HAL
open science

Valorisation chimique et biotechnologique de la biodiversité marine de l'Archipel des Comores : recherche de molécules naturelles anti-âge

Charifat Saïd Hassane

To cite this version:

Charifat Saïd Hassane. Valorisation chimique et biotechnologique de la biodiversité marine de l'Archipel des Comores : recherche de molécules naturelles anti-âge. Biotechnologie. Université de la Réunion, 2020. Français. NNT : 2020LARE0016 . tel-03352174

HAL Id: tel-03352174

https://theses.hal.science/tel-03352174v1

Submitted on 23 Sep 2021

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 Technologie Santé

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 23 septembre 2020

par

Charifat SAID HASSANE

Valorisation chimique et biotechnologique de la biodiversité marine de l'Archipel des Comores : Recherche de molécules naturelles anti-âge.

Tome I

Diretrice de Thèse	Anne BIALECKI-GAUVIN	Professeur, Université de La Réunion
Co-directeur de Thèse	Laurent DUFOSSE	Professeur, Université de La Réunion
Encadrant	Mireille FOUILLAUD	MCF, Université de La Réunion

Composition du jury

Rapporteurs	Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI	Directrice de Recherches CNRS-MNHN
	Olivier GROVEL	Professeur, Université de Nantes
Examinateurs	Evelyne OLLIVIER	Professeur, Université d'Aix-Marseille
	Fabien GUERIN	MCF, Université de La Réunion
	Jamal OUAZZANI	Directeur de Recherches CNRS-ICSN

« Don't give up, for that is ignorance and not according to the rules of this art… Like the lover, you can't hope to achieve success without infinite perseverance »

Muhammad ibn Muhammad al-Fulani al-Kishnawi

Avant-propos

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de ce doctorat ont donné lieu à une publication soumise [P], une communication orale [Co] et quatre posters [Po] :

[P] **C. Saïd Hassane**, M. Fouillaud, G. Le Goff, J-B Boyer, I. Trougakos, Moran Jerabek, N. de Voogd, J. Ouazzani, A. Gauvin-Bialecki, L. Dufossé. « **Microorganisms associated with the marine sponge *Scopalina hapalia*: a reservoir of bioactive molecules to slow down the aging process. »** Publication soumise.

[Co] **C. Saïd Hassane**, M. Fouillaud, J-B Boyer, P. Clerc, N. de Voogd, L. Dufossé, A. Gauvin-Bialecki. Octobre 2018. **«Valorisation biotechnologique de microorganismes associés à des éponges marines de l'Archipel des Comores : une nouvelle perspective d'utilisation durable de la biodiversité marine de la zone Océan Indien. ».** Conférence internationale « promouvoir l'économie bleue pour une sécurité alimentaire durable en Afrique ». Institut Halieutique et des Sciences Marines, Tuléar - Madagascar.

[Po1] **C. Saïd Hassane**, M. Fouillaud, J-B Boyer, P. Clerc, L. Dufossé, A. Gauvin-Bialecki. **"Research of bioactive molecules from marine environment in the context of TASCMAR project: new perspectives for LCSNSA".** 52nd European Marine Biology Symposium (EMBS). Piran, Slovénie, 25-29 Septembre 2017.

[Po2] **C. Saïd Hassane**, M. Fouillaud, J-B Boyer, P. Clerc, N. de Voogd, L. Dufossé, A. Gauvin-Bialecki. **"Valorisation of marine sponges and their microbial symbionts: Isolation and identification of marine natural products modulating molecular processes underlying aging."** International Conference on Biodiversity Health and Food (IC-BioHealf), Université de La Réunion, Saint-Denis, France, 13-14 Décembre 2017.
Ce poster a reçu le 3ème prix du concours de la meilleure présentation.

[Po3] **C. Saïd Hassane**, M. Fouillaud, J-B Boyer, P. Clerc, N. de Voogd, E. Garayev, S. Greff, T. Perez, G. Herbette, B. Baghdikian, E. Ollivier, L. Dufossé, A. Gauvin-Bialecki. **"Identification of anti-aging natural products from southwestern Indian Ocean marine sponges and their microbial symbionts."** European Congress on Biotechnology (ECB 2018), Genève, Suisse, 1-4 Juillet 2018.

[Po4] **C. Saïd Hassane**, P.-E. Campos, F. Tintillier, P. Clerc, J.-B. Boyer, N. De Voogd, N. Fokialakis, I. P. Trougakos, K. Gardikis, C.Wenzkowski, J. Bignon, G. Le Goff, C. Moriou, A. Al-Mourabit, L. Dufossé, M. Fouillaud, J. Ouazzani, A. Gauvin-Bialecki. **"Marine sponges from Indian Ocean: A highly promising source for the discovery of novel bioactive compounds to fight against ageing and age-related diseases."** XVI International Symposium on Marine Natural Products (MaNaPro) / XI European Conference on Marine Natural Products, Peniche, Portugal, 01-05 Septembre 2019.

Les travaux de cette thèse ont également donné lieu à deux stages de Master 2 :

- **Amans Tina** (2017) M2 P^{2}AON, Université d'Angers. « Etude chimique de l'éponge *Scopalina hapalia* : recherche de métabolites secondaires à activité anti-âge ».
  Encadrants : A. GAUVIN-BIALECKI, C. SAÏD HASSANE

- **Le Loarer Alexandre** (2019) M2 CHIMBIOTECH, Université de La Réunion. « Recherche de molécules issues de trois microorganismes d'origine marine à propriété anti-âge ».
  Encadrants : M. FOUILLAUD, A. GAUVIN-BIALECKI, C. SAÏD HASSANE

Enfin, cette thèse m'a offert l'opportunité de participer à une école thématique :

- **Première approche de la systématique des éponges à La Réunion.**

  Cette formation a été organisée par l'Association Vie Océane, La Réserve Naturelle Nationale Marine de La Réunion et L'institut Méditerranéen de la Biodiversité et d'Ecologie Marine de la Biodiversité.

  La formation a été assurée par :
  - Jean Vacelet, Directeur de recherche émérite du CNRS - Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), France
  - Thierry Pérez, Directeur de recherche au CNRS - Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), France
  - Michelle Klautau, Professeur à l'Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil

  Date : 06-11 Novembre 2017 (5 jours)
  Lieu : Parc Marin de La Réunion

Note aux lecteurs

- Ce mémoire est constitué de 2 Tomes. Le Tome II complète le Tome I et comprend la majorité des tableaux et des figures. Cette structuration présente l'avantage de pouvoir consulter en même temps le texte et la figure ou le tableau correspondant.

  Les tableaux, les figures et les molécules se trouvant dans les Tomes I et II ont été numérotés indépendamment.

- Dans le Tome I, les mots marqués d'un astérisque ont leur définition dans un glossaire page 309.

- Par ailleurs, certaines étapes des travaux de thèse présentées dans ce mémoire ont nécessité :
  - La réalisation d'un stage dans un laboratoire partenaire [stage] ;
  - La contribution de partenaires du programme H2020 [Partenariat]
  - La contribution de prestataires de service [Prestation]

  Le tableau ci-après est une synthèse des différentes contributions.

INVESTIGATION	LOCALISATION	CONTRIBUTION
Investigation Chimique		
Les réseaux moléculaires	Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE). UMR Aix-Marseille Université (AMU)/CNRS 7263/IRD 237/UAPV Equipe Diversité et Fonctionnement : des Molécules aux Ecosystèmes (DFME) Plateforme MALLABAR	[Stage] Initiation aux réseaux moléculaires et à l'analyse de données acquises par CLUHP-SMHR sous la direction de Stéphane Greff (Ingénieur d'étude). (05 au 07 mars 2018)
Isolement des métabolites	Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE). UMR Aix-Marseille Université (AMU)/CNRS 7263/IRD 237/UAPV Equipe Diversité et Fonctionnement : des Molécules aux Ecosystèmes (DFME) Laboratoire de pharmacognosie	[Stage] Formation au couplage CL-SM sous la direction d'Elnur Garayev (Docteur). (~120h) (08 janvier au 06 juillet 2018)
Elucidation structurale des métabolites isolés.	Plateforme Spectropôle de Marseille	[Stage] Formation à la RMN sous la direction de Gaëtan Herbette (Ingénieur de recherche). (08 janvier au 06 juillet 2018)

INVESTIGATION	LOCALISATION	CONTRIBUTION
Investigation microbiologique		
- Identification bactérienne - Etude du microbiome de *Scopalina hapalia* par métagénomique.	Genoscreen (www.genoscreen.fr), Lille, France	[Prestation]
Identification des souches fongiques	Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Pays-Bas	[Prestation]
Criblage biologique		
Test d'inhibition de l'élastase Test d'inhibition de la tyrosinase Test du protéasome	Département de Biologie cellulaire et de Biophysique, Faculté de Biologie, Université Nationale et capodistrienne d'Athènes, Athènes, Grèce	[Partenariat]
Test d'activation de la sirtuine 1 Test d'activation de la catalase	Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS, Gif-sur-Yvette, France	[Partenariat]
Test d'inhibition de la CDK7 Test d'inhibition de la FynB Test du protéasome	CRELUX (www.crelux.com), Munich, Allemagne	[Partenariat]

Remerciements

Cette thèse a été menée au sein du *Laboratoire de Chimie et de Biotechnologie des Produits Naturels* (ChemBioPro), anciennement *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 européen de recherche et d'innovation Horizon 2020 dans le cadre du projet TASCMAR (*Tools And Strategies to access original bioactive compounds by Cultivating MARine invertebrates and associated symbionts*).

- La Région Réunion qui m'a accordé une allocation régionale de recherche.

- L'Ecole Doctorale qui m'a octroyé plusieurs financements (soutien à la réalisation d'un séjour doctoral ainsi qu'à la participation d'un congrès, aide au paiement de mes trois derniers loyers).

En premier lieu, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse ainsi que mon encadrant qui m'ont permis de travailler sur un sujet qui me tenait particulièrement à cœur à savoir la valorisation de la biodiversité marine de l'Archipel des Comores.

Je remercie les Professeurs Anne Bialecki, ma directrice de thèse, et Laurent Dufossé, mon co-directeur de thèse. Merci pour votre encadrement, vos conseils et surtout pour votre confiance qui m'ont permis d'appréhender ce vaste sujet et de progresser dans mon apprentissage scientifique. Je remercie également le Professeur Anne Bialecki, en sa qualité de directrice du laboratoire ChemBioPro, pour m'avoir donné la chance d'intégrer son laboratoire. La deuxième fois a été la bonne. La constance dans ma volonté d'intégrer votre laboratoire a finalement été récompensée de la plus belle des façons. Je n'aurai pas pu espérer mieux comme environnement de travail pour découvrir la valorisation de la biodiversité de la zone sud-ouest de l'Océan Indien.

J'adresse mes remerciements à Mireille Fouillaud, MCF et mon encadrant, pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des champignons filamenteux. Je tiens à la remercier pour sa gentillesse ainsi que pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de cette thèse.

J'exprime également ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps à la lecture et à l'évaluation de ces travaux de thèse :

- Marie-Lise Bourguet-Kondracki, directrice de Recherches CNRS – HDR au Muséum National d'Histoire Naturelle, Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes – MCAM (UMR 7245 CNRS/MNHN).
- Olivier Grovel, Professeur à l'Université de Nantes, Institut Universitaire Mer et Littoral – IUML (FR3473 CNRS), Groupe Mer-Molécules-Santé (MMS / EA 2160).
- Evelyne Ollivier, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille, Institut Méditerranéen de la Biodiversité et d'Écologie marine et continentale – IMBE, Groupe Diversité et Fonctionnement : des Molécules aux Ecosystèmes (DFME).
- Fabien Guerin, Maître de conférences à l'Université de La Réunion, Unité Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu tropical (UMR PVBMT).

- Jamal Ouazzani, directeur de Recherches CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles – ICSN, Unité Pilote de l'ICSN métabolites secondaires microbiens.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes extérieures au laboratoire ChemBioPro qui ont contribué à la réalisation de ces travaux.

J'adresse mes remerciements à Gaëtan Herbette, Ingénieur de recherche au Spectropole de Marseille, pour m'avoir accueillie au sein de son service RMN. Merci d'avoir facilité mon arrivée et pour l'aide apportée tout au long de mon séjour à Marseille. Soyez assuré de ma gratitude pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées au cours de cette expérience, tant dans la réalisation des analyses que dans l'interprétation des spectres RMN. Votre disponibilité ainsi que votre bonne humeur ont grandement contribué à mon apprentissage. Un grand merci à Valérie Monnier, Ingénieure de recherche au Spectropole de Marseille, non seulement pour la réalisation des spectres de masse des composés isolés mais aussi pour sa gentillesse.

Je remercie, par ailleurs, le Professeur Evelyne Ollivier, Directrice du laboratoire de Pharmacognosie – AMU, pour m'avoir reçue au sein de son laboratoire. Ce fut une très belle expérience tant scientifique qu'humaine. Merci pour votre encadrement, vos conseils avisés ainsi que pour votre confiance. Merci à Béatrice Baghdikian, MCF – HDR, pour vos conseils sur la chromatographie ; Un grand merci à Elnur Garayev, docteur, pour m'avoir grandement aidé dans mes travaux de thèse et pour m'avoir formé sur les différents appareils, tout cela sans jamais se départir de son sourire ; Sans oublier Fathi Mabrouki, technicien du laboratoire, pour son accompagnement dans les différentes manipulations.

Je remercie globalement tous les membres du laboratoire pour leur bonne humeur, leur bienveillance ainsi que pour les moments partagés. Je remercie plus particulièrement tous les étudiants de master, les doctorants ainsi que les post-doctorants que j'ai eu le plaisir de rencontrer durant mon séjour marseillais. Vous m'avez fait découvrir un tout autre visage de la cité phocéenne et fait de ce séjour un moment particulièrement agréable.

Un grand merci à Thierry Perez, directeur de recherche CNRS – IMBE DFME, station Marine d'Endoume, pour m'avoir ouvert les portes de la plateforme MALLABAR (Métabolomique Appliquée à L'étude de LA Biodiversité mARine). Merci à Stéphane Greff, ingénieur d'étude à l'IMBE, pour la réalisation des analyses CLHUP-SMHR et pour m'avoir initié aux réseaux moléculaires. Grâce à vous, cette approche bioinformatique ne m'est plus inconnue.

Je remercie, par ailleurs, le personnel du Département de Biologie de l'Université de La Réunion :

Sébastien Jacquemet, MCF – UMR Entropie, et Maud Balland, enseignante, pour m'avoir donné accès à leurs appareils et ainsi facilité mes travaux en microbiologie. Hafsah Limbada, technicienne, et Patrice Malet, technicien, pour leur gentillesse, leur disponibilité ainsi que pour leur aide que ce soit pour l'autoclave ou encore l'accès aux microscopes.

Parmi les personnes qui ont contribué à cette thèse, je ne saurais oublier les membres de mon comité de thèse, Ali Al-Mourabit, DR CNRS-ICSN, et Marcelino Suzuki, Pr UMPC-CNRS. Je tiens à vous remercier pour nos échanges lors de mes différents comités. Vos appréciations sur mon travail ainsi que vos conseils ont grandement contribué à l'améliorer.

Enfin, je témoigne ici toute ma gratitude à mes collègues du laboratoire ChemBioPro que j'ai côtoyé durant ces quatre ans. Je remercie plus particulièrement :

Patricia Clerc, ingénieure, et Pierre-Eric, post-doctorant, pour m'avoir fait découvrir la véritable chimie ! J'entends bien évidemment celle de la paillasse. Merci pour votre disponibilité, votre écoute et votre aide tout au long de ces années. Je remercie plus particulièrement Patricia qui m'a formée aux différentes techniques de la chimie. Ta positivité et ton sourire face aux problèmes d'appareillages que nous avons rencontrés m'ont permis de toujours garder le moral ! Pierre-Eric, merci pour tes cours accélérés de chimie pour les nuls et pour ta serviabilité sans laquelle je n'aurais jamais pu collecter mes premiers ECTS.

Jean-Bernard Boyer (alias Mister JB), technicien en chimie et accessoirement en microbiologie. Que serais-je devenue sans vous et votre assistance ?! Merci de m'avoir tenu compagnie durant toute la période de chasse aux microorganismes associés. Votre bonne humeur et votre aide sans faille ont fait de vous un allié de taille durant cette thèse. Merci d'avoir toujours été présent que ce soit pour les voyages à l'autoclave PVBMT, le travail à la paillasse, prendre la relève sur la souchotèque ou pour casser la blague ! Ti hache y coupe gros bois, me voici enfin arrivée au bout du tunnel XD.

Florent Tintillier, technicien du projet TASCMAR, pour sa bonne humeur quand celle-ci était au rendez-vous et ses bons conseils. Merci également pour tout le travail accompli sur *Lendenfeldia*.

Jacqueline Smadja, professeur émérite, pour la relecture de ce manuscrit mais aussi et surtout pour sa gentillesse.

Lynda Saminadin, gestionnaire, pour son aide administrative mais pas que ! Merci pour les cafés, ton sourire et ta bonne humeur. M. Volsan, ancien technicien et verrier. Vous m'avez sauvé la mise à bien des reprises, un grand merci. Votre sagesse et votre tempérament de feu m'ont bien souvent fait penser à mon père. Et ça, c'était rafraichissant ! Yanis Dijoux, technicien, pour sa bonne humeur ainsi que sa gentillesse. Merci à vous trois ! Nos conversations entre 2 manipulations m'ont permis à de multiples reprises d'évacuer la pression et de repartir de plus belle.

Isabelle Grondin, HDR, pour sa bienveillance. Vos conseils ou maximes au détour d'un couloir ou d'une porte durant ces années ont toujours été soit une source de motivation soit une invitation à relativiser les choses.

Alain Shum Cheong Sing, MCF – HDR, et Xavier Chasseray, MCF, pour votre bonne humeur quotidienne le midi ainsi que pour vos bons petits plats. La gourmande que je suis s'est bien régalée.

Arnaud Marvilliers, MCF, que dire ?! Tes blagues journalières, même les plus mauvaises d'ailleurs, ont souvent eu le mérite de me redonner le sourire. Merci de m'avoir encouragée à me mettre au sport et à toujours me dépasser. Mon moral te dit merci et à jamais le Piton des Neiges est associé à ton nom !

Aux occupants du bureau des doctorants, anciens et nouveaux : Alexandre CYS & LL, Elsa, Elise, Flavia, Keshika, Héloïse et les autres ! Merci pour vos sourires, votre bonne humeur, votre patience (surtout quand je me lançais dans mes bavardages interminables) ainsi que pour les moments passés ensemble qui ont contribué à faire de ces quatre années une très belle expérience.

Je tiens aussi à remercier M. Mistrin et Florent Bancalin pour leur bonhommie et tous les efforts qu'ils fournissent pour nous permettre de travailler dans de bonnes conditions. Vous n'avez

jamais manqué de répondre à mes sollicitations que ce soit pour une ampoule grillée dans le bureau ou une climatisation qui fait des siennes dans le labo S2.19.

Je voudrais profiter de cette occasion pour exprimer ma profonde reconnaissance à Mohamed Haddad, CR à l'IRD, au Pr Richomme, responsable du master P^2AON, ainsi qu'à Catherine Roullier et El-Hassane Nazih, MCF à l'université de Nantes. Merci pour votre confiance, votre soutien ainsi que pour vos conseils. Vous avez rendu mon aventure dans le monde des produits naturels possible. Je remercie tout particulièrement le Dr Haddad, votre conseil avisé a été l'étincelle qui a illuminé mon parcours dans cette discipline.

Un immense merci à mes amis de longue date Al-Farouk, Bilal, Cathy, Chamsia, et les autres qui m'ont encouragée et apporté leur soutien dès les prémices de cette belle aventure ; aux amis rencontrés à mi-parcours Ghalil, Jamal, Jooyeon, Marta, Narjes et les autres, merci pour les bons moments passés ensembles et nos discussions aussi délirantes que sérieuses. Merci pour votre soutien et votre présence malgré la distance qui nous sépare. Je suis une femme vraiment chanceuse de vous compter parmi mes amis.

Je ne peux oublier de remercier les personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer en dehors du laboratoire. Je remercie plus particulièrement Corinne Romeder, la propriétaire de ce qui est devenu mon refuge au fil des années. Votre gentillesse ainsi que votre bienveillance m'ont assuré de toujours pouvoir travailler en toute sérénité. Merci infiniment ! A toute ma famille réunionnaise que j'ai découverte ici, merci pour les moments passés ensemble.

Je ne peux conclure sans dire un grand merci aux membres de ma famille qui m'ont aidée durant toutes ces années. A ma grande sœur Fatouma et à son mari Mihidoiri Ali, merci pour votre accueil à mon arrivée sur l'île. Merci Mihidoiri pour tes encouragements et ton soutien. Merci à mes nièces Jihane et Nojoud pour la joie que vous m'apportez. Merci à ma cousine Faizat, son mari Faid ainsi que leurs petits garçons, Yanel et Kaim, pour ces moments de détente et de partage qui m'ont permis de sortir de ma routine. Je vous remercie également pour votre présence constante et votre soutien moral qui m'ont aidée à mieux supporter ces deux dernières années. Merci à mon petit frère Al qui a su prendre la relève au bon moment. Merci à mon oncle Mohamed Ismaël et à ma cousine Chaïma Zaki pour leurs appels réguliers et leurs encouragements, sans jamais me tenir rigueur pour mes longues périodes de silence.

Enfin, je remercie du plus profond de mon cœur les personnes qui me sont les plus chères, mes parents. Vous m'avez tant donné et tant appris qu'un simple merci ne suffira pas à vous exprimer toute ma gratitude. Et pourtant, je n'ai que cela à offrir aujourd'hui. Merci pour votre confiance, votre compréhension, votre soutien indéfectible ainsi que vos encouragements dans tout ce que j'entreprends. Loin des yeux mais près du cœur comme le dit l'adage

Je remercie ici toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin (que je n'ai pas oubliées mais il faut que j'abrège au risque de rédiger une seconde thèse). C'est dans les grandes comme les petites choses que j'ai puisé ma force pour achever ce 3ème jalon de mon projet. Merci à vous !

Ya tawwakali Mgu, tsimtsovu

Sommaire

AVANT-PROPOS **5**

NOTE AUX LECTEURS **7**

REMERCIEMENTS **9**

SOMMAIRE 13

LISTE DES ABREVIATIONS **17**

INTRODUCTION GENERALE **19**

CHAPITRE I SELECTION DES EPONGES **29**

I.1 COLLECTE ET IDENTIFICATION 31

I.2 OBTENTION DES EXTRAITS BRUTS 32

I.2.1 Principe *32*

I.2.2 Résultats *32*

I.3 CRIBLAGE BIOLOGIQUE 32

I.3.1 Présentation des cibles biologiques sélectionnées *33*

I.3.1.1 Qu'est-ce que l'élastase? 33

I.3.1.2 Qu'est-ce que la tyrosinase? 34

I.3.1.3 Qu'est-ce que la Fyn kinase ? 35

I.3.1.4 Qu'est-ce que la CDK7 ? 37

I.3.1.5 Qu'est-ce que le protéasome ? 38

I.3.1.6 Bilan des cibles biologiques sélectionnées 39

I.3.2 Résultats du criblage biologique *40*

I.3.2.1 Evaluation de l'activité anti-élastase 40

I.3.2.2 Evaluation de l'activité anti-tyrosinase 41

I.3.2.3 Evaluation de l'activité d'inhibition de la Fyn kinase 42

I.3.2.4 Evaluation de l'activité d'inhibition de la Cyclin-dependent kinase (CDK) 7 42

I.3.2.5 Evaluation de l'activité d'inhibition du protéasome 43

I.3.3 Conclusion du criblage biologique *44*

I.4 CRIBLAGE CHIMIQUE 45

I.4.1 Principe du criblage par CCM *45*

I.4.2 Principe du criblage par CLHP-DAD-CAD *46*

I.4.3 Principe du criblage par CLHP-SM *46*

I.4.4 Résultats *46*

I.5 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE DES EPONGES BIOACTIVES 51

I.6 CHOIX DES ORGANISMES A ETUDIER ET STRATEGIE D'ETUDE 52

CHAPITRE II ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EPONGE *LENDENFELDIA* SP. (ML-240) **57**

II.1 ETAT DE L'ART SUR *LENDENFELDIA* (BERGQUIST, 1980) 59

II.1.1 Distribution géographique du genre Lendenfeldia (Bergquist, 1980) *59*

II.1.2 Taxonomie et description du genre *59*

II.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre Lendenfeldia (Bergquist, 1980) *60*

II.1.3.1 Sesterterpènes et furanoterpènes 61
II.1.3.2 Polybromodiphényléthers (PBDE) 66
II.1.3.3 Composés stéroïdiens 69
II.1.3.4 Dérivés d'acides aminés et autres composés 70

II.2 ETUDE CHIMIQUE DE L'EPONGE *LENDENFELDIA* SP. DE MAYOTTE 73

II.2.1 Fractionnement bioguidé et isolement des métabolites spécialisés 73

II.2.2 Elucidation structurale des métabolites spécialisés isolés 74

II.2.2.1 Elucidation structurale de la classe 1 : cycle A substitué en position 3',5' 76
II.2.2.2 Elucidation structurale de la catégorie 2 : cycle A substitué en position 4',6' 83

II.2.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés 84

II.3 DISCUSSION 87

CHAPITRE III ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EPONGE *SCOPALINA HAPALIA* (ML-263) 89

III.1 ETAT DE L'ART SUR *SCOPALINA HAPALIA* 91

III.1.1 Localisation du genre Scopalina - Distribution géographique 91

III.1.2 Taxonomie et description du genre Scopalina (Schmidt, 1862) 91

III.1.3 Cas particulier de l'espèce Scopalina hapalia (Hooper et al., 1997) 93

III.1.4 Etudes chimiques antérieures relatives au genre Scopalina (Schmidt, 1862) 94

III.1.4.1 Ecologie chimique 94
III.1.4.2 Métabolites spécialisés isolés du genre *Scopalina* 95

III.2 ETUDE CHIMIQUE DE *SCOPALINA HAPALIA* DE MAYOTTE 98

III.2.1 Etude comparative des profils chimiques de 3 spécimens de Scopalina hapalia 98

III.2.1.1 Analyse comparative des profils chromatographiques 99
III.2.1.2 Déréplication des extraits bruts 99
III.2.1.3 Discussion 109

III.2.2 Isolement et élucidation structurale des métabolites de Scopalina hapalia 111

III.2.2.1 Isolement des métabolites 111
III.2.2.2 Elucidation structurale des métabolites 114

III.2.3 Evaluation des activités biologiques des métabolites isolés 134

III.3 DISCUSSION 135

III.4 CONCLUSION 142

CHAPITRE IV ETUDE DES MICROORGANISMES ASSOCIES A *SCOPALINA HAPALIA* 145

IV.1 ETAT DE L'ART 147

IV.1.1 Relations éponges - microorganismes marins 148

IV.1.1.1 Bacteria 150
IV.1.1.2 Fungi 157

IV.1.2 Caractérisation de la communauté microbienne associée au genre Scopalina 159

IV.2 ETUDE DU MICROBIOME DE *SCOPALINA HAPALIA* DE MAYOTTE : APPROCHE MOLECULAIRE 164

IV.2.1 Evaluation de la qualité de l'ADN extrait de Scopalina hapalia en vue du séquençage 165

IV.2.2 Etude des microorganismes associés à Scopalina hapalia par une approche de métagénomique ciblée de l'ADNr 16S et de la région ITS2 166

IV.2.2.1 Prétraitements des données brutes et validation des contrôles 167
IV.2.2.2 Caractérisation de la communauté procaryotique associée à *Scopalina hapalia* 170

IV.2.2.3 Discussion 180

IV.3 ETUDE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE CULTIVABLE ASSOCIEE A L'EPONGE *SCOPALINA HAPALIA* DE MAYOTTE 188

IV.3.1 Isolement des microorganismes associés 188

IV.3.2 Identification des microorganismes 190

IV.3.2.1 Actinobacteria / Firmicutes 190

IV.3.2.2 Champignons filamenteux 194

IV.3.3 Discussion 195

IV.4 CRIBLAGE BIOLOGIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES CULTIVABLES 201

IV.4.1 Production microbienne 201

IV.4.2 Obtention des extraits microbiens 202

IV.4.3 Les cibles biologiques 202

IV.4.3.1 Activité de la catalase 203

IV.4.3.2 Activité de la sirtuine 1 (Sirt1) 203

IV.4.3.3 Evaluation des activités biologiques des extraits microbiens 204

IV.4.3.3.1 Actinobacteria : genre *Salinispora* 205

IV.4.3.3.2 Actinobacteria : genre *Micromonospora* 206

IV.4.3.3.3 Actinobacteria : genre *Rhodococcus* 207

IV.4.3.3.4 Bacillaceae : espèce *Bacillus paralicheniformis* 208

IV.4.3.3.5 Bacillaceae : espèce *Bacillus licheniformis* 209

IV.4.3.3.6 Bacillaceae : espèce *Bacillus berkeleyi* 210

IV.4.3.3.7 Thermoactinomycetaceae 211

IV.4.3.3.8 Fungi : genres *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora* 211

IV.4.4 Discussion 212

IV.5 CONCLUSION 223

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 227

PARTIE EXPERIMENTALE 235

PARTIE I INVESTIGATIONS CHIMIQUES 237

I.1 Procédures générales 237

I.1.1 Les solvants 237

I.1.2 Les réactifs 237

I.1.3 Les techniques chromatographiques 237

I.1.3.1 La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 237

I.1.3.2 La Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP) 237

I.1.3.3 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) 238

I.1.4 Les techniques spectrales 238

I.1.4.1 La Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) 238

I.1.4.2 La Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN ^{1}H et RMN ^{13}C) 239

I.2 Etude chimique des éponges 239

I.2.1 Collecte 239

I.2.2 Obtention des extraits bruts 239

I.2.3 Criblage biologique haut débit 240

I.2.4 Réalisation des signatures chimiques 241

I.2.5 Déréplication et profilage chimique 242

I.2.5.1 Réalisation des réseaux moléculaires avec GNPS et Cytoscape 243

I.2.5.2 Annotation 243

I.2.6 Fractionnement, isolement et caractérisation des métabolites de *Lendenfeldia* sp. 244
I.2.6.1 Fractionnement et isolement des métabolites de *Lendenfeldia* sp..... 244
I.2.6.2 Caractérisation des métabolites de *Lendenfeldia* sp..... 245
I.2.7 Fractionnement, isolement et caractérisation des métabolites de *Scopalina hapalia* 247
I.2.7.1 Fractionnement et isolement des métabolites de *Scopalina hapalia*..... 247
I.2.7.2 Caractérisation des métabolites isolés de *Scopalina hapalia*..... 252
PARTIE II MICROBIOLOGIE 257
II.1 Etude du microbiome de *Scopalina hapalia*..... 257
II.1.1 Extraction de l'ADN génomique 257
II.1.2 Amplification et séquençage par la technique Illumina MiSeq® « paired-end » 258
II.1.3 Analyse bio-informatique 260
II.2 Etude de la diversité microbienne cultivable associée à l'éponge *Scopalina hapalia* 261
II.2.1 Isolement des microorganismes 261
II.2.2 Identification des souches bactériennes cultivables 262
II.2.3 Identification des souches fongiques cultivables 263
II.3 Criblage biologique des souches microbiennes cultivables..... 264
II.3.1 Revivification des souches..... 265
II.3.2 Préparation des pré-cultures..... 265
II.3.3 Mise en culture..... 265
II.3.4 Obtention des extraits bruts..... 266
II.3.5 Criblages chimique et biologique haut débit..... 266
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....269
LISTE DES FIGURES 303
LISTE DES TABLEAUX.....305
GLOSSAIRE 309

Liste des abréviations

Abréviations liées à la chimie

AA : Acide Arachidonique

AKG : alkylglycérol

ACN : Acétonitrile

AcOEt : acétate d'éthyle

A.F. : acide formique

AMPA : Acide Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

CAD : Charged Aerosol Detector

CD_3OD : méthanol deutéré

$CDCl_3$: chloroforme deutéré

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLMP : Chromatographie Liquide Moyenne Pression

CLUHP : Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance

d : doublet

DAD : Diode Array Detector

DCM : dichlorométhane

dd : doublet de doublet

ddd : doublet de doublet de doublet

DNP : Dictionary of Natural Products

dqt : doublet de quintuplet

dt : doublet de triplet

EPA : Acide EicosaPentanoïque

GNPS : Global Natural Products Social Molecular Networking

l : large

ldt : large doublet de triplet

lqt : large quintuplet

ls : large singulet

lt : large triplet

m : multiplet

MeOH : méthanol

NMDA : *N*-Méthyl-D-Aspartate

PBDE : PolyBromoDiphényl Ether

PAF : Platelet Activating Factor

PL : PhosphoLipide

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

q : quadruplet

QqTOF : détecteur en tandem quadripôle – Time Of Flight

qt : quintuplet

s : singulet

ss : signal superposé

SM : Spectrométrie de Masse

SMHR : Spectrométrie de Masse Haute Résolution

t : triplet

tt : triplet de triplet

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

UV : Ultra-Violet

Abréviations liées à la biologie

15-LO : 15-LipOxygenase

ARD : Age Related Disease

ARNr 16S : Acide RiboNucléique ribosomique 16 Svedberg

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CE_{50} : Concentration Efficace médiane

CI_{50} : Concentration Inhibitrice médiane

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

GMPS : Guanosine MonoPhosphate Synthetase

HMA : High Microbial Abundance

IMPD : Inosine MonoPhosphate Dehydrogenase

ITS : Internal Transcribed Spacer

LMA : Low Microbial Abundance

LysoPL : lysophopholipide

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NGS : Next Generation Sequencing

NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthetase

PLA2 : Phospholipase A2.

PKS : Polyketide (ou Polycétide en français) Synthase

PKC : Protéine Kinase C

PTK : Protéine Tyrosine Kinase

QIIME : Quantitative Insights Into Microbial Ecology

bp : base paire

Introduction générale

- ✓ **Contexte**

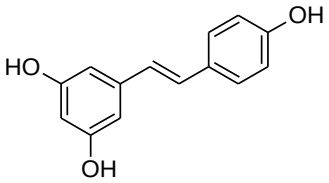
Le vieillissement de la population est un phénomène mondial touchant l'ensemble des continents à différents degrés. D'après un rapport des Nations Unies, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus devrait atteindre la barrière des 2 milliards d'ici 2050. Une des explications à ce phénomène est incontestablement l'amélioration de la qualité de vie. Toutefois, face au vieillissement, nous ne sommes pas tous égaux car notre capacité à bien vieillir dépend de plusieurs facteurs tant extrinsèques qu'intrinsèques. Le vieillissement est lui-même un processus multifactoriel et complexe, associé à une accumulation de lésions moléculaires et cellulaires tout au long de la vie. Ce processus se caractérise par une réduction concomitante de l'intégrité physiologique. Le vieillissement de la peau, qui constitue une première barrière de protection contre différentes agressions, est l'un des premiers signes visibles de ce processus. Cette détérioration lente et progressive des fonctions physiologiques est l'un des facteurs de risques majeurs identifiés dans le développement d'un certain nombre de pathologies regroupées sous l'appellation « maladies associées au vieillissement » (Age-Related Diseases ou ARD) incluant les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer mais aussi les cancers, l'athérosclérose ou encore les maladies métaboliques. Avec l'allongement de l'espérance de vie, il a été observé un accroissement de la prévalence de ces maladies dues au vieillissement (rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé « Global health and ageing », 2011 ; Nations Unies « World population ageing », 2015). Cette transition démographique à laquelle fait face la société s'accompagne de nombreux défis notamment celui d'assurer un vieillissement en bonne santé à sa population. Maintenir l'intégrité physiologique ainsi que le bien-être des personnes âgées devient donc des enjeux majeurs de santé publique.

- ✓ **Recherche d'actifs pour lutter contre le vieillissement**

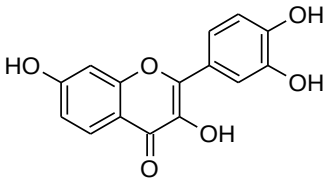
Les avancées de la recherche sur le vieillissement de ces dernières décennies ont permis de mettre en lumière un ensemble de dénominateurs communs qui seraient impliqués. Ces processus moléculaires et cellulaires qui se manifestent au cours du vieillissement sont : l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères*, les modifications épigénétiques*, la perte de la protéostasie*, la dérégulation de la voie de détection des nutriments, la dysfonction mitochondriale, la sénescence cellulaire*, l'épuisement du stock de cellules souches et l'altération de la communication intercellulaire [Lopez-Otin *et al.*, 2013]. La mise en évidence de ces 9 facteurs biologiques et leur acceptation par la communauté scientifique a ouvert la voie à de nouvelles pistes de recherche. Ainsi, aujourd'hui, la science du vieillissement, baptisée géroscience, vise à comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et génétiques qui font du vieillissement un facteur de risque majeur pour le développement de pathologies chroniques entraînant comorbidité et mortalité chez les personnes âgées [Kennedy *et al.*, 2014]. Comprendre ces processus moléculaires et physiologiques, qui sont étroitement interconnectés et qui sous-tendent la biologie du vieillissement, est fondamental pour identifier des cibles biologiques pertinentes et bien spécifiques. En effet, cibler les mécanismes fondamentaux du vieillissement pourrait offrir une stratégie pour non seulement prévenir ou traiter les ARD, à la source et dans leur

ensemble, plutôt que de ne soigner que les symptômes mais aussi minimiser les effets secondaires éventuels [Kennedy *et al.*, 2014; Kennedy et Pennypacker, 2014].

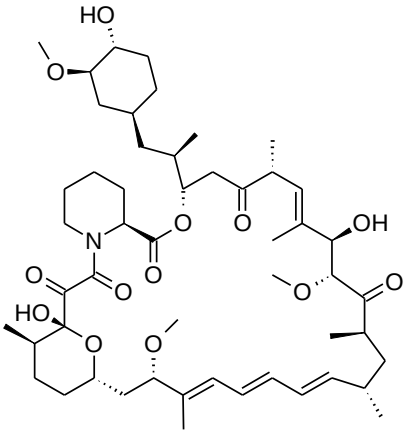
A ce jour, de nombreuses études ont montré que des interventions par approches nutritionnelle ou encore pharmacologiques chez différents organismes modèles (*D. melanogaster*, *C. elegans*, souris/rat) peuvent agir sur les processus fondamentaux du vieillissement pour améliorer ou prolonger la période de vie en bonne santé et/ou la longévité [Francesco *et al.*, 2018; Kennedy et Pennypacker, 2014; Longo *et al.*, 2015]. La restriction calorique, par exemple, est connue depuis plusieurs années pour avoir de nombreux avantages pour la santé ainsi que pour prolonger la durée de vie de différentes espèces animales [Balasubramanian *et al.*, 2017; Masoro, 2005]. En 2018, a été publiée une étude, menée pendant 2 ans chez des sujets humains sains et non obèses, qui a montré qu'une réduction de 15 % de l'apport calorique suffisait à ralentir le métabolisme (réduction de la dépense énergétique) et à réduire le stress oxydatif qui est impliqué dans le vieillissement et certaines pathologies associées [Redman *et al.*, 2018]. Afin d'obtenir les effets bénéfiques de la restriction calorique sans passer par une phase de restriction effective du nombre de calories, des approches pharmacologiques ont été entreprises. Ainsi, un certain nombre de nutraceutiques ainsi que des médicaments déjà utilisés en thérapeutique sont à l'étude comme mimétiques de la restriction calorique. C'est le cas notamment du resvératrol (**1**) (activateur de Sirt1*) ainsi que de la rapamycine (**2**) (inhibiteur de mTOR*) qui ont démontré des effets positifs sur la longévité en agissant sur des voies moléculaire et cellulaire impliquées dans le vieillissement [Balasubramanian *et al.*, 2017; Barzilai *et al.*, 2012]. Une nouvelle étude, publiée en 2018, révèle que la fisétine (**3**), flavonoïde naturellement présent dans les fruits et légumes, agit comme un sénolytique en nettoyant l'organisme des cellules vieillissantes endommagées favorisant ainsi la longévité et la durée de vie en bonne santé [Yousefzadeh *et al.*, 2018]. Les sénolytiques représentent une nouvelle classe de médicaments qui cible directement une cause biologique du vieillissement. Ces molécules pionnières dans le traitement des ARD sont aujourd'hui en essais cliniques [Justice *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2018].



resvératrol (**1**)



fisétine (**3**)



rapamycine (**2**)

Les efforts de recherche prouvent ainsi qu'il est possible de retarder le vieillissement humain que ce soit par le biais de classes de petites molécules connues ou par un panel de molécules émergentes. Dans les deux catégories, nous retrouvons les produits d'origine naturelle qui démontrent des propriétés anti-âges [Argyropoulou *et al.*, 2013] en agissant notamment sur certains facteurs biologiques du vieillissement tels que la protéostasie* [Wedel *et al.*, 2018], la sénescence* [Gurau *et al.*, 2018], l'épigénétique* et l'autophagie* [Cătană *et al.*, 2018]. Ces avancées sans précédent dans la recherche sur le vieillissement ont donné lieu à l'émergence d'une nouvelle branche des biotechnologies appelée « biotechnologie de réjuvénation ».

L'industrie cosmétique n'est pas en reste et s'intéresse de près à ce phénomène. Avec un marché mondial de l'anti-âge estimé à 140 milliards USD en 2015 et une croissance attendue de 216 milliards USD en 2021 (http://globenewswire.com), ce secteur en pleine explosion a de beaux jours devant lui. En effet, les seniors représentent une part importante de la clientèle de ce secteur. Aspirant au bien-être et attentif à leur santé, c'est une clientèle exigeante qui apporte une attention toute particulière à la qualité des produits proposés. A la frontière entre la cosmétique et la pharmaceutique, les cosméceutiques, en alliant produits cosmétiques et ingrédients bioactifs d'origine naturelle, connaissent un réel engouement de la part des consommateurs. Le marché mondial des cosméceutiques, très ciblé anti-âge, est en constante augmentation et devrait atteindre 72 milliards USD d'ici 2022 (https://www.researchandmarkets.com). Avec leurs propriétés photoprotectrice, anti-âge, antioxydante et hydratante pour ne citer que celles-là, les produits naturels ont déjà prouvé leur potentiel pour l'industrie cosmétique. Selon une estimation du site « Persistence Market Research » (https://www.persistencemarketresearch.com), le marché mondial des produits de soins/beauté bio et naturels devrait atteindre 29,5 milliards USD d'ici 2028. La répartition du marché cosmétique mondial par type de produits montre que les soins de la peau représentaient 39 % de la valeur du marché mondial en 2018 (https://www.loreal-finance.com). Ces chiffres mettent en évidence les désirs d'hommes et de femmes soucieux non seulement de diminuer les signes visibles du vieillissement en utilisant des procédés moins invasifs mais aussi de préserver leur capital santé avec des produits sains qui soignent et renforcent cette barrière naturelle qu'est la peau. Le potentiel de développement de ces marchés associés à la préoccupation des consommateurs pour leur santé incite les industriels à se tourner vers de nouvelles sources pour avoir accès à de nouveaux ingrédients toujours plus innovants et performants.

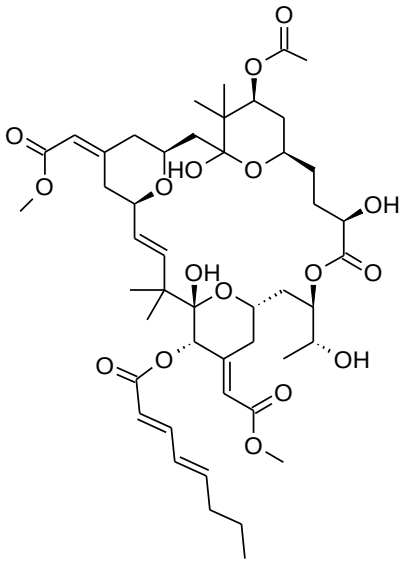
- ✓ **Milieu marin : source de molécules naturelles à activité anti-âge**

Les produits naturels, ayant démontré leur potentiel anti-âge, constituent un arsenal exceptionnel à exploiter. Leur importante contribution dans la découverte de médicaments, notamment dans le développement des médicaments actuels, a fait l'objet de nombreuses publications [Newman et Cragg, 2016a; Patridge *et al.*, 2016]. Historiquement, les premiers produits naturels exploités dans les domaines cosméceutique, nutraceutique et pharmaceutique étaient issus principalement de l'environnement terrestre (plantes et microorganismes) mais les enjeux actuels poussent les industriels à s'orienter de plus en plus vers l'environnement marin qui recouvre environ 70 % de la superficie de la planète.

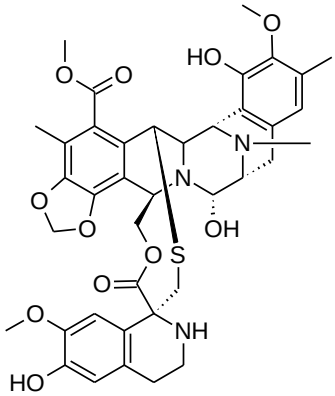
Avec plus de 29 000 produits naturels marins isolés à ce jour, dont 41 % environ découverts sur cette dernière décennie [Carroll *et al.*, 2019], la biodiversité marine offre un réservoir extraordinaire de molécules originales aux propriétés potentiellement anti-âges. En effet, la diversité chimique des produits naturels marins ainsi que la diversité des activités biologiques qui leur sont associées suscitent un intérêt de plus en plus croissant de la part non seulement des chercheurs académiciens mais aussi des industriels [Molinski *et al.*, 2009].

Aujourd'hui, la plupart des molécules d'origine marine en développement clinique sont destinées au traitement des cancers [Newman et Cragg, 2016b]. Ceci s'explique par les moyens mis à la disposition de la recherche de nouveaux anticancéreux, notamment par le National Cancer Institute aux Etats-Unis, tels que les travaux de G.R. Pettit [Pettit, 1994]. Les cas de la bryostatine-1 (**4**), l'ecteinascidine-743 (**5**) (ET-743) et la manzamine A (**6**), découvertes dans les années 80 au cours des grandes campagnes de recherche d'anticancéreux, illustrent bien et cristallisent les espoirs et contraintes de ces produits naturels marins. Peu après l'établissement de leurs intérêts thérapeutiques, il s'est rapidement posé la question de leur approvisionnement. En effet, pour des molécules telles que la bryostatine-1 ou l'ET-743, il faudrait environ 1 tonne de biomasse pour avoir accès à 1g de produit pur. Il était donc impératif de trouver des alternatives. L'homologie de structure de l'ET-743 avec des métabolites spécialisés issus de bactéries suggérait une origine microbienne. Les efforts de recherche dans ce sens ont permis, par des approches moléculaires, l'identification de la bactérie candidate responsable de la production de l'ET-743 mais celle-ci est restée réfractaire à la culture [Rath *et al.*, 2011]. A l'heure actuelle, l'ET-743 commercialisée sous la marque Yondelis® est produite par hémisynthèse à partir de la cyanosafracine B (**7**), une molécule produite par un microorganisme marin *Pseudomonas fluorescens.* L'ET-743 a reçu l'autorisation de mise sur le marché européen en 2007 pour le traitement des sarcomes mous et en 2009 l'autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) pour le marché américain. Puissant antitumoral évalué en essais cliniques contre une variété de cancers (pancréas, leucémie, lymphome non-hodgkinien, etc), la bryostatine-1 fait aujourd'hui partie des candidats, en phase II, de la lutte contre la maladie d'Alzheimer (https://clinicaltrials.gov/ct2/home). En raison de son potentiel en santé humaine, la famille des bryostatines (polycétides cycliques) produite par les bryozoaires *Bugula neritina*, pour protéger leur larve de la prédation, a été intensément étudiée. Ces études, rendues possibles grâce à l'évolution des outils de la biologie moléculaire, ont révélé plusieurs faits intéressants : (1) l'existence d'espèces cryptiques* au sein de la population de *B. neritina* ayant des distributions géographiques différentes, (2) la variation de la communauté microbienne en association avec les espèces considérées, (3) l'identification de la bactérie endosymbiote non cultivable responsable de la synthèse des bryostatines "*Candidatus Endobugula sertula*", (4) l'identification du cluster de gènes PKS, polyketide synthase, responsable de leur biosynthèse chez la bactérie symbionte [Davidson *et al.*, 2001; Davidson et Haygood, 1999; Mcgovern et Hellberg, 2003; Sudek *et al.*, 2007]. Les quantités infinitésimales de bryostatines retrouvées chez *B. neritina* (18 g de produit pur obtenu à partir de 14 tonnes de matière première) ainsi que l'impossibilité actuelle de cultiver la bactérie candidate *E. sertula* entravent son développement clinique. D'une grande complexité structurale, la première synthèse totale de la Bryostatine-1, en 58 étapes, a été publiée en 2011

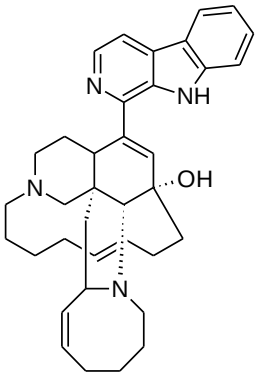
[Keck *et al.*, 2011]. Par la suite, une voie de synthèse beaucoup plus efficace a été présentée en 2017, soit quelques grammes de produit obtenus en 30 étapes, laissant enfin entrevoir des perspectives de développement [Wender *et al.*, 2017]. La recherche d'une voie d'approvisionnement durable étant le cheval de bataille des scientifiques impliqués dans la valorisation des produits naturels, la manzamine A a également fait l'objet de recherche intensive. Principal composé de la famille des alcaloïdes de « type manzamines », la manzamine A a été isolée de plusieurs genres différents d'éponges. Cette observation a été à l'origine de l'hypothèse selon laquelle cette famille de molécules serait également produite par un microorganisme commun [Kobayashi *et al.*, 1995]. A ce jour, la bactérie productrice a pu être isolée, mise en culture et identifiée comme étant un actinomycète appartenant au genre *Micromonospora* [Waters *et al.*, 2014]. Depuis sa découverte dans les années 80, l'éventail de ses activités biologiques s'est élargi à des activités antipaludique, immunosuppressive et neuroprotective [Ang *et al.*, 2000; Hamann *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2006].



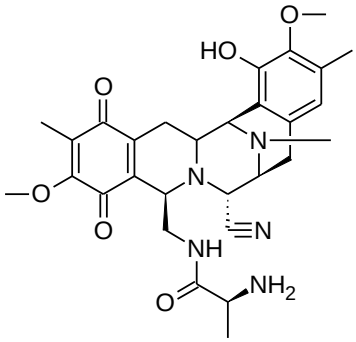
bryostatine 1 (**4**)



ecteinascidine-743 (**5**)



manzamine A (**6**)

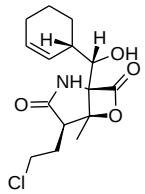


cyanosafracine B (**7**)

Ces quelques exemples pris dans la littérature mettent en lumière le « challenge » que peut présenter le travail avec les macroorganismes marins. L'un des obstacles les plus souvent cités concerne la collecte ou l'approvisionnement dans la mesure où ces organismes peuvent

être rares, à croissance lente ou encore difficile à collecter. Et quand une collecte d'échantillon en grande quantité est requise, cela peut occasionner des dégâts environnementaux pour les habitats les plus vulnérables. L'aquaculture ou encore la synthèse peuvent être des options mais dans certains cas, les résultats sont insatisfaisants. Une troisième option repose sur les microorganismes qui, contrairement aux macroorganismes, peuvent être mis en culture de façon durable et à grande échelle. Ces avantages expliquent l'intérêt croissant des chercheurs pour les microorganismes marins [Newman et Hill, 2006]. Par ailleurs, l'hypothèse (confirmée dans certains cas) selon laquelle les microorganismes symbiotiques des macroorganismes seraient les véritables producteurs de certains métabolites spécialisés bioactifs tels que les polycétides renforce cet intérêt [Haygood *et al.*, 1999; Piel, 2009, 2006; Taylor *et al.*, 2007]. Cette tendance s'observe aujourd'hui avec la croissance de la découverte de nouveaux produits naturels marins issus de microorganismes qui représentaient, en 2017, 57 % du nombre total de produits naturels marins rapportés [Carroll *et al.*, 2019]. Les métabolites spécialisés isolés de microorganismes contribuent ainsi à élargir considérablement le panel de la diversité chimique actuellement disponible et offrent des alternatives pour l'exploitation biotechnologique. De ce fait, les microorganismes associés deviennent donc une très bonne alternative pour pallier les problèmes d'approvisionnement et les risques environnementaux.

A l'instar de l'ET-743, un certain nombre de produits naturels marins sont déjà sur le marché des produits pharmaceutiques ou en cours de développement [Gerwick et Moore, 2012; Newman et Cragg, 2016b]. L'intensification des recherches sur les microorganismes marins a également fourni des résultats probants. Ces microorganismes ont montré une capacité de production de molécules particulièrement intéressantes en matière de diversité et d'originalité structurale. Le salinosporamide A (**8**) isolée de *Salinispora*, un genre nouveau d'actinomycètes exclusivement marin, en est un très bon exemple [Feling *et al.*, 2003]. Elle est actuellement en essais cliniques pour le traitement des myélomes multiples [Newman et Cragg, 2016b].



salinosporamide A (**8**)

Malgré les contraintes inhérentes à l'exploitation des produits naturels marins, en 2016, le marché mondial des médicaments d'origine marine était estimé à 8,6 milliards USD [Menon et Lele, 2015] et devrait continuer sa croissance dans les années à venir (https://www.transparencymarketresearch.com). Les produits naturels marins sont également retrouvés sur les marchés des cosméceutiques et des nutraceutiques notamment pour leurs propriétés anti-âge [Himaya et Kim, 2015; Martins *et al.*, 2014; Suleria *et al.*, 2015]. Parmi les entreprises qui intègrent déjà des produits naturels marins dans leur formulation, nous pouvons citer un des géants de la cosmétique, Ester Lauder avec sa gamme Résilience. Ces produits anti-rides contiennent des pseudoptérosines (extrait de gorgone) aux propriétés anti-

inflammatoires [Newman et Cragg, 2004]. En ce qui concerne les nutraceutiques d'origine marine, ceux-ci représentent une part importante du marché mondial et proviennent de sources diverses fournissant des molécules bioactives. Nous pouvons citer en exemple la spiruline, microalgue utilisée depuis plusieurs siècles pour ses vertus nutritionnelles, ou encore les Fucoïdanes, issus d'algues, qui présentent une palette d'activité anti-âge notamment neuroprotective.

- ✓ **Travaux de thèse**

C'est dans ce contexte général que le projet H2020 TASCMAR a vu le jour. Financé par l'Union Européenne à hauteur de 6,7 millions d'euros pour une durée de 4 ans, le projet coordonné par le Dr Jamal OUAZZANI du CNRS, est un projet collaboratif faisant intervenir 13 partenaires issus de 8 pays différents à savoir, 6 industriels, 5 laboratoires académiques dont le ChemBioPro, 1 cabinet de conseil et une ONG (Organisation Non Gouvernementale).

L'objectif de ce projet est la recherche de molécules issues du milieu marin ayant la capacité d'interagir avec certaines cibles moléculaires impliquées dans le processus du vieillissement afin de ralentir ou retarder l'apparition des effets liés à ce processus. *In fine*, ce projet permettra d'assurer la valorisation des molécules bioactives en cosmétique, pharmaceutique et nutraceutique dans le respect de l'environnement et de l'utilisation raisonnée et durable des ressources biologiques.

Les objectifs du projet TASCMAR sont multiples :

- Répondre au problème du vieillissement de la population et des pathologies associées par une exploitation durable des produits naturels marins.
- Explorer des écosystèmes de zones géographiques peu exploitées.
- Mettre en place une exploitation durable et éco-responsable en assurant un approvisionnement durable de la biomasse et en favorisant la production à grande échelle de molécules marines bioactives.
- Valoriser les produits naturels marins dans les domaines pharmaceutique, cosméceutique et nutraceutique.

Concernant plus précisément l'implication du ChemBioPro dans le cadre de ce projet, son action comprend 4 points majeurs :

- La collecte des invertébrés marins dans la zone Océan Indien.
- L'étude de la composition chimique de ces derniers afin d'isoler les molécules aux activités anti-âges.
- L'isolement et la production des microorganismes associés.
- La caractérisation des métabolites spécialisés bioactifs microbiens.

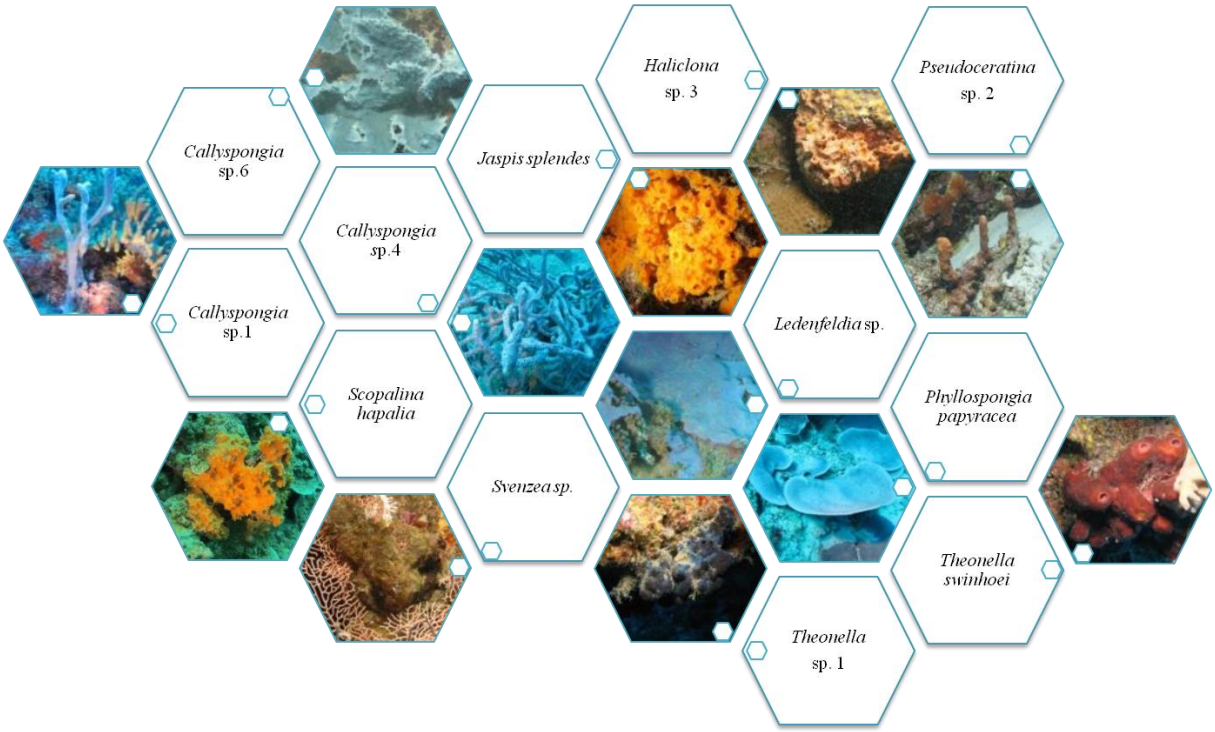
Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du projet TASCMAR. L'objectif des travaux menés étant l'isolement de métabolites spécialisés, ayant des activités anti-âge, à partir d'éponges de Mayotte (Océan Indien) et de leurs

microorganismes associés en mettant l'accent sur les actinomycètes et les champignons filamenteux.

Ainsi, les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit s'articulent autour de quatre grandes parties :

- Le premier chapitre aborde la stratégie de recherche mise en place pour la sélection des éponges bioactives.
- Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la composition chimique de *Lendenfeldia* sp..
- Le troisième chapitre concerne l'étude de la composition chimique de *Scopalina hapalia*.
- Le quatrième chapitre met l'accent sur l'étude des microorganismes associés à *Scopalina hapalia*.

Chapitre I
Sélection des éponges



I.1 Collecte et identification

La collecte des organismes marins sessiles (éponges et tuniciers) a été effectuée au large des côtes Sud-Est de l'île de Mayotte en Mai 2013 à une profondeur comprise entre 1 et 34 m (**Figure 1**). Mayotte, Département français de l'Océan Indien, est localisée dans l'archipel des Comores à l'entrée nord du Canal du Mozambique. L'île de Mayotte, à l'instar des trois autres îles de l'archipel, possède un patrimoine naturel, tant terrestre que marin, exceptionnel mais encore mal connu. Dotée d'un lagon d'une surface de plus de 1 000 km^2 et d'une double barrière de corail d'environ 200 km de long (http://www.aires-marines.fr), le lagon de Mayotte est l'un des plus grands et des plus riches du monde en terme de biodiversité. Afin de la valoriser et de la préserver des impacts du changement climatique ainsi que des activités anthropiques menaçantes, la biodiversité marine de Mayotte a été reconnue par la création du premier parc naturel marin d'Outre-Mer en Janvier 2010.

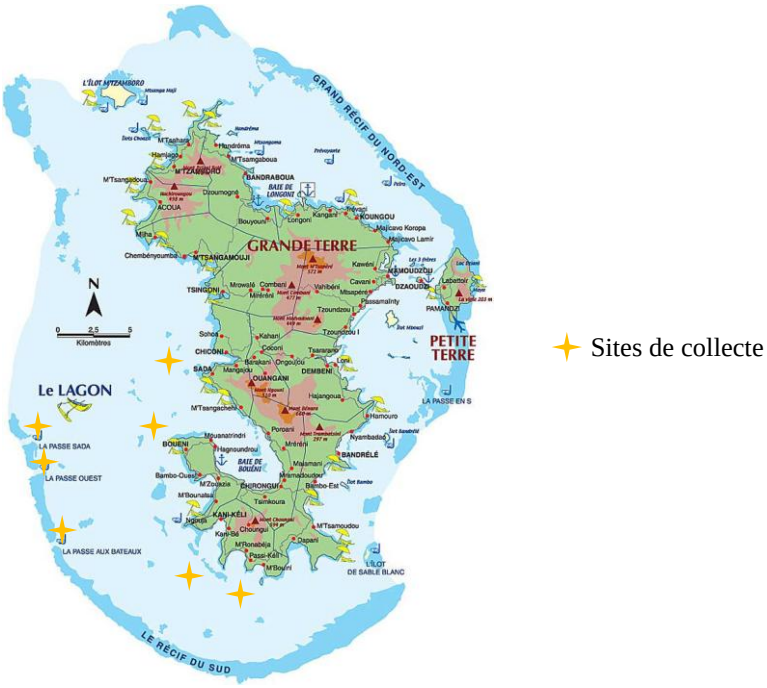


Figure 1 : Sites de collecte des invertébrés marins.

En raison de son fort taux d'endémisme, cette région, sans équivalent au niveau mondial, est source de nouvelles connaissances biologiques et chimiques. Pourtant, malgré l'engouement de la communauté scientifique pour la chimie des produits naturels marins, l'exploration ainsi que l'exploitation des fonds marins de Mayotte n'en sont qu'à leurs prémices.

Dans ce contexte, il a semblé pertinent de s'intéresser à la valorisation des invertébrés marins de cette île. Ces travaux de thèse se sont plus spécifiquement focalisés sur les éponges pour deux raisons principales et interdépendantes : (1) les éponges constituent la source la plus prolifique en termes de métabolites spécialisés biologiquement actifs isolés à ce jour et

(2) elles forment des liens étroits avec une grande variété de micro-organismes, producteurs potentiels de métabolites bioactifs.

Les organismes, listés en **Annexe 1** (Tome II, p. 7-15), ont été collectés par le Pr Anne Bialecki (ChemBioPro, Université de La Réunion) et son équipe, puis identifiés par le Dr Nicole de Voogd (Museum Naturalis de Leyden, Pays-Bas). Au total, 44 échantillons ont été collectés et identifiés comme représentant 22 genres différents d'éponges. Pour chaque organisme collecté, un échantillon de référence a été conservé aussi bien au LCSNSA qu'au Muséum Naturalis (Pays-Bas).

I.2 Obtention des extraits bruts

Afin de pouvoir étudier la chimie des organismes collectés ainsi que leurs activités biologiques associées, une étape d'extraction de la matière première a été indispensable.

I.2.1 Principe

Les 44 échantillons d'éponges collectés et conservés au congélateur ont été découpés congelés puis dessalés par macération dans l'eau. Après lyophilisation, les échantillons dessalés, ont été extraits au moyen, soit d'une macération à froid, soit d'une extraction par ASE (Extraction Accélérée par Solvant). Les deux méthodes d'extraction utilisent le même mélange de solvants : Dichlorométhane/Méthanol (50/50 v/v). Le choix du mode d'extraction était fonction de la consistance de l'éponge. Certaines éponges produisant un mucus abondant empêchaient, en effet, l'emploi de l'ASE.

I.2.2 Résultats

Les rendements en extraits bruts ont été calculés par rapport à la masse de matière sèche de l'organisme. Ces rendements sont donnés dans l'**Annexe 1** (Tome II, p.7-15).

I.3 Criblage biologique

Le vieillissement est un processus physiologique normal et d'une grande complexité au niveau moléculaire. Dans le cadre de la recherche de molécules ayant la capacité d'agir sur les causes biologiques du vieillissement, afin de ralentir ou retarder l'apparition des effets naturels/physiologiques ou pathologiques liés à ce processus, plusieurs cibles moléculaires, ont été sélectionnées pour la réalisation des tests d'activité biologique. Il s'agit de cibles moléculaires impliquées aussi bien dans les maladies liées au vieillissement que dans le vieillissement cutané. En effet, le vieillissement de la peau, premier signe visible du vieillissement, est un processus physiologique normal. Celui-ci résulte de deux processus biologiques différents mais qui peuvent être concomitants à savoir : le vieillissement

intrinsèque, lié à une perte d'élasticité de la peau au fil du temps, et le vieillissement extrinsèque, conséquence des facteurs environnementaux tels que l'exposition aux UV, la pollution ou le tabac.

Les différents tests d'activité appliqués aux extraits bruts des éponges de Mayotte ont été effectués par 3 partenaires du projet TASCMAR. Il s'agit de la société APITIVA (Grèce), de la société CRELUX (Allemagne) et de l'Université d'Athènes (Grèce). Tous les extraits bruts ont fait l'objet d'un criblage sur des cibles moléculaires pour tester leur activité inhibitrice des protéines suivantes : l'élastase, la tyrosinase, la CDK7, FYN kinase et le protéasome.

I.3.1 Présentation des cibles biologiques sélectionnées

I.3.1.1 Qu'est-ce que l'élastase?

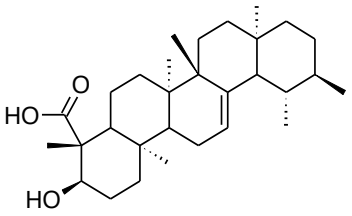
Les élastases constituent un groupe de sérine protéases* (élastases leucocytaire ou neutrophile, pancréatique et fibroblastique) et de métalloprotéinases matricielles* (Matrix MetalloProteinases-2, -9 et -12) impliquées dans la dégradation de l'élastine [Kielty, 2006; Tsuji *et al.*, 2001; Werb *et al.*, 1982]. L'élastine est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire et est organisée en fibres élastiques fonctionnelles. Ayant un renouvellement très lent (temps de demi-vie* estimé à 70 ans) et faisant partie des protéines les plus résistantes de l'organisme, l'élastine confère élasticité et solidité aux tissus conjonctifs [Kielty *et al.*, 2002]. Parmi les tissus riches en élastine, nous pouvons citer : l'aorte, les vaisseaux sanguins, les ligaments, les poumons, les tendons ainsi que la peau [Robert *et al.*, 1984; Werb *et al.*, 1982]. Sa synthèse ainsi que son organisation en fibres élastiques fonctionnelles ont lieu de l'embryogénèse à la puberté. Au-delà, sa capacité à former des fibres élastiques fonctionnelles est perdue.

La dégradation de l'élastine est un processus normal ayant lieu en condition physiologique lors, par exemple, de la croissance, de la cicatrisation ou encore au cours de la grossesse [Werb *et al.*, 1982]. Toutefois, en condition physiopathologique, les taux de dégradation et de fragmentation de l'élastine et des fibres élastiques s'accélèrent. Par conséquent, les acteurs moléculaires responsables de la perte de l'intégrité structurale de l'élastine joueraient un rôle majeur dans le développement de maladies chroniques [Werb *et al.*, 1982]. Aussi, il a été montré qu'une augmentation de l'activité de l'élastase leucocytaire favoriserait le développement de diverses pathologies chroniques telles que l'arthrite, l'emphysème, l'athérosclérose ou encore le vieillissement prématuré de la peau qui peut être la résultante de changements dégénératifs provoqués par le soleil [Edwards et Bernstein, 1994; Robert *et al.*, 1984].

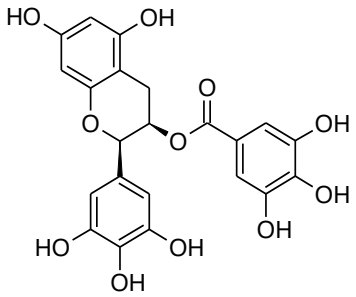
La perte d'élasticité due à l'activité des élastases est un facteur majeur contribuant au vieillissement des tissus conjonctifs. Dans sa review de 2009, Sherratt expose le lien existant entre la perte d'élasticité, liée à l'âge, des organes dynamiques (poumons, vaisseaux, peau) et les pathologies associées. Il en ressort que la dégradation des fibres élastiques par les élastases

est l'une des causes majeures de cette perte d'élasticité [Sherratt, 2009]. Des études montrent qu'une déficience en α1-antitrypsine (inhibiteur endogène de l'élastase) est associée à un risque accru de cancers et qu'une augmentation des niveaux d'élastase leucocytaire pourraient concourir au développement de plusieurs cancers [Sun et Yang, 2004]. Cette hypothèse a été démontrée *in vivo* par inhibition de l'élastase leucocytaire qui a abouti à la suppression du développement de tumeurs cutanées chez la souris [Starcher *et al.*, 1996]. Par ailleurs, d'autres études d'inhibition sélective de l'activité de l'élastase montrent que l'élastase secrétée par les fibroblastes de la peau jouerait un rôle décisif dans la formation des rides à travers la dégénérescence des fibres élastiques [Tsuji *et al.*, 2001; Tsukahara *et al.*, 2001]. L'étude de Godeau et Hornebeck montre qu'au niveau de la peau, au moins deux types d'élastases participent à la dégradation des fibres élastiques [Godeau et Hornebeck, 1988]. Il s'agit des élastases leucocytaire et fibroblastique.

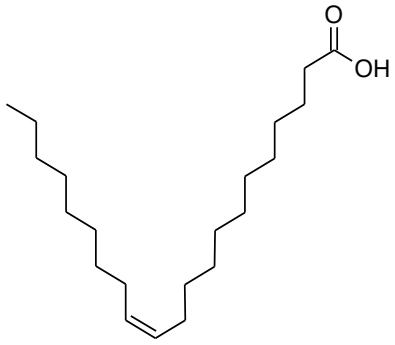
Du fait de leur possible implication dans les pathologies liées aux tissus conjonctifs, il y a, ces dernières années, un intérêt croissant pour la recherche d'inhibiteurs de l'activité de l'élastase notamment à partir des produits naturels [Siedle *et al.*, 2007; Thring *et al.*, 2009]. L'acide boswellique (**9**), triterpène pentacyclique isolé de l'encens, le gallate d'épigallocatéchine (**10**), flavonoïde le plus abondant dans le thé, ou encore l'acide érucique (**11**), acide gras naturel présent dans le colza, en sont quelques exemples [Rennert et Melzig, 2002; Safayhi *et al.*, 1997; Sartor *et al.*, 2002]. En effet, sur le plan thérapeutique mais aussi cosmétique, l'étude de ces voies physiopathologiques conduit à la recherche et à l'utilisation progressive d'inhibiteurs de l'élastase afin de réduire la dégradation de l'élastine.



acide β-boswellique (**9**)



gallate d'épigallocatéchine (**10**)



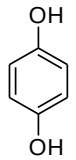
acide érucique (**11**)

I.3.1.2 Qu'est-ce que la tyrosinase?

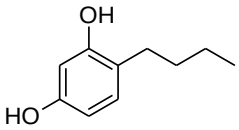
La tyrosinase humaine est une enzyme clé impliquée dans la mélanogénèse, processus biologique responsable de la synthèse de la mélanine. La mélanine joue un rôle important dans la protection contre les rayonnements UV du soleil qui accentuent le processus du vieillissement de la peau et le risque de cancer de la peau, ainsi que contre les espèces réactives de l'oxygène [Różanowska *et al.*, 1999]. Ces pigments sont produits par les mélanocytes à l'intérieur d'organites spécialisés appelés mélanosomes. La synthèse de la mélanine est un processus enzymatique complexe sous contrôle de plusieurs facteurs

notamment génétique et enzymatique [Pillaiyar *et al.*, 2018]. Les premières étapes de la mélanogénèse sont sous contrôle de la tyrosinase qui est l'enzyme limitante dans l'initiation de ce processus. La tyrosinase, protéine transmembranaire, est produite exclusivement par les mélanocytes et est localisée dans les membranes des mélanosomes. Une dérégulation de la production de la mélanine peut entraîner une hyperpigmentation anormale de la peau conduisant à des problèmes dermatologiques tels que les lentigos ou taches de vieillesse, le mélasma, l'hyperpigmentation post-inflammatoire ou encore les grains de beauté pouvant dégénérer en mélanome [Pillaiyar *et al.*, 2018]. Par conséquent, il existe une forte demande d'inhibiteurs de la mélanogénèse afin de prévenir cette affection de la peau. En effet, d'après les estimations, le marché des produits dépigmentants (ou éclaircissants) devrait atteindre les 23 milliards USD d'ici 2020 [Pillaiyar *et al.*, 2018]. Malheureusement, la plupart des produits éclaircissants déjà présents sur le marché dont l'hydroquinone (**12**), produit phare, provoquent dans certains cas des effets secondaires notamment mutagène [Parvez *et al.*, 2006]. En raison de cette toxicité et de la forte demande des consommateurs, les inhibiteurs d'origine naturelle attirent de plus en plus l'attention [Chang, 2012; Parvez *et al.*, 2007]. Cette demande croissante incite les chercheurs à s'orienter vers les produits naturels pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de la mélanogenèse.

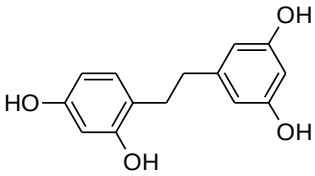
Catalysant les étapes limitantes de la mélanogenèse et ayant une expression cellule-spécifique, la tyrosinase a été reconnue comme une cible thérapeutique pertinente pour contrôler la synthèse anormale/pathologique de la mélanine [Pillaiyar *et al.*, 2018]. L'un des mécanismes possibles pour réduire l'activité de la tyrosinase est d'inhiber directement son activité catalytique. Le 4-*n*-butylrésorcinol (**13**), un dérivé du résorcinol, est un puissant inhibiteur de la mélanogenèse agissant comme un inhibiteur compétitif de la tyrosinase [Kim *et al.*, 2005b]. A l'heure actuelle, il est utilisé comme actif cosmétique sous le nom de Rucinol dans des crèmes pour le traitement du mélasma. Le dihydroxyresvératrol (**14**), un analogue du Resvératrol, a été identifié récemment comme un puissant inhibiteur de la tyrosinase avec une CI_{50} de 0,3 µM et semble être un « lead » potentiel [Chaita *et al.*, 2017].



hydroquinone (**12**)



4-*n*-butylrésorcinol (**13**)



dihydroxyresvératrol (**14**)

I.3.1.3 Qu'est-ce que la Fyn kinase ?

La Fyn kinase est une protéine tyrosine kinase cytoplasmique appartenant à la famille des Src kinases. Découvertes initialement dans des tumeurs, l'activité des Src kinases a été essentiellement associée aux processus prolifératifs. Moins étudiée que les autres Src kinases, la Fyn kinase est exprimée de façon ubiquitaire dans le corps humain et existe sous deux

isoformes actives. D'une part, il y a l'isoforme T (thymus) spécifique des lymphocytes T et d'autre part, l'isoforme B (brain) exprimé davantage dans le cerveau que dans les autres tissus. Localisées dans le cytoplasme, elles assurent la phosphorylation de résidus tyrosines d'un ensemble d'enzymes clés impliquées dans différentes voies de signalisation et agissent notamment en aval de cascades de signalisation de plusieurs récepteurs membranaires. Les fonctions biologiques de Fyn kinases sont multiples et incluent notamment une implication dans la signalisation de la croissance et la motilité cellulaire, l'apoptose* ou encore la différenciation neuronale [Saito *et al.*, 2010]. Les études réalisées dans le domaine du cancer montrent une surexpression et/ou une suractivation de Fyn qui contribuent au développement et à la progression tumorale de plusieurs types de cancers à l'instar du mélanome, des cancers du sein ou de la prostate [Elias et Ditzel, 2015]. Par ailleurs, il a été montré que Fyn participerait aux mécanismes de résistances observés pour certains traitements. Ainsi, l'inhibition de Fyn dans les cancers surexprimant la protéine pourrait ralentir la progression de la maladie.

Au niveau du système nerveux central, Fyn y occupe plusieurs fonctions biologiques documentées par Schenone *et al.* dans une publication parue en 2011 [Schenone *et al.*, 2011]. Dans cette revue, les auteurs rapportent, entre autres, qu'une hyperactivation de cette protéine est impliquée dans les maladies neurodégénératives. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer par exemple, pendant de nombreuses années, seules les protéines Tau et peptide amyloïde-β ont été les cibles thérapeutiques privilégiées dans la recherche de médicaments contre cette maladie. En effet, ce sont des acteurs clés de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Ils sont responsables des lésions caractéristiques observées lors de la maladie à savoir : les dégénérescences neurofibrillaires*, conséquences d'une phosphorylation anormale de la protéine Tau, et les plaques séniles* résultant d'une neurotoxicité médiée par le peptide amyloïde-β [Ittner *et al.*, 2010]. Les avancées de la recherche sur cette pathologie permettent aujourd'hui une meilleure compréhension du processus physiopathologique et des mécanismes moléculaires sous-jacents. Ainsi, l'étude réalisée par Ittner en 2010 a permis de mieux comprendre le lien existant entre la voie de signalisation responsable de la neurotoxicité de l'amyloïde-β et l'implication de la protéine Tau [Ittner *et al.*, 2010]. Cette étude a ainsi contribué à mettre en évidence l'implication de l'axe Amyloïde – Fyn – Tau, appelé le triade toxique, dans la médiation de la neurotoxicité de l'amyloïde β et à mettre en lumière le rôle central de Fyn [Haass et Mandelkow, 2010]. Une étude *in vivo* d'inhibition de Fyn par approche pharmacologique réalisée dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer a montré des résultats encourageants [Kaufman *et al.*, 2015]. Aussi, l'identification de cette voie de signalisation bien spécifique a ouvert la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur un rationnel ciblant des mécanismes moléculaires plus spécifiques. C'est ainsi que Fyn est devenue une nouvelle cible moléculaire d'intérêt thérapeutique dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et que des études de preuves de concept en phase 2 d'essais cliniques sont actuellement en cours [Nygaard, 2018; Nygaard *et al.*, 2015, 2014].

La protéine Fyn a donc une expression ubiquitaire. Une hyperactivation ou une surexpression de Fyn est impliquée aussi bien dans les cancers que dans les maladies

neurodégénératives. Pour ces raisons, la recherche d'inhibiteurs spécifiques/sélectives de Fyn est en pleine expansion car à ce jour aucun inhibiteur sélectif de cette protéine n'a été rapporté.

I.3.1.4 Qu'est-ce que la CDK7 ?

La protéine CDK7, pour Cyclin-dependent kinase (CDK) 7, est une protéine appartenant à la famille des kinases dépendantes des cyclines et qui joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est un processus biologique hautement régulé avec plusieurs points de contrôle. Ainsi, les CDK sont elles-mêmes placées sous le contrôle de différents facteurs cellulaires. Par conséquent, leur activité est non seulement modulée par leur association à leur sous-unité régulatrice respective appelée cycline mais, également par modifications post-traductionnelles (réactions de phosphorylation/déphosphorylation) [Morgan, 1995]. Cette activation par phosphorylation est assurée par une kinase dénommée CAK, pour cdk activating kinase. La régulation négative de cette activité est, par ailleurs, assurée par une famille de protéines inhibitrices des complexes cdk-cyclines appelée CKI [Morgan, 1995]. La modulation de leur activité permet ainsi d'assurer une intervention ordonnée et adéquate durant la progression du cycle cellulaire et de contrôler ainsi les différentes transitions du cycle. En résumé, les CDK, en association avec les cyclines, contrôlent les « points de transition » du cycle cellulaire, constitué de phases successives, en phosphorylant de nombreux substrats.

Dans la famille des CDK, CDK7 tient une place spéciale, en sa qualité de CAK, dans la mesure où elle est responsable de l'activation d'autres CDK (CDK1, CDK2 et CDK4) par phosphorylation d'un résidu thréonine conservé [Fisher et Morgan, 1994]. En contrôlant ainsi l'activité d'autres CDK impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, CDK7 joue un rôle central et indispensable dans la progression du cycle cellulaire.

CDK7 est également une des sous-unités du complexe multiprotéique du facteur de transcription TFIIH, impliqué dans l'initiation de la transcription et la réparation par excision de nucléotides de l'ADN [Roy *et al.*, 1994]. De ce fait, CDK7 se trouve à la croisée des chemins de 3 mécanismes cellulaires importants à savoir : la transcription, la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire [Nigg, 1996].

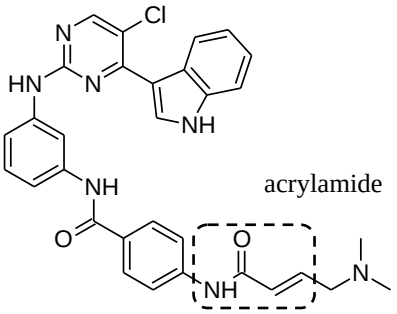
CDK7 ayant un rôle clé dans des mécanismes cellulaires importants, il en résulte que la perte ou le dysfonctionnement de la régulation négative de CDK7, mais aussi des autres CDK, pourrait entraîner :

- ✓ une prolifération cellulaire incontrôlée telle qu'observée chez les cellules cancéreuses [Asghar *et al.*, 2015]
- ✓ un dysfonctionnement du cycle cellulaire comme plus récemment observé dans la pathogénie d'Alzheimer [Zhu *et al.*, 2000].

Ainsi, depuis plus de 20 ans déjà, des criblages intensifs ont permis l'identification de plusieurs inhibiteurs non sélectifs des CDK sans succès clinique. L'évaluation thérapeutique de ces inhibiteurs est particulièrement avancée en chimiothérapie anticancéreuse où l'une des

stratégies alternatives est de cibler sélectivement CDK7 [Greenall *et al.*, 2017; Kwiatkowski *et al.*, 2014].

L'ensemble de ces résultats a impulsé une nouvelle approche qui est la recherche et le développement de composés présentant une plus grande sélectivité [Asghar *et al.*, 2015]. Ce travail de longue haleine a conduit à l'identification du premier inhibiteur irréversible (inactivateur) de CDK7, le THZ1 (**15**) [Kwiatkowski *et al.*, 2014]. Le THZ1 est une phénylaminopyrimidine portant une structure acrylamide fonctionnelle qui cible sélectivement et forme une liaison covalente avec un résidu cystéine du domaine kinase de CDK7.



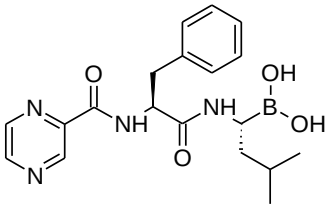
THZ1 (**15**)

I.3.1.5 Qu'est-ce que le protéasome ?

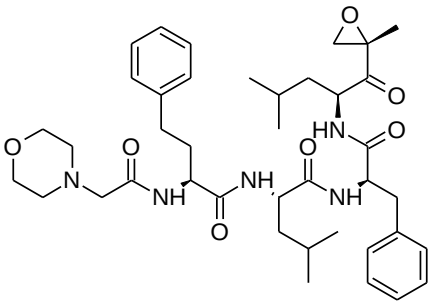
Le protéasome est un complexe multiprotéique composé d'un cœur protéolytique*, appelé le protéasome 20S, et de différentes sous-unités régulatrices [Adams, 2003]. Ces sous-unités régulatrices servent essentiellement à la sélection ainsi qu'à la dégradation spécifique et séquentielle des protéines en peptides inactifs. Cette voie par laquelle les protéines sont ubiquitinylées* et dégradées par le protéasome est appelée la voie ubiquitine-protéasome.

Le protéasome est donc impliqué dans la dégradation spécifique et régulée des protéines intracellulaires. Ce processus, appelé protéolyse intracellulaire, est un processus essentiel du bon fonctionnement cellulaire et est assuré, entre autres, par le système ubiquitine-protéasome. Cette machinerie moléculaire intervient directement dans le contrôle des niveaux protéiques (protéostasie) qui doivent être adaptés aux besoins de la cellule ainsi que dans la régulation de fonctions essentielles des cellules vivantes [Adams, 2003]. En effet, le protéasome joue un rôle central dans la régulation des protéines qui contrôlent la progression du cycle cellulaire ainsi que dans la mort cellulaire programmée (apoptose). En raison de ses multiples fonctions, les dysfonctionnements du protéasome sont impliqués dans un certain nombre de pathologies notamment celles liées au vieillissement telles que les cancers et les maladies neurodégénératives [Schmidt et Finley, 2014]. De fait, le protéasome est devenu une cible importante dans la thérapie anticancéreuse dans la mesure où l'inhibition de ses fonctions peut arrêter ou retarder la progression du cycle cellulaire et déclencher à

terme l'apoptose entre autres mécanismes [Crawford *et al.*, 2011]. Plusieurs inhibiteurs du protéasome ont été décrits au cours de ces 20 à 30 dernières années [Teicher et Tomaszewski, 2015] parmi lesquels un certain nombre sont issus des produits naturels [Kisselev, 2008]. Le bortézomib (**16**) est le premier inhibiteur du protéasome à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2003 pour le traitement des myélomes multiples réfractaires suivi par le carfilzomib (**17**) en 2012 pour les patients ne répondant pas aux traitements existants. Malheureusement, à ce jour, le traitement avec les inhibiteurs de première et seconde générations ne semble efficace qu'avec les cancers hématologiques et montre des cas de rechutes fréquents ainsi que le développement de résistance au traitement [Manasanch et Orlowski, 2017].



bortézomib (**16**)



carfilzomib (**17**)

Ainsi, la recherche et le développement d'une nouvelle génération d'inhibiteurs du protéasome plus performants et offrant éventuellement de nouveaux champs d'application thérapeutique restent encore une nécessité dans le domaine thérapeutique.

I.3.1.6 Bilan des cibles biologiques sélectionnées

Les activités biologiques recherchées ainsi que leurs implications thérapeutiques et/ou cosméceutiques sont présentées dans le **Tableau I**.

Tableau I : Synthèse des cibles biologiques sélectionnées.

Cibles moléculaires	Activités recherchées	Implication physiologique / pathologique
Elastase	Inhibition	Formation des rides
Tyrosinase	Inhibition	Hyperpigmentation / lentigo
FynB kinase	Inhibition	Anti Alzheimer / Anti Parkinson
CDK7	Inhibition	Anticancéreux
Protéasome	Inhibition	Anticancéreux

I.3.2 Résultats du criblage biologique

I.3.2.1 Evaluation de l'activité anti-élastase

Un seuil d'inhibition de l'activité protéolytique de l'élastase a été fixé à 50 % pour la sélection des extraits bruts les plus actifs et entre 25 % et 50 % pour les extraits moyennement actifs. Deux types de tests élastases ont été réalisés.

Test 1 : ce premier test a été effectué sur un élastase purifié. Les extraits les plus actifs, détectés avec le premier criblage, sont présentés dans le **Tableau II**. Il s'agit des extraits suivants, présentés par ordre décroissant de leur activité inhibitrice : *Theonella* sp. 1 (XML-265), *Callyspongia* sp. 6 (XML-222), *Jaspis splendens* (XML-237), *Scopalina hapalia* (XML-263) et *Rhabdastrella* sp. 1 (XML-259). Ces extraits se sont montrés les plus actifs et ont été sélectionnés pour un second criblage. Il est à noter que l'extrait brut de *Theonella* sp. 1 s'est montré particulièrement actif avec 100 % d'inhibition de l'activité protéolytique de l'élastase purifié.

Test 2 : ce second test a été réalisé sur un modèle cellulaire aux concentrations de 1 et 10 µg/mL. Les résultats sont présentés dans le **Tableau II**. Étonnamment, l'extrait de *Theonella* sp. s'est montré inactif. Les extraits de *Jaspis splendens* et *Callyspongia* sp. 6 ont été actifs aux concentrations respectives suivantes : 1 µg/mL (49 %) et 10 µg/mL (26 %). Seul l'extrait de *Scopalina hapalia* a été actif aux deux concentrations testées : 10 µg/mL (48 %) et 1 µg/mL (44 %). Cet extrait a donc été sélectionné pour l'isolement des métabolites spécialisés bioactifs.

Tableau II : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de l'élastase.

Eponges			**Inhibition de l'élastase purifié (%)**	**Inhibition de l'élastase cellulaire (%)**
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*		
***Callyspongia* sp. 6**	XML-222		59	26
Jaspis splendens	XML-237		51	49
***Rhabdastrella* sp. 1**	XML-259		25	Inactif
Scopalina hapalia	XML-263		49	48 (10 µg/mL) 44 (1 µg/mL)

Tableau II : (suite).

Eponges			Inhibition de l'élastase purifié (%)	Inhibition de l'élastase cellulaire (%)
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*		
***Theonella* sp. 1**	XML-265		100	Inactif

I.3.2.2 Evaluation de l'activité anti-tyrosinase

Un seuil d'inhibition de l'activité de la tyrosinase a été fixé à 50 % pour la sélection des extraits bruts les plus actifs et entre 25 % et 50 % pour les extraits moyennement actifs.

Les résultats du criblage pour les extraits bruts les plus actifs sont présentés dans le **Tableau III**. Sur les 44 extraits d'éponges testés, 4 extraits bruts ont montré une activité d'inhibition de la tyrosinase. Il s'agit de, présentés par ordre décroissant de leur activité inhibitrice : *Callyspongia* sp. 1 (XML-215), *Svenzea* sp. (XML-264), *Callyspongia* sp. 4 (XML-220) et *Haliclona* sp. 3 (XML-233). Toutes présentent une activité modérée à l'exception de *Callyspongia* sp. 1 qui s'est montrée très active.

Tableau III : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la tyrosinase.

Eponges			Inhibition de la tyrosinase (%)
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*	
***Callyspongia* sp. 1**	XML-215		53
***Callyspongia* sp. 4**	XML-220		41
***Haliclona* sp. 3**	XML-233		31
***Svenzea* sp.**	XML-264		47

I.3.2.3 Evaluation de l'activité d'inhibition de la Fyn kinase

Le criblage des extraits bruts pour la recherche d'inhibiteurs de la Fyn kinase a été réalisé en testant 3 concentrations différentes (111,1 µg/mL, 11,1 µg/mL et 1,1 µg/mL) pour chaque extrait brut. Un extrait brut est considéré actif voire très actif lorsqu'une réponse dose-dépendante est observée pour 2 ou 3 concentrations testées.

Les résultats du criblage pour les extraits bruts les plus actifs sont présentés dans le **Tableau IV**. Sur les 44 extraits bruts d'éponges testés pour leur capacité à inhiber la protéine Fyn kinase, 5 extraits bruts ont montré une activité inhibitrice dose-dépendante. Ces extraits sont issus des éponges : *Scopalina hapalia* (XML-263), *Axinyssa* sp. 1 (XML-209), *Axinyssa* sp. 3 (XML-211), *Lendenfeldia* sp. (XML-240), *Neopetrosia* sp. 3 (XML-244). Sur les 5 extraits bruts, seul celui de *Scopalina hapalia* (XML-263) a montré une activité inhibitrice dose-dépendante pour les trois concentrations testées.

Tableau IV : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la Fyn kinase.

Eponges			**Inhibition de la Fyn kinase**		
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*	111,1 µg/mL	11,1 µg/mL	1,1 µg/mL
***Axinyssa* sp. 1**	XML-209		+	+	Inactif
***Axinyssa* sp. 3**	XML-211		+	+	Inactif
***Lendenfeldia* sp.**	XML-240		+	+	Inactif
***Neopetrosia* sp. 3**	XML-244		+	+	Inactif
Scopalina hapalia	XML-263		+	+	+

I.3.2.4 Evaluation de l'activité d'inhibition de la Cyclin-dependent kinase (CDK) 7

La recherche d'inhibiteurs sélectifs de CDK7 a permis d'identifier 4 extraits bruts d'éponges présentant une activité inhibitrice pour les 3 concentrations testées (111,1 µg/mL,

11,1 µg/mL et 1,1 µg/mL) à savoir : *Lendenfeldia* sp. (XML-240), *Phyllospongia papyracea* (XML-254), *Pseudoceratina* sp. 2 (XML-257) et *Theonella swinhoei* (XML-267) (**Tableau V**).

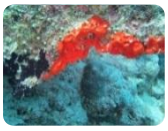
Tableau V : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la protéine CDK7.

Eponges			**Inhibition du CDK7**
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*	
***Lendenfeldia* sp.**	XML-240		+
Phyllospongia papyracea	XML-254		+
***Pseudoceratina* sp. 2**	XML-257		+
Theonella swinhoei	XML-267		+

I.3.2.5 Evaluation de l'activité d'inhibition du protéasome

La recherche d'inhibiteurs du protéasome a été effectuée grâce à un test mené sur protéasome purifié. Sur les 44 extraits bruts d'éponges testés, les extraits bruts ayant montré une activité inhibitrice du protéasome sont issus des éponges : *Callyspongia* sp. 6 (XML-222), *Dragmacidon coccineum* (XML-227), *Haliclona* sp. 3 (XML-233), *Lendenfeldia* sp. (XML-240), *Rhabdastrella* sp. 2 (XML-260) et *Theonella* sp. 1 (XML-265) (**Tableau VI**). Les éponges *Callyspongia* sp. 6, *Haliclona* sp. 3 et *Lendenfeldia* sp. ont été identifiées comme super hits.

Tableau VI : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice du protéasome.

Eponges			Inhibition du protéasome
Espèces	Références MACLIB	Photos *in situ*	
***Callyspongia* sp. 6**	XML-222		+
Dragmacidon coccineum	XML-227		+
***Haliclona* sp. 3**	XML-233		+
***Lendenfeldia* sp.**	XML-240		+
***Rhabdastrella* sp. 2**	XML-260		+
***Theonella* sp. 1**	XML-265		+

I.3.3 Conclusion du criblage biologique

Le criblage biologique sur 5 cibles moléculaires différentes (élastase, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase, protéasome) a permis d'identifier, parmi les 44 extraits bruts d'éponges sélectionnés pour le projet TASCMAR, 19 extraits bruts d'éponges actifs sur au moins une des cibles testées. Ces éponges appartiennent à 13 genres différents : *Axinyssa*, *Callyspongia*, *Dragmacidon*, *Haliclona*, *Jaspis*, *Lendenfeldia*, *Neopetrosia*, *Phyllospongia*, *Pseudoceratina*, *Rhabdastrella*, *Scopalina*, *Svenzea* et *Theonella*. Sur les 19 extraits bruts actifs, seuls 10 se sont montrés très actifs sur la base de critères d'évaluation établis par les partenaires (Université d'Athènes et CRELUX) : *Callyspongia* sp. 1 et *Callyspongia* sp. 6, *Haliclona* sp. 3, *Jaspis splendens*, *Lendenfeldia* sp., *Phyllospongia papyraceae*, *Pseudoceratina* sp. 2, *Scopalina hapalia*, *Theonella* sp. 1 et *Theonella swinhoei*.

Parmi les 10 éponges très actives identifiées, 5 présentent deux, voire trois activités inhibitrices sur des cibles différentes. Il s'agit de :

- ✓ *Callyspongia* sp. 6 (XML-222) active contre l'élastase et le protéasome.

- ✓ *Haliclona* sp. 3 (XML-233) active contre la tyrosinase ainsi que le protéasome.
- ✓ *Lendenfeldia* sp. (XML-240) active contre la CDK7, la Fyn kinase et le protéasome.
- ✓ *Scopalina hapalia* (XML-263) active contre l'élastase ainsi que la Fyn kinase.
- ✓ *Theonella* sp. 1 (XML-265) active contre l'élastase et le protéasome.

Une analyse des résultats reliant espèce / genre / activité biologique montre que les activités biologiques ne sont pas particulièrement associées à un genre donné. En effet, hormis les 3 espèces d'*Axinyssa* qui présentent la même activité biologique (inhibition Fyn kinase), les espèces appartenant aux genres suivants présentent des activités biologiques distinctes :

- ✓ *Callyspongia* sp. 1 et *Callyspongia* sp. 4 présentent une activité d'inhibition de la tyrosinase tandis que *Callyspongia* sp. 6 présentent un profil d'inhibition de l'élastase ainsi que du protéasome,
- ✓ *Rhabdastrella* sp. 1 présente une activité d'inhibition de l'élastase alors que *Rhabdastrella* sp. 2 inhibe le protéasome,
- ✓ *Theonella* sp. 1 démontre une activité d'inhibition de l'élastase à 100 % tandis que *T. swinhoei* inhibe les activités du protéasome et de CDK7.

I.4 Criblage chimique

Le criblage chimique des 10 extraits bruts les plus actifs a été effectué en utilisant les techniques classiques de la chromatographie à savoir : la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée en série à un détecteur UV (DAD) et un détecteur Corona (CAD®) ainsi que la CLHP couplée à un spectromètre de masse (SM).

I.4.1 Principe du criblage par CCM

Les extraits bruts ont d'abord été analysés par CCM, en utilisant quatre systèmes d'éluants de polarité croissante afin de déterminer la polarité des composés. Ces quatre systèmes d'éluants sont :

- ✓ Cyclohexane/AcOEt 80/20 (v/v)
- ✓ Cyclohexane/AcOEt 20/80 (v/v)
- ✓ AcOEt/MeOH 80/20 (v/v)
- ✓ AcOEt/MeOH 20/80 (v/v)

La vanilline sulfurique, révélateur non spécifique d'une fonction ou d'une classe chimique, a été utilisée.

I.4.2 Principe du criblage par CLHP-DAD-CAD

Par la suite, les extraits bruts ont été analysés, par CLHP couplée à deux types de détecteurs :

- ✓ Un détecteur à barrettes de diodes (DAD) qui permet de mesurer l'absorbance simultanée sur l'ensemble du spectre UV-visible (entre 190 et 800 nm) des composés présents dans l'extrait brut. Grâce à la spectrophotométrie à barrettes de diodes qui permet une acquisition en trois dimensions des données (absorbance, longueur d'onde et temps).
- ✓ Un détecteur Corona CAD® (Charged Aerosol Detector) qui permet la détection des composés indépendamment de leurs structures chimiques notamment, des composés n'ayant pas de chromophore ou ne s'ionisant pas. Le mécanisme de fonctionnement de ce détecteur commence par la formation de particules (nébulisation) à partir de l'échantillon, puis ces particules sont chargées positivement grâce à un flux de gaz et enfin le détecteur mesure les charges imparties à chaque analyte. Le signal obtenu est directement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon.

I.4.3 Principe du criblage par CLHP-SM

Enfin, les extraits bruts ont été analysés, par CLHP couplée à un spectromètre de masse à ionisation par electrospray (électronébulisation) en mode positif (ESI^+) ou négatif (ESI^-). L'ionisation par electrospray est une méthode d'ionisation douce permettant d'observer, sur le spectre de masse, les ions moléculaires $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ à un rapport masse sur charge (*m/z*) donné. Ces ions moléculaires correspondent aux molécules intactes dépourvues de solvants et chargées positivement ou négativement en fonction du mode d'ionisation. Ainsi, en soustrayant ou additionnant la masse *m/z* d'un proton, cela conduit à la masse monoisotopique du composé analysé. Cette masse obtenue nous permet par la suite d'effectuer une recherche dans les bases de données existantes telle que MarinLit (R.S Chemistry) pour vérifier si celle-ci correspond à une molécule déjà isolée, et donc connue, ou non. MarinLit est une base de données qui répertorie l'ensemble des données de la littérature sur les produits naturels marins : données spectrales (UV, masse, RMN ^1H et ^{13}C), références bibliographiques et localisation géographique. Le travail de déréplication se trouve ainsi facilitée.

I.4.4 Résultats

Le criblage chimique (CCM et CLHP/DAD/CAD/SM) des extraits bruts des 10 éponges les plus actives a permis d'identifier 4 grands types de profils chimiques en fonction de la polarité des métabolites détectés.

- ❖ Le **groupe 1** (**Figure 2**) rassemble des profils chimiques constitués de composés polaires et semi-polaires et comprend :

- *Theonella swinhoei* (XML-267) qui présente une zone semi-polaire relativement simple.
- *Pseudoceratina* sp. 2 (XML-257) dont la zone semi-polaire est très complexe.

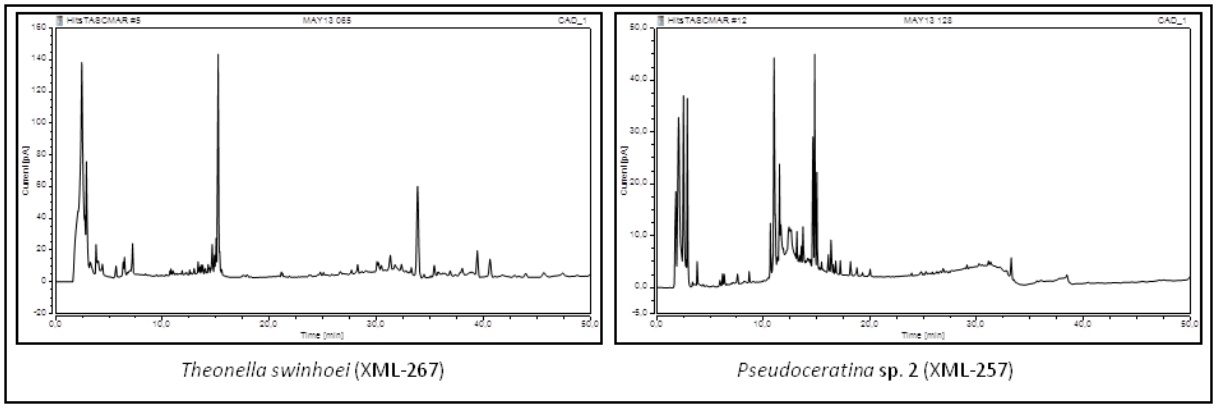
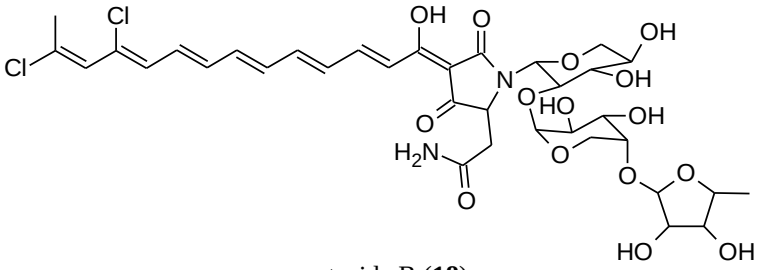
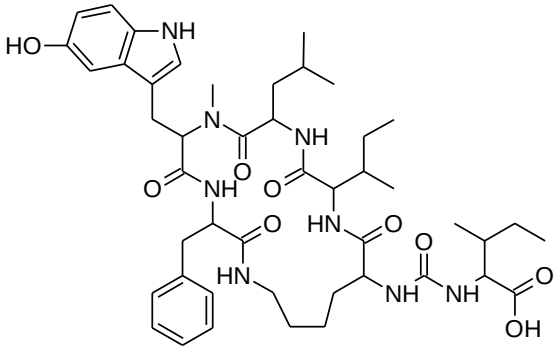


Figure 2 : Profils CLHP-CAD du groupe 1.

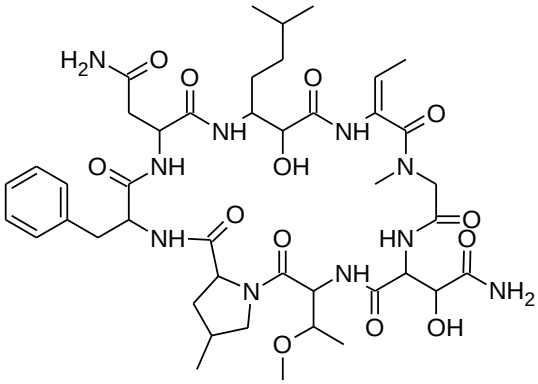
L'analyse des spectres de masse obtenus pour ***Theonella swinhoei*** présentent des pics d'ions pouvant correspondre à des composés déjà isolés du genre *Theonella* à savoir l'aurantoside B (**18**) à *m/z* 801,59 (ESI$^-$), la mozamide B (**19**) à *m/z* 873,36 (ESI$^-$) ou encore le perthamide D (**20**) à *m/z* 927,72 (ESI$^-$) [Festa *et al.*, 2009; Matsunaga *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1997].



aurantoside B (**18**)



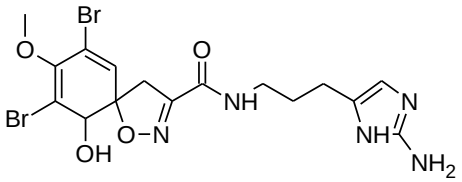
mozamide B (**19**)



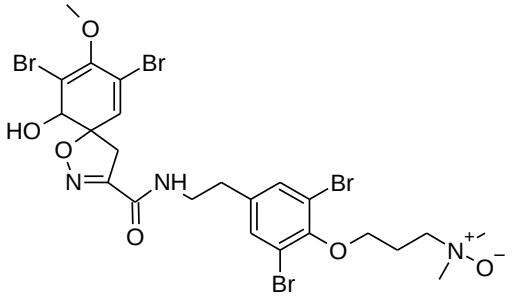
perthamide D (**20**)

L'exploitation des spectres de masse de ***Pseudoceratina* sp. 2** indique la présence de plusieurs composés bromés caractérisés par la présence d'un massif isotopique bien

spécifique due à l'abondance des isotopes du brome ^{79}Br (50,69 %) et ^{81}Br (49,31 %). En effet, sont observés, par exemple, des clusters de pics à *m/z* 504, 506 et 508 à un ratio 1:2:1 indiquant la présence de 2 bromes ou encore à *m/z* 756, 758, 760, 762 et 764 à un ratio 1:4:6:4:1 caractéristique de la présence de 4 bromes dans la molécule. La recherche sur MarinLit donne quelques identifications possibles de composés polybromés de type bromotyrosine : l'aérophobine 2 (**21**) et la puréalidine (**22**) qui sont caractéristiques de l'ordre des Verongiida [Cimino *et al.*, 1983; Ma *et al.*, 2008]. *Pseudoceratina* appartenant à cet ordre, ces résultats semblent donc être cohérents. Les bromotyrosines sont connus pour avoir un large éventail d'activités biologiques.



aérophobine 2 (**21**)



puréalidine T (**22**)

- Le **groupe 2** (**Figure 3**) est caractérisé par des profils chimiques peu riches, constitués de composés polaires et apolaires :
  - *Callyspongia* sp. 6 (XML-222),
  - *Jaspis splendens* (XML-237)
  - *Theonella* sp. 1 (XML-265).

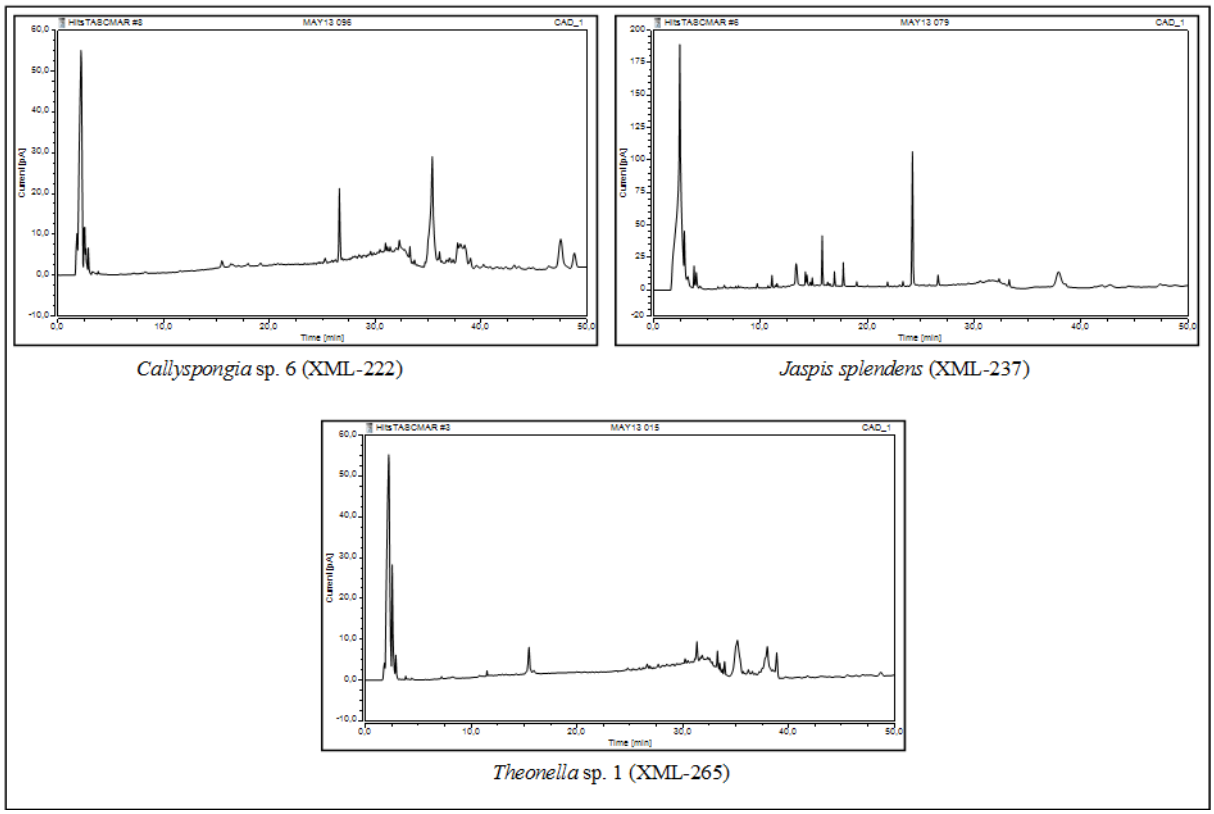
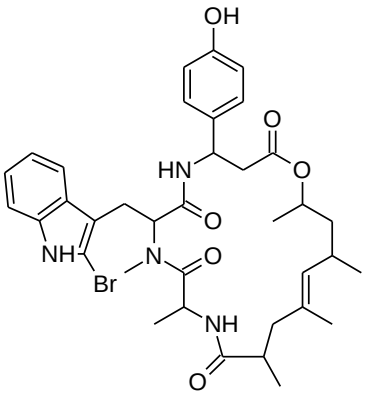


Figure 3 : Profils CLHP-CAD du groupe 2.

Les profils CLHP-SM de *Callyspongia* sp. 6 et de *Theonella* sp. 1 ne présentent pas de pics d'intérêt. La recherche sur MarinLit permet d'obtenir quelques hypothèses d'identification pour *Jaspis splendens* à savoir la jaspamide (jasplakinolide) (**23**) et ses dérivés, un cyclodepsipeptide avec plusieurs activités biologiques connues, notamment, l'activité cytotoxique [Crews *et al.*, 1986; Ebada *et al.*, 2009].



jaspamide A (**23**)

- Le **groupe 3** (**Figure 4**) réunit les profils chimiques présentant un composé majoritaire dans la zone apolaire. Dans ce groupe sont inclus :
  - *Callyspongia* sp.1 (XML-215) dont le profil présente des composés aussi bien polaires qu'apolaires,

- *Lendenfeldia* sp. (XML-240) qui présente des composés essentiellement apolaires.

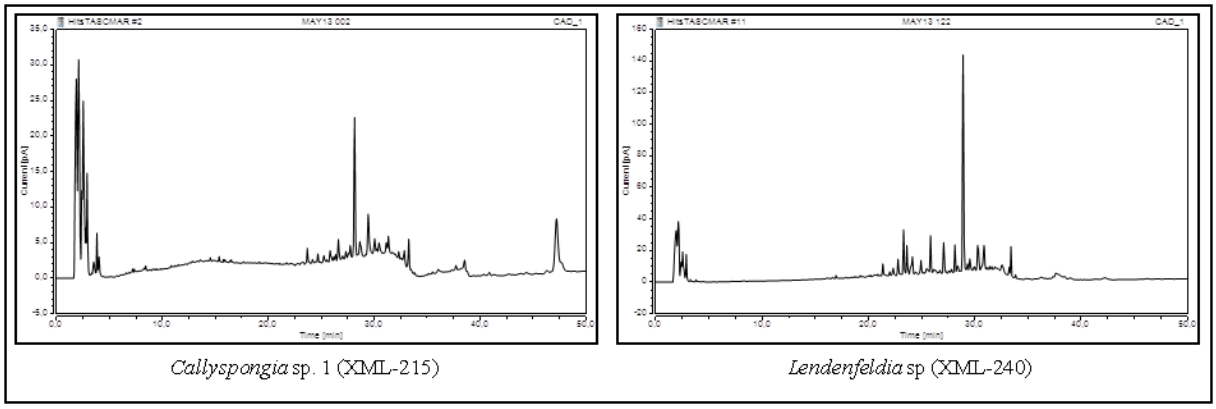
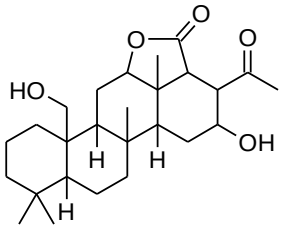
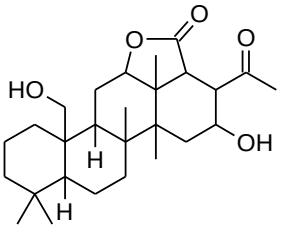


Figure 4 : Profils CLHP-CAD du groupe 3.

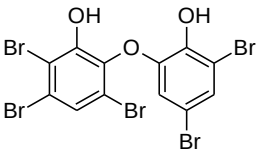
Le profil CLHP-SM de *Callyspongia* sp. 1 ne présente pas de pics d'intérêt permettant de faire des hypothèses de structures. Par contre, l'analyse par spectrométrie de masse de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. indique non seulement la présence de structures caractéristiques du genre mais également de composés bromés. La recherche sur MarinLit des masses correspondantes donne quelques propositions de structures. Par exemple, pour l'ion à *m/z* 433,38 (ESI^+), il pourrait s'agir de deux sesterterpènes de type scalarane : l'épihomoscalaralactone IIA (**24**) et la dihydroxy-méthyl-oxoscalaran-olactone (**25**) isolés de *Lendenfeldia* [Alvi et Crews, 1992; Kazlauskas *et al.*, 1982]. Pour le cluster de pics à *m/z* 592, 594, 596, 598 (ESI^-) avec un ratio 2: 8: 8: 2 indiquant la présence éventuelle de cinq bromes dans la molécule, cela pourrait correspondre à un composé de type polybromodiphényléther (**26**), isolé de *Lendenfeldia dendyi* [Radwan *et al.*, 2015].



épihomoscalaralactone IIA (**24**)



dihydroxy-méthyl-oxoscalaran-olactone (**25**)



Composé type polybromodiphényléther (**26**)

- Le **groupe 4** (**Figure 5**) est caractérisé par des profils chimiques très complexes car très riches en métabolites aussi bien dans la zone polaire qu'apolaire :
  - *Haliclona* sp. 3 (XML-233),
  - *Phyllospongia papyraceae* (XML-254),
  - *Scopalina hapalia* (XML-263).

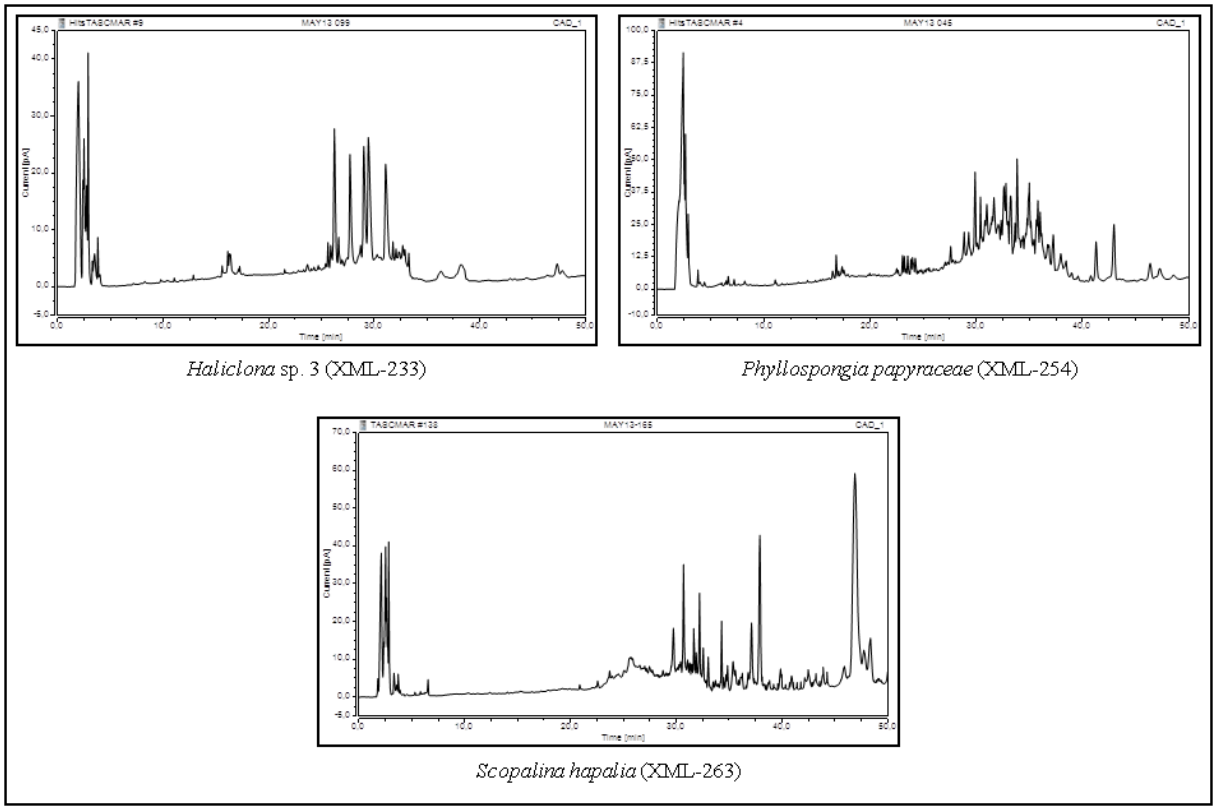
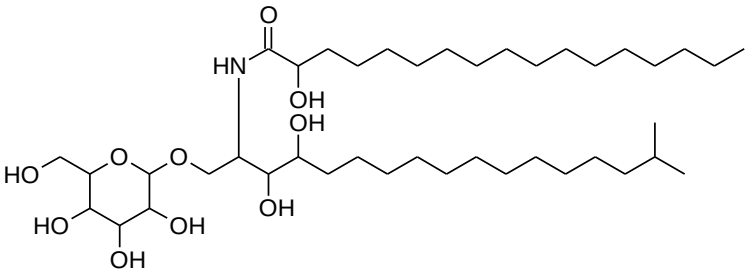


Figure 5 : Profils CLHP-CAD du groupe 4.

L'exploitation des profils CLHP-SM n'a pas permis d'identifier de composés caractéristiques à l'exception d'un composé identifié dans l'extrait brut d'*Haliclona* sp. 3 pouvant correspondre au sphingolipide réniéroside C5 (**27**), ou à son isomère C6 [Park *et al.*, 2009].



réniéroside C5 (**27**)

I.5 Synthèse bibliographique des éponges bioactives

Suite aux criblages biologique et chimique, une recherche bibliographique a été menée à partir de la base de données MarinLit sur les 13 genres correspondant aux 19 éponges actives. L'objectif de cette synthèse bibliographique est d'avoir un aperçu des travaux antérieurs réalisés sur le genre concernant notamment les molécules isolées. Les résultats

concernant le nombre d'articles publiés et de molécules isolées par genre ont été répertoriés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII : Nombre de publications et de composés isolés référencés dans la base de données MarinLit pour les 13 genres recensés (26/02/2020).

Genres	Nombre de publications	Nombre de composés isolés
Axinyssa	67	120
Callyspongia	190	262
Dragmacidon	24	21
Haliclona	383	360
Jaspis	185	175
Lendenfeldia	21	24
Neopetrosia	33	28
Phyllospongia	65	92
Pseudoceratina	95	118
Rhabdastrella	28	80
Scopalina	5	8
Svenzea	7	7
Theonella	367	333

La recherche dans la base de données montre que les genres *Haliclona*, *Theonella*, *Callyspongia* et *Jaspis* sont les plus étudiés suivis par *Pseudoceratina* et *Phyllospongia*. Il est intéressant de noter la proportion de molécules isolées à partir des genres *Axinyssa* et *Rhabdastrella* par rapport au nombre d'articles publiés. Cette synthèse permet de voir que la composition chimique des genres précédemment cités est relativement bien étudiée. En revanche, les genres *Scopalina* et *Svenzea* semblent être les moins étudiés avec moins de 10 articles chacun. En s'intéressant aux composés isolés, nous constatons que contrairement au genre *Svenzea*, les composés isolés de *Scopalina* qui ont été référencés sont issus d'un microorganisme (actinomycète) associé à *Scopalina*. Aucun composé isolé directement de *Scopalina* n'a été référencé dans la base de données MarinLit à ce jour.

I.6 Choix des organismes à étudier et stratégie d'étude

Pour sélectionner les organismes à étudier dans le cadre de ces travaux de thèse, les données issues des criblages biologique et chimique ont été croisées avec celles de la synthèse bibliographique. Ces données sont présentées sous la forme d'un tableau synthétique (**Tableau VIII**).

De ce tableau, il apparait que :

- ✓ *Lendenfeldia* sp. présente non seulement une littérature peu abondante mais aussi un intérêt tant chimique que biologique. En effet, l'analyse par CLHP-SM de l'extrait brut a révélé la présence de composés bromés, une catégorie de métabolites spécialisés connue pour avoir des activités pharmacologiques significatives. Par ailleurs, son extrait brut s'est particulièrement démarquée des autres grâce à ses activités inhibitrices contre la CDK7, la Fyn kinase et le protéasome.

- ✓ *Scopalina hapalia* présente un réel intérêt bibliographique et biologique. En effet, bien que 5 articles soient référencés dans MarinLit, il apparaît qu'aucun composé n'ait été isolé directement du genre *Scopalina*. Par ailleurs, l'extrait brut de cette éponge a démontré des activités inhibitrices significatives contre l'élastase et la Fyn kinase. Ainsi, malgré la complexité de son profil chimique ainsi que l'absence de résultats avec la déréplication, il importe d'explorer davantage sa composition chimique afin d'en connaître les métabolites bioactifs mais aussi d'enrichir l'état de l'art.

Ce sont donc ces deux holobiontes* éponges, *Lendenfeldia* sp (ML-240) et *Scopalina hapalia* (ML-263), qui ont été choisies pour la recherche de molécules à activité anti-âge, dans le cadre de ces travaux de thèse. Les grandes étapes des travaux de thèse sont présentées dans **l'organigramme 1**. La recherche de molécules aux propriétés anti-âge a été réalisée à partir de :

- L'invertébré pour *Lendenfeldia* sp.
- L'invertébré et des microorganismes associés pour *Scopalina hapalia*.

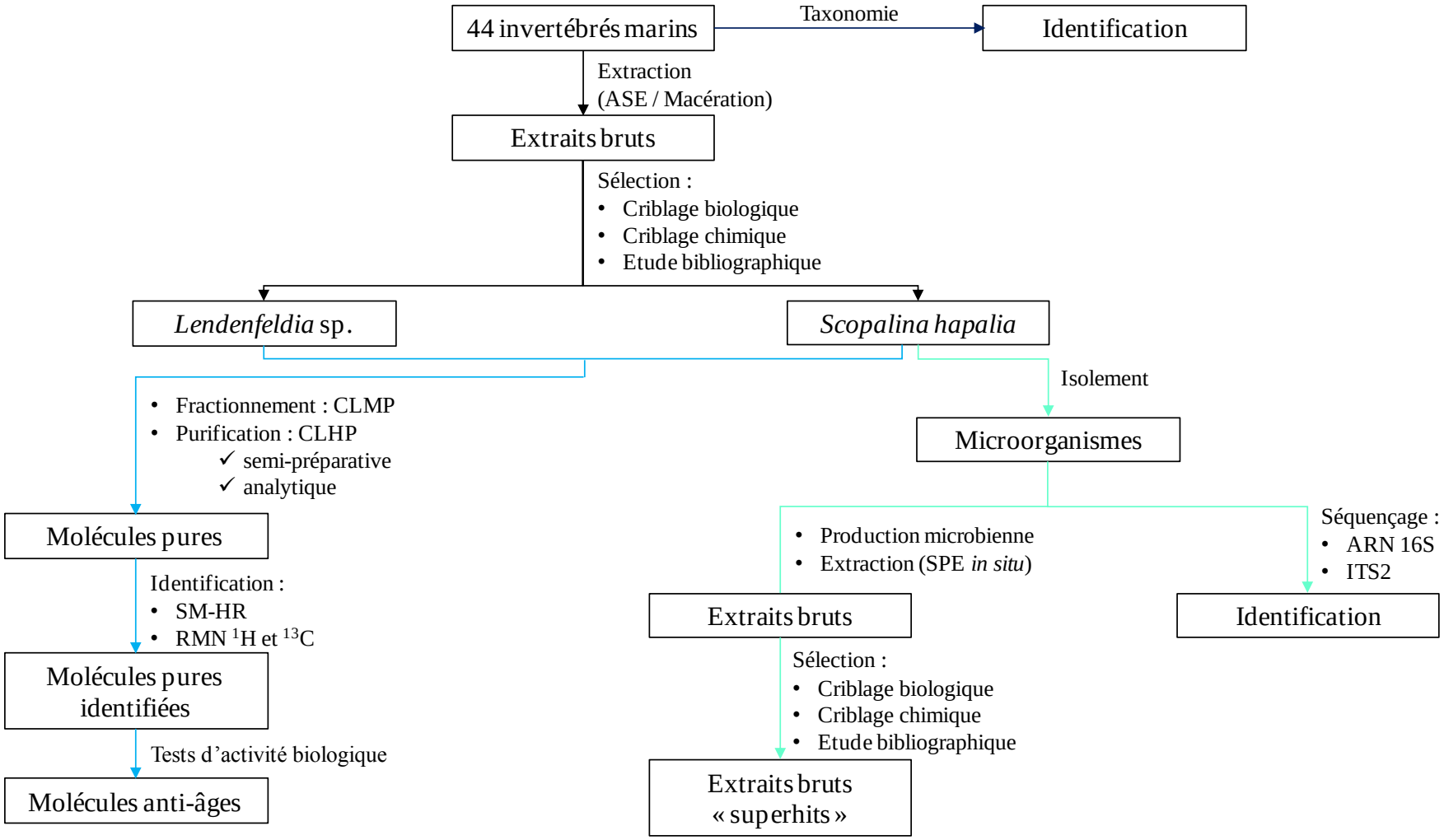
Tableau VIII : Synthèse des éponges bioactives regroupant les résultats issus des criblages chimique et biologique ainsi que des données de la littérature.

Eponges		Criblage chimique	Criblage biologique					Données bibliographiques
Espèces	**Réf. MACLIB**		**Inhibition élastase**	**Inhibition tyrosinase**	**Inhibition CDK7**	**Inhibition Fyn kinase**	**Inhibition protéasome**	
Axinyssa sp. 1	XML-209							
Axinyssa sp. 3	XML-211							
Axinyssa sp. 4	XML-212							
Callyspongia sp. 1	XML-215							
Callyspongia sp. 4	XML-220							
Callyspongia sp. 6	XML-222							
Dragmacidon coccineum	XML-227							
Haliclona sp. 3	XML-233							
Jaspis splendens	XML-237							
Lendenfeldia sp.	XML-240							
Neopetrosia sp. 3	XML-244							
Phyllospongia papyracea	XML-254							
Pseudoceratina sp. 2	XML-257							
Rabdastrella sp. 1	XML-259							
Rabdastrella sp. 2	XML-260							
Scopalina hapalia	XML-263							
Svenzea sp.	XML-264							
Theonella sp. 1	XML-265							
Theonella swinhoei	XML-267							

Spécimens d'intérêt chimique

Spécimens d'intérêt biologique

Spécimens d'intérêt bibliographique



Avec la participation de :

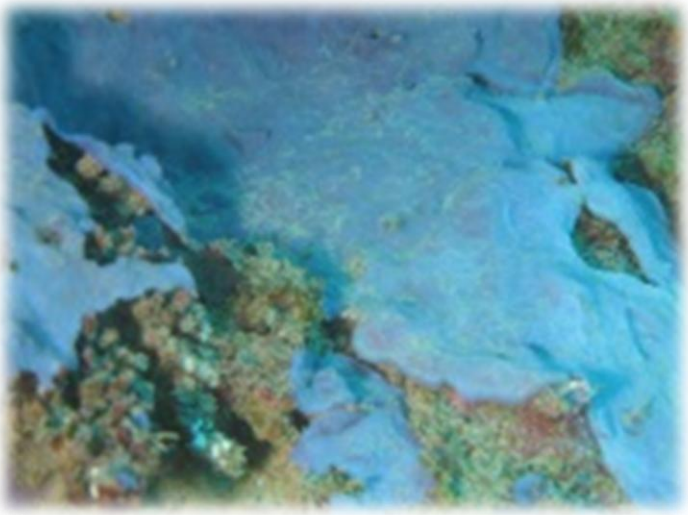
Tascmar : Criblage biologique

Spectropole : Identification structurale

GenoScreen Innovative Genomics / Westerdijk Fungal Biodiversity Institute : Séquençage et identification microbienne

Organigramme 1 : Schéma présentant la stratégie d'étude des éponges *Lendenfeldia* sp. (ML-240) et *Scopalina hapalia* (ML-263).

Chapitre II
Etude de la composition chimique de l'éponge *Lendenfeldia* sp. (ML-240)



Lendenfeldia sp.
Credit ChemBioPro

Au cours du criblage biologique primaire pour la recherche d'extraits bruts d'invertébrés actifs sur différentes cibles biologiques impliquées dans le processus du vieillissement, l'extrait de *Lendenfeldia* sp. (XML-240) s'est montré actif sur 3 cibles biologiques : CDK7, Fyn kinase et protéasome. Aussi, afin d'identifier les métabolites bioactifs, une étude chimique a été entreprise à partir de ce spécimen de *Lendenfeldia* sp. (ML-240), collecté à Mayotte en 2013.

II.1 Etat de l'art sur *Lendenfeldia* (Bergquist, 1980)

II.1.1 Distribution géographique du genre *Lendenfeldia* (Bergquist, 1980)

Les éponges appartenant au genre *Lendenfeldia* sont principalement localisées dans la zone Indo-Pacifique (**Figure 6**) avec la majorité des collectes ayant eu lieu dans le Pacifique. En effet, les données de la littérature indiquent que ces éponges ont été collectées, pour la plupart, sur différents sites de l'Océan Pacifique bordant l'Australie ainsi qu'en Mer des Salomon (Papouasie-Nouvelle-Guinée et les îles Salomon), en Mer de Java (Indonésie) et en Mer des Philippines (Palaos, Micronésie et les îles Mariannes du Nord). En dehors des spécimens qui ont été trouvés sur la façade occidentale de l'Australie, quelques spécimens ont également été collectés dans la zone Océan Indien, en Mer des Laquedives (Inde), dans le Golfe du Bengale (Iles Andaman et Nicobar) ainsi que dans le canal du Mozambique (îles Quirimbas et Madagascar).

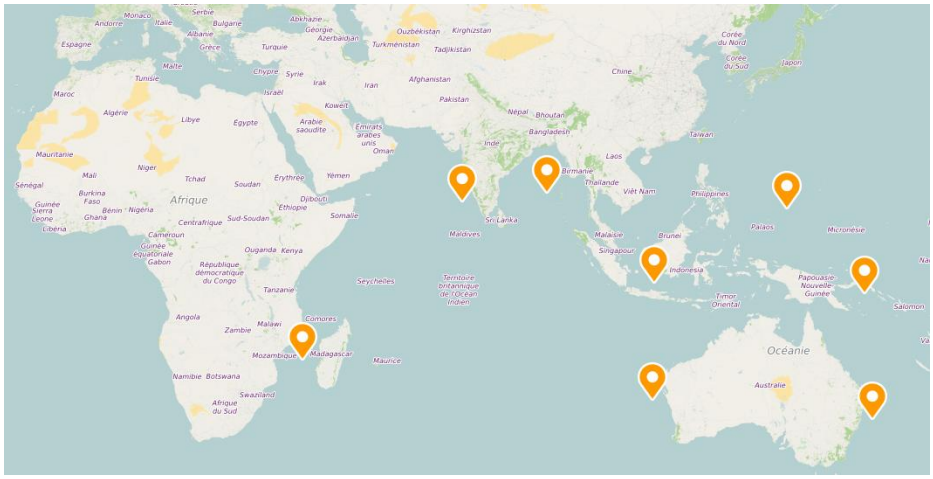


Figure 6: Distribution géographique des éponges du genre *Lendenfeldia*.
(crédit geoportail.gouv.fr)

II.1.2 Taxonomie et description du genre

Le genre *Lendenfeldia*, décrit par Bergquist en 1980, appartient à la sous-famille des Phyllospongiinae (ordre Dictyoceratida) et comprend 6 espèces validées : *L. chondrodes* (Laubenfels, 1954), *L. dendyi* (Lendenfeld, 1889), *L. foliacea* (Ridley, 1884), *L. frondosa*

(Lendenfeld, 1889), *L. plicata* (Esper, 1806) et *L. ramosa* (Lendenfeld, 1889). L'espèce-type du genre est *Phyllospongia dendyi* var. *frondosa* (Lendenfeld, 1889), aujourd'hui identifiée comme *Lendenfeldia dendyi* [de Cook et Bergquist, 2002].

Règne : Animal
Phylum : Porifera
Classe : Demospongiae
Ordre : Dictyoceratida
Famille : Thorectidae
Genre : *Lendenfeldia*

Les éponges du genre *Lendenfeldia* sont de type encroûtante (**Figure 7** A). Telles que décrites par Bergquist, elles ont une structure lamellaire ou lamello-digitée complexe et imbriquée [Bergquist, 1980]. Leur charpente (squelette) est constituée par un assemblage de fibres (primaires, secondaires et tertiaires). Les fibres primaires, emplies de débris, sont souvent fasciculées et tendent à être sinueuses plutôt que clairement disposées en fibres ascendantes. Les fibres secondaires et tertiaires forment, quant à elles, un maillage irrégulier (**Figure 7** B) [de Cook et Bergquist, 2002]. La surface, quant à elle, est recouverte de conules très fins et ne présente pas de protection particulière. Ces éponges, composées exclusivement de spongine, ont une consistance souple, charnue et douce.

A

B

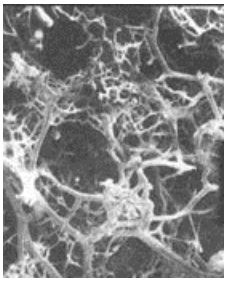


Figure 7 : Photographies associées aux éponges du genre *Lendenfeldia*.

A : Photographie *in situ* d'un spécimen de *Lendenfeldia* collectés à Mayotte, *Lendenfeldia* sp. (ML-240).
B : Fibres tertiaires typiques de *Lendenfeldia* [de Cook et Bergquist, 2002].

II.1.3 Travaux chimiques antérieurs relatifs au genre *Lendenfeldia* (Bergquist, 1980)

Les éponges du genre *Lendenfeldia* ont fait l'objet de peu d'études chimiques. En incluant les éponges *Phyllospongia dendyi*, aujourd'hui identifiées comme *Lendenfeldia dendyi*, seuls 41 composés ont été recensés dans la base de données MarinLit (17/01/2020). Ces derniers se répartissent en différentes classes chimiques : les sesterterpènes et furanoterpènes, les polybromodiphényléthers (PBDE), les composés stéroïdiens ainsi que des dérivés d'acides aminés et autres classes chimiques de métabolites spécialisés. Plusieurs de ces métabolites ont démontré des activités biologiques : anti-inflammatoire [Kazlauskas *et al.*,

1982; Alvi et Crews, 1992], anti-tumorale [Liu *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2007], anti-rétrovirale (VIH-1) [Chill *et al.*, 2004], anti-fouling [Sera *et al.*, 1999] et antibactérienne [Radwan *et al.*, 2015].

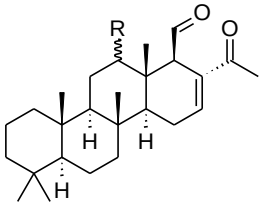
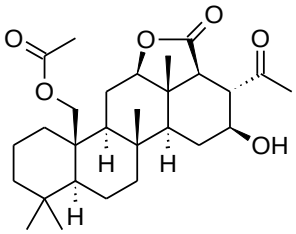
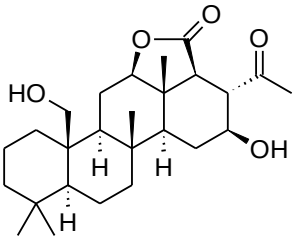
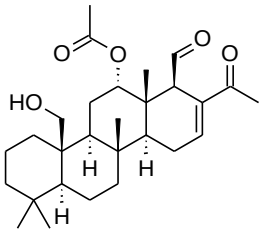
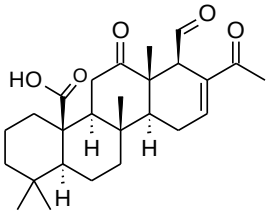
II.1.3.1 Sesterterpènes et furanoterpènes

Les sesterterpènes sont des métabolites spécialisés relativement rares dans la nature. Les éponges appartenant à l'ordre des Dictyoceratida (familles Spongidae et Thorectidae) constituent l'une des rares sources de ce type de métabolites [Kazlauskas *et al.*, 1982]. Les sesterterpènes polycycliques de type scalarane représentent l'une des principales classes chimiques isolées de ces éponges. Ainsi, plusieurs de ces métabolites ont été isolés de différents spécimens de *Phyllospongia dendyi* (actuellement *Lendenfeldia dendyi*) ainsi que de spécimens du genre *Lendenfeldia* (**Tableau IX**).

Les sesterterpènes de type scalarane sont principalement connus pour leur activité cytotoxique significative sur différentes lignées cellulaires [Liu *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2007; Chill *et al.*, 2004]. Toutefois, d'autres activités biologiques telles que anti-inflammatoire et inhibitrice de l'agrégation des plaquettes ont également été associées à cette famille chimique [Potts *et al.*, 1992; Nakagawa *et al.*, 1987; Kazlauskas *et al.*, 1982]. A titre d'exemple, nous pouvons citer :

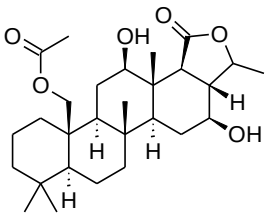
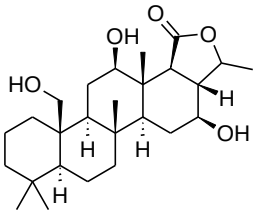
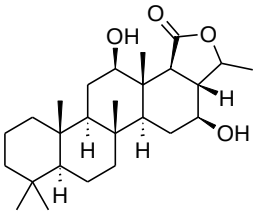
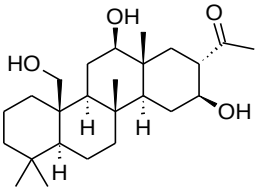
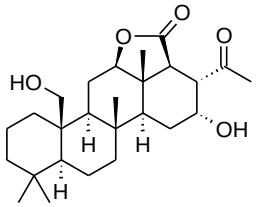
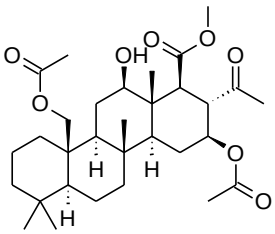
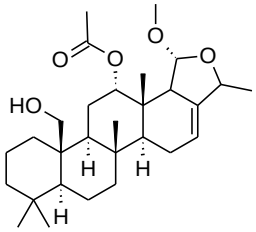
- ✓ le composé **L6** (acide 24-méthyl-12,24,25-trioxoscalar-16-én-22-oïque), isolé pour la première fois en 1982 d'un spécimen de *Lendenfeldia* collecté en Australie [Kazlauskas *et al.*, 1982]. Isolé à nouveau en 2007, à partir d'un spécimen collecté en Indonésie, celui-ci a présenté une activité cytotoxique sur des lignées cellulaires du cancer du sein (T47D et MDA-MB-231) [Dai *et al.*, 2007].
- ✓ le composé **L21** (22-hydroxy-24-méthyl-12α-hydroxy-24-oxoscalarane), isolé en 2008 d'un spécimen collecté à Saipan (îles Mariannes), présente aussi bien une activité inhibitrice du facteur HIF-1 (CI_{50} 0,4 µM) qu'une activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, notamment T47D (CI_{50} 1,6 µM) [Liu *et al.*, 2008].
- ✓ le composé **L1** isolé d'un spécimen de *Phyllospongia dendyi* (*L. dendyi*) collecté en Australie, a montré quant à lui aussi bien une activité anti-inflammatoire qu'anti-fongique [Kazlauskas *et al.*, 1980b].

Tableau IX : Sesterterpènes de type scalarane isolés d'éponges du genre *Lendenfeldia*.

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L1[a] **L2**[a]	24-Méthyl-24,25-dioxoscalar-16-én-12*β*-yl 3-hydroxybutanoate 12α-Acétoxy-24-méthyl-24-oxoscalar-16-én-25-al	 **L1** : R = *β*OCOCH$_2$CH(OH)CH$_3$ **L2** : R = *α*OCH$_3$CO	• **L1** antifongique et anti-inflammatoire	Kazlauskas *et al.*, 1980
L3[a]	22-Acétoxy-16*β*-hydroxy-24-méthyl-24-oxoscalaran-25,12*β*-olactone		• Inhibition de l'agrégation plaquettaire (anti-inflammatoire) • Cytotoxique sur lignée cancéreuse de poumon • Antifouling (moule commune)	Kazlauskas *et al.*, 1982 Chill *et al.*, 2004 Sera *et al.*, 1999
L4[a]	16*β*,22-Dihydroxy-24-méthyl-24-oxoscalaran-25,12*β*-olactone		• Cytotoxique sur lignée cancéreuse de poumon • Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) • Cytotoxique (T47D, MDA-MB-231)	Kazlauskas *et al.*, 1982 Chill *et al.*, 2004 Dai *et al.*, 2007
L5[a]	12*α*-Acétoxy-22-hydroxy-24-méthyl-24-oxoscalar-16-én-2-al			Kazlauskas *et al.*, 1982
L6[a]	Acide 24-méthyl-12,24,25-trioxoscalar-l6-én-22-oïque		• Cytotoxique • Antifouling (moule commune)	Kazlauskas *et al.*, 1982 Dai *et al.*, 2007 Sera *et al.*, 1999

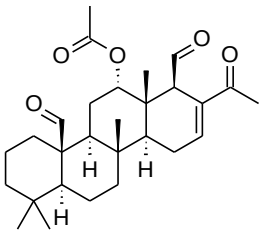
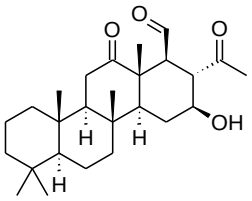
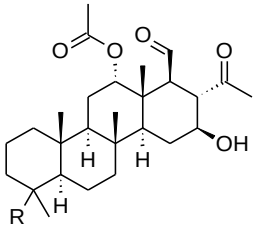
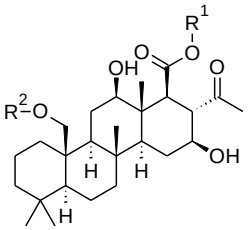
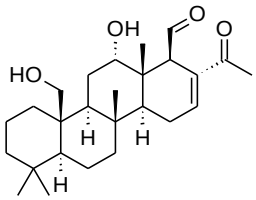
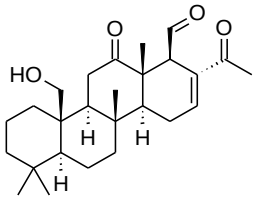
[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Tableau IX : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L7[a]	Acétoxy-dihydroxy-méthylscalaran-olactone			Kazlauskas *et al*., 1982
L8[a]	12*β*,16*β*,22-Trihydroxy-24-méthylscalaran-25,24-olactone			Rao *et al*., 1991
L9[a]	12*β*,16*β*-Dihydroxy-24-méthylscalaran-25,24-olactone		• Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) • Cytotoxique (T47D, MDA-MB-231)	Rao *et al*., 1991 Dai *et al*., 2007
L10[a]	12*β*,16*β*,22-Trihydroxy-24-méthyl-24-oxo-25-norscalarane			Rao *et al*., 1991
L11[a]	Epihomoscalaralactone IIA			Alvi et Crews, 1992
L12[a]	16,22-Diacétylhomoscalarate II			Alvi et Crews, 1992
L13[a]	-			Rao *et al*., 1993

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Tableau IX : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L14	12*α*-Acétoxy-24-méthyl 24-oxoscalar-16-én-22,25-dial		• Antifouling (moule commune)	Sera *et al.*, 1999
L15[a]	16*β*-Hydroxy-24-méthyl-12,24-dioxoscalaran-25-al		• Cytotoxiques sur 14 lignées cellulaires de cancer (sein, ovaire, prostate, poumons, colon, pancréas, etc)	Chill *et al.*, 2004
L16 **L17**	12*α*-Acétoxy-16*β*-hydroxy-24-méthyl-24-oxoscalarane-25-al 12*α*-Acétoxy-16*β*-hydroxy-20,24-diméthyl-24-oxoscalarane-25-al	 **L16** : R = CH_3 **L17** : R = CH_2CH_3	• Cytotoxiques sur 14 lignées cellulaires de cancer (sein, ovaire, prostate, poumons, colon, pancréas, etc)	Chill *et al.*, 2004
L18[a] **L19**[a] **L20**[a]	12*β*,16*β*,22-Trihydroxy-24-méthyl-24-oxoscalaran-25-oxo méthyl ester Acide 12*β*,16*β*,22-trihydroxy-24-méthyl-24-oxoscalaran-25-oïque 12*β*,16*β*-Dihydroxy-22-acétoxy-24-méthyl-24-oxoscalaran-25-oxo méthyl ester	 **L18** : $R^1 = CH_3$; $R^2 = H$ **L19** : $R^1 = H$; $R^2 = H$ **L20** : $R^1 = CH_3$; $R^2 = CH_3CO$	• **L17** : Cytotoxique sur lignée cancéreuse de poumon	Chill *et al.*, 2004
L21[a]			• Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) • Cytotoxique (T47D, PC-3)	Liu *et al.*, 2008
L22	22-Hydroxy-24-méthyl-12,24-dioxoscalar-16-én-25-al		• Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) • Cytotoxique (T47D, PC-3)	Liu *et al.*, 2008

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Tableau IX : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L23	24-Méthyl-12,24,25-trioxoscalar-16-én-22-oate		• Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) • Cytotoxique (T47D, PC-3)	Liu *et al.*, 2008

La littérature fait également mention des furanoterpènes en C-21 et en C-22, plus rares, qui seraient des dérivés de sesterterpènes linéaires [Kazlauskas *et al.*, 1980a]. Ces métabolites spécialisés sont des composés minoritaires retrouvés dans les extraits riches en scalaranes des éponges de l'ordre des Dictyoceratida, dont les éponges du genre *Lendenfeldia* (**Tableau X**).

Tableau X : Furanoterpènes isolés d'éponges du genre *Lendenfeldia*.

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L24[a]	Furodendine			Kazlauskas, Murphy, & Wells, 1980
L25	Anhydrofurospongine-1			Kazslauskas *et al.*, 1982
L26	Furospongolipide		• Inhibition HIF-1 (anticancéreuse)	Kazslauskas *et al.*, 1982 Liu *et al.*, 2008
L27[a]	Déhydrofurodendine		• Inhibition VIH-1	Chill *et al.*, 2004
L28[a]	3-[(3*E*,7*E*)-4,8-Diméthylpentadeca-3,7-dienyl]furan			Dai *et al.*, 2007

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Deux des cinq furanolipides isolés des éponges *Lendenfeldia* ont présenté des activités biologiques distinctes :

- ✓ Le composé **L26** (furospongolipide), isolé pour la première fois en 1980 d'un spécimen de *Dysidea herbacea*, puis de l'extrait lipidique actif d'un spécimen de *Lendenfeldia* collecté à Saipan (îles Mariannes, Océan Pacifique) [Liu *et al.*, 2008; Kashman et Zviely, 1980]. Au cours d'un fractionnement bio-guidé pour la recherche d'inhibiteurs du facteur HIF-1 (activité anticancéreuse), le composé **L24** s'est

particulièrement démarqué des scalaranes, isolés conjointement, au cours de cette étude [Liu *et al.*, 2008]. En effet, le composé **L24** a présenté une activité d'inhibition sélective du facteur HIF-1 (97 % d'inhibition) tout en étant relativement dépourvu de cytotoxicité (26 % d'inhibition de la prolifération) pour une concentration testée de 30 µM.

- ✓ Le composé **L27** (déhydrofurodendine) est un nouveau furanoterpène en C22, isolé d'un spécimen de *Lendenfeldia* collecté à Madagascar [Chill *et al.*, 2004]. Celui-ci a présenté une activité inhibitrice significative de la transcriptase inverse du VIH-1 (activité anti-rétrovirale) [Chill *et al.*, 2004].

II.1.3.2 Polybromodiphényléthers (PBDE)

Les polybromodiphényléthers (PBDE), ou éthers diphényliques polybromés, sont des métabolites spécialisés caractéristiques et communément retrouvés chez certaines éponges du genre *Dysidea* (Dictyoceratida). Ces éponges sont caractérisées par leur association avec *Oscillatoria spongeliae*, une cyanobactérie symbionte. L'association systématique de cette algue bleu-verte avec l'éponge *Dysidea herbaceae* a souvent été documentée par le passé [Hinde *et al.*, 1994]. Par ailleurs, certains travaux semblent indiquer que ce serait *Oscillatoria spongeliae* le responsable de la synthèse des métabolites spécialisés halogénés retrouvés chez cette éponge, et plus particulièrement des PBDE et peptides chlorés [Unson *et al.*, 1994; Unson et Faulkner, 1993; Flowers *et al.*, 1998]. Les PBDE sont relativement abondants chez certains spécimens de *Dysidea*, pouvant représenter jusqu'à ~12 % du poids sec. La présence d'halogènes dans le métabolisme de certaines éponges appartenant à l'ordre des Dictyoceratida, notamment *Lendenfeldia chondrodes*, pourrait provenir de leur association avec la cyanobactérie symbionte *Oscillatoria spongeliae* [Ridley *et al.*, 2005]. A ce jour, 16 PBDE ont été isolés du genre *Lendenfeldia* dont 6 nouveaux (**Tableau XI**).

Tableau XI : PBDE isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*.

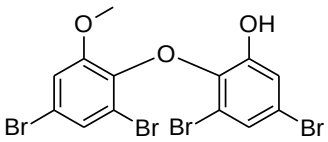
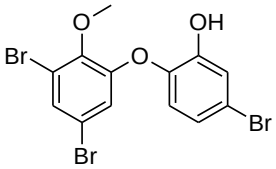
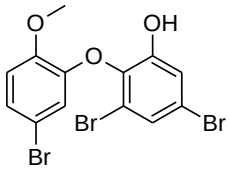
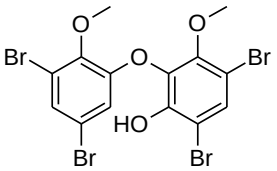
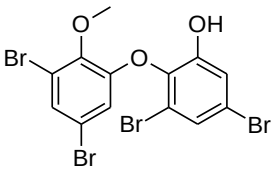
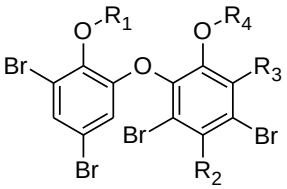
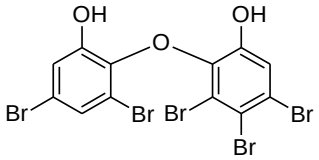
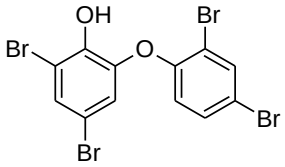
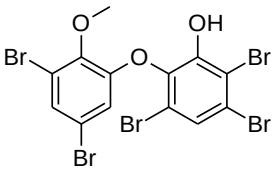
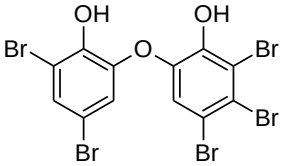
Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L29[a]	3,5-Dibromo-2-(4,6-dibromo-2-hydroxyphénoxy)anisole		• Antifouling (micro- et macro-algues)	Hattori *et al.*, 2001
L30[a]	4,6-Dibromo-2-(4-bromo-2-hydroxyphénoxy)anisole		• Antifouling (micro- et macro-algues)	Hattori *et al.*, 2001
L31[a]	4-Bromo-2-(4,6-dibromo-2-hydroxyphénoxy)anisole		• Antifouling (micro- et macro-algues)	Hattori *et al.*, 2001

Tableau XI : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L32[a]	4,6-Dibromo-2-(3,5-dibromo-6-hydroxy-2-méthoxyphénoxy)anisole		• Antifouling (micro- et macro-algues)	Hattori *et al*., 2001
L33	4,6-Dibromo-2-(4,6-dibromo-2-hydroxyphénoxy)anisole		• Antifouling (micro- et macro-algues) • Inhibition HIF-1 (anticancéreuse) Cytotoxique (T47D, MDA-MB-231)	Hattori *et al*., 2001 Dai *et al.*, 2007; Podlesny et Kozlowski, 2012
L34[a] **L35**[a] **L36** **L37** **L38** **L39** **L40** **L41**	2-(3',4',5',6'-Tétrabromo-2'-méthoxyphénoxy)-4,6-dibromophénol 2-(4',5',6'-Tribromo-2'-méthoxyphénoxy)-4,6-dibromophénol 2-(3',5'-Dibromo-2'-hydroxyphenoxy)-3,4,5,6-tétrabromophénol - 4,6-Dibromo-2-(2'-méthoxy-4',6'-dibromophénoxy)phénol 2-(3',5'-Dibromo-2'-hydroxyphénoxy)-3,5,6-tribromophénol 4,6-Dibromo-2-(3',4',6'-tri-bromo-2'-méthoxyphénoxy)phénol -	 **L34** : R_1 = H; R_2 = R_3 = Br; R_4 = CH_3 **L35** : R_1 = H; R_2 = Br; R_3 = H; R_4 = CH_3 **L36** : R_1 = H; R_2 = R_3 = Br; R_4 = H **L37** : R_1 = CH_3; R_2 = Br; R_3 = H; R_4 = CH_3 **L38** : R_1 = H; R_2 = R_3 = H; R_4 = CH_3 **L39** : R_1 = CH_3; R_2 = R_3 = H; R_4 = CH_3 **L40** : R_1 = CH_3; R_2 = H; R_3 = Br; R_4 = H **L41** : R_1 = H; R_2 = H; R_3 = Br; R_4 = CH_3	**L36** et **L40** • Inhibition de l'assemblage des microtubules • Inhibition de la maturation méiotique **L36**, **L40** et **L41** • Inhibition de la prolifération cellulaire • Augmentation de la production d'IL-8 **L36** et **L40** • Antibactérienne	Liu *et al.*, 2004 Oda *et al.*, 2005 Radwan *et al.*, 2015

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Tableau XI : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L42	2-(4',6'-Dibromo-2'-hydroxyphénoxy)-3,4,5-tribromophénol		• Inhibition de l'assemblage des microtubules • Inhibition de la maturation méiotique • Inhibition de la prolifération cellulaire • Augmentation de la production d'IL-8	Liu *et al.*, 2004 Oda *et al.*, 2005
L43	-			Liu *et al.*, 2004
L44	-		• Antibactérienne	Radwan *et al.*, 2015
L45	-		• Antibactérienne	Radwan *et al.*, 2015

Ces métabolites spécialisés présentent un large éventail d'activités biologiques, parmi lesquelles, des activités antibactériennes et antifongiques [Handayani *et al.*, 1997], antifouling [Ortlepp *et al.*, 2008] et anti-inflammatoires. Des activités inhibitrices de la lipoxygénase ainsi que d'enzymes impliquées dans le développement tumoral [Fu *et al.*, 1995] ont également été rapportées. Dans le cas des PBDE isolés directement du genre *Lendenfeldia*, une diversité des activités biologiques reportées a également pu être observée, tels que :

- ✓ Les composés **L30** à **L32**, isolés de l'éponge *L. dendyi* collectée aux Palaos, ont des propriétés antifouling [Hattori *et al.*, 2001]. L'évaluation de leur activité vis-à-vis de différentes micro-algues ainsi que sur l'attachement et la germination d'une macroalgue ont montré que les 4 nouveaux composés étaient actifs à des concentrations différentes.
- ✓ Les composés **L36**, **L40** et **L42** ont été isolés au cours d'un fractionnement bio-guidés pour la recherche d'inhibiteurs du cycle cellulaire, à partir d'un autre spécimen de *L. dendyi* collecté aux Palaos [Liu *et al.*, 2004]. Ces 3 composés ont montré une activité

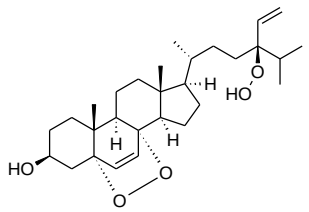
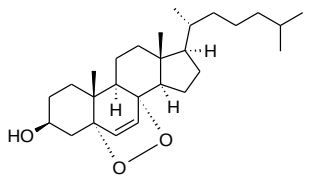
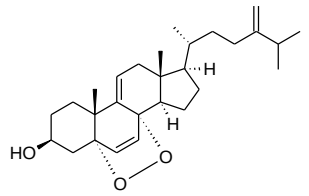
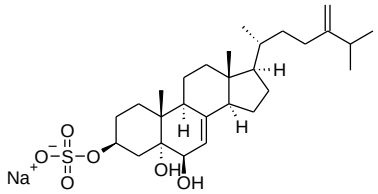
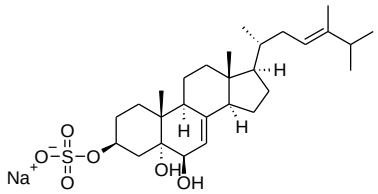
d'inhibition de l'assemblage des microtubules ainsi que de la maturation méiotique des oocytes d'étoiles de mer. Le composé **L42**, par exemple, a présenté des CI_{50} respectives de 20,9 µM (inhibition de l'assemblage des microtubules) et 4,2 µM (inhibition de la maturation des oocytes). Au cours de leur étude, Liu *et al*. (2004) ont également montré que les 2 groupements hydroxyles phénoliques étaient nécessaires à la bioactivité de ces PBDE.

- ✓ Quatre PBDE (**L36**, **L40**, **L44** et **L45**) isolés de *L. dendyi*, collecté en Papouasie Nouvelle-Guinée, ont présenté une activité antifongique mais aussi une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* MRSa (bactérie multi-résistante aux antibiotiques méthicilline, pénicillines et céphalosporines) [Radwan *et al.*, 2015]. Parmi ces PBDE, les composés **L36** et **L45** ont présenté les activités les plus intéressantes. A titre d'exemple, les CI_{50} pour l'activité anti-MRSa sont de 0,29 µM (**L36**) et 0,05 µM (**L45**).
- ✓ Le composé **L33**, isolé pour la première fois d'un spécimen de *Dysidea herabcea*, a été également isolé à deux reprises de spécimens de *Lendenfeldia* sp. collectés dans l'Océan Pacifique (Palaos et Indonésie) [Dai *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 1981]. Ce composé a présenté des activités biologiques allant d'une activité antifouling à une activité cytotoxique en passant par une activité inhibitrice significative du facteur HIF-1 (activité anticancéreuse). Identifié comme étant un dimère de naphtalène dans la publication de Dai *et al.*, l'élucidation structurale réalisée par Podlesny et Kozlowski a permis de le réassigner à la classe chimique des PBDE [Podlesny et Kozlowski, 2012].

II.1.3.3 Composés stéroïdiens

Les données de la littérature font mention de 4 nouveaux composés stéroïdiens (**L46** à **L50**) isolés d'éponges appartenant au genre *Lendenfeldia* (**Tableau XII**). Deux épidioxystérols ont été isolés, sous formes d'un mélange d'isomères inséparables, à partir d'un spécimen de *L. chondrodes* collecté dans un lac marin aux Palaos [Sera *et al.*, 1999]. Parmi les composés isolés au cours de cette étude, seul le composé **L46** a présenté une activité antifouling modérée. Deux autres stérols sulfatés (**L49**, **L50**), dont le 3*β*, 5*α*, 6*β*- trihydroxy-24-méthylène-cholesta-7-ène-3-sodium sulfate (**L49**), ont été isolés de *L. dendyi*, collectée en Papouasie-Nouvelle-Guinée [Radwan *et al.*, 2007]. Evalués pour leur activité inhibitrice sur différentes souches de microorganismes (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus* (MRSa)), ces composés n'ont montré aucune activité antibactérienne.

Tableau XII : Composés stéroïdiens isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*.

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L46[a]	5*α*,8*α*-Epidioxy-24(*R*/*S*)-hydroperoxycholesta-6,28(29)-dién-3*β*-ol (mélange d'épimères)		Antifouling (moule commune)	Sera *et al.*, 1999
L47	5*α*,8*α*-Epidioxycholest-6-én-3*β*-ol		Pas d'activité antifouling	Sera *et al.*, 1999
L48	5*α*,8*α*-Epidioxy-24-méthylcholesta-6,9(11),24(28)-triièn-3*β*-ol		Pas d'activité antifouling	Sera *et al.*, 1999
L49[a]	3*β*,5*α*,6*β*-Trihydroxy-24-méthylène-cholesta-7-ène-3-sodium sulfate		Non actif sur différentes souches microbiennes	Radwan *et al.*, 2007
L50[a]	3*β*, 5*α*, 6*β*-Trihydroxy-23(*E*)-24-méthyl-cholesta-7,23-diène-3-sodium sulfate		Non actif sur différentes souches microbiennes	Radwan *et al.*, 2007

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

II.1.3.4 Dérivés d'acides aminés et autres composés

Une étude exhaustive menée sur des extraits aqueux d'un spécimen micronésien de *L. chondrodes* (initialement identifié comme étant *Dysidea herbacea*), par Sakai et ses collaborateurs (1997, 1999, 2001, 2004, 2006, 2008, 2017), a conduit à l'isolement de plusieurs dérivés d'acides aminés bioactifs et structurellement diversifiés (**L51** à **L62**) (**Tableau XIII**).

Deux neurotoxines, la dysiherbaïne (**L51**) et la néodysiherbaïne A (**L52**), composés minoritaires de l'extrait aqueux de *L. chondrodes* ont été isolées [Sakai *et al.*, 1997, 2001]. Ces deux acides aminés sont des agonistes des récepteurs ionotropiques au glutamate non-NMDA. Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont responsables de la neurotransmission

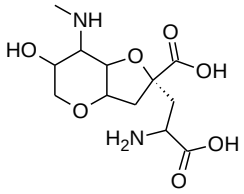
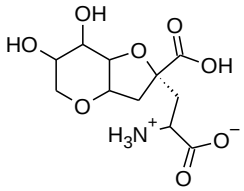
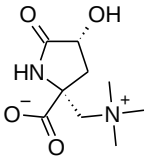
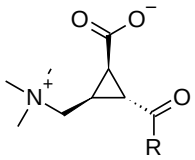
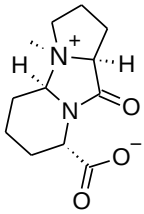
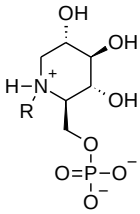
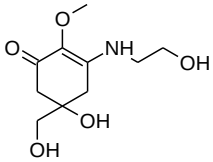
excitatrice rapide chez les mammifères. En fonction de leurs propriétés pharmacologiques, trois classes de récepteurs ionotropiques au glutamate ont été définies : les récepteurs NMDA et les récepteurs non-NMDA qui comprennent les récepteurs AMPA et kainate. La dysiherbaïne (**L51**) représente non seulement une nouvelle classe d'acides aminés grâce à sa structure unique mais aussi un nouvel agoniste sélectif des récepteurs au glutamate non-NMDA (avec une préférence pour le type kainate). Les récepteurs de type kainate, avec leur localisation pré- et post-synaptique, auraient un rôle modulateur de la transmission neuronale [Lerma, 2003]. Une étude visant à déterminer l'origine biosynthétique de la dysiherbaïne semble indiquer une origine symbiotique impliquant la cyanobactérie *Synechocystis* sp. [Sakai *et al.*, 2008].

Plusieurs bétaïnes (**L53** à **L56**), composés minoritaires de l'extrait aqueux de ce spécimen, ont également été isolés. Un nouveau dérivé d'un acide α-aminé, la dysibétaïne (**L53**), a été isolé en 1999 [Sakai *et al.*, 1999]. Par la suite, de nouvelles bétaïnes avec des motifs cyclopropane (**L54** et **L55**) et pipécolate (**L56**) ont été isolées [Sakai *et al.*, 2004]. Les dysibétaïnes avec un motif cyclopropane représentent une nouvelle classe chimique de dérivés d'acides aminés. Les composés **L54** et **L55** ont présenté une faible affinité vis-à-vis des récepteurs du glutamate. Le composé **L56** n'a pas présenté d'activité à la concentration la plus forte testée (100 µM).

Trois acides aminés type-mycosporine (**L60** – **L62**), dont 1 nouveau, ainsi qu'une nouvelle mycosporine-éthanolamine (**L59**) ont été récemment isolés de l'extrait aqueux de *L. chondrodes* [Oda *et al.*, 2017]. Les nouveaux composés LC-343 (**L60**) et mycosporine-éthanolamine (**L59**) n'ont pas été évalués pour leurs activités biologiques. Toutefois, les mycosporines et acides aminés type-mycosporine sont connus pour leurs propriétés photo-protective et antioxydante.

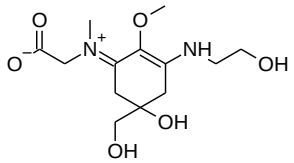
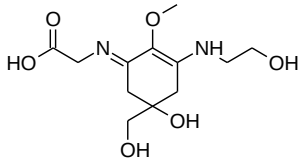
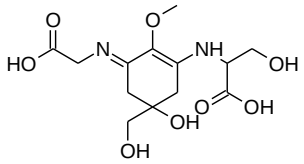
Deux osamines, dérivés de la 1-déoxynojirimycine, ont également été isolés, pour la première fois d'une source naturelle à partir d'un spécimen micronésien de *L. chondrodes* [Sakai et Kamiya, 2006]. Le composé 1-déoxynojirimycin-6-phosphate (**L57**), ainsi que son dérivé methylé (**L58**), ont été obtenus à partir de l'extrait aqueux de l'éponge. Les activités biologiques de **L57** et **L58** n'ont pas été évaluées. Cependant, la 1-déoxynojirimycine ainsi que ses dérivés *N*-alkyl sont connus comme étant de puissants inhibiteurs de l'α-glucosidase, une enzyme impliquée dans la digestion des sucres. Les inhibiteurs de l'α-glucosidase ont un pouvoir hypoglycémiant.

Tableau XIII : Dérivés d'acides aminés et autres métabolites isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*.

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L51[a]	Dysiherbaïne		Activation des récepteurs au glutamate non-NMDA (Neuroexcitation)	Sakai *et al.*, 1997
L52[a]	Néodysiherbaïne A		Activation des récepteurs au glutamate non-NMDA	Sakai *et al.*, 2001
L53[a]	Dysibétaïne			Sakai *et al.*, 1999
L54[a] **L55**[a]	Dysibetaïne CPa Dysibetaïne CPb	 **L54** : R = OH **L55** : R = NH_2	Inhibition des récepteurs au glutamate	Sakai *et al.*, 2004
L56[a]	Dysibetaïne PP		Pas d'activité	Sakai *et al.*, 2004
L57[a] **L58**[a]	1-Deoxynojirimycin-6-*O*-phosphate *N*-Méthyl-1-deoxynojirimycin-6-*O*-phosphate	 **L57** : R = H **L58** : R = CH_3		Sakai et Kamiya, 2006
L59[a]	Mycosporine-éthanolamine			Oda *et al.*, 2017

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

Tableau XIII : (suite).

Numéro	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
L60[a]	LC-343			Oda *et al.*, 2017
L61	Asterina-330			Oda *et al.*, 2017
L62	Shinorine			Oda *et al.*, 2017

[a] Composés nouveaux, isolés pour la première fois du genre *Lendenfeldia*.

II.2 Etude chimique de l'éponge *Lendenfeldia* sp. de Mayotte

L'étude chimique de l'éponge *Lendenfeldia* sp. (ML-240) collectée à Mayotte a conduit à l'isolement de 6 polybromodiphényléthers purs (**LS1** à **LS6**). Les approches utilisées pour les isolements et l'élucidation structurale sont détaillées ci-après.

II.2.1 Fractionnement bioguidé et isolement des métabolites spécialisés

La procédure d'isolement des métabolites spécialisés de *Lendenfeldia* sp. est présentée à la **Figure 8**. Le fractionnement a été réalisé par CLMP sur une colonne de silice normale à partir de 874 mg d'extrait brut DCM/MeOH (50/50 v/v) de l'éponge. L'élution a été menée au moyen d'un système de solvants de polarité croissante : cyclohexane / AcOEt / DCM / MeOH. Cette étape a permis l'obtention de 11 fractions F1-F10.

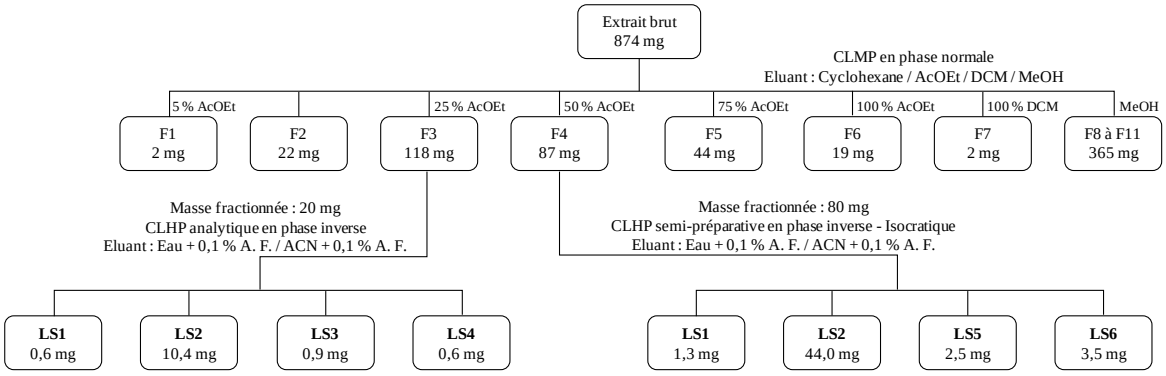


Figure 8 : Fractionnement de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. pour l'isolement des composés **LS1** à **LS6**.

Les analyses par CLHP-CAD des 11 fractions couplées au criblage biologique montrent que les fractions actives et les plus riches (avec des masses suffisantes) à travailler sont les fractions F3 et F4.

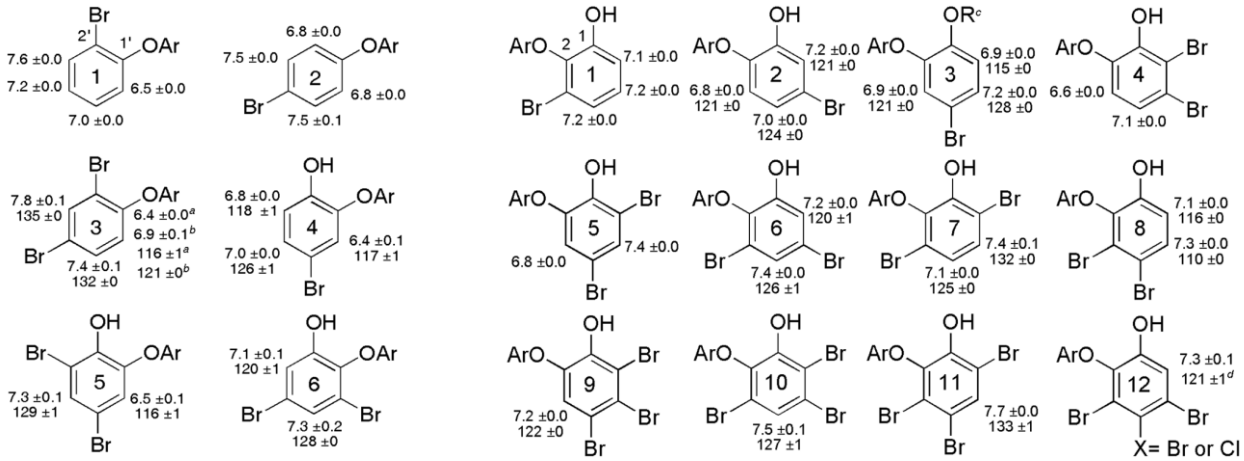
La fraction F3 a été travaillée par CLHP semi-préparative sur une colonne en phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm). L'élution, réalisée à l'aide d'un gradient de solvants eau acidifiée / ACN acidifié, a abouti à la collecte de 15 sous-fractions. Les 4 composés purs **LS1** à **LS4** ont été identifiés respectivement dans les sous-fractions SF1, SF3, SF5 et SF7.

La fraction F4 a également été soumise à un second fractionnement par CLHP semi-préparative sur une colonne en phase inverse (Phenomenex Gemini C18, 5 µm, 250 x 10 mm). 9 sous-fractions ont été collectées grâce à une élution menée au moyen d'un gradient de solvants eau acidifiée / ACN acidifié. Les composés **LS1** et **LS2** ont été retrouvés respectivement dans les sous-fractions SF3 et SF5 de la fraction F4. Les composés **LS6** et **LS5** ont été collectés purs dans les sous-fractions SF8 et SF9 respectivement.

II.2.2 Elucidation structurale des métabolites spécialisés isolés

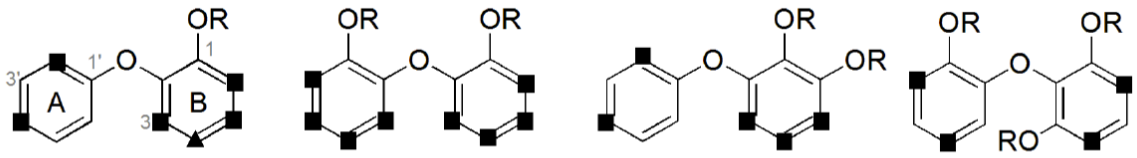
La comparaison des données spectroscopiques (SMHR, RMN ^{1}H, RMN ^{13}C) des composés **LS1** à **LS6** avec celles de la littérature (MarinLit) a montré que les composés isolés appartiennent à la famille des polybromodiphényléthers (PBDE). Plus de 42 PBDE, issus de la symbiose éponge/cyanobactérie, étaient connus en 2009. Ainsi, Calcul et ses collaborateurs (2009), au cours de leurs travaux sur les PBDE bioactifs dérivés d'éponges, ont mis en place une approche systématique et succincte basée sur la RMN pour identifier ce type de composés. Ils ont établi un tableau des déplacements caractéristiques (^{1}H et ^{13}C) des cycles A et B des PBDE connus (**Tableau XIV**). Toutefois, leur approche ne peut s'appliquer à certains PBDE substitués, notamment par un groupement méthoxyle. En effet, ce type de groupement induit un effet imprévisible et parfois considérable sur les déplacements chimiques en RMN ^{1}H et ^{13}C.

Tableau XIV : Déplacements chimiques caractéristiques des cycles A et B de PBDE connus dérivés d'éponges (Calcul *et al.*, 2009).

Cycle A	Cycle B
	

[a] Valeur des déplacements chimiques (^{1}H et ^{13}C) en 6' (cycle A) lorsque la position 3 du cycle B est occupée par Br.
[b] Valeur des déplacements chimiques (^{1}H et ^{13}C) en 6' (cycle A) lorsque la position 3 du cycle B est occupée par H.
[c] OR = OCH_3.
[d] Valeur des déplacements chimiques ^{13}C pour X = Br.

Dans le cadre de notre travail, les structures des composés **LS1** à **LS6** ont été élucidées en se basant sur l'interprétation des données spectrales (**Annexe 2**, Tome II, p. 16-27) et la comparaison avec les données de la littérature, plus particulièrement le **Tableau XIV.** Les formules brutes des composés purifiés ont permis dans un premier temps de déterminer la structure de base des composés en s'aidant de la classification (**Figure 9**) effectuée par Calcul *et al.* (2009).



R = H ou CH_3. Sites de substitution (halogénation) possibles : ■ Br et ▲ Br ou Cl

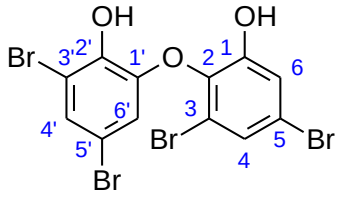
Figure 9 : Structures types des PBDE dérivés d'éponges [Calcul *et al.*, 2009].

Ainsi, les composés **LS1** à **LS6** (**Figure 10**) peuvent être classés en 2 catégories sur la base de leur cycle A :

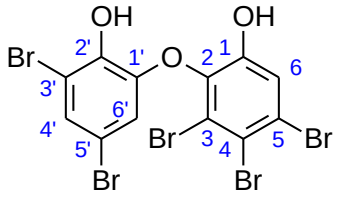
- ✓ Classe 1 : le cycle A est substitué par des atomes de brome en position 3',5'. C'est le cas des métabolites **LS1** à **LS5**.
- ✓ Classe 2 : le cycle A est substitué par des atomes de brome en position 4',6'. C'est le cas du métabolite **LS6**.

En outre, la classe 1 peut être subdivisée en 3 sous-classes en fonction des substitutions du cycle B. Ainsi, nous avons des éthers diphényliques :

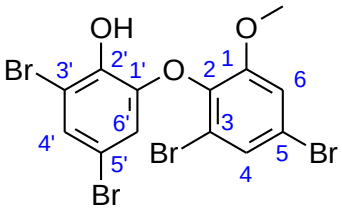
- ✓ tétrabromés : **LS1** et **LS3**
- ✓ pentabromés : **LS2** et **LS4**
- ✓ hexabromés : **LS5**



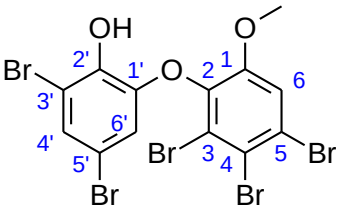
3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol **(LS1)**



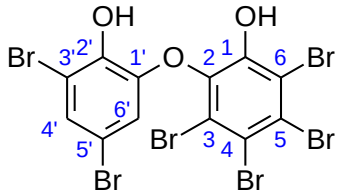
3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol **(LS2)**



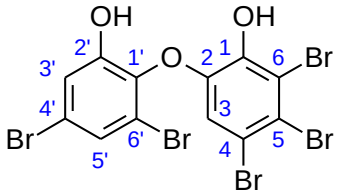
3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole **(LS3)**



3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole **(LS4)**



3,4,5,6-tétrabromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS5**)

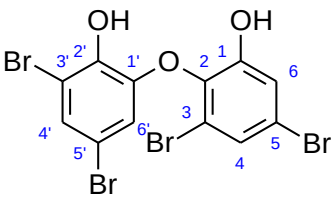


4,5,6-tribromo-2-(4',6'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol **(LS6)**

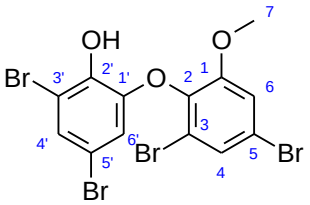
Figure 10 : Structures des polybromodiphényléthers isolés de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. (ML-240).

II.2.2.1 Elucidation structurale de la classe 1 : cycle A substitué en position 3',5'

❖ **Ethers diphényliques tétrabromés LS1 et LS3**



LS1



LS3

Les composés **LS1** et **LS3** ont été isolés sous forme de cristaux blancs. Les profils isotopiques observés en spectrométrie de masse basse résolution présentent des clusters de pics avec un ratio 1 : 4 : 6 : 4 :1 caractéristiques de la présence de 4 atomes de brome dans la molécule. Les spectres de masse obtenus en mode ESI^- et ESI^+ indiquent respectivement les présences d'ion-pseudomoléculaire et d'adduit sodium :

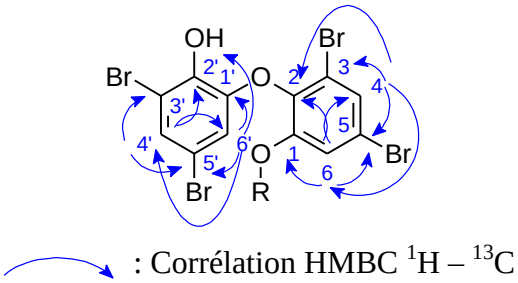
- ✓ **LS1** : $[M-H]^-$ à *m/z* 516,7 et $[M+Na]^+$ à *m/z* 540,7 (5ème pic du massif isotopique : 2 x ^{79}Br, 2 x ^{81}Br)
- ✓ **LS3** : $[M-H]^-$ à *m/z* 530,7 et $[M+Na]^+$ à *m/z* 554,7 (5ème pic du massif isotopique : 2 x ^{79}Br, 2 x ^{81}Br)

Les analyses SM-ESI et RMN (^1H et ^{13}C) ont permis de déduire les formules brutes suivantes : $C_{12}H_6Br_4O_3$ et $C_{13}H_8Br_4O_3$ correspondants respectivement à **LS1** et **LS3**.

Par ailleurs, l'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C mono et bidimensionnelles (**Tableau XV**) met en évidence la présence de :

- ✓ 12 et 13 carbones respectivement pour **LS1** et **LS3**
- ✓ Pour **LS1** et **LS3 :**
  - 2 paires de protons aromatiques dont la constante de couplage (*d* ; 2,2) indique qu'ils sont placés en position méta
    - **LS1** H4 (δ_H 7,27) / H6 (δ_H 7,09) et H4' (δ_H 7,29) / H6' (δ_H 6,56)
    - **LS3** H4 (δ_H 7,49) / H6 (δ_H 7,34) et H4' (δ_H 7,29) / H6' (δ_H 6,39)
  - 1 proton aromatique H6' dont le déplacement chimique indique sa proximité avec le brome en position C-3 [Calcul *et al.*, 2009]
    - **LS1** (δ_H 6,56 ; δ_C 117,7)
    - **LS3** (δ_H 6,39 ; δ_C 116,8)
- ✓ Pour **LS3**, 1 groupement méthoxyle (δ_H 3,80 ; δ_C 57,2).

Les corrélations HMBC entre H-4', C-2', C-3', C-5' et C-6' ainsi qu'entre H-6', C-1', C-2', C-4' et C-5' sur le cycle A permettent de positionner les protons non substitués du cycle aromatique (**Figure 11**). De la même façon, les corrélations HMBC entre H-4, C-2, C-3, C-5 et C-6 ainsi qu'entre H-6, C-1, C-2, C-4 et C-5 sur le cycle B renseignent sur les substitutions du cycle B. L'exploration du spectre NOESY du composé **LS3** met en lumière une certaine proximité spatiale entre les protons en position H-6, H-6' et le groupement méthoxyle porté par C-1.



LS1 : R = H
LS3 : R = CH_3

: Corrélation HMBC ^1H – ^{13}C

Figure 11 : Corrélations RMN 2D clés des métabolites **LS1** et **LS3**.

Tableau XV : Données de la RMN ^1D et ^2D pour **LS1** et **LS3** (CD_3OD).

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

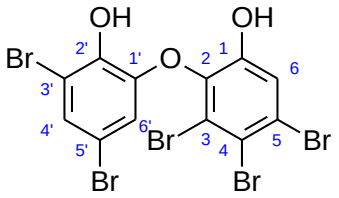
Position	δC (150 MHz)		δH (600 MHz)		HMBC (^1H-^{13}C)	NOESY
	LS1	LS3	LS1	LS3	LS1 et LS3	LS3
1	154,7	155,1	-	-	-	-
2	141,1	141,4	-	-	-	-
3	120,1	120,6	-	-	-	-
4	126,4	128,2	7,27 (1H ; d ; 2,2)	7,49 (1H ; d ; 2,2)	2, 3, 5, 6	-
5	119,2	119,3	-	-	-	-
6	121,0	117,2	7,09 (1H ; d ; 2,2)	7,34 (1H ; d ; 2,2)	1, 2, 4, 5	OCH_3
7 (OCH3)		57,2	-	3,80 (3H ; s)	-	6, (6')
1'	147,8	147,8	-	-	-	-
2'	146,2	145,3	-	-	-	-
3'	112,3	112,1	-	-	-	-
4'	129,7	129,7	7,29 (1H ; d ; 2,2)	7,29 (1H ; d ; 2,2)	2', 3', 5', 6'	-
5'	110,4	110,9	-	-	-	-
6'	117,7	116,8	6,56 (1H ; d ; 2,2)	6,39 (1H ; d ; 2,2)	1', 2', 4', 5'	OCH_3

Une recherche dans la base données MarinLit indique que le composé **LS1** a déjà été isolé en 2006 à partir de l'éponge *Dysidea herbacea* (actuellement nommée *Lamellodysidea herbacea*) [Utkina et Denisenko, 2006] et identifié comme étant le 3,5-dibromo-2-(3,5-dibromo-2-hydroxyphénoxy)phénol. Ce composé, produit synthétiquement dans le cadre d'une étude réalisée par Hanif *et al.* (2007), a démontré une activité antibactérienne modérée aux concentrations de 5 et 10 µg/disque avec des zones d'inhibition respectives de 16 et 18 mm [Hanif *et al.*, 2007].

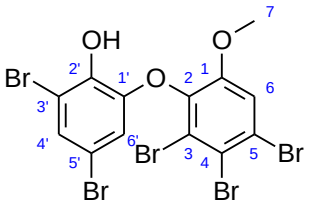
Le composé **LS3** (dérivé méthoxylé de **LS1**) a été isolé en 1995 à partir d'un spécimen de *Dysidea* sp. [Fu *et al.*, 1995]. Son activité biologique a été évaluée sur 5 enzymes différentes impliquées dans le cancer (Protéine Kinase C, Protéine Tyrosine Kinase, Inosine Monophosphate Dehydrogenase, Guanosine MonoPhosphate Synthetase) et dans le développement de l'athérosclérose (15-lipoxygénase). Aucune activité inhibitrice de ces enzymes n'a été décelée. Ce composé a également été isolé d'un spécimen de *Phyllospongia*

dendyi (*Lendenfeldia dendyi*) (*cf* **Tableau XI**, p. 67, composé n° **L38**). Le composé a été testé pour l'inhibition de l'assemblage des microtubules ainsi que de la maturation des oocytes d'étoiles de mer à la concentration de 100 µM [Liu *et al.*, 2004]. Toutefois, aucune activité inhibitrice n'a été décelée. Les auteurs en ont conclu que les 2 groupements OH phénoliques sont nécessaires à la bioactivité des PBDE évalués.

❖ Ethers diphényliques pentabromés LS2 et LS4



LS2



LS4

Les composés **LS2** et **LS4** ont été isolés sous forme de cristaux blancs. Les profils isotopiques observés en spectrométrie de masse basse résolution présentent des clusters de pics avec un ratio 1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1 caractéristiques de la présence de 5 atomes de brome dans la molécule. Les spectres de masse obtenus en mode ESI^- et ESI^+ indiquent respectivement les présences d'ion-pseudomoléculaire et d'adduit sodium :

- ✓ **LS2** : $[M-H]^-$ à *m/z* 594,6 et $[M+Na]^+$ à *m/z* 618,6 (5ème pic du massif isotopique : 3 x ^{79}Br, 2 x ^{81}Br)
- ✓ **LS4** : $[M-H]^-$ à *m/z* 608,6 et $[M+Na]^+$ à *m/z* 632,6 (5ème pic du massif isotopique : 3 x ^{79}Br, 2 x ^{81}Br)

Les analyses SM-ESI et RMN (^1H et ^{13}C) ont permis de déduire les formules brutes suivantes : $C_{12}H_5Br_5O_3$ et $C_{13}H_7Br_5O_3$ correspondants respectivement à **LS2** et **LS4**.

En outre, l'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C mono et bidimensionnelles (**Tableau XVI**) met en évidence la présence de :

- ✓ 12 et 13 carbones respectivement pour **LS2** et **LS4**
- ✓ Pour **LS2** et **LS4** :
  - 1 proton aromatique non couplé
    - **LS2** H-6 (δ_H 7,37)
    - **LS4** H-6 (δ_H 7,58)
  - 1 paire de protons aromatiques dont la constante de couplage (*d* 2,2) indique qu'ils sont placés en position méta
    - **LS2** H4' (δ_H 7,29) / H6' (δ_H 6,56)
    - **LS4** H4' (δ_H 7,29) / H6' (δ_H 6,39)
  - 1 proton aromatique H6' dont le déplacement chimique indique sa proximité avec le brome en position C-3 [Calcul *et al.*, 2009]
    - **LS2** (δ_H 6,48; δ_C 117,1)
    - **LS4** (δ_H 6,40; δ_C 116,7)

✓ Pour le composé **LS4**, 1 groupement méthoxyle (δ_H 3,80 ; δ_C 57,2).

Les protons aromatiques couplés en position méta sont localisés sur le cycle A. En effet, d'après Calcul *et al.*, aucun PBDE avec un cycle A possédant un seul proton n'a été identifié à ce jour [Calcul *et al.*, 2009]. Les corrélations HMBC entre H-4', C-2', C-3', C-5' et C-6' ainsi qu'entre H-6', C-1', C-2', C-4' et C-5' sur le cycle A permettent de positionner les protons non substitués du cycle aromatique (**Figure 12**). Le proton aromatique restant est positionné sur le cycle B. Les corrélations HMBC entre H-6, C-1, C-2, C-4 et C-5 sur le cycle B confirme le profil de substitutions du cycle B. L'exploration du spectre NOESY du composé **LS4** met en lumière une certaine proximité spatiale entre les protons en position H-6, H-6' et le groupement méthoxyle porté par C-1.

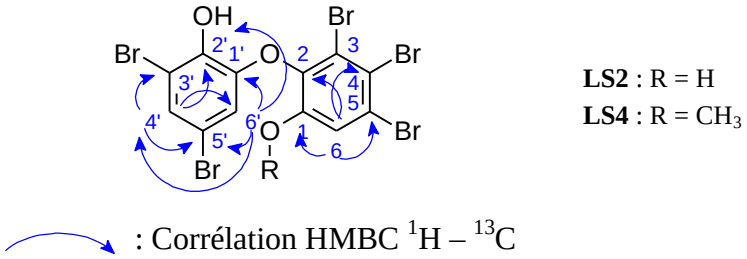


Figure 12 : Corrélations RMN ^2D clés des métabolites **LS2** et **LS4**.

Tableau XVI : Données de la RMN ^1D et ^2D pour **LS2** et **LS4** (CD_3OD).

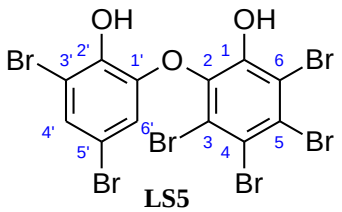
Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δC (150 MHz)		δH (600 MHz)		HMBC (^1H-^{13}C)	NOESY
	LS2	LS4	LS2	LS4	LS2 et LS4	LS4
1	152,6	153,9	-	-	-	-
2	141,8	142,4	-	-	-	-
3	122,8	123,1	-	-	-	-
4	117,4	119,4	-	-	-	
5	122,9	123,3	-	-	-	--
6	122,1	118,4	7,37 (1H, s)	7,58 (1H ; s ; 2,2)	1, 2, 4, 5	OCH_3
7 (OCH3)		57,3	-	3,81 (3H, s)	-	6, (6')
1'	147,2	147,3	-	-	-	-
2'	145,5	145,3	-	-	-	-
3'	112,2	112,1	-	-	-	-
4'	129,8	129,9	7,31 (1H ; d ; 2,2)	7,30 (1H ; d ; 2,2)	2', 3', 5', 6'	-
5'	111,0	110,7	-	-	-	-
6'	117,1	116,7	6,48 (1H ; d ; 2,2)	6,40 (1H ; d ; 2,2)	1', 2', 4', 5'	OCH_3

Une recherche dans MarinLit montre que le composé **LS2** a été isolé à deux reprises, l'une en 1995 [Fu *et al.*, 1995] et l'autre en 2009 [Calcul *et al.*, 2009], de spécimens de *Dysidea*. Ce composé a également été synthétisé en 2007 au cours d'une étude de relation structure activité des PBDE contre *Bacillus subtilis* [Hanif *et al.*, 2007]. L'évaluation de ses activités biologiques montre que **LS2** inhibe 89 % de l'activité de l'enzyme GMPS (impliquée dans le cancer) à une concentration de 50 µM [Fu *et al.*, 1995]. Il agit également par inhibition de la protéine Mcl-1 (cible moléculaire anticancéreux) avec une CI_{50} > 10 µg/mL [Calcul *et al.*, 2009]. Par ailleurs, il présente une bonne activité antibactérienne (zones d'inhibition 7 – 16 mm) dans une gamme de concentration de 0,1 – 10 µg/disque [Hanif *et al.*, 2007]. L'étude de Hanif *et al.* conclut que les 2 groupements OH phénoliques ainsi qu'un atome de brome en position C-2 et/ou C-5 sont importants pour une activité antibactérienne.

Le composé **LS4** (dérivé méthoxylé de **LS2**) a été isolé pour la première fois en 2004 de l'éponge *Phyllospongia dendyi* (*Lendenfeldia dendyi*) (*cf* **Tableau XI**, p. 67, composé n° **L35**) et son activité biologique évaluée à une concentration de 100 µM [Liu *et al.*, 2004]. Ce composé n'a présenté aucune activité d'inhibition ni de l'assemblage des microtubules ni de la maturation des oocytes d'étoiles de mer. Les auteurs en ont conclu, à l'instar du composé **LS3**, que les 2 groupements OH phénoliques sont nécessaires à la bioactivité des PBDE évalués.

❖ **Ether diphénylique hexabromé LS5**



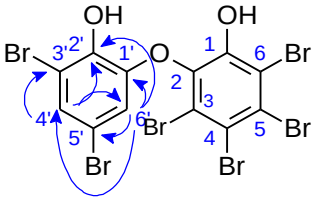
LS5

Le composé **LS5** a été isolé sous forme de cristaux blancs. Le profil isotopique observé en spectrométrie de masse haute résolution est caractéristique de la présence de 6 atomes de brome (clusters de pics avec un ratio 1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1) dans la molécule. Le spectre de masse obtenu en mode ESI^- montre également la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ détecté à *m/z* 674,5127 au maximum isotopique (3 x ^{79}Br, 3 x ^{81}Br). Les analyses SM-HR et RMN (^1H et ^{13}C) ont permis de déduire la formule brute suivante : $C_{12}H_4Br_6O_3$.

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

- ✓ 12 carbones
- ✓ 1 paire de protons aromatiques dont la constante de couplage (*d* 1,7) indique qu'ils sont placés en position méta : H-4' (δ_H 7,33) / H-6' (δ_H 6,60)
- ✓ 1 proton aromatique H-6' dont le déplacement chimique (δ_H 6,60; δ_C 117,8) indique sa proximité avec le brome en position C-3 [Calcul *et al.*, 2009].

Le spectre RMN ^{1}H ne présentant pas de proton aromatique supplémentaire, les carbones du cycle B sont donc tous substitués. Les corrélations HMBC entre H-4', C-2', C-3' et C-6' ainsi qu'entre H-6', C-1', C-2', C-4' et C-5' sur le cycle A permettent de positionner les protons non substitués du cycle aromatique (**Figure 13**).



: Corrélation HMBC ^{1}H – ^{13}C

Figure 13 : Corrélations RMN ^{2}D clés du métabolite **LS5**.

Tableau XVII : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS5** enregistrées dans CD_3OD.

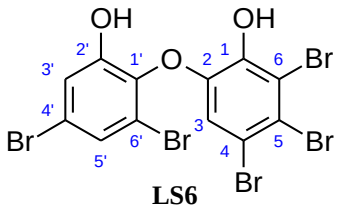
Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS.
Les constantes de couplage *J* en Hertz figurent entre parenthèses.

Position	δ_{13C} (150 MHz)	δ_{1H} (600 MHz)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	n.d.	-	-
2	n.d.	-	-
3	121,1	-	-
4	n.d.	-	-
5	n.d.	-	-
6	126,2	-	-
7		-	-
1'	147,3	-	-
2'	145,7	-	-
3'	111,7	-	-
4'	129,9	7,33 (1H ; d ; 1,7)	2', 3', 6'
5'	110,5	-	-
6'	117,8	6,60 (1H ; d ; 1,7)	1', 2', 4', 5'

n.d. : non déterminé

La comparaison des données RMN avec celles de la littérature permet de conclure que le composé **LS5** est un éther diphénylique hexabromé [Calcul *et al.*, 2009; Hanif *et al.*, 2007]. Ce dernier, isolé pour la première fois en 1981 à partir d'un spécimen de *Dysidea herbacea* (actuellement nommée *Lamellodysidea herbacea*) [Norton *et al.*, 1981], a également été isolé du genre *Lendenfeldia* (*cf* **Tableau XI**, p. 67, composé n° **L36**). Isolé de *Lamellodysidea herbaceae* en 2009, il a été identifié par Calcul et ses collègues comme étant le 3,4,5,6-tétrabromo-2-(3,5-dibromo-2-hydroxyphénoxy)phénol. L'évaluation des activités biologiques de ce composé montre qu'il possède plusieurs activités notamment inhibitrice de la protéine Mcl-1 avec une CI_{50} > 10 µg/mL et antibactérienne dans une gamme de concentration allant de 0,1 µg/disque à 10 µg/disque [Calcul *et al.*, 2009; Hanif *et al.*, 2007].

II.2.2.2 Elucidation structurale de la catégorie 2 : cycle A substitué en position 4',6'



Le composé **LS6** a été isolé sous forme de cristaux blancs. Le profil isotopique observé en spectrométrie de masse haute résolution est caractéristique de la présence de 5 atomes de brome (clusters de pics avec un ratio 1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1) dans la molécule. Le spectre de masse obtenu en mode ESI^- montre également la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ détecté à *m/z* 594,6042 (5ème pic du massif isotopique : 3 x ^{79}Br, 2 x ^{81}Br). Les analyses SM-HR et RMN (^1H et ^{13}C) ont permis de déduire la formule brute suivante $C_{12}H_5Br_5O_3$.

De plus, l'exploitation des données RMN ^1H et ^{13}C mono et bidimensionnelles (**Tableau XVIII**) met en évidence la présence de :

- ✓ 12 carbones
- ✓ 1 proton aromatique non couplé H-3 (δ_H 7,15)
- ✓ 1 paire de protons aromatiques H-3' (δ_H 7,02) / H-5' (δ_H 7,46) dont la constante de couplage (*d* 2,2) indique qu'ils sont placés en position méta

Les corrélations HMBC entre H-3', C-1', C-2', C-4' et C-5' et entre H-5', C-1', C-3', C-4' et C-6' permettent de positionner les protons aromatiques sur le cycle A (**Figure 14**). De la même façon, les corrélations HMBC entre H-3, C-1, C-2, C-4 et C-5 sur le cycle B renseignent sur les substitutions du cycle B.

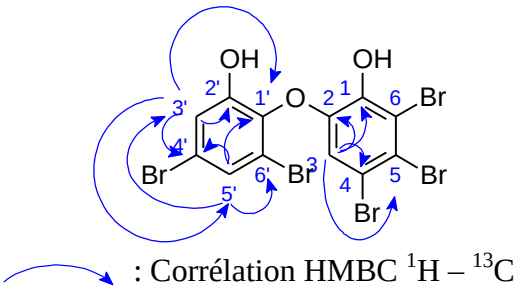


Figure 14 : Corrélations RMN ^2D clés du métabolite **LS6**.

Tableau XVIII : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS6** (CD_3OD).

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

Position	δC (150 MHz)	δH (600 MHz)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	149,6	-	-
2	146,2	-	-
3	123,0	7,15 (1H, s)	1, 2, 4, 5
4	116,7	-	-
5	123,4	-	-
6	131,7	-	-
1'	147,9	-	-
2'	146,9	-	-
3'	122,9	7,02 (1H, d, 2.2)	1', 2', 4', 5'
4'	111,1	-	-
5'	132,0	7,46 (1H, d, 2.2)	1', 3', 4', 6'
6'	113,1	-	-

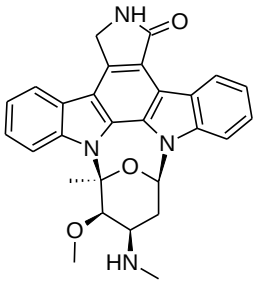
Une recherche dans les bases de données MarinLit et Dictionnary of Natural Products ne renvoie pas de correspondance structurale entre le composé **LS6** et les PBDE référencés dans ces bases de données. Ce résultat semble indiquer que **LS6** serait un nouveau composé.

II.2.3 Evaluation de l'activité biologique des métabolites isolés

Les activités biologiques des métabolites purifiés (**LS1** à **LS6**) ont été évaluées par un criblage secondaire sur les 7 cibles moléculaires anti-âge selectionnées dans ce projet. Les tests pour lesquels un résultat a été obtenu sont présentés ci-après.

❖ Evaluation de l'activité d'inhibition de Fyn B

Les protéines kinases appartiennent à une famille de protéines qui régulent l'activité de leurs protéines cibles par phosphorylation. L'activité kinase se traduit par le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers son substrat et la conversion de l'ATP en ADP. Afin d'identifier les composés inhibiteurs de l'activité de phosphorylation de la FynB, des essais enzymatiques utilisant une méthode basée sur la luminescence, ont été réalisés. Ainsi, le signal luminescent observé est proportionnel à la concentration d'ADP produit, qui est lui-même corrélé à l'activité kinase de FynB. La staurosporine (**28**), un inhibiteur de kinase non sélectif, a été utilisée comme contrôle positif. Pour déterminer l'efficacité inhibitrice des composés actifs, une étude d'inhibition dose-dépendante de l'activité kinase de la FynB a été menée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XIX**.



staurosporine (**28**)

Tableau XIX : Activité inhibitrice (CI_{50}) de FynB des composés **LS1** à **LS6**.

Composés	CI_{50}
Staurosporine	0,137 µM (0,06 µg/mL)
LS1	-
LS2	-
LS3	-
LS4	-
LS5	> 33,33 µg/mL
LS6	> 33,33 µg/mL

Ce criblage a montré que les composés **LS5** et **LS6** inhibaient la moitié de l'activité kinase de FynB à une concentration supérieure à 33,33 µg/mL. Cette dernière concentration est largement supérieure (555 fois) à la concentration effective de la staurosporine.

❖ **Evaluation de l'activité d'inhibition de CDK7**

Afin d'identifier les composés inhibiteurs de l'activité de phosphorylation de la CDK7, une étude d'inhibition dose-dépendante de l'activité kinase de la CDK7 a été menée en utilisant une méthode basée sur la luminescence. De la même façon que FynB, le signal luminescent observé est corrélé à l'activité kinase de CDK7. La staurosporine a été utilisée comme contrôle positif. Les concentrations inhibitrices médianes des composés actifs sont présentées dans le **Tableau XX**.

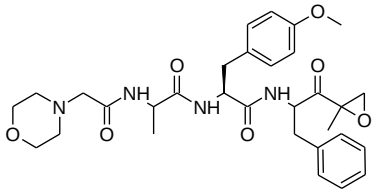
Tableau XX : Activité inhibitrice (CI_{50}) de CDK7 des composés **LS1** à **LS6**.

Composés	CI_{50}
Staurosporine	0,172 µM (0,08 µg/mL)
LS1	-
LS2	-
LS3	-
LS4	-
LS5	> 33,33 µg/mL
LS6	> 15,00 µg/mL

Ce criblage a permis de mettre en évidence les composés **LS5** et **LS6** comme inhibiteurs de CDK7. Le composé **LS6** (> 15,00 µg/mL) inhibe l'activité kinase de CDK7 à une concentration 2 fois plus faible que le composé **LS5** (> 33,33 µg/mL). Toutefois, les activités inihibitrices des composés **LS5** et **LS6** sont très faibles comparativement à la staurosporine.

❖ Evaluation de l'activité inhibitrice du protéasome

Le protéasome est une machinerie cellulaire assurant la dégradation des protéines intracellulaires soit malformées soit dont la cellule n'a plus besoin. Cet assemblage multiprotéique possède plusieurs sites actifs peptidasiques capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques de nombreux résidus d'acides aminés. Afin d'identifier des inhibiteurs du protéasome, les composés purifiés ont été évalués pour leur capacité à inhiber le site protéase de type chymotrypsine du protéasome de levure, en utilisant une méthode basée sur la fluorescence. En effet, si le site protéase-chymotrypsine du protéasome n'est pas inhibé, celui-ci va cliver le substrat utilisé dans le test (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) et libérer le fluorophore AMC. Un inhibiteur sélectif du protéasome, l'ONX-0914 (**29**), a été utilisé comme contrôle positif. Afin de déterminer l'efficacité inhibitrice des composés actifs, une étude d'inhibition dose-dépendante du protéasome a été menée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XXI**.



ONX-0914 (**29**)

Tableau XXI : Activité inhibitrice du protéasome des composés **LS1** à **LS6**

Composés	CI_{50}
ONX-0914	0,0463 nM (0,000026 µg/mL)
LS1	Inhibition à 33 µg/mL
LS2	-
LS3	-
LS4	-
LS5	-
LS6	-

Au cours de ce criblage, seul le composé **LS1** a présenté une activité inhibitrice du protéasome à la concentration la plus forte testée soit 33 µg/mL. Toutefois, aucune interaction du composé actif avec le site actif du protéasome n'a été observée.

II.3 Discussion

L'étude chimique de *Lendenfeldia* sp. (ML-240) a ainsi conduit à l'isolement de 5 composés purs connus (**LS1** – **LS5**) et d'un composé nouveau (**LS6**) appartenant à la classe des PBDE. Ces composés ont été identifiés comme étant :

- ✓ 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS1**),
- ✓ 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS2**),
- ✓ 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (**LS3**),
- ✓ 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (**LS4**),
- ✓ 3,4,5,6-tétrabromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS5**),
- ✓ 4,5,6-tribromo-2-(4',6'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS6**).

Les composés **LS1** à **LS5** ont été précédemment isolés des éponges *Dysidea* sp., *Dysidea herbacea* (devenue *Lamellodysidea herbacea* suite à un transfert de genre) ainsi que *Phyllospongia dendyi* (actuellement *Lendenfeldia dendyi*) [Calcul *et al.*, 2009; Hanif *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 1995]. Plus globalement, les PBDE sont des spécialisés fréquemment isolés des éponges appartenant au genre *Dysidea*/*Lamellodysidea* [Carté et Faulkner, 1981; Fu *et al.*, 1995; Handayani *et al.*, 1997; Hanif *et al.*, 2007; Ortlepp *et al.*, 2008; Utkina et Denisenko, 2006; Zhang *et al.*, 2008]. Seuls quelques PBDE dérivent d'éponges appartenant au genre *Lendenfeldia* [Radwan *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2004; Hattori *et al.*, 2001].

Les données de la littérature apportent également quelques informations sur les activités biologiques associées aux composés isolés (**Tableau XXII**). Plusieurs activités ont été mentionnées notamment : antibactériennes (**LS1**, **LS2** et **LS5**), inhibitrices d'enzymes (**LS2** et **LS5**) et de la protéine Mcl-1 (**LS2** et **LS5**) [Hanif *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 1995; Calcul *et al.*, 2009]. Le composé **LS6** n'ayant pas été référencé dans la littérature, aucune activité biologique ne lui est associée. Par ailleurs, les études de relation structure/activité menées sur les PBDE isolés d'éponges semblent indiquer l'importance des 2 groupements OH phénoliques dans l'activité biologique des PBDE [Hanif *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004].

Tableau XXII : Activités biologiques référencées dans la littérature pour les composés **LS1** à **LS5**.

Numéro	Organisme	Lieu de collecte	Activité biologique	Référence
LS1	*Lamellodysidea herbacea*	Indonésie	• Antibactérienne (*B. subtilis*)	Hanif *et al.*, 2007
LS2	*Lamellodysidea herbacea*	Indonésie	• Antibactérienne (*B. subtilis*)	Hanif *et al.*, 2007
	Dysidea sp.	Micronésie	• Inhibition GMPS	Fu *et al.*, 1995
	Dysidea sp.	Pacifique	• Inhibition Mcl-1	Calcul *et al.*, 2009

Tableau XXII : (suite).

Numéro	Organisme	Lieu de collecte	Activité biologique	Référence
LS3	*Dysidea* sp.	Micronésie	Pas d'activité observée	Fu *et al.*, 1995
LS4	*Lendenfeldia dendyi*	Palau	• Pas d'activité observée	Liu *et al.*, 2004
	Lamellodysidea herbacea	Indonésie	• Pas d'activité observée	Hanif *et al.*, 2007
LS5	*Dysidea* sp.	Micronésie	• Inhibition 15-LO, GMPS, IMPDH	Fu *et al.*, 1995
	Lendenfeldia dendyi	Palau	• Inhibition de l'assemblage des microtubules	Liu *et al.*, 2004
			• Stimulation de la production d'IL-8	Oda *et al.*, 2005
	Lamellodysidea herbacea	Indonésie	• Antibactérienne (*B. subtilis*)	Hanif *et al.*, 2007
	Dysidea sp.	Pacifique	• Inhibition Mcl-1	Calcul *et al.*, 2009

Les travaux de thèse menés ont permis de compléter les données de la littérature et de mettre en lumière :

- ✓ 2 inhibiteurs des protéines kinases FynB et CDK7, impliquées respectivement dans la maladie d'Alzheimer et les cancers. Ces inhibiteurs sont le 4,5,6-tribromo-2-(4',6'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS6**) et le 3,4,5,6-tétrabromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS5**). Comparativement à l'activité inhibitrice de la staurosporine, composé de référence, les composés **LS5** et **LS6** possèdent une activité inhibitrice très faible. Il est à noter, toutefois, qu'une activité inhibitrice de protéine kinase a déjà été reportée pour 2 PBDE isolés d'une éponge *Dysidea* sp., actifs sur la protéine Tie2 (cible thérapeutique du cancer) [Xu *et al.*, 2005].
- ✓ 1 inhibiteur du protéasome, actif à la concentration testée la plus forte (33 µg/mL). Il s'agit du composé **LS1**. Toutefois, les études d'inhibition dose-dépendante n'ont pas donné de résultats concluants.

Bien que plusieurs activités biologiques aient été associées aux PBDE dans la littérature, il semble que ce soit la première fois que des activités inhibitrices des protéines CDK7 et FynB ainsi que du protéasome leur soient attribuées.

Enfin, il faut souligner que les dérivés méthoxylés des composés **LS1** et **LS2**, à savoir **LS3** et **LS4** respectivement, n'ont présenté aucune activité. Ce résultat semble aller dans le sens des observations relevées dans la littérature concernant l'importance des 2 groupements OH phénoliques dans la bioactivité des composés.

Chapitre III
Etude de la composition chimique de l'éponge *Scopalina hapalia* (ML-263)

Scopalina hapalia
Crédit ChemBioPro

Au cours du criblage biologique primaire pour la recherche d'extraits bruts d'invertébrés actifs sur différentes cibles biologiques impliquées dans le processus du vieillissement, l'extrait de *Scopalina hapalia* (XML-263) s'est montré actif sur 2 cibles biologiques : élastase et Fyn kinase. Aussi, l'étude chimique de *Scopalina hapalia*, collecté à Mayotte en 2013, a été entreprise afin d'identifier les métabolites bioactifs.

III.1 Etat de l'art sur *Scopalina hapalia*

III.1.1 Localisation du genre *Scopalina* - Distribution géographique

Les éponges du genre *Scopalina* ont une distribution relativement localisée et produisent des larves philopatriques* ayant une faible capacité de dispersion ce qui favoriserait la spéciation des espèces dans des zones biogéographiques relativement proches [Blanquer et Uriz, 2007]. Elles ont été principalement signalées en mer Méditerranée ainsi que dans les trois océans : Atlantique (Golfe du Mexique, Mer des Caraïbes, Côtes du Brésil), Indien (canal du Mozambique et Australie) et Pacifique (Australie) (**Figure 15**) (https://obis.org; http://www.marinespecies.org).

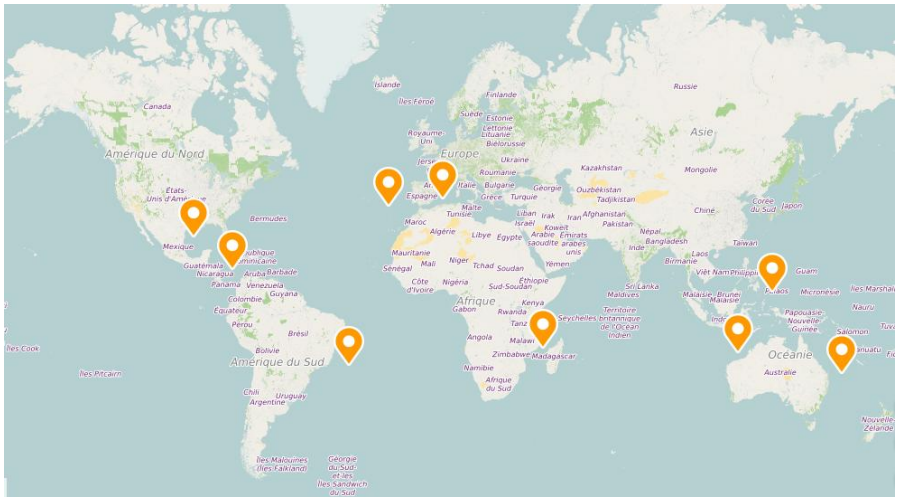


Figure 15 : Distribution géographique des éponges du genre *Scopalina*.
(crédit geoportail.gouv.fr)

III.1.2 Taxonomie et description du genre *Scopalina* (Schmidt, 1862)

L'identification de beaucoup d'espèces, notamment d'éponges, peut être extrêmement difficile. Dans certains cas, un spécimen d'éponge peut être identifié sous différents noms d'espèces et parfois même de genre. L'utilisation d'une approche moléculaire dans le domaine de la taxonomie permet aujourd'hui d'y remédier et de mettre notamment en lumière les espèces cryptiques* couramment rencontrées chez les éponges. Par conséquent, cette nouvelle approche peut entraîner pour certains organismes, un changement du nom de genre (modification de l'appartenance à un genre donné) ou une modification de toute la

classification du genre comme cela a été le cas pour le genre *Scopalina*. Il est important de noter à ce stade que cet état de fait a quelque peu compliqué la recherche bibliographique ainsi que la discussion qui en résulte dans ce chapitre.

Décrite pour la première fois en 1862 à partir d'un spécimen de *Scopalina lophyropoda* trouvé en mer Adriatique, la classification des espèces appartenant au genre *Scopalina* ainsi que celle du genre lui-même ont connu plusieurs remaniements au cours de ces dernières années. Initialement classées dans la famille des Axinellidae, les éponges appartenant au genre *Scopalina* ont été transférées dans la famille des Dictyonellidae qui a été créée en 1990 au sein de l'ordre des Halichondrida (Van Soest, Diaz & Pomponi 1990) [Alvarez et Hooper, 2011; Soest *et al.*, 2002]. Suite à une révision de la classification des Démosponges sur la base de données moléculaires, la famille des Scopalinidae puis l'ordre des Scopalinida ont été créés pour accueillir les genres suivants [Morrow et Cárdenas, 2015; Morrow *et al.*, 2012] :

- *Scopalina* (Schmidt, 1862) comprenant 12 espèces,
- *Svenzea* (Alvarez, Van Soest et Rützler, 2002) avec 5 espèces actuellement décrites,
- *Stylissa* (Hallmann, 1914) composé de 14 espèces.

Il est à noter que le genre *Stylissa* a été provisoirement inclus dans cet ordre et cette famille avec beaucoup de réserve. En effet, Alvarez *et al.* ont montré en 2010 par une approche moléculaire que *Stylissa flabelliformis*, l'espèce type du genre *Stylissa*, est étroitement apparentée aux espèces du genre *Scopalina* tandis que les espèces *Stylissa carteri* et *Stylissa massa*, dont l'appartenance au genre *Stylissa* est confirmée, indiquent davantage une affiliation à la famille des Agelasidés [Morrow *et al.*, 2012; Redmond *et al.*, 2013].

Par ailleurs, l'analyse par approche moléculaire de plusieurs spécimens de *Scopalina* a également permis de révéler l'existence d'espèces cryptiques au sein du genre. Cela a eu pour conséquence non seulement d'enrichir le genre mais aussi d'améliorer l'assignation géographique des espèces. En effet, l'étude réalisée par Blanquer et Uriz sur les populations de *Scopalina* de la Méditerranée et de l'Atlantique, identifiées initialement comme appartenant à l'espèce *Scopalina lophyropoda* (Schmit, 1862), a montré qu'elles faisaient parties d'un complexe d'espèces cryptiques* génétiquement distinctes [Blanquer et Uriz, 2008]. Cette même étude a permis de montrer que l'espèce type *S. lophyropoda* est endémique de la zone Méditerranée et de mettre en évidence trois espèces cryptiques caractéristiques de la zone Méditerrano – Atlantique. Il s'agit des espèces : *S. blanensis*, *S. canariensis*, *S. ceutensis* [Blanquer et Uriz, 2008]. Cette « étude de cas » montre ainsi les limites de l'utilisation d'une simple combinaison de caractères morphologiques pour la classification.

Deux autres espèces du genre, relativement bien étudiées, présentent également une distribution très localisée. L'espèce *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977), anciennement *Ulosa ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977), est une espèce commune des Indes occidentales, en allant de Bélize au Brésil en passant par les Caraïbes [Blanquer et Uriz, 2008; Soest *et al.*, 2002]. L'espèce *Scopalina australiensis* (Pulitzer-Finali, 1982), initialement décrite comme

étant *Dictyonella australiensis*, est quant à elle, endémique du bassin Indo-Pacifique (Australie).

A l'heure actuelle, le genre comprend 12 espèces d'éponges décrites comme étant encroûtantes, à croissance massive ou érigée avec un squelette formé de fibres de spongine* et de spicules* de type styles* arrangés en faisceaux ; elles sont de consistance molle avec une surface lisse ou conuleuse ; elles sont caractérisées par l'absence de squelette ectosomal* et leur tissu contient des cellules inhabituelles remplies de granules réfringentes* [Alvarez et Hooper, 2011; Morrow *et al.*, 2012].

Règne : Animalia

Phylum : Porifera

Classe : Demospongiae

Ordre : Scopalinida (Morrow & Cardenas, 2015)

Famille : Scopalinidae (Morrow *et al.*, 2012)

Genre : *Scopalina*

Synonyme : *Hoplochalina* (Lendenfeld, 1887)

III.1.3 Cas particulier de l'espèce *Scopalina hapalia* (Hooper et al., 1997)

Initialement décrite sous le nom *Hymeniacidon hapalia* par Hooper *et al.* en 1997, l'espèce *Scopalina hapalia* a été reportée pour la première fois dans les eaux australiennes, où sa présence est très courante, ainsi qu'en Papouasie Nouvelle-Guinée [Alvarez et Hooper, 2011]. Elle a par la suite été collectée à Singapour [Lim *et al.*, 2012] et à Zanzibar [Helber *et al.*, 2017].

L'espèce *S. hapalia*, décrite par Alvarez et Hooper en 2011, est, à l'instar des autres espèces du genre, une éponge encroûtante d'épaisseur variable (5-10 mm), de couleur orange, recouvrant de grandes surfaces de substrat jusqu'à 40 cm de diamètre et formant parfois des pointes saillantes à sa surface (**Figure 16** A) [Alvarez et Hooper, 2011]. Les oscules* présentent des bords transparents et membraneux et sont compris entre les conules*. D'après Alvarez et Hooper, elle partage également avec les autres espèces du genre, la consistance molle, la présence de fibres de spongines s'élevant d'une plaque basale ainsi que de conules à sa surface, et l'aspect granuleux de son choanosome qui serait probablement dû à la présence de cellules granulaires pigmentées. Ces caractéristiques sont également partagées par *Stylissa flabelliformis* et le genre *Svenzea*. D'une texture charnue et gluante, elle tend à se désagréger et à libérer un mucus lors de sa collecte. Plus spécifiquement, son squelette est constitué d'une plaque basale en spongine, avec des fibres de spongines mal définies et dans lesquelles viennent s'implanter des styles (**Figure 16** B) uniques, paucispiculaires ou multispiculaires.

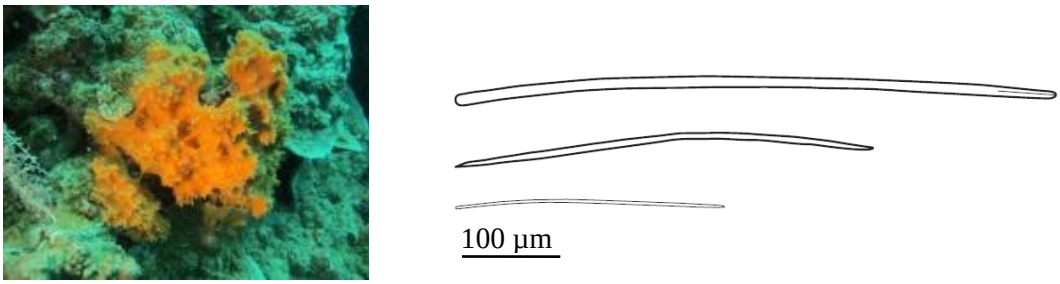


Figure 16 : Photographies associées aux éponges du genre *Scopalina*.

A : photographie *in situ* de *Scopalina hapalia* (ML-263) (crédit LCSNSA).
B : Schéma de spicules de *Scopalina hapalia* de type styles (crédit Alvarez et Hooper, 2011).

III.1.4 Etudes chimiques antérieures relatives au genre *Scopalina* (Schmidt, 1862)

III.1.4.1 Ecologie chimique

Des travaux sur l'écologie des éponges nous apportent quelques éléments d'informations sur les interactions du genre *Scopalina* avec son environnement.

- ❖ Une première étude portant sur les interactions interspécifiques de 43 éponges du récif corallien de Key Largo en Floride [Engel et Pawlik, 2005] montre que ***S. ruetzleri*** est :
  - ✓ Une espèce relativement abondante dans ce milieu ;
  - ✓ Un épibionte lorsqu'elle est en interaction directe avec d'autres éponges. Aucun recouvrement de celle-ci par les autres espèces d'éponges n'a été observé.

Les auteurs concluent que cette capacité à proliférer sur les autres espèces serait davantage due à la morphologie de l'éponge qu'à la production de substances allélochimiques*. Cette conclusion reste quelque peu discutable.

- ❖ Une seconde étude s'intéressant, cette fois-ci, aussi bien à l'écologie chimique qu'aux activités antimicrobienne et cytotoxique des éponges du récif corallien de Zanzibar [Helber *et al.*, 2018] a montré que l'espèce ***S. hapalia*** est :
  - ✓ L'une des espèces les plus abondantes dans ce milieu ;
  - ✓ Une espèce bioactive. Son extrait brut éthanolique (EtOH) présente une double activité :
    - une activité antimicrobienne modérée en inhibant 26 % (9/35) des souches marines testées (bactéries pathogènes « marines » ou non). L'activité antimicrobienne (faible, modérée ou forte) observée étant variable en fonction de la souche testée.
    - une activité cytotoxique à une concentration de 1 mg/mL. Son extrait brut entraîne 95 % de mortalité chez des nauplii, larves de crustacés.

Les observations issues de ces deux études laissent penser que le genre *Scopalina*, bien que ne présentant pas de moyens mécanique (présence de longs spicules à la surface) et physique (consistance dure par exemple) pour se défendre, prolifère aisément dans un environnement aussi compétitif que les récifs coralliens. Aussi, sa forme de croissance encroûtante ainsi que sa texture charnue ne peuvent expliquer à elles seules ses atouts en matière de compétition. Un autre mécanisme de défense connu des éponges est la production de substances chimiques pour se prémunir de différents prédateurs (poissons, tortues, crustacés et autres), compétiteurs et autres pathogènes [Pawlik *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 2005; Pawlik, 2011]. Ainsi, il est fort probable que, les éponges du genre *Scopalina* produisent également des substances toxiques ou du moins répulsives pour se protéger et prospérer dans ce milieu. Les activités biologiques observées pourraient donc être la résultante de la production de ces substances allélochimiques* qui leur confèreraient un avantage dans la colonisation de ce type de milieu.

III.1.4.2 Métabolites spécialisés isolés du genre *Scopalina*

A l'exception du genre *Stylissa*, les éponges de la famille des Scopalinidés ont fait l'objet de très peu d'études chimiques. En effet, une recherche bibliographique dans la base de données des produits naturels marins, MarinLit, nous indique :

- 8 composés référencés dans 5 articles publiés pour le genre *Scopalina*,
- 7 composés dans 7 articles référencés pour le genre *Svenzea*,
- 74 composés pour 69 articles publiés en ce qui concerne le genre *Stylissa*.

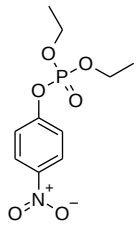
A la lumière des données de la littérature, il apparaît que la place du genre *Stylissa* dans la famille des Scopalinidés soit incertaine. Par conséquent, il serait hasardeux de présenter une synthèse des travaux chimiques antérieurs relatifs à cette famille et de vouloir en tirer des conclusions pour l'ensemble des genres qui la constitue. Aussi, pour éviter d'éventuels biais dans l'étude de la composition chimique du spécimen *S. hapalia*, notre attention sera focalisée uniquement sur les quelques données existantes sur le genre *Scopalina*. L'ensemble des espèces constituant le genre a donc été passé au crible en effectuant, pour chaque espèce acceptée, des recherches avec les mots-clés correspondants aux : nom d'origine (1ère description), synonymes ainsi qu'au nom scientifique en usage.

Les 8 composés référencés dans MarinLit ont été isolés d'un actinomycète associé à un spécimen de *Scopalina ruetzleri* et non de l'éponge directement. Une recherche bibliographique plus élargie a permis d'identifier 6 métabolites qui ont été isolés directement du genre *Scopalina* (**Tableau XXIII**). Il s'agit plus précisément de l'espèce *Scopalina ruetzleri* anciennement, *Ulosa ruetzleri*, collectée dans les Bermudes. Les premiers travaux sur la chimie de *Scopalina ruetzleri* datent de 1983 et ont été entrepris par l'équipe de Cardellina. Ces travaux ont permis l'isolement d'un éther de glycérol inhabituel, le (17*Z*)-tétracosényl 1-glycérol éther (**S1**), en composé majoritaire ainsi que d'un alkylglycérol, le batilol (**S2**), en composé minoritaire [Cardellina *et al.*, 1983]. En 1986, la même équipe a publié l'isolement d'un dérivé indolique, le 4-hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxopentanone (**S3**), à

partir de l'extrait polaire de *Scopalina ruetzleri* qui avait montré une activité régulatrice de la croissance des plantes [Cardellina *et al.*, 1986]. Sept ans plus tard, ils ont isolé un dérivé phosphorylé de l'hydantoïne, l'ulosantoïne (**S4**), ainsi qu'un second composé structurellement apparenté, le diméthyl *N*2-créatininylphosphate (**S5**), à partir de l'extrait apolaire de *Scopalina ruetzleri* [VanWagenen *et al.*, 1993]. L'ulosantoïne s'est avéré être un puissant insecticide, équivalent au paraoxone (**30**) qui est un organophosphoré inhibiteur de l'acétylcholinestérase. A ce jour, il est considéré comme étant l'insecticide le plus puissant issu du monde marin [El Sayed *et al.*, 1997]. Au cours de l'étude réalisée en 1983, un dérivé du 4-hydroxybenzaldéhyde a également été isolé (**S6)** [Cardellina *et al.*, 1983]. Toutefois les auteurs soupçonnent ce composé d'être un artefact issu d'une réaction entre le 4-hydroxybenzaldéhyde, un produit naturel courant, et l'acétone (solvant d'extraction). Ainsi, à l'heure actuelle et à notre connaissance, seuls 6 composés sont connus du genre *Scopalina*. Ces quelques résultats ne permettent cependant pas de dresser un profil chimique du genre en terme de grandes classes chimiques produites.

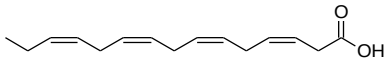
Tableau XXIII : Composés isolés de l'espèce *Scopalina ruetzleri* (anciennement *Ulosa ruetzleri*).

Composé	Nom	Structure	Activité biologique	Référence
S1	(17*Z*)-Tétracosényl 1-glycérol éther		Pas d'évaluation de l'activité.	Cardellina *et al.*, 1983
S2	Batilol		Pas d'évaluation de l'activité.	Cardellina *et al.*, 1983
S3	4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxopentanone		Régulateur de la croissance des plantes.	Cardellina *et al.*, 1986
S4	Ulosantoïne		Insecticide (inhibiteur acétylcholinestérase).	VanWagenen *et al.*, 1993
S5	Diméthyl *N*2-créatininylphosphate		Pas d'activité insecticide.	VanWagenen *et al.*, 1993
S6	Dérivé du 4-hydroxybenzaldéhyde		Pas d'évaluation de l'activité.	Cardellina *et al.*, 1983

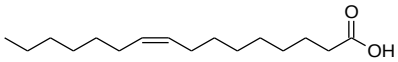


paraoxone (**30**)

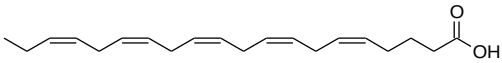
Plus récemment, des études de criblage évaluant les activités biologiques des extraits bruts de *Scopalina ruetzleri* ont été publiées sans aller jusqu'à l'isolement des métabolites spécialisés actifs. Dans cette lignée, Prado *et al.* ont démontré l'activité antiproliférative de l'extrait méthanolique de *Scopalina ruetzleri* sur les cellules tumorales mammaires T47D [Prado *et al.*, 2004]. A une concentration de 30 µg/mL, l'extrait méthanolique non seulement inhibe 81 % de la croissance cellulaire mais il a également été observé qu'à cette concentration, l'extrait perturbe l'organisation des microtubules et impacte la progression du cycle cellulaire. En 2007, lors du criblage de l'activité antimicrobienne d'éponges du Golfe d'Uraba dans les Caraïbes, une activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* a été révélée pour les extraits méthanolique et hexanique de *Scopalina ruetzleri* [Galeano et Martínez, 2007]. En 2014, Biegelmeyer *et al.* ont étudié les effets cytotoxiques de *Scopalina ruetzleri* sur deux lignées tumorales humaines différentes (gliome (U87) et neuroblastome (SH-SY5Y)) ainsi que son activité antioxydante [Biegelmeyer *et al.*, 2015]. Leurs résultats démontrent une activité cytotoxique significative de la fraction acétate d'éthyle (AcOEt) sur les lignées U87 (CI_{50} = 18,35 µg/mL) et SH-SY5Y (CI_{50} = 10,51 µg/mL) ainsi qu'une capacité antioxydante très intéressante (TEAC = 21,17 µM Trolox/g d'éponge). Ils se sont par la suite penchés sur la composition chimique de la fraction AcOEt. Le dosage des acides gras totaux, par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras, a montré que la fraction AcOEt était très riche en acides gras (32 identifiés) répartis comme suit : acides gras polyinsaturés (52,89 %), acides gras saturés (29,77 %) et acides gras monoinsaturés (17,32 %). Les composés majoritaires détectés étant : l'acide (3*Z*,6*Z*,9*Z*,12*Z*)-pentadéca-3,6,9,12-tétraénoïque (19,15 %) (**S7**), l'acide eicosapentaénoïque (EPA : 17,25 %) (**S8**) et l'acide arachidonique (AA : 10,90 %) (**S9**). L'acide palmitoléique (8,85 %) (**S10**) et l'acide palmitique (8,1 %) (**S11**) sont les principaux acides gras monoinsaturés et saturés identifiés. Les auteurs concluent que l'EPA ainsi que l'AA, ayant été identifiés comme bénéfiques dans le traitement du cancer, pourraient expliquer l'activité cytotoxique observée.



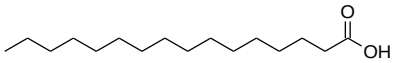
acide (3*Z*,6*Z*,9*Z*,12*Z*)-pentadéca-3,6,9,12-tétraénoïque (**S7**)



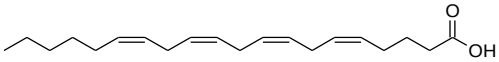
acide palmitoléique (**S10**)



acide eicosapentaénoïque (**S8**)



acide palmitique (**S11**)



acide arachidonique (**S9**)

III.2 Etude chimique de *Scopalina hapalia* de Mayotte

III.2.1 Etude comparative des profils chimiques de 3 spécimens de *Scopalina hapalia*

Bien que dans le cadre de TASCMAR, seul le spécimen ML-263 ait été testé pour ses activités biologiques, l'étude de la composition chimique de *Scopalina hapalia* a, quant à elle, été menée sur 3 spécimens collectés dans le récif corallien de Mayotte en 2013 à des profondeurs différentes (**Tableau XXIV**).

Tableau XXIV : Présentation des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* collectés à Mayotte (2013).

Spécimen	Photos *in situ*	Numéro de référence		Site de collecte (Profondeur)	Points GPS
		Collecte	TASCMAR		
1		MAY13 165	ML-263	Pointe Kani 2 - 10 m	12°57.624' S 45°04.697' E
2		MAY13 037	-	Ranikiki 10 - 15 m	12°56.470' S 45°04.305' E
3		MAY13 108	-	Rocchi 24 m	12°59.536' S 45°03.183' E

La différence de couleur en fonction de la profondeur d'une part et l'absence d'études chimiques portant sur l'espèce *S. hapalia* d'autre part, nous ont incité à mener un travail comparatif sur les 3 spécimens. L'objectif de cette approche est double : (1) nous permettre d'avoir accès au maximum d'informations sur la composition chimique de cette éponge, (2) voir s'il y a une influence de la profondeur sur sa composition chimique. L'étude comparative a été réalisée selon deux approches :

- Comparaison des profils chromatographiques par CLUHP-QqToF-SM des extraits bruts.
- Déréplication des extraits bruts à partir des analyses CLUHP-SM^2.

III.2.1.1 Analyse comparative des profils chromatographiques

Les extraits bruts dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v) des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* ont donc été analysés par CLUHP-QqToF-SM sur une colonne en phase inverse (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, Agilent) éluée avec un gradient de solvants eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. L'acquisition des données a été effectuée aussi bien en mode positif que négatif. Les profils chromatographiques acquis en mode positif sont présentés à la **Figure 17**. La comparaison des profils montre que les 3 spécimens de *Scopalina hapalia* ont des profils chimiques quelque peu différents. Le spécimen 1 présente le profil le moins riche avec notamment l'absence de composés élués entre 1 et 2 minutes. Le spécimen 3 présente le profil le plus riche avec notamment la présence de composés élués entre 4 et 10 minutes contrairement aux deux autres spécimens.

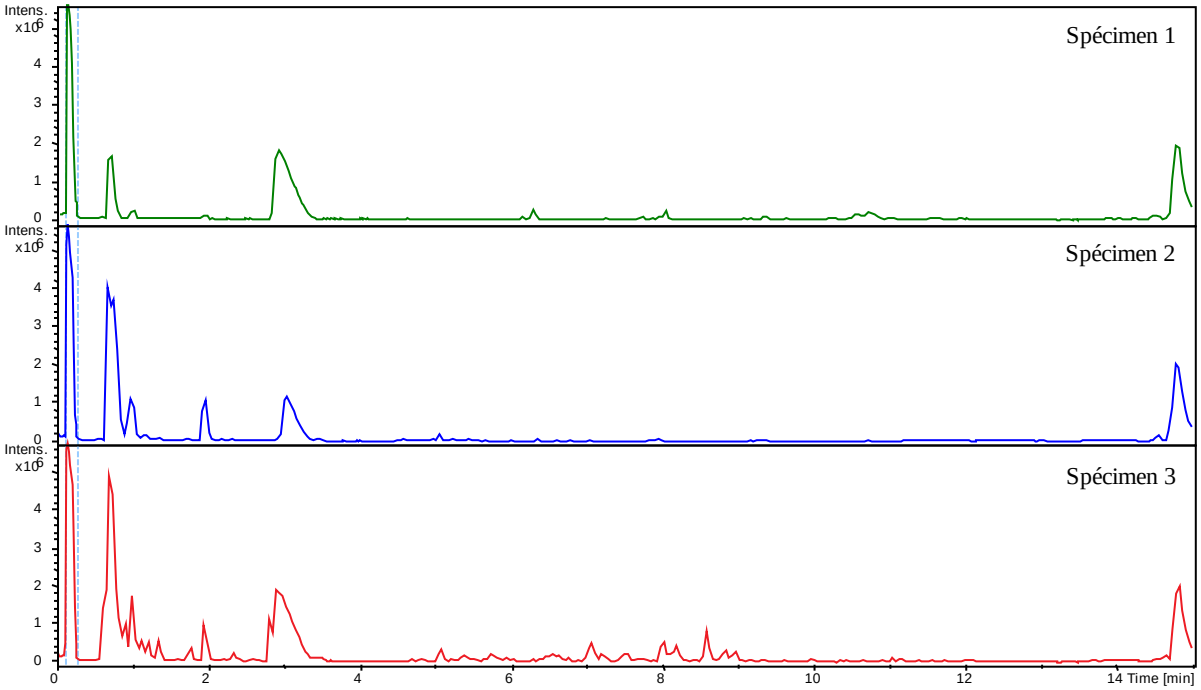


Figure 17 : Profil chromatographique des extraits bruts des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* obtenus par CLUHP-QqToF-SM en mode positif.

III.2.1.2 Déréplication des extraits bruts

❖ **Méthode**

Pour identifier rapidement les composés connus présents dans les extraits ainsi que les molécules spécifiques à chaque extrait, une déréplication des 3 extraits bruts a été effectuée en combinant plusieurs approches. Ainsi, l'acquisition des profils chimiques des 3 extraits bruts de *Scopalina hapalia* par CLUHP-SM^2 en mode positif a permis la création d'un réseau moléculaire à l'aide de la plateforme Global Natural Products Social Molecular Networking

[Wang *et al.*, 2016]. Cette approche par les réseaux moléculaires offre un point de départ à la déréplication en comparant et organisant les spectres SM^2 expérimentaux entre eux, dans un premier temps. Les spectres SM^2 expérimentaux considérés comme identiques sont assemblés pour créer des spectres consensus, puis ces derniers sont comparés avec ceux des bases de données spectrales de GNPS. Le réseau moléculaire généré sous GNPS a ensuite été importé sous le logiciel Cytoscape v3.7.1. Une représentation graphique en camembert des différents nœuds a été effectuée sous Cytoscape v.3.7.1. Cette présentation permet de visualiser la distribution relative de chaque ion (métabolite) dans les différents extraits de *Scopalina hapalia* collecté à des profondeurs différentes. Le réseau moléculaire obtenu permet donc de visualiser (**Figure 18**) :

- L'organisation des spectres de fragmentation acquis en SM^2 des ions parents (ou précurseurs) qui sont représentés par les nœuds. Ces derniers sont « étiquetés » avec les masses *m/z* des ions précurseurs $[M+H]^+$. Les nœuds pour lesquels une correspondance, spectrale mais aussi de masse pour l'ion précurseur, a été obtenue avec GNPS ont été mis en relief par des carrés noirs.
- La similarité spectrale (évaluée par un indice « cosine score ») entre 2 ions parents, représentée par les traits reliant les nœuds entre eux. L'épaisseur de ces traits est proportionnelle à la valeur du « cosine score » comprise entre 0,7 et 1.
- Le regroupement des métabolites dont les spectres de masses sont similaires.

Une similarité spectrale apparaît, à partir du moment où, au moins 6 ions-fragments communs sont détectés. Typiquement, les spectres présentant un cosine score supérieur à 0,7 sont considérés comme étant fortement similaires et ceux avec un cosine score de 1 indiquent que les structures sont totalement identiques. Par conséquent, les nœuds (métabolites) dont les spectres de masse sont similaires vont être regroupés au sein de clusters. En effet, dans la mesure où un spectre de fragmentation (SM^2) reflète la structure chimique d'un métabolite, il est probable que des métabolites présentant de fortes similarités spectrales soient de structures chimiques proches. Ces spectres, une fois organisés, sont comparés à ceux disponibles dans les différentes bases de données spectrales associées à GNPS (telles que Casmi[1], HMDB[2], MassBank[3], NIST[4], Respect[5] ainsi que la base de données communautaire GNPS).Toutefois, les bases de données GNPS étant limitées à environ 70 000 composés, une recherche a également été effectuée avec la base de données spectrales UNPD (Universal Natural Products Database) - ISDB (*In silico* Database – molecular networking). Cette dernière regroupe les spectres SM^2 *in silico* d'environ 200 000 produits naturels [Allard *et al.*, 2016].

[1] Banque de spectres SM/SM issue des challenges CASMI 2014 et 2016 pour l'identification de petites molécules.
[2] Banque de spectres SM/SM issue de la base de données du métabolome humain (Human Metabolome DataBase).
[3] Base de données de spectres de masse haute résolution.
[4] Banque de spectres de masse développée par la National Institute of Standards and Technology.
[5] Banque de spectres de masse SM/SM de molécules de plantes, acquis avec une source electrospray mode positif.

Enfin, une recherche avec la formule brute ainsi que la masse exacte des ions précurseurs a été effectuée dans les bases de données DNP[6], MarinLit[7] et METLIN[8].

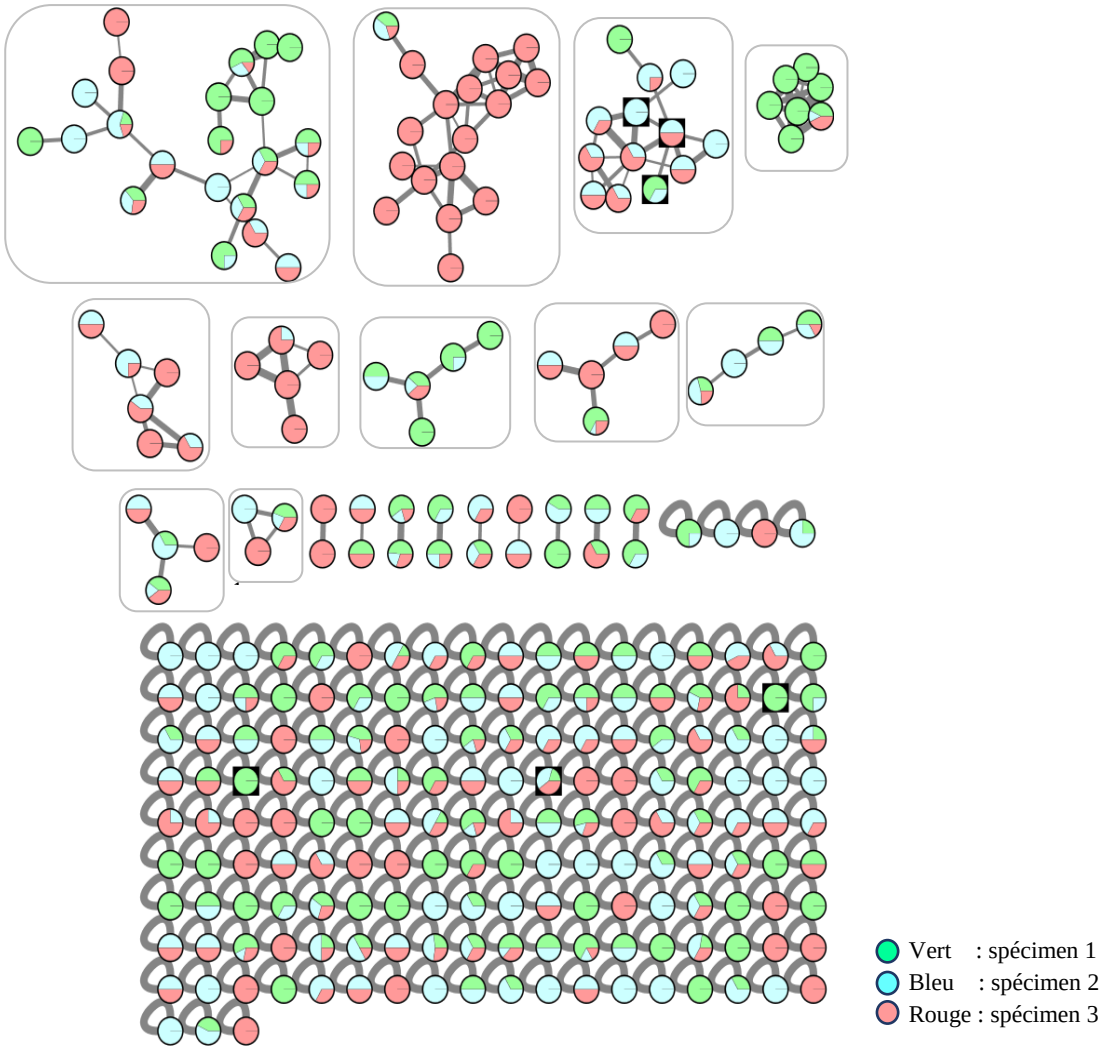


Figure 18 : Réseau moléculaire généré sur la plateforme GNPS, à partir de l'analyse par CLUHP-SM/SM des extraits bruts de 3 spécimens de *Scopalina hapalia*.

❖ Résultats

Le réseau moléculaire généré à partir des extraits bruts des spécimens 1 (en vert), 2 (en bleu) et 3 (en rouge) est composé de 284 nœuds (**Figure 18**). L'analyse visuelle du réseau moléculaire montre que celui-ci comprend 11 clusters (nœuds ≥ 3) avec 2 clusters qui semblent être spécifiques respectivement au spécimen 3 (cluster 2) et au spécimen 1 (cluster 4). La déréplication a été effectuée avec différents niveaux d'annotation, détaillée ci-après :

[6] Dictionary of Natural Products : base de données pour les produits naturels issus de plantes, microorganismes et animaux.
[7] Base de données de produits naturels d'origine marine.
[8] Base de données de spectre de masse SM/SM de métabolites divers (lipides, acides aminés, peptides, produits naturels, etc) et autres composés chimiques.

- Le premier niveau a été basé non seulement sur la similarité structurale mais aussi l'équivalence des masses des ions précurseurs entre les métabolites présents dans les extraits de *Scopalina hapalia* et ceux référencés dans GNPS. Par ce moyen, seul 6 nœuds ont pu être annotés.
- Le second niveau a été réalisé avec GNPS et UNPD-ISDB par la recherche d'analogues structuraux présentant des similarités spectrales.
- Le troisième niveau a été basé sur la détermination des formules brutes des ions détectés dans les extraits bruts puis l'exploration des bases de données MarinLit et DNP pour confronter ces formules brutes avec les propositions d'analogues structuraux obtenus. Les formules brutes ont été proposées par le logiciel DataAnalysis (Bruker) en se basant sur les masses exactes des molécules ionisées.

✓ **Annotation du cluster 1**

La recherche d'analogues structuraux pour le **cluster 1** a mis en lumière la présence possible de différents composés lipidiques. Par ailleurs, l'exploitation des spectres SM^2 montre une fragmentation qui est caractéristique d'une chaîne aliphatique par la perte d'une ou plusieurs unités méthylènes. Une recherche effectuée dans MarinLit et DNP a présenté une correspondance avec certains dérivés lipidiques, azotés pour la plupart, isolés du milieu marin (**Tableau XXV** et **Figure 19**).

Tableau XXV : Annotation des nœuds du cluster 1.

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Sources d'isolement	
				d'origine marine	***d'origine terrestre***
S12	370,366	$C_{23}H_{48}NO_2$	Pénazétidine	*Penares sollasi*. (éponge)[1]	-
S13	366,371	$C_{24}H_{48}NO$	15-Tétracosénamide	*Pseudaxinella* sp. (éponge)[2]	*Tropaeolum speciosum* (plante à fleur)[2]
S14	254,246	$C_{16}H_{32}NO$	Crucigastérine D	*Pseudodistoma crucigaster* (ascidie)[1]	-
S15	269,246	$C_{16}H_{29}O_3$	Acide 2-Hydroxy-5,9-hexadécadiénoïque	*Erylus goffrilleri* (éponge)[2]	-
S16	300,288	$C_{18}H_{38}NO_2$	Jaspine B	*Jaspis* sp. (éponge)[1]	-
S17	364,249	$C_{21}H_{34}NO_4$	Anthocidine A/B	*Streptomyces* sp. (actinomycète)[1]	-
S18	362,234	$C_{21}H_{32}NO_4$	Antibiotique CJ 17572		*Pezicula* sp. (champignon)[2]
S19	362,267	$C_{22}H_{36}NO_3$	Vitroprocine F	*Vibrio* sp. (bactérie)[1] *Sinularia flexibilis* (corail)[1]	-

[1] MarinLit. [2] DNP.

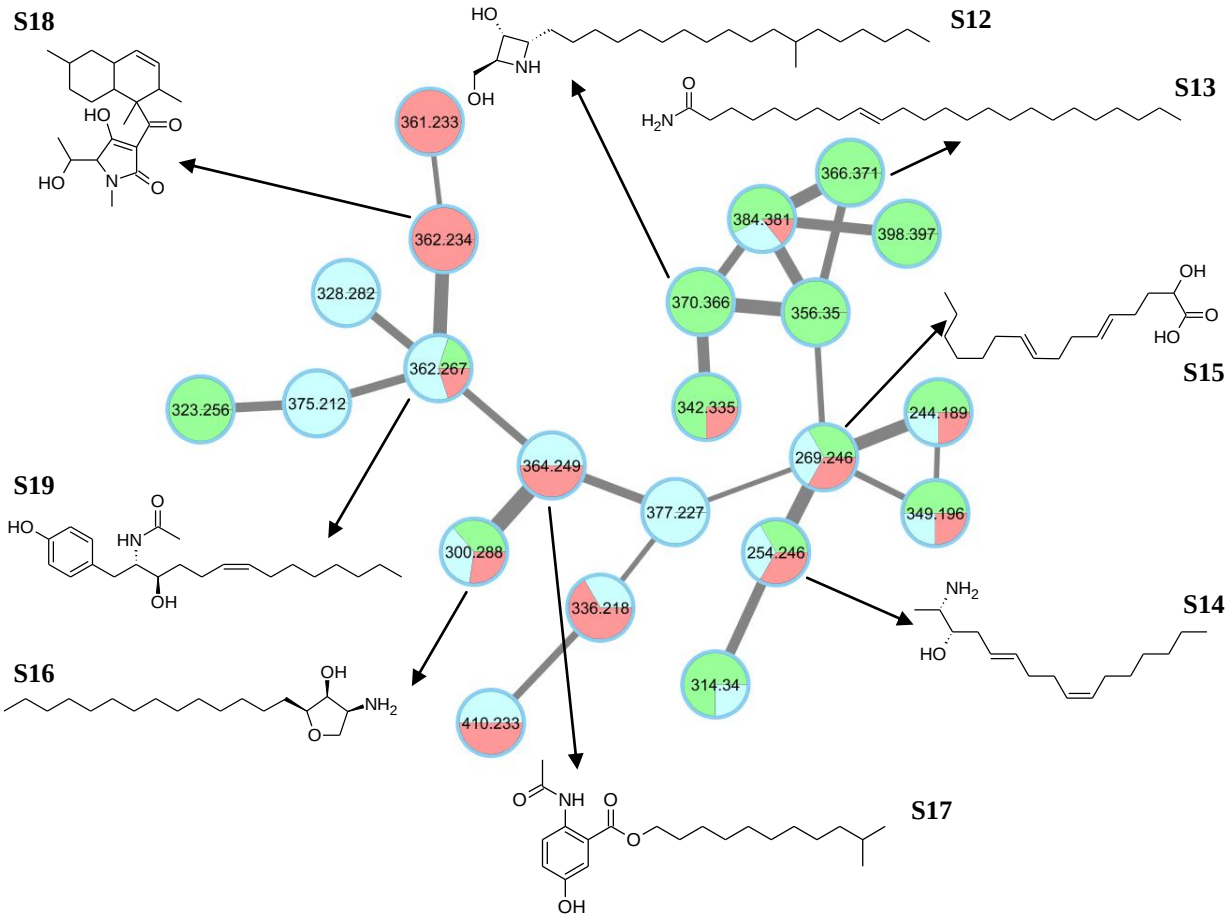


Figure 19 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 1.

✓ **Annotation du cluster 2**

La recherche d'analogues structuraux avec GNPS pour le **cluster 2** indique une correspondance des spectres SM^2 des ions à *m/z* 299,195 ; 300,263 et 315,226 avec des dipeptides référencés dans la base de données NIST14. Par ailleurs, l'examen des spectres expérimentaux SM^2 des ions du cluster montre qu'ils présentent un profil de fragmentations similaire à celui d'un peptide. La recherche dans les bases de données avec les masses exactes a permis l'identification de 6 peptides d'origine marine et/ou microbienne (**Tableau XXVI**) qui pourraient correspondre aux ions à *m/z* 315,226 ; 305,220 ; 285,179 ; 243,205 ; 229,19 et 217,153 présents dans le cluster 2 (**Figure 20**). Mise à part les ions 217,153 et 305,220 pour lesquels 4 et 6 isomères ont été proposés dans DNP respectivement, une identification unique a été retrouvée pour les autres ions. Ces résultats suggèrent que l'extrait brut du spécimen 3 serait enrichi en diamines / peptides. Il est intéressant de noter qu'à l'exception du *N*-(3-aminopropyl)-subergorgamide (**S21**) isolé d'un macroorganisme marin, le reste des composés identifiés sont des métabolites isolés de microorganismes marins endophytes ou non.

Tableau XXVI : Annotation des nœuds du cluster 2.

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Source d'isolement	
				d'origine marine	***d'origine terrestre***
S20	315,226	$C_{16}H_{31}N_2O_4$	Lipoamide B	*Bacillus pumilus* (bactérie)[1]	-
S21	305,222	$C_{18}H_{29}N_2O_2$	- *N*-(3-Aminopropyl)-subergorgamide (**S21.1**)	*Paraplexaura* sp. (gorgone)[1,2]	-
			- Lycoverticine (**S21.2**)	-	*Lycopodium verticillatum* (plante)[2]
			- Jaborandine (**S21.3**) (structure inconnue)	-	*Piper jaborandi* (plante)[2]
			- Myrifamine (**S21.4**)	-	*Myrioneuron faberi* (plante)[2]
			- Oléracone A (**S21.5**)	-	*Portulaca oleracea* (plante)[2]
			- Serratinidine (**S21.6**)	-	*Lycopodium serratum* (plante)[2]
S22	285,179	$C_{14}H_{25}N_2O_4$	Phomoénamide	-	*Phomopsis* sp. (Champignon endophyte plante)[2]
S23	243,205	$C_{13}H_{27}N_2O_2$	N_1-Acétyl-N_7-*n*-hexanoyl cadavérine	*Streptomyces* sp. (actinomycète de mangrove)[1]	-
S24	229,191	$C_{12}H_{25}N_2O_2$	Diamide	-	Synthèse[2]
S25	217,153	$C_{10}H_{21}N_2O_3$	3 isomères :		
			- KA57A(**S25.1**)	-	*Actinomadura* sp. (actinomycète)[2]
			- Eméricédine B (**S25.2**)	-	*Emericella quadrilineata* (champignon)[2]
			- Maniwamycine C (**S25.3**)	-	*Streptomyces prasinopilosus* (actinomycète)[2]
			- *N*-Acétyl-*N*-triméthylornithine (**S25.4**)	*Digenea simplex* (algues rouges)[2]	-

[1] MarinLit. [2] DNP.

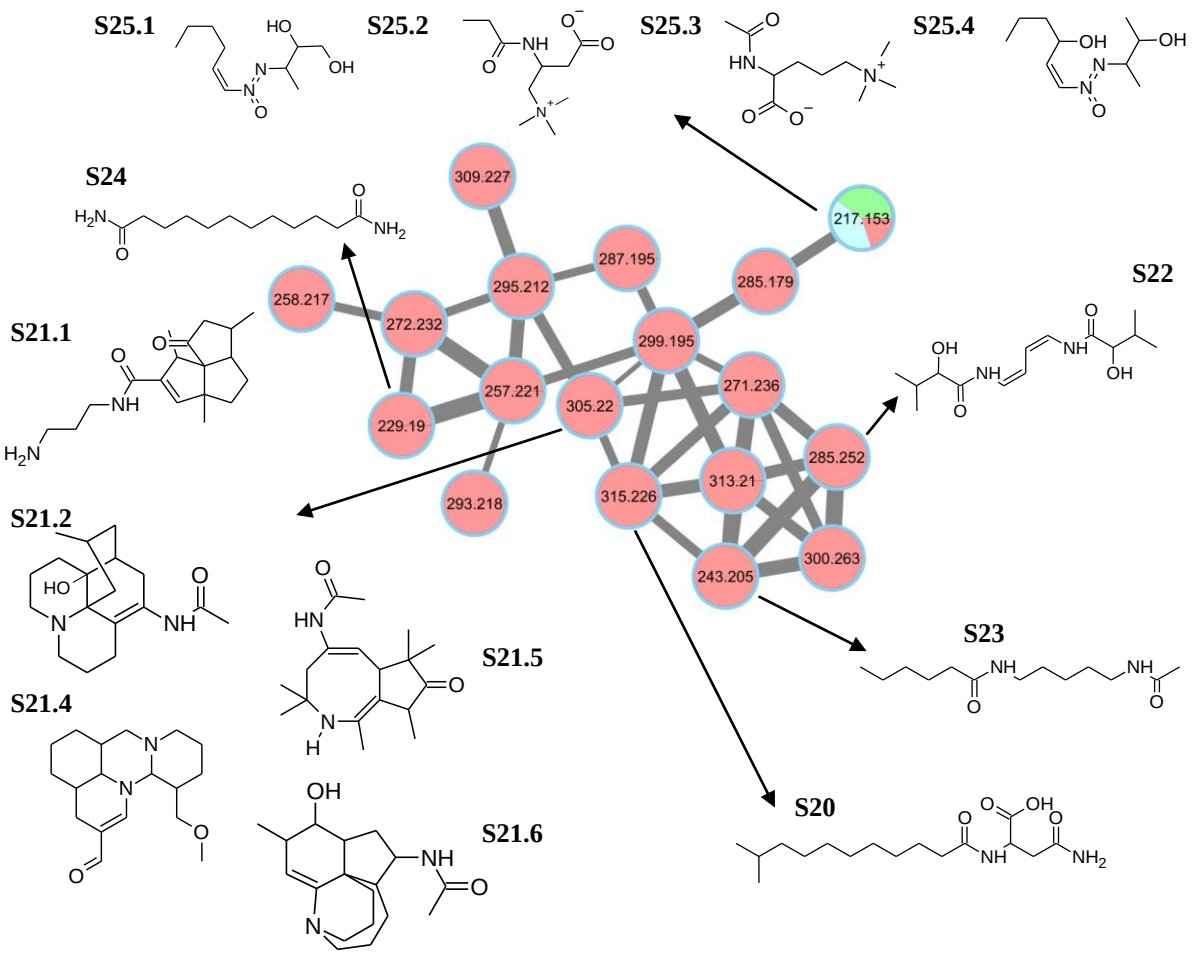


Figure 20 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 2.

✓ **Annotation du cluster 3**

La déréplication du **cluster 3** avec GNPS indique une correspondance spectrale pour les ions 219,173 ; 303,23 et 335,222 avec un dérivé de phénylpropane, un acide gras et un terpène respectivement (**Tableau XXVII** et **Figure 21**). La recherche d'analogues structuraux avec GNPS et UNPD-ISDB a permis l'annotation de nœuds supplémentaires avec des dérivés d'acides gras polyinsaturés (295,225 ; 301,214 ; 303,23 ; 370,256) ainsi que différents dérivés terpéniques (302,246 ; 304,262 ; 335,22). La détection de structures dérivées d'acides gras sous forme libre ou estérifiés (MAG) dans les extraits bruts de *Scopalina hapalia* est en accord avec les résultats publiés par Biegelmeyer *et al.* (2015) qui ont montré que la fraction active AcOEt de *Scopalina ruetzleri* était riche en acides gras mono- et polyinsaturés. Il est également intéressant de noter la détection de l'imiprothrine (**S29**), un insecticide dérivé de l'acide chrysanthémique présentant un motif hydantoïne, autrement appelé imidazolidinedione. En effet, il a été isolé de *Scopalina ruetzleri* un dérivé phosphorylé de l'hydantoïne (**S4**), l'ulosantoïne, présentant un fort potentiel insecticide.

Tableau XXVII : Annotation des nœuds du cluster 3.

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Source d'isolement	
				d'origine marine	***d'origine terrestre***
S26	219,174	$C_{15}H_{23}O$	Di-*tert*-butyl-4-hydroxyméthylphénol	Eau de mer[1] Récif corralien[1]	*Streptomyces wadayamensis* (actinomycète)[1]
S27	295,225	$C_{18}H_{31}O_3$	Monolinolénine	Eau de mer[1]	Animaux[1] Microorganismes[1] Plantes[1]
S28	301,214	$C_{20}H_{29}O_2$	Acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque	Eau de mer (communauté d'espèces complexe)[1]	Animaux[1] Plantes[1]
S29	302,246	$C_{20}H_{32}NO$	Imiprothrine (dérivé acide chrysanthémique)	-	Pyrèthre (plante)[2]
S30	303,23	$C_{20}H_{31}O_2$	Acide 5,6-époxy-8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatriénoïque	-	Animaux[1]
S31	304,262	$C_{20}H_{33}NO$	Imiprothrine (dérivé acide chrysanthémique)	-	Pyrèthre (plante)[2]
S32	335,22	$C_{20}H_{31}O_4$	14-Déoxyandrographolide	-	*Andrographis paniculata* (plante)[2] *Antrodia camphorata* (champignon)[1]
S33	360,252	$C_{22}H_{34}NO_3$	Hermitamide A	*Lyngbya majuscula* (cyanobactérie)[2]	Plantes[2]
S34	370,256	$C_{20}H_{36}NO_5$	Monolinoléine	-	*Sclerotinia fructicola* (champignon)[2] Plantes[2]

[1] GNPS. [2] DNP.

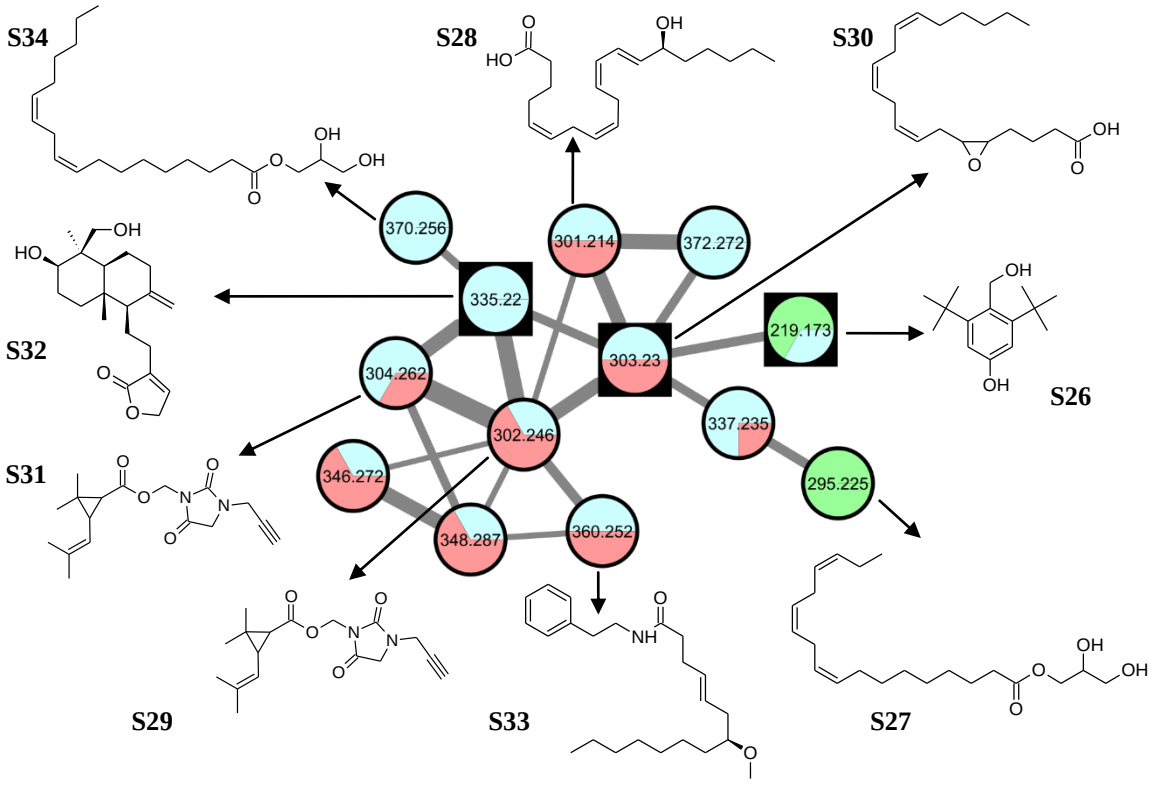


Figure 21 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 3.

✓ **Annotation du cluster 4**

La recherche dans les bases de données avec la masse exacte a conduit à l'identification de 3 bases sphingoïdes, ainsi qu'à leurs conformères respectifs, isolées d'organismes marins (**Tableau XXVIII** et **Figure 22**). La base 2-Amino-4-hexacosène-1,3-diol (**S35**) a été isolée, d'un corail mou, sous sa forme liée à un acide gras pour donner une céramide [Ahmed *et al.*, 2013].

Tableau XXVIII : Annotation des nœuds du cluster 4.

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Source d'isolement	
				d'origine marine	*d'origine terrestre*
S35	358,366	$C_{22}H_{48}NO_2$	Rollcérébroside B	*Asterias rollestoni* (étoile de mer)[1]	-
S36	372,381	$C_{23}H_{50}NO_2$	Aspériamide B	*Aspergillus niger* (champignon marin)[1]	-
S37	412,412	$C_{26}H_{54}NO_2$	2-Amino-4-hexacosène-1,3-diol	*Sinularia candidula* (corail)[1]	-

[1] DNP.

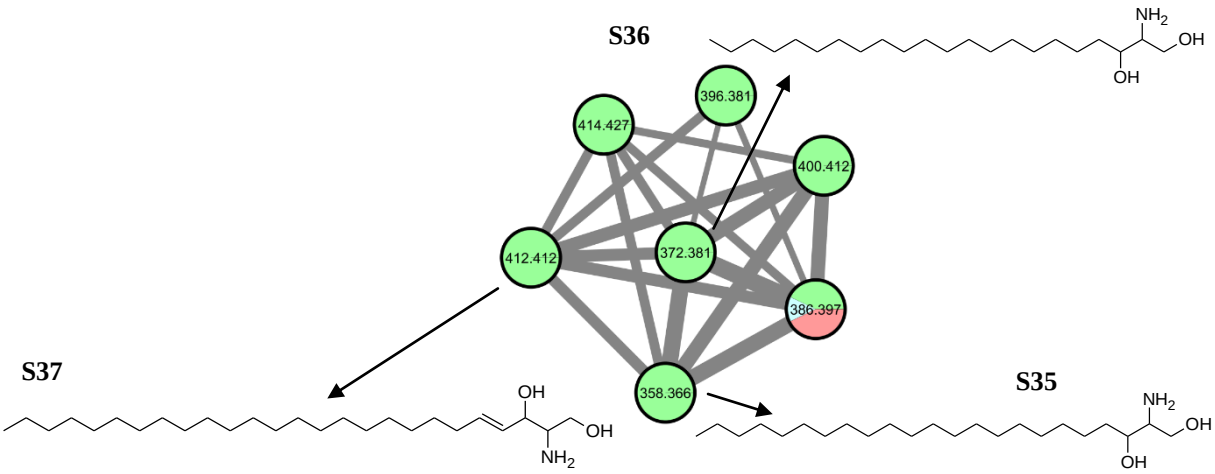


Figure 22 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 4.

✓ **Annotation du cluster 11**

La recherche d'analogues structuraux avec GNPS indique une correspondance des spectres SM^2 des ions 245,185 et 346,231 du **cluster 11** avec les peptides Val-leu (**S38.1**) et Ile-Gly-Ile (**S39**) (NIST14) (**Tableau XXIX** et **Figure 23**). La recherche dans DNP avec les formules brutes permet une correspondance de l'ion 245,185 avec un dérivé d'acide aminé, le *N*6-Hexanoyllysine (**S38.2**), isolé de riz soumis à un stress oxydant [Minato *et al.*, 2005]. Par ailleurs, un nœud unique correspondant à l'ion 261,159 a présenté une similarité spectrale avec le cyclo(L-Phe-D-Pro) (**S40**), dérivé d'acides aminés appartenant à la famille des dicétopipérazines (**Tableau XXIX** et **Figure 23**). La recherche dans DNP avec la formule brute indique une correspondance, notamment avec le cyclo(L-Phe-L-Leu) isolé d'un champignon marin, *Paecilomyces marquandii* [Cabrera *et al.*, 2006].

Tableau XXIX : Annotation des nœuds du cluster 11.

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Source d'isolement	
				d'origine marine	*d'origine terrestre*
S38	245,185	$C_{12}H_{25}N_2O_3$	- Val-leu (**S38.1**) - *N*6-Hexanoyllysine (**S38.2**)	Exhalant d'éponge[1]	Aliments[1] Animaux[1] Lichens[1] Microorganismes[1]
S39	346,231	$C_{16}H_{32}N_3O_5$	Ile-Gly-Ile	Corail[1]	Aliments[1] Animaux[1] Microorganismes[1]
S40	261,16	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	cyclo(L-Phe-D-Pro)	*Salinispora* sp. (actinomycètes) [1]	Actinomycètes[1] Champignons[1]

[1] GNPS

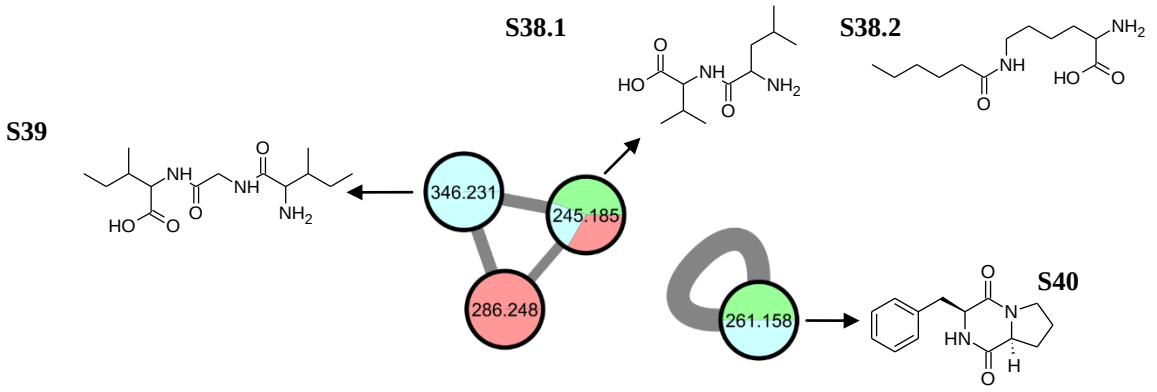


Figure 23 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 11.

✓ **Annotation de nœuds « non-clusterisés »**

L'exploration des nœuds uniques présents au sein du réseau moléculaire indique la présence de la palmitoylcarnitine ainsi que de dérivés phospholipidiques : les lysophospholipides (**Tableau XXX**). Le terme lysophospholipide (LPL) se réfère à un phospholipide ayant perdu un de ces deux résidus d'acides gras sous l'action d'une enzyme. Ces derniers ne forment pas de clusters spécifiques en raison probablement des paramètres imposés lors de la création du réseau moléculaire (minimum de 6 ions fragments en commun) (**Figure 24**). Les phospholipides étant des éléments constitutifs des membranes biologiques, ils peuvent être isolés de différentes sources biologiques. L'ion à *m/z* 400,342 $[M+H]^+$ a été annoté comme étant la palmitoylcarnitine grâce à GNPS et à une recherche dans DNP avec la masse exacte (399,33486) (**S41**). Cette dernière est impliquée dans le catabolisme des acides gras (β-oxydation) en facilitant leur transport dans les mitochondries favorisant ainsi la production énergétique.

Tableau XXX : Annotation de nœuds « non-clusterisés ».

N°	*m/z* $[M+H]^+$	Formule brute	Analogue structurel	Source d'isolement	
				d'origine marine	*d'origine terrestre*
S41	400,342	$C_{23}H_{46}NO_4$	Palmitoylcarnitine		Synthèse[2]
S42	454,29	$C_{21}H_{45}NO_7P$	1-Palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine Lyso-PE (16:0)	Environnement[1] *Theonella swinhoei* / *Entotheonella* sp. (éponge / bactérie symbionte)[1]	Aliments[1] Animaux[1] Environnement[1] Microorganisme[1] Plante[1]
S43	476,392	-	1-Hexadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine Lyso-PAF C16	Environnement[1] Corail[1]	Animaux[1] Environnement[1]
S44	498,316	$C_{23}H_{49}NO_8P$	1-(9*Z*-Octadécénoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine LysoPC (18 :1(9Z))	Environnement[1] Cyanobactéries[1] *Porites* sp. (corail)[1]	Aliments[1] Animaux[1] Environnement[1] Lichens[1] Microorganisme[1] Plante[1]
S45	510,375	-	1-heptadécanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine LysoPC (17:0)	Algues[1] Corail[1] Environnement[1]	Aliments[1] Animaux[1] Environnement[1] Microorganisme[1]

[1] GNPS. [2] DNP.

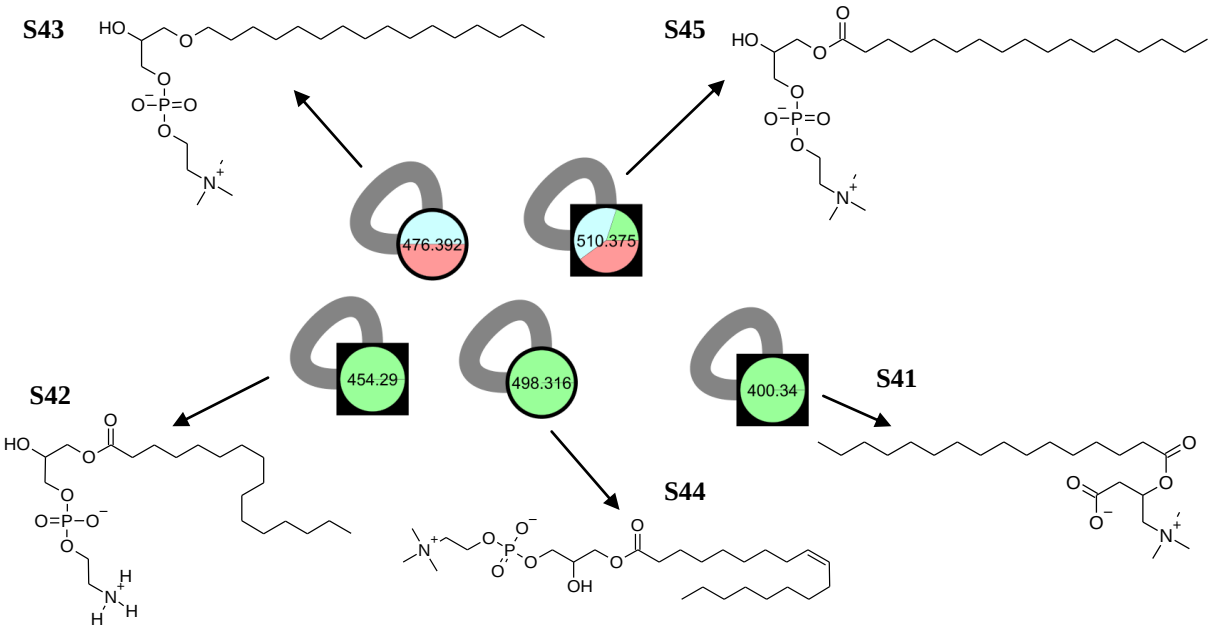


Figure 24 : Proposition d'analogues structuraux pour les nœuds « non-clusterisés ».

III.2.1.3 Discussion

La comparaison des profils chromatographiques des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* indique une différence qualitative relative dans leurs compositions chimiques (**Figure 17** p. 99). Par ailleurs, la déréplication des extraits bruts par l'approche des réseaux moléculaires apporte plusieurs informations. Tout d'abord, l'analyse visuelle du réseau généré révèle des

clusters (sous-ensembles de SM/SM) qui semblent être spécifiques du spécimen 1 collecté entre 2-10 m de profondeur, d'une part, et du spécimen 3 collecté à 24 m de profondeur, d'autre part. L'annotation de ces clusters grâce aux différentes bases de données spectrales met en lumière des composés appartenant aux classes chimiques des sphingolipides (spécimen 1) et des diamines / peptides (spécimen 3).

De façon plus globale, la déréplication des extraits bruts fournit des informations intéressantes concernant leur composition chimique. En effet, l'annotation de 36 nœuds sur les 286 constituant le réseau moléculaire révèle la présence de plusieurs composés connus, issus principalement du métabolisme primaire. Ces composés se répartissent en deux grandes familles chimiques : les dérivés lipidiques d'une part et les dérivés d'acides aminés d'autre part. Bien que minoritaires, quelques composés issus du métabolisme secondaire ont également été détectés. Cette déréplication laisse donc supposer la présence de composés appartenant à différentes familles chimiques : alcaloïdes, terpènes, phénols, peptides/dicétopipérazines et lipides.

- **Les alcaloïdes**

La présence d'alcaloïdes dans les extraits bruts de *Scopalina hapalia* est en accord avec la littérature. Des composés de type alcaloïdes (4-hydroxy-5-(indole-3-yl)-5-oxopentanone (**S3**) et ulosantoïne (**S4**)) ont en effet été isolés de *Scopalina ruetzleri* (anciennement *Ulosa ruetzleri*) (**Tableau XXIII** p. 96).

- **Les terpènes**

La présence de terpènes est soutenue par la formation d'un sous-cluster au sein du cluster 3 constitué par le 14-déoxyandrographolide (**S32**) et l'imiprothrine (**S29**) qui sont respectivement des dérivés de diterpènes et monoterpènes (**Tableau XXIII** p. 96).

- **Les dérivés phénoliques**

La présence du dérivé phénolique, le di-*tert*-butyl-4-hydroxyméthylphénol (**S26**) dans le cluster 3 (**Tableau XXIII** p. 96) est en accord avec les résultats publiés par Cardellina et ses collaborateurs en 1983. Les chercheurs ont en effet reporté l'isolement d'un dérivé du 4-hydroxybenzaldéhyde (**S6**) au cours de l'étude chimique de *Scopalina ruetzleri* (anciennement *Ulosa ruetzleri*) (**Tableau XXIII** p. 96).

- **Les peptides/dicétopipérazines**

Bien que les peptides/dicétopipérazines ne forment pas un cluster monobloc au sein du réseau moléculaire généré, plusieurs peptides et dérivés de peptides ont été retrouvés au cours de la déréplication (clusters 2 et 11).

❖ **Les lipides**

Concernant les lipides, il apparaît que ces derniers appartiennent à différentes classes chimiques : les acides gras (AG), les acyl- et alkylglycérols (AKG), les lysophospholipides (LysoPL) (dérivés de phospholipides (PL)) ainsi que les sphingolipides[9]. La présence des AKG dans les extraits bruts de *S. hapalia* est en accord avec la littérature. En effet, deux composés appartenant à la classe des AKG, le (17*Z*)-tétracosényl 1-glycérol éther (**S1**) et le batilol (**S2**), ont été isolés de *Scopalina ruetzleri* (anciennement *Ulosa ruetzleri*) (**Tableau XXIII** p. 96). Par ailleurs, les lipides sont des métabolites ubiquitaires dans la nature. Ainsi, des LysoPL tels que les analogues du Lyso-PAF (**S43**) (PAF : facteur d'activation plaquettaire) ou encore les sphingosines ont déjà été isolés d'invertébrés marins, notamment d'éponges [Ivanisevic *et al.*, 2011; Meyer et Guyot, 2002; Garg et Agrawal, 1995; Sugiura *et al.*, 1992].

Les lipides, contrairement aux alcaloïdes et autres composants du métabolisme secondaire des éponges, sont peu explorés pour leur potentiel thérapeutique. En effet, les lipides sont d'avantage connus pour leurs fonctions physiologiques (structuration des membranes biologiques, reconnaissance cellulaire, transduction du signal, stockage énergétique, etc). Par conséquent, ils sont rarement la cible directe des investigations chimiques pour la recherche de nouveaux métabolites bioactifs. Cependant, en raison de leur potentiel biomédical, les lipides d'éponges reçoivent aujourd'hui de plus en plus d'attention.

III.2.2 Isolement et élucidation structurale des métabolites de *Scopalina hapalia*

L'étude chimique du spécimen 1 de l'éponge *Scopalina hapalia* (ML-263) a conduit à l'isolement et l'identification de 14 composés répartis en 5 classes chimiques différentes :

- ✓ Phospholipides : **SH1 - SH4**
- ✓ Monoacylglycérols et alkylglycérols : **SH5 - SH8**
- ✓ Epidioxystérols : **SH9 - SH10**
- ✓ Buténolides (ou lactones) : **SH11 - SH12**
- ✓ Dicétopipérazines : **SH13 - SH14**

III.2.2.1 Isolement des métabolites

❖ **Les métabolites SH1 à SH9 et SH12**

L'isolement des métabolites **SH1** à **SH9** ainsi que **SH12** décrit ci-après, est illustré dans la **Figure 25**.

[9] Afin d'aider le lecteur à mieux appréhender ces différentes classes de lipides, une présentation détaillée des lipides retrouvés chez les éponges est donnée en **Annexe 3**, Tome II p. 28-32.

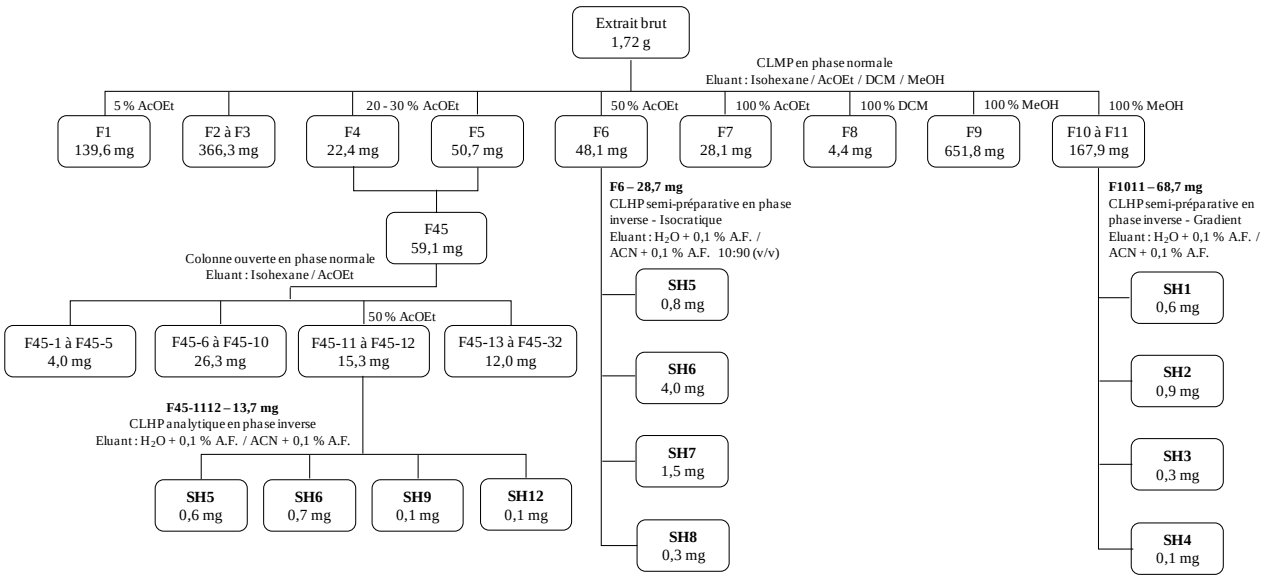


Figure 25 : Fractionnement de l'extrait brut de *Scopalina hapalia* pour l'isolement des métabolites **SH1** à **SH9** et **SH12**.

2,89 g de l'extrait brut dichlorométhane/méthanol (50/50 v/v) de *Scopalina hapalia* ont été fractionnés par CLMP sur une colonne de silice en phase normale. L'opération a été réalisée 3 fois sur une masse d'extrait brut ~ 900 mg. L'élution a été réalisée au moyen d'un système de solvants de polarité croissante : isohexane / AcOEt / DCM / MeOH. Un total de 13 fractions a été obtenu. L'analyse par CCM et CLHP-DAD-CAD des 13 fractions a montré que les composés majoritaires des différentes fractions ont une très faible absorbance aux ultraviolets. Par ailleurs, nous avons pu observer que :

- les fractions F1 à F3 sont composées en majorité d'acides gras et de stérols,
- les fractions F4 et F5 sont constituées majoritairement d'épidioxystérols,
- les fractions F6 et F7 sont quant à elles riches en métabolites spécialisés polaires mais les masses récupérées sont faibles.
- les fractions méthanoliques F9 à F12 sont composées principalement de métabolites spécialisés très polaires éluant dans la zone du pic d'injection.
- la fraction F8 (DCM) n'a pu être analysée en raison de la quantité collectée très négligeable.

- Isolement des métabolites **SH1** à **SH4**

L'analyse des fractions méthanoliques F9 à F12 par CLHP-CAD montre, en plus des composés très polaires qui éluent au niveau du pic d'injection, la présence d'un composé majoritaire accompagné de plusieurs composés minoritaires. Ces derniers composés ont donc été purifiés par CLHP semi-préparative sur une silice en phase inverse (Gemini C-18, 5 µm, 250 x 10 mm) et élués avec un gradient de solvants eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Un total de 4 composés ont ainsi été isolés : **SH1**, **SH2**, **SH3** et **SH4**.

- Isolement des métabolites **SH5** à **SH8**

La fraction F6 peu complexe, ne renfermant qu'un composé majoritaire, a donc été sélectionnée pour un fractionnement en CLHP-CAD semi-préparative en phase inverse

(Gemini C-18, 5 µm, 250 x 10 mm) avec une élution en mode isocratique et un système de solvants eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Cette dernière étape de purification a abouti à l'obtention de 4 composés : **SH5**, **SH6**, **SH7** et **SH8**.

- Isolement des métabolites **SH9** et **SH12**

Les fractions rassemblées F4 et F5 (F45), identifiées comme étant riches en épidioxystérols, ont été soumises à un fractionnement en utilisant un système de solvant de polarité croissante : isohexane / AcOEt / MeOH appliqué sur colonne ouverte en phase normale. Cette étape a permis l'obtention de 33 sous-fractions. Après contrôle par CCM des 33 sous-fractions, les sous-fractions F45-11 et F45-12 ont été regroupées puis soumises à un dernier fractionnement par CLHP-DAD sur une colonne analytique en phase inverse (Gemini C-18, 3 µm, 150 x 4,6 mm). L'élution a été effectuée avec un gradient eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Cette dernière étape de purification a abouti à l'obtention de 2 composés : **SH9** et **SH12**.

❖ **Les métabolites SH10, SH11, SH13 et SH14**

L'isolement des métabolites **SH10**, **SH11**, **SH13** et **SH14** décrit ci-après, est illustré dans la **Figure 26**.

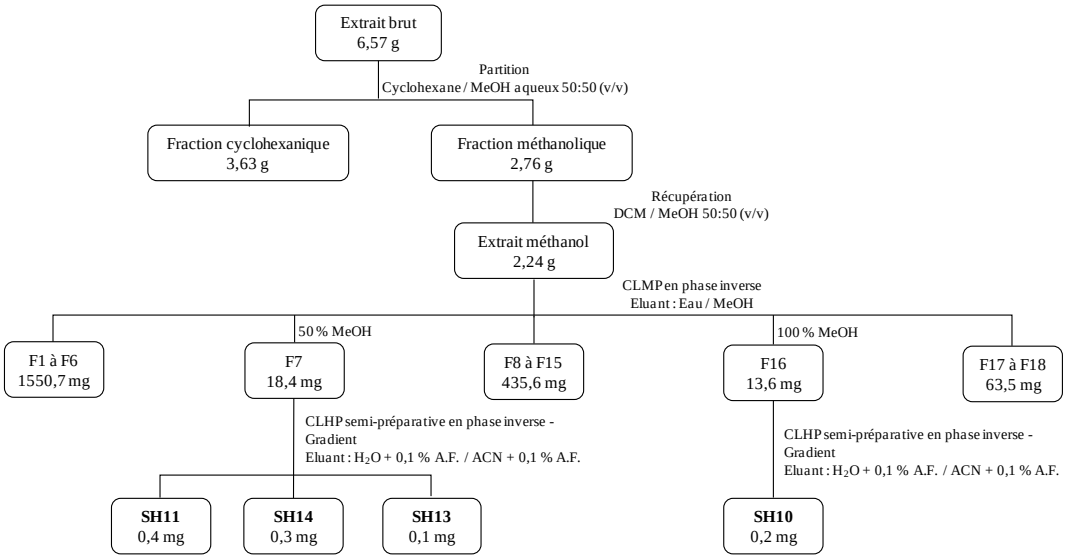


Figure 26 : Fractionnement de l'extrait brut de *Scopalina hapalia* pour l'isolement des métabolites **SH10**, **SH11**, **SH13** et **SH14**.

6,57 g de l'extrait de brut DCM/MeOH (50/50 v/v) de *Scopalina hapalia* ont été soumis à une partition cyclohexane/méthanol aqueux (50/50 v/v). Le cyclohexane étant partiellement miscible avec le méthanol, un système méthanol/eau (9 :1 v/v) a été utilisé pour améliorer la séparation. L'opération a été répétée 5 fois avec des masses d'extrait brut d'environ 1,2 g. L'analyse par CCM des partitions méthanoliques obtenues, représentant ~ 2,76 g, montre une diminution de la charge lipidique. A la suite de cette étape, 2,24 g d'extrait méthanolique restants ont été fractionnés par CLMP sur une colonne de silice en phase

inverse. L'opération a été réalisée 5 fois sur des masses d'environ 500 mg. L'élution a été menée au moyen d'un mélange de solvants H_2O / MeOH avec un gradient de 5 à 100 % MeOH. Un total de 18 fractions a été obtenu. L'analyse par CCM et CLHP-DAD-CAD indique que les composés majoritaires ont une très faible absorbance en UV. Les résultats montrent également que :

- les fractions F2 à F6 sont composées de métabolites majoritaires très polaires qui éluent au niveau du pic d'injection en CLHP,
- les fractions F7 à F14 présentent quelques composés polaires d'intérêts mais les masses cumulées sont faibles,
- les fractions F15 à F18 sont très riches en métabolites spécialisés, ces derniers sont visibles en CAD et CCM après révélation à la vanilline.

- Isolement du métabolite **SH10**

La fraction F16 présente un profil relativement simple avec un pic majoritaire éluant à 100 % ACN et non visible en UV. F16 a été fractionnée par CLHP semi-préparative sur une silice en phase inverse (Gemini C-18, 5 µm, 250 x 10 mm) avec une élution au moyen d'un gradient de solvants eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Le contrôle des sous-fractions obtenues a révélé la présence du composé **SH10** dans la sous-fraction 64.

- Isolement des métabolites **SH11**, **SH13** et **SH14**

La fraction F7 est riche en composés très polaires observables en CAD et éluant très tôt au niveau du pic d'injection. Par ailleurs, l'analyse CCM révèle une bande unique peu prononcée et de couleur orangée. F7 a été fractionnée par CLHP semi-préparative sur une silice en phase inverse (Gemini C-18, 5 µm, 250 x 10 mm) avec une élution au moyen d'un gradient de solvants eau + 0,1 % acide formique / acétonitrile + 0,1 % acide formique. Le contrôle des sous-fractions obtenues a révélé la présence de **SH11** (SF56), **SH13** (SF26) et **SH14** (SF28).

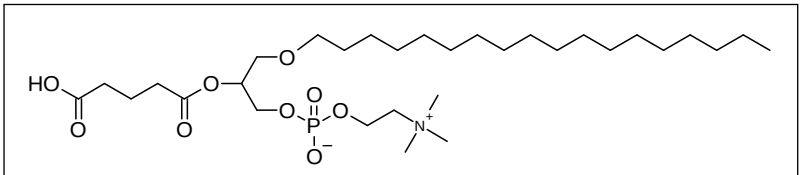
III.2.2.2 Elucidation structurale des métabolites

Les structures des métabolites isolés (SH1 à SH14) ont été élucidées par SMHR et RMN mono- et bi-dimensionnelle. L'ensemble de spectres sont donnés en **Annexe 4** (Tome II, p. 33-57).

❖ **Elucidation structurale des métabolites SH1 à SH4**

Les 4 métabolites isolés **SH1** à **SH4** sont des lipides appartenant à la famille des phospholipides (**SH1**) et lysophospholipides (**SH2** à **SH4**). Alors que **SH2** et **SH3** sont des lipides connus, **SH1** et **SH4** sont à priori de structures nouvelles. Leur élucidation structurale est détaillée ci-après.

- **Le métabolite SH1**



SH1

Le composé **SH1**, isolé sous la forme d'une huile/poudre incolore, montre dans son spectre SMHR obtenu en mode ESI^+ un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 624,4235 (valeur calculée : 624,4235) auquel est associée la formule brute $C_{31}H_{63}NO_9P^+$ avec un nombre d'insaturations calculé de 3.

En outre, l'ion *m/z* 624,4 a été soumis à collision dans des expériences SM/SM. Le spectre de fragmentation obtenu (**Figure 27**) présente des pics d'ions fragments caractéristiques des glycérophospholipides de la classe des phosphatidylcholines [Colsch *et al.*, 2017; Godzien *et al.*, 2015] à savoir :

- *m/z* 86,1 associé à la formule brute $C_5H_{12}N^+$ correspond à l'ion fragment de la choline suite à une perte de la fonction alcool.
- *m/z* 125,0 associé à la formule brute $C_2H_6O_4P^+$ correspond à l'ion fragment du phosphate protoné.
- *m/z* 184,1 associé à la formule brute $C_5H_{15}NO_4P^+$ constitue le pic de base ; cet ion correspond à la phosphocholine protonée et constitue le « fragment diagnostique » dans l'identification des phosphatidylcholines.
- *m/z* 510,4 de formule brute $C_{26}H_{57}NO_6P^+$ correspond au 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine.

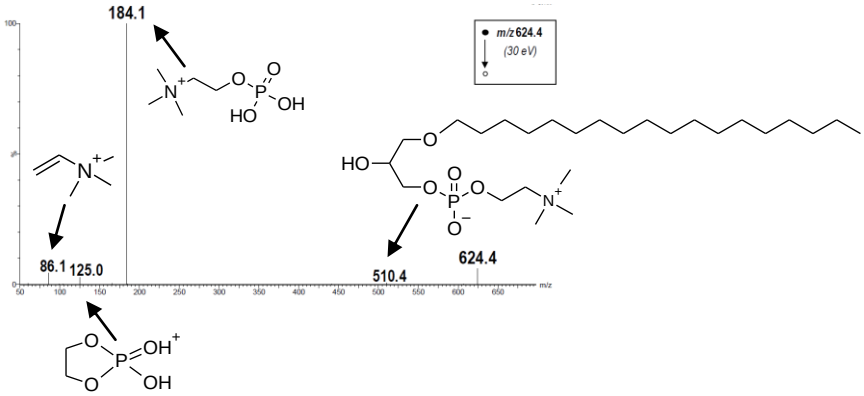


Figure 27 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 624,4.

L'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C, mono- et bidimensionnelles de **SH1** (**Tableau XXXI** et **Figure 28**) met en évidence les signaux caractéristiques des phosphatidylcholines. Ces signaux correspondent à :

- Un éther de glycérol avec ses trois ensembles de signaux caractéristiques de deux méthylènes et un méthine liés à un atome d'oxygène. Les déplacements chimiques déblindés, caractéristiques de protons et carbones proches d'hétéroatomes, sont les suivants : C-1 (δ_H 3,59 et 3,61 ; δ_C 70,2), C-2 (δ_H 5,17 ; δ_C 73,2) et C-3 (δ_H 3,97 et 4,03 ; δ_C 65,5).
- Une chaîne carbonée aliphatique avec un méthylène proche d'un hétéroatome, C-1' (δ_H 3,43 et 3,48 ; δ_C 72,7), C-2' (δ_H 1,57 ; δ_C 30,8), C-3' – C-17' (δ_H 1,35 – 1,25 ; δ_C 33,2 – 23,8) et un groupement méthyle terminal C-18' (δ_H 0,90 ; δ_C 14,5).
- Une partie phosphocholine avec deux méthylènes proches d'un hétéroatome, C-1'' (δ_H 4,27 ; δ_C 60,5) et C-2'' (δ_H 3,65 ; δ_C 67,4) ainsi qu'une triméthylamine (δH 3,23 ; δC 54,7).

En outre, les données RMN, en accord avec celles de la SM, permettent de déduire la formule brute ($C_5H_6O_3$) du résidu en position 2 ainsi que son élucidation structurale. Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C mettent en évidence la présence de :

- 2 fonctions carbonyles C-1''' (δ_C 174,4) et C-5''' (δ_C 178,7)
- 3 groupes méthylènes C-2''' (δ_H 2,42 ; δ_C 34,6), C-3''' (δ_H 1,90 ; δ_C 22,1) et C-4''' (δ_H 2,31 ; δ_C 35,9)

Les corrélations HMBC entre H-2 (δ_H 5,17) et C-1''' (δ_C 174,4) ainsi qu'entre H-2''' (δ_H 2,42) et C-1''' indiquent que le carbone 2 est relié au résidu par une liaison ester. Par ailleurs, le déplacement chimique du carbone quaternaire C-5''' (δ_C 178,7) est caractéristique du carbone d'une fonction carboxylique. Le positionnement de la fonction carboxylique en bout de chaîne a été déterminé grâce :

- Aux corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC entre H-3''' (δ_H 1,90) et C-5''' ainsi que H-4''' (δ_H 2,31) et C-5'''.
- Aux corrélations COSY, notamment entre H-2''' et H-3''' et H-4''', qui déterminent l'enchaînement des protons dans la chaîne aliphatique.

L'analyse de l'ensemble de ces données a permis d'élucider la structure du composé **SH1** comme étant le 1-*O*-Octadécyl-2-pentanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine. Un dédoublement des signaux des protons H-2''' et H-4''' a été observé sur le spectre RMN ^{1}H suggérant la possibilité de 2 conformations pour la molécule. Par ailleurs, une recherche dans la littérature n'a donné aucune référence structurale laissant penser qu'il pourrait s'agir d'un **nouveau composé**.

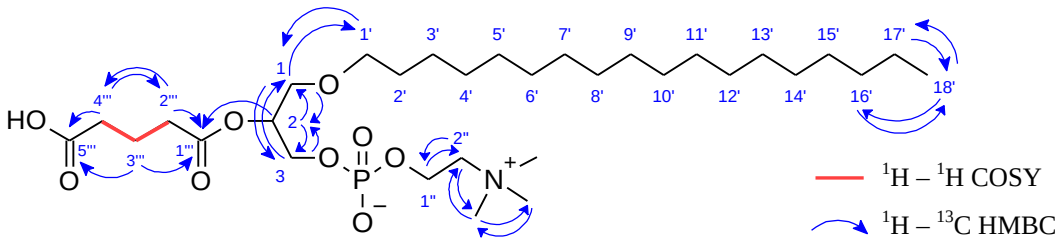


Figure 28 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH1**.

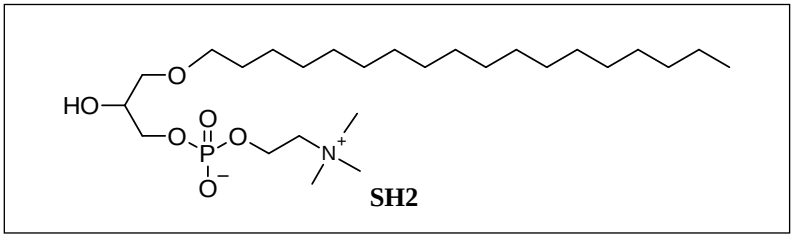
Tableau XXXI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH1** (CD_3OD).

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

Position	δ_H (600 MHz)	δ_C, type (150 MHz)	COSY (^{1}H-^{1}H)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	3,59 (dd 10,9 ; 5,9) 3,61 (dd 10,9 ; 4,7)	70,2, CH_2	-	2, 3, 1'
2	5,17 (m)	73,2, CH	-	1, 3, 1'''
3	3,97 (dt 11,1; 6,1[b]) 4,03 (ddd 11,1; 5,7; 4,2[b])	65,5, CH_2	-	1, 2
1'	3,43 (dt 9,3 ; 6,6) 3,48 (dt 9,3 ; 6,7)	72,7, CH_2	-	1, 2', 3'
2'	1,54 (lqt 6,8)	30,8, CH_2	-	-
3'	[1,25 - 1,35] (ss)	27,6, CH_2	-	-
4'→15'	[1,25 - 1,35] (ss)	30,7, CH_2	-	-
16'	[1,25 - 1,35] (ss)	33,2, CH_2	-	-
17'	[1,25 - 1,35] (ss)	23,8, CH_2	-	-
18'	0,90 (t 7,1)	14,5, CH_3	-	16', 17'
1''	4,27 (m[b])	60,5[a], CH_2	-	2''
2''	3,65 (m)	67,4[a], CH_2	-	1'', $N^+(CH_3)_3$
$N^+(CH_3)_3$	3,23 (ls)	54,7 [a], CH_3	-	2'', $N^+(CH_3)_3$
1'''	-	174,4, C	-	-
2'''	2,42 (lt 7,5)[c]	34,6, CH_2	3'''	1''', 4''',
3'''	1,90 (lqt 7,5)	22,1, CH_2	2''', 4'''	1''', 5'''
4'''	2,31 (lt 7,3)[c]	35,9, CH_2	3'''	2''', 5'''
5'''	-	178,7, C	-	-

[a] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N non observés car δ_{13C} déterminé à partir du spectre RMN HSQC et HMBC.
[b] Couplage ^{1}H-^{31}P.
[c] Dédoublement des signaux.

- **Le métabolite SH2**



Le spectre de masse en mode SMHR-ESI$^+$ du composé **SH2** montre un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 510,3918 (calc. 510,3918). Cette masse est en accord avec la formule brute $C_{26}H_{57}NO_6P^+$. Le nombre d'insaturation calculé pour cette formule brute est de 1. Par la suite, l'ion *m/z* 510,3918 a été soumis à collision dans des expériences SM/SM. Le spectre de fragmentation (**Figure 29**) présente plusieurs ions fragments parmi lesquels figurent les ions diagnostic suivants :

- *m/z* 86,1 ($C_5H_{12}N^+$) et *m/z* 125,0 ($C_2H_6O_4P^+$) correspondent aux ions fragments issus de la fragmentation de la partie phosphocholine.
- *m/z* 104,1 associé à la formule brute $C_5H_{14}NO^+$, correspond à l'ion fragment de la choline.
- *m/z* 184,1 associé à la formule brute $C_5H_{15}NO_4P^+$, constitue le pic de base ; cet ion correspond à la phosphocholine protonée et constitue le « fragment diagnostic » dans l'identification des phosphatidylcholines.
- *m/z* 240,1 associé à la formule brute $C_8H_{19}NO_5P^+$, correspond à l'ion fragment spécifique des lysoglycérophosphocholine ayant perdu une fonction alcool.

Ces premiers résultats permettent de conclure que le composé **SH2** est un glycérophosphocholine.

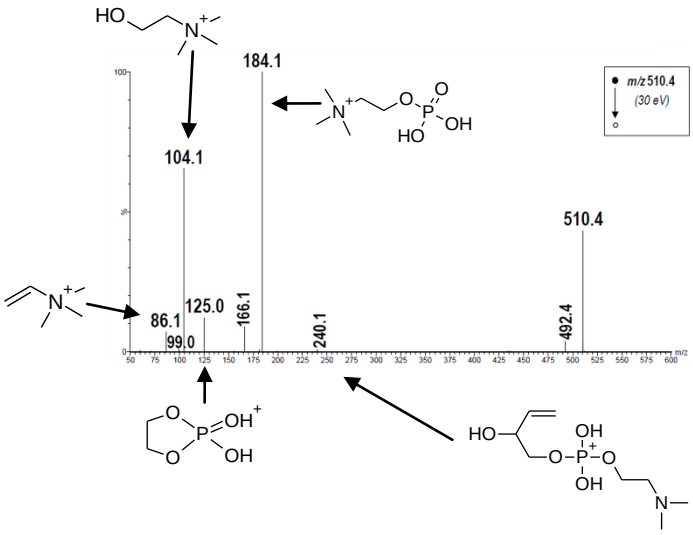


Figure 29 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 510,4.

L'analyse des données RMN ^{1}H et ^{13}C, mono- et bidimensionnelles de **SH2** (**Tableau XXXII** et **Figure 30**) met également en évidence les signaux caractéristiques des phosphatidylcholine. Ces signaux correspondent à :

- Un éther de glycérol avec ses trois ensembles de signaux caractéristiques de deux méthylènes et un méthine liés à un atome d'oxygène. Les déplacements chimiques déblindés, caractéristiques de protons et carbones proches d'hétéroatomes, sont les suivants : C-1 (δ_H 3,45 et 3,50 ; δ_C 72,9), C-2 (δ_H 3,90 ; δ_C 71,0) et C-3 (δ_H 3,84 et 3,93 ; δ_C 68,4).
- Une chaîne carbonée aliphatique avec un méthylène proche d'un hétéroatome, C-1' (δ_H 3,46 ; δ_C 72,6), C-2' (δ_H 1,57 ; δ_C 30,7), C-3' – C-17' (δ_H 1,35 – 1,25 ; δ_C 33,1 – 23,7) et un groupement méthyle terminal C-18' (δ_H 0,90 ; δ_C 14,5).
- Une partie phosphocholine avec deux méthylènes proches d'un hétéroatome, C-1'' (δ_H 4,29 ; δ_C 60,4) et C-2'' (δ_H 3,64 ; δ_C 67,2) ainsi qu'une triméthylamine (δH 3,23 ; δC 54,7).

Les corrélations HMBC entre H-1 (δ_H 3,45 et 3,50) et C-3 (δ_C 68,4), C-1' (δ_C 72,6) d'une part et entre H-2' (δ_H 1,57) et C-1 (δ_C 72,9), C-3' (δ_C 27,2), C-4' (δ_C 30,7) indique que le carbone 1 est relié à la chaîne aliphatique par une liaison éther. Les données SM et RMN ont permis de caractériser le composé **SH2** comme étant le 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (LysoPC(O-18 :0)), un analogue du Lyso-PAF. En 2004, ce composé a été isolé de l'éponge *Suberites domuncula* [Müller *et al.*, 2004].

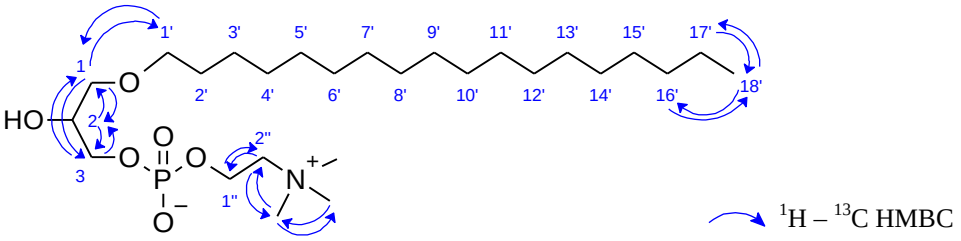


Figure 30 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **SH2**.

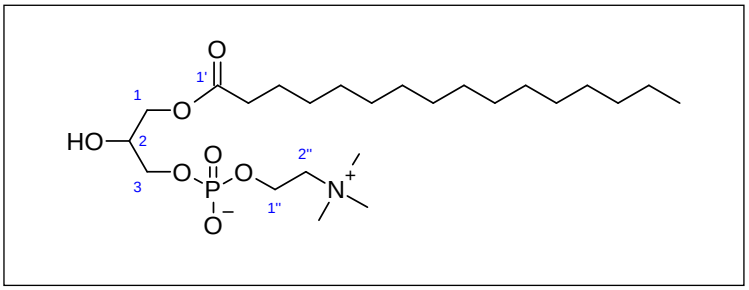
Tableau XXXII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine [Nishikawa *et al.*, 2015] avec ceux observés pour **SH2** (CD_3OD).

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

Position	δ_H		δ_C, type		HMBC (^{1}H-^{13}C)
	Littérature (600 MHz)	SH2 (600 MHz)	Littérature (150 MHz)	SH2, (150 MHz)	
1	3,44 3,49	3,45 (dd, 10,0; 5,7) 3,50 (dd, 10,0; 4,9)	72,92	72,9, CH_2	2, 3, 1'
2	3,88	3,90 (m)	71,03	71,0[a], CH	1, 3
3	3,84 3,93	3,84 (ldt, 10,2; 6,2) 3,93 (ddd, 10,2; 6,2; 3,8[b])	68,49	68,4[a], CH_2	1, 2
1'	3,45	3,46 (t, 6,7)	72,69	72,6, CH_2	2', 3'
2'	1,56	1,57 (lqt, 7,0)	30,66	30,7, CH_2	1,3',4'
3'	1,34	[1,25 - 1,35] (ss)	27,23	27,2, CH_2	-
4'→15'	1,28	[1,25 - 1,35] (ss)	30,46 - 30,77	30,7, CH_2	-
16'	1,28	[1,25 - 1,35] (ss)	33,07	33,1, CH_2	-
17'	1,29	[1,25 - 1,35] (ss)	23,72	23,7, CH_2	-
18'	0,89	0,90 (t, 7,1)	14,44	14,5, CH_3	16', 17'
1''	4,28	4,29 (m[b])	60,37	60,4[a], CH_2	2''
2''	3,63	3,64 (m)	67,50	67,2[a], CH_2	$N^+(CH_3)_3$, 1''
$N^+(CH_3)_3$	3,21	3,23 (l)	54,68	54,7[a], CH_3	$N^+(CH_3)_3$, 2''

[a] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N.
[b] Couplage ^{1}H-^{31}P.

- **Le métabolite SH3**



L'étude du spectre de masse SMHR du métabolite **SH3**, obtenu en mode ESI^+, a révélé la présence d'ions moléculaires à *m/z* 496,3399 (calc. 496,3398) compatible avec la formule brute $C_{24}H_{50}NO_7P^+$.

En outre, la confrontation des analyses spectrales RMN de **SH3** (**Tableau XXXIII**) avec les données de la littérature [Nishikawa *et al.*, 2015] permet d'attribuer à **SH3**, la structure d'un lysophosphatidylcholine (LysoPC) : le 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, forme ester du Lyso-PAF.

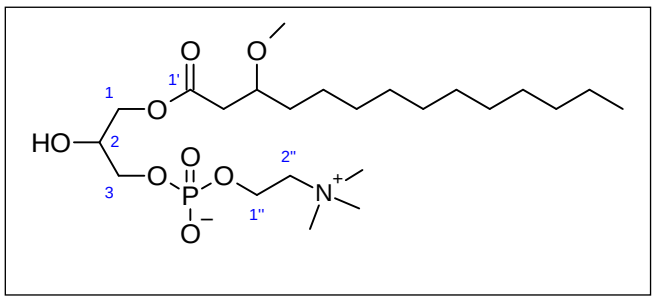
Tableau XXXIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine [Nishikawa *et al.*, 2015] avec ceux observés pour **SH3** (CD_3OD).

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

Position	δ_H		δ_C, type	
	Littérature (600 MHz)	SH3 (600 MHz)	Littérature (150 MHz)	SH3 (150 MHz)
1	4,17 (dd, 11,5 ; 4,6) 4,10 (dd, 11,5 ; 4,6)	4,17 (dd, 11,2 ; 4,6) 4,10 (dd, 11,2 ; 4,6)	66,24	66,2, CH_2
2	3,96 (m)	3,97 (m)	69,84	69,8[a], CH
3	3,89 (m)	3,90 (m)	67,81	67,8[a], CH_2
1'	-	-	175,38	175,4, C
2'	2,34 (t, 7,6)	2,35 (t, 7,5)	34,92	34,8, CH_2
3'	1,61 (m)	[1,25 - 1,35] (ss)	25,99	26,1, CH_2
4'→14'	1,28 (m)	[1,25 - 1,35] (ss)	33,07 – 30,23	30,6, CH_2
15'	1,29 (m)	[1,25 - 1,35] (ss)	23,72	23,8, CH_2
16'	0,89 (t, 7,2)	0,90 (t, 7,1)	14,44	14,5, CH_3
1''	4,28 (m)	4,29 (m[b])	60,42	60,4[a], CH_2
2''	3,63 (m)	3,64 (m)	67,50	67,2[a], CH_2
$N^+(CH_3)_3$	3,21 (s)	3,23 (l)	54,68	54,7[a], CH_3

[a] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N.
[b] Couplage ^{1}H-^{31}P.

- **Le métabolite SH4**



L'étude du spectre de masse SMHR du métabolite **SH4**, obtenu en mode ESI^+, a révélé la présence d'ions moléculaires à *m/z* 498,3190 (calc. 498,3190) compatibles avec la formule brute $C_{23}H_{49}NO_8P^+$. L'ion pseudo-moléculaire *m/z* 498,3190 a été soumis à collision dans des expériences SM/SM. Le spectre de fragmentation obtenu (**Figure 31**) présente plusieurs ions fragments caractéristiques des phosphatidylcholines, à savoir :

- *m/z* 86,1 ($C_5H_{12}N^+$), *m/z* 104,1 ($C_5H_{14}NO^+$) et *m/z* 125,0 ($C_2H_6O_4P^+$) issus de la fragmentation de la moitié phosphocholine.
- *m/z* 184,1 associé à la formule brute $C_5H_{15}NO_4P^+$, constitue le pic de base ; cet ion correspond à la phosphocholine protonée et représente le « fragment diagnostic » dans l'identification des phosphatidylcholines.

- *m/z* 258,1 associé à la formule brute $C_8H_{21}NO_6P^+$, est un ion fragment spécifique des lysophosphatidylcholines et correspond à la partie glycérophosphocholine protonée à la suite de la perte de la chaine aliphatique.

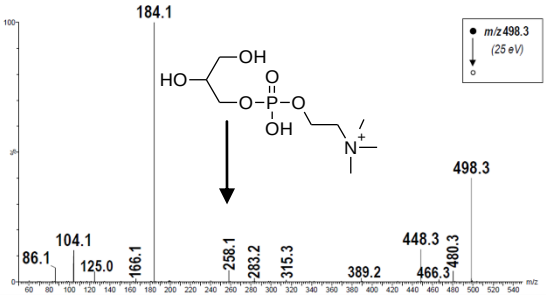


Figure 31 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 498,3.

L'analyse des données RMN ^{1}H et ^{13}C mono- et bidimensionnelles de **SH4** (**Tableau XXXIV**) met en évidence les signaux caractéristiques des glycérophosphatidylcholines :

- Un éther de glycérol avec ses trois ensembles de signaux caractéristiques de deux méthylènes et un méthine liés à un atome d'oxygène. Les déplacements chimiques déblindés, caractéristiques de protons et carbones proches d'hétéroatomes, sont les suivants : C-1 (δ_H 4,19 ; 4,13 ; δ_C 66,0), C-2 (δ_H 3,98 ; δ_C 69,4) et C-3 (δ_H 3,90 ; δ_C 67,4).
- Une chaîne carbonée aliphatique avec C-2' (δ_H 2,54 et 2,51 ; δ_C 39,9), C-3' (δ_H 3,66 ; δ_C 78,8), C-4' (δ_H 1,53 ; δ_C 34,5), C-5' – C-13' (δ_H 1,35 – 1,25 ; δ_C 33,2 – 23,4) et un groupement méthyle terminal C-14' (δ_H 0,90 ; δ_C 14,1). Les déplacements chimiques du carbone ayant été obtenus à partir du spectre HSQC, le δ_C du carbone C-1' n'a pu être déterminé. Celui-ci ne porte en effet aucun proton. De plus, les déplacements de C-3' (δ_H 3,66 ; δ_C 78,8) indiquent que celui-ci est proche d'un hétéroatome.
- Une partie phosphocholine avec deux méthylènes proches d'un hétéroatome, C-1'' (δ_H 4,29 ; δ_C 60,1) et C-2'' (δ_H 3,65 ; δ_C 67,0) ainsi qu'une triméthylamine (δH 3,23 ; δC 54,3).

Un oxyméthyle (δ_H 3,34 ; δ_C 56,9) a également été observé.

En raison de la très faible quantité de matière collectée au cours de l'isolement, l'acquisition d'un spectre HMBC n'a pu se faire. Par conséquent, les couplages hétéronucléaires à longue distance n'ont pu être établis. Toutefois, les données SM et RMN obtenues sont en accord avec une structure de type lysophosphatidylcholine. Ainsi, conformément à la formule brute et en se basant sur le carbone tétra-substitué en C-1', nous pouvons conclure que le résidu d'acide gras de formule brute $C_{15}H_{29}O_2$ est lié au glycérol par une liaison ester. De plus, les corrélations observées en COSY entre H-2' (δ_H 2,51) et H-3' (δ_H 3,66) d'une part et celle observées en HSQC entre H-3' (δ_H 3,66) et C-3' (δ_C 78,8) d'autre part permettent de déduire que la fonction oxyméthyle est portée par le carbone en C-3'. L'exploitation des données SMHR et RMN permettent donc d'identifier le métabolite **SH4**

comme étant le 1-*O*-(3-Méthox-tétradécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine. Une recherche dans les bases de données n'a renvoyé aucune référence structurale, ce qui laisse penser qu'il s'agirait d'un **nouveau composé naturel**.

Tableau XXXIV : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH4** (CD_3OD).

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

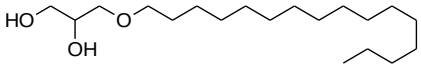
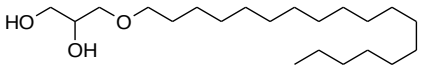
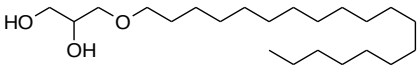
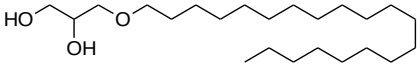
Position	δ_H	δ_C[a], type	COSY (^1H-^1H)
	SH4 (600 MHz)	SH4 (150 MHz)	SH4
1	4,19 (dd, 10,9 ; 4,7) 4,13 (dd, 10,9 ; 5,9)	66,0, CH_2	-
2	3,98 (m)	69,4, CH	-
3	3,90 (m[b])	67,4, CH_2	-
1'	-	n.o. C	-
2'	2,54 (dd, 15,3; 7,3) 2,51 (dd, 15,3; 5,6)	39,9, CH_2	3'
3'	3,66 (m)	78,8, CH	2'
4'	1,53 (m)	34,5, CH_2	-
5'→12'	[1,35 - 1,25] (ss)	33,2, CH_2	14'
13'	[1,35 - 1,25] (ss)	23,4, CH_2	-
14'	0,90 (t, 7,1)	14,1, CH_2	13'
OCH_3	3,34 (s)	56,9, CH_3	-
1''	4,29 (m[b])	60,1, CH_2	2''
2''	3,65 (m)	67,0, CH_2	1''
$N^+(CH_3)_3$	3,23 (l)	54,3, CH_3	-

[a] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N non observé car δ_C déterminé à partir du spectre HSQC.
[b] Couplage ^1H-^{31}P.
[c] n.o. non observé.

❖ Elucidation structurale des métabolites SH5 à SH8

Les 4 métabolites isolés **SH5** à **SH8** sont des lipides appartenant à la famille des alkylglycérols (AKG). Tous de structures connues (**Tableau XXXV**), leur élucidation structurale est proposée ci-après.

Tableau XXXV : Alkylglycérols (**SH5** à **SH8**) isolés de *Scopalina hapalia*.

N°	Nom	Formule brute (MM)	Structure	Techniques d'analyse	Référence
SH5	1-*O*-Hexadécyl-*sn*-glycérol (*alcool chimylique*)	$C_{19}H_{40}O_3$ (316,2977)		RMN ^{1}H HRMS	Do et Erickson, 1983
SH6	1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycérol (*batilol*)	$C_{21}H_{44}O_3$ (344,3290)		HRMS RMN ^{1}H RMN ^{13}C COSY HSQC HMBC	Do et Erickson, 1983
SH7	1-Nonadécyloxy-2,3-propanediol	$C_{22}H_{46}O_3$ (358,3447)		RMN ^{1}H HRMS	Quijano *et al.*, 1994
SH8	3-Icosyloxy-1,2-propanediol	$C_{23}H_{48}O_3$ (372,3603)		RMN ^{1}H HRMS	Quijano *et al.*, 1994

- **Le métabolite SH6**

Le composé **SH6** identifié comme étant le batilol (Huang *et al*., 2007), a été isolé sous forme d'un solide blanc. L'étude de son spectre de masse SMHR obtenu en mode ESI$^+$ a révélé la présence d'un ion moléculaire à *m/z* 345,3362 compatible avec la formule brute $C_{21}H_{45}O_3^+$ (calc. 345,3363).

L'analyse des données de la RMN mono- et bidimensionnelle ^{1}H et ^{13}C (**Tableau XXXVI** et **Figure 32**) montre des signaux caractéristiques des monoacylglycérols. A savoir :

- Ceux des carbones C-1' (δ_H 3,47 et 3,41 ; δ_C 73,3), C-2' (δ_H 3,74 ; δ_C 72,3) et C-3' (δ_H 3,57 et 3,50 ; δ_C 64,6) caractéristiques d'un résidu glycérol constitué de deux méthylènes et d'un méthine proche d'un hétéroatome.
- Ceux d'un acide gras lié au glycérol par une liaison éther, constitué d'une succession de méthylènes C-2 – C-17 (δ_H 1,57 – 1,25 ; δ_C 33,1 – 23,7), d'un oxyméthylène C-1 (δ_H 3,46 ; δ_C 72,6) et d'un méthyle terminal C-18 (δ_H 0,90 ; δ_C 14,4).

Par ailleurs, les corrélations HMBC (**Figure 32**) permettent d'affiner l'élucidation structurale. En effet, les corrélations observées entre H-1' (δ_H 3,47), C-1 (δ_C 72,6), C-2' (δ_C 72,3) et C-3' (δ_C 64,6) d'une part et entre H-1 (δ_H 3,46), C-1' (δ_C 73,3), C-2 (30,7) et C-3 (27,2) d'autre part montrent que la chaîne aliphatique est lié au glycérol par une liaison éther. Enfin, la longueur de la chaîne aliphatique a été déterminée à partir de la formule brute soit 17 carbones méthyléniques et 1 groupement méthyle.

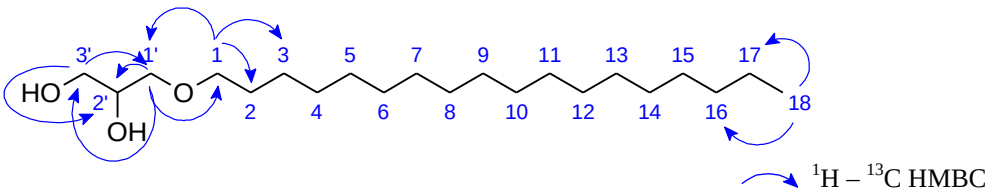


Figure 32 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH6**.

Tableau XXXVI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH6** (CD_3OD) et comparaison avec la littérature ($CDCl_3$) [Huong *et al.*, 2007].

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

Position	δ_H		δ_C, type	
	Littérature (500 MHz)	**SH6 (600 MHz)**	**Littérature (125 MHz)**	**SH6 (150 MHz)**
1	3,46 (m)	3,46 (t, 6,7)	71,89	72,6, CH_2
2	1,58 (m)	1,57 (lqt, 7,0)	29,71	30,7, CH_2
3	1,26 (l)	[1,25 – 1,38] (ss)	26,11	27,2, CH_2
4 → 15	1,26 (l)	[1,25 – 1,38] (ss)	29,71	30,7, CH_2
16	1,26 (l)	[1,25 – 1,38] (ss)	31,94	33,1, CH_2
17	1,26 (l)	[1,25 – 1,38] (ss)	22,70	23,7, CH_2
18	0,88 (t, 7,0)	0,90 (t, 7,1)	14,12	14,4, CH_3
1'	3,72 (dd, 11,0 ; 5,0) 3,65 (dd, 11,0 ; 3,0)	3,47 (dd, 10,0 ; 5,0) 3,41 (dd, 10,0 ; 6,0)	72,55	73,3, CH_2
2'	3,86 (m)	3,74 (tt, 6,0 ; 5,0)	70,44	72,3, CH
3'	3,52 (m)	3,57 (dd, 11,2 ; 5,0) 3,50 (dd, 11,2 ; 6,0)	64,35	64,6, CH_2

- **Les métabolites SH5, SH7 et SH8**

Les composés **SH5**, **SH7** à **SH8** ont été obtenus sous forme de solide blanc. La confrontation des données spectrales SMHR (**Tableau XXXV**) et RMN ^{1}H (**Tableau XXXVII**) des AKG à celles du batilol **SH6** ainsi qu'à celles de la littérature a permis d'attribuer à ces métabolites les structures de 3 autres AKG :

- ✓ Le 1-*O*-Hexadécyl-*sn*-glycérol (**SH5**)
- ✓ Le 1-Nonadécyloxy-2,3-propanediol (**SH7**)
- ✓ Le 3-Icosyloxy-1,2-propanediol (**SH8**)

Tableau XXXVII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H des AKG **SH5**, **SH7** et **SH8** à ceux observés pour **SH6** (CD_3OD).

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

Position	δ_H			
	SH6	SH5	SH7	SH8
1	3,46 (t, 6,7)	3,46 (t, 6,7)	3,46 (t, 6,7)	3,46 (t, 6,7)
2	1,57 (lqt, 7,0)	1,57 (lqt, 7,0)	1,57 (lqt, 7,0)	1,57 (lqt, 7,0)
3 – 15	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]
16	[1,38 – 1,25]	0,90 (t, 7,1)	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]
17	[1,38 – 1,25]	-	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]
18	0,90 (t, 7,1)	-	[1,38 – 1,25]	[1,38 – 1,25]
19	-	-	0,90 (t, 7,1)	[1,38 – 1,25]
20	-	-	-	0,90 (t, 7,1)
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
1'	3,47 (dd, 10,0 ; 5,0) 3,41 (dd, 10,0 ; 6,0)	3,47 (dd, 10,0 ; 5,0) 3,41 (dd, 10,0 ; 6,0)	3,48 (dd, 10 ; 0, 5,0) 3,41 (dd, 10,0 ; 6,0)	3,47 (dd, 10,0 ; 5,0) 3,41 (dd, 10,0 ; 6,0)
2'	3,74 (tt, 6,0 ; 5,0)	3,74 (tt, 6,0 ; 5,0)	3,75 (tt, 6,0 ; 5,0)	3,74 (tt, 6,0 ; 5,0)
3'	3,57 (dd, 11,2 ; 5,0) 3,50 (dd, 11,2 ; 6,0)	3,57 (dd, 11,2 ; 5,0) 3,50 (dd, 11,2 ; 6,0)	3,57 (dd, 11,2 ; 5,0) 3,51 (dd, 11,2 ; 6,0)	3,57 (dd, 11,2 ; 5,0) 3,50 (dd, 11,2 ; 6,0)

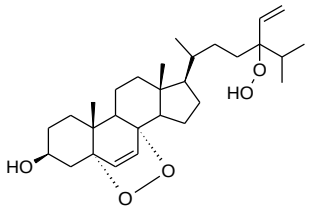
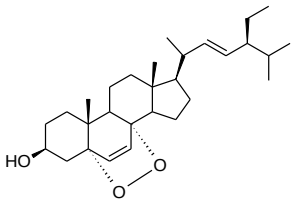
Les composés **SH5** et **SH6** sont dans la nature des métabolites ubiquitaires, généralement sous leurs formes estérifiées. Cela étant, ils ont été isolés pour la première fois d'éponge en 1983, à partir d'un spécimen du genre *Aaptos* [Do et Erickson, 1983]. La même année, le composé **SH6** a également été isolé de l'éponge *Scopalina ruetzleri*. Les composés **SH7** et **SH8** ont, quant à eux, été isolés pour la première fois d'éponge en 1994 par Quijano *et al.*, à partir d'un spécimen de *Desmapsamma anchorata*.

❖ Elucidation structurale des métabolites SH9 à SH10

Les composés **SH9** et **SH10** sont 2 épidioxystérols de structure connue. Leur élucidation structurale a été réalisée par comparaison de leurs données SMHR (**Tableau XXXVIII**) et RMN (**Tableau XXXIX** et **Tableau XL**) avec celles de la littérature. Il s'agit du :

- ✓ 5*α*,8*α*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol (**SH9**) obtenu sous forme d'un mélange 50/50 de 2 diastéréoisomères 24*R*/24*S*.
- ✓ 5*α*,8*β*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol (**SH10**) sous forme d'un mélange de 2 diastéréoisomères 24*R*/24*S*.

Tableau XXXVIII : Epidioxystérols (**SH9** et **SH10**) isolés de *Scopalina hapalia*.

N°	Nom	Formule brute (MM)	Structure	Technique d'analyse	Référence
SH9	5*α*,8*α*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol	$C_{29}H_{46}O_5$ (474,3345)		RMN HRMS	Sera *et al.*, 1999
SH10	5*α*,8*β*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol	$C_{29}H_{46}O_3$ (442,3447)		RMN HRMS	Gunatilaka *et al.*, 1981

L'analyse comparative des données expérimentales de la spectrométrie de masse et de la RMN avec celles de la littérature (**Tableau XXXIX**) a permis l'identification du composé **SH9** comme étant le 5α,8α-épidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol. Ce composé a été isolé pour la première fois en 1999, sous la forme d'un mélange inséparable de 2 stéréoisomères (24*R*/24*S*) à partir de l'éponge *Lendenfeldia chondrodes* [Sera *et al.*, 1999]. Toutefois, les auteurs pensent que, du fait de la présence du groupement hydroperoxyde sur la chaîne latérale, il s'agirait d'un artéfact apparu durant la conservation de l'éponge.

L'analyse comparative des données expérimentales de la spectrométrie de masse et de la RMN ainsi que de la littérature (**Tableau XL**) a permis l'identification du composé **SH10** comme étant le 5*α*,8*β*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol. Le **Tableau XL** présente les déplacements chimiques caractéristiques de **SH10**. Isolé pour la première fois en 1981 à partir de différents organismes marins, **SH10** a également été obtenu sous forme d'un mélange de 2 stéréoisomères (24*R*/24*S*) [Gauvin *et al.*, 2000; Gunatilaka *et al.*, 1981]. Contrairement au composé **SH9**, le composé **SH10** semble être un métabolite naturellement présent chez les organismes marins.

Tableau XXXIX : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du 5*α*,8*α*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol ($CDCl_3$) [Sera *et al.*, 1999] à ceux observés pour **SH9** (CD_3OD).

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

Position	δ_H		δ_C[a], type	
	Littérature (500 MHz)	**SH9 (600 MHz)**	**Littérature (125 MHz)**	**SH9 (150 MHz)**
3	3,93 (m)	3,77 (tt, 11,6; 5,1)	66,5	-, CH
6	6,24 (d, 8,55)	6,27 (d, 8,6)	135,4	136,5, =CH
7	6,50 (d, 8,55)	6,54 (d, 8,6)	130,7	131,7, = CH
18	0,81 (s)	0,85 (s)	12,6	12,7, CH_3
19	0,88 (s)	0,91 (s)	18,2	18,3, CH_3
21	0,95 (d, 7,5)	0,96 (d, 8,6)[b]	18,8	18,9, CH_3
26	0,86 (d, 7,5)	0,86 (d, 7,2)[b]	17,6	17,8, CH_3
27	0,87 (d, 7,5)	0,87 (d, 7,4)[b]	16,6	16,9, CH_3
28	5,72 (dd, 17,8, 11,5)	5,75 (dd, 17,9 ; 11,5)[b]	137	138,0, =CH
29	5,27 (dd, 11,5 ; 1,1) 5,15 (dd, 17,8 ; 1,1)	5,19 (dd, 11,5 ;1,8)[b] 5,05 (dd, 17,9 ; 1,8)[b]	116,3	-, =CH

[a] δ_C déterminé à partir des spectres RMN HSQC et HMBC.
[b] Dédoublement des signaux.

Tableau XL: Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du 5*α*,8*β*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol ($CDCl_3$) [Gauvin *et al.*, 2000] à ceux observés pour **SH10** (CD_3OD).

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

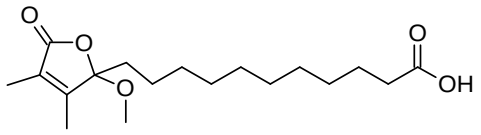
Position	δ_H		δ_C[a], type	
	Littérature (400 MHz)	**SH11 (600 MHz)**	**Littérature (100 MHz)**	**SH11 (150 MHz)**
1	-	-	34,76	-
2	-	-	30,19	-
3	3,95 (m)	3,77 (m)	66,54	67,03, CH
6	6,22 (d, 8,5)	6,26 (d, 8,6)	135,46	136,7, =CH
7	6,48 (d, 8,5)	6,54 (d, 8,6)	130,83	131,7, =CH
18	0,78 (s)	0,86 (s)	12,51	13,3, CH_3
19	0,86 (s)	0,91 (s)	18,23	18,6, CH_3
20	-	-	40,09	-
21	0,99 (d, 6,1)	1,03 (d, 6,6)[b]	21,16	21,6, CH_3
22	5,10 (dd, 8,4 ; 15,2)	5,17 (dd, 8,7 ; 15,1)[b]	137,72	139,2, =CH
23	5,00 (dt, 8,6 ; 15,2)	5,07 (dd, 8,8 ; 15,1)[b]	129,97	131,1, =CH
26	0,75 (d, 6,2)	0,82 (d, 6,6)[b]	19,00	19,42, CH_3
27	0,76 (d, 6,8)	0,87 (d, 6,5)[b]	21,22	21,51, CH_3
29	0,80 (m)	0,83 (m)	12,92	12,81, CH_3

[a] δ_C déterminé à partir des spectres RMN HSQC.
[b] Dédoublement des signaux.

❖ Elucidation structurale des métabolites SH11 et SH12

Les métabolites **SH11** et **SH12** sont des métabolites spécialisés de type buténolides. Ces métabolites spécialisés sont caractérisés par la présence d'un noyau buténolide dans leurs structures. Les composés **SH11** et **SH12** sont à priori de structure nouvelle. Leur élucidation structurale est présentée ci-après.

- **Le métabolite SH11**



SH11

Le métabolite **SH11** a été isolé sous la forme d'une huile jaunâtre en mélange avec d'autres composés à chaîne grasse (~ 64 %). Son ionisation par électrospray en mode positif ESI^+ génère un ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 349,1985. L'analyse SMHR du métabolite **SH11** permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{18}H_{30}O_5$, de masse monoisotopique 326,2093 et comportant 4 insaturations.

L'analyse des données RMN ^1H et ^{13}C mono- et bidimensionnelles (**Tableau XLI** et **Figure 33**) met en évidence la présence de :

- 2 groupements méthyles proches d'une insaturation (méthyles oléfiniques) : C-16 (δ_H 1,84 ; δ_C 8,2) et C-17 (δ_H 1,90 ; δ_C 10,9).
- Plusieurs groupements méthylènes : C-5 (δ_H 1,95 et 1,73 ; δ_C 36,5) proche d'un hétéroatome, C-6 (δ_H 1,24 et 1,13 ; δ_C 23,8), C-7 à C-12 (δ_H 1,33 – 1,27 ; δ_C 30,8 – 30,6), C-13 (δ_H 1,59 ; δ_C 27,8) et C-14 (δ_H 2,15 ; δ_C 39,2) proche d'un hétéroatome.
- 2 carbones vinyliques C-2 (δ_C 128,4) et C-3 (δ_C 158,4)
- Un oxyméthyle C-18 (δ_H 3,07 ; δ_C 50,5)
- 2 carbonyles C-1 (δ_C 173,8) et C-15 (δ_C 183,0)
- 1 acétal C-4 (δ_C 111,9)

L'exploitation du spectre HMBC indique, quant à elle, des corrélations longues distances entre les protons du groupement méthyle H-16 et les carbones C-1, C-2 et C-3 d'une part, et les protons du groupement méthyle H-17 et les carbones C-2, C-3 et C-4 d'autre part. Ces corrélations sont caractéristiques d'un cycle α,β-insaturé 2,3-diméthyl-γ-lactone similaire au buténolide décrit par Lee et ses collaborateurs [Lee *et al.*, 2007]. Par ailleurs, l'observation d'une corrélation entre les protons du groupement méthoxyle H-18 et le carbone C-4 indique une substitution en C-4 par le groupement méthoxy. L'analyse du spectre COSY montrant une corrélation entre H-5 et H-6, H-12 et H-13, H-13 et H-14 ainsi que les corrélations observées en HMBC entre H-5, C-4, C-6 et C-7 ; H-13, C-12, C-14 et C-15 ; H-14 et C-12, C-13 et C-15 indiquent la présence d'un acide carboxylique relié à une chaîne aliphatique

constituée de 10 groupements méthylènes. Les interactions observées en NOESY entre H-18 et H-17 d'une part, et entre H-18 et H-6 d'autre part indiquent que ces groupements (méthyle, méthoxyle et chaîne alkyle) sont proches dans l'espace. Les données RMN sont relativement similaires à celles de la sinularone I exception faite de la chaîne alkyle (en position terminale) et de la substitution en C-4 [Shi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2007] ce qui suggère que le métabolite **SH11** serait un **nouveau dérivé des sinularones**.

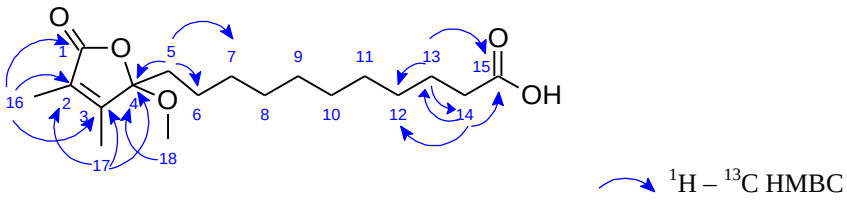


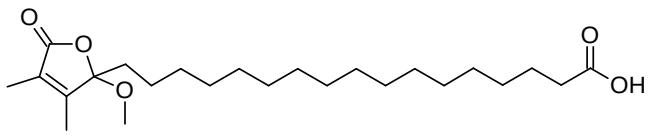
Figure 33 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH11**.

Tableau XLI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH11** (CD_3OD).

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

Position	δ_H (600 MHz)	δ_C, type (150 MHz)	HMBC (^{1}H-^{13}C)	NOESY
1	-	173,8, C	-	-
2	-	128,4, =CH	-	-
3	-	158,4, =CH	-	-
4	-	111,9, C	-	-
5	1,95 (m) 1,73 (m)	36,5, CH_2	4, 6, 7	-
6	1,24 (m) 1,13 (m)	23,8, CH_2	-	-
7 – 12	[1,33-1,27] (m)	[30,8-30,6], CH_2	-	-
13	1,59 (qt 7,4)	27,8, CH_2	12, 14, 15	-
14	2,15 (dd, 8,1; 7,5)	39,2, CH_2	12, 13, 15	-
15	-	183,0, C	-	-
16 (CH_3-2)	1,84 (q, 1,2)	8,2, CH_3	1, 2, 3	-
17 (CH_3-3)	1,90 (q, 1,2)	10,9, CH_3	2, 3, 4	18 (OCH_3-4)
18 (OCH_3-4)	3,07 (s)	50,5, CH_3	4	6, 17 (CH_3-3)

- **Le métabolite SH12**



SH12

Le métabolite **SH12** a été isolé sous la forme d'un produit incolore en mélange avec d'autres composés à chaîne grasse (~ 58 %). Son spectre SMHR en mode ESI^+ présente un ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 433,2921 en accord avec la formule brute $C_{24}H_{42}O_5Na$ (calc. 433,2924). Ceci permet de conclure à la présence d'un composé de formule brute $C_{24}H_{42}O_5$ avec une masse exacte de 410,2032 et comportant 4 insaturations.

Comme pour le composé **SH11**, l'analyse des données RMN 1H et 13C mono- et bidimensionnelles de SH12 (**Tableau XLII** et **Figure 34**) a permis la mise en évidence d'une structure dérivée des sinularones, avec des signaux caractéristiques tels que :

- 2 groupements méthyles proches d'une insaturation (méthyles oléfiniques) : C-22 (δ_H 1,83 ; δ_C 8,3) et C-23 (δ_H 1,90 ; δ_C 10,9).
- Plusieurs groupements méthylènes : C-5 (δ_H 1,96 et 1,73 ; δ_C 36,6) proches d'un hétéroatome, C-6 (δ_H 1,24 et 1,14 ; δ_C 23,9), C-7 à C-18 (δ_H 1,33 – 1,27 ; δ_C 31,0 – 30,6), C-19 (δ_H 1,59 ; δ_C 27,8) et C-20 (δ_H 2,16 ; δ_C 39,2) proche d'un hétéroatome.
- 2 carbones vinyliques C-2 (δ_C 128,4) et C-3 (δ_C 158,4)
- Un oxyméthyle C-24 (δ_H 3,07 ; δ_C 50,5)
- 2 carbonyles C-1 (δ_C 173,8) et C-21 (δ_C 182,9)
- 1 acétal C-4 (δ_C 111,9)

La structure de **SH12** ne diffère de celle de **SH11** que par la longueur de la chaîne aliphatique. En effet, comme pour le composé **SH11**, les corrélations hétéronucléaires ^1H – ^{13}C HMBC (H-22 et C-1, C-2 et C-3 / H-23 et C-2, C-3 et C-4) indiquent bien la présence d'un cycle *α,β*-insaturé 2,3-diméthyl-*γ*-lactone dans la structure de **SH12**. Par ailleurs, l'observation d'une corrélation entre les protons du groupement méthoxyle H-24 et le carbone C-4 indique une substitution en C-4 par le groupement méthoxy. Les corrélations observées entre H-5, C-4, C-6 et C-7 d'une part et entre H-20, C-18, C-19 et C-21 d'autre part indiquent la présence d'un acide carboxylique relié à une chaîne aliphatique constituée de 16 groupements méthylènes. L'absence de données spectrales RMN similaires dans la littérature laisse supposer que **SH12** pourrait être un **nouveau dérivé des sinularones**.

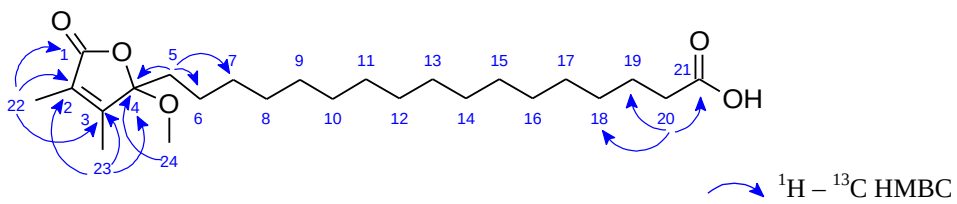


Figure 34 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **SH12**.

Tableau XLII : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH12** (CD_3OD).

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

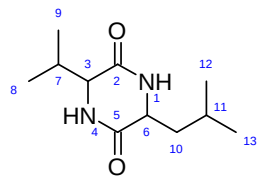
Position	δ_H (600 MHz)	δ_C, type (150 MHz)	HMBC (^{1}H-^{13}C)
1	-	173,8, C	-
2	-	128,4, =CH	-
3	-	158,4, =CH	-
4	-	111,9, C	-
5	1,96 (m) 1,73 (m)	36,6, CH_2	4, 6, 7
6	1,24 (m) 1,14 (m)	23,9, CH_2	-
7 – 18	[1,33-1,27] (m)	[31,0-30,6], CH_2	-
19	1,59 (qt, 7,5)	27,8, CH_2	-
20	2,16 (t, 7,5)	39,2, CH_2	18, 19, 21
21	-	182,9, CH_2	-
22 (CH_3-2)	1,83 (q, 1,1)	8,3, CH_3	1, 2, 3
23 (CH_3-3)	1,90 (q, 1,1)	10,9, CH_3	2, 3, 4
24 (OCH_3-4)	3,07 (s)	50,5, CH_3	4

❖ Elucidation structurale des métabolites SH13 et SH14

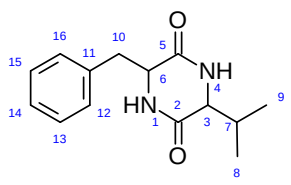
Les métabolites **SH13** et **SH14** sont des métabolites spécialisés appartenant à la famille des 2,5 dicétopipérazines. De structures connues, leur élucidation structurale a été réalisée par comparaison de leurs données RMN ^{1}H et ^{13}C mono- et bidimensionnelles (**Tableau XLIII** et

Tableau XLIV) avec celles de la littérature. Il s'agit du :

- ✓ cyclo(L-Val-L-Leu) **SH13**
- ✓ cyclo(L-Val-L-Phe) **SH14**



SH13



SH14

Les métabolites **SH13** et **SH14** ont été isolés sous forme de solides orangés. Ces métabolites, ainsi que plusieurs autres dicétopipérazines, ont été détectés pour la première fois dans les arômes de cacao. Le processus de torréfaction serait responsable de l'apparition de ces derniers [Pickenhagen *et al.*, 1975]. Le composé **SH14** a été identifié dans le cacao dès les années 70 [Pickenhagen *et al.*, 1975]. **SH13**, a été retrouvé, ainsi que **SH14**, dans les arômes de fèves de cacao grillées parmi une cohorte de 28 autres 2,5 dicétopipérazines [Stark et Hofmann, 2005]. Ce n'est que récemment que **SH13** et **SH14** ont, semble-t-il, été isolés de source « non-alimentaire ». En 2006, l'isolement de **SH13** et **SH14** à partir de microorganismes marins a été rapporté. **SH13** a été obtenu d'un actinomycète marin, *Streptomyces fungicidicus*, [Li *et al.*, 2007] et **SH14** d'une moisissure marine, *Paecilomyces marquandii* [Cabrera *et al.*, 2006].

Tableau XLIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du *cis*-cyclo(L-Val-L-Leu) (DMSO) [Stark et Hofmann, 2005] à ceux observés pour **SH13** (CD_3OD).

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

Position	δ_H		δ_C [a]	
	Littérature (400 MHz)	SH13 (600 MHz)	Littérature (100 MHz)	SH13 (150 MHz)
1 (NH)	8,13 (s)	8,54 (s)	-	-
2 (CO)	-	-	167,0	169,8, C
3	3,62 (m)	3,77 (dd, 4,4 ; 1,2)	59,7	61,2, CH
4 (NH)	8,01 (s)	-	-	-
5 (CO)	-	-	168,6	171,2, C
6	3,76 (m)	3,94 (m)	52,6	54,1, CH
7	2,11 (m)	2,22 (m)	31,6	33,4, CH
8	0,95 (d, 7,1)	1,05 (d, 7,0)	18,9	19,1, CH_3
9	0,85 (d, 7,1)	0,96 (d, 6,8)	17,5	17,7, CH_3
10	1,45 (m) 1,63 (m)	1,61 (m) 1,75 (m)	44,1	45,8, CH_2
11	1,85 (m)	1,86 (m)	23,7	25,1, CH
12	0,86 (d, 6,6)	0,95 (d, 6,5)	21,9	21,6, CH_3
13	0,88 (d, 6,6)	0,97 (d, 6,6)	23,2	23,4, CH_3

[a] δ_C déterminé à partir des spectres RMN HSQC et HMBC.

Tableau XLIV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^{1}H et ^{13}C du *cis*-cyclo(L-Val-L-Phe) (DMSO) [Stark et Hofmann, 2005] à ceux observés pour **SH14** (CD_3OD).

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

Position	δ_H		δ_C[a], type	
	Littérature (400 MHz)	SH14 (600 MHz)	Littérature (100 MHz)	SH14 (150 MHz)
1 (NH)	8,06 (s)	8,55 (s)	-	-
2 (CO)	-	-	167,4	169,4, C
3	3,53 (m)	3,64 (dd, 4,6 ; 1,8)	60,1	61,3, CH
4 (NH)	7,88 (s)	-	-	-
5 (CO)	-	-	167,3	169,4, C
6	4,20 (m)	4,31 (m, 7,6 ; 1,8)	55,9	57,4, CH
7	1,70 (m)	1,64 (m, 12,3 ; 4,6)	31,9	33,4, CH
8	0,67 (d, 6,9)	0,79 (d, 7,1)	19,1	19,3, CH_3
9	0,31 (d, 6,9)	0,42 (d, 6,9)	17,1	17,2, CH_3
10	2,88 (dd, 13,4 ; 5,0) 3,14 (dd, 13,4 ; 4,3)	3,03 (dd, 13,9 ; 4,9) 3,23 (dd, 13,7 ; 5,3)	38,7	40,0, CH_2
11	-	-	137,2	137,2, C
12/16	7,21 (m)	7,23 (m)	131,2	131,6, CH
13/15	7,21 (m)	7,28 (m)	128,8	129,7, CH
14	7,21 (m)	7,23 (m)	127,3	128,4, CH
15/13	7,21 (m)	-	128,8	129,7, CH
16/12	7,21 (m)	-	131,2	131,6, CH

[a] δ_C déterminé à partir des spectres RMN HSQC et HMBC.

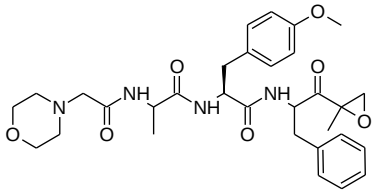
En résumé, l'étude chimique du spécimen 1 de *Scopalina hapalia* a conduit à l'isolement de 14 métabolites répartis en 5 classes chimiques différentes (PL, MAG, épidioxystérols, buténolides et dicétopipérazines). Parmi ces métabolites, quatre d'entre eux sont nouveaux (**SH1**, **SH4**, **SH12** et **SH13**).

III.2.3 Evaluation des activités biologiques des métabolites isolés

L'extrait brut du spécimen 1 de *Scopalina hapalia* (XML-263) a présenté 2 activités anti-âges significatives au cours du criblage biologique primaire. D'une part, cet extrait a présenté une activité anti-élastase aux concentrations testées de 1 µg/mL et 10 µg/mL avec une inhibition de l'activité élastase de 44 % et 48 %, respectivement. D'autre part, il a démontré une activité inhibitrice de la protéine Fyn kinase 3 concentrations testées (111,1 ; 11,1 et 1,1 µg/mL). Ainsi, un second criblage biologique a été réalisé afin d'évaluer les activités biologiques des métabolites isolés. En raison des masses très faibles obtenues lors du processus d'isolement, seuls les composés **SH3**, **SH6** et **SH7** ont pu être évalués pour leurs activités biologiques. Sur les 7 tests biologiques effectués, seul le test protéasome a donné une réponse mais non significative.

❖ Evaluation de l'activité inhibitrice du protéasome

Afin d'identifier des inhibiteurs du protéasome, les composés purifiés ont été évalués pour leur capacité à inhiber le site protéase de type chymotrypsine du protéasome de levure, en utilisant une méthode basée sur la fluorescence. En effet, si le site protéase-chymotrypsine du protéasome n'est pas inhibé, celui-ci va cliver le substrat utilisé dans le test (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) et libérer le fluorophore AMC. Un inhibiteur sélectif du protéasome, l'ONX-0914 (**29**), a été utilisé comme contrôle positif.



ONX-0914 (**29**)

Au cours de ce criblage, seul le composé **SH3** a présenté une activité inhibitrice du protéasome à la concentration la plus faible testée soit 0,3 µg/mL. Toutefois, ce résultat semble être davantage un artefact qu'une activité réelle. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XLV**.

Tableau XLV : Activité inhibitrice du protéasome des composés **SH3**, **SH6** et **SH7.**

Composé	33,0 µg/mL	3,3 µg/mL	0,3 µg/mL
SH3	-	-	+
SH6	-	-	-
SH7	-	-	-

III.3 Discussion

A ce jour, il existe très peu de données sur la composition chimique du genre *Scopalina*. Une étude de la littérature existante a permis de relever uniquement 6 métabolites (**S1** à **S6**) isolés d'*Ulosa ruetzleri* (devenue *Scopalina ruetzleri* après un transfert de genre) (**Tableau XXIII** p.7). Ces composés se répartissent dans 3 classes chimiques différentes :

- ✓ Les alkylglycérols avec le (17*Z*)-tétracosényl 1-glycérol éther (**S1**) et le batilol (**S2**).
- ✓ Les alcaloïdes avec le 4-hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxopentanone (**S3**) (indolique), l'ulosantoïne (**S4**) et le diméthyl *N*2-créatininylphosphate (**S5**) (dérivés de l'imidazole).
- ✓ Les phénols avec le dérivé du 4-hydroxybenzaldéhyde (**S6**).

Par ailleurs, un extrait méthanolique de *Scopalina ruetzleri* a montré une capacité à inhiber la prolifération cellulaire de T47D (lignée cancéreuse mammaire humaine) à la concentration de 30 µg/mL [Prado *et al.*, 2004]. Une fraction AcOEt de l'espèce *Scopalina ruetzleri*, très riche en acide gras insaturés, a également révélé un effet cytotoxique sur

différentes lignées tumorales du cerveau (CI_{50} < 20 µg/mL) ainsi qu'une activité antioxydante (C < 25 µg/mL) [Biegelmeyer *et al.*, 2015].

Concernant le criblage biologique mené dans le cadre de TASCMAR, sur différentes cibles moléculaires impliquées dans les processus de vieillissement, l'extrait brut du spécimen 1 de *Scopalina hapalia* (XML-263) a montré une activité sur l'élastase (vieillissement matriciel) et la Fyn kinase (nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer). Ce résultat semble donc indiquer que *Scopalina hapalia* produirait des métabolites avec des propriétés anti-élastase et anti-Fyn kinase. Au vu de ses activités biologiques, l'éponge *Scopalina hapalia* (ML-263) a été sélectionnée pour une étude exhaustive de sa composition chimique.

Préalablement au travail d'isolement, une déréplication des extraits bruts de trois spécimens de *Scopalina hapalia* collectés à différentes profondeurs a été effectuée par l'approche des réseaux moléculaires. Grâce à cette approche, une différence relative en termes de composition chimique a été remarquée entre les différents spécimens. En effet, le spécimen 1 (ML-263), collecté en eaux peu profondes (2-10 m), présente un cluster spécifique qui correspondrait aux sphingolipides. Quant au spécimen 3, collecté en eaux profondes (24 m), son extrait brut semble être plus riche en peptides comparativement aux 2 autres. Les peptides identifiés dans l'extrait brut du spécimen 3 ont été pour la plupart, selon la littérature, isolés de microorganismes. Ces peptides étant spécifiques à l'extrait brut du spécimen 3, ceci laisse supposer que les différences de profils chimiques observées pourraient être dues, en partie du moins, à des communautés microbiennes différentes. La déréplication a également révélée que ces extraits bruts étaient riches en lipides tels que des dérivés d'acides gras (AG), de phospholipides (PL) ainsi que de sphingosines. Selon la littérature, plusieurs d'entre eux se sont révélés être bioactifs. Parmi ces lipides bioactifs, nous pouvons citer par exemple la pénazitidine (**S11**), un analogue de la sphingosine isolé de l'éponge *Penares sollasi*, qui a présenté une activité inhibitrice significative de la PKC [Alvi *et al.*, 1994]. La détection d'un inhibiteur de protéine kinase est particulièrement intéressante dans la mesure où l'extrait brut XML-263 a montré une activité inhibitrice significative de la protéine kinase Fyn. Bien que moins bien représentés, des composés de type alcaloïdes, terpènes et phénols ont également été détectés. Pour terminer, l'approche par les réseaux moléculaires a permis la mise en lumière de plusieurs analogues structuraux correspondant à des familles chimiques déjà isolées du genre *Scopalina*, (alcaloïdes, lipides et phénols) et encore inconnues du genre (peptides, dicétopipérazines et terpènes).

Dans l'optique d'avoir accès à l'information la plus exhaustive possible sur la chimie de l'éponge, l'extrait brut bioactif du spécimen 1 a été fractionné. 14 composés (**SH1** à **SH14**) appartenant à 5 classes différentes ont été obtenus.

❖ <u>Classe 1</u> : les phospholipides (PL) et lysophospholipides (LysoPL)

4 composés (**SH1** à **SH4**) appartenant à cette classe ont été identifiés parmi lesquels 2 nouveautés **SH1** et **SH4** qui correspondent respectivement à un PL et un LysoPL :

- ✓ 1-*O*-Octadécyl-2-pentanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (**SH1**)
- ✓ 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (**SH2**)
- ✓ 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (**SH3**)
- ✓ 1-*O*-(3-Méthox-tétradécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (**SH4**)

Les PL constituent la principale classe de lipides polaires chez les éponges. Les PL, en association avec les AG, font partis des principaux constituants des membranes biologiques où ils assurent différentes fonctions. Le composé **SH1** semble être un nouveau PL caractérisé par un AG en position 2 à courte chaîne (C_5), l'acide pentanoïque. Les acides gras à chaîne courte (C_1 à C_6), appelés « short-chain fatty acid » en anglais, sont des métabolites issus de la fermentation microbienne. Les plus courants sont les acides acétique, propionique et butyrique. Ces AG à chaîne courte sont davantage caractérisés dans le microbiote intestinal des mammifères que chez les invertébrés marins [Yuille *et al.*, 2018; Louis *et al.*, 2014]. Les AG méthoxylés comme **SH4** sont quant à eux peu répandus dans la nature et sont essentiellement limités aux organismes primitifs tels que les cyanobactéries, bactéries et éponges [Bergé et Barnathan, 2005]. La présence d'AG méthoxylés a été mise en évidence dans les PL d'éponges (principalement PE et PS) appartenant à différents ordres [Kornprobst, 2005, p.640]. Dans une revue publiée en 2002 sur les lipides méthoxylés, il a été spécifié que les AG méthoxylés avec le groupement méthoxy en position α (C-2) n'avaient été identifiés que chez les éponges [Carballeira, 2002]. De plus, il apparaît que les AG α-méthoxylés à courtes chaînes (C_{14} – C_{18}) seraient le produit des bactéries associées aux éponges contrairement aux AG α-méthoxylés à longue chaîne (C_{19} – C_{28}). Les AG méthoxylés avec le groupement méthoxy en milieu de chaîne seraient quant à eux d'origine microbienne. Toutefois, il n'est pas fait mention d'AG méthoxylés avec le groupement méthoxy en position C-3, caractéristique du LysoPL **SH4** isolé dans notre étude. Une recherche dans la littérature semble indiquer que la présence d'acide 3-méthoxy-tétradécanoïque n'a été reportée que chez des souches bactériennes appartenant aux genres *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium* et *Rhodomicrobium* [Eckhardt *et al.*, 1979]. Au-delà de leur fonction biologique de soutien, de nombreuses études tendent à montrer que les lipides sont aussi des messagers secondaires impliqués dans différents processus biologiques.

Les LysoPL, dérivés des PL, jouent un rôle de second messager dans la transduction du signal intracellulaire [D'Arrigo et Servi, 2010; Torkhovskaya *et al.*, 2007]. Leur rôle de second messager implique les LysoPL dans différents processus physiologiques (ex : régulation du système nerveux, reproduction, développement vasculaire) et pathologiques (ex : inflammation, cancer, athérosclérose) [Birgbauer et Chun, 2006; Torkhovskaya *et al.*, 2007; Moolenaar, 2000]. L'étude réalisée par Sugiura et ses collègues suggère que les éthers lipides (PL et analogues de Lyso-PAF) seraient des métabolites physiologiquement importants pour certains invertébrés [Sugiura *et al.*, 1992]. Aujourd'hui, quelques études tendent à montrer que ces molécules (LysoPL et analogues de Lyso-PAF) joueraient un rôle de médiateurs dans la communication cellulaire chez les invertébrés marins [Ivanisevic *et al.*, 2011; Nishikawa *et al.*, 2015]. Retrouvés dans la fraction des lipides neutres polaires de différents invertébrés marins (mollusques, concombres, étoiles de mer, etc), le rôle physiologique des LysoPL chez ces organismes reste encore très peu élucidé. Quelques

LysoPL ont été isolés d'éponges appartenant à des genres différents *Spirastrella*, *Stellatta*, *Homoaxinella* et *Oscarella* mais les publications sur le sujet sont rares [Alam *et al.*, 2001; Ivanisevic *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015; Mansoor *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003]. Toutefois, les études menées à ce jour ont montré que ces lipides présentaient des activités biologiques d'intérêt : antifouling [Butler *et al.*, 1996], antimicrobienne [Lin *et al.*, 2015], cytotoxique contre différentes lignées tumorales humaines [Alam *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003] et hypolipémiante [Shin *et al.*, 1999]. En effet, Shin et ses collaborateurs ont reporté une activité inhibitrice de la biosynthèse du cholestérol de façon spécifique par des analogues de LysoPC ainsi que de Lyso-PAF en agissant sur la dernière étape de la voie de biosynthèse du cholestérol.

Quelques activités biologiques ont été recensées dans la littérature pour les composés **SH2** et **SH3**. Le LysoPC 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (**SH2**), isolé de l'éponge *Suberites domuncula*, a démontré une activité antibactérienne significative [Müller *et al.*, 2004]. Par ailleurs, les auteurs ont montré que la synthèse de **SH2**, ainsi que du LysoPAF analogue de **SH3**, était régulée à la hausse par l'éponge lorsque celle-ci est exposée à du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est en effet une endotoxine présente dans la membrane externe des bactéries gram-négatives. Ainsi, l'augmentation de la synthèse de ces lipides bioactifs, **SH2** et Lyso-PAF, à la suite d'une exposition au LPS serait le reflet d'une réponse immunitaire adaptative. De plus, en 2005, le composé **SH2** a été synthétisé dans le cadre d'une étude évaluant l'activité anticancéreuse de différents éthers lipides bioactifs, libérés directement sur site par la Phospholipase A_2 [Andresen *et al.*, 2005]. Les auteurs ont montré que **SH2** était cytotoxique sur les lignées cellulaires HT-29 (carcinome colorectal), KATO III (carcinome gastrique humain) et Caco-2 (adénocarcinome colorectal) avec une CI_{50} comprise entre 30 et 70 µM en fonction du modèle cellulaire de cancer utilisé. Le composé **SH3** a été identifié dans une fraction lipidique de concombre de mer, riche en LysoPC et analogues du Lyso-PAF (dont **SH2**) [Nishikawa *et al.*, 2015]. L'évaluation de l'activité biologique de cette fraction a démontré des activités antioxydante et cytoprotective contre le stress oxydant. Il est intéressant de souligner que lorsque certains LysoPC et Lyso-PAF (dont **SH2**) issus du commerce sont testés seuls, aucune activité n'est observée. Ceci semble indiquer que l'activité cytoprotective serait due à une action synergique entre LysoPC et Lyso-PAF [Nishikawa *et al.*, 2015]. Une revue de la littérature révèle que **SH3** n'a encore jamais été isolé d'éponge. Dans le cadre du projet TASCMAR, seul **SH3** a présenté une activité biologique (anti-protéasome) bien que non significative. Chez les mammifères, il a été montré que **SH3** était une molécule de signalisation très importante dans les processus d'inflammation [Sevastou *et al.*, 2013]. En effet, **SH3** agit sur différents cibles moléculaires notamment des protéines kinases (p-38, PKC, PI3 kinase).

❖ **<u>Classe 2</u> : les alkylglycérols (AKG)**

4 composés connus appartenant à cette classe ont été isolés :

- ✓ 1-*O*-Hexadécyl-*sn*-glycérol (**SH5**)
- ✓ 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycérol (**SH6**)
- ✓ 1-Nonadécyloxy-2,3-propanediol (**SH7**)

- ✓ 3-Icosyloxy-1,2-propanediol (**SH8**)

Les alkylglycérols (1-*O*-alkyl-*sn*-glycérols ou AKG) sont des éthers lipides retrouvés naturellement dans une grande variété d'organismes tels que les microorganismes [Grossi *et al.*, 2015], les poissons [Hallgren et Larsson, 1962a] et les invertébrés marins à l'instar des éponges et coraux [Watschinger et Werner, 2013; Smith et Djerassi, 1987]. Ils sont également retrouvés chez les mammifères notamment dans les laits de vache et humain, dans les organes hématopoïétiques (moelle osseuse et rate) ainsi que dans les érythrocytes [Hallgren et Larsson, 1962b]. Les principaux AKG retrouvés dans la nature sont les alcools chimylique (C16:0) (**SH5**), batylique (C18:0) (**SH6**) et sélachylique (chaîne alkyle avec une insaturation C18:1) qui représentent à eux trois 70 % et 85 % des glycérols éthers de la moelle osseuse et de la rate [Hallgren et Larsson, 1962b]. **SH5** et **SH6** sont généralement isolés ensemble. Le batilol (**SH6**), par exemple, a été isolé d'un invertébré marin pour la première fois en 1942 [Kind et Bergmann, 1942]. Par la suite, il a été retrouvé dans différentes éponges appartenant aux genres *Aaptos* [Do et Erickson, 1983], *Callyspongia* [Prakasa Rao *et al.*, 2010], *Desmapsamma* [Quijano *et al.*, 1994], *Petrosia* [Huong *et al.*, 2007], *Scopalina* [Cardellina *et al.*, 1983] et *Tedania* [Schmidtz *et al.*, 1983]. Le 1-nonadécyloxy-2,3-propanediol (**SH7**) a été isolé pour la première fois sous forme libre en 1994 à partir d'éponge [Quijano *et al.*, 1994]. Bien que souvent isolés, les AKG d'éponges restent néanmoins très peu étudiés pour leurs activités biologiques. Toutefois, certaines activités biologiques associées aux composés **SH6** et **SH7**, isolés d'invertébrés marins, ont pu être identifiées. En 2015, pour la première fois, une activité inhibitrice de la formation de biofilm a été démontrée pour **SH6**, isolé d'un spécimen de corail appartenant au genre *Eunicea* [Díaz *et al.*, 2015]. Cette activité antifouling a été couplée à une faible activité antibactérienne sur les différentes souches testées. **SH7** a été isolé d'un corail (*Dendronephthya gigantea*) au cours d'un fractionnement bio-guidé pour la recherche d'anticancéreux [Han *et al.*, 2005]. Ce composé a démontré une activité cytotoxique modérée sur différentes lignées cancéreuses humaines [Han *et al.*, 2005]. Contrairement aux AKG isolés d'éponges, les AKG dérivés d'huiles de foie de requins sont davantage étudiés. Aussi, il est intéressant de noter que les AKG prédominants dans ces huiles sont les même que ceux retrouvés chez les éponges, à savoir les alcools : batylique (**SH6**), sélachylique (C18:1), chimylique (**SH5**) ainsi que de l'alcool monoinsaturé correspondant (C16:1).

L'intérêt thérapeutique des AKG est étroitement lié à l'utilisation de l'huile de foie de requin dans la médecine traditionnelle scandinave mais aussi japonaise [Deniau *et al.*, 2010]. Concentrée en AKG, l'huile de foie de requin était utilisée pour soigner les plaies, traiter les problèmes respiratoires et digestifs ainsi que les lymphadénopathies* [Iannitti et Palmieri, 2010]. De plus, une utilisation en tant que traitement adjuvant de plusieurs types de cancers a également été rapportée [Pugliese *et al.*, 1998]. Dès 1996, les AKG de l'huile de foie de requin, notamment **SH5** et **SH6**, étaient déjà connus pour leurs activités bactériostatique, fongistatique, anti-inflammatoire et hématopoïétique [Bordier *et al.*, 1996]. En 2010, l'efficacité thérapeutique des AKG, incluant **SH5** et **SH6**, dans le cancer, la radiothérapie et la stimulation de l'immunité a été documentée [Deniau *et al.*, 2010; Iannitti et Palmieri, 2010]. Une étude réalisée en 2014 par Qian et ses collaborateurs a montré que **SH5** et **SH6** avaient

un effet immunomodulateur en stimulant la prolifération ainsi que la maturation de lymphocytes murins *in vitro* [Qian *et al.*, 2014]. Bien qu'isolé depuis les années 40, les études portant sur le batilol (**SH6**) mais aussi sur les AKG en général se sont multipliées ces dernières années démontrant un intérêt croissant pour ces lipides bioactifs. En effet, les éthers lipides constituent une classe de lipides encore très peu étudiée [Watschinger et Werner, 2013] mais qui présente toutefois un réel potentiel. A ce propos, une étude datant de 2012 a montré l'effet antiprolifératif sélectif des niphaténones, glycérols éthers isolés de l'éponge *Niphates digitalis*, sur des cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP exprimant le récepteur aux androgènes [Meimetis *et al.*, 2012]. Cette étude a permis d'identifier le niphaténone B comme étant un nouvel antagoniste du récepteur aux androgènes et un nouveau pharmacophore naturel potentiel pour le développement de nouveaux candidat-médicaments pour le traitement des cancers prostatiques résistants à la castration.

❖ **<u>Classe 3</u> : les épidioxystérols**

Deux métabolites (**SH9** et **SH10**) de structures connues ont été identifiés dans cette classe, il s'agit du :

- ✓ 5*α*,8*α*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol (**SH9**)
- ✓ 5*α*,8*α*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol (**SH10**)

Les stérols d'éponges sont des métabolites particulièrement bien étudiés car ce sont des marqueurs chimiotaxonomiques très utiles dans la classification des éponges [Gilles Barnathan *et al.*, 2004]. Composants importants des membranes cellulaires, la distribution ainsi que la diversité structurale des stérols sont très variables d'une espèce d'éponge à l'autre. Généralement, la composition en stérols des éponges est faite d'un mélange de stérols retrouvés chez les plantes (stigmastérol et sitostérol), les microorganismes (ergostérol) et les animaux (cholestérol) ainsi que de stérols aux structures inhabituelles et/ou originales [Aiello *et al.*, 1999; Djerassi et Lam, 1991]. La présence de cholestérol dans l'extrait de *Scopalina hapalia* (XML-263) a été détectée par CCM et par RMN ^{1}H dans la fraction F18 obtenue par fractionnement en phase inverse (**Figure 26** p. 113). Les 2 métabolites isolés dans notre étude sont des dérivés oxygénés du stigmastérol appartenant à la famille des 5*α*,8*α*-épidioxystérols. L'occurrence des 5*α*,8*α*-épidioxystérols chez les invertébrés marins, notamment les éponges, est souvent relatée [Gauvin *et al.*, 2000; Gunatilaka *et al.*, 1981]. Contrairement à la grande diversité structurale rencontrée en milieu marin, seuls les 5*α*,8*α*-épidioxystérols avec un squelette ergostérol sont retrouvés en milieu terrestre (champignons et lichens) [Yasukawa *et al.*, 1996; Gunatilaka *et al.*, 1981]. A ce jour, l'origine biosynthétique de ces métabolites fait encore débat, à savoir : est-ce des produits issus naturellement d'une voie de biosynthèse endogène ou d'une dégradation (photo-oxydation). Peu de littérature existe sur leurs activités biologiques, quelques publications rapportent toutefois des activités cytotoxiques/anticancéreuses [Ioannou *et al.*, 2009; Gauvin *et al.*, 2000; Yasukawa *et al.*, 1996], antivirale (HTLV-I) [Gauvin *et al.*, 2000] et antifouling [Li *et al.*, 2013; Sera *et al.*, 1999].

SH9, isolé de *Lendenfeldia chondrodes* avec 3 épidioxystérols supplémentaires, a démontré une activité antifouling modérée [Sera *et al.*, 1999]. **SH10** a été isolé de différents organismes et testé pour des activités antifouling et cytotoxique mais aucune activité significative n'a été reportée [Li *et al.*, 2013; Ioannou *et al.*, 2009]. Toutefois, **SH10** a été détecté dans un mélange de 5*α*,8*α*-épidioxystérols, isolé de l'éponge *Luffariella cf. variabilis*, [Gauvin *et al.*, 2000]. Ce mélange a présenté des activités antivirale (HTLV-I) ainsi que cytotoxique sur une lignée cellulaire de cancer du sein humain (MCF7).

❖ **<u>Classe 4</u> : les buténolides**

Deux métabolites (**SH11** et **SH12**) de structures vraisemblablement nouvelles ont été identifiés comme appartenant à la classe des buténolides. La similarité structurale des composés **SH11** et **SH12** avec les sinularones A-I, isolés du corail *Sinularia* sp., amène à penser à une origine microbienne de ces composés [Shi *et al.*, 2012].

Les buténolides sont des métabolites spécialisés caractérisés par une lactone sur un hétérocycle à 4 atomes de carbones. Contrairement à certaines classes chimiques de métabolites spécialisés, il apparaît que les buténolides ne sont rencontrés qu'occasionnellement dans les organismes marins : actinomycètes [Mukku *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2010], champignons [Zhang *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2019], microorganismes associés [Liu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018], plantes [Yadav *et al.*, 2007], coraux [Guo *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2012] et éponges [Cambie *et al.*, 1988; Tinto et Layne, 2006; Van Kiem *et al.*, 2013]. A ce jour, il n'existe que 50 composés décrits et référencés dans la base de données de MarinLit (16/10/2019). Certains de ces composés ont démontré des activités biologiques telles que l'inhibition de l'α-glucosidase et de NF-κB, les activités antioxydante, anti-inflammatoire, antiproliférative et antifouling. Les études actuelles semblent indiquer que les buténolides α,β-insaturés pourraient être des composés antifouling prometteurs grâce à leur cycle 2-furanone ainsi qu'à leur caractère lipophile [Xu *et al.*, 2010]. Les buténolides de type 2,3-diméthyle sont, quant à eux, inhabituels et le premier cas rapporté d'isolement de ce type de métabolites à partir d'un organisme marin date de 2007 [Lee *et al.*, 2007]. Une évaluation de l'activité biologique des sinularones a montré que certains présentaient une activité antifouling significative (CE_{50} inférieure à la valeur de CE_{50} de référence établie soit < 25 µg/mL). La recherche sur MarinLit montre que seuls 3 buténolides ont été isolés directement d'éponge et aucun ne présente une structure de type α,β-insaturé 2,3-diméthyl-γ-lactone, à l'instar des métabolites **SH11** et **SH12** isolés ici.

❖ **<u>Classe 5</u> : les dicétopipérazines**

Deux composés (**SH13** et **SH14**) connus appartenant à cette classe chimique ont été isolés :

- ✓ Cyclo(L-Leu-L-Val) (**SH13**)
- ✓ Cyclo(Phe-Val) (**SH14**)

Les dicétopipérazines sont des dipeptides cycliques constituant une famille importante de métabolites spécialisés structurellement très diversifiés et aux propriétés pharmacologiques intéressantes (neuroprotective, anticancéreuse, antimicrobienne, etc) [Borthwick, 2012; Martins et Carvalho, 2007; Prakash *et al.*, 2002]. Très peu étudiée comparativement à d'autres familles chimiques, les dicétopipérazines font l'objet d'un regain d'intérêt pour la recherche de nouveaux candidat-médicaments. Quelques médicaments actuellement sur le marché ou en essais cliniques dérivent de ces métabolites, à l'instar de l'aplaviroc (anti-VIH), du retosiban et de l'epelsiban (antagonistes de l'ocytocine) [Borthwick, 2012]. Les dicétopipérazines sont essentiellement produits par les microorganismes bien qu'ils aient été isolés de sources diverses incluant les organismes marins [Huang *et al.*, 2014]. Les données disponibles à ce jour montrent que très peu de dicétopipérazines ont été isolés directement d'éponges. Les éponges appartenant aux genres *Callyspongia*, *Dysidea*, *Tedania*, *Calyx*, *Stellata* et *Axinella* en ont été les principales sources [Chen *et al.*, 2014, 2012; Ovenden *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009; Flowers *et al.*, 1998; Adamczeski *et al.*, 1995; Dillman et Cardellina, 1991; Schmidtz *et al.*, 1983; Kazlauskas *et al.*, 1978]. La recherche dans les bases de données MarinLit et DNP semblent indiquer que les composés **SH13** et **SH14** soient isolés pour la première fois d'éponges.

En terme d'activité biologique, le composé **SH13**, isolé de l'actinomycète marin *Streptomyces fungicidicus*, a démontré une activité antifouling contre la bernacle *Balanus amphitrite* avec des concentrations effective (CE_{50}) de 0,27 mM et léthale (LC_{50}) de 0,68 mM ainsi qu'un ratio thérapeutique (LC_{50}/CE_{50}) de 2,5 [Li *et al.*, 2007]. Cette étude montre également que l'effet antifouling de **SH13** est associé à un effet cytotoxique. Le composé **SH14**, isolé du champignon marin *Paecilomyces marquandii*, associé au cyclo(L-Phe-L-Leu) serait responsable de l'activité antibactérienne observée avec l'extrait [Cabrera *et al.*, 2006]. Une étude réalisée en 2010 a montré que **SH14** avait un effet stimulant sur la production de métabolites antibactériens d'une souche de *Pseudoalteromonas* sp., isolée d'une éponge et mise en co-culture avec *Staphylococcus aureus* [Guo *et al.*, 2011]. Les résultats de Guo et ses collaborateurs suggèrent un rôle de **SH14** dans la signalisation du quorum-sensing. En 2016, **SH13** et **SH14** ont de nouveau été ré-isolés, d'une souche terrestre de *Streptomyces rutgersensis*, parmi une cohorte de plusieurs dicétopipérazines [Li *et al.*, 2016]. Leur activité antibactérienne a été évaluée sur différentes souches, mais aucune activité n'a été observée.

III.4 Conclusion

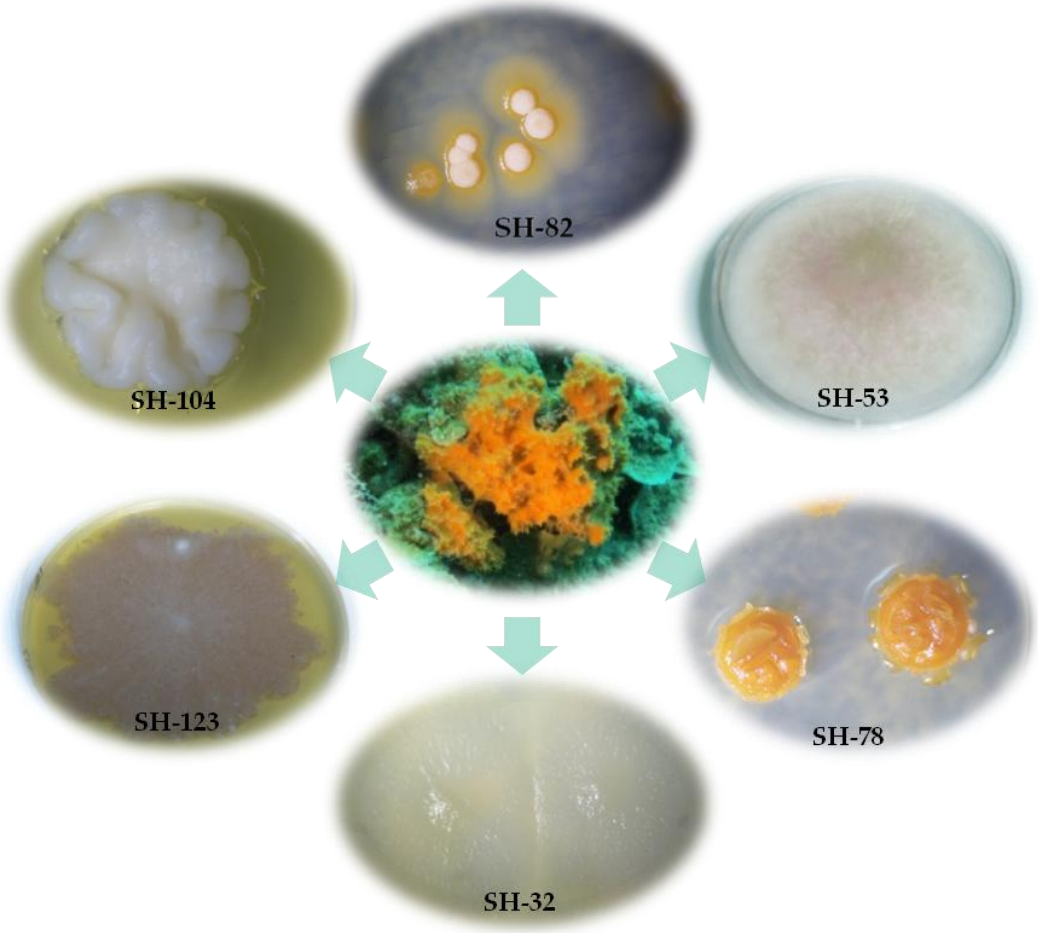
En conclusion, 14 métabolites dont 4 nouveaux, appartenant à différentes familles chimiques (PL/LysoPL, AKG, épidioxystérols, buténolides et dicétopipérazines), ont été isolés du spécimen 1 de *Scopalina hapalia*. Ces résultats confortent ceux obtenus par la création du réseau moléculaire. Néanmoins, plusieurs nœuds du réseau moléculaire restent encore aujourd'hui non annotés. Ceci laisse à penser qu'il existerait chez *S. hapalia* une originalité structurale plus vaste que ce qui a pu être mise en évidence au cours du processus d'isolement.

Par ailleurs, les faibles masses obtenues pour les métabolites purifiés n'ont pas permis de réaliser les tests d'activités biologiques pour l'ensemble des composés isolés. Seuls les composés **SH3**, **SH6** et **SH7** ont été évalués, et parmi eux, seul **SH3** a présenté une activité d'inhibition du protéasome mais non significative.

Toutefois, l'étude bibliographique menée sur les composés connus isolés a montré que *Scopalina hapalia* renferme :

- Des métabolites lipidiques bioactifs (LysoPL et AKG). Les AKG (dont **SH5** et **SH6**) sont des composés hautement bioactifs et caractéristiques de l'huile de foie de requin, laquelle est utilisée pour différentes applications thérapeutiques. Par ailleurs, les AKG sont connus comme étant des inhibiteurs de la protéine kinase C [Magnusson et Haraldsson, 2011]. Les LysoPL (dont **SH3**) sont, quant à eux, des lipides bioactifs influençant divers processus biologiques, notamment les processus d'inflammation. Tout ceci laisse à penser que les activités biologiques démontrées par l'extrait brut de *Scopalina hapalia*, à savoir l'inhibition de l'activité de la Fyn kinase ainsi que de l'élastase, seraient dues à la présence de métabolites lipidiques types LysoPL et AKG, dans cette éponge.
- Plusieurs composés aux propriétés antifouling (**SH3**, **SH6**, **SH9** et **SH13**), cytotoxique (**SH2**, **SH3**, **SH7** et **SH14**) et antimicrobienne (**SH2**, **SH3** et **SH14**). Ces composés pourraient contribuer à expliquer, d'une part, les activités biologiques cytotoxique et microbicide observées pour l'extrait brut de *Scopalina hapalia* dans le cadre de l'étude d'Herber et ses collaborateurs (2018). Et d'autre part, d'un point de vue écologique, cela pourrait également justifier l'observation de Engel et Pawlik (2005) à savoir que dans un milieu hautement compétitifs, les éponges appartenant au genre *Scopalina* (éponge encroûtante) ne sont que très rarement recouverts par d'autres spécimens d'éponges.

Chapitre IV
Etude des microorganismes associés à *Scopalina hapalia*



IV.1 Etat de l'art

Les éponges marines sont connues pour être un réservoir extraordinaire de métabolites spécialisés bioactifs d'intérêt biotechnologique aux propriétés pharmacologiques variées : antitumorale, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antivirale ou plus généralement cytotoxique . Ce sont des organismes filtreurs qui peuvent pomper plusieurs milliers de litres d'eau de mer par jour (~ 24 m^3/Kg d'éponge/jour) [Hentschel *et al.*, 2006; Wang, 2006]. Pour se nourrir, les éponges vont capter dans l'eau circulante les particules organiques (débris organiques, algues unicellulaires, microorganismes) et inorganiques en suspension dont elles ont besoin. Cette eau de mer contient typiquement pour un millilitre : 10^7 virus, 10^6 bactéries et 10^3 cellules fongiques [Kubanek *et al.*, 2003]. Bien que les microorganismes fassent partie du régime alimentaire des éponges, une partie non négligeable est retrouvée à l'intérieur de ces dernières, dans le mésohyle*. Ainsi, les éponges sont aussi connues pour être des « fermenteurs microbiens » car elles cohabitent avec une communauté microbienne hautement complexe composée de bactéries (photosynthétiques, hétérotrophes et probablement autotrophes), de champignons filamenteux ainsi que de virus [Hentschel *et al.*, 2006]. Cette biomasse peut représenter jusqu'à 40 % de la biomasse totale de l'éponge, en fonction de l'espèce considérée, avec une densité de 10^9 cellules microbiennes/mL de tissu d'éponge [Taylor *et al.*, 2007]. D'après certains auteurs, cette charge bactérienne serait proportionnellement corrélée à l'état d'irrigation de l'éponge [Hentschel *et al.*, 2003]. Ainsi, les éponges sont classées en deux catégories en fonction de l'abondance en microorganismes : (1) les « bacteriosponges » ou « High Microbial Abundance sponge », HMA, qui contiennent 10^8 – 10^{10} cellules/g d'éponge et (2) les « Low Microbial Abundance sponge », LMA, qui renferment entre 10^5 – 10^6 cellules/g d'éponge [Gloeckner *et al.*, 2014]. Les travaux actuels tendent à montrer une origine microbienne de certains produits naturels marins isolés à ce jour à partir des macroorganismes marins. Les observations en faveur de cette « hypothèse du symbionte » sont de trois ordres [Proksch *et al.*, 2002] :

- ✓ Les ressemblances structurales rencontrées entre métabolites spécialisés issus de macroorganismes et de microorganismes. C'est le cas par exemple entre l'ecteinascidine-743, isolée du tunicier *E. turbinata*, et de la safracine B, isolée de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.
- ✓ L'isolement direct de métabolites précédemment isolés d'éponges à partir de microorganismes. C'est le cas par exemple de la manzamine A isolée pour la première fois d'une éponge marine appartenant au genre *Haliclona*. Cette molécule a été ultérieurement obtenue à partir d'une souche de *Micromonospora* isolée d'une éponge appartenant au genre *Acanthostrongylophora* [Waters *et al.*, 2014].
- ✓ La réalisation des premières études expérimentales, par l'équipe de Faulkner dès 1993, visant à mettre en évidence l'origine bactérienne de certains métabolites isolés des éponges *Dysidea herbacea* et *Theonella swinhoei* [Unson et Faulkner, 1993; Bewley *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998]. *Theonella swinhoei*, par exemple, est connue pour fournir des métabolites bioactifs et abriter des microorganismes symbiontes. A partir de cette éponge, Faulkner et ses collaborateurs ont effectué un fractionnement cellulaire qui a abouti à l'obtention de 4 types cellulaires : cellules eucaryotes

d'éponge, bactéries unicellulaires et filamenteuses hétérotrophes ainsi que des cyanobactéries unicellulaires. L'analyse chimique de ces 4 types cellulaires a montré que le swinholide A ainsi que le théopalauamide, métabolites spécialisés majeurs de *T. swinhoei*, sont produits respectivement par les bactéries unicellulaires et filamenteuses associées à l'éponge [Bewley *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998].

Cette implication des microorganismes associés dans la biosynthèse des métabolites spécialisés bioactifs a donné lieu à une multitude de travaux sur le sujet. Notamment en 2008, Simmons et ses collègues ont publié un article faisant une synthèse des approches traditionnelles et innovantes utilisées pour l'élucidation de l'origine biosynthétique des métabolites isolés à partir des invertébrés marins, connus pour abriter une communauté microbienne [Simmons *et al.*, 2008].

Après plusieurs années d'exploration et d'exploitation des produits naturels avec succès, des périodes de ralentissement ont été observées ponctuellement en raison de difficultés rencontrées dans la découverte de nouvelles structures. Toutefois, l'environnement marin est encore aujourd'hui un milieu pratiquement inexploité qui ouvre de nouvelles perspectives de découverte de nouveaux métabolites originaux et bioactifs [Newman et Cragg, 2016b; Gerwick et Moore, 2012]. Il a notamment été montré que le milieu marin est un réservoir prolifique pour la recherche de nouveaux microorganismes tels que les actinobactéries [Fenical et Jensen, 2006; Bull et Stach, 2007]. Par conséquent, ces nouveaux microorganismes offrent l'opportunité de découvrir de nouveaux métabolites [Fiedler *et al.*, 2005]. Les microorganismes associés aux éponges représentent une niche écologique particulièrement intéressante et encore sous-exploitée pour la découverte de molécules d'intérêt [Thomas *et al.*, 2010].

IV.1.1 Relations éponges - microorganismes marins

L'étude de la diversité des bactéries et archées associées aux éponges montre l'existence d'une communauté symbiotique stable et spécifique [Hentschel *et al.*, 2002]. Plus récemment, une étude a également montré qu'il en allait de même pour les champignons [Nguyen et Thomas, 2018]. Toutefois, la communauté fongique présenterait une plus grande variabilité que la communauté bactérienne [Nguyen et Thomas, 2018].

Actuellement, l'étude des associations entre éponge et microorganismes, communément appelée symbiose au sens large du terme, est devenue un champ de recherche émergeant et très vaste. En effet, cette discipline vise à étudier l'évolution, l'écologie ainsi que le potentiel biotechnologique de ces interactions éponges - microorganismes en essayant de répondre à des questions sur le rôle écologique des microorganismes dans l'hôte et sur l'influence de l'organisme hôte sur la structuration des communautés microbiennes. Une revue publiée en 2007 par Taylor et ses collaborateurs traite de la microbiologie des éponges de façon détaillée [Taylor *et al.*, 2007].

Brièvement, diverses études ont montré que les éponges forment une niche écologique propice au développement des microorganismes, comparativement à l'eau de mer

environnante pauvre en nutriments. Organismes sessiles filtrants, les éponges jouent un rôle crucial dans la communauté benthique par le recyclage des nutriments tels que le carbone ou encore l'azote [Bell, 2008]. Ainsi, le métabolisme de l'hôte devient une source d'azote (excrétion d'ammoniac), de glucides et d'acides aminés (processus de phagocytose) pour les différents symbiontes [Hentschel *et al.*, 2006]. Cette communauté microbienne confère en contrepartie à l'hôte une grande capacité métabolique, telle que : la fixation du carbone photosynthétique (cyanobactéries), la nitrification (bactéries nitrifiantes) ou encore la production de métabolites spécialisés. En 2010, Kamke et ses collaborateurs ont montré que la majorité des microorganismes symbiontes étaient métaboliquement actifs [Kamke *et al.*, 2010]. Par la suite, Diez-vives et ses collaborateurs, en 2017, se sont intéressés à une classe de protéines, les Eukaryotic-Like Proteins (ELP), exprimées chez les procaryotes et qui jouerait un rôle dans les interactions hôte-microbiome [Diez-Vives *et al.*, 2017]. Les conclusions de leur étude montrent que les gènes codant les ELP retrouvés chez les symbiontes d'éponges pourraient participer aux interactions moléculaires hôte-symbiontes. Ces résultats contribuent à conforter certaines des hypothèses qui ont été émises concernant les fonctions écologiques de cette symbiose éponge-microorganismes. Il s'agit notamment de l'échange de métabolites primaires et de la participation à la production de métabolites spécialisés bioactifs à des fins de défenses (contre les prédateurs et autres épibiontes) ou de compétition pour l'espace [Webster et Taylor, 2012]. Par ailleurs, dans cet environnement riche et diversifié, il ne serait pas étonnant que des interactions entre microorganismes se mettent en place et que des substances allélochimiques soient produites pour favoriser leur survie [Esteves *et al.*, 2017]. La compétition entre espèces adjacentes dans l'environnement de l'éponge pourrait également être favorable à des transferts horizontaux de gènes impliqués dans la production de métabolites spécialisés [Kim *et al.*, 2005a; Bose *et al.*, 2015].

Plusieurs publications exhaustives sur les produits naturels marins d'origine microbienne jalonnent la littérature de ces 20 dernières années [Pietra, 1997; Kelecom, 2002; Piel, 2009; Rateb et Ebel, 2011; Saleem et Nazir, 2015; Kobayashi et Ishibashi, 1993]. De ces différentes revues, il en ressort que les métabolites produits par les microorganismes marins sont généralement assez différents de ceux produits par leurs hôtes mais aussi par leurs homologues terrestres. En 2018, Xie et ses collaborateurs démontraient par une approche de métabolomique comparative qu'il existait des différences significatives entre les actinomycètes marins et terrestres [Xie *et al.*, 2018]. Il ressort également que parmi les métabolites spécialisés produits, les composés azotés (amides, cyclopeptides/peptides, alcaloïdes indoliques) et les polycétides sont prédominants au sein de leurs productions, tandis que les terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, caroténoïdes) sont plus rares [Kelecom, 2002; Rateb et Ebel, 2011].

Après plusieurs années de recherche intensive orientée vers les macroorganismes marins pour la découverte de nouvelles molécules originales et bioactives, l'attention des chercheurs se porte de plus en plus vers les microorganismes marins. Cette tendance s'observe par la hausse des nouveaux produits naturels marins d'origine microbienne découverts sur la période de 2012 à 2017 [Carroll *et al.*, 2019]. En 2017, ces produits représentaient 57 % du nombre total des nouveaux produits naturels marins. Cet intérêt pour

les microorganismes marins peut trouver son origine dans le fait qu'un grand nombre d'antibiotiques et autres métabolites d'intérêt (antitumoraux, inhibiteurs d'enzymes, etc.) ont été isolés d'actinomycètes et de champignons terrestres [Bérdy, 2005]. Dans une revue parue en 2012, Subramani et Aalbersberg indiquaient qu'il y avait plus de 22 000 métabolites spécialisés microbiens connus, dont 70 % étaient produits par les actinomycètes, 20 % par les champignons, 7 % par différentes espèces de *Bacillus* et 1-2 % produits par d'autres genres bactériens [Subramani et Aalbersberg, 2012]. Ces chiffres soulignent ainsi l'importance des actinomycètes et des champignons dans la production de métabolites spécialisés d'intérêt.

Les communautés microbiennes associées aux éponges sont présentées ci-après. Cette présentation portant sur leur diversité et leur production de métabolites spécialisés inclut dans un premier temps, la communauté bactérienne avec un focus sur les actinomycètes et les *Bacillus* ; et dans un second temps, la communauté fongique.

IV.1.1.1 Bacteria

Les études relatives à la communauté bactérienne associée aux éponges montrent que celle-ci est très diversifiée. Grace aux analyses moléculaires, plusieurs phyla ont été identifiés et se répartissent comme suit : 17 phyla bactériens décrits, 12 phyla bactériens au statut de « candidat » et 2 phyla majeurs appartenant au domaine du vivant des archées [Simister *et al.*, 2012]. Au total, plus de 25 phyla bactériens associés aux éponges ont été identifiés à ce jour [Schmitt *et al.*, 2012; Webster et Taylor, 2012; Simister *et al.*, 2012]. Les phyla dominants, en termes d'abondance des séquences retrouvées dans les bases de données, sont les : *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* et *Cyanobacteria*. Par ailleurs, un nouveau taxa spécifique aux éponges a été identifié : les *Poribacteria* [Fieseler *et al.*, 2004]. Les phyla découverts récemment en association avec les éponges, tels que les *Tenericutes* et les *Gemmatimonadetes*, sont quant eux présents avec de très faibles abondances [Webster et Taylor, 2012]. La **Figure 35** présente les phyla qui ont été décrits chez les éponges et pour lesquels des séquences ont été déposées dans les bases de données publiques. Ainsi, le graphique a été construit grâce aux 11 284 séquences d'ARNr 16S référencées dans la base de données GenBank en septembre 2010. Les phyla ayant moins de 10 séquences référencées n'ont pas été inclus dans le graphique. Il s'agit des phyla suivants : *Chlamydiae*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Epsilonproteobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, OP11, *Tenericutes*, WS3.

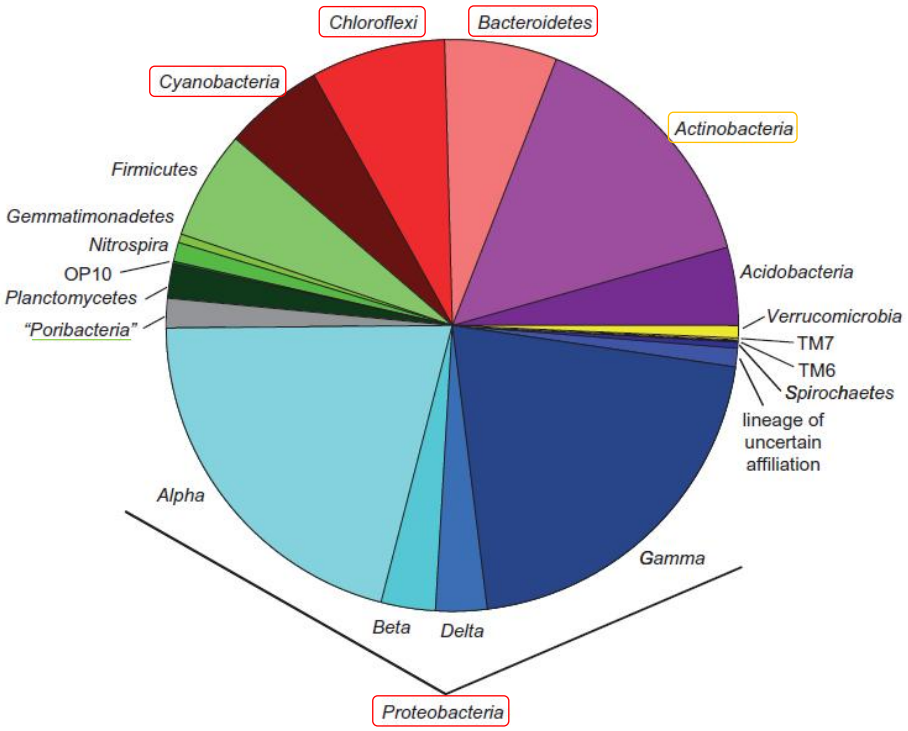


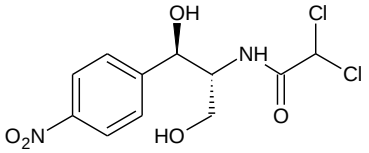
Figure 35: Distribution phylogénétique des bactéries associées aux éponges [Webster et Taylor, 2012].

❖ Actinobacteria

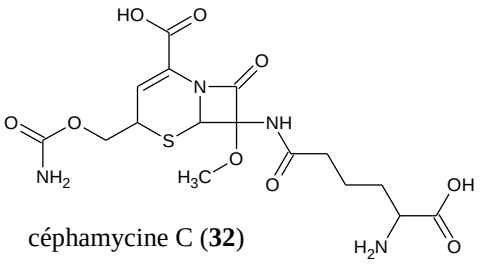
Dans le phylum des Actinobacteria, nous nous intéresserons à la classe des Actinobacteria (actinobactéries) plus particulièrement aux membres de l'ordre des Actinomycetales qui sont les plus étudiés [Bull *et al.*, 2005].

Les actinobactéries sont également appelés actinomycètes, en référence à leur morphologie rappelant celle des mycètes. Leur présence au sein de la communauté bactérienne des éponges est particulièrement intéressante. En effet, il est communément admis que les actinomycètes marins sont des producteurs prolifiques de métabolites spécialisés non seulement originaux mais aussi d'intérêt thérapeutique [Manivasagan *et al.*, 2014b, 2014a]. Plusieurs revues ont été publiées ces dernières années faisant état du potentiel des actinomycètes marins dans la découverte de molécules originales et bioactives [Fiedler *et al.*, 2005; Lam, 2006; Fenical et Jensen, 2006; Dhakal *et al.*, 2017]. A titre d'exemple, nous pouvons citer :

- ✓ Les antibiotiques chloramphénicol (**31**) et les céphamycines dont la céphamycine C (**32**) [Bérdy, 2005; Lazzarini *et al.*, 2000]. Sur les 10 000 antibiotiques connus en 2012, près de 50 % étaient produits par le genre *Streptomyces*, représentant majeur de ce groupe [Subramani et Aalbersberg, 2012].

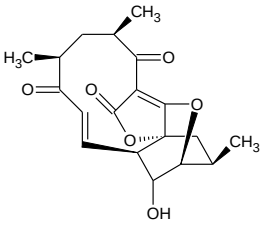


chloramphénicol (**31**)

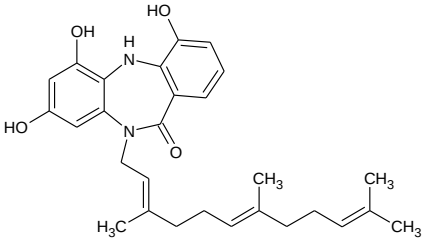


céphamycine C (**32**)

- ✓ L'abyssomicine C (**33**), un nouveau polycétide polycyclique, isolé d'une souche marine appartenant au genre *Verrucosispora*. Ce composé a démontré une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* qui est une bactérie multi-résistante [Bister *et al.*, 2004].
- ✓ La diazépinomicine (ECO-4601) (**34**), un alcaloïde isolé d'une souche de *Micromonospora* symbionte de *Didemnum proliferum* (ascidie). Ce composé a tout d'abord démontré une activité antimicrobienne avant d'être testé en phase I d'essai clinique contre différentes tumeurs solides (https://clinicaltrials.gov/ct2/home) [Charan *et al.*, 2004].



abyssomicine C (**33**)



diazépinomicine (**34**)

En 2013, la construction d'un arbre phylogénétique* avec la méthode « maximum de vraisemblance » a abouti à l'identification de 60 genres différents d'actinomycètes associés aux éponges (**Figure 36**) [Abdelmohsen *et al.*, 2014]. Cet arbre a été généré en utilisant l'ensemble des séquences d'ARN 16S d'actinomycètes associés aux éponges disponibles dans la base de données NCBI. Le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) abrite différentes bases de données pertinentes pour la biotechnologie dont les principales sont GenBank pour les séquences d'ADN et PubMed pour la littérature biomédicale. La méthode « maximum de vraisemblance », décrite comme étant la meilleure méthode pour obtenir l'arbre le plus proche de la réalité, permet d'évaluer en termes de probabilité l'ordre des branchements et la longueur des branches. Le travail réalisé par Abdelmohsen *et al.* a permis d'identifier différentes catégories d'actinomycètes associées aux éponges marines qui peuvent être élargies à l'ensemble du milieu marin.

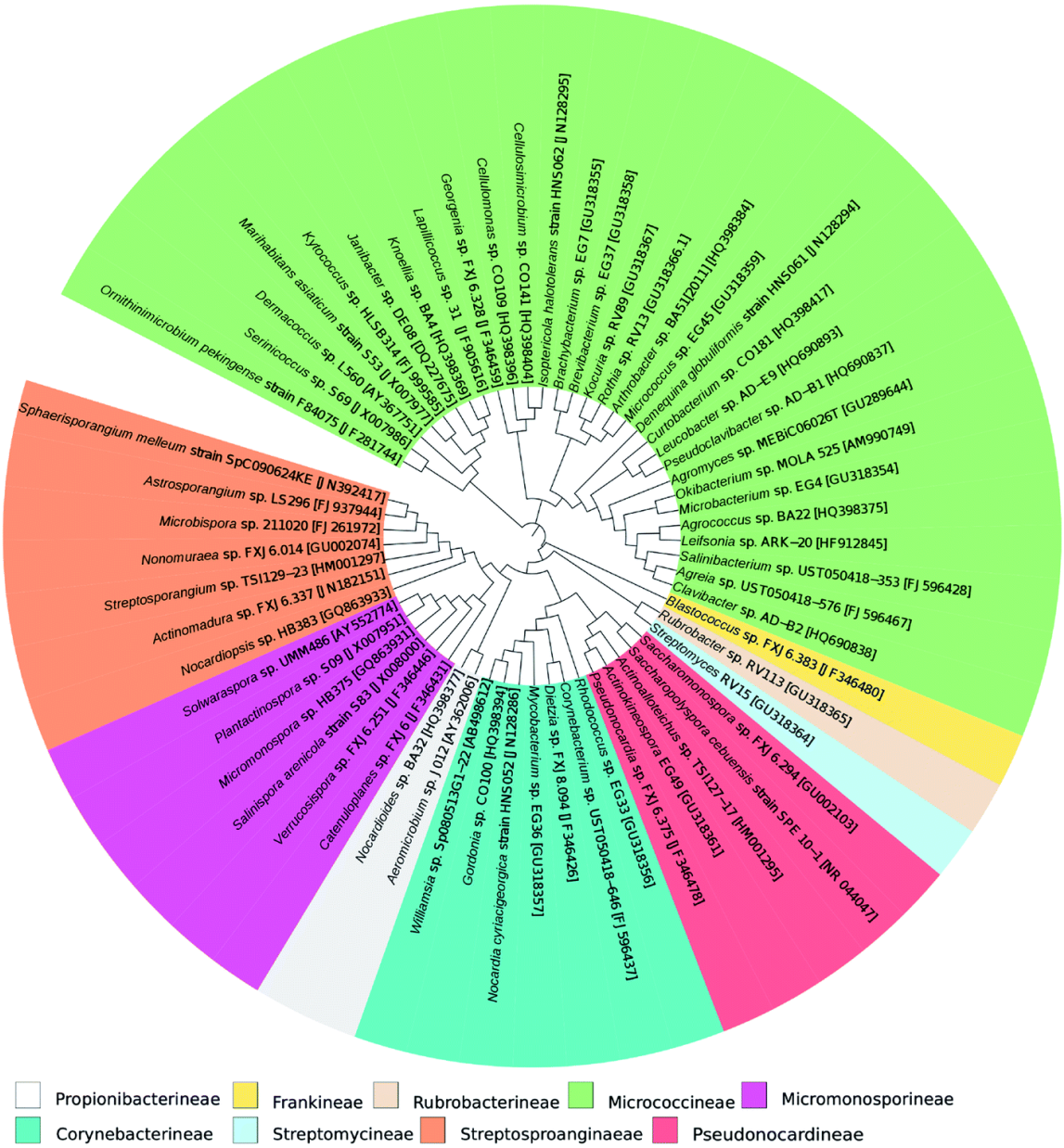


Figure 36 : Arbre phylogénétique, construit avec la méthode "maximum de vraisemblance", des genres d'actinomycètes associés aux éponges [Abdelmohsen *et al.*, 2014].

- ***Actinomycètes faciles à isoler***

Près de la moitié des genres identifiés appartient au sous-ordre des Micrococcineae qui comprend des genres tels que *Arthrobacter*, *Micrococcus* et *Microbacterium* faciles à isoler car à croissance rapide et ne requérant pas de conditions particulières.

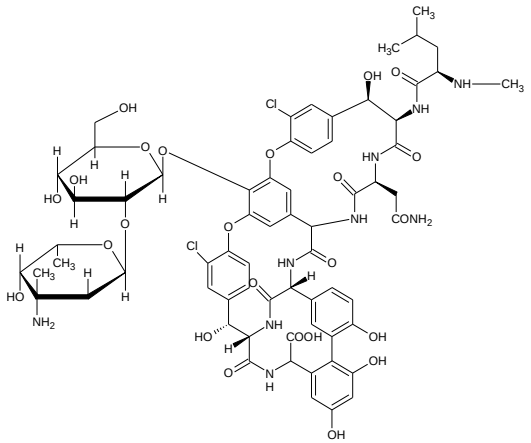
- ***Actinomycètes communément isolés à haut potentiel de production de métabolites***

Cette catégorie comprend les genres les plus souvent isolés et qui produisent des métabolites spécialisés bioactifs et aux structures chimiques nouvelles à l'exemple des *Streptomyces* et *Micromonospora*. Certains auteurs classent le genre *Micromonospora* dans la

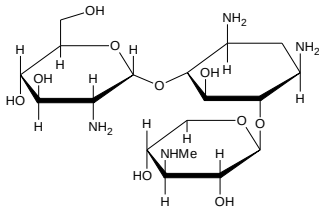
catégorie des actinomycètes rares. Le terme actinomycètes rares se réfère généralement aux souches (genres) d'actinomycètes dont la fréquence d'isolement est très inférieure à celle des souches de *Streptomyces* en utilisant les méthodes conventionnelles (paramètres classiques) d'isolement [Subramani et Sipkema, 2019]. Cela étant, ce terme ne reflète pas nécessairement l'occurrence naturelle de ces souches dans l'environnement terrestre et marin. Autrement dit, est qualifiée d'actinomycète rare toute souche d'actinomycète différente d'une souche de *Streptomyces* [Bérdy, 2005].

- ***Actinomycètes rares***

Ce groupe renferme des genres tels que *Saccharopolyspora* ou *Actinomadura*, difficiles à isoler et à cultiver dans les conditions de laboratoire en raison de leur croissance lente mais aussi des conditions particulières et spécifiques qu'ils peuvent requérir. Ce groupe d'actinomycètes renferme, par ailleurs, des genres avec des potentiels de production de composés nouveaux et bioactifs qui ont été sous-exploités ou inexplorés. Une revue de la littérature, réalisée par Lazzarini et ses collaborateurs, sur plus de 20 000 composés microbiens bioactifs a contribué à montrer l'intérêt qu'il y avait à travailler avec ce groupe d'actinomycètes, notamment pour la recherche de nouveaux antibiotiques [Lazzarini *et al.*, 2000]. En effet, l'isolement et le « screening » des actinomycètes rares augmentent les probabilités de découvrir de nouveaux composés bioactifs avec des structures chimiques originales. De plus, les actinomycètes rares sont une source de métabolites d'intérêt thérapeutique, à l'instar de la vancomycine (**35**) et de la gentamicine (**36**) produites respectivement par *Amycolatopsis orientalis* et *Micromonopsora purpurea*. Ils ont également montré que 38 % des souches productrices de composés bioactifs parmi les actinomycètes appartiennent à la famille des *Micromonosporaceae* [Lazzarini *et al.*, 2000]. Les genres les plus prolifiques dans cette famille sont *Micromonospora* et *Actinoplanes*. Tiwari et Gupta ont publié en 2011 une revue dans laquelle ils recensent tous les composés aux propriétés antibiotiques isolés de souches de *Micromonosporaceae* et *d'Actinoplanes* ainsi que quelques méthodes pour favoriser l'isolement sélectif des actinomycètes rares [Tiwari et Gupta, 2012]. D'autres articles ont été publiés concernant plus spécifiquement la culture des actinomycètes rares d'origine marine qui requièrent des conditions de croissance beaucoup plus spécifiques que leurs homologues terrestres [Subramani et Aalbersberg, 2013].



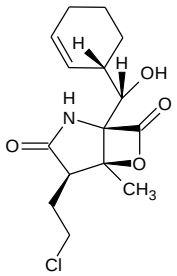
vancomycine (**35**)



gentamycine (**36**)

- ***Actinomycètes nouvellement décrits issus du milieu marin***

Bien que le premier actinomycète d'origine marine, *Rhodococcus marinonascens*, ait été décrit en 1984, la recrudescence de l'intérêt porté aux microorganismes marins fait que ces dernières années des espèces, voire des genres nouveaux, sont constamment découverts. Les études basées sur les techniques de culture des microorganismes ayant démontré l'existence d'actinomycètes marins et/ou adaptés au milieu marin, ont contribué à impulser la recherche sur cette thématique [Jensen *et al.*, 2005] Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le genre *Salinispora*. Ce genre, décrit en 2005, a été initialement isolé de sédiments marins avant d'être retrouvé dans la communauté microbienne cultivable de l'éponge *Pseudoceratina clavata* [Kim *et al.*, 2005a; Maldonado *et al.*, 2005a]. Les espèces appartenant à ce genre ont déjà démontré leur potentiel de production de métabolites spécialisés d'intérêt thérapeutique avec des composés comme le salinosporamide A (**8**), un puissant inhibiteur du protéasome actuellement en essai clinique pour le traitement du cancer [Newman et Cragg, 2016b].



salinosporamide A (**8**)

Dans la diversité des genres d'actinomycètes associés aux éponges, les genres *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Salinispora* et *Micromonospora* ont été identifiés comme étant les genres les plus prolifiques dans la capacité de production de métabolites spécialisés à la fois originaux et à haut potentiel thérapeutique.

❖ *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un ensemble de bactéries aérobies Gram-positives formant des spores. Il comprend des groupes d'espèces hétérogènes d'un point de vue phylogénétique* et phénotypique*. Récemment, la systématique du genre *Bacillus* a été profondément modifiée. En se basant sur l'étude de la séquence de la petite sous-unité ribosomique (ARN), les espèces du genre *Bacillus* ont été subdivisées en 4 clusters :

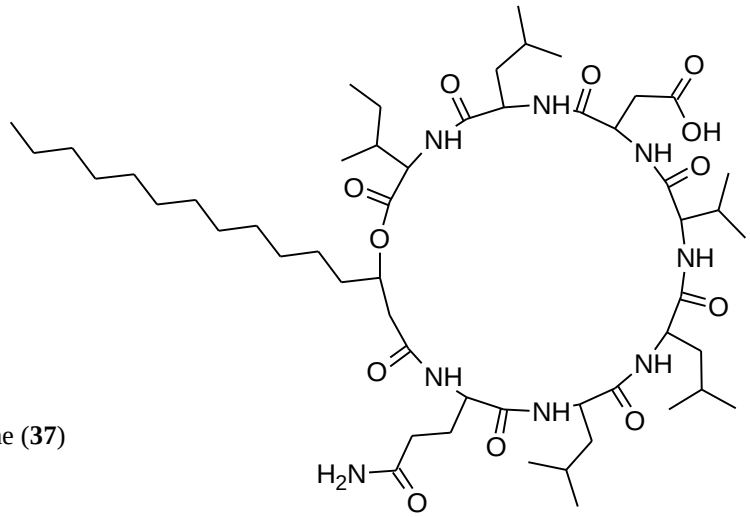
- Le **groupe 1** (*Bacillus* au sens stricte du terme) inclut *B. subtilis* qui représente l'espèce type du genre ;
- Le **groupe 2** inclut les Bacilli formant des spores rondes ainsi que quelques taxa ne générant pas de spore ;
- Le **groupe 3** comprend un ensemble d'espèces qui ont été reclassifiées dans le genre *Paenibacillus* ;
- Le **groupe 4** comprenant des souches qui ont été classées dans 2 genres nouvellement crées : *Aneurinibacillus* et *Brevibacillus* [Ivanova *et al.*, 1999].

Par ailleurs, plusieurs nouveaux isolats ont été décrits.

Très peu de publications ont été consacrées à l'étude des espèces de *Bacillus* isolés de l'environnement marin [Ivanova *et al.*, 1999]. Toutefois, Gontang et ses collaborateurs montrent, dans leur étude portant sur la diversité phylogénétique des bactéries Gram-positives isolées de sédiments marins, qu'une population diversifiée d'isolats de *Bacillus* peut être facilement obtenues à partir du milieu marin [Gontang *et al.*, 2007]. Grâce à leur ubiquité et leur capacité à survivre dans des conditions défavorables (stressantes), les souches hétérotrophes du genre *Bacillus* sont difficilement considérées comme des espèces spécifiques à un certain habitat. Il existe néanmoins un groupe hétérogène de bactéries modérément halophiles qui se distingue par leur capacité à se développer dans des milieux riches en sels. A celles-ci s'ajoutent les espèces véritablement marines qui dépendent de la présence d'ions sodium et potassium pour se développer à l'instar de *B. marinus*, isolées de sédiments marins collectés aussi bien en zone polaire que tropicale [Rüger *et al.*, 2000]. D'autres espèces-types (souches-types) marines isolées de sédiments (*B. oceanisediminis*), d'éponges (*B. plakortidis*), d'anémones de mer (*B. neizhouensis*) ou encore d'algues (*B. algicola*) ont été également décrites [Zhang *et al.*, 2010; Borchert *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Ivanova *et al.*, 2004].

Parmi les nombreuses espèces du genre *Bacillus* isolées du milieu marin, les espèces *B. amyloliquefaciens*, *B. badius*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. lentus* et *B. mycoïdes* sont les plus fréquemment isolées [Ettoumi *et al.*, 2009; Ivanova *et al.*, 1999]. Toutefois, les souches *B. subtilis* et *B. pumilus* sont les espèces du genre *Bacillus* les plus fréquemment retrouvées en association avec les invertébrés marins, notamment les éponges [Ivanova *et al.*, 1999]. Certaines de ces souches présentent des activités biologiques d'intérêt. A titre d'exemple, une souche de *B. subtilis*, isolée de l'éponge *Fasciospongia cavernosa*, a montré une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, une enzyme impliquée dans la dégradation du neuromédiateur acétylcholine [Pandey *et al.*, 2014]. L'utilisation des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est l'une des approches pharmacologiques disponibles actuellement pour pallier les symptômes cognitifs de la maladie d'Alzheimer.

Le séquençage du génome complet de *B. subtilis*, l'une des espèces les mieux caractérisées des bactéries Gram-positives, montre qu'environ 8 % de son génome est consacré à la production de métabolites spécialisés [Kunst *et al.*, 1997]. Les espèces appartenant aux genre *Bacillus* sont connues pour produire un large éventail de métabolites bioactifs tels que des lipopetides, des polypeptides, des macrolactones, des acides gras, des polycétides et des isocoumarines [Mondol *et al.*, 2013; Hamdache *et al.*, 2011]. Ces espèces sont particulièrement reconnues pour leurs capacités à synthétiser une grande diversité de composés antimicrobiens (antibiotiques et bactériocines) [Stein, 2005]. Toutefois, un éventail d'activités biologiques est associé à cette diversité chimique. Les espèces *B. subtilis* et *B. licheniformis*, appartenant au groupe 1, sont particulièrement reconnues pour leur grande valeur commerciale [Harwood *et al.*, 2018]. Quelques souches marines de *Bacillus* ont également démontré une capacité de production de métabolites originaux différents de ceux produits par leurs homologues terrestres [Jensen et Fenical, 1994]. Quelques exemples peuvent être cités telles une nouvelle glucanase (enzyme) isolée dans les années 80 ou encore l'halobacilline (**37**), nouveau lipopeptide cyclique de la famille des iturines [Okami *et al.*, 1980; Trischman *et al.*, 1994]. A ce jour, une seule revue a été publiée recensant les métabolites spécialisés isolés de *Bacillus* d'origine marine ainsi que leurs activités biologiques associées [Mondol *et al.*, 2013].

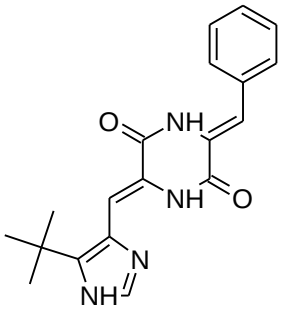


halobacilline (**37**)

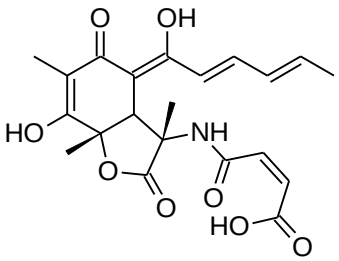
IV.1.1.2 Fungi

Les champignons microscopiques marins représentent le groupe le moins étudié du milieu marin [Nguyen et Thomas, 2018]. Connaissant le potentiel des champignons terrestres à produire des métabolites spécialisés d'une grande valeur thérapeutique, il est logique de penser que les champignons marins pourraient représenter un réservoir non négligeable de métabolites originaux. Au cours de ces dernières années, de nombreux isolements de champignons à partir de différents habitats marins ont été réalisés. Une des principales raisons expliquant cet engouement est le besoin de nouveaux composés bioactifs potentiellement

valorisables en pharmaceutique ou dans d'autres domaines industriels telles que les cosmétiques. Les nombreux travaux ayant porté sur l'isolement de produits naturels à partir des isolats fongiques sont intéressants. Ainsi, certains travaux ont montré que des genres ubiquitaires tels que *Aspergillus* ou *Penicillium*, peuvent fournir de nouveaux composés avec des structures proches mais différentes des composés isolés de souches terrestres [Edrada *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003]. Par ailleurs, plusieurs composés aux structures originales (polycétides, alcaloïdes, peptides, terpénoïdes, lipides) avec des propriétés biologiques d'intérêt ont été obtenus [Bugni et Ireland, 2004; Bhadury *et al.*, 2006; Rateb et Ebel, 2011; Saleem et Nazir, 2015]. A titre d'exemple, la plinabuline (**38**), un analogue synthétique de l'halimide (polycétide isolé d'*Aspergillus* sp. marin), a pour cible la tubuline, mais agit sur celle-ci avec un mécanisme d'action différent de celui des taxanes/vinca-alcaloides. Elle est actuellement utilisée dans différents essais cliniques notamment pour les cancers avancés des poumons à petites cellules. Un autre exemple est la sorbicillactone A (**39**), un nouvel alcaloïde avec une structure particulièrement originale, isolée d'une souche de *Penicillium chrysogenum* associée à l'éponge *Ircinia fasciculata* [Bringmann *et al.*, 2003]. Ses effets anti-leucémiques remarquables ont motivé les chercheurs impliqués dans cette découverte à anticiper sur des études d'optimisation de production à grande échelle [Bringmann *et al.*, 2007]. Les champignons associés aux éponges ont été identifiés comme étant la source la plus prolifique en termes de production de métabolites spécialisés biologiquement actifs et structurellement originaux [Bugni et Ireland, 2004; Proksch *et al.*, 2010].



plinabuline (**38**)



sorbicillactone A (**39**)

Bien que les champignons soient *a priori* relativement faciles à isoler à partir du tissu interne de l'éponge [König *et al.*, 2006; Wang, 2006], les études portant sur les champignons associés aux éponges se sont essentiellement intéressées aux produits naturels synthétisés par ces symbiontes. Contrairement aux bactéries associées/symbiotiques, les champignons marins symbiotiques sont relativement peu étudiés en termes d'occurrence, fonctions et biodiversité. Aussi, les études visant à investiguer la diversité de la communauté fongique des éponges sont rares. Cela étant, les chercheurs s'attachent de plus en plus à étudier la diversité fongique présente chez les éponges [Höller *et al.*, 2000; Morrison-Gardiner, 2002; Wang *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2009; Li et Wang, 2009; Ding *et al.*, 2011; Wiese *et al.*, 2011].

Parmi ces travaux, nous pouvons présenter l'étude réalisée par Höller et ses collaborateurs, qui a porté sur la recherche de nouveaux composés fongiques bioactifs à partir

de champignons isolés d'éponges [Höller *et al.*, 2000]. Au cours de cette étude, un total de 681 souches a été obtenu à partir de 16 espèces d'éponges collectées en 6 lieux différents, incluant les régions tempérées, subtropicales et tropicales. Les champignons isolés ont été identifiés et classés dans 13 genres d'Ascomycètes, 2 de Zygomycètes et 37 de champignons mitosporiques*. Ils ont ainsi constaté que la diversité des genres ainsi que le nombre d'isolats varient non seulement d'une éponge à l'autre mais aussi d'une localité à l'autre. Toutefois, les genres dominants identifiés sont de type ubiquitaire : *Acremonium*, *Arthrinium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma* et *Verticilium*. Globalement, les approches par culture ont permis l'identification de plusieurs souches fongiques chez les éponges. Ces souches appartiennent généralement à des genres ubiquitaires retrouvés également en milieu terrestre : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, et *Penicillium*. En 2008, Gao et ses collaborateurs, grâce à une approche moléculaire, ont révélé pour la première fois l'existence de 5 taxa fongiques (*Malasseziales*, *Corticiales*, *Polyporales*, *Agaricales*, et *Dothideomycetes*) qui n'avaient encore jamais été retrouvés en association avec les éponges dans les approches par culture [Gao *et al.*, 2008]. Ce résultat suggère qu'il existe une plus grande diversité fongique chez les éponges que les approches par culture ne permettent pas de voir.

En 2018, Nguyen et ses collaborateurs faisaient état de 22 ordres d'Ascomycètes et 8 ordres de Basidiomycètes décrits chez les éponges, principalement grâce à des approches par culture au cours d'études visant à découvrir des métabolites spécialisés bioactifs [Nguyen et Thomas, 2018].

IV.1.2 Caractérisation de la communauté microbienne associée au genre *Scopalina*

En raison de sa large distribution et de sa capacité à coloniser/dominer des environnements singuliers (récifs coralliens et fonds rocheux), les éponges appartenant au genre *Scopalina* (*Scopalina* sp. et *S. ruetzleri*) sont utilisées depuis peu comme éponges modèles pour étudier les interactions symbiotiques microorganismes – éponges [Lurgi *et al.*, 2019; Diez-Vives *et al.*, 2017; Esteves *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2012]. Ces éponges ont été identifiées comme appartenant aux éponges de la catégorie « Low Microbial Abundance » (LMA) [Gloeckner *et al.*, 2014]. Cette appartenance à la catégorie LMA est établie sur la base de différents critères qui sont : un mésohyle relativement dépourvu de microorganismes (observation au microscope) (**Figure 37**) ainsi qu'une diversité microbienne plus faible comparativement aux éponges HMA (approche moléculaire) [Moitinho-Silva *et al.*, 2017; Gloeckner *et al.*, 2014; Moitinho-Silva *et al.*, 2014]. La communauté microbienne associée aux éponges du genre *Scopalina* a été caractérisée par métagénomique* [Fan *et al.*, 2012; Rua *et al.*, 2015] et séquençage de l'ARN 16S [Helber *et al.*, 2019; Esteves *et al.*, 2016]. Par ailleurs, le potentiel biotechnologique de son microbiome pour la production de métabolites spécialisés a été révélé par approche moléculaire [Woodhouse *et al.*, 2013].

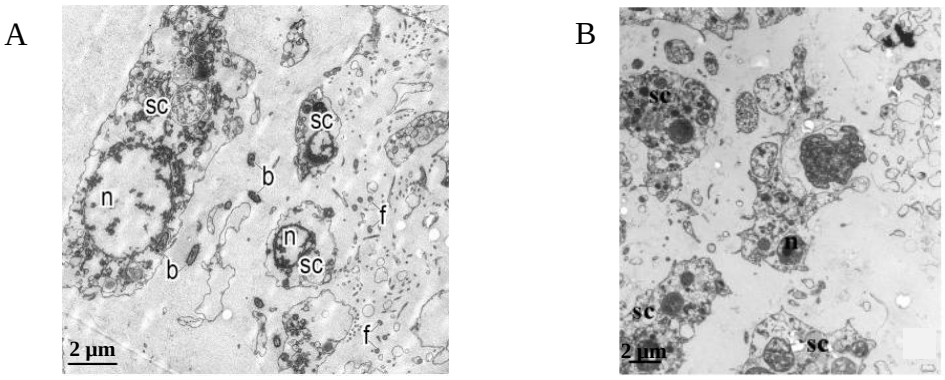


Figure 37 : Observation au microscope électronique en transmission du mésohyle de spécimens de *Scopalina.*

A : *S. hapalia*, collecté à Zanzibar, avec présence d'artefacts en arrière-plan.[Helber *et al.*, 2019].
B : *S. ruetzleri*, collecté en Floride [Gloeckner *et al.*, 2014].
n : noyau, sc : cellule de l'éponge (sponge cell), b : bactéries, f : flagelles de choanocyte.

L'analyse métagénomique de Rua *et al*. (2015) a permis d'identifier 9 phyla bactériens différents chez 3 spécimens *S. ruetzleri* collecté dans l'Océan Atlantique (Brésil). Parmi ces phyla, les cyanobactéries (31 %), les Protéobactéries (23 %), les Thaumarchaeota (3 %) ainsi que les Firmicutes et Bacteroïdetes (1,5 %) représentaient les phyla dominants. Toutefois, il est à noter qu'une très grande variabilité, en termes d'abondance relative et de diversité des phyla microbiens, a été observée entre les 3 spécimens de *Scopalina* étudiés. Cette hétérogénéité au sein des différents spécimens étudiés amène à penser qu'il s'agirait de bactéries présentes transitoirement dans l'éponge. En effet, de précédentes études ont montré que malgré la faible diversité des phyla présents chez les éponges de la catégorie LMA, ces dernières avaient une communauté bactérienne qui leur était spécifique, souvent dominée soit par les cyanobactéries soit par les protéobactéries (*Alpha-*, *Beta-* ou *Gammaproteobacteries*) [Easson et Thacker, 2014; Giles *et al.*, 2013]. L'étude réalisée en 2012 sur 3 spécimens de *Scopalina* sp. collectés en Australie a fourni des résultats plus reproductibles [Fan *et al.*, 2012]. Cette étude a révélé une communauté bactérienne constitutée de 4 phyla en moyenne et largement dominée par les Protéobactéries. Le nombre de phyla détectés chez les éponges LMA est néanmoins relatif et variable (entre 2 et 5) en fonction de l'éponge considérée [Kamke *et al.*, 2010; Giles *et al.*, 2013]. Des études plus récentes indiquent qu'il existe des exceptions et que des éponges LMA peuvent aussi abriter des communautés microbiennes plus riches et plus diversifiées que celles des éponges HMA [Voogd *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2016]. Ainsi, une étude portant sur des éponges collectées à Zanzibar a montré que certaines éponges LMA, parmi lesquelles figure un spécimen de *Scopalina hapalia*, abritaient une vingtaine de phyla différents [Helber *et al.*, 2019]. En raison des différentes approches méthodologiques utilisées dans ces études, nous ne pouvons pas tirer de conclusion sur cette analyse comparative. Toutefois, des études montrent que les facteurs aussi bien abiotiques que biotiques influencent la structuration des communautés microbiennes [Lurgi *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2016]. Par ailleurs, plusieurs isolats appartenant aux phyla des Actinobactéries, des Bacteroidetes, des Firmicutes et des Protéobactéries ont été obtenus de spécimens de

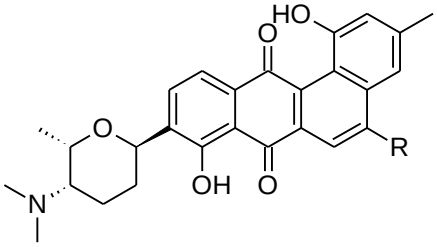
Scopalina collectés en Australie et dans les Caraibes [Esteves *et al.*, 2017; Vicente *et al.*, 2013; Tabares *et al.*, 2011].

Une étude par approche moléculaire utilisant le pyroséquençage, technique de séquençage haut-débit, associé à la technologie 454-FLX titanium, a permis la détection au sein du microbiome de *Scopalina* sp. de gènes *pks* (codant pour des Polyketides Synthases) et *nrps* (codant pour des Non-Ribosomal Peptide Synthetases) [Woodhouse *et al.*, 2013]. Les gènes *pks* sont à l'origine de la production des polycétides tels que la rifamycine (antibiotique), la rapamycine (immunosuppresseur) ou la lovastatine (anti-cholestérol). Les gènes *nrps* sont responsables de la synthèse des peptides non-ribosomiques à l'exemple de la pénicilline (antibiotique de référence), la cyclosporine (immunosuppresseur), la daptomycine (anti-infectieux contre les bactéries Gram-positives) ou encore la bléomycine (anticancéreux). Ces deux classes de produits naturels, polycétides et peptides non-ribosomiques, présentent une grande diversité et originalité structurale ainsi qu'un grand intérêt thérapeutique. Les enzymes responsables de la biosynthèse de ces métabolites présentent des structures multimodulaires avec différents domaines qui contribuent à la condensation séquentielle de sous-unités amines et carboxyliques. Woodhouse et ses collaborateurs (2013) montrent ainsi dans leur étude que le microbiome de *Scopalina* sp. recèle une grande richesse ainsi qu'une grande diversité de domaines de condensation et KS (Keto-Synthase). De plus, la majorité des domaines KS détectés sont de type *trans*-acyltransférase responsable de la biosynthèse de polycétides complexes d'intérêt pharmaceutique. En effet, les travaux de Piel et ses collaborateurs (2004) sur l'origine biosynthétique des polycétides antitumoraux produits par l'éponge *Theonella swinhoi* ont révélé une voie de synthèse par PKS, intégrant des domaines *trans*-acyltransférase [Piel *et al.*, 2004b, 2004a]. Identifiée à partir du métagénome de l'éponge, les caractéristiques architecturales et fonctionnelles des gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse (présence d'une séquence putative de Shine Dalgarno et d'un élement transposable bactérien entre autres) ont permis de les attribuer à une bactérie candidate non cultivée. En termes de pourcentage d'identité, les domaines *trans*-acyltransférase détectés chez *Scopalina* présentent moins de 90 % d'acides aminés identiques à ceux impliqués dans les voies de biosynthèse connues. Ce résultat semble indiquer la présence de nouvelles voies de biosynthèse dans cette éponge et probablement dans les éponges appartenant à ce genre. Il est intéressant de noter que des gènes PKS ont été identifiés chez des isolats de *Pseudovibrio* sp. (Protéobactéries) obtenus de *Scopalina* sp. et ayant présenté des activités antimicrobiennes [Esteves *et al.*, 2017]. Une étude publiée en 2019 utilisant une approche de métagénomique prédictive a révélé la présence potentielle, dans l'holobionte *Scopalina hapalia*, de plusieurs voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse d'antibiotiques (type ansamycine ou encore tétracycline) [Helber *et al.*, 2019]. D'autres voies impliquées dans la biosynthèse de terpénoides et d'alcaloïdes ont été mises à jour. Bien que l'étude d'Helber et ses collaborateurs se soit basée sur des amplicons de séquences d'ARNr 16S (séquençage Illumina), cette étude offre l'avantage de donner un aperçu sur le potentiel de production en métabolites spécialisés de cette éponge très peu étudiée. Ces données métagénomique et moléculaire laissent perplexe lorsqu'elles sont mises en regard de la littérature concernant la chimie du genre *Scopalina*. En effet, celle-ci reste très limitée et met en lumière uniquement 2 composés bioactifs isolés du genre *Scopalina* (*cf* p.7 chapIII) alors que quelques études ont

révélé des activités biologiques associées à ses extraits bruts [Prado *et al.*, 2004; Biegelmeyer *et al.*, 2015].

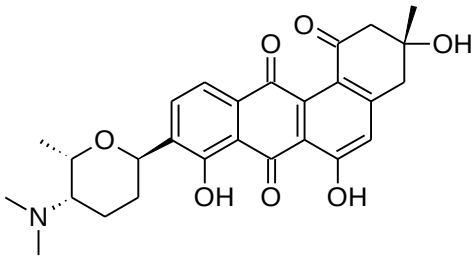
Cependant, il est important de garder à l'esprit que la détection de ces voies de biosynthèse par l'approche moléculaire n'implique pas nécessairement qu'elles seront exprimées au cours du métabolisme secondaire. En effet, les avancées de la génomique ainsi que celles de la biologie moléculaire appliquées aux produits naturels ont permis de révéler une très grande diversité chimique encore inaccessible, au sein de beaucoup de voies de biosynthèse non exprimées [Piel *et al.*, 2004a, 2004b]. Ces données soulignent la nécessité d'optimiser les stratégies de production des produits naturels afin d'aller vers le développement de procédés plus efficaces. Des stratégies telles que le « genome mining » ou la biologie synthétique offrent la possibilité d'accéder à ces voies de biosynthèse non exprimées et d'élargir ainsi la diversité chimique dans les programmes de recherche de nouveaux candidats médicaments [Ziemert *et al.*, 2016; Mitchell, 2011]. Toutefois, ces stratégies sont longues et coûteuses. D'autres approches ont été développées alliant avancées techniques et production traditionnelle. Il s'agit de la récupération de produit *in situ* (*in situ* product recovery) ou de la fermentation extractive [Roffler *et al.*, 1984; Phillips *et al.*, 2013]. L'approche par adsorption *in situ* des produits d'intérêt a ainsi été utilisée pour enrichir des banques de produits naturels dans les premières étapes du screening [Magarvey *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2001; Gerth *et al.*, 1994]. Par ailleurs, elle permet également dans certains cas d'augmenter le titre de production dans un temps relativement court (plusieurs semaines) [Gerth *et al.*, 2003]. Cette approche présente plusieurs avantages. En effet, elle est peu coûteuse, elle permet d'utiliser des volumes raisonnables de solvants et, enfin, elle est facilement adaptable à la production de masse.

Au cours d'une étude visant à investiguer les actinomycètes associés aux éponges caribéennes pour la production de nouveaux métabolites spécialisés bioactifs, 6 nouveaux dérivés d'angucyclinone (**40** - **45**) ont été isolés d'une souche de *Streptomyces*, symbionte de *Scopalina ruetzleri* [Vicente *et al.*, 2015]. Les dérivés d'angucyclinone représentent un groupe d'antibiotiques caractérisés par 4 cycles aromatiques accolés de façon asymétrique. Ils appartiennent à la classe chimique des polycétides et sont relativement proches des anthracyclines et tétracyclines. La monacyclinone F (**45**) est celle qui a démontré la meilleure activité biologique parmi les 6 nouveaux dérivés d'angucyclinone isolés. En effet, la monacyclinone F a une forte activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses SJCRH30 de rhabdomyosarcome, avec une CE_{50} de 0,73 µM après 48 h de traitement. Ce composé a également démontré une forte activité antibactérienne sur des bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis* et *Mycobacterium smegmatis*). L'isolement de ces dérivés d'angucyclinone permet d'appuyer les études moléculaires précédemment citées sur le genre *Scopalina*.

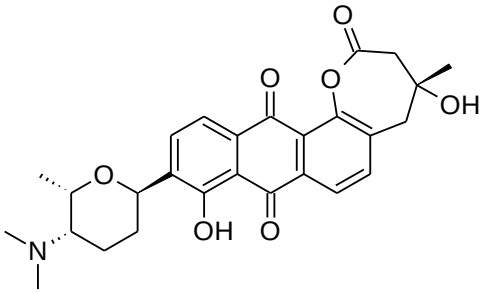


R = H, monacyclinone A (**40**)

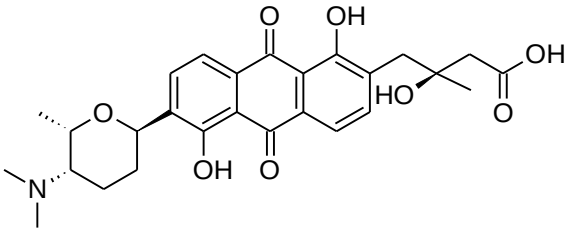
R = OH, monacyclinone B (**41**)



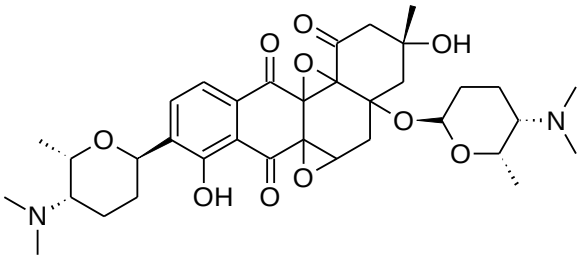
monacyclinone C (**42**)



monacyclinone D (**43**)

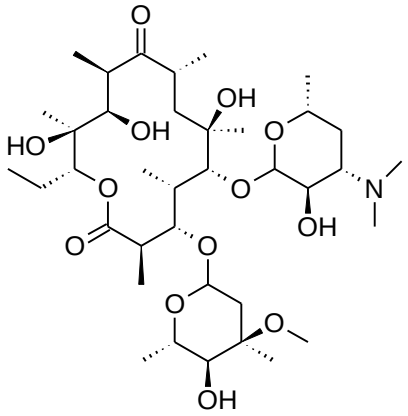


monacyclinone E (**44**)



monacyclinone F (**45**)

En 2017, une nouvelle espèce de *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov. a été isolée de *Scopalina ruetzleri* [Souza *et al.*, 2017]. Le genre *Saccharopolyspora* appartient à la catégorie des actinomycètes rares présentant un intérêt thérapeutique, il produit notamment l'érythromycine (**46**), un antibiotique antibactérien de la famille des macrolides.



érythromycine (**46**)

Ces quelques résultats illustrent le potentiel de la communauté microbienne associée aux éponges du genre *Scopalina*, à produire des métabolites spécialisés d'intérêt. De plus, l'extrait brut de l'éponge *S. hapalia* (XML-263) a démontré des activités inhibitrices de l'élastase et de la Fyn-kinase dans le cadre de travaux visant à isoler des métabolites spécialisés ayant des propriétés anti-âges. Ces résultats ont impulsé notre étude sur les microorganismes associés à cette éponge.

Il existe à ce jour plusieurs techniques pour mettre en évidence les communautés microbiennes des éponges. Les deux approches les plus communément utilisées sont : (1) l'utilisation des outils de la biologie moléculaire, telle que le séquençage de régions spécifiques de l'ADN (ARNr 16S* / ITS*) et/ou (2) la mise en culture dans les conditions de laboratoire. Dans le cadre de ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les actinomycètes et les champignons filamenteux associés à l'éponge *Scopalina hapalia*, en termes de diversité et de capacité de production de métabolites spécialisés bioactifs, en utilisant les approches suivantes :

- Une étude du microbiome par métagénomique ciblée (approche moléculaire).
- Une étude de la diversité microbienne cultivable.
- Un criblage biologique des souches microbiennes cultivables.

IV.2 Etude du microbiome de *Scopalina hapalia* de Mayotte : approche moléculaire

Selon la littérature, seulement 1 % environ des bactéries endobiontes peuvent être cultivées en conditions de laboratoire, avec les techniques de culture actuellement disponibles [Proksch *et al.*, 2002]. Afin d'avoir accès à l'information la plus exhaustive possible sur la communauté microbienne associée à une éponge, une approche moléculaire globale par séquençage à haut débit peut être envisagée. Plusieurs technologies de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing – NGS), telles que le pyroséquençage ou le séquençage par synthèse (Illumina), sont aujourd'hui disponibles. Une revue publiée dans Nature en 2016 détaille et compare ces différentes technologies [Goodwin *et al.*, 2016].

Dans le cadre de notre étude sur *Scopalina hapalia* de Mayotte (ML-263), nous avons opté pour une approche de métagénomique* ciblée utilisant la technologie Illumina MiSeq. Globalement, le principe du séquençage reste relativement le même, indépendamment de l'approche utilisée (Illumina, pyroséquençage…) et comprend 4 grandes étapes.

- La première est la constitution d'une librairie, soit l'ensemble des fragments d'ADN à séquencer.
- La seconde étape, dans le cas d'un séquençage ciblé, consiste à enrichir la librairie avec les fragments d'ADN d'intérêts par une réaction en chaîne par polymérase (PCR).
- A la troisième étape, les brins complémentaires de chaque fragment d'ADN cloné sont synthétisés. Au cours de cette synthèse, à chaque incorporation d'un nucléotide, un signal est détecté. Dans le cas de la technologie Illumina, chaque nucléotide constitutif de l'ADN est étiqueté par un fluorophore qui lui est propre. C'est cette fluorescence qui est détectée.
- La dernière étape mobilise des outils bioinformatiques pour le traitement des données et l'affiliation taxonomique des séquences obtenues.

IV.2.1 Evaluation de la qualité de l'ADN extrait de *Scopalina hapalia* en vue du séquençage

Pour les besoins du séquençage, l'ADN génomique (ADNg) de l'éponge *Scopalina hapalia* a été extrait au moyen de 2 kits d'extractions différents : Qiagen et CTAB. Les 2 échantillons d'ADNg obtenus ont été identifiés respectivement avec les appellations suivantes : ADNg-Qiagen et ADNg-CTAB.

La qualification, par NanoDrop, de l'ADNg extrait de *Scopalina hapalia* montre des ratios A260/A280 inférieurs à la valeur seuil de 1,8 pour l'ADN pur (**Tableau XLVI**). Cela indique la présence de contaminants dans les échantillons. Toutefois, la méthode Qiagen semble fournir un ADNg de meilleure qualité (A260/A280 = 1,77) contrairement à la méthode CTAB (A260/A280 = 1,55). Nous remarquons également qu'en fonction de la méthode d'extraction utilisée, les quantités d'ADNg obtenues diffèrent. Ainsi, 3,6 µg/200 µL et 42,92 µg/200 µL ont été obtenus respectivement avec les méthodes Qiagen et CTAB (**Tableau XLVI**).

Tableau XLVI : Quantification et qualification, par NanoDrop, de l'ADN génomique (ADNg) de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction différents (Qiagen et CTAB).

Echantillon	Méthode d'extraction	Concentration (ng/µL)	Quantité totale (µg/200 µL)	Absorbance 260 nm	Absorbance 280 nm	A260/A280
Contrôle	Qiagen	-	-	0,002	-0,005	-0,400
ADNg	Qiagen	18	3,6	0,361	0,204	1,770
ADNg	CTAB	214,6	42,92	4,243	2,732	1,553

La vérification de la qualité des ADNg de *Scopaliana hapalia* extraits au moyen de deux kits d'extraction différents, Qiagen et CTAB, par migration sur gel d'agarose présente des profils de migrations différents. Par ailleurs, les résultats pris dans leur ensemble, NanoDrop et électrophorèse, indiquent une mauvaise qualité de l'ADNg extrait, due à l'état de conservation de l'échantillon. En effet, au cours de la campagne de collecte des invertébrés marins en 2013, aucun échantillon n'a été préparé en prévision d'étude moléculaire. Ainsi, l'échantillon de *Scopalina hapalia*, à partir duquel les extractions d'ADNg ont été réalisées, a été sorti de l'eau, mis à l'air libre, puis conservé à - 20 °C pendant plusieurs années. Ces conditions ne sont pas optimales pour la préservation de l'ADN qui a pu se dégrader au cours du temps.

IV.2.2 Etude des microorganismes associés à *Scopalina hapalia* par une approche de métagénomique ciblée de l'ADNr 16S et de la région ITS2

L'objectif de cette étude est d'analyser la communauté microbienne associée à *Scopalina hapalia* par une approche de métagénomique ciblée sur les régions V1-V3, V3-V4, V4-V5 de l'ADNr 16S (bactéries) (**Figure 38**) et de la région ITS2 (champignons). Les optimisations du procédé pour le gène gyrB (bactéries) ayant été infructueuses, l'étude de ce gène n'a finalement pas été incluse dans cette étude. Ce travail, réalisé par la société Genoscreen (www.genoscreen.fr), a été effectué en mettant en œuvre leur protocole Metabiote®. Au cours de cette étude, les deux ADNg (Qiagen et CTAB), présentant des profils différents, ont été séquencés ainsi que le contrôle d'extraction Qiagen. Ce contrôle d'extraction correspond à une extraction à blanc (sans tissu d'éponge) pour évaluer la qualité du kit d'extraction Qiagen.

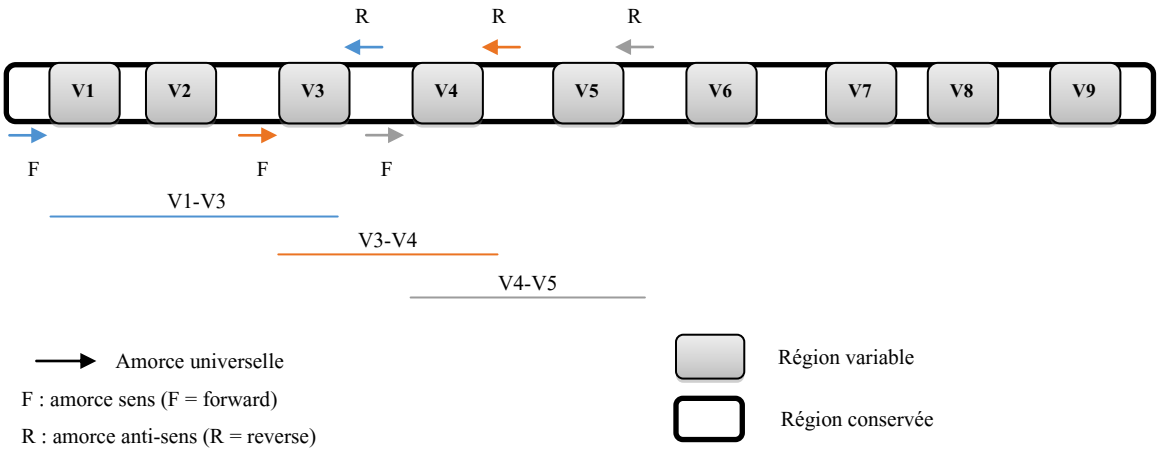


Figure 38 : Structure schématique de l'ARNr 16S avec présentation des régions ciblées pour l'affiliation taxonomique des bactéries associées à *Scopalina hapalia*.

Les flèches de couleur représentent les paires d'amorces universelles (sens et anti-sens) utilisées dans le protocole Metabiote® de Genoscreen.

IV.2.2.1 Prétraitements des données brutes et validation des contrôles

Le séquençage des 12 librairies correspondants aux jeux de données des régions V1-V3, V3-V4, V4-V5 et ITS2 des 3 échantillons issus de *Scopalina hapalia* permet l'obtention de données cohérentes avec les spécifications du fournisseur Illumina (www.illumina.com) ainsi qu'avec les critères de qualité fixés par Genoscreen. Préalablement aux analyses bioinformatiques, la qualité des données issues du séquençage a été évaluée avec l'outil FastQC. La représentation graphique de cette analyse est donnée en **Annexe 5** (Tome II, p. 58) et permet de visualiser la qualité des reads (séquences) obtenus à la fin du séquençage. L'analyse des données a été menée par Genoscreen à l'aide de leur pipeline Metabiote® Online v2.0, partiellement basé sur le logiciel QIIME v1.9.1 [Caporaso *et al.*, 2010]. La diversité des communautés microbiennes au sein d'un système donné est évaluée grâce à la diversité alpha. Ainsi, une analyse complète de la diversité alpha des échantillons a été réalisée selon les méthodes de l'index de Shannon et de Chao1 [Shannon, 1948; Chao, 1984]. Ces index sont générés automatiquement par un script spécifique de QIIME (**Annexes 6 à 8**, Tome II, p. 58-61). La diversité est un terme utilisé, ici, pour décrire le nombre effectif de taxa (richesse) d'un rang taxonomique donné (espèce, genre ou phylum) ainsi que leurs abondances respectives [Yarza *et al.*, 2014].

- **Courbes de raréfaction**

Trois indices différents ont été calculés pour évaluer la biodiversité microbienne intrinsèque de *Scopalina hapalia* :

- **L'indice « observed OTUs »** qui évalue la **richesse** de la communauté microbienne en termes de nombres d'unités taxonomiques opérationnelles observées (Operational Taxonomic Unit : OTU). L'OTU est un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ARN 16S présentent une similitude de plus de 97 %. Cet indice donne une idée de la diversité génétique, en se basant sur les séquences de nucléotides, au sein d'une communauté ou d'une espèce. Ainsi, la richesse se définit comme étant le nombre d'OTUs dans une communauté donnée.
- **L'indice de Chao1** est une estimation de la **richesse** prenant en considération les espèces rares, c'est-à-dire représentées à l'échelle de 1 ou 2 individu(s). En raison de cette sous-représentation, il est probable qu'elles ne soient pas observées au cours du séquençage. Ainsi, l'indice de Chao1 utilise le nombre d'OTUs observés (espèces observées) 1 ou 2 fois pour déduire le nombre des espèces non observées à l'aide de méthodes non paramétriques. L'objectif étant de donner une estimation du nombre total d'OTUs attendus.
- **L'indice de Shannon** qui permet de mieux évaluer la diversité microbienne au sein d'une communauté donnée en évaluant à la fois la **richesse** et l'**équitabilité** [Tuomisto, 2010]. L'équitabilité représente la régularité de la distribution des espèces. La quantification de la diversité, en outre, prend non seulement en considération la richesse des OTUs mais aussi l'abondance relative de chaque OTU observée.

Les formules pour calculer ces indices sont données dans la partie expérimentale. Les courbes de raréfaction générées avec les indices de diversité alpha (à savoir observed OTUs (**Annexe 9**, Tome II, p. 62), Chao1 (**Annexe 10**, Tome II, p. 63) et Shannon (**Figure 39**)) montrent toutes un plateau indiquant que la couverture du séquençage obtenue est suffisante. Les courbes de raréfaction de l'indice de Shannon, pour les différentes régions séquencées, présentent toutes ce profil où l'horizontalité de la courbe est atteinte (**Figure 39**). Ceci signifie que le séquençage des échantillons a permis d'atteindre un niveau d'exhaustivité des OTUs représentatif de la totalité des OTUs présents (autrement dit qui décrit la communauté présente de la façon la plus exhaustive possible). Par ailleurs, plus l'indice de Shannon est grand, plus la diversité microbienne au sein de l'échantillon analysé est grande. Pour les régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5, les valeurs sont comprises entre 4 et 6 indiquant une diversité microbienne relativement grande. Ces valeurs se situent dans la gamme des valeurs d'indices de Shannon (entre 0 et 6) associées aux microbiomes d'éponges retrouvées dans la littérature [Moitinho-Silva *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2016; Steinert *et al.*, 2016]. En revanche, les indices de Shannon pour la région ITS2 sont très faibles, entre 0,5 et 1,5 indiquant au contraire une diversité très faible. Par ailleurs, nous observons, pour cette cible ITS2, que le contrôle d'extraction Qiagen a un index de Shannon 8 fois plus élevé que l'ADNg-Qiagen, ce qui laisse penser que la diversité microbienne associée à cette cible est négligeable.

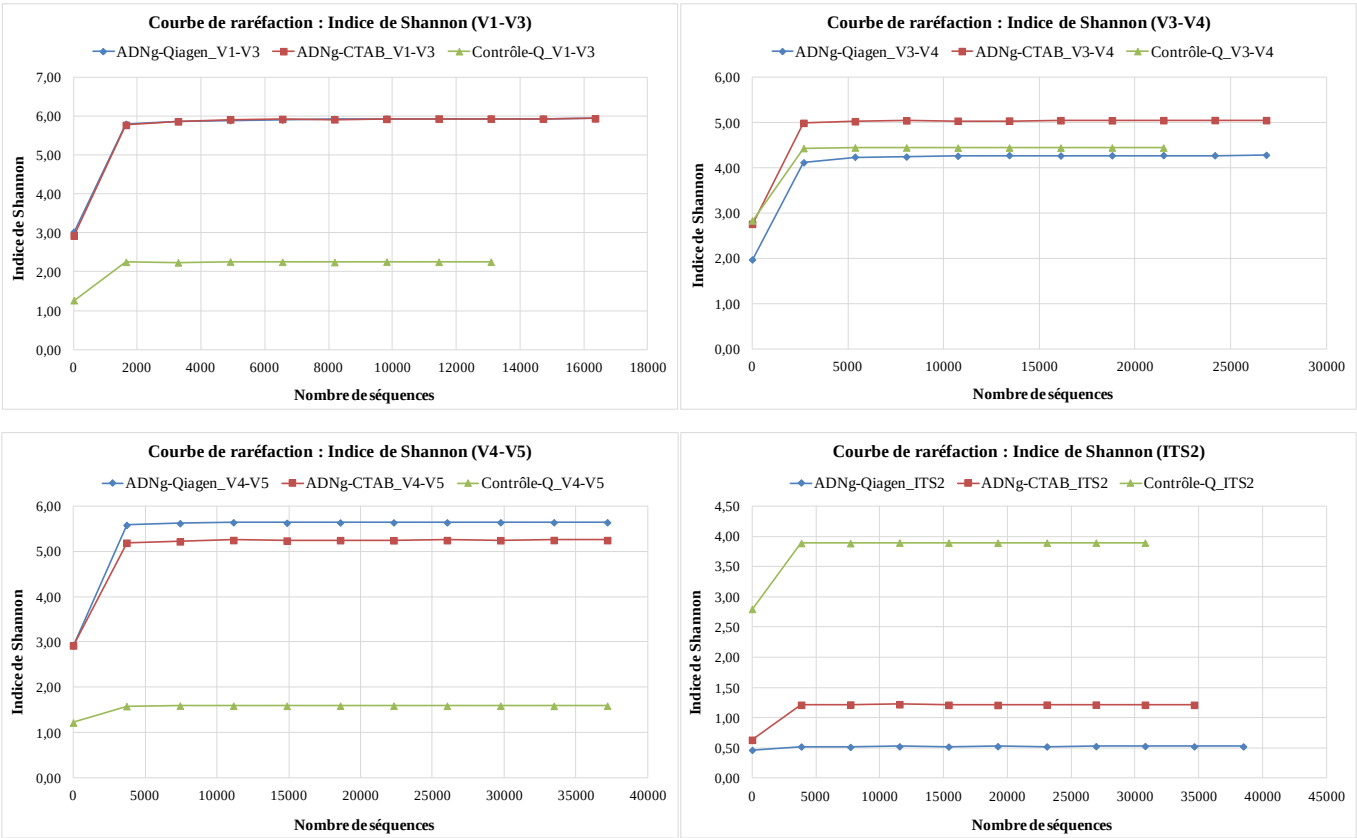


Figure 39 : Courbes de raréfaction basées sur l'indice de Shannon pour les échantillons ADNg-Qiagen, ADNg-CTAB et Contrôle-Q (contrôle d'extraction avec le kit Qiagen) en fonction d'un nombre croissant de séquences (rapport Genoscreen).

Les résultats du séquençage des régions de l'ARNr 16S vont donc permettre une caractérisation de la communauté procaryote malgré la mauvaise qualité de l'ADNg initial. Malheureusement, les résultats du séquençage de la région ITS2 ne peuvent pas être exploités pour caractériser la communauté eucaryote. En effet, l'alignement des séquences avec les bases de données montre que moins de 5 % des séquences obtenues sont affiliées à des champignons. Les 95 % restant des séquences sont affiliées soit à des taxa non classifiés soit à des métazoaires. L'une des explications plausibles pour expliquer ce résultat serait que le couple d'amorces utilisé pour amplifier la région ITS2 n'est pas suffisamment sélectif pour distinguer la région ITS2 fongique de celle de l'hôte. Toutefois, plusieurs articles portant sur l'étude des communautés fongiques associées aux éponges ont rapporté l'obtention d'un nombre de séquences fongiques très faible comparativement au nombre de séquences non-spécifiques obtenues [Naim *et al.*, 2017; He *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2008]. La seconde explication est en lien avec les abondances très faibles de champignons (10^3 cellules fongiques/mL) comparativement aux bactéries (10^6 cellules bactériennes/mL) dans l'eau de mer, et par extension dans les éponges [Kubanek *et al.*, 2003].

❖ Contrôle négatif (blanc) d'extraction à l'aide du kit Qiagen

La préparation des librairies à partir du contrôle d'extraction Qiagen (Contrôle-Q) permet d'avoir un profil microbien propre au kit d'extraction Qiagen. Ce blanc est traité de sorte à amplifier tout ce qui peut l'être, même en absence relative d'ADN (- 32 ng/µL), afin d'avoir le bruit de fond inhérent au kit.

- Pour la **cible V1-V3** (**Annexe 11 A**, Tome II, p. 64), le contrôle négatif présente un profil dominé à hauteur de 85 % par les genres : *Escherichia* (71,45 %), *Novosphingobium* (7,64 %) et *Sphingomonas* (6,16 %). Ces 3 genres appartiennent au phylum des protéobactéries.
- Pour la **cible V3-V4** (**Annexe 11 B**, Tome II, p. 65), les 10 genres les plus abondants (76 %) appartiennent au phylum des protéobactéries et sont dominés par *Escherichia* (17,29 %) et *Labrenzia* (14,40 %).
- Pour la **cible V4-V5** (**Annexe 11 C**, Tome II, p. 66), le profil est dominé à hauteur de 91 % par 3 genres : *Escherichia* (70,63%), *Sediminibacterium* (13,04 %) et *Burkholderia* (7,43 %).

Le séquençage de ce contrôle négatif permet d'identifier ce qui peut être obtenu en l'absence de biomasse initiale et de quantité détectable d'ADN. Ainsi, les ADN amplifiés peuvent provenir de contaminants présents dans les différents réactifs de biologie moléculaire utilisés soit au cours de l'extraction avec le kit Qiagen soit au cours du séquençage avec le protocole Metabiote®.

❖ Validation des contrôles internes propres à Genoscreen

Au cours du processus de séquençage, différents contrôles ont été intégrés au processus afin de pouvoir valider le bon déroulement de l'étude.

Le contrôle positif (**ABCv2**) utilisé est une communauté artificielle composée de 15 souches eubactériennes et de 2 souches archéennes. Ce contrôle correspond à la mise en œuvre du protocole Metabiote® à partir de 5 ng de la communauté artificielle. Le terme eubactérie renvoie à toute bactérie à l'exception des archées. Ce contrôle a pour objectif de permettre de définir avec précision les paramètres de l'affiliation taxonomique des échantillons analysés en tenant compte des interférences créées par le séquenceur MiSeq, ainsi que celles créées entre les échantillons [Bokulich *et al.*, 2013]. Ce contrôle a été validé pour les 3 cibles V1-V3, V3-V4 et V4-V5 (**Annexe 12 A – C**, Tome II, p. 67-69). En effet, les résultats obtenus ont permis de valider l'affiliation correcte au genre attendu pour les bactéries composant la communauté artificielle ABCv2.

Le contrôle négatif (**BF-lib)** a été utilisé comme contrôle pour la préparation des librairies et permet d'identifier ce qui peut être obtenu en l'absence de biomasse. Il s'agit ici d'un contrôle de la mise en œuvre du protocole Metabiote®, préparé à partir de 2 µL d'eau stérile exempte de RNase/DNase. Le nombre de séquences obtenues pour les cibles V3-V4 et V4-V5 est insuffisant (inférieur à 10 000) et ne permet pas d'effectuer une affiliation taxonomique correcte. En effet, il est admis qu'un nombre minimum de 10 000 séquences est nécessaire pour obtenir une affiliation taxonomique exploitable (Genoscreen). Seuls les résultats issus de la région V1-V3 ont pu être exploités. Concernant cette cible (V1-V3), le témoin négatif BF-lib (**Annexe 13**, Tome II, p. 70) présente un profil dominé par 3 genres : *Escherichia* (~ 80 %), *Sphingomonas* (~ 10 %) et *Sphingobium* (~ 10 %). Les genres *Escherichia*, *Sphingomonas* et *Pseudomonas* seraient des contaminants caractéristiques liés à l'utilisation des réactifs de biologie moléculaire (Genoscreen).

IV.2.2.2 Caractérisation de la communauté procaryotique associée à *Scopalina hapalia*

Les résultats obtenus après le prétraitement des séquences pleines longueurs de l'ADNr 16S, le tri et la suppression des séquences chimériques, sont présentés dans le **Tableau XLVII**. Ce tableau indique le nombre total de séquences, OTUs, phyla et genres obtenus par ADNg et par région hypervariable, à la fin du prétraitement des données. La séquence la plus abondante de chaque OTU est prise comme séquence référence et comparée à la base de données Greengenes. L'affiliation taxonomique a été réalisée en utilisant la méthode du classificateur RDP (Ribosomal Database Project) [Wang *et al.*, 2007a]. Cette méthode associe un indice de confiance à l'assignement taxonomique des séquences. Une OTU correspond à un groupe de séquences similaires entre elles. L'assignement taxonomique des séquences a été effectué au niveau du phyla et du genre avec une indice de similarité fixée arbitrairement à 97 %, valeur standard utilisée pour ce type d'étude [Nguyen *et al.*, 2016].

Tableau XLVII : Résultats du séquençage de l'ADNg de *Scopalina hapalia* au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB).

Cible	**V1-V3**		**V3-V4**		**V4-V5**	
Dispositif d'extraction	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB
Séquences	16353	18262	47630	26877	37213	38048
OTUs	337	309	408	162	355	324
Phyla	16	17	21	15	19	21
Genres	118	115	164	98	146	154

Le **Tableau XLVIII** présente une moyenne des index de diversité alpha (observed OTUs, Chao1 et Shannon) générés automatiquement par QIIME (**Annexes 6 à 8**, Tome II, p. 59-61) et visualisés sous forme de courbes de raréfaction (**Annexes 9** et **10**, Tome II, p. 62-63 et **Figure 39**, p. 168). Ces résultats montrent que :

- L'échantillon d'ADNg-Qiagen présente la plus grande richesse en OTU comparativement à l'échantillon d'ADNg-CTAB.
- Les cibles V3-V4 et V4-V5 fournissent une plus grande richesse en OTU que la région V1-V3. Toutefois, cette observation ne s'applique pas à l'échantillon ADNg-CTAB pour la cible V3-V4.
- En termes de diversité (qui prend en considération aussi bien la richesse que la fréquence et l'abondance relative des OTUs), c'est la région V1-V3 qui offre la plus grande diversité suivie par V4-V5 puis V3-V4.

Tableau XLVIII : Moyenne des index de la diversité alpha de *Scopalina hapalia* par échantillon d'ADNg (ADNg-Qiagen ou ADNg-CTAB) et par région cible.

Echantillons	**Richesse[a]**		**Diversité[b]**
	Observed OTUs	**Chao1**	**Shannon**
ADNg-Qiagen_V1-V3	286,74 ± 98,97	308,97 ± 94,37	5,65 ± 0,87
ADNg-CTAB_V1-V3	266,05 ± 90,04	281,75 ± 86,22	5,64 ± 0,90
ADNg-Qiagen_V3-V4	315,79 ± 119,56	361,43 ± 118,27	4,04 ± 0,69
ADNg-CTAB_V3-V4	143,05 ± 45,80	147,27 ± 44,08	4,83 ± 0,69
ADNg-Qiagen_V4-V5	313,23 ± 103,65	324,04 ± 101,00	5,39 ± 0,82
ADNg-CTAB_V4-V5	286,35 ± 94,29	295,62 ± 90,32	5,03 ± 0,70

[a] La richesse est le nombre de taxa (OTUs) différents présents dans un système donné.
[b] La diversité prend en considération aussi bien la richesse en OTUs d'un système donné que la régularité avec laquelle ces OTUs sont distribuées dans le système (équitabilité).

Pour essayer de dresser une image de la composition de la communauté procaryote de *Scopalina hapalia*, nous avons mené une analyse comparative des résultats obtenus à partir des 2 échantillons et pour chaque région ciblée.

❖ Région V1-V3

L'analyse de la région V1-V3 montre que les phyla dominants sont ceux des Protéobactéries et des Cyanobactéries, quel que soit l'échantillon d'ADN génomique (ADNg) considéré, (ADNg-Qiagen : 62,58 et 16,77 % / ADNg-CTAB : 62,35 et 17,48 %), (**Tableau XLIX** et **Figure 40**). S'ensuivent, les phyla des Planctomycetes, des Bacteroidetes et des Actinobactéries qui présentent des abondances relatives variables en fonction de l'ADNg considéré. Ces 5 phyla représentent à eux seuls 94,97 % à 97,51 % de l'ensemble des phyla détectés. Les phyla restants, détectés à partir de l'ADNg-Qiagen (11 phyla) et de l'ADNg-CTAB (12 phyla), représentent respectivement 2,49 % et 5,03 %. Parmi ces derniers phyla figurent plusieurs phyla candidats* : OD1, NKB19, SAR 406 (marine group A), SRB1093, TM6, TM7 et WPS-2 [Rinke *et al.*, 2013]. Par ailleurs, certaines séquences n'ont pu être classifiées ni au niveau du domaine du vivant (0,06 % - 0,39 %) ni au niveau du phyla (1,16 % - 1,70 %). L'abondance relative, dans notre contexte, fait référence au nombre de séquences (individus) classées dans un niveau taxonomique donné (phylum/genre) par rapport au nombre total de séquences détectées.

L'affiliation taxonomique au niveau du genre des séquences générées à partir de la région V1-V3 a permis d'identifier 118 et 115 genres respectivement, à partir des ADNg-Qiagen et ADNg-CTAB. La **Figure 41** présente une comparaison des genres qui apparaissent dans le top 10, une fois classés en fonction de leur abondance relative. Ces 10 genres les plus abondants, détectés à partir des ADNg-Qiagen et ADNg-CTAB, représentent respectivement 72,04 % et 64,26 % de tous les genres détectés.

Tableau XLIX : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V1-V3 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*.

Phyla	Abondance relative (%)	
	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB
Proteobacteria	62,58	62,35
Cyanobacteria	16,77	17,48
Planctomycetes	11,71	5,16
Bacteroidetes	4,77	7,03
Actinobacteria	1,68	2,96
Autres	1,16	1,70
Verrucomicrobia	0,45	1,20
TM7	0,31	0,64
Spirochaetes	0,23	0,08
OD1	0,10	0,03
SAR406	0,07	0,11
Non-classifié[a]; Autre	0,06	0,39
Firmicutes	0,04	0,13
Chloroflexi	0,02	0,15
Nitrospirae	0,02	-
SBR1093	0,02	0,26
TM6	-	0,21
WPS-2	-	0,11

[a] Non-classifié : toute séquence ne pouvant être assignée avec un score de confiance supérieur au seuil de 80 % fixé par RDP.

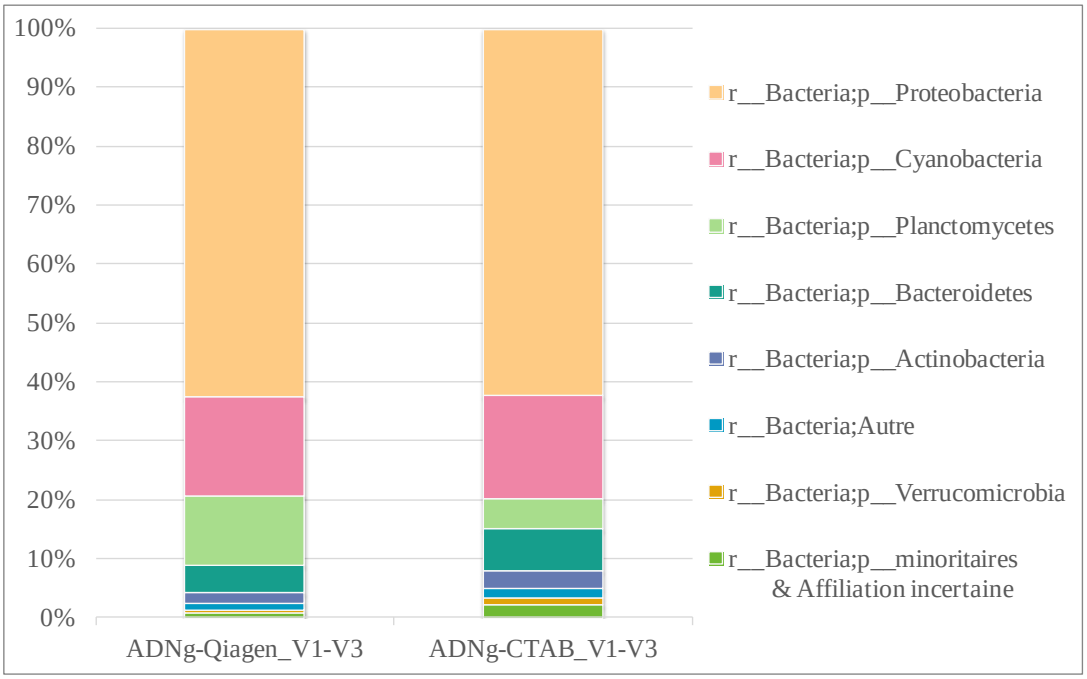


Figure 40 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V1-V3 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB).

r : règne ; p : phylum.
Phyla minoritaires : TM7, Spirochaetes, OD1, SAR406, Firmicutes, Chloroflexi, Nitrospirae, SBR1093, TM6, WPS-2.

La visualisation du graphique montre que le séquençage des ADNg-Qiagen et ADNg-CTAB permet la détection des mêmes taxa avec toutefois une variation des abondances relatives. Seuls 2 genres sont détectés différentiellement, dans le cadre du « top 10 », c'est-à-dire qu'ils sont détectés dans le « top 10 » de l'un et pas dans celui de l'autre. Il s'agit pour l'ADNg-Qiagen de 2 genres non identifiés appartenant respectivement à la classe des Gammaprotéobactéries (famille des *Endozoicimonaceae*, 6,46 %) et à la classe des Alphaprotéobactéries (famille des *Rhodobacteraceae*, 2,59 %). S'agissant de l'ADNg-CTAB, les 2 genres sont : un genre non identifié appartenant à la classe des Alphaprotéobactéries (famille des *Phyllobacteriaceae*, 3,23 %) et le genre *Escherichia* (5,02 %). La présence du genre *Escherichia* parmi les genres détectés, bien que discutable, ne peut être exclue de la communauté microbienne de *Scopalina hapalia*. En effet, ce genre a été détecté dans le contrôle d'extraction du kit Qiagen à une abondance relative beaucoup plus importante (71,45 %). Néanmoins, il a également été rapporté dans la littérature que des souches d'*Escherichia* sp., notamment des souches pathogènes, peuvent survivre transitoirement en milieu marin et sont considérées comme des membres transitoires de la communauté bactérienne de l'hôte [Vignaroli *et al.*, 2012]. Ce profil de détection différentielle des genres dans le « top 10 » est relativement représentatif de l'ensemble des résultats obtenus pour le séquençage de cette région hypervariable V1-V3. Par ailleurs, nous constatons que pour plusieurs séquences, l'assignation à un genre n'a pas pu se faire. Le genre dominant relativement la communauté bactérienne est le genre *Synechococcus*, qui appartient au

phylum des Cyanobactéries, avec une abondance relative moyenne de 12,62 % pour les deux échantillons d'ADNg (Qiagen / CTAB).

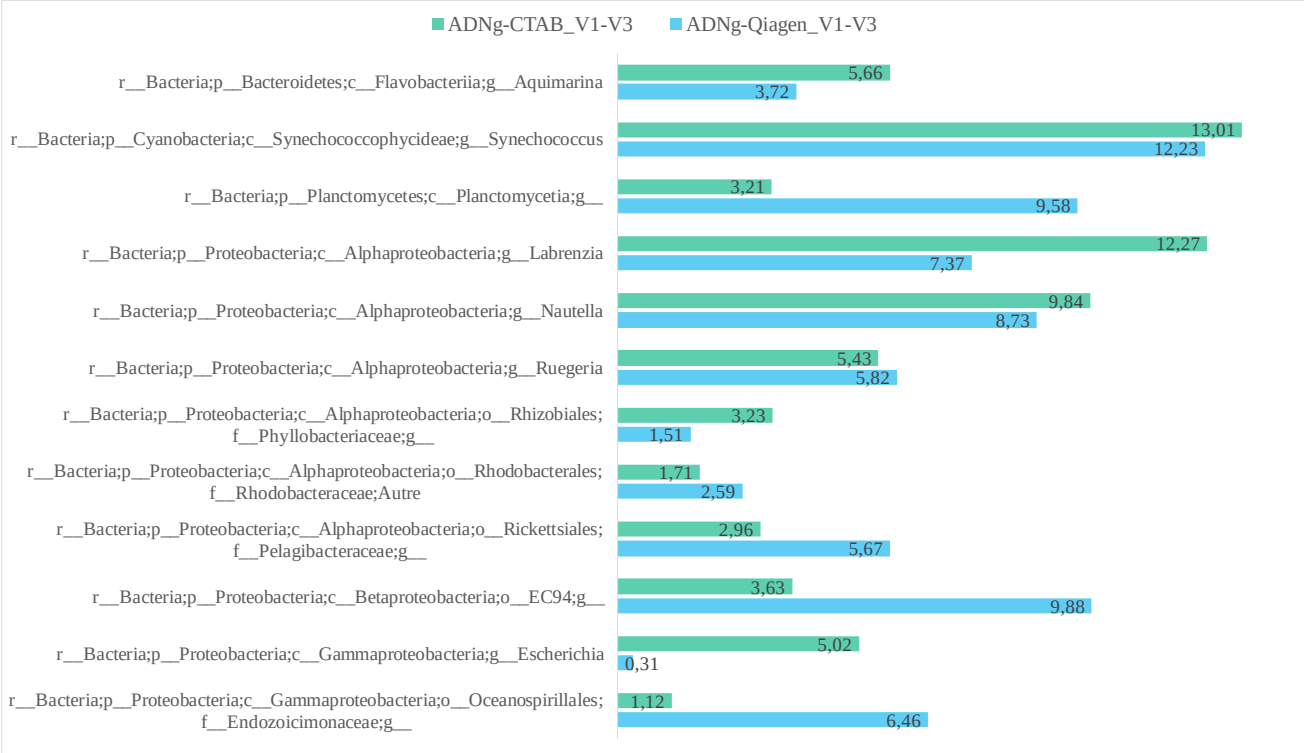


Figure 41 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V1-V3 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*.

r : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre.
Les abondances relatives (%) de chaque genre sont indiquées aux bords intérieurs des barres.

❖ Région V3-V4

L'analyse du séquençage de la région V3-V4 montre que le phylum dominant est nettement celui des Protéobactéries suivi par le phylum des Actinobactéries (**Tableau L** et **Figure 42**). En fonction de l'ADNg considéré (Qiagen / CTAB), suivent ensuite les phyla des Bacteroidetes (ADNg-Qiagen : 1,24 % et ADNg-CTAB : 1,13 %) et des Firmicutes (ADNg-Qiagen : 0,76 % et ADNg-CTAB : 2,54 %). Ces 4 phyla représentent, à eux seuls, plus de 98 % des phyla détectés à partir de l'ADNg-Qiagen (21 phyla) et de l'ADNg-CTAB (15 phyla). D'autres phyla aux abondances relatives faibles (< 0,6 %) ont été détectés, parmi lesquels figurent plusieurs phyla candidats. Ces phyla ont été par ailleurs détectés avec V1-V3, il s'agit de : SAR 406 (marine group A), TM6, TM7, NKB19 et SRB1093. L'analyse de la région V3-V4 favorise l'identification non seulement d'un plus grand nombre de phyla mais aussi d'un domaine du vivant supplémentaire. Ainsi des extrêmophiles (*Deinococcus-Thermus* ou encore *Caldithrix*) sont détectés en plus de 2 phyla (*Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*) appartenant au domaine du vivant des Archées. *Caldithrix* fait également partie des phyla candidats identifiés chez les éponges.

Tableau L : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V3-V4 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*.

Phyla	Abondance relative (%)	
	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB
Proteobacteria	94,03	86,83
Actinobacteria	2,82	7,78
Bacteroidetes	1,24	1,13
Firmicutes	0,76	2,54
Spirochaetes	0,33	0,23
Deinococcus-Thermus	-	0,32
SAR406	0,29	0,58
Gemmatimonadetes	0,09	0,06
TM7	0,06	0,06
Euryarchaeota (Archaea)	0,06	-
Planctomycetes	0,06	0,06
Chlamydiae	0,05	0,14
Nitrospirae	0,05	-
Cyanobacteria	0,05	0,02
Acidobacteria	0,04	0,12
Crenarchaeota (Archaea)	0,02	0,11
Caldithrix	0,02	-
Lentisphaerae	-	0,02
Bacteria;Autre	0,01	-
SBR1093	0,01	-
NKB19	0,01	-
TM6	0,01	-
Tenericutes	0,01	-

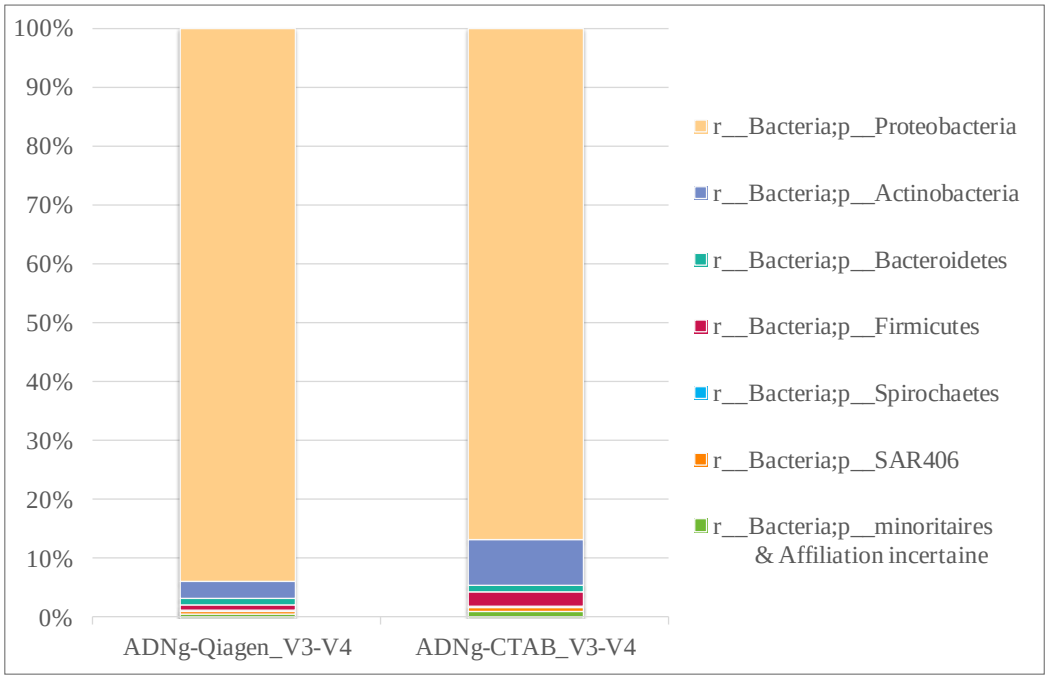


Figure 42 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V3-V4 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB).

r : règne ; p : phylum.
Phyla minoritaires : Deinococcus-Thermus, Gemmatimonadetes, TM7, Euryarchaeota (Archaea), Planctomycetes, Chlamydiae, Nitrospirae, Cyanobacteria, Acidobacteria, Crenarchaeota (Archaea), Caldithrix, Lentisphaerae, SBR1093, NKB19, TM6 et Tenericutes.

L'affiliation taxonomique au niveau du genre des séquences générées à partir de la région V3-V4 a conduit à l'identification de 164 et 98 genres respectivement, à partir des ADN extraits par les 2 méthodes (Qiagen et CTAB). Une analyse comparative des genres apparaissant dans le top 10, classés en fonction de leur abondance relative, montre que ces derniers représentent 85,07 % (l'ADNg-Qiagen) et 74,22 % (ADNg-CTAB) de l'ensemble des genres détectés (**Figure 43**). Parmi ces 10 genres, 9 genres apparaissent aussi bien dans le top 10 des genres identifiés par le séquençage de l'ADNg-Qiagen que dans celui de l'ADNg-CTAB. Seules les abondances relatives associées à chaque genre varient comme illustré à la **Figure 43**.

Enfin, les points suivants sont à souligner :

- Plusieurs de ces genres détectés, appartenant au phylum des Protéobactéries, sont à ce jour non identifiés.
- La présence dans ce classement d'un genre non identifié appartenant au phylum des Actinobactéries (classe : *Acidimicrobiia*).
- Le genre qui domine la communauté bactérienne détecté à partir de l'ADNg-Qiagen est un genre non identifié appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries (48,03 %).
- A partir du séquençage de l'ADNg-CTAB, c'est le genre *Ruegeria* (16,72 %) appartenant à la classe des Alphaprotéobactéries qui domine.

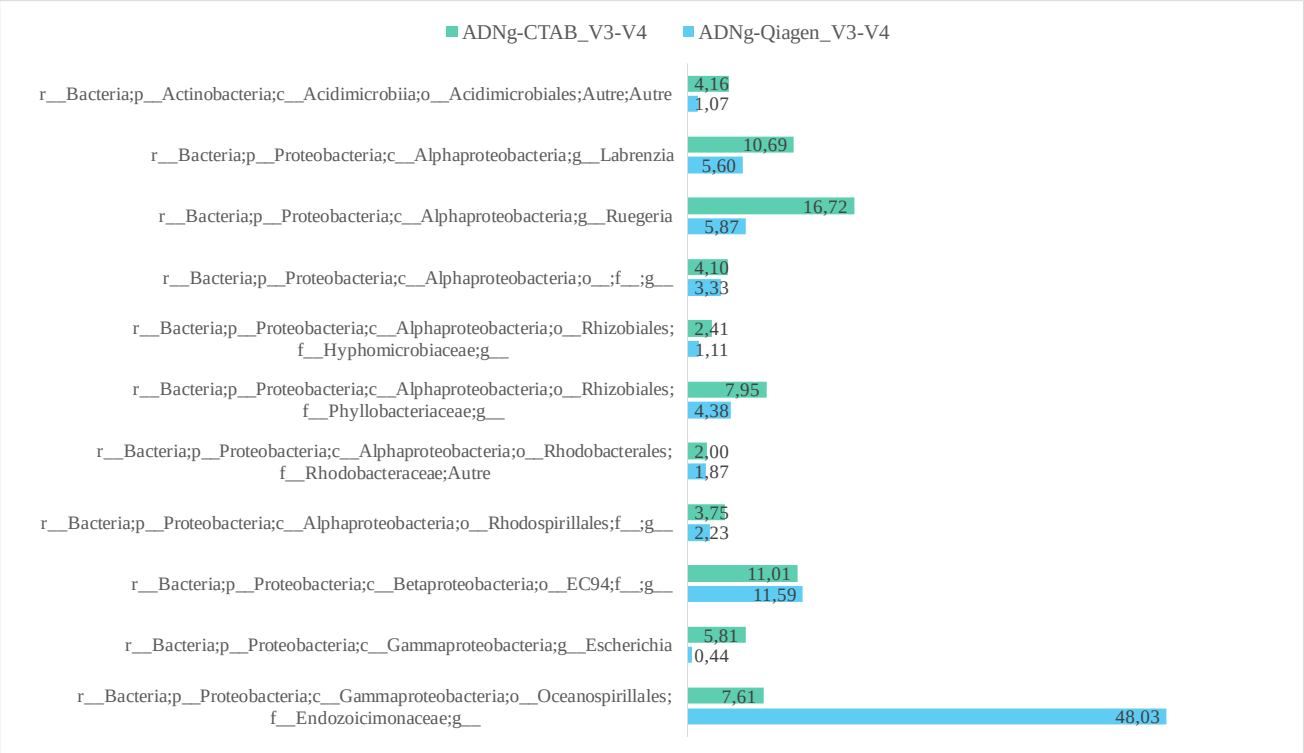


Figure 43 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V3-V4 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*.

r : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre.
Les abondances relatives (%) de chaque genre sont indiquées aux bords intérieurs des barres.

❖ Région V4-V5

L'analyse de la région V4-V5 montre que les 3 phyla dominants sont ceux des : Protéobactéries, Bacteroidetes et Cyanobactéries (**Tableau LI** et **Figure 44**). Ces 3 phyla représentent plus de 80% des phyla détectés à partir de l'ADNg-Qiagen (19 phyla) et de l'ADNg-CTAB (21 phyla). Le séquençage de cette région permet également l'identification d'un phylum, Crénarchées, appartenant au domaine du vivant des Archaebactéries. Deux nouveaux phyla candidats ont été identifiés grâce au séquençage de cette région : OP8 et ZB3. Les phyla des *Chlorobi*, *Nitrospirae*, OP8 et Tenericutes ne sont pas détectés avec l'ADNg-Qiagen. Pour l'ADNg-CTAB, ce sont les phyla ZB3 et *Deinococcus-Thermus* qui n'ont pas été détectés. Ces phyla sont très peu abondants, de l'ordre de 0,03 % exception faite du phylum des *Nitrospirae* (0,14 %). Cette détection différentielle des phyla les moins abondants a également été observée pour les régions V1-V3 et V3-V4.

Tableau LI : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V4-V5 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*.

Phylum	Abondance relative (%)	
	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB
Proteobacteria	57,21	55,97
Bacteroidetes	17,99	16,16
Cyanobacteria	11,08	12,13
Planctomycetes	9,90	5,00
Actinobacteria	1,30	2,43
Crenarchaeota (Archaea)	0,62	5,93
WPS-2	0,54	0,19
Firmicutes	0,34	0,68
Spirochaetes	0,26	0,37
SAR406	0,23	0,21
SBR1093	0,16	0,21
Chloroflexi	0,12	0,04
TM7	0,06	0,08
TM6	0,04	-
Deinococcus-Thermus	0,04	-
Acidobacteria	0,04	-
ZB3	0,03	-
Verrucomicrobia	0,02	0,05
TM6	-	0,20
Nitrospirae	-	0,14
Bacteria;Autre	-	0,11
Chlorobi	-	0,02
OP8	-	0,02
Tenericutes	-	0,02

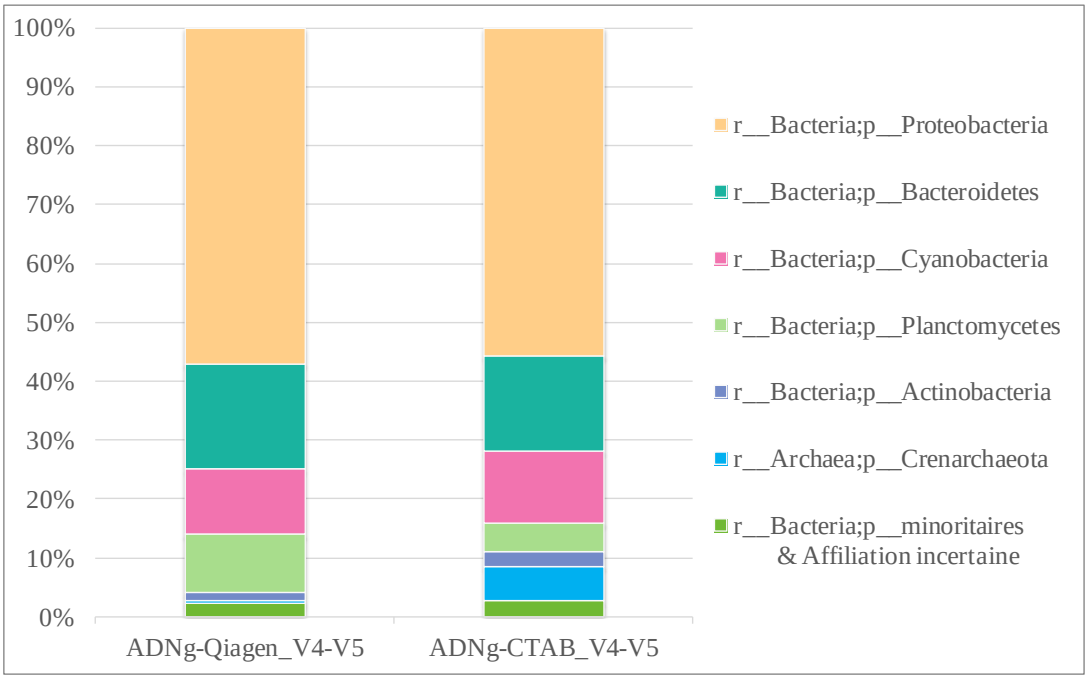


Figure 44 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V4-V5 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB).

r : règne ; p : phylum.
Phyla minoritaires : WPS-2, Firmicutes, Spirochaetes, SAR406, SBR1093, Chloroflexi, TM7, TM6, Deinococcus-Thermus, Acidobacteria, ZB3, Verrucomicrobia, TM6, Nitrospirae, Chlorobi, OP8 et Tenericutes.

L'affiliation taxonomique au niveau du genre des séquences générées à partir de la région V4-V5 a conduit à l'identification de 146 et 154 genres, respectivement à partir des ADNg-Qiagen et ADNg-CTAB. La comparaison des 10 genres les plus abondants détectés à partir des ADNg-Qiagen (68,45 %) et ADNg-CTAB (70,49 %) montre que ces genres sont détectés quel que soit l'ADN génomique considéré, la seule différence étant les abondances relatives (**Figure 45**). L'affiliation taxonomique au niveau des genres à l'issue du séquençage de la région V4-V5 montre que les genres dominants sont *Ruegeria* pour l'ADNg-CTAB (22,87 %) et *Aquimarina* pour l'ADNg-Qiagen (14,29 %). *Ruegeria* appartient au phylum dominant des Protéobactéries, le genre *Aquimarina* lui appartient à celui des Bacteroidetes. Pour les genres peu abondants, nous observons des différences non seulement en termes d'abondance relative mais aussi en termes de présence/absence en fonction de l'ADNg considéré.

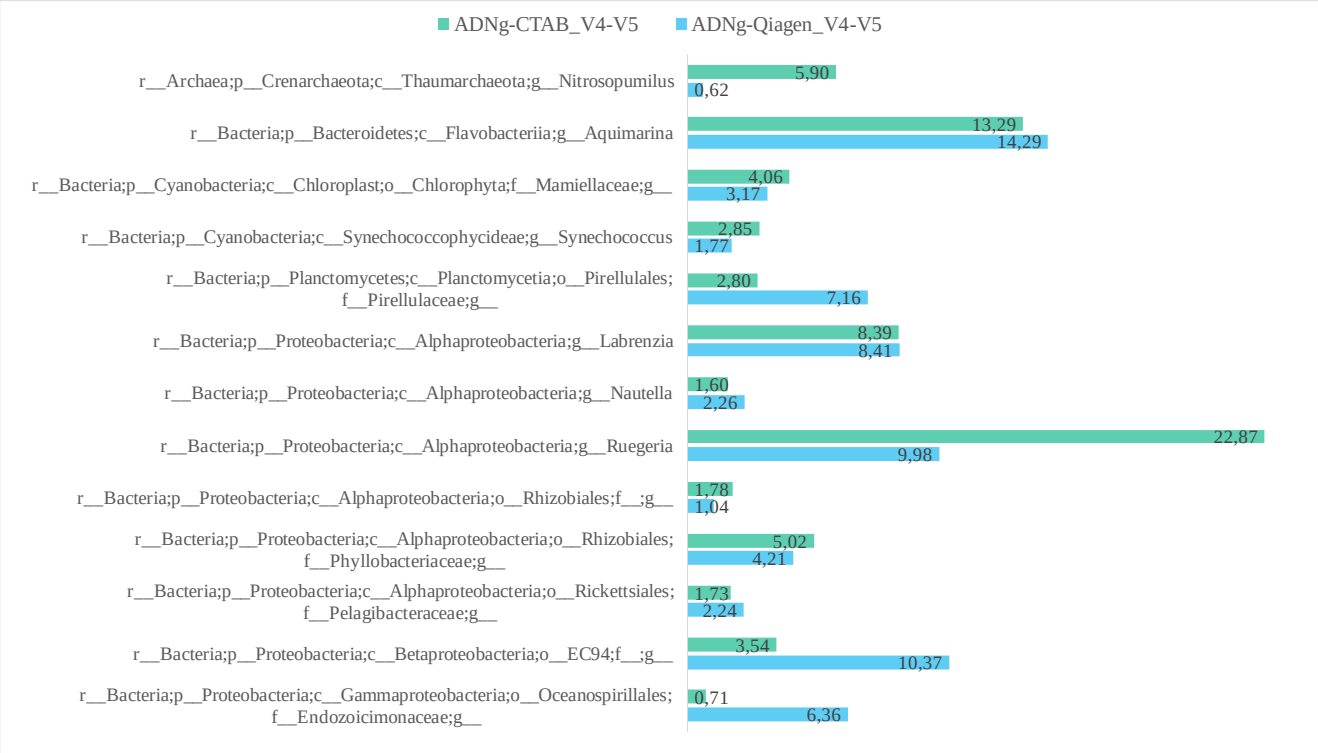


Figure 45 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V4-V5 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*.

r : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre.
Les abondances relatives, en pourcentage, de chaque genre sont indiquées aux bords intérieurs des barres.

IV.2.2.3 Discussion

L'étude du microbiome de *Scopalina hapalia* a été réalisée par séquençage de l'ARNr 16S, à partir de 2 échantillons de son ADN génomique extraits au moyen de 2 kits d'extraction différents : Qiagen et CTAB. Le séquençage de l'ARNr 16S est une approche privilégiée dans les études de la composition et de la diversité des communautés microbiennes [Sinclair *et al.*, 2015]. L'ARNr 16S est composé, en plus de ses régions conservées chez la plupart des microorganismes, de 9 régions hypervariables. Ces régions variables génèrent une diversité considérable de séquences au sein des différents microorganismes permettant ainsi de différencier et de classer ces derniers. Ainsi, la plupart des études de métagénomique actuelles, utilisant les technologies de séquençage de nouvelles générations telles que Illumina MiSeq, ciblent une ou plusieurs de ces régions hypervariables [Mizrahi-Man *et al.*, 2013]. Certaines de ces études ont également cherché à évaluer l'efficacité (en termes de sensibilité, résolution et précision) de ces régions hypervariables pour l'affiliation taxonomique mais aucun véritable consensus ne semble se dégager [Zhang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2011; Claesson *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2009].

Le degré de conservation de ces régions variables étant lui-même variable d'une région à l'autre, l'analyse d'une région variable ne suffit pas, à elle seule, à décrire la diversité bactérienne d'une communauté de manière complète [Yarza *et al.*, 2014]. Aussi, dans le cadre

de notre étude, les régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 ont été ciblées afin d'avoir accès à l'information la plus exhaustive possible. A l'instar de ce qui a été décrit dans la littérature, les 3 régions analysées produisent des résultats différents en termes de richesse des espèces, de diversité ainsi que de la composition de la communauté bactérienne, notamment au niveau du phylum. En effet, les régions V3-V4 et V4-V5 semblent être plus performantes dans leurs capacités à détecter et distinguer des rangs taxonomiques de niveaux supérieurs (tels que le domaine du vivant, le phylum ou le genre) comparativement à la région V1-V3 (**Tableau XLVII** p. 171). En prenant l'exemple de l'ADNg-Qiagen, 19 phyla et 146 genres ont été détectés avec le séquençage de la région V4-V5 contre 16 phyla et 118 genres pour V1-V3. Ce résultat est cohérent avec les index Chao1 (estimateur de richesse) calculés pour les mêmes régions (**Tableau XLVIII** p. 171). Ainsi, un index Chao1 de 324,04 a été obtenu pour V4-V5 contre 308,97 pour V1-V3. Dans ce sens, nous observons que le séquençage des régions V3-V4 et V4-V5 permet la détection des archées ainsi que de certains phyla bactériens tels que les extrêmophiles contrairement à la région V1-V3. Il ressort donc que la région V3 à V5 est plus sensible dans la détection d'un spectre plus large de phyla et offre une meilleure résolution de la communauté bactérienne au niveau du phylum ainsi que du genre. Toutefois, concernant l'index de Shannon (diversité des espèces), il apparaît que l'index obtenu avec la région V1-V3 (index = 5,65) est sensiblement plus élevé que ceux des régions V4-V5 (5,39) et V3-V4 (4,04). Ceci semble indiquer que la région V1-V3 serait plus performante pour capturer la diversité des espèces que V4-V5 (5,39) et V3-V4 (4,04). Ces résultats sont en parfait accord avec les études qui montrent que les indices de diversité sont largement dépendantes des régions hypervariables étudiées mais aussi de la technologie NGS utilisée [Claesson *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2009]. Youssef et ses collaborateurs (2009) se sont intéressés, dans le cas du pyroséquençage, aux indices de richesse et à l'influence que pouvait avoir sur elles, l'utilisation de courtes séquences de l'ARN 16S (régions hypervariables) comparativement à la séquence d'ARN 16S presque complète. Ils ont montré que les séquences englobant la région V4 donnaient des indices de richesse comparables à celles obtenues avec les séquences presque entières de l'ARN 16S. D'autres études s'intéressant aux communautés microbiennes et aux analyses phylogénétiques montrent que la région V4 (V1-V4 ou V4-V6) est particulièrement sensible aux divergences génétiques et offre donc une bonne résolution pour les affiliations taxonomiques au niveau du phylum et du genre [Zhang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016; Yarza *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007a]. La région V1-V3, étant très variable, offre une bonne résolution pour distinguer et classifier les taxa au niveau de l'espèce [Yarza *et al.*, 2014].

❖ Les phyla dominants

En considérant les abondances relatives des phyla identifiés par le séquençage des 3 régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5, 5 phyla dominants émergent : les Protéobactéries, les Cyanobactéries, les Bacteroidetes, les Planctomycetes et les Actinobactéries (**Tableau LII**). Ces 5 phyla sont retrouvés quel que soit l'ADNg considéré et la région séquencée. Avec plus de 50 % des OTUs affiliés au phylum des Protéobactéries, celui-ci est de loin le phylum dominant la communauté bactérienne de *Scopalina hapalia*. Les phyla des Cyanobacteries, Bacteroidetes et des Planctomycètes n'atteignent qu'occasionnellement une abondance

relative supérieure à 10 %. Enfin, bien que figurant dans le top 5, les abondances relatives du phylum des Actinobactéries ne dépassent que très rarement les 5 %.

Il est à noter que les Crenarchaeota, les Firmicutes, les SAR406 et les Spirochaetes apparaissent également ponctuellement dans ce classement des phyla les plus abondants retrouvés dans le microbiome de *Scopalina hapalia*. Les phyla des Firmicutes, des SAR406 et des Spirochaetes sont essentiellement détectés avec le séquençage de la région V3-V4. Les Crenarchaeota sont eux détectés à partir du séquençage de la cible V4-V5.

Tableau LII : Présentation des phyla les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction différents (Qiagen et CTAB).

Phyla	**Abondance relative (%)**		
	V1-V3	**V3-V4**	**V4-V5**
ADNg-Qiagen			
Proteobacteria	62,58	94,03	57,21
Cyanobacteria	16,77	-	11,08
Planctomycetes	11,71	-	9,9
Bacteroidetes	4,77	1,24	17,99
Actinobacteria	1,68	2,82	1,30
Firmicutes	-	0,76	-
Spirochaetes	-	0,33	-
ADNg-CTAB			
Proteobacteria	62,35	86,83	55,97
Cyanobacteria	17,48	-	12,13
Bacteroidetes	7,03	1,13	16,16
Planctomycetes	5,16	-	5,00
Actinobacteria	2,96	7,78	-
Firmicutes	-	2,54	-
SAR406	-	0,58	-
Crenarchaeota (Archaea)	-	-	5,93

L'analyse comparative des phyla détectés aussi bien avec l'ADNg-Qiagen qu'avec l'ADNg-CTAB met en lumière plusieurs phyla en commun, ce qui permet de corroborer les résultats obtenus. Des détections différentielles (présence/absence) sont également obtenues, essentiellement, pour les phyla aux abondances relatives très faibles telles que les Euryarchaeota, Chlorobi et Lentisphaerae. Par ailleurs, plusieurs phyla candidats (*Caldithrix*, NKB19, OD1, OP8, SAR406 (marine group A), SRB1093, TM6, TM7 et ZB3) ont également été identifiés à des abondances relatives très faibles.

❖ Cas particulier du phylum des Protéobactéries

Dans le phylum des Protéobactéries, ce sont les Gammaprotéobactéries et Alphaprotéobactéries qui dominent, seules les abondances relatives varient en fonction de l'échantillon d'ADNg considéré (**Tableau LIII**).

Tableau LIII : Abondance relative des différentes classes de Protéobactéries en fonction de l'échantillon de l'ADNg de *Scopalina hapalia* considéré.

Classes	Abondance relative (%)					
	ADNg-Qiagen			ADNg-CTAB		
	V1-V3	V3-V4	V4-V5	V1-V3	V3-V4	V4-V5
Alphaprotéobactérie	43,80	29,35	36,88	48,90	55,78	48,82
Betaprotéobactérie	9,93	11,61	10,37	4,18	11,31	3,67
Gammaprotéobactérie	8,54	51,55	8,66	8,38	18,44	2,70
Deltaprotéobactérie	0,21	1,51	1,26	0,28	1,31	0,75

Plus de la moitié des OTUs détectés au cours de cette étude du microbiome de *Scopalina hapalia* n'ont pu être affiliés à un genre décrit. Cela est dû au fait que la grande majorité des microorganismes n'est pas encore cultivable en laboratoire. De ce fait, ils ne sont identifiés, pour la plupart, que par des approches moléculaires.

Tableau **LIV** et **Tableau LV** permettent d'illustrer ce résultat en présentant les 10 genres les plus abondants. En effet, ces 10 genres représentent à eux seuls plus de la moitié de la communauté microbienne de *Scopalina hapalia* en termes d'abondance relative. En fonction des OTUs considérés, une affiliation taxonomique au niveau d'un genre / famille / ordre / classe décrit a pu être réalisé. Les 5 genres les plus abondants qui ont été détectés à partir des 2 échantillons d'ADNg et pour les 3 régions ciblées sont : *Ruegeria* (Alphaproteobacteria), *Aquimarina* (Bacteroidetes), *Labrenzia* (Alphaproteobacteria), un genre non classifié de l'ordre EC94 (Betaproteobacteria) et *Synechococcus* (Cyanobacteria). Un autre genre non décrit de la famille des Endozoicimonaceae (Gammaproteobacteria) a été détecté en grande quantité avec la cible V3-V4 (48 %). Ce résultat pourrait être la conséquence d'une sur-amplification d'une séquence particulière. En effet, la surreprésentation de certains taxa peut survenir dans certains cas où les amorces sélectionnées pour amplifier les régions d'intérêt ne sont pas optimales [Yang *et al.*, 2016; Klindworth *et al.*, 2013]. Il a été montré, par exemple, que l'utilisation du couple d'amorces 515F/806R pour amplifier la région V4 pouvait sous-estimer (exemple : SAR11 – classe des

Proteobacteria) ou surestimer (exemple : Gammaproteobacteria) la représentation de certains taxa communs dans le milieu marin [Parada *et al.*, 2016].

Tableau LIV : Affiliation des 10 OTUs les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen du kit d'extraction Qiagen, (**ADNg-Qiagen)**.

c : classe ; f : famille ; g : genre ; o : ordre.

Taxonomie	**Abondance relative (%)**		
	V1-V3	**V3-V4**	**V4-V5**
g__*Synechococcus*	12,23	-	-
c__Betaproteobacteria;o__EC94;f__;g__	9,88	11,59	10,37
o__Pirellulales;f__Pirellulaceae;g__	9,58	-	7,16
g__*Nautella*	8,73	-	2,26
g__*Labrenzia*	7,37	5,60	8,41
o__Oceanospirillales;f__Endozoicimonaceae;g__	6,46	48,03	6,36
g__*Ruegeria*	5,82	5,87	9,98
o__Rickettsiales;f__Pelagibacteraceae;g__	5,67	-	-
g__*Aquimarina*	3,72	-	14,29
o__Rhodobacterales;f__Rhodobacteraceae;Autre	2,59	1,87	-
o__Rhizobiales;f__Phyllobacteriaceae;g__	-	4,38	4,21
c__Alphaproteobacteria;o__;f__;g__	-	3,33	-
c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__;g__	-	2,23	-
o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__	-	1,11	-
o__Acidimicrobiales;Autre;Autre	-	1,07	-
o__Chlorophyta;f__Mamiellaceae;g__	-	-	3,17
o__Rickettsiales;f__Pelagibacteraceae;g__	-	-	2,24

Tableau LV : Affiliation des 10 OTUs les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen du kit d'extraction CTAB (**ADNg-CTAB**).

c : classe ; f : famille ; g : genre ; o : ordre.

Taxonomie	Abondance relative (%)		
	V1-V3	V3-V4	V4-V5
g__*Synechococcus*	13,01	-	2,85
g__*Labrenzia*	12,27	10,69	8,39
g__*Nautella*	9,84	-	-
g__*Aquimarina*	5,66	-	13,29
g__*Ruegeria*	5,43	16,72	22,87
g__*Escherichia*	5,02	-	-
c__Betaproteobacteria;o__EC94;f__;g__	3,63	11,01	3,54
o__Rhizobiales;f__Phyllobacteriaceae;g__	3,23	7,95	5,02
o__Pirellulales;f__Pirellulaceae;g__	3,21	-	2,80
o__Rickettsiales;f__Pelagibacteraceae;g__	2,96	-	-
o__Oceanospirillales;f__Endozoicimonaceae;g__	-	7,61	-
g__*Escherichia*	-	5,81	-
o__Acidimicrobiales;Autre;Autre	-	4,16	-
c__Alphaproteobacteria;o__;f__;g__	-	4,10	-
o__Rhodospirillales;f__;g__	-	3,75	-
o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__	-	2,41	-
g__*Nitrosopumilus*	-	-	5,90
o__Chlorophyta;f__Mamiellaceae;g__	-	-	4,06
o__Rhizobiales;f__;g__	-	-	1,78

❖ Cas particulier du phylum des Actinobactéries

Dans le cadre du projet TASCMAR, un intérêt particulier est porté aux Actinobactéries car certains membres de ce phylum sont connus pour être des producteurs prolifiques de métabolites spécialisés. La détection de ce phylum dans la communauté microbienne de *Scopalina hapalia* est particulièrement encourageante malgré des abondances relatives faibles. Globalement, les abondances relatives liées à ce phylum varient entre 1,5 % et 3,0 %, en fonction de l'échantillon d'ADNg et de la région ciblée (**Tableau LVI**). Nous observons, toutefois, une augmentation drastique de ce chiffre à 7,78 % pour la cible V3-V4 de l'ADNg-CTAB (**Tableau LVI**). En s'intéressant aux OTUs qui ont été créés à partir du séquençage de la région V3-V4 de l'ADNg-CTAB, nous nous apercevons qu'un OTU est particulièrement surreprésenté. Cet OTU, appartenant à la classe des Acidimicrobiia (ordre acidimicrobiales), représente à lui seul 4,16 % (soit 1 118 séquences) de l'ensemble des OTUs détectés à partir de l'ADNg-CTAB de *Scopalina hapalia*. Les abondances relatives du phylum des Actinobactéries étant cohérentes à travers 5 jeux de données différentes (cible / échantillon), cette différence significative observée pour V3-V4 / ADNg-CTAB semble être

liée à un biais du séquençage et pourrait correspondre à un cas de sur-amplification d'une espèce en particulier.

Tableau LVI : Nombre de séquences détectées et affiliées au phylum des Actinobactéries à partir de l'ADNg de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB).

Cibles	**V1-V3**		**V3-V4**		**V4-V5**	
Dispositif d'extraction	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB	ADNg-Qiagen	ADNg-CTAB
Abondances relatives	1,68 %	2,96 %	2,82 %	7,78 %	1,30 %	2,43 %
Séquences	274	540	1341	2090	485	986
OTUs	17	19	24	18	17	16
Affiliation (Genres non décrits)	93,07 %	87,78 %	98,51 %	93,83 %	94,64 %	94,82 %
Affiliation (genres)	6,93 % (4 OTUs)	12,22 % (4 OTUs)	1,49 % (3 OTUs)	6,17 % (4 OTUs)	5,36 % (1 OTU)	5,18 % (1 OTU)

L'affiliation taxonomique des OTUs appartenant au phylum des Actinobacteria indique que les membres appartenant à la classe des Acidimicrobiia dominent (abondance relative > 80 %), suivie par les Actinobacteria (10 - 20 %) et les Thermoleophilia (< 2 %) (**Tableau LVII**). Les Acidimicrobiia sont abondants dans les milieux aquatiques notamment les habitats marins [Hu *et al.*, 2018]. Les membres de cette classe ont également été retrouvés dans la communauté microbienne des éponges [Hentschel *et al.*, 2006]. Toutefois, très peu d'espèces ont été cultivées et caractérisées. Quatre espèces types, isolées de milieux extrêmement acides, ont été identifiées à ce jour : *Acidimicrobium ferreoxidans*, *Acidithrix ferooxidans*, *Ferrimicrobium acidiphilum* et *Ferrithrix thermotolerans*. Un autre représentant cultivable a été isolé de boues d'épuration, *Microthrix parvicella*. La classe des Thermoleophilia, à l'instar des Acidimicrobiia, n'a que très peu de représentants isolés et caractérisés [Hu *et al.*, 2019]. Les études métagénomiques suggèrent que les membres de cette classe sont abondants dans les eaux thermales et les sols. La grande majorité des actinomycètes cultivables appartiennent à la classe des Actinobacteria et plus particulièrement à l'ordre des Actinomycétales. Ces derniers sont très peu représentés (entre 0,18 % et 1,32 %) dans la communauté bactérienne de *Scopalina hapalia*. Enfin, moins de 1 % des séquences affiliées au phylum des Actinobactéries n'ont pu être positionnées jusqu'au niveau de la classe.

Plus de 90 % des séquences ont été affiliées à des genres non décrits. Plusieurs OTUs affiliées à la famille des *Microthrixaceae* ont été identifiées, toutefois une seule OTU a pu être caractérisée jusqu'au niveau du genre : *candidatus Microthrix*. Les genres cultivables : *Brevibacterium*, *Mycobacterium* et *Pseudonocardia* ont également été identifiés.

Tableau LVII : Affiliation taxonomique des OTUs appartenant au phylum des Actinobacteria, identifiées à partir du séquençage de l'ADNg de *Scopalina hapalia*.

Classes	Abondance relative	Ordres	Familles	Genres
Acidimicrobiia	> 80 %	Acidimicrobiales	C111 koll13 EB1017 JdFBGBact ntu14 *Microthrixaceae* OCS155 wb1_P06 ZA3409c	 *candidatus Microthrix*
Actinobacteria	10 % - 20 %	Actinomycetales	*Brevibacteriaceae* *Corynebacteriaceae* [a] *Mycobacteriaceae* *Nocardioidaceae* *Propionibacteriaceae* [a] *Pseudonocardiaceae*	*Brevibacterium* *Corynebacterium* *Mycobacterium* *Propionibacterium* *Pseudonocardia*
Thermoleophilia	< 2 %	Gaiellales	AK1AB1_02E	
Non défini	< 1 %	-	-	-

[a] Egalement identifiés dans le contrôle.

❖ En résumé

En résumé, l'étude du microbiome de *Scopalina hapalia* par séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 révèle que sa communauté bactérienne est largement dominée par les Protéobactéries suivis par les Cyanobactéries, les Bacteroidetes, les Plantomycetes et les Actinobactéries. De ces résultats, il apparaît que l'éponge *Scopalina hapalia* appartient bien à la catégorie des éponges « Low Microbial Abundance » (LMA). En effet, les éponges de la catégorie « LMA » sont généralement caractérisées par une communauté bactérienne dominée par les Protéobactéries (alpha, beta, ou gamma) ou les Cyanobactéries (genre *Synechococcus*) [Gloeckner *et al.*, 2014]. Par ailleurs, la présence des phyla des Bacteroidetes, des Planctomycetes ainsi que des Firmicutes sont également considérés comme des « indicateurs LMA » [Moitinho-Silva *et al.*, 2017]. Bien qu'en plus faibles proportions dans les éponges LMA, les Actinobactéries sont souvent retrouvées parmi les phyla dominants associés aux éponges, indépendamment des techniques utilisées [Abdelmohsen *et al.*, 2014; Hentschel *et al.*, 2012].

Toutefois, avec une moyenne de 18 phyla détectés au cours du séquençage, le spécimen de *Scopalina hapalia* étudié dans le cadre de cette thèse se démarque de la plupart des éponges « LMA » qui sont généralement caractérisées par une faible diversité microbienne. Nous observons ici que sa communauté bactérienne est constituée par des phyla appartenant aussi bien au domaine du vivant des Archées que des Bactéries ainsi que par un certain nombre de phyla candidats. Bien que plusieurs de ces phyla aient été détectés avec des abondances relatives faibles, voire très faibles pour certains (de l'ordre de 0,01 %), la communauté bactérienne de *Scopalina hapalia* semble être relativement diversifiée. Bien que

surprenant au premier abord, quelques études publiées récemment semblent indiquer que la division des éponges entre « Low Microbial Abundance » et « High Microbial Abundance » n'est pas nette. Ainsi, une investigation menée en 2016 sur le microbiome de 81 espèces d'éponges, incluant des éponges LMA, a montré que toutes les éponges étudiées abritaient une communauté bactérienne comprenant en moyenne 13 phyla différents [Thomas *et al.*, 2016]. De plus, une étude réalisée en 2018 portant spécifiquement sur les communautés bactériennes des éponges de Mayotte a montré que certaines éponges LMA abritaient plus de phyla (≥ 20) que ce qui est généralement rapporté dans la littérature [Voogd *et al.*, 2018]. Une autre étude menée sur des éponges collectées à Zanzibar, incluant un spécimen de *Scopalina hapalia*, a également montré que certaines éponges LMA possedaient une très grande diversité microbienne (> 21 phyla) [Helber *et al.*, 2019]. Zanzibar étant situé dans la même zone géographique que Mayotte, nous pouvons supposer que l'espèce *Scopalina hapalia* collectée dans cette zone est caractérisée par une riche diversité microbienne.

IV.3 Etude de la diversité microbienne cultivable associée à l'éponge *Scopalina hapalia* de Mayotte

IV.3.1 Isolement des microorganismes associés

Deux broyats de *Scopalina hapalia*, traités ou non par préchauffage à 50 °C, ainsi que leurs dilutions successives (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) dans de l'eau de mer artificielle (ASW) ont été ensemencés sur 8 milieux solides différents (A1BFe+c, LB, MBA, MYA2, PDA, R2A, SCAM, SFM) et incubés à 27 °C pendant 10 semaines. La composition des milieux est donnée en **Annexe 14** (Tome II p. 71). Le prétraitement à chaud pendant 30 minutes avait pour objectif d'éliminer les souches à croissance rapide et de favoriser ainsi le développement des actinomycètes connus pour avoir une croissance plus lente. L'isolement des microorganismes a été effectué de façon exhaustive, avec une attention particulière portée aux actinomycètes et aux champignons filamenteux. Les milieux A1BFe+C, LB et MYA2 ont été sélectionnés afin de favoriser respectivement le développement des actinomycètes, des bactéries et des champignons filamenteux. Ce travail a permis l'obtention de 124 isolats répartis entre actinomycètes putatifs (12), autres bactéries (109) et champignons filamenteux (3) (**Figure 46**).

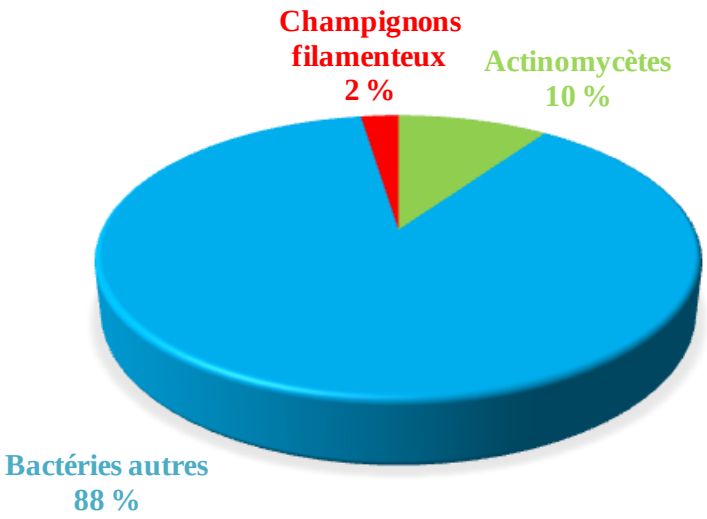
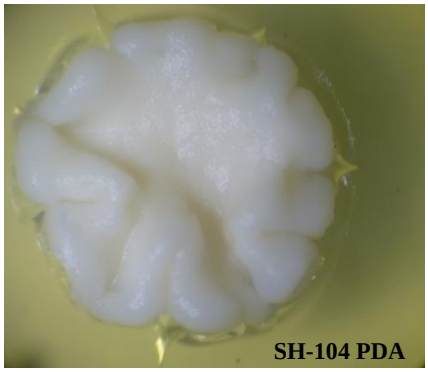
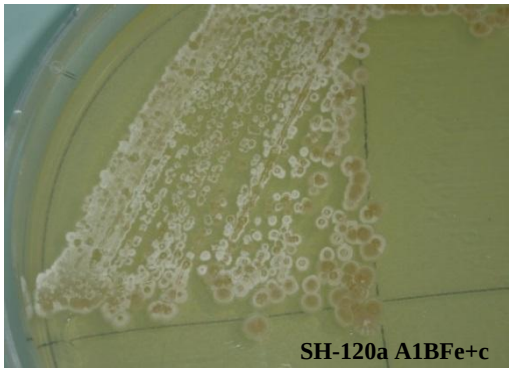


Figure 46 : Distribution par types microbiens des 124 isolats cultivés à partir de l'éponge *Scopalina hapalia*.

Concernant le cas particulier des deux actinomycètes putatifs SH-104 et SH-120a (**Figure 47**), leur purification s'est révélée être relativement compliquée. Pour la souche SH-104, il s'est avéré qu'un milieu PDA seul ou avec ajout de sel était plus adapté à son développement. Concernant la souche SH-120a, une fois isolée sur le milieu A1BFe+c, il a été impossible de la repiquer par la suite.



Milieu d'isolement : PDA-S P2.10^{-2}



Milieu d'isolement : SCAM P2.10^{0}

Figure 47 : Actinomycètes putatifs SH-104 et SH-120a sur leurs milieux de culture respectifs PDA et A1BFe+c.

P2 : protocole 2. 10^{0} : solution mère et 10^{-2} : dilution au centième

L'ensemble des souches obtenues est conservé à - 80 °C dans un milieu cryoprotecteur composé de lait écrémé (10 % w/v), glycérol (10 % v/v) et sels marins (3,3 % w/v). L'efficacité du cryoprotecteur a pu être évaluée sur une période de 3 ans grâce à des revivifications périodiques. Les résultats obtenus à ce jour sont globalement satisfaisants dans la mesure où les reprises de croissance se sont toujours faites correctement.

IV.3.2 Identification des microorganismes

IV.3.2.1 Actinobacteria / Firmicutes

Le séquençage de l'ARN 16S ainsi que l'identification des bactéries ont été réalisés par la société Genoscreen, France. Les identifications bactériennes ont été effectuées par comparaison avec les bases de données LeBibi et GenBank (NCBI).

30 souches bactériennes ont été sélectionnées pour identification par séquençage des régions hypervariables V1-V2-V3-V4-V5 de l'ARN 16S. Les séquences d'ARN 16S ont été obtenues pour 28 souches. Les longueurs de séquences varient entre 473 et 1013 paires de bases (bp). Elles ont été comparées avec les différentes séquences d'ARN 16S répertoriées dans la base de données EzBioCloud [Yoon *et al.*, 2017]. Contrairement à la base de données NCBI, EzBioCloud offre l'avantage du contrôle qualité des séquences répertoriées ainsi que l'usage des noms validés. L'affiliation phylogénétique des 28 bactéries étudiées montre que celles-ci se répartissent entre les phyla des Actinobacteria (**Tableau LVIII** et **Annexe 15**, Tome II, p. 72-74) et des Firmicutes (**Tableau LIX** et **Annexe 16**, Tome II, p. 75-76), regroupant au total 4 familles différentes :

- *Micromonosporaceae* (ordre : *Micromonosporales)* et *Nocardiaceae* (ordre : *Corynebacteriales*) pour les Actinobacteria
- *Bacillaceae* (ordre : *Bacillales*) et *Thermoactinomycetaceae* (ordre : *Bacillales*) pour les firmicutes.

Tableau LVIII : Affiliation phylogénétique des Actinobacteria isolés de *Scopalina hapalia*. Séquençage de la région V1 à V5.

Code Isolat	Milieu isolement - Protocole[a]	Taxa le plus proche (numéro d'accession)	Similarité de séquence (%)	Longueur de la séquence (bp)	Hit taxonomie (Famille)
SH-36	R2A - P2	*Micromonospora chokoriensis* (LT607409)	100	1013	*Micromonosporaceae*
SH-45	SCAM - P3	*Salinispora arenicola* (AY040619)	100	1012	*Micromonosporaceae*
SH-54	MBA - P2	*Salinispora arenicola* (AY040619)	100	1012	*Micromonosporaceae*
SH-57	A1BFe+c - P2	*Micromonospora echinospora* (LT607413)	99,57	473	*Micromonosporaceae*
SH-78	MBA - P2	*Salinispora arenicola* (AY040619)	100	1010	*Micromonosporaceae*
SH-82	MBA - P2	*Micromonospora fluostatini* (LC033898)	99,15	477	*Micromonosporaceae*
SH-89	SCAM - P3	*Micromonospora citrea* (FMHZ01000002)	99,5	1010	*Micromonosporaceae*
SH-95	MBA - P2	*Micromonospora tulbaghiae* (jgi.1058868)	99,26	942	*Micromonosporaceae*
SH-108	R2A - P2	*Micromonospora endophytica*	99,5	1011	*Micromonosporaceae*
SH-115	SCAM - P2	*Rhodococcus nanhaiensis* (JN582175)	99,9	1012	*Nocardiaceae*
SH-104	PDA - P2	Culture contaminée par *Penicillium*			-
SH-120	SCAM - P2	Réfractaire au maintien en culture			-

[a] P2 : protocole d'isolement sans prétraitement par la chaleur du broyat d'éponge.
P3 : protocole d'isolement incluant un prétraitement par chauffage du broyat d'éponge.

Tableau LIX : Affiliation phylogénétique des Firmicutes associés à *Scopalina hapalia*. Séquençage de la région V1 à V5.

Code Isolat	Milieu isolement - Protocole[a]	Taxa le plus proche (numéro d'accession)	Similarité de séquence (%)	Longueur de la séquence (bp)	Hit taxonomie (Famille)
SH-02a	A1BFe+c P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	100	858	Bacillaceae
SH-02b	A1BFe+c P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	100	856	Bacillaceae
SH-02c	A1BFe+c - P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	100	856	Bacillaceae
SH-04	A1BFe+c - P3	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,9	1011	Bacillaceae
SH-10	LB - P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	99,9	980	Bacillaceae
SH-22	R2A - P2	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	100	1043	Bacillaceae
SH-42	MYA2 - P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	99,59	978	Bacillaceae
SH-44	R2A - P2	LGUF_s (LGUF01000007)	100	1049	Bacillaceae (phylotype)
SH-46	SCAM - P3	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,9	1049	Bacillaceae
SH-60	LB - P3	*Bacillus paralicheniformis* (KY694465)	100	1018	Bacillaceae
SH-68a	MYA2 - P2	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,8	1016	Bacillaceae
SH-68b	MYA2 - P2	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,81	1051	Bacillaceae
SH-99	MBA - P3	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,81	1054	Bacillaceae
SH-100	MBA - P3	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,81	1048	Bacillaceae
SH-116a	MBA - P2	*Bacillus licheniformis* (AE017333)	99,81	1053	Bacillaceae
SH-137	MBA - P2	*Bacillus berkeleyi* (JN187498)	98,8	1000	Bacillaceae; *Bacillus*_g27 (phylotype)
SH-32	MBA - P2	DQ448769_s	100	1012	Thermoactinomycetaceae; DQ448769_g
SH-39	MBA - P3	DQ448769_s	97,12	1013	Thermoactinomycetaceae; DQ448769_g

[a] P2 : protocole d'isolement sans prétraitement par la chaleur du broyat d'éponge.
P3 : protocole d'isolement incluant un prétraitement par chauffage du broyat d'éponge.

❖ Familles des Micromonosporaceae, Nocardiaceae et Bacillaceae

L'alignement des séquences a permis l'identification de 26 souches bactériennes jusqu'au niveau du genre (**Figure 48**) : 16 ont été affiliées au genre *Bacillus* (classe *Bacilli*), 6 au genre *Micromonospora*, 1 au genre *Rhodococcus* et 3 au genre *Salinispora* ; les 3 derniers genres appartiennant à la classe des *Actinobacteria*.

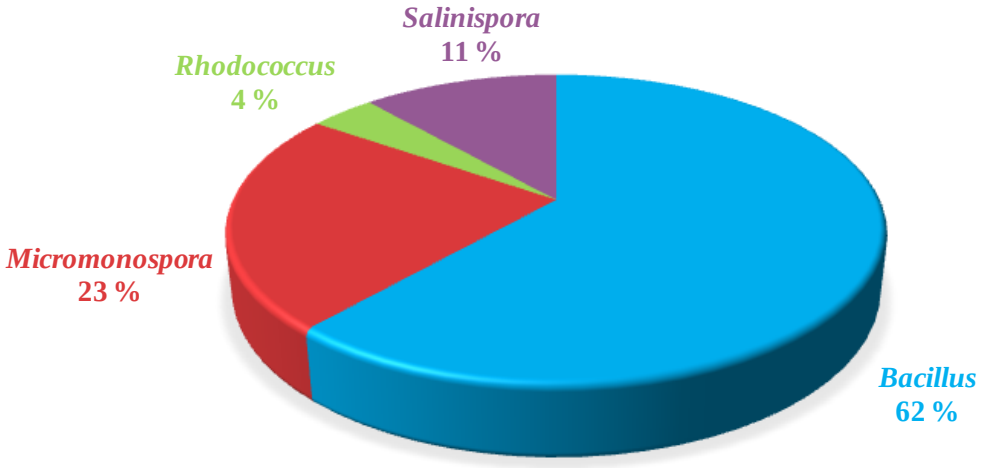


Figure 48 : Distribution taxonomique, au niveau du genre, des 26 isolats bactériens isolés à partir de l'éponge *Scopalina hapalia*.

L'alignement des séquences sur celles de la base de données EzBioCloud a permis d'aboutir à des résultats d'affiliation taxonomique jusqu'au niveau de l'espèce avec beaucoup moins d'ambiguïté qu'à partir de la base de données GenBank.

- Le genre ***Micromonospora*** se démarque avec 6 espèces identifiées correspondant à 6 isolats différents (**Tableau LVIII**) : ***M. chokoriensis*** (SH-36), ***M. citrea*** (SH-89), ***M. fluostatini*** (SH-82), ***M. echinospora*** (SH-57), ***M. tulbaghiae*** (SH-95) et ***M. endophytica*** (SH-108).
  Une nouvelle étude phylogénétique de la famille des Micromonosporaceae réalisée par Li et ses collaborateurs en 2019 a abouti au transfert de genre de *Jishengella endophytica* à *Micromonospora endophytica* [Li *et al.*, 2019]. De fait, la souche SH-108, initialement identifiée comme étant *J. endophytica* à la suite du BLAST effectué en 2018, est maintenant affiliée à *M. endophytica*. Les nouvelles analyses phylogénétiques réalisées par Li et ses collaborateurs ont été basées non seulement sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S mais aussi sur celui du gène gyrB. Le gène gyrB, codant pour la sous-unité B de l'ADB gyrase (enzyme de la famille des ADN topoisomérases), est un marqueur alternatif utilisé dans les cas où les taxa étudiés sont étroitement apparentés. Il offre une meilleure résolution pour les études phylogénétiques [Wang *et al.*, 2007b; Kasai *et al.*, 2000].

- Les genres ***Rhodococcus*** et ***Salinispora*** sont représentés par une seule espèce correspondant respectivement à ***R. nanhaiensis*** et ***S. arenicola***.

- Le genre ***Bacillus*** (famille *Bacillaceae*) se limite à 4 espèces pour 16 isolats (**Tableau LIX**).
  Deux espèces étroitement apparentées ont été identifiées : ***B. licheniformis*** (7 souches) et ***B. paralicheniformis*** (7 souches). L'espèce *B. licheniformis* est connue depuis 1898, année de sa première description. L'espèce *B. paralicheniformis* a été

décrite pour la première fois en 2015, après son isolement à partir d'une pâte de soja fermentée utilisée dans la cuisine traditionnelle coréenne [Dunlap *et al.*, 2015]. La communauté bactérienne de cette pâte, appelée cheonggukjang, est connue pour être dominée par des espèces appartenant au genre *Bacillus*. Les membres du genre *Bacillus* sont pour la plupart non pathogènes et inoffensifs pour l'Homme notamment l'espèce *B. licheniformis* [de Boer *et al.*, 1994].

La souche SH-137 a été affiliée à l'espèce ***B. berkeleyi*** qui a été isolée d'oursin, collecté en mer du Japon, et décrite en 2012 [Nedashkovskaya *et al.*, 2012].

Enfin, l'isolat SH-44 a été affilié au phylotype **LGUF_s** ; toutefois aucune information supplémentaire n'est disponible dans la base EzBioCloud. Une recherche avec le numéro d'accession associé au phylotype LGUF_s renvoie à l'espèce *Sporosarcina globispora* (Famille : Planococcaceae), anciennement identifiée comme étant *Bacillus globisporus* (www.ebi.ac.uk) [Yoon *et al.*, 2001; Larkin et Stokes, 1967]. *Sporosarcina globispora* est une bactérie psychrophile (température de croissance optimale inférieure à 25°C) isolée pour la première fois de sol et eau de rivière. Toutefois, une incertitude demeure quant à cette dernière identification. En effet, les séquences référencées dans EzBioCloud sont, en principe, systématiquement associées aux noms validés de l'espèce ainsi que toute autre information y afférant. Ce qui n'a pas été le cas pour le phylotype LGUF_s.

❖ Famille des Thermoactinomycetaceae

Avant l'avènement de la phylogénétique moléculaire, les membres de la famille des *Thermoactinomycetaceae*, aujourd'hui placés dans l'ordre des *Bacillales*, ont longtemps été considérés comme étant des actinomycètes [Carrillo et Benítez-Ahrendts, 2014]. La famille des *Thermoactinomycetaceae* a été décrite en 2006 par Matsuo *et al.*, bien que le premier genre, *Thermoactinomyces*, ait été décrit en 1989 [Matsuo *et al.*, 2006]. Dans le cadre de notre étude sur les microorganismes cultivables associés à *Scopalina hapalia*, deux souches, SH-32 et SH-39, ont été identifiées comme appartenant à cette famille (**Figure 49**). L'affiliation phylogénétique indique une homologie de séquence de 100 % pour SH-32 et de 97,12 % pour SH-39 avec une souche de *Thermoactinomycetaceae*, DQ448769_s, qui a déjà été isolée à partir de sédiments marins collectés en République de Palau [Gontang *et al.*, 2007]. En 2014, Kim *et al.* ont défini une valeur seuil d'homologie de séquence de 98,65 % à partir de laquelle deux espèces peuvent être considérées comme étant apparentées [Kim *et al.*, 2014]. Le pourcentage d'homologie de séquence de 97,12 % que nous avons obtenu pour la souche SH-39 nous amène donc à penser que celle-ci pourrait être un nouveau taxon.

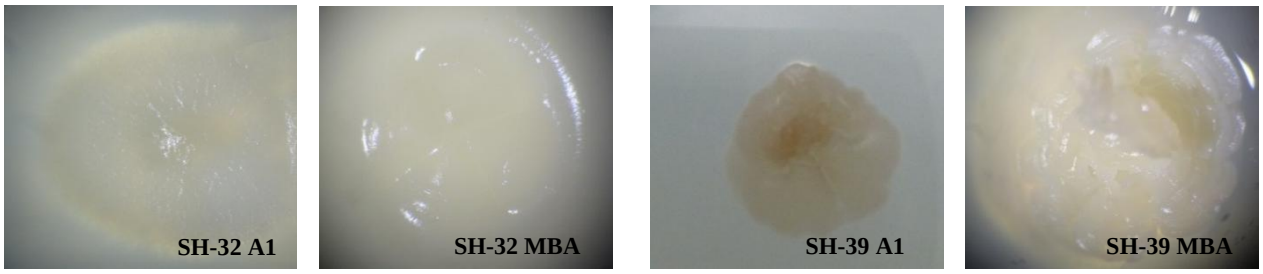


Figure 49 : Souches appartenant à la famille des *Thermoactynomycetaceae* SH-32 et SH-39 sur deux milieux de culture différents : A1 (A1BFe+c) et MBA.

IV.3.2.2 Champignons filamenteux

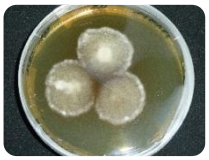
L'identification des champignons filamenteux a été réalisée par le Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Pays Bas.

Préalablement à l'identification, des étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN ainsi que de séquençage ont été nécessaires. Pour identifier des champignons, ce sont les régions ITS (Internal Transcribed Spacer), incluant le gène ARNr 5,8S, de l'ADN ribosomal et/ou les gènes de la β-tubuline (BenA) ainsi que de la calmoduline (CaM) qui sont séquencés. La région ITS, comme l'ARNr 16S, comprend aussi bien une partie très conservée chez la majorité des champignons, qu'une partie variable pouvant être utilisée pour l'affiliation phylogénétique des champignons filamenteux. Cette région ITS est donc considérée par les taxonomistes comme étant une région de référence pour l'identification des souches fongiques [Bridge *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2008; Schoch *et al.*, 2012]. Les gènes de la β-tubuline ainsi que de la calmoduline sont également des marqueurs phylogénétiques alternatifs comme c'est le cas du gène gyrB pour les bactéries. L'affiliation taxonomique a été obtenue par comparaison des séquences d'intérêt avec les séquences référencées dans la base de données GenBank ainsi que la base de données interne de la Westerdijk Fungal Biodiversity.

Les alignements de séquences avec les bases de données ont permis d'identifier les souches fongiques cultivables associées à *Scopalina hapalia*. Elles appartiennent à 3 genres différents ***Aspergillus***, ***Chaetomium*** et ***Nigrospora*** soit 3 ordres différents (Eurotiales, Sordariales et Xylariales) (**Tableau LX**). Ces derniers appartiennent aux classes des Eurotiomycetes (ordre : Eurotiales, famille : Trichocomaceae) et des Sordariomycetes (ordre : Sordariales, famille : Chaetomiaceae et ordre : Trichosphaeriales, famille : Trichosphaeriaceae), 2 classes majeures du phylum des Ascomycètes.

Aspergillus fait partie des genres les plus communément isolés du milieu marin et étudiés (MarinLit : 719 articles / 1293 composés). Les genres *Chaetomium* (MarinLit : 27 articles / 52 composés) et *Nigrospora* (MarinLit : 20 articles / 30 composés), quant à eux, le sont beaucoup moins.

Tableau LX : Identification des champignons filamenteux isolés de *Scopalina hapalia*.

Code Isolat	Milieu d'isolement - Protocole[a]	Photo PDA J+7	Régions séquencées	Taxa le plus proche (auteurs)	Hit taxonomie (Ordre)
SH-53	A1BFe+c - P3		ITS Gène partiel *BenA*	*Nigrospora aurantiaca* (Mei Wang & L. Cai, 2017)	Trichosphaeriales
SH-122	A1BFe+c - P2		Gène partiel *BenA* Gène partiel *CaM*	*Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory, 1913) (Thom & Church, 1926)	Eurotiales
SH-123	LB - P2		ITS Gène partiel *BenA*	*Chaetomium globosum* (Kunze, 1817)	Sordariales

[a] P2 : protocole d'isolement sans prétraitement par la chaleur du broyat d'éponge.
P3 : protocole d'isolement incluant un prétraitement par chauffage du broyat d'éponge.

IV.3.3 Discussion

La communauté cultivable des microorganismes associée à l'éponge *Scopalina hapalia* a été étudiée en accordant une attention particulière aux actinomycètes et champignons filamenteux. La sélection d'une trentaine de souches pour un premier travail d'identification, a permis d'avoir un aperçu de cette communauté composée notamment de Micromonosporaceae, Nocardiaceae, Bacillaceae et Thermoactinomycetaceae pour les bactéries (Actinobacteria et Firmicutes), Trichosphaeriaceae, Chaetomiaceae et Trichocomaceae pour les champignons filamenteux.

La discussion sur la communauté cultivable a tout d'abord concerné les bactéries puis les champignons. L'analyse comparative des approches moléculaire et culturale a suivi.

❖ Bactéries cultivables identifiées

121 souches bactériennes ont été isolées de l'éponge *Scopalina hapalia*, parmi lesquelles une première série de 28 souches a été identifiée. L'identification a révélé la présence des genres *Bacillus*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Salinispora* et de la famille des Thermoactinomycetaceae dans la communauté cultivable de *Scopalina hapalia*.

- ***Bacillus***

Le genre *Bacillus* est l'un des groupes taxonomiques offrant la plus grande diversité (https://bacterio.net/). Il regroupe à ce jour 284 espèces avec des noms valides publiés (sans compter les synonymes). Les espèces appartenant à ce genre, en raison de leur ubiquité, sont

souvent isolées de différentes sources marines [Gontang *et al.*, 2007]. Toutefois, seules 13 espèce-types ont été isolées du milieu marin [Nedashkovskaya *et al.*, 2012]. Les 4 espèces de *Bacillus* identifiées dans cette étude sont : LGUF-s (identification incertaine *cf* p. 193), *B. berkeleyi*, *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis*. Décrite en 2012, l'espèce *B. berkeleyi* reste encore très peu étudiée. Les espèces *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis* sont classées dans le groupe 1 des *Bacillus* (*cf* p. 156) qui est lui-même subdivisé en 2 sous-groupes :

- le groupe *B. cereus* incluant les espèces qui lui sont étroitement apparentées à savoir *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*.
- le groupe *B. subtilis* constitué des espèces suivantes : *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. paralicheniformis*, *B. pumilus*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* et *B. velezensis*.

Les espèces composant ces 2 sous-groupes sont difficilement distinguables entre-elles mais le sont facilement des autres espèces du groupe *Bacillus*.

Ainsi, *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis* sont des espèces très étroitement apparentées retrouvées dans les milieux terrestres et marins. Une étude phylogénétique réalisée, par Dunlap et ses collaborateurs en 2015, à partir de l'ensemble des génomes de *B. licheniformis* disponibles dans les bases de données, a permis de mieux distinguer ces 2 espèces [Dunlap *et al.*, 2015]. En effet, leur étude a abouti à une clustérisation en 2 groupes des différentes séquences :

- Groupe 1 : *B. licheniformis*, souche type DSM 13T + 11 autres souches ;
- Groupe 2 : souche type KJ-16T + 4 autres souches. A ce groupe, il a été attribué le nom de *B. paralicheniformis.*

Ces deux groupes se distinguent essentiellement au niveau de leur génome de base (92 gènes uniques pour le groupe 1 contre 179 pour le groupe 2) et de leur capacité à synthétiser certains métabolites [Dunlap *et al.*, 2015; Harwood *et al.*, 2018].

Avant cette distinction en 2 groupes, les membres de *B. licheniformis* étaient utilisés en fermentation industrielle pour la production d'enzymes (amylases, protéases, etc.), d'antibiotiques ainsi que d'autres composés d'intérêt pour l'agro-alimentaire et l'environnement (biotransformation de l'amidon, production de biocarburant, etc.) [Harwood *et al.*, 2018]. En terme de distribution, quelques souches marines de *B. licheniformis* ont été isolées de : sédiments marins [Tareq *et al.*, 2012] ;[Chen *et al.*, 2017], éponges [Bibi *et al.*, 2020; Sathiyanarayanan *et al.*, 2013; Devi *et al.*, 2010], algues [Choi *et al.*, 2016; Luz Prieto *et al.*, 2012] et source thermale [Arena *et al.*, 2006]. Depuis sa description en 2015, des souches marines de *B. paralicheniformis* ont été reportées de : poisson [Collins *et al.*, 2016], d'eau de mer [Othoum *et al.*, 2019] et d'éponge [Bibi *et al.*, 2020].

Enfin, bien que quelques représentants du genre *Bacillus* (*Bacillus* sp.) aient été isolés d'un spécimen de *Scopalina* sp. [Esteves *et al.*, 2017], l'espèce à laquelle ils appartenaient n'a pas été précisée.

- ***Micromonospora***

Chez les actinobactéries, les membres du genre *Micromonospora* arrivent second derrière les *Streptomyces* dans leur capacité à produire des métabolites spécialisés d'intérêt. Le genre *Micromonospora* appartient à la famille des *Micromonosporaceae* qui comprend 84 espèces au total (https://bacterio.net/). Ce genre a une distribution ubiquitaire et est souvent isolé du milieu marin [Maldonado *et al.*, 2005b]. Reconnues comme productrices de métabolites spécialisés d'intérêt thérapeutique [Hirsch et Valdés, 2010], les espèces du genre *Micromonospora* ont souvent été isolées d'invertébrés marins tels que les coraux, éponges et ascidies [Romero *et al.*, 1997; Fernández-Chimeno *et al.*, 2000; Charan *et al.*, 2004; Tabares *et al.*, 2011]. Plusieurs isolats de *Micromonospora* ont également été obtenues de *Scopalina ruetzleri* parmi lesquelles une souche de *M. coxensis* a montré une activité anti-protéase [Tabares *et al.*, 2011]. La souche *M. echinospora* isolée dans le cadre de notre étude appartient à une espèce productrice de métabolites spécialisés d'intérêt. A notre connaissance, l'espèce *M. endophytica*, anciennement *Jishengella endophytica*, isolée au cours de cette étude est le premier cas de symbiose reporté entre cette espèce et un invertébré marin. Isolée de mangrove en 2011, *J. endophytica* s'est montré être une source de différents types d'alcaloïdes avec pour certains une activité antivirale (H1N1) [Wang *et al.*, 2014]. Les espèces *M. chokoriensis*, *M. citrea*, *M. fluostatini* et *M. tulbaghiae* semblent être peu étudiées.

- ***Rhodococcus***

Le genre *Rhodococcus* appartient à la famille des Nocardiaceae et est retrouvé dans des environnements divers. Il comprend 66 espèces (https://bacterio.net/) dont quelques-unes pathogènes à l'exemple de *R. equi* [Bell *et al.*, 1998]. C'est un genre reconnu pour présenter une diversité enzymatique d'intérêt environnemental et biotechnologique [Warhurst et Fewson, 1994; Bell *et al.*, 1998]. Les membres de ce genre sont particulièrement reconnus pour leur capacité à dégrader une variété de composés naturels et xénobiotiques [McLeod *et al.*, 2006; Warhurst et Fewson, 1994]. Durant l'étude du génome complet d'une espèce de *Rhodococcus* sp., McLeod et ses collaborateurs ont révélé l'existence d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire tels que des gènes NRPS au nombre de 24 ainsi que 7 gènes PKS. Ces gènes sont impliqués dans la synthèse de molécules jouant un rôle dans la signalisation cellulaire, la production d'antibiotiques et de sidérophores* [McLeod *et al.*, 2006]. Cette découverte suggère que les *Rhodococci* possèderaient une grande capacité de production de métabolites spécialisés. En 2017, Elsayed et ses collaborateurs ont publié ce qui semble être la première revue mettant en lumière les métabolites spécialisés isolés de ce genre, ainsi que les activités biologiques associées [Elsayed *et al.*, 2017]. Toutefois, il existe peu d'études faisant référence à des métabolites spécialisés isolés de *Rhodococci* d'origine marine, comparativement à des genres tels *Streptomyces* et *Micromonospora*. Pourtant, il a été montré que le trio *Micromonospora* - *Rhodococcus* - *Streptomyces* représente les genres dominants d'actinobactéries dans le milieu marin [Maldonado *et al.*, 2005b]. Bien que souvent retrouvés en association avec les éponges [Abdelmohsen *et al.*, 2014], seules quelques études évaluant les activités biologiques de *Rhodococci* isolés d'éponges ont été reportées [Elsayed *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2015; Tabares *et al.*, 2011]. Les spécimens étudiés respectivement par Elsayed et collaborateurs ainsi que Cheng et collaborateurs ont

démontré des activités anti-infectieuses ; ces activités seraient portées par des peptides. Au cours de l'étude de Tabares et collaborateurs (2011), 2 souches appartenant au genre *Rhodococcus* (*R. rhodochrous* et *R. equi*) ont été isolées de l'espèce *Scopalina ruetzleri*. Toutefois aucune activité immunomodulatrice, ni inhibitrice de protéase n'a été décelée [Tabares *et al.*, 2011]. L'espèce *Rhodococcus nanhaiensis* isolée à partir de *Scopalina hapalia* étudiée dans le cadre de notre étude, a été décrite en 2012 [Li *et al.*, 2012].

- ***Salinispora***

Le genre *Salinispora*, décrit récemment par Maldonado et ses collaborateurs (2005), est un genre exclusivement marin appartenant à l'ordre des *Actinomycetaceae* et à la famille des *Micromonosporaceae* [Maldonado *et al.*, 2005a]. Le genre comprend 3 espèces étroitement apparentées *S. arenicola*, *S. pacifica* et *S. tropica* qui partagent 99 % de similarité au niveau des séquences de l'ARN 16S [Freel *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2005a]. Elles peuvent toutefois être différenciées par leur chimiospécificité c'est-à-dire que les membres d'une même espèce produisent certains métabolites de façon systématique. En effet, Jensen et ses collaborateurs ont montré, en 2007, que chaque espèce de *Salinispora* avait un profil chimique qui lui était propre, caractérisé par un « chemotype » de base accompagné ou non de composés accessoires [Jensen *et al.*, 2007]. Par ailleurs, une étude par approche moléculaire, réalisée sur l'espèce *S. arenicola*, semble indiquer que la production de certains métabolites spécialisés serait spécifique à certaines zones géographiques [Edlund *et al.*, 2011]. Dans leur revue publiée en 2015, Jensen et ses collaborateurs font une synthèse des données actuellement disponibles pour ce genre, cette synthèse répertorie l'ensemble des métabolites spécialisés isolés [Jensen *et al.*, 2015]. Parmi les espèces de *Salinispora*, l'espèce *S. arenicola* est l'espèce la plus largement distribuée et la plus abondante [Jensen *et al.*, 2015]. Toutefois, celle-ci semble n'avoir encore jamais été détectée dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien [Bauermeister *et al.*, 2018; Jensen *et al.*, 2015]. Généralement isolé des sédiments, ce genre a également été retrouvé en symbiose avec d'autres invertébrés marins tels que les éponges, notamment un spécimen de *Scopalina ruetzleri* [Kim *et al.*, 2005a; Tabares *et al.*, 2011]. Une étude réalisée en 2006 a montré la capacité d'une souche de *Salinispora* isolée d'éponge à produire la rifamycine. Le genre *Salinispora* est la première source d'origine marine pour l'obtention de cet antibiotique [Kim *et al.*, 2006].

- **Thermoactinomycetaceae**

Très peu étudiée, la famille des *Thermoactinomycetaceae* comprend 14 genres et seulement 20 espèces [Carrillo et Benítez-Ahrendts, 2014; Frikha Dammak *et al.*, 2017]. Isolés de différents environnements tant terrestres que marins, certains de ses membres peuvent être responsables d'allergies. A ce jour, seuls 3 genres ont été étudiés pour la production de métabolites spécialisés : *Laceyella*, *Paludifilum*, *Thermoactinomyces* [Akiyama *et al.*, 2014; Matsuo *et al.*, 2007; Kanoh *et al.*, 2005; Hafenbradl *et al.*, 1996]. La plupart des microorganismes étudiés ont été isolés de sédiments de sources thermales et hydrothermales, d'étangs salins ou de fossés d'irrigation de rizière [Frikha Dammak *et al.*, 2017; Teta *et al.*, 2017; Akiyama *et al.*, 2014; Matsuo *et al.*, 2007; Kanoh *et al.*, 2005; Hafenbradl *et al.*, 1996]. L'étude de ces genres a permis l'obtention de métabolites aux propriétés antimicrobiennes,

antitumorales, anesthésiques ou encore antialgales [Carrillo et Benítez-Ahrendts, 2014]. Les métabolites spécialisés produits par ce groupe de microorganismes appartiennent aux classes chimiques des alcaloïdes, des dérivés d'acides aminés (tryptamine, acide anthranilique, tryptophane), des cyclodipeptides et des peptides macrocycliques. A ce jour et à notre connaissance, il semblerait que ce soit la première fois que ces microorganismes aient été reportés comme étant associés aux invertébrés marins et *a fortiori* aux éponges. Le seul cas de symbiose à avoir été reporté concerne *Laceyella sacchari* qui a été isolée d'algues vertes collectées dans un fossé d'irrigation de rizière. Ce spécimen produit des composés de la classe des bacillamides ainsi que des métabolites dérivés du tryptophane aux propriétés herbicides [Akiyama *et al.*, 2014]. Les bacillamides ont été isolés initialement d'une souche marine de *Bacillus* ainsi que d'une souche obtenue à partir d'un tapis microbien collecté dans un étang hypersalé [Socha *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2003].

❖ Champignons filamenteux cultivables

Au cours de l'isolement des microorganismes associés à l'éponge *Scopalina hapalia*, 3 souches fongiques ont été obtenues. Le travail d'identification qui a été réalisé a conduit à leur affiliation taxonomique aux espèces suivantes : *Aspergillus sydowii*, *Chaetomium globosum* et *Nigrospora aurantiaca*.

• *Aspergillus sydowii*

Aspergillus sydowii a été identifié comme étant pathogène des gorgones dans les Caraïbes mais semble être bien toléré chez les éponges [Alker *et al.*, 2001; Ein-Gil *et al.*, 2009]. En effet, Ein-Gil et ses collaborateurs ont isolé une souche d'*A. sydowii* d'une éponge en bonne santé, qui présentait des caractéristiques morphologiques et moléculaires identiques à l'agent pathogène responsable de l'aspergillose des gorgones. Le genre *Aspergillus* est l'une des sources de métabolites les plus intéressantes. Il est en effet connu pour être la principale source fongique de métabolites spécialisés marins [Lee *et al.*, 2013]. Un large éventail de nouvelles molécules bioactives (en majorité cytotoxiques et antimicrobiennes) appartenant à des classes chimiques différentes (alcaloïdes, peptides, polycétides, terpènes, lipides) a été isolé de ce genre. En 2013, grâce à l'utilisation d'un modificateur épigénétique, Chung et ses collaborateurs ont pu avoir accès à des structures nouvelles de sesquiterpenoïdes [Chung *et al.*, 2013].

• *Chaetomium globosum*

Chaetomium globosum, décrite dès 1817, est l'espèce-type du genre *Chaetomium*. Ubiquitaire, ce genre est retrouvé aussi bien dans l'air que dans le milieu marin. C'est une espèce considérée comme cellulolytique et/ou endophyte avec une grande capacité de production de métabolites spécialisés aux activités biologiques diverses. Plusieurs souches marines ont été isolées notamment des fonds marins [Zhang *et al.*, 2016], d'algues [Abdel-Lateff, 2008], de gorgones [Guo *et al.*, 2017], d'éponges [Proksch *et al.*, 2008; Höller *et al.*, 2000] ou encore de poisson [Yamada *et al.*, 2011].

- ***Nigrospora aurantiaca***

Nigrospora aurantiaca est une nouvelle espèce décrite en 2017 appartenant à un genre largement distribué [Wang *et al.*, 2017]. Les espèces de ce genre peuvent s'associer à une grande variété d'hôtes (endophytes de plantes) et se développer en saprophytes* ou être potentiellement pathogènes. Il semble que ce soit la première fois que cette espèce soit isolée du milieu marin, ou encore d'une éponge. Toutefois, d'autres espèces de *Nigrospora* ont été isolées de différentes sources marines : éponge, corail, plantes de mangrove ainsi que dans les fonds marins (800 m) [Ding *et al.*, 2016; Sun *et al.* 2014; Dong *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2011; Arumugam *et al.*, 2015]. Quelques métabolites spécialisés isolés de ces souches marines (*N. oryzae* et *Nigrospora* sp.) ont présenté différentes activités biologiques (cytotoxique, antimicrobienne, antifouling).

❖ Comparaison des résultats des approches moléculaire et par culture

Lorsque nous mettons en regard les résultats, par approche moléculaire, de l'étude de la composition de la communauté bactérienne de *Scopalina hapalia* (ML-263) avec les quelques identifications des isolats obtenus par culture, nous observons des différences. En effet, sur les 121 souches bactériennes isolées à partir de l'éponge, 16 ont été identifiées comme appartenant au genre *Bacillus* (Firmicutes), 6 au genre *Micromonospora* (Actinobacteria), 1 au genre *Rhodococcus* (Actinobacteria), 3 au genre *Salinispora* (Actinobacteria) et 2 à un genre non identifié appartenant à la famille des Thermoactinomycetaceae (Firmicutes). Ces chiffres sont à relativiser car une souche appartenant à une espèce donnée a pu être isolée plusieurs fois. C'est le cas par exemple des *Bacillus licheniformis*. Concernant le phylum des Firmicutes, l'approche moléculaire n'a pas permis l'identification d'OTU appartenant à la famille des Thermoactinomycetaceae. Quant au genre *Bacillus*, celui-ci n'a été détecté qu'une seule fois grâce au séquençage de la région V3-V4 de l'ADNg-Qiagen avec une abondance relative de 0,03 %. Pour ce qui est du phylum des Actinobacteria, le séquençage partiel de l'ARNr 16S n'a pas abouti à l'identification des Micromonosporaceae ni à celle des Nocardiaceae. Il est admis que la plupart des actinobactéries marines isolées par culture sont des actinomycètes (membres de l'ordre des Actinomycétales) [Yilmaz *et al.*, 2016]. L'approche moléculaire a par contre mis en évidence plusieurs OTUs affiliés aux Acidimicrobiia. Cette classe d'actinobactéries, plus abondante chez les éponges HMA que LMA, fait partie des « indicateurs HMA » [Moitinho-Silva *et al.*, 2017]. Ces différences observées entre les résultats de l'approche par culture et ceux de l'approche moléculaire sont bien connues de la microbiologie environnementale et mettent en lumière les biais ainsi que les limites liés à chacune des approches. Une des limites majeures de l'approche par culture est liée à la difficulté de cultiver les microorganismes en laboratoire avec les techniques classiques. Taylor et ses collaborateurs (2007) indique que moins de 1 % des bactéries associées aux éponges peuvent être cultivées même en améliorant les techniques [Taylor *et al.*, 2007]. Dans le cas de la culture de la communauté microbienne de l'éponge *Rhopaloeides odorabile*, par exemple, moins de 0,1 % des bactéries ont pu être cultivées [Webster et Hill, 2001]. Plus de 88 % de tous les microorganismes isolés appartiennent à 4 phyla bactériens majeurs : Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria et Bacteroidetes [Rinke

et al., 2013]. Dans notre cas, nous avons pu mettre en évidence la présence des Actinobacteria ainsi que des Firmicutes. Toutefois, Esteves et ses collaborateurs (2016) ont isolé et identifié plusieurs souches affiliées aux phyla des Proteobacteria et des Bacteroidetes à partir d'un spécimen de *Scopalina* sp.. Nous pouvons notamment remarquer la présence des genres *Ruegeria* et *Labrenzia* avec des abondances relatives respectives de 29,10 % et 21,70 %. Il est intéressant de noter que ces genres figurent parmi les genres les plus abondants identifiés par l'approche moléculaire. Il reste encore plusieurs souches (91) isolées de *S. hapalia* (ML-263) à identifier afin d'avoir un meilleur aperçu de la diversité des bactéries cultivables.

Concernant le séquençage de la région ITS2, seules 5 % des séquences obtenues ont pu être affiliées au groupe des champignons. Bien que ces résultats aient été insuffisants pour permettre une caractérisation de la communauté fongique associée à *S. hapalia*, ils nous ont quand même donné un petit aperçu. En effet, ces quelques séquences ont pu être affiliées aux phyla des Ascomycota (classe : Sordariomycetes et Saccharomycetes) et Basidiomycota (classe : Agaricomycetes et Malasseziomycetes). Ces 2 phyla sont largement retrouvés en association avec les éponges, le phylum des Ascomycota étant le plus dominant. Dans le cadre de l'approche par culture, nous avons pu isoler 3 souches appartenant aux classes des Eurotiomycetes (Eurotiales) et des Sordariomycetes (Sordariales et Trichosphaeriales), 2 classes importantes du phylum des Ascomycètes.

IV.4 Criblage biologique des souches microbiennes cultivables

IV.4.1 Production microbienne

Les 30 souches identifiées ont été mises en culture pour la production des métabolites spécialisés. La mise en culture a été réalisée en milieu Marine Broth aussi bien en culture liquide que solide, en présence d'une résine non-ionique adsorbante XAD-16. L'amberlite XAD-16 est une résine poly-aromatique hydrophobe permettant l'adsorption de composés organiques et hydrophobes ayant des masses moléculaires faibles à moyennes (≤ 40 000 MW) [Woo *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 1990]. Les résines adsorbantes non ioniques sont utilisées depuis les années 1970 dans le domaine des bioprocédés afin d'améliorer l'isolement de produits d'intérêts ainsi que les rendements de production. En effet, les résines étant inertes, leur ajout directement dans le milieu de culture permet d'augmenter le rendement de certains métabolites, en favorisant leur captation par la résine, les protégeant ainsi, soit de la dégradation, soit d'un rétrocontrôle négatif sur la production ou d'un effet cytotoxique [Phillips *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2003; Stoffels *et al.*, 1993]. Cette approche a été utilisée aussi bien pour la culture de bactéries que de champignons [Casey *et al.*, 2007; de la Cruz *et al.*, 2012; Warr *et al.*, 1996]. Le milieu Marine Broth a été choisi comme milieu standard pour la production dans le cadre du projet TASCMAR. Ce milieu a été conçu par Zobell (1941) spécialement pour la culture et l'isolement de bactéries marines [Zobell, 1941]. Ce milieu est relativement riche en nutriments : peptone, extrait de levure ainsi que différents minéraux afin de mimer au mieux le milieu marin. Celui-ci favoriserait ainsi la croissance des bactéries marines en leur fournissant tous les nutriments dont elles ont besoin pour se développer.

IV.4.2 Obtention des extraits microbiens

L'extraction des métabolites à partir des cultures a été menée, après 5 jours d'incubation pour la culture liquide (CL) et 15 jours pour la culture solide (CS), au moyen de solvants organiques, par extractions successives à l'acétate d'éthyle (AcOEt – 60 mL) suivie par le méthanol (MeOH – 20 mL). La production microbienne a permis l'obtention de 118 extraits bruts microbiens. La totalité des rendements obtenus (masses d'extraits bruts par culture) est listée dans l'**Annexe 17** (Tome II, p. 77).

Globalement, le résultat des extractions à partir de la résine et de la biomasse microbienne montre que les masses des extraits AcOEt sont beaucoup plus faibles comparativement aux extraits MeOH. En moyenne, nous obtenons pour les cultures liquides, des masses de 6,57 ± 1,62 mg pour les extraits AcOEt et 231,69 ± 87,75 mg pour les extraits MeOH. Pour les cultures solides, les masses moyennes sont de 4,23 ± 1,44 mg pour les extraits AcOEt et 206,87 ± 64, 89 mg pour les extraits MeOH. Par ailleurs, aucun lien évident ne peut être fait entre les masses obtenues et la durée d'incubation (5 jours *versus* 15 jours) ni même le type de culture (liquide *versus* solide) sachant que l'ensemble des cultures a été incubé à 28 °C en statique à l'obscurité.

L'analyse des extraits bruts ainsi que d'un contrôle « milieu de culture additionné d'XAD-16 non ensemencé » a montré la présence systématique dans tous les extraits analysés de composés également présents dans le contrôle. Ces composés sont des artéfacts issus du milieu de culture. En effet, la littérature montre que les résines utilisées dans la production microbienne, bien qu'ayant une grande capacité à adsorber les composés d'intérêts, peuvent également capter des composés non souhaités provenant du milieu [Casey *et al.*, 2007; Frykman *et al.*, 2006]. Des analyses réalisées par l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) semblent indiquer que ces composés correspondraient à des dicétopipérazines. Les dicétopipérazines peuvent ête générées, au cours de la stérilisation à haute température, par une cyclisation non-enzymatique des peptides contenus dans les milieux complexes (peptone et extrait de levure par exemple) [Silva *et al.*, 2017; Holden *et al.*, 1999; Prasad, 1995]. Il faudra donc prendre en considération la présence de ces artéfacts au cours du processus d'isolement.

Les 118 extraits bruts obtenus ont été envoyés aux différents partenaires du projet TASCMAR pour le criblage biologique sur les cibles biologiques choisies, impliquées dans le processus de vieillissement (élastase, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase, protéasome, catalase, sirtuine 1).

IV.4.3 Les cibles biologiques

Les extraits bruts microbiens ont été testés sur les différentes cibles moléculaires sélectionnées pour le criblage biologique des extraits bruts des macroorganismes étudiés dans le cadre du projet TASCMAR: élastase, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase, protéasome. Ces

cibles biologiques ont été présentées en détail dans le chapitre I, partie 3.1. Pour élargir la palette des processus biologiques impliqués dans le vieillissement et ciblés par ce programme, deux nouvelles cibles ont été ajoutées dans le processus de screening. Il s'agit de la catalase et de la sirtuine 1.

IV.4.3.1 Activité de la catalase

La catalase est une enzyme antioxydante utilisée dans les pathologies liées à l'âge afin de réduire les effets négatifs du stress oxydant. Dès 1956, Harman émettait l'hypothèse selon laquelle les dommages cellulaires et moléculaires, causés par le stress oxydant, seraient un des facteurs à l'origine du vieillissement [Harman, 1956]. Un niveau élevé d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou une diminution de la capacité antioxydante de la cellule conduit à un état de stress oxydant. Les ERO telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) sont générés au cours du métabolisme cellulaire par une réduction partielle de l'oxygène. Ces composés jouent un rôle de molécules de signalisation dans des fonctions biologiques cruciales telles que la prolifération et la survie cellulaires [Ray *et al.*, 2012]. Toutefois, en raison de leur forte réactivité, un excès et/ou une accumulation d'ERO entraîne des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Aussi, le stress oxydant a été impliqué dans la pathogénèse du cancer, la neuro-dégénérescence, l'athérosclérose, le diabète et le vieillissement [Liguori *et al.*, 2018]. La dégradation des ERO est contrôlée par les antioxydants qui s'adaptent au taux d'ERO présent dans la cellule. Ces antioxydants constituent donc un système de défense au stress oxydant en neutralisant les effets négatifs des ERO. La catalase fait partie des principales enzymes antioxydantes. Celle-ci agit sur la régulation du peroxyde d'hydrogène en accélérant sa dismutation, autrement dit sa décomposition, en eau et oxygène évitant ainsi la production de radicaux hydroxyles. Ainsi, des composés ayant un effet activateur sur la catalase sont recherchés.

IV.4.3.2 Activité de la sirtuine 1 (Sirt1)

La sirtuine 1 (Sirt1) appartient à la famille des sirtuines, au nombre de 7 chez les mammifères. Ce sont des protéines désacétylases NAD^+-dépendantes très conservées des bactéries aux humains. Parmi les membres de cette famille, Sirt1 est celui qui se rapproche le plus de la protéine Sir2 (silent information regulator 2) exprimée chez les non mammifères. L'intérêt porté aux sirtuines, dans la recherche contre le vieillissement, remonte à 1999 quand Kaeberlin et ses collaborateurs ont montré qu'une surexpression de la protéine Sir2 contribuait à augmenter la longévité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Kaeberlein *et al.*, 1999]. Par la suite, il a été montré qu'une surexpression de Sir2 aussi bien chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et que chez la mouche *Drosophila melanogaster* contribuait à augmenter la longévité de ces organismes [Tissenbaum et Guarente, 2001; Rogina et Helfand, 2004]. Bien qu'à l'heure actuelle aucun lien direct n'ait été fait entre les sirtuines et la longévité chez les Hommes, plusieurs travaux ont démontré les effets positifs de Sirt1 dans les maladies liées au vieillissement. Il y a notamment, une accumulation de données qui

montrent une amélioration de certains paramètres physiologiques impliqués dans des pathologies tels que le cancer ou le diabète chez des personnes sous restriction calorique [Most *et al.*, 2017]. La restriction calorique est, à l'heure actuelle, la seule approche nutritionnelle permettant de ralentir le processus du vieillissement. Certaines études tendent à montrer une implication possible des sirtuines dans les effets bénéfiques observés [Bordone et Guarente, 2005]. La fonction de Sirt1, étroitement liée au métabolisme énergétique cellulaire, expliquerait probablement le lien entre la restriction calorique et la longévité/santé [Lin *et al.*, 2000; Imai et Guarente, 2014]. En effet, les sirtuines sont des senseurs métaboliques régulés par l'alimentation et le stress (oxydatif et génotoxique). En plus de la régulation du métabolisme énergétique, les sirtuines régulent plusieurs fonctions biologiques impliquées dans le processus du vieillissement. Parmi ces fonctions, nous pouvons citer l'expression des gènes ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN, l'apoptose, la survie cellulaire et la neuroprotection [Michan et Sinclair, 2007]. Les résultats encourageants, obtenus sur cette dernière décennie, ont impulsé une recherche intensive d'activateurs de sirtuines plus particulièrement de Sirt1, afin de mimer la restriction calorique, pour déjouer les maladies liées au vieillissement [Grabowska *et al.*, 2017]. Parmi ces activateurs, des composés d'origine naturelle telle que la curcumine ou le resvératrol présentent déjà des résultats prometteurs. En raison de la multiplicité de leurs fonctions biologiques, l'inhibition de l'activité des sirtuines peut également avoir des effets bénéfiques dans certaines pathologies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives [Villalba et Alcaín, 2012].

IV.4.3.3 Evaluation des activités biologiques des extraits microbiens

Les extraits actifs « hits » et très actifs « super-hits » ont été déterminés sur la base des valeurs seuils ou critères établis par les partenaires. La représentation des résultats d'activité a été effectuée sous forme de tableau synthétique pour chaque genre, espèce, ou groupe microbien.

- ✓ **Evaluation des activités inhibitrices de l'élastase et de la tyrosinase**

Ces activités ont été exprimées en pourcentage d'inhibition (I) de l'activité enzymatique.

Les extraits ont été classés en fonction des valeurs de pourcentage comme indiqué ci-après :

✓ **Evaluation des activités de la catalase et de la sirtuine 1**

Ces activités ont été évaluées en pourcentage de moyenne d'activation (A) par rapport à une condition contrôle (absence d'extrait). Les extraits ont été classés en fonction des valeurs de pourcentage comme indiqué ci-après :

Activation sirtuine		Super-hit : A > 170 % Hit : A < 170 %
Activation catalase		Super-hit : A > 170 % Hit : A < 150 %

✓ **Evaluation des activités inhibitrices de la CDK7, FynB et Protéasome**

Ces activités ont été évaluées à partir d'études dose-réponses. Pour chacune des activités, 3 concentrations ont été testées (forte : 1 mg/mL ; médium : 0,1 mg/mL ; faible : 0,01 mg/mL) et pour ces 3 concentrations, une valeur seuil (80 % ou 85 % en fonction du test) correspondant à un pourcentage d'inhibition (I) par rapport au contrôle DMSO a été fixée.

Pour les tests FynB kinase et protéasome, un extrait a été considéré comme un « super-hit » lorsqu'une réponse dose-dépendante a été observée pour 2 ou 3 concentrations. Le statut d'extrait « hit » a été attribué aux extraits pour lesquels le pourcentage d'inhibition à la concentration la plus forte testée était inférieur à 85 % (FynB) ou 80 % (protéasome) du contrôle DMSO.

Dans le cas du test CDK7, une réponse dose-dépendante aux 3 concentrations testées était indispensable pour qu'un extrait soit considéré comme « super-hit ». L'extrait a été considéré « hit » lorsqu'une réponse dose-dépendante était observée pour les concentrations forte et médium testées.

Inhibition de la CDK7		Super-hit : I < 85 % pour les 3 concentrations Hit : I < 85 % pour les concentrations forte et médium
Inhibition de la FynB		Super-hit : I < 85 % pour 2 à 3 concentrations Hit : I < 85 % pour la concentration la plus élevée
Inhibition du protéasome		Super-hit : I < 80 % pour 2 à 3 concentrations Hit : I < 80 % pour la concentration la plus élevée

IV.4.3.3.1 Actinobacteria : genre *Salinispora*

Trois souches de *Salinispora arenicola* SH-45, SH-54 et SH-78 ont été testées (**Tableau LXI**). Le criblage biologique des 12 extraits bruts obtenus montre que ceux-ci ne sont actifs ni sur l'élastase ni sur la catalase.

En revanche, les 3 souches produisent des métabolites actifs aussi bien sur les protéines kinases (CDK7 et FynB) que sur le protéasome. Les extraits AcOEt-CS de ces souches ont été identifiés comme étant des « super-hits » en raison de leur capacité à inhiber les protéines kinases CDK7 et FynB de façon dose-dépendante. Les extraits AcOEt-CL sont actifs uniquement sur la FynB.

Enfin, seules les souches SH-54 et SH-78 sont actives sur la tyrosinase et la Sirt1. Les extraits obtenus en milieu liquide semblent être les plus actifs sur ces deux cibles.

Tableau LXI : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Salinispora arenicola*.

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-45 *Salinispora arenicola*	Acétate d'éthyle	Liquide						L	
		Solide					S	S	S
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-54 *Salinispora arenicola*	Acétate d'éthyle	Liquide		L 37,01 %				L	
		Solide					S	S	S
	Méthanol	Liquide			L 135 %				
		Solide							
SH-78 *Salinispora arenicola*	Acétate d'éthyle	Liquide		L 34,90 %	L 132 %			L	
		Solide		S 39,06 %			S	S	S
	Méthanol	Liquide			L 144 %				
		Solide							S

IV.4.3.3.2 Actinobacteria : genre *Micromonospora*

Au cours de ces travaux, 6 souches d'espèces différentes de *Micromonospora* ont été étudiées, soit un total de 24 extraits bruts testés (**Tableau LXII**). Aucun d'entre eux ne s'est montré actif sur les cibles catalase, CDK7 et protéasome. Les résultas obtenus pour les autres cibles sont davantage prometteurs. En effet :

La souche SH-82 a produit 3 extraits actifs sur l'élastase.

Cinq souches (SH-57, SH-82, SH-89, SH-95 et SH-108) produisent un total de 8 extraits actifs sur la tyrosinase. L'extrait SH-89-AcOEt-CS (*M. citrea*), avec un pourcentage d'inhibition de l'activité de la tyrosinase supérieur à 50 % (I = 58,33 %), a été identifié comme « super-hit » parmi les extraits inhibiteurs de la tyrosinase.

Les souches SH-36, SH-57 et SH-82 ont produit respectivement 1, 2 et 3 extraits actifs sur la Sirtuine 1. Parmi les 6 extraits activateurs de la sirtuine 1, l'extrait SH-82-AcOEt-CL (*M. fluostatini*) avec une moyenne d'activation égale à 177 %, s'est distingué comme « super-hit » parmi les extraits activateurs de la sirtuine 1.

Enfin, les souches SH-57 et SH-108 ont donné chacune 1 extrait actif sur la protéine FynB.

Tableau LXII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches appartenant au genre *Micromonospora*.

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-36 ***Micromonospora chokoriensis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide			S 144 %				
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-57 ***Micromonospora echinospora***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 34,90 %	L 148 %				
		Solide		S 39,58 %				S	
	Méthanol	Liquide			L 168 %				
		Solide		S 25,78 %					
SH-82 ***Micromonospora fluostatini***	Acétate d'éthyle	Liquide	L 25,28 %		L 177 %				
		Solide	S 32,50 %	S 29,95 %	S 149 %				
	Méthanol	Liquide			L 150 %				
		Solide	S 37,13 %						
SH-89 ***Micromonospora citrea***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 28,39 %					
		Solide		S 58,33 %					
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-95 ***Micromonospora tulbaghiae***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 29,43 %					
		Solide							
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-108 ***Micromonospora endophytica***	Acétate d'éthyle	Liquide						L	
		Solide		S 28,13 %					
	Méthanol	Liquide							
		Solide							

IV.4.3.3.3 Actinobacteria : genre *Rhodococcus*

La mise en culture de la souche de *Rhodococcus nanhaiensis* a permis l'obtention de 4 extraits bruts (**Tableau LXIII**).

Bien que l'extrait SH-115a-AcOEt-CS inhibe la cible FynB à 2 concentrations testées (1 mg/mL et 0,1 mg/mL), celui-ci n'induit pas une réponse dose-dépendante marquée.

Une inhibition très marquée (< 60 % du contrôle DMSO) de l'activité de CDK7 à la concentration la plus forte utilisée (1 mg/mL), pour les extraits AcOEt-CL, AcOEt-CS et MeOH-CL, a été observée. Toutefois, ces extraits bien qu'actifs ne répondent pas au critère de « hit » (réponse dose-dépendante pour au moins 2 concentrations).

Tableau LXIII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures de la souche *Rhodococcus nanhaiensis.*

Souche	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-115a ***Rhodococcus nanhaiensis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide							

IV.4.3.3.4 Bacillaceae : espèce *Bacillus paralicheniformis*

Sept souches de *Bacillus paralicheniformis* ont été étudiées soit un total de 28 extraits bruts produits (**Tableau LXIV**). L'évaluation des activités biologiques de ces extraits n'a montré aucune activité sur les cibles élastase, CDK7 et protéasome.

En revanche, cinq souches (SH-02a, SH-02b, SH-02c, SH-42 et SH-60) ont donné 8 extraits actifs sur la tyrosinase. Seuls les extraits AcOEt de ces souches sont capables d'inhiber l'activité de la tyrosinase de façon plus ou moins modérée. Parmi ces extraits, l'extrait SH-60-AcOEt-CL se démarque en raison de sa capacité à inhiber près de 50 % de l'activité de la tyrosinase (I = 48 %).

Trois souches (SH-02a, SH-10 et SH-22) ont présenté chacune 1 extrait actif sur la sirtuine 1. Il s'agit uniquement d'extraits issus des cultures liquides.

Trois souches (SH-02a, SH-02b et SH-02c) produisent chacune 1 extrait actif sur la catalase. Ces extraits activent la catalase (SH-02a-MeOH-CS, A = 150 % ; SH-02b-MeOH-CL, A = 151 % ; SH-02c-AcOEt-CS, A = 155 %) avec une moyenne d'activation supérieure à 150 %. Ces derniers ont donc été identifiés comme des « super-hits » parmi les extraits activateurs de la catalase.

Enfin, les souches SH-10 et SH-60 ont fourni respectivement 1 et 2 extraits actifs sur la protéine FynB. Ce sont des extraits issus du milieu de culture solide.

Tableau LXIV : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Bacillus paralicheniformis.*

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-02a ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide		L 36,81 %					
	Méthanol	Liquide			L 136 %				
		Solide				S 150 %			
SH-02b ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 31,32 %					
		Solide		S 38,46 %					
	Méthanol	Liquide				L 151 %			
		Solide							
SH-02c ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 43,41 %					
		Solide		S 30,22 %		S 155 %			
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-10 ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide			L 137 %				
		Solide							
SH-22 ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide			L 149 %				
		Solide							
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-42 ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 32,38 %					
		Solide							
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-60 ***Bacillus paralicheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 48,09 %					
		Solide		S 31,69 %				S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide						S	

L'évaluation des activités biologiques des 7 souches appartenant à l'espèce *B. paralicheniformis* révèle des profils d'activités biologiques relativement différents. Ces différences sont particulièrement intéressantes car tous les isolats évalués ici ont été affiliés à la même souche de *B. paralicheniformis* (KY694465) référencée dans la base de données EzBioCloud. Ceci suggère une certaine diversité intraspécifique au sein des *B. paralicheniformis* qui ont été testées.

IV.4.3.3.5 Bacillaceae : espèce *Bacillus licheniformis*

Sept souches de *Bacillus licheniformis* ont été étudiées dans le cadre de ces travaux. La mise en culture de ces souches a permis l'obtention de 28 extraits bruts pour lesquels les activités biologiques ont été évaluées (**Tableau LXV**). Les résultats montrent que ces extraits ne sont pas actifs sur les cibles élastase, catalase et CDK7.

En revanche, trois souches (SH-04, SH-68a et SH-68b) se sont révélées être productrices de 5 extraits actifs sur la tyrosinase.

La souche SH-100 a donné des extraits actifs sur la sirtuine 1 : SH-100-AcOEt-CL (A = 190 %) et SH-100-MeOH-CS (A = 222 %). Avec leurs moyennes d'activation supérieures à 170 %, ces extraits ont été identifiés comme des « super-hits » pour la recherche d'activateur de sirtuine 1.

Cinq souches (SH-04, SH-68a, SH-68b, SH-100 et SH-116a) produisent un total de 7 extraits capables d'inhiber l'activité de la protéine kinase FynB. Parmi ces extraits, 4 inhibent l'activité de la Fyn-B de façon dose-dépendante (SH-04-AcOEt-CS, SH-68a-AcOEt-CL, SH-68b-AcOEt-CL et SH-116a-AcOEt-CS). Bien que ces 4 extraits aient été identifiés comme étant des « super-hits », c'est toutefois l'extrait SH-04-AcOEt-CS qui est le plus actif (inhibition aux 3 concentrations testées).

Enfin, concernant la recherche d'inhibiteur du protéasome, un seul extrait (SH-99-AcOEt-CL) obtenu de la souche SH-99 a montré une activité inhibitrice. Il a par conséquent été identifié comme prometteur dans la recherche d'inhibiteur du protéasome.

Tableau LXV : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Bacillus licheniformis.*

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-04 ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 38,25 %					
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide		S 28,96 %					
SH-46 ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide	Contamination						
	Méthanol	Liquide							
		Solide	Contamination						
SH-68a ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 40,98 %				L	
		Solide		S 35,52 %				S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-68b ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide						L	
		Solide							
	Méthanol	Liquide		L 43,17 %					
		Solide							
SH-99 ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide							L
		Solide							
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-100 ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide			L 190 %				
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide			S 222 %				
SH-116a ***Bacillus licheniformis***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide						L	
		Solide							

A l'instar des isolats de *B. paralicheniformis*, tous les isolats de *B. licheniformis* étudiés ont été affiliés à la même souche de *B. licheniformis* (AE017333) référencée dans EzBioCloud. La diversité des profils d'activités biologiques observés laisse à penser qu'une certaine diversité intraspécifique existerait également au sein des souches de *B. licheniformis*.

IV.4.3.3.6 Bacillaceae : espèce *Bacillus berkeleyi*

La mise en culture de la souche *Bacillus berkeleyi* a permis l'obtention de 4 extraits bruts. L'évaluation de ses activités biologiques révèle que ses extraits ne sont pas actifs sur les cibles élastase, sirtuine 1, CDK7 et protéasome (**Tableau LXVI**).

Toutefois, 2 activités d'inhibition modérée ont été observées pour 2 extraits, tyrosinase (SH-137-AcOEt-CL, I = 30,23 %) et Fyn-B (SH-137-AcOEt-CS).

En revanche, l'extrait SH-137-AcOEt-CL a montré une capacité d'activation de la catalase relativement forte avec une moyenne d'activation égale à 153 %. Cet extrait rentre donc dans la catégorie des « super-hits » pour la recherche d'activateur de la catalase.

Tableau LXVI : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures de la souche de *Bacillus berkeleyi*.

Souche	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-137 ***Bacillus berkeleyi***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 30,23 %		L 153 %			
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide							

IV.4.3.3.7 Thermoactinomycetaceae

La mise en culture des 2 souches appartenant à la famille des Thermoactinomycetaceae a permis l'obtention de 8 extraits bruts. L'évaluation de l'activité biologique de ces derniers montre une activité unique pour la tyrosinase (**Tableau LXVII**). Seuls les extraits AcOEt des cultures solides (SH-32-AcOEt-CS et SH-39-AcOEt-CS) montrent une activité inhibitrice de la tyrosinase.

Tableau LXVII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches appartenant à la famille des Thermoactinomycetaceae.

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-32	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide		S 34,90 %					
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-39	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide		S 29,95 %					
	Méthanol	Liquide							
		Solide							

IV.4.3.3.8 Fungi : genres *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora*

La mise en culture des 3 champignons filamenteux a permis l'obtention respective de 12 extraits bruts. L'évaluation de leur activité biologique montre que ces derniers ne sont pas actifs sur l'élastase, la catalase, la protéine kinase CDK7 et le protéasome (**Tableau LXVIII**).

Toutefois, la souche SH-53, *Nigrospora aurantiaca*, produit 2 extraits favorisant l'activation de la sirtuine 1 : SH-53-AcOEt-CS (A = 130 %) et SH-53-MeOH-CS (146 %).

La souche SH-122, *Aspergillus sydowii*, a également démontré une capacité à produire des métabolites actifs. L'extrait SH-122-AcOEt-CL présente une activité d'inhibition modérée de la tyrosinase (I = 34,38 %). L'extrait SH-122-AcOEt-CS inhibe, quant à lui, l'activité de la Fyn-B à la concentration la plus forte soit 1 mg/mL.

La souche SH-123, *Chaetomium globosum*, présente une activité d'inhibition de la tyrosinase ainsi que de la Fyn-B. Les extraits SH-123-AcOEt-CL (I = 32,79 %) et SH-123-AcOEt-CS (I = 45,36 %) inhibent plus ou moins modérément l'activité de la tyrosinase. L'extrait SH-123-AcOEt-CS inhibe également, mais de façon modérée, l'activité de la FynB. Cependant les extraits SH-123-MeOH-CL et SH-123-MeOH-CS inhibent l'activité de la FynB de façon dose-dépendante aux concentrations de 1 mg/mL et 0,1 mg/mL. Ces 2 extraits

peuvent ainsi être considérés comme des « super-hits » pour la recherche d'inhibiteurs de la FynB.

Tableau LXVIII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de champignons filamenteux.

Souches	Solvant	Culture	Inhibition de l'élastase	Inhibition de la tyrosinase	Activation de la sirtuine 1	Activation de la catalase	Inhibition de CDK7	Inhibition de la FynB	Inhibition du protéasome
SH-53 ***Nigrospora aurantiaca***	Acétate d'éthyle	Liquide							
		Solide			S 130 %				
	Méthanol	Liquide							
		Solide			S 146 %				
SH-122 ***Aspergillus sydowii***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 34,38 %					
		Solide						S	
	Méthanol	Liquide							
		Solide							
SH-123 ***Chaetomium globosum***	Acétate d'éthyle	Liquide		L 32,79 %					
		Solide		S 45,36 %				S	
	Méthanol	Liquide						S	
		Solide						S	

IV.4.4 Discussion

Sur les 118 extraits bruts microbiens testés, 92 (soit 77,96 %) d'entre eux ont été actifs sur au moins une cible biologique. Une fois les extraits bruts actifs ne répondant pas aux critères de « hit » ou « super-hit » exclus de la liste, le nombre d'extraits actifs sur au moins une cible passe à 64 (soit 54 %). Chaque souche ayant été cultivée sur 2 milieux différents (Liquide et Solide) et chaque milieu de culture extrait au moyen de 2 solvants (AcOEt et MeOH), il s'est alors posé la question de l'influence des solvants d'extraction ainsi que celle des milieux de culture sur les activités biologiques observées lors du criblage.

❖ Influence du solvant d'extraction sur l'activité biologique

La répartition des extraits bruts actifs, sur au moins une cible, en fonction du solvant d'extraction, montre que 45 (soit 70,3 %) extraits actifs sont des extraits AcOEt et seuls 19 (29,7 %) sont des extraits MeOH. De plus, les extraits AcOEt démontrent souvent des activités multiples contrairement aux extraits MeOH. C'est le cas par exemple de l'extrait AcOEt-CS de la souche SH-78 (*Salinispora arenicola*) qui agit sur 4 cibles biologiques différentes (tyrosinase, CDK7, FynB et protéasome) par inhibition de leurs activités alors que l'extrait MeOH-CS de cette même souche n'agit que sur le protéasome (**Tableau LXI** p. 206). Les extraits MeOH, quand ils sont actifs, présentent en général une seule activité.

❖ Influence du milieu de culture (Solide/Liquide) sur l'activité biologique

L'analyse de la bioactivité des extraits bruts AcOEt en fonction du milieu de culture (liquide ou solide) met en lumière 2 constats :

- Le premier est qu'il y a presque autant d'extraits bruts AcOEt actifs issus des cultures solides (24/45 soit 53,3 %) que d'extraits AcOEt actifs issus des cultures liquides (21/45 soit 46,7 %).

- Le deuxième est que les extraits AcOEt-CS présentent souvent des activités multiples contrairement aux extraits AcOEt-CL. A l'instar, par exemple, de l'extrait AcOEt-CS de la souche SH-45 (*Salinispora arenicola*) qui est actif sur les cibles CDK7, FynB et protéasome alors que l'extrait AcOEt-CL de la même souche n'est actif que sur la cible FynB.

Concernant les extraits MeOH, nous remarquons qu'il y a autant d'extraits actifs issus des cultures liquides (9/19) que d'extraits actifs issus des cultures solides (10/19). Par ailleurs, nous observons que les extraits issus d'une culture solide sont plus actifs (4 extraits super-hits) que les extraits issus d'une culture liquide (1 extrait super-hit).

Cette analyse de l'activité biologique observée pour les extraits bruts en fonction du solvant d'extraction ainsi que de la nature du milieu de culture (CL/CS) suggère qu'une extraction à l'AcOEt ainsi qu'une culture en milieu solide semblent être favorables à la production d'extraits bioactifs. Dans leur mini-revue publiée en 2001, Robinson et ses collaborateurs indiquaient que la fermentation en milieu solide présentait de nombreux avantages pour la production de métabolites spécialisés bioactifs [Robinson *et al.*, 2001]. Parmi ceux-ci, l'offre d'un support adapté à la morphologie filamenteuse des micro-organismes utilisés majoritairement pour la production de métabolites spécialisés et la préservation de la bioactivité des composés produits est à citer. Cependant, il est important de se rappeler que durant cette étape de criblage, la durée d'incubation des milieux de culture liquide fixée par TASCMAR n'était que de 5 jours sur un milieu MB (marine broth) comparé à 15 jours pour le milieu solide MBA (marine broth agar). Ces deux paramètres, durée d'incubation et milieu de culture, sont importants dans la mesure où ils influencent grandement la capacité de production en métabolites spécialisés de certaines souches testées. En effet, il est généralement considéré qu'il faut un minimum de 7 jours pour que des bactéries telles que les actinomycètes puissent se développer suffisamment jusqu'à atteindre un stade optimal de production des métabolites spécialisés. Il est communément admis que la transition du métabolisme primaire vers le métabolisme secondaire a lieu dans des conditions d'appauvrissement du milieu en nutriment [Nieselt *et al.*, 2010; Flärdh et Buttner, 2009]. Cette transition du métabolisme est caractérisée au niveau du cycle de développement du microorganisme par un switch d'une phase de croissance exponentielle vers une phase stationnaire (idiophase). Par ailleurs, le milieu Marine Broth utilisé comme milieu de culture standard n'est pas forcement optimal pour le développement de certaines souches testées telles que la SH-36 (*Micromonospora chokoriensis*).

Concernant les extraits bruts identifiés comme « super-hits » (**Tableau LXIX**), ils représentent 16,9 % de tous les extraits bruts testés et 31,3 % des extraits bruts actifs (« hits » et « super-hits »). En considérant le pourcentage d'extraits bruts « super-hits » produit par les différents types microbiens testés, nous constatons que :

- 50 % sont produits par le genre *Bacillus* (SH-02a, b, c : *B. paralicheniformis* ; SH-04, -68a, -68b, -99, -100 : *B. licheniformis* ; SH-137 : *B. berkeleyi*),
- 30 % par le genre *Salinispora* (SH-45, SH-54, SH-78 : *S. arenicola*),
- 10 % par le genre *Micromonospora* (SH-82 : *M. fluostatini* ; SH-89 : *M. citrea*)

- 10 % par le genre *Chaetomium* (SH-123 : *C. globosum*).

Tableau LXIX : Tableau synthétique des extraits bruts microbiens « super-hits ».

Inhibiteur Tyrosinase	Inhibiteur CDK7	Inhibiteur Fyn-B	Inhibiteur protéasome	Activateur catalase	Activateur sirtuine 1
SH-89-AcOEt-CS	SH-45-AcOEt-CS	SH-45-AcOEt-CS	SH-99-AcOEt-CL	SH-02a-MeOH-CS	SH-82-AcOEt-CL
	SH-54-AcOEt-CS	SH-54-AcOEt-CS		SH-02b-MeOH-CL	SH-100-AcOEt-CL
	SH-78-AcOEt-CS	SH-78-AcOEt-CS		SH-02c-AcOEt-CS	SH-100-MeOH-CS
		SH-04-AcOEt-CS		SH-137-AcOEt-CL	
		SH-68a-AcOEt-CL			
		SH-68b-AcOEt-CL			
		SH-123-MeOH-CL			
		SH-123-MeOH-CS			

SH-02a : *Bacillus paralicheniformis* ; SH-02b : *B. paralicheniformis* ; SH-02c : *B. paralicheniformis* ; SH-04 : *Bacillus licheniformis ;* SH-45 : *Salinispora arenicola* ; SH-54 : *S. arenicola* ; SH-78 : *S. arenicola* ; SH-68a : *Bacillus licheniformis* ; SH-68b : *B. licheniformis* ; SH-82 : *Micromonospora fluostatini* ; SH-89 : *Micromonospora citrea* ; SH-99 : *B. licheniformis* ; SH-100 : *B. licheniformis* ; SH-123 : *Chaetomium globosum* ; SH-137 : *Bacillus berkeleyi*.

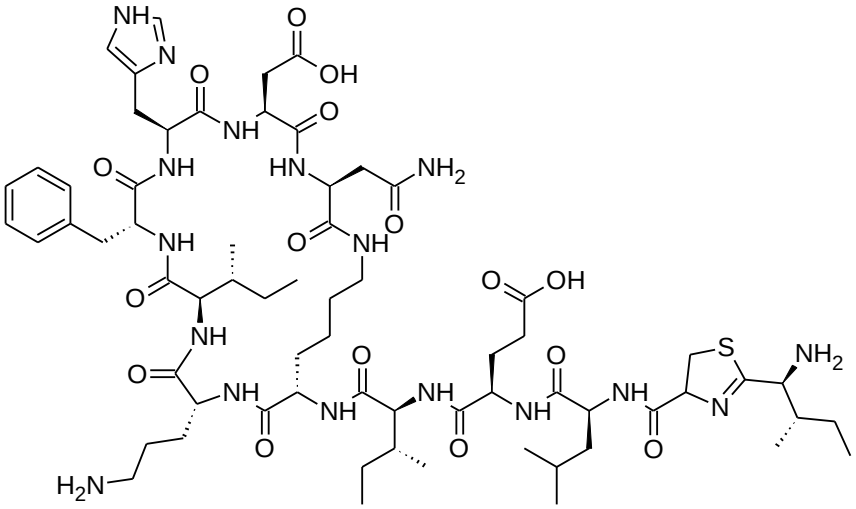
Dans la suite de notre discussion, une attention particulière est accordée aux microorganismes producteurs d'extraits bruts super-hits. Une recherche bibliographique sur leur production de métabolites bioactifs a été réalisée avec notamment un focus sur les activités recherchées dans le cadre du projet TASCMAR.

❖ *Bacillus licheniformis, Bacillus paralicheniformis* et *Bacillus berkeleyi*

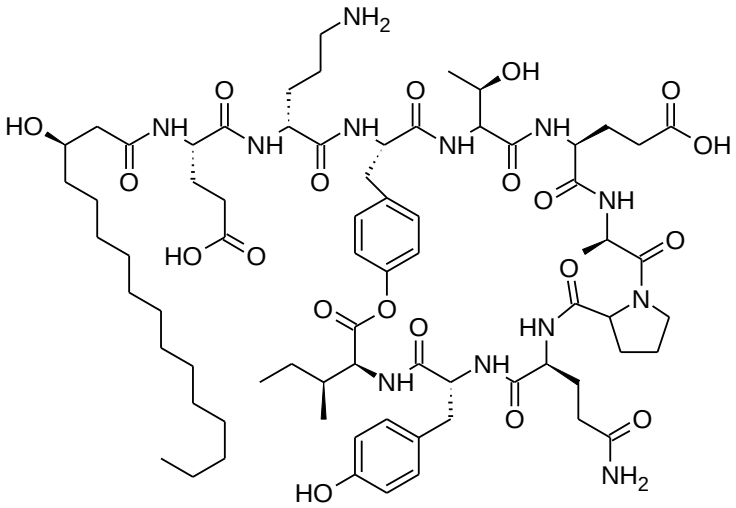
Alors qu'aucune étude ne porte sur les métabolites spécialisés de *B. berkeleyi* (SH-137) décrite en 2012, les espèces *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis* sont utilisées depuis plusieurs dizaines d'années déjà dans l'industrie pour la production d'antibiotiques, enzymes et autres composés d'intérêt notamment en agroalimentaire [Rey *et al.*, 2004; Baruzzi *et al.*, 2011]. Etroitement apparentées, ces 2 espèces possèdent un répertoire chimique commun mais se distinguent néanmoins au niveau de « leur profil chimique de base ».

Les *B. licheniformis* sont caractérisées par leur capacité à produire la lichenicidine (lantibiotique). Aucune structure n'est disponible pour ce composé. La lichénicidine est synthétisée sous forme de 2 propeptides (constitué de plus de 30 acides aminés chacun) qui subissent ultérieurement différentes modifications post-traductionnelles conduisant à des peptides matures. L'action synergique des 2 peptides matures de la lichénicidine VK21, par exemple, a un effet antibactérien à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, alors qu'indivuellement ces peptides sont actifs à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Les *B. paralicheniformis* sont quant à elles caractérisées par leur capacité à produire les antibiotiques bacitracine (**47**) (polypeptide) et fengycine (**48**) (lipopeptide).



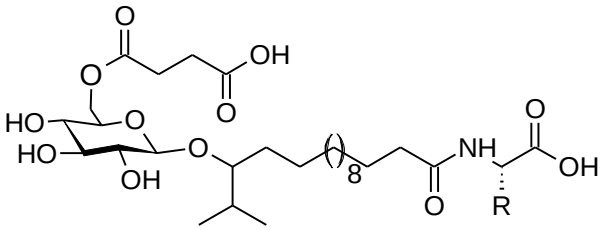
bacitracine A (**47**)



fengycine (**48**)

En outre, les quelques isolats marins de *B. licheniformis* étudiés pour leur potentiel pharmacologique se sont révélés être sources de molécules bioactives avec parfois des structures chimiques uniques. C'est le cas par exemple des ieodoglucomides A (**49**) et B (**50**) qui sont des glycopeptides aux structures uniques caractérisés par un enchaînement : acide aminé, un nouvel acide gras (C_{29} ou C_{30}), acide succinique et sucre [Tareq *et al.*, 2012]. Ces molécules purifiées à partir d'un extrait de *B. licheniformis*, isolée de sédiment marin collecté sur le Rocher de Socotra (Ieodo), ont montré des activités antimicrobiennes modérées. Seul l'iodoglucomide B a montré une activité cytotoxique contre des cellules cancéreuses de poumons et d'estomac. D'autres souches isolées à partir de macroorganismes (éponge et algue rouge), de source thermale ou de sédiments marins ont conduit à l'isolement de métabolites bioactifs. Ces métabolites ont démontré des activités antimicrobienne [Devi *et al.*,

2010], bactériostatique [Chen *et al.*, 2017], anticancéreuse en ciblant le facteur 1 induit par l'hypoxie (HIF-1) [Choi *et al.*, 2016], antivirale et immunomodulatrice [Arena *et al.*, 2006]. Ces métabolites bioactifs appartiennent respectivement aux classes chimiques des alcaloïdes indoliques ainsi que de l'acide phénylpropionique et ses dérivés, des lipopeptides biosurfactants, des sesquiterpènes ainsi que des exopolysaccharides.

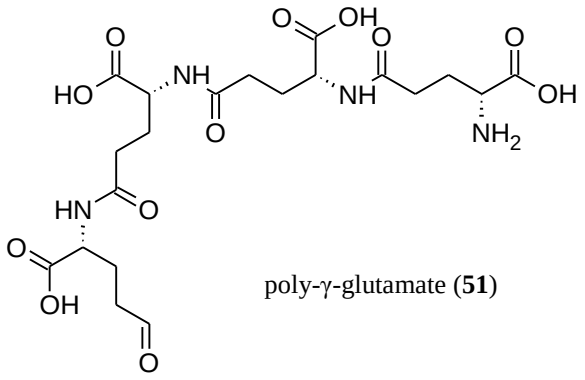


R = CH_3, iedoglucomide A (**49**)

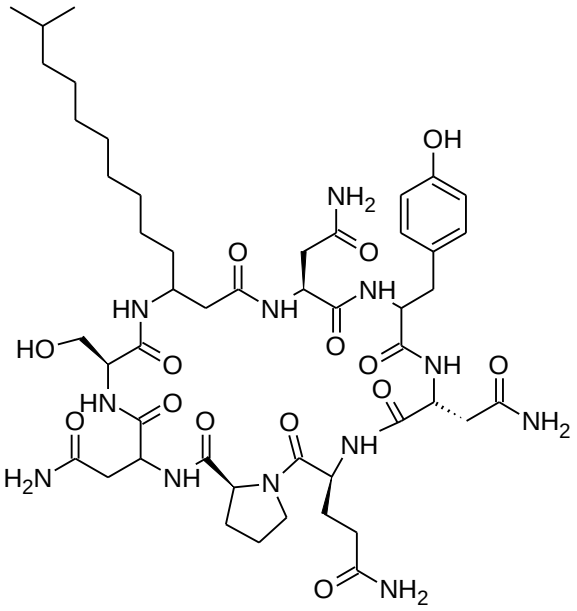
R = H, iedoglucomide B (**50**)

Concernant l'espèce *B. paralicheniformis*, une étude fait référence à l'isolement d'un nouvel antibiotique, la formicine. Cette molécule, dont la structure demeure indisponible dans la littérature, a été extraite d'une souche marine de *B. paralicheniformis* isolée d'un poisson collecté en Irlande [Collins *et al.*, 2016]. Ce composé appartient à la classe des bactériocines (famille de peptides/protéines synthétisés par certaines bactéries) et plus particulièrement aux lantibiotiques à 2 peptides à l'instar de la lichénicidine évoquée précédemment.

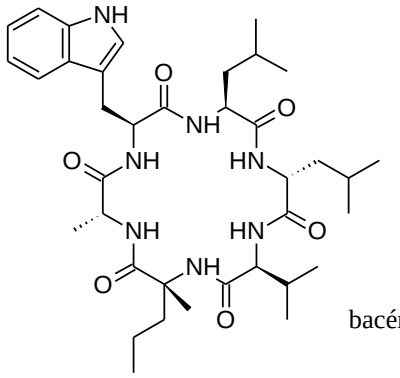
Une revue de la littérature semble indiquer que c'est la première fois que des activités inhibitrices de protéasome et de Fyn-kinase ainsi qu'activatrices de la catalase et de la sirtuine 1 sont reportées pour ces espèces. Toutefois, une étude publiée en 2013 a montré que le poly-γ-glutamate (**51**), isolé de *B. subtilis*, inhibait l'activité de la tyrosinase tout en régulant à la hausse l'activité de la catalase [Liu *et al.*, 2013; Candela et Fouet, 2006]. Ce polymère est produit par différentes espèces de *Bacillus*, notamment *B. licheniformis*. Par ailleurs, l'iturine A (**52**), isolée d'une souche marine de *Bacillus*, a présenté une activité inhibitrice de protéine kinase (Akt et MAPK) [Dey *et al.*, 2015]. L'iturine A (**52**) est un cyclopeptide aux propriétés antifongiques synthétisé par différente espèces de *Bacillus* et plus particulièrement *B. amyloliquefaciens* (groupe *B. subtilis*, *cf* p. 196) [Harwood *et al.*, 2018]. Enfin, la bacéridine (**53**), un autre cyclopeptide isolé d'une souche de *Bacillus* endophyte, a démontré une activité inhibitrice de protéasome [Niggemann *et al.*, 2014].



poly-γ-glutamate (**51**)



iturine A (**52**)

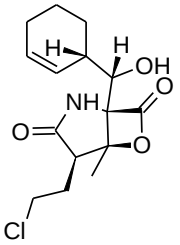


bacéridine (**53**)

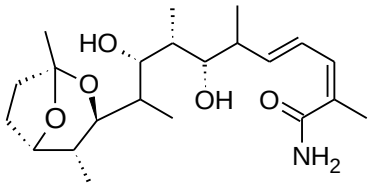
❖ ***Salinispora arenicola***

Les espèces du genre *Salinispora* consacrent environ 10 % de leurs génomes à la production de métabolites spécialisés [Udwary *et al.*, 2007; Penn *et al.*, 2009]. Ce chiffre est supérieur au pourcentage du génome de *Streptomyces*, et autres actinomycètes producteurs de métabolites spécialisés, dédié à la même fonction. Par ailleurs, il a été montré que cette production est « espèce-spécifique », c'est-à-dire que chaque espèce produit un panel de composés qui lui est spécifique en plus des composés communs [Jensen *et al.*, 2007; Penn *et al.*, 2009]. Les activités biologiques de ces métabolites spécialisés ainsi que les cibles moléculaires, quand elles sont connues, sont indiquées dans les articles cités précédemment. En raison de sa très grande capacité à produire des métabolites spécialisés structurellement uniques mais aussi biologiquement actifs, un très grand intérêt est accordé à ce genre [Jensen *et al.*, 2015; Fenical et Jensen, 2006]. Bien que plusieurs métabolites spécialisés isolés à partir de ce genre soient déjà connus, la plupart des métabolites spécialisés sont nouveaux telle que le salinosporamide A (**8**). Ce dernier composé est un inhibiteur sélectif du protéasome actuellement en essai clinique sous le nom *marizomib* [Feling *et al.*, 2003; Fenical *et al.*, 2009]. D'après Jensen *et al.*, la voie de biosynthèse responsable de la production de la salinisporamide A ne serait présente que chez un certain nombre de souches de *S. arenicola*, et la production de ce métabolite resterait faible [Jensen *et al.*, 2015]. Ceci pourrait expliquer l'activité inhibitrice modérée du protéasome observée. Par ailleurs, la salinikétale (**54**), la staurosporine (**28**) ainsi que la rifamycine (**55**) sont toutes isolées de *S. arenicola* et constituent son chémotype de base [Jensen *et al.*, 2007]. Il est à noter que la staurosporine et

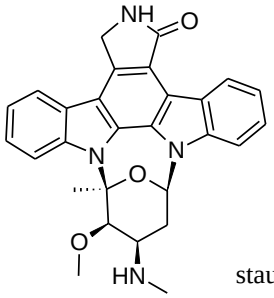
la rifamycine ont été isolées d'autres genres d'actinomycètes par le passé [Omura *et al.*, 1995].



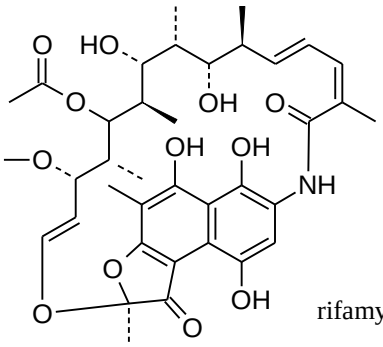
salinosporamide A (**8**)



salinikétale A (**54**)

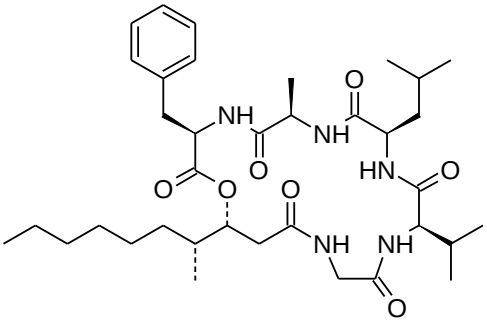


staurosporine (**28**)

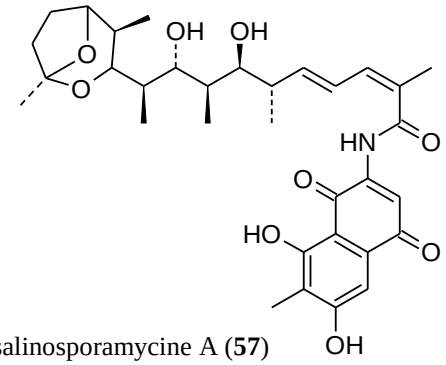


rifamycine (**55**)

De nouveaux composés plus spécifiques de *S. arenicola* ont également été découverts : les arénamides (**56**) (cyclohexadepsipeptides) et la salinisporamycine (**57**) pour ne citer que ceux-là. Les arénamides, par exemple, ont démontré des activités anti-inflammatoires et d'inhibition de la NF-kB. La staurosporine et la rifamycine sont toutefois, les métabolites spécialisés les plus actifs isolés de ce genre, auxquels sont associées respectivement des activités anticancéreuse et antimicrobienne [Jensen *et al.*, 2015]. Les cibles moléculaires identifiées à ce jour pour la staurosporine sont les protéines kinases. Les protéines CDK7 et Fyn-B étant des protéines kinases, il est envisageable que les activités inhibitrices observées pour les extraits AcOEt-CS des souches de *S. arenicola* soient dues à la staurosporine. Il est à noter que ce même composé a été utilisé comme contrôle positif dans ces deux tests (inhibitions CDK7 et FynB). La déréplication de ces extraits bruts pourrait nous permettre de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Cette déréplication pourrait s'avérer doublement intéressante dans la mesure où il a été démontré que le profil de production en métabolites spécialisés de certaines souches de *S. arenicola* pouvait varier en fonction de la localisation géographique de leur collecte [Edlund *et al.*, 2011].



arénamide A (**56**)



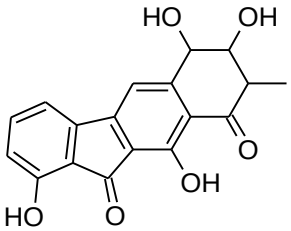
salinosporamycine A (**57**)

❖ ***Micromonospora* spp.**

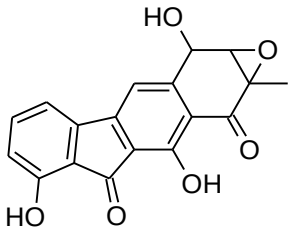
Dans le cadre de notre étude, le genre *Micromonospora* a présenté 2 espèces, *M. fluostatini* (SH-82) et *M. citrea* (SH-89), capables de produire respectivement un extrait activateur de la sirtuine 1 et un extrait inhibiteur de l'activité de la tyrosinase.

Isolée de sédiments marins en 2015, *M. fluostatini* a semble-t-il hérité son nom de sa capacité à produire les composés fluostatines B (**58**) et C (**59**) [Phongsopitanun *et al.*, 2015]. Ces composés ont été précédemment isolés de 2 souches différentes de *Streptomyces* [Akiyama *et al.*, 1998; Baur *et al.*, 2006]. La fluostatine B a été identifiée au cours d'un screening pour des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase III, et la fluostatine C a montré une activité cytotoxique modérée contre une sélection de cellules tumorales.

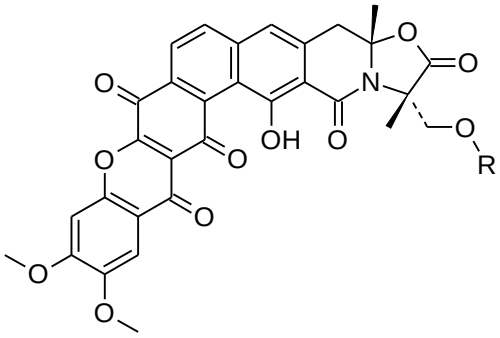
L'espèce *M. citrea*, validée en 2005, a été identifiée dès 1989 comme étant productrice d'une nouvelle classe d'antibiotiques, les citréamicines (**60** à **63**) [Carter *et al.*, 1990; Maiese *et al.*, 1989]. Par la suite, d'autres citréamicines (**64** et **65**) ont été isolées de *Streptomyces* [Hopp *et al.*, 2008]. Parmi celles-ci, les citréamicines η (**63**), δ (**64**) et ε (**65**) se sont montrées particulièrement actives, avec une concentration minimale inhibitrice < 0,06 µg/mL, contre différentes souches bactériennes Gram+, notamment des pathogènes résistantes à la pénicilline et la quinolone. Cette activité est comparable à celles de la daptomycine (**66**) (lipopeptide) et du linézolide (**67**) (synthétique) actuellement sur le marché et utilisés comme antibiotiques actifs uniquement contre les bactéries Gram+. Aucune étude n'a pu être trouvée sur les métabolites spécialisés produits par le genre *Micromonospora* qui pourraient éventuellement expliquer les activités observées (inhibition de la tyrosinase (SH-89) et activation de la sirtuine 1 (SH-82)).



fluostatine B (**58**)



fluostatine C (**59**)

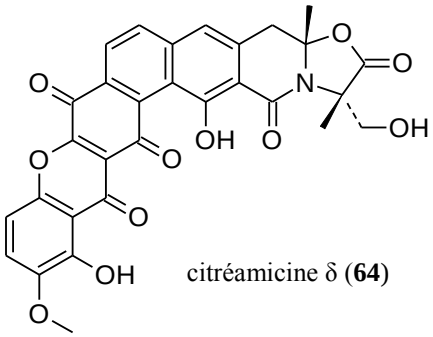


R = $COCH_2CH(CH_3)_2$, citréamicine α (**60**)

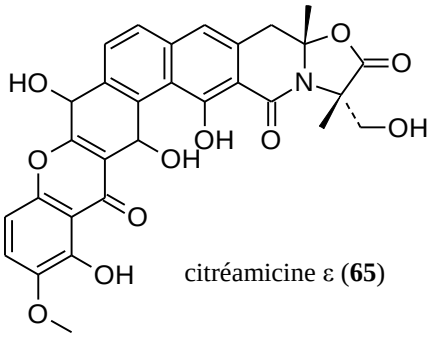
R = $COCH(CH_3)_2$, citréamicine β (**61**)

R = $COOCH_3$, citréamicine γ (**62**)

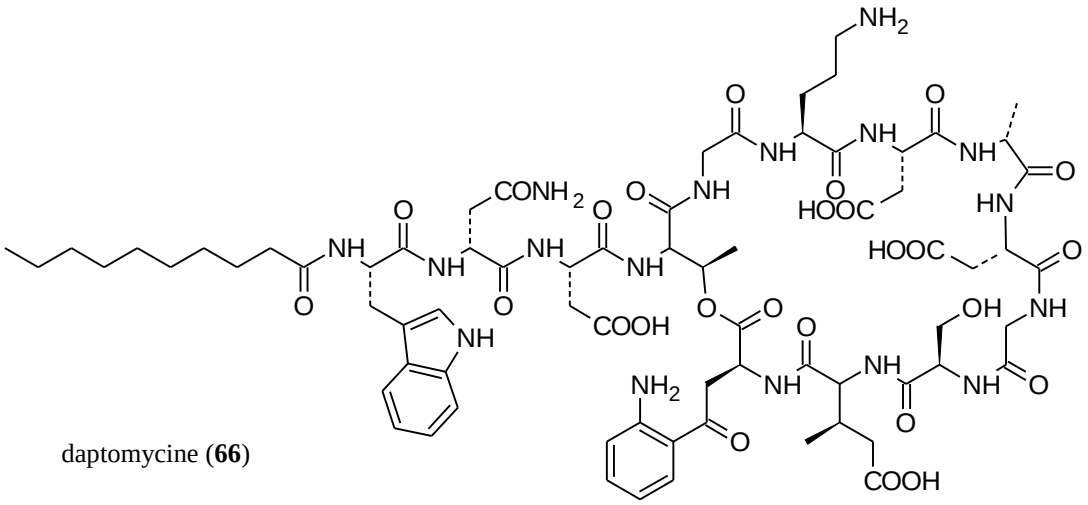
R = H, citréamicine η (**63**)



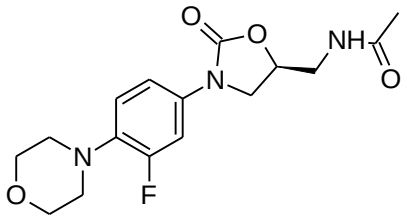
citréamicine δ (**64**)



citréamicine ε (**65**)



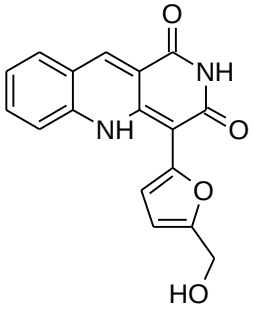
daptomycine (**66**)



linézolide (**67**)

❖ ***Chaetomium globosum***

Chaetomium globosum est une espèce de champignon dotée d'une grande capacité de production de métabolites spécialisés aux d'activités biologiques diverses. Parmi les activités reportées, il faut noter les activités cytotoxique [Wang *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2010; Muroga *et al.*, 2009], anti-inflammatoire [Dou *et al.*, 2011], antioxydante et antimicrobienne [Awad *et al.*, 2014]. C'est également une source de structures originales. En 2011, par exemple, une nouvelle classe d'azaphilone a été isolée d'une souche de *C. globosum* associée à un poisson [Yamada *et al.*, 2011]. Par ailleurs, un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase, la chaetominedione (**68**), a été isolée d'une souche de *Chaetomium* sp. en association avec une algue [Abdel-Lateff, 2008]. La protéine FynB, dont l'activité a été inhibée par les extraits MeOH de *C. globosum*, appartient à la famille des protéines tyrosine kinase. Ceci suggère que la souche SH-123 produit dans son extrait brut un composé capable d'inhiber la FynB et qu'il pourrait probablement être un analogue de la chaetominedione. Seule la déréplication des extraits bruts pourra infirmer ou confirmer cette hypothèse.



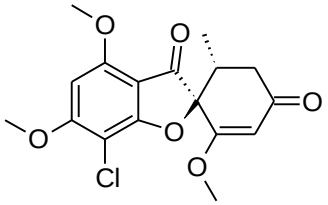
chaetominedione (**68**)

❖ ***Rhodococcus nanhaiensis***

Isolée en 2012 à partir de sédiments marins, *Rhodococcus nanhaiensis* ne semble pas avoir fait l'objet d'étude pour l'isolement de métabolites bioactifs. Il apparaît ainsi que l'activité inhibitrice de la FynB, révélée par son extrait AcOEt-CS soit la première mentionnée. Globalement, contrairement aux genres *Micromonospora* et *Salinispora*, le genre *Rhodococcus* est peu étudié et exploité pour la recherche de métabolites spécialisés bioactifs. Peu de métabolites spécialisés ont été reportés à ce jour mais il semblerait que la tendance s'inverse du fait des applications possibles notamment grâce aux enzymes produites par ce genre [Bell *et al.*, 1998; Elsayed *et al.*, 2017; Warhurst et Fewson, 1994].

❖ ***Nigrospora aurantiaca***

La souche SH-53 de *Nigrospora aurantiaca* a également retenu notre attention pour plusieurs raisons. Il s'agit d'une espèce nouvellement décrite, en 2017, et il semble que ce soit la première fois que cette espèce soit isolée du milieu marin, et *a fortiori* d'une éponge. Par ailleurs, quelques métabolites spécialisés (alcaloïdes, anthraquinones, cyclopeptides, mycotoxines, dérivés pyrrolidinone) ont été isolés à partir de souches marines de *Nigrospora* auxquelles sont associées quelques rares bioactivités (cytotoxique, antimicrobienne, antifouling) [Ding *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013]. Des composés connus tels que la griséofulvine (**69**) ainsi que de nouveaux dérivés ont également été isolés de ce genre [Arumugam *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2011]. La diversité de la trentaine de composés bioactifs isolés à ce jour à partir d'espèces marines combinée à la nouveauté de l'espèce, qui n'a encore jamais été étudiée pour la recherche de nouveaux produits naturels marins bioactifs, suggèrent que cette souche pourrait être intéressante à exploiter ultérieurement. Enfin, il faut se rappeler que ces extraits AcOEt-CS et MeOH-CS ont également démontré une capacité à activer la sirtuine 1, bien que cette activité soit modérée.



griséofulvine (**69**

IV.5 Conclusion

En conclusion, l'étude du microbiome de *Scopalina hapalia* (ML-263) a révélé que sa communauté microbienne était dominée en majorité par le phylum des Proteobacteria suivi par les phyla des Cyanobacteria, des Bacteroidetes, des Planctomycetes et des Actinobacteria. Ces résultats sont en parfaite cohérence avec les données de la littérature sur les éponges LMA en général. Par ailleurs, il a été montré que l'éponge abritait une communauté bactérienne particulièrement diverse avec une moyenne de 18 phyla détectés à l'image de ce qui a été relaté dans la littérature pour certaines éponges LMA collectées à Mayotte ainsi que pour un spécimen de *Scopalia hapalia* collecté à Zanzibar et pour lesquels plus de 20 phyla ont été détectés dans leur communauté bactérienne [Helber *et al.*, 2019; Voogd *et al.*, 2018].

L'étude de la communauté microbienne cultivable a conduit à l'isolement de 124 isolats répartis entre actinomycètes, autres types de bactéries et champignons filamenteux.

Un travail préliminaire d'identification a permis d'affilier une trentaine d'isolats bactériens aux genres suivants : *Bacillus* (Firmicutes – 17 isolats), *Micromonospora* (Actinobacteria – 6), *Rhodococcus* (Actinobacteria – 1) et *Salinispora* (Actinobacteria – 3). Deux isolats ont été affiliés à un genre non décrit de la famille des Thermoactinomycetaceae (Firmicutes). Enfin, un isolat, dont l'identification est incertaine, a été affilié à la famille des Bacillaceae (Firmicutes). L'approche par culture a permis, d'une part, l'isolement de représentants d'un phylum (Actinobacteria) identifié parmi les phylas dominants par l'approche moléculaire, et d'autre part, de membres du phylum des Firmicutes, détecté quant à lui de façon ponctuelle avec la cible V3-V4. L'identification des isolats restants sera à réaliser afin d'avoir un aperçu global de la communauté cultivable.

Concernant à présent, les 3 champignons isolés, ils ont été affiliés aux genres *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora*. Le séquençage de la région ITS2 ayant donné des résultats insuffisants pour la caractérisation de la communauté fongique de l'éponge, une étude comparative n'a pu être réalisée. Toutefois, les genres qui ont été identifiés ici appartiennent au phylum des Ascomycota qui est l'un des phyla majeurs du règne des champignons. Les représentants de ce phylum sont souvent retrouvés en association avec les éponges.

Tous les isolats identifiés, à l'exception de celui à l'identification incertaine (SH-44), ont été mis en culture afin d'évaluer leur potentiel de production en métabolites spécialisés aux propriétés anti-âges. L'analyse des résultats du criblage biologique des extraits des

cultures microbiennes a montré que tous les isolats testés, à l'exception de SH-46, étaient capables de produire des métabolites spécialisés actifs sur au moins l'une des cibles suivantes : élastase, tyrosinase, sirtuine 1, catalase, CDK7, FynB et protéasome. Toutefois, certains isolats se sont montrés particulièrement performants dans la production de métabolites bioactifs et ont donné des extraits très actifs ou super-hits. Ces isolats sont les suivants : *Bacillus paralicheniformis* (SH-02a, SH-02b, SH-02c), *Bacillus licheniformis* (SH-04, SH-68a, SH-68b, SH-99, SH-100), *Bacillus berkeleyi* (SH-137), *Micromonospora fluostatini* (SH-82), *Micromonospora citrea* (SH-89), *Salinispora arenicola* (SH-45, SH-54, SH-78) et *Chaetomium globosum* (SH-123).

Au final, ces travaux ont contribué à mettre en place une souchothèque constituée d'une centaine de microorganismes parmi lesquels une trentaine a déjà été identifiée et dont le potentiel de production en métabolites spécialisés aux propriétés anti-âge a été révélé. A ce stade du travail, 2 axes de recherches complémentaires peuvent être envisagés pour la suite.

- ✓ Les paramètres sélectionnés dans le programme TASCMAR pour la production microbienne, afin de réaliser un premier criblage biologique des extraits microbiens, ne sont pas optimaux pour certaines souches étudiées. Il y a donc nécessité d'optimiser les paramètres de la production, en milieu liquide notamment, afin d'augmenter le rendement de production. Cette étape est primordiale afin d'initier un travail d'isolement et de caractérisation des métabolites spécialisés à partir des extraits microbiens qui ont présenté des activités anti-âges.
- ✓ Pour pouvoir explorer et exploiter au mieux la chimiodiversité qu'offrent les microorganismes, il serait intéressant de tester la production des microorganismes d'intérêt dans différents milieux de culture (approche OSMAC). L'approche OSMAC (One Strain MAny Compounds) consiste à cultiver un microorganisme donné dans plusieurs milieux différents afin de stimuler différentes voies de biosynthèse, notamment les gènes dits « silencieux » [Romano *et al.*, 2018; Bode *et al.*, 2002]. En effet, il a déjà été observé qu'un microorganisme donné avait la capacité de produire une grande diversité chimique en fonction de ses conditions de culture. Cette approche couplée à une approche de métabolomique non ciblée serait particulièrement intéressante pour explorer la chimiodiversité des souches encore peu étudiées à l'instar de SH-53 (*Nigrospora aurantiaca*) ou SH-115 (*Rhodococcus nanhaiensis*).

Il est à noter que les résultats issus de ces travaux ont donné lieu à :

▶ **Un stage de Master 2** (Janvier à Juin 2019) mené par Alexandre Le Loarer (Master CHIMBIOTECH, Université de La Réunion). Au cours de ce stage, les souches SH-78 de *S. arenicola*, SH-82 de *M. fluostatini* ainsi que SH-123 de *C. globosum* ont été sélectionnées pour des études préliminaires d'optimisation des conditions de culture. Le détail de ces travaux est consigné dans son mémoire de Master 2 intitulé « Recherche de molécules issues de trois microorganismes d'origine marine à propriété anti-age ». La souche SH-78 a été sélectionnée car plusieurs études ont prouvé que le genre *Salinispora* est particulièrement

prolifique dans la production de métabolites spécialisés bioactifs. Bien que le genre ait été intensément étudié en termes de capacité de production de métabolites spécialisés, ces derniers n'ont pas encore démontré d'activité contre les protéines CDK7 et FynB. Il est donc possible que ce genre soit un réservoir de molécules avec de nouvelles activités biologiques à découvrir. Il en va de même pour la souche SH-123 de *C. globosum.* La souche SH-82 de *M. fluostatini* a, quant à elle, été sélectionnée car très peu étudiée et il est communément admis que le genre *Micromonospora* présente un bon potentiel de production de métabolites spécialisés d'intérêt.

▶ **Une thèse** débutée en Janvier 2020 et menée par Alexandre Le Loarer. Cette thèse intitulée « *Production et caractérisation de métabolites bioactifs issus de micro-organismes isolés d'une éponge de la zone océan Indien, Scopalina hapalia* » traite de l'exploitation biotechnologique des microorganismes producteurs d'extraits super-hits isolés de *Scopalina hapalia*.

Conclusion générale
et
Perspectives

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du projet Européen H2020 TASCMAR conduit de 2015 à 2020 par un consortium de 5 laboratoires académiques (l'Institut de Chimie des Substances naturelles (CNRS, Gif-sur-Yvette), l'université d'Athènes, l'université de La Réunion, l'université de Tel-Aviv, l'université de Chulalongkorn (Thaïlande)), 6 industriels (Apitiva, Astareal, Bict, Crelux, iMare, Pierre Guerin), un cabinet de conseil (T6) et une ONG (EcoOcean). A l'interface entre la chimie et la microbiologie, ces travaux avaient pour objectif la recherche de principes actifs anti-âges dans les invertébrés marins d'une part et les micro-organismes associés à ceux-ci d'autre part. Les chapitres 1, 2 et 3 de ce mémoire concernent le travail réalisé sur les invertébrés marins ; le chapitre 4 est consacré aux travaux sur les micro-organismes.

Les criblages chimique et biologique de 47 éponges marines collectées à Mayotte en 2013 constituent la première étape de ce travail. Le criblage biologique a été réalisé sur les cibles élastase, tyrosinase, CDK7, FynK et protéasome. Ces cibles moléculaires sont impliquées dans différents processus biologiques liés au vieillissement normal et pathologique de l'être humain. Ainsi, l'inhibition de leur activité a un effet bénéfique sur le vieillissement. Les résultats du criblage biologique ont mis en évidence 19 extraits bruts d'éponges actifs sur au moins une des cibles biologiques étudiées. Par la suite, une analyse comparative des résultats issus des criblages chimique et biologique ainsi que ceux de la littérature a permis d'identifier 9 éponges parmi les 19 actives qui présentaient un intérêt chimique et/ou bibliographique. Suite à cette analyse, 2 éponges ont été retenues pour ces travaux de thèse:

- *Lendenfeldia* sp. (ML-240) a été sélectionnée pour une investigation chimique en raison de ses activités anticancéreuses (inhibition de CDK7 et du protéasome) et anti-Alzheimer (inhibition de FynK). Par ailleurs, l'éponge est connue pour produire des métabolites spécialisés d'intérêt thérapeutique (polybromodiphényléthers (PBDE), sesterterpènes, stéroïdes, dérivés d'acides aminés, etc).
- *Scopalina hapalia* (ML-263) a été choisie pour ses activités inhibitrices significatives sur FynK et l'élastase. Les inhibiteurs d'élastase sont particulièrement recherchés pour une valorisation en cosméceutique. Malgré le potentiel biologique des extraits issus des éponges appartenant au genre *Scopalina* (activités cytotoxique, antiproliférative, antimicrobienne, antifongique, régulatrice de la croissance des plantes et antioxydante), aucune étude chimique approfondie n'a été réalisée. Seuls 6 composés dont 2 actifs ont été reportés du genre *Scopalina* depuis 1983, année de la première publication relative à la composition chimique d'*Ulosa ruetzleri*, devenue *Scopalina ruetzleri*. Les résultats pharmacologiques prometteurs associés à une littérature peu abondante sur la chimie de l'éponge justifient le choix d'étudier celle-ci de façon approfondie en dépit de son profil chimique complexe. *Scopalina hapalia* a donc été étudiée tant pour sa composition chimique que pour la composition de sa communauté microbienne.

Concernant tout d'abord l'étude chimique de l'éponge *Lendenfeldia* sp. (ML-240), ordre Dictyoceratida, le travail a conduit à l'isolement de 5 composés purs connus (**LS1** à **LS5**) ainsi que d'un nouveau composé (**LS6)** appartenant à la classe des PBDE :

- 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS1**),
- 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS2**),
- 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (**LS3**),
- 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (**LS4**),
- 3,4,5,6-tétrabromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS5**),
- 4,5,6-tribromo-2-(4',6'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (**LS6**).

Les PBDE sont des métabolites spécialisés caractéristiques des éponges appartenant à l'ordre des Dictyoceratida, et plus particulièrement au genre *Dysidea*. Leur synthèse serait due à la cyanobactérie symbionte *Oscillatoria spongeliae* identifiée chez les éponges du genre *Dysidea*. Les composés **LS1** à **LS5** ont déjà été isolés de spécimens du genre *Dysidea*. Seuls les composés **LS3** à **LS5** ont également été retrouvés dans une éponge du genre *Lendenfeldia* en 2004. A ce jour, 16 PBDE ont été recensés dans le genre *Lendenfeldia*, à ceux-ci viennent s'ajouter à présent les 2 composés connus (**LS1** et **LS2**) ainsi que le composé nouveau **LS6**.

Parmi ces composés isolés, 2 inhibiteurs de protéines kinases et 1 inhibiteur de protéasome ont été identifiés cependant leurs activités biologiques anti-âge sont très faibles :

- **LS5** et **LS6** inhibent aussi bien CDK7 et FynK mais seulement à des CI_{50} > 15,00 µg/mL. En comparaison à la staurosporine, composé de référence, actif à une CI_{50} de 0,08 µg/mL, les composés **LS5** et **LS6** sont donc très faiblement inhibiteurs.
- **LS1** inhibe le protéasome à la concentration de 33 µg/mL. En comparaison à l'ONX-0914, composé de référence, actif à une CI_{50} de 0,000026 µg/mL, le composé **LS1** est un inhibiteur très faible du protéasome.

Le fractionnement de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. a été entrepris car celui-ci avait présenté une activité inhibitrice significative sur FynK et CDk7 aux concentrations respectives de 11,1 µg/mL et 1,1 µg/mL. Malheureusement, aucune des molécules purifiées ne s'est montrée active à des concentrations inférieures à 10 µg/mL. Néanmoins, il est possible que ces composés soient responsables de l'activité observée avec l'extrait brut de l'éponge. En effet, d'une part il a été reporté que certains PBDE étaient des inhibiteurs de protéines kinases et, d'autre part, certains auteurs ont reporté une perte d'activité de PBDE purifiés par fractionnement bio-guidé de fractions riches en PBDE actives sur la protéine Mcl-1. Ces derniers ont suggéré une éventuelle activité synergique des PBDE. Cette hypothèse n'exclut toutefois pas la possibilité que les activités observées soient portées par d'autres composés non purifiés à l'instar des sesterterpènes identifiés par RMN et qui sont également connus pour être actifs sur certaines protéines kinases.

L'étude chimique de l'éponge *Scopalina hapalia* a ensuite été entreprise. Eponge encroûtante, fragile et de couleur orangée, l'espèce est retrouvée abondamment dans les récifs coralliens de la zone Sud-ouest de l'Océan Indien, aussi bien à Zanzibar qu'à Mayotte. Bien qu'aucun métabolite n'ait été reporté dans la littérature pour cette espèce, des activités

cytotoxique et antibactérienne ont été associées à son extrait brut. Ces activités biologiques sont en accord avec de précédents résultats publiés pour l'espèce *S. ruetzleri* indiquant que le genre *Scopalina* serait un réservoir de métabolites bioactifs. L'étude menée a permis l'isolement et l'identification de 14 métabolites (**SH1** à **SH14**) dont 4 nouveaux (**SH1**, **SH4**, **SH11** et **SH12**) appartenant à 5 classes chimiques différentes :

Phospholipides et dérivés

- 1-*O*-Octadécyl-2-pentanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (**SH1**)
- 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (**SH2**)
- 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (**SH3**)
- 1-*O*-(3-Méthox-tétradécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (**SH4**)

Alkylglycérols (AKG)

- 1-*O*-Hexadécyl-*sn*-glycérol (**SH5**)
- 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycérol (**SH6**)
- 1-Nonadécyloxy-2,3-propanediol (**SH7**)
- 3-Icosyloxy-1,2-propanediol (**SH8**)

Épidioxystérols

- 5*α*,8*α*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol (**SH9**)
- 5*α*,8*α*-Epidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol (**SH10**)

Buténolides

- Dérivé 1 de sinularone (**SH11**)
- Dérivé 2 de sinularone (**SH12**)

Dicétopipérazines

- Cyclo(L-Leu-L-Val) (**SH13**)
- Cyclo(Phe-Val) (**SH14**)

A ce jour, seuls 6 composés appartenant aux classes chimiques des AKG (2), alcaloïdes (3) et phénols (1) ont été isolés de l'espèce *Scopalina ruetzleri* collectée aux Bermudes (Océan Atlantique). Grâce à notre étude, 13 métabolites dont 4 nouveaux ont pu être ajoutés au répertoire chimique du genre *Scopalina* ; le composé **SH6** ayant déjà été isolé de l'espèce *Scopalina ruetzleri*. Les phospholipides, les lysophospholipides, les alkylglycérols ainsi que les épidioxystérols sont des métabolites ubiquitaires retrouvés dans différents organismes incluant les invertébrés marins. Les dicétopipérazines représentent, quant à eux, une classe chimique essentiellement produite par les microorganismes bien que largement distribués dans différentes sources naturelles. Les buténolides, en revanche, sont rarement rencontrés chez les invertébrés marins ; seuls 3 buténolides semblent avoir été isolés directement d'éponges. De plus, les buténolides de type 2,3-diméthyle, tels que **SH11** et **SH12**, sont quant à eux inhabituels. Par ailleurs, il est intéressant de noter que plusieurs des composés isolés de *Scopalina hapalia* laisse supposer une origine microbienne :

- Les nouveaux composés **SH1** et **SH4**, avec leurs résidus d'acides gras à courtes chaînes.

- Les buténolides **SH11** et **SH12** qui présentent une similarité structurale avec les sinularones A-I, isolés du corail *Sinularia* sp. Sans oublier le fait que le premier buténolide de ce type ait été isolé d'une étoile de mer.
- Les composés **SH13** et **SH14**, isolés aussi bien de fèves de cacao torréfiées que de microorganismes. Il apparaît, en outre, que c'est la première fois que ces composés sont isolés d'éponges.

La réalisation de réseaux moléculaires à partir des extraits bruts de *Scopalina hapalia* semble indiquer :

- Une richesse en composés lipidiques et notamment en lipides bioactifs (dérivés d'AG, dérivés de sphingolipides, lysoPL, MAG/AKG et terpènes entre autres).
- Une diversité chimique bien plus importante que celle qui a pu être révélée au cours du processus d'isolement.
- Une certaine originalité structurale soutenue par plusieurs nœuds qui n'ont pu être dérépliqués.

En raison des faibles masses obtenues au cours de l'isolement, seuls 3 composés (**SH3**, **SH6** et **SH7**) sur les 14 isolés ont pu être évalués pour leurs activités biologiques. Malheureusement, aucune activité significative n'a été décelée. Néanmoins, plusieurs des composés connus isolés ont déjà démontré des activités antifouling (**SH3**, **SH6**, **SH9** et **SH13**), cytotoxique (**SH2**, **SH3**, **SH7** et **SH14**) et antimicrobienne (**SH2**, **SH3** et **SH14**). Ces composés bioactifs appartiennent aux classes chimiques des lysophospholipides, des alkylglycérols, des épidioxystérols ainsi qu'à celle des dicétopipérazines. Considérant la nature fragile de l'éponge avec une capacité de défense physique minimale, il est probable que ces composés contribuent à la défense chimique de l'éponge pour la protéger de la prédation et lui donner un certain avantage dans l'occupation de l'espace.

Il est communément admis que la production des métabolites spécialisés est une réponse écologique des organismes à leur environnement et que celle-ci évolue sous la pression de sélection naturelle. Ainsi, certaines études montrent une variation spatiale et temporelle interspécifique mais également intra-spécifique de la production de métabolites spécialisés, notamment chez les éponges. Cette variation de la production en métabolites spécialisés peut également être influencée par la composition de la communauté microbienne symbiote. Les quelques rares études relatives aux microorganismes associés aux éponges du genre *Scopalina* ont montré que celles-ci abritaient une communauté microbienne avec un potentiel de production de métabolites spécialisés d'intérêt mais aucune étude exhaustive n'a été réalisée pour *Scopalina hapalia*.

Enfin ces travaux sur l'éponge *Scopalina hapalia* ont été complétés par la caractérisation de la communauté microbienne qui lui est associée et la mise en évidence d'extraits microbiens ayant des activités anti-âges afin de répondre à l'un des objectifs du projet TASCMAR.

L'utilisation d'une approche de métagénomique ciblée sur les régions V1 à V5 de l'ARNr 16S (Illumina MiSeq 300x2) a permis de caractériser une communauté bactérienne relativement diversifiée avec une moyenne de 18 phyla bactériens (eubactéries et archées)

identifiés. Cette communauté est toutefois largement dominée par le phylum des Protéobactéries suivis par les phyla des Cyanobacteria, des Bacteroidetes, des Planctomycetes et des Actinobacteria. Il est à noter que plusieurs des phyla identifiés sont des phyla candidats tels que SAR 406 (marine group A), TM6, TM7, NKB19 et SRB1093. Les phyla dominants détectés au sein de la communauté bactérienne du spécimen collecté à Mayotte sont comparables à ceux du spécimen collecté à Zanzibar (séquençage Illumina Miseq de la région V4).

L'approche par culture a conduit à l'isolement de 124 microorganismes qui ont été intégrés à la souchotèque de microorganismes associés aux éponges mise en place au cours de cette thèse. Un travail préliminaire d'identification sur une trentaine d'isolats sélectionnés a permis d'identifier des représentants des genres *Bacillus*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Salinispora* d'une part pour les bactéries, et des genres *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora* d'autre part pour les champignons filamenteux. Deux isolats ont également été affiliés à un genre non décrit de la famille des Thermoactinomycetaceae.

Pour terminer, la recherche d'extraits microbiens à activité anti-âge a été réalisée à partir de microorganismes sélectionnés mis en culture parallèlement en milieu liquide et solide et couplé à un système de récupération *in situ* des métabolites spécialisés. Grâce à cette approche, 118 extraits bruts microbiens ont été produits et soumis à un criblage biologique sur les cibles élastase, tyrosinase, CDK7, FynK, protéasome, catalase et sirtuine 1. A la suite de cette étape de criblage, 13 extraits bruts ont été identifiés comme étant prometteurs dans la recherche d'inhibiteurs des protéines suivantes : élastase, tyrosinase, CDK7, FynK, protéasome. Sept extraits bruts seraient prometteurs pour l'identification d'activateurs de la catalase, enzyme antioxydante, et de la sirtuine 1, impliquée dans la régulation de différents processus biologiques liés au vieillissement (métabolisme énergétique, inflammation, sénescence par exemple). Ces extraits bruts sont produits par des isolats affiliés aux espèces suivantes : *Bacillus paralicheniformis* (SH-02a, SH-02b, SH-02c), *Bacillus licheniformis* (SH-04, SH-68a, SH-68b, SH-99, SH-100), *Bacillus berkeleyi* (SH-137), *Micromonospora fluostatini* (SH-82), *Micromonospora citrea* (SH-89), *Salinispora arenicola* (SH-45, SH-54, SH-78) et *Chaetomium globosum* (SH-123).

Ce travail représente la première étude sur la communauté cultivable de l'espèce *Scopalina hapalia*. Par ailleurs, cette étude confirme l'étude de Helber et ses collaborateurs (2019) qui indiquaient le potentiel de production en métabolites spécialisés bioactifs de la communauté procaryote de *Scopalina hapalia* par une approche d'analyse fonctionnelle prédictive. Fondamentalement, ces résultats ne sont pas étonnants et viennent conforter les précédents résultats sur le genre *Scopalina*. En effet, en dépit de sa morphologie encroûtante et de son appartenance à la catégorie « Low Microbial Abundance », plusieurs microorganismes producteurs prolifiques de métabolites spécialisés d'intérêt thérapeutique, essentiellement des actinomycètes, ont été isolés de ce genre.

Les résultats obtenus à ce stade permettent d'envisager différentes perspectives de travail pour l'avenir :

- ⇨ L'étude chimique de certaines éponges présentant un intérêt suite au criblage biologique réalisé mais n'ayant pu être exploitées faute de temps.

- Extraits bruts actifs avec un intérêt chimique : *Haliclona* sp. 3 (XML-233), *Jaspis splendens* (XML-237), *Pseudoceratina* sp. 2 (XML-257), *Theonella swinhoei* (XML-267).
- Extraits bruts actifs avec un intérêt bibliographique : *Dragmacidon coccineum* (XML-227), *Neopetrosia* sp. 3 (XML-244), *Svenzea* sp. (XML-264).

⇨ La poursuite des investigations chimiques sur *Scopalina hapalia*.

- La déréplication des extraits bruts de *Scopalina hapalia* par l'approche des réseaux moléculaires a révélé qu'ils étaient particulièrement riches en composés de structures nouvelles, dérivés de composés connus ou non. A titre d'exemple, un composé de formule brute $C_{27}H_{52}O_4$ avec des déplacements chimiques en RMN ^1H caractéristiques des AKG mais ne correspondant à aucun composé connu, a été isolé. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour compléter son élucidation structurale.
- La déréplication par l'approche des réseaux moléculaires ainsi que par RMN a montré que les extraits étaient très riches en lipides notamment en lipides bioactifs mais également en composés particulièrement polaires tels que des dérivés d'acides aminés et de bétaïnes. Toutefois, au cours du fractionnement de l'extrait de *Scopalina hapalia*, n'ont été retenues que les fractions moyennement polaires relativement faciles à travailler. Par conséquent, ce sont essentiellement des lipides polaires, tels que les phospholipides et dérivés ainsi que les alkylglycérols, qui ont été isolés. Les fractions très polaires et apolaires n'ont pas été explorées.

⇨ La caractérisation des métabolites spécialisés microbiens aux propriétés anti-âges à partir des extraits bruts prometteurs. Une thèse sur ce sujet, intitulée « *Production et caractérisation de métabolites bioactifs issus de micro-organismes isolés d'une éponge de la zone océan Indien, Scopalina hapalia* », a été entamée début 2020 et traite de l'exploitation biotechnologique des microorganismes producteurs d'extraits super-hits isolés de *Scopalina hapalia*.

⇨ L'étude de la chimiodiversité de certains isolats comme ceux de *Nigrospora aurantiaca* (SH-53), *Rhodococcus nanhaiensis* (SH-115) ou encore les 2 isolats de la famille des Thermoactinomycetaceae (SH-32 et SH-39). Ces isolats récemment décrits ou non n'ont encore fait l'objet d'aucune étude chimique. Ainsi, afin d'influer sur la diversité des métabolites produits par ces microorganismes, il serait souhaitable de multiplier le nombre de milieux ainsi que les conditions de culture.

⇨ L'identification des 91 isolats restants afin d'avoir un meilleur aperçu de la diversité cultivable de *Scopalina hapalia*.

Partie expérimentale

PARTIE I INVESTIGATIONS CHIMIQUES

I.1 Procédures générales

I.1.1 Les solvants

Les extractions, les premiers fractionnements par CLMP et colonnes ouvertes ainsi que les analyses CCM ont été réalisés avec des solvants (Fisher Scientific, Acros Organics et Carlo Erba) de qualité analytique (99 % de pureté). Les analyses et séparations par CLHP ont été effectuées à l'aide de solvants de qualité CLHP ou 100 % de pureté. L'eau utilisée au cours des analyses a été obtenue à partir d'un système Millipore (Simplicity®). Des solvants deutérés ont été utilisés pour les analyses RMN.

I.1.2 Les réactifs

- Acide formique (A.F.) HCOOH (Carlo Erba, France)
- Acide sulfurique (Carlo Erba, France)
- Cholestérol (Sigma, Etats-Unis)
- Ammoniac (Labosi, France)
- Vanilline (Fluka™, Honeywell, Etats-Unis)

I.1.3 Les techniques chromatographiques

I.1.3.1 La Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les analyses par CCM ont été menées sur des plaques de gel de silice (SI60, Alugram® SILG/UV254) de 0,2 mm d'épaisseur. Celles-ci sont imprégnées d'un indicateur fluorescent à la longueur d'onde d'UV 254 nm.

I.1.3.2 La Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP)

Les fractionnements par CLMP ont été effectués sur un système Sepacore® (Buchi) équipé de deux modules de pompes C-605, d'un programmateur de pompe C-615 et d'un collecteur de fraction C-660. Les colonnes utilisées (15 x 230 mm ou 26 x 100 mm) ont été remplies avec un gel de silice en phase normale (Macherey-Nagel MN Kieselgel 60, 0,063 - 0,2 µm) ou en phase inverse (C18-RP, Acros Organic).

I.1.3.3 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Deux systèmes CLHP différents ont été utilisés pour les analyses et les purifications :

- Une chaîne CLHP analytique Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®) pilotée par le logiciel Chroméléon. Le système est couplé en série à un détecteur UV à barrette de diodes DAD (190 - 800 nm) et un détecteur d'aérosol chargés (CAD) Corona Ultra RS équipé d'un générateur d'azote de type Alliance (Thermo scientific®). *(LCSNSA, Université de La Réunion).*
- Une chaîne CLHP analytique Agilent Technologies pilotée par le logiciel Chemstation. Le système est couplé à un détecteur UV à barrette de diodes DAD ainsi qu'à un spectromètre de masse basse résolution Esquire 2000 (Bruker Daltonics) équipé d'un générateur d'azote. *(Laboratoire de Pharmacognosie, Aix-Marseille Université).*

Les colonnes utilisées durant les analyses et les étapes de purification sont :

- Une colonne analytique Phenomenex Gemini® C18 3 µm, 150 x 4,6 mm.
- Une colonne semi-préparative Phenomenex Gemini® C18 5 µm, 250 x 10 mm.

I.1.4 Les techniques spectrales

I.1.4.1 La Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR)

Les analyses par SMHR ont été effectuées sur 2 systèmes différents :

- Une chaîne UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®) couplée à un spectromètre de masse haute résolution QqTOF équipé d'une source d'ionisation Electrospay - ESI (Impact II, Bruker Daltonics®). Une colonne C18 Zorbax Eclipse Plus (1,8 µm) 2,1 x 100 mm a été utilisée. Les échantillons ont été solubilisés dans des mélanges de solvants eau-MeOH ou MeOH-THF. Les données ont été acquises en mode positif (ESI^+) ou négatif (ESI^-). *(Station marine d'Endoume, plateau de métabolomique MALLABAR*).
- Un spectromètre de masse SYNAPT G2 HDMS (Waters) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) avec assistance pneumatique et d'un analyseur temps de vol (TOF). Les échantillons ont été dissous dans 300 µL de MeOH puis dilués au 1/100 dans une solution de MeOH à 3 mM d'acétate d'ammonium avant d'être injectés par infusion dans la source d'ionisation à un débit de 10 µL/min. Les analyses ont été menées en mode ESI^+. Les mesures de masses ont été effectuées en triplicat. *(Spectropole de Marseille, Université Aix-Marseille).*

I.1.4.2 La Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN ^{1}H et RMN ^{13}C)

Les analyses RMN, mono- et bidimensionnelles, ont été réalisées sur 2 types d'appareillage (*Spectropole de Marseille, Université Aix-Marseille)* :

- *Pour le profilage chimique* sur un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz équipé d'une sonde BBFO+ et d'un passeur d'échantillons SampleJet. La sonde BBFO+ est adaptée pour l'étude de tous les noyaux analysables en RMN. Les échantillons ont été dissous dans 700 µL de MeOH deutéré (CD_3OD) ou de chloroforme deutéré ($CDCl_3$).
- *Pour l'élucidation structurale des composés purifiés*, sur un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz équipé d'une cryosonde triple résonnance TCI (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N) ou sur spectromètre Bruker Avance III 600 MHz équipé d'une sonde BBFO+.

Les déplacements chimiques δ, qui sont exprimés en partie par million (ppm), ont été référencés sur les pics de solvants : CD_3OD (δ_H 3,31 ppm et δ_C : 49,00 ppm) et $CDCl_3$ (δ_H 7,27 ppm et δ_C : 77,00 ppm). Les constantes de couplages *J* sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux est indiquée de la façon suivante : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet), dq (doublet de quadruplet), ddd (doublet de doublet de doublet), ldt (doublet de triplet large), lqt (quadruplet de triplet large), qtl (quintuplet large), l (signal large), ss (signal superposé). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D (^{1}H et ^{13}C) et 2D (^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC et ^{1}H-^{1}H NOESY) à l'aide du logiciel TopSpin 3.6.1 (Bruker).

I.2 Etude chimique des éponges

I.2.1 Collecte

La collecte des invertébrés marins a été réalisée en Mai 2013 sur la côte Sud-Est de Mayotte, île localisée dans l'archipel des Comores à l'entrée Nord du Canal du Mozambique. L'échantillonnage des éponges a été effectué en plongée bouteille jusqu'à une profondeur de 32 m. Les organismes abondants ont été prélevés, entre 200 et 500 g poids frais, à l'aide d'un couteau puis stockés individuellement dans des sacs. Pour les identifications, un échantillon a été conservé dans une solution éthanolique à 80 %. Pour les investigations chimique et microbiologique, chaque spécimen numéroté a été identifié et conservé à - 20 °C en attendant leur extraction.

I.2.2 Obtention des extraits bruts

L'obtention des extraits bruts à partir des éponges comprend les étapes suivantes :

1. Découpage en morceaux de 1 cm x 1 cm de l'échantillon congelé ;
2. Macération aqueuse de l'échantillon découpé, 12 h sous agitation ;

3. Récupération des morceaux d'éponge, après filtration ;
4. Lyophilisation de l'éponge sur un cycle de 48 h ;
5. Extraction de l'éponge lyophilisée au moyen de solvants organiques DCM/MeOH (50/50 v/v). En fonction de la consistance de l'éponge, l'extraction a été menée par deux techniques :
   - La macération à température ambiante sous agitation pendant 3 x 12 h suivie d'une filtration par gravité sur papier filtre.
   - L'ASE (Accelerated Solvent Extraction / Extraction Accélérée par Solvant) dans les conditions suivantes : température 40 °C, pression 100 bars, nombre de cycles 5, temps de purge 120 s et temps de pause 5 min.
6. Evaporation sous vide des solvants.

Les extraits bruts obtenus ont été pesés et conservés à 4°C. Le bilan des rendements d'extraction est donné en **Annexe 1** (Tome II, p. 7-15).

I.2.3 Criblage biologique haut débit

L'ensemble des extraits bruts a été testé sur 5 cibles biologiques différentes :

- **Test anti-élastase** (UoA) **:** l'activité inhibitrice des extraits bruts a été testée dans un premier temps, sur une élastase pancréatique porcine (PPE) purifiée, type IV selon la méthode décrite par [Hubert *et al.*, 2016]. Le N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide a été utilisé comme substrat. L'inhibition de l'élastase (PPE) a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la libération de la p-nitroanilide.
  Puis, les extraits actifs ont été évalués à nouveau, sur un modèle cellulaire d'élastase.
- **Test anti-tyrosinase** (UoA) **:** l'activité inhibitrice des extraits bruts a été évaluée sur une tyrosinase de champignon purifiée et en utilisant la L-DOPA comme substrat selon la méthode décrite par [Masuda *et al.*, 2005] avec quelques modifications mineures. La capacité des extraits bruts à inhiber l'activité enzymatique de la tyrosinase, à savoir la conversion de la L-DOPA en dopaquinone, a été mesurée à 475 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- **Test anti-CDK7** (Crelux) **:** l'activité inhibitrice des extraits bruts a été évaluée sur une protéine CDK7 purifiée (construction Crelux CZY-3, PC09891) avec pour substrat le CDKtide. L'activité de la kinase a été mesurée à l'aide d'un test bioluminescent, ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega), qui permet de quantifier l'ADP produit par l'activité enzymatique de la protéine.
- **Test anti-Fyn kinase** (Crelux) **:** l'activité inhibitrice des extraits bruts a été évaluée en utilisant une protéine Fyn purifiée (construction Crelux CTX4, PC09815-1) ainsi qu'un peptide substrat de la Fyn kinase (Enzo Life Sciences, P215). L'activité de la kinase a été mesurée à l'aide d'un test bioluminescent, ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega), qui permet de quantifier l'ADP produit par l'activité enzymatique de la protéine.
- **Test anti-protéasome** (Crelux) **:** la capacité d'inhibition des extraits bruts a été évaluée sur des protéasomes de levure purifiés (TUM Groll group) et le peptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo Lifesciences, BML-P802-0005) a été utilisé comme substrat. La capacité

des extraits à inhiber le protéasome a été déterminée à l'aide d'un test fluorescent qui détecte la libération du fluorophore AMC. Le test d'inhibition de l'activité du protéasome a ciblé plus particulièrement le site actif de type chymotrypsine. La méthode est détaillée par

❖ ***Interprétation des résultats d'activités anti-élastase et anti-tyrosinase***

Pour ces tests, l'activité des extraits bruts a été évaluée aux concentrations de 1 et 10 µg/mL et différents seuils ont été fixés par le partenaire réalisant les tests :

- Inhibition > 50 % : l'extrait est très actif et qualifié de « super-hit ».
- 25 % < Inhibition < 50 % : l'extrait est modérément actif.

❖ ***Interprétation des résultats d'inhibition de l'activité kinase : CDK7 et Fyn***

Pour ces tests, les extraits bruts ont été testés aux concentrations de 111,1 µg/mL, 11,1 µg/mL et 1,1 µg/mL.

- Inhibition de l'activité kinase de façon dose-dépendante pour les 3 concentrations testées : l'extrait est très actif et qualifié de « super-hit ».
- Inhibition de l'activité kinase de façon dose-dépendante pour 2 concentrations testées : l'extrait est actif et qualifié de « hit » pour CDK7 et « super-hit » pour la Fyn kinase.
- Inhibition de l'activité kinase à une concentration donnée : l'extrait est non retenu.

❖ ***Interprétation des résultats d'inhibition du protéasome***

Pour ces tests, les extraits bruts ont été testés aux concentrations de 1 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,01 mg/mL soit des concentrations finales de 0,033 mg/mL ; 0,0033 mg/mL et 0,00033 mg/mL.

- Inhibition de l'activité du protéasome de façon dose-dépendante pour les 3 ou 2 (forte et moyenne) concentrations testées : l'extrait est très actif et qualifié de « super-hit ».
- Inhibition de l'activité du protéasome à la concentration la plus forte testée : l'extrait est actif et qualifié de « hit ».

I.2.4 Réalisation des signatures chimiques

Afin d'obtenir l'empreinte chimique des extraits bruts actifs, ces derniers ont été soumis à :

- Une analyse par **CCM** avec les conditions d'analyses suivantes :

Concentration des échantillons : 10 mg/mL dissout dans un solvant adéquat
Volume des solutions déposé : 10 µL
Elution des composés : la migration des plaques CCM a été réalisée au moyen de différents mélanges d'éluants :

- Cyclohexane / AcOEt 80/20 (v/v)
- Cyclohexane / AcOEt 20/80 (v/v)
- DCM / MeOH 95/5 (v/v) + 0,1 % NH_3
- DCM / MeOH 90/10 (v/v) + 0,1 % NH_3

Révélation des composés : les plaques ont été révélées dans un premier temps aux UV (λ = 254 et 365 nm) puis par chauffage (100 °C pendant 3 minutes environs) après pulvérisation d'une solution de vanilline préparée selon le mode opératoire décrit ci-après.

Réactif	Mode opératoire	Substances détectées
Vanilline	**Solution A** : dissoudre 1 g de vanilline dans 100 mL d'éthanol. **Solution B** : mélanger 3 mL d'acide perchlorique avec 97 mL d'eau. **Solution H_2SO_4** : mélanger 10 mL d'acide sulfurique avec 90 mL d'éthanol. Pulvériser le mélange A/B (1:1 v/v) puis la solution éthanolique à 10 % d'acide sulfurique. Chauffer pour révéler les bandes	Terpènes

- Des analyses par **CLHP-DAD-CAD** et **CLHP-ELSD-SM** réalisées avec les conditions d'analyse suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (3 µm), 4,6 x 150 mm
Eluant : H_2O + 0,1 % AF / ACN + 0,1 % AF
Gradient : 95/5 → 0/100 (30 min) ; 0/100 (20 min)
Débit : 0,7 mL/min
Détection : DAD/CAD/ELSD/SM

I.2.5 Déréplication et profilage chimique

L'analyse des extraits bruts et des fractions a été réalisée sur une chaîne CLUHP (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific®) :

- équipée d'une pompe RS, d'un échantillonneur automatique, d'un four colonne thermostaté et d'un détecteur UV à barrette de diodes
- couplée à un spectromètre de masse haute résolution (SMHR) pourvu d'une source d'ionisation électrospray (ESI) (Impact II, Bruker Daltonics®).

La séparation des échantillons a été effectuée selon les conditions suivantes :

Colonne : C_{18} ZORBAX Eclipse Plus (1,8 µm), 2,1 x 100 mm, Agilent
Température de la colonne : 40°C
Éluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 0,5 mL/min
Gradient : 95:5 (5 min) ; 95:5 → 0:100 (8 min) ; 0:100 (3 min).
Volume d'injection : 0,4 µL pour les extraits bruts, 0,25 µL pour les fractions.

Les spectres de masses ont été acquis aussi bien en mode positif que négatif sur une plage *m/z* 50 à 1200. Le mode d'acquisition automatique a été paramétré pour réaliser les spectres SM^2 toutes les 3 secondes sur les ions les plus intenses en SM. L'énergie de fragmentation a été fixée à 40 eV. Les paramètres instrument utilisés sont les suivants : voltage du capillaire 2500 V, nébulizeur (N_2) 50,8 psi, débit du gaz 12 L/min, température 200°C. Une solution de formate/acétate de sodium a été utilisée pour calibrer systématiquement le spectromètre de masse dans la gamme de masse étudiée. La même

solution a été automatiquement injectée avant chaque analyse d'échantillon pour une calibration de masse interne.

Les données brutes ont été automatiquement calibrées, en utilisant la portion du calibrant comme référence, avant d'être exportées au format .mzXML (mode centroïde) avec le logiciel Bruker Compass DataAnalysis 4.3.

I.2.5.1 Réalisation des réseaux moléculaires avec GNPS et Cytoscape

Les données LC-MS/MS ont été converties au format mzXML avec le logiciel DataAnalysis puis envoyées sur la plateforme GNPS (https://gnps.ucsd.edu) à l'aide de FileZilla. Les données spectrales ont été traitées automatiquement sur GNPS afin de générer les réseaux moléculaires correspondants. Les spectres ont été prétraités en éliminant les ions situés à ± 17 Da du *m/z* du précurseur. Afin de simplifier les données, des spectres consensus ont été créés en utilisant MS-Cluster avec une tolérance de 0,02 Da aussi bien pour l'ion précurseur que pour les ions fragments (ions produits en SM^2). Les spectres consensus contenant moins de 2 spectres n'ont pas été retenus. Le réseau moléculaire a ensuite été généré en excluant tous les spectres ayant des indices de similarité (cosine score) inférieurs à 0,7 et ayant moins de 6 fragments ions en communs. Les spectres finaux ont été comparés aux spectres des banques spectrales de GNPS. Les spectres de ces banques spectrales ont été traités de la même manière que les spectres de l'analyse CLUHP-SM.

Les données GNPS ont ensuite été importées pour être exploitées. Une recherche dans la base de données spectrale *in-silico* UNPD-ISDB (https://github.com/oolonek/ISDB) a été effectuée. Les paramètres (filtres) utilisés sont les suivants : tolérance pour l'ion précurseur (0,005 Da), seuil de similarité « score threshold » (0,2 Da) et résultats à renvoyer pour les spectres SM^2 les plus similaires (5). Le logiciel Cytoscape v.3.7.1 a été utilisé pour visualiser et organiser la disposition spatiale du réseau moléculaire obtenu. Le plugin chemViz a été installé sous Cytoscape pour visualiser les résultats de la recherche avec UNPD-ISDB. La représentation graphique du réseau moléculaire montre les spectres SM^2 consensus ayant le même ion parent sous forme de nœuds. Les connexions entre ces nœuds, représentés par des traits, apparaissent dès lors qu'il y a au moins 6 ions fragments en communs détectés et donc une forte similarité spectrale (cosine score ≥ 0,7). L'épaisseur des traits est proportionnelle à la valeur du cosine score.

I.2.5.2 Annotation

Les nœuds d'intérêt ont été annotés :

- en recherchant la formule brute la plus probable avec l'outil « smartformula » de DataAnalysis,
- en déterminant la masse exacte avec chemcalc (http://www.chemcalc.org/),
- en analysant les profils de fragmentations.

En plus des bases de données de GNPS et UNPD-ISDB qui ont aidé à la déréplication, d'autres bases de données ont été utilisées pour des informations complémentaires :

- MarinLit (http://pubs.rsc.org/marinlit/),
- DNP (http://dnp.chemnetbase.com/),
- Metlin (https://metlin.scripps.edu/),
- LipidMaps (http://www.lipidmaps.org/).

I.2.6 Fractionnement, isolement et caractérisation des métabolites de *Lendenfeldia* sp.

I.2.6.1 Fractionnement et isolement des métabolites de *Lendenfeldia* sp.

❖ **Fractionnement 1**

874 mg d'extrait brut de *Lendenfeldia* sp., obtenu par macération avec un mélange de solvants organiques DCM/MeOH, ont été fractionnés par CLMP selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : 230 x 15 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Débit : 15 mL/min
Elution : Isohexane / AcOEt 95:5 (3 min) ; isohexane / AcOEt 75:25 (3 min) ; isohexane / AcOEt 50:50 (3 min) ; isohexane / AcOEt 25:75 (3 min) ; AcOEt 100 % (3 min) ; DCM 100 % (3 min) ; DCM / MeOH 75:25 (3 min) ; DCM / MeOH 50:50 (3 min) ; DCM / MeOH 25:75 (3 min) ; MeOH 100 % (3 min).

Ce fractionnement a permis l'obtention de 11 fractions : **F1** (2 mg) ; **F2** (22 mg), **F3** (118 mg), **F4** (87 mg), **F5** (44 mg), **F6** (19 mg), **F7** (2 mg), **F8** (0 mg), **F9** (276 mg), **F10** (64 mg) et **F11** (25 mg).

❖ **Fractionnement 2**

20 mg de la fraction **F3** ont été fractionnés par CLHP semi-préparative selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Éluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 2,7 mL/min
Gradient : 30:70 → 20:80 (5 min) ; 20:80 (15 min) ; 20:80 → 0:100 (10 min) ; 0:100 (10 min) ; 0:100 → 30:70 (5 min) ; 30:70 (5 min).
Détection : UV (230 nm)

Ce second fractionnement a permis l'obtention de 16 fractions : **F3.1** (0,8 mg), **F3.2** (0,6 mg), **F3.3** (0,8 mg), **F3.4** (10,4 mg), **F3.5** (0,7 mg), **F3.6** (0,9 mg), **F3.7** (0,4 mg), **F3.8** (0,6 mg), **F3.9** (0,2 mg), **F3.10** (0,3 mg), **F3.11** (0,2 mg), **F3.12** (0,2 mg), **F3.13** (0,5 mg), **F3.14** (0,3 mg), **F3.15** (0,2 mg), **F3.16** (1,5 mg).

Les fractions **F3.2**, **F3.4**, **F3.6** et **F3.8** contiennent respectivement les composés **LS1**, **LS2**, **LS3** et **LS4** purs.

❖ **Fractionnement 3**

80 mg de la fraction **F4** ont été fractionnés par CLHP semi-préparative selon les conditions opératoires suivantes :

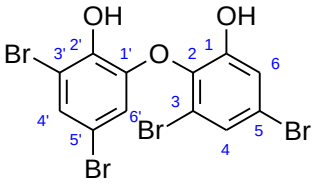
Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Éluants : H_2O + 0,1 % AF / ACN + 0,1 % AF
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 35:65 (30 min) ; 35:65 → 0:100 (5 min) ; 0:100 (15 min).
Détection : UV (230 nm)

Ce troisième fractionnement a permis l'obtention de 9 fractions : **F4.1** (1,2 mg), **F4.2** (2,8 mg), **F4.3** (1,3 mg), **F4.4** (0,5 mg), **F4.5** (44,0 mg), **F4.6** (0,7 mg), **F4.7** (1,9 mg), **F4.8** (3,5 mg), **F4.9** (2,5 mg).

Les fractions **F4.3**, **F4.5, F4.8** et **F4.9** contiennent respectivement les composés **LS1**, **LS2**, **LS6** et **LS5** purs.

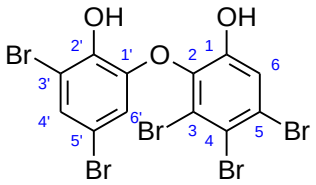
I.2.6.2 Caractérisation des métabolites de *Lendenfeldia* sp.

❖ **3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (LS1)**



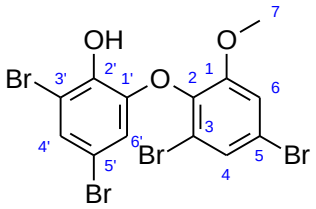
Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{12}H_6Br_4O_3$
SMBR (ESI$^+$) : *m/z* 540,7 $[M+Na]^+$
SMBR (ESI$^-$) : *m/z* 516,7 $[M-H]^-$
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,29 (H-4', d, *2,2*); 7,27 (H-4, d, *2,2*); 7,09 (H-6, d, *2,2*), 6,56 (H-6', d, *2,2*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 154,7 (C-1), 147,8 (C-1'), 146,2 (C-2'), 141,1 (C-2), 129,7 (C-4'), 126,4 (C-4), 121,0 (C-6), 120,1 (C-3), 119,2 (C-5), 117,7 (C-6'), 112,3 (C-3'), 110,4 (C-5').

❖ 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (LS2)



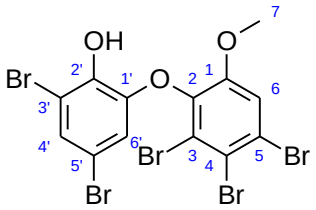
Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{12}H_5Br_5O_3$
SMBR (ESI$^+$) : *m/z* 618,6 $[M+Na]^+$
SMBR (ESI$^-$) : *m/z* 594,6 $[M-H]^-$
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,37 (H-6, s); 7,31 (H-4', d, *2,2*); 6,48 (H-6', d, *2,2*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 152,6 (C-1), 147,2 (C-1'), 145,5 (C-2'), 141,8 (C-2), 129,8 (C-4'), 122,9 (C-5), 122,8 (C-3), 122,1 (C-6), 117,4 (C-4), 117,1 (C-6'), 112,2 (C-3'), 111,0 (C-5').

❖ 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (LS3)



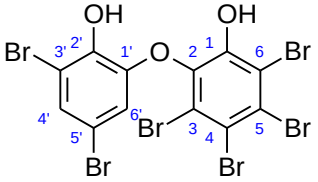
Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{13}H_8Br_4O_3$
SMBR (ESI$^+$) : *m/z* 554,7 $[M+Na]^+$
SMBR (ESI$^-$) : *m/z* 530,7 $[M-H]^-$
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,49 (H-4, d, *2,2*); 7,34 (H-6, d, *2,2*); 7,29 (H-4', d, *2,2*), 6,39 (H-6', d, *2,2*), 3,80 (H-7, s).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 155,1 (C-1), 147,8 (C-1'), 145,3 (C-2'), 141,4 (C-2), 129,7 (C-4'), 128,2 (C-4), 120,6 (C-3), 119,3 (C-5), 117,2 (C-6), 116,8 (C-6'), 112,1 (C-3'), 110,9 (C-5'), 57,2 (C-7).

❖ 3,4,5-tribromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)anisole (LS4)



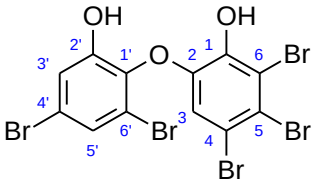
Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{13}H_7Br_5O_3$
SMBR (ESI$^+$) : *m/z* 632,6 $[M+Na]^+$
SMBR (ESI$^-$) : *m/z* 608,6 $[M-H]^-$
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,58 (H-6, s); 7,30 (H-4', d, *2,2*); 6,40 (H-6', d, *2,2*), 3,81 (H-7, s).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 153,9 (C-1), 147,3 (C-1'), 145,3 (C-2'), 142,4 (C-2), 129,9 (C-4'), 123,3 (C-5), 123,1 (C-3), 119,4 (C-4), 118,4 (C-6), 116,7 (C-6'), 112,1 (C-3'), 110,7 (C-5').

❖ **3,4,5,6-tétrabromo-2-(3',5'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (LS5)**



Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{12}H_4Br_6O_3$
SMHR (ESI⁻) : *m/z* 674.5124 (calculé pour $C_{12}H_4O_3Br_6$, 674,5127)
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,33 (H-4', d, *1,7*); 6,60 (H6', d, *1,7*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 147,3 (C-1'), 145,7 (C-2'), 129,9 (C-4'), 126,2 (C-6), 121,1 (C-3), 117,8 (C-6'), 111,7 (C-3'), 110,5 (C-5').

❖ **4,5,6-tribromo-2-(4',6'-dibromo-2'-hydroxyphénoxy)phénol (LS6)**



Aspect : Cristaux blancs
Formule Brute : $C_{12}H_5Br_5O_3$
SMHR (ESI⁻) : *m/z* 594.6042 (calculé pour $C_{12}H_5O_3Br_5$, 594,6042)
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 7,46 (H-5', d, *2,2*); 7,15 (H-3, s); 7,02 (H-3', d, *2,2*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 149,6 (C-1), 147,9 (C-1'), 146,9 (C-2'), 146,2 (C-2), 132,0 (C-5'), 131,7 (C-6), 123,4 (C-5), 123,0 (C-3), 122,9 (C-3'), 116,7 (C-4), 113,1 (C-6'), 111,1 (C-4').

I.2.7 Fractionnement, isolement et caractérisation des métabolites de *Scopalina hapalia*

I.2.7.1 Fractionnement et isolement des métabolites de *Scopalina hapalia*

Les métabolites SH1 à SH9 et SH12

❖ **Fractionnement 1**

L'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia* a été fractionné à deux reprises, par CLMP selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : 230 x 15 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Masses extrait brut : 0,69 g (IF1) et 1,03 g (IIF1)
Débit : 15 mL/min
Elution : Isohexane / AcOEt 95:5 (14 min) ; isohexane / AcOEt 90:10 (14 min) ; isohexane / AcOEt 85:15 (14 min) ; isohexane / AcOEt 80:20 (14 min) ; isohexane / AcOEt 70:30 (14

min), isohexane / AcOEt 50:50 (14 min) ; AcOEt 100 % (14 min) ; DCM 100 % ; MeOH 100 %.

Ce fractionnement a permis l'obtention de 6 fractions isohexane / AcOEt (**F1** à **F6**), 1 fraction AcOEt (**F7**) ; 1 fraction DCM (**F8**) et 3 fractions MeOH (**F7** à **F11**). Les bilans massiques sont donnés dans le **Tableau LXX**.

Tableau LXX : Bilan massique des fractionnements en phase normale de l'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia*.

Masse extrait brut (mg)	Masses des fractions (mg)										
	F1	**F3**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**	**F9**	**F10**	**F11**
690	41,8	80,5	43,0	12,0	23,3	18,0	18,5	2,5	264,3	37,8	30,8
1030	97,8	195,9	46,9	10,4	27,4	30,1	9,6	1,9	387,5	61,2	38,1
Total	139,6	276,4	89,9	22,4	50,7	48,1	28,1	4,4	651,8	99,0	68,9

❖ Fractionnement 2

Les fractions méthanoliques **F10-F11** rassemblées sous **F1011** (68,7 mg) ont été fractionnées par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Eluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 95:5 (2 min), 95:5 → 0:100 (38 min), 0:100 (10 min).
Détection : CAD

Le fractionnement de **F10-F11** a conduit à l'obtention de 8 sous fractions : **F1011.1** (0 mg), **F1011.2** (0,1 mg), **F1011.3** (0,2 mg), **F1011.4** (0,3 mg), **F1011.5** (0,3 mg), **F1011.6** (0,1 mg), **F1011.7** (0,9 mg) et **F1011.8** (0,6 mg).

Les fractions **F1011.8**, **F1011.2, F1011.7** et **F1011.5** contiennent respectivement les composés **SH1**, **SH2**, **SH3** et **SH4**.

❖ Fractionnement 3

28,7 mg de la fraction **F6** ont été fractionnés par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Eluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 4,5 mL/min
Gradient : 10:90 (45 min), 10:90 → 0:100
Détection : CAD

Ce fractionnement a permis l'obtention de 6 sous fractions : **F6.1** (0,1 mg) ; **F6.2** (0,3 mg) ; **F6.3** (0,8 mg), **F6.4** (4,0 mg), **F6.5** (1,5 mg), et **F6.6** (0,3 mg).

Les fractions **F6.3**, **F6.4**, **F6.5** et **F6.6** contiennent respectivement les composés **SH5**, **SH6**, **SH7** et **SH8**.

❖ Fractionnement 4

59,1 mg des fractions **F4** et **F5** rassemblées ont été fractionnées sur colonne ouverte selon les conditions suivantes :

Colonne : 250 x 10 mm
Phase stationnaire : Gel de silice
Elution : Isohexane / AcOEt 80:20 (5 volumes colonne (v.c.)) ; isohexane / AcOEt 70:30 (5 v.c.) ; isohexane / AcOEt 50:50 (5 v.c.) ; isohexane / AcOEt 40:60 (5 v.c.) ; AcOEt 100 % (5 v.c.) ; MeOH 100 % (8 v.c.) ;

32 sous fractions ont été obtenues. Après analyse par CCM et regroupement, le nombre de sous fractions est passé à 11 : **F45-1** à **F45-5** (4,0 mg) ; **F45-6** à **F45-7** (4,0 mg) ; **F45-8** (7,7 mg) ; **F45-9** à **F45-10** (14,6 mg) ; **F45-11** à **F45-12** (15,3 mg) ; **F45-13** (2,2 mg) ; **F45-14** (1,1 mg) ; **F45-15** (0,6 mg) ; **F45-16** à **F45-30** (4,6 mg) ; **F45-31** (0,0 mg) ; **F45-32** (3,5 mg).

❖ Fractionnement 5

13,7 mg des fractions **F45-11** et **F45-12** rassemblées (**F45-1112**) ont été soumis à un fractionnement par CLHP analytique suivant les conditions ci-dessous :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (3 µm) 150 x 4,6 mm
Eluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 0,7 mL/min
Gradient : 35:65 → 0:100 (30 min) ; 0:100 (20 min)
Détection : UV (254 nm)

Ce fractionnement a abouti à 6 sous fractions : **F45-1112.1** (0,0 mg) ; **F45-1112.2** (0,1 mg), **F45-1112.3** (0,1 mg), **F45-1112.4** (0,6 mg) ; **F45-1112.5** (0,2 mg) et **F45-1112.6** (0,7 mg).

Les fractions **F45-1112.2**, **F45-1112.3**, **F45-1112.4**, **F45-1112.6** et **F45-1112.5** contiennent respectivement les composés **SH9**, **SH12**, **SH5**, **SH6** ainsi qu'un dérivé non identifié du batilol.

Les métabolites SH10, SH11, SH13 et SH14

❖ Partition de l'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia*

L'extrait brut de *Scopalina hapalia* a été soumis à une partition cyclohexane / MeOH aqueux 50/50 (v:v). Du méthanol avec 10 % d'eau a été utilisé afin d'augmenter l'immiscibilité des solvants cyclohexane / MeOH. Un total de 5 extractions a été effectué. Les masses des extraits bruts travaillées ainsi que celles des fractions obtenues sont indiquées dans le **Tableau LXXI**.

Tableau LXXI : Bilan massique des fractions cyclohexane et MeOH après partition de l'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia*.

Partition	Extrait brut (g)	Partition cyclohexane (g)	Partition MeOH (g)
1	1,3114	0,6633	0,7045
2	1,0918	0,5843	0,4991
3	1,361	0,8362	0,4568
4	1,3052	0,7516	0,4722
5	1,4989	0,7909	0,6261
Total	6,5683	3,6263	2,7587

❖ Fractionnement 1

Les fractions MeOH aqueux ont été rassemblées, évaporées puis fractionnées par CLMP selon les conditions opératoires suivantes :

Colonne : 230 x 15 mm
Phase stationnaire : Gel de silice C-18
Eluants : H_2O / MeOH
Débit : 10 mL/min
Gradient : 95:5 → 0:100 (66 min), 0:100 (18 min).
Volume collecté : 45 mL

Le fractionnement a été réalisé 5 fois. Le bilan massique des fractions obtenues après les différents fractionnements est présenté dans le **Tableau LXXII**. Les fractions ont par la suite été analysées par CCM et CLHP, celles présentant des profils similaires ont été regroupées.

Tableau LXXII : Bilan massique des fractions obtenues à partir des différents fractionnements de l'extrait MeOH de *Scopalina hapalia*.

n°	Masse extrait brut (mg)	Masse des fractions (mg)																	
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
I	250	1,2	72,0	22,3	22,7	31,0	16,8	5,9	3,6	2,0	2,3	2,0	3,0	3,9	6,3	9,6	13,7	9,0	9,5
II	420	116,2	102,6	20,4	14,9	11,4	9,7	6,8	5,1	5,1	4,7	5,3	6,2	8,6	13,9	23,7	20,3	5,8	4,7
III	680	16,8	387,3	32,0	14,5	10,9	9,6	10,1	8,1	8,9	9,5	9,9	12,1	17,1	15,3	26,8	24,1	7,4	8,9
IV	660	15,8	275,0	21,0	12,4	10,9	11,0	12,0	12,0	11,6	12,2	12,8	18,5	17,0	21,3	25,0	12,0	4,0	4,9
V	690	5,3	411,9	29,1	15,0	12,6	11,7	10,7	10,2	11,7	13,1	13,3	20,5	18,0	20,4	24,0	11,4	3,5	5,8
Total	2 700	155,3	1248,8	124,8	79,5	76,8	58,8	45,5	39,0	39,3	41,8	43,3	60,3	64,6	77,2	109,1	81,5	29,7	33,8

❖ Fractionnement 2

Les fractions **F16** obtenues à partir des fractionnements **IV** et **V** ont été rassemblées et 13,6 mg de ces fractions rassemblées, ont été fractionnées par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Eluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 3,0 mL/min
Gradient : 22:78 (2 min), 22:78 → 3:97 (64 min), 3:97 → 0:100 (2 min), 0:100 (7 min).
Détection : UV (254 nm)
Volume collecté : 3 mL

75 sous fractions de 3 mL ont été obtenues. 200 µL de chaque fraction ont été prélevés pour contrôle par CLHP-SM.

Le composé **SH10** a été identifié dans la fraction **F16.64** (0,2 mg).

❖ Fractionnement 3

Les fractions **F7**, obtenues à partir des fractionnements **IV** et **V** ont été rassemblées et 18,4 mg de ces fractions rassemblées, ont été fractionnées par CLHP semi-préparative selon les conditions suivantes :

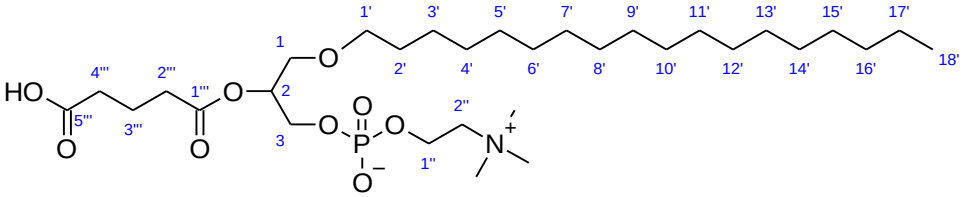
Colonne : Phenomenex Gemini C18 (5 µm) 250 x 10 mm
Eluants : H_2O + 0,1 % A.F. / ACN + 0,1 % A.F.
Débit : 3,0 mL/min
Elution : gradient 90:10 (2 min) ; 90:10 → 22:78 (55 min) ; 0:100 (17 min)
Détection : UV (254 nm)
Volume collecté : 3 mL

75 sous fractions de 3 mL ont été obtenues. 200 µL de chaque fraction ont été prélevés pour contrôle par CLHP-SM.

Les composés **SH13**, **SH14** et **SH11** ont été identifiés respectivement dans les fractions **F7.26** (0,1 mg), **F7.28** (0,3 mg) et **F7.56** (0,4 mg).

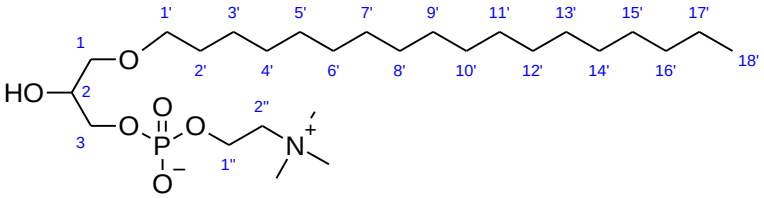
I.2.7.2 Caractérisation des métabolites isolés de *Scopalina hapalia*

❖ **1-*O*-Octadécyl-2-pentanoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (SH1)**



Formule brute : $C_{31}H_{63}NO_9P^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 624,4235
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 5,17 (H-2, m) ; 4,27 (H-1”, m[10]) ; 4,03 (H-3, ddd *11,1* ; *5,7* ; *4,2* [1]) ; 3,97 (H-3, dt *11,1* ; *6,1* [1]) ; 3,65 (H-2”, m) ; 3,61 (H-1, dd *10,9* ; *4,7*) ; 3,59 (H-1, dd *10,9* ; *5,9*) ; 3,48 (H-1’, dt 9,3 ; *6,7*) ; 3,43 (H-1’, dt 9,3 ; *6,6*) ; 3,23 ($N^+(CH_3)_3$, ls) ; 2,42 (H-2’’’, lt *7,5*) ; 2,31 (H-4’’’, lt *7,3*) ; 1,90 (H-3’’’, lqt *7,5*) ; 1,54 (H-2’, lqt *6,8*) ; 1,35 - 1,25 (H-3’ - H-17’, ss) ; 0,90 (H-18’, t *7,1*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ[2] ppm : 178,7 (C-5’’’) ; 174,4 (C-1’’’) ; 73,2 (C-2) ; 72,7 (C-1’) ; 70,2 (C-1) ; 67,4 (C-2’’)[11] ; 65,5 (C-3) ; 60,5 (C-1’’)[2] ; 54,7 ($N^+(CH_3)_3$)[2] ; 35,9 (C-4’’’) ; 34,6 (C-2’’’) ; 33,2 (C-16’) ; 30,8 (C-2’) ; 30,7 (C-4’ - C-15’) ; 27,6 (C-3’) ; 23,8 (C-17’) ; 22,1 (C-3’’’) ; 14,5 (C-18’).

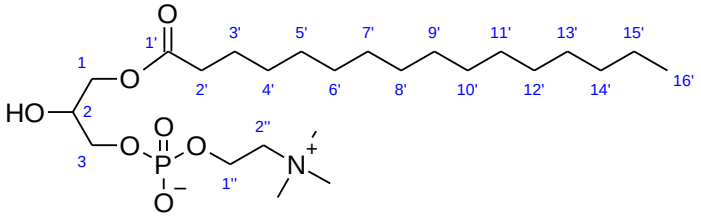
❖ **1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (SH2)**



Formule brute : $C_{26}H_{57}NO_6P^+$
SMHR (ESI$^+$) : m/z 510,3918
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 4,29 (H-1”, m[1]); 3,93 (H-3, ddd *10,2*; *6,2*; *3,8*[1]); 3,90 (H-2, m) ; 3,84 (H-3, ldt *10,2*; *6,2*); 3,64 (H-2”, m); 3,50 (H-1, dd *10,0* ; *4,9*) ; 3,46 (H-1’, t *6,7*) ; 3,45 (H-1, dd *10,0* ; *5,7*) ; 3,23 (H ($N^+(CH_3)_3$), ls) ; 1,57 (H-2’, lqt *7,0*) ; 1,35 – 1,25 (H-4’ - H-17’, ss) ; 0,90 (H-18’, t *7,1*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 72,9 (C-1) ; 72,6 (C-1’) ; 71,0 (C-2)[12] ; 68,4 (C-3)[3] ; 67,2 (C-2”)[3] ; 60,1 (C-1”)[3] ; 54,7 ($N^+(CH_3)_3$)[3]°; 33,1 (C-16’) ; 30,7 (C-4’ – C-15’) ; 30,7 (C-2’) ; 27,2 (C-3’) ; 23,7 (C-17’) ; 14,5 (C-18’).

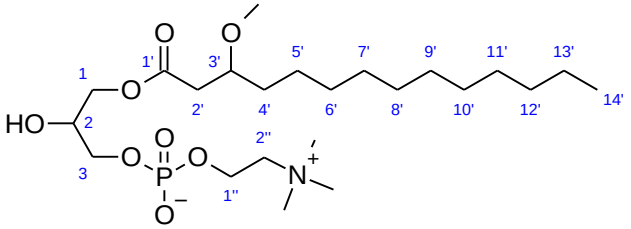
[10] Couplage ^{1}H-^{31}P.
[11] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N non observés car δ_{13C} déterminé à partir du spectre RMN HSQC.
[12] Couplage ^{13}C-^{31}P et/ou ^{13}C-^{14}N

❖ 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (SH3)



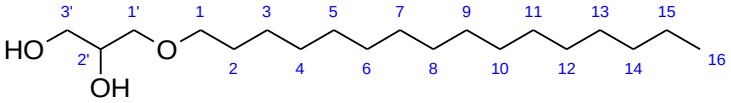
Formule brute : $C_{24}H_{50}NO_7P^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 496,3398
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 4,29 (H-1”, m) ; 4,17 (H-1, dd, *11,2* ; *4,6*) ; 4,10 (H-1, dd, *11,2* ; *4,6*) ; 3,97 (H-2, m) ; 3,90 (H-3, m), 3,64 (H-2”, m) ; 3,23 (H ($N^+(CH_3)_3$), ls) ; 2,35 (H-2’, t, *7,5*) ; 1,35 - 1,25 (H-3’ - H-15’, ss) ; 0,90 (H-16’, t, *7,1*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 175,4 (C-1’) ; 69,8 (C-2) ; 67,8 (C-3) ; 67,2 (C-2”) ; 66,2 (C-1) ; 60,4 (C-1”) ; 54,7 ($N^+(CH_3)_3$); 34,8 (C-2’) ; 30,6 (C-4’ - C-14’) ; 26,1 (C-3’) ; 23,8 (C-15’) ; 14,5 (C-16’).

❖ 1-*O*-(3-Méthox-tétradécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (SH4)



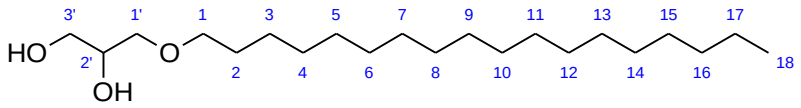
Formule brute : $C_{23}H_{49}NO_8P^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 498,3190
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 4,29 (H-1”, m^1); 4,19 (H-1, dd, *10,9*; *5,9*); 4,13 (H-1, dd, *10,9*; *4,7*); 3,98 (H-2, m); 3,90 (H-3, m^1); 3,66 (H-3’, m); 3,65 (H-2”, m); 3,34 (H(OCH_3), s); 3,23 (H($N^+(CH_3)_3$), ls); 2,54 (H-2’, dd, *15,3*; *7,3*); 2,51 (H-2’, dd, *15,3*; *5,6*); 1,53 (H-4’, m); 1,35 - 1,25 (H-5’ - H-12’, ss); 0,90 (H-14’, t, *7,1*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ^2 ppm : 78,8 (C-3’); 69,4 (C-2) ; 67,4 (C-3) ; 67,0 (C-2”)^2 ; 66,0 (C-1) ; 60,1(C-1”)^2 ; 56,9 (OCH_3); 54,3 ($N^+(CH_3)_3$)^2 ; 39,9 (C-2’) ; 34,5 (C-4’) ; 33,2 (C-5’ – C-12’) ; 23,4 (C-13’) ; 14,1 (C-14’).

❖ 1-*O*-Hexadécyl-*sn*-glycérol (SH5)



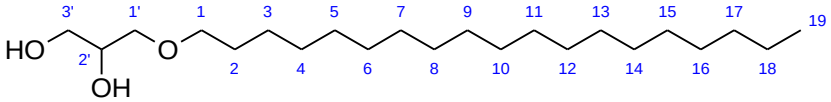
Formule brute : $C_{19}H_{41}O_3^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 317,3050
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,74 (H-2’, tt, *6,0* ; *5,0*) ; 3,57 (H-3’, dd, *11,2* ; *5,0*) ; 3,50 (H-3’, dd, *11,2* ; *6,0*) ; 3,47 (H-1’, dd, *10,0* ; *5,0*) ; 3,46 (H-1, t, *6,7*) ; 3,41 (H-1’, dd, *10,0* ; *6,0*) ; 1,57 (H-2, qtl, *7,0*) ; 1,38 - 1,25 (H-3 - H-15, ss) ; 0,90 (H-16, t, *7,1*).

❖ 1-*O*-Octadécylglycérol (SH6)



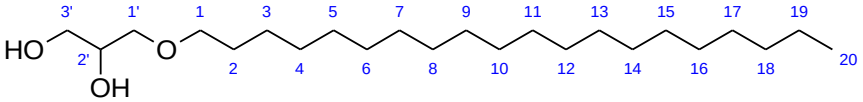
Formule brute : $C_{21}H_{45}O_3^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 345,3363
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,74 (H-2', tt, *6,0* ; *5,0*) ; 3,57 (H-3', dd, *11,2* ; *5,0*) ; 3,50 (H-3', dd, *11,2* ; *6,0*) ; 3,47 (H-1', dd, *10,0* ; *5,0*) ; 3,46 (H-1, t, *6,7*) ; 3,41 (H-1', dd, *10,0* ; *6,0*) ; 1,57 (H-2, qtl, *7,0*) ; 1,38 – 1,25 (H-3 – H-17, ss) ; 0,90 (H-18, t, *7,1*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 73,3 (C-1') ; 72,6 (C-1) ; 72,3 (C-2') ; 64,6 (C-3') ; 33,1 (C-16) ; 30,7 (C-4 – C-15) ; 30,7 (C-2) ; 27,2 (C-3) ; 23,7 (C-17) ; 14,4 (C-18).

❖ 3-Nonadécyloxy-1,2-propanediol (SH7)



Formule brute : $C_{22}H_{47}O_3^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 359,3520
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,75 (H-2', tt *6,0*, *5,0*) ; 3,58 (H-3', dd *11,2*, *5,0*) ; 3,51 (H-3', dd *11,2*, *6,0*) ; 3,48 (H-1', dd *10,0*, *5,0*) ; 3,46 (H-1, t *6,7*) ; 3,41 (H-1', dd *10,0*, *6,0*) ; 1,57 (H-2, qtl *7,0*) ; 1,38 - 1,25 (H-3 - H-18, ss) ; 0,90 (H-19, t *7,1*).

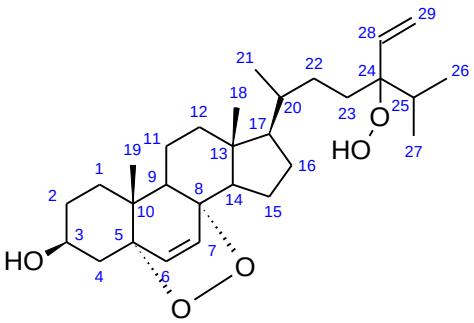
❖ 3-Icosyloxy-1,2-propanediol (SH8)



Formule brute : $C_{23}H_{49}O_3^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 373,3676

RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,74 (H-2', tt *6,0*, *5,0*) ; 3,57 (H-3', dd *11,2*, *5,0*) ; 3,50 (H-3', dd *11,2*, *6,0*) ; 3,47 (H-1', dd *10,0*, *5,0*) ; 3,46 (H-1, t *6,7*) ; 3,41 (H-1', dd *10,0*, *6,0*) ; 1,57 (H-2, qtl *7,0*) ; 1,38 - 1,25 (H-3 - H-19, ss) ; 0,90 (H-20, t *7,1*).

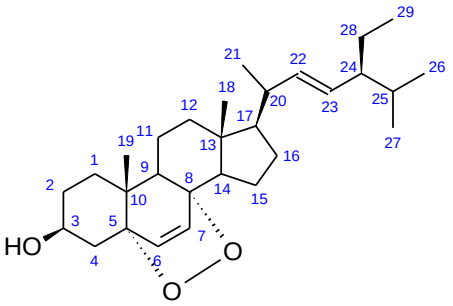
❖ 5*α*,8*α*-Epidioxy-(24R/24S)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol (SH9)



Formule brute : $C_{29}H_{46}O_5Na^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 497,3237

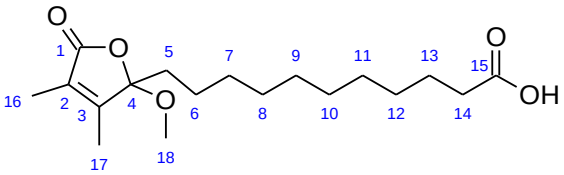
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 6,54 (H-7, d, *8,6*) ; 6,27 (H-6, d, *8,6*) ; 5,75 (H-28, dd, *17,9*, *11,5*)[13] ; 5,19 (H-29, dd, *17,9,1,8*)[4] ; 5,05 (H-29, dd, *11,5*, *1,8*)[4] ; 3,77 (H-3, tt, *11,6*, *5,1*); 2,02 (H-25, ss) ; 1,44 (H-20, dq, *13,0*, *5,8*) ; 0,96 (H-21, d, *8,6*)[4] ; 0,91 (H-19, s) ; 0,87 (H-27, d, *7,4*)[4] ; 0,86 (H-26, d, *7,2*)[4] ; 0,85 (H-18, s).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ[14] ppm : 138,0 (C-28) ; 136,5 (C-6) ; 131,7 (C-7) ; 88.1 (C-24) ; 82,2 (C-5) ; 79,6 (C-8) ; 56,2 (C-17) ; 51,8 (C-14) ; 51,6 (C-9) ; 44,2 (C-13) ; 39,6 (C-12) ; 37,6 (C-4) ; 36,9 (C-1) ; 35,4 (C-20) ; 32,0 (C-25) ; 30,2 (C-2) ; 28,4 (C-22) ; 18,9 (C-21) ; 18,3 (C-19) ; 17,8 (C-26) ; 16,9 (C-27) ; 12,7 (C-18).

❖ 5*α*,8*β*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol (SH10)



Formule brute : $C_{29}H_{47}O_3^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 443,3520
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 6,54 (H-7, d, *8,6*) ; 6,26 (H-6, d, *8,6*) ; 5,17 (H-22, dd, *8,7* ; *15,1*) ; 5,07 (H-23, dd, *8,8* ; *15,1*) ; 3,77 (H-3, m) ; 1,03 (H-21, d, *6,6*) ; 0,91 (H-19, s) ; 0,87 (H-27, d, *6,5*) ; 0,86 (H-18, s) ; 0,83 (H-24, m) ; 0,82 (H-26, d, *6,6*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 139,2 (C-22) ; 136,7 (C-6) ; 131,7 (C-7) ; 131,1 (C-23) ; 67,03 (C-3) ; 53,1 (C-24) ; 21,6 (C-21) ; 21,5 (C-27) ; 19,42 (C-26) ; 18,6 (C-19) ; 13,3 (C-18).

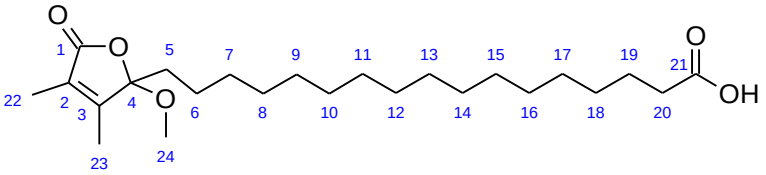
❖ Sinularone XX (SH11)



Formule brute : $C_{18}H_{30}O_5Na^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 349,1985
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,07 (H-18, s); 2,15 (H-14, dd, *8,1*; *7,5*); 1,95 (H-5, m); 1,90 (H-17, q, *1,2*); 1,84 (H-16, q, *1,2*); 1,73 (H-5, m); 1,59 (H-13, qt, *7,4*); [1,33-1,27] (H-7 – H-12, m); 1,24 (H-6, m); 1,13 (H-6, m).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 183,0 (C-15) ; 173,8 (C-1) ; 158,4 (C-3) ; 128,4 (C-2) ; 111,9 (C-4) ; 50,5 (C-18) ; 39,2 (C-14) ; 36,5 (C-5) ; [30,8-30,6] (C-7 – C-12) ; 27,8 (C-13) ; 23,8 (C-6) ; 10,9 (C-17) ; 8,2 (C-16).

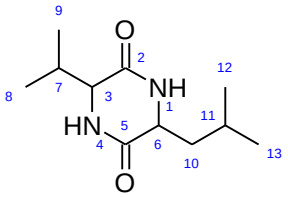
[13] Dédoublement des signaux à cause de la présence possible des diastéréoisomères isomères 24*R* et 24*S* en mélange.
[14] δ_{13C} déterminé à partir des spectres RMN HSQC et HMBC.

❖ Sinularone XY (SH12)



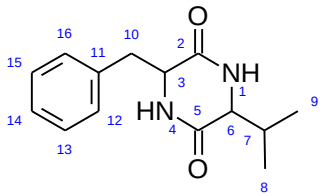
Formule brute : $C_{24}H_{42}O_5Na^+$
SMHR (ESI$^+$) : *m/z* 433,2924
RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 3,07 (H-24, s); 2,16 (H-20, t, 7,5); 1,96 (H-5, m); 1,90 (H-23, q, *1,1*); 1,83 (H-22, q, *1,1*); 1,73 (H-5, m); 1,59 (H-13, qt, *7,4*); [1,33-1,27] (H-7 – H-18, m); 1,24 (H-6, m); 1,14 (H-6, m).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 182,9 (C-21) ; 173,8 (C-1) ; 158,4 (C-3) ; 128,4 (C-2) ; 111,9 (C-4) ; 50,5 (C-24) ; 39,2 (C-20) ; 36,6 (C-5) ; [31,0-30,6] (C-7 – C-18) ; 27,8 (C-19) ; 23,9 (C-6) ; 10,9 (C-23) ; 8,3 (C-22).

❖ Cyclo(L-leucyl-L-valyl) (SH13)



RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,54 (NH-1/4, s) ; 3,94 (H-6, m, *9,2* ; *1,2*) ; 3,77 (H-3, dd, *4,4* ; *1,2*) ; 2,22 (H-7, m, *12,8* ; *4,4*) ; 1,85 (H-11, m) ; 1,75 (H-10, m, *13,7* ; *9,0* ; *4,5*) ; 1,60 (H-10, m, *13,9* ; *9,2* ; *4,9*) ; 1,05 (H-8, d, *7,0*) ; 0,97 (H-13, d, *6,60*) ; 0,96 (H-9, d, *6,8*) ; 0,95 (H-12, d, *6,54*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 171,2 (C-5) ; 169,8 (C-2) ; 61,2 (C-3) ; 54,1 (C-6) ; 45,8 (C-10) ; 33,4 (C-7) ; 25,1 (C-11) ; 23,4 (C-13) ; 21,6 (C-12) ; 19,1 (C-8) ; 17,7 (C-9).

❖ Cyclo(Phe-Val) (SH14)



RMN ^{1}H (600 MHz, CD_3OD), δ ppm (m, *J* en Hz) : 8,55 (NH-1/4, s) ; 7,28 (H-13/15, m) ; 7,23 (H-14, m) ; 7,23 (H-12/16, m) ; 4,31 (H-3, m, *7,6* ; *1,8*) ; 3,64 (H-6, dd, *4,6* ; *1,8*) ; 3,23 (H-10, dd, *13,7* ; *5,3*) ; 3,03 (H-10, dd, *13,9* ; *4,9*) ; 1,64 (H-7, m, *12,3* ; *4,6*) ; 0,79 (H-8, d, *7,1*) ; 0,42 (H-9, d, *6,9*).
RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD), δ ppm : 169,4 (C-5) ; 169,4 (C-2) ; 137,2 (C-11) ; 131,6 (C-12/16) ; 129,7 (C-13/15) ; 128,4 (C-14) ; 61,3 (C-6) ; 57,4 (C-3) ; 40,0 (C-10) ; 33,4 (C-7) ; 19,3 (C-8) ; 17,2 (C-9).

PARTIE II MICROBIOLOGIE

II.1 Etude du microbiome de *Scopalina hapalia*

La communauté microbienne de l'éponge a été étudiée par une approche de métagénomique ciblée sur les régions V1-V3, V3-V4, V4-V5 de l'ADNr 16S et sur la région ITS2. Le séquençage ainsi que le traitement bioinformatique des données ont été réalisés par Genoscreen (France) *via* la mise en œuvre de leur protocole Metabiote®.

II.1.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à partir d'un échantillon de *Scopalina hapalia* congelé à - 20 °C. Après 6 ans de conservation dans ces conditions, l'échantillon partiellement décongelé a été découpé en 3 petits morceaux. L'aspect visuel de l'échantillon montrait un extérieur de couleur marron et un intérieur d'un orange intense. La masse de chaque morceau était d'environ 2,5 g ± 0,5. Deux des morceaux d'éponge ont été décontaminés par bains successifs selon le schéma suivant : eau de mer artificielle stérilisée (Sel Instant Ocean, Aquarium System, France, 33 g/L), éthanol à 70% et eau de mer artificielle stérilisée [Kjer *et al.*, 2010]. Le trempage a duré en moyenne 100 secondes sans dépasser les 120 secondes.

L'extraction de l'ADNg a été réalisée par le Pr L. Dufossé en utilisant deux méthodes (kit) d'extraction différentes : Qiagen et CTAB [Simister *et al.*, 2011]. L'extraction a été réalisée à partir de petits prélèvements effectués à la pointe d'un scalpel stérile. Un contrôle d'extraction avec le kit Qiagen a également été réalisé en utilisant de l'eau pure. La qualité et la quantité de l'ADNg extrait ont été évaluées par spectrophotométrie avec la technique Nanodrop (ThermoFischer, Etats-Unis). Une seconde vérification de la qualité de l'ADNg a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 % w/v) coloré au GelRed™ (Biotium, Etats-Unis). Les ADNg (Qiagen et CTAB) ainsi que le contrôle ont été envoyés par la suite à Genoscreen pour l'étude métagénomique.

Le spectrophotomètre UV-Visible Nanodrop a permis de quantifier et d'analyser la pureté de l'ADN par mesure de l'absorbance. 1 µL du blanc ou de l'échantillon est déposé sur la surface de mesure de l'appareil. La mesure se fait automatiquement avec affichage de la courbe d'absorbance. Le dosage spectrophotométrique donne :

- La concentration en acides nucléiques.
- Deux rapports d'absorbance (A260/A280 et A260/A230) qui renseignent sur la pureté de l'échantillon (**Figure 50**).

D'une manière générale, les acides nucléiques absorbent à λ_{max} = 260 nm et les protéines à λ_{max} = 280 nm. Plusieurs contaminants provenant de l'échantillon (peptides, carbohydrates, etc.) ou des réactifs utilisés durant la purification absorbent à λ_{max} = 230 nm.

Pureté d'un échantillon ADN

RATIO	VALEUR	INDICATION DE PURETÉ
260/280	1,8	ADN pur
	< 1,8	Présence de protéines, phénol et autres contaminants
	> 1,8	Contamination ARN
260/230	1,8 - 2,2	ADN pur
	< 1,8	Contaminants co-purifiés (solvants, sels, contaminants organiques)

Les valeurs minimales acceptables sont :
260/280 ≥ 1,8
260/230 ≥ 1,6

Figure 50 : Rapport de pureté pour un échantillon d'ADN.
(source : manuel de l'utilisateur NanoDrop).

II.1.2 Amplification et séquençage par la technique Illumina MiSeq® « paired-end »

La concentration des échantillons (ADNg-Qiagen, ADNg-CTAB, contrôle-Qiagen) envoyés à Genoscreen a été validée par un protocole Genoscreen basé sur l'utilisation d'un intercalant fluorométrique de l'ADN. Par la suite, 4 librairies ont été générées par amplification (PCR) des régions spécifiques V1-V3, V3-V4, V4-V5 de l'ADNr 16S et de la région ITS2 à partir d'amorces spécifiques. Trois contrôles (2 positifs et 1 négatif) internes à Genoscreen ont été ajoutés aux échantillons et conservés tout au long du processus :

- ABCv2 est constitué de l'ADN d'une communauté bactérienne artificielle composée de 15 souches bactériennes et de 2 souches archéennes. Il est utilisé comme contrôle positif pour les cibles V1-V3, V3-V4, V4-V5 de l'ADNr 16S.
- *Candida* comporte l'ADN d'une souche fongique appartenant au genre *Candida* utilisé comme contrôle positif pour la cible ITS2.
- BF-Lib, constitué d'eau dépourvue de RNase/DNase, a également été intégré comme contrôle négatif pour la préparation des librairies.

La préparation des librairies d'amplicons (produits de l'amplification) a été réalisée à partir de 5 ng d'ADNg, quand disponible, ou avec un volume maximal d'ADNg suivant le protocole Metabiote®v2.0 développé par Genoscreen. A la fin de cette étape, 20 librairies d'amplicons (V1-V3, V3-V4, V4-V5 et ITS2) ont été obtenues : 12 librairies découlant des 3 échantillons envoyés et 8 des contrôles (**Tableau LXXIII**). Le dosage de l'ADN et le contrôle qualité ont été réalisés respectivement par une méthode fluorométrique et par électrophorèse capillaire (2100 Bioanalyzer, Agilent, Etats-Unis) (**Tableau LXXIII**).

Tableau LXXIII : Plan de plaque utilisé et concentrations finales (ng/µL) des différentes librairies.

(source : rapport technique Genoscreen).

	1	2	3	4		1	2	3	4
A	ADNg-Qiagen	ADNg-Qiagen	ADNg-Qiagen	ADNg-Qiagen	A	16,99	15,95	13,53	16,36
B	ADNg-CTAB	ADNg-CTAB	ADNg-CTAB	ADNg-CTAB	B	10,70	18,09	19,44	18,60
C	Contrôle-Q	Contrôle-Q	Contrôle-Q	Contrôle-Q	C	13,10	6,32	12,88	21,42
D	ABCv2	ABCv2	BF-lib	*Candida*	D	15,50	16,81	-0,36	17,15
E	BF-lib	BF-lib	ABCv2	BF-lib	E	-0,36	12,68	16,36	16,28
F					F				
G					G				
H					H				
	V3-V4	V1-V3	V4-V5	ITS2		V3-V4	V1-V3	V4-V5	ITS2

ABCv2 : contrôle positif interne (Genoscreen) pour les bactéries, *Candida* : contrôle positif interne (Genoscreen) pour les champignons, BF-lib : contrôle négatif (H_2O stérile) de la préparation des librairies.

Un mélange équimolaire des 20 librairies a été préparé puis dilué à 10 nM en vue du séquençage. Le séquençage « paired-ended » en chimie 2x300 bases a été effectué sur un séquenceur Illumina MiSeq® (Illumina, Etats-Unis). Le séquençage « paired-ended » implique que les 2 brins (sens et antisens) de chaque amplicon sont séquencés. Les conditions du séquençage ont été les suivantes :

- 4 pM de la librairie finale ont été chargés sur la lame de séquençage.
- une librairie contrôle PhiX à 25 % (v/v) a été incorporée. Cette librairie permet de contrôler les différentes étapes du processus de séquençage (suivi du taux d'erreur par exemple).

Les taux d'erreur potentiels du séquençage calculés dans le cadre de notre projet sont de 2,49 % ± 0,09 pour les brins sens (Read 1) et 2,73 % ± 0,09 pour les brins anti-sens (Read 2). La codification internationale veut que la lecture du brin sens soit notée « Read 1 » et la lecture du brin antisens notée « Read 2 ». Le taux d'erreur moyen rapporté pour le séquençage 2 x 250 bases est d'environ 2 % (source Genoscreen).

Un contrôle qualité des lectures ou « reads » (produits du séquençage) est réalisé avec le logiciel FastQC (Illumina, Etats-Unis) avant les analyses bioinformatiques. La représentation sous forme de box plot des scores qualité (*Phred*) en fonction de la longueur pour l'ensemble des séquences « Read 1 » et « Read 2 » est présentée en **Annexe 5** (Tome II, p. 58). *Phred* est un score de qualité qui indique, de façon logarithmique, la probabilité que la base identifiée soit due à une erreur de séquençage. Généralement, il est considéré que la qualité est :

- Bonne si le score est entre 28 et 41,
- Moyenne si le score est entre 20 et 28,
- Mauvaise si le score est inférieur à 20.

Généralement, le fichier antisens a toujours une plus mauvaise qualité sur la fin des lectures que le fichier sens. C'est ce qui est observé pour les 4 jeux de données. Le séquençage des 20 librairies permet l'obtention de données qui répondent aux spécifications du fournisseur Illumina ainsi qu'aux critères qualités fixés par Genoscreen.

II.1.3 Analyse bio-informatique

Le prétraitement des jeux de données de séquençage a été réalisé avec la pipeline Metabiote® Online v2.0 (Genoscreen). Au cours du prétraitement, l'assemblage des lectures « Read 1 » et « Read 2 » pour chaque échantillon est réalisé avec l'outil FLASH [Magoč et Salzberg, 2011]. A cette étape, les séquences sont nettoyées avant d'être fusionnées. Cela implique la suppression des amorces ainsi que des extrémités des « reads » de mauvaise qualité. L'assemblage des paires a été effectué suivant une zone de recouvrement minimale de 30 paires de bases et un seuil de similarité (identité nucléique) fixé arbitrairement à 97 % sur toute la zone de recouvrement. Pour la cible V1-V3, la zone de recouvrement minimale a été fixée à 20 pb. Les séquences pleines longueurs des cibles de l'ADNr 16S ainsi que de l'ITS2 obtenues sont de qualité et en nombre suffisant pour permettre l'affiliation taxonomique.

L'affiliation taxonomique a été réalisée à l'aide de la pipeline Metabiote® Online v2.0 partiellement basée sur le logiciel QIIME v1.9.1 [Caporaso *et al.*, 2010]. Dans un premier temps, les séquences chimères sont identifiées puis supprimées avec une méthode interne à Genoscreen basée sur l'outil Usearch 6.1 [Edgar, 2010]. L'étape suivante a consisté à regrouper entre elles des séquences présentant de fortes similarités, seuil de similarité fixé à 97 %, pour former des OTUs (Operational Taxonomic Units). Pour le regroupement, c'est l'algorithme Uclust v1.2.22q qui a été utilisé [Edgar, 2010]. Enfin, la séquence la plus abondante de chaque OTU est retenue comme étant la référence et est utilisée pour les alignements avec la base de données Greengenes v13.8 (http://greengenes.secondgenome.com/). Greengenes est une base de données référençant des séquences d'ARNr 16S de bactéries et d'archées.

L'assignement taxonomique des OTUs a été effectué avec la méthode du « Classifier » de la Ribosomal Database Project (RDP, https://rdp.cme.msu.edu/) [Wang *et al.*, 2007a]. La base de données RDP référence les séquences d'ARNr 16S de bactéries, archées ainsi que les séquences ITS de champignons. La méthode du «Classifier » de RDP permet de classer rapidement plusieurs séquences d'ARNr par rapport à la taxonomie établie.

- **Analyse statistique : Diversité alpha**

Les index de diversité alpha qui permettent d'évaluer la diversité microbienne ont été générés automatiquement par un script spécifique de QIIME v1.9.1 : alpha_diversity.py. Ce script calcule la diversité alpha à partir des matrices d'abondance des OTUs. Une analyse complète de la diversité alpha des échantillons a été réalisée à l'aide de la détermination des index de Shannon et de Chao1 [Shannon, 1948; Chao, 1984].

L'**indice de Shannon** est une mesure quantitative de la diversité reflétant le nombre d'OTUs différents au sein d'un jeu de données, ici en l'occurrence, il s'agit de la communauté microbienne associée à *Scopalina hapalia*. Cet indice prend en considération aussi bien le nombre de taxons total présent dans l'échantillon que l'abondance des individus présents au sein de chacun de ces OTUs. L'index de Shannon est calculé selon la formule suivante :

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i$$

H' : indice de diversité de Shannon
i : une OTU (ou une espèce) du milieu d'étude
p_i : proportion d'une OTU i par rapport au nombre total d'OTUs
S : nombre total d'OTUs dans le milieu d'étude/échantillon (richesse spécifique du milieu)

L'**index de Chao1** est basé sur l'abondance des évènements rares, ici en l'occurrence les OTUs, retrouvés dans un échantillon. Les OTU « rares » sont les OTUs qui ne sont représentés que par quelques individus dans l'échantillon. L'index de Chao1 est calculé selon la formule suivante :

$$S_{est} = S_{obs} + \left(\frac{(f_1)^2}{2f_2}\right)$$

S_{est} : nombre d'espèces (OTUs) estimées (correspond à un nombre inconnu d'espèces présentes dans la communauté microbienne mais non observées)
S_{obs} : nombre d'espèces (OTUs) différentes observées
f_1 : nombre d'OTUs observés une fois
f_2 : nombre d'OTUs observés deux fois

II.2 Etude de la diversité microbienne cultivable associée à l'éponge *Scopalina hapalia*

II.2.1 Isolement des microorganismes

Le spécimen de *Scopalina hapalia* (ML-263) a été collecté au sud de Mayotte, par plongée sous-marine, à une profondeur comprise entre 2-10 m en Mai 2013. L'échantillon a été conservé à - 20 °C jusqu'en mars 2017 date à laquelle a été initiée la procédure d'isolement des microorganismes.

Tout le travail d'isolement a été conduit sous des conditions (poste de sécurité microbiologique ou bec bunsen) et avec du matériel stérile. Les cultures ont été incubées dans des étuves thermostatées (MIR-154 et MIR-254, Panasonic, Japon) à 27 °C à l'obscurité.

La procédure d'isolement a été réalisée à partir de 1 cm^3 de tissu d'éponge (environ 1 g) passé rapidement (< 120 s) dans de l'éthanol à 70 % puis dans de l'eau de mer artificielle stérilisée (Sel Instant Ocean, Aquarium System, France, 33 g/L) [Kjer *et al.*, 2010]. Après cette étape de décontamination de surface, l'échantillon a été broyé finement à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat obtenu a été transféré dans un tube Falcon 50 mL contenant 1 g de billes de verres stériles et complété à 10 mL avec de l'eau de mer artificielle. Ce mélange a été passé au Vortex pendant 1 minute afin d'obtenir un homogénat. Pour l'isolement des

microorganismes, deux protocoles ont été mis œuvre à partir du broyat. Le premier protocole (identifié sous la dénomination P2 ou protocole 2) est basé sur un broyat non-traité. Le second protocole (identifié sous la dénomination P3 ou protocole 3) est réalisé à partir d'un broyat soumis à un prétraitement par la chaleur. En effet, afin de favoriser l'isolement des bactéries et champignons à croissance lente, une étape de chauffage à 50°C pendant 30 minutes a été appliquée pour s'affranchir des microorganismes thermosensibles. Les broyats non-traité (P2) et traité à la chaleur (P3) ont ensuite été utilisés pour effectuer des dilutions sérielles (10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3}) dans de l'eau de mer artificielle. 100 µL de chaque suspension mère (10^{0}) ainsi que de ses dilutions (10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3}) ont été inoculés sur 8 milieux de culture différents (A1BFe+c, LB, MBA, MYA2, PDA, R2A, SCAM et SFM). La composition des différents milieux de culture est détaillée en **Annexe 14** (Tome II, p. 71). Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du Parafilm® (Bemis, Etats-Unis) et incubées à 27 °C pendant 10 semaines. Les boîtes de Pétri sont observées tous les 2 jours. L'isolement des microorganismes a été effectué par repiquage, au fur et à mesure de leur apparition sur les milieux, avant que ceux-ci ne soient complètement envahis. Trois milieux de culture, identifiés comme favorables pour le développement des microorganismes d'intérêt, ont été sélectionnés pour l'étape de purification. Il s'agit des milieux : A1BFe+c pour les actinomycètes, LB pour les autres types de bactéries et MYA2 pour les champignons filamenteux. Chaque isolat a été soumis à des repiquages successifs jusqu'à l'observation visuelle de sa pureté. Pour la préservation des souches sur le long terme, une suspension cellulaire de chaque souche a été préparée à partir de cultures denses effectuées sur milieu gélosé et d'un milieu cryoprotecteur dont la composition est donnée dans l'**Annexe 14** (Tome II, p. 71). Ainsi pour chaque souche, 5 cryotubes ont été remplis avec la suspension cellulaire et stockés à - 80 °C.

II.2.2 Identification des souches bactériennes cultivables

❖ Extraction, amplification et séquençage des régions V1 à V5 de l'ARNr 16S

L'identification des souches bactériennes a été effectuée, par la société Genoscreen (Lille, France), par séquençage des régions hypervariables V1 à V5 de l'ARN ribosomique 16S. Le principe de la méthodologie appliquée par Genoscreen est présenté ci-après.

Dans un premier temps, après réception des différentes cultures sur milieu gélosé, l'ADN génomique bactérien a été extrait (Genoscreen). Les régions hypervariables V1 à V3 et V3 à V5 de l'ARNr 16S ont été amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction), ou réaction en chaîne par polymérase, grâce à des couples d'amorces spécifiques à ces régions (**Figure 51**). Chaque région à amplifier est encadrée par un couple d'amorces (flèches orange et verte) chargé de la synthèse des brins sens et antisens de l'ADN double brins. Cette étape a permis l'obtention des séquences 1 (V1 à V3) et 2 (V3 à V).

Le séquençage des produits de PCR (les brins d'ADN (sens et antisens) des séquences 1 et 2) a ensuite été réalisé suivant un protocole optimisé par Genoscreen. Une fois, le séquençage terminé, les séquences sens et antisens obtenues ont été nettoyées puis assemblées à l'aide du logiciel Sequencher V4.7 (Gene Codes Corporation). Deux contrôles internes ont

été utilisés pour permettre la validation de la qualité des résultats. Un contrôle négatif (H_2O pure) de PCR a permis de valider la non-contamination du Mix (mélange de réactifs) utilisé lors d'une réaction PCR. L'ADN d'*Escherichia coli* a été utilisé comme contrôle positif de qualité durant tout le processus de la PCR au séquençage.

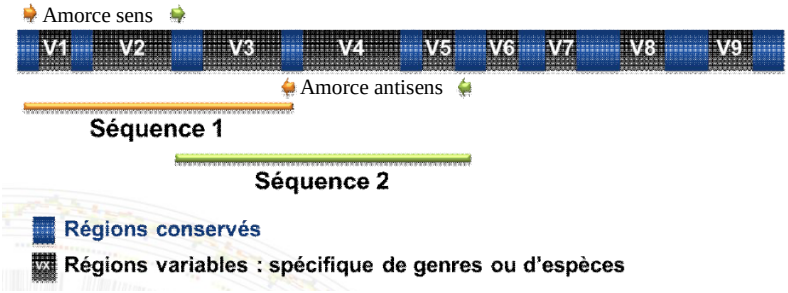


Figure 51 : Schéma de la séquence de l'ADNr 16S avec la position des paires d'amorces correspondant respectivement aux régions V1-V3 (séquence 1) et V3-5 (séquence 2).
Schéma modifié provenant du rapport technique de Genoscreen.

❖ **Identification**

Dans un second temps, les séquences obtenues ont été alignées, autrement dit comparées, avec les séquences référencées dans les bases de données publiques. Dans le cadre de l'analyse effectuée par Genoscreen, deux bases de données ont été utilisées avec les paramètres de recherche suivants :

- ✓ LeBibi (https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/) : (1) « sequence databases » fixée sur « procaryota_16S-rDNA_TS-stringent », (2) « Max number of BLAST hits to align » à 50 et (3) « Alignement Mode » sur « speed oriented ».
- ✓ NCBI – GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) : (1) « database » fixée sur « 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) », (2) algorithme/programme de comparaison « somewhat similar sequences (blastn) ».

Au sein du laboratoire, un alignement avec la base de données EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/) a été privilégié. L'option « 16S-based ID » a été sélectionnée pour l'identification des isolats.

II.2.3 Identification des souches fongiques cultivables

L'identification moléculaire des champignons a été réalisée au Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Pays-Bas) par séquençage de différents gènes marqueurs des champignons en fonction de la souche considérée.

Dans un premier temps, à la réception des souches, ces dernières ont été remises en culture sur les milieux MEA (Malt Extract Agar) et DG18 (Dichloran 18 % glycérol) [Samson, 2019]. Après une période d'incubation de 3 jours à 25 °C à l'obscurité, l'ADN a été

extrait à partir d'une culture sur milieu MEA en utilisant le kit « DNeasy Ultraclean™ Microbial » (Qiagen, Pays-Bas).

Pour la souche SH-53, ce sont les régions ITS1 à ITS2 ainsi que le gène partiel de la β-tubuline (*BenA*) qui ont été séquencés en utilisant les couples d'amorces suivants :

- ITS : LS266 (GCATTCCCAAACAACTCGACTC) (antisens) et
  V9G (TTACGTCCCTGCCCTTTGTA) (sens)
- *BenA* : Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) (sens) et
  BT2b (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) (antisens)

Pour la souche SH-122, ce sont des fragments contenant les gènes partiels de la β-tubuline (*BenA*) ainsi que de la calmoduline (*CaM*) qui ont été séquencés avec les couples d'amorces suivants :

- *BenA* : Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) (sens) et
  BT2b (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) (antisens)
- *CaM* : CMD5 (CCGAGTACAAGGARGCCTTC) (sens) et
  CMD6 (CCGATRGAGGTCATRACGTGG) (antisens)

Pour la souche SH-123, ce sont les régions ITS1 à ITS2 ainsi que le gène partiel de la beta-tubuline (*BenA*) qui ont été séquencés en utilisant les couples d'amorces suivants :

- ITS : LS266 (GCATTCCCAAACAACTCGACTC) (antisens) et
  V9G (TTACGTCCCTGCCCTTTGTA) (sens)
- *BenA* : T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT) (sens) et
  Tub4RD (CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC) (antisens)

L'amplification et le séquençage des brins sens et anti-sens ont été effectués avec le kit ABI Prism® Big DyeTM Terminator v. 3.0 Ready Reaction Cycle sequencing. Les échantillons ont été analysés à l'aide du logiciel ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer (ThermoFischer Scientific, Etats-Unis). Puis les contigs (fragments d'ADN sens et anti-sens séquencés) ont été assemblés grâce au programme Seqman (LaserGene, DNASTAR, Etats-Unis).

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences disponibles dans la base de données GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) en utilisant l'algorithme BLAST ainsi qu'à celles de la base de données interne de la Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.

II.3 Criblage biologique des souches microbiennes cultivables

Toutes les étapes allant de la revivification des souches à la mise en culture ont été réalisées dans des conditions et avec du matériel stérile. Les cultures ont été incubées dans des étuves thermostatées (Panasonic et Multitron Pro, Infors, Suisse) à 28 °C dans le noir. Le protocole de la production des métabolites par les microorganismes a été établi par l'ICSN, porteur du projet TASCMAR.

II.3.1 Revivification des souches

Avant de démarrer la mise en culture pour la production microbienne, une étape de revivification des souches d'intérêts a été nécessaire. Pour ce faire, un inoculum a été prélevé, à l'aide d'une oese stérile, directement à partir des cryotubes stockés à - 80 °C puis ensemencé sur un milieu gélosé adapté. Les milieux utilisés ont été : A1BFe+c pour les actinomycètes, LB pour les autres types de bactéries et MYA2 pour les champignons filamenteux (**Annexe 14**, Tome II, p. 71). Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 28 °C pendant 24 h à 14 jours dans une étuve thermostatée. La reprise de croissance a été régulièrement contrôlée pour la présence de contaminants éventuels.

II.3.2 Préparation des pré-cultures

Les milieux MB (Marine Broth) et MBA (Marine Broth Agar) (**Annexe 14**, Tome II, p. 71) ont été sélectionnés comme milieux de référence pour évaluer la capacité de production en métabolites spécialisés des souches.

A partir des cultures revivifiées de chaque souche, une colonie ou un bout de mycélium a été transféré dans un tube Eppendorf 2 mL contenant 1 mL d'ASW. Après broyage grossier à l'aide d'un piston, le mélange est passé au Vortex afin d'obtenir un homogénat cellulaire. Cet inoculum a ensuite été utilisé pour ensemencer 2 boîtes de Pétri (9 cm) contenant du milieu MBA, à raison de 200 µL/boîte. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28 °C pendant au moins 48 h, jusqu'à ce que les cultures arrivent à confluence.

II.3.3 Mise en culture

La biomasse de chaque souche (bactéries ou mycélium) obtenue à partir des pré-cultures est grattée puis transférée dans un tube Falcon 50 mL contenant 40 mL d'ASW. Le mélange est passé au Vortex afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène puis complété à 50 mL. Cet inoculum va servir à ensemencer les milieux de culture pour la production microbienne.

- **Culture liquide**

1 L de milieu MB supplémenté de 30 g de résine d'amberlite XAD-16 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) ont été préparés dans un Erlenmeyer de 2 L. 10 mL de la suspension cellulaire précédemment préparée, ont servi à inoculer le milieu de culture MB.

Les cultures liquides des différentes souches ont été incubées en statique, pendant 5 jours à 28 °C dans une étuve thermostatée.

Un milieu de culture liquide (MB), supplémenté de 30 g de résine d'amberlite XAD-16 et non ensemencé, a également été produit pour servir de contrôle.

❖ **Culture solide**

Environ 250 mL de milieu de culture MBA ont servi à remplir les boîtes de Pétri destinées à la production (25 x 25 cm, Nunc™, Thermo Fischer, Etats-Unis). 40 mL de l'inoculum restant, mélangé à 35 g de résine d'amberlite XAD-16, ont été répandus uniformément à la surface de l'agar. Après 5 à 10 min de temps de repos, le surplus de liquide a été retiré à l'aide d'une pipette.

Les cultures solides des différentes souches ont été incubées pendant 15 jours à 28 °C.

II.3.4 Obtention des extraits bruts

❖ **Filtration sur Büchner**

Les cultures liquides ont été filtrées sur un dispositif de filtration Büchner (papier filtre Whatman®, grade 4, Ø 110 mm) afin de récupérer la résine ainsi que la biomasse. Les cultures solides ont été grattées puis également transférées sur un dispositif de filtration Büchner. Les mélanges biomasse + résine obtenus aussi bien des cultures liquides que solides ont été rincés avec 1 L d'eau distillée afin d'enlever au maximum les résidus du milieu de culture. Le maximum d'eau a été éliminé par aspiration à l'aide du dispositif de filtration Büchner puis les mélanges biomasse + résine ont été laissés à l'air libre (5 – 10 min) pour séchage.

❖ **Extraction**

Les mélanges biomasse + résine relativement secs ont ensuite été transférés dans des Erlenmeyer de 250 mL, puis des extractions successives ont été réalisées :

- 60 mL d'acétate d'éthyle (AcOEt) ont été ajoutés dans les Erlenmeyer contenant les mélanges biomasse + résine. Par la suite, une macération de 3 h en statique et à température ambiante a été effectuée, suivie d'une filtration par gravité sur papier filtre plissé « Standard » (FILTRES RS).
- 30 mL de méthanol (MeOH) ont ensuite été ajoutés aux mélanges biomasse + résine. Une seconde macération de 3 h en statique et à température ambiante a été effectuée suivie d'une filtration par gravité sur papier filtre plissé « Standard » (FILTRES RS).

Les filtrats AcOEt et MeOH ont été évaporés sous vide pour se débarrasser des solvants. Les extraits bruts obtenus ont été pesés et conservés à 4°C. Le recensement des souches mises en production ainsi que les masses d'extraits obtenus sont donnés en **Annexe 17** (Tome II, p. 77).

II.3.5 Criblages chimique et biologique haut débit

Le criblage chimique des extraits bruts par CCM (chromatographie sur couche mince) a été réalisé suivant la méthode présentée dans la partie expérimentale I.2.4.

Les extraits bruts microbiens ont été testés sur les mêmes cibles biologiques que les extraits d'éponges, à savoir l'élastase, la tyrosinase, les protéines kinases CDK7 et FynB ainsi que le protéasome. Les tests sont présentés au paragraphe I.2.3 de la partie expérimentale. Pour les tests CDK7 et FynB, les extraits microbiens ont été évalués aux concentrations de 1,0 ; 0,1 et 0,01 mg/mL soit des concentrations finales de 0,033 ; 0,0033 et 0,00033 mg/mL.

Deux cibles biologiques supplémentaires ont été rajoutées pour les extraits microbiens, il s'agit de la catalase et de la sirtuine 1.

- **Test d'activation de la catalase** (ICSN) : la capacité d'activation de la catalase par les extraits bruts a été testée à l'aide du kit Amplex® Red Catalase en se référant aux instructions du fournisseur (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- **Test d'activation de la sirtuine 1** (ICSN) : l'activité de la sirtuine 1 a été mesurée en utilisant le kit SIRT1 fluorometric drug discovery et en se référant aux instructions du fournisseur (Enzo Life Sciences).

Références bibliographiques

Abdel-Lateff A. - Chaetominedione, a new tyrosine kinase inhibitor isolated from the algicolous marine fungus *Chaetomium* sp. *Tetrahedron Letters*, 2008, **49** (45), 6398–6400.

Abdelmohsen U.R., Bayer K., Hentschel U. - Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 2014, **31** (3), 381–399.

Adamczeski M., Reed A.R., Crews P. - New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx cf. podatypa*. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58** (2), 201–208.

Adams J. - The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*, 2003, **29**, 3–9.

Ahmed S., Ibrahim A., Arafa A.S. - Anti-H5N1 virus metabolites from the Red Sea soft coral, *Sinularia candidula*. *Tetrahedron Letters*, 2013, **54** (19), 2377–2381.

Aiello A., Fattorusso E., Menna M. - Steroids from sponges: recent reports. *Steroids*, 1999, **64** (10), 687–714.

Akiyama T., Harada S., Kojima F., Takahashi Y., Imada C., Okami Y., Muraoka Y., Aoyagi T., Takeuchi T. - Fluostatins A and B, new inhibitors of dipeptidyl peptidase III, produced by *Streptomyces* sp. TA-3391. I. Taxonomy of producing strain, production, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiot.*, 1998, **51** (6), 553–559.

Akiyama H., Oku N., Kasai H., Shizuri Y., Matsumoto S., Igarashi Y. - Metabolites from thermophilic bacteria I: *N*-propionylanthranilic acid, a co-metabolite of the bacillamide class antibiotics and tryptophan metabolites with herbicidal activity from *Laceyella sacchari*. *J Antibiot*, 2014, **67** (11), 795–798.

Alam N., Bae B.H., Hong J., Lee C.-O., Shin B.A., Im K.S., Jung J.H. - Additional bioactive Lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*. *J. Nat. Prod.*, 2001, **64** (4), 533–535.

Alker A.P., Smith G.W., Kim K. - Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia*, 2001, **460** (1), 105–111.

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. *Anal. Chem.*, 2016, **88** (6), 3317–3323.

Alvarez B., Hooper J.N. - Taxonomic revision of the order Halichondrida (Porifera: Demospongiae) of northern Australia. Family Halichondriidae. *Beagle: Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory, The*, 2011, **27**, 55.

Alvi K.A., Crews P. - Homoscalarane sesterterpenes from *Lendenfeldia frondosa*. *J. Nat. Prod.*, 1992, **55** (7), 859–865.

Alvi K.A., Jaspars M., Crews P., Strulovici B., Oto E. - Penazetidine A, an alkaloid inhibitor of protein kinase C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1994, **4** (20), 2447–2450.

Andresen T.L., Jensen S.S., Madsen R., Jørgensen K. - Synthesis and biological activity of anticancer ether lipids that are specifically released by phospholipase A2 in tumor tissue. *J. Med. Chem.*, 2005, **48** (23), 7305–7314.

Ang K.K.H., Holmes M.J., Higa T., Hamann M.T., Kara U.A.K. - *In vivo* antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44** (6), 1645–1649.

Arena A., Maugeri T.L., Pavone B., Iannello D., Gugliandolo C., Bisignano G. - Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology*, 2006, **6** (1), 8–13.

Argyropoulou A., Aligiannis N., Trougakos I.P., Skaltsounis A.-L. - Natural compounds with anti-ageing activity. *Nat Prod Rep*, 2013, **30** (11), 1412–1437.

Arumugam G.K., Srinivasan S.K., Joshi G., Gopal D., Ramalingam K. - Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora* sp. in submerged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, **118** (1), 99–111.

Asghar U., Witkiewicz A.K., Turner N.C., Knudsen E.S. - The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14** (2), 130–146.

Awad N.E., Kassem H.A., Hamed M.A., El-Naggar M. a. A., El-Feky A.M.M. - Bioassays guided isolation of compounds from *Chaetomium globosum*. *J Mycol Med*, 2014, **24** (2), e35-42.

Baker P.W., Kennedy J., Dobson A.D.W., Marchesi J.R. - Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from irish coastal waters. *Mar Biotechnol*, 2009, **11** (4), 540–547.

Balasubramanian P., Howell P.R., Anderson R.M. - Aging and caloric restriction research: a biological perspective with translational potential. *EBioMedicine*, 2017, **21**, 37–44.

Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. - Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, 2011, **2**.

Barzilai N., Huffman D.M., Muzumdar R.H., Bartke A. - The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 2012, **61** (6), 1315–1322.

Bauermeister A., Velasco-Alzate K., Dias T., Macedo H., Ferreira E.G., Jimenez P.C., Lotufo T.M.C., Lopes N.P., Gaudêncio S.P., Costa-Lotufo L.V. - Metabolomic fingerprinting of *Salinispora* from Atlantic Oceanic islands. *Front. Microbiol.*, 2018, **9**. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03021/full [Accessed September 18, 2019].

Baur S., Niehaus J., Karagouni A.D., Katsifas E.A., Chalkou K., Meintanis C., Jones A.L., Goodfellow M., Ward A.C., Beil W., Schneider K., Süssmuth R.D., Fiedler H.-P. - Fluostatins C-E, novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain Acta 1383. *J. Antibiot.*, 2006, **59** (5), 293–297.

Bell J.J. - The functional roles of marine sponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2008, **79** (3), 341–353.

Bell, Philp, Aw, Christofi - The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, **85** (2), 195–210.

Bérdy J. - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 2005, **58** (1), 1–26.

Bergé J.-P., Barnathan G. - Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In : Marine Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, eds. Roland Ulber et Yves Le Gal. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005, 49–125. Available at: https://doi.org/10.1007/b135782 [Accessed March 20, 2019].

Bergquist P.R. - A revision of the supraspecific classification of the orders Dictyoceratida, Dendroceratida, and Verongida (class Demospongiae). *New Zealand Journal of Zoology*, 1980, **7** (4), 443–503.

Bewley C.A., Holland N.D., Faulkner D.J. - Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 1996, **52** (7), 716–722.

Bhadury P., Mohammad B.T., Wright P.C. - The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33** (5), 325.

Bibi F., Yasir M., Al-Sofyani A., Naseer M.I., Azhar E.I. - Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, **27** (4), 1139–1147.

Biegelmeyer R., Schröder R., Rambo D.F., Dresch R.R., Stout E.P., Carraro J.L.F., Mothes B., Moreira J.C.F., Molinski T.F., da Frota Junior M.L.C., Henriques A.T. - Cytotoxic effects on tumour cell lines of fatty acids from the marine sponge *Scopalina ruetzleri*. *J Pharm Pharmacol*, 2015, **67** (5), 746–753.

Birgbauer E., Chun J. - New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, **63** (23), 2695–2701.

Bister B., Bischoff D., Ströbele M., Riedlinger J., Reicke A., Wolter F., Bull A.T., Zähner H., Fiedler H.-P., Süssmuth R.D. - Abyssomicin C - a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the *p*-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, **43** (19), 2574–2576.

Blanquer A., Uriz M.-J. - Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: A phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **45** (1), 392–397.

Blanquer A., Uriz M.-J. - "A posteriori" searching for phenotypic characters to describe new cryptic species of sponges revealed by molecular markers (Dictyonellidae : *Scopalina*). *Invert. Systematics*, 2008, **22** (5), 489–502.

Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A. - Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, 2002, **3** (7), 619–627.

de Boer A.S., Priest F., Diderichsen B. - On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **40** (5), 595–598.

Bokulich N.A., Subramanian S., Faith J.J., Gevers D., Gordon J.I., Knight R., Mills D.A., Caporaso J.G. - Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*, 2013, **10** (1), 57–59.

Borchert M.S., Nielsen P., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., Pape T., Antranikian G., Schäfer T. - *Bacillus plakortidis* sp. nov. and *Bacillus murimartini* sp. nov., novel alkalitolerant members of rRNA group 6. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, **57** (12), 2888–2893.

Bordier C.G., Sellier N., Foucault A.P., Le Goffic F. - Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-*O*-alkylglycerol ether lipids. *Lipids*, 1996, **31** (5), 521–528.

Bordone L., Guarente L. - Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, **6** (4), 298–305.

Borthwick A.D. - 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.*, 2012, **112** (7), 3641–3716.

Bose U., Hewavitharana A.K., Ng Y.K., Shaw P.N., Fuerst J.A., Hodson M.P. - LC-MS-based metabolomics study of marine bacterial secondary metabolite and antibiotic production in *Salinispora arenicola*. *Marine Drugs*, 2015, **13** (1), 249–266.

Bridge P.D., Spooner B.M., Roberts P.J. - The impact of molecular data in fungal systematics. In : Advances in Botanical Research. Advances in Botanical Research, ed. J. A. Callow. Academic Press, 2005, 33–67. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229605420029 [Accessed August 6, 2019].

Bringmann G., Gulder T.A.M., Lang G., Schmitt S., Stöhr R., Wiese J., Nagel K., Imhoff J.F. - Large-scale biotechnological production of the antileukemic marine natural product sorbicillactone A. *Mar Drugs*, 2007, **5** (2), 23–30.

Bringmann G., Lang G., Mühlbacher J., Schaumann K., Steffens S., Rytik P.G., Hentschel U., Morschhäuser J., Müller W.E.G. - Sorbicillactone A: a structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 2003, **37**, 231–253.

Bugni T.S., Ireland C.M. - Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep*, 2004, **21** (1), 143–163.

Bull A.T., Stach J.E.M. - Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, 2007, **15** (11), 491–499.

Bull A.T., Stach J.E.M., Ward A.C., Goodfellow M. - Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, **87** (3), 65–79.

Butler A.J., van Altena I.A., Dunne S.J. - Antifouling activity of lyso-platelet-activating factor extracted from australian sponge *Crella incrustans*. *J Chem Ecol*, 1996, **22** (11), 2041–2061.

Cabrera G.M., Butler M., Rodriguez M.A., Godeas A., Haddad R., Eberlin M.N. - A sorbicillinoid urea from an intertidal *Paecilomyces marquandii*. *J. Nat. Prod.*, 2006, **69** (12), 1806–1808.

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 ⊥. *J. Nat. Prod.*, 2009, **72** (3), 443–449.

Cambie R.C., Bergquist P.R., Karuso P. - Chemistry of sponges, v. Dictyodendrillolide, a new prenylated butenolide from a sponge. *J. Nat. Prod.*, 1988, **51** (5), 1014–1016.

Candela T., Fouet A. - Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, 2006, **60** (5), 1091–1098.

Caporaso J.G. *et al.* - QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 2010, **7** (5), 335–336.

Carballeira N.M. - New advances in the chemistry of methoxylated lipids. *Progress in Lipid Research*, 2002, **41** (6), 437–456.

Cardellina J.H., Graden C.J., Greer B.J., Kern J.R. - 17*Z*-Tetracosenyl 1-glycerol ether from the sponges *Cinachyra alloclada* and *Ulosa ruetzleri*. *Lipids*, 1983, **18** (2), 107–110.

Cardellina J.H., Nigh D., VanWagenen B.C. - Plant growth regulatory indoles from the sponges *Dysidea etheria* and *Ulosa ruetzleri*. *J. Nat. Prod.*, 1986, **49** (6), 1065–1067.

Carrillo L., Benítez-Ahrendts M.R. - The Family Thermoactinomycetaceae. In : The Prokaryotes. eds. Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, et Fabiano Thompson. Springer Berlin Heidelberg, 2014, 389–410. Available at: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30120-9_355 [Accessed August 13, 2017].

Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A., Prinsep M.R. - Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 2019, **36** (1), 122–173.

Carté B., Faulkner D.J. - Polybrominated diphenyl ethers from *Dysidea herbacea*, *Dysidea chlorea* and *Phyllospongia foliascens*. *Tetrahedron*, 1981, **37** (13), 2335–2339.

Carter G.T., Nietsche J.A., Williams D.R., Borders D.B. - Citreamicins, novel antibiotics from *Micromonospora citrea*: isolation, characterization, and structure determination. *J. Antibiot.*, 1990, **43** (5), 504–512.

Casey J.T., Walsh P.K., O'Shea D.G. - Characterisation of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from fermentation broth. *Separation and Purification Technology*, 2007, **53** (3), 281–288.

Cătană C.-S., Atanasov A.G., Berindan-Neagoe I. - Natural products with anti-aging potential: affected targets and molecular mechanisms. *Biotechnology Advances*, 2018, **36** (6), 1649–1656.

Chaita E., Lambrinidis G., Cheimonidi C., Agalou A., Beis D., Trougakos I., Mikros E., Skaltsounis A.-L., Aligiannis N. - Anti-melanogenic properties of greek plants. A novel depigmenting agent from *Morus alba* wood. *Molecules*, 2017, **22** (4).

Chang T.-S. - Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials (Basel)*, 2012, **5** (9), 1661–1685.

Chao A. - Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, **11** (4), 265–270.

Charan R.D., Schlingmann G., Janso J., Bernan V., Feng X., Carter G.T. - Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 2004, **67** (8), 1431–1433.

Chen J.-H., Lan X.-P., Liu Y., Jia A.-Q. - The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, **22** (9), 3177–3180.

Chen Y., Liu S.A., Mou H., Ma Y., Li M., Hu X. - Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments. *Front. Microbiol.*, 2017, **8**. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00871/full [Accessed November 6, 2019].

Chen Y., Peng Y., Gao C., Huang R. - A new diketopiperazine from South China Sea marine sponge *Callyspongia* sp. *Natural Product Research*, 2014,. Available at: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.903397 [Accessed October 17, 2019].

Chen Y.-G., Zhang Y.-Q., Wang Y.-X., Liu Z.-X., Klenk H.-P., Xiao H.-D., Tang S.-K., Cui X.-L., Li W.-J. - *Bacillus neizhouensis* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from a sea anemone. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, **59** (12), 3035–3039.

Cheng Z., Li Y., Liu W., Liu L., Liu J., Yuan W., Luo Z., Xu W., Li Q. - Butenolide derivatives with α-glucosidase inhibitions from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus terreus* YPGA10. *Marine Drugs*, 2019, **17** (6), 332.

Cheng C., MacIntyre L., Abdelmohsen U.R., Horn H., Polymenakou P.N., Edrada-Ebel R., Hentschel U. - Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from mediterranean sponges. *PLoS One*, 2015, **10** (9), e0138528.

Chill L., Rudi A., Aknin M., Loya S., Hizi A., Kashman Y. - New sesterterpenes from madagascan *Lendenfeldia* sponges. *Tetrahedron*, 2004, **60** (47), 10619–10626.

Cho K.W., Lee H.-S., Rho J.-R., Kim T.S., Mo S.J., Shin J. - New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.*, 2001, **64** (5), 664–667.

Choi Y.-J., Shin H.-W., Chun Y.-S., Leutou A.S., Son B.W., Park J.-W. - Diacetoxyscirpenol as a new anticancer agent to target hypoxia-inducible factor 1. *Oncotarget*, 2016, **7** (38), 62107–62122.

Chung Y.-M., Wei C.-K., Chuang D.-W., El-Shazly M., Hsieh C.-T., Asai T., Oshima Y., Hsieh T.-J., Hwang T.-L., Wu Y.-C., Chang F.-R. - An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, **21** (13), 3866–3872.

Cimino G., De Rosa S., De Stefano S., Self R., Sodano G. - The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Letters*, 1983, **24** (29), 3029–3032.

Claesson M.J., Wang Q., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., Cole J.R., Ross R.P., O'Toole P.W. - Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly

complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38** (22), e200.

Collins F.W.J., O'Connor P.M., O'Sullivan O., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. - Formicin – a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology*, 2016, **162** (9), 1662–1671.

Colsch B., Fenaille F., Warnet A., Junot C., Tabet J.-C. - Mechanisms governing the fragmentation of glycerophospholipids containing choline and ethanolamine polar head groups. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2017, **23** (6), 427–444.

de Cook S.C., Bergquist P.R. - Family Thorectidae Bergquist, 1978. In : Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. eds. John N. A. Hooper, Rob W. M. Van Soest, et Philippe Willenz. Springer US, Boston, MA, 2002, 1028–1050. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_100 [Accessed September 23, 2019].

Crawford L.J., Walker B., Irvine A.E. - Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal*, 2011, **5** (2), 101–110.

Crews P., Manes L.V., Boehler M. - Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* sp. *Tetrahedron Letters*, 1986, **27** (25), 2797–2800.

de la Cruz M., Martín J., González-Menéndez V., Pérez-Victoria I., Moreno C., Tormo J.R., El Aouad N., Guarro J., Vicente F., Reyes F., Bills G.F. - Chemical and physical modulation of antibiotic activity in *Emericella* species. *Chem. Biodivers.*, 2012, **9** (6), 1095–1113.

Cui C.-M., Li X.-M., Li C.-S., Proksch P., Wang B.-G. - Cytoglobosins A-G, cytochalasans from a marine-derived endophytic fungus, *Chaetomium globosum* QEN-14. *J. Nat. Prod.*, 2010, **73** (4), 729–733.

Dai J., Liu Y., Zhou Y.-D., Nagle D.G. - Cytotoxic metabolites from an indonesian sponge *Lendenfeldia* sp. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70** (11), 1824–1826.

D'Arrigo P., Servi S. - Synthesis of lysophospholipids. *Molecules*, 2010, **15** (3), 1354–1377.

Davidson S.K., Allen S.W., Lim G.E., Anderson C.M., Haygood M.G. - Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67** (10), 4531–4537.

Davidson S.K., Haygood M.G. - Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*." *Biol. Bull.*, 1999, **196** (3), 273–280.

Deniau A.-L., Mosset P., Pédrono F., Mitre R., Le Bot D., Legrand A.B. - Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil. *Mar Drugs*, 2010, **8** (7), 2175–2184.

Devi P., Wahidullah S., Rodrigues C., Souza L.D. - The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 2010, **8** (4), 1203–1212.

Dey G., Bharti R., Dhanarajan G., Das S., Dey K.K., Kumar B.N.P., Sen R., Mandal M. - Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3β and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. *Sci Rep*, 2015, **5**, 10316.

Dhakal D., Pokhrel A.R., Shrestha B., Sohng J.K. - Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front. Microbiol.*, 2017, **8**. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01106/full [Accessed August 13, 2019].

Díaz Y.M. *et al.* - Biofilm inhibition activity of compounds isolated from two Eunicea species collected at the Caribbean Sea. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015, **25** (6), 605–611.

Diez-Vives C., Moitinho-Silva L., Nielsen S., Reynolds D., Thomas T. - Expression of eukaryotic-like protein in the microbiome of sponges. *Mol. Ecol.*, 2017, **26** (5), 1432–1451.

Dillman R.L., Cardellina J.H. - An unusual sulfur-containing diketopiperazine from the bermudian sponge *Tedania ignis*. *J. Nat. Prod.*, 1991, **54** (4), 1159–1161.

Ding B., Yin Y., Zhang F., Li Z. - Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea* sp. in the South China Sea. *Mar Biotechnol*, 2011, **13** (4), 713–721.

Ding L.-J., Yuan W., Liao X.-J., Han B.-N., Wang S.-P., Li Z.-Y., Xu S.-H., Zhang W., Lin H.-W. - Oryzamides A–E, cyclodepsipeptides from the sponge-derived fungus *Nigrospora oryzae* PF18. *J. Nat. Prod.*, 2016, **79** (8), 2045–2052.

Djerassi C., Lam W.K. - Phospholipid studies of marine organisms. Part 25. Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.*, 1991, **24** (3), 69–75.

Do M.N., Erickson K.L. - Branched chain mono-glycerol ethers from a taiwanese marine sponge of the genus *Aaptos*. *Tetrahedron Letters*, 1983, **24** (51), 5699–5702.

Dong J.-J., Bao J., Zhang X.-Y., Xu X.-Y., Nong X.-H., Qi S.-H. - Alkaloids and citrinins from marine-derived fungus *Nigrospora oryzae* SCSGAF 0111. *Tetrahedron Letters*, 2014, **55** (16), 2749–2753.

Dou H., Song Y., Liu X., Gong W., Li E., Tan R., Hou Y. - Chaetoglobosin fex from the marine-derived endophytic fungus inhibits induction of inflammatory mediators *via* Toll-Like Receptor 4 signaling in macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, **34** (12), 1864–1873.

Dunlap C.A., Kwon S.-W., Rooney A.P., Kim S.-J. - *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, **65** (10), 3487–3492.

Easson C.G., Thacker R.W. - Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Front Microbiol*, 2014, **5**, 532.

Ebada S.S., Proksch P. - The chemistry of marine sponges *. In : Handbook of Marine Natural Products. Springer, Dordrecht, 2012, 191–293. Available at: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-90-481-3834-0_4 [Accessed January 30, 2018].

Ebada S.S., Wray V., De Voogd N.J., Deng Z., Lin W., Proksch P. - Two new jaspamide derivatives from the marine sponge *Jaspis splendens*. *Marine Drugs*, 2009, **7** (3), 435–444.

Eckhardt F.E.W., Roggentin P., Hirsch P. - Fatty acid composition of various hyphal budding bacteria. *Arch. Microbiol.*, 1979, **120** (2), 81–85.

Edgar R.C. - Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, **26** (19), 2460–2461.

Edlund A., Loesgen S., Fenical W., Jensen P.R. - Geographic distribution of secondary metabolite genes in the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77** (17), 5916–5925.

Edrada R.A., Heubes M., Brauers G., Wray V., Berg A., Grafe U., Wohlfarth M., Muhlbacher J., Schaumann K., Sudarsono S., Bringmann G., Proksch P. - Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod.*, 2002, **65** (11), 1598–1604.

Edwards P.D., Bernstein P.R. - Synthetic inhibitors of elastase. *Medicinal Research Reviews*, 1994, **14** (2), 127–194.

Ein-Gil N., Ilan M., Carmeli S., Smith G.W., Pawlik J.R., Yarden O. - Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *The ISME Journal*, 2009, **3** (6), 752–755.

El Sayed K.A., Dunbar D.C., Perry T.L., Wilkins S.P., Hamann M.T., Greenplate J.T., Wideman M.A. - Marine natural products as prototype insecticidal agents. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45** (7), 2735–2739.

Elias D., Ditzel H.J. - Fyn is an important molecule in cancer pathogenesis and drug resistance. *Pharmacol. Res.*, 2015, **100**, 250–254.

Elsayed Y., Refaat J., Abdelmohsen U., Fouad M. - The Genus *Rhodococcus* as a source of novel bioactive substances: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017, **6**, 83–92.

Elsayed Y., Refaat J., Abdelmohsen U.R., Othman E.M., Stopper H., Fouad M.A. - Metabolomic profiling and biological investigation of the marine sponge-derived bacterium *Rhodococcus* sp. UA13. *Phytochemical Analysis*, 2018, **29** (6), 543–548.

Engel S., Pawlik J.R. - Interactions among Florida sponges. I. Reef habitats. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 2005, **303**, 133–144.

Esteves A.I.S., Amer N., Nguyen M., Thomas T. - Sample processing impacts the viability and cultivability of the sponge microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**. Available at: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00499/abstract [Accessed August 22, 2017].

Esteves A.I.S., Cullen A., Thomas T. - Competitive interactions between sponge-associated bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2017, **93** (3).

Ettoumi B., Raddadi N., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A., Cherif A. - Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *J. Basic Microbiol.*, 2009, **49 Suppl 1**, S13-23.

Fan L., Reynolds D., Liu M., Stark M., Kjelleberg S., Webster N.S., Thomas T. - Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *PNAS*, 2012, **109** (27), E1878–E1887.

Feling R.H., Buchanan G.O., Mincer T.J., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. - Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, **42** (3), 355–357.

Fenical W., Jensen P.R. - Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol*, 2006, **2** (12), 666–673.

Fenical W., Jensen P.R., Palladino M.A., Lam K.S., Lloyd G.K., Potts B.C. - Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, **17** (6), 2175–2180.

Fernández-Chimeno R.I., Cañedo L., Espliego F., Grávalos D., De La Calle F., Fernández-Puentes J.L., Romero F. - IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, 2000, **53** (5), 474–478.

Festa C., De Marino S., Sepe V., Monti M.C., Luciano P., D'Auria M.V., Débitus C., Bucci M., Vellecco V., Zampella A. - Perthamides C and D, two new potent anti-inflammatory cyclopeptides from a solomon lithistid sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron*, 2009, **65** (50), 10424–10429.

Fiedler H.-P., Bruntner C., Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M., Potterat O., Puder C., Mihm G. - Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, **87** (1), 37–42.

Fieseler L., Horn M., Wagner M., Hentschel U. - Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in marine sponges. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (6), 3724–3732.

Fisher R.P., Morgan D.O. - A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 1994, **78** (4), 713–724.

Flärdh K., Buttner M.J. - *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, **7** (1), 36–49.

Flowers A.E., Garson M.J., Webb R.I., Dumdei E.J., Charan R.D. - Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res.*, 1998, **292** (3), 597–607.

Francesco A.D., Germanio C.D., Bernier M., Cabo R. de - A time to fast. *Science*, 2018, **362** (6416), 770–775.

Freel K.C., Nam S.-J., Fenical W., Jensen P.R. - Evolution of secondary metabolite genes in three closely related marine actinomycete species▿. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77** (20), 7261–7270.

Frikha Dammak D., Zarai Z., Najah S., Abdennabi R., Belbahri L., Rateb M.E., Mejdoub H., Maalej S. - Antagonistic properties of some halophilic thermoactinomycetes isolated from superficial sediment of a solar saltern and production of cyclic antimicrobial peptides by the novel isolate *Paludifilum halophilum*. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**, 1205258.

Frykman S., Tsuruta H., Galazzo J., Licari P. - Characterization of product capture resin during microbial cultivations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **33** (6), 445–453.

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. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58** (9), 1384–1391.

Galeano E., Martínez A. - Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 2007, **17** (1), 21–24.

Gao Z., Li B., Zheng C., Wang G. - Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74** (19), 6091–6101.

Garg H.S., Agrawal S. - A novel sphingosine derivative from the sponge *Spirastrella inconstans*. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58** (3), 442–445.

Gauvin A., Smadja J., Aknin M., Faure R., Gaydou E.-M. - Isolation of bioactive 5α,8α-epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2000, **78** (7), 986–992.

Gerth K., Bedorf N., Irschik H., Höfle G., Reichenbach H. - The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.*, 1994, **47** (1), 23–31.

Gerth K., Pradella S., Perlova O., Beyer S., Müller R. - Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *Journal of Biotechnology*, 2003, **106** (2), 233–253.

Gerwick W.H., Moore B.S. - Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.*, 2012, **19** (1), 85–98.

Giles E.C., Kamke J., Moitinho-Silva L., Taylor M.W., Hentschel U., Ravasi T., Schmitt S. - Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, **83** (1), 232–241.

Gilles Barnathan, Nambinina Velosaotsy, Sultan S Al-Lihaibi, Jean Michel Njinkoué, Jean-Michel Kornprobst, Jean Vacelet, Nicole Boury-Esnault - Unusual sterol composition

and classification of three marine sponge families. *ResearchGate*, 2004,. Available at: https://www.researchgate.net/publication/262253316_Unusual_sterol_composition_and_classification_of_three_marine_sponge_families [Accessed February 19, 2020].

Gloeckner V., Wehrl M., Moitinho-Silva L., Gernert C., Schupp P., Pawlik J.R., Lindquist N.L., Erpenbeck D., Wörheide G., Hentschel U. - The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscopical survey of 56 sponge species. *Biol. Bull.*, 2014, **227** (1), 78–88.

Godeau G., Hornebeck W. - Morphometric analysis of the degradation of human skin elastic fibres by human leukocyte elastase (EC 3-4-21-37) and human skin fibroblast elastase (EC 3-4-24). *Pathol. Biol.*, 1988, **36** (9), 1133–1138.

Godzien J., Ciborowski M., Martínez-Alcázar M.P., Samczuk P., Kretowski A., Barbas C. - Rapid and reliable identification of phospholipids for untargeted metabolomics with LC–ESI–QTOF–MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 2015, **14** (8), 3204–3216.

Gontang E.A., Fenical W., Jensen P.R. - Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (10), 3272–3282.

Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. - Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 2016, **17** (6), 333–351.

Grabowska W., Sikora E., Bielak-Zmijewska A. - Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology*, 2017, **18** (4), 447–476.

Greenall S.A., Lim Y.C., Mitchell C.B., Ensbey K.S., Stringer B.W., Wilding A.L., O'Neill G.M., McDonald K.L., Gough D.J., Day B.W., Johns T.G. - Cyclin-dependent kinase 7 is a therapeutic target in high-grade glioma. *Oncogenesis*, 2017, **6** (5), e336.

Grossi V., Mollex D., Vinçon-Laugier A., Hakil F., Pacton M., Cravo-Laureau C. - Mono- and dialkyl glycerol ether lipids in anaerobic bacteria: biosynthetic insights from the mesophilic sulfate reducer *Desulfatibacillum alkenivorans* PF2803T. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, **81** (9), 3157–3168.

Gunatilaka A.A.L., Gopichand Y., Schmitz F.J., Djerassi C. - Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5.alpha.,8.alpha.-epidoxy sterols from four marine organisms. *The Journal of Organic Chemistry*, 1981, **46** (19), 3860–3866.

Guo Y.-W., Gavagnin M., Mollo E., Trivellone E., Cimino G. - Three new butenolide lipids from the caribbean gorgonian *Pterogorgia anceps*. *J. Nat. Prod.*, 1999, **62** (8), 1194–1196.

Guo Z.-L., Zheng J.-J., Cao F., Wang C., Wang C.-Y. - Chemical constituents of the gorgonian-derived fungus *Chaetomium globosum*. *Chem Nat Compd*, 2017, **53** (1), 199–202.

Guo X., Zheng L., Zhou W., Cui Z., Han P., Tian L., Wang X. - A case study on chemical defense based on quorum sensing: antibacterial activity of sponge-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 induced by quorum sensing mechanisms. *Ann Microbiol*, 2011, **61** (2), 247–255.

Gurau F., Baldoni S., Prattichizzo F., Espinosa E., Amenta F., Procopio A.D., Albertini M.C., Bonafe M., Olivieri F. - Anti-senescence compounds: a potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Res. Rev.*, 2018, **46**, 14–31.

Haass C., Mandelkow E. - Fyn-Tau-Amyloid: a toxic triad. *Cell*, 2010, **142** (3), 356–358.

Hafenbradl D., Keller M., Stetter K.O., Hammann P., Hoyer F., Kogler H. - Sibyllimycine, 5,6,7,8-tetrahydro-3-methyl-8-oxo-4-azaindolizidine, a novel metabolite from *Thermoactinomyces* sp. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1996, **35** (5), 545–547.

Hallgren B., Larsson S. - The glyceryl ethers in the liver oils of elasmobranch fish. *J. Lipid Res.*, 1962a, **3** (1), 31–38.

Hallgren B., Larsson S. - The glyceryl ethers in man and cow. *J. Lipid Res.*, 1962b, **3** (1), 39–43.

Hamann M. *et al.* - Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70** (9), 1397–1405.

Hamdache A., Lamarti A., Aleu J., Collado I.G. - Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *J. Nat. Prod.*, 2011, **74** (4), 893–899.

Han A.-R., Song J.-I., Jang D.S., Min H.-Y., Lee S.K., Seo E.-K. - Cytotoxic constituents of the octocoral *Dendronephthya gigantea*. *Arch. Pharm. Res.*, 2005, **28** (3), 290–293.

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. *J. Nat. Prod.*, 1997, **60** (12), 1313–1316.

Hanif N., Tanaka J., Setiawan A., Trianto A. - Polybrominated diphenyl ethers from the indonesian sponge *Lamellodysidea herbacea*. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 432–435.

Harman D. - Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 1956, **11** (3), 298–300.

Harwood C.R., Mouillon J.-M., Pohl S., Arnau J. - Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018, **42** (6), 721–738.

Hattori T., Konno A., Adachi K., Shizuri Y. - Four new bioactive bromophenols from the palauan sponge *Phyllospongia dendyi*. *Fisheries Sci*, 2001, **67** (5), 899–903.

Haygood M.G., Schmidt E.W., Davidson S.K., Faulkner D.J. - Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **1** (1), 33–43.

He L., Liu F., Karuppiah V., Ren Y., Li Z. - Comparisons of the fungal and protistan communities among different marine sponge holobionts by pyrosequencing. *Microb Ecol*, 2014, **67** (4), 951–961.

Helber S.B., Hoeijmakers D.J.J., Muhando C.A., Rohde S., Schupp P.J. - Sponge chemical defenses are a possible mechanism for increasing sponge abundance on reefs in Zanzibar. *PLoS One*, 2018, **13** (6). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6010217/ [Accessed March 18, 2019].

Helber S.B., Steinert G., Wu Y.-C., Rohde S., Hentschel U., Muhando C.A., Schupp P.J. - Sponges from Zanzibar host diverse prokaryotic communities with potential for natural product synthesis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2019, **95** (4).

Helber S.B., Voogd N.J. de, Muhando C.A., Rohde S., Schupp P.J. - Anti-predatory effects of organic extracts of 10 common reef sponges from Zanzibar. *Hydrobiologia*, 2017, **790** (1), 247–258.

Hentschel U., Fieseler L., Wehrl M., Gernert C., Steinert M., Hacker J., Horn M. - Microbial diversity of marine sponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 2003, **37**, 59–88.

Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A.B., Wagner M., Hacker J., Moore B.S. - Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68** (9), 4431–4440.

Hentschel U., Piel J., Degnan S.M., Taylor M.W. - Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, **10** (9), 641–654.

Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W. - Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, **55** (2), 167–177.

Hill M.S., Lopez N.A., Young K.A. - Anti-predator defenses in Western North Atlantic sponges with evidence of enhanced defense through interactions between spicules and chemicals. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, **291**, 93–102.

Himaya S.W.A., Kim S.-K. - Marine nutraceuticals. In : Springer Handbook of marine biotechnology. ed. Se-Kwon Kim. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015, 995–1014. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_43 [Accessed October 13, 2018].

Hinde R., Pironet F., Borowitzka M.A. - Isolation of *Oscillatoria spongeliae*, the filamentous cyanobacterial symbiont of the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Marine Biology*, 1994, **119** (1), 99–104.

Hirsch A.M., Valdés M. - *Micromonospora*: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, **42** (4), 536–542.

Holden M.T.G. *et al.* - Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 1999, **33** (6), 1254–1266.

Höller U., Wright A.D., Matthee G.F., Konig G.M., Draeger S., Aust H.-J., Schulz B. - Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 2000, **104** (11), 1354–1365.

Hopp D.C., Milanowski D.J., Rhea J., Jacobsen D., Rabenstein J., Smith C., Romari K., Clarke M., Francis L., Irigoyen M., Luche M., Carr G.J., Mocek U. - Citreamicins with potent Gram-positive activity. *J. Nat. Prod.*, 2008, **71** (12), 2032–2035.

Hu D., Cha G., Gao B. - A phylogenomic and molecular markers based analysis of the class Acidimicrobiia. *Front Microbiol*, 2018, **9**, 987.

Hu D., Zang Y., Mao Y., Gao B. - Identification of molecular markers that are specific to the class Thermoleophilia. *Front. Microbiol.*, 2019, **10**. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01185/full [Accessed April 27, 2020].

Huang R.-M., Yi X.-X., Zhou Y., Su X., Peng Y., Gao C.-H. - An update on 2,5-diketopiperazines from marine organisms. *Mar Drugs*, 2014, **12** (12), 6213–6235.

Hubert J., Angelis A., Aligiannis N., Rosalia M., Abedini A., Bakiri A., Reynaud R., Nuzillard J.-M., Gangloff S.C., Skaltsounis A.-L., Renault J.-H. - *In vitro* dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees. *Planta Med.*, 2016, **82** (15), 1351–1358.

Huong T.T., Anh N.T., Quang T.T., Huy C.N., Minh T.T., Minh C.V., Kiem P.V. - Study on chemistry of the sponge *Petrosia nigricans* living in vietnamese sea. *Vietnamian Journal of Chemistry*, 2007, **45**, 5.

Iannitti T., Palmieri B. - An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Mar Drugs*, 2010, **8** (8), 2267–2300.

Imai S., Guarente L. - NAD+ and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*, 2014, **24** (8), 464–471.

Ioannou E., Abdel-Razik A.F., Zervou M., Christofidis D., Alexi X., Vagias C., Alexis M.N., Roussis V. - 5α,8α-Epidioxysterols from the gorgonian Eunicella cavolini and the ascidian Trididemnum inarmatum: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity. *Steroids*, 2009, **74** (1), 73–80.

Ittner L.M., Ke Y.D., Delerue F., Bi M., Gladbach A., van Eersel J., Wölfing H., Chieng B.C., Christie M.J., Napier I.A., Eckert A., Staufenbiel M., Hardeman E., Götz J. - Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 2010, **142** (3), 387–397.

Ivanisevic J., Pérez T., Ereskovsky A.V., Barnathan G., Thomas O.P. - Lysophospholipids in the mediterranean sponge *Oscarella tuberculata*: seasonal variability and putative biological role. *J Chem Ecol*, 2011, **37** (5), 537.

Ivanova E.P., Alexeeva Y.A., Zhukova N.V., Gorshkova N.M., Buljan V., Nicolau D.V., Mikhailov V.V., Christen R. - *Bacillus algicola* sp. nov., a novel filamentous organism isolated from brown alga *Fucus evanescens*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, **27** (3), 301–307.

Ivanova E.P., Vysotskii M.V., Svetashev V.I., Nedashkovskaya O.I., Gorshkova N.M., Mikhailov V.V., Yumoto N., Shigeri Y., Taguchi T., Yoshikawa S. - Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.*, 1999, **2** (4), 267–271.

Jensen P.R., Fenical W. - Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, **48**, 559–584.

Jensen P.R., Gontang E., Mafnas C., Mincer T.J., Fenical W. - Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 2005, **7** (7), 1039–1048.

Jensen P.R., Moore B.S., Fenical W. - The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Nat Prod Rep*, 2015, **32** (5), 738–751.

Jensen P.R., Williams P.G., Oh D.-C., Zeigler L., Fenical W. - Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (4), 1146–1152.

Jeong S.-Y., Ishida K., Ito Y., Okada S., Murakami M. - Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*, 2003, **44** (43), 8005–8007.

Justice J.N., Nambiar A.M., Tchkonia T., LeBrasseur N.K., Pascual R., Hashmi S.K., Prata L., Masternak M.M., Kritchevsky S.B., Musi N., Kirkland J.L. - Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 2019, **0** (0). Available at: https://www.ebiomedicine.com/article/S2352-3964(18)30629-7/fulltext [Accessed February 26, 2019].

Kaeberlein M., McVey M., Guarente L. - The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, 1999, **13** (19), 2570–2580.

Kamke J., Taylor M.W., Schmitt S. - Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *ISME J*, 2010, **4** (4), 498–508.

Kanoh K., Matsuo Y., Adachi K., Imagawa H., Nishizawa M., Shizuri Y. - Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *The Journal of Antibiotics*, 2005, **58** (4), 289–292.

Kasai H., Tamura T., Harayama S. - Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from gyrB-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50** (1), 127–134.

Kashman Y., Zviely M. - Furospongolide, a new C21 furanoterpene from a marine organism. *Experientia*, 1980, **36** (11), 1279–1279.

Kaufman A.C., Salazar S.V., Haas L.T., Yang J., Kostylev M.A., Jeng A.T., Robinson S.A., Gunther E.C., Van C.D., Nygaard H.B., Strittmatter S.M. - Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice. *Ann Neurol*, 2015, **77** (6), 953–971.

Kazlauskas R., Murphy P.T., Wells R.J. - A diketopiperazine derived from trichloroleucine from the sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Letters*, 1978, **19** (49), 4945–4948.

Kazlauskas R., Murphy P.T., Wells R.J. - Furodendin, a C22 degraded terpene from the sponge *Phyllospongia dendyi*. *Experientia*, 1980a, **36** (7), 814–815.

Kazlauskas R., Murphy P.T., Wells R.J. - Five new C26 tetracyclic terpenes from a sponge (*Lendenfeldia* sp.). *Aust. J. Chem.*, 1982, **35** (1), 51–59.

Kazlauskas R., Murphy P.T., Wells R.J., Daly J.J. - Terpenoid constituents from two *Phyllospongia* spp. *Aust. J. Chem.*, 1980b, **33** (8), 1783–1797.

Keck G.E., Poudel Y.B., Cummins T.J., Rudra A., Covel J.A. - Total synthesis of bryostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133** (4), 744–747.

Kelecom A. - Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2002, **74** (1), 151–170.

Kennedy B.K. *et al.* - Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, 2014, **159** (4), 709–713.

Kennedy B.K., Pennypacker J.K. - Drugs that modulate aging: the promising yet difficult path ahead. *Transl Res*, 2014, **163** (5), 456–465.

Keyzers R.A., Davies-Coleman M.T. - Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34** (4), 355–365.

Kielty C.M. - Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*, 2006, **8** (19), 1–23.

Kielty C.M., Sherratt M.J., Shuttleworth C.A. - Elastic fibres. *J. Cell Sci.*, 2002, **115** (14), 2817–2828.

Kim T.K., Garson M.J., Fuerst J.A. - Marine actinomycetes related to the "*Salinospora*" group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.*, 2005a, **7** (4), 509–518.

Kim T.K., Hewavitharana A.K., Shaw P.N., Fuerst J.A. - Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72** (3), 2118–2125.

Kim D.-S., Kim S.-Y., Park S.-H., Choi Y.-G., Kwon S.-B., Kim M.-K., Na J.-I., Youn S.-W., Park K.-C. - Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005b, **28** (12), 2216–2219.

Kim M., Morrison M., Yu Z. - Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods*, 2011, **84** (1), 81–87.

Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. - Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, **64** (Pt 2), 346–351.

Kind C.A., Bergmann W. - Contributions to the study of marine products. Xi. The occurrence of octadecyl alcohol, batyl alcohol, and cetyl palmitate in gorgonias [1]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1942, **07** (5), 424–427.

Kisselev A.F. - Joining the army of proteasome inhibitors. *Chemistry & Biology*, 2008, **15** (5), 419–421.

Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch P. - Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat Protoc*, 2010, **5** (3), 479–490.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. - Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41** (1), e1.

Kobayashi M., Chen Y.-J., Aoki S., In Y., Ishida T., Kitagawa I. - Four new β-carboline alkaloids isolated from two okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp. and *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, 1995, **51** (13), 3727–3736.

Kobayashi Junichi., Ishibashi Masami. - Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.*, 1993, **93** (5), 1753–1769.

König G.M., Kehraus S., Seibert S.F., Abdel-Lateff A., Müller D. - Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chembiochem*, 2006, **7** (2), 229–238.

Kornprobst J.-M. - Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies (2 vol.. inséparables). Lavoisier, 2005. Available at: https://www.decitre.fr/livres/substances-naturelles-d-origine-marine-chimiodiversite-pharmacodiversite-biotechnologies-2-vol-9782743007218.html [Accessed April 29, 2020].

Kubanek J., Jensen P.R., Keifer P.A., Sullards M.C., Collins D.O., Fenical W. - Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100** (12), 6916–6921.

Kunst F. *et al.* - The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390** (6657), 249–256.

Kwiatkowski N. *et al.* - Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature*, 2014, **511** (7511), 616–620.

Lam K.S. - Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006, **9** (3), 245–251.

Larkin J.M., Stokes J.L. - Taxonomy of psychrophilic strains of *Bacillus*. *J Bacteriol*, 1967, **94** (4), 889–895.

Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, **78** (3), 399–405.

Lee Y.M., Kim M.J., Li H., Zhang P., Bao B., Lee K.J., Jung J.H. - Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. *Mar Biotechnol*, 2013, **15** (5), 499–519.

Lee J.C., Park H.R., Park D.J., Lee H.B., Kim Y.B., Kim C.J. - Improved production of teicoplanin using adsorbent resin in fermentations. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **37** (3), 196–200.

Lee J., Wang W., Hong J., Lee C.-O., Shin S., Im K.S., Jung J.H. - A new 2,3-dimethyl butenolide from the brittle Star *Ophiomastix mixta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, **55** (3), 459–461.

Lerma J. - Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4** (6), 481–495.

Li X., Dobretsov S., Xu Y., Xiao X., Hung O.S., Qian P. - Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling*, 2007,. Available at: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927010600780771 [Accessed February 19, 2020].

Li Q., Wang G. - Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiological Research*, 2009, **164** (2), 233–241.

Li Y.-X., Wu H.-X., Xu Y., Shao C.-L., Wang C.-Y., Qian P.-Y. - Antifouling activity of secondary metabolites isolated from chinese marine organisms. *Mar. Biotechnol.*, 2013, **15** (5), 552–558.

Li S.-Q., Yang Y.-B., Yang X.-Q., Jiang Y., Li Z.-J., Li X.-Z., Chen X., Li Q.-L., Qin S.-H., Ding Z.-T. - Two new cyclic tetrapeptides of *Streptomyces rutgersensis* T009 isolated from *Elaphodus davidianus* excrement. *Helvetica Chimica Acta*, 2016, **99** (3), 210–214.

Li J., Zhao G.-Z., Long L.-J., Wang F.-Z., Tian X.-P., Zhang S., Li W.-J. - *Rhodococcus nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, **62** (Pt 10), 2517–2521.

Li L., Zhu H., Xu Q., Lin H., Lu Y. - *Micromonospora craniellae* sp. nov., isolated from a marine sponge, and reclassification of *Jishengella endophytica* as *Micromonospora*

endophytica comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, **69** (3), 715–720.

Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. - Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 2018, **13**, 757–772.

Lim S.-C., de Voogd N.J., Tan K.-S. - Biodiversity of shallow-water sponges (Porifera) in Singapore and description of a new species of *Forcepia* (Poecilosclerida: Coelosphaeridae). *Scopus*, 2012,. Available at: http://scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/116940 [Accessed March 15, 2019].

Lin W., Brauers G., Ebel R., Wray V., Berg A., Sudarsono, Proksch P. - Novel chromone derivatives from the fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the marine sponge *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod.*, 2003, **66** (1), 57–61.

Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. - Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2000, **289** (5487), 2126–2128.

Lin K., Yang P., Yang H., Liu A.-H., Yao L.-G., Guo Y.-W., Mao S.-C. - Lysophospholipids from the Guangxi sponge *Spirastrella purpurea*. *Lipids*, 2015, **50** (7), 697–703.

Liu X., Liu F., Liu S., Li H., Ling P., Zhu X. - Poly-γ-glutamate from *Bacillus subtilis* inhibits tyrosinase activity and melanogenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97** (22), 9801–9809.

Liu Y., Liu R., Mao S.-C., Morgan J.B., Jekabsons M.B., Zhou Y.-D., Nagle D.G. - Molecular-targeted antitumor agents. 19. Furospongolide from a marine *Lendenfeldia* sp. sponge inhibits hypoxia-inducible factor-1 activation in breast tumor cells. *J. Nat. Prod.*, 2008, **71** (11), 1854–1860.

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. *J. Nat. Prod.*, 2004, **67** (3), 472–474.

Liu M., Zhou Q., Wang J., Liu J., Qi C., Lai Y., Zhu H., Xue Y., Hu Z., Zhang Y. - Anti-inflammatory butenolide derivatives from the coral-derived fungus *Aspergillus terreus* and structure revisions of aspernolides D and G, butyrolactone VI and 4′,8″-diacetoxy butyrolactone VI. *RSC Adv.*, 2018, **8** (23), 13040–13047.

Longo V.D. *et al.* - Interventions to slow aging in humans: are we ready? *Aging Cell*, 2015, **14** (4), 497–510.

Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. - The hallmarks of aging. *Cell*, 2013, **153** (6), 1194–1217.

Louis P., Hold G.L., Flint H.J. - The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12** (10), 661–672.

Lurgi M., Thomas T., Wemheuer B., Webster N.S., Montoya J.M. - Modularity and predicted functions of the global sponge-microbiome network. *Nat Commun*, 2019, **10** (1), 1–12.

Luz Prieto M., O'Sullivan L., Tan S.P., McLoughlin P., Hughes H., O'Connor P.M., Cotter P.D., Lawlor P.G., Gardiner G.E. - Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Mar Drugs*, 2012, **10** (10), 2280–2299.

Ma K., Yang Y., Deng Z., de Voogd N.J., Proksch P., Lin W. - Two new bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, **5** (7), 1313–1320.

Magarvey N.A., Keller J.M., Bernan V., Dworkin M., Sherman D.H. - Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70** (12), 7520–7529.

Magnusson C.D., Haraldsson G.G. - Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids*, 2011, **164** (5), 315–340.

Magoč T., Salzberg S.L. - FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, **27** (21), 2957–2963.

Maiese W.M., Lechevalier M.P., Lechevalier H.A., Korshalla J., Goodman J., Wildey M.J., Kuck N., Greenstein M. - LL-E19085α, A novel antibiotic from *Micromonospora citrea*: taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot.*, 1989, **42** (6), 846–851.

Maldonado L.A., Fenical W., Jensen P.R., Kauffman C.A., Mincer T.J., Ward A.C., Bull A.T., Goodfellow M. - *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005a, **55** (Pt 5), 1759–1766.

Maldonado L.A., Stach J.E.M., Pathom-aree W., Ward A.C., Bull A.T., Goodfellow M. - Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005b, **87** (1), 11–18.

Manasanch E.E., Orlowski R.Z. - Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017, **14** (7), 417–433.

Manivasagan P., Kang K.-H., Sivakumar K., Li-Chan E.C.Y., Oh H.-M., Kim S.-K. - Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014a, **38** (1), 172–188.

Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.-K. - Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 2014b, **169** (4), 262–278.

Mansoor T.A., Bae B.H., Hong J., Lee C.-O., Im K.S., Jung J.H. - New fatty acid derivatives from *Homaxinella* sp., a marine sponge. *Lipids*, 2005, **40** (9), 981–985.

Marshall V.P., McWethy S.J., Sirotti J.M., Cialdella J.I. - The effect of neutral resins on the fermentation production of rubradirin. *J. Ind. Microbiol.*, 1990, **5** (5), 283–287.

Martins M.B., Carvalho I. - Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 2007, **63** (40), 9923–9932.

Martins A., Vieira H., Gaspar H., Santos S. - Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine Drugs*, 2014, **12** (2). Available at: http://www.mdpi.com/1660-3397/12/2/1066 [Accessed December 3, 2017].

Masoro E.J. - Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, **126** (9), 913–922.

Masuda T., Yamashita D., Takeda Y., Yonemori S. - Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69** (1), 197–201.

Matsunaga S., Fusetani N., Kato Y., Hirota H. - Aurantosides A and B: cytotoxic tetramic acid glycosides from the marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 9690–9692.

Matsuo Y., Kanoh K., Yamori T., Kasai H., Katsuta A., Adachi K., Shin-ya K., Shizuri Y. - Urukthapelstatin A, a novel cytotoxic substance from marine-derived *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542. *J Antibiot*, 2007, **60** (4), 251–255.

Matsuo Y., Katsuta A., Matsuda S., Shizuri Y., Yokota A., Kasai H. - *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of Thermoactinomycetaceae fam. nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 2006, **56** (12), 2837–2842.

Mcgovern T.M., Hellberg M.E. - Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographical variation in chemical defences in the bryozoan *Bugula neritina*. *Molecular Ecology*, 2003, **12** (5), 1207–1215.

McLeod M.P. *et al.* - The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, **103** (42), 15582–15587.

Mehbub M.F., Lei J., Franco C., Zhang W. - Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs*, 2014, **12** (8), 4539–4577.

Meimetis L.G., Williams D.E., Mawji N.R., Banuelos C.A., Lal A.A., Park J.J., Tien A.H., Fernandez J.G., de Voogd N.J., Sadar M.D., Andersen R.J. - Niphatenones, glycerol ethers from the sponge *Niphates digitalis* block androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cells: structure elucidation, synthesis, and biological activity. *J. Med. Chem.*, 2012, **55** (1), 503–514.

Menon V.V., Lele S.S. - Nutraceuticals and bioactive compounds from seafood processing waste. In : Springer Handbook of Marine Biotechnology. Springer Handbooks, ed. Se-Kwon Kim. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015, 1405–1425. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_65 [Accessed February 27, 2019].

Meyer M., Guyot M. - New sphingosines from the marine sponge *Grayella cyatophora*. *J. Nat. Prod.*, 2002, **65** (11), 1722–1723.

Michan S., Sinclair D. - Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007, **404** (1), 1–13.

Minato K., Gono M., Yamaguchi H., Kato Y., Osawa T. - Accumulation of *N* ε-(Hexanoyl)lysine, an oxidative stress biomarker, in rice seeds during storage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, **69** (9), 1806–1810.

Mitchell W. - Natural products from synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, **15** (4), 505–515.

Mizrahi-Man O., Davenport E.R., Gilad Y. - Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS One*, 2013, **8** (1). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538547/ [Accessed March 5, 2020].

Moitinho-Silva L., Bayer K., Cannistraci C.V., Giles E.C., Ryu T., Seridi L., Ravasi T., Hentschel U. - Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. *Molecular Ecology*, 2014, **23** (6), 1348–1363.

Moitinho-Silva L., Steinert G., Nielsen S., Hardoim C.C.P., Wu Y.-C., McCormack G.P., López-Legentil S., Marchant R., Webster N., Thomas T., Hentschel U. - Predicting the HMA-LMA status in marine sponges by machine learning. *Front Microbiol*, 2017, **8**. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421222/ [Accessed September 4, 2019].

Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L., Saludes J.P. - Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, **8** (1), 69–85.

Mondol M.A.M., Shin H.J., Islam M.T. - Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Mar Drugs*, 2013, **11** (8), 2846–2872.

Moolenaar W.H. - Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, **905** (1), 1–10.

Morgan D.O. - Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, **374** (6518), 131.

Morrison-Gardiner S. - Dominant fungi from australian coral reefs. *Fungal Diversity*, 2002, **9**, 105–121.

Morrow C., Cárdenas P. - Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Frontiers in Zoology*, 2015, **12**, 7.

Morrow C.C., Picton B.E., Erpenbeck D., Boury-Esnault N., Maggs C.A., Allcock A.L. - Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongiae: a new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongiae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2012, **62** (1), 174–190.

Most J., Tosti V., Redman L.M., Fontana L. - Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res. Rev.*, 2017, **39**, 36–45.

Mukku V.J.R.V., Speitling M., Laatsch H., Helmke E. - New butenolides from two marine *Streptomycetes*. *J. Nat. Prod.*, 2000, **63** (11), 1570–1572.

Müller W.E.G., Klemt M., Thakur N.L., Schröder H.C., Aiello A., D'Esposito M., Menna M., Fattorusso E. - Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Marine Biology*, 2004, **144** (1), 19–29.

Muroga Y., Yamada T., Numata A., Tanaka R. - Chaetomugilins I–O, new potent cytotoxic metabolites from a marine-fish-derived *Chaetomium* species. Stereochemistry and biological activities. *Tetrahedron*, 2009, **65** (36), 7580–7586.

Naim M.A., Smidt H., Sipkema D. - Fungi found in Mediterranean and North Sea sponges: how specific are they? *PeerJ*, 2017, **5**, e3722.

Nakagawa M., Hamamoto Y., Ishihama M., Hamasaki S., Endo M. - Pharmacologically active homosesterterpenes from palauan sponges. *Tetrahedron Letters*, 1987, **28** (4), 431–434.

Nedashkovskaya O.I., Van Trappen S., Frolova G.M., De Vos P. - *Bacillus berkeleyi* sp. nov., isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Arch. Microbiol.*, 2012, **194** (3), 215–221.

Newman D.J., Cragg G.M. - Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.*, 2004, **67** (8), 1216–1238.

Newman D.J., Cragg G.M. - Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 2016a, **79** (3), 629–661.

Newman D.J., Cragg G.M. - Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play." *Planta Med.*, 2016b, **82** (9–10), 775–789.

Newman D.J., Hill R.T. - New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **33** (7), 539–544.

Nguyen M.T.H.D., Thomas T. - Diversity, host-specificity and stability of sponge-associated fungal communities of co-occurring sponges. *PeerJ*, 2018, **6**, e4965.

Nguyen N.-P., Warnow T., Pop M., White B. - A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms Microbiomes*, 2016, **2** (1), 1–8.

Nieselt K. *et al.* - The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics*, 2010, **11** (1), 10.

Nigg E.A. - Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1996, **8** (3), 312–317.

Niggemann J., Bozko P., Bruns N., Wodtke A., Gieseler M.T., Thomas K., Jahns C., Nimtz M., Reupke I., Brüser T., Auling G., Malek N., Kalesse M. - Baceridin, a cyclic hexapeptide from an epiphytic *Bacillus* strain, inhibits the proteasome. *ChemBioChem*, 2014, **15** (7), 1021–1029.

Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., Larsson K.-H. - Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online*, 2008, **4**, 193–201.

Nishikawa Y., Furukawa A., Shiga I., Muroi Y., Ishii T., Hongo Y., Takahashi S., Sugawara T., Koshino H., Ohnishi M. - Cytoprotective effects of lysophospholipids from sea cucumber *Holothuria atra*. *PLOS ONE*, 2015, **10** (8), e0135701.

Norton R.S., Croft K.D., Wells R.J. - Polybrominated oxydiphenol derivatives from the sponge *Dysidea herbacea*: structure determination by analysis of 13C spin-lattice relaxation data for quaternary carbons and 13C-1H coupling constants. *Tetrahedron*, 1981, **37** (13), 2341–2349.

Nygaard H.B. *et al.* - A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 2015, **7** (1). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396171/ [Accessed February 15, 2019].

Nygaard H.B. - Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*, 2018, **83** (4), 369–376.

Nygaard H.B., van Dyck C.H., Strittmatter S.M. - Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 2014, **6** (1), 8.

Oda T., Liu H., Namikoshi M. - Effects of polybrominated diphenol ethers from a marine sponge *Phyllospongia dendyi* on Il-8 production in a PMA stimulated promyelocytic leukemia cell line. *Marine Drugs*, 2005, **3** (4), 119–125.

Oda Y., Zhang Q., Matsunaga S., Fujita M.J., Sakai R. - Two new mycosporine-like amino acids LC-343 and mycosporine-ethanolamine from the Micronesian marine sponge *Lendenfeldia chondrodes*. *Chem. Lett.*, 2017, **46**, 1272–1274.

Okami Y., Kurasawa S., Hirose Y. - A new glucanase produced by a marine *Bacillus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, **44** (5), 1191–1192.

Omura S., Sasaki Y., Iwai Y., Takeshima H. - Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J. Antibiot.*, 1995, **48** (7), 535–548.

Ortlepp S., Pedpradap S., Dobretsov S., Proksch P. - Antifouling activity of sponge-derived polybrominated diphenyl ethers and synthetic analogues. *Biofouling*, 2008, **24** (3), 201–208.

Othoum G. *et al.* - Comparative genomics study reveals Red Sea *Bacillus* with characteristics associated with potential microbial cell factories (MCFs). *Sci Rep*, 2019, **9** (1), 1–13.

Ovenden S.P.B., Nielson J.L., Liptrot C.H., Willis R.H., Tapiolas D.M., Wright A.D., Motti C.A. - A new diketopiperazine, cyclo-(4-*S*-hydroxy-*R*-proline-*R*-isoleucine), from an australian specimen of the sponge *Stelletta* sp. *Marine Drugs*, 2011, **9** (11), 2469–2478.

Pandey S., Sree A., Sethi D.P., Kumar C.G., Kakollu S., Chowdhury L., Dash S.S. - A marine sponge associated strain of *Bacillus subtilis* and other marine bacteria can produce anticholinesterase compounds. *Microb Cell Fact*, 2014, **13**, 24.

Parada A.E., Needham D.M., Fuhrman J.A. - Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.*, 2016, **18** (5), 1403–1414.

Park T., Mansoor T.A., Shinde P.B., Bao B., Hong J., Jung J.H. - New cerebrosides from a marine sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. *Chem. Pharm. Bull.*, 2009, **57** (1), 106–111.

Parvez S., Kang M., Chung H.-S., Bae H. - Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 2007, **21** (9), 805–816.

Parvez S., Kang M., Chung H.-S., Cho C., Hong M.-C., Shin M.-K., Bae H. - Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*, 2006, **20** (11), 921–934.

Patridge E., Gareiss P., Kinch M.S., Hoyer D. - An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today*, 2016, **21** (2), 204–207.

Pawlik J.R. - The chemical ecology of sponges on caribbean reefs: natural products shape natural systems. *BioScience*, 2011, **61** (11), 888–898.

Pawlik J.R., Chanas B., Toonen R.J., Fenical W. - Defenses of caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrency. *Marine Ecology Progress Series*, 1995, **127** (1/3), 183–194.

Penn K., Jenkins C., Nett M., Udwary D.W., Gontang E.A., McGlinchey R.P., Foster B., Lapidus A., Podell S., Allen E.E., Moore B.S., Jensen P.R. - Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. *ISME J*, 2009, **3** (10), 1193–1203.

Pettit G.R. - Marine animal and terrestrial plant anticancer constituents. *Pure and Applied Chemistry*, 1994, **66** (10–11), 2271–2281.

Phillips T., Chase M., Wagner S., Renzi C., Powell M., DeAngelo J., Michels P. - Use of in situ solid-phase adsorption in microbial natural product fermentation development. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **40** (5), 411–425.

Phongsopitanun W., Kudo T., Mori M., Shiomi K., Pittayakhajonwut P., Suwanborirux K., Tanasupawat S. - *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, **65** (12), 4417–4423.

Pickenhagen W., Dietrich P., Keil B., Polonsky J., Nouaille F., Lederer E. - Identification of the bitter principle of cocoa. *Helvetica Chimica Acta*, 1975, **58** (4), 1078–1086.

Piel J. - Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13** (1), 39–50.

Piel J. - Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep*, 2009, **26** (3), 338–362.

Piel J., Hui D., Fusetani N., Matsunaga S. - Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ. Microbiol.*, 2004a, **6** (9), 921–927.

Piel J., Hui D., Wen G., Butzke D., Platzer M., Fusetani N., Matsunaga S. - Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *PNAS*, 2004b, **101** (46), 16222–16227.

Pietra F. - Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Nat. Prod. Rep.*, 1997, **14** (5), 453–464.

Pillaiyar T., Namasivayam V., Manickam M., Jung S.-H. - Inhibitors of melanogenesis: an updated review. *J. Med. Chem.*, 2018, **61** (17), 7395–7418.

Podlesny E.E., Kozlowski M.C. - Structural reassignment of a marine metabolite from a binaphthalenetetrol to a tetrabrominated diphenyl ether. *J. Nat. Prod.*, 2012, **75** (6), 1125–1129.

Potts B.C., Faulkner D.J., Jacobs R.S. - Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. *J. Nat. Prod.*, 1992, **55** (12), 1701–1717.

Prado M.P., Torres Y.R., Berlinck R.G.S., Desiderá C., Sanchez M.A., Craveiro M.V., Hajdu E., da Rocha R.M., Machado-Santelli G.M. - Effects of marine organisms extracts on microtubule integrity and cell cycle progression in cultured cells. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, **313** (1), 125–137.

Prakasa Rao T.S., Sarma N.S., Murthy Y.L.N., Kantamreddi V.S.S.N., Wright C.W., Parameswaran P.S. - New polyhydroxy sterols from the marine sponge *Callyspongia fibrosa* (Ridley & Dendly). *Tetrahedron Letters*, 2010, **51** (27), 3583–3586.

Prakash K.R.C., Tang Y., Kozikowski A.P., Flippen-Anderson J.L., Knoblach S.M., Faden A.I. - Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, **10** (9), 3043–3048.

Prasad C. - Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 1995, **16** (1), 151–164.

Proksch P., Ebel R., Edrada R., Riebe F., Liu H., Diesel A., Bayer M., Li X., Lin W.H., Grebenyuk V., Müller W.E.G., Draeger S., Zuccaro A., Schulz B. - Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. *Botanica Marina*, 2008, **51** (3), 209–218.

Proksch P., Edrada R.A., Ebel R. - Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59** (2–3), 125–134.

Proksch P., Putz A., Ortlepp S., Kjer J., Bayer M. - Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. *Phytochem Rev*, 2010, **9** (4), 475–489.

Pugliese P.T., Jordan K., Cederberg H., Brohult J. - Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1998, **4** (1), 87–99.

Qian L., Zhang M., Wu S., Zhong Y., Van Tol E., Cai W. - Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes. *PLoS ONE*, 2014, **9** (4), e96207.

Quijano L., Cruz F., Navarrete I., Gómez P., Rios T. - Alkyl glycerol monoethers in the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids*, 1994, **29** (10), 731–734.

Radwan M.M., Manly S.P., Ross S.A. - Two new sulfated sterols from the marine sponge *Lendenfeldia dendyi*. *Nat. Prod. Commun.*, 2007, **2**, 901–904.

Radwan M.M., Wanas A.S., Fronczek F.R., Jacob M.R., Ross S.A. - Polybrominated diphenyl ethers from the marine organisms *Lendenfeldia dendyi* and *Sinularia dura* with anti-MRSa activity. *Med Chem Res*, 2015, **24** (9), 3398–3404.

Rao K.V., Donia M.S., Peng J., Garcia-Palomero E., Alonso D., Martinez A., Medina M., Franzblau S.G., Tekwani B.L., Khan S.I., Wahyuono S., Willett K.L., Hamann M.T. - Manzamine B and E and ircinal A related alkaloids from an indonesian *Acanthostrongylophora* sponge and their activity against infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases. *J. Nat. Prod.*, 2006, **69** (7), 1034–1040.

Rao Ch.B., Kalidindi R.S.H.S.N., Trimurtulu G., Rao D.V. - Metabolites of Porifera, Part III. New 24-methylscalaranes from *Phyllospongia dendyi* of the Indian Ocean. *J. Nat. Prod.*, 1991, **54** (2), 364–371.

Rateb M.E., Ebel R. - Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28** (2), 290–344.

Rath C.M. *et al.* - Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS Chem Biol*, 2011, **6** (11), 1244–1256.

Ray P.D., Huang B.-W., Tsuji Y. - Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2012, **24** (5), 981–990.

Redman L.M., Smith S.R., Burton J.H., Martin C.K., Il'yasova D., Ravussin E. - Metabolic slowing and reduced oxidative damage with sustained caloric restriction support the rate of living and oxidative damage theories of aging. *Cell Metabolism*, 2018, **27** (4), 805-815.e4.

Redmond N.E., Morrow C.C., Thacker R.W., Diaz M.C., Boury-Esnault N., Cárdenas P., Hajdu E., Lôbo-Hajdu G., Picton B.E., Pomponi S.A., Kayal E., Collins A.G. - Phylogeny and Systematics of Demospongiae in Light of New Small-Subunit Ribosomal DNA (18S) Sequences. *Integr Comp Biol*, 2013, **53** (3), 388–415.

Rennert B., Melzig M.F. - Free fatty acids inhibit the activity of *Clostridium histolyticum* collagenase and human neutrophil elastase. *Planta Med.*, 2002, **68** (9), 767–769.

Rey M.W. *et al.* - Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 2004, **5** (10), r77.

Ridley C.P., Bergquist P.R., Harper M.K., Faulkner D.J., Hooper J.N.A., Haygood M.G. - Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont, *Oscillatoria spongeliae*. *Chemistry & Biology*, 2005, **12** (3), 397–406.

Rinke C. *et al.* - Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, **499** (7459), 431–437.

Robert L., Jacob M.P., Frances C., Godeau G., Hornebeck W. - Interaction between elastin and elastases and its role in the aging of the arterial wall, skin and other connective tissues. A review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1984, **28** (2–3), 155–166.

Robinson T., Singh D., Nigam P. - Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55** (3), 284–289.

Roffler S.R., Blanch H.W., Wilke C.R. - *In situ* recovery of fermentation products. *Trends in Biotechnology*, 1984, **2** (5), 129–136.

Rogina B., Helfand S.L. - Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *PNAS*, 2004, **101** (45), 15998–16003.

Romano S., Jackson S.A., Patry S., Dobson A.D.W. - Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar Drugs*, 2018, **16** (7).

Romero F., Espliego F., Pérez Baz J., García de Quesada T., Grávalos D., de la Calle F., Fernández-Puentes J.L. - Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.*, 1997, **50** (9), 734–737.

Roy R., Adamczewski J.P., Seroz T., Vermeulen W., Tassan J.P., Schaeffer L., Nigg E.A., Hoeijmakers J.H., Egly J.M. - The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell*, 1994, **79** (6), 1093–1101.

Różanowska M., Sarna T., Land E.J., Truscott T.G. - Free radical scavenging properties of melanin: interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **26** (5), 518–525.

Rua C.P.J., Gregoracci G.B., Santos E.O., Soares A.C., Francini-Filho R.B., Thompson F. - Potential metabolic strategies of widely distributed holobionts in the oceanic archipelago of St Peter and St Paul (Brazil). *FEMS Microbiol Ecol*, 2015, **91** (6). Available at: https://academic.oup.com/femsec/article/91/6/fiv043/2594552 [Accessed January 19, 2018].

Rüger H.J., Fritze D., Spröer C. - New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50** (3), 1305–1313.

Safayhi H., Rall B., Sailer E.R., Ammon H.P. - Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, **281** (1), 460–463.

Saito Y.D., Jensen A.R., Salgia R., Posadas E.M. - Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer*, 2010, **116** (7), 1629–1637.

Sakai R., Kamiya H. - 1-Deoxynojirimycin derivatives from the marine sponge *Lendenfeldia chondrodes*. *J Antibiot*, 2006, **59** (8), 507–511.

Sakai R., Kamiya H., Murata M., Shimamoto K. - Dysiherbaine: a new neurotoxic amino acid from the micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119** (18), 4112–4116.

Sakai R., Koike T., Sasaki M., Shimamoto K., Oiwa C., Yano A., Suzuki K., Tachibana K., Kamiya H. - Isolation, structure determination, and synthesis of neodysiherbaine A, a new excitatory amino acid from a marine sponge. *Org. Lett.*, 2001, **3** (10), 1479–1482.

Sakai R., Oiwa C., Takaishi K., Kamiya H., Tagawa M. - Dysibetaine: a new α,α-disubstituted α-amino acid derivative from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Letters*, 1999, **40** (38), 6941–6944.

Sakai R., Suzuki K., Shimamoto K., Kamiya H. - Novel betaines from a micronesian sponge *Dysidea herbacea*. *J. Org. Chem.*, 2004, **69** (4), 1180–1185.

Sakai R., Yoshida K., Kimura A., Koike K., Jimbo M., Koike K., Kobiyama A., Kamiya H. - Cellular origin of dysiherbaine, an excitatory amino acid derived from a marine sponge. *ChemBioChem*, 2008, **9** (4), 543–551.

Saleem M., Nazir M. - Chapter 9 - Bioactive natural products from marine-derived fungi: an update. In : Studies in Natural Products Chemistry. ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier, 2015, 297–361. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634733000095 [Accessed December 9, 2018].

Samson R. - Food and indoor fungi. Second edition., Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht The Netherlands, 2019.

Sartor L., Pezzato E., Garbisa S. - (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, **71** (1), 73–79.

Sathiyanarayanan G., Saibaba G., Seghal Kiran G., Selvin J. - Process optimization and production of polyhydroxybutyrate using palm jaggery as economical carbon source by marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* MSBN12. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013, **36** (12), 1817–1827.

Schenone S., Brullo C., Musumeci F., Biava M., Falchi F., Botta M. - Fyn kinase in brain diseases and cancer: the search for inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 2011, **18** (19), 2921–2942.

Schmidt E.W., Bewley C.A., Faulkner D.J. - Theopalauamide, a bicyclic glycopeptide from filamentous bacterial symbionts of the lithistid sponge *Theonella swinhoei* from Palau and Mozambique. *J. Org. Chem.*, 1998, **63** (4), 1254–1258.

Schmidt M., Finley D. - Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2014, **1843** (1), 13–25.

Schmidt E.W., Harper M.K., Faulkner D.J. - Mozamides A and B, cyclic peptides from a theonellid sponge from Mozambique. *J. Nat. Prod.*, 1997, **60** (8), 779–782.

Schmidtz F.J., Vanderah D.J., Hollenbeak K.H., Enwall C.E.L., Gopichand Y., SenGupta P.K., Hossain M.B., Van der Helm D. - Metabolites from the marine sponge *Tedania ignis*. A new atisanediol and several known diketopiperazines. *J. Org. Chem.*, 1983, **48** (22), 3941–3945.

Schmitt S., Tsai P., Bell J., Fromont J., Ilan M., Lindquist N., Perez T., Rodrigo A., Schupp P.J., Vacelet J., Webster N., Hentschel U., Taylor M.W. - Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J*, 2012, **6** (3), 564–576.

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Consortium F.B. - Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 2012, **109** (16), 6241–6246.

Sera Y., Adachi K., Shizuri Y. - A new epidioxy sterol as an antifouling substance from a palauan marine sponge, *Lendenfeldia chondrodes*. *J. Nat. Prod.*, 1999, **62** (1), 152–154.

Sevastou I., Kaffe E., Mouratis M.-A., Aidinis V. - Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1831** (1), 42–60.

Shannon C.E. - A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 1948, **27** (3), 379–423.

Sherratt M.J. - Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordr)*, 2009, **31** (4), 305–325.

Shi H., Yu S., Liu D., van Ofwegen L., Proksch P., Lin W. - Sinularones A-I, new cyclopentenone and butenolide derivatives from a marine soft coral *Sinularia* sp. and their antifouling activity. *Mar Drugs*, 2012, **10** (6), 1331–1344.

Shin B.A., Kim Y.R., Lee I.-S., Sung C.K., Hong J., Sim C.J., Im K.S., Jung J.H. - Lyso-PAF Analogues and Lysophosphatidylcholines from the Marine Sponge Spirastrella abata as Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, 1999, **62** (11), 1554–1557.

Siedle B., Hrenn A., Merfort I. - Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Med.*, 2007, **73** (5), 401–420.

Silva M.M. da, Andrade M. dos S., Bauermeister A., Merfa M.V., Forim M.R., Fernandes J.B., Vieira P.C., Silva M.F. das G.F. da, Lopes N.P., Machado M.A., Souza A.A. de - A simple defined medium for the production of true diketopiperazines in *Xylella fastidiosa* and their identification by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Molecules*, 2017, **22** (6), 985.

Simister R.L., Deines P., Botté E.S., Webster N.S., Taylor M.W. - Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ. Microbiol.*, 2012, **14** (2), 517–524.

Simister R.L., Schmitt S., Taylor M.W. - Evaluating methods for the preservation and extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, **397** (1), 38–43.

Simmons T.L., Coates R.C., Clark B.R., Engene N., Gonzalez D., Esquenazi E., Dorrestein P.C., Gerwick W.H. - Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, **105** (12), 4587–4594.

Sinclair L., Osman O.A., Bertilsson S., Eiler A. - Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the Illumina platform. *PLOS ONE*, 2015, **10** (2), e0116955.

Smith G.M., Djerassi C. - Phospholipid studies of marine organisms: 14. Ether lipids of the sponge *Tethya aurantia*. *Lipids*, 1987, **22** (4), 236–240.

Socha A.M., Long R.A., Rowley D.C. - Bacillamides from a hypersaline microbial mat bacterium. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70** (11), 1793–1795.

Soest R.W.M.V., Erpenbeck D., Alvarez B. - Family Dictyonellidae Van Soest, Diaz & Pomponi, 1990. In : Systema Porifera. Springer, Boston, MA, 2002, 773–786. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-0747-5_83 [Accessed September 11, 2017].

Souza D.T., Silva F.S.P. da, Silva L.J. da, Crevelin E.J., Moraes L.A.B., Zucchi T.D., Melo I.S. - *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the marine sponge *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, **67** (6), 2019–2025.

Starcher B., O'Neal P., Granstein R.D., Beissert S. - Inhibition of neutrophil elastase suppresses the development of skin tumors in hairless mice. *J. Invest. Dermatol.*, 1996, **107** (2), 159–163.

Stark T., Hofmann T. - Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (Theobroma cacao). *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53** (18), 7222–7231.

Stein T. - *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, 2005, **56** (4), 845–857.

Steinert G., Taylor M.W., Deines P., Simister R.L., Voogd N.J. de, Hoggard M., Schupp P.J. - In four shallow and mesophotic tropical reef sponges from Guam the microbial community largely depends on host identity. *PeerJ*, 2016, **4**, e1936.

Stoffels G., Sahl H.-G., Gudmundsdóttir Á. - Carnocin U149, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various Gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, **20** (4), 199–210.

Subramani R., Aalbersberg W. - Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 2012, **167** (10), 571–580.

Subramani R., Aalbersberg W. - Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97** (21), 9291–9321.

Subramani R., Sipkema D. - Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs*, 2019, **17** (5), 249.

Sudek S., Lopanik N.B., Waggoner L.E., Hildebrand M., Anderson C., Liu H., Patel A., Sherman D.H., Haygood M.G. - Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J. Nat. Prod.*, 2007, **70** (1), 67–74.

Sugiura T., Fukuda T., Miyamoto T., Waku K. - Distribution of alkyl and alkenyl ether-linked phospholipids and platelet-activating factor-like lipid in various species of invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1126** (3), 298–308.

Suleria H.A.R., Osborne S., Masci P., Gobe G. - Marine-based nutraceuticals: an innovative trend in the food and supplement industries. *Mar Drugs*, 2015, **13** (10), 6336–6351.

Sun Y., Liu J., Li L., Gong C., Wang S., Yang F., Hua H., Lin H. - New butenolide derivatives from the marine sponge-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018, **28** (3), 315–318.

Sun X.-P., Xu Y., Cao F., Xu R.-F., Zhang X.-L., Wang C.-Y. - Isoechinulin-type alkaloids from a soft coral-derived fungus *Nigrospora oryzae*. *Chem Nat Compd*, 2014, **50** (6), 1153–1155.

Sun Z., Yang P. - Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.*, 2004, **5** (3), 182–190.

Tabares P., Pimentel-Elardo S.M., Schirmeister T., Hünig T., Hentschel U. - Anti-protease and immunomodulatory activities of bacteria associated with caribbean sponges. *Mar Biotechnol*, 2011, **13** (5), 883–892.

Tareq F.S., Kim J.H., Lee M.A., Lee H.-S., Lee Y.-J., Lee J.S., Shin H.J. - Ieodoglucomides A and B from a marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis*. *Org. Lett.*, 2012, **14** (6), 1464–1467.

Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. - Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007, **71** (2), 295–347.

Teicher B.A., Tomaszewski J.E. - Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 2015, **96** (1), 1–9.

Teta R., Marteinsson V.T., Longeon A., Klonowski A.M., Groben R., Bourguet-Kondracki M.-L., Costantino V., Mangoni A. - Thermoactinoamide A, an antibiotic lipophilic cyclopeptide from the icelandic thermophilic bacterium *Thermoactinomyces vulgaris*. *J. Nat. Prod.*, 2017, **80** (9), 2530–2535.

Thomas T. *et al.* - Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 11870.

Thomas T.R.A., Kavlekar D.P., LokaBharathi P.A. - Marine drugs from sponge-microbe association—a review. *Mar Drugs*, 2010, **8** (4), 1417–1468.

Thring T.S.A., Hili P., Naughton D.P. - Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med*, 2009, **9**, 27.

Tinto W., Layne T. - A butenolide from the marine sponge *Callyspongia vaginalis*. *Heterocycles*, 2006, **68**.

Tissenbaum H.A., Guarente L. - Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2001, **410** (6825), 227–230.

Tiwari K., Gupta R.K. - Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2012, **32** (2), 108–132.

Torkhovskaya T.I., Ipatova O.M., Zakharova T.S., Kochetova M.M., Khalilov E.M. - Lysophospholipid receptors in cell signaling. *Biochemistry Mosc.*, 2007, **72** (2), 125–131.

Trischman J.A., Jensen P.R., Fenical W. - Halobacillin: A cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Letters*, 1994, **35** (31), 5571–5574.

Tsuji N., Moriwaki S., Suzuki Y., Takema Y., Imokawa G. - The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.*, 2001, **74** (2), 283–290.

Tsukahara K., Takema Y., Moriwaki S., Tsuji N., Suzuki Y., Fujimura T., Imokawa G. - Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J. Invest. Dermatol.*, 2001, **117** (3), 671–677.

Tuomisto H. - A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. *Oecologia*, 2010, **164** (4), 853–860.

Udwary D.W., Zeigler L., Asolkar R.N., Singan V., Lapidus A., Fenical W., Jensen P.R., Moore B.S. - Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS*, 2007, **104** (25), 10376–10381.

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. - New polybrominated diphenyl ether from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Chem Nat Compd*, 2006, **42** (5), 606–607.

Van Kiem P. *et al.* - New butenolide and pentenolide from *Dysidea cinerea*. *Nat Prod Commun*, 2013, **8** (12), 1751–1752.

VanWagenen B.C., Larsen R., Cardellina J.H., Randazzo D., Lidert Z.C., Swithenbank C. - Ulosantoin, a potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*. *J. Org. Chem.*, 1993, **58** (2), 335–337.

Vicente J., Stewart A., Song B., Hill R.T., Wright J.L. - Biodiversity of actinomycetes associated with caribbean sponges and their potential for natural product discovery. *Mar. Biotechnol.*, 2013, **15** (4), 413–424.

Vicente J., Stewart A.K., van Wagoner R.M., Elliott E., Bourdelais A.J., Wright J.L.C. - Monacyclinones, New Angucyclinone Metabolites Isolated from Streptomyces sp. M7_15 Associated with the Puerto Rican Sponge Scopalina ruetzleri. *Mar Drugs*, 2015, **13** (8), 4682–4700.

Vignaroli C., Luna G.M., Rinaldi C., Di Cesare A., Danovaro R., Biavasco F. - New sequence types and multidrug resistance among pathogenic *Escherichia coli* isolates from coastal marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78** (11), 3916–3922.

Villalba J.M., Alcaín F.J. - Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*, 2012, **38** (5), 349–359.

Voogd N.J. de, Gauvin-Bialecki A., Polónia A.R.M., Cleary D.F.R. - Assessing the bacterial communities of sponges inhabiting the remote western Indian Ocean island of Mayotte. *Marine Ecology*, 2018, **39** (6). Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/maec.12517 [Accessed December 2, 2019].

Wang G. - Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **33** (7), 545–551.

Wang C. *et al.* - Anti-mycobacterial activity of marine fungus-derived 4-deoxybostrycin and nigrosporin. *Molecules*, 2013, **18** (2), 1728–1740.

Wang M. *et al.* - Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 2016, **34** (8), 828–837.

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. - Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007a, **73** (16), 5261–5267.

Wang P., Kong F., Wei J., Wang Y., Wang W., Hong K., Zhu W. - Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. *Marine Drugs*, 2014, **12** (1), 477–490.

Wang L.-T., Lee F.-L., Tai C.-J., Kasai H. - Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007b, **57** (Pt 8), 1846–1850.

Wang G., Li Q., Zhu P. - Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, **93** (1–2), 163–174.

Wang W., Liao Y., Chen R., Hou Y., Ke W., Zhang B., Gao M., Shao Z., Chen J., Li F. - Chlorinated azaphilone pigments with antimicrobial and cytotoxic activities isolated from the deep sea derived fungus *Chaetomium* sp. NA-S01-R1. *Marine Drugs*, 2018, **16** (2), 61.

Wang M., Liu F., Crous P.W., Cai L. - Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia*, 2017, **39**, 118–142.

Warhurst A.M., Fewson C.A. - Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1994, **14** (1), 29–73.

Warr G.A., Veitch J.A., Walsh A.W., Hesler G.A., Pirnik D.M., Leet J.E., Lin P.F., Medina I.A., McBrien K.D., Forenza S., Clark J.M., Lam K.S. - BMS-182123, a fungal metabolite that inhibits the production of TNF-alpha by macrophages and monocytes. *J. Antibiot.*, 1996, **49** (3), 234–240.

Waters A.L., Peraud O., Kasanah N., Sims J.W., Kothalawala N., Anderson M.A., Abbas S.H., Rao K.V., Jupally V.R., Kelly M., Dass A., Hill R.T., Hamann M.T. - An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Front Mar Sci*, 2014, **1**. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5076551/ [Accessed June 28, 2018].

Watschinger K., Werner E.R. - Orphan enzymes in ether lipid metabolism. *Biochimie*, 2013, **95** (1), 59–65.

Webster N.S., Hill R.T. - The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α-Proteobacterium. *Marine Biology*, 2001, **138** (4), 843–851.

Webster N.S., Taylor M.W. - Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ. Microbiol.*, 2012, **14** (2), 335–346.

Wedel S., Manola M., Cavinato M., Trougakos I.P., Jansen-Dürr P. - Targeting protein quality control mechanisms by natural products to promote healthy ageing. *Molecules*, 2018, **23** (5).

Wender P.A., Hardman C.T., Ho S., Jeffreys M.S., Maclaren J.K., Quiroz R.V., Ryckbosch S.M., Shimizu A.J., Sloane J.L., Stevens M.C. - Scalable synthesis of bryostatin 1 and analogs, adjuvant leads against latent HIV. *Science*, 2017, **358** (6360), 218–223.

Werb Z., Banda M.J., McKerrow J.H., Sandhaus R.A. - Elastases and elastin degradation. *J. Invest. Dermatol.*, 1982, **79 Suppl 1**, 154s–159s.

Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R., Imhoff J.F. - Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Mar Drugs*, 2011, **9** (4), 561–585.

Woo E.J., Starks C.M., Carney J.R., Arslanian R., Cadapan L., Zavala S., Licari P. - Migrastatin and a new compound, isomigrastatin, from *Streptomyces platensis*. *J. Antibiot.*, 2002, **55** (2), 141–146.

Woodhouse J.N., Fan L., Brown M.V., Thomas T., Neilan B.A. - Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. *ISME J*, 2013, **7** (9), 1842–1851.

Xia X., Li Q., Li J., Shao C., Zhang J., Zhang Y., Liu X., Lin Y., Liu C., She Z. - Two new derivatives of griseofulvin from the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. (strain no. 1403) from *Kandelia candel* (l.) druce. *Planta Med*, 2011, **77** (15), 1735–1738.

Xie C.-L., Xia J.-M., Wang J.-S., Lin D.-H., Yang X.-W., Xie C.-L., Xia J.-M., Wang J.-S., Lin D.-H., Yang X.-W. - Metabolomic investigations on *Nesterenkonia flava* revealed significant differences between marine and terrestrial actinomycetes. *Marine Drugs*, 2018, **16** (10), 356.

Xu M. *et al.* - Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*, 2018, **24** (8), 1246.

Xu Y., He H., Schulz S., Liu X., Fusetani N., Xiong H., Xiao X., Qian P.-Y. - Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresour. Technol.*, 2010, **101** (4), 1331–1336.

Xu Y., Johnson R.K., Hecht S.M. - Polybrominated diphenyl ethers from a sponge of the *Dysidea* genus that inhibit Tie2 kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, **13** (3), 657–659.

Yadav P.P., Arora A., Bid H.K., Konwar R.R., Kanojiya S. - New cassane butenolide hemiketal diterpenes from the marine creeper *Caesalpinia bonduc* and their antiproliferative activity. *Tetrahedron Letters*, 2007, **48** (40), 7194–7198.

Yamada T., Muroga Y., Jinno M., Kajimoto T., Usami Y., Numata A., Tanaka R. - New class azaphilone produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*. The stereochemistry and biological activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **19** (13), 4106–4113.

Yang B., Dong J., Zhou X., Yang X., Lee K.J., Wang L., Zhang S., Liu Y. - Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* species. *Helvetica Chimica Acta*, 2009, **92** (6), 1112–1117.

Yang B., Wang Y., Qian P.-Y. - Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 2016, **17**. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4802574/ [Accessed November 28, 2019].

Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.-H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. - Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, **12** (9), 635–645.

Yasukawa K., Akihisa T., Kanno H., Kaminaga T., Izumida M., Sakoh T., Tamura T., Takido M. - Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1996, **19** (4), 573–576.

Yilmaz P., Yarza P., Rapp J.Z., Glöckner F.O. - Expanding the world of marine bacterial and archaeal clades. *Front Microbiol*, 2016, **6**. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705458/ [Accessed August 20, 2019].

Yoon S.-H., Ha S.-M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. - Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, **67** (5), 1613–1617.

Yoon J.H., Lee K.C., Weiss N., Kho Y.H., Kang K.H., Park Y.H. - *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51** (3), 1079–1086.

Yousefzadeh M.J. *et al.* - Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 2018,.

Youssef N., Sheik C.S., Krumholz L.R., Najar F.Z., Roe B.A., Elshahed M.S. - Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75** (16), 5227–5236.

Yuille S., Reichardt N., Panda S., Dunbar H., Mulder I.E. - Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors *in vitro* through production of butyric acid and valeric acid. *PLoS One*, 2018, **13** (7). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6063406/ [Accessed April 5, 2020].

Zhang J., Ding X., Guan R., Zhu C., Xu C., Zhu B., Zhang H., Xiong Z., Xue Y., Tu J., Lu Z. - Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment*, 2018, **618**, 1254–1267.

Zhang P., Li X.-M., Wang J.-N., Li X., Wang B.-G. - New butenolide derivatives from the marine-derived fungus *Paecilomyces variotii* with DPPH radical scavenging activity. *Phytochemistry Letters*, 2015, **11**, 85–88.

Zhang Z., Min X., Huang J., Zhong Y., Wu Y., Li X., Deng Y., Jiang Z., Shao Z., Zhang L., He F. - Cytoglobosins H and I, new antiproliferative cytochalasans from deep-sea-derived fungus *Chaetomium globosum*. *Mar Drugs*, 2016, **14** (12). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192470/ [Accessed April 27, 2020].

Zhang H., Skildum A., Stromquist E., Rose-Hellekant T., Chang L.C. - Bioactive polybrominated diphenyl ethers from the marine sponge *Dysidea* sp. *J. Nat. Prod.*, 2008, **71** (2), 262–264.

Zhang J., Wang J., Fang C., Song F., Xin Y., Qu L., Ding K. - *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, **60** (12), 2924–2929.

Zhao Q., Mansoor T.A., Hong J., Lee C.-O., Im K.S., Lee D.S., Jung J.H. - New lysophosphatidylcholines and monoglycerides from the marine sponge *Stelletta* sp. *J. Nat. Prod.*, 2003, **66** (5), 725–728.

Zhu X., Rottkamp C.A., Raina A.K., Brewer G.J., Ghanbari H.A., Boux H., Smith M.A. - Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 2000, **21** (6), 807–813.

Ziemert N., Alanjary M., Weber T. - The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports*, 2016, **33** (8), 988–1005.

Zobell C.E. - Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal Of Marine Research*, 1941, 35.

Sites Internet

https://bacterio.net/

https://gnps.ucsd.edu

http://www.chemcalc.org/

http://pubs.rsc.org/marinlit/

http://dnp.chemnetbase.com/

https://metlin.scripps.edu/

http://www.lipidmaps.org/

http://greengenes.secondgenome.com/

https://rdp.cme.msu.edu/

https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov

https://www.ezbiocloud.net/

https://www.who.int/

http://globenewswire.com

https://www.researchandmarkets.com

https://www.persistencemarketresearch.com

https://www.loreal-finance.com

https://www.transparencymarketresearch.com

https://obis.org

http://www.marinespecies.org

https://clinicaltrials.gov/ct2/home

https://github.com/oolonek/ISDB

http://www.aires-marines.fr

Liste des figures

Figure 1 : Sites de collecte des invertébrés marins. 31
Figure 2 : Profils CLHP-CAD du groupe 1. 47
Figure 3 : Profils CLHP-CAD du groupe 2. 49
Figure 4 : Profils CLHP-CAD du groupe 3. 50
Figure 5 : Profils CLHP-CAD du groupe 4. 51
Figure 6: Distribution géographique des éponges du genre *Lendenfeldia*. 59
Figure 7 : Photographies associées aux éponges du genre *Lendenfeldia*. 60
Figure 8 : Fractionnement de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. pour l'isolement des composés **LS1** à **LS6**. 74
Figure 9 : Structures types des PBDE dérivés d'éponges [Calcul *et al.*, 2009]. 75
Figure 10 : Structures des polybromodiphényléthers isolés de l'extrait brut de *Lendenfeldia* sp. (ML-240). 76
Figure 11 : Corrélations RMN 2D clés des métabolites **LS1** et **LS3**. 78
Figure 12 : Corrélations RMN ^{2}D clés des métabolites **LS2** et **LS4**. 80
Figure 13 : Corrélations RMN ^{2}D clés du métabolite **LS5**. 82
Figure 14 : Corrélations RMN ^{2}D clés du métabolite **LS6**. 83
Figure 15 : Distribution géographique des éponges du genre *Scopalina*. 91
Figure 16 : Photographies associées aux éponges du genre *Scopalina*. 94
Figure 17 : Profil chromatographique des extraits bruts des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* obtenus par CLUHP-QqToF-SM en mode positif. 99
Figure 18 : Réseau moléculaire généré sur la plateforme GNPS, à partir de l'analyse par CLUHP-SM/SM des extraits bruts de 3 spécimens de *Scopalina hapalia*. 101
Figure 19 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 1. 103
Figure 20 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 2. 105
Figure 21 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 3. 106
Figure 22 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 4. 107
Figure 23 : Proposition d'analogues structuraux pour le cluster 11. 108
Figure 24 : Proposition d'analogues structuraux pour les nœuds « non-clusterisés ». 109
Figure 25 : Fractionnement de l'extrait brut de *Scopalina hapalia* pour l'isolement des métabolites **SH1** à **SH9** et **SH12**. 112
Figure 26 : Fractionnement de l'extrait brut de *Scopalina hapalia* pour l'isolement des métabolites **SH10**, **SH11**, **SH13** et **SH14**. 113
Figure 27 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 624,4. 115
Figure 28 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH1**. 117
Figure 29 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 510,4. 118
Figure 30 : Corrélations RMN 2D clés du métabolite **SH2**. 119
Figure 31 : Spectre de masse SM/SM de l'ion *m/z* 498,3. 122
Figure 32 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH6**. 125
Figure 33 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH11**. 130
Figure 34 : Corrélation RMN 2D clés du métabolite **SH12**. 132
Figure 35: Distribution phylogénétique des bactéries associées aux éponges 151

Figure 36 : Arbre phylogénétique, construit avec la méthode "maximum de vraisemblance", des genres d'actinomycètes associés aux éponges [Abdelmohsen *et al.*, 2014]. 153
Figure 37 : Observation au microscope électronique en transmission du mésohyle de spécimens de *Scopalina.* 160
Figure 38 : Structure schématique de l'ARNr 16S avec présentation des régions ciblées pour l'affiliation taxonomique des bactéries associées à *Scopalina hapalia*. 166
Figure 39 : Courbes de raréfaction basées sur l'indice de Shannon pour les échantillons ADNg-Qiagen, ADNg-CTAB et Contrôle-Q (contrôle d'extraction avec le kit Qiagen) en fonction d'un nombre croissant de séquences (rapport Genoscreen). 168
Figure 40 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V1-V3 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB). 173
Figure 41 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V1-V3 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 174
Figure 42 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V3-V4 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB). 176
Figure 43 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V3-V4 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 177
Figure 44 : Affiliation taxonomique au niveau du phylum après séquençage de la région V4-V5 de l'ARNr 16S obtenues des ADNg de *Scopalina hapalia*, extraits au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB). 179
Figure 45 : Comparaison des 10 genres les plus abondants détectés par le séquençage de la région V4-V5 (ADNg-Qiagen / ADNg-CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 180
Figure 46 : Distribution par types microbiens des 124 isolats cultivés à partir de l'éponge *Scopalina hapalia*..... 189
Figure 47 : Actinomycètes putatifs SH-104 et SH-120a sur leurs milieux de culture respectifs PDA et A1BFe+c. 189
Figure 48 : Distribution taxonomique, au niveau du genre, des 26 isolats bactériens isolés à partir de l'éponge *Scopalina hapalia*. 192
Figure 49 : Souches appartenant à la famille des *Thermoactynomycetaceae* SH-32 et SH-39 sur deux milieux de culture différents : A1 (A1BFe+c) et MBA..... 194
Figure 1 : Rapport de pureté pour un échantillon d'ADN. 258
Figure 2 : Schéma de la séquence de l'ADNr 16S avec la position des paires d'amorces correspondant respectivement aux régions V1-V3 (séquence 1) et V3-5 (séquence 2)..... 263

Liste des tableaux

Tableau I : Synthèse des cibles biologiques sélectionnées. 39
Tableau II : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de l'élastase. 40
Tableau III : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la tyrosinase. 41
Tableau IV : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la Fyn kinase. 42
Tableau V : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice de la protéine CDK7. 43
Tableau VI : Liste des éponges sélectionnées (par ordre alphabétique) pour leur activité inhibitrice du protéasome. 44
Tableau VII : Nombre de publications et de composés isolés référencés dans la base de données MarinLit pour les 13 genres recensés (26/02/2020). 52
Tableau VIII : Synthèse des résultats issus des criblages chimique et biologique ainsi que des données de la littérature 54
Tableau IX : Sesterterpènes de type scalarane isolés d'éponges du genre *Lendenfeldia*. 62
Tableau X : Furanoterpènes isolés d'éponges du genre *Lendenfeldia*. 65
Tableau XI : PBDE isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*. 66
Tableau XII : Composés stéroïdiens isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*. 70
Tableau XIII : Dérivés d'acides aminés et autres métabolites isolés des éponges du genre *Lendenfeldia*. 72
Tableau XIV : Déplacements chimiques caractéristiques des cycles A et B de PBDE connus dérivés d'éponges (Calcul *et al.*, 2009). 75
Tableau XV : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS1** et **LS3** (CD_3OD). 78
Tableau XVI : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS2** et **LS4** (CD_3OD). 80
Tableau XVII : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS5** enregistrées dans CD_3OD. 82
Tableau XVIII : Données de la RMN ^{1}D et ^{2}D pour **LS6** (CD_3OD). 84
Tableau XIX : Activité inhibitrice (CI_{50}) de FynB des composés **LS1** à **LS6**. 85
Tableau XX : Activité inhibitrice (CI_{50}) de CDK7 des composés **LS1** à **LS6**. 85
Tableau XXI : Activité inhibitrice du protéasome des composés **LS1** à **LS6** 86
Tableau XXII : Activités biologiques référencées dans la littérature pour les composés **LS1** à **LS5**. 87
Tableau XXIII : Composés isolés de l'espèce *Scopalina ruetzleri* (anciennement *Ulosa ruetzleri*). 96
Tableau XXIV : Présentation des 3 spécimens de *Scopalina hapalia* collectés à Mayotte (2013). 98
Tableau XXV : Annotation des nœuds du cluster 1. 102
Tableau XXVI : Annotation des nœuds du cluster 2. 104
Tableau XXVII : Annotation des nœuds du cluster 3. 106
Tableau XXVIII : Annotation des nœuds du cluster 4. 107
Tableau XXIX : Annotation des nœuds du cluster 11. 108

Tableau XXX : Annotation de nœuds « non-clusterisés ». 109
Tableau XXXI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH1** (CD_3OD). 117
Tableau XXXII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du 1-*O*-Octadécyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine [Shin *et al.*, 1999] avec ceux observés pour **SH2** (CD_3OD)..... 120
Tableau XXXIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du 1-Palmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine [Nishikawa *et al.*, 2015] avec ceux observés pour **SH3** (CD_3OD)..... 121
Tableau XXXIV : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH4** (CD_3OD). 123
Tableau XXXV : Alkylglycérols (**SH5** à **SH8**) isolés de *Scopalina hapalia*. 124
Tableau XXXVI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH6** (CD_3OD) et comparaison avec la littérature ($CDCl_3$) [Huong *et al.*, 2007]. 125
Tableau XXXVII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H des AKG **SH5**, **SH7** et **SH8** à ceux observés pour **SH6** (CD_3OD). 126
Tableau XXXVIII : Epidioxystérols (**SH9** et **SH10**) isolés de *Scopalina hapalia*. 127
Tableau XXXIX : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du 5*α*,8*α*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-hydroperoxy-stigmasta-6,28-dién-3*β*-ol ($CDCl_3$) [Sera *et al.*, 1999] à ceux observés pour **SH9** (CD_3OD). 128
Tableau XL: Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du 5*α*,8*β*-épidioxy-(24*R*/24*S*)-stigmasta-6,22*E*-dién-3*β*-ol ($CDCl_3$) [Gauvin *et al.*, 2000] à ceux observés pour **SH10** (CD_3OD). 128
Tableau XLI : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH11** (CD_3OD). 130
Tableau XLII : Données de la RMN 1D et 2D pour **SH12** (CD_3OD)..... 132
Tableau XLIII : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du *cis*-cyclo(L-Val-L-Leu) (DMSO) [Stark et Hofmann, 2005] à ceux observés pour **SH13** (CD_3OD)..... 133
Tableau XLIV : Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du *cis*-cyclo(L-Val-L-Phe) (DMSO) [Stark et Hofmann, 2005] à ceux observés pour **SH14** (CD_3OD)..... 134
Tableau XLV : Activité inhibitrice du protéasome des composés **SH3**, **SH6** et **SH7**..... 135
Tableau XLVI : Quantification et qualification, par NanoDrop, de l'ADN génomique (ADNg) de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction différents (Qiagen et CTAB)..... 165
Tableau XLVII : Résultats du séquençage de l'ADNg de *Scopalina hapalia* au moyen de 2 kits d'extraction (Qiagen et CTAB). 171
Tableau XLVIII : Moyenne des index de la diversité alpha de *Scopalina hapalia* par échantillon d'ADNg (ADNg-Qiagen ou ADNg-CTAB) et par région cible. 171
Tableau XLIX : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V1-V3 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 172
Tableau L : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V3-V4 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 175
Tableau LI : Affiliation taxonomique au niveau du phylum et abondances relatives (%), obtenues à partir du séquençage de la région V4-V5 de l'ADNg (Qiagen et CTAB) de *Scopalina hapalia*..... 178

Tableau LII : Présentation des phyla les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction différents (Qiagen et CTAB). 182
Tableau LIII : Abondance relative des différentes classes de Protéobactéries en fonction de l'échantillon de l'ADNg de *Scopalina hapalia* considéré. 183
Tableau LIV : Affiliation des 10 OTUs les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen du kit d'extraction Qiagen, (**ADNg-Qiagen)**. 184
Tableau LV : Affiliation des 10 OTUs les plus abondants identifiés suite au séquençage des régions V1-V3, V3-V4 et V4-V5 de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique de *Scopalina hapalia* extrait au moyen du kit d'extraction CTAB (**ADNg-CTAB**). 185
Tableau LVI : Nombre de séquences détectées et affiliées au phylum des Actinobactéries à partir de l'ADNg de *Scopalina hapalia* extrait au moyen de 2 kits d'extraction..... 186
Tableau LVII : Affiliation taxonomique des OTUs appartenant au phylum des Actinobacteria, identifiées à partir du séquençage de l'ADNg de *Scopalina hapalia*. 187
Tableau LVIII : Affiliation phylogénétique des Actinobacteria isolés de *Scopalina hapalia*. 190
Tableau LIX : Affiliation phylogénétique des Firmicutes associés à *Scopalina hapalia*..... 191
Tableau LX : Identification des champignons filamenteux isolés de *Scopalina hapalia*..... 195
Tableau LXI : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Salinispora arenicola*. 206
Tableau LXII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches appartenant au genre *Micromonospora*. 207
Tableau LXIII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures de la souche *Rhodococcus nanhaiensis.* 207
Tableau XIX : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Bacillus paralicheniformis.* 208
Tableau LXV : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de *Bacillus licheniformis.* 210
Tableau LXVI : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures de la souche de *Bacillus berkeleyi*. 211
Tableau LXVII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches appartenant à la famille des Thermoactinomycetaceae. 211
Tableau LXVIII : Synthèse des activités biologiques associées aux extraits bruts obtenus à partir des cultures des souches de champignons filamenteux. 212
Tableau LXIX : Tableau synthétique des extraits bruts microbiens « super-hits ». 214
Tableau I : Bilan massique des fractionnements en phase normale de l'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia*..... 248
Tableau II : Bilan massique des fractions cyclohexane et MeOH après partition de l'extrait brut DCM/MeOH de *Scopalina hapalia*. 250
Tableau III : Bilan massique des fractions obtenues à partir des différents fractionnements de l'extrait MeOH de *Scopalina hapalia*. 251
Tableau IV : Plan de plaque utilisé et concentrations finales (ng/µL) des différentes librairies. 259

Glossaire

Allélochimique : substance chimique intervenant lors de la communication entre organisme différent (interspécifique) pour modifier leur comportement (prédation, symbiose, parasitisme, etc).

Apoptose : autrement appelé mort cellulaire programmée, est un processus fortement régulé par lequel les cellules sénescentes, inutiles ou potentiellement dangereuses déclenchent leur autodestruction.

Arbre phylogénétique : représentation graphique de la parenté entre espèces.

ARNr 16S : l'ARN ribosomique 16S est une des sous-unités composant les ribosomes bactériens (eubactéries et archéobactéries). Le gène (16S) codant pour l'ARN ribosomal 16S contient des régions conservées chez toutes les bactéries ainsi que des régions variables, spécifiques pour un groupe donné (espèce, genre, famille). Grâce à ces séquences spécifiques, il est possible de déterminer la filiation des bactéries.

Autophagie : mécanisme de dégradation qui contribue au bon fonctionnement de l'organisme en contrôlant les agents infectieux intracellulaires et en régulant les réponses innées et adaptatives.

Biosurfactant : surfactant d'origine microbienne. Les surfactants (ou tensioactifs en français) sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Cette propriété permet leur utilisation comme émulsifiant, détergent ou encore comme antiseptique.

Cellulolytique : bactérie ou enzyme possédant la capacité de dégrader la cellulose en molécules plus simples (mono-, oligo- ou poly-saccharides).

Champignons mitosporiques : autrement appelés anamorphes ou imparfaits qui regroupent les champignons dont on ne connait pas de forme de reproduction sexuée (ni asques ni basidies).

Conule : projection conique de l'ectoderme de l'éponge vers l'extérieur et soutenue par des fibres ou des spicules perpendiculaires à la surface.

Dégénérescence neurofibrillaire : une des deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit d'une agrégation intracellulaire due à la transformation de la protéine Tau en sa forme anormalement hyper-phosphorylée.

Ectosomal : relatif à l'ectosome (ou ectoderme ou pinacoderme) qui est la couche de cellules externe de l'éponge.

Endophytique : caractéristique d'un microorganisme qui vit à l'intérieur d'un macroorganisme (plante ou animal) de façon asymptomatique avec ou sans bénéfice mutuel. Cette interaction biologique n'est pas systématiquement durable.

Epigénétique : relatif à une modification réversible de l'activité (expression) d'un gène n'affectant pas directement la séquence d'ADN. Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement et peuvent être transmis au cours des divisions cellulaires.

Espèces cryptiques : groupe d'espèces ne présentant pas de différences morphologiques marquées rendant difficile l'identification de nouvelles espèces sur la seule base des caractères phénotypiques. Les analyses moléculaires s'appuyant sur l'ARN et/ou l'ADN sont indispensables pour révéler des différences notables.

Hématopoïèse : processus physiologique qui assure la production et le renouvellement continu des différentes cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique.

HIF-1 : facteur induit par l'hypoxie (manque d'oxygène) 1. Régulateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie et cible moléculaire pour la recherche d'anticancéreux.

Holobionte : association entre un organisme hôte (plante ou animal) et son microbiote, c'est-à-dire l'ensemble des microorganismes (bactéries, archées, micro-eucaryotes tels que les champignons filamenteux et virus) hébergés par cet hôte.

ITS : l'espaceur interne transcrit, en français, est une portion de l'ADN ribosomique fongique située entre les gènes de la grande et la petite sous-unité de l'ARNr. Région non codante de l'ADN et hautement polymorphe, l'ITS est utilisé pour la filiation des champignons à l'instar de l'ARNr 16S pour les bactéries.

Lipolyse : ensemble de voies métaboliques de la production énergétiques permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'oxydation des acides gras provenant notamment de l'hydrolyse des lipides tels que les triglycérides.

Lymphadénopathie : atteinte inflammatoire des ganglions lymphatiques caractérisée par une hypertrophie de ces derniers.

Matrice extracellulaire (MEC) : désigne l'ensemble des macromolécules extracellulaires secrétées par les cellules qui fournissent un support structurel (tissu conjonctif) entre autres fonctions. La composition de la MEC varie en fonction des cellules et peut notamment être constituée de fibres d'élastines.

MDA-MB-231 : lignée cellulaire de cancer du sein (hormono-indépendante).

Mésohyle : matrice extracellulaire (composée de glycoprotéines, de fibres de spongine et de collagène) située entre la paroi externe (pinacoderme, constitué de pinacocytes) et la paroi interne (choanoderme, composé de choanocytes) des éponges.

Métabolites spécialisés : appelés aussi métabolites secondaires. Toutefois, suite à une révision des notions de métabolites primaires et secondaires, les termes de « métabolisme hautement intégré et évolué » et de « métabolisme spécialisé » sont aujourd'hui préférés en lieu et place respectivement de métabolites primaires et de métabolites secondaires.

Métagénomique : méthode d'étude du microbiote par séquençage et analyse du génome de tous les microorganismes présents dans un milieu donné.

Métalloprotéinase matricielle : enzyme protéolytique caractérisée par la présence d'un ion zinc (Zn^{2+}) dans leur site catalytique (site actif). Elles sont responsables de la modification de la matrice extracellulaire en agissant sur les protéines qui la constituent.

mTOR : protéine kinase, conservée au cours de l'évolution, favorisant la croissance, la prolifération ainsi que la survie cellulaire. L'activité de cette protéine est fréquemment intensifiée dans les cancers. Par ailleurs, sa capacité à détecter différents nutriments lui permet d'assurer un couplage entre les apports nutritifs cellulaires et l'homéostasie métabolique cellulaire.

Oscule : large orifice par lequel l'éponge évacue l'eau qui pénètre dans son organisme *via* les pores inhalants.

PC3 : lignée cellulaire hormono-résistant du cancer de la prostate humain.

Phénotypique : ensemble des caractères observables d'un organisme.

Philopatrie : comportement de certains organismes qui s'expriment par une tendance à rester ou à revenir à un endroit particulier.

Phylum candidat : phyla pour lequel, à l'heure actuelle, aucun représentant n'a pu être cultivé en laboratoire mais dont l'existence a pu être révélée grâce aux analyses métagénomique et de l'ARNr 16S.

Phylogénétique : relatif à la phylogénie qui correspond à l'étude des liens existant entre des espèces apparentées.

Pipeline : ensemble des étapes allant du traitement de l'échantillon jusqu'à l'analyse bioinformatique des séquences.

Plaques séniles ou **amyloïdes** : une des deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Les plaques amyloïdes sont des dépôts denses formés progressivement par l'accumulation extracellulaire (entre les neurones) de peptides amyloïde-β.

Protéinases : appelés aussi protéases, sont des enzymes qui dégradent les protéines en hydrolysant les liaisons peptidiques entre les résidus d'acides amines.

Protéine Tau : protéine, associée aux microtubules, jouant un rôle dans la structure des neurones et dans le maintien de leurs réseaux de transport interne.

Protéolyse : processus permanents de synthèse et de dégradation des protéines pour assurer leur renouvellement continu.

Protéolytique : qui hydrolyse les protéines.

Protéostasie : ou homéostasie protéique est caractérisée par la balance biosynthèse / élimination des protéines résultant de l'action coordonnée des différents acteurs du système de contrôle qualité cellulaire qui assure par exemple la reconnaissance des protéines mal repliées et leur dégradation.

Réfringent : qui produit de la réfraction (réfracte/renvoie la lumière).

Ribosome : complexe ribonucléoprotéiques issu de l'assemblage de protéines et d'ARN. Celui-ci est constitué de deux sous-unités, une petite et une grande, avec chacune une fonction qui lui est propre. Conservés au cours de l'évolution, ces ribosomes sont responsables de la synthèse des protéines.

Saprophyte : se nourrit des matières organiques en décomposition.

Sénescence cellulaire : processus biologique caractérisé par un arrêt essentiellement irréversible de la prolifération cellulaire après un certain nombre de divisions ou suite à un stress/dommage irréversible (lésion irréparable de l'ADN, stress oxydatif, etc).

Sérine Protéase : enzymes protéolytiques responsables de la digestion des polypeptides (grosses protéines) en des chaines plus courtes. Le nom de cette famille provient du résidu d'acide aminé nucléophile serine situé dans leur site catalytique (site actif de l'enzyme).

Sidérophore : molécule capable de capturer le fer avec une très haute affinité et synthétisée par les microorganismes lorsque la disponibilité du fer est limitée dans leur environnement.

Sirt1 : protéine de la famille des sirtuines qui sont des protéines dé-acétylases NAD-dépendantes impliquées dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que l'homéostasie énergétique.

Spicules : petites structures épineuses, de nature siliceuse ou calcaire, qui forment le squelette/charpente de l'éponge. Celles-ci jouent un rôle important dans la détermination de la nature (calcaire ou siliceuse) et de la forme de l'éponge.

Spongine : protéine fibreuse soufrée riche en iode produite par les spongioblastes et apparentée au collagène, qui est une protéine structurale présente dans la matrice extracellulaire des animaux. La spongine constitue le squelette Démosponges et peut se présenter sous forme dispersée ou structurée en fibres dans le mésohyle.

Style : forme de spicule de grande taille (mégasclère) en forme de bâtonnet pointu à une de ses extrémités (monoactine), sécrétée par les sclérocytes de l'éponge.

T47D : lignée cellulaire du cancer du sein humain.

Télomères : petites structures de ribonucléoprotéines (assemblage d'une nucléoprotéine et de l'ARN) présentes aux extrémités des chromosomes. Ces structures protègent les cellules contre le développement d'anomalies génétiques en contrôlant l'entrée en sénescence. Cette entrée en sénescence est déclenchée par le raccourcissement des télomères, suite à un grand nombre de division cellulaire.

Temps de demi-vie : le temps de demi-vie d'une protéine est associé au temps qu'elle met à perdre la moitié de son activité physiologique spécifique en raison d'une dénaturation ou d'une inactivation.

Ubiquitination : processus séquentiel par lequel la protéine à éliminer est « taguée » (étiquetée) par l'addition de molécules d'ubiquitine (peptide) et qui donne le signal de la dégradation (4 molécules d'ubiquitine au minimum).

Ubiquitinyler : modification des protéines caractérisée par l'ubiquitination de ces dernières.

Résumé

Le vieillissement du corps humain crée un terrain propice au développement de certaines pathologies. Afin de ralentir ou retarder l'apparition des effets physiologiques normaux ou pathologiques liés à l'âge, différentes stratégies de recherche peuvent être développées. Aussi, dans le cadre de cette thèse, plusieurs éponges marines, collectées à Mayotte, ont été évaluées pour leur capacité à produire des métabolites aux propriétés anti-âge. L'évaluation des activités biologiques a été menée sur les cibles suivantes : élastase et tyrosinase (vieillissement cutané), CDK7 et protéasome (cancers), Fyn kinase (maladie d'Alzheimer), catalase (stress oxydant) et sirtuine 1 (différentes fonctions biologiques). Les éponges *Lendenfeldia* sp. et *Scopalina hapalia*, en raison de leurs activités biologiques, ont été sélectionnées pour des études chimiques. L'extraction, l'isolement et l'identification de leurs métabolites ont été entrepris par différentes techniques chromatographiques (CLMP, CLHP…) et spectroscopiques (SMHR, RMN 1D et 2D). Vingt métabolites appartenant aux classes chimiques des alkylglycérols, des buténolides, des dicétopipérazines, des épidioxystérols, des phospholipides ainsi que des polybromodiphényléthers ont été isolés de ces deux éponges. Il est à noter que quatre métabolites de structures nouvelles ont été isolés de *S. hapalia* dont la composition chimique n'avait été jusqu'à ce jour que très peu étudiée. Par ailleurs, peu d'études portant sur la caractérisation et le potentiel de production de métabolites d'intérêts de la communauté microbienne associée à *S. hapalia* ont été retrouvées dans la littérature. Dans cette thèse, la communauté bactérienne de cette éponge a été caractérisée, par une approche de métagénomique ciblée. Cette étude a mis en lumière une communauté majoritairement dominée par les Protéobactéries suivis par les Cyanobactéries, les Bacteroidetes, les Planctomycètes ainsi que les Actinobactéries. L'étude de la diversité microbienne cultivable a permis l'isolement de microorganismes appartenant aux genres *Bacillus*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora*. Enfin, trente microorganismes ont été caractérisés pour leur capacité à produire des molécules bioactives en mettant en œuvre les techniques de culture classique couplées à une récupération *in situ* des molécules produites par les microorganismes. L'évaluation des activités anti-âge des extraits produits a été réalisée par un criblage sur les sept cibles biologique étudiées. Quinze souches différentes ont été identifiées comme prometteuses pour la recherche de métabolites aux différentes propriétés anti-âge.

Mots-clés : Eponges marines, Océan Indien, *Lendenfeldia* sp., *Scopalina hapalia*, actinomycètes, champignons filamenteux, métabolites spécialisés, vieillissement, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase, catalase, et sirtuine 1.

Human aging creates a breeding grounds for the development of conditions that get more common as we get older. In order to slow or delay the onset of physiological or pathological effects of aging process, different research strategies can be developed. Thus, in the context of this PhD work, several marine sponges collected in Mayotte, were evaluated for their capacity to produce metabolites with anti-aging properties. The evaluation of biological activities was carried out on the following biological targets: elastase and tyrosinase (skin aging), CDK7 and proteasome (cancers), Fyn kinase (Alzheimer's disease), catalase (oxidative stress) and sirtuin 1 (different biological functions). Because of their biological activities, the marine sponges *Lendenfeldia* sp. and *Scopalina hapalia* were selected for chemical studies. The extraction, isolation and identification were undertaken by various chromatographic (MPLC, HPLC ...) and spectroscopic (HRMS, 1D and 2D NMR) techniques. Twenty metabolites belonging to the chemical classes of alkylglycerols, butenolides, diketopiperazines, epidioxysterols, phospholipids and polybromodiphenyl ethers were isolated from these sponges. It should be noted that four new metabolites of new structures were isolated from *S. hapalia* whose chemical composition has been little studied up until now. Furthermore, there is a paucity of information on its microbial community and its potential for bioactive metabolites production. The bacterial community associated with *S. hapalia* was therefore characterized by a targeted metagenomic approach. This study shed light on a diverse community highly dominated by Proteobacteria followed by Cyanobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes as well as Actinobacteria. The use of cultivation approach allowed the isolation of microorganisms affiliated to genera *Bacillus*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Chaetomium* and *Nigrospora*. Finally, the potential of isolated microorganisms to produce bioactive molecules was investigated in two steps: 1) by implementing conventional culture techniques coupled with *in situ* recovery of the molecules produced by the microorganisms, 2) by screening the produced crude extracts from thirty isolates for anti-aging activities. The results highlighted fifteen promising microorganisms producing bioactive metabolites with various anti-aging activities.

Keywords : marine sponges, Indian Ocean, *Lendenfeldia* sp., *Scopalina hapalia*, actinomycetes, filamentous fungi, metabolites, aging, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase, catalase, and sirtuin 1.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 23 septembre 2020

par

Charifat SAID HASSANE

Valorisation chimique et biotechnologique de la biodiversité marine de l'Archipel des Comores : Recherche de molécules naturelles anti-âge.

Tome II

Diretrice de Thèse	Anne Bialecki-GAUVIN	Professeur, Université de La Réunion
Co-directeur de Thèse	Laurent DUFOSSE	Professeur, Université de La Réunion
Encadrant	Mireille FOUILLAUD	MCF, Université de La Réunion

Composition du jury

Rapporteurs	Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI	Directrice de Recherches CNRS-MNHN
	Olivier GROVEL	Professeur, Université de Nantes
Examinateurs	Evelyne OLLIVIER	Professeur, Université d'Aix-Marseille
	Fabien GUERIN	MCF, Université de La Réunion
	Jamal OUAZZANI	Directeur de Recherches CNRS-ICSN

Note aux lecteurs

Ce mémoire est constitué de 2 Tomes.

Le Tome II complète le Tome I et comprend la majorité des tableaux et des figures. Cette structuration présente l'avantage de pouvoir consulter en même temps le texte et la figure ou le tableau correspondant.

Les tableaux, les figures et les molécules se trouvant dans les Tomes I et II ont été numérotés indépendamment.

Liste des annexes

ANNEXE 1 Liste des éponges étudiées dans le cadre du projet TASCMAR associées à l'ensemble de leurs activités biologiques. 7

ANNEXE 2 Données spectrales des métabolites isolés de l'éponge *Lendenfeldia* sp.. 16

ANNEXE 3 Les différentes classes de lipides identifiées au cours de la déréplication des extraits bruts de *Scopalina hapalia.* 28

ANNEXE 4 Données spectrales des métabolites isolés de l'éponge *Scopalina hapalia*..... 33

ANNEXE 5 Evolution des scores qualité *Phred* des bases lues en fonction de la longueur, pour l'ensemble des lectures « Read 1 » et « Read 2 » des régions V1-V3, V3-V4, V4-V5 et ITS2. 58

ANNEXE 6 Valeurs moyennes par itération de l'indice Observed OTUs en fonction d'un nombre croissant de séquences. 59

ANNEXE 7 Valeurs moyennes par itération de l'index Chao1 en fonction d'un nombre croissant de séquences. 60

ANNEXE 8 Valeurs moyennes par itération de l'index Shannon en fonction d'un nombre croissant de séquences. 61

ANNEXE 9 Courbe de raréfaction Observed OTUs pour les échantillons 62

ANNEXE 10 Courbe de raréfaction Indice Chao1 pour les échantillons 63

ANNEXE 11 Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle négatif 64

ANNEXE 12 Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle positif interne à Genoscreen. 67

ANNEXE 13 Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle négatif interne à Genoscreen. 70

ANNEXE 14 Composition des milieux de culture et de stockage des microorganismes..... 71

ANNEXE 15 Actinomycètes isolés de *Scopalina hapalia* sur milieu A1BFe+c. 72

ANNEXE 16 *Bacillus* isolés de *Scopaliana hapalia* sur milieu A1BFe+c. 75

ANNEXE 17 Rendement de la production microbienne. 77

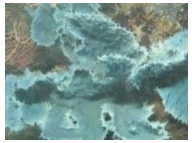
ANNEXE 1

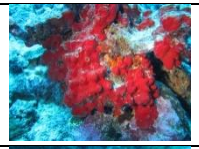
Liste des éponges étudiées dans le cadre du projet TASCMAR associées à l'ensemble de leurs activités biologiques.

Remarque :

- Les activités antioxydante, cytotoxique et QSI ont été évaluées dans le cadre du projet POMARE.
- Les activités biologiques évaluées dans le cadre du projet TASCMAR ont ciblé les protéines suivantes : élastase, tyrosinase, CDK7, Fyn kinase et le protéasome.

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Axinyssa* sp.1**		Lagon, face à la passe de Boueni 12°55.163' S 44°59.233' E 15-20 m	MAY13 135, 136	ML-209	28,4	1,7	6,0	XML-209	**Inhibition de la Fyn kinase** (500 µM, 100 µM)
***Axinyssa* sp.2**		Lagon, face à la passe de Boueni 12°55.163' S 44°59.233' E 15-20 m	MAY13 134	ML-210	11,5	3,3	28,7	XML-210	---
***Axinyssa* sp.3**		Lagon, face à la passe de Boueni 12°55.163' S 44°59.233' E 20 m	MAY13 150b	ML-211	38,7	3,3	8,5	XML-211	**Inhibition de la Fyn kinase** (500 µM, 100 µM)
***Axinyssa* sp.4**		Outer Boueni bay 12°54.094' S 45°02.806' E 15 m	MAY13 166, 168	ML-212	15 (166) 26,7 (168)	2,0 (166) 4,9 (168)	13,3 18,4	XML-212	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 12-13 mm/0,5 mg d'extrait brut (non confirmée) **Inhibition de la Fyn kinase** (500 µM, 100 µM)
Callyspongia aerizusa		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 024	ML-213	5,4	1,1	20,4	XML-213	---

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Callyspongia* sp. 1**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 002	ML-215	44,71	6,0	ASE 13,5	XML-215	**Inhibition de la tyrosinase** (> 50 %)
***Callyspongia* sp. 2**		Ranikiki (récif corallien) 12°56.470' S 45°04.305' E 10-15 m	MAY13 036	ML-216	13,0	1,58	12,2	XML-216	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire HCT116** (1 < CI_{50} < 10 µg/mL)
***Callyspongia* sp. 3**		Passe de Boueni (Sud) 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m	MAY13 043	ML-217	11,6	0,36	3,1	XML-217	Aucune activité détectée
***Callyspongia* sp. 4**		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 20-24 m	MAY13 093, 094	ML-220	8,4 39,28	0,20 8,05	2,4 20,5	XML-220	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 98 % **Inhibition de la tyrosinase** (25 %< < 50 %)
***Callyspongia* sp. 5**		Rocchi 12°59.536' S 45°03.183' E 10 m	MAY13 095	ML-221	4,1	0,35	8,5	XML-221	---
***Callyspongia* sp. 6**		12°56.388' S 45°03.247' E 9-18 m	MAY13 096	ML-222	5,4 7,93	0,48 1,19	8,9 15,10	XML-222	**Inhibition de l'élastase** (> 50 %) **Inhibition du protéasome**

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
Crella cyathophora		Lagon. face à la passe de Boueni 12°55.198' S 44°59.492' E 3-4 m 12°55.163' S 44°59.233' E 12 m	MAY13 158	ML-223	105,0	6,7	6,4	XML-223	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 12-13 mm/0,5 mg d'extrait brut (confirmée)
***Dactylospongia* sp.**		Boat Pass 12°58.653' S 44°58.949' E 15-17 m	MAY13 162	ML-224	15,0	0,20	1,3	XML-224	**Activité antioxydante** (µM Equivalent Trolox /mg d'extrait brut) : ABTS : 324 FRAP : 387
Dragmacidon coccineum		Passe de Boueni (Sud) 12°55.592' S 44°58.005' E 10-12 m	MAY13 046, 061, 068	ML-226	18,0	0,76 (046)	4,2	XML-226	---
		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 4 m	MAY13 100	ML-227	20,9	0,80	3,8	XML-227	**Inhibition du protéasome**
		West large Pass 12°48.356' S 44°57.793' E 15 m	MAY13 176	ML-228	17,5	0,73	4,2	XML-228	---
Haliclona fascigera		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 15-20 m	MAY13 144, 145	ML-231	119,9 78,07	0,53 6,69	0,4 8,5	XML-231	---

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Haliclona* sp. 2**		Récif Chira Le Poe 12°58.021' S 45°03.778' E 20 m	MAY13 051, 075	ML-232	63,5	7,5	11,8	XML-232	---
***Haliclona* sp. 3**		12°56.388' S 45°03.247' E 9-18 m	MAY13 099	ML-233	7,7	0,16	2,1%	XML-233	**Inhibition de la tyrosinase** (25 %< < 50 %) **Inhibition du protéasome**
***Ircinia* sp. 1**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 026	ML-234	16,0	1,2	7,5%	XML-234	---
***Jaspis* sp.**		Lagon. face à la passe de Boueni 12°55.198' S 44°59.492' E 27 m	MAY13 155	ML-235	35,4	3,1	8,8%	XML-235	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire HCT116** (CI_{50} < 1 µg/mL)
Jaspis splendens		Pointe sud de Mayotte 13°00.375' S 45°08.250' E 10-15 m	MAY13 079	ML-237	27,7	0,47	1,7%	XML-237	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 86 % **Inhibition de l'élastase** (>50%)
***Lendenfeldia* sp.**		12°56.388' S 45°03.247' E 9-18 m	MAY13 122	ML-240	12,4	2,9	23,4%	XML-240	**Cytotoxicité sur une lignée cellulaire de mélanome** (% inhibition à 10 µg/mL) : 86 % **Inhibition du protéasome** **Inhibition de la CDK7**

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Leucetta* sp.**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 027	ML-241	34,3	1,0	2,9	XML-241	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 13-14 mm/0,5 mg d'extrait brut (confirmée)
		Passe de Boueni (Sud) 12°55.592' S 44°58.005' E 15 m	MAY13 044, 058	ML-242	36,7	0,87 (044)	2,4	XML-242	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 15-20 mm/0,5 mg d'extrait brut
Myrmekioderma granulatum		Kani tip 12°57.624' S 45°04.697' E 12 m	MAY13 170	ML-214	11,0	0,12	1,1	XML-214	---
***Neopetrosia* sp. 2**		Récif de Chira Le Poe 12°58.021' S 45°03.778' E 20 m	MAY13 048	ML-243	22,8	0,89	3,9	XML-243	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 98 % **Activité antioxydante** (µM Equivalent Trolox /mg d'extrait brut) : ABTS : 893 FRAP : 219
***Neopetrosia* sp. 3**		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 18-20 m	MAY13 102	ML-244	13,4	0,37	2,8	XML-244	**Inhibition de la Fyn kinase** (500µM, 100µM)
Oceanapia globosa		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 20 m	MAY13 127	ML-247	20,2	0,66	3,3	XML-247	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 100 % **Activité antioxydante** (µM Equivalent Trolox /mg d'extrait brut) : ABTS : 1087 FRAP : 203

EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Paratetilla*sp. ?** ***Cinachyrella*sp. ?**		12°58.860 S 45°05.025 E 15-20 m	MAY13 147	ML-251	46,3	2,8	6,0	XML-251	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire HCT116** (CI_{50} ≈ 10 µg/mL)
		Lagon. face à la passe de Boueni 12°55.198' S 44°59.492' E 20 m	MAY13 159	ML-252	20,4	2,0	9,8	XML-252	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 10-12 mm/0,5 mg d'extrait brut (non confirmée)
Petrosia microxea		Passe de Boueni (Sud) 12°55.265' S 44°58.126' E 22-27 m	MAY13 066, 077	ML-253	13,6	0,16 (066)	1,2	XML-253	---
Phyllospongia papyracea?		Passe de Boueni (Sud) 12°55.592' S 44°58.005' E 20-27 m	MAY13 045	XML-254	12,0	0,75	6,3	XML-254	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 97 % **Inhibition de la CDK7**
***Plakinastrella* sp.**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 011	ML-255	15,7	0,77	4,9	XML-255	
***Pseudoceratina* sp. 1**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 15-22 m	MAY13 003	ML-256	15,8	0,46	2,9	XML-256	

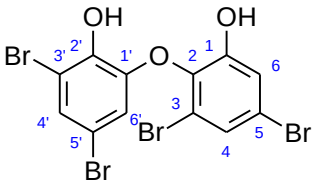
EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Pseudoceratina*sp. 2**		Passe de Sada 12°54.141' S 44°57.862' 20 m	MAY13 128	ML-257	21,4	8,2	38,3	XML-257	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 99 % **Inhibition de la CDK7**
Rhabdastrella globostellata		West large Pass 12°48.356' S 44°57.793' E 32 m N'Gouja 12°57.784' S 45°02.806' E 2 m	MAY13 174, 177	ML-258	14,0 (174) 36,2 (177)	0,9 (174) 8,3 (177)	6,4 22,9	XML-258	**Cytotoxicité sur une lignée cellulaire de mélanome** (% inhibition à 10 µg/mL) : 78 % (174) **Cytotoxicité sur une lignée cellulaire de mélanome** (% inhibition à 10 µg/mL) : 80 % (177)
***Rhabdastrella* sp. 1**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388' S 44°58.758' E 10 m	MAY13 021	ML-259	16,1	1,1	6,8	XML-259	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 80 % **Inhibition de l'élastase** (25 % < < 50 %)
***Rhabdastrella* sp. 2**		Ranikiki (récif corallien) 12°56.470' S 45°04.305' E 10-15 m	MAY13 034 (031)	ML-260	20,1	1,0	5,0	XML-260	**Cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB** (% inhibition à 10 µg/mL) : 80 % **Cytotoxicité sur une lignée cellulaire de mélanome** (% inhibition à 10 µg/mL) : 83 % **Inhibition du protéasome**
Scopalina hapalia		Kani tip 12°57.624' S 45°04.697' E 2-10 m	MAY13 165	ML-263	26,6 74,29	5,7 7,82	21,4 10,5	XML-263	**Activité antioxydante** (µM Equivalent Trolox /mg d'extrait brut) : ABTS : 460 FRAP : 375 **Inhibition de l'élastase** (25 %< < 50 %) **Inhibition de la Fyn kinase** (500 µM, 100 µM, 10 µM)

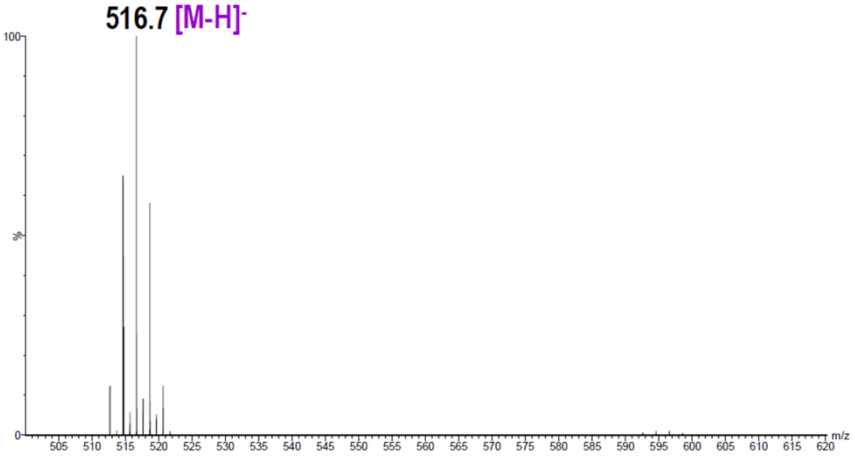
EPONGES		LIEU DE COLLECTE (Mayotte)	N° Echantillon		EXTRACTION				ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
			Références Collecte	Références MACLIB	Poids sec éponge (g)	Masse extrait brut (g)	Rdt (%)	Références EXTLIB	
***Svenzea* sp. ?**		Rocchi 12°59.536’ S 45°03.183’ E 10-20 m	MAY13 120	ML-264	18,0	2,1	11,7	XML-264	**Inhibition de la tyrosinase** (25 %< < 50 %)
***Theonella* sp. 1**		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388’ S 44°58.758’ E 15-22 m	MAY13 015	ML-265	12,1 30,64	0,15 2,91	1,2 9,5	XML-265	**Inhibition de l’élastase** (> 50 %) **Inhibition du protéasome**
***Theonella* sp. 2**		Passe de Boueni (Sud) 12°55.592’ S 44°58.005’ E 20-27 m	MAY13 060	ML-266	38,0	3,3	8,7	XML-266	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 15-15 mm/0,5 mg d’extrait brut (non confirmée)
Theonella swinhoei		Ankazoberavina Roland Point 12°58.388’ S 44°58.758’ E 15-22 m	MAY13 022	ML-267	11,0	1,0	9,1	XML-267	**Activité QSI : Inhibition de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*** 12-13 mm/0,5 mg d’extrait brut (non confirmée) **Inhibition de la CDK7**

ANNEXE 2

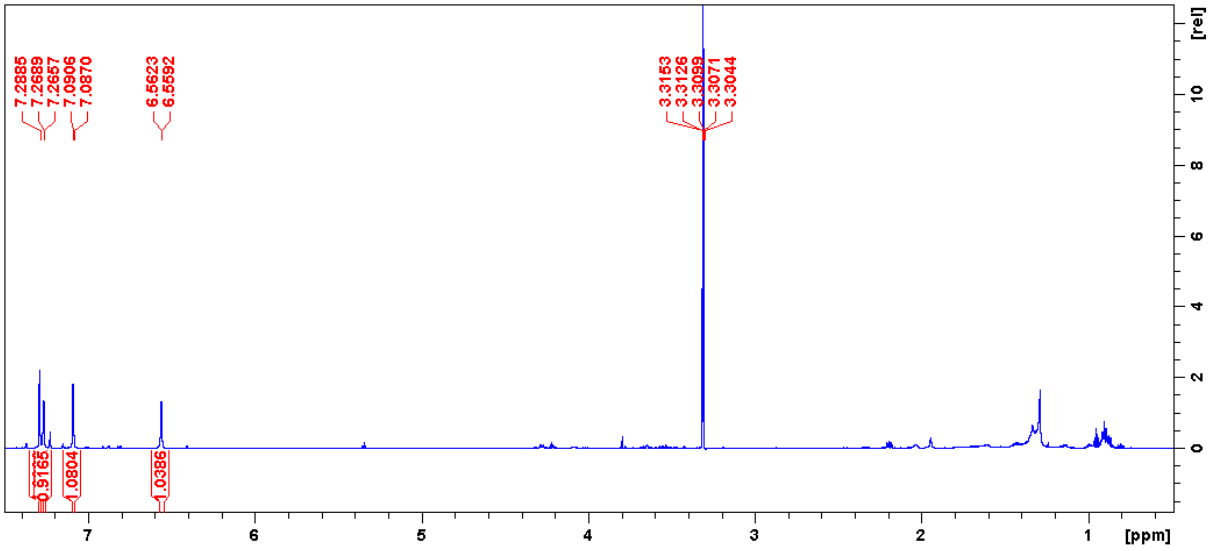
Données spectrales des métabolites isolés de l'éponge *Lendenfeldia* sp..

❖ Données spectrales du métabolite LS1

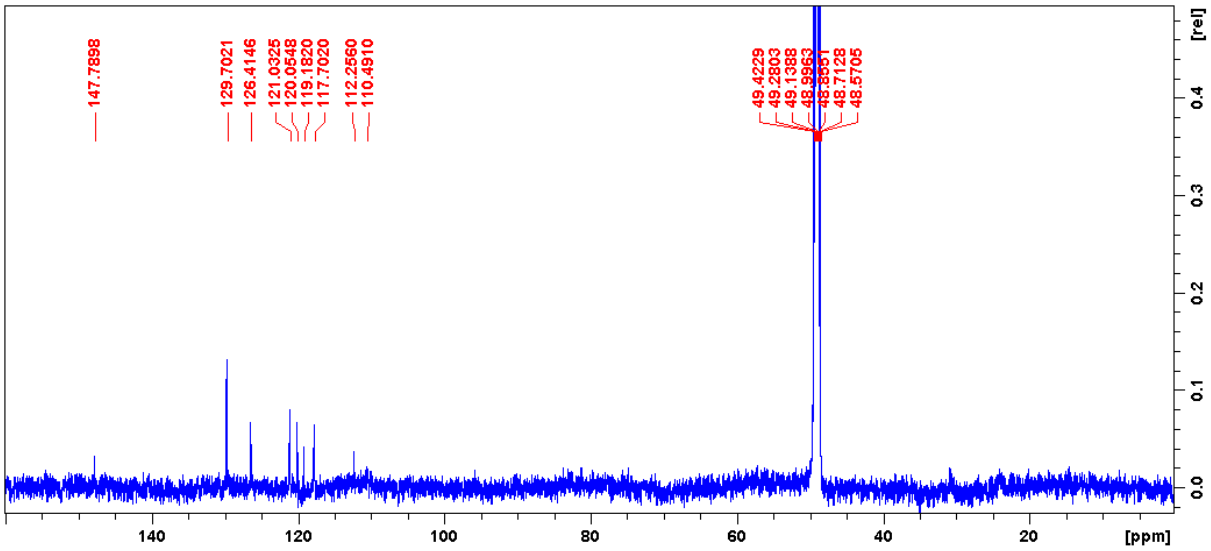




Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI$^-$)

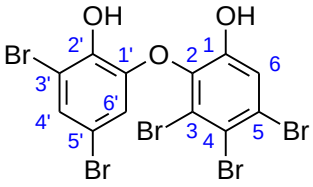


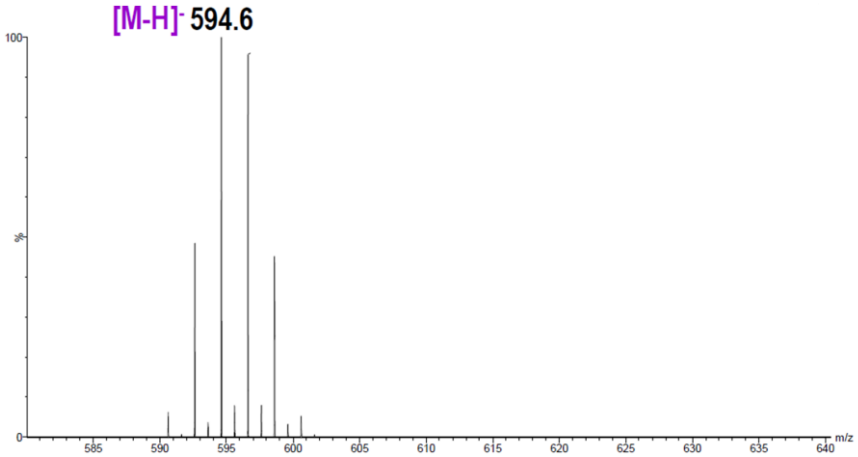
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz)



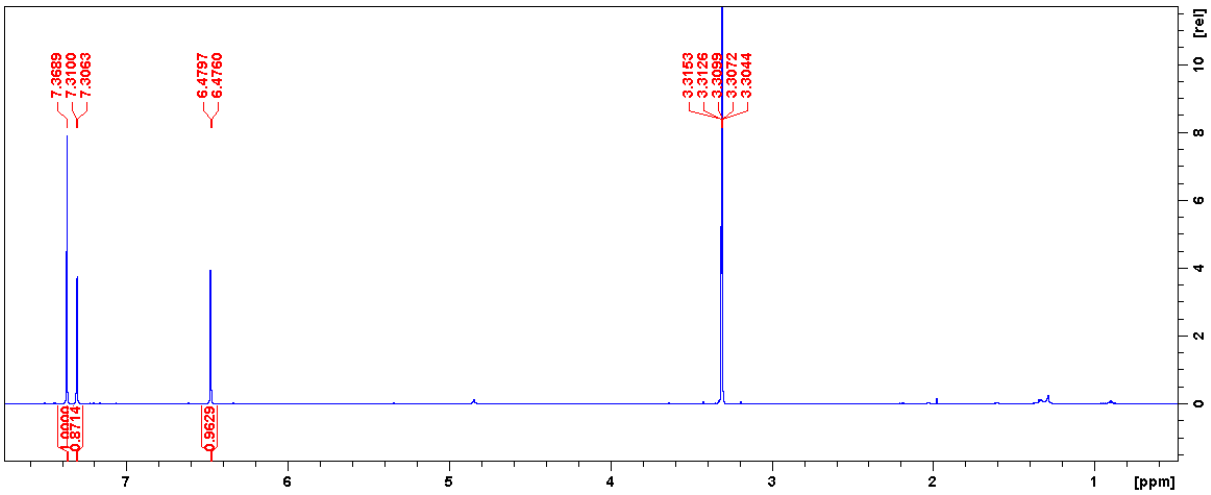
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite LS2

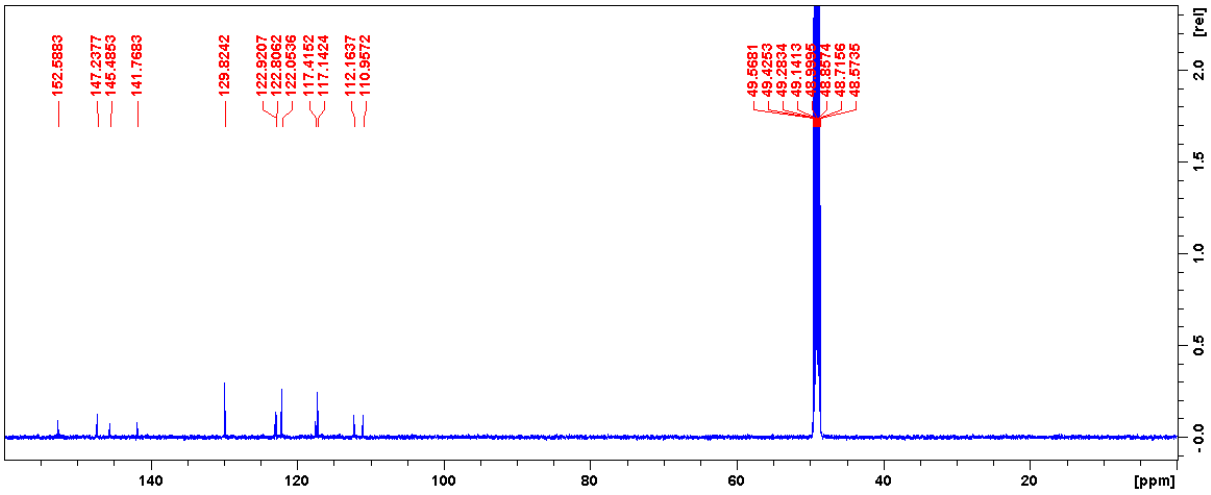




Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI$^-$)

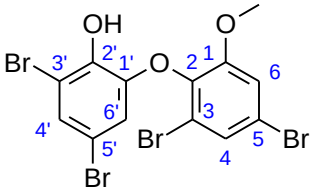


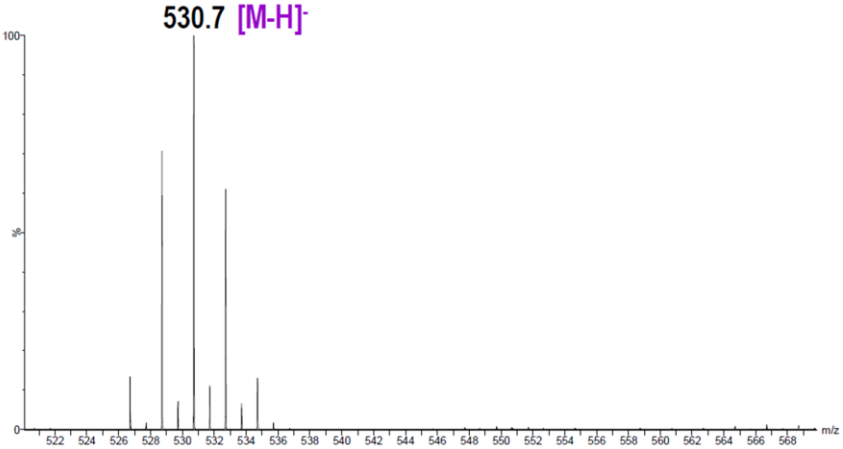
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz)



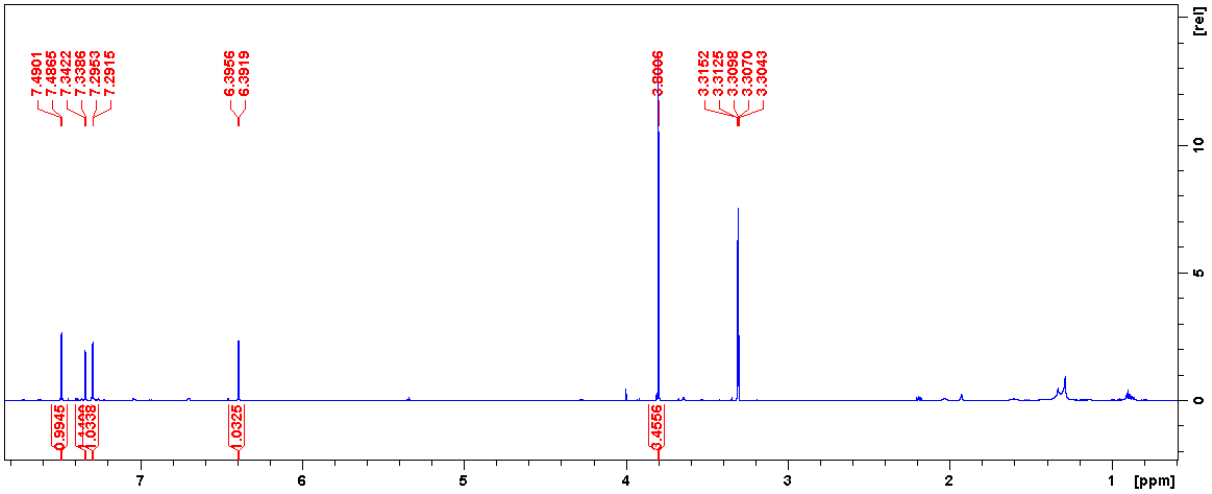
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite LS3

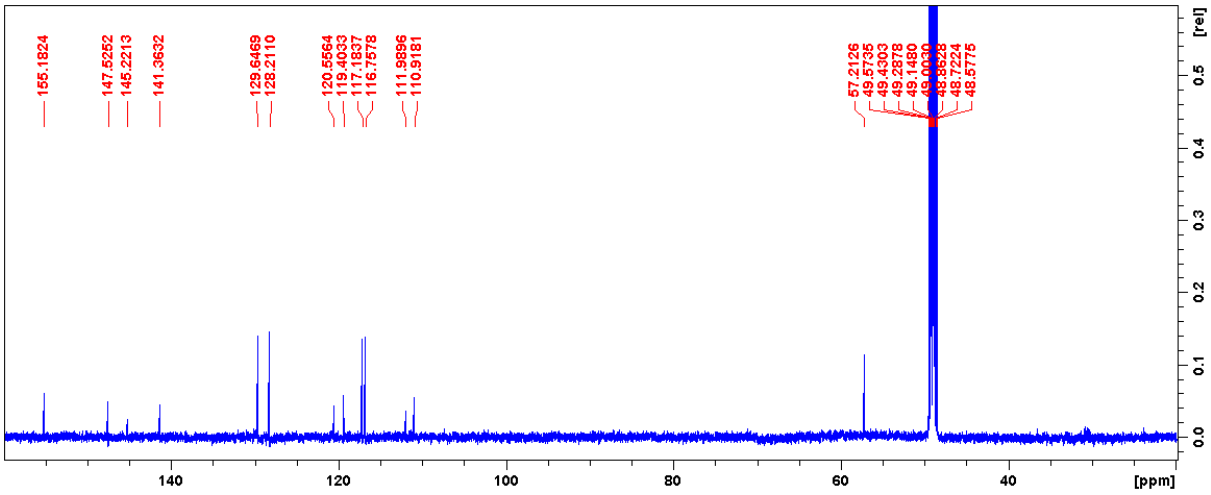




Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI$^-$)

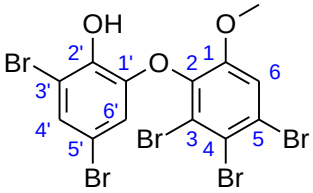


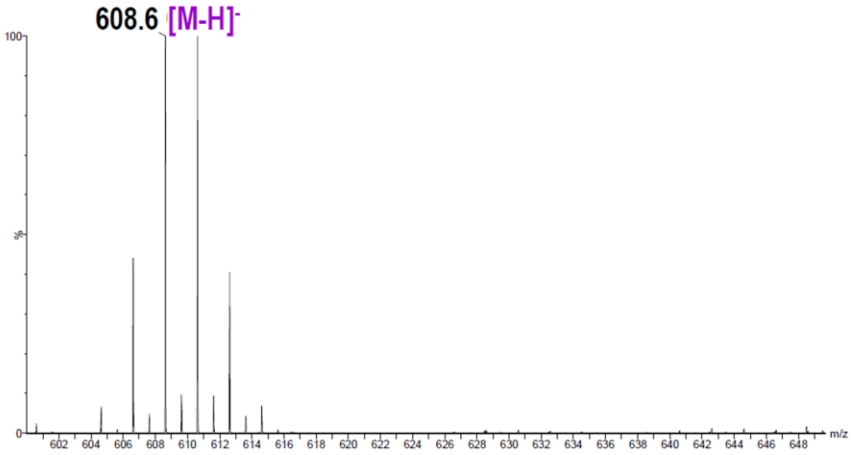
Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz)



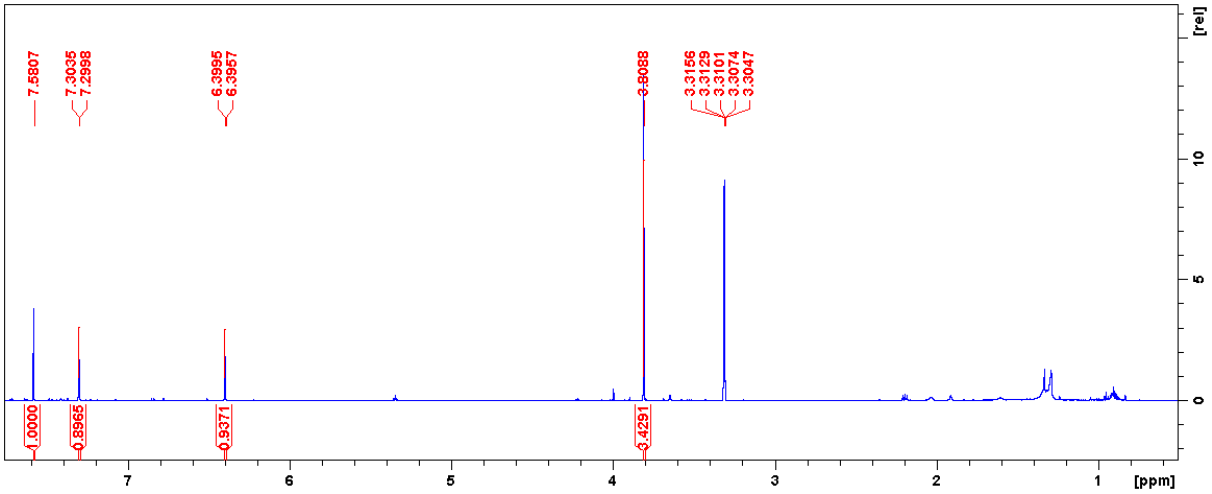
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite LS4

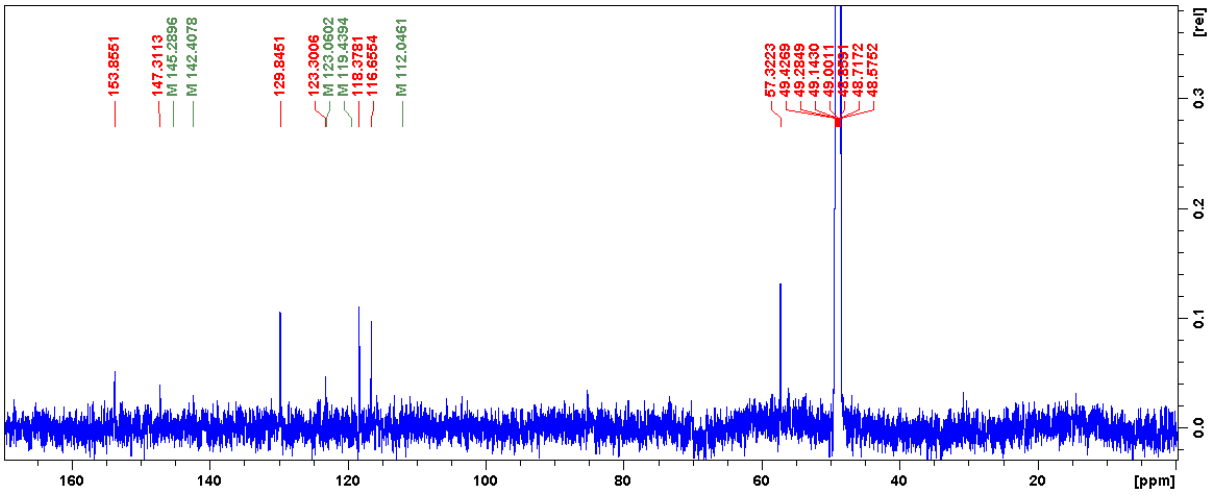




Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI^-)

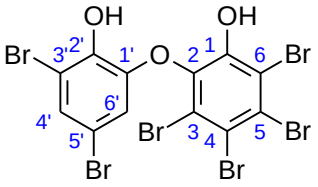


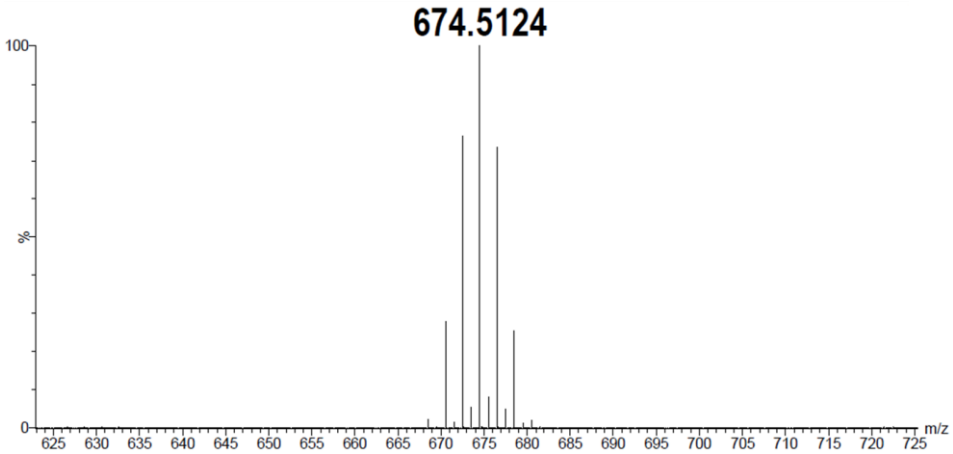
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



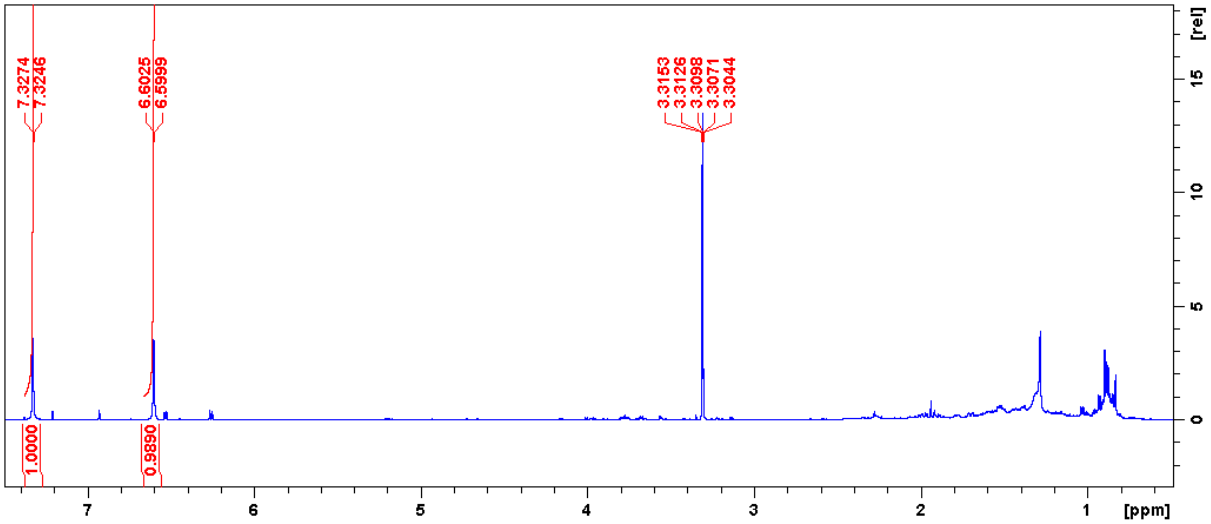
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite LS5

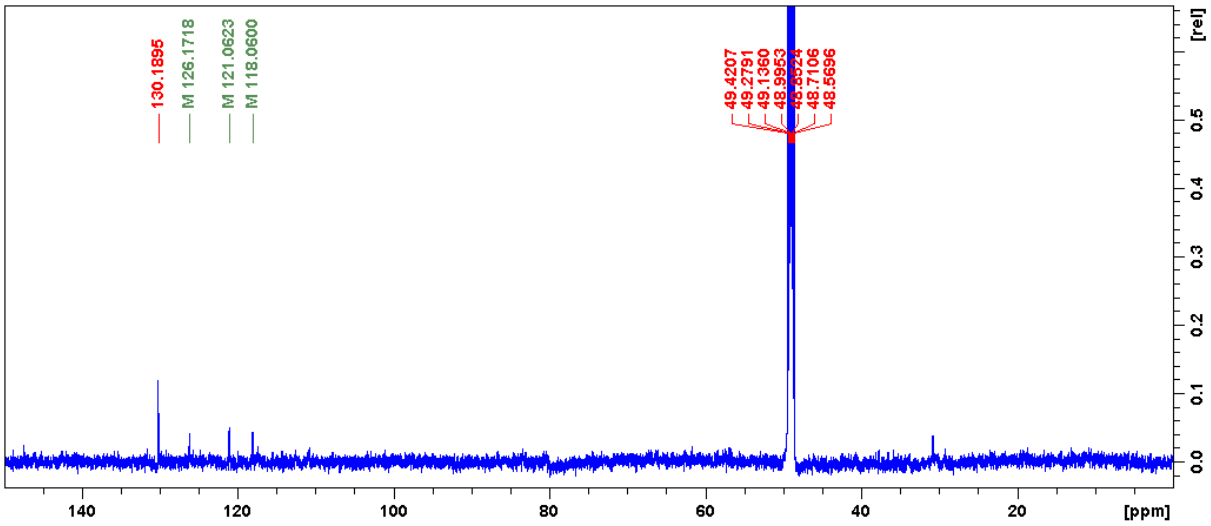




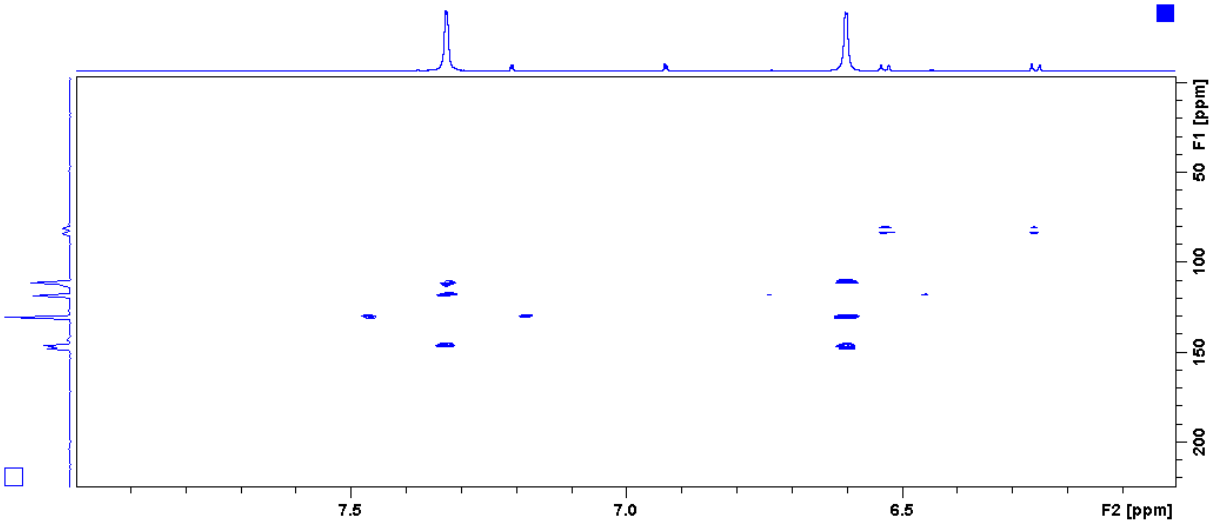
Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI^-)



Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



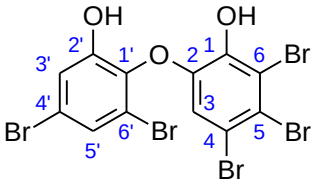
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

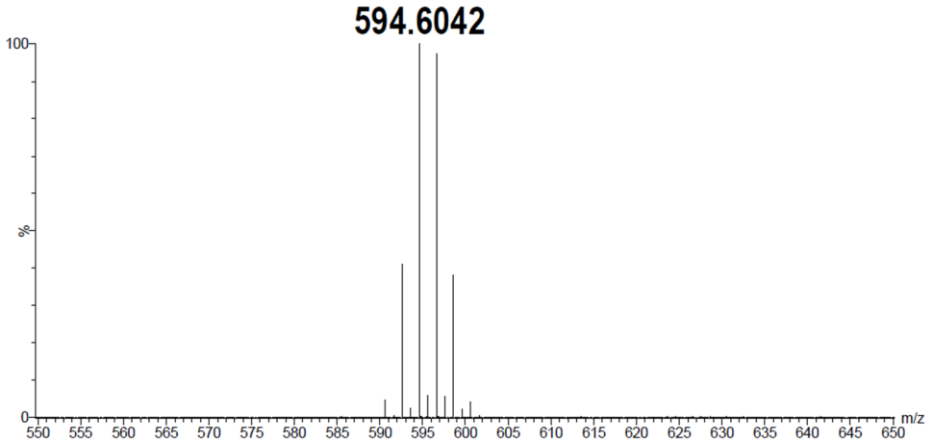


Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

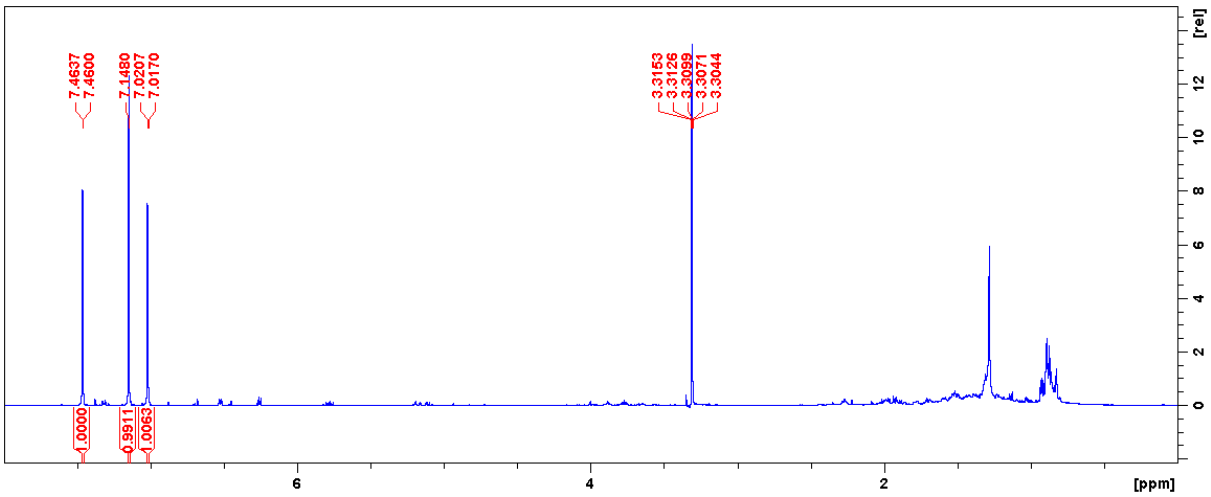
❖ Données spectrales du métabolite LS6

Nouveau

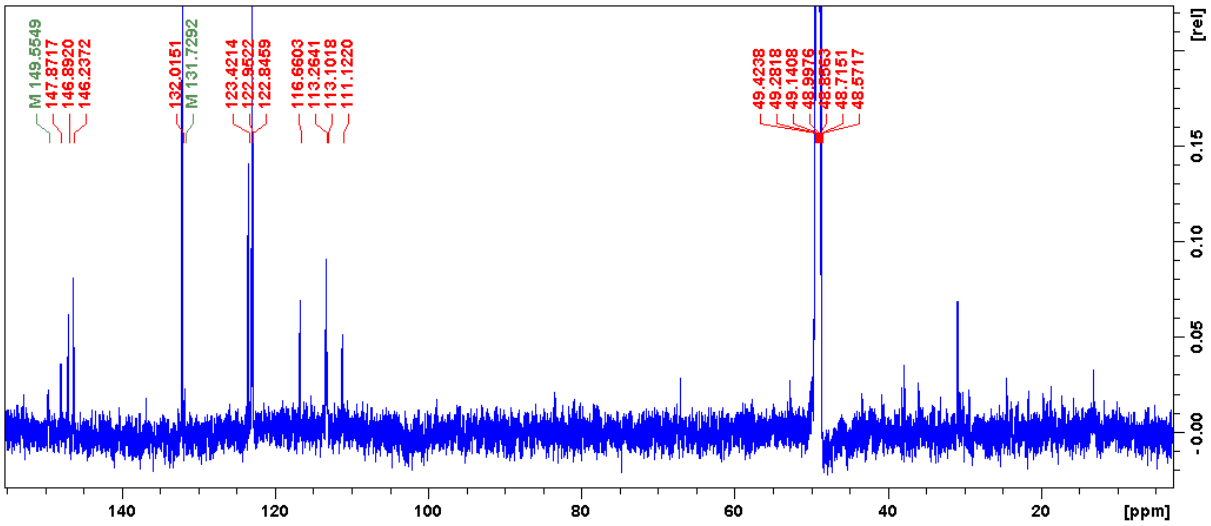




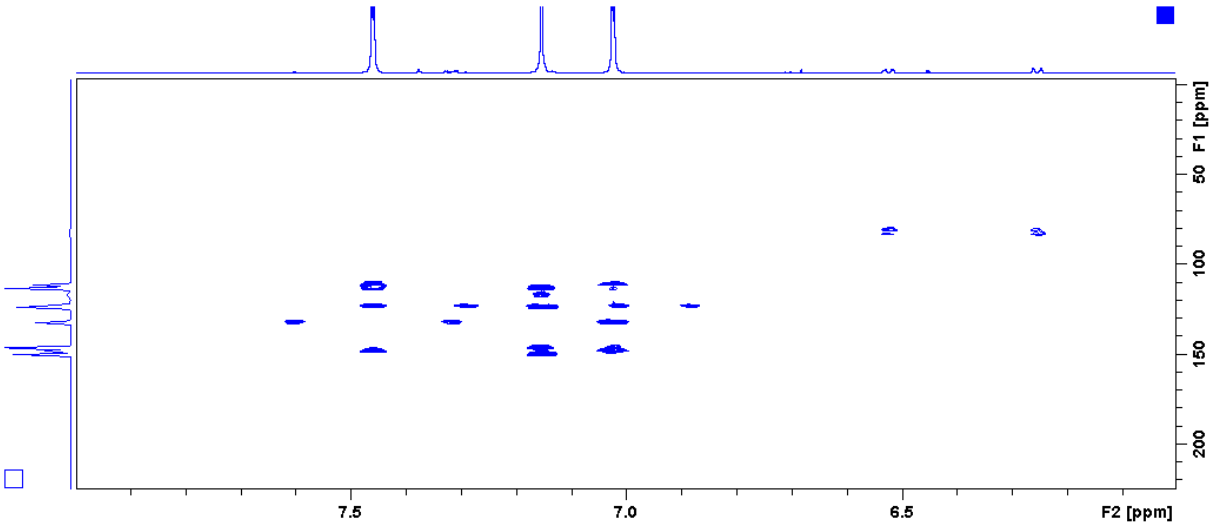
Spectre de masse haute résolution en mode négatif (ESI^-)



Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)



Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

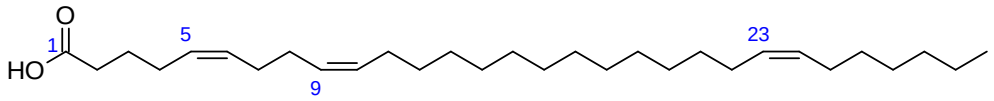
ANNEXE 3

Les différentes classes de lipides identifiées au cours de la déréplication des extraits bruts de *Scopalina hapalia.*

❖ Les Acides Gras

Les acides gras (AG) sont les précurseurs d'une grande variété de composés lipidiques complexes tels que les phospholipides, les sphingolipides et les triglycérides. Parmi les acides gras, nous pouvons distinguer :

- Les acides gras dits *conventionnels* de longueurs de chaines et d'insaturation variables. La longueur de la chaine est caractérisée par un nombre pair de carbone. Ce nombre est généralement compris entre 12 (C_{12}) et 24 (C_{24}).
- Les acides gras *caractéristiques des bactéries*. Ces derniers présentent une longueur de chaine relativement plus courte que les AG conventionnels (C_{10} – C_{20}) avec un nombre impair de carbone [Bergé et Barnathan, 2005]. De plus, ils sont généralement caractérisés par une ou plusieurs ramifications ainsi qu'une insaturation. Par ailleurs, certaines bactéries produisent des AG avec intégration d'un noyau cyclopropane ou une fonction hydroxyle en position C-3 (le premier carbone étant le carboxyle). Les éponges, connues pour abriter un grand nombre de microorganismes, contiennent également des AG d'origine bactérienne [Djerassi et Lam, 1991; Genin *et al.*, 2008; Bergé et Barnathan, 2005]. Ainsi, des AG en C_{15} ou C_{17} monoinsaturés, ramifié par un méthyle peuvent être considérés comme marqueurs d'une présence bactérienne.
- Les acides gras *caractéristiques des éponges* sont appelés acides démospongiques. L'acide 5,9,23-triacontatriénoïque (**A1**) en est un exemple. Ils sont caractérisés par de longues chaines alkyles (C_{24} - C_{38}) avec des insaturations caractéristiques en C_5 et C_9 [Bergé et Barnathan, 2005; Litchfield *et al.*, 1976]. Les éponges, à l'instar d'autres invertébrés marins, produisent également des AG acétylénique, halogénés, méthoxylés et/ou ramifiés [Bergé et Barnathan, 2005]. Toutefois, les acides gras saturés à courtes chaînes C_{16} et C_{18} dominent chez la plupart des éponges [Rod'kina, 2005].

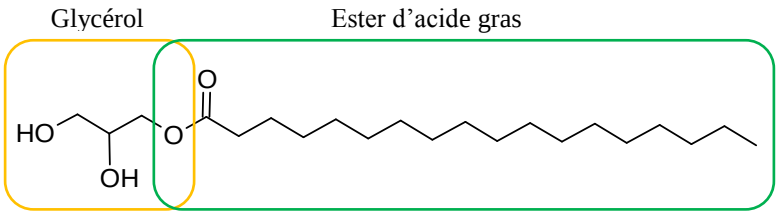


(Acide 5,9,23-triacontatriénoïque (**A1**))

Acide démospongique

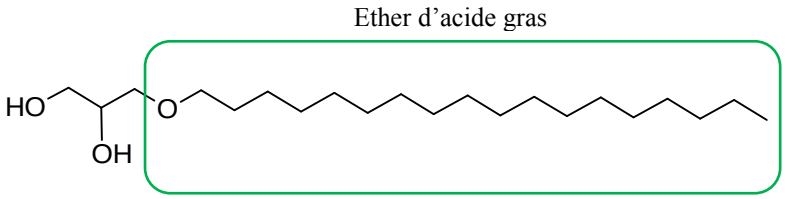
❖ Les Acylglycérols et les Akylglycérols

Les acides gras en association avec le glycérol par des liaisons esters forment les **acylglycérols** (ou glycérides). Ainsi, le glycérol, comportant trois fonctions alcools, va donner les **monoacylglycérols** (MAG) tel que la monostéarine (**A2**), les **diacylglycérols** et les **triacylglycérols**. Les acylglycérols, ainsi que la plupart des lipides complexes, sont obtenus principalement par estérification des fonctions alcools du glycérol par les acides gras. Toutefois, dans certains cas, ces liaisons esters sont remplacées par des liaisons éthers donnant ainsi naissance aux éthers lipides, et plus particulièrement aux **alkylglycérols** (AKG) tel que le batilol, par opposition aux acylglycérols. Les éthers lipides, comme les glycérolipides, sont largement distribués dans la nature (bactéries, invertébrés, mammifères incluant les humains).



Monostéarine ou monostéarate de glycérol (**A2**)

Monoacylglycérol (MAG)



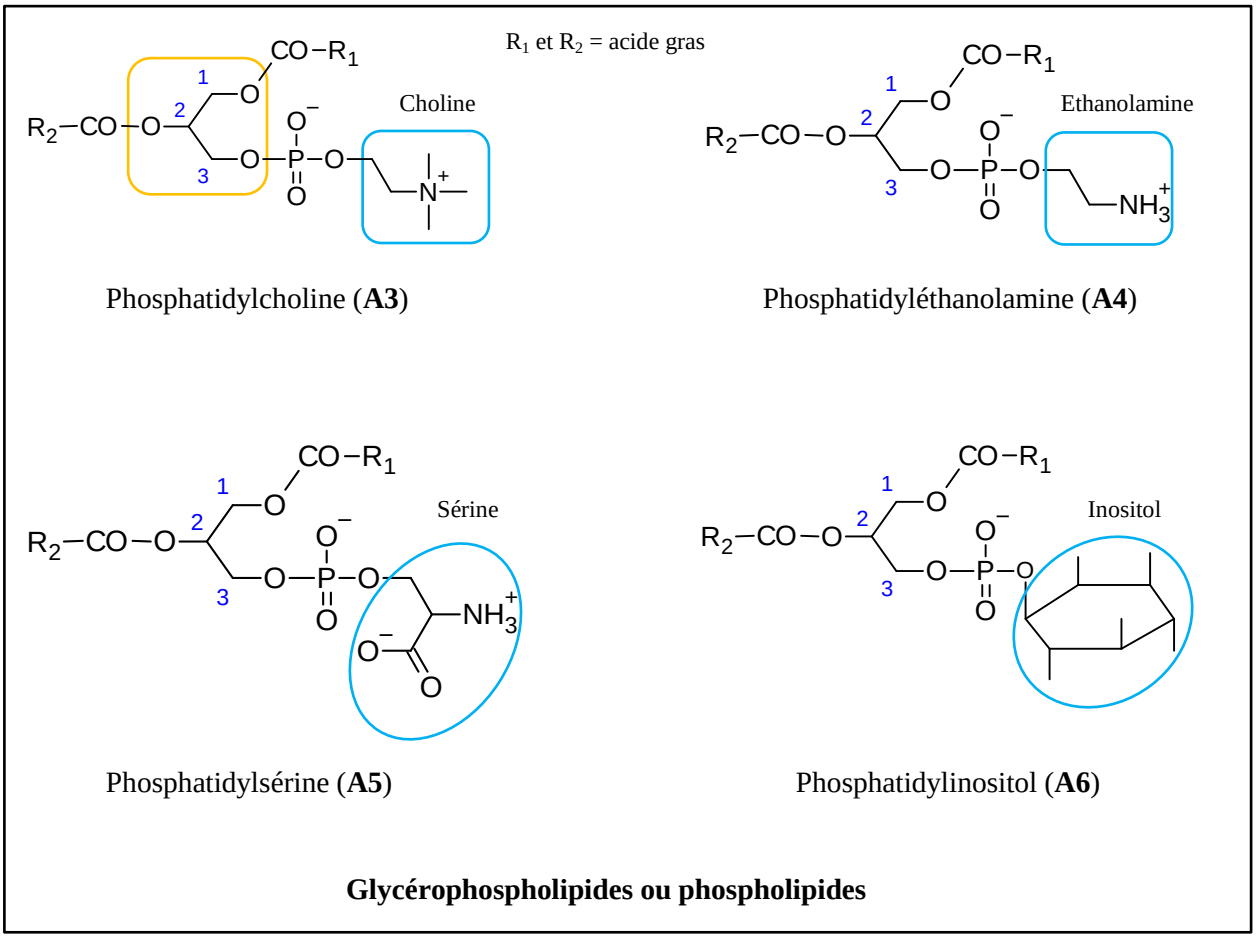
Batilol (**S2**)

Alkylglycérol (**AKG**)

❖ Les Phospholipides

Les phospholipides sont obtenus par estérification des fonctions alcool présentes sur le glycérol :

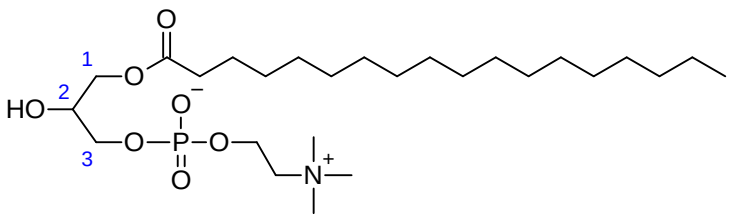
1. En position C-1 (carbone 1) et C-2 (carbone 2) par des acides gras,
2. En position C-3 (carbone 3) par de l'acide phosphorique lié ou non à un aminoalcool (choline, éthanolamine ou sérine) ou à l'inositol. Différentes classes de PL peuvent ainsi être formées : les phosphatidylcholines (PC) (**A3**), les phosphatidyléthanolamines (PE) (**A4**), etc.



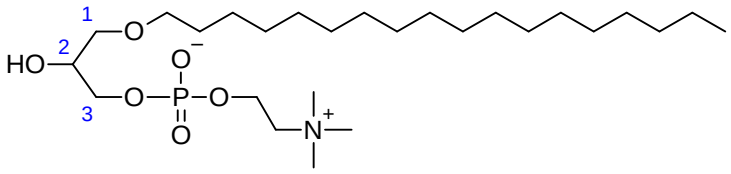
Glycérophospholipides ou phospholipides

❖ Les Lysophospholipides

Les lysophospholipides (LysoPL) sont formés par hydrolyse des PL sous l'action de différentes enzymes/lipases (phospholipases). Ainsi, les LysoPL, comme le LysoPC (**A7**), sont des monoglycérophospholipides constitués d'un résidu glycérol avec une substitution en C-3 par la phosphorylcholine. La position C-1 est occupée par des acides gras de longueur de chaine et d'insaturation variable ; les acides gras à 16, 18 et 20 carbones étant les plus courants. Ces acides gras peuvent être liés au glycérol soit par une liaison ester soit par une liaison éther donnant lieu aux éthers lipides tels que les analogues du Lyso-PAF (**A8**).



1-stearoyl-lysophosphatidylcholine (**A7**)



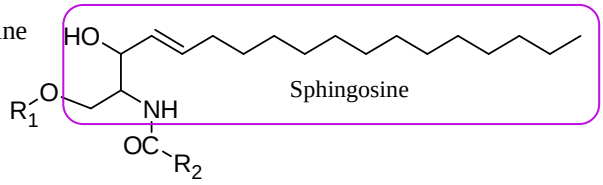
Lyso-PAF (**A8**)
1-octadécylglycéro-3-phosphocholine

Lysophospholipides

❖ Les Sphingolipides

Les sphingolipides (SL) sont formés à la suite de la fixation d'un acide gras sur la sphingosine par une liaison amide pour donner les **céramides** (**A9**). Les sphingosines sont de longues chaines aliphatiques, saturées ou non, avec une partie 2 amino-1,3-dihydroxy. Les céramides représentent les formes les plus simples de SL. Les sphingomyélines (**A10**), formes les plus complexes, sont constitués par l'association sphingosine, AG et phosphorylcholine.

R_1 = H ou phosphorylcholine
R_2 = acide gras



R_1 = H céramides (**A9**)
R_1 = $C_5H_{15}NO_4P^+$ Sphingomyélines (**A10**)

Sphingolipides

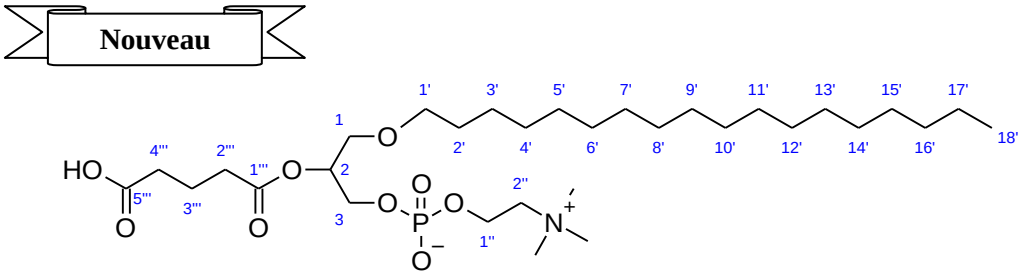
Ces lipides complexes (phospholipides et sphingolipides) sont les principaux constituants des membranes biologiques des organismes vivants. Ce sont toutefois, les PL qui prédominent dans les membranes ; les PC étant les plus abondants. Chez les éponges, les abondances relatives des différentes classes de PL varient en fonction des espèces d'éponges considérés, toutefois, certains auteurs indiquent que ce sont les PL aminés qui prédominent notamment les PC et PE [Genin *et al.*, 2008; Djerassi et Lam, 1991]. D'après les résultats de Genin, il ressort que la présence de sphingomyélines (**A11**) n'est pas systématique chez les éponges. L'exceptionnel capacité d'adaptation des éponges, habitants divers environnements marins depuis l'ère du cambrien, pourrait être expliqué par les structures originales et parfois uniques que présentent certains des constituants de leurs membranes [Morales et Litchfield, 1976; Djerassi et Lam, 1991].

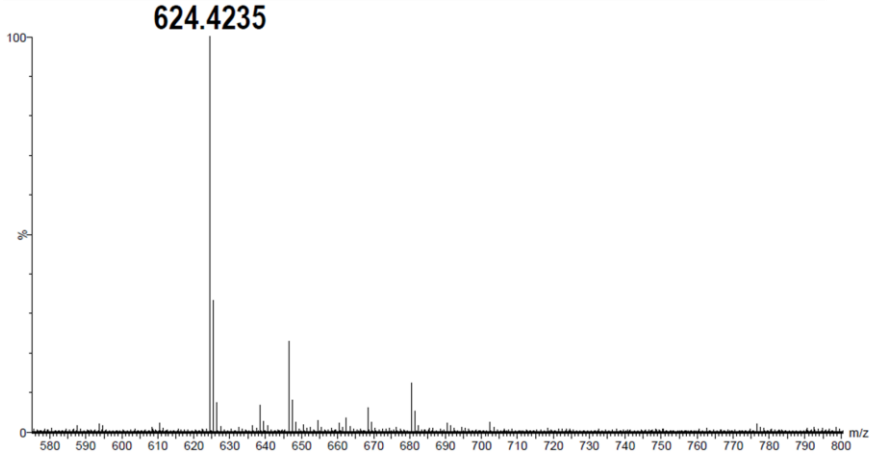
En raison de leurs structures originales et parfois uniques, les lipides d'éponges ont été particulièrement étudiés [Djerassi et Lam, 1991; Morales et Litchfield, 1976; Barnathan *et al.*, 1996; Dembitsky *et al.*, 2003]. Cette originalité structurale est essentiellement portée par les acides gras. En effet, leurs phospholipides contiennent une forte proportion d'acides démospongiques (> 80 %) [Bergé et Barnathan, 2005]. Ces acides gras caractéristiques des éponges sont principalement rencontrés parmi les PE tandis que les acides gras conventionnels (C_{14} – C_{20}) sont davantage présents parmi les PC [Djerassi et Lam, 1991]. Les éponges sont également une riche source d'éthers lipides (PL et LysoPL) [Smith et Djerassi, 1987].

ANNEXE 4

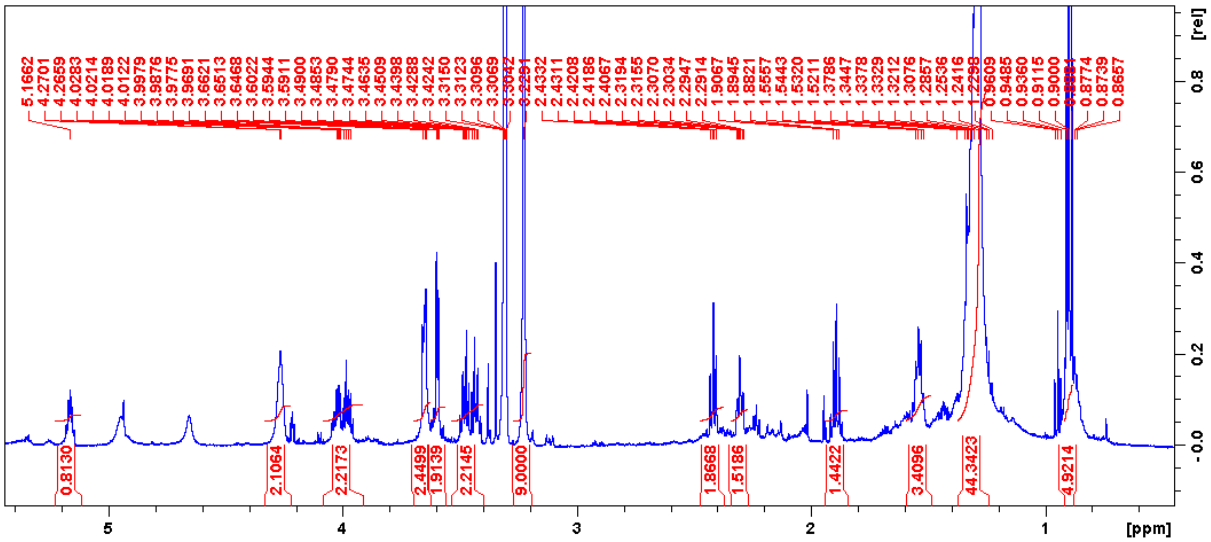
Données spectrales des métabolites isolés de l'éponge *Scopalina hapalia.*

❖ Données spectrales du métabolite SH1

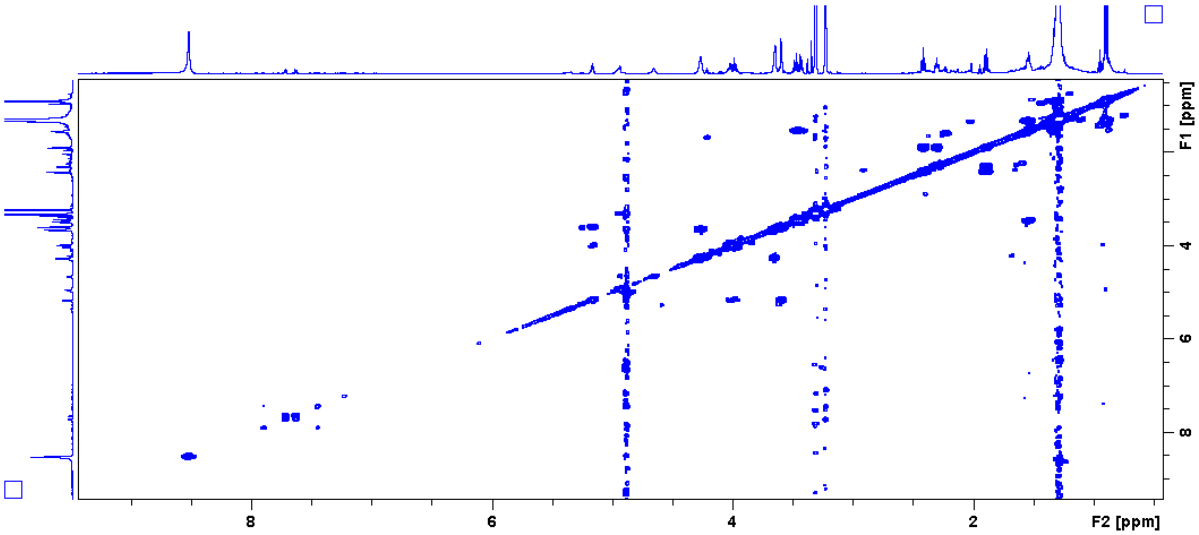




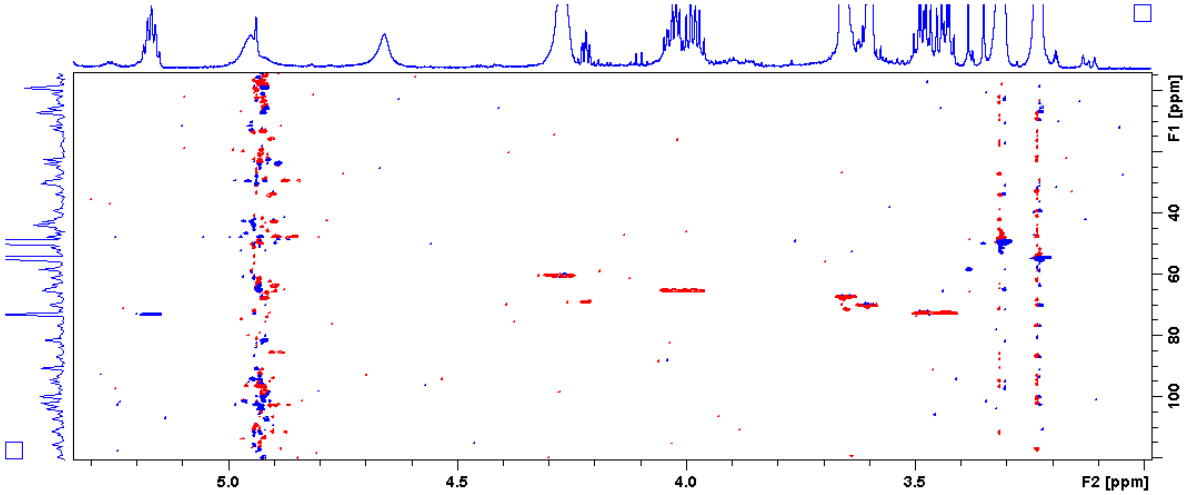
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



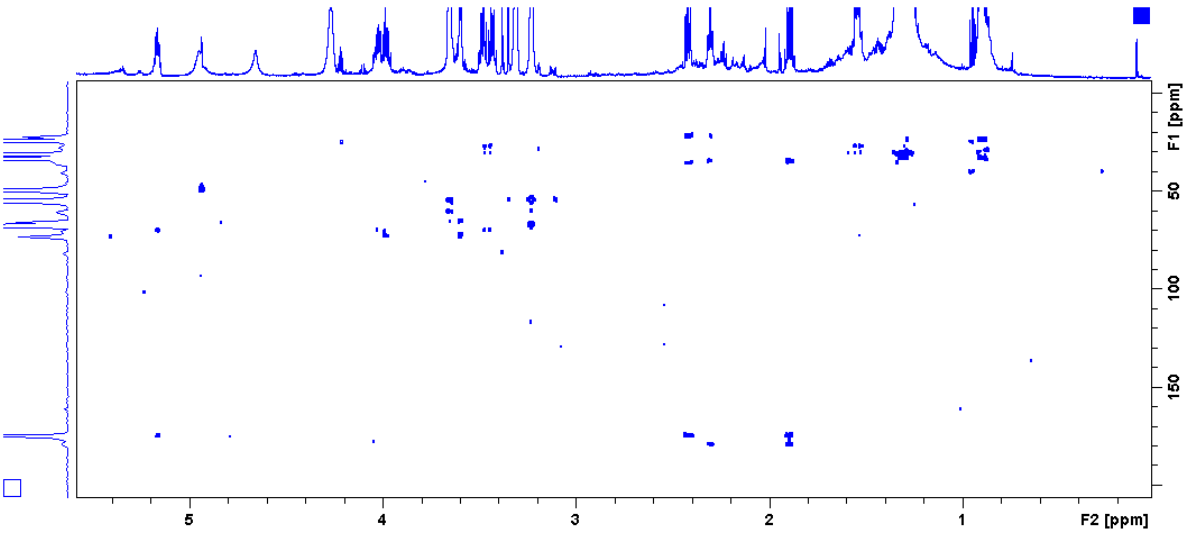
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



Spectre COSY (CD_3OD, 600 MHz)

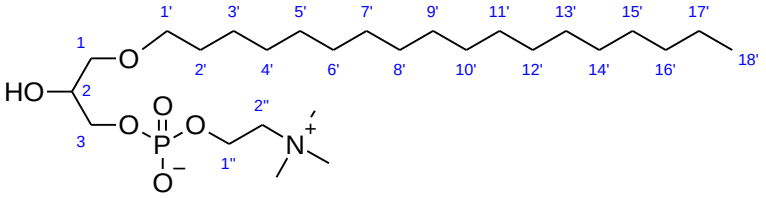


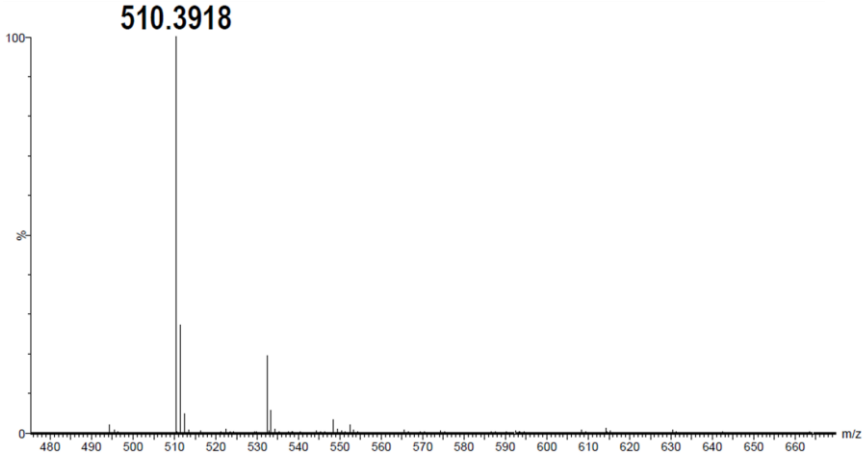
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)



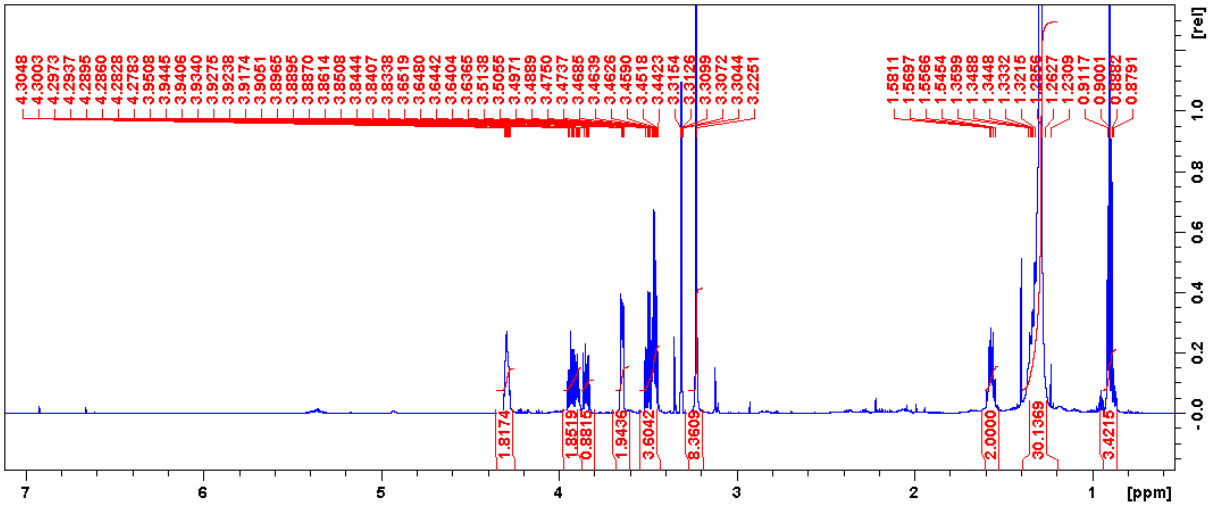
Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH2

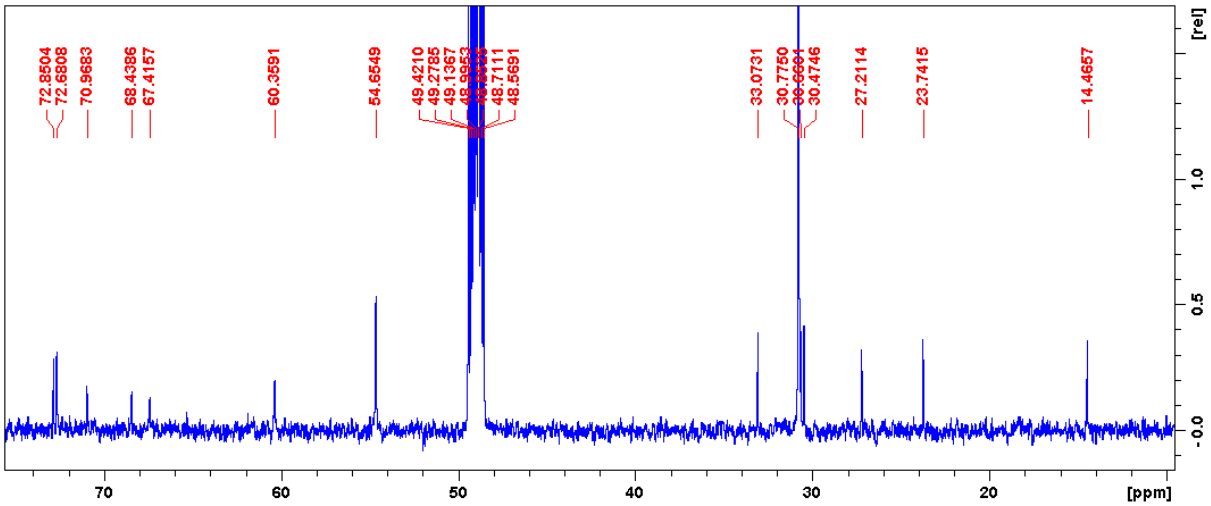




Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)

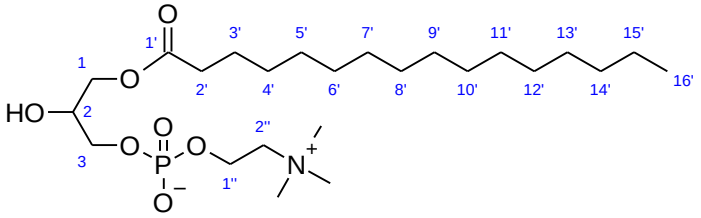


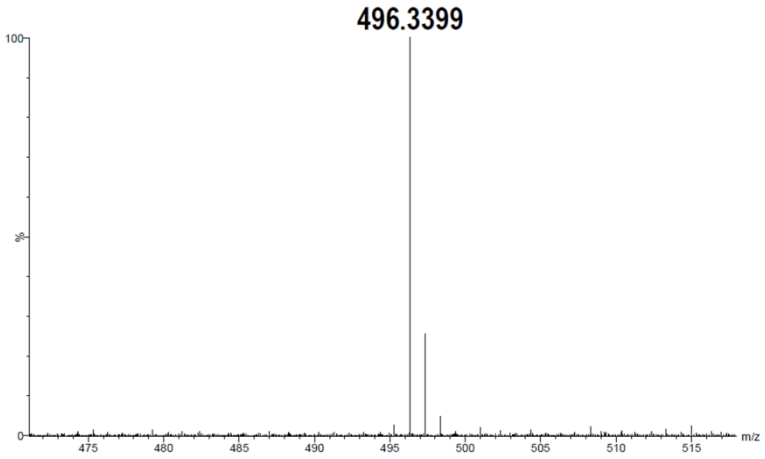
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



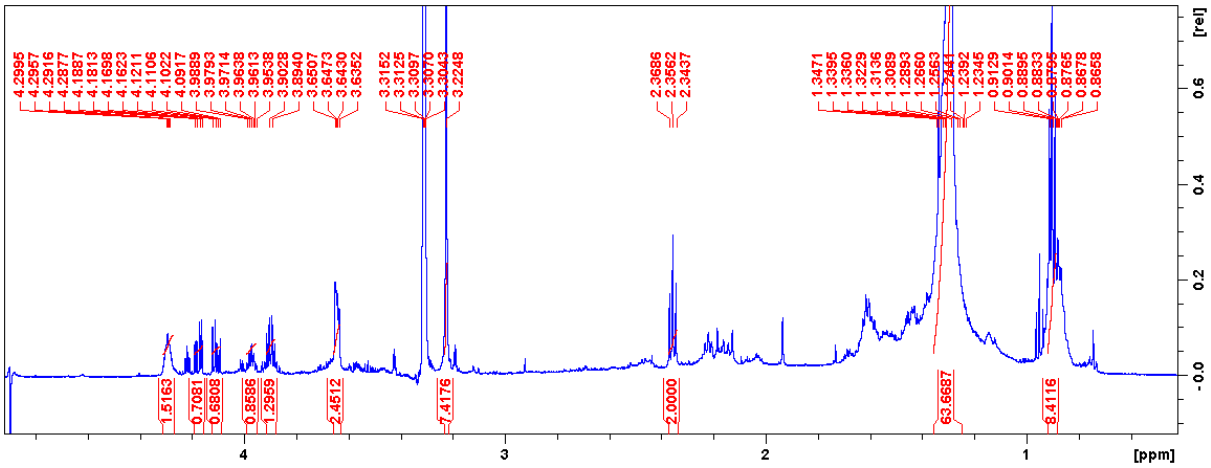
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH3

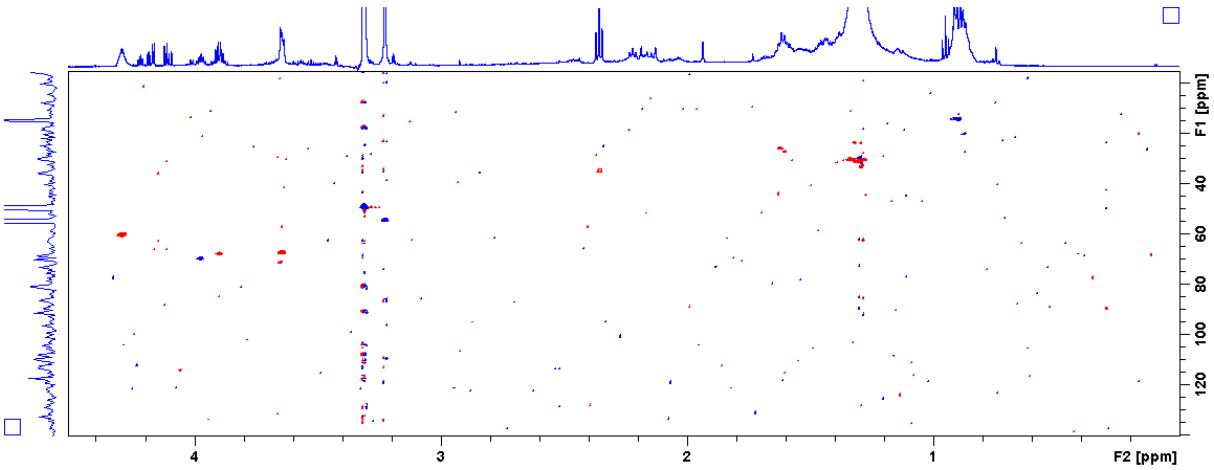




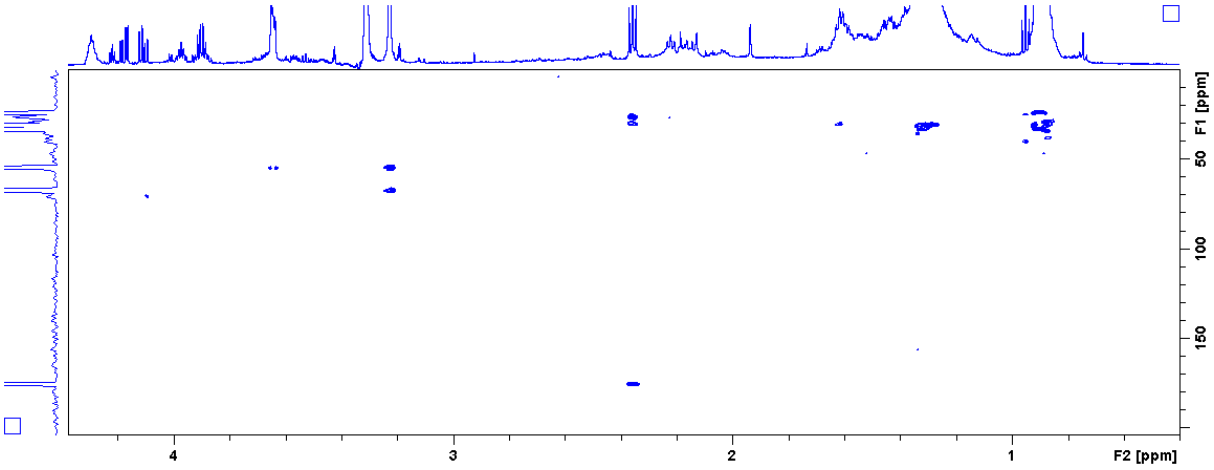
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

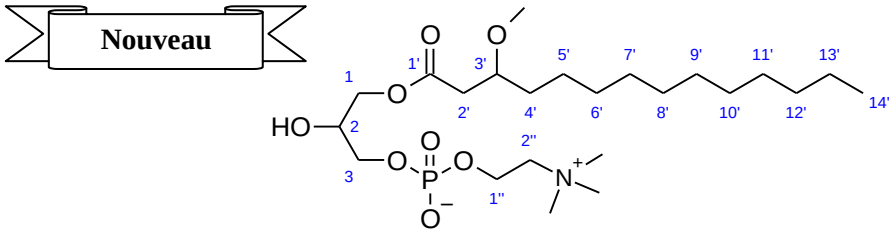


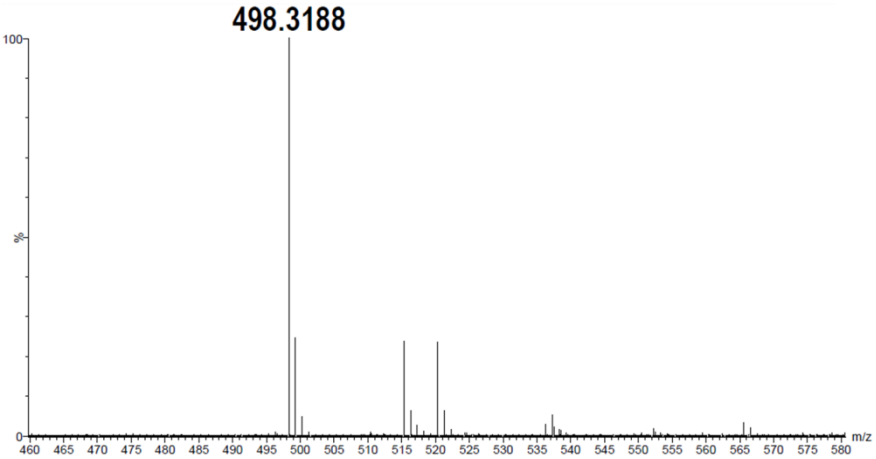
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)



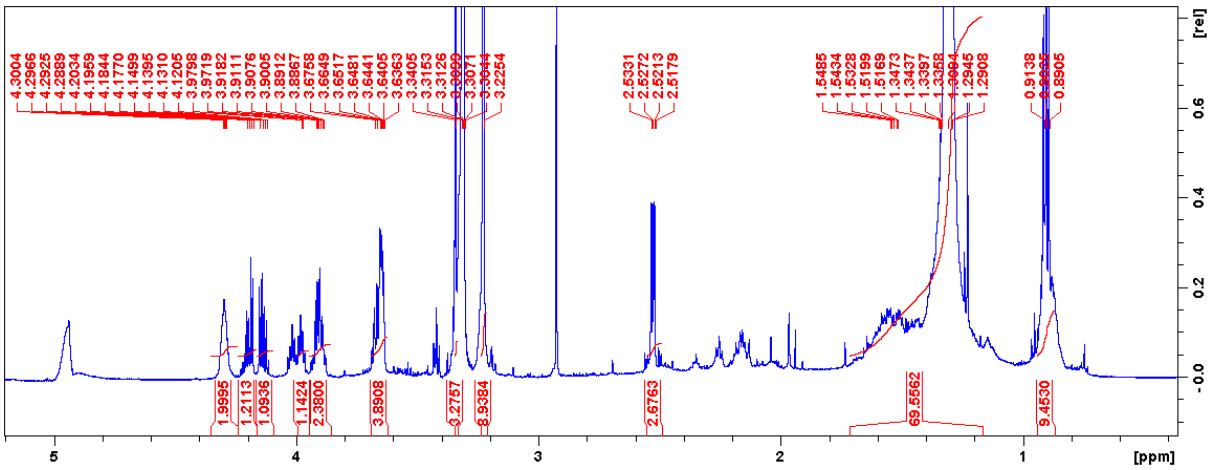
Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH4

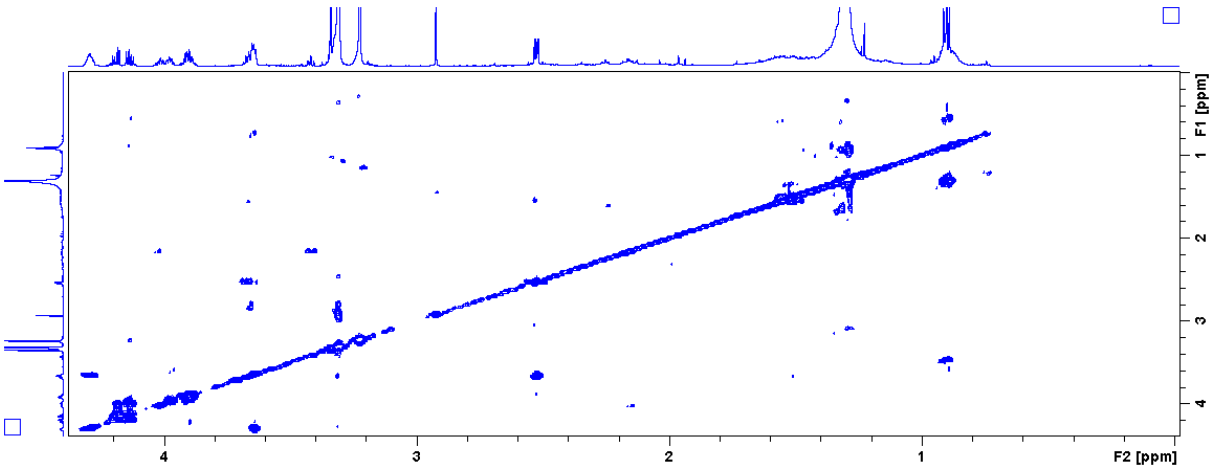




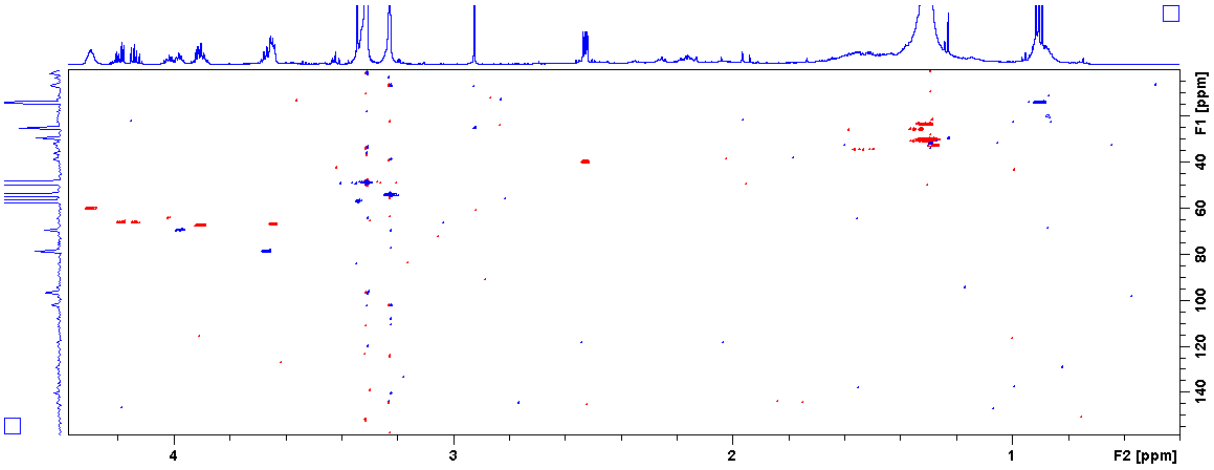
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

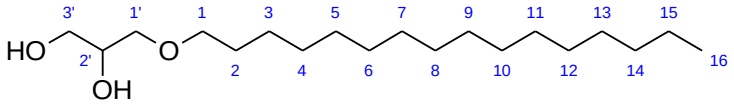


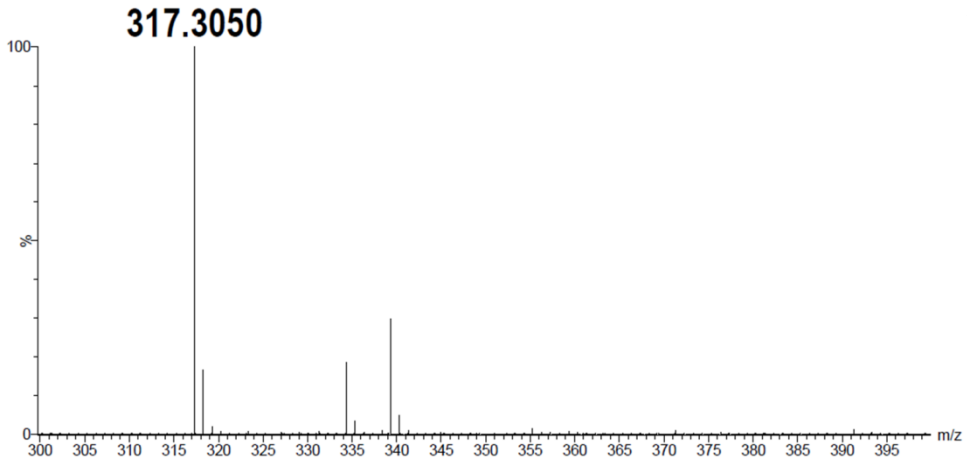
Spectre COSY (CD_3OD, 600 MHz)



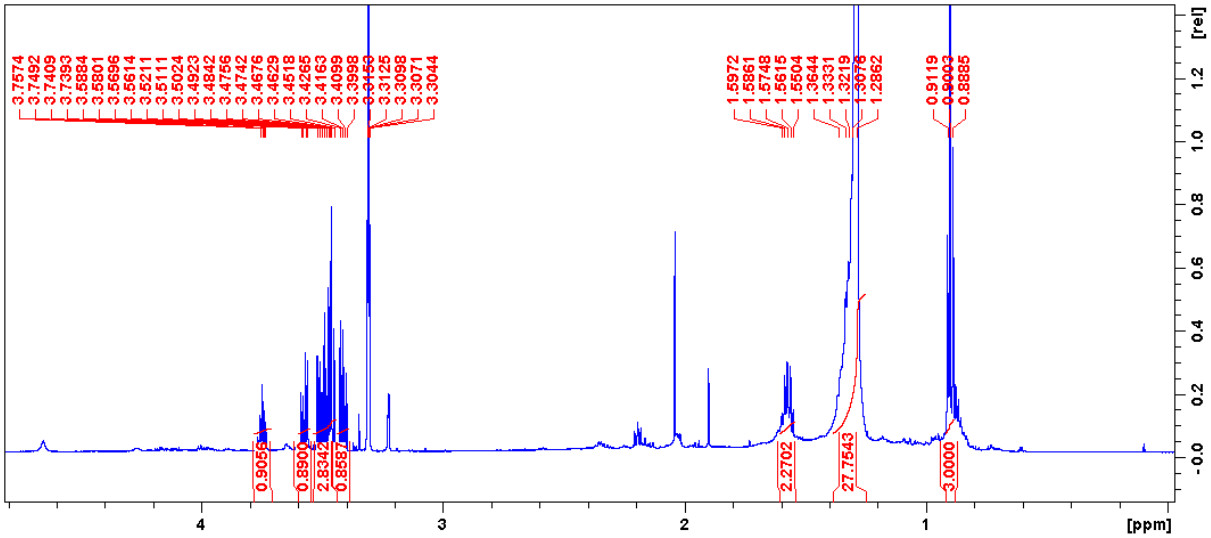
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH5



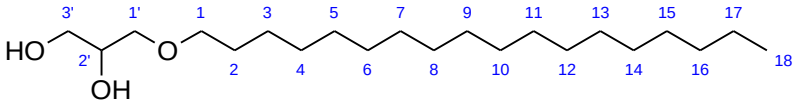


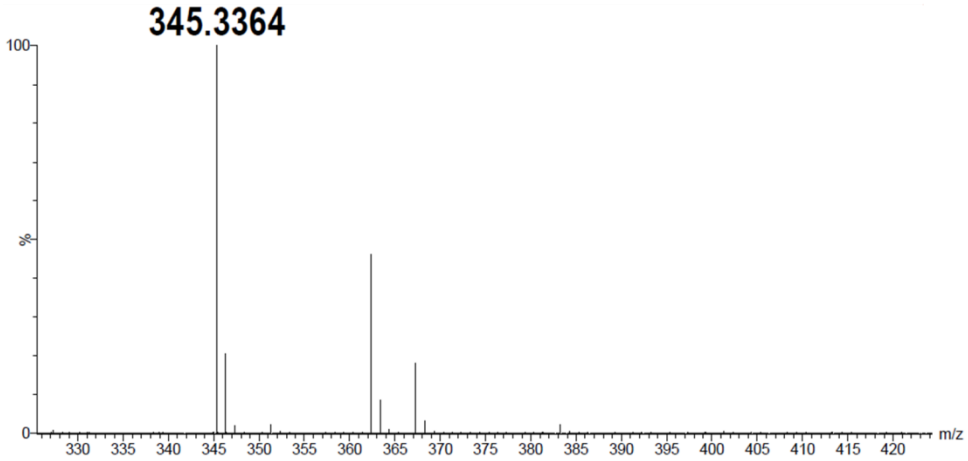
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



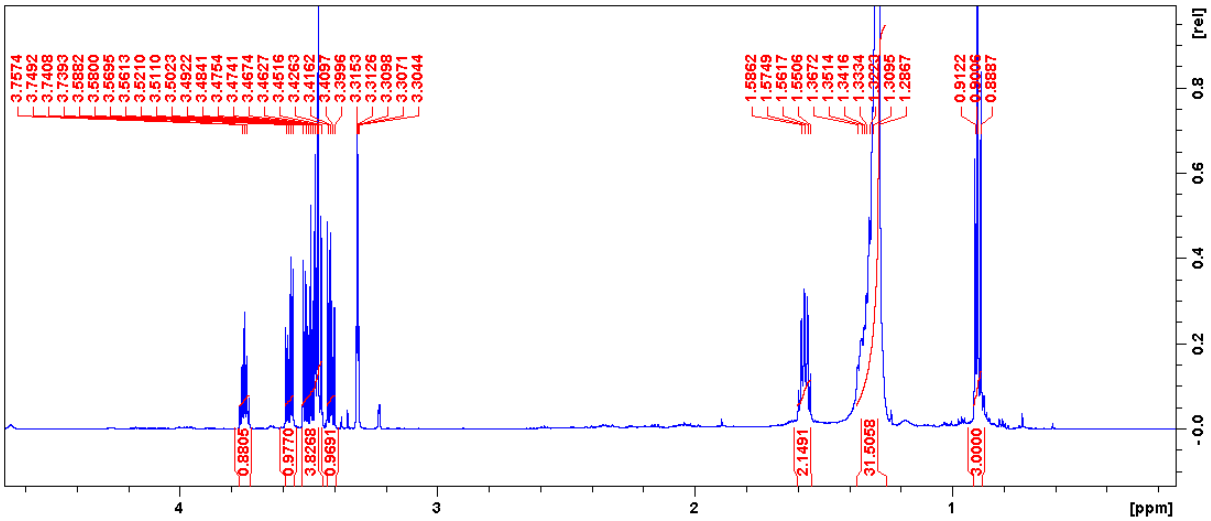
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH6



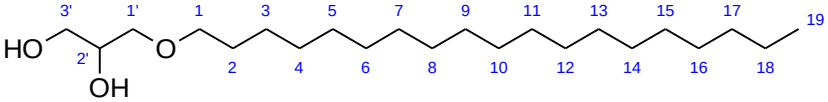


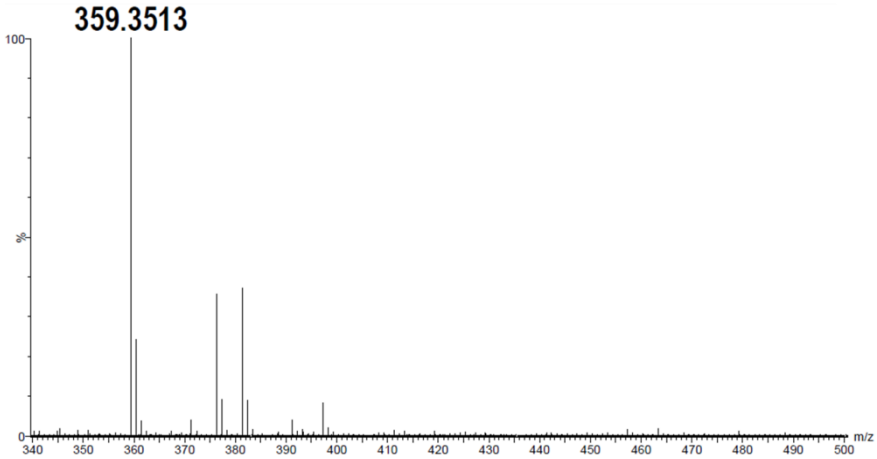
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



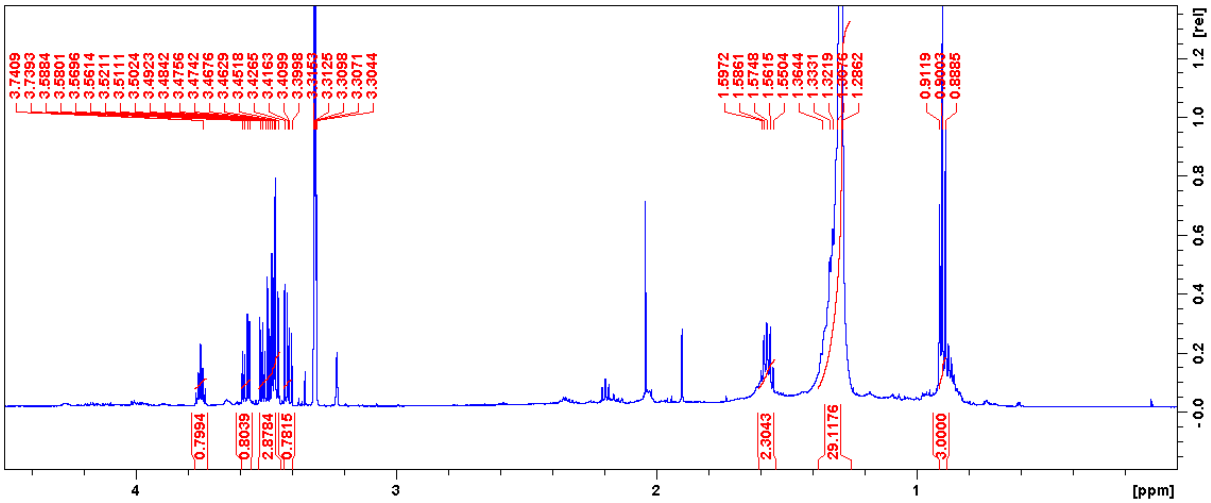
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH7



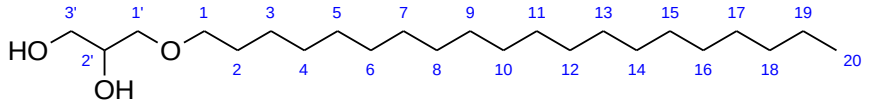


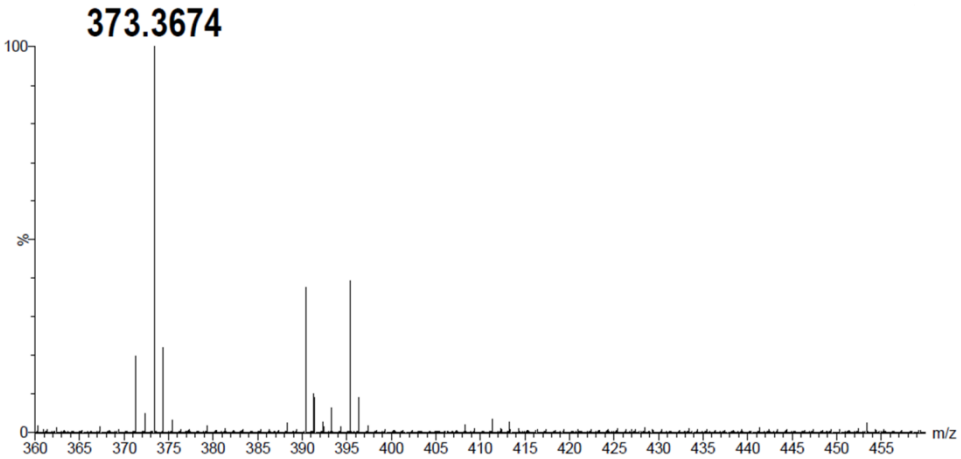
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



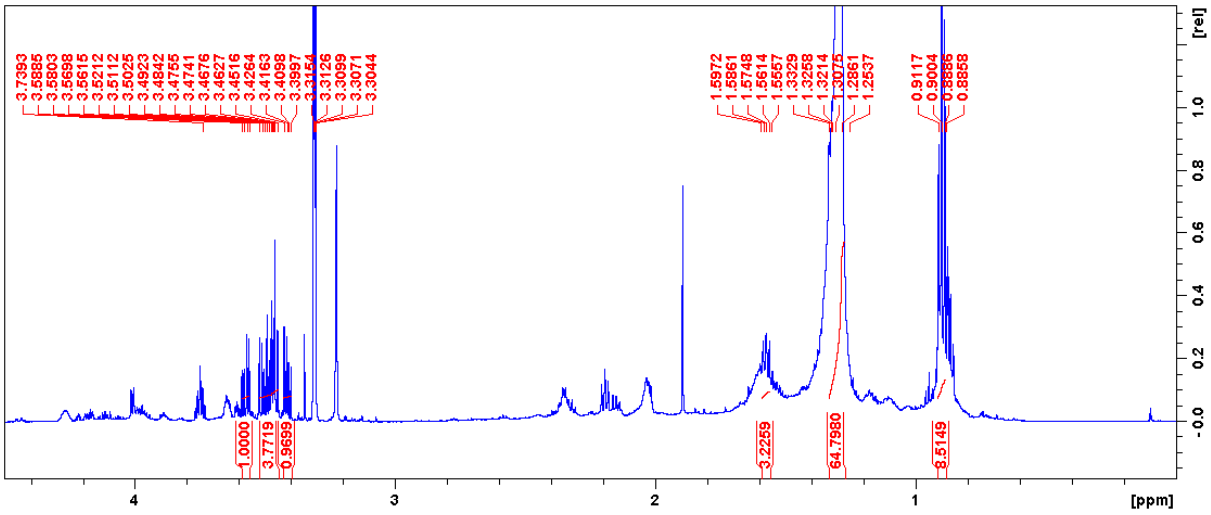
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH8



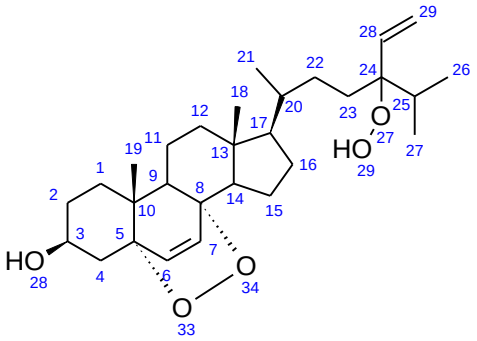


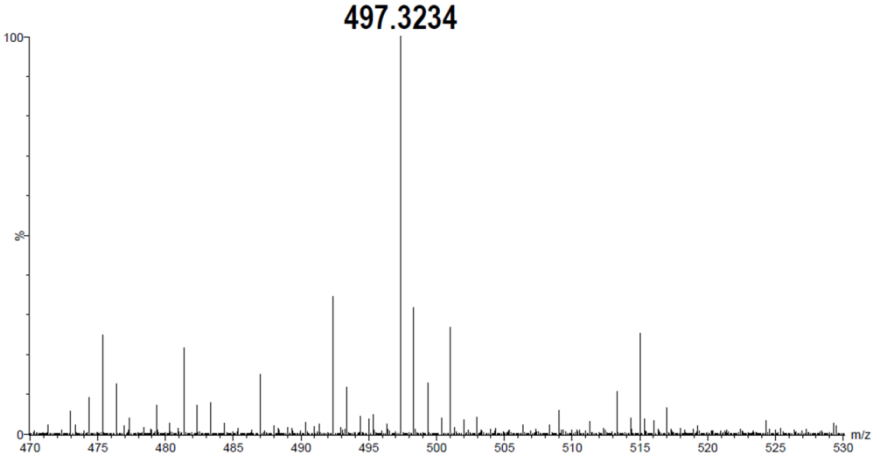
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



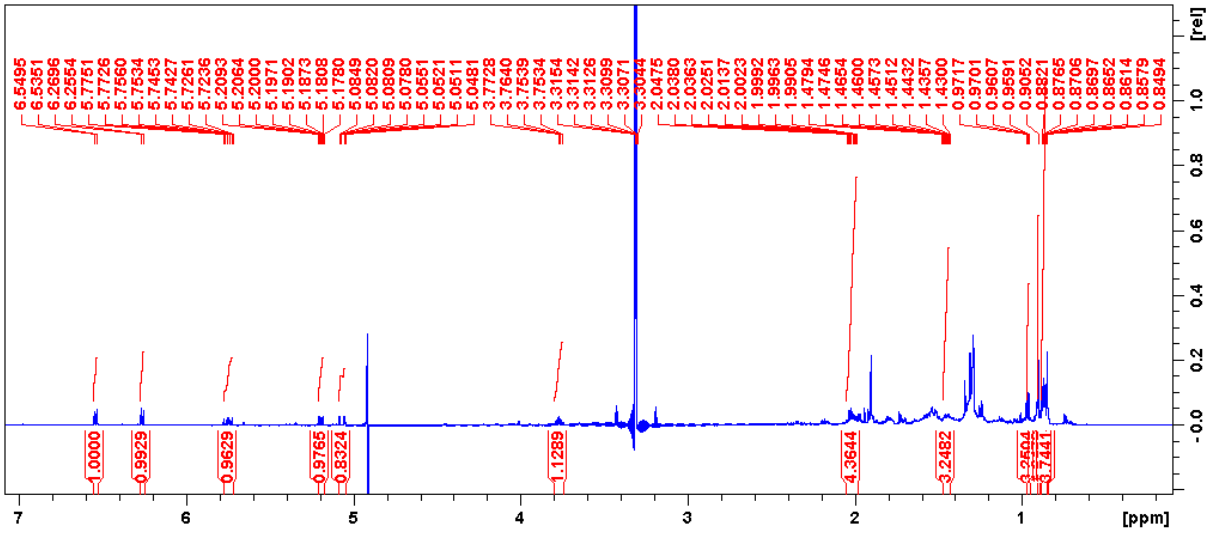
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH9

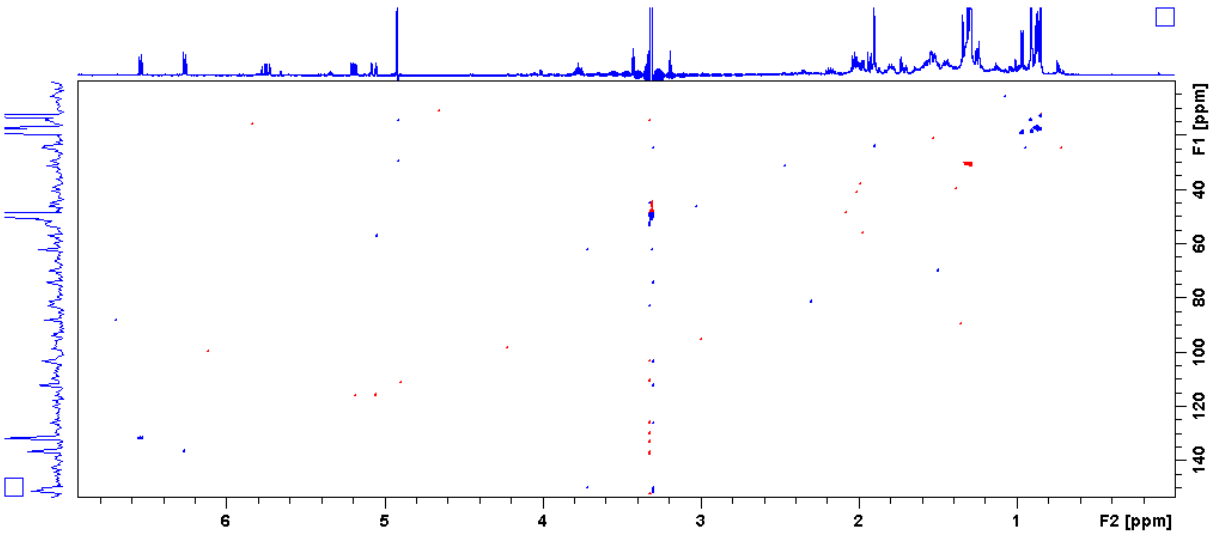




Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)

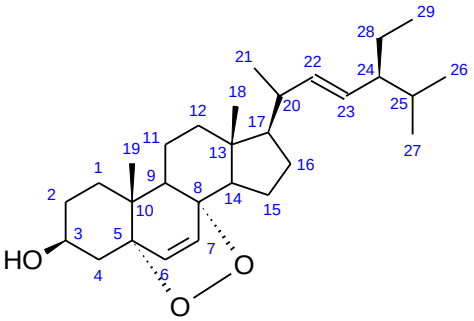


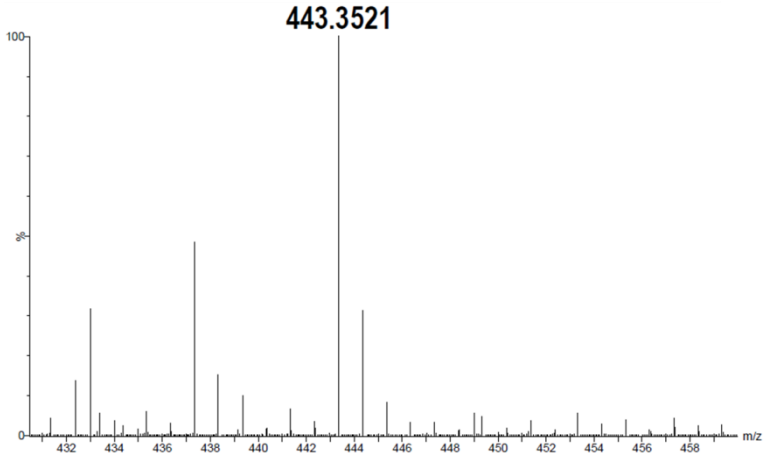
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



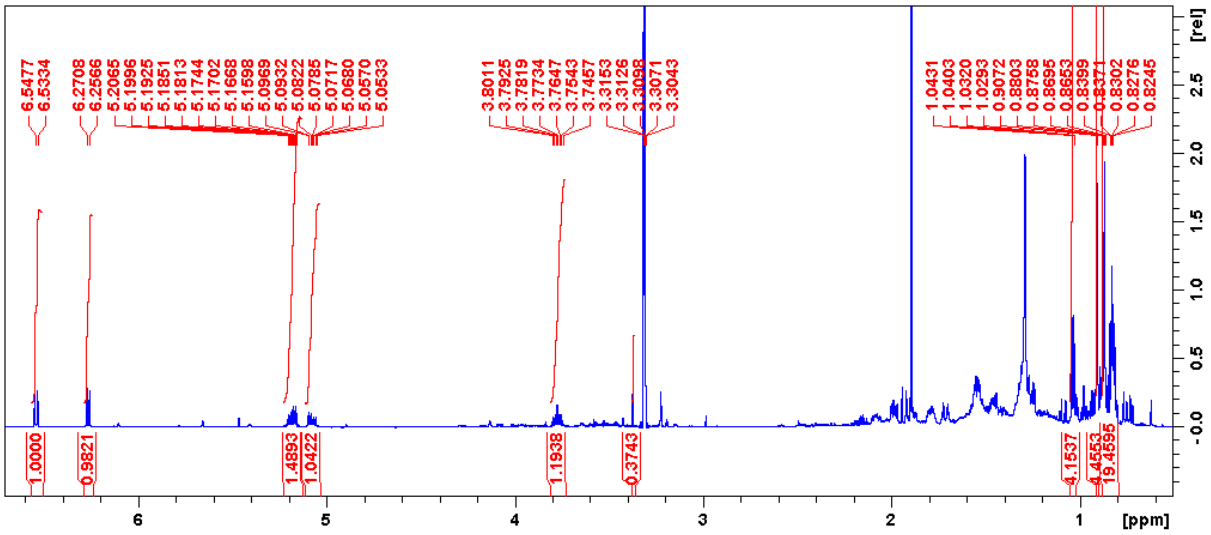
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH10

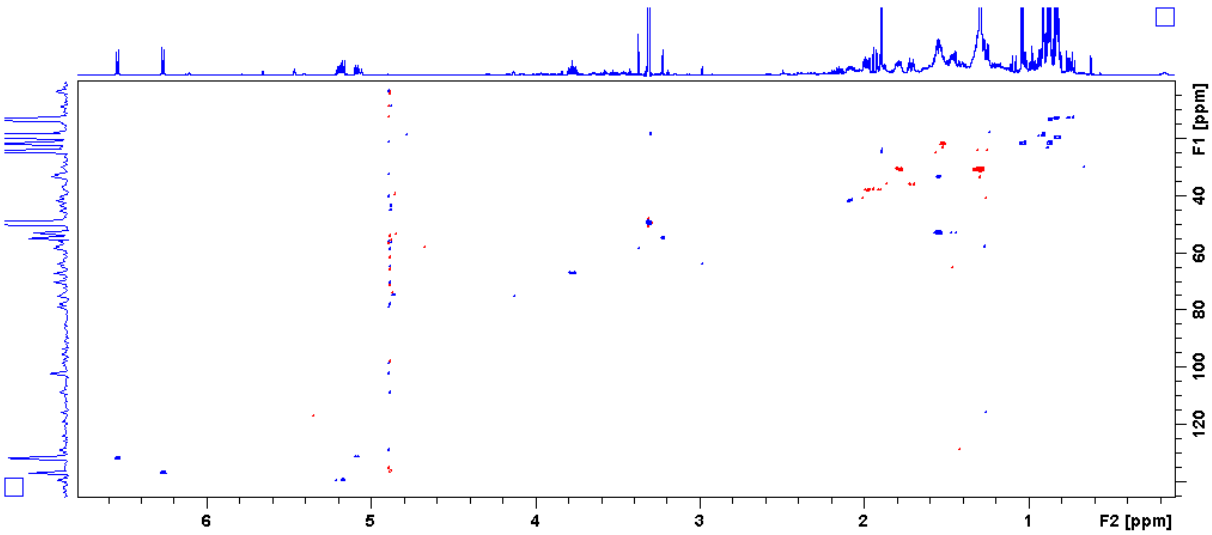




Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)

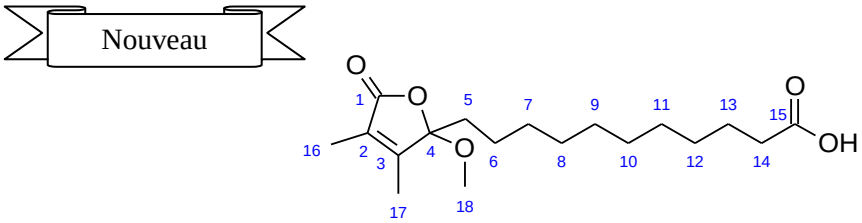


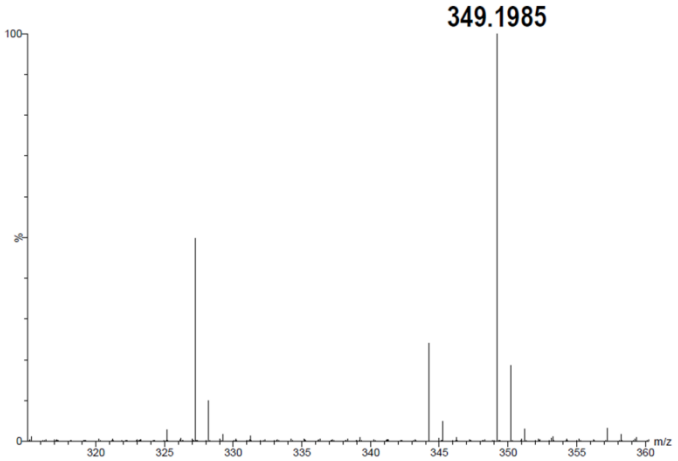
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



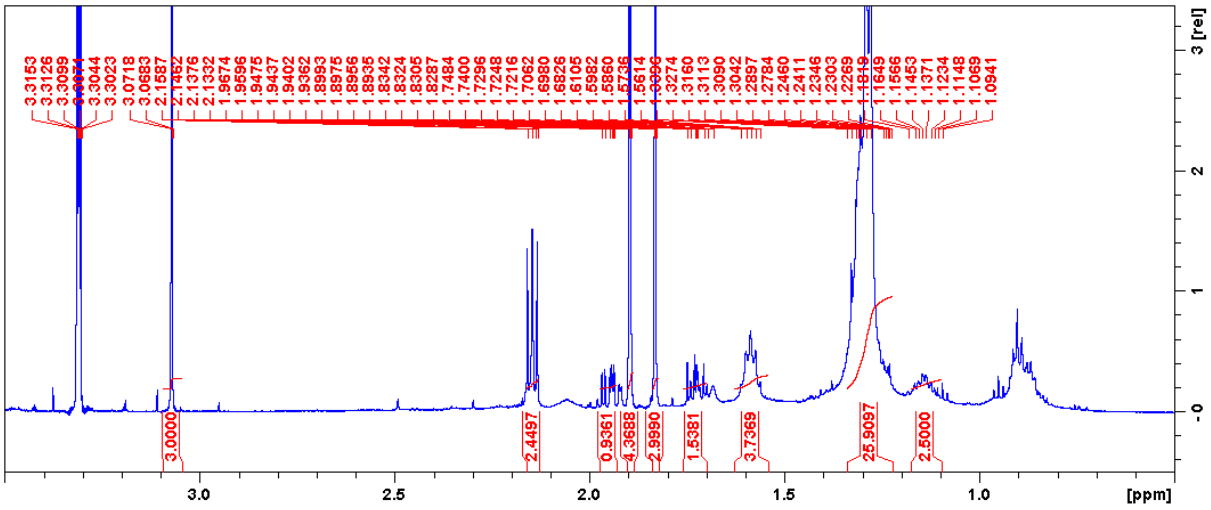
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH11

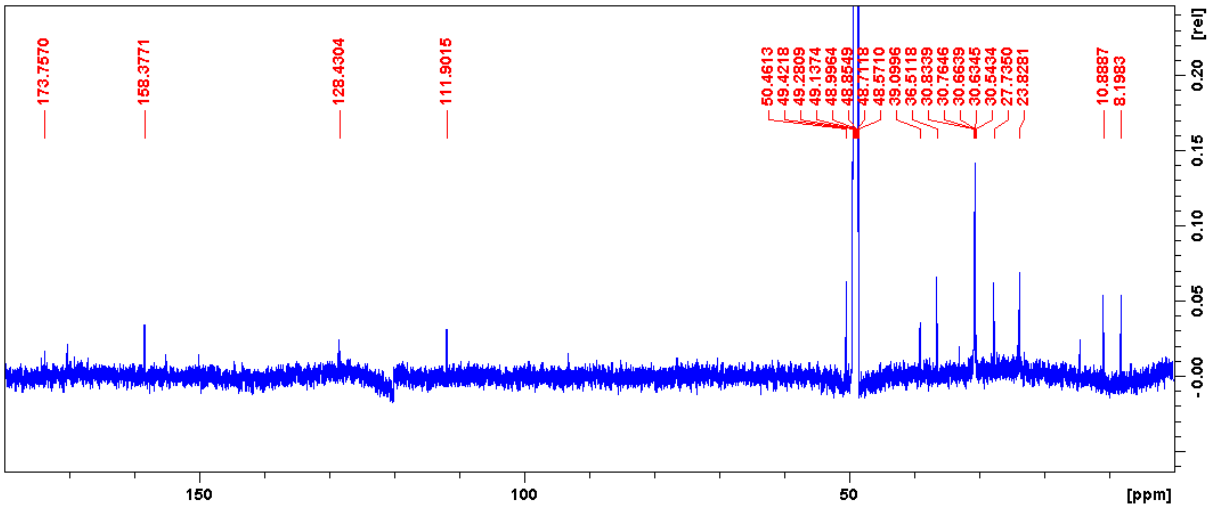




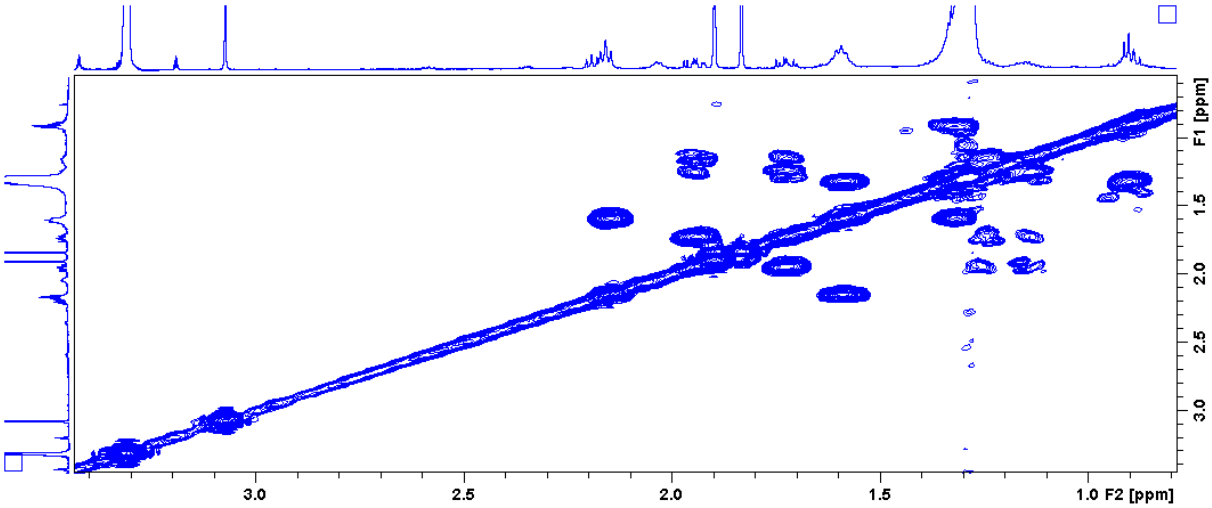
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



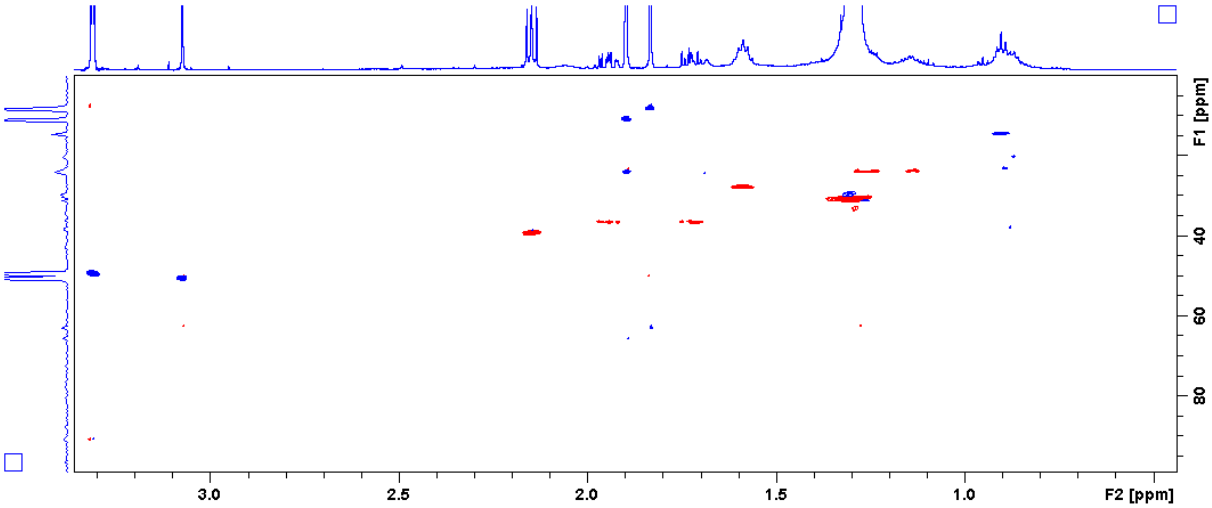
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



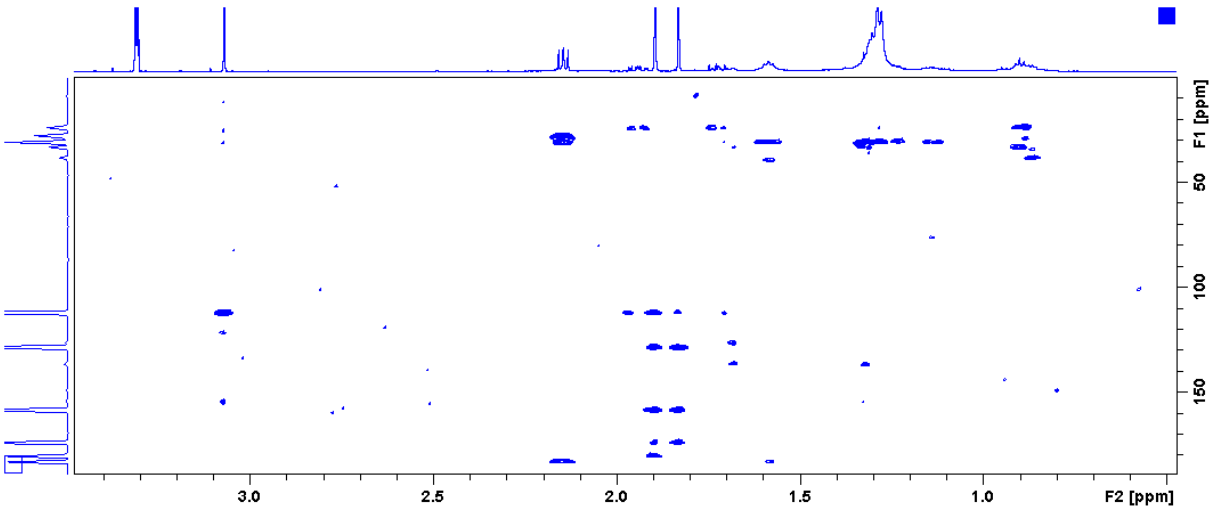
Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD, 150 MHz)



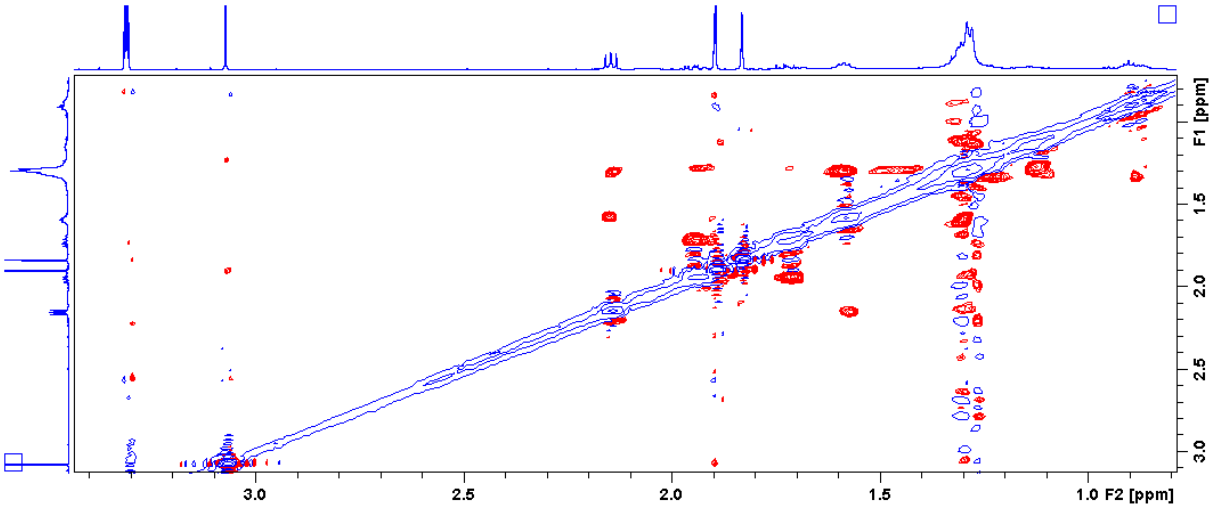
Spectre COSY (CD_3OD, 600 MHz)



Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)

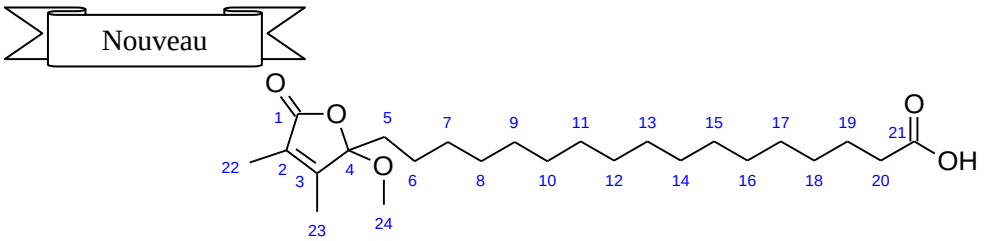


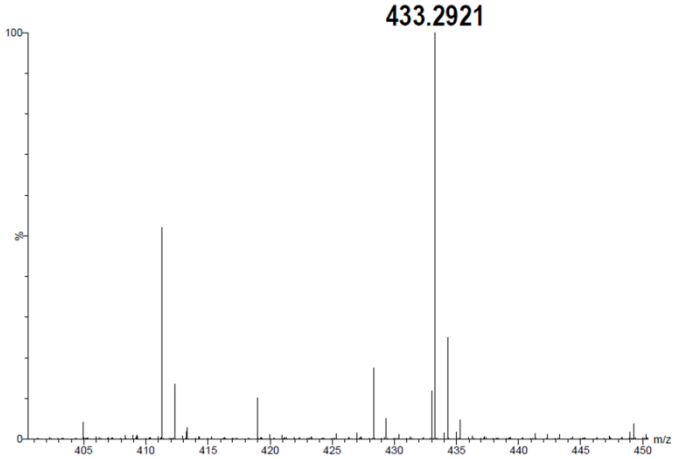
Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)



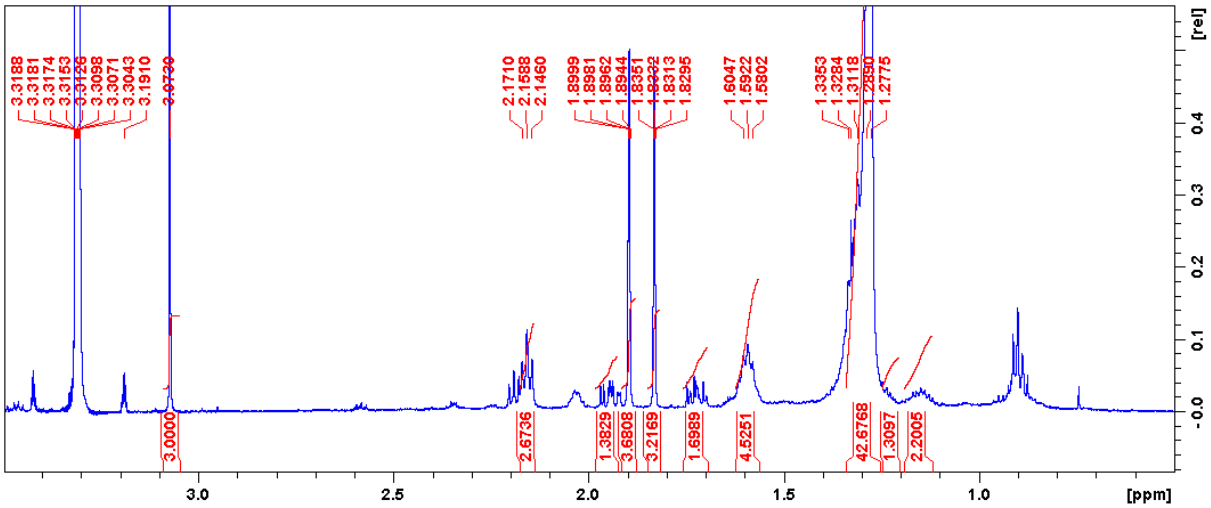
Spectre NOESY (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH12

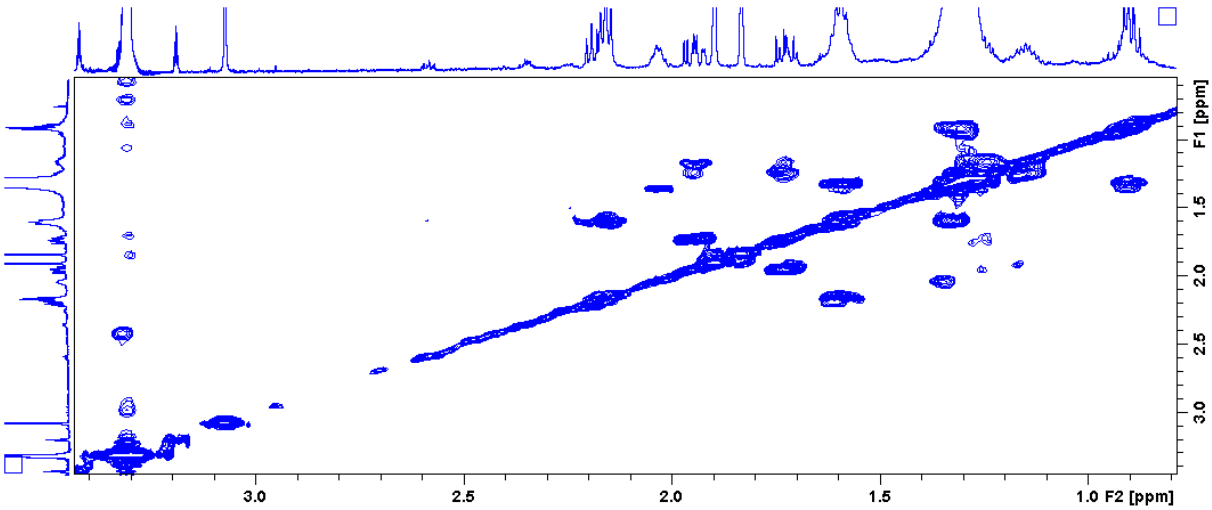




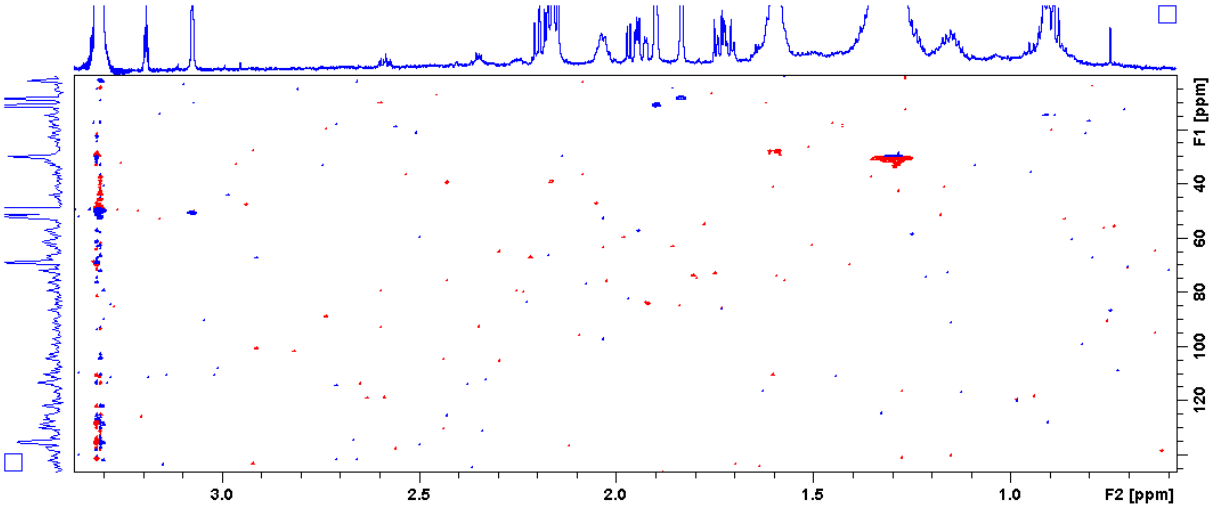
Spectre de masse haute résolution en mode positif (ESI^+)



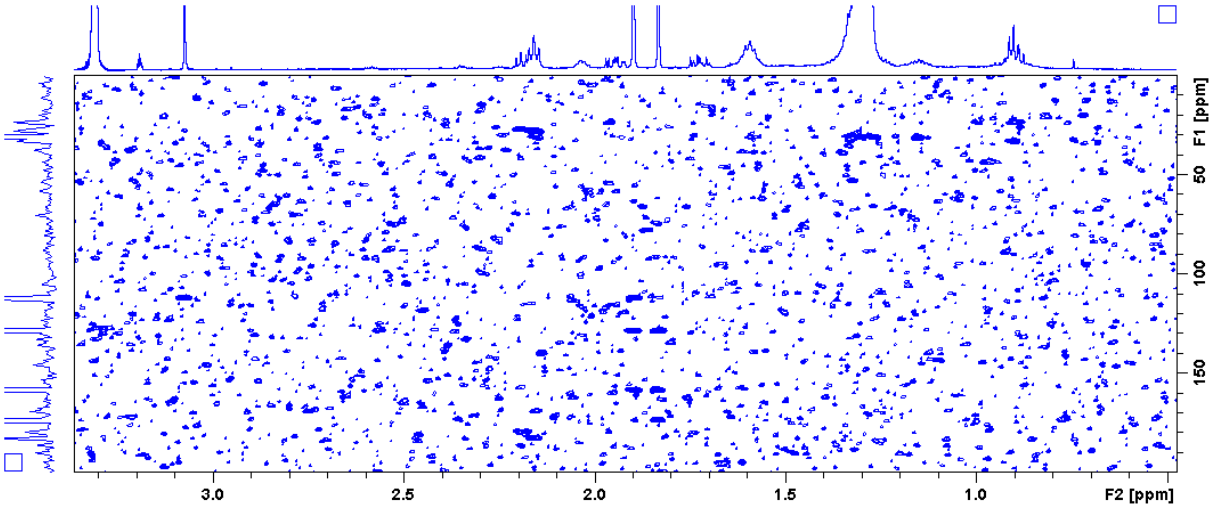
Spectre RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz)



Spectre COSY (CD_3OD, 600 MHz)

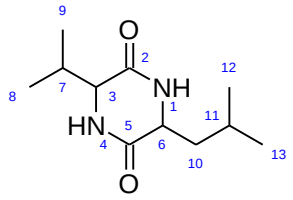


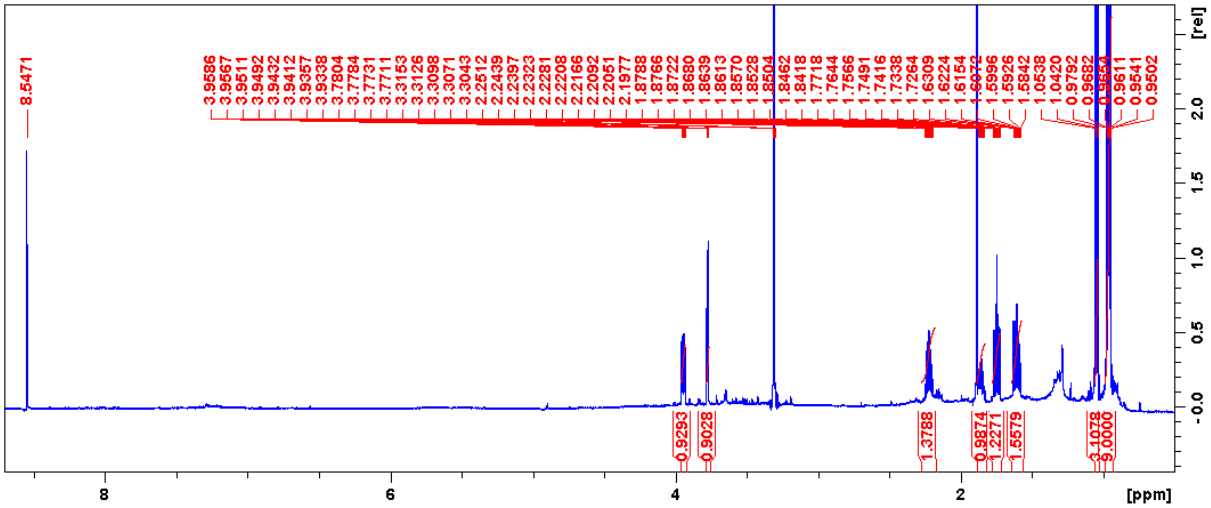
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)



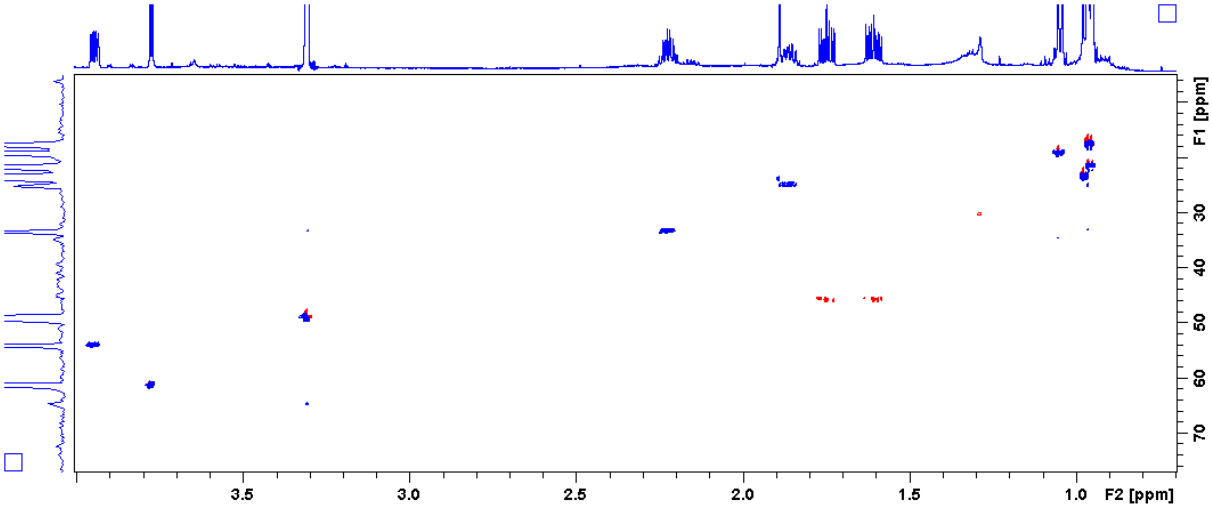
Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH13

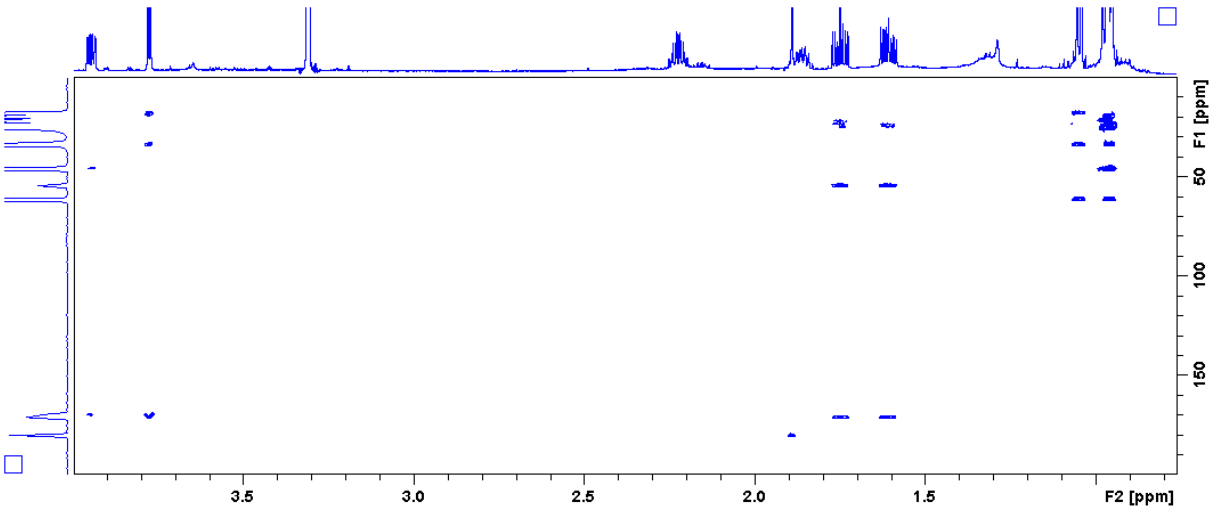




Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz)

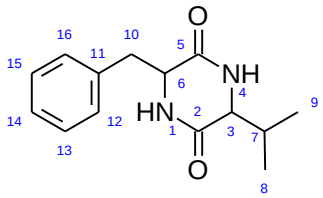


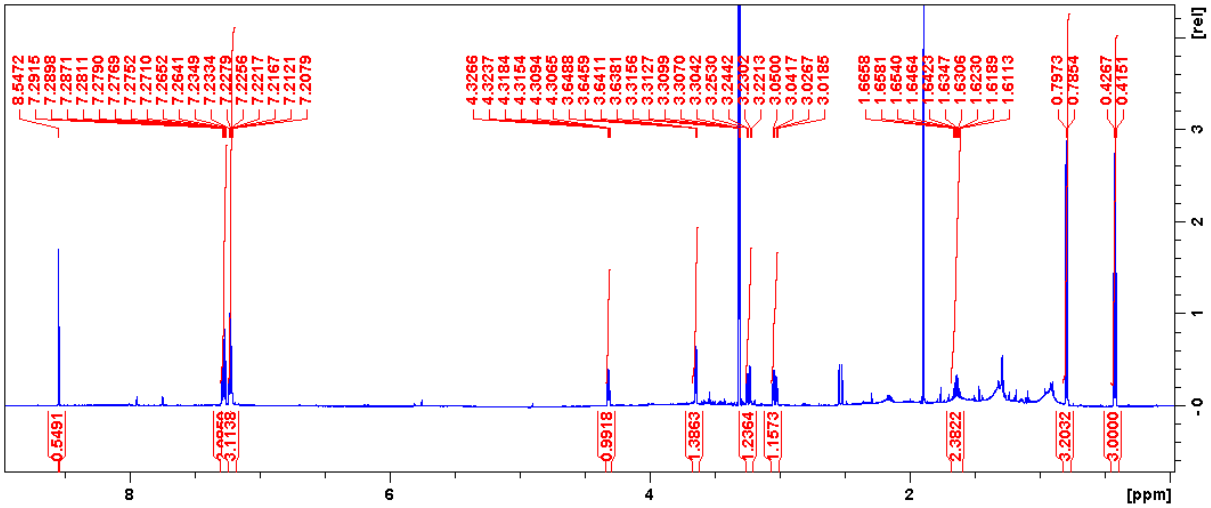
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)



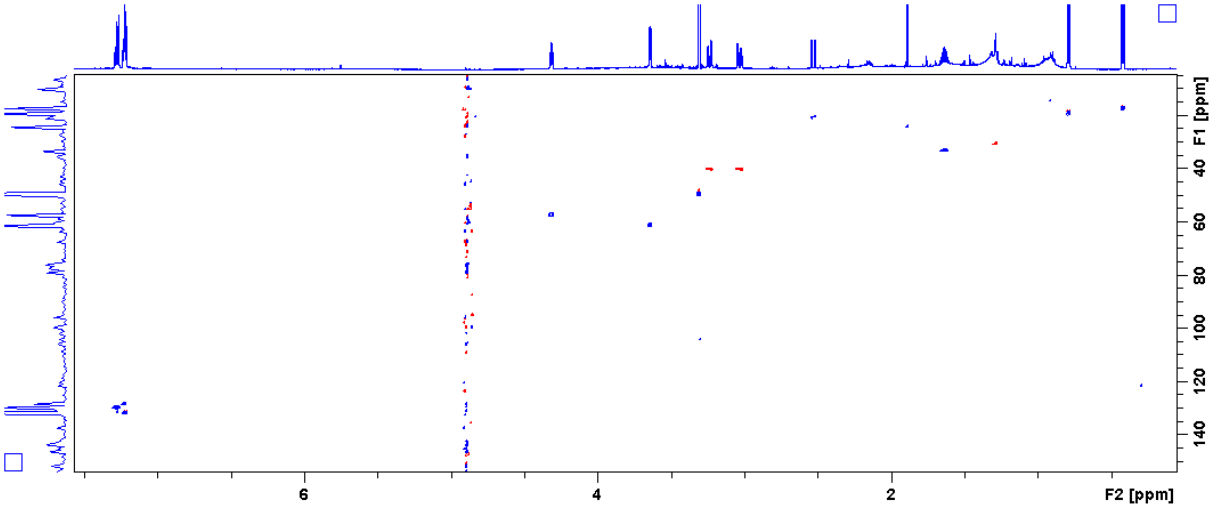
Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

❖ Données spectrales du métabolite SH14

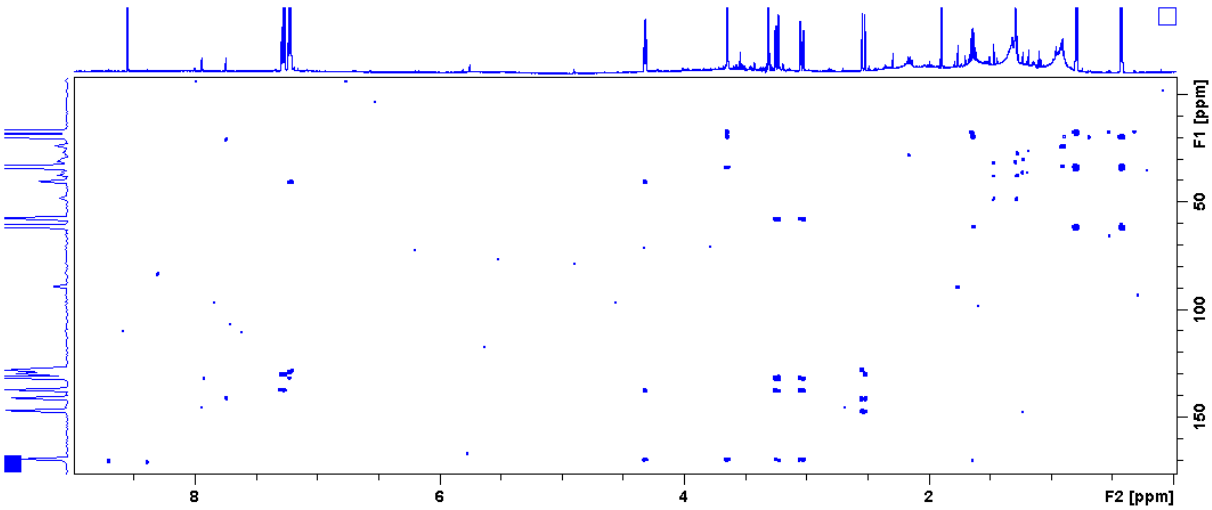




Spectre RMN ^{1}H (CD_3OD, 600 MHz)



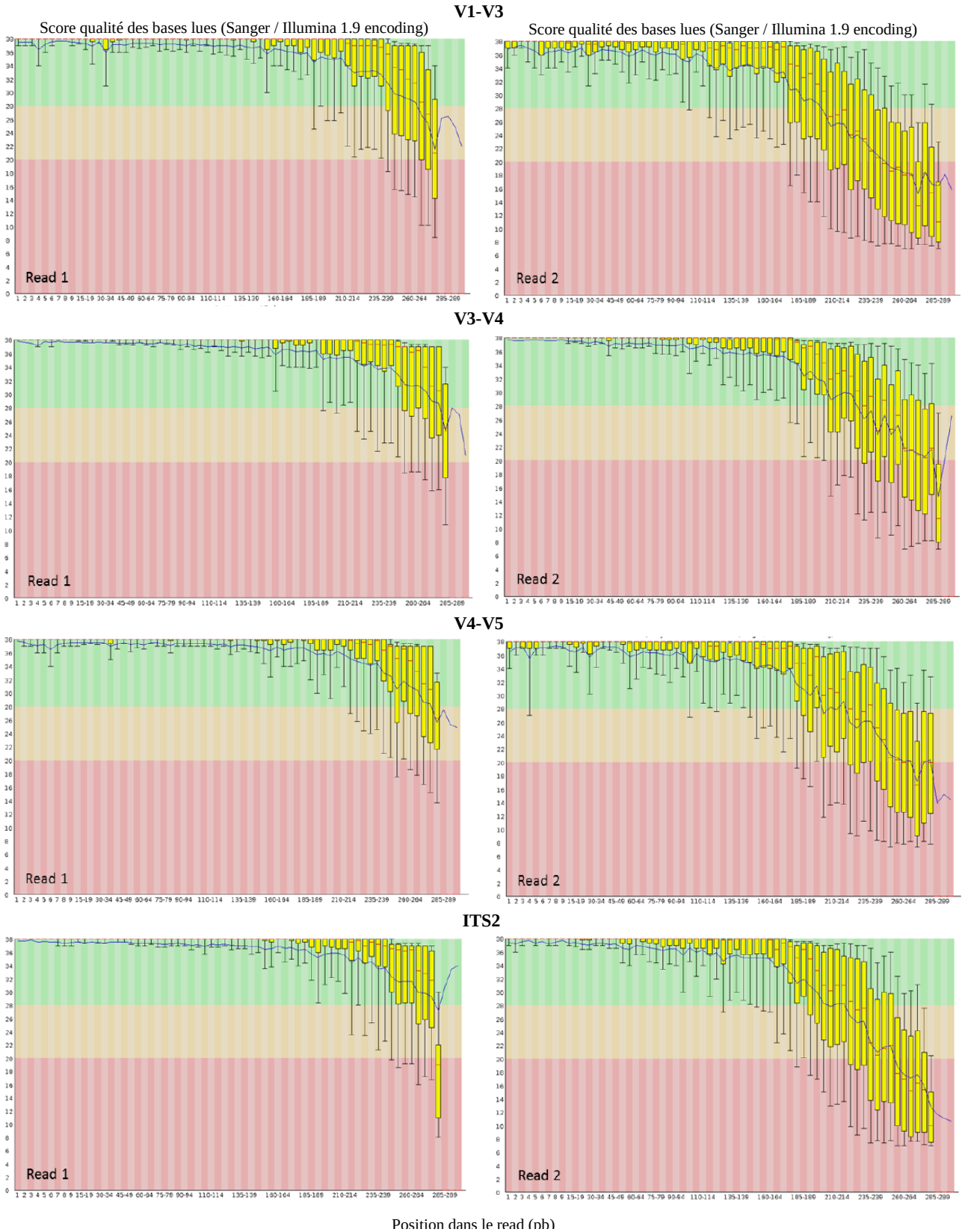
Spectre HSQC (CD_3OD, 600 MHz)



Spectre HMBC (CD_3OD, 600 MHz)

ANNEXE 5

Evolution des scores qualité *Phred* des bases lues en fonction de la longueur, pour l'ensemble des lectures « Read 1 » et « Read 2 » des régions V1-V3, V3-V4, V4-V5 et ITS2.



(source : rapport technique Genoscreen).

ANNEXE 6

Valeurs moyennes par itération de l'indice Observed OTUs en fonction d'un nombre croissant de séquences.

Nb seq : nombre de séquences.

A) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-Qiagen.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	8,70	10	5,40	10	8,10	10	1,80
1644	220,50	2696	204,30	3730	281,30	3860	19,30
3278	279,80	5382	273,70	7450	327,10	7710	25,60
4912	307,20	8068	320,60	11170	347,10	11560	28,40
6546	322,70	10754	345,30	14890	352,70	15410	30,30
8180	331,90	13440	369,80	18610	354,50	19260	31,00
9814	336,10	16126	376,10	22330	354,70	23110	31,50
11448	336,30	18812	387,10	26050	355,00	26960	31,80
13082	336,90	21498	393,30	29770	355,00	30810	32,00
14716	337,00	24184	398,60	33490	355,00	34660	32,00
16350	337,00	26870	399,50	37210	355,00	38510	32,00

B) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage du contrôle d'extraction Qiagen.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	3,70	10	7,70	10	3,50	10	7,50
1644	40,40	2696	47,30	3730	15,10	3860	20,90
3278	47,90	5382	49,80	7450	15,60	7710	21,00
4912	49,50	8068	50,60	11170	15,90	11560	21,00
6546	50,50	10754	51,70	14890	16,00	15410	21,00
8180	51,00	13440	51,60	18610	15,90	19260	21,00
9814	50,90	16126	51,90	22330	16,00	23110	21,00
11448	51,00	18812	52,00	26050	16,00	26960	21,00
13082	51,00	21498	52,00	29770	16,00	30810	21,00
14716		24184		33490	16,00	34660	
16350		26870		37210	16,00	38510	

C) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-CTAB.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	8,10	10	7,40	10	8,20	10	2,10
1644	217,00	2696	133,70	3730	258,90	3860	18,10
3278	266,10	5382	149,00	7450	302,70	7710	21,00
4912	289,50	8068	155,70	11170	315,40	11560	21,60
6546	298,90	10754	158,00	14890	321,50	15410	22,50
8180	304,10	13440	160,70	18610	323,30	19260	22,60
9814	307,70	16126	161,40	22330	323,90	23110	23,00
11448	308,50	18812	161,80	26050	324,00	26960	23,00
13082	308,70	21498	161,80	29770	324,00	30810	23,00
14716	309,00	24184	162,00	33490	324,00	34660	23,00
16350	309,00	26870	162,00	37210	324,00	38510	

ANNEXE 7

Valeurs moyennes par itération de l'index Chao1 en fonction d'un nombre croissant de séquences.

A) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-Qiagen.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	24,50	10	11,60	10	19,55	10	1,90
1644	332,62	2696	339,22	3730	350,17	3860	25,49
3278	338,85	5382	368,20	7450	352,68	7710	31,01
4912	340,24	8068	394,16	11170	355,60	11560	32,09
6546	337,23	10754	404,40	14890	355,85	15410	33,53
8180	338,08	13440	411,89	18610	355,71	19260	32,81
9814	338,96	16126	404,00	22330	354,85	23110	32,51
11448	337,20	18812	414,06	26050	355,00	26960	32,25
13082	336,96	21498	410,97	29770	355,00	30810	32,42
14716	337,00	24184	411,09	33490	355,00	34660	32,08
16350	337,00	26870	406,14	37210	355,00	38510	32,00

B) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage du contrôle d'extraction Qiagen.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	6,30	10	15,90	10	5,50	10	13,07
1644	48,18	2696	48,96	3730	15,70	3860	20,90
3278	51,22	5382	51,50	7450	15,80	7710	21,00
4912	51,70	8068	51,23	11170	15,90	11560	21,00
6546	51,16	10754	52,88	14890	16,10	15410	21,00
8180	51,24	13440	51,66	18610	15,90	19260	21,00
9814	50,90	16126	52,15	22330	16,00	23110	21,00
11448	51,00	18812	52,00	26050	16,00	26960	21,00
13082	51,00	21498	52,00	29770	16,00	30810	21,00
14716		24184		33490	16,00	34660	
16350		26870		37210	16,00	38510	

C) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-CTAB.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	22,02	10	14,95	10	23,43	10	2,25
1644	299,37	2696	148,49	3730	314,02	3860	23,02
3278	301,69	5382	159,72	7450	322,20	7710	23,23
4912	311,23	8068	160,58	11170	323,02	11560	22,11
6546	309,85	10754	163,13	14890	324,56	15410	23,16
8180	308,23	13440	162,67	18610	324,53	19260	22,98
9814	310,71	16126	162,35	22330	324,01	23110	23,10
11448	309,12	18812	162,25	26050	324,03	26960	23,00
13082	308,93	21498	161,83	29770	324,00	30810	23,00
14716	309,07	24184	162,00	33490	324,00	34660	23,00
16350	309,00	26870	162,00	37210	324,00	38510	

ANNEXE 8

Valeurs moyennes par itération de l'index Shannon en fonction d'un nombre croissant de séquences.

A) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-Qiagen.

Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	3,03	10	1,97	10	2,92	10	0,47
1644	5,80	2696	4,12	3730	5,58	3860	0,52
3278	5,87	5382	4,24	7450	5,62	7710	0,52
4912	5,89	8068	4,24	11170	5,64	11560	0,52
6546	5,91	10754	4,26	14890	5,63	15410	0,52
8180	5,93	13440	4,28	18610	5,64	19260	0,53
9814	5,93	16126	4,27	22330	5,64	23110	0,52
11448	5,93	18812	4,27	26050	5,64	26960	0,53
13082	5,94	21498	4,28	29770	5,64	30810	0,53
14716	5,94	24184	4,27	33490	5,64	34660	0,52
16350	5,94	26870	4,28	37210	5,64	38510	0,52

B) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage du contrôle d'extraction Qiagen.

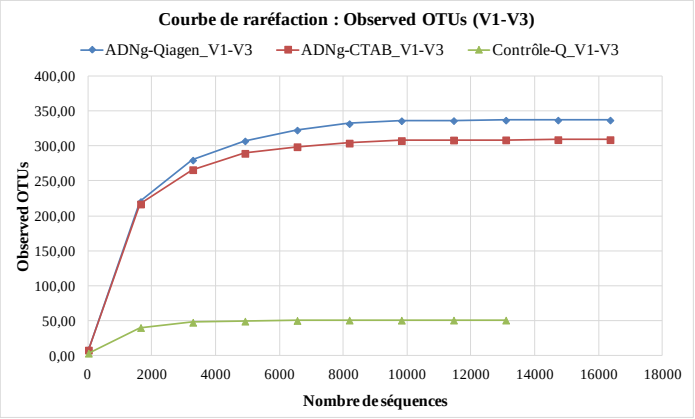
Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	1,26	10	2,83	10	1,23	10	2,80
1644	2,25	2696	4,43	3730	1,59	3860	3,89
3278	2,24	5382	4,45	7450	1,60	7710	3,89
4912	2,26	8068	4,45	11170	1,60	11560	3,90
6546	2,25	10754	4,44	14890	1,59	15410	3,90
8180	2,24	13440	4,44	18610	1,60	19260	3,90
9814	2,26	16126	4,44	22330	1,60	23110	3,90
11448	2,25	18812	4,44	26050	1,60	26960	3,90
13082	2,25	21498	4,44	29770	1,60	30810	3,90
14716		24184		33490	1,59	34660	
16350		26870		37210	1,60	38510	

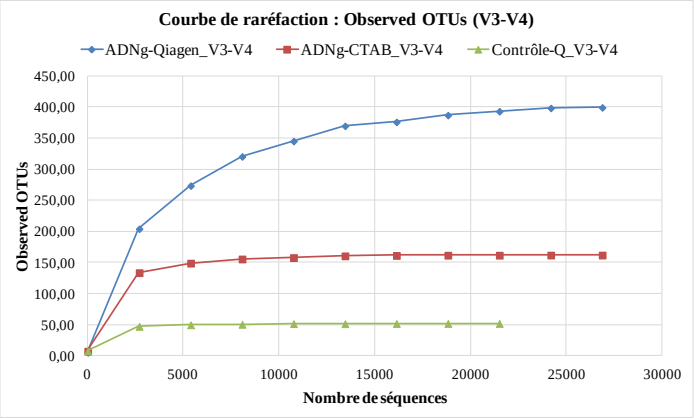
C) Valeurs moyennes obtenues à partir du séquençage de l'ADNg-CTAB.

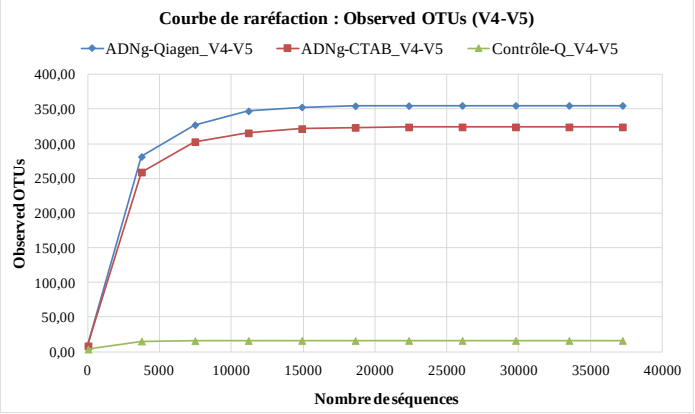
Nb seq	V1-V3	Nb seq	V3-V4	Nb seq	V4-V5	Nb seq	ITS2
10	2,93	10	2,76	10	2,93	10	0,63
1644	5,77	2696	4,99	3730	5,19	3860	1,21
3278	5,87	5382	5,03	7450	5,22	7710	1,22
4912	5,92	8068	5,04	11170	5,25	11560	1,22
6546	5,93	10754	5,04	14890	5,24	15410	1,21
8180	5,92	13440	5,04	18610	5,25	19260	1,21
9814	5,93	16126	5,05	22330	5,25	23110	1,21
11448	5,94	18812	5,05	26050	5,25	26960	1,21
13082	5,94	21498	5,05	29770	5,25	30810	1,21
14716	5,93	24184	5,05	33490	5,25	34660	1,21
16350	5,94	26870	5,05	37210	5,25	38510	

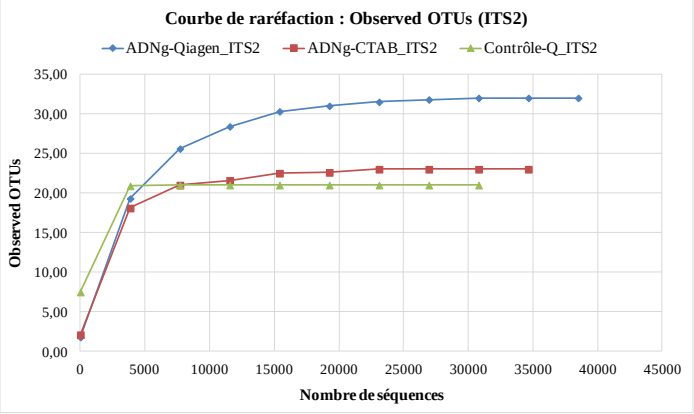
ANNEXE 9

Courbe de raréfaction Observed OTUs pour les échantillons ADNg-Qiagen, ADNg-CTAB et Contrôle-Q.







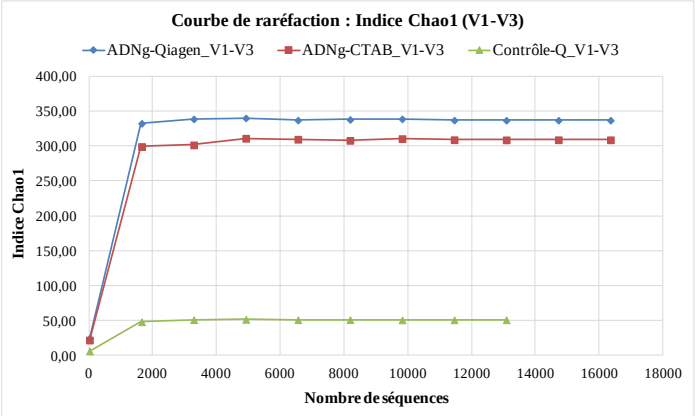


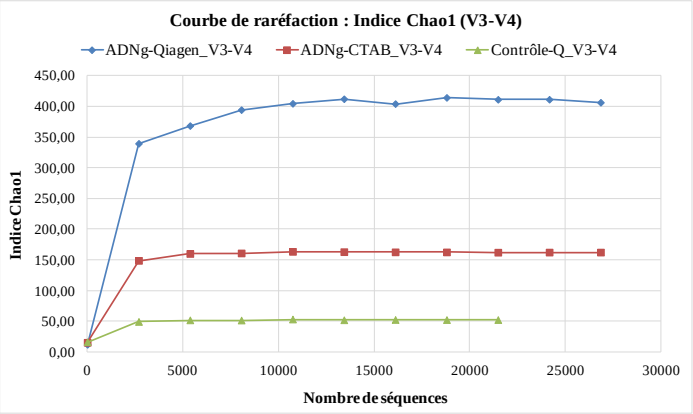
Les valeurs des index Observed OTUs sont exprimées en fonction du nombre des séquences.

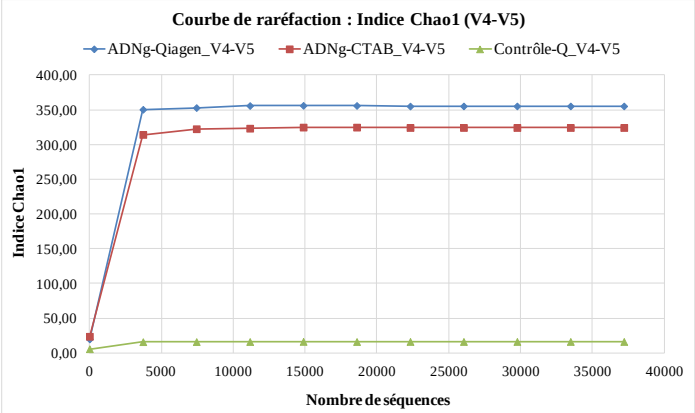
Contrôle-Q correspond au contrôle d'extraction avec le kit Qiagen.

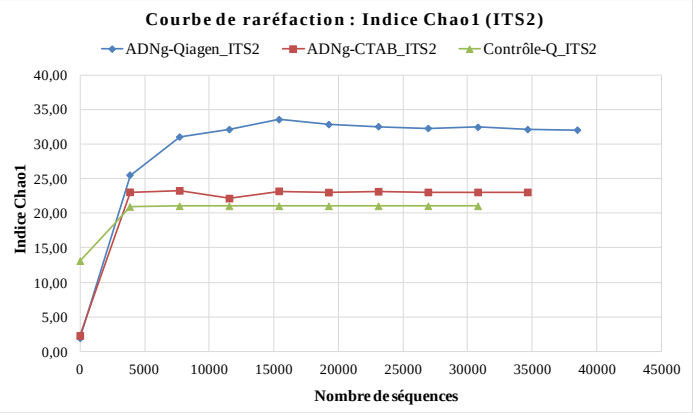
ANNEXE 10

Courbe de raréfaction Indice Chao1 pour les échantillons ADNg-Qiagen, ADNg-CTAB et Contrôle-Q.









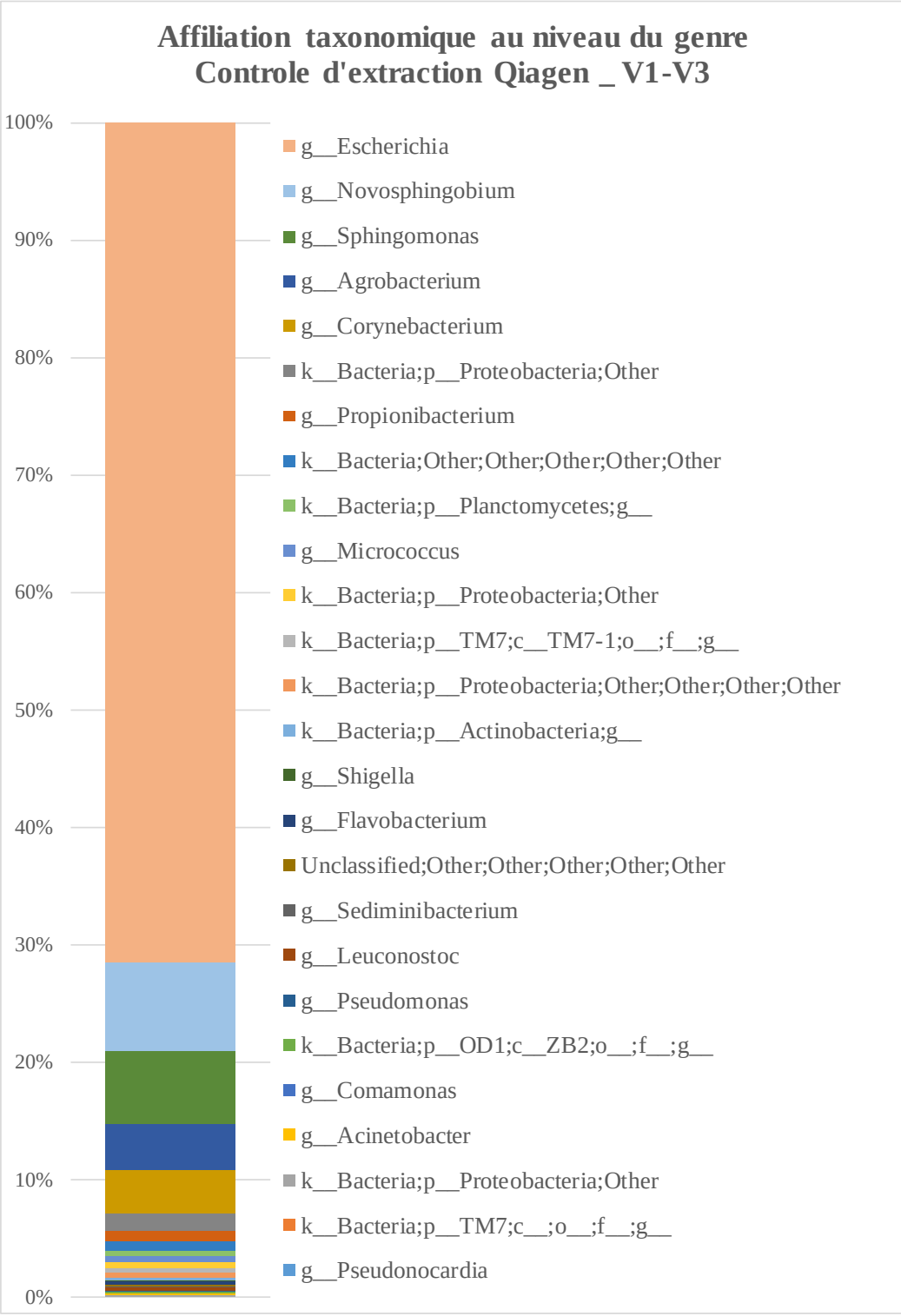
Les valeurs des index Chao1 sont exprimées en fonction du nombre des séquences.

Contrôle-Q correspond au contrôle d'extraction avec le kit Qiagen.

ANNEXE 11

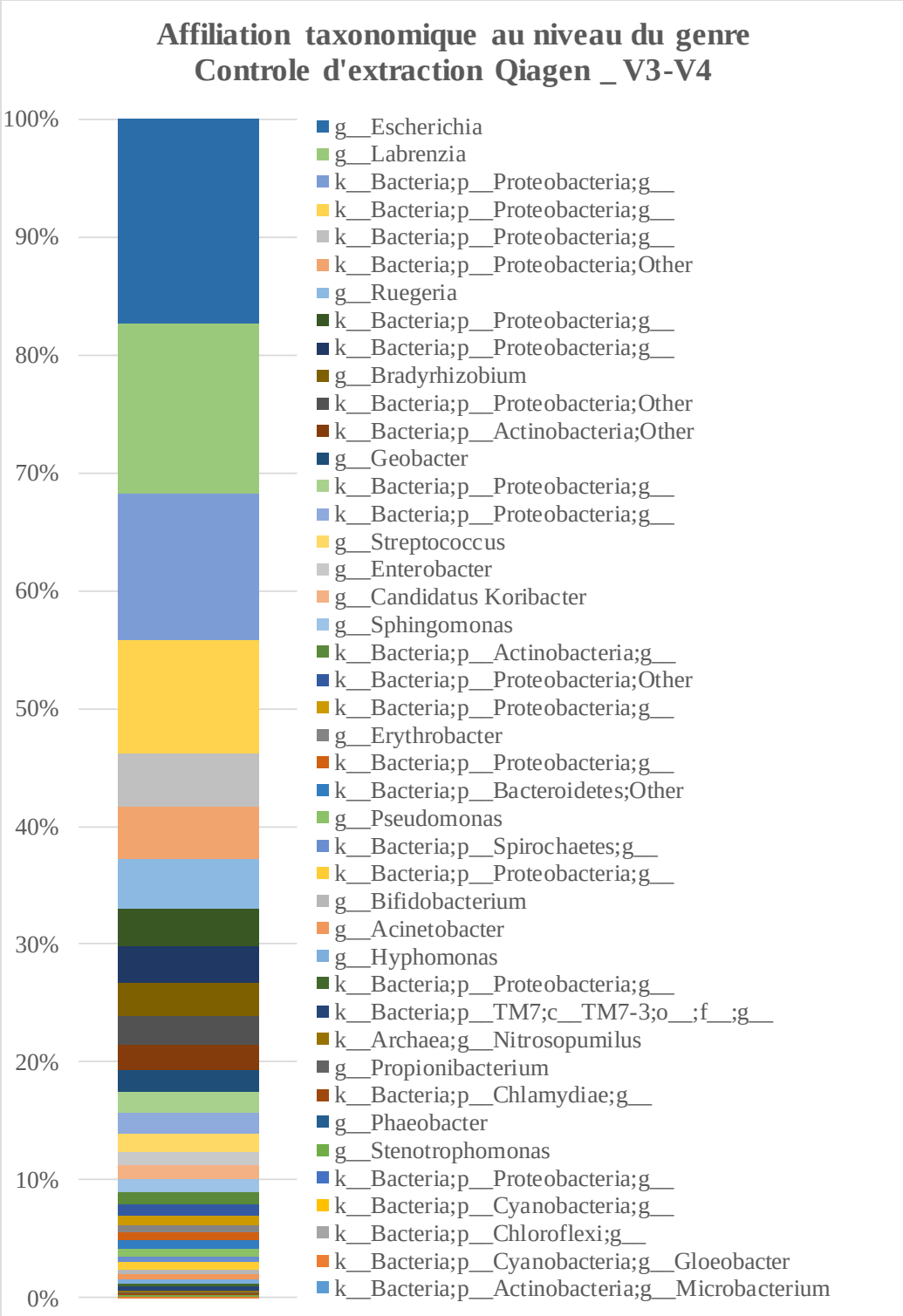
Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle négatif (contrôle d'extraction Qiagen).

A) **Région V1-V3.**



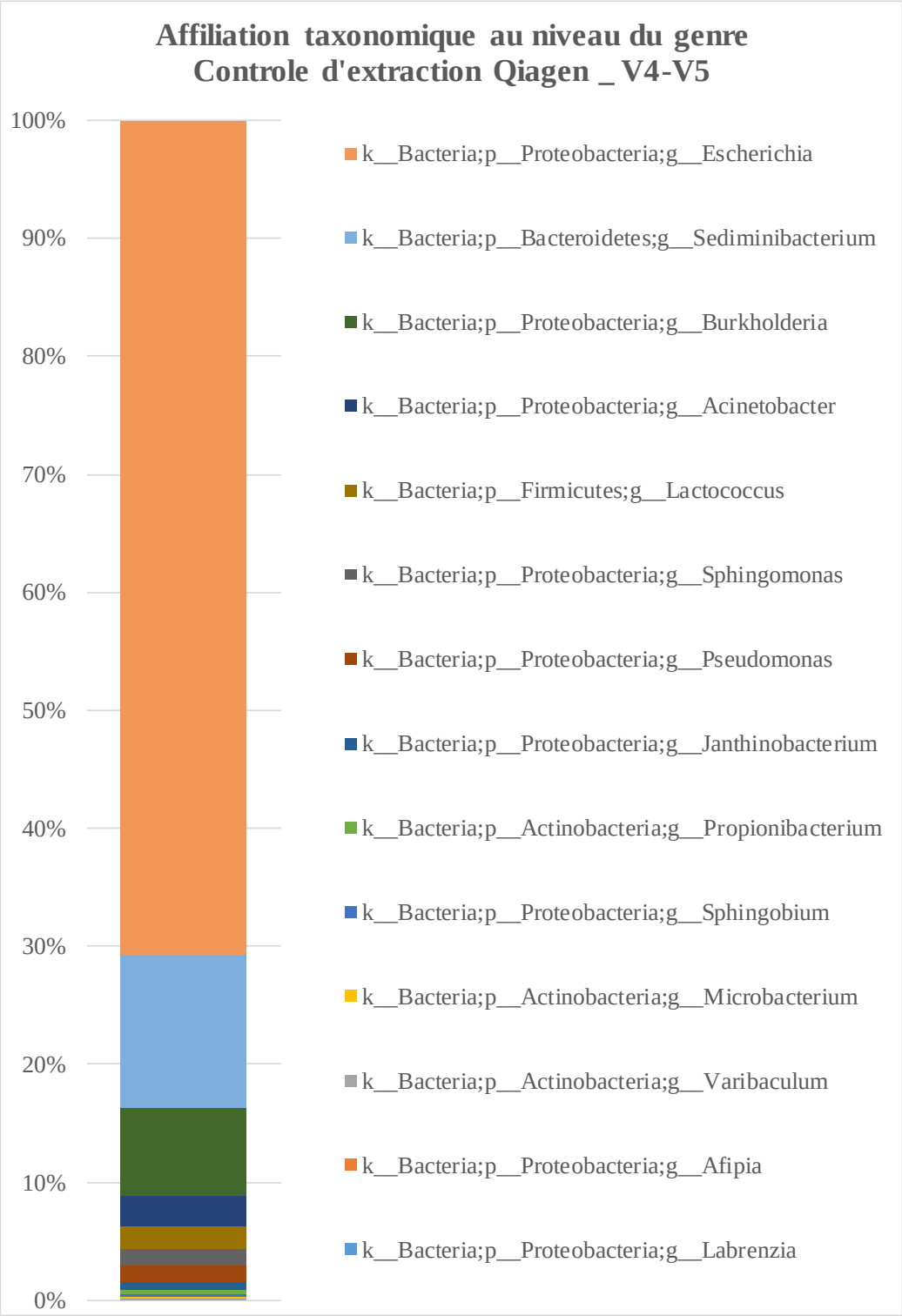
k : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre
Unclassified : séquences non classifiées (indice de confiance RDP < 80 %)

B) Région V3-V4.



k : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre

C) Région V4-V5



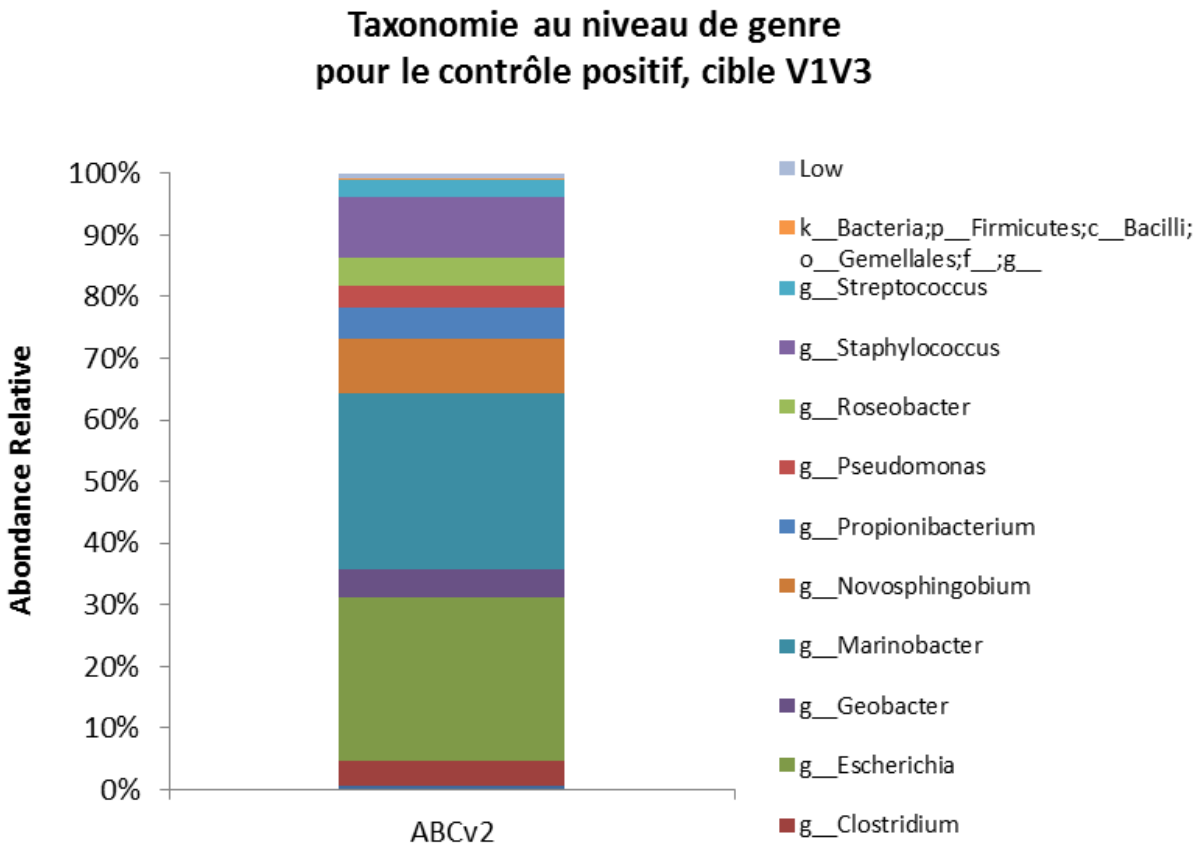
k : règne ; p : phylum ; g : genre

.

ANNEXE 12

Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle positif interne à Genoscreen.

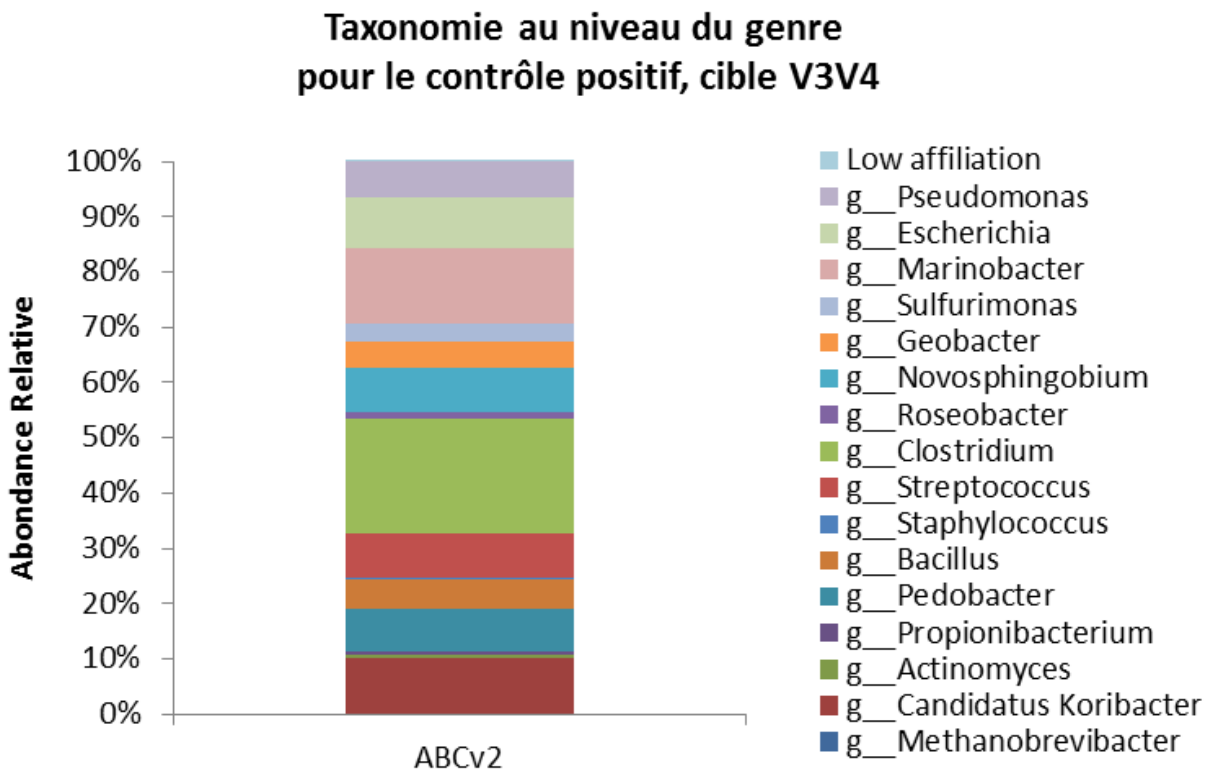
A) Région V1-V3.



(source : rapport technique Genoscreen).

k : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre
Low : séquences avec des abondances relatives très faibles (entre 0,04 % et 0,7 %)

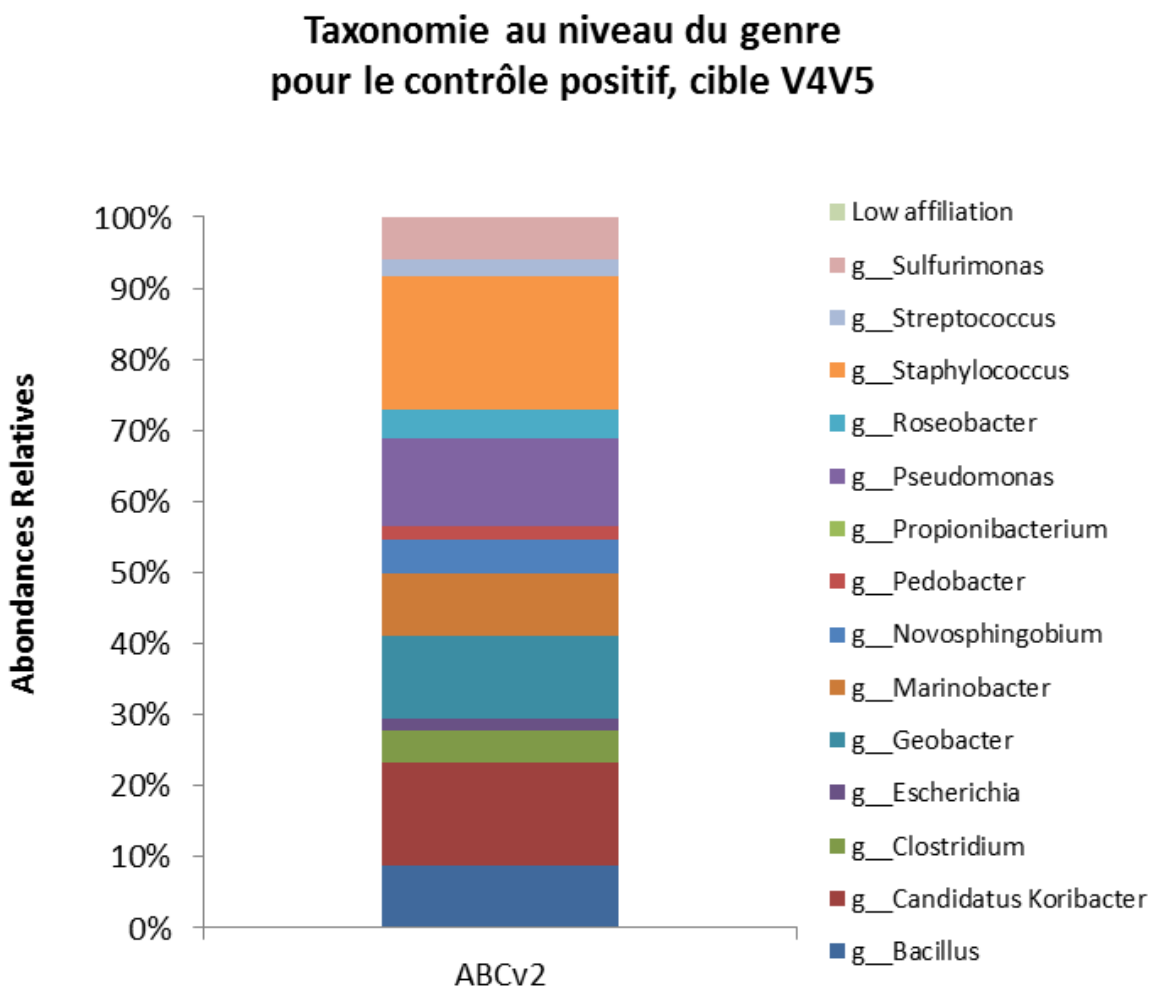
B) Région V3-V4.



(source : rapport technique Genoscreen).

g : genre
Low : séquences avec des abondances relatives très faibles (entre 0,04 %)

C) Région V4-V5.

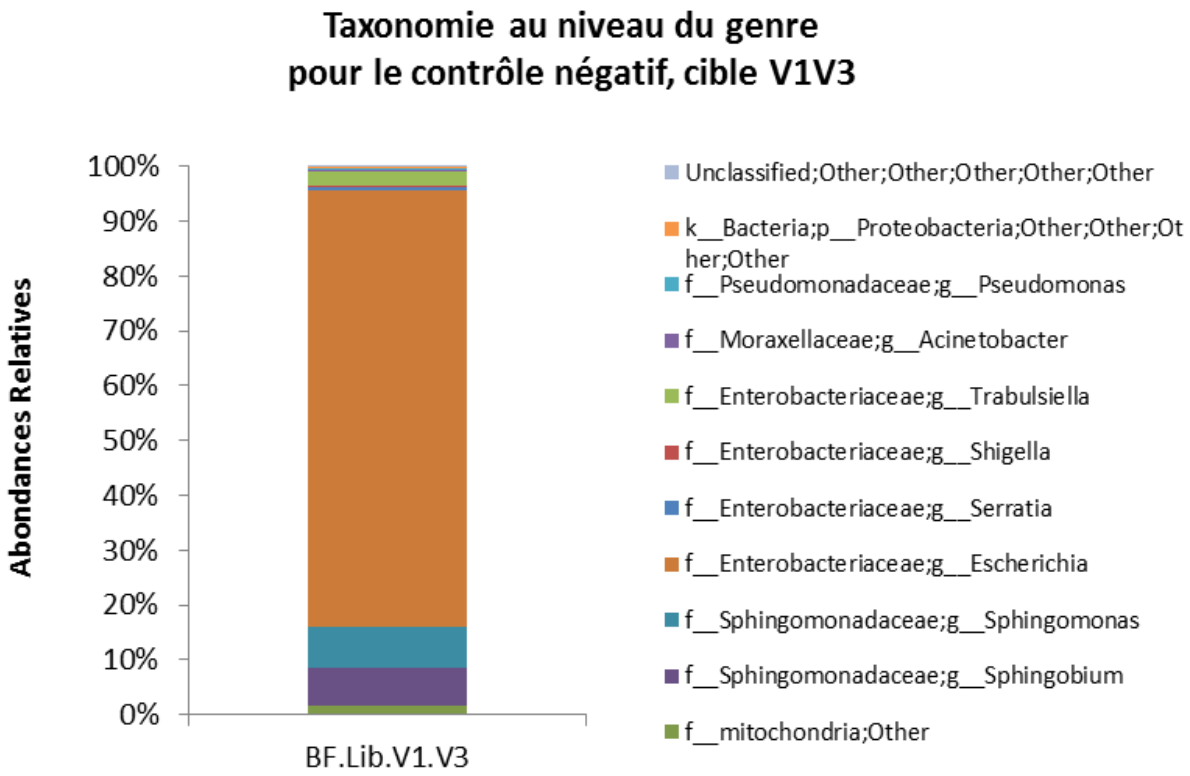


(source : rapport technique Genoscreen).

g : genre
Low : séquence avec des abondances relatives très faibles (entre 0,02 %)

ANNEXE 13

Affiliation taxonomique au niveau du genre du contrôle négatif interne à Genoscreen.



(source : rapport technique Genoscreen).

k : règne ; p : phylum ; c : classe ; o : ordre ; f : famille ; g : genre
Unclassified : séquences non classifiées (indice de confiance RDP < 80 %)

ANNEXE 14

Composition des milieux de culture et de stockage des microorganismes.

La composition des milieux est donnée pour 1 L d'eau distillée, le pH est ajusté avec du NaOH ou HCl à 7,2 ± 0,2. Seul le milieu SFM a été préparé avec de l'eau du robinet. Les milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 15 minutes. Les réactifs utilisés proviennent de chez BD (Becton, Dickinson and Company, Etats-Unis) sauf indication contraire.

A1BFe+c	
Composants	Masse (g)
Amidon	10
Extrait de levure	4
Peptone	2
$CaCO_3$ (Carlo Erba)	1
$Fe(SO_4)_3$ (Carlo Erba)	0,04
KBr (Carlo Erba)	0,1
Sels marins	30
Agar	20

LB	
Composants	Masse (g)
Tryptone (Sigma-Aldrich)	10
Extrait de levure	5
NaCl (Labosi)	10
Agar	20

MYA2	
Composants	Masse (g)
Extrait de malt	20
Extrait de levure	1
Sels marins	30
Agar	20

Marine Broth (MB)	
Composants	Masse (g)
Peptone	5
Extrait de levure	1
Citrate ferrique	0,1
NaCl	19,45
$MgCl_2$	5,9
$MgSO_4$	3,24
$CaCl_2$	1,8
KCl	0,55
$NaHCO_3$	0,16
KBr	0,08
$SrCl_2$	0,034
H_3BO_3	0,022
Na_2SiO_3	0,004
NaF	0,0024
NH_4NO_3	0,0016
Na_2HPO_4	0,008

Marine Broth Agar (MBA)	
Composants	Masse (g)
MB	37,4
Agar	20

R2A (Fischer Scientific)	
Composants	Masse (g)
Extrait de levure	0,5
Protéose peptone	0,5
Tryptone	0,5
Glucose	0,5
Amidon soluble	0,5
Pyruvate de sodium	0,3
K_2HPO_4	0,3
$MgSO_4$	0,02

Potato Dextrose Broth (PDB)	
Composants	Masse (g)
Amidon de pomme de terre	4,0
Dextrose	20

Potato Dextrose Agar (PDA)	
Composants	Masse (g)
PDB	24
Agar	20

SCAM	
Composants	Masse (g)
Amidon de mais (Fischer chemical)	10
Caséine hydrolysée (VWR Chemicals)	1
Sels marins	30
Agar	20

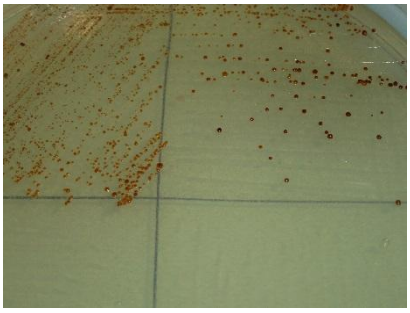
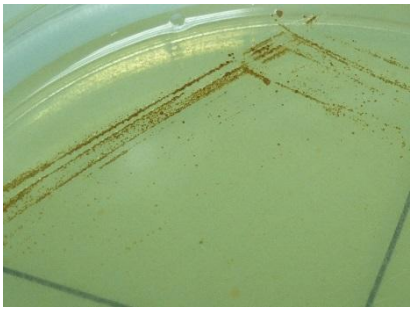
SFM	
Composants	Masse (g)
Farine de soja toastée (La vie claire)	20
Mannitol (Carlo Erba)	20
Agar	20

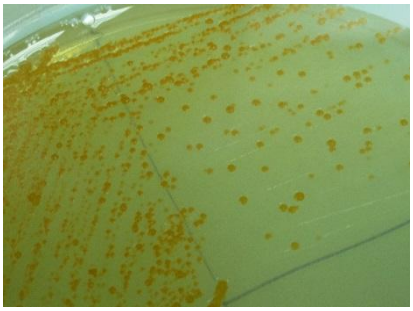
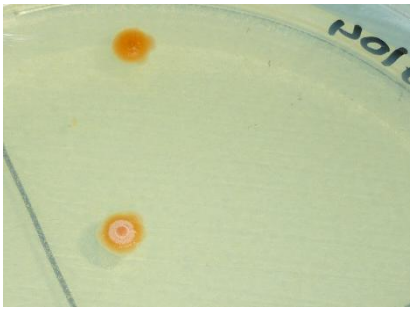
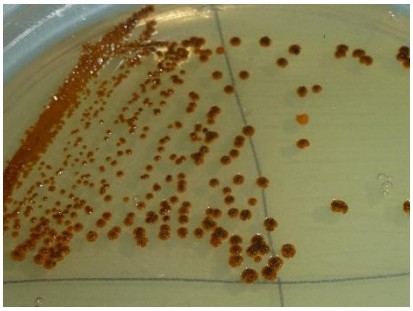
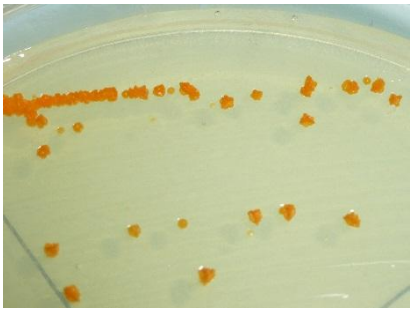
Cryoprotectant	
Composants	Quantité (%)
Glycérol (Carlo Erba)	10
Lait écrémé (Régilait)	10
Sels marins	3,3

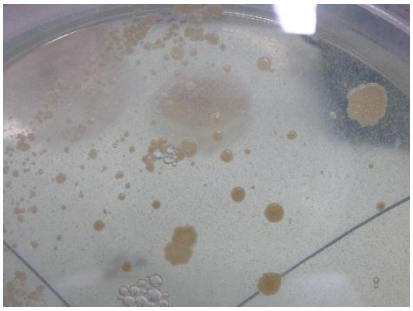
ANNEXE 15

Actinomycètes isolés de *Scopalina hapalia* sur milieu A1BFe+c.

Les souches de *Salinispora arenicola* (SH-45, SH-54 et SH-78) ont été photographiées à différents stades de développement. Les colonies orange (SH-45 et SH-78) correspondent au stade végétatif. En vieillissant, les colonies noircissent en raison de la production de spores de couleur noire (SH-54).

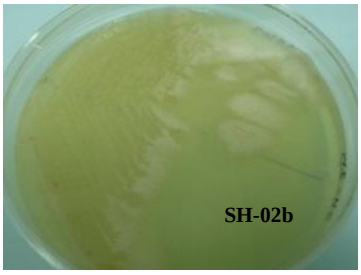
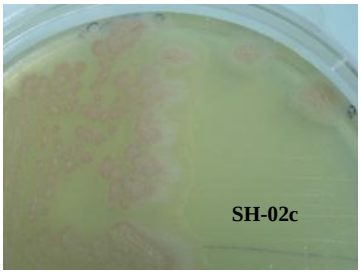
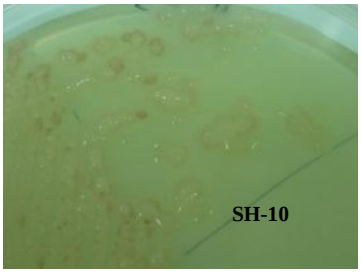
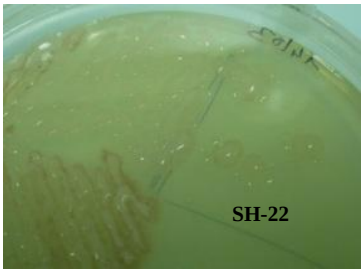
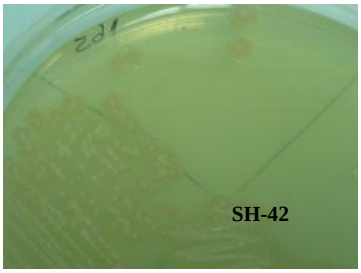
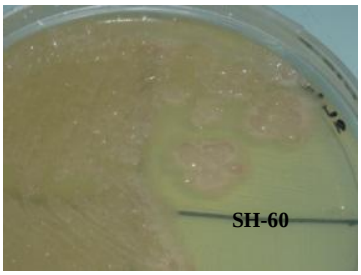
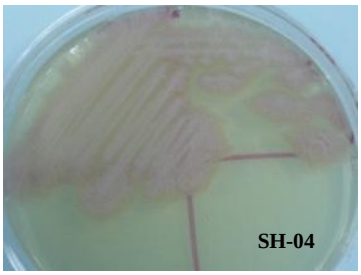
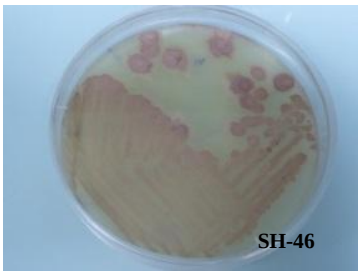
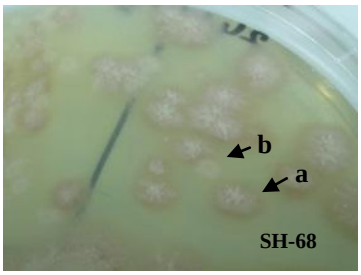
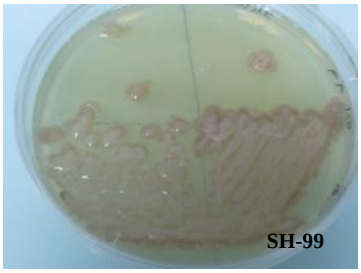
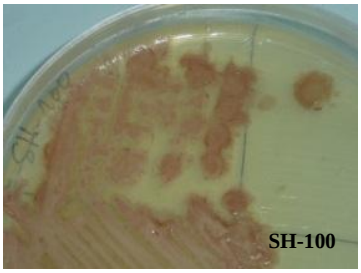
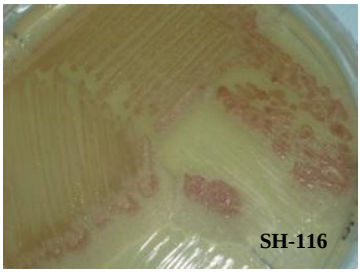
Code isolat	Identification	Photos sur milieu A1BFe+c
SH-36	*Micromonospora chokoriensis*	
SH-45	*Salinispora arenicola*	
SH-54	*Salinispora arenicola*	
SH-57	*Micromonospora echinospora*	

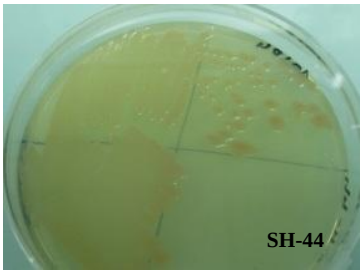
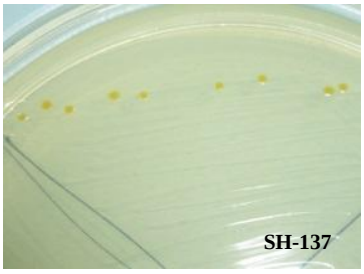
SH-78	*Salinispora arenicola*	
SH-82	*Micromonospora fluostatini*	
SH-89	*Micromonospora citrea*	
SH-95	*Micromonospora tulbaghiae*	
SH-108	*Micromonospora endophytica*	

SH-115	*Rhodococcus nanhaiensis*	

ANNEXE 16

Bacillus isolés de *Scopaliana hapalia* sur milieu A1BFe+c.

Identification	Photos sur milieu A1BFe+c		
Bacillus paralicheniformis		 SH-02b	 SH-02c
	 SH-10	 SH-22	 SH-42
	 SH-60		
Bacillus licheniformis	 SH-04	 SH-46	 SH-68
	 SH-99	 SH-100	 SH-116

LGUF-s	
Bacillus berkeleyi	

ANNEXE 17

Rendement de la production microbienne.

Durée d'incubation des cultures : 5 jours (liquides) et 15 jours (solides).

	Culture liquide (1 L)		Culture solide (~ 250 mL)	
	AcOEt	**MeOH**	**AcOEt**	**MeOH**
Souches	Masse EB (mg)	Masse EB (mg)	Masse EB (mg)	Masse EB (mg)
Actinomycètes				
SH-36	5,9	337,7	4,9	367,4
SH-45	5,1	248,3	6,5	288,7
SH-54	5,5	210,1	6,4	329
SH-57	6,1	250,2	4,7	268,5
SH-78	5,2	239,1	7	251,8
SH-82	6,3	120,3	7,5	156,9
SH-89	5,4	260,8	5	306
SH-95	8,4	376	3,7	159,7
SH-108	8,8	292	3,6	154,3
SH-116a	5,4	162,8	2,1	189,2
Bacillus				
SH-02a	4,8	103,7	4,4	229,5
SH-02b	5,4	79,5	3,8	222
SH-02c	5,2	96,7	3,2	214,3
SH-04	7,8	337	3,4	192,2
SH-10	6	201,3	1,5	166,1
SH-22	8	327,6	4,3	164,6
SH-42	12,3	295,1	3,4	228,6
SH-46	5,2	140,5	Contamination de la culture	
SH-60	5,5	158,4	4,6	179,3
SH-68a	6,2	239,8	4,5	119,7
SH-68b	6,6	85	4,9	205,9
SH-99	5,8	367,4	2,9	191,8
SH-100	6,1	231,1	2,5	191,7
SH-115a	5,8	220,3	2,2	227,4
SH-137	6	208,8	4	159,5
Thermoactinomycetaceae				
SH-32	7,8	342,1	3,5	178,9
SH-39	8	345,7	3,6	160
Champignons filamenteux				
SH-53	47,2	380,9	5,2	285,2
SH-122	8,6	174,9	3,9	83
SH-123	7,4	324,3	5,4	128

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

POLE RECHERCHE
Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) ....Chouiat SAID HASSANE....., 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 ..St-Denis....., le (date) ...20/11/2019

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.