'étude

Dans le cadre du projet BIOMOL TCN, l'éponge *Biemna laboutei* (Gray, 1867), collectée à Madagascar en 2009, a été étudiée lors de la thèse « Isolement, identification et synthèse biomimétique de métabolites secondaires issus d'invertébrés marins de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien », soutenue par le Docteur Gros E. en 2013. Cette étude a mené à l'isolement et l'élucidation structurale de dix-huit molécules dont douze nouveaux composés (Gros E. *et al*., 2014 ; Gros E. *et al*., 2015). Ces molécules sont toutes des alcaloïdes guanidiniques tricycliques, regroupées en deux familles, les mirabilines et les nétamines.

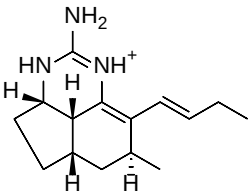
Les **mirabilines A** (**E3**), **C** (**E4**) et **F** (**E5**) ont été isolées pour la première fois de l'éponge *Arenochalina mirabilis* (Barrow R A. *et al*., 1996). A ce jour, une révision taxonomique a conduit à reclasser cette éponge dans le genre *Mycale (Mycale (Arenochalina) mirabilis)* (Van Soest R. W. M. et Hajdu E., 2002). Lors de ces travaux, ces trois mirabilines ont été isolées sous forme de dérivés *N*-acétylés. Aucune autre publication ne fait mention de la mirabiline A hormis la publication de Gros E. *et al*. (2014). Les mirabilines C et F ont également été isolées, avec la **mirabiline J** (**E6**), de *Clathria* sp. (El-Naggar M. *et al.*, 2009). Elles ont été caractérisées pour la première fois sans dérivatisation et la configuration absolue de la **mirabiline F** a également été déterminée. Les **nétamines E** (**E7**) et **G** (**E8**) ont été isolées de l'éponge *Biemna laboutei* par Sorek H. *et al*. (2006). Pour les **mirabilines A, C, J** et les **nétamines E** et **G**, seules les configurations relatives ont été déterminées jusqu'à présent.



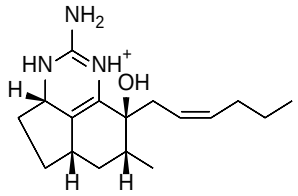
mirabilline A (**E3**)



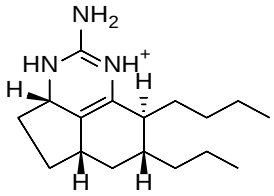
mirabilline C (**E4**)



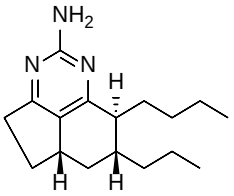
mirabilline F (**E5**)



mirabilline J (**E6**)



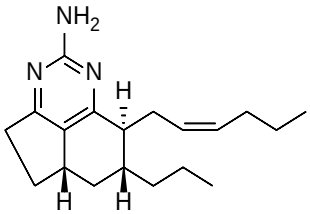
nétamine E (**E7**)



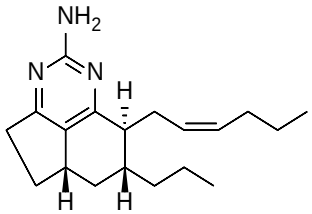
nétamine G (**E8**)

Les **nétamines H** à **S** (**E9 – E20**) ont été isolées pour la première fois de *Biemna laboutei* (Gros E. *et al*., 2014 ; Gros E. *et al*., 2015). L'élucidation structurale de ces douze nouveaux composés a été réalisée par HRMS et RMN 1D et 2D ; ces analyses spectroscopiques ont permis, grâce aux effets NOE, de déterminer la configuration relative de ces douze molécules.

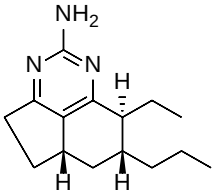
Pour six des molécules isolées, les **nétamines I, J, K, L, M** et **N**, des études théoriques/expérimentales conjointes du dichroïsme circulaire ont conduit à la détermination de leur configuration absolue. Ces travaux ont ainsi permis d'attribuer respectivement les configurations (5a*S*, 7*R*, 8*R*) à la **nétamine I**, (5a*S*, 7*R*, 8*S*) à la **nétamine J** et (3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*R*) (Gauvin-Bialecki A. et al., 2016) pour les **nétamines K, L, M** et **N** (Macé A., 2014).



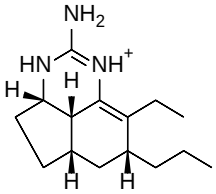
nétamine H (**E9**)



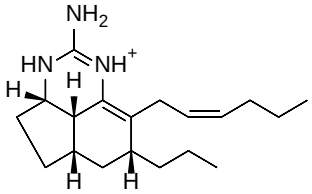
nétamine I (**E10**)



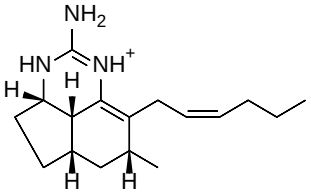
nétamine J (**E11**)



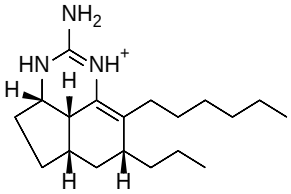
nétamine K (**E12**)



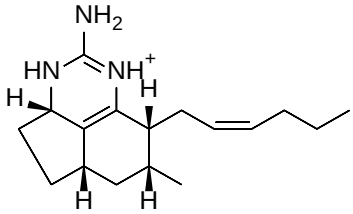
nétamine L (**E13**)



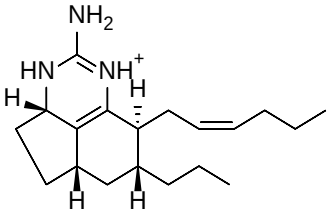
nétamine M (**E14**)



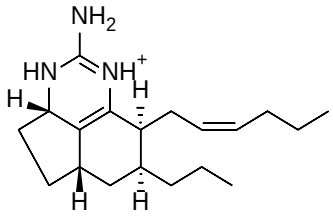
nétamine N (**E15**)



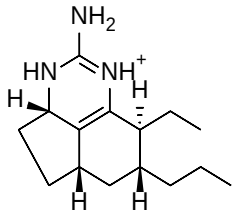
nétamine O (**E16**)



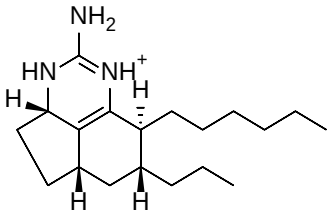
nétamine P (**E17**)



nétamine Q (**E18**)



nétamine R (**E19**)



nétamine S (**E20**)

Ce chapitre a donc pour but de déterminer la configuration absolue d'autres molécules isolées dans le cadre du projet BIOMOL TCN par une approche couplée théorie/expérience du dichroïsme circulaire électronique (DCE). Les spectres UV et DCE expérimentaux utilisés ont été mesurés dans le métanol par le Docteur Emmanuelle Gros au cours de ses travaux de thèse.

La caractérisation d'un stéréoisomère par RMN n'étant pas toujours aisée, Grimblat N. *et al.*, (2015) ont essayé de répondre à cette problématique en publiant une méthode statistique nommée DP4+, calculant une probabilité d'accord entre les déplacements chimiques ^{13}C et ^{1}H expérimentaux et calculés de façon théorique. Il s'agit d'une version améliorée de la méthode DP4 créée par Goodman (Smith S. G., et Goodman J. M., 2010). L'utilisation de cette méthode a permis d'étayer la détermination de la configuration relative des mirabilines et nétamines faite par RMN. La méthode DP4+ donne des probabilités pour les déplacements chimiques ^{1}H ; ^{13}C et globale (ensemble ^{1}H et ^{13}C). Dans le but d'éviter toutes ambiguïtés, seules les molécules, présentant des probabilités intermédiaires DP4+(^{1}H) et DP4+(^{13}C) cohérentes <u>et</u> une probabilité DP4+ globale proche de 100% pour une configuration relative donnée, ont été sélectionnées afin d'étudier leur configuration absolue.

V.2 Détermination de la configuration relative par la méthode DP4+

V.2.1 Principe de la probabilité DP4+

La détermination de la stéréochimie d'une molécule se fait, très souvent, par l'analyse d'expériences RMN basées sur les effets NOEs (NOESY et ROESY). Mais, même si les avancées dans la spectroscopie par RMN ont été conséquentes, les erreurs lors de caractérisation structurale de produits naturels ne sont pas rares (Nicolaou K. C. et Snyder S. A., 2005 ; Suyama T. L. *et al.*, 2011). Que ces erreurs soient dues à une grande complexité moléculaire, à des erreurs humaines, à une ambiguïté entre les signaux ou encore à la présence d'impuretés, il en résulte que des centaines de structures publiées ces dernières décennies ont fait l'objet de révisions. Ces corrections peuvent aller d'une rectification structurale à une révision de la stéréochimie de la molécule. Le développement de la chimie théorique peut contribuer à prévenir de ces erreurs. En effet, l'utilisation de celle-ci afin de générer des spectres RMN théoriques se démocratise et peut

participer à l'attribution ou la réattribution de signaux pour des molécules complexes (Andernach L. *et al.*, 2016).

Il existe différentes stratégies concernant l'utilisation de calculs de déplacements RMN par chimie quantique lors de l'élucidation structurale d'une molécule. Pour ce qui est de la détermination de la configuration relative d'une molécule, l'utilisation d'une méthodologie basée sur la comparaison semble adaptée ; cela veut dire que plusieurs candidats (stéréoisomères) sont évalués et comparés sur un ensemble de déplacements chimiques. Avec l'introduction du paramètre CP3, de la probabilité DP4, puis de la probabilité DP4+, des avancées majeures pour ce type de méthodologie ont été réalisées ces dernières années (Smith S. G. et Goodman J. M., 2009 ; Smith S. G., et Goodman J. M., 2010 ; Grimblat N. *et al.*, 2015).

- Le paramètre CP3 (Smith S. G. et Goodman J. M., 2009) :

Le paramètre CP3 est basé sur la comparaison, pour deux diastéréoisomères donnés (A et B) (Equation 1), des différences entre les déplacements chimiques calculés ($\Delta_{calc} = \delta_{\mathrm{a}}^{i} - \delta_{\mathrm{b}}^{i}$) et les déplacements chimiques expérimentaux ($\Delta_{exp} = \delta_{\mathrm{A}}^{i} - \delta_{\mathrm{B}}^{i}$).

$$\mathrm{CP3} = \frac{\sum_i f_3(\Delta_{exp}, \Delta_{calc})}{\sum_i \Delta_{exp}^2} \quad \text{avec} \quad f_3(\Delta_{exp}, \Delta_{calc}) = \begin{cases} \Delta_{exp}^3 / \Delta_{calc} & \text{si } \Delta_{calc}/\Delta_{exp} > 1 \\ \Delta_{exp}\Delta_{calc} & \end{cases} \qquad (1)$$

L'inconvénient principal vient du fait que ce paramètre n'est utilisable, pour deux diastéréoisomères donnés, qu'en comparant les deux jeux de déplacements chimiques expérimentaux aux deux jeux de déplacements chimiques théoriques. Comme c'est souvent le cas dans l'étude de produits naturels, pour l'étude des molécules issues de *Biemna laboutei*, seules les données expérimentales du diastéréoisomère isolé sont disponibles, ce paramètre n'est donc pas utilisable dans le cas présent et c'est pour répondre à cette problématique que la probabilité DP4 a été développée.

- La probabilité DP4 (Smith S. G., et Goodman J. M., 2010) :

La probabilité DP4, qui a été développée pour attribuer à un spectre expérimental l'un des différents diastéréoismères possibles (candidats), aborde le problème différemment. Effectivement, une probabilité de correspondance est calculée entre le spectre expérimental et les spectres théoriques de chacun des diastéréoisomères possibles.

Tout d'abord, les déplacements chimiques théoriques δ_{th} sont ramenés à l'échelle des déplacements chimiques expérimentaux δ_{exp} à partir des résultats de régressions linéaires $\delta_{th} = f(\delta_{exp})$. Ainsi $\delta_{scaled} = (\delta_{th} - b)/a$ où les paramètres a et b sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine issues de la régression linéaire précédente. Ces régressions linéaires sont faites

successivement pour les déplacements chimiques ^{1}H, puis pour les ^{13}C. Ces δ_{scaled} sont calculés pour chacun des candidats. L'erreur *e*, correspondant à la différence entre le déplacement théorique mis à l'échelle de l'expérience δ_{scaled} et le déplacement expérimental, est également calculé ($e = \delta_{scaled} - \delta_{exp}$).

Ensuite, la probabilité de chaque erreur observée est calculée (Equation 2) en supposant que l'erreur pour un atome dans une structure correcte obéit à une distribution *t* de Student, avec une moyenne μ, un écart type σ et un degré de liberté υ. Ces probabilités obtenues pour chaque atome, sont multipliées afin d'obtenir, pour chaque candidat, une probabilité globale d'avoir cette erreur particulière. Ceci, en admettant que l'erreur dans les déplacements chimiques de chaque atome de la molécule est une variable indépendante. Les probabilités obtenues sont converties en un ensemble de probabilités que chaque candidat soit le bon selon le théorème de Baye.

$$P(i|\delta_1, \delta_2, \dots, \delta_N) = \frac{\prod_{k=1}^{N}\left(1-T^{\upsilon}\left(\left|\left(\delta^{i}_{\text{scaled},k}-\delta_{exp,k}\right)-\mu\right|/\sigma\right)\right)}{\sum_{j=1}^{m}\left[\prod_{k=1}^{N}\left(1-T^{\upsilon}\left(\left|\left(\delta^{j}_{\text{scaled},k}-\delta_{exp,k}\right)-\mu\right|/\sigma\right)\right)\right]} \quad (2)$$

Cette équation donne la probabilité qu'un candidat *i* (parmi *m* candidats) soit le bon pour les déplacements chimiques expérimentaux δ_1, δ_2, …, δ_N. Dans cette équation, T^{υ} est le cumul des fonctions de distribution en *t*, avec υ degrés de liberté. $\delta_{exp,k}$ correspond au déplacement chimique expérimental relatif au noyau *k* (où *k* varie de 1 à *N*) et $\delta^{j}_{\text{scaled},k}$ correspond au déplacement chimique calculé pour le noyau *k*, pour le candidat *j*.

Smith S. G., et Goodman J. M. (2009), ont optimisé les paramètres μ, σ et υ à partir des 117 molécules pour lesquelles ils avaient les déplacements chimiques expérimentaux, soit un ensemble de données de 1717 déplacements ^{13}C et 1794 déplacements ^{1}H. Les valeurs obtenues sont $\mu = 0$, $\sigma = 2{,}306$ ppm (^{13}C) et 0,185 ppm (^{1}H) et $\upsilon = 11{,}38$ (^{13}C) et 14,18 (^{1}H).

- La probabilité DP4+ :

La probabilité DP4+ (Grimblat N. *et al.*, 2015) est une amélioration de la probabilité DP4, visant à prendre en compte en plus des paramètres précédents :

- L'erreur e_u, (l'indice *u* pour unscaled) correspondant à la différence entre les déplacements chimiques théoriques (non mis à l'échelle) et les déplacements expérimentaux ($e_u = \delta_{th} - \delta_{exp}$).
- Un niveau de théorie plus élevé dans l'optimisation de la géométrie (B3LYP/6-31G** au lieu MMFF précédemment) mais aussi dans le calcul des déplacements chimiques RMN (mPW1PW91/6-31+G** au lieu de B3LYP/6-31G* précédemment).

- La prise en compte des effets de solvants par la méthode PCM (modèle de continuum polarisable). Toutes les données expérimentales ont été acquises dans le chloroforme et par conséquent, la méthode a été optimisée pour ce solvant.

La formule permettant le calcul de la probabilité DP4+ (Equation 3) suit le même modèle que celle permettant le calcul de la probabilité DP4. De plus, elle prend en compte des erreurs moyennes ($\mu_{u\text{-}sp2}$, $\mu_{u\text{-}sp3}$), des écart-types sur ces erreurs ($\sigma_{u\text{-}sp2}$, $\sigma_{u\text{-}sp3}$) et des degrés de liberté ($\upsilon_{u\text{-}sp2}$, $\upsilon_{u\text{-}sp3}$) associées aux déplacements chimiques théoriques pour des carbones ayant des hybridations différentes. Ces paramètres ont aussi été déterminés pour les H en fonction de l'hybridation des C auxquels ils sont rattachés. Au final, 16 paramètres (8 pour les déplacements ^{1}H et 8 pour les déplacements ^{13}C) dépendant de l'hybridation des carbones (σ_s, υ_s, $\mu_{u\text{-}sp2}$, $\sigma_{u\text{-}sp2}$, $\upsilon_{u\text{-}sp2}$, $\mu_{u\text{-}sp3}$, $\sigma_{u\text{-}sp3}$ et $\upsilon_{u\text{-}sp3}$) ont été optimisés à partir de 72 molécules, soit 1219 déplacements ^{13}C et 1123 déplacements ^{1}H expérimentaux. Il faut noter que les déplacements chimiques théoriques des atomes de carbone hybridés sp ont été mis dans le même ensemble que ceux hybridés sp^2. (*cf.* SI, Grimbalt N. *et al.,* 2015 ; sarotti-nmr.weebly.com)

$$P(i) = \frac{\prod_{k=1}^{N}\left[1-T^{\upsilon}{}_{s}\left(e_{s,k}^{i}/\sigma_s\right)\right]\left[1-T^{\upsilon}{}_{u-spx}\left(\left(e_{u,k}^{i}-\mu_{u-spx}\right)/\sigma_{u-spx}\right)\right]}{\sum_{j=1}^{m}\prod_{k=1}^{N}\left[1-T^{\upsilon}{}_{s}\left(e_{s,k}^{i}/\sigma_s\right)\right]\left[1-T^{\upsilon}{}_{u-spx}\left(\left(e_{u,k}^{i}-\mu_{u-spx}\right)/\sigma_{u-spx}\right)\right]} \quad (3)$$

V.2.2 Méthodologie et détails des calculs DP4+

- **Méthodologie**

Depuis les années 1990, il y a eu beaucoup de comparaisons entre la théorie des fonctionnelles de la densité (DFT) et les méthodes *post* Hartree-Fock (MP2, CISD, …) pour le calcul de l'état fondamental. Comme le conclut Cramer C. (2004), la ligne de fond de l'ensemble de ce travail est que, en règle générale, la DFT est la méthode la plus rentable car elle permet de prendre en compte les interactions entre électrons de façon satisfaisante pour un temps de calcul plus faible que les méthodes *post* Hartree-Fock. Pour ces mêmes raisons d'efficacité, l'étude des transitions électroniques par la théorie dite TD-DFT (Time Dependent – DFT ou théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps) s'est largement développée au détriment des méthodes *ab initio* d'interaction de configurations.

Pour étudier la configuration relative d'une molécule, il faut tenir compte de tous les diastéréoisomères possibles ; tous les calculs présentés ont été faits pour chacun d'entre eux. Afin de calculer le spectre RMN d'un isomère donné, il n'est pas suffisant de considérer uniquement le minimum global, c'est-à-dire la conformation de la molécule la plus stable. En effet, le spectre RMN dépendant de la conformation de la molécule, il est nécessaire de prendre en compte tous les

conformères ayant une population significative à température ambiante (298 K) dans le calcul du spectre RMN théorique. Les différentes conformations possibles de l'isomère ont donc été générées manuellement et optimisées par une fonctionnelle de la densité hybride (ωB97XD) avec la prise en compte des effets du solvant. Un calcul des fréquences de vibration de chaque conformère est réalisé pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle. Les déplacements chimiques RMN de chacun des conformères ont été calculés avec la même méthode de calculs que celle utilisée par Grimblat N. *et al.*, (2015), à savoir une fonctionnelle hybride (mPW1PW91) (Adamo C. et Barone V., 1998), avec la prise en compte des effets de solvants. L'ensemble de ces résultats, pondéré selon Boltzmann, a permis d'obtenir des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C théoriques. Les déplacements chimiques ^{13}C et ^{1}H expérimentaux ont alors été comparés aux déplacements chimiques ^{13}C et ^{1}H théoriques de chaque diastéréoisomère avec la méthode DP4+ ; ce qui permet d'obtenir un pourcentage de probabilité de correspondance entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques. La correspondance est considérée comme concluante si la probabilité sur les protons et la probabilité sur les carbones indiquent le même diastéréoisomère et si la probabilité globale est supérieure à 95% pour ce diastéréoisomère.

- **Détails des calculs**

L'ensemble des calculs quantiques a été réalisé à l'aide du programme Gaussian 09 (*cf.* **annexe V**).

Optimisation de géométrie

Les optimisations de géométrie ont été réalisées avec la méthode ωB97XD/6-31+G(d,p)

ωB97XD est une fonctionnelle de la densité hybride de cinquième génération prenant en compte des effets de dispersion qui semble être efficace pour l'optimisation de géométrie (Jacquemin D. *et al.*, 2011).

La base 6-31+G** comprend :

- des fonctions de polarisation (**) sur tous les atomes. Des fonctions *d* sur les atomes lourds et des fonctions *p* sur les hydrogènes. Ces fonctions sont importantes pour décrire la liaison chimique (*cf.* distorsion des orbitales atomiques).
- des fonctions diffuses *s* et *p* sur les atomes lourds (tous sauf l'Hydrogène). Les fonctions diffuses (+) permettent de mieux décrire les paires d'électrons libres et sont nécessaires pour la description des liaisons hydrogène.

Les effets de solvants sont pris en compte par le modèle SMD (Solvent Model Density) (Marenich A. V. *et al.*, 2009) où la densité électronique du soluté (calculée par la mécanique

quantique) interagit avec une description continue du solvant. Le solvant est dans ce cas représenté comme un milieu diélectrique avec des tensions de surface à l'interface soluté-solvant. Comme les spectres RMN expérimentaux ont été acquis dans le méthanol deutéré (excepté la nétamine G, dont les spectres ont été acquis dans le chloroforme deutéré), le modèle SMD a été utilisé pour simuler ces solvants au niveau des optimisations de géométrie.

Calculs de déplacements chimiques

Pour le calcul des déplacements chimiques, le niveau de théorie mPW1PW91/6-31+G(d,p)/PCM préconisée pour la méthode DP4+ a été utilisé.

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

Un calcul des fréquences de vibration de chaque conformère a permis de vérifier qu'il s'agissait de minimum sur la surface d'énergie potentielle (absence de fréquence imaginaire). Les fréquences de vibration calculées dans l'approximation harmonique sont surestimées par rapport à l'expérience avec la méthode ωB97XD/6-31+G**. Un facteur 0,971 a été appliqué aux fréquences harmoniques pour calculer la correction vibrationnelle d'énergie au point zéro et pour calculer les termes vibrationnels dépendant de la température dans l'enthalpie libre. Ce facteur 0,971 a été optimisé en minimisant la différence calculée entre la correction d'énergie au point zéro et les valeurs expérimentales pour un ensemble de 15 petites molécules organiques suivant la procédure de Alecu I. M. *et al*. (2010).

Les déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C ont ensuite été calculés par TD-DFT, avec la méthode « Gauge-Independent Atomic Orbital (GIAO) ». La fonctionnelle et la base utilisées étaient mPW1PW91/6-31+G**. Grimblat N. *et al.,* (2015) ont mis au point et optimisé la probabilité DP4+ sur les calculs de déplacements chimiques RMN avec cette méthode. Il est donc important de garder cette même méthode.

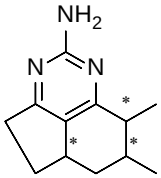
V.2.3 Résultats

Les 18 molécules présentées dans le **paragraphe V.1.2** ont été désignées sous deux dénominations, les mirabilines et les nétamines ; mais en observant les structures de celles-ci, si l'on remplace les deux chaînes latérales par deux groupements méthyles, elles peuvent être regroupées en trois familles, selon leur noyau tricyclique :

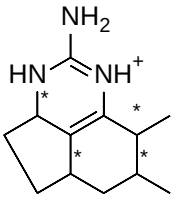
- Les structures possédant un **noyau pyrimidinique** (**N1**), c'est-à-dire les **mirabilines A** (**E3**), **C** (**E4**) et les **nétamines G** (**E9**), **H** (**E10**), **I** (**E11**) et **J** (**E12**).

- Les structures possédant une **insaturation 8a-8b** (**N2**), c'est-à-dire la **mirabiline J** (E6) et les **nétamines E** (**E7**), **O** (**E16**), **P** (**E17**), **Q** (**E18**), **R** (**E19**) et **S** (**E20**).
- Les structrures possédant une **insaturation 8-8a** (**N3**), c'est-à-dire la **mirabiline F** (**E5**) et les **nétamines K** (**E12**), **L** (**E13**), **M** (**E14**) et **N** (**E15**).

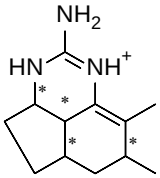
Hormis pour la **mirabiline F** (**E5**), dont la configuration absolue a déjà été déterminée et ne sera, par conséquent, pas étudiée, aucune des 17 autres molécules ne présentent de systèmes conjugués entre le noyau et les chaînes latérales. L'influence de ces chaînes sur les déplacements chimiques, observés en RMN, des atomes du système tricyclique est considérée comme négligeable. Les configurations absolues de toutes les nétamines possédant une **insaturation 8-8a** (**N3**) ayant déjà été déterminée, l'étude a été ciblée sur les deux autres types de structures.



noyau pyrimidinique (**N1**)



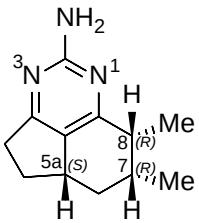
insaturation 8a-8b (**N2**)



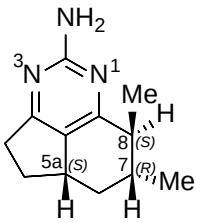
insaturation 8-8a (**N3**)

V.2.3.1 Résultats de la probabilité DP4+ pour les structures à noyaux pyrimidiniques

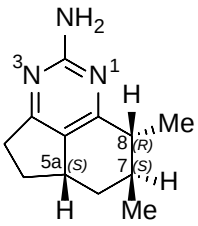
Le **modèle N1** possède 3 carbones asymétriques *R* ou *S* (C-5a, C-7 et C-8), et donc il existe 4 paires d'énantiomères. Quatre diastéréoisomères sont représentés ci-dessous.



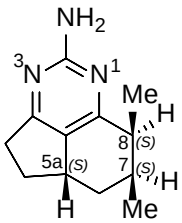
5a*S*,7*R*,8*R*



5a*S*,7*R*,8*S*



5a*S*,7*S*,8*R*

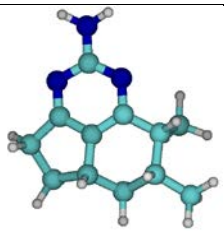
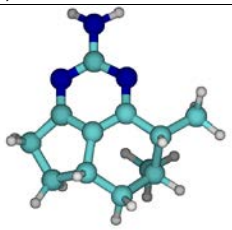
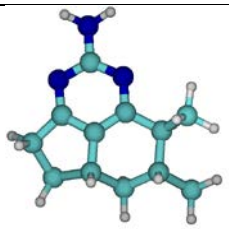
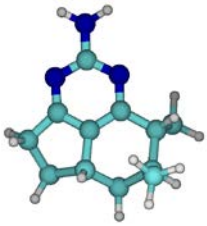
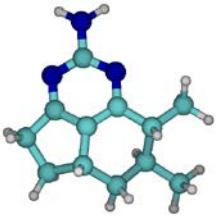
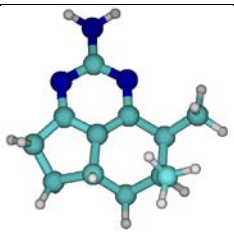
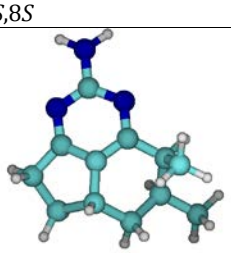


5a*S*,7*S*,8*S*

Pour chacun des isomères ci-dessus, 2 conformères ont été trouvés et optimisés dans le méthanol et dans le chloroforme (**Tableau XXVIII**). Ces deux conformères diffèrent par une déformation de cycle au niveau des carbones C-6, C-7 et C-8, ce qui a pour conséquence, une inversion des positions axiales ou équatoriales des substituants de ces trois carbones. Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de ces différents conformères associés aux 4 isomères ont été calculés dans le

méthanol et pour chaque énantiomères, les déplacements chimiques moyens ont été obtenus par une pondération selon la statistique de Boltzmann.

Tableau XXVIII : *Populations des différents conformères pour chacun des isomères du modèle **N1**.*

		5a*S*,7*R*,8*R*		5a*S*,7*R*,8*S*	
Conformère	(Solvant)				
ΔG (kJ/mol)	(CD_3OD)	0	11,9	0	11,3
	($CDCl_3$)	0	12,3	0	13,2
Population	(CD_3OD)	99,2%	0,8%	99,0 %	1,0 %
	($CDCl_3$)	99,3%	0,7%	99,5%	0,5%
		5a*S*,7*S*,8*R*		5a*S*,7*S*,8*S*	
Conformère	(Solvant)				
ΔG (kJ/mol)	(CD_3OD)	0	10,5	0	5,5
	($CDCl_3$)	0	10,0	0	5,5
Population	(CD_3OD)	98,5%	1,5%	90,2%	9,8%
	($CDCl_3$)	98,2%	1,8%	90,3%	9,7%

Les déplacements expérimentaux de la **mirabiline C** (El-Naggar M. *et al.*, 2009) de C-3a (δC=127 ppm), C-8a (δC=117,8 ppm) et C-8b (δC=115,9 ppm) sont très éloignés des déplacements chimiques calculés (écart supérieur à 30 ppm) pour ces mêmes carbones pour les 4 configurations relatives. Il n'est donc pas pertinent de faire un calcul DP4+ sur cette molécule. Par ailleurs, ces déplacements chimiques sont également très différents de ceux en position analogue dans la **mirabiline A** et les **nétamines G** et **H**. Il existe probablement un problème dans l'analyse structurale proposée par El-Naggar M. *et al.* (2009).

La méthode DP4+ a été utilisée pour comparer les valeurs des déplacements chimiques moyens des 4 isomères aux valeurs expérimentales de la **mirabiline A** et des **nétamines G** et **H** ; les résultats sont regroupés dans le **Tableau XXIX**.

- Pour la **mirabiline A**, les probabilités DP4+ sur les protons et les carbones convergent vers l'isomère 5a*S*, 7*R*, 8*R* et la probalibilité globale est de 99,99% pour cet isomère. Le calcul de la probabilité DP4+ est donc en accord avec la configuration relative de la **mirabiline A** faite par Gros E. *et al.,* (2014), à savoir 5a*S*, 7*R*, 8*R*.
- Pour la **nétamine G**, les probabilités DP4+ sur les protons et les carbones convergent vers l'isomère 5a*S*, 7*R*, 8*S* et la probalibilité globale est de 100% pour cet isomère. Le

calcul de la probabilité DP4+ est donc en accord avec la configuration relative de la **nétamine G** faite par Sorek H. *et al.,* (2006), à savoir 5a*S*, 7*R*, 8*S*.

- Pour la **nétamine H**, les probabilités DP4+ sur les protons et les carbones convergent vers l'isomère 5a*S*, 7*R*, 8*S* et la probalibilité globale est de 100% pour cet isomère. Le calcul de la probabilité DP4+ est donc en accord avec la configuration relative de la **nétamine H** faite par Gros E. *et al.,* (2014), à savoir 5a*S*, 7*R*, 8*S*.

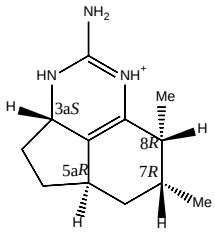
Pour ces trois molécules, le calcul de probabilité DP4+ vient donc étayer la configuration relative déterminée par l'expérience, à savoir 5a*S*, 7*R*, 8*R* pour la **mirabiline A** et 5a*S*, 7*R*, 8*S* pour les **nétamines G** et **H**. Celles-ci ont donc été retenues pour le calcul de leur configuration absolue.

Tableau XXIX : *Résultats du calcul de probabilité DP4+ pour la mirabiline A, la nétamine G et la nétamine H.*

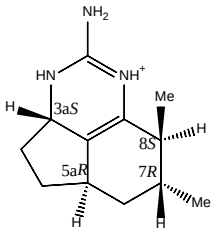
Molécule (solvant)	Déplacements chimiques	Isomère (%)			
		5a*S*,7*R*,8*R*	5a*S*,7*R*,8*S*	5a*S*,7*S*,8*R*	5a*S*,7*S*,8*S*
mirabiline A (CD_3OD)	δH	93,10	0,00	0,02	6,88
	δC	76,58	23,31	0,00	0,11
	δH + δC	99,99	0,00	0,00	0,01
nétamine G ($CDCl_3$)	δH	0,00	100,00	0,00	0,00
	δC	0,00	100,00	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	100,00	0,00	0,00
nétamine H (CD_3OD)	δH	0,00	100,00	0,00	0,00
	δC	0,00	100,00	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	100,00	0,00	0,00

V.2.3.2 Résultats de la probabilité DP4+ pour les structures insaturées 8a-8b

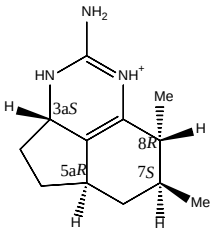
Le **modèle N2** possède 4 carbones asymétriques *R* ou *S* (C-3a, C-5a, C-7 et C-8), et donc il existe 8 paires d'énantiomères. Huit diastéréoisomères sont représentés ci-dessous.



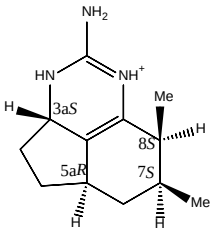
3a*S*,5a*R*,7*R*,8*R*



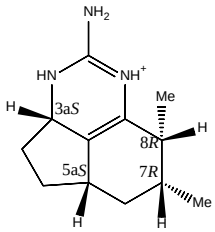
3a*S*,5a*R*,7*R*,8*S*



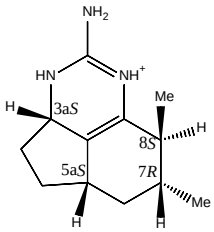
3a*S*,5a*R*,7*S*,8*R*



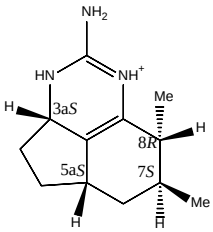
3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*



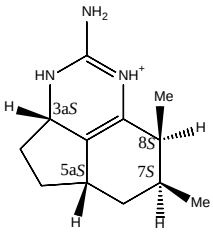
3a*S*,5a*S*,7*R*,8*R*



3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S*



3a*S*,5a*S*,7*S*,8*R*



3a*S*,5a*S*,7*S*,8*S*

Pour l'isomère (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*R*), un seul conformère a été trouvé et optimisé dans le méthanol ; pour les isomères (3a*S*,5a*R*,7*R*,8*R*), (3a*S*,5a*R*,7*R*,8*S*), (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*), deux conformères, différant au niveau de la position axiale ou équatoriale des substituants des carbones C-6, C-7 et C-8 ; et pour les isomères (3a*S*,5a*S*,7*R*,8*R*), (3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S*), (3a*S*,5a*S*,7*S*,8*R*), (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*), trois conformères, différant au niveau de la position axiale ou équatoriale des substituants des carbones C-6, C-7 et C-8 ou au niveau de la position axiale ou équatoriale des hygrogènes substituants les carbones C-4 et C5 (**Tableau XXX**). Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de ces différents conformères associés aux 8 isomères ont été calculés dans le méthanol et pour chaque énantiomères, les déplacements chimiques moyens ont été obtenus par une pondération selon la statistique de Boltzmann.

Tableau XXX : *Populations des différents conformères pour chacun des isomères du modèle **N2**.*

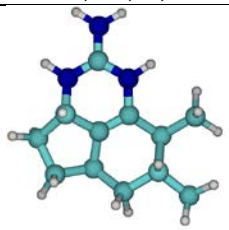
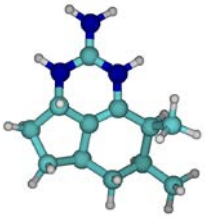
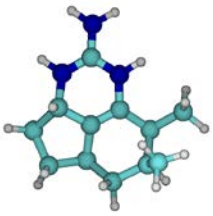
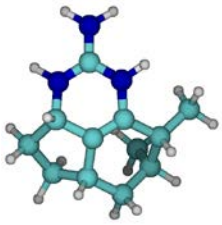
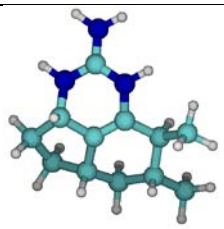
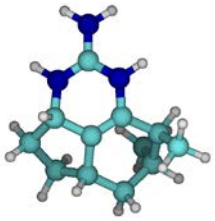
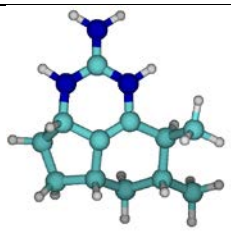
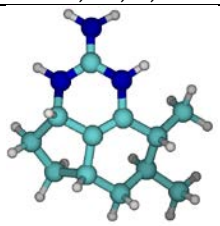
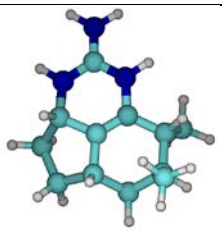
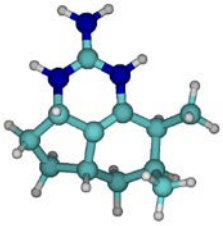
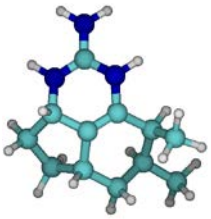
	3a*S*,5a*R*,7*R*,8*R*		
Conformère			-
ΔG (kJ/mol)	0	5,4	-
Population	90,0%	10,0%	-
	3a*S*,5a*R*,7*R*,8*S*		
Conformère			-
ΔG (kJ/mol)	0	13,0	-
Population	99,5%	0,5%	-
	3a*S*,5a*R*,7*S*,8*R*		
Conformère		-	-
ΔG (kJ/mol)	0	-	-
Population	100%	-	-
	3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*		
Conformère			-
ΔG (kJ/mol)	0	15,5	-
Population	99,8%	0,2%	-

Tableau XXX : *Populations des différents conformères pour chacun des isomères du modèle **N2** (suite).*

	3a*S*,5a*S*,7*R*,8*R*		
Conformère			
ΔG (kJ/mol)	0	14,3	3,2
Population	78,0%	0,3%	21,7%
	3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S*		
Conformère			
ΔG (kJ/mol)	0	10,1	1,9
Population	67,7%	1,1%	31,2%
	3a*S*,5a*S*,7*S*,8*R*		
Conformère			
ΔG (kJ/mol)	0	12,9	2,6
Population	73,8%	0,4%	25,8%
	3a*S*,5a*S*,7*S*,8*S*		
Conformère			
ΔG (kJ/mol)	0	4,8	3,5
Population	72,0%	10,3%	17,7%

L'attribution des valeurs expérimentales des protons H-5 et H-6 est ambigüe. En effet, les déplacements chimiques des protons H-5α et H-5β sont très différents, il en est de même pour les protons H-6α et H-6β. Une mauvaise attribution de leur position α ou β pouvant entraîner une erreur sur la détermination de la stéréochimie de la molécule, une première probabilité DP4+ a donc été calculée sans tenir compte de ces protons (**Tableau XXXI**). Pour les nétamines E, P, R et S, les probabilités DP4+ sur les déplacements chimiques des carbones et des protons convergent pour l'isomère (3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S*) ; de plus, la probabilité DP4+ globale est supérieure à 99% pour ces quatre molécules. Le calcul de la probabilité DP4+ est donc en accord avec les configurations relatives des **nétamines E, P, R** et **S** faite par Gros E. *et al.,* (2014 ; 2015), à savoir 3a*S*,5a*S*, 7*R*, 8*S*.

En revanche, il n'y a pas de convergence entre les probabilités DP4+ sur les déplacements chimiques des carbones et des protons pour les nétamines O et Q.

Pour la nétamine O, même si la probabilité globale est de 93,95% pour l'isomère (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*), la divergence entre les données protons et les données carbones ne nous permet pas de conclure. En effet, la probabilité sur les déplacements chimiques des protons semble indiquer que la conformation de la molécule est (3a*S*,5a*S*,7*R*,8*R*) avec un pourcentage de 48,68% alors que la probabilité sur les déplacements chimiques des carbones est de 81,57% pour l'isomère (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*S*).

Pour la nétamine Q, la probabilité globale n'est pas concluante (35,18% pour l'isomère 3a*S*,5a*R*,7*S*,8*R*), de plus, la probabilité sur les déplacements chimiques des protons semble indiquer que la conformation de la molécule est (3a*S*,5a*S*,7*S*,8*S*) avec un pourcentage de 86,89% alors que la probabilité sur les déplacements chimiques des carbones est de 91,42% pour l'isomère (3a*S*,5a*R*,7*S*,8*R*).

Pour quatre molécules, les **nétamines E, P, R** et **S**, le calcul de probabilité DP4+ vient donc étayer la configuration relative déterminée par l'expérience, à savoir 3a*S*, 5a*S*, 7*S*, 8*R*. Celles-ci ont donc été retenues pour le calcul de leur configuration absolue. En revanche, le calcul de la probabilité DP4+ n'a pas permis de conforter les configurations relatives des **nétamines O** et **Q** déterminées par l'expérience mais elle ne permet pas non plus de les discriminer.

Tableau XXXI : *Résultats du calcul de probabilité DP4+ pour les nétamines E, O, P, Q, R et S.*

Molécule	Déplacements chimiques	Isomère (%)							
		3a*S*,5a*R*, 7*R*,8*R*	3a*S*,5a*R*, 7*R*,8*S*	3a*S*,5a*R*, 7*S*,8*R*	3a*S*,5a*R*, 7*S*,8*S*	3a*S*,5a*S*, 7*R*,8*R*	3a*S*,5a*S*, 7*R*,8*S*	3a*S*,5a*S*, 7*S*,8*R*	3a*S*,5a*S*, 7*S*,8*S*
Nétamine E	δH	0,00	0,08	9,74	0,00	0,14	75,66	14,37	0,00
	δC	0,00	0,00	3,64	0,00	0,00	96,36	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00	99,52	0,00	0,00
Nétamine O	δH	0,00	0,00	0,00	6,60	48,68	0,00	0,07	44,65
	δC	0,00	16,15	0,00	81,57	0,71	0,00	1,56	0,00
	δH + δC	0,00	0,01	0,00	93,95	5,99	0,00	0,02	0,03
Nétamine P	δH	0,00	0,05	8,46	0,00	0,11	87,15	4,23	0,00
	δC	0,00	0,00	7,34	0,00	0,00	92,66	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	99,24	0,00	0,00
Nétamine Q	δH	0,00	0,05	0,01	0,39	10,73	0,00	1,92	86,89
	δC	0,00	6,80	91,42	1,11	0,00	0,45	0,22	0,00
	δH + δC	0,00	18,26	35,18	21,89	1,21	0,05	21,16	2,25
Nétamine R	δH	0,00	0,06	7,60	0,00	0,05	88,30	3,98	0,00
	δC	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	99,56	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	99,96	0,00	0,00
Nétamine S	δH	0,00	0,08	7,20	0,00	0,06	87,28	5,38	0,00
	δC	0,00	0,00	2,11	0,00	0,00	97,89	0,00	0,00
	δH + δC	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	99,82	0,00	0,00

V.3 Détermination de la configuration absolue par la chimie théorique

V.3.1 Méthodologie et détails des calculs

- **Méthodologie**

Comme les spectres RMN, les spectres DCE étant dépendants de la conformation de la molécule, il n'est pas suffisant de considérer uniquement le minimum global, il faut prendre en compte tous les conformères ayant une population significative à température ambiante (298 K) dans le calcul du spectre DCE théorique. Les différentes conformations possibles de l'isomère ont donc été générées manuellement et optimisées par une fonctionnelle hybride de la densité (ωB97XD) avec la prise en compte des effets du solvant. Un calcul des fréquences de vibration de chaque conformère est réalisé pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle. Afin de simplifier les calculs tout en restant cohérent par rapport à la répartition de population des différents conformères à température ambiante, tous les conformères les plus stables en énergies (ayant un écart inférieur à 3 kcal/mol soit 12,5 kJ/mol par rapport au minimum global) ont été pris en compte. Ainsi, les transitions électroniques de plus basses énergies de chacun de conformères ont été calculées avec la prise en compte des effets de solvants et l'ensemble de ces résultats, pondéré selon Boltzmann, a permis d'obtenir un spectre UV-visible théorique.

Ce spectre théorique peut être comparé au spectre expérimental et servir à calibrer le spectre de DCE théorique. En effet, d'une façon générale, la méthode ωB97XD surestime souvent les énergies de transition singulet de type π→π* à l'origine des premières bandes d'absorption UV-visible. Le calcul de l'écart d'énergie entre la première bande d'absorption expérimentale et théorique et son retranchement sur le spectre UV théorique permet de prendre en compte l'erreur systématique de la méthode utilisée et ainsi améliorer la concordance entre le spectre UV-visible théorique et celui issu de l'expérience. Cette calibration est effectuée sur le spectre UV-visible car en général, les énergies et les intensités des transitions électroniques changeant peu d'un conformère à l'autre, le spectre calculé concorde bien avec le spectre expérimental. Cela n'est pas le cas pour les spectres de DCE, dont les intensités dépendent principalement de ces conformations.

Ensuite, un spectre de DCE, pondéré selon Boltzmann, est calculé et décalé avec la même énergie que dans le cas du spectre UV-visible correspondant. Une comparaison avec le spectre de DCE expérimental est ensuite effectuée. Bringmann G. *et al.*, 2009, furent les premiers à utiliser cette façon de procéder pour les spectres UV-visible et ceux de DCE.

- **Détails des calculs**

L'ensemble des calculs quantiques a été réalisé à l'aide du programme Gaussian 09 (*cf.* **annexe V**).

L'optimisation de géométrie ainsi que le calcul des fréquences de vibration de chaque conformère ont été réalisés de la même façon que lors du calcul de la probabilité DP4+ (voir **Chapitre V.2.2**).

En revanche, pour le calcul des transitions électroniques singulets de plus basses énergies, également effectué par TD-DFT, un jeu de fonctions diffuses *s* a été ajouté sur les atomes d'hydrogène (ωB97XD/6-31++G**). Cet ajout vise à donner plus de flexibilité à la base de fonctions pour le calcul des transitions électroniques. La fonctionnelle ωB97XD semble être également efficace pour la simulation de spectre UV-visible (Jacquemin D. *et al*., 2011).

L'absorption UV-visible liée à une transition électronique entre l'état fondamental 0 et un état excité *k* est décrite, en mécanique quantique, par la force d'oscillateur f_{0k} (Equation 4). Il s'agit d'une valeur sans dimension, proportionnelle au produit de la fréquence de la transition électronique ν_{0k} par le carré du moment dipolaire électrique de la transition considérée $|\langle 0|\mu|k\rangle|^2$ (Atkins P. et Friedman R., 2008).

$$f_{0k} = \frac{8\pi^2 m_e \nu_{0k}}{3he^2} |\langle 0|\mu|k\rangle|^2 \qquad (4)$$

f_{0k} : force d'oscillateur entre l'état fondamental (0) et l'état excité *k*
m_e : masse d'un électron
e : charge d'un électron
h : constante de Planck

Les forces d'oscillateur f_{0k} calculées ont été converties dans l'unité du coefficient d'extinction ε, afin que les spectres UV-visibles calculés puissent être comparés aux spectres expérimentaux. Cela a été fait par association à des fonctions gaussiennes centrées aux fréquences respectives ν_{0k} des transitions électroniques. Le spectre UV résulte de la superposition de ces gaussiennes (Équation 5). Une demi-largeur à 1/e fois la hauteur de la gaussienne Δσ = 0,2 eV a été utilisée.

$$\varepsilon(\nu) = \frac{N_A e^2}{4 m_e c \varepsilon_0 \ln(10)} \sum_k f_{0k} \frac{\exp\left(-\left(\frac{\nu-\nu_{0k}}{\Delta\sigma}\right)^2\right)}{\Delta\sigma\sqrt{\pi}} \qquad (5)$$

N_A :nombre d'Avogadro
ε_0: permittivité diélectrique du vide
c : célérité de la lumière dans le vide

En mécanique quantique, la force rotatoire R_{0k} (Equation 6) est un paramètre représentant le signe et l'intensité d'un effet Cotton (Sreerama N et Woody R. W., 2004 ; Stephens

P. J. et Harada N., 2010). Elle est définie comme la partie imaginaire du produit scalaire des moments dipolaire électrique μ et dipolaire magnétique M entre l'état fondamental 0 et un état excité k pour une transition électronique donnée de nombre d'onde $\bar{\nu}_{0k}$.

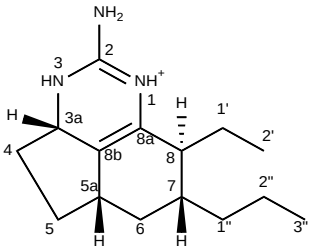
$$R_{0k} = Im\{\langle 0|\mu|k\rangle \cdot \langle k|M|0\rangle\} \qquad (6)$$

Les spectres DCE expérimentaux sont obtenus par la différence entre les coefficients d'extinction molaire de la lumière polarisée à droite (ε_R) et à gauche (ε_L) et ont donc pour ordonnées Δε. Comme pour les spectres UV-visible, afin de pouvoir comparer les spectres DCE théoriques aux spectres expérimentaux, les forces rotatoires calculées R_{0k} sont transformées en unité de Δε en associant à chaque force rotatoire une fonction gaussienne de même Δσ que celle utilisée pour le calcul des spectres UV. Ainsi, l'expression de Δε au nombre d'onde $\bar{\nu}$ est donnée par l'Equation 4.

$$\Delta\varepsilon(\bar{\nu}) = \frac{1}{2{,}2964810^{-39}} \sum_k \bar{\nu}_{0k} R_{0k} \frac{exp\left[-\left(\frac{\bar{\nu}-\bar{\nu}_{0k}}{\Delta\sigma}\right)^2\right]}{\Delta\sigma\sqrt{\pi}} \qquad (7)$$

Les spectres UV-visible et les spectres de DCE moyens sont obtenus par pondération selon la statistique de Boltzmann des spectres des conformères les plus stables en énergies (ayant un écart inférieur à 3 kcal/mol par rapport au minimum global). Le spectre UV-visible moyen ainsi obtenu est ensuite calibré sur le spectre UV-visible expérimental en retranchant l'écart d'énergie entre la première bande d'absorption expérimentale et théorique. Le spectre de DCE moyen, est ensuite décalé d'une même énergie que celle utilisée pour le spectre UV.

V.3.2 Recherches des différents conformères



nétamine R (**E19**)

L'exemple de recherche des différents conformères de la nétamine R est exposé ci-après. Tous les calculs ont étés réalisés sur l'énantiomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*. La recherche des différents conformères s'est faite manuellement mais de façon méthodique. Pour cela, il faut tenir compte des conformations du noyau tricyclique insaturé 8a-8b (**N2**) déterminées précédemment pour l'isomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S :* C1, C2 et C3 (**Figure 43**).

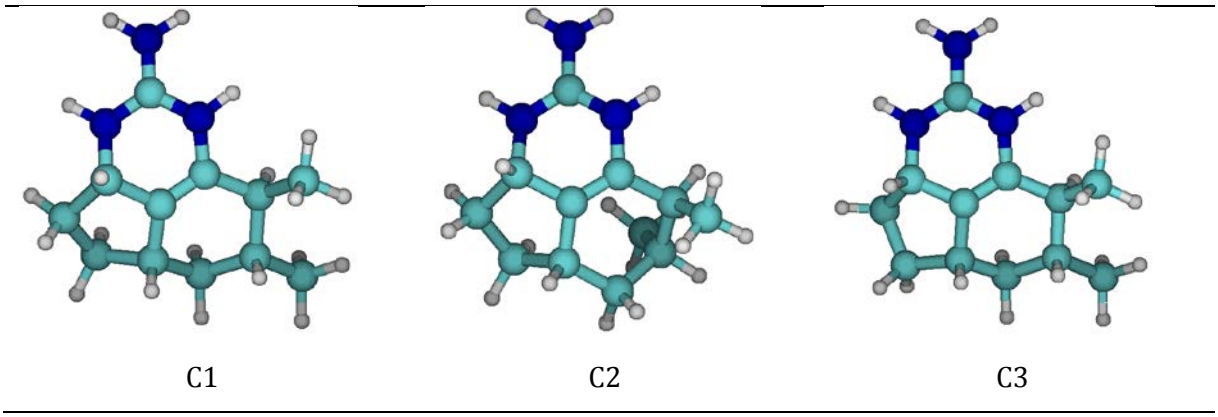


Figure 43 : *Différentes conformations du noyau tricyclique insaturé 8a-8b pour l'isomère 3aS,5aS,7R,8S.*

Une fois ces trois conformations du système tricyclique déterminées, il faut tenir compte des chaînes carbonées. Pour cela, pour chacune de ces trois conformations de noyaux, la chaîne propyle en C7 et la chaîne éthyle en C8 ont été ajoutées. Ces trois premières géométries ont été optimisées, puis la position des carbones C2', C2" et C3" a été modifiée un par un par pas de 120° (**Figure 44**). Il en est de même pour le groupement propyle, soit 9 positions attendues. Cela représente donc 81 géométries de départ différentes à optimiser (3 cycles ; 3 positions du groupe éthyle ; 9 pour le propyle : 3 X 3 X 9 = 81 attendus).

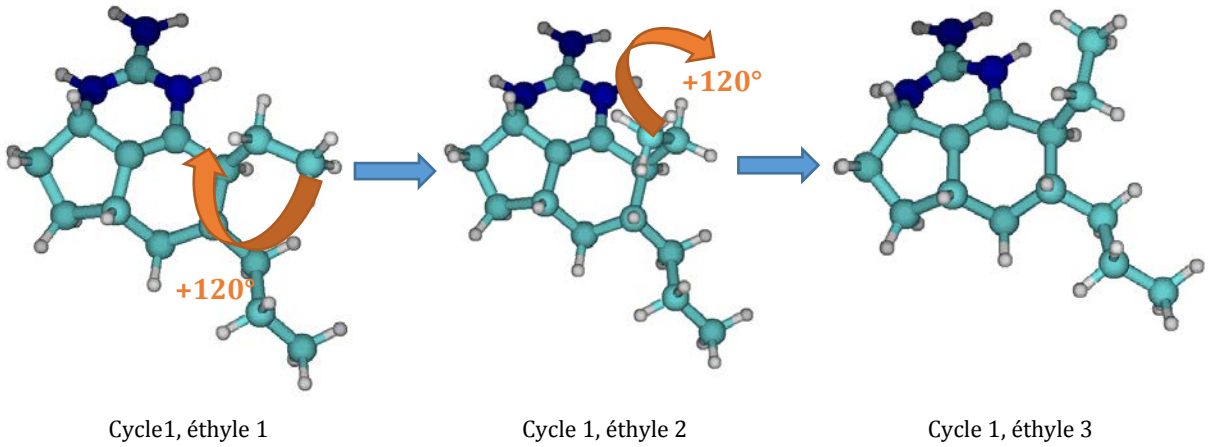
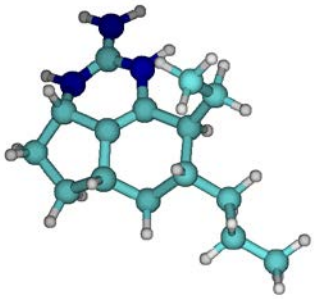
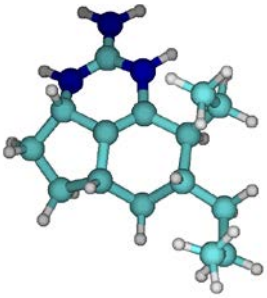
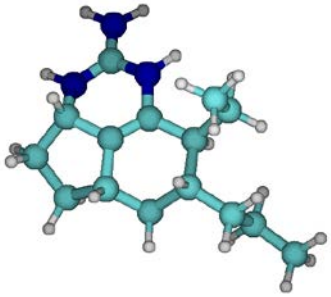
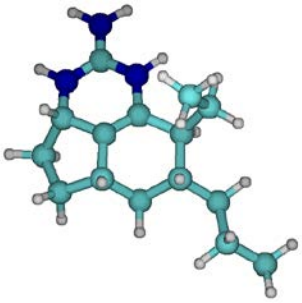
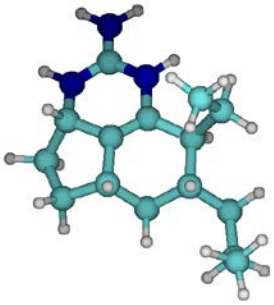


Figure 44 : *Méthode de recherche des différents conformères.*

Finalement parmi les 81 géométries de départ, 73 conformères ont pu être optimisés. C'est-à-dire qu'ils ont convergés vers un minimum d'énergie et que le calcul de leurs fréquences de vibration ne révèle pas de fréquences négatives. Il s'agit donc bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle. 45 de ces 73 conformères ont des énergies relatives inférieures à 3 kcal.mol^{-1} dont 5 présentent une population supérieure ou égale à 5% à 298 K. Ces derniers sont représentés dans le (**Tableau XXXII**). Les conformères V10, V12 et V17 possèdent un noyau tricyclique de type C1 alors que les conformères V64 et V66 possèdent un noyau tricyclique de

type C3. V10 et V64 ont les chaînes latérales en position 7 et 8 aux mêmes positions relatives, il en est de même pour V12 et V66. Contrairement aux tableaux précédents, la somme des pourcentages ici diffère de 100 % (64,7 %) car ne sont représentés que les 5 conformères d'énergies plus basses. Sont également pris en compte les 40 autres conformères ayant des énergies relatives inférieures à 3 kcal.mol^{-1} mais représentant moins de 5% de la population. Additionés, ces 40 conformères représentent 35,3 % de la population globale.

Tableau XXXII : *Conformères les plus stables de la nétamine R (**E19**) ayant une population ≥ 5%*

	V10	V12	V17
			
ΔG (kJ/mol)	0,056	0,167	0,677
Population	13,7%	13,1%	10,7%
	V64	V66	
			
ΔG (kJ/mol)	0	0,149	
Population	14,0%	13,2%	

V.3.3 Résultats

V3.3.1 Configuration absolue de la nétamine R

Les 50 transitions électroniques de plus basses énergies ont été calculées pour les 45 conformères les plus stables (**chapitre V.3.2**) ainsi que leur spectre UV. Ceux des conformères présentant une population relative supérieure à 5% selon Boltzmann sont représentés dans la **Figure 45**. Ceux-ci peuvent être séparés en deux groupes, ceux ayant une première bande

d'absorption vers 236 nm (correspondant aux conformères ayant une conformation de cycle C1) et ceux ayant une première bande d'absorption vers 244 nm (correspondant aux conformères ayant une conformation de cycle C1).

Les spectres UV obtenus ont ensuite été pondérés selon la statistique de Boltzmann afin d'obtenir un spectre UV moyen alors comparable avec le spectre expérimental. Ce spectre moyen (**Figure 46**) a été décalé de -0,0436eV (-2nm sur le premier λ_{max} du spectre théorique) afin d'être en accord avec le spectre expérimental (**Figure 47**) et pour tenir compte de la surestimation des énergies de transition électronique singulet calculées par la méthode ωB97XD.

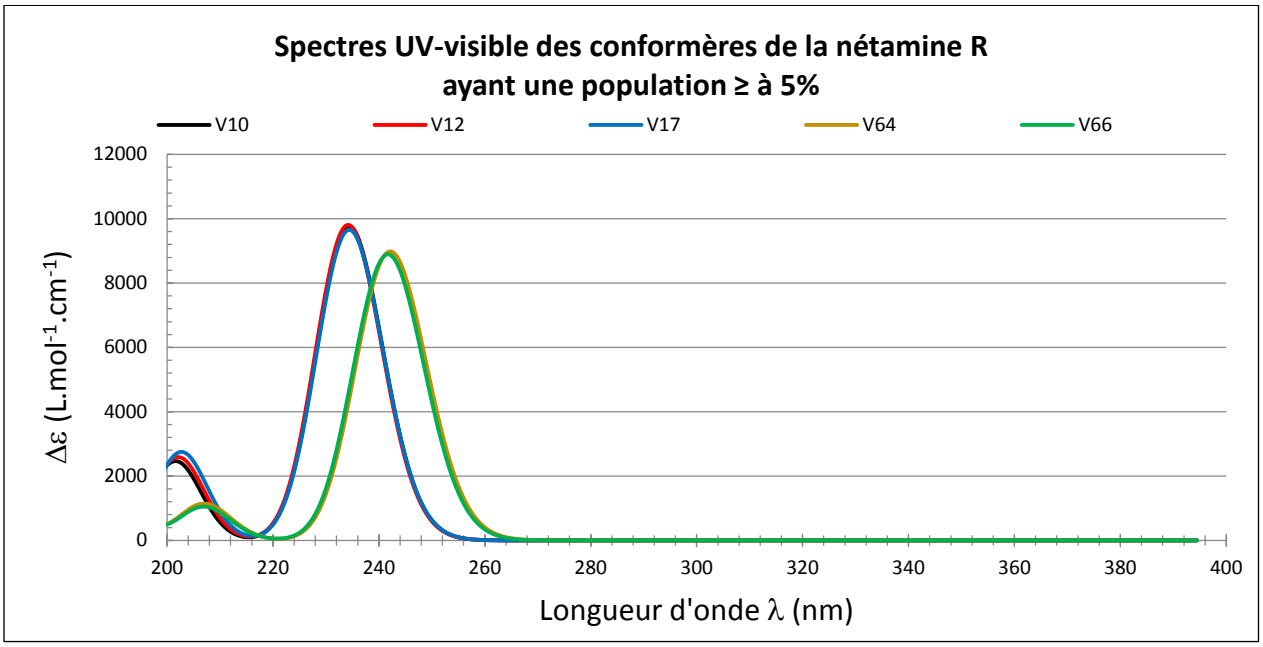


Figure 45 : *Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine R (**E19**).*

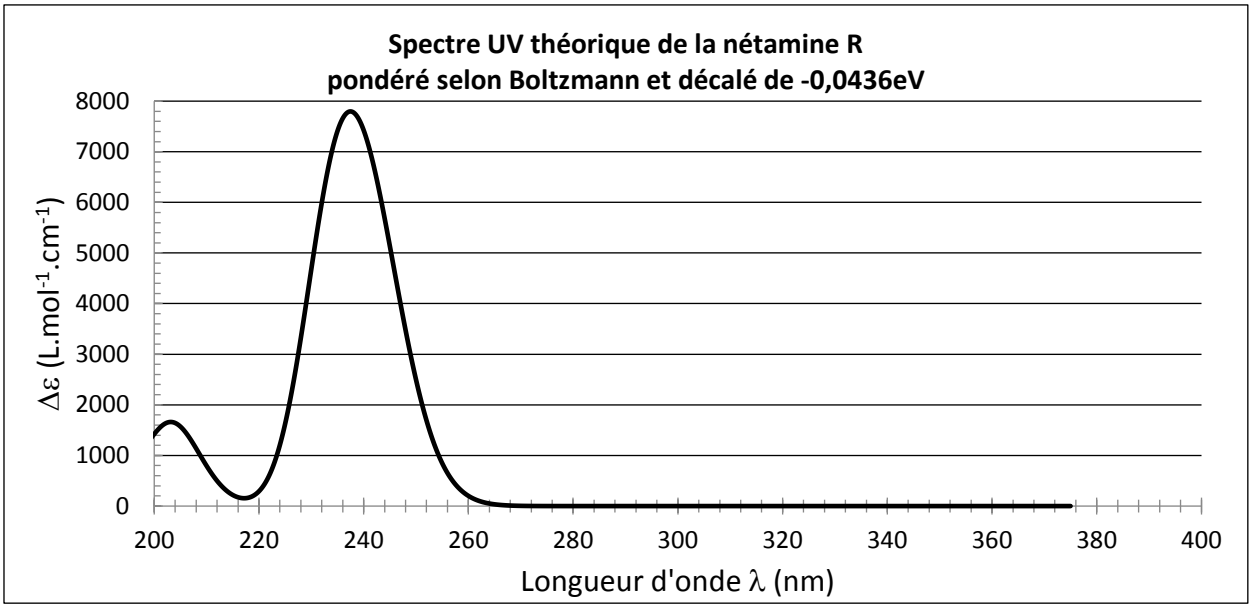


Figure 46 : *Spectre UV théorique de la nétamine R (**E19**) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,0436 eV.*

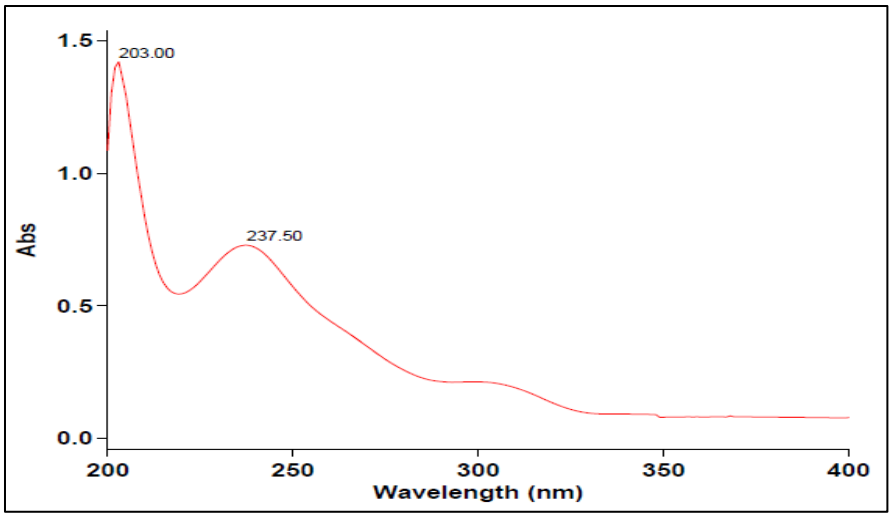


Figure 47 : *Spectre UV expérimental de la nétamine R (**E19**).*

De la même manière, les spectres théoriques de DCE des 45 conformères de l'isomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S* ont été calculés, ceux des conformères présentant une population relative supérieure à 5% selon Boltzmann sont représentés dans la **Figure 48**. Comme les spectres UV, ceux-ci peuvent être regroupés en deux catégories, les conformères ayant un premier maxima vers 236 nm (correspondant aux conformères ayant une conformation de cycle C1) et ceux ayant un premier maxima vers 244 nm (correspondant aux conformères ayant une conformation de cycle C3). Malgré ce regroupement, il est à noter que tous les spectres présentent uniquement deux maxima et aucun minimum.

Ces spectres ont été pondérés selon Boltzmann et décalés selon l'énergie déterminée avec le spectre UV expérimental soit -0,0436 eV, le spectre résultant (celui de l'isomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*), celui de l'énantiomère (3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R*) ainsi que le spectre expérimental de la nétamine R sont représentés dans la **Figure 49**.

Le spectre expérimental présente un maximum d'absorption à 237,5 nm et un épaulement approximativement vers 255 nm. Les pics des conformères de type c1 étant tous légèrement plus intense que ceux des conformères de type c3 ; le pic à 237,5 nm du spectre expérimental pourrait être lié aux conformères type C1 et l'épaulement vers 255 nm aux conformères de type C3.

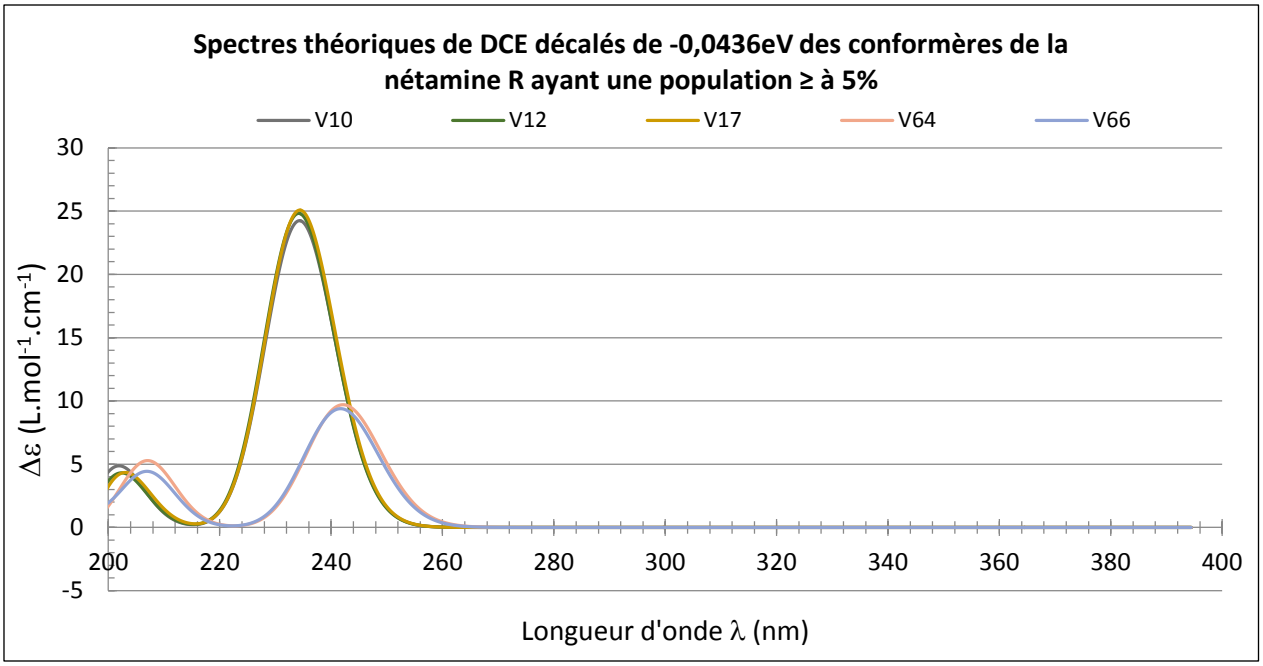


Figure 48 : *Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 3aS,5aS,7R,8S de la nétamine R (**E19**).*

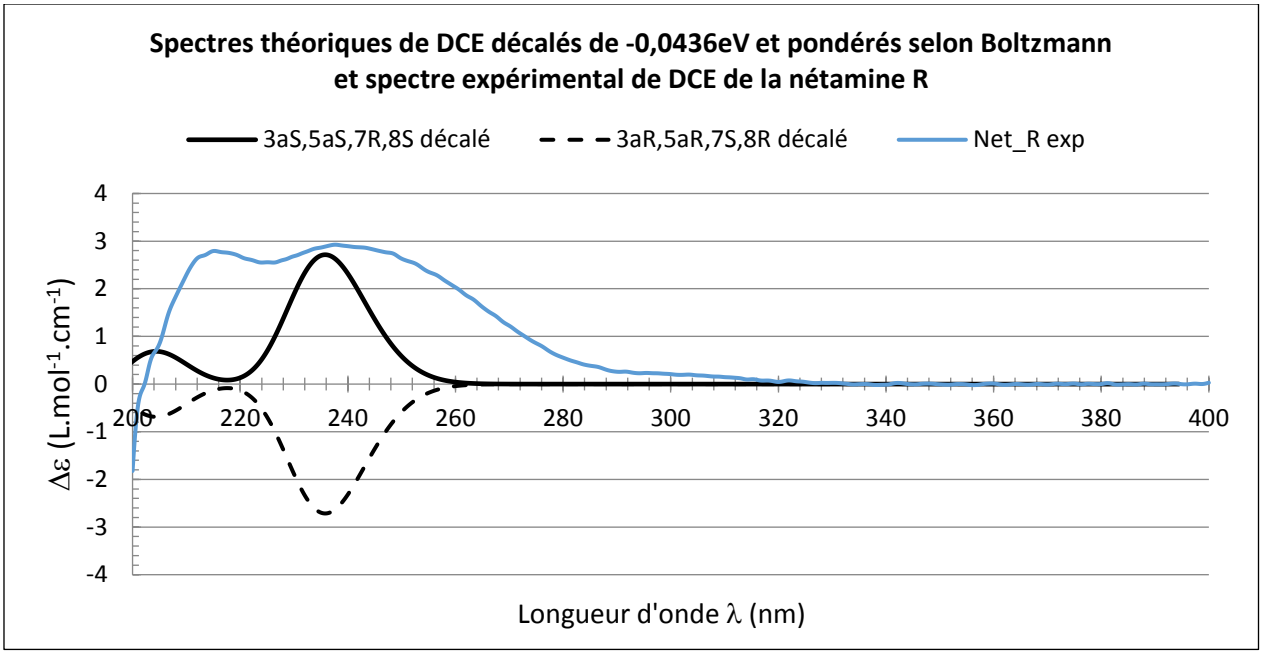


Figure 49 : *Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine R (**E19**).*

Tableau XXXIII : *Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine R (**E19**).*

Expérimentaux	Calculés (3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*)	Calculés (3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R*)
215,2 +	204,4 +	204,4 -
237,7 +	235,8 +	235,8 -

λ (nm) ; + = EC positif, - = négatif

Le **Tableau XXXIII** regroupe les différents effets Cotton (EC) calculés pour l'énantiomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S* et l'énantiomère 3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R* ainsi que ceux du spectre expérimental. Il existe un bon accord théorie-expérience pour la longueur d'onde de l'effet Cotton le plus intense (235,8 +) ; de même, si l'on compare les longueurs d'ondes du deuxième EC (204,4 + calculé et 215,2 + expérimental), l'écart est plus important, mais la courbe présente tout de même des Δε positifs en accord avec l'expérience. La comparaison des spectres théoriques de DCE des deux énantiomères avec le spectre expérimental de la nétamine R nous permet ainsi d'en déduire sa configuration absolue. Cette molécule possède donc une configuration 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*.

Afin de mieux comprendre l'allure des spectres en fonction de la structure de la molécule, il est intéressant de noter quelles sont les transitions électroniques majoritairement impliquées dans la plage étudiées, c'est-à-dire 200-400 nm. Sur cette plage, pour le conformère le plus stable de la nétamine R (**Figure 50**), les bandes d'absorptions du spectre UV théorique correspondent chacune à une seule transition électronique π→π* localisée sur la guanidine et la double liaison 8a-8b (**Figure 51**). Sur la plage 200-400 nm, une variation de la conformation du système tricyclique a donc plus d'impact sur les spectres UV et DCE qu'une variation des chaînes carbonées en C7 et C8. Cela concorde donc avec les regroupements de population effectués pour les spectres UV et de DCE calculés.

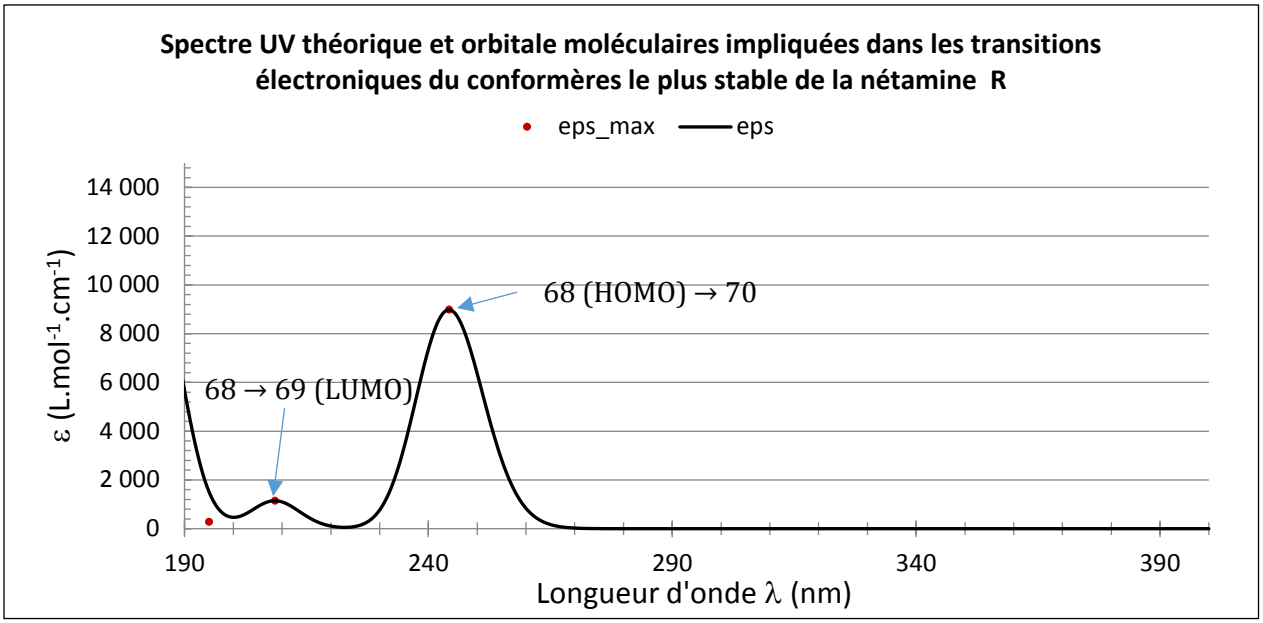


Figure 50 : *Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine R (**E19**).*

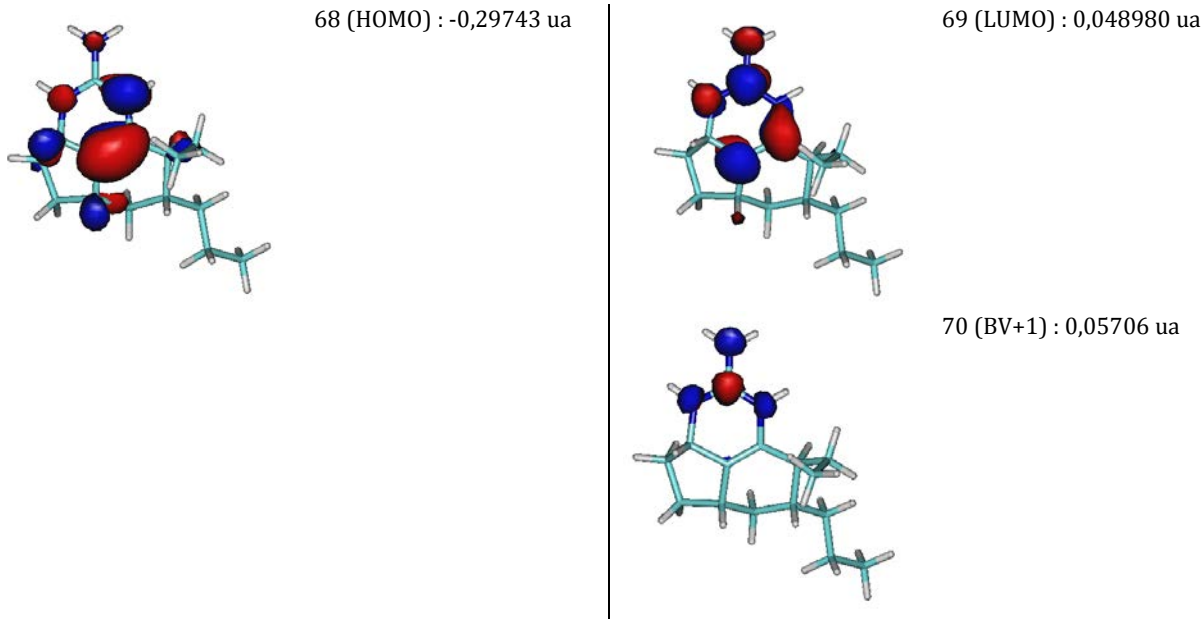
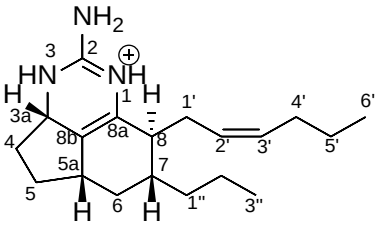


Figure 51 : *Orbitales moléculaires principalment impliquée dans le spectre UV du conformères le plus stable de la nétamine R (**E19**).*

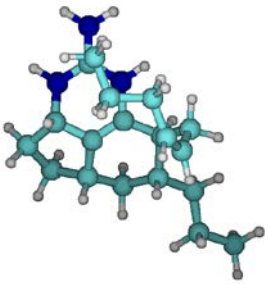
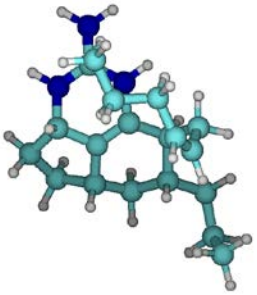
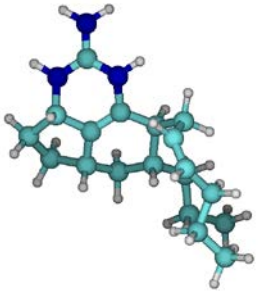
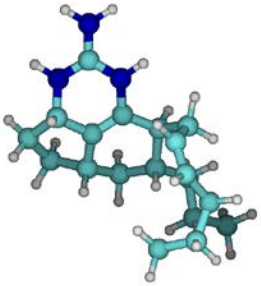
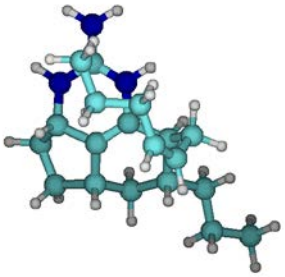
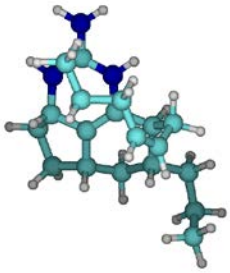
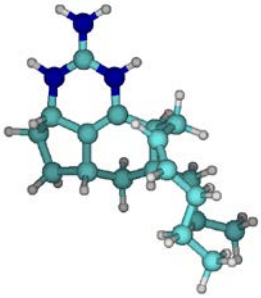
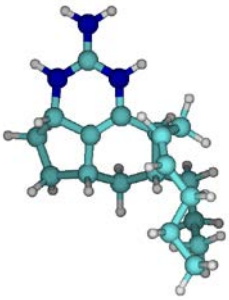
V.3.3.2 Configuration absolue de la nétamine P



nétamine P (**E17**)

Tous les calculs ont étés réalisés sur l'énantiomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*. En utilisant la méthode précédemment décrite pour la recherche de conformère, c'est-à-dire en tenant compte des 3 conformations de cycles du **modèle N2** ainsi que les différentes conformations possibles des deux chaînes latérales en C7 et en C8, cela représente 754 conformères à optimiser. Finalement parmi ces 754 géométries de départ, 573 conformères ont pu être optimisés. C'est-à-dire qu'ils ont convergé vers un minimum d'énergie et que le calcul de leurs fréquences de vibration ne révèle pas de fréquences négatives. Il s'agit donc bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle. 229 de ces 573 conformères ont des énergies relatives inférieures à 3 kcal.mol^{-1} dont 8 présentent une population supérieure ou égale à 2% à 298 K avec un conformère majoritaire ayant une population de 7,78%. Parmi ces 8 conformères, 4 ont une conformation de cycle type C1 et 4 autres une conformation de cycle type C3 (**Tableau XXXIV**).

Tableau XXXIV : *Conformères les plus stables de la nétamine P (**E17**) ayant une population ≥ 5%*

	C1_V24_1	C1_V24_3	C1_V28_1
			
ΔG (kJ/mol)	2,520	3,195	0,000
Population	2,82%	2,14%	7,78%
	C1_V29_1	C3_V19_4	C3_V19_5
			
ΔG (kJ/mol)	3,076	1,607	2,279
Population	2,25%	4,07%	3,10%
	C3_V31_4	C3_V31_4	
			
ΔG (kJ/mol)	0,746	3,143	
Population	5,76%	2,19%	

Les 50 transitions électroniques de plus basses énergies ont été calculées pour les 229 conformères les plus stables ainsi que leur spectre UV. Ceux des conformères présentant une population relative supérieure à 2% selon Boltzmann sont représentés dans la **Figure 52**, il est à noter que la superposition des 8 spectres des conformères ayant une population de Boltzmann supérieure à 2% indique que la position de la première bande d'absorption est liée à la conformation du noyau tricyclique : 235-237 nm si celui-ci a une conformation type c1 et 244-247

nm si celui-ci à une conformation type c3. Les 229 spectres UV obtenus ont ensuite été pondérés selon la statistique de Boltzmann afin d'obtenir un spectre UV moyen (**Figure 53**) alors comparable avec le spectre expérimental (**Figure 54**). Ce spectre moyen a été décalé de 0,119 eV (5,4 nm sur le premier λmax du spectre théorique) afin d'être en accord avec l'expérience et pour tenir compte de la surestimation des énergies de transition électronique singulet calculées par la méthode ωB97XD.

Le spectre expérimental présente un maximum d'absorption vers 235 nm et un épaulement approximativement vers 250 nm. Les pics des conformères de type c1 étant tous légèrement plus intenses que ceux des conformères de type c3 ; le pic à 235 nm du spectre expérimental pourrait être lié aux conformères type c1 et l'épaulement vers 250 nm aux conformères de type c3.

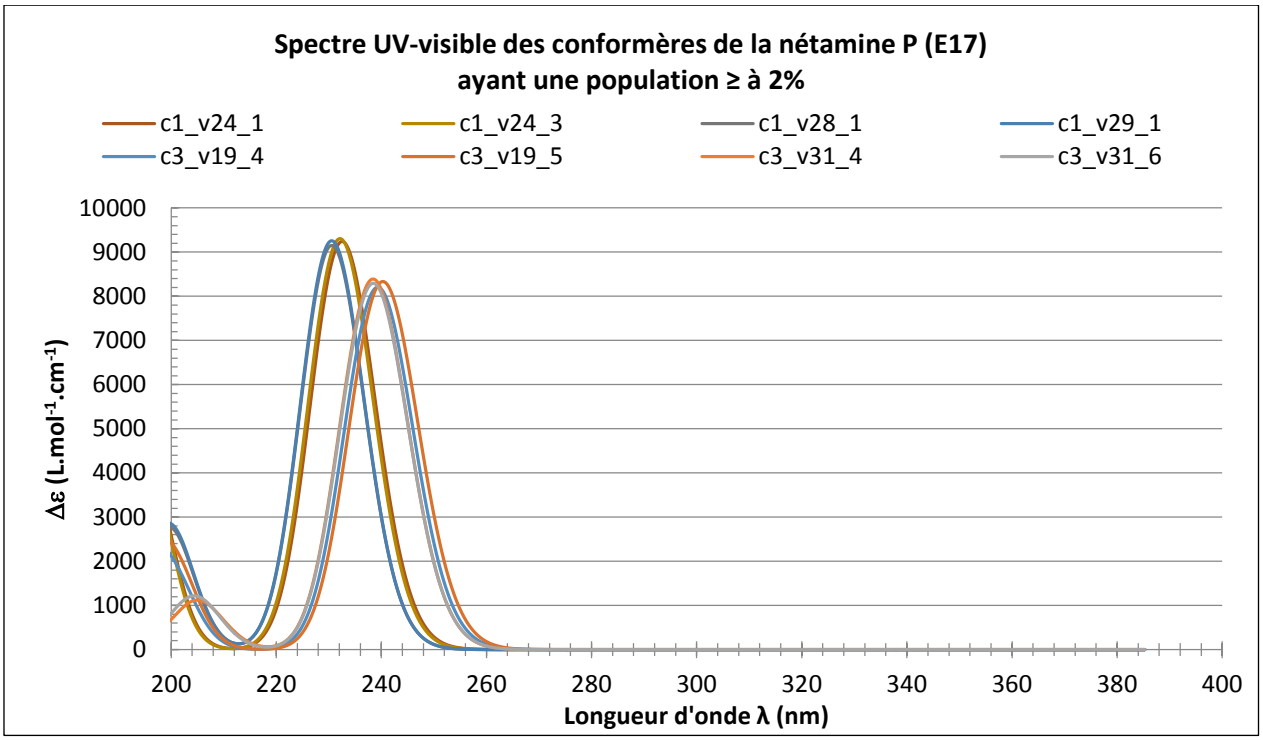


Figure 52 : *Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine P (**E17**).*

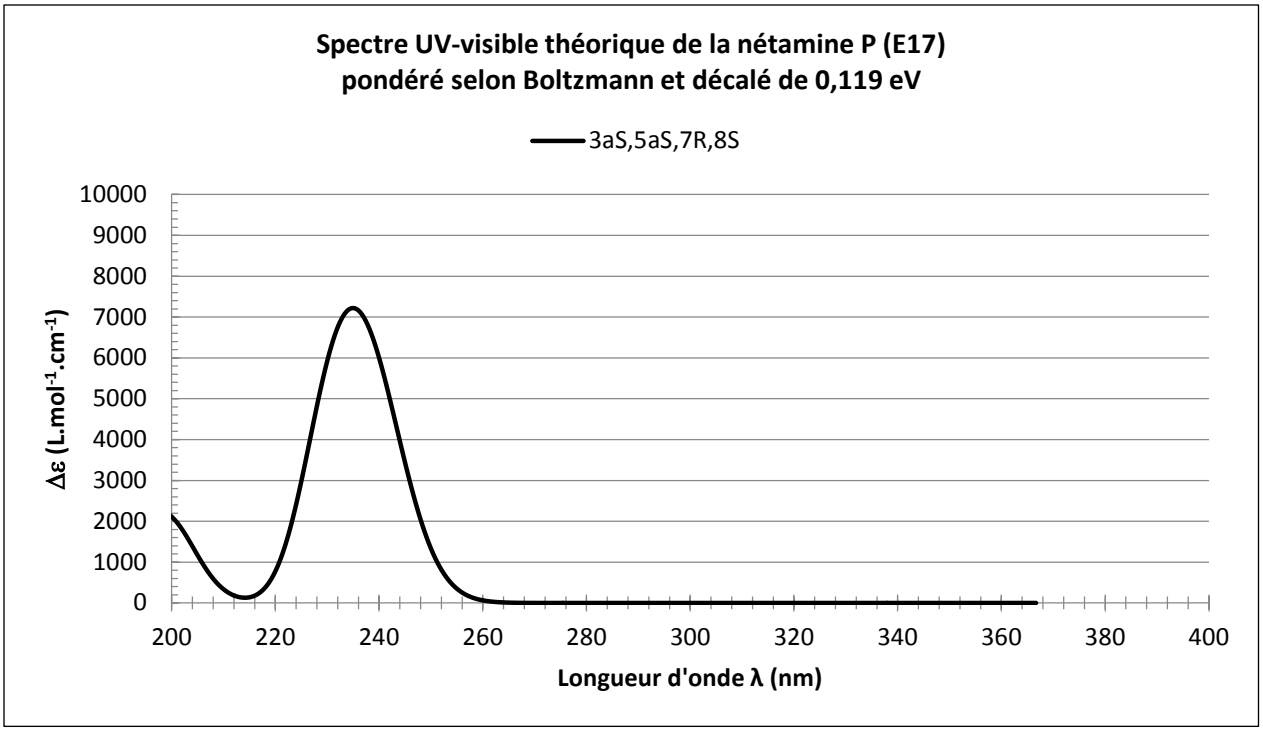


Figure 53 : *Spectre UV théorique de la nétamine P (**E17**) pondéré selon Boltzmann et décalé de 0,119 eV.*

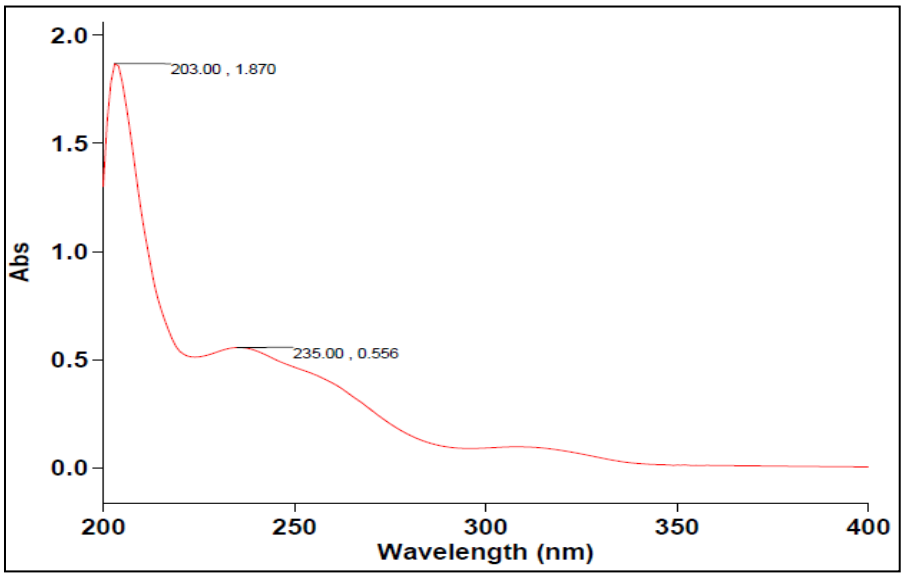


Figure 54 : *Spectre UV expérimental de la nétamine P (**E17**).*

De la même manière, les spectres théoriques de DCE des 229 conformères de l'isomère 3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S* ont été calculés, ceux des 8 conformères présentant une population relative supérieure à 2% selon Boltzmann sont représentés dans la **Figure 55**. Comme les spectres UV, les spectres de DCE varient essentiellement en fonction du type de conformation c1 ou c3 du noyau tricyclique. Les conformères ayant un noyau de type c1 présentent un maximum vers 230 nm et les conformères ayant un noyau de type c3 présentent un maximum (moins intense) vers 240 nm. Les 229 spectres ont été pondérés selon Boltzmann et décalés selon l'énergie déterminée avec le

spectre UV soit 0,119 eV, le spectre résultant (celui de l'isomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*), celui de l'énantiomère (3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R*) ainsi que le spectre expérimental de la nétamine P sont représentés dans la **Figure 56**.

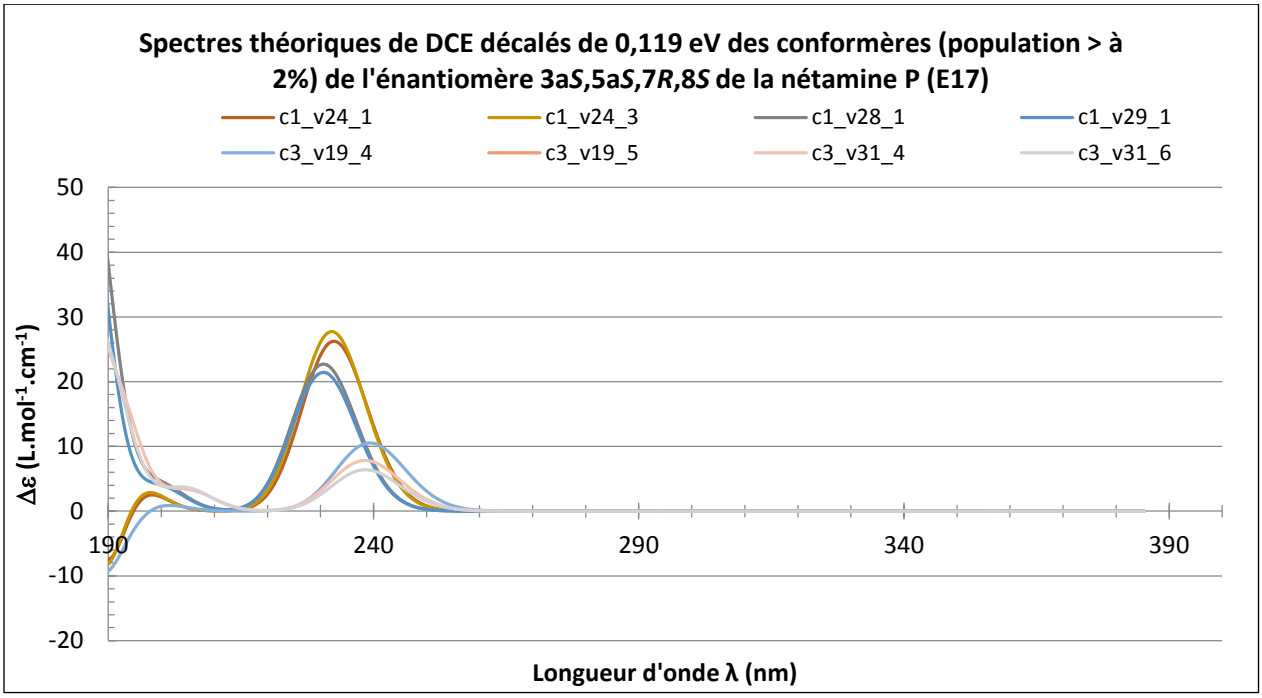


Figure 55 : *Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 3aS,5aS,7R,8S de la nétamine P (**E17**).*

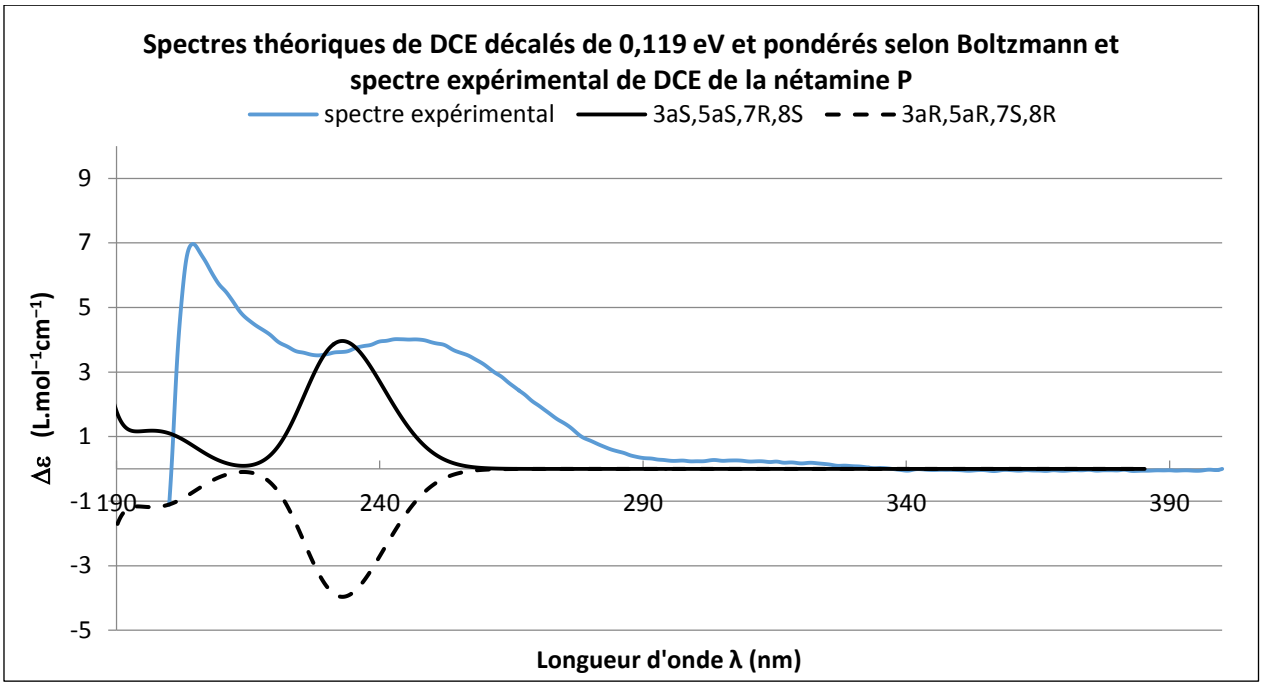


Figure 56 : *Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine P (**E17**).*

Tableau XXXV : *Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine P (E**17**).*

Expérimentaux	Calculés (3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*)	Calculés (3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R*)
204,5 +	196,7 +	196,7 -
243,2 +	232,9 +	232,9 -

λ (nm) ; + = EC positif, - = négatif

Le **Tableau XXXV** regroupe les différents effets Cotton (EC) calculés pour l'énantiomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S* et l'énantiomère 3a*R*, 5a*R*, 7*S*, 8*R* ainsi que ceux du spectre expérimental. Les effets Cotton calculés pour l'énantiomère 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S* peuvent être comparés à ceux du spectre expérimental. En effet, cet énantiomère, comme la nétamine P, présente deux maxima positifs. En revanche, les longueurs d'ondes de ces EC semblent sous estimées (232,9 théorique pour 243,2 expérimentale et 196,7 théorique pour 204,5 expérimental). Cela peut être dû à une sous-estimation du pourcentage de conformères de type C3 dans la population de Boltzmann ; ceux-ci ayant tous un premier EC vers 240 nm.

La comparaison des spectres théoriques de DCE des deux énantiomères avec le spectre expérimental de la nétamine P nous permet d'en déduire sa configuration absolue. Cette molécule possède donc une configuration 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S.*

Afin de mieux comprendre l'allure des spectres en fonction de la structure de la molécule, il est intéressant de noter quelles sont les transitions électroniques majoritairement impliquées dans la plage étudiée, c'est-à-dire 200-400 nm. Sur cette plage, pour le conformère le plus stable de la nétamine P (**Figure 57**), les bandes d'absorptions du spectre UV théorique correspondent chacune à une seule transition électronique π→π* localisée sur la guanidine et la double liaison 8a-8b (**Figure 58**). Sur la plage 200-400 nm, une variation de la conformation du système tricyclique a donc plus d'impact sur les spectres UV et DCE qu'une variation des chaînes carbonées en C7 et C8. Cela concorde donc avec les regroupements de population effectués pour les spectres UV et de DCE calculés.

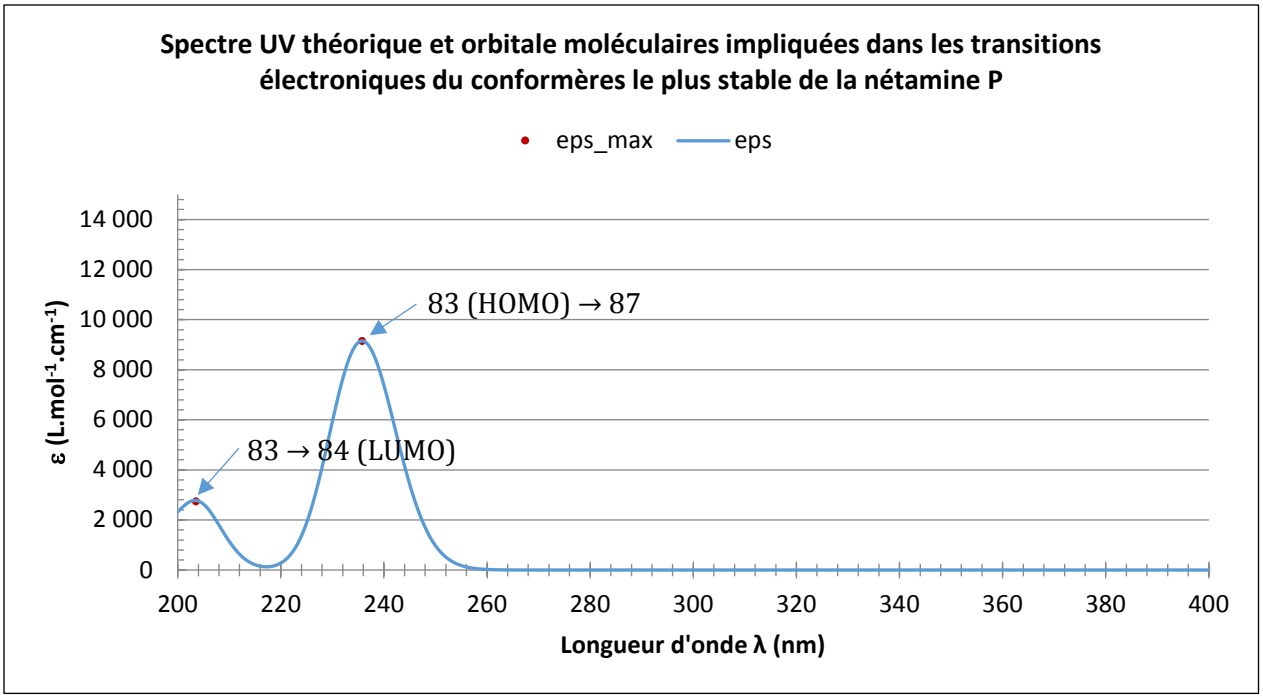


Figure 57 : *Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine P (**E17**).*

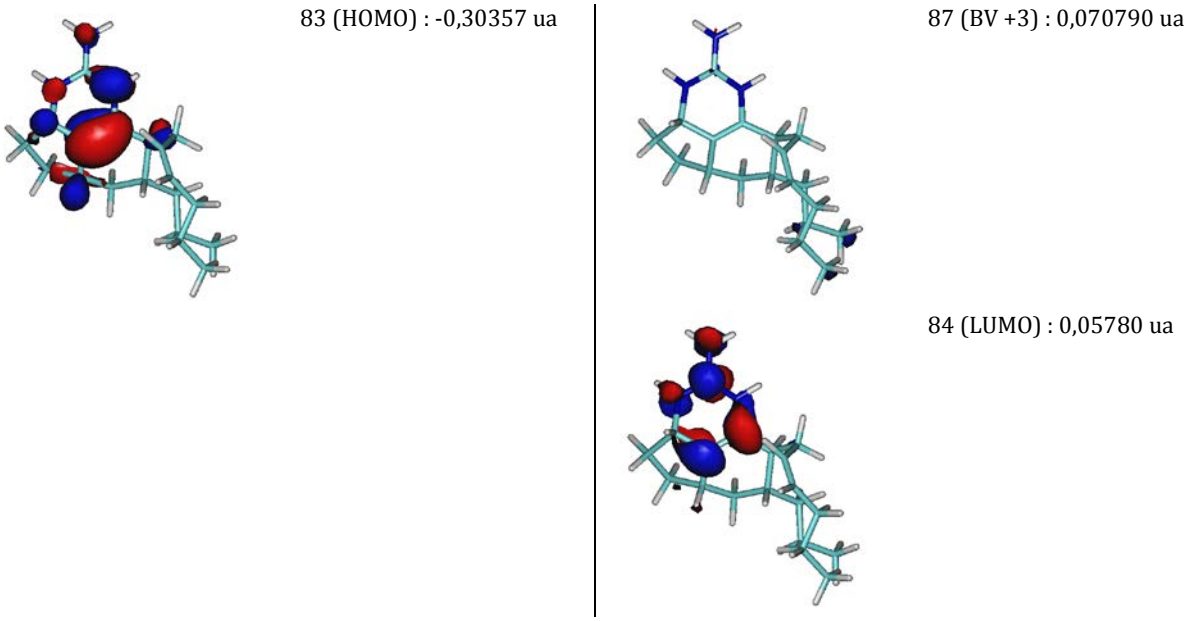
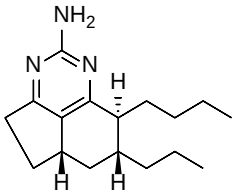


Figure 58 : *Orbitales moléculaires principalment impliquée dans le spectre UV du conformères le plus stable de la nétamine P (**E17**).*

V.3.3.3 Configuration absolue de la nétamine G



nétamine G (**E8**)

En utilisant la méthode précédemment décrite pour la recherche de conformère, c'est-à-dire en tenant compte des 2 conformations de cycles du **modèle N1** ainsi que les différentes conformations possible des chaînes propyle en C7 et butyle en C8, cela représente 486 conformères à optimiser. L'influence de ces chaînes carbonées uniquement constituées de liaisons σ étant considérée comme négligeable dans la bande d'absorption étudiée (400 – 200 nm), comme nous avons pu le montrer pour la nétamine R (**E19**), celles-ci ont été remplacées par des groupements méthyles afin de simplifier les calculs. Deux conformères ont donc été trouvés et optimisés. C'est-à-dire qu'ils ont convergés vers un minimum d'énergie et que le calcul de leurs fréquences de vibration ne révèle pas de fréquences négatives. Il s'agit donc bien d'un minimum sur la surface d'énergie potentielle.

Les 50 transitions électroniques de plus basses énergies ont été calculées pour ces 2 conformères ainsi que leur spectre UV (**Figure 59**). Ces spectres sont à comparer avec ceux des différents conformères de la nétamine J (**E11**) calculés par Gros E. et disponible dans sa thèse ; En effet, les nétamines G (**E8**) et J (**E11**) possède la même configuration relative et diffèrent uniquement au niveau de la chaîne latérale en C8 (chaîne butyle pour la nétamine G et éthyle pour la nétamine J). Comme les conformères de la nétamine J, les spectres de DCE calculés présentent une première bande d'absorption vers 265 nm, une seconde vers 215 nm et une troisième vers 180 nm. La simplification des chaînes latérales de la nétamine G ne semble donc pas influer sur les spectres calculés. Les spectres UV obtenus ont ensuite été pondérés selon la statistique de Boltzmann afin d'obtenir un spectre UV moyen (**Figure 60**) alors comparable avec le spectre expérimental (**Figure 61**). Ce spectre moyen a été décalé de -0,5560eV (-35,8 nm sur le premier λmax du spectre théorique) afin d'être en accord avec l'expérience et de pour tenir compte de la surestimation des énergies de transition électronique singulet calculées par la méthode ωB97XD. Le spectre ainsi obtenu présente trois bandes d'absorption sur la plage 190 – 400 nm, à savoir 301,0 nm, 238,7 nm et 194,7 nm. Ces valeurs sont comparables à celles du spectre expérimental (301,0 nm , 234,0 nm et 202,0 nm) ainsi que celles de spectre théorique de la nétamine J calculé par Gros E. (303 nm, 239 nm, 197 nm).

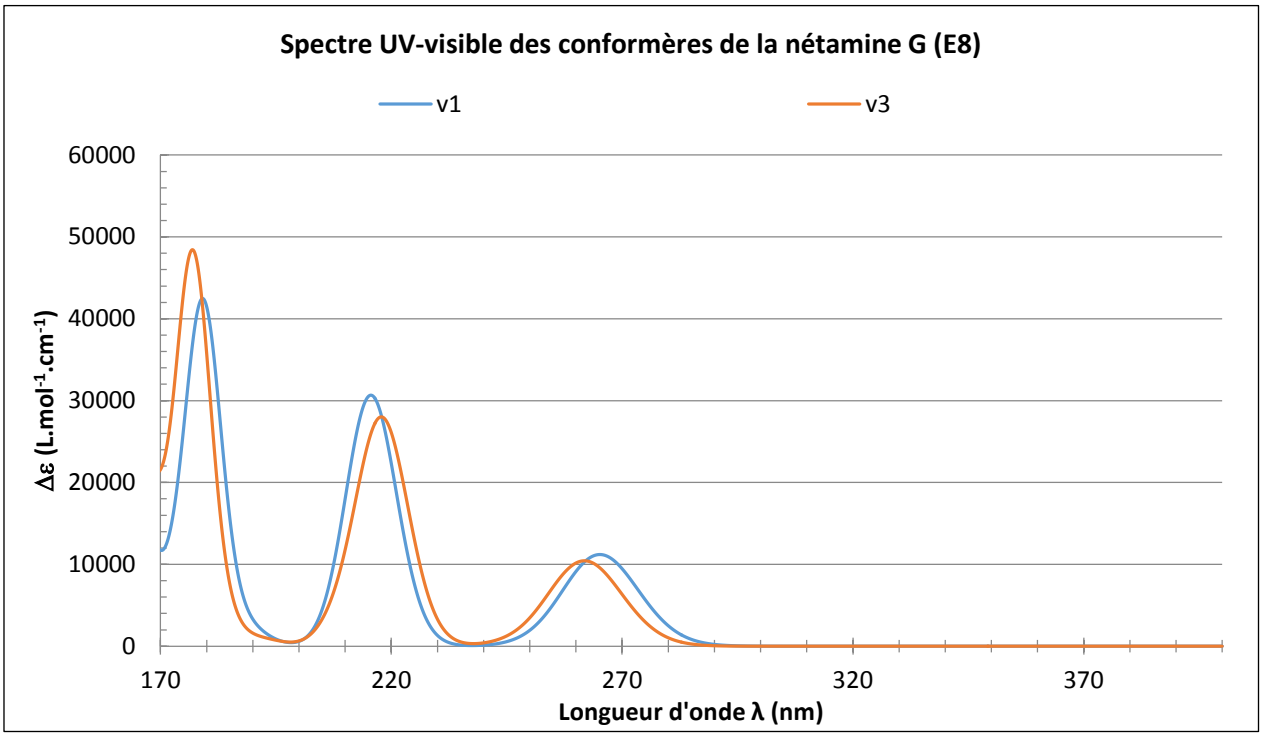


Figure 59 : *Spectres UV théoriques des conformères de la nétamine G (**E8**).*

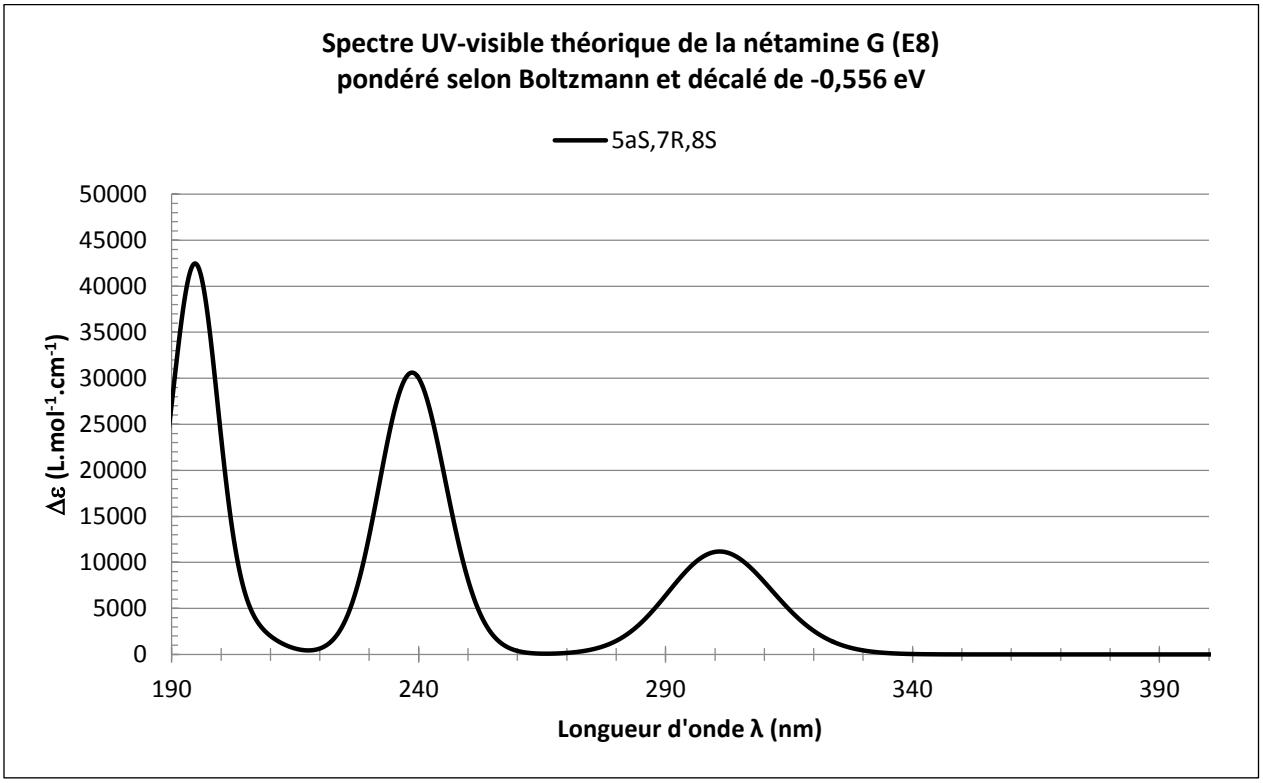


Figure 60 : *Spectre UV théorique de la nétamine G (**E8**) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,556 eV.*

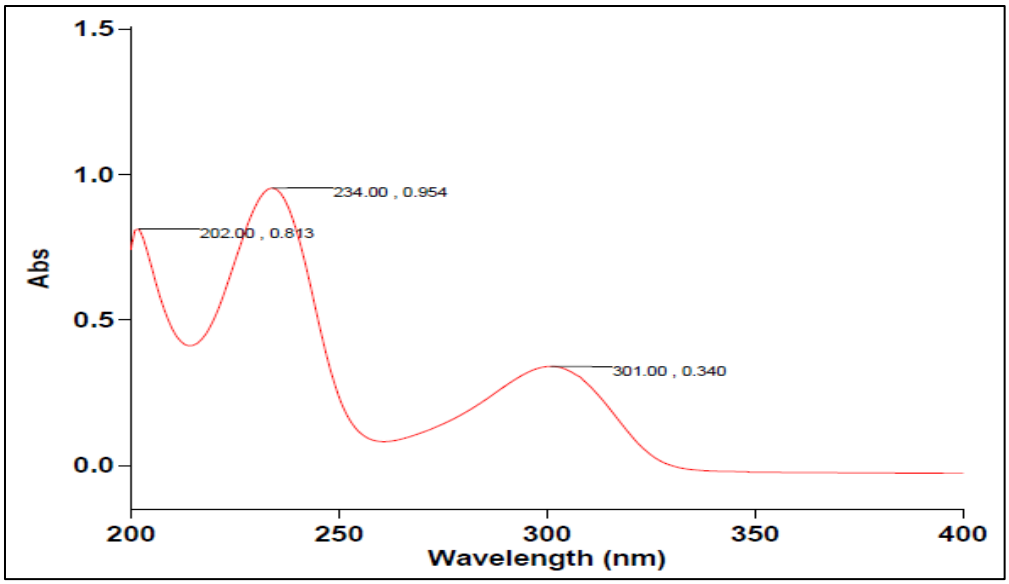


Figure 61 : *Spectre UV expérimental de la nétamine G (**E8**).*

Les spectres théoriques de DCE des 2 conformères de l'isomère 5a*S*,7*R*,8*S* ont été calculés (**Figure 62**). Ceux-ci ont globalement la même allure. Ils présentent tous les deux un maximum vers 300 nm, un minimum vers 280 nm, un minimum vers 230 – 235 nm et un maximum vers 215 nm. En revanche, le conformère V1 présente un maximum vers 245 nm, ce que n'est pas le cas pour le conformère V2. Les 2 spectres ont été pondérés selon Boltzmann et décalés selon l'énergie déterminée avec le spectre UV soit -0,556 eV, le spectre résultant (celui de l'isomère 5a*S*, 7*R*, 8*S*), celui de l'énantiomère (5a*R*, 7*S*, 8*R*) ainsi que le spectre expérimental de la nétamine G sont représentés dans la **Figure 63**.

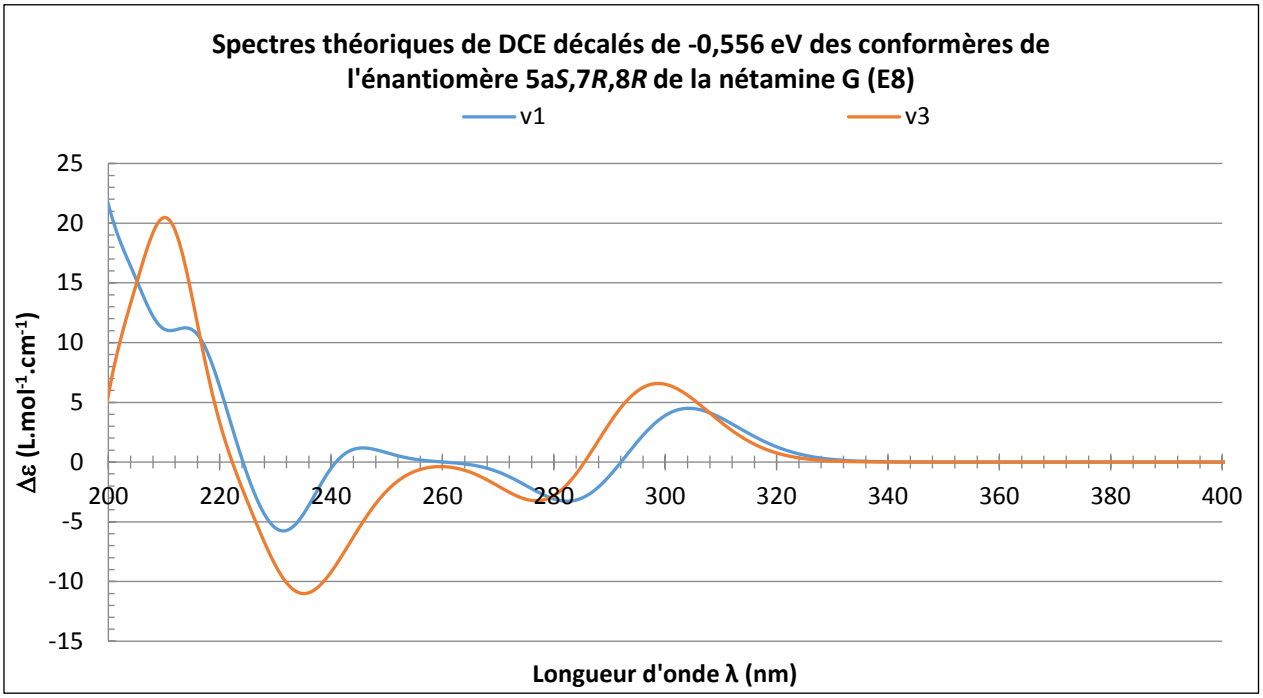


Figure 62 : *Spectres de DCE des conformères de l'énantiomère 5aS,7R,8R de la nétamine G (**E8**).*

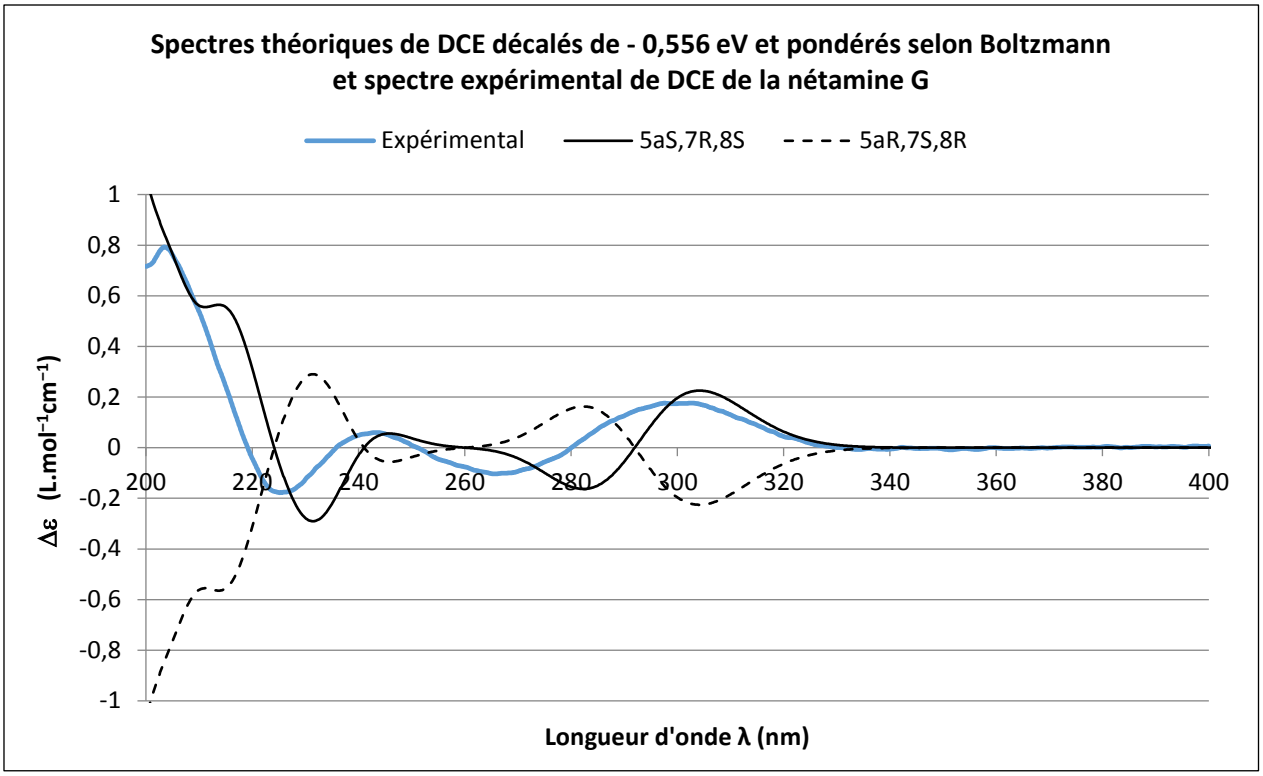


Figure 63 : *Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine G (**E8**).*

Tableau XXXVI : *Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine G (**E8**).*

Expérimentaux	Calculés (5a*S*, 7*R*, 8*S*)	Calculés (5a*R*, 7*S*, 8*R*)
203,5 +	213,7 +	213,7 -
225,3 -	231,5 -	231,5 +
243,7 +	245,8 +	245,8 -
265,6 -	282,3 -	282,3 +
297,6 +	304,2 +	304,2 -

λ (nm) ; + = EC positif, - = négatif

Le **Tableau XXXVI** regroupe les différents effets Cotton (EC) calculés pour l'énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*S* et l'énantiomère 5a*R*, 7*S*, 8*R* ainsi que ceux du spectre expérimental. Il existe une très bonne corrélation entre les effets Cotton calculés pour l'énantiomère 5a*S*, 7*R*, 8*S* et ceux du spectre expérimental. En revanche, les longueurs d'ondes de ces EC calculés semblent surestimées. Celles-ci sont toutes supérieures aux longueurs d'ondes des EC équivalents sur le spectre expérimental (de 2 à 17 nm). Le décalage de -0,556 eV lors de la calibration du spectre UV théorique par rapport au spectre expérimental est donc trop grand.

La comparaison des spectres théoriques de DCE des deux énantiomères avec le spectre expérimental de la nétamine G nous permet d'en déduire sa configuration absolue. Cette molécule possède donc une configuration 5a*S*, 7*R*, 8*S*.

V.4 Discussion

L'étude, par modélisation moléculaire, des molécules isolées de l'éponge *Biemna laboutei* par Gros E. *et al*., (2014 ; 2015) avait deux objectifs :

- Etayer la configuration relative déterminée par RMN grâce à la probabilité DP4+.
- Déterminer la configuration absolue des molécules dont le spectre de DCE expérimental est disponible et dont la configuration relative a été déterminée par la probabilité DP4+.

Finalement, la probabilité DP4+ a été effectuée sur 9 molécules, les molécules ayant un noyau pyrimidinique (**mirabiline A**, et **nétamines G** et **H**) ainsi que les molécules ayant une insaturation 8a – 8b (**nétamine E**, **O**, **P**, **Q**, **R** et **S**). Pour la **mirabiline A** et les **nétamines E**, **G**, **H**, **P**, **R** et **S**, la probabilité DP4+ est en accord avec la configuration relative déterminée par RMN alors que pour les **nétamines O** et **Q**, les probabilités DP4+ effectuées sur les déplacements ^{13}C et sur les déplacements ^{1}H ne convergent pas vers le même isomère. De plus, si l'on s'intéresse uniquement à la probabilité DP4+ globale, la configuration relative déterminée pour la **nétamine O** est 3a*S*, 5a*R*, 7*S*, 8*S*, (93,95 %) alors que la configuration relative déterminée par RMN est 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*R* et la configuration relative déterminée pour la **nétamine Q** est 3a*S*, 5a*R*, 7*S*, 8*R*, (35,18 %) alors que la configuration relative déterminée par RMN est 3a*S*, 5a*S*, 7*S*, 8*S* (Gros E. *et al*., 2015). Sur les 9 molécules initiales, la configuration relative de 7 d'entre elles a été étayée par modélisation moléculaire et parmi ces 7 molécules, 3 ont fait l'objet d'une étude approfondie par chimie théorique afin de déterminer leur configuration absolue, les **nétamines G**, **P** et **R**.

La modélisation des spectres théoriques UV puis de DCE a permis de déterminer la configuration absolue de ces trois molécules en les comparants avec les spectres de DCE expérimentaux. La configuration absolue de la **nétamine G** est 5a*S*, 7*R*, 8*S* et la configuration absolue des **nétamine P** et **R** est 3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*.

La comparaison entre les spectres UV expérimentaux et les spectres théoriques de la **nétamine P** et **R** peut soulever certaines questions. Les spectres expérimentaux présentent une bande d'absorption très peu intense vers 300-320 nm, alors que la transition de plus basse énergie (de plus grande longueur d'onde) de chaque conformère, pour les deux nétamines est inférieure à 248 nm. Ces calculs ne permettent donc pas d'expliquer la présence de cette bande expérimentale de faible intensité vers 300-320 nm. Cela peut être dû à une dégradation des molécules ; en effet, les nétamines ayant un noyau pyrimidinique présentent une bande d'absorption UV vers 300-310 nm et, de plus une analyse HRMS de la **nétamine Q** (**E18**), molécule ayant le même noyau que les **nétamines P** et **R** (cycle guanidinique insaturé 8a-8b), a montré que celle-ci se dégrade en une molécule de masse *m/z* 300,2434 correspondant à la formule brute

$C_{19}H_{30}N_3$ (masse calculée, *m/z* 300,2440). Cette molécule, issue de la dégradation de la nétamine Q, possède 2 hydrogènes de moins que la **nétamine Q**, cette perte concorde avec une déshydrogénation du cycle guanidinique pour donner un cycle pyrimidinique (**Figure 64**).

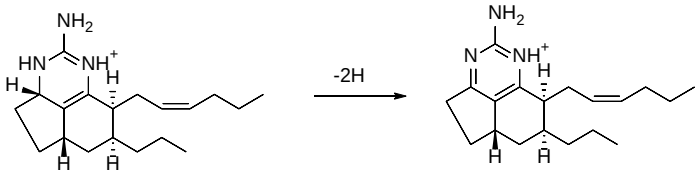


Figure 64 : *Déshydrogénation de la nétamine Q (**E18**).*

Si cette bande d'absorption vers 300-320 nm est très peu intense sur les spectres expérimentaux des **nétamines P** et **R**, elle est en revanche très clairement visible sur le spectre de la **nétamine O** (λ_{max} = 302 nm) et celui de la **nétamine Q** (λ_{max} = 305 nm) (**Figure 65**) ; cela concorderait donc avec la dégradation décrite dans la **Figure 64** pour la nétamine Q. De plus, ces deux molécules sont celles dont le calcul de la probabilité DP4+ divergeait avec la configuration relative déterminée par RMN par Gros E. *et al.*, (2015). Par conséquent, aucune caractérisation structurale ne peut être effectuée sur ces molécules à partir de ces spectres.

Les spectres expérimentaux des **nétamines E** et **S** ne présentent pas cette bande d'absorption, celles-ci n'ont, semble-t-il, pas subit de dégradation et leur configuration absolue peut donc être étudiée par modélisation moléculaire. De même, la **mirabiline A** et la **nétamine H**, qui possèdent déjà un noyau pyrimidinique, ne sont pas soumis à ce phénomène de dégradation. Leur configuration absolue peut donc être étudiée.

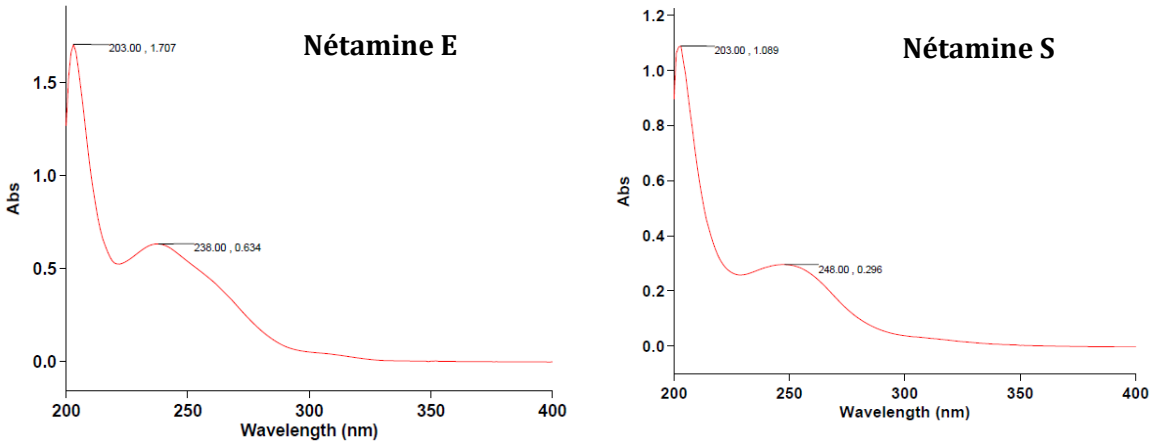


Figure 65 : *Spectres UV expérimentaux des nétamines E, O, Q et S.*

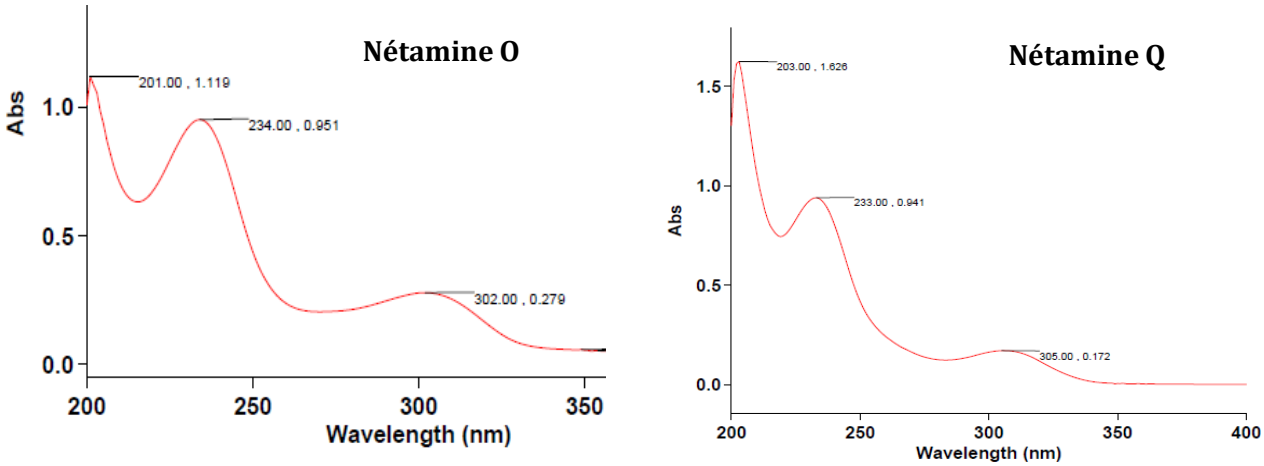


Figure 65 : *Spectres UV expérimentaux des nétamines E, O, Q et S (suite).*

Conclusion générale
et
Perspectives

Ces travaux de thèse s'incrivent dans le cadre du projet BIOMOL-TCN et font suite à une collaboration établie entre différents laboratoires (le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments de l'Université de La Réunion, l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, le Laboratoire de Pharmacognosie – Institut de Pharmacie de l'Université de Liège, le Laboratoire de Virologie et Chimiothérapie de l'Université Catholique de Louvain et le Laboratoire de Phytochimie et Pharmacologie de l'Ecole de Pharmacie de Genève – Lausanne). L'objectif premier de cette collaboration était la découverte de molécules d'origine marine, à haute valeur ajoutée dans le domaine de la santé (molécules à activité anticancéreuse, antipaludique, antivirale et antioxydante).

La première partie de ces travaux a été consacrée à la réalisation d'un criblage chimique et d'un criblage biologique sur 60 échantillons d'invertébrés marins issus de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien (Madagascar). Une corrélation entre les données obtenues par ces deux criblages et les données bibliographiques a montré que parmi les 60 échantillons testés :

- 33 sont dépourvus d'intérêt chimique et d'activité biologique.
- 3 présentent uniquement un intérêt chimique.
- 2 présentent à la fois un intérêt chimique et bibliographique.
- 8 présentent uniquement un intérêt pour leurs activités biologiques mais aucun intérêt chimique et bibliographique.
- 9 présentent à la fois un intérêt pour leurs activités biologiques et un intérêt chimique mais aucun intérêt bibliographique.
- 5 présentent à la fois un intérêt pour leurs activités biologiques, un intérêt chimique et un intérêt bibliographique.

Cette étape a permis de sélectionner 3 éponges afin de réaliser leur étude chimique :

- *Monanchora unguiculata*, sélectionnée pour son profil chimique, sa cytotoxicité sur cellules KB et son activité antipaludique.
- *Amphimedon* sp., sélectionnée pour son profil chimique et sa cytotoxicité sur cellules KB.
- *Aulospongus gardineri*, sélectionée pour son profil chimique et l'absence de données dans la littérature.

La deuxième partie, consacrée à l'étude chimique de l'éponge ***Monanchora unguiculata***, a conduit à l'isolement de neuf alcaloïdes guanidiniques :

- la crambescidine 359 (**M62**)
- la crambescidine 800 (**M59**)
- la fromiamycaline (**M61**)
- l'acide crambescidique (**M67**)
- l'unguiculine A (**MU5**)
- la ptilomycaline E (**MU6**)
- la ptilomycaline F (**MU7**)
- le mélange ptilomycaline G et ptilomycaline H (**MU8** + **MU9**)

Parmi ceux-ci, ont été caractérisés, quatre alcaloïdes guanidiniques pentacycliques connus (**M59, M61, M62** et **M67**), déjà isolés d'éponges appartenant au genre *Monanchora* et cinq molécules de structures nouvelles, dont un alcaloïde guanidinique linéaire (**MU5**) et quatre alcaloïdes guanidiniques pentacycliques (**MU6**, **MU7**, **MU8** et **MU9**). Les alcaloïdes **M59, M61, M62, M67, MU6**, **MU7**, **MU8** et **MU9** sont des dérivés de la ptilomycaline A, isolé pour la première fois en 1992 de deux éponges, l'une appartenant au genre *Ptilocaulis* et l'autre appartenant au genre *Hemimycale*. A ce jour, 34 analogues de la ptilomycaline A ont été isolés d'invertébrés marins et 33 d'entre eux, ont été isolés d'éponges appartenannt à la famille des Crambeidae. Ces molécules peuvent donc être considérées comme marqueurs chimiotaxonomiques de cette famille.

Certains des métabolites isolés présentent des activités biologiques intéréssantes :

- ***Une activité cytotoxique.***

Avec des CI_{50} inférieures à 1 µg/mL, la fromiamycaline (**M61**), la ptilomycaline E (**MU6**) ainsi que le mélange des ptilomycalines G (**MU8**) et H (**MU9**) présentent une cytotoxicité élevée sur cellules KB. Ces molécules peuvent être considérées comme agents anticancéreux potentiels.

- ***Une activité antipaludique.***

Avec des CI_{50} inférieures à 0,2 µg/mL, la fromiamycaline (**M61**) et la ptilomycaline F (**MU7**) sont les deux molécules isolées présentant la meilleure activité antipaludique. Au regard de cette excellente activité, l'index de sélectivité de ces molécules vis-à-vis de cette activité a été évalué. Si la fromiamycaline montre un index de sélectivité moyen (IS 4,9), la ptilomycaline F en revanche présente un bon index de sélectivité (IS 7,0). Cette dernière peut donc être considérée comme un agent antipaludique potentiel.

La troisième partie, consacrée à l'étude chimique de l'éponge ***Amphimedon* sp.**, a conduit à l'isolement de trois métabolites secondaires :

- l'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (**AS1**)
- l'acide amphimédonoïque (**AS2**)
- le psammaplysène E (**AS3**)

L'acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (**AS1**) est un composé phénolique polybromé connu. L'acide amphimédonoïque (**AS2**) et le psammaplysène E (**AS3**), de structures nouvelles, sont des dérivés de la bromotyrosine. Ces trois composés sont atypiques d'une éponge appartenant au genre *Amphimedon*, les composés phénoliques polybromés étant plus communément retrouvés chez des cyanobactéries et les dérivés de la bromotyrosine chez les éponges appartenant à l'ordre des Verongida. L'hypothèse, la plus probable, serait une symbiose entre l'éponge *Amphimedon* sp. et une cyanobactérie. La cytotoxicité sur cellules KB de ces trois composés a été testée. Ces derniers ont montré une cytotoxicité modérée.

La quatrième partie, consacrée à l'étude chimique de l'éponge ***Aulospongus gardineri***, a conduit à l'isolement de trois métabolites secondaires :

- la *N,N*-lauroyldiéthanolamine (**AG1**)
- la *N*-lauroyléthanolamine (**AG2**)
- le (*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**)

La *N,N*-lauroyldiéthanolamine (**AG1**), molécule déjà isolée d'une bactérie marine, et la *N*-lauroyléthanolamine (**AG2**), qui n'a, jusqu'alors, jamais été isolé de milieux naturels, font partie du groupe des *N*-acyléthanolamines, qui est un groupe de lipides présents dans les membranes cellulaires de cellules animales et végétales. Le (*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**) est un polyyne de structure nouvelle. Les polyynes et plus généralement les polyacétylènes sont des molécules couramment retrouvées chez les éponges et sont considérées comme des constituants membranaires des éponges. Ces trois molécules semblent donc provenir des membranes cellulaires de l'éponge *Aulospongus gardineri.* **AG1** et **AG2** étant des molécules facilement accessibles de manière synthétique et **AG3** se dégradant rapidement, ces molécules n'ont pas été soumises à des tests d'activités biologiques.

La génération d'un réseau moléculaire a, en revanche, permis de mettre en évidence la présence de 7 autres polyacétylènes (**AG4 – AG10**) proches du (*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (**AG3**). L'extrait brut de l'éponge *Aulospongus gardineri* semble donc être majoritairement composé de constituants membranaires des cellules de

l'éponge, à savoir des polyynes et des *N*-acyléthanolamines. L'extrait de cette éponge est par conséquent assez pauvre en métabolites secondaires, ce qui peut expliquer l'absence de publication sur le genre *Aulospongus* et l'absence d'activités biologiques associées aux éponges de ce genre.

La cinquième partie, consacrée à l'étude, par chimie théorique, de métabolites isolés de l'éponge ***Biemna laboutei***, a permis de valider les configurations relatives de sept alcaloïdes guanidiniques et de déterminer les configurations absolues de trois d'entre eux, les nétamines G (**E8**), P (**E17**) et R (**E19**).

La probabilité DP4+, méthode statistique basée sur la comparaison des déplacements chimiques théoriques calculés pour différents diastéréoisomères avec les déplacements chimiques expérimentaux, effectuée sur 9 molécules, la mirabiline A (**E3**) et les nétamines E (**E7**), G (**E8**), H (**E9**), O (**E16**), P (**E17**), Q (**E18**), R (**E19**) et S (**E20**), a permis de confirmer les configurations relatives déterminées par RMN de 7 molécules, la mirabiline A et les nétamines E, G, H, P, R et S. Trois d'entre elles ont fait l'objet d'une étude approfondie par chimie théorique afin de déterminer leur configuration absolue, les nétamines G, P et R.

La modélisation des spectres théoriques UV puis de DCE, prenant en compte l'effet du solvant (méthode SMD) dans le cadre d'une méthode de fonctionnelle de la densité récente (ωB97XD), a permis de déterminer la configuration absolue de ces trois molécules. Une calibration des spectres UV théoriques par rapport aux spectres UV expérimentaux afin de supprimer l'erreur produite par ωB97XD dans le calcul des énergies de transitions électroniques a été effectuée. Cette calibration, reportée sur les spectres de DCE théoriques, a permis une comparaison de ces derniers avec les spectres de DCE expérimentaux permettant ainsi de déterminer la configuration absolue de la **nétamine G** (5a*S*, 7*R*, 8*S*) et la configuration absolue des **nétamine P** et **R** (3a*S*, 5a*S*, 7*R*, 8*S*).

Les résultats obtenus à partir de ces travaux de thèse permettent d'envisager différentes poursuites d'études, que ce soit dans la caractérisation de molécules ou la valorisation de molécules isolées :

- ***L'étude chimique d'autres invertébrés marins présentant un intérêt suite aux criblages réalisés***

Par manque de temps, certains extraits bruts n'ont pas pu être exploités. Les extraits bruts d'*Acanthella cavernosa* (TCN-M107), *Lemnalia madagascariensis* (TCN-M177), et *Stylissa carteri*

(TCN-M145) se sont révélés particulièrement remarquables lors des criblages chimiques et biologiques. Il serait donc intéressant de mener une étude chimique complète sur ces organismes.

- ***L'élucidation structurale des métabolites isolés de Biemna laboutei***

La configuration absolue de certaines molécules isolées de *Biemna laboutei* n'a pas encore été déterminée. Au regard des spectres de DCE expérimentaux disponibles, les calculs de modélisation moléculaire appliqués aux nétamines G, P et R pourraient également être appliqués à la mirabiline A ainsi qu'aux nétamines E et S afin de déterminer leur configuration absolue.

- ***La valorisation des molécules bioactives isolées***

Certaines molécules isolées de l'éponge *Monanchora unguiculata* ont révelé des activités biologiques *in vitro* prometteuses. Il conviendrait à présent de mener des investigations approfondies sur les molécules les plus actives : la ptilomycaline F pour son activité antipaludique et les ptilomycalines E, G et H pour leur cytotoxicité sur cellules KB.

- ***Le fractionnement guidé par masse de Monanchora unguiculata***

La réalisation d'un réseau moléculaire à partir de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* a permis de mettre en évidence la présence d'autres dérivés de la ptilomycaline A, de structures nouvelles, qui pourraient également présenter un intérêt biologique. Il serait alors judicieux de mener un isolement guidé par masse afin de purifier ces molécules à partir de l'extrait brut.

- ***La compréhension de l'origine biosynthétique des molécules isolées d'Amphimedon sp.***

La composition chimique de l'éponge *Amphimedon* sp. est inhabituelle car elle est particulièrement riche en molécules polybromés. Il serait donc intéressant de comprendre l'origine biosynthétique de ces molécules. A savoir si celles-ci sont produites par l'éponge, par un microogarnisme associé, ou alors si elles sont le fruit d'une symbiose entre ces deux organismes.

Partie expérimentale

I. Procédures générales

I.1 Les solvants et les réactifs

I.1.1 Les solvants

Les extractions et les premiers fractionnements sur CLMP, ont été réalisés au moyen de solvants (Fischer Scientific et Acros Organics) à 99% de pureté. Des solvants de qualité CLHP ou 100% de pureté (SDS) ont été utilisés pour les séparations et analyses par CLHP. Pour les premiers fractionnements ainsi que ceux par CLHP, de l'eau milliQ a été utilisée.

I.1.2 Les réactifs

- Acide acétique (pour CLHP) : Sigma Aldrich
- Acide TriFluoroAcétique (TFA) (pour CLHP) : Fisher Scientific
- Acide acétique glacial : Fisher Scientific
- Acide formique : Sigma Aldrich
- Acide sulfurique concentré : Fisher Scientific
- Acide tartrique : Acros Organics
- Aldéhyde anisique : Acros Organics
- Cholestérol : Janssen Chimica
- Iodure de potassium : Sigma Aldrich

I.2 Les techniques chromatographiques

I.2.1 Chromatographie sur couche Mince (CCM)

Des plaques de gel de silice (SI60-F_{254}, Merck) de 0,2 mm d'épaisseur ont été utilisées pour effectuer les CCM analytiques. Différents mélanges d'éluant ont été utilisés pour la migration des plaques CCM :

- Isohexane/AcOEt 20:80 (v/v)
- Isohexane/AcOEt 80:20 (v/v)
- DCM/MeOH 90:10 (v/v)
- DCM/MeOH 95:5 (v/v)

Les plaques ont, dans un premier temps, été révélées sous UV (λ= 254 et 365 nm), puis par pulvérisation de deux réactifs différents : anisaldéhyde et Dragendorff, préparés selon les modes opératoires suivants (***Tableau XXXVII***).

Tableau XXXVII : *Révélateurs utilisés pour les CCM.*

Réactifs	Préparation/Application	Substances Détectées
Anisaldéhyde	Mélanger dans l'ordre 0,5 mL d'aldéhyde anisique avec 10 mL d'acide acétique (CH_3COOH) glacial, 85 mL de méthanol et 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) conc. Pulvériser, puis révéler en chauffant.	Réactif polyvalent
Dragendorff	***Solution A :*** Dissoudre 0,85 g de nitrate basique de bismuth, 10 g d'acide tartrique dans 40 mL d'eau. ***Solution B :*** Dissoudre 16 g d'iodure de potassium (KI) dans 40 mL d'eau. Au moment de l'emploi, mélanger 5 mL de solution A + 5 mL de solution B + 100 mL d'eau + 20 g d'acide tartrique. Révéler par pulvérisation (Vis : orange)	Alcaloïdes

I.2.2 Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP)

Les séparations par CLMP ont été effectuées au moyen d'un système Sepacore® (Buchi) muni de deux modules de pompes C-605, d'un programmateur de pompe C-615 et d'un collecteur de fractions C-660. Les colonnes utilisées (460 X 36 mm ; 460 X 26 mm et 230 X 15 mm) ont été remplies avec un gel de silice : Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 70-230 Mesh**.**

I.2.3 Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les CLHP ***analytiques*** ont été réalisées sur trois systèmes différents :

- Une chaîne analytique Alliance Waters® 2695, pilotée par le logiciel Empower™ 2, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de photodiodes PAD (190-600 nm, Waters 2998), (2) un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Waters 2420), et (3) un spectromètre de masse SM (Waters Micromass ZQ 2000).
- Une chaîne analytique Dionex Ultimate 3000 (Thermo scientific), pilotée par le logiciel Chroméléon, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de diodes DAD (190-600 nm) (Thermo scientific), et (2) un détecteur d'aérosols chargés Corona équipé d'un générateur de diazote de type Alliance (Thermo scientific).
- Une chaîne analytique Agilent 1100 series, pilotée par le logiciel Chemstation, couplée en série à (1) un détecteur UV à barrette de photodiodes PAD (190-600 nm) (Serie Agilent 1100 G1315B) et (2) un spectromètre de masse SM (Serie Agilent 1100 G1956A) équipé d'un générateur d'azote de type Claino.

Les colonnes analytiques utilisées ont été les suivantes :

- La colonne Waters SunFire Shield RP 18 (5 µm), 4,6 X 150 mm.
- La colonne Waters XBridge C_{18} (5 µm), 4,6 X 250 mm.
- La colonne Phenomenex Gemini C_{18} (3 µm), 4,6 X 150 mm.

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

- Le système manuel équipé d'une pompe Waters 600, d'un détecteur UV Waters 2487, d'un système d'injection rhéodyne® et piloté par le logiciel Masslynx.

Les colonnes préparatives et semi-préparatives utilisées ont été les suivantes :

- La colonne Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10*150 mm.
- La colonne Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 15*120 mm.
- La colonne Waters XBridge C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
- La colonne Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.

I.3 Analyses physiques et spectrales des métabolites

I.3.1 Le pouvoir rotatoire

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

I.3.2 La spectroscopie de masse haute résolution (SMHR)

Les spectres de masse haute résolution en Ionisation Electrospray (mode positif ESI^+ ou mode négatif ESI^-) ont été réalisés sur un spectromètre de masse ESI-TOF (Micromass LCT Premier XE, Waters) et un spectromètre de masse à trappe ionique (Q-Exactive Plus Orbitrap, Thermo Scientific). Les échantillons ont été solubilisés dans du MeOH ou de l'ACN selon leur solubilité, et injectés dans l'appareil de masse *via* les systèmes Waters Acquity UPLC et Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC, équipés d'une colonne Waters BEH C18 (1,7 µm), 2,1 X 50 mm.

I.3.3 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN proton (^1H) et carbone (^{13}C) ont été réalisés sur les appareillages Bruker Ultrashield Avance 300 MHz, 500 MHz et 600 MHz. Les déplacements chimiques (δ), exprimés en

partie par million (ppm) ont été référencés sur les pics de solvants : CD_3OD δH 3,31 et δC 49,00, $CDCl_3$ δH 7,27 et δC 77,00. Les constantes de couplages J sont exprimées en Hertz. L'attribution des signaux se fait comme suit : *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *qt* (quintuplet), *m* (multiplet), *dd* (doublet de doublet), *ddd* (doublet de doublet de doublet), *br* (signal large) L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D (^1H, ^{13}C et DEPT-135), associées aux expériences 2D (^1H-^1H COSY, ^1H-^{13}C HSQC, ^1H-^{13}C HMBC, ^1H-^1H TOCSY, ^1H-^1H NOESY), avec l'utilisation du logiciel MestReNova.

II. Etude chimique des éponges

II.1 Collecte

Toutes les éponges étudiées dans le cadre de cette thèse proviennent de la collecte de Novembre 2012, réalisée aux îles Mitsio, à Madagascar. Après la collecte, les éponges étudiées (Annexe 1) ont été étiquetées et conservées au congélateur (- 20°C) jusqu'à leur extraction.

II.2 Extraction

II.2.1 Extraction par macération à froid

Les éponges préalablement décongelées, sont découpées en morceaux de 1 cm * 1 cm environ ; les morceaux sont placés dans un mélange MeOH/DCM (50:50 v/v). L'ensemble est laissé à macérer à température ambiante pendant 2 × 12 heures pour le mélange MeOH/DCM. Après filtration par gravité sur papier filtre, les différents solvants sont évaporés sous vide. Les extraits bruts obtenus sont alors pesés et conservés au froid.

II.2.2 Bilan des extractions des invertébrés marins étudiées

Le bilan des extractions réalisées sur l'ensemble des invertébrés marins est donné dans l'annexe 1.

II.3 Réalisation des signatures chimiques

Chaque extrait brut d'éponges a été soumis à :

- Une analyse RMN ^1H réalisée dans $CDCl_3$ ou dans CD_3OD, et enregistrée sur un spectromètre Bruker Ultrashield Avance 300 MHz.
- Une analyse CLHP réalisée dans les conditions suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} (3 µm), 4,6 X 150 mm.
Eluant : H_2O + 0,1% HCOOH / ACN + 0,1% AF
Gradient : 98:2 (5 min) ; 98:2 → 0/100 (35 min)
Débit : 0,7 mL.min^{-1}
Détection : UV DEDL/SM

II.4 Fractionnement, isolement et purification des métabolites secondaires

II.4.1 Métabolites isolés de *Monanchora unguiculata*

- **Fractionnement 1**

L'extrait brut de *Monanchora unguiculata* (25,8 g) obtenu par macération au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH a été fractionné par **CLMP**, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 460 mm ; d.i. = 36 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Débit : 20 mL/min
Elution : isohexane 100 % (30 min.) ; isohexane / AcOEt 50:50 (30 min.) ; AcOEt 100 % (30min.) ; AcOEt / MeOH 50:50 (30 min.) ; MeOH 100 % (30 min.)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 5 fractions : **F1** (0,327 g) ; **F2** (1,323 g) ; **F3** (1,911 g) ; **F4** (3,168 g) et **F5** (1,515 g).

- **Fractionnement 2**

F3 (1,911 g), contenant les composés **MU5** et **MU6**, a été soumise à un second fractionnement par **CLMP**, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 460 mm ; d.i. = 26 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Eluants : Isohexane / AcOEt / MeOH
Débit : 20 mL/min
Gradient :
- Isohexane / AcOEt 95:5 → 50:50 (20 min.) ; 50:50 (10 min.) ; 50:50 → 0:100 (20 min.) ; 0:100 (10 min.)
- AcOEt / MeOH 100:0 → 50:50 (20 min.) ; 50:50 (10 min.) ; 50:50 → 0:100 (20 min.) ; 0:100 (20 min.)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 7 fractions : **F31** (11,8 mg) ; **F32** (5,3 mg) ; **F33** (65,7 mg) ; **F34** (190,0 mg) ; **F35** (484 mg) ; **F36** (619 mg) et **F37** (51 mg).

- **Fractionnement 3**

F36 (619 mg), contenant les composés **MU5** et **MU6**, a été soumise à un troisième fractionnement par **CLMP**, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 230 mm ; d.i. = 15 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Eluants : AcOEt / MeOH
Débit : 10 mL/min
Gradient : 80:20 → 50:50 (30 min.) ; 50:50 (10 min.) ; 50:50 → 25:75 (30 min.) ; 25:75 (20 min.) ; 25:75 → 0:100 (30 min.) ; 0:100 (10 min.)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 4 fractions : **F361** (3,8 mg) ; **F362** (58,3 mg) ; **F363** (45,1 mg) et **F364** (12,5 mg).

- **Fractionnement 4**

F363 (45,1 mg), contenant les composés **MU5** et **MU6**, a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 98:2 (5 min.) ; 98:2 → 0:100 (30 min.)
Détection : UV (205 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 4 fractions : **F3632** (4,0 mg) ; **F3633** (5,5 mg) ; **F3634** (25,1 mg) et **F3635** (4,1 mg).

- **Fractionnement 5**

F3634 (25 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, afin de séparer et d'obtenir les composés purs **MU5** (3,5 mg) et **MU6** (14,0 mg) selon les conditions opératoires suivantes:

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 98:2 (5 min.) ; 98:2 → 75:35 (15 min.)
Détection : UV (205 nm)

- **Fractionnement 6**

F4 (3,16 g), a été fractionnée par **CLHP** préparative, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 19 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 18,0 mL/min
Gradient : 80:20 → 65:35 (15 min.) ; 65:35 (10 min.) ; 65:35 → 40:60 (5 min.)

Détection : UV (205 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 6 fractions : **F41** (150 mg) ; **F42** (62 mg) ; **F43** (245 mg) ; **F44** (28 mg) ; **F45** (35 mg) et **F46** (42 mg).

- **Fractionnement 7**

F42 (62 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Isocratique : 71:29 (20 min.)
Détection : UV (205 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 4 fractions : **F421** (8 mg) ; **F422** (9 mg) ; **F423** (9 mg) et **F424** (7 mg).

- **Fractionnement 8**

F423 (9 mg), a été soumise à une **CLHP** semi-préparative, afin de purifier le composé **MU2** (12 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 10 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Isocratique : 71:29 (20 min.)
Détection : UV (205 nm)

- **Fractionnement 9**

F43 (245 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters XBridge C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,7 mL/min
Gradient : 70:30 (19 min.) ; 70:30 → 50:50 (2 min.) ; 50:50 (5 min.)
Détection : UV (205 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 7 fractions : **F431** (8 mg) ; les quatres fractions **F432, F433, F434, F435** ont été rassemblées sous **F432** (39 mg) ; **F436** (13 mg) contenant le composé pur **MU6** et **F437** (10 mg).

- **Fractionnement 10**

F432 (39 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, afin de fournir le mélange **MU8 + MU9** (6 mg) et le composé pur **MU6** (9 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters XBridge C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm
Eluants : H_2O + 0,1% TFA / ACN + 0,1% TFA
Débit : 4,7 mL/min
Gradient : 52:48 → 44:56 (30 min.)
Détection : UV (205 nm)

- **Fractionnement 11**

F437 (10 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, afin de fournir le composé pur **MU7** (9 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters XBridge C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm
Eluants : H_2O + 0,1% TFA / ACN + 0,1% TFA
Débit : 4,7 mL/min
Gradient : 48:52 → 46:64 (20 min.)
Détection : UV (205 nm)

- **Fractionnement 12**

F46 (42 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, afin de purifier le composé **MU4** (1,1 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 50:50 → 5:95 (30 min.)
Détection : UV (205 nm)

- **Fractionnement 13**

F5 (1,51 g), a été fractionnée par **CLHP** préparative, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Sunfire Shield RP 18 (5 µm) 19 X 150 mm
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 18,0 mL/min
Gradient : 80:20 → 65:35 (15 min.) ; 65:35 (10 min.) ; 65:35 → 40:60 (5 min.)
Détection : UV (205 nm)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 6 fractions : **F51** (65 mg) ; **F52** (15 mg) ; **F53** (42 mg) ; **F54** (37 mg) ; **F55** (1 mg) et **F56** (18 mg).

- **Fractionnement 14**

Les fractions **F53** (42 mg) et **F54** (37 mg), ont été rassemblées puis fractionnées par **CLHP** semi-préparative, afin de fournir les composés purs **MU2** (12 mg) et **MU3** (2,6 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters XBridge C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm
Eluants : H_2O + 0,1% TFA / ACN + 0,1% TFA
Débit : 4,7 mL/min
Gradient : 55:45 → 30:70 (40 min.)
Détection : UV (205 nm)

II.4.2 Métabolites isolés d'*Amphimedon* sp.

- **Fractionnement 1**

L'extrait brut d'*Amphimedon* sp. (1,5 g) obtenu par macération au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH a été fractionné par **CLMP**, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 460 mm ; d.i. = 36 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Débit : 20 mL/min
Elution : isohexane 100 % (30 min.) ; isohexane / AcOEt 50:50 (30 min.) ; AcOEt 100 % (30min.) ; AcOEt / MeOH 50:50 (30 min.) ; MeOH 100 % (60 min.)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 10 fractions : **F1** (252 mg) ; **F2** (57 mg) ; **F3** (138 mg) ; **F4** (12 mg) ; **F5** (93 mg) ; **F6** (52 mg) ; **F7** (31 mg) ; **F8** (120 mg) ; **F9** (15 mg) ; **F10** (32 mg).

- **Fractionnement 2**

F9 (15 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, et a permis d'obtenir le composé **AS3** (0,7 mg) purifié, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
Eluants : H_2O + 0,1% AF / MeOH + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 80:20 (5 min.) ; 80:20 → 20:80 (30 min.)
Détection : UV (220 nm)

- **Fractionnement 3**

F10 (32 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative, afin de purifier les composés **AS1** (1,0 mg), **AS2** (2,8 mg), et **AS3** (1,3 mg), selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
Eluants : H_2O + 0,1% AF / MeOH + 0,1% AF

Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 80:20 (5 min.) ; 80:20 → 20:80 (30 min.)
Détection : UV (220 ; nm)

II.4.3 Métabolites isolés d'*Aulospongus gardineri*

- **Fractionnement 1**

L'extrait brut d'*Aulospongus gardineri* (2,3 g) obtenu par macération au moyen du mélange de solvants DCM/MeOH a été fractionné par **CLMP**, selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : L = 460 mm ; d.i. = 36 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Débit : 40 mL/min
Elution : - Isohexane / AcOEt 100:0 (5 min.) ; 100:0 → 0:100 (20 min.) ; 0:100 (10 min.)
- AcOEt / MeOH 100:0 → 0:100 (20 min.) ; 0:100 (10 min.)

Ce fractionnement a permis l'obtention de 8 fractions : **F1** (256 mg) ; **F2** (274 mg) ; **F3** (93 mg) ; **F4** (58 mg) ; **F5** (45 mg) ; **F6** (53 mg) ; **F7** (95 mg) et **F8** (214 mg).

- **Fractionnement 2**

F7 (95 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative et a permis d'obtenir les composés **AG1** (9 mg), **AG2** (1,5 mg) et **AG3** (9 mg) purs. Les conditions opératoires suivantes ont été utilisées :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 40:60 (5 min.) ; 40:60 → 20:80 (30 min.)
Détection : UV (220 nm)

- **Fractionnement 3**

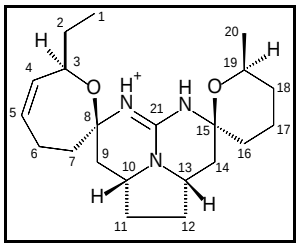
F8 (214 mg), a été fractionnée par **CLHP** semi-préparative et a permis d'obtenir les composés **AG1** (4 mg) et **AG3** (1,5 mg) purs. Les conditions opératoires suivantes ont été utilisées :

Colonne : Phenomenex Gemini C_{18} prep (5 µm), 10 X 250 mm.
Eluants : H_2O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 40:60 (5 min.) ; 40:60 → 20:80 (30 min.)
Détection : UV (220 nm)

III. Caractéristiques physiques et spectrales des métabolites isolés

III.1 Métabolites isolés de *Monanchora unguiculata*

- **Crambescidine 359 (MU1)**



Aspect : huile blanche

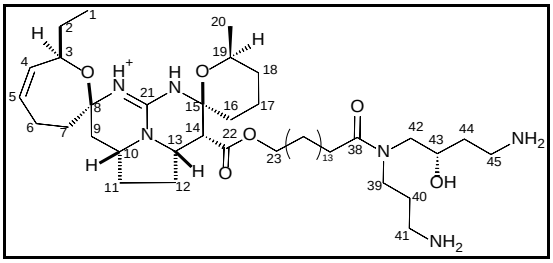
Formule brute : $C_{21}H_{34}N_3O_2^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 360,26532 (calculée pour $C_{21}H_{34}N_3O_2^+$: 360,2646)

$[\alpha]_D^{20}$ **:** -12,7 (*c* 0,4 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,72 (H5, dd, *10,8, 7,5*), 5,51 (H4, dt, *10,8, 2,0*), 4,35 (H3, d, *11,0*), 4,04 (H10, m), 4,04 (H13, m), 3,74 (H19, m), 2,60 (H9b, dd, *12,9, 4,7*), 2,43 (H7a, t, *16,0*), 2,34 (H6, m), 2,32 (H11, m), 2,32 (H12, m), 2,32 (H17, m), 2,15 (H6, dt, *17,4, 6,7*), 2,15 (H14, m), 1,98 (H7b, dd, *14,0, 6,2*), 1,75 (H16, m), 1,75 (H17, m), 1,71 (H12, m), 1,70 (H18, m), 1,69 (H11, m), 1,59 (H16, t, *12,4*), 1,52 (H14, m), 1,47 (H9a, t, *12,4*), 1,46 (H2, m), 1,21 (H18, m), 1,08 (H20, d, *6,2*), 0,85 (H1, t, *7,3*)

- **Crambescidine 800 (MU2)**



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{45}H_{81}N_6O_6^+$

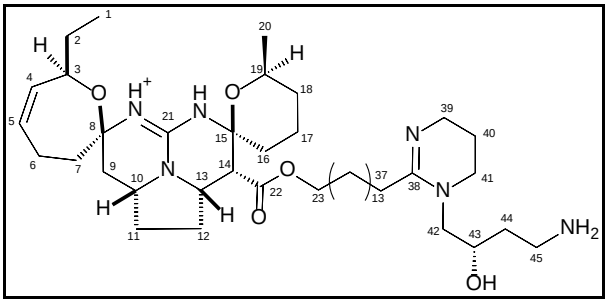
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 801,62323 (calculée pour $C_{45}H_{81}N_6O_6^+$: 801,6218)

$[\alpha]_D^{20}$ **:** -7,8 (*c* 4,1 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,70 (H5, br dd, *11,0, 7,6*), 5,50 (H4, br d, *11,0*), 4,44 (H3, d, *9,8*), 4,33 (H13, dt, *9,6, 4,8*), 4,13 (H23, m), 4,03 (H10, m), 3,96 (H43, m), 3,84 (H19,

m), 3,65 (H39, m), 3,55 (H42, m), 3,40 (H39, m), 3,40 (H42, m), 3,12 (H45, m), 3,04 (H14, d, *5,0*), 2,89 (H41, m), 2,63 (H9b, dd, *12,9, 4,5*), 2,49 (H7a, m), 2,49 (H37, m), 2,41 (H6, m), 2,31 (H11, m), 2,31 (H12, m), 2,14 (H6, dt, *16,2, 6,5*), 1,91 (H7b, m), 1,91 (H40, m), 1,80 (H12, m), 1,73 (H44, m), 1,67 (H11, m), 1,63 (H24, m), 1,54 (H2, dt, *7,1, 3,1*), 1,46 (H2, m), 1,41 (H9a, t, *12,6*), 1,29 (H25-36, m), 1,08 (H20, d, *6,2*), 0,85 (H1, t, *7,1*)

- **Fromiamycaline (MU3)**



Aspect : huile jaune

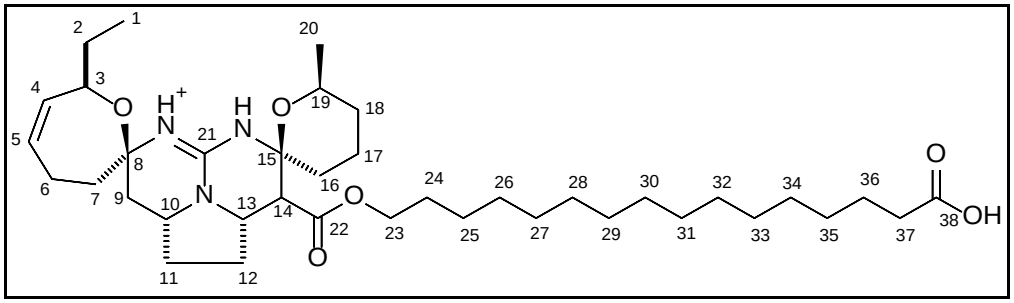
Formule brute : $C_{45}H_{79}N_6O_5^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 783,60980 (calculée pour $C_{45}H_{79}N_6O_5^+$: 783,6106)

$[\alpha]_D^{20}$ **:** -1,3 (*c* 1,3 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,77 (H5, br t, *7,5*), 5,52 (H4, br d, *11,0*), 4,41 (H3, br d, *10,3*), 4,36 (H13, dt, *9,7, 5,5*), 4,14 (H23, m), 4,06 (H10, m), 4,04 (H43, m), 3,84 (H19, m), 3,60 (H42, m), 3,55 (H39, m), 3,39 (H41, m), 3,35 (H42, m), 3,12 (H45, m), 3,08 (H14, d, *5,0*), 2,75 (H37, dt, *15,4, 8,0*), 2,65 (H9, m), 2,50 (H37, dd, *15,3, 7,3*), 2,43 (H6, m), 2,39 (H7, m), 2,34 (H12, m), 2,29 (H11, m), 2,15 (H6, m), 2,05 (H40, m), 1,98 (H7b, dd, *13,7, 6,1*), 1,84 (H44, m), 1,82 (H12, m), 1,75 (H17, m), 1,74 (H44, m), 1,70 (H18, m), 1,66 (H36, m), 1,65 (H16, m), 1,65 (H24, m), 1,60 (H11, m), 1,57 (H2, m), 1,48 (H2, m), 1,42 (H9, m), 1,39 (H16, m), 1,29 (H18, m), 1,32 (H25-35, m), 1,10 (H20, d, *6,1*), 0,85 (H1, t, *7,2*)

- **Acide crambescidique (MU4)**



Aspect : huile jaune

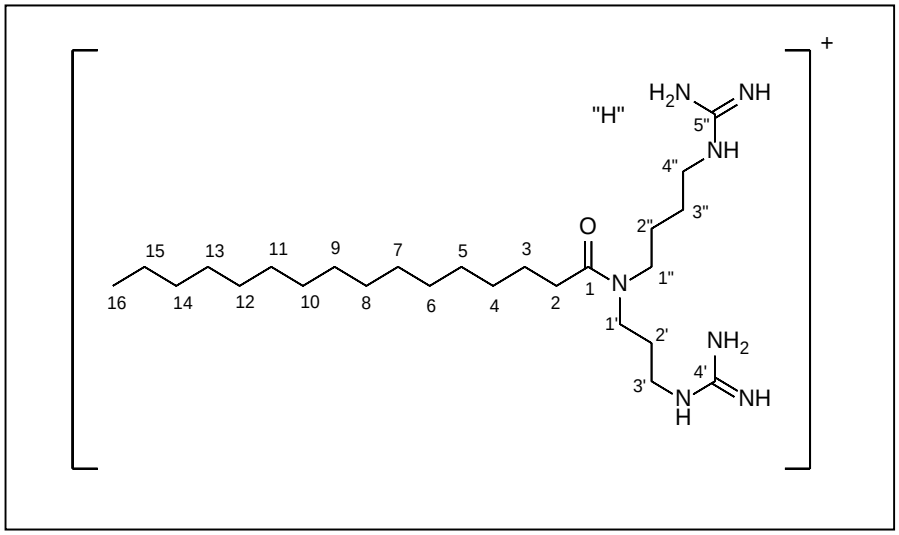
Formule brute : $C_{38}H_{64}N_3O_6^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 658,47943 (calculée pour $C_{38}H_{64}N_3O_6^+$: 658,4790)

$[\alpha]_D^{20}$ **:** -6,6 (*c* 0,9, mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,72 (H5, br t, *8,5*), 5,52 (H4, br d, *10,9*), 4,40 (H3, br d, *10,8*), 4,36 (H13, dt, *9,8, 5,9*), 4,15 (H23, t, *6,6*), 4,07 (H10, m), 3,84 (H19, m), 3,09 (H14, d, *4,9*), 2,65 (H9, dd, *13,0, 4,7*), 2,43 (H7a, m), 2,33 (H11, m), 2,27 (H37, t, *7,1*), 2,17 (H6, m), 2,00 (H7b, dd, *13,9, 5,3*), 1,83 (H17, m), 1,75 (H16, m), 1,69 (H18, m), 1,64 (H24, m), 1,60 (H25, m), 1,48 (H2, m), 1,41 (H9, m), 1,35 (H12, m), 1,30 (H26-36, m), 1,10 (H20, d, *6,2*), 0,86 (H1, t, *7,2*)

- **Unguiculine A (MU5)**



Aspect : huile jaune

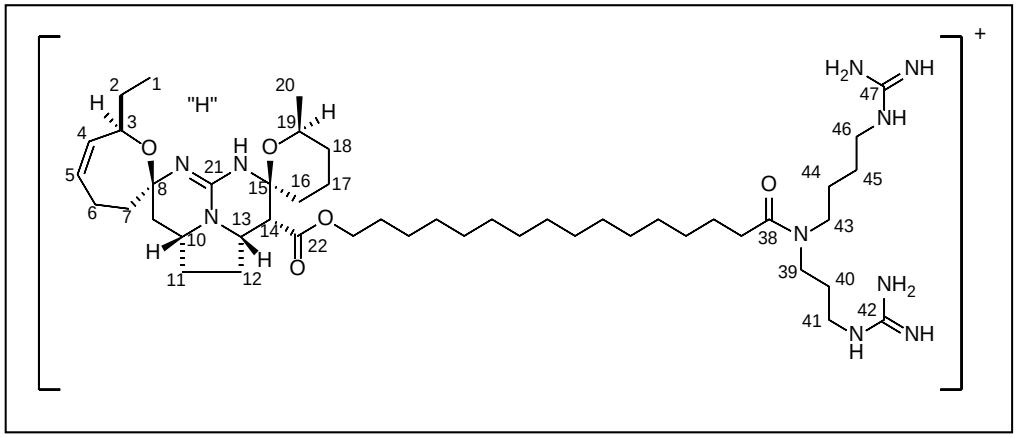
Formule brute : $C_{25}H_{54}N_7O^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 468,43820 (calculée pour $C_{25}H_{54}N_7O^+$: 468,4384)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,42 (MU5b : H1', m), 3,41 (MU5a : H1', m), 3,37 (H1", m), 3,21 (H4", t, *6,8*), 3,21 (MU5b : H3', t, *6,8*), 3,15 (MU5a : H3', t, *6,9*), 2,38 (H2, t, *7,1*), 1,89 (MU5b : H2', qt, *7,0*), 1,79 (MU5a : H2', qt, *6,8*), 1,64 (H2", m), 1,61 (H3, m), 1,57 (H3", m), 1,31 (H15, m), 1,30 (H4-14, m), 0,90 (H161, t, *6,9*)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 175,6 (C1), 158,4 (C4'), 158,4 (C5"), 48,5 (MU5a : C1"), 46,0 (MU5b : C1'), 45,8 (MU5b : C1"), 43,8 (MU5a : C1'), 41,9 (C4"), 39,8 (MU5a : C3'), 39,5 (MU5b : C3'), 33,7 (C2), 33,0 (C14), 30,0 – 31,0 (C4-C13), 28,9 (MU5b : C2'), 28,0 (MU5a : C2'), 26,9 (C2"), 26,8 (C3"), 26,4 (C3), 23,5 (C15), 14,2 (C16)

- **Ptilomycaline E (MU6)**



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{47}H_{85}N_{10}O_5^+$

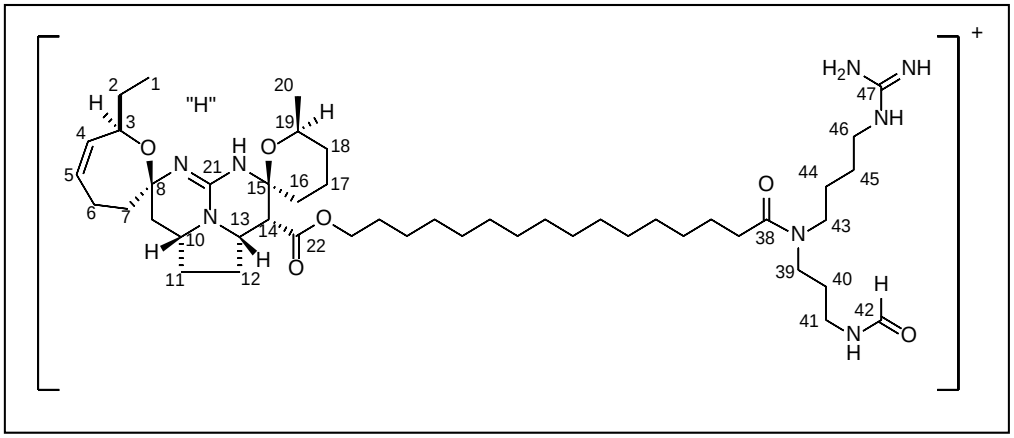
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 869,67041 (calculée pour $C_{47}H_{85}N_{10}O_5^+$: 869,6699)

$[\alpha]_D^{20}$ **:** -3,8 (*c* 6,9 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,72 (H5, br dd, *9,9, 7,8*), 5,52 (H4, br d, *11,0*), 4,45 (H3, br d, *9,4*), 4,36 (H13, dt, *9,2, 5,4*), 4,14 (H23, m), 4,06 (H10, m), 3,87 (H19, m), 3,43 (MU6b : H39, m), 3,42 (MU6a : H39, m), 3,40 (H43, m), 3,23 (MU6b : H41, m), 3,23 (H46, m), 3,18 (MU6a : H41, t, *6,7*), 3,06 (H14, d, *5,1*), 2,65 (H9, dd, *13,0, 4,8*), 2,49 (H7, m), 2,46 (H6, m), 2,40 (H37, m), 2,33 (H12, m), 2,31 (H11, m), 2,17 (H6, m), 2,00 (H7, m), 2,00 (H17, m), 1,90 (MU6b : H40, m), 1,83 (H12, m), 1,82 (MU6a : H40, m), 1,78 (H17, m), 1,72 (H16, m), 1,72 (H18, m), 1,66 (H24, m), 1,66 (H44, m), 1,63 (H36, m), 1,61 (H45, m), 1,61 (H11, m), 1,47 (H2, m), 1,43 (H9, m), 1,29 – 1,31 (H25-H35, m), 1,28 (H18, m), 1,10 (H20, d, *6,2*), 0,87 (H1, t, *7,3*)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 175,7 (C38), 170,1 (C22), 158,7 (C42), 158,7 (C47), 150,4 (C21), 134,4 (C4), 131,2 (C5), 85,1 (C8), 82,1 (C15), 72,2 (C3), 68,3 (C19), 66,5 (C23), 55,4 (C10), 53,9 (C13), 51,2 (C14), 49,0 (MU6a : C43), 46,3 (MU6b : C43), 46,1 (MU6b : C39), 44,2 (MU6a : C39), 42,1 (C46), 40,1 (MU6a : C41), 39,8 (MU6b : C41), 37,9 (C7), 37,8 (C9), 33,9 (C37), 33,0 (C18), 32,8 (C16), 31,5 (C11), 30,0 – 31,0 (C25-C35), 29,6 (C2), 29,2 (MU6b : C40), 28,2 (MU6a : C40), 27,6 (C12), 27,1 (C44), 27,1 (C45), 27,0 (C24), 26,7 (C36), 24,5 (C6), 21,9 (C20), 19,4 (C17), 10,9 (C1)

- **Ptilomycaline F (MU7)**



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{47}H_{84}N_8O_6^{2+}$

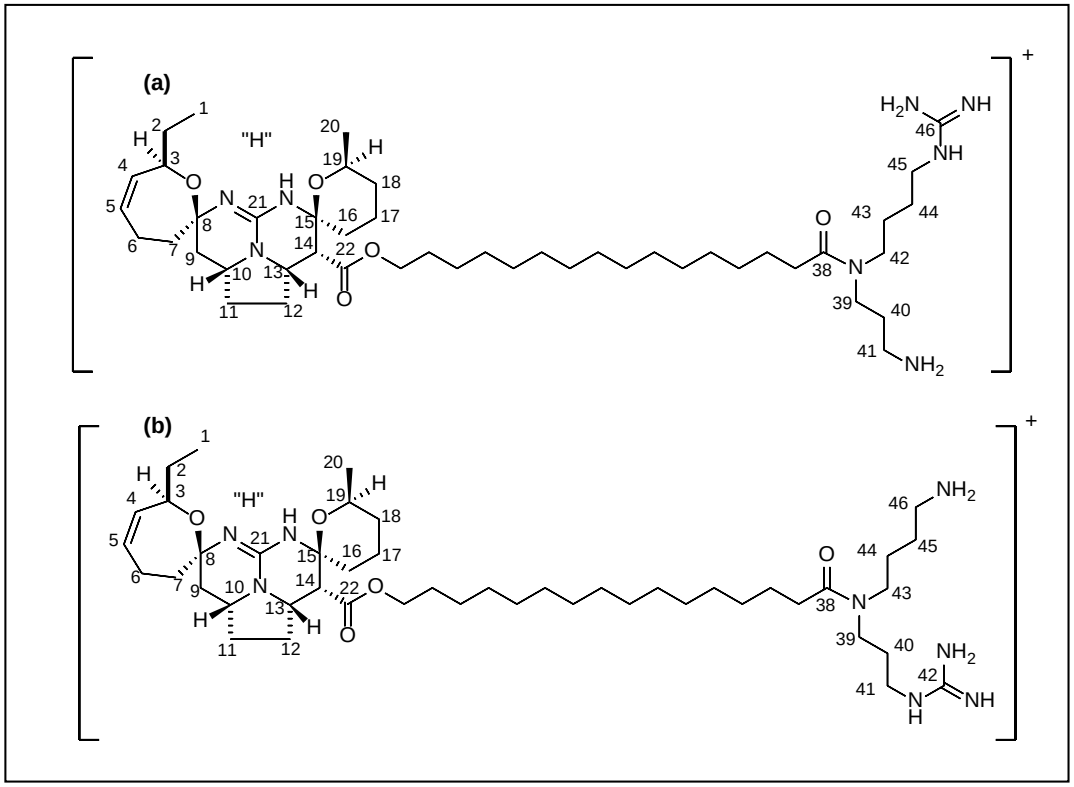
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 428,32483 (calculée pour $C_{47}H_{84}N_8O_6^{2+}$: 428,3255)

$[\alpha]_D^{20}$: -5,0 (*c* 2,2 mg/100 mL MeOH)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,08 (MU7a : H42, s), 7,98 (MU7b : H42, s), 5,72 (H5, m), 5,52 (H4, br d, *11,0*), 4,45 (H3, br d, *9,5*), 4,36 (H13, dt, *9,5, 5,6*), 4,14 (H23, m), 4,07 (H10, m), 3,83 (H19, m), 3,36 (H39, m), 3,36 (H43, m), 3,26 (MU7a : H41, t, *6,8*), 3,21 (MU7b : H41, t, *6,8*), 3,21 (H46, m), 3,08 (H14, d, *5,0*), 2,65 (H9, dd, *12,9, 4,8*), 2,44 (H6, m), 2,37 (H37, m), 2,36 (H7, m), 2,35 (H12, m), 2,31 (H11, m), 2,16 (H6, m), 2,00 (H7, m), 1,82 (H12, m), 1,82 (H17, m), 1,82 (H40, m), 1,77 (H17, m), 1,70 (H16, m), 1,70 (H18, m), 1,66 (H24, m), 1,62 (H45, m), 1,60 (H44, m), 1,61 (H11, m), 1,60 (H36, m), 1,56 (H2, m), 1,47 (H2, m), 1,42 (H9, m), 1,29 – 1,31 (H25-H35, m), 1,29 (H18, m), 1,10 (H20, d, *6,2*), 0,85 (H1, t, *7,3*)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 175,7 (C38), 170,2 (C22), 164,0 (MU7b : C42), 163,9 (MU7a : C42), 158,7 (C47), 150,4 (C21), 134,3 (C4), 131,3 (C5), 85,1 (C8), 82,2 (C15), 72,3 (C3), 68,4 (C19), 66,5 (C23), 55,6 (C10), 54,2 (C13), 50,7 (C14), 46,2 (C43), 46,9 (C39), 42,1 (C46), 38,2 (C7), 37,8 (C9), 36,6 (MU7b : C41), 36,5 (MU7a : C41), 34,0 (C37), 32,9 (C18), 32,9 (C16), 31,4 (C11), 30,0 – 31,0 (C25-C35), 30,3 (C2), 30,0 (C40), 29,6 (C24), 27,5 (C12), 27,1 (C45), 26,8 (C36), 25,8 (C44), 24,5 (C6), 21,8 (C20), 19,4 (C17), 10,8 (C1)

- **Ptilomycaline G (MU8) et ptilomycaline H (MU9)**



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{46}H_{83}N_8O_5^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 827,64819 (calculée pour $C_{46}H_{83}N_8O_5^+$: 827,6481)

- **Ptilomycaline G (MU8) (a)**

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,71 (H5, m), 5,51 (H4, br d, *10,9*), 4,41 (H3, br d, *10,3*), 4,35 (H13, dt, *9,7, 5,3*), 4,14 (H23, m), 4,06 (H10, m), 3,83 (H19, m), 3,46 (MU8b : H39, t, *6,5*), 3,42 (MU8a : H39, m), 3,38 (H42, m), 3,22 (H45, m), 3,07 (H14, d, *5,0*), 2,98 (MU8a : H41, m), 2,88 (MU8b : H41, t, *6,9*), 2,64 (H9, dd, *12,8, 4,7*), 2,42 (H6, m), 2,39 (H37, m), 2,38 (H7, m), 2,32 (H12, m), 2,30 (H11, m), 2,16 (H6, m), 1,98 (H7, m), 1,95 (MU8a : H40, m), 1,90 (MU8b : H40, m), 1,82 (H17, m), 1,81 (H12, m), 1,76 (H17, m), 1,70 (H16, m), 1,70 (H18, m), 1,68 (H43, m), 1,65 (H24, m), 1,60 (H36, m), 1,60 (H44, m), 1,60 (H11, m), 1,55 (H2, m), 1,46 (H2, m), 1,42 (H9, m), 1,29 – 1,31 (H25-H35, m), 1,28 (H18, m), 1,09 (H20, d, *6,1*), 0,85 (H1, t, *7,3*)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 176,3 (C38), 170,0 (C22), 158,5 (C46), 150,3 (C21), 134,1 (C4), 131,1 (C5), 84,9 (C8), 81,9 (C15), 72,1 (C3), 68,2 (C19), 66,4 (C23), 55,4 (C10), 54,0 (C13), 50,7 (C14), 48,5 (C42), 46,1 (MU8a : C39), 43,0 (MU8b : C39), 42,0 (C45), 38,8 (MU8a : C41), 38,0 (C7), 37,9 (MU8b : C41), 37,7 (C9), 33,7 (C37), 32,8 (C18), 32,7 (C16), 31,3 (C11), 30,0 – 31,0 (C25-

C35), 30,1 (C2), 29,4 (C24), 27,9 (MU8a : C40), 27,4 (C12), 26,8 (C44), 26,6 (C43), 26,6 (MU8b : C40), 26,6 (C36), 24,3 (C6), 21,7 (C20), 19,2 (C17), 10,7 (C1)

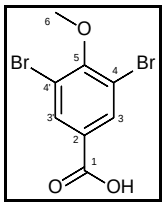
- **Ptilomycaline H (MU9) (b)**

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,71 (H5, m), 5,51 (H4, br d, *10,9*), 4,41 (H3, br d, *10,3*), 4,35 (H13, dt, *9,7, 5,3*), 4,14 (H23, m), 4,06 (H10, m), 3,83 (H19, m), 3,40 (MU9a : H39, m), 3,38 (H43, m), 3,22 (MU9a : H41, m), 3,15 (MU9b : H41, t, *6,8*), 3,07 (H14, d, *5,0*), 2,96 (H46, m), 2,64 (H9, dd, *12,8, 4,7*), 2,42 (H6, m), 2,39 (H37, m), 2,38 (H7, m), 2,32 (H12, m), 2,30 (H11, m), 2,16 (H6, m), 1,98 (H7, m), 1,89 (MU9a : H40, m), 1,82 (H17, m), 1,81 (H12, m), 1,80 (MU9b : H40, m), 1,76 (H17, m), 1,70 (H16, m), 1,70 (H18, m), 1,67 (H44, m), 1,65 (H24, m), 1,63 (H45, m), 1,60 (H36, m), 1,60 (H11, m), 1,55 (H2, m), 1,46 (H2, m), 1,42 (H9, m), 1,29 – 1,31 (H25-H35, m), 1,28 (H18, m), 1,09 (H20, d, *6,1*), 0,85 (H1, t, *7,3*)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 176,3 (C38), 170,0 (C22), 158,5 (C42), 150,3 (C21), 134,1 (C4), 131,1 (C5), 84,9 (C8), 81,9 (C15), 72,1 (C3), 68,2 (C19), 66,4 (C23), 55,4 (C10), 54,0 (C13), 50,7 (C14), 49,1 (MU9a : C39), 48,5 (C43), 43,9 (MU9b : C39), 40,2 (C46), 39,9 (MU9b : C41), 39,6 (MU9a : C41), 38,0 (C7), 37,7 (C9), 33,7 (C37), 32,8 (C18), 32,7 (C16), 31,3 (C11), 30,0 – 31,0 (C25-C35), 30,1 (C2), 29,4 (C24), 29,0 (MU9a : C40), 28,0 (MU9b : C40), 27,4 (C12), 26,7 (C45), 26,6 (C36), 25,7 (C44), 24,3 (C6), 21,7 (C20), 19,2 (C17), 10,7 (C1)

III.2 Métabolites isolés d'*Amphimedon* sp.

- **Acide 3,5-dibromo-4-méthoxybenzoïque (AS1)**



Aspect : huile incolore

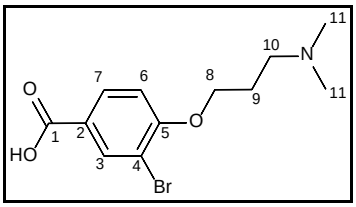
Formule brute : $C_8H_5Br_2O_3^-$

SMHR (ESI$^-$) : *m/z* 306,86111 / 308,85901 / 310,85684 (ratio : 53 / 100 / 48 ; calculée pour $C_8H_5Br_2O_3^-$: 306,8611 / 308,8511 / 310,8564)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,12 (H3, s), 3,87 (H6, s)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 171,0 (C1), 156,6 (C5), 134,7 (C3), 118,0 (C4), 60,8 (C6)

- **Acide amphimédonoïque (AS2)**



Aspect : huile jaune

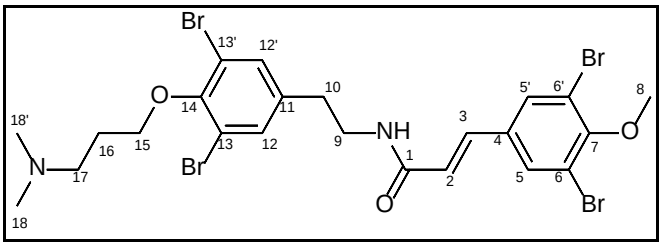
Formule brute : $C_{12}H_{17}BrNO_3^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 302,03882 / 304,03668 (ratio : 100 / 98 ; calculée pour $C_{12}H_{17}BrNO_3^+$ 302,0386 / 304,0366)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,10 (H3, d, *1,9*), 7,83 (H7, dd, *8,6, 2,0*), 6,97 (H6, d, *8,5*), 4,21 (H8, t, *5,7*), 3,21 (H10, t, *7,4*), 2,81 (H11, s), 2,23 (H9, m)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 172,6 (C1), 157,6 (C5), 135,3 (C3), 132,2 (C2), 131,1 (C7), 112,9 (C6), 111,7 (C4), 67,2 (C8), 56,7 (C10), 43,9 (C11), 25,9 (C9)

- **Psammaplysène E (AS3)**



Aspect : huile incolore

Formule brute : $C_{23}H_{27}Br_4N_2O_3^+$

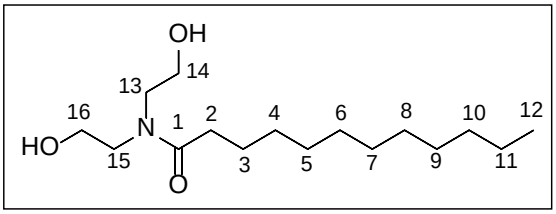
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 694,87579 / 696,87402 / 698,87231 / 700,87024 / 702,86914 (ratio : 16 / 70 / 100 / 68 / 18 ; calculée pour $C_{23}H_{27}Br_4N_2O_3^+$: 694,8755 / 696,8735 / 698,8716 / 700,8699 / 702,8685)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,79 (H5, s), 7,50 (H12, s), 7,37 (H3, d, *15,7*), 6,52 (H2, d, *15,7*), 4,07 (H15, t, *5,8*), 3,88 (H8, s), 3,51 (H9, t, *7,1*), 3,07 (H17, t, *7,3*), 2,82 (H10, t, *7,0*), 2,63 (H18, s), 2,15 (H16, m)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 167,6 (C1), 156,1 (C7), 152,3 (C14), 139,9 (C11), 138,1 (C3), 135,1 (C4), 134,2 (C12), 132,8 (C5), 123,6 (C2), 119,3 (C6), 118,7 (C13), 71,6 (C15), 60,9 (C8), 57,1 (C17), 44,3 (C18), 41,5 (C9), 34,9 (C10), 27,4 (C16)

III.3 Métabolites isolés d'*Aulospongus gardineri*

- ***N,N*-lauroyldiéthanolamine (AG1)**



Aspect : huile jaune

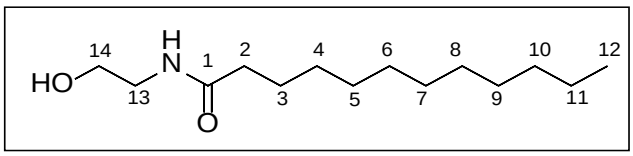
Formule brute : $C_{16}H_{34}NO_3^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 288,25372 (calculée pour $C_{16}H_{34}NO_3^+$: 288,2533)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, J en Hz) : 3,84 (H16, t, 4,8), 3,80 (H14, t, 5,2), 3,57 (H15, t, 4,7), 3,51 (H13, t, 5,1), 2,40 (H2, t, 7,7), 1,62 (H3, qt, 7,4), 1,29 (H11, m), 1,26 – 1,30 (H4-H10, m), 0,88 (H12, t, 6,9)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 176,6 (C1), 62,7 (C16), 61,8 (C14), 53,1 (C13), 51,5 (C15), 34,5 (C2), 30,0 – 31,0 (C4-C10), 26,1 (C3), 23,6 (C11), 15,0 (C12)

- ***N*-lauroyléthanolamine (AG2)**



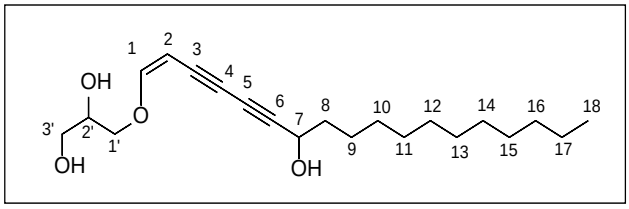
Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{14}H_{30}NO_2^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 244,22725 (calculée pour $C_{14}H_{30}NO_2^+$: 244,2271)

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, J en Hz) 3,75 (H14, t, 4,5), 3,44 (H13, m), 2,22 (H2, t, 7,7), 1,64 (H3, qt, 7,2), 1,26 – 1,30 (H4-H11, m), 0,89 (H12, t, 6,9)

- **(*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (AG3)**



Aspect : huile jaune

Formule brute : $C_{21}H_{35}O_4^+$

SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 351,25290 (calculée pour $C_{21}H_{35}O_4^+$: 351,2530)

UV (λ_{max} en nm) : 221,8 ; 260,8 ; 274,8 ; 290,8

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, J en Hz) 6,60 (H1, d, 6,4), 4,50 (H2, d, 6,4), 4,37 (H7, m), 4,02 (H1', dd, 11,1, 4,4), 3,93 (H1', dd, 10,9, 6,1), 3,84 (H2', m), 3,59 (H3', m), 1,20 – 1,45 (H8-H17, m), 0,91 (H18, t, 6,9)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD), δ ppm : 160,3 (C1), 84,3 (C2), 77,7 (C6), 75,6 (C1'), 75,5 (C4), 71,8 (C2'), 70,8 (C3), 67,3 (C7), 66,4 (C5), 63,4 (C3'), 23,0 – 30,0 (C8-C17), 14,2 (C18)

Références bibliographiques

- **Publications, ouvrages et chapitres d'ouvrages**

Adamo, C.; Barone, V. Exchange functionals with improved long-range behavior and adiabatic connection methods without adjustable parameters: The mPW and mPW1PW models. *The Journal of Chemical Physics* **1998**, *108* (2), 664–675.

Adesanya, S. A.; Chbani, M.; Païs, M.; Debitus, C. Brominated β-carbolines from the marine tunicate *Eudistoma album*. *Journal of Natural Products* **1992**, *55* (4), 525–527.

Agrawal, M. S.; Bowden, B. F. Marine sponge *Dysidea herbacea* revisited: another brominated diphenyl ether. *Marine Drugs* **2005**, *3* (1), 9–14.

Albrizio, S.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pawlik, J. R. Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *Journal of Natural Products* **1995**, *58* (5), 647–652.

Alecu, I. M.; Zheng, J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Computational thermochemistry: scale factor databases and scale factors for vibrational frequencies obtained from electronic model chemistries. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2010**, *6* (9), 2872–2887.

Allard, P.-M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry* **2016**, *88* (6), 3317–3323.

Andernach, L.; Sandjo, L. P.; Liermann, J. C.; Schlämann, R.; Richter, C.; Ferner, J.-P.; Schwalbe, H.; Schüffler, A.; Thines, E.; Opatz, T. Terphenyl derivatives from *Allantophomopsis lycopodina*. *Journal of Natural Products* **2016**.

Aron, Z. D.; Overman, L. E. The tethered Biginelli condensation in natural product synthesis. *Chemical Communications* **2004**, No. 3, 253–265.

Aron, Z. D.; Pietraszkiewicz, H.; Overman, L. E.; Valeriote, F.; Cuevas, C. Synthesis and anticancer activity of side chain analogs of the crambescidin alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14* (13), 3445–3449.

Atkins, P.; Friedman, R. *Molecular Quantum Mechanics*, 4. ed., reprint. (with).; Oxford Univ. Press: Oxford, **2008**.

Azzollini, A.; Favre-Godal, Q.; Zhang, J.; Marcourt, L.; Ebrahimi, S.; Wang, S.; Fan, P.; Lou, H.; Guillarme, D.; Queiroz, E.; Wolfender, J.-L. Preparative scale MS-guided isolation of bioactive compounds using high-resolution flash chromatography: antifungals from *Chiloscyphus polyanthos* as a case study. *Planta Medica* **2016**, *82* (11/12), 1051–1057.

Baker, B. J.; Scheuer, P. J.; Shoolery, J. N. Papuamine, an antifungal pentacyclic alkaloid from a marine sponge, *Haliclona* sp. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110* (3), 965–966.

Barrow, R. A.; Murray, L. M.; Lim, T. K.; Capon, R. J. Mirabilins (A-F): new alkaloids from a southern Australian marine sponge, *Arenochalina mirabilis*. *Australian journal of chemistry* **1996**, *49* (7), 767-773.

Basco, L.; Gillotin, C.; Gimenez, F.; Farinotti, R.; Le Bras, J. *In Vitro* activity of the enantiomers of mefloquine, halofantrine and enpiroline against *Plasmodium falciparum*. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1992**, *33* (5), 517–520.

Benharref, A.; Païs, M.; Debitus, C. Bromotyrosine alkaloids from the sponge *Pseudoceratina verrucosa*. *Journal of Natural Products* **1996**, *59* (2), 177–180.

Bensemhoun, J.; Bombarda, I.; Aknin, M.; Vacelet, J.; Gaydou, E. M. Ptilomycalin D, a polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (12), 2033–2035.

Benzie, I. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical biochemistry* **1996**, *239* (1), 70–76.

Berlinck, R. G. S.; Ogawa, C. A.; Almeida, A. M. P.; Sanchez, M. A. A.; Malpezzi, E. L. A.; Costa, L. V.; Hajdu, E.; de Freitas, J. C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the Southeastern Brazilian coast. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1996**, *115* (2), 155–163.

Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody R. W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2. ed.; Wiley-VCH, 2000.

Bowden, B. F.; Towerzey, L.; Junk, P. C. A new brominated diphenyl ether from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Australian Journal of Chemistry* **2000**, *53* (4), 299–301.

Braekman, J. C.; Daloze, D.; Tavares, R.; Hajdu, E.; Van Soest, R. W. M. Novel polycyclic guanidine alkaloids from two marine sponges of the genus *Monanchora*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63* (2), 193–196.

Bringmann, G.; Bruhn, T.; Maksimenka, K.; Hemberger, Y. The assignment of absolute stereostructures through quantum chemical circular dichroism calculations. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009* (17), 2717–2727.

Brittain, H. G. Applications of chiroptical spectroscopy for the characterization of pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1998**, *17* (6–7), 933–940.

Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. Psammaplysenes C and D, cytotoxic alkaloids from *Psammoclemma* sp. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (11), 1827–1829.

Calcul, L.; Chow, R.; Oliver, A. G.; Tenney, K.; White, K. N.; Wood, A. W.; Fiorilla, C.; Crews, P. NMR strategy for unraveling structures of bioactive sponge-derived oxy-polyhalogenated diphenyl ethers. *Journal of Natural Products* **2009**, *72* (3), 443–449.

Cameron, G. M.; Stapleton, B. L.; Simonsen, S. M.; Brecknell, D. J.; Garson, M. J. New sesquiterpene and brominated metabolites from the Tropical marine ponge *Dysidea* sp. *Tetrahedron* **2000**, *56* (29), 5247–5252.

Carté, B.; Faulkner, D. J. Polybrominated diphenyl ethers from *Dysidea herbacea, Dysidea chlorea* and *Phyllospongia foliascens*. *Tetrahedron* **1981**, *37* (13), 2335–2339.

Carter, H. J. XLVII.—New genus of sponges. *Journal of Natural History* **1883**, *11* (65), 369–370.

Chang, L. C.; Whittaker, N. F.; Bewley, C. A. Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. that inhibit HIV-1 fusion. *Journal of Natural Products* **2003**, *66* (11), 1490–1494.

Chehade, C. C.; Dias, R. L. A.; Berlinck, R. G. S.; Ferreira, A. G.; Costa, L. V.; Rangel, M.; Malpezzi, E. L. A.; de Freitas, J. C.; Hajdu, E. 1,3-Dimethylisoguanine, a new purine from the marine sponge *Amphimedon viridis*. *Journal of Natural Products* **1997**, *60* (7), 729–731.

Coffey, D. S.; McDonald, A. I.; Overman, L. E.; Stappenbeck, F. Enantioselective total synthesis of 13,14,15-isocrambescidin 800. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (29), 6944–6945.

Coffey, D. S.; McDonald, A. I.; Overman, L. E.; Rabinowitz, M. H.; Renhowe, P. A. A practical entry to the crambescidin family of guanidine alkaloids. Enantioselective total syntheses of ptilomycalin A, crambescidin 657 and its methyl ester (neofolitispates 2), and crambescidin 800. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (20), 4893–4903.

Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2. ed.; Wiley: Chichester, 2014.

Croft, A. M. J.; World, M. J. Neuropsychiatric reactions with mefloquine chemoprophylaxis. *The Lancet* **1996**, *347* (8997), 326.

Daly, J. W.; Malkin, B.; Myers, C. W. A dangerously toxic new frog (*Phyllobates*) used by Emberá Indians of Western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *Bulletin of the AMNH* ; v. 161, Article 2. **1978**.

Dassonville-Klimpt, A.; Cézard, C.; Mullié, C.; Agnamey, P.; Jonet, A.; Da Nascimento, S.; Marchivie, M.; Guillon, J.; Sonnet, P. Absolute configuration and antimalarial activity of erythro-mefloquine enantiomers. *ChemPlusChem* **2013**, *78* (7), 642–646.

Dendy, A. No. 1—report on the sigmatotetraxonida collected by H.M.S. "Sealark" in the Indian Ocean. *The Transactions of The Linnean Society of London Zoology* **1922,** *18*, 1–164.

Desqueyroux-Faúndez, R.; Valentine, C. Family Niphatidae Van Soest, 1980. *Systema Porifera*; Springer, **2002**, 874–889.

Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyo, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S. S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N. P. J.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361* (5), 455–467.

Dondorp, A. M.; Yeung, S.; White, L.; Nguon, C.; Day, N. P. J.; Socheat, D.; von Seidlein, L. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Reviews Microbiology* **2010**.

Drake, A. F. Polarisation modulation - the measurement of linear and circular dichroism. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1986**, *19* (3), 170.

Duchassaing de Fonbressin, P.; Michelotti, G. Spongiaires de La Mer Caraïbe; *Natuurkundige Verhandelingen van de Hollandsche Maatschappij der Wetenschappen te Haarlem* **1864**, Vol. 2.

El-Demerdash, A.; Moriou, C.; Martin, M.-T.; Rodrigues-Stien, A. de S.; Petek, S.; Demoy-Schneider, M.; Hall, K.; Hooper, J. N. A.; Debitus, C.; Al-Mourabit, A. Cytotoxic guanidine alkaloids from a French Polynesian *Monanchora* n. sp. sponge. *Journal of Natural Products* **2016**, *79* (8), 1929–1937.

El-Naggar, M.; Conte, M.; Capon, R. J. Mirabilins revisited: polyketide alkaloids from a Southern Australian marine sponge, *Clathria* sp. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *8* (2), 407–412.

Escrig, V.; Ubeda, A.; Ferrandiz, M. L.; Darias, J.; Sanchez, J. M.; Alcaraz, M. J.; Paya, M. Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A2 with anti-

inflammatory activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, *282* (1), 123–131.

Fahy, E.; Molinski, T. F.; Harper, M. K.; Sullivan, B. W.; Faulkner, D. J.; Parkanyi, L.; Clardy, J. Haliclonadiamine, an antimicrobial alkaloid from the aponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29* (28), 3427–3428.

Ferreira, E. G.; Wilke, D. V.; Jimenez, P. C.; de Oliveira, J. R.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Viana, F. A.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Hajdu, E.; Costa-Lotufo, L. V. Guanidine alkaloids from *Monanchora arbuscula*: chemistry and antitumor potential. *Chemistry & Biodiversity* **2011**, *8* (8), 1433–1445.

Fu, X.; Schmitz, F. J.; Govindan, M.; Abbas, S. A.; Hanson, K. M.; Horton, P. A.; Crews, P.; Laney, M.; Schatzman, R. C. Enzyme inhibitors: new and known polybrominated phenols and diphenyl ethers from four Indo-Pacific *Dysidea* sponges. *Journal of natural products* **1995**, *58* (9), 1384–1391.

Gallimore, W. A.; Kelly, M.; Scheuer, P. J. Alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *Journal of Natural Products* **2005**, *68* (9), 1420–1423.

Gaudêncio, S. P.; Pereira, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Natural Product Reports* **2015**, *32* (6), 779–810.

Gauvin-Bialecki, A.; Aknin, M.; Kashman, Y.; Gros, E.; Al-Mourabit, A.; Campos, P. E.; Remanevy, M. E.; Illien, B. Bioactive molecules of marine invertebrates from South-West Indian Ocean: status and perspectives. In *Crystallizing Ideas – The Role of Chemistry*; Ramasami, P., Gupta Bhowon, M., Jhaumeer Laulloo, S., Li Kam Wah, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 23–45.

Gibson, D. M. Belladonna, a study. *British Homoeopathic journal* **1964**, *53* (2), 113–119.

Gray, J. S. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* **1997**, *6* (1), 153–175.

Grimblat, N.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (24), 12526–12534.

Gros, E.; Al-Mourabit, A.; Martin, M.-T.; Sorres, J.; Vacelet, J.; Frederich, M.; Aknin, M.; Kashman, Y.; Gauvin-Bialecki, A. Netamines H–N, tricyclic alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei* and their antimalarial activity. *Journal of Natural Products* **2014**, *77* (4), 818–823.

Gros, E.; Martin, M.-T.; Sorres, J.; Moriou, C.; Vacelet, J.; Frederich, M.; Aknin, M.; Kashman, Y.; Gauvin-Bialecki, A.; Al-Mourabit, A. Netamines O–S, five new tricyclic guanidine alkaloids from the Madagascar sponge *Biemna laboutei*, and their antimalarial activities. *Chemistry & Biodiversity* **2015**, *12* (11), 1725–1733.

Groszek, G.; Kantoci, D.; Pettit, G. R. The isolation and structure elucidation of debromoaxinohydantoin. *Liebig's Annalen der Chemie* **1995**, *1995* (4), 715–716.

Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. (+)-Raspailyne-A, a novel, acid-sensitive acetylenic enol ether glyceride from the marine sponge *Raspailia pumila*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1986**, No. 1, 77–78.

Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. Raspailynes, novel long-chain acetylenic enol ethers of glycerol from the marine sponges Raspailia pumila and Raspailia ramosa. *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70* (4), 1050–1062.

Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. Oxidative breaking of long-chain acetylenic enol ethers of glycerol of the marine sponges Raspailia pumila and of model compounds with aerial oxygen. *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70* (5), 1400–1411.

Guzii, A. G.; Makarieva, T. N.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Kuzmich, A. S.; Dyshlovoy, S. A.; Krasokhin, V. B.; Stonik, V. A. Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra*. *Organic Letters* **2010**, *12* (19), 4292–4295.

Guzii, A. G.; Makarieva, T. N.; Korolkova, Y. V.; Andreev, Y. A.; Mosharova, I. V.; Tabakmaher, K. M.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Ogurtsova, E. K.; Antonov, A. S.; Lee, H.-S.; Grishin, E. V. Pulchranin A, isolated from the Far-Eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: the first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (10), 1247–1250.

Handayani, D.; Edrada, R. A.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L.; Van Soest, R. W. M.; Kunzmann, A.; Soedarsono. Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonesia. *Journal of Natural Products* **1997**, *60* (12), 1313–1316.

Hanif, N.; Tanaka, J.; Setiawan, A.; Trianto, A.; de Voogd, N. J.; Murni, A.; Tanaka, C.; Higa, T. Polybrominated diphenyl ethers from the Indonesian sponge *Lamellodysidea herbacea*. *Journal of Natural Products* **2007**, *70* (3), 432–435.

Helmy, T.; Van Soest, R.W.M. *Amphimedon* species (Porifera: Niphatidae) from the Gulf of Aqaba, Northern Red Sea: filling the gaps in the distribution of a common pantropical genus. *Zootaxa* **2005**, *859*, 1–18.

Hirano, K.; Kubota, T.; Tsuda, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. 'ichi. Pyrinodemins B-D, potent cytotoxic bis-pyridine alkaloids from marine sponge *Amphimedon* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2000**, *48* (7), 974–977.

Hooper, J.; Lehnert, H.; Zea, S. Revison of *Aulospongus* and other Raspailiidae with rhabdostyles (Porifera: Demospongiae). *Memoirs of the Queensland Museum* **1999**, *43* (2), 649–707.

Hooper, J. N.; Van Soest, R. W. A new species of *Amphimedon* (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida, Niphatidae) from the Capricorn-Bunker group of islands, Great Barrier Reef, Australia: target species for the "sponge genome project." *Zootaxa* **2006**, *1314*, 31–39.

Hua, H. M.; Peng, J.; Fronczek, F. R.; Kelly, M.; Hamann, M. T. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (24), 6461–6464.

Hua, H. M.; Peng, J.; Dunbar, D. C.; Schinazi, R. F.; de Castro Andrews, A. G.; Cuevas, C.; Garcia-Fernandez, L. F.; Kelly, M.; Hamann, M. T. Batzelladine alkaloids from the Caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens. *Tetrahedron* **2007**, *63* (45), 11179–11188.

Iguchi, K.; Kitade, M.; Kashiwagi, T.; Yamada, Y. Structure and synthesis of petrosynes, new acetylenic enol ether glycerides from the Okinawan marine sponge of the genus *Petrosia*. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58* (21), 5690–5698.

Ishibashi, M.; Kurosaki, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. 'ichi. The stereochemistry of variabilin, an antimicrobial sesterterpene isolated from marine sponges. *Natural Product Letters* **1993**, *3* (3), 189–192.

Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C. Assessment of the ωB97 family for excited-state calculations. *Theoretical Chemistry Accounts* **2011**, *128* (1), 127–136.

Jansen, O.; Tits, M.; Angenot, L.; Nicolas, J.-P.; De Mol, P.; Nikiema, J.-B.; Frédérich, M. Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound. *Malaria journal* **2012**, *11*, 289.

Jares-Erijman, E. A.; Sakai, R.; Rinehart, K. L. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56* (19), 5712–5715.

Jeong, S.-J.; Inagaki, M.; Higuchi, R.; Miyamoto, T.; Ono, M.; Kuwano, M.; Soest, R. W. M. V. 1,3-dimethylisoguaninium, an antiangiogenic purine analog from the sponge *Amphimedon paraviridis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2003**, *51* (6), 731–733.

Karle, J. M.; Olmeda, R.; Gerena, L.; Milhous, W. K. *Plasmodium falciparum*: role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol antimalarial agents. *Experimental Parasitology* **1993**, *76* (4), 345–351.

Kind, T.; Fiehn, O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **2007**, *8*, 105.

Kobayashi, J.; Harbour, G. C.; Gilmore, J.; Rinehart, K. L. Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, and Q, bromo, hydroxy, pyrrolyl and 1-pyrrolinyl-*β*-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106* (5), 1526–1528.

Kobayashi, J. 'ichi; Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Matsumoto, K.; Adachi, T. Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp. : a plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (25), 4383–4386.

Kobayashi, J. 'ichi; Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Sasaki, T.; Mikami, Y. 6-hydroxymanzamine A and 3, 4-dihydromanzamine A, new alkaloids from the Okinawan marine sponge *Amphimedon* sp. *Journal of natural products* **1994**, *57* (12), 1737–1740.

Kobayashi, J. 'ichi; Watanabe, D.; Kawasaki, N.; Tsuda, M. Nakadomarin A, a novel hexacyclic manzamine-related alkaloid from *Amphimedon* sponge. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (26), 9236–9239.

Kobayashi, J. 'ichi; Tsuda, M.; Watanabe, D. A new manzamine congener from marine sponge *Amphimedon* sp. *Heterocycles* **1999**, *50* (1), 485.

Kobayashi, N.; Muranaka, A.; Mack, J. Chapter 7. Analysis of Chiral Systems by Theoretical Calculations. In *Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy for Organic Chemists*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011; 130–141.

Kubota, T.; Nishi, T.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Nakinadine A, a novel bis-pyridine alkaloid with a β-amino acid moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (29), 4983–4985.

Kubota, T.; Kura, K. 'ichi; Fromont, J.; Kobayashi, J. 'ichi. Pyrinodemins G–I, new bis-3-alkylpyridine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* **2013**, *69* (1), 96–100.

Kubota, T.; Kamijyo, Y.; Takahashi-Nakaguchi, A.; Fromont, J.; Gonoi, T.; Kobayashi, J. Zamamiphidin A, a new manzamine related alkaloid from an Okinawan marine sponge *Amphimedon* sp. *Organic Letters* **2013**, *15* (3), 610–612.

Kura, K.; Kubota, T.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Pyrinodemins E and F, new 3-alkylpyridine alkaloids from sponge *Amphimedon* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (1), 267–270.

Laville, R.; Thomas, O. P.; Berrué, F.; Marquez, D.; Vacelet, J.; Amade, P. Bioactive guanidine alkaloids from two Caribbean marine sponges. *Journal of Natural Products* **2009**, *72* (9), 1589–1594.

Li, Q.-M.; Ren, J.; Zhou, B.-D.; Bai, B.; Liu, X.-C.; Wen, M.-L.; Zhu, H.-J. Determining the absolute configuration of benzopyrenomycin by optical rotation, electronic circular dichroism, and population analysis of different conformations via DFT methods and experiments. *Tetrahedron* **2013**, *69* (14), 3067–3074.

Li, L.; Li, C.; Si, Y.-K.; Yin, D.-L. Absolute configuration of buagafuran: an experimental and theoretical Electronic Circular Dichroism study. *Chinese Chemical Letters* **2013**, *24* (6), 500–502.

Liu, H.; Namikoshi, M.; Meguro, S.; Nagai, H.; Kobayashi, H.; Yao, X. Isolation and characterization of polybrominated diphenyl ethers as inhibitors of microtubule assembly from the marine sponge *Phyllospongia dendyi* collected at Palau. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (3), 472–474.

Makarieva, T. N.; Tabakmaher, K. M.; Guzii, A. G.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Shubina, L. K.; Kuzmich, A. S.; Lee, H.-S.; Stonik, V. A. Monanchocidins B–E: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora Pulchra*. *Journal of Natural Products* **2011**, *74* (9), 1952–1958.

Makarieva, T. N.; Tabakmaher, K. M.; Guzii, A. G.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Kuzmich, A. S.; Lee, H.-S.; Stonik, V. A. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora Pulchra*. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (32), 4228–4231.

Makarieva, T. N.; Ogurtsova, E. K.; Korolkova, Y. V.; Andreev, Y. A.; Mosharova, I. V.; Tabakmakher, K. M.; Guzii, A. G.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Lee, H.-S.; Grishinb, E. V.; Stonik, V. A. Pulchranins B and C, new acyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. *Natural product communications* **2013**, *8* (9), 1229–1232.

Makarieva, T. N.; Ogurtsova, E. K.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Tabakmakher, K. M.; Guzii, A. G.; Pislyagin, E. A.; Es'kov, A. A.; Kozhemyako, V. B.; Aminin, D. L.; Wang, Y.-M.; Stonik, V. A. Urupocidin A: a new, inducing iNOS expression bicyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora Pulchra*. *Organic Letters* **2014**, *16* (16), 4292–4295.

Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (18), 6378–6396.

Matsunaga, S.; Miyata, Y.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Tetradehydrohalicyclamine A and 22-hydroxyhalicyclamine A, new cytotoxic bis-piperidine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (10), 1758–1760.

Meragelman, K. M.; McKee, T. C.; McMahon, J. B. Monanchorin, a bicyclic alkaloid from the sponge *Monanchora Ungiculata*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (7), 1165–1167.

Mitchell, S. S.; Whitehill, A. B.; Trapido-Rosenthal, H. G.; Ireland, C. M. Isolation and characterization of 1,3-dimethylisoguanine from the Bermudian sponge *Amphimedon Viridis*. *Journal of Natural Products* **1997**, *60* (7), 727–728.

Monde, K.; Taniguchi, T.; Miura, N.; Nishimura, S.-I.; Harada, N.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A. Preparation of cruciferous phytoalexin related metabolites, (−)-dioxibrassinin and (−)-3-cyanomethyl-3-hydroxyoxindole, and determination of their absolute configurations by vibrational circular dichroism (VCD). *Tetrahedron Letters* **2003**, *44* (32), 6017–6020.

Mondol, M. A. M.; Shin, H. J. Antibacterial and antiyeast compounds from marine-derived bacteria. *Marine Drugs* **2014**, *12* (5), 2913–2921.

Nagasawa, K.; Georgieva, A.; Koshino, H.; Nakata, T.; Kita, T.; Hashimoto, Y. Total synthesis of crambescidin 359. *Organic Letters* **2002**, *4* (2), 177–180.

Nicholas, G. M.; Newton, G. L.; Fahey, R. C.; Bewley, C. A. Novel bromotyrosine alkaloids: inhibitors of mycothiol S-conjugate amidase. *Organic letters* **2001**, *3* (10), 1543–1545.

Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A. chasing molecules that were never there: misassigned natural products and the role of chemical synthesis in modern structure elucidation. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (7), 1012–1044.

Nielsen, K. F.; Larsen, T. O. The importance of mass spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 71.

Nishi, T.; Kubota, T.; Fromont, J.; Sasaki, T.; Kobayashi, J. Nakinadines B–F: new pyridine alkaloids with a β-amino acid moiety from sponge *Amphimedon* Sp. *Tetrahedron* **2008**, *64* (14), 3127–3132.

Norman, A. M. On the genus *Haliphysema*. *Annals and Magazine of Natural History* **1878,** *1* (5).

Norton, R. S.; Croft, K. D.; Wells, R. J. Polybrominated oxydiphenol derivatives from the sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron* **1981**, *37* (13), 2341–2349.

Nothias-Scaglia, L.-F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. Antiviral activity of diterpene esters on chikungunya virus and HIV replication. *Journal of Natural Products* **2015**, *78* (6), 1277–1283.

Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kakisawa, H.; Kashman, Y.; Hirsh, S. Structure and chemical properties of ptilomycalin A. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (22), 8472–8479.

Ovenden, S. P. B.; Capon, R. J.; Lacey, E.; Gill, J. H.; Friedel, T.; Wadsworth, D. Amphilactams A–D: novel nematocides from Southern Australian marine sponges of the genus *Amphimedon*. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (4), 1140–1144.

Overman, L. E.; Rhee, Y. H. Total synthesis of (−)-crambidine and definition of the relative configuration of its unique tetracyclic guanidinium core. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (44), 15652–15658.

Palagiano, E.; De Marino, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Zollo, F.; Iorizzi, M.; Carré, J. B.; Debitus, C.; Lucarain, L.; Provost, J. Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani*. *Tetrahedron* **1995**, *51* (12), 3675–3682.

Patil, A. D.; Kumar, N. V.; Kokke, W. C.; Bean, M. F.; Freyer, A. J.; Brosse, C. D.; Mai, S.; Truneh, A.; Carte, B. Novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: inhibitors of HIV gp120-human CD4 binding. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60* (5), 1182–1188.

Perry, N. B.; Becker, E. G.; Blunt, J. W.; Lake, R. J.; Munro, M. H. G. Diyne enol ethers of glycerol from a New Zealand sponge, *Petrosia hebes*. *Journal of Natural Products* **1990**, *53* (3), 732–734.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26* (9–10), 1231–1237.

Rho, J.-R.; Hwang, B. S.; Sim, C. J.; Joung, S.; Lee, H.-Y.; Kim, H.-J. Phorbaketals A, B, and C, sesterterpenoids with a spiroketal of hydrobenzopyran moiety isolated from the marine sponge *Phorbas* sp. *Organic Letters* **2009**, *11* (24), 5590–5593.

Roberts, C. M.; McClean, C. J.; Veron, J. E. N.; Hawkins, J. P.; Allen, G. R.; McAllister, D. E.; Mittermeier, C. G.; Schueler, F. W.; Spalding, M.; Wells, F.; Vynne, C.; Werner, T. B. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science* **2002**, *295* (5558), 1280–1284.

Sakurada, T.; Gill, M. B.; Frausto, S.; Copits, B.; Noguchi, K.; Shimamoto, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R. Novel *N*-methylated 8-oxoisoguanines from Pacific sponges with diverse neuroactivities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (16), 6089–6099.

Salvá, J.; Faulkner, D. J. A new brominated diphenyl ether from a Philippine *Dysidea* species. *Journal of Natural Products* **1990**, *53* (3), 757–760.

Santalova, E. A.; Makarieva, T. N.; Ponomarenko, L. P.; Denisenko, V. A.; Krasokhin, V. B.; Mollo, E.; Cimino, G.; Stonik, V. A. Sterols and related metabolites from five species of sponges. *Biochemical Systematics and Ecology* **2007**, *35* (7), 439–446.

Santos, M. F. C.; Harper, P. M.; Williams, D. E.; Mesquita, J. T.; Pinto, É. G.; da Costa-Silva, T. A.; Hajdu, E.; Ferreira, A. G.; Santos, R. A.; Murphy, P. J.; Andersen, R. J.; Tempone, A. G.; Berlinck, R. G. S. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. *Journal of Natural Products* **2015**, *78* (5), 1101–1112.

Schmitz, F. J.; Agarwal, S. K.; Gunasekera, S. P. Amphimedine, new aromatic alkaloid from a Pacific sponge, *Amphimedon* sp. carbon connectivity determination from natural abundance ^{13}C-^{13}C coupling constants. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (14), 4835–4836.

Schupp, P.; Poehner, T.; Edrada, R.; Ebel, R.; Berg, A.; Wray, V.; Proksch, P. Eudistomins W and X, two new β-carbolines from the Micronesian tunicate *Eudistoma* sp. *Journal of Natural Products* **2003**, *66* (2), 272–275.

Schroeder, F. C.; Kau, T. R.; Silver, P. A.; Clardy, J. The psammaplysenes, specific inhibitors of FOXO1a nuclear export. *Journal of Natural Products* **2005**, *68* (4), 574–576.

Seo, Y.; Cho, K. W.; Lee, H.-S.; Rho, J.-R.; Shin, J. New acetylenic enol ethers of glycerol from the sponge *Petrosia* sp. *Journal of Natural Products* **1999**, *62* (1), 122–126.

Sharma, G. M.; Vig, B. Studies on the antimicrobial substances of sponges. VI. Structures of two antibacterial substances isolated from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (17), 1715–1718.

Shepard, R.D.; Fletcher A. Use of (+)-mefloquine for the treatment of malaria. **1998**, Int Patent Appl WO, 9839003.

Smith, S. G.; Goodman, J. M. Assigning the stereochemistry of pairs of diastereoisomers using GIAO NMR shift calculation. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (12), 4597–4607.

Smith, S. G.; Goodman, J. M. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (37), 12946–12959.

Solecki, R. S. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in Northern Iraq. *Science* **1975**, *190*, 880–881.

Sorek, H.; Rudi, A.; Gueta, S.; Reyes, F.; Martin, M. J.; Aknin, M.; Gaydou, E.; Vacelet, J.; Kashman, Y. Netamines A–G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*. *Tetrahedron* **2006**, *62* (37), 8838–8843.

Sreerama, N.; Woody, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra; *Methods in Enzymology*; Academic Press, 2004; Vol. 383, pp 318–351.

Stephens, P. J.; Harada, N. ECD cotton effect approximated by the gaussian curve and other methods. *Chirality* **2009**, *22*, 229-233.

Suyama, T. L.; Gerwick, W. H.; McPhail, K. L. Survey of marine natural product structure revisions: a synergy of spectroscopy and chemical synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (22), 6675–6701.

Tabakmakher, K. M.; Denisenko, V. A.; Guzii, A. G.; Dmitrenok, P. S.; Dyshlovoy, S. A.; Lee, H.-S.; Makarieva, T. N. Monanchomycalin C, a new pentacyclic guanidine alkaloid from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. *Natural Product Communications* **2013**, *8* (10), 1399–1402.

Tabakmakher, K.M.; Makarieva, T.N.; Denisenko, V.A.; Guzii, A.G.; Dmitrenok, P.S.; Kuzmich, A.S.; Stonik, V.A. Normonanchocidins A, B and D, new pentacyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. *Natural Product Communications* **2015,** *10* (6), 913-916.

Takahashi, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Zamamidines A and B, new manzamine alkaloids from the sponge *Amphimedon* species. *Organic Letters* **2009**, *11* (1), 21–24.

Takekawa, Y.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Amphimedosides, 3-alkylpyridine glycosides from a marine sponge *Amphimedon* sp. *Journal of Natural Products* **2006**, *69* (10), 1503–1505.

Takishima, S.; Ishiyama, A.; Iwatsuki, M.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Õmura, S.; Kobayashi, H.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. Merobatzelladines A and B, anti-infective tricyclic guanidines from a marine sponge *Monanchora* sp. *Organic Letters* **2009**, *11* (12), 2655–2658.

Tavares, R.; Daloze, D.; Braekman, J. C.; Hajdu, E.; Van Soest, R. W. M. 8b-hydroxyptilocaulin, a new guanidine alkaloid from the sponge *Monanchora arbuscula*. *Journal of natural products* **1995**, *58* (7), 1139–1142.

Thacker, R. W.; Starnes, S. Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. *Marine Biology* **2003**, *142* (4), 643–648.

Tian, L.-W.; Feng, Y.; Shimizu, Y.; Pfeifer, T.; Wellington, C.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. Aplysinellamides A–C, bromotyrosine-derived metabolites from an Australian Aplysinella sp. marine sponge. *Journal of Natural Products* **2014**, *77* (5), 1210–1214.

Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Kobayashi, J. 'ichi. Ircinols A and B, first antipodes of manzamine-related alkaloids from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron* **1994**, *50* (27), 7957–7960.

Tsuda, M.; Kawasaki, N.; Kobayashi, J. 'ichi. Keramaphidin C and keramamine C plausible biogenetic precursors of manzamine C from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (25), 4387–4388.

Tsuda, M.; Inaba, K.; Kawasaki, N.; Honma, K.; Kobayashi, J. 'ichi. Chiral resolution of (±)-keramaphidin B and Isolation of Manzamine L, a new β-carboline alkaloid from a sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* **1996**, *52* (7), 2319–2324.

Tsuda, M.; Watanabe, D.; Kobayashi, J. 'ichi. Ma'eganedin A, a new manzamine alkaloid from *Amphimedon* sponge. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (10), 1207–1210.

Tsuda, M.; Hirano, K.; Kubota, T.; Kobayashi, J. 'ichi. Pyrinodemin A, a cytotoxic pyridine alkaloid with an isoxazolidine moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (26), 4819–4820.

Tsukamoto, S.; Takahashi, M.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M. Hachijodines A–G: seven new cytotoxic 3-alkylpyridine alkaloids from two marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Amphimedon*. *Journal of Natural Products* **2000**, *63* (5), 682–684.

Unson, M. D.; Faulkner, D. J. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* **1993**, *49* (4), 349–353.

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. *Marine Biology* **1994**, *119* (1), 1–11.

Utkina, N. K.; Denisenko, V. A.; Scholokova, O. V.; Virovaya, M. V.; Gerasimenko, A. V.; Popov, D. Y.; Krasokhin, V. B.; Popov, A. M. Spongiadioxins A and B, two new polybrominated dibenzo-P-dioxins from an Australian marine sponge *Dysidea dendyi*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64* (2), 151–153.

Utkina, N. K.; Denisenko, V. A.; Virovaya, M. V.; Scholokova, O. V.; Prokof'eva, N. G. Two new minor polybrominated dibenzo-P-dioxins from the marine sponge Dysidea dendyi. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (8), 1213–1215.

Utkina, N. K.; Denisenko, V. A. New polybrominated diphenyl ether from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Chemistry of Natural Compounds* **2006**, *42* (5), 606–607.

Vacelet, J.; Vasseur, P. Éponges des récifs coralliens de Tuléar (Madagascar). *Téthys, Supplément* **1971**, *1*, 51-126.

Van Soest, R. W. M. *Monanchora stocki* n. sp. (Porifera, Poecilosclerida) from the Mid-Atlantic islands. *Bijdragen tot de Dierkunde* **1990**, *60* (3/4), 249–255.

Van Soest, R. W.; Hajdu, E. Family Mycalidae Lundbeck, 1905. In *Systema Porifera*; Springer, 2002; 669–690.

Velluz, L.; Legrand, M. Progress in optical circular dichroism. *Angewandte Chemie International Edition* **1965**, *4* (10), 838–845.

Venkateswarlu, Y.; Chavakula, R. Brominated benzeneacetonitriles, the dibromotyrosine metabolites from the sponge *Psammaplysilla purpurea*. *Journal of Natural Products* **1995**, *58* (7), 1087–1088.

Venkateswarlu Y.; Reddy M.V.R.; Ramesh P.; Rao J.V. Neofolitispates, pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Neofolitispa dianchora*. *Indian Journal of Chemistry*, **1999**, *38B*, 254–256.

Wang, W.; Mun, B.; Lee, Y.; Venkat Reddy, M.; Park, Y.; Lee, J.; Kim, H.; Hahn, D.; Chin, J.; Ekins, M.; Nam, S.-J.; Kang, H. bioactive sesterterpenoids from a korean sponge *Monanchora* sp. *Journal of Natural Products* **2013**, *76* (2), 170–177.

Watanabe, D.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. 'ichi. Three new manzamine congeners from *Amphimedon* sponge. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (5), 689–692.

West, R. The pharmacology and therapeutics of curare and its constituents. *Proceedings of the Royal Society of Medecine* **1935**, *28* (5), 565–578.

Xu, N. J.; Sun, X.; Yan, X. J. A new cyclostellettamine from sponge *Amphimedon compressa*. *Chinese Chemical Letters* **2007**, *18* (8), 947–950.

Yamada, M.; Takahashi, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Ishiyama, A.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Ōmura, S.; Kobayashi, J. 'ichi. Zamamidine C, 3,4-dihydro-6-hydroxy-10,11-epoxymanzamine A, and 3,4-dihydromanzamine J *N*-oxide, new manzamine alkaloids from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* **2009**, *65* (11), 2313–2317.

Zhang, H.; Skildum, A.; Stromquist, E.; Rose-Hellekant, T.; Chang, L. C. Bioactive polybrominated diphenyl ethers from the marine sponge *Dysidea* sp. *Journal of Natural Products* **2008**, *71* (2), 262–264.

Zhu, H.-J.; Li, W.-X.; Hu, D.-B.; Wen, M.-L. Discussion of absolute configuration for bioactive griseusins by comparing computed optical rotations and Electronic Circular Dichroism with the experimental results. *Tetrahedron* **2014**, *70* (44), 8236–8243.

- ## Sites Internet

sarotti-nmr.weebly.com

www.chikungunya.net

www.developpement-durable.gouv.fr

www.e-cancer.fr

www.geoportail.gouv.fr

www.iobis.org

www.marinespecies.org

www.pasteur.fr

www.roche.fr

www.sigmaaldrich.com

www.univ-reunion.fr

www.who.int

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Zone de collecte des organismes étudiés (Crédit Google Map). 21
Figure 2 : Organismes sélectionnés pour leur composition chimique. 24
Figure 3 : Profils CLHP-SM des 10 organismes sélectionnés. 25
Figure 4 : Profils RMN ^{1}H des 10 organismes sélectionnés. 26
Figure 5 : Cytotoxicité des 15 organismes les plus actifs : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses KB. 28
Figure 6 : Principaux organismes sélectionnés pour leur cytotoxicité sur la lignée cancéreuse KB. 29
Figure 7 : Activité antiplasmodium des organismes les plus actifs : 31
Figure 8 : Principales éponges sélectionnées pour leur activité antiplasmodium. 31
Figure 9 : Activité antichikungunya des organismes les plus actifs. 34
Figure 10 : Eponges sélectionnées pour leur activité antichikungunya. 34
Figure 11 : Activité antioxydante des 5 invertébrés marins les plus actifs. 36
Figure 12 : Corail mou sélectionné pour son activité antioxydante. 36
Figure 13 : Lieux de collectes d'éponges du genre *Monanchora* (crédit geoportail.gouv.fr). 43
Figure 14 : Photographie *in situ* de *Monanchora unguiculata* (Crédit LCSNSA). 45
Figure 15 : Photographie de microsclères unguifères de *Monanchora unguiculata* (crédit Van Soest R. W. M., 1990). 45
Figure 16 : Fractionnement de *Monanchora unguiculata* pour l'obtention des métabolites **MU1** à **MU9**. 56
Figure 17 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU5**. 65
Figure 18 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU6**. 68
Figure 19 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU7**. 70
Figure 20 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU8**. 74
Figure 21 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **MU9**. 75
Figure 22 : Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata*. 79
Figure 23 : Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* : Zones 1, 2 et 3. 81
Figure 24 : Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* : Zone 4. 82
Figure 25 : Réseau moléculaire réalisé à partir de l'extrait brut de *Monanchora unguiculata* : Zone 5. 83
Figure 26 : Lieu de collecte des éponges du genre *Amphimedon* (crédit geoportail.gouv.fr). 93
Figure 27 : Photographie de mégasclères (oxes strongylotes) d'A*mphimedon queenslandica* 95

Figure 28 : Fractionnement d'*Amphimedon* sp. pour l'obtention des métabolites **AS1** à **AS3**... 107
Figure 29 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS1**. ... 109
Figure 30 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS2**. ... 111
Figure 31 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **AS3.** ... 114
Figure 32 : Lieux de collecte des éponges appartenant au genre *Aulospongus* (crédit geoportail.gouv.fr). ... 121
Figure 33 : Photographie *in situ* d'*Aulospongus gardineri* (Crédit LCSNSA). ... 124
Figure 34 : Photographie de spicules d'*Aulospongus gardineri* ; A, E et F : rhabdostyles (acanthostyles). B : Styles. C : Oxes. D. Rhabdostyles. (Crédit Hooper J. N. A. *et al*., 1999). ... 124
Figure 35 : Fractionnement d'*Aulospongus gardineri* pour l'obtention des métabolites **AG1** à **AG3**. ... 125
Figure 36 : Corrélations RMN 2D clés de **AG1**. ... 127
Figure 37 : Corrélations RMN 2D clés de **AG3**. ... 131
Figure 38 : Déréplication de l'extrait brut de l'éponge *Aulospongus gardineri* à partir du réseau moléculaire ... 133
Figure 39 : Cluster contenant les analogues du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol ... 134
Figure 40 : Déréplication de l'analyse CLUP-SMHR de l'extrait brut d'*Aulospongus gardineri* (TCN-M085) ... 134
Figure 41 : Métabolites isolés de l'éponge *Aulospongus gardineri* ... 136
Figure 42 : Exemple de spectres de Dichroïsme Circulaire (DC) de deux énantiomères ... 140
Figure 43 : Différentes conformations du noyau tricyclique insaturé 8a-8b pour l'isomère 3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S*. ... 158
Figure 44 : Méthode de recherche des différents conformères. ... 158
Figure 45 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine R (**E19**). 160
Figure 46 : Spectre UV théorique de la nétamine R (**E19**) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,0436 eV. ... 160
Figure 47 : Spectre UV expérimental de la nétamine R (**E19**). ... 161
Figure 48 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S* de la nétamine R (**E19**). ... 162
Figure 49 : Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine R (**E19**). ... 162
Figure 50 : Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine R (**E19**). ... 163
Figure 51 : Orbitales moléculaires principalment impliquée dans le spectre UV du conformères le plus stable de la nétamine R (**E19**). ... 164

Figure 52 : Spectres UV théoriques des conformères les plus stables de la nétamine P (**E17**). 166
Figure 53 : Spectre UV théorique de la nétamine P (**E17**) pondéré selon Boltzmann et décalé de 0,119 eV. 167
Figure 54 : Spectre UV expérimental de la nétamine P (**E17**). 167
Figure 55 : Spectres de DCE des conformères les plus stables de l'énantiomère 3a*S*,5a*S*,7*R*,8*S* de la nétamine P (**E17**). 168
Figure 56 : Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine P (**E17**). 168
Figure 57 : Spectre UV théorique et transitions électroniques du conformère le plus stable de la nétamine P (**E17**). 170
Figure 58 : Orbitales moléculaires principalment impliquée dans le spectre UV du conformères le plus stable de la nétamine P (**E17**). 170
Figure 59 : Spectres UV théoriques des conformères de la nétamine G (**E8**). 172
Figure 60 : Spectre UV théorique de la nétamine G (**E8**) pondéré selon Boltzmann et décalé de -0,556 eV. 172
Figure 61 : Spectre UV expérimental de la nétamine G (**E8**). 173
Figure 62 : Spectres de DCE des conformères de l'énantiomère 5a*S*,7*R*,8*R* de la nétamine G (**E8**). 173
Figure 63 : Spectres théoriques et expérimental de DCE des énantiomères de la nétamine G (**E8**). 174
Figure 64 : Déshydrogénation de la nétamine Q (**E18**). 176
Figure 65 : Spectres UV expérimentaux des nétamines E, O, Q et S. 177

Liste des tableaux

Tableau I : Nombre de publications et de composés isolés référencés..... 37
Tableau II : Bilan des criblages chimique et biologiques et des données bibliographiques. 40
Tableau III : Activités antiparasitaires des batzelladines C (M37) et L (M50) et de la déhydrobatzelladine C (M38). 51
Tableau IV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la crambescidine 359 (Braeckman J. C. *et al*., 2000)..... 58
Tableau V : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la crambescidine 800 (Braeckman J. C. *et al*., 2000, Jares-Erijman E. A. *et al*., 1991) à ceux observés pour **MU2**. 59
Tableau VI : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de la fromiamycaline (Palagiano E. *et al*. 1995) à ceux observés pour **MU3**..... 61
Tableau VII : Comparaison des déplacements chimiques RMN 1H de l'acide crambescidique (Gallimore W. A. *et al.*, 2005) à ceux observés pour **MU4.**..... 63
Tableau VIII : Données de la RMN 1D et 2D pour **MU5** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz. 66
Tableau IX : Données de la RMN 1D et 2D pour **MU6** enregistrées dans CD_3OD à 600MHz..... 68
Tableau X : Données de la RMN 1D et 2D pour **MU7** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 71
Tableau XI : Données de la RMN 1D et 2D pour **MU8** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz..... 74
Tableau XII : Données de la RMN 1D et 2D pour **MU9** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 76
Tableau XIII : Activité antiplasmodium des métabolites isolés de *Monanchora unguiculata.* 84
Tableau XIV : Cytotoxicité sur les cellules KB des métabolites isolés de *Monanchora unguiculata*. 85
Tableau XV : Origine, bioactivités et existence d'une voie de synthèse des dérivés de la ptilomycaline A 89
Tableau XVI *:* Activités cytotoxiques des manzanines et dérivés..... 100
Tableau XVII : Activités cytotoxiques des différents dérivés de la pyridines isolés des éponges du genre *Amphimedon*. 105
Tableau XVIII : Données de la RMN 1D et 2D pour **AS1** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz.. 109
Tableau XIX : Données de la RMN 1D et 2D pour **AS2** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 112
Tableau XX : Données de la RMN 1D et 2D pour **AS3** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 114
Tableau XXI : Cytotoxicité sur les cellules KB des métabolites isolés d'*Amphimedon* sp. 115
Tableau XXII : Données de la RMN 1D et 2D de **AG1** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 127
Tableau XXIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C de la *N,N*-lauroyldiéthanolamine..... 127
Tableau XXIV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H de **AG1** et **AG2**. 128

Tableau XXV : Comparaison des spectres UV (λ_{max}) du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (Perry, N. B. *et al*., 1990) et de **AG3**. 129
Tableau XXVI : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du (*Z*)-3-((7-hydroxyhexadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol (Perry, N. B. *et al*., 1990) et de **AG3**. 130
Tableau XXVII : Données de la RMN 1D et 2D pour **AG3** enregistrées dans CD_3OD à 500MHz. 131
Tableau XXVIII : Populations des différents conformères pour chacun des isomères du modèle **N1**. 150
Tableau XXIX : Résultats du calcul de probabilité DP4+ pour la mirabiline A, la nétamine G et la nétamine H. 151
Tableau XXX : Populations des différents conformères pour chacun des isomères du modèle **N2**. 152
Tableau XXXI : Résultats du calcul de probabilité DP4+ pour les nétamines E, O, P, Q, R et S... 154
Tableau XXXII : Conformères les plus stables de la nétamine R (**E19**) ayant une population ≥ 5% 159
Tableau XXXIII : Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine R (**E19**). 162
Tableau XXXIV : Conformères les plus stables de la nétamine P (**E17**) ayant une population ≥ 5% 165
Tableau XXXV : Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine P (E**17**). 169
Tableau XXXVI : Effets Cotton expérimentaux et calculés de la nétamine G (**E8**). 174
Tableau XXXVII : Révélateurs utilisés pour les CCM. 190

Lexique

Acanthostyle : Style doté de nombreuses épines, sur tout ou partie de sa longueur.

Anastomose : Connexion, abouchement de deux canaux anatomiques de même nature.

Apex : Extrémité.

Arbovirus : Grand groupe de virus très divers, dont la plupart sont pathogènes pour les vertébrés, et qui sont étudiés conjointement car ils ont en commun le fait d'être transmis par des arthropodes. Taxonomiquement, ce regroupement n'était pas viable et ses membres (plus de 350) sont étudiés à présent dans les familles correspondantes (*Togaviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae* et *Reoviridae*). Les Arbovirus sont responsables des arboviroses, affections essentiellement tropicales dont les plus fréquentes sont la dengue, la fièvre jaune et certaines encéphalites.

Arthralgie : Douleur articulaire.

Ascidie : Les Ascidiacés sont des animaux marins filtreurs qui vivent dans la zone littorale fixés, au stade adulte, aux roches, algues, pontons, coques de bateaux ou pour certaines espèces enfouies dans le sable. Au cours de leur développement, les ascidies passent par un court stade larvaire libre et nageur. Les ascidies peuvent être solitaires ou coloniales. Elles mesurent de quelques millimètres à 20 cm, parfois beaucoup plus chez certaines espèces coloniales. Il en existe environ 1400 espèces qui peuplent toutes les mers du globe. Le corps d'une ascidie type solitaire, enveloppé dans une tunique, a la forme d'un sac ou d'une outre avec deux orifices en position supérieure: ce sont deux siphons, un siphon inhalant par lequel l'eau de mer pénètre à l'intérieur de l'ascidie, un siphon exhalant par lequel l'eau ressort.

Céphalée : Mal de tête diffus ou localisé, pouvant s'exacerber sous l'effet d'influences extérieures ou de causes internes.

Chèle : Microsclère qui présente une belle forme sigmoïde. Il peut être symétrique (isochèle) ou asymétrique (anisochèle).

Choanocyte : Cellule particulière aux éponges, de forme ovoïde, à collerette et cil central, tapissant la cavité gastrique et assurant la circulation de l'eau à travers l'animal.

Choanosome : région de l'éponge comprenant les chambres choanocytaires.

Corail mou : Colonie d'animaux proches des coraux durs mais qui ne forment pas de squelette calcaire. Les coraux mous, aussi appelés alcyonnaires, sont des octocoralliaires (les polypes possèdent 8 tentacules).

Cyanobactéries : Micro-organismes procaryotes photosynthétiques également appelées cyanophytes ou cyanophycées. Elles sont classées du point de vue systématique dans le règne des Eubactéries mais ont longtemps fait partie du règne végétal car elles possèdent à la fois des caractéristiques de bactéries (absence de noyau et d'organites intracellulaires) et d'algues (présence de chlorophylle A et de phycobiliprotéines (pigments accessoires) et capacité à faire la photosynthèse).

Ectosome : Région périphérique de l'éponge dépourvue de chambres choanocytaires.

Encéphalite : Inflammation sans suppuration de l'encéphale. Elle peut être d'origine virale, bactérienne ou parasitaire.

Eponge (Spongiaire, Porifère) : Les Spongiaires sont des animaux fixés, marins pour la plupart. Longtemps pris pour des végétaux, le statut d'animaux leur a été définitivement attribué par Dujardin (1841). Ce sont des Métazoaires diploblastiques dont l'organisation est très primitive : ils n'ont pas de symétrie, pas d'organes définis. Animaux essentiellement filtreurs, l'eau traverse la double paroi du corps (ectoderme + endoderme), par d'innombrables petits pores inhalants et

ressort par un orifice unique, béant, l'oscule, après avoir baigné la vaste cavité gastrale interne ou spongocoele. A très grande profondeur, certaines espèces sont carnivores.

Mégasclère : Spicule généralement de longueur supérieure à 100 µm et formant la charpente squelettique.

Mésoglée : substance extracellulaire gélatineuse, translucide, située entre le choanoderme et l'ectoderme, dans laquelle évoluent librement les amibocytes. Dans la mésoglée se situent également les éléments de squelette de l'éponge, spicules ou fibres de spongine.

Microsclère : Spicule généralement de longueur inférieure ou égale à 100 µm, et seulement additionnel. Les microsclères (ectosomiques et choanosomiques) représentent un critère très important et constant intragénériquement ; ils peuvent souvent être aussi utilisés pour la détermination spécifique.

Mucroné : Présence d'un *mucron*, sorte de petit prolongement du spicule.

Myalgie : Douleur musculaire.

Myocardite : Inflammation aiguë ou chronique du myocarde.

Oscule : Orifice de grande taille présent chez les éponges et servant à éjecter l'eau filtrée.

Oxe : Spicule de type monoaxone diactine aux deux pointes acérées.

Péricardite : Affection inflammatoire du péricarde, aiguë ou chronique, avec ou sans épanchement.

Pleurésie : Inflammation avec congestion et épaississement de la plèvre, et réaction fibrineuse (période sèche), à laquelle succède généralement l'exsudation d'une quantité plus ou moins grande de liquide séreux (période exsudative).

Prophylaxie : Ensemble des moyens destinés à prévenir l'apparition ou la propagation des maladies. La prophylaxie peut être individuelle ou collective.

Rhabdostyle : Spicule de type style mais avec une extrémité coudée (rhabde).

Sessile : Se dit de tout organe inséré directement sur l'axe et dépourvu de pédoncule.

Spicule : Elément de soutien du mésenchyme de formes variées, souvent en aiguille. Sa nature, siliceuse ou calcaire, permet de distinguer, entre autres, les éponges calcaires (Calcisponges) et les éponges siliceuses (Silicosponges).

Spongine : La spongine, chez les invertébrés, est une matière (protéine) fibreuse formant un réseau rigide chez de nombreuses éponges, leur créant une sorte de squelette. Chez les spongiaires, c'est une scléroprotéine riche en liaisons disulfure et en tyrosine halogénée, synthétisée par les spongioblastes et formant des fibres dans la mésoglée.

Strongylote : Relatif aux strongyles, spicules de type monoaxones arrondis aux deux extrémités, d'un diamètre sensiblement constant sur toute leur longueur.

Style : Spicule de type monoaxone dont l'une des extrémités est arrondie.

Subtylostyle : Spicule intermédiaire entre les styles et les tylostyles.

Tylostyle : Spicule ressemblant aux styles, mais possèdant une boule à l'une des extrémités, que l'on appelle tyle.

Tylote : Spicule possèdant un tyle à chaque extrémité.

Résumé :

Les travaux de thèse exposés dans ce manuscrit portent sur l'étude chimique de quatre éponges marines collectées à Madagascar : *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri* et *Biemna laboutei*. Pour les trois premières, l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires par différentes techniques chromatographiques (CLMP, CLHP…) et spectroscopiques (UV-visible, SMHR, RMN 1D et 2D…) ont été envisagés. Quinze métabolites secondaires de type alcaloïdes guanidiniques, dérivés de la bromotyrosine, *N*-acyléthanolamines et polyynes, ont été isolés de ces éponges. Huit sont de structures nouvelles. La valorisation des molécules isolées a ensuite été envisagée *via* l'évaluation de leurs activités biologiques. Deux d'entres elles, la fromiamycaline (M70) et la ptilomycaline F (MU7) ont montré une excellente activité antipaludique et quatre, la fromiamycaline (M70) et les ptilomycalines E (MU6), G (MU8) et H (MU9) une cytotoxicité sur cellules KB prometteuse. L'étude de la dernière éponge, *Biemna laboutei*, portait sur des molécules précédement isolées au sein du LCSNSA. Les travaux entrepris comprenaient une vérification des configurations relatives de neuf alcaloïdes guanidiniques déterminées par RMN grâce à la probabilité DP4+. Les configurations relatives déterminées par RMN de sept des molécules ont ainsi pu être confirmées et trois d'entre elles, les nétamines G (E8), P (E17) et R (E19) ont fait l'objet d'une étude plus approfondie par modélisation moléculaire afin de déterminer leur configuration absolue par comparaison de leur spectre de Dichroïsme Circulaire Electronique expérimental avec un spectre calculé.

Mots clés : Océan Indien, Eponges marines, *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri*, *Biemna laboutei*, métabolites secondaires, activité antipaludique, cytotoxicité, modélisation moléculaire, dichroïsme circulaire, configuration absolue.

Summary :

The work described in this manuscript concerns the chemical study of four sponges from Madagascar: *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri* and *Biemna laboutei*. For the first three sponges, the study was devoted to the extraction, isolation and identification of secondary metabolites by various chromatographic (MPLC, HPLC…) and spectroscopic (UV, HRMS, 1D and 2D NMR…) techniques. Fitfteen secondary metabolites including guanidine alkaloids, bromotyrosin derivated, *N*-acylethanolamines and polyynes were isolated from these sponges. Eight are new molecules. The biological activities of the isolated compounds were then evaluated. Two of them, fromiamycalin (M70) and ptilomycalin F (MU7) showed a very good antimalarial activity and four of them, fromiamycalin (M70) and ptilomycalins E (MU6), G (MU8) and H (MU9) a promising cytotoxicity against KB cells. The study of the last sponge, *Biemna laboutei*, was performed on molecules already isolated in the LCSNSA. This work included the determination of the relative configuration of nine guanidine alkaloids by using the DP4+ probability. The relative configuration of seven molecules was confirmed. Three of them, netamines G (E8), P (E17) and R (E19) were selected for a study by molecular modeling to determine their absolute configuration by comparison of their experimental Electronic Circular Dichroism spectrum with a calculated spectrum.

Keywords : Indian Ocean, Marine sponges, *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri*, *Biemna laboutei*, secondary metabolites, antimalarial activity, cytotoxicity, molecular modeling, circular dichroism, absolute configuration.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 08/02/2017

par

Pierre-Eric CAMPOS

Biodiversité des invertébrés marins : de l'isolement à la modélisation moléculaire de métabolites secondaires pour la découverte de nouveaux candidats médicaments.

TOME II

Directeur de thèse :	Bertrand ILLIEN	Professeur, Université de La Réunion
Co-directrice de thèse :	Anne BIALECKI	Professeur, Université de La Réunion

Composition du jury :

Rapporteurs :	Grégory GENTA-JOUVE	MCF-HDR, Université de Paris-Descartes
	Emerson F. QUEIROZ	Professeur associé, Université de Genève
Examinateurs :	Michel FREDERICH	Professeur, Université de Liège
	Jacqueline SMADJA	Professeur Emerite, Université de La Réunion

Note au lecteur

Ce Tome est proposé afin de compléter le précédent et rassemble :

- un tableau récapitulatif des organismes étudiés dans la première partie du Tome I.
- l'ensemble des spectres (UV, SM et RMN) étudiés dans les deuxième, troisième et quatrième parties du Tome I.
- Les ressources et paramètres utilisés pour les calculs de modélisation moléculaire décrits dans la cinquième partie du Tome I.

Le lecteur peut ainsi consulter ces documents parallèlement à la lecture du Tome I.

Sommaire

Annexe I – Liste des invertébrés marins étudiés.....4

Annexe II – Données spectrales des métabolites de structures nouvelles isolés de *Monanchora unguiculata* 17

Annexe II.1. Données spectrales du métabolite MU5..... 18

Annexe II.2. Données spectrales du métabolite MU6..... 23

Annexe II.3. Données spectrales du métabolite MU7..... 27

Annexe II.4. Données spectrales des métabolites MU8 et MU9 32

Annexe III – Données spectrales des métabolites de structures nouvelles isolés de *Amphimedon* sp. 36

Annexe III.1. Données spectrales du métabolite AS2..... 37

Annexe III.2. Données spectrales du métabolite AS3..... 40

Annexe IV – Données spectrales du métabolite de structure nouvelle isolé d'*Aulospongus gardineri* 43

Annexe V – Ressources et paramètres utilisés pour les calculs de modélisation moléculaire..... 47

Annexe I

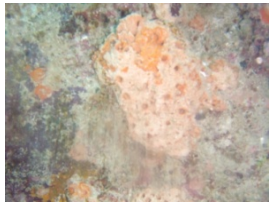
Liste des invertébrés marins étudiés

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Acanthella cavernosa (Dendy, 1922) Famille : Dictyonellidae Ordre : Bubarida Classe : Demospongiae		Madagascar Castor 12°51.110' S 48°25.088' E	TCN-M107	**Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 5,73 µg/mL	25,58	2,760	10,8
***Amphimedon* sp.** Famille : Niphatidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 13°00.142' S 48°29.099' E	TCN-M183	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100,0%	36,22	1,770	4,9
Aulospongus gardineri (Dendy, 1922) Famille : Raspailiidae Ordre : Axinellida Classe : Demospongiae		Madagascar Roland Point 13°23.530' S 48°00.143' E	TCN-M085	-	98,29	2,471	2,5
Biemna laboutei (Hooper, 1996) Famille : Biemnidae Ordre : Biemnida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M101	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 6,16 µg/mL	37,27	8,85	23,8
		Madagascar Riva Be 12°59.126 S 48°34.453 E	TCN-M103	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100,0%	49,41	16,728	33,9

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Biemna triraphis (sensu Pulitzer-Finali, 1993) Famille : Biemnidae Ordre : Biemnida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°50.848' S 48°34.718' E	TCN-M129	-	14,67	2,878	19,6
Callyspongia biru (de Voogd, 2004) Famille : Callyspongiidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.126 S 48°34.453 E	TCN-M075	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 97,0%	38,4	8,507	22,2
		Madagascar 4 frères 13°00.142' S 48°29.099' E	TCN-M079	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100,0%	38,14	8,551	22,4
Callyspongia sp. « black » Famille : Callyspongiidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Castor 12°51.110' S 48°25.088' E	TCN-M083	-	37,92	2,449	6,5
***Calyspongia (Cladochalina)* sp.** Famille : Callyspongiidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°49.978' S 48°34.504' E	TCN-M133	-	7,08	0,670	9,5

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Didemnum molle (Herdmann, 1886) Famille : Didemnidae Ordre : Aplousobranchia Classe : Ascidiacea		Madagascar Ankaréa 12°50.848' S 48°34.718' E	TCN-M087	-	48,65	2,104	4,3
		Madagascar Roland Point 13°23.530' S 48°00.143' E	TCN-M089	-	3,45	0,864	25,1
		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M091	-	64,58	4,218	6,5
		Madagascar 4 frères 13°00.142' S 48°29.099' E	TCN-M095	-	21,18	2,200	10,4
		Madagascar Roland Point Baie des Russes 13°29,032' S 47°58,721' E	TCN-M097	-	20,74	1,221	5,9

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Dragmacidon coccineum* ???** **ou *Ulosa rubra sensu Vacelet & Vasseur		Madagascar Roland Point Baie des Russes 13°29,032' S 47°58,721' E	TCN-M149	-	91,84	3,524	3,8
***Eudistoma* sp.** Famille : Polycitoridae Ordre : Aplousobranchia Classe : Ascidiacea		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M181	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 98,0%	68,87	2,067	3,0
Haliclona fascigera (Hentschel, 1912) Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.126 S 48°34.453 E	TCN-M123	-	53,51	9,812	18,3
Haliclona aff. Fascigera (Hentschel, 1912) Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Castor 12°51.110' S 48°25.088' E	TCN-M155	-	22,28	1,722	7,7
Haliclona polypoides (Vacelet, Vasseur & Lévi, 1976) Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M109	-	22,59	2,284	8,7

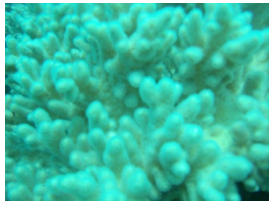
Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
***Haliclona* sp.** Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M173	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 100,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 3,47 µg/mL	43,8	2,333	5,3
***Haliclona* sp.** Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°50.848' S 48°34.718' E	TCN-M193	-	14,24	0,942	6,6
***Haliclona* sp. « black »** Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M179	-	12,84	1,023	8,0
Haliclona tulearensis Famille : Chalinidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M141	-	33,72	4,029	11,9
Hemiasterella intermedia (Dendy, 1922) Famille : Hemiasterellidae Ordre : Tethyida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°49.978' S 48°34.504' E	TCN-M147	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 97,0%	71,38	1,8427	2,6

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Jaspis diastra (Vacelet & Vasseur, 1965) Famille : Ancorinidae Ordre : Tetractinellida Classe : Demospongiae		Madagascar Castor 12°51.110' S 48°25.088' E	TCN-M137	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 96,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 2,52 µg/mL	41,66	2,088	5,0
Jaspis diastra (Vacelet & Vasseur, 1965) Famille : Ancorinidae Ordre : Tetractinellida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M169	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 85,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 11,08 µg/mL	65,68	3,087	4,7
Liosina paradoxa (Thiele, 1899) Famille : Dictyonellidae Ordre : Bubarida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.126 S 48°34.453 E	TCN-M119	-	173,82	13,944	8,0
Lemnalia africana (May, 1898) Famille : Nephtheidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M187	-	33,85	3,995	11,8
Lemnalia madagascariensis (Verseveldt, 1969) Famille : Nephtheidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M177	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99,0%	42,57	8,215	19,3

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
***Leucetta* sp.** Famille : Leucettidae Ordre : Clathrinida Classe : Calcarea		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M143	-	39,1	0,594	1,5
Lobophytum depressum (Tixier-Durivault, 1966) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M159	-	95,42	1,835	1,9
Monanchora unguiculata (Dendy, 1922) Famille : Crambeidae Ordre : Poecilosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Roland Point Baie des Russes 13°29,032' S 47°58,721' E	TCN-M121	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 99,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 2,26 µg/mL	72,91	25,8	35,4
Mycale parishi (Bowerbank, 1875) Famille : Mycalidae Ordre : Poecilosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M117	-	39,29	5,501	14,0
Myrmekioderma granulatum (Esper, 1794) Famille : Heteroxyidae Ordre : Axinellida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°49.978' S 48°34.504' E	TCN-M077	**Activité antivirale** Virus CHIKV (CC_{50} > 100 µg/mL ; CE_{50} : 40,9 µg/mL)	101,07	9,026	8,9

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Myrmekioderma granulatum (Esper, 1794) Famille : Heteroxyidae Ordre : Axinellida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M093	-	83,24	4,567	5,5
		Madagascar 4 frères 12°59.655' S 48°29.248' E	TCN-M167	-	117,01	2,462	2,1
Oceanapia globose (Pulitzer-Finali, 1993) Famille : Phloeodictyidae Ordre : Haplosclerida Classe : Demospongiae		Madagascar Ankaréa 12°49.978' S 48°34.504' E	TCN-M125	-	45,98	7,673	16,7
Phyllospongia ou Ledenfeldia		Madagascar Castor 12°50.794' S 48°25.198' E	TCN-M131	-	41,19	2,676	6,5
***Pseudoceratina* sp.** Famille : Pseudoceratinidae Ordre : Verongiida Classe : Demospongiae		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M105	-	81,64	9,365	11,5

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Rhytisma fulvum fulvum (Forskål, 1775) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M161	**Activité Antioxydante** Equivalent Trolox : ABTS : 750 µM à 1 mg/mL FRAP : 428.8 µM à 1 mg/mL	202,39	12,768	6,3
		Madagascar Castor 12°50.794' S 48°25.198' E	TCN-M163	**Activité Antioxydante** Equivalent Trolox : ABTS : 1070 µM à 1 mg/mL FRAP : 459,3 µM à 1 mg/mL	217,11	15,641	7,2
Sarcophyton stolidotum (Verseveldt, 1971) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M099	**Activité antivirale** Virus CHIKV (CC_{50} : 52,5 µg/mL ; CE_{50} : 8,99 µg/mL)	137,85	9,687	7,0
		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M135	-	28,5	5,0815	17,8
Sarcophyton subviride (Tixier-Durivault, 1958) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M157	-	46,8	4,799	10,3

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Sarcophyton trocheliophorum (Von Marenzeller, 1886) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M191	**Activité antivirale** Virus CHIKV (CC_{50} : 52,2 µg/mL ; CE_{50} : 7,68 µg/mL)	27,08	5,506	20,3
Sinularia crucita (Tixier-Durivault, 1970) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M185	-	94,99	3,210	3,4
Sinularia humesi (Verseveldt, 1971) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M175	-	119,53	7,170	6,0
Sinularia notanda (Tixier-Durivault, 1966) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Riva Be 12°59.094 S 48°34.622 E	TCN-M189	-	121,24	5,408	4,5
Sinularia polydactyla (Ehrenberg, 1834) Famille : Alcyoniidae Ordre : Alcyonacea Classe : Anthozoa		Madagascar Ankaréa 12°50.054' S 48°34.563 E	TCN-M153	**Activité antivirale** Virus CHIKV (CC_{50} : 57,1 µg/mL ; CE_{50} : 6,4 µg/mL)	141,52	2,691	1,9

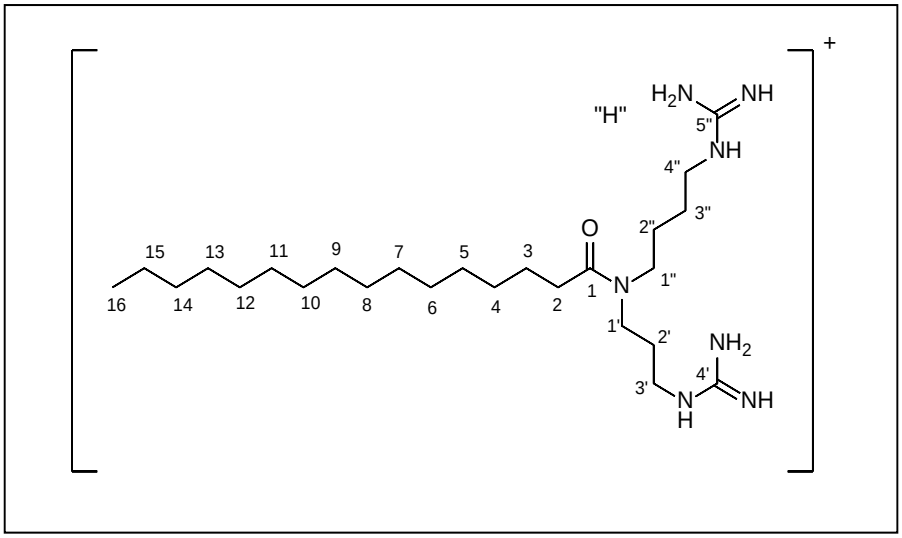
Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Stylissa carteri (Dendy, 1889) Famille : Scopalinidae Ordre : Scopalinida Classe : Demospongiae		Madagascar Castor 12°51.110' S 48°25.088' E	TCN-M145	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 93,0% **Activité antipaludique** Inhibition *Plasmodium falciparum* CI_{50} = 4,40 µg/mL	16,12	1,0152	6,3
Ascidie Non identifiée 1		Madagascar Roland Point Baie des Russes 13°29,032' S 47°58,721' E	TCN-M081	**Cytotoxicité sur cellules KB** % inhibition à 10 µg/mL : 82,0%	101,62	5,555	5,5
Ascidie Non identifiée 2		Madagascar Castor 12°50.794' S 48°25.198' E	TCN-M127	-	104,52	9,2765	8,9
Corail mou Non identifié 1			TCN-M115	-	76,1	14,911	19,6
Corail mou Non identifié 2			TCN-M139	-	131,72	3,476	2,6

Nom systématique	Photographie	Point GPS	N° échantillon (solvant d'extraction)	Activités biologiques	Extraction		
					Masse éponge sèche (g)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Corail mou Non identifié 3			TCN-M171	-	187,84	3,277	1,7
Eponge Non identifiée 1			TCN-M111	-	120,8	10,542	8,7
Eponge Non identifiée 2			TCN-M113	-	122,08	21,210	17,4
Eponge Non identifiée 3			TCN-M151	-	22,32	1,360	6,1
Eponge Non identifiée 4			TCN-M165	-	25,42	2,506	9,9

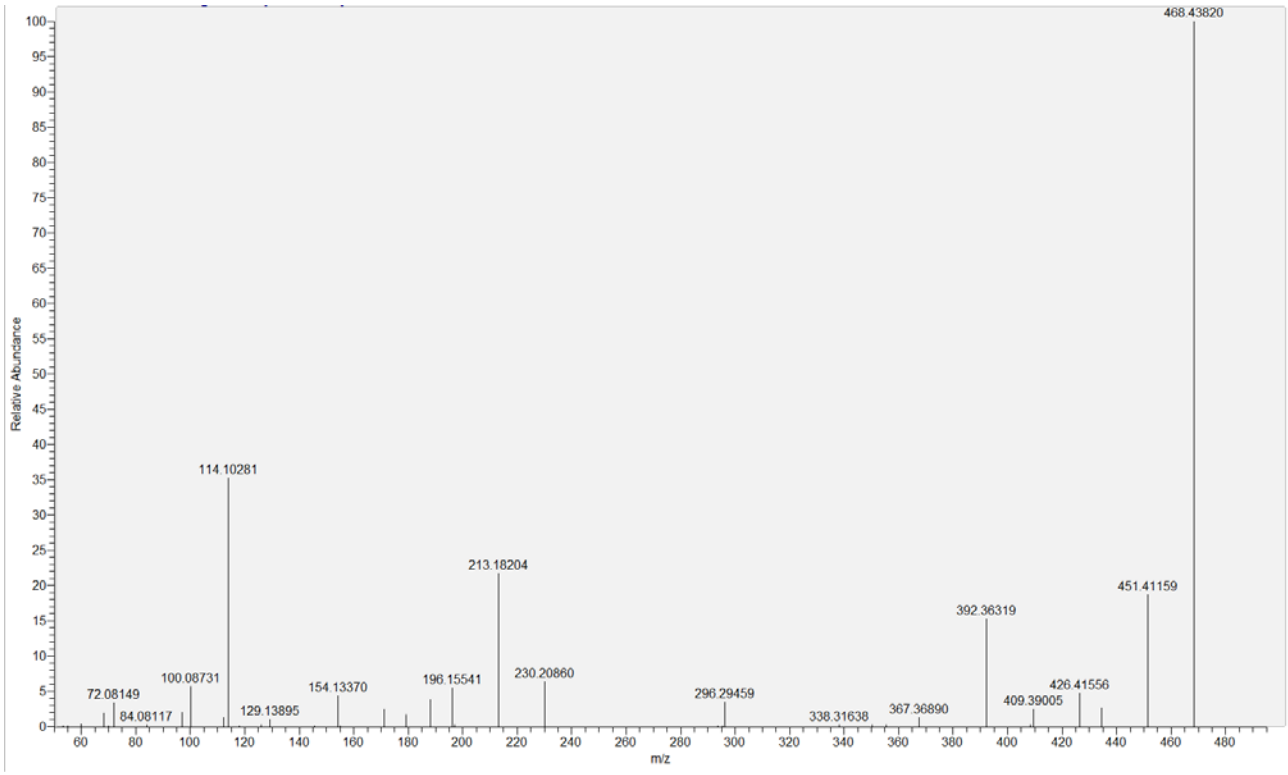
Annexe II

Données spectrales des métabolites de structures nouvelles isolés de *Monanchora unguiculata*

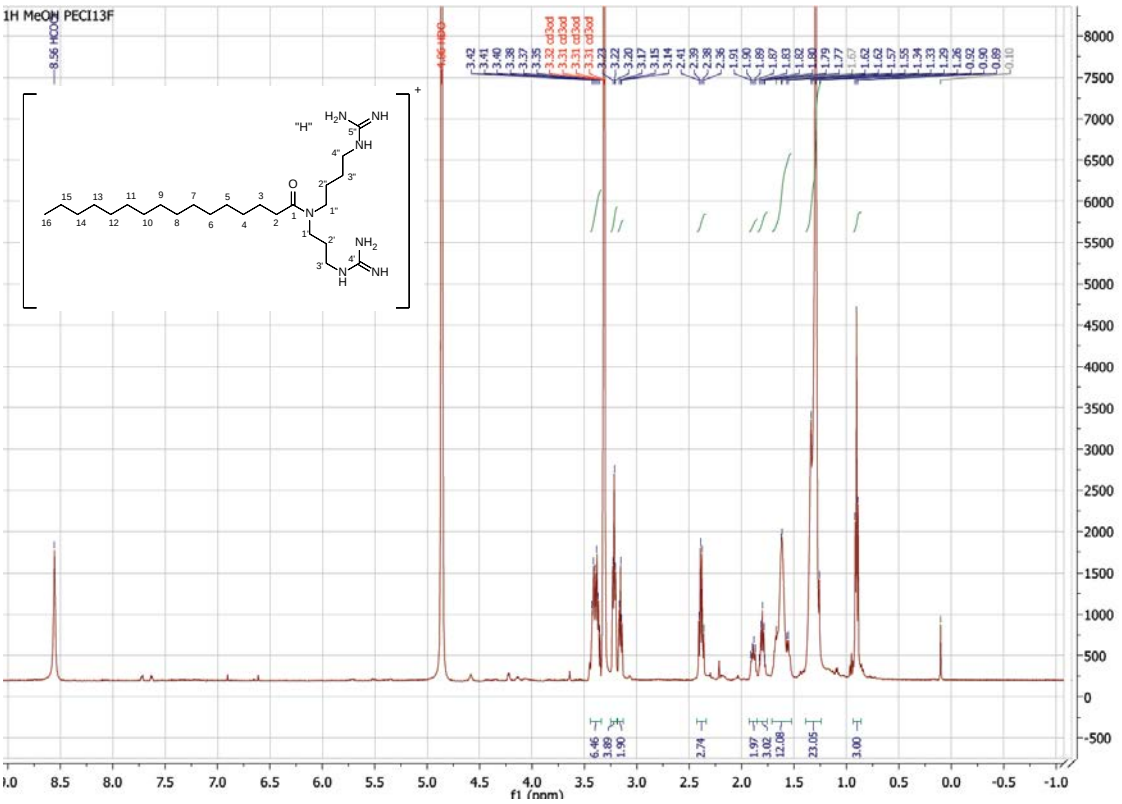
Annexe II.1. Données spectrales du métabolite **MU5**



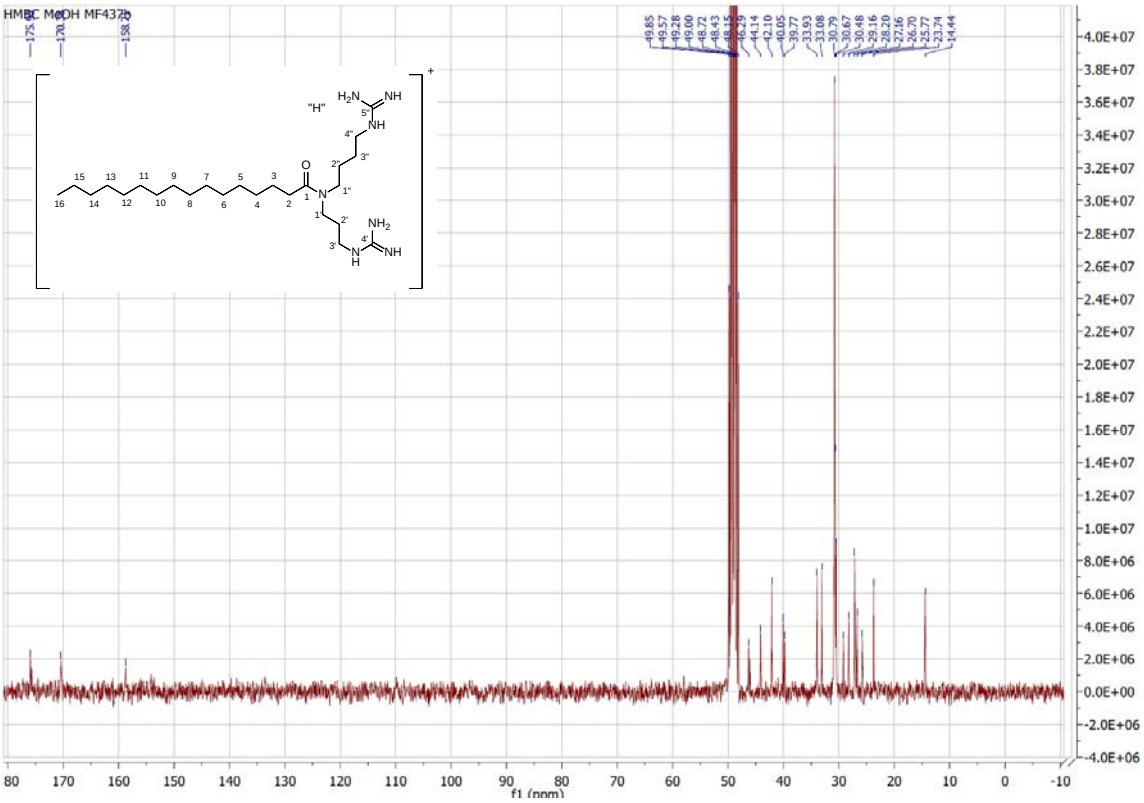
unguiculine A (**MU5**)



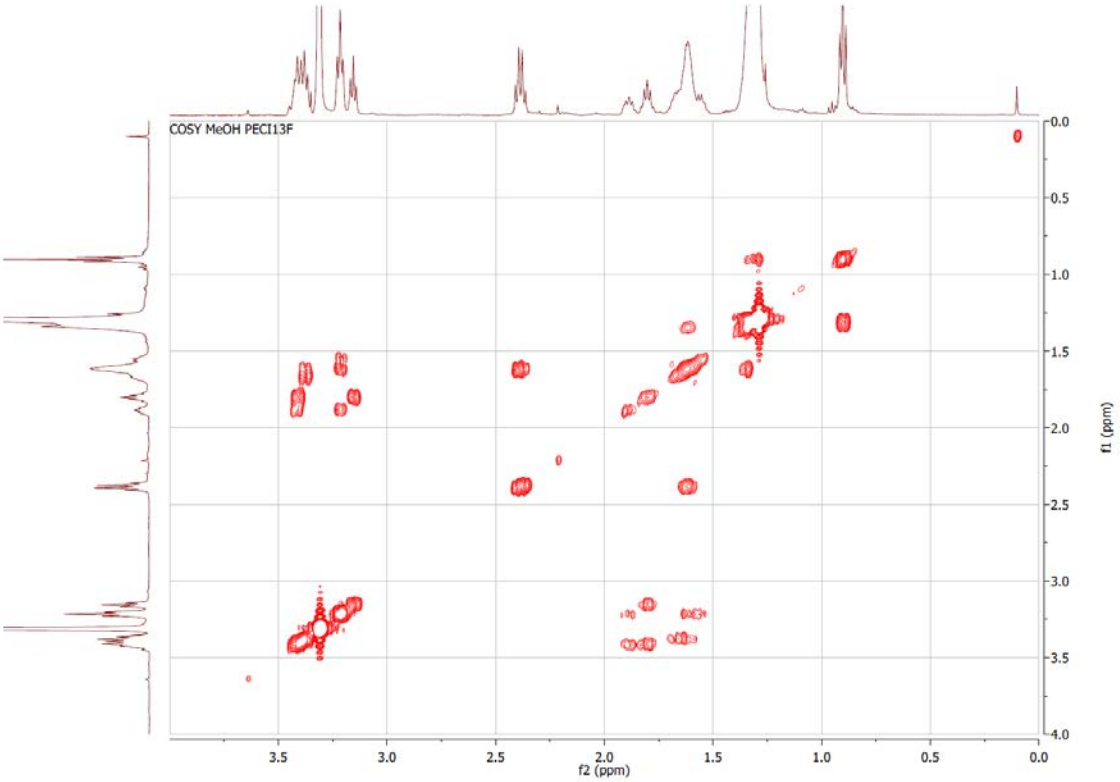
Spectre de Masse Haute Résolution (SMHR-SMHR ; mode ESI$^+$) du métabolite **MU5**.



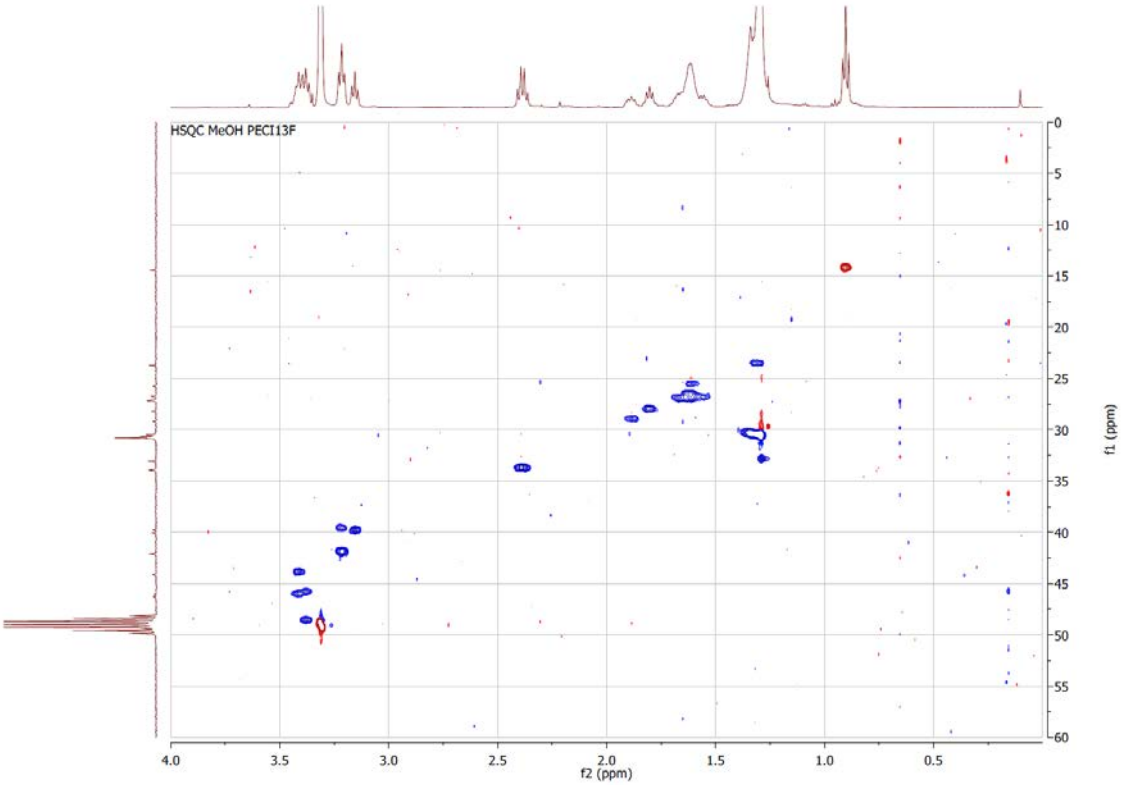
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**



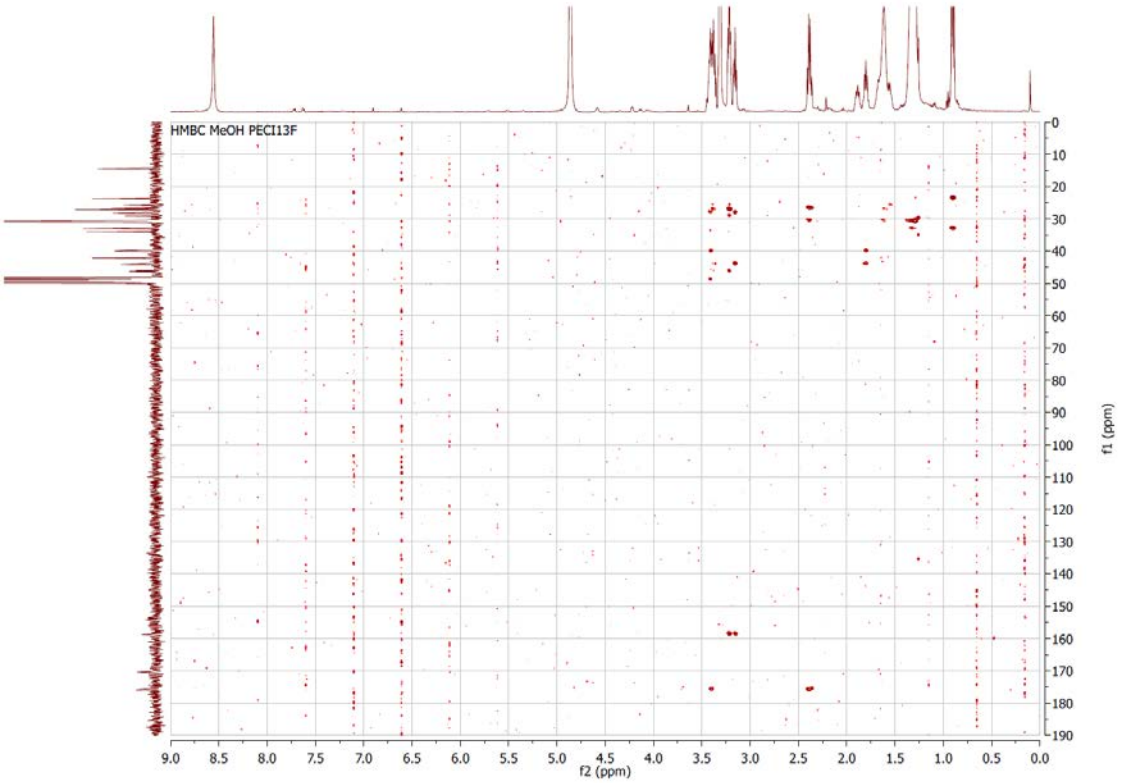
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**



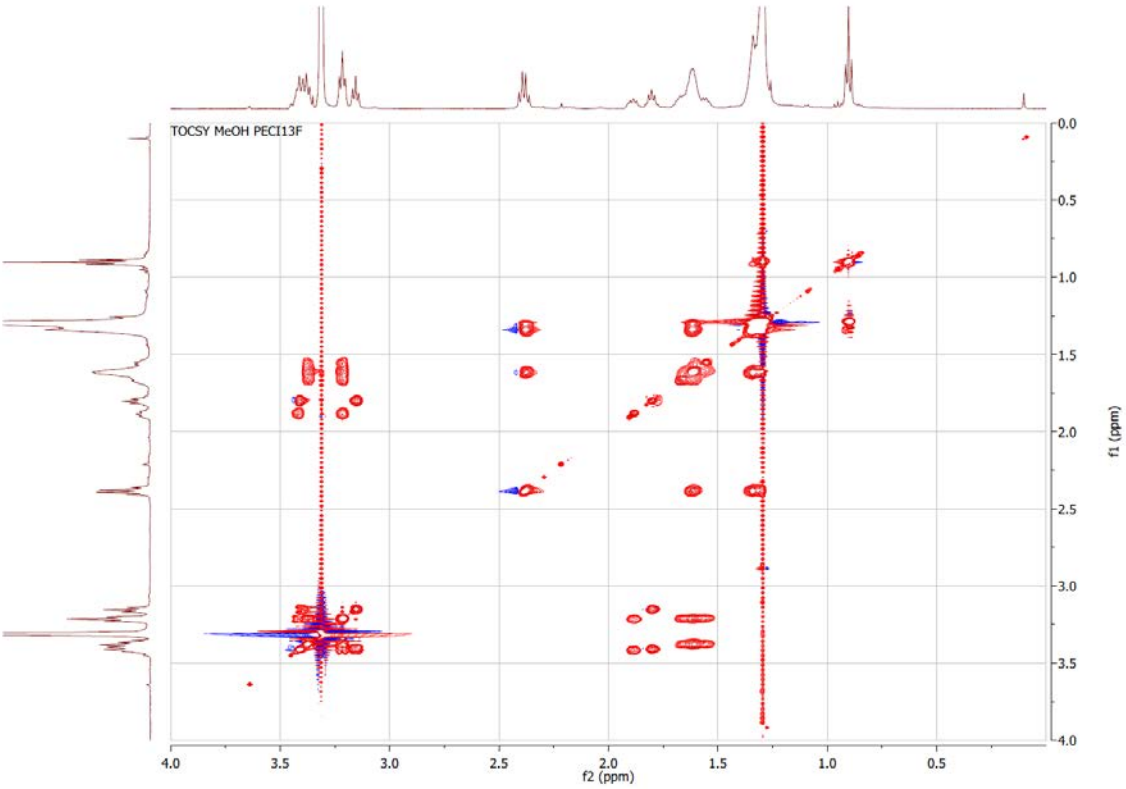
Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**



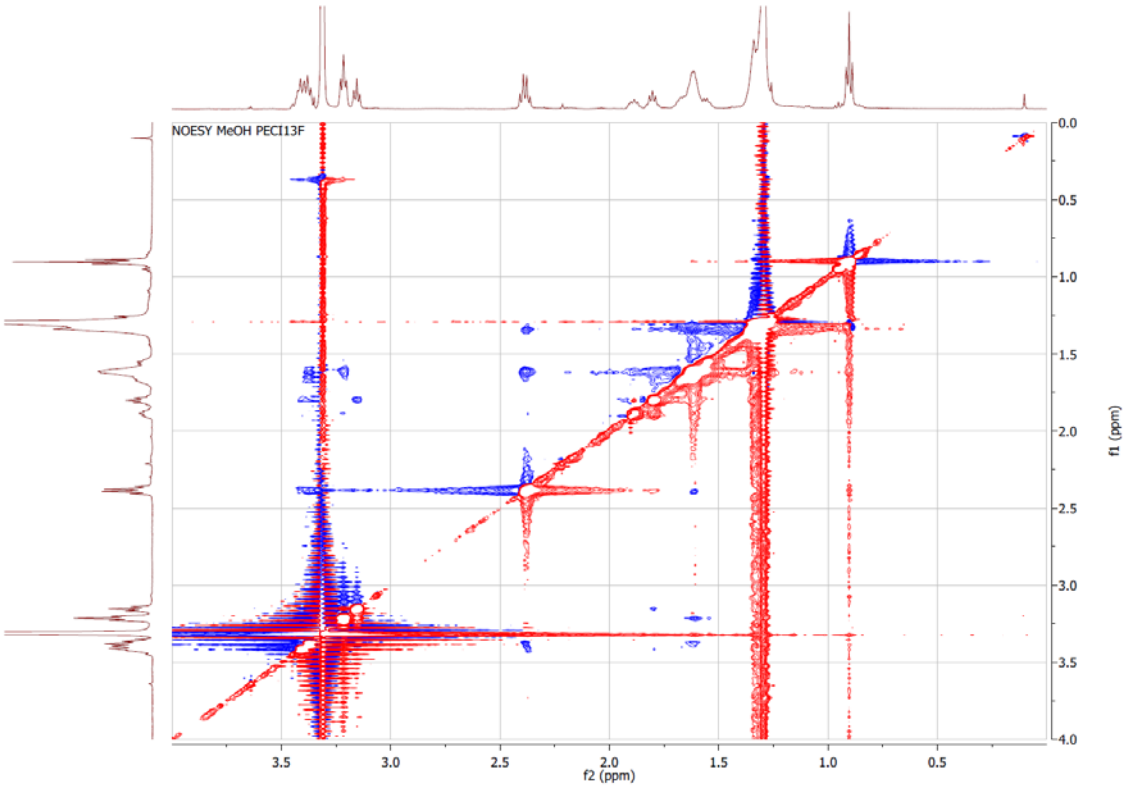
Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**



Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**

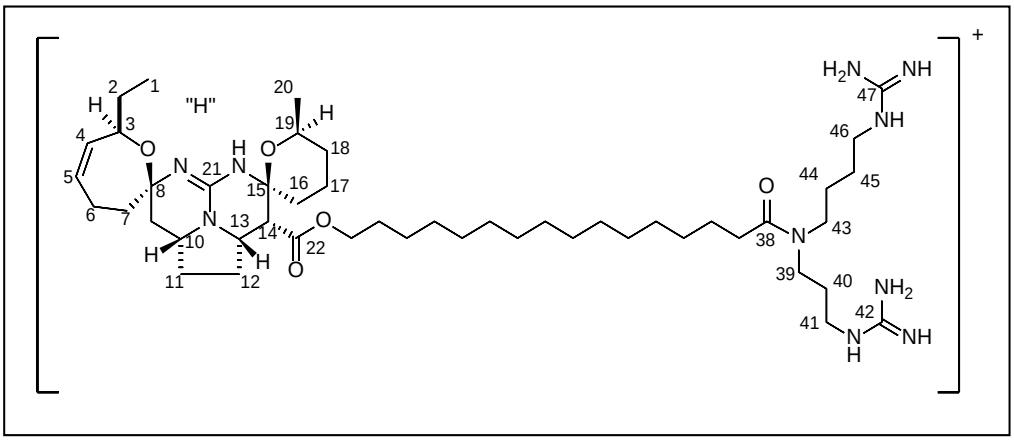


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H TOCSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**

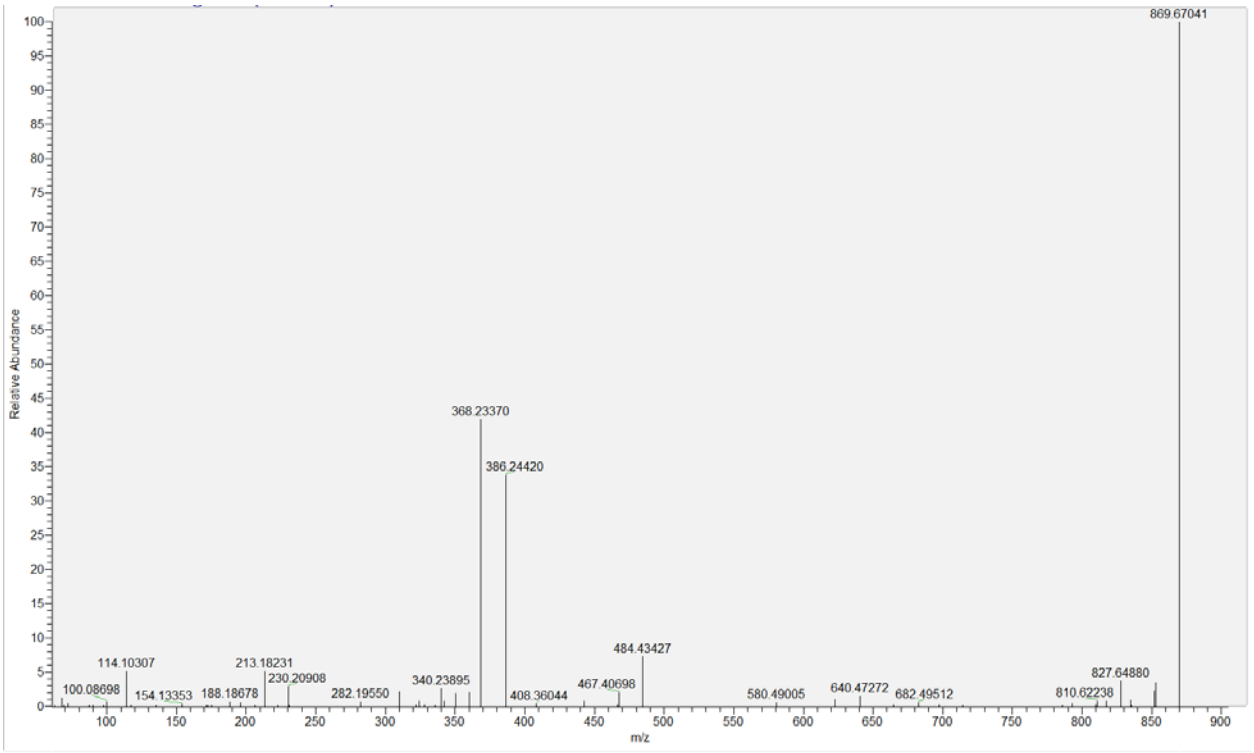


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H NOESY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**

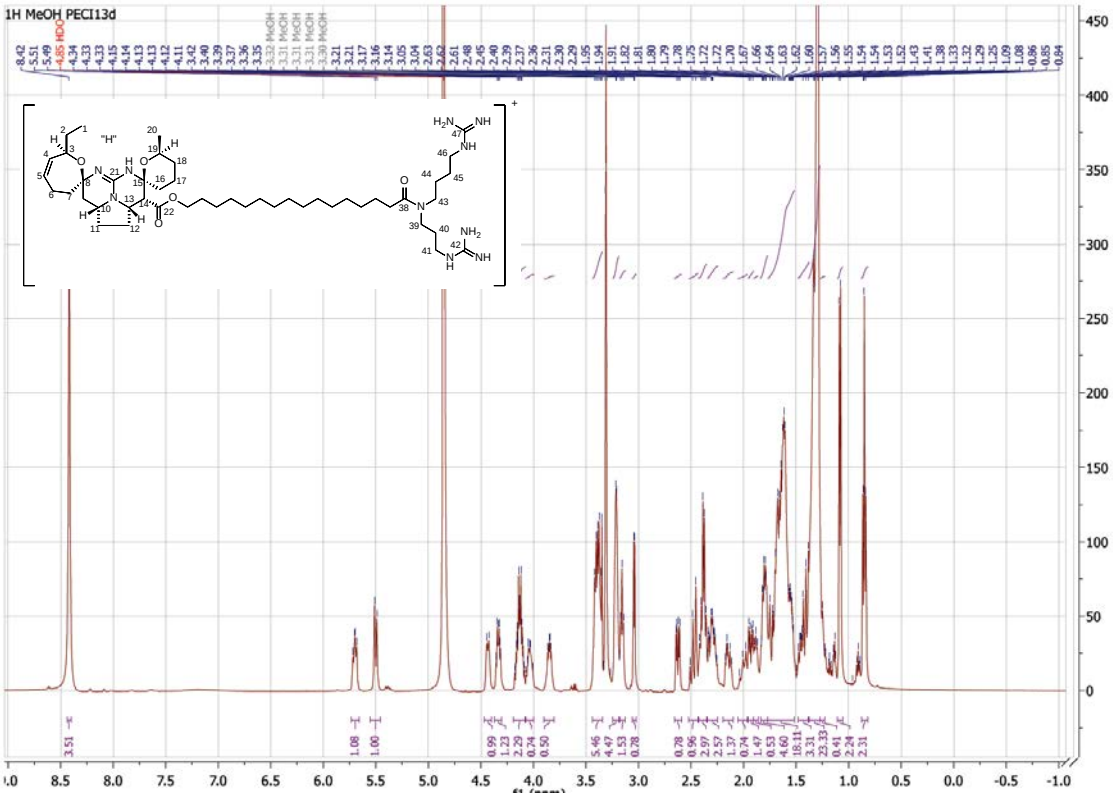
Annexe II.2. Données spectrales du métabolite **MU6**



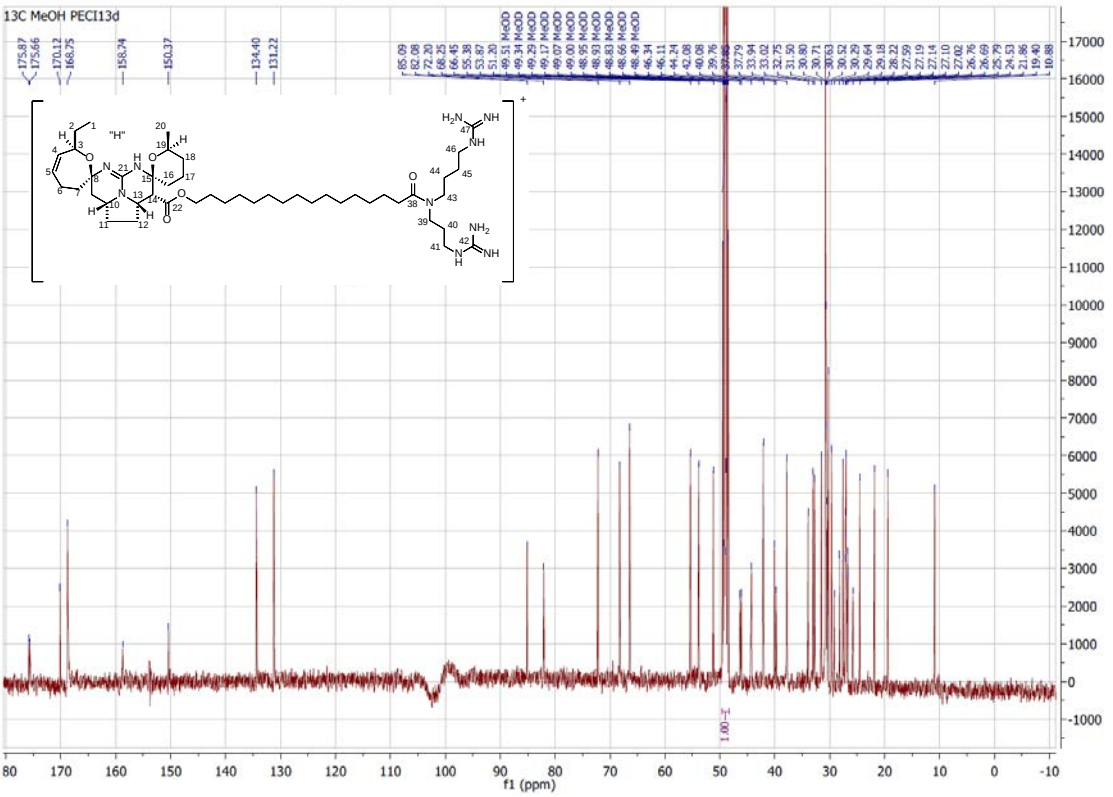
ptilomycaline E (**MU6**)



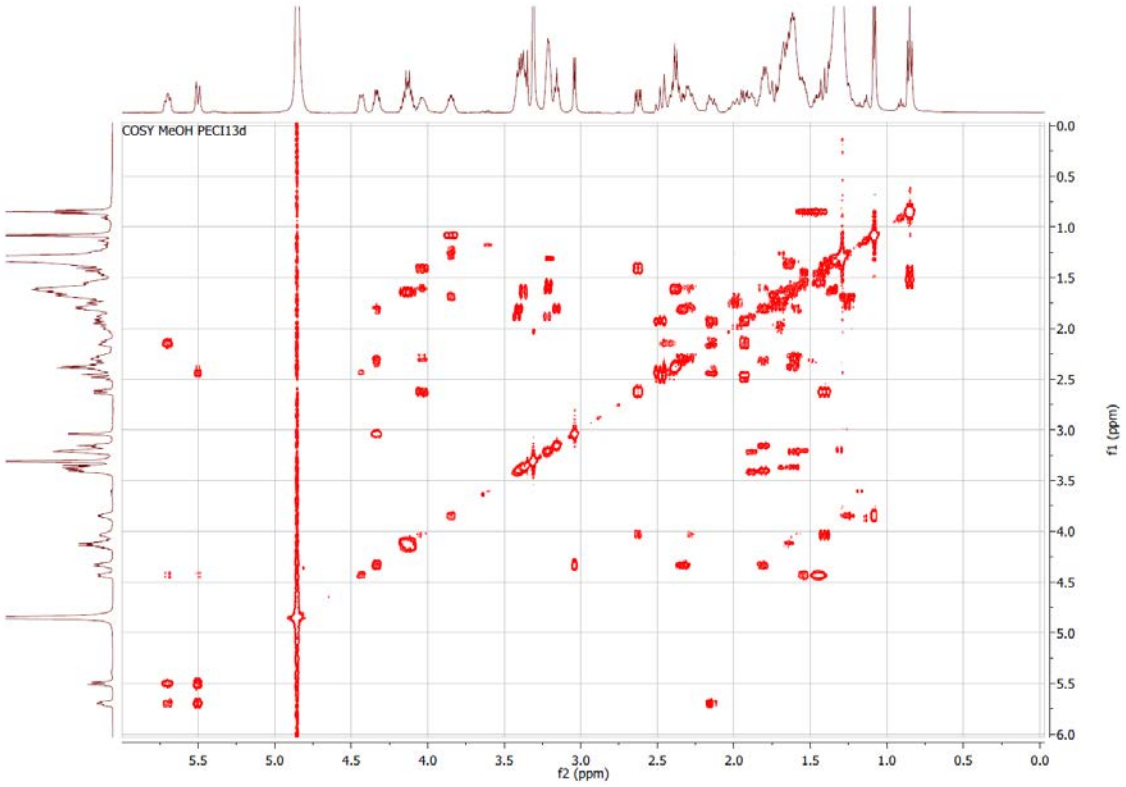
Spectre de Masse Haute Résolution (SMHR-SMHR ; mode ESI$^+$) du métabolite **MU6**.



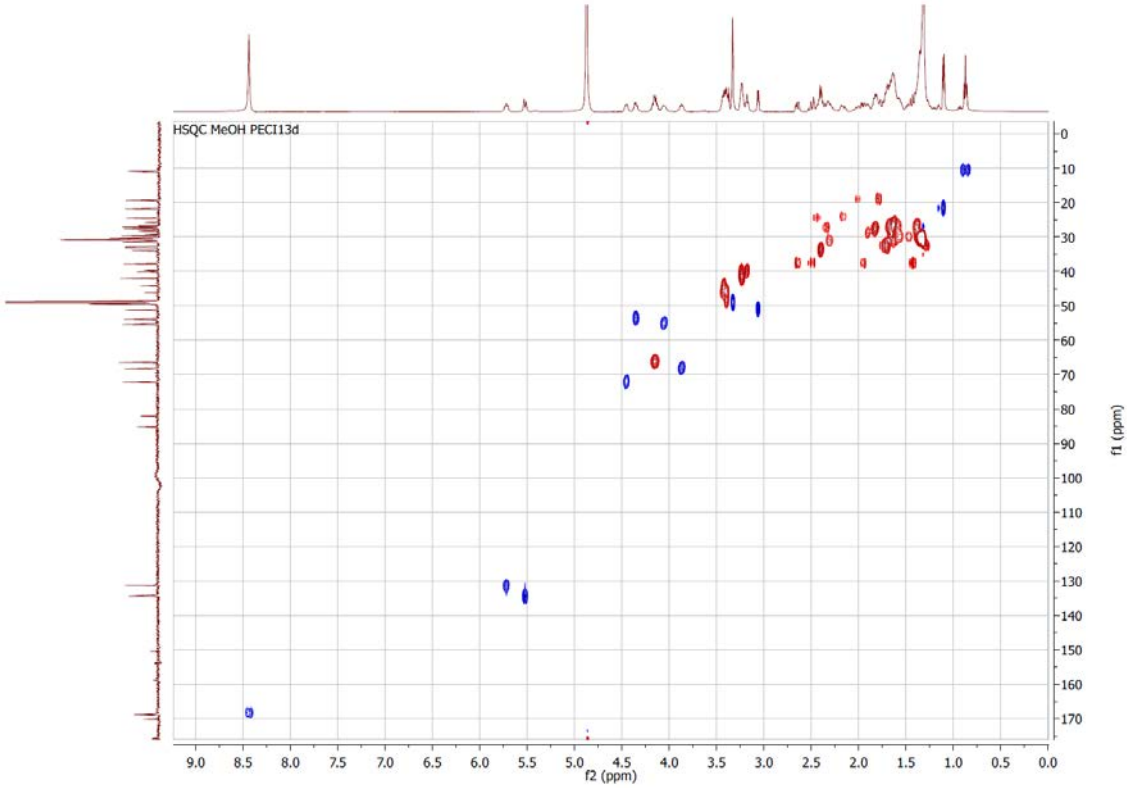
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU6.**



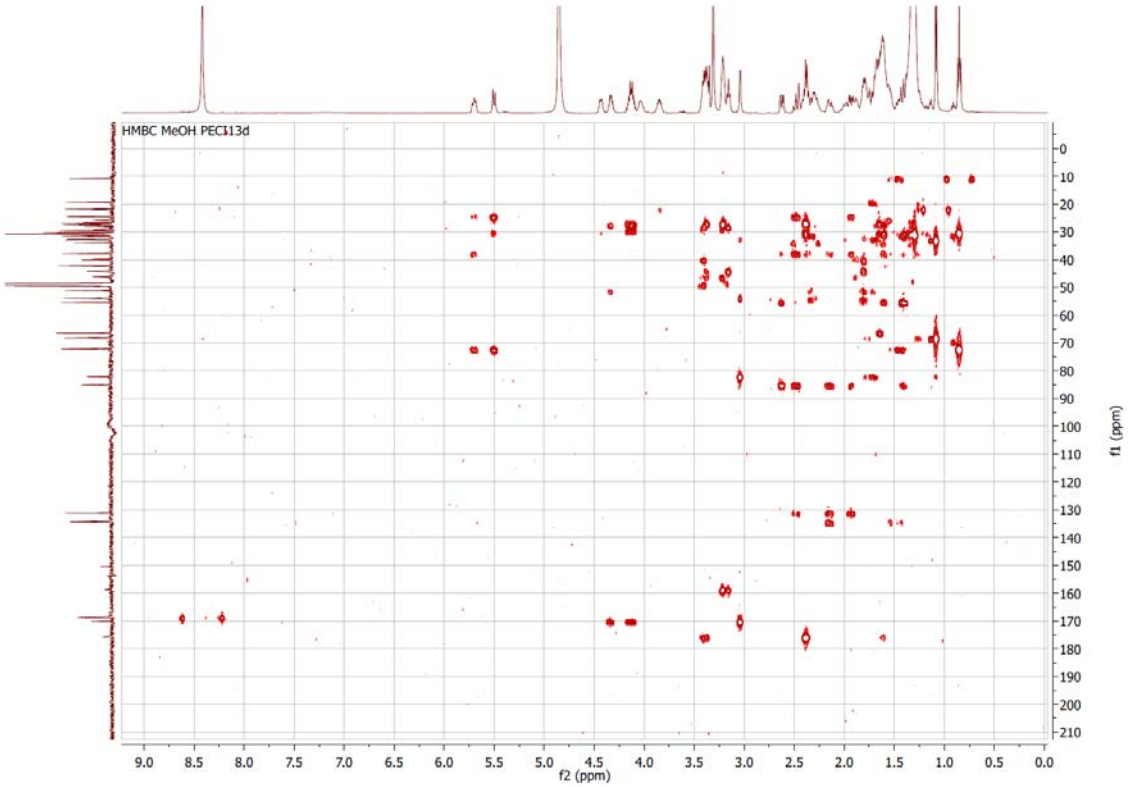
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU6.**



Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU6.**

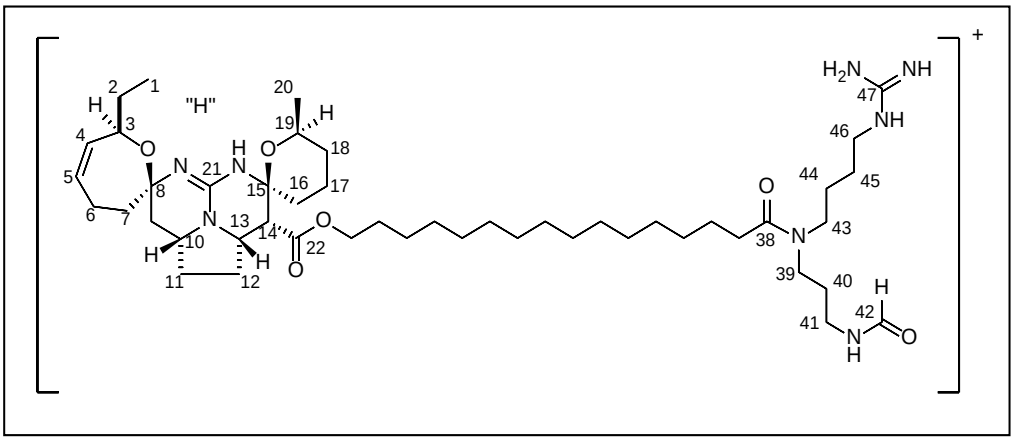


Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU6.**

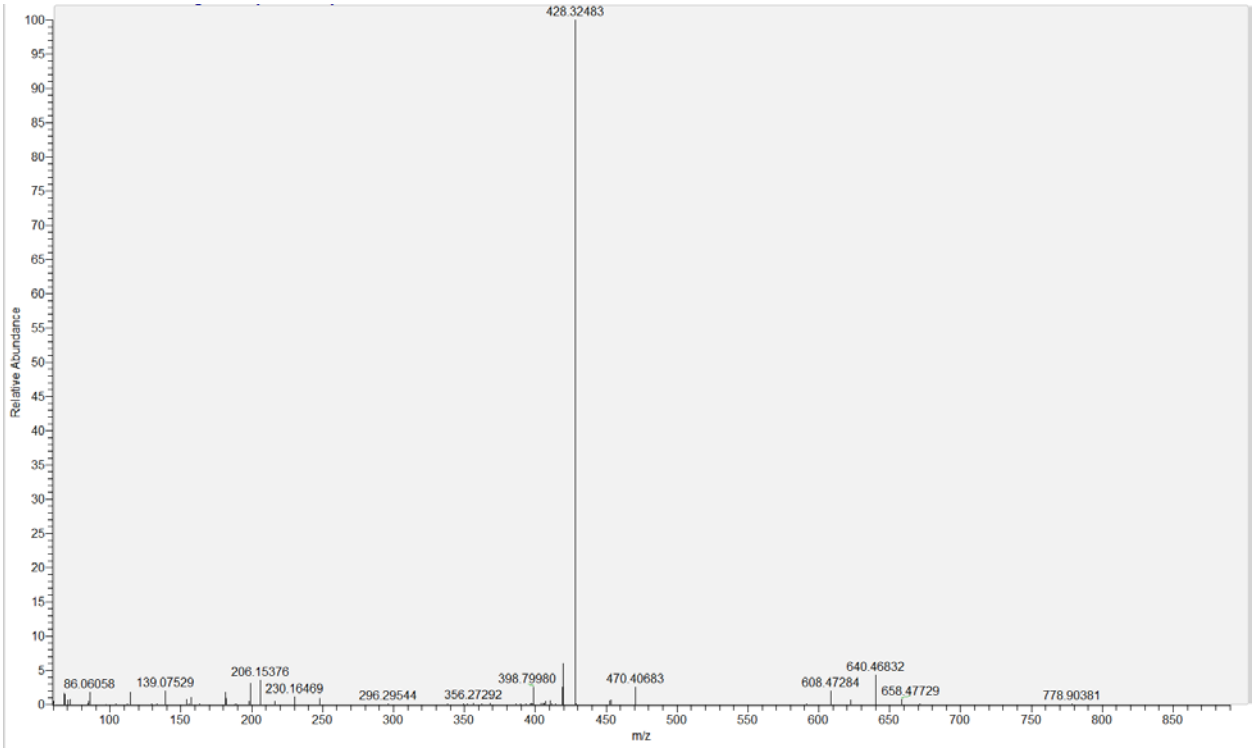


Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU6.**

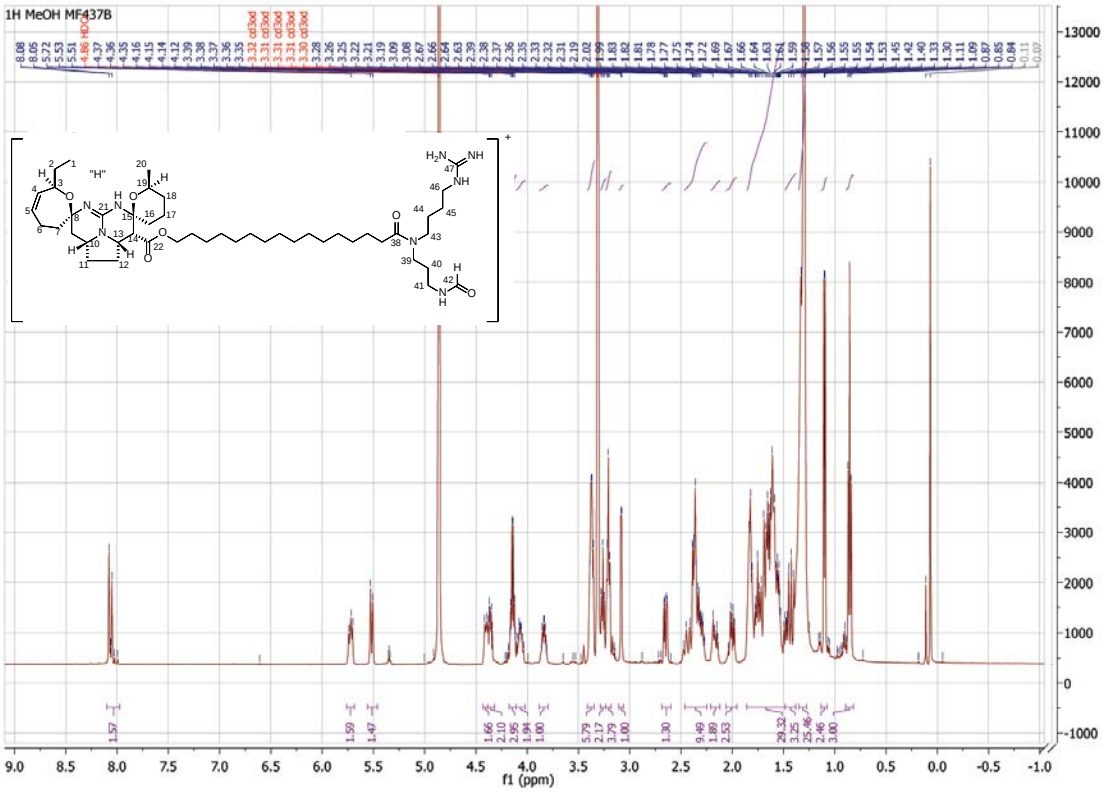
Annexe II.3. Données spectrales du métabolite **MU7**



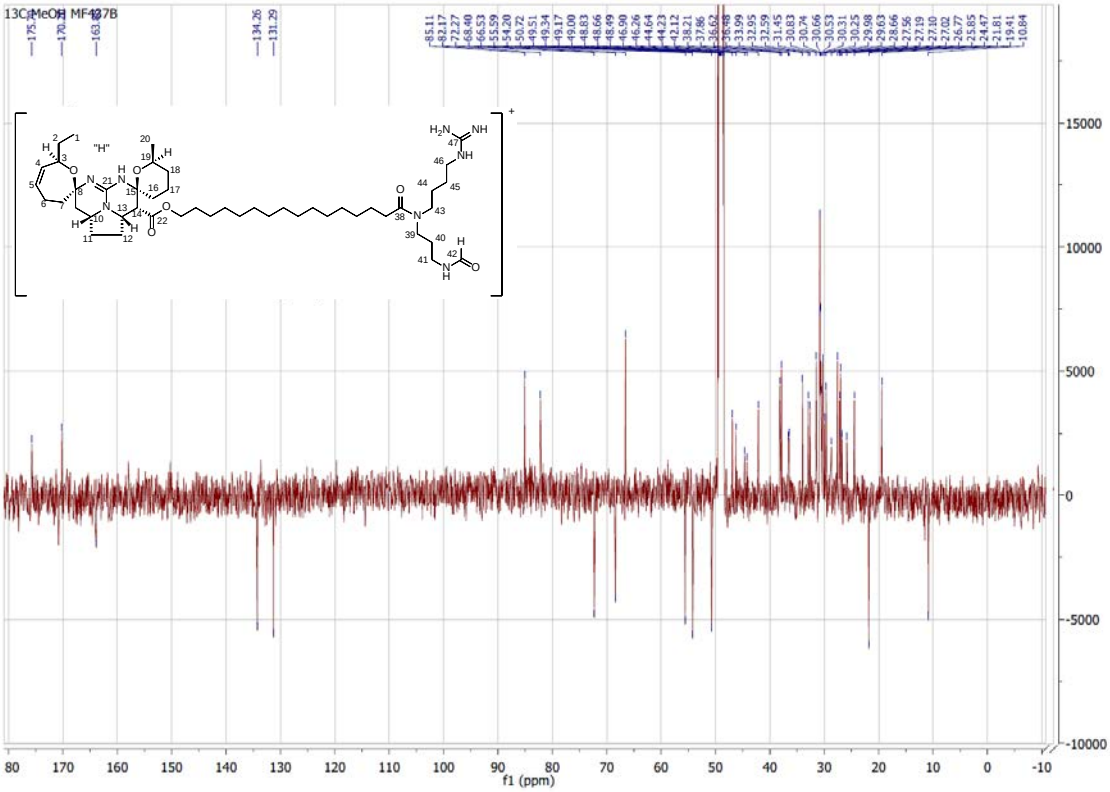
ptilomycaline F (**MU7**)



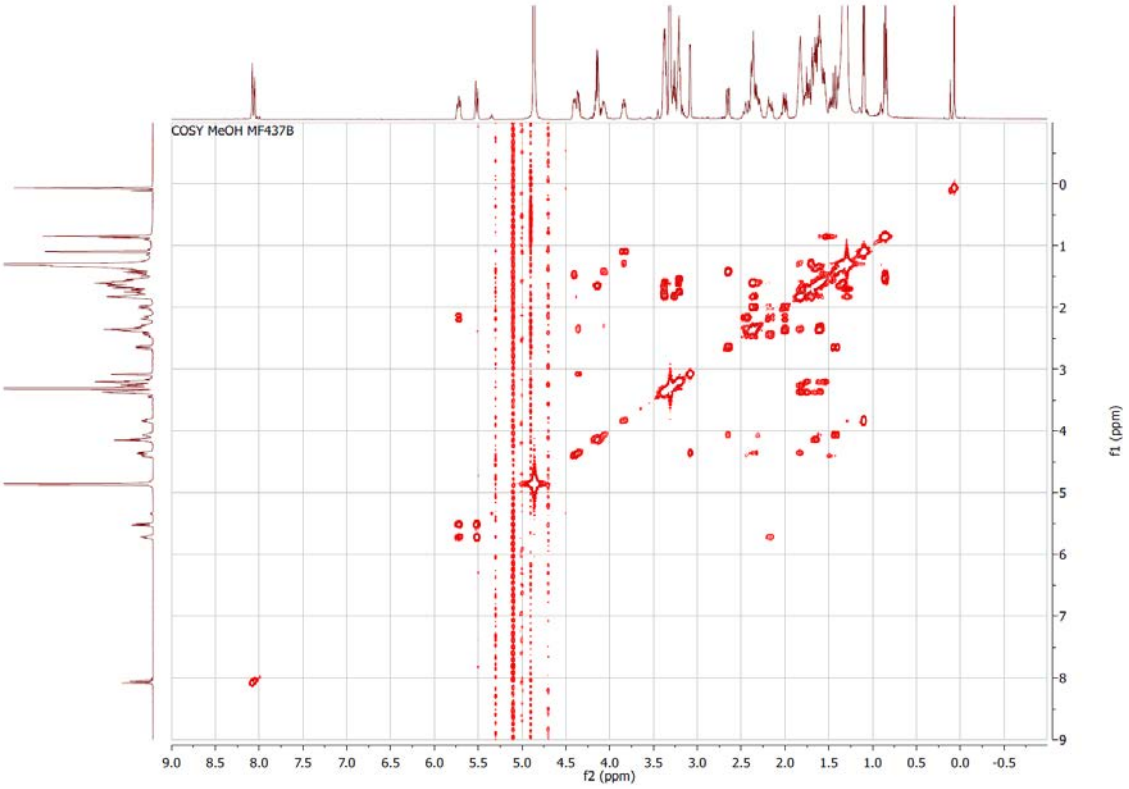
Spectre de Masse Haute Résolution (SMHR-SMHR ; mode ESI$^+$) du métabolite **MU7**.



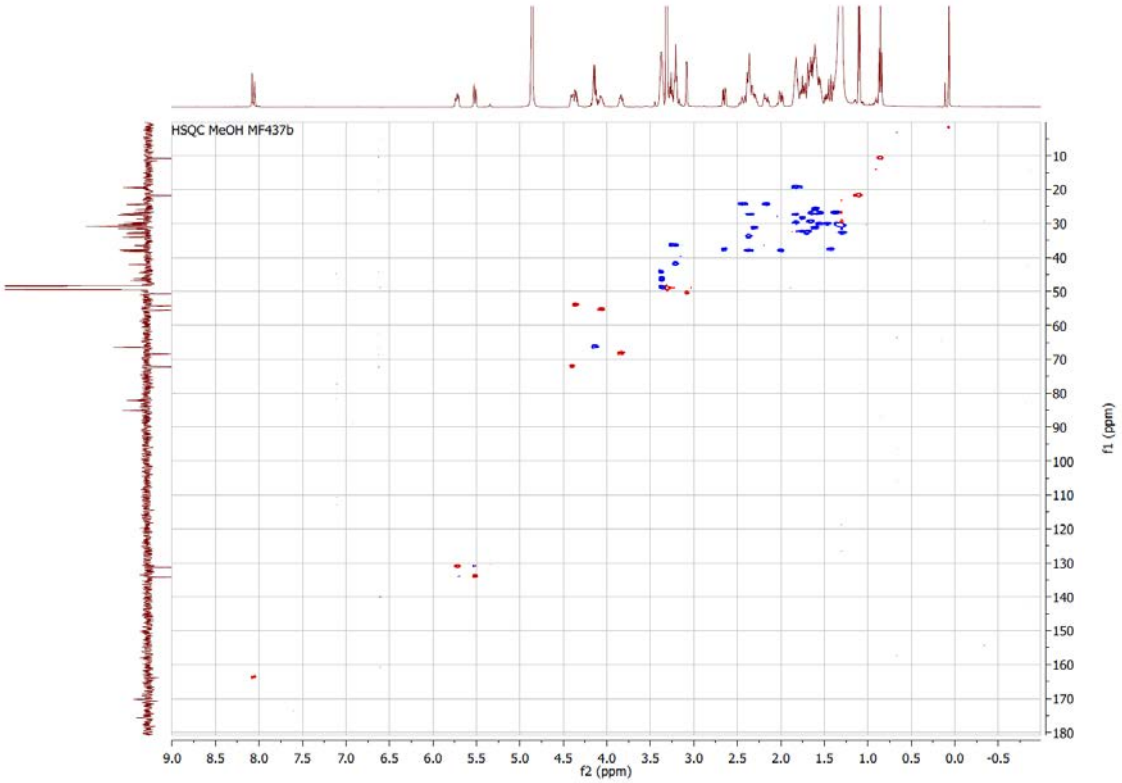
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU7.**



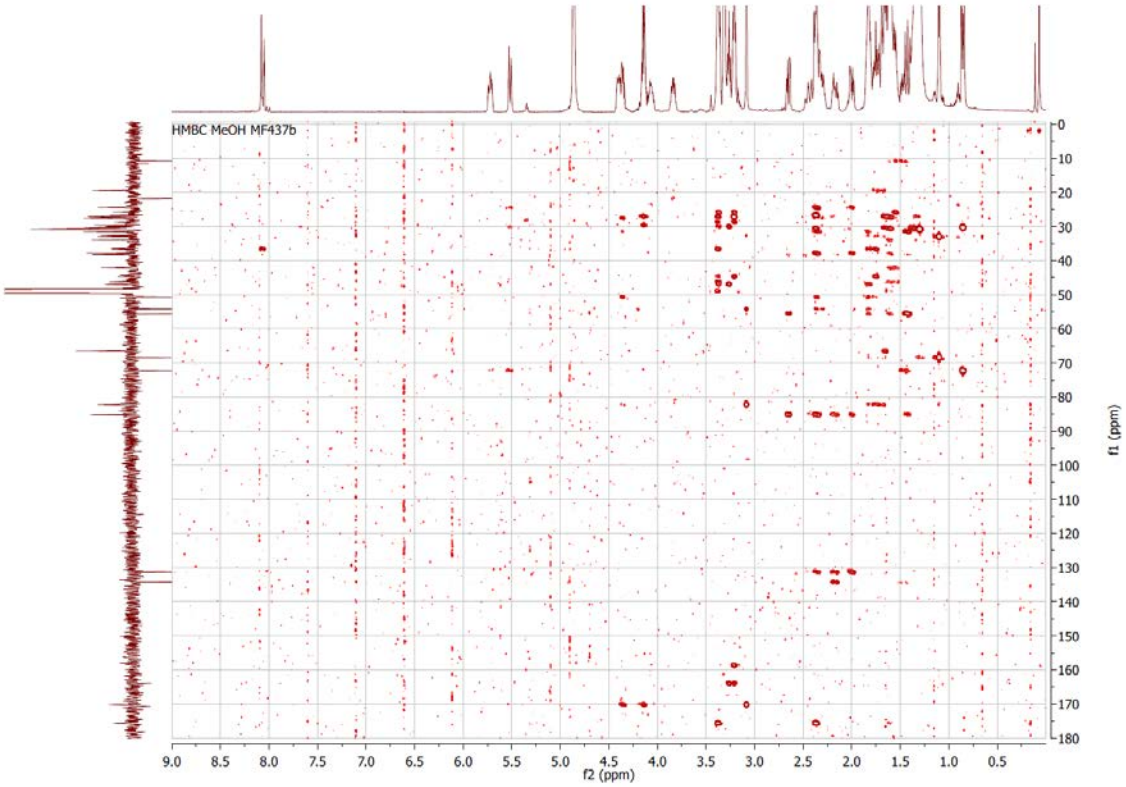
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU7.**



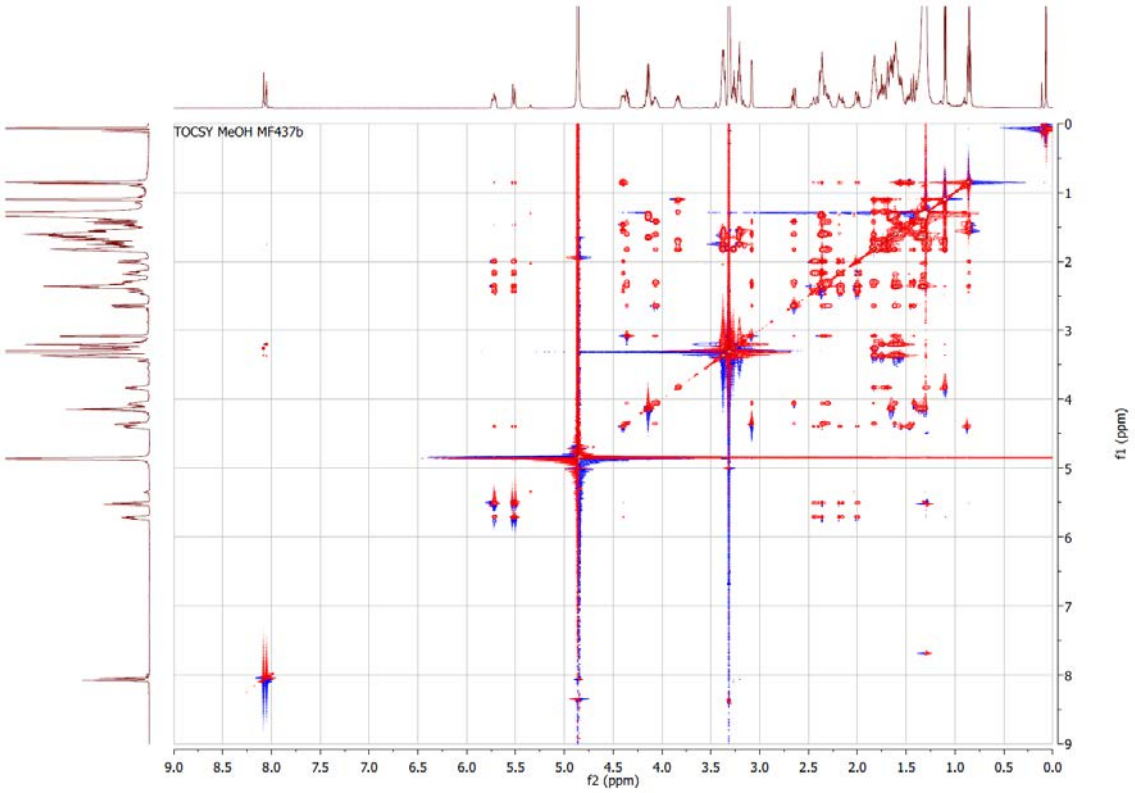
Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU7.**



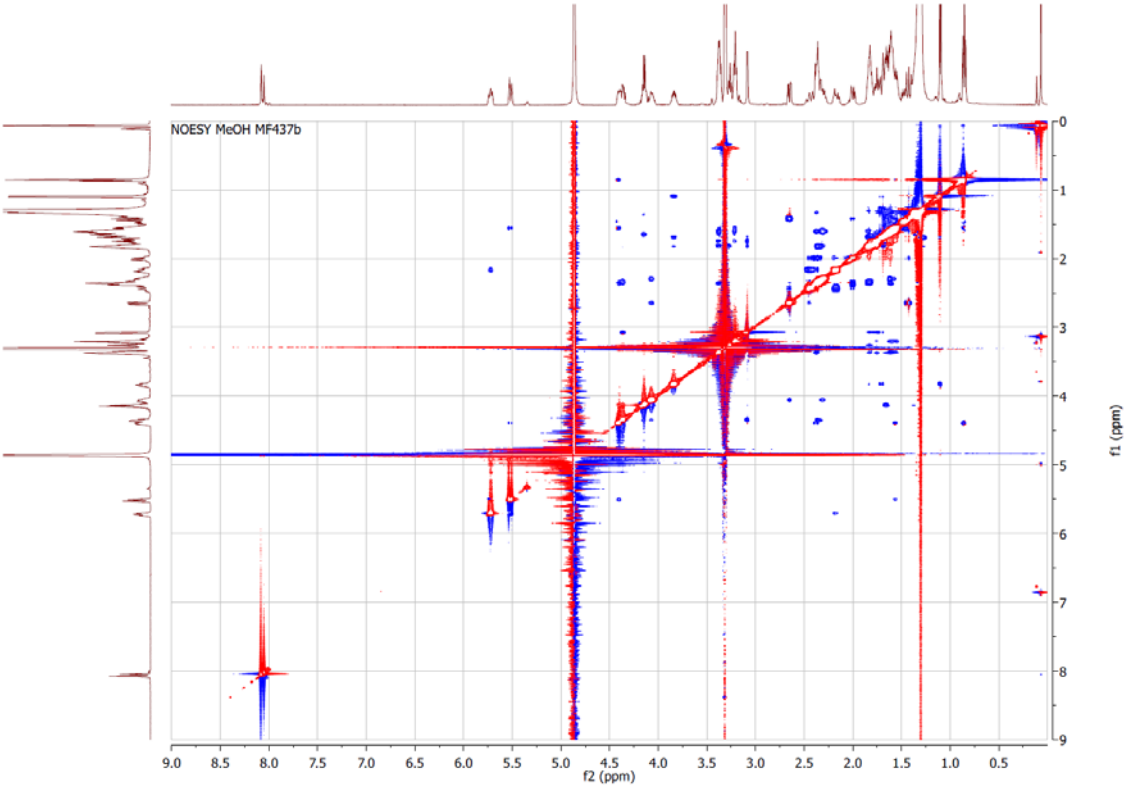
Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU7.**



Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU7.**

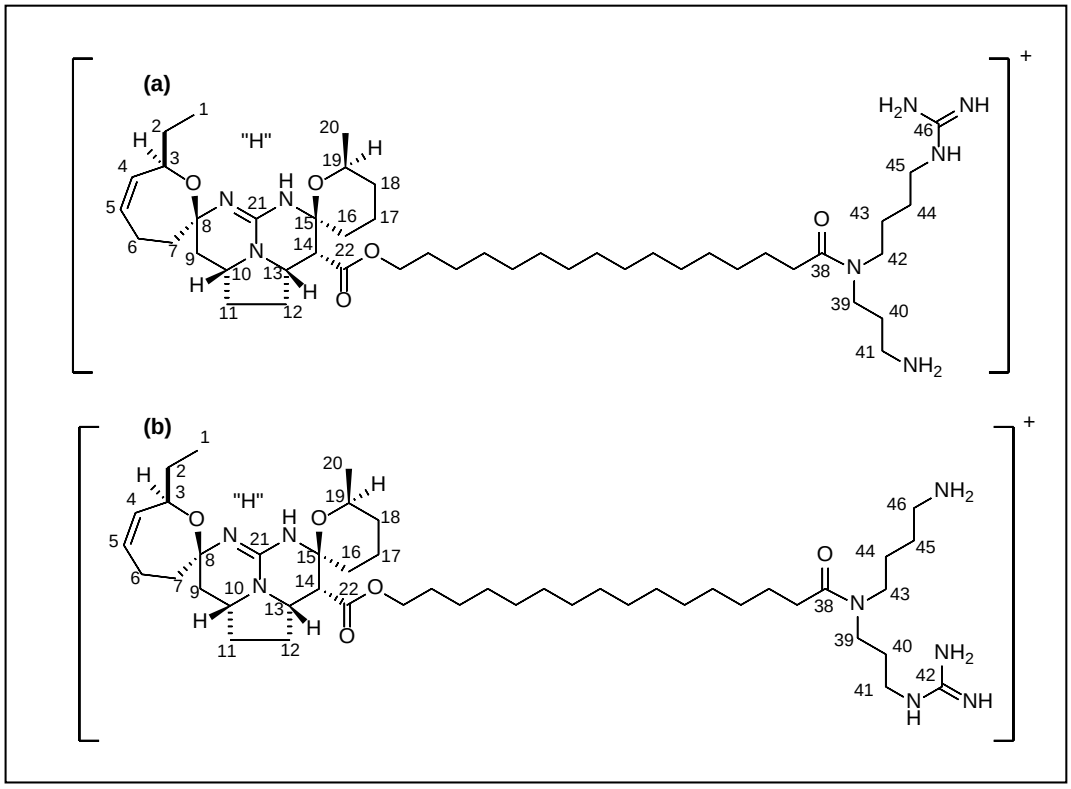


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H TOCSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**

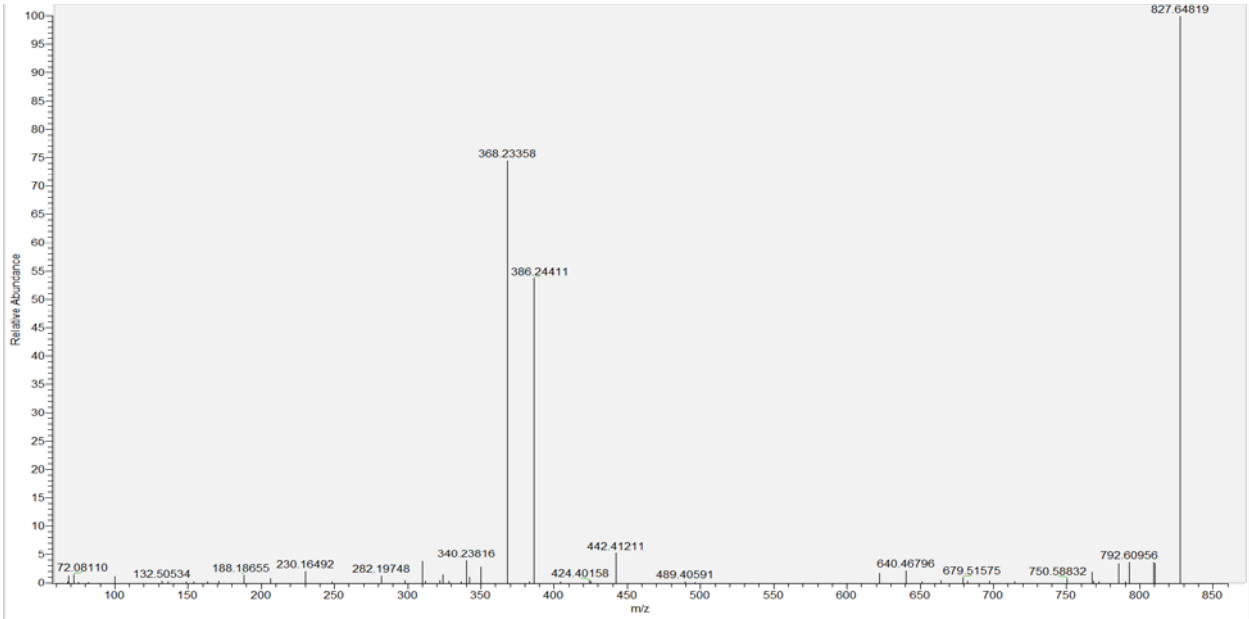


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H NOESY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **MU5.**

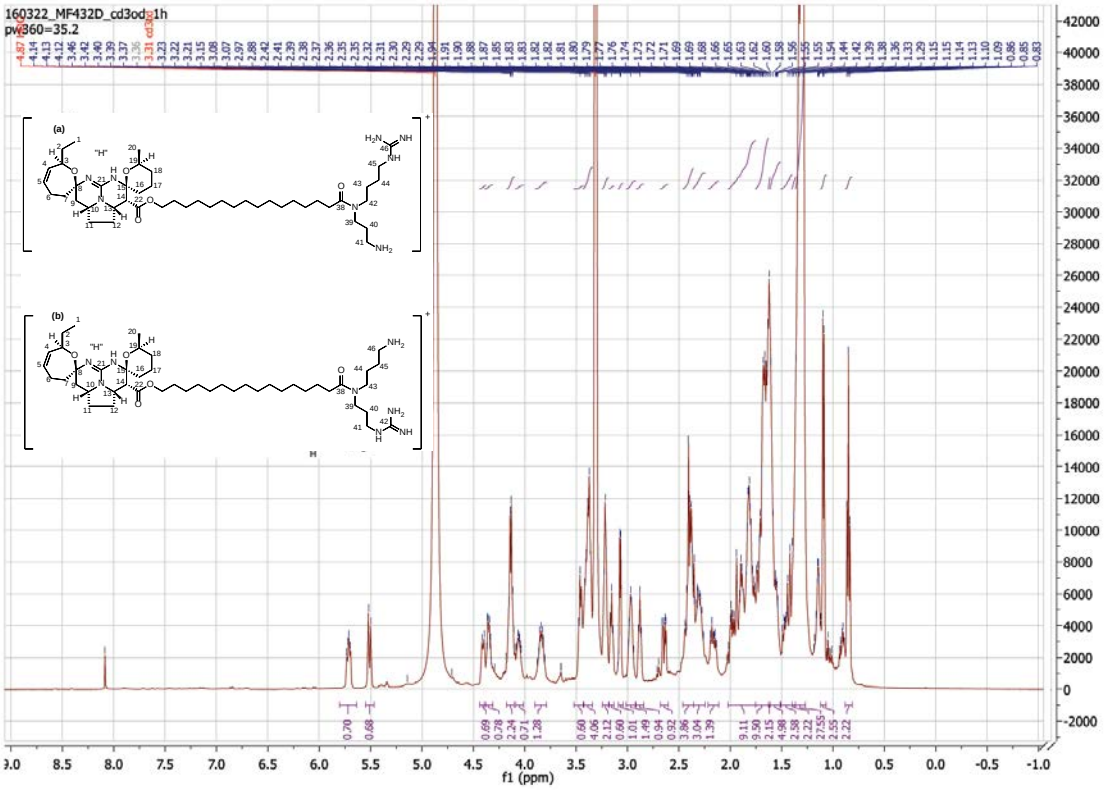
Annexe II.4. Données spectrales des métabolites **MU8** et **MU9**



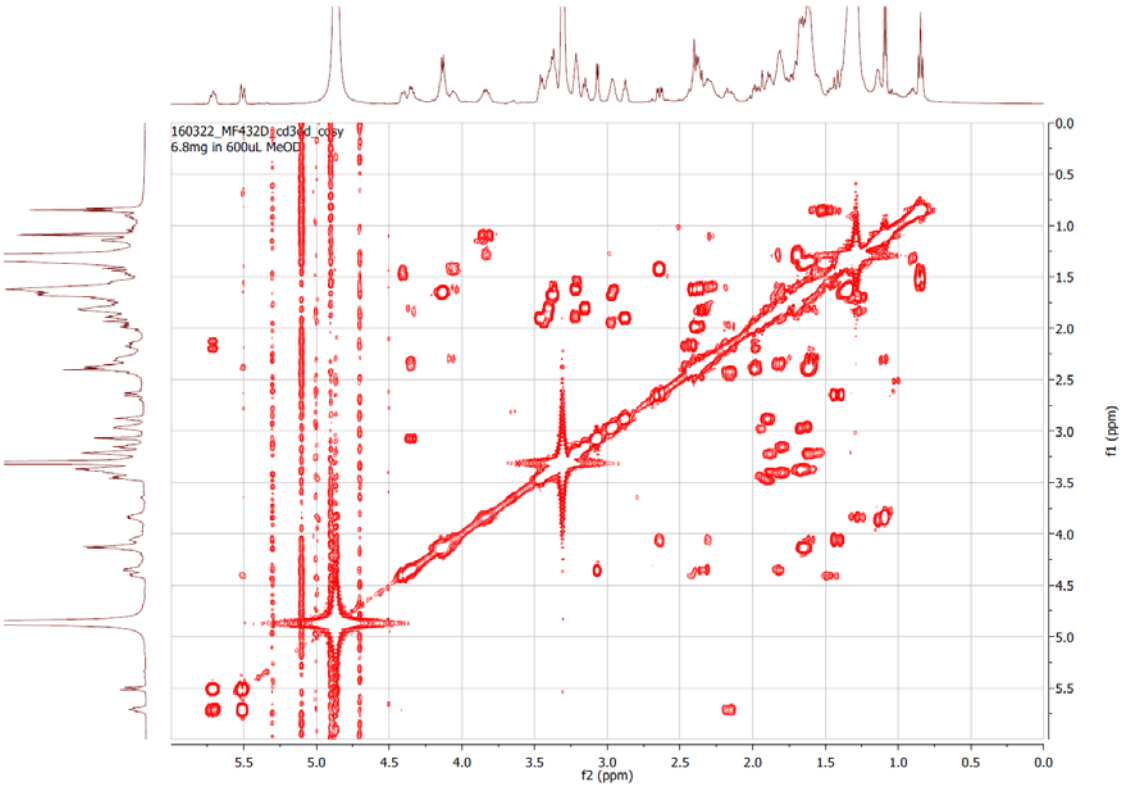
ptilomycaline G (**MU8 ; a**) et ptilomycaline H (**MU9 ; b**)



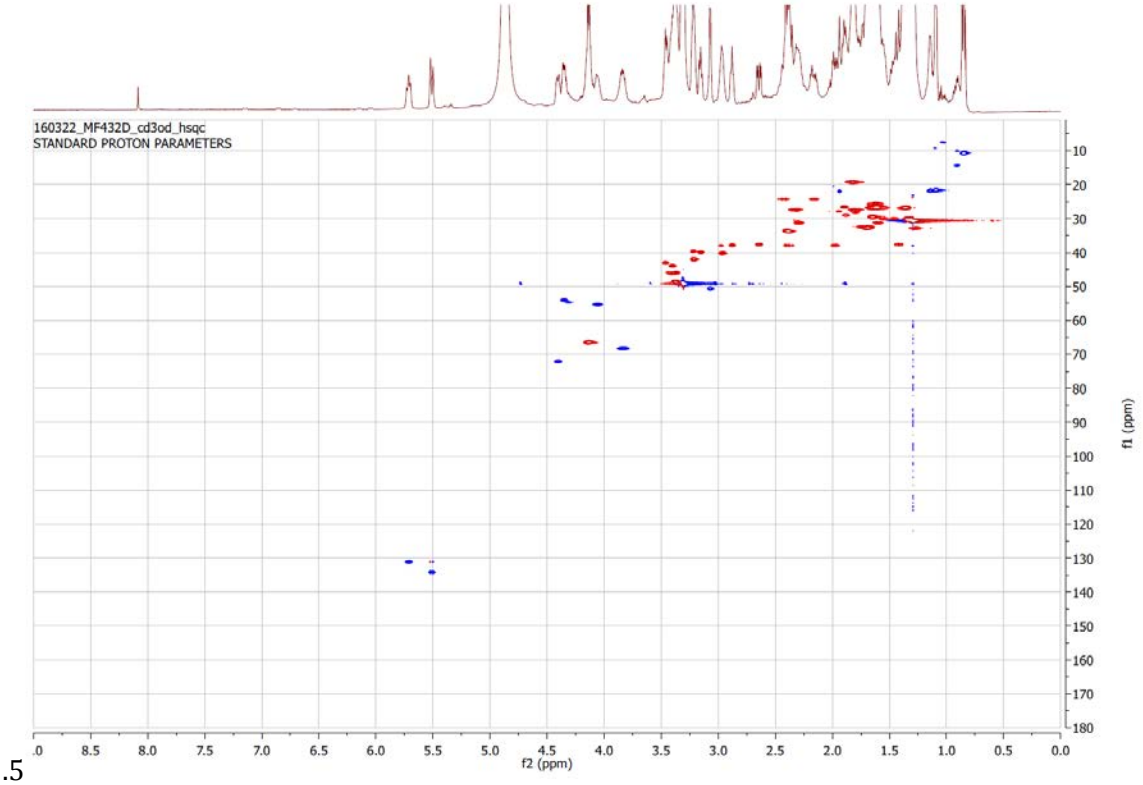
Spectre de Masse Haute Résolution (SMHR-SMHR ; mode ESI$^+$) des métabolites **MU8** et **MU9**.



Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.

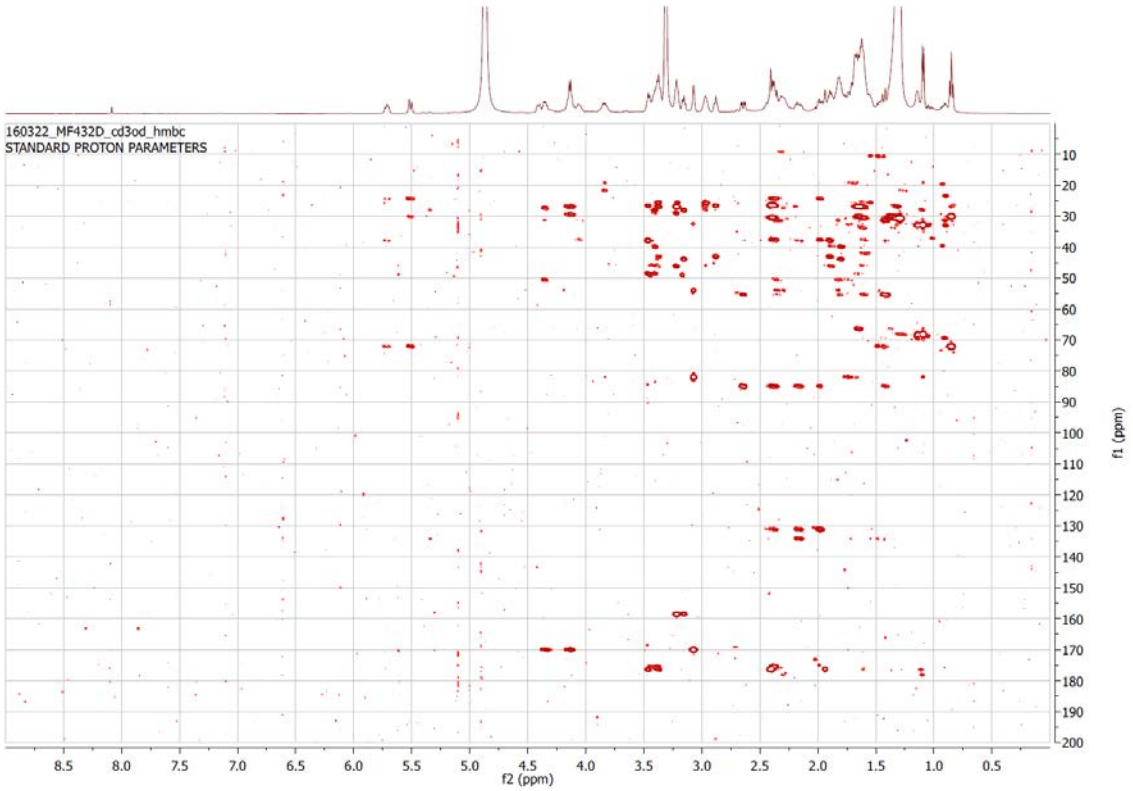


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.

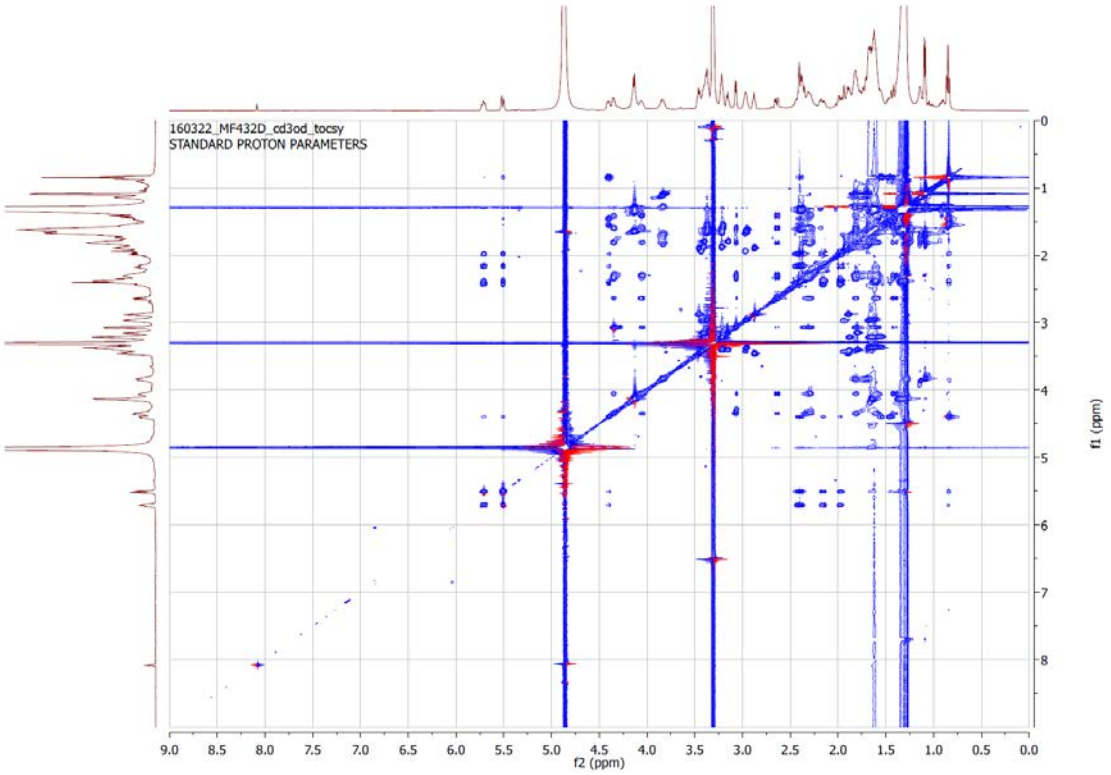


.5

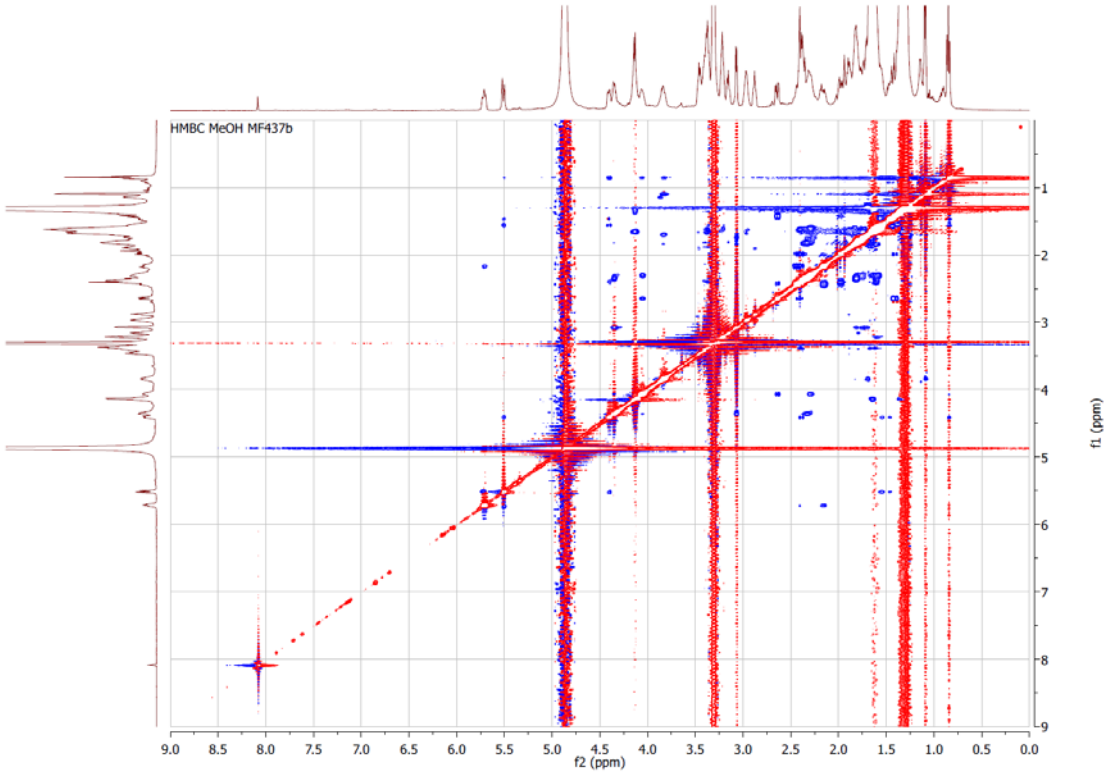
Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.



Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.



Spectre RMN ^{1}H-^{1}H TOCSY (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.

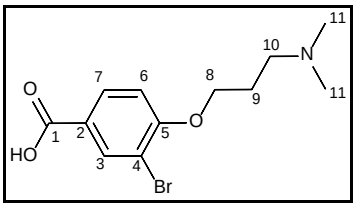


Spectre RMN ^{1}H-^{1}H NOESY (CD_3OD, 500 MHz) des métabolites **MU8** et **MU9**.

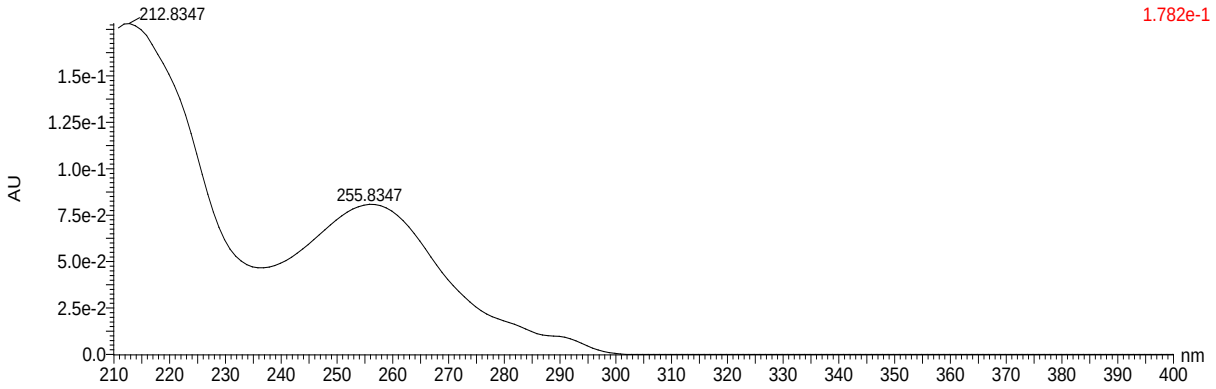
Annexe III

Données spectrales des métabolites de structures nouvelles isolés de *Amphimedon* sp.

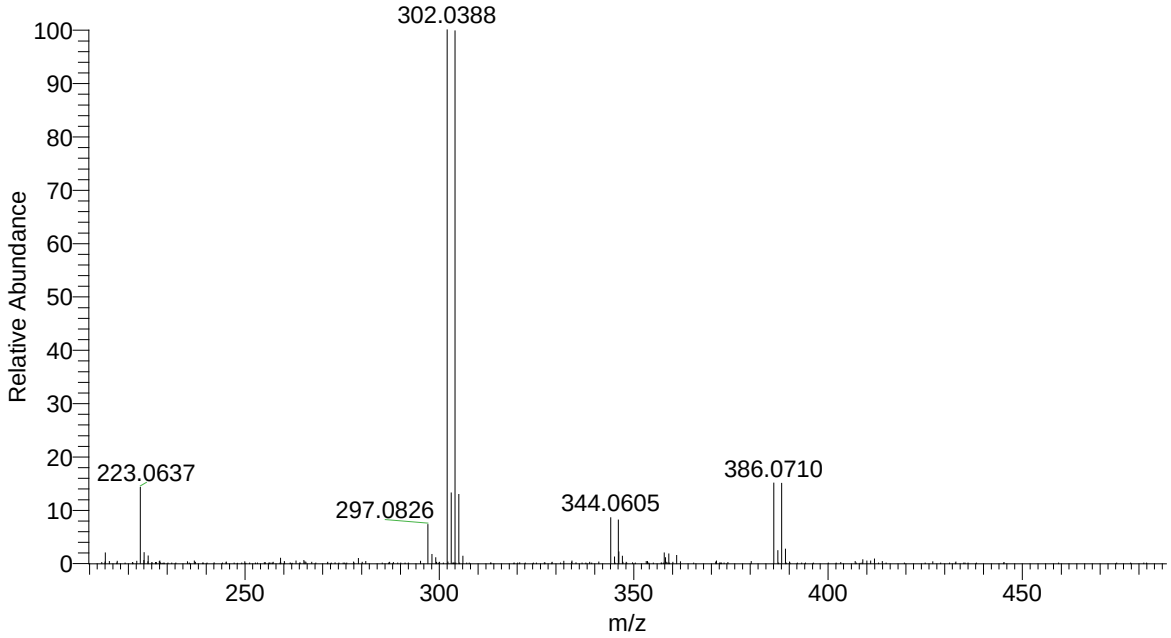
Annexe III.1. Données spectrales du métabolite **AS2**



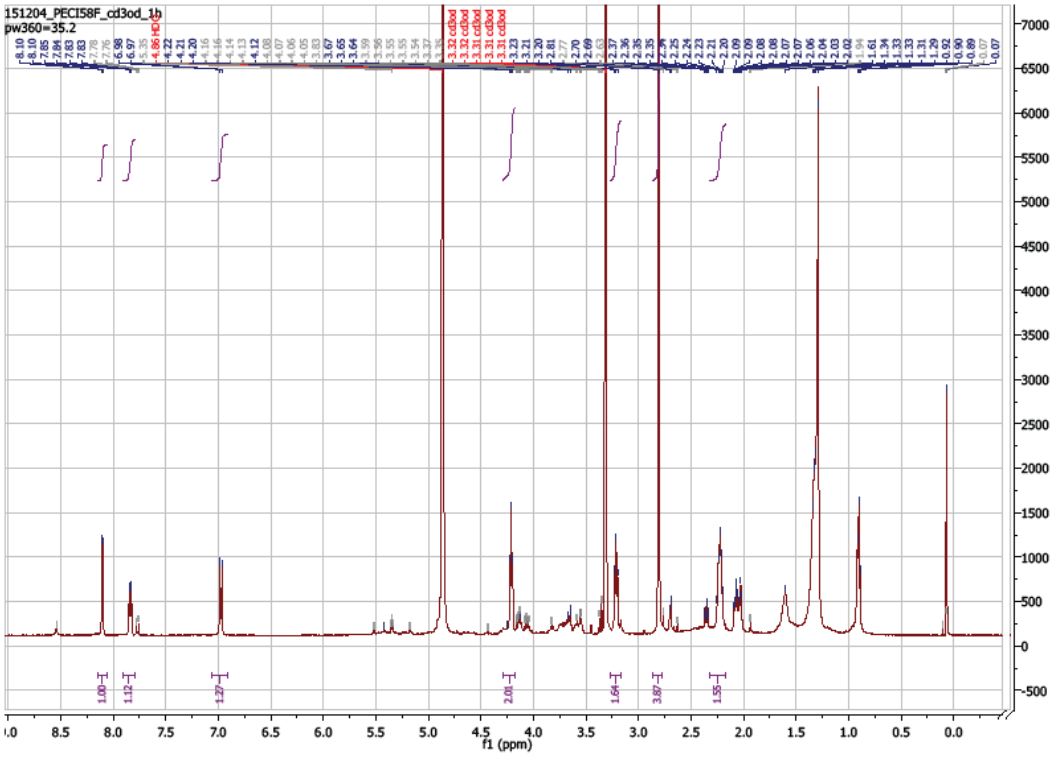
acide amphimedonoïque **(AS2)**



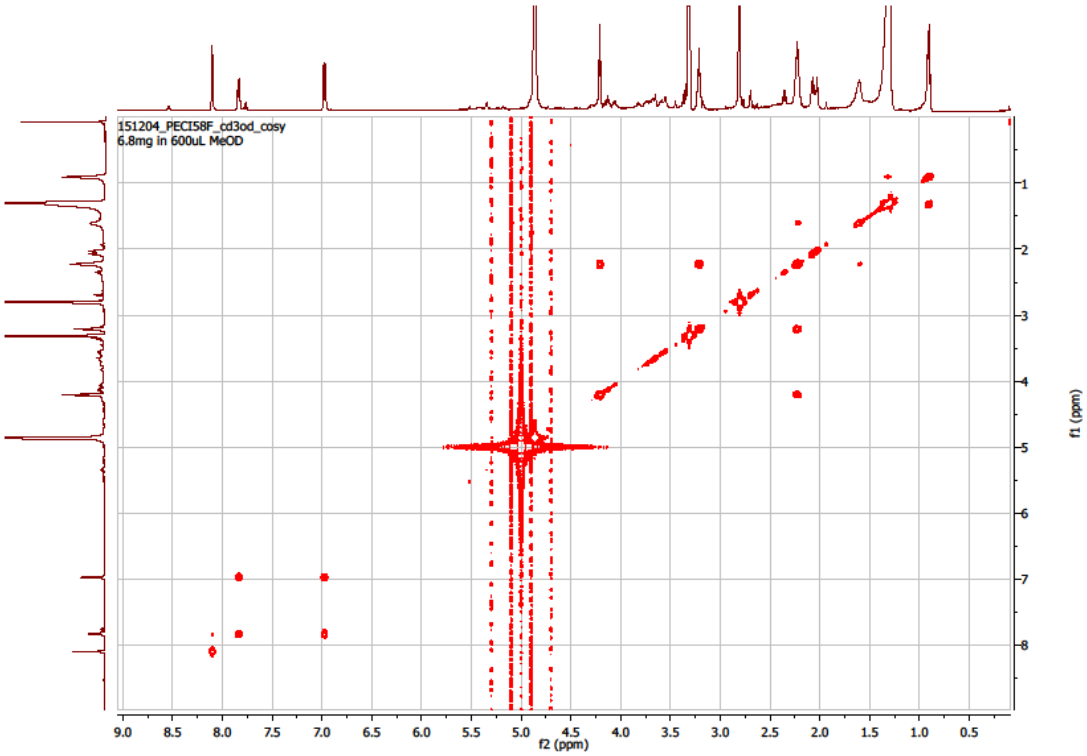
Spectre UV du métabolite **AS2.**



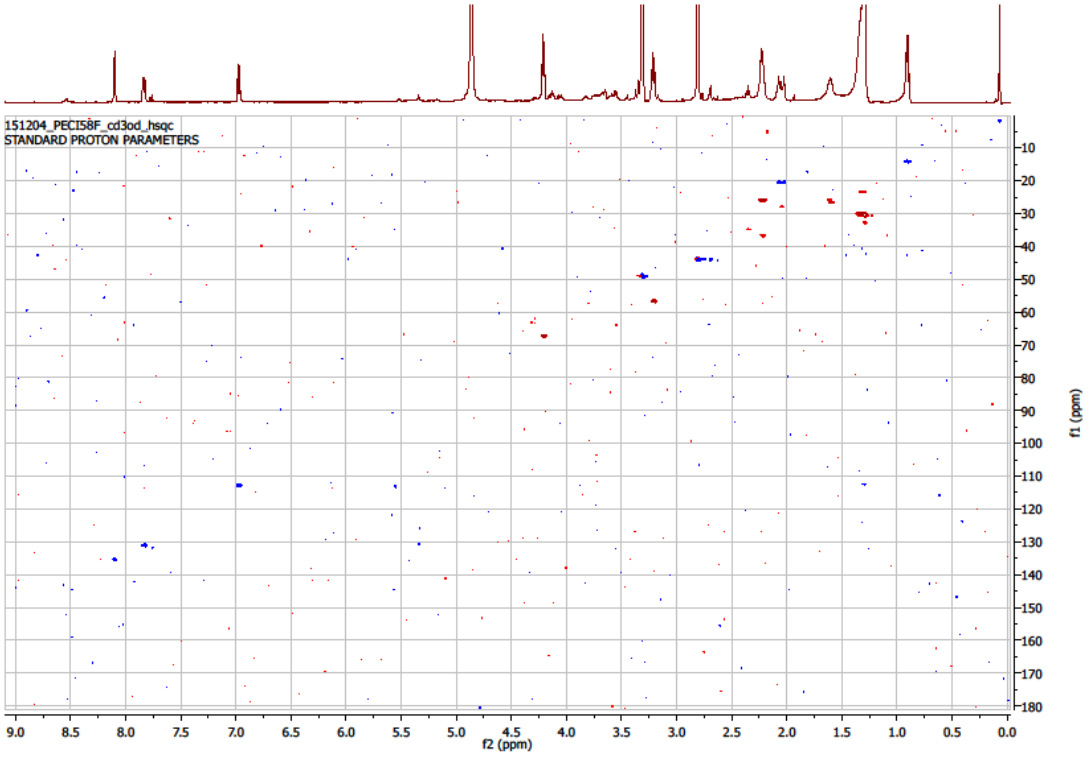
Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^+$) du métabolite **AS2.**



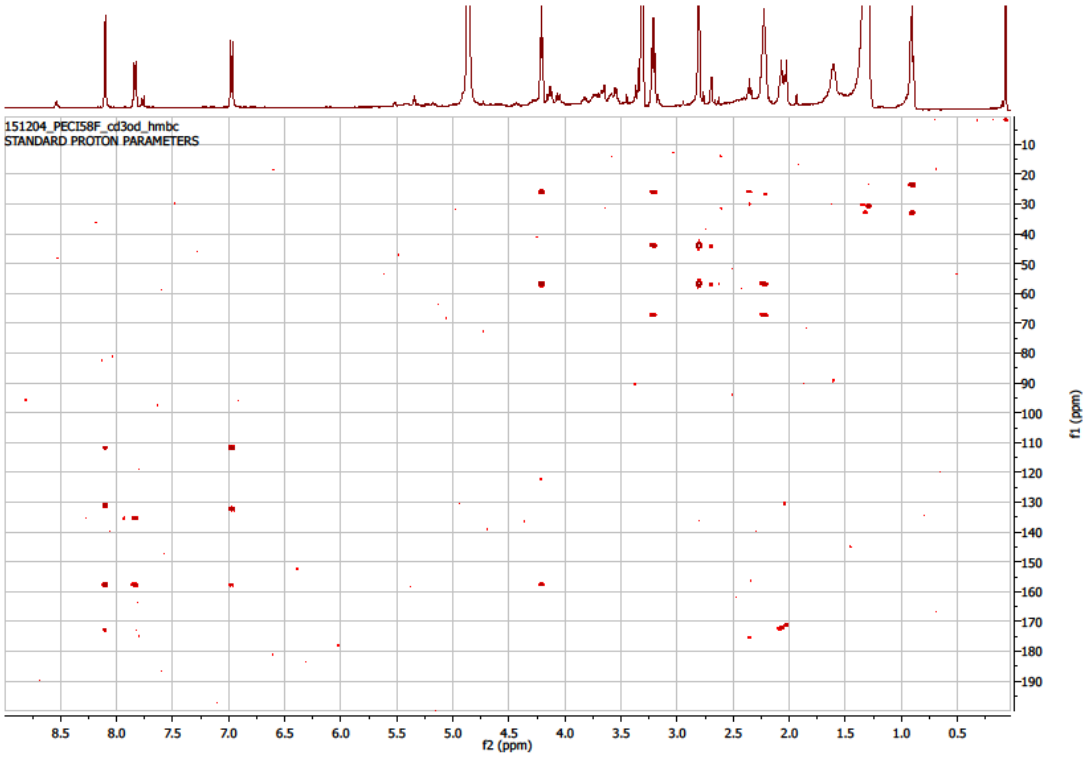
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS2.**



Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS2.**

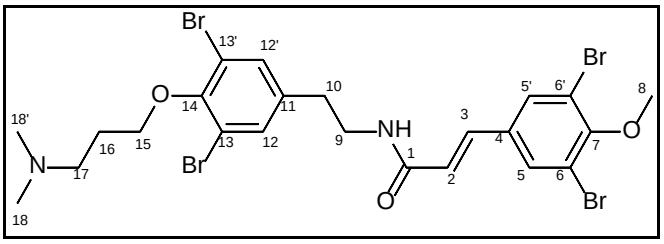


Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS2.**

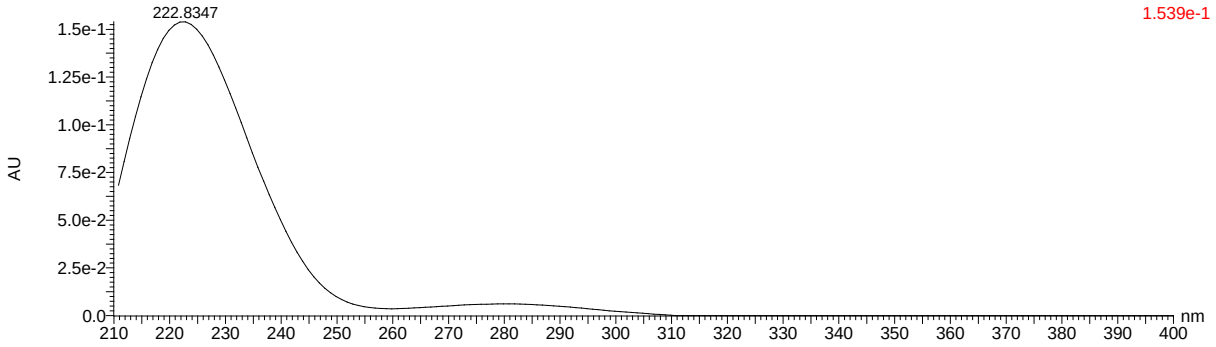


Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS2.**

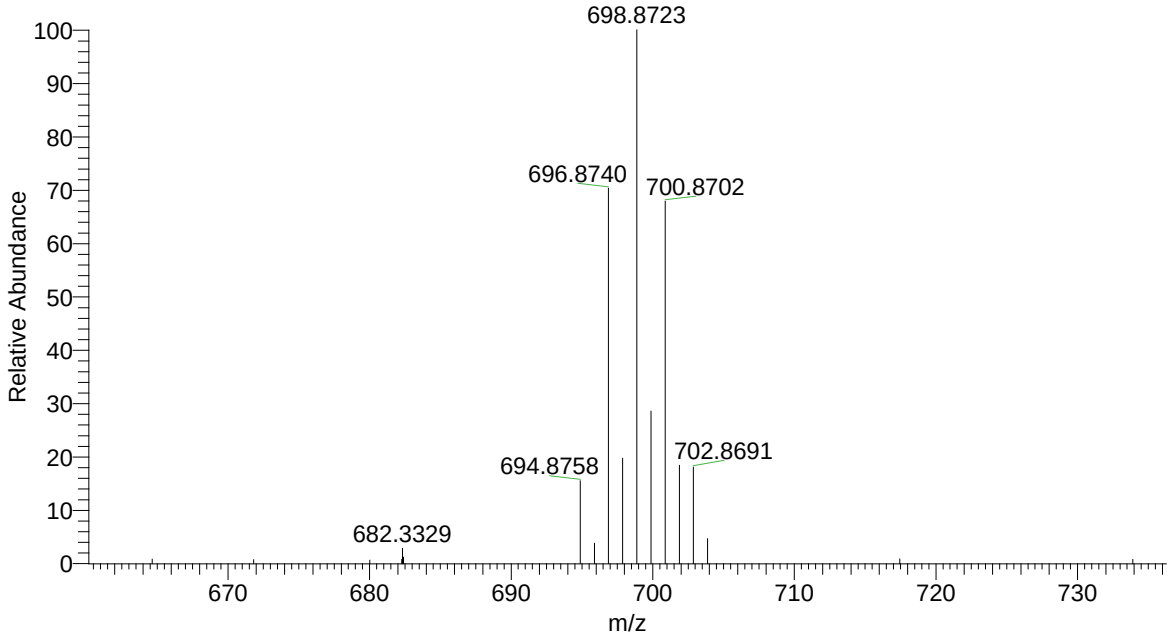
Annexe III.2. Données spectrales du métabolite **AS3**



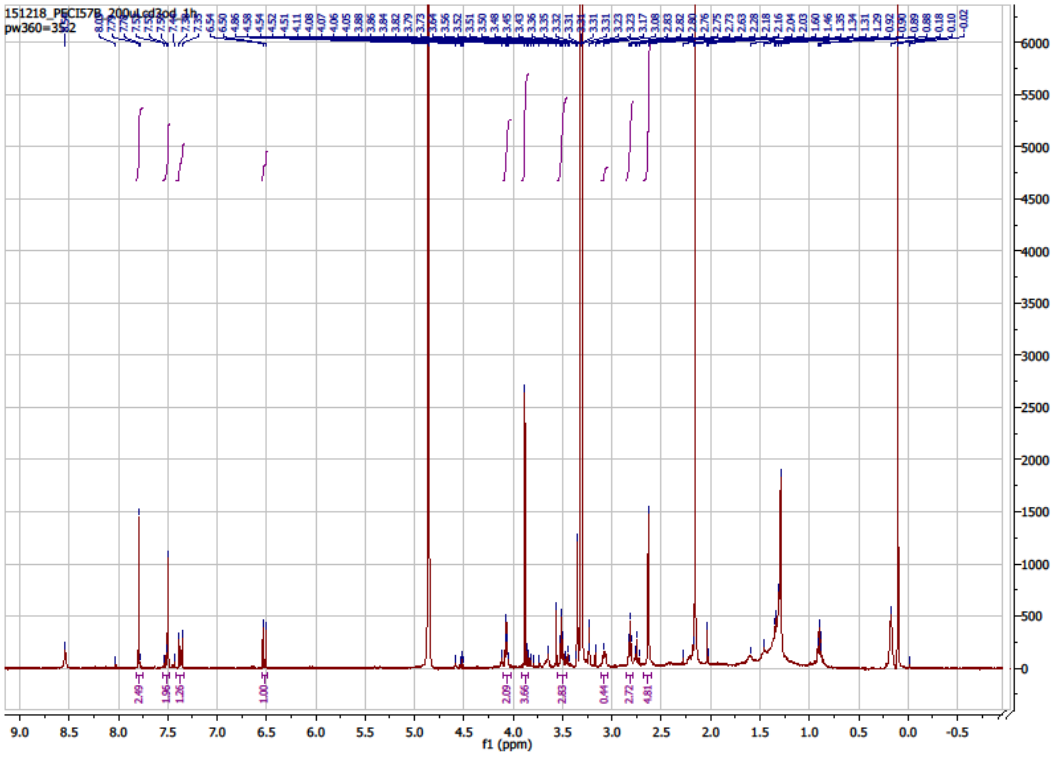
psammaplysène E **(AS3)**



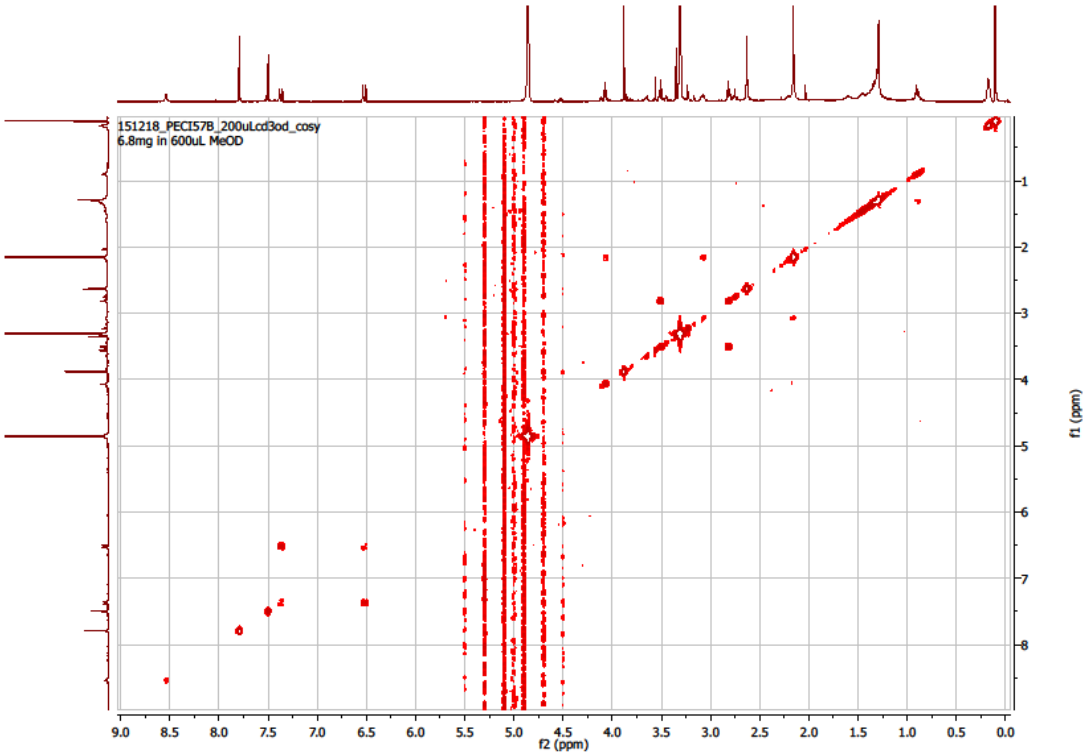
Spectre UV du métabolite **AS3.**



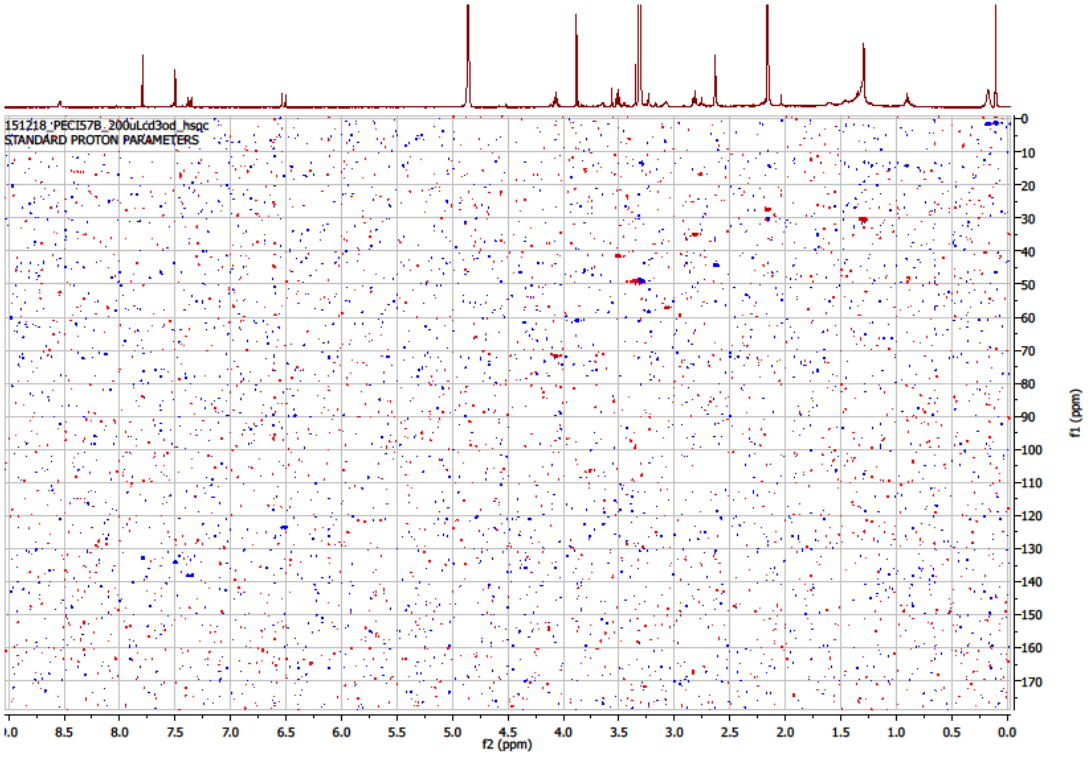
Spectre de Masse Haute Résolution (mode ESI$^+$) du métabolite **AS3.**



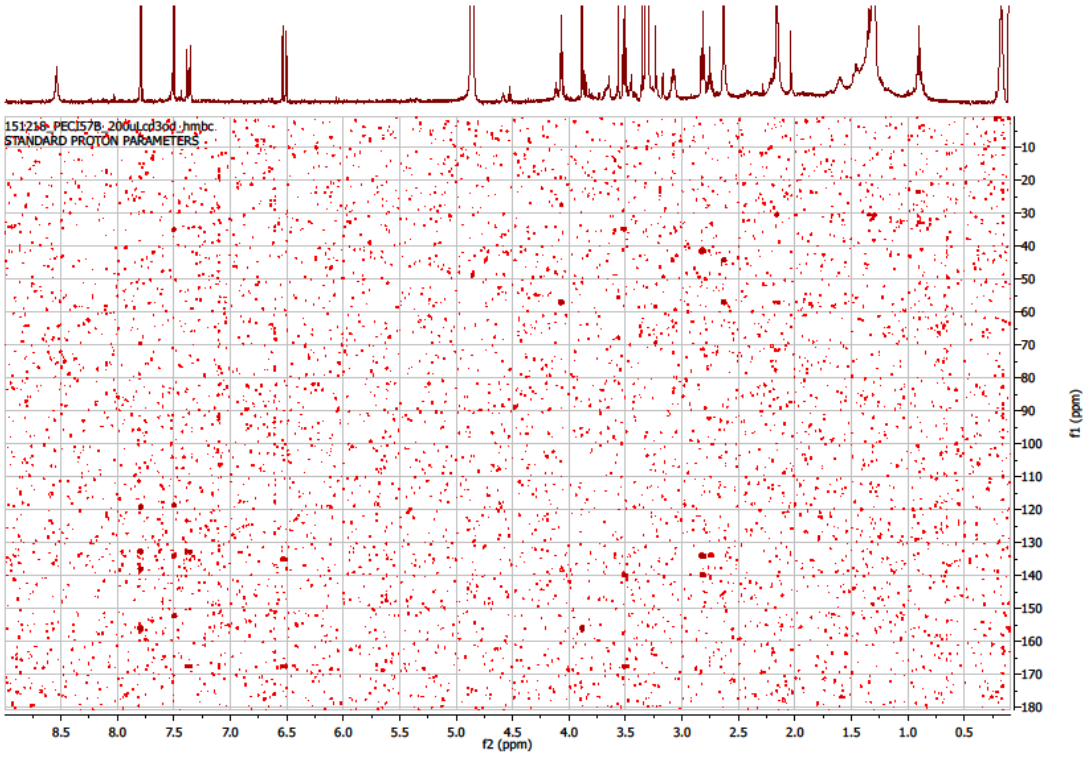
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS3.**



Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS3.**



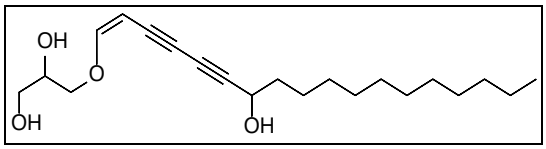
Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS3.**



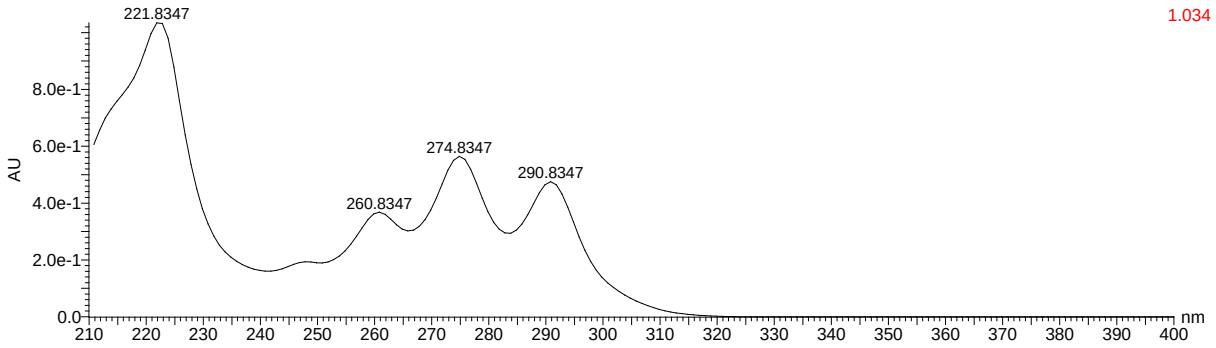
Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AS3.**

Annexe IV

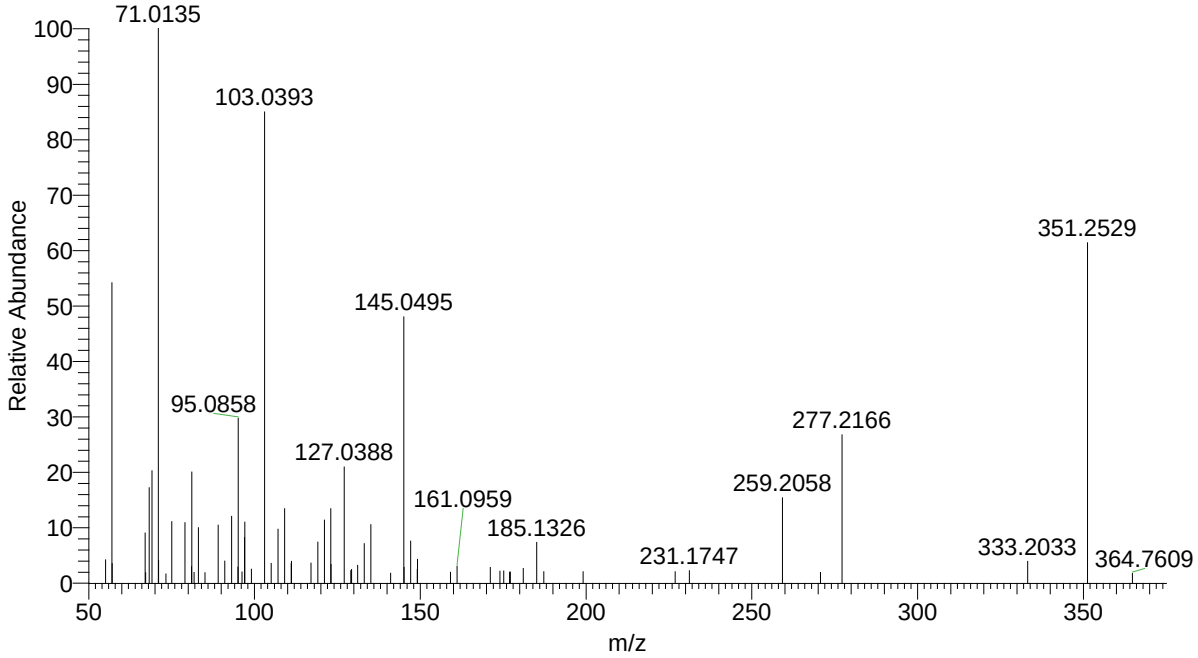
Données spectrales du métabolite de structure nouvelle isolé d'*Aulospongus gardineri*



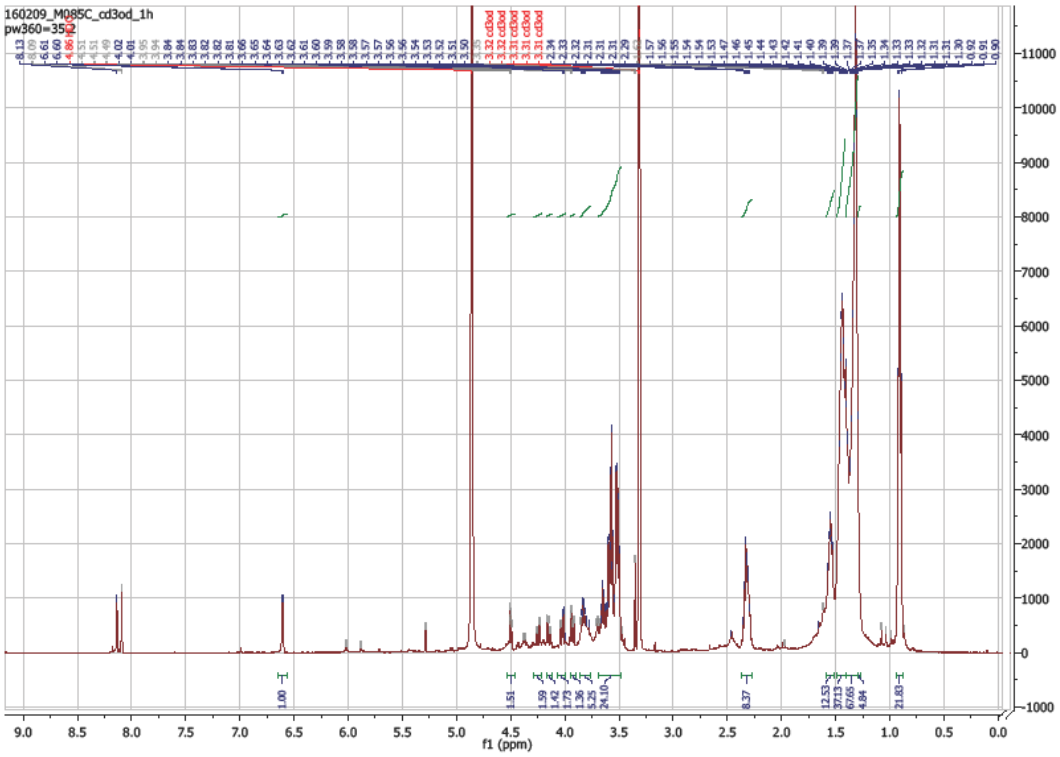
(*Z*)-3-((7-hydroxyoctadéca-1-én-3,5-diyn-1-yl)oxy)propane-1,2-diol **(AG3)**



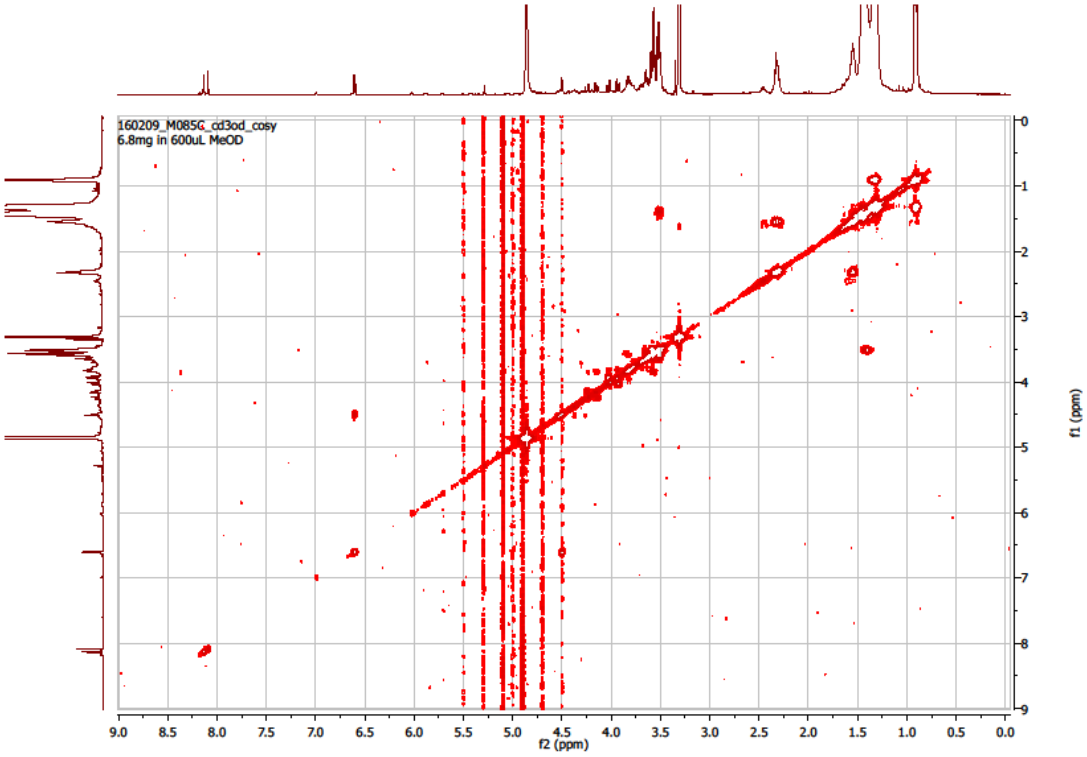
Spectre UV du métabolite **AG3.**



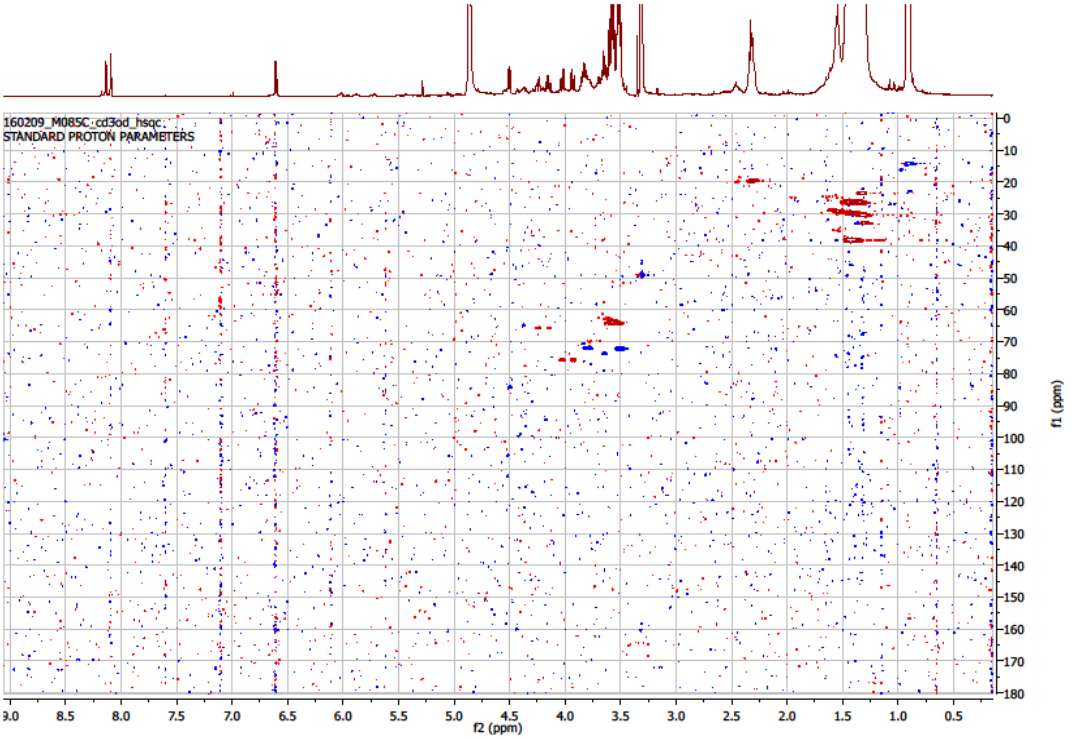
Spectre de Masse Haute Résolution (SMHR-SMHR ; mode ESI$^+$) du métabolite **AG3.**



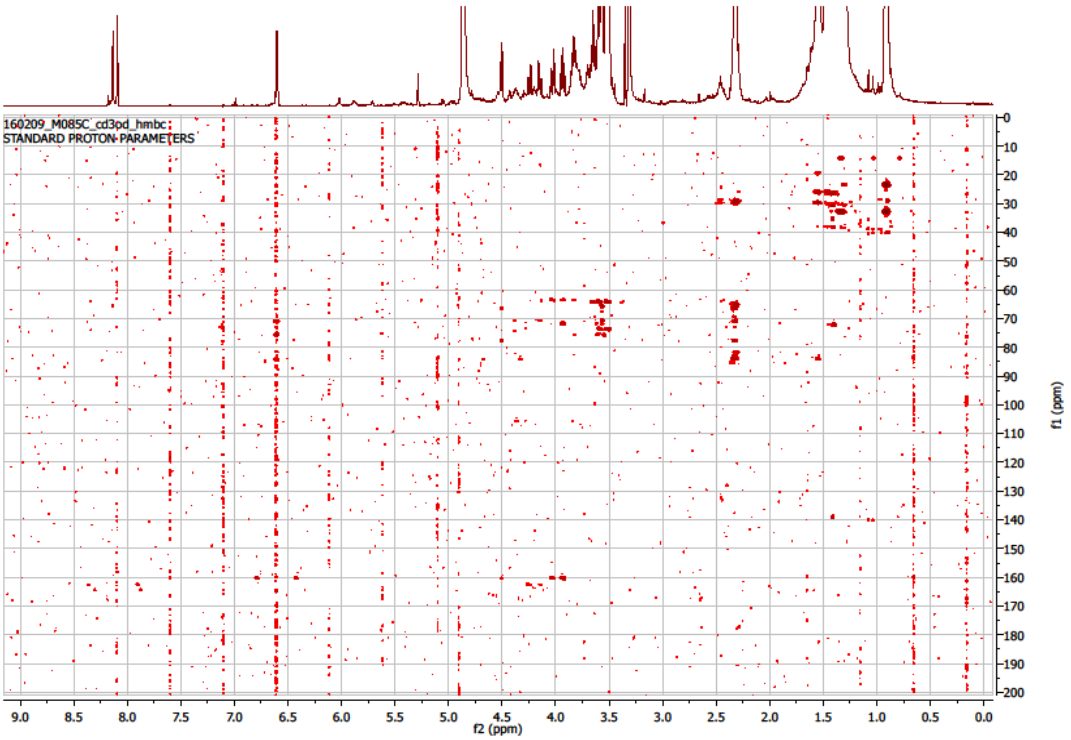
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AG3.**



Spectre RMN ^{1}H-^{1}H COSY (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AG3.**



Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HSQC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AG3.**



Spectre RMN ^{1}H-^{13}C HMBC (CD_3OD, 500 MHz) du métabolite **AG3.**

Annexe V

Ressources et paramètres utilisés pour les calculs de modélisation moléculaire

- **Moyens informatiques disponibles et puissance crête théorique (processeurs, réseau d'interconnexion, stockage)**

Cluster de serveurs Bull de la gamme NovaScale :

- 20 noeuds de calcul comprenant chacun 2 processeurs Xeon E5520 quadri-coeurs cadencés à 2,26 Ghz ainsi que 24 Go de mémoire.
- 1 noeud de calcul comprenant 2 x 2 processurs X5570 quadri-coeur cadencés à 2,93 Ghz et 72 Go de mémoire.
- 1 noeud de calcul (super-node bulles) comprenant 4 Intel Xeon octocoeur cadencés à 2,26 GHz ainsi que 132 Go de mémoire.

Stockage : 24 To (Optima 1500)

Puissance crête théorique : **1,92 Teraflops**

Puissance totale fournie : 1,92 TFlops avec 200 cœurs

- **Mots clés utilisés**

  - **Optimisation de géométrie :**

```
$ RunGauss
%NprocShared=8
%mem=8GB
#P wB97XD/6-31+G(d,p)  scf=tight opt=tight  Integral(UltraFineGrid)
# scrf=(smd,solvent=methanol)
```

  - **Calcul de fréquence :**

```
$ RunGauss
%NprocShared=8
%mem=8GB
#P wB97XD/6-31+G(d,p)  scf=tight freq scale=0.971 Integral(UltraFineGrid)
# pop=npa gfinput IOP(6/7=3) density=current scrf=(smd,solvent=methanol)
```

  - **Calcul de déplacements chimiques RMN :**

```
$ RunGauss
%NprocShared=8
%mem=8GB
#P mPW1PW91/6-31+G(d,p) scf=tight nmr(giao) Integral(UltraFineGrid)
# scrf(solvent=methanol)
```

  - **Calcul des transitions électroniques, des forces d'oscillateurs et des forces rotatoires utilisées pour la construction des spectres UV et de DCE :**

```
$ RunGauss
%NprocShared=8
%mem=22GB
#P wB97XD/6-31++G(d,p)  scf=tight Integral(UltraFineGrid)
# td(full,singlet,nstates=50) scrf=(smd,solvent=methanol)
```

Pierre-eric CAMPOS
LCSNSA – Université de La Réunion

Thèse de Doctorat en Chimie
08 Février 2017

Résumé :

Les travaux de thèse exposés dans ce manuscrit portent sur l'étude chimique de quatre éponges marines collectées à Madagascar : *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri* et *Biemna laboutei*. Pour les trois premières, l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires par différentes techniques chromatographiques (CLMP, CLHP…) et spectroscopiques (UV-visible, SMHR, RMN 1D et 2D…) ont été envisagés. Quinze métabolites secondaires de type alcaloïdes guanidiniques, dérivés de la bromotyrosine, *N*-acyléthanolamines et polyynes, ont été isolés de ces éponges. Huit sont de structures nouvelles. La valorisation des molécules isolées a ensuite été envisagée *via* l'évaluation de leurs activités biologiques. Deux d'entres elles, la fromiamycaline (M70) et la ptilomycaline F (MU7) ont montré une excellente activité antipaludique et quatre, la fromiamycaline (M70) et les ptilomycalines E (MU6), G (MU8) et H (MU9) une cytotoxicité sur cellules KB prometteuse. L'étude de la dernière éponge, *Biemna laboutei*, portait sur des molécules précédement isolées au sein du LCSNSA. Les travaux entrepris comprenaient une vérification des configurations relatives de neuf alcaloïdes guanidiniques déterminées par RMN grâce à la probabilité DP4+. Les configurations relatives déterminées par RMN de sept des molécules ont ainsi pu être confirmées et trois d'entre elles, les nétamines G (E8), P (E17) et R (E19) ont fait l'objet d'une étude plus approfondie par modélisation moléculaire afin de déterminer leur configuration absolue par comparaison de leur spectre de Dichroïsme Circulaire Electronique expérimental avec un spectre calculé.

Mots clés : Océan Indien, Eponges marines, *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri*, *Biemna laboutei*, métabolites secondaires, activité antipaludique, cytotoxicité, modélisation moléculaire, dichroïsme circulaire, configuration absolue.

Summary :

The work described in this manuscript concerns the chemical study of four sponges from Madagascar: *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri* and *Biemna laboutei*. For the first three sponges, the study was devoted to the extraction, isolation and identification of secondary metabolites by various chromatographic (MPLC, HPLC…) and spectroscopic (UV, HRMS, 1D and 2D NMR…) techniques. Fitfteen secondary metabolites including guanidine alkaloids, bromotyrosin derivated, *N*-acylethanolamines and polyynes were isolated from these sponges. Eight are new molecules. The biological activities of the isolated compounds were then evaluated. Two of them, fromiamycalin (M70) and ptilomycalin F (MU7) showed a very good antimalarial activity and four of them, fromiamycalin (M70) and ptilomycalins E (MU6), G (MU8) and H (MU9) a promising cytotoxicity against KB cells. The study of the last sponge, *Biemna laboutei*, was performed on molecules already isolated in the LCSNSA. This work included the determination of the relative configuration of nine guanidine alkaloids by using the DP4+ probability. The relative configuration of seven molecules was confirmed. Three of them, netamines G (E8), P (E17) and R (E19) were selected for a study by molecular modeling to determine their absolute configuration by comparison of their experimental Electronic Circular Dichroism spectrum with a calculated spectrum.

Keywords : Indian Ocean, Marine sponges, *Monanchora unguiculata*, *Amphimedon* sp., *Aulospongus gardineri*, *Biemna laboutei*, secondary metabolites, antimalarial activity, cytotoxicity, molecular modeling, circular dichroism, absolute configuration.

POLE RECHERCHE
Ecoles Doctorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) M. Pierre-Eric Campos,
en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 28/06/2017

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.