



HAL
open science

Valorisation de biocides d'invertébrés marins méditerranéens

Estelle Sfecci

► **To cite this version:**

Estelle Sfecci. Valorisation de biocides d'invertébrés marins méditerranéens. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4039 . tel-04368857

HAL Id: tel-04368857

<https://theses.hal.science/tel-04368857v1>

Submitted on 2 Jan 2024

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.



$$\rho \left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot T + f$$

$$e^{i\pi} + 1 = 0$$

THÈSE DE DOCTORAT

Valorisation de biocides d'invertébrés marins Méditerranéens

Tome I

Estelle SFECCI

Institut de Chimie de Nice (ICN), UMR 7272 CNRS

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Chimie
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Mohamed Mehiri

Soutenue le : 4 juin 2018

Devant le jury, composé de :

Denis Allemand, Pr, Centre Scientifique de Monaco

Marie-Lise Bourguet-Kondracki, Dr, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris

Joël Boustié, Pr, Université de Rennes 1

Thierry Lacour, Dr, BioPreserv, Grasse

Michel Ponchet, CR, INRA PACA, Sophia-Antipolis

Valorisation de biocides d'invertébrés marins Méditerranéens

Jury :

Rapporteurs

Marie-Lise Bourguet-Kondracki, DR

Université Paris-Saclay

Joël Boustié, Pr

Université de Rennes 1

Examineurs

Denis Allemand, Pr

Centre Scientifique de Monaco

Thierry Lacour, Dr

BioPreserv

Michel Ponchet, CR

INRA PACA

Directeur

Mohamed Mehiri, Dr, HDR

Université Nice Sophia Antipolis

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur l'étude chimique d'espèces marines échantillonnées en Méditerranée. Cette dernière, considérée comme un point chaud de la biodiversité marine, renferme de nombreux organismes marins n'ayant jamais fait l'objet d'étude chimique antérieure et est susceptible de constituer une source potentielle de métabolites bioactifs nouveaux. Dans le cadre du projet VALBIM, co-financé par la région PACA et en étroite collaboration avec la société BioPreserv à Grasse mais également avec la *Mycoteca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin, nous avons isolé et caractérisé 21 molécules dont 14 se sont avérées nouvelles.

L'étude de l'algue *Caulerpa taxifolia* a conduit à la caulerpényne et à quatre nouveaux dérivés de l'acide pyruvique sulfatés. Les travaux sur l'ascidie *Polysyncraton* sp. ont conduit aux bolascidines A-D, quatre nouveaux métabolites de type bolaamphiphiles dont il n'existe pas à notre connaissance d'équivalent naturel ou synthétique. La première étude chimique de l'éponge *Hexadella racovitzai* a conduit à deux dérivés de la bromotyrosine, la psammaplaine A et une nouvelle molécule, la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaplaine A. Par ailleurs, trois nouvelles crambescines C1, aux propriétés antibactériennes avérées, conjointement avec une crambescine A2 déjà répertoriée, ont été isolées de *Crambe crambe*, une éponge relativement bien étudiée depuis les années 90, notamment par notre équipe. Pour l'ensemble des métabolites isolés d'invertébrés marins, le (ou les) organisme(s) producteur(s) reste(nt) à explorer. Une origine microbienne n'est pas à exclure. Dans ce contexte, l'étude du champignon marin *Stachybotrys chartarum*, isolé de l'éponge *Aplysina cavernicola*, a conduit à la satratoxine H et à un nouveau dérivé, la 2,3-dihydrosatratoxine H, ainsi qu'à trois dérivés stachybotrylactame déjà répertoriés dans la bibliographie. Finalement, l'étude de *Stachybotrys chartarum* a également conduit à l'*épi*-chartarutine G, un produit naturel nouveau. Les différents métabolites ont été évalués pour leurs propriétés antibactériennes et cytotoxiques.

Ces travaux ont bénéficié de nouvelles approches analytiques (calculs des spectres de dichroïsme circulaire électroniques par TDDFT, réseaux moléculaires) et ont permis de renforcer l'intérêt des études liées à l'écologie chimique et à la recherche de nouvelles molécules bioactives potentiellement valorisables dans différents domaines, dans le cadre d'une exploitation raisonnée des ressources naturelles.

Mots-clés : Produits naturels marins, Méditerranée, invertébrés marins, macroalgue verte, champignons marins, métabolites spécialisés, isolement, acide pyruvique, bolaamphiphiles, alcaloïdes, bromotyrosines, biocides.

Summary

This PhD work focuses on the chemical study of marine species sampled in the Mediterranean Sea. The latter, considered as a hotspot for marine biodiversity, contains many marine organisms that have never been studied before and which may constitute a potential source of new bioactive molecules. As part of the VALBIM project, co-financed by the region PACA and in close collaboration with the SME BioPreserv in Grasse but also with the *Mycoteca Universitatis Taurinensis* (MUT) of the University of Turin, we have isolated and characterized 21 molecules in total. 14 of them were never reported before.

The study of the seaweed *Caulerpa taxifolia* led to caulerpenyne and four new sulphated pyruvic acid derivatives. The work on the ascidian *Polysyncraton* sp. led to bolascidins A-D, four new metabolites which belong to the bolaamphiphile family, which, to the best of our knowledge, have no natural or synthetic equivalent. The first chemical study of the sponge *Hexadella racovitzai* led to two bromotyrosine derivatives, psammapline A and a new molecule, 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A. In addition, three new C1 crambescins, with antibacterial properties, together with one crambescine A2 already reported, have been isolated from *Crambe crambe*, a sponge relatively well studied since the 90's, especially by our team. For all isolated marine invertebrate metabolites, the producer(s) remain(s) to be explored. A microbial origin is not excluded. In this context, the study of the marine fungus *Stachybotrys chartarum*, isolated from the sponge *Aplysina cavernicola*, led to 2,3-dihydrosatratoxin H and three stachybotrylactam derivatives already reported in the literature. Finally, the study of *Stachybotrys chartarum* led to *epi*-chartarutine G, a new natural product. The different metabolites were evaluated for their antibacterial and cytotoxic properties.

This work benefited from new analytical approaches (calculations of electronic circular dichroism spectra by TDDFT, molecular networking) and reinforced the interest of studies related to chemical ecology and search for new bioactive molecules to be valorized in different areas.

Keywords: Marine natural products, Mediterranean, marine invertebrates, green macroalgae, marine fungi, secondary metabolites, isolation, pyruvic acid, bolaamphiphiles, alkaloids, bromotyrosines, biocides.

« L'important dans la Recherche, c'est l'Imprévisible »

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Marie-Lise Bourguet-Kondracki et Joël Boustié pour avoir accepté de juger et d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Denis Allemand, Michel Ponchet et Thierry Lacour pour avoir accepté de juger ces travaux.

Je remercie Elisabet Duñach, directrice de l'ICN et Rachid Benhida, à la tête du groupe MB, pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire PNM.

Mes remerciements s'adressent également :

A mon directeur Mohamed Mehiri, pour sa disponibilité, pour ses qualités scientifiques, et pour m'avoir permis de participer à de nombreuses manifestations scientifiques nationales et internationales. A la Région PACA et à l'entreprise BioPreserv et son directeur Thierry Lacour pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et bien sur tous ceux de BioPreserv ayant travaillé sur ce projet. Au personnel de la PFTC et notamment Lionel Massi pour son écoute et son aide professionnelle, Marc Gaysinski pour les acquisitions RMN et Fabien Fontaine-Vive pour les calculs *in-silico*. Un grand merci également au service de spectrométrie de masse de l'INRA (Aurélié Seassau et Marc Magliano) pour nous avoir permis de réaliser la quasi-totalité de nos analyses en haute résolution, ainsi qu'aux laboratoires KISSf de Roscoff (Stéphane Bach, Thi Ngoc Dung Nguyen, Blandine Baratte, Amandine Bescond), au LUBEM de Plouzané (Gaëtan Burgaud), au CIMI-Paris (Dominique Mazier) et au C3M (Laurent Boyer) pour les différents tests d'activité réalisés.

Un ringraziamento speciale per Cristina Varese per avermi accettata 2 mesi nella sua « team » della *Mycotheca Universitatis Taurinensis*, ma anche a Elena (mia confidente), Giorgio (un picco di folia « salvavita »), Anna, Iolanda e gli altri : grazie mille per l'aiuto, ho imparato tanto con voi !

Un grand merci à l'entreprise Armen Instruments pour m'avoir accueillie, Greg et Céline pour m'avoir formée à la CPC. Je souhaite également remercier Yohann de Gilson pour son invitation à présenter mes travaux lors de la 2^{ème} journée scientifiques sur les substances naturelles. Une belle expérience et une organisation très au point !

Plus personnellement, concernant le laboratoire PNM... Merci à Jo, mon amie, qui m'a soutenue même à des centaines de km de Nice, à Arnaud et nos pauses de 17h, nos bons petits plats et nos réflexions philosophiques sur la vie, à Adrien pour son efficacité sur *C. crambe* et C2 et surtout pour ses blagues nulles et son talent d'artiste, à Philippe Amade (mon 1^{er} Directeur !) pour ses conseils (~~parfois~~) avisés et ses blagues constantes et également à Loïc et nos quelques brefs repas (sauf en cas de colonne), à Sofia Elena (ma princesse paillettes préférée), à Sameh (même si tu as voulu nous faire grossir avec tes bonnes pâtisseries Tunisiennes !), à Dominique (pour tous les petits services rendus au labo), à Carla pour son

aide sur *Hexadella*, à Pauline et Hind, deux petits rayons de soleil qui ont égayé mon « avant rédaction », et les autres stagiaires du laboratoire que je n'aurais pas cité, tout simplement pour leur présence.

Merci également à toutes les autres personnes de l'ICN sans qui ma thèse n'aurait pas été si belle... Alors un merci à Lorenzo (BFF ! Merci pour m'avoir écoutée râler et conseillée. Maintenant que j'ai fini, arrête de vouloir me remplacer !) & Diana (la plus belle), Superman et Wonder-Woman ou plutôt Pierrick et Luisa (on recommence le jacuzzi quand tu veux !), Alex (que je « supporte » depuis le FOQUAL ! Ne change rien tu es au top), Vincent (là-bas au Connemara), Caroline, Gabriella, Hélène (quelle fin de thèse... ahurissante !), Pauline (mon oreille attentive), Emilie et autres petits poneys de l'ICN. De beaux petits moments de complicité dans cet institut ! J'ai également eu la chance de pouvoir former des étudiants (au top !) en TP avec notamment Guilhem et Anthony avec qui j'ai « jointé » avec grand plaisir. Je n'oublie pas les autres bons souvenirs : des promesses d'apéro avec Sylvain, des déjeuners improvisés (et des siestes lors des tests olfactifs) en ModMol, la fête de la Science... Il va sans dire que je remercie mes comparses de l'organisation des JMJC à Nice tant chez nous (merci à mon copilote JB sans qui j'aurais maintes fois flanché, à Alain qui nous a tant soutenu et à Martine pour son aide précieuse) que sur Montpellier (Maxime et Rémi, vous avez été super !). Une sacrée aventure et que d'émotions ! A refaire, sans aucune hésitation...

Un merci aussi à mes copains en tous genre : à Presc, pour notre belle amitié, nos soirées papotage ou plus... (parce que « le carré, c'est pas pareil ! »), à mes « copains du Ping » : Chris, Barbie, Antho, Sebounet, Angelo (homme), Julot et les autres. Vous m'avez permis de décompresser tous ces mardis et lors de nos voyages, soirées et délires en tous genres et puis je n'oublie pas non plus nos « voisins ». Je sais qu'on a déménagé en cours de route (pas trop loin heureusement) mais vous avez été, et vous êtes toujours autant parfaits pour nous. Merci de nous avoir fait partager vos vies ! D'ailleurs, j'ajoute également notre nouveau voisin Thomas à mes remerciements, pour sa patience lors de nos petites sessions mise en page de ce manuscrit... Bravo à toi !

Je souhaiterais finalement remercier ma famille, tant ceux qui ont compris l'enjeu de la thèse que ceux qui n'ont pas bien compris mes absences répétées en cette fin de thèse... Je remercie donc mes grand-parents pour leur présence (et leurs bons petits plats !). Sachez que je vous aime et que je ne vous en veux pas si vous croyez encore que je suis médecin ou biologiste...

Ma maman, mon papa, mon amour de frère (tu as été si loin de moi tout ce temps...), tous aux petits soins même dans vos moments difficiles. Je vous aime et vous remercie de tout cœur.

Enfin à Flo, mon chéri, mon plus grand soutien surtout en cette fin de thèse, bien plus qu'éprouvante (et pourtant si heureuse). Maintenant que tout cela est fini, ~~tu sais ce qu'il te reste à faire...~~ notre vraie vie commence.

Table des matières

Glossaire.....	v
Abréviations	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des schémas	ix
Liste des figures	xi
Introduction générale.....	1
Partie A : Métabolisme spécialisé de <i>Caulerpa taxifolia</i>	7
I. Introduction	9
II. Les algues : généralités.....	9
III. Espèces marines sessiles : défenses chimiques	10
III.1. Défense induite.....	11
III.2. Défense activée.....	12
IV. <i>Caulerpa taxifolia</i> : état de l'art	17
IV.1. Classification	17
IV.2. Description morphologique.....	17
IV.3. Historique de <i>Caulerpa taxifolia</i>	18
IV.4. Métabolisme spécialisé de <i>Caulerpa taxifolia</i> : état de l'art	19
V. Etude de <i>Caulerpa taxifolia</i>	24
V.1. Objectif initial de l'étude.....	24
V.2. Extraction, fractionnement et isolement.....	25
V.3. Détermination structurale	27
V.4. Discussion	44
V.5. Hypothèse de biosynthèse	45
V.6. Activités antimicrobiennes	47
VI. Conclusion.....	49
Partie B : Biodiversité et chimiodiversité d'invertébrés marins Méditerranéens	51
I. Introduction	52
II. Les éponges	52
III. Les ascidies.....	54
IV. Missions d'échantillonnage et contexte de l'étude.....	55
Partie B : Chapitre 1 : Métabolisme spécialisé de <i>Polysyncraton</i> sp.	63
I. Introduction	65
II. <i>Polysyncraton</i> sp. : état de l'art	65
II.1. Classification	65
II.2. Description morphologique.....	65
II.3. Métabolisme spécialisé du genre <i>Polysyncraton</i>	66
III. Etude de <i>Polysyncraton</i> sp.	67

III.1.	Extraction, fractionnement et isolement.....	68
III.2.	Détermination structurale	70
III.3.	Activités biologiques.....	92
IV.	Conclusion.....	95
Partie B : Chapitre 2 : Métabolisme spécialisé d' <i>Hexadella racovitzai</i>		97
I.	Introduction.....	99
II.	<i>Hexadella racovitzai</i> : état de l'art	99
II.1.	Classification	99
II.2.	Description morphologique	100
II.3.	Dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire.....	100
III.	Etude d' <i>Hexadella racovitzai</i>	105
III.1.	Extraction, fractionnement et isolement.....	106
III.2.	Détermination structurale	107
III.3.	Hypothèse de biosynthèse	117
III.4.	Discussion	117
III.5.	Activités biologiques.....	118
IV.	Conclusion.....	121
Partie B : Chapitre 3 : Métabolisme spécialisé de <i>Crambe crambe</i>		123
I.	Introduction.....	125
II.	<i>Crambe crambe</i> : état de l'art.....	125
II.1.	Classification	125
II.2.	Description morphologique.....	126
II.3.	Métabolisme spécialisé de <i>C. crambe</i>	126
III.	Etude de <i>Crambe crambe</i>	131
III.1.	Etude de <i>C. crambe</i> sous le prisme du réseau moléculaire	132
III.2.	Extraction, fractionnement et isolement.....	133
III.3.	Détermination structurale	134
III.4.	Activités biologiques.....	145
IV.	Conclusion.....	148
Partie C : Biodiversité et chimiodiversité fongique marine		151
I.	Introduction.....	153
II.	Biodiversité et chimiodiversité des champignons marins	153
II.1.	Une importante biodiversité	153
II.2.	Chimiodiversité marine fongique	155
Partie C : Chapitre 1 : Communautés fongiques cultivables associées aux éponges méditerranéennes <i>Aplysina carvernica</i> , <i>Phorbas tenacior</i> et <i>Crambe crambe</i>		159
I.	Introduction.....	161
II.	Eponges hôtes.....	161
II.1.	<i>Aplysina cavernicola</i>	161
II.2.	<i>Phorbas tenacior</i>	165
II.3.	<i>Crambe crambe</i>	168
III.	Communautés fongiques cultivables associées aux éponges <i>A. cavernicola</i> , <i>P. tenacior</i> et <i>C. crambe</i>	170
III.1.	Isolement et détermination des souches cultivables	170
III.2.	Discussion	172

IV.	Sélection des champignons	177
IV.1.	Profils métabolomiques	178
IV.2.	Activités antibactériennes.....	181
V.	Comparaison des souches fongiques sous le prisme du réseau moléculaire	182
V.1.	Comparaison de <i>P. tenacior</i> et <i>P. brevicompactum</i>	182
V.2.	Comparaison de <i>C. crambe</i> et <i>P. citrinum</i>	184
VI.	Conclusion.....	184
Partie C : Chapitre 2 : Métabolisme spécialisé de <i>Stachybotrys chartarum</i>		185
I.	Introduction	187
II.	<i>Stachybotrys chartarum</i> : état de l'art	187
II.1.	Classification	187
II.2.	Description morphologique	188
II.3.	Métabolisme spécialisé de <i>Stachybotrys chartarum</i>	189
III.	Etude de <i>Stachybotrys chartarum</i>	200
III.1.	Etude de <i>S. chartarum</i> sous le prisme du réseau moléculaire	201
III.2.	Extraction, fractionnement et isolement.....	201
III.3.	Détermination structurale	202
III.4.	Activités antimicrobiennes	221
IV.	Conclusion.....	223
Conclusion générale		225

Glossaire

Antifouling ou **Antisalissure** : Ensemble de produits permettant de préserver les coques de bateaux contre la colonisation des organismes aquatiques (microorganismes, algues, mollusques...).

Axénique : Culture stérile dépourvue de germes pathogènes.

Benthique : Espèce vivant dans la zone de fond marin.

Biocide : Ensemble de produits destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, par une action chimique ou biologique.

Chimiotaxonomie : Rapport entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique.

Cœnocytaire : Structure cellulaire unique contenant de nombreux noyaux.

Conidie : Spore assurant la multiplication asexuée des champignons.

Conidiophore : Organe portant les conidies.

Cytoplasme : Milieu rencontré à l'intérieur des cellules, comprenant l'ensemble des éléments qui s'y trouvent, à l'exception du noyau.

Eucaryote : Organisme unicellulaire ou pluricellulaire, qui se caractérise par la présence d'un noyau et généralement de mitochondries dans les cellules.

Eutrophisation : Pollution de certains écosystèmes aquatiques qui se produit lorsque le milieu reçoit trop de matières nutritives assimilables par les algues et que celles-ci prolifèrent.

Hétérotrophe : Organisme incapable de synthétiser lui-même ses composants et qui utilise les matières organiques d'autres organismes pour se nourrir.

Hyphe : Structure cellulaire en forme de filaments tubulaires dont l'ensemble constitue le mycélium.

Métabolome : Ensemble des métabolites retrouvés dans un échantillon biologique (cellule, organe, organisme) à un instant donné.

Métabolomique : Etude scientifique du métabolome.

Métazoaire : Ensemble des animaux, êtres eucaryotes, pluricellulaires, hétérotrophes et généralement mobiles.

Mycélium : Partie végétative des champignons, formée de filaments souterrains ramifiés à partir desquels croissent les champignons.

Nématocyste : Organite à l'intérieur des cnidocytes formant une capsule urticante dans les tentacules des cnidaires.

Parasite : Organisme animal, végétal ou microorganisme qui se nourrit strictement aux dépens d'un organisme hôte d'une espèce différente, de façon permanente ou pendant une phase de son cycle vital.

Phialide : Article mycélien fertile en forme de bouteille synthétisant les conidies.

Procaryote : Organisme unicellulaire dont la structure ne possède pas de noyau.

Protozoaire : Organisme unicellulaire, pouvant s'associer en colonies qui paraissent former des êtres pluricellulaires, mais dans lesquelles les éléments anatomiques sont tous semblables.

Saprophyte : Microorganisme non pathogène vivant dans la nature sur des débris organiques en décomposition, tout en assurant leur dégradation.

Sessile : Organisme stationnaire vivant directement fixé au substrat.

Spicule : Corpuscule minéral solide des tissus d'invertébrés marins.

Symbiose : Association constante, obligatoire et spécifique entre organismes hétérospecifics ne pouvant vivre l'un sans l'autre, chacun d'eux tirant un bénéfice de cette association.

Symbiote : Organisme vivant en symbiose avec un autre.

Ubiquitaire : Être vivant (ou molécule) dont l'aire de répartition est très étendue.

Abréviations

ACN : Acétonitrile
af ou **CH₃COOH** : Acide formique
CD : Dichroïsme circulaire
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CI₅₀ : Concentration inhibant 50% des individus ciblés
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
COSY : COrrélation SpectroscopY
Cyn : Caulerpényne
DAD : Diode Array Detector (détecteur à barrette de diodes)
DE₅₀ : Dose efficace nécessaire pour obtenir un effet sur 50% des individus ciblés
DEDL : Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière
DFT : Density Functional Theory
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
DORIS : Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatiques
ECD : Dichroïsme circulaire électronique
ESI : Ionisation électrospray
GNPS : Global Natural Product Social molecular networking
H₂O : Eau
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation
HSV : Virus de l'Herpes Simplex
ITS : Internal Transcribed Spacer
LSU : Large SubUnit
MeOH : Méthanol
NOESY : Nuclear Overhauser Spectroscopy
PACA : Provence-Alpes Côte-d'Azur
PCR : Polymerisation Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PN : Produit Naturel
PNM : Produit Naturel Marin
ppm : Partie par millions
R&D : Recherche et Développement
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SM : Spectrométrie de masse
SM/SM : Spectrométrie de masse en tandem
STS : Staurosporine
TDDFT : Time Dependant Density Functional Theory
ToF : Time-of-Flight (temps de vol)
UV : Ultra-Violet
VALBIM : VALorisation des Biocides d'Invertébrés marins de Méditerranée
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
WoRMS : World Register of Marine Species
ZI : Zone d'Inhibition

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de <i>Caulerpa taxifolia</i>	17
Tableau 2. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) du composé Ct1 (125/500 MHz, d_4 -MeOH) et de la caulerpényne (67/270 MHz, CDCl_3)	29
Tableau 3. Données RMN (A) ^1H et (B) ^{13}C , pour les composés Ct2 , 53 , 54 , 61 et 62 et coefficients de corrélation linéaire R^2 pour les couples Ct2/53 , Ct2/54 , Ct2/61 et Ct2/62	36
Tableau 4. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) de Ct2 (d_4 -MeOH, 125/500 MHz).	37
Tableau 5. Données RMN (A) ^1H et (B) ^{13}C , pour les composés Ct3 , 55 et 56 et coefficients de corrélation linéaire R^2 pour les couples Ct3/55 et Ct3/56	39
Tableau 6. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Ct3 (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).	40
Tableau 7. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Ct4 (d_6 -DMSO, 500/125 MHz).	42
Tableau 8. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Ct5 (d_6 -DMSO, 500/125 MHz).	44
Tableau 9. Efficacité biocide des composés à 0,1 mg/mL.	48
Tableau 10. Espèces marines échantillonnées en Espagne et au Maroc.	56
Tableau 11. Classification de <i>Polysyncraton</i>	65
Tableau 12. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C et ^{31}P) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Psp3 (D_2O , 500/125/200 MHz).	78
Tableau 13. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C et ^{31}P) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Psp4 (D_2O , 500/125/200 MHz).	80
Tableau 14. Données RMN ^1H et ^{31}P du composé Psp1 (D_2O , 500/200 MHz).	82
Tableau 15. Données RMN ^1H et ^{31}P du composé Psp2 (D_2O , 500/200 MHz).	83
Tableau 16. Activité résiduelle (%) de kinases après traitement avec Psp3 et Psp4 à 10 μM	93
Tableau 17. Classification d' <i>Hexadella racovitzai</i>	100
Tableau 18. Données RMN ^1H (400 MHz) associées à Hr1 (d_4 -MeOH) et comparaison avec les données de la psammaline A de la bibliographie (CD_3CN , fréquence non précisée) ¹⁰⁵	108
Tableau 19. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) de Hr2 (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).	116
Tableau 20. Classification de <i>Crambe crambe</i>	125
Tableau 21. Différentes classes d'alcaloïdes guanidiniques ¹¹¹	127
Tableau 22. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) du composé Cc1 (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) et comparaison avec la crambescine A2 364 (d_6 -DMSO) ¹²¹	139

Tableau 23. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) des composés Cc2-4 (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).	144
Tableau 24. Activités antibactériennes préliminaires obtenues pour les crambescines Cc1-4	145
Tableau 25. CI_{50} de Cc1-4 (contre-ion HFBA ⁻) sur les lignées cellulaires U2OS, Jurkat A3 et RPE1.	148
Tableau 26. Classification d' <i>Aplysina cavernicola</i>	162
Tableau 27. Classification de <i>Phorbas tenacior</i>	165
Tableau 28. Souches fongiques cultivables obtenues en fonction des conditions d'isolement, de température et du milieu de culture.	171
Tableau 29. Espèces fongiques cultivables obtenues à partir des trois éponges de notre étude.....	173
Tableau 30. Activités antibactériennes des extraits organiques	181
Tableau 31. Classification de <i>Stachybotrys chartarum</i>	188
Tableau 32. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) de la partie sesquiterpénol du composé Sc1 et comparaison avec celle de la roridine E ²⁰⁴	205
Tableau 33. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) du composé Sc1 (d_4 -MeOH, 500 MHz) et comparaison avec la satratoxine H (CDCl_3) ²⁰⁴	208
Tableau 34. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) de Sc2 et Sc1 (CD_3OD , 500/125 MHz).	211
Tableau 35. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Sc2 (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).	213
Tableau 36. Données RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 400 MHz) des composés Sc3-5	216
Tableau 37. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) du composé Sc4 (d_4 -MeOH, 400/100 MHz) et comparaison avec les données RMN 1D de l'acétate de stachybotrylactame (CDCl_3) ²⁰²	217
Tableau 38. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) du composé Sc6 (d_4 -MeOH, 400/100 MHz) et comparaison avec les données RMN 1D de la chartarutine G ²¹⁸	220
Tableau 39. Activités antibactériennes des composés Sc1-6 (les résultats sont exprimés en % de survie).	222

Liste des schémas

Schéma 1. Conversion des glucosinolates de Brassicaceae.....	10
Schéma 2. Conversion des tridentatols E-G (5-7) en tridentatols A-D (1-4) par <i>T. marginata</i>	12
Schéma 3. Conversion de la 4- <i>O</i> -sulfatopsammapline A (9) en psammapline A (10).....	12
Schéma 4. Conversion des métabolites sulfatés (11-13) en dérivés non sulfatés (14-16) chez les Dasycladaceae	13
Schéma 5. Conversion de la DMSP (19) en DMS (20) et acrylate (21).....	15
Schéma 6. Conversion du tétraacétate d'haliméda (22)	15
Schéma 7. Conversion de l'isofistularine-3 (25) et de l'aérophobine-2 (27) en aéroplysinine-1 (28)..	16
Schéma 8. Conversion de la caulerpényne (30) en dérivés sesquiterpéniques	16
Schéma 9. Biosynthèse de la caulerpényne (30).....	20
Schéma 10. Schéma d'extraction adopté pour <i>C. taxifolia</i>	27
Schéma 11. Voie de biosynthèse supposée de l'acide rosmarinique	46
Schéma 12. Voie de biosynthèse proposée pour la production des dérivés de l'algue <i>C. taxifolia</i>	47
Schéma 13. Schéma d'extraction de <i>Polysyncraton</i> sp.	70
Schéma 14. Voie de biosynthèse hypothétique proposée pour les métabolites isolés de <i>Polysyncraton</i> sp.	90
Schéma 15. Schéma d'extraction d' <i>H. racovitzai</i>	107
Schéma 16. Voie de biosynthèse hypothétique proposée pour la 4- <i>O</i> -sulfatocyclobispsammapline A (Hr2).	117
Schéma 17. Schéma d'extraction de <i>C. crambe</i>	134
Schéma 18. Relations biosynthétiques hypothétiques pour la formation (A) des anchinopeptolides et (B) du cycloanchinopeptolide C.....	167
Schéma 19. Relations biosynthétiques hypothétiques pour la formation (A) des crambescines B et (B) des crambescidines.	169
Schéma 20. Voie de biosynthèse hypothétique des trichothécènes	191
Schéma 21. Voie de biosynthèse hypothétique des atranones A, B et I à partir des atranones F et G	192
Schéma 22. Voie de biosynthèse hypothétique de l'atranone J (224) à partir de l'atranone H (222)..	193
Schéma 23. Voie de biosynthèse hypothétique pour les chartarolides A-C	197
Schéma 24. Schéma d'extraction de <i>S. chartarum</i>	202
Schéma 25. Méthode employée pour déterminer la configuration absolue du centre asymétrique C-12' de la satratoxine H.....	206
Schéma 26. Biosynthèse hypothétique de la chartarutine A et sa conversion en chartarutine G-H. ..	221

Liste des figures

Figure 1. (A) Polymérisation de la sulfooxydihydroxycoumarine (13) et (B) photographies du « plug » <i>in situ</i>	13
Figure 2. Structures des acides zostérique (17) et <i>p</i> -coumarique (18)	14
Figure 3. Photographie du « plug » <i>in situ</i> de <i>C. taxifolia</i>	17
Figure 4. Représentation schématique de <i>C. taxifolia</i>	18
Figure 5. Caulerpényne (30).....	20
Figure 6. Structures des sesquiterpènes dérivés de la caulerpényne isolés de <i>C. taxifolia</i>	21
Figure 7. Structures des mono- et diterpènes dérivés de la caulerpényne	22
Figure 8. Structures des di- et triterpénoides isolés de <i>C. taxifolia</i>	22
Figure 9. Caulerpine (52) ⁵⁰	23
Figure 10. Structures des dérivés de l'acide phénylpyruvique (53-56) isolés de <i>C. taxifolia</i>	23
Figure 11. Structures des glycolipides isolés de <i>C. taxifolia</i>	24
Figure 12. Photographie <i>in situ</i> de <i>Caulerpa taxifolia</i>	24
Figure 13. Profil métabolomique de l'extrait brut organique de <i>C. taxifolia</i>	25
Figure 14. (A) Structure de Ct1 et (B) spectres RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) de Ct1 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	28
Figure 15. Structure aux RX de Ct1	29
Figure 16. (A) Spectres RMN ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) des composés Ct2-5 (Ct2 et Ct3 : <i>d</i> ₄ -MeOH ; Ct4 et Ct5 : <i>d</i> ₆ -DMSO).	31
Figure 17. Structure du <i>p</i> -sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (Ct2 , 60).	33
Figure 18. Spectres RMN : (A) ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) de Ct2 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	33
Figure 19. Agrandissement n°1 du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Ct2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125MHz)..	34
Figure 20. Agrandissement n°2 du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Ct2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125 MHz). 35	
Figure 21. Structures du (<i>Z</i>)- et (<i>E</i>)-phénylpyruvate de méthyle (53 , 54) ⁵⁸ , de l'acide (<i>Z</i>)- <i>p</i> -sulfooxyphénylpyruvique (61) ⁵⁸ et de l'acide (<i>Z</i>)- <i>p</i> -hydroxyphénylpyruvique (62) ⁶¹	35
Figure 22. Structure et corrélations de Ct2 (60).....	36
Figure 23. Structure du <i>m</i> -hydroxy- <i>p</i> -sulfooxypyruvate de méthyle (Ct3 , 63).....	37
Figure 24. Spectres RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) de Ct3 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	38
Figure 25. Agrandissement du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Ct3 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125 MHz).	38
Figure 26. Structures des (<i>Z</i>)- et (<i>E</i>)- <i>m</i> -hydroxypyruvate de méthyle (55 , 56).....	39
Figure 27. Structure de l' α -méthoxy- <i>m,p</i> -disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4 , 64).....	40
Figure 28. Spectres RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) de Ct4 (<i>d</i> ₆ -DMSO).	41
Figure 29. Agrandissement du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Ct4 (<i>d</i> ₄ -MeOH).....	42
Figure 30. Structure de Ct5 (65).	43
Figure 31. Spectres RMN : (A) ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) de Ct5 (<i>d</i> ₆ -DMSO)	43

Figure 32. Structures des composés dérivés de l'acide phénylpyruvique.....	45
Figure 33. Structures des céphamycines A et B	45
Figure 34. Structures des composés de référence testés.	47
Figure 35. Les différents types d'éponges.....	53
Figure 36. Structure d'une ascidie simple	55
Figure 37. Zones des missions d'échantillonnage.....	56
Figure 38. Organismes sélectionnés pour l'étude chimique.....	62
Figure 39. Structures des composés isolés de <i>P. lithostrotum</i>	66
Figure 40. Structures des pyridoacridines isolés de <i>P. echinatum</i>	67
Figure 41. Structure du mycalamide A (88).....	67
Figure 42. Photographie <i>in situ</i> de <i>Polysyncraton</i> sp.	68
Figure 43. Empreinte chimique de la fraction FI par CLHP-UV	68
Figure 44. Spectre RMN ¹ H (500 MHz) de la fraction FI (<i>d</i> ₄ -MeOH).....	69
Figure 45. Structure de la bolascidine C (Psp3, 89).....	71
Figure 46. (A) Spectre RMN ¹ H (500 MHz) de Psp3 (D ₂ O) et (B) structure et corrélations RMN 2D principales pour les fragments F1-F4 associés.....	72
Figure 47. Structures des fragments F1 et F2.....	72
Figure 48. Agrandissement du spectre de masse en tandem (SM/SM) de l'ion de <i>m/z</i> 721.	72
Figure 49. Agrandissement du spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H de Psp3 (D ₂ O, 500/500 MHz).	73
Figure 50. Structure du fragment F3.	73
Figure 51. Spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H de Psp3 (D ₂ O, 500/500 MHz).	74
Figure 52. Structures des fragments F4a et F4b.	74
Figure 53. Agrandissement du spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H de Psp3 (D ₂ O, 500/500 MHz).	75
Figure 54. Agrandissements des spectres RMN : (A) COSY ¹ H- ¹ H (D ₂ O, 500/500 MHz) et (B) HMBC ¹ H- ¹³ C (D ₂ O, 500/125 MHz) de Psp3	76
Figure 55. Structures possibles pour Psp3 (89).....	76
Figure 56. Agrandissement du spectre RMN HMBC ¹ H- ³¹ P de Psp3 (D ₂ O, 200 MHz).....	77
Figure 57. Structure et corrélations RMN 2D de Psp3 (89).....	78
Figure 58. Structure de la bolascidine D (Psp4, 90).	79
Figure 59. Superposition des spectres RMN ¹ H des composés Psp3 et Psp4 (D ₂ O, 500 MHz).	80
Figure 60. Structure de Psp1 (91).	81
Figure 61. Spectre RMN ¹ H de Psp1 (91) (D ₂ O, 500 MHz).	82
Figure 62. Structure de Psp2 (92).	83
Figure 63. Principe des analyses par réseau de similarité moléculaire.....	85
Figure 64. Sous-réseau de similarité spectrale provenant du réseau moléculaire de <i>Polysyncraton</i> sp.	86
Figure 65. Sous-réseau de similarité spectrale correspondant aux zones de Psp1-4 (1-4).....	87

Figure 66. Agrandissement du réseau sur (1) Psp1 , (2), Psp2 , (3), Psp3 et (4) Psp4	88
Figure 67. Métabolites potentiellement présents dans l'extrait brut organique de <i>Polysyncraton</i> sp. .	89
Figure 68. Représentation schématique d'un bola.	91
Figure 69. Représentation schématique de l'organisation micellaire d'un bola.	91
Figure 70. Siladénosérinols isolés d'une ascidie de la famille des Didemnidae ⁸²	92
Figure 71. Activités anti-inflammatoires sans stimulation au TNF α	94
Figure 72. Activités anti-inflammatoires de Psp3 et Psp4 avec stimulation au TNF α	94
Figure 73. Cytotoxicité de Psp3 et Psp4	95
Figure 74. Structures de la bisaprasine (93), de la 4- <i>O</i> -sulfatobisaprasine (94), de la bispsammapline A (95) et de la cyclobispsammapline A (96).....	102
Figure 75. Structures des bastadines isolées jusqu'en 2004.....	103
Figure 76. Structures des bastadines isolées après 2004	104
Figure 77. Structures des bromotyrosines détectées chez des bactéries isolées d'une éponge du genre <i>Haplosclerida</i>	105
Figure 78. Photographie <i>in situ</i> de l'éponge <i>H. racovitzai</i> étudiée	106
Figure 79. Profil métabolomique de la fraction organique d' <i>H. racovitzai</i> par CLHP-UV-DEDL, ..	106
Figure 80. Structure de la psammapline A (10).....	108
Figure 81. Spectre RMN ¹ H (<i>d</i> ₄ -MeOH, 400 MHz) de Hr1 (131).....	108
Figure 82. Structure de Hr2 (132).....	109
Figure 83. Spectres RMN (A) ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) de Hr2 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	110
Figure 84. Structures des fragments F1-4 de Hr2	110
Figure 85. Structures des fragments F1 et F2.....	111
Figure 86. Spectres RMN COSY ¹ H- ¹ H des fragments F1 et F2 de Hr2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz).	111
Figure 87. Structures des fragments F3a et F3b.	112
Figure 88. Agrandissements des spectres RMN COSY ¹ H- ¹ H des fragments F3 de Hr2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz).	112
Figure 89. Structures des fragments F4a et F4b.	112
Figure 90. Agrandissement du spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H des fragments F4 de Hr2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz).	113
Figure 91. Agrandissement du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Hr2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125 MHz)....	114
Figure 92. Structures possibles pour Hr2	114
Figure 93. Structures de la cyclobispsammapline A (96) et de la 4- <i>O</i> -sulfatocyclobispsammapline A (Hr2 , 132).	115
Figure 94. Spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H du groupement butyle (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz).....	115
Figure 95. Structures des dérivés bromotyrosines sulfatés.....	118
Figure 96. Activité anti-inflammatoire de Hr2	120

Figure 97. Cytotoxicité de Hr2	120
Figure 98. Crambescidines isolées de <i>C. crambe</i>	127
Figure 99. Structures des crambescines de type A, B et C.	128
Figure 100. Dérivés crambescines recensés jusqu'en 2017.	131
Figure 101. Photographie <i>in-situ</i> de <i>C. crambe</i>	132
Figure 102. Analyse en réseau de l'extrait brut de <i>C. crambe</i> à l'exception des nœuds isolés.	133
Figure 103. Profil métabolomique de la fraction 6 de <i>C. crambe</i>	134
Figure 104. Schéma de fragmentation des crambescines.	135
Figure 105. Structure de la crambescine A2 364 (160).	135
Figure 106. Spectres RMN (A) ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) de Cc1 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	136
Figure 107. Schéma de fragmentation de Cc1	137
Figure 108. Spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux de la crambescine Cc1	138
Figure 109. Structures des composés Cc2-4 (169-171).	139
Figure 110. Agrandissements (A) du spectre RMN COSY ¹ H- ¹ H (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz) et (B) du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125 MHz) de Cc2	140
Figure 111. Agrandissements du spectre RMN HMBC ¹ H- ¹³ C de Cc2 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/125 MHz).	141
Figure 112. Cc1-4 : A) Structures et corrélations en RMN, B) fragmentation en SM.	142
Figure 113. Spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux des composés Cc2-4	143
Figure 114. Activités anti-inflammatoires de Cc1-4 sans activation au TNF α	146
Figure 115. Activités anti-inflammatoires de Cc1-4 avec activation au TNF α	147
Figure 116. Cytotoxicité de Cc1-4	147
Figure 117. Développement d'un mycélium à partir d'une spore	153
Figure 118. Structures reproductives des ascomycètes (A) et des basidiomycètes (B).	154
Figure 119. Structures de la céfalotine (172) et de la céphalosporine C (173).	156
Figure 120. Photographie <i>in situ</i> de l'éponge <i>A. cavernicola</i>	162
Figure 121. Structures des métabolites secondaires isolés d' <i>A. cavernicola</i>	164
Figure 122. Photographie <i>in situ</i> de l'éponge <i>P. tenacior</i> étudiée.	166
Figure 123. Structures des métabolites isolés de <i>P. tenacior</i>	167
Figure 124. Exemples d'alcaloïdes guanidiniques polycycliques isolés de <i>C. crambe</i>	168
Figure 125. Morceau d'éponge sur laquelle un mycélium de champignon se développe.	170
Figure 126. Exemple de champignons mis en culture en triplica sur trois milieux de culture différents	178
Figure 127. Empreinte métabolomique des extraits de <i>Stachybotrys chartarum</i>	179
Figure 128. Empreinte métabolomique d'extraits organiques de <i>Penicillium citrinum</i>	179
Figure 129. Empreinte métabolomique des extraits bruts organiques pour les trois souches de <i>Penicillium brevicompactum</i>	180
Figure 130. Analyse en réseau des extraits bruts organiques de <i>P. brevicompactum</i> et <i>P. tenacior</i> . .	183

Figure 131. Représentation schématique de la structure microscopique de <i>S. chartarum</i>	188
Figure 132. Structures des trichothécènes simples isolés de <i>S. chartarum</i>	189
Figure 133. Structures des trichoverroïdes isolés de <i>S. chartarum</i>	190
Figure 134. Structures des trichothécènes macrocycliques isolés de <i>S. chartarum</i>	191
Figure 135. Structures des dérivés diterpéniques isolés de <i>S. chartarum</i>	192
Figure 136. Structures des dérivés phénylspirodrimanes isolés de <i>S. chartarum</i>	194
Figure 137. Structures des chartarlactames isolées de <i>S. chartarum</i>	195
Figure 138. Structures des stachartines (279-283) isolées de <i>S. chartarum</i>	196
Figure 139. Structures des chartarolides isolés de <i>S. chartarum</i> et ses dérivés.....	196
Figure 140. Voie de biosynthèse hypothétique de la stachybotrine G (298).....	198
Figure 141. Structures des phénols triprénylés isolés de <i>S. chartarum</i>	199
Figure 142. Structures de la 11- <i>O</i> -methyl-épi-cochlioquinone A (305) et de l'épi-cochlioquinone A (306)	199
Figure 143. Structure de FR901459 (307).....	200
Figure 144. <i>S. chartarum</i> sur différents milieux de culture.....	200
Figure 145. Réseau moléculaire de <i>S. chartarum</i> à l'exception des nœuds isolés.	201
Figure 146. Structure de la satratoxine H (214).	202
Figure 147. Spectres RMN (A) ¹ H (500 MHz) et (B) ¹³ C (125 MHz) de Sc1 (<i>d</i> ₄ -MeOH).	203
Figure 148. Agrandissement du spectre NOESY ¹ H- ¹ H de Sc1 (<i>d</i> ₄ -MeOH, 500/500 MHz).	204
Figure 149. Corrélation NOESY H-2'/H-12' et stéréochimie relative en C-12'.	205
Figure 150. Structures des conformères de plus basse énergie pour la (2 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11 <i>R</i> , 12 <i>R</i> , 6' <i>R</i> , 12' <i>S</i> , 13' <i>R</i>)-satratoxine H.....	207
Figure 151. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de Sc1 (en rouge) et spectres ECD théoriques associés à la (2 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11 <i>R</i> , 12 <i>R</i> , 6' <i>R</i> , 12' <i>S</i> , 13' <i>R</i>)-satratoxine H (en vert) et à la (2 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11 <i>R</i> , 12 <i>R</i> , 6' <i>R</i> , 12' <i>R</i> , 13' <i>R</i>)-satratoxine H (en bleu) (MeOH).....	207
Figure 152. Corrélations RMN 2D principales de Sc1 (308).	208
Figure 153. Structure du composé Sc2 (309).	209
Figure 154. Comparatif des spectres RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) des composés Sc1 et Sc2 (<i>d</i> ₄ -MeOH).....	210
Figure 155. Structure du conformère de plus basse énergie pour le (12' <i>S</i>)- Sc2 (100%).	212
Figure 156. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de Sc2 (en rouge) et spectres ECD théoriques associés à la (2 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11 <i>R</i> , 12 <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>R</i> , 12' <i>S</i> , 13' <i>R</i>)-2',3'-dihydrosatratoxine H (en vert) et à la (2 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11 <i>R</i> , 12 <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>R</i> , 12' <i>R</i> , 13' <i>R</i>)-2',3'-dihydrosatratoxine H (en bleu) (MeOH).	212
Figure 157. Corrélations RMN 2D principales de Sc2 (309).	213
Figure 158. Exemples de squelettes de type 12,13-époxytrichothécène et 10,13-cyclotrichothécène.	214
Figure 159. Structures des composés Sc3 , Sc4 et Sc5 et corrélations RMN 2D principales.....	215

Figure 160. Spectres RMN ^1H (500 MHz, d_4 -MeOH) de A) Sc5 , B) Sc4 et C) Sc3	215
Figure 161. Structures de la chartarutine G (295)	217
Figure 162. Spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de Sc6 (d_4 -MeOH).	218
Figure 163. Structures des conformères de plus basse énergie pour la (3' <i>S</i>)-chartarutine G.....	219
Figure 164. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de Sc6	219
Figure 165. Structure et corrélations RMN 2D principales de Sc6 (313).	220

Introduction générale

Le milieu marin abrite de nombreuses espèces qui, du fait des conditions environnementales (pression, salinité, luminosité et composition en certains éléments chimiques), produisent plusieurs molécules spécifiques, souvent différentes du milieu terrestre, désignés par le terme métabolites spécialisés. Ces derniers, en raison notamment des conditions de vie sous-marine, présentent de nombreuses activités biologiques *in situ*, même sous l'effet de la haute dilution : lutte contre la prédation, compétition et communication inter- et intraspécifiques. Par ailleurs, la majorité des macroorganismes marins vivent en association plus ou moins étroite avec des microorganismes. Plusieurs études ont révélé que certains microorganismes sont les producteurs réels de métabolites extraits et isolés de macroorganismes marins étudiés de façon globale. Ainsi, le milieu marin, bien qu'étudié depuis plusieurs décennies, représente toujours une source sous-explorée de molécules potentiellement valorisables dans différents domaines.

La Méditerranée, dont la surface ne représente que 0,8 % de la superficie des océans, contiendrait 4 à 18 % de la biodiversité marine mondiale, dont un quart des espèces sont endémiques¹. On dénombre plusieurs centaines d'espèces marines accidentellement introduites telles que certains mollusques ou arthropodes, en provenance notamment de l'Océan Indien ou de l'Océan Pacifique. Plus de 17 000 espèces marines sont recensées en Méditerranée, parmi lesquelles 190 espèces d'algues vertes (7% du total mondial), 681 espèces d'éponges (12% du total mondial) et 229 espèces d'ascidies (5% du total mondial). Les microorganismes **eucaryotes** et **procaryotes** représentent quant à eux plus d'un quart des espèces marines méditerranéennes recensées. Les données relatives aux bactéries et aux champignons restent à ce jour très fragmentées en raison des difficultés rencontrées pour les identifier mais surtout pour les cultiver². Depuis quelques années, plusieurs menaces anthropiques (dégradation des paysages côtiers, pollutions, pêche intensive, invasions biologiques, changement climatique) pèsent sur cet écosystème riche et mènent inexorablement au déclin de nombreuses espèces. Il semble donc crucial de protéger la biodiversité marine méditerranéenne d'une importance capitale. Cette protection passe notamment par une meilleure connaissance des différents écosystèmes méditerranéens et des espèces marines qui y vivent. La biodiversité marine méditerranéenne est étroitement liée à une chimiodiversité spécifique.

Ces dernières décennies, les molécules produites par les organismes marins méditerranéens ont fait l'objet de très nombreuses études. Ainsi, entre 1965 et 2014, plus de 2 358 produits naturels nouveaux ont été décrits, ce qui place les études sur les métabolites d'organismes marins méditerranéens au 3^{ème} rang mondial après le Japon (3 877 métabolites repartis sur 1 570 publications) et la Chine (2915

¹ Bianchi C. N., Morri C. 2000, Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Mar. Poll. Bull.*, **40**, 367–376

² Coll M., Piroddi C., Steenbeek J., Kaschner K., Ben Rais Lasram F., Aguzzi J., Ballesteros E., Bianchi C. N., Corbera J., Dailianis T. et al. 2010, The biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, patterns, and threats. *PLoS ONE*, **5** (8), e11842.

métabolites répartis sur 942 publications)³. De très nombreux invertébrés marins méditerranéens, mais également les microorganismes qu'ils renferment, notamment les champignons, restent à étudier.

Notre groupe de recherche occupe une place privilégiée en région PACA pour l'étude de la biodiversité et de la chimiodiversité marine méditerranéenne. Le groupe Produits Naturels Marins de l'université Nice Sophia Antipolis s'intéresse depuis de nombreuses années aux métabolites d'invertébrés marins (spongiaires, algues, cnidaires) et à leur valorisation. La valorisation des molécules isolées et/ou synthétiques dans le domaine thérapeutique, cosmétique, des matériaux et environnemental, inscrite dans une stratégie globale d'exploitation raisonnée des ressources naturelles, est réalisée au travers d'un réseau de collaborateurs publics et privés, notamment la société BioPreserv. Cette dernière, fondée en 2011 et implantée à Grasse, délivre des prestations de service, des conseils et propose un savoir-faire réglementaire dans le domaine de la cosmétique, de la détergence et du bâtiment en lien avec les biocides. L'entreprise accorde une grande importance à la R&D, notamment par la recherche de nouveaux composés biocides biosourcés. La demande du marché biocide s'oriente vers des produits biosourcés alors que les molécules utilisées actuellement sont essentiellement issues de la chimie combinatoire.

Dans ce contexte, le projet de thèse **VALBIM** (**VAL**orisation de **Biocides d'Invertébrés marins de Méditerranée**) développé dans ce manuscrit, co-financé par la région PACA et la société BioPreserv, concerne l'étude de la biodiversité et de la chimiodiversité : (i) d'invertébrés marins méditerranéens échantillonnés en Espagne et au Maroc, (ii) de champignons marins cultivables associés aux éponges méditerranéennes *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, pour une valorisation potentielle et de façon non exclusive dans le domaine des antimicrobiens. Le choix des espèces étudiées a été basé sur plusieurs critères : l'abondance naturelle, la présence de métabolites non recensés dans la bibliographie, l'activité biologique des extraits bruts organiques et/ou l'absence d'étude chimique.

Bien que relativement bien étudiés depuis les années 90, notamment par notre groupe, nous nous sommes intéressés aux métabolites de l'algue *Caulerpa taxifolia* ((Vahl) C. Agardh, 1817) et de l'éponge *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). Les travaux préliminaires ont révélé la présence de plusieurs métabolites de faible poids moléculaire potentiellement nouveaux. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux molécules produites par l'ascidie *Polysyncraton* sp. et l'éponge *Hexadella racovitza* (Topsent, 1896), deux espèces échantillonnées en Méditerranée qui n'avaient jamais fait l'objet d'étude chimique antérieure. Enfin, en collaboration étroite avec la *Mycoteca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin, nous avons étudié pour la première fois les mycobiota cultivables de trois éponges méditerranéennes, *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, en tant que sources potentielles de métabolites valorisables dans le domaine des biocides. On estime que la communauté fongique de moins de 1,5% des éponges marines a fait l'objet d'une étude.

³ Blunt J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H. G., Prinsep M. R. 2016, Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 33 (3), 382-431.

Les travaux menés ont également fait appel à l'utilisation de nouvelles approches analytiques, telles que celles qui mettent en jeu le dichroïsme circulaire et les calculs des spectres de dichroïsme circulaire électroniques (ECD) par TDDFT pour résoudre des problèmes de stéréochimie lorsque les molécules s'y prêtent ou encore les analyses par réseaux de similarité moléculaire, basées sur la spectrométrie de masse en tandem, afin d'étudier sous un nouvel angle les métabolites d'organismes marins ayant déjà fait l'objet ou non d'étude.

Ce manuscrit est divisé en trois grandes parties :

- La première partie (Partie A) est dédiée à l'étude de l'algue *Caulerpa taxifolia*. La seconde partie (Partie B) est consacrée aux travaux menés sur l'ascidie *Polysyncraton* sp. (Chapitre 1) ainsi que sur les deux éponges *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896) (Chapitre 2) et *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) (Chapitre 3). Dans chaque chapitre sont développés :
 - Les éléments bibliographiques relatifs à l'espèce étudiée (taxonomie, description morphologique, travaux chimiques antérieurs),
 - Les travaux menés sur les métabolites de l'espèce échantillonnée (isolement et détermination structurale des métabolites spécialisés isolés),
 - Les propriétés biologiques associées aux métabolites isolés.
- La troisième et dernière partie (Partie C) traite de la biodiversité et de la chimiodiversité de communautés fongiques cultivables associées aux trois éponges méditerranéennes *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*. Cette partie est divisée en trois chapitres dans lesquels sont développés :
 - Quelques généralités sur la biodiversité et la chimiodiversité fongique marine,
 - Les éléments bibliographiques relatifs aux éponges hôtes (taxonomie, description morphologique, travaux chimiques antérieurs et microbiote), l'isolement et la détermination des espèces fongiques cultivables et la comparaison des extraits bruts (hôte – champignon) *via* des analyses par réseau de similarité moléculaire,
 - L'étude menée sur les métabolites du champignon *Stachybotrys chartarum* isolé d'*Aplysina cavernicola* (éléments bibliographiques, travaux chimiques menés sur le champignon).

Ce projet de thèse propose ainsi de contribuer à enrichir nos connaissances sur la biodiversité et la chimiodiversité d'invertébrés marins de Méditerranée, des champignons cultivables qu'ils renferment et de sélectionner les molécules bioactives potentiellement valorisables pour leurs propriétés singulières.

Partie A :
Métabolisme spécialisé de
Caulerpa taxifolia



I. Introduction

Les algues sont des organismes végétaux présents dans tous les milieux aquatiques. Les domaines de valorisation associés concernent plusieurs secteurs industriels : alimentaire, cosmétique, agriculture et pharmaceutique. Il s'agit d'une source potentielle de molécules biocides biosourcées.

De nombreux produits cosmétiques contiennent de l'eau, ce qui les rend sujets aux contaminations microbiennes, avec des conséquences plus ou moins graves pour les utilisateurs. De façon identique, les supports revêtus de peinture sont fréquemment le siège du développement de nombreux microorganismes pathogènes. Pour limiter cette prolifération microbienne, la majorité des peintures et produits cosmétiques contiennent des conservateurs, judicieusement sélectionnés pour leurs propriétés antimicrobiennes. Un conservateur est considéré comme efficace lorsqu'il permet de limiter la croissance de bactéries, de moisissures et de levures pathogènes. Les éléments pathogènes principalement ciblés sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, les salmonelles (bactéries), *Aspergillus brasiliensis* (moisissure) et *Candida albicans* (levure). La demande du marché biocide s'oriente vers des produits biosourcés alors que les molécules utilisées actuellement sont essentiellement issues de la chimie de synthèse.

Dans le cadre d'une collaboration étroite avec la société BioPreserv de Grasse, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une algue verte de Méditerranée relativement bien étudiée depuis les années 90, *Caulerpa taxifolia*, pour une application dans le domaine des biocides. Les travaux préliminaires menés sur un échantillon de *Caulerpa taxifolia* collecté en 2013 à Villefranche-sur-Mer ont révélé la présence de plusieurs métabolites de faible poids moléculaire et sulfatés. Certaines algues qui présentent une organisation coenocytique, excepté à ce jour *Caulerpa taxifolia*, produisent des métabolites sulfatés pour se défendre.

Dans ce contexte, après une brève introduction sur les algues et les différents types de défense chimique, notamment celles mettant en jeu des métabolites sulfatés, la suite de ce manuscrit est consacrée aux travaux menés sur un échantillon de *Caulerpa taxifolia* collecté en 2013 à Villefranche-sur-Mer.

II. Les algues : généralités

Une algue est un organisme végétal photosynthétique (chlorophyllien) qui peut être **procaryote** (on parle alors de cyanobactéries) ou **eucaryote** – unicellulaire dans le cas des diatomées ou dinoflagellés et pluricellulaires dans le cas des algues rouges, vertes et brunes. La photosynthèse, catalysée par des pigments (chlorophylles, caroténoïdes) spécifiques à chaque espèce, leur permet de stocker l'énergie sous forme de polysaccharides de stockage (amidon) ou de polysaccharides nécessaires à la production des parois cellulaires (cellulose). Les algues représentent la quasi-totalité des plantes de l'environnement marin et sont retrouvées dans tous les milieux aquatiques. D'un point de vue phylogénétique, les algues

font partie d'un ensemble polyphylétique (tous les organismes qui le composent ne possèdent pas le même ancêtre commun) et sont divisées en deux lignées : les algues vertes et les algues brunes.

D'un point de vue morphologique, les macroalgues possèdent un thalle végétatif non spécialisé simple (une cellule unique, plusieurs cellules identiques) ou plus complexe et spécialisé. Leur reproduction peut être sexuée ou asexuée.

Les domaines de valorisation des algues sont multiples et concernent plusieurs secteurs industriels : alimentaire (nourriture à base d'algues ou en tant qu'additifs), cosmétique (principes actifs), agriculture (fertilisants) ainsi que pharmaceutique (antiviraux, anticoagulants, antitumoraux...). Dans ce dernier cas, plusieurs algues, et en particulier les algues vertes, représentent une importante source de molécules⁴. Ces molécules permettent aux différentes espèces de se défendre.

III. Espèces marines sessiles : défenses chimiques

De nombreuses espèces **sessiles**, en particulier les plantes, produisent des métabolites spécifiques qui leur permettent de se défendre à la suite d'une agression. Ils constituent une barrière chimique de la plante et sont stockés sous une forme inactive (ou moins active) afin de ne pas être délétère pour l'hôte⁵. Ces métabolites sont libérés et/ou transformés rapidement par des enzymes clés, à la suite d'une attaque physique. A titre d'exemple, les Brassicaceae (plantes à moutarde) convertissent les glucosinolates qu'ils produisent en thio- et isothiocyanates ou isonitriles pour se défendre (schéma 1)⁶.

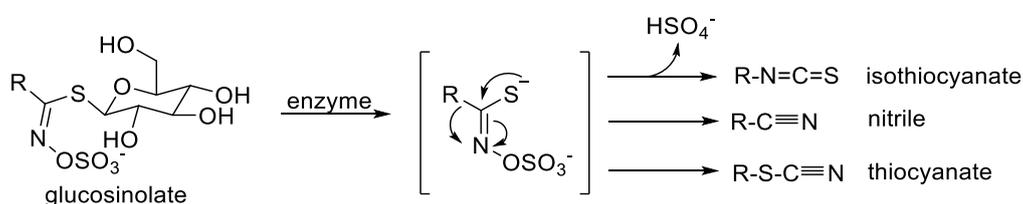


Schéma 1. Conversion des glucosinolates de Brassicaceae⁶.

Plusieurs travaux de recherche ont permis de mettre en exergue de nombreux métabolites avec des propriétés similaires au niveau des espèces marines. En effet, l'environnement marin regorge d'habitats divers et variés, souvent hostiles (prédateurs) pour les espèces marines. Ces dernières, qu'elles soient **sessiles** ou en mouvement, ont évolué en développant des mécanismes de défense particuliers. La production dynamique de toxines (défense induite), ou la conversion de précurseurs non toxiques en toxines à la suite d'un traumatisme (défense activée), sont les techniques de choix employées notamment par les espèces **sessiles**⁷. Ces réactions sont aujourd'hui assez bien décrites chez les algues, les éponges

⁴ Andrade P. B., Barbosa M., Matos R. P., Lopes G., Vinholes J., Mouga T., Valentão P. 2013, Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem.*, **138**, 1819–1828.

⁵ Thoms C., Schupp P. J. 2008, Activated chemical defense in marine sponges – a case study on *Aplysinella rhax*. *J. Chem. Ecol.*, **34**, 1242–1252.

⁶ Fahey J. W., Zalcman A. T., Talalay P. 2001, The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**, 5–51.

⁷ Pohnert G. 2004, Chemical Defense Strategies of Marine Organisms. *Top. Curr. Chem.*, **239**, 179–219.

et les cnidaires. Par ailleurs, les algues ont développé tout un arsenal de défenses chimiques, en complément de celui utilisé pour lutter contre des agents pathogènes potentiels, pour se protéger lorsqu'elles sont blessées (morsures de brouteur, arrachage par les ancras des bateaux...) et mises en danger dans leur environnement. Ces moyens de défense permettent également à l'algue de prévenir l'épanchement de son **cytoplasme** dans le milieu extérieur et l'intrusion d'éléments étrangers. Ils reposent sur des métabolites stockés dans les tissus des organismes. Ces métabolites subissent une cascade de réactions enzymatiques pour être transformés en produits permettant une cicatrisation rapide des plaies. Il s'agit d'un phénomène particulièrement important pour plusieurs macroalgues vertes qui présentent une organisation **cœnocytique** telles que *Dasycladus vermicularis* ou *Caulerpa taxifolia*. Ces différents types de défenses sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

III.1. Défense induite

Certaines algues rouges et brunes relarguent des espèces oxydantes (H_2O_2 et/ou O_2^-) si elles sont attaquées⁸. Hormis ce phénomène, plusieurs espèces ont également montré une augmentation de la concentration en composés actifs. Ainsi :

- Le taux en polyphénols augmente au niveau de l'algue *Fucus distichus* au bout de quelques jours après une coupure manuelle⁹,
- Le taux en phlorotannins (polyphénols)¹⁰ augmente au niveau de l'algue *Ascophyllum nodosum* et le taux en diterpènes¹¹ augmente au niveau de l'algue *Dictyota menstrualis* en présence de prédateurs,
- Le taux en pseudoptérosines A-D augmente au niveau de la gorgone *Pseudopterogorgia elisabethae* en réponse à l'attaque d'un mollusque¹².

⁸ Kupper F. C., Muller D. G., Peters A. F., Kloareg B., Potin P. 2002, Oligoalginat recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of Laminariales. *J. Chem. Ecol.*, **28** (10), 2057–81.

⁹ Van Alstyne K. L. 1988, Herbivore Grazing Increases Polyphenolic Defenses in the Intertidal Brown Alga *Fucus Distichus*. *Ecology*, **69** (3), 655–663.

¹⁰ Toth G., Pavia H. 2000, Lack of phlorotannin induction in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* in response to increased copper concentrations. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **192**, 119–126.

¹¹ Cronin G., Hay M. E. 1996, Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*, **77** (8), 2287–2301.

¹² Thornton R. S., Kerr R. G. 2002, Induction of pseudopterosin biosynthesis in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Chem. Ecol.*, **28** (10), 2083–2090.

III.2. Défense activée

III.2.1. Dérivés sulfates

III.2.1.1. *Tridentata marginata*

Les tridentatols A-C (**1-3**), isolés de *Tridentata marginata*, en particulier le tridentatol A (**1**), se sont avérés être de puissants répulsifs des prédateurs du cnidaire¹³. Une étude plus poussée de l'espèce a conduit à l'isolement des tridentatols E-H (**5-8**), dérivés sulfates des tridentatols A-D (**1-4**)¹⁴. Ces derniers sont rapidement convertis en métabolites non sulfatés lorsque l'espèce est agressée et blessée (schéma 2). En dehors de ce rôle écologique, les tridentatols E-H (**5-8**) ne présentent à ce jour aucune autre activité biologique.

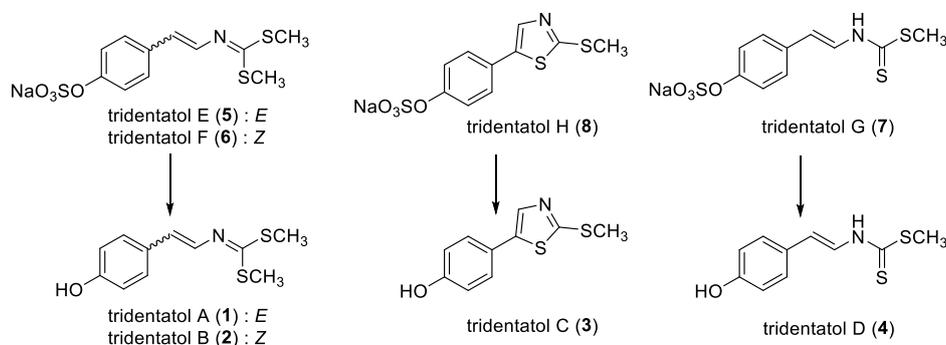


Schéma 2. Conversion des tridentatols E-G (**5-7**) en tridentatols A-D (**1-4**) par *T. marginata*^{13,14}.

III.2.1.2. *Aplysinella rhax*

De façon identique à *T. marginata*, l'éponge *Aplysinella rhax* produit un dérivé sulfaté de la bromotyrosine, la 4-*O*-sulfatopsammapline A (**9**), présent de façon latente dans l'espèce. Lorsque l'éponge est blessée, la 4-*O*-sulfatopsammapline A (**9**) est rapidement convertie en psammapline A (**10**) (schéma 3). Cette réaction implique sans équivoque des enzymes spécifiques de l'éponge⁵.

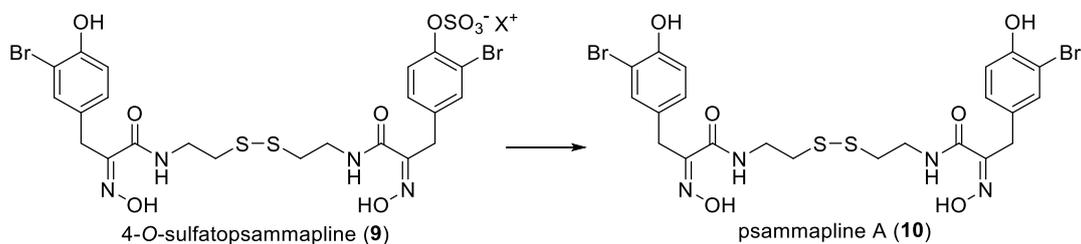


Schéma 3. Conversion de la 4-*O*-sulfatopsammapline A (**9**) en psammapline A (**10**)⁵.

¹³ Stachowicz J. J., Lindquist N. 1997, Chemical defense among hydroids on pelagic *Sargassum*. Predator deterrence and absorption of solar UV radiation by secondary metabolites. *Mar. Ecol.*, **155**, 115–126.

¹⁴ Lindquist N. 2002, Tridentatols D-H, Nematocyst Metabolites and precursors of the activated chemical defense in the marine hydroid *Tridentata marginata* (Kirchenpauer 1864). *J. Nat. Prod.*, **65**, 681–684.

III.2.1.3. Macroalgues vertes

Les algues vertes appartenant au genre *Dasycladaceae* possèdent un thallus **cœnocytique** (cellule polyploïde unique géante) qui les rend vulnérables en cas d'attaque ou de rupture de leur membrane. Parmi ces dernières, trois espèces, *Dasycladus vermicularis*, *Cymopolia barbata* et *Neomeris annulata* ont été étudiées et plusieurs dérivés aromatiques ont été isolés. Il s'agit notamment de l'acide sulfoxybenzoïque (**11**), de l'acide sulfoxyphénylacétique (**12**) et de la 3-sulfoxy-6,7-dihydroxycoumarine (**13**)¹⁵. Lorsque l'espèce est blessée, ces métabolites sont désulfatés par une désulfatase, puis relâchés dans le milieu extérieur (schéma 4). Ces composés ont été évalués pour leurs propriétés antibiofilms. Les dérivés non sulfatés se sont avérés plus actifs que les précurseurs sulfatés.

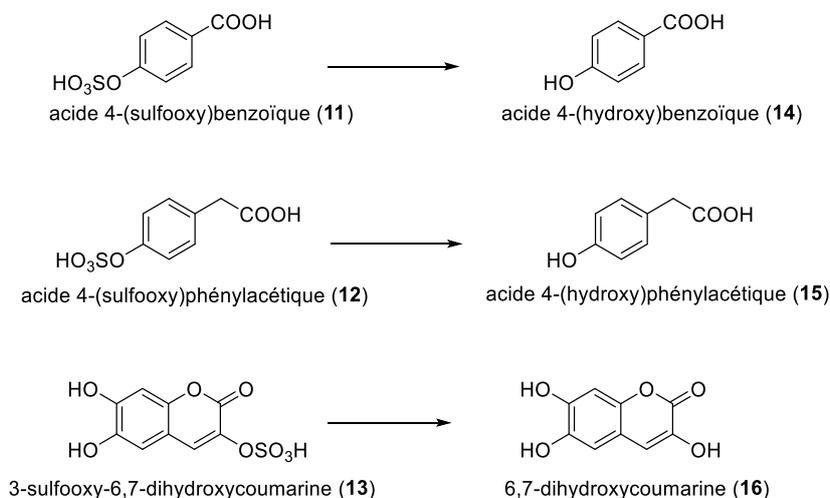


Schéma 4. Conversion des métabolites sulfatés (**11-13**) en dérivés non sulfatés (**14-16**) chez les *Dasycladaceae*¹⁵.

Lorsque *Dasycladus vermicularis* subit une agression, elle sécrète une enzyme clé qui lui permet de convertir la 3-sulfoxy-6,7-dihydroxycoumarine (**13**) en 6,7-dihydroxycoumarine (**16**)¹⁶. Cette dernière est rapidement oxydée en une espèce radicalaire très réactive qui sert de précurseur à une réaction de polymérisation qui se met en place. Après réticulation, le polymère comble l'intégralité de la membrane dégradée (figure 1).

A)

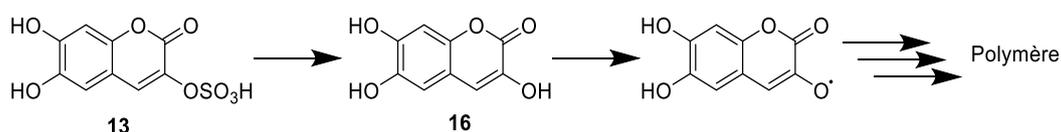


Figure 1. (A) Polymérisation de la sulfoxydihydroxycoumarine (**13**) et (B) photographies du « plug » *in situ*¹⁶.

¹⁵ Kurth C., Welling M., Pohnert G. 2015a, Sulfated phenolic acids from *Dasycladales* siphonous green algae. *Phytochemistry*, **117**, 417–423.

¹⁶ Welling M., Ross C., Pohnert G. 2011, A Desulfatation–oxidation cascade activates coumarin-based crosslinkers in the wound reaction of the giant Unicellular alga *Dasycladus vermicularis*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 7691–7694.

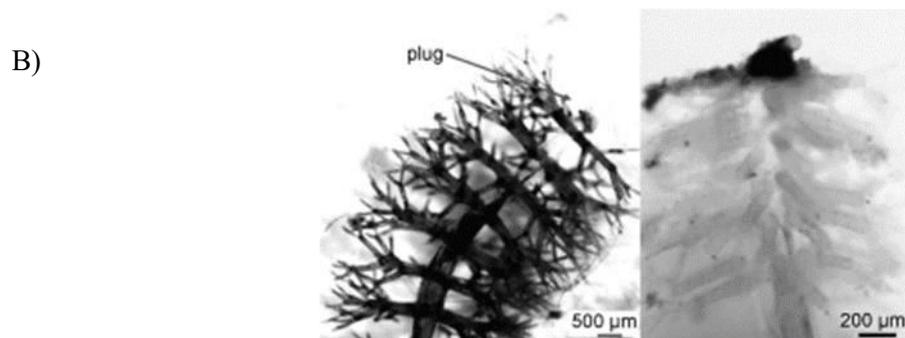
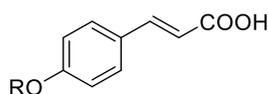


Figure 1 (suite). (A) Polymérisation de la sulfooxydihydroxycoumarine (**13**) et (B) photographies du « plug » *in situ*¹⁶.

III.2.1.4. Zostère marine

L'acide zostérique (**17**) est un acide phénolique sulfaté isolé de *Zostera marina*¹⁷. Il s'agit d'un puissant composé biocide, décrit comme un substitut potentiel aux composés biocides à base d'étain dans les peintures antifoulings. L'acide zostérique (**17**) est converti en acide *p*-coumarique (**18**) en milieu acide (figure 2).



acide zostérique (**17**) : R = SO₃H

acide *p*-coumarique (**18**) : R = H

Figure 2. Structures des acides zostérique (**17**) et *p*-coumarique (**18**)¹⁷.

En 2015, les travaux du groupe de Pohnert ont remis en question les conclusions émises par l'équipe de Crews sur les propriétés de l'acide zostérique (**17**). Cette étude a révélé que l'acide *p*-coumarique (**18**) est : (i) relargué *in situ* par action d'aryl-sulfatases à partir de l'acide zostérique, (ii) à l'origine des propriétés antifoulings observées et non l'acide zostérique¹⁸.

III.2.2. Dérivés non sulfates

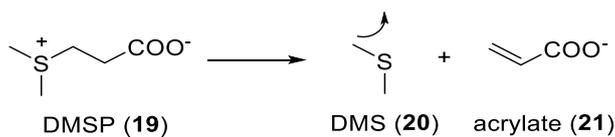
III.2.2.1. Microalgues

Certaines microalgues produisent du diméthylsulfoniopropionate (DMSP (**19**)) qu'elles convertissent en diméthylsulfure (DMS (**20**)) et en acrylate (**21**) (schéma 5) par action d'une enzyme, la DMS-lyase, pour se rendre moins attractives vis-à-vis des oursins qui s'en nourrissent¹⁹.

¹⁷ Todd J. S., Zimmerman R. C., Crews P., Alberte R. S. 1993, The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulfate esters. *Phytochem.*, **34** (2), 401–404.

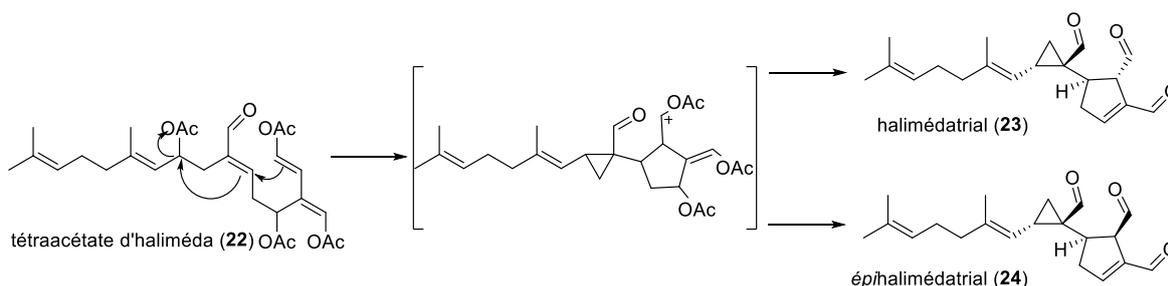
¹⁸ Kurth C., Cavas L., Pohnert G. 2015b, Sulfation mediates activity of zosteric acid against biofilm formation. *Biofouling*, **31** (3), 253–263.

¹⁹ Van Alstyne K. L., Houser L. T. 2003, Dimethylsulfide release during macroinvertebrate grazing and its role as an activated chemical defense. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **250**, 175–181.

Schéma 5. Conversion de la DMSP (19) en DMS (20) et acrylate (21)¹⁹.

III.2.2.2. *Halimeda* spp.

Quelques minutes après avoir subi un traumatisme physique, le tétraacétate d'haliméda (22), isolé de l'algue *Halimeda*, est converti en halimédatrial (23) et épihalimédatrial (24) (schéma 6), deux métabolites dissuasifs vis-à-vis des brouteurs de l'algue²⁰.

Schéma 6. Conversion du tétraacétate d'haliméda (22) en halimédatrial (23) et épihalimédatrial (24)²⁰.

III.2.2.1. *Aplysina aerophoba*

Plusieurs dérivés isoxazolines ont été isolés de l'éponge *Aplysina aerophoba*. Il s'agit notamment de l'isofistularine-3 (25) et de l'aérophobine-2 (27), qui sont convertis en aéroplysinine-1 (28). Cette dernière est une toxine qui permet de repousser les prédateurs et de protéger l'éponge vis-à-vis d'infections bactériennes potentielles (schéma 7)²¹. Ces conversions sont assurées par plusieurs enzymes de la famille des nitriles hydratases (NHase) dont l'organisme producteur (éponge ou bactéries) reste à ce jour non déterminé²².

²⁰ Paul V. J., Van Alstyne, K. L. 1992, Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **160** (2), 191–203.

²¹ a) Ebel R., Brenzinger M., Kunze A., Gross H. J., Proksch P. 1997, Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, **23** (5), 1451–1462. b) Thoms C., Ebel R., Proksch P. 2006, Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *J. Chem. Ecol.*, **32** (1), 97–123.

²² Lipowicz B., Hanekop N., Schmitt L., Proksch P. 2013, An aeroplysinin-1 specific nitrile hydratase isolated from the marine sponge *Aplysina cavernicola*. *Mar. Drugs*, **11** (8), 3046–3067.

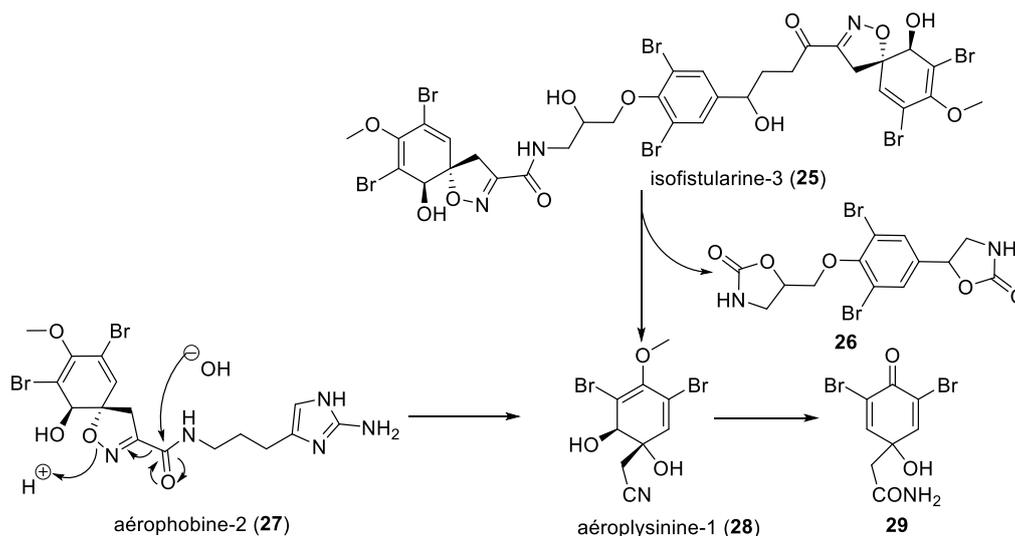


Schéma 7. Conversion de l'isofistularine-3 (25) et de l'aérophobine-2 (27) en aéroplysinine-1 (28)^{21,22}.

III.2.2.2. *Caulerpa taxifolia*

Caulerpa taxifolia produit principalement la caulerpényne (30), un sesquiterpénoïde, qui se dégrade en une série de composés aldéhydes (32-38), sous contrôle enzymatique, quelques secondes après un dommage physique (schéma 8). Les dérivés aldéhydes, notamment dialdéhydes, sont instables et très réactifs. Ils permettent à l'algue de repousser les prédateurs potentiels. Par ailleurs, ces métabolites ne semblent pas être relargués en dehors de l'algue²³.

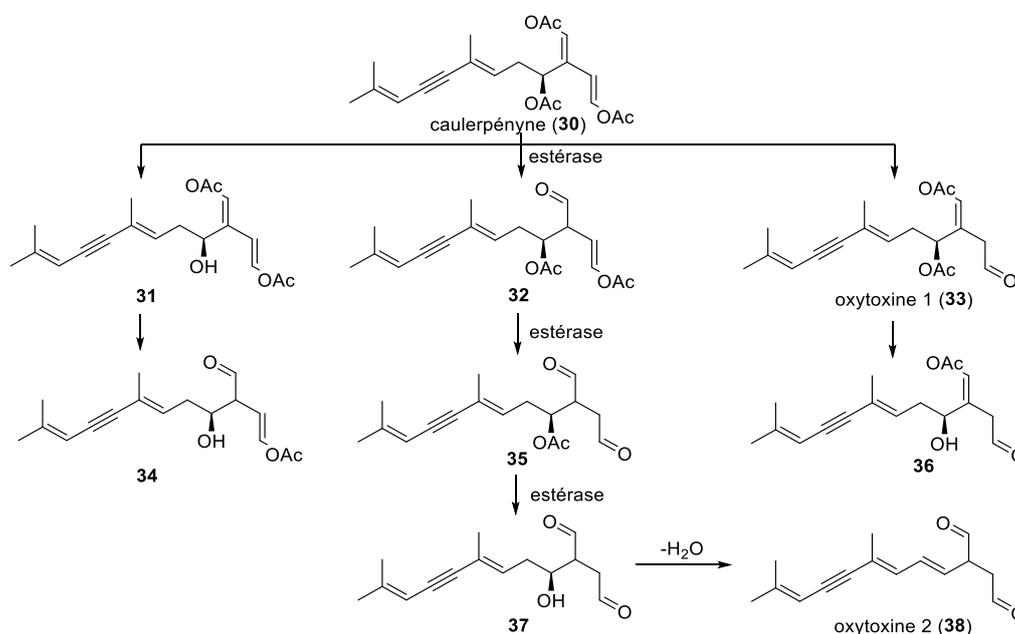


Schéma 8. Conversion de la caulerpényne (30) en dérivés sesquiterpéniques²³.

²³ Amade P., Lemée R. 1998, Chemical defense of the Mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. *Aquat. Toxicol.*, **43** (4), 287-300.

L'oxytoxine 2 (**38**) joue également un rôle dans la réticulation d'un polymère gélatineux et permet à l'algue de refermer ses plaies en cas de blessure (figure 3)²⁴. Cette technique de survie permet aussi d'éloigner les herbivores en diminuant l'appétence de l'algue²⁵.

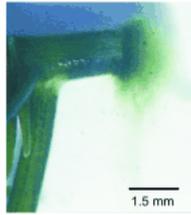


Figure 3. Photographie du « plug » *in situ* de *C. taxifolia*²⁴.

Ce chapitre est dédié aux travaux menés sur *Caulerpa taxifolia*. Cette dernière est brièvement présentée dans la suite de ce manuscrit.

IV. *Caulerpa taxifolia* : état de l'art

IV.1. Classification

La famille des Caulerpaceae de l'ordre des Bryopsidales ne comporte que deux genres : *Caulerpa* et *Caulerpella*. Plus de 100 espèces de *Caulerpa* sont recensées à travers le monde²⁶. Parmi elles, on retrouve l'algue *Caulerpa taxifolia* (tableau 1), dont le nom évoque la ressemblance de ses frondes pennées avec les feuilles d'if.

Tableau 1. Classification de *Caulerpa taxifolia*.

Règne Végétal	
Division	Chlorophyta
Classe	Ulvophyceae
Ordre	Bryopsidales
Famille	Caulerpaceae
Genre	<i>Caulerpa</i>
Espèce	<i>Caulerpa taxifolia</i>

IV.2. Description morphologique

L'algue *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh est une algue verte - ou Chlorophycée – **cœnocytique** endémique des mers tropicales. Elle est susceptible de se développer sur des substrats sableux,

²⁴ Adolph S., Jung V., Rattke J., Pohnert G. 2005, Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2806–2808.

²⁵ Weissflog J., Adolph S., Wiesemeier T., Pohnert G. 2008, Reduction of herbivory through wound-activated protein cross-linking by the invasive macroalga *Caulerpa taxifolia*. *Chem. Bio. Chem.*, **9**, 29–32.

²⁶ D'après la base de données WorMS, accédée le 03/09/17

sédimenteux, rocheux ou coralligènes. D'un point de vue morphologique, l'algue possède des stolons rampants à piliers, se terminant par des rhizoïdes qui lui permettent de s'accrocher aux substrats. A partir de ces stolons se dressent des frondes pennées de 5 à 15 cm de long, composées de pinnules plates opposées (figure 4). Sa reproduction est sexuée.

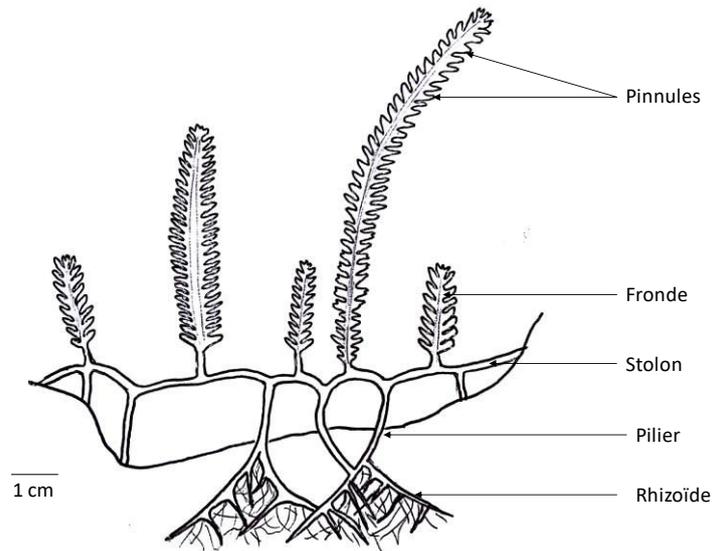


Figure 4. Représentation schématique de *C. taxifolia*²⁷.

IV.3. Historique de *Caulerpa taxifolia*

C. taxifolia, en raison de sa très grande pérennité et de sa couleur verte très vive, a longtemps été utilisée comme algue d'apparat des aquariums publics et privés. Elle est recensée pour la première fois en Méditerranée en 1984²⁸. Plusieurs études ont révélé que la *C. taxifolia* de Méditerranée et celle d'Australie, la plus robuste et pérenne, donnée à plusieurs aquariums à travers l'Europe, ont des génomes similaires²⁹.

L'individu mâle de *C. taxifolia* relâché en Méditerranée, ne pouvant se reproduire de façon sexuée comme d'usage dans les tropiques, a dû s'adapter. Son développement par bouturage (multiplication végétative du même individu par clonage) et sa résistance aux basses températures lui ont permis de croître de manière exponentielle à partir des années 1990 et de se développer dans toute la Méditerranée. Son développement a provoqué une modification brutale de l'écosystème marin et engendré une régression de la faune et de la flore. De nombreuses méthodes pour l'éradiquer furent mises en œuvre

²⁷ Adapté d'après : <https://plants.ifas.ufl.edu/wp-content/uploads/images/cautax/cautaxdr.jpg> consultée le 12/08/2017.

²⁸ Meinesz A., Hesse B. 1991, Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanol. Acta*, **14** (4), 415–426.

²⁹ a) Jousson O., Pawlowski J., Zaninetti L., Meinesz A., Boudouresque C. F. 1998, Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **172**, 275–280. b) Meusnier I., Olsen J. L., Stam W. T., Destombe C., Valero M. 2001, Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the Mediterranean introduction. *Mol. Ecol.*, **10**, 931–946. c) Widenmann J., Baumstark A., Pillen T. L., Meinesz A., Vogel W. 2001, DNA fingerprints of *Caulerpa taxifolia* provide evidence for the introduction of an aquarium strain into the Mediterranean Sea and its close relationship to an Australian population. *Mar. Biol.*, **138**, 229–234.

sur tous les territoires impactés par sa prolifération. Depuis quelques années, *C. taxifolia* semble avoir régressé de 80% sans qu'à ce jour une explication ait pu être trouvée. Une relation entre le déclin de *C. taxifolia* et un défaut de son système antioxydant, devenu moins efficace, a été proposée par Tejada et Sureda en 2013³⁰. Le taux en espèces réactives se retrouverait augmenté et les cellules ne seraient plus protégées vis-à-vis des effets délétères de ces dernières. Ce phénomène ne semble pas en lien avec la caulerpényne dont le taux dans l'algue ne semble pas avoir été impacté³⁰. En 2017, nous avons pourtant observé une baisse significative du taux de caulerpényne dans un échantillon de *C. taxifolia* collecté en 2013 à Villefranche-sur-Mer³¹ (publication en annexe 4 du Tome II). Enfin, le déclin de *C. taxifolia* en Méditerranée semble être la conséquence d'une dégénérescence génétique principalement dû à sa reproduction asexuée et la présence de bactéries ou virus qui lui sont nocifs³².

IV.4. Métabolisme spécialisé de *Caulerpa taxifolia* : état de l'art

La prolifération rapide et importante²⁸ de *C. taxifolia* a notamment été favorisée par la production de nombreux métabolites aux propriétés diverses, largement étudiés par la communauté scientifique. Son mécanisme de défense repose sur la production de nombreux terpénoïdes plus ou moins toxiques³³ et en particulier la caulerpényne (**30**), son métabolite principal³⁴. *C. taxifolia* produit également, mais dans une moindre mesure, d'autres métabolites spécialisés potentiellement actifs tels que des dérivés terpéniques de la caulerpényne, la caulerpine ou encore des glycolipides et des dérivés de l'acide phénylpyruvique.

IV.4.1. Terpénoïdes

La caulerpényne (**30**) est un sesquiterpénoïde isolé de plusieurs algues de type *Caulerpe*³⁴ (figure 5). Sa teneur pouvait avoisiner les 13% du poids sec de l'algue dans les années 90³⁵.

³⁰ Tejada S., Sureda A. 2013, A new approach using biomarkers to elucidate the regression state of the invasive alga *Caulerpa taxifolia* in waters around the Balearic Islands (Western Mediterranean Sea). *Mar. Freshwater Res.*, **64**, 986–991.

³¹ Sfecci E., Le Quemener C., Lacour T., Massi L., Amade P., Audo G., Mehiri M. 2017, Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia*: a comparative study between CPC and classical chromatographic techniques. *Phytochem. Lett.* **20**, 406–409.

³² Arnaud-Haond S., Aires T., Candeias R., Teixeira S. J. L., Duarte C. M., Valero M., Serrão E. A. 2017, Entangled fates of holobiont genomes during invasion: nested bacterial and host diversities in *Caulerpa taxifolia*. *Mol. Ecol.* **26** (8), 2379–2391.

³³ Guerriero A., Marchetti F., D'Ambrosio M., Senesi S., Dini F., Pietra F. 1993, New ecotoxicologically and biogenetically relevant terpenes of the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which is invading the Mediterranean. *Helv. Chim. Acta*, **76** (2), 855–64.

³⁴ D'Amico V., Oriente G., Piattelli M., Tringali C., Fattorusso E., Magno S., Mayol L. 1978, Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3593–3596.

³⁵ Amade P., Valls R., Bouaicha N., Lemée R., Artaud J. 1994, Méthodes de dosage de la caulerpényne produite par *Caulerpa taxifolia*, pp. 163–167, C. F. Boudouresque, A. Meinesz, et V. Gravez (eds.). "First International Workshop on *Caulerpa taxifolia*", GIS Posidonie.

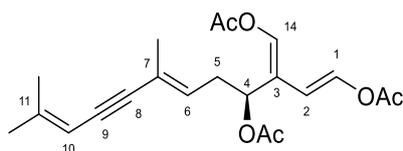
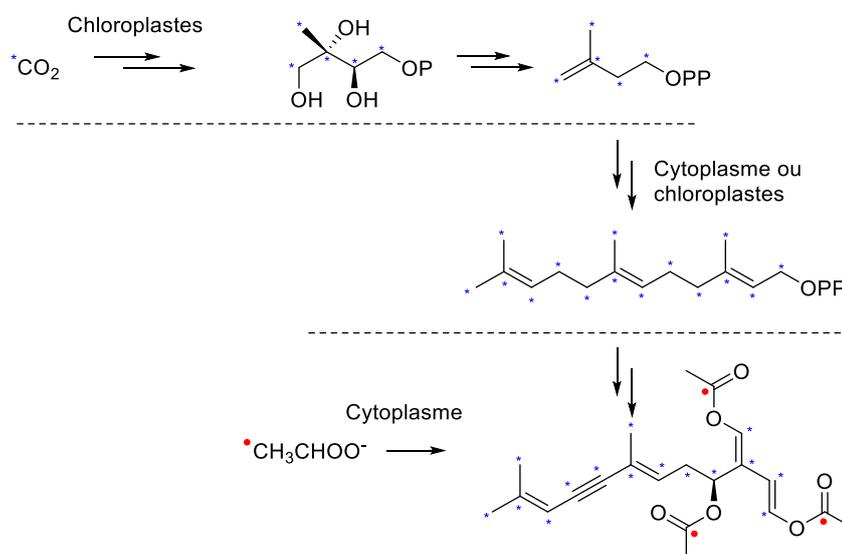


Figure 5. Caulerpényne (30).

Son mécanisme de biosynthèse a été élucidé par marquage isotopique (schéma 9). Cette étude a révélé que le squelette de la caulerpényne est produit dans les chloroplastes (fixation du $^{13}\text{CO}_2$ par photosynthèse) et découle de la voie méthylérythritol phosphate (MEP), une voie alternative à celle de type mévalonate pour la production de terpénoïdes. L'acétylation est réalisée dans le cytosol (incorporation du ^{13}C -acétate)³⁶.

Schéma 9. Biosynthèse de la caulerpényne (30) élucidée par marquage isotopique³⁶.

Du point de vue structural, la caulerpényne (30) est constituée d'un motif diacétoxybutadiène extrêmement réactif qui permet d'expliquer ses propriétés écologiques. Elle présente une activité répulsive vis-à-vis de brouteurs d'algues³⁷. Par ailleurs, la caulerpényne (30) a fait l'objet de nombreuses évaluations biologiques. Elle présente de très bonnes activités cytotoxiques et inhibe le développement de plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines^{38,39}. Elle s'est avérée en revanche très faiblement cytotoxique *in vitro* vis-à-vis de cellules de la peau (cultures primaires de mélanocytes et kératinocytes

³⁶ Pohnert G., Jung V. 2003, Intracellular compartmentation in the biosynthesis of caulerpenyne: Study on intact macroalgae using stable-isotope-labeled precursors. *Org. Lett.*, **5** (26), 5091–5093.

³⁷ Paul V. J., Fenical W. 1986, Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **34** (1-2), 157–169.

³⁸ Pesando D., Lemée R., Ferrua C., Amade P., Girard J.-P. 1996, Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. *Aquat. Toxicol.*, **35** (3,4), 139–155.

³⁹ Fischel J. L., Lemee R., Formento P., Caldani C., Moll J. L., Pesando D., Meinesz A., Grelier P., Pietra F., Guerriero A. 1995, Cell-growth-inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine alga *Caulerpa taxifolia*. *Anticancer Res.*, **15** (5B), 2155–2160.

humains) et de la moëlle osseuse⁴⁰. Des études plus poussées, menées notamment sur des œufs d'oursins^{38,41}, ont permis de préciser son mode d'action. Il s'agit d'un agent antimitotique qui inhibe l'assemblage de la tubuline⁴², une étape importante pour la prolifération de cellules tumorales⁴². La caulerpényne (**30**) agit également en inhibant l'action de la 5-lipoxygénase humaine⁴³.

Elle possède également des propriétés antimicrobiennes :

- Antibactériennes : inhibition importante de *S. aureus*³³, *B. subtilis*⁴⁴ et *Vibrio*³⁷,
- Antifongiques³³ : inhibition de *Leptosphaeria* sp., *Lulworthia* sp., *Alternaria* sp. et *Lindra thalassiae*³⁷.

Plusieurs sesquiterpènes, dérivés de la caulerpényne, ont également été isolés de *C. taxifolia*. On distingue les oxytoxines 1 et 2 (**33**, **34**), les taxifolials A, B et C (**39-41**), la 10,11-époxycaulerpényne (**42**) et le caulerpénynol (**43**) (figure 6)³³. Ces métabolites, qui présentent tous une ou deux fonction(s) aldéhyde(s) libre(s) ou masquée(s), sont très réactifs et sont impliqués dans les mécanismes de défense de l'algue.

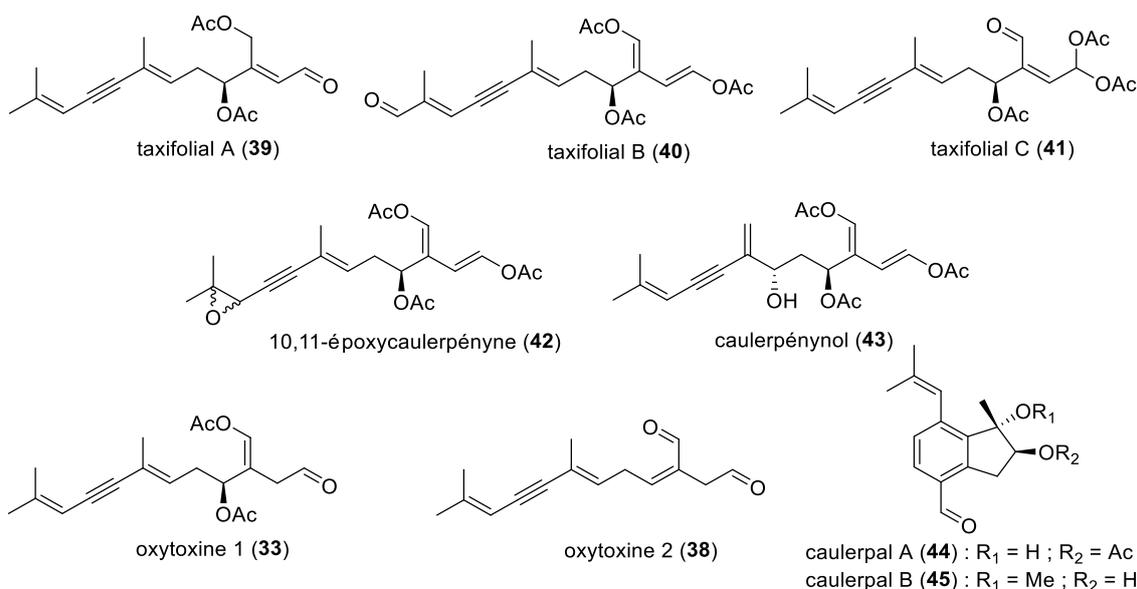


Figure 6. Structures des sesquiterpènes dérivés de la caulerpényne isolés de *C. taxifolia*^{33,45}.

⁴⁰ Parent-Massin D., Fournier V., Amade P., Lemée R., Durand-Clement M., Delescluse C., Pesando D. 1996, Evaluation of the toxicological risk to humans of caulerpenyne using human hematopoietic progenitors, melanocytes, and keratinocytes in culture. *J. Toxicol. Environ. Health*, **47** (1), 47–59.

⁴¹ Pedrotti M. L., Marchi B., Lemée R. 1996, Effects of *Caulerpa taxifolia* secondary metabolites on the embryogenesis, larval development and metamorphosis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Oceanol. Acta*, **19** (3-4), 255–262.

⁴² Commeiras L., Bourdron J., Douillard S., Barbier P., Vanthuyn N., Peyrot V., Parrain J.-L. 2006, Total synthesis of terpenoids isolated from Caulerpa algae and their inhibition of tubulin assembly. *Synthesis*, **1**, 166–181.

⁴³ Richter P., Schubert G., Schaible A. M., Cavas L., Werz O., Pohnert G. 2014, Caulerpenyne and related bis-enol esters are novel-type inhibitors of human 5-lipoxygenase. *Chem. Med. Chem.*, **9** (8), 1655–1659.

⁴⁴ Hodgson L. M. 1984, Antimicrobial and antineoplastic activity in some South Florida seaweeds. *Bot. Mar.*, **27**, 387–390.

Deux autres dérivés, les caulerpals A et B (**44-45**) (figure 6), proches du point de vue structural de l'acide valérénique, ont été isolés d'un échantillon de *C. taxifolia* collecté en Chine⁴⁵. Ils semblent être les produits d'une cascade de réactions d'oxydation/cyclisation de la caulerpényne (**30**).

Deux autres composés terpéniques dérivés de la caulerpényne ont été isolés^{33,46} : la taxifolione (**46**) (monoterpène) et le taxifolial D (**47**) (diterpène) (figure 7). Il s'agit probablement de produits de dégradation de la caulerpényne, dont le rôle et les activités biologiques ne sont pas encore connus.

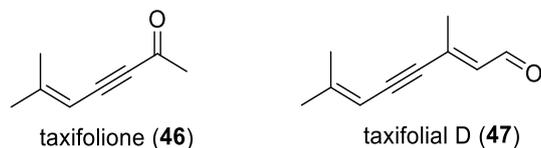


Figure 7. Structures des mono- et diterpènes dérivés de la caulerpényne isolés de *C. taxifolia*^{33,46}.

D'autres composés non liés à la caulerpényne ont également été décrits. Il s'agit de deux diterpénoïdes, l'hexahydrofarnésyl acétone (**48**) et le phytol (**49**), probablement dérivés de la chlorophylle et décrits d'un échantillon de *C. taxifolia* collecté en Inde⁴⁷. Le 14,15-dihydroxy- α -tocophérol (**50**) et le triterpénoïde clionastérol (**51**)⁴⁸ ont également été isolés d'un échantillon de *C. taxifolia* de Méditerranée. Ces dérivés sont représentés à la figure 8.

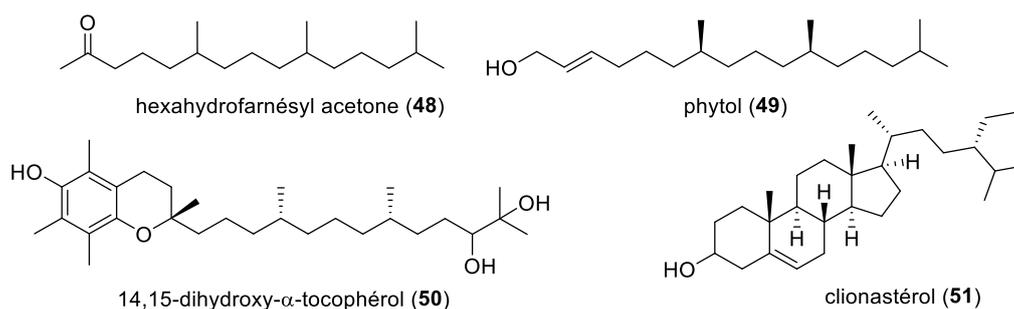


Figure 8. Structures des di- et triterpénoïdes isolés de *C. taxifolia*^{47,48}.

IV.4.2. La caulerpine

La caulerpine (**52**) est le seul exemple d'alcaloïde indolique isolé de *C. taxifolia* (figure 9). Quand ce pigment rouge a été isolé pour la première fois à partir de *Caulerpa* spp., il a tout d'abord été décrit à tort comme un dérivé phénazine⁴⁹. Plus tard, sa structure a été révisée en un indole lié à un diester

⁴⁵ Mao S.-C., Guo Y.-W., Shen X. 2006, Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2947–2950.

⁴⁶ Guerriero A., Meinesz A., D'Ambrosio M., Pietra F. 1992, Isolation of toxic and potentially toxic sesqui- and monoterpene from the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which has invaded the region of Cap Martin and Monaco. *Helv. Chim. Acta*, **75** (3), 689–695.

⁴⁷ Rao B. C., Pullaiah C. 1981, Chemical examination of marine algae of Visakhapatnam coast: constituents of *Caulerpa taxifolia*. *Indian J. Chem.*, **21B**, 264–265.

⁴⁸ Viano Y. 2010, Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée. Thèse de doctorat de Chimie. Université Toulon-Sud. 264 p.

⁴⁹ Aguilar-Santos G. 1970, Caulerpine, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa*. *J. Chem. Soc. C*, **6**, 1842–1843.

cyclooctaénique⁵⁰. Cette molécule, qui ne présente pas d'effet répulsif vis-à-vis de prédateurs potentiels de l'algue⁵¹, s'est avérée active. On distingue :

- Une activité de régulation de la croissance des plantes⁵²,
- Une activité larvicide sur le moustique *Culex pipiens*⁵³,
- L'inhibition de la protéine tyrosine phosphatase humaine 1B (hPTP1B, $CI_{50} = 3,77 \mu M$), impliquée dans la désactivation du récepteur à insuline⁴⁵,
- Des propriétés antinociceptives et anti-inflammatoires⁵⁴,
- Une activité antivirale contre le virus de l'Herpes simplex 1 (VHS-1)⁵⁵ et le virus de la diarrhée bovine (BVDV)⁵⁶.

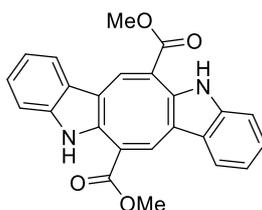


Figure 9. Caulerpine (52)⁵⁰.

IV.4.1. Dérivés de l'acide phénylpyruvique

Quatre dérivés de l'acide phénylpyruvique (53-56) ont été décrits de *C. taxifolia* (figure 10)⁵⁸. Il est à noter que la forme cétone n'a pas été retrouvée.

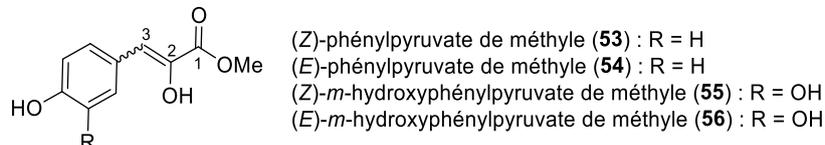


Figure 10. Structures des dérivés de l'acide phénylpyruvique (53-56) isolés de *C. taxifolia*⁵⁸.

⁵⁰ Maiti B. C., Thomson R. H., Mahendran M. J. 1978, The structure of caulerpin, a pigment from *Caulerpa* algae. *Chem. Res.*, **4**, 126-127.

⁵¹ Meyer K. D., Paul V. J. 1992, Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, **82**, 249-257.

⁵² Raub M. F., Cardellina J. H., Schwede J. G. 1987, The green algal pigment caulerpin as a plant growth regulator. *Phytochem.*, **26**, 619-620.

⁵³ Alarif W. M., Abou-Elnaga Z. S., Ayyad S.-E. N., Al-Lihaibi S. S. 2010, Insecticidal metabolites from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Clean (Weinh)*, **38**, 548-557.

⁵⁴ De Souza E. T., de Lira D. P., de Queiroz A. C., da Silva D. J. C., de Aquino A. B., Mella E. A. C., Lorenzo V. P., de Miranda G. E. C., de Araújo-Júnior J. X., de Oliveira Chaves M. C. *et al.* 2009, The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. *Mar. Drugs*, **7**, 689-704.

⁵⁵ Macedo N. R. P. V., Ribeiro M. S., Villac R. C., Ferreira W., Pinto A. M., Teixeira V. L., Cirne-Santos C., Paixao I. C. N. P., Giongo V. 2012, Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **22**, 861-867.

⁵⁶ Pinto A. M. V., Leite J. P. G., Ferreira W. J., Cavalcanti D. N., Villaca R. C., Giongo V., Teixeira V. L., Paixao I. C. N. P. 2012, Marine natural seaweed products as potential antiviral drugs against bovine viral diarrhea virus. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **22**, 813-817.

IV.4.2. Autres dérivés recensés

Un hétéropolysaccharide sulfaté (sans précision sur sa structure)⁵⁷ et plusieurs dérivés de glycoglycérolipides (**57-59**) ont été isolés de *C. taxifolia* en 1986 et 1998, respectivement (figure 11)⁵⁸.

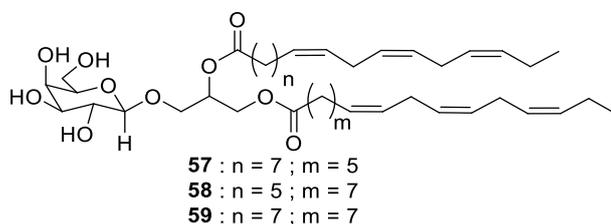


Figure 11. Structures des glycoglycérolipides isolés de *C. taxifolia*⁵⁸.

V. Etude de *Caulerpa taxifolia*

L'algue *Caulerpa taxifolia* étudiée a été échantillonnée en juin 2013 à Villefranche-sur-Mer (figure 12⁵⁹). Elle a fait l'objet de deux études successives : une étude appliquée dédiée à la caulerpénine, en partenariat avec la société BioPreserv, et une étude plus fondamentale consacrée à l'isolement et à la caractérisation de métabolites sulfatés que nous avons pu détecter dans le cadre de travaux préliminaires.



Figure 12. Photographie *in situ* de *Caulerpa taxifolia* (©Ria Tan).

V.1. Objectif initial de l'étude

L'objectif de l'étude de *Caulerpa taxifolia* concernait initialement l'optimisation de la méthode d'isolement de la caulerpénine, pour une application industrielle, en collaboration avec la société BioPreserv. Ce projet collaboratif a donné lieu à une publication (Annexe 4 du Tome II). Brièvement,

⁵⁷ Rao N. V. S. A. V. P., Rao E. V. 1986, Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Caulerpa taxifolia*. *Phytochem.*, **25** (7), 1645–1647.

⁵⁸ Mancini I., Guella G., Defant A., Candenas M. L., Armesto C. P., Depentori D., Pietra F. 1998, Polar metabolites of the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which is spreading in the Mediterranean sea: Glycoglycerolipids and stable enols (α -keto esters). *Helv. Chim. Acta*, **81**, 1681–1691.

⁵⁹ La Figure 12 ne correspond pas au spécimen étudié.

la caulerpényne a été isolée à la fois par des techniques classiques de chromatographie (chromatographie sur colonne ouverte) et à la fois par la technique de chromatographie de partage centrifuge⁶⁰. La technique classique de chromatographie a impliqué trois étapes dont : (i) une partition liquide/liquide de l'extrait brut, (ii) une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique, et (iii) une chromatographie sur colonne diol pour finalement obtenir la caulerpényne avec un rendement de 0,03% (poids sec de l'algue). La chromatographie de partage centrifuge n'a reposé que sur une seule étape de séparation. Elle a permis d'isoler la caulerpényne avec un rendement de 0,5% (poids sec de l'algue). Cette technique, utilisée pour la première fois sur cette algue, constitue une excellente alternative aux procédés classiques pour isoler la caulerpényne. En effet, en seulement une étape, il a été possible d'augmenter considérablement le rendement d'extraction, tout en diminuant la consommation de solvant et le temps de purification.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux autres métabolites de l'algue. Nous avons observé des différences notables entre les extraits organiques de l'algue échantillonnée à Villefranche-sur-Mer en pleine prolifération en 1994, et en régression en 2013.

V.2. Extraction, fractionnement et isolement

Nous avons essayé plusieurs procédés d'extraction et de purification afin de réduire le nombre de manipulations des extraits sur les phases stationnaires. L'algue, préalablement lyophilisée, a été extraite à plusieurs reprises par un mélange de méthanol et de dichlorométhane (1/1, v/v) sous ultrasons. Le chromatogramme obtenu pour cet extrait brut organique est relativement simple (figure 13). On y retrouve un composé peu polaire majoritaire (la caulerpényne, **Ct1**, $t_r \sim 28$ mn, par comparaison avec les bases de données) ainsi que plusieurs composés polaires (**Ct2-5**, $t_r \sim [11-18]$ mn) que nous avons pu isoler.

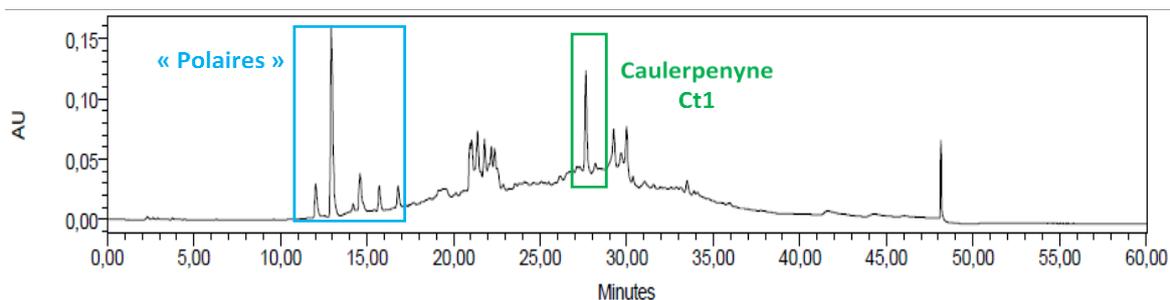


Figure 13. Profil métabolomique de l'extrait brut organique de *C. taxifolia*, obtenu par CLHP-UV à 254 nm : colonne Macherey-Nagel propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

⁶⁰ Technique de chromatographie utilisant un système de solvants biphasique, obtenu à partir d'un mélange de solvants non miscibles. L'une des phases sera utilisée comme phase stationnaire et l'autre comme phase mobile, lors de la séparation.

Une première phase d'extraction a tout d'abord permis de traiter 4,9 g d'extrait brut. L'extraction liquide/liquide avec le mélange hexane / acétate d'éthyle / méthanol / eau (1/1/1/1, v/v/v/v) a conduit à une phase supérieure contenant la caulerpényne (**Ct1**) et une phase inférieure riche en composés polaires et en sels. La séparation sur phase solide (SPE) de cette fraction avec de l'eau puis par un mélange de méthanol et de dichlorométhane (1/1, v/v) a conduit à une fraction organique d'intérêt avec une teneur réduite en sels. Les analyses par RMN ¹H de la fraction nous ont permis de déduire la présence de composés aromatiques. L'analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (CLHP-SM/SM) a également révélé la présence de composés sulfatés décelés par la perte d'un fragment neutre de 80 uma. Cette dernière information nous a permis de développer une méthode minimisant la quantité d'acide normalement utilisée (0,1% en routine) lors de la séparation, afin d'éviter la dégradation du groupement sulfate.

Une purification par CLHP sur une colonne semi-préparative (Macherey Nagel Sphinx Nucleodur phénylpropyl-C₁₈, 250×10 mm id, 5 μm, gradient H₂O/CH₃CN/H₂CO₂, 85:15:0,06 sur 5 mn puis à 70:30:0,06 en 25 mn) a été réalisée afin d'obtenir les composés **Ct2** (4 mg) et **Ct3** (4 mg) (schéma 10). D'autres tentatives de purification ont été réalisées afin d'obtenir des conditions optimales d'isolement. Le protocole optimisé nécessite une quantité minimale d'acide (0,06%) pour éviter la dégradation des composés. Ainsi, une seconde phase d'extraction a permis de traiter 14 g d'extrait brut organique. L'extrait brut a été solubilisé dans de l'eau et une partie de la fraction de cette fraction (1 g sur 11 g) a été récupérée afin de réaliser une nouvelle purification par CLHP sur une colonne semi-préparative (Macherey Nagel Sphinx Nucleodur phénylpropyl-C₁₈, 250×10 mm id, 5 μm, gradient H₂O/CH₃CN/H₂CO₂, 95:5:0,06 sur 10 mn puis à 60:40:0,06 en 20 mn). Durant la purification, les composés ont été conservés à l'abri de la lumière et au congélateur avant leur lyophilisation. Deux nouveaux composés, **Ct4** (7,8 mg) et **Ct5** (1,6 mg) ont pu être isolés et caractérisés (schéma 10).

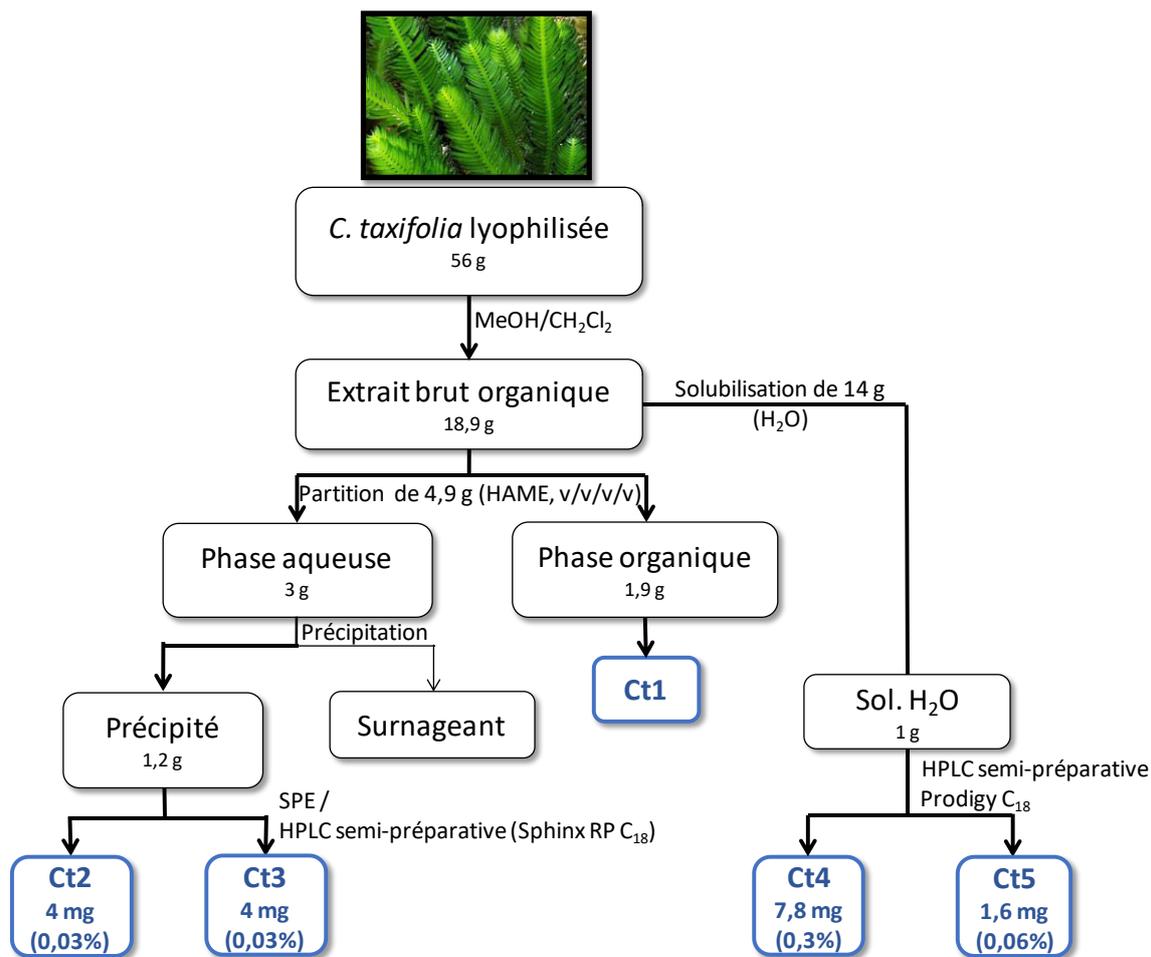


Schéma 10. Schéma d'extraction adopté pour *C. taxifolia*. (H : hexane, A : acétate d'éthyle, M : méthanol, E : eau ; les rendements indiqués sont exprimés par rapport au poids sec de l'algue).

V.3. Détermination structurale

V.3.1. Structure de Ct1

Le composé **Ct1** (**60**) a été isolé sous la forme d'une huile jaune-orangé. Sa formule brute, $C_{21}H_{26}O_6$, a été déduite de l'analyse du spectre HRESI(+) SM (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de m/z 375,1817 ; $\Delta ppm = 2,5$). L'ensemble des données spectrales (SM , $SMHR$, RMN) et des chromatogrammes obtenus par $CLHP$ et $CLHP-SM$, couplé aux données de la bibliographie, notamment celles relatives à *C. taxifolia*, nous a permis de déduire qu'il s'agit de la caulerpényne (**30**). En effet, le spectre RMN 1H de **Ct1** (**60**) présente : (a) cinq signaux singulets à δ_H 2,18 ; 2,14 ; 2,06 ; 1,87 et 1,82 ppm, caractéristiques des méthyles C-12, C-12', C-13, C-14, C-15, C-16 et C-17, (b) cinq signaux à δ_H 7,67 ; 7,26 ; 5,91 ; 5,66 et 5,35 ppm, caractéristiques de protons éthyléniques H-1, H-2, H-6, H-10, H-14, (c) un signal à δ_H 2,61 ppm, caractéristique des deux protons diastéréotopes H-5 et (d) un signal à δ_H à 5,86 ppm, caractéristique du proton de la méthine en C-4. Le spectre RMN ^{13}C de **Ct1** (**30**) présente : (a) trois signaux à δ_C 171,4 ; 169,4 et 171,4 ppm, caractéristiques des fonctions carbonyles C-15, C-16 et C-17,

(b) six signaux à δ_C 148,6 ; 130,6 ; 122,8 ; 120,1 ; 110,2 et 106,2 ppm, caractéristiques de carbones sp^2 C-2, C-3, C-6, C-7, C-10 et C-11, (c) trois signaux dont deux à δ_C 138,1 et 135,6 ppm, caractéristiques de méthines en α des carbones sp^2 C-1 et C-14, et un signal à δ_C 70,2 ppm, significatif d'une méthine (C-4), (d) deux signaux à δ_C 94,8 et 86,0 ppm, caractéristiques des carbones sp C-8 et C-9, (e) un signal à δ_C 32,7 ppm, caractéristique d'un méthylène C-5, (f) six signaux à δ_C 24,6 ; 20,8 ; 20,6 ; 20,3 ; 20,3 et 17,74 ppm, caractéristiques de méthyles C-12, C-12', C-13, C-14, C-15, C-16 et C-17 (figure 14).

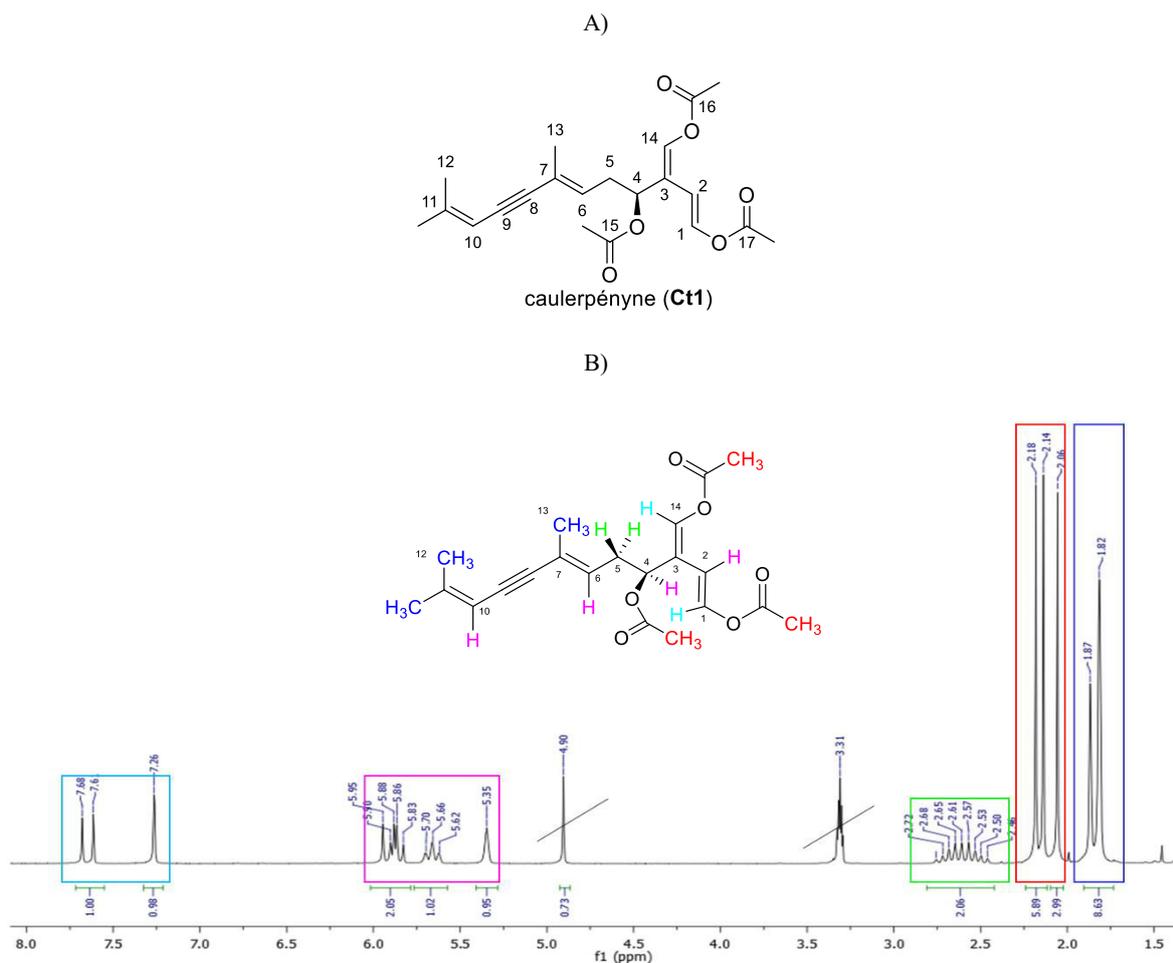


Figure 14. (A) Structure de Ct1 et (B) spectres RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de Ct1 (d_4 -MeOH).

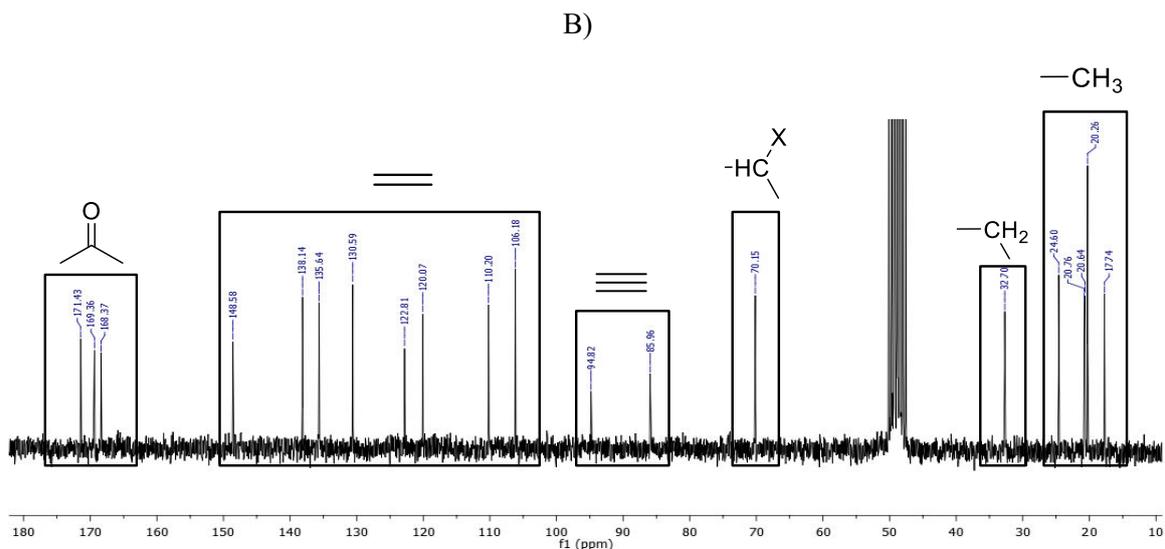


Figure 14 (suite). (A) Structure de Ct1 et (B) spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de Ct1 (d_4 -MeOH).

Le composé Ct1 (60) a été recristallisé dans de l'éther et les cristaux obtenus ont été analysés par diffraction de rayons X. Cette étude nous a permis de confirmer la structure et la stéréochimie de la molécule (figure 15).

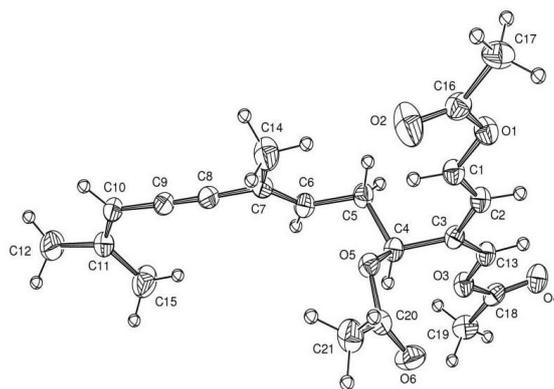


Figure 15. Structure aux RX de Ct1.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé Ct1 (60) est regroupé dans le tableau 2.

Tableau 2. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) du composé Ct1 (125/500 MHz, d_4 -MeOH) et de la caulerpényne (67/270 MHz, CDCl_3)³⁴.

N°	Ct1		Caulerpényne	
	δ_C (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/mult./J (Hz)	δ_C (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)
1	138,1, CH	7,67, <i>d</i> , 12,7	136,7, CH	7,64, <i>dd</i> , 0,8, 12,5
2	130,6, CH	5,91, <i>d</i> , 12,7	129,4, CH	5,83, <i>dd</i> , 0,8, 12,5
3	148,6, Cq	-	147,5, Cq	-
4	70,2, CH	5,86, <i>t</i> , 7,4	68,5, CH	5,87, <i>t</i> , 7,5
5a	32,7, CH ₂	2,61, <i>m</i>	31,7, CH ₂	2,64, <i>ddd</i> , 7,5, 7,5, 15,0
5b	32,7, CH ₂	2,61, <i>m</i>	31,7, CH ₂	2,47, <i>ddd</i> , 7,5, 7,5, 15,0
6	110,2, CH	5,66, <i>t</i> , 7,6	108,8, CH	5,69, <i>ddq</i> , 1,4, 7,5, 7,5
7	122,8, Cq	-	121,2, Cq	-
8	86,0, Cq	-	84,9, Cq	-
9	94,8, Cq	-	93,8, Cq	-
10	106,2, CH	5,35, <i>s</i>	105,1, CH	5,35, <i>qq</i> , 1,1, 1,1
11	120,1, Cq	-	118,4, Cq	-
12	20,8, CH ₃	1,82, <i>s</i>	20,5, CH ₃	1,89, <i>d</i> , 1,1
12'	20,6, CH ₃	1,82, <i>s</i>	20,5, CH ₃	1,81, <i>d</i> , 1,1
13	24,6, CH ₃	7,26, <i>s</i>	24,4, CH ₃	7,26, <i>dd</i> , 0,7, 0,8
14	135,6, CH	1,87, <i>s</i>	133,9, CH	1,83, <i>d</i> , 1,4
15	171,4, Cq	-	169,3, Cq	-
16	169,4, Cq	-	167,3, Cq	-
17	168,4, Cq	-	166,5, Cq	-
15-Me	20,3, CH ₃	2,06, <i>s</i>	20,2, CH ₃	2,06, <i>s</i>
16-Me	20,3, CH ₃	2,14, <i>s</i>	20,2, CH ₃	2,15, <i>s</i>
17-Me	17,7, CH ₃	2,18, <i>s</i>	17,3, CH ₃	2,18, <i>s</i>

V.3.2. Structure de Ct2-5

Une analyse préliminaire des données spectrales (UV, SMHR, RMN) des composés **Ct2** à **Ct5**, couplée aux données de la bibliographie, notamment celles relatives à *C. taxifolia*, nous a permis de déduire la présence d'un squelette de type acide phénylpyruvique. Cette hypothèse est notamment confirmée par la présence : (i) de plusieurs signaux caractéristiques de protons aromatiques observés en RMN ¹H avec deux signaux pour **Ct2**, trois signaux pour les composés **Ct3** et **Ct4**, et un signal pour **Ct5**, (ii) d'un signal caractéristique d'un proton éthylénique dans le spectre RMN ¹H, et (iii) d'un signal caractéristique d'une fonction carbonyle conjuguée observée en RMN ¹³C (figure 16).

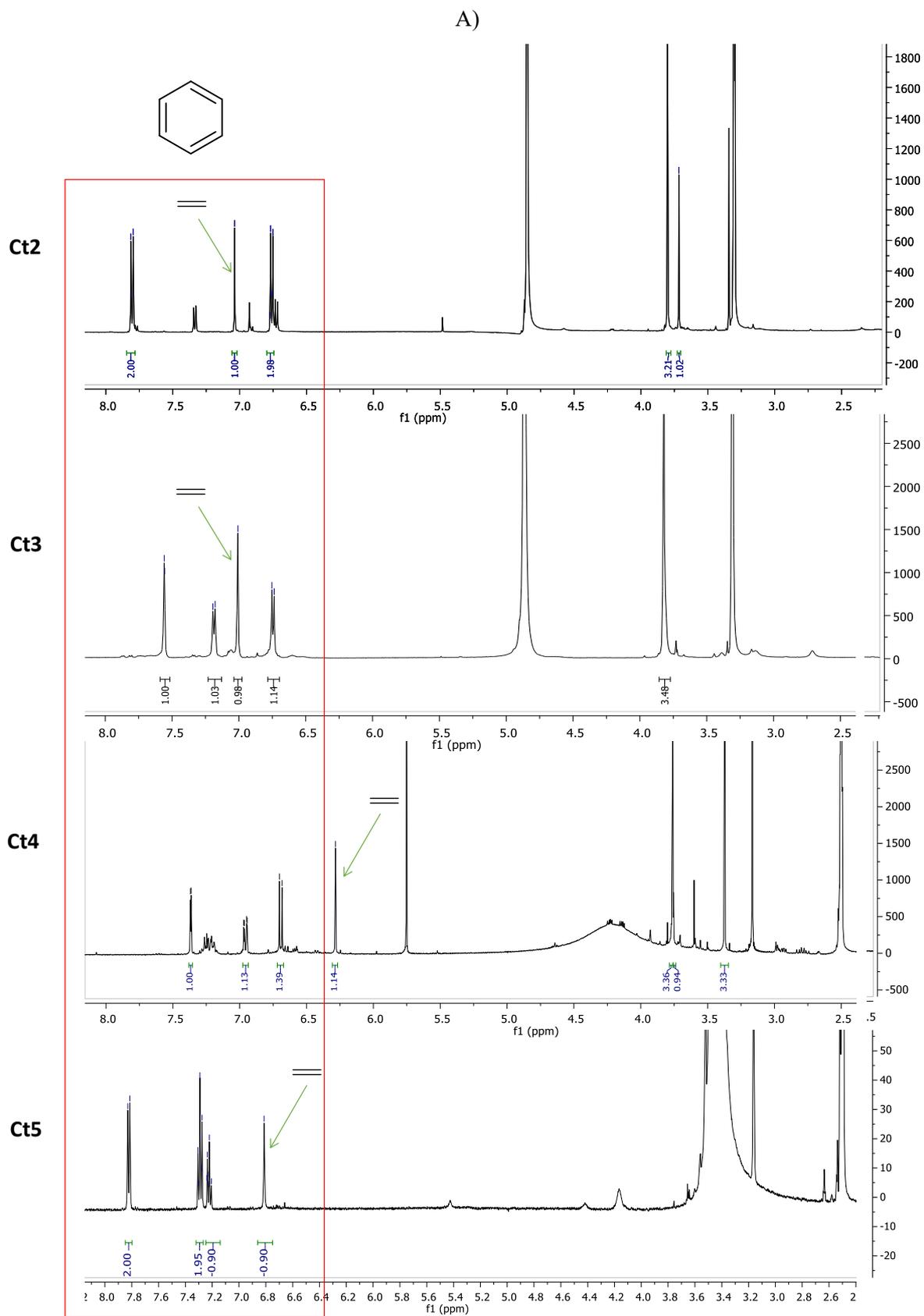


Figure 16. (A) Spectres RMN ¹H (500 MHz) et (B) ¹³C (125 MHz) des composés Ct2-5 (Ct2 et Ct3 : *d*₄-MeOH ; Ct4 et Ct5 : *d*₆-DMSO).

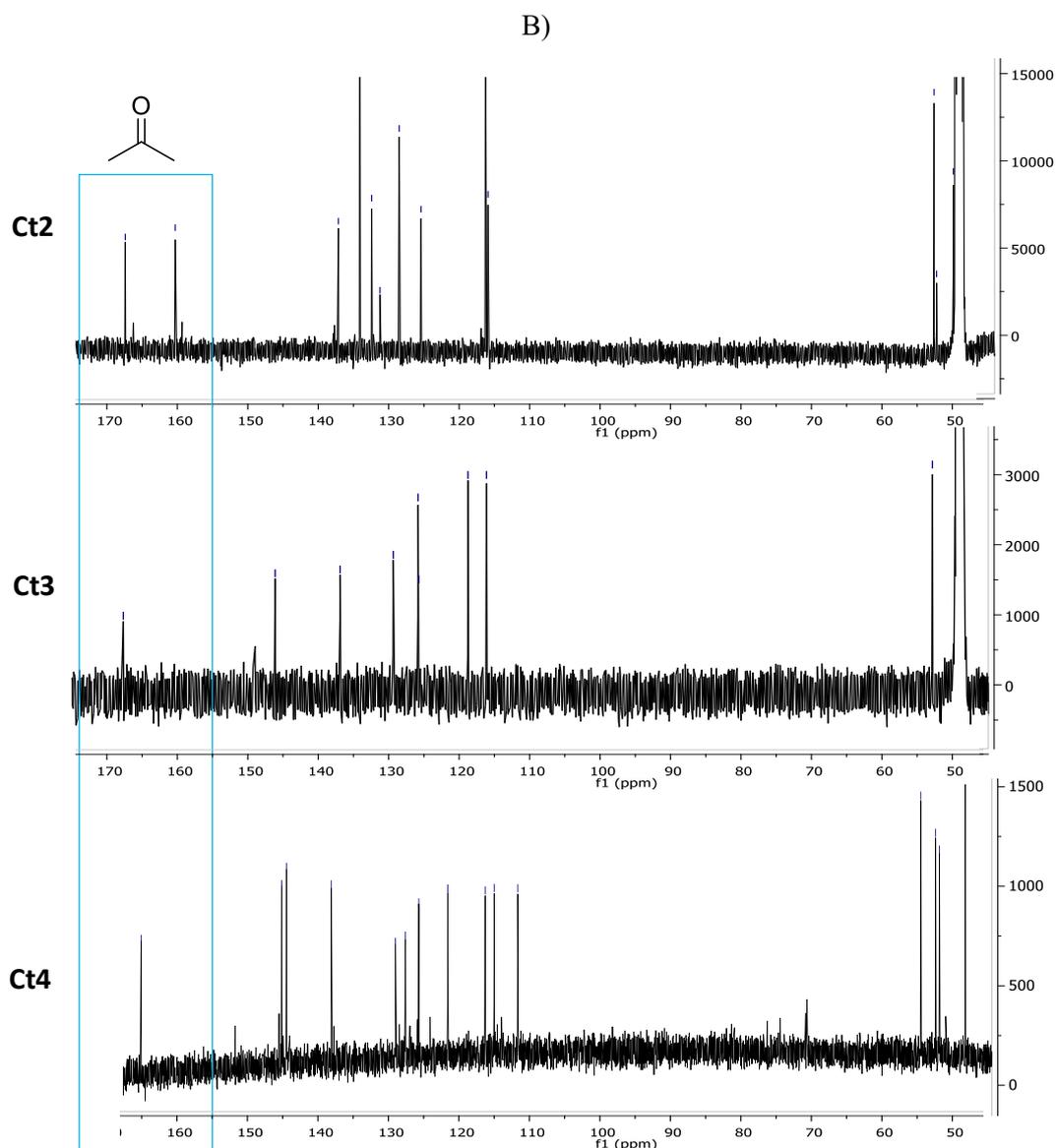


Figure 16 (suite). (A) Spectres RMN ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) des composés **Ct2-5** (**Ct2** et **Ct3** : d_4 -MeOH ; **Ct4** et **Ct5** : d_6 -DMSO).

Le composé **Ct2** (**61**) a été isolé sous la forme d'une huile de couleur jaune pâle. Sa formule brute, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif HRESI(-)SM (ion pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 273,0133 ; $\Delta\text{ppm} = 4,9$). Les analyses par SMHR et RMN (1D, 2D) nous ont permis de déduire qu'il s'agit du *p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (figure 17), un produit naturel nouveau, apparenté aux dérivés de l'ester phénylpyruvique décrits par Mancini en 1998⁵⁸. L'ensemble des éléments clés utilisés pour les déterminations structurales est détaillé par la suite.

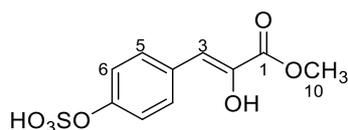


Figure 17. Structure du *p*-sulfoxyphénylpyruvate de méthyle (**Ct2**, **61**).

L'analyse fine des différentes données (SMHR, RMN 1D et 2D) nous a permis de décomposer la structure de **Ct2** (**61**) en quatre fragments avec un cycle aromatique, une double liaison, une fonction carbonyle et un groupement sulfate. La perte d'un fragment neutre de 80 uma par spectrométrie de masse tandem en mode négatif est caractéristique de la présence d'un groupement sulfate dans la molécule. Les deux signaux doublets à δ_{H} 7,81 ppm (2H, *d*, $^3J = 8,75$ Hz, H-5, H-9) et 6,76 ppm (2H, *d*, $^3J = 8,75$ Hz, H-6, H-8), présents dans le spectre RMN ^1H , et le signal fortement déblindé à δ_{C} 160,2 ppm (1C, C-7) ainsi que les trois signaux à δ_{C} 134,1 ppm (2C, C-5, C-9), 125,4 ppm (1C, C-4) et 115,9 ppm (2C, C-6, C-8), observés dans le spectre RMN ^{13}C , sont tous caractéristiques d'un noyau aromatique *para*-disubstitué de type phénol. Par ailleurs, le signal singulet à δ_{H} 7,04 ppm (1H, *s*, H-3) et les deux signaux à δ_{C} 137,1 ppm (1C, C-2) et 128,5 ppm (1C, C-3) sont caractéristiques d'une double liaison trisubstituée. En outre, les spectres RMN ^1H et ^{13}C présentent un signal singulet à δ_{H} 3,81 ppm (3H, *s*, H₃-10) et deux signaux à δ_{C} 167,4 ppm (1C, C-1) et 52,2 ppm (1C, C-10) caractéristiques d'une fonction carbonyle conjuguée de type ester méthylique (figure 18).

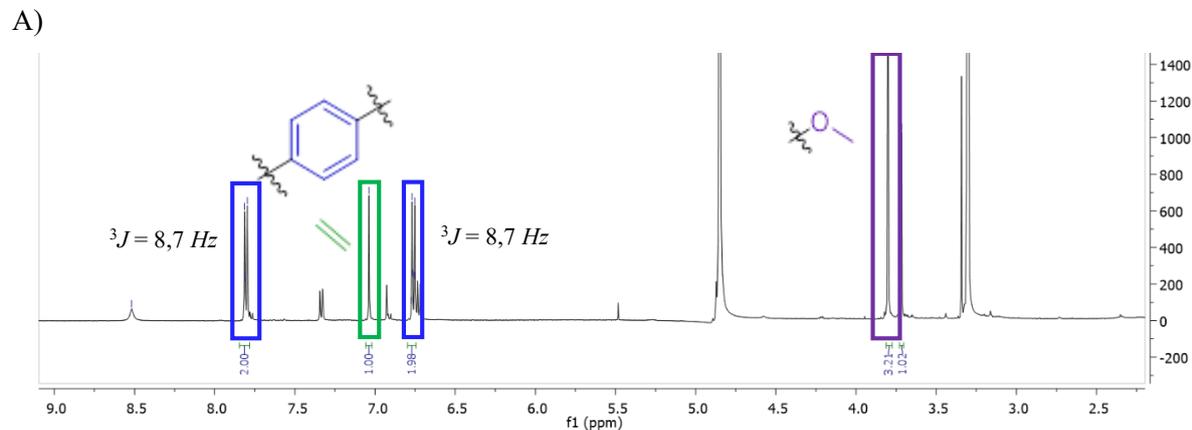


Figure 18. Spectres RMN : (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **Ct2** (*d*₄-MeOH).

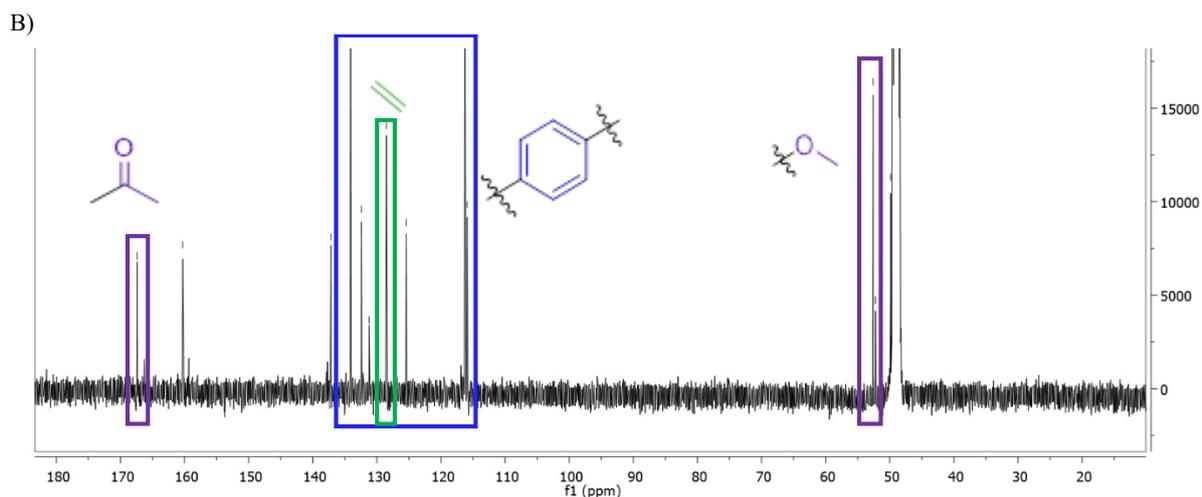


Figure 18 (suite). Spectres RMN : (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de Ct2 (d_4 -MeOH).

La connexion entre les différents fragments a pu être réalisée à partir des analyses par RMN HMBC ^1H - ^{13}C . Les corrélations clés entre le proton éthylénique H-3 (δ_{H} 7,04 ppm) et les carbones C-5 et C-9 (δ_{C} 134,1 ppm) nous a permis de connecter le carbone C-3 au carbone C-4 du noyau aromatique (figure 19).

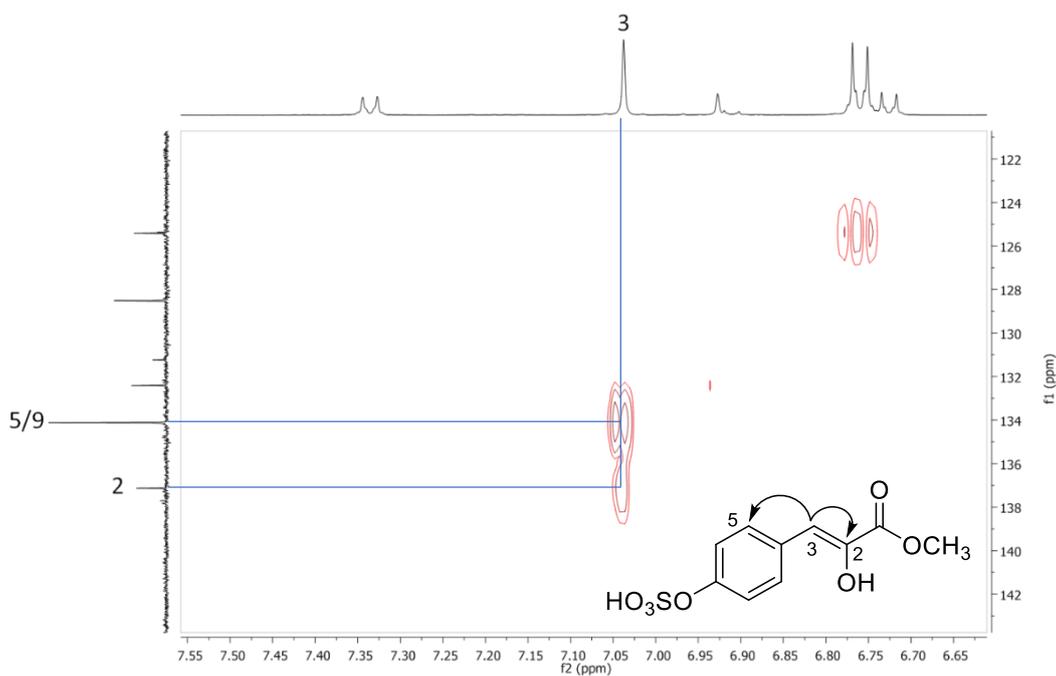


Figure 19. Agrandissement n°1 du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de Ct2 (d_4 -MeOH, 500/125MHz).

Par ailleurs, la corrélation par RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le méthyle H₃-10 (δ_{H} 3,72 ppm) et le carbone C-2 (δ_{C} 137,1 ppm) nous a permis de positionner l'ester méthylique au niveau du carbone C-2 de la double liaison (figure 20).

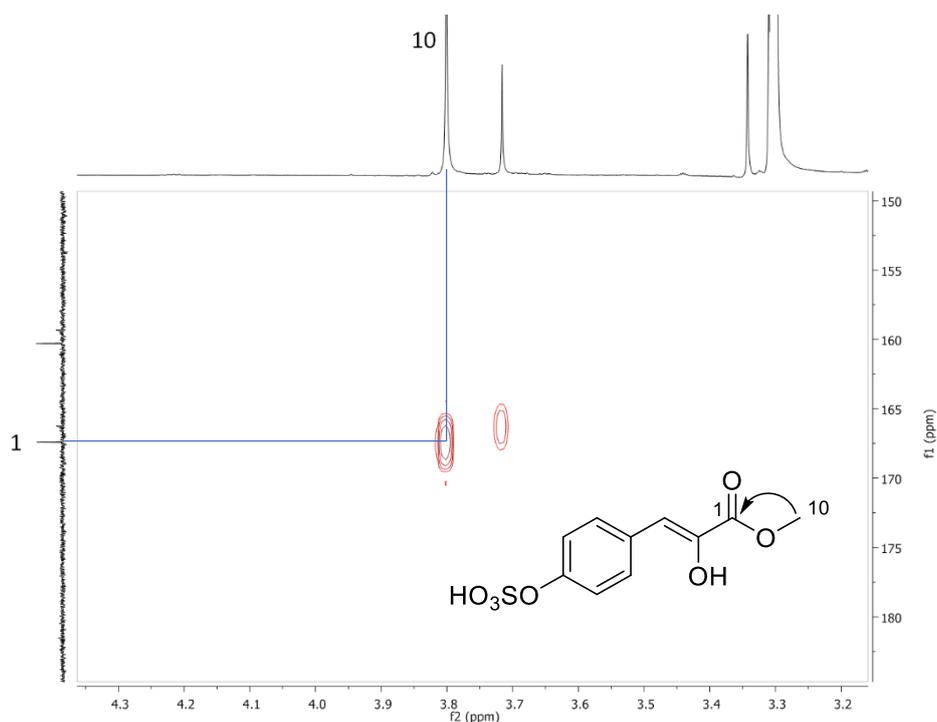


Figure 20. Agrandissement n°2 du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de **Ct2** (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).

Pour satisfaire la formule brute et le caractère déblindé du carbone C-2 (δ_c à 137,2 ppm), nous avons placé une fonction hydroxyle au niveau du carbone C-2. Enfin, la comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé **Ct2** (**61**) avec celles du (*Z*)-phénylpyruvate de méthyle (**53**), du (*E*)-phénylpyruvate de méthyle (**54**)⁵⁸, de l'acide (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvique (**62**)⁵⁸ et de l'acide (*Z*)-*p*-hydroxyphénylpyruvique (**63**)⁶¹ (figure 21) nous a permis de déduire que : (i) le groupement sulfate est positionné au niveau du carbone C-7 en raison de son caractère fortement déblindé (δ_c 160,3 ppm) et (ii) l'énol ($\Delta^{2,3}$) est de configuration *Z*.

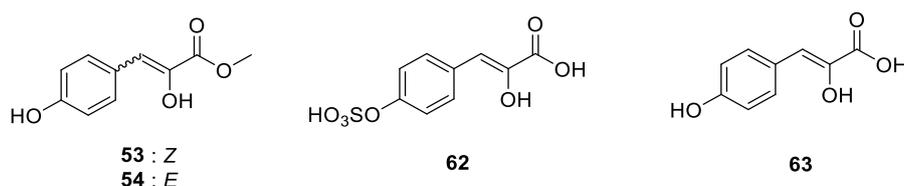


Figure 21. Structures du (*Z*)- et (*E*)-phénylpyruvate de méthyle (**53**, **54**)⁵⁸, de l'acide (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvique (**62**)⁵⁸ et de l'acide (*Z*)-*p*-hydroxyphénylpyruvique (**63**)⁶¹.

En effet, le coefficient de corrélation linéaire R^2 pour les données RMN ^1H et ^{13}C est plus élevé pour le couple **Ct2/53** ($R^2 = 1$) que pour le couple **Ct2/54**, significatif d'un énol $\Delta^{2,3}$ de configuration *Z*. Par ailleurs, le coefficient de corrélation R^2 est plus élevé pour le couple **Ct2/62** que pour le couple **Ct2/63** ce qui est caractéristique d'un groupement sulfate sur le phénol. Enfin, ces comparaisons nous ont

⁶¹ Bugni T. S., Concepcion G. P., Mangalindan G. C., Harper M. K., James R. D., Ireland C. M. 2002, *p*-Sulfooxyphenylpyruvic acid from the red macro alga *Ceratodictyon spongiosum* and its sponge symbiont *Haliclona cymaeformis*. *Phytochem.*, **60**, 361–363.

permis de déceler une inversion potentielle dans les attributions RMN ^{13}C réalisées par Mancini et ses collaborateurs⁵⁸ pour les positions 2 et 4. Lorsque cette inversion est corrigée, nous observons un coefficient de corrélation linéaire R^2 de 1 pour le couple **Ct2/53**. Il est fort probable que les composés **Ct2** et **53** soient identiques. Dans les travaux de Mancini⁵⁸, les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par impact électronique et dans ces conditions la présence d'un groupement sulfate n'a probablement pas pu être observée.

Tableau 3. Données RMN (A) ^1H et (B) ^{13}C , pour les composés **Ct2**, **53**, **54**, **62** et **63** et coefficients de corrélation linéaire R^2 pour les couples **Ct2/53**, **Ct2/54**, **Ct2/62** et **Ct2/63**.

A)	Ct2^a	53^b	54^b	62^c	63^c
N ^o	δ_{H} (ppm)				
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	7,04, <i>s</i>	7,05, <i>s</i>	6,94, <i>s</i>	7,09, <i>s</i>	6,79, <i>s</i>
4	-	-	-	-	-
5,9	7,81, <i>d</i> , 8,75	7,81, <i>d</i> , 8,70	7,34, <i>d</i> , 8,70	7,78, <i>dd</i> , 8,80	7,27, <i>d</i> , 8,60
6,8	6,76, <i>d</i> , 8,75	6,76, <i>d</i> , 8,70	6,73, <i>d</i> , 8,70	6,80, <i>dd</i> , 8,80	6,77, <i>d</i> , 8,60
7	-	-	-	-	-
10	3,81, <i>s</i>	3,82, <i>s</i>	3,72, <i>s</i>	-	-
R²	/	1	0,9892	0,9999	0,9502

^aCD₃OD, 500 MHz

^bCD₃OD, 300 MHz⁵⁷

^c5% D₂O/CD₃OD, 400 MHz⁶⁰

B)		Ct2^a	53^b	62^c	63^c
N ^o	Multi.	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	Cq	167,4	167,4	169,0	168,0
2	Cq	137,1	137,1 ^d	137,9	138,7
3	CH	128,5	128,5	128,8	127,2
4	Cq	125,4	125,4 ^d	125,8	124,8
5,9	CH	134,1	134,1	134,2	131,0
6,8	CH	115,9	116,2	116,5	115,1
7	Cq	160,2	160,3	159,8	156,2
10	CH ₃	52,6	52,6	-	-
R²		/	1*	0,999	0,9891

^aCD₃OD, 125 MHz

^bCD₃OD, 75 MHz⁵⁷

^c5% D₂O/CD₃OD, 100 MHz⁶⁰

^dles déplacements chimiques ont été intervertis par rapport à la publication d'origine.

La structure déterminée est présentée à la figure 22.

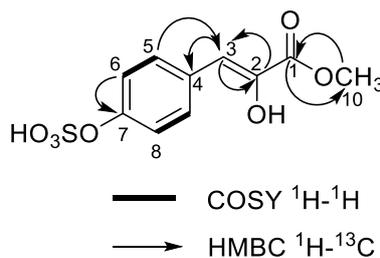


Figure 22. Structure et corrélations de **Ct2** (**61**).

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé **Ct2 (61)** est regroupé dans le tableau 4.

Tableau 4. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) de **Ct2** (*d*-MeOH, 125/500 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C
1	167,4, Cq	-	-	-
2	137,1, Cq	-	-	-
3	128,5, CH	7,04, <i>s</i>	-	1, 2, 5, 9
4	125,4, Cq	-	-	-
5,9	134,1, CH	7,81, <i>d</i> , 8,75	6, 8	3, 7
6,8	115,9, CH	6,76, <i>d</i> , 8,75	5, 9	4, 7
7	160,2, Cq	-	-	-
10	52,6, CH ₃	3,81, <i>s</i>	-	1

Le composé **Ct3 (64)** a été obtenu sous la forme d'une huile de couleur jaune pâle. Sa formule brute, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_8\text{S}$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif HRESI(-)SM (ion pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 289,0023; $\Delta\text{ppm} = 1,6$). Les analyses par SMHR et RMN nous ont permis de déduire qu'il s'agit du *m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (figure 23), un produit naturel nouveau, apparenté à **Ct2 (61)**. L'ensemble des éléments clés utilisés pour déterminer sa structure sont détaillés par la suite.

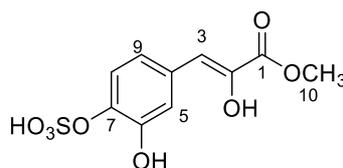


Figure 23. Structure du *m*-hydroxy-*p*-sulfooxypyruvate de méthyle (**Ct3**, **64**).

Une analyse fine des différentes données RMN 1D et 2D nous a permis de déduire que **Ct2 (61)** et **Ct3 (64)** sont très proches d'un point de vue structural puisqu'ils sont constitués de trois fragments identiques. Il s'agit de la double liaison trisubstituée, de la fonction ester méthylique conjuguée et de la fonction sulfate. La perte d'un fragment neutre de 80 uma par spectrométrie de masse tandem en mode négatif est caractéristique de la présence d'un groupement sulfate dans la molécule. La double liaison trisubstituée a été déduite par la présence du signal singulet à δ_{H} 7,00 ppm (1H, *s*, H-3) ainsi que des deux signaux à δ_{C} 136,8 ppm (1C, C-2) et 129,3 ppm (1C, C-3). Le signal à δ_{H} 3,81 ppm (3H, *s*, H₃-10) et les deux signaux à δ_{C} 167,5 ppm (1C, C-1) et 52,8 ppm (1C, C-10) sont caractéristiques de la fonction ester méthylique conjuguée. Les composés **Ct2 (61)** et **Ct3 (64)** diffèrent par : (i) un oxygène au niveau de leurs formules brutes, ce qui nous a permis de déduire que le composé **Ct3 (64)** présente un groupement hydroxyle supplémentaire au niveau du noyau aromatique et (ii) la structure du noyau aromatique qui porte cet hydroxyle supplémentaire. En effet, le signal singulet à δ_{H} 7,56 ppm (1H, *s*, H-5), le signal doublet à 7,18 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,75$ Hz, H-9) et le signal doublet à 6,74 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,75$ Hz, H-8), dans le spectre RMN ^1H , et les deux signaux déblindés à δ_{C} 148,9 ppm (1C, C-7) et 146,0 ppm (1C, C-6) ainsi que les signaux à δ_{C} 125,8 ppm (1C, C-9), 125,7 ppm (1C, C-4), 118,7 ppm (1C, C-

5) et 116,1 ppm (1C, C-8) présents dans le spectre RMN ^{13}C , sont caractéristiques d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué de type pyrocatechol (figure 24).

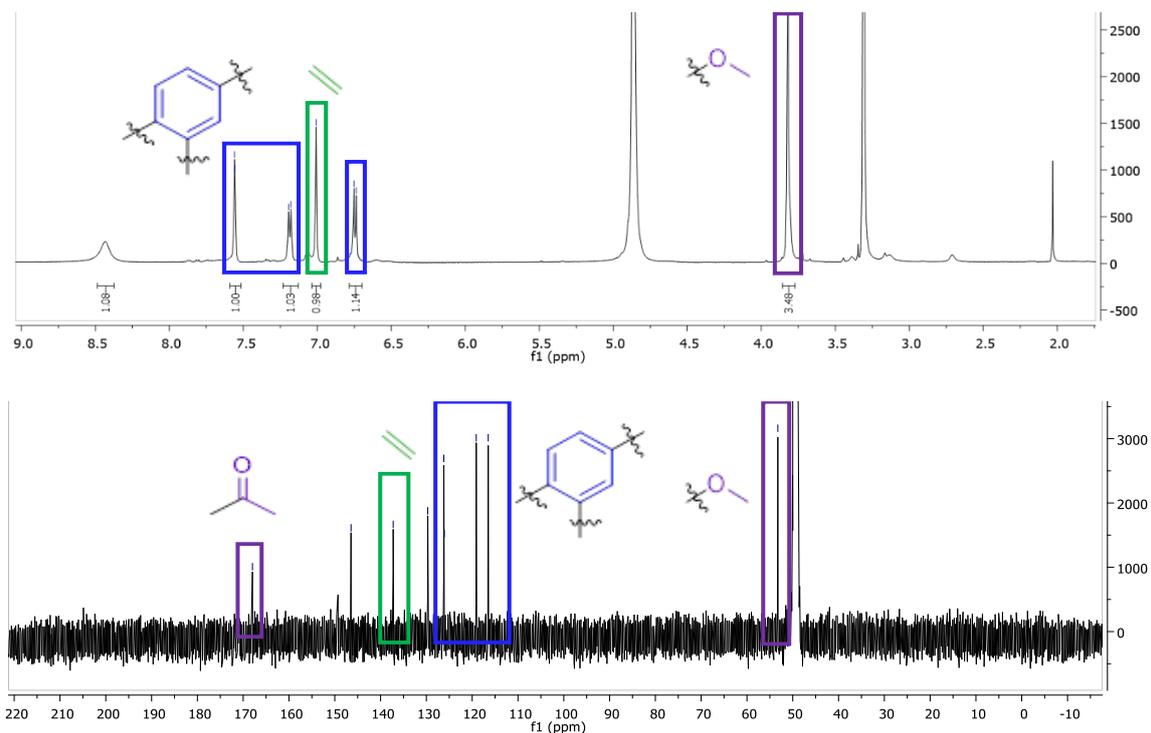


Figure 24. Spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de Ct3 (*d*₄-MeOH).

De façon identique au composé Ct2 (61), la connexion entre les différents fragments a pu être déduite des analyses par RMN HMBC ^1H - ^{13}C . Les corrélations par RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le proton éthylénique H-3 (δ_{H} 7,00 ppm) et les carbones C-5 (δ_{C} 118,7 ppm) et C-9 (δ_{C} 125,8 ppm) nous a permis de connecter le carbone C-3 au carbone C-4 du noyau aromatique (figure 25).

Par ailleurs, la corrélation par RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le proton éthylénique H-3 (δ_{H} 7,00 ppm) et le carbone C-1 (δ_{C} 167,5 ppm) nous a permis de positionner l'ester méthylique au niveau du carbone C-2 de la double liaison.

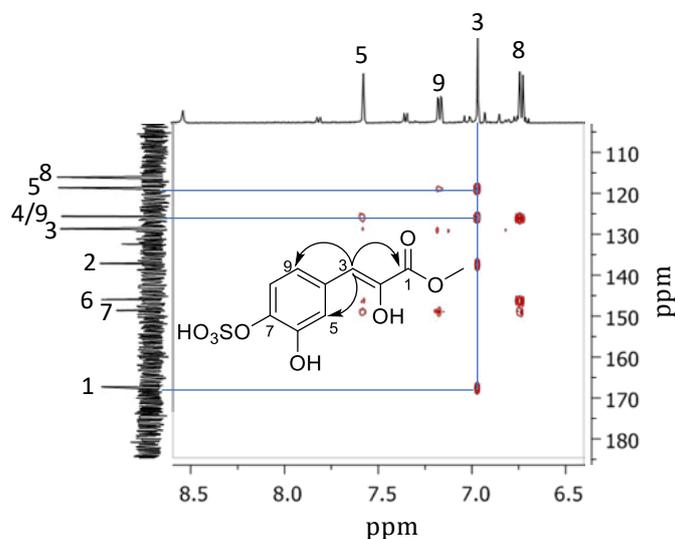


Figure 25. Agrandissement du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de Ct3 (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz).

Enfin, la comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé **Ct3** (**64**) avec celles du (*Z*)-*m*-hydroxypyruvate de méthyle (**55**) et du (*E*)-*m*-hydroxypyruvate de méthyle (**56**)⁵⁸ (figure 26) nous a permis de déduire que : (i) le groupement sulfate est positionné au niveau du carbone C-7 en raison de son déplacement chimique (δ_c 148,9 ppm) et (ii) l'énol ($\Delta^{2,3}$) est de configuration *Z*.

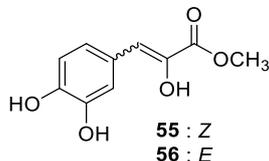


Figure 26. Structures des (*Z*)- et (*E*)-*m*-hydroxypyruvate de méthyle (**55**, **56**)⁵⁸.

De façon identique au composé **Ct2** (**61**), le coefficient de corrélation linéaire R^2 pour les données RMN ^1H et ^{13}C est plus élevé ($R^2 = 1$) pour le couple **Ct3/55** que pour le couple **Ct3/56** ce qui est caractéristique d'un énol $\Delta^{2,3}$ de configuration *Z* (tableau 5). Par ailleurs, la comparaison des données RMN ^{13}C nous a permis de déceler une inversion potentielle dans les attributions réalisées par Mancini et ses collaborateurs⁵⁸ pour les positions 2 et 4. Lorsque cette inversion est corrigée, nous observons un coefficient de corrélation R^2 de 1 pour le couple **Ct3/55**. De nouveau, il est fort probable que les composés **Ct3** (**64**) et **55** soient identiques. Dans les travaux de Mancini⁵⁸, les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par impact électronique et dans ces conditions la présence d'un groupement sulfate n'a probablement pas pu être observée.

Tableau 5. Données RMN (A) ^1H et (B) ^{13}C , pour les composés **Ct3**, **55** et **56** et coefficients de corrélation linéaire R^2 pour les couples **Ct3/55** et **Ct3/56**.

A) N°	Multi.	Ct3 ^a	55 ^b	56 ^b
		δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	Cq	-	-	-
2	Cq	-	-	-
3	CH	7,00	7,01	6,94
4	Cq	-	-	-
5	CH	7,55	7,57	7,34
6	Cq	-	-	-
7	Cq	-	-	-
8	CH	6,74	6,76	6,73
9	CH	7,18	7,19	7,34
10	CH ₃	3,81	3,82	3,72
R²		/	1	0,9923

^aCD₃OD, 500 MHz

^bCD₃OD, 300 MHz⁵⁷

Tableau 5 (suite). Données RMN (A) ^1H et (B) ^{13}C , pour les composés **Ct3**, **55** et **56** et coefficients de corrélation linéaire R^2 pour les couples **Ct3/55** et **Ct3/56**.

B) N°	Ct3^a	55^b	56^b
	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	167,5	167,4	166,4
2	136,8	136,9 ^c	137,6 ^c
3	129,3	129,1	131,1
4	125,7	125,8 ^c	132,4 ^c
5	118,7	118,6	117,5
6	146,0	145,9	145,8
7	148,9	148,7	145,4
8	116,1	116,1	115,9
9	125,8	125,7	123,4
10	52,8	52,4	52,7
R²	/	1*	0,9917*

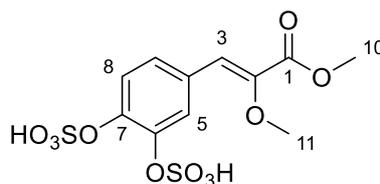
^aCD₃OD, 125 MHz^bCD₃OD, 75 MHz⁵⁷^cLes déplacements chimiques ont été intervertis par rapport à la publication d'origine.

Le composé **Ct3** (**64**) est donc le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxypyruvate de méthyle. Il s'agit d'un nouveau produit naturel, dérivé du (*Z*)-*m*-hydroxypyruvate de méthyle⁵⁸. L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé **Ct3** (**64**) est regroupé dans le tableau 6.

Tableau 6. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé **Ct3** (*d*_l-MeOH, 500/125 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./ <i>J</i> (Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C
1	167,5, Cq	-	-	-
2	136,8, Cq	-	-	-
3	129,3, CH	7,00, <i>s</i>	-	1, 2, 4, 5
4	125,7, Cq	-	-	-
5	118,7, CH	7,56, <i>s</i>	9	4, 6, 7
6	146,0, Cq	-	-	-
7	148,9, Cq	-	-	-
8	116,1, CH	6,74, <i>d</i> , 8,35	9	6, 7, 9
9	125,8, CH	7,18, <i>d</i> , 8,35	8, 5	5, 7
10	52,8, CH ₃	3,81, <i>s</i>	-	1

Le composé **Ct4** (**65**) a été isolé sous forme d'une huile de couleur jaune pâle. Sa formule brute, C₁₁H₁₂O₁₁S₂, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif (ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ de *m/z* 383,9730 ; $\Delta\text{ppm} = 3,3$). Les analyses par SMHR et RMN nous ont permis de déduire qu'il s'agit de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (figure 27). L'ensemble des éléments clés utilisés pour déterminer sa structure sont détaillés par la suite.

**Figure 27.** Structure de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (**Ct4**, **65**).

Une analyse fine des différentes données RMN 1D et 2D a révélé que les composés **Ct3 (64)** et **Ct4 (65)** sont très proches du point de vue structural. **Ct4 (65)** est constitué d'un groupement supplémentaire. Ainsi, la perte de deux fragments neutres de 80 uma observés par spectrométrie de masse tandem en mode négatif est caractéristique de la présence de deux groupements sulfate dans la molécule. Les signaux doublets à δ_H 7,37 ppm (1H, *d*, $^4J = 2,0$ Hz, H-5), doublets dédoublés à 6,95 ppm (1H, *dd*, $^4J = 2,0$ Hz, $^3J = 8,35$ Hz, H-9), doublet à 6,69 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,25$ Hz, H-8), au niveau du spectre RMN 1H , et les deux signaux déblindés à δ_C 145,0 ppm (1C, C-6) et 144,3 ppm (1C, C-7) ainsi que les signaux à δ_C 125,6 ppm (1C, C-4), 121,5 ppm (1C, C-9), 116,2 ppm (1C, C-5) et 114,9 ppm (1C, C-8) présents dans le spectre RMN ^{13}C , sont tous caractéristiques d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué de type pyrocatéchol. Par ailleurs, le signal singulet à δ_H 6,28 ppm (1H, *s*, H-3) et les deux signaux à δ_C 138,4 ppm (1C, C-2) et 111,5 ppm (1C, C-3) sont caractéristiques de la double liaison éthylénique trisubstituée. Par ailleurs, les signaux à δ_H 3,76 ppm (3H, *s*, H₃-10) et à δ_C 164,9 ppm (1C, C-1) sont caractéristiques d'une fonction ester méthylique conjuguée (figure 28).

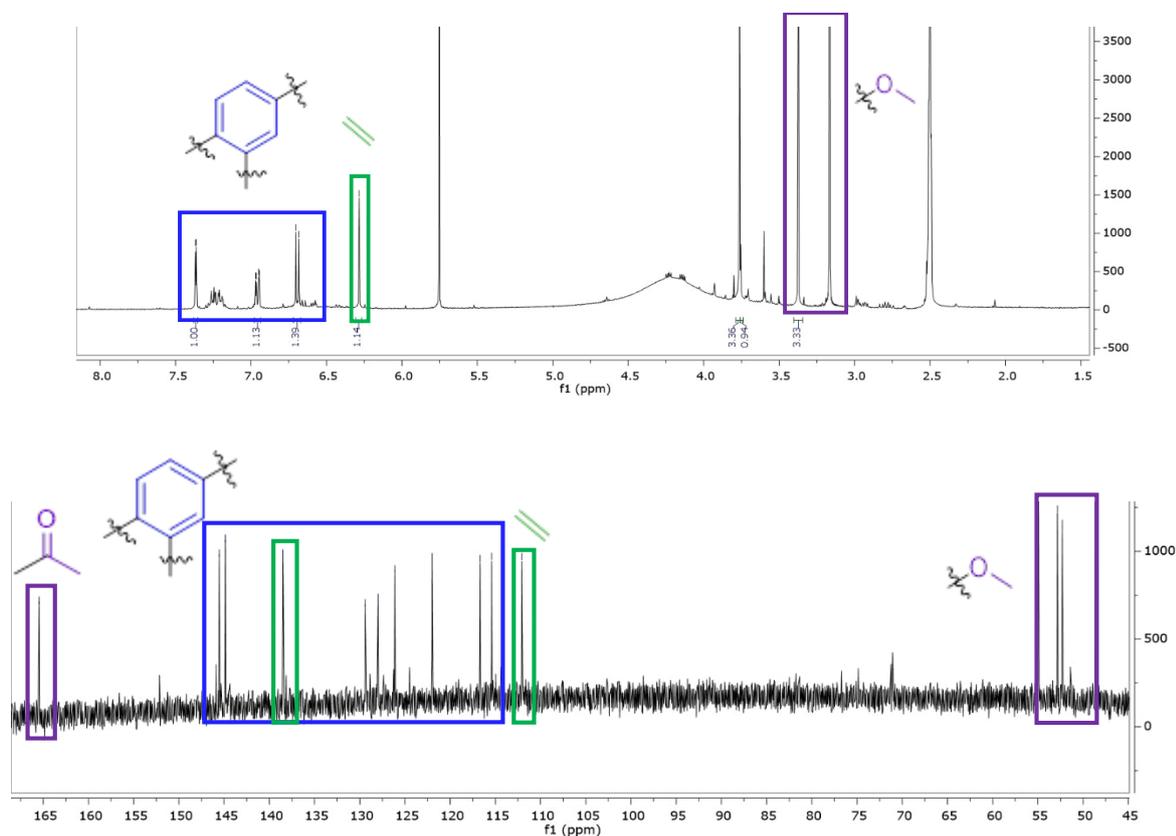


Figure 28. Spectres RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de **Ct4** (d_6 -DMSO).

De façon identique aux composés **Ct2 (61)** et **Ct3 (64)**, la connexion entre les différents fragments a pu être réalisée à partir des analyses par RMN HMBC 1H - ^{13}C . Les corrélations par RMN HMBC 1H - ^{13}C entre le proton éthylénique H-3 (δ_H 6,82 ppm) et les carbones C-5 (δ_C 116,2 ppm) et C-9 (δ_C 121,5 ppm) nous a permis de connecter le carbone C-3 au carbone C-4 du noyau aromatique.

Par ailleurs, la corrélation par RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le méthyle H_3 -10 (δ_{H} 3,76 ppm) et le carbone C-2 (δ_{C} 138,4 ppm) nous a permis de positionner l'ester méthylique au niveau du carbone C-2 de la double liaison (figure 29).

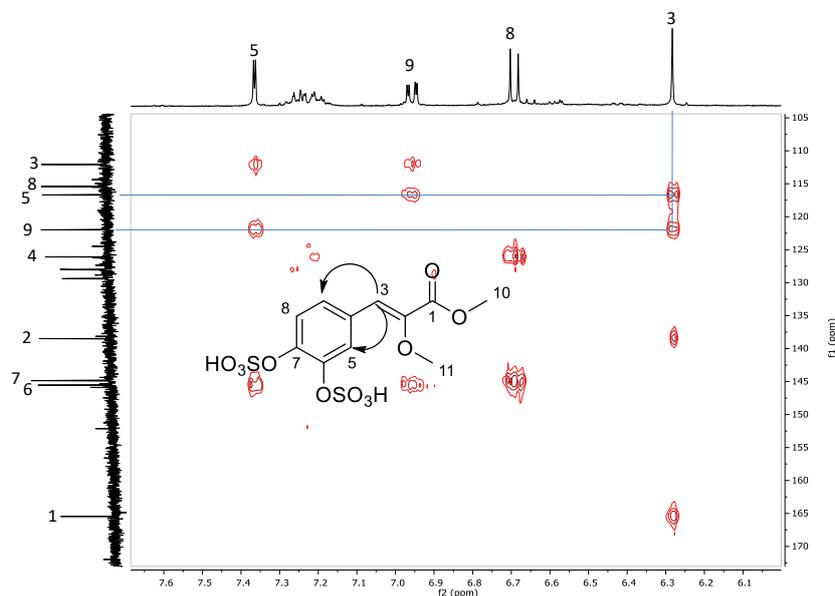


Figure 29. Agrandissement du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de Ct4 (d_4 -MeOH).

Enfin, le composé Ct4 (65) présente deux signaux supplémentaires par rapport à Ct3 (64) à δ_{H} 3,37 ppm (3H, *s*, H_3 -11) et à δ_{C} 52,3 ppm (1C, C-11), caractéristiques d'un groupement méthoxy. La comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé Ct4 (65) avec celles du (*Z*)-*m*-hydroxypyruvate de méthyle et du composé Ct3 (64) nous a permis de déduire que : (i) le second groupement sulfate est positionné au niveau du carbone C-6 en raison de son déplacement chimique (δ_{C} 145,0 ppm), (ii) le second groupement méthoxy est porté par le carbone C-2, et (iii) l'énol ($\Delta^{2,3}$) est de configuration *Z*.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé Ct4 (65) est regroupé dans le tableau 7.

Tableau 7. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé Ct4 (d_6 -DMSO, 500/125 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./ <i>J</i> (Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C
1	164,9, Cq	-	-	-
2	138,4, Cq	-	-	-
3	111,5, CH	6,28, <i>s</i>	-	1, 2, 5, 9
4	125,6 Cq	-	-	-
5	116,2, CH	7,37, <i>d</i> , 2,0	9	3, 6, 9
6	145,0, Cq	-	-	-
7	144,3, Cq	-	-	-
8	114,9, CH	6,69, <i>d</i> , 8,25	-	4, 6
9	121,5, CH	6,95, <i>dd</i> , 2,0, 8,35	5, 8	3, 5, 6
10	51,8, CH_3	3,76, <i>s</i>	-	1
11	52,3, CH_3	3,37, <i>s</i>	-	-

Le composé Ct5 (66) a été isolé sous la forme d'une huile de couleur jaune pâle. Sa formule brute, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_6\text{S}$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif (ion

pseudomoléculaire $[M-H]^-$ de m/z 242,9966 ; $\Delta\text{ppm} = 1,1$). Les analyses par SMHR et RMN nous ont permis de déduire qu'il s'agit de l'acide α -sulfooxycinnamique, un produit naturel nouveau (figure 30). L'ensemble des éléments clés utilisés pour déterminer sa structure est détaillé par la suite.

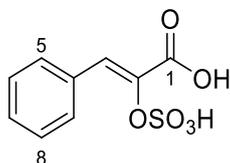


Figure 30. Structure de Ct5 (66).

Une analyse fine des différentes données RMN 1D et 2D a révélé que les composés Ct2 (61) et Ct5 (66) présentent plusieurs fragments en commun. Il s'agit de la double liaison trisubstituée, de la fonction carbonyle conjuguée ainsi que du groupement sulfate. La perte d'un fragment neutre de 80 uma par spectrométrie de masse tandem en mode négatif est caractéristique de la présence d'un groupement sulfate dans la molécule. Par ailleurs, le signal singulet à δ_H 6,82 ppm (1H, *s*, H-3) et les deux signaux à δ_C 145,8 ppm (1C, C-2) et 119,5 ppm (1C, C-3) sont caractéristiques de la double liaison éthylénique trisubstituée. Les composés Ct2 (61) et Ct5 (66) diffèrent au niveau du noyau aromatique. Ainsi, le signal doublet à δ_H 7,82 ppm (2H, *d*, $^3J = 7,50$ Hz, H-5, H-9), le signal triplet à δ_H 7,29 ppm (2H, *t*, $^3J = 7,50$ Hz, H-6, H-8) et le signal à δ_H 7,23 ppm (1H, *m*, H-7), au niveau du spectre RMN 1H , et les signaux à δ_C 134,5 ppm (1C, C-4), 129,3 ppm (2C, C-5, C-9), 127,9 ppm (2C, C-6, C-8) et 127,1 ppm (1C, C-7), observés dans le spectre RMN ^{13}C , sont caractéristiques d'un noyau aromatique monosubstitué. Le spectre RMN 1H présente quatre signaux à 7,82 ppm (2H, *d*, 7,4 Hz, H-5, H-9), 7,29 ppm (2H, *t*, 7,5 Hz, H-6, H-8), 7,22 ppm (1H, *m*, H-7) et 6,81 ppm (1H, *s*, H-3), caractéristiques de protons aromatiques. L'intégration et la multiplicité des signaux à 7,82 ppm (H-5, H-9), 7,29 ppm (H-6, H-8) et 7,22 ppm (H-7) nous ont amené à proposer un cycle monosubstitué (figure 31).

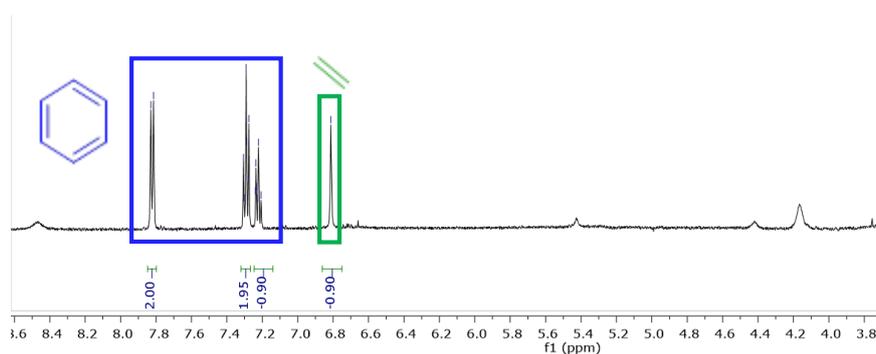


Figure 31. Spectres RMN : (A) 1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de Ct5 (*d*₆-DMSO) (les signaux sous forme de pointillés ont été déduits des analyses RMN 2D).

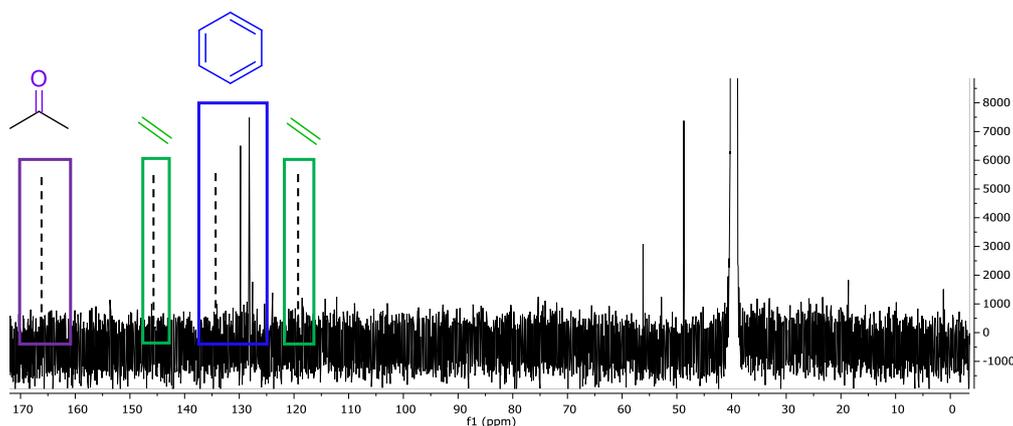


Figure 31 (suite). Spectres RMN : (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **Ct5** (d_6 -DMSO) (les signaux sous forme de pointillés ont été déduits des analyses RMN 2D).

De façon identique aux composés **Ct2** (**61**), **Ct3** (**64**) et **Ct4** (**65**), la connexion entre les différents fragments a pu être réalisée à partir des analyses par RMN HMBC ^1H - ^{13}C . Les corrélations par RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le proton éthylénique H-3 (δ_{H} 6,82 ppm) et les carbones C-5 et C-9 (δ_{C} 129,5 ppm) nous a permis de connecter le carbone C-3 au carbone C-4 du noyau aromatique.

Contrairement aux composés **Ct2** (**61**), **Ct3** (**64**) et **Ct4** (**65**), le composé **Ct5** (**66**) ne présente pas les signaux à δ_{H} 3,81 ppm et à δ_{C} 52,8 ppm caractéristiques de la fonction ester méthylique. Le spectre RMN ^{13}C présente tout de même un signal à δ_{C} 166,4 ppm (1C, C-1) caractéristique d'une fonction acide carboxylique conjuguée positionnée au niveau du carbone C-2. Ceci nous a conduit à placer le groupement sulfate au niveau du carbone C-2.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé **Ct5** (**66**) est regroupé dans le tableau 8.

Tableau 8. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé **Ct5** (d_6 -DMSO, 500/125 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C
1	166,4, Cq	-	-	-
2	145,8, Cq	-	-	-
3	119,5, CH	6,82, <i>s</i>	nv ^a	1, 5, 9
4	134,5, Cq	-	-	-
5,9	129,3, CH	7,82, <i>d</i> , 7,50	nv ^a	3, 6, 8
6,8	127,9, CH	7,29, <i>t</i> , 7,50	nv ^a	4, 5, 9
7	127,1, CH	7,23, <i>m</i>	nv ^a	5, 9

^anv : non visualisable

V.4. Discussion

Si les dérivés esters phénylpyruviques ont déjà été décrits à partir de *C. taxifolia*, les analogues sulfatés **Ct2** (**61**), **Ct3** (**64**), **Ct4** (**65**) et **Ct5** (**66**) que nous avons isolé, le sont pour la première fois. Les composés décrits sont principalement de configuration *Z* car ils sont plus stables que les dérivés de configuration *E*. Comme évoqué précédemment, le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**Ct2**, **61**)

et le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**Ct3**, **64**) ont très probablement été isolés par Mancini et ses collaborateurs en 1998⁵⁸ mais élucidés de façon incomplète. De façon identique aux autres algues qui présentent une organisation cœnocyttique, *C. taxifolia* produit donc bien des métabolites sulfatés, dérivés de l'acide phénylpyruvique et de l'acide cinnamique, différents des polysaccharides sulfatés⁵⁷ déjà recensés. Le rôle écologique de ces métabolites reste à élucider pour déterminer s'il s'agit de défense ou non. Ces dérivés non sulfatés et sulfatés de l'acide phénylpyruvique ont également été identifiés pour l'association entre *Ceratodictyon spongiosum* (algue rouge) et *Haliclona cymaeformis* (éponge symbiote)⁶¹ (figure 32).

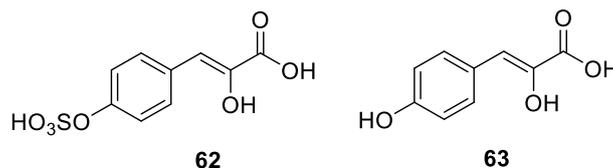


Figure 32. Structures des composés dérivés de l'acide phénylpyruvique⁶¹.

Parmi les produits naturels constitués par un fragment dérivé de l'acide phénylpyruvique, on distingue la céphamycine A (**67**), qui présente un fragment *p*-sulfooxyphénylpyruvate, et la céphamycine B (**68**), qui comporte un fragment *p*-hydroxyphénylpyruvate (figure 33).

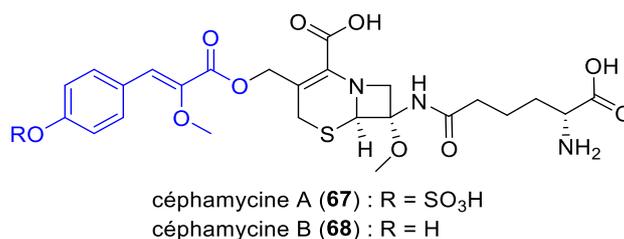


Figure 33. Structures des céphamycines A et B (en bleu, la partie commune aux composés **Ct2-5**).

Les céphamycines sont des antibactériens produits par des microorganismes fongiques. Dans ce contexte, une origine microbienne pour les composés **Ct2** (**61**), **Ct3** (**64**), **Ct4** (**65**) et **Ct5** (**66**) n'est pas à exclure et reste à étudier.

V.5. Hypothèse de biosynthèse

La bibliographie relative à la biosynthèse de dérivés de l'acide phénylpyruvique et cinnamique est assez sommaire. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la voie de biosynthèse de l'acide rosmarinique (**82**)⁶², un composé relativement proche du point de vue structural des dérivés sulfates que nous avons isolé de *C. taxifolia* (schéma 11). Cette dernière met en jeu la tyrosine (**73**) (ou la DOPA

⁶² Ma X.-H., Ma Y., Tang J.-F., He Y.-L., Liu Y.-C., Ma X.-J., Shen Y., Cui G.-H., Lin H.-X., Rong Q.-X., Guo J., Huang L.-Q. 2015, The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecules*, **20** (9), 16235–16254.

(76)), un précurseur impliqué dans la biogénèse de nombreuses molécules potentiellement bioactives⁶³. L'oxydation enzymatique de la tyrosine (73) (tyrosine hydroxylase) conduirait à la DOPA (76). A l'issue de plusieurs étapes supplémentaires de biosynthèse, les acides 4-hydroxy- et 3,4-dihydroxyphényllactiques (75, 78) seraient obtenus (schéma 11). La deuxième voie de biosynthèse proposée pour la formation de l'acide rosmarinique (82) est celle des phénylpropanoïdes. Elle impliquerait la phénylalanine (69) qui subirait une réaction de désamination pour former l'acide cinnamique (70) (schéma 11).

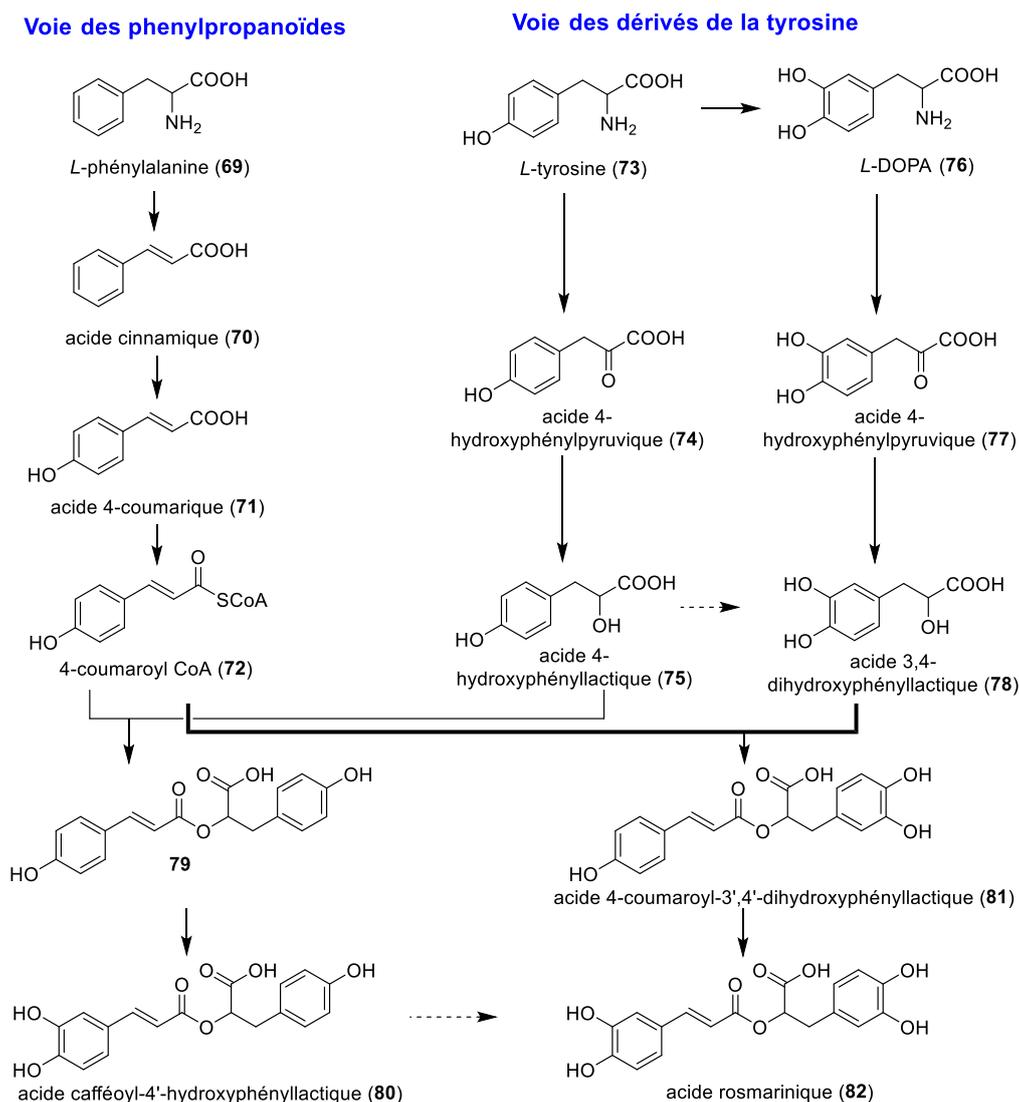


Schéma 11. Voie de biosynthèse supposée de l'acide rosmarinique, modifiée d'après Ma *et al.* 2015⁶².

Dans notre cas, les acides 4-hydroxyphényllactique (75), 3,4-dihydroxyphényllactique (78) ou cinnamique (70) pourraient être sulfatés pour conduire aux dérivés que nous avons isolé (schéma 12). Cette étape est probablement réalisée par des sulfotransférases.

⁶³ Sugumarán M., Robinson W. E. 2010, Bioactive dehydrotyrosyl and dehydropropyl compounds of marine origin. *Mar. Drugs*, **8**, 2906–2935.

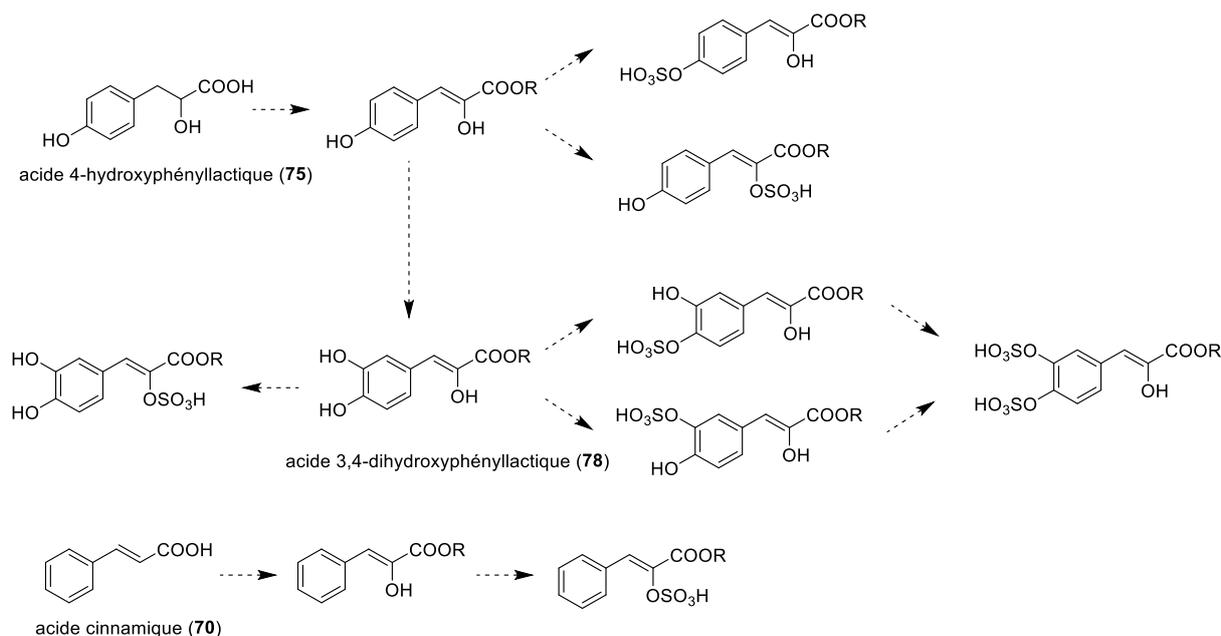


Schéma 12. Voie de biosynthèse proposée pour la production des dérivés de l'algue *C. taxifolia* (R = H ou Me).

V.6. Activités antimicrobiennes

Les propriétés antimicrobiennes des composés **Ct2** (**61**) et **Ct3** (**64**) ont été évaluées par notre partenaire BioPreserv à Grasse. Les données associées à **Ct1** (**60**) sont confidentielles. **Ct4** (**65**) et **Ct5** (**66**) se sont avérés instables dans le temps et n'ont par conséquent pas pu être testés.

Plusieurs composés commerciaux, structurellement proches des composés **Ct2-5**, ont également été évalués dans les mêmes conditions pour leurs activités antimicrobiennes. Il s'agit de l'acide *p*-coumarique (**18**), de l'ester méthylique de l'acide *p*-coumarique (**83**), de l'acide caféique (**84**), de l'ester méthylique de l'acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-2-méthoxyacrylique (**85**), ainsi que de l'acide rosmarinique (**82**) (figure 34).

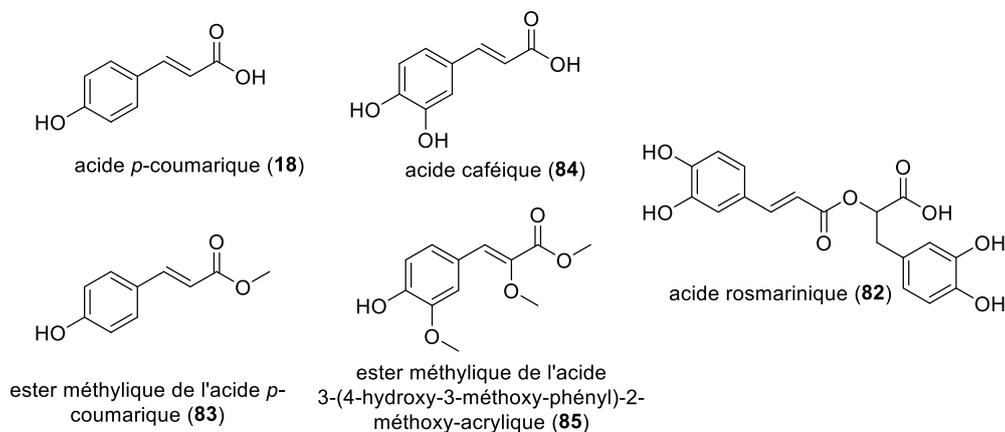


Figure 34. Structures des composés de référence testés.

Les composés ont été testés en milieu liquide à une concentration de 0,1 mg/mL sur *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*. En fonction des molécules, le DMSO et le tampon phosphate (PBS) (additionné ou non de méthanol pour améliorer la solubilisation) ont été testés en tant que contrôles négatifs des expériences et le mélange commercial CMI/MI (chlorométhylisothiazolinone/ méthylisothiazolinone) a été choisi comme contrôle positif. Pour un effet désinfectant, l'efficacité des composés a été déterminée après 24h de temps de contact, et pour un effet conservateur, au bout de 5 jours. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage d'efficacité biocide par rapport au temps initial t_0 (tableau 9).

Tableau 9. Efficacité biocide des composés à 0,1 mg/mL.

		Ct2	Ct3	82	83	84	85	CMI/MI 15 ppm
<i>E. coli</i>	Efficacité à T _{24h}	73%	100%	19%	10%	39%	78%	100%
	Efficacité à T _{5j}	100%	100%	0%	0%	39%	0%	100%
<i>C. albicans</i>	Efficacité à T _{24h}	0%	0%	-	0%	0%	0%	100%
	Efficacité à T _{5j}	0%	100%	-	0%	0%	0%	100%
	T _{24h} -T _{5j} *	-	-	16%*	-	-	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	Efficacité à T _{24h}	0%	4%	0%	0%	0%	0%	100%
	Efficacité à T _{5j}	0%	39%	0%	0%	0%	0%	100%

* Lors de la réalisation de l'expérience, le dénombrement de *C. albicans* dans l'acide rosmarinique n'a donné aucun résultat. Les données exploitables pour cette condition sont donc l'efficacité biocide de 24 heures à 5 jours de temps de contact.

Les composés **Ct2 (61)** et **Ct3 (64)** se sont avérés actifs vis-à-vis d'*E. coli* à partir de 24h de temps de contact. En revanche, **Ct2 (61)** est inefficace sur *C. albicans* et *A. brasiliensis* même au bout de 5 jours. Le composé **Ct3 (64)** est quant à lui inactif vis-à-vis de *C. albicans* après 24h de temps de contact et pratiquement inactif sur *A. brasiliensis*. Après 5 jours, le composé **Ct3 (64)** est très peu actif sur *A. brasiliensis* (39%) mais devient biocide sur *C. albicans*.

Pour l'acide rosmarinique (**82**), on observe une faible efficacité biocide sur *E. coli* (19%) après 24h de temps de contact ainsi qu'un effet d'inhibition de la croissance d'*A. brasiliensis*. Une faible efficacité biocide est observée sur *C. albicans* (16%) entre 24h et 5 jours de temps de contact. Au bout de 5 jours de temps de contact, on observe une inhibition de la croissance d'*E. coli* et d'*A. brasiliensis* par rapport au contrôle.

Pour l'ester méthylique de l'acide *p*-coumarique (**83**), on observe un effet biocide partiel (10%) sur *E. coli* au bout de 24h. Pour le même temps de contact, on observe un effet d'inhibition de la croissance de *C. albicans* par rapport au contrôle (méthanol à 0,5% dans le PBS). Le composé n'a pas d'effet remarquable sur *A. brasiliensis* pour le même temps de contact. Au bout de 5 jours, le composé n'a plus d'effet remarquable sur *E. coli* et *C. albicans* mais on observe un faible effet d'inhibition de la croissance d'*A. brasiliensis* par rapport au contrôle.

Pour l'acide caféique (**84**), on observe une efficacité biocide partielle sur *E. coli* (39%) et un effet d'inhibition de la croissance de *C. albicans* par rapport au contrôle après 24h de temps de contact. Il n'a pas d'effet remarquable sur *A. brasiliensis* en comparaison avec le témoin. Au bout de 5 jours de temps de contact, on observe une efficacité biocide partielle sur *E. coli* (39%), un effet d'inhibition de la croissance de *C. albicans* et un effet d'inhibition moindre de la croissance d'*A. brasiliensis* par rapport au contrôle.

Pour l'ester méthylique de l'acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)-2-méthoxyacrylique (**85**), on observe après 24h de temps de contact un effet biocide important sur *E. coli* (78%) mais pas d'effet remarquable sur *C. albicans* et *A. brasiliensis*.

Enfin, l'acide *p*-coumarique (**18**) n'a pas d'effet notable sur les souches sélectionnées (résultats non présentés).

En termes de perspectives, il conviendrait d'évaluer les propriétés antimicrobiennes des dérivés isolés et/ou synthétiques, sulfatés ou non sulfatés, vis-à-vis de microorganismes marins (tests antifoulings) pour tenter de comprendre leurs rôles écologiques, notamment pour l'algue dans son environnement naturel.

VI. Conclusion

Les algues produisent de nombreuses molécules valorisables dans divers domaines industriels : alimentaire, cosmétique, agriculture et pharmaceutique.

En étroite collaboration avec la société BioPreserv à Grasse, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une algue verte de Méditerranée relativement bien étudiée depuis les années 90, *Caulerpa taxifolia*, pour une application dans le domaine des biocides. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation d'une molécule connue, la caulerpényne (**30**) et quatre nouvelles molécules, le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**61**), le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**64**), le (*Z*)- α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (**65**) et l'acide (*Z*)- α -sulfooxycinnamique (**66**). Nos travaux semblent indiquer que le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**61**) et le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**64**) avaient été isolés par Mancini et ses collaborateurs en 1998⁵⁸ mais incorrectement élucidés. Il est toutefois fort probable que *C. taxifolia* produise à la fois les formes sulfatées et non sulfatées. Il conviendrait également d'évaluer plusieurs échantillons de *C. taxifolia* collectés à différentes périodes de l'année pour tenir compte d'une éventuelle variabilité saisonnière

La production de dérivés aromatiques sulfatés semble être une caractéristique commune des algues qui présentent une organisation cœnocytique. Ils permettent aux algues de se défendre lorsqu'elles sont agressées et blessées. Dans le cas de *C. taxifolia*, le rôle écologique des dérivés sulfatés et non sulfatés reste à étudier. Les métabolites isolés ont été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes. Le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**61**) s'est avéré légèrement actif vis-à-vis d'*E. coli* et le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle (**64**) s'est révélé faiblement actif contre *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*.

En dehors des algues, les invertébrés marins tels que les ascidies et les éponges constituent également une source de molécules nouvelles et/ou bioactives valorisables dans le domaine des biocides.

Partie B :

**Biodiversité et
chimiodiversité
d'invertébrés marins
Méditerranéens**

I. Introduction

De nombreux organismes vivants (microorganismes, plantes, invertébrés) produisent des métabolites secondaires, dont certains sont toxiques en réponse adaptative à la prédation (défense chimique) ou à la compétition pour l'espace dans leur environnement. Les invertébrés marins, qui sont souvent associés à des microorganismes symbiotiques, représentent une source sous-explorée de produits naturels nouveaux, responsables d'activités biologiques variées *in situ* (antibiotique, antifongique, antifouling, repellant, ...). Ces métabolites secondaires possèdent fréquemment des structures originales, souvent bioactives, différentes de celles du milieu terrestre, susceptibles de valorisation en physiologie (toxines), en biologie (taxonomie), en cosmétique et en thérapeutique, notamment dans le domaine des antimicrobiens et des anticancéreux.

Parmi les invertébrés marins producteurs de métabolites bioactifs (éponges, cnidaires, mollusques, tuniciers, ...), les spongiaires (éponges) et les tuniciers (ascidies) fournissent plus de deux tiers des molécules nouvelles isolées. Ils constituent une cible de recherche incroyablement attrayante en raison de leur ubiquité, de leur biodiversité élevée et de leur grande chimiodiversité, elle-même élargie par la présence variable de micro-organismes qu'ils hébergent (symbiose) ou dont ils se nourrissent dans le cas des spongiaires, par filtration de l'eau de mer : bactéries, champignons et microalgues.

La Méditerranée, dont la surface ne représente que 0,8 % de la superficie des océans, contiendrait 4 à 18 % de la biodiversité marine mondiale, dont un quart des espèces sont endémiques⁶⁴. Notre groupe s'intéresse depuis plusieurs années à la recherche de nouveaux métabolites secondaires bioactifs isolés d'invertébrés marins méditerranéens. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la biodiversité et à la chimiodiversité d'invertébrés méditerranéens échantillonnés en Espagne et au Maroc pour une valorisation potentielle dans le domaine des biocides. Après quelques généralités sur les spongiaires et les ascidies, la suite de ce manuscrit sera consacrée aux études chimiques menées sur les espèces sélectionnées.

II. Les éponges

Les éponges marines représentent une part importante de la communauté **benthique** à travers le monde. Plus de 8 000 espèces ont été décrites dans divers habitats (écosystèmes marins, eaux douces ou saumâtres, régions polaires, tropicales ou tempérées)⁶⁵. Les éponges font partie des plus anciens animaux multicellulaires décrits : ce sont des **métazoaires** organisés comme des **protozoaires**, dont la présence remonterait au Cambrien inférieur (550 millions d'années environ). Elles sont constituées

⁶⁴ Bianchi C. N., Morri C. 2000, Marine biodiversity of the Mediterranean sea: Situation, problems and prospects for future research. *Mar. Poll. Bull.*, **40**, 367–376.

⁶⁵ Hooper J. N. A., Van Soest R. W. M. 2002, *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, p. 1810.

d'une double paroi de cellules percée d'une multitude de petits pores, les ostioles. Leurs tissus ne sont que très peu différenciés. Elles ne possèdent ni appareil génital, ni système respiratoire, ni système nerveux. Leur reproduction peut être sexuée, par fécondation indirecte d'un spermatozoïde expulsé par une éponge et ingéré avant fécondation par une autre, ou asexuée, par bourgeonnement ou fragmentation. Dans le premier cas, il y aura formation d'une larve motile, susceptible de se déplacer sur de longues distances.

La très grande majorité des éponges se nourrissent de bactéries, de phytoplanctons et d'autres débris organiques, par filtration de l'eau environnante. Certaines espèces peuvent filtrer l'équivalent de leur propre volume d'eau en seulement quelques secondes. Les choanocytes sont des cellules composées d'un flagelle. Ils tapissent la paroi intérieure de l'éponge ou son atrium (selon le type d'éponge). Leur mouvement continu permet de mettre l'eau en mouvement afin d'apporter les nutriments et l'oxygène à l'intérieur de l'organisme *via* le réseau inhalant. Les particules nutritives sont piégées dans les microvillosités des choanocytes qui les ingèrent. L'eau est ensuite collectée par un réseau de canaux exhalants, qui se rejoignent en un oscule plus large, par où elle est rejetée.

On distingue trois types d'éponges : les éponges de type ascon, sycon et leucon. Les éponges simples, de type ascon, sont constituées par un atrium, caractérisé par une paroi interne tapissée de choanocytes. Les éponges de type sycon possèdent un atrium et des tubes tapissés de choanocytes. Enfin, les éponges de type leucon ne possèdent pas d'atrium, mais sont constituées d'un ensemble de canaux se rejoignant en chambres où sont disposés les choanocytes (figure 35). Les organisations plus complexes de type sycon et leucon sont les plus efficaces pour la filtration de l'eau. Ils permettent d'éviter le mélange entre l'eau filtrée et l'eau non encore filtrée.

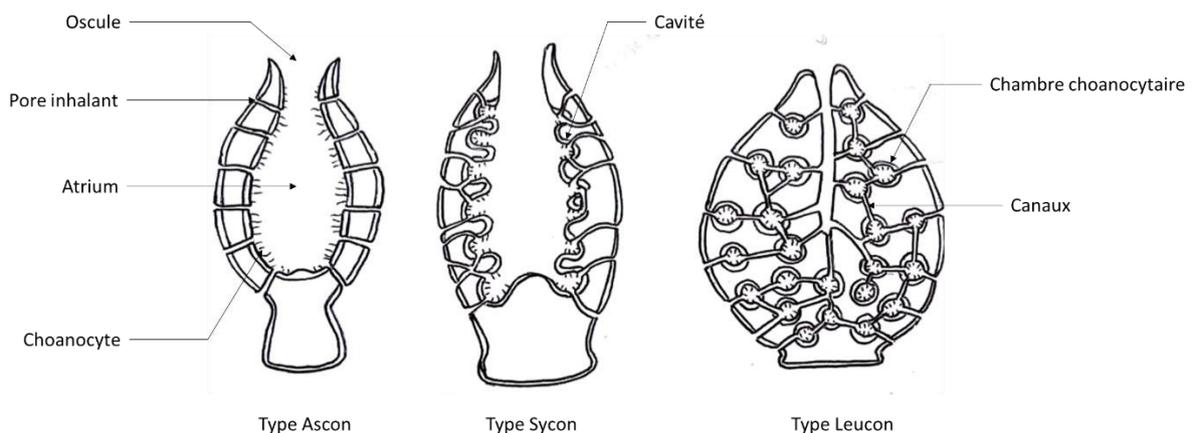


Figure 35. Les différents types d'éponges⁶⁶.

Les éponges possèdent une grande variété de couleurs, de formes et de consistances. La consistance peut être due à la présence de **spicules**, dont l'abondance est variable d'une espèce à une autre et permet de

⁶⁶ Adapté d'après le site http://ressources.unisciel.fr/zoologie/Spongiaires/Planche_spongiaires.htm accédé le 09/09/17.

protéger l'éponge. En fonction de la composition de leur squelette, les éponges marines sont divisées en quatre classes principales :

- Les éponges calcaires (Calcarea), constituées uniquement de spicules en calcaire,
- Les éponges de verre (Hexactinellida), composées de spicules en silice,
- Les démosponges (Demospongiae), qui représentent environ 95% des espèces et possèdent des squelettes extrêmement diversifiés, constitués de silice et/ou de spongine (protéine fibreuse similaire à la kératine) ou même ne comportent aucun squelette,
- Enfin, depuis 2012, les éponges homoscléromorphes (Homoscleromorpha) constituent le dernier groupe d'éponges recensé⁶⁷.

Dans le cas où cette défense physique par les spicules (et le squelette en général) ferait défaut, certaines éponges ont su développer un arsenal chimique pour contrer les prédateurs. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, l'origine de la plupart des produits naturels marins des éponges – hôte ou symbiote – fait l'objet de nombreux débats et n'a pas encore été clairement élucidée. Cette problématique constitue un des domaines d'un grand intérêt dans la chimie des produits naturels marins.

III. Les ascidies

Les ascidies sont des prochordés exclusivement marins appartenant à la classe des Ascidiaceae du sous-phylum Urochordata. Elles sont également nommées tuniciers car elles possèdent une sorte d'exosquelette protecteur composé de tunicine (proche de la cellulose), les enveloppant à la manière d'une tunique. Les ascidies se développent en deux stades bien définis : un stade larvaire proche des vertébrés, et un stade adulte, plutôt simple. Au stade larvaire, l'organisme est motile, possède une queue avec une notochorde dans sa partie postérieure et ce qui s'apparente à un cerveau dans sa partie antérieure. Le stade adulte est, quant à lui, très différent. L'organisme devient **sessile** et ne possède qu'un système nerveux peu développé. Il est directement attaché au substrat de l'environnement.

Il s'agit d'organismes filtreurs avec un système digestif assez primitif. Le courant d'eau entre dans le siphon buccal par des fentes branchiques grâce à des cils, traverse le pharynx pour entrer dans l'atrium et ressort par le siphon atrial (ou cloacal). Le plancton est retenu par les cils du stigmaté tapissant la paroi interne du pharynx. La nourriture est d'abord captée par un mucus et digérée, puis absorbée par l'intestin, tandis que le reste est éliminé par le siphon atrial (figure 36).

⁶⁷ Gazave E., Lapebie P., Ereskovsky A. V., Vacelet J., Renard E., Cardenas P., Borchiellini C. 2012, No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia*, **687**, 3–10.

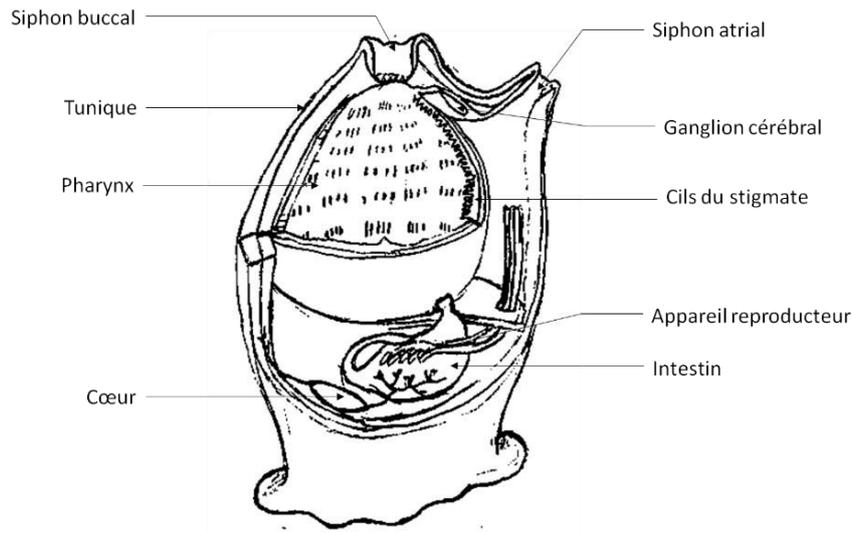


Figure 36. Structure d'une ascidie simple⁶⁸.

Les ascidies ne possèdent ni système respiratoire, ni système excréteur bien définis. En revanche, bien que rudimentaire, leur système circulatoire est unique et possède un cœur tubulaire bien développé ainsi qu'un système sanguin (comprenant plasma et autres corpuscules). Enfin, leur reproduction se fait le plus souvent de manière asexuée par bourgeonnement et/ou fragmentation, mais certaines ascidies sont capables d'expulser leurs gamètes pour qu'elles puissent être fertilisées de manière sexuée.

En fonction de leur organisation, les ascidies peuvent être classées en trois catégories distinctes : les ascidies solitaires (simples), les ascidies coloniales, qui partagent une même tunique (et parfois un même siphon cloacal), et les ascidies sociales, qui vivent regroupées dans une même zone et sont reliées les unes aux autres par leur base.

IV. Missions d'échantillonnage et contexte de l'étude

Deux missions d'échantillonnage ont été réalisées dans des zones peu explorées de la Méditerranée : une zone maritime protégée en Espagne en 2012 et sur les côtes marocaines, près de l'embouchure du détroit de Gibraltar en 2014 (figure 37).

⁶⁸ Reproduit et adapté d'après http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm/File_name/uoc005b/File_type/gif

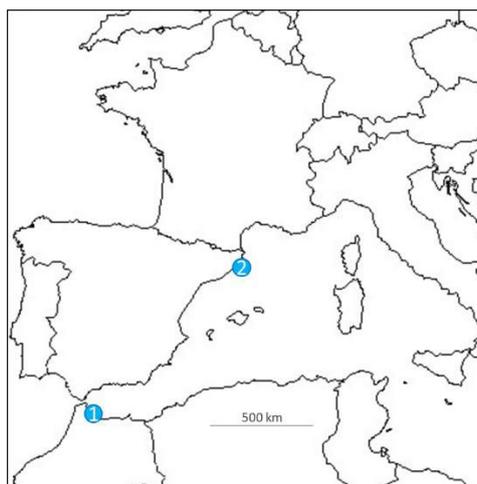


Figure 37. Zones des missions d'échantillonnage ① au Maroc et ② en Espagne.

Vingt spécimens ont été collectés au large de la côte est de l'Espagne en 2012 et autant d'espèces ont été collectées au Maroc en 2014. Trois types d'organismes ont été échantillonnés : majoritairement des éponges (27 démosponges, 1 homoscléromorphe et 1 calcaire) mais aussi des ascidies (7 au total). La liste complète des espèces échantillonnées est reportée dans le tableau 10.

Tableau 10. Espèces marines échantillonnées en Espagne et au Maroc.

Echantillonnage Espagne				
Nom systématique	Code	Lieu de collecte	Prof.	Photographie
<i>Aplidium</i> sp. 1				
Classe : Ascidiacea Ordre : Aplousobranchia Famille : Polyclinidae	120620-Cad-06	Illa Portalo	46 m	
<i>Aplidium</i> sp. 2				
Classe : Ascidiacea Ordre : Aplousobranchia Famille : Polyclinidae	120620-Cad-08	Illa Encalladora	33 m	
<i>Axinyssa aurantiaca</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Suberitida Famille : Halichondriidae	120619-Cad-05	Illa Galera	30 m	
		Forcats	39 m	

Partie B. Les invertébrés marins

<i>Axinyssa</i> sp.					
Classe : Demospongiae	120625-Med-26	Pota de Llop	38 m		
Ordre : Suberitida					
Famille : Halichondriidae					
<i>Cliona viridis</i>					
Classe : Demospongiae	120625-Med-24	Punta Salina	26 m		
Ordre : Clionaida					
Famille : Clionaidae					
<i>Dysidea avara</i>					
Classe : Demospongiae	120622-Cad-16	Pedra de Deu	43 m		
Ordre : Dictyoceratida		Barra de	38 m		
Famille : Dysideidae		Tascon			
<i>Dysidea tupha</i>					
Classe : Demospongiae	120627-Med-39	Pedra de Deu	43 m		
Ordre : Dictyoceratida					
Famille : Dysideidae					
<i>Haliclona fulva</i>					
Classe : Demospongiae	120623-Cad-18	Cap de Norfeu	39 m		
Ordre : Haplosclerida		Pota de Llop	34 m		
Famille : Chalinidae					
<i>Haliclona mediterranea</i>					
Classe : Demospongiae	120627-Med-35	Pota de Llop	34 m		
Ordre : Haplosclerida		Barra de	38 m		
Famille : Chalinidae		Tascon			
<i>Haliclona mucosa</i>					
Classe : Demospongiae	120623-Cad-17	Cap de Norfeu	39 m		
Ordre : Haplosclerida					
Famille : Chalinidae					
<i>Hemimycale columella</i>					
	120621-Cad-09	Punta de Farallons	23 m		

Partie B. Les invertébrés marins

<p>Classe : Demospongiae Ordre : Poecilosclerida Famille : Hymedesmiidae</p>		Bau Trencat	24 m	
<p><i>Hexadella racovitzai</i></p> <p>Classe : Demospongiae Ordre : Verongiida Famille : Ianthellidae</p>	120619-Cad-04	Illa Galera	30 m	
		Pota de Llop	38 m	
<p><i>Ircinia oros</i></p> <p>Classe : Demospongiae Ordre : Dictyoceratida Famille : Irciniidae</p>	120619-Cad-03	Illa Galera	30 m	
<p><i>Oscarella lobularis</i></p> <p>Classe : Homoscleromorpha Ordre : Homoscleromorphorida Famille : Oscarellidae</p>	120625-Med-27	Pota del Llop	38 m	
		Barra de Tascon	38 m	
<p><i>Phorbas tenacior</i></p> <p>Classe : Demospongiae Ordre : Poecilosclerida Famille : Hymedesmiidae</p>	120622-Cad-15	Bau Trencat	24 m	
<p><i>Polysyncraton</i> sp.</p> <p>Classe : Ascidiaceae Ordre : Aplousobranchia Famille : Didemnidae</p>	120625-Med-29	Punta Salina	26 m	
<p><i>Scopalina lophyropoda</i></p> <p>Classe : Demospongiae Ordre : Scopalinida Famille : Scopalinidae</p>	120625-Med-21	Pota de Llop	38 m	

Partie B. Les invertébrés marins

<i>Scopalina</i> sp.2*		Bau Trencat	24 m	
Classe : Demospongiae	120622-Cad-13			
Ordre : Scopalinida Famille : Scopalinidae		Pota de Llop	24 m	
<i>Spirastrella cuntatrix</i> *				
Classe : Demospongiae	120625-Med-28	Punta Salina	26 m	
Ordre : Clionaida Famille : Spirastrellidae				
<i>Spongia</i> sp.*				
Classe : Demospongiae	120625-Med-22	Pota de Llop	38 m	
Ordre : Dictyoceratida Famille : Spongiidae				
Echantillonnage Maroc				
<i>Acanthella acuta</i>				
Classe : Demospongiae	140524-CNo-32	Kabila	30 m	
Ordre : Bubarida Famille : Dictyonellidae				
<i>Aplidium tabarquensis</i>				
Classe : Ascidiacea	140521-CNo-04	Cabo Negro	23 m	
Ordre : Aplousobranchia Famille : Polyclinidae				
<i>Aplidium conicum</i>				
Classe : Ascidiacea	140523-CNo-17	Petit Mérou	26 m	
Ordre : Aplousobranchia Famille : Polyclinidae				
<i>Axinella damicornis</i>				
Classe : Demospongiae	140523-CNo-21	Cabo Negro	31 m	
Ordre : Axinellida Famille : Axinellidae				

Partie B. Les invertébrés marins

<i>Clathrina clathrus</i>					
Classe : Calcarea	140526-CNo-50	Kabila/Ketchup	31 m		
Ordre : Clathrinida					
Famille : Clathrinidae					
<i>Clavelina dellavallei</i>					
Classe : Ascidiaceae	140521-CNo-03	Cabo Negro	23 m		
Ordre : Aplousobranchia					
Famille : Clavelinidae					
<i>Cliona viridis</i>					
Classe : Demospongiae	140527-CNo-53	Kabila/Ketchup	31 m		
Ordre : Clionaida					
Famille : Clionidae					
<i>Crambe crambe</i>					
Classe : Demospongiae	140526-CNo-51	Cabo Negro	25 m		
Ordre : Poecilosclerida					
Famille : Crambeidae					
<i>Dictyonella</i> sp.					
Classe : Demospongiae	140524-CNo-30	Ketchup	29 m		
Ordre : Bubarida					
Famille : Dictyonellidae					
<i>Didemnum</i> sp.					
Classe : Ascidiacea	140524-CNo-29	Ketchup	29 m		
Ordre : Aplousobranchia					
Famille : Didemnidae					
<i>Diplosoma</i> sp.					
Classe : Ascidiaceae	140525-CNo-40	Kabila	39 m		
Ordre : Aplousobranchia					
Famille : Didemnidae					

Partie B. Les invertébrés marins

<i>Dysidea avara</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Dictyoceratida Famille : Dysideidae	140522-CNo-08	Cabo Negro	32 m	
<i>Hemimycale columella</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Poecilosclerida Famille : Hymedesmiidae	140521-CNo-01	Cabo Negro	32 m	
<i>Hexadella racovitzai</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Verongiida Famille : Ianthellidae	140525-CNo-41	Kabila	39 m	
<i>Ircinia variabilis</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Dictyoceratida Famille : Irciniidae	140523-CNo-19	Petit Mérou	26 m	
<i>Polycitor adriaticus</i>				
Classe : Ascidiaceae Ordre : Aplousobranchia Famille : Polycitoridae	140523-CNo-16	Petit Mérou	26 m	
<i>Pseudodistoma crucigaster</i>				
Classe : Ascidiacea Ordre : Aplousobranchia Famille : Pseudodistomidae	140523-CNo-20	Cabo Negro	31 m	
<i>Raspaciona aculeata</i>				
Classe : Demospongiae Ordre : Axinellida Famille : Raspailiidae	140524-CNo-37	Ketchup	29 m	

Spongia agaricina

Classe : Demospongiae

140523-CNo-25

Cabo Negro

31 m

Ordre : Dictyoceratida

Famille : Spongiidae



Chaque espèce a tout d'abord fait l'objet d'une recherche bibliographique pour évaluer si elle avait déjà donné lieu à une ou plusieurs études chimiques. Par la suite, les extraits bruts organiques de chaque espèce ont été préparés (extrait dichlorométhane/méthanol), analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrette de diode (DAD) et spectromètre de masse (SM) avec une ionisation par électrospray (ESI) en mode positif et négatif afin de détecter la présence potentielle de nouveaux métabolites.

Parmi les espèces collectées au Maroc, les éponges *C. crambe* et *H. racovitzai* ont été sélectionnées en raison de la présence potentielle de nouveaux métabolites dans les extraits bruts associés (figure 38). De plus, *H. racovitzai* n'a jamais fait l'objet d'une étude chimique antérieure. Parmi les espèces collectées en Espagne, c'est *Polysyncraton* sp., une ascidie, qui a retenu notre attention pour les mêmes raisons (figure 38).

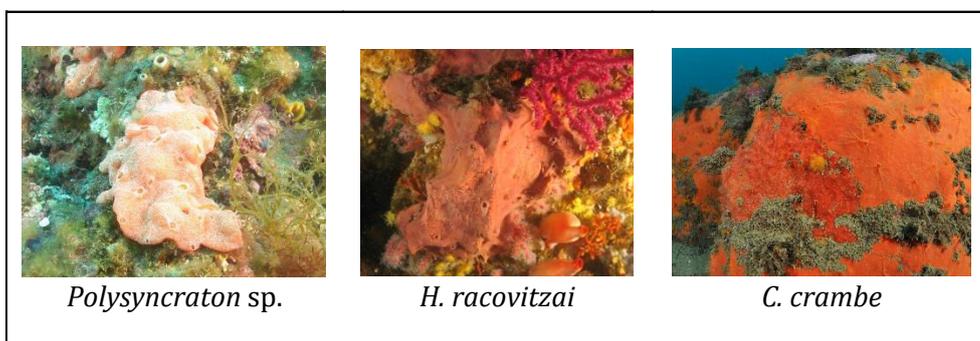


Figure 38. Organismes sélectionnés pour l'étude chimique.

La suite de ce chapitre sur la biodiversité et la chimiodiversité marine méditerranéenne est consacrée à l'extraction, l'isolement, la caractérisation structurale ainsi que les propriétés biologiques des composés obtenus. Chaque espèce sera brièvement décrite puis fera l'objet d'un état de l'art sur les métabolites spécialisés recensés pour l'espèce dans la bibliographie ou une espèce phylogénétiquement proche, avant de détailler l'étude chimique réalisée.

Partie B :

Chapitre 1 :

Métabolisme spécialisé de

Polysyncraton sp.

I. Introduction

Les ascidies sont la source de diverses classes de molécules aux propriétés biologiques d'intérêt valorisées dans le domaine des antitumoraux, des antiviraux et des antimicrobiens.

Parmi les ascidies, très peu de métabolites ont été décrits à partir d'espèces du genre *Polysyncraton* alors qu'il s'agit du deuxième genre le plus représenté chez les Didemnidae. Dans ce contexte, nous sommes intéressés aux métabolites d'une ascidie de méditerranée, *Polysyncraton* sp., qui, à ce jour et à notre connaissance, n'a fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure. Les travaux préliminaires menés sur un échantillon de *Polysyncraton* sp. collecté en Espagne en 2012 ont révélé la présence de plusieurs métabolites potentiellement nouveaux.

Après une brève description d'espèces appartenant au genre *Polysyncraton* ainsi que les métabolites recensés à ce jour, la suite de ce manuscrit sera consacrée aux travaux menés sur l'échantillon de *Polysyncraton* sp. collecté à Punta Salina (Espagne) en 2012.

II. *Polysyncraton* sp. : état de l'art

II.1. Classification

La famille des Didemnidae de l'ordre des Aplousobranchia comporte neuf genres : *Atriolum*, *Clitella*, *Coelocormus*, *Didemnum*, *Diplosoma*, *Leptoclinides*, *Lissoclinum*, *Polysyncraton* et *Trididemnum*. Parmi ces derniers, le genre *Polysyncraton* (tableau 11) est le deuxième genre le plus représenté (98 espèces) après le genre *Didemnum* (237 espèces)⁶⁹.

Tableau 11. Classification de *Polysyncraton*.

Règne Animal	
Division	Chordata
Classe	Ascidacea
Ordre	Aplousobranchia
Famille	Didemnidae
Genre	<i>Polysyncraton</i>

II.2. Description morphologique

Les espèces du genre *Polysyncraton* sont des ascidies coloniales fermes et lisses où chaque individu (zoïde) possède son propre orifice inhalant (siphon buccal) et un orifice cloacal commun. Leurs atriums

⁶⁹ D'après la base de données WoRMS, accédée le 20/08/17

possèdent six denticules blancs (languettes cloacales) étoilés. *Polysyncraton* possède également quatre rangs de stigmates, un spermiducte courbé, un siphon branchial à six lobes, des spicules calcaires et plus de deux testicules (sauf *P. bilobatum*, qui en possède seulement deux)⁷⁰.

II.3. Métabolisme spécialisé du genre *Polysyncraton*

Avec uniquement trois études, très peu de métabolites ont été décrits à partir d'espèces du genre *Polysyncraton*, alors qu'il s'agit du deuxième genre le plus représenté chez les Didemnidae. Parmi ces métabolites, il existe une grande disparité dans les familles chimiques recensées.

Les travaux menés sur *Polysyncraton lithostrotum* collecté aux îles Fidji ont conduit à l'isolement de deux métabolites, recensés usuellement à partir de microorganismes, aux propriétés antitumorales : la naménamicine (**86**)⁷¹, un composé énediène, et la vitilévamide (**87**)⁷² (figure 39), un depsipeptide bicyclique.

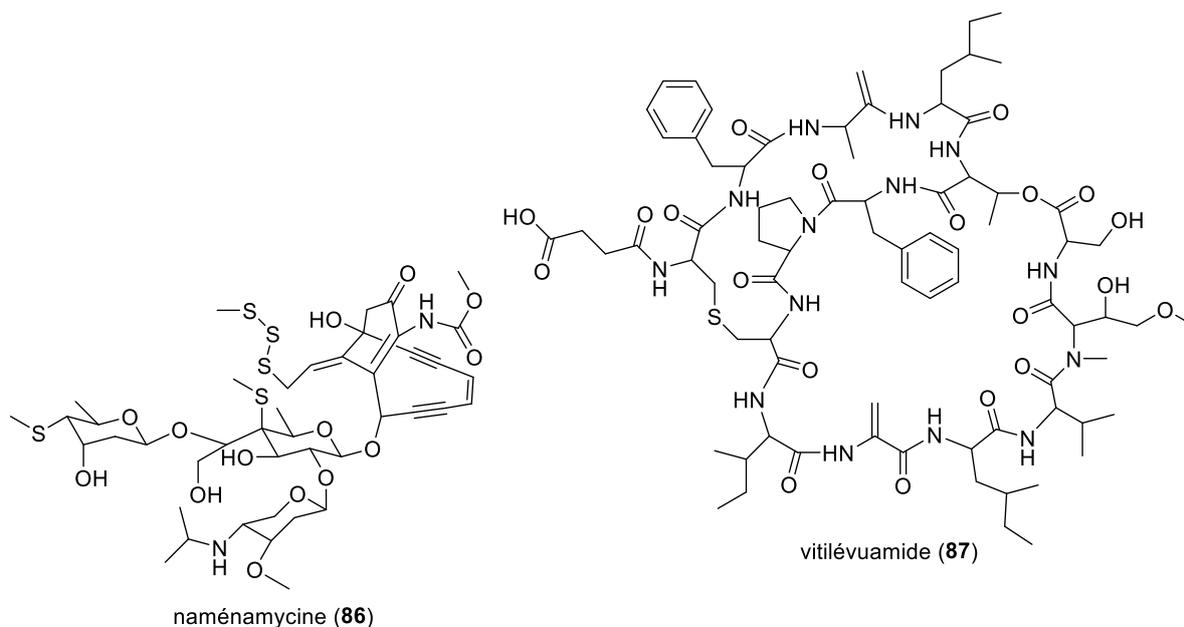


Figure 39. Structures des composés isolés de *P. lithostrotum*^{71,72}.

Par ailleurs, trois alcaloïdes de type pyridoacridine avec des propriétés antitrypanosomales ont été isolés d'un échantillon de *Polysyncraton echinatum* collecté en Australie en 2004⁷³. Il s'agit de la 12-déoxyascididémine (**88**), isolée pour la première fois, et deux autres analogues, l'ascididémine (**89**) et

⁷⁰ D'après la base de données DORIS : <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/515> et <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/1817> consultées le 20/08/2017

⁷¹ McDonald L. A., Capson T. L., Krishnamurthy G., Ding W.-D., Ellestad G. A., Bernan V. S., Maiese W. M., Lassota P., Discafani C., Kramer R. A., Ireland C. M. 1996, Namenamicin, a new enediyne antitumor antibiotic from the marine ascidian *Polysyncraton lithostrotum*. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10898–10899.

⁷² Ireland C. M., Fernandez A. 1998, Cyclic peptide antitumor agent from an ascidian. US Pat. US5830996A.

⁷³ Feng Y., Davis R. A., Sykes M. L., Avery V. M., Carroll A. R., Camp D., Quinn R. J. 2010, Antitrypanosomal pyridoacridine alkaloids from the Australian ascidian *Polysyncraton echinatum*. *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2477–2479.

l'éilatine (**90**) (figure 40), décrits auparavant à partir des ascidies *Didemnum* sp. et *Eudistoma* sp.⁷⁴. Ces métabolites se sont avérés actifs vis-à-vis de *Trypanosoma brucei brucei*, avec des CI_{50} de 0,077, 0,032 et 1,33 μ M, respectivement.

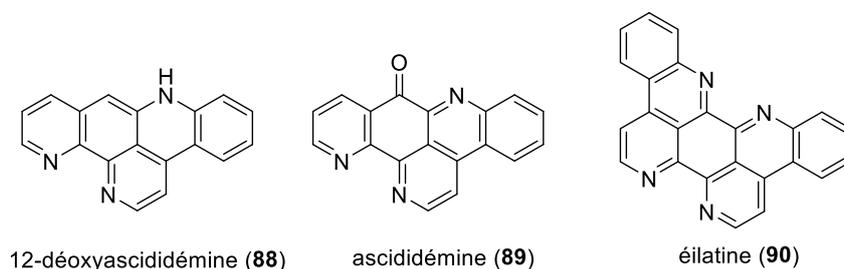


Figure 40. Structures des pyridoacridines isolés de *P. echinatum*⁷³.

Enfin, l'étude d'un spécimen de *Polysyncraton* sp. échantillonné en 2008 au large de l'île Ouroup (Russie) a conduit à l'isolement du mycalamide A (**91**)⁷⁵, précédemment isolé d'une éponge du genre *Mycale*⁷⁶, et qui possède de bonnes propriétés antitumorales (figure 41).

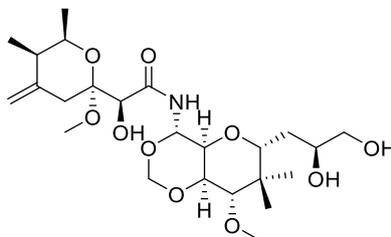


Figure 41. Structure du mycalamide A (**91**)⁷⁵.

III. Etude de *Polysyncraton* sp.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à un spécimen de *Polysyncraton* sp. (code 120625-Med-29) échantillonné par le Dr. Philippe Amade à Punta Salina en Espagne, en juin 2012 (26 m de profondeur) (figure 42).

⁷⁴ a) Kobayashi J., Cheng J.-F., Nakamura H., Ohizumi Y., Hirata Y., Sasaki T., Ohta T., Nozoe S. 1988, Ascididemin, a novel pentacyclic aromatic alkaloid with potent antileukemic activity from the okinawan tunicate *Didemnum* sp. *Tetrahedron Lett.*, **29** (10), 1177–1180. b) Rudi M., Kashman Y. 1989, Six new alkaloids from the purple Red Sea tunicate *Eudistoma* sp. *J. Org. Chem.*, **54**, 5331–5337.

⁷⁵ Dyshlovoy S. A., Fedorov S. N., Kalinovsky A. I., Shubina L. K., Bokemeyer C., Stonik V. A., Honecker F. 2012, Mycalamide A shows cytotoxic properties and prevents EGF-induced neoplastic transformation through inhibition of nuclear factors. *Mar. Drugs*, **10**, 1212–1224.

⁷⁶ Perry N. B., Blunt J. W., Munro M. H. G., Pannell L. K. 1988, Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4850–4851.



Figure 42. Photographie *in situ* de *Polysyncraton* sp. (©P. Amade).

III.1. Extraction, fractionnement et isolement

L'ascidie (12,2 g), préalablement lyophilisée, a été extraite à plusieurs reprises par du méthanol sous ultrasons. L'extrait méthanolique a été fractionné par chromatographie liquide sur gel de Sephadex® LH-20 pour conduire à deux fractions : FI (figure 43) et FII.

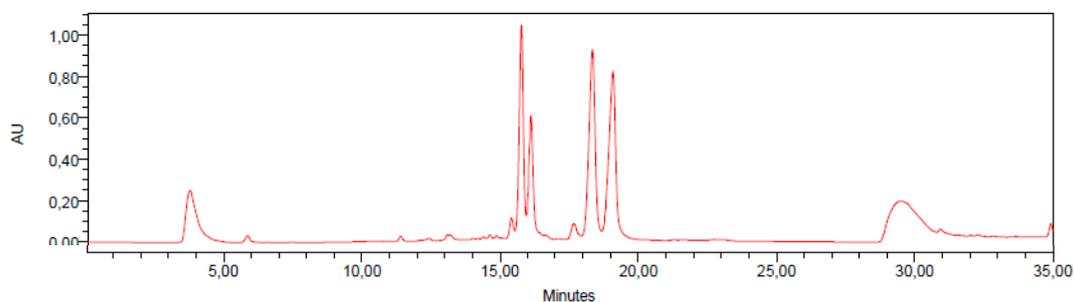


Figure 43. Empreinte chimique de la fraction FI par CLHP-UV, obtenue à 254 nm sur une colonne Macherey-Nagel propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

La 1^{ère} fraction (FI), de couleur jaune orangé et contenant les métabolites d'intérêt, a été analysée par RMN du proton (figure 44). L'analyse préliminaire du spectre RMN ¹H a révélé la présence de groupements caractéristiques de lipides polyinsaturés : (a) plusieurs signaux entre 1,4 et 0,8 ppm caractéristiques des méthylènes d'une ou plusieurs longues chaînes aliphatiques saturées, (b) plusieurs signaux déblindés entre 5,2 et 6,6 ppm correspondant à des protons éthyléniques, et (c) des signaux entre 4,4 et 3,1 ppm caractéristiques de protons au voisinage d'hétéroatomes.

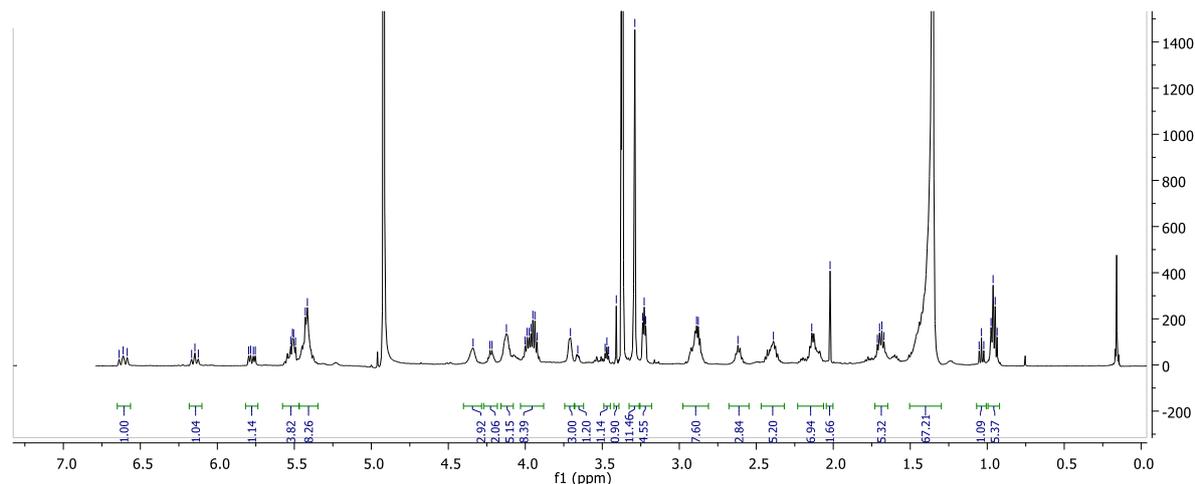


Figure 44. Spectre RMN ^1H (500 MHz) de la fraction FI (d_4 -MeOH).

L'analyse préliminaire de cette fraction par spectrométrie de masse en basse résolution a révélé la présence de composés avec des masses moléculaires moyennes comprises entre 650 et 725 uma. Par ailleurs, l'analyse des spectres de fragmentation par spectrométrie de masse nous a permis de suggérer qu'il s'agissait très probablement de phospholipides. En effet, l'étude plus fine des spectres de masse associés à ces composés, permet bien de retrouver les fragments caractéristiques d'une fonction phosphocholine, avec notamment la présence des ions suivants : un signal très intense de m/z 184,0 caractéristique de l'ion phosphocholine $[\text{Me}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{PO}_3\text{OH}]^+$, un signal de m/z 104,1 significatif de la présence d'une choline $[\text{Me}_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}]^+$ et enfin un signal de m/z 86,1 correspondant à l'ion $[\text{Me}_3\text{NCH}_2=\text{CH}]^+$. Une expérience RMN ^{31}P a été réalisée sur la fraction FI. Elle a permis de confirmer la présence de phosphore pour les composés de cette fraction.

Cette 1^{ère} fraction (FI) a par la suite été fractionnée par chromatographie liquide sur gel de silice greffée C_{18} (SPE) par passages successifs de deux solvants ou mélanges de solvants de polarité décroissante (H_2O puis $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Finalement, les métabolites d'intérêt, présents uniquement dans la fraction $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, ont été purifiés par CLHP semi-préparative (Macherey Nagel Sphinx Nucleodur phénylpropyl- C_{18} , 250×10 mm id, 5 μm , isocratique $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 64:36 sur 30 mn), pour conduire à quatre composés amorphes de couleur blanche : **Psp1** (6,2 mg), **Psp2** (4,3 mg), **Psp3** (9,4 mg) et **Psp4** (9,6 mg).

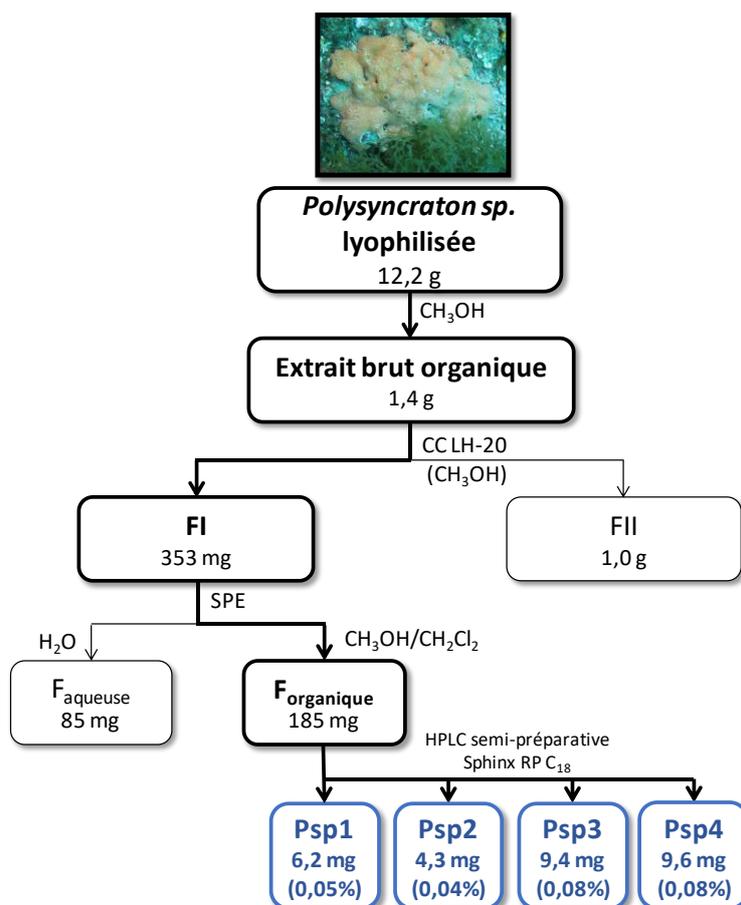


Schéma 13. Schéma d'extraction de *Polysyncraton* sp. (les rendements sont exprimés par rapport au poids sec de l'ascidie).

III.2. Détermination structurale

Comme évoqué précédemment, une analyse préliminaire des données spectrales (MS, HRMS, RMN) associées aux composés **Psp1-4** nous a permis de déduire qu'il s'agissait de dérivés lipidiques présentant des structures très proches. La structure des métabolites de cette famille de composés n'a pu être déterminée sur la base de la simple analyse des données de la bibliographie et a nécessité une étude approfondie des spectres de masse et de RMN. Nous avons pu obtenir la totalité des spectres RMN 1D et 2D uniquement pour **Psp3** et **Psp4** puisqu'il s'agit des composés obtenus en quantité. De ce fait, les structures des composés **Psp3** et **Psp4** sont les premières à être explicitées.

III.2.1. Structure de Psp3

Le composé **Psp3** (**92**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc. Sa formule brute, $C_{35}H_{66}N_2O_9P_2$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)-SM (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de m/z 721,4301 ; $\Delta ppm = 2,3$). L'étude des données spectrales (SMHR, RMN) nous a permis d'identifier la structure de la bolascidine C (figure 45). Les éléments qui nous ont permis d'arriver à cette conclusion sont détaillés par la suite.

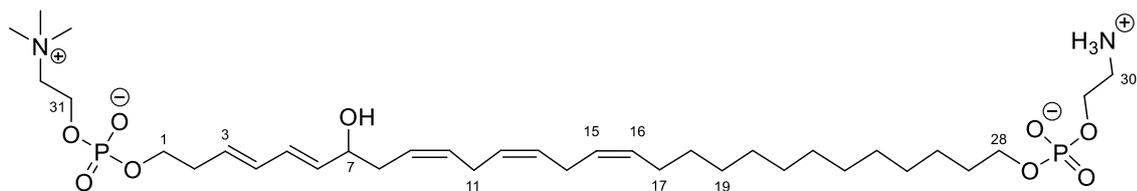


Figure 45. Structure de la bolascidine C (**Psp3**, 92).

D'après la formule brute, cette molécule contient 5 centres d'insaturation. Le spectre RMN DEPT135 présente un seul signal très intense, déblindé, associé à un signal très intense qui intègre pour 3 dans le spectre RMN ^1H . L'ensemble est caractéristique d'un groupement triméthyle isolé, lié à un hétéroatome. Aucun autre signal ne peut être attribué à une extrémité terminale de la molécule, ce qui pourrait à priori nous faire penser à une structure cyclique.

Les spectres RMN proton, carbone et phosphore de **Psp3** (92) révèlent la présence des éléments suivants :

- 10 carbones sp^2 (δ_{H} 6,8-5,4 ppm ; δ_{C} 137-125 ppm), qui suggèrent la présence de 5 doubles liaisons. Elles correspondent aux 5 centres d'insaturation de la molécule et donc la structure est bien linéaire,
- 25 carbones sp^3 , dont dix sont déblindés (δ_{H} 4,5 - 3,2 ppm), suggérant leur liaison à des hétéroatomes de type azote et oxygène,
- Deux phosphores (δ_{P} 0,1 et -0,5 ppm).

Une analyse fine des différentes données spectrales (SMHR, RMN 1D et 2D), nous ont permis de décomposer la structure de **Psp3** (92) en 5 fragments (F1-F4, figure 46).

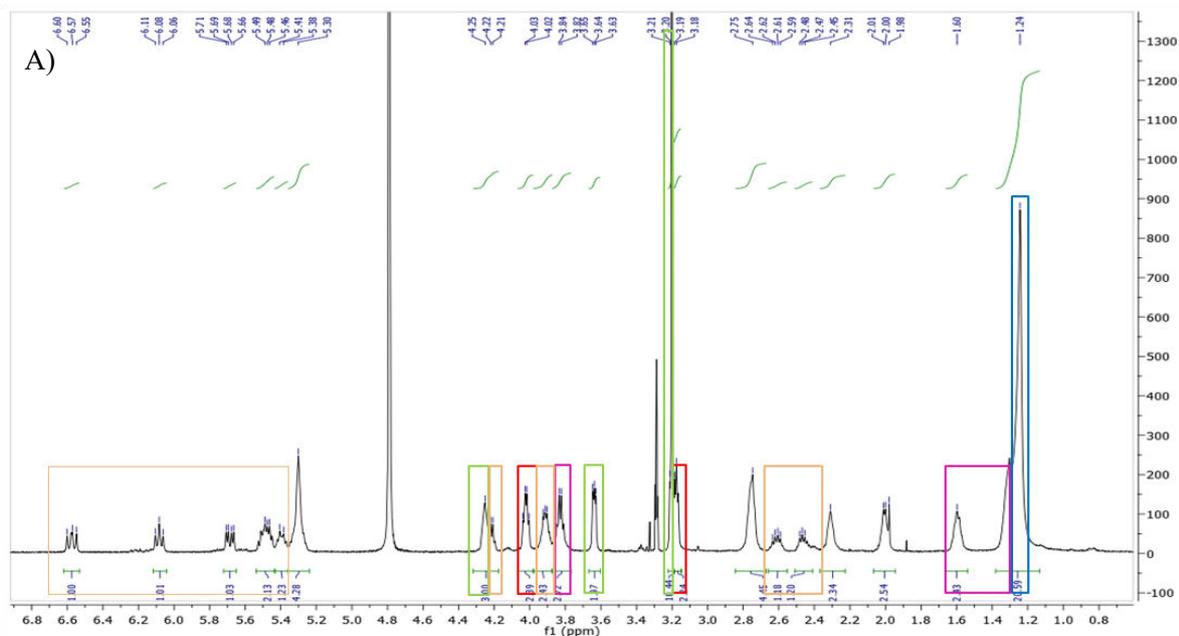


Figure 46. (A) Spectre RMN ^1H (500 MHz) de Psp3 (D₂O) et (B) structure et corrélations RMN 2D principales pour les fragments F1-F4 associés.

B)

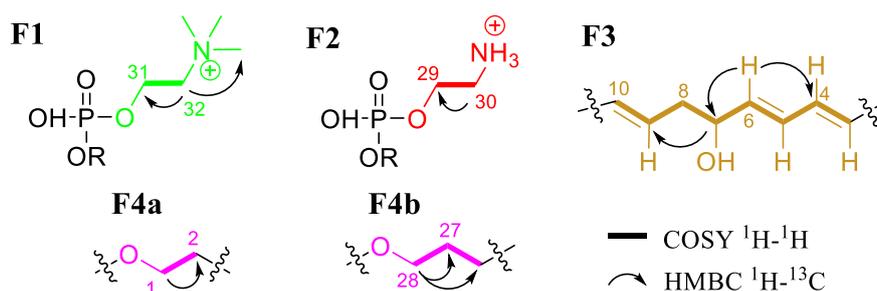


Figure 46 (suite). (A) Spectre RMN ^1H (500 MHz) de **Psp3** (D_2O) et (B) structure et corrélations RMN 2D principales pour les fragments F1-F4 associés.

Fragments F1 et F2

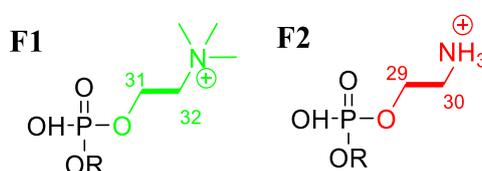


Figure 47. Structures des fragments F1 et F2.

Les analyses par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif en tandem HRESI(+)/SM/SM menées sur le composé **Psp3** (**92**) ont révélé la présence d'ions de m/z 86, 104 et 184 uma caractéristiques d'un groupement phosphocholine (figure 48). Par ailleurs, la perte d'un fragment neutre de 141 uma suggère la présence potentielle d'un groupement phosphoéthanolamine.

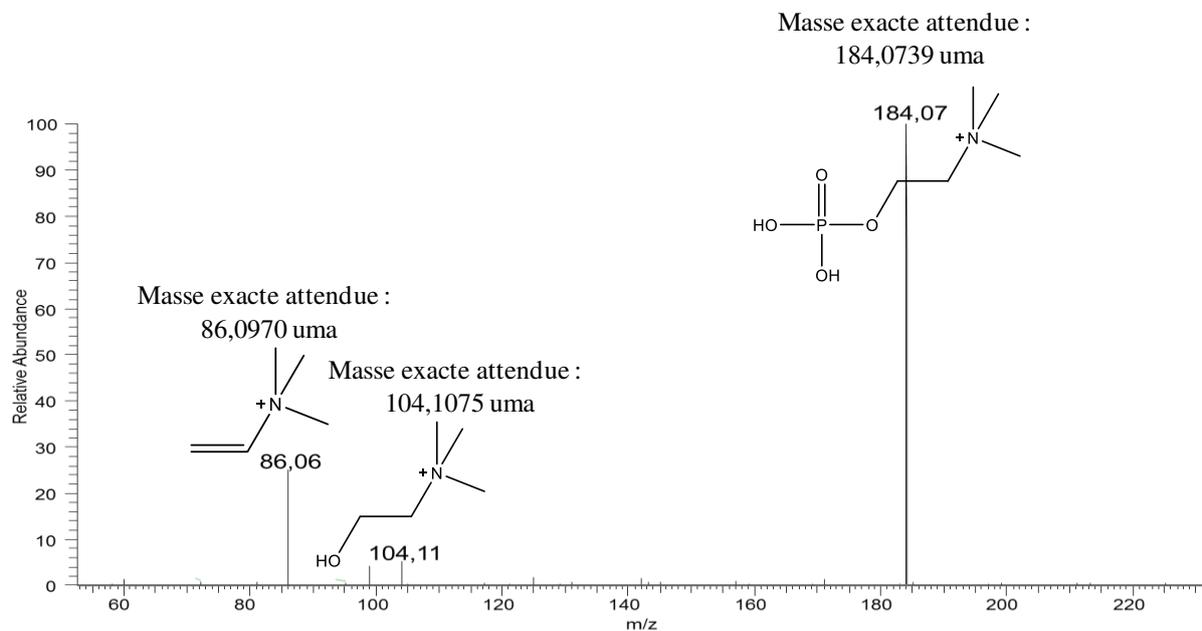


Figure 48. Agrandissement du spectre de masse en tandem (SM/SM) de l'ion de m/z 721.

Par la suite la présence des groupements phosphoéthanolamine (F1) et phosphocholine (F2) a été confortée par les analyses de RMN mono- et bidimensionnelles (expériences RMN ^1H , ^{13}C , COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C). Ainsi :

- Les signaux dans le spectre RMN ^1H à δ_{H} 4,03 (2H, *m*, H-29) et entre 3,20 et 3,18 ppm (2H, *m*, H-30), qui présentent des corrélations dans le spectre RMN COSY ^1H - ^1H (figure 49), sont caractéristiques de la chaîne éthyle du groupement phosphoéthanolamine (figure 47),
- Les signaux dans le spectre RMN ^1H à δ_{H} 4,25 (2H, *s*, H-31) et 3,64 ppm (2H, *m*, H-32), de surcroît corrélés dans le spectre RMN COSY ^1H - ^1H (figure 49), sont caractéristiques de la chaîne éthyle du fragment phosphocholine (figure 47). Par ailleurs, les corrélations dans le spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C entre le méthylène à δ_{H} 4,25 (2H, *s*, H-31) et les trois méthyles à δ_{H} 3,20 ppm (3H, *s*, H-33), nous ont permis de placer le groupement triméthylammonium au niveau du fragment F2.

Ces deux fragments ne sont pas reliés entre eux.

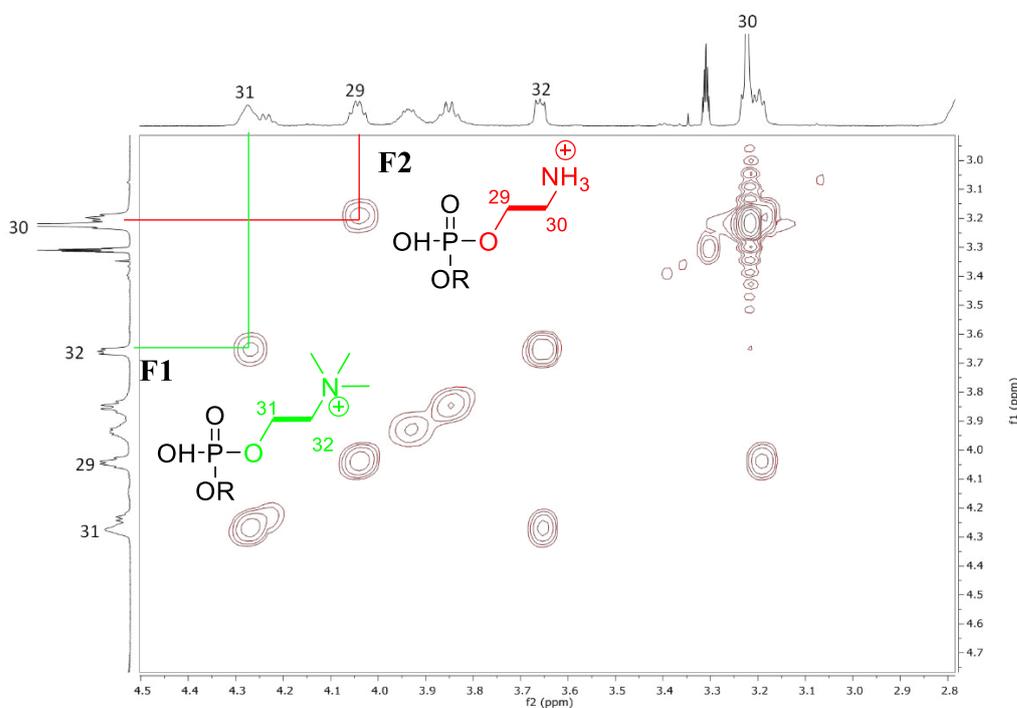


Figure 49. Agrandissement du spectre RMN COSY ^1H - ^1H de **Psp3** (D_2O , 500/500 MHz).

Fragment F3

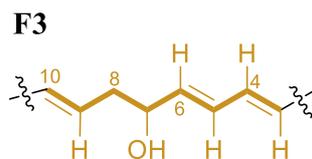


Figure 50. Structure du fragment F3.

Le fragment F3 peut être divisé en trois sous-unités : un diène 1,4-disubstitué, une unité méthylène-oxyméthylène et une double liaison (figure 50). Dans le spectre RMN ^1H , les signaux à δ_{H} 5,50 ppm

(1H, *m*, H-3), 6,08 ppm (1H, *t*, $J = 10,9$ Hz, H-4), 6,57 ppm (1H, *t*, $J = 11,1$ Hz, H-5) et 6,08 ppm (1H, *dd*, $J = 6,2$ Hz, $J = 10,9$ Hz, H-6) sont caractéristiques d'un diène 1,4-disubstitué. Par ailleurs, les signaux à δ_H 5,50 ppm (1H, *m*, H-9) et δ_H 5,48 ppm (1H, *m*, H-10) correspondent à une double liaison 1,2-disubstituée. Cette dernière et le diène 1,4-disubstitué sont séparés par une unité méthylène-oxyméthylène caractérisée par les signaux à δ_H 4,22 ppm (1H, *m*, H-7) et 2,31 ppm (2H, *s*, H-8). Les corrélations observées par RMN COSY ^1H - ^1H sont reportées à la figure 51.

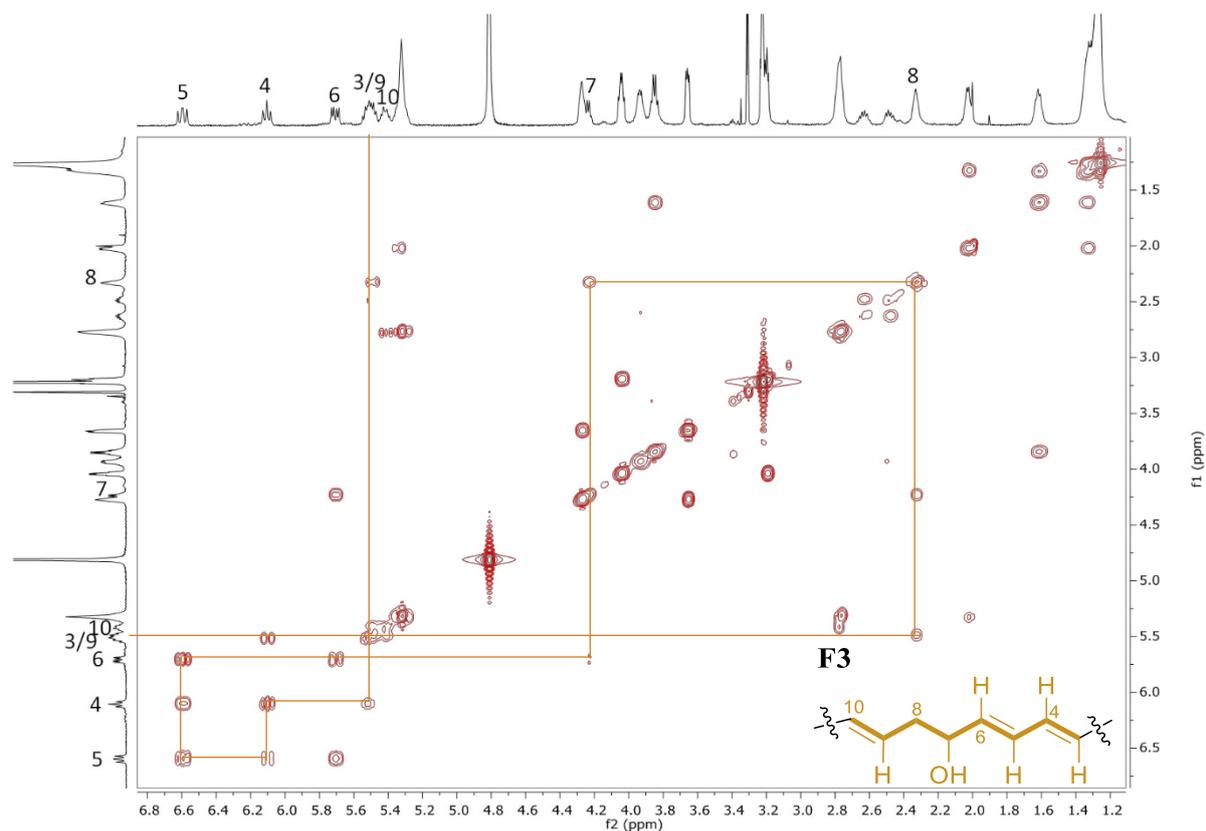


Figure 51. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H de **Psp3** (D_2O , 500/500 MHz).

Fragment F4

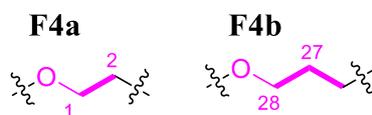


Figure 52. Structures des fragments F4a et F4b.

Pour le fragment F4a, le signal déblindé à δ_H 3,92 ppm (2H, *m*, H-1), correspondant à un méthylène au voisinage immédiat d'un hétéroatome (en l'occurrence un oxygène), est corrélé dans les spectres RMN COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C à un second méthylène à δ_H 2,61 et 2,47 ppm (2H, *m*, H-2) caractéristique d'une unité éthyle (F4a, figure 52). De façon identique pour le fragment F4b, le signal déblindé à δ_H 3,83 ppm (2H, *m*, H-28) est corrélé dans les spectres RMN COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C au méthylène H_2 -27 à δ_H 1,6 ppm (2H, *m*) ainsi qu'aux méthylènes H_2 -25 et H_2 -26 à δ_H 1,6 ppm (4H, *m*, H-25/H-26) caractéristique d'une unité propyle (F4b, figure 52). Pour chacun de ces fragments et pour satisfaire la

formule brute, l'oxygène est lié à un des deux phosphores. Ces deux fragments ne sont pas reliés entre eux.

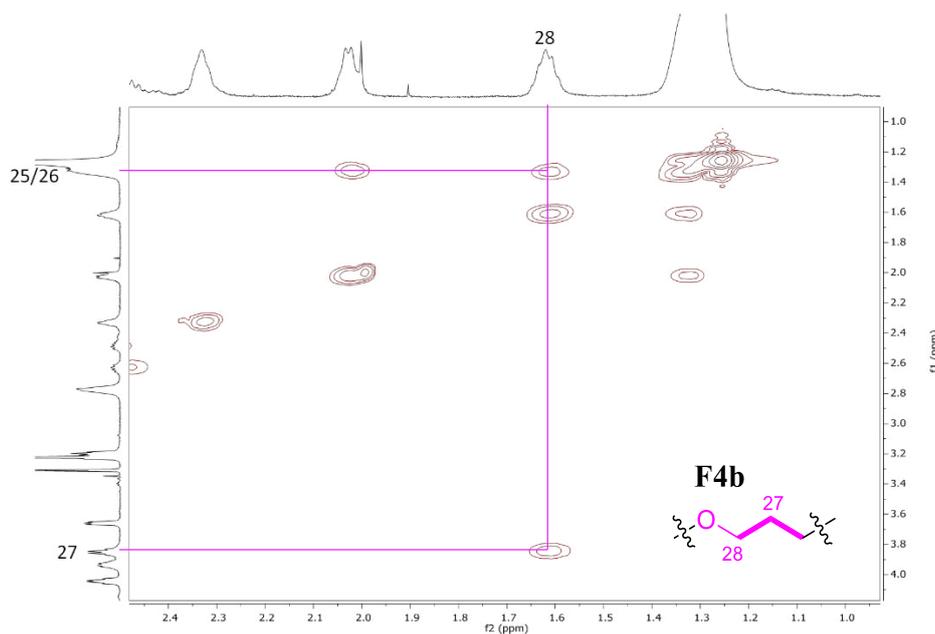


Figure 53. Agrandissement du spectre RMN COSY ^1H - ^1H de **Psp3** (D_2O , 500/500 MHz).

Proposition de structure

En se basant sur les différentes expériences de RMN 2D (COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C), la connexion des fragments F1 à F4 aux autres groupements a pu être réalisée (figure 54).

Dans le spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C , on observe une corrélation entre les protons à δ_{H} 3,92 ppm (2H, *m*, H-1) et le carbone à δ_{C} 128,7 ppm (1C, C-3) et entre les protons à δ_{H} 2,61 et 2,47 ppm (2H, *m*, H-2) et le carbone à δ_{C} 128,7 ppm (1C, C-3), ce qui nous a permis de lier le fragment F4 au fragment F5a.

La structure des fragments F1-F4 étant élucidée, l'ensemble des hétéroatomes ont été placés. Ceci nous permet de compléter la structure avec 4 autres protons éthyléniques portés par des carbones sp^2 , impliqués dans des doubles liaisons (C_4H_4). Tous résonnent à δ_{H} 5,3 ppm sous la forme d'un signal large d'intégration 4 (H-(12/13), H-(15/16)). Les corrélations entre les protons à δ_{H} 5,48 ppm (1H, *m*, H-10) et à δ_{H} 2,75 ppm (2H, *s*, H-11), entre les protons à δ_{H} 5,30 ppm (2H, *s*, H-12-13) et à δ_{H} 2,75 ppm (2H, *s*, H-14) et entre les protons à δ_{H} 2,75 ppm (2H, *s*, H-14) et à δ_{H} 5,30 ppm (2H, *s*, H-15-16) nous permettent de lier ces protons éthyléniques au fragment F4. Dans le spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C , les corrélations entre les protons à δ_{H} 2,75 ppm (2H, *s*, H-11/14) et les carbones à δ_{C} 130,6 et 129,0 ppm (2C, C-15, C-16) viennent confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, l'étude du spectre de RMN ^1H a également permis de déceler la présence d'une longue chaîne aliphatique saturée entre 1,30 et 1,20 ppm. Afin de satisfaire la formule brute, il s'agit d'une chaîne aliphatique insaturée composée de sept méthylènes (*m*, H-18-26). Elle relie le précédent enchaînement de fragments avec le fragment F5b. En effet, ce sont les corrélations par RMN COSY ^1H -

^1H observées entre les protons à δ_{H} 5,30 ppm (2H, *s*, H-15/16) et δ_{H} 2,00 ppm (2H, *m*, H-17) puis entre les protons à δ_{H} 2,00 ppm (2H, *m*, H-17) et entre δ_{H} 1,30 et 1,20 ppm (*m*, H-18-26) d'une part et les corrélations entre les protons à δ_{H} 3,83 ppm (2H, *m*, H-28) et les carbones entre δ_{C} 30,8 et 29,2 ppm (7C, C-18-24) et entre les protons à δ_{H} 3,83 ppm (2H, *m*, H-28) et les carbones à δ_{C} 26,8 ppm (2C, C-25-26) d'autre part, qui permettent de le vérifier.

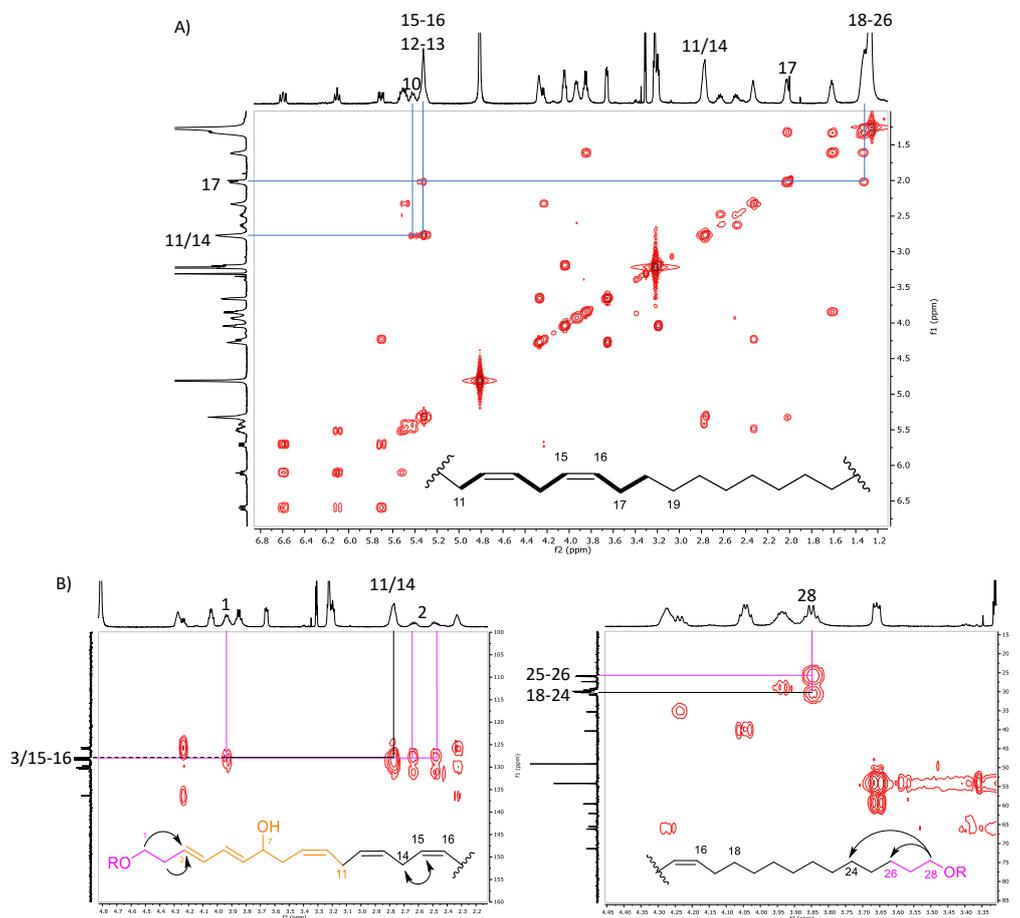


Figure 54. Agrandissements des spectres RMN : (A) COSY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) et (B) HMBC ^1H - ^{13}C (D_2O , 500/125 MHz) de **Psp3**.

Ces corrélations laissent seulement une incertitude concernant la position des fragments F1 et F2 : la phosphocholine et la phosphoéthanolamine. Deux hypothèses pour la structure de **Psp3** (**92**) ont été envisagées (figure 55).

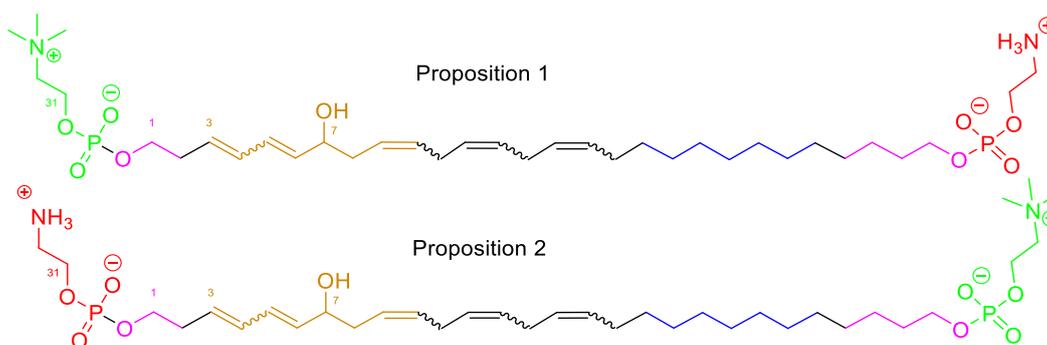


Figure 55. Structures possibles pour **Psp3** (**92**).

L'étude du spectre RMN HMBC ^1H - ^{31}P (figure 56) permet de relier un premier phosphore aux protons à δ_{H} 3,92 ppm (2H, *m*, H-1) du fragment F5a et aux protons à δ_{H} 4,25 ppm (2H, *s*, H-31) et 3,64 ppm (2H, *m*, H-32) de la fonction triméthylammonium du fragment F2. Le deuxième phosphore est corrélé aux protons à δ_{H} 3,83 ppm (2H, *m*, H-28) du fragment F5b et aux protons à δ_{H} 4,03 ppm (2H, *m*, H-29) de la fonction éthanolamine du fragment F1. Le composé **Psp3** (**92**) correspond donc à la première structure proposée à la figure 55.

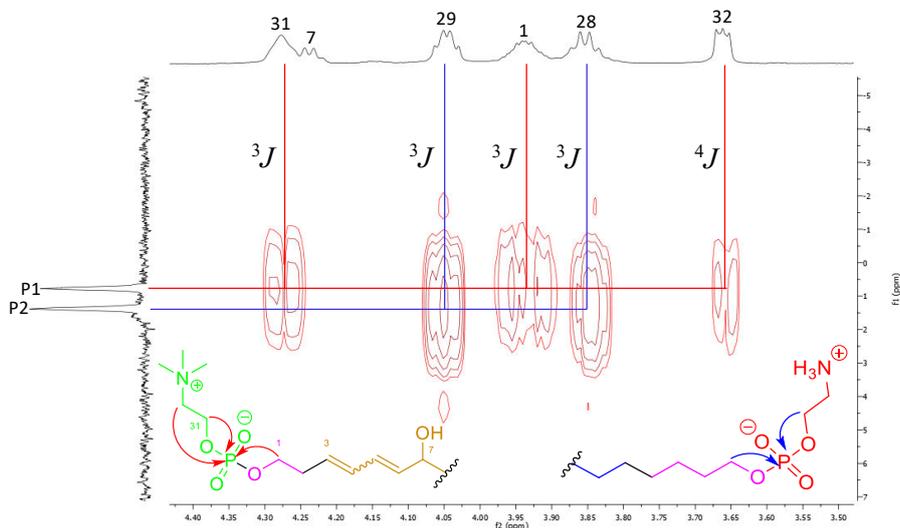


Figure 56. Agrandissement du spectre RMN HMBC ^1H - ^{31}P de **Psp3** (D_2O , 200 MHz).

Stéréochimie

La configuration des doubles liaisons a pu être déterminée, soit par mesure directe des constantes de couplages entre les protons éthyléniques ($6 < Z < 12 \text{ Hz}$; $11 < E < 18 \text{ Hz}$), soit indirectement en se basant sur les déplacements chimiques de méthylènes situés en α des protons éthyléniques (E : $\delta_{\text{C}} > 30 \text{ ppm}$; Z : $\delta_{\text{C}} < 30 \text{ ppm}$). Les doubles liaisons (Δ^{3-4}) et (Δ^{5-6}) sont de configuration *E* puisque les constantes de couplage 3J mesurées sont de 11 et 15 Hz, respectivement. Les doubles liaisons (Δ^{9-10}), (Δ^{12-13}), (Δ^{15-16}) sont de configuration *Z* car les carbones sp^3 adjacents sont situés à δ_{C} 26,6 ppm ($\delta_{\text{C}-11}$ et $\delta_{\text{C}-14}$) et 28,2 ppm ($\delta_{\text{C}-17}$) dans le spectre RMN carbone. A noter que le carbone C-8 ne peut pas être pris en compte puisqu'il est à proximité d'un hétéroatome.

Des études par dichroïsme circulaire ont été menées afin de tenter de déterminer la stéréochimie de la position C-7. En raison de la grande flexibilité moléculaire, les spectres de dichroïsme circulaire ne présentent pas d'effet Cotton significatif et ne peuvent donc nous renseigner sur la configuration absolue de la position C-7. Par ailleurs, il est fortement probable que le composé **Psp3** (**92**) soit structuré en solution (sous forme d'agrégats) ce qui nous empêche d'aller plus avant dans la stéréochimie avec cette méthode. La recherche d'une organisation supramoléculaire par différentes techniques physico-chimiques sera également réalisée. D'autres études basées notamment sur la méthode de Möscher sont en cours pour déterminer la configuration de la position C-7.

La structure de **Psp3** (**92**) est donc bien celle présentée à la figure 57. Il s'agit d'un métabolite de type bolaamphiphile isolé pour la première fois. Par la suite, les métabolites appartenant à cette famille de composés seront désignés par le nom « bolascidine ».

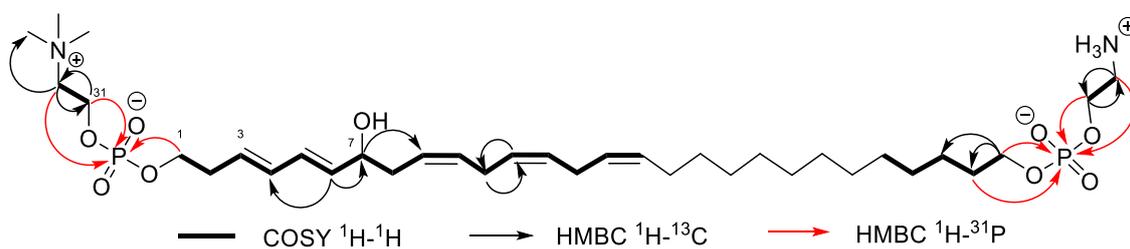


Figure 57. Structure et corrélations RMN 2D de **Psp3** (**92**).

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives à la bolascidine C (**92**) est regroupé dans le tableau 12.

Tableau 12. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C et ^{31}P) et 2D (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) du composé **Psp3** (D_2O , 500/125/200 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$	δ_{P} (ppm)
P1	-	-	-	-	0,1
P2	-	-	-	-	-0,5
1	66,3, CH ₂	3,92, <i>m</i>	2	-	-
2	30,0, CH ₂	2,61, <i>m</i>	1, 3	-	-
2'		2,47, <i>m</i>	1,3	-	-
3	128,7, CH	5,50, <i>m</i>	2, 4	-	-
4	131,7, CH	6,08, <i>t</i> , 10,9	3, 5	-	-
5	126,5, CH	6,57, <i>t</i> , 11,1	4, 6	-	-
6	137,2, CH	5,69, <i>dd</i> , 6,2, 15,2	5, 7	4, 7	-
7	72,3, CH	4,22, <i>m</i>	6, 8	9	-
8	36,1, CH ₂	2,31, <i>bs</i>	7, 9	-	-
9	126,7, CH	5,50, <i>m</i>	8	-	-
10	131,0, CH	5,48, <i>m</i>	11/14	-	-
11	26,6, CH ₂	2,75, <i>bs</i>	10, 12-13/15-16	12-13/15-16	-
12, 13	129,0 ^a , CH	5,30, <i>bs</i>	11/14, 24	11/14	-
14	26,6, CH ₂	2,75, <i>bs</i>	10, 12-13/15-16	12-13/15-16	-
15, 16	130,6 ^a , CH	5,30, <i>bs</i>	11/14, 24	11/14	-
17	28,2, CH ₂	2,00, <i>m</i>	12-13/15-16, 25/26	-	-
18 - 24	30,8-29,2, CH ₂	1,25-1,20, <i>m</i>	-	-	-
25, 26	26,8, CH ₂	1,25-1,30, <i>m</i>	24, 27	-	-
27	31,7, CH ₂	1,60, <i>m</i>	25/26, 28	-	-
28	67,0, CH ₂	3,83, <i>m</i>	27	27, 28	-
29	63,1, CH ₂	4,03, <i>m</i>	30	30	-
30	41,3, CH ₂	3,21-3,18, <i>m</i>	29	29	-
31	60,4, CH ₂	4,25, <i>bs</i>	32	32	-
32	66,3, CH ₂	3,64, <i>m</i>	31	31, 33	-
33	55,0, CH ₃	3,20, <i>s</i>	-	-	-

^a signaux interchangeables

III.2.2. Structure de Psp4

Le composé **Psp4** (**93**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc. Sa formule brute, $\text{C}_{32}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)-SM (ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 679,3836 ; $\Delta\text{ppm} = 2,4$).

L'étude des données spectrales (SMHR, RMN) nous a conduit à la structure de la bolascidine D (figure 58).

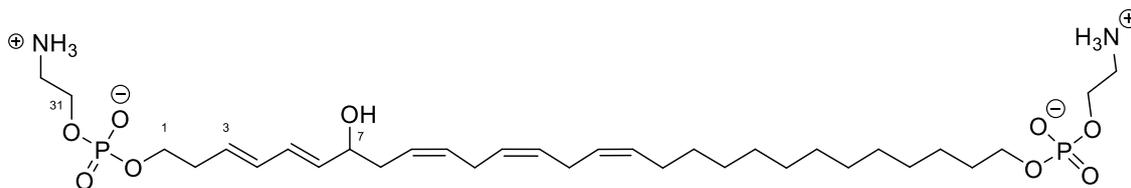


Figure 58. Structure de la bolascidine D (**Psp4**, **93**).

L'analyse des données spectrales du composé **Psp4** (**93**) nous a permis d'identifier une majorité de groupements fonctionnels identiques à ceux du composé **Psp3** (**92**). Ces deux métabolites sont très proches du point de vue structural et appartiennent à la même famille. Ils présentent une différence de masse de 42 uma. D'après la formule brute, **Psp4** (**93**) contient également 5 centres d'insaturation. Pour les mêmes raisons que pour **Psp3** (**92**), une structure linéaire est proposée.

Une étude approfondie des spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P de **Psp4** (**93**) révèle la présence des éléments suivants :

- 10 carbones sp^2 (δ_{H} 6,8-5,4 ppm ; δ_{C} 137-125 ppm), qui suggèrent la présence de 5 doubles liaisons,
- 22 carbones sp^3 , dont sept sont déblindés (δ_{H} 4,5 - 3,2 ppm), suggérant leur liaison à des hétéroatomes de type azote et oxygène,
- Un seul type de phosphore (δ_{P} 4,6 ppm), bien que la formule brute en indique deux, ce qui constitue la première différence avec **Psp3** (**92**).

L'ensemble des données spectrales nous a permis d'identifier la structure de **Psp4** (**93**). D'après ces données, les fragments F1, F3, F4a et F4b sont identiques à ceux déjà décrits pour **Psp3** (**92**).

Le spectre SM/SM associé à l'ion pseudomoléculaire de m/z 679,3836 enregistré en mode positif montre une perte de neutre de 18 uma. Ce phénomène suggère la présence du même type de fonction alcool également observé dans le cas de **Psp3** (**92**). De façon identique, la perte de neutre de 141 uma suggère la présence potentielle d'un fragment phosphoéthanolamine. En revanche, les ions de m/z 86, 104 et 184 uma, caractéristiques de la présence de phosphocholine, sont absents.

La comparaison des spectres RMN ^1H pour les composés **Psp3** (**92**) et **Psp4** (**93**) confirme l'absence d'une fonction phosphocholine (fragment F2), en faveur d'une deuxième fonction phosphoéthanolamine (fragment F1) dans la molécule. En effet, les deux signaux d'intégration 2 à δ_{H} 4,25 et 3,64 ppm de la phosphocholine ne sont plus observés, tandis que les signaux associés au fragment phosphoéthanolamine présente une intégration de 4 (figure 59). Par ailleurs, la présence de deux fragments phosphoéthanolamine dans des environnements relativement proches explique également le signal unique observé dans le spectre RMN ^{31}P .

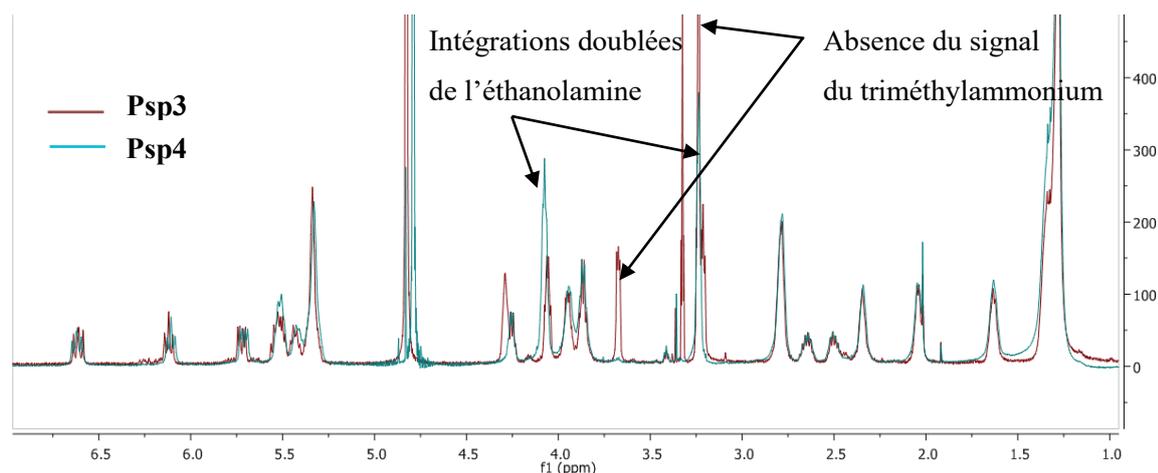


Figure 59. Superposition des spectres RMN ^1H des composés **Psp3** et **Psp4** (D_2O , 500 MHz).

Le composé **Psp4** (**93**) peut être considéré comme le dérivé diphosphoéthanolamine de **Psp3** (**92**) (figure 58). Il s'agit également d'un métabolite de type bolaamphiphile isolé pour la première fois.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives à la bolascidine D (**93**) est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C et ^{31}P) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) du composé **Psp4** (D_2O , 500/125/200 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C	δ_{P} (ppm)
P1/P2	-	-	-	-	4,6
1	66,4, CH ₂	3,88, <i>m</i>	-	-	-
2	30,0, CH ₂	2,60, <i>m</i>	2'	-	-
2'		2,46, <i>m</i>	2	-	-
3	130,6, CH	5,48, <i>m</i>	4	-	-
4	131,2, CH	6,06, <i>t</i> , 10,9	3, 5	-	-
5	126,5, CH	6,57, <i>t</i> , 13,0	4, 6	-	-
6	137,2, CH	5,66, <i>dd</i> , 6,1, 15,1	5, 7	4, 7	-
7	72,3, CH	4,21, <i>m</i>	8	10	-
8	36,1, CH ₂	2,29, <i>bs</i>	7, 9	-	-
9	130,6, CH	5,48, <i>m</i>	8	-	-
10	126,8, CH	5,37, <i>m</i>	9, 11/14	-	-
11	26,6, CH ₂	2,74, <i>bs</i>	10, 12-13/15-16	12-13/15-16	-
12	128,8 ^a , CH	5,27, <i>bs</i>	11/14, 24	-	-
13	129,0 ^a , CH				
14	26,6, CH ₂	2,74, <i>bs</i>	10, 12-13/15-16	12-13/15-16	-
15	129,3 ^b , CH	5,27, <i>bs</i>	11/14, 24	-	-
16	130,9 ^b , CH				
17	28,2, CH ₂	1,99, <i>m</i>	12-13/15-16, 25/26	-	-
18 - 24	31,1-30,5, CH ₂				
25	26,8 ^c , CH ₂	1,38-1,14, <i>m</i>	24, 27	-	-
26	26,9 ^c , CH ₂				
27	31,7, CH ₂	1,58, <i>m</i>	25/26, 28	-	-
28	67,2, CH ₂	3,82, <i>m</i>	27	27	-
29	63,1, CH ₂	4,03, <i>m</i>	30	30	-
30	41,3, CH ₂	3,19, <i>bs</i>	29	29	-
31	62,9, CH ₂	4,03, <i>m</i>	32	32	-
32	54,6, CH ₂	3,19, <i>bs</i>	31	31	-

^{a,b,c} signaux interchangeables

III.2.3. Structures de Psp1 et Psp2

De façon identique aux composés **Psp3** (92) et **Psp4** (93), les structures des composés **Psp1** (94) et **Psp2** (95) ont principalement été déduites de l'analyse fine des données obtenues par spectrométrie de masse et RMN.

Le composé **Psp1** (94) a été isolé sous la forme d'un solide blanc. Sa formule brute, $C_{33}H_{65}N_2O_9P_2$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)-SM (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de m/z 695,4148 ; $\Delta ppm = 1,9$).

L'étude des données spectrales (SMHR, RMN) nous a permis d'identifier la structure de la bolascidine A (94) (figure 60).

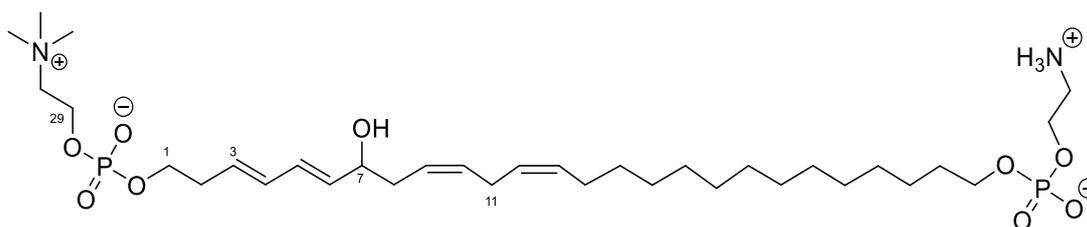


Figure 60. Structure de **Psp1** (94).

L'analyse des données spectrales du composé **Psp1** (94) nous a permis d'identifier une majorité de groupements fonctionnels identiques à ceux du composé **Psp3** (92). Ces deux métabolites sont très proches du point de vue structural et appartiennent à la même famille. Ils présentent une différence de masse de 26 uma. D'après la formule brute, cette molécule contient 4 centres d'insaturation, soit une de moins comparativement à **Psp3** (92) et **Psp4** (93). Pour les mêmes raisons que pour les composés **Psp3** (92) et **Psp4** (93), une structure linéaire est proposée.

Les spectres RMN 1H et ^{31}P de **Psp1** (94) révèlent la présence d'éléments similaires à ceux du composé **Psp3** (92) :

- Plusieurs protons éthyléniques (δ_H 6,8 - 5,4 ppm),
- De nombreux méthylènes, dont sept sont déblindés (δ_H 4,5 - 3,2 ppm), suggérant leur liaison à des hétéroatomes de type azote et oxygène,
- Deux phosphores (δ_P 0,1 et -0,5 ppm).

L'ensemble des données spectrales nous ont permis d'identifier la structure du composé **Psp1** (94), constitué des 5 fragments F1-F4 déjà décrits pour le composé **Psp3** (92).

Le spectre SM/SM associé à l'ion pseudomoléculaire enregistré en mode positif montre une perte de neutre de 18 uma. Ce phénomène suggère la présence du même type de fonction alcool précédemment observé. De la même manière, la perte d'un fragment neutre de 141 uma suggère la présence potentielle de phosphoéthanolamine (fragment F1) et les ions de m/z 86, 104 et 184 uma, sont significatifs d'un fragment phosphocholine (fragment F2).

La structure du composé **Psp1** (94) est fortement liée à celle de **Psp3** (92). Ils ne diffèrent que d'une double liaison (2 carbones sp^2 , 2 protons éthyléniques et une insaturation en moins). En effet, le signal

d'intégration 4 dans le spectre RMN ^1H du composé **Psp1** (**94**) associé aux protons H-(12-13) et H-(15-16) à δ_{H} 5,29 ppm, n'intègre désormais que pour 2 (figure 61).

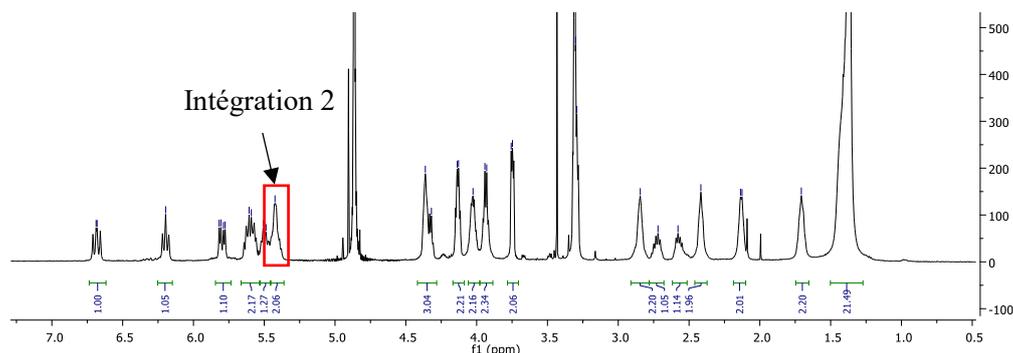


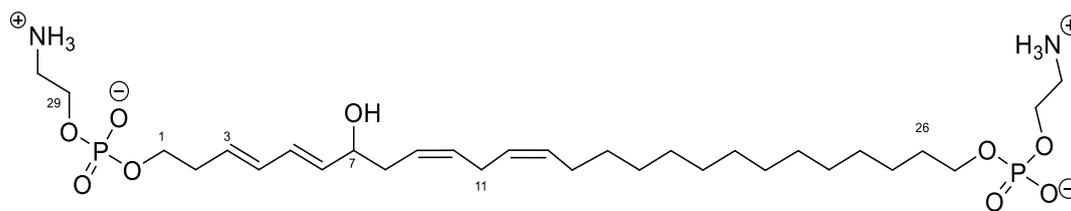
Figure 61. Spectre RMN ^1H de **Psp1** (D_2O , 500 MHz).

Le composé **Psp1** (**94**) correspond finalement à la structure de la bolascidine A présentée à la figure 60, qui ne présente pas de double liaison entre les positions 15 et 16 par rapport au composé **Psp3** (**92**). Les données RMN ^1H du composé **Psp1** (**94**) sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14. Données RMN ^1H et ^{31}P du composé **Psp1** (D_2O , 500/200 MHz).

N°	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	δ_{P} (ppm)
P1	-	0,1
P2	-	-0,5
1	3,89, <i>m</i>	-
2	2,58, <i>m</i>	-
2'	2,44, <i>m</i>	-
3	5,46, <i>m</i>	-
4	6,06, <i>t</i> , 10,9	-
5	6,55, <i>t</i> , 13,0	-
6	5,66, <i>dd</i> , 6,3, 15,1	-
7	4,19, <i>bs</i>	-
8	2,28, <i>bs</i>	-
9	5,46, <i>m</i>	-
10	5,36, <i>m</i>	-
11	2,71, <i>bs</i>	-
12, 13	5,29, <i>m</i>	-
14	2,71, <i>bs</i>	-
15 - 21	1,34-1,18, <i>m</i>	-
22	1,99, <i>bs</i>	-
23, 24	1,34-1,18, <i>m</i>	-
25	1,57, <i>m</i>	-
26	3,80, <i>m</i>	-
27	4,00, <i>m</i>	-
28	3,17, <i>bs</i>	-
29	4,23, <i>m</i>	-
30	3,61, <i>m</i>	-
31	3,17, <i>m</i>	-

Le composé **Psp2** (**95**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc. Sa formule brute, $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)/SM (ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 653,3681 ; $\Delta_{\text{ppm}} = 0,9$). L'étude des données spectrales (SMHR, RMN) nous a permis d'identifier la structure de la bolascidine B pour **Psp2** (**95**) (figure 62).

Figure 62. Structure de **Psp2 (95)**.

L'analyse des données spectrales du composé **Psp2 (95)** a conduit à l'identification d'une majorité de groupements fonctionnels identiques à ceux observés pour les autres composés isolés. Le spectre RMN ^1H de **Psp2 (95)** révèle la présence de groupements identiques à ceux présents dans **Psp1 (94)** et le spectre RMN ^{31}P contient un signal unique comme observé pour **Psp4 (93)** (δ_{P} à 0 ppm). Les métabolites **Psp2 (95)** et **Psp4 (93)** sont structurellement très proches. Ils présentent une différence de masse de 26 uma qui correspond à une double liaison (2 carbones sp^2 , 2 protons éthyléniques et une insaturation en moins). D'après la formule brute, la molécule **Psp2 (95)** contient 4 centres d'insaturation. Pour les mêmes raisons que pour **Psp1 (94)**, **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)**, une structure linéaire est proposée. Le composé **Psp2 (95)** correspond finalement à la structure de la bolascidine B présentée à la figure 62 par analogie à **Psp1 (94)**. Elle possède une double liaison en moins entre les positions 15 et 16 par rapport à **Psp4 (93)**.

Les données RMN ^1H de **Psp2 (95)** sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15. Données RMN ^1H et ^{31}P du composé **Psp2** (D_2O , 500/200 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	δ_{P} (ppm)
P1/P2	-	-	0
1	66,7, CH ₂	3,89, <i>m</i>	-
2	29,4, CH ₂	2,59, <i>m</i>	-
2'		2,46, <i>m</i>	-
3	130,7, CH	5,46, <i>m</i>	-
4	130,2, CH	6,06, <i>t</i> , 11,0	-
5	126,1, CH	6,57, <i>t</i> , 13,0	-
6	136,3, CH	5,66, <i>dd</i> , 6,2, 14,9	-
7	71,5, CH	4,20, <i>m</i>	-
8	35,5, CH ₂	2,29, <i>bs</i>	-
9	125,9, CH	5,46, <i>m</i>	-
10	130,2, CH	5,36, <i>m</i>	-
11	[26,3-26,2], CH ₂	2,72, <i>bs</i>	-
12, 13	128,3, CH	5,29, <i>bs</i>	-
14	[26,3-26,2], CH	2,72, <i>bs</i>	-
15 - 21	[31,0-30,1], CH ₂	[1,14-1,38], <i>m</i>	-
22	27,7, CH ₂	2,01, <i>bs</i>	-
23, 24	[26,3-26,2], CH ₂	[1,14-1,38], <i>m</i>	-
25	31,1, CH ₂	1,59, <i>bs</i>	-
26	66,5, CH ₂	3,81, <i>m</i>	-
27, 29	62,3, CH ₂	4,02, <i>m</i>	-
28, 30	40,5, CH ₂	3,18, <i>m</i>	-

III.2.1. Déréplication sous le prisme du réseau moléculaire

De nos jours, la faible probabilité de trouver un métabolite nouveau et/ou dans des proportions suffisantes pour mener à bien la caractérisation structurale et entreprendre les évaluations biologiques associées constituent des obstacles majeurs dans la chimie des produits naturels. De plus, les molécules sont souvent isolées avec difficulté en raison de la complexité des extraits.

Pour pallier ces obstacles et optimiser la recherche de nouveaux produits naturels, la déréplication est devenue une méthode de choix couramment employée. Elle consiste à inventorier les molécules présentes dans un extrait complexe, avec une attention particulière pour les métabolites déjà recensés, avant de passer à l'étape d'isolement. Cette méthode est basée sur l'acquisition d'un ensemble de propriétés physico-chimiques associées aux métabolites afin de les comparer aux données de la bibliographie. Il est ainsi possible de mieux cibler les composés d'intérêt et d'optimiser le temps passé pour l'étape d'isolement. La méthode classique met principalement en jeu la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (MS), de préférence haute résolution (SMHR). Les résultats obtenus sont souvent analysés « manuellement » par l'opérateur qui, malgré son expertise, ne peut analyser de façon exhaustive les données générées. Une alternative consiste à utiliser des algorithmes dédiés qui permettent de comparer les résultats obtenus par spectrométrie de masse avec les données présentes dans les bases de données.

Dans le cas de l'analyse manuelle des données, une étude bibliographique est souvent nécessaire afin d'établir la liste des métabolites présents dans chaque espèce étudiée, à comparer avec les données obtenues par les analyses en laboratoire.

Plus récemment, une méthode de déréplication par algorithme a été mise au point et mise gratuitement en ligne sur la plateforme GNPS (disponible à l'adresse <https://gnps.ucsd.edu/>). Cette méthode, désignée par « réseaux moléculaires » ou « réseaux de similarité moléculaire » (*Molecular Networking* en anglais), permet de trouver rapidement les molécules répertoriées – dès lors qu'elles sont présentes dans les bases de données interrogées. Pour cela, les extraits sont d'abord analysés par spectrométrie de masse en tandem avant d'être comparés aux bases de données. Ces dernières renferment des données principalement expérimentales et/ou *in silico*.

Cette nouvelle approche a été développée par l'équipe de Pieter C. Dorrestein⁷⁷. Elle repose sur un principe relativement simple : les molécules proches du point de vue structural présentent des voies de fragmentation similaires par spectrométrie de masse en tandem avec des fragments ou des pertes de neutre(s) en commun. Les réseaux moléculaires (ou réseaux de similarité spectrale) permettent ainsi : (i) de détecter un ensemble d'analogues structuraux à partir du spectre SM/SM d'une molécule de référence ; (ii) d'identifier des groupes spectraux SM/SM ; et (iii) la comparaison fine entre les analyses

⁷⁷ a) Yang J. Y., Sanchez L. M., Rath C. M., Liu X., Boudreau P. D., Bruns N., Glukhov E., Wodtke A., de Felicio R., Fenner A. et al. 2013, Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.*, **76** (9), 1686–1699. b) Quinn R. A., Nothias L.-F., Vining O., Meehan M., Esquenazi E., Dorrestein P. C. 2017, Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **38** (2), 143–154.

SM/SM de différents échantillons. Sa puissance réside dans sa capacité à organiser les données y compris en condition *ex nihilo*, à savoir sans connaissance préalable de l'échantillon. Cette approche permet d'organiser et de visualiser les données obtenues par spectrométrie de masse tandem sous la forme d'une carte de similarité structurale permettant de mettre en lumière des groupes de molécules avec des degrés de similarité plus ou moins élevés. Chaque ion précurseur, associé à une molécule, est visualisé sous la forme d'un disque, désigné par « nœud ». Par la suite, l'algorithme, disponible en ligne gratuitement sur la plateforme GNPS, regroupe les composés similaires d'un extrait, en les organisant sous formes de groupes, désignés par « clusters ». Les bases de données utilisées sont soit expérimentales (NIST14, MASSBANK, NIH, bases de données privées...), soit issues d'études *in silico*⁷⁸ (figure 63).

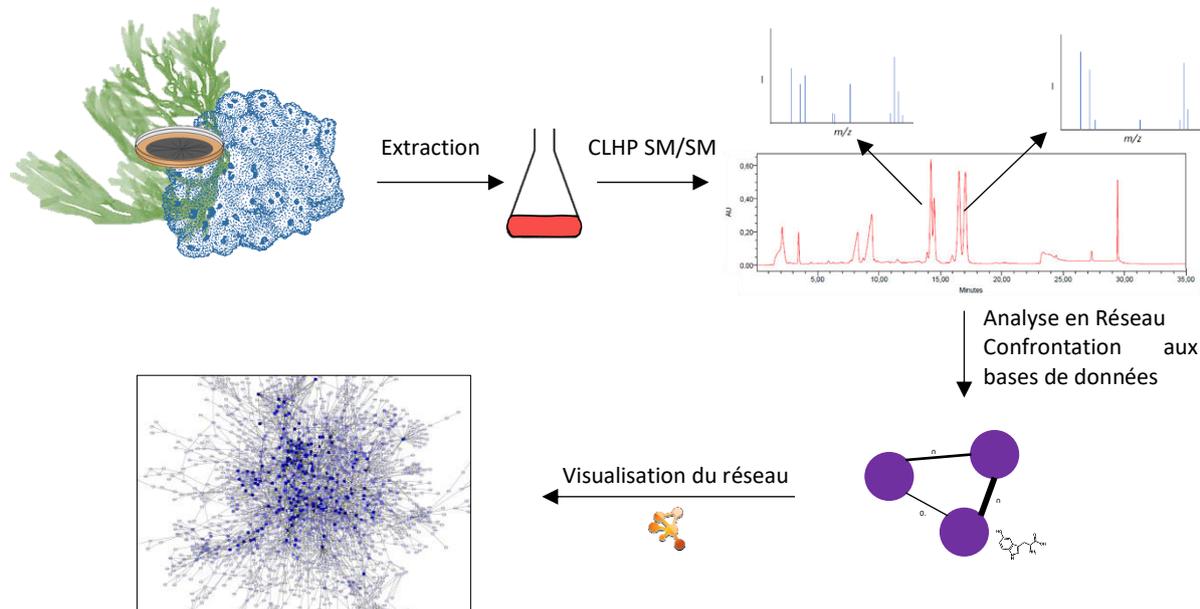


Figure 63. Principe des analyses par réseau de similarité moléculaire.

Dans le contexte de notre étude, nous nous sommes intéressés aux analogues structuraux des métabolites isolés. Les données CLHP-SMHR/SM associées à l'extrait brut organique de *Polysyncraton* sp. ont été analysées sur la plateforme GNPS et comparées à un ensemble de bases de données expérimentales. Le réseau moléculaire obtenu est constitué de 282 nœuds dont seulement 79 sont isolés. Parmi les nœuds observés, aucun ne correspond à l'un des composés déjà décrits dans la bibliographie pour le genre *Polysyncraton* sp. En revanche, une proposition de structure a pu être avancée pour seize composés par comparaison aux bases de données. Tous sans exception sont vraisemblablement des lipides saturés ou insaturés de type phosphocholine, présents dans un seul et même groupe de similarité spectrale (figure 64).

⁷⁸ Pour plus d'informations, se référer à la note d'application suivante : Nothias-Scaglia L.-F., Esposito M., Costa J., Paolini J., Touboul D., Litaudon M. 2015, Les réseaux moléculaires, une approche bio-informatique globale pour interpréter les données de spectrométrie de masse tandem. *Spectra Analyse*, Paris : PCI, **307**, 73–78.

Bien qu'il ne soit pas raisonnable d'affirmer uniquement sur la base des analyses par spectrométrie de masse qu'il s'agit bien de ces métabolites, il est en revanche intéressant de noter le fait qu'ils possèdent tous un groupement phosphocholine en commun.

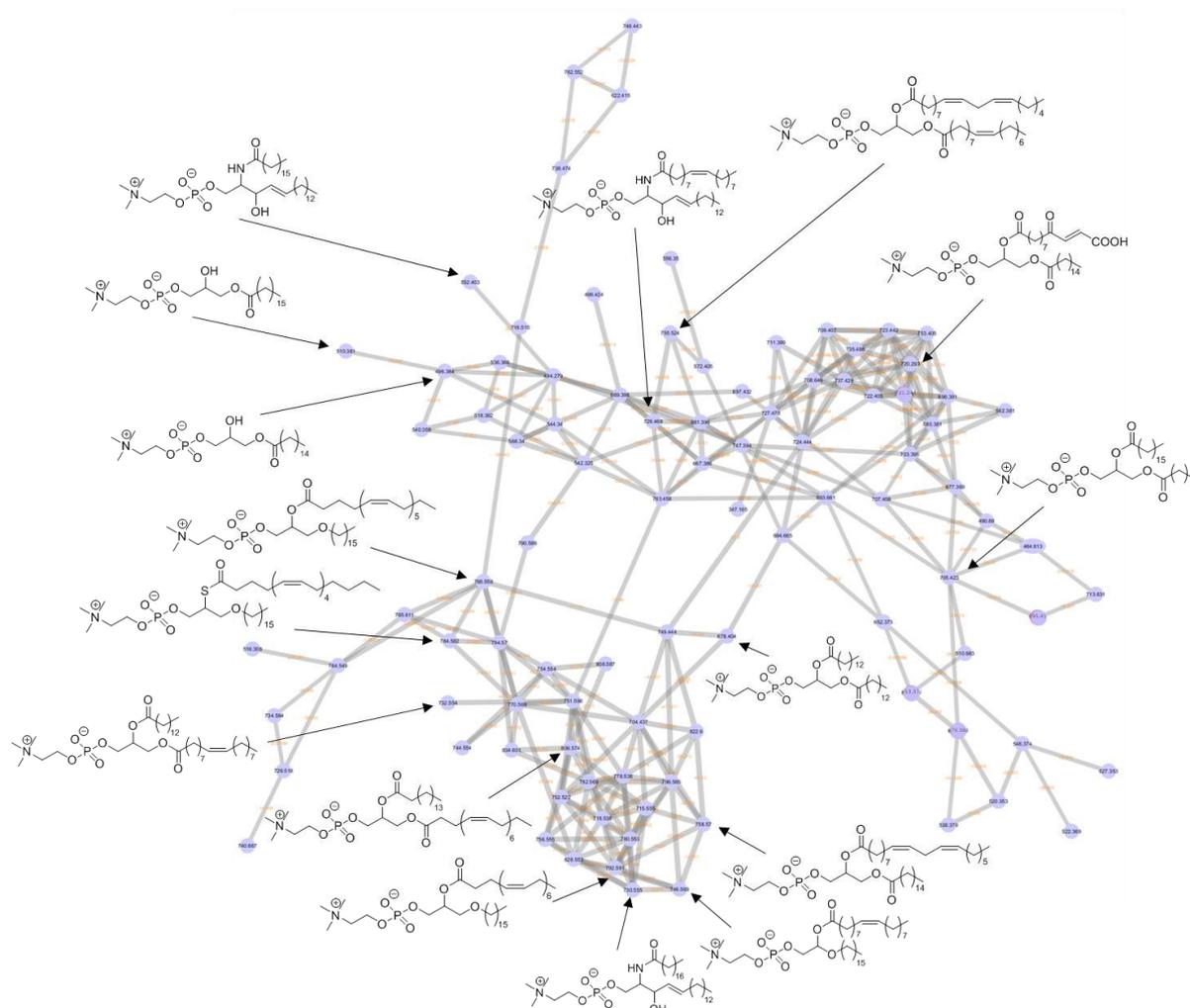


Figure 64. Sous-réseau de similarité spectrale provenant du réseau moléculaire de *Polysyncraton* sp.

Par la suite, nous avons placé les métabolites **Psp1-4 (92-95)** isolés sur le réseau moléculaire (figure 65) en nous basant sur les valeurs des rapports m/z et les spectres de masse associés.

Bien que les composés **Psp1-4 (92-95)** soient systématiquement constitués de deux groupements phosphocholine et/ou phosphoéthanolamine, ils forment un seul et même sous-réseau de similarité spectrale avec les phosphocholines décrites précédemment. Il s'agit d'un des biais des analyses par réseau de similarité moléculaire. Les composés **Psp2 (95)** et **Psp4 (93)** possèdent deux groupements phosphoéthanolamine. Les spectres de fragmentation SM/SM associés aux deux groupements phosphoéthanolamine donneront exactement les mêmes ions fragments. Il sera donc peu probable de déceler le fait que les molécules possèdent deux groupements communs *ex nihilo*.

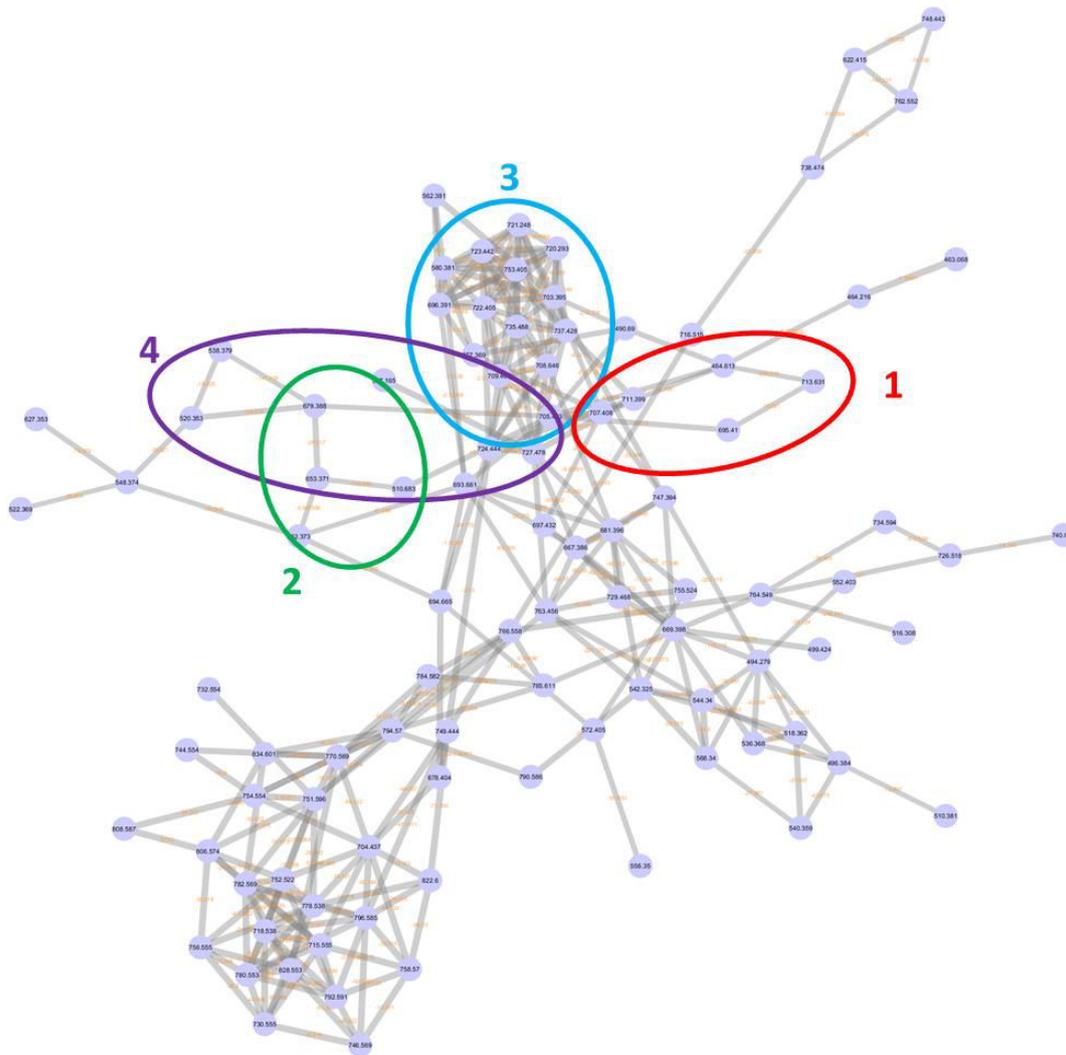


Figure 65. Sous-réseau de similarité spectrale correspondant aux zones de **Psp1-4** (1-4).

Il en est de même pour l'ensemble des phosphocholines. Il est important de noter qu'un minimum de 6 fragments communs entre les spectres de masse en tandem expérimentaux et ceux présents dans les bases de données est nécessaire pour l'attribution d'une structure à un nœud (paramètres de l'analyse en réseau réalisée). Il est donc possible qu'un des deux groupements, phosphoéthanolamine ou phosphocholine, ne soient pas pris en compte lors de la comparaison avec les bases de données. Cet aspect constitue un autre biais important de l'analyse. Dans ce cas, seul l'isolement et la caractérisation des métabolites permet d'avoir une connaissance précise de la structure des molécules présentes dans l'extrait.

Par la suite, nous avons pu émettre quelques hypothèses de structure pour les métabolites présents de façon minoritaire dans l'extrait brut organique de *Polysyncraton* sp. (figure 66).

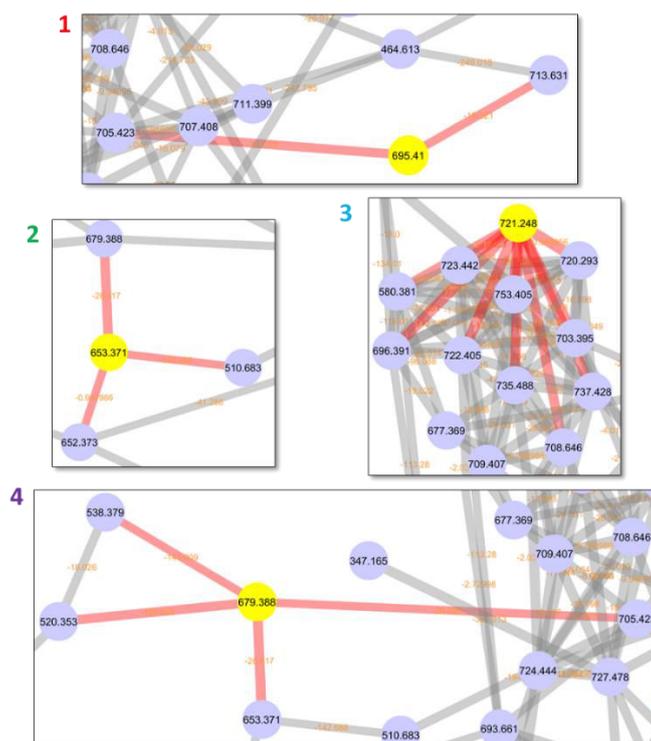


Figure 66. Agrandissement du réseau sur (1) Psp1, (2), Psp2, (3), Psp3 et (4) Psp4.

Ainsi, à partir de **Psp1** (94), un nœud de m/z 713 est observé (figure 66, encadré 1). Il pourrait s'agir de la bolascidine A hydroxylée au niveau de l'une de ses doubles liaisons.

A partir de **Psp2** (95), un nœud de m/z 679 correspondant à **Psp4** (93) est détecté (figure 66, encadré 2). Un nœud de m/z 510 est également présent. Il pourrait s'agir de la bolascidine B sans fonction alcool en position C-7 (-18 uma) et sans groupement phosphoéthanolamine (-125 uma).

A partir de **Psp3** (92), on distingue plusieurs nœuds d'intérêt (figure 66, encadré 3). Le nœud de m/z 723 pourrait correspondre à la bolascidine C (+2 uma). Le nœud de m/z 735 est vraisemblablement un dérivé de la bolascidine C avec un méthylène supplémentaire (+14 uma). Le nœud de m/z 703 pourrait correspondre à la bolascidine C sans fonction alcool en position C-7 (-18 uma). Enfin, le nœud de m/z 580 peut correspondre à la bolascidine C sans le groupement phosphoéthanolamine (-125 uma).

Enfin, à partir de **Psp4** (93), on observe tout d'abord **Psp2** (95) de m/z 653 mais également un nœud de m/z 705 qui pourrait correspondre à un analogue de la bolascidine D avec une insaturation supplémentaire (figure 66, encadré 4). On observe également un nœud de m/z 538, correspondant à un analogue de la bolascidine D sans le groupement phosphoéthanolamine et enfin le nœud de m/z 520 pourrait correspondre au composé précédant déshydraté.

L'ensemble de ces structures hypothétiques est représenté à la figure 67.

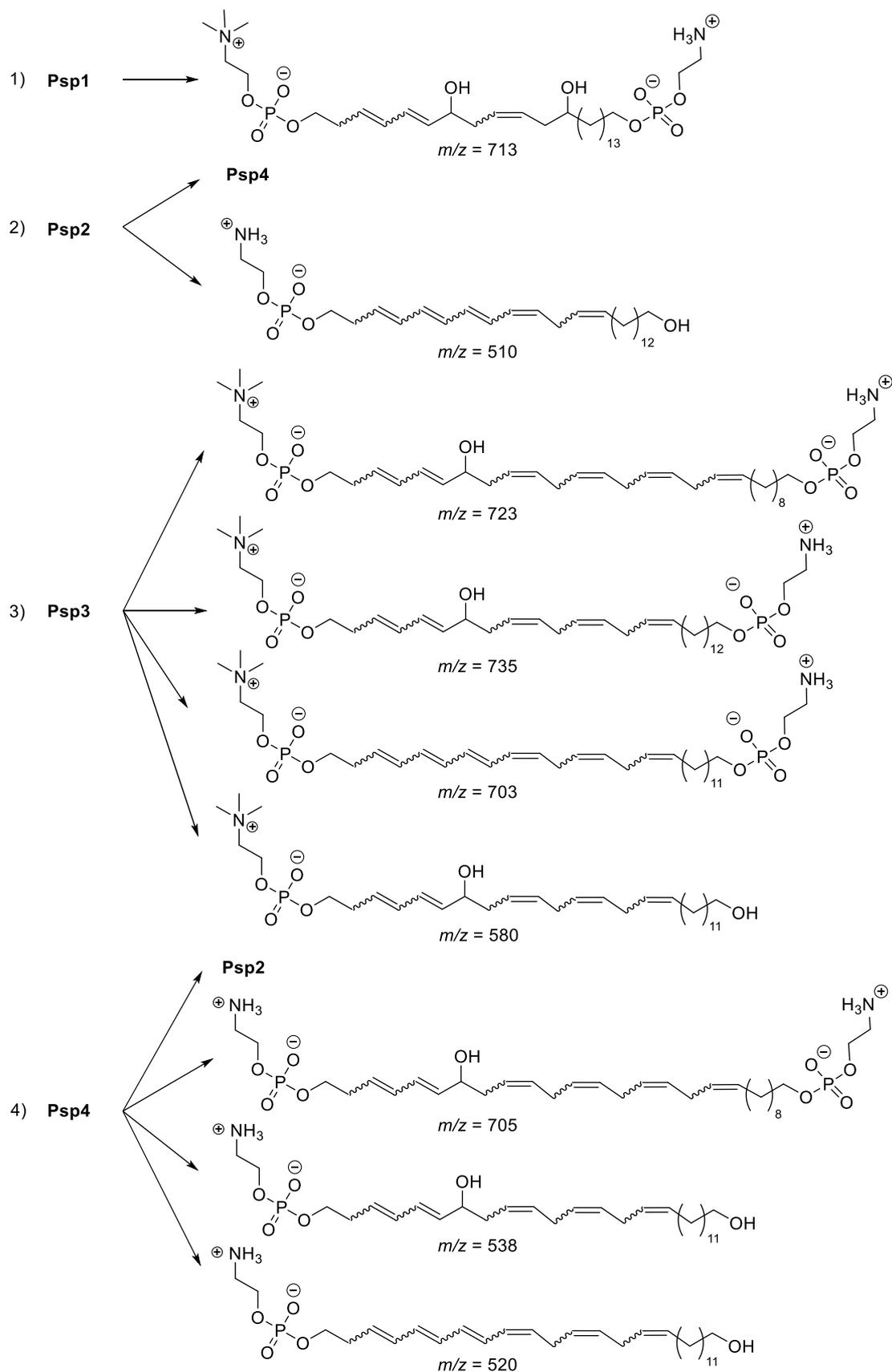


Figure 67. Métabolites potentiellement présents dans l'extrait brut organique de *Polysyncraton* sp.

III.2.2. Hypothèse de biosynthèse

Les bolascidines A-D (**92-95**) isolés de *Polysyncraton* sp. sont des phospholipides constitués de deux têtes polaires, identiques ou différentes, de type phosphocholine ou phosphoéthanolamine, et d'une chaîne alkyle centrale monohydroxylée et polyinsaturée. Il s'agit de bolaamphiphiles (ou bolas) de type bolalipides. C'est la première fois, à notre connaissance, que des bolaamphiphiles sont isolés d'une ascidie.

Leur biosynthèse est vraisemblablement proche de celles de dérivés oxylipines, pour la chaîne centrale monohydroxylée et polyinsaturée, et de celles de phosphatidylcholine ou éthanolamine, pour les deux extrémités.

Une voie de biosynthèse hypothétique pour les composés **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)** est proposée dans le schéma 14.

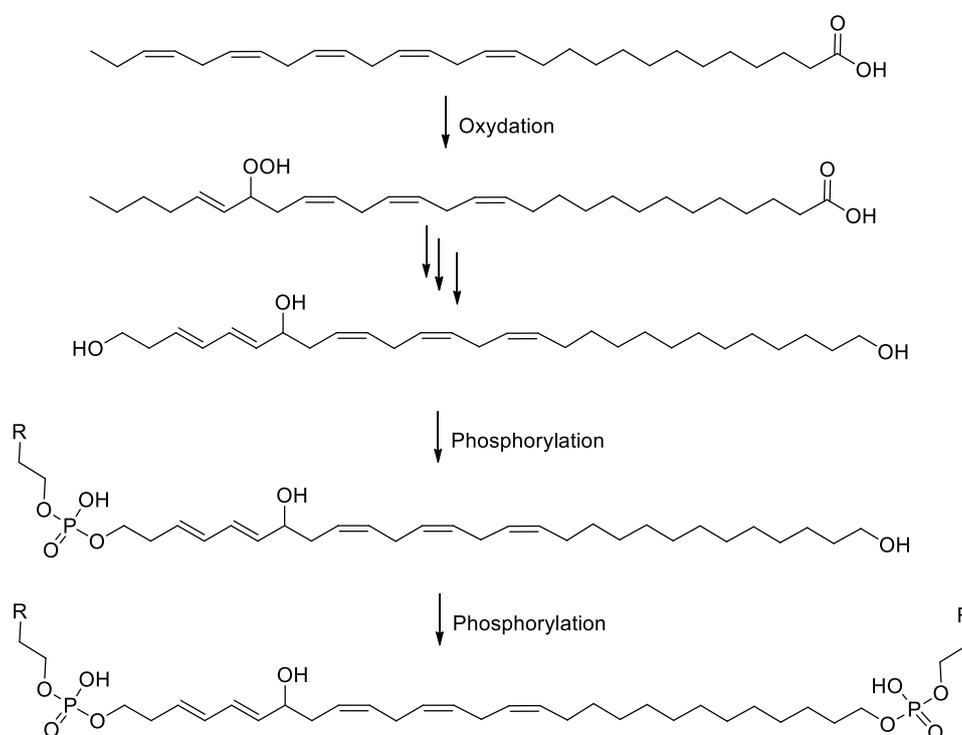


Schéma 14. Voie de biosynthèse hypothétique proposée pour les métabolites isolés de *Polysyncraton* sp. (R = ⁺NMe₃ ou NH₂).

III.2.3. Discussion

Les bolas sont des surfactants naturels ou synthétiques constitués de deux têtes hydrophiles (identiques ou différentes, chargées ou non chargées) et d'une chaîne centrale hydrophobe, souvent longue, aux caractéristiques très variées (saturée ou insaturée, substituée ou non substituée)⁷⁹ (figure 68).

⁷⁹ Fuhrhop J. -H., Wang T. 2004, Bolaamphiphiles. *Chem. Rev.* **104**, 2901–2937.

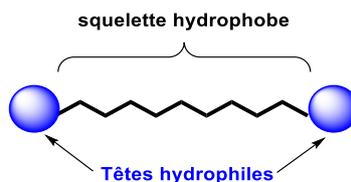


Figure 68. Représentation schématique d'un bola.

Les bolas s'autoassemblent à une concentration bien déterminée en fonction de la chaîne alkyle centrale (micelles, vésicules membranaires lipidiques monocouche, fibres...) ⁸⁰ (figure 69).

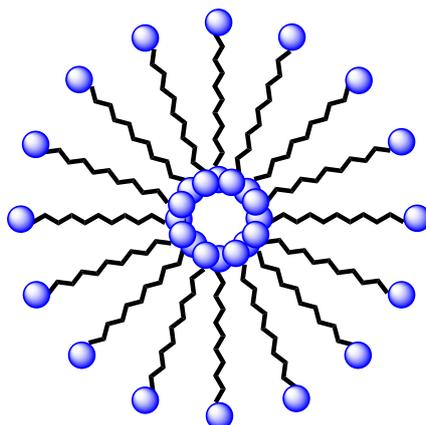


Figure 69. Représentation schématique de l'organisation micellaire d'un bola.

Les membranes lipidiques des archées sont constituées de bolaamphiphiles. Elles constituent la source naturelle principale de cette famille de molécules ⁷⁹. Ces derniers leur permettent de résister aux conditions extrêmes de températures et d'acidité du milieu dans lequel elles vivent.

De façon générale, les phospholipides constituent la classe prédominante de lipide produite par les ascidies. Pour certaines espèces, la proportion de phospholipides peut représenter entre 30 et 90% des lipides totaux ⁸¹.

Parmi les dérivés phospholipides non conventionnels issus d'une ascidie, une seule étude menée sur une espèce de la famille des Didemnidae, dont fait partie le genre *Polysyncraton*, reporte la production de siladenosérinols A-L, des sérinols sulfonés constitués d'un groupement phosphocholine ou phosphoéthanolamine terminal ⁸² (figure 70). Ces derniers sont impliqués dans l'interaction entre la protéine p53 (suppresseur de tumeur par induction de l'apoptose) et Hdm2 (enzyme activant p53). Cette interaction est importante pour la thérapie contre le cancer puisque la protéine p53 intervient dans le développement de cellules tumorales et dans la mort cellulaire par apoptose.

⁸⁰ Blume A., Drescher S., Graf G., Köhler K., Meister A. 2014, Self-assembly of different single-chain bolaphospholipids and their miscibility with phospholipids or classical amphiphiles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **208**, 264–278.

⁸¹ Dagorn F., Dumay J., Wielgosz-Collin G., Rabesaotra V., Viau M., Monniot C., Biard J.-F., Barnathan G. 2010, Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids of the tropical tunicates *Eudistoma* sp. and *Leptoclinides uniorbis*. *Lipids*, **45**, 253–261.

⁸² Nakamura Y., Kato H., Nishikawa T., Iwasaki N., Suwa Y., Rotinsulu H., Losung F., Maarisit W., Mangindaan R. E. P., Morioka H., Yokosawa H., Tsukamoto S. 2013, Siladenoserinols A- L: New sulfonated serinol derivatives from a tunicate as inhibitors of p53-Hdm2 interaction. *Org. Lett.*, **15** (2), 322–325.

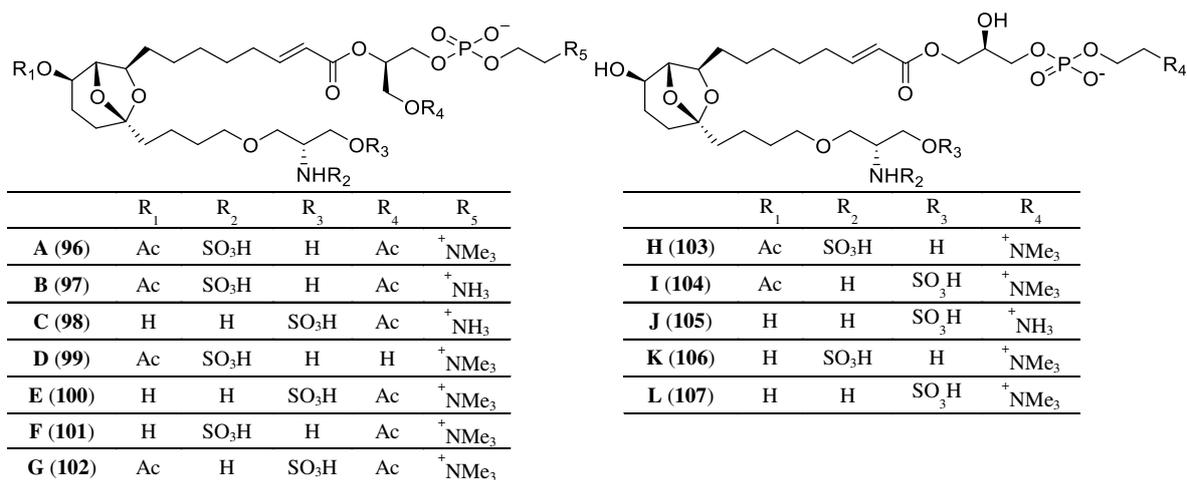


Figure 70. Siladénosérinols isolés d'une ascidie de la famille des Didemnidae⁸².

Plusieurs bolas ont également été conçus, synthétisés et évalués pour leurs propriétés physico-chimiques (encapsulation, transport d'ions, surfaces conductrices...) ⁷⁹ mais ils n'ont pas fait l'objet d'évaluations biologiques.

III.3. Activités biologiques

Seuls les composés **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)** ont été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-kinases, anti-inflammatoires et cytotoxiques. La recherche de propriétés antibactériennes a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Gaëtan Burgaud du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) basé à Plouzané. Les propriétés anti-kinases, anti-inflammatoires et cytotoxiques ont été évaluées en collaboration avec la plateforme de criblage moléculaire « KISSf » (« Kinase inhibitor specialized screening facility ») de la Station Biologique de Roscoff dirigée par le Dr. Stéphane Bach. L'évaluation des propriétés anti-acétylcholinestérase et anti-phospholipase est actuellement en cours.

III.3.1. Activités antimicrobiennes

Un test antimicrobien préliminaire a été réalisé en milieu liquide dans des microplaques, pour différentes concentrations (de 40 à 640 µg/mL), sur les composés **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)**. Ces composés se sont avérés inactifs sur *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Salmonella enterica* (CIP8297), *Klebsiella oxytoci* (CIP7932), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Enterococcus faecalis* (CIPA186) et *Listeria monocytogenes* (80R100). En revanche, à l'inverse de **Psp3 (92)**, **Psp4 (93)** possède un léger effet inhibiteur sur *Streptococcus equinus* (NRRLB4268) à 320 et 640 µg/mL. En raison des faibles activités antimicrobiennes obtenues, les tests antimicrobiens n'ont pas été poussés.

III.3.2. Activités anti-kinases

Les kinases sont des enzymes permettant les phosphorylations de plusieurs substrats à partir d'ATP. Il existe un très grand nombre de kinases. Parmi ces dernières, les protéines kinases permettent de phosphoryler-déphosphoryler des acides aminés portant un groupement hydroxyle (sérine, thréonine, tyrosine) afin de réguler les processus métaboliques des cellules. Ces kinases sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Ainsi, les kinases LmCK1, LdTLK et GSK3 sont impliquées dans des maladies parasitaires⁸³, les CDKs sont impliquées dans de nombreuses maladies humaines (cancers principalement⁸⁴), RIPK3 est impliquée dans la mort cellulaire⁸⁵, Haspin et Aurora sont impliquées dans le cancer⁸⁶, DYRK1 semble être impliquée dans la trisomie 21 et le développement précoce de la maladie d'Alzheimer⁸⁷ et enfin, PIM est surexprimée dans les cellules tumorales⁸⁸.

Les pourcentages d'activité résiduelle de ces kinases ont été évalués en présence de chaque composé, **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)**, en milieu liquide et à une concentration de 10 μ M. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 16.

Tableau 16. Activité résiduelle (%) de kinases après traitement avec **Psp3** et **Psp4** à 10 μ M.

%	Lm CK1	Ld TLK	Hs RIPK3	Hs Aurora	Hs Haspin	Rn DYRK1A	Hs CDK2/ CyA	Hs CDK5/ p25	Hs CDK9/ CyT	Mm CLK1	Ssc GSK3	Hs PIM1
Psp3	97	99	118	129	134	103	78	102	107	107	102	107
Psp4	82	99	105	126	117	97	80	98	106	108	103	96

Lm : *Leishmania major* ; Ld : *Leishmania donovani* ; Hs : *Homo sapiens* ; Rn : *Rattus norvegicus* ; Mm : *Mus musculus* ; Ssc : *Sus Scrofa domesticus* ; CK : Casein Kinase ; TLK : Tyrosine Like Kinase ; RIPK : Receptor Interactive threonine/serine Protein Kinase ; Dyrk : Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase ; Cdk : Cyclin Dependant Kinase ; Cy : cycline ; p25 : protéine p25 ; CLK : CDC Like Kinase ; GSK : Glycogen Synthase Kinase ; PIM : Pronto-oncogen serine-threonine protein kinase.

Les composés **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)** ne présentent pas d'effet sur l'activité des kinases testées et induisent même dans certains cas une augmentation d'activité (ex : Hs Haspin : 134% d'activité).

III.3.3. Activités anti-inflammatoires

L'inflammation est un ensemble de réactions de défense généré par le système immunitaire d'un organisme en réponse à une agression interne (cancer) ou externe (origine physique, chimique, biologique...). Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central dans l'inflammation par sa

⁸³ Doerig C., Billker O., Haystead T., Sharma P., Tobin A. B., Waters N. C. 2008, Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol.*, **24** (12), 570–577.

⁸⁴ Sánchez-Martínez C., Gelbert L. M., Lallena M. J., de Dios A. 2015, Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3420–3435.

⁸⁵ Newton K. 2015, RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol.*, **25** (6), 347–353.

⁸⁶ a) Amoussou N. G., Bigot A., Roussakis C., Robert J.-M. H. 2017, Haspin: A promising target for the design of inhibitors as potent anticancer drugs. *Drug Discov. Today*, 7 p (in press). b) Damodaran A. P., Vaufrey L., Gavard O., Prigent C. 2017, Aurora A kinase is a priority pharmaceutical target for the treatment of cancers. *Trends Pharmacol. Sci.*, **38** (8), 687–700.

⁸⁷ Ferrer I., Barrachina M., Puig B., Martínez de Lagran M., Marti E., Avila J., Dierssen M. 2005, Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis.*, **20**, 392–400.

⁸⁸ Warfel N. A., Kraft A. S. 2015, PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. *Pharmacol. Ther.*, **151**, 41–49.

capacité à induire la transcription de gènes pro-inflammatoires. NF- κ B peut être activé par la TNF α (Tumor necrosis Factor α), une cytokine pro-inflammatoire permettant l'élimination de pathogènes.

Les propriétés anti-inflammatoires des composés **Psp3 (92)** et **Psp4 (93)** ont été évaluées. Brièvement, l'induction de la transcription de pGreenfire – une luciférase impliquée dans la bioluminescence, sous le contrôle de NF- κ B – a été suivie afin de mettre en évidence l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Les molécules ont été testées i) seules pour identifier un éventuel effet pro-inflammatoire ou immunostimulant et ii) avec stimulation au TNF α afin d'identifier un éventuel effet anti-inflammatoire / immunodépresseur ou un effet potentialisateur du TNF α . La réponse est mesurée en unité relative de lumière (RLU) par rapport au milieu de culture (témoin négatif) dans le premier cas et par rapport au milieu de culture (témoin négatif) et au parthénolide à 18 μ M (témoin positif) dans le second cas.

Le composé **Psp3 (92)** semble activer la voie NF- κ B à 100 μ M. Le composé **Psp4 (93)** active très légèrement la voie NF- κ B à 100 μ M mais n'a pas d'effet à 10 μ M (figure 71).

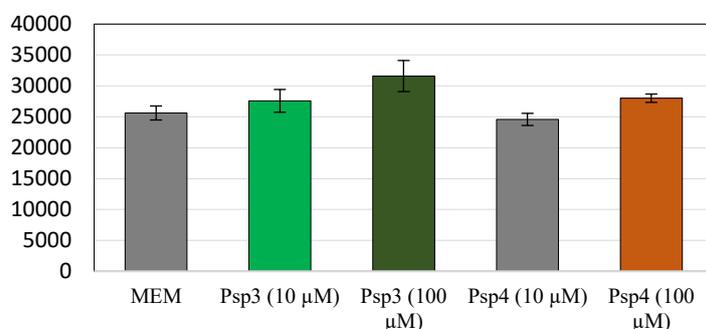


Figure 71. Activités anti-inflammatoires sans stimulation au TNF α . MEM = milieu de culture.

Le composé **Psp3 (92)** n'a pas d'effet à 10 μ M sur la voie NF- κ B après traitement au TNF α . **Psp3 (92)** potentialise à 100 μ M l'effet du TNF α et active d'autant plus la voie NF- κ B. Le composé **Psp4 (93)** n'a pas d'effet à 10 μ M et 100 μ M sur la voie NF- κ B après traitement au TNF α (figure 72). En revanche, le composé de référence, le parthénolide, possède bien un effet anti-inflammatoire à 18 μ M et diminue l'activité de la voie NF- κ B.

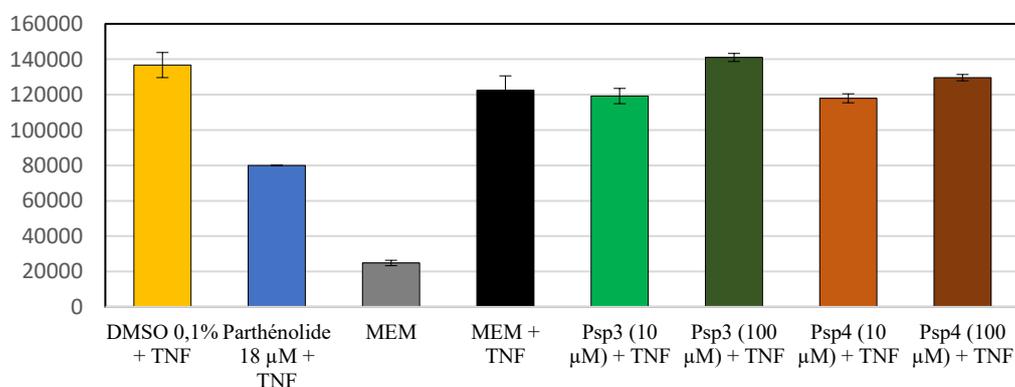


Figure 72. Activités anti-inflammatoires de **Psp3** et **Psp4** avec stimulation au TNF α . MEM = milieu de culture.

III.3.4. Cytotoxicité

Les composés **Psp3** (**92**) et **Psp4** (**93**) ont été évalués pour leur cytotoxicité vis-à-vis de deux lignées cellulaires tumorales : U2OS (ostéosarcome) et Jurkat A3 (leucémie). Les résultats obtenus montrent que **Psp3** (**92**) et **Psp4** (**93**) ne présentent pas d'activité cytotoxique à 100 μM tandis que les composés de référence, la staurosporine (STS) et la doxorubicine, diminuent bien de façon significative la viabilité cellulaire à 10 et 100 $n\text{M}$ (figure 73). Par conséquent, les CI_{50} n'ont donc pas été évaluées.

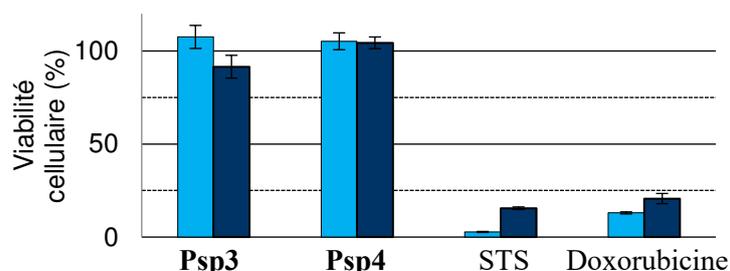


Figure 73. Cytotoxicité de **Psp3** et **Psp4** sur les lignées cellulaires U2OS (bleu clair) et Jurkat A3 (bleu foncé) après 24h à 100 μM et comparaison avec le STS (100 $n\text{M}$) et la doxorubicine (3 μM).

IV. Conclusion

Les ascidies sont la source de diverses molécules bioactives qui présentent de bonnes propriétés antitumorales, antivirales et antimicrobiennes. Parmi les ascidies, très peu de métabolites ont été décrits d'espèces du genre *Polysyncraton* alors qu'il s'agit du deuxième genre le plus représenté chez les Didemnidae. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une ascidie de méditerranée, *Polysyncraton* sp., collectée à Punta Salina (Espagne) en 2012, qui, à notre connaissance, n'avait fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatre nouvelles molécules, les bolascidines A (**94**), B (**95**), C (**93**) et D (**92**). Elles sont constituées de têtes polaires identiques ou différentes de type phosphocholine ou phosphoéthanolamine et d'une chaîne alkyle centrale monohydroxylée et polyinsaturée. Il s'agit de métabolites de type bolaamphiphile isolés pour la première fois, dont il n'existe pas, à notre connaissance, d'équivalent naturel ou synthétique. Des études sont en cours pour déterminer la stéréochimie de la position C-7. Les analyses par réseau de similarité moléculaire nous ont également permis de mettre en évidence la présence de nombreux autres dérivés de la même famille. Par ailleurs, il est fortement probable que ces molécules soient structurées en solution. La recherche d'une organisation supramoléculaire sera également entreprise. Leur rôle écologique reste à élucider. Ils pourraient permettre à l'ascidie de lubrifier sa surface pour prévenir l'adhésion d'organismes ou encore entrer en jeu dans le système nerveux de l'espèce. Les bolascidines C (**93**) et D (**92**), évalués pour leurs propriétés antikinases, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques, ne présentent aucune activité significative. L'évaluation des propriétés anti-acétylcholinestérases et anti-phospholipases est actuellement en cours. Enfin, le (ou les) organisme(s) producteur(s) des bolascidines reste(nt) à explorer.

Partie B :

Chapitre 2 :

Métabolisme spécialisé

d'Hexadella racovitzai

I. Introduction

Les éponges appartenant à l'ordre Verongiida produisent différentes classes de dérivés bromotyrosines aux propriétés biologiques d'intérêt potentiellement valorisables dans le domaine des antitumoraux, des antifoulings et des antimicrobiens.

Parmi les éponges de Méditerranée appartenant à l'ordre Verongiida, seules *Aplysina aerophoba* et *Aplysina cavernicola* semblent avoir été étudiées⁸⁹. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une éponge méditerranéenne, *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896), qui, à ce jour et à notre connaissance, n'a fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure, pour une application potentielle dans le domaine des biocides. Les travaux préliminaires menés sur un échantillon d'*Hexadella racovitzai* collecté au Maroc en 2014 ont révélé la présence de quelques métabolites bromés de haut poids moléculaire potentiellement nouveaux. Les dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire sont rares.

Après une brève description d'*Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896) ainsi que les principales classes de bromotyrosines, notamment celles de haut poids moléculaire isolées d'éponges appartenant à l'ordre Verongiida, la suite de ce manuscrit sera consacrée aux travaux menés sur l'échantillon d'*Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896) collecté à Kabila (Maroc) en 2014.

II. *Hexadella racovitzai* : état de l'art

II.1. Classification

La famille des Ianthellidae de l'ordre Verongiida est divisée en quatre genres, avec : *Anomoianthella*, *Hexadella*, *Ianthella* et *Vansoestia*. En outre, on distingue huit espèces du genre *Hexadella* : *H. crypta*, *H. dendritifera*, *H. indica*, *H. kirkpatricki*, *H. pruvoti*, *H. purpurea*, *H. racovitzai* et *H. topsenti*⁹⁰. A notre connaissance, *H. racovitzai* (tableau 17) n'a fait l'objet d'aucune étude chimique.

⁸⁹ Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Pansini M. 1997, Chemistry of Verongida sponges VIII - Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron*, **53** (18), 6565–6572.

⁹⁰ D'après la base de données WoRMS, accédée le 19/08/17

Tableau 17. Classification d'*Hexadella racovitzai*.

Règne Animal	
Division	Porifera
Classe	Demospongiae
Ordre	Verongiida
Famille	Ianthellidae
Genre	<i>Hexadella</i>
Espèce	<i>Hexadella racovitzai</i>

II.2. Description morphologique

Principalement recensée en Méditerranée, mais également retrouvée aux îles Canaries, *Hexadella racovitzai* est une éponge encroûtante de couleur crème à rose pâle, vivant surtout sur des substrats rocheux qu'elle peut recouvrir sur de grandes surfaces. Ne comportant pas de spicules, sa paroi est lisse. Ses oscules surélevés possèdent des bords transparents susceptibles de s'affaisser au gré du courant et ses ostioles ne sont pas visibles à l'œil nu⁹¹.

II.3. Dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire

Les éponges de l'ordre Verongiida sont classées en quatre familles : Aplysinellidae, Aplysinidae, Ianthellidae et Pseudoceratinidae. Ces dernières ont fait l'objet de très nombreuses études chimiques qui ont révélé que la production de dérivés de la bromotyrosine constitue une caractéristique commune aux éponges de cet ordre⁹².

Les bromotyrosines ont été décrites pour la première fois en 1913⁹³. Elles ont par la suite été très recherchées notamment pour leurs propriétés antitumorales, antifoulings et biocides. Du point de vue écologique, les bromotyrosines permettent aux différentes espèces qui les produisent de se défendre⁹⁴. De nos jours, plus de 360 métabolites de la famille des bromotyrosines ont été décrites, principalement à partir d'éponges de l'ordre Verongiida, mais également d'éponges appartenant à d'autres ordres (Agelasida, Suberitida, Poecilosclerida, Dictyoceratida, Tetractinellida, Axinellida et Tethyida). Les bromotyrosines sont également produites par quelques ascidies et mollusques. On distingue six classes principales⁹⁵ :

⁹¹ D'après la base données DORIS : <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/811> consultée le 19/08/2017

⁹² Makarieva T. N., Stonik V. A., Alcolado P., Elyakov Y. B. 1981, Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). *Compar. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **68**, 481–484.

⁹³ Mörner C. T. 1913, Zur Kenntnis der organischen Gerüstsubstanz des Anthozoenskeletts. IV. Mitt. Isolierung und Identifizierung der Bromgorgosäure. *Z. physiol. Chem.*, **88**, 138–?

⁹⁴ Thoms C., Schupp P. J. 2008, Activated chemical defense in marine sponges – a case study on *Aplysinella rhax*. *J. Chem. Ecol.*, **34**, 1242–1252.

⁹⁵ Peng J., Li J., Hamann M. T. 2005, Chapter 2. The marine bromotyrosine derivatives. Ed. Cordell G. A., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, Vol. 61, pp 59–262, Elsevier.

- Les bromotyrosines simples,
- Les spirocyclohexadiénylisoxazolines,
- Les spirooxepinisoxazolines,
- Les oximes,
- Les bastadines et hémibastadines,
- Et d'autres dérivés tels que les cyclodepsipeptides, par exemple.

Ces métabolites sont constitués d'une (bromotyrosine simple) à quatre unités bromotyrosine. Par ailleurs, on constate que le nombre de métabolites constitués de quatre unités bromotyrosine est plus faible comparativement aux métabolites qui en possèdent une ou deux.

L'ensemble des bromotyrosines isolées jusqu'en 2004 ayant déjà fait l'objet d'une revue de très grande qualité par le groupe de Hamann⁹⁵, nous avons uniquement recensé les dérivés bromotyrosines isolés entre 2004 et 2017 (annexe 1 du Tome II).

La suite de ce chapitre est spécifiquement dédiée aux dérivés les plus rares, à savoir ceux constitués de quatre unités bromotyrosine. Ces derniers sont retrouvés dans deux classes : les oximes constituées de ponts disulfures et les bastadines.

II.3.1. Oximes avec un pont disulfure

Parmi les dérivés bromotyrosines de la classe des oximes constituées de ponts disulfures, on distingue la bisaprasine (**108**), isolée à partir de l'éponge *Pseudoceratina purpurea* (ordre Verongiida, famille Pseudoceratinidae)⁹⁶, la 4-*O*-sulfatobisaprasine (**109**), isolée à partir de l'éponge *Aplysinella rhax* (ordre Verongiida, famille Aplysinellidae)⁹⁷ et la bispsammapline A (**110**), isolée à partir d'une association entre les éponges *Jaspis wondoensis* (ordre Tetractinellida, famille Ancorinidae) et *Poecillastra wondoensis* (ordre Tetractinellida, famille Vulcanellidae)⁹⁸ (figure 74). Enfin, la cyclobispsammapline A (**111**) est le seul dérivé de cette classe recensé après 2004. Ce métabolite a été isolé de l'association entre deux éponges de l'ordre Tetractinellida collectées en Corée : *Jaspis* sp. (famille Ancorinidae) et *Poecillastra* sp. (famille Vulcanellidae)⁹⁹ (figure 74).

⁹⁶ Rodriguez A. D., Akee R. K., Scheuer P. J. 1987, Two bromotyrosine-cysteine derived metabolites from a sponge. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4989–4992.

⁹⁷ Pham N. B., Butler M. S., Quinn R. J. 2000, Isolation of psammaplin A 11'-sulfate and bisaprasin 11'-sulfate from the marine sponge *Aplysinella rhax*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 393–395.

⁹⁸ Park Y., Liu Y., Hong J., Lee C., Cho H., Kim D.-K., Im K. S., Jung J. H. 2003, New bromotyrosine derivatives from an association of two sponges, *Jaspis wondoensis* and *Poecillastra wondoensis*. *J. Nat. Prod.*, **66** (11), 1495–1498.

⁹⁹ Shinde P. B., Lee Y. M., Dang H. T., Hong J., Lee C.-O., Jung J. H. 2008, Cytotoxic bromotyrosine derivatives from a two-sponge association of *Jaspis* sp. and *Poecillastra* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6414–6418.

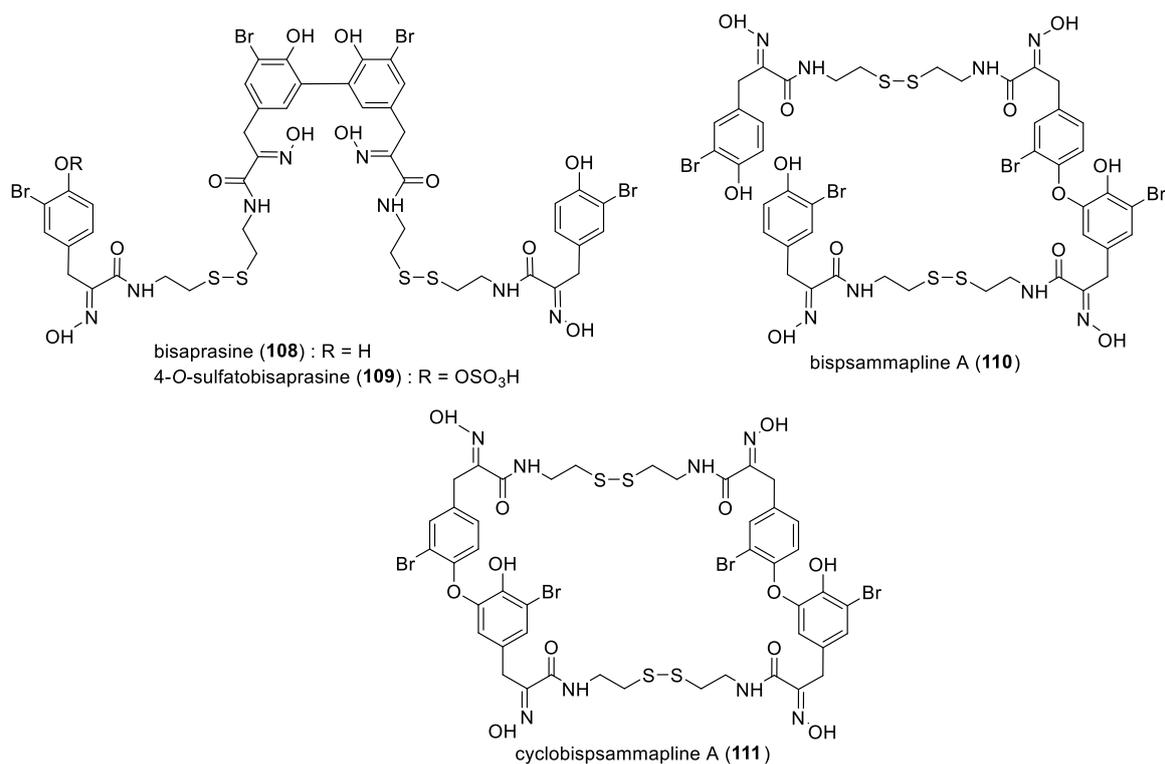


Figure 74. Structures de la bisaprasine (**108**), de la 4-*O*-sulfatobisaprasine (**109**), de la bispsammaplaine A (**110**) et de la cyclobispsammaplaine A (**111**)⁹⁶⁻⁹⁹.

II.3.2. Les bastadines

Les bastadines, dérivés principalement macrocycliques, sont constituées de quatre unités bromotyrosine. Entre 1913 et 2004, quatre bastadines acycliques et vingt bastadines cycliques ont été isolées d'éponges du genre *Ianthella*. Il s'agit des bastadines-1-21 (**112-131**), de la 10-*O*-sulfatobastadine-3 (**132**), de la 15,34-*O*-disulfatobastadine-7 (**133**) et de la 34-*O*-sulfatobastadine-13 (**134**) (figure 75)¹⁰⁰.

¹⁰⁰ a) Kazlauskas R., Lidgard R. O., Murphy P. T., Wells R. J. 1980, Brominated tyrosine-derived metabolites from the sponge *Ianthella basta*. *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2277–2280. b) Kazlauskas R., Lidgard R. O., Murphy P. T., Wells R. J., Blount J. F. 1981, Brominated tyrosine-derived metabolites from the sponge *Ianthella basta*. *Aust. J. Chem.*, **34**, 765–786. c) Franklin M. A., Penn S. G., Lebrilla C. B., Lam T. H., Pessah I. N., Molinski T. F. 1996, Bastadin 20 and bastadin *O*-sulfate esters from *Ianthella basta*: Novel modulators of the Ry1R FKBP12 receptor complex. *J. Nat. Prod.*, **59** (12), 1121–1127. d) Butler M. S., Lim T. K., Capon R. J., Hammond L. S. 1991, The bastadins revisited: New chemistry from the Australian marine sponge *Ianthella basta*. *Aust. J. Chem.*, **44**, 287–296. e) Pordesimo E. O., Schmitz F. J. 1990, New bastadins from the sponge *Ianthella basta*. *J. Org. Chem.*, **55** (15), 4704–4709. f) Carney J. R., Scheuer P. J., Kelly-Borges M. 1993, A new bastadin from the sponge *Psammaphysilla purpurea*. *J. Nat. Prod.*, **56** (1), 153–157. g) Dexter A. F., Garson M. J., Hemling M. E. 1993, Isolation of a novel bastadin from the temperate marine sponge *Ianthella* sp. *J. Nat. Prod.*, **56** (5), 782–786. h) Park S. K., Jurek J., Carney J. R., Scheuer P. J. 1994, Two more bastadins, 16 and 17, from an Indonesian sponge *Ianthella basta*. *J. Nat. Prod.*, **57** (3), 407–410. i) Park S. K., Park H., Scheuer P. J. 1994, Isolation and structure determination of a new bastadin from the marine sponge *Ianthella basta*. *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **15** (7), 534–537. j) Park S. K., Ryu J. K., Scheuer P. J. 1995, Isolation and structure determination of a new bastadin from an Indonesian sponge *Ianthella basta*. *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **16** (7), 677. k) Jaspars M., Rali T., Laney M., Schatzman R. C., Diaz M. C., Schmitz F. J., Pordesimo E. O., Crews P. 1994, The search for inosine 5'-Phosphatase dehydrogenase (IMPDH) inhibitors from marine sponges. Evaluation of the bastadin alkaloids. *Tetrahedron*, **50** (25), 7367–7374. l) Mack M. M., Molinski T. F., Buck E. D., Pessah I. N. 1994, Novel modulators of skeletal muscle FKBP12/calcium channel complex from *Ianthella basta*. Role of FKBP12 in channel gating. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23236–23249. m) Coll J. C., Kearns P. S., Rideout J. A., Sankar V. 2002, Bastadin 21, a novel isobastarine metabolite from the Great Barrier Reef marine sponge *Ianthella quadrangulata*. *J. Nat. Prod.*, **65** (5), 753–756. n) Gulavita N. K., Wright A. E., McCarthy P. J., Pomponi S. A., Kelly-Borges M., Chin M., Sills M. A. 1993, Isolation and structure elucidation of 34-sulfatobastadin 13, an inhibitor of the endothelin A receptor, from a marine sponge of the genus *Ianthella*. *J. Nat. Prod.*, **56** (9), 1613–1617. o) Miao S., Andersen R. J., Allen T. M. 1990, Cytotoxic metabolites from the sponge *Ianthella basta* collected in Papua New Guinea. *J. Nat. Prod.*, **53** (6), 1441–1446.

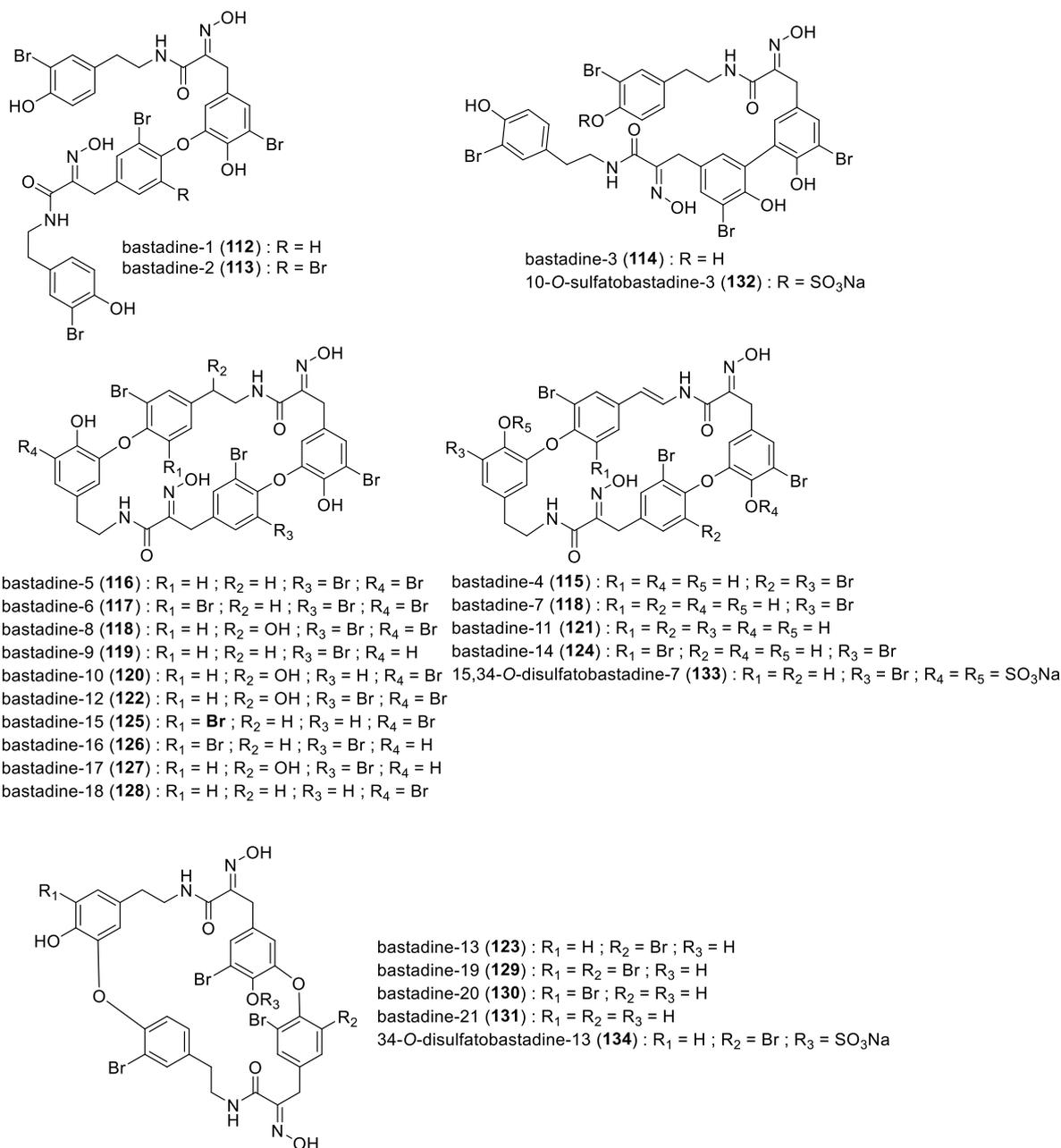
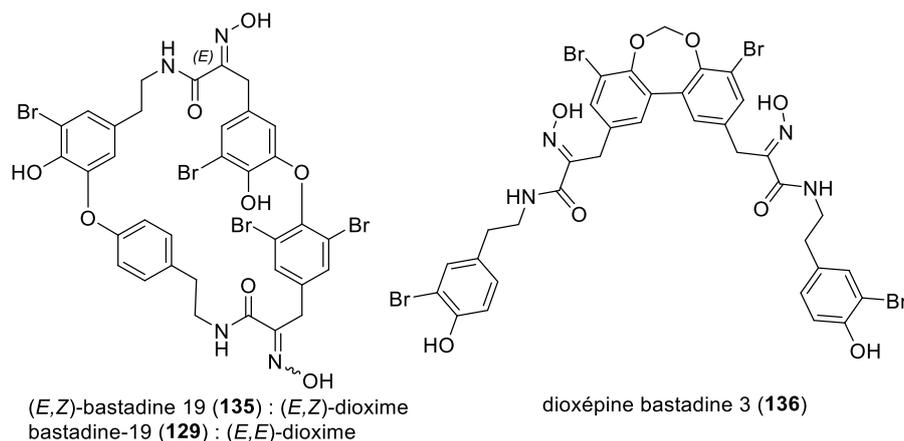


Figure 75. Structures des bastadines isolées jusqu'en 2004¹⁰⁰.

Seules deux nouvelles bastadines ont été décrites depuis 2004 (figure 76). Il s'agit de la (*E,Z*)-bastadine 19 (**135**) – un diastéréoisomère de la (*E,E*)-bastadine 19 (**129**) – et de la dioxépine bastadine 3 (**136**), constituée d'une fonction dioxépine peu commune¹⁰¹.

¹⁰¹ Calcul L., Inman W. D., Morris A. A., Tenney K., Ratnam J., McKerrow J. H., Valeriote F. A., Crews P. 2010, Additional insights on the bastadins: Isolation of analogues from the sponge *Ianthella* cf. *reticulata* and exploration of the oxime configurations. *J. Nat. Prod.* **73**, 365–372.

Figure 76. Structures des bastadines isolées après 2004¹⁰¹.

II.3.3. Origine des bromotyrosines

Les travaux sur l'origine biosynthétique des dérivés bromotyrosines menés par enrichissement isotopique ont montré que la production de ces derniers mettait en jeu la conversion de la phénylalanine en tyrosine, ainsi que d'autres réactions telles que la bromation, l'oxydation, voire des réarrangements¹⁰². Ces réactions semblent pouvoir aussi bien être assurées par l'éponge que par des microorganismes.

D'après des études publiées en 1983 et 2000, les composés bromés (*i.e.* les bromotyrosines) se retrouvent dans les cellules sphéruleuses de l'éponge qui ne comportent, à priori, aucune bactérie¹⁰³. Cette observation tend à prouver que les bromotyrosines sont bel et bien produites par l'éponge et non par les microorganismes associés.

Pourtant, très récemment en 2017, plusieurs bromotyrosines mono- et bis-spirocyclohexanediényloxazoliques ont été décrites et/ou détectées par CLUHP/SMHR à partir d'extraits organiques de bactéries isolées d'une éponge du genre *Haplosclerida*¹⁰⁴. Il s'agit de la fistularine-3 (**137**), de la 11-hydroxyaérothionine (**138**) et de l'acide verongidoïque (**139**) pour les métabolites isolés et caractérisés finement, et de l'aérothionine (**140**), de l'acide homopurpurocératique B (**141**), de la puréalidine L (**142**) et de l'aplysinamisine II (**143**) pour les composés dont la présence a uniquement été déduite des analyses par CLUHP/SMHR (figure 77).

¹⁰² a) Tymiak A. A., Rinehart K. L. 1981, Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (22), 6763–6765. b) Carney J. R., Rinehart K. L. 1995, Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *J. Nat. Prod.*, **58** (7), 971–985.

¹⁰³ a) Thompson J. E., Barrow K. D., Faulkner D. J. 1983 Localization of two brominated metabolites, aérothionin and homoaérothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zool.*, **64** (4), 199–210. b) Turon X., Becerro M. A., Uriz M. J. 2000, Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res.*, **301**, 311–322.

¹⁰⁴ Nicacio K. J., Lóca L. P., Fróes A. M., Leomil L., Appolinario L. R., Thompson C. C., Thompson F. L., Ferreira A. G., Williams D. E., Andersen R. J., Eustaquio A. S., Berlinck R. G. S. 2017, Cultures of the marine bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. *J. Nat. Prod.* **80**, 235–240.

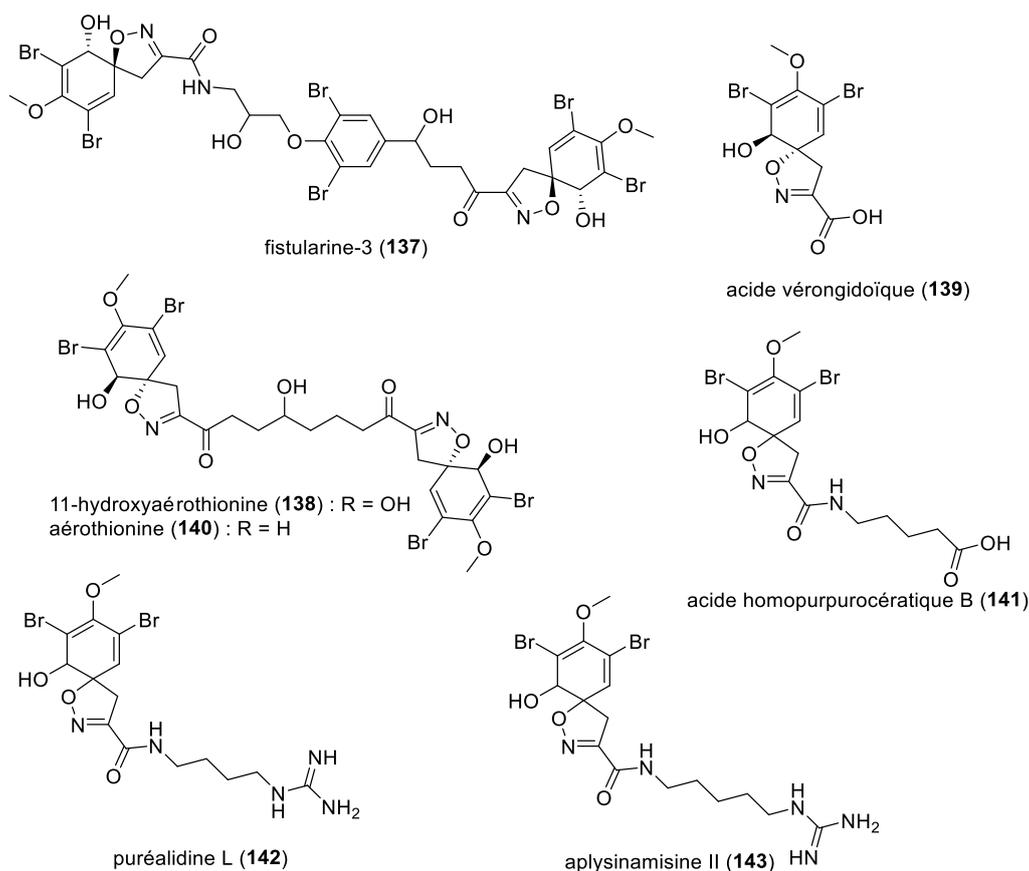


Figure 77. Structures des bromotyrosines détectées chez des bactéries isolées d'une éponge du genre *Haplosclerida*¹⁰⁴.

Ces travaux relancent le débat sur l'origine biosynthétique de métabolites isolés à partir d'espèces marines qui vivent en communauté avec des microorganismes.

III. Etude d'*Hexadella racovitzai*

L'éponge *Hexadella racovitzai* (140525-CNo-41) étudiée (figure 78) a été échantillonnée en mai 2014 à Kabila au Maroc (30 m de profondeur) par le Dr Philippe Amade. La suite de ce manuscrit est consacrée aux travaux menés sur l'espèce *H. racovitzai*.



Figure 78. Photographie *in situ* de l'éponge *H. racovitzai* étudiée (©P. Amade).

III.1. Extraction, fractionnement et isolement

L'éponge (48,1 g), préalablement lyophilisée, a été extraite à plusieurs reprises par un mélange dichlorométhane/méthanol (1:1, v/v) sous ultrasons. L'extrait organique brut obtenu a par la suite été fractionné par chromatographie liquide sur gel de silice greffée C₁₈ (SPE) par passages successifs de solvants de polarité décroissante (H₂O puis CH₃OH/CH₂Cl₂) pour conduire à deux fractions : une fraction aqueuse et une fraction organique. Cette dernière, reprise dans du méthanol, a été analysée par CLHP/UV/DEDL (figure 79).

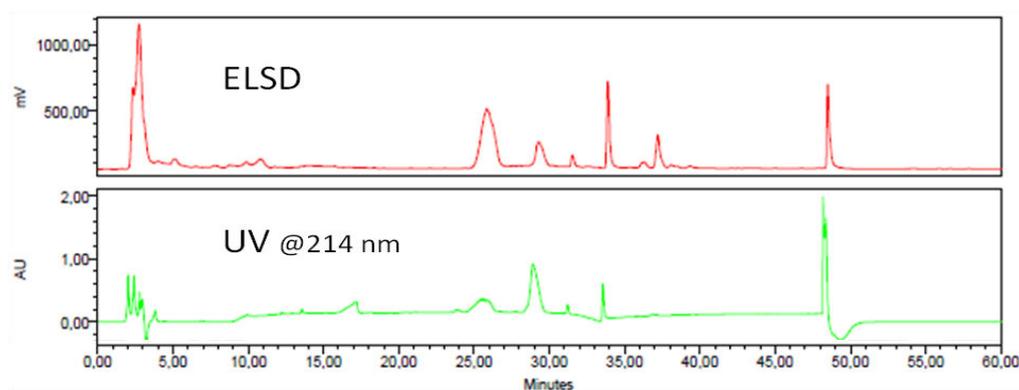


Figure 79. Profil métabolomique de la fraction organique d'*H. racovitzai* par CLHP-UV-DEDL, sur colonne Macherey-Nagel propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

Par la suite, la fraction méthanol a été fractionnée par chromatographie liquide sur gel de Sephadex® LH-20 (schéma 15) pour conduire à une fraction **Fr1** (700 mg) et aux composés **Hr2** (30 mg) et **Hr3** (38 mg). Finalement, le métabolite d'intérêt, présent dans la fraction **Fr1** a été purifié par CLHP semi-préparative pour conduire à **Hr1** (1,5 mg). La structure du composé **Hr3** ne sera pas présentée dans ce manuscrit. Malgré nos différentes tentatives, il présente un faible niveau de pureté et s'est avéré instable. La structure s'avère en outre beaucoup plus complexe que les autres métabolites isolés. D'autres études

(telles que la dégradation de la molécule par réduction) sont en cours afin de finaliser la structure du composé **Hr3**.

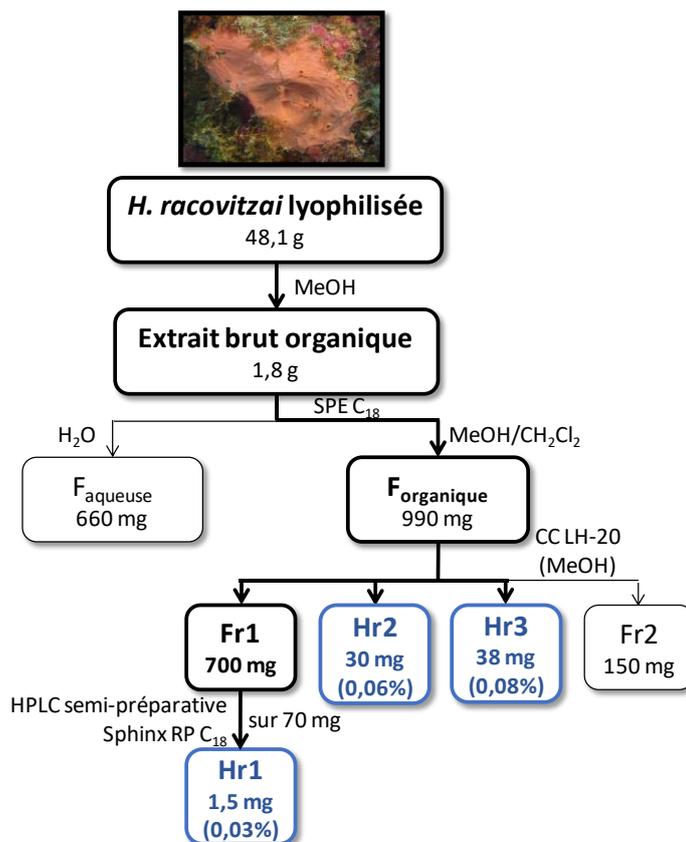


Schéma 15. Schéma d'extraction d'*H. racovitzai* (les rendements indiqués sont exprimés par rapport au poids sec de l'éponge).

III.2. Détermination structurale

III.2.1. Structure de Hr1

L'ensemble des données spectrales (MS, RMN) et des chromatogrammes obtenus par CLHP et CLHP-SM, couplés aux données de la bibliographie, notamment celles relatives aux bromotyrosines, nous a permis d'identifier la structure de **Hr1** comme étant celle de la psammaline A (**10**). Le raisonnement qui nous a amené à cette conclusion est détaillé par la suite.

Le composé **Hr1** (**144**) a été obtenu sous la forme d'une huile transparente. De l'analyse par spectrométrie de masse en mode négatif ESI(-)SM, on observe un massif isotopique de rapport m/z 661,1/663,1/665,0 (ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$). Le massif isotopique nous renseigne sur la présence de deux atomes de brome (abondance relative 49 ; 100 ; 41). Un seul métabolite de la bibliographie relative aux bromotyrosines, la psammaline A (figure 80), est en accord avec ces données¹⁰⁵.

¹⁰⁵ Quinoa E., Crews P. 1987, Phenolic constituents of *Psammaphysilla*. *Tetrahedron Lett.*, **28** (28), 3229–3232.

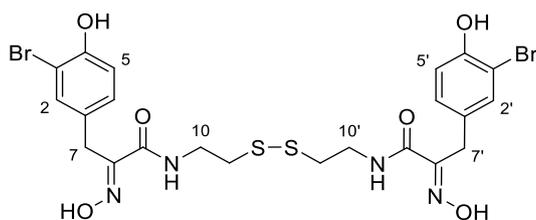
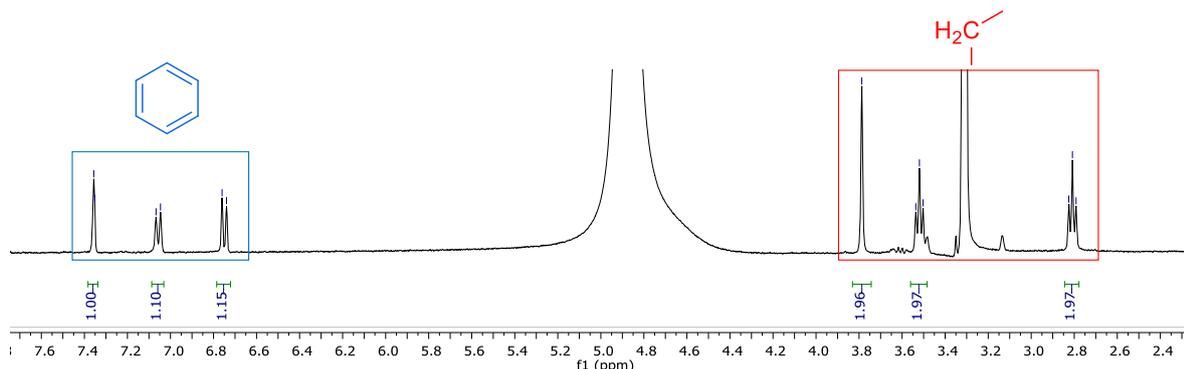


Figure 80. Structure de la psammapline A (10).

L'analyse des données RMN 1D nous a permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, le spectre RMN ^1H est composé de trois signaux dans la région des protons aromatiques, à δ_{H} 7,36 ppm (1H, *s*, H-2, H2'), δ_{H} 7,06 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,3$ Hz, H-6, H-6') et 6,75 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,3$ Hz, H-5, H-5') caractéristiques d'un cycle aromatique trisubstitué, et de trois signaux déblindés, à δ_{H} 3,79 ppm (2H, *s*, H-7, H-7') caractéristique du méthylène au voisinage du noyau aromatique et de l'oxime, à δ_{H} 3,52 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,7$ Hz, H-10, H-10') caractéristique, selon les données de la bibliographie, d'un méthylène au voisinage d'un amide et à δ_{H} 2,81 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,7$ Hz, H-11, H-11') caractéristique d'un méthylène au voisinage du pont disulfure (figure 81). Par ailleurs, le faible nombre de signaux dans le spectre RMN ^1H est bien caractéristique d'une molécule symétrique.

Figure 81. Spectre RMN ^1H (d_4 -MeOH, 400 MHz) de Hr1 (131).

L'ensemble des données RMN ^1H de Hr1 (144) et la comparaison avec les données de la psammapline A (10) sont regroupés dans le tableau 18.

Tableau 18. Données RMN ^1H (400 MHz) associées à Hr1 (d_4 -MeOH) et comparaison avec les données de la psammapline A de la bibliographie (CD_3CN , fréquence non précisée)¹⁰⁵.

N°	Hr1	Psammapline A
	δ_{H} (ppm)/mult./ J (Hz)	δ_{H} (ppm)/ mult./ J (Hz)
2, 2'	7,36, <i>s</i>	7,33, <i>d</i> , 1,8
5, 5'	6,75, <i>d</i> , 8,3	6,79, <i>d</i> , 8,1
6, 6'	7,06, <i>d</i> , 8,3	7,04, <i>dd</i> , 8,1-1,8
7, 7'	3,79, <i>s</i>	3,74, <i>s</i>
10, 10'	3,52, <i>t</i> , 6,7	3,46, <i>q</i> , 6,3
11, 11'	2,81, <i>t</i> , 6,7	2,77, <i>t</i> , 6,6

La psammapline A (10) a été isolée pour la première fois de l'éponge *Psammaplysilla* sp. Elle appartient à la classe des bromotyrosines de type oxime constitué d'un pont disulfure. Par la suite, la psammapline A a été isolée de plusieurs éponges de l'ordre Verongiida^{94,105}. Il s'agit d'un composé antibactérien qui

présente des activités inhibitrices vis-à-vis de *S. aureus* et *B. subtilis* (sans autre précision de la part des auteurs)¹⁰⁶. Il s'agit également d'un composé cytotoxique vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires tumorales : poumon (A549, DE₅₀ = 0,57 µg/mL), ovaires (SK-OV-3, DE₅₀ = 0,14 µg/mL), peau (SK-MEL-2, DE₅₀ = 0,13 µg/mL), système nerveux central (XF 498, DE₅₀ = 0,57 µg/mL), colon (HCT 15, DE₅₀ = 0,68 µg/mL)⁹⁸, avec également un potentiel antiangiogénique¹⁰⁷.

III.2.1. Structure de Hr2

Le composé **Hr2 (145)** a été isolé sous la forme d'une huile verte. Sa formule brute, C₄₄H₄₃Br₄N₈O₁₅S₅, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif HRESI(-)SM (ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ de *m/z* 1402,8742 ; Δppm = 29,2), notamment par la présence d'un massif isotopique sous la forme d'un quintuplet 1/4/6/4/1 caractéristique d'un composé tétrabromé. L'étude fine des données spectrales (SMHR, RMN) nous a permis de déduire que le composé **Hr2 (145)** est la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaline A (figure 82). Les éléments qui nous ont permis d'arriver à cette conclusion sont détaillés par la suite.

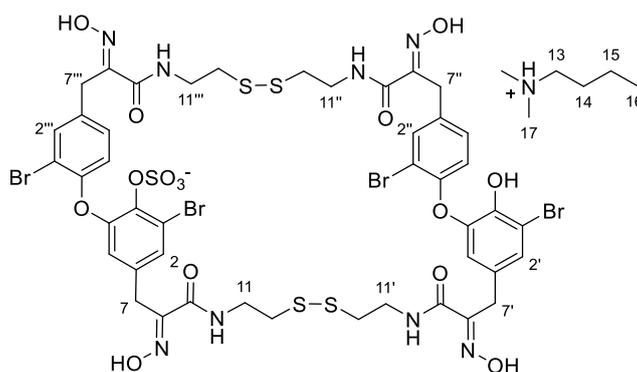


Figure 82. Structure de Hr2 (145).

Hr2 présente 25 centres d'insaturation.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C de **Hr2 (145)** (figure 83) présentent les éléments suivants :

- 10 signaux avec des δ_H compris entre 7,3 et 6,5 ppm et 24 signaux avec des δ_C compris entre 150 et 110 ppm, tous caractéristiques de la présence de noyaux aromatiques multisubstitués,
- 4 signaux avec des δ_C compris entre 160 et 150 ppm, caractéristiques des carbones des fonctions oximes,
- 4 signaux avec un δ_C au voisinage de 165 ppm, caractéristiques des fonctions carbonyles, et,
- 4 signaux sous la forme de singulets avec des δ_H compris entre 3,9 et 3,6 ppm, caractéristiques de méthylènes isolés et 8 signaux sous la forme de triplets avec des δ_H compris entre 3,6 et 2,7 ppm, significatifs de méthylènes couplés deux à deux.

¹⁰⁶ Rodriguez A. D., Akee R. K., Scheuer P. J. 1987, Two bromotyrosine-cysteine derived metabolites from a sponge. *Tetrahedron Lett.*, **28** (42), 4989-4992.

¹⁰⁷ Shim S. S., Lee H.-S., Shin J., Kwon H. J. 2004, Psammalin A, a marine natural product, inhibits aminopeptidase N and suppresses angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett.*, **203** (2), 163-169.

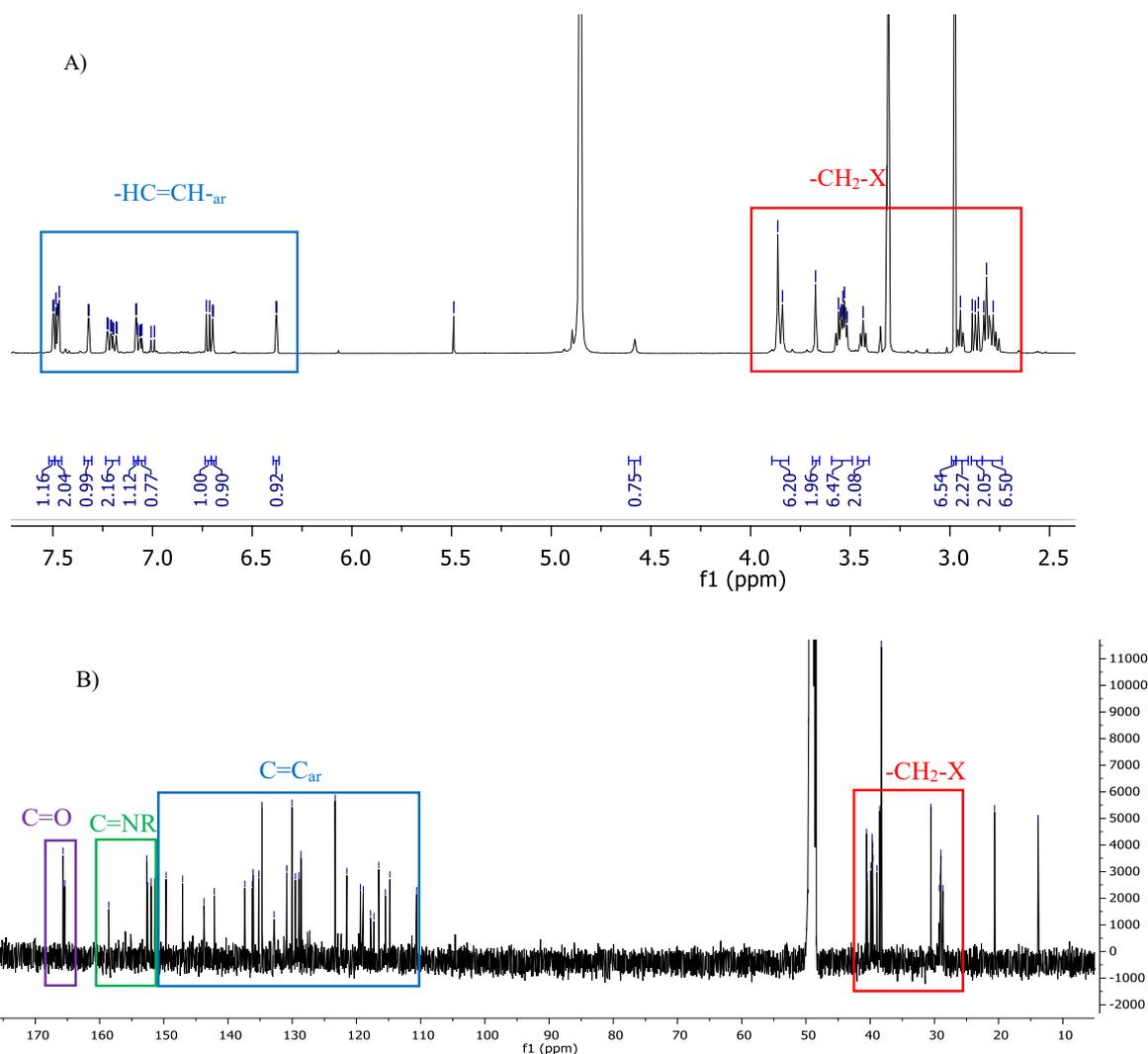


Figure 83. Spectres RMN (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **Hr2** (d_4 -MeOH).

Une analyse fine des différentes données spectrales (SMHR, RMN 1D et 2D) avec les données de la bibliographie, notamment celles relatives aux dérivés bromotyrosines, nous a permis de décomposer la structure de **Hr2** (**145**) en 4 types de fragments : F1 à F4 (figure 84).

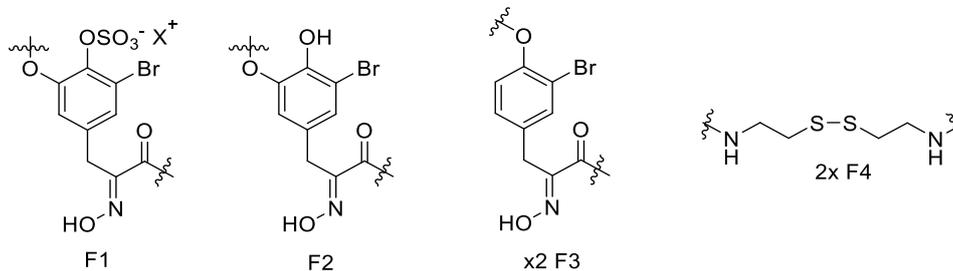


Figure 84. Structures des fragments F1-4 de **Hr2**.

Structure des fragments F1 et F2

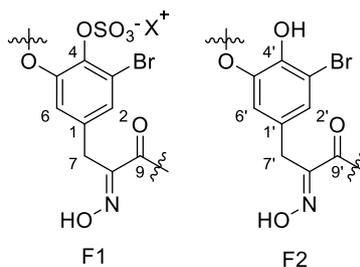


Figure 85. Structures des fragments F1 et F2.

Les fragments F1 et F2 sont très proches d'un point de vue structural (figure 85). Le fragment F1 présente des signaux à δ_{H} 7,32 ppm (1H, *d*, $^3J = 1,9$ Hz, H-2) et 6,70 ppm (1H, *d*, $^3J = 2,0$ Hz, H-6), caractéristiques d'un cycle aromatique 1,3,4,5-tétrasubstitué et un signal à δ_{H} 3,84 ppm (2H, *s*, H-7), caractéristique du méthylène au voisinage du cycle aromatique et de l'oxime. De façon identique, le fragment F2 présente des signaux à δ_{H} 7,08 ppm (1H, *d*, $^3J = 2,0$ Hz, H-2') et 6,38 ppm (1H, *d*, $^3J = 1,9$ Hz, H-6'), caractéristiques d'un cycle aromatique 1,3,4,5-tétrasubstitué et un signal à 3,67 ppm (2H, *s*, H-7'), caractéristique d'un méthylène au voisinage du cycle aromatique et de l'oxime. Les corrélations observées par RMN COSY ^1H - ^1H pour les fragments F1 et F2 sont reportées à la figure 86.

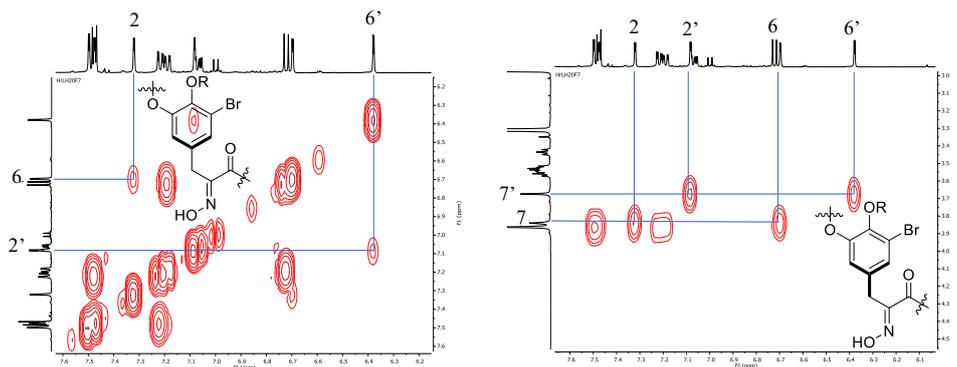


Figure 86. Spectres RMN COSY ^1H - ^1H des fragments F1 et F2 de **Hr2** (*d*₄-MeOH, 500/500 MHz).

Les fragments F1 et F2 diffèrent notamment par le substituant de l'oxygène. Le fragment F1 présente un signal à δ_{C} 142,13 (1C, C-4), plus blindé que son équivalent dans le fragment F2 pour lequel un signal est observé à δ_{C} 147,07 (1C, C-4'), caractéristique, en accord avec la formule brute et les données de la bibliographie, d'un groupement sulfate sur la position C-4.

Structure des fragments F3

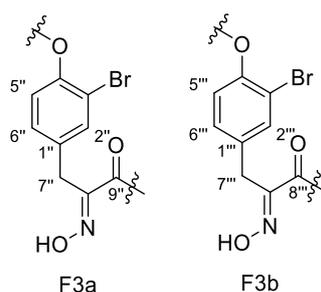
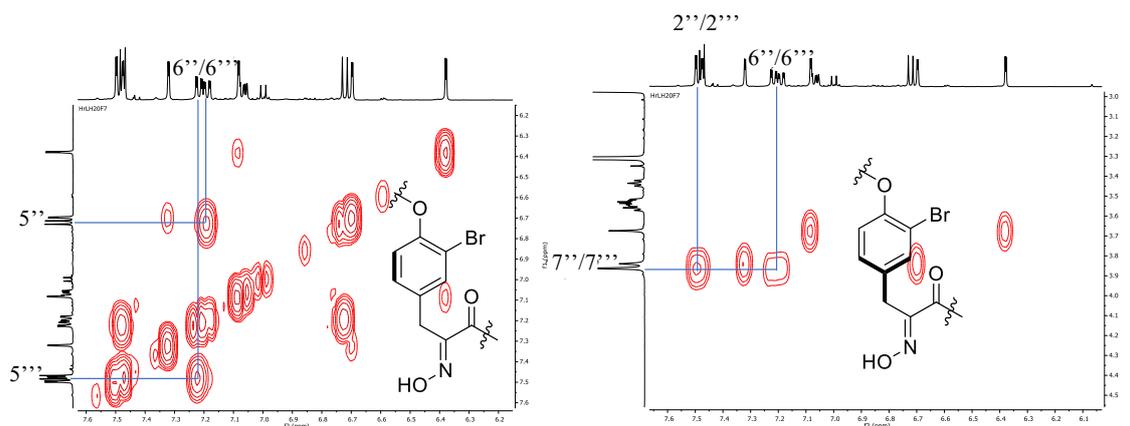


Figure 87. Structures des fragments F3a et F3b.

Le fragment F3 est présent à deux reprises dans le composé **Hr2 (145)** sous la forme des sous-fragments F3a et F3b (figure 87). On observe un premier ensemble de signaux à δ_{H} 7,50 ppm (1H, *dd*, $^3J = 11-2,9$ Hz, H-2''), 7,47 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,4$ Hz, H-5'') et 7,21 ppm (1H, *dd*, $^3J = 13,9-2,2$ Hz, H-6''), un deuxième ensemble de signaux à δ_{H} 7,50 ppm (1H, *dd*, $^3J = 11-2,9$ Hz, H-2'''), 6,72 ppm (1H, *d*, $^3J = 8,4$ Hz, H-5''') et 7,16 ppm (1H, *dd*, $^3J = 13,9-2,2$ Hz, H-6'''), tous deux caractéristiques d'un cycle aromatique 1,3,4-trisubstitué ainsi qu'un signal à δ_{H} 3,86 ppm (4H, *s*, H-7'', H-7''') caractéristique des méthylènes situés entre un cycle aromatique et une fonction oxime. Les corrélations observées par RMN COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ pour les fragments F3a et F3b sont reportées à la figure 88.

Figure 88. Agrandissements des spectres RMN COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ des fragments F3 de **Hr2** (*d*-MeOH, 500/500 MHz).

Structure du fragment F4

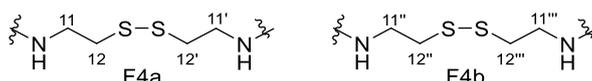


Figure 89. Structures des fragments F4a et F4b.

Le fragment F4 est présent à deux reprises dans le composé **Hr2 (145)** sous la forme des sous-fragments F4a et F4b (figure 89). Pour le sous-fragment F4a, on observe des signaux à δ_{H} 3,55 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,8$ Hz, H-11) et à 3,53 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,8$ Hz, H-11'), caractéristiques des méthylènes au voisinage des fonctions amides. Par ailleurs, les signaux à δ_{H} 2,95 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,4$ Hz, H-12) et 2,83 ppm (2H,

t , $^3J = 6,8$ Hz, H-12') sont caractéristiques de méthylènes au voisinage de ponts disulfure. De façon identique, on observe pour le sous-fragment F4b des signaux à δ_{H} 3,53 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-11'') et à 3,44 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-11'''), caractéristiques de méthylènes au voisinage de fonctions amides, ainsi que des signaux à δ_{H} 2,83 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-12'') et 2,73 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-12'''), caractéristiques de méthylènes au voisinage des ponts disulfure. Les corrélations H₂-11/ H₂-12, H₂-11'/H₂-12', H₂-11''/H₂-12'' et H₂-11'''/H₂-12''' par RMN COSY ¹H-¹H nous ont permis d'affiner la structure des sous-fragments F4a et F4b (figure 90).

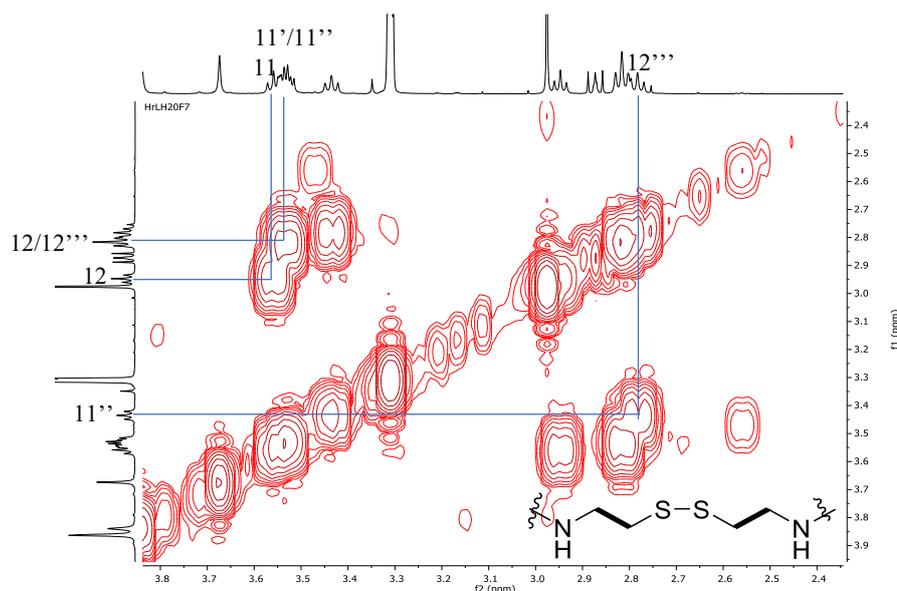


Figure 90. Agrandissement du spectre RMN COSY ¹H-¹H des fragments F4 de **Hr2** (*d*₄-MeOH, 500/500 MHz).

Proposition de structure

Les fragments F1 à F4 permettent d'expliquer 24 des 25 centres d'insaturation. En l'absence d'autres groupements fonctionnels dans les spectres RMN ¹H et ¹³C, nous avons déduite que le composé **Hr2** (**145**) est cyclique. En se basant sur les différentes expériences RMN 2D (COSY ¹H-¹H et HMBC ¹H-¹³C) et sur la bibliographie associée aux dérivés de la bromotyrosine⁹⁹, nous avons pu établir les connexions entre les différents fragments F1 à F4.

Les corrélations observées par RMN HMBC ¹H-¹³C entre les signaux à δ_{H} 3,84 ppm (2H, *s*, H-7) et à δ_{H} 3,53 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-11) et le signal à δ_{C} 165,43 ppm (1C, C-9) (figure 91) nous ont permis de connecter les fragments F1 et F4a. De façon identique, les corrélations observées par RMN HMBC ¹H-¹³C entre les signaux à δ_{H} 3,86 ppm (2H, *s*, H-7'') et δ_{H} 3,53 ppm (2H, t , $^3J = 6,8$ Hz, H-11'') avec le signal à δ_{C} 165,70 ppm (1C, C-9'') nous ont permis de lier les fragments F3 et F4b.

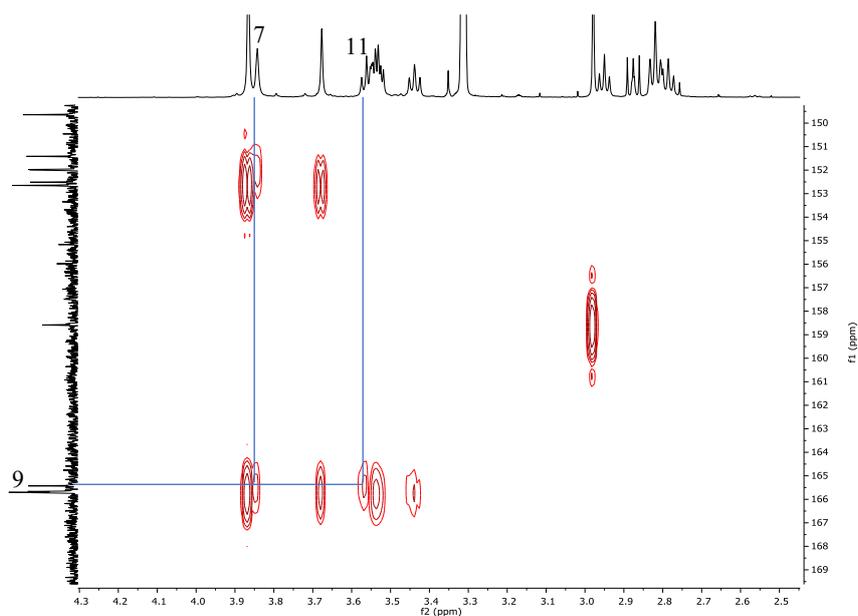


Figure 91. Agrandissement du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de **Hr2** (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz).

Puisque la molécule est cyclique, il peut alors subsister deux possibilités pour la structure de **Hr2** (**145**) (figure 92).

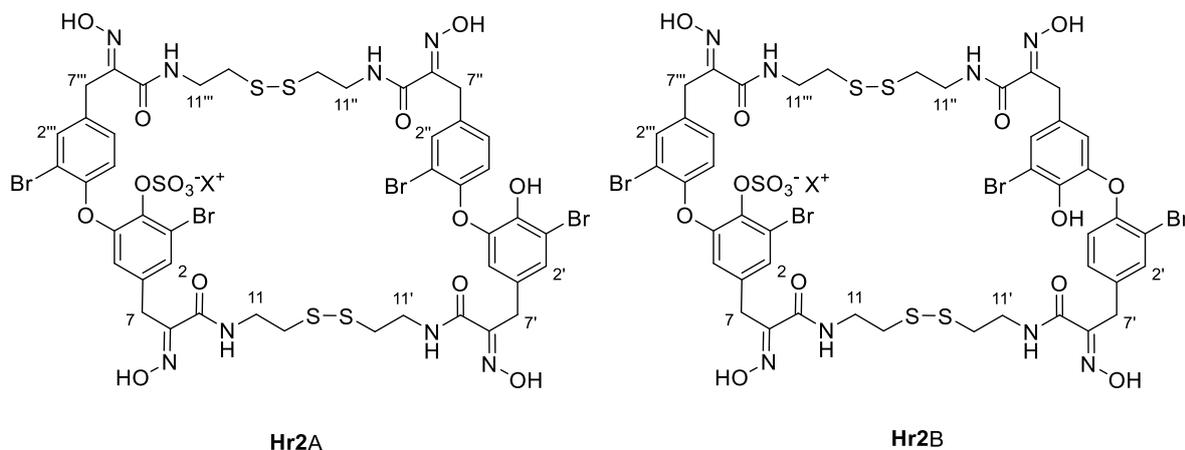


Figure 92. Structures possibles pour **Hr2**.

Cependant, nous n'observons aucune corrélation sur le spectre RMN NOESY ^1H - ^1H entre les protons H-12 et H-12' ni entre les protons H-12'' et H-12''' . D'après l'équipe de Jung⁹⁹, cela implique bien un enchaînement de type **Hr2A** et non un enchaînement de type **Hr2B**. Ainsi, par analogie à la cyclobispsammaline A (**111**), le fragments F2 est lié au fragment F1 *via* une liaison de type F4 et l'un des fragments F3 est directement relié au fragment F1 pour donner la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaline A **Hr2** (**145**) (figure 93).

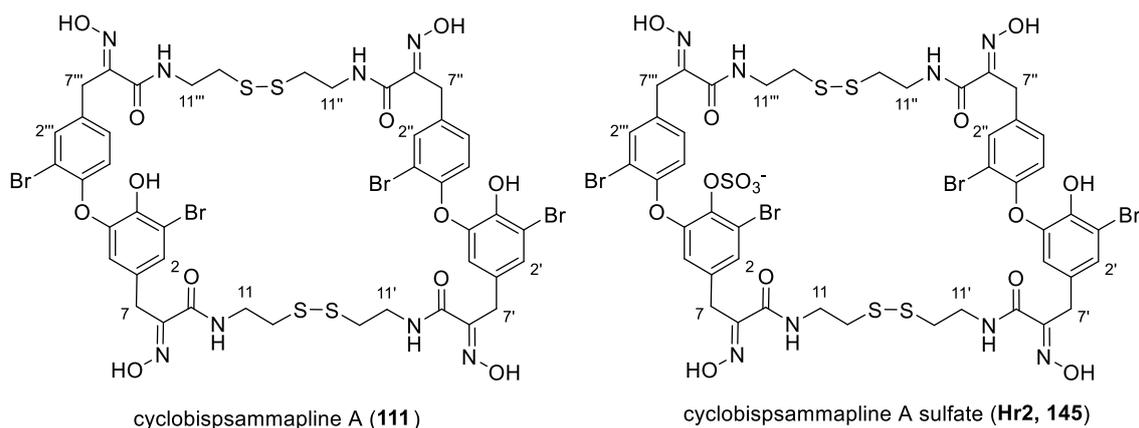


Figure 93. Structures de la cyclobissammapline A (111) et de la 4-*O*-sulfatocyclobissammapline A (Hr2, 145).

Stéréochimie des oximes

La stéréochimie des oximes a pu être déduite en se basant sur les déplacements chimiques par RMN ¹³C des méthylènes situés à proximité (*Z* ~ 35 ppm ; *E* ~ 28 ppm). Les carbones C-7, C-7', C-7'' et C-7''' présentent des signaux avec des δ_C compris entre 29,5 et 28,5 ppm, ce qui nous a permis de proposer une stéréochimie *E* pour les quatre oximes.

Contre-ion

Les spectres RMN ¹H et ¹³C de Hr2 (145) comportent également des signaux distincts provenant probablement du contre-ion. On observe d'une part quatre signaux à δ_H 2,88 ppm (2H, *m*, H-13), 1,58 ppm (2H, *m*, H-14), 1,38 ppm (2H, *sext*, ³*J* = 5,3 Hz, H-15) et 0,94 ppm (3H, *t*, ³*J* = 7,4 Hz, H-16), corrélés dans le spectre RMN COSY ¹H-¹H (figure 94), caractéristiques d'une chaîne *N*-butylamine. D'autre part, un signal singulet à 2,98 ppm (6H, *s*, H-17) caractéristique d'un groupement *N,N*-diméthylamine

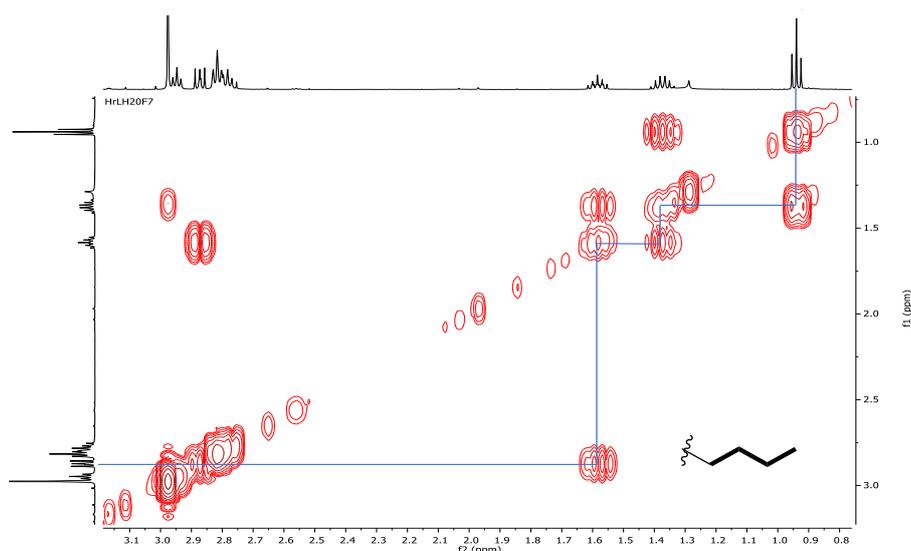


Figure 94. Spectre RMN COSY ¹H-¹H du groupement butyle (*d*₄-MeOH, 500/500 MHz).

L'ensemble de ces signaux est caractéristique d'un contre-ion de type *N,N*-diméthylbutylammonium.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé **Hr2 (145)** est regroupé dans le tableau 19.

Tableau 19. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C) de **Hr2** (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).

N°	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J(Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC ^1H - ^{13}C
1	137,39, Cq	-	-	-
2	128,94, CH	7,32, <i>d</i> , 2,0	6, 7	4, 5, 6, 7
3	C, Cq ^a	-	-	-
4	142,13, Cq	-	-	-
5	151,42, Cq	-	-	-
6	119,38, CH	6,70 <i>d</i> , 1,9	2, 7	2, 4, 7
7	29,23, CH ₂	3,84, <i>s</i>	2, 6	1, 2, 6, 8, 9
8	151,99, Cq	-	-	-
9	165,43, Cq	-	-	-
11	39,90, CH ₂	3,55, <i>t</i> , 6,8	12	9
12	40,45, CH ₂	2,95, <i>t</i> , 6,4	11	11
13	40,57, CH ₂	2,88, <i>m</i>	14	14, 15
14	30,55, CH ₂	1,58, <i>m</i>	13, 15	13, 15, 16
15	20,62, CH ₂	1,38, <i>sext</i> , 5,3	14, 16	13, 14, 16
16	13,85, CH ₂	0,94, <i>t</i> , 7,4	15	14, 15
17	38,25, CH ₃	2,98, <i>s</i>	-	-
1'	143,74, Cq	-	-	-
2'	128,68, CH	7,08, <i>d</i> , 1,9	6', 7'	1', 3', 6', 7'
3'	110,62, Cq	-	-	-
4'	147,07, Cq	-	-	-
5'	152,65, Cq	-	-	-
6'	114,79, CH	6,38, <i>d</i> , 1,9	2', 7'	1', 2', 4', 7'
7'	28,67, CH ₂	3,67, <i>s</i>	2', 6'	7', 9'
8'	152,65, Cq	-	-	-
9'	165,66, Cq	-	-	-
11'	39,57, CH ₂	3,53, <i>t</i> , 6,8	12'	9'
12'	38,51, CH ₂	2,83, <i>t</i> , 6,8	11'	11'
1''	136,08, Cq	-	-	-
2''	134,76, CH	7,50, <i>dd</i> , 2,1, 11	6'', 7''	1'', 4'', 6'', 7''
3''	116,53, Cq	-	-	-
4''	149,64, Cq	-	-	-
5''	123,36, CH	7,47, <i>d</i> , 8,4	6''	1'', 4''
6''	130,06, CH	7,21, <i>dd</i> , 2,2, 13,9	2'', 6'', 7''	2'', 4'', 7''
7''	28,99, CH ₂	3,86, <i>s</i>	2'', 6''	6'', 8'', 9''
8''	152,65, Cq	-	-	-
9''	165,70, Cq	-	-	-
11''	39,69, CH ₂	3,53, <i>t</i> , 6,8	12''	9''
12''	38,51, CH ₂	2,83, <i>t</i> , 6,8	11''	11''
1'''	136,20, Cq	-	-	-
2'''	135,19, CH	7,50, <i>dd</i> , 2,1, 11	7'''	1''', 4''', 6''', 7'''
3'''	115,49, Cq	-	-	-
4'''	151,97, Cq	-	-	-
5'''	121,54, CH	6,72, <i>d</i> , 8,4	6'''	1''', 3''', 4'''
6'''	130,88, CH	7,16, <i>dd</i> , 2,2, 13,8	5'''	2''', 4''', 7'''
7'''	29,08, CH ₂	3,86, <i>s</i>	2'''	1''', 8''', 9'''
8'''	152,65, Cq	-	-	-
9'''	165,70, Cq	-	-	-
11'''	39,65, CH ₂	3,44, <i>t</i> , 6,8	12'''	12'''
12'''	38,96, CH ₂	2,73, <i>t</i> , 6,8	11'''	11'''

^a non discernable

III.3. Hypothèse de biosynthèse

La biosynthèse du composé **Hr2 (145)** semble impliquer deux psammaphline A (**10**) pour la formation de la cyclobispsammaphline A (**111**) puis une réaction de sulfatation (schéma 16).

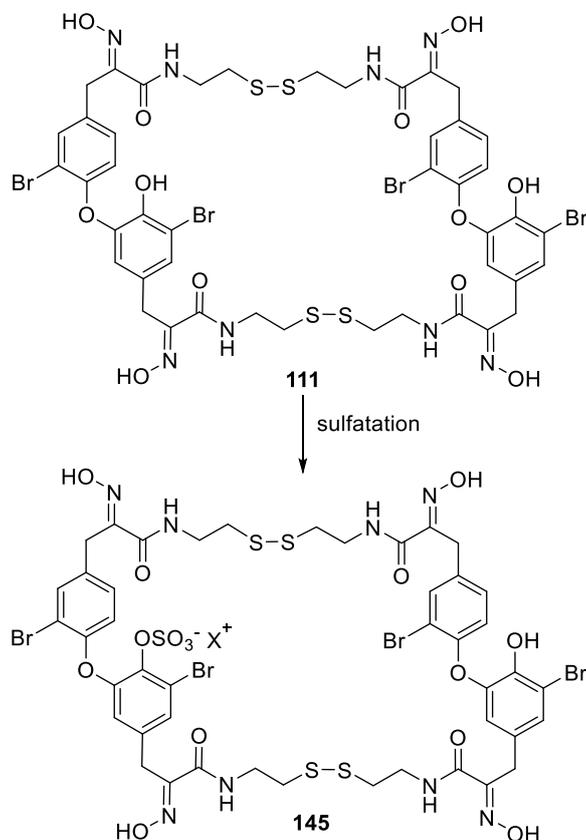


Schéma 16. Voie de biosynthèse hypothétique proposée pour la 4-O-sulfatocyclobispsammaphline A (**Hr2**).

III.4. Discussion

Les dérivés bromotyrosines sont des métabolites spécifiques d'éponges de l'ordre Verongiida. Ces dernières années, la psammaphline A (**10**) a été isolée des éponges *Psammaphysilla* sp. et *Aplysinella rhax*^{94,105} et la cyclobispsammaphline A (**111**) a été isolée de l'association entre les éponges *Jaspis* sp. et *Poecillastra* sp.⁹⁹ En revanche, la 4-O-sulfatocyclobispsammaphline A (**Hr2**, **145**) est isolée et décrite pour la première fois à partir d'*Hexadella racovitzai*. Il s'agit d'un nouveau métabolite.

La présence d'un groupement sulfate au niveau de dérivés bromotyrosines est assez peu commune. Parmi ces dérivés, on distingue ainsi la 4-O-sulfatopsammaphline (**9**), la ianthésine E (**146**), la 10-O-sulfatobastadine-3 (**132**), la 15,34-O-disulfatobastadine-7 (**133**), la 34-O-sulfatobastadine-13 (**134**) et la 4-O-sulfatobisaprasine (**109**) (figure 95).

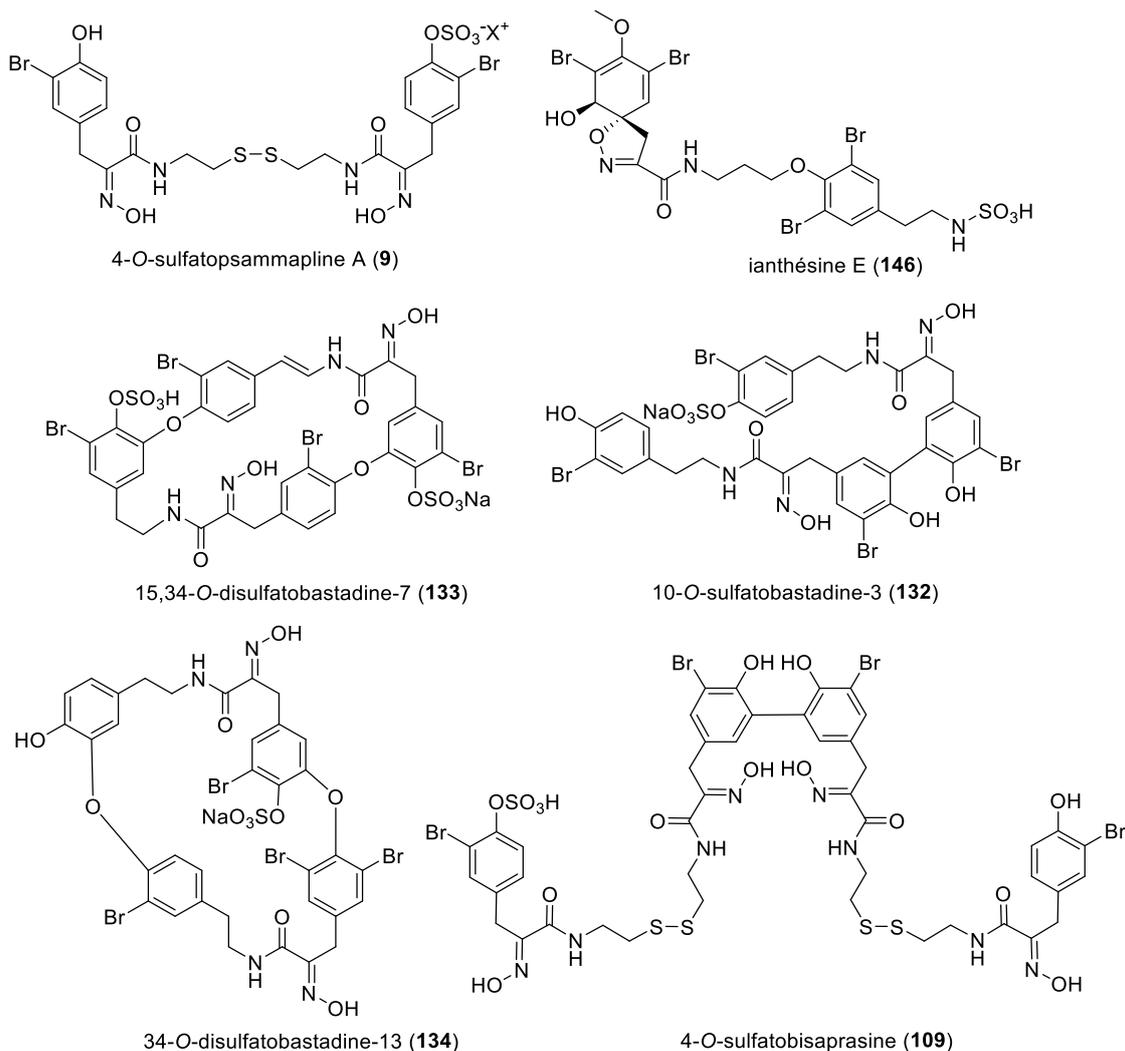


Figure 95. Structures des dérivés bromotyrosines sulfatés.

Lorsque *Aplysinella rhax* est blessée, la 4-O-sulfatopsammapline A (9) est convertie en psammapline A (10) via des enzymes spécifiques. Il s'agit vraisemblablement d'un mécanisme de défense spécifique de l'éponge (cf Partie A *Caulerpa taxifolia*).

Les rôles écologiques de la 4-O-sulfatocyclobispsammapline A (145) et de la cyclobispsammapline A (111) restent à élucider.

III.5. Activités biologiques

Le composé **Hr2** (145) a été évalué pour ses propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques. La recherche de propriétés antibactériennes a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Gaëtan Burgaud du LUBEM de l'UBO basé à Plouzané. Les propriétés anti-inflammatoires et cytotoxiques ont été évaluées en collaboration avec la plateforme « KISSf » de la Station Biologique de Roscoff dirigée par le Dr. Stéphane Bach.

III.5.1. Activités antibactériennes

Un criblage primaire a été réalisé par diffusion sur des milieux solides pré-inoculés avec des bactéries à Gram négatif et positif pour différentes concentrations du composé **Hr2 (145)** (de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ à 1,28 mg/mL).

Le composé **Hr2 (145)** ne présente aucune activité sur *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enterica* (CIP8297), *Enterobacter aerogenes* (CIP6086), *Klebsiella oxytoci* (CIP7932) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853, Mex AB, et Brse). Une faible activité a été décelée sur *Yersinia ruckeri* (ATCC29473), *Streptococcus equinus* (NRRLB4268), *Enterococcus faecalis* (CIPA186) et sur *Listeria monocytogenes* (80R100).

Par ailleurs, **Hr2 (145)** induit un changement de morphologie de *P. aeruginosa* (souches OprD⁻ et souche VIM2 résistantes aux carbapénèmes) à une concentration de 1,28 mg/mL . Il peut s'agir d'un signe d'une inactivation de la bactérie.

Enfin, une activité antibactérienne significative a été observée sur *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) (jusqu'à 64 $\mu\text{g/mL}$) ainsi que vis-à-vis des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (souches MeC C et MeC A III). On note par ailleurs une meilleure activité sur *S. aureus* et *S. aureus* MeC C par rapport à *S. aureus* MeC A III.

Par la suite, la CMI de **Hr2 (145)** a été mesurée en milieu liquide vis-à-vis des souches pour lesquelles une activité antibactérienne avait pu être observée en milieu solide. Dans ce contexte, on observe :

- Une faible activité antibactérienne sur *Y. ruckeri* avec une CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$,
- Aucun effet sur les 2 souches de *P. aeruginosa* testées (le changement de morphologie n'est pas visualisable en milieu liquide),
- Une faible activité antibactérienne sur *E. faecalis* avec une CMI de 640 $\mu\text{g/mL}$ ainsi que sur *Streptococcus equinus* avec une CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$,
- Une CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$ vis-à-vis de *S. aureus*, une CMI comprise entre 16 et 32 $\mu\text{g/mL}$ sur *S. aureus* MeC C et une faible CMI de 640 $\mu\text{g/mL}$ sur *S. aureus* MeC A III.

III.5.2. Activités anti-inflammatoires

L'activité anti-inflammatoire du composé **Hr2 (145)** a également été évaluée. Pour l'ensemble des analyses, les propriétés de **Hr2 (145)** ont été comparées à celle du DMSO et testées à une concentration finale de 0,1% ou 1 %. Dans le cas de la stimulation au TNF, le parthénolide a été utilisé en tant que molécule de référence.

Sans stimulation au TNF α , le composé **Hr2 (145)** active la voie NF- κ B et possède un effet pro-inflammatoire ou immunostimulant (figure 96, A). Avec stimulation au TNF α , le composé **Hr2 (145)** diminue légèrement l'activité de la voie NF- κ B à 10 μM . A 100 μM , le composé **Hr2 (145)** diminue de manière significative l'activité de la voie NF- κ B (figure 96, B). Cette molécule possède un effet anti-

inflammatoire / immunodépresseur ou un effet potentialisateur du $\text{TNF}\alpha$, comparable à celui du parthénolide à $18 \mu\text{M}$.

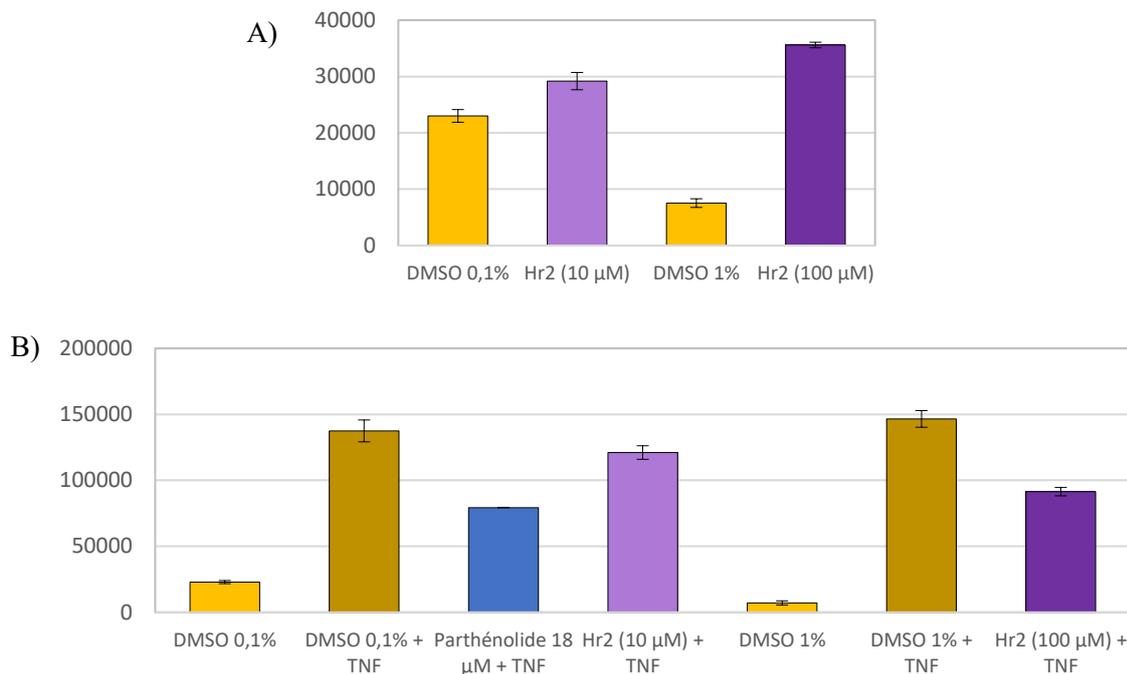


Figure 96. Activité anti-inflammatoire de **Hr2** A) sans stimulation au $\text{TNF}\alpha$ et B) avec stimulation au $\text{TNF}\alpha$.

Cette molécule présente donc des effets contradictoires : sans TNF , **Hr2** (**145**) active la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$, mais avec stimulation de la voie au $\text{TNF}\alpha$, l'activité d' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ est diminuée.

III.5.3. Cytotoxicité

Le composé **Hr2** (**145**) a été évalué pour ses propriétés cytotoxiques vis-à-vis de lignées tumorales et saines : U2OS (ostéosarcome), Jurkat A3 (leucémie), HepG2 (cancer du foie), HT29 (cancer colorectal), Mcf7 (cancer du sein) et RPE1 (cellules saines de l'épithélium rétinien). Les résultats obtenus montrent que le composé **Hr2** (**145**) présente une faible cytotoxicité à 10 et 100 μM sur les cellules HT29 et RPE1, similaire à la STS à 10 et 100 nM. Sa cytotoxicité est également faible à 10 μM sur U2OS et Jurkat A3 mais devient significative à 100 μM (figure 97). Toutefois dans le cas de la lignée U2OS, le composé **Hr2** (**145**) est moins efficace à 100 μM que la STS.

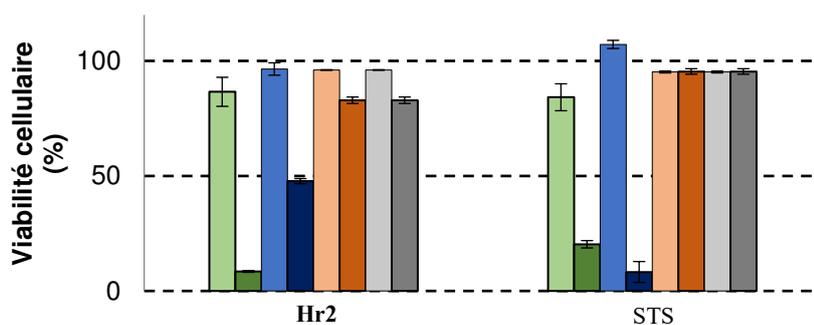


Figure 97. Cytotoxicité de **Hr2** sur les lignées cellulaires Jurkat A3 (vert), U2OS (bleu), RPE1 (orange) et HT29 (gris) après 24h à deux concentrations (clair : 10 μM , foncé : 100 μM) et comparaison avec le standard STS.

A partir de ces résultats, les CI_{50} de la 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A (**Hr2**) ont pu être déterminées pour les lignées cellulaires Jurkat A3 et U2OS. Elles sont modérées et s'élèvent à 40 μ M sur U2OS et 35 μ M sur Jurkat A3.

IV. Conclusion

Les éponges appartenant à l'ordre Verongiida produisent différentes classes de dérivés bromotyrosines aux propriétés biologiques d'intérêt potentiellement valorisables dans le domaine des antitumoraux, des antifoulings et des antimicrobiens. Parmi les éponges de Méditerranée appartenant à l'ordre Verongiida, seules *Aplysina aerophoba* et *Aplysina cavernicola* ont fait l'objet de nombreuses études. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une éponge méditerranéenne, *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896), qui, à notre connaissance, n'avait fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation complète d'une molécule déjà répertoriée, la psammapline A (**10**), isolée de plusieurs éponges de l'ordre Verongiida et un nouveau métabolite, la 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A (**145**). Les dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire sont rares. La 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A (**145**), a été évaluée pour ses propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques. Les activités anti-inflammatoires et cytotoxiques obtenues ne sont pas significatives. Plusieurs métabolites restent à isoler et à caractériser. Le rôle écologique des dérivés sulfatés et non sulfatés des dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire doit être étudié.

Le (ou les) organisme(s) producteur(s) des dérivés de la bromotyrosine d'éponges de l'ordre Verongiida reste(nt) faiblement exploré(s). Une origine microbienne, bactérienne et/ou fongique, n'est pas exclue et reste également à étudier.

Partie B :

Chapitre 3 :

Métabolisme spécialisé de

Crambe crambe

I. Introduction

De nombreuses éponges appartenant aux ordres Poecilosclerida et Axinellida produisent différentes classes d'alcaloïdes guanidiniques telles que les crambines, crambescines, crambescidines, batzelladines et nétamines aux propriétés biologiques d'intérêt potentiellement valorisables dans le domaine des antitumoraux, des antiviraux et des antimicrobiens.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une éponge de Méditerranée relativement bien étudiée depuis les années 90, notamment par notre équipe, *Crambe crambe* (Schmidt, 1862), pour une application dans le domaine des biocides. Les travaux préliminaires menés sur un échantillon de *Crambe crambe* collecté au Maroc en 2014 ont révélé la présence de plusieurs métabolites de faible poids moléculaire potentiellement nouveaux. Deux classes d'alcaloïdes guanidiniques ont été isolées à ce jour de *C. crambe* : les crambescines et les crambescidines. Les études relatives aux crambescines, notamment les propriétés biologiques associées, sont peu nombreuses en raison des difficultés rencontrées lors de l'étape d'isolement pour les obtenir avec un degré de pureté suffisant.

Après une brève description de *Crambe crambe* ainsi que des principales classes d'alcaloïdes guanidiniques isolés d'éponges appartenant aux ordres Poecilosclerida et Axinellida, la suite de ce manuscrit sera consacrée aux travaux menés sur l'échantillon de *Crambe crambe* collecté à Cabo Negro (Maroc) en 2014.

II. *Crambe crambe* : état de l'art

II.1. Classification

La famille des Crambeidae de l'ordre Poecilosclerida regroupe quatre genres : *Crambe*, *Discorhabdella*, *Lithochela* et *Monanchora*¹⁰⁸ (tableau 20).

Tableau 20. Classification de *Crambe crambe*.

Règne Animal	
Division	Porifera
Classe	Demospongiae
Ordre	Poecilosclerida
Famille	Crambeidae
Genre	<i>Crambe</i>
Espèce	<i>Crambe crambe</i>

¹⁰⁸ D'après la base de données WoRMS, accédée le 24/08/17

II.2. Description morphologique

Crambe crambe (Schmidt, 1862) est une éponge encroûtante de couleur orange à rouge principalement recensée en Méditerranée, mais également retrouvée dans l'Atlantique, la Manche et la mer du Nord. Elle se développe dans un environnement marin peu profond (jusqu'à 30 m) sur des substrats durs, des coquilles de mollusques ou sur les rhizomes de posidonies. Sa surface peut atteindre jusqu'à 1 m². Elle est recouverte de canaux exhalants visibles sous forme de veines et menant à de gros oscules. Il s'agit d'une espèce hermaphrodite pour laquelle la reproduction est sexuée¹⁰⁹.

II.3. Métabolisme spécialisé de *C. crambe*

Depuis la fin des années 90, plusieurs alcaloïdes guanidiniques avec une structure bi-, tri- ou pentacyclique ont été isolés d'éponges appartenant aux ordres Poecilosclerida et Axinellida.

Ces métabolites présentent des activités biologiques diverses, notamment antimicrobiennes, antivirales et antitumorales¹¹⁰. Ces alcaloïdes ont été placés dans plusieurs classes¹¹¹, pour lesquelles nous proposons une légère modification¹¹⁰ (tableau 21) :

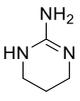
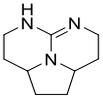
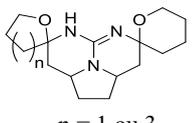
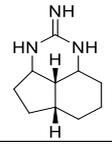
- Classe 1 : les squelettes pyrimidinamine mono- et bicycliques, tels que les crambescines,
- Classe 2 : les squelettes triazaacénaphthylène tricycliques contenant un ou plusieurs groupements guanidine comme les batzelladines,
- Classe 3 : les squelettes triazaacénaphthylène pentacycliques comme ceux des crambescidines,
- Classe 4 : les squelettes cyclopentaquinazolinamine tricycliques comme les nétamines.

¹⁰⁹ D'après la base de données DORIS <http://doris.ffessm.fr/Especes/Crambe-crambe-Eponge-encroûtante-orange-rouge-112> accédée le 24/08/17

¹¹⁰ Sfecci E., Lacour T., Amade P., Mehiri M. 2016, Polycyclic guanidine alkaloids from Poecilosclerida marine sponges. *Mar. Drugs*, **14** (77), 24 p.

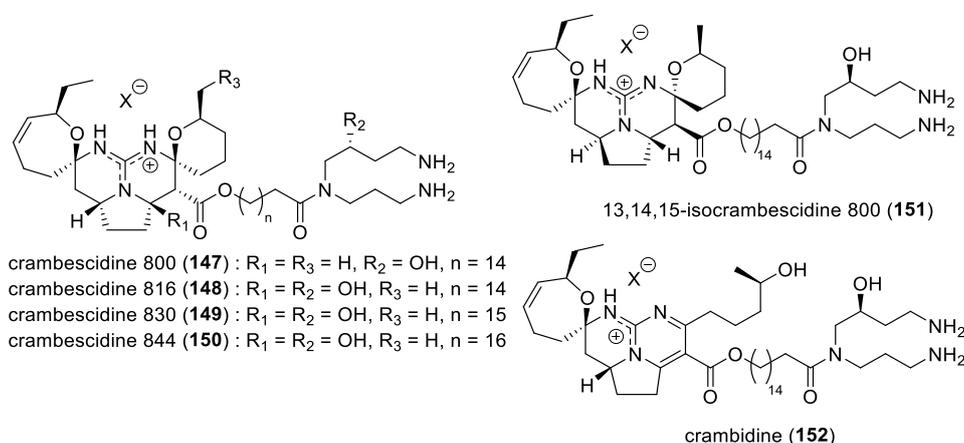
¹¹¹ Santos M. F., Harper P. M., Williams D. E., Mesquita J. T., Pinto E. G., da Costa-Silva T. A., Hajdu E., Ferreira A. G., Santos R. A., Murphy P.J., et al. 2015, Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. *J. Nat. Prod.*, **78**, 1101–1112.

Tableau 21. Différentes classes d'alcoïdes guanidiniques¹¹¹.

Classe	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Structure			 n = 1 ou 3	
Eponges	Batzella Crambe Pseudaxinella (Ptilocaulis)	Batzella Clathria Monanchora	Crambe Hemimycale Monanchora Neofolitispa Ptilocaulis	Acanthella Arenochalina Batzella Biemna Clathria Monanchora Ptilocaulis

Jusqu'à présent, seules deux familles d'alcoïdes guanidiniques ont été isolées de *C. crambe* : les crambescines (première classe) et les crambescidines (troisième classe). Les composés appartenant à la deuxième et à la quatrième classe d'alcoïdes guanidiniques ne seront donc pas détaillés dans ce chapitre.

Entre 1991 et 1993, six crambescidines de la troisième classe ont été isolées de *C. crambe* (figure 98). Il s'agit des crambescidines 800, 816, 830 et 844 (**147-150**), de l'isocrambescidine 800 (**151**) ainsi que de la crambidine (**152**)¹¹². Les crambescidines du troisième groupe et les batzelladines du deuxième groupe ont fait l'objet d'une revue en 2016 par notre équipe¹¹¹ (Annexe 4 du Tome II).

**Figure 98.** Crambescidines isolées de *C. crambe*¹¹².

Les crambescidines présentent une large gamme de bioactivités. A titre d'exemple, la crambescidine 816 (**148**) est un antibactérien puissant et présente des propriétés cytotoxiques avérées sur plusieurs lignées cellulaires tumorales¹¹³.

¹¹² a) Jares-Erijman E. A., Sakai R., Rinehart K. L. 1991, Crambescidins: New antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *J. Org. Chem.* **56**, 5712–5715. b) Berlinck R. G. S., Braekman J. C., Daloze D., Bruno I., Riccio R., Feri S., Spampinato S., Speroni E. 1993, Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca²⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. *J. Nat. Prod.*, **56** (7), 1007–1015.

¹¹³ a) Rinehart K. L., Jares-Erijman E. A. 1998, Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. US Pat. 5756734A. b) Olszewski A., Sato K., Aron Z. D., Cohen F., Harris A., McDougall B. R., Robinson

Par ailleurs, les crambescines de la première classe peuvent être divisées en trois types (figure 99) :

- Les crambescines de type A, comportant un noyau pyrrolidine,
- Les crambescines de type B, constituées d'un fragment spiro tétrahydrofurane en position C-8 et,
- Les crambescines C, qui présentent en position C-8, une chaîne latérale de type 3-hydroxypropyle.

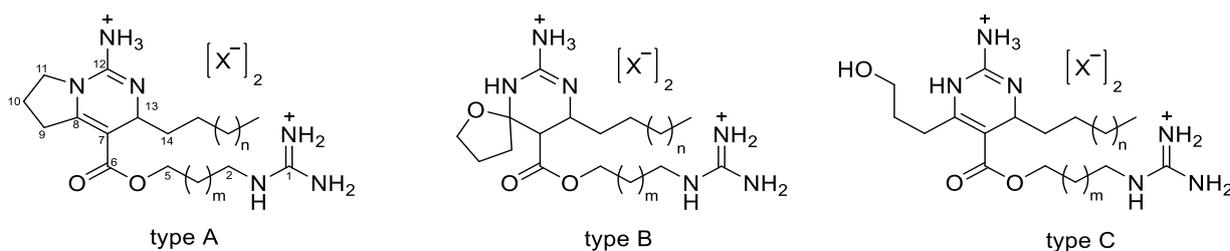


Figure 99. Structures des crambescines de type A, B et C.

Chaque type de crambescines peut être sous-divisé en plusieurs catégories en fonction de la nature des chaînes latérales aux positions C-7 et C-13. On distingue les crambescines suivantes :

- [A-C] 1, lorsque la chaîne latérale en position C-13 est une chaîne alkyle de type C_9H_{19} ($n = 6$) et que la chaîne latérale en position C-7 renferme au moins six carbones dans sa partie centrale ($m \geq 4$),
- [A-C] 2, lorsque la chaîne latérale en position C-13 est une chaîne alkyle composée d'au moins 5 carbones ($n \geq 2$) et que la chaîne latérale en position C-7 possède seulement quatre carbones dans sa partie centrale ($m = 2$), et,
- [A-C] 3, lorsque la chaîne latérale en position C-13 est une chaîne alkyle polyinsaturée de type $C_{15}H_{23}$ et que la chaîne latérale en position C-13 possède au moins six atomes de carbones ($m \geq 4$).

Enfin, depuis quelques années, la dénomination des crambescines est complétée par la masse moléculaire moyenne associée.

Tous ces éléments descriptifs seront utilisés pour désigner l'ensemble des crambescines extraites depuis les années 90.

Les crambescines A2 448 (**153**) et B1 480 (**154**) sont les premières à avoir été décrites de *C. crambe*¹¹⁴, juste avant les crambescines C1 480 (**155**) et C2 466 (**156**)¹¹⁵. A l'époque, elles furent nommées à tort « crambines », une nomenclature déjà employée pour désigner des composés peptidiques. De plus, la

Jr W. E., Overman L. E., Weiss G. A. 2004, Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56^{lck}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 14079–14084. c) Ottinger S., Kloppel A., Rausch V., Liu L., Kallifatidis G., Gross W., Gebhard M.-M., Brummer F., Herr I. 2012, Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract. *Int. J. Cancer*, **130**, 1671–1681.

¹¹⁴ Berlinck R. G. S., Braekman J. C., Daloz D., Hallenga K., Ottinger R. 1990, Two new guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. *Tetrahedron Lett.* **31** (45), 6531–6534.

¹¹⁵ Berlinck R. G. S., Braekman J. C., Daloz D., Bruno I., Riccio R., Rogeau D., Amade P. 1992, Crambines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*. *J. Nat. Prod.*, **55** (4), 528–532.

stéréochimie du carbone C-8¹¹⁶ ainsi que la longueur des chaînes latérales aux positions C-7 et C-13¹¹⁷ ont été revues et corrigées en 1993.

La crambescine B1 480 (**154**) a montré une activité cytotoxique (CI₅₀ de 1 µg/mL) sur des cellules leucémiques (L1210). Plus récemment, la crambescine C1 480 (**155**) a montré, à faible concentration, un effet protecteur sur des cellules tumorales du foie (HepG2) soumises à un stress oxydatif ainsi qu'une inhibition de la division des mêmes cellules à plus haute concentration¹¹⁸. Par ailleurs, la crambescine C1 480 (**155**) diminue la viabilité cellulaire de neurones corticaux de 22,6% à une concentration de 1 µM¹¹⁹.

En 2012, de nouvelles crambescines ont été isolées de *C. crambe*. Il s'agit de la didéhydrocrambescine A1 460 (**157**) ainsi que des crambescines A2 462 (**158**), A2 476 (**159**), B1 466 (**160**) et B1 494 (**161**), C1 466 (**162**) et C1 494 (**163**)¹¹⁹. Pour ces dernières, la configuration absolue des centres asymétriques a été déterminée, pour la première fois, par comparaison des spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux (DC) avec les spectres de dichroïsme circulaire électroniques (ECD) théoriques.

Une méthode analytique basée sur un couplage CLUHP x CLUHP – QToF – SM/SM a été mise au point afin de détecter les crambescines présentes de façon minoritaire dans un extrait de *C. crambe*¹²⁰. De nouvelles crambescines [A-C] 3 ont pu être identifiées par cette méthode. Il est à noter toutefois que cette approche n'aurait pas été possible sans la purification, au préalable, d'une crambescine A3 de cette série. Cette dernière a servi de molécule de référence pour déterminer la position des doubles liaisons par RMN. C'est ainsi que les crambescines A3 524 (**164**), A3 538 (**165**), B3 542 (**166**), B3 556 (**167**), C3 542 (**168**), C3 556 (**169**) et la didéhydrocrambescine C3 554 (**170**) ont été détectées.

Enfin, plusieurs exemples de crambescines ont été isolées d'espèces appartenant aux ordres Axinellida et Poecilosclerida. Tout d'abord en 2003, l'équipe de Chu rapporte la Sch 575948 (ou crambescine A2 364 dans la nomenclature adoptée) (**171**) ayant une activité antibactérienne sur *S. aureus* et aucune activité antifongique sur *S. cerevisiae*. Cette molécule a été isolée de l'éponge *Ptilocaulis spiculifer*¹²¹. En 2015, Jamison et Molinski retrouvent chez *Dracmacidon reticulatum* (anciennement *Pseudaxinella reticulata*), deux énantiomères de crambescines déjà décrites, les (+)-crambescine A2 420 (**172**) et (+)-Sch 575948 ((+)-crambescine A2 364) (**173**), en complément de deux nouvelles crambescines (qui présentent également une configuration absolue opposée par rapport aux autres crambescines), les (+)-

¹¹⁶ Snider B. B., Shi Z. 1993, Biomimetic synthesis of (+/-)-crambines A, B, C1, and C2. Revision of the structure of crambines B and C1. *J. Org. Chem.*, **58**, 3828–3839.

¹¹⁷ Jares-Erijman E. A., Ingrum A. A., Sun F., Rinehart K. L. 1993, On the structures of crambescines B and C1. *J. Nat. Prod.*, **56** (12), 2186–2188.

¹¹⁸ Roel M., Rubiolo J. A., Terson E., Thomas O. P., Vieytes M. R., Botana L. M. 2015, Crambescin C1 exerts a cytoprotective effect on HepG2 cells through metallothionein induction. *Mar. Drugs*, **13** (8), 4633–4653.

¹¹⁹ Bondu S., Genta-Jouve G., Leiros M., Vale C., Guignon J.-M., Botana L. M., Thomas O. P. 2012, Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. *RSC Adv.*, **2**, 2828–2835.

¹²⁰ Genta-Jouve G., Croué J., Weinberg L., Cocandeau V., Holderith S., Bontemps N., Suzuki M., Thomas O. P. 2014, Two-dimensional ultra high pressure liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry for semi-targeted natural compounds identification. *Phytochem. Lett.*, **10**, 318–323.

¹²¹ Yang S.-W., Chan T.-M., Pomponi S. A., Chen G., Wright A. E., Patel M., Gullo V., Pramanik B., Chu M. 2003, A new bicyclic guanidine alkaloid, Sch 575948, from a marine sponge, *Ptilocaulis spiculifer*. *J. Antibiot.*, **56** (11), 970–972.

crambescine A2 392 (**174**) et (+)-crambescine A2 406 (**175**)¹²². La (+)-crambescine A2 420 (**172**) et (+)-Sch 575948 (**173**) possèdent une activité antifongique de l'ordre du micromolaire sur les levures *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, et *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Enfin, en 2016, l'équipe de A. Al-Mourabit retrouve les énantiomères (-)-crambescine A2 392 (**176**) et A2 406 (**177**) conjointement à la déhydrocrambescine A2 418 (**178**) à partir de l'éponge *Monanchora* sp.¹²³. Leur cytotoxicité a été évaluée sur les lignées cellulaires tumorales KB (carcinome oral). Les CI₅₀ mesurées pour la (-)-crambescine A2 392 (**172**), la (-)-crambescine A2 406 (**177**) et la déhydrocrambescine A2 418 (**178**) sont de 0,1 μ M, 0,3 μ M et 0,1 μ M, respectivement. Dans cette étude, la CI₅₀ de (-)-crambescine A2 420 (**179**) a également été déterminée et s'élève à 0,03 μ M.

L'ensemble des crambescines recensées à ce jour est regroupé à la figure 100.

Les études relatives aux crambescines, notamment les propriétés biologiques associées, sont peu nombreuses en raison des difficultés rencontrées lors de l'étape d'isolement pour les obtenir avec un degré de pureté suffisant. En effet, ces métabolites sont proches du point de vue structural. Il est vraisemblable que de nombreux autres dérivés restent encore à isoler.

¹²² Jamison M. T., Molinski T. F. 2015, Antipodal crambescine A2 homologues from the marine sponge *Pseudaxinella reticulata*. Antifungal structure–activity relationships. *J. Nat. Prod.* **78**, 557–561.

¹²³ El-Demerdash A., Moriou C., Martin M.-T., de Souza Rodrigues-Stien A., Petek S., Demoy-Schneider M., Hall K., Hooper J. N. A., Debitus C., Al-Mourabit A. 2016, Cytotoxic guanidine alkaloids from a French Polynesian *Monanchora* sp. sponge. *J. Nat. Prod.*, **79**, 1929–1937.

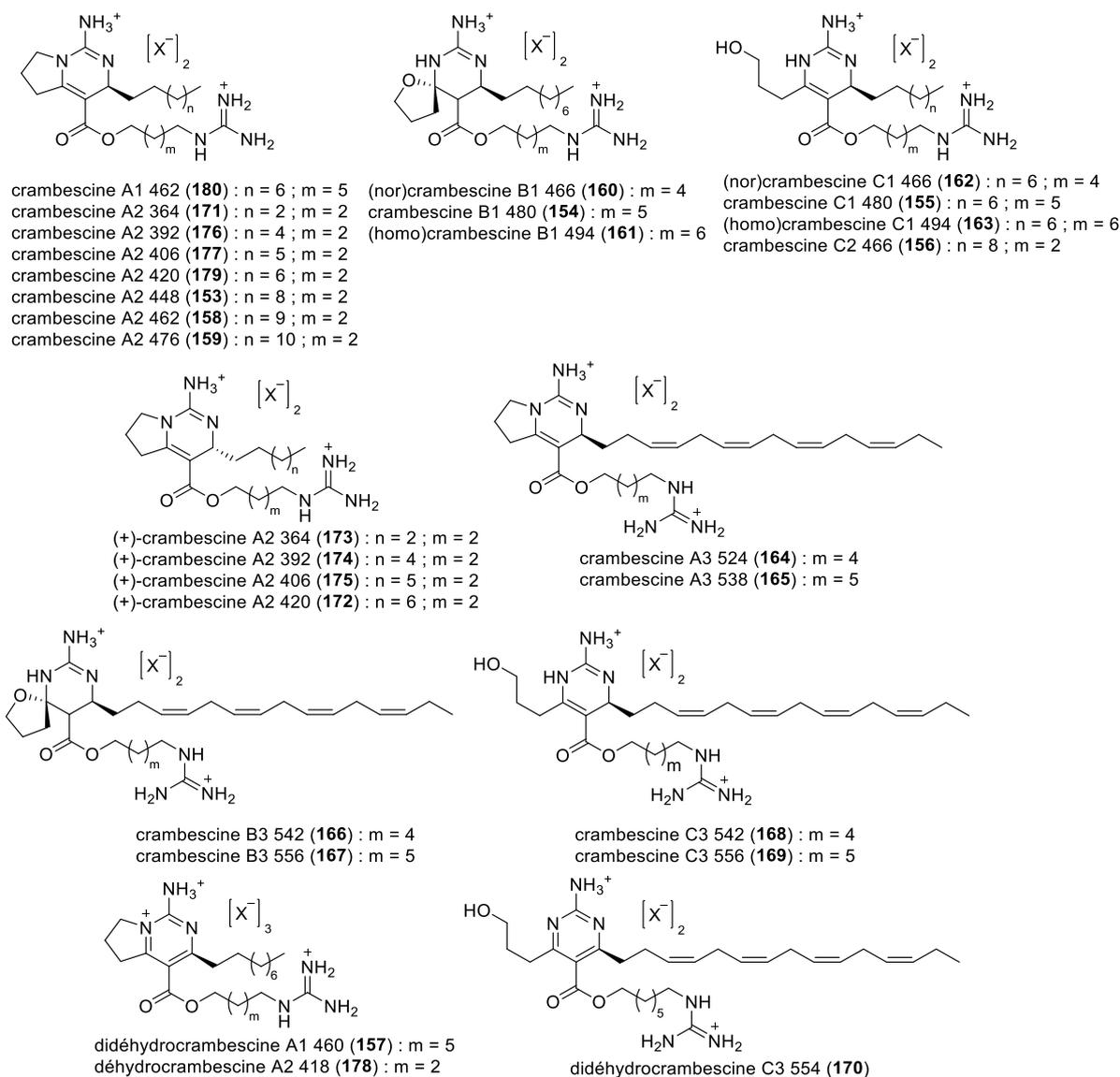


Figure 100. Dérivés crambescines recensés jusqu'en 2017.

III. Etude de *Crambe crambe*

L'éponge *C. crambe* (code 140526-CNo-51) étudiée (figure 101) a été échantillonnée à Cabo Negro au Maroc, en 2014 à 25 m de profondeur.



Figure 101. Photographie *in-situ* de *C. crambe* (©P. Amade).

III.1. Etude de *C. crambe* sous le prisme du réseau moléculaire

Les données CLHP-SMHR/SM associées à l'extrait brut organique de *C. crambe* ont été analysées sur la plateforme GNPS et comparées à un ensemble de bases de données expérimentales et théoriques (*in silico*). Les bases de données *in silico* regroupent des molécules présentes dans la base de données DNP (Dictionary of Natural Products). Leur création est basée sur les spectres de fragmentation théoriques.

Le réseau moléculaire obtenu est constitué de 324 nœuds, dont 246 sont isolés. Parmi les nœuds observés, aucun composé n'a été annoté, il pourrait donc s'agir uniquement de molécules nouvelles.

Les bases de données expérimentales contiennent principalement des molécules terrestres, cependant, la base de données *in silico* contient des molécules isolées des Poecilosclerida telles que les crambescines et les crambescidines. Ainsi, la cause la plus vraisemblable serait la contradiction entre les spectres expérimentaux et les spectres théoriques de la base de données. Par exemple, dans les conditions théoriques, l'ion pseudomoléculaire des crambescines est monochargé, tandis que dans les conditions expérimentales, l'ion pseudomoléculaire prépondérant est dichargé. Ainsi, l'algorithme ne peut associer les spectres et les annotations sont impossibles.

Par la suite, chaque valeur du rapport m/z des nœuds (ions précurseurs) et leur spectre de masse de fragmentation ont été comparés aux composés connus de la bibliographie associée à *C. crambe*. Grâce à cette technique, des composés semblables aux crambescines semblent être retrouvés (figure 102). Dans cette zone, on retrouve hypothétiquement les crambescines A1 462 (**180**), A2 364 (**171/173**), A2 392 (**174/176**) et A2 448 (**153**). La plupart des autres composés de la zone ne possèdent pas un rapport m/z connu et ils ont donc été ciblés sur le chromatogramme, afin de les obtenir lors de la purification.

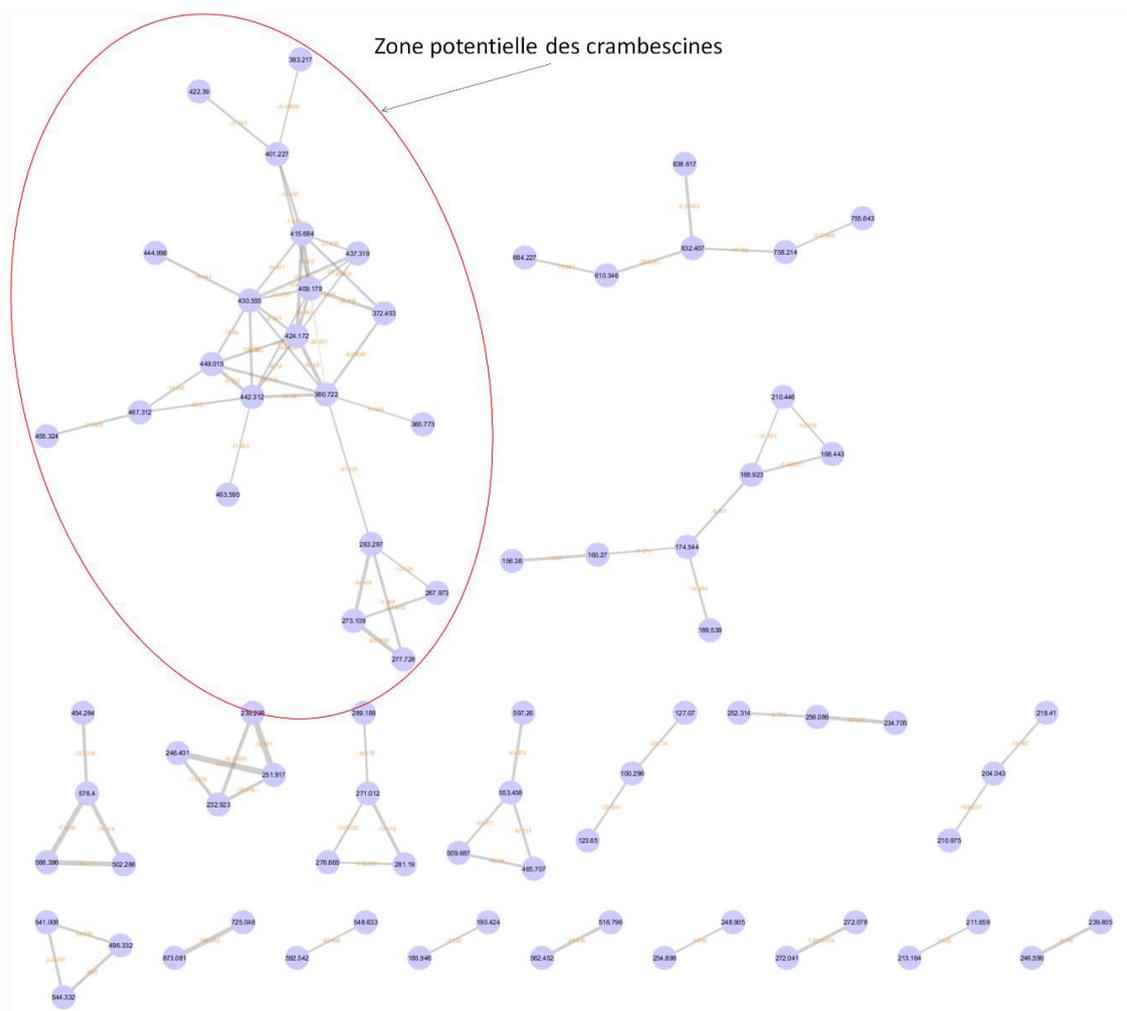


Figure 102. Analyse en réseau de l'extrait brut de *C. crambe* à l'exception des nœuds isolés.

III.2. Extraction, fractionnement et isolement

L'éponge (37,8 g), préalablement lyophilisée, a été extraite à plusieurs reprises par un mélange dichlorométhane/méthanol (1:1, v/v) sous ultrasons. Par la suite, l'extrait brut organique obtenu a été fractionné par chromatographie liquide sur gel de silice greffée C₁₈ (SPE) par passages successifs de solvants ou mélanges de solvants de polarité décroissante (H₂O jusqu'à CH₂Cl₂) pour conduire à 13 fractions (figure 103). Finalement, les métabolites de la fraction 6, caractérisés par des ratio *m/z* non répertoriés pour *C. crambe*, ont été purifiés par CLHP semi-préparative (Macherey Nagel Sphinx Nucleodur phénylpropyl-C₁₈, 250×10 mm id, 5 μm, gradient H₂O/CH₃CN/HFBA, 77:23:0,05 sur 5 mm puis à 50:50:0,05 en 80 mn), pour conduire à quatre composés amorphes : **Cc1** (12,4 mg), **Cc2** (6,0 mg), **Cc3** (9,3 mg) et **Cc4** (8,7 mg) (schéma 17).

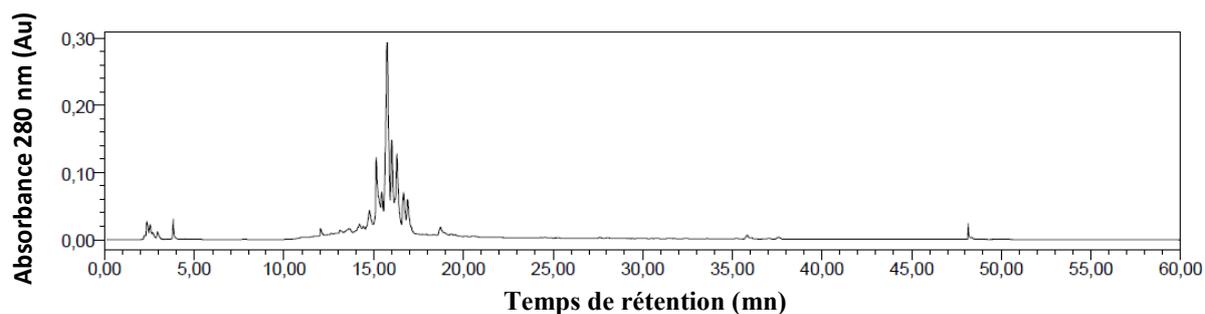


Figure 103. Profil métabolomique de la fraction 6 de *C. crambe* obtenu par CLHP-UV, enregistré à 254 nm sur une colonne Macherey-Nagel propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

Dans cette étude, l'acide heptafluorobutyrique (HFBA), un agent de paires d'ions, nous a permis d'obtenir une meilleure séparation des métabolites comparativement aux méthodes usuelles à base d'acide formique (AF) ou d'acide trifluoroacétique (TFA).

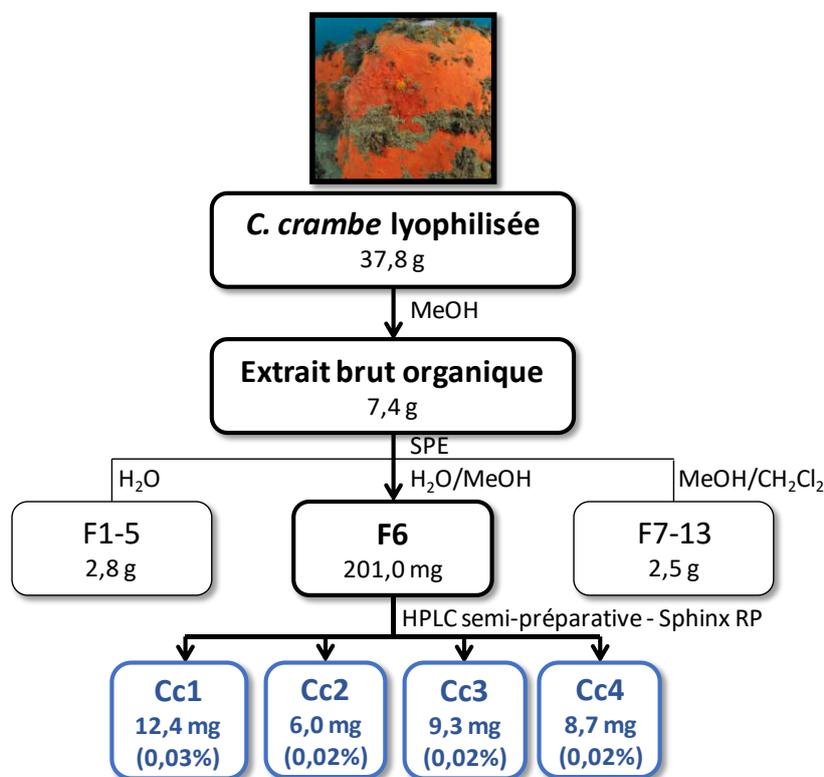


Schéma 17. Schéma d'extraction de *C. crambe* (les rendements sont exprimés en fonction du poids sec de l'éponge).

III.3. Détermination structurale

Dans cette étude, la structure complète des métabolites isolés a pu être déduite de l'analyse des données spectroscopiques (RMN 1D et 2D, dichroïsme circulaire) et spectrométriques (SMHR et/ou SM, SM/SM). Les analyses RMN nous ont permis de déduire qu'il s'agissait de crambescines dont le type a pu être précisé sur la base des analyses de spectrométrie de masse et le calcul du nombre de centres d'insaturation. Les analyses par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) nous ont permis de

déduire, en se basant sur la méthode de Rinehart¹¹⁷, la nature et la longueur des chaînes aux positions C-13 (chaîne « supérieure ») et C-7 (chaîne « inférieure »). Les fragments clés observés par spectrométrie de masse en tandem pour les crambescines A, B et C sont regroupés à la figure 104.

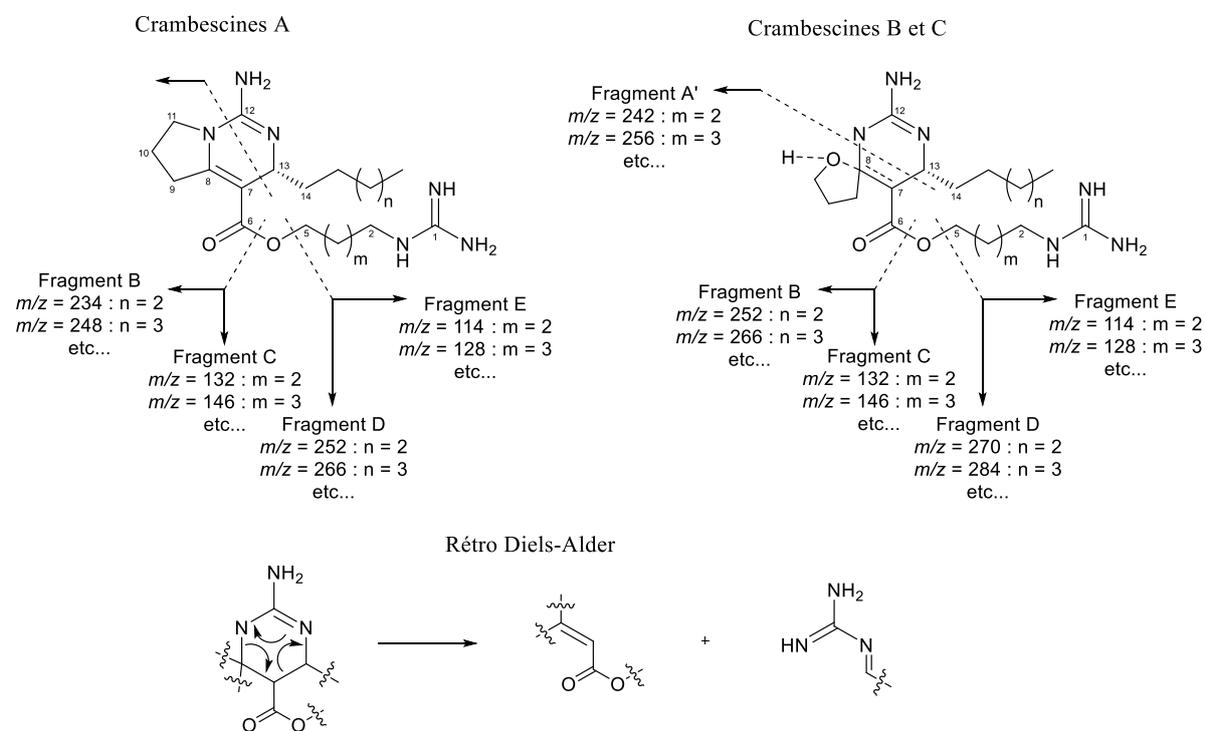


Figure 104. Schéma de fragmentation des crambescines.

En amont, l'exploitation des données RMN nous permet de confirmer la présence de dérivés crambescines et de différencier la classe B de la classe C.

III.3.1. Structure de Cc1

Le composé Cc1 (**181**) a été isolé sous forme d'huile jaune. Sa formule brute, $C_{18}H_{33}N_6O_2$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)SM (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de m/z 365,2674 ; $\Delta ppm = 2,5$). L'ensemble des données spectrales (SM, RMN) et leur comparaison avec les données bibliographiques nous a permis de déduire qu'il s'agit de la crambescine A2 364 (**173**) (figure 105). Les points clés qui nous ont conduit à cette conclusion sont détaillés par la suite.

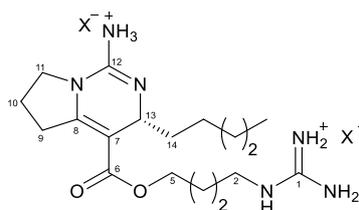


Figure 105. Structure de la crambescine A2 364 (**173**).

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de **Cc1 (181)** présentent de fortes similitudes avec les spectres RMN des crambescines. Par ailleurs, la molécule présente 6 centres d'insaturation, une spécificité des crambescines de type A.

L'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de **Cc1 (181)** nous a permis d'identifier les éléments clés suivants (figure 106) :

- 5 carbones sp^2 répartis de la façon suivante : un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} 166,1$ ppm (1C, C-6), caractéristique de la fonction carbonyle α,β -insaturé, deux carbones quaternaires à $\delta_{\text{C}} 158,7$ ppm (1C, C-1) et $153,1$ ppm (1C C-12) associés aux deux groupements guanidiniums, ainsi que deux carbones à $\delta_{\text{C}} 152,8$ (1C, C-8) et $\delta_{\text{C}} 103,3$ (1C, C-7) ppm, attribués à la double liaison tétrasubstituée,
- Un méthylène lié à un ester ($\delta_{\text{C}-5} 65,1$ ppm, $\delta_{\text{H}-5} 4,22$ ppm),
- Deux méthylènes liés aux groupements guanidinium ($\delta_{\text{C}-2} 42,0$ ppm, $\delta_{\text{H}-2} 3,23$ ppm et $\delta_{\text{C}-11} 49,7$ ppm, $\delta_{\text{H}-11} 3,67$ - $3,82$ ppm),
- Un méthine ($\delta_{\text{C}-13} 51,3$ ppm, $\delta_{\text{H}-13} 4,40$ ppm),
- Un fragment pyrrolidine déduit de la présence des signaux à $\delta_{\text{H}} 3,17$ et $2,98$ ppm (2H, *m*, H-9), $2,24$ et $2,10$ ppm (2H, *m*, H-10) et $3,82$ et $3,37$ ppm (2H, *m*, H-11), caractéristiques des protons diastéréotopiques des crambescines A.

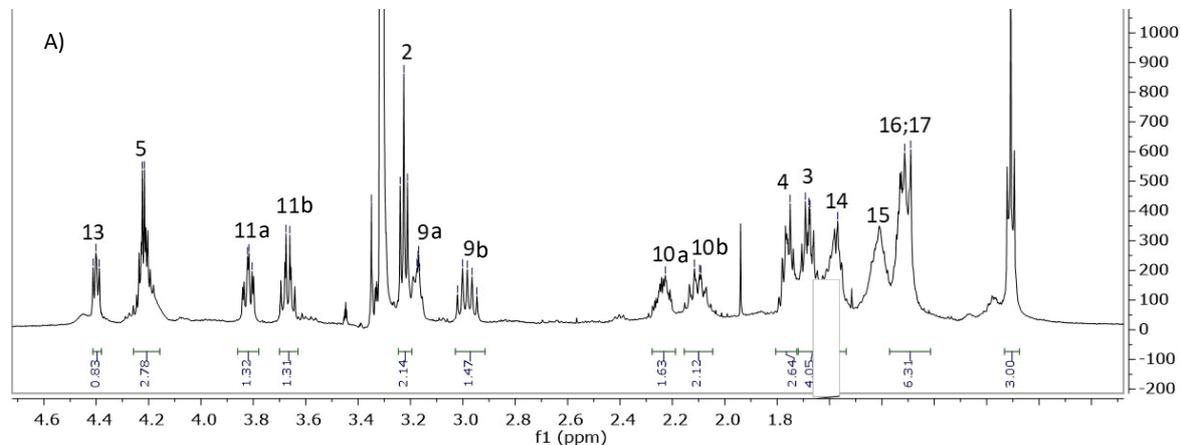


Figure 106. Spectres RMN (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **Cc1** (d_4 -MeOH).

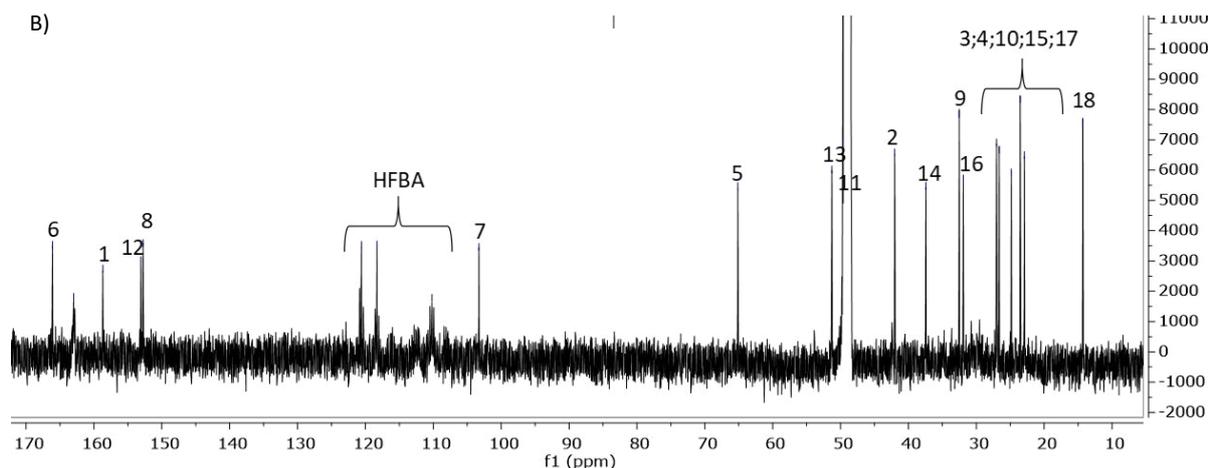


Figure 106 (suite). Spectres RMN (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de *Cc1* (d_4 -MeOH).

En revanche, la nature et la longueur des chaînes inférieures et supérieures n'ont pu être déterminées en se basant uniquement sur les données RMN. Nous avons pu les déduire des analyses HRESI(+)/SM/SM en appliquant la méthode de Rinehart¹¹⁷. Cette dernière nous a permis de déceler la présence de cinq fragments A-E permettant chacun d'affiner la structure du composé (figure 107) :

- Le fragment A de m/z 241,1668 ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_4$) correspond à la fragmentation du cycle portant un guanidinium. Ce fragment est caractéristique des crambescines A2 et indique une chaîne latérale en position C-7 constituée de quatre carbones ($m = 2$),
- Le fragment C de m/z 132,1138 et le fragment E de m/z 114,1034 (groupement 4-guanidinobut-1-ène ou 4-guanidinobutanol), issus de la fragmentation de l'ester, nous ont permis de corroborer la présence en position C-7 d'une chaîne constituée de 4 carbones ($m = 2$),
- D'autre part, la fragmentation de l'ester donne également lieu à un fragment B de m/z 234,1608 et à un fragment D de m/z 252,1717. Ces derniers nous ont permis de déduire la présence d'une chaîne alkyle de 4 carbones en position C-13.

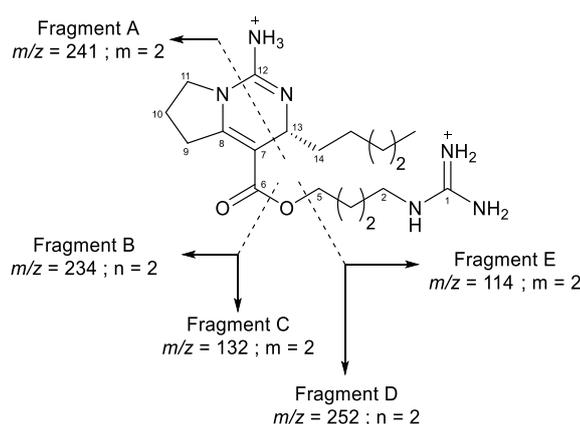


Figure 107. Schéma de fragmentation de *Cc1*.

Les deux énantiomères de la crambescine A2 364 ont été isolés d'éponges de l'ordre Poecilosclerida par le passé. A ce titre, l'énantiomère *S* de la crambescine A2 364 (**171**) a été isolé de *Ptilocaulis spiculifer* et l'énantiomère *R* (+)-crambescine A2 364 (**173**) a été isolé de *Dragmacidon reticulatum*

(anciennement *Pseudaxinella reticulata*). Les crambescines sont obtenues sous forme de sels et la nature du contre-ion est fonction des conditions d'isolement. Dans notre étude, le composé **Cc1 (181)** a été obtenu sous la forme d'un sel d'heptafluorobutyrate (HFBA⁻) en raison des conditions de purification utilisées. De façon identique à d'autres ammoniums chiraux, la nature du contre-ion peut influencer les propriétés chiroptiques mesurées¹²². Pour prévenir ces difficultés, nous avons mesuré les spectres de dichroïsme circulaire associés au composé **Cc1 (181)** avec les différents contre-ions : HFBA⁻, Cl⁻ et trifluoroacétate (TFA⁻). La configuration absolue du centre asymétrique C-13 de **Cc1 (181)** a été déterminée par comparaison du spectre de dichroïsme circulaire expérimental avec les spectres ECD théoriques de la bibliographie¹¹⁹. D'après les travaux de Bondu¹¹⁹, le spectre ECD calculé pour une crambescine de type A prévoit un fort effet Cotton négatif vers 260 nm pour un centre asymétrique C-13 de configuration *S* et un fort effet Cotton positif vers 260 nm pour un centre asymétrique C-13 de configuration *R*. Les spectres CD expérimentaux du composé **Cc1 (181)** possèdent un fort effet Cotton positif à 250 nm avec les contre-ions HFBA⁻ et TFA⁻ (figure 108), ce qui nous a permis de déduire que le centre asymétrique C-13 possède une configuration absolue *R* et donc une stéréochimie similaire à celle de la crambescine A2 364 (**173**) isolée de *Dracopis reticulatum*¹²¹.

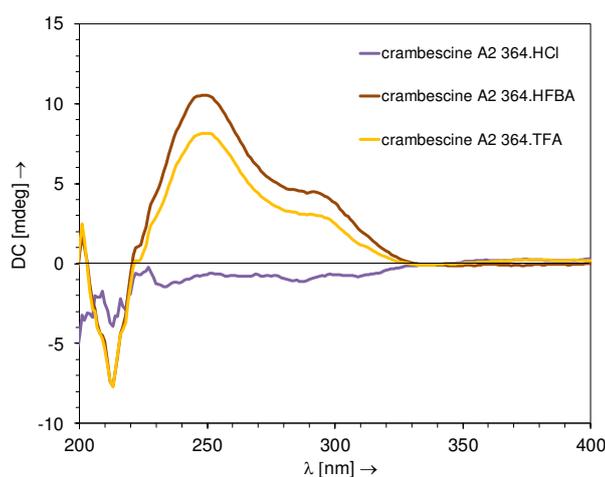


Figure 108. Spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux de la crambescine **Cc1** sous forme de sel de Cl⁻ (violet), HFBA⁻ (marron) et TFA⁻ (orange) (MeOH, C = 0,05 mM).

Il faut noter que dans le cas du contre-ion Cl⁻, l'échange du contre-ion a probablement engendré une aromatisation de la structure cyclique et a conduit à la perte du centre asymétrique. Ainsi, on observe une absence d'effet Cotton sur le spectre de dichroïsme circulaire.

L'ensemble des données RMN associées au composé **Cc1 (181)**, ainsi que celles de la crambescine A2 364 (**173**)¹²¹ issues de la bibliographie sont consignées dans le tableau 22.

Tableau 22. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) du composé **Cc1** (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) et comparaison avec la crambescine A2 364 (d_6 -DMSO)¹²¹.

N°	Cc1		Crambescine A2 364	
	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J (Hz)	δ_{C} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/ mult./J (Hz)
1	158,7, Cq	-	156,9, C	-
2	42,0, CH ₂	3,23, <i>t</i> , 7,0	40,2, C	3,13, <i>m</i>
3	26,6, CH ₂	1,68, <i>m</i>	25,2, C	1,51, <i>qt</i> , 7,0
4	27,0, CH ₂	1,76, <i>m</i>	25,4, C	1,63, <i>qt</i> , 7,0
5	65,1, CH ₂	4,22, <i>m</i>	63,5, C	4,11, <i>m</i>
6	166,1, Cq	-	164,1, C	-
7	103,3, Cq	-	100,8, C	-
8	152,8, Cq	-	151,5, C	-
9a	32,5, CH ₂	2,98, <i>qt</i> , 9,2	30,6, C	2,88, <i>ddd</i> , 9,5, 9,5, 19
9b		3,17, <i>m</i>		3,15, <i>m</i>
10a	23,5, CH ₂	2,10, <i>m</i>	21,4, C	1,97, <i>m</i>
10b		2,24, <i>m</i>		2,11, <i>m</i>
11a	49,7, CH ₂	3,67, <i>ddd</i> , 2,2, 8,0, 10,0	47,8, C	3,62, <i>ddd</i> , 2,5, 9,5, 9,5
11b		3,82, <i>td</i> , 2,9, 9,0		3,72, <i>ddd</i> , 2,5, 9,5, 9,5
12	153,1, Cq	-	151,1, C	-
13	51,3, CH	4,40, <i>t</i> , 5,6	49,0, C	4,28, <i>t</i> , 6,5
14	37,4, CH ₂	1,58, <i>m</i>	35,9, C	1,45, <i>m</i>
15	24,8, CH ₂	1,41, <i>m</i>	23,2, C	1,35, <i>m</i>
16	31,9, CH ₂	1,31, <i>m</i>	30,7, C	1,23, <i>m</i>
17	22,9, CH ₂		21,9, C	
18	14,3, CH ₃	0,91, <i>t</i> , 6,9	13,8, C	0,85, <i>t</i> , 7,0

III.3.2. Structures de Cc2 à 4

Les composés **Cc2-4** (**182-184**) ont été isolés sous la forme d'une huile orange. Les formules brutes associées ont été déduites des analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)*SM* (ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$). Il s'agit de $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_3$ pour **Cc2** (m/z 425,3250 ; $\Delta\text{ppm} = 2,3$), $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_3$ pour **Cc3** (m/z 439,3425 ; $\Delta\text{ppm} = 6,5$) et $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_3$ pour **Cc4** (m/z 453,3536 ; $\Delta\text{ppm} = 2,3$). L'ensemble des données spectroscopiques (RMN 1D et 2D, dichroïsme circulaire) et spectrométrique (*SM*, *SM/SM*) nous a permis de déduire qu'il s'agit des crambescines C1 424 (**Cc2**), C1 438 (**Cc3**) et C1 452 (**Cc4**) (figure 109).

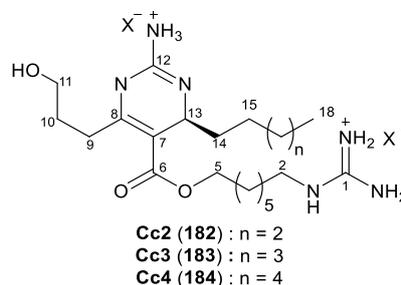


Figure 109. Structures des composés **Cc2-4** (**182-184**).

Ces composés ne diffèrent entre eux que d'un ou deux méthylènes. Tous présentent 5 centres d'insaturation, une caractéristique commune aux crambescines B et C.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C nous ont permis de déduire les éléments en commun suivants :

- 5 carbones sp^2 répartis de la façon suivante : un carbone quaternaire à δ_C 166,1 ppm (C-6) caractéristique de la fonction carbonyle α,β -insaturé, deux carbones quaternaires à δ_C 158,6 ppm (1C, C-1) et 153,5 ppm (1C C-12) associés aux deux groupements guanidiniums, ainsi que deux carbones à δ_C 149,0 ppm (C-8) et δ_C 106,0 ppm (C-7) attribués à la double liaison tétrasubstituée,
- Un méthylène lié à un ester (δ_{C-5} 65,8 ppm, δ_{H-5} 4,20-4,17 ppm),
- Un méthylène lié à un groupement guanidinium (δ_{C-2} 42,4 ppm, δ_{H-2} 3,17 ppm),
- Un méthine (δ_{C-13} 51,1 ppm, δ_{H-13} 4,41 ppm),
- Un méthylène lié à un oxygène (δ_{C-11} 62,1 ppm ; δ_{H-11} 3,61 ppm).

Le type de crambescine a pu être déduit de l'analyse fine des données RMN 1D et 2D. Dans le spectre RMN 1H , les signaux à δ_H 2,84 et 2,79 ppm (2H, *m*, H-9), à δ_H 1,81 ppm (2H, *qt*, $^3J = 7,2$ Hz, H-10) et à δ_H 3,61 ppm (2H, *t*, $^3J = 6,4$ Hz, H-11) sont caractéristiques d'une chaîne hydroxypropyle. Les corrélations par RMN COSY 1H - 1H entre les méthylènes H₂-9, H₂-10 et H₂-11, ainsi que la corrélation par RMN HMBC 1H - ^{13}C entre les protons du méthylène H₂-9 et le carbone C-8, nous ont permis de conforter la présence d'une chaîne hydroxypropyle en position C-8, une caractéristique des crambescines de type C (figure 110).

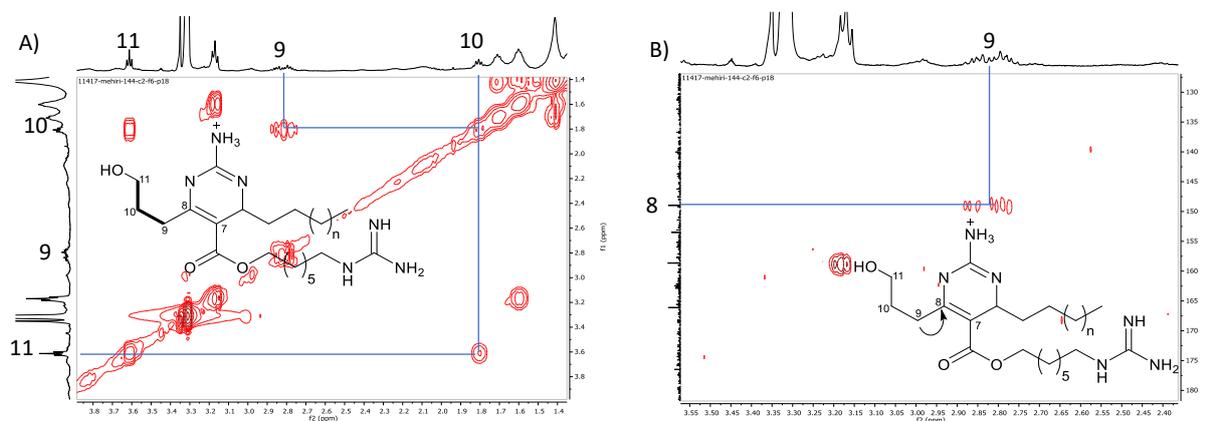


Figure 110. Agrandissements (A) du spectre RMN COSY 1H - 1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) et (B) du spectre RMN HMBC 1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de Cc2.

Les corrélations RMN HMBC 1H - ^{13}C entre le signal à δ_H 4,41 ppm (1H, *dd*, $^3J = 4,4, 7,9$ Hz, H-13) et les signaux à δ_C 106,0 (1C, C-7), 149,0 (1C, C-8) et 153,5 (1C, C-12) ppm mais également la corrélation RMN COSY 1H - 1H entre le signal à δ_H 4,41 ppm (1H, *dd*, $^3J = 4,4, 7,9$ Hz, H-13) et le signal à δ_H 1,60 ppm (2H, *m*, H-14), nous ont permis de déduire la présence d'une chaîne alkyle en position C-13. Par ailleurs, les corrélations RMN HMBC 1H - ^{13}C entre les signaux à δ_H 4,17/4,20 ppm (1H, *m*, H-5) et le signal à δ_C 166,1 ppm (1C, C-6) ainsi que celles entre le signal à δ_H 3,17 ppm (2H, *t*, $^3J = 7,0$ Hz, H-2) et le signal à δ_C 158,6 ppm (1C, C-1), nous ont permis de confirmer définitivement l'appartenance des composés Cc2-4 au groupe des crambescines C (figure 111).

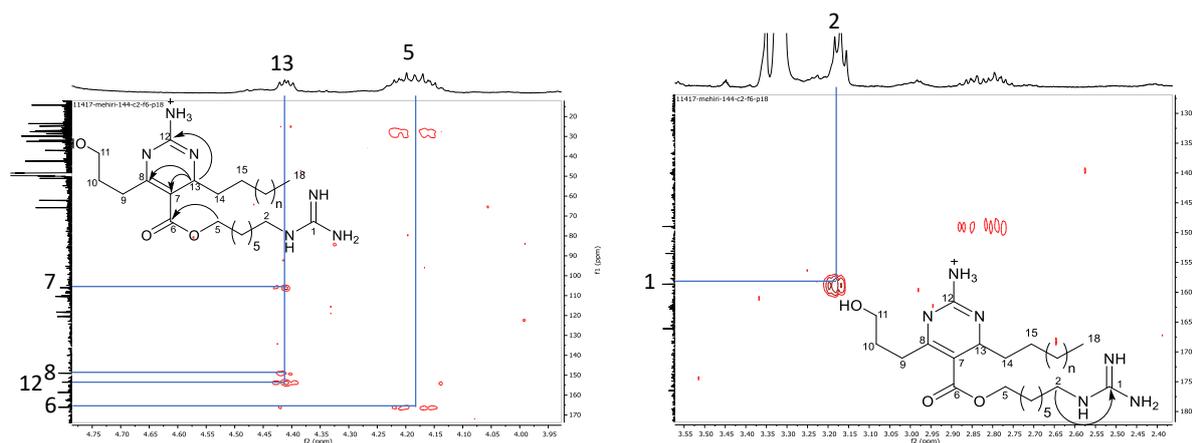


Figure 111. Agrandissements du spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C de **Cc2** (d_4 -MeOH, 500/125 MHz).

Les composés **Cc2-4** (**182-184**) diffèrent uniquement par le nombre de méthylènes regroupés entre 1,40 et 1,30 ppm dans les spectres RMN ^1H . Tel que nous l'avons évoqué précédemment, il s'est avéré très difficile de déterminer le nombre exact de méthylènes porté par chacune des chaînes sur la seule base de la RMN. Par conséquent, nous avons de nouveau fait appel aux analyses HRESI(+)/SM/SM et à la méthode de Rinehart pour finaliser les structures planes des composés isolés.

De façon identique au composé **Cc1** (**181**), la méthode de Rinehart nous a permis de déduire la présence de plusieurs fragments, dont les plus significatifs pour l'élucidation structurales sont les suivants :

- Un fragment C de m/z 174,16 (174,1607 pour **Cc2**, 174,1615 pour **Cc3** et 174,1596 pour **Cc4**) est observé pour les trois composés. Il est caractéristique de la perte d'un fragment 7-guanidinoheptanol et donc d'une chaîne constituée de 7 carbones en position C-7 ($m = 5$),
- Un fragment B de $m/z = 252,1714$ pour **Cc2**, 266,1884 pour **Cc3** et 280,2011 pour **Cc4** (14 uma d'écart), caractéristique d'une chaîne de type pentyle ($n = 2$) pour **Cc2**, hexyle ($n = 3$) pour **Cc3** et heptyle ($n = 4$) pour **Cc4**, en position C-13.

Les corrélations par RMN COSY ^1H - ^1H et HMBC ^1H - ^{13}C ainsi que les ions fragments observés par spectrométrie de masse en tandem sont présentés à la figure 112.

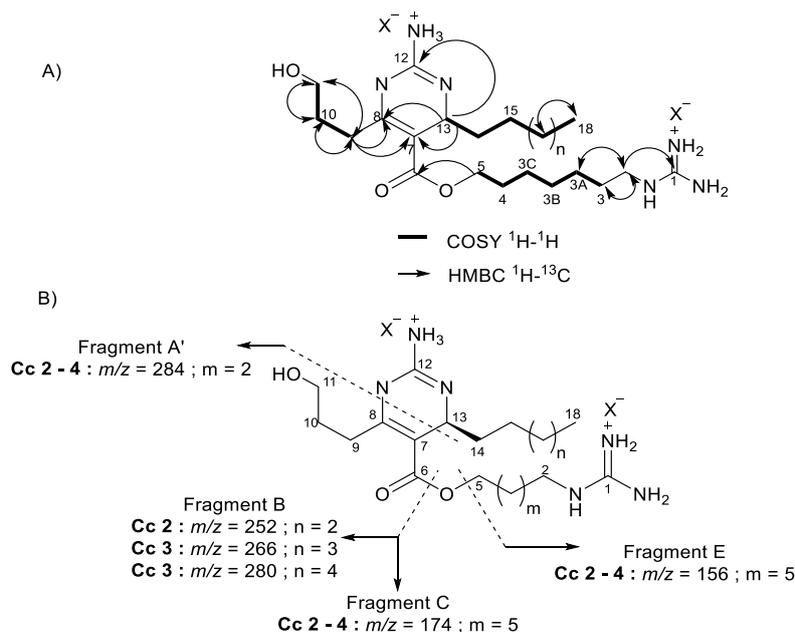


Figure 112. Cc1-4 : A) Structures et corrélations en RMN, B) fragmentation en SM.

De façon identique au composé **Cc1 (181)**, la configuration absolue des centres asymétriques C-13 des crambescines C isolées a été déduite de la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux avec les spectres ECD théoriques obtenus par calculs TDDFT. Le spectre ECD théorique prédit un fort effet Cotton positif vers 250 nm pour un centre asymétrique C-13 de configuration *S* et un fort effet Cotton négatif vers 250 nm pour une configuration *R*¹¹⁹. Les spectres ECD expérimentaux des composés **Cc2-4 (182-184)** présentent un fort effet Cotton positif à 250 nm pour les trois contre-ions HFBA⁻, Cl⁻ et TFA⁻ (figure 113), ce qui nous a permis de déduire que les centres asymétriques C-13 sont de configuration *S*. Les crambescines reportées à ce jour de *C. crambe* possèdent toutes cette stéréochimie. Un résultat similaire a été reporté en 2015 pour les crambescines A2 isolées de *Dragmacidon reticulatum*¹²². Par ailleurs, la nature du contre-ion n'a finalement aucun impact sur l'allure des spectres de dichroïsme circulaire et donc sur la stéréochimie.

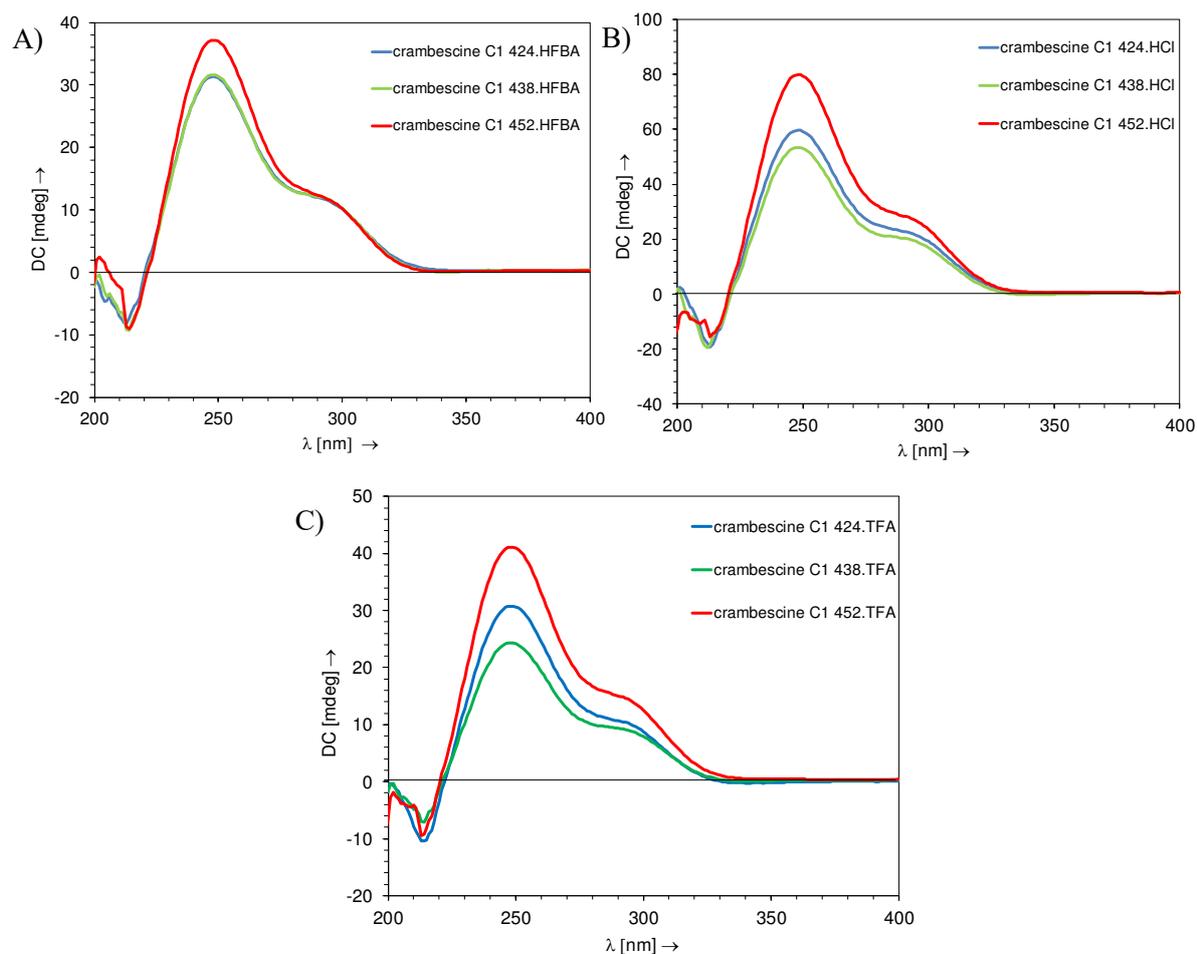


Figure 113. Spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux des composés **Cc2-4** (MeOH, C = 0,05 mM). A) sels de HFBA, B) sels de Cl⁻, C) sels de TFA⁻.

Ainsi, les composés isolés sont la crambescine C1 424 (**Cc2**, **182**), la crambescine C1 438 (**Cc3**, **183**) et la crambescine C1 452 (**Cc4**, **184**), tous constitués d'un centre asymétrique C-13 de configuration *S*.

L'ensemble des données RMN pour ces composés est regroupé dans le tableau 23.

Les aspects relatifs à la biosynthèse de ces dérivés ne seront pas présentés dans ce chapitre mais feront l'objet d'un paragraphe de la partie C dédié aux microorganismes fongiques (partie descriptive de *C. crambe*).

Tableau 23. Données RMN 1D (¹H et ¹³C) et 2D (COSY ¹H-¹H, HMBC ¹H-¹³C) des composés **Cc2-4** (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz).

N°	Cc2				Cc3				Cc4			
	δ_c (ppm)/ mult.	δ_H (ppm)/mult./ <i>J</i> (Hz)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C	δ_c (ppm)/ mult.	δ_H (ppm)/mult./ <i>J</i> (Hz)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C	δ_c (ppm)/ mult.	δ_H (ppm)/mult./ <i>J</i> (Hz)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C
1	158,6, Cq	-	-	-	158,7, Cq	-	-	-	158,7, Cq	-	-	-
2	42,4, CH	3,17, <i>t</i> , 7,0	3	1, 3, 3A, 3B	42,5, CH	3,17, <i>t</i> , 7,0	3	1, 3, 3A, 3B	42,4, CH	3,17, <i>t</i> , 7,0	3	1, 3, 3A, 3B, 3C
3	29,8, CH	1,60, <i>m</i>	2, 3A	2, 3A	29,9, CH	1,59, <i>m</i>	2, 3A	-	30,0, CH	1,59, <i>m</i>	2, 3A	2, 3A
3A	27,7, CH	1,41, <i>m</i>	3B, 3	3, 3B, 4	27,7, CH	1,39, <i>m</i>	3B, 3	3, 3B, 4	27,6, CH	1,41, <i>m</i>	3B, 3	3, 3B, 4
3B	29,9, CH	1,41, <i>m</i>	3C, 3A	3, 4	30,3, CH	1,39, <i>m</i>	3C, 3A	3, 4	30,3, C	1,41, <i>m</i>	3C, 3A	3, 4
3C	27,1, CH	1,41, <i>m</i>	4, 3B	3, 3B, 4	27,2, CH	1,39, <i>m</i>	4, 3B	3, 3B, 4	27,1, C	1,41, <i>m</i>	4, 3B	3, 3B, 4
4	29,7, CH	1,71, <i>m</i>	3C, 5	5, 3C	29,7, CH	1,70, <i>m</i>	3C, 5	3A, 3C	29,9, C	1,70, <i>m</i>	3C, 5	3C
5	65,8, CH	4,17, <i>m</i>	4	3C, 6	65,8, CH	4,16, <i>m</i>	4	3C, 6	65,8, C	4,17, <i>m</i>	4	3C, 6
		4,20, <i>m</i>	4			4,19, <i>m</i>				4,20, <i>m</i>		
6	166,1, Cq	-	-	-	166,1, Cq	-	-	-	166,1, Cq	-	-	-
7	106,0, Cq	-	-	-	106,0, Cq	-	-	-	106,0, Cq	-	-	-
8	149,0, Cq	-	-	-	149,0, Cq	-	-	-	149,0, Cq	-	-	-
9a	28,7, CH	2,79, <i>m</i>	9, 10	7, 8, 10, 11	28,7, CH	2,79, <i>m</i>	9, 10	8, 10, 11	28,7, C	2,79, <i>m</i>	9, 10	8, 10
9b		2,84, <i>m</i>				2,84, <i>m</i>				2,84, <i>m</i>		
10	32,0, CH	1,81, <i>qt</i> , 7,2	11, 9	8, 9, 11	32,0, CH	1,80, <i>qt</i> , 7,2	9, 11	8, 9, 11	32,0, CH	1,81, <i>qt</i> , 7,2	9, 11	9, 11
11	62,1, CH	3,61, <i>t</i> , 6,4	10	9, 10	62,1, CH	3,61, <i>t</i> , 6,4	10	9, 10	62,1, CH	3,61, <i>t</i> , 6,5	10	8, 9, 10
12	153,5, Cq	-	-	-	153,5, Cq	-	-	-	153,5, Cq	-	-	-
13	51,1, CH	4,41, <i>dd</i> , 4,4, 7,9	14	7, 8, 12	51,1, CH	4,41, <i>dd</i> , 4,3, 7,9	14	7, 8, 12	51,1, CH	4,41, <i>dd</i> , 4,4, 7,7	14	7, 8, 12
14	37,0, CH	1,60, <i>m</i>	15, 13	-	37,0, CH	1,59, <i>m</i>	15, 13	-	37,0, CH	1,59, <i>m</i>	15, 13	-
15	24,8, CH	1,41, <i>m</i>	14, 16	-	24,8, CH	1,39, <i>m</i>	14, 16	17, 17A	25,1, CH	1,38, <i>m</i>	14, 16	16
16	32,5, CH	1,32, <i>m</i>	17	17, 18	30,3, CH	1,39, <i>m</i>	15,17	17, 17A	29,7, CH	1,38, <i>m</i>	15,17	17
17	23,5, CH	1,32, <i>m</i>	16, 18	16, 18	32,5, CH	1,29, <i>m</i>	16, 17A	16	30,2, CH	1,31, <i>m</i>	16, 17A	16, 17
17A	-	-	-	-	23,6, CH	1,32, <i>m</i>	17, 17A	17	32,9, CH	1,29, <i>m</i>	17, 17B	-
17B	-	-	-	-	-	-	-	-	23,7, CH	1,31, <i>m</i>	17A	17A, 17A
18	14,3, CH	0,91, <i>t</i> , 6,8	17	16, 17	14,3, C	0,91, <i>m</i>	17A	17, 17A	14,4, CH	0,90, <i>m</i>	17B	17A, 17B

III.4. Activités biologiques

De façon identique aux chapitres précédents, les crambescines **Cc1-4 (181-184)** ont été évaluées pour leurs propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques. La recherche de propriétés antibactériennes a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Laurent Boyer du Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) de l'Université de Nice Sophia Antipolis. Les propriétés anti-inflammatoires et cytotoxiques ont été évaluées en collaboration avec la plateforme « KISSf » de la Station Biologique de Roscoff.

III.4.1. Activités antibactériennes

Les composés **Cc1-4 (181-184)** ont fait l'objet d'un simple test d'inhibition de plusieurs bactéries en milieu liquide et à une concentration de 100 µg/mL. Les bactéries ciblées sont *E. coli* (J96) et trois souches de *S. aureus* (RN4220, S25 issu d'une inflammation des os (ostéite) et Lug1799 résistante à la méthicilline) (tableau 24).

Tableau 24. Activités antibactériennes préliminaires obtenues pour les crambescines **Cc1-4** sur *E. coli* et trois souches de *S. aureus*.

Molécule	Contre-ion	<i>E. coli</i> (J96)	<i>S. aureus</i> (RN4220)	<i>S. aureus</i> ostéite (S25)	<i>S. aureus</i> (Lug1799)
Cc1 (100µg/mL)	TFA ⁻	Très peu actif	-	-	-
	Cl ⁻	Peu actif	< 3% survie	-	< 3% survie
	HFBA ⁻	-	-	-	< 3% survie
Cc2 (100 µg/mL)	TFA ⁻	75% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	Cl ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	HFBA ⁻	75% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
Cc3 (100 µg/mL)	TFA ⁻	20% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	Cl ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	HFBA ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
Cc4 (100 µg/mL)	TFA ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	Cl ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
	HFBA ⁻	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie	< 3% survie
Témoin chloramphénicol	< 3% survie (20 µg/mL)	< 3% survie (20 µg/mL)	20% survie (40 µg/mL)	13% survie (40 µg/mL)	15% survie (40 µg/mL)

Le composé **Cc1**, qu'il soit sous forme de sel de TFA⁻ et de HFBA⁻, est peu ou pas actif sur *E. coli*, *S. aureus* RN4220 et *S. aureus* S25. En revanche **Cc1.HFBA**, présente une activité antibactérienne supérieure au témoin sur *S. aureus* Lug1799. Par ailleurs, le composé **Cc1.Cl** est aussi actif à 20 µg/mL (3% de survie) que le composé témoin, le chloramphénicol, sur *S. aureus* RN4220 et sur *S. aureus* Lug1799. En revanche, il n'est pas actif sur *S. aureus* S25 et est peu actif sur *E. coli* (plus de 50% de survie).

L'ensemble des crambescines C1 (**Cc2-4**) testées présente de très bonnes activités antibactériennes. La plupart sont aussi actives ou plus actives que le témoin chloramphénicol à 20 ou 40 µg/mL sur *E. coli* et les trois souches de *S. aureus*. Il faut toutefois noter les exceptions suivantes : **Cc2.TFA** et

Cc2.HFBA n'induit la mort que de 25% de la population d'*E. coli*, et **Cc3.TFA** induit la mort de 80% de la population d'*E. coli*.

Les activités antibactériennes observées sont probablement liées aux propriétés tensioactives des crambescines. En effet, on constate que les crambescines C1 (**Cc2-4, 182-184**) sont plus actives que la crambescine A (**Cc1, 181**). Par ailleurs, la nature du contre-ion influe légèrement sur l'activité antibactérienne sur *E. coli* ($\text{Cl}^- > \text{HFBA}^- > \text{TFA}^-$). D'autre part, les activités antibactériennes des crambescines C1 observées sur *E. coli* augmentent avec la longueur de la chaîne en position C-13 (**Cc4** > **Cc3** > **Cc2**). Ces tendances peuvent être expliquées par une diminution de la polarité (fonction de la longueur de la chaîne aliphatique) et une meilleure disponibilité du substrat (fonction de la nature du contre-ion), qui viendrait lyser plus facilement les membranes des bactéries et ainsi augmenter l'activité antibactérienne.

Ces résultats devront être confirmés par un test similaire à des concentrations inférieures et préférentiellement par un calcul des CMI.

III.4.2. Activités anti-inflammatoires

Les crambescines **Cc1-4 (181-184)** ont été évaluées pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Les résultats obtenus montrent que ces composés, sous forme de sels de HFBA^- , n'activent pas la voie NF- κB aussi bien à 10 qu'à 100 μM , et n'ont donc aucun effet pro-inflammatoire ou immuno-stimulant (figure 114). On constate qu'ils induisent une faible diminution de l'activité de la voie NF- κB à 100 μM .

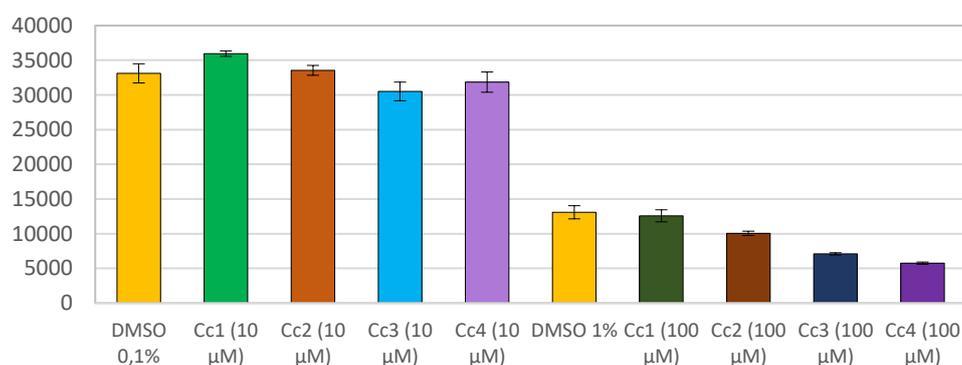


Figure 114. Activités anti-inflammatoires de **Cc1-4** sans activation au $\text{TNF}\alpha$.

Par ailleurs, les crambescines **Cc1-4 (181-184)** n'ont pas d'effet à 10 μM sur la voie NF- κB même après activation par le $\text{TNF}\alpha$. En revanche, elles diminuent à 100 μM l'activité de la voie NF- κB de façon significative (figure 115). L'activité du composé **Cc4 (184)** à 100 μM est comparable à celle du parthénolide à 18 μM .

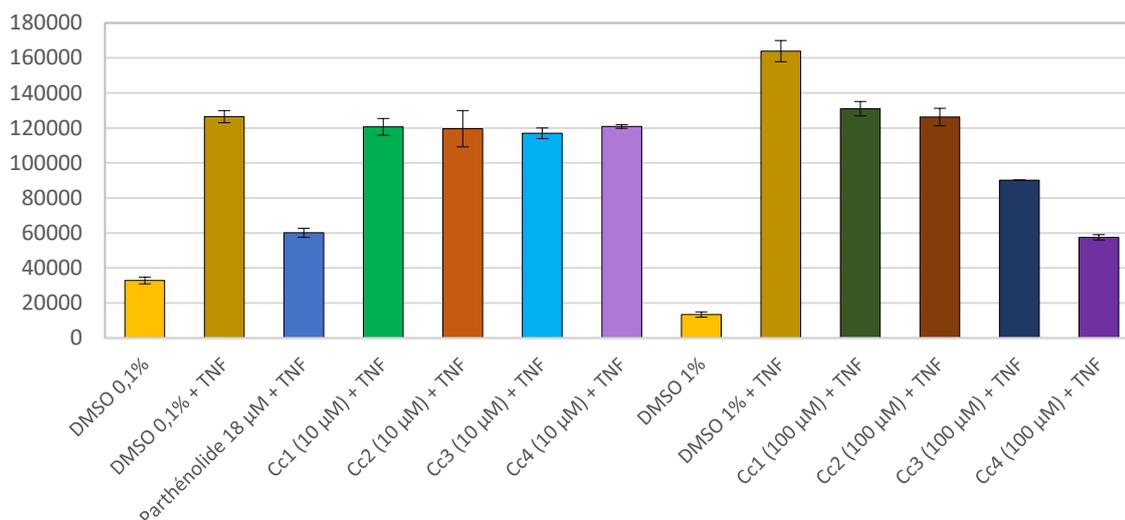


Figure 115. Activités anti-inflammatoires de Cc1-4 avec activation au TNF α .

Les crambescines Cc1-4 (181-184) ont un effet anti-inflammatoire à 100 μ M. Parmi ces derniers, Cc3 (170) et Cc4 (171) diminuent plus fortement l'activité de la voie NF- κ B comparativement à Cc1 (181) et Cc2 (182). Ainsi, la longueur de la chaîne en position C-13 semble donc influencer l'activité biologique des crambescines C1 à 100 μ M.

III.4.3. Cytotoxicité

Les crambescines Cc1-4 (181-184) isolées ont été évaluées, à 10 et 100 μ M, pour leurs propriétés cytotoxiques vis-à-vis de lignées cellulaires tumorales et saines : U2OS (ostéosarcome), Jurkat A3 (leucémie) et HEK293 (cancer du rein) et RPE1 (cellules saines de l'épithélium rétinien).

Les composés Cc1 (181) et Cc2 (182) ne semblent pas actifs sur les trois lignées cellulaires à 10 et 100 μ M (figure 116). En revanche, le composé Cc3 (183) est peu ou pas actif sur les trois lignées cellulaires à 10 et 100 μ M. Il induit, à 100 μ M, près de 50% de mort cellulaire sur la lignée U2OS et près de 80% de mort cellulaire sur Jurkat A3. Enfin, le composé Cc4 (184) semble être le plus cytotoxique des quatre composés testés.

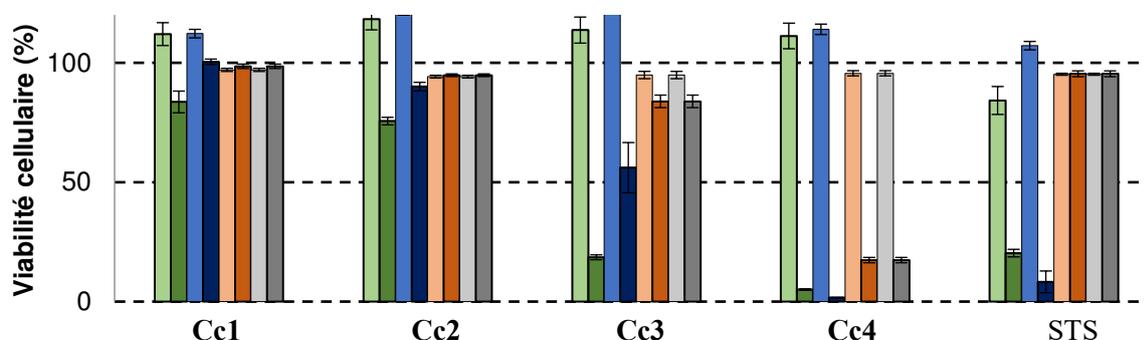


Figure 116. Cytotoxicité de Cc1-4 à 10 μ M (clair) et 100 μ M (foncé) sur 4 lignées cellulaires (orange : RPE1 ; gris : HEK293 ; bleu : U2OS ; vert : Jurkat A3) en fonction du contrôle staurosporine (STS, nM).

Par la suite, les CI_{50} des composés **Cc1-4 (181-184)** ont pu être déterminées pour l'ensemble des lignées cellulaires (tableau 25).

Tableau 25. CI_{50} de **Cc1-4** (contre-ion HFBA⁻) sur les lignées cellulaires U2OS, Jurkat A3 et RPE1.

	CI_{50} (μ M)			
	Crambescine A2 364 (Cc1)	Crambescine C1 424 (Cc2)	Crambescine C1 438 (Cc3)	Crambescine C1 452 (Cc4)
U2OS	> 250	> 250	> 250	100
Jurkat A3	> 250	> 250	> 250	75
RPE1	> 250	> 250	> 250	46

Les molécules **Cc1-3 (181-183)** sont inactives ($CI_{50} > 250 \mu$ M) sur l'ensemble des lignées cellulaires tandis que **Cc4 (184)** présente une cytotoxicité très modérée sur Jurkat A3 (CI_{50} de 75μ M), sur U2OS (CI_{50} de 100μ M) et sur la lignée non cancéreuse RPE1 (CI_{50} de 46μ m). La cytotoxicité semble être liée à la longueur de la chaîne supérieure en position C-13 : plus la chaîne est longue et plus la cytotoxicité augmente. De plus, **Cc4 (184)** affecte à la fois les lignées cellulaires tumorales et non tumorales. Le composé **Cc4 (184)** ne peut donc pas être considéré comme un bon candidat anticancéreux.

Des tests complémentaires ont été menés dans les mêmes conditions pour vérifier l'effet du contre-ion Cl⁻ et TFA⁻ sur la bioactivité. La nature du contre-ion n'a aucune influence sur la cytotoxicité, et la viabilité cellulaire n'est pas compromise jusqu'à 100μ M (données non présentées).

IV. Conclusion

Plusieurs éponges appartenant aux ordres Poecilosclerida et Axinellida produisent différents types d'alcaloïdes guanidiniques tels que les crambescines et les crambescidines. Bien que les crambescidines présentent de bonnes propriétés biologiques (antitumorales, antivirales et antimicrobiennes), les études relatives aux dérivés crambescines, notamment les propriétés biologiques associées, sont peu nombreuses en raison des difficultés rencontrées lors de l'étape d'isolement.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une éponge de Méditerranée relativement bien étudiée depuis les années 90, également par notre équipe, *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation complète d'une molécule déjà répertoriée, la crambescine A2 364 (**173**), ainsi que trois nouvelles molécules, les crambescines C1 424 (**182**), 438 (**183**) et 452 (**184**) de configuration *S*. Nos travaux soulèvent de nouveau la question si une même éponge, ou deux éponges appartenant à un même ordre, peuvent produire les deux antipodes d'une même molécule, ou si cela est la conséquence d'une épimérisation potentielle lors de l'étape de purification. Les métabolites isolés ont été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques. Les différents composés se sont avérés particulièrement actif sur *E. coli* et *S. aureus* à une concentration de 100μ g/mL. Les crambescines C1 424 (**173**), 438 (**182**) et 452 (**183**) ne sont pas cytotoxiques sur les lignées cellulaires U2OS (ostéosarcome), Jurkat A3 (leucémie) et RPE1

(épithélium de la rétine). En revanche, la crambescine C1 452 (**184**) présente une très légère cytotoxicité sur les mêmes lignées cellulaires saines et tumorales. Enfin, les molécules n'ont pas d'activité anti-inflammatoire significative.

Le (ou les) organisme(s) producteur(s) des dérivés crambescines et crambescidines reste(nt) à ce jour non élucidé(s). Une origine microbienne, bactérienne et/ou fongique, n'est pas exclure et reste à étudier.

Partie C :

**Biodiversité et
chimiodiversité fongique
marine**



Kernia geniculotricha (©MUT)

I. Introduction

Les champignons sont des organismes **eucaryotes hétérotrophes** non photosynthétiques, principalement **parasites, saprophytes** ou **symbiotiques**. On distingue la forme levure (unicellulaire) et la forme mycélienne (pluricellulaire). Leur reproduction peut être sexuée ou asexuée. Dans le cas de la reproduction asexuée, les champignons mycéliens produisent des spores généralement haploïdes¹²⁴ qui évoluent en **hyphes**, puis en **mycélium** (thalle indifférencié) après croissance (figure 117). Ces spores sont responsables de la survie et de la dispersion des champignons mycéliens.

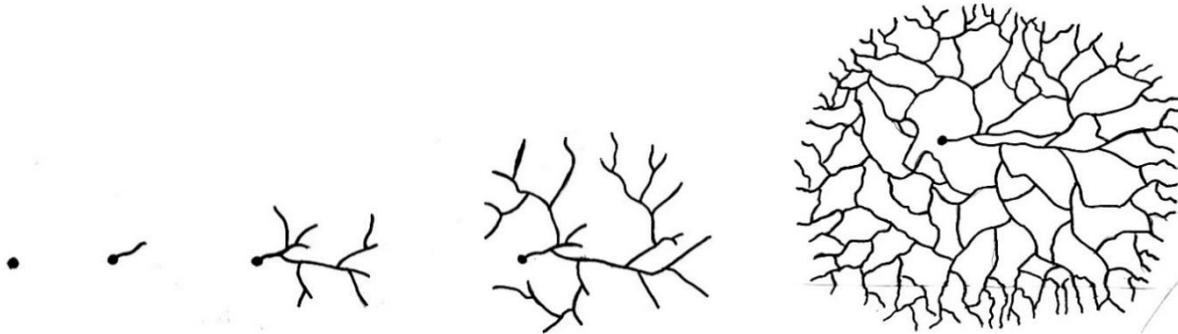


Figure 117. Développement d'un mycélium à partir d'une spore¹²⁵.

Ils peuvent vivre, se développer et produire des métabolites aussi bien dans les écosystèmes terrestres que marins. La suite de ce chapitre introductif est consacrée à la biodiversité et à la chimiodiversité fongique marine.

II. Biodiversité et chimiodiversité des champignons marins

II.1. Une importante biodiversité

Si les champignons terrestres sont bien connus, la première description d'un champignon exclusivement marin, *Phaeosphaeria typharum*, date de 1849¹²⁶. L'étude de la biodiversité marine fongique a véritablement commencé en 1944 avec l'examen de champignons de mangroves¹²⁷.

L'origine terrestre hypothétique des champignons a mené la communauté scientifique à définir deux types de champignons marins : les champignons « obligatoires » et les champignons « facultatifs ». Un champignon sera considéré comme « obligatoire » s'il est exclusivement présent dans les sédiments ou associé à des espèces marines (éponges, algues...). En revanche, un champignon sera considéré comme

¹²⁴ Carlile M. J., Watkinson S. C. 1994, The Fungi. Academic Press eds. London.

¹²⁵ Reproduit d'après le site <https://www.anbg.gov.au/fungi/mycelium.html>

¹²⁶ Desmazières J. B. 1849. Plantes cryptogames de France, 2^{ème} ed., n° 1778. Lille.

¹²⁷ Barghoorn E. S., Linder D. H. 1944, Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia.*, 1, 395–467.

« facultatif » de l'écosystème marin, s'il est à la fois terrestre et marin¹²⁸. Les champignons facultatifs se développent dans le milieu marin et peuvent éventuellement y sporuler, de la même manière que les champignons obligatoires. Depuis 2013, cette classification a été revue, donnant lieu à trois catégories¹²⁹ : i) les champignons marins strictement endémiques, ii) les champignons marins ubiquitaires actifs qui produisent des métabolites secondaires et iii) les champignons ubiquitaires passifs.

La classification des champignons fait encore l'objet de nombreux débats qui se sont traduits par plusieurs remaniements ces dernières années. Ces aspects ne seront pas discutés dans ce manuscrit. Les champignons marins les plus fréquemment observés sont issus de deux phyla : les ascomycètes (Ascomycota) et les basidiomycètes (Basidiomycota)¹³⁰. Leur principale différence réside dans la nature et la production des structures reproductives : les spores. Ainsi, les ascomycètes possèdent un asque où sont produites et stockées les spores, tandis que les basidiomycètes possèdent des basides qui fabriquent des spores exogènes (figure 118).

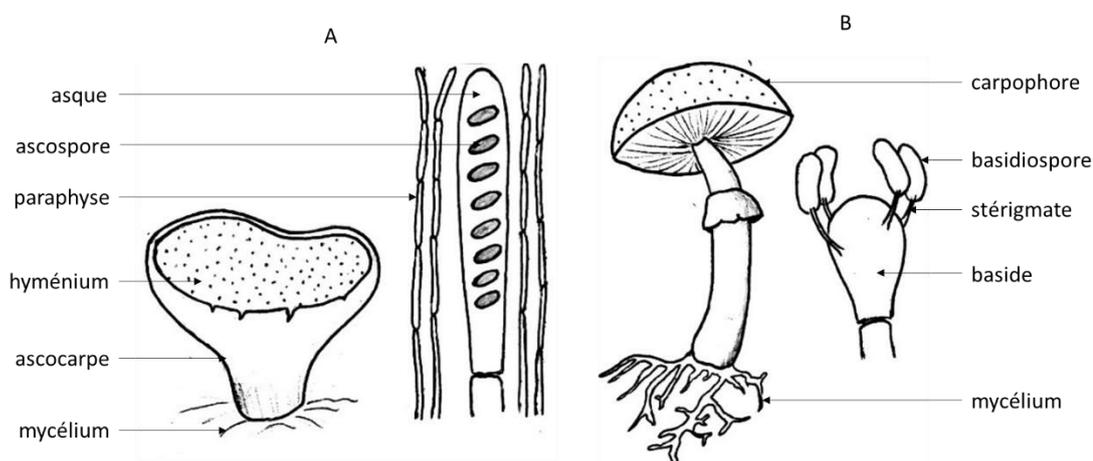


Figure 118. Structures reproductives des ascomycètes (A) et des basidiomycètes (B)¹³¹.

Bien que les estimations sur le nombre d'espèces fongiques soient très élevées (de l'ordre de 700 000 à 5 millions¹³²), peu d'espèces ont été reconnues à ce jour comme étant aquatiques (3 000 – 4 000)¹³³ et encore moins d'espèces ont été décrites comme marines (1 112)¹³⁴. La biodiversité fongique aquatique paraît donc sous-estimée et il est crucial de l'étudier.

¹²⁸ Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. 1979, Marine mycology: the higher fungi. London: Academic Press.

¹²⁹ Mahé S., Redou V., Calvez T. L., Vandenkoornhuysen P., Burgaud G. 2013, Fungi in deep-sea environments and metagenomics. The Ecological Genomics of Fungi, éd. F. Martin, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

¹³⁰ Fröhlich-Nowoisky J., Burrows S. M., Xie Z., Engling G., Solomon P. A., Fraser M. P., Mayol-Bracero O. L., Artaxo P., Begerow D., Conrad R., Andreae M. O., Despres V. R., Pöschl U. 2012, Biogeography in the air: fungal diversity over land and oceans. *Biogeosciences*, **9**, 1125–1136.

¹³¹ Adapté d'après : Des Abbayes H., Chadeffaud M., Feldmann J., de Ferré Y., Gaussen H., Grassé P.-P., Prévot A. R. 1978, Les champignons, Caractères généraux. pp 321–322. Précis de botanique 1. Végétaux inférieurs. 2^{ème} éd., Masson, Paris, 722p.

¹³² Estimations basées sur le ratio champignons / plantes des zones écologiques bien étudiées.

¹³³ a) Jones E. G., Hyde K. D., Pang K.-L. (eds) 2014, Freshwater Fungi and Fungal-like Organisms. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Berlin, 496 p. b) Blackwell M. 2011, The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *Am. J. Bot.*, **98**, 426–438.

¹³⁴ Jones E. G., Suetrong S., Sakayaroj J., Bahkali A. H., Abdel-Wahab M. A., Boekhout T., Pang K.-L. 2015, Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Divers.*, **73**, 1–72.

La biodiversité fongique marine dépend de plusieurs facteurs abiotiques liés les uns aux autres¹³⁵. Parmi ces derniers, on distingue :

- **L'habitat** : certains champignons peuvent être spécifiques des mangroves, des bois immergés,
- **La nature et la disponibilité du substrat** : les substrats lignocellulosiques contiennent une large gamme d'espèces fongiques tandis que les substrats calcaires et sableux sont plus pauvres. De plus, il n'est pas rare d'observer des champignons spécifiques d'une espèce d'arbre donnée, notamment dans les mangroves. Enfin, de nombreux champignons sont associés à d'autres espèces marines telles que les éponges, les algues ou autres, que ces associations soient spécifiques ou non,
- **La température** : la distribution géographique des champignons est pour une grande partie liée à la température. Ainsi *Antennospora quadricornuta* est uniquement recensé sous les tropiques, *Ceriosporopsis tubulifera* n'a été répertorié que sous un climat tempéré, tandis que *Spathulospora antarctica* n'a été décrite qu'en Arctique,
- **La salinité** : il s'agit, conjointement avec la température, d'un facteur primordial qui influe fortement la biodiversité. Certains champignons préféreront les eaux salines (*Lindra inflata*) quand d'autres préféreront les eaux saumâtres (*Amylocarpus encephaloides*) ou à l'inverse les eaux douces.

D'autres facteurs tels que la quantité de nutriments organiques dissous, les effets osmotiques, la disponibilité de l'oxygène, la pression hydrostatique ou la luminosité ont également une influence sur la biodiversité fongique marine. La combinaison de ces nombreux facteurs ont conduit à des espèces fongiques très variées, présentes dans des environnements très différents, avec un fort potentiel de production de métabolites spécialisés diversifiés. La suite de ce manuscrit est dédiée à la description de la chimiodiversité fongique marine.

II.2. Chimiodiversité marine fongique

Puisque les champignons ont un rôle clé dans les écosystèmes (dégradation de la matière organique) et parce que la chimiodiversité de leurs métabolites est vaste et surtout valorisable pour l'Homme et la Nature, l'étude des champignons est depuis quelques années devenue une discipline de choix¹³⁶.

La céfalotine (**185**), un analogue de la céphalosporine C (**186**) isolée du champignon *Acremonium chrysogenum*¹³⁷, est le premier antibiotique d'origine fongique à avoir été commercialisé (figure 119).

¹³⁵ Jones E. B. G. 2000, Marine fungi: some factors influencing biodiversity, *Fungal Divers.*, **4**, 53–73.

¹³⁶ Grossart H.-P., Rojas-Jimenez K. 2016, Aquatic fungi: targeting the forgotten in microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.*, **31**, 140–145.

¹³⁷ Abraham E. 1979, A glimpse of the early history of the cephalosporins. *Rev. Infect. Dis.*, **1**, 99–105.

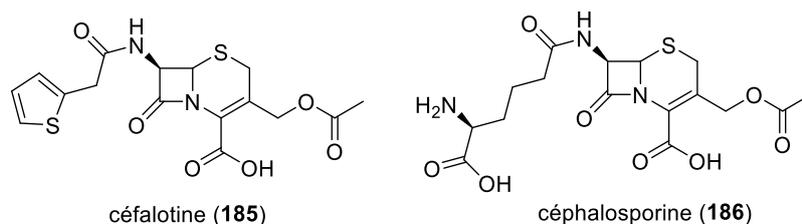


Figure 119. Structures de la céfalotine (185) et de la céphalosporine C (186)¹³⁷.

Depuis, plusieurs groupes de recherche et compagnies pharmaceutiques se sont intéressés aux métabolites marins d'origine fongique. Plus d'un millier de molécules ont été isolées et caractérisées avec des applications diverses et variées telles que le traitement des maladies cardiovasculaires, du diabète, du cancer, ou encore une application en tant que biocides¹³⁸. Les champignons marins sont devenus un important sujet de discussion pour leur qualité de réservoir de produits naturels, souvent bioactifs et possédant des structures nouvelles¹³⁹. L'analyse des génomes des champignons montre que ces organismes présentent de nombreuses voies de biosynthèse de métabolites secondaires. En effet, ils possèdent de nombreux gènes codant des enzymes clés telles que les PKS (Polyketide Synthase) et les hybrides PKS-NRPS, impliquées dans la biosynthèse des polycétides, les NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase), impliquées dans la synthèse de peptides, ainsi que les TS (Terpen Cyclase) et DMATS (DimethylAllyl Tryptophan Synthase), impliquées dans la biosynthèse des terpènes et des alcaloïdes. Pourtant, lors de la culture en laboratoire, les microorganismes n'expriment pas la totalité de leurs gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites. Leur capacité à produire des métabolites a donc largement été sous-estimée¹⁴⁰. Afin d'activer ces gènes silencieux et également pour choisir les voies de biosynthèse à activer/ désactiver, il est important de comprendre comment la production de métabolites est régulée. Ainsi, plusieurs facteurs spécifiques de transcription ont pu être décrits, notamment dans le cas de la régulation du *cluster* des gènes stérigmatocystine et aflatoxine¹⁴⁰. De plus, l'environnement est également une donnée importante dans ce domaine puisque les sources de carbone et d'azote, la température, la luminosité, le pH mais également les cocultures avec d'autres microorganismes (principalement des bactéries mais également avec d'autres espèces fongiques) jouent un rôle important dans la transcription des gènes et donc l'expression du métabolisme secondaire¹⁴¹. Les chercheurs tendent donc à stimuler certaines voies de biosynthèse par la mise en place de techniques spécifiques visant à changer plus ou moins drastiquement ces conditions environnementales. C'est par

¹³⁸ a) Gomes N. G., Lefranc F., Kijjoo A., Kiss R. 2015, Can some marine-derived fungal metabolites become actual anticancer agents? *Mar. Drugs.*, **13**, 3950–3991. b) Wang Y.-T., Xue Y.-R., Liu C.-H. 2015, A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi. *Mar. Drugs.* **13**, 4594–4616. c) Yamazaki H., Ukai K., Namikoshi M. 2016, Asperdichrome, an unusual dimer of tetrahydroxanthone through an ether bond, with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity, from the Okinawan freshwater *Aspergillus sp.* TPU1343. *Tetrahedron Lett.*, **57** (7), 732-735.

¹³⁹ a) Blunt J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H., Prinsep M. R. 2015, Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 116–211. b) Newman D. J., Cragg G. M. 2016, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, **79** (3), 629–661.

¹⁴⁰ Wiemann P., Keller N. P. 2013, Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 301–313.

¹⁴¹ Yin W., Keller N. P. 2011, Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.*, **49**, 329–339.

exemple le cas de l'approche « OSMAC » (One Strain MAny Compounds) développée dans les années 2000¹⁴². Cette méthode implique la modulation des conditions de culture (pH, milieu de culture, luminosité, température, stress chimique...) afin d'initier l'expression des voies de biosynthèse pour obtenir toujours plus de métabolites.

La suite de ce chapitre sur la biodiversité et la chimiodiversité fongique marine est consacrée à l'isolement et à la caractérisation des communautés fongiques cultivables de trois éponges méditerranéennes, *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, en tant que sources potentielles de métabolites valorisables dans le domaine des biocides.

¹⁴² Bode H. B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A. 2002, Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *Chem. Bio. Chem.*, **3**, 619–627.

Partie C :

Chapitre 1 :

Communautés fongiques cultivables

associées aux éponges

méditerranéennes *Aplysina*

carvernicola, *Phorbas tenacior* et

Crambe crambe

I. Introduction

Le milieu marin regroupe de nombreux habitats aux caractéristiques très contrastées qui abritent plusieurs communautés microbiennes (bactéries, archées, protistes et champignons). Ces communautés microbiennes complexes, en constante interaction, produisent une grande diversité de molécules mises en jeu dans la communication (*quorum sensing*) ou dans la compétition. De nombreuses molécules bioactives issues de macroorganismes marins semblent être produites par les microorganismes associés. Ces derniers peuvent représenter 40 à 60% de la biomasse de spongiaires.

Bien que les espèces terrestres produisent de nombreux métabolites ayant permis le développement de nombreuses molécules thérapeutiques notamment des antibiotiques, les champignons du milieu marin n'ont suscité que peu d'attention. Ces derniers produisent 40% à 60% des molécules microbiennes marines recensées et le nombre de nouvelles molécules fongiques marines décrit chaque année ne cesse d'augmenter. On estime que la communauté fongique de moins de 1,5% des éponges marines a fait l'objet d'une étude. Parmi les éponges méditerranéennes, on distingue *Suberites domuncula*, *Axinella damicornis*, *Psammocinia* sp., *Ircinia variabilis* et *Tethya aurentium*. Dans le cadre d'une collaboration étroite avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin, nous nous sommes intéressés pour la première fois aux mycobiota de trois éponges méditerranéennes, *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, en tant que sources potentielles de métabolites valorisables dans le domaine des biocides.

Après une brève description des éponges modèles choisies ainsi que les métabolites associés, la suite de ce manuscrit est consacrée aux travaux d'isolement et de caractérisation des champignons présents dans *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*.

II. Eponges hôtes

II.1. *Aplysina cavernicola*

II.1.1. Classification et distribution géographique de l'éponge

Aplysina cavernicola (Vacelet, 1959) est une démosponge appartenant à l'ordre Verongiida¹⁴³ (tableau 26).

¹⁴³ D'après la base de données WoRMS, accédée le 11/09/17.

Tableau 26. Classification d'*Aplysina cavernicola*.

Règne Animal	
Division	Porifera
Classe	Demospongiae
Ordre	Verongiida
Famille	Aplysinidae
Genre	<i>Aplysina</i>
Espèce	<i>Aplysina cavernicola</i>

Cette espèce, d'abord décrite comme endémique de la Méditerranée, a été retrouvée en Atlantique (îles Canaries, Cap Vert, golfe de Guinée).

II.1.2. Description morphologique

Aplysina cavernicola est une éponge ferme de couleur jaune. La base massive, porte des tubulures digitiformes de plusieurs centimètres de hauteur et d'environ 2 cm de diamètre. Le sommet des doigts est aplati et porte un oscule en son centre (figure 120)¹⁴⁴.



Figure 120. Photographie *in situ* de l'éponge *A. cavernicola* étudiée (©J. de Vaugelas).

II.1.3. Métabolisme spécialisé d'*Aplysina cavernicola*

De façon identique à d'autres éponges appartenant à l'ordre Verongiida, les métabolites isolés d'*A. cavernicola* sont principalement des dérivés de la bromotyrosine (cf. Annexe 1 du Tome II). L'ensemble des molécules décrites à ce jour est présenté à la figure 121.

La première étude dédiée aux métabolites d'*A. cavernicola* (alors confondue avec *A. aerophoba*) date des années 70. Ces travaux ont conduit aux aéroplysinine-1 (**28**) et -2 (**187**) (bromotyrosines simples),

¹⁴⁴ D'après la base de données DORIS à l'adresse <http://doris.ffessm.fr/Especies/Aplysina-cavernicola-Eponge-cavernicole-jaune-631> accédée le 11/09/17.

à l'aérothionine (**140**) et l'homoaérothionine (**188**) (*bis*-spirocyclohexadiénylisoxazolines) ainsi qu'à l'acide 3,4-dihydroxyquinoline-2-carboxylique (**189**)¹⁴⁵. Par la suite, d'autres dérivés halogénés ont été décrits, tels que les dibromolactames cavernicolines-1 (**190**) et -2 (**191**), pour lesquels aucune activité biologique n'a été recensée à ce jour¹⁴⁶, le dichloroverongiaquinol (**192**) (premier dérivé comportant du chlore), qui s'est révélé être un inhibiteur de la croissance des bactéries *B. subtilis* et *P. vulgaris*¹⁴⁷, ainsi que les verongiaquinols (3-bromo- (**193**), 3-bromo-5-chloro- (**194**)) et plusieurs dérivés cavernicolines (bromo- (**195**), 5-chloro- (**196**) et plusieurs bromochloro- (**197-200**))¹⁴⁸. En 1985 et 1986, deux bromoénones bicycliques ont également été isolées et caractérisées. On distingue la 7-bromocavernicolénone (**201**), active vis-à-vis de *P. cichorii* et *B. subtilis*¹⁴⁹ et la 7-chlorocavernicolénone (**202**)¹⁵⁰. Dans cette dernière étude, la *N*-carbamoylpyrrolidine (**203**) a également été identifiée pour la première fois comme un produit naturel. En 1997 et 2004, de nouveaux dérivés mono- et bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines ont été isolés à partir d'*A. cavernicola*. Il s'agit de l'oxohomoaérothionine (**204**), de la 11-hydroxyfistularine-3 (**205**)¹⁵¹ et de l'aplysinaisine (**206**), ainsi que du dérivé diénone de l'aéroplysine-1 (**207**)¹⁵².

¹⁴⁵ a) Fattorusso E., Minale L., Sodano G. 1970a, Aeroplysinin-I, a new bromo-compound from *Aplysina aerophoba*. *J.C.S. D Chem. Com.*, **12**, 751–752. b) Fattorusso E., Minale L., Sodano G., Moody K., Thomson R. H. 1970b, Aerothionin, a tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. *J.C.S. D Chem. Com.*, **12**, 752–753. c) Fattorusso E., Minale L., Moody K., Sodano G., Thomson R. H. 1971a, Homo-aerothionin, a second tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. *Gazz. Chim. It.*, **101**, 61–62. d) Fattorusso E., Forenza S., Minale L., Sodano G. 1971b, Isolation of 3,4-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Gazz. Chim. Ital.* **101**, 104–105. e) Minale L., Sodano G., Chan W. R., Chen A. M. 1972, Aeroplysinin-2, a dibromolactone from marine sponges *Aplysina (Verongia) aerophoba* and *Ianthella sp.* *J.C.S. Chem. Comm.*, **11**, 674–675.

¹⁴⁶ D'Ambrosio M., Guerriero A., Traldi P., Pietra F. 1982, Cavernicolin-1 and cavernicolin-2, two epimeric dibromolactams from the mediterranean sponge *Aplysina (Verongia) cavernicola*. *Tetrahedron Lett.*, **23** (42), 4403–4406.

¹⁴⁷ D'Ambrosio M., Guerriero A., De Clauser R., De Stanchina G., Pietra F. 1983, Dichloroverongiaquinol, a new marine antibacterial compound from *Aplysina cavernicola*. Isolation and synthesis. *Experientia*, **39**, 1091–1092.

¹⁴⁸ a) D'Ambrosio M., Guerriero A., Pietra F. 1984, Novel, racemic or nearly-racemic antibacterial bromo- and chloroquinols and γ -lactams of the verongiaquinol and the cavernicolin type from the marine sponge *Aplysina (= Verongia) cavernicola*. *Helv. Chim. Acta.*, **67**, 1484–1492. b) Guerriero A., D'Ambrosio M., Traldi P., Pietra F. 1984, On the first marine natural product having low enantiomeric purity. *Naturwiss.*, **71**, 425–426.

¹⁴⁹ D'Ambrosio M., Mealli C., Guerriero A., Pietra F. 1985, 7-Bromocavernicolénone, a new α -bromoénone from the Mediterranean sponge *Aplysina (= Verongia) cavernicola* implied, unprecedented involvement of a halogenated dopa in the biogenesis of a natural product. *Helv. Chim. Acta.*, **68**, 1453–1460.

¹⁵⁰ D'Ambrosio M., Guerriero A., Pietra F. 1986, *N*-Carbamoylpyrrolidine and 7-chlorocavernicolénone, two new metabolites of the Mediterranean sponge *Aplysina (= Verongia) cavernicola*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83B** (2), 309–312.

¹⁵¹ Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Pansini M. 1997, Chemistry of Verongida sponges VIII - Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron*, **53** (18), 6565–6572.

¹⁵² Thoms C., Wolff M., Padmakumar K., Ebel R., Proksch P. 2004, Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z. Naturforsch.*, **59c**, 113–122.

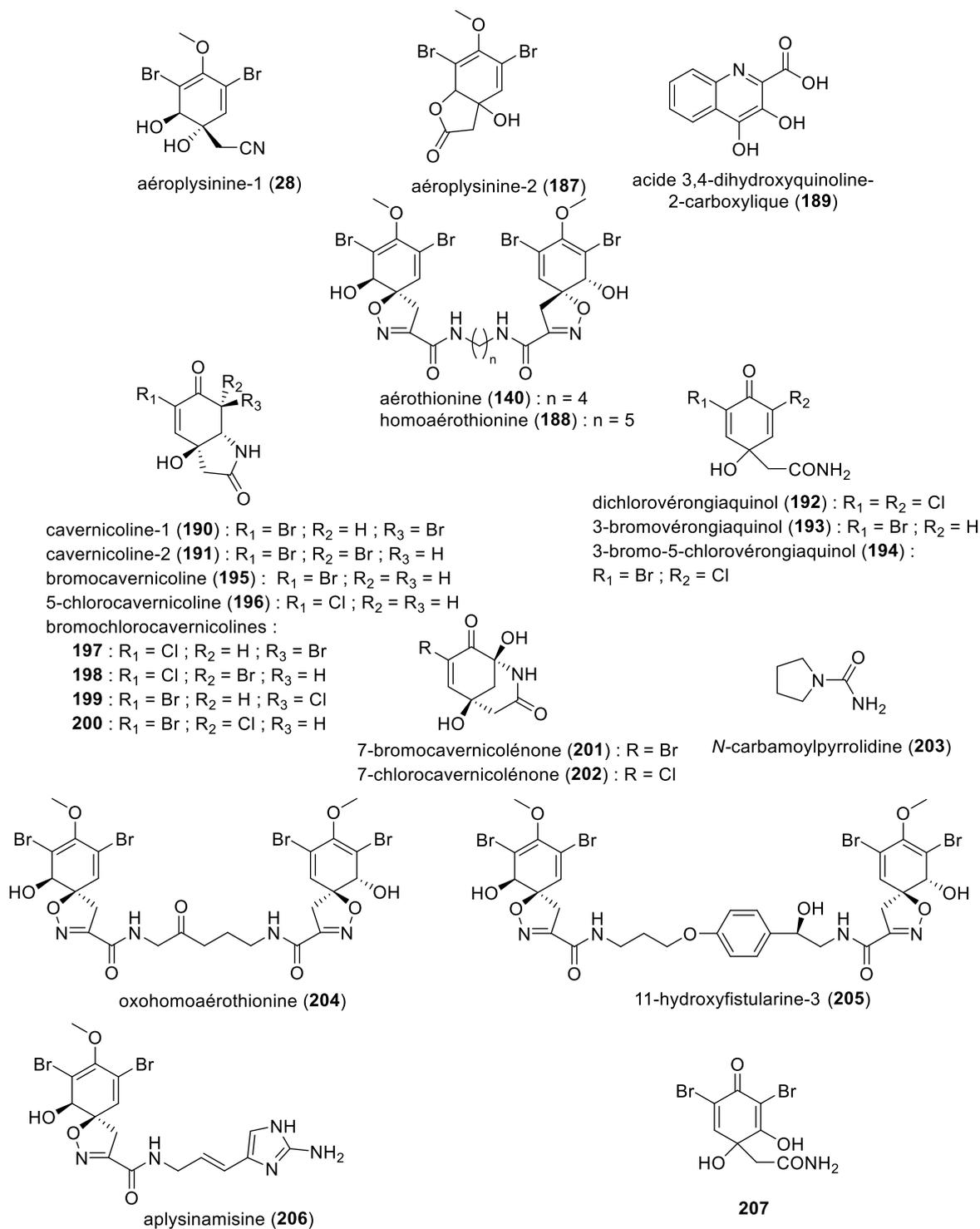


Figure 121. Structures des métabolites secondaires isolés d'*A. cavernicola*¹⁴⁵⁻¹⁵².

II.1.4. Microbiome associé à *Aplysina cavernicola*

Plusieurs études ont été menées sur la communauté bactérienne d'*A. cavernicola*. En 2001, 238 souches bactériennes cultivables regroupées dans les familles des α - et γ -protéobactéries, ainsi que plusieurs

bactéries à Gram positif et négatif, ont été isolées¹⁵³. En 2012, 119 espèces bactériennes réparties en 13 phyla ont été identifiées chez *A. cavernicola* par pyroséquençage¹⁵⁴.

A ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la communauté fongique associée à *A. cavernicola*.

II.2. *Phorbas tenacior*

II.2.1. Classification et distribution géographique de l'éponge

P. tenacior (Topsent, 1925), autrefois dénommée *Anchinoe tenacior*, est une démosponge appartenant à l'ordre Poecilosclerida (tableau 27)¹⁵⁵.

Tableau 27. Classification de *Phorbas tenacior*.

Règne Animal	
Division	Porifera
Classe	Demospongiae
Ordre	Poecilosclerida
Famille	Hymedesmiidae
Genre	<i>Phorbas</i>
Espèce	<i>Phorbas tenacior</i>

Cette espèce, principalement recensée en Méditerranée, est également retrouvée dans l'Atlantique (îles Canaries).

II.2.2. Description morphologique

P. tenacior (figure 122) est une éponge de couleur bleue. Plutôt fine et fragile, elle peut s'étendre en larges plaques sur des substrats généralement situés à l'abri de la lumière. Elle possède des pores inhalants regroupés et une série de gros canaux, avec des orifices exhalants légèrement surélevés¹⁵⁶.

¹⁵³ Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., Hacker J. 2001, Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 305–312.

¹⁵⁴ Schmitt S., Hentschel U., Taylor M. W. 2012, Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. *Hydrobiologia*, **687**, 341–351.

¹⁵⁵ D'après la base de données WoRMS, accédée le 04/08/17.

¹⁵⁶ D'après la base de données DORIS, à l'adresse <http://doris.ffessm.fr/Especes/Eponge-encroutante-bleuatre3> accédée le 04/08/17.

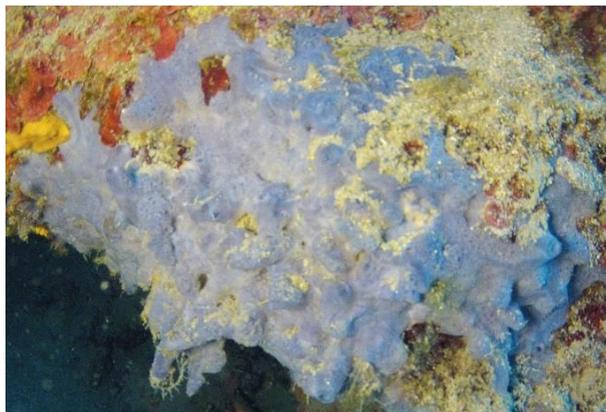


Figure 122. Photographie *in situ* de l'éponge *P. tenacior* étudiée (©J. de Vaugelas).

II.2.3. Métabolisme spécialisé de *Phorbas tenacior*

De nombreux métabolites originaux et souvent bioactifs tels que des alcaloïdes¹⁵⁷, des macrolides¹⁵⁸, des terpénoïdes¹⁵⁹, des stéroïdes¹⁶⁰ et des dérivés peptidiques, ont été isolés de plusieurs éponges du genre *Phorbas*. Seuls huit métabolites ont été isolés de *Phorbas tenacior* par Casapullo *et al.* en 1993 et 1994 (figure 123). On distingue six dérivés pseudopeptidiques avec les anchinoeptolides A-D (**208-211**), le cycloanchinoeptolide C (**212**), le *L*-Glu-Gly-4-hydroxystyrylamine (**213**) et la sulfone 6-(*p*-hydroxyphényl)-2*H*-3,4-dihydro-1,1-dioxo-1,4-thiazine (**214**)¹⁶¹. La configuration absolue des centres stéréogéniques des anchinoeptolides B-D (**209-211**) a été déterminée par dichroïsme circulaire dans notre équipe, durant la thèse de Nathalie Legrave¹⁶². Les anchinoeptolides A-D (**208-211**), qui présentent une très faible cytotoxicité, se sont avérés être de bons inhibiteurs des kinases GSK-3 et *Pf*GSK-3 (1,7 – 5,0 μ M) impliquées dans certaines maladies neurodégénératives et la malaria, respectivement¹⁶².

¹⁵⁷ Rudi A., Stein Z., Green S., Goldberg I., Kashman Y., Benayahu Y., Schleyer M. 1994, Phorbazoles A-D, novel chlorinated phenylpyrrolyloxazoles from the marine sponge *Phorbas aff Clathrata*. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2589–2592.

¹⁵⁸ Searle P. A., Molinski T. F. 1995, 4-Dehydroecdysterone, a new ecdysteroid from the zoanthid *Parazoanthus sp.* *J. Nat. Prod.*, **58**, 264–268.

¹⁵⁹ a) McNally M., Capon, R. J. 2001, Phorbasin B and C: novel diterpenes from a southern Australian marine sponge, *Phorbas* species. *J. Nat. Prod.*, **64**, 645–647. b) Rho J. R., Lee H. S., Sim C. J., Shin J. 2002, Gagunins, highly oxygenated diterpenoids from the sponge *Phorbas sp.* *Tetrahedron*, **58**, 9585–9591. c) Jang K. H., Jeon J. E., Ryu S., Lee H. S., Oh K. B., Shin J. 2008, Polyoxygenated diterpenes from the sponge *Phorbas sp.* *J. Nat. Prod.*, **71**, 1701–1707. d) Zhang H., Major J. M., Lewis R. J., Capon R. J. 2008, Phorbasins G–K: new cytotoxic diterpenes from a southern Australian marine sponge, *Phorbas sp.* *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 3811–3815.

¹⁶⁰ Morinaka B. I., Masuno M. N., Pawlik J. R., Molinski T. F. 2007, Amaranzole A, a new *N*-imidazolyl steroid from *Phorbas amaranthus*. *Org. Lett.*, **9**, 5919–2477. b) Morinaka B. I., Pawlik J. R., Molinski T. F. 2009, Amarofoxocanes A and B: sulfated dimeric sterols defend the Caribbean coral reef sponge *Phorbas amaranthus* from fish predators. *J. Nat. Prod.*, **72**, 259–264.

¹⁶¹ a) Casapullo A., Finamore E., Minale L., Kollo F. 1993a, A dimeric peptide alkaloid of a completely new type, Anchinoeptolide A, from the marine sponge *Anchinoe tenacior*. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 6297–6300. b) Casapullo A., Minale L., Zollo F. 1993b, The unique 6-(*p*-Hydroxyphenyl)-2*H*-3,4-dihydro-1,1-dioxo-1,4-thiazine and the new tripeptide *L*-Glu-Gly-4-hydroxystyrylamine from the marine sponge *Anchinoe tenacior*. *Tetrahedron Lett.* **35**, 2421–2422. c) Casapullo A., Minale L., Zollo F., Lavayre J. 1994a, Four New dimeric peptide alkaloids, anchinoeptolides B-D, and cycloanchinoeptolide C, congeners of anchinoeptolide A, from the Mediterranean marine sponge *Anchinoe tenacior*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 1227–1233. d) Casapullo A., Minale L., Zollo F. 1994b, The unique 6-(*p*-hydroxyphenyl)-2*H*-3,4-dihydro-1,1-dioxo-1,4-thiazine and the new tripeptide *L*-Glu-Gly-4-hydroxystyrylamine from the marine sponge *Anchinoe tenacior*. *Tetrahedron Lett.*, **35** (15), 2421–2422.

¹⁶² Legrave N. 2013, Identification, synthèse et valorisation de molécules bioactives d'invertébrés marins de Nouvelle Calédonie et de Méditerranée. Thèse de doctorat en Chimie. Université de Nice.

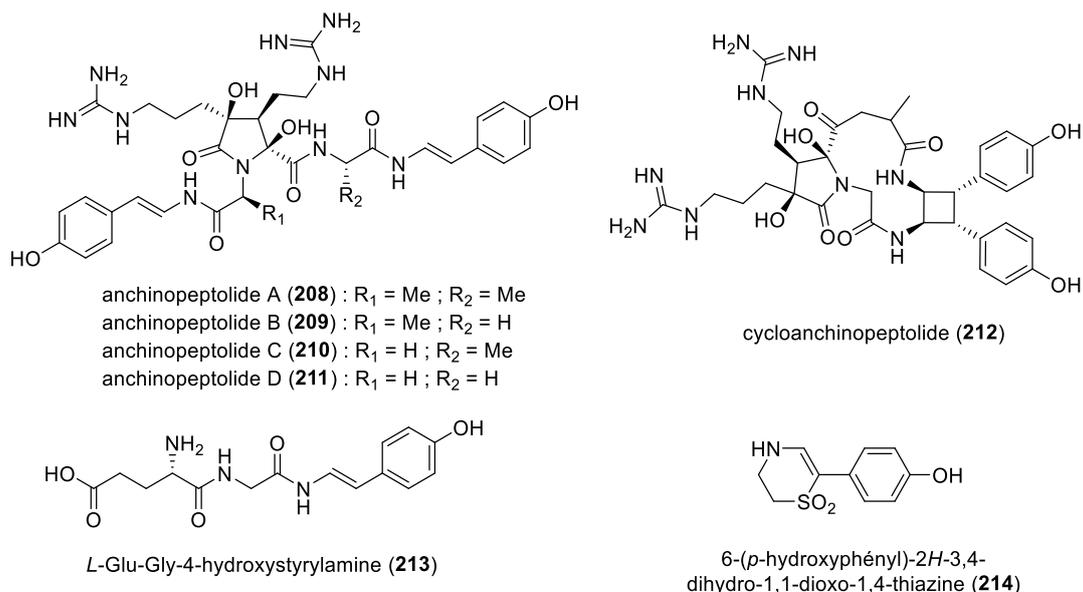


Figure 123. Structures des métabolites isolés de *P. tenacior*¹⁶¹.

Du point de vue biosynthétique, les anchinopeptolides semblent être le résultat de l'autocondensation d'un même précurseur, qui serait issu du *L*-Glu-Gly-4-hydroxystyrylamine (**213**) (schéma 18. A). Par ailleurs, le cycloanchinopeptolide C (**212**) serait le produit de la réaction de cyclisation intramoléculaire [2+2] des 2 unités styryles de l'anchinopeptolide C (**210**) (schéma 18. B).

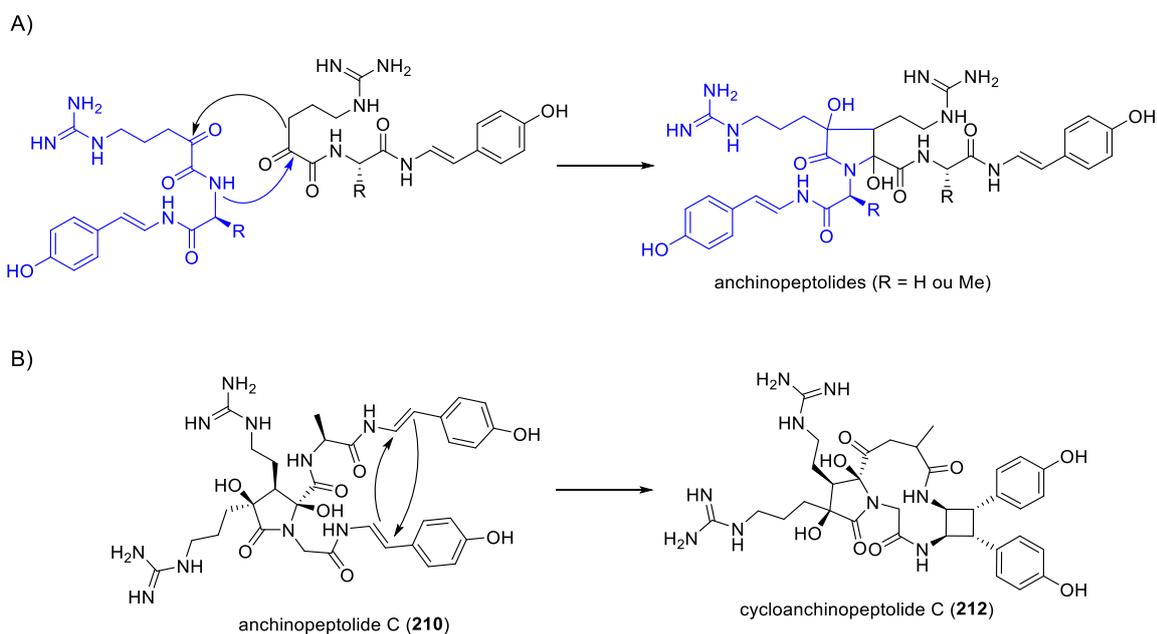


Schéma 18. Relations biosynthétiques hypothétiques pour la formation (A) des anchinopeptolides et (B) du cycloanchinopeptolide C.

II.2.4. Microbiome associé à *Phorbas tenacior*

Le microbiome de *P. tenacior* a fait l'objet d'une seule étude en 2013¹⁶³. Dans cette dernière, 23 souches bactériennes classées en protéobactéries (α et χ) et actinobactéries ont pu être isolées et cultivées. Sept genres différents ont pu être identifiés : *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Ruegeria*, *Pseudovibrio* et *Citricoccus*.

A ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la communauté fongique associée à *P. tenacior*.

II.3. *Crambe crambe*

II.3.1. Rappels

L'éponge *C. crambe* (Schmidt, 1862) a fait l'objet de travaux présentés dans le chapitre 3 de la partie B de ce manuscrit. Il s'agit d'une demosponge encroûtante rouge-orangée de l'ordre Poecilosclerida, très répandue en Méditerranée.

Plusieurs alcaloïdes guanidiniques polycycliques (crambines, crambescidines) avec des activités biologiques très diversifiées ont été isolés de *C. crambe* (figure 124).

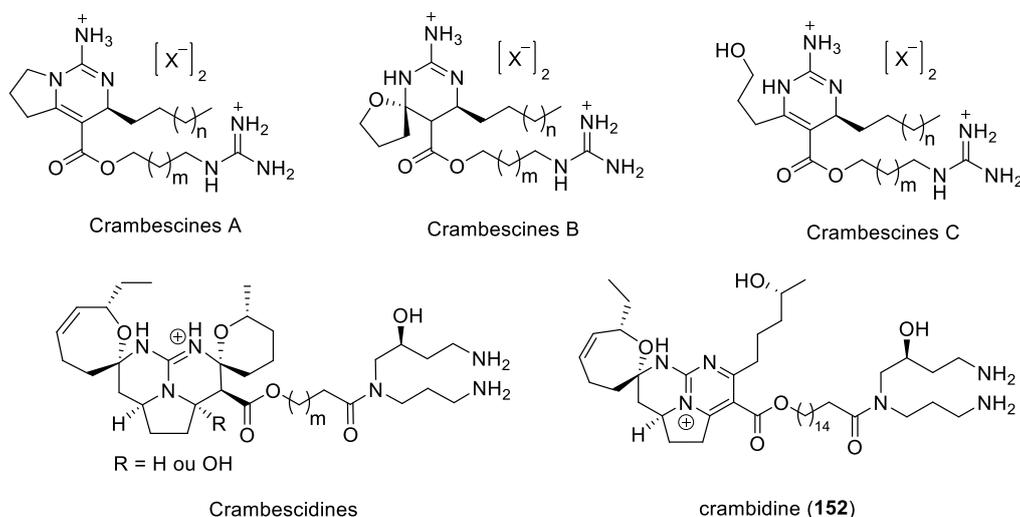


Figure 124. Exemples d'alcaloïdes guanidiniques polycycliques isolés de *C. crambe*.

L'origine biosynthétique des dérivés crambines et crambescidines reste à ce jour non élucidée. Du point de vue structural, ces métabolites semblent issus de la condensation de précurseurs polycétides (usuellement d'origine microbienne) avec un ou plusieurs groupements guanidiniums. Par ailleurs, les dérivés crambescines B semblent être les produits de la cyclisation des crambescines C (réaction de type

¹⁶³ Dupont S., Carré-Mlouka A., Descarrega F., Ereskovsky A., Longeon A., Mouray E., Florent I., Bourguet-Kondracki M. L. 2013, Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Lett. Appl. Microbiol.*, **58**, 42–52.

oxo-Michael, schéma 19. A). Les crambescidines semblent quant à elles dériver des crambidines (schéma 19. B).

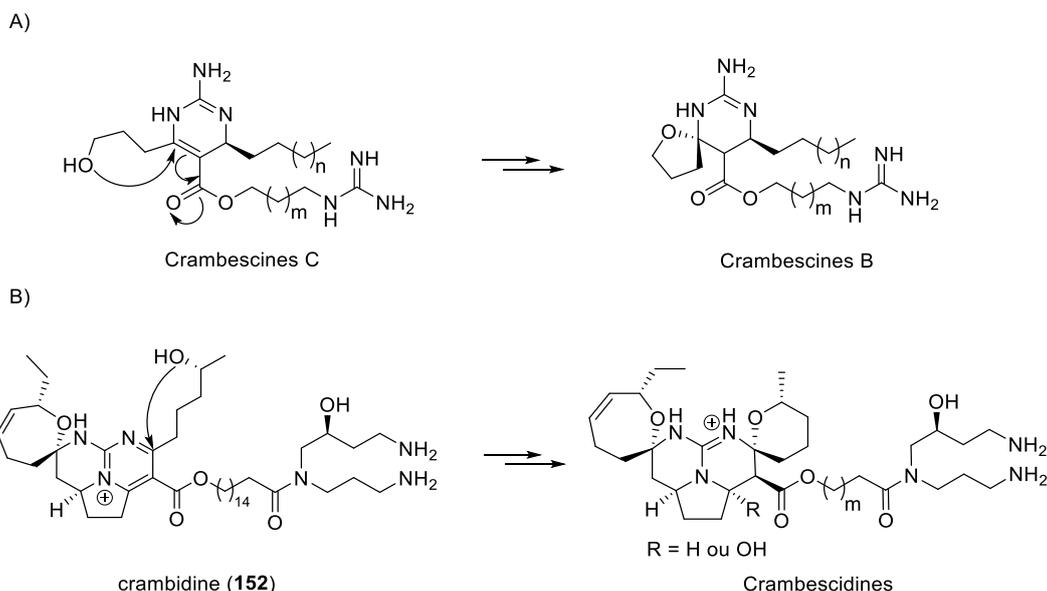


Schéma 19. Relations biosynthétiques hypothétiques pour la formation (A) des crambescidines B et (B) des crambescidines.

II.3.2. Microbiome associé à *Crambe crambe*

Plusieurs études mêlant culture de bactéries et analyse par microscopie ont décelé l'absence d'organisme à la surface de l'éponge¹⁶⁴ ainsi qu'une faible densité et diversité en termes de microorganismes associés à *C. crambe*¹⁶⁵ due à la toxicité de ses métabolites¹⁶⁶.

Par pyroséquençage, Croue *et al.* ont obtenu plusieurs classes de bactéries à partir de *C. crambe* : flavobactéries et protéobactéries (α , β et γ)¹⁶⁷. Une seule bêtaprotéobactérie a regroupé 95% des séquences obtenues. Celle-ci n'avait jamais été décrite auparavant et, pour cause, les auteurs n'ont pas réussi à la cultiver en laboratoire sur les milieux de culture testés.

A ce jour et à notre connaissance, aucune étude de la communauté fongique associée à *C. crambe* n'a été publiée.

¹⁶⁴ Becerro M. A., Lopez N. I., Turon X., Uriz M. J. 1994, Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **179**, 195–205.

¹⁶⁵ Vacelet J., Donadey C. 1977, Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301–314.

¹⁶⁶ Uriz M. J., Becerro M. A., Tur J. M., Turon X. 1996, Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Mar. Biol.*, **124**, 583–590.

¹⁶⁷ Croue J., West N. J., Escande M.-L., Intertaglia L., Lebaron P., Suzuki M. T. 2013, A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Sci. Rep.*, **3**, (art. n° 2583), 8 p.

III. Communautés fongiques cultivables associées aux éponges *A. cavernicola*, *P. tenacior* et *C. crambe*

Les travaux d'isolement et de caractérisation des souches fongiques cultivables ont été réalisés en collaboration avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin.

III.1. Isolement et détermination des souches cultivables

III.1.1. Isolement

Les éponges ont toutes été collectées à Villefranche-sur-Mer (pointe Pilone) à 25 m de profondeur en août 2014. *A. cavernicola* et *P. tenacior* étaient à proximité sur le même rocher, tandis que *C. crambe* était distante des deux autres. Elles ont été déposées sur des boîtes de Pétri soit sous forme d'homogénéat, préalablement obtenu en broyant chaque éponge dans de l'eau stérile, soit sous forme de morceaux d'éponge uniquement dans le cas d'*A. cavernicola*¹⁶⁸.

Nous avons utilisé plusieurs conditions d'isolement qui diffèrent par la composition du milieu de culture et la température d'incubation, afin d'obtenir un maximum de champignons cultivables. Trois milieux de culture ont été employés : (i) un milieu à base d'agarose dans de l'eau de mer artificielle (SWA), (ii) un milieu constitué d'agarose et de gélatine dans de l'eau de mer artificielle (GSW), une source de carbone et pour tenter de mimer la surface des éponges, et (iii) un milieu à base de farine de maïs dans de l'eau de mer artificielle (CMASW), qui est considéré comme un milieu nutritif encore plus riche. Deux températures ont également été testées afin d'obtenir un maximum de souches fongiques : (i) 15 °C pour mimer la température moyenne de l'eau de mer et (ii) 25 °C pour favoriser leur développement. Pour chaque éponge et chaque condition, les expériences ont été réalisées en triplica, soit 36 boîtes pour *A. cavernicola* et 18 boîtes pour *C. crambe* et *P. tenacior*. Après 30 jours et une vérification régulière des plaques (figure 125), les différentes souches fongiques ont été isolées et dénombrées.



Figure 125. Morceau d'éponge sur laquelle un mycélium de champignon se développe.

¹⁶⁸ Le manque de matériel pour ces deux éponges n'a pas permis de réaliser les deux techniques.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 28. Ils ne tiennent pas compte de la détermination des espèces de chaque souche fongique obtenue.

Tableau 28. Souches fongiques cultivables obtenues en fonction des conditions d'isolement, de température et du milieu de culture.

		<i>A. cavernicola</i>		<i>P. tenacior</i>		<i>C. crambe</i>		Total	
		Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Méthode	Morceaux	10	27	-	-	-	-	-	10
	Homogénat	27	73	27	100	4	100	60	90
T°	25 °C	15	41	22	81	3	75	41	61
	15 °C	22	59	5	19	1	25	26	39
Milieu	GSW	11	30	11	41	3	75	25	37
	CMASW	13	35	11	41	0	0	22	33
	SWA	13	35	5	19	1	25	20	30
Total		36	100	27	100	4	100		

La température d'incubation a une influence sur le nombre de souches cultivables. Bien que les éponges aient été échantillonnées au niveau du même site et à la même profondeur, les mycobiomes de chaque éponge présentent une préférence notable pour une des deux températures d'incubation. Pour *P. tenacior* et *C. crambe*, 81% et 75% des taxons ont été isolés à 25 °C, respectivement (tableau 28) alors que pour *A. cavernicola* seuls 41% des taxons ont pu être isolés à cette température. Pour cette dernière, la majorité des taxons (59%) a été isolée à 15 °C. C'est la première fois que différentes températures d'incubation sont utilisées pour l'isolement de champignons marins à partir d'une éponge. D'autres études sont nécessaires pour tenter de trouver une explication écologique à ces résultats. Avec les données obtenues, l'hypothèse la plus viable est liée à la différence d'habitats. Parmi les trois éponges, *A. cavernicola* est fréquemment retrouvée dans des sites faiblement exposés à la lumière ce qui pourrait expliquer la préférence du mycobiome pour une température d'incubation de 15°C.

Tout comme la température d'incubation, la composition du milieu de culture s'est avérée très importante pour augmenter le nombre de souches cultivables. Ainsi, le nombre d'espèces fongiques isolé d'*A. cavernicola* et de *P. tenacior* dépend du milieu de culture utilisé. En revanche, les champignons de *C. crambe* se développent exclusivement sur les milieux GSW et SWA, deux milieux spécifiquement sélectionnés pour mimer la composition des éponges et celle de l'eau de mer, respectivement.

Enfin, l'utilisation de différentes méthodes d'inoculation dans le cas d'*A. cavernicola* s'est avérée utile pour améliorer le nombre de champignons cultivables. L'inoculation directe d'*A. cavernicola* a permis d'isoler 27% de la communauté fongique.

III.1.2. Détermination des espèces

Tous les champignons, à l'exception des *Hypocreales* qui se sont avérés difficiles à maintenir en condition **axénique**, ont été identifiés jusqu'au niveau de l'espèce par une approche polyphasique. Cette dernière, basée sur la complémentarité des analyses morphologiques, moléculaires et phylogénétiques, nous a permis de déterminer de façon robuste la taxonomie des différentes souches isolées¹⁶⁹. Dans ce cadre, l'ADN de chaque souche a été extrait du mycélium, purifié, puis amplifié par **PCR**¹⁷⁰ (gène actine pour le genre *Cladosporium*¹⁷¹, gène β -tubuline pour le genre *Penicillium*¹⁷² et gène ITS1-5,8S-ITS2 pour les autres genres¹⁷³). Par la suite, les séquences obtenues, préalablement nettoyées, ont été comparées aux bases de données GenBank (NCBI) et Mycobank (CBS). Concernant les souches pour lesquelles la séquence n'était pas répertoriée dans les bases de données ou pour lesquelles l'identification est douteuse, nous avons procédé à une analyse phylogénétique, basée sur les séquences partielles LSU (arbres phylogénétiques de l'Annexe 2 du Tome II). Enfin, les espèces redondantes ont été soumises à une déréduplication génomique (analyse des microsatellites), pour déterminer si elles étaient identiques ou différentes.

L'ensemble des résultats obtenus, est consigné dans le tableau 29. Il s'agit d'une synthèse de la version présentée en annexe 2 du tome II.

III.2. Discussion

III.2.1. Comparaison avec l'environnement marin

La grande majorité de la communauté fongique cultivable des trois éponges fait partie des ascomycètes (92%) et seulement trois espèces (8%) font partie des basidiomycètes. Il s'agit de *Irpex lacteus* et *Schizophyllum commune* isolés d'*A. cavernicola* et de *Psathyrella candolleana* isolé de *P. tenacior*. Cette forte proportion d'ascomycètes est cohérente avec les valeurs généralement observées en milieu marin notamment pour les éponges marines. Dans l'environnement marin, les ascomycètes sont impliqués dans de nombreux processus principalement endossés par les

¹⁶⁹ Paz Z., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I. S., Aveskamp M. M., Shnaiderman A., Aluma Y., Carmeli S., Ilan M., Yarden O. 2010, Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Divers.*, **42** (1), 17–26.

¹⁷⁰ La PCR (Polymerization Chain Reaction) est une réaction de polymérisation en chaîne des gènes, permettant d'amplifier une partie spécifique et choisie de l'ADN.

¹⁷¹ Bensch K., Braun U., Groenewald J. Z., Crous P. W. 2012, The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, **72**, 1–401.

¹⁷² Glass N. L., Donaldson G. C. 1995, Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (4), 1323–1330.

¹⁷³ White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis MA, Gelfand DH, Sninky J. J, White T. J. edn. PCR protocols : A guide to methods and applications. pp 315–322. Academic Press, San Diego.

Tableau 29. Espèces fongiques cultivables obtenues à partir des trois éponges de notre étude.

<i>A. cavernicola</i>	<i>P. tenacior</i>	<i>C. crambe</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Arthrimum arundinis</i>	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (5 souches)	<i>Aspergillus protuberus</i>	<i>Kernia geniculotricha</i>
<i>Cladosporium delicatulum</i>	<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Cladosporium haloterans</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (5 souches)	
<i>Cladosporium perangustum</i>	<i>Cladosporium perangustum</i>	
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (7 souches)	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (2 souches)	
<i>Eutypella scoparia</i>	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	
<i>Irpex lacteus</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> (2 souches)	
<i>Neosetophoma samararum</i>	<i>Hypocreales</i> sp.	
<i>Penicillium brevicompactum</i> (2 souches)	<i>Lecanicillium antillanum</i>	
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Neosetophoma samararum</i>	
<i>Penicillium corylophilum</i> (2 souches)	<i>Penicillium brevicompactum</i>	
<i>Penicillium murcianum</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	
<i>Preussia terricola</i>	<i>Penicillium cinereoatrum</i>	
<i>Rosellinia</i> sp. 1	<i>Penicillium steckii</i>	
<i>Rosellinia</i> sp. 2	<i>Penicillium catenatum</i>	
<i>Sarocladium glaucum</i>	<i>Psathyrella candolleana</i>	
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Torula herbarum</i>	
<i>Scopulariopsis</i> sp.	<i>Uwebraunia dekkeri</i>	
<i>Sordaria fimicola</i>	<i>Xylaria badia</i>	
<i>Stachybotrys chartarum</i>		
<i>Trichoderma atroviride</i>		
<i>Virgaria nigra</i>		

basidiomycètes en milieu terrestre tels que la dégradation des matériaux lignocellulosiques¹⁷⁴ ou des hydrocarbures¹⁷⁵. En revanche, les basidiomycètes, en raison de leur faible proportion en milieu marin, restent à ce jour trop faiblement étudiés.

Les genres les plus représentés en termes d'espèces sont les *Penicillium* (8 espèces) et les *Cladosporium* (6 espèces), qui sont généralement associés aux éponges et sont parmi les champignons les plus étudiés pour l'isolement de nouveaux produits naturels¹⁷⁶.

¹⁷⁴ Raghukumar S. 2017, The marine environment and the role of fungi, pp 17–38. Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems. Springer, Berlin Heidelberg, 378 p.

¹⁷⁵ Bovio E., Gnani G., Prigione V., Spina F., Denaro R., Yakimov M., Calogero R., Crisafi F., Varese G. C. 2017, The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Sci. Total Environ.*, **576**, 310–318.

¹⁷⁶ Imhoff J. F. 2016, Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. *Mar. Drugs*, **14**, 19 p.

III.2.2. Biodiversité des communautés fongiques associées aux éponges

C. crambe, *A. cavernicola* et *P. tenacior*

Seules quelques espèces sont communes à au moins deux des trois éponges. Il s'agit de *P. citrinum* recensé au niveau d'*A. cavernicola* et *C. crambe*, et cinq espèces, *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. perangustum*, *Neosetophoma samararum* et *Penicillium brevicompactum* isolées d'*A. cavernicola* et de *P. tenacior*. De façon intéressante, une analyse des microsattellites menée sur les différentes souches de *C. cladosporioides* et *C. pseudocladosporioides* isolés d'*A. cavernicola* et de *P. tenacior* a révélé qu'il s'agissait des mêmes souches. Ces résultats soulèvent de nouveau la question de la spécificité des champignons marins pour leur hôte. La spécificité des champignons pour leur substrat, notamment pour les éponges, fait encore l'objet de nombreux débats.

Bien que les communautés fongiques cultivables de *P. tenacior* et *A. cavernicola* présentent quelques espèces communes, elles se distinguent par une majorité de taxons spécifiques, 85% et 62%, respectivement. En revanche, le mycobiota de *C. crambe* ne présente qu'une seule espèce spécifique, *Kernia geniculotricha*. C'est la première fois que cette espèce est décrite à la fois à partir d'une éponge et dans l'environnement marin alors que dans les écosystèmes terrestres il s'agit d'un champignon coprophile relativement fréquent¹⁷⁷.

Dans notre étude, la communauté fongique cultivable de *C. crambe*, constituée uniquement par trois espèces réparties en trois genres, présente la biodiversité la plus faible. Ce résultat est vraisemblablement lié aux propriétés notamment antimicrobiennes des différents métabolites isolés de l'éponge et que l'on retrouve fortement concentrés dans la couche externe de l'éponge¹⁷⁸. Cette caractéristique métabolique rend l'éponge très faiblement attractive pour les bactéries¹⁷⁹. *C. crambe* fait partie des éponges à faible abondance bactérienne puisque la quantité moyenne de bactéries par gramme de poids humide d'éponge est inférieure à celle de l'eau de mer¹⁸⁰. Seules 107 souches bactériennes ont été isolées de l'éponge par l'équipe de Sipkema¹⁸¹, malgré l'utilisation de 16 milieux d'isolement différents et de plusieurs spécimens de *C. crambe*. Dans ce contexte, les différents métabolites isolés de l'éponge semblent : (i) sélectionner fortement la communauté fongique capable de se développer dans l'éponge, (ii) inhiber la croissance fongique sur les plaques d'isolement. D'un point de vue écologique, une fois libérés, les différents métabolites ont un effet tératogène sur les embryons d'ascidies ce qui

¹⁷⁷ a) Saxena A. S., Mukerji K. G. 1970, Fungi of Delhi. XIV. Imperfect state of *Kernia geniculotricha*. *Acta Bot. Neerl.*, **19** (1), 49–52. b) Seth H. K. 1978, The fungus genus *Kernia* with the description of a new species. *Acta Bot. Neerl.*, **17** (6), 478–482.

¹⁷⁸ Uriz M. J., Becerro M. A., Tur J. M., Turon X. 1996, Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Mar. Biol.*, **124**, 583–590.

¹⁷⁹ A) Becerro M. A., Lopez N. I., Turon X., Uriz M. J. 1994, Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **179**, 195–205. B) Becerro M. A., Uriz M. J., Turon X. 1997, Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia*, **355** (1–3), 77–89.

¹⁸⁰ Sipkema D., de Caralt S., Morillo J. A., Al-Soud W. A., Sørensen S. J., Smidt H., Uriz M. J. 2015, Similar sponge-associated bacteria can be acquired via both vertical and horizontal transmission. *Environ Microbiol.* **17** (10), 3807–3821.

¹⁸¹ Öztürk B., de Jaeger L., Smidt H., Sipkema D. 2013, Culture-dependent and independent approaches for identifying novel halogenases encoded by *Crambe crambe* (marine sponge) microbiota. *Sci Rep.*, **3** (2780), 9 p.

permet de soutenir l'hypothèse que les éponges encroûtantes comme *C. crambe* produisent des métabolites toxiques pour coloniser de nouveaux habitats¹⁸².

Sept souches de la communauté fongique isolée d'*A. cavernicola* sont constituées par des mycéliums stériles (annexe 2 du tome II). Ils sont identifiés par analyse phylogénétique (annexe 2 du tome II) aux Pléosporales et aux Sordariomycètes, respectivement. Par ailleurs, chaque espèce n'a été isolée que sur un seul milieu de culture (annexe 2 du tome II). Le genre *Rosellinia* isolé de cette éponge est généralement observé dans les mangroves et/ou les sols¹⁸³. C'est la première fois que ce genre est recensé dans une éponge marine. Dans le milieu terrestre, certaines espèces appartenant au genre *Rosellinia* telles que *Rosellinia necatrix*, constituent une menace mondiale responsable de la pourriture blanche de nombreuses plantes commerciales¹⁸³.

Le mycobiota d'*A. cavernicola* obtenu par la méthode de l'homogénat est constitué d'ascomycètes et de basidiomycètes. Les genres les plus représentés sont *Cladosporium* et *Penicillium*, avec quatre espèces chacun. L'inoculation directe d'*A. cavernicola* sur différents milieux de culture a permis d'isoler au total 14 taxons répartis en 8 genres (annexe 2 du tome II). Parmi ces derniers, *Cladosporium delicatulum*, *Virgaria nigra* et *Penicillium murcianum* sont recensés pour la première fois en milieu marin et deux espèces, *Cladosporium perangustum* et *Neosetophoma samararum*, sont isolés pour la première fois d'une éponge marine.

Le mycobiota d'*A. cavernicola* obtenu par la méthode d'inoculation directe est exclusivement constitué par des ascomycètes. Le genre le plus représenté par la méthode de l'homogénat, *Penicillium spp.*, est absent. Par ailleurs, une seule espèce appartenant au genre *Cladosporium* a pu être isolée.

L'inoculation directe d'*A. cavernicola* sur différents milieux de culture a permis d'isoler au total 9 taxons répartis en 9 genres (annexe 2 du tome II). Parmi ces derniers, une espèce, *Sarocladium glaucum*, est recensée pour la première fois en milieu marin et deux espèces, *Sordaria fimicola* et *Preussia terricola* sont isolées pour la première fois d'une éponge marine.

De façon identique à *C. crambe*, les métabolites isolés d'*A. cavernicola* semblent influencer et contribuer fortement à la sélection de la communauté fongique de l'éponge¹⁸⁴. En effet, les différents métabolites isolés, dérivés de la bromotyrosine, présentent de bonnes activités antimicrobiennes. Ils sont actifs vis-à-vis de plusieurs bactéries à Gram positif et négatif ainsi que quelques champignons¹⁸⁵. Par ailleurs, plusieurs bactéries isolées d'*A. cavernicola* produisent de nombreux composés

¹⁸² Ternon E., Zarate L., Chenesseau S., Croué J., Dumollard R., Suzuki M. T., Thomas O. P. 2016, Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Sci. Rep.*, **6** (29474), 11 p.

¹⁸³ Chareprasert, S., Abdelghany, M. T., El-sheikh, H. H., Ahmed, A. F., Khalil, A. M., Sharples, G. P., Sihanonth P., Soliman H. G. *et al.* 2012, Xylariaceae on the fringe, pp 229–241. *Biology of marine fungi*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 336 p.

¹⁸⁴ Reverter M., Perez T., Ereskovsky A. V., Banaigs B. 2016, Secondary metabolome variability and inducible chemical defenses in the Mediterranean sponge *Aplysina cavernicola*. *J. Chem. Ecol.*, **42**, 60–70.

¹⁸⁵ Peng J., Li J., Hamann M. T. 2005, Chapter 2. The marine bromotyrosine derivatives. Ed. Cordell G. A., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, Vol. 61, pp 59–262, Elsevier.

antimicrobiens¹⁸⁶ ce qui soulève de nouveau la question de l'organisme producteur, éponge et/ou microorganismes, des métabolites de type bromotyrosine.

Enfin, la communauté fongique cultivable de *P. tenacior* présente la biodiversité la plus importante comparativement aux deux autres éponges étudiées, ainsi que le taux le plus élevé de taxons fongiques spécifiques (85%). Le mycobiota de *P. tenacior* est constitué d'ascomycètes et d'un basidiomycète. Les genres les plus représentés sont *Penicillium* (5 espèces) et *Cladosporium* (4 espèces). L'inoculation de l'éponge sur différents milieux de culture a permis d'isoler au total 20 taxons répartis en 13 genres (annexe 2 du tome II). Parmi ces derniers, *Lecanicillium antillanum*, *Xylaria badia* et *Psathyrella candolleana* sont recensés pour la première fois en milieu marin et six espèces, *Aspergillus protuberus*, *Beauvaria brongniartii*, *Cladosporium perangustum*, *Cladosporium ramotenellum*, *Neosetophoma samararum* et *Torula herbarum*, sont isolées pour la première fois d'une éponge marine.

Les métabolites isolés de *P. tenacior*, contrairement à ceux issus de *C. crambe* et d'*A. cavernicola*, n'ont fait l'objet d'aucune d'étude approfondie pour évaluer leur capacité à sélectionner ou non la communauté fongique de l'éponge. La communauté bactérienne de l'éponge a fait l'objet d'une seule étude. La biodiversité de cette dernière s'est avérée faible. Ceci est fort probablement dû à la méthode d'isolement utilisée¹⁸⁷.

III.2.3. Variabilité de la diversité fongique

Bien que la Méditerranée soit un point chaud de la biodiversité marine, le mycobiome d'un trop faible nombre d'éponges a fait l'objet d'une étude approfondie par une approche culturomique. On distingue deux catégories d'éponges qui diffèrent par la diversité fongique du mycobiome. D'une part les éponges dont le mycobiome présente une diversité fongique élevée, telles que les deux éponges méditerranéennes *Psammocinia sp.*¹⁶⁹ et *Suberites domuncula*¹⁸⁸ qui hébergent 85 taxons et 81 souches, respectivement. Pour ces deux études, peu de champignons ont été identifiés jusqu'au niveau de l'espèce. D'autre part, les éponges qui hébergent une diversité fongique faible, comme c'est le cas de 7 éponges prélevées dans la mer Rouge (Egypte)¹⁸⁹ et de 10 éponges échantillonnées dans l'antarctique¹⁹⁰ qui présentent 22 et 24 espèces fongiques, respectivement. La diversité fongique d'une éponge semble être influencée par plusieurs facteurs et notamment, la nature de l'espèce de l'éponge. Ainsi, *C. crambe*

¹⁸⁶ Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., Hacker J. 2001, Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 305–312.

¹⁸⁷ Dupont S., Carré-Mlouka A., Descarrega F., Ereskovsky A., Longeon A., Mouray E., Florent I., Bourguet-Kondracki M. L. 2013, Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Lett. Appl. Microbiol.*, **58**, 42–52.

¹⁸⁸ Proksch P., Ebel R., Edrada R., Riebe F., Liu H., Diesel A., Bayer M., Li X., Han Li W., Grebenyuk V., Müller W. E. G., Draeger S., Zuccaro A., Schulz B. 2008, Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: The *Suberites* case. *Bot. Mar.*, **51** (3), 209–218.

¹⁸⁹ Sayed, M. A. E., El-Rahman, T. M. A., El-Diwany, A. I., & Sayed, S. M. (2016) Biodiversity and bioactivity of Red Sea sponge associated endophytic fungi. *Int. J. Adv. Res. Eng. Appl. Sci.*, **5** (7), 1–15.

¹⁹⁰ Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., Araya I., Chavez R., San-Martín A., Darias J., Darias, M. J., Vaca I. 2014, Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **30** (1), 65–76.

hébergerait la diversité fongique la plus faible recensée à ce jour. Seule une éponge, *Myxilla incrustans*, collectée sur les côtes de l'île de Sakhaline dans l'océan Pacifique héberge une diversité fongique plus faible puisque seuls deux taxons ont été isolés¹⁹¹. Ce faible nombre de champignons semble également être la conséquence du site de prélèvement de l'éponge puisque la même espèce présente une diversité fongique plus élevée lorsque la même éponge est prélevée au niveau d'autres sites. Dans notre cas, l'étude a été menée sur un seul spécimen de *C. crambe* collecté au niveau d'un seul site. De façon identique à *Myxilla incrustans*, il serait intéressant d'évaluer l'influence du site d'échantillonnage sur la diversité du mycobiome de *C. crambe*.

Enfin, la variabilité saisonnière représente également une donnée importante à évaluer. En effet, tous nos résultats sont fournis à un temps donné, et nous ne possédons aucune donnée relative aux communautés fongiques associées aux éponges de cette étude au cours d'une autre saison. Pourtant, il n'est pas rare d'observer une différence de composition chimique des espèces marines (telles que *Caulerpa taxifolia* par exemple) au cours de l'année. Cela pourrait bel et bien avoir un impact sur la communauté fongique associée.

IV. Sélection des champignons

Par la suite, les différents champignons isolés ont été mis en culture sur trois milieux différents, afin de sélectionner les champignons les plus prometteurs en termes de métabolites produits (figure 126). Les milieux sélectionnés sont :

- GSW (eau de mer, gélatine et agarose), un milieu relativement pauvre en éléments nutritifs,
- Whickerham's (eau de mer, extrait de levure, de malt, glucose et agarose), un milieu plus riche en éléments nutritifs que le GSW,
- PDA (extrait de pomme de terre, dextrose et agarose), un milieu également riche en éléments nutritifs.

¹⁹¹ Pivkin M. V., Aleshko S. A., Krasokhin V. B., Khudyakova Y. V. 2006, Fungal assemblages associated with sponges of the southern coast of Sakhalin Island. *Russ. J. Mar. Biol.*, **32** (4), 207–213.



Figure 126. Exemple de champignons mis en culture en triplica sur trois milieux de culture différents (Haut : GSW, Milieu : Whickerham's, Bas : PDA) après 15 jours de croissance.

Le milieu GSW permet de mimer la composition de l'eau de mer. Le milieu PDA est le milieu préconisé par l'équipe de Proksh¹⁹² pour l'isolement de champignons marins tandis que le milieu Whickerham's est le milieu préconisé pour les fermentations à plus grande échelle¹⁹². Les surfaces solides miment la surface de l'éponge pour le développement des champignons.

IV.1. Profils métaboliques

Pour chaque milieu, l'ensemble souche/ milieu de culture, préalablement lyophilisé, a été extrait par un mélange dichlorométhane/ acétate d'éthyle (1/1, v/v) puis dichlorométhane/ méthanol (1/1, v/v). L'acétate d'éthyle est le solvant préconisé pour l'extraction des champignons car il permet à la fois d'extraire efficacement les métabolites apolaires et à la fois de diminuer le nombre de spores tout en augmentant leur perméabilité¹⁹². L'ajout de dichlorométhane permet d'accéder encore plus facilement aux compartiments cellulaires fongiques tout en gardant une polarité faible, et l'emploi du mélange dichlorométhane et méthanol correspond à nos conditions classiques d'extraction. Les extraits obtenus ont fait l'objet d'analyses par HPLC-DAD-DEDL pour conduire aux différents profils métaboliques. La plupart des champignons ne se sont pas révélés être de bons producteurs dans les conditions de culture opérées et très peu d'entre eux ont été sélectionnés pour réaliser des tests antibactériens préliminaires. Trois espèces ont retenu notre attention :

- *Stachybotrys chartarum*, isolé de l'éponge *A. cavernicola*, du fait de l'abondance de métabolites spécialisés extraits (figure 127),

¹⁹² Kjer J., Debbab A., Aly A. H., Proksh P. 2010, Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.*, 5 (3), 479–490.

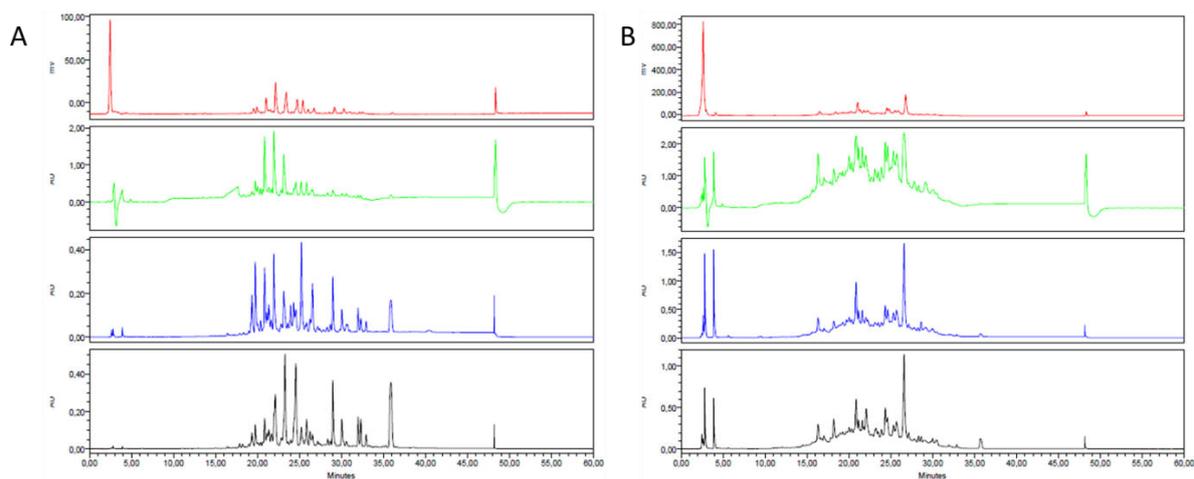


Figure 127. Empreinte métabolomique des extraits de *Stachybotrys chartarum* (A : extrait aux solvants apolaires ; B : extrait aux solvants polaires) obtenue par CLHP-UV à 254 nm sur colonne propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

- *Penicillium citrinum*, car il s'agit du seul champignon de l'éponge *C. crambe* qui produit quelques métabolites dans les conditions utilisées (figure 128), et enfin,

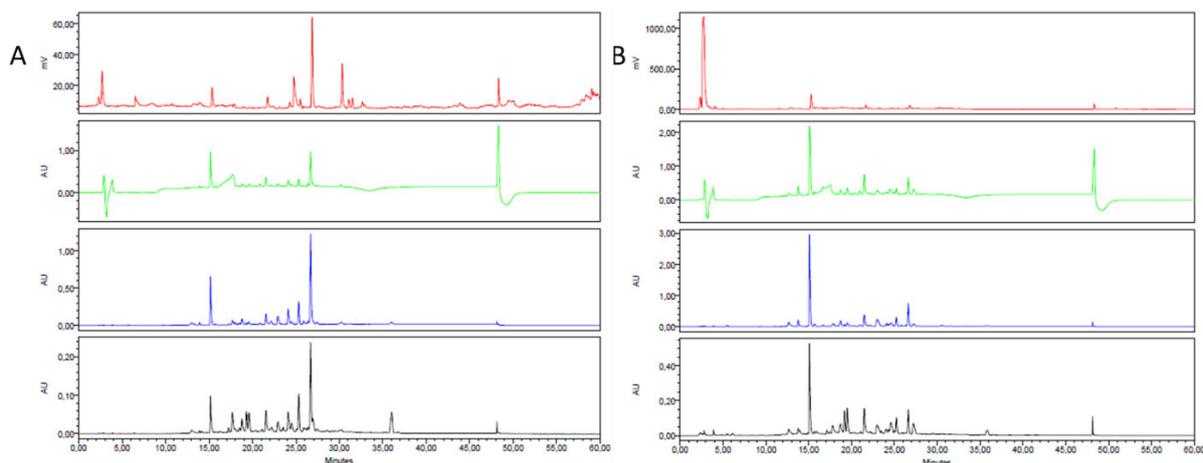


Figure 128. Empreinte métabolomique d'extraits organiques de *Penicillium citrinum* (A : extrait aux solvants apolaires ; B : extrait aux solvants polaires), obtenue par CLHP-UV sur colonne propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

- *Penicillium brevicompactum*, car il produit quelques métabolites et il est également retrouvé à la fois sur l'éponge *A. cavernicola* et sur l'éponge *P. tenacior* (figure 129).

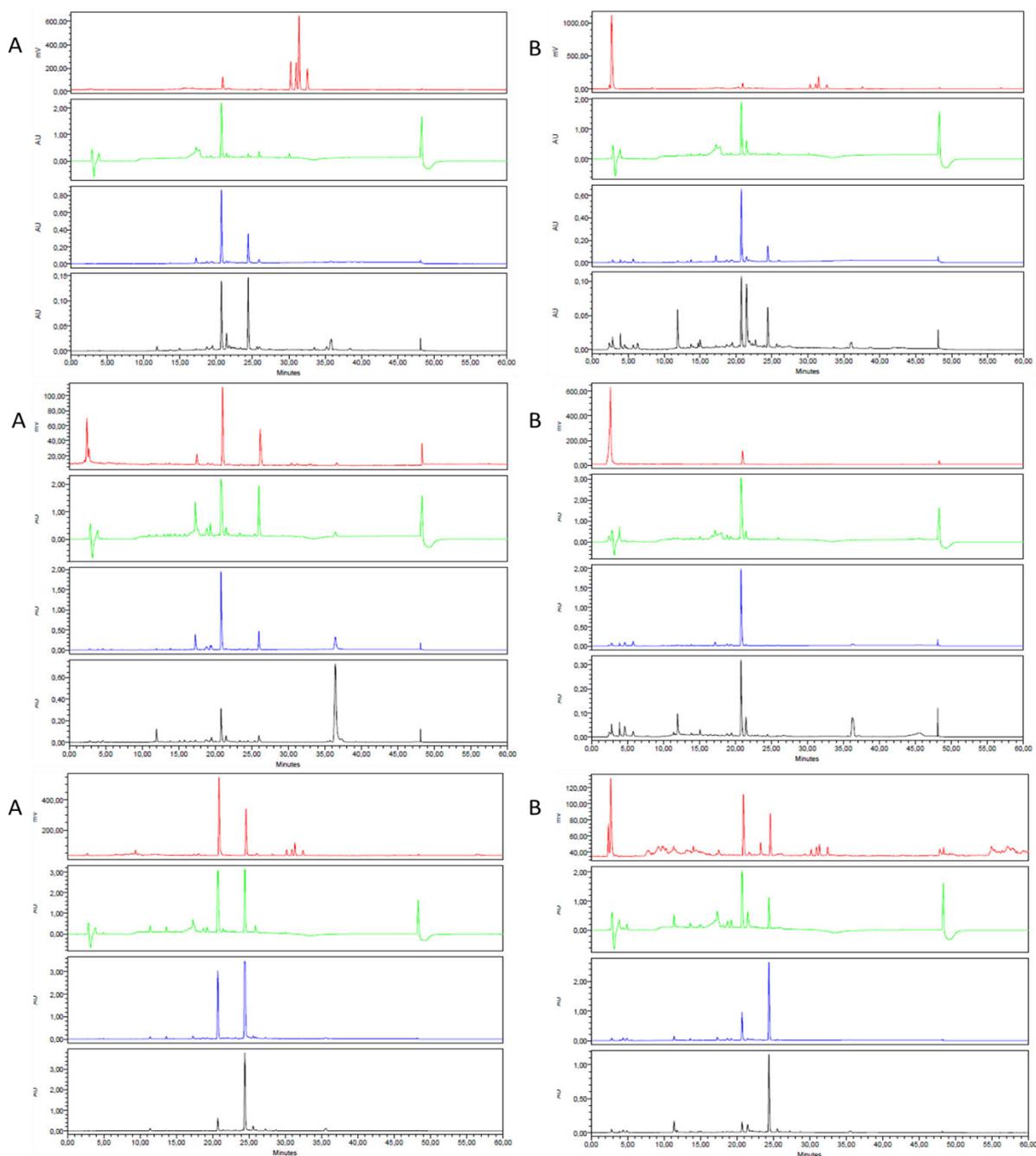


Figure 129. Empreinte métabolomique des extraits bruts organiques pour les trois souches de *Penicillium brevicompactum*. Haut : souche 1 isolée d'*A. cavernicola*, milieu : souche 2 isolée d'*A. cavernicola*, bas : souche isolée de *P. tenacior*. A : extrait aux solvants apolaires ; B : extrait aux solvants polaires. Empreinte obtenue par CLHP-UV sur colonne propylphényl-C18 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), gradient : CH₃CN + 0,1% d'acide formique (AF), H₂O + 0,1% AF, 10:90 à 100:0 en 30 mn.

Ces trois champignons ont été cultivés en quantité sur le milieu de culture le plus adapté afin de pouvoir extraire et purifier les métabolites d'intérêt dans des proportions suffisantes. Les cultures en milieu liquide ont également été réalisées mais ne seront pas discutées dans le cadre de cette thèse. *S. chartarum* fait l'objet du prochain chapitre et les produits naturels isolés y seront détaillés. De l'étude chimique de *P. brevicompactum*, seul l'acide mycophénolique a pu être isolé. De l'étude de *P. citrinum*, seules les quinolactacines A et B ont été isolées. Ces trois composés sont bien connus et sont spécifiques des espèces à partir desquelles ils ont été extraits et purifiés. Leur structure a été confirmée après

comparaison des données spectroscopiques (RMN) et spectrométriques (SM) obtenues avec les données de la bibliographie pour ces champignons. Ces données ne sont pas détaillées.

Les profils métabolomiques obtenus nous ont amené à retenir d'autres souches afin de réaliser un criblage antimicrobien primaire. Il s'agit de *T. atroviride*, *S. fimicola*, *Preussia terricola*, *Scopulariopsis* sp., *E. nigrum*, *A. protuberus* et *X. badia*.

IV.2. Activités antibactériennes

Les extraits bruts apolaires (PA) et polaires (PP), repris à une concentration de 500 µg/mL, ont été évalués pour leurs activités antibactériennes sur *E. coli* et *S. aureus* (souche RN4220, souche S25 et Lug1799, une souche résistante à la méthicilline) en collaboration avec le laboratoire C3M de Nice (tableau 30).

Tableau 30. Activités antibactériennes des extraits organiques sur *E. coli* (J96) et *S. aureus* (RN4220, S25 et Lug1799) et leur cytotoxicité sur des cellules THP1 à 500 µg/mL.

Extrait (500 µg/mL)		<i>E. coli</i> (J96)	<i>S. aureus</i> (RN4220)	<i>S. aureus</i> ostéite (S25)	<i>S. aureus</i> (Lug1799)	THP1
<i>T. atroviride</i>	PA	-	-	-	-	Peu actif
	PP	Peu actif	-	-	Peu actif	-
<i>P. citrinum</i>	PA	-	-	-	Peu actif	Très peu actif
	PP	-	-	-	-	Très peu actif
<i>S. fimicola</i>	PA	Très peu actif	-	-	-	Très peu actif
	PP	Peu actif	-	-	Peu actif	Très peu actif
<i>P. terricola</i>	PA	Très peu actif	5% survie	<10% survie	36% survie	20% survie
	PP	-	-	-	-	Très peu actif
<i>Scopulariopsis</i> sp.	PA	-	-	-	-	Très peu actif
	PP	-	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	PA	-	3% survie	-	-	-
	PP	-	3% survie	-	Peu actif	-
<i>S. chartarum</i>	PA	-	Très peu actif	-	Peu actif	34% survie
	PP	-	-	-	-	Très peu actif
<i>E. nigrum</i>	PA	-	-	-	-	Peu actif
	PP	*	-	-	-	-
<i>A. protuberus</i>	PA	-	-	-	-	65% survie
	PP	-	-	-	-	-
<i>X. badia</i>	PA	-	40% survie	-	-	Très peu actif
	PP	-	-	-	-	Très peu actif
Témoin chloramphénicol		< 3% survie (20 µg/mL)	3% survie (20 µg/mL)	30% survie (40 µg/mL)	15% survie (40 µg/mL)	-
Témoin amphotéricine B		-	-	-	-	15% survie (100 µg/mL)

* à retester

Les extraits se sont avérés inefficaces sur *E. coli*. La grande majorité des extraits s'est révélée inefficace sur les différentes souches de *S. aureus* (>75% de survie à 500 µg/mL). En revanche, les extraits polaires et apolaires de *P. brevicompactum* et les extraits apolaires de *P. terricola* ont une activité proche du témoin chloramphénicol à 20 µg/mL (3% de survie). L'espèce *X. badia* possède une activité significative (< 50% de survie) sur la souche RN4220. Seul l'extrait apolaire de *P. terricola* possède une activité significative sur la souche S25 de *S. aureus* avec une induction de la mort de plus de 90% de la population bactérienne et sur Lug1799 résistante à la méthicilline avec la mort de 64% de la population bactérienne. Malheureusement, l'extrait apolaire de *P. terricola* s'est révélé être cytotoxique puisqu'il

induit plus de 80% de mort des cellules lymphocytaires THP1 à 500 $\mu\text{g/mL}$. Dans une moindre mesure, *S. chartarum* et *A. protuberus* ont également montré une cytotoxicité significative sur THP1 (34 et 65% de survie respectivement).

Finalement, ce test d'activité antibactérienne nous a permis de nous conforter dans l'étude du champignon *P. brevicompactum* dont les extraits polaires et apolaires sont actifs sur *S. aureus* (souche S25). Les extraits de *P. terricola* sont actifs sur *S. aureus* (souches S25 et Lug1799) mais ils sont également cytotoxiques. Dans ce contexte, *P. terricola* n'a pas été retenu pour la suite de ces travaux.

V. Comparaison des souches fongiques sous le prisme du réseau moléculaire

Le champignon *P. brevicompactum* a été choisi, d'une part parce qu'il produit des métabolites potentiellement antibactériens dans nos conditions de culture, et d'autre part parce qu'il est retrouvé à la fois chez l'éponge *A. cavernicola* et l'éponge *P. tenacior*. Le champignon *P. citrinum* a été choisi parce qu'il est le seul champignon de *C. crambe* à produire des métabolites dans nos conditions de culture. Le champignon *S. chartarum*, choisi sur la base de sa production abondante de métabolites, n'a pas pu être confronté à *A. cavernicola* puisque nous ne disposions pas assez de matériel biologique pour réaliser un extrait brut de l'éponge hôte.

Les extraits organiques bruts des champignons ont été comparés à ceux des éponges hôtes *via* une analyse par réseau moléculaire de similarité.

V.1. Comparaison de *P. tenacior* et *P. brevicompactum*

Les deux extraits obtenus pour *P. brevicompactum* ont été analysés par CLHP-SMHR/SM avant d'être confrontés en ligne sur le site GNPS. Par la suite, les spectres ont été comparés à la fois aux bases de données présentes dans GNPS mais aussi aux bases de données *in-silico*. Le résultat obtenu, généré par le logiciel Cytoscape est présenté à la figure 130.

Sur les 578 nœuds définis, 428 ne sont reliés à aucun autre nœud et 150 sont engagés dans des réseaux de similarité spectrale avec des nœuds provenant des deux espèces. Sur l'ensemble des nœuds, 22% sont exclusivement retrouvés chez *P. tenacior*, 22% sont exclusivement retrouvés chez *P. brevicompactum* et 56% sont communs. Parmi les composés non retrouvés chez les autres souches, il est à noter que seuls 8 composés pour l'éponge et 6 composés pour le champignon, n'étant pas des nœuds isolés, sont organisés dans des groupes séparés. Les 136 nœuds restants sont donc des analogues structuraux (ou ayant des caractéristiques spectrales similaires) tout en étant propres à chaque souche. Finalement, ce sont plus de 70% des composés de l'éponge qui sont expliqués par le champignon *P. brevicompactum*.

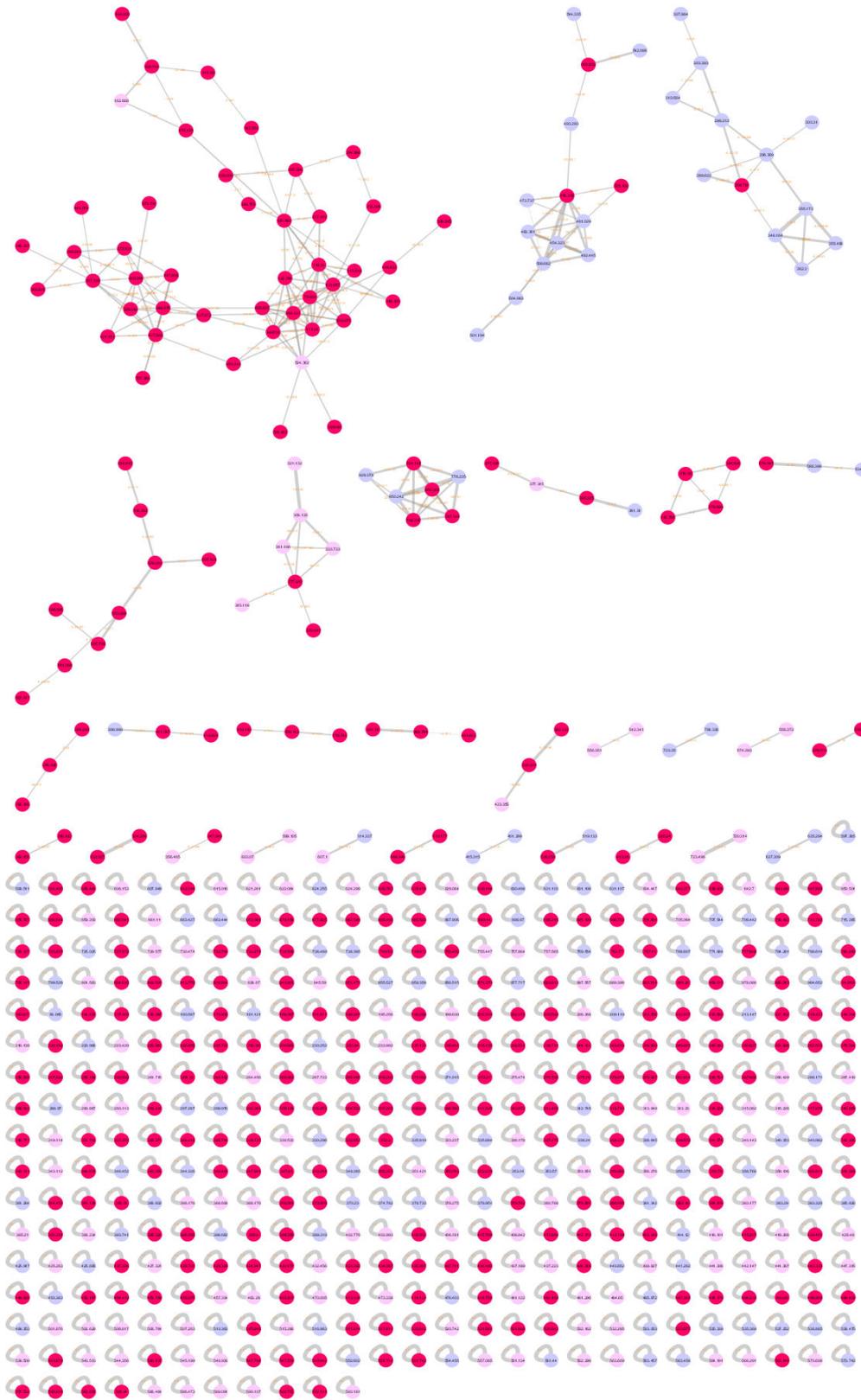


Figure 130. Analyse en réseau des extraits bruts organiques de *P. brevicompactum* et *P. tenacior*. Légende : en bleu, les composés propres à l'éponge, en rose pâle, les composés propres au champignon, en rose foncé, les composés présents chez les deux espèces.

V.2. Comparaison de *C. crambe* et *P. citrinum*

Les deux extraits bruts réalisés ont été analysés par CLHP-SMHR/SM avant d'être confrontés sur GNPS. De façon identique aux cas précédents, les spectres ont été comparés à la fois aux bases de données GNPS en ligne et *in-silico*. Le résultat retraité est généré grâce au logiciel Cytoscape.

L'analyse de *C. crambe* seul (Partie B. Chapitre 3) a conduit à l'obtention de 324 nœuds, dont 78 sont regroupés. L'analyse de *P. citrinum* seul (résultat non présenté), conduit à l'obtention de 308 nœuds, dont 51 sont regroupés. Enfin, la confrontation des deux extraits sur la plateforme GNPS a conduit à l'obtention d'un réseau strictement similaire à celui de *C. crambe* seul, ce qui signifie qu'aucun composé n'est partagé par l'éponge et le champignon cultivé sur ce milieu.

VI. Conclusion

En étroite collaboration avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin, nous nous sommes intéressés pour la première fois aux champignons de trois éponges méditerranéennes, *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, en tant que sources potentielles de métabolites valorisables dans le domaine des biocides. Au total, 68 souches ont pu être isolées et identifiées. Parmi les champignons isolés, une espèce, *Stachybotrys chartarum* issue de l'éponge *A. cavernicola*, a particulièrement retenu notre attention du fait de l'abondance de métabolites secondaires dans les extraits.

Partie C :

Chapitre 2 :

Métabolisme spécialisé de

Stachybotrys chartarum

I. Introduction

Les champignons appartenant au genre *Stachybotrys* sont bien distribués à travers le monde. Parmi ces derniers, *Stachybotrys chartarum* (S. Hughes, 1958) se développe dans des bâtiments très humides et peut causer des pathologies légères à sévères : infections, allergies, mycotoxicoses et/ou inflammations¹⁹³. Plusieurs cas d'hémorragies pulmonaires, susceptibles de provoquer la mort des nourrissons touchés, ont été reportés¹⁹⁴. En raison de ces épisodes tragiques, ce champignon est depuis surnommé la moisissure noire toxique (« toxic black mold »), bien qu'elle ne semble pas infectieuse. Une fois relâchées dans la nature, ses spores ont une faible durée de vie et ne germent en aucun cas dans les organismes touchés¹⁹³. Généralement isolé à partir d'échantillons de sols et de plantes en décomposition, *S. chartarum* est également retrouvé dans l'environnement marin.

Dans le cadre d'une collaboration étroite avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin et la société BioPreserv à Grasse, nous nous sommes intéressés aux métabolites de *Stachybotrys chartarum* isolé d'*A. cavernicola* pour une application dans le domaine des biocides. Les travaux préliminaires menés sur la souche de *S. chartarum*, cultivée sur un milieu solide, ont révélé la présence de quelques métabolites potentiellement nouveaux.

Dans ce contexte, après une brève description des champignons appartenant au genre *Stachybotrys* ainsi que les métabolites associés, la suite de ce manuscrit est consacrée aux travaux menés sur les métabolites du champignon *Stachybotrys chartarum* isolé d'*Aplysina cavernicola*.

II. *Stachybotrys chartarum* : état de l'art

II.1. Classification

Stachybotrys chartarum fait partie de la famille des Stachybotryceae de l'ordre Hypocreales (tableau 31)¹⁹⁵. Par le passé, ce champignon a arboré les dénominations suivantes : *Stachybotrys atra*, *Stachybotrys alternans* et *Stilbospora chartarum*.

¹⁹³ Pestka J. J., Yike I., Dearborn D. G., Ward M. D. W., Harkema J. R. 2008, *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: New insights into a public health enigma. *Toxicol. Sciences*, **104** (1), 4–26.

¹⁹⁴ Yike I., Miller M. J., Sorenson W. G., Walenga R., Tomashefski J. F. Jr, Dearborn D. G. 2001, Infant animal model of pulmonary mycotoxicosis induced by *Stachybotrys chartarum*. *Mycopathologia*, **154**, 139–152.

¹⁹⁵ D'après la base de données WoRMS, accédée le 07/08/17.

Tableau 31. Classification de *Stachybotrys chartarum*.

Règne Fongique	
Division	Ascomycota
Classe	Sordariomycetes
Ordre	Hypocreales
Famille	Stachybotryaceae
Genre	<i>Stachybotrys</i>
Espèce	<i>Stachybotrys chartarum</i>

II.2. Description morphologique

S. chartarum est une moisissure **saprophyte** qui nécessite une importante quantité d'eau libre pour se développer. Sa croissance est assez rapide. Du point de vue macroscopique, la colonie, initialement blanche, devient rapidement noire et revêt un aspect cotonneux dû à l'amas de spores.

D'un point de vue microscopique, *S. chartarum* possède des **hyphes** septées, des **conidiophores** simples ou ramifiés portant des **phialides** au niveau de l'apex. Les **phialides**, de forme ovale, sont regroupées en trois à dix cellules et possèdent une collerette très étroite. Enfin, les **conidies** sont mucilagineuses et ellipsoïdales, passant d'un stade hyalin lisse à un stade foncé verruqueux à maturité¹⁹⁶ (figure 131).

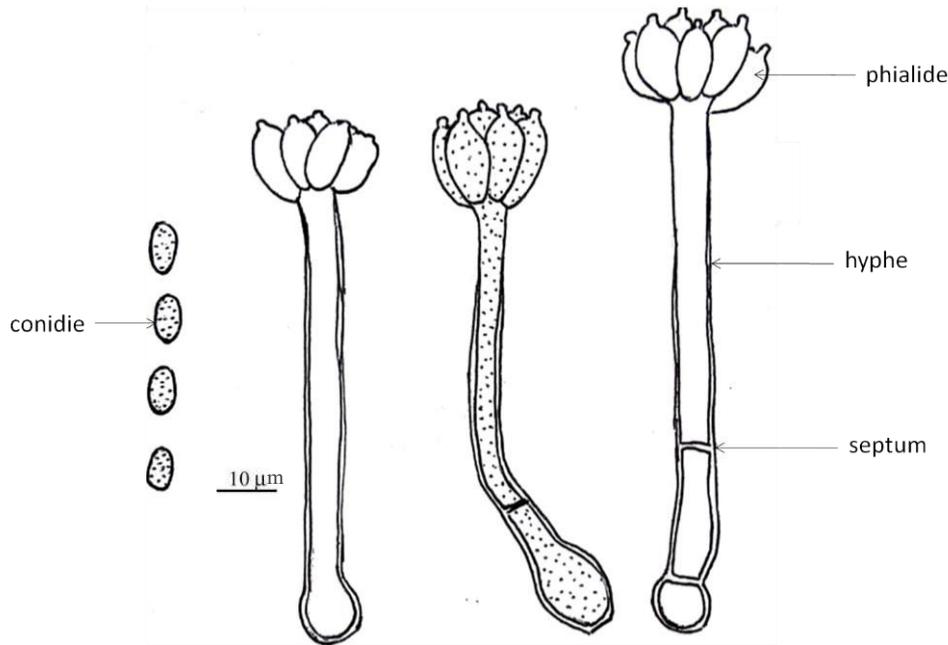


Figure 131. Représentation schématique de la structure microscopique de *S. chartarum*¹⁹⁷.

L'ensemble des métabolites isolés de *S. chartarum* est décrit dans la suite de ce manuscrit.

¹⁹⁶ Miller J. D., Rand T. G., Jarvis B. B. 2003, *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Med. Mycol.*, **41**, 271–291.

¹⁹⁷ Adapté d'après : Matsushima T. 1971, *Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea*. Osaka, p. 60, 72 p.

II.3. Métabolisme spécialisé de *Stachybotrys chartarum*

S. chartarum produit une large variété de métabolites secondaires regroupés en plusieurs catégories : les sesquiterpénoïdes (trichothécènes simples ou macrocycliques), les diterpénoïdes (atranones, dollabelanes) et les isoindolinones (drimanes spirocycliques, alcools triprenylés). On distingue également deux chémotypes de *S. chartarum* terrestre, qui diffèrent par leur capacité à produire certains métabolites : le chémotype A et le chémotype S¹⁹⁸. Les atranones, les dolabellanes ainsi que les trichothécènes simples sont produits par le chémotype A. Les trichothécènes macrocycliques de type satratoxines, sont produits par le chémotype S. De façon générale, on constate qu'environ 1/3 des souches de *S. chartarum* terrestre produisent des trichothécènes macrocycliques et 2/3 de souches produisent des trichothécènes simples et des atranones. Par ailleurs, les drimanes spirocycliques ne sont produits que par moins de 10% des souches étudiées¹⁹⁹. Les trichothécènes et les dolabellanes n'ont jusqu'à présent, pas été isolés de souches marines, tandis que les isoindolinones l'ont été. L'ensemble des métabolites isolés de *S. chartarum*, que la souche soit marine ou terrestre, est présenté dans la suite de ce manuscrit.

II.3.1. Sesquiterpénoïdes

II.3.1.1. Trichothécènes simples

Le trichodermol (**215**), la trichodermine (**216**) et le verrucarol (**217**) sont trois trichothécènes simples recensés chez plusieurs souches de *S. chartarum* isolées de substrats terrestres^{200,201} (figure 132).

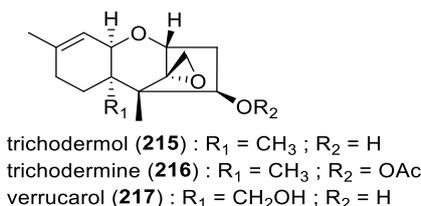


Figure 132. Structures des trichothécènes simples isolés de *S. chartarum*^{200,201}.

¹⁹⁸ Andersen B., Nielsen K. F., Thrane U., Szaro T., Taylor J. W., Jarvis B. B. 2003, Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia*, **95** (6), 1227–1238.

¹⁹⁹ Hinkley S. F., Mazzola E. P., Fettingner J. C., Lam Y.-F., Jarvis B. B. 2000, Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochem.*, **55**, 663–673.

²⁰⁰ Jarvis B. B., Pavanadasivam G., Holmlund C. E., DeSilva T., Stahly G. P., Mazzola E. P. 1981, Biosynthetic intermediates to the macrocyclic trichothecenes. *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (2), 472–474.

²⁰¹ Jarvis B. B., Lee Y.-W., Comezoglu S. N., Yatawara C. S. 1986, Trichothecenes Produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51** (5), 915–918.

Plusieurs dérivés trichoverroïdes, les trichoverrols A (**218**) et B (**219**) et les trichoverrines A (**220**) et B (**221**), sont isolées pour la première fois d'un *S. chartarum* terrestre en 1986²⁰¹, suivie par la roridine L-2 (**222**) en 1995²⁰² (figure 133).

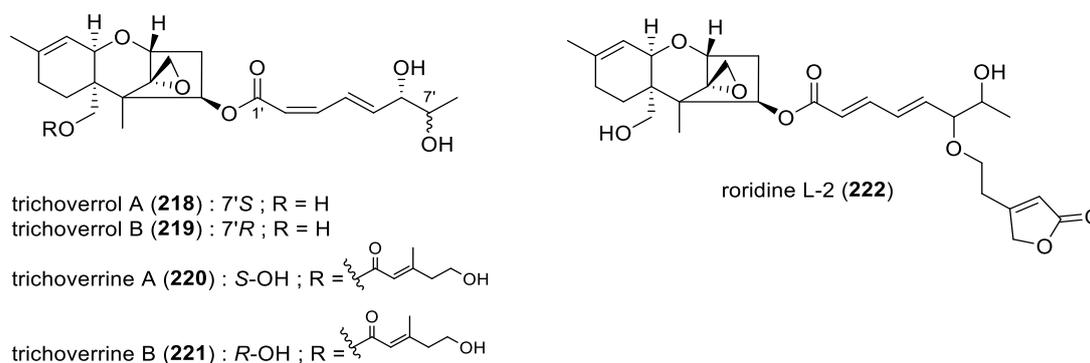


Figure 133. Structures des trichoverroïdes isolés de *S. chartarum*^{201,202}.

A ce jour, les trichoverroïdes n'ont fait l'objet d'aucune évaluation biologique.

II.3.1.2. Trichothécènes macrocycliques

Les travaux menés par Eppley et Bailey en 1973, ont révélé que la toxicité d'une souche terrestre de *S. chartarum* était liée à la production de plusieurs sesquiterpènes macrocycliques du groupe des 12,13-époxy- Δ^9 -trichothécènes²⁰³. Il s'agit de la verrucarine J (**223**), de la roridine E (**224**) (déjà isolé du champignon terrestre *Myrothecium verrucaria*) et des satratoxines F (**225**), G (**226**) et H (**227**) (figure 134). La structure de la satratoxine H (**227**) a été élucidée en 1977²⁰⁴ et celles des satratoxines F (**225**) et G (**228**) en 1980²⁰⁵. Par la suite, plusieurs dérivés appartenant au même groupe ont été isolés d'une souche terrestre de *S. chartarum* : l'épi-isororidine ainsi que les isosatratoxines E, F, G et H^{202,206}. Pour l'ensemble de ces composés, les stéréochimies des positions C-6' et C-12' restent à ce jour non déterminées. Ces mycotoxines inhibent la synthèse de protéines²⁰⁷ et possèdent des propriétés anticancéreuses²⁰⁸.

²⁰² Jarvis B. B., Salemm J., Morais A. 1995, *Stachybotrys* Toxins. 1. *Natural Toxins*, 3, 10–16.

²⁰³ Eppley R. M., Bailey W. J. 1973, 12,13-Epoxy- Δ^9 -trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for stachybotryotoxicosis. *Science*, **181**, 758–760.

²⁰⁴ Eppley R. M., Mazzola E. P., Highet R. J., Bailey, W. J. 1977, Structure of satratoxin H, a metabolite of *Stachybotrys atra*. application of proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Org. Chem.*, **42** (2), 240–243.

²⁰⁵ Eppley R. M., Mazzola E. P., Stack M. E., Dreifuss P. A. 1980, Structures of satratoxin F and satratoxin G, metabolites of *Stachybotrys atra*: application of proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Org. Chem.* **45**, 2522–2523.

²⁰⁶ Jarvis B. B., Sorenson W. G., Hintikka E.-L., Nikulin M., Zhou Y., Jiang J., Wang S., Hinkley S., Etzel R. A., Dearborn D. 1998, Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (10), 3620–3625.

²⁰⁷ Jarvis B. B. 2003, *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochem.*, **64**, 53–60.

²⁰⁸ a) Hughes B. J., Hsieh G. C., Jarvis B. B., Sharma R. P. 1989, Effects of macrocyclic trichothecene mycotoxins on the murine immune system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 388–395. b) Jarvis B. B., Acierto A. M. 1989. Anticancer properties of trichothecenes. *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects*. Vol. 1, Beasley, V. R. (ed), CRC Press, Boca Raton, pp.73-105.

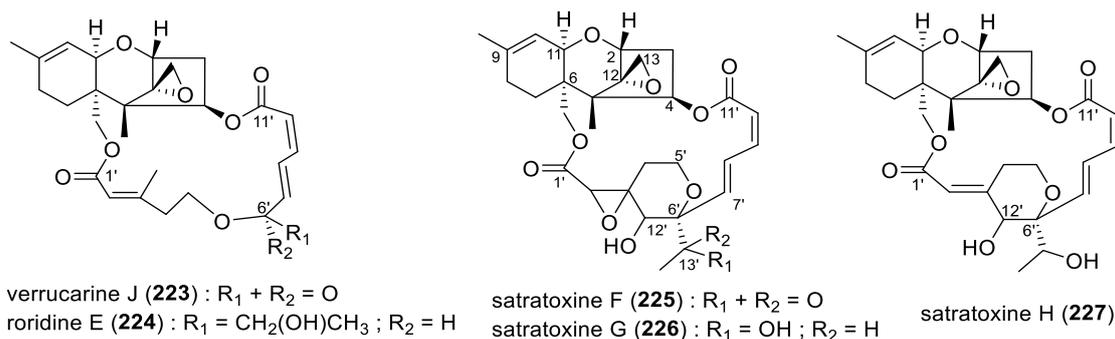


Figure 134. Structures des trichothécènes macrocycliques isolés de *S. chartarum*²⁰³⁻²⁰⁶.

II.3.1.3. Biosynthèse des trichothécènes

Les trichoverrines A (**220**) et B (**221**) sont des trichothécènes simples aux structures intermédiaires entre celles des trichoverrols A (**218**) et B (**219**) et de la roridine E (**224**). Ainsi, il est possible de déduire que les trichothécènes simples sont impliqués dans la biosynthèse des trichoverroïdes, eux même impliqués dans la biosynthèse de l'ensemble des trichothécènes macrocycliques (schéma 20).

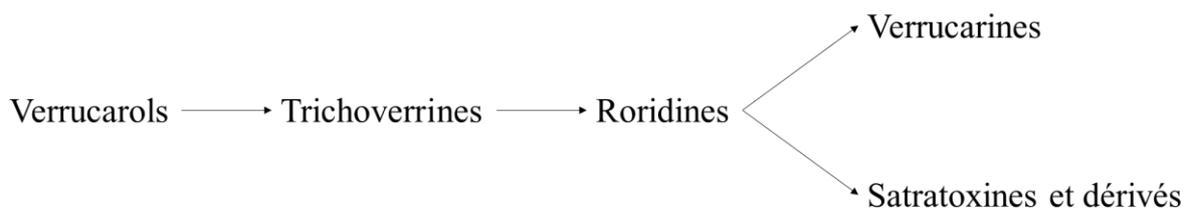


Schéma 20. Voie de biosynthèse hypothétique des trichothécènes²⁰⁹.

II.3.2. Diterpénoïdes

Entre 1999 et 2003, le groupe de Jarvis a isolé et identifié 11 dérivés diterpéniques aux structures proches à partir d'une souche terrestre de *S. chartarum*. Ainsi, on distingue d'une part les atranones A-K (**228-238**) et d'autre part les dérivés dollabelanes tels que la (1*S*, 6*S*, 11*S*)-6-hydroxydolabella-3*E*,7*E*,12-trién-14-one (**239**) et la (1*S*, 3*R*, 4*R*, 6*S*, 11*S*)-3,4-époxy-6-hydroxydolabella-7*E*,12-dién-14-one (**240**)^{199,210} (figure 135).

²⁰⁹ Adapté d'après Grove J. F. 1993, Macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.*, **5**, 429–448.

²¹⁰ a) Hinkley S. F., Jiang J., Mazzola E. P., Jarvis B. B. 1999, Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *stachybotrys atra*. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2725–2728. b) Hinkley S. F., Moore J. A., Squillari J., Tak H., Oleszewski R., Mazzola E. P., Jarvis B. B. 2003, New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 337–343.

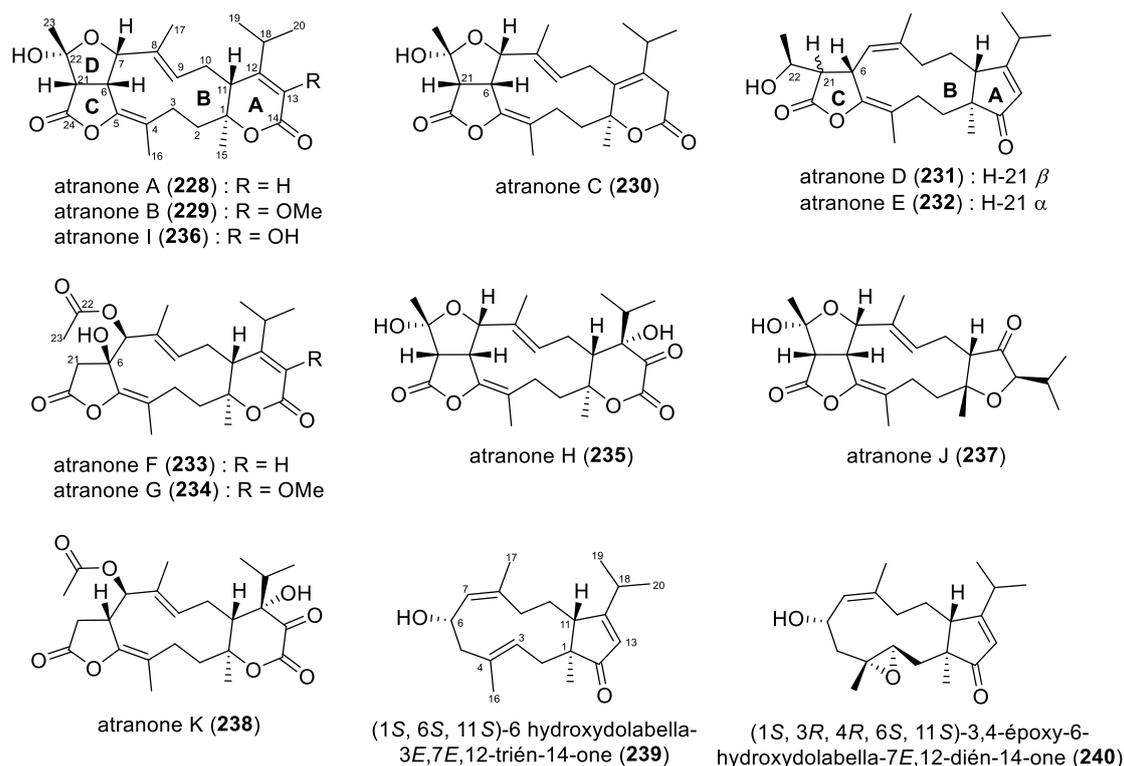


Figure 135. Structures des dérivés diterpéniques isolés de *S. chartarum*^{199,210}.

Du point de vue biosynthétique, les atranones A (**228**), B (**229**) et I (**236**) semblent dériver des atranones F (**233**) et G (**234**) à l'issue d'une réaction de déshydratation en position C-6/C-21, suivie d'une cyclisation intramoléculaire (schéma 21)¹⁹⁹.

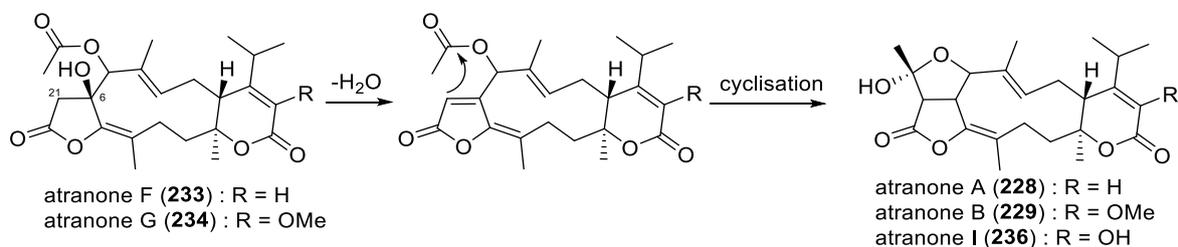


Schéma 21. Voie de biosynthèse hypothétique des atranones A, B et I à partir des atranones F et G¹⁹⁹.

Les atranones A-C (**228-230**) et F-I (**233-236**) semblent également dériver des atranones D-E (**231-232**) via une réaction de Baeyer-Villiger au niveau du cycle A (figure 135).

Toutes les atranones sont des dérivés en C₂₄ mis à part l'atranone J (**237**) qui est un dérivé en C₂₃. L'origine biosynthétique de l'atranone J (**237**) peut être expliquée par un réarrangement de l'atranone H (**235**), suivi par l'hydrolyse de la lactone, puis d'une réaction de décarboxylation/déshydratation de l'intermédiaire résultant, et enfin par une réaction d'addition de Michaël intramoléculaire entre le groupement hydroxyle et la cétone α,β insaturée (schéma 22). La force motrice de ce réarrangement semble être liée au gain de stabilité dû à la perte du système 1,2-dicarbonylé. Cette séquence réactionnelle n'a pas pu être reproduite en laboratoire^{210b}.

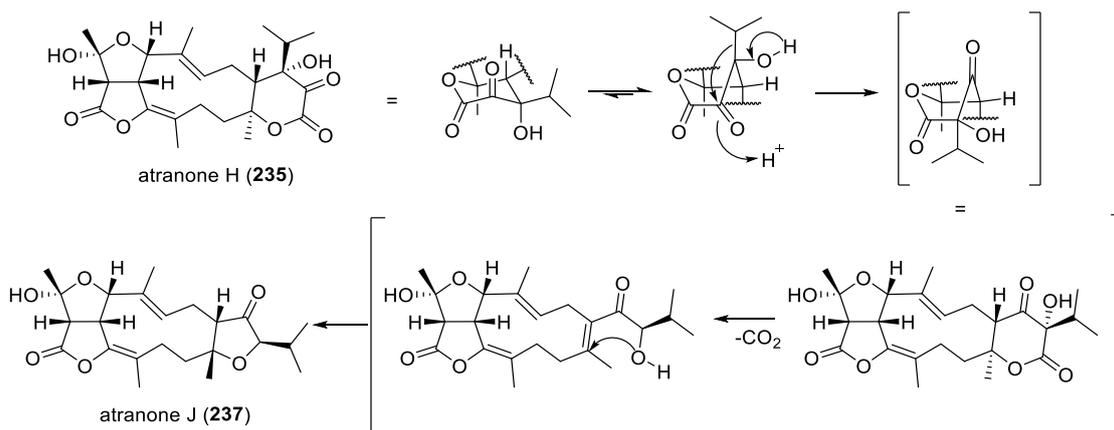


Schéma 22. Voie de biosynthèse hypothétique de l'atranone J (235) à partir de l'atranone H (237)^{210b}.

A ce jour, les dérivés diterpéniques isolés de *S. chartarum* n'ont fait l'objet d'aucune évaluation biologique.

II.3.3. Isoindolinones

II.3.3.1. Phénylspirodrimanes

De nombreux drimanes spirocycliques ont été isolés en 1995 d'une souche terrestre de *S. chartarum* par le groupe de Jarvis²⁰². Il s'agit de la stachybotrylactone (241), de l'acétate de stachybotrylactone (242), du 2 α -hydroxystachybotrylactone (243), de l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactone (244), du stachybotrylactame (245), de l'acétate de stachybotrylactame (246), de l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame (247), du stachybotramide (248), du stachybotridial (249) et du 2 α -hydroxystachybotrydial (250) (également désigné K-76 et isolé de *Stachybotrys complementi*²¹¹). D'un point de vue biogénétique, le stachybotrydial (249) peut être considéré comme un précurseur du stachybotrylactame (245)²¹². Par la suite, la stachybotrine A (251), le 13-monoacétate de stachybotral (252) et le 13-monoacétate de stachybotrolide (253) ont été décrites en 1999²¹³. Ces dérivés n'ont fait l'objet d'aucune évaluation biologique.

Dans les années 2010, la recherche de nouveaux phénylspirodrimanes a mené à l'isolement de dérivés phénylspirodrimanes supplémentaires (figure 136). On distingue d'une part des dérivés stachybotrines, stachybosides et stachyboines et d'autre part de nouveaux métabolites tels que les chartarlactames, les stachartines et les chartarolides.

²¹¹ Kaise H., Shinohara M., Miyazaki W., Izawa T., Nakano Y., Sugawara M., Sugiura K. 1979, Structure of K-76, a complement inhibitor produced by *Stachybotrys complementi* nov. sp. K-76. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 16, 726–727.

²¹² Liu D., Li Y., Li X., Cheng Z., Huang J., Proksch P., Lin W. 2017 Chartarolides A-C, novel meroterpenoids with antitumor activities. *Tetrahedron Lett.*, **58**, 1826–1829.

²¹³ Kamalov L. S., Aripova S. F., Isaev M. I. 1999, Low-molecular-mass metabolites of fungi I. The structures of stachybotrin A and stachybotral. *Chem. Nat. Compounds*, **35** (1), 82–85.

En 2013, les stachybotrines D-F (**254-256**), les stachybosides A-B (**257-258**) et les stachybocines E-F (**259-260**)^{214,215}, aux structures proches des dérivés **261-267** décrits en 2004, sont isolés de *S. chartarum* (origine terrestre ou marine). Les dérivés stachybotrines ont été évalués pour leurs propriétés anti-VIH1 et seule la stachybotrine D (**254**) s'est avérée active. Elle inhibe la transcriptase inverse du virus avec une CE₅₀ de 8,4 μM²¹⁴. Par ailleurs, la plupart des sept autres dérivés **261-267** décrits en 2004, se sont avérés être des inhibiteurs du récepteur Tie2²¹⁶, avec des CI₅₀ comprises entre 25 et 146 μM, exceptés les composés **261** et **263** qui présentent des CI₅₀ supérieures à 200 μM²¹⁵.

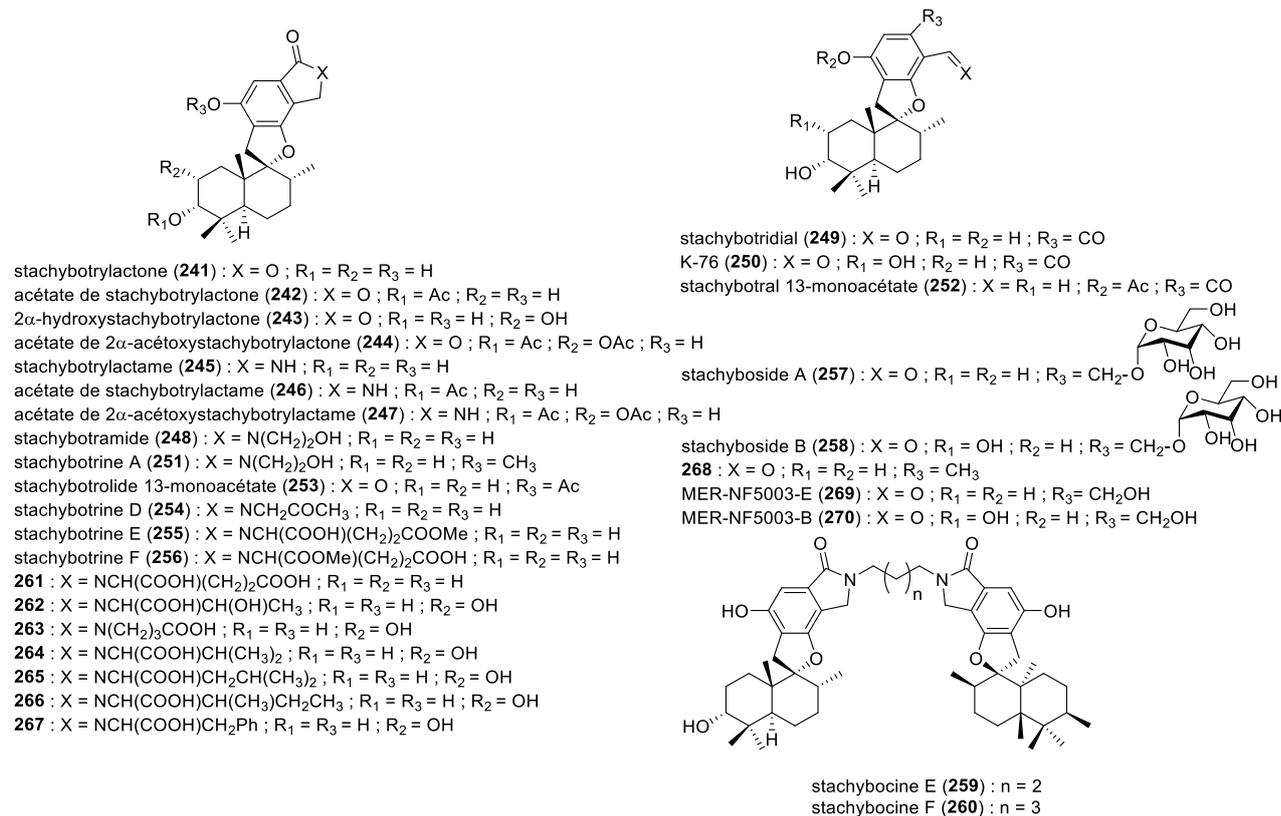


Figure 136. Structures des dérivés phénylspirodrimanes isolés de *S. chartarum*^{202,211-215}.

En 2014, les travaux menés sur une souche de *S. chartarum* marine ont conduit à l'isolement de nombreux dérivés phénylspirodrimanes, les chartarlactames A-P (**271-286**)²¹⁷, ainsi que les F1839-A (**287**), F1839-D (**288**) et F1839-E (**289**)²¹⁸, la *N*-(acide 2-benzènepropanoïque)stachybotrylactame (**290**) et la stachybotrysame E (**291**)²¹⁹ (figure 137).

²¹⁴ Ma X., Li L., Zhu Ti., Ba M., Li G., Gu Q., Guo Y., Li D. 2013, Phenylspirodrimanes with Anti-HIV Activity from the Sponge Derived Fungus *Stachybotrys chartarum* MXH-X73. *J. Nat. Prod.*, **76**, 2298–2306.

²¹⁵ Vazquez M. J., Vega A., Rivera-Sagredo A., Jimenez-Alfaro M. D., Diez E., Hueso-Rodriguez J. A. 2004, Novel sesquiterpenoids as tyrosine kinase inhibitors produced by *Stachybotrys chartarum*. *Tetrahedron*, **60**, 2379–2385.

²¹⁶ Récepteur à la tyrosine kinase, important en angiogénèse et donc dans l'occurrence de cancers, métastases, maladies oculaires, arthrite...

²¹⁷ Li Y., Wu C., Liu D., Proksch P., Guo P., Lin W. 2014a, Chartarlactams A–P, phenylspirodrimanes from the sponge associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. *J. Nat. Prod.*, **77**, 138–147.

²¹⁸ Li Y., Lio D., Cen S., Proksch P., Lin W. 2014b, Isoindolinone-type alkaloids from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum*. *Tetrahedron*, **70**, 7010–7015.

²¹⁹ Zhao J., Liu J., Shen Y., Tan Z., Zhang M., Chen R., Zhao J., Zhang D., Yu L., Dai J. 2017, Stachybotrysams A–E, prenylated isoindolinone derivatives with anti-HIV activity from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Phytochem. Lett.*, **20**, 289–294.

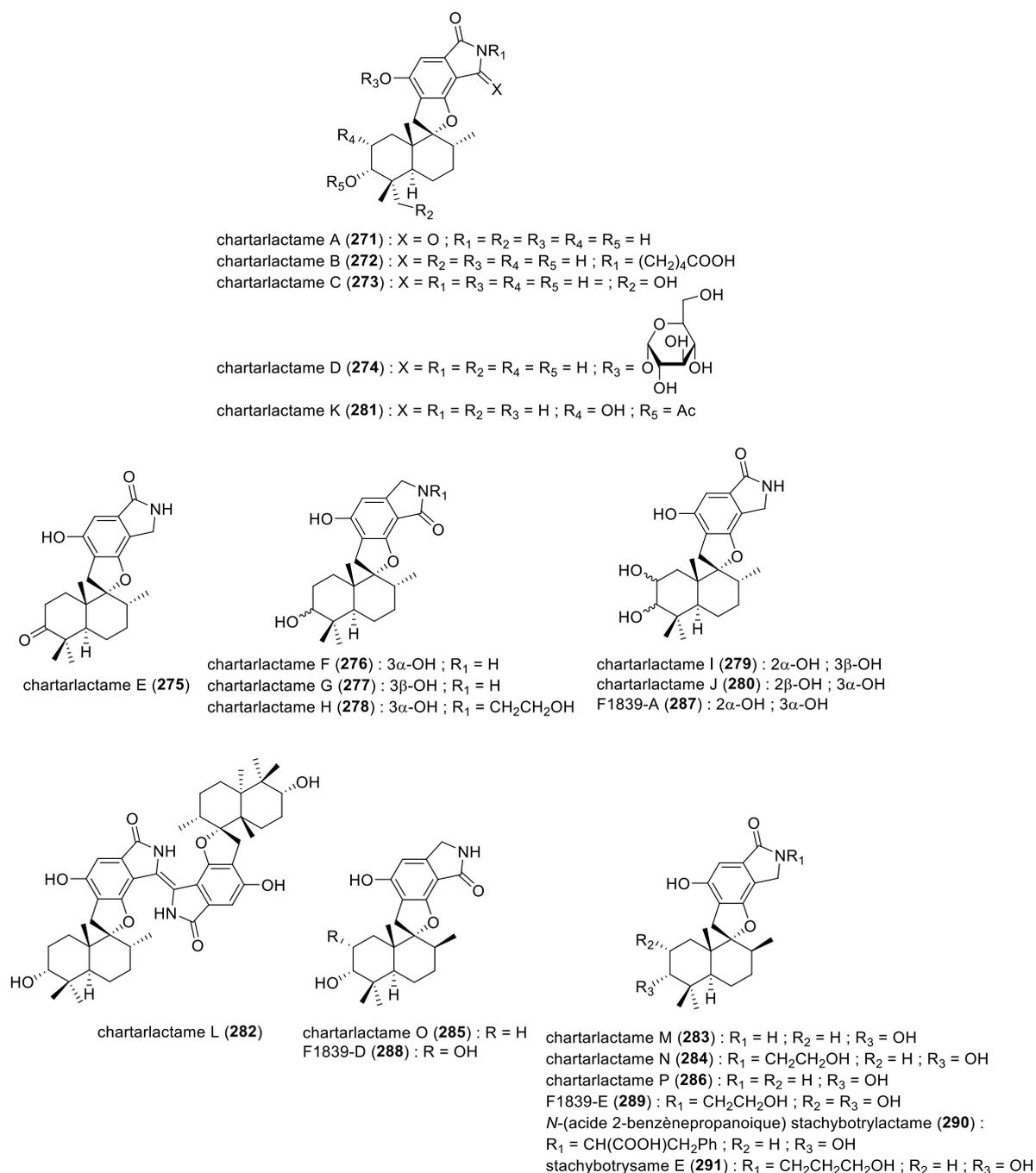


Figure 137. Structures des chartarlactames isolées de *S. chartarum*²¹⁷⁻²¹⁹.

Les chartarlactames (**271-286**) ont été évaluées pour leurs propriétés antivirales et anti-hyperlipidémiantes. Ils ne présentent aucune activité anti-VIH1²¹⁹. En revanche, en fonction de leur structure, ils diminuent de façon significative le taux de lipides, de triglycérides ou de cholestérol total. Ainsi, les chartarlactames D, E, F, K, L, N, O et la *N*-(acide 2-benzènepropanoïque)stachybotrylactame diminuent le taux de lipides à une concentration de 10 μ M. Les chartarlactames E, F, K, O et la *N*-(acide 2-benzènepropanoïque)stachybotrylactame agissent sur le taux de triglycérides. Les chartarlactames D, E, F, L, N et la *N*-(acide 2-benzènepropanoïque)stachybotrylactame réduisent de façon conséquente le

cholestérol total. Enfin, les chartarlactames (**271-286**) ne présentent aucune cytotoxicité sur les cellules Hep-G2 à la concentration maximale testée (100 μ M).

En 2016, le groupe de Wen a isolé les stachartines A-E (**292-296**) (figure 138)²²⁰ d'une souche terrestre de *S. chartarum*. Ces derniers n'ont fait l'objet d'aucune évaluation biologique.

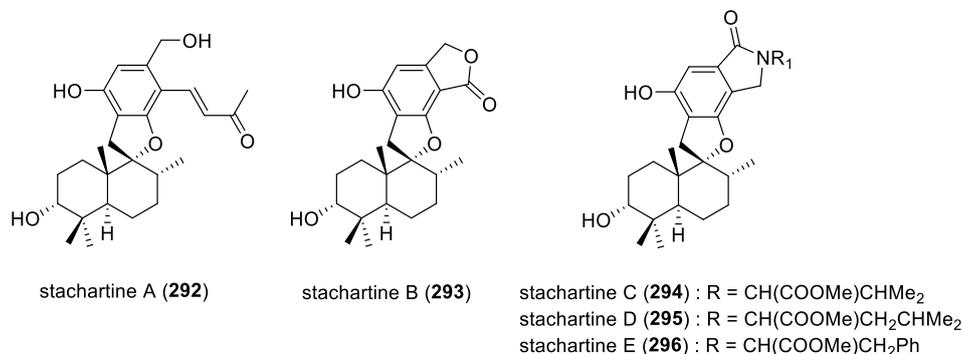


Figure 138. Structures des stachartines (**292-296**) isolées de *S. chartarum*²²⁰.

Enfin, plusieurs phénylspirodrimanes chlorés, les chartarolides A-C (**297-299**), sont décrits pour la première fois à partir d'une souche de *S. chartarum* isolée de l'éponge *Niphates recondite* (figure 139)²¹². Il est à noter que le milieu de culture utilisé pour ces travaux n'est pas précisé.

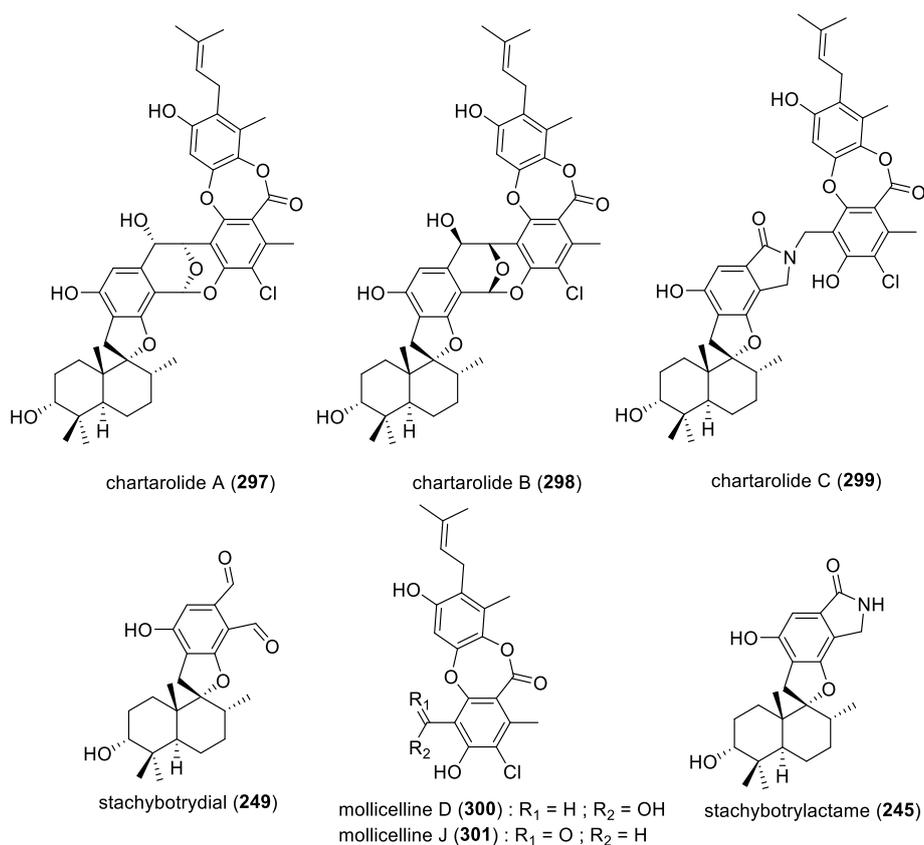


Figure 139. Structures des chartarolides isolés de *S. chartarum* et ses dérivés²¹².

²²⁰ Chunyu W.-X., Ding Z.-G., Li M.-G., Zhao J.-Y., Gu S.-J., Gao Y., Wang F., Ding J.-H., Wen M.-L. 2016, Stachartins A – E, phenylspirodrimanes from the tin mine tailings-associated fungus *Stachybotrys chartarum*. *Helv. Chim. Acta*, **99**, 583–587.

Du point de vue biosynthétique, les chartarolides A (**297**) et B (**298**) semblent provenir de la réaction entre le stachybotrydial (**249**) et la mollicelline J (**301**), alors que le chartarolide C (**299**) serait le produit de la réaction entre la stachybotrylactame (**245**) et la mollicelline D (**300**) (schéma 23).

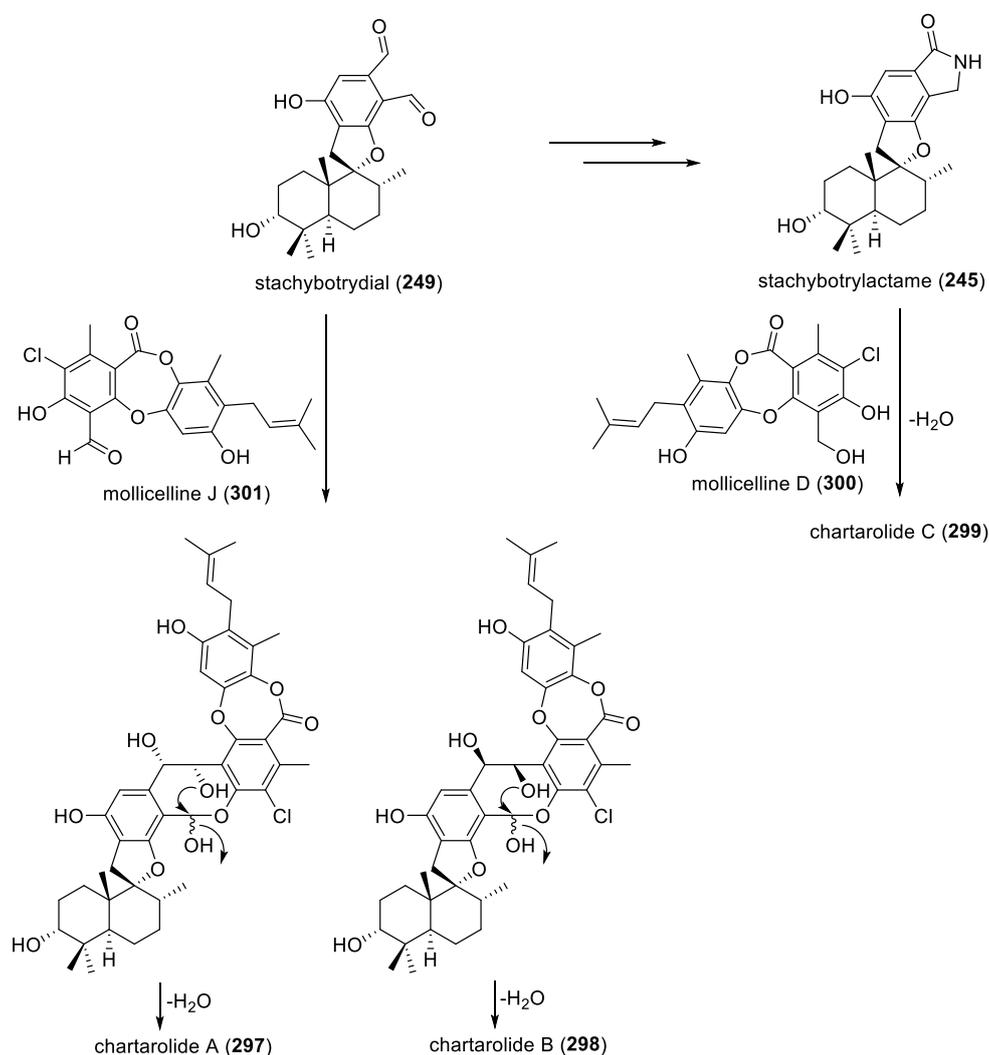


Schéma 23. Voie de biosynthèse hypothétique pour les chartarolides A-C²¹².

Les chartarolides A-C (**297-299**) inhibent de façon significative, plusieurs carcinomes cellulaires humains tels que le carcinome colorectal (HCT-116), hépatocellulaire (HepG2), gastrique (BGC-823), pulmonaire (NCIH1650) ainsi que deux types de carcinomes ovariens (A2780 et MCF7) avec des CI₅₀ comprises entre 1,4 et 12,5 μ M. Il est à noter que les précurseurs des chartarolides, la mollicelline D (**300**) et la stachybotrylactame (**245**), sont quant à eux faiblement cytotoxiques (CI₅₀ > 25 μ M).

Les chartarolides A-C (**297-299**) sont également des inhibiteurs de plusieurs kinases (FGFR3, IGF1R, PDGFRb et TrkB)²²¹ impliquées dans la prolifération de tumeurs, avec des CI₅₀ comprises entre 2,6 et 25 μ M.

²²¹ FGFR régule le développement et la prolifération des cellules (contrôle de la prolifération, de la migration, de l'apoptose et de la différenciation des cellules). PDGFR est reliée à la croissance, l'angiogénèse et la fibrose des cellules. TrkB joue un rôle important dans la progression des tumeurs de différents cancers.

II.3.3.2. Triprénylphénols

Plusieurs dérivés triprénylphénols ont été isolés de *S. chartarum* d'origine terrestre ou marine. On distingue les chartarutines A-H (**302-309**), le BR-011 (**310**), la stachybotrine G (**311**) et les stachybotrysames A-D (**312-315**) (figure 141).

Les chartarutines A-H (**302-309**) ont été évalués pour leur propriétés antivirales. Elles se sont avérées être de bons inhibiteurs du VIH²¹⁸, avec des CI_{50} comprises entre 4,9 et 5,6 μM et une faible cytotoxicité comparativement à l'éfavirenz.

La stachybotrine G (**311**)²²² est le seul composé constitué par un motif diazépino-isoindole-farnésyle, isolé d'une souche marine de *S. chartarum*. Il s'est avéré non cytotoxique jusqu'à une concentration de 10 μM vis-à-vis des lignées cellulaires tumorales P388, BEL-7402, A-549 et HeLa. La stachybotrine G ne présente pas d'activité antivirale notamment contre les virus H1N1 ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$) et VIH ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$). Enfin, il ne présente pas d'activité antibactérienne ou antifongique, en particulier vis-à-vis des bactéries *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Colibacillus* sp. et du champignon *Blastomyces albicans* ($\text{CMI} > 400 \mu\text{g/mL}$). La stachybotrine G (**311**) semble provenir d'une voie de biosynthèse mixte, mévalonate et polycétide, suivie par la formation d'un iminium, une cyclisation, et enfin une sulfatation (figure 140).

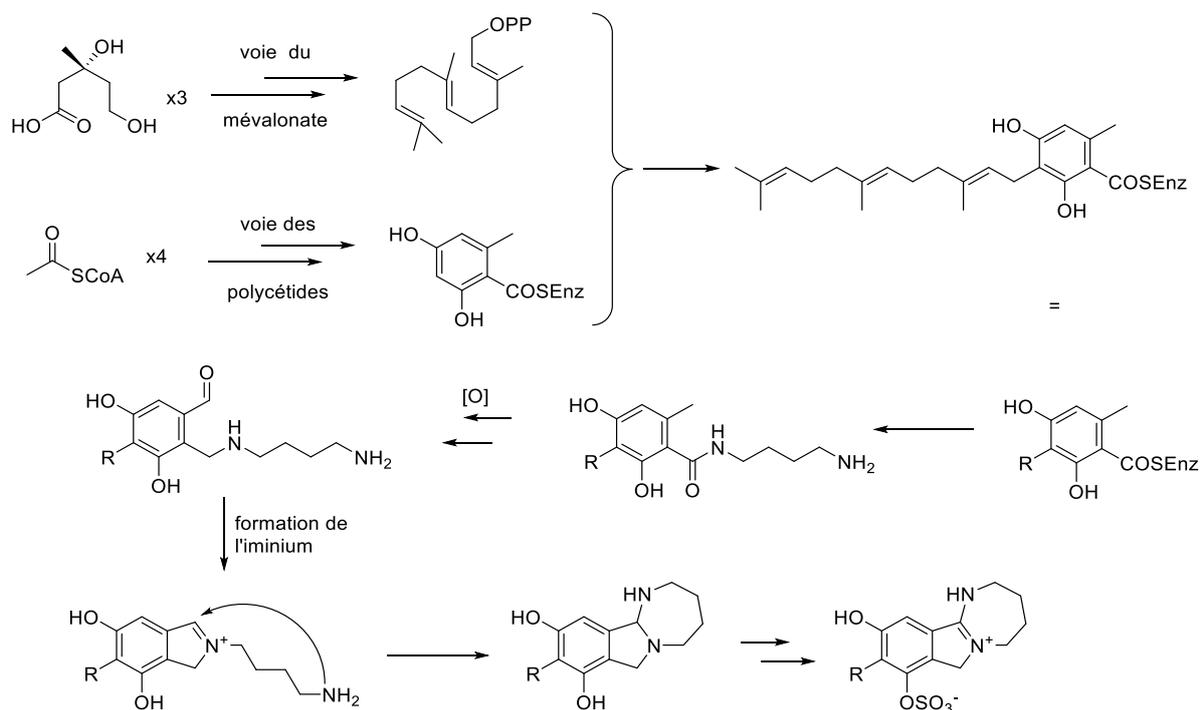


Figure 140. Voie de biosynthèse hypothétique de la stachybotrine G (**311**)²²².

Les stachybotrysames A-D (**312-315**)²¹⁹, ont été évalués pour leur propriétés antivirales et se sont révélés être de bons inhibiteurs du VIH-1 avec des CI_{50} comprises entre 1,0 et 9,6 μM . Dans cette série de

²²² Ma X., Wang H., Li F., Zhu T., Gu Q., Li D. 2015, Stachybotrin G, a sulfate meroterpenoid from a sponge derived *Stachybotrys chartarum* MXH-X73. *Tetrahedron Lett.*, **56**, 7053–7055.

dérivés, les stachybotrysames C (**314**) et D (**315**) sont les moins cytotoxiques. L'activité antivirale est affectée par la cyclisation, les modifications de la partie farnésyle, la nature de la chaîne latérale portée par l'azote ainsi que par la présence d'un groupement sulfate. De façon identique à la stachybotrine G (**311**), les stachybotrysames A-D (**312-315**) sont issus de la transamination, sulfatation, oxydation et cyclisation de l'ilicoline B (**316**). Ce dernier provient de l'acide orsellinique (**317**) (voie des polycétides) et du farnésyldiphosphate (voie mévalonate).

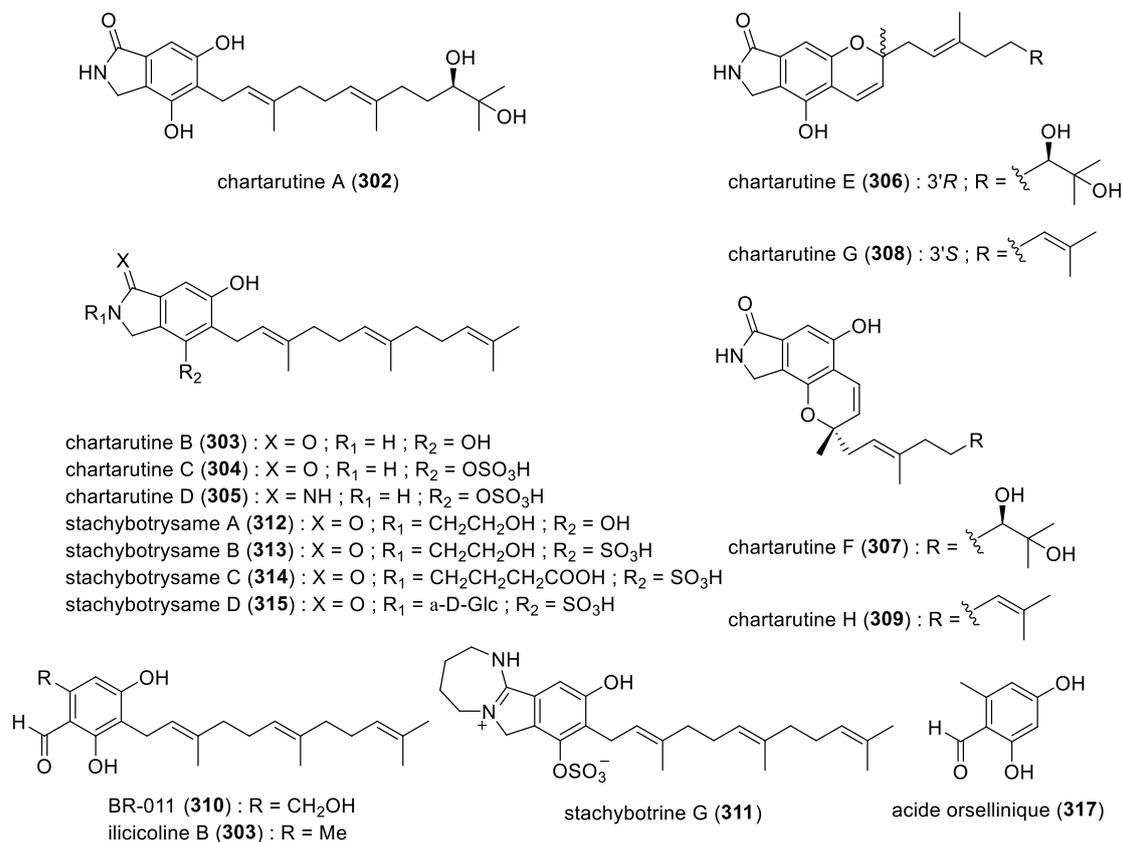


Figure 141. Structures des phénols triprénylés isolés de *S. chartarum*^{218,222}.

II.3.4. Autres composés recensés

Deux dérivés cochlioquinones, la 11-*O*-methyl-épi-cochlioquinone A (**318**) et l'épi-cochlioquinone A (**319**), ont été isolés d'une souche terrestre de *S. chartarum* (figure 142)²²³.

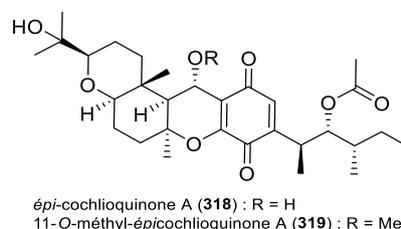


Figure 142. Structures de la 11-*O*-methyl-épi-cochlioquinone A (**318**) et de l'épi-cochlioquinone A (**319**)²²³.

²²³ Yoganathan K., Yang L.-K., Rossant C., Huang Y., Ng S., Butler M. S. et Buss A. D. 2004, Cochlioquinones and epi-cochlioquinones: Antagonists of the human chemokine receptor CCR5 from *Bipolaris brizae* and *Stachybotrys chartarum*. *J. Antibiol.*, **57**, 59–63.

Ces métabolites semblent inhiber l'entrée du VIH-1 dans les cellules. En effet, ils entrent en compétition avec la protéine MIP-1 α ²²⁴ vis-à-vis du récepteur humain des chimiokines²²⁵ (CCR5) avec des CI₅₀ de 7 et 4 μ M respectivement.

S. chartarum (souche terrestre) produit également un dérivé de cyclosporine, FR901459 (**320**)²²⁶ (figure 143), ainsi que la stachylysine, une hémolysine de près de 12 kDa²²⁷.

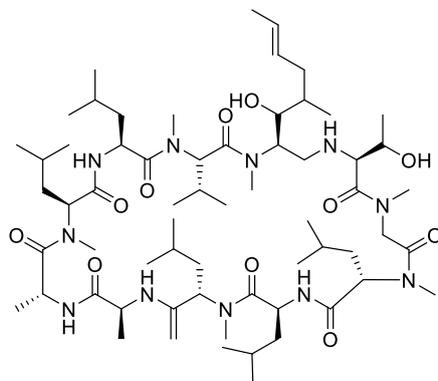


Figure 143. Structure de FR901459 (**320**)²²⁶.

III. Etude de *Stachybotrys chartarum*

Le champignon *S. chartarum* (MUT3308) étudié (figure 144) a été isolé à partir de l'éponge *A. cavernicola* (partie C chapitre 1). La culture a été réalisée sur milieu solide de type Whickerham's. L'extraction, l'isolement et la détermination structurale des métabolites de *S. chartarum* sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

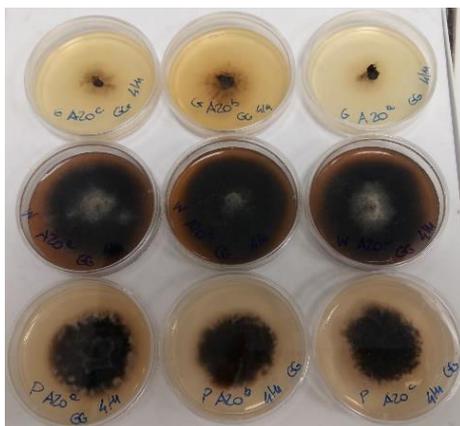


Figure 144. *S. chartarum* sur différents milieux de culture.

²²⁴ MIP : « Macrophage inflammatory protein », une chimiokine importante dans la réponse immunitaire.

²²⁵ Egalement récepteur pour le HIV-1.

²²⁶ K. Sakamoto, E. Tsujii, M. Miyauchi, T. Nakanishi, M. Yamashita, N. Shigematsu, T. Tada, S. Izumi, M. Okuhara 1993, FR901459, A novel immunosuppressant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*, **46** (12), 1788–1798.

²²⁷ Vesper S. J., Magnuson M. L., Dearborn D. G., Yike I., Haugland R. A. 2001, Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infect. Immun.*, **69** (2), 912–916.

III.1. Etude de *S. chartarum* sous le prisme du réseau moléculaire

Le champignon *S. chartarum* (MUT3308) a été extrait par un mélange de solvants organiques. L'extrait brut organique a par la suite été analysé par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) avant de procéder à une analyse par réseau moléculaire (figure 145).

Le réseau est composé de 361 nœuds dont 270 sont isolés et 91 sont impliqués dans des groupes de similarité spectrale. Seul un composé de m/z 529,2242, à priori la satratoxine H (**227**), a pu être placé. Les métabolites engagés dans une similarité spectrale avec ce dernier présentent une différence de masse de 2 et 14 uma. Il s'agit vraisemblablement de dérivés de la satratoxine H (**227**) qu'il convient d'isoler.

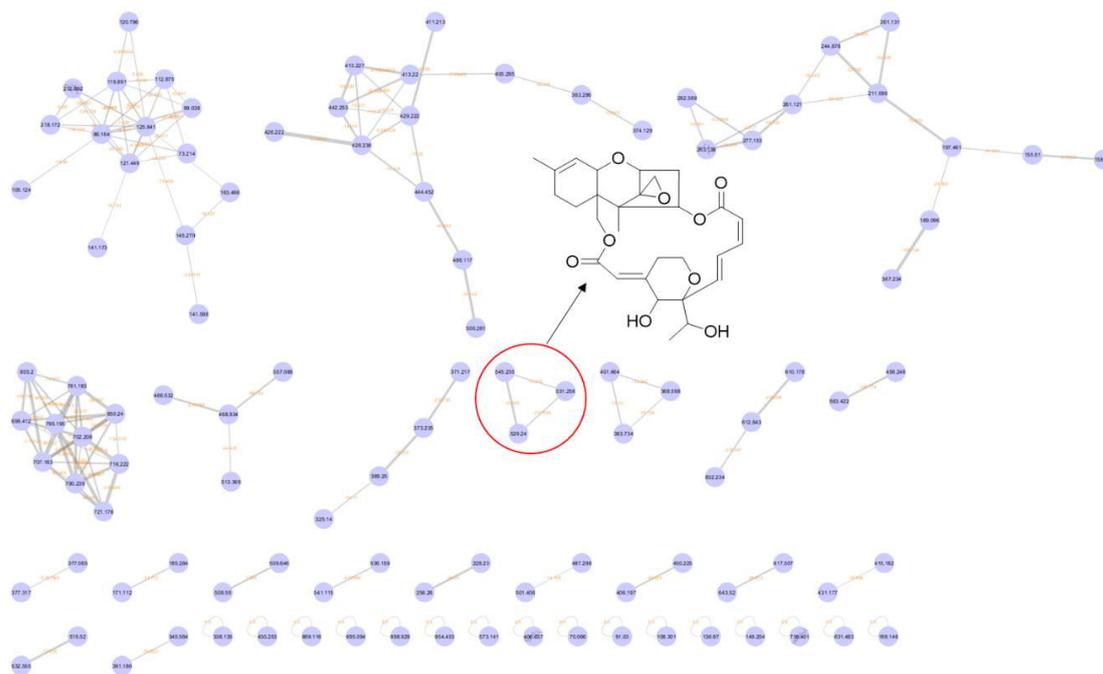


Figure 145. Réseau moléculaire de *S. chartarum* à l'exception des nœuds isolés.

III.2. Extraction, fractionnement et isolement

L'équivalent du contenu de 100 boîtes de pétri, préalablement lyophilisées, a été extrait à plusieurs reprises par un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (1:1, v/v, extrait organique PA) puis un mélange dichlorométhane/méthanol (1:1, v/v, extrait organique PP) sous ultrasons. L'extrait organique PP contient moins de métabolites que l'extrait PA et n'est, par conséquent, pas étudié. Par la suite, l'extrait brut organique PA obtenu a été fractionné par chromatographie liquide sur gel de silice greffée Diol par passages successifs de mélanges de solvants de polarité décroissante (AcOEt jusqu'à MeOH) pour conduire à 6 fractions : F1-20, F21-24, F25-26, F27-30, F31-32 et F33 (schéma 27). Finalement, les métabolites présents dans les fractions F21-24, F27-30 et F31-32 ont été purifiés par CLHP semi-préparative (Macherey Nagel Sphinx Nucleodur phénylpropyl-C18, 250×10 mm id, 5 μ m, divers

gradients de H₂O/CH₃CN/H₂CO₂), pour conduire à six composés : **Sc1** (2,0 mg), **Sc2** (0,9 mg), **Sc3** (11,8 mg), **Sc4** (2,5 mg), **Sc5** (1,5 mg) et **Sc6** (3,9 mg) (schéma 24).

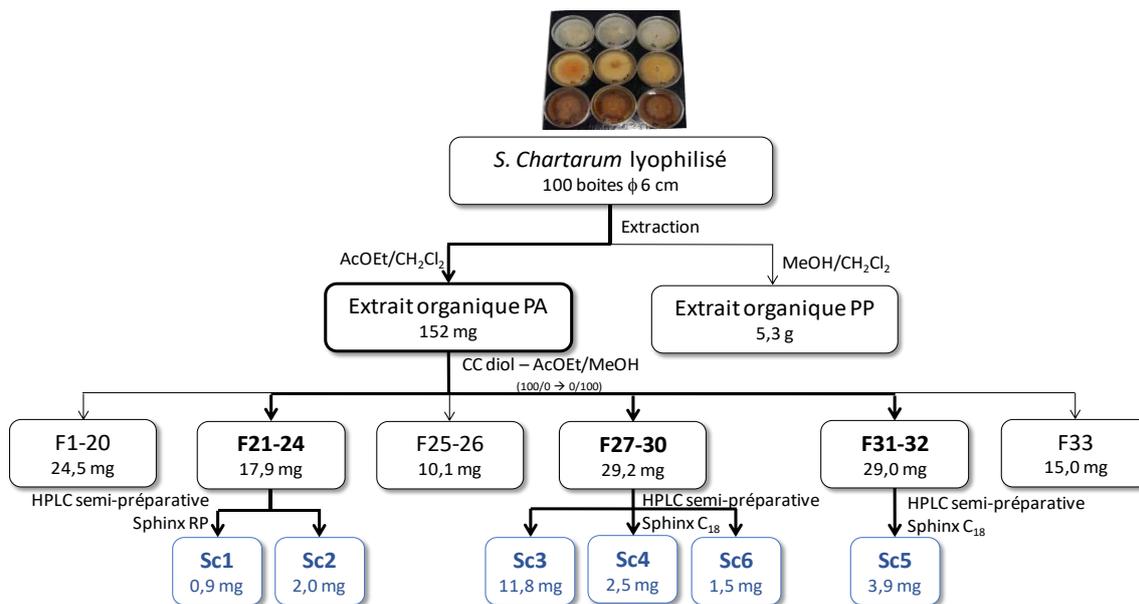


Schéma 24. Schéma d'extraction de *S. chartarum*.

III.3. Détermination structurale

III.3.1. Structures de Sc1–2

Le composé **Sc1** (**321**) a été isolé sous la forme d'un solide de couleur blanche. Sa formule brute, C₂₉H₃₇O₉, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)^{MS} (ion pseudomoléculaire [M+H]⁺ de *m/z* 529,2242 ; Δppm = 37). L'ensemble de ces données spectrales (MS, HRMS, RMN), couplé aux données de la bibliographie, notamment celles relatives à *S. chartarum*, nous a permis d'identifier la structure comme étant celle de la satratoxine H (**227**) (figure 146).

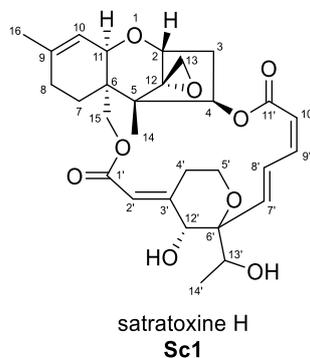


Figure 146. Structure de la satratoxine H (**227**).

Cette hypothèse est appuyée par la présence dans les spectres RMN ^1H et ^{13}C des éléments suivants (figure 147) :

- Huit signaux à δ_c 157,8 (C-3'), 144,5 (C-9'), 141,2 (C-9), 135,0 (C-8'), 134,4 (C-7'), 120,8 (C-10'), 120,3 (C-10) et 119,3 (C-2') ppm ainsi que six signaux à δ_H 7,36 (1H, *dd*, $J = 17,0$ Hz, $J = 10,1$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-8'), 6,63 (1H, *t*, $J = 10,5$ Hz, H-9'), 6,09 (1H, *d*, $J = 17,1$ Hz, H-7'), 5,91 (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz, H-10'), 5,85 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2') et 5,46 (1H, *d*, $J = 5,0$ Hz, H-10) ppm caractéristiques des 4 oléfines aux positions $\Delta^{9,10}$, $\Delta^{2',3'}$, $\Delta^{7',8'}$ et $\Delta^{9',10'}$,
- Trois groupes de signaux à δ_H 4,56 (1H, *d*, $J = 12,5$ Hz, H-15b) et 3,88 (1H, *d*, $J = 12,0$ Hz, H-15a), 3,90 (2H, *m*, H-5' α , H-5' β), 3,12 (1H, *d*, $J = 4,0$ Hz, H-13b) et 2,81 (1H, *d*, $J = 4,0$ Hz, H-13a) ppm ainsi que les carbones associés à δ_c 65,2 (1C, C-15), 61,0 (1C, C-5') et 48,5 (1C, C-13) ppm, caractéristiques des méthylènes aux positions 15 et 5' ainsi que celui de l'époxyde en position 13,
- Cinq signaux à δ_H 5,90 (1H, *m*, H-4), 4,38 (1H, *q*, $J = 7,0$ Hz, H-13'), 3,97 (1H, *s*, H-12'), 3,90 (1H, *m*, H-2) et 3,62 (1H, *d*, $J = 5,0$ Hz, H-11) ppm ainsi que les carbones associés à δ_c 80,5 (1C, C-2), 75,6 (1C, C-4), 74,2 (1C, C-13), 70,5 (1C, C-13') et 69,3 (1C, C-11) ppm, caractéristiques des protons déblindés (au voisinage d'un oxygène) H-4, H-13', H-12', H-2 et H-11,
- Trois signaux à δ_H 1,74 (3H, *s*, H₃-16), 1,16 (3H, *s*, H₃-14') et 0,83 (3H, *s*, H₃-14) ppm ainsi que les carbones associés à δ_c 21,3 (1C, C-16), 16,8 (1C, C-14') et 8,3 (1C, C-14) ppm caractéristiques des méthyles aux positions 16, 14' et 14, respectivement, et,
- Deux signaux à δ_c 168,6 (1C, C-11') et 167,9 (1C, C-1') ppm caractéristiques des deux carbonyles α,β -conjugués.

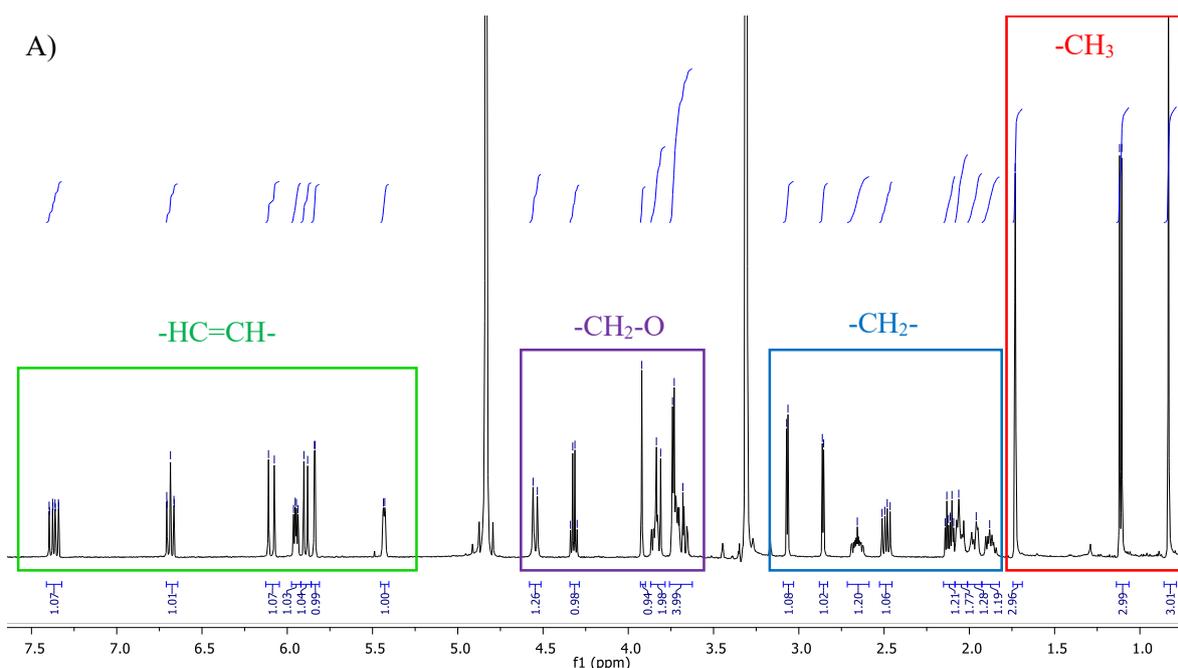


Figure 147. Spectres RMN (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **1** (d_4 -MeOH).

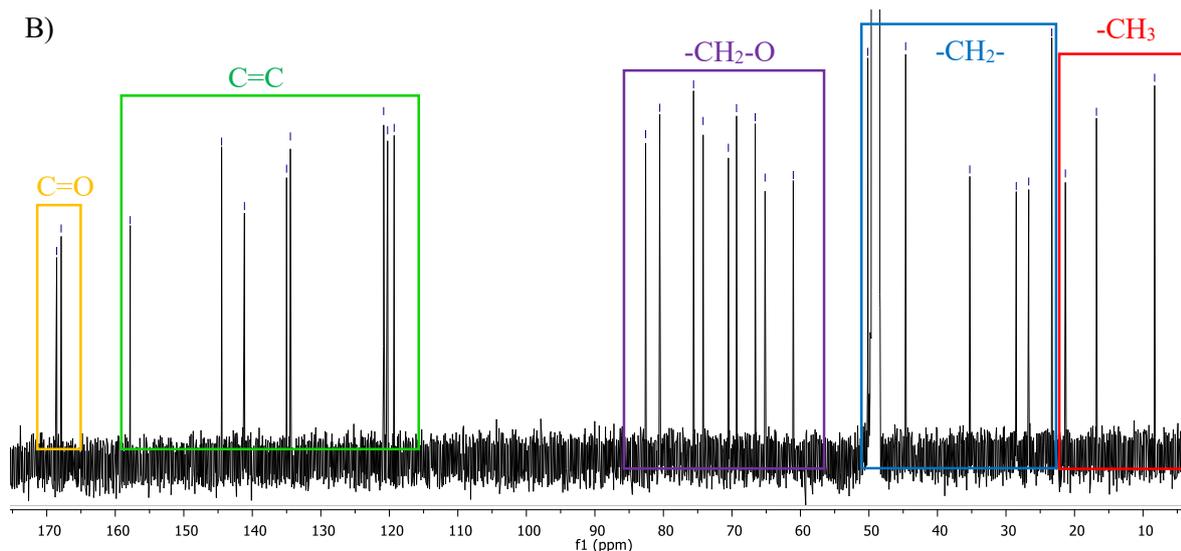


Figure 147 (suite). Spectres RMN (A) ^1H (500 MHz) et (B) ^{13}C (125 MHz) de **Sc1** (d_4 -MeOH).

Stéréochimie

La configuration des doubles liaisons a pu être déterminée, soit par mesure directe des constantes de couplages entre les protons éthyléniques ($6 < Z < 12 \text{ Hz}$; $11 < E < 18 \text{ Hz}$), soit indirectement en se basant sur les déplacements chimiques de méthylènes situés en α des protons éthyléniques (E : $\delta_{\text{C}} > 30 \text{ ppm}$; Z : $\delta_{\text{C}} < 30 \text{ ppm}$).

Les doubles liaisons $\Delta^{7,8'}$ et $\Delta^{9,10'}$ sont de configuration E ($^3J_{\text{H}7', \text{H}8'} = 17,0 \text{ Hz}$) et Z ($^3J_{\text{H}9', \text{H}10'} = 10,0 \text{ Hz}$). Par ailleurs, les oléfines $\Delta^{2',3'}$ et $\Delta^{9,10}$ sont de configuration Z car les méthylènes C-4' et C-8 situés à proximité, donnent un signal à $\delta_{\text{C}} 26,7 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}} 28,5 \text{ ppm}$ dans le spectre RMN carbone.

La configuration relative de la partie sesquiterpénol, $2R^*$, $4R^*$, $5S^*$, $6R^*$, $11R^*$, $12R^*$, a pu être déduite des corrélations observées par RMN NOESY ^1H - ^1H entre les protons H-13a/H-2, H-13b/H-14 et H-15a/H-4 (figure 148).

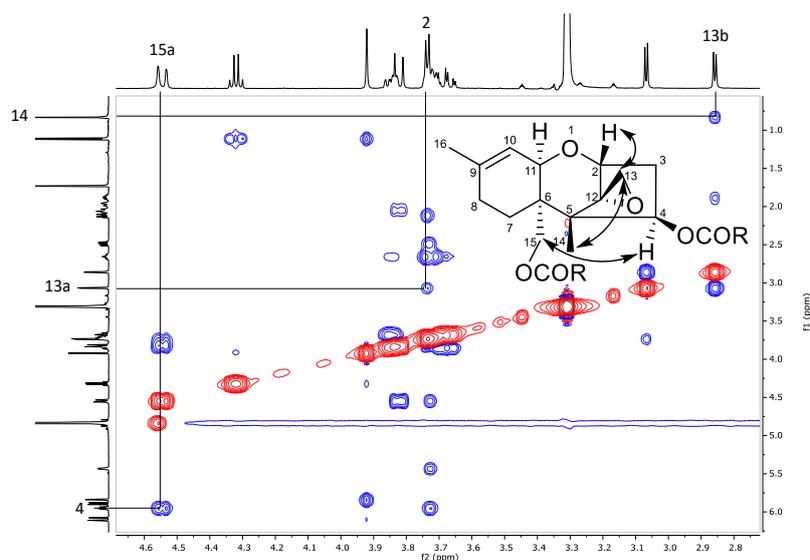


Figure 148. Agrandissement du spectre NOESY ^1H - ^1H de **Sc1** (d_4 -MeOH, 500/500 MHz).

Par ailleurs, le fragment sesquiterpénol de **Sc1 (321)** présente par RMN ^1H et ^{13}C des déplacements chimiques très proches de ceux du fragment sesquiterpénol de la roridine E (**211**)²⁰⁴ (tableau 32) ($|\overline{X}(\Delta\delta_{\text{C}(\text{Sc1-roridine E})})| = 1,6 \text{ ppm}$ et $s = \Delta\delta_{\text{C}(\text{Sc1-roridine E})} = 1,7 \text{ ppm}$; $|\overline{X}(\delta_{\text{H}(\text{Sc1-roridine E})})| = 0,2 \text{ ppm}$ et $s = \Delta\delta_{\text{H}(\text{Sc1-roridine E})} = 0,2 \text{ ppm}$), ce qui nous a permis de déduire que les centres asymétriques de la partie sesquiterpénol de **Sc1 (321)** présentent les mêmes configurations absolues à savoir $2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R$.

Tableau 32. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) de la partie sesquiterpénol du composé **Sc1** et comparaison avec celle de la roridine E²⁰⁴.

N°	Sc1		Roridine E	
	δ_{c} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/mult./J (Hz)	δ_{c} (ppm)/mult.	δ_{H} (ppm)/ mult./J (Hz)
2	80,5, CH	3,73, <i>m</i>	79,5, CH	3,83, <i>d</i> , 5,0
3 α	35,3, CH	2,49, <i>dd</i> , 8,5, 15,2	36,1, CH	2,51, <i>dd</i> , 8,0, 15,0
3 β	35,3, CH	2,12, <i>dt</i> , 4,0, 5,0, 15,0	36,1, CH	2,04, <i>ddd</i> , 4,0, 5,0, 15,0
4	75,6, CH	5,95, <i>dd</i> , 4,8, 8,5	74,4, CH	6,20, <i>dd</i> , 4,0, 8,0
5	44,6, Cq	-	48,6, Cq	-
6	35,3, Cq	-	42,9, Cq	-
7 α	23,3, CH	1,88, <i>m</i>	21,8, CH	2,02, <i>ddd</i> , 5,5, 12,6, 12,6
7 β	23,3, CH	1,95, <i>m</i>	21,8, CH	1,65, <i>ddd</i> , 1,4, 5,5, 12,6
8 α	28,5, CH ₂	2,06, <i>m</i>	27,9, CH ₂	2,01, <i>ddd</i> , 5,5, 12,6, 12,6
8 β			27,9, CH ₂	2,00, <i>ddd</i> , 1,4, 5,5, 12,6
9	141,2, Cq		140,4, Cq	-
10	120,3, CH	5,44, <i>d</i> , 4,0	119,1, CH	5,46, <i>bd</i> , 5,0
11	69,3, CH	3,73, <i>m</i>	67,5, CH	3,89, <i>bd</i> , 5,0
12	66,6, Cq	-	65,8, Cq	-
13a	48,5, CH	2,86, <i>d</i> , 4,0	48,4, CH	3,12, <i>d</i> , 4,1
13b	48,5, CH	3,07, <i>d</i> , 4,0	48,4, CH	2,80, <i>d</i> , 4,1
14	8,3, CH ₃	0,83, <i>s</i>	6,9, CH ₃	0,77, <i>s</i>
15a	65,2, CH	3,82, <i>d</i> , 12,5	64,0, CH	4,29, <i>d</i> , 12,5
15b	65,2, CH	4,55, <i>d</i> , 12,5	64,0, CH	3,92, <i>d</i> , 12,5
16	21,3, CH ₃	1,73, <i>s</i>	23,5, CH ₃	1,69, <i>bs</i>

D'autre part, les analyses par RMN NOESY ^1H - ^1H nous ont permis de déduire que le proton H-2' est en conformation *syn*-périplanaire vis-à-vis du proton H-12' (figure 149).

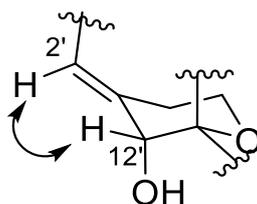


Figure 149. Corrélation NOESY H-2'/H-12' et stéréochimie relative en C-12'.

Nous nous sommes alors intéressés aux propriétés chiroptiques de la molécule. La satrattoxine H (**227**) est constituée de plusieurs chromophores : un ester α,β -conjugué et un ester $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -conjugué (figure 146). Ces chromophores ont la particularité de se trouver à proximité des centres asymétriques C-12' et C-6' ce qui fait du dichroïsme circulaire la méthode de choix pour cette étude sur la base de la comparaison du spectre de dichroïsme circulaire expérimental avec les spectres ECD théoriques.

Le spectre de DC d'une molécule de configuration donnée peut être prédit grâce au développement de la chimie quantique et des méthodes de calculs associées. La comparaison des spectres expérimentaux

et calculés donne alors accès à la configuration absolue de la molécule. Plusieurs méthodes de chimie quantique permettent les calculs. A ce jour, la plus utilisée est la méthode TDDFT (Time-Dependent Density Functional Theory). Il s'agit d'une méthode *ab initio*. En principe, elle est applicable à toutes les molécules. Cependant, les calculs peuvent devenir très longs si la taille de la molécule est trop importante. En général, cette méthode est utilisée avec la fonction B3LYP et la base 6-31G+(d,p). Tous les calculs de mécanique quantique requièrent une détermination au préalable de la géométrie de la molécule. Une étude conformationnelle détaillée est donc requise avant d'effectuer des calculs. La méthode TDDFT étant longue, ces optimisations de géométrie se font à un niveau de calculs DFT (Density Functional Theory). En partant d'un énantiomère arbitraire, des calculs rapides sont effectués, à l'état fondamental, afin de sélectionner les conformères de plus basse énergie. Ces derniers font alors l'objet d'une optimisation de géométrie par des calculs à un niveau semi-empirique (AM1, PM3). Les molécules sont, une fois de plus triées en fonction de leur énergie. Par la suite, les calculs sont menés sur les conformères sélectionnés, à l'état excité (TDDFT). Le spectre de DC est calculé pour chaque conformère. La distribution de Boltzmann est déterminée pour chaque population de conformères. Enfin, les spectres UV et DC totaux sont simulés et comparés aux spectres expérimentaux (schéma 25).

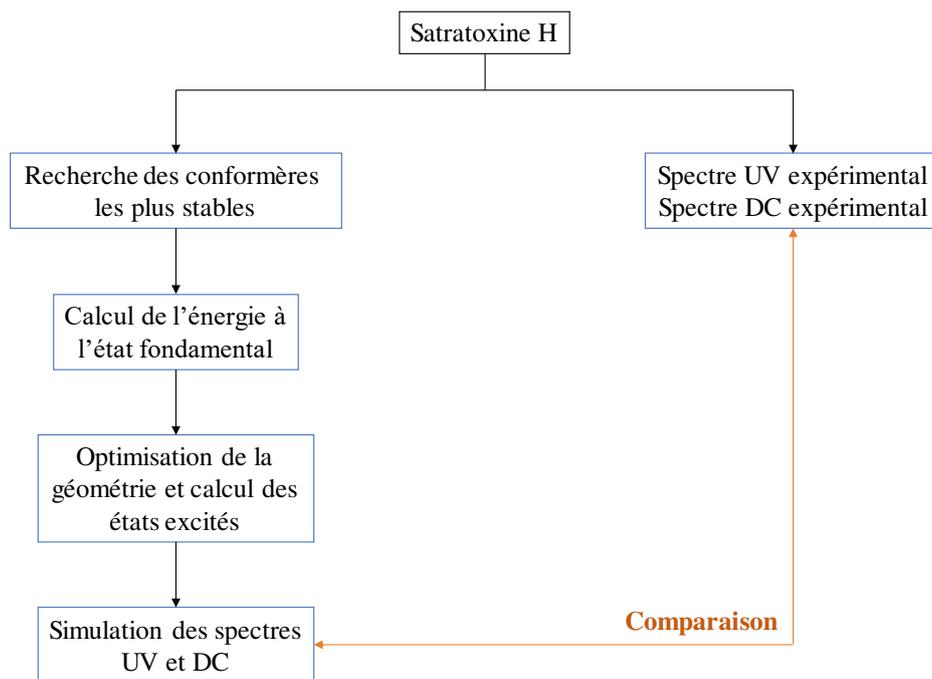


Schéma 25. Méthode employée pour déterminer la configuration absolue du centre asymétrique C-12' de la satratoxine H.

Sur la base de cette méthodologie, les spectres ECD théoriques ont été déterminés. Les calculs ont été menés sur la satratoxine H (**227**) de configuration $2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R, 6'R, 12'S$ et $13'R$. Les configurations absolues pour les centres asymétriques 6' et 13' ont été attribués de façon arbitraire.

Pour chaque structure, une recherche conformationnelle a tout d'abord été menée par des calculs à un niveau semi-empirique (AM1) et a conduit à l'identification de quelques conformères de plus basse

énergie. Par la suite, ces derniers ont été optimisés par TDDFT pour conduire à deux conformères de plus basse énergie : (12'S)-**Sc1**-C1 (28,5 %) et (12'S)-**Sc1**-C2 (71,5 %) (figure 150).

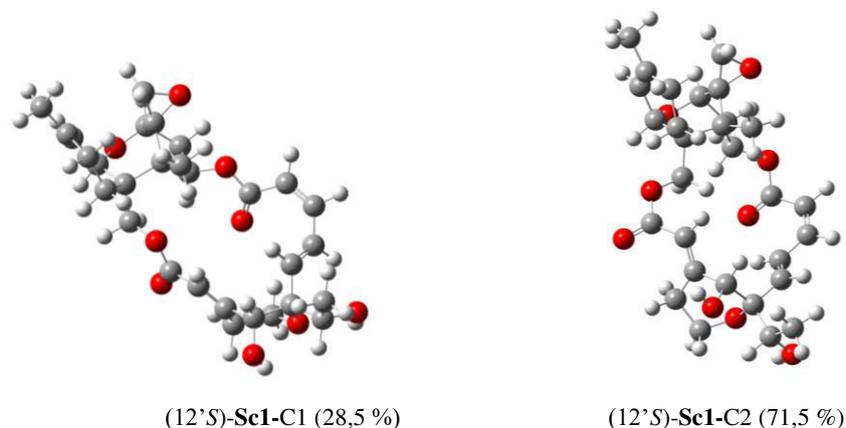


Figure 150. Structures des conformères de plus basse énergie pour la (2*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 11*R*, 12*R*, 6'*R*, 12'*S*, 13'*R*)-saratroxine H.

Finalement et pour chaque conformère, les spectres ECD théoriques ont été calculés par TDDFT. Les spectres ECD totaux, pondérés par la distribution de Boltzmann associée à chaque conformère, ont alors été simulés et comparés au spectre de dichroïsme circulaire expérimental (figure 151).

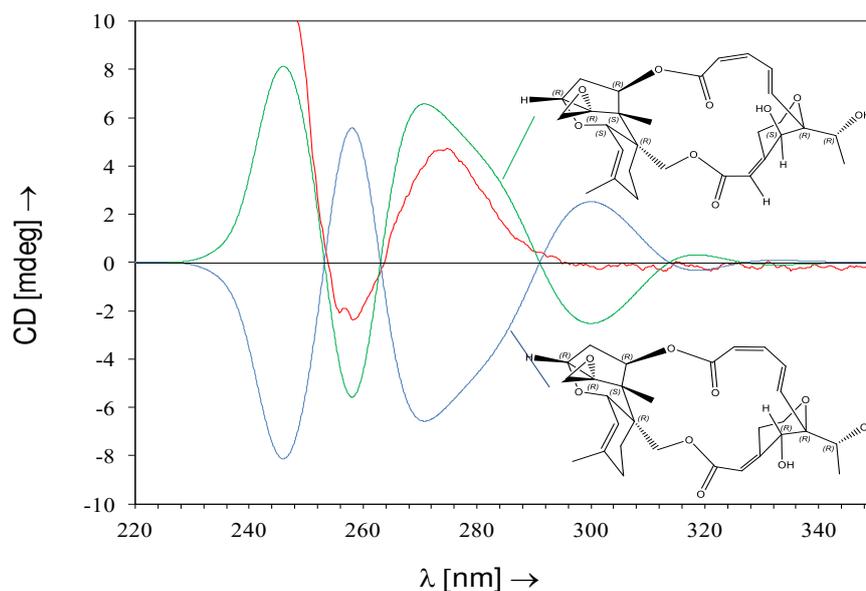


Figure 151. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de **Sc1** (en rouge) et spectres ECD théoriques associés à la (2*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 11*R*, 12*R*, 6'*R*, 12'*S*, 13'*R*)-saratroxine H (en vert) et à la (2*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 11*R*, 12*R*, 6'*R*, 12'*R*, 13'*R*)-saratroxine H (en bleu) (MeOH).

La comparaison du spectre de dichroïsme circulaire expérimental avec les spectres ECD théoriques nous a permis de déduire que le centre asymétrique C-12' est de configuration *S*.

Les corrélations RMN COSY ¹H-¹H, HMBC ¹H-¹³C et NOESY ¹H-¹H de **Sc1** (**321**) sont reportées à la figure 153.

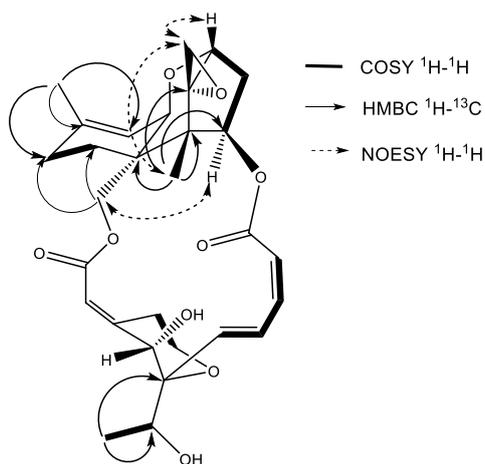


Figure 152. Corrélations RMN 2D principales de Sc1 (321).

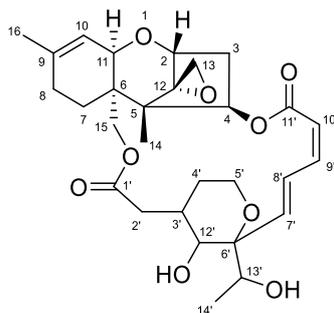
L'ensemble des données RMN 1D de Sc1 (321) et la comparaison avec les données de la satratoxine H (227) sont regroupés dans le tableau 33.

Tableau 33. Données RMN 1D (¹H, ¹³C) du composé Sc1 (*d*₄-MeOH, 500 MHz) et comparaison avec la satratoxine H (CDCl₃)²⁰⁴.

N°	Sc1 ^a		Satratoxine H ^b	
	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/mult./J (Hz)	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)
2	80,5, CH	3,73, <i>m</i>	79,1, CH	3,90, <i>m</i>
3 α	35,3, CH	2,49, <i>dd</i> , 8,5, 15,2	34,4, CH	2,45, <i>dd</i> , 7,5, 15,0
3 β		2,12, <i>dt</i> , 4,0, 5,0, 15,0		2,20, <i>dt</i> , 4,0, 5,0, 15,0
4	75,6, CH	5,95, <i>dd</i> , 4,8, 8,5	74,2, CH	5,90, <i>m</i>
5	44,6, Cq	-	49,0, Cq	-
6	35,3, Cq	-	43,4, Cq	-
7 α	23,3, CH	1,88, <i>m</i>	20,4, CH	1,90, <i>m</i>
7 β		1,95, <i>m</i>		1,90, <i>m</i>
8	28,5, CH ₂	2,06, <i>m</i>	27,6, CH ₂	2,10, <i>m</i>
9	141,2, Cq	-	140,2, Cq	-
10	120,3, CH	5,44, <i>d</i> , 4,0	119,0, CH	5,46, <i>d</i> , 5,0
11	69,3, CH	3,73, <i>m</i>	68,2, CH	3,62, <i>d</i> , 5,0
12	66,6, Cq	-	65,4, Cq	-
13a	48,5, CH	2,86, <i>d</i> , 4,0	48,0, CH	2,81, <i>d</i> , 4,0
13b		3,07, <i>d</i> , 4,0		3,12, <i>d</i> , 4,0
14	8,3, CH ₃	0,83, <i>s</i>	7,6, CH ₃	0,83, <i>s</i>
15a	65,2, CH	3,82, <i>d</i> , 12,5	64,2, CH	3,88, <i>d</i> , 12,5
15b		4,55, <i>d</i> , 12,5		4,56, <i>d</i> , 12,5
16	21,3, CH ₃	1,73, <i>s</i>	23,3, CH ₃	1,74, <i>s</i>
1'	167,9, Cq	-	166,2, Cq	-
2'	119,3, CH	5,84, <i>s</i>	119,0, CH	5,85, <i>d</i> , 2,0
3'	157,8, Cq	-	155,1, Cq	-
4' α	26,7, CH	3,73, <i>m</i>	25,3, CH	2,20, <i>dt</i> , 3,0, 10,0
4' β		2,68, <i>m</i>		2,60, <i>m</i>
5' α	61,0, CH	3,68, <i>m</i>	60,4, CH	3,90, <i>m</i>
5' β		3,88, <i>m</i>		3,90, <i>m</i>
6'	82,6, Cq	-	81,4, Cq	-
7'	134,4, CH	6,10, <i>d</i> , 17,1	134,2, CH	6,09, <i>d</i> , 17,5
8'	135,0, CH	7,36, <i>ddd</i> , 1,0, 10,1, 17,0	132,2, CH	7,36, <i>dd</i> , 10,1, 17,0
9'	144,5, CH	6,68, <i>t</i> , 10,0	143,0, CH	6,63, <i>t</i> , 10,5
10'	120,8, CH	5,89, <i>d</i> , 11,0	120,4, CH	5,91, <i>d</i> , 10,5
11'	168,6, Cq	-	167,0, Cq	-
12'	74,2, CH	3,92, <i>s</i>	73,7, CH	3,97, <i>s</i>
13'	70,5, CH	4,32, <i>q</i> , 6,5	69,7, CH	4,38, <i>q</i> , 7,0
14'	16,8, CH ₃	1,12, <i>d</i> , 6,5	15,7, CH ₃	1,16, <i>d</i> , 7,0

^aCD₃OD, 500/125 MHz;^bCDCl₃, 300/75 MHz²²¹

Le composé **S_c2** (**322**) a été isolé sous la forme d'un solide de couleur blanche. Sa formule brute, C₂₉H₃₉O₉, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)^{MS} (ion pseudomoléculaire [M+H]⁺ de *m/z* 531,2377; Δppm = 41). L'analyse des données spectrales (SMHR, RMN) du composé **S_c2** (**322**) a conduit à l'identification d'une majorité de groupements identiques à ceux du composé **S_c1** (**321**). Ces deux métabolites sont très proches du point de vue structural et appartiennent à la même famille. Ils présentent une différence de masse de 2 uma. Ces données nous ont permis de déduire que **S_c2** (**322**) est la 2',3'-dihydrosatratoxine H (figure 153).



2',3'-dihydrosatratoxine H (**S_c2**)

Figure 153. Structure du composé **S_c2** (**322**).

Cette hypothèse est appuyée par la présence dans les spectres RMN ¹H et ¹³C des éléments caractéristiques suivants (figure 154) :

- Six signaux à δ_c 146,0 (C-9'), 141,1 (C-9), 132,9 (C-8'), 131,6 (C-7'), 120,8 (C-10') et 120,1 (C-10) ppm ainsi que cinq signaux à δ_H 6,86 (1H, *ddd*, *J* = 16,5 Hz, *J* = 6,8 Hz, *J* = 1,5 Hz, H-8'), 6,76 (1H, *ddd*, *J* = 11,4 Hz, *J* = 6,8 Hz, *J* = 1,5 Hz, H-9'), 5,91 (1H, *dd*, *J* = 11,3 Hz, *J* = 1,2 Hz, H-10'), 5,70 (1H, *dd*, *J* = 16,5 Hz, *J* = 1,3 Hz, H-7') et 5,41 (1H, *m*, H-10) ppm caractéristiques des 3 oléfines aux positions Δ^{9,10}, Δ^{7',8'} et Δ^{9',10'},
- Trois groupes de signaux à δ_H 4,32 (1H, *d*, *J* = 12,5 Hz, H-15b) et 4,16 (1H, *d*, *J* = 12,5 Hz, H-15a), 4,06 (1H, *td*, *J* = 2,7 Hz, *J* = 12,3 Hz, H-5'α) et 3,85 (1H, *m*, H-5'β), 3,09 (1H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-13b) et 2,87 (1H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-13a) ppm ainsi que les carbones associés à δ_c 66,0 (1C, C-15), 61,3 (1C, C-5') et 48,6 (1C, C-13) ppm, caractéristiques des méthylènes aux positions 15 et 5' ainsi que celui de l'époxyde en position 13,
- Cinq signaux à δ_H 5,98 (1H, *m*, H-4), 4,26 (1H, *q*, *J* = 6,5 Hz, H-11), 3,76 (1H, *m*, H-13'), 3,51 (1H, *s*, H-12') et 3,76 (1H, *m*, H-2) ppm ainsi que cinq signaux associés à δ_c 80,6 (1C, C-2), 75,1 (1C, C-4), 48,6 (1C, C-13), 69,3 (1C, C-13') et 71,4 (1C, C-11) ppm, caractéristiques des protons déblindés (au voisinage d'un oxygène) H-4, H-11, H-13', H-12', H-2,
- Trois signaux à δ_H 1,73 (3H, *s*, H₃-16), 1,07 (3H, *d*, *J* = 6,5 Hz, H₃-14') et 0,89 (3H, *s*, H₃-14) ppm ainsi que les carbones associés à δ_c 23,3 (1C, C-16), 17,1 (1C, C-14') et 8,8 (1C, C-14) ppm caractéristiques des méthyles aux positions 16, 14' et 14, respectivement, et,

- Deux signaux à δ_c 169,2 (1C, C-11') et 167,9 (1C, C-1') ppm caractéristiques des deux fonctions carbonyles α,β -conjugués.

Les composés **Sc1** (**321**) et **Sc2** (**322**) diffèrent par le type de connexion entre les carbones 2 et 3'. En effet, les signaux à δ_c 157,8 (C-3') et 119,3 (C-2') ppm ainsi que le signal à δ_H 5,85 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2') ppm sont caractéristiques de la double liaison $\Delta^{2,3'}$ dans **Sc1** (**321**). En revanche, les signaux à δ_c 66,5 (C-3') et 73,8 (C-2') ppm ainsi que les signaux à δ_H 3,76 (1H, *m*, H-3') et 3,27 (1H, *m*, H-2') ppm reflètent l'absence d'oléfine $\Delta^{2,3'}$ en faveur d'une simple liaison entre les positions 2 et 3 dans **Sc2** (**322**) (figure 154).

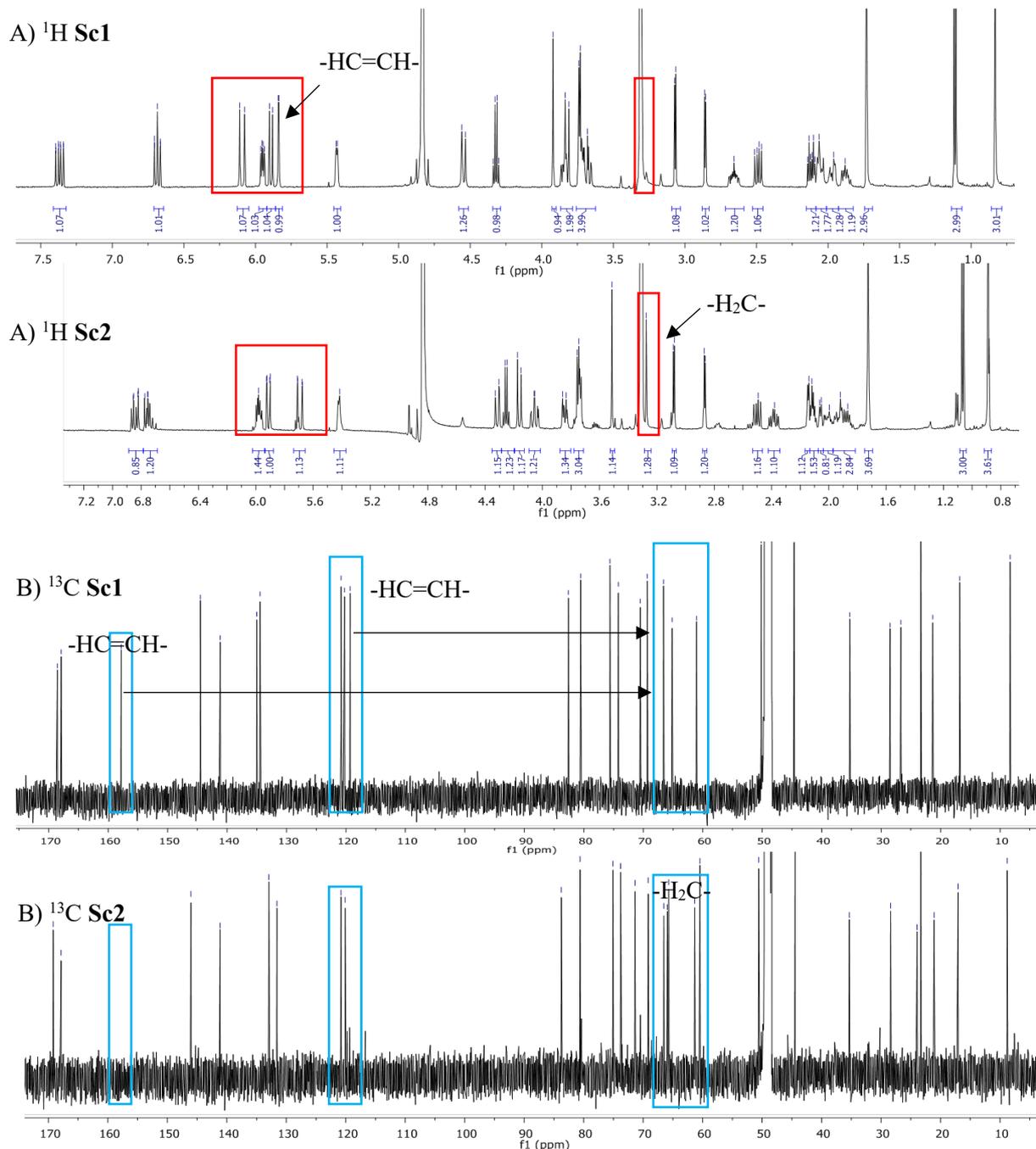


Figure 154. Comparatif des spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **Sc1** et **Sc2** (d_4 -MeOH). A) Spectres RMN ^1H associés à **Sc1** et **Sc2**, B) Spectres RMN ^{13}C associés à **Sc1** et **Sc2**.

Les données RMN 1D relatives aux composés **Sc1 (321)** et **Sc2 (322)** sont présentées dans le tableau 34.

Tableau 34. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) de **Sc2** et **Sc1** (CD_3OD , 500/125 MHz).

N°	Sc2		Sc1	
	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)
2	80,6, CH	3,76, <i>m</i>	80,5, CH	3,73, <i>m</i>
3 α	35,4, CH	2,49, <i>dd</i> , 8,4, 15,1	35,3, CH	2,49, <i>dd</i> , 8,5, 15,2
3 β		2,11, <i>m</i>		2,12, <i>dt</i> , 4,0, 5,0, 15,0
4	75,1, CH	5,98, <i>m</i>	75,6, CH	5,95, <i>dd</i> , 4,8, 8,5
5	50,6, Cq	-	44,6, Cq	-
6	44,5, Cq	-	35,3, Cq	-
7 α	21,1, CH	1,87, <i>m</i>	23,3, CH	1,88, <i>m</i>
7 β		1,92, <i>m</i>		1,95, <i>m</i>
8 α	28,4, CH	2,00, <i>m</i>	28,5, CH ₂	2,06, <i>m</i>
8 β		2,06, <i>m</i>		-
9	141,1, Cq	-	141,2, Cq	-
10	120,1, CH	5,41, <i>m</i>	120,3, CH	5,44, <i>d</i> , 4,0
11	71,4, CH	4,26, <i>q</i> , 6,5	69,3, CH	3,73, <i>m</i>
12	65,7, Cq	-	66,6, Cq	-
13a	48,6, CH	2,87, <i>d</i> , 4,0	48,5, CH	2,86, <i>d</i> , 4,0
13b		3,09, <i>d</i> , 4,0		3,07, <i>d</i> , 4,0
14	8,8, CH ₃	0,89, <i>s</i>	8,3, CH ₃	0,83, <i>s</i>
15a	66,0, CH	4,16, <i>d</i> , 12,5	65,2, CH	3,88, <i>d</i> , 12,5
15b		4,32, <i>d</i> , 12,5		4,55, <i>d</i> , 12,5
16	23,3, CH ₃	1,73, <i>s</i>	21,3, CH ₃	1,73, <i>s</i>
1'	167,9, Cq	-	167,9, Cq	-
2'	73,8, CH ₂	3,27, <i>s</i>	119,3, CH	5,84, <i>s</i>
3'	66,5, CH	3,76, <i>m</i>	157,8, Cq	-
4' α	23,9, CH	2,38, <i>td</i> , 5,6, 13,3	26,7, CH	3,73, <i>m</i>
4' β		2,14, <i>m</i>		2,68, <i>m</i>
5' α	61,3, CH	4,06, <i>td</i> , 2,7, 12,3	61,0, CH	3,68, <i>m</i>
5' β		3,85, <i>m</i>		3,88, <i>m</i>
6'	83,8, Cq	-	82,6, Cq	-
7'	131,6, CH	5,70, <i>dd</i> , 1,3, 16,5	134,4, CH	6,10, <i>d</i> , 17,1
8'	132,9, CH	6,86, <i>ddd</i> , 1,5, 6,8, 16,5	135,0, CH	7,36, <i>ddd</i> , 1,0, 10,1, 17,0
9'	146,0, CH	6,76, <i>ddd</i> , 1,5, 6,8, 11,4	144,5, CH	6,68, <i>t</i> , 10,0
10'	120,8, CH	5,91, <i>dd</i> , 1,2, 11,3	120,8, CH	5,89, <i>d</i> , 11,0
11'	169,2, Cq	-	168,6, Cq	-
12'	60,5, CH	3,51, <i>s</i>	74,2, CH	3,92, <i>s</i>
13'	69,3, CH	3,76, <i>m</i>	70,5, CH	4,32, <i>q</i> , 6,5
14'	17,1, CH ₃	1,07, <i>d</i> , 6,5	16,8, CH ₃	1,12, <i>d</i> , 6,5

Stéréochimie

Les composés **Sc1 (321)** et **Sc2 (322)** présentent des stéréochimies similaires. Les doubles liaisons $\Delta^{7:8'}$ et $\Delta^{9',10'}$ sont de configuration *E* ($^3J_{\text{H}7', \text{H}8'} = 16,5$ Hz) et *Z* ($^3J_{\text{H}9', \text{H}10'} = 11,3$ Hz), respectivement. Par ailleurs, l'oléfine $\Delta^{9,10}$ est de configuration *Z* car le méthylène C-8 situé à proximité, donne un signal à 28,5 ppm dans le spectre RMN carbone.

De façon identique à **Sc1 (321)**, la configuration relative de la partie sesquiterpenol, *2R**, *4R**, *5S**, *6R**, *11R**, *12R**, a pu être déduite des corrélations observées par RMN NOESY ^1H - ^1H entre les protons H-13a/H-2, H-13b/H-14 et H-15a/H-4.

Les fragments sesquiterpenols de **Sc1 (321)** et **Sc2 (322)** présentent des déplacements chimiques très proches par RMN ^1H ($|\overline{X}(\delta_{\text{H}(\text{Sc1}-\text{Sc2}))}| = 0,2$ ppm et $s = \Delta\delta_{\text{H}(\text{Sc1}-\text{Sc2})} = 0,7$ ppm) et ^{13}C ($|\overline{X}(\Delta\delta_{\text{C}(\text{Sc1}-\text{Sc2}))}| = 1,5$ ppm et $s = \Delta\delta_{\text{C}(\text{Sc1}-\text{Sc2})} = 2,4$ ppm), très proches également de ceux des fragments sesquiterpenols de la

roridine E, ce qui nous a permis de déduire que les centres asymétriques de la partie sesquiterpénol de **Sc2** (**322**) ont les configurations absolues suivantes : $2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R$.

Par ailleurs, les spectres ECD théoriques ont été simulés pour la ($2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R, 3'R, 6'R, 12'S, 13'R$)-2',3'-dihydrosatratoxine H. Un seul conformère de basse énergie a été obtenu et optimisé par TDDFT (figure 155).

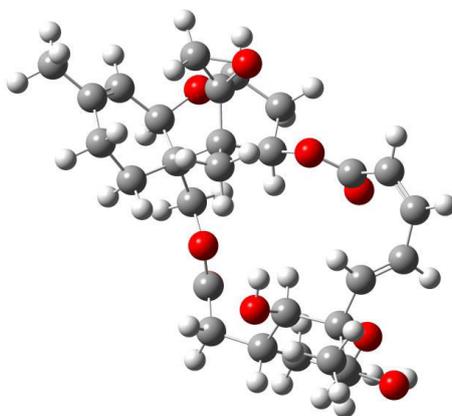


Figure 155. Structure du conformère de plus basse énergie pour le ($12'S$)-**Sc2** (100%).

La comparaison du spectre de dichroïsme circulaire expérimental avec les spectres ECD théoriques ne nous a malheureusement pas permis de déduire la configuration du centre asymétrique C-6' (figure 156).

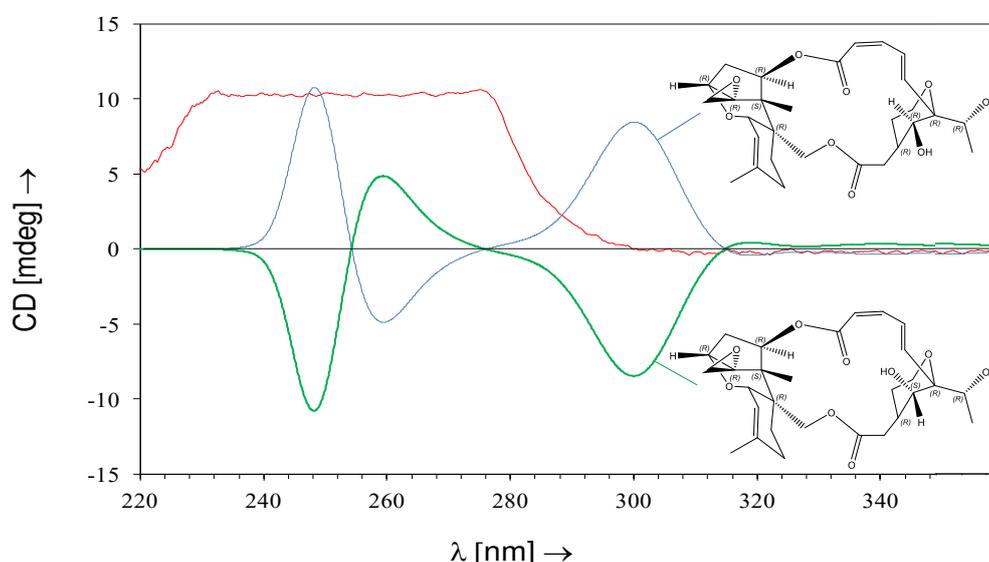
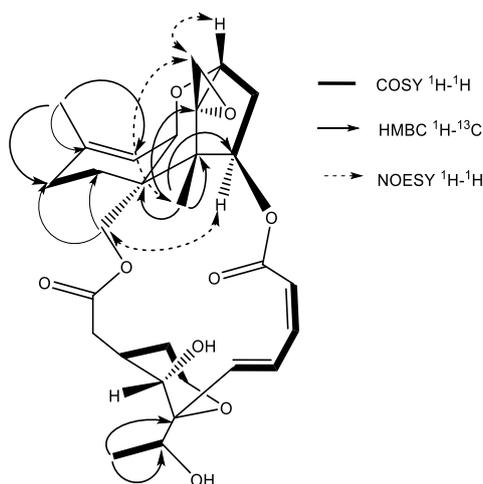


Figure 156. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de **Sc2** (en rouge) et spectres ECD théoriques associés à la ($2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R, 3'R, 6'R, 12'S, 13'R$)-2',3'-dihydrosatratoxine H (en vert) et à la ($2R, 4R, 5S, 6R, 11R, 12R, 3'R, 6'R, 12'R, 13'R$)-2',3'-dihydrosatratoxine H (en bleu) (MeOH).

Ainsi, **Sc2** est la 2',3'-dihydrosatratoxine H (**322**). Il s'agit, à notre connaissance, d'un produit naturel nouveau. Les corrélations RMN COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C et NOESY ^1H - ^1H sont reportées à la figure 157.

Figure 157. Corrélations RMN 2D principales de **Sc2** (**322**).

L'ensemble des données RMN 1D et 2D relatives au composé **Sc2** (**322**) est regroupé dans le tableau 35.

Tableau 35. Données RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) du composé **Sc2** (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz).

N°	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/mult./J (Hz)	COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
2	80,6, CH	3,76, <i>m</i>	3, 4	4, 5
3 α	35,4, CH	2,49, <i>dd</i> , 8,4, 15,1	3 β , 4	-
3 β		2,11, <i>m</i>	2, 3 α , 4	-
4	75,1, CH	5,98, <i>m</i>	2, 3	-
5	50,6, C _q	-	-	-
6	44,5, C _q	-	-	-
7 α	21,1, CH	1,87, <i>m</i>	8	-
7 β		1,92, <i>m</i>	8	-
8 α	28,4, CH	2,00, <i>m</i>	7	-
8 β		2,06, <i>m</i>	7	-
9	141,1, C _q	-	-	-
10	120,1, CH	5,41, <i>m</i>	16	-
11	71,4, CH	4,26, <i>q</i> , 6,5	-	-
12	65,7, C _q	-	-	-
13a	48,6, CH	2,87, <i>d</i> , 4,0	-	-
13b		3,09, <i>d</i> , 4,0	-	-
14	8,8, CH ₃	0,89, <i>s</i>	-	5, 6, 12
15a	66,0, CH	4,16, <i>d</i> , 12,5	15b	-
15b		4,32, <i>d</i> , 12,5	15a	-
16	23,3, CH ₃	1,73, <i>s</i>	10	8, 9, 10
1'	167,9, C _q	-	-	-
2'	73,8, CH ₂	3,27, <i>s</i>	-	-
3'	66,5, CH	3,76, <i>m</i>	4'	-
4' α	23,9, CH	2,38, <i>td</i> , 5,6, 13,3	4' β , 5' α , 5' β	-
4' β		2,14, <i>m</i>	3', 5' α , 5' β	-
5' α	61,3, CH	4,06, <i>td</i> , 2,7, 12,3	4' α , 4' β , 5' β	-
5' β		3,85, <i>m</i>	4' α , 4' β , 12'	-
6'	83,8, C _q	-	-	-
7'	131,6, CH	5,70, <i>dd</i> , 1,3, 16,5	8', 9'	9'
8'	132,9, CH	6,86, <i>ddd</i> , 1,5, 6,8, 16,5	7'	-
9'	146,0, CH	6,76, <i>ddd</i> , 1,5, 6,8, 11,4	7', 10'	-
10'	120,8, CH	5,91, <i>dd</i> , 1,2, 11,3	9'	-
11'	169,2, C _q	-	-	-
12'	60,5, CH	3,51, <i>s</i>	5'	-
13'	69,3, CH	3,76, <i>m</i>	14'	-
14'	17,1, CH ₃	1,07, <i>d</i> , 6,5	13'	6', 13'

De très nombreux trichothécènes macrocycliques et non-macrocycliques ont été isolés de sources naturelles²²⁸. Principalement isolés de cultures de champignons, notamment *Myrothecium* et *Stachybotrys* spp., les trichothécènes sont également recensés au niveau de plantes (du genre *Baccharis* notamment). De façon générale, les trichothécènes macrocycliques sont constitués d'un squelette tricyclique de type 12,13-époxytrichothécène (figure 158). Par ailleurs, quelques structures de type 10,13-cyclotrichothécane ont également été isolées de *Baccharis* et *Myrothecium*²²⁹ (figure 158).

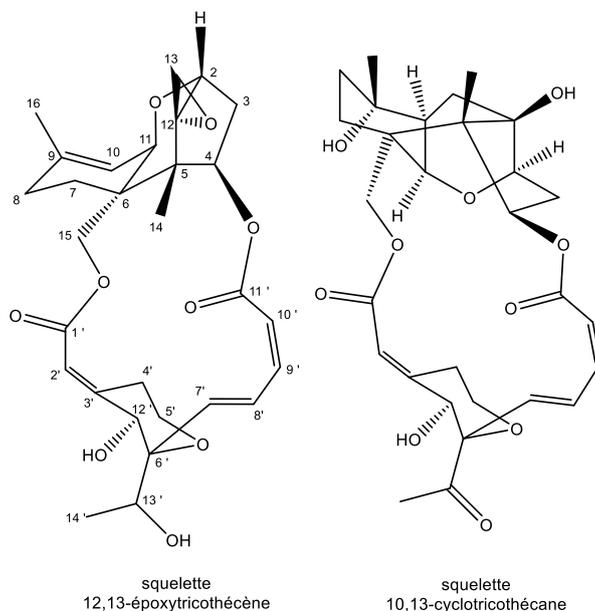


Figure 158. Exemples de squelettes de type 12,13-époxytrichothécène et 10,13-cyclotrichothécane.

Ces métabolites, potentiellement impliqués dans les interactions plantes-microorganismes (endophytisme ou symbiose), semblent intervenir dans le processus de détoxification de l'organisme hôte (initié par des enzymes de type époxyde hydrolase). En effet, les 12,13-époxytrichothécènes se réarrangent en structures de type 10,13-cyclotrichothécane beaucoup plus actives^{229b}.

III.3.1. Structures de Sc3–6

Les composés **Sc3** (323), **Sc4** (324) et **Sc5** (325) ont été isolés sous la forme de solides blancs. Les formules brutes associées ont été déduites des analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+)-SM (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$). Il s'agit de $C_{27}H_{36}NO_7$ pour **Sc3** (m/z 486,2486 ; $\Delta ppm = 1,2$), $C_{25}H_{34}NO_5$ pour **Sc4** (m/z 428,2430 ; $\Delta ppm = 1,6$) et $C_{22}H_{26}NO_3$ pour **Sc5** (m/z 386,2344 ; $\Delta ppm = 3,3$). L'ensemble des données spectroscopiques (RMN 1D, figure 160, 2D, rotations spécifiques et dichroïsme circulaire) et spectrométrique (SM, SM/SM), couplé aux données de la bibliographie, notamment celles relatives à *S. chartarum*²⁰², nous a permis de déduire qu'il s'agit de

²²⁸ a) Grove J. F. 1993, Macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.*, **5**, 429–448. b) de Carvalho M. P., Weich H., Abraham W.-R. 2016, Macrocyclic trichothecenes as antifungal and anticancer compounds. *Curr. Med. Chem.*, **23**, 23–35.

²²⁹ a) Habermehl G. 1989, Isolation and structure of new toxins from plants. *Pure Appl. Chem.* **61** (3), 377–380. b) Shen L., Jiao R. H., Ye Y. H., Wang X. T., Xu C., Song Y. C., Zhu H. L., Tan R. X. 2006, Absolute configuration of new cytotoxic and other bioactive trichothecene macrolides. *Chem. Eur. J.* **12**, 5596–5602.

l'acétate de 2 α -acétoxyastachybotrylactame (**247**), de l'acétate de stachybotrylactame (**246**) et de la stachybotrylactame (**245**) (figure 159).

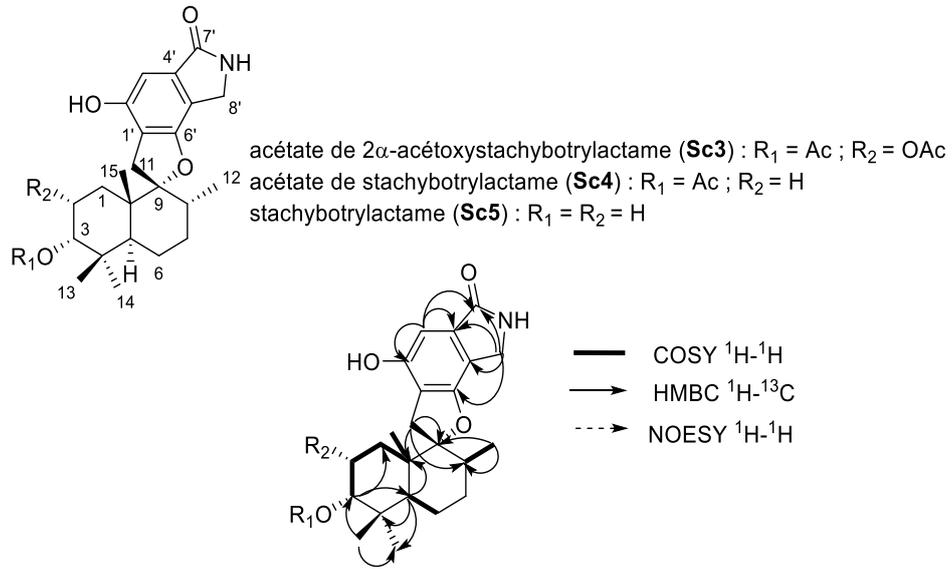


Figure 159. Structures des composés **Sc3**, **Sc4** et **Sc5** et corrélations RMN 2D principales.

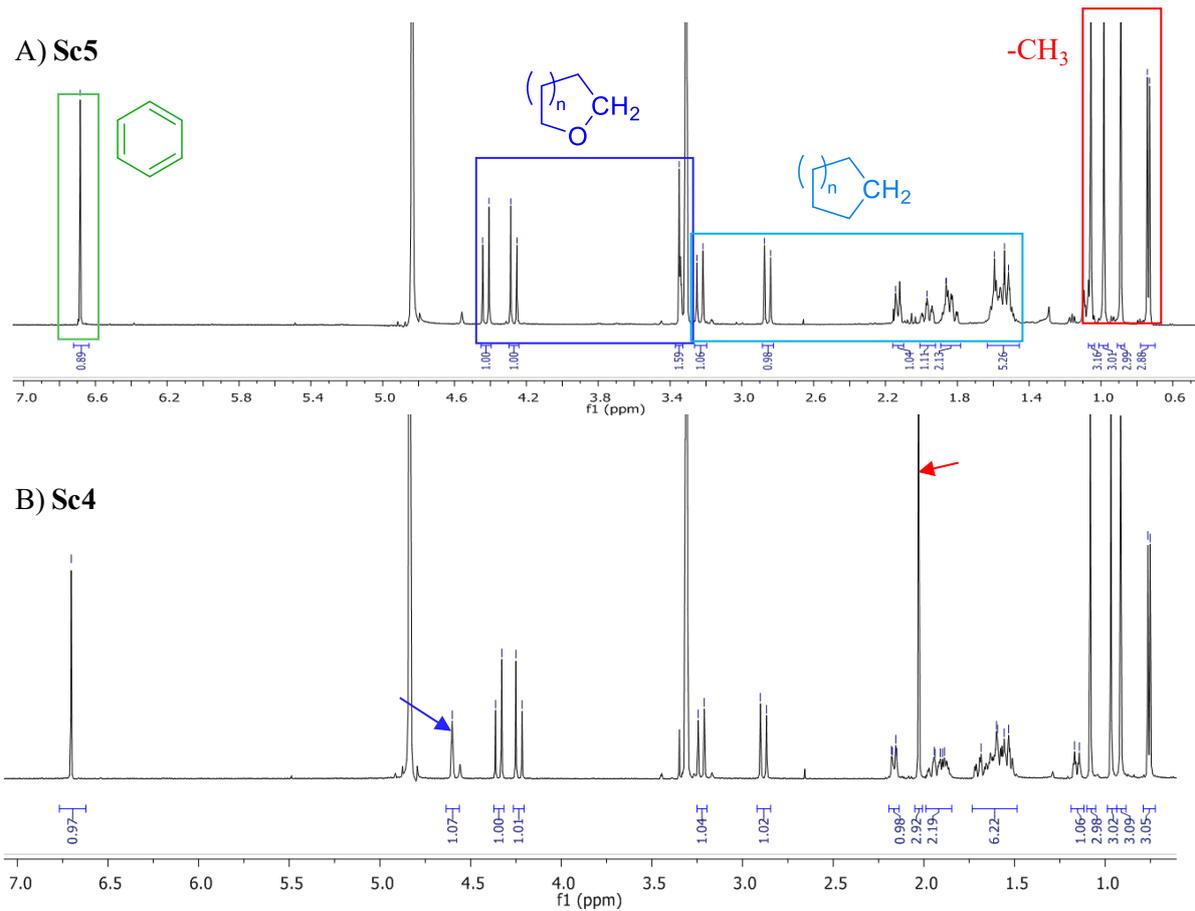


Figure 160. Spectres RMN ¹H (500 MHz, *d*₇-MeOH) de A) **Sc5**, B) **Sc4** et C) **Sc3**.

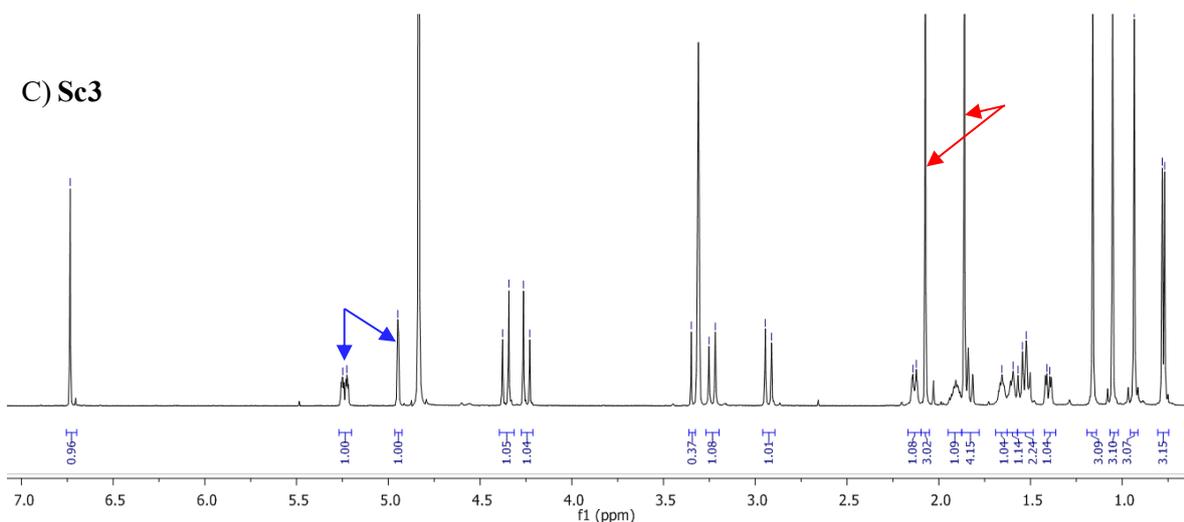


Figure 160 (suite). Spectres RMN ^1H (500 MHz, d_4 -MeOH) de A) **Sc5**, B) **Sc4** et C) **Sc3**.

Séréochimie

Les pouvoirs rotatoires de ces molécules sont de signe négatif (**Sc3** = $-5,4^\circ$ ($c = 0,6$) ; **Sc4** = $-0,6^\circ$ ($c = 0,3$) ; **Sc5** = -10° ($c = 0,5$)), tout comme celui de l'acétate de 2α -acétoxystachybotrylactame ($[\alpha]_D = -29$ ($c = 0,1$)). Ainsi, **Sc3** est l'acétate de 2α -acétoxystachybotrylactame (**247**), **Sc4** est l'acétate de stachybotrylactame (**246**) et **Sc5** est la stachybotrylactame (**245**), déjà isolés par ailleurs²⁰².

Les données RMN ^{13}C relatives aux composés **Sc3** (**323**), **Sc4** (**324**) et **Sc5** (**325**) sont reportées dans le tableau 36.

Tableau 36. Données RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 400 MHz) des composés **Sc3-5**.

N°	Sc3	Sc4	Sc5
	δ_c (ppm)/mult.	δ_c (ppm)/mult.	δ_c (ppm)/mult.
1	31,6, CH	25,9, CH ₂	25,4, CH ₂
2	69,6, CH	22,3, CH	22,1, CH
3	78,3, CH	79,6, CH	76,5, CH
4	39,1, Cq	37,8, Cq	38,6, Cq
5	41,9, CH	42,3, Cq	41,3, CH
6	21,4, CH ₂	23,4, CH ₂	26,0, CH
7	32,0, CH	32,2, CH	32,2, CH ₂
8	37,8, CH	38,2, CH	38,4, CH
9	99,1, Cq	99,6, Cq	99,7, Cq
10	44,8, Cq	43,5, Cq	43,5, Cq
11	32,9, CH	32,9, CH	33,0, CH
12	15,7, CH ₃	15,9, CH ₃	15,9, CH ₃
13	28,3, CH ₃	28,4, CH ₃	28,9, CH ₃
14	22,0, CH ₃	21,9, CH ₃	23,0, CH ₃
15	17,2, CH ₃	16,4, CH ₃	16,3, CH ₃
16	172,3, Cq	172,4, Cq	-
17	20,9, CH ₃	21,1, CH ₃	-
18	172,4, Cq	-	-
19	20,8, CH ₃	-	-
1'	118,6, Cq	118,9, Cq	119,0, Cq
2'	155,5, Cq	155,4, Cq	155,0, Cq
3'	102,5, Cq	102,3, CH	102,1, Cq
4'	116,2, Cq	116,2, Cq	116,7, Cq
5'	135,0, CH	134,9, CH	134,7, CH
6'	157,4, Cq	157,6, Cq	157,8, Cq
7'	173,9, Cq	174,0, Cq	174,1, Cq
8'	43,8, CH	43,6, CH	43,9, CH

Les données RMN ^1H relatives aux composés **Sc3** (**323**), **Sc4** (**324**) et **Sc5** (**325**) sont reportées dans le tableau 37.

Tableau 37. Données RMN 1D (^1H et ^{13}C) du composé **Sc4** (*d*-MeOH, 400/100 MHz) et comparaison avec les données RMN 1D de l'acétate de stachybotrylactame (CDCl_3)²⁰².

N°	Sc3	Sc4	Sc5
	δ_{H} (ppm)/ mult./J (Hz)	δ_{H} (ppm)/ mult./J (Hz)	δ_{H} (ppm)/ mult./J (Hz)
1A	1,84, <i>m</i>	1,64, <i>m</i>	1,83, <i>m</i>
B	1,30, <i>m</i>	-	-
2	5,24, <i>dq</i> , 2,5, 12,5	1,58, <i>m</i>	1,54, <i>m</i>
3	4,95, <i>s</i>	4,60, <i>s</i>	3,35, <i>s</i>
4	-	-	-
5	2,13, <i>bd</i> , 9,1	2,16, <i>m</i>	2,13, <i>m</i>
6a	1,57, <i>m</i>	1,94, <i>m</i>	1,52, <i>m</i>
6b	-	-	1,97, <i>m</i>
7a	1,65, <i>m</i>	1,60, <i>m</i>	1,59, <i>m</i>
7b	1,52, <i>m</i>	1,56, <i>m</i>	-
8	1,9, <i>m</i>	1,91, <i>m</i>	1,86, <i>m</i>
11A	2,93, <i>d</i> , 17,1	2,89, <i>d</i> , 17,0	2,89, <i>d</i> , 16,9
11B	3,23, <i>d</i> , 17,1	3,23, <i>d</i> , 17,0	3,24, <i>d</i> , 16,9
12	0,78, <i>d</i> , 6,5	0,76, <i>d</i> , 6,5	0,74, <i>d</i> , 6,5
13	1,05, <i>s</i>	0,97, <i>s</i>	0,98, <i>s</i>
14	0,93, <i>s</i>	0,92, <i>s</i>	0,89, <i>s</i>
15	1,16, <i>s</i>	1,08, <i>s</i>	1,06, <i>s</i>
17	1,86, <i>s</i>	2,05, <i>s</i>	-
19	2,07, <i>s</i>	-	-
3'	6,73, <i>s</i>	6,70, <i>s</i>	6,68, <i>s</i>
8'A	4,24, <i>d</i> , 17,2	4,24, <i>d</i> , 17,2	4,27, <i>d</i> , 17,4
8'B	4,35, <i>d</i> , 17,2	4,35, <i>d</i> , 17,2	4,42, <i>d</i> , 17,4

Le composé **Sc6** (**326**) a été isolé sous la forme d'un solide blanc. Sa formule brute, $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{N}$, a été déduite de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode positif HRESI(+) MS (ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 368,2242 ; $\Delta\text{ppm} = 4,4$). Les données spectrales (MS , HRMS, RMN), couplées aux données de la bibliographie, notamment celles relatives à *S. chartarum*, nous a permis de déduire que **Sc6** (**326**) possède une structure plane identique à celle de la chartarutine G (**308**)²¹⁸ (figure 161).

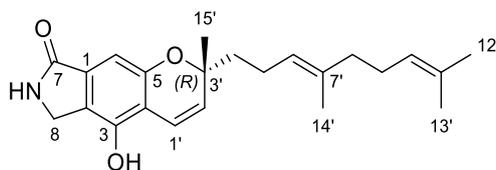


Figure 161. Structures de la chartarutine G (**308**)²¹⁸.

Cette hypothèse est appuyée par la présence dans les spectres RMN ^1H et ^{13}C des éléments suivants (figure 162) :

- Huit signaux à δ_{C} 173,8 (1C, C-7), 156,0 (1C, C-3), 149,2 (1C, C-5), 133,7 (1C, C-1), 124,1 (1C, C-2), 114,7 (1C, C-4), 103,5 (1C, C-6), 44,6 (1C, C-8) ppm et deux signaux à δ_{H} 6,71 (1H, *s*, H-6) et 4,30 (2H, *s*, H₂-8) ppm caractéristiques du fragment isoindolinone,

- Deux signaux à δ_c 131,2 (1C, C-2') et 118,3 (1C, C-1') ppm ainsi que deux signaux à δ_H 6,80 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-1') et 5,74 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-2') ppm caractéristiques des protons éthyléniques du noyau chromène du fragment pyranoisindolinone,
- Deux signaux à δ_c 26,5 (1C, C-15') et à δ_H 1,38 (3H, *s*, H₃-15') ppm caractéristiques du méthyle C-15' en position C-3',
- Deux signaux à δ_c 125,4 (1C, C-10') et δ_c 125,3 (1C, C-7') ppm ainsi que deux signaux à δ_H 5,12 (1H, *m*, H-6') et 5,07 (1H, *m*, H-10') caractéristiques des deux protons éthyléniques,
- Trois signaux à δ_c 25,8 (1C, C-12'), δ_c 17,7 (1C, C-13') et δ_c 16,0 (1C, C-14') ainsi que les trois signaux à δ_H 1,64 (3H, *s*, H₃-12'), 1,57 (3H, *s*, H₃-13') et 1,56 (3H, *s*, H₃-14') caractéristiques des méthyles éthyléniques de la chaîne prényle.

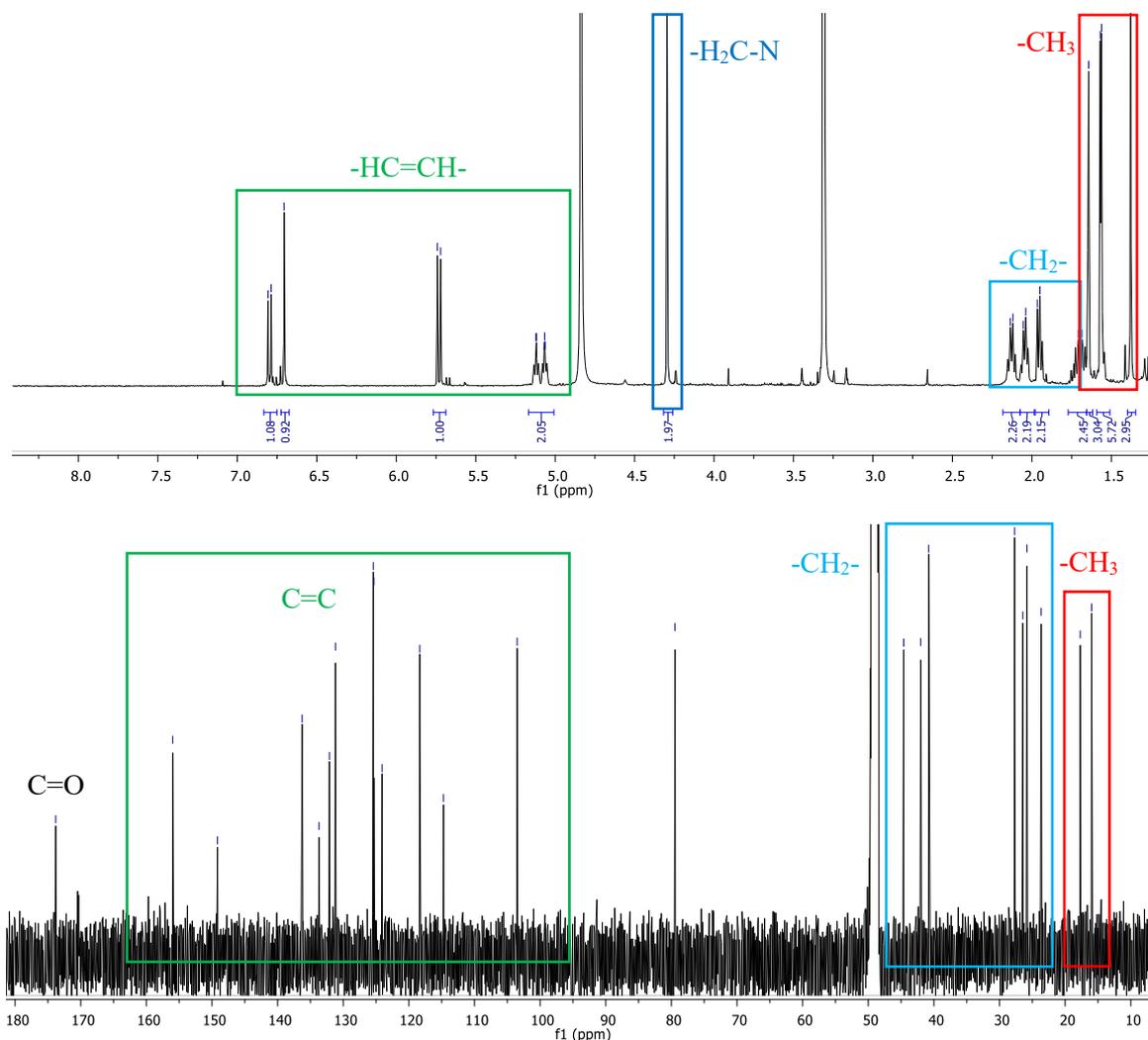


Figure 162. Spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de Sc6 (*d*₄-MeOH).

Stéréochimie

La double liaison $\Delta^{1,2}$ est de configuration *Z* ($^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 10,1$ Hz). Les déplacements chimiques par RMN ^1H et ^{13}C des méthyles éthyléniques (δ_c 25,8-16,0 ; δ_H 1,64-1,56) nous ont permis de déduire que les doubles liaisons $\Delta^{6',7'}$ et $\Delta^{10',11}$ sont de configuration *E*.

Les spectres ECD théoriques ont été simulés pour la (3'*S*)- chartarutine G. Trois conformères de plus basse énergie ont été obtenus et optimisés par TDDFT (figure 163).

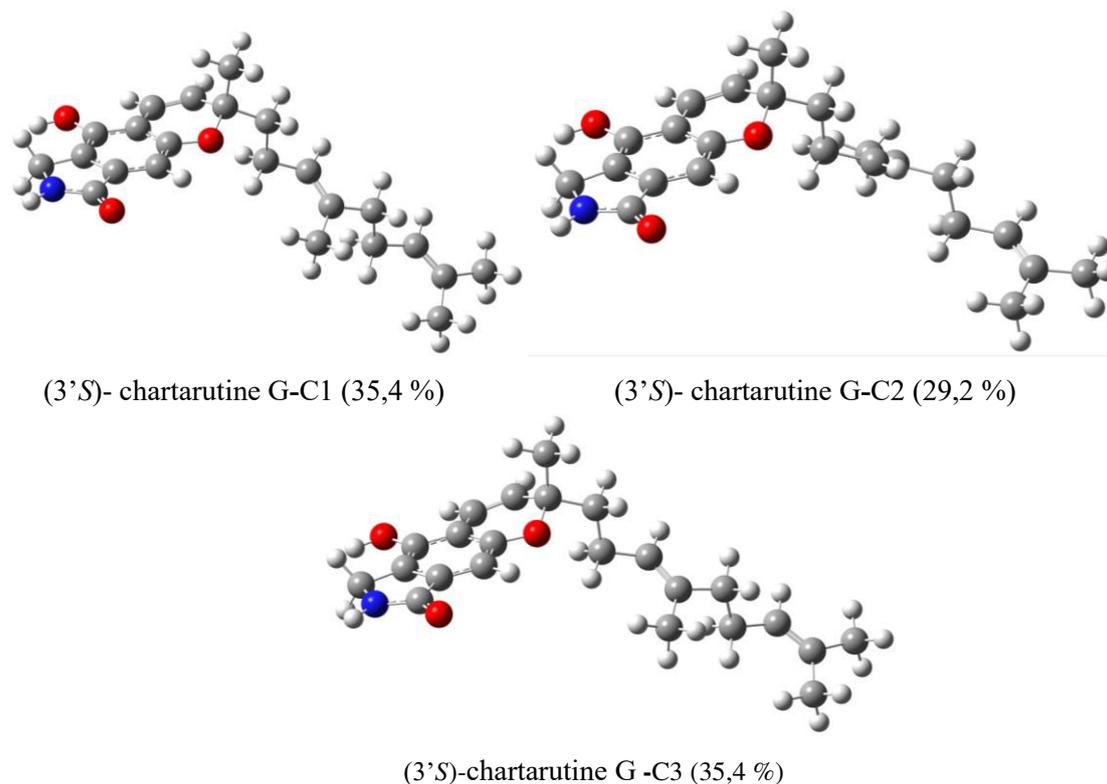


Figure 163. Structures des conformères de plus basse énergie pour la (3'*S*)-chartarutine G.

La comparaison du spectre de dichroïsme circulaire expérimental avec les spectres ECD théoriques nous a permis de déduire que le centre asymétrique C-3' est de configuration *S* (figure 164).

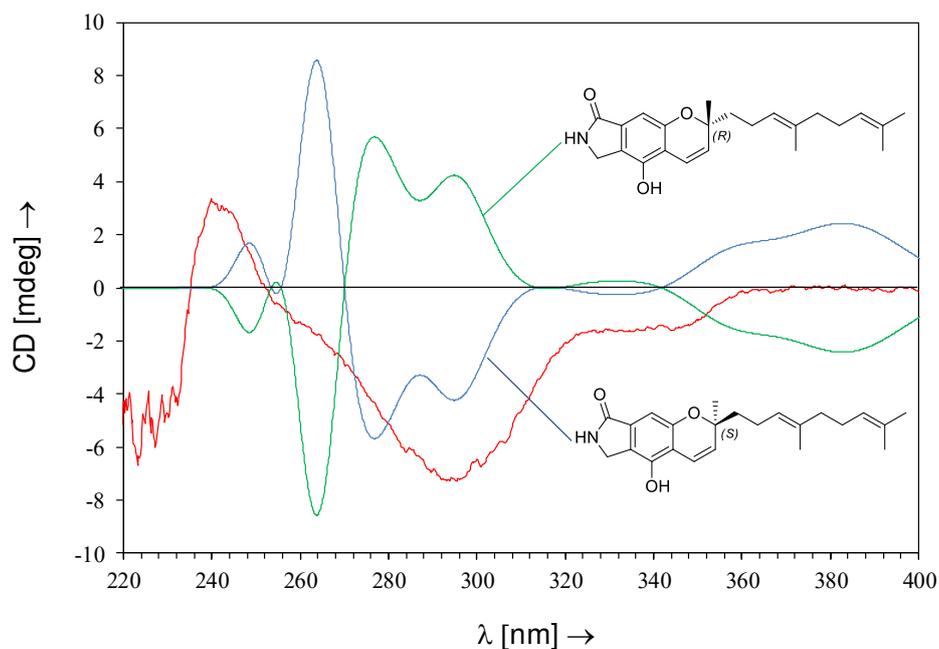


Figure 164. Spectre de dichroïsme circulaire expérimental de **Sc6** (en rouge) et spectres ECD théoriques associés à la (3'*R*)-chartarutine G (en vert) et à la (3'*S*)-chartarutine G (en bleu) (MeOH).

Ce résultat est en accord avec la règle empirique de Crabbe²¹⁸. Cette dernière prévoit pour les noyaux de type α -chromène un effet Cotton positif vers 280 nm pour un centre asymétrique de configuration *R* et un effet Cotton négatif vers 280 nm pour une configuration *S*. Le spectre de dichroïsme circulaire de **Sc6 (326)** présente un fort effet Cotton négatif vers 290 nm, caractéristique d'un centre asymétrique C-3' de configuration *S*, une stéréochimie opposée à celle décrite pour la chartarutine G (**308**)²¹⁸. De plus, le pouvoir rotatoire spécifique de **Sc6** ($\alpha_D = -0,06$, $c = 0,3$) est de signe opposé à celui de la chartarutine G ($\alpha_D = +54,3$, $c = 14$).

Ainsi, **Sc6 (326)** est l'*épi*-chartarutine G (figure 165). Il s'agit à notre connaissance d'un produit naturel nouveau.

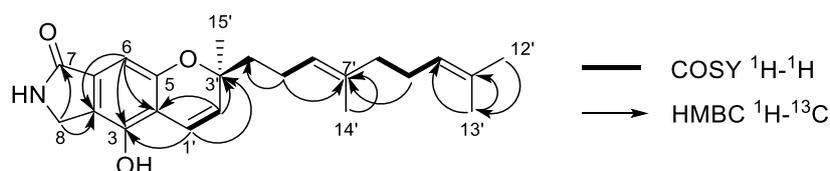


Figure 165. Structure et corrélations RMN 2D principales de **Sc6 (326)**.

Les données RMN 1D relatives au composé **Sc6 (326)** ainsi que les données RMN 1D associées à la chartarutine G (**308**)²¹⁸ sont regroupées dans le tableau 38.

Tableau 38. Données RMN 1D (¹H et ¹³C) du composé **Sc6** (*d*₄-MeOH, 400/100 MHz) et comparaison avec les données RMN 1D de la chartarutine G²¹⁸.

N°	Sc6		Chartarutine G	
	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)	δ_c (ppm)/mult.	δ_H (ppm)/ mult./J (Hz)
1	133,7, Cq	-	133,9, Cq	-
2	124,1, Cq	-	123,2, Cq	-
3	156,0, Cq	-	154,2, Cq	-
4	114,7, Cq	-	112,7, Cq	-
5	149,2, Cq	-	148,2, Cq	-
6	103,5, CH	6,71, <i>s</i>	101,8, CH	6,50, <i>s</i>
7	173,8, Cq	-	170,3, Cq	-
8	44,6, CH ₂	4,30, <i>s</i>	43,4, CH ₂	4,18, <i>s</i>
1'	118,3, CH	6,80, <i>d</i> , 10,1	117,7, CH	6,75, <i>d</i> , 10
2'	131,2, CH	5,74, <i>d</i> , 10,1	130,2, CH	5,76, <i>d</i> , 10
3'	79,4, Cq	-	78,3, Cq	-
4'	42,0, CH ₂	1,70, <i>m</i>	40,5, CH ₂	1,63, <i>m</i>
5'	23,7, CH ₂	2,12, <i>m</i>	22,5, CH ₂	2,03, <i>m</i>
6'	125,3, CH	5,12, <i>m</i>	124,2, CH	5,09, <i>m</i>
7'	136,3, Cq	-	135,0, Cq	-
8'	40,8, CH ₂	1,96, <i>m</i>	39,6, CH ₂	1,90, <i>m</i>
9'	27,7, CH ₂	2,04, <i>m</i>	26,8, CH ₂	1,99, <i>m</i>
10'	125,4, CH	5,07, <i>m</i>	124,6, CH	5,04, <i>m</i>
11'	132,1, Cq	-	131,1, Cq	-
12'	25,8, CH ₃	1,64, <i>s</i>	25,9, CH ₃	1,61, <i>s</i>
13'	17,7, CH ₃	1,57, <i>s</i>	18,0, CH ₃	1,53, <i>s</i>
14'	16,0, CH ₃	1,56, <i>s</i>	16,2, CH ₃	1,52, <i>s</i>
15'	26,5, CH ₃	1,38, <i>s</i>	26,1, CH ₃	1,34, <i>s</i>

La biosynthèse de l'*épi*-chartarutine G (**326**) peut être expliquée par une voie mixte entre la voie du mévalonate et des polycétides. Par la suite, il y a formation des chartarutines A-D (**302-305**) puis des

chartarutines G-H (**308-309**) (schéma 26). Dans notre cas, nous obtenons l'énantiomère de la chartarutine G décrite, tandis que ces mêmes auteurs ont trouvé une chartarutine E (**306**) de configuration 3'R et les chartarutines F-H (**307-309**) isolées de configuration 3'S. Cette conversion n'est probablement pas sous contrôle enzymatique, ce qui explique la disparité de la stéréochimie des centres stéréogènes. Ainsi, les chartarutines F-H (**307-309**) sont probablement converties *in situ* et sont peut-être des produits de dégradation.

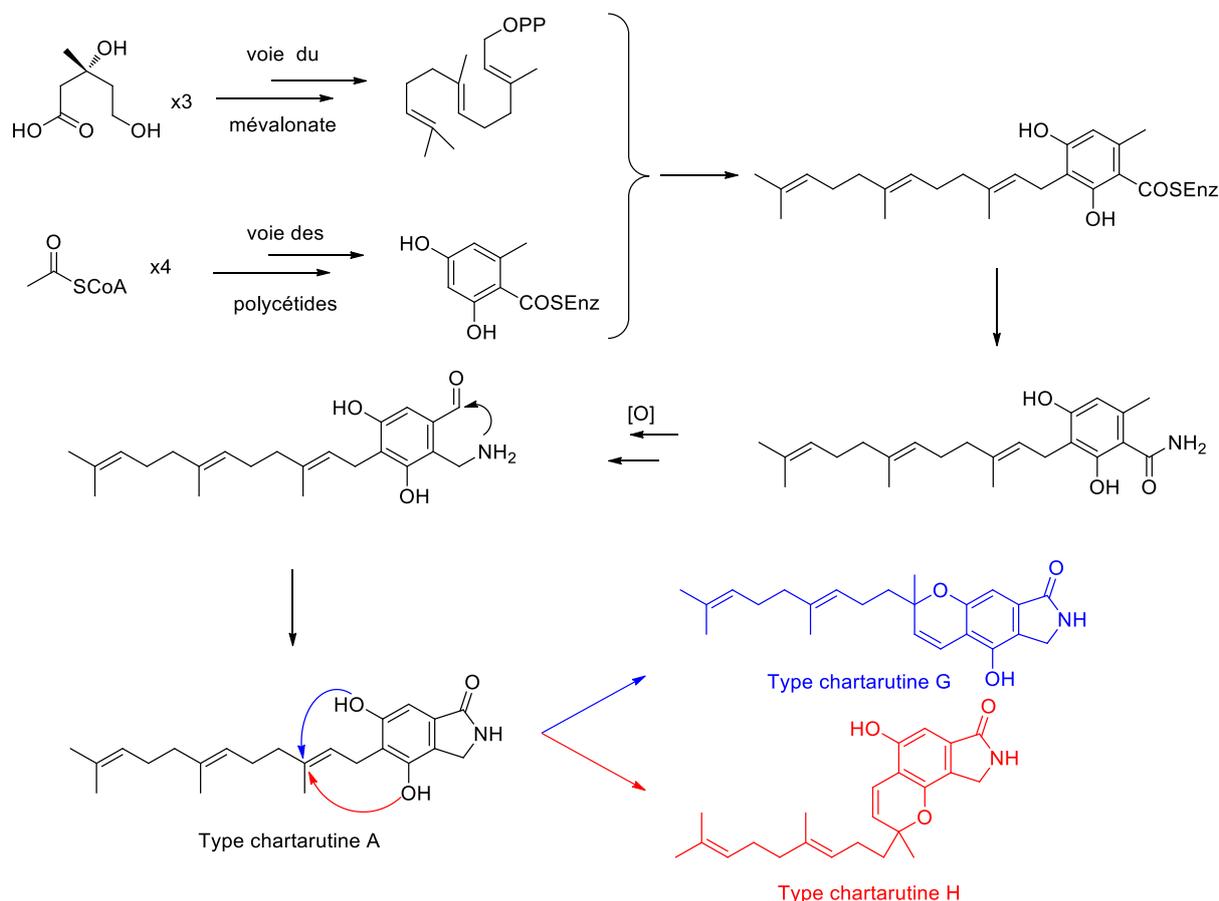


Schéma 26. Biosynthèse hypothétique de la chartarutine A et sa conversion en chartarutine G-H.

III.4. Activités antimicrobiennes

Les composés **Sc1-6** (**321-326**) ont été évalués pour leurs propriétés antibactériennes, en milieu liquide et à trois différentes concentrations (25, 50 et 100 μM), en collaboration avec l'équipe du Dr. Laurent Boyer du Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) de l'Université de Nice Sophia Antipolis. Les bactéries ciblées sont *E. coli* (J96), ainsi que trois souches de *S. aureus*, RN4220, S25 à l'origine d'une inflammation osseuse (ostéite) et prélevée dans le milieu hospitalier, et Lug1799, une souche résistante à la méthicilline (tableau 39). Pour les composés **Sc3-6** (**323-326**), il s'agit de la première fois que des propriétés antibactériennes sont évaluées.

Tableau 39. Activités antibactériennes des composés **Sc1-6** (les résultats sont exprimés en % de survie).

Molécule	C (μ M)	<i>E. coli</i> (J96)	<i>S. aureus</i> (RN4220)	<i>S. aureus</i> (S25)	<i>S. aureus</i> (Lug1799)
Sc1	100				
	50	-	-	-	-
	25				
Sc2	100				
	50	-	-	-	-
	25				
Sc3	100		70% survie	20% survie	
	50	-	-	55% survie	-
	25		-	-	
Sc4	100		< 5% survie	< 3% survie	< 3% survie
	50	-	< 3% survie	< 3% survie	-
	25		-	-	-
Sc5	100		< 3% survie	< 3% survie	60% survie
	50	-	-	-	-
	25		-	-	-
Sc6	100		50% survie		
	50	-	-	-	-
	25		-		

Les satratoxines **Sc1** (**321**) et **Sc2** (**322**) ne présentent pas d'activité sur l'ensemble des souches testées. L'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame **Sc3** (**323**), s'est avéré légèrement actif sur *S. aureus* RN4220 (réduction de 30% de la population bactérienne) à 100 μ M et très actif sur la souche S25 avec réduction de 80% et 45% de la population bactérienne à 100 μ M et 50 μ M, respectivement. L'acétate de stachybotrylactame **Sc4** (**324**) s'est avéré très actif à 100 μ M sur les souches RN4220 et S25 de *S. aureus* (100% de mort de la population bactérienne). **Sc4** (**324**) s'est également révélé très actif à 50 μ M sur les souches RN4220 et S25. **Sc5** (**325**) présente une excellente activité inhibitrice sur les souches RN4220 et S25 (100% de mort de la population bactérienne) et possède une activité significative sur la souche Lug1799 (40% de mort de la population bactérienne) à 100 μ M. **Sc4** (**324**) semble être le composé le plus actif de cette série. Il s'avère que le groupement acétoxy en position C-3 soit important pour l'activité antibactérienne puisque les composés **Sc4** (**324**) et **Sc5** (**325**) sont plus actifs que **Sc3** (**323**). En revanche, le deuxième groupement acétoxy en position C-2 semble diminuer légèrement l'activité antibactérienne puisque **Sc4** (**324**) est plus actif que **Sc5** (**325**).

Enfin, **Sc6** (**326**) l'*épi*-chartarutine G, possède une activité significative uniquement sur la souche RN4220 de *S. aureus* avec une induction de la mort de près de 50% de la population bactérienne à 100 μ M. Ces résultats sont en accord avec les faibles activités observées lors de l'évaluation des propriétés antibactériennes préliminaires.

De façon surprenante, les satratoxines **Sc1** (**321**) et **Sc2** (**322**) se sont avérés totalement inactives sur les bactéries testées. Les différents travaux menés sur les trichothécènes macrocycliques ont révélé que ces mycotoxines présentent en général une large gamme d'activités biologiques (antibactérienne,

antifongique, insecticide, phytotoxicité). Elles sont impliquées dans un grand nombre de mycotoxicoses humaines et animales²³⁰.

Les perspectives pour ces travaux concernent : (i) l'isolement et la détermination structurale de l'ensemble des métabolites de *S. chartarum* cultivé en milieu solide et liquide, (ii) la comparaison fine du métabolisme de souches terrestres et marines de *S. chartarum*, et (iii) l'évaluation des activités biologiques des différentes molécules notamment les propriétés cytotoxiques de **Sc1 (321)** et **Sc2 (322)**.

IV. Conclusion

Stachybotrys chartarum est un champignon retrouvé dans le milieu terrestre et marin. En collaboration avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin et la société BioPreserv à Grasse, nous nous sommes intéressés aux métabolites de *Stachybotrys chartarum* isolé d'*Aplysina cavernicola* pour une application dans le domaine des biocides. Les travaux menés sur une souche de *S. chartarum*, cultivée sur un milieu solide de type Whickerham's, a conduit à l'isolement et à la caractérisation de deux nouvelles molécules, la 2',3'-dihydrosatratoxine H (**322**) et l'épi-chartarutine G (**326**), et quatre molécules répertoriées auparavant, la satratoxine H (**227**), l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame (**247**), l'acétate de stachybotrylactame (**246**) ainsi que la stachybotrylactame (**245**). C'est la première fois que des tricothécènes macrocycliques, la satratoxine H (**227**) et la 2',3'-dihydrosatratoxine H (**322**), sont isolés d'une souche marine de *Stachybotrys chartarum*. Les différents métabolites isolés ont été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli*. Seuls l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame (**247**), l'acétate de stachybotrylactame (**246**), la stachybotrylactame (**245**) et l'épi-chartarutine G (**326**) se sont avérés légèrement actif sur au moins une des trois souches de *S. aureus* à 100 μ M. Plusieurs métabolites restent à isoler et caractériser. Une comparaison fine du métabolisme de souches terrestres et marines doit être entreprise. Il conviendrait également d'évaluer les propriétés cytotoxiques de la satratoxine H (**227**) et de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (**322**).

²³⁰ Grove J. F. 1988, Non-macrocyclic tricothecenes. *Nat. Prod. Rep.*, **5** (2), 187–209.

Conclusion générale

La Méditerranée, dont la surface ne représente que 0,8 % de la superficie des océans, contiendrait 4 à 18 % de la biodiversité marine mondiale, dont un quart des espèces sont endémiques. Plusieurs macroorganismes marins méditerranéens n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure et sont la source potentielle de métabolites bioactifs nouveaux. Par ailleurs, l'avènement de nouvelles méthodes analytiques, telles que celles qui mettent en jeu le dichroïsme circulaire et les calculs des spectres de dichroïsme circulaire électroniques (ECD) par TDDFT pour résoudre la stéréochimie de certaines molécules ou encore dernièrement les analyses par réseau de similarité moléculaire, basées sur la spectrométrie de masse en tandem, permettent d'étudier sous un nouvel angle les métabolites d'organismes marins ayant déjà fait l'objet ou non d'études. En outre, plusieurs métabolites bioactifs issus de macroorganismes marins semblent être produits par les microorganismes qui leurs sont associés. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la biodiversité et à la chimiodiversité : (i) d'invertébrés marins méditerranéens échantillonnés en Espagne et au Maroc, (ii) de champignons marins cultivables associés aux éponges méditerranéennes *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, pour une valorisation potentielle et de façon non exclusive dans le domaine des antimicrobiens.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une algue verte de Méditerranée relativement bien étudiée depuis les années 90, notamment par notre équipe, *Caulerpa taxifolia*. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation d'une molécule déjà répertoriée, la caulerpénine et quatre nouvelles molécules, le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle, le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle, le (*Z*)- α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle et l'acide (*Z*)- α -sulfooxycinnamique. Le (*Z*)-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle et le (*Z*)-*m*-hydroxy-*p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle semblent avoir été isolés par le passé mais incorrectement élucidés. Du point de vue écologique, la production de dérivés aromatiques sulfatés semble être une caractéristique commune des algues qui présentent une organisation cœnocytaire. Ils permettent aux algues de se défendre lorsqu'elles sont agressées et blessées. Dans le cas de *C. taxifolia*, le rôle des dérivés sulfatés et non sulfatés reste à étudier.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une ascidie et de deux spongiaires de méditerranée, *Polysyncraton* sp., *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896) et *Crambe crambe* (Schmidt, 1862), respectivement. Parmi les ascidies, très peu de métabolites ont été décrits d'espèces du genre *Polysyncraton* alors qu'il s'agit du deuxième genre le plus représenté chez les Didemnidae. Par ailleurs, les espèces de Méditerranée appartenant genre *Polysyncraton* n'ont, à notre connaissance, fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'un échantillon de *Polysyncraton* sp. collecté à Punta Salina (Espagne) en 2012. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatre nouvelles molécules, les bolascidines A, B, C et D, qui présentent la particularité d'être constituées de deux têtes polaires, identiques ou différentes de type phosphocholine ou phosphoéthanolamine, et d'une chaîne alkyle centrale monohydroxylée et polyinsaturée. Il s'agit de métabolites de type bolaamphiphile isolés pour la première fois, dont il n'existe pas, à notre connaissance, d'équivalents naturels ou synthétiques. Les

analyses par réseau de similarité moléculaire menées sur l'extrait brut organique de *Polysyncraton* sp. nous ont également permis de mettre en évidence la présence de nombreux autres dérivés appartenant à cette nouvelle famille de métabolites. Des études sont en cours pour déterminer la stéréochimie de la position C-7 substituée par une fonction alcool. Par ailleurs, il est fort probable que ces molécules soient structurées en solution. La recherche d'une organisation supramoléculaire sera également entreprise. Le rôle écologique des bolascidines A, B, C et D reste à élucider. Ils pourraient permettre à l'ascidie de lubrifier sa surface pour prévenir l'adhésion d'organismes ou encore entrer en jeu dans le système nerveux de l'espèce.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'*Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896), une éponge appartenant à l'ordre Verongiida. Les éponges appartenant à cet ordre produisent différentes classes de dérivés bromotyrosines aux propriétés biologiques d'intérêt potentiellement valorisables dans le domaine des antitumoraux, des antifoulings et des antimicrobiens. Parmi les éponges de Méditerranée appartenant à l'ordre Verongiida, seules *Aplysina aerophoba* et *Aplysina cavernicola* ont fait l'objet de nombreuses études. L'éponge méditerranéenne, *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896), n'avait, à notre connaissance, fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation complète d'une molécule déjà répertoriée, la psammaline A, isolée de plusieurs éponges de l'ordre Verongiida et un nouveau métabolite, la 4-O-sulfatocyclobispsammaline A. Ce type de dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire sont rares. Plusieurs métabolites restent à isoler et à caractériser. Par ailleurs, le rôle écologique des dérivés sulfatés et non sulfatés des dérivés bromotyrosines de haut poids moléculaire reste à élucider.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux métabolites d'une éponge de Méditerranée appartenant à l'ordre Poecilosclerida relativement bien étudiée depuis les années 90, notamment par notre équipe, *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). Plusieurs éponges appartenant aux ordres Poecilosclerida et Axinellida produisent différents types d'alcaloïdes guanidiniques et en particulier les crambescines et les crambescidines. Bien que les crambescidines présentent de bonnes propriétés biologiques antitumorales, antivirales et antimicrobiennes, les études relatives aux dérivés crambescines, spécifiquement les propriétés biologiques associées, sont peu nombreuses en raison des difficultés rencontrées lors de l'étape d'isolement. Les travaux menés ont conduit à l'isolement et à la caractérisation complète d'une molécule déjà répertoriée, la crambescine A2 364, ainsi que de trois nouvelles molécules, les crambescines C1 424, C1 438 et C1 452.

Pour l'ensemble des métabolites isolés, le (ou les) organisme(s) producteur(s) reste(nt) à explorer. Une origine microbienne, bactérienne et/ou fongique, n'est pas exclue et reste à étudier.

Dans ce contexte et dans un troisième temps, nous sommes intéressés pour la première fois, en étroite collaboration avec la *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT) de l'Université de Turin, aux communautés fongiques cultivables associées à trois éponges méditerranéennes, *Aplysina cavernicola*, *Phorbas tenacior* et *Crambe crambe*, en tant que sources potentielles de métabolites valorisables dans le domaine des antimicrobiens. Au total, 68 souches ont pu être isolées et identifiées. Parmi les

champignons obtenus, une espèce, *Stachybotrys chartarum* issue de l'éponge *A. cavernicola*, a particulièrement retenu notre attention du fait de l'abondance de métabolites secondaires produits. *Stachybotrys chartarum* est un champignon retrouvé dans le milieu terrestre et marin. Les travaux menés sur *Stachybotrys chartarum*, cultivé sur un milieu solide, a conduit à l'isolement et à la caractérisation de deux nouvelles molécules, la 2',3'-dihydrosatratoxine H et l'épi-chartarutine G, et de quatre molécules répertoriées auparavant, la satratoxine H, l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame, l'acétate de stachybotrylactame ainsi que la stachybotrylactame. C'est la première fois que des tricothécènes macrocycliques, la satratoxine H et la 2',3'-dihydrosatratoxine H, sont isolés d'une souche marine de *Stachybotrys chartarum*. Plusieurs métabolites restent à isoler et caractériser. Une comparaison fine du métabolisme de souches terrestres et marines sera entreprise.

Les métabolites ont été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-kinases, anti-inflammatoires et cytotoxiques. Pour *Caulerpa taxifolia*, le (Z)-p-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle s'est avéré légèrement actif vis-à-vis d'*E. coli* et le (Z)-m-hydroxy-p-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle s'est révélé faiblement actif contre *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*. Pour *Polysyncraton* sp., les bolascidines C et D, ne présentent aucune activité anti-kinases, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques significatives. L'évaluation des propriétés anti-acétylcholinestérase et anti-phospholipases est actuellement en cours. Pour *Hexadella racovitzai* (Topsent, 1896), la 4-O-sulfatocyclobispsammaphline A possède de bonnes propriétés antibactériennes et des activités anti-inflammatoires et cytotoxiques non significatives. Pour *Crambe crambe* (Schmidt, 1862), les différents composés se sont avérés particulièrement actifs sur *E. coli* et *S. aureus* à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. Les crambescines A2 364, C1 424 et C1 438 ne sont pas cytotoxiques sur les lignées cellulaires U2OS (ostéosarcome), Jurkat A3 (leucémie) et RPE1 (épithélium de la rétine). En revanche, la crambescine C1 452 présente une très légère cytotoxicité sur les mêmes lignées cellulaires saines et tumorales. Par ailleurs, les molécules ne présentent pas de propriétés anti-inflammatoires significatives. Enfin, pour *Stachybotrys chartarum*, seuls l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame, l'acétate de stachybotrylactame, la stachybotrylactame et l'épi-chartarutine G se sont avérés légèrement actifs sur au moins une des trois souches de *S. aureus* à 100 μM . L'évaluation des propriétés cytotoxiques de la satratoxine H et de la 2',3'-dihydrosatratoxine H est en cours.

Ces travaux de thèse renforcent de nouveau l'intérêt des études dédiées aux macro- et microorganismes marins méditerranéens pour tenter de répondre à des questions d'écologie chimique mais également pour découvrir de nouvelles molécules bioactives potentiellement valorisables dans différents domaines d'intérêt dans le cadre d'une exploitation raisonnée des ressources naturelles.



$\rho \left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot T + f$

$e^{i\pi} + 1 = 0$

THÈSE DE DOCTORAT

Valorisation de biocides d'invertébrés marins Méditerranéens

Tome II

Estelle SFECCI

Institut de Chimie de Nice (ICN), UMR 7272 CNRS

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Chimie
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Mohamed Mehiri

Soutenue le : 4 juin 2018

Devant le jury, composé de :

Marie-Lise Bourguet-Kondracki, DR, Muséum
d'Histoire Naturelle, Paris

Joël Boustié, Pr, Université de Rennes 1

Denis Allemand, Pr, Centre Scientifique de
Monaco

Michel Ponchet, CR, INRA PACA, Sophia-
Antipolis

Thierry Lacour, Dr, BioPreserv, Grasse

Table des matières

Partie Expérimentale	1
I. Solvants et réactifs.....	3
II. Chromatographie sur colonne	3
III. Instruments	3
III.1. HPLC analytiques et semi-préparatives	3
III.1.1. Analyse et purification en routine	3
III.1.2. Purification de <i>C. taxifolia</i>	4
III.2. LC-MS et MS/MS	4
III.2.1. Spectromètre de masse à basse résolution.....	4
III.2.2. Spectromètre de masse à haute résolution (1)	5
III.2.3. Spectromètre de masse à haute résolution (2)	5
III.3. RMN.....	5
III.4. Dichroïsme circulaire	5
III.5. Microscopie.....	6
III.6. Spectrophotomètre pour lecture ADN.....	6
III.7. PCR	6
IV. Tests d'activité biologique	6
IV.1. Evaluation de l'activité biocide.....	6
IV.1.1. Extraits et composés de <i>C. taxifolia</i>	6
IV.1.2. Extraits et composés de <i>Polysyncraton</i> sp. et <i>H. racovitzai</i>	7
IV.2. Evaluation de l'activité cytotoxique.....	7
IV.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	8
IV.4. Evaluation de l'activité sur les kinases.....	8
V. Analyse en réseau.....	10
VI. Obtention du matériel biologique.....	11
VII. Cas particulier des champignons.....	11
VII.1. Isolement des champignons.....	11
VII.1.1. Milieux de culture	11
VII.2. Isolement	13
VII.3. Détermination des espèces	14
VII.4. Culture à grande échelle	15
VIII. Etude métabolomique de <i>C. taxifolia</i>	16
VIII.1. Isolement	16
VIII.2. Caractérisation.....	18
IX. Etude métabolomique des invertébrés.....	19
IX.1. <i>Polysyncraton</i> sp.	19
IX.1.1. Isolement	19

IX.1.2.	Caractérisation.....	20
IX.2.	<i>H. racovitzai</i>	22
IX.2.1.	Isolement.....	22
IX.2.2.	Caractérisation.....	22
IX.3.	<i>C. crambe</i>	23
IX.3.1.	Isolement.....	23
IX.3.2.	Caractérisation.....	24
X.	Etude des champignons marins.....	25
X.1.	<i>Stachybotrys chartarum</i>	25
X.1.1.	Isolement.....	26
X.1.2.	Caractérisation.....	26
X.2.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	28
X.2.1.	Isolement.....	28
X.2.2.	Caractérisation.....	28
X.3.	<i>Penicillium citrinum</i>	29
X.3.1.	Isolement.....	29
X.3.2.	Caractérisation.....	29
	Annexes.....	31
	Etat de l'art sur les bromotyrosines isolées entre 2004 et 2017.....	35
I.	Introduction.....	37
II.	Les bromotyrosines simples.....	38
III.	Les spirocyclohexadiénylisoxazolines.....	42
III.1.	Les bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines.....	42
III.2.	Les mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines.....	44
III.2.1.	Simple.....	44
III.2.2.	Possédant une unité bromotyrosine.....	44
III.2.3.	Possédant une unité histamine.....	46
III.2.4.	Possédant une chaîne latérale linéaire.....	47
III.2.5.	Mixte.....	48
IV.	Les spirooxepinisoxazolines.....	48
V.	Les oximes.....	49
V.1.	Possédant une unité histamine.....	49
V.2.	Possédant une unité bromotyramine.....	49
V.3.	Possédant un pont disulfure.....	50
V.4.	Autres oximes.....	51
VI.	Les bastadines et hemibastadines.....	52

VII.	Autres dérivés.....	53
VIII.	Activités biologiques.....	54
VIII.1.	Activité antibactérienne.....	54
VIII.2.	Activité antifongique.....	57
VIII.3.	Activité anticancéreuse.....	58
VIII.4.	Activité antiparasitaire.....	60
VIII.5.	Autres activités biologiques notables.....	62
	Souches fongiques isolées des éponges <i>A. cavernicola</i> , <i>P. tenacior</i> et <i>C. crambe</i>	63
	Liste des souches fongiques isolées de <i>A. cavernicola</i>	65
	Liste des souches fongiques isolées de <i>P. tenacior</i>	66
	Liste des souches fongiques isolées de <i>C. crambe</i>	66
	Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés.....	73
	Publications.....	189

Partie Expérimentale

I. Solvants et réactifs

L'intégralité des solvants utilisés (Méthanol : MeOH, eau : H₂O, dichlorométhane : CH₂Cl₂, acétonitrile : ACN, acétate d'éthyle : AcOEt, Hexane : *n*-Hex, Cyclohexane : CyHex) ainsi que l'acide formique (af ou CH₃COOH) sont de pureté chromatographique HPLC minimum (Merck).

II. Chromatographie sur colonne

Plusieurs techniques et supports ont été utilisés lors des purifications :

- Chromatographie sur colonne en phase normale : gel de silice (40-63 μm , Carlo-Erba) ou de silice greffée diol (40-75 μm , Sigma-Aldrich) versé dans une colonne adéquate et solvants d'élution choisis en fonction des composés à séparer.
- Chromatographie sur colonne en phase inverse, généralement SPE : gel de silice greffée C18 (60-80 μm , Macherey-Nagel), utilisée dans des cartouches SPE reliées à un manifold soumis à une pression obtenue grâce à une pompe reliée au système.
- Résines : Chromatographie de perméation sur gel : gel de Sephadex LH-20 (GE HealthCare) suspendu dans un solvant approprié et versé dans une colonne avant élution avec le même solvant. Chromatographie en phase inverse : Diaion HP-20 (Supelco) suspendu dans l'eau et versé dans une colonne avant élution avec le même solvant.

III. Instruments

III.1. HPLC analytiques et semi-préparatives

III.1.1. Analyse et purification en routine

- Pompe : Alliance Waters 2695
- Détecteurs : PhotoDiode Array Waters 996 et DEDL Shimadzu ELSD LT
- Logiciel : Empower 2
- Colonnes analytiques : Macherey-Nagel Nucleodur Sphinx RP de phase propylphényl-C18 (4,6 x 100 mm, 5 μm) et Macherey-Nagel Nucleodur HILIC (4,6 x 100 mm, 5 μm).
- Colonnes semi-préparatives : Macherey-Nagel Nucleodur Sphinx RP de phase propylphényl-C18 (10 x 250 mm, 5 μm), Macherey-Nagel Nucleodur HILIC (10 x 250 mm, 5 μm).

En analyse de routine (empreinte métabolomique des extraits bruts à 10 mg/mL), la colonne utilisée est la Sphinx RP, les longueurs d'ondes de détection sont programmées à 214, 254 et 280 nm, le débit est de 1 mL/min et le gradient d'élution est celui présenté dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1. Gradient de l'analyse de routine.

Temps /min	Phase mobile /%	
	H ₂ O + 0,1% CH ₃ COOH	ACN + 0,1% CH ₃ COOH
0	90	10
5	90	10
30	0	100
35	0	100
45	90	10
60	90	10

III.1.2. Purification de *C. taxifolia*

- Pompe : Alliance Waters Delta Prep 4000 avec vanne rhéodyne
- Détecteur : Waters 2487 Dual
- Logiciel : Empower 2
- Colonnes semi-préparatives : Phenomenex Gemini C18 (10 x 250 mm, 5 μ m), Phenomenex Gemini C6-phényl (21,2 x 150 mm ; 5 μ m), Phenomenex Prodigy (21,2 x 250 ; 5 μ m), Waters Symmetry C18 (19 x 100 ; 5 μ m) et cartouche Waters C18 (10 x 250 ; 15 μ m) montée dans le montage Waters Prep LC Universal Base.

III.2. LC-MS et MS/MS

Différents spectromètres de masse ont pu être utilisés en fonction du type d'analyse à réaliser. Concrètement, un appareil en basse résolution et deux appareils en haute résolution ont permis d'obtenir l'ensemble des résultats de cette thèse aussi bien en spectrométrie de masse qu'en spectrométrie de masse en tandem.

III.2.1. Spectromètre de masse à basse résolution

- Pompe HPLC : Agilent 1100 équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes
- Source : Ionisation électrospray
- Spectromètre de masse : Thermo LCQ Advantage
- Analyseur : Trappe ionique
- Logiciel : Xcalibur 2.0.7

III.2.2. Spectromètre de masse à haute résolution (1)

- Pompe HPLC : Thermo Dionex Ultimate 3000
- Source : Ionisation électrospray
- Spectromètre de masse : Thermo LTQ-Exactive Plus
- Analyseur : Orbitrap
- Logiciel : Xcalibur 2.2

III.2.3. Spectromètre de masse à haute résolution (2)

- Pompe HPLC : Thermo Dionex Ultimate 3000
- Source : Ionisation électrospray
- Spectromètre de masse : Bruker Daltonics
- Analyseur : Bruker micrOTOF II
- Logiciel : Data Analysis

III.3. RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés par deux spectromètre :

- Spectromètres : Bruker Avance 400 MHz ou 500 MHz
- Application : MestReNova

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage (J) en Hz. Lors de la résolution des spectres RMN, les abréviations suivantes ont été utilisées : *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *dd* (doublet de doublet), *m* (multiplet) et *b* (signal large). Les solvants deutérés utilisés pour solubiliser les échantillons ont permis de calibrer les signaux des protons et des carbones (D_2O : $\delta_{\text{H}} = 4,79$ ppm ; CDCl_3 : $\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 77,2$ ppm ; *d*₄-MeOH : $\delta_{\text{H}} = 3,31$, $\delta_{\text{C}} = 49,0$; *d*₆-DMSO : $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm). Les signaux sont attribués d'après les expériences 1D (^1H , ^{13}C) associées aux expériences 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC).

Pour les produits naturels connus, les données RMN sont comparées à la bibliographie existante.

III.4. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaires sont mesurés dans le solvant adéquat à température ambiante, à la concentration indiquée.

- Polarimètre : JASCO J-810
- Logiciel : Spectro Manager

III.5. Microscopie

- Microscope optique : Leica DM 4500 B
- Stéréomicroscope : Leica EZ 4

III.6. Spectrophotomètre pour lecture ADN

Spectrophotomètre ThermoScientific NanoDrop 1000.

III.7. PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou « Polymerase Chain Reaction » est réalisée avec le thermocycleur BIORAD T100™ Thermal Cycler. Les cycles sont programmés en fonction des marqueurs utilisés dans le mélange suivant :

- 5 μ L 10x PCR buffer (15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3)
- 0,4 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTP
- 1 μ M de marqueur
- 2,5 U Taq polymérase

IV. Tests d'activité biologique

IV.1. Evaluation de l'activité biocide

IV.1.1. Extraits et composés de *C. taxifolia*

Tests antibactériens et antifongiques réalisés par la société partenaire BioPreserv à Grasse.

Il s'agit d'un test de criblage en microplaques (96 puits). En plus des échantillons (molécules pures ou mélanges de molécules), les milieux de cultures seuls et les solvants jouent le rôle des témoins négatifs et les témoins (parabènes, CMI/MI, commerciaux) jouent le rôle de contrôles positifs.

Les échantillons sont déposés à 2% dans le milieu de culture contenant les souches testées (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *A. brasiliensis*). Les milieux sont agités à 600 trs/min pendant 5 minutes, avant le dénombrement (t_0). Un nouveau dénombrement peut être réalisé après 24h (t_{24h}), 3 jours (t_{3j}) et/ou 5 jours (t_{5j}), sachant que les souches bactériennes sont incubées à 30 °C et les souches fongiques sont incubées à 23 °C.

Préparation du milieu de culture M9 G (1000 mL) :

- 100 mL M9 10x préparé à partir d'une solution commerciale M9 5x
- 50 mL de MgSO₄
- 10 mL de glucose à 20%
- Qsp 1000 mL d'eau

IV.1.2. Extraits et composés de *Polysyncraton* sp. et *H. racovitzai*

Les souches *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *E. faecalis* résistant à la vancomycine BM4148 (VRE), *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *S. aureus* résistant à la méticilline (MRSA) et *Streptococcus equinus* NRRL-B-4268 sont choisies pour les bactéries à Gram-positif, les souches *Acinetobacter baumannii* CIP70.34T, *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC8045 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 sont choisies pour les bactéries à Gram-négatif. Les études préliminaires en milieu solide sont réalisées par diffusion passive de nos composés dans une gélose Mueller Hinton pré-inoculée avec les bactéries.

Les CMI sont déterminées par la technique de microdilution en milieu liquide. Les tests sont réalisés comme décrits dans les standards M07- A9 du CLSI : « methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ». Les cibles bactériennes sont préservées à -20 °C. Les souches sont inoculées dans la gélose tryptone-soja et incubées 24h à 37 °C. Une colonie est suspendue dans 5 mL de milieu Mueller Hinton et incubée 4h à 37 °C sous agitation. Une suspension à $1,0 \times 10^6$ CFU/mL dans le milieu Mueller Hinton 2X est réalisée puis 50 µL de cette préparation est distribuée sur des microplaques 96 puits contenant 50 µL des composés à tester. La concentration finale en bactéries est de $5,0 \times 10^6$ CFU/mL et la concentration en composés à tester est initialement de 256 µg/mL. Par une série de dilution au demi, la concentration atteint 0,5 µg/mL.

IV.2. Evaluation de l'activité cytotoxique

Six lignées cellulaires humaines ont été testées dont les lignées cancéreuses U2OS (ostéosarcome), Jurkat A3 (leucémie lymphoblastique), HepG2 (cancer du foie), HT29 (cancer colorectal), Mcf7 (cancer du sein) et la lignée saine RPE1 (cellules épithéliales de la rétine).

La viabilité cellulaire a été déterminée par l'utilisation du CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Après traitement, les cellules sont incubées avec la MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) pendant 24 heures à 37 °C. Par la suite, l'absorbance est mesurée par un lecteur de microplaques automatique entre 490 et 630 nm. Le pourcentage de viabilité est calculé par comparaison au contrôle dans le DMSO.

IV.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les cellules cancéreuses humaines du colon dont est issue la HT29-NFκB pGreenfire ont été données par le laboratoire du Pr. Peter Vandenameele (Inflammation Research Center, Ghent, Belgique). La HT29 - NFκB pGreenfire est obtenue après transfection avec le vecteur NFκB pGreenfire de luciférase de lucioles comme gène rapporteur. L'expression de la luciférase est sous le contrôle du facteur de transcription NFκB. Le kit "luciferase assay system" (# E4550 Promega, France) est utilisé pour suivre l'expression du gène rapporteur. Pour l'ensemble des analyses, l'effet des composés testés est comparé avec les cellules traitées avec le contrôle DMSO, à la concentration finale de 0,1% ou 1 %. Le parthenolide (#P0667, Sigma-Aldrich, France), est utilisé comme contrôle anti-inflammatoire positif. La concentration optimale de parthenolide inhibant la voie de la NFκB a été déduite expérimentalement à 18 μM.

Tout d'abord, les cellules sont incubées à 37 °C, à 5% de CO₂ dans le milieu MEM (Minimum Essential Medium Eagle, MEM, Gibco) contenant 10 % de sérum fœtal de veau et 0,5 mg/ml de G418 (Sigma-Aldrich, France) pendant 3 jours afin d'obtenir approximativement 80% de confluence et d'avoir une quantité suffisante de cellules pour réaliser les essais. Après une première étape d'amplification, les cellules sontensemencées dans le MEM à hauteur de 10 000 cellules/50 μl par puit sur une plaque de 96 puits (#655098, Greiner). Les plaques sont incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24 heures. A la suite de cette étape, 50 μl des composés à tester sont incubés avec les cellules à une concentration finale de 10 et 100 μM pendant 1 heure. Puis, la protéine recombinante humaine du facteur de nécrose tumorale-α (TNF-α, # 10602, Life Technologies), utilisés comme un inducteur de la voie du NFκB, est ajouté à la concentration finale de 25 ng/ml. Les plaques 96-puits sont incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 23 heures. Après incubation, la luminescence est détectée selon le protocole suivant : (i) les cellules sont lavées 3 fois avec 100 μl du tampon PBS 1X réchauffé, (ii) les cellules sont lysées par le réactif de lyse des cellules de culture 1X du kit (# E4550 Promega, France) pendant 45 minutes à température ambiante, (iii) 100 μl du réactif de quantification de la Luciferase (# E4550 Promega, France) est ajouté dans chaque puit et la luminescence est immédiatement mesurée sur un lecteur de microplaques (Mithras LB 940 luminomètre, Berthold Technologie). Les essais sont réalisés en triplicatas.

IV.4. Evaluation de l'activité sur les kinases

L'activité sur les kinases est testée dans l'une des solutions tampons appropriées suivantes (A, B, C ou H) :

- Tampon A :
 - o 10 mM MgCl₂

- 1 mM EGTA
- 1 mM DTT
- 25 mM Tris-HCl pH 7,5
- 50 $\mu\text{g/ml}$ héparine
- Tampon B :
 - 60 mM β -glycérophosphate
 - 30 mM *p*-nitrophényl-phosphate
 - 25 mM MOPS (pH 7)
 - 5 mM EGTA
 - 15 mM MgCl_2
 - 1 mM DTT
 - 0,2 mM sodium orthovanadate
- Tampon C :
 - 60 mM β -glycérophosphate
 - 15 mM *p*-nitrophenyl-phosphate
 - 25 mM MOPS (pH 7.2)
 - 5 mM EGTA
 - 15 mM MgCl_2
 - 1 mM DTT
- Tampon H :
 - MOPS 25 mM pH 7.5
 - 10 mM MgCl_2

Les kinases sont :

- *RnDYRK1A*-kd, dans le tampon A (additionné de 0,5 mg/mL de BSA et 0,23 mg/mL de DTT) avec 0,033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ du peptide KKISGRLSPIMTEQ comme substrat,
- *MmCLK1* dans le tampon A (additionné de 0,15 mg/mL de BSA et 0,23 mg/mL de DTT) avec 0,027 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ du peptide GRSRSRSRSRSR comme substrat,
- *HsPIM1* dans le tampon B avec 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de l'histone H1 (Sigma #H5505) comme substrat.
- *HsHaspin*-kd dans le tampon H avec 0,007 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de l'histone H3 (1-21) et le peptide ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA comme substrats,
- *MgCDK1*/Cycline B dans le tampon C with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of histone H1 as substrate.
- *HsCDK2*/Cycline A dans le tampon A (additionné de 0,15 mg/mL of BSA et 0,23 mg/ml de DTT) avec 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de l'histone H1 comme substrat.
- *HsCDK5*/p25 dans le tampon B, avec 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de l'histone H1 comme substrat.
- *HsCDK9*/Cycline T dans le tampon A (additionné de 0,15 mg/mL of BSA et 0,23 mg/mL de DTT) avec 0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ du peptide YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK comme substrat.

- *Ssc*GSK-3 α/β dans le tampon A (additionné de 0,15 mg/mL de BSA et 0,23 mg/mL de DTT), avec 0,010 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ du peptide GS-1, un substrat sélectif de la GSK-3 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE, où “Sp” signifie sérine phosphorylée).
- *Pf*GSK-3 dans le tampon A (additionné de 0,15 mg/ml of BSA et 0,23 mg/ml de DTT) avec 0,010 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ du peptide GS-1.
- *Ssc*CK1 δ/ϵ dans le tampon B, avec 0,022 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ du peptide RRKHAAIGSpAYSITA comme substrat spécifique de CK1.

Les réactions sont conduites dans un volume final de 5 μL pendant 30 minutes à 30 °C dans le tampon ADP-Glo (40 mM Tris pH 7,5, 20 mM MgCl_2 et 0,1 mg/mL de BSA). Puis, 5 μL du réactif ADP-GloTM est ajouté pour stopper la réaction de la kinase. Après 50 minutes d’incubation à température ambiante, 10 μL du réactif de détection de kinase est ajouté à température ambiante pendant 1 heure. Le signal transmis est mesuré par un lecteur de plaques (luminomètre Envision, PerkinElmer, Waltham, MA) et est exprimé en RLU (unité relative de lumière).

V. Analyse en réseau

Trois étapes sont nécessaires pour ce type d’analyse. Tout d’abord les extraits bruts (ou dessalés) sont analysés par spectrométrie de masse en tandem pour obtenir les fragmentations spécifiques des molécules du mélange. Les fichiers sont convertis au format mzXML par le logiciel libre MSconvert (ProteoWizard, <http://proteowizard.sourceforge.net/>) avant d’être téléchargés en ligne sur la plateforme internet GNPS (<http://gnps.ucsd.edu/>) via un client FTP. Les analyses en réseau sont effectuées par comparaison des fragmentations avec d’une part l’ensemble des molécules de l’extrait et d’autre part avec les bases de données utilisée (classiques *in vivo* ou générées *in silico*¹). Les paramètres de l’analyse sont les suivants :

- Min pair cos. : 0,7
- Min matched fragment ions : 6
- Score threshold : 0,7

Après téléchargement, les réseaux générés sont finalement visualisés par le logiciel Cytoscape 3.5.1 (<http://www.cytoscape.org/>), pour lequel chaque nœud correspond à un ion, connecté à d’autres ions en fonction de la similarité de leur spectres MS², dont le « cosine score » (similarité) est au minimum de 0,7, et pour lesquels 6 ions communs sont observés.

Le calque de représentation par défaut a été amélioré pour visualiser les masses exactes des composés au centre des nœuds, leur couleur choisie en fonction de l’espèce et l’épaisseur des connections entre

¹ Les données *in silico* ont été utilisées d’après le protocole établi à la publication suivante : Allard P. M., Péresse T., Bisson J., Gindro K., Marcourt L., Pham V. C., Roussi F., Litaudon M., Wolfender J. L. 2016, Integration of molecular networking and *in-silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal Chem.*, 15, **88** (6), 3317–3323.

les nœuds est proportionnelle à la valeur du « cosine scores » (plus un lien est épais plus la similarité est grande). Pour chaque nœud, les spectres peuvent être visualisés sur GNPS à l'aide d'un lien internet associé.

VI. Obtention du matériel biologique

Toutes les algues et invertébrés ont été échantillonnés par les Drs. Philippe Amade et Jean de Vaugelas.

L'algue *C. taxifolia* a été collectée au large des côtes de Villefranche-sur-Mer en juin 2013.

L'éponge *H. racovitzai* utilisée pour la purification de **Hr1 (10)** et **Hr2 (131)** a été collectée en mai 2014 à Kabila au Maroc (30 m de profondeur).

L'éponge *C. crambe* utilisée pour la purification des **Cc1-4 (169-171)** a été collecté au Maroc en mai 2014 (25 m de profondeur).

L'ascidie *Polysyncraton* sp. a été collecté en Espagne, à Punta Salina en juin 2012 (26 m de profondeur).

L'ensemble des spécimens ont été étiquetés et congelés (-20 °C) directement après récupération, puis lyophilisés avant leur extraction.

VII. Cas particulier des champignons

Les champignons sont isolés à partir de trois éponges différentes : *C. crambe*, *A. cavernicola* et *P. tenacior*, récoltées dans des flacons Eppendorf stériles avec l'eau de mer environnante à Villefranche-sur-Mer le 9 août 2014 par le Dr Jean de Vaugelas et le Dr Philippe Amade à 25 mètres de profondeur. Les spécimens sont congelés après récolte à -20 °C jusqu'à leur étude ultérieure.

VII.1. Isolement des champignons

Pour l'isolement, toutes les étapes sont réalisées de façon stérile, sous hotte à flux laminaire (hormis pour la décongélation).

VII.1.1. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture sont utilisés au cours de cette étude, en fonction du type de travail à réaliser (culture, isolement, extraction d'ADN...) et sont présentés ci-après.

- Mélange d'antibiotiques (A)
 - o Gentamicine Sulfate 40 mg/L
 - o Pipéracilline + tazobactam (commercial)

- Milieu CMASW avec (CMASW_A) ou sans antibiotiques (CMASW)
 - 2 g de farine de maïs
 - 15 g d'agarose
 - 3 % de sels de mer
 - 1000 ml d'eau distillée
 - Avec ou sans A dilué à 440 $\mu\text{L/L}$

- Milieu GSW avec (GSW_A) ou sans antibiotiques (GSW)
 - 20 g de gélatine animale
 - 15 g d'agarose
 - 3 % de sels de mer
 - 1000 ml d'eau distillée
 - Avec ou sans A dilué à 440 $\mu\text{L/L}$

- Milieu SWA avec (SWA_A) ou sans antibiotiques (SWA)
 - 3% de sels de mer
 - 15 g d'agarose
 - 1000 ml d'eau distillée
 - Avec ou sans A dilué à 440 $\mu\text{L/L}$

- Milieu MEA
 - 30 g d'extrait de malt
 - 15 g d'agarose
 - 1000 mL d'eau distillée

- PDA
 - 20 g de dextrose
 - 15 g d'agarose
 - 4 g d'extrait de pomme de terre
 - 1000 ml d'eau distillée

- Wickerham's
 - 3 g d'extrait de levure
 - 3 g d'extrait de malt
 - 5 g de peptone
 - 10 g de glucose
 - 15 g d'agarose

- 24,4 g de sels de mer
- 1000 ml d'eau distillée

Dans le cas de la préparation des boîtes de Pétri, l'ensemble des composés des milieux de culture sont ajoutés dans une bouteille bouchée avant d'être autoclavés. Une fois le programme d'autoclavage terminé, le milieu de culture liquide homogénéisé dans la bouteille est coulé dans les boîtes de Pétri adéquates puis sont laissés à refroidir sous la hotte stérile avant utilisation. Dans le cas des tubes d'isolement, l'ensemble des composés des milieux de culture sont ajoutés dans une bouteille bouchée avant d'être mise à homogénéisation aux microondes pendant plusieurs minutes. Puis le milieu de culture est coulé dans les tubes en verre de taille adéquate, bouchés par du coton avant d'être lyophilisés. Enfin, après le programme d'autoclavage, les tubes en verre sont inclinés pour augmenter la surface de contact avec le milieu de culture.

VII.2. Isolement

Les éponges sont lentement décongelées pendant une nuit entière à 4 °C. Une fois décongelées, leur surface est stérilisée pendant 30 secondes dans l'éthanol à 70% dans de l'eau de mer stérile, puis rincée trois fois avec de l'eau de mer stérile afin de stopper la stérilisation et également pour éliminer les débris ne provenant pas de l'éponge. Par la suite, les éponges sont découpées en plusieurs parties distinctes :

- La 1^{ère} partie est conservée dans un flacon contenant de l'éthanol pour l'identification,
- La 2^{ème} partie est utilisée pour calculer le poids sec et donc le pourcentage d'eau contenu dans l'éponge, calculé en fonction de la différence entre le poids avant et après séchage à l'étuve à 50 °C,
- La 3^{ème} partie est dédiée à la mise en culture par homogénat : l'éponge est pesée puis « diluée » au 1/10^{ème} (m/m) dans de l'eau de mer stérile et le tout est broyé dans un broyeur stérile avant d'être déposé sur les boîtes de culture,
- Enfin, dans le cas d'*A. cavernicola*, une dernière partie pour la mise en culture des pièces d'éponges est prélevée : cette partie est découpée au scalpel stérile à usage unique en plusieurs morceaux réguliers d'environ 0,5 à 1 cm³, ceux-ci par la suite déposés sur les boîtes de culture.

Dans le cas de l'homogénat et/ou des pièces d'éponges, les milieux de culture utilisés sont CMASW_A, GSW_A et SWA_A. Les éponge, sous forme de pièces et/ou d'homogénat, sont déposés sur ces trois milieux de culture coulés dans des boîtes de Pétri de diamètre 15 cm pour l'homogénat et

de diamètre 6 cm pour les pièces (figure 1). La température est également testée à 15 et 25 °C dans des incubateurs. Au total, pour chaque condition, trois réplicas sont effectués ce qui revient à :

- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur CMASW_A à 15 °C
- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur CMASW_A à 25 °C
- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur GSW_A à 15 °C
- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur GSW_A à 25 °C
- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur SWA_A à 15 °C
- 3 réplicas pour l'homogénéat + 3 réplicas pour les pièces sur SWA_A à 25 °C

Soit 36 boîtes au total pour *A. cavernicola* et 18 boîtes au total pour *C. crambe* et *P. tenacior*.

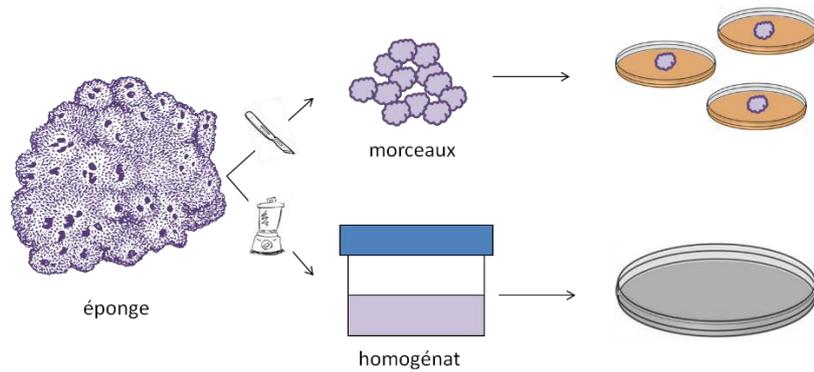


Figure 1. Préparation des morceaux et de l'homogénéat

Les 72 boîtes sont régulièrement inspectées à l'œil nu et au microscope optique pendant 4 semaines au minimum. Chaque souche fongique est isolée à la fois dans un tube contenant le milieu de culture MEA pour implémenter la mycothèque de l'Université de Turin (*Mycotheca Universitatis Taurinensis*, MUT), et à la fois sur une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre contenant également le milieu de culture MEA, pour les analyses ADN (figure 2).

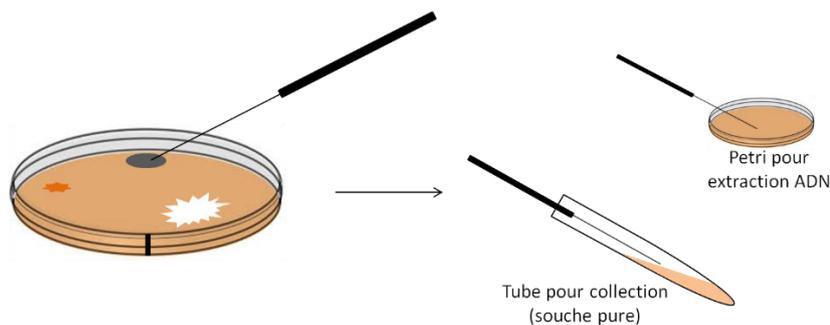


Figure 2. Isolement des souches fongiques à partir du milieu de culture initial

VII.3. Détermination des espèces

Après leur isolement, les souches fongiques sont caractérisées par leurs caractéristiques morphologiques et génomiques (approche polyphasique). Chaque morphotype est conservé à la

Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT, <http://www.mut.unito.it/en>). Les codes sont reportés en annexe.

Dans le cas de la morphologie, l'aspect macroscopique et physiologique (œil nu et microscope optique) sont les premiers éléments utilisés. Par la suite, des lames sont préparées pour l'observation des spores, hyphes et éventuellement des parties reproductives, au stéréomicroscope. Les comparaisons sont menées selon les clés de déterminations et les bases de données en ligne.

Dans le cas de l'étude du génome, c'est l'ADN qui a pu être extrait et comparé aux bases de données. Pour ce faire, l'ADN de chaque champignon est extrait. Le mycélium des champignons seuls, développés à partir des boîtes au MEA, sont précautionneusement retirés et déposés dans un Eppendorf en présence de billes d'acier. Les tissus sont rompus à l'aide du Tissue Lyser Retsch (MM 400) à une fréquence de 30 Hz pendant 2 minutes. Ensuite, l'ADN est extrait à partir du kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel). Les ADN sont par la suite amplifiés par PCR. Dans le cas de la détermination des espèces, des régions de gènes spécifiques sont amplifiées pour chaque genre de champignons : actine (ACT512F/ACT783R) pour les *Cladosporium*, β -tubuline (Bt2a/Bt2b) pour *Penicillium* et ITS (ITS1/ITS4) pour les autres genres. Ensuite, les ADN amplifiés sont envoyés à la société Macrogen Europe (Amsterdam, Pays Bas) pour être purifiés et séquencés puis sont nettoyés après leur retour grâce au logiciel Sequencher. Enfin, les ADN sont analysés par comparaison de l'alignement local de séquences (BLAST pour « Basic Local Alignment Search Tool » accessible à l'adresse <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) avec les séquences de référence des bases de données GenBank (NCBI, accessible à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) et par alignement par paire avec la base de données Mycobank (CBS, accessible à l'adresse <http://www.mycobank.org/>), toutes deux mises à disposition gratuitement en ligne. Les similarités supérieures ou égales à 98% sont considérées comme fiables et leurs caractéristiques sont confirmées par la morphologie.

Dans le cas des mycéliums stériles, des champignons dont la détermination était considérée comme douteuse, ou dont la séquence ne concordait pas avec les bases de données utilisées, la construction des arbres phylogénétiques a été nécessaire. Ce sont les gènes LSU (NS1/NS4) de toutes les souches qui ont donc été amplifiés par PCR. Trois jeux de données sont composés pour les ordres Pleosporales, Capnodiales (127 et 85 séquences^{2,3}) et Sordariomycetes (165 séquences⁴). Les séquences sont comparées grâce à la fonction MUSCLE du logiciel MEGA 6.0.

VII.4. Culture à grande échelle

² Suetrong S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Sakayaroj J., Phongpaichit S., Tanaka K., Hirayama K., Jones E. B. 2009, Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Stud Mycol.*, 64, 155-173.

³ Hyde K. D., Jones E. B. G., Liu J.-K., Boehm H. A. E., Boonmee S., Braun U., Chomnunti P., Crous P. W., Dai D.-Q. et al. 2013, Families of Dothideomycetes. *Fungal Divers.*, 63, 1-313.

⁴ Tang A. M., Jeewon R., Hyde K. D. 2007, Phylogenetic utility of protein (RPB2, beta-tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91, 327-349.

Toutes les espèces sont mises en culture sur les milieux GSW, PDA et Whickerham's en triplica à 25 °C à partir des tubes. Après 15 jours de croissance, les champignons obtenus sur milieu Whickerham's (milieu riche) sont lyophilisés avec le milieu de culture avant d'être extraits d'une part avec un mélange dichlorométhane et acétate d'éthyle (1/1 v/v) et d'autre part avec un mélange dichlorométhane et méthanol (1/1 v/v). Les empreintes chimiques obtenues par HPLC-UV-DEDL dans les conditions d'analyses classiques ont permis de choisir les champignons les plus producteurs de métabolites. La même étape d'extraction est réalisée sur les deux autres milieux de culture lorsque le profil du champignon était intéressant, afin de choisir le meilleur milieu de culture pour la purification des composés produits.

La culture à grande échelle est réalisée sur une centaine de boîtes de Pétri de diamètre 6 cm. Le milieu Whickerham's est utilisé pour le champignon *S. chartarum* et le milieu PDA est utilisé pour les champignons *P. brevicompactum* et *P. citrinum*.

La purification des composés ainsi que l'ensemble des données concernant les molécules purifiées est présentée ci-après.

VIII. Etude métabolomique de *C. taxifolia*

VIII.1. Isolement

L'algue lyophilisée est extraite par un mélange de dichlorométhane et méthanol (1/1 v/v) pour obtenir 36 g d'extrait brut. Plusieurs aliquots différents sont préparés en fonction du type de purification.

- 4,9 g d'extrait brut sont soumis à une extraction liquide-liquide avec un mélange Hexane / Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau (1/1/1/1 v/v/v/v) pour donner une phase supérieure apolaire (3,8 g) et une phase inférieure (1,1 g). La phase supérieure est fractionnée *via* une séparation en phase solide (SPE). La fraction aqueuse n'est pas récupérée et la fraction organique (330 mg) est soumise à purification par HPLC semi-préparative sur colonne en phase inverse (Nucleodur Sphinx RP 5 μ m, 250 x 10 mm) avec le gradient d'eau et d'acétonitrile (acidifiés à 0,06% par l'acide formique) du tableau 2 afin d'obtenir les composés **Ct2** (4 mg) et **Ct3** (4 mg)..

- **Tableau 2.** Gradient pour la purification de la partition 1.

Temps /min	%Eau	%ACN
0	85	15
5	85	15
30	70	35
35	70	35
45	85	15
60	85	15
Débit : 3 mL/mn		

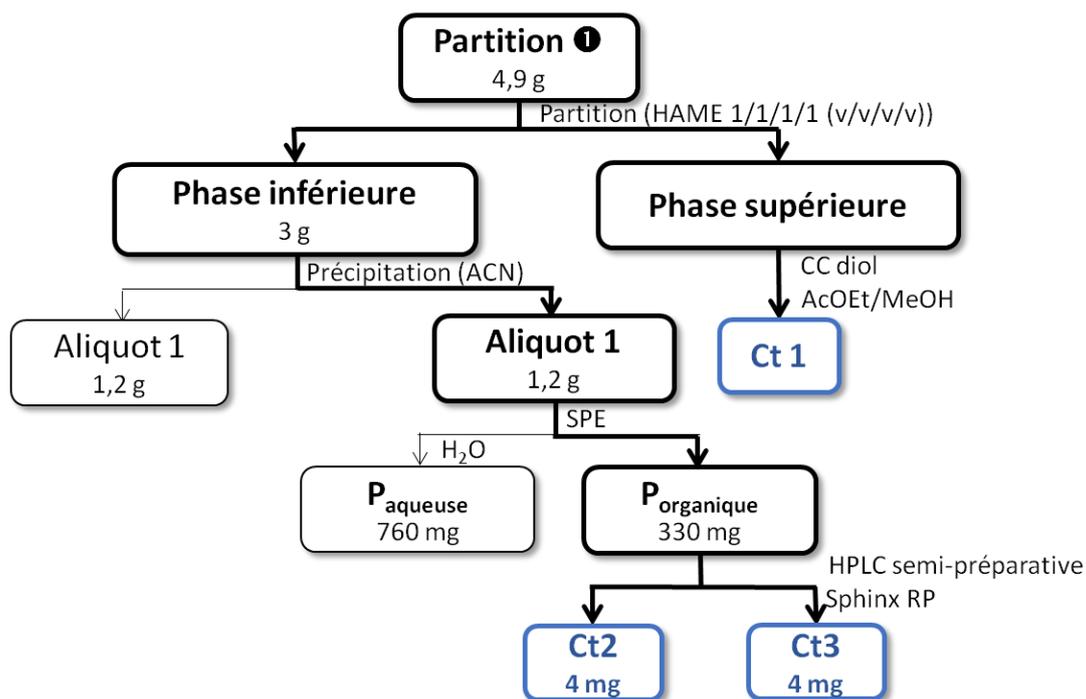


Schéma 1. Schéma d'extraction de la partition 1. (HAME : Hexane, Acétate d'éthyle, Méthanol, Eau).

- 14 g de l'extrait brut séché sont solubilisés dans l'eau. La partie insoluble n'est pas récupérée. Une portion de la partie soluble (1/10,6 g), est purifiée par HPLC sur colonne semi-préparative C18 (Waters Prodigy C18, 21,2 x 250 mm, 5 μ m) avec le gradient proposé dans le tableau 3.

Tableau 3. Gradient de purification de la partition 3.

Temps /min	%Eau 0,06% af	%ACN
0	95	5
10	95	5
30	60	40
35	0	100
40	0	100
45	90	10
Débit : 15 mL/mn		

Cinq composés sont purifiés, dont seulement trois ont pu être analysés : Ct3 (0,7 mg) Ct4 (7,8 mg) et Ct5 (1,6 mg).

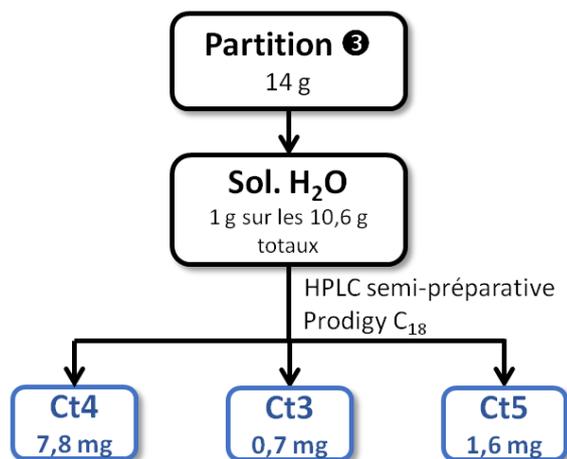
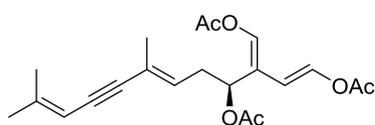
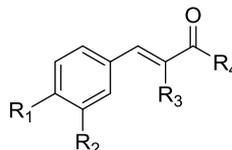


Schéma 2. Schéma d'extraction de la partition 3.

VIII.2. Caractérisation



caulerpényne (Ct1, 30)



- Ct2 (60)** : $R_1 = \text{OSO}_3\text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OMe}$
Ct3 (63) : $R_1 = \text{OSO}_3\text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OMe}$
Ct4 (64) : $R_1 = \text{OSO}_3\text{H}$; $R_2 = \text{OSO}_3\text{H}$; $R_3 = \text{OMe}$; $R_4 = \text{OMe}$
Ct5 (65) : $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OSO}_3\text{H}$; $R_4 = \text{OH}$

- **Ct1 (30)** : Caulerpényne

Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$

$M = 374,4 \text{ g/mol}$

Apparence : huile orange foncé

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Ct2 (60)** : *p*-sulfooxyphénylpyruvate de méthyle

Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}$

$M = 274,2 \text{ g/mol}$

Apparence : huile jaune

HRMS : $[\text{M}-\text{H}]^- \text{ } m/z = 273,0075$

RMN ^1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult., J) : 7,81 (*d*, $^3J = 8,7 \text{ Hz}$, 2H, H-5/H-9), 7,04 (*s*, 1H, H-3), 6,76 (*d*, $^3J = 8,7 \text{ Hz}$, 2H, H-6/H-8), 3,81 (*s*, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm : 167,4 (C-1), 160,2 (C-7), 137,1 (C-2), 134,1 (C-5/C-9), 128,5 (C-3), 125,4 (C-4), 115,9 (C-6/C-8), 52,6 (C-10).

- **Ct3 (63)** : *m*-hydroxy-*p*-sulfooxypyruvate de méthyle

Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_8\text{S}$

$M = 290,2 \text{ g/mol}$

Apparence : huile jaune

HRMS : $[M-H]^-$ $m/z = 289,0023$

RMN 1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult., J) : 7,56 (*bs*, 1H, H-5), 7,18 (*d*, $^3J = 8,3$ Hz, 1H, H-9), 7,00 (*s*, 1H, H-3), 6,74 (*d*, $^3J = 8,3$ Hz, 1H, H-8), 3,81 (*s*, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm : 167,5 (C-1), 148,9 (C-7), 146,0 (C-6), 136,8 (C-2), 129,3 (C-3), 125,7 (C-4), 125,8 (C-9), 118,7 (C-5), 116,1 (C-8), 52,8 (C-10).

- **Ct4 (64)** : α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle

Formule brute : $C_{11}H_{12}O_{11}S_2$

M = 384,3 g/mol

Apparence : huile jaune

HRMS : $[M-H]^-$ $m/z = 382,9730$

RMN 1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult., J) : 7,37 (*d*, $^3J = 2,0$ Hz, 1H, H-5), 6,95 (*dd*, $^3J = 8,3$; $2,0$ Hz, 1H, H-9), 6,69 (*d*, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, H-8), 6,28 (*s*, 1H, H-3), 3,76 (*s*, 3H, H-10), 3,37 (*s*, 3H, H-11).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm : 164,9 (C-1), 145,0 (C-6), 144,3 (C-7), 138,4 (C-2), 125,6 (C-4), 121,5 (C-9), 116,2 (C-5), 114,9 (C-8), 111,5 (C-3), 52,3 (C-11), 51,8 (C-10).

- **Ct5 (65)** : acide α -sulfooxycinnamique

Formule brute : $C_9H_8O_6S$

M = 244,2 g/mol

Apparence : huile jaune

HRMS : $[M-H]^-$ $m/z = 242,9966$

RMN 1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult., J) : 7,82 (*d*, $^3J = 7,4$ Hz, 2H, H-5/H-9), 7,29 (*t*, $^3J = 7,5$ Hz, 2H, H-6/H-8), 7,22 (*m*, 1H, H-7), 6,82 (*s*, 1H, H-3).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm : 166,4 (C-1), 145,8 (C-2), 134,5 (C-4), 129,3 (C-5 / C-9), 127,9 (C-6/C-8), 127,1 (C-7), 119,5 (C-3).

IX. Etude métabolomique des invertébrés

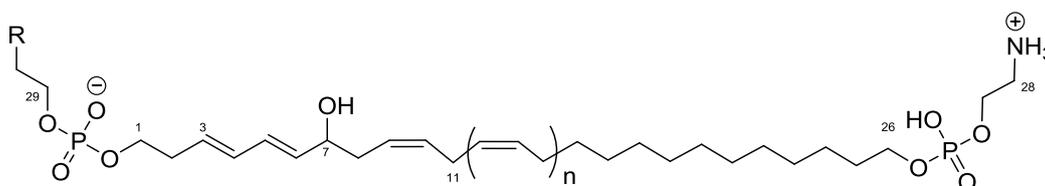
IX.1. *Polysyncraton* sp.

IX.1.1. Isolement

L'ascidie lyophilisée (12,2 g) est extraite plusieurs fois aux ultrasons par le méthanol après broyage. L'extrait méthanolique évaporé (1,4 g) est soumis à une séparation sur colonne de LH-20 pour obtenir deux fractions FI et FII. La fraction d'intérêt FI est aliquotée en deux échantillons identiques dont la première (153,3 mg) est chromatographiée sur silice greffée C18 par SPE et a conduit à l'obtention

d'une fraction organique (85 mg). La seconde (200 mg) est chromatographiée sur colonne chromatographique C18 Nucleodur Sphinx RP (Macherey Nagel) avec les 85 mg de la fraction organique précédemment obtenue par SPE afin de donner les composés **Psp1** (6,2 mg), **Psp2** (4,3 mg), **Psp3** (9,4 mg) et **Psp4** (9,6 mg). L'élution est réalisée en mode isocratique avec de l'eau et l'acétonitrile en proportions 64/36 et avec un débit de 3 mL/mn.

IX.1.2.Caractérisation



Psp1 (91) : R = $^+\text{NMe}_3$; n = 1

Psp2 (92) : R = $^+\text{NH}_3$; n = 1

Psp3 (89) : R = $^+\text{NMe}_3$; n = 2

Psp4 (90) : R = $^+\text{NH}_3$; n = 2

- **Psp1 (91)** : bolascidine A

Formule brute : $\text{C}_{33}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2$

M = 694,8 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

HRMS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 695,4148$

$[\alpha_D]$: - 5,9 ° (c 0,09, H_2O).

RMN ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm (mult., J) : 6,55 (t , $^3J = 13,0$ Hz, 1H, H-5), 6,06 (t , $^3J = 10,9$ Hz, 1H, H-4), 5,66 (dd , $^3J = 15,1 - 6,3$ Hz, 1H, H-6), 5,46 (m , 2H, H-3, H-9), 5,36 (m , 1H, H-10), 5,29 (m , 2H, H-12-13), 4,23 (m , 2H, H-29), 4,19 (bs , 1H, H-7), 4,00 (m , 2H, H-27), 3,89 (m , 2H, H-1), 3,80 (m , 2H, H-26), 3,61 (m , 2H, H-30), 3,17 (s , 11H, H-28, H-31), 2,71 (bs , 4H, H-11/14), 2,58 (m , 1H, H-2), 2,44 (m , 1H, H-2'), 2,28 (bs , 2H, H-8), 1,99 (m , 2H, H-22), 1,55 (m , 2H, H-25), 1,18-1,34 (m , 18H, H-15-21, H-23-24).

- **Psp2 (92)** : bolascidine B

Formule brute : $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2$

M = 652,8 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

$[\alpha_D]$: + 24,4 ° (c 0,1, H_2O).

HRMS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 653,3681$

RMN ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm (mult., J) : 6,57 (t , $^3J = 13,0$ Hz, 1H, H-5), 6,06 (t , $^3J = 11,0$ Hz, 1H, H-4), 5,66 (dd , $^3J = 14,9 - 6,2$ Hz, 1H, H-6), 5,46 (m , 2H, H-3, H-9), 5,36 (m , 1H, H-10), 5,29 (bs , 2H, H-12-13), 4,20 (m , 1H, H-7), 4,02 (m , 4H, H-27, H-29), 3,89 (m , 2H, H-1), 3,81 (m , 2H, H-26), 3,18

(*m*, 4H, H-28, H-30), 2,72 (*bs*, 4H, H-11/14), 2,59 (*m*, 1H, H-2), 2,46 (*m*, 1H, H-2'), 2,29 (*bs*, 2H, H-8), 2,01 (*bs*, 2H, H-22), 1,59 (*bs*, 2H, H-25), 1,14-1,38 (*m*, 18H, H-15/21, H-23-24).

• **Psp3 (89)** : bolascidine C

Formule brute : C₃₅H₆₆N₂O₉P₂

M = 720,9 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

[α_D] : - 9,9 ° (c 0,09, H₂O).

HRMS : [M+H]⁺ m/z = 721,4301

RMN ¹H (500 MHz, D₂O), δppm (mult., J) : 6,57 (*t*, ³J = 13,0 Hz, 1H, H-5), 6,06 (*t*, ³J = 10,9 Hz, 1H, H-4), 5,66 (*dd*, ³J = 15,1 – 6,1 Hz, 1H, H-6), 5,48 (*m*, 2H, H-3, H-9), 5,37 (*m*, 1H, H-10), 5,27 (*bs*, 4H, H-12-13/H-15-16), 4,21 (1H, H-7), 4,03 (*m*, 4H, H-29, H-31), 3,88 (*m*, 2H, H-1), 3,82 (*m*, 2H, H-28), 3,19 (*bs*, 4H, H-30, H-32), 2,74 (*bs*, 4H, H-11/14), 2,60 (*m*, 1H, H-2), 2,46 (*m*, 1H, H-2'), 2,29 (*bs*, 2H, H-8), 1,99 (*m*, 2H, H-17), 1,58 (*m*, 2H, H-27), 1,38-1,14 (*m*, 18H, H-18-24, H-25-26).

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O), δppm : 137,2 (C-6), 131,2 (C-4), 130,6 (C-9), 130,9-128,8 (C-12-13/C-15-16), 130,6 (C-3), 126,8 (C-10), 126,5 (C-5), 72,3 (C-7), 67,2 (C-28), 66,4 (C-2), , 63,1 (C-29), 62,9 (C-31), 54,6 (C-32), 41,3 (C-30), 36,1 (C-8), 31,7 (C-27), 30,5-31,1 (C-17-23), 30,0 (C-2), 28,2 (C-24), 26,8 (C-25), 26,9 (C-26), 26,6 (C-11/14).

• **Psp4 (90)** : bolascidine D

Formule brute : C₃₂H₆₀N₂O₉P₂

M = 678,8 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

[α_D] : + 6,4 ° (c 0,1, H₂O).

HRMS : [M+H]⁺ m/z = 679,3836

RMN ¹H (500 MHz, D₂O), δppm (mult., J) : 6,57 (*t*, ³J = 11,1 Hz, 1H, H-5), 6,08 (*t*, ³J = 10,9 Hz, 1H, H-4), 5,69 (*dd*, ³J = 15,2 – 6,2 Hz, 1H, H-6), 5,50 (*m*, 2H, H-3, H-9), 5,48 (*m*, 1H, H-10), 5,30 (*bs*, 4H, H-12-13/H-15-16), 4,25 (*bs*, 2H, H-31), 4,22 (*m*, 1H, H-7), 4,03 (*m*, 2H, H-29), 3,92 (*m*, 2H, H-1), 3,83 (*m*, 2H, H-28), 3,64 (*m*, 2H, H-32), 3,20 (*s*, 9H, H-33), 3,20 (*m*, 2H, H-30), 2,75 (*bs*, 4H, H-11-14), 2,61 (*m*, 1H, H-2), 2,47 (*m*, 1H, H-2'), 2,31 (*bs*, 2H, H-8), 2,00 (*m*, 2H, H-17), 1,60 (*m*, 2H, H-27), 1,30-1,25 (*m*, 4H, H-25-26), 1,25-1,20 (*m*, 14H, H-18-24).

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O), δppm : 137,2 (C-6), 131,7 (C-4), 131,0 (C-10), 130,9-128,95 (C-12-13/C-15-16), 128,7 (C-3), 126,7 (C-9), 126,5 (C-5), 72,3 (C-7), 67,0 (C-28), 66,34 (C-32), 66,30 (C-1), 63,1 (C-29), 60,4 (C-31), 55,0 (C-33), 41,3 (C-30), 36,1 (C-8), 31,7 (C-27), 30,8-29,18 (C-17-23), 30,0 (C-2), 28,2 (C-24), 26,77 (C-25-26), 26,6 (C-11/14).

IX.2. *H. racovitzai*

IX.2.1. Isolement

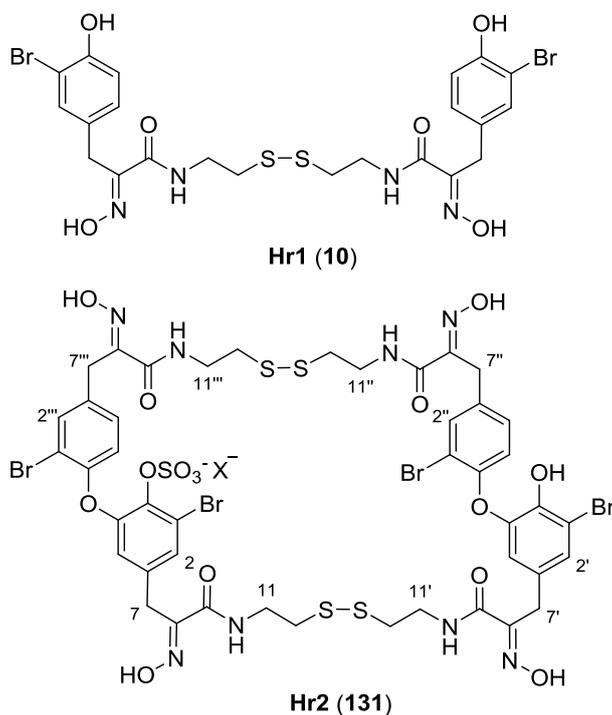
L'éponge lyophilisée (48 g) est extraite plusieurs fois aux ultrasons par du MeOH après broyage. L'extrait organique évaporé (1,8 g) est dessalé par SPE. La phase organique (990 mg) solubilisée dans le méthanol est séparée sur colonne LH-20 (2,2 x 55 cm) dans le MeOH pour donner **Hr2** (30 mg) et une fraction Fr1 (700 mg). 70 mg de Fr1 a finalement été séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Gémini C18 pour donner **Hr1** (1,5 mg) avec un gradient comme défini au tableau 4.

Tableau 4. Gradient de purification du composé **Hr1**.

Temps /min	%A	%B
0	90	10
5	90	10
25	0	100
35	90	10
Débit : 3 mL/mn		

A : H₂O/CH₃OH (35/65)B : CH₃OH

IX.2.2. Caractérisation



- **Hr1 (10)** : psammapline A

Formule brute : C₂₂H₂₄Br₂O₆S₂

M = 664,4 g/mol

Apparence : huile incolore

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Hr2 (131)** : 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A

Formule brute : C₅₀H₅₈Br₄N₈O₁₂S₄

M = 1403,8 g/mol

Apparence : huile vert clair

RMN ¹H (500 MHz, *d*₄-MeOH), δppm (mult. , *J*) : 7,50 (*dd*, ³*J* = 11-2,1 Hz, H-2'', H-2'''), 7,47 (*d*, ³*J* = 8,4 Hz, H-5''), 7,32 (*d*, ³*J* = 1,9 Hz, H-2), 7,21 (*dd*, ³*J* = 13,9-2,2 Hz, H-6'), 7,16 (*dd*, ³*J* = 13,8-2,2 Hz, H-6'''), 7,08 (*d*, ³*J* = 1,9 Hz, H-2'), 6,72 (*d*, ³*J* = 8,4 Hz, H-5'''), 6,70 (*d*, ³*J* = 2,0 Hz, H-6), 6,38 (*d*, ³*J* = 1,9 Hz, H-6'), 3,86 (*s*, H-7'', H-7'''), 3,84 (*s*, H-7), 3,67 (*s*, H-7'), 3,55 (*t*, ³*J* = 6,8 Hz, H-11), 3,53 (*t*, ³*J* = 6,8 Hz, H-11', H-11''), 3,44 (*t*, ³*J* = 6,8 Hz, H-11'''), 2,95 (*t*, ³*J* = 6,4 Hz, H-12), 2,83 (*t*, ³*J* = 6,8 Hz, H-12', H-12''), 2,73 (*t*, ³*J* = 6,8 Hz, H-12''').

RMN ¹³C (125 MHz, *d*₄-MeOH), δppm : 165,70 (C-9'', C9'''), 165,66 (C-9'), 165,43 (C-9), 152,65 (C-5', C-8', C-8'', C-8'''), 151,99 (C-8), 151,97 (C-4'''), 151,42 (C-5), 149,64 (C-4''), 147,07 (C-4'), 143,74 (C-1'), 142,13 (C-4), 137,39 (C-1), 136,20 (C-1'''), 136,08 (C-1''), 135,19 (C-2'''), 134,76 (C-2''), 130,88 (C-6'''), 130,06 (C-6''), 128,94 (C-2), 128,68 (C-2'), 123,36 (C-5''), 121,54 (C-5'''), 119,38 (C-6), 116,53 (C-3'''), 115,49 (C-3''), 114,79 (C-6'), 110,62 (C-3'), 40,45 (C-12), 39,90 (C-11), 39,69 (C-11''), 39,65 (C-11'''), 39,57 (C-11'), 38,96 (C-12'', C-12'''), 38,51 (C-12'), 29,23 (C-7), 29,08 (C-7'''), 28,99 (C-7''), 28,67 (C-7').

IX.3. C. crambe

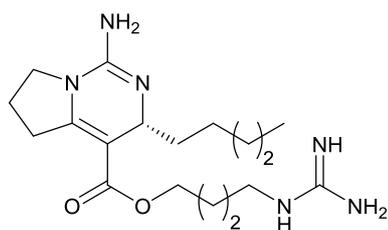
IX.3.1. Isolement

L'éponge *C. crambe* lyophilisée (37,8 g) est broyée et extraite plusieurs fois dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH aux ultrasons. L'extrait organique est fractionné par SPE (13 fractions). La fraction 6 (201 mg) éluée avec un mélange H₂O/MeOH (50/50 v/v) est purifiée par HPLC semi-préparative sur colonne NUCLEODUR Sphinx RP pour donner **Cc1** (12,4 mg), **Cc2** (6,0 mg), **Cc3** (9,3 mg) et **Cc4** (8,7 mg). Le gradient utilisé est celui présenté au tableau 5.

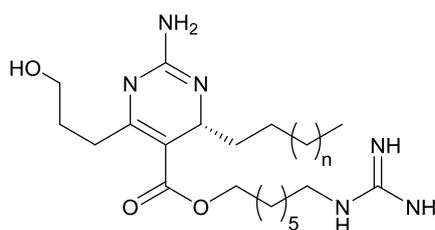
Tableau 5. Gradient pour la purification.

Temps /min	%Eau + 0,05% HFBA	%ACN + 0,05% HFBA
0	77	23
5	77	23
85	50	50
Débit : 3 mL/mn		

IX.3.2.Caractérisation



Cc1 (160)

Cc2 (169) : n = 2
Cc3 (170) : n = 3
Cc4 (171) : n = 4

- **Cc1 (160)** : crambescine A2 364

Formule brute : $C_{18}H_{33}N_6O_2$

M = 364,5 g/mol.

Apparence : huile orangée.

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Cc2 (169)** : crambescine C1 424

Formule brute : $C_{21}H_{40}N_6O_3$

M = 424,5 g/mol.

Apparence : huile orangée.

HRMS : $[M+H]^+ m/z = 425,3250$.

CD : $\Delta\epsilon (\lambda_{max}/nm) = -8,20 (213) + 31,23 (248)$ ($c 5,74 \times 10^{-4}$ M, MeOH).

$[\alpha_D]_{HCl} : - 8,0^\circ$ ($c 0,43$, MeOH) ; $[\alpha_D]_{TFA} : - 12,0^\circ$ ($c 0,35$, MeOH) ; $[\alpha_D]_{HFBA} : - 0,92^\circ$ ($c 0,65$, MeOH).

RMN 1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult. , J) : 4,41 (dd, $^3J = 7,9 - 4,4$ Hz, 1H, H-13), 4,20 (m, 1H, H-5), 4,17 (m, 1H, H-5), 3,61 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, H-11), 3,17 (t, $^3J = 7,0$ Hz, 2H, H-2), 2,84 (m, 1H, H-9), 2,79 (m, 1H, H-9), 1,81 (qt, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, H-10), 1,71 (m, 2H, H-4), 1,60 (m, 2H, H-3), 1,60 (m, 2H, H-14), 1,41 (m, 2H, H-3A), 1,41 (m, 2H, H-3B), 1,41 (m, 2H, H-3C), 1,41 (m, 2H, H-15), 1,32 (m, 2H, H-16), 1,32 (m, 2H, H-17), 0,91 (t, $^3J = 6,8$ Hz, 3H, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm : 166,1 (C-6), 158,6 (C-1), 153,5 (C-12), 149,0 (C-8), 106,0 (C-7), 65,8 (C-5), 62,1 (C-11), 51,1 (C-13), 42,4 (C-2), 37,0 (C-14), 32,5 (C-16), 32,0 (C-10), 29,9 (C-3B), 29,8 (C-3), 29,7 (C-4), 28,7 (C-9), 27,7 (C-3A), 27,1 (C-3C), 24,8 (C-15), 23,5 (C-17), 14,3 (C-18).

- **Cc3 (170)** : crambescine C1 438

Formule brute : $C_{22}H_{42}N_6O_3$

M = 438,5 g/mol.

Apparence : huile jaune.

HRMS : $[M+H]^+ m/z = 439,3425$.

CD : $\Delta\epsilon (\lambda_{max}/nm) = -8,23 (214) + 28,07 (248)$ ($c 5,11 \times 10^{-4}$ M, MeOH).

$[\alpha_D]_{\text{HCl}} : -2,7^\circ$ (*c* 0,48, MeOH) ; $[\alpha_D]_{\text{TFA}} : +0,8^\circ$ (*c* 0,38, MeOH) ; $[\alpha_D]_{\text{HFBA}} : -0,10^\circ$ (*c* 1,0, MeOH).
 RMN ^1H (500 MHz, *d*₄-MeOH), δ ppm (mult., *J*) : 4,41 (*dd*, $^3J = 7,9 - 4,3$ Hz, 1H, C-13), 4,19 (*m*, 1H, C-5), 4,16 (*m*, 1H, C-15), 3,61 (*t*, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, C-11), 3,17 (*t*, $^3J = 7,0$ Hz, 2H, C-2), 2,84 (*m*, 1H, C-9), 2,79 (*m*, 1H, C-9), 1,81 (*qt*, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, C-10), 1,70 (*m*, 2H, C-4), 1,59 (*m*, 2H, C-3), 1,59 (*m*, 2H, C-14), 1,39 (*m*, 2H, C-3A), 1,39 (*m*, 2H, C-3B), 1,39 (*m*, 2H, C-3C), 1,39 (*m*, 2H, C-15), 1,39 (*m*, 2H, C-16), 1,32 (*m*, 2H, C-17A), 1,29 (*m*, 2H, C-17), 0,91 (*t*, $^3J = 6,8$ Hz, 3H, C-18).
 RMN ^{13}C (125 MHz, *d*₄-MeOH), δ ppm : 166,1 (C-6), 158,7 (C-1), 153,5 (C-12), 149,0 (C-8), 106,0 (C-7), 65,8 (C-5), 62,1 (C-11), 51,1 (C-13), 42,5 (C-2), 37,0 (C-14), 32,5 (C-17), 32,0 (C-10), 30,3 (C-3B), 30,3 (C-16), 29,9 (C-3), 29,7 (C-4), 28,7 (C-9), 27,7 (C-3A), 27,2 (C-3C), 24,8 (C-15), 23,6 (C-17A), 14,3 (C-18).

- **Cc4 (171)** : crambescine C1 458

Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_3$

M = 452,5 g/mol.

Apparence : huile jaune.

HRMS : $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 453,3536$.

DC : $\Delta\varepsilon$ (λ_{max} nm) = -9.36 (214) +38.71 (248) (MeOH, *c* 6,00 x 10⁻⁴ M).

$[\alpha_D]_{\text{HCl}} : -11,6^\circ$ (*c* 0,48, MeOH) ; $[\alpha_D]_{\text{TFA}} : +1,5^\circ$ (*c* 0,33, MeOH) ; $[\alpha_D]_{\text{HFBA}} : -1,5^\circ$ (*c* 0,85, MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, *d*₄-MeOH), δ ppm (mult., *J*) : 4,41 (*dd*, $^3J = 7,7 - 4,4$ Hz, 1H, C-13), 4,20 (*m*, 1H, C-5), 4,17 (*m*, 1H, C-5), 3,61 (*t*, $^3J = 6,5$ Hz, 2H, C-11), 3,17 (*t*, $^3J = 7,0$ Hz, 2H, C-2), 2,84 (*m*, 1H, C-9), 2,79 (*m*, 1H, C-9), 1,81 (*qt*, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, C-10), 1,70 (*m*, 2H, C-4), 1,59 (*m*, 2H, C-3), 1,59 (*m*, 2H, C-14), 1,41 (*m*, 2H, C-3A), 1,41 (*m*, 2H, C-3B), 1,41 (*m*, 2H, C-3C), 1,38 (*m*, 2H, C-15), 1,38 (*m*, 2H, C-16), 1,33 (*m*, 2H, C-17), 1,33 (*m*, 2H, C-17B), 1,29 (*m*, 2H, C-17A), 0,91 (*t*, $^3J = 6,8$ Hz, 3H, C-18).

RMN ^{13}C (125 MHz, *d*₄-MeOH), δ (ppm) : 166,1 (C-6), 158,7 (C-1), 153,5 (C-12), 149,0 (C-8), 106,0 (C-7), 65,8 (C-5), 62,1 (C-11), 51,1 (C-13), 42,4 (C-12), 37,0 (C-14), 32,9 (C-17A), 32,0 (C-10), 30,3 (C-3B), 30,2 (C-17), 29,9 (C-3), 29,9 (C-4), 29,7 (C-16), 28,7 (C-9), 27,6 (C-3A), 27,1 (C-3C), 25,1 (C-15), 23,7 (C-17B), 14,4 (C-18).

X. Etude des champignons marins

Après lyophilisation et broyage, les champignons sont tous extraits d'une part avec un mélange de CH_2Cl_2 et AcOEt pour obtenir une fraction PA et d'autre part avec un mélange de CH_2Cl_2 et MeOH pour obtenir une fraction PP.

X.1. *Stachybotrys chartarum*

X.1.1. Isolement

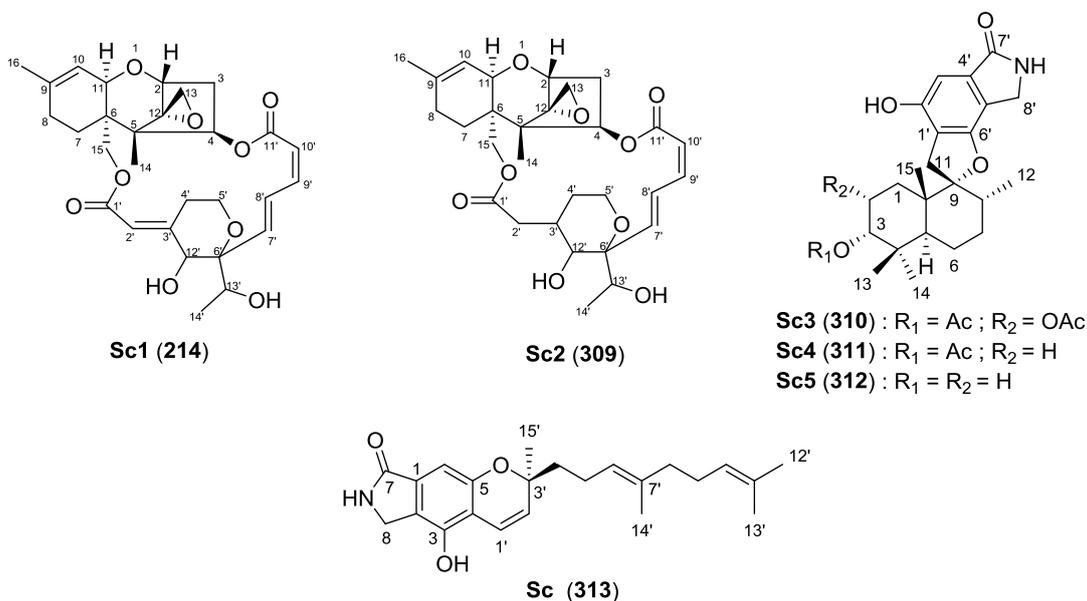
La fraction PA (152 mg) est fractionnée sur colonne diol (0,9 x 13,5 cm) avec un gradient de CyHex à l'AcOEt puis au MeOH pour donner 7 fractions rassemblées selon leur profil chromatographique, dont certaines sont purifiées par HPLC semi-préparative sur colonne analytique NUCLEODUR Sphinx RP (Macherey-Nagel) à la longueur d'onde 254 nm. La fraction 21-24 (17,9 mg) purifiée avec de l'eau et de l'ACN additionnés à 0,1% d'af selon le gradient du tableau 6, a donné lieu à **Sc1** (2,0 mg) et **Sc2** (0,9 mg). La fraction 27-30 (29,2 mg) purifiée avec de l'eau et de l'ACN additionnés à 0,1% d'af selon le gradient du tableau 6, a donné lieu à **Sc3** (9,3 mg), **Sc4** (2,5 mg) et **Sc5** (1,5 mg). La fraction 31-32 (29 mg) purifiée avec de l'eau et de l'ACN additionnés à 0,1% d'af selon le gradient du tableau 6, a donné lieu à **Sc6** (3,9 mg) et **Sc3** (2,5 mg).

Tableau 6. Gradient de purification sur *S. chartarum*.

Fraction 21-24			Fraction 27-30			Fraction 31-32		
Temps /min	%Eau	%ACN	Temps /min	%Eau	%ACN	Temps /min	%Eau	%ACN
0	70	30	0	60	40	0	70	30
5	70	30	5	60	40	5	70	30
28	0	100	22	0	100	30	15	85
33	0	100	25	0	100	35	15	85

Débit 1 mL/mn

X.1.2. Caractérisation



- **Sc1 (214) : satratoxine H**

Formule brute : C₂₉H₃₆O₉

M = 528,6 g/mol.

Apparence : solide blanc amorphe.

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Sc2 (309)** : 2',3'-dihydrosatratoxine H

Formule brute : $C_{29}H_{38}O_9$

M = 530,6 g/mol.

Apparence : solide blanc amorphe.

HRMS : $[M+H]^+$ $m/z = 531,2377$.

$[\alpha_D]$: - 0,5 ° (c 0,3, MeOH).

RMN 1H (500 MHz, d_4 -MeOH), δ ppm (mult., J) : 6,86 (*ddd*, $^3J = 16,5-6,8-1,5$ Hz, 1H, H-8'), 6,76 (*ddd*, $^3J = 11,4-6,8-1,5$ Hz, 1H, H-9'), 5,98 (*m*, 1H, H-4), 5,91 (*dd*, $^3J = 11,3-1,2$ Hz, 1H, H-10'), 5,41 (*m*, 1H, H-10), 5,70 (*dd*, 1H, $^3J = 16,5-1,3$ Hz, H-7'), 4,32 (*d*, $^3J = 12,6$ Hz, 1H, H-15b), 4,26 (*q*, $^3J = 6,5$ Hz, 1H, H-11), 4,16 (*d*, $^3J = 12,5$ Hz, 1H, H-15a), 4,06 (*td*, $^3J = 12,3-2,7$ Hz, 1H, H-5'α), 3,85 (*m*, 1H, H-5'β), 3,76 (*m*, 3H, H-2, H-3', H-13'), 3,51 (*s*, 1H, H-12'), 3,27 (H-2'), 3,09 (*d*, $^3J = 4,0$ Hz, 1H, H-13a), 2,87 (*d*, $^3J = 4,0$ Hz, 1H, H-13b), 2,49 (*dd*, $^3J = 15,1-8,4$ Hz, 1H, H-3α), 2,38 (*td*, $^3J = 13,3-5,6$ Hz, 1H, H-4'α), 2,14 (*m*, 1H, H-4'β), 2,11 (*m*, 1H, H-3β), 2,06 (*m*, 1H, H-8α), 2,00 (*m*, 1H, H-8β), 1,92 (*m*, 1H, H-7α), 1,87 (*m*, 1H, H-7β), 1,73 (*s*, 3H, H-16), 1,07 (*d*, $^3J = 6,5$ Hz, 3H, H-14'), 0,89 (*s*, 3H, H-14).

RMN ^{13}C (125 MHz, d_4 -MeOH), δ (ppm) : 169,1 (C-11'), 167,9 (C-1'), 146,0 (C-9'), 141,1 (C-9), 132,9 (C-8'), 131,6 (C-7'), 120,8 (C-10'), 120,1 (C-10), 83,8 (C-9), 80,6 (C-2), 75,11 (C-4), 73,8 (C-2'), 71,4 (C-11), 69,2 (C-13'), 66,5 (C-3'), 66,0 (C-15), 65,7 (C-12), 61,3 (C-5'), 60,5 (C-12'), 50,6 (C-5), 48,6 (C-13), 44,5 (C-6), 35,4 (C-3), 28,4 (C-8), 23,9 (C-4'), 23,3 (C-16), 21,1 (C-7), 17,1 (C-14'), 8,8 (C-14).

- **Sc3 (310)** : Acétate de 2α-acétoxystachybotrylactame

Formule brute : $C_{27}H_{35}O_7N$

M = 485,6 g/mol.

Apparence : solide blanc amorphe.

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Sc4 (311)** : Acétate de stachybotrylactame

Formule brute : $C_{25}H_{33}O_5N$

M = 427,5 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Sc5 (312)** : Stachybotrylactame

Formule brute : $C_{23}H_{31}O_4N$

M = 385,5 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- **Sc6 (313)** : *S*-chartarutine G

Formule brute : C₂₃H₂₉O₃N

M = 367,5 g/mol

Apparence : solide blanc amorphe

HRMS : [M+H]⁺ *m/z* = 368,2242.

[α_D] : - 0,06 ° (*c* 0,3, MeOH).

RMN ¹H (500 MHz, *d*₄-MeOH), δppm (mult., *J*) : 6,80 (*d*, ³*J* = 10,1 Hz, 1H, H-1'), 6,71 (*s*, 1H, H-6), 5,74 (*d*, ³*J* = 10,1 Hz, 1H, H-2'), 5,12 (*m*, 1H, H-6'), 5,07 (*m*, 1H, H-10'), 4,30 (*s*, 2H, H-8), 2,12 (*m*, 2H, H-5'), 2,04 (*m*, 2H, H-9'), 1,96 (*m*, 2H, H-8'), 1,70 (*m*, 2H, H-4'), 1,64 (*s*, 3H, H-12'), 1,57 (*s*, 3H, H-13'), 1,56 (*s*, 3H, H-14'), 1,38 (*s*, 3H, H-15').

RMN ¹³C (125 MHz, *d*₄-MeOH), δ (ppm) : 173,8 (C-7), 156,0 (C-3), 149,2 (C-5), 136,3 (C-7'), 133,7 (C-1), 132,1 (C-11'), 131,2 (C-2'), 125,4 (C-10'), 125,3 (C-6'), 124,1 (C-2), 118,3 (C-1'), 114,7 (C-4), 103,5 (C-6), 79,4 (C-3'), 44,6 (C-8), 42,0 (C-4'), 40,8 (C-8'), 27,7 (C-9'), 26,5 (C-15'), 25,8 (C-12'), 23,7 (C-5'), 17,7 (C-13'), 16,0 (C-14').

X.2. *Penicillium brevicompactum*

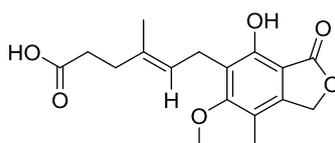
X.2.1. Isolement

La fraction PA (579 mg) est séparée en deux aliquots identiques. L'aliquot 1 (400 mg) est purifié sur colonne au gel de LH-20 dans le méthanol pour donner l'acide mycophénolique (125 mg). L'aliquot 2 (179 mg) est séparé par HPLC semi-préparative sur colonne Phenomenex Gemini C18 (10 x 250 mm, 5 μm) avec un gradient d'eau et d'acétonitrile acidifiés à l'acide formique selon le gradient du tableau 7 a donné l'acide mycophénolique (20 mg) avec une meilleure pureté.

Tableau 7. Gradient pour la purification.

Temps /min	%Eau	%ACN
0	90	10
5	90	10
30	0	100
Débit : 3 mL/min		

X.2.2. Caractérisation



acide mycophénolique

- Acide mycophénolique

Formule brute : $C_{17}H_{20}O_6$

$M = 320,3$ g/mol

Apparence : huile jaune

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

X.3. *Penicillium citrinum*

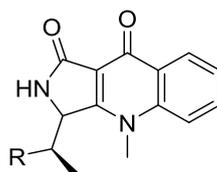
X.3.1. Isolement

La fraction PP (1,6 g) est fractionnée sur cartouche SPE avec de l'eau puis du méthanol et enfin un mélange dichlorométhane et méthanol pour donner 3 fractions. La fraction méthanolique (148 mg) est séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Nucleodur Sphinx RP (250 x 10 mm, 5 μ m) avec un gradient d'eau et d'acétonitrile acidifiés à l'acide formique 0,1% selon le gradient du tableau 8, a donné lieu à la quinolactacine A1 (7,5 mg) et la quinolactacine B1 (2,1 mg).

Tableau 8. Gradient pour la purification.

Temps /min	%Eau + 0,1% af	%ACN + 0,1% af
0	80	20
5	80	20
45	25	75
Débit : 3 mL/min		

X.3.2. Caractérisation



quinolactacine A : R = Et
quinolactacine B : R = Me

- Quinolactacine A

Formule brute : $C_{16}H_{18}N_2O_2$

$M = 270,3$ g/mol

Apparence : huile jaune

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

- Quinolactacine B

Formule brute : $C_{15}H_{16}N_2O_2$

$M = 256,3$ g/mol

Apparence : huile jaune

Données analytiques et spectroscopiques en accord avec les données bibliographiques.

Annexes

Annexe 1 : Revue des bromotyrosines isolées sur la période 2004-2017

Annexe 2 : Récapitulatif des champignons isolés et codes MUT associés, arbres phylogénétiques pour la détermination des espèces à la détermination douteuse et activité antibactérienne et cytotoxicité des extraits de champignons

Annexe 3 : Données spectrales

Annexe 4 : Publications

**Etat de l'art sur les bromotyrosines isolées entre 2004 et
2017**

I. Introduction

Les éponges de l'ordre Verongiida sont classées en quatre familles : Aplysinellidae, Aplysinidae, Ianthellidae et Pseudoceratinidae. Ces dernières ont fait l'objet de très nombreuses études chimiques qui ont révélé que la production de dérivés bromotyrosines constitue une caractéristique commune aux éponges de cet ordre⁵.

Les bromotyrosines ont été décrites pour la première fois en 1913⁶. Elles ont par la suite été très recherchées notamment pour leurs propriétés antitumorales, antifouling et biocides d'intérêt. Du point de vue écologique, les bromotyrosines permettent aux différentes espèces qui les produisent de se défendre. De nos jours, plus de 360 métabolites de la famille des bromotyrosines ont été décrites, principalement à partir d'éponges de l'ordre Verongiida, mais également d'éponges appartenant à d'autres ordres (Agelasida, Suberitida, Poecilosclerida, Dictyoceratida, Tetractinellida, Axinellida et Tethyida). Les bromotyrosines sont également produites par quelques ascidies et mollusques. On distingue six classes principales⁷ :

- Les bromotyrosines simples,
- Les spirocyclohexadiénylisoxazolines,
- Les spirooxepinisoxazolines,
- Les oximes,
- Les bastadines et hemibastadines,
- Et d'autres dérivés tels que les cyclodepsipeptides, par exemple.

Excepté pour les composés de la classe des bromotyrosines simples qui ne possèdent qu'une seule unité bromotyrosine, les métabolites appartenant aux autres classes sont constitués d'une à quatre unités bromotyrosine. Par ailleurs, on constate que le nombre de métabolites constitués de quatre unités bromotyrosine est plus faible comparativement aux métabolites qui en possèdent une ou deux.

L'ensemble des bromotyrosines isolées jusqu'en 2004 ayant déjà fait l'objet d'une revue de très grande qualité par l'équipe d'Hamann⁷, nous avons uniquement recensé les dérivés bromotyrosines isolés entre 2004 et 2017. Cette annexe traite donc de l'ensemble des bromotyrosines nouvelles isolées sur cette période, sur le plan structurel et en y ajoutant les activités associées. Seules les espèces différant des Vérongidés verront leurs ordres et familles spécifiquement explicitées.

⁵ Makarieva T. N., Stonik V. A., Alcolado P., Elyakov Y. B. 1981, Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). *Compar. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **68**, 481–484.

⁶ Mörner C. T. 1913, Zur Kenntnis der organischen Gerüstsubstanz des Anthozoönskeletts. IV. Mitt. Isolierung und Identifizierung der Bromgorgosäure. *Z. physiol. Chem.*, **88**, 138 - ?

⁷ Peng J., Li J., Hamann M. T. 2005, Chapter 2. The marine bromotyrosine derivatives. Ed. Cordell G. A., *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, Vol. 61, pp 59–262, Elsevier.

II. Les bromotyrosines simples

Trois nouvelles bromotyrosines simples, les purpuréalidines F et G⁸ ainsi que l'ester méthylique de l'acide *N*-((3,5-dibromo-4-(3-méthylaminopropoxy)phényl)éthyl)carbamique⁹ ont été isolées à partir de l'éponge *Psammaphysilla purpurea*. La stéréochimie des purpuréalidines n'a cependant pas été précisée pour le carbone portant le groupement hydroxyle en C-2. (figure 3).

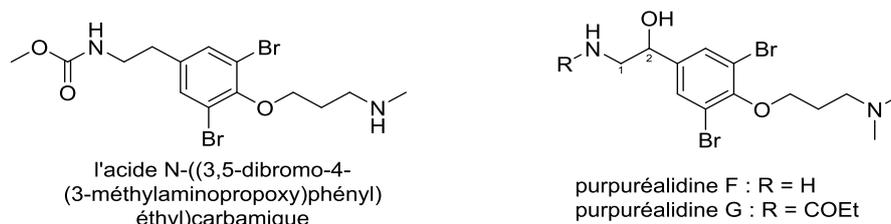


Figure 3. Structures des bromotyrosines simples isolées de *P. purpurea*^{8,9}.

L'acide 3,5-dibromo-4-méthoxyphénylpyruvique et la *N*-acétyl-3-bromo-4-hydroxyphényléthamine ont été décrits chez *Callyspongia* sp. (Ordre Haplosclerida, Famille Callyspongiidae), collectée en Australie¹⁰ (figure 4).

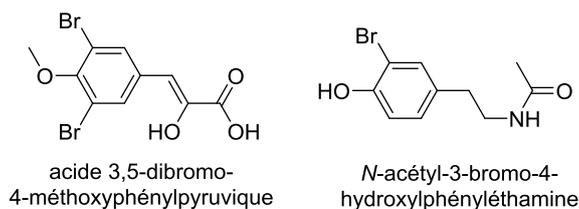


Figure 4. Structures des bromotyrosines simples isolées de *Callyspongia* sp.¹⁰

En 2012, les ianthelliformisamines A-C ont été décrites à partir de l'éponge *Suberea ianthelliformis* collectée en Australie¹¹. Si les ianthelliformisamines A et B possèdent une seule unité bromotyrosine, la ianthelliformisamine quant à elle, en possède deux (figure 5).

⁸ Tilvi S., Rodrigues C., Naik C. G., Parameswaran P. S., Wahidhulla S. 2004, New bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Psammaphysilla purpurea*. *Tetrahedron*, **60**, 10207–10215.

⁹ Ravinder K., Vijender Reddy A., Raju T.V., Venkateswarlu Y. 2005, A new dibromotyrosine-derived metabolite from the sponge *Psammaphysilla purpurea*. *ARKIVOC*, **iii**, 51–55.

¹⁰ Tian L.-W., Feng Y., Shimizu Y., Pfeifer T. A., Wellington C., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2014a, ApoE secretion modulating bromotyrosine derivative from the Australian marine sponge *Callyspongia* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 3537–3540.

¹¹ Xu M., Davis R. A., Feng Y., Sykes M. L., Shelper T., Avery V. M., Camp D., Quinn R. J. 2012, Ianthelliformisamines A–C, antibacterial bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Suberea ianthelliformis*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1001–1005.

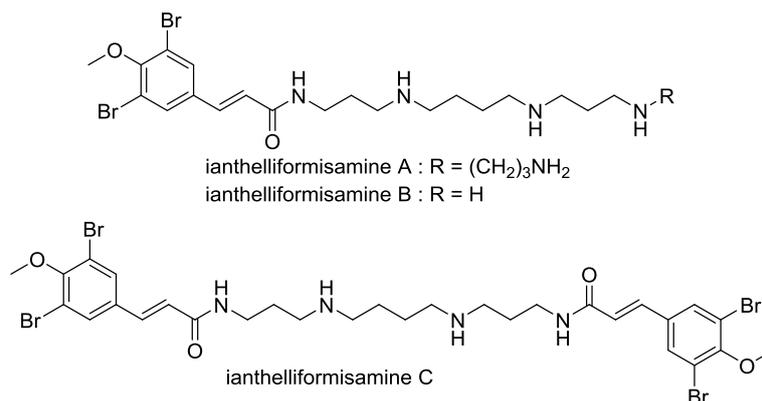


Figure 5. Structures des ianthelliformisamines A-C isolées de *Suberea ianthelliformis*¹¹.

Dans la même série, les aplysinellamines A-C et l'aplysamine-1-*N*-oxide ont été isolées de l'éponge *Aplysina* sp.¹². Seule l'aplysinellamine C n'est pas chargée (figure 6).

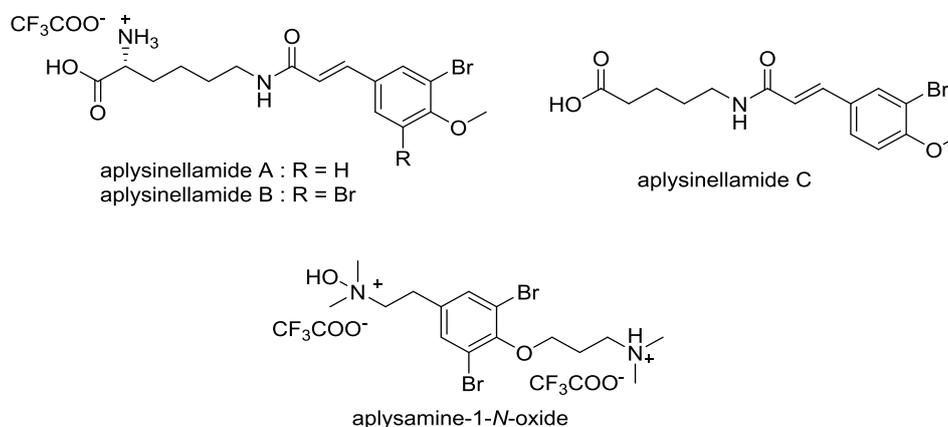


Figure 6. Structures des bromotyrosines simples isolées de *Aplysina* sp.¹²

A partir d'une éponge non déterminée de l'ordre Verongiida, les tyrokéradines E et F ont été isolées¹³. A partir de *Suberea* sp., les subéréamides A-C et la 12-hydroxysubéréamide C ont été isolées¹⁴. La subéréamide B a été isolée sous forme d'un mélange d'isomères *E/Z* en proportions 1:1. La 11-*N*-méthylmolo'kaiamine et la 11-*N*-cyano-11-*N*-méthylmolo'kaiamine ont également été décrites chez *Hexadella* sp.¹⁵ et le (1'*R*, 5'*S*, 6'*S*)-2-(3',5'-dibromo-1',6'-dihydroxy-4'-oxocyclohex-2'-ényl)acétonitrile, a été isolé de l'éponge *Pseudoceratina* sp.¹⁶. Mis à part la 11-*N*-méthylmolo'kaiamine, ces derniers composés viennent allonger la liste des sept dérivés des bromotyrosines simples composées d'un groupement cyano, précédemment décrits (figure 7).

¹² Tian L.-W., Feng Y., Shimizu Y., Pfeifer T., Wellington C., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2014b, Aplysinellamides A-C, bromotyrosine-derived metabolites from an Australian *Aplysinella* sp. marine sponge. *J. Nat. Prod.* **77**, 1210–1214.

¹³ Kubota T., Watase S., Mukai H., Fromont J., Kobayashi J. 2012, Tyrokéradines C-F, New bromotyrosine alkaloids from the verongid sponges. *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (12), 1599–1601.

¹⁴ Lee Y.-J., Han S., Lee H.-S., Kang J. S., Yun J., Sim C. J., Shin H. J., Lee J. S. 2013, Cytotoxic psammoplysin analogues from a *Suberea* sp. marine sponge and the role of the spirooxepinoxazoline in their activity. *J. Nat. Prod.*, **76**, 1731–1736.

¹⁵ Matsunaga S., Kobayashi H., van Soest R. W. M., Fusetani N. 2005, Novel bromotyrosine derivatives that inhibit growth of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila*, from a marine sponge *Hexadella* sp. *J. Org. Chem.* **70**, 1893–1896.

¹⁶ Su J.-H., Chen Y.-C., El-Shazly M., Du Y.-C., Su C.-W., Tsao C.-W., Liu L.-L., Chou Y., Chang W.-B., Su Y.-D., Chiang M. Y., Yeh Y.-T., Lu M.-C. 2013, Towards the small and the beautiful: A small dibromotyrosine derivative from *Pseudoceratina* sp. sponge exhibits potent apoptotic effect through targeting IKK/NFκB signaling pathway. *Mar. Drugs*, **11**, 3168–3185.

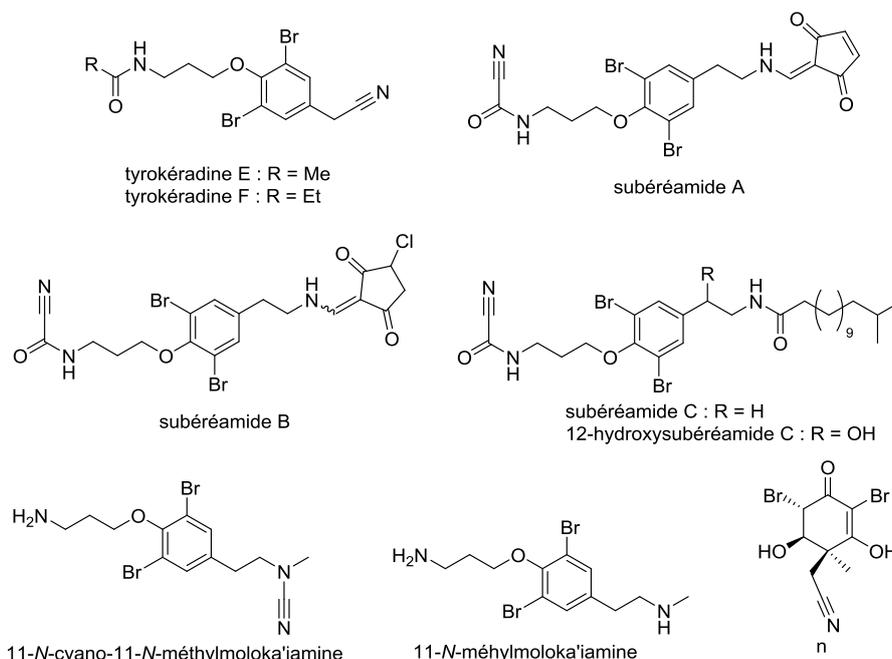


Figure 7. Structures des bromotyrosines simples à groupement cyano et 11-N-méthylmolluka'iamine¹³⁻¹⁶.

Lors de cette même étude sur *Hexadella* sp., un dernier métabolite, la kuchinoénamine, a été isolé. Il s'agit de la première bromotyrosine possédant un squelette tricyclo[5.2.1.0]-décane. Elle est dérivée de la 11-N-méthylmolluka'iamine sur laquelle le tricyclo est fixé *via* une liaison énamine (figure 8).

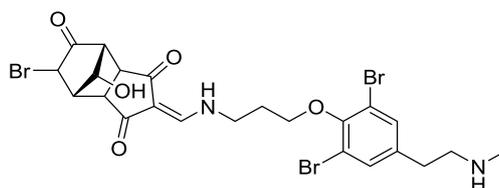


Figure 8. Structure de la kuchinoénamine¹⁵.

La pseudocéralidinone A est le deuxième composé dérivé de la bromotyrosine possédant un motif oxazolidone, tout comme la LL-PPA216 et ses stéréoisomères. Elle a été obtenue à partir de l'éponge *Pseudoceratina verrucosa*¹⁷. Par la suite, l'acanthodendrilline a également été décrite à partir de l'éponge *Acanthodendrilla* sp. (ordre Dendroceratida, famille Dictyodendrillidae). La stéréochimie *S* du carbone asymétrique de ce composé a été confirmée par synthèse totale et comparaison des propriétés chiroptiques¹⁸. Ces composés sont présentés à la figure 9.

¹⁷ Tran T. D., Pham N. B., Fechner G., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2013, Bromotyrosine alkaloids from the Australian marine sponge *Pseudoceratina verrucosa*. *J. Nat. Prod.* **76**, 516–523.

¹⁸ Sirimangkalakitti N., Yokoya M., Chamni S., Chanvorachote P., Plubrukarn A., Saito N., Suwanborirux K. 2016, Synthesis and absolute configuration of acanthodendrilline, a new cytotoxic bromotyrosine alkaloid from the Thai marine sponge *Acanthodendrilla* sp. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 258–262.

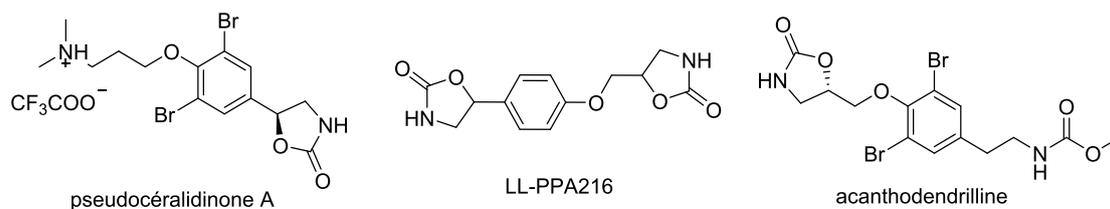


Figure 9. Structures des bromotyrosines simples possédant un motif oxazolidone^{17,18}.

A partir de l'ascidie *Synoicum pulmonaria* (Ordre Aplousobranchia, Famille Policlinidae), les synoxazolidinone A et C et les pulmonarines A et B ont été isolées¹⁹ (figure 10).

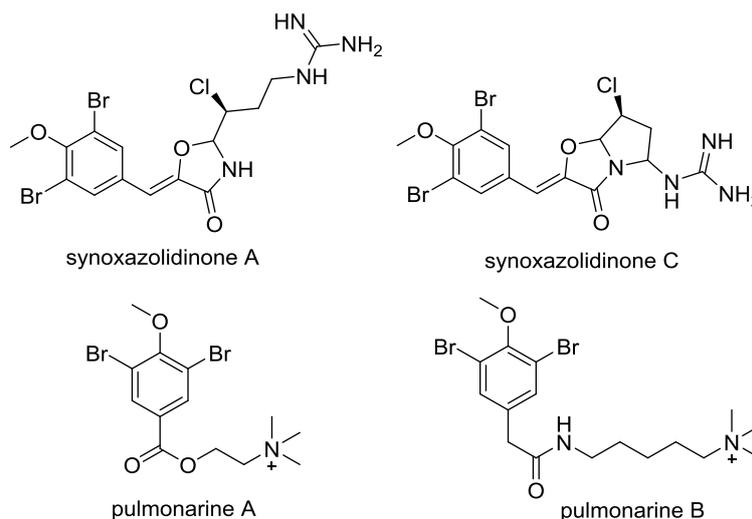


Figure 10. Structures des composés isolés de *Synoicum pulmonaria*¹⁹.

En 2009, l'aphrocallistine est isolée de l'éponge *Aphrocallistes beatrix*²⁰. Il s'agit de l'unique bromotyrosine simple possédant un motif adénine. En 2015, l'aplysinine A est isolée de l'éponge *Aplysina lacunosa*²¹. Elle possède un motif 2-aminoimidazole (figure 11).

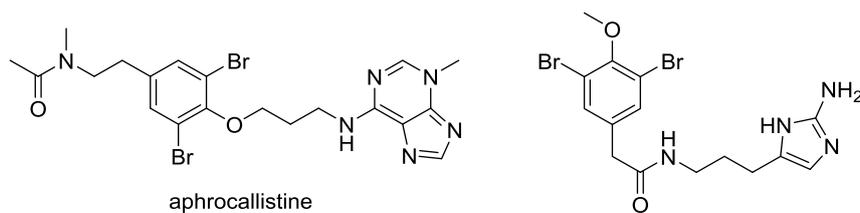


Figure 11. Structures de l'aphrocallistine et de l'aplysinine A^{20,21}.

D'autres molécules font partie des dibromotyrosines aromatiques. Il s'agit des subéréphénols B et C (figure 12) isolées à partir de l'éponge *Suberea mollis* échantillonnée en mer Rouge²², de l'acide 2-(3-

¹⁹ Trepos R., Cervin G., Hellio C., Pavia H., Stensen W., Stensvåg K., Svendsen J.-S., Haug T., Svenson J. 2014, Antifouling compounds from the Sub-Arctic ascidian *Synoicum pulmonaria*: Synoxazolidinones A and C, pulmonarins A and B, and synthetic analogues. *J. Nat. Prod.*, **77**, 2105–2113.

²⁰ Wright A. E., Roth G. P., Hoffman J. K., Divlianska D. B., Pechter D., Sennett S. H., Guzman E. A., Linley P., McCarthy P. J., Pitts T. P., Pomponi S. A., Reed J. K. 2009, Isolation, synthesis, and biological activity of aphrocallistin, an adenine-substituted bromotyramine metabolite from the Hexactinellida sponge *Aphrocallistes beatrix*. *J. Nat. Prod.*, **72**, 1178–1183.

²¹ Göthel Q., Sirirak T., Köck M. 2015, Bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina lacunosa*. *Beilstein J. Org. Chem.*, **11**, 2334–2342.

²² Abou-Shoer M. I., Shaala L. A., Youssef D. T. A., Badr J. M., Habib A.-A. M. 2008, Bioactive brominated metabolites from the Red Sea sponge *Suberea mollis*. *J. Nat. Prod.*, **71**, 1464–1467.

amino-2,4-dibromo-6-hydroxyphényl)acétique isolé à partir de l'éponge *Aplysina cauliformis* et de la 3-(3,5-dibromo-4-méthoxyphényl)-2-méthoxy-*N*-méthylpropan-1-ammonium isolé à partir de l'éponge *Pachychalina* sp. échantillonnées au large de Rio de Janeiro²³ et des 3,5-dibromo-*N,N,N*-triméthyltyraminium et 3,5-dibromo-*N,N,N,O*-tétraméthyltyraminium isolés de l'éponge *Verongula rigida*²⁴.

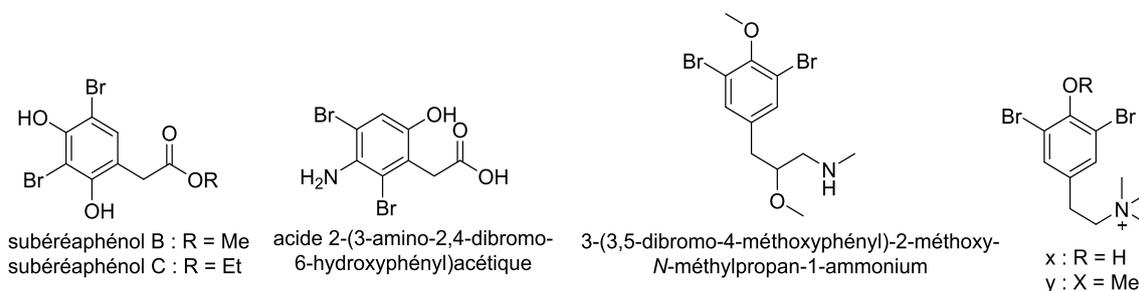


Figure 12. Structures des bromotyrosines aromatiques²²⁻²⁴.

III. Les spirocyclohexadiénylisoxazolines

Cette classe est constituée des bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines et des mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines. Ces derniers peuvent être simples ou posséder une unité bromotyrosine, une unité histamine, une chaîne latérale linéaire ou une combinaison de plusieurs de ces unités.

III.1. Les bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines

Plusieurs bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines ont été décrites depuis 2004. La (+)-aplysinilline a été isolée de *Aplysinella* sp.²⁵, les aplysinones A-D ont été isolées de *Aplysina gerardogreeni*²⁶ et la 11-hydroxyaérothionine a été isolée de *Verongula rigida*²⁴. Leur chaîne centrale est simple (figure 13).

²³ De Oliveira M. F., de Oliveira J. H. H. L., Galetti F. C. S., de Souza A. O., Silva C. L., Hajdu E., Peixinho S., Berlinck R. G. S. 2006, Antimycobacterial brominated metabolites from two species of marine sponges. *Planta Med.*, **72**, 437–441.

²⁴ Galeano E., Thomas O. P., Robledo S., Munoz D., Martinez A. 2011, Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Mar. Drugs*, **9**, 1902–1913.

²⁵ Ankudey F. J., Kiprof P., Stromquist E. R., Chang L. C. 2008, New bioactive bromotyrosine-derived alkaloid from a marine sponge *Aplysinella* sp. *Planta Med.*, **74**, 555–559.

²⁶ Hernandez-Guerrero C. J., Zubia E., Ortega M. J., Carballo J. L. 2007, Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5275–5282.

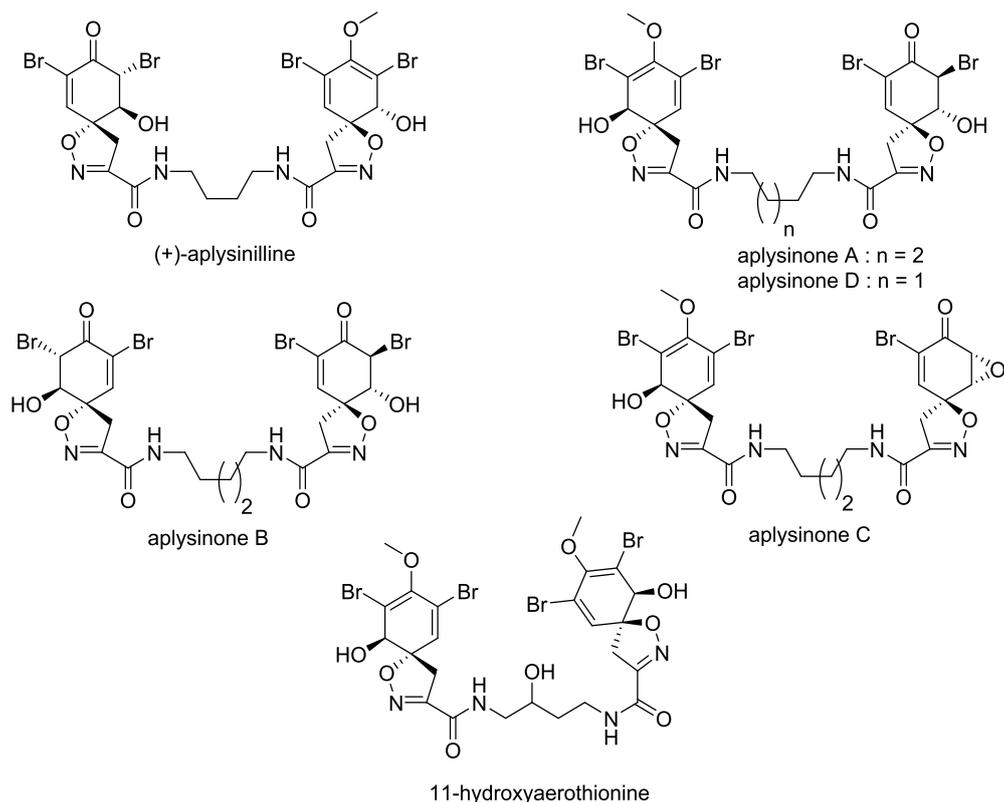


Figure 13. Structures des bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines à chaîne centrale simple²⁴⁻²⁶.

Deux autres composés isolés de *Verongula rigida*, la fistularine-3 et la 19-déoxifistularine-3, et la 14-débro-11-déoxifistularine-3 isolée de *Aplysina lacunosa*²¹ possèdent une unité bromotyramine (figure 14).

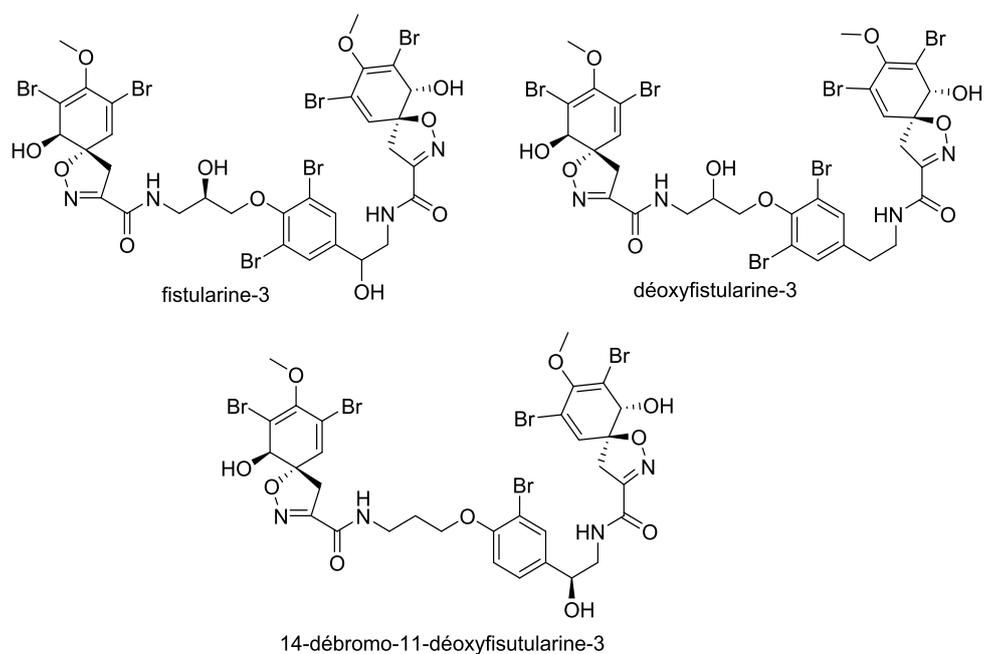


Figure 14. Structure des bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines possédant une unité bromotyramine²¹.

La sunabédine A, isolée d'une éponge de l'ordre Verongida dont la taxonomie n'a pas été précisée²⁷ et la pseudocératinazole, isolée de *Pseudoceratina* sp.²⁸ sont deux bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines possédant une unité imidazole (figure 15).

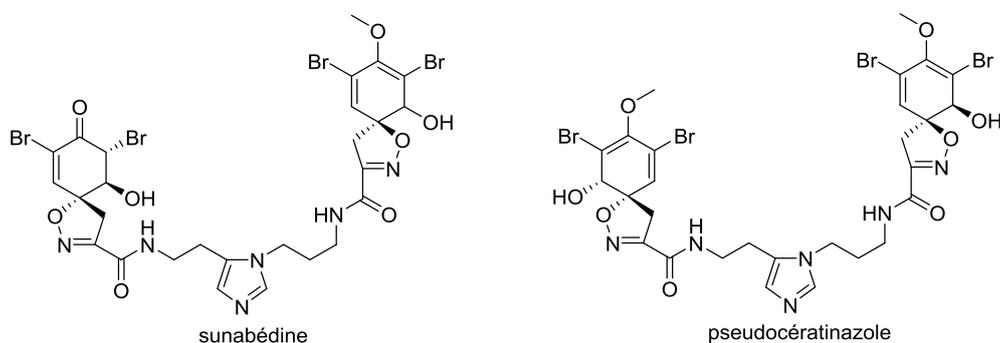


Figure 15. Structures des bis-spirocyclohexadiénylisoxazolines simples possédant une unité imidazole^{27,28}.

III.2. Les mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines

III.2.1. Simples

Seulement deux cas de bromotyrosines mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines simples ont été recensés au cours de ces dernières années. Il s'agit de la puréalidine R²⁴ et de son énantiomère²⁹ (figure 16).

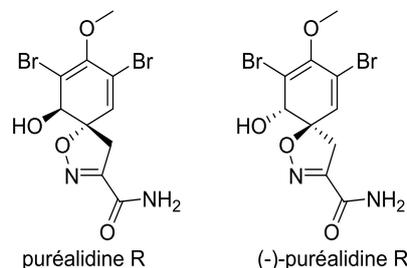


Figure 16. Structures de la puréalidine R et de son énantiomère^{24,29}.

III.2.2. Possédant une unité bromotyrosine

Les purpuréalidines A-D⁸ et J³⁰ ont été découvertes chez *Psammaphysilla purpurea*. Si les purpuréalidines A-D ont bien été isolées puis caractérisées, la purpuréalidine J a seulement été déduite en se basant sur des analyses conduites en spectrométrie de masse en tandem.

En 2008, les puréalidines T et U ont également été décrites après leur isolement à partir de l'éponge *Pseudoceratina* sp. provenant de Chine³¹. L'énantiomère de la puréalidine U, la puréalidine B, a été

²⁷ Maru N., Koyama T., Ohno O., Yamada K., Uemura D. 2010, Sunabedine, a novel toxic bromotyrosine-derivative alkaloid from okinawan sponge, order Verongida. *Heterocycles*, **82** (1), 371–375.

²⁸ Feng Y., Davis R. A., Sykes M. L., Avery V. M., Camp D., Quinn R. J. 2010, Pseudoceratinazole A: a novel bromotyrosine alkaloid from the Australian sponge *Pseudoceratina* sp. *Tetrahedron Lett.*, **51**, 4847–4850.

²⁹ Salim A. A., Khalil Z. G., Capon R. J. 2012, Structural and stereochemical investigations into bromotyrosine-derived metabolites from southern Australian marine sponges, *Pseudoceratina* spp. *Tetrahedron*, **68**, 9802–9807.

³⁰ Tilvi S., D'Souza L. 2012, Identifying the related compounds using electrospray ionization tandem mass spectrometry: bromotyrosine alkaloids from marine sponge *Psammaphysilla purpurea*. *Eur. J. Mass Spectrom.* **18**, 333–343.

isolée en 2011 à partir de l'éponge *Verongula rigida*²⁴. La ianthesine E a été isolée de *Pseudoceratina* sp. Elle possède un groupement sulfate en bout de chaîne³².

D'autres composés similaires, l'araplysilline N20-formamide, l'araplysilline N20-hydroxyformamide, les araplysillines IV et V isolées de l'éponge *Suberea ianthelliformis*³³ et les araplysillines VII-XI isolées d'une éponge d'Indonésie de la famille des *Aplysinellidae*³⁴ ont aussi été recensées.

Enfin, la (-)-puréaline B est le dernier exemple de bromotyrosine mono-spirocyclohexadiénylisoxazoline isolée de *Pseudoceratina* sp. Australie²⁹.

Toutes les structures sont reportées à la figure 17.

³¹ Ma K., Yang Y., Deng Z., de Voogd N. J., Proksch P., Wenhan L. 2008, Two new bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. *Chem. Biodiversity*, **5**, 1313–1320.

³² Kalaitzis J. A., de Almeida Leone P., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2008, Ianthesine E, a new bromotyrosine-derived metabolite from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina* sp. *Nat. Prod. Res.*, **22** (14), 1257–1263.

³³ Mani L., Jullian V., Mourkazel B., Valentin A., Dubois J., Cresteil T., Folcher E., Hooper J. N. A., Erpenbeck D., Aalbersberg W., Debitus C. 2012, New antiplasmodial bromotyrosine derivatives from *Suberea ianthelliformis* Lendenfeld, 1888. *Chem. Biodiversity*, **9**, 1436–1451.

³⁴ Dai J., Parrish S. M., Yoshida W. Y., Yip M. L. R., Turkson J., Kelly M., Williams P. 2016, Bromotyrosine-derived metabolites from an Indonesian marine sponge in the family *Aplysinellidae* (Order Verongiida). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26** 499–504.

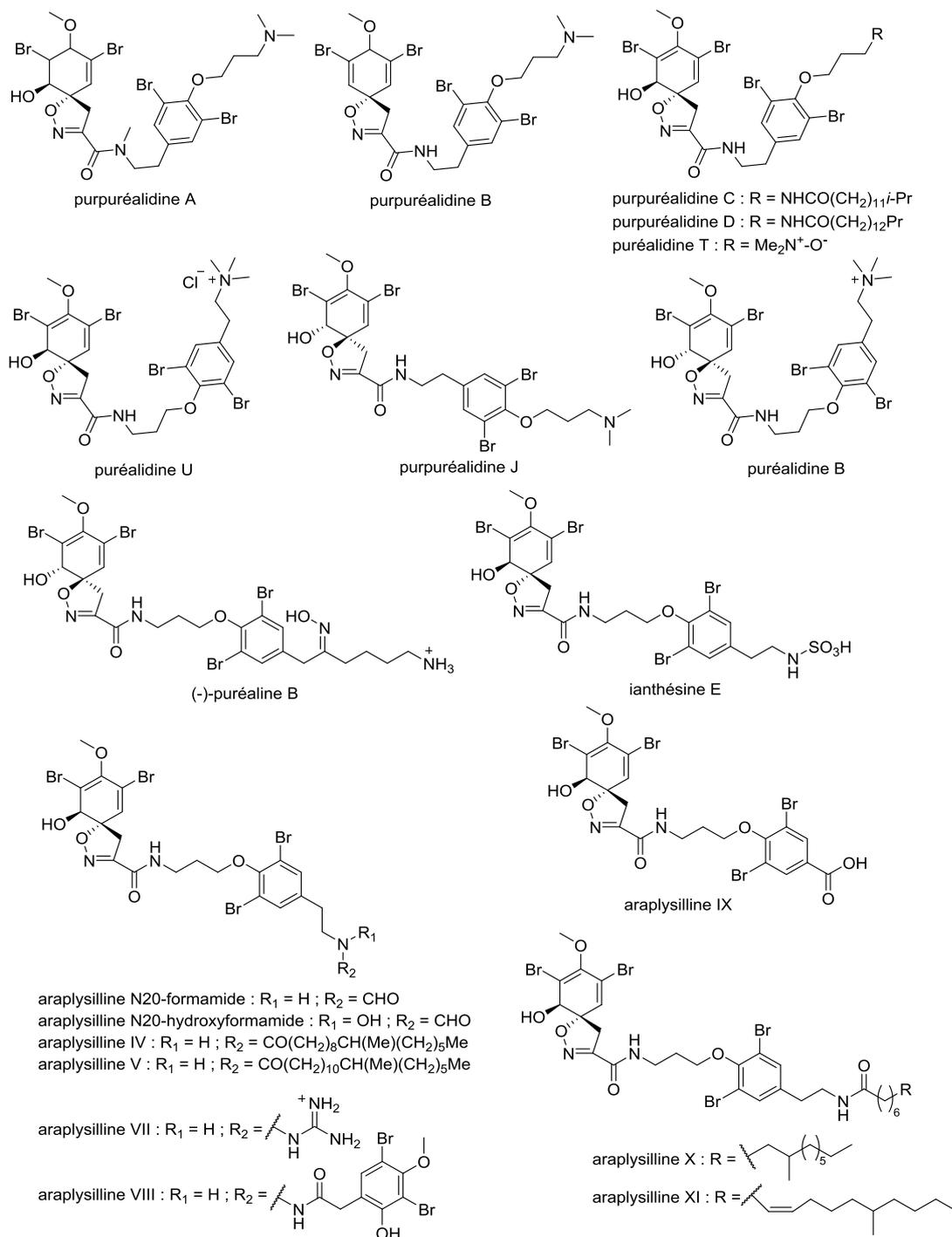


Figure 17. Structures des mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines à bromotyrosine^{8, 24,29-34}.

III.2.3. Possédant une unité histamine

Cinq mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines possédant une fonction histamine ont été décrites entre 2010 et 2015 (figure 18). Les cératinadines A-C ont été isolées de l'éponge *Pseudoceratina* sp.³⁵ et la cératinadine D a été isolée de l'éponge *Pseudoceratina purpurea* et son prédateur *Tylodina*

³⁵ Kon Y., Kubota T., Shibasaki A., Gono T., Kobayashi J. 2010, Ceratinadins A–C, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan marine sponge *Pseudoceratina* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** 4569–4572.

*corticalis*³⁶. Enfin, la (-)-aérophobine-2 a été isolée chez *Pseudoceratina* spp. collectée en Australie²⁹. En plus du motif histamine, les cératinadines A, B et D possèdent toutes trois un motif *N*-imidazole-quinolinone.

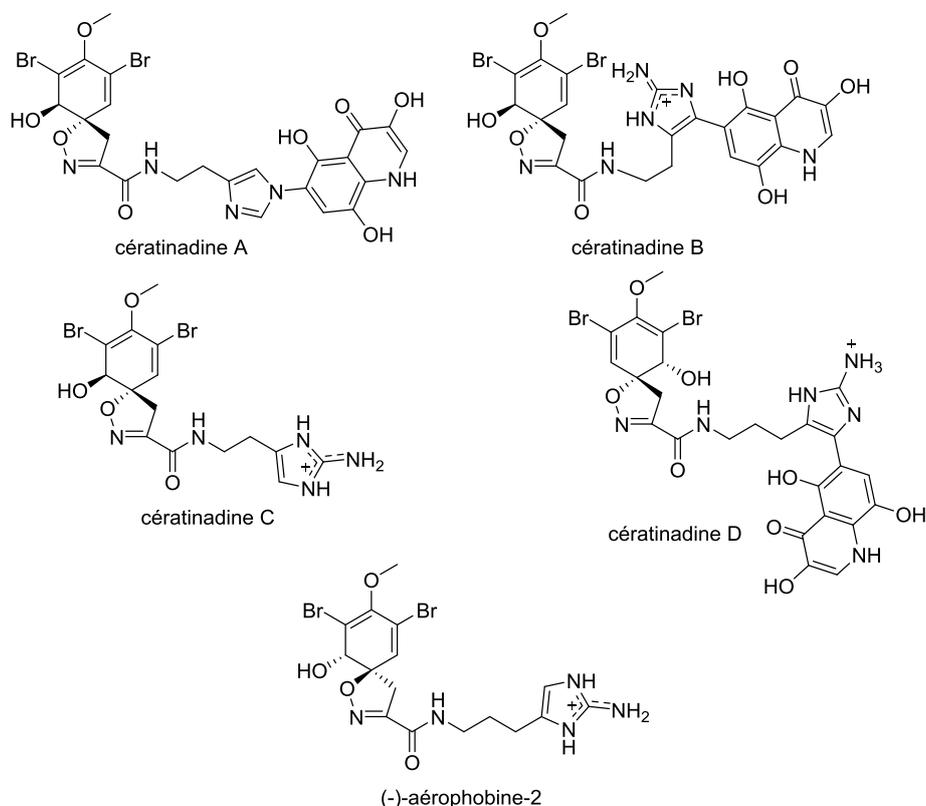


Figure 18. Structures des mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines à histamine^{29,35,36}.

III.2.4. Possédant une chaîne latérale linéaire

Les subéréamollines A-B isolées de *Suberea mollis*, une éponge collectée en mer Rouge et les acides purpurocératiques A-B isolés de *Pseudoceratina purpurea*³⁷ sont les seuls exemples de mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines à chaîne latérale décrits depuis 2004²² (figure 19).

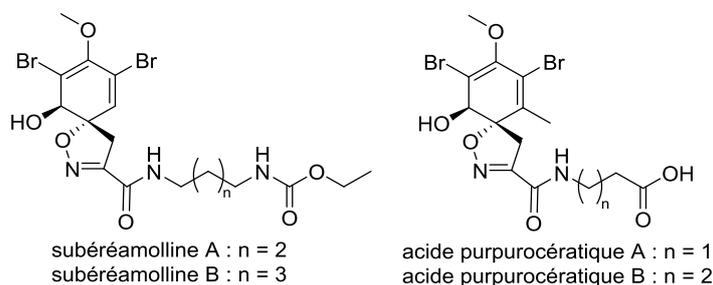


Figure 19. Structures des mono-spirocyclohexadiénylisoxazolines à chaîne latérale linéaire^{22,37}.

³⁶ Gotsbacher M. P., Karuso P. 2015, New antimicrobial bromotyrosine analogues from the sponge *Pseudoceratina purpurea* and its predator *Tylodina corticalis*. *Mar. Drugs*, **13**, 1389–1409.

³⁷ Kijjoa A., Bessa J., Wattanadilok R., Sawangwong P., Nascimento M. S. J., Pedro M., Silva A. M. S., Eaton G., van Soest R., Herz W. 2005, Dibromotyrosine Derivatives, a maleimide, aplysamine-2 and other constituents of the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Z. Naturforsch.*, **60b**, 904–908.

III.2.5. Mixte

La (+/-)-puréaline a été isolé sous la forme d'un mélange racémique à partir de *Pseudoceratina* sp. en 2012²⁹. Il s'agit d'un dérivé mono-spirocyclohexadiénylisoxazoline comportant à la fois une unité bromotyramine, une unité oxime et une unité histamine (figure 20).

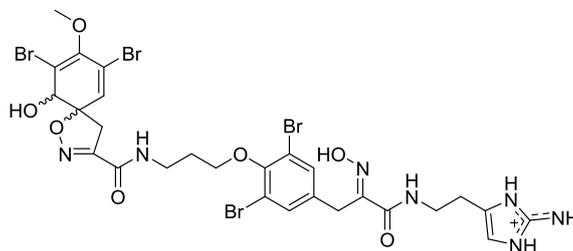


Figure 20. Structure de la (+/-)-puréaline²⁹.

IV. Les spirooxepinisoxazolines

La psammaplysine G, isolée de l'éponge *Hyattella* sp. (Ordre Dictyoceratida, Famille Spongiidae)³⁸, la psammaplysine H, isolée d'une éponge du genre *Pseudoceratina*³⁹, les psammaplysines X et Y, la 19-hydroxypsammaplysine X et la 19-hydroxycératinamide A isolées à partir de l'éponge *Suberea* sp.¹⁴ sont des bromotyrosines de type spirooxepinisoxazoline isolées entre 2010 et 2013 (figure 21).

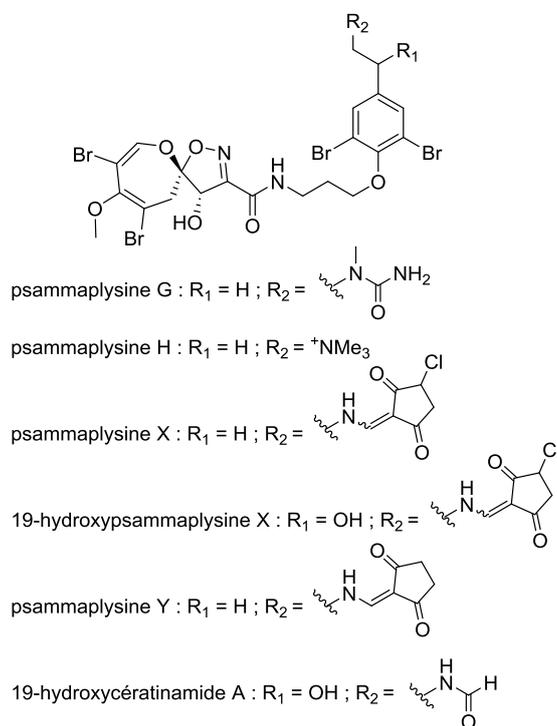


Figure 21. Structures des spirooxepinisoxazolines^{14,38,39}.

³⁸ Yang X., Davis R. A., Buchanan M. S., Duffy S., Avery V. M., Camp D., Quinn R. J. 2010, Antimalarial bromotyrosine derivatives from the Australian marine sponge *Hyattella* sp. *J. Nat. Prod.*, **73**, 985–987.

³⁹ Xu M., Andrews K. T., Birrell G. W., Tran T. L., Camp D., Davis R. A., Quinn R. J. 2011, Psammaplysin H, a new antimalarial bromotyrosine alkaloid from a marine sponge of the genus *Pseudoceratina*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** 846–848.

V. Les oximes

Cette classe est composée d'oximes possédant une unité histamine, une unité bromotyramine, un pont disulfure ou d'autre(s) unité(s) plus rares.

V.1. Possédant une unité histamine

Les tyrokéradines A-D ont été extraites et purifiées à partir d'éponges de l'ordre des Vérongidés collectées en Chine^{13,40}. Elles possèdent un motif histamine commun et les tyrokéradines A et B possèdent également un motif *N*-imidazolyle-quinolinone, de façon identique aux cératinadines A, B et D décrites précédemment (figure 22).

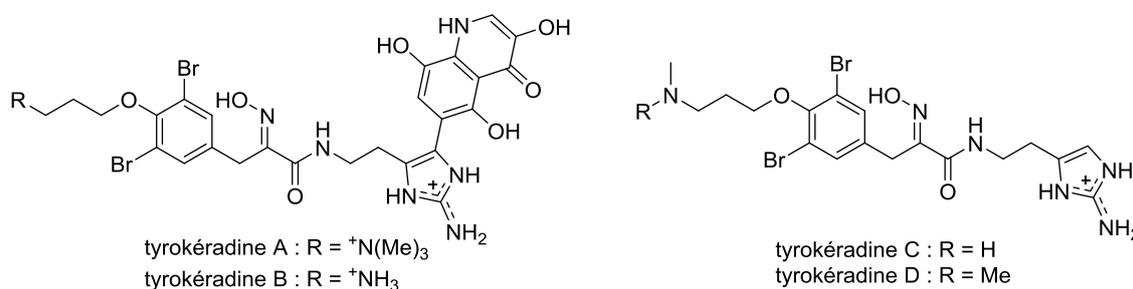


Figure 22. Structures des oximes à histamine^{13,40}.

V.2. Possédant une unité bromotyramine

L'araplysilline VI de *Suberea ianthelliformis* collectée dans les îles Salomon a aussi décrite³³. Elle fait partie des oximes à bromotyramine.

Dans cette même catégorie, les puréalines C et D et l'aplysamine-7 ont été retrouvées chez *Pseudoceratina* sp.²⁹ et l'aplysamine 8 a été retrouvée chez *Pseudoceratina purpurea* et son prédateur *Tyrodina corticalis*³⁶. Une autre « aplysamine 7 » a été décrite en 2013¹⁷ et sera dénommée aplysamine 7b.

En 2016, les purpuramines M et N ont été isolées d'une éponge de la famille des Aplysinellidae provenant d'Indonésie³⁴.

Tous ces composés sont présents sur la figure 23.

⁴⁰ Mukai H., Kubota T., Aoyama K., Mikami Y., Fromont J., Kobayashi J. 2009, Tyrokéradines A and B, new bromotyrosine alkaloids with an imidazolyl-quinolinone moiety from a Verongid sponge. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1337–1339.

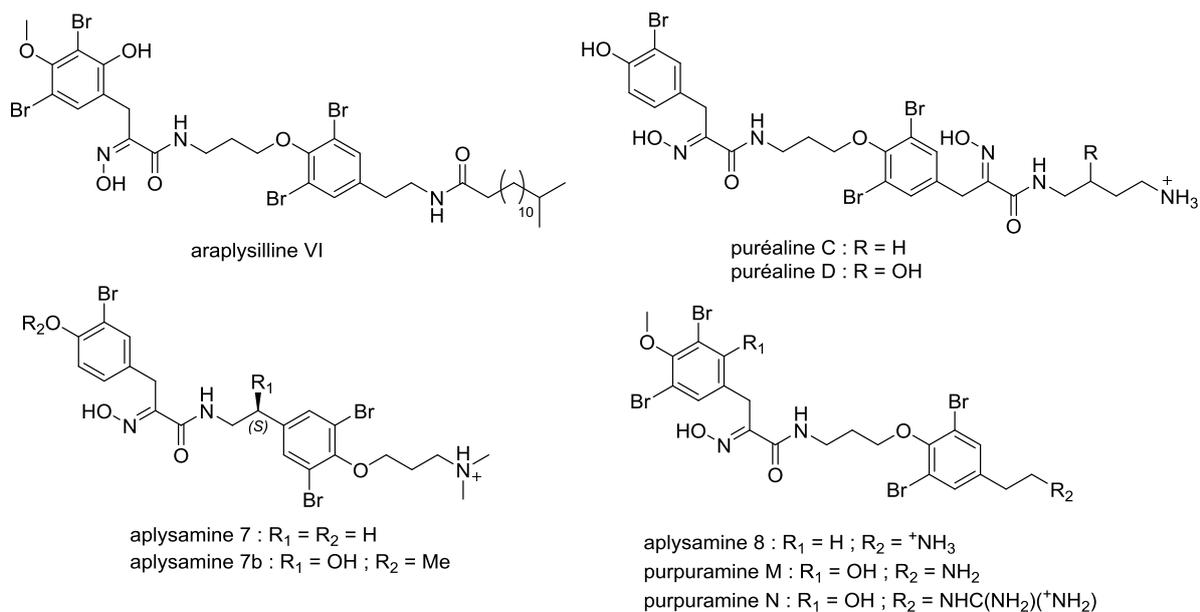


Figure 23. Structures des oximes à bromotyramine^{17,29,33,34,36}.

A partir de l'éponge *Psammaphysilla purpurea*, la purpuréalidine H a été isolée et décrite tandis que la purpuréalidine I a seulement été décrite après une analyse intensive par spectrométrie de masse tandem^{8,30} (figure 24).

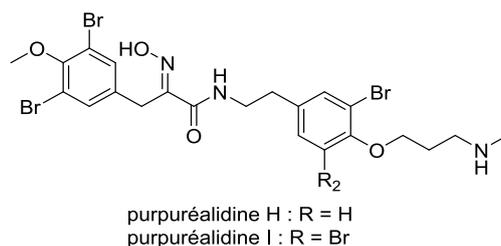


Figure 24. Structures des purpuréalidines H et I^{8,30}.

Enfin, la 20-*N*-méthylpurpuramine E⁴¹ est le dernier exemple de cette catégorie (figure 25). L'absence de brome et d'alcool sur le cycle aromatique attenant à l'oxime en fait une bromotyrosine non conventionnelle très rare.



Figure 25. Structure de la 20-*N*-méthylpurpuramine E⁴¹.

V.3. Possédant un pont disulfure

⁴¹ Teruya T., Iwasaki A., Suenaga K. 2008, 20-*N*-Méthylpurpuramine E: New bromotyrosine-derived metabolite from Okinawan marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **81** (8), 1026–1027.

La cyclobispsammapline A est le seul dérivé de cette classe recensé. Ce métabolite a été isolé à partir de l'association entre deux éponges de l'ordre Tetractinellida : les éponges *Jaspis* sp. (famille Ancorinidae) et *Poecillastra* sp. (famille Vulcanellidae) en 2008⁴² (figure 26).

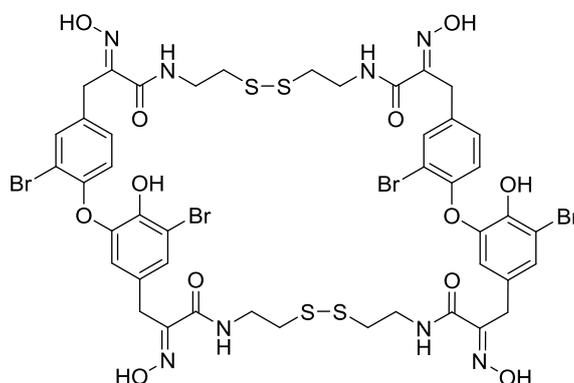


Figure 26. Structure de la cyclobispsammapline A⁴².

V.4. Autres oximes

La psammapline M a été isolée de l'association entre les éponges *Jaspis* sp et *Poecillastra* sp. en 2008⁴² et deux tyrokéradines ont été isolées d'une éponge de l'ordre des Vérongidés en 2015⁴³. La psammapline M et les tyrokéradines G et H sont des oximes composées d'une β-alanine et la tyrokéradine H est également constituée d'une fonction pyridinium (figure 27).

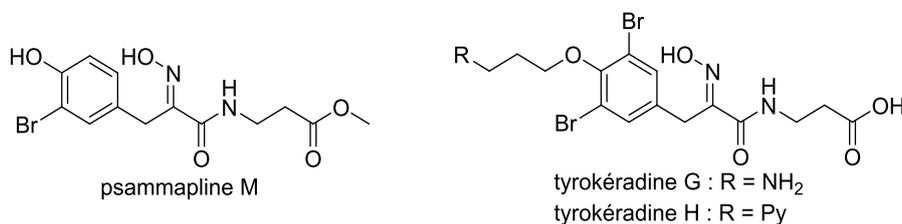


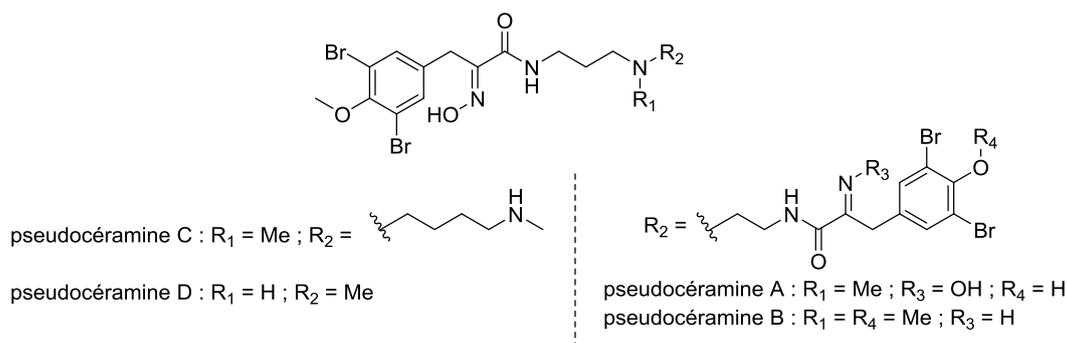
Figure 27. Structures de la psammapline M et des tyrokéradines G et H^{42,43}.

Enfin, quatre autres composés ont été décrits à partir de l'éponge *Pseudoceratina* sp. collectée en Australie⁴⁴ (figure 28).

⁴² Shinde P. B., Lee Y. M., Dang H. T., Hong J., Lee C.-O., Jung J. H. 2008, Cytotoxic bromotyrosine derivatives from a two-sponge association of *Jaspis* sp. and *Poecillastra* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6414–6418.

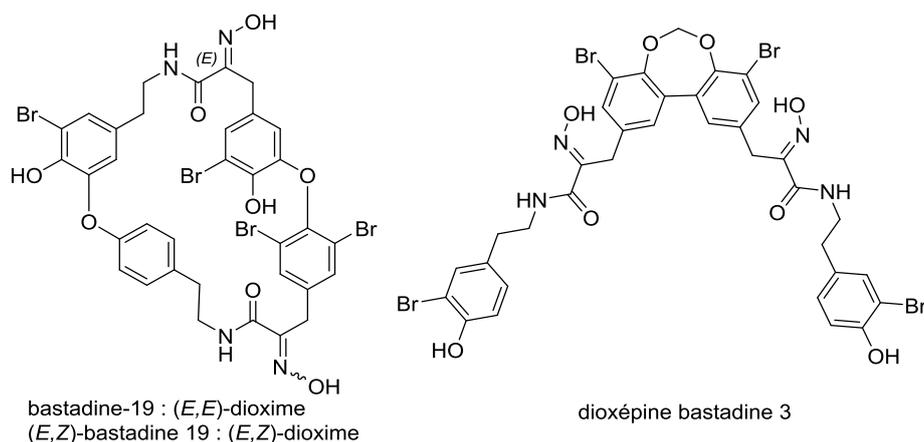
⁴³ Kubota T., Watase S., Sakai K., Fromont J., Gonoï T., Kobayashi J. 2015, Tyrokeradines G and H, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan Verongid sponge. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 5221–5223.

⁴⁴ Yin S., Davis R. A., Shelper T., Sykes M. L., Avery V. M., Elofsson M., Sundin C., Quinn R. J. 2011, Pseudoceramines A–D, new antibacterial bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Pseudoceratina* sp. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 6755–6760.

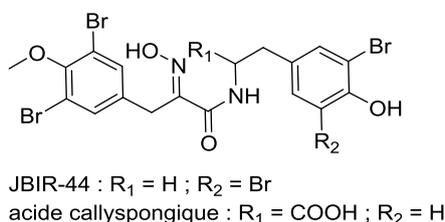
Figure 28. Structures des pseudocéramines A-D⁴⁴.

VI. Les bastadines et hemibastadines

Seulement deux nouvelles bastadines ont été décrites depuis 2004 (figure 29). Il s'agit de la (*E,Z*)-bastadine 19, un diastéréoisomère de la (*E,E*)-bastadine 19 et de la dioxépine bastadine 3, composée d'une fonction dioxépine peu commune⁴⁵.

Figure 29. Structures des bastadines⁴⁵.

Plusieurs structures similaires aux hemibastadines ont été décrites depuis 2004. JBIR-44 en est le premier exemple⁴⁶. Plus tard, l'acide callyspongique a été décrit chez *Callyspongia* sp. (Ordre Haplosclerida, Famille Callyspongiidae), collectée en Australie¹⁰ (figure 30).

Figure 30. Structures des dérivés des bastadines^{10,46}.

⁴⁵ Calcul L., Inman W. D., Morris A. A., Tenney K., Ratnam J., McKerrow J. H., Valeriote F. A., Crews P. 2010, Additional insights on the bastadins: Isolation of analogues from the sponge *Ianthella* cf. *reticulata* and exploration of the oxime configurations. *J. Nat. Prod.* **73**, 365–372.

⁴⁶ Fujiwara T., Hwang J.-H., Kanamoto A., Nagai H., Takagi M., Shin-ya K. 2009, JBIR-44, a new bromotyrosine compound from a marine sponge *Psammaphysilla purpurea*. *J. Antibiot.*, **62**, 393–395.

Enfin, l'aplysamine 6, qui possède une double liaison supplémentaire par rapport aux hémibastadines, a également été isolée à partir de l'éponge *Pseudoceratina* sp. collectée en Australie⁴⁷ (figure 31).

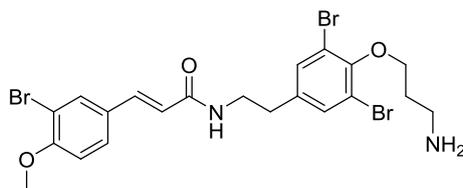


Figure 31. Structure de l'aplysamine 6⁴⁷.

VII. Autres dérivés

En 2004, les psammaplysènes A et B ont été isolés de *Psammaplysilla* sp. (taxonomie corrigée en *Pseudoceratina* sp.)⁴⁸, en 2007 la psammaplysène C a été isolée de *Psammoclema* sp. (Ordre Poecilosclerida, Famille Chondropsidae)⁴⁹, plus récemment en 2017, l'anomoiane B a été isolée chez une éponge du genre *Hexadella* et l'aplyzanzine B a été retrouvée chez l'association *Jaspis* sp. (Ordre Teractinellida, Famille Ancorinidae) et *Bubaris* sp. (Ordre Bubarida, Famille Bubaridae) collectées en Indonésie⁵⁰ (figure 32).

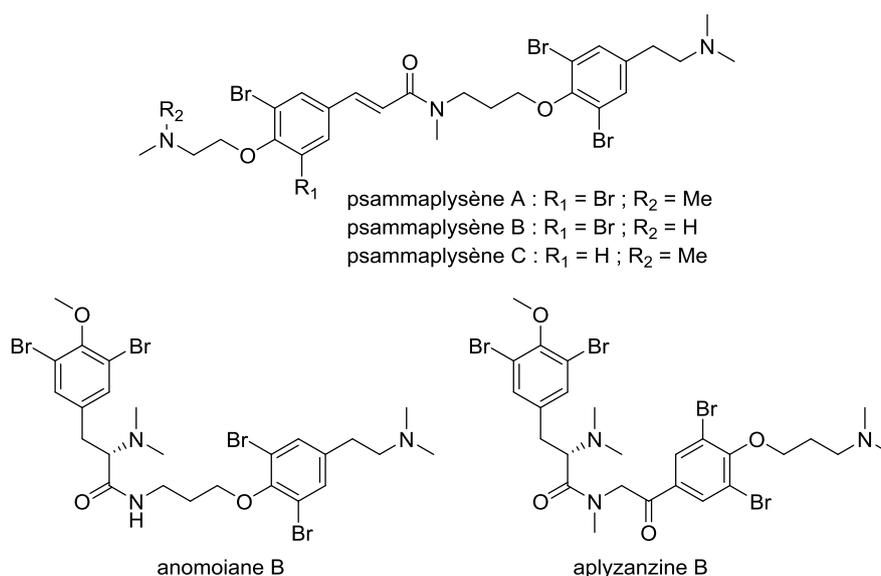


Figure 32. Structures de l'anomoiane B et de l'aplyzanzine B⁴⁸⁻⁵⁰.

⁴⁷ Buchanan M. S., Carroll A. R., Fechner G. A., Boyle A., Simpson M., Addepalli R., Avery V. M., Hooper J. N. A., Cheung T., Chen H., Quinn R. J. 2008, Aplysamine 6, an alkaloidal inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase from the sponge *Pseudoceratina* sp. *J. Nat. Prod.* **71**, 1066–1067.

⁴⁸ Schroeder F. C., Kau T. R., Silver P. A., Clardy J. 2005, The psammaplysènes, specific inhibitors of FOXO1a nuclear export. *J. Nat. Prod.*, **68**, 574–576.

⁴⁹ Buchanan M. S., Carroll A. R., Addepalli R., Avery V. M., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2007, Psammaplysènes C and D, cytotoxic alkaloids from *Psammoclema* sp. *J. Nat. Prod.* **70**, 1827–1829.

⁵⁰ Tarazona G., Santamaría G., Cruz P. G., Fernández R., Pérez M., Martínez-Leal J. F., Rodríguez J., Jiménez C., Cuevas C. 2017, Cytotoxic anomoian B and aplyzanzine B, new bromotyrosine alkaloids from Indonesian sponges. *ACS Omega*, **2**, 3494–3501.

Les pseudocératines A et B (figure 33) sont des molécules cycliques composées de deux sous-unités bromotyrosines, isolées à partir de l'éponge *Pseudoceratina purpurea*⁵¹.

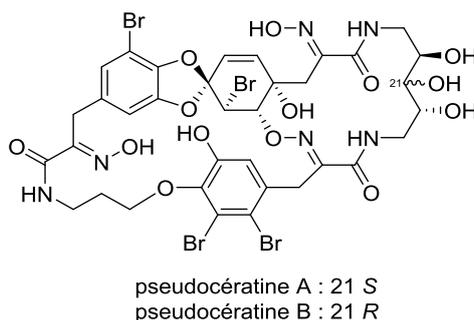


Figure 33. Structures des pseudocératines A et B⁵¹.

Les pipestélides A et B font partie des cyclodepsipeptides déjà retrouvés chez les vérongidés (figure 34). Ces bromotyrosines cycliques isolées à partir de l'éponge *Pipestela candelabra* (Ordre Axinellida, Famille Axinellidae) sont dérivées du jaspamide⁵².

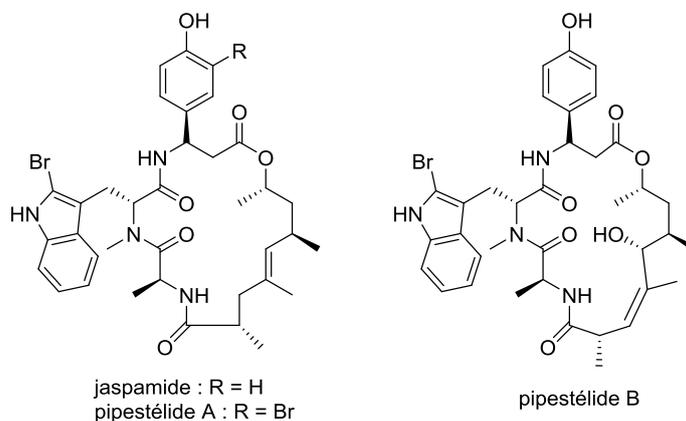


Figure 34. Structures des cyclodepsipeptides : pipestélides et jaspamide⁵².

VIII. Activités biologiques

Les bromotyrosines sont diversifiées tant par leur structure que par leur bioactivité. Les activités incluent à la fois un potentiel antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiparasitaire...

Les activités biologiques recensées pour ces derniers composés décrits ont été regroupées par la suite. L'évaluation de l'activité (bonne, moyenne, faible ou absence) est rapportée en fonction des critères des auteurs des publications recensées.

VIII.1. Activité antibactérienne

⁵¹ Jang J.-H., van Soest R. W. M., Fusetani N., Matsunaga S. 2007, Pseudoceratins A and B, antifungal bicyclic bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *J. Org. Chem.* **72**, 1211–1217.

⁵² Sorres J., Martin M.-T., Petek S., Levaique H., Cresteil T., Ramos S., Thoison O., Debitus C., Al-Mourabit A. 2012, Pipestelides A–C: Cyclodepsipeptides from the Pacific marine sponge *Pipestela candelabra*. *J. Nat. Prod.* **75**, 759–763.

Plusieurs dérivés des bromotyrosines ont été évalués pour leur activité antibactérienne contre des bactéries à Gram+ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et à Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*...). Les données regroupées pour les 26 composés testés sont résumées dans le tableau 9.

Tableau 9. Activité antibactérienne des bromotyrosines.

Composé	Activité	Ref.
11-N-méthyl-moloka'iamine	Activité modérée sur le pathogène de poisson <i>A. hydrophila</i> (ZI 7,5 mm à 100 µg).	15
11-N-cyano-11-N-méthyl-moloka'iamine	Activité modérée sur le pathogène de poisson <i>A. hydrophila</i> (ZI 8 mm à 100 µg).	15
(-)-Aérophobine 2	CI ₅₀ = 2,1 et 12 µM sur <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051 et 6633) ; absence d'activité (CI ₅₀ > 30 µM) sur <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 et 9144), <i>E. coli</i> (ATCC 11775) et <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145).	29
Aplysamine-7	Absence d'activité (CI ₅₀ > 30 µM) sur <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 et 9144), <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051 et 6633), <i>E. coli</i> (ATCC 11775) et <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145).	29
Aplysamine 8	CMI 125 µg/mL contre <i>E. coli</i> et 31 µg/mL sur <i>S. aureus</i> .	36
Cératinadine D	Absence d'activité sur <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .	36
Ianthelliformisamine A	Activité sélective sur <i>P. aeruginosa</i> , CI ₅₀ = 6,8 µM (CMI = 35 µM) et 77% d'inhibition de <i>S. aureus</i> à 175 µM.	11
Ianthelliformisamine B	Inhibition mineure de <i>P. aeruginosa</i> (80% à 87,5 µM).	11
Ianthelliformisamine C	Activité contre <i>P. aeruginosa</i> (CI ₅₀ de 8,9 µM (CMI = 17,5 µM)) et <i>S. aureus</i> (CI ₅₀ = 4,1 µM (CMI = 8,75 µM)).	11
Kuchinoénamine	Activité modérée contre le pathogène de poisson <i>A. hydrophila</i> (ZI 8 mm à 100 µg).	15
Pseudocéramine A	Absence d'activité sur <i>Y. pseudotuberculosis</i> (CI ₅₀ > 100 µM).	44
Pseudocéramine B	CI ₅₀ = 40 µM sur <i>Y. pseudotuberculosis</i> .	44
Pseudocéramine C	Absence d'activité sur <i>Y. pseudotuberculosis</i> (> 100 µM).	44
Pseudocéramine D	Absence d'activité sur <i>Y. pseudotuberculosis</i> (> 100 µM).	44
Pseudocératine A	Activité modérée sur <i>E. coli</i> (ZI 7 mm à 10 µg/disque), <i>B. subtilis</i> (ZI 7 mm à 10 µg/disque) et <i>S. aureus</i> (ZI 6,5 mm à 10 µg/disque).	51
Pseudocératine B	Activité modérée sur <i>E. coli</i> (ZI 8 mm à 10 µg/disque), <i>B. subtilis</i> (ZI 8 mm à 10 µg/disque) et <i>S. aureus</i> (ZI 7 mm à 10 µg/disque).	51
(+/-)-Puréaline	CI ₅₀ = 2,3 et 3,8 µM sur <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051 et 6633) et CI ₅₀ = 3,8 et 0,83 µM sur <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 et 9144) ; absence d'activité sur <i>E. coli</i> (ATCC 11775) et <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145).	29
(-)-Puréaline B	CI ₅₀ = 3,4 et 3,8 µM sur <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051 et 6633), absence d'activité sur <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 et 9144), <i>E. coli</i> (ATCC 11775) et <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145).	29
Puréaline C	CI ₅₀ = 2,6 et 2,8 µM sur <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051 et 6633) et CI ₅₀ = 2,6 et 6,2 µM sur <i>S. aureus</i> (ATCC 25923 et 9144) ; absence d'activité sur <i>E. coli</i> (ATCC 11775) et <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145).	29
Purpuréalidine B	Activité sur <i>E. coli</i> (CI ₅₀ > 12 µg/mL), <i>S. aureus</i> (CI ₅₀ = 10 µg/mL), <i>V. cholerae</i> (CI ₅₀ = 25 µg/mL), faible activité contre <i>S. flexneri</i> (CI ₅₀ = 100 µg/mL), absence d'activité sur <i>Klebsiella sp.</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	8
Subéréamolline A	ZI 3 mm sur <i>S. aureus</i> , absence d'activité sur <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> .	22
Subéréaphenol B	ZI 5 mm sur <i>S. aureus</i> , absence d'activité sur <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> .	22
Tyrokéradine A	Absence d'activité (CMI > 25 µg/mL) sur <i>M. luteus</i> et <i>S. aureus</i> .	40
Tyrokéradine B	Faible activité inhibitrice contre <i>M. luteus</i> et <i>S. aureus</i> (CMI = 25 µg/mL).	40
Tyrokéradine G	Absence d'activité sur <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>M. luteus</i> .	43
Tyrokéradine H	Absence d'activité sur <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>M. luteus</i> .	43

D'une façon générale, les bromotyrosines semblent être plus actives vis-à-vis des bactéries à Gram+ que des bactéries à Gram-. En effet, la quasi-totalité des composés testés sur *P. aeruginosa* sont inactifs ((-)-aérophobine, aplysamine-7, (+/-)-puréaline, (-)-puréaline B, puréaline C, purpuréalidine B, subéréamolline A et subéréaphénol B), hormis les ianthelliformisamines A-C qui inhibent sa croissance. De façon identique, seule la purpuréalidine B est active sur *E. coli*, quand les pseudocératine A et B ont une activité modérée et que les autres ((-)-aérophobine, aplysamine-7, aplysamine 8, cératinadine D, (+/-)-puréaline, (-)-puréaline B, puréaline C, purpuréalidine B, tyrokéradine G) sont inactifs. La 11-*N*-méthyl-moloka'iamine, la 11-*N*-cyano-11-*N*-méthyl-moloka'iamine et la kuchinoénamine ont seulement une activité modérée sur *Aeromonas hydrophila*, mais la subéréamolline A et la subéréaphénol B n'ont aucune activité sur *Klebsiella pneumoniae*. Lorsque les pseudocéramines A-D ont été testées contre *Yersinia pseudotuberculosis*, seule la pseudocéramine B a montré un effet modéré (CI₅₀ = 40 μM). Enfin, la purpuréalidine B a été testée sur *Klebsiella* sp. sans montrer d'effet, sur *Vibrio cholerae* avec une CI₅₀ moyenne de 25 μg/mL et sur *Shigella flexneri* avec un faible effet inhibiteur (CI₅₀ = 100 μg/mL).

A l'inverse, plusieurs bromotyrosines sont actives contre *S. aureus* (aplysamine 8, ianthelliformisamines A et C, pseudocératines A et B, (+/-)-puréaline, puréaline C, purpuréalidine B, subéréamolline A, subéréaphénol B) hormis l'aérophobine 2, l'aplysamine 7, la (-)-puréaline B, et les tyrokéradines A, B, G et H. De la même manière, la plupart sont actives sur *B. subtilis* ((-)-aérophobine 2, pseudocératines A et B, (+/-)-puréaline, (-)-puréaline B, puréaline C), hormis l'aplysamine-7 et les tyrokéradines G et H.

Les pseudocéramines A-D ont été testées à la fois sur *Y. pseudotuberculosis*, et en tant qu'inhibiteurs de la sécrétion de type III⁵³ de toxines chez cette même bactérie. Seule la pseudocéramine B inhibe faiblement la sécrétion de la « Yersinia outer protein » YopE⁵⁴ (CI₅₀ = 19 μM) et l'activité enzymatique de la YopH (CI₅₀ = 33 μM)⁴⁴.

Les relations de structure-activité sont difficiles à établir puisque par exemple, la (+/-)-puréaline, la (-)-puréaline B et la puréaline C ont quasiment la même activité sur *B. subtilis* et *P. aeruginosa* tandis que sur *S. aureus*, la (-)-puréaline B est inactive alors que les deux autres ont une CI₅₀ du même ordre de grandeur (3,8 et 0,83 μM en fonction de la souche et 2,6 et 6,2 μM en fonction de la souche, respectivement). La purpuréalidine B, de structure proche, est également inactive vis-à-vis de *P. aeruginosa* et possède pourtant une CI₅₀ de 10 μg/mL sur *S. aureus*. En revanche pour les ianthelliformisamines, le groupement spermine des ianthelliformisamines A et C semble important pour l'activité sur *P. aeruginosa*, puisque la ianthelliformisamine B, est constituée d'un fragment spermidine, voit son activité fortement réduite.

⁵³ Système de virulence de certaines bactéries à Gram-, leur permettant d'envahir un hôte, de résister à la phagocytose, de se développer dans les tissus et de causer la mort.

⁵⁴ Protéine effectrice inhibant la réponse immunitaire des cellules hôtes.

VIII.2. Activité antifongique

Quinze dérivés bromotyrosine ont été testés sur plusieurs champignons, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* en majorité et plus ponctuellement sur *Mycobacterium tuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Mortierella ramanniana*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Rhodotorula* sp., *Norcardia* sp. et *Trychophyton mentagrophytes*. Le tableau 10 regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau 10. Activité antifongique des bromotyrosines.

Composé	Activité	Ref.
3,5-dibromo-<i>N,N,N</i>-triméthyltyraminium	Activité moyenne sur <i>M. tuberculosis</i> (CMI = 49 µM).	23
3,5-dibromo-<i>N,N,N,O</i>-tétraméthyltyraminium	Pas d'activité sur <i>M. tuberculosis</i>	23
(-)-Aérophobine 2	Absence d'activité sur <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).	29
Aplysamine-7	Absence d'activité sur <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).	29
Cératinadine A	Actif sur <i>C. neoformans</i> (CMI = 4 µg/mL) et <i>C. albicans</i> (CMI = 2 µg/mL).	35
Cératinadine B	Actif sur <i>C. neoformans</i> (CMI = 8 µg/mL) <i>C. albicans</i> (CMI = 4 µg/mL).	35
Cératinadine C	Absence d'activité sur <i>C. neoformans</i> et <i>C. albicans</i> (CMI > 32 µg/mL).	35
Pseudocératine A	Inhibition de la croissance d'un mutant de <i>S. cerevisiae</i> (ZI 6,5 mm à 10 µg/disque), absence d'activité sur le phénotype sauvage de <i>S. cerevisiae</i> . Bonne activité sur <i>C. albicans</i> (ZI 8 mm à 10 µg/disque). Pas d'activité sur <i>P. chrysogenum</i> et <i>M. ramanniana</i> .	51
Pseudocératine B	Inhibition de la croissance d'un mutant de <i>S. cerevisiae</i> (ZI 6,5 mm à 10 µg/disque), absence d'activité sur le phénotype sauvage de <i>S. cerevisiae</i> . Bonne activité sur <i>C. albicans</i> (ZI 6,5 mm à 10 µg/disque). Pas d'activité sur <i>P. chrysogenum</i> et <i>M. ramanniana</i> .	51
(+/-) Puréaline	Absence d'activité sur <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).	29
(-)-Puréaline B	Absence d'activité sur <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).	29
Puréaline C	Absence d'activité sur <i>C. albicans</i> (ATCC 90028).	29
Purpuréalidine B	Absence d'activité sur <i>A. fumigatus</i> , <i>Fusarium</i> sp, <i>C. neoformans</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhodotorula</i> sp, <i>Norcardia</i> sp. et <i>C. albicans</i> .	8
Tyrokéradine A	Absence d'activité sur <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> et <i>A. niger</i> (CMI > 25 µg/mL).	40
Tyrokéradine B	Inhibition de <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> et <i>A. niger</i> (CMI de 12,5 µg/mL pour chacun).	40
Tyrokéradine G	Activité sur <i>C. neoformans</i> (CI ₅₀ = 16 µg/mL) et faible sur <i>A. niger</i> (CI ₅₀ = 32 µg/mL) ; pas d'activité sur <i>T. mentagrophytes</i> ni sur <i>C. albicans</i> .	43
Tyrokéradine H	Faible activité sur <i>A. niger</i> (CI ₅₀ = 32 µg/mL) ; pas d'activité sur <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. albicans</i> et <i>C. neoformans</i> .	43

Les bromotyrosines simples telles que l'acide 2-(3-amino-2,4-dibromo-6-hydroxyphényl)acétique et le 3-(3,5-dibromo-4-méthoxyphényl)-2-méthoxy-*N*-méthylpropan-1-ammonium sont faiblement actifs sur *M. tuberculosis*. Plusieurs composés tels que la (-)-aérophobine 2, l'aplysamine 7, la (+/-)-puréaline, la (-)-puréaline B et les tyrokéradines B, G, et H sont inactives sur *C. albicans*. La purpuréalidine B est inactive contre l'ensemble des souches fongiques testées (*A. fumigatus*, *Fusarium* sp, *C. neoformans*, *A. niger*, *Rhodotorula* sp, *Norcardia* sp. et *C. albicans*), tout comme la cératinadine C (*C. neoformans* et *C. albicans*). A l'inverse, les cératinadines A et B possèdent une activité sur *C.*

albicans (CMI de 2 et 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et *C. neoformans* (CMI de 4 et 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dans ce cas, cela suggère d'une part que le groupement imidazole quinoline, faisant défaut à la ceratinadine C, peut être important pour l'activité contre ces champignons et que d'autre part, la présence d'un guanidinium cyclique au lieu d'une histamine simple, augmente également l'activité.

Dans le cas des tyrokéradines, seuls les tyrokéradines G et H et les tyrokéradines A et B peuvent être comparées deux à deux du fait de leur structure. La tyrokéradine A est totalement inactive contre les souches testées (*T. mentagrophytes*, *C. neoformans*, *C. albicans* et *A. niger*) et la tyrokéradine B est active contre l'ensemble de ces souches (CMI de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour chacun). La seule différence entre ces deux composés est la présence d'une méthylamine dans le cas de la tyrokéradine A, alors que la tyrokéradine B possède une simple amine. Enfin, les tyrokéradines G et H ont une activité antifongique proche puisqu'elles sont toutes deux inactives sur *T. mentagrophytes* et sur *C. albicans*, et faiblement active sur *A. niger* ($\text{CI}_{50} = 32 \mu\text{g}/\text{mL}$). En revanche, la tyrokéradine G, possédant un groupement β -alanine, est active contre *C. neoformans* ($\text{CI}_{50} = 16 \mu\text{g}/\text{mL}$) alors que la tyrokéradine H, possédant un noyau pyridinium à la place, ne l'est pas.

VIII.3. Activité anticancéreuse

Hormis quelques composés ne présentant pas d'activité anticancéreuse, la grande majorité des 27 bromotyrosines testées sont actifs au micromolaire sur les cellules tumorales testées, généralement sans affecter les cellules saines. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 11.

Tableau 11. Activité anticancéreuse des bromotyrosines.

Composé	Activité	Ref.
Acanthodendrinine	Activité sur les cellules cancéreuses du poumon (H292, $\text{CI}_{50} = 58,5 \mu\text{M}$) sans cytotoxicité sur cellules saines (HaCaT, $\text{CI}_{50} > 400 \mu\text{M}$).	18
Acide purpurocératique A	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du sein (MCF7), du poumon (NCI-H460) et du système nerveux (SF268).	37
Anomoiane B	Activité significative sur les cellules cancéreuses du poumon (A549, $\text{CI}_{50} = 5,1 \mu\text{M}$), du colorectum (HT-29, $\text{CI}_{50} = 3,2 \mu\text{M}$) et du sein (MDA-MB-231, $\text{CI}_{50} = 5,3 \mu\text{M}$).	50
Aplysamine 6	$\text{CI}_{50} = 14 \mu\text{M}$ sur l'isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt).	47
Aplysamine 7b	Aucune cytotoxicité sur les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa) et de la prostate (PC3).	17
(+)-Aplysinelline	$\text{CI}_{50} = 1,19 \mu\text{M}$ sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7).	25
Aplysinine A	Absence d'activité sur fibroblastes de souris (L929) ; Activité modérée sur cellules cancéreuses du sein (MCF-7, $\text{CI}_{50} = 25,8 \mu\text{M}$), fibroblastes humains (FS4LTM, $\text{CI}_{50} = 77,5 \mu\text{M}$) et carcinome épidermique (KB31, $\text{CI}_{50} = 32,2 \mu\text{M}$).	21
Aplysinine B	Absence d'activité sur fibroblastes de souris (L929), cellules cancéreuses du sein (MCF-7), fibroblastes humains (FS4LTM) et carcinome épidermique (KB31).	21
Aplysinones A-D	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du sein (MDA), x (MB-231), du poumon (A549) et du colon (HT-29).	26
Aplyzanzine B	Activité significative sur les cellules cancéreuses du poumon (A549, CI_{50}	50

Annexe 1 : Revue sur les bromotyrosines (2004-2017)

	= 6,1 μ M), du colorectum (HT-29, CI_{50} = 1,6 μ M) et du sein (MDA-MB-231, CI_{50} = 7,8 μ M).	
Araplysiline VII	Cytotoxique sur lignées cellulaires cancéreuses et saines.	34
Araplysiline IX	Cytotoxique sur lignées cellulaires cancéreuses et saines.	34
Araplysiline N20 formamide	CI_{50} = 3,8 μ M sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7).	33
(E,Z)-Bastadine 19	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	45
Cyclobispsammapline A	Actif sur les cellules cancéreuses du poumon (A549, ED_{50} = 1,95 μ g/mL), de l'ovaire (SK-OV-3, ED_{50} = 1,21 μ g/mL), de la peau (SK-MEL-2, ED_{50} = 1,14 μ g/mL), du système nerveux (XF-498, ED_{50} = 2,88 μ g/mL) et du colon (HCT-15, ED_{50} = 3,82 μ g/mL).	42
14-Débromo-11-déoxyfistularine-3	Absence d'activité sur fibroblastes de souris (L929), cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et fibroblastes humains (FS4LTM). Activité modérée sur carcinome épidermique (KB31, CI_{50} = 68,8 μ M)	21
Dioxépine bastadine 3	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	45
13-Hydroxy-psammaplysine X	Actif sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-15, GI_{50} = 3,5 μ M), de la prostate (PC-3, GI_{50} = 2,1 μ M), du rein (ACHN, GI_{50} = 2,5 μ M), du sein (MDA-MB-231, GI_{50} = 0,8 μ M), de l'estomac (NUGC-3, GI_{50} = 4,0 μ M) et du poumon (NCI-H23, GI_{50} = 3,5 μ M).	14
20N méthylpurpuramine E	Faible cytotoxicité sur les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa S3, CI_{50} = 4,3 μ g/mL).	41
JBIR 44	Activité sur les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa, CI_{50} = 3,7 μ M).	46
Pipestelide A	100% d'inhibition du carcinome de la bouche (cellules KB) à 10 et 1 μ M (CI_{50} = 0,10 μ M).	52
Pipestelide B	100% d'inhibition du carcinome de la bouche (cellules KB) à 10 μ M.	52
Psammapline E	Inactif sur les cellules cancéreuses du poumon (A549), de l'ovaire (SK-OV-3), de la peau (SK-MEL-2), du système nerveux (XF-498) et du colon (HCT-15) (ED_{50} > 30 μ g/mL).	42
Psammaplysine X	Actif sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-15, GI_{50} = 3,3 μ M), de la prostate (PC-3, GI_{50} = 2,3 μ M), du rein (ACHN, GI_{50} = 3,3 μ M), du sein (MDA-MB-231, GI_{50} = 1,2 μ M), de l'estomac (NUGC-3, GI_{50} = 3,5 μ M) et du poumon (NCI-H23, GI_{50} = 6,4 μ M).	14
Pseudocéralidinone	Actif sur les cellules leucémiques (K562, CI_{50} = 1,4 μ g/mL).	16
Pseudocéralidinone A	Actif sur les cellules cancéreuses de la prostate (PC3, CI_{50} = 4,9 μ M) et inactif (CI_{50} > 10 μ M) envers les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa).	17
Puréalidine T	Faible activité (CI_{50} > 10 μ g/mL) sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-8), du foie (Bel-7402), de l'estomac (BGC-823), du poumon (A549) et de l'ovaire (A2780).	31
Puréalidine U	Faible activité (CI_{50} > 10 μ g/mL) sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-8), du foie (Bel-7402), de l'estomac (BGC-823), du poumon (A549) et de l'ovaire (A2780).	31
Purpuramine M	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses des ovaires (A2780S, CI_{50} = 20 μ M), de sa variante résistante (A2780SCP5, CI_{50} = 40 μ M) et du gliome (U251MG, CI_{50} = 50 μ M).	34
Purpuramine N	Faible inhibition (CI_{50} > 50 μ M) de la croissance des cellules cancéreuses des ovaires (A2780S), de sa variante résistante (A2780SCP5) et du gliome (U251MG).	34
Subéréamolline A	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	22
Subéréamolline B	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	22
Subéréaphenol B	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	22
Subéréaphenol C	Absence d'activité sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-116).	22
Sunabédine	CI_{50} = 39 μ M sur les cellules cancéreuses de souris (B16).	27

L'activité antitumorale semble être assurée par la présence de deux unités tyrosine. Ainsi, l'acide purpurocératique A, la psammapline M, les subéréamolines A-B et les subéréaphenols B-C n'en

comportant qu'une, ne sont pas actifs, de même que l'acanthodendrine est peu active sur les cellules cancéreuses du poumon (H292). Par ailleurs, la (*E,Z*)-bastadine 19 et la dioxépine bastadine 3 avec leur quatre tyrosines ne possède aucune activité, alors que la cyclobispsammaline A est active sur plusieurs lignées de cellules tumorales. Ce n'est pas le cas de la pseudocéralidinone A, qui est à la fois active sur les cellules cancéreuses de la prostate PC3 ($CI_{50} = 4,9 \mu M$) et inactive sur les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa). L'aplysamine 7b est la seconde exception à cette hypothèse. En revanche, elle possède également un groupement oxime, qui semble être moins actif que le groupement spirocyclohexadiénylisoxazoline. Ainsi, la 20*N*-méthylpurpuramine E possède une faible cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa S3) et les purpuramines M et N inhibent que peu ou pas, la croissance des cellules cancéreuses des ovaires (A2780S), de sa variante résistante (A2780SCP5) et du gliome (U251MG). Seul JBIR-44 est actif sur les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa, $CI_{50} = 3,7 \mu M$).

Parmi les composés possédant deux unités bromotyrosine, l'anomoiane B et l'aplyzanzine B possèdent une activité significative sur les cellules cancéreuses du poumon (A549, $CI_{50} = 5,1$ et $6,1 \mu M$), du colorectum (HT-29, $CI_{50} = 3,2$ et $1,6 \mu M$) et du sein (MDA-MB-231, $CI_{50} = 5,3$ et $7,8 \mu M$), l'aplysamine 6 est efficace contre l'isoprénylcystéine carboxyl méthyltransférase (Icmt)⁵⁵, la (+)-aplysinelline et l'araplysinelline N20-formamide possèdent une CI_{50} de 1,19 et 3,8 μM sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7), l'araplysinelline VII et IX sont actives sur plusieurs lignées tumorales mais présentent malheureusement une cytotoxicité sur les cellules saines et enfin la psammalysine X et son dérivé 13-hydroxy sont actifs sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-15, $GI_{50} = 3,3$ et $3,5 \mu M$), de la prostate (PC-3, $GI_{50} = 2,3$ et $2,1 \mu M$), du rein (ACHN, $GI_{50} = 3,3$ et $2,5 \mu M$), du sein (MDA-MB-231, $GI_{50} = 1,2$ et $0,8 \mu M$), de l'estomac (NUGC-3, $GI_{50} = 3,5$ et $4,0 \mu M$) et du poumon (NCI-H23, $GI_{50} = 6,4$ et $3,5 \mu M$).

Ce n'est pas le cas des puréalidines T et U, dont l'activité est plutôt faible ($CI_{50} > 10 \mu g/mL$) sur les cellules cancéreuses du colon (HCT-8), du foie (Bel-7402), de l'estomac (BGC-823), du poumon (A549) et de l'ovaire (A2780), ni de la sunabédine, faiblement active contre les cellules cancéreuses de souris (B16, $CI_{50} = 39 \mu M$) ou encore des aplysinones A-D, inactives sur plusieurs lignées cellulaires.

Enfin, les pipestelides A et B inhibent à 100% les cellules du carcinome de la bouche (KB) à $10 \mu M$ et la CI_{50} pour la pipestelide A est de $0,10 \mu M$. Même s'ils ne possèdent qu'une unité bromotyrosine, ce sont également des cyclodepsipeptides.

VIII.4. Activité antiparasitaire

⁵⁵ Enzyme utilisée comme cible dans la recherche de composés anticancéreux.

Peu de composés ont été testés pour une activité antiparasitaire (tableau 12). C'est le cas de l'araplysilline N20 formamide, l'araplysilline *N*-oxide N20 formamide et des psammaplysines G et H, qui ont été testées sur *P. falciparum* (lignées chloroquine-résistantes FcB-1 et/ou Dd2 et -sensibles 3D7) et des fistularine-3, 19-déoxyfistularine-3, puréalidine B et R, 11-hydroxyaérothionine et les 3,5-dibromo-*N,N,N*-triméthyltyraminium et 3,5-dibromo-*N,N,N,O*-tétraméthyltyraminium qui ont été testés sur *L. panamensis*, *P. falciparum* et *T. cruzi*.

Tableau 12. Activité antiparasitaire des bromotyrosines.

Composé	Activité	Ref.
Araplysilline N20 formamide	Activité sur les lignées chloroquine-résistantes et -sensibles de <i>P. falciparum</i> : FcB-1 (CI ₅₀ = 3,6 µM) et 3D7 (CI ₅₀ = 7 µM) avec un IS de 1,4 entre FcB-1 et cellules <i>Vero</i> .	33
Araplysilline N-oxide N20 formamide	Activité sur les lignées chloroquine-résistantes et -sensibles de <i>P. falciparum</i> : FcB-1 (CI ₅₀ = 5 µM) et 3D7 (CI ₅₀ = 4,1 µM).	33
19-Déoxyfistularine-3	Absence d'activité sur <i>L. panamensis</i> , <i>P. falciparum</i> et <i>T. cruzi</i>	24
3,5-Dibromo-N,N,N-triméthyltyraminium	Absence d'activité sur <i>L. panamensis</i> , <i>P. falciparum</i> et <i>T. cruzi</i>	24
3,5-Dibromo-N,N,N,O-tétraméthyltyraminium	Absence d'activité sur <i>L. panamensis</i> , <i>P. falciparum</i> et <i>T. cruzi</i>	24
Fistularine-3	Très faiblement actif sur <i>L. panamensis</i> (8% inhibition), <i>P. falciparum</i> (11% inhibition) et <i>T. cruzi</i> (6% inhibition)	24
11-Hydroxyaérothionine	Absence d'activité sur <i>T. cruzi</i> ; très faiblement actifs sur <i>P. falciparum</i> (8% inhibition) et amastigotes intracellulaires de <i>L. panamensis</i> (13% inhibition)	24
Psammaplysine G	98% d'inhibition de la lignée chloroquine-résistante (Dd2) de <i>P. falciparum</i> à 40 µM ; pas de cytotoxicité sur la lignée HEK293 (cellules embryonnaires du rein) jusqu'à 40 µM ; CI ₅₀ de 5,23 µM sur la lignée chloroquine sensible (3D7) de <i>P. falciparum</i> .	38, 39
Psammaplysine H	CI ₅₀ de 0,41 µM sur la lignée chloroquine sensible (3D7) de <i>P. falciparum</i> .	39
Puréalidine B	Absence d'activité sur <i>T. cruzi</i> ; faiblement actif sur <i>L. panamensis</i> (2% inhibition), <i>P. falciparum</i> (23% inhibition)	24
Puréalidine R	Absence d'activité sur <i>L. panamensis</i> ; faiblement actif sur <i>T. cruzi</i> (2% inhibition), <i>P. falciparum</i> (7% inhibition)	24

La psammaplysine H avec une CI₅₀ de 0,41 µM sur la lignée chloroquine sensible (3D7) de *P. falciparum* présente le résultat le plus prometteur avec un indice de sélectivité supérieur à 97 (test sur lignées HEK293 et HepG2). Elle est plus de 10 fois plus active que la psammaplysine G, testée lors de la même étude (CI₅₀ = 5,23 µM) et que les araplysilline N20 formamide (CI₅₀ = 7 µM) et araplysilline *N*-oxide N20 formamide (CI₅₀ = 4,1 µM). Dans le cas des lignées chloroquine-résistantes FcB-1, les araplysilline N20 formamide et araplysilline *N*-oxide N20 formamide sont actives à l'ordre du micromolaire (CI₅₀ = 3,6 µM et 5 µM, respectivement). La psammaplysine G semble moins active (98% d'inhibition de la lignée Dd2). Enfin, l'ensemble des composés isolés de *Verongula rigida* sont tous très peu ou pas actifs sur les parasites testés²⁴.

VIII.5. Autres activités biologiques notables

D'autres activités ont pu être testées ponctuellement pour quelques autres dérivés bromotyrosines. Par exemple, les subéréaphenols B et C ont une forte action antioxydante sur le test *in vitro* sur la DPPH²². Dans le cas du traitement de la maladie d'Alzheimer, l'acide 3,5-dibromo-4-méthoxyphénylpyruvique et l'aplysinnellamide A augmentent la sécrétion d'ApoE⁵⁶ à partir des cellules cancéreuses astrocytaires CCF-STTG1 entre une et deux fois à 40 et 30 μM respectivement¹⁰ et la protéase BACE1 (memapsine-2) est modérément inhibée par la purpuramine M (36% à 42 μM) et les araplysillines VII (40% à 39,6 μM), IX (35% à 41,9 μM), X (70% à 31,4 μM) et XI (60% à 30,6 μM)³⁴. Les synoxazolidinones A et C et les pulmonarines A et B possèdent une activité antifouling élevée¹⁹. Les psammaplysènes A et B possèdent une activité inhibitrice sur la restauration de la fonction de FOXO1a ($\text{CI}_{50} = 5$ et 20 μM , respectivement), qui est une cible du gène suppresseur de tumeur PTEN, impliqué dans de nombreux cancers. Enfin, la ianthésine E possède une activité modérée sur l'inhibition de la liaison entre l'adénosine et son récepteur A₁ (61% à 100 μM), dont l'application thérapeutique n'a pas été explicitée³².

⁵⁶ L'apolipoprotéine E (ApoE) est l'apolipoprotéine majoritaire dans le système nerveux central. Elle joue un rôle clé dans le transport du cholestérol et peut être une cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

**Souches fongiques isolées des éponges *A. cavernicola*,
P. tenacior et *C. crambe***

Liste des souches fongiques isolées de *A. cavernicola*

Taxa	Technique		Milieu de culture			Température		Code MUT
	Morceaux	Homogénéat	CMASW	GSW	SWA	15 °C	25 °C	
<i>Aplysina cavernicola</i>								
<i>Chaetomium globosum</i>	x			x		x		3236
* <i>Sordaria fimicola</i>	x			x			x	3064
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x			x	x		3540
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x			x	x		3542
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x		x			x	3549
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x			x		x	3551
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x	x			x		3040
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x			x	x		
<i>Cladosporium delicatulum</i>		x			x	x		3250
<i>Cladosporium halotolerans</i>	x				x	x		3271
<i>Cladosporium perangustum</i>		x			x	x		3292
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x		x			x	3553
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x	x				x	3554
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x	x				x	3555
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x			x		x	3556
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x		x		x		3557
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x		x		x		3558
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x	x				x	3559
<i>Eutypella scoparia</i>		x	x				x	2975
<i>Irpex lacteus</i>		x			x	x		mort
* <i>Scopulariopsis sp.</i>	x				x	x		3056
<i>Penicillium brevicompactum</i>		x	x			x		3501
<i>Penicillium brevicompactum</i>		x	x				x	3503
<i>Penicillium brevicompactum</i>		x	x			x		
<i>Penicillium citrinum</i>		x	x				x	3297
<i>Penicillium corylophilum</i>		x		x		x		3560
<i>Penicillium corylophilum</i>		x		x			x	3561
<i>Penicillium murcianum</i>		x	x			x		3299
* <i>Neosetophoma samararum</i>		x			x	x		3045
* <i>Preussia terricola</i>	x			x			x	2961
* <i>Rosellinia sp. 1</i>		x	x			x		3041
* <i>Rosellinia sp. 2</i>	x		x				x	2970
<i>Schizophyllum commune</i>		x		x		x		3019
<i>Stachybotrys chartarum</i>	x		x			x		3308
<i>Trichoderma atroviride</i>	x				x		x	3313
<i>Virgaria nigra</i>		x		x		x		2971
* <i>Sarocladium glaucum</i>	x				x	x		3643

* : identification par arbre phylogénétique ; gris : souches identiques.

Liste des souches fongiques isolées de *P. tenacior*

Taxa	Technique		Milieu de culture			Température		Code MUT
	Morceaux	Homogénéat	CMASW	GSW	SWA	15 °C	25 °C	
<i>Phorbas tenacior</i>								
* <i>Arthrimum arundinis</i>		x	x			x		3035
<i>Aspergillus protuberus</i>		x		x			x	3393
* <i>Torula herbarum</i>		x			x	x		3038
<i>Beauvaria brongniartii</i>		x		x			x	3048
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x			x	x		3562
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x		x			x	3563
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x		x		x		3564
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x		x			x	3050
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x	x				x	3571
<i>Cladosporium perangustum</i>		x	x				x	3397
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x	x				x	3580
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x			x		x	
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x	x				x	3587
<i>Cladosporium ramotenellum</i>		x		x			x	3459
<i>Epicoccum nigrum</i>		x	x				x	3460
<i>Epicoccum nigrum</i>		x			x		x	3463
* <i>Lecanicillium antillanum</i>		x			x	x		3468
<i>Hypocreales sp.</i>		x		x			x	mort
* <i>Uwebraunia dekkeri</i>		x		x			x	3036
<i>Penicillium brevicompactum</i>		x	x				x	3471
<i>Penicillium glabrum</i>		x		x			x	3485
<i>Penicillium cinereoatrum</i>		x	x				x	3486
<i>Penicillium steckii</i>		x	x				x	3495
<i>Penicillium tularense</i>		x	x				x	3498
* <i>Neosetophoma samararum</i>		x	x				x	3046
* <i>Psathyrella candolleana</i>		x		x			x	3033
* <i>Xylaria badia</i>		x		x			x	3034

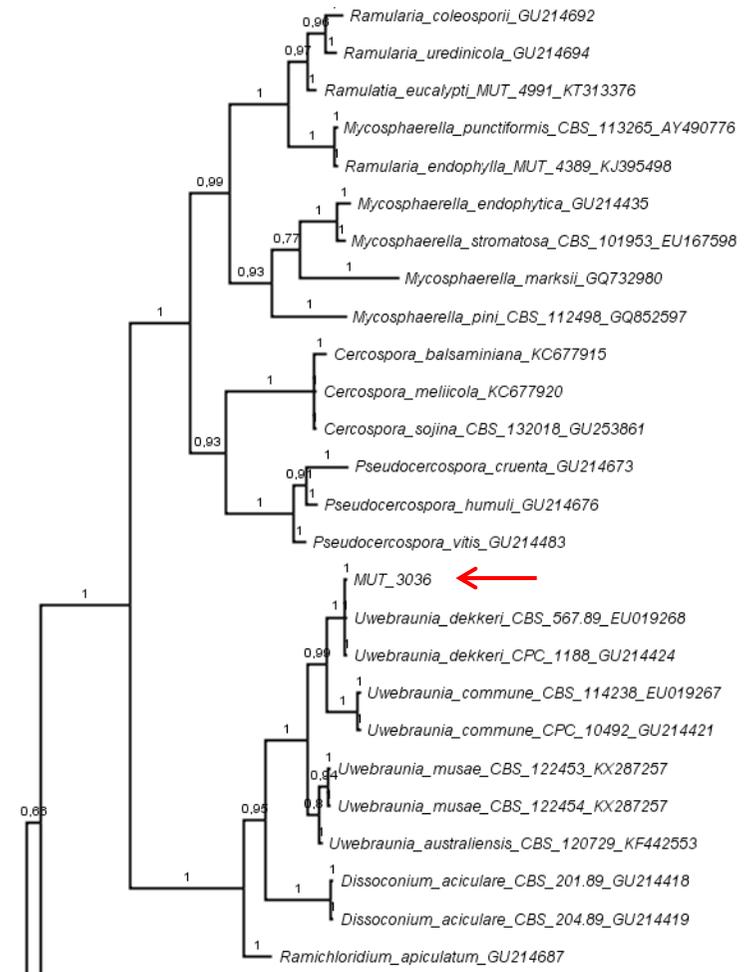
* : identification par arbre phylogénétique ; gris : souches identiques.

Liste des souches fongiques isolées de *C. crambe*

Taxa	Technique		Milieu de culture			Température		Code MUT
	Morceaux	Homogénéat	CMASW	GSW	SWA	15 °C	25 °C	
<i>Crambe crambe</i>								
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>		x		x		x		3499
<i>Kernia geniculotricha</i>		x			x		x	3058
<i>Penicillium citrinum</i>		x		x			x	3500
<i>Penicillium citrinum</i>		x		x			x	

* : identification par arbre phylogénétique ; gris : souches identiques.

Annexe 2 : Souches fongiques et activité associée



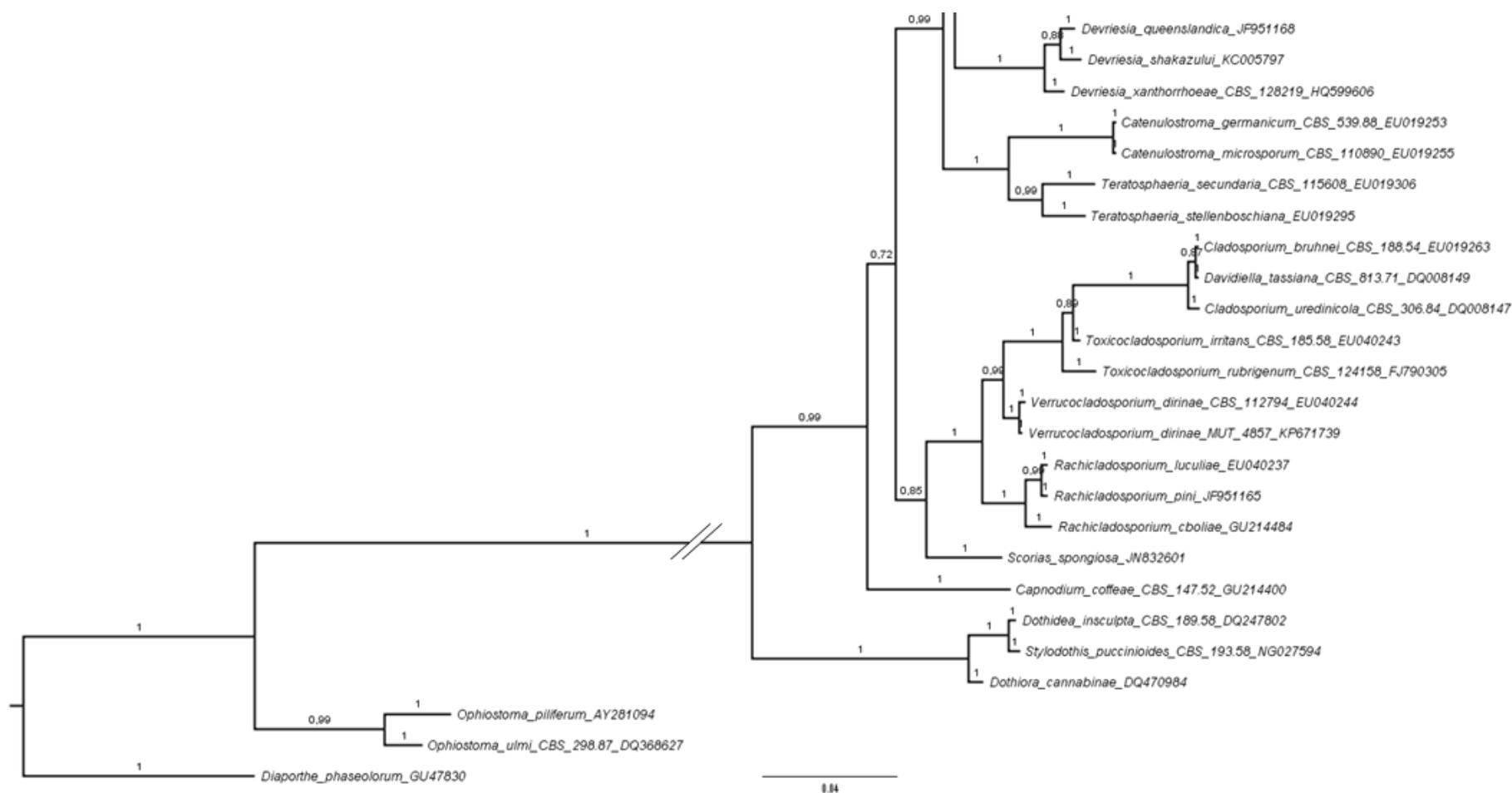
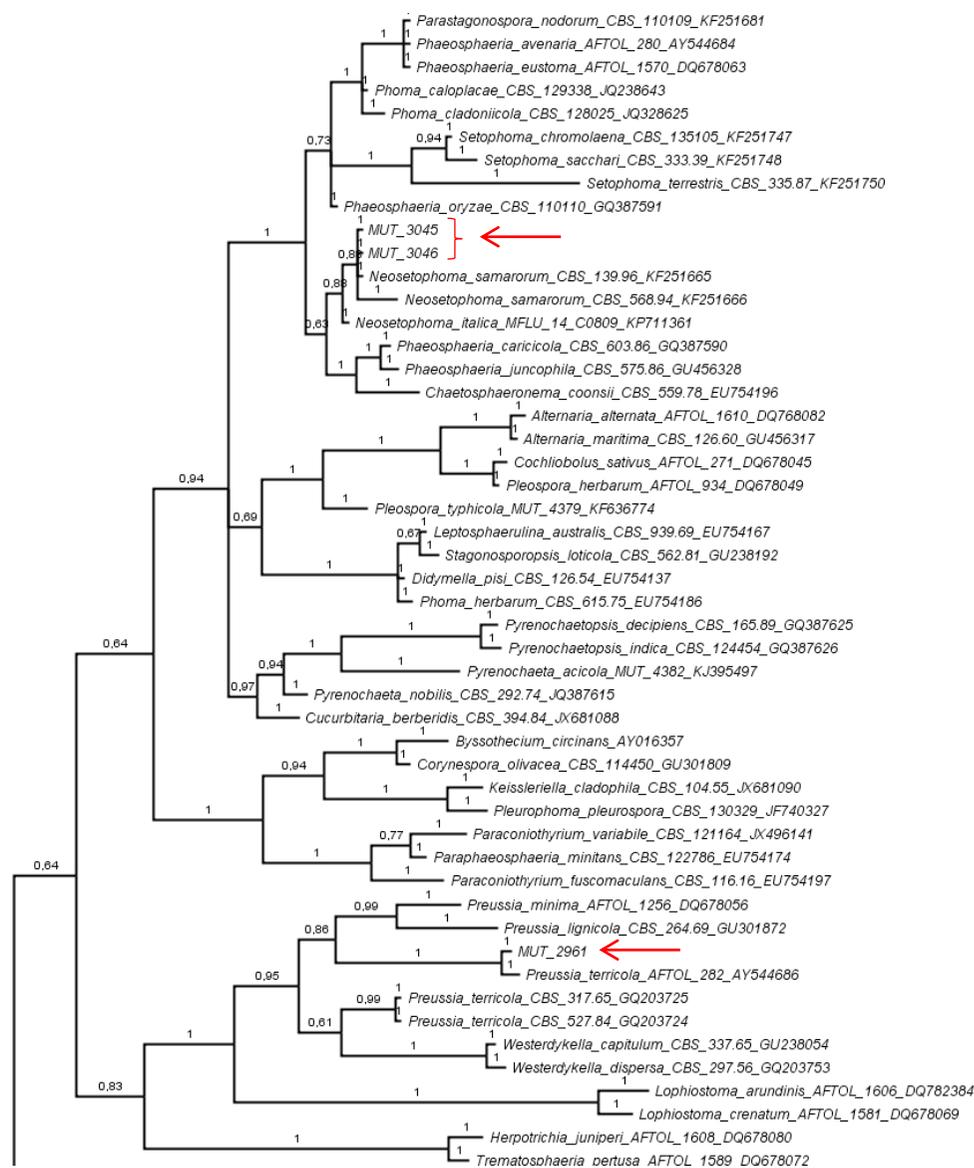


Figure 35. Arbre phylogénétique des Capnodiales.

Annexe 2 : Souches fongiques et activité associée



Annexe 2 : Souches fongiques et activité associée

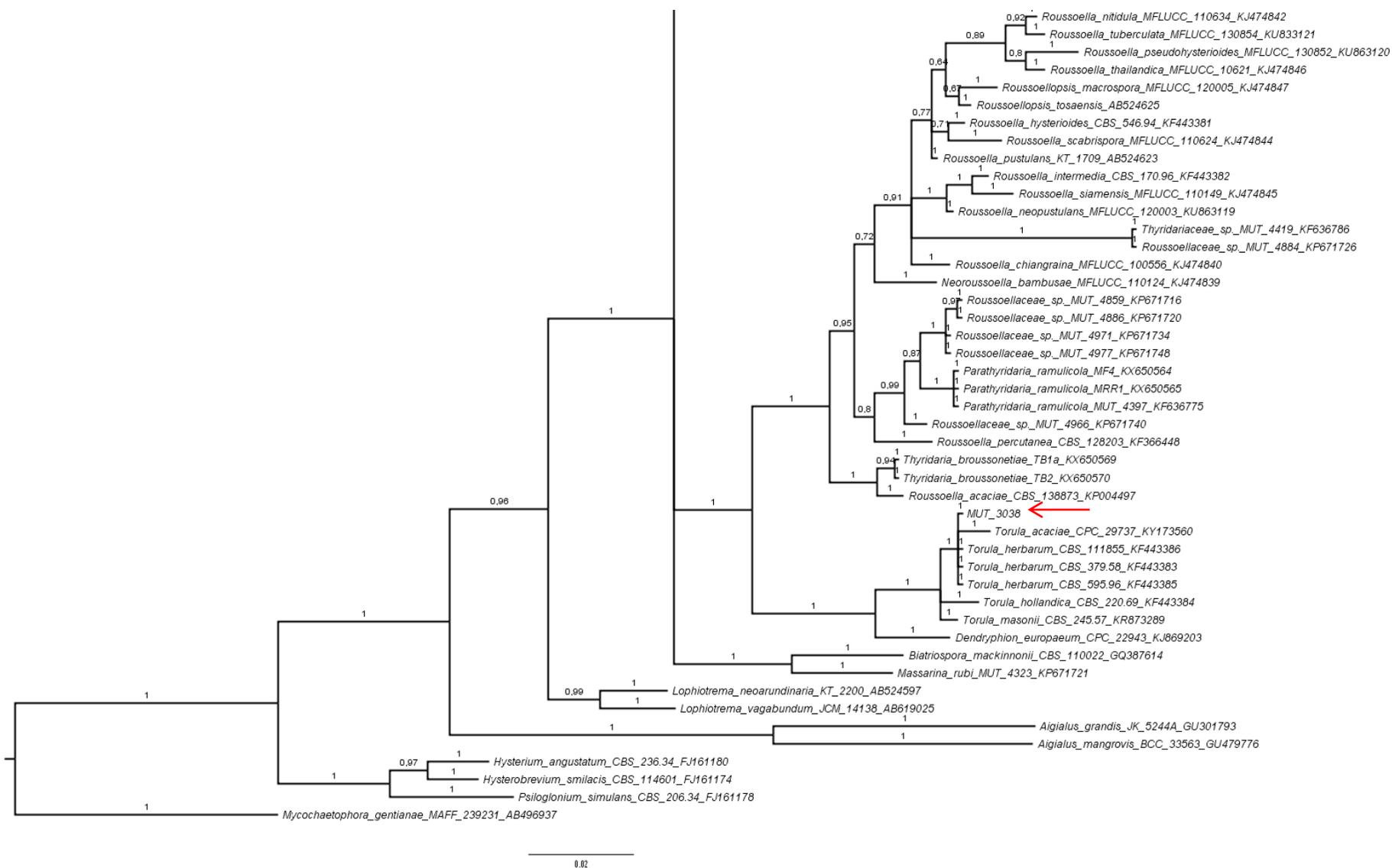


Figure 36. Arbre phylogénétique des Pleosporales.

Annexe 2 : Souches fongiques et activité associée



Annexe 2 : Souches fongiques de éponges sélectionnées

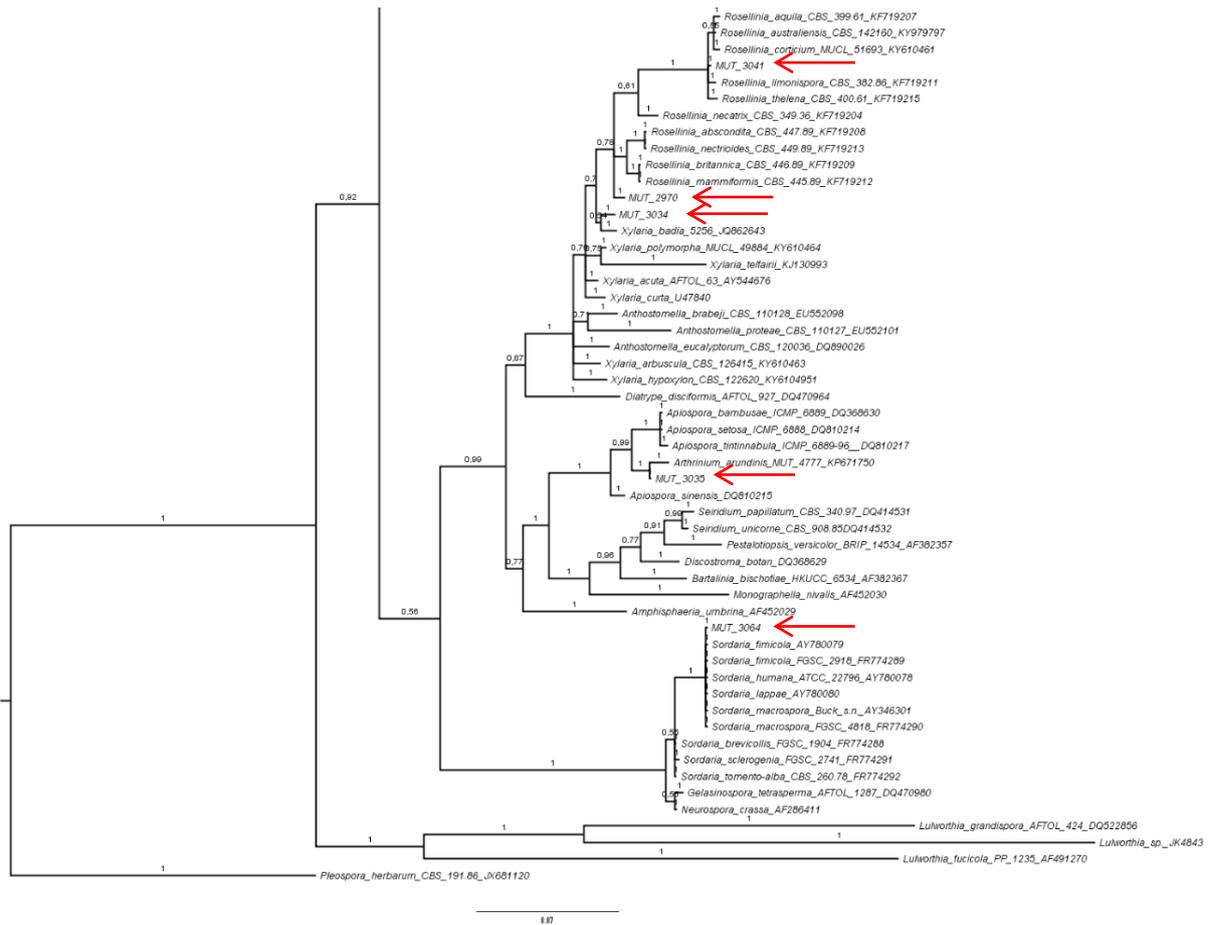


Figure 37. Arbre phylogénétique des Sordariomycetes.

Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

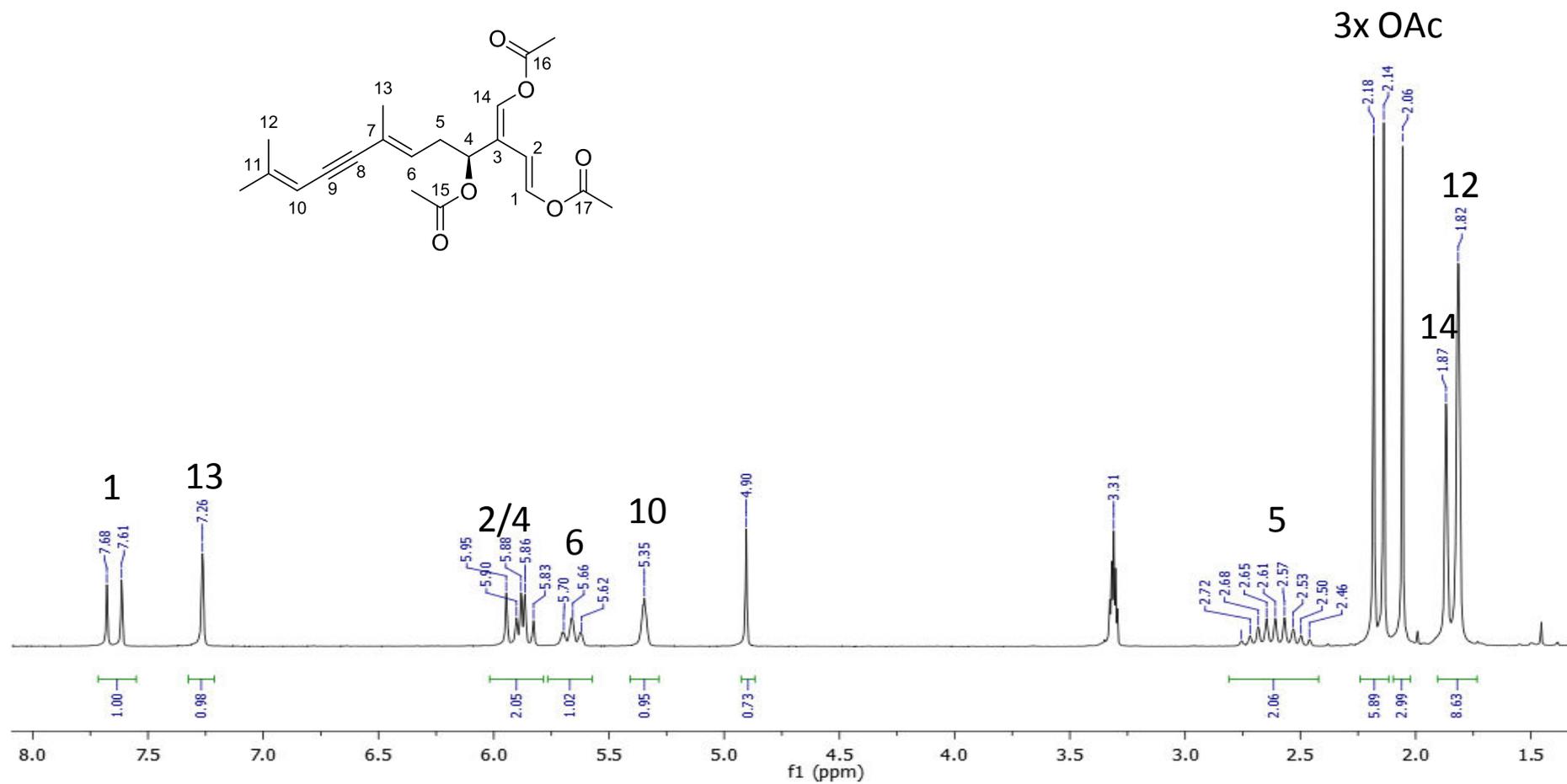


Figure 38. Spectre RMN ¹H (*d*₄-MeOH, 500 MHz) de la caulerpényne (Ct1).

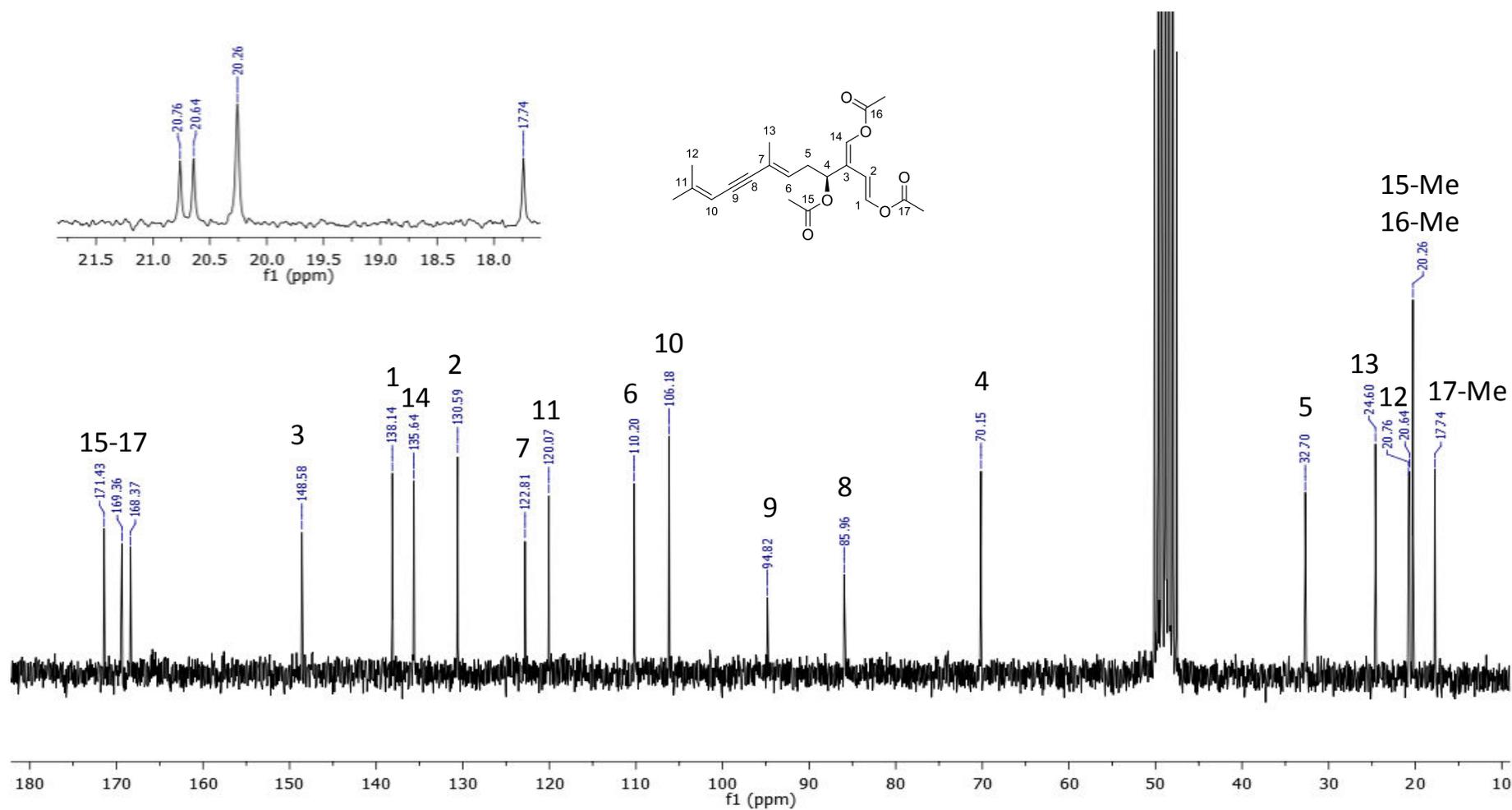


Figure 39. Spectre RMN ^{13}C (d_7 -MeOH, 125 MHz) de la caulerpényne (Ct1).

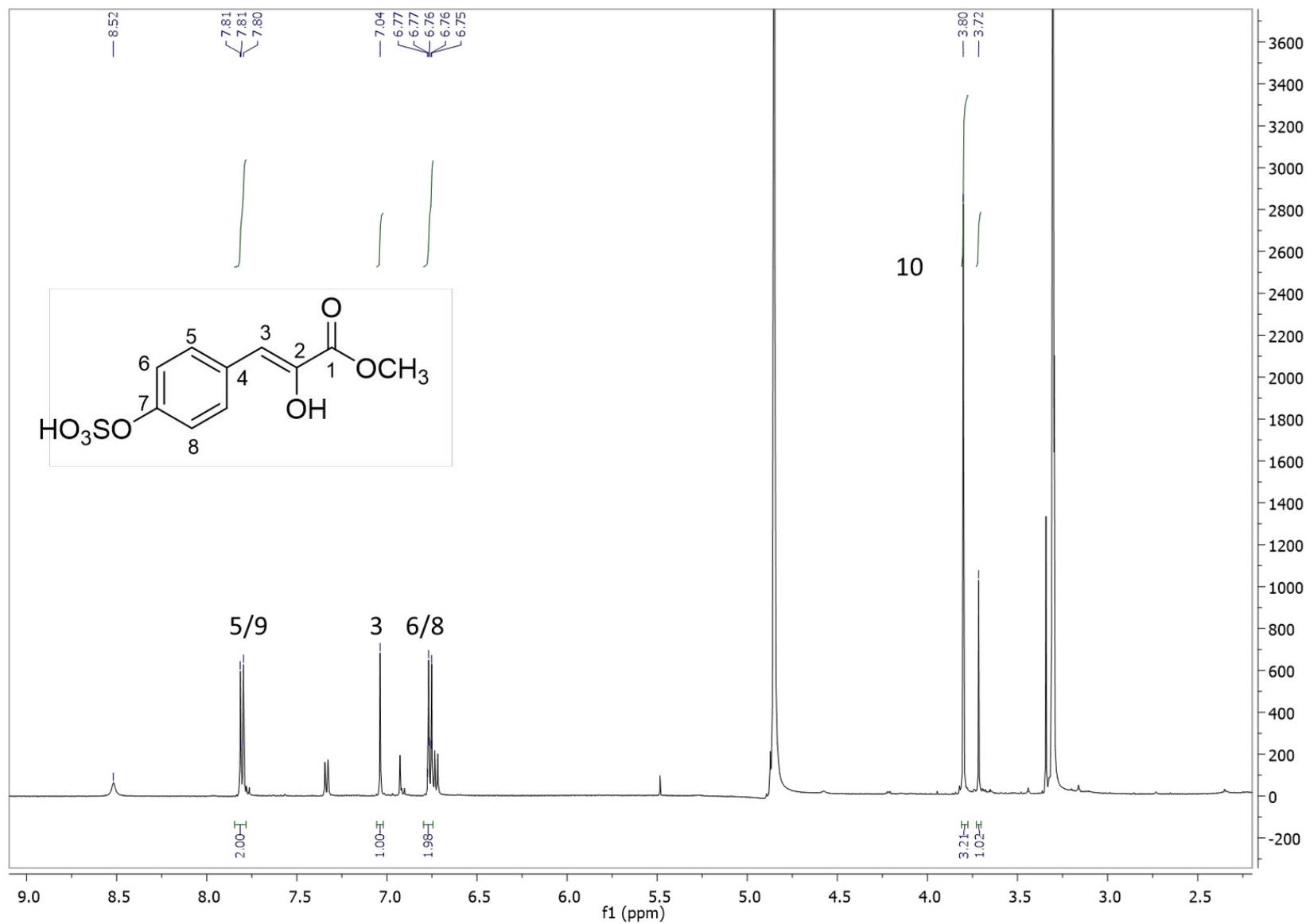


Figure 40. Spectre RMN ^1H (d_4 -MeOH, 500 MHz) du *p*-sulfoxypropionate de méthyle (Ct2).

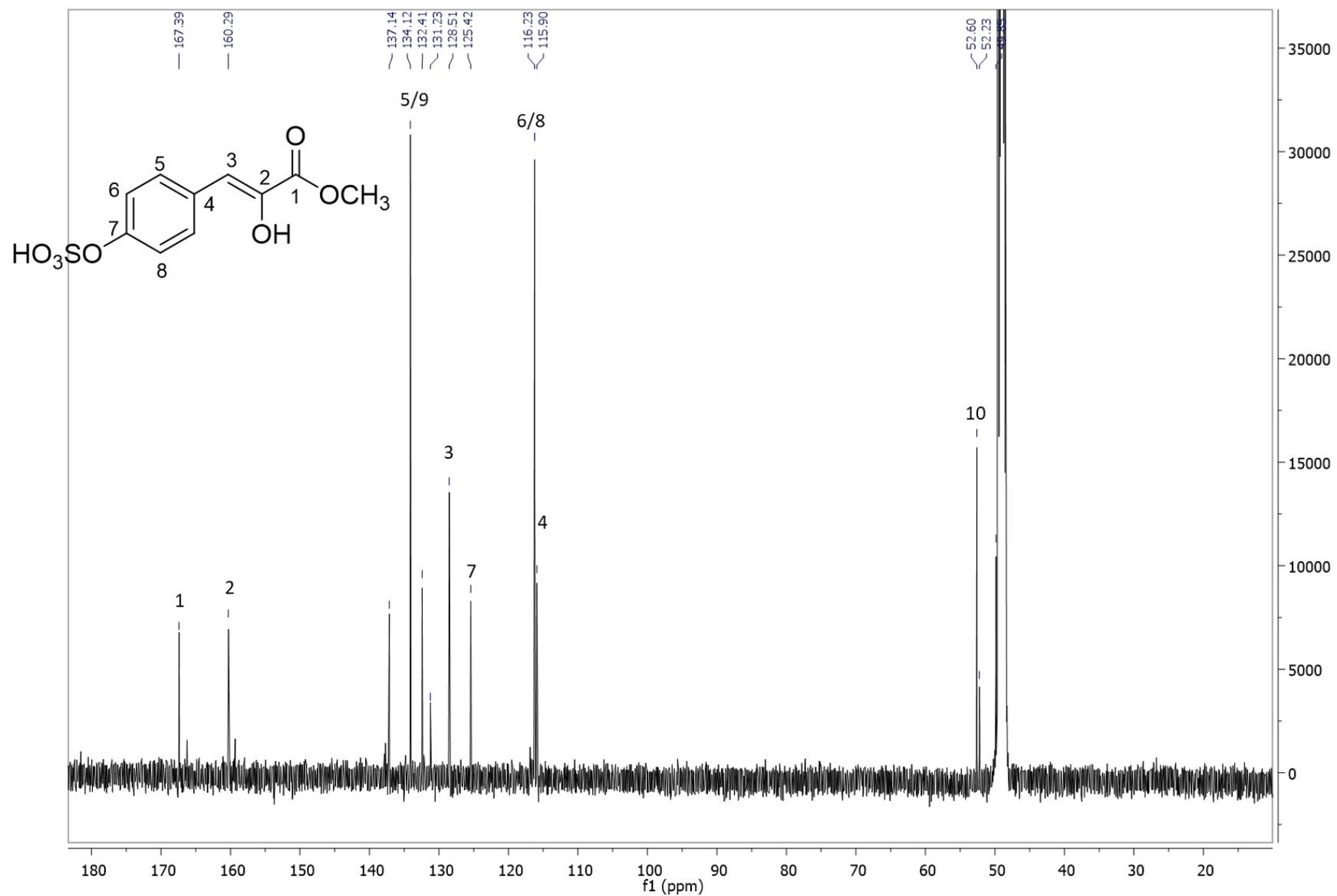


Figure 41. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) du *p*-sulfooxypyruvate de méthyle (Ct2).

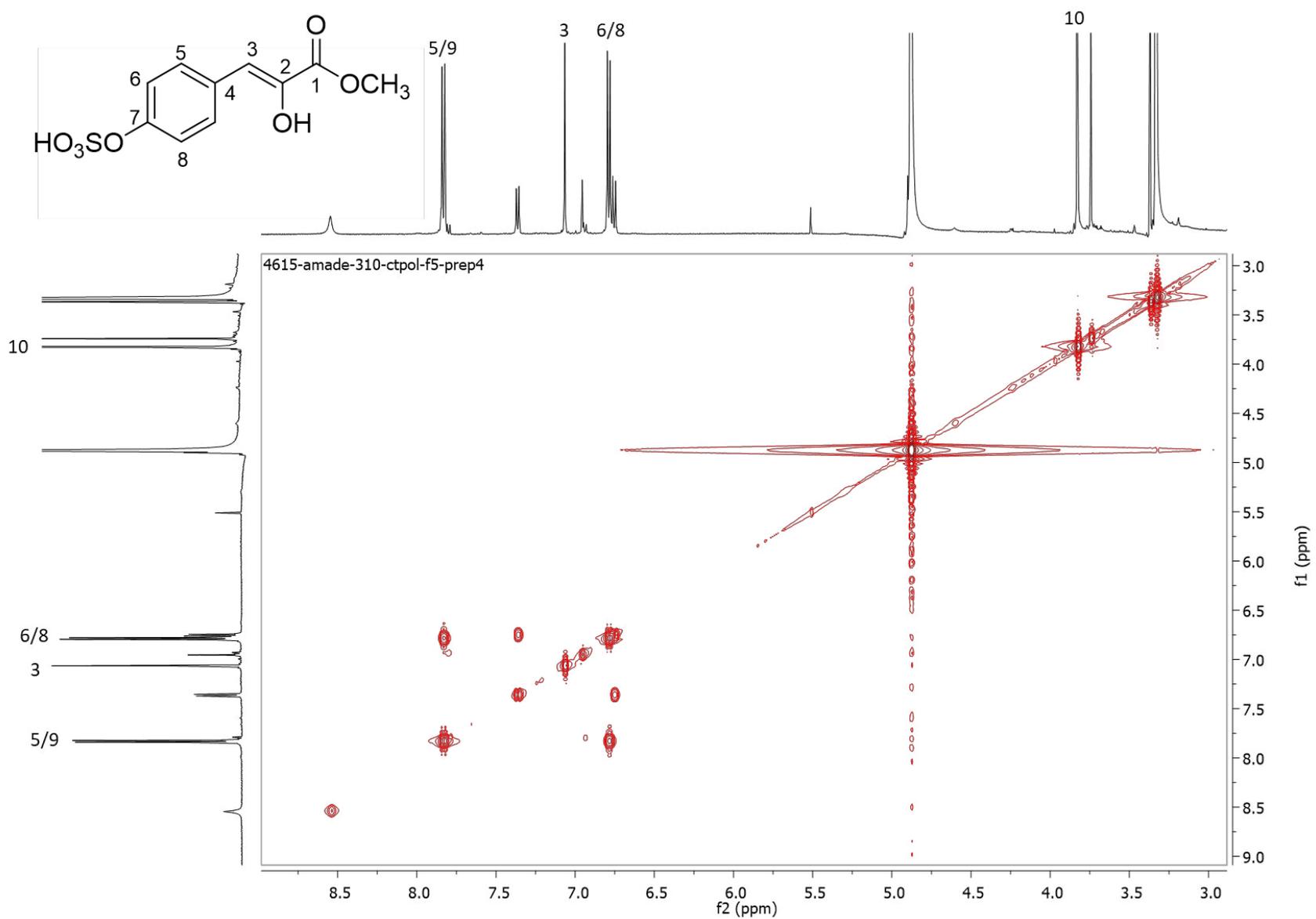


Figure 42. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) du *p*-sulfooxypruvate de méthyle (Ct2).

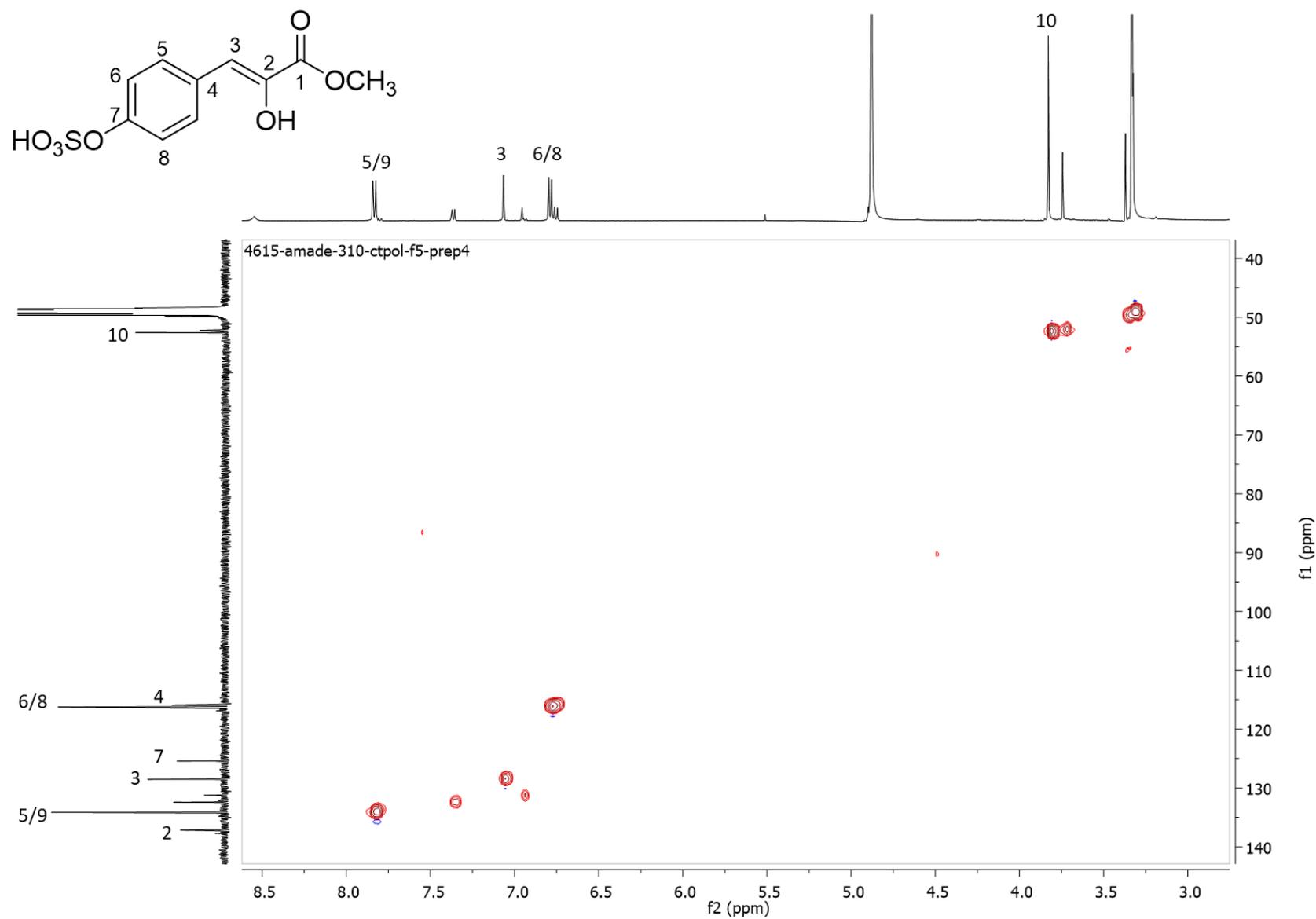


Figure 43. Spectre RMN HSQC ¹H-¹³C (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz) du *p*-sulfoxypruvate de méthyle (Ct2).

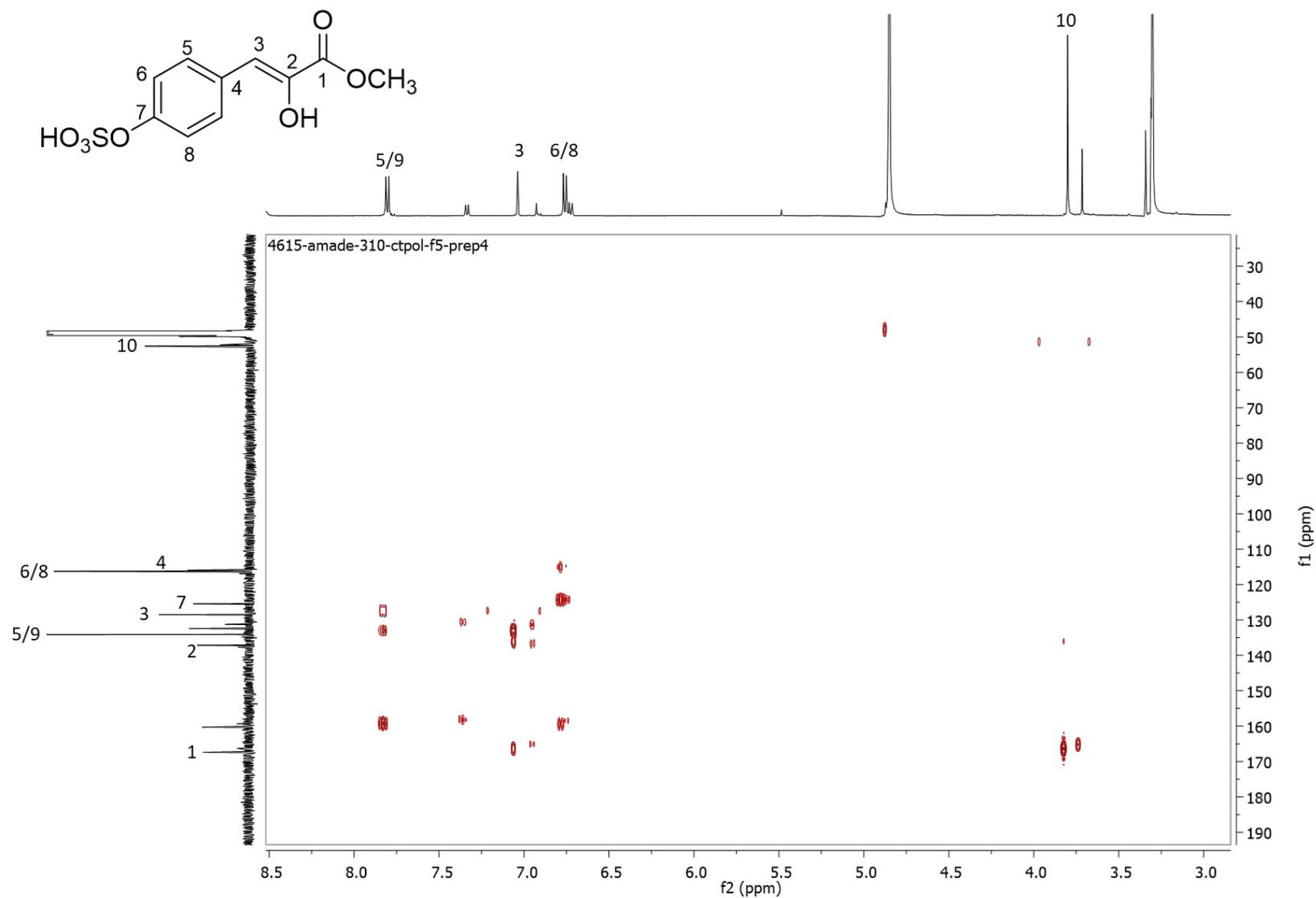


Figure 44. Spectre RMN HMBC ¹H-¹³C (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz) du *p*-sulfoxypruvate de méthyle (Ct2).

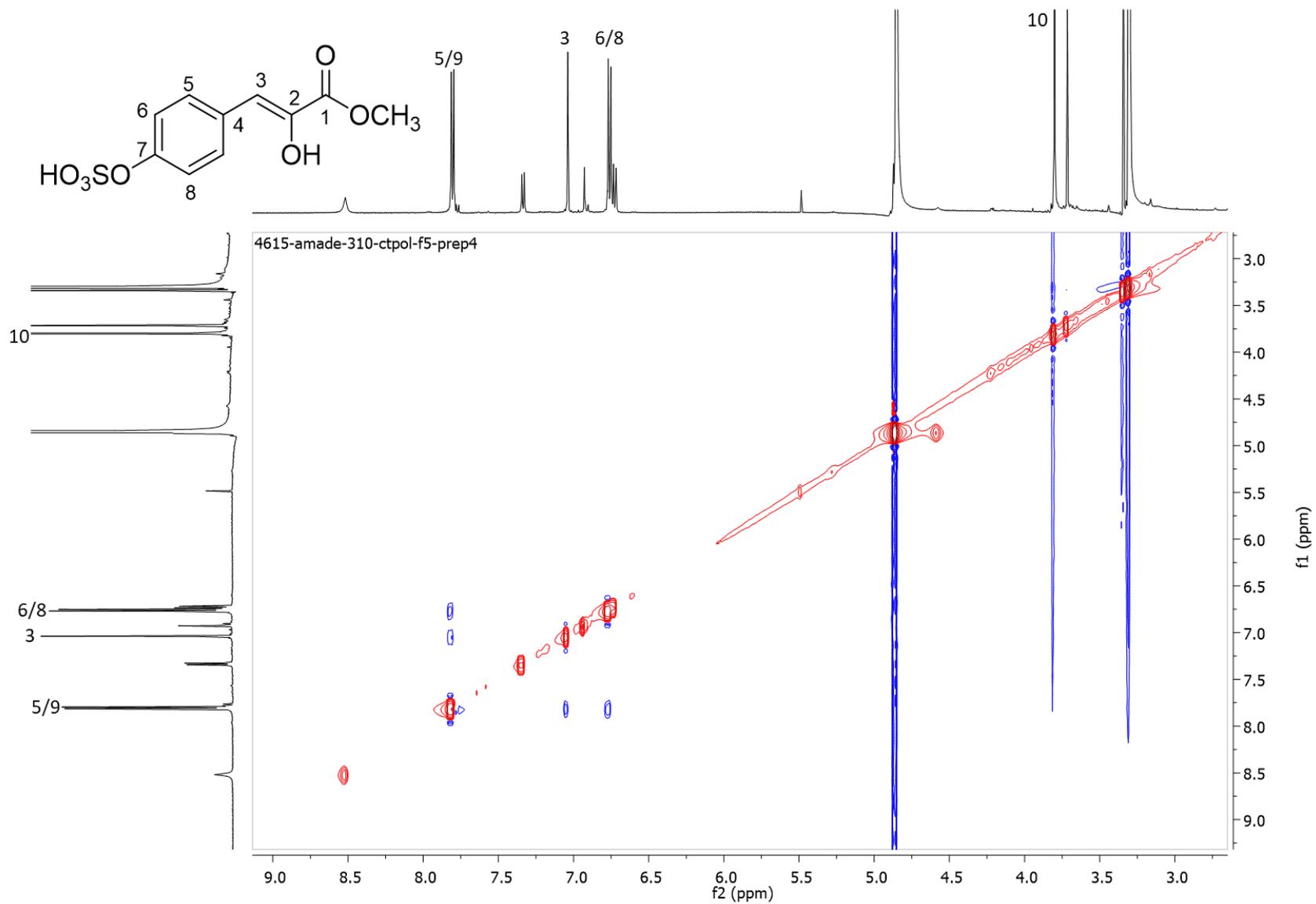
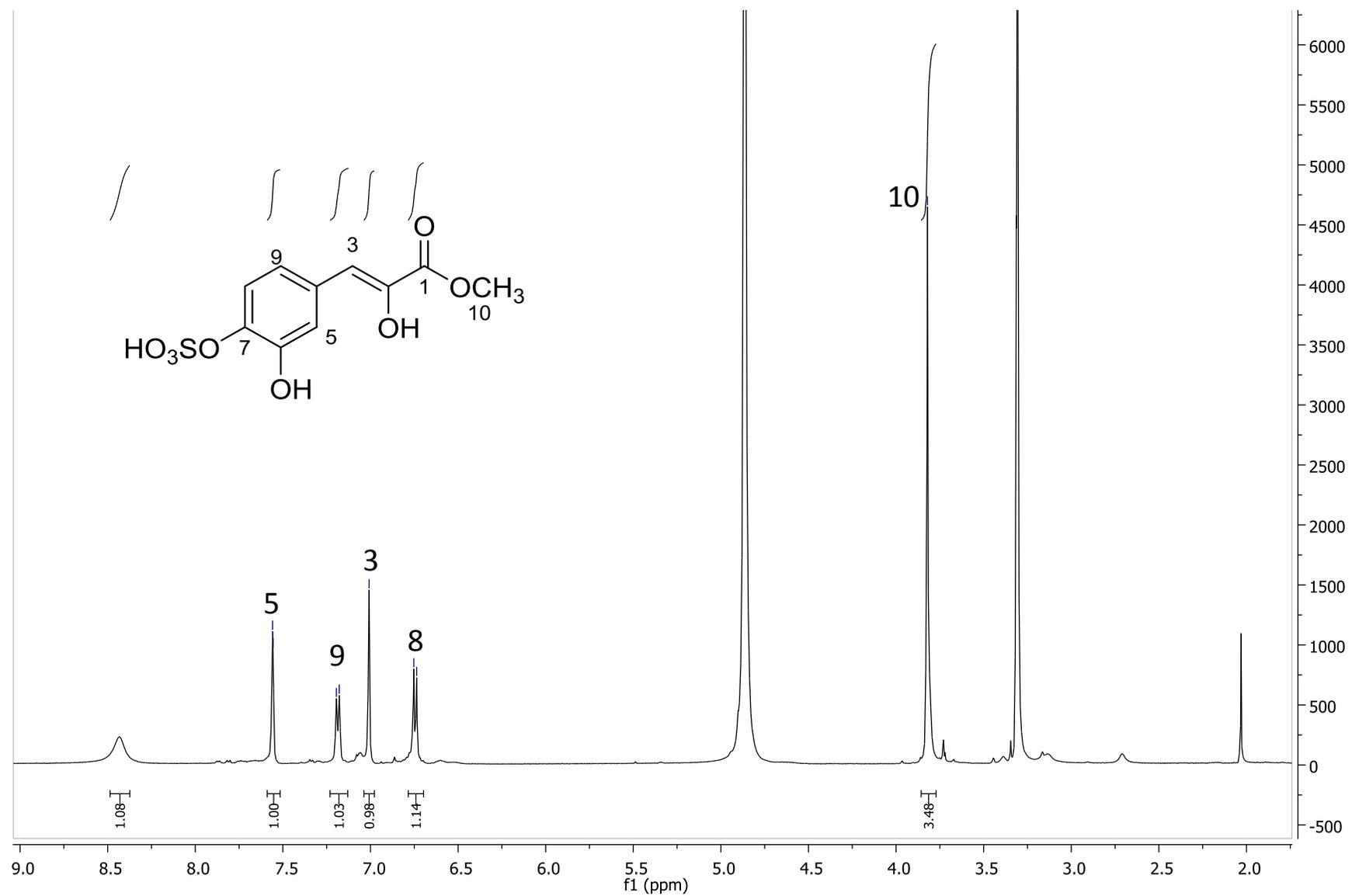


Figure 45. Spectre RMN NOESY ¹H-¹H (*d*₄-MeOH, 500/500 MHz) du *p*-sulfoxypropionate de méthyle (Ct2).

Figure 46. Spectre RMN ^1H (d_4 -MeOH, 500 MHz) du *m*-hydroxy-*p*-sulfooxypyruvate de méthyle (Ct3).

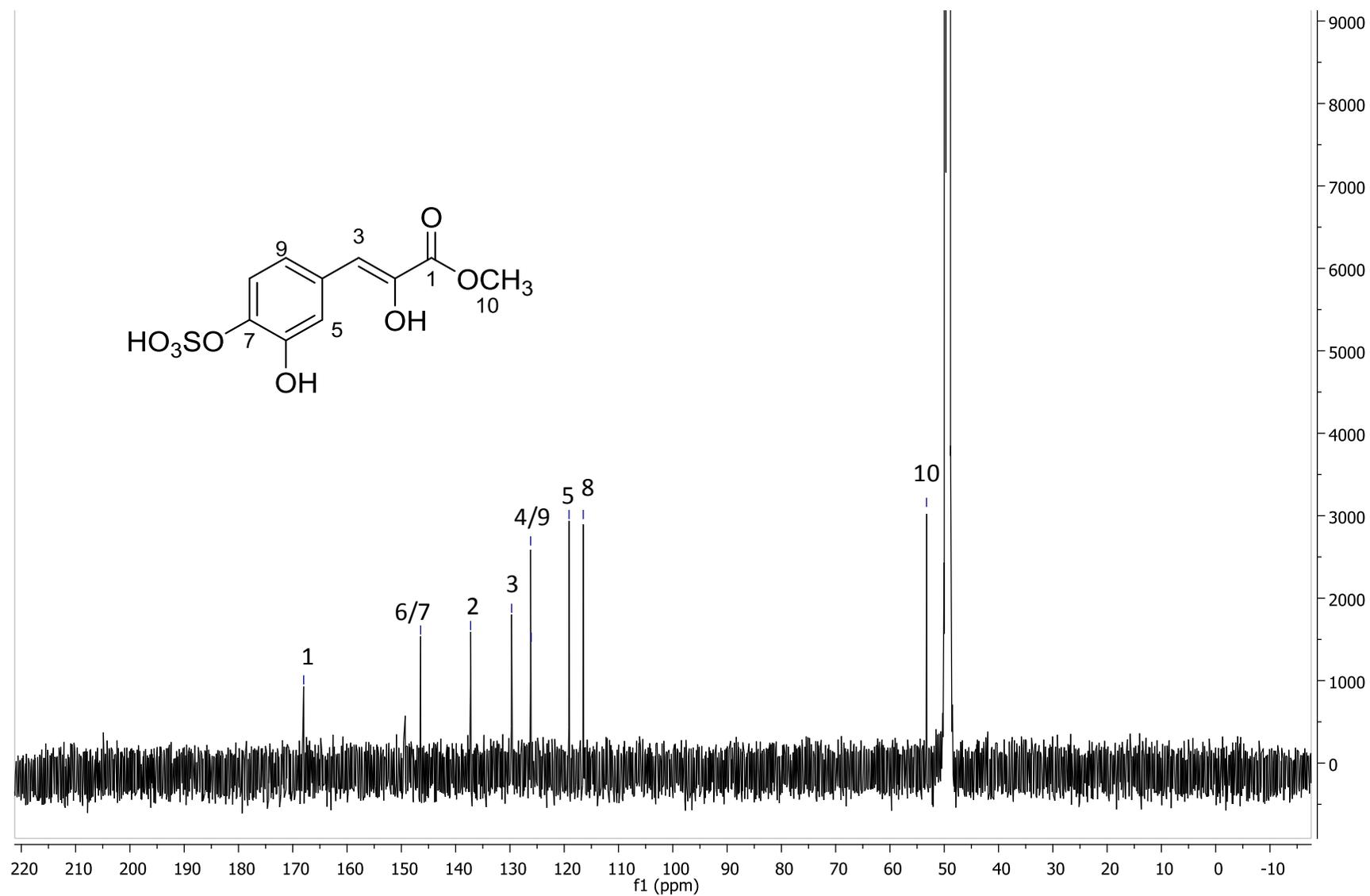


Figure 47. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) du *m*-hydroxy-*p*-sulfooxypyruvate de méthyle (Ct3).

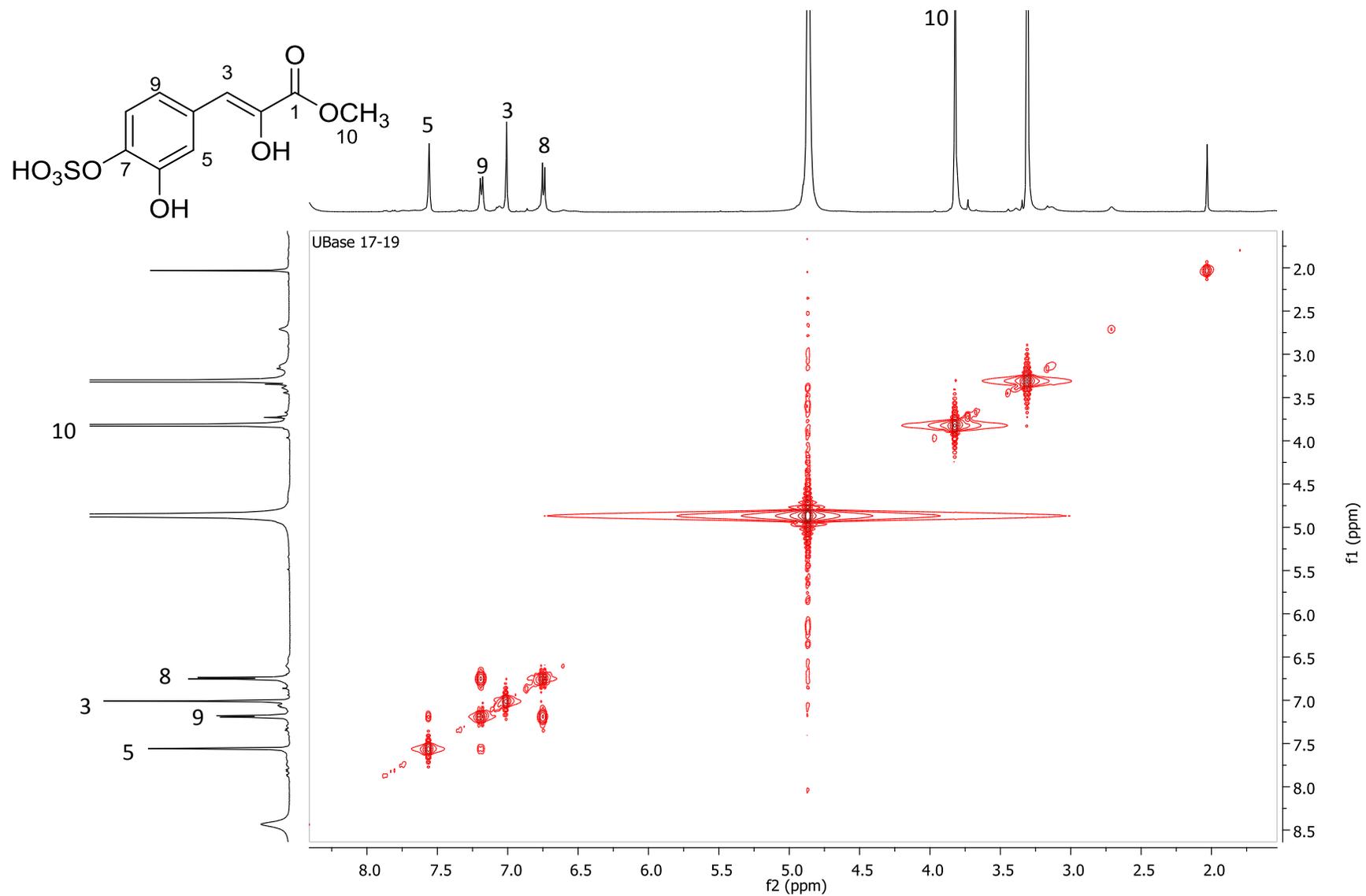


Figure 48. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_r -MeOH, 500/500 MHz) du *m*-hydroxy-*p*-sulfoxypruvate de méthyle (C13).

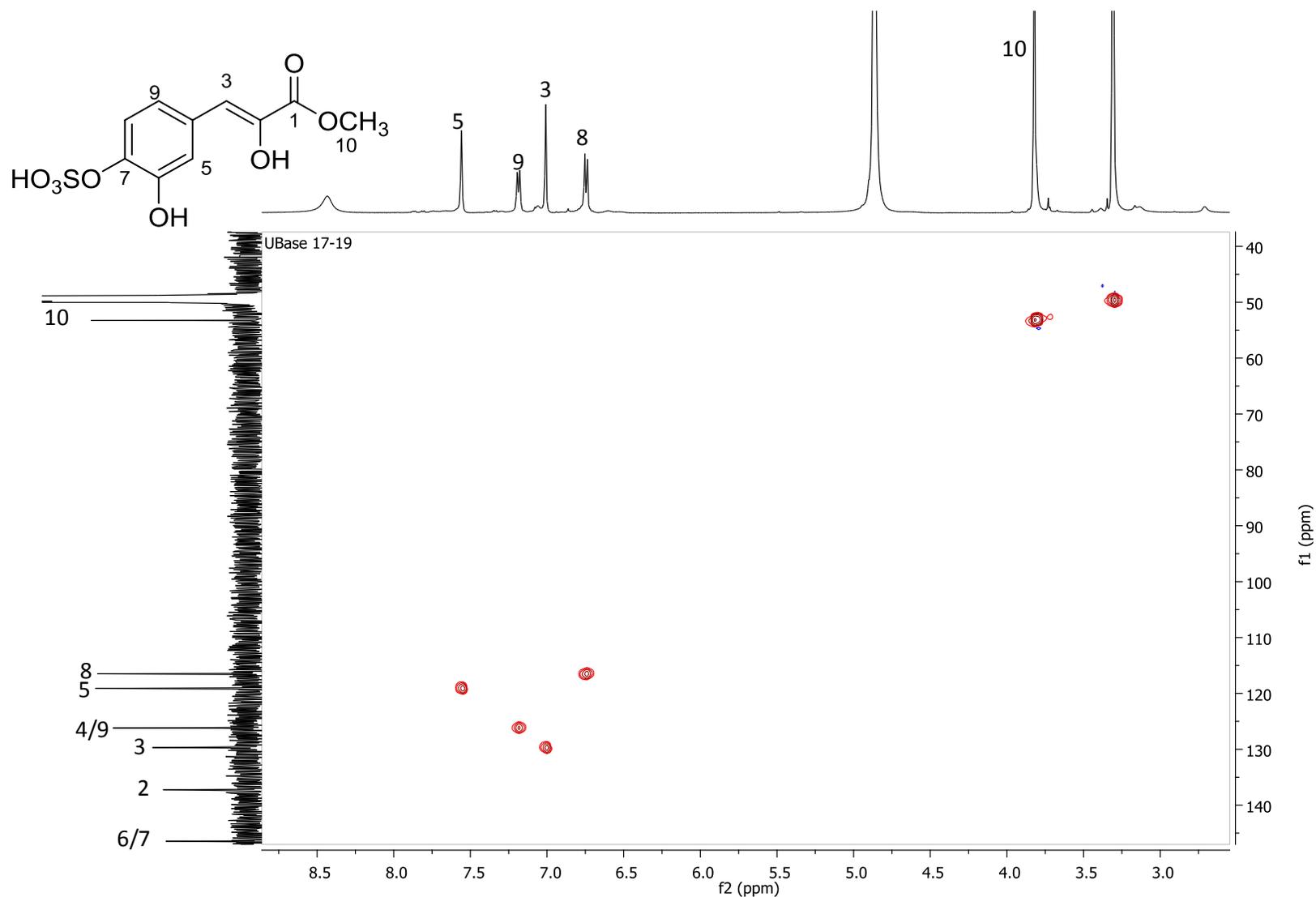


Figure 49. Spectre RMN HSQC ¹H-¹³C (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz) du *m*-hydroxy-*p*-sulfoxypruvate de méthyle (Ct3).

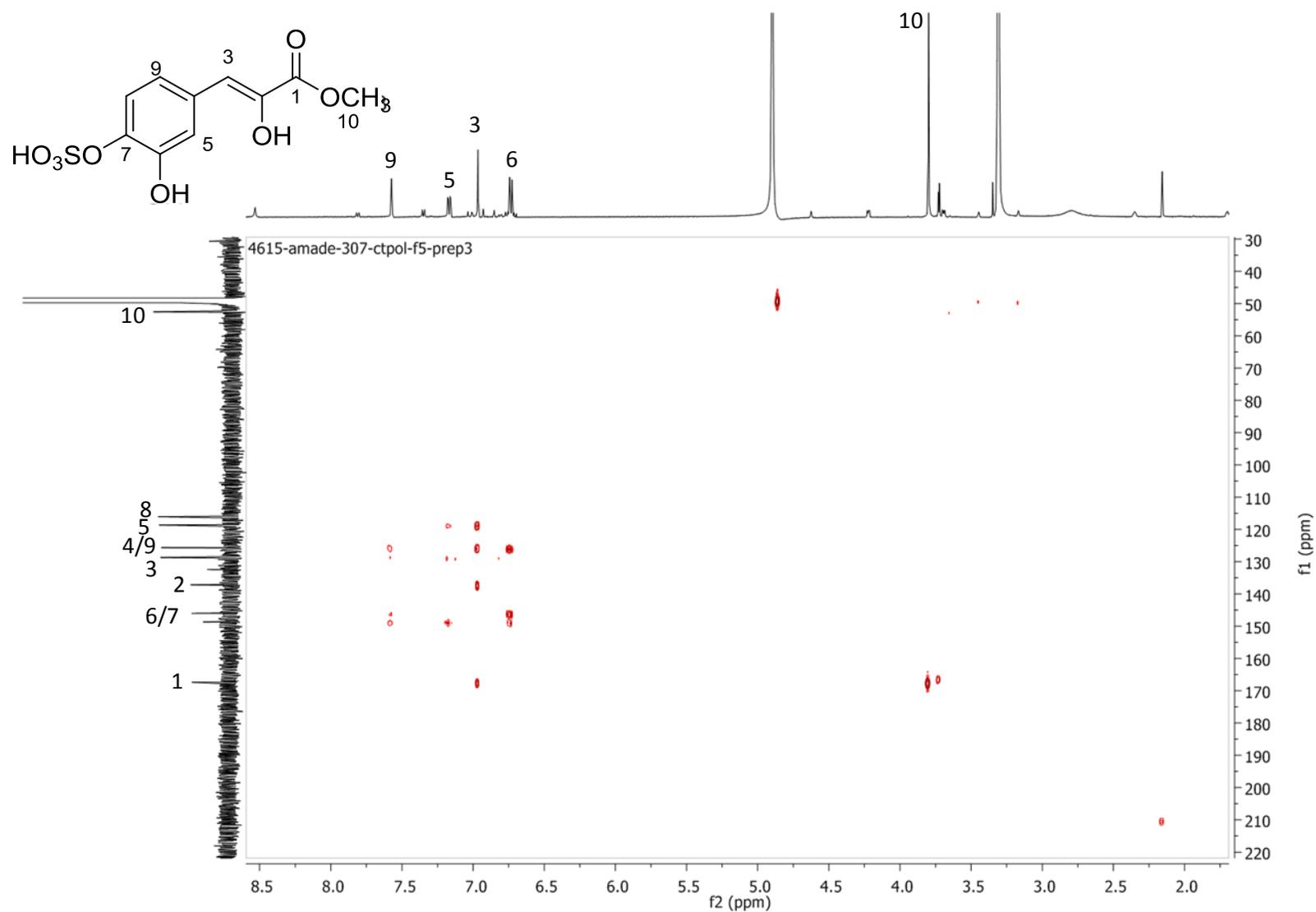


Figure 50. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_7 -MeOH, 500/125 MHz) du *m*-hydroxy-*p*-sulfoxypyruvate de méthyle (Ct3).

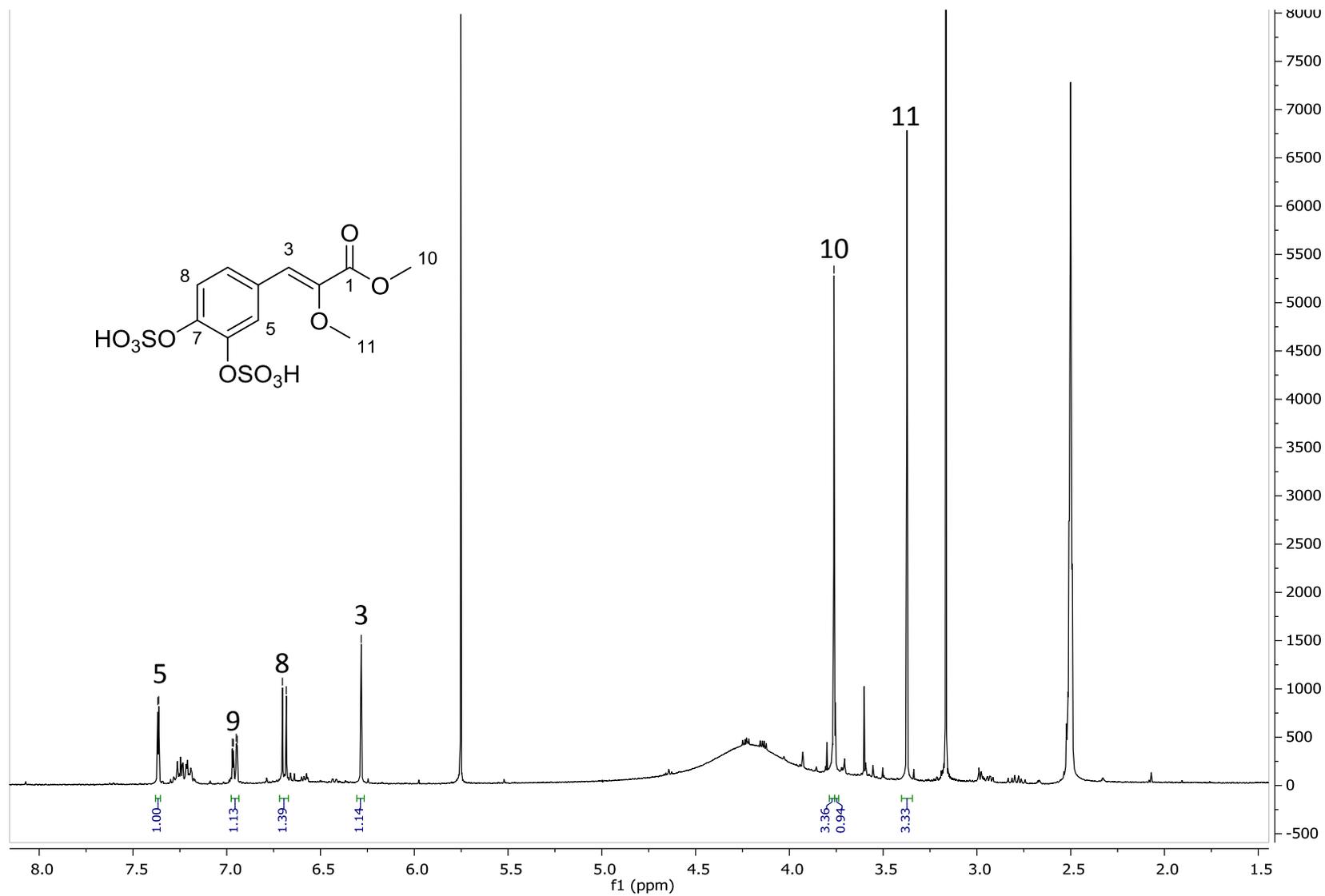


Figure 51. Spectre RMN ^1H (d_6 -DMSO, 500 MHz) de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4).

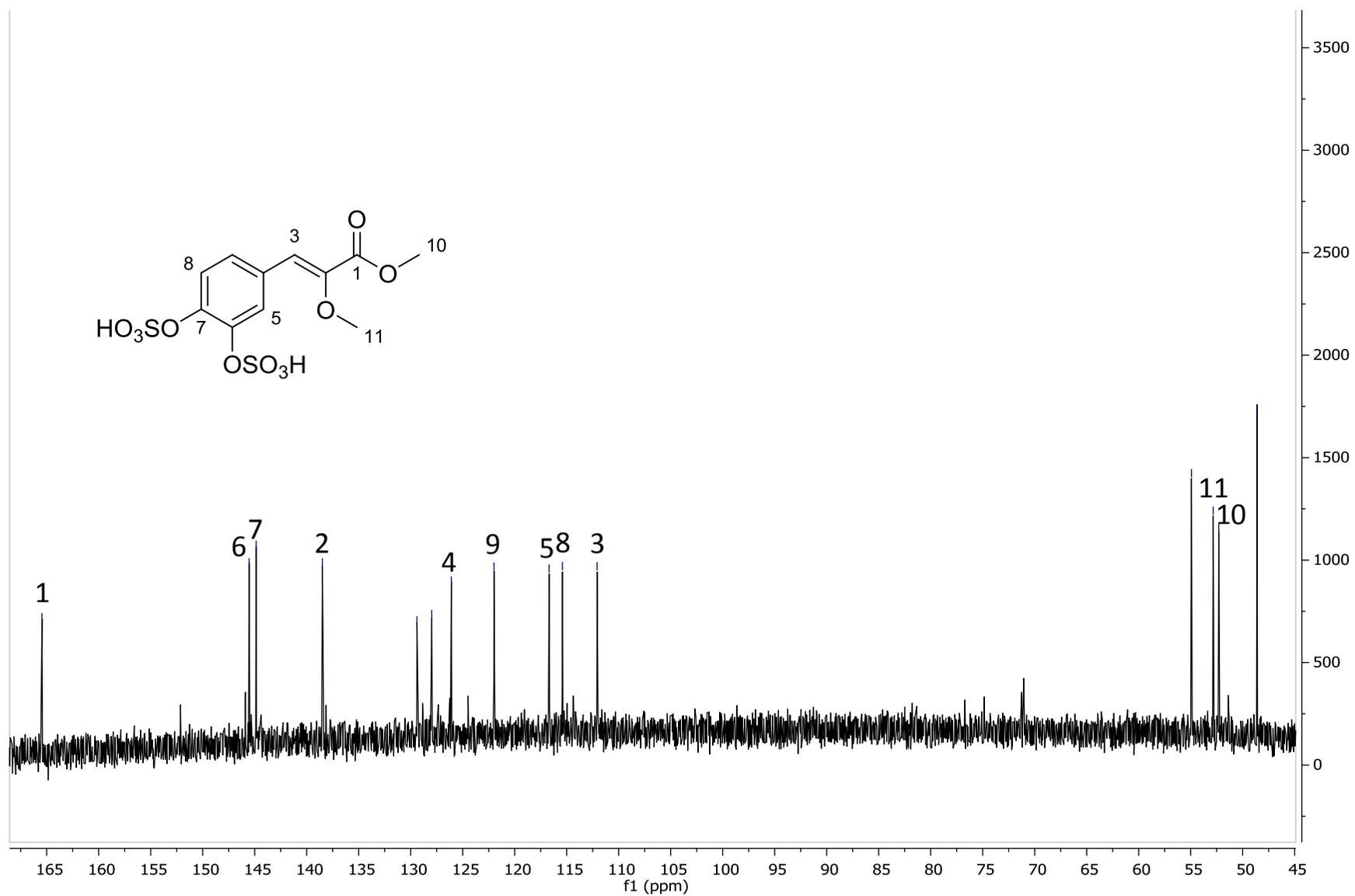


Figure 52. Spectre RMN ^{13}C (d_6 -DMSO, 125 MHz) de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4).

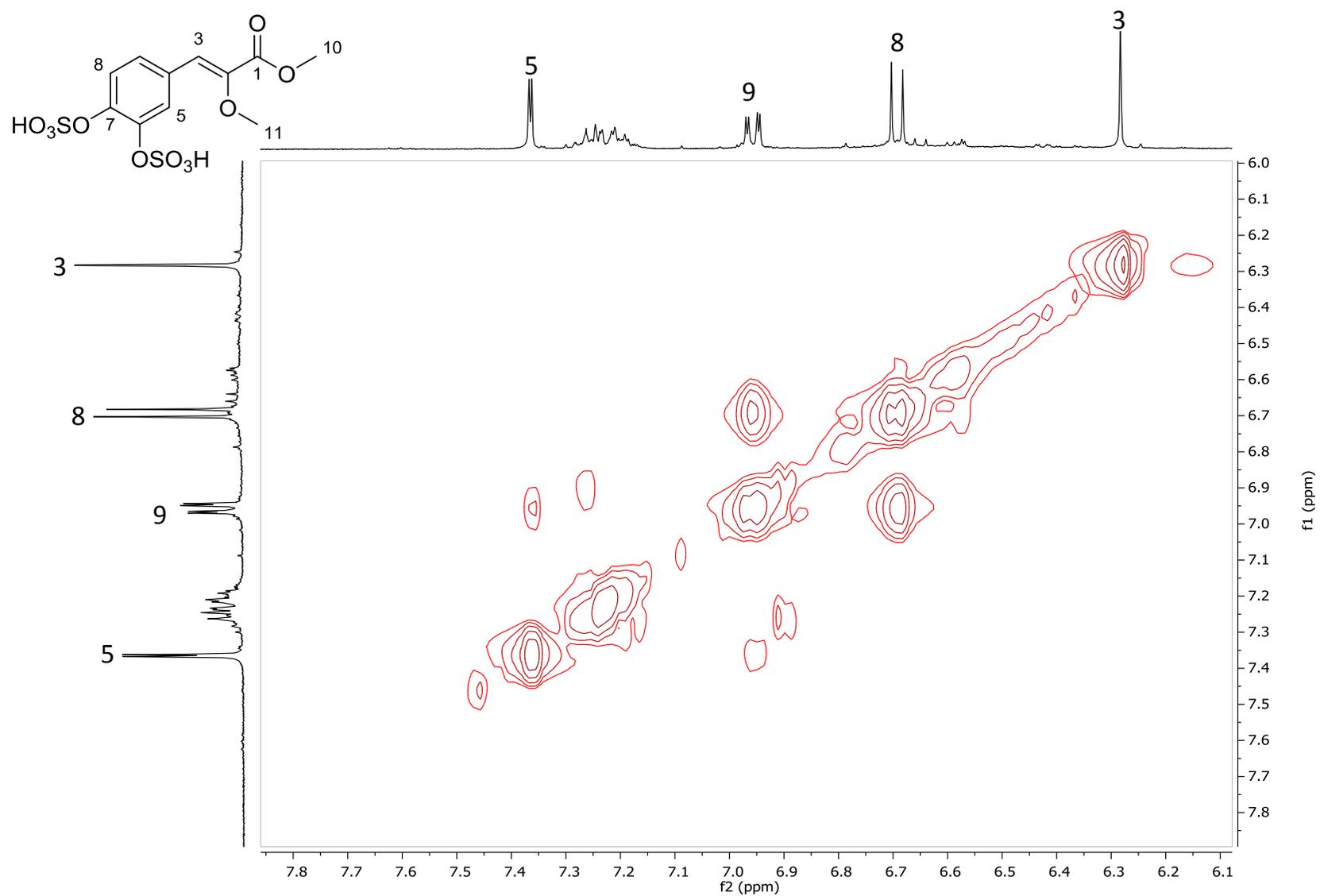


Figure 53. Spectre RMN COSY ¹H-¹H (*d*₆-DMSO, 500/500 MHz) de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4).

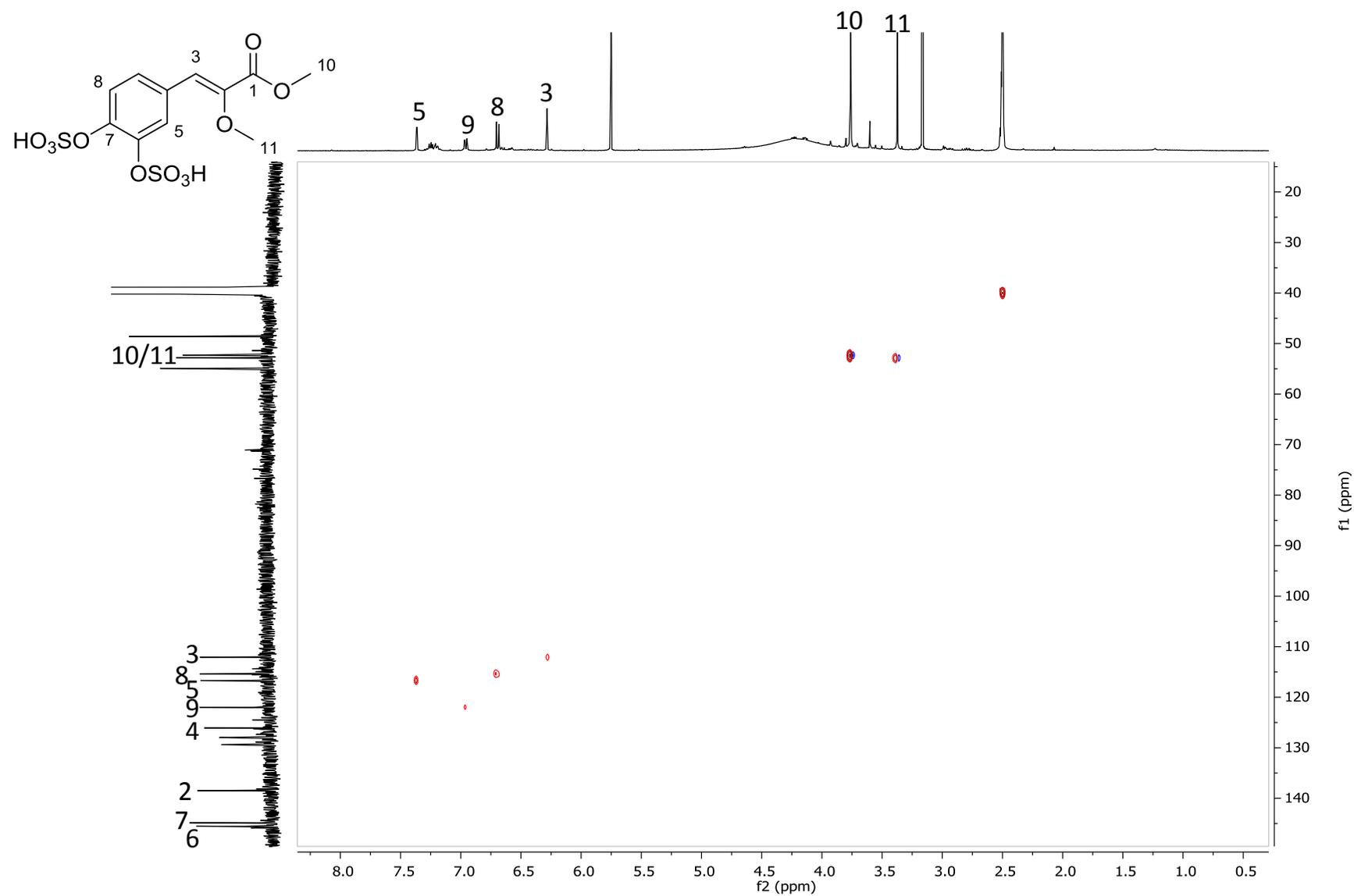


Figure 54. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_6 -DMSO, 500/125 MHz) de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4).

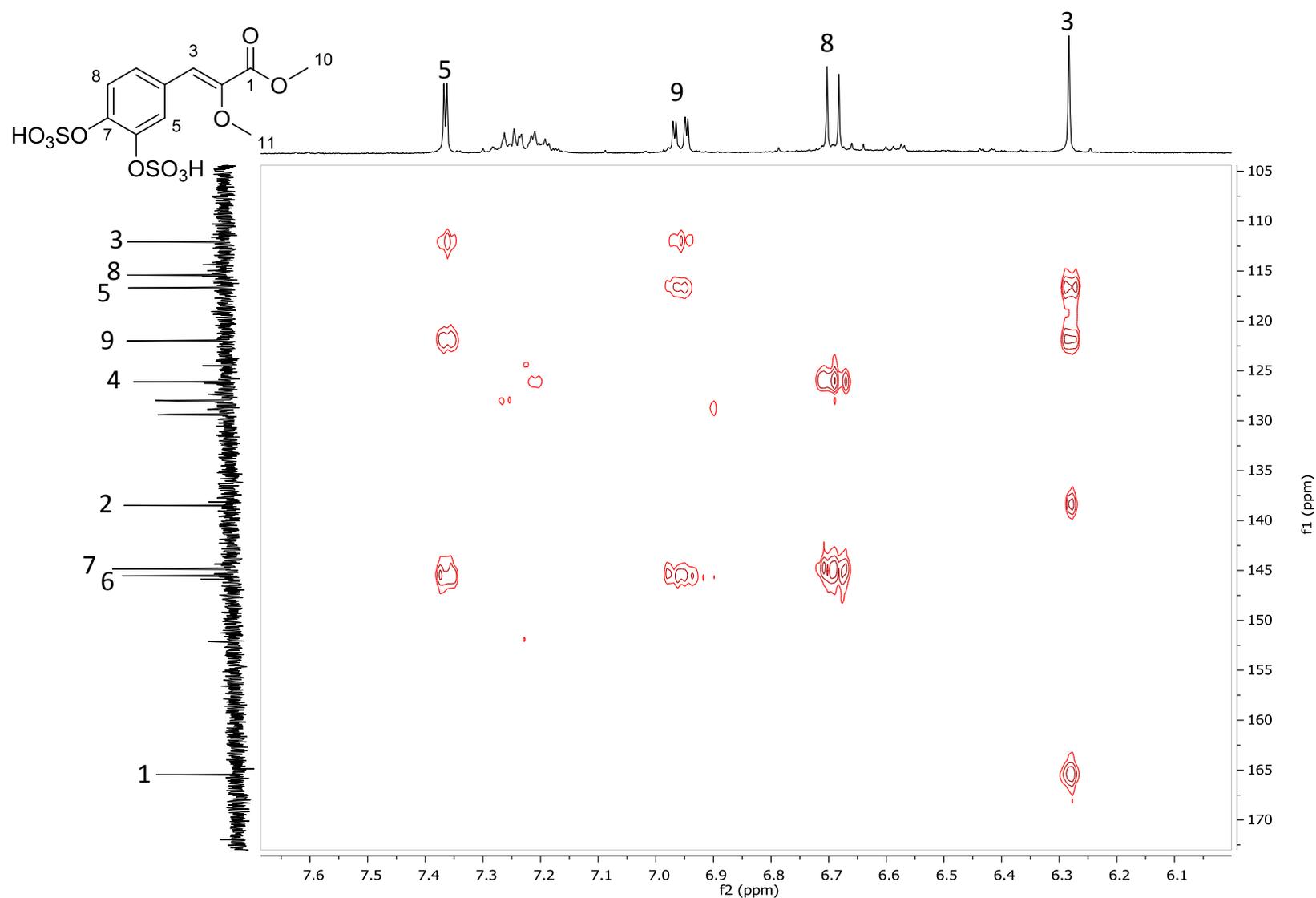


Figure 55. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_6 -DMSO, 500/125 MHz) de l' α -méthoxy-*m,p*-disulfooxycinnamate de méthyle (Ct4).

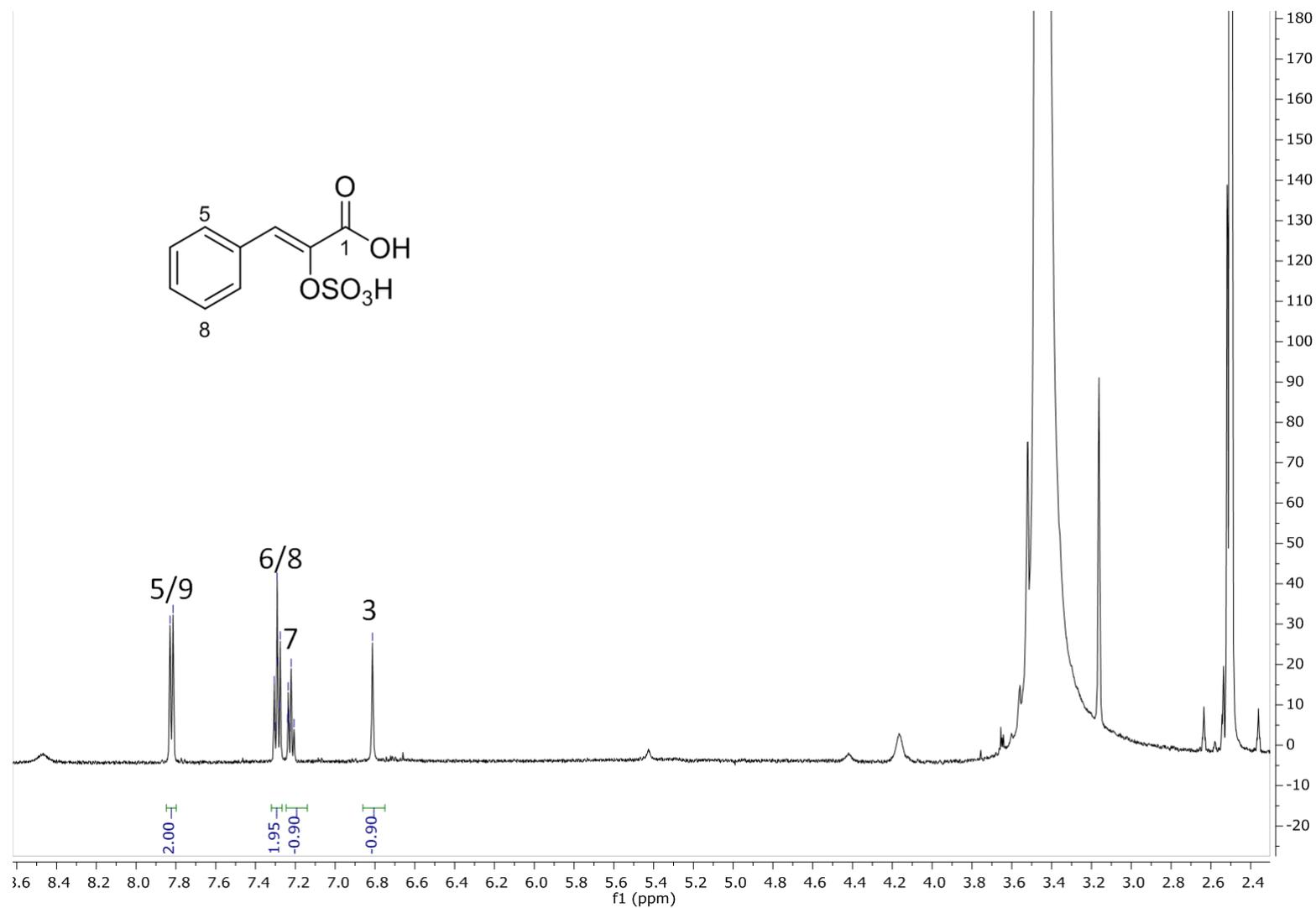


Figure 56. Spectre RMN ^1H (d_6 -DMSO, 500 MHz) de l'acide α -sulfooxycinnamique (Ct5).

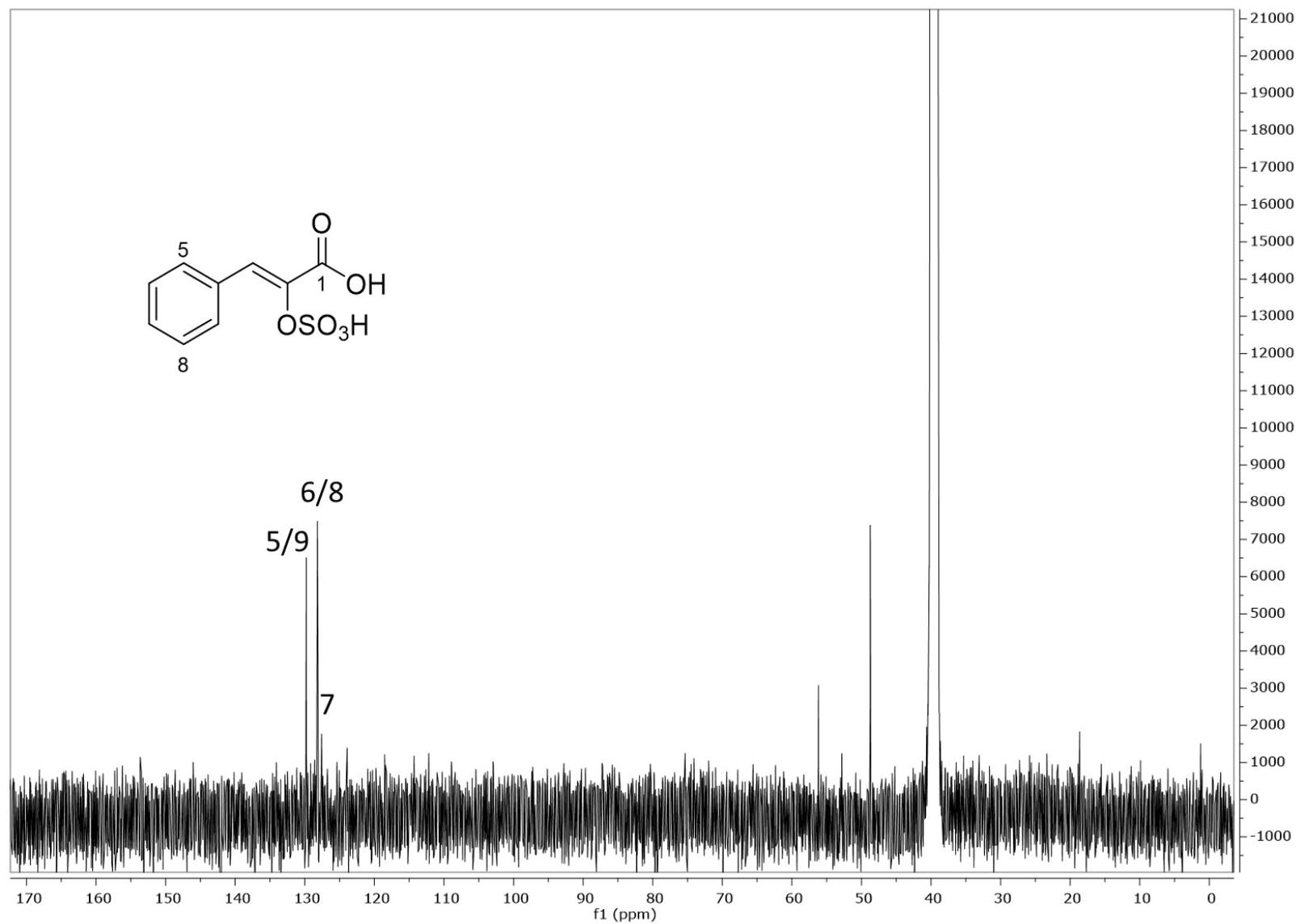


Figure 57. Spectre RMN ^{13}C (d_6 -DMSO, 125 MHz) de l'acide α -sulfooxycinnamique (Ct5).

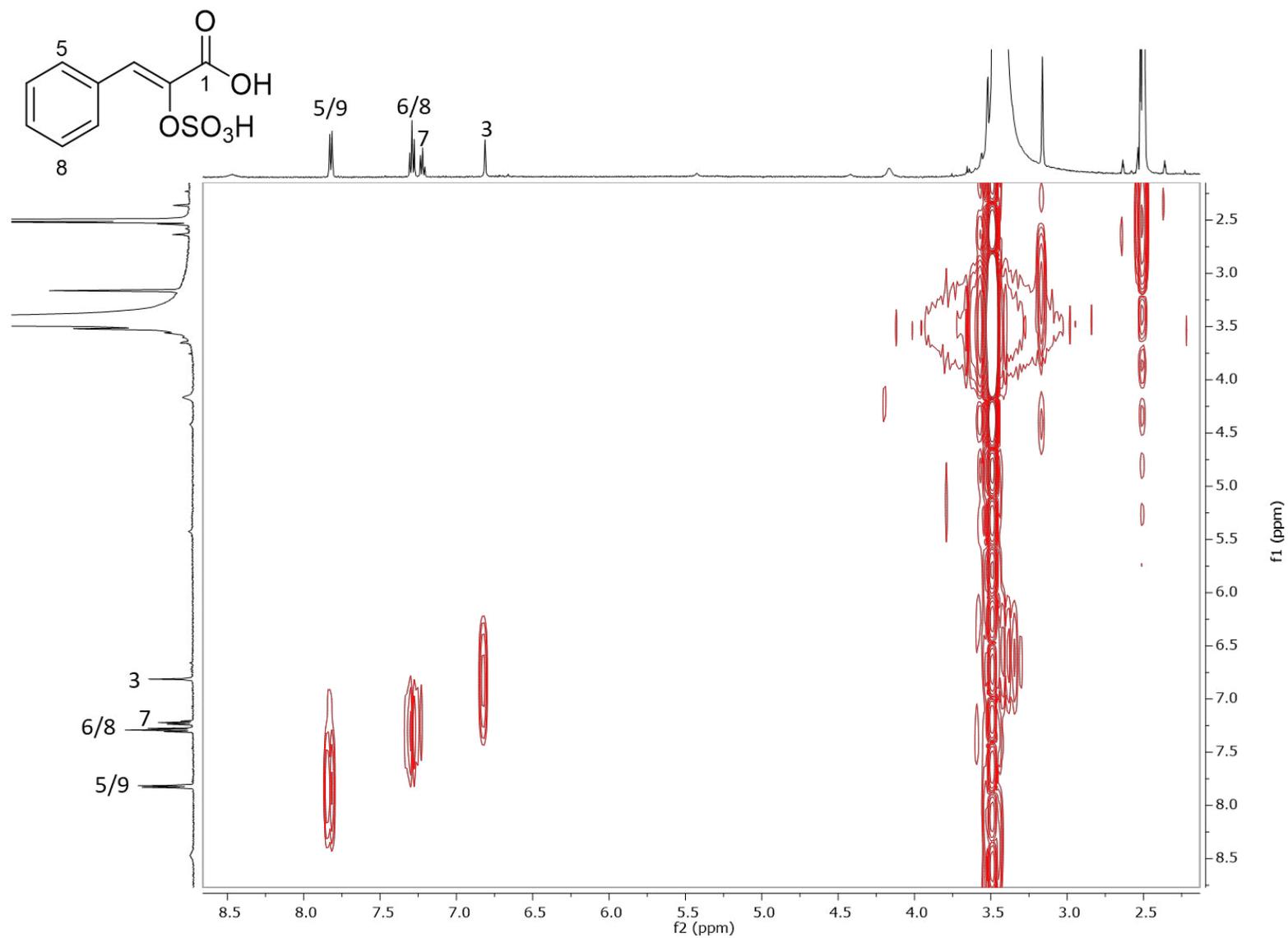


Figure 58. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_6 -DMSO, 500/500 MHz) de l'acide α -sulfoacrylique (Ct5).

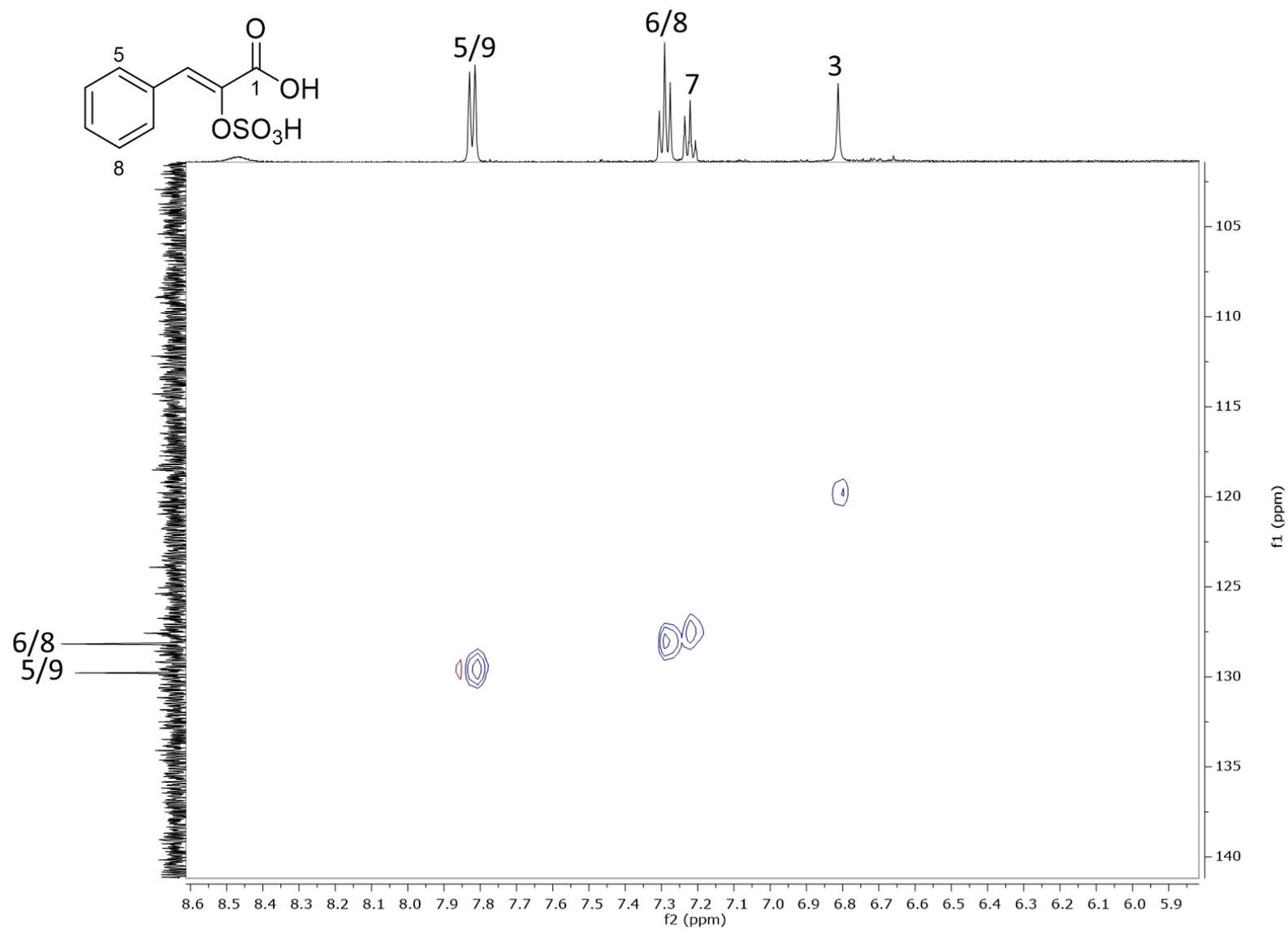


Figure 59. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_6 -DMSO, 500/125 MHz) de l'acide α -sulfooxycinnamique (**Ct5**).

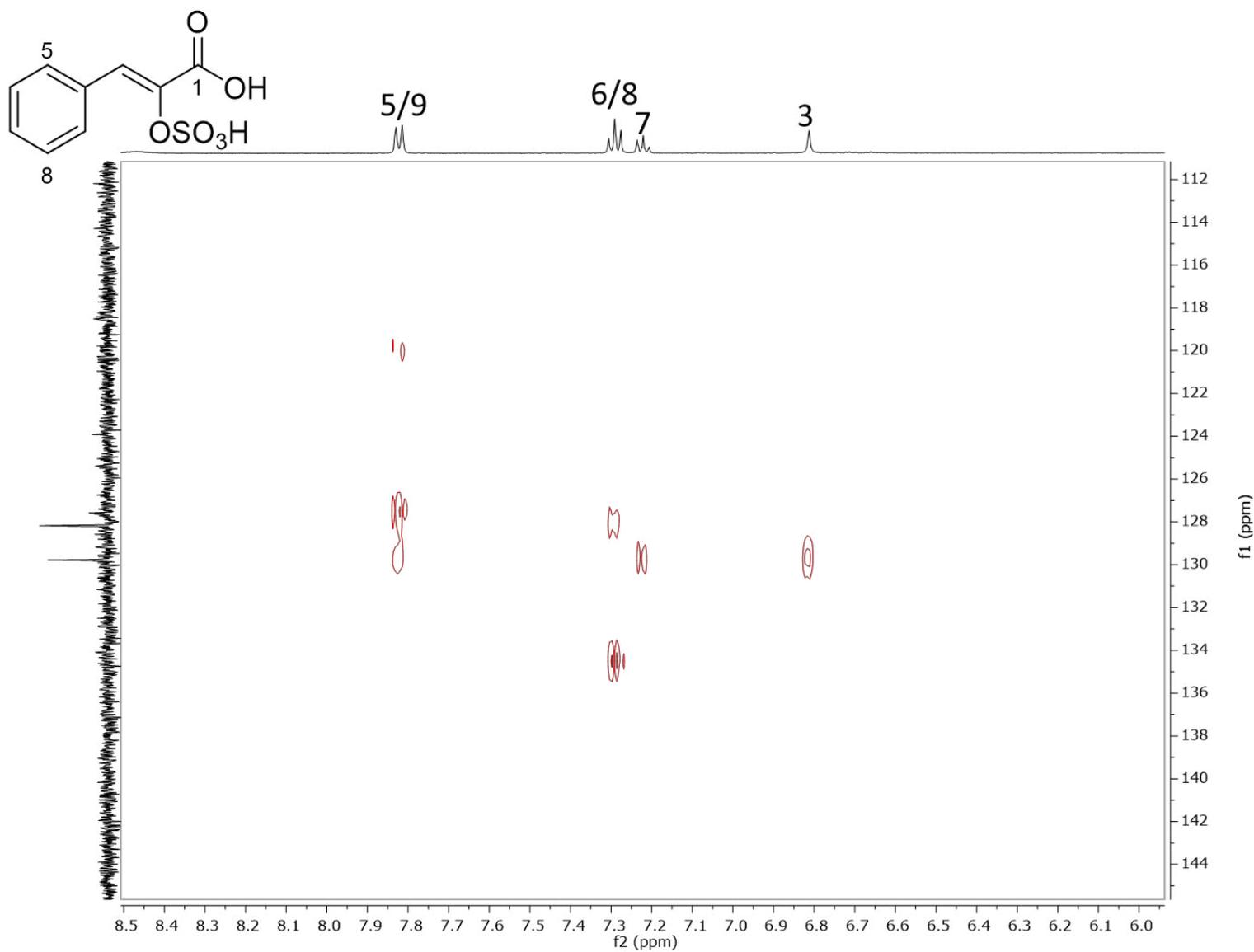


Figure 60. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_6 -DMSO, 500/125 MHz) de l'acide α -sulfooxycinnamique (Ct5).

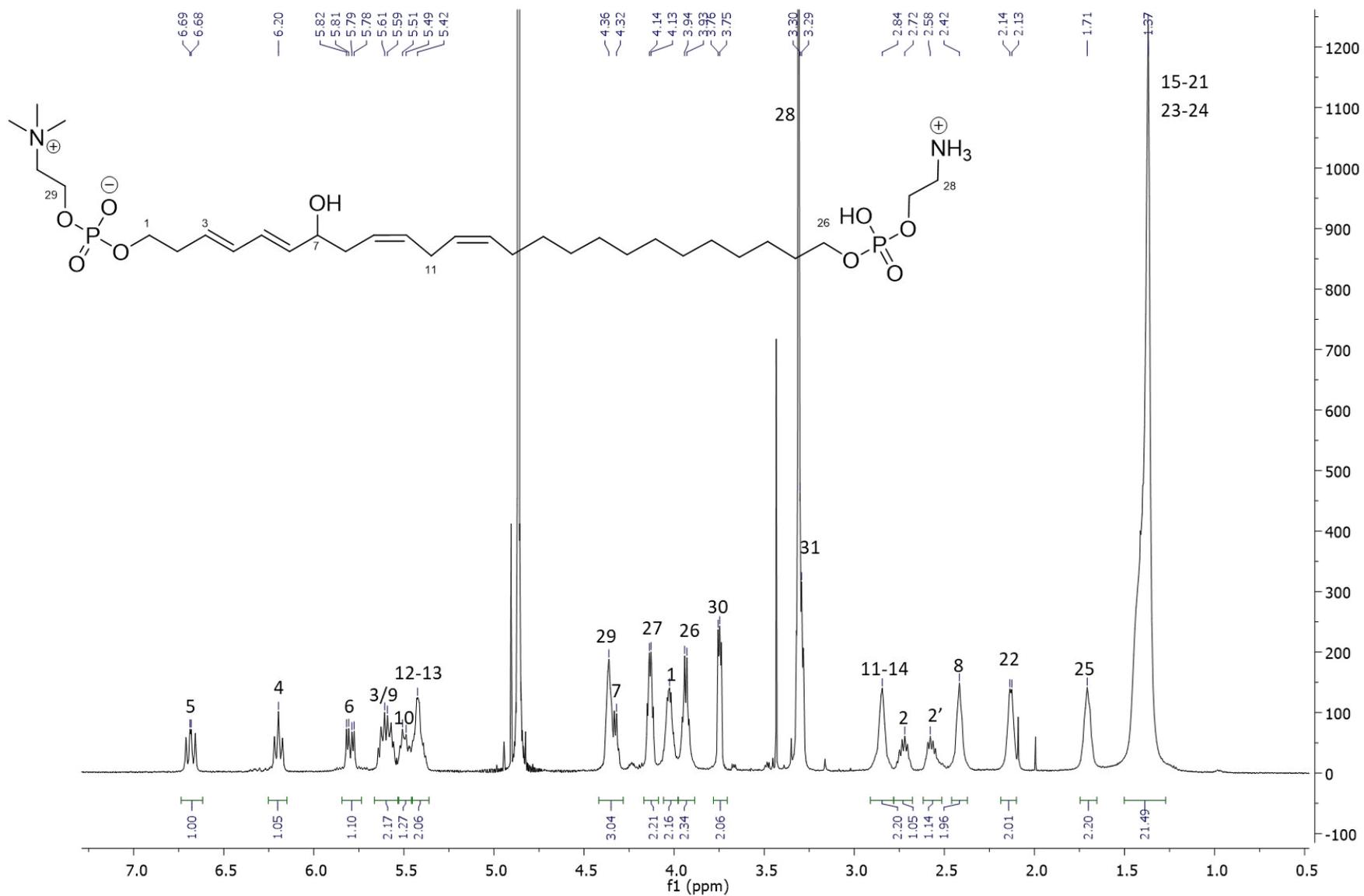


Figure 61. Spectre RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de la bolascidine A (Psp1).

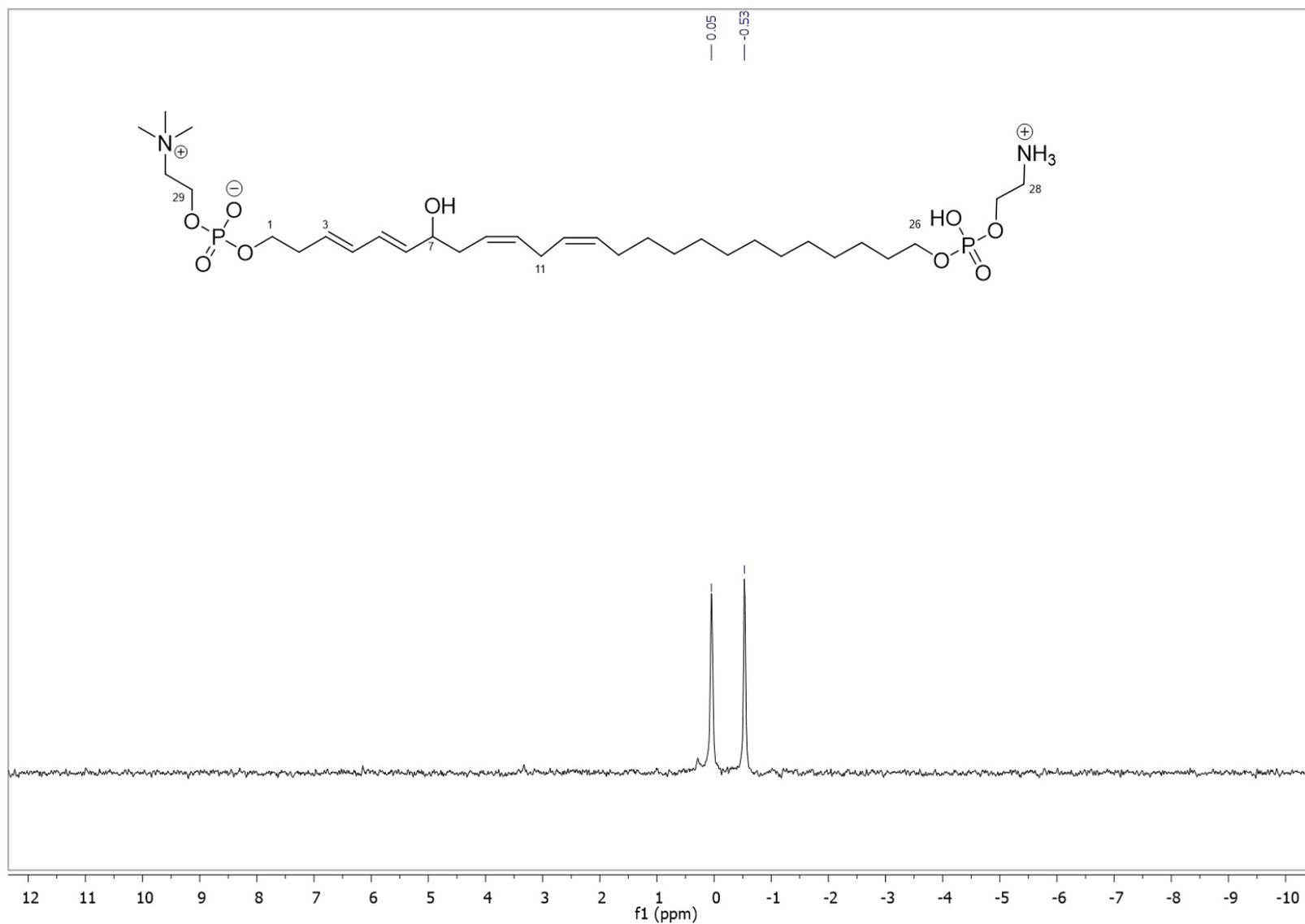


Figure 62. Spectre RMN ^{31}P (D_2O , 200 MHz) découplé du proton de la bolascidine A (**Psp1**).

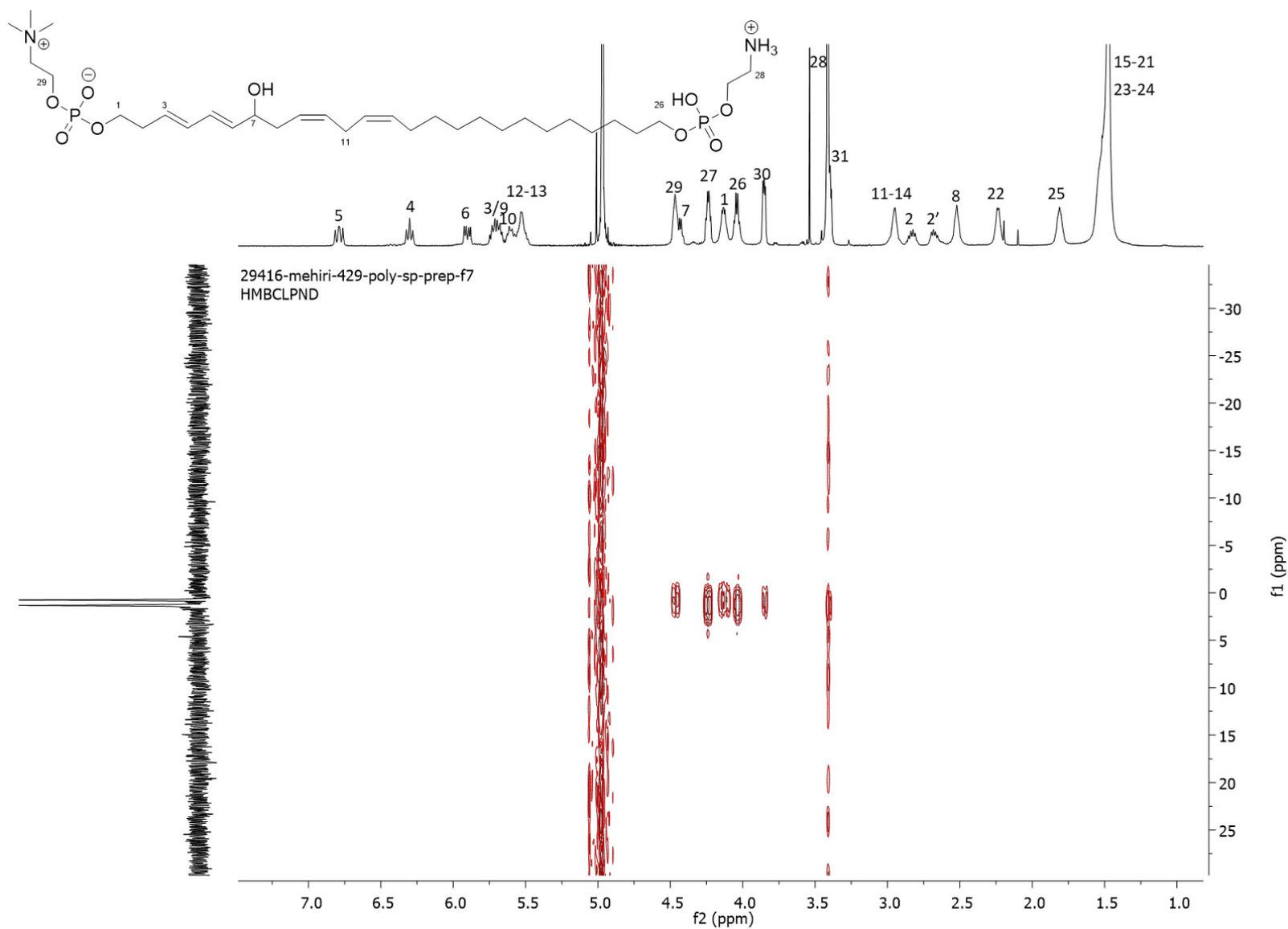


Figure 63. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{31}P (D_2O , 500/200 MHz) de la bolascidine A (**Psp1**).

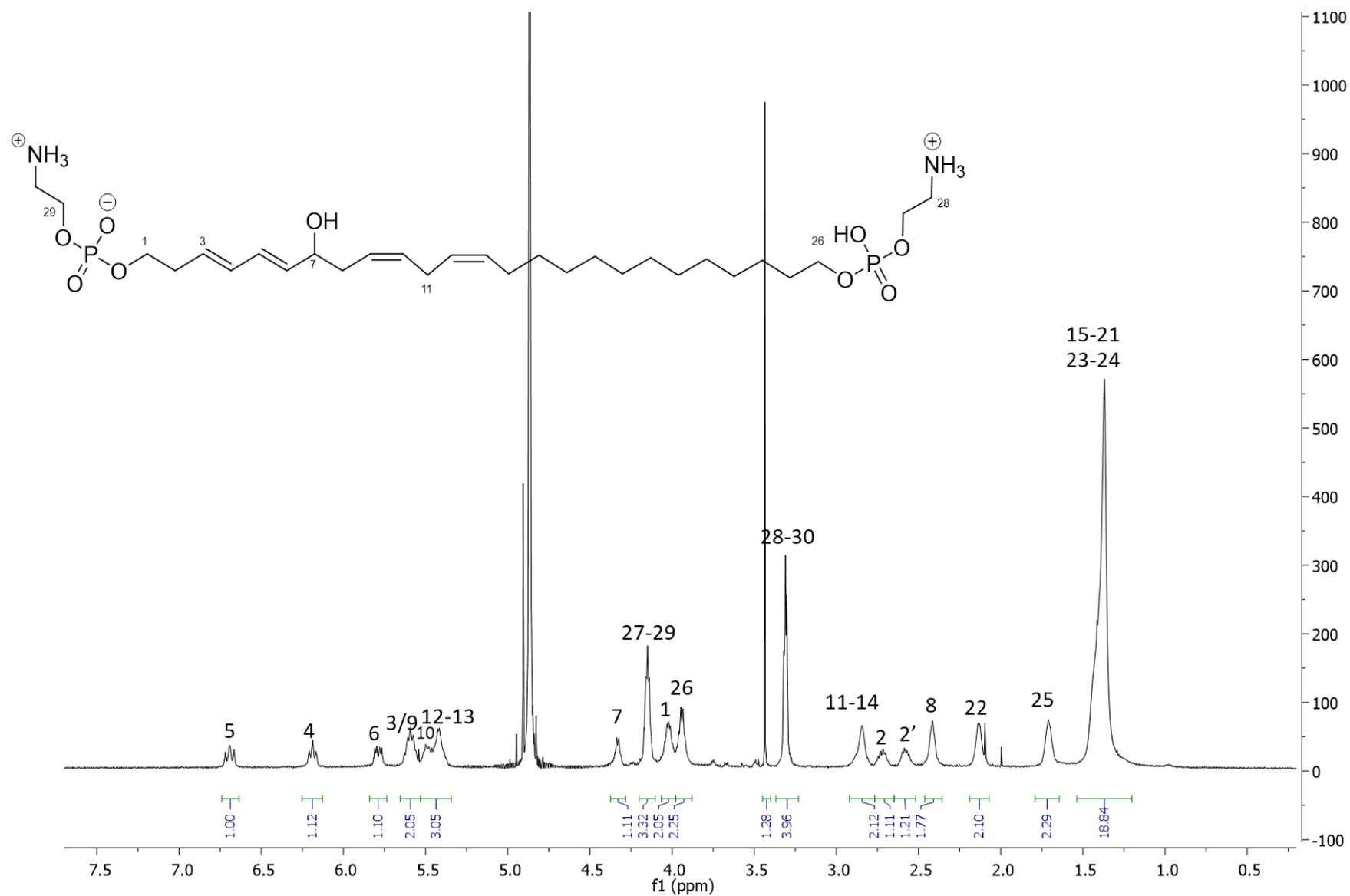


Figure 64. Spectre RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de la bolascidine B (Psp2).

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

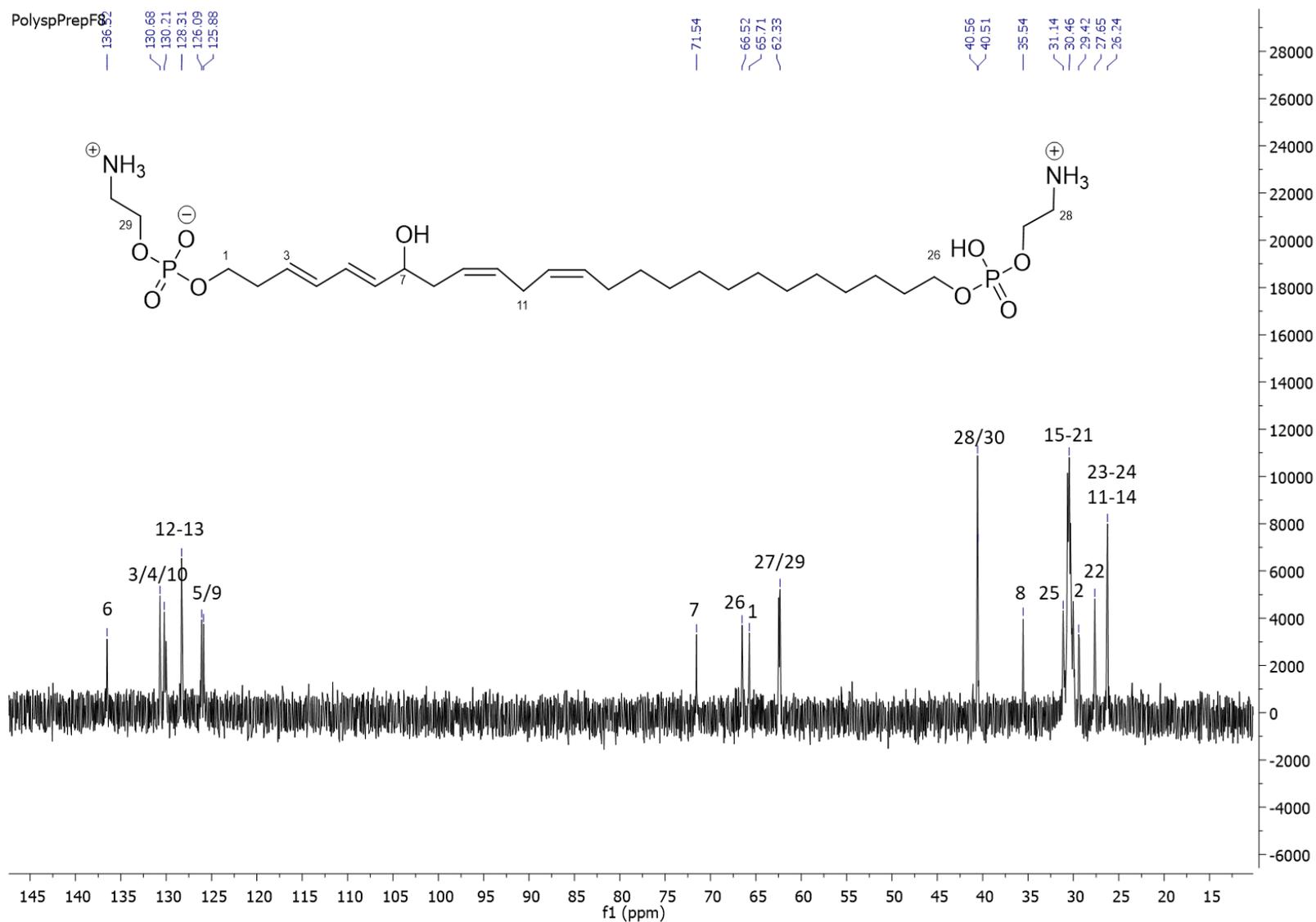


Figure 65. Spectre RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz) de la bolascidine B (**Psp2**).

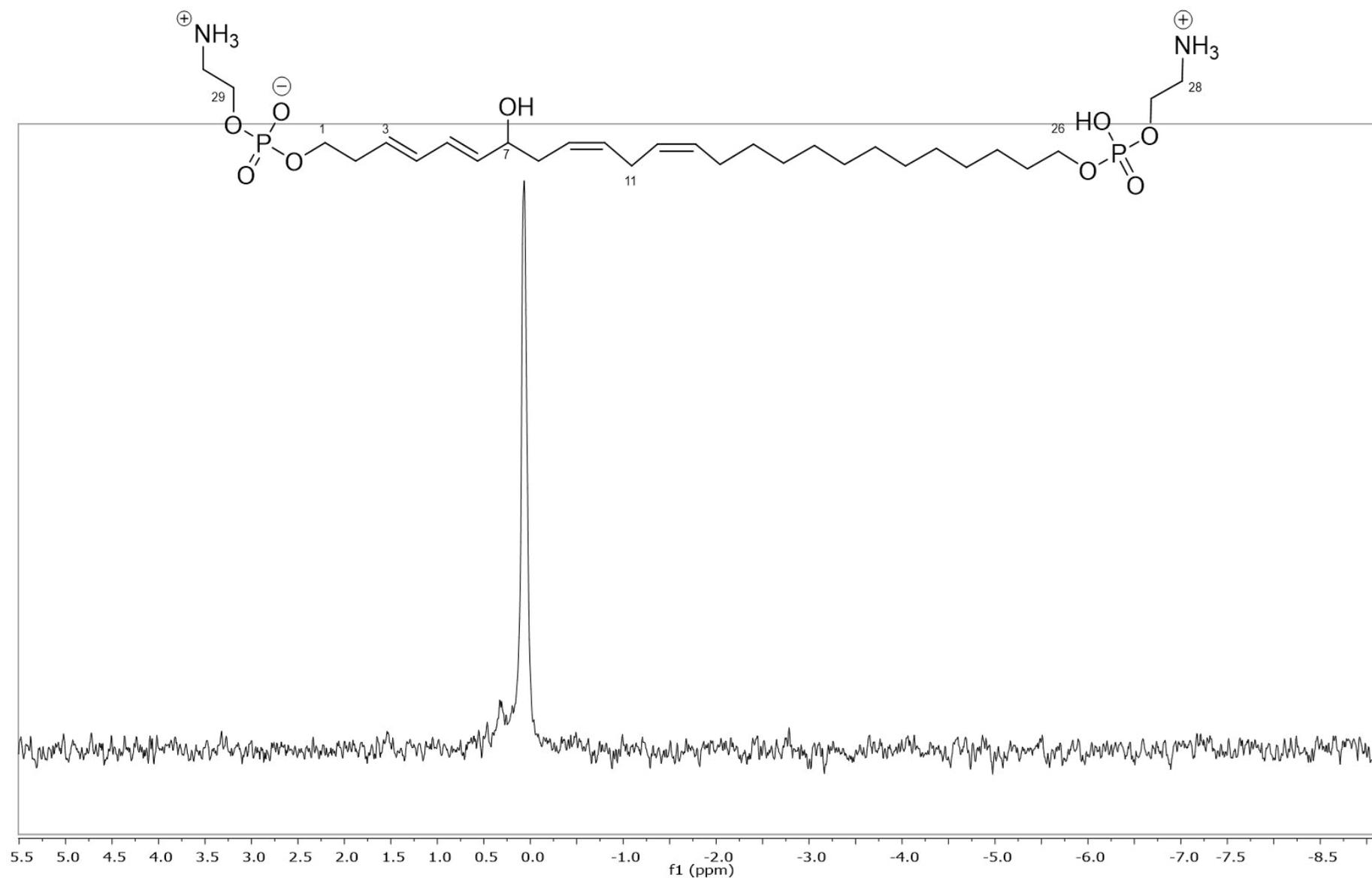
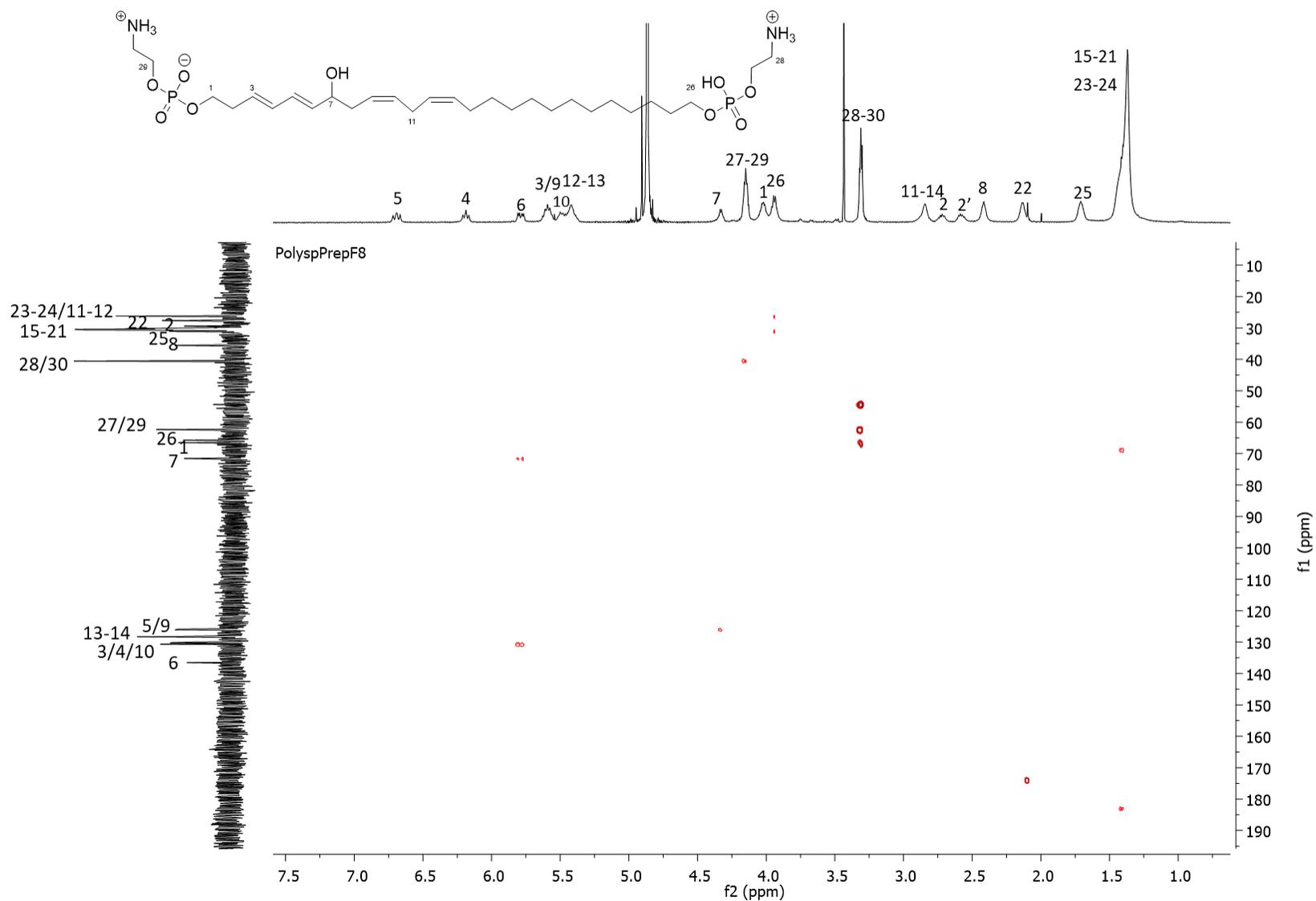


Figure 66. Spectre RMN ^{31}P (D_2O , 200 MHz) découplé du proton de la bolascidine B (**Psp2**)

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés



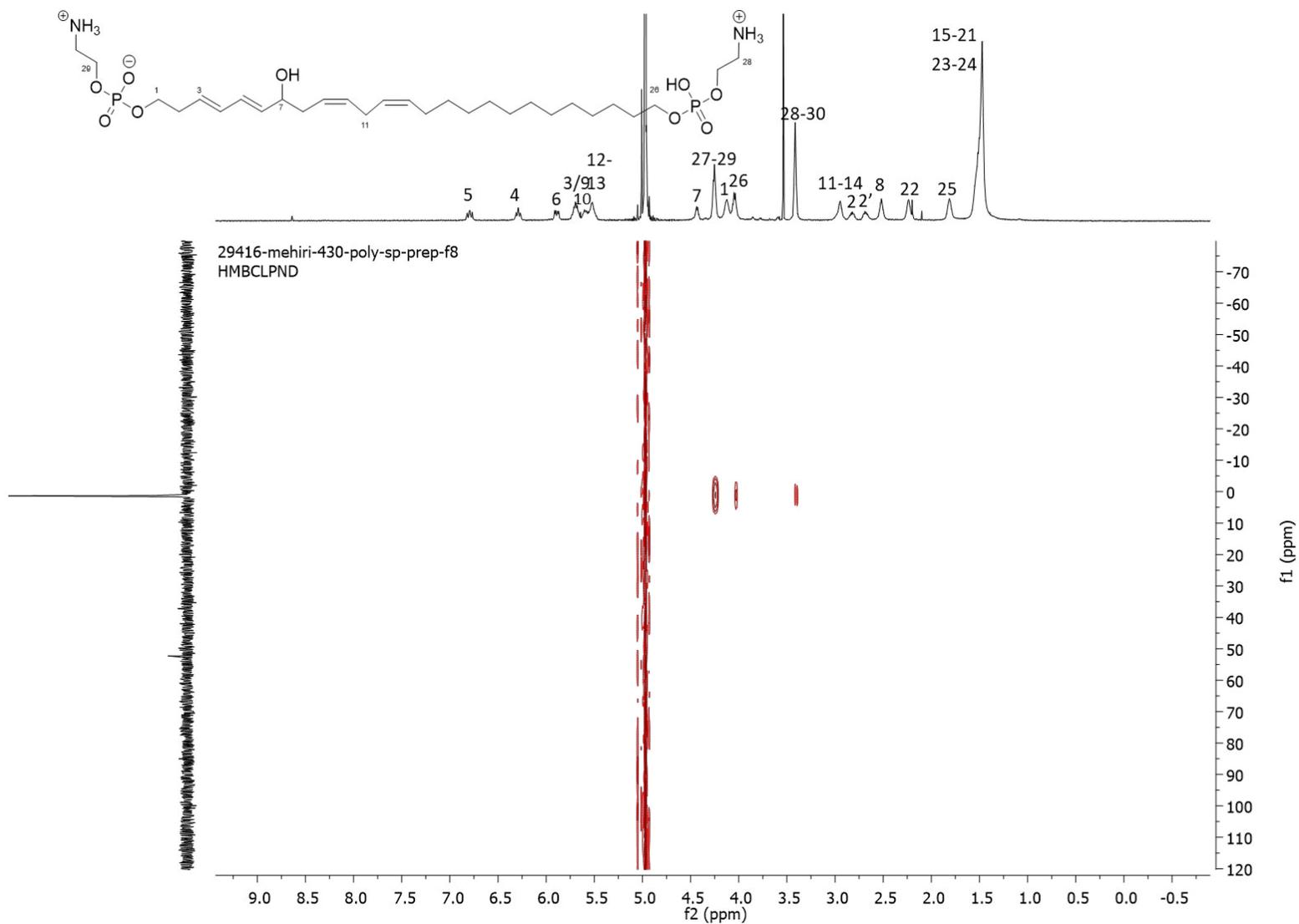


Figure 68. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{31}P (D_2O , 500/200 MHz) de la bolascidine B (**Psp2**).

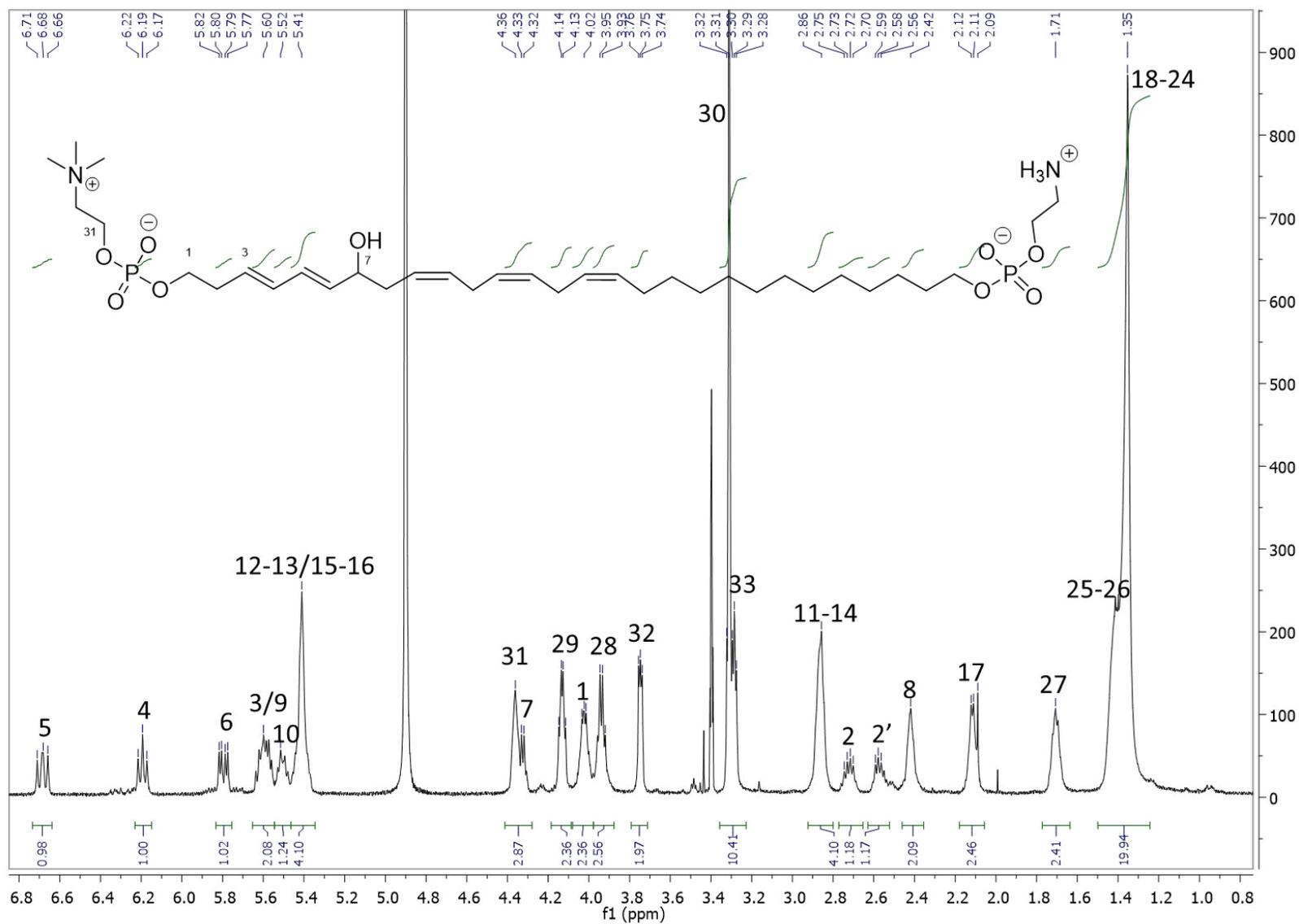


Figure 69. Spectre RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de la bolascidine C (Psp3).

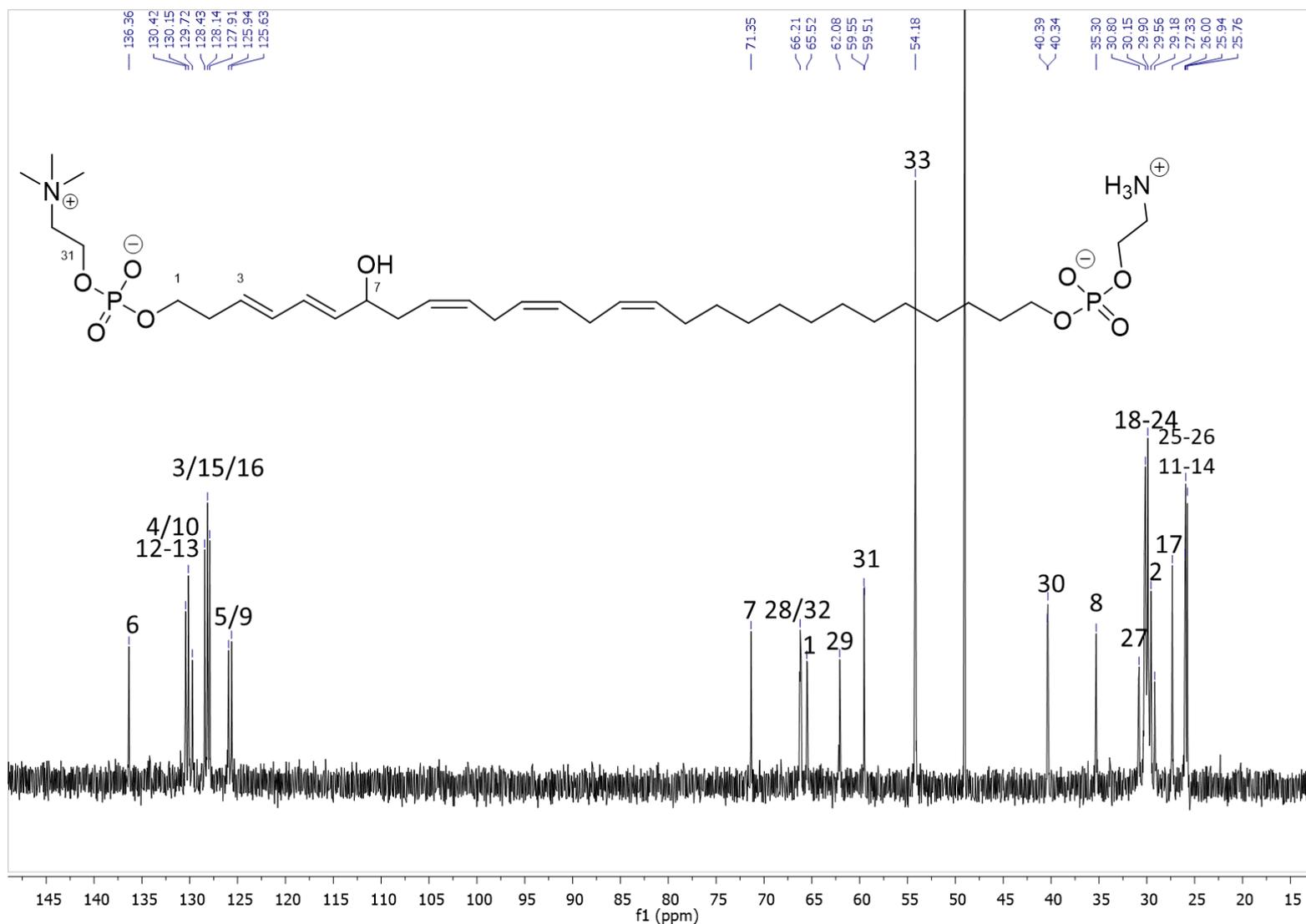


Figure 70. Spectre RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz) de la bolascidine C (**Psp3**).

The figure displays the ¹³C DEPT 135 NMR spectrum of bolascidine C (Psp3) in D₂O at 125 MHz. The chemical structure is shown at the top, with carbon atoms numbered 1 through 31. The spectrum shows peaks in the aromatic region (125-137 ppm) and the aliphatic region (25-72 ppm). The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 145 to 15. The y-axis represents intensity. The spectrum is a DEPT 135 experiment, where CH and CH₃ groups appear as positive peaks and CH₂ groups appear as negative peaks. The chemical structure includes a trimethylammonium cation (N⁺Me₃) and a trimethylammonium anion (H₃N⁺), both linked to the main chain via phosphate groups. The main chain is a long polyunsaturated hydrocarbon with a hydroxyl group (OH) at C7.

Chemical Shift (ppm)	Assignment
136.36	Aromatic/Quaternary C
130.42	Aromatic/Quaternary C
130.15	Aromatic/Quaternary C
129.72	Aromatic/Quaternary C
128.43	Aromatic/Quaternary C
128.14	Aromatic/Quaternary C
127.91	Aromatic/Quaternary C
125.94	Aromatic/Quaternary C
125.63	Aromatic/Quaternary C
71.35	CH-OH (C7)
66.17	CH ₂ -O (C1)
65.48	CH ₂ -O (C3)
62.04	CH ₂ -O (C5)
59.55	CH ₂ -O (C9)
59.51	CH ₂ -O (C13)
54.18	CH ₂ -O (C17)
49.00	CH ₂ -O (C21)
40.39	CH ₂ -O (C25)
40.34	CH ₂ -O (C29)
35.30	CH ₂ -O (C31)
30.81	CH ₂ -O (C2)
30.16	CH ₂ -O (C4)
29.90	CH ₂ -O (C6)
29.57	CH ₂ -O (C8)
29.18	CH ₂ -O (C10)
27.33	CH ₂ -O (C12)
25.94	CH ₂ -O (C14)
25.76	CH ₂ -O (C16)
16	CH (C1)
15	CH (C3)
13	CH (C5)
12	CH (C9)
11	CH (C13)
7	CH (C17)
6	CH (C21)
5	CH (C25)
4	CH (C29)
3	CH (C31)
28/32	CH ₂ (C2)
29	CH ₂ (C4)
31	CH ₂ (C6)
30	CH ₂ (C8)
8	CH ₂ (C10)
27	CH ₂ (C12)
2	CH ₂ (C14)
17	CH ₂ (C16)
18-24	CH ₂ (C18-24)
25-26	CH ₂ (C26-27)
11-14	CH ₂ (C28-30)

Figure 71. Spectre RMN ¹³C DEPT 135 (D₂O, 125 MHz) de la bolascidine C (Psp3).

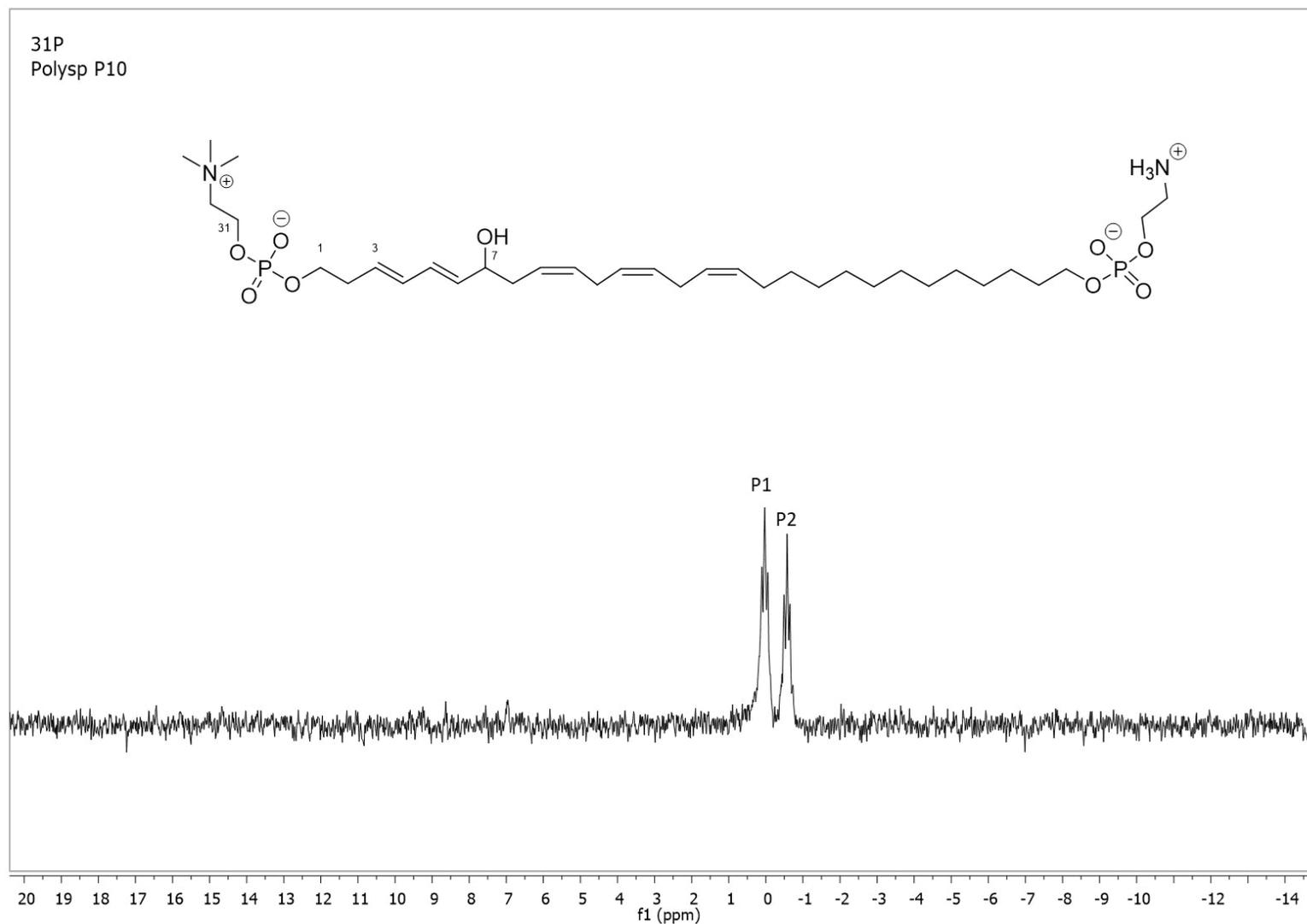


Figure 72. Spectre RMN ³¹P (D₂O, 200 MHz) couplé du proton de la bolascidine C (**Psp3**).

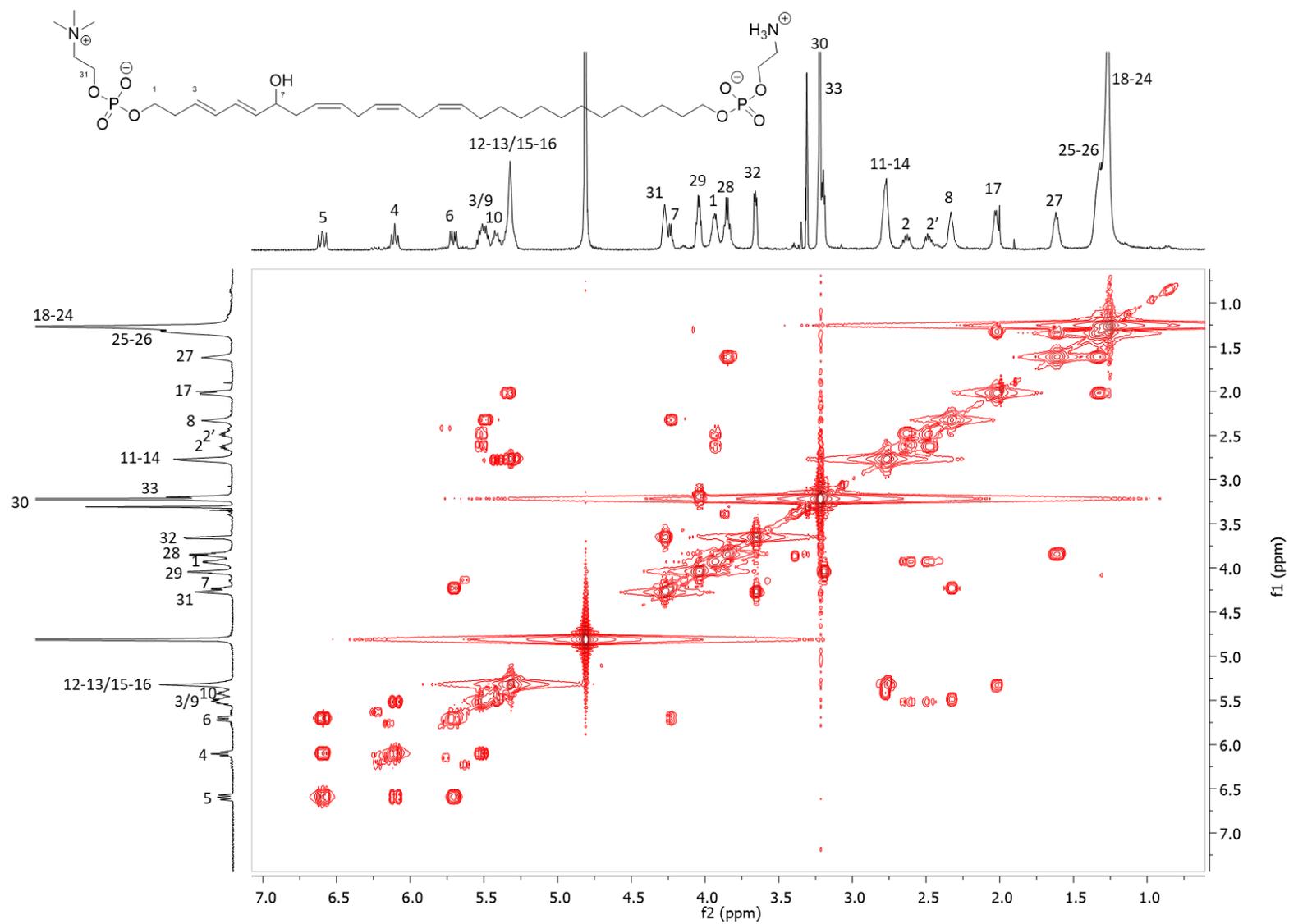


Figure 73. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) de la bolascidine C (Psp3).

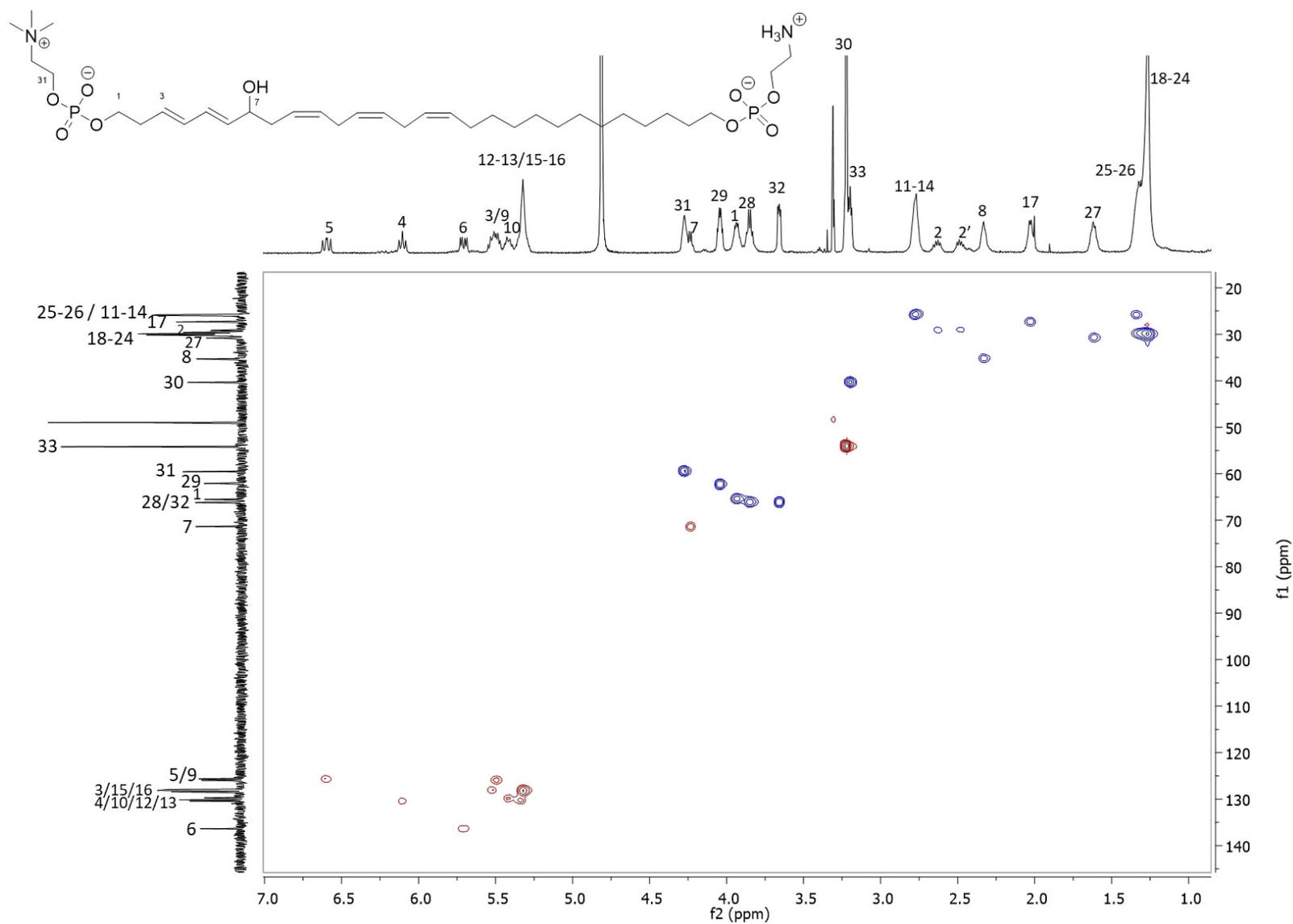


Figure 74. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (D_2O , 500/125 MHz) de la bolascidine C (Psp3).

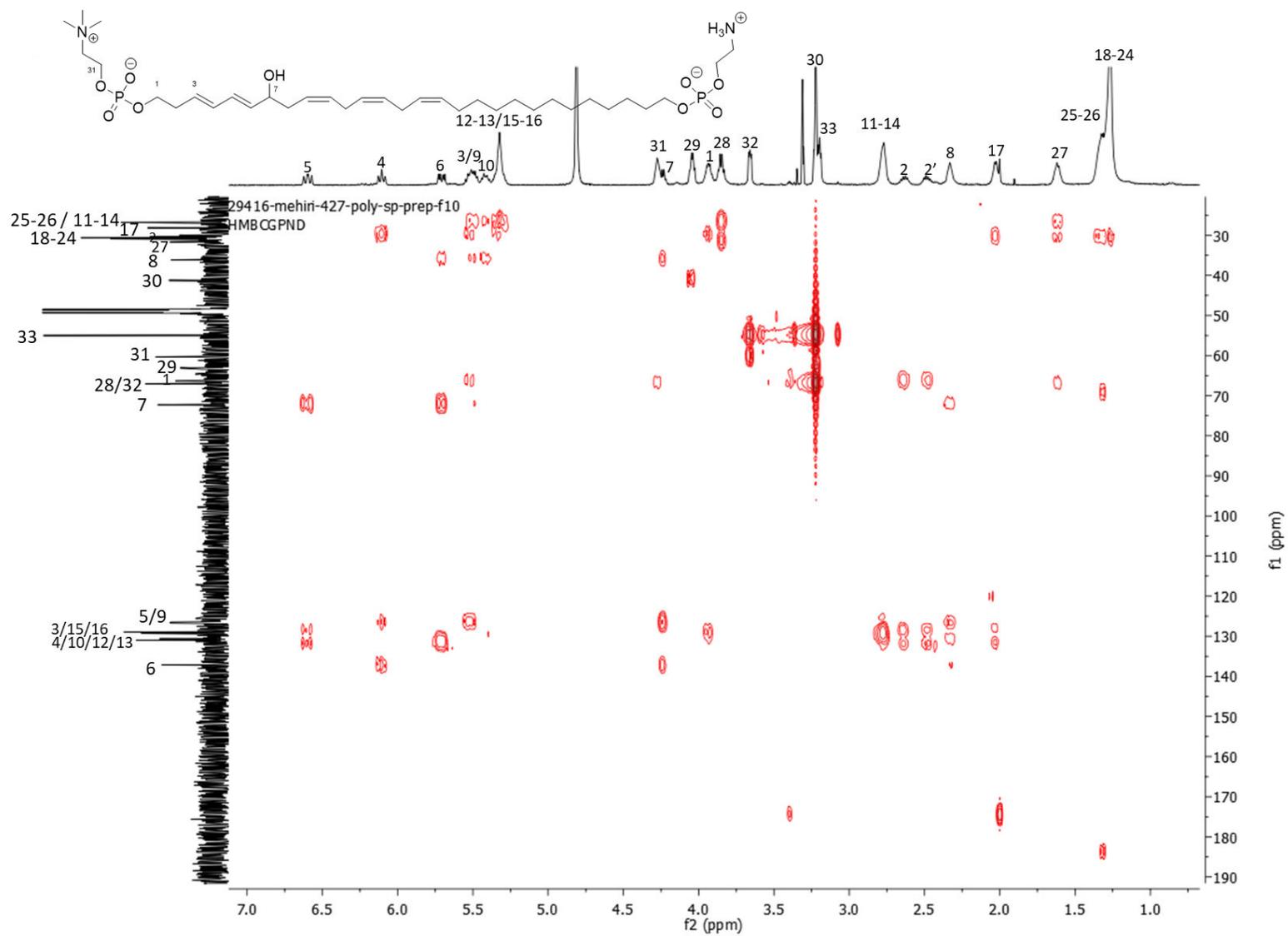


Figure 75. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{31}P (D_2O , 500/125 MHz) de la bolascidine C (**Psp3**).

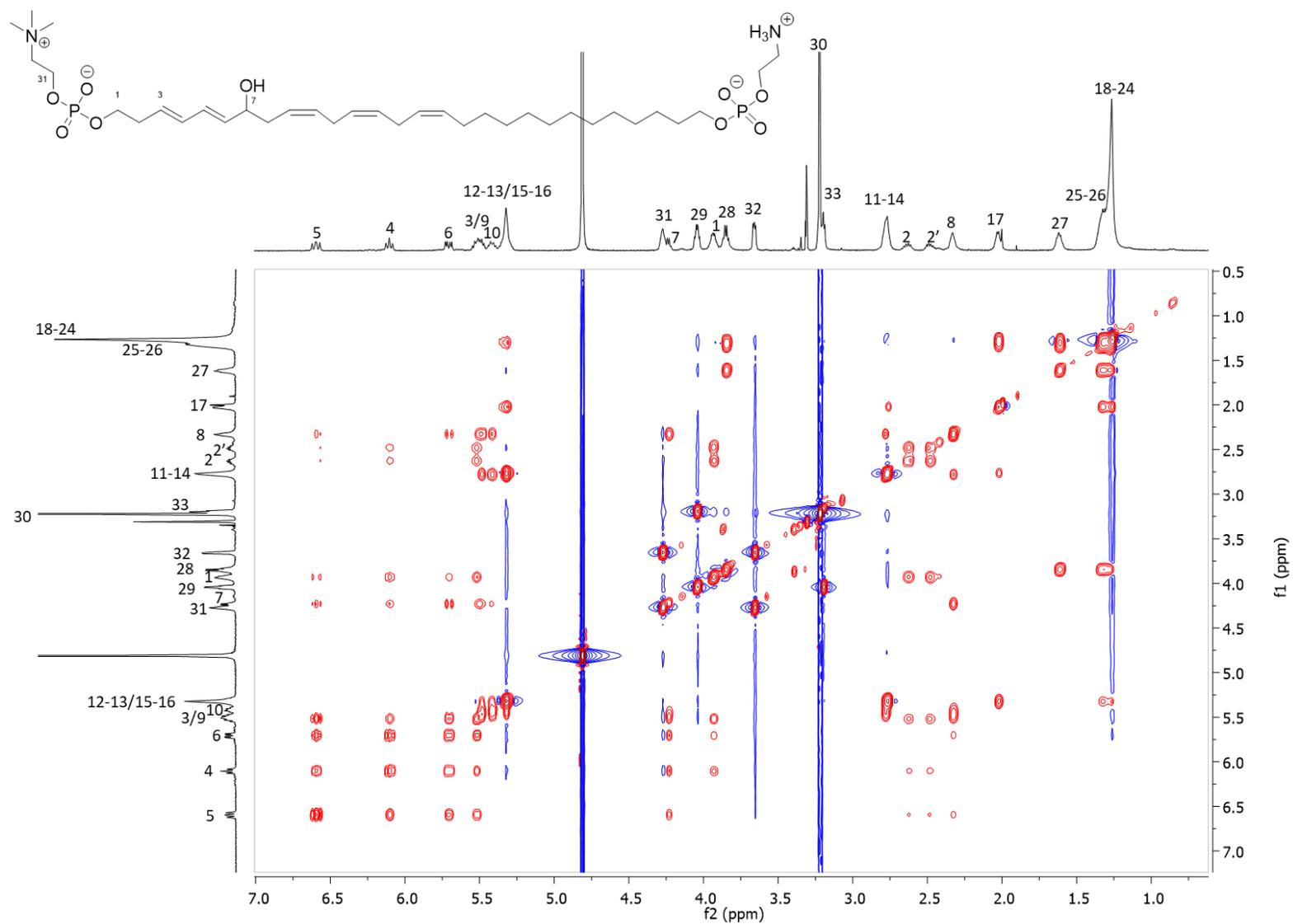


Figure 76. Spectre RMN NOESY ¹H-¹H (D₂O, 500/500 MHz) de la bolascidine C (**Psp3**).

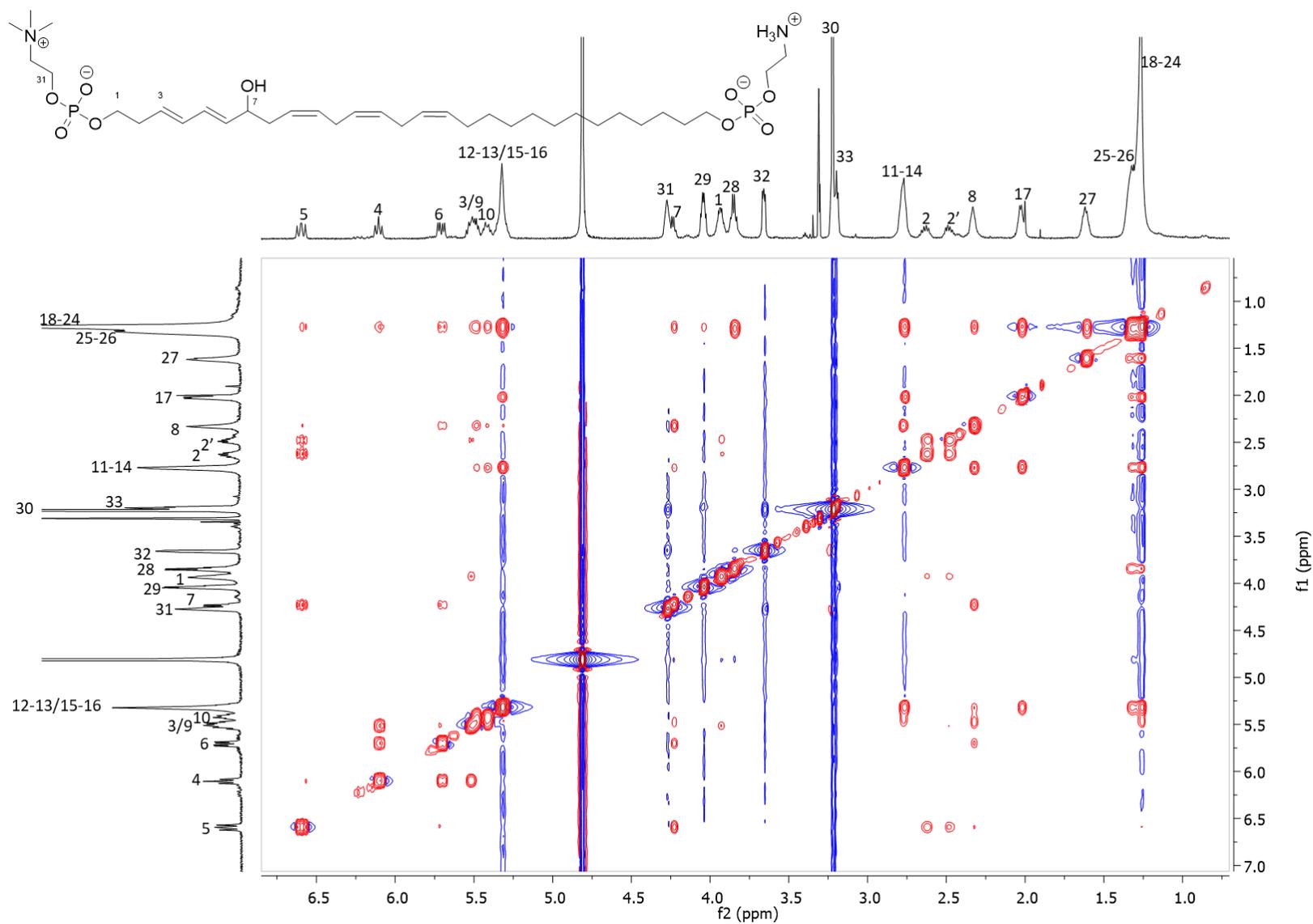


Figure 77. Spectre RMN TOCSY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) de la bolascidine C (**Psp3**).

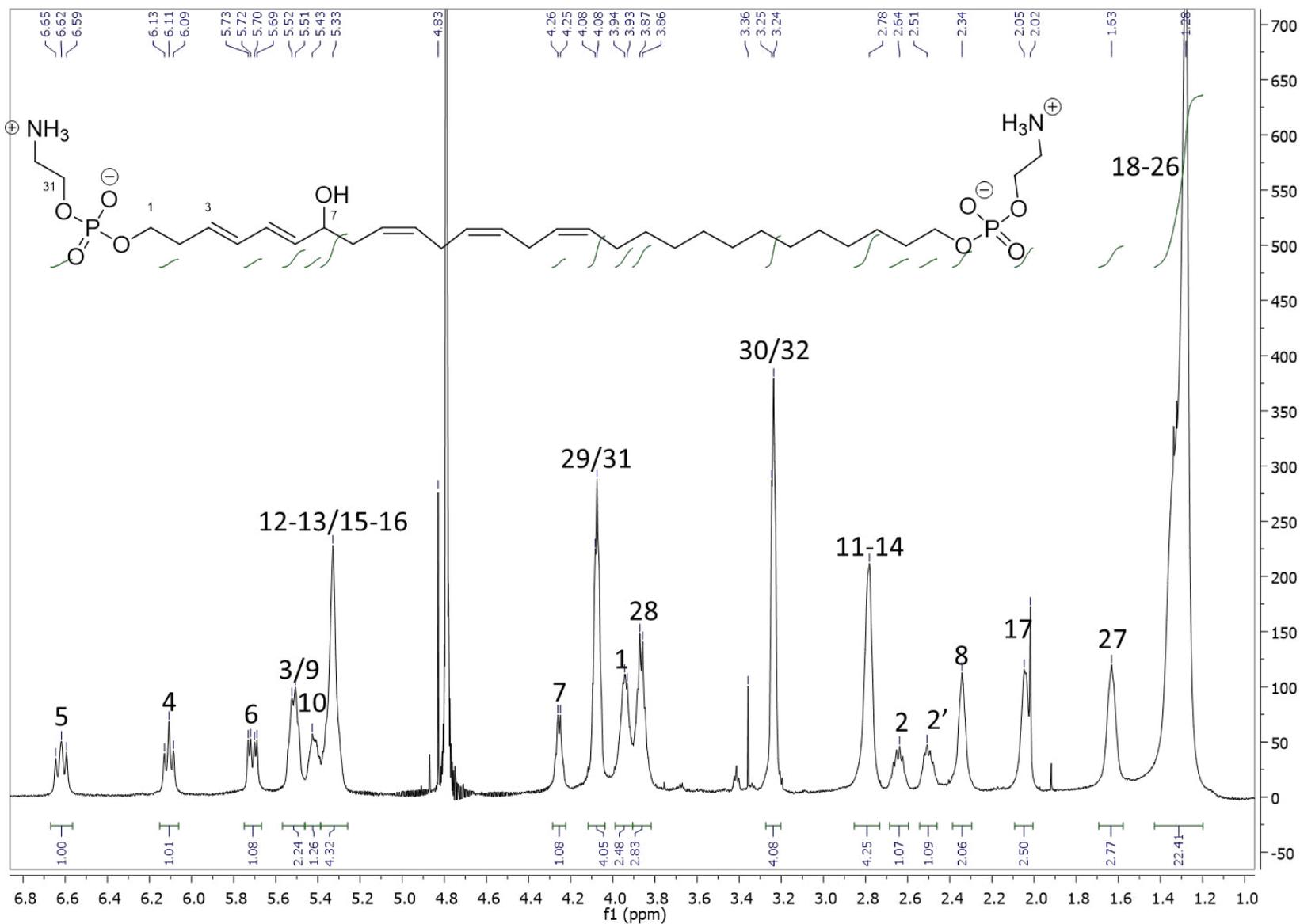


Figure 78. Spectre RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

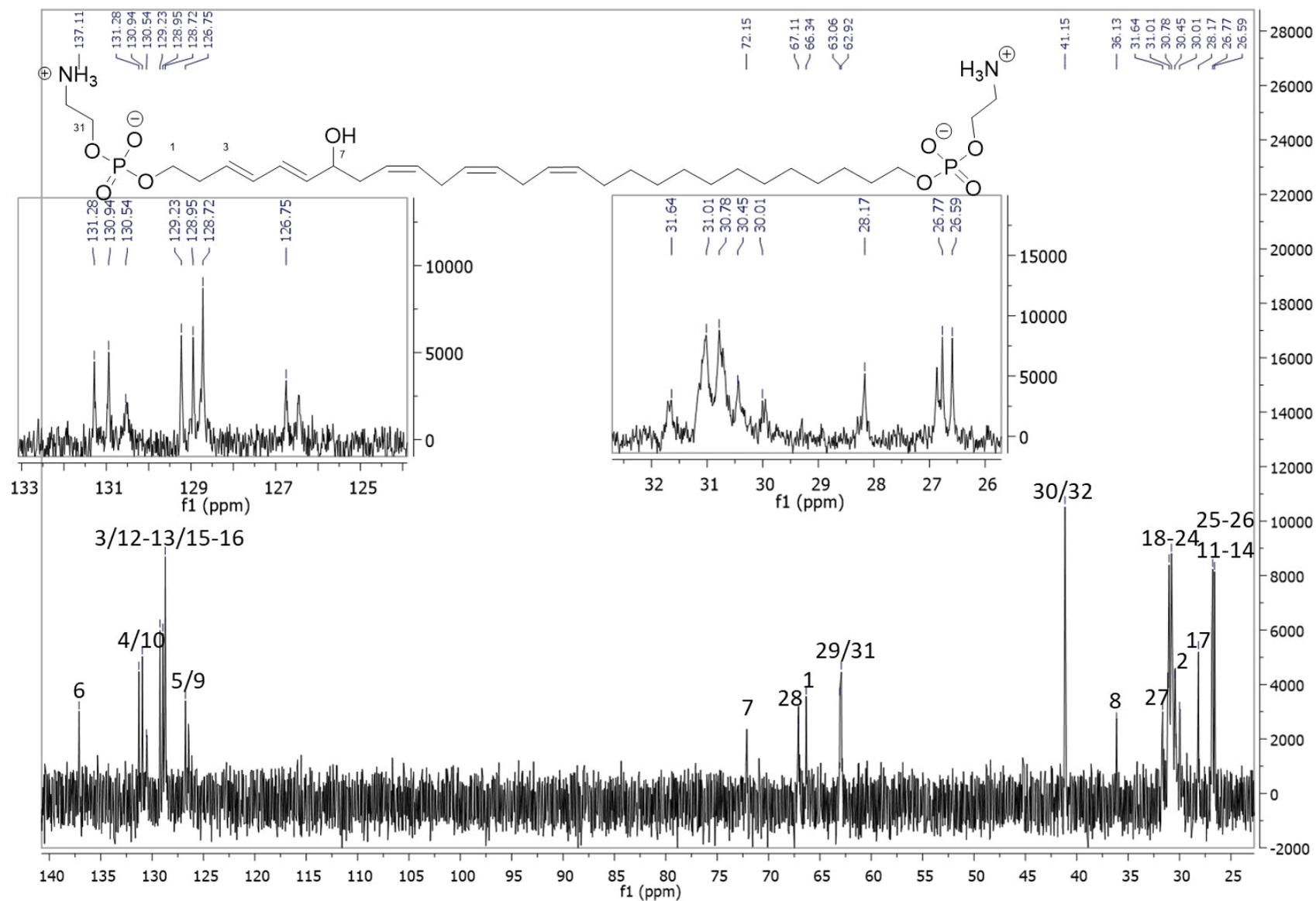


Figure 79. Spectre RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

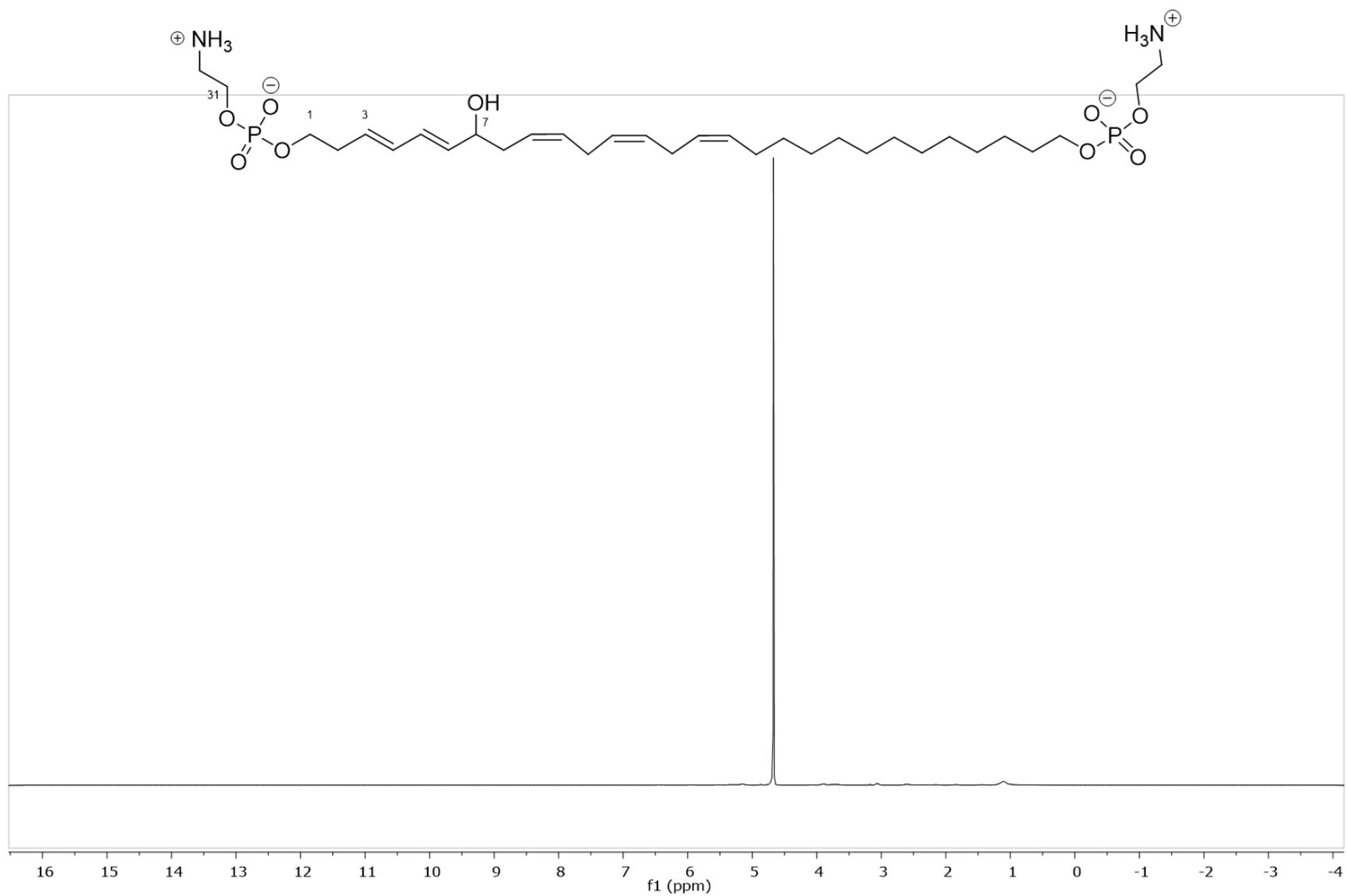


Figure 80. Spectre RMN ^{31}P (D_2O , 200 MHz) découplé du proton de la bolascidine D (Psp4).

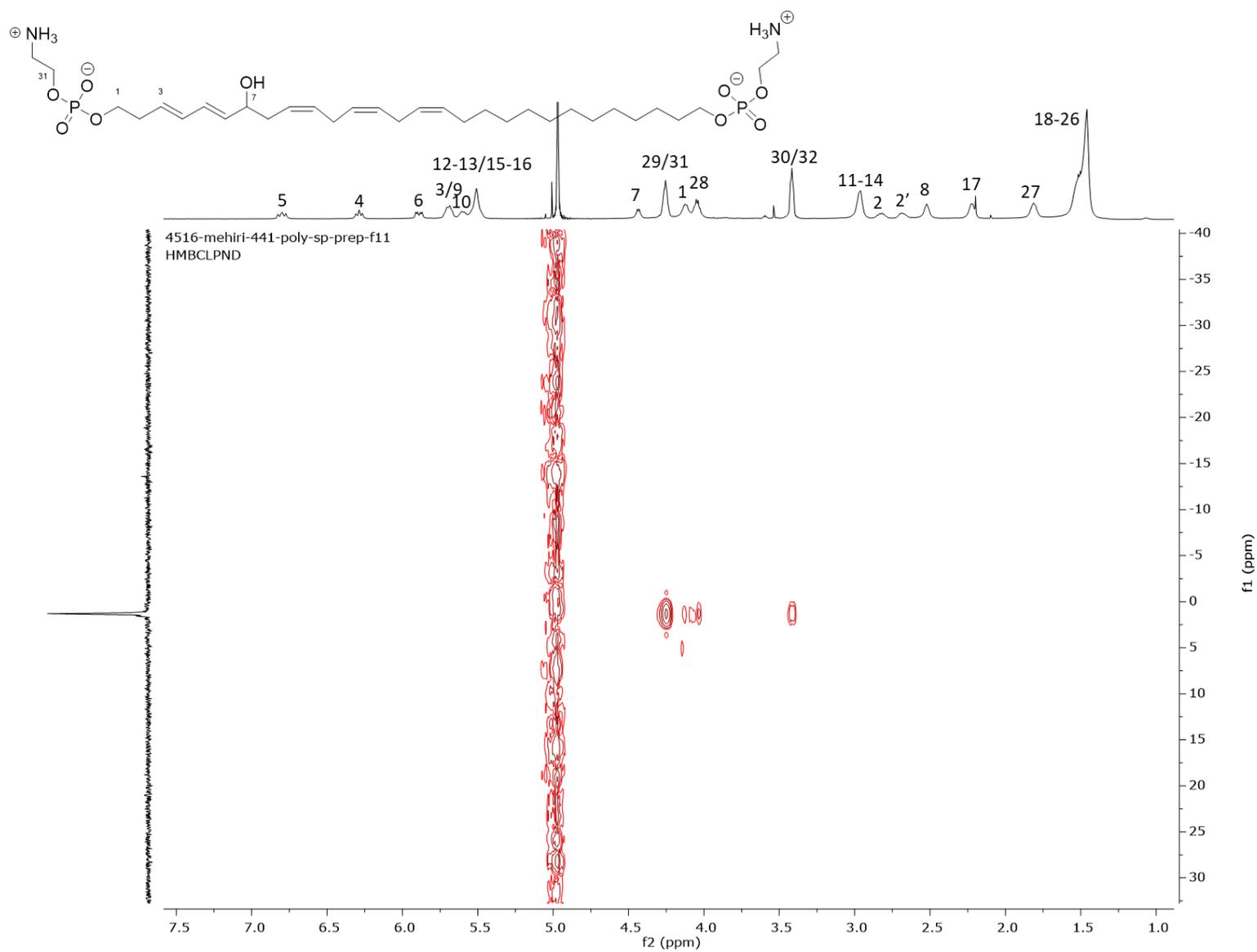


Figure 81. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{31}P (D_2O , 500/200 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

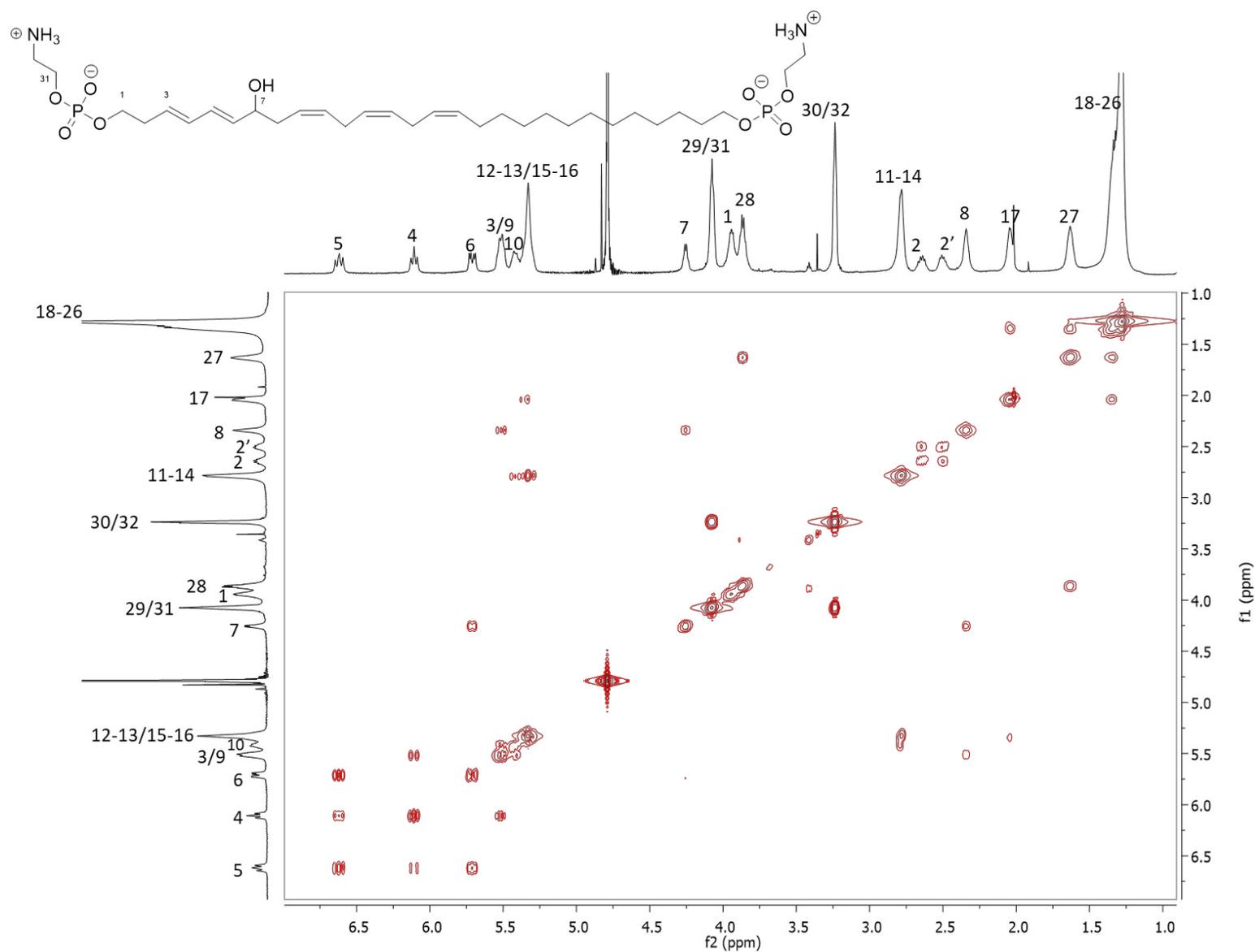


Figure 82. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

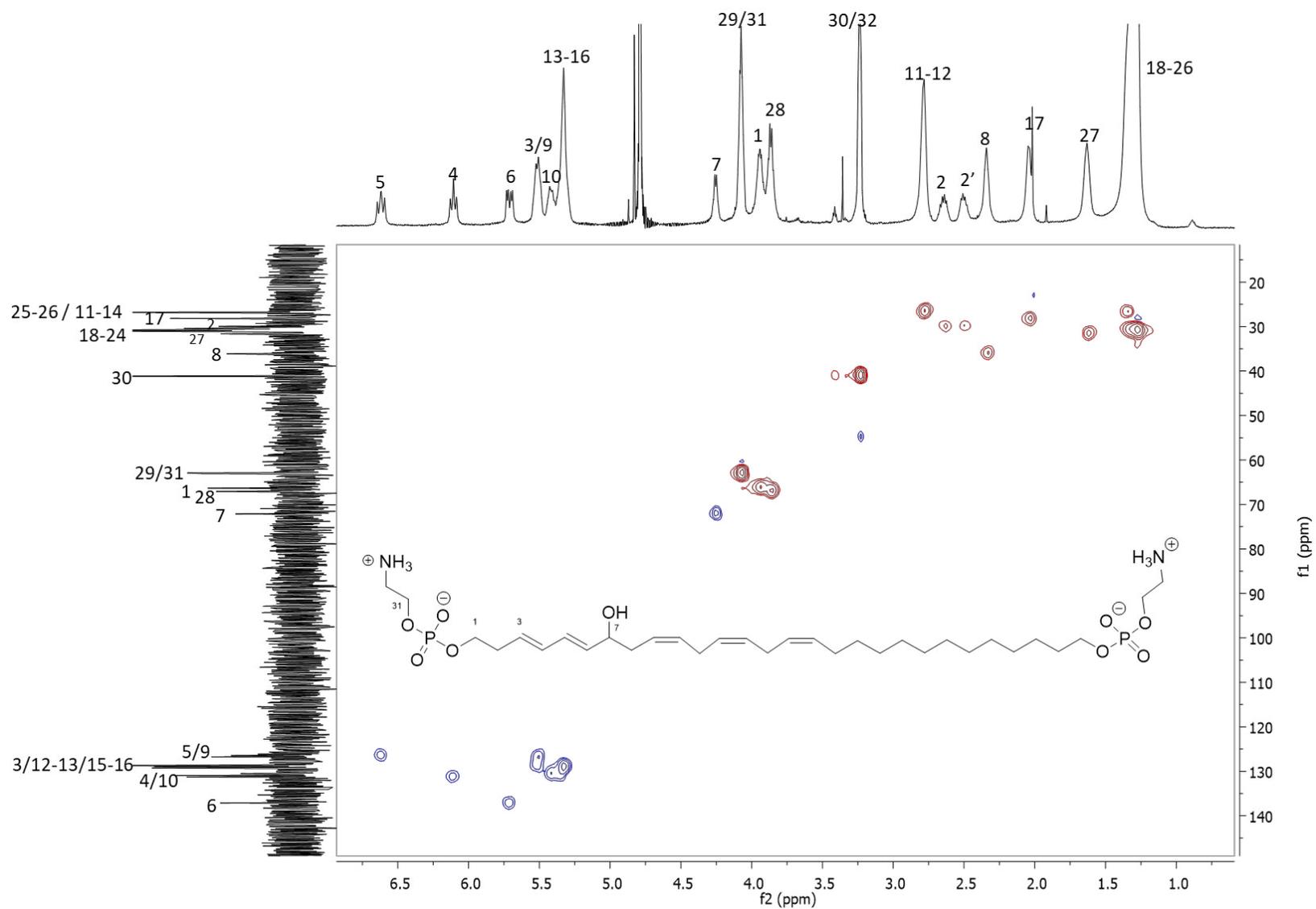


Figure 83. Spectre RMN HSQC ¹H-¹³C (D₂O, 500/125 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

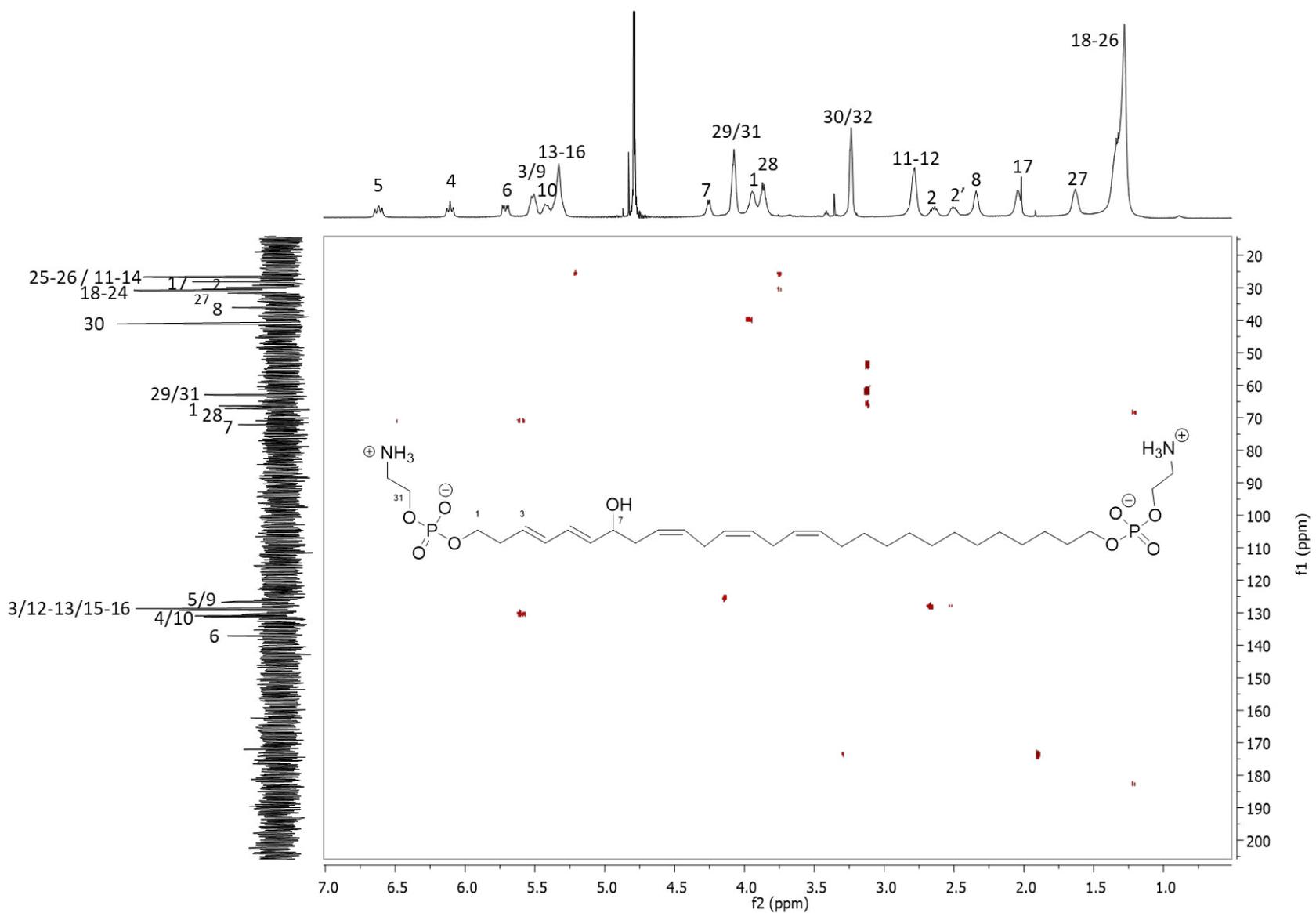


Figure 84. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (D_2O , 500/125 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

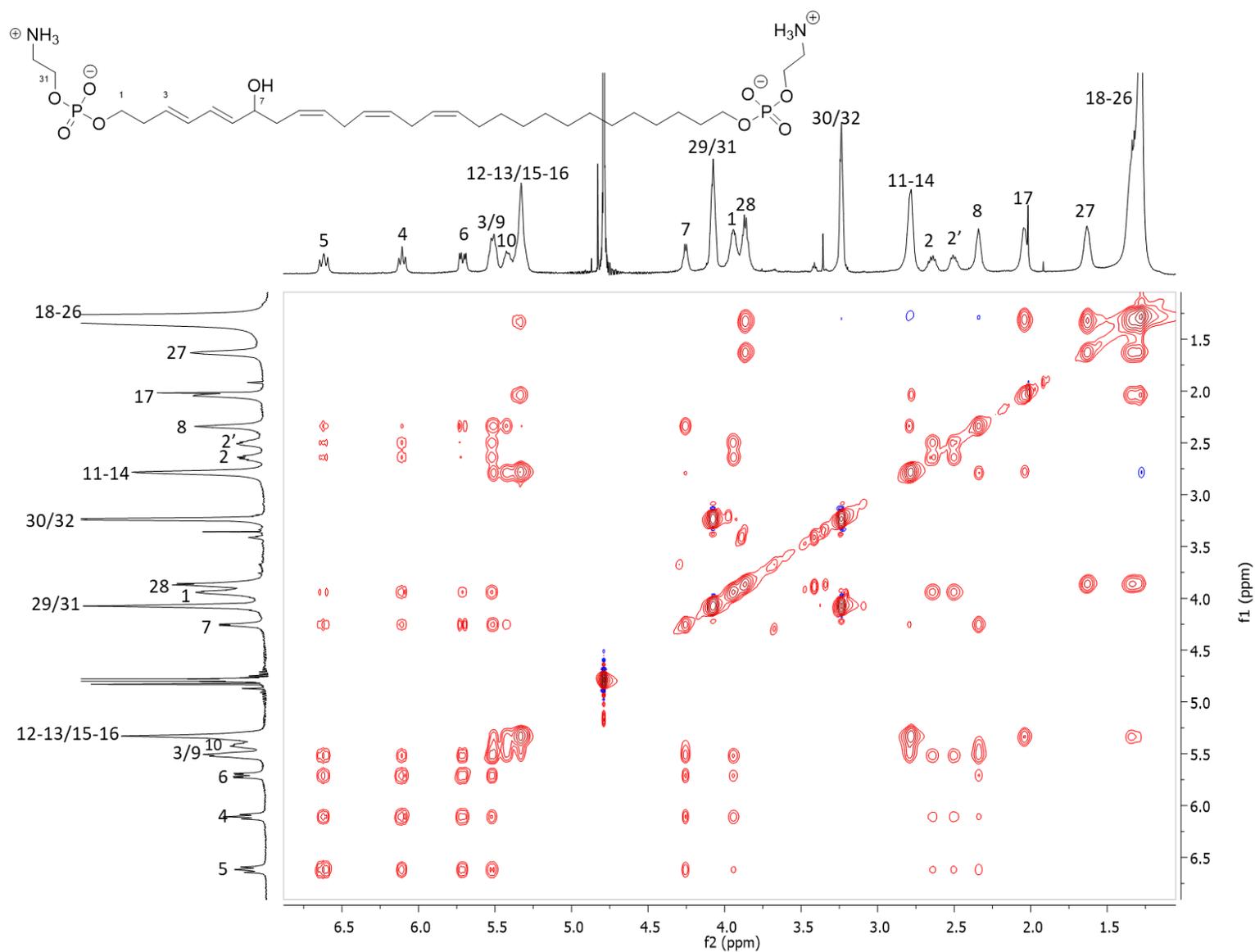


Figure 85. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) de la bolascidine D (Psp4).

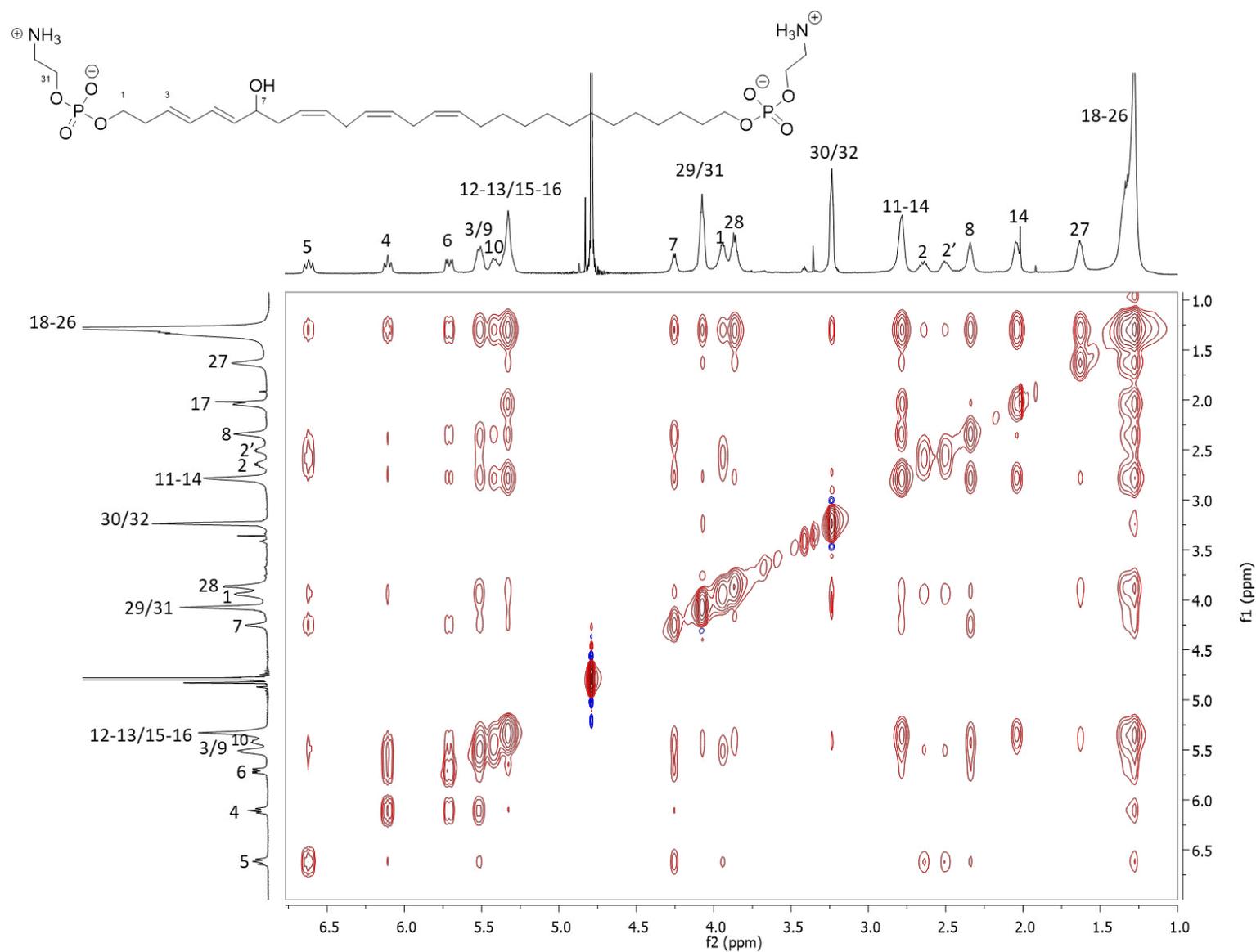


Figure 86. Spectre RMN TOCSY ^1H - ^1H (D_2O , 500/500 MHz) de la bolascidine D (**Psp4**).

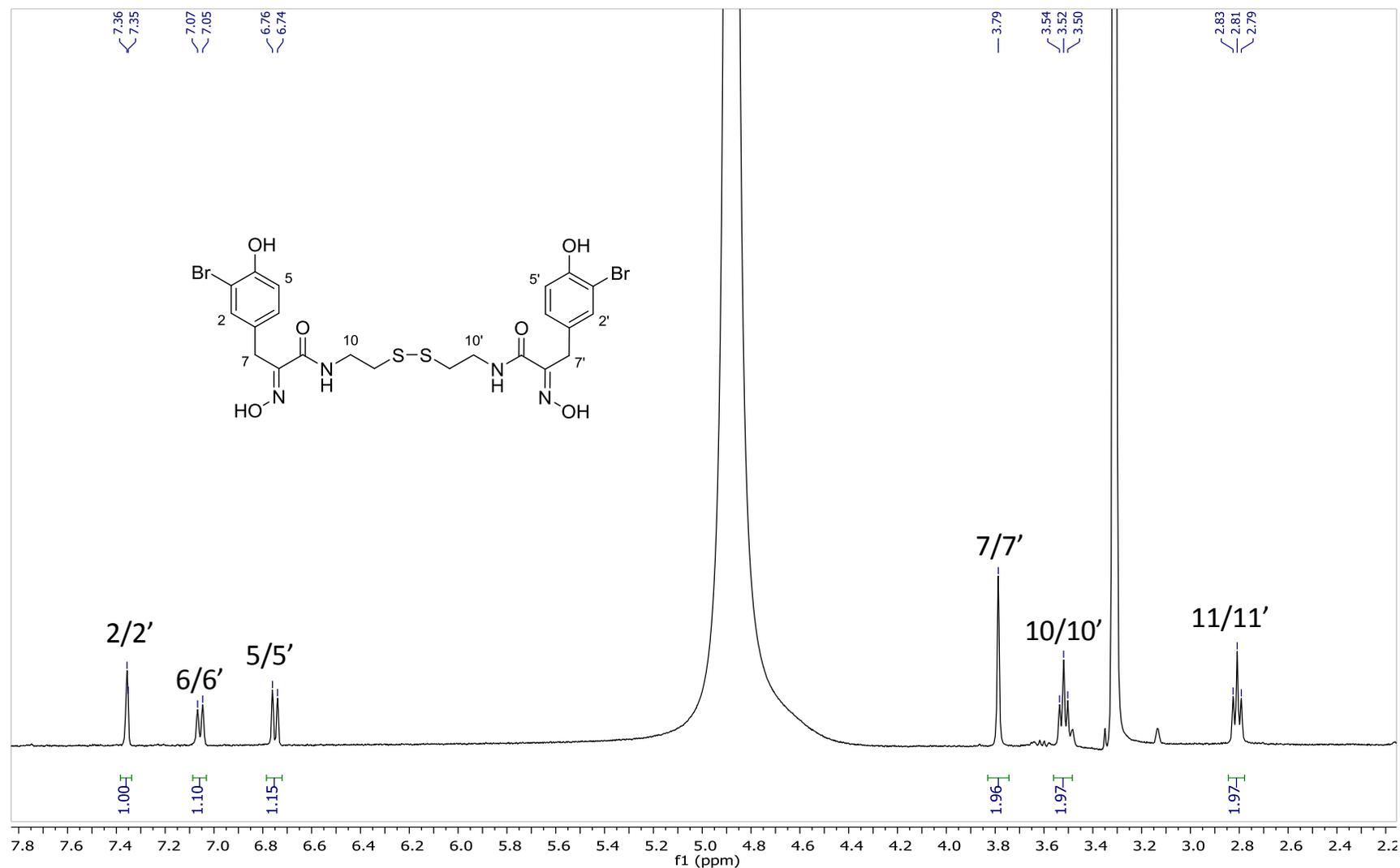


Figure 87. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de la psammapline A (Hr1).

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

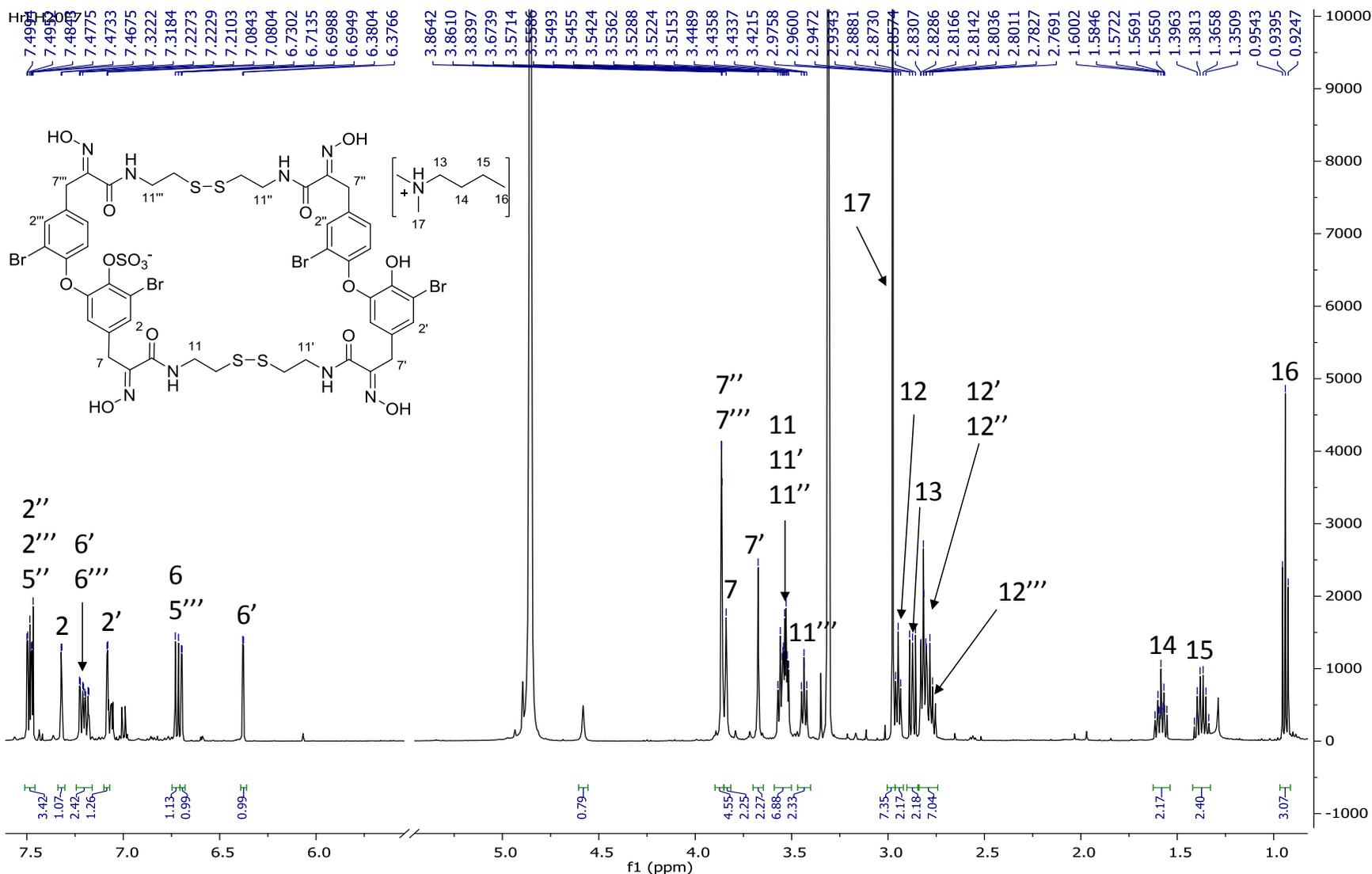


Figure 88. Spectre RMN ¹H (*d*₇-MeOH, 500 MHz) de la 4-O-sulfatocyclobispsammaline A (Hr2).

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

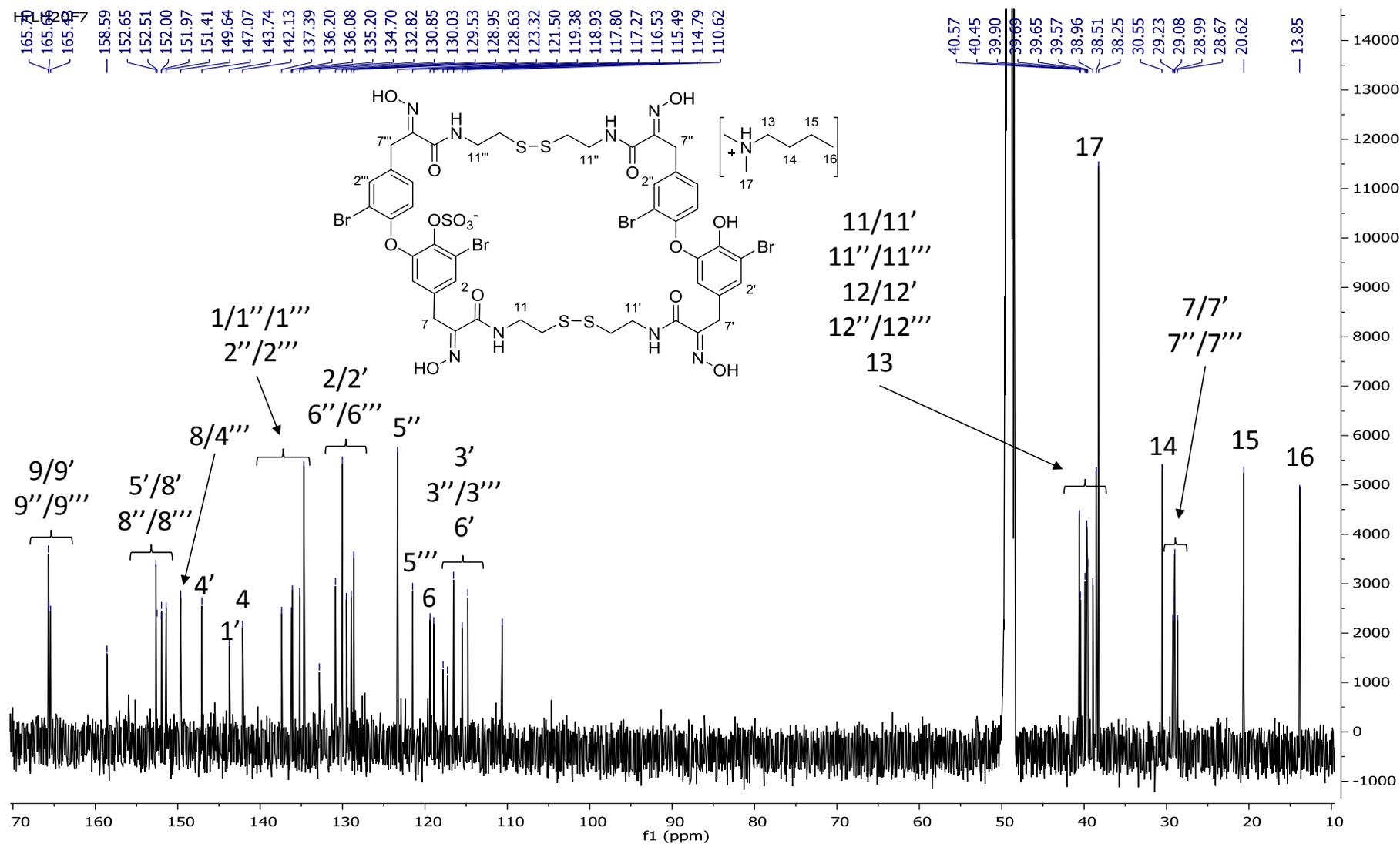


Figure 89. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaline A (Hr2).

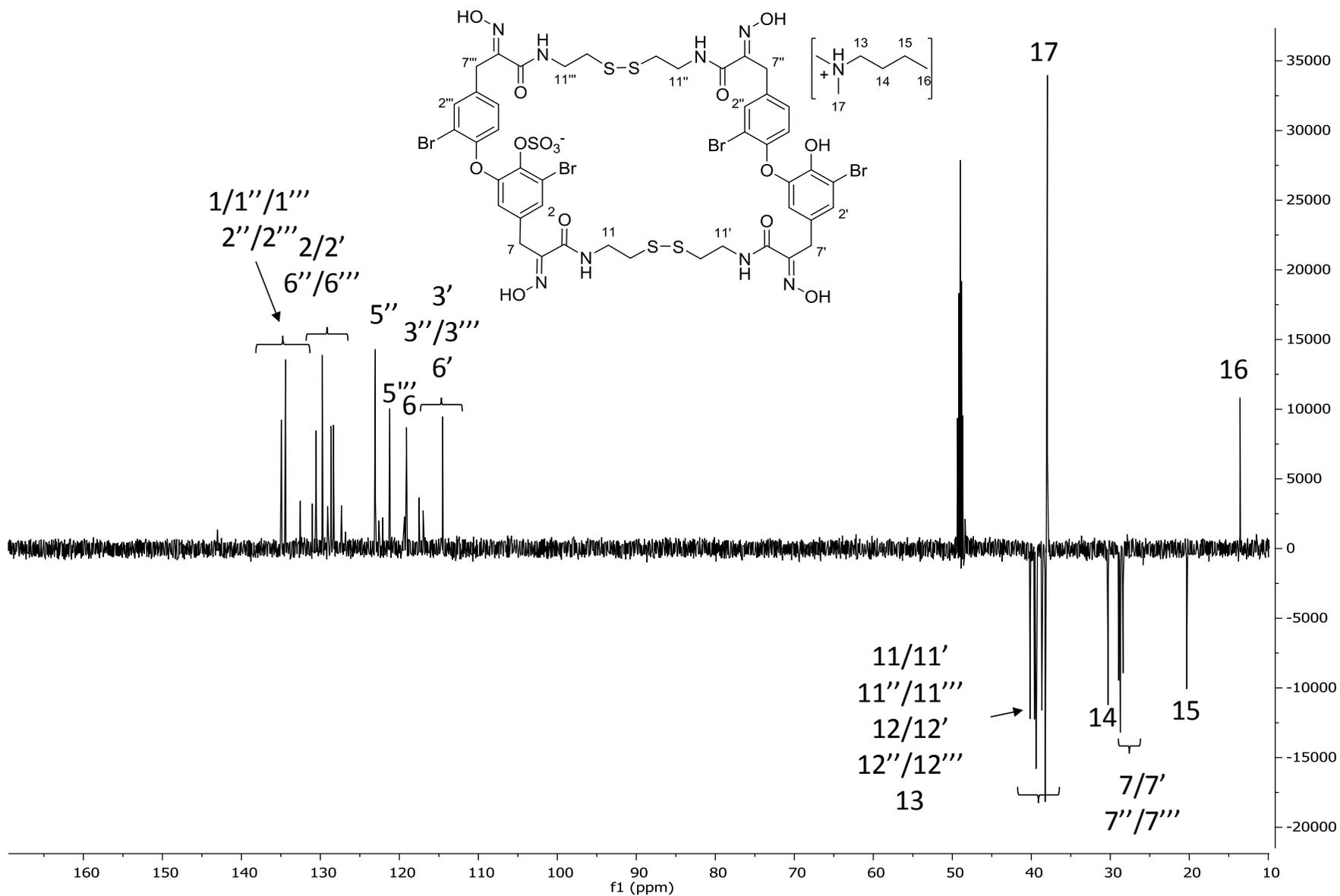


Figure 90. Spectre RMN ^{13}C DEPT135 (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la 4-O-sulfatocyclobispsammaphline A (Hr2).

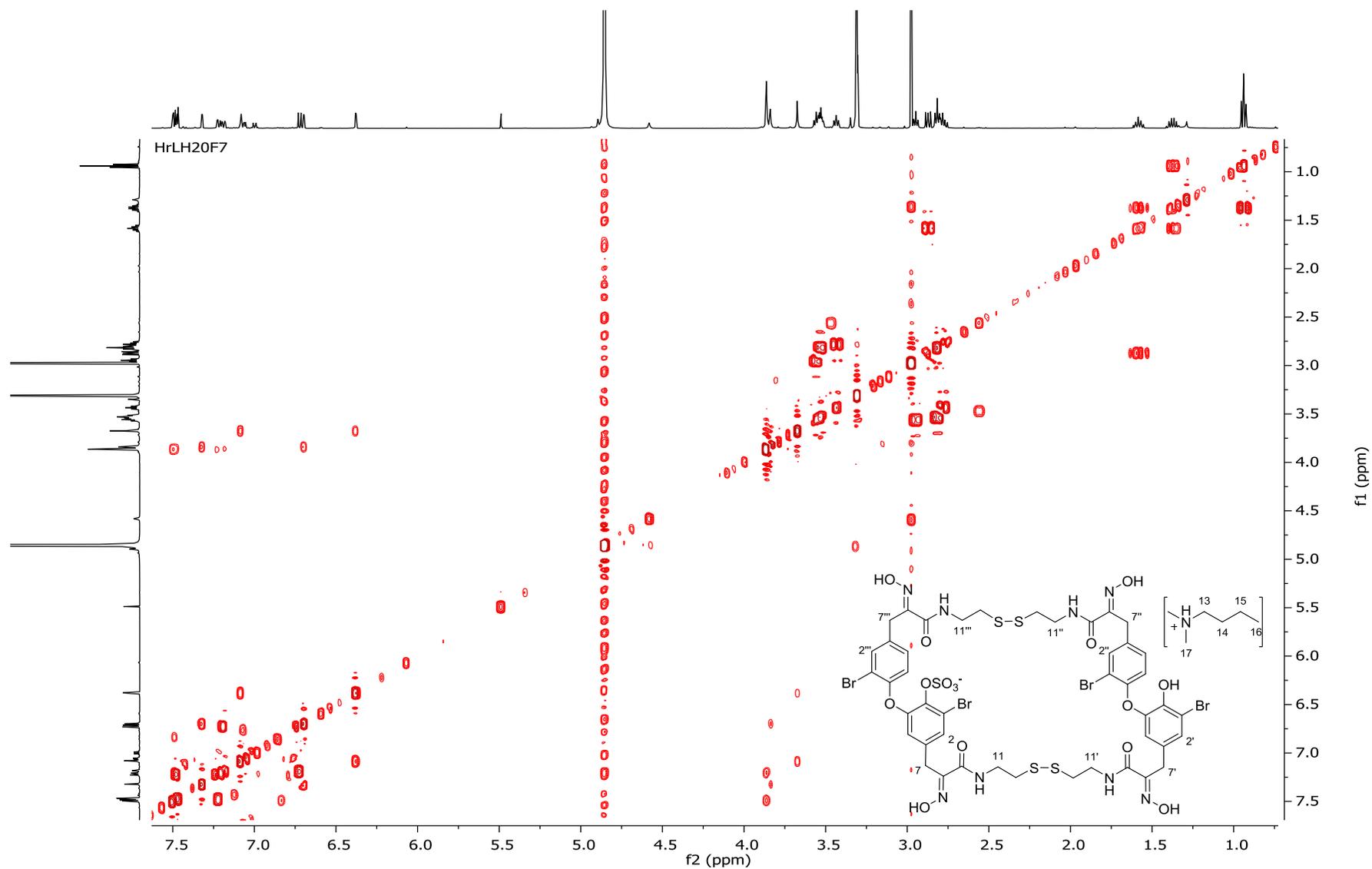


Figure 91. Spectre RMN COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (d_7 -MeOH, 500/500 MHz) de la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaline A (**Hr2**).

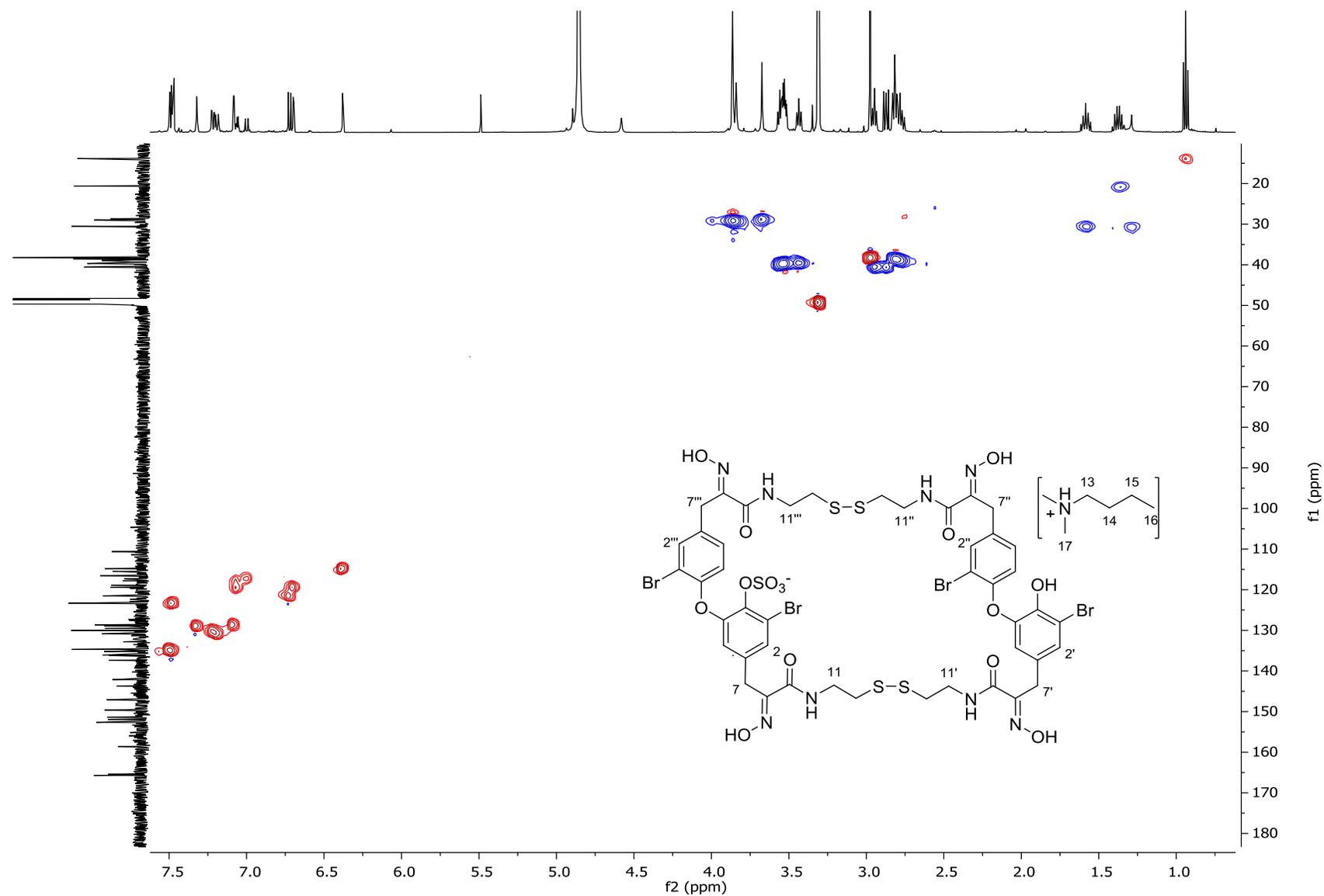


Figure 92. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_7 -MeOH, 500/125 MHz) de la 4-O-sulfatocyclobispsammapline A (Hr2).

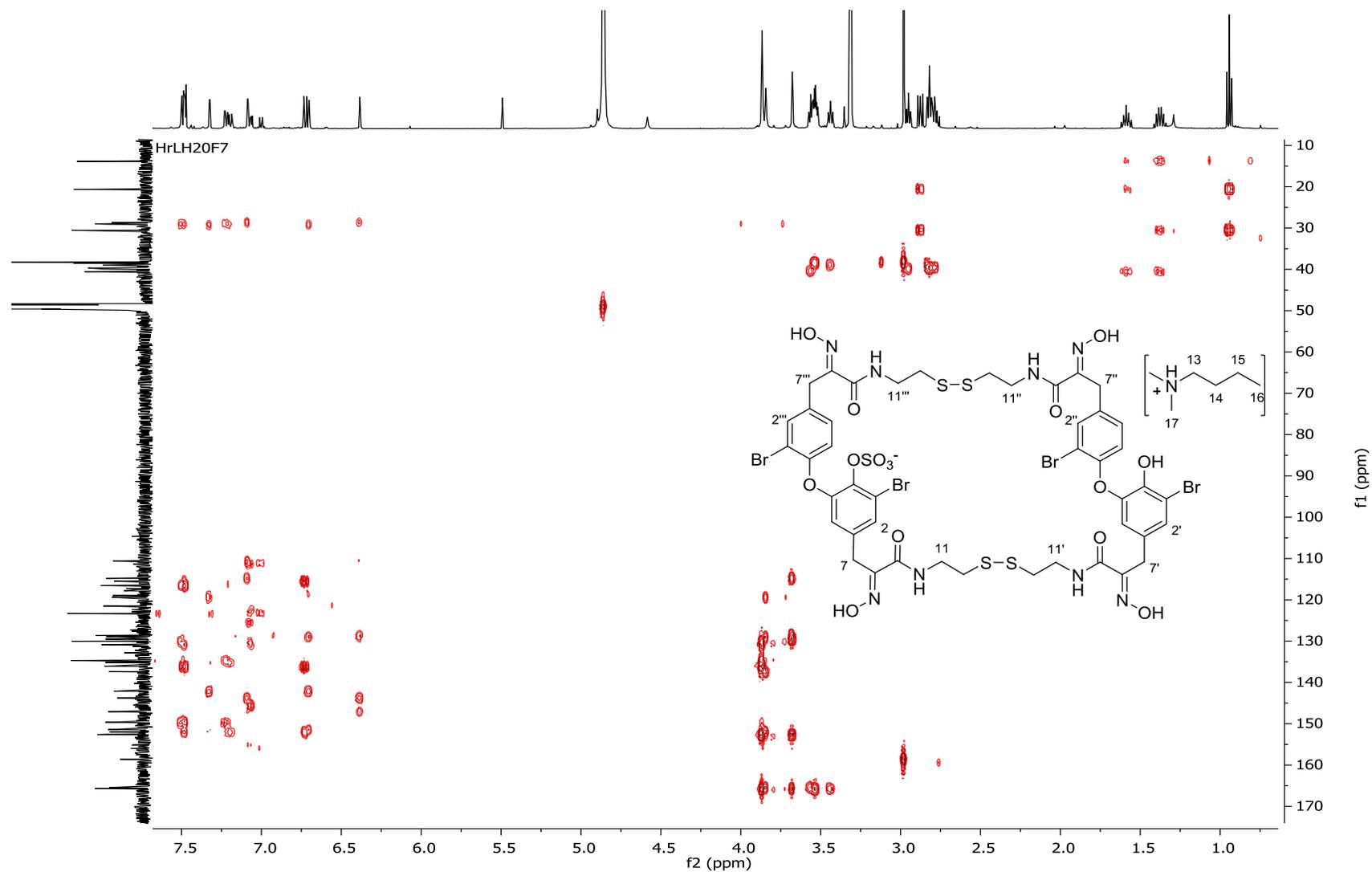


Figure 93. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_7 -MeOH, 500/125 MHz) de la 4-*O*-sulfatocyclobispsammapline A (**Hr2**).

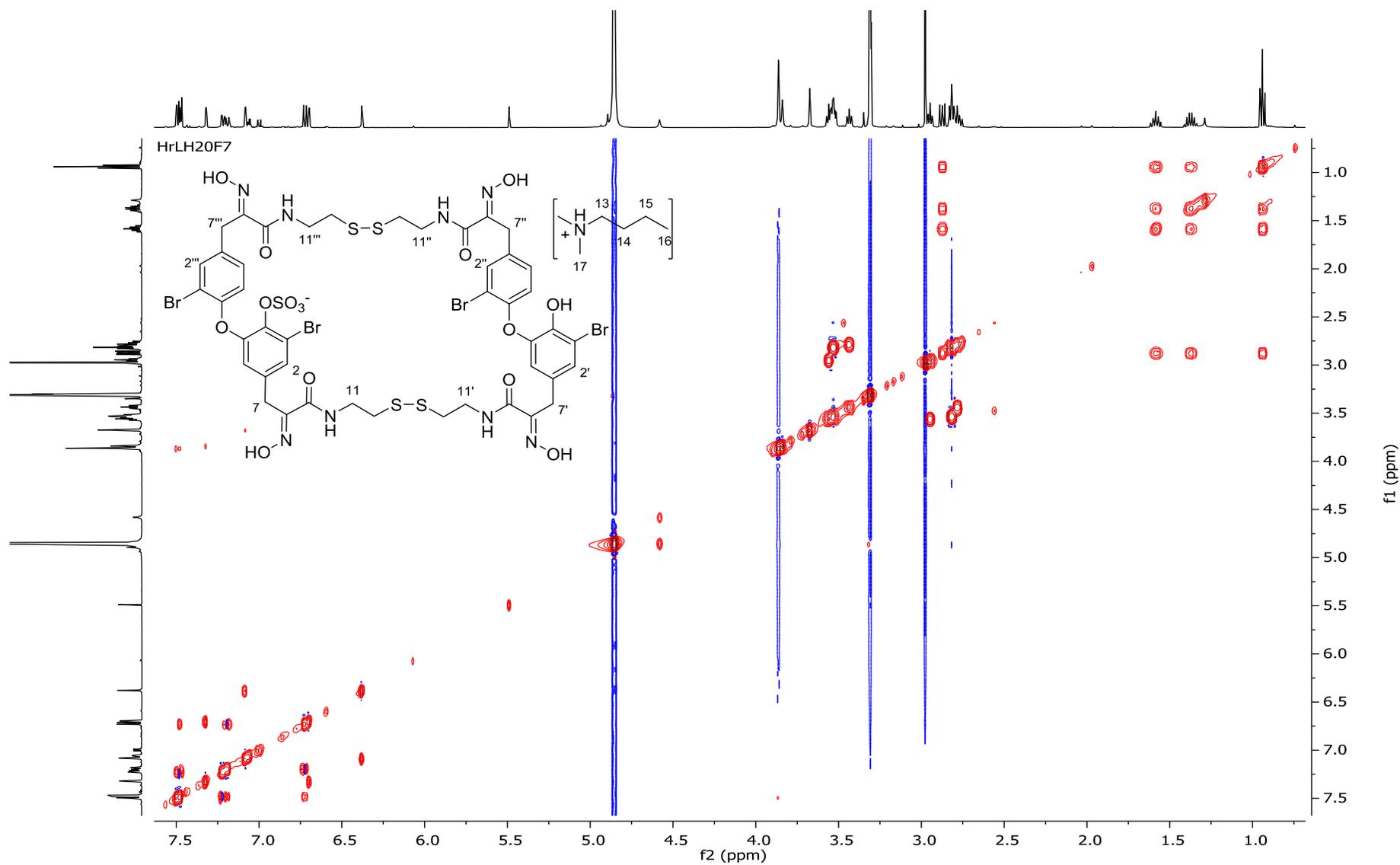


Figure 94. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la 4-*O*-sulfatocyclobispsammaline A (**Hr2**).

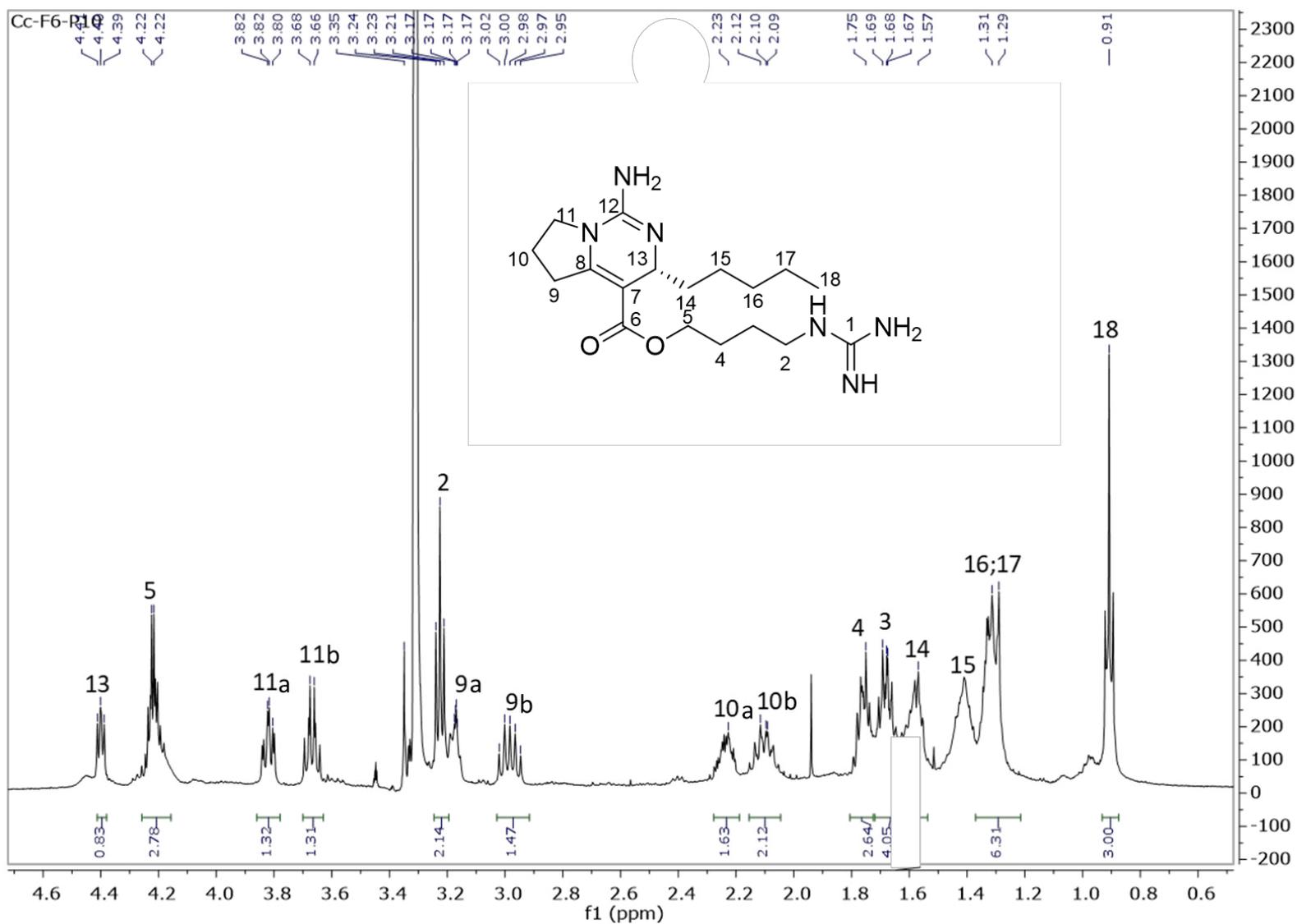


Figure 95. Spectre RMN ¹H (*d*₇-MeOH, 500 MHz) de la crambescine A2 364 (Cc1).

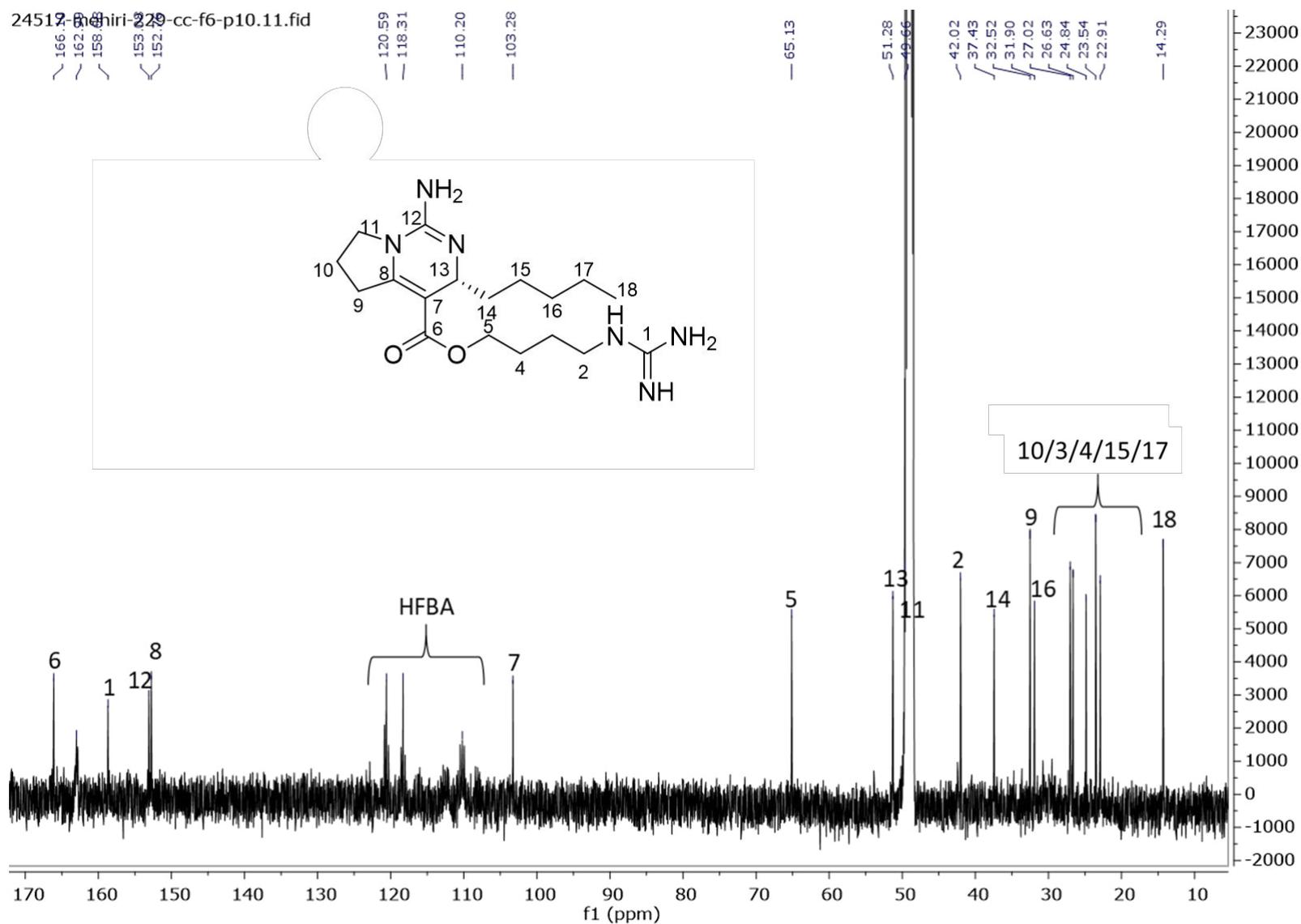


Figure 96. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la crambescine A2 364 (Cc1).

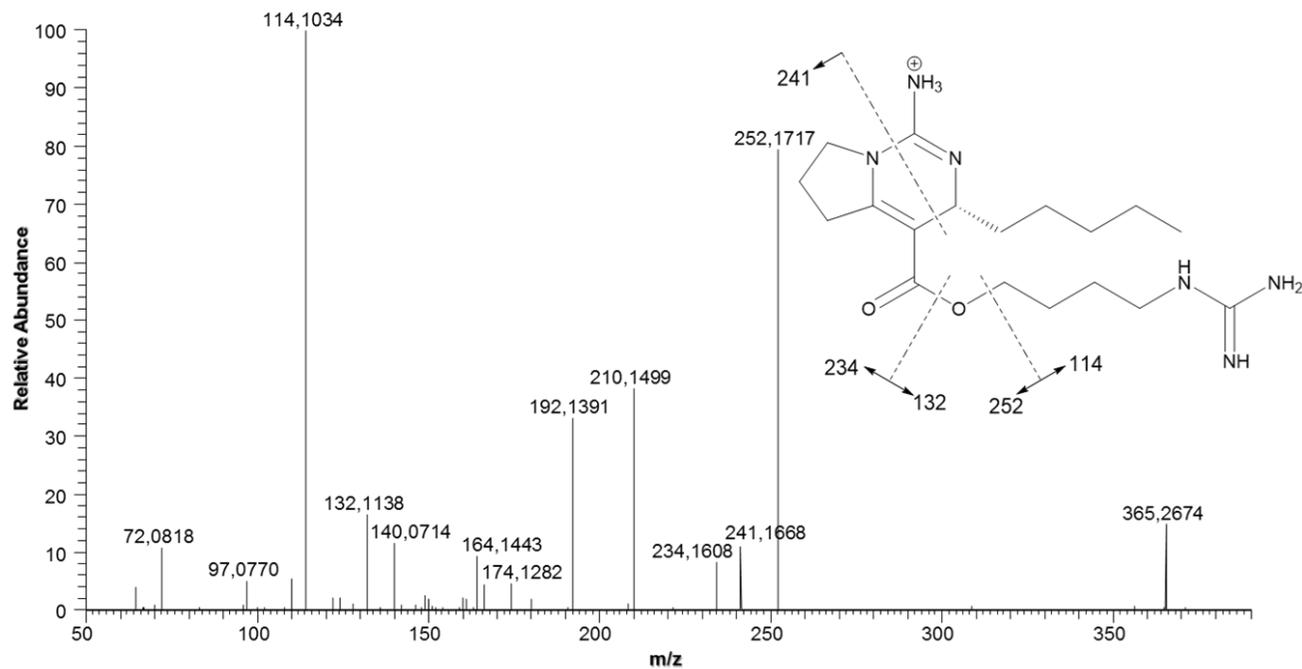


Figure 97. Spectre HR-ESI-MS/MS (+) de la crambescine A2 364 (Cc1) dans le MeOH.

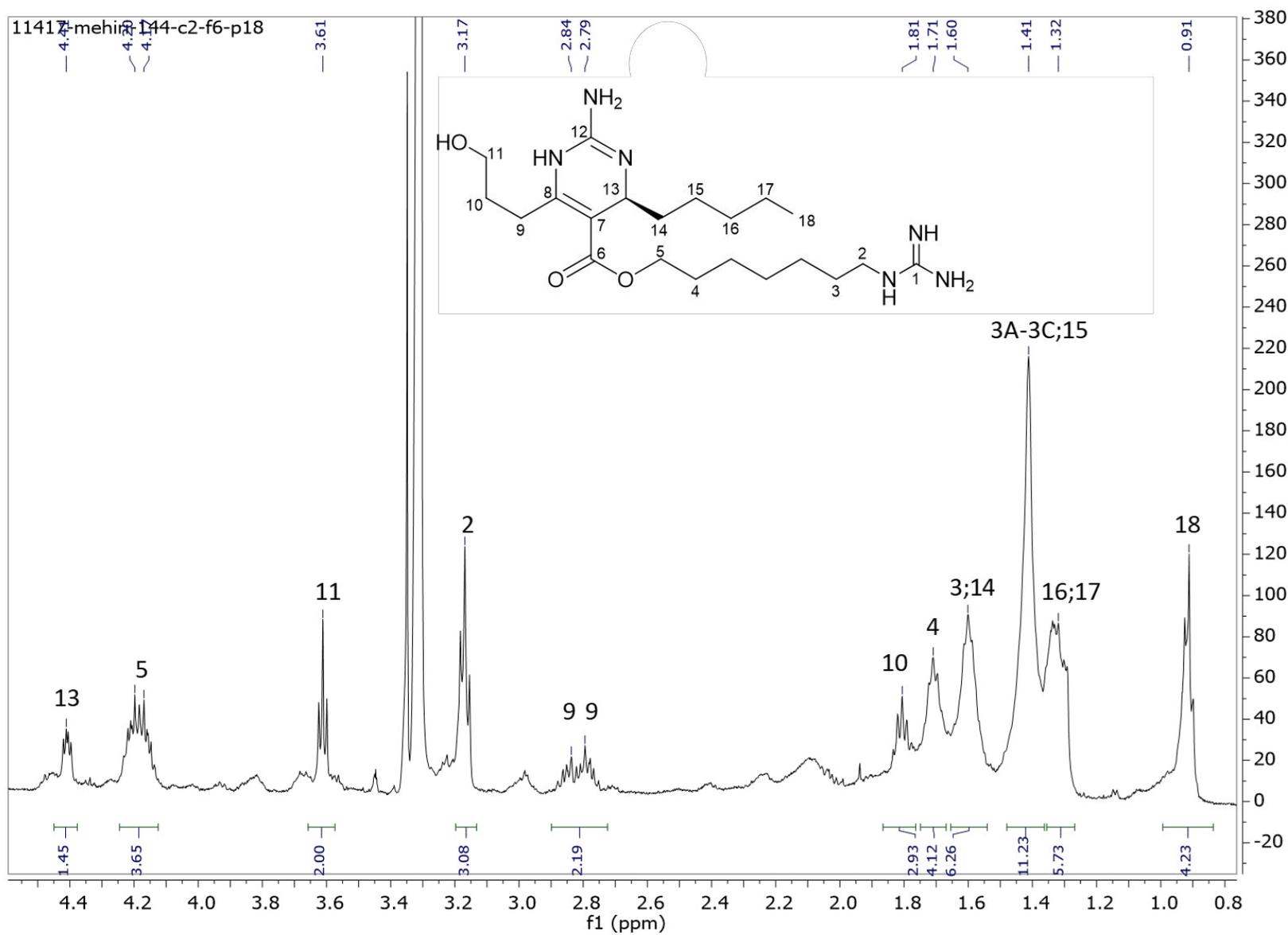


Figure 98. Spectre RMN ^1H (d_4 -MeOH, 500 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

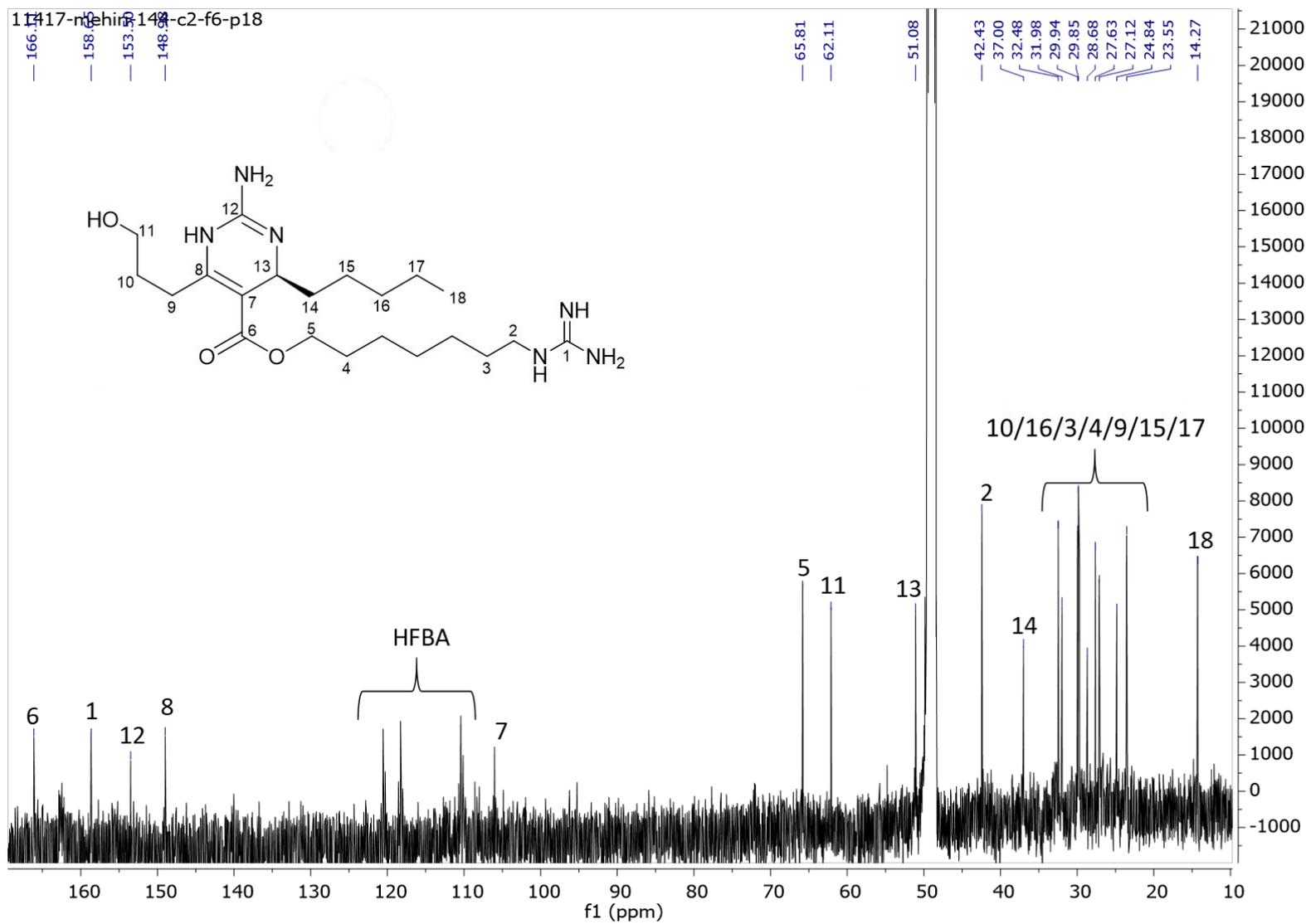


Figure 99. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

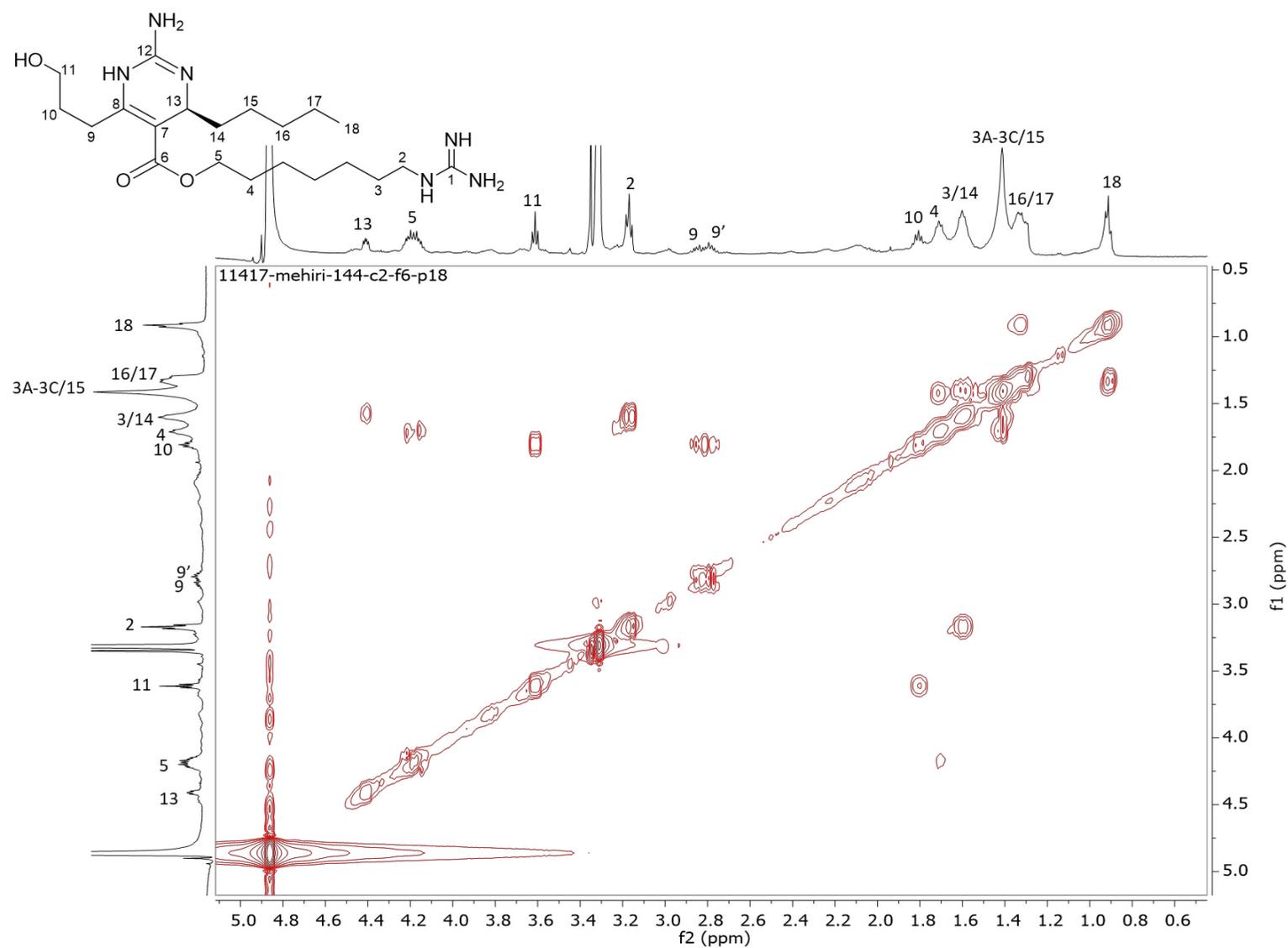


Figure 100. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

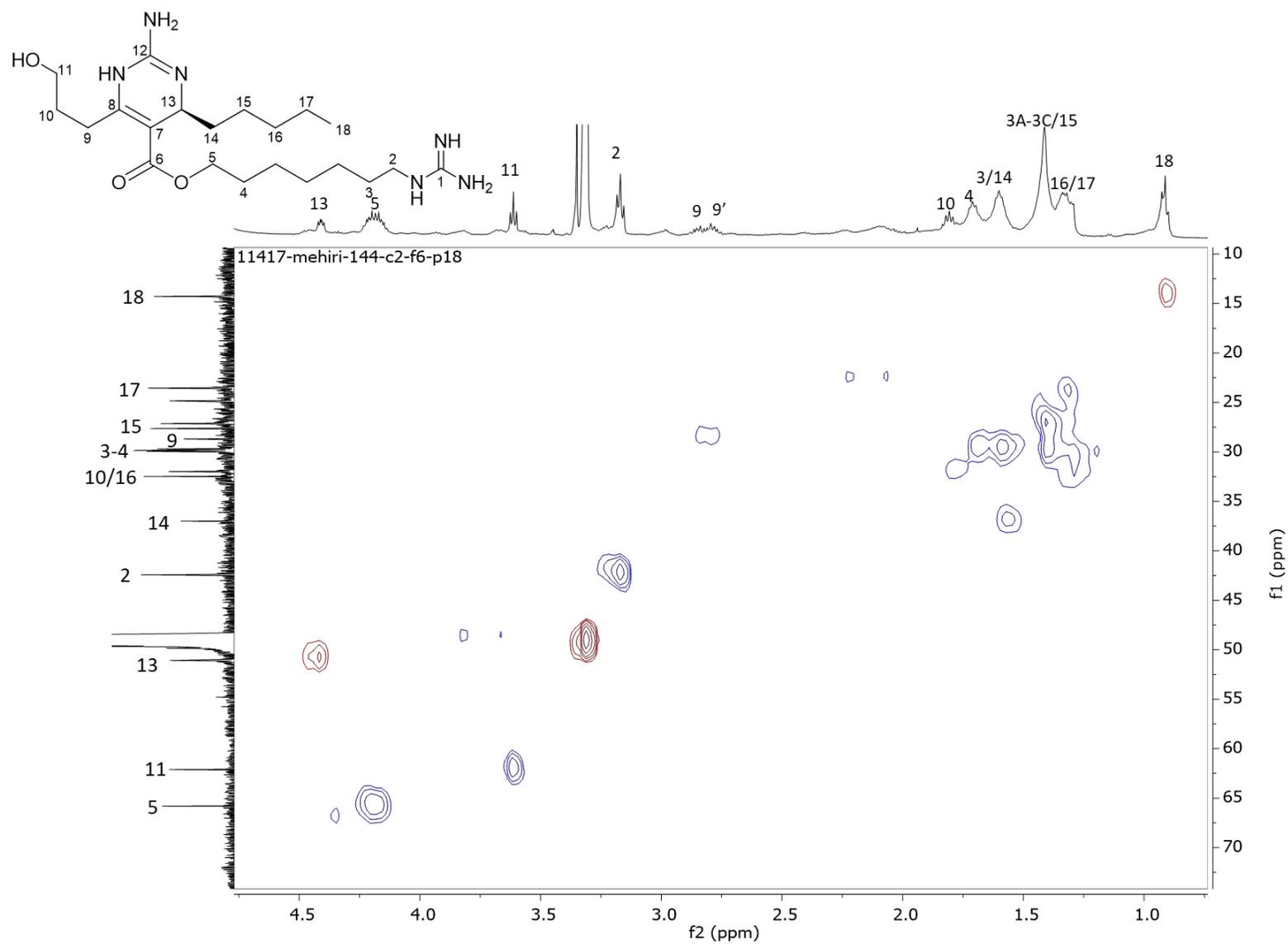


Figure 101. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_r -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

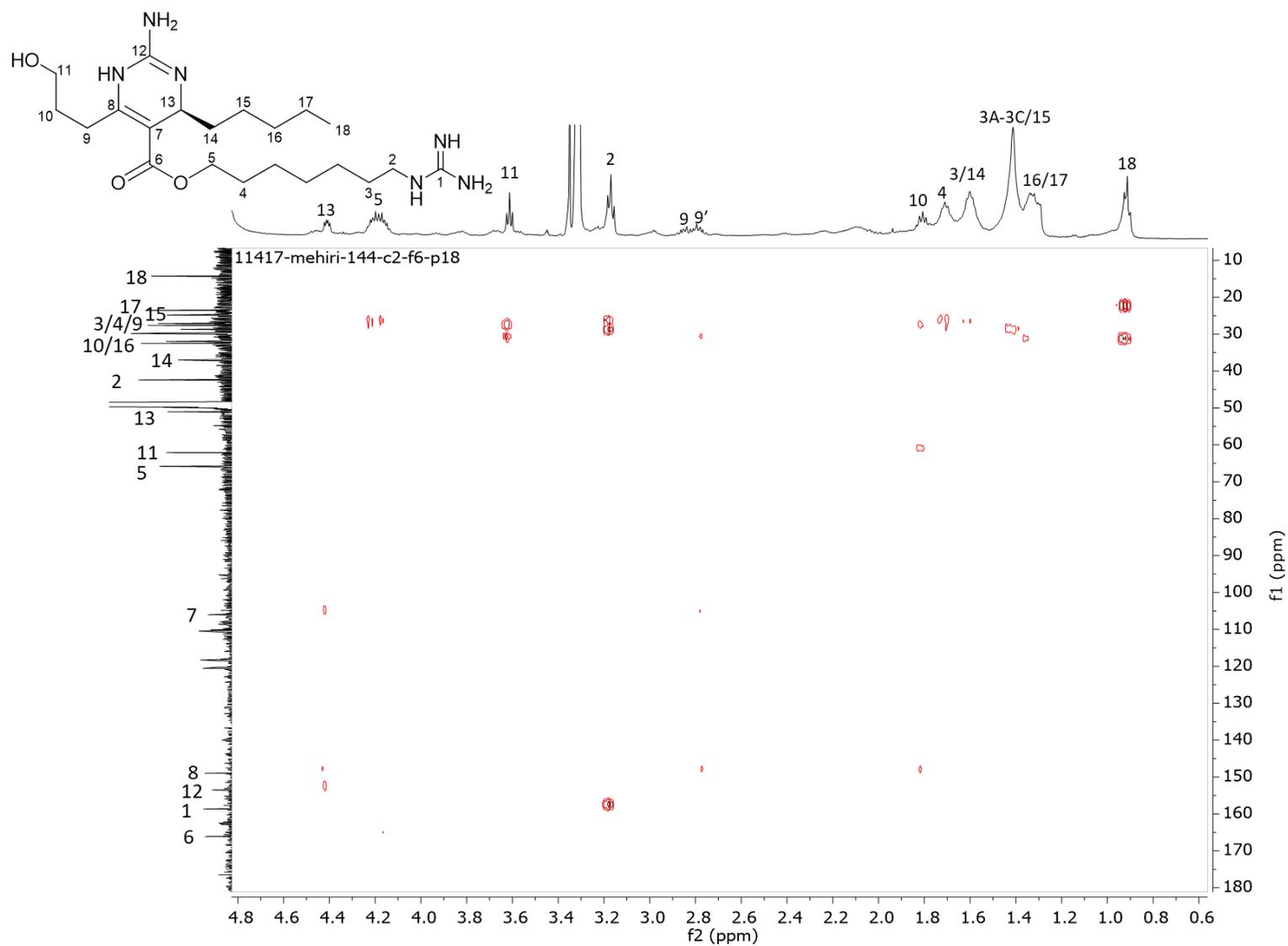


Figure 102. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

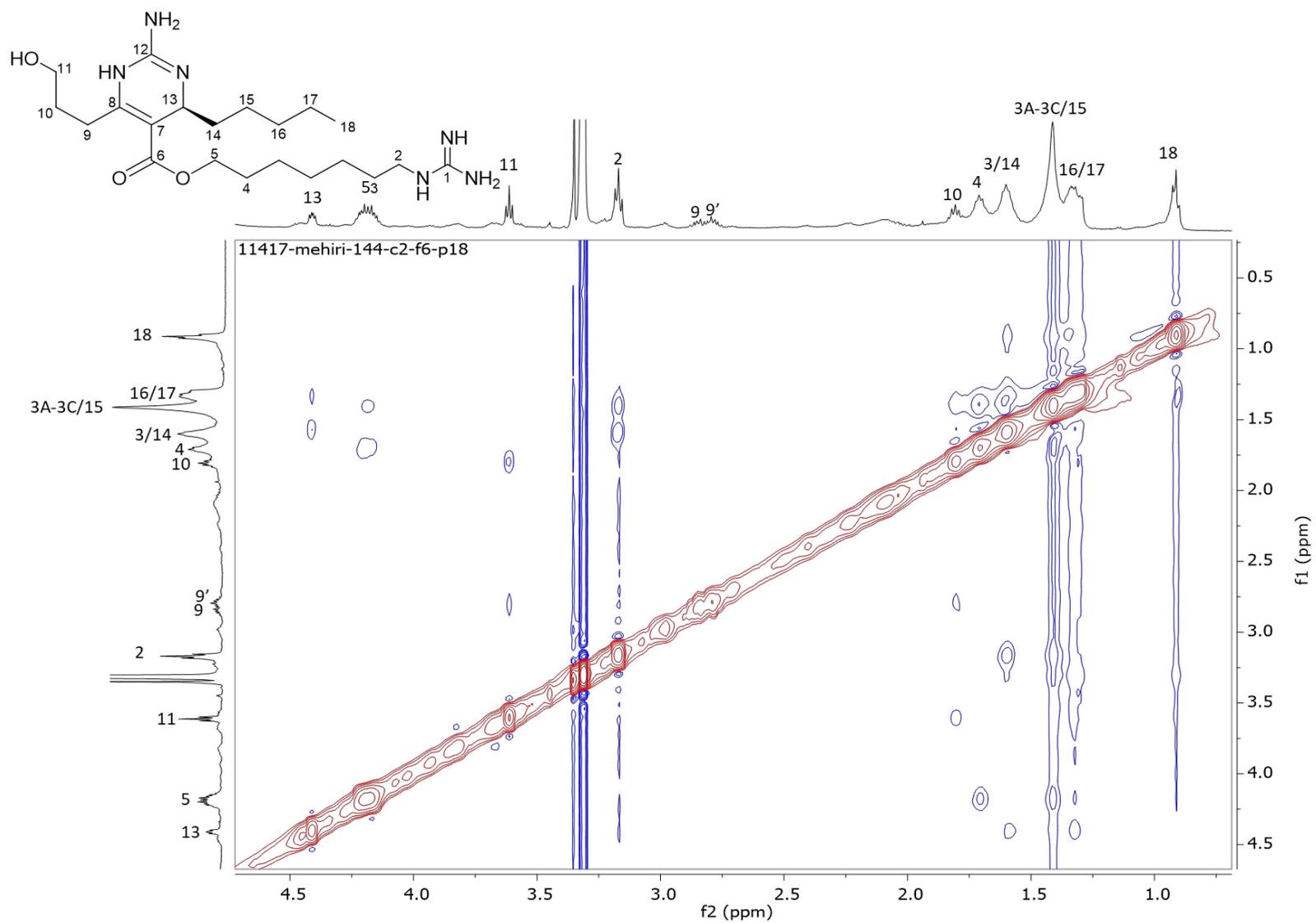


Figure 103. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_7 -MeOH, 500/500 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

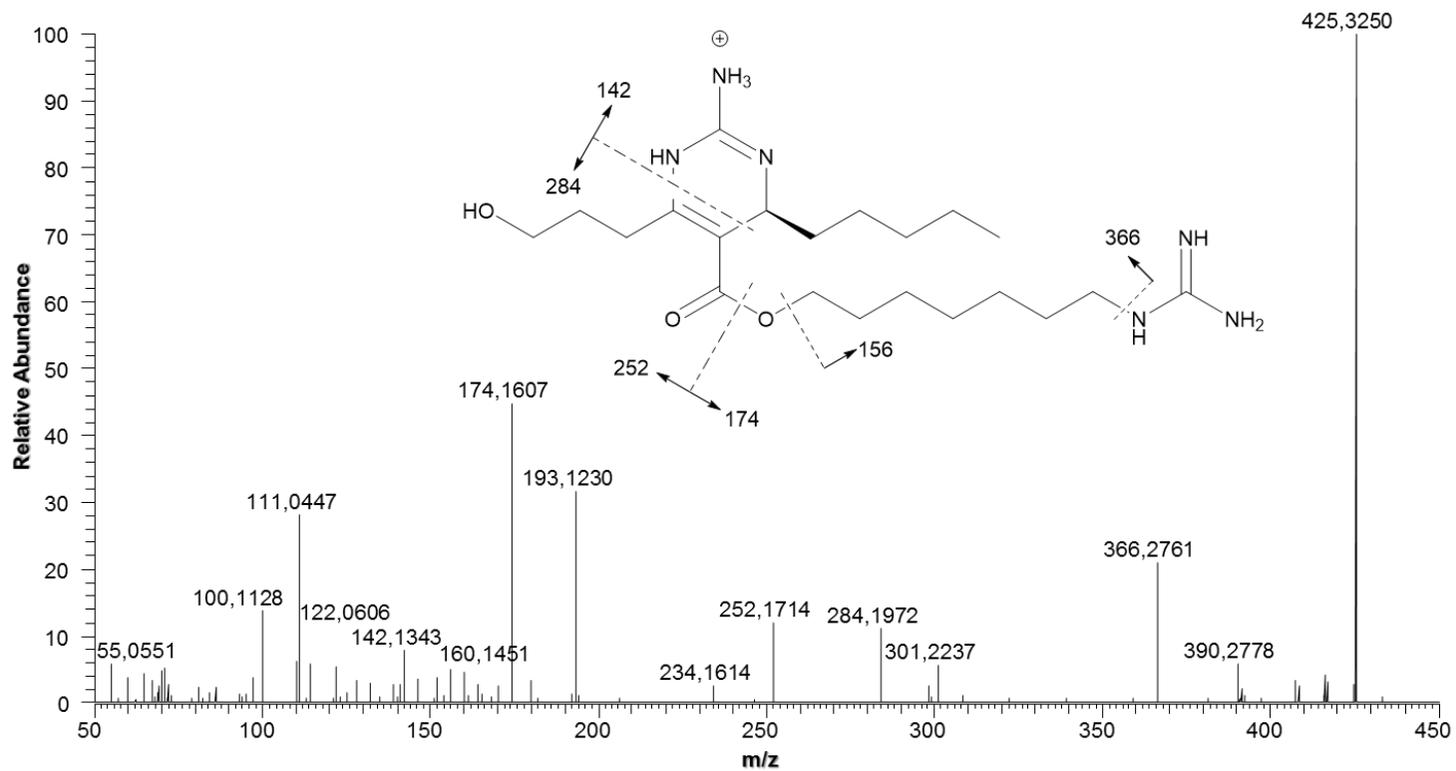


Figure 104. Spectre HR-ESI-MS/MS (+) de la crambescine C1 424 (Cc2) dans le MeOH.

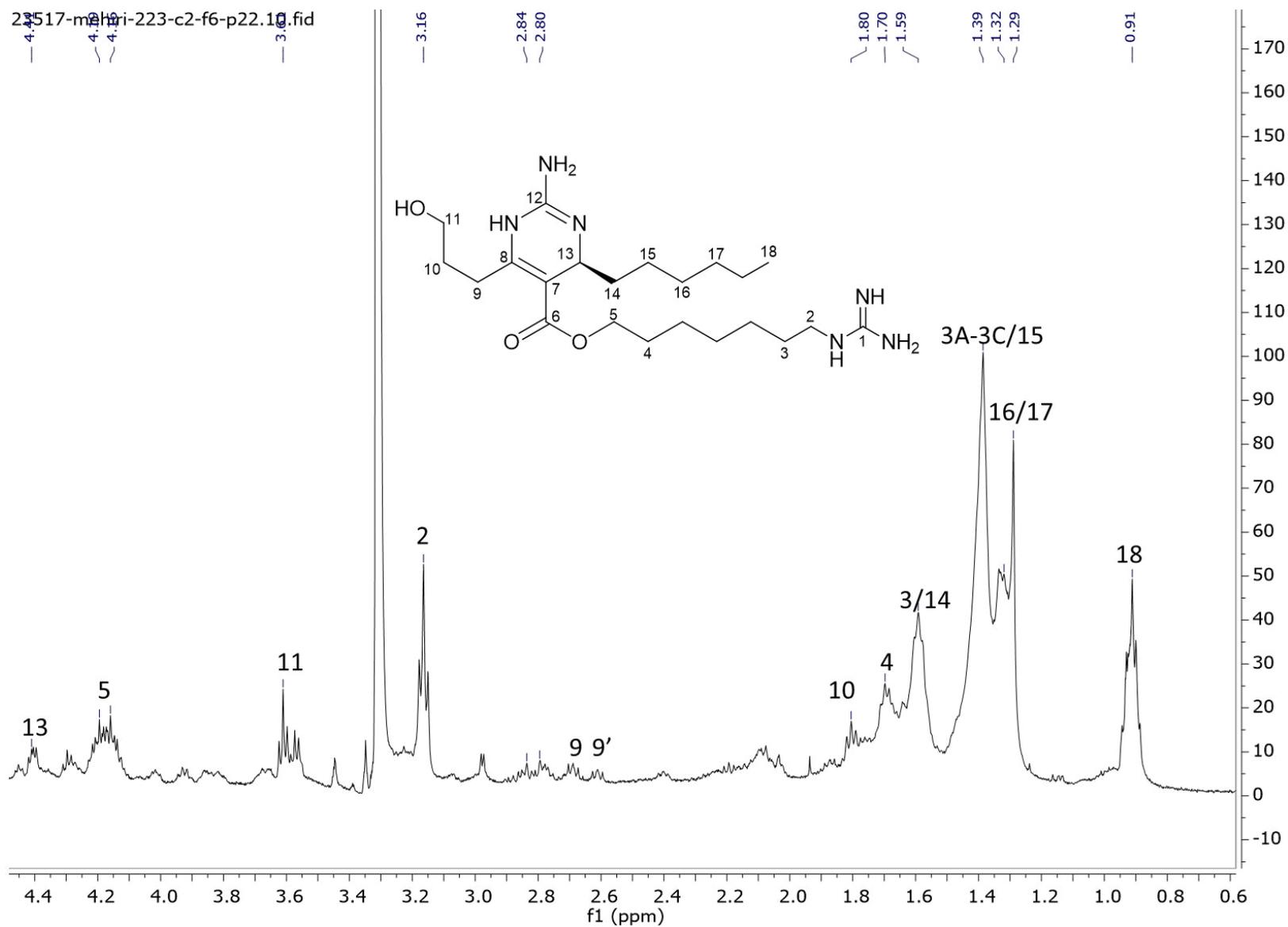


Figure 105. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de la crambescine C1 438 (Cc3).

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

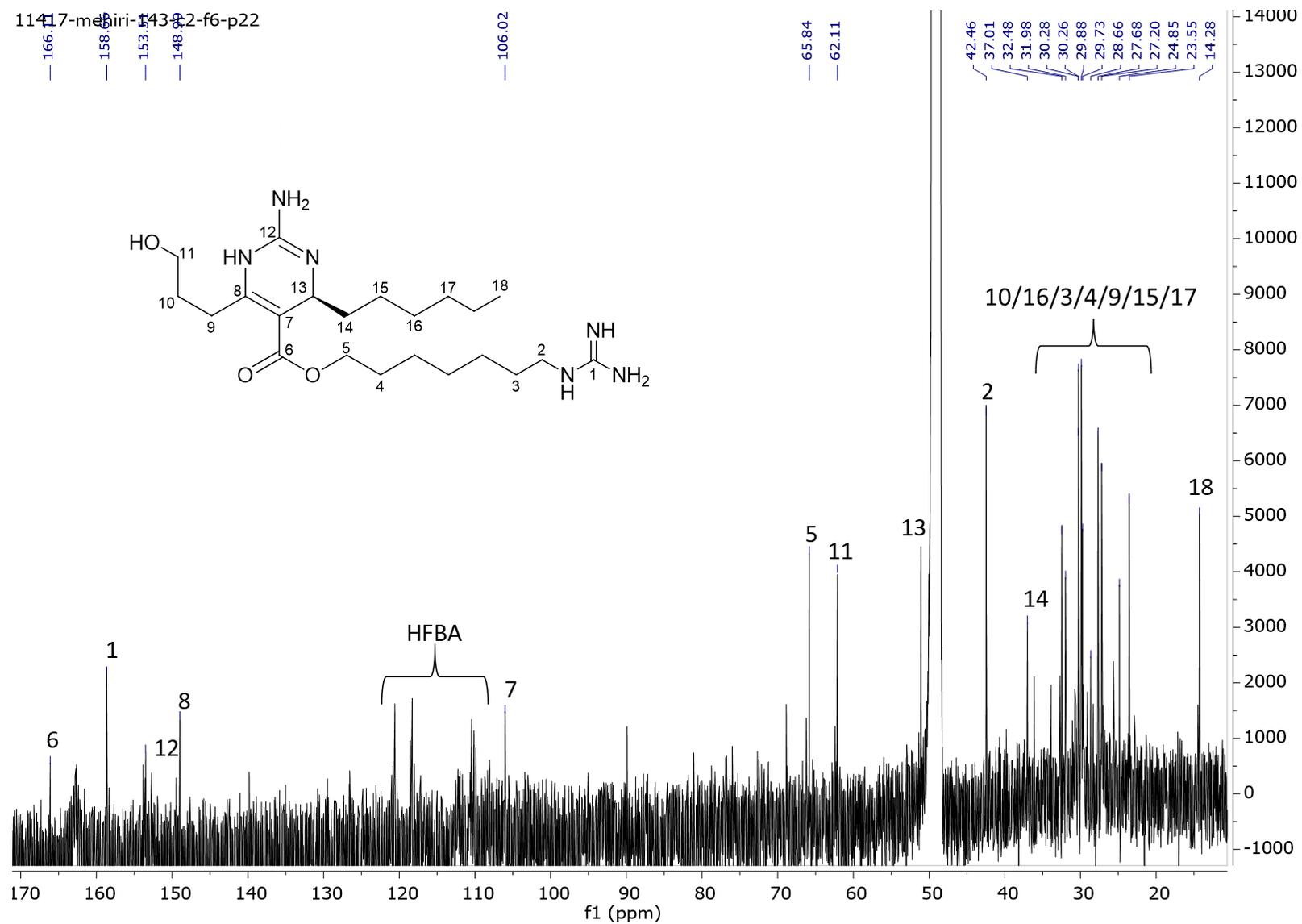


Figure 106. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la crambescine C1 438 (Cc3).

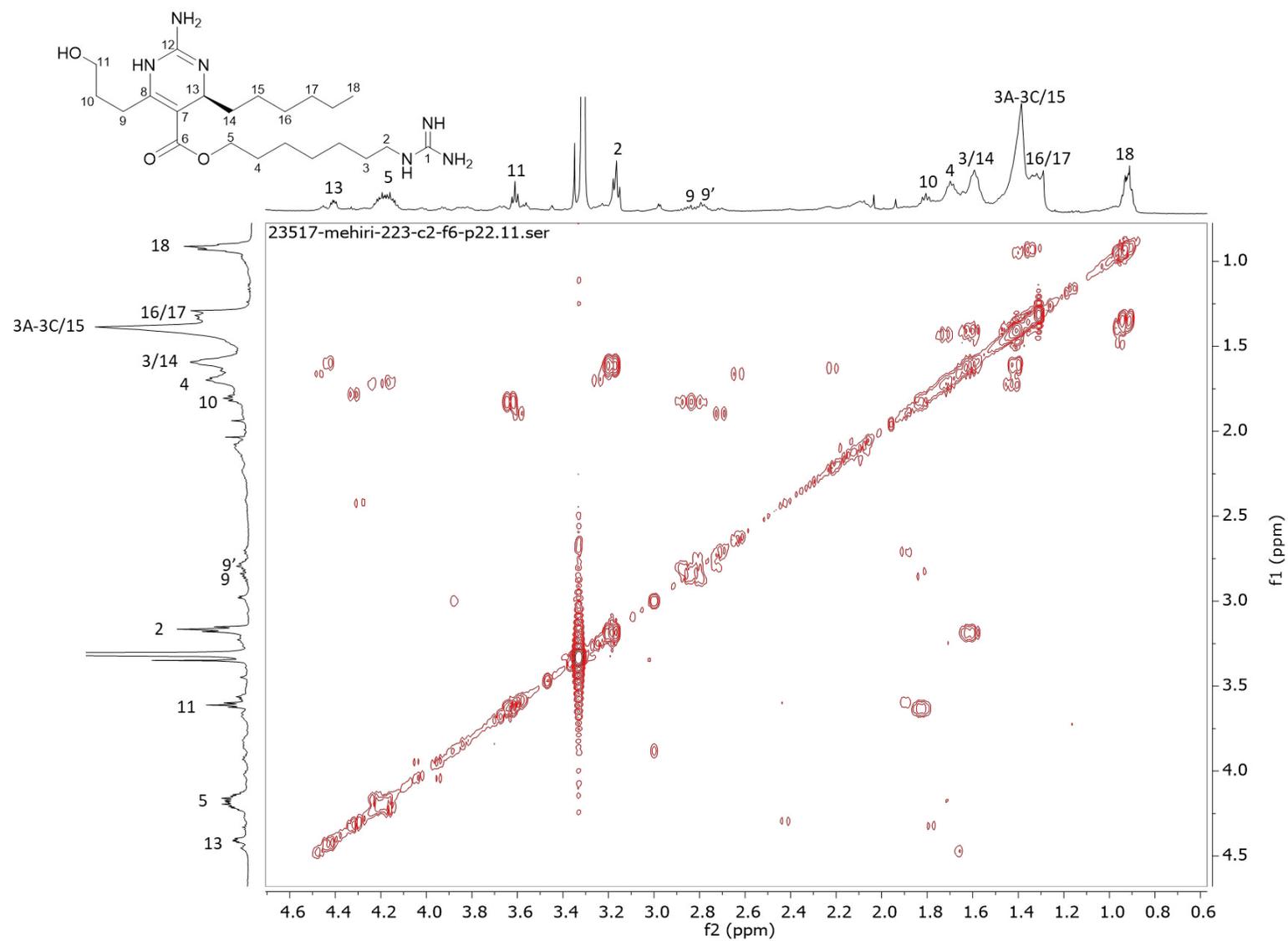


Figure 107. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la crambescine C1 438 (Cc3).

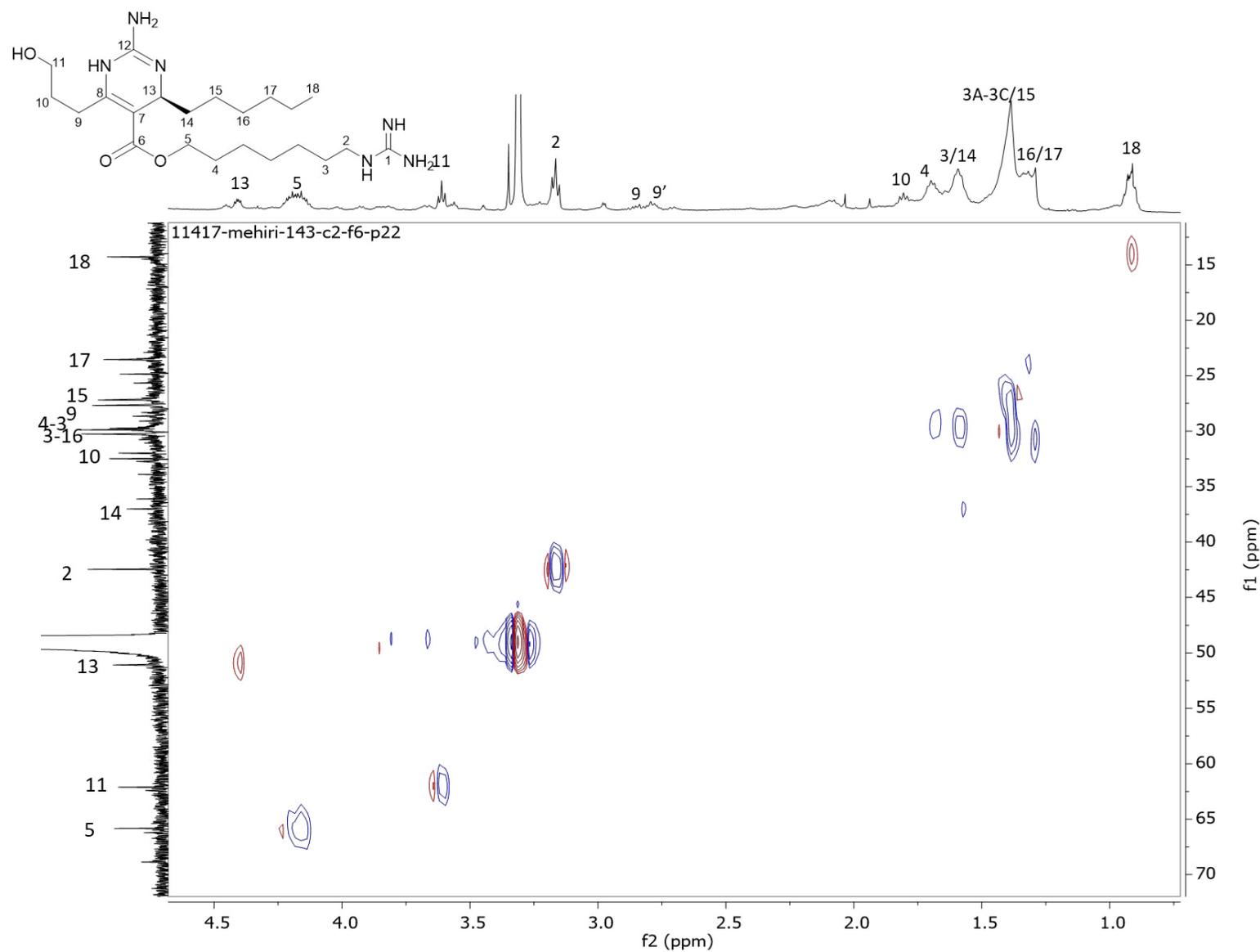


Figure 108. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 438 (Cc3).

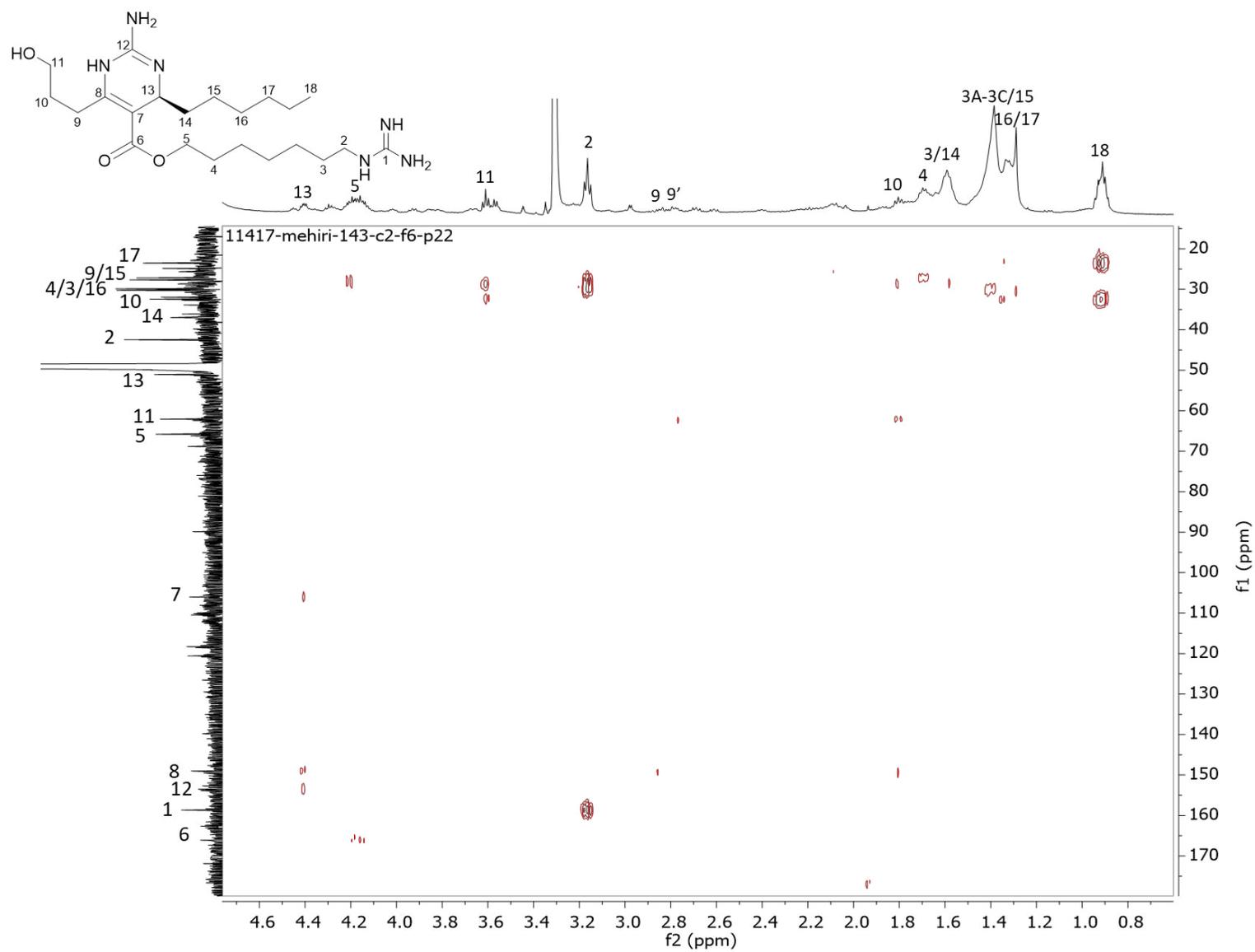


Figure 109. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 438 (Cc3).

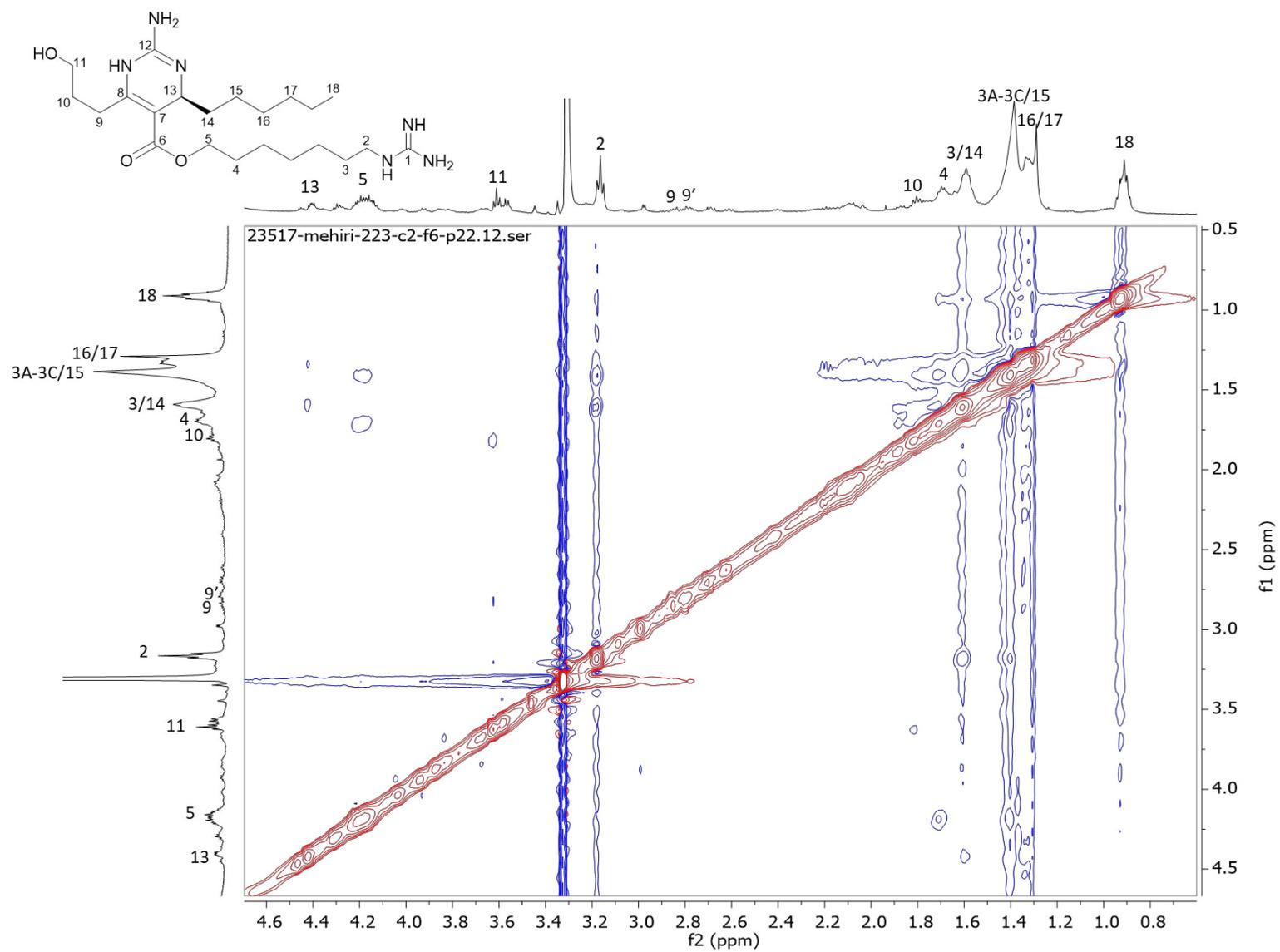


Figure 110. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la crambescine C1 424 (Cc2).

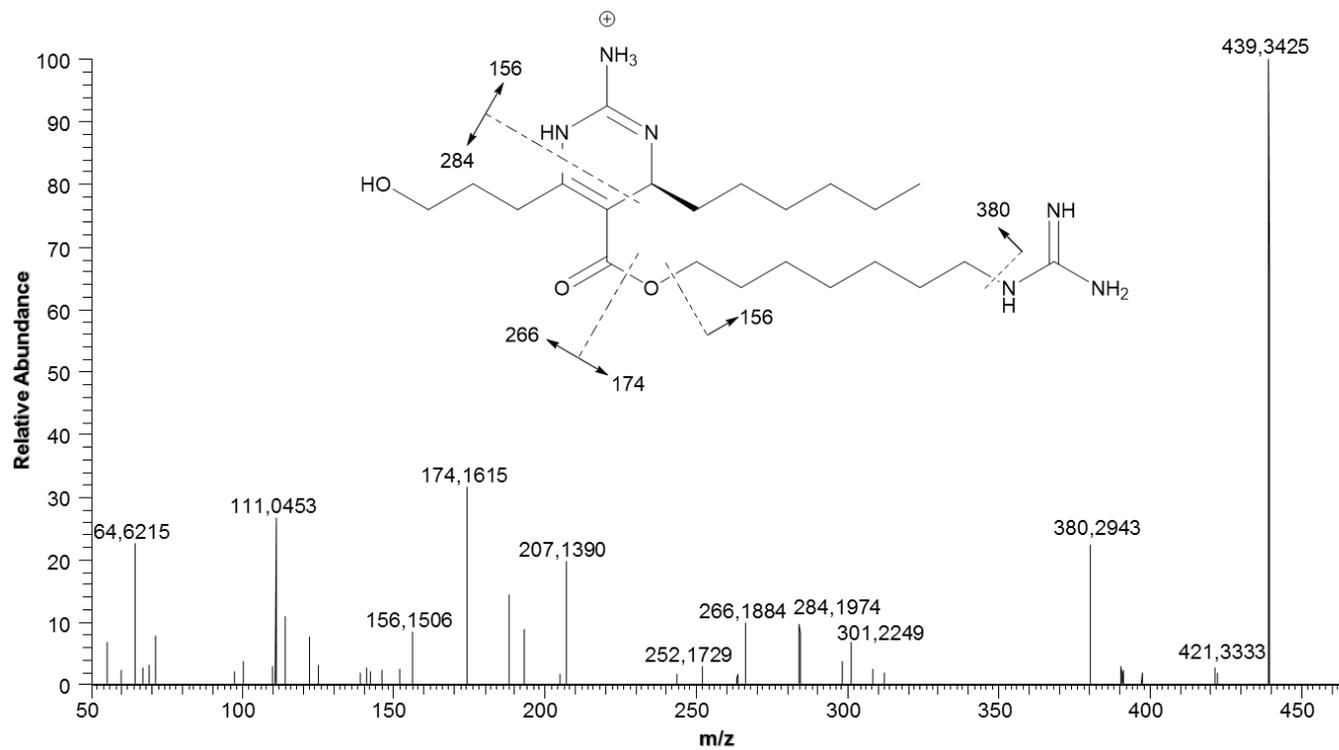


Figure 111. Spectre HR-ESI-MS/MS (+) de la crambescine C1 438 (Cc3) dans le MeOH.

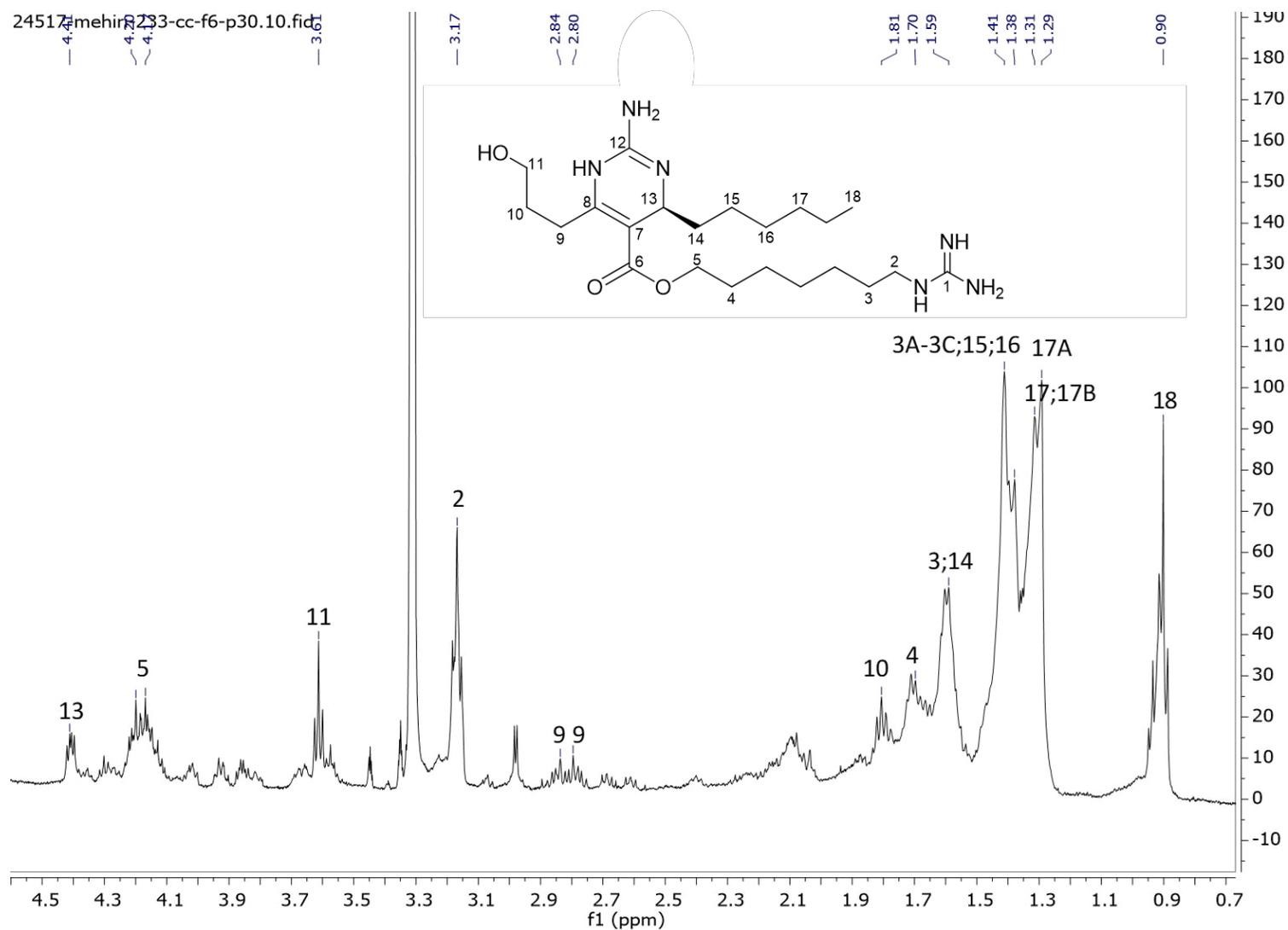


Figure 112. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

Annexe 3 : Données spectrales de l'ensemble des métabolites isolés

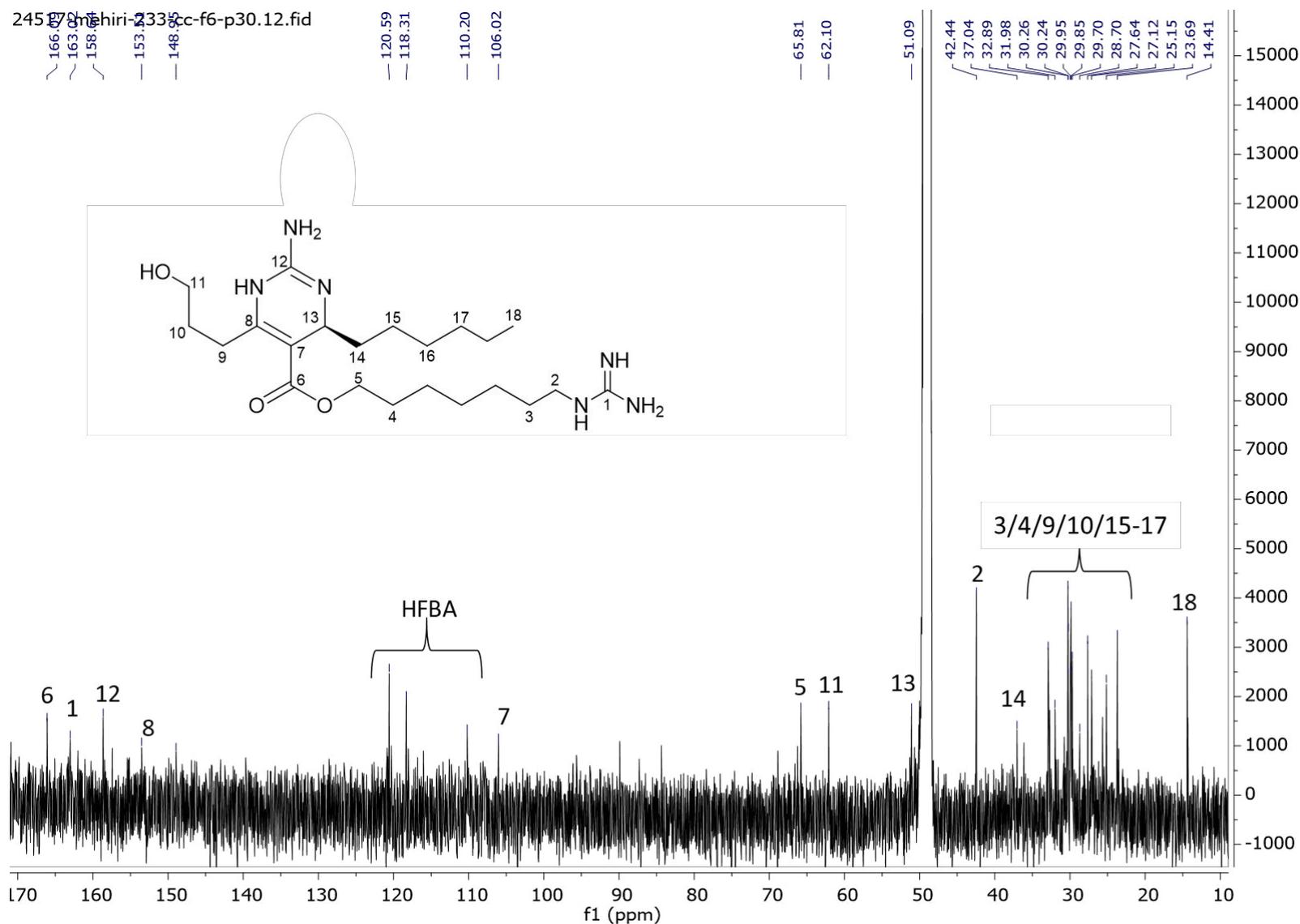


Figure 113. Spectre RMN ¹³C (*d*₇-MeOH, 125 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

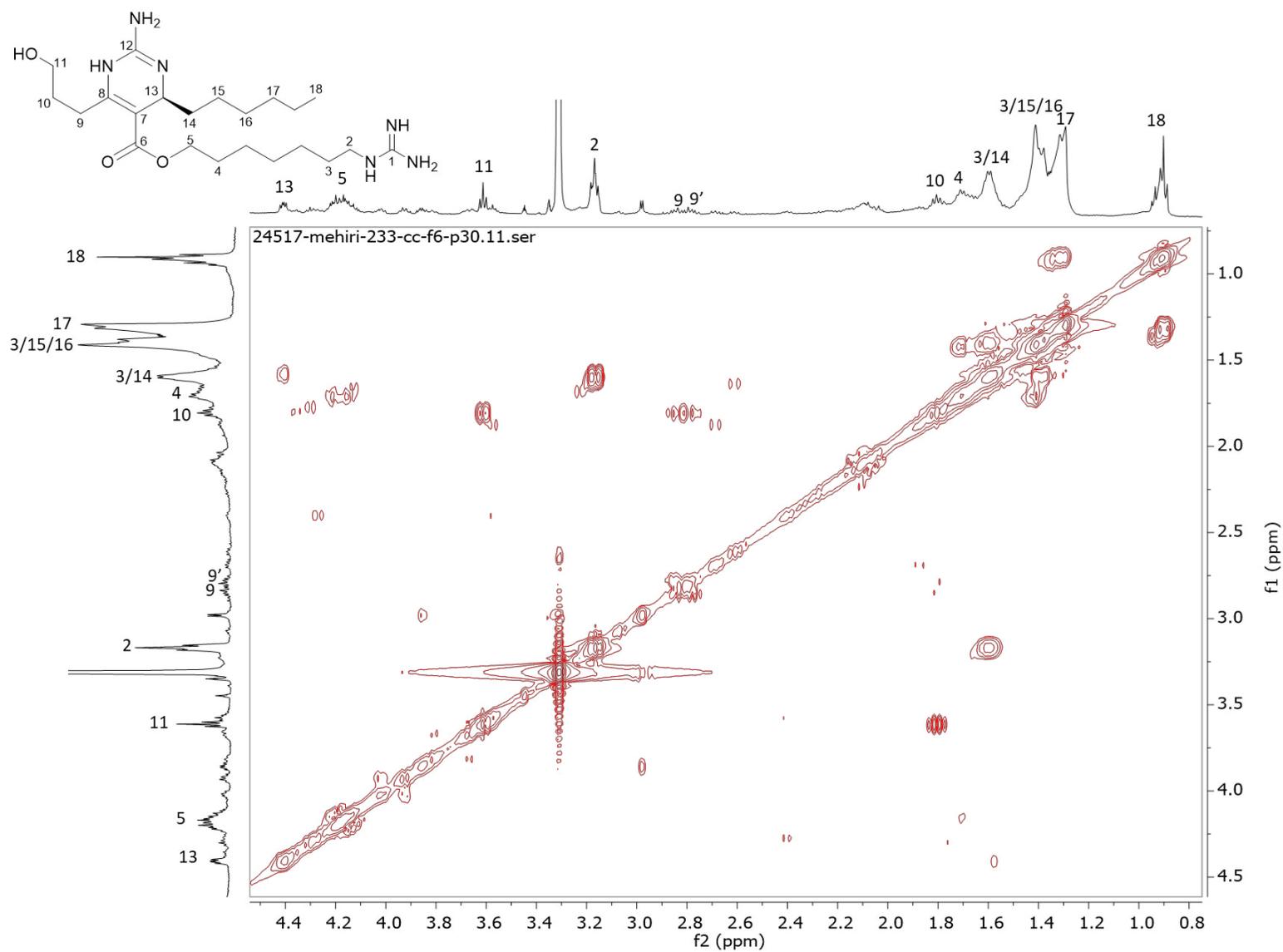


Figure 114. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

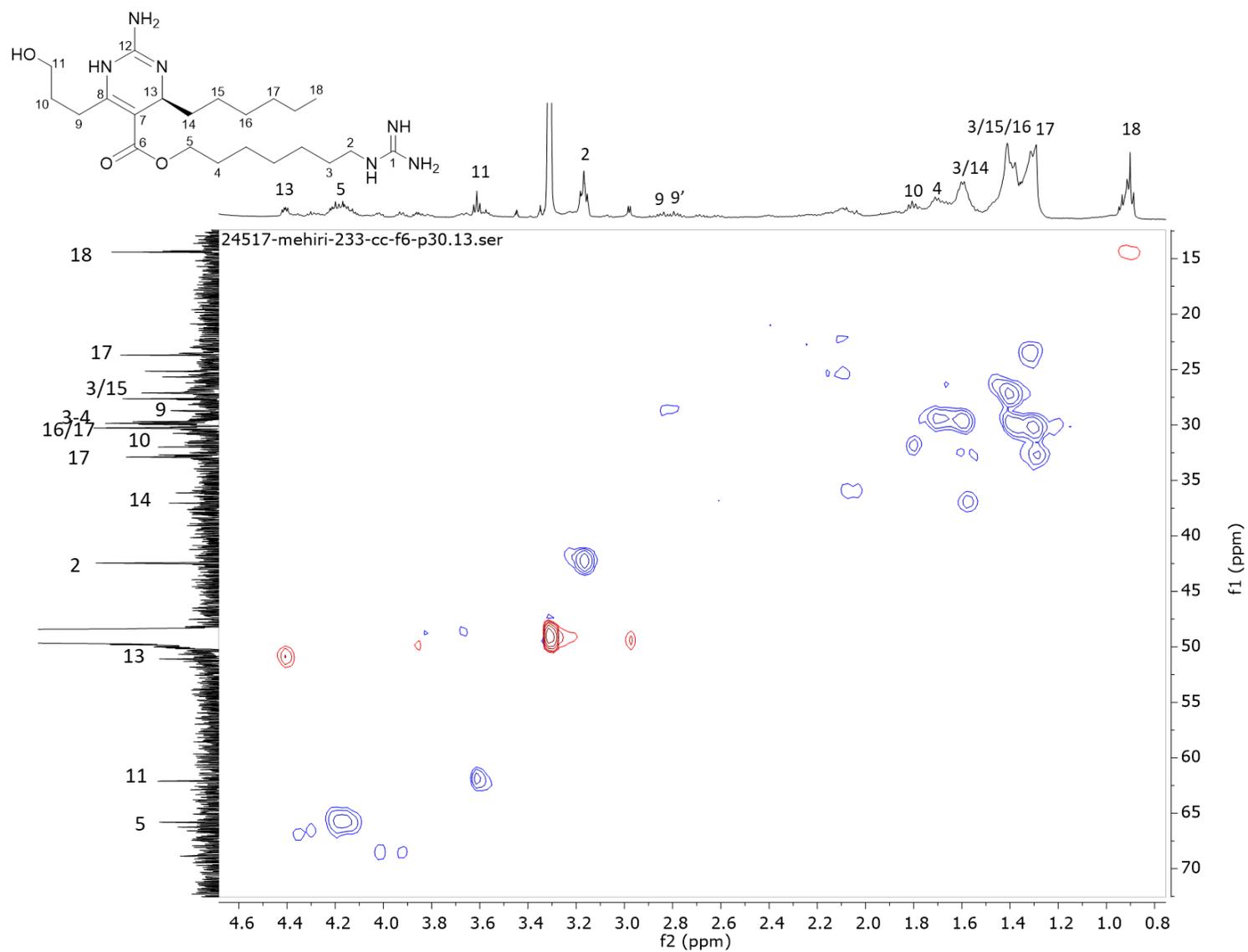


Figure 115. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_r -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

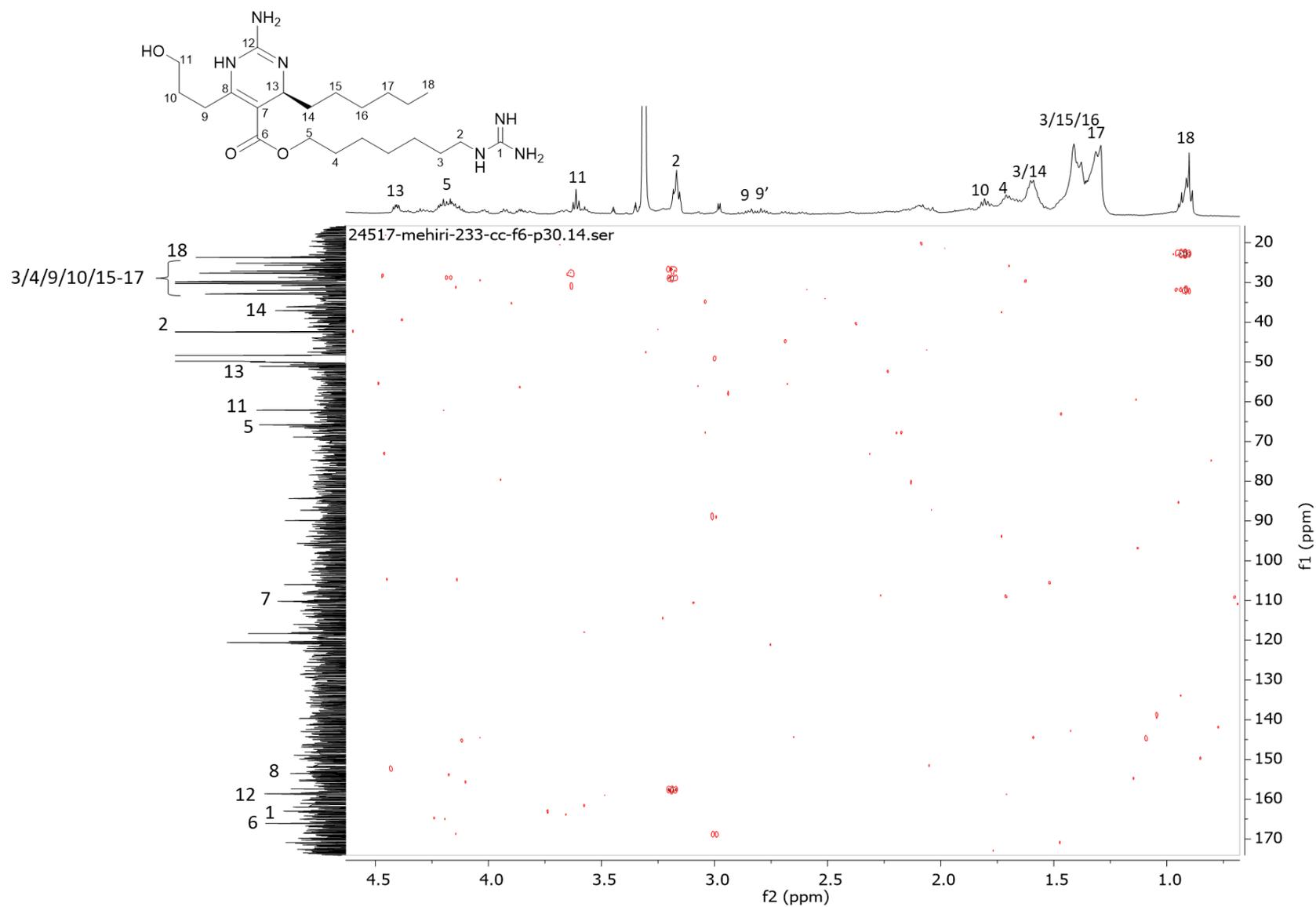


Figure 116. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

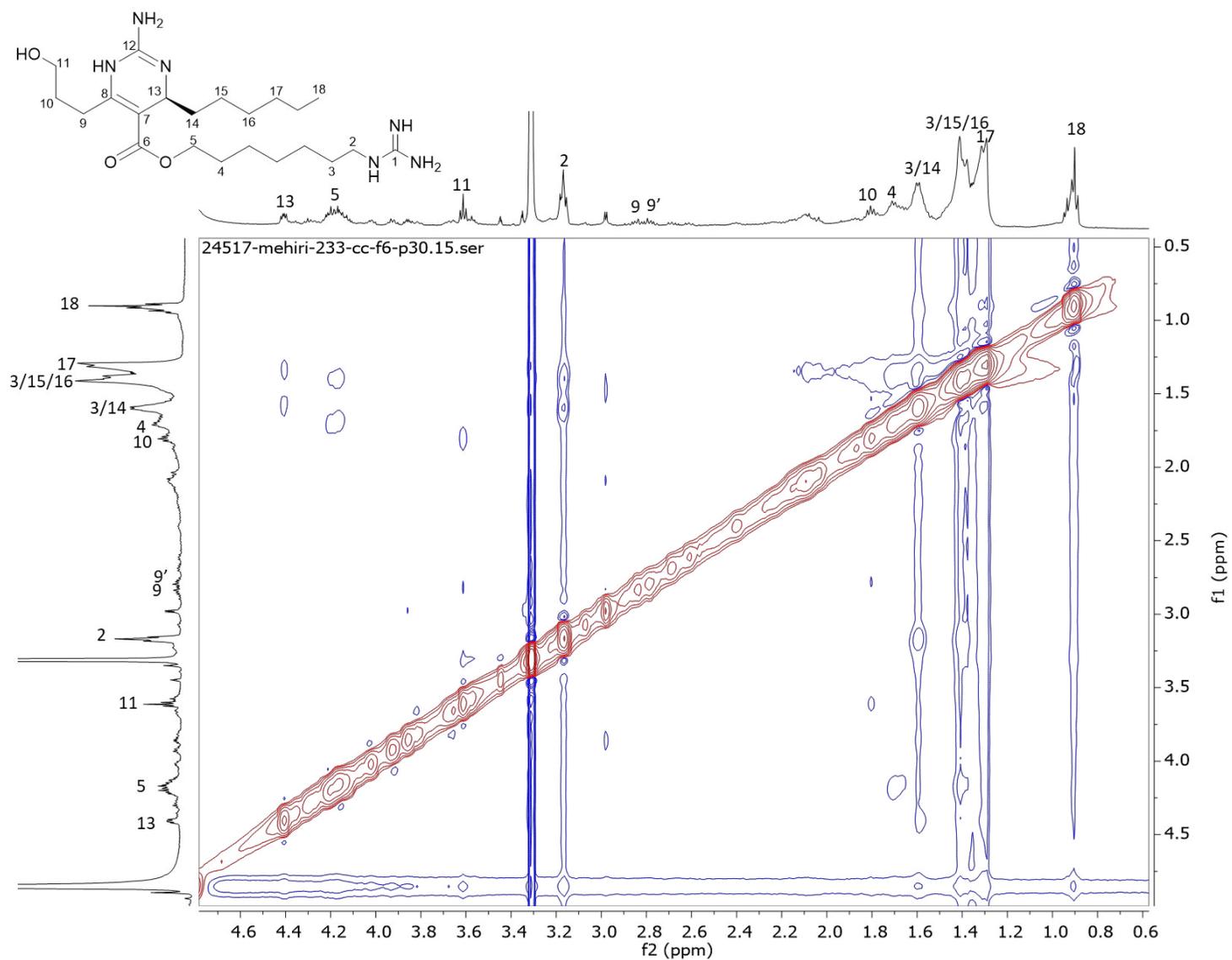


Figure 117. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la crambescine C1 452 (Cc4).

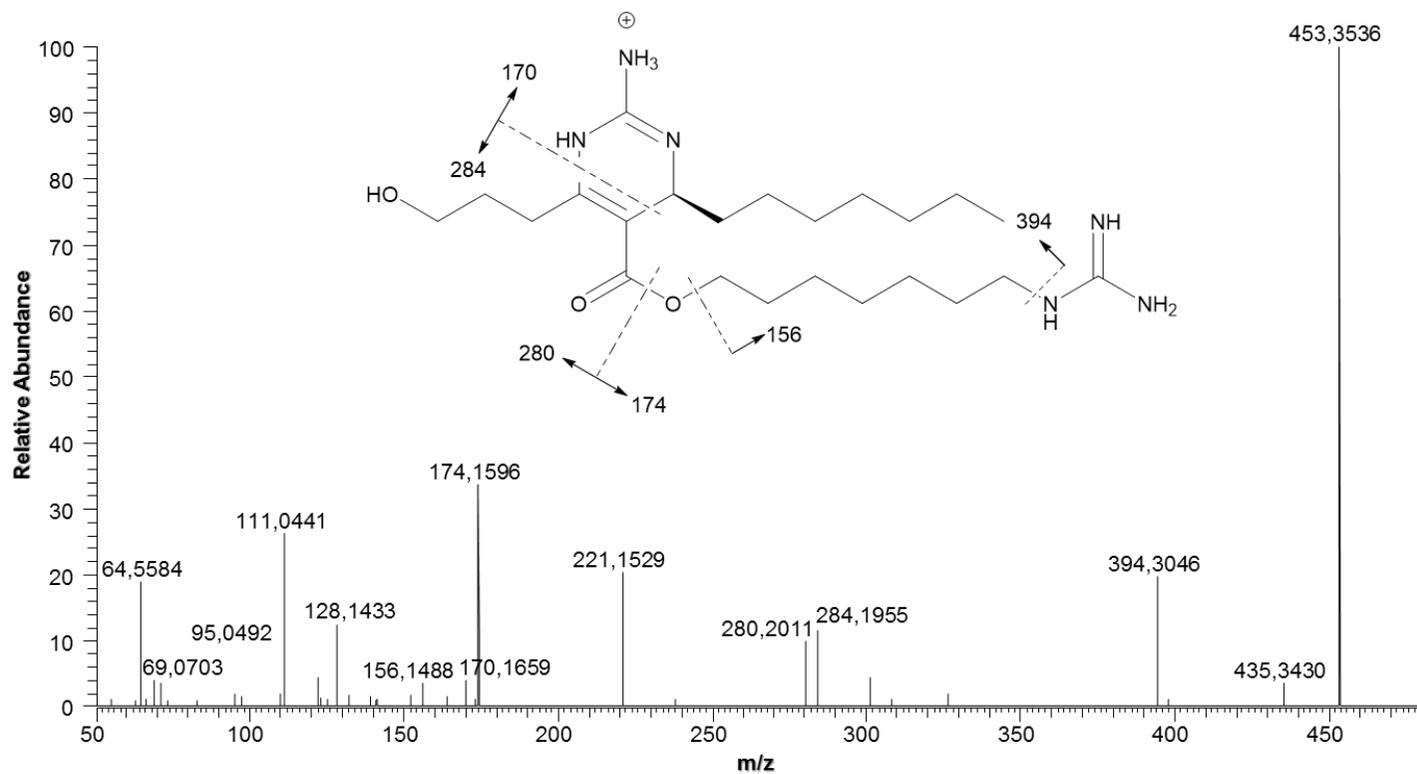


Figure 118. Spectre HR-ESI-MS/MS (+) de la crambescine C1 452 (Cc4) dans le d_4 -MeOH.

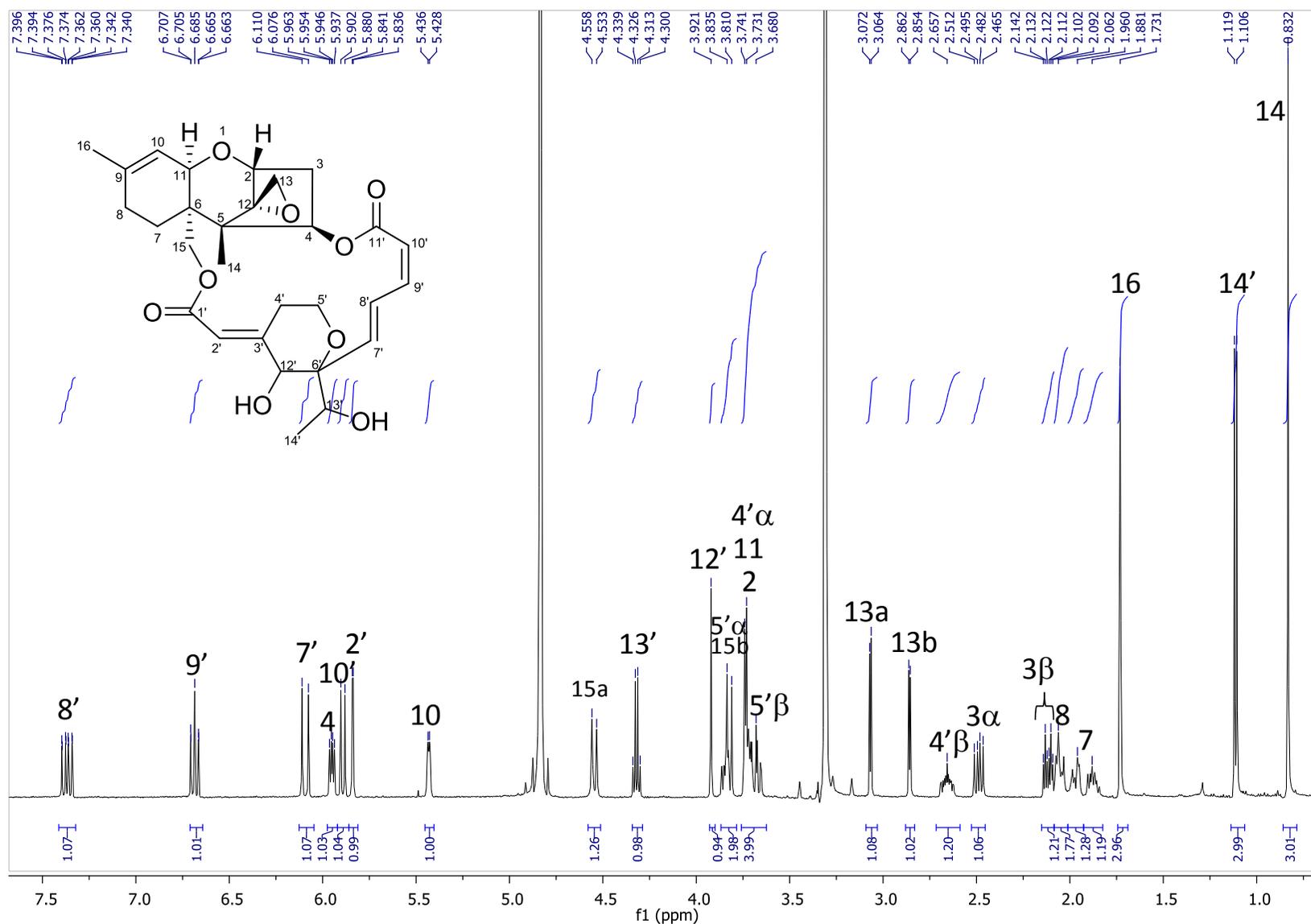


Figure 119. Spectre RMN ¹H (*d*₇-MeOH, 500 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

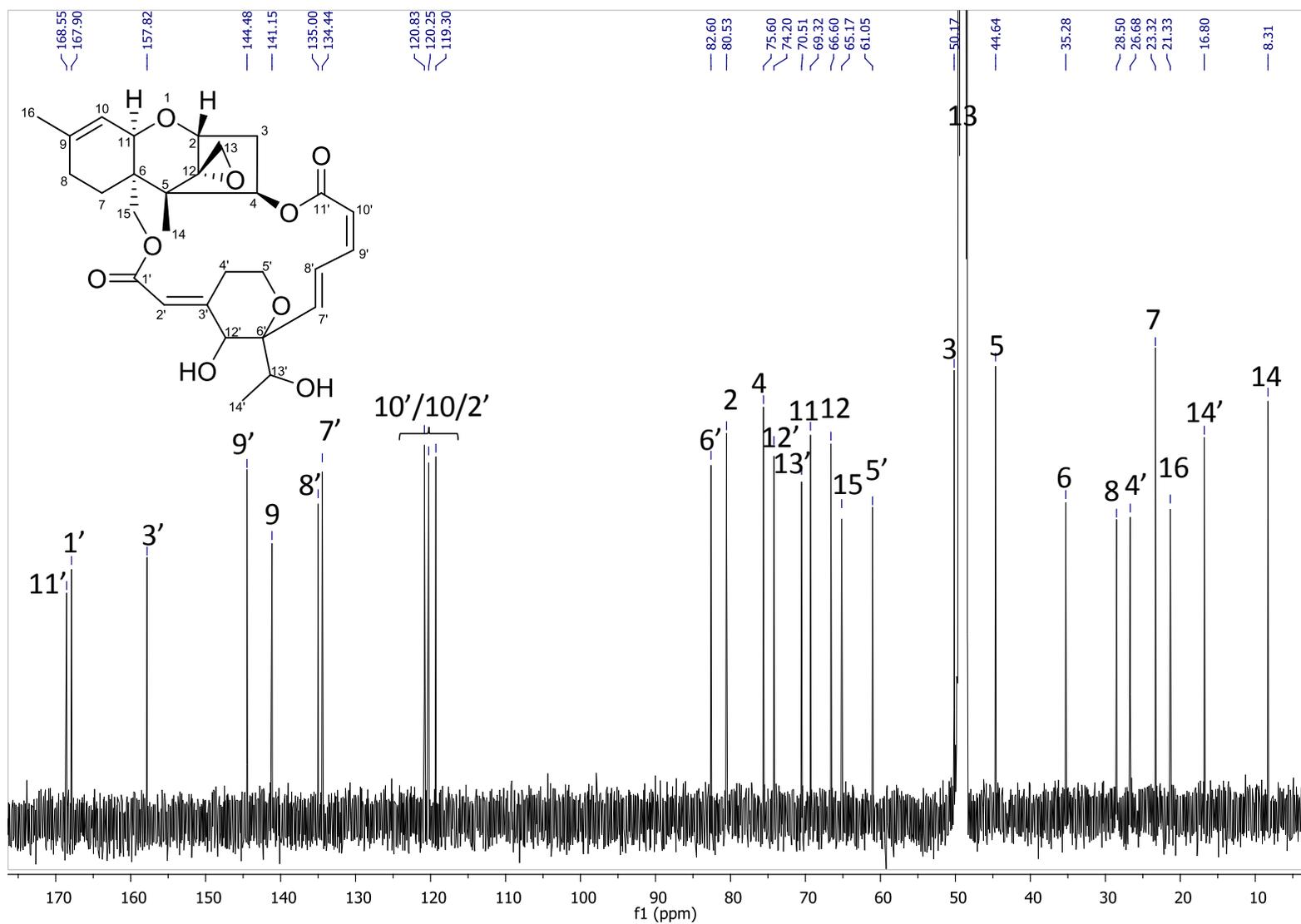


Figure 120. Spectre RMN ^{13}C (d_7 -MeOH, 125 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

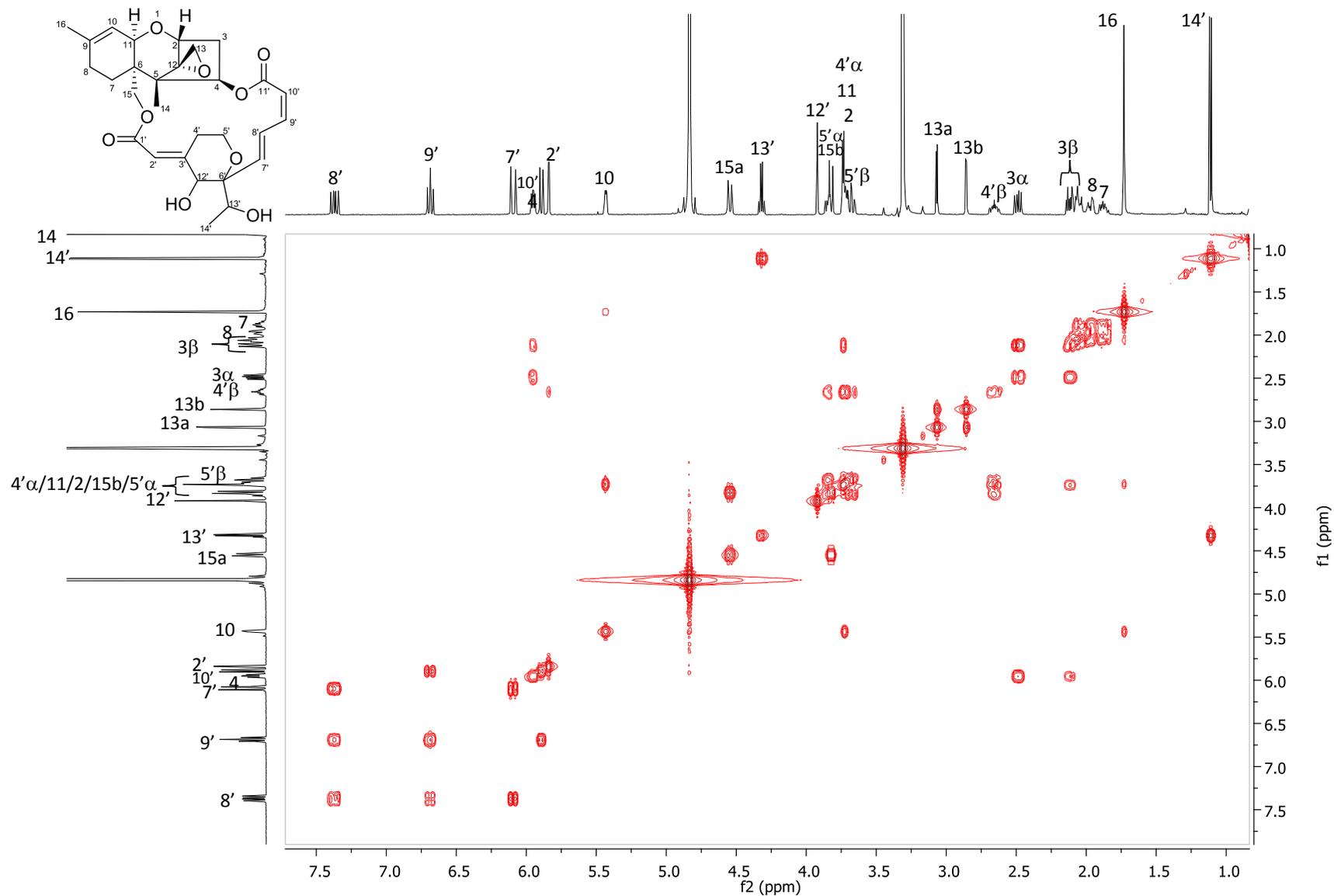


Figure 121. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

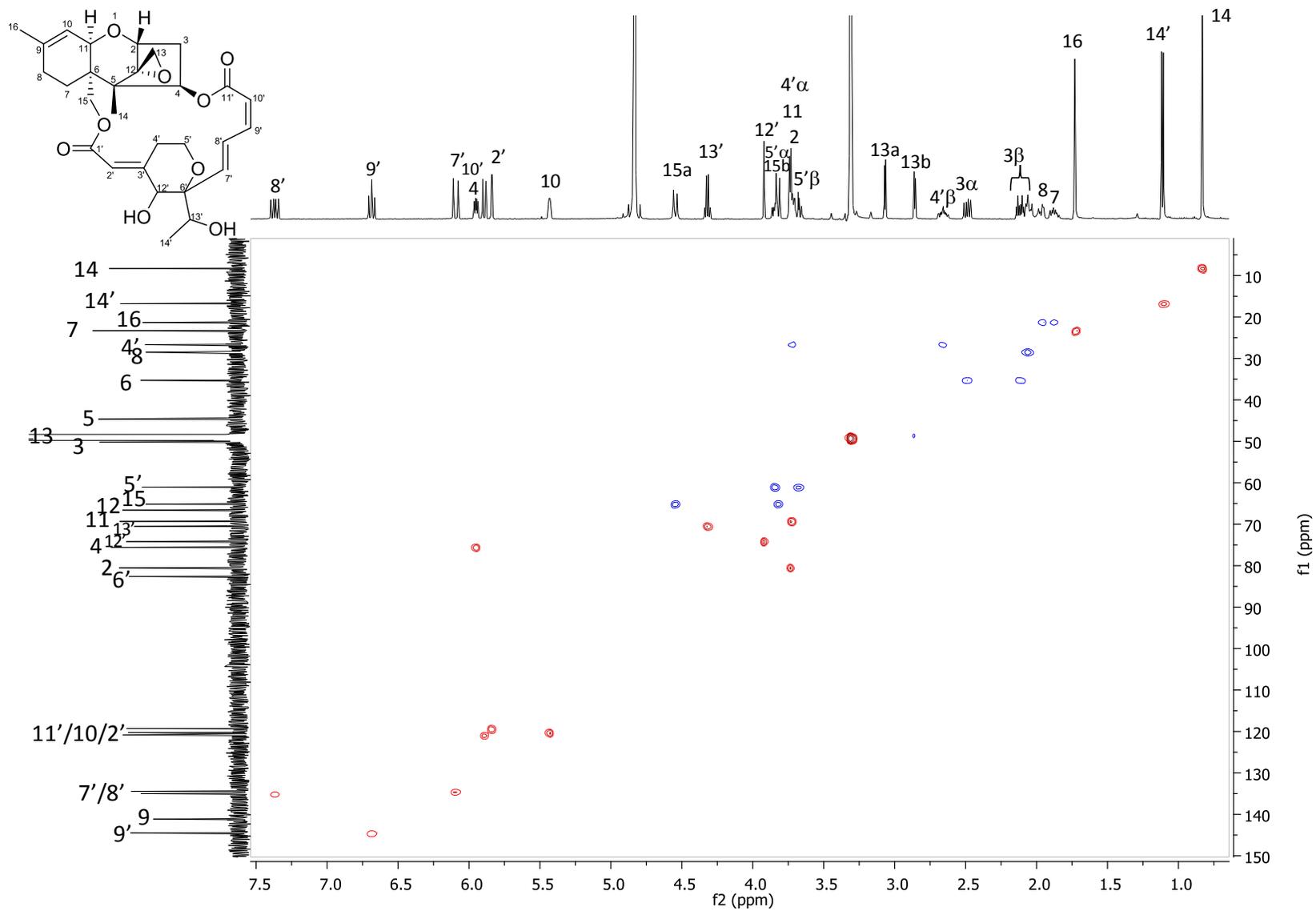


Figure 122. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_7 -MeOH, 500/125 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

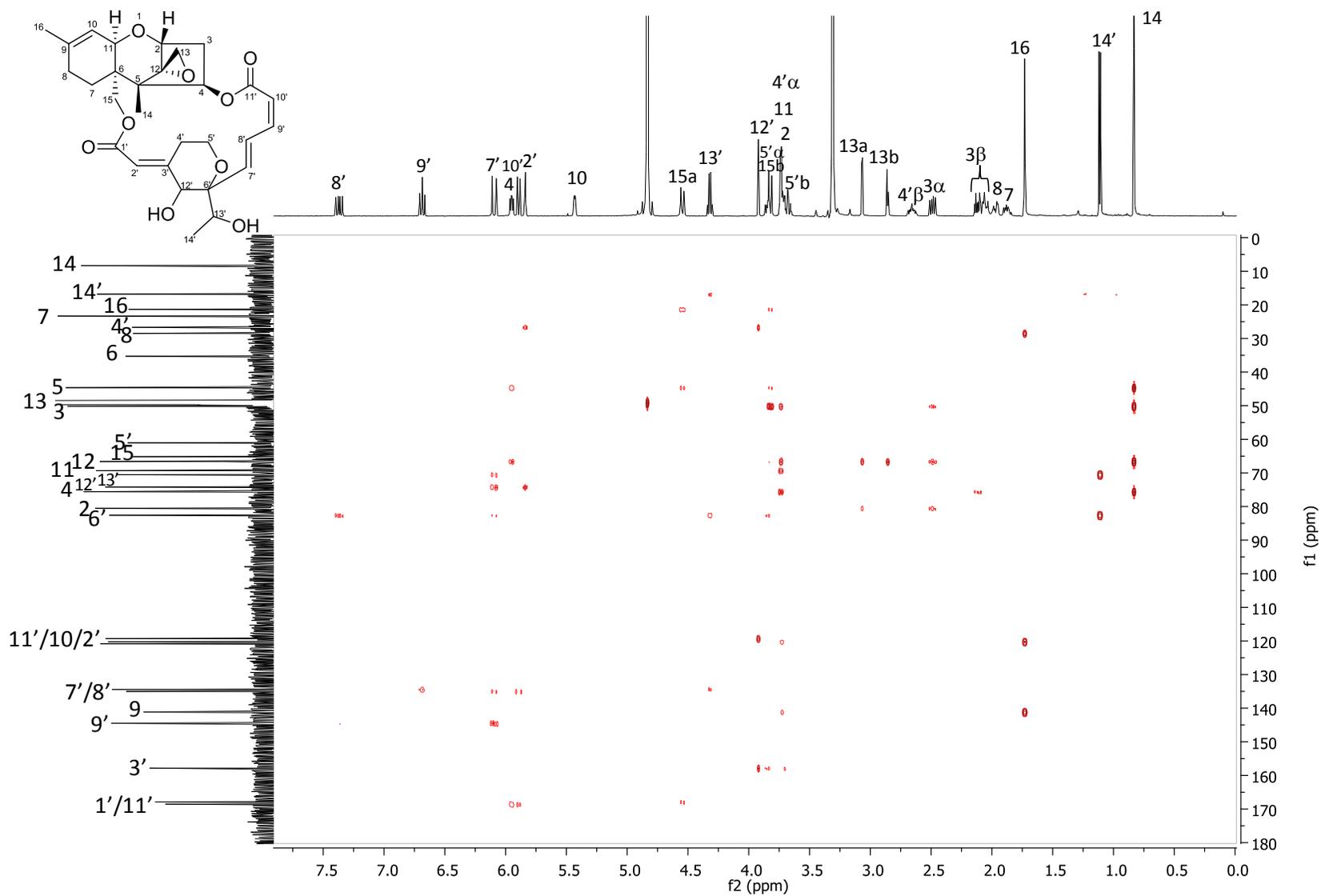


Figure 123. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

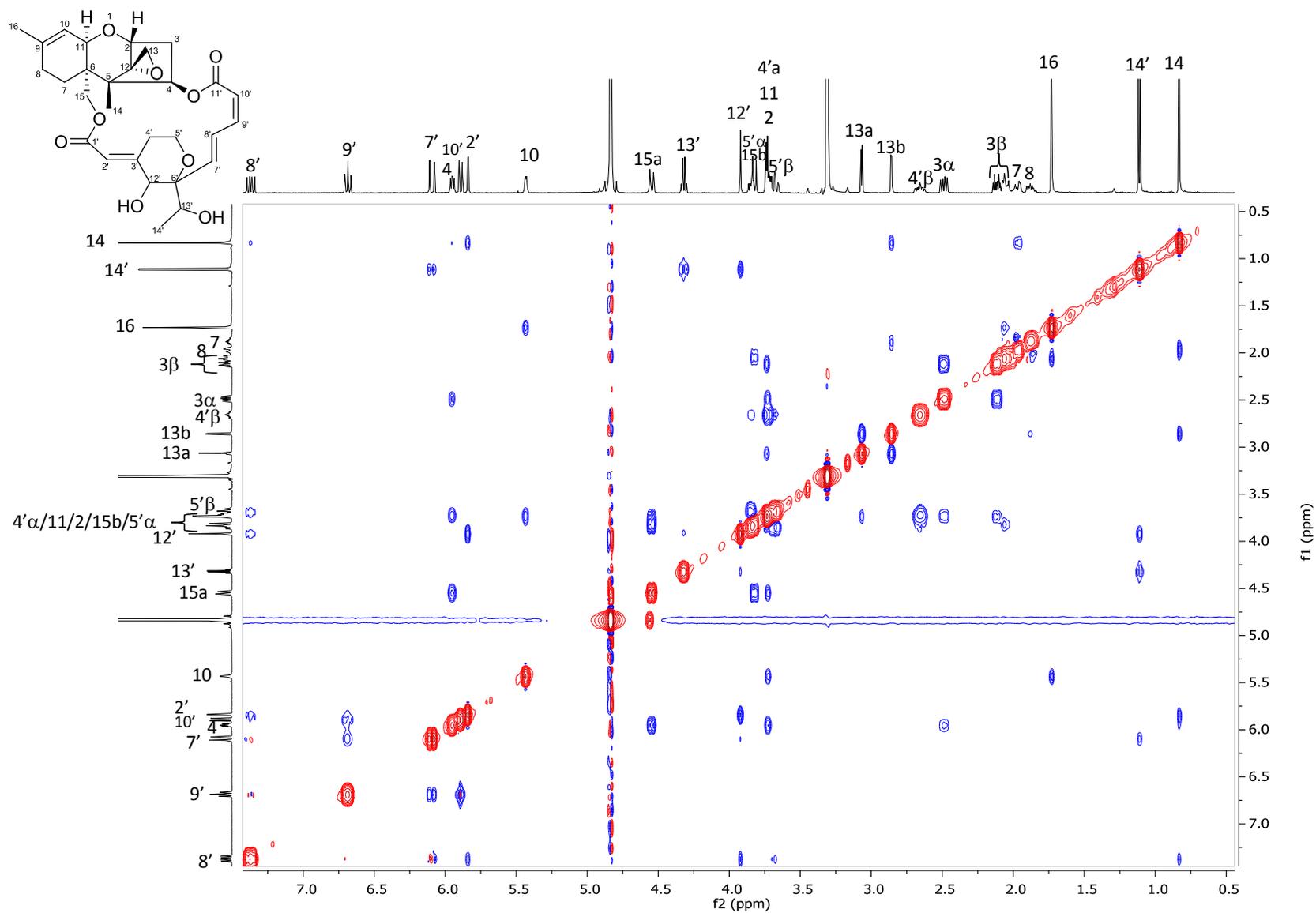


Figure 124. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la satratoxine H (Sc1).

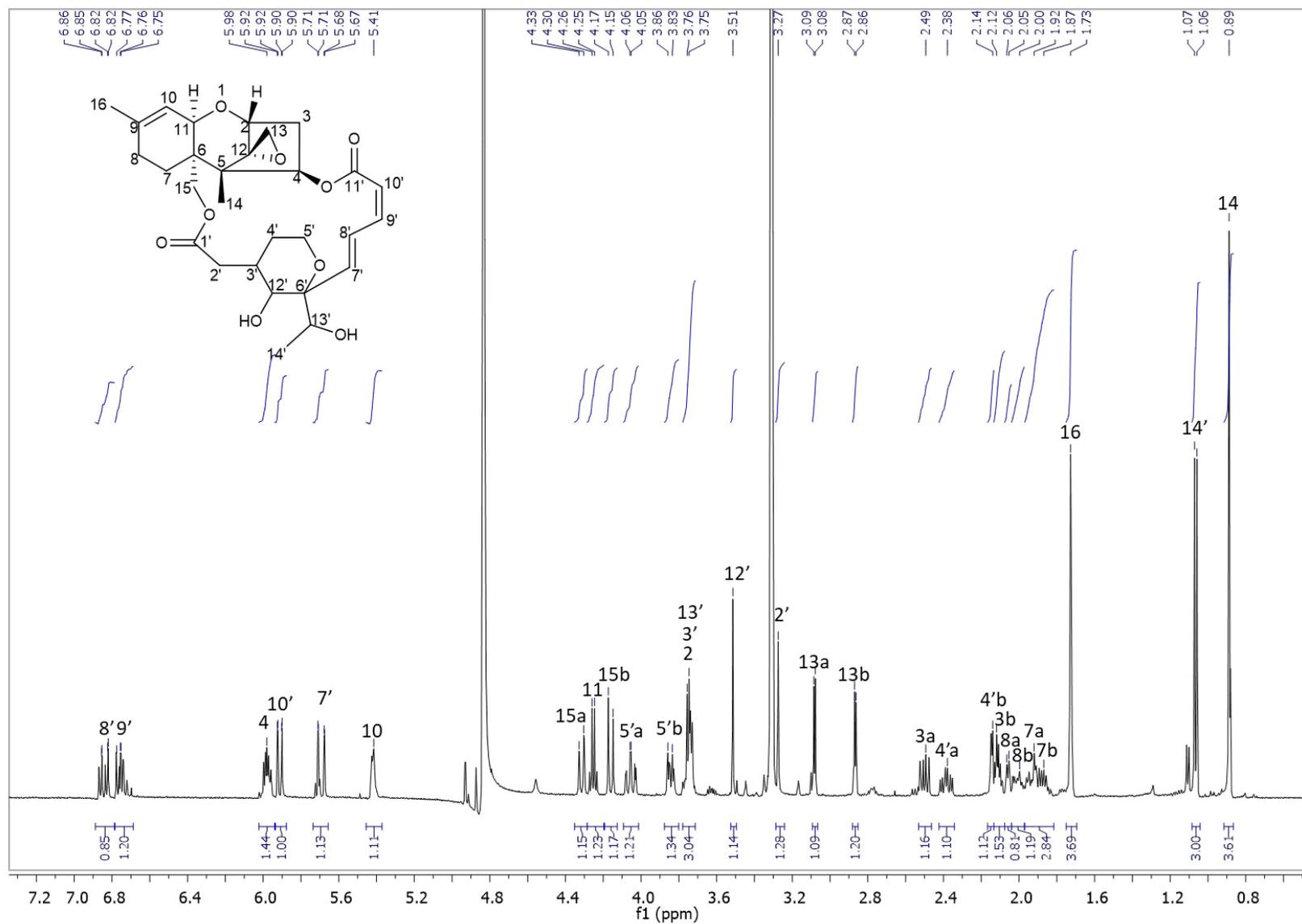


Figure 125. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (Sc2).

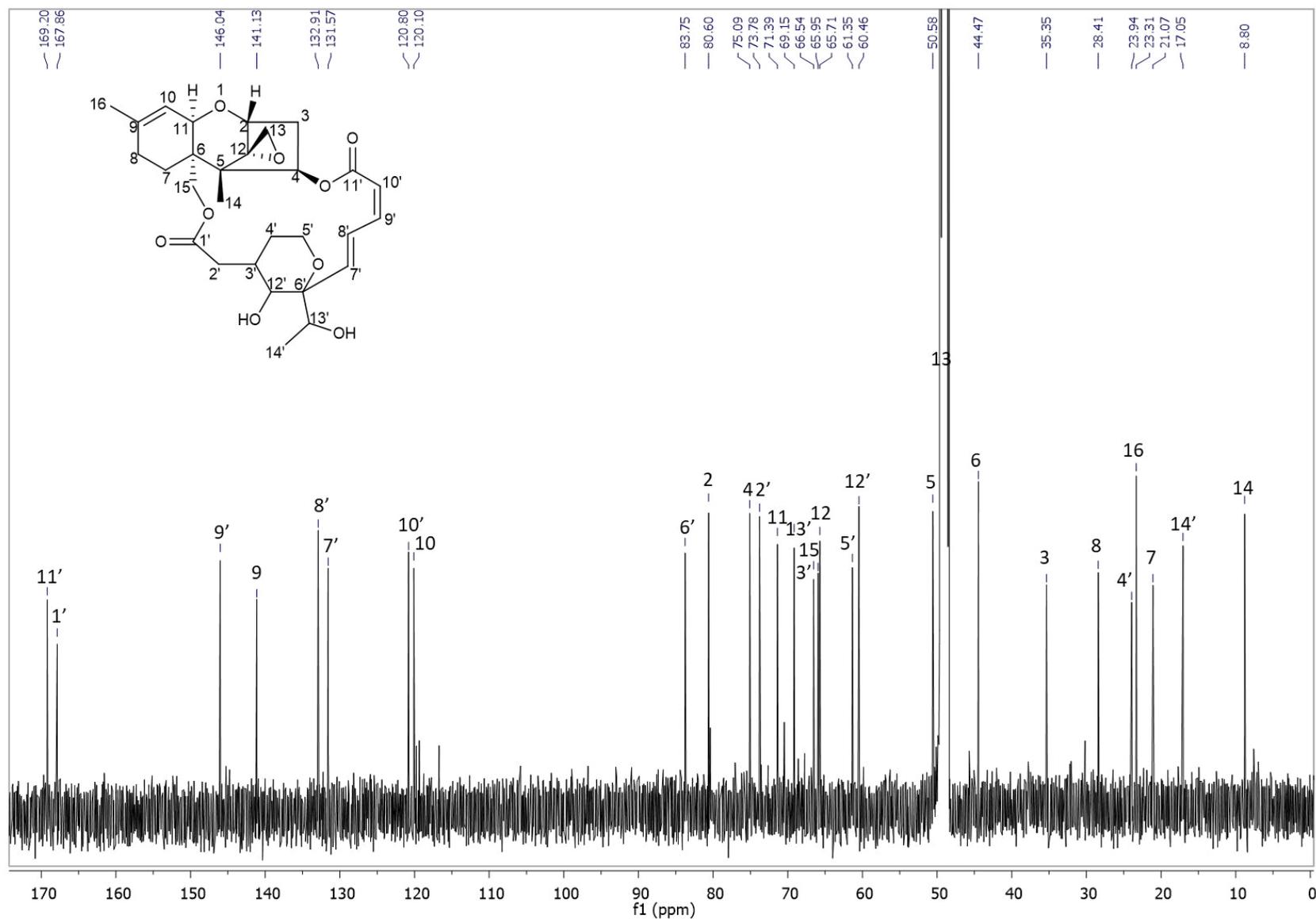


Figure 126. Spectre RMN ^{13}C (d_7 -MeOH, 125 MHz) de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (Sc2).

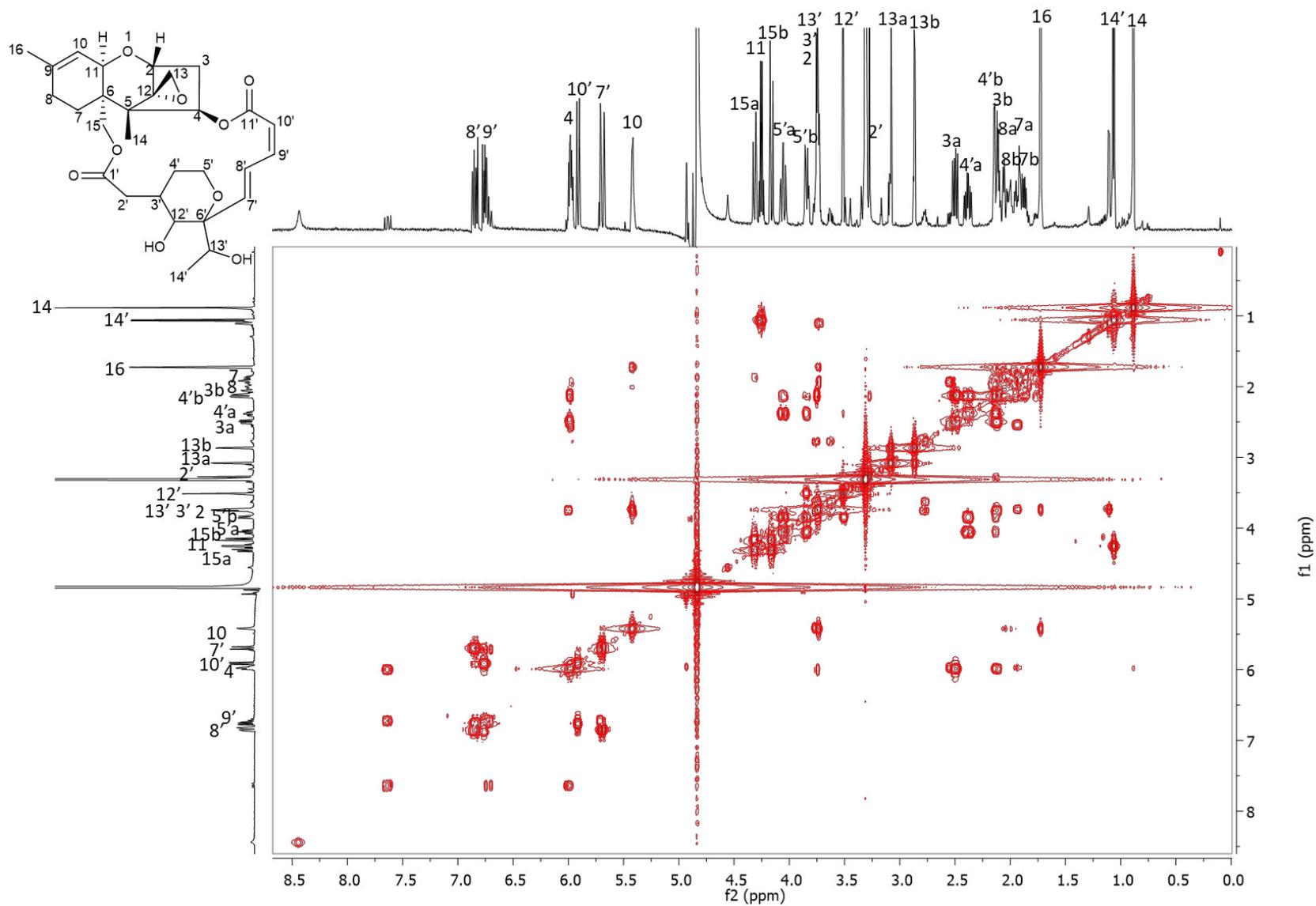


Figure 127. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_7 -MeOH, 500/125 MHz) de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (Sc2).

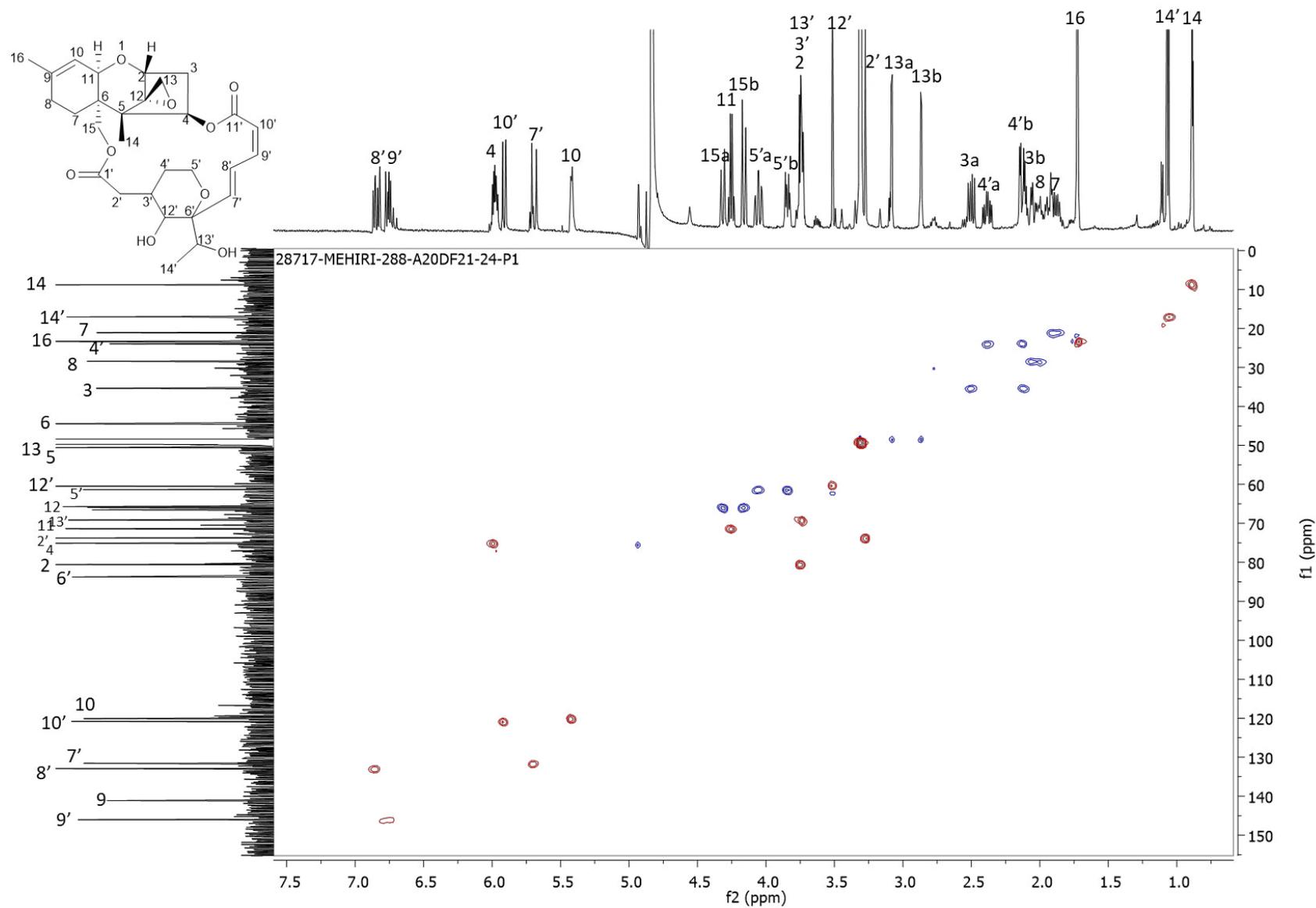


Figure 128. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_r -MeOH, 500/125 MHz) de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (Sc2).

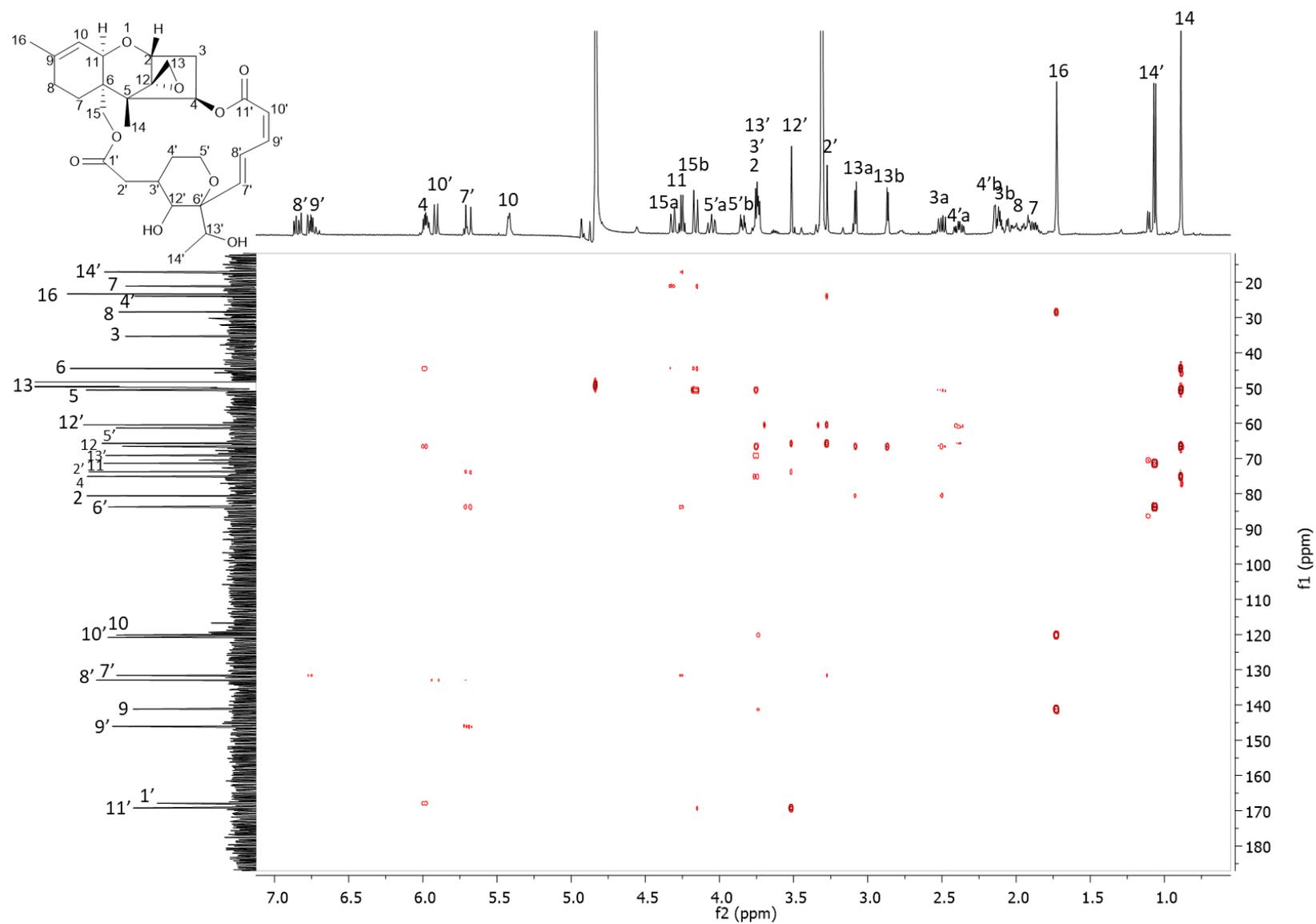


Figure 129. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la 2',3'-dihydrosatratoxine H (Sc2).

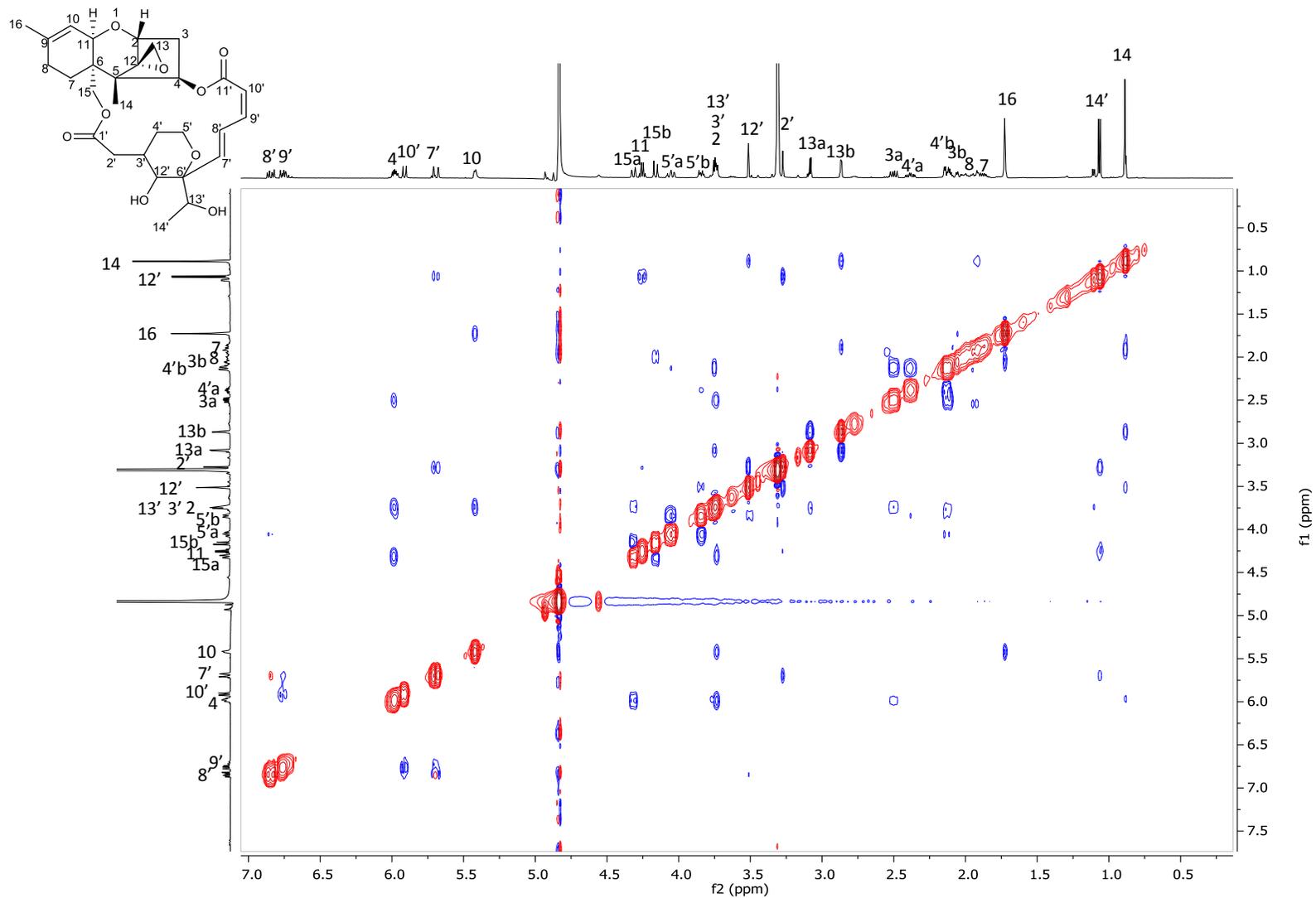


Figure 130. Spectre RMN NOESY ^1H - ^{13}H (d_7 -MeOH, 500/500 MHz) de la 2',3'-dihydrostratotoxine H (Sc2).

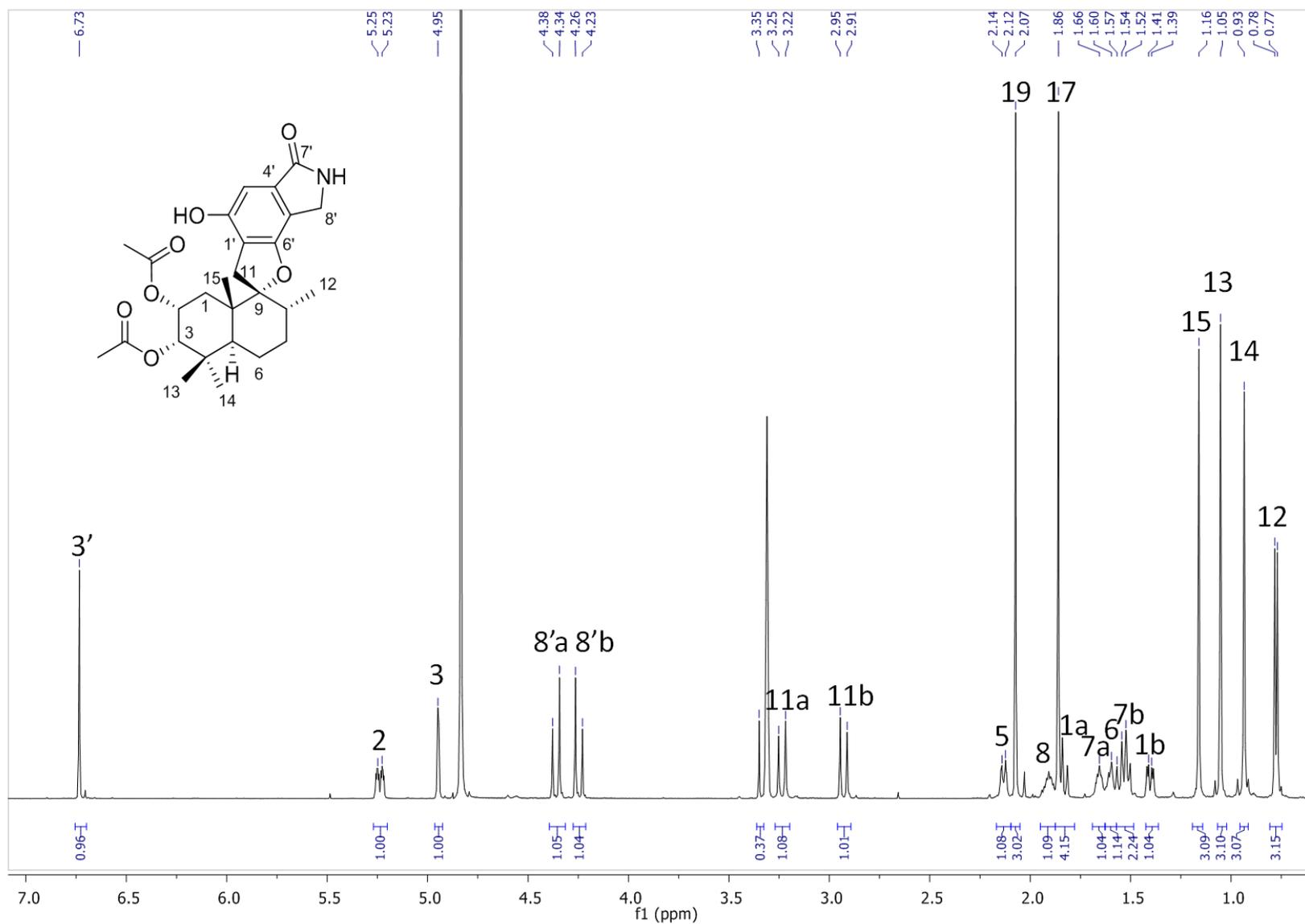


Figure 131. Spectre RMN ¹H (d₄-MeOH, 500 MHz) de l'acétate de 2α-acétoxystachybotrylactame (Sc3).

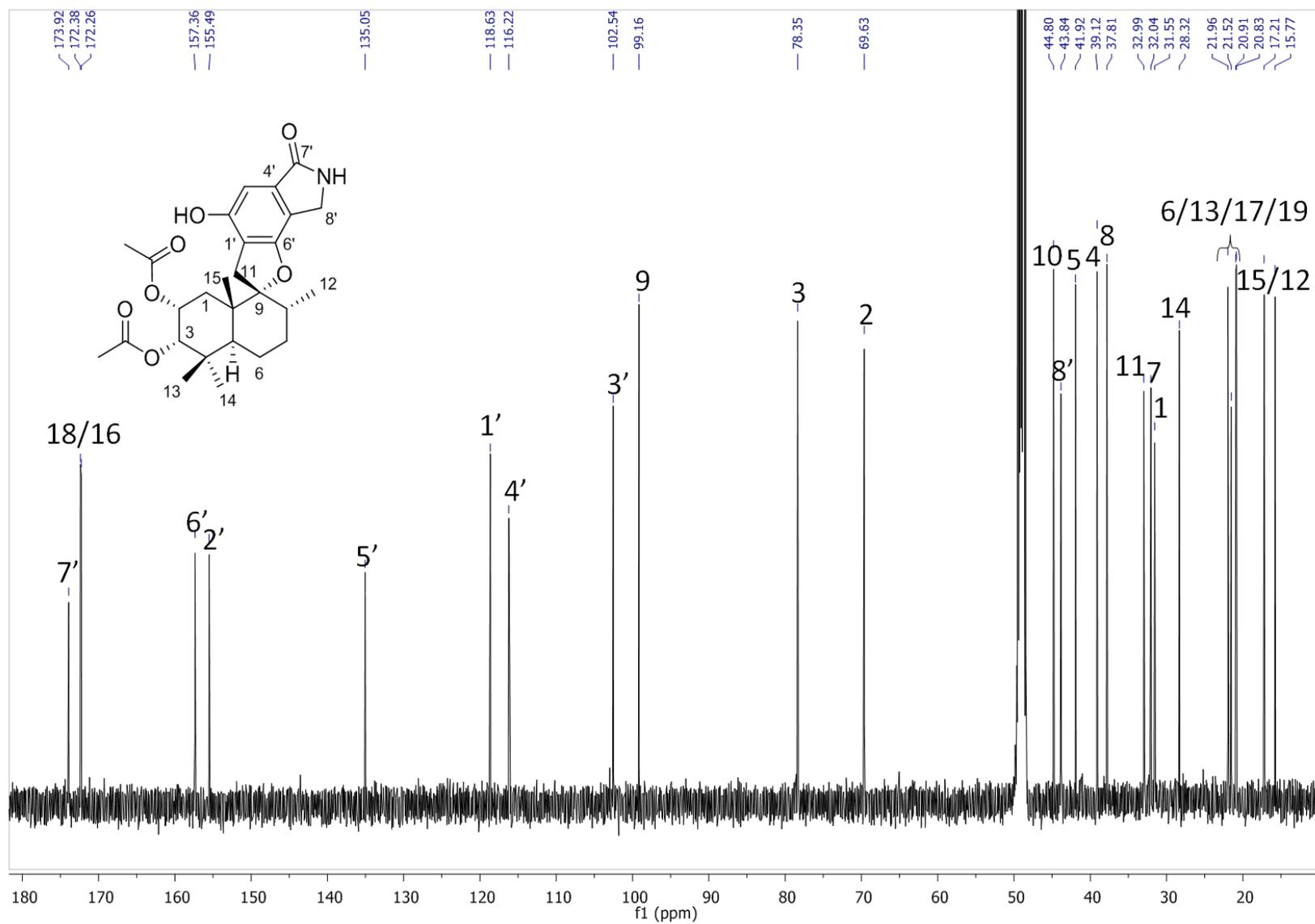


Figure 132. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de l'acétate de 2 α -acétostachybotrylactame (Sc3).

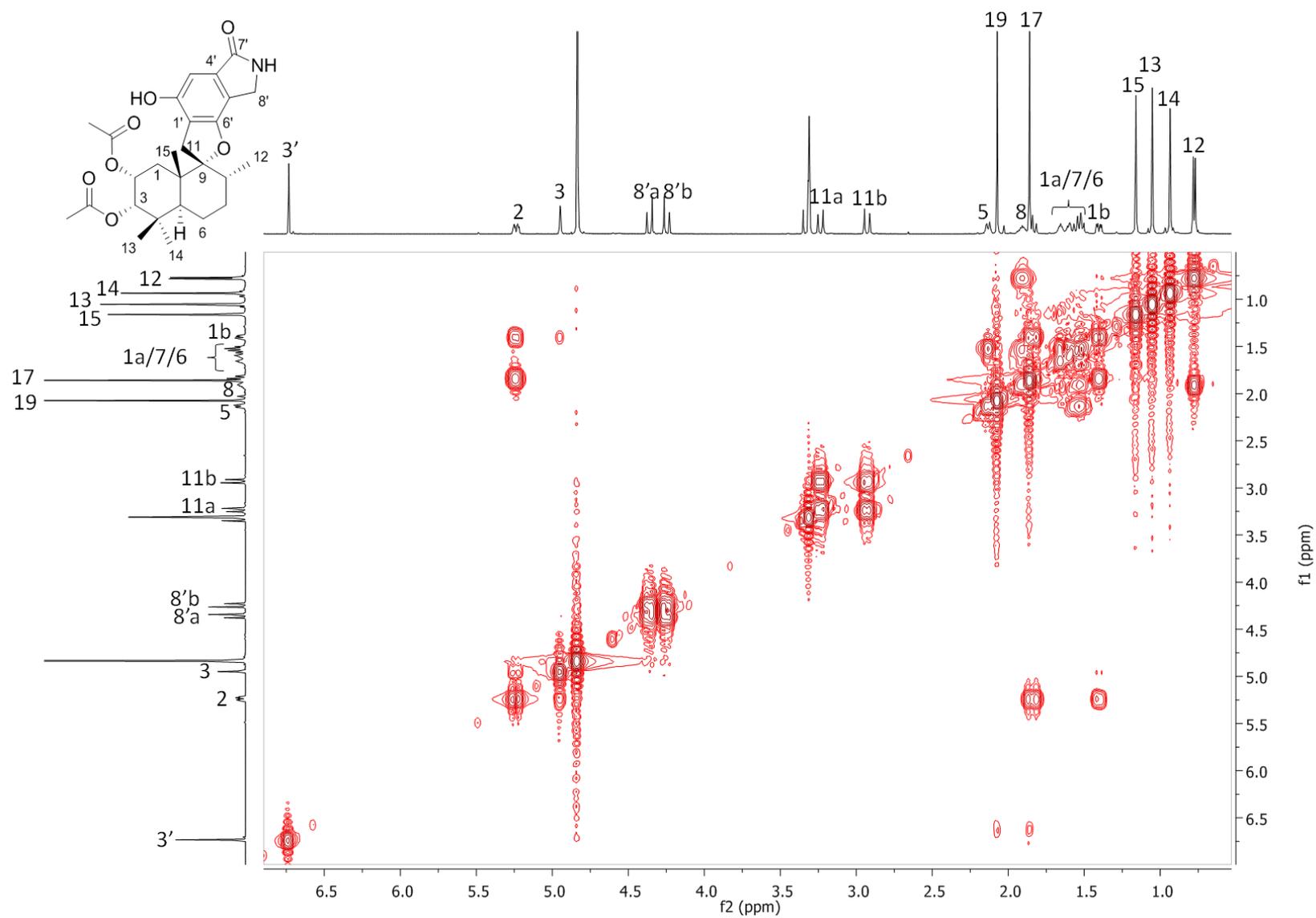


Figure 133. Spectre RMN COSY ¹H-¹H (*d*₇-MeOH, 500/500 MHz) de l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame (Sc3).

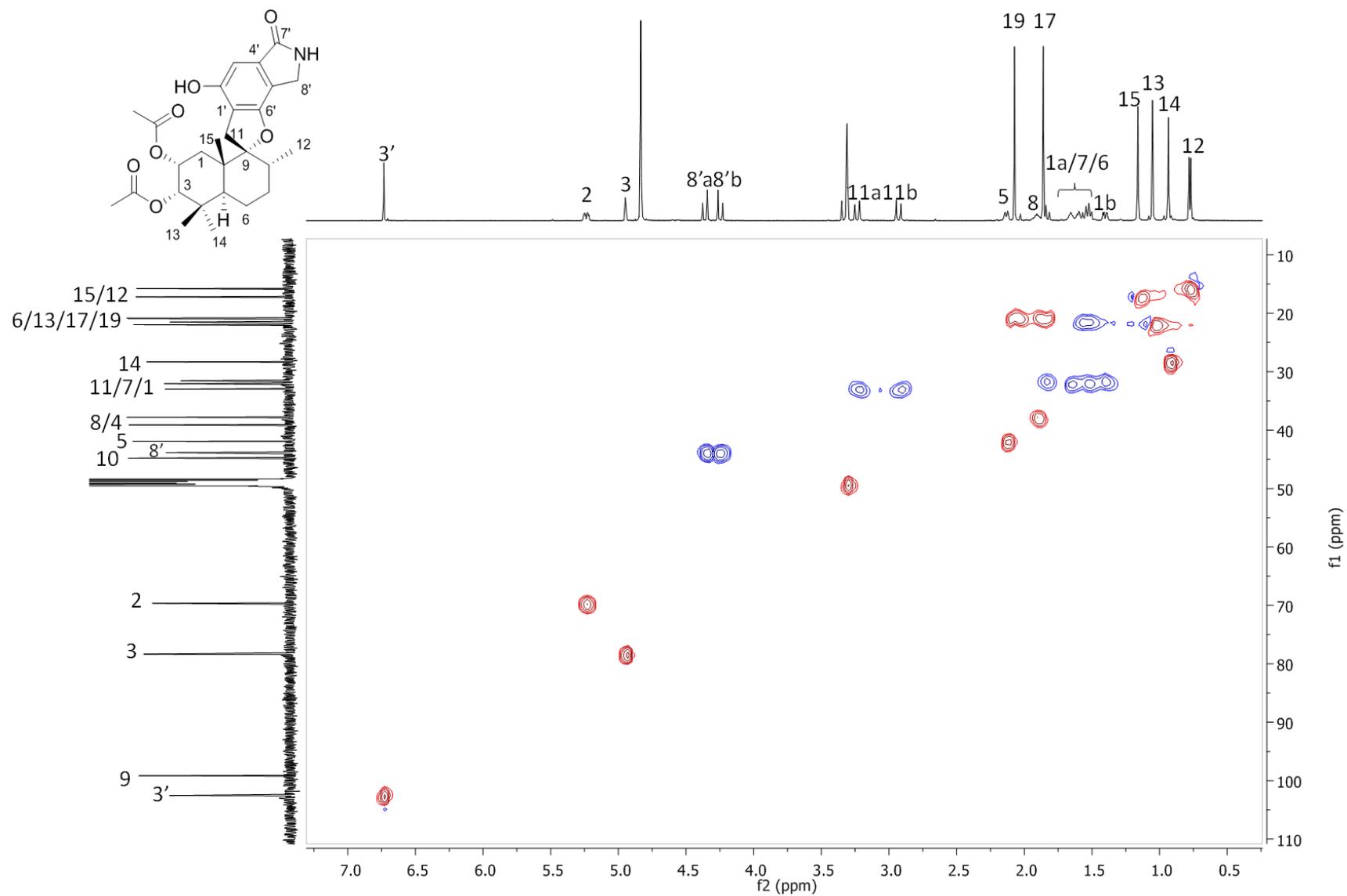


Figure 134. Spectre RMN HSQC ¹H-¹³C (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz) de l'acétate de 2α-acétoxytachybotrylactame (Sc3).

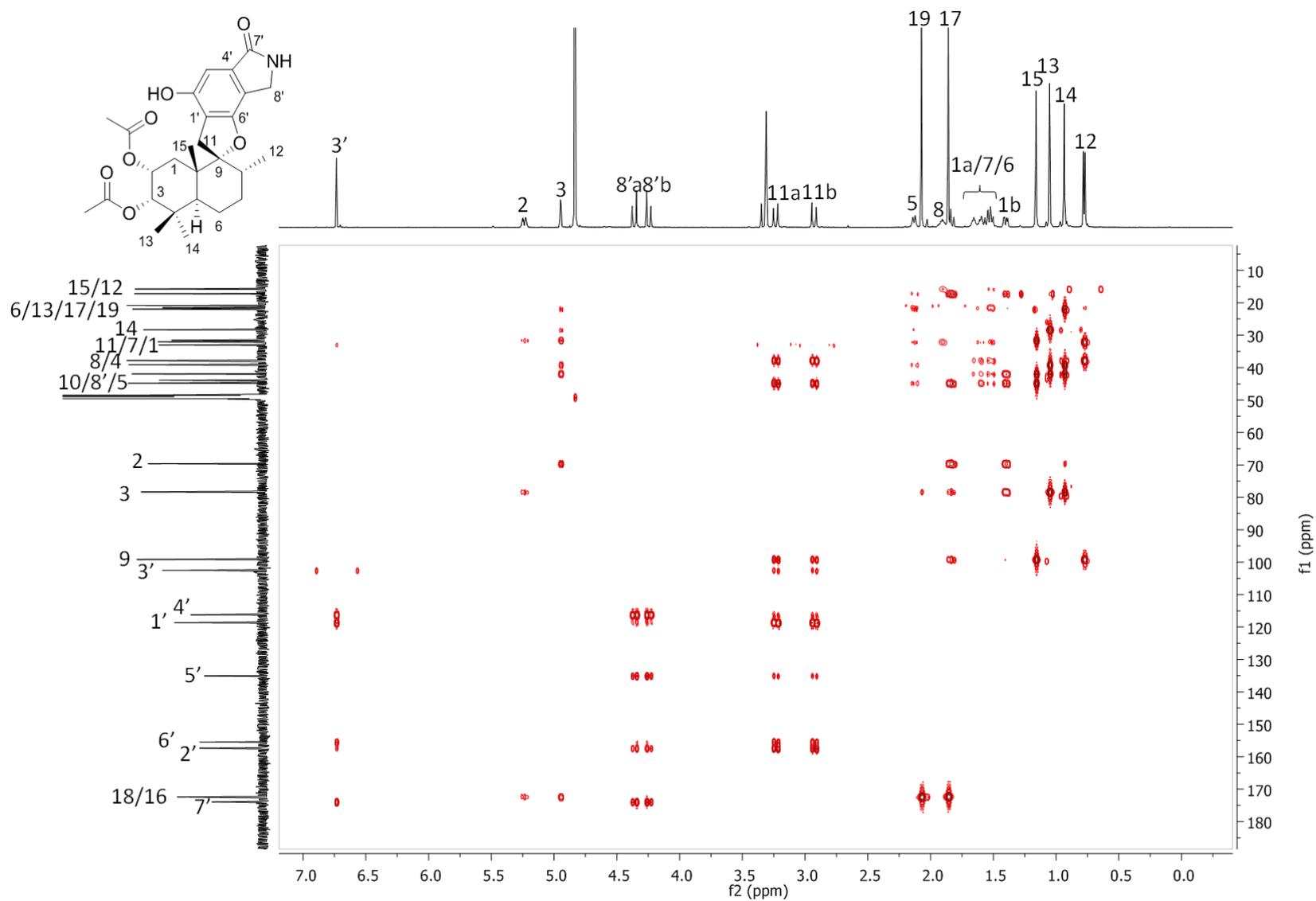


Figure 135. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de l'acétate de 2 α -acétoxystachybotrylactame (Sc3).

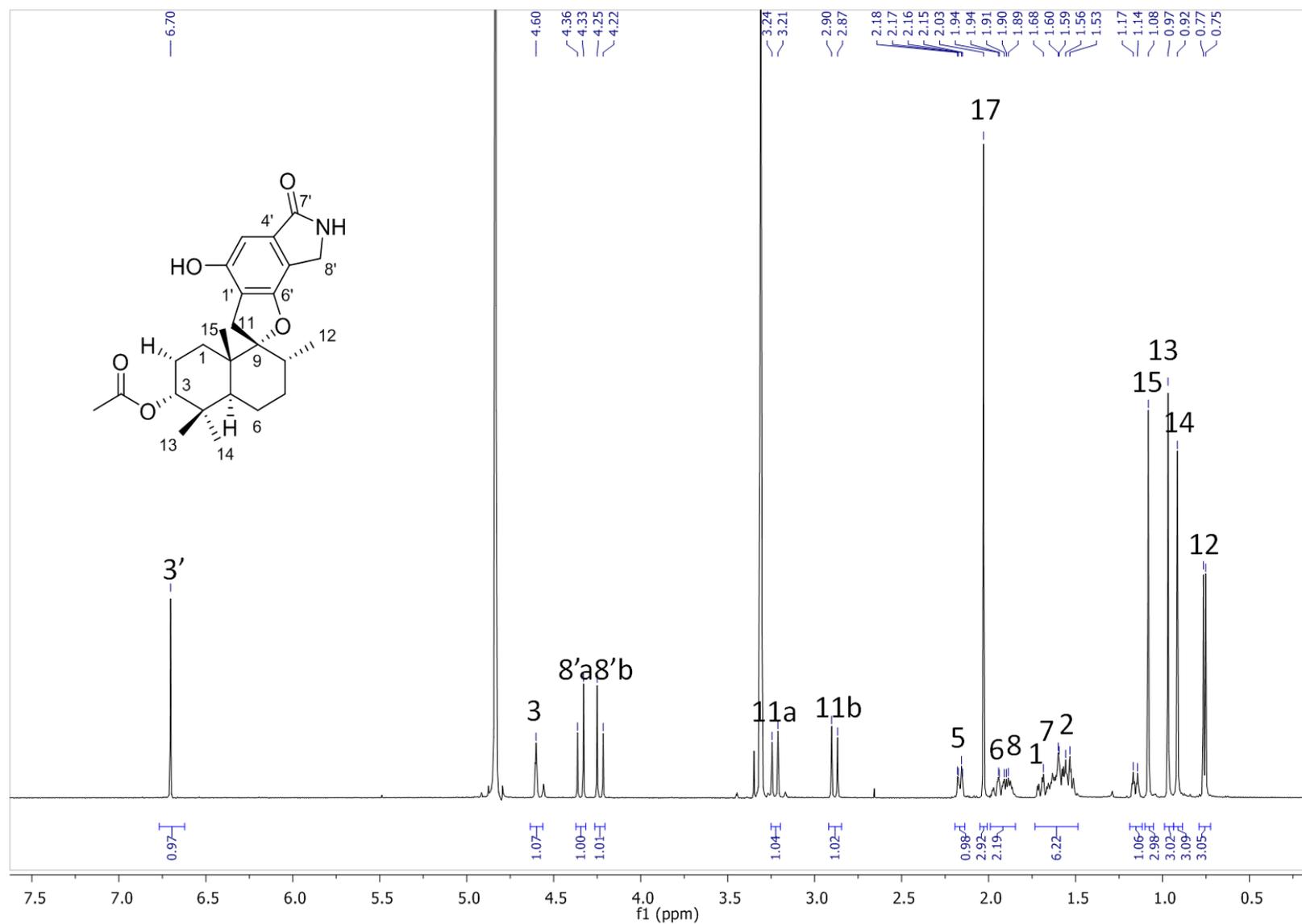


Figure 136. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de l'acétate de stachybotrylactame (Sc4).

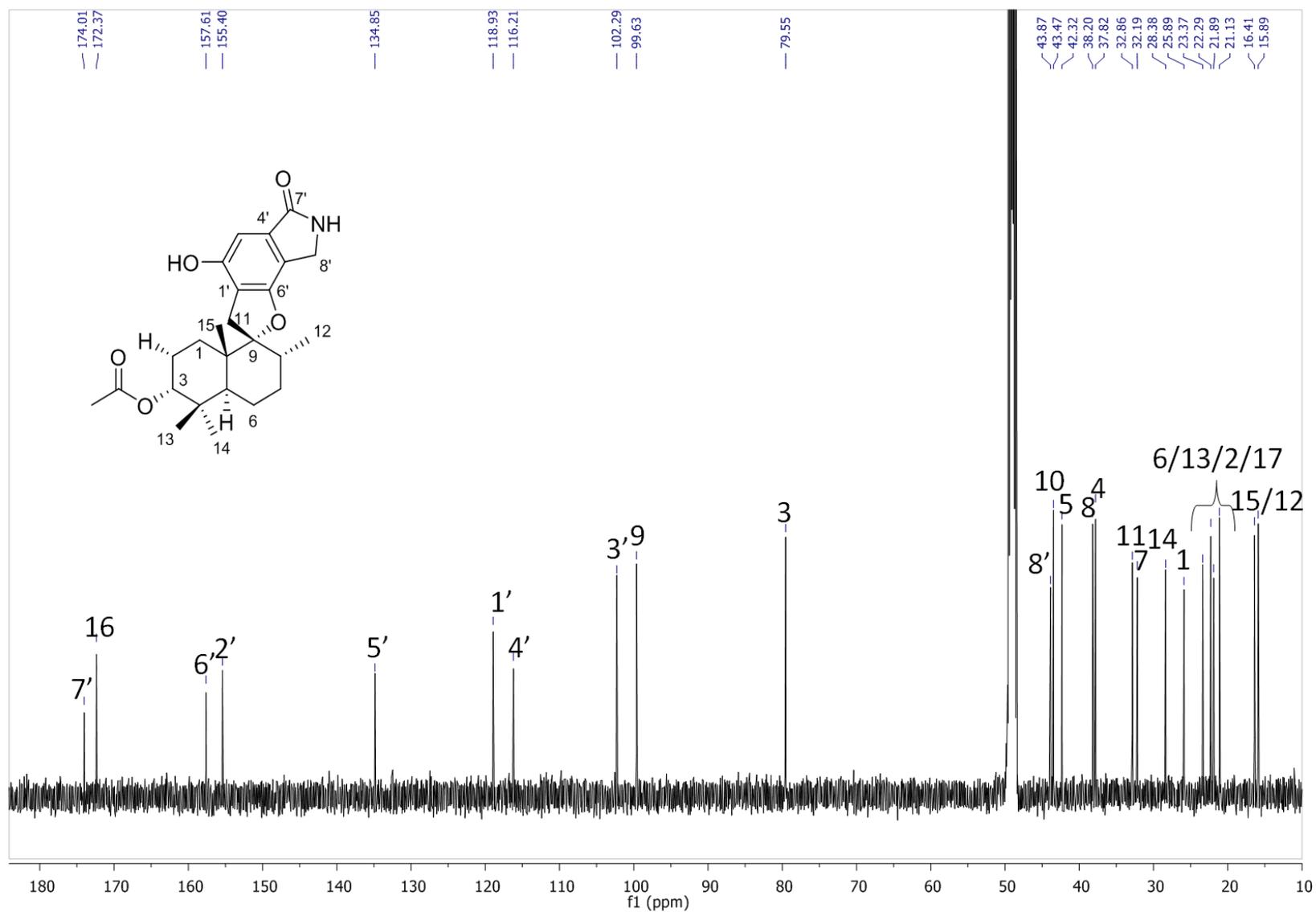


Figure 137. Spectre RMN ^{13}C (d_7 -MeOH, 125 MHz) de l'acétate de la stachybotrylactame (Sc4).

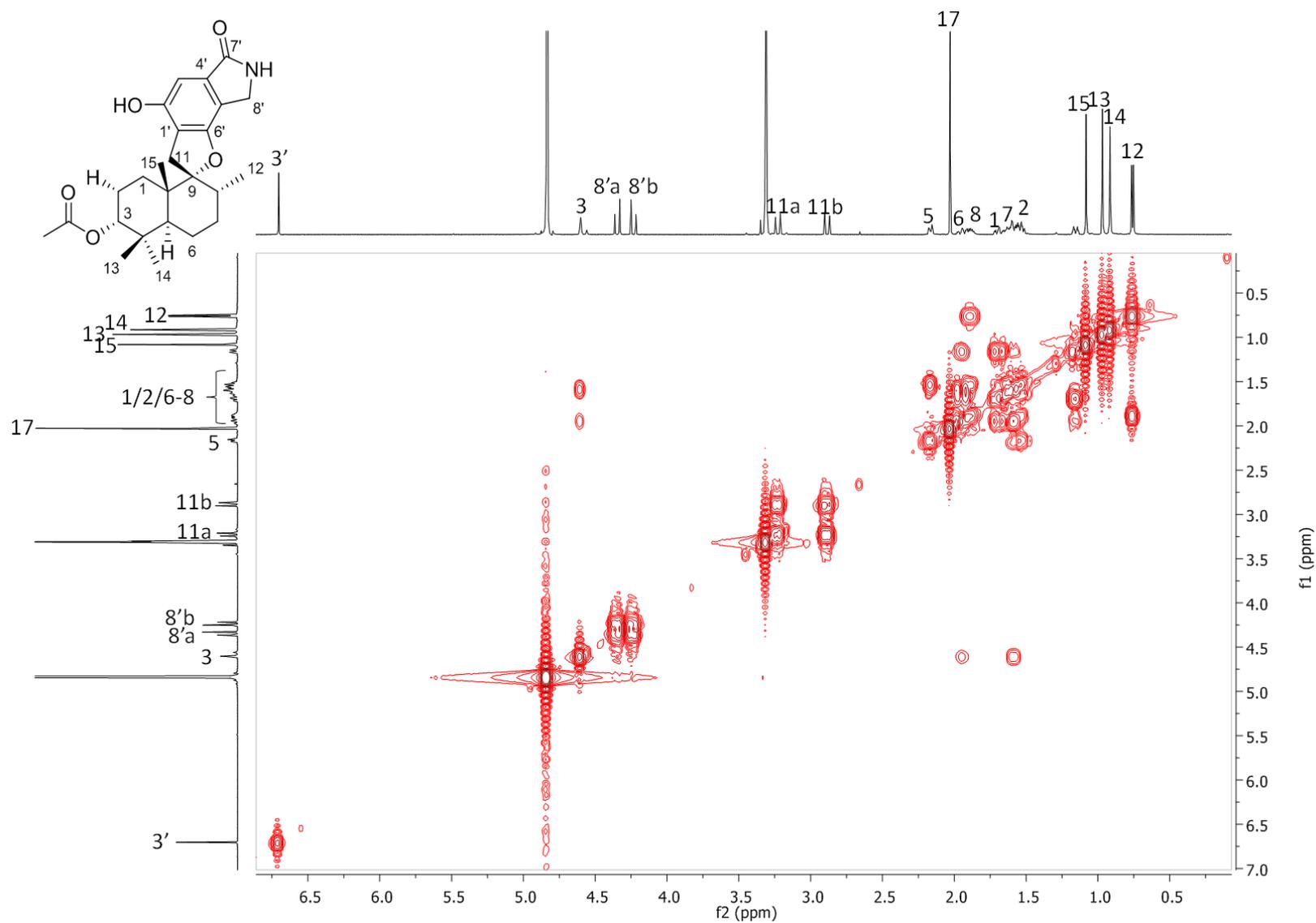


Figure 138. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de l'acétate de stachybotrylactame (Se4).

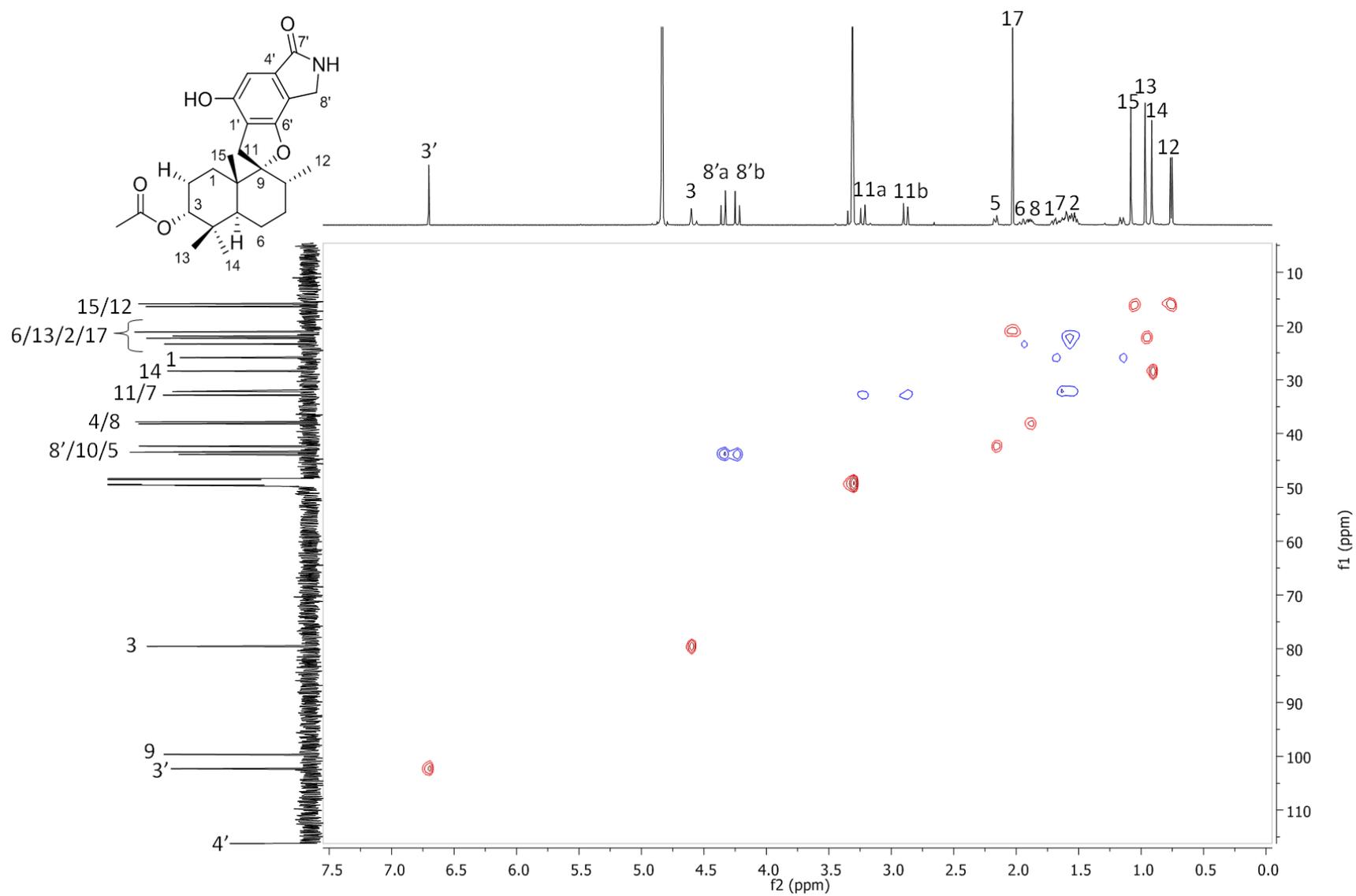


Figure 139. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de l'acétate de stachybotrylactame (Sc4).

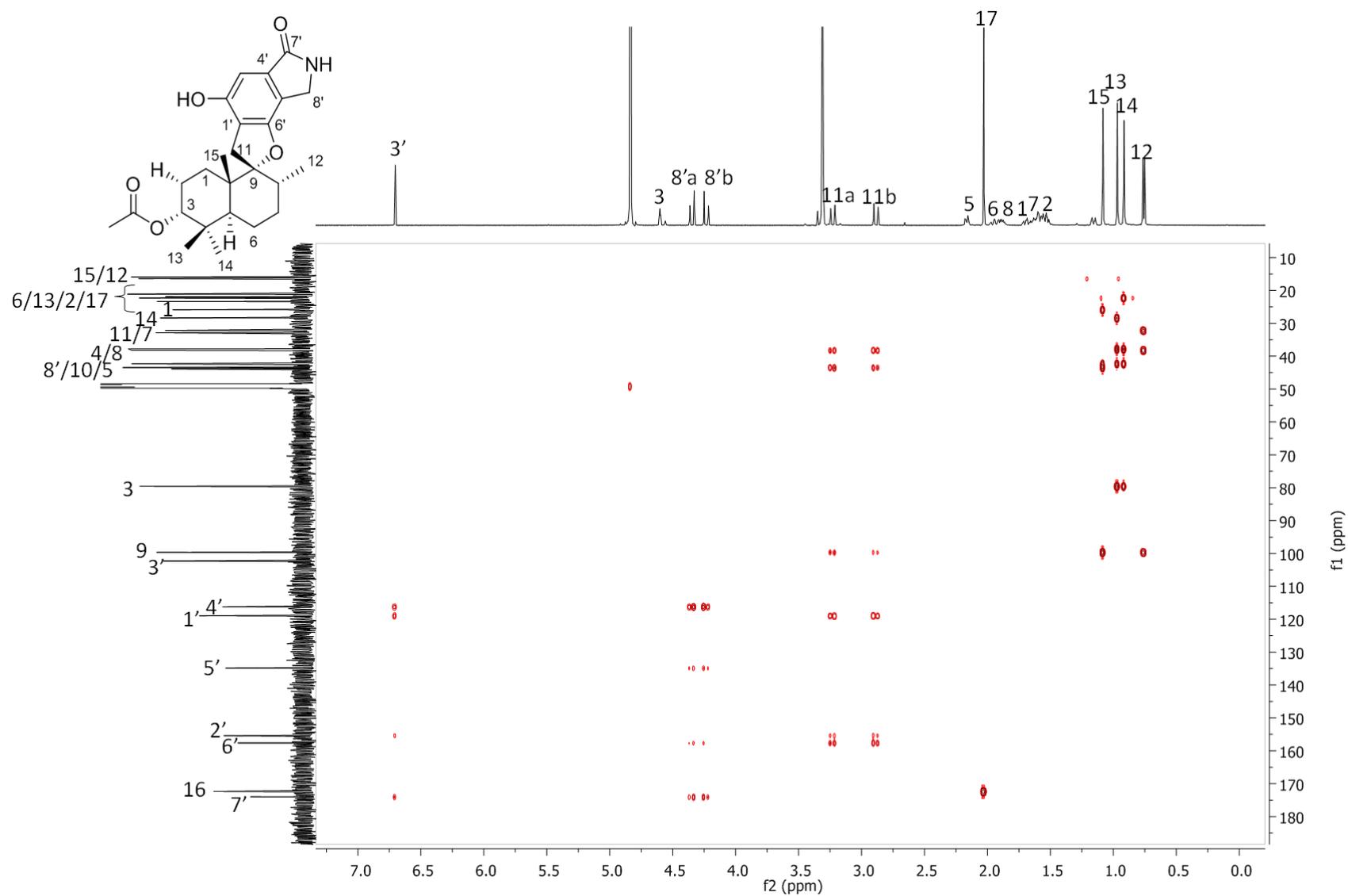


Figure 140. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de l'acétate de stachybotrylactame (Sc4).

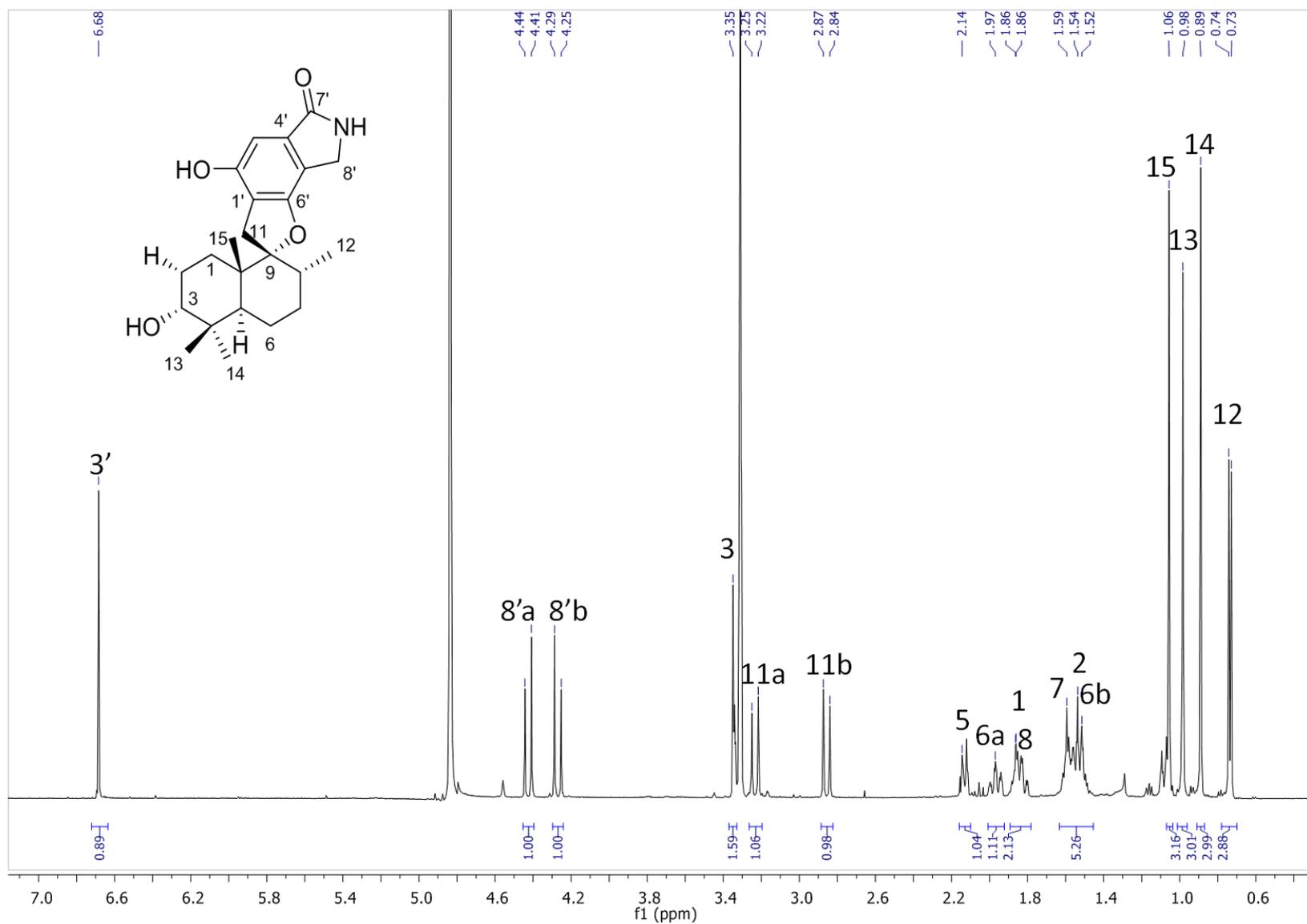


Figure 141. Spectre RMN ^1H (d_4 -MeOH, 500 MHz) de la stachybotrylactame (Sc5).

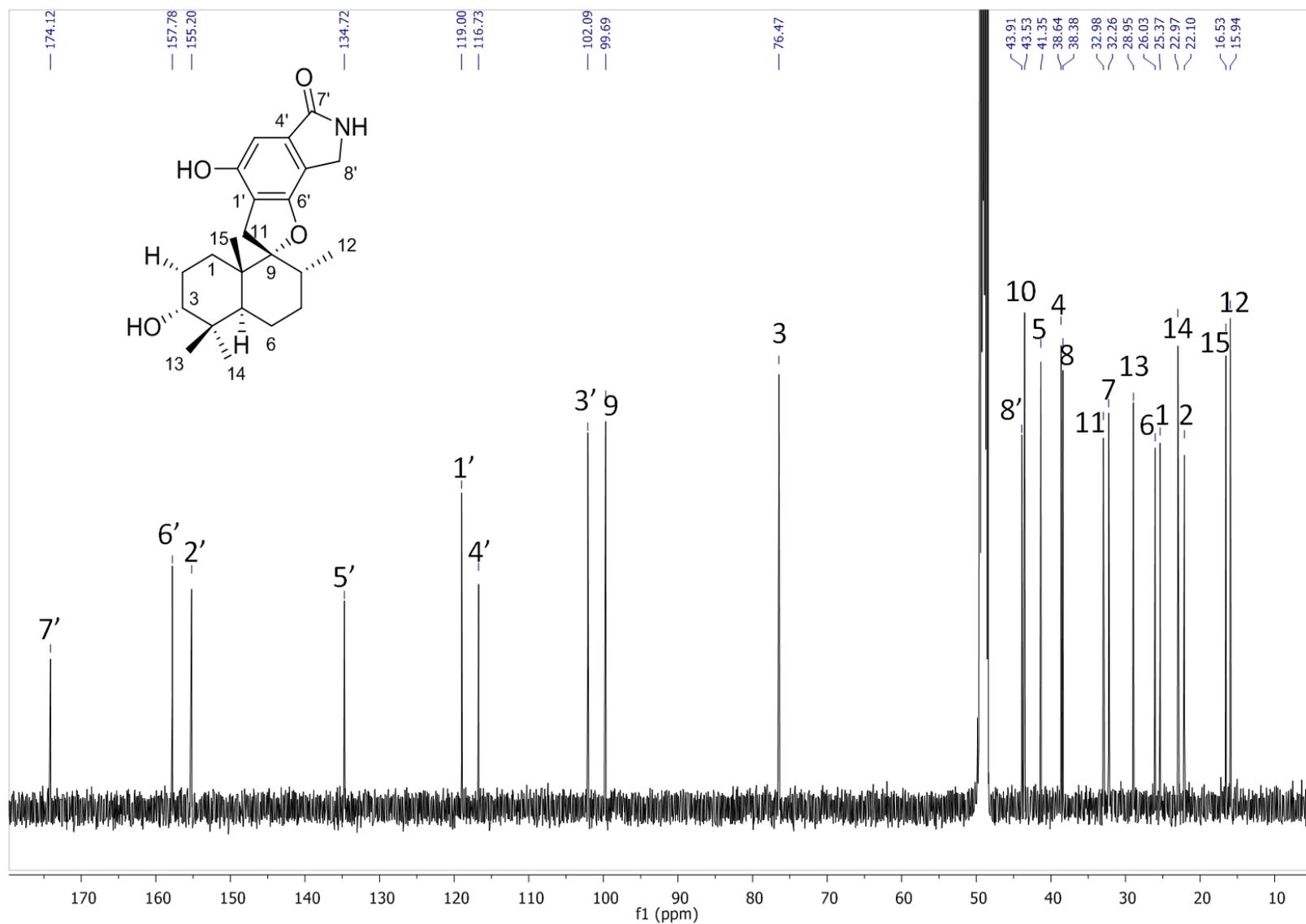


Figure 142. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la stachybotrylactame (Sc5).

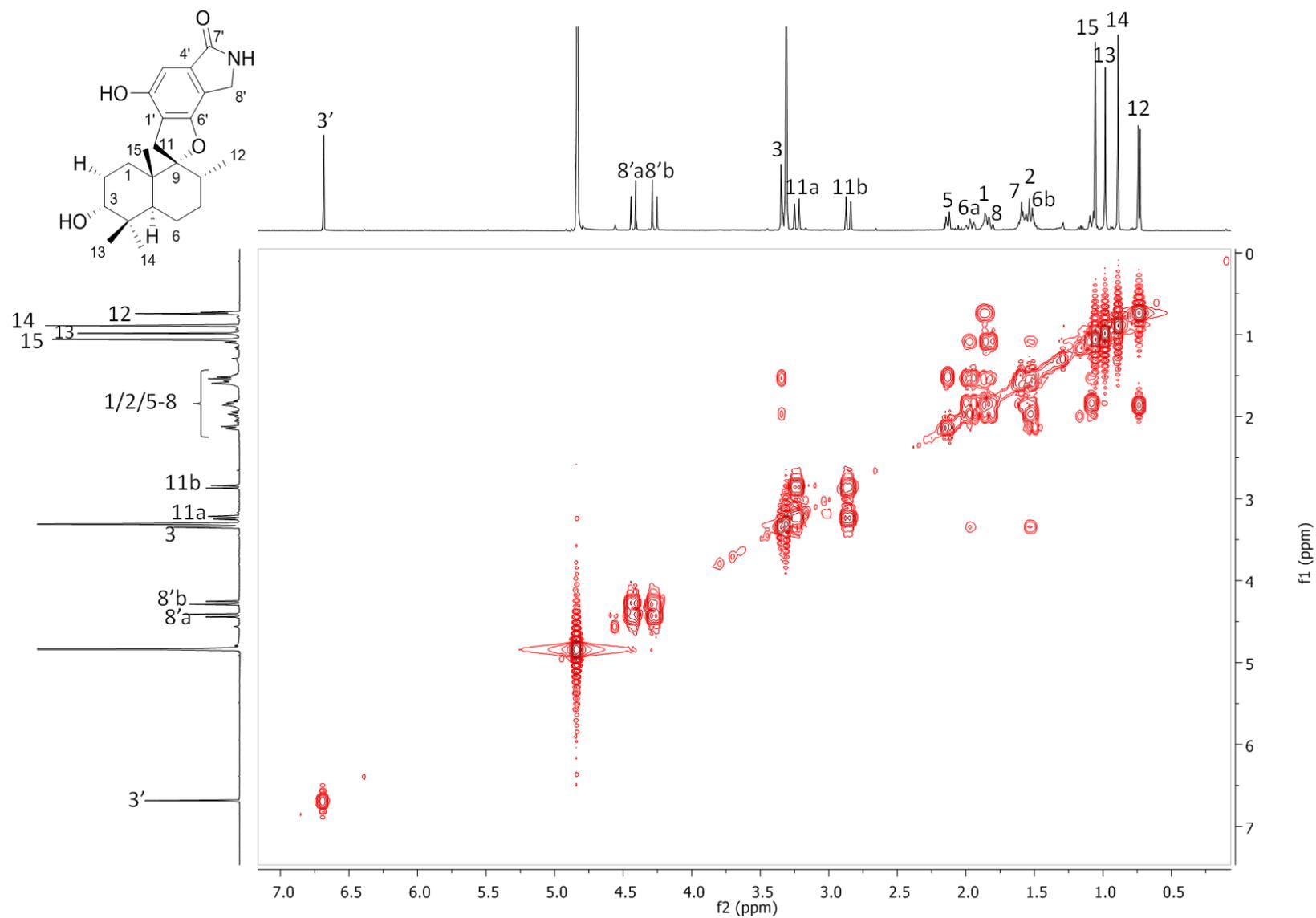


Figure 143. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la stachybotrylactame (Sc5).

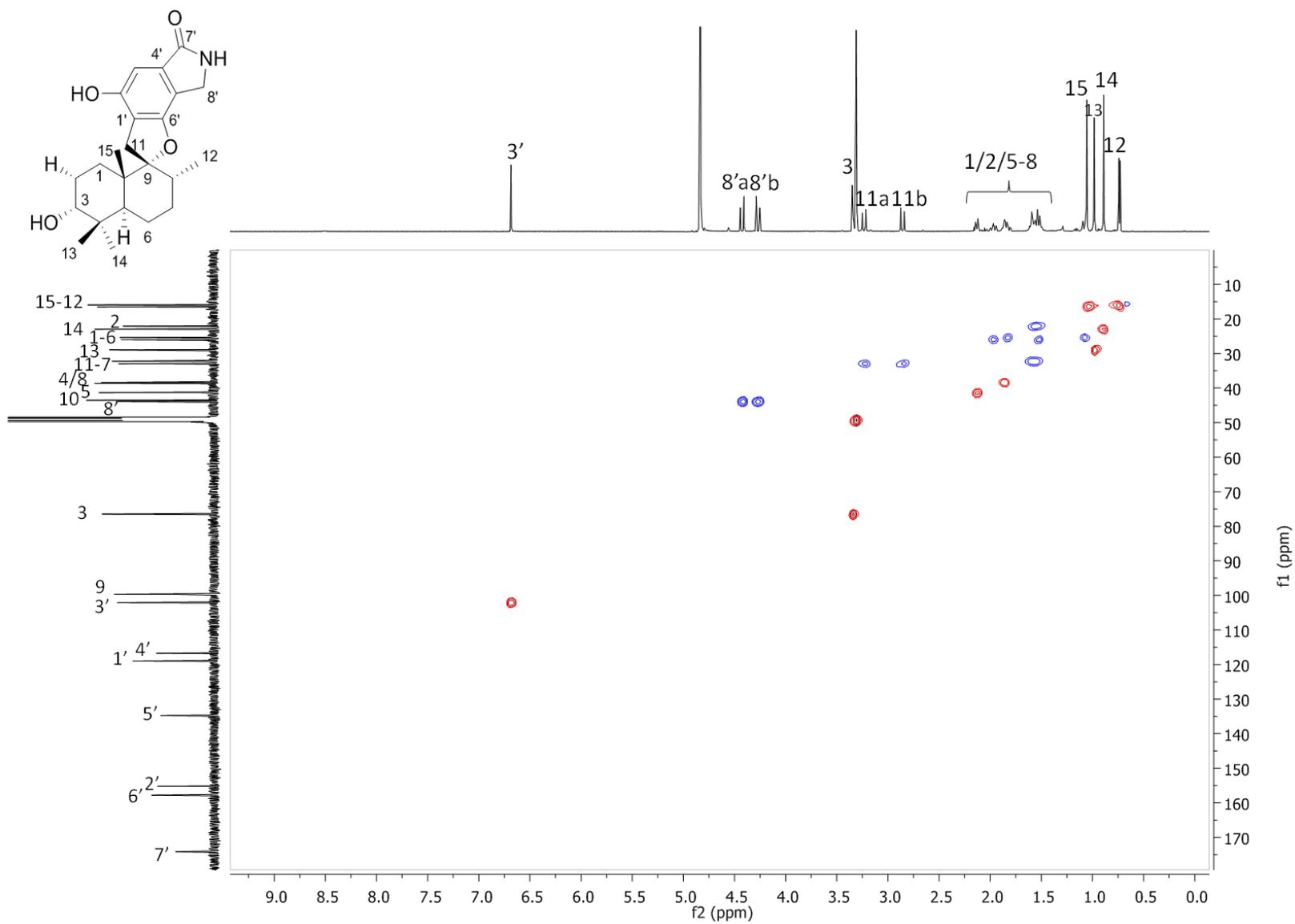


Figure 144. Spectre RMN HSQC ¹H-¹³C (*d*₄-MeOH, 500/125 MHz) de la stachybotrylactame (Sc5).

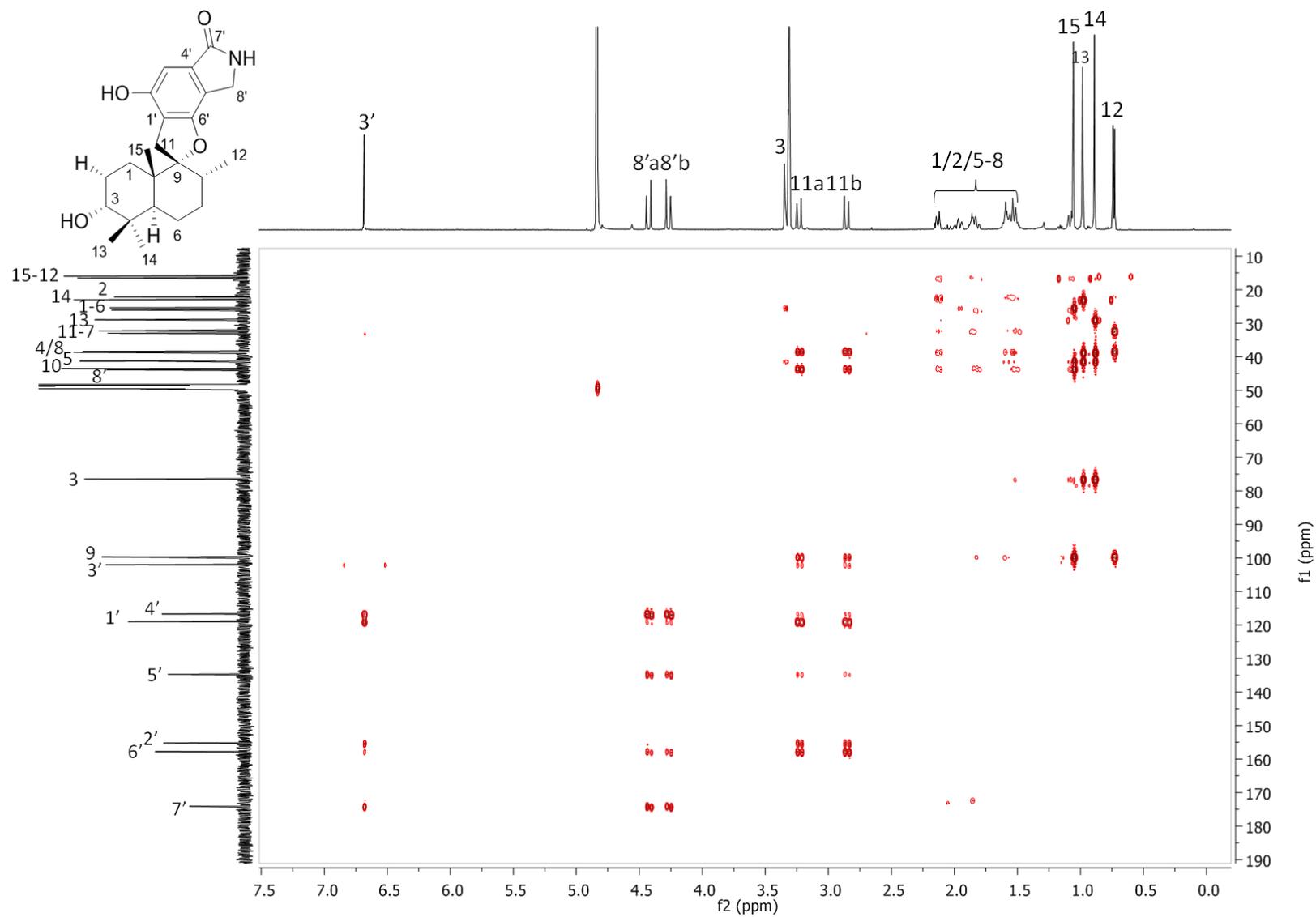


Figure 145. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la stachybotrylactame (Sc5).

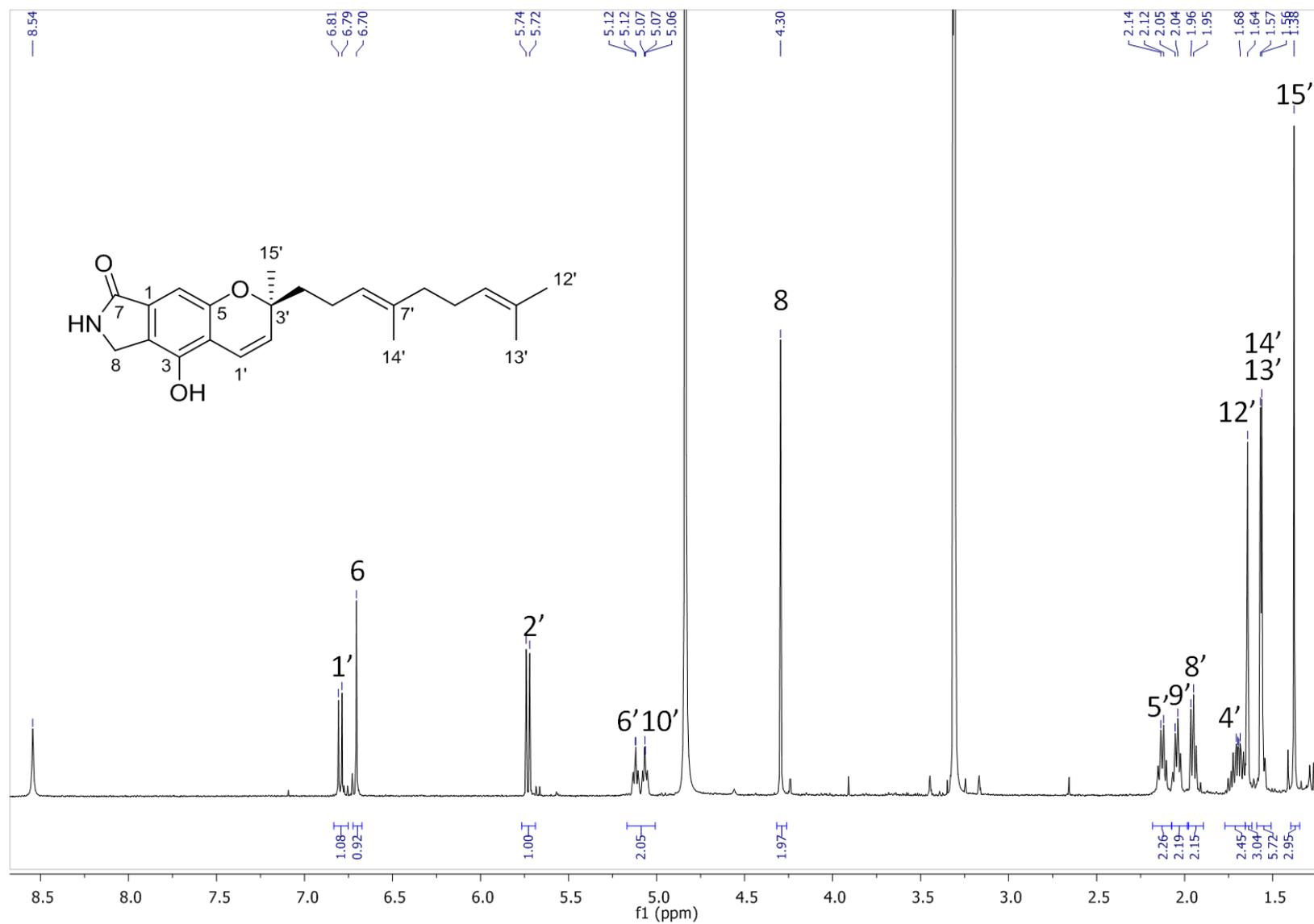


Figure 146. Spectre RMN ^1H (d_7 -MeOH, 500 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

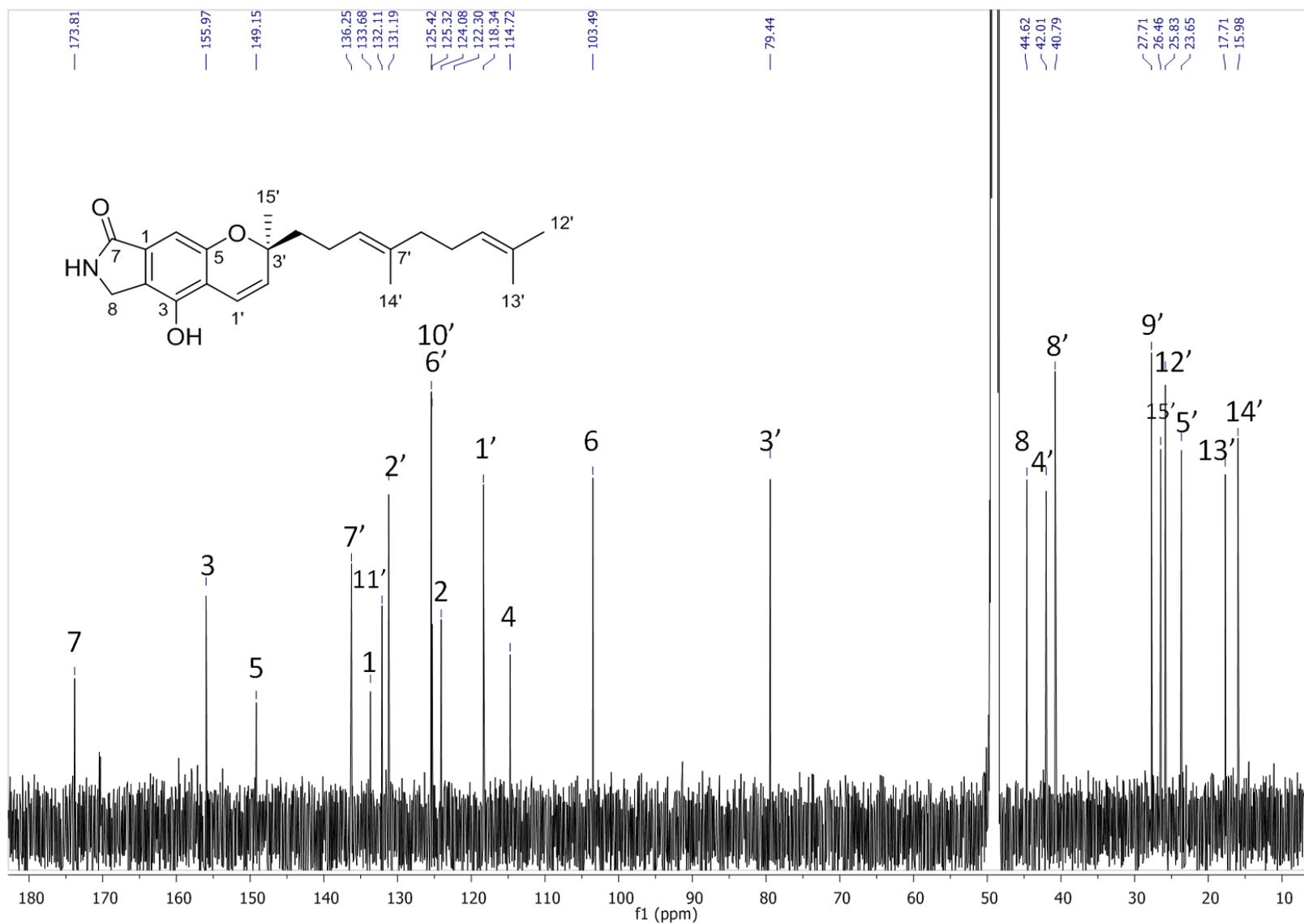


Figure 147. Spectre RMN ^{13}C (d_4 -MeOH, 125 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

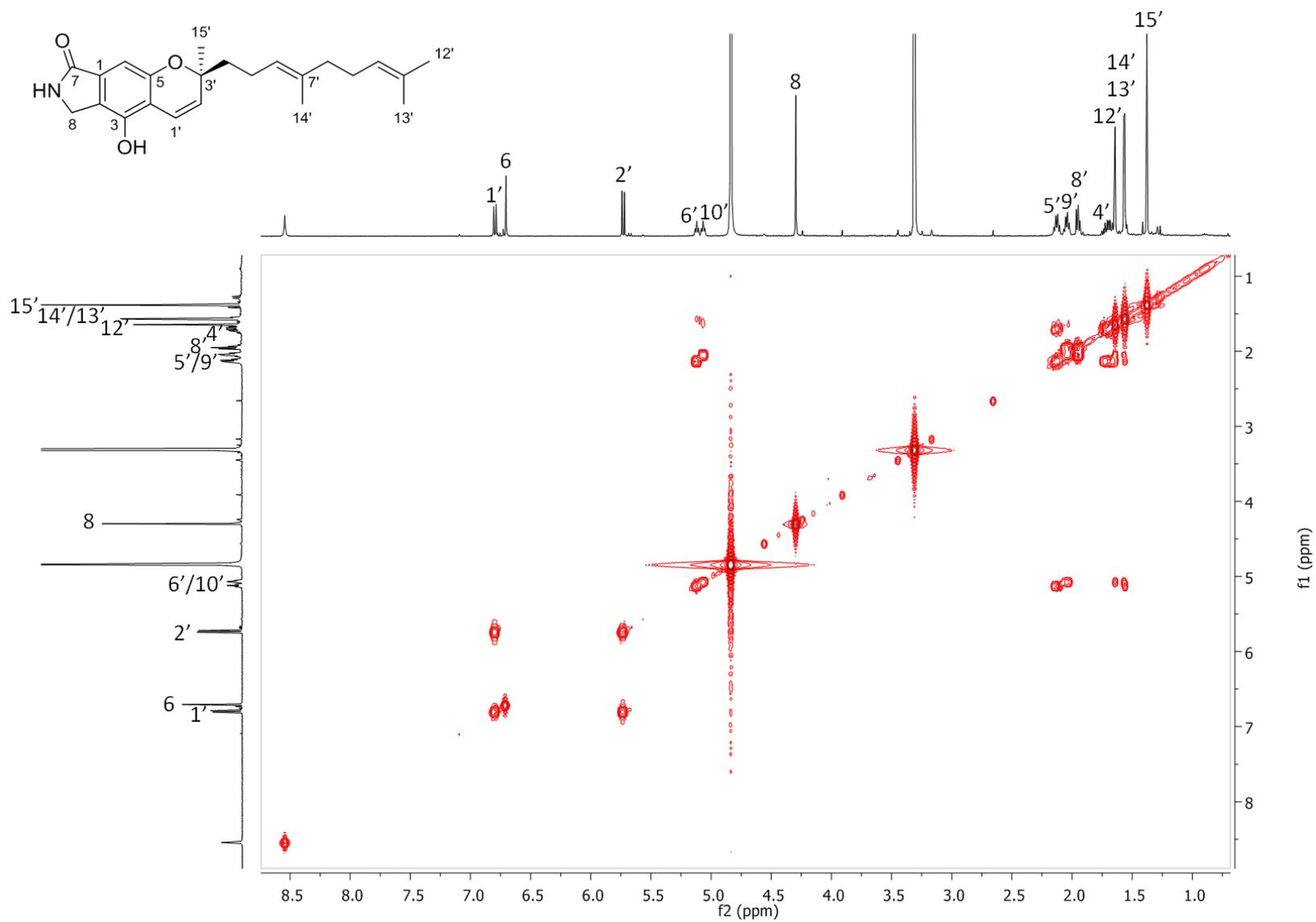


Figure 148. Spectre RMN COSY ^1H - ^1H (d_4 -MeOH, 500/500 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

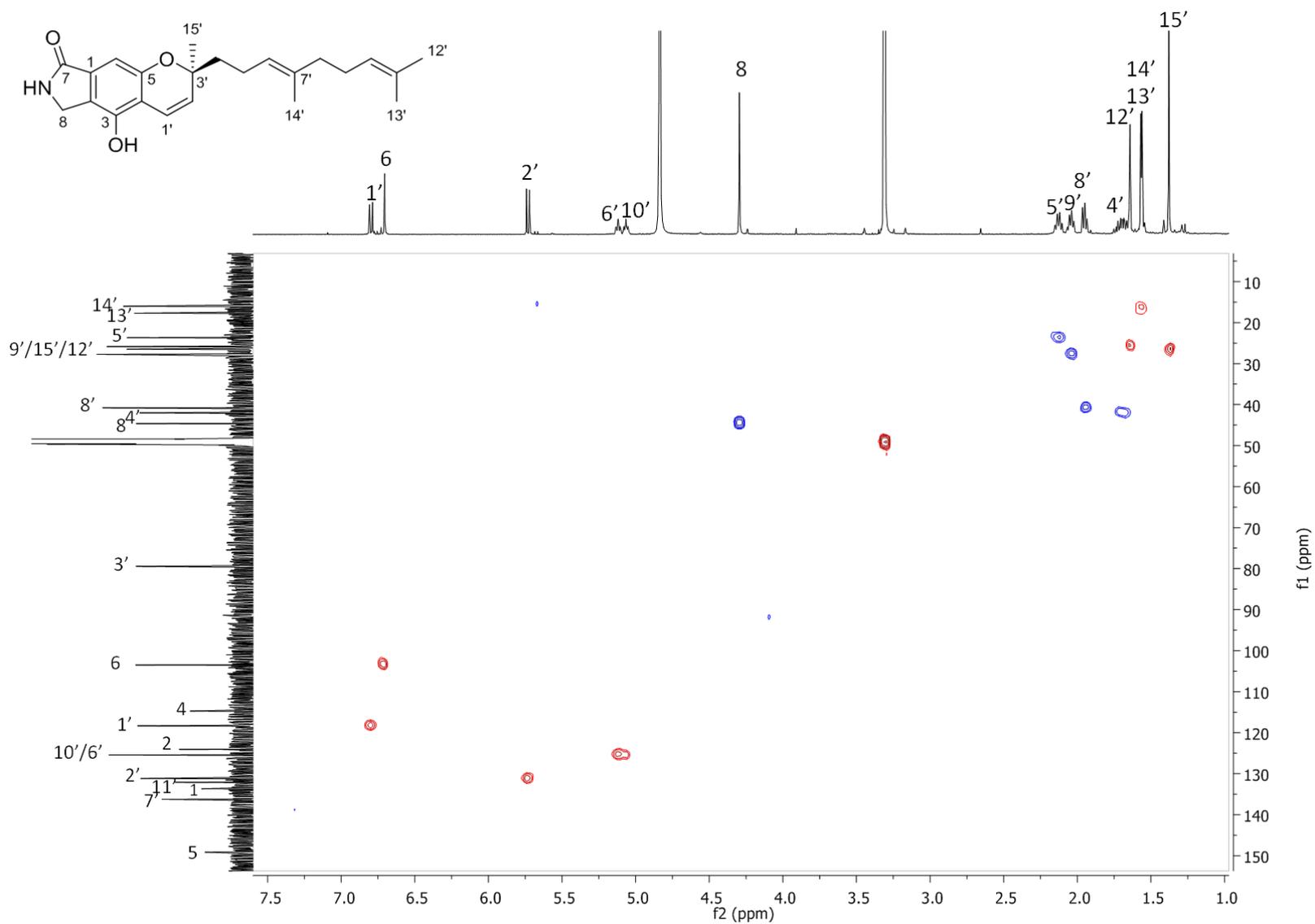


Figure 149. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C (*d*_r-MeOH, 500/125 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

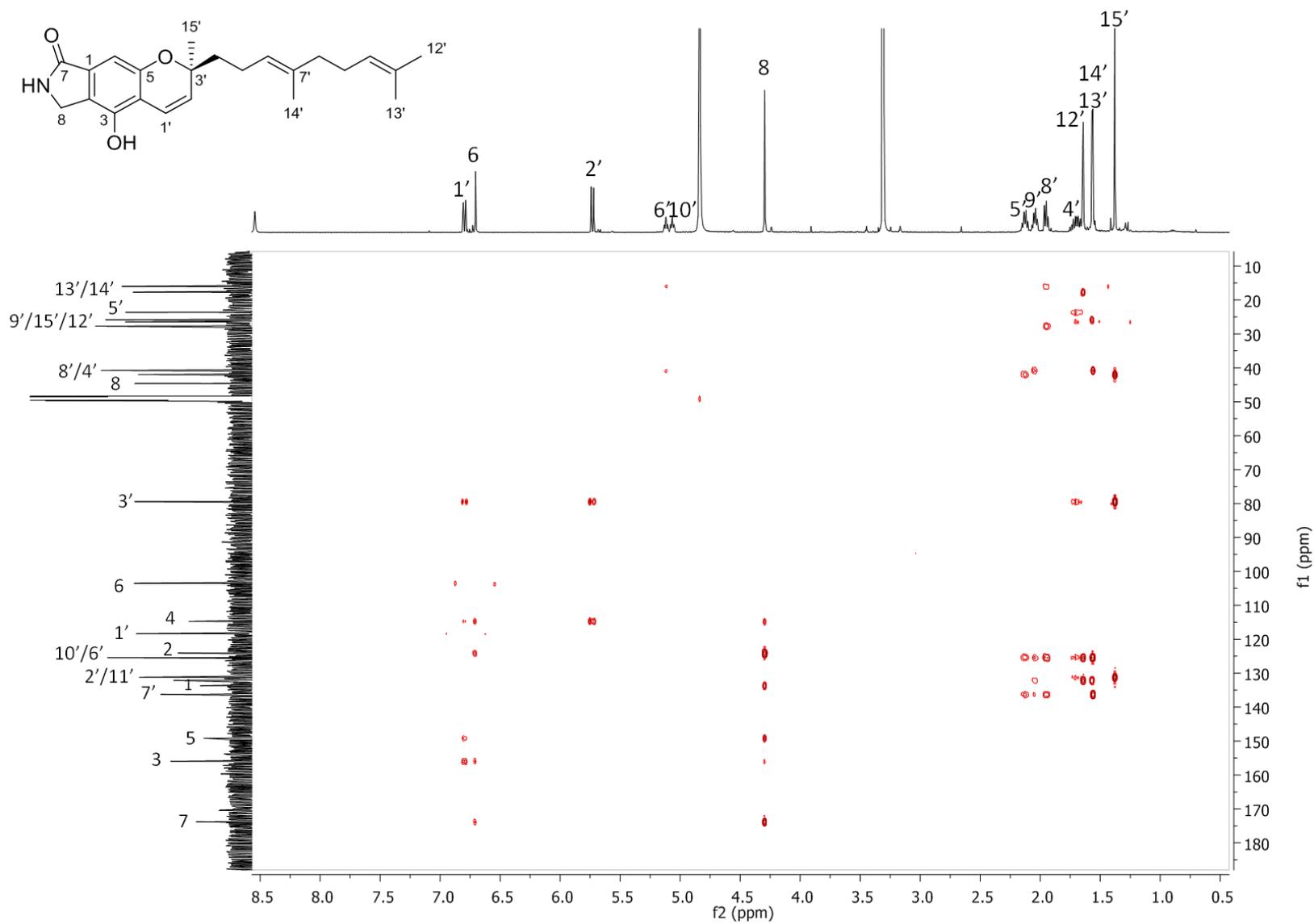


Figure 150. Spectre RMN HMBC ^1H - ^{13}C (d_4 -MeOH, 500/125 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

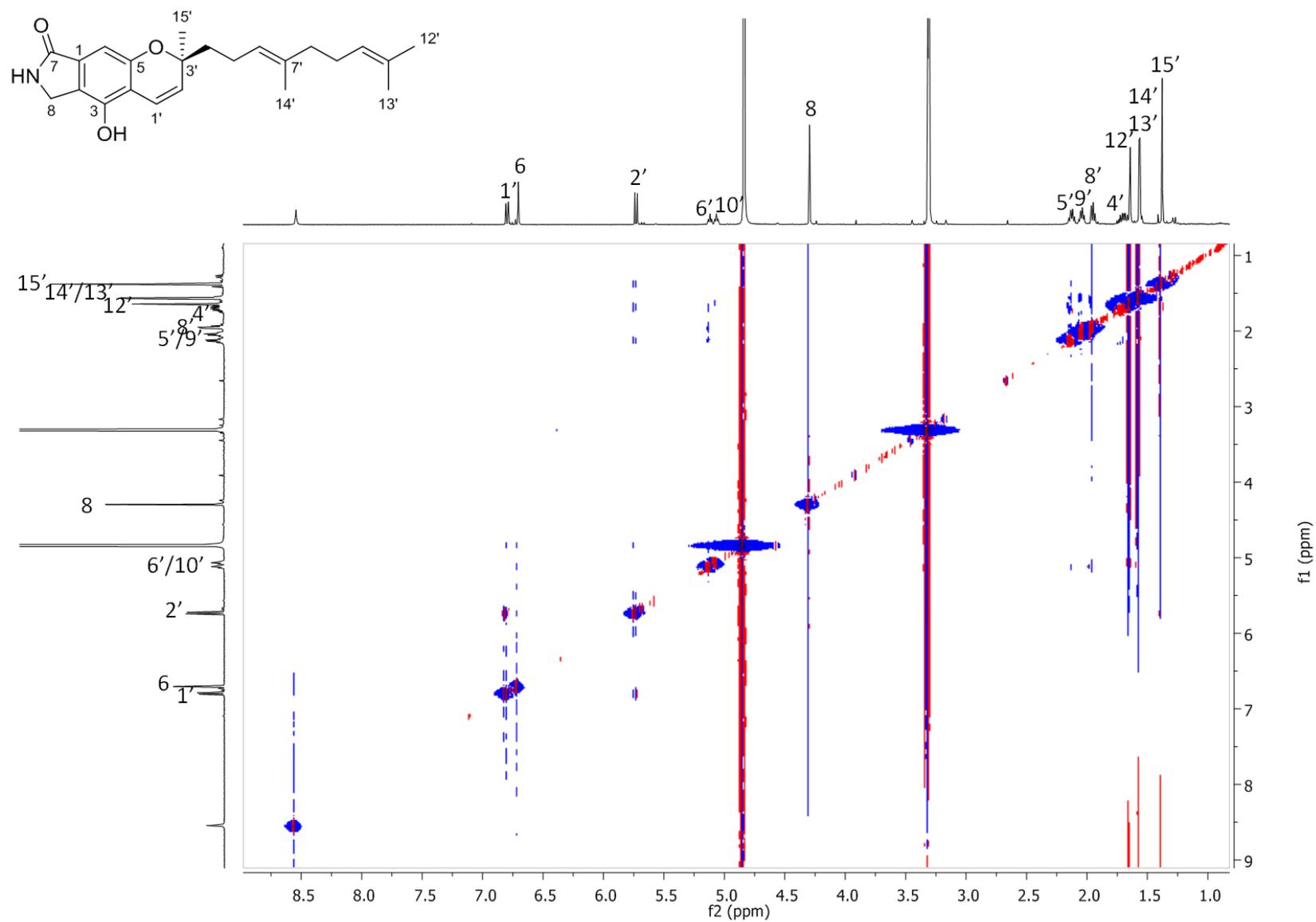


Figure 151. Spectre RMN NOESY ^1H - ^1H (d_r -MeOH, 500/125 MHz) de la *S*-chartarutine G (Sc6).

Publications



Review

Polycyclic Guanidine Alkaloids from Poecilosclerida Marine Sponges

Estelle Sfecci ¹, Thierry Lacour ², Philippe Amade ¹ and Mohamed Mehiri ^{1,*}

¹ Nice Institute of Chemistry, Marine Natural Product Team, University Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose, 28 avenue de Valrose, 06108 Nice Cedex 02, France; sfecci@unice.fr (E.S.); amade@unice.fr (P.A.)

² Biopreserv, 4 traverse Dupont, 06130 Grasse, France; tlacour@biopreserv.fr

* Correspondence: mehiri@unice.fr; Tel.: +33-492-076-154

Academic Editor: Kirsten Benkendorff

Received: 2 February 2016; Accepted: 1 April 2016; Published: 9 April 2016

Abstract: Sessile marine sponges provide an abundance of unique and diversified scaffolds. In particular, marine guanidine alkaloids display a very wide range of biological applications. A large number of cyclic guanidine alkaloids, including crambines, crambescins, crambescidins, batzelladines or netamins have been isolated from Poecilosclerida marine sponges. In this review, we will explore the chemodiversity of tri- and pentacyclic guanidine alkaloids. NMR and MS data tools will also be provided, and an overview of the wide range of bioactivities of crambescidins and batzelladines derivatives will be given.

Keywords: marine sponges; Poecilosclerida; alkaloids; crambescidins; batzelladines; analytical tools; bioactivity

1. Introduction

The most primitive benthic marine organisms are also among the most chemodiversified producers of secondary metabolites (SM). These compounds are used for predation and competition for space, as well as for communication, and protection against potential surrounding aggressors. Due to the high water dilution, the produced metabolites exhibit several potent biological activities [1]. Several reviews dealing with bioactive marine natural products, in particular, alkaloids have been published in the last few decades [2–19]. Of the many different marine species that have been researched, sponges are likely to be the most studied sources of marine natural products due to the large amount of structurally diverse SM scaffolds they produce. Even so, the last few years have seen a slight decline in the number of newly described metabolites [17,18].

In this review, we focused on the chemodiversity and biological activities of batzelladine- and crambescidin-like guanidine alkaloids isolated from Poecilosclerida marine sponges. These polycyclic guanidine alkaloids are extremely versatile SM [20]. Since their original isolation in 1989, several revisions have been made and many aspects remain to be studied. However, what is clear is that they seem to be specific to Poecilosclerida marine sponges. Over 53 derivatives have been isolated and their original structures, based on chemical degradation studies and extensive NMR and MS studies, have been revised since the development of their total synthesis. The structural and stereochemical complexity of this class of natural products have inspired the development of a number of new synthetic methodologies [21–34], which in turn has led to several total syntheses [31,33,35–50] beyond the scope of this review. Finally, these unique and fascinating structures are coupled with a wide range of biological activities due to the typical shape of their tricyclic skeleton. However, little is known about their exact mechanism of action.

2. Structural Diversity

From 1989 to 2015, 53 TGA (triazacenenaphthylene guanidine alkaloids) have been isolated. Natural TGA reported to date are listed in Tables 1 and 2.

Ptilomycalin A (1), isolated from the sponges *Ptilocaulis spiculifer* and *Hemimycale* sp. [51], is the parent member of a group of related metabolites. This includes crambescidins [52–55] and their derivatives (isocrambescidine (6) [52,56], crambidine (7) [52], neofolitispatas (8–10) [57], crambescidin acid (14) [58], crambescidic acid (15) [59], ptilomycalin D (17) [60], monanchocidins (18–22) [61,62], and monanchomycalins (23–25) [63,64]), which are found in several sponges (*Crambe crambe*, *Neofolitispa dianchora*, *Monanchora arbuscula*, *Monanchora unguiculata*, *Monanchora dianchora*, and *Monanchora pulchra*), as well as, for a subset, in the New Caledonian starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani* (Table 1) [65]. Additional guanidine derivatives have been isolated, such as the batzelladines A–E (26–30) from the Bahamian sponge *Batzella* sp. (which has since been revised to *Crambe crambe*) [66], batzelladines F–I (31–34) from the Jamaican sponge *Batzella* sp. [67], batzelladine J (51) from the Caribbean sponge *Monanchora unguifera* [59], and their derivatives (clathriadic acid (41) [68], merobatzelladines (42,43) [69], and batzellamide A (50) [70]) from *Monanchora unguifera*, *Clathria calla*, and *Monanchora arbuscula* (Table 2).

TGA are only found in Poecilosclerida marine sponges. To date, they have been only isolated from the Crambidae (*Crambe*, *Monanchora*), Mycalidae (*Arenochalina*, *Mycale*), Phoriospongidae (*Batzella*, *Hemimycale*), and Microcionidae (*Clathria*) families [71]. Sponges that produce TGA can be found in warm waters, without distinction between oceans and seas. A large majority were sampled in the Caribbean Sea (Figure 1).

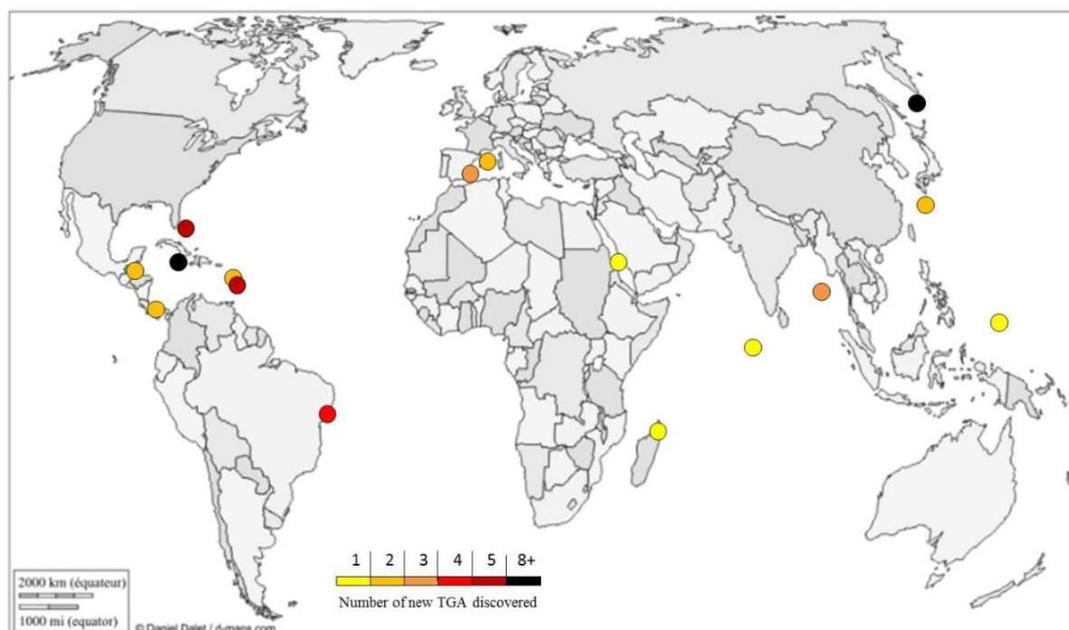


Figure 1. Geographical repartition of new TGA (triazacenenaphthylene guanidine alkaloids) discovered from 1989 to 2015. Graphic © d-maps.com [72]. Used with permission.

Table 1. Reviewed crambescidin-like GA (guanidine alkaloids) from 1989 to 2015.

Metabolite	Species	Sampling Site	Discovery Year	Guanidine Moiety	Biological Activity	Synthesis Described	Ref.
ptilomycalin A (1)	<i>Hemimycale</i> sp. <i>Ptilocaulis spiculifer</i>	Red sea	1989	1	Av, Am, At	Yes	[42,51,73]
crambescidin 800 (2)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av, Am, At	Yes	[54–56,73,74]
crambescidin 816 (3)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av, At, Ca ²⁺ antagonist	No	[52,55,56,75]
crambescidin 830 (4)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	n.t.	No	[55]
crambescidin 844 (5)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av	No	[55,56]
13,14,15-isocrambescidine 800 (6)	<i>Crambe crambe</i>	Banyuls, Mediterranean sea	1993	1	Not active	Yes	[36,42,56]
crambidine (7)	<i>Crambe crambe</i>	Banyuls, Mediterranean sea	1993	1	n.t.	Yes	[45,49,52]
neofolitispate 1 (8)	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Andaman Islands, Indian Ocean	1999	1	Av	No	[57]
neofolitispate 2 (9)	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Andaman Islands, Indian Ocean	1999	1	Av	Yes	[57]
neofolitispate 3 (10)	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Andaman Islands, Indian Ocean	1999	1	Av	No	[57]
crambescidin 359 (11)	<i>Monanchora unguiculata</i>	Belize, North Atlantic Ocean	2000	1	n.t.	Yes	[33,41,48,53]
crambescidin 431 (12)	<i>Monanchora unguiculata</i>	Belize, North Atlantic Ocean	2000	1	n.t.	No	[53]
crambescidin 826 (13)	<i>Monanchora</i> sp.	Palau, Pacific Ocean	2003	1	Av	No	[54]
crambescidin acid (14)	<i>Monanchora unguiculata</i>	Maldive Islands, Indian Ocean	2004	1	At	No	[58]
crambescidic acid (15)	<i>Monanchora unguifera</i> <i>Monanchora dianchora</i>	Panama, Caribbean side, Atlantic Ocean	2005	1	n.t.	No	[59]
16β-hydroxycrambescidin 359 (16)	<i>Monanchora unguifera</i>	Jamaica, North Atlantic Ocean	2007	1	Am	No	[73]
ptilomycalin D (17)	<i>Monanchora dianchora</i>	Madagascar, Indian Ocean	2007	1	n.t.	No	[60]
monanchocidin A (18)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2010	1	At	No	[61]
monanchocidin B (19)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2011	1	At	No	[62]
monanchocidin C (20)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2011	1	At	No	[62]
monanchocidin D (21)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2011	1	At	No	[62]
monanchocidin E (22)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2011	1	At	No	[62]
monanchomycalin A (23)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2012	1	At	No	[63]
monanchomycalin B (24)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2012	1	n.t.	No	[63]
monanchomycalin C (25)	<i>Monanchora pulchra</i>	Urup Island, North Pacific Ocean	2013	1	n.t.	No	[64]

Am, antimicrobial activity; Av, antiviral activity; At, antitumoral activity; and n.t., not tested.

Table 2. Reviewed batzelladine-like GA from 1989 to 2015.

Metabolites	Species	Sampling Site	Discovery Year	Guanidine Moiety	Biological Activities	Synthesis Described	Ref.
batzelladine A (26)	<i>Batzella</i> sp.	Bahamas, North Atlantic Ocean	1996	3	Am, Av	Yes	[32,46,66]
batzelladine B (27)	<i>Batzella</i> sp.	Bahamas, North Atlantic Ocean	1996	3	Av	No	[66]
batzelladine C (28)	<i>Batzella</i> sp.	Bahamas, North Atlantic Ocean	1996	2	Av, Am, At	No	[66,73]
batzelladine D (29)	<i>Batzella</i> sp.	Bahamas, North Atlantic Ocean	1996	2	Av, Am	Yes	[37,40,46,47,66]
batzelladine E (30)	<i>Batzella</i> sp.	Bahamas, North Atlantic Ocean	1996	2	n.t.	Yes	[35,66]
batzelladine F (31)	<i>Batzella</i> sp.	Jamaica, North Atlantic Ocean	1997	2	Am	Yes	[30,39,42,67]
batzelladine G (32)	<i>Batzella</i> sp.	Jamaica, North Atlantic Ocean	1997	2	Av	No	[67]
batzelladine H (33)	<i>Batzella</i> sp.	Jamaica, North Atlantic Ocean	1997	2	Av	No	[67]
batzelladine I (34)	<i>Batzella</i> sp.	Jamaica, North Atlantic Ocean	1997	2	Av	No	[67]
dehydrobatzelladine C (35)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Belize, North Atlantic Ocean	2000	2	Av, Am, At	Yes	[43,53,73]
batzelladine J (36)	<i>Monanchora unguifera</i>	Panama, North Atlantic Ocean	2005	3	n.t.	No	[59]
batzelladine K (37)	<i>Monanchora unguifera</i>	Jamaica, North Atlantic Ocean	2007	1	n.t.	No	[73]
batzelladine L (38)	<i>Monanchora unguifera</i>	Jamaica, North Atlantic Ocean	2007	2	Av, Am, At	No	[73]
batzelladine M (39)	<i>Monanchora unguifera</i>	Jamaica, North Atlantic Ocean	2007	2	Av, Am, At	No	[73]
batzelladine N (40)	<i>Monanchora unguifera</i>	Jamaica, North Atlantic Ocean	2007	2	Av, At	No	[73]
clathriadic acid (41)	<i>Clathria calla</i>	Martinique, North Atlantic Ocean	2009	1	Am	No	[68]
merobatzelladine A (42)	<i>Monanchora</i> sp.	Amami-Oshima Island, North Pacific Ocean	2009	1	Am	No	[50,69]
merobatzelladine B (43)	<i>Monanchora</i> sp.	Amami-Oshima Island, North Pacific Ocean	2009	1	Am	Yes	[69]
norbatzelladine A (44)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Guadeloupe Island, North Atlantic Ocean	2009	3	Am, At	No	[68]
norbatzelladine L (45)	<i>Clathria calla</i>	Martinique, North Atlantic Ocean	2009	2	Am, At	No	[68]
dinorbatzelladine A (46)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Guadeloupe island, North Atlantic Ocean	2009	3	Am, At	No	[68]
dinorbatzelladine B (47)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Guadeloupe island, North Atlantic Ocean	2009	3	n.t.	No	[68]
dinordehydrobatzelladine B (48)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Guadeloupe island, North Atlantic Ocean	2009	3	Am, At	No	[68]
dihomodehydrobatzelladine C (49)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Guadeloupe island, North Atlantic Ocean	2009	2	Am, At	No	[68]
batzellamide A (50)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Rio de Janeiro state, South Atlantic Ocean	2015	2	n.t.	No	[70]
hemibatzelladine J (51)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Rio de Janeiro state, South Atlantic Ocean	2015	2	n.t.	No	[70]
Δ^{19} -hemibatzelladine J (52)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Rio de Janeiro state, South Atlantic Ocean	2015	2	n.t.	No	[70]
Δ^{200} -hemibatzelladine J (53)	<i>Monanchora arbuscula</i>	Rio de Janeiro state, South Atlantic Ocean	2015	2	n.t.	No	[70]

Am, antimicrobial activity; Av, antiviral activity; At, antitumor activity; and n.t., not tested.

Since 1989, the number of new TGA discovered each year is considered as almost constant, although it should be noted that in some years no new TGA were described (Figure 2).

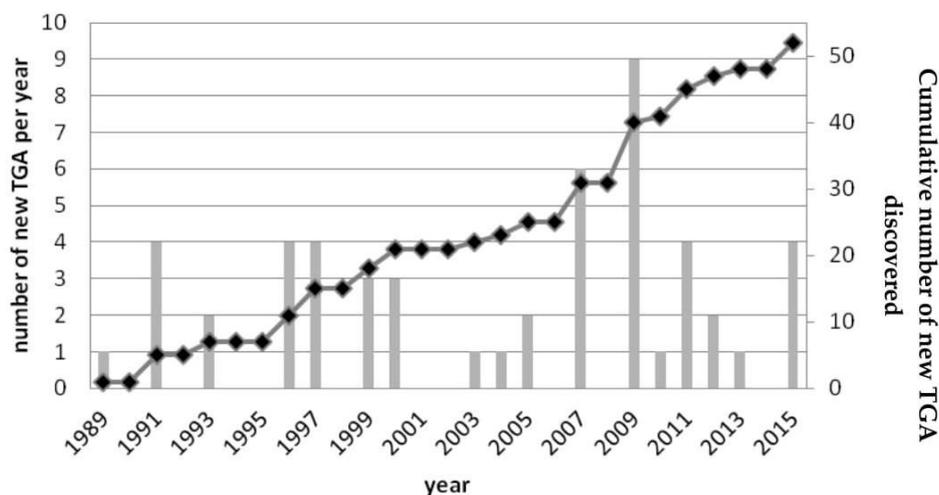


Figure 2. Number of new TGA discovered since 1989. The number of TGA discovered per year (grey bars) and the cumulative data representing the total number of TGA discovered (black curve) are presented from 1989 to 2015.

2.1. TGA Structures

Each TGA is structurally closely related to the others. Crambescidins-like GA differ from one another, by the C-8 spiro ring, the presence or absence of a hydroxyl group at C-13 or the nature of the side chain terminus at C-14.

The structures of 22 related crambescidin-like GA are summarized in Figure 3.

Other derivatives such as 13,14,15-isocrambescidin 800 (**6**), crambidin (**7**) or 16 β -hydroxycrambescidin 359 (**16**) have also been isolated (Figure 4).

A

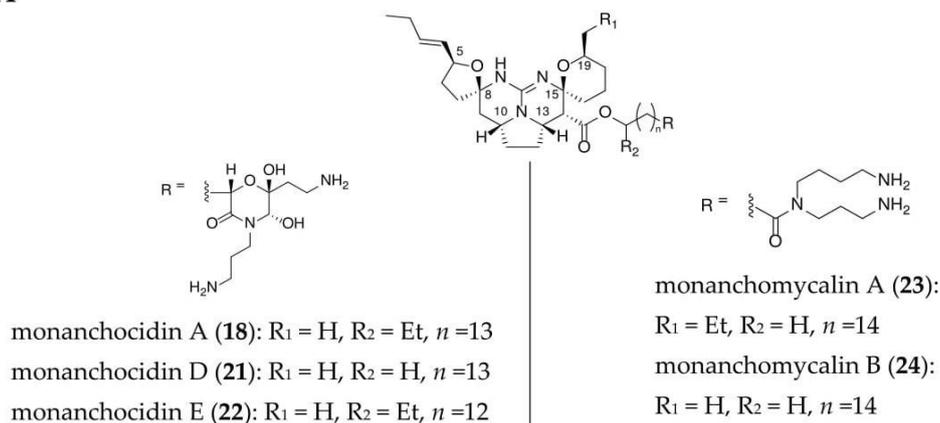
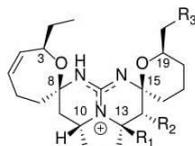
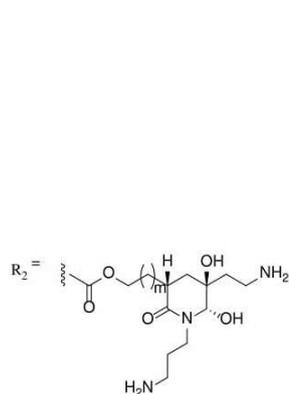


Figure 3. Cont.

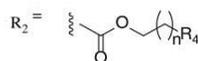
B



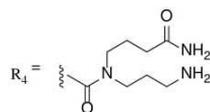
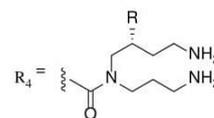
crambescidin 359 (**11**): $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 crambescidin 431 (**12**): $R_1 = R_3 = H, R_2 = COOEt$
 crambescidin acid (**14**): $R_1 = R_3 = H, R_2 = COOH$



monanchocidin B (**19**):
 $R_1 = R_3 = H, m = 13$
 monanchocidin C (**20**):
 $R_1 = R_3 = H, m = 14$



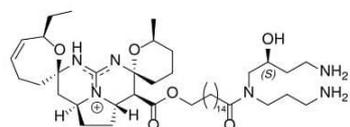
neofolitispate 1 (**8**): $R_1 = R_3 = H, R_4 = COOMe, n = 15$
 neofolitispate 2 (**9**): $R_1 = R_3 = H, R_4 = COOMe, n = 14$
 neofolitispate 3 (**10**): $R_1 = R_3 = H, R_4 = COOMe, n = 13$
 crambescidic acid (**15**): $R_1 = R_3 = H, R_4 = COOH, n = 14$
 ptilomycalin D (**17**): $R_1 = R_3 = H, R_4 = Me, n = 14$



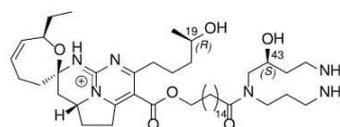
crambescidin 826 (**13**):
 $R_1 = R_3 = H, n = 16$

ptilomycalin A (**1**):
 $R_1 = R_3 = R = H, n = 14$
 crambescidin 800 (**2**):
 $R_1 = R_3 = H, R = OH, n = 14$
 crambescidin 816 (**3**):
 $R_1 = R = OH, R_3 = H, n = 14$
 crambescidin 830 (**4**):
 $R_1 = R = OH, R_3 = H, n = 15$
 crambescidin 844 (**5**):
 $R_1 = R = OH, R_3 = H, n = 16$
 monanchomycalin C (**25**):
 $R_1 = R = H, R_3 = Et, n = 14$

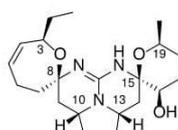
Figure 3. Related (A) C-8 cycloheptanic spiro ring and (B) C-8 cyclopentanic spiro ring crambescidin-like GA.



13,14,15-isocrambescidin 800 (**6**)



Crambidine (**7**)



16β-hydroxycrambescidin 359 (**16**)

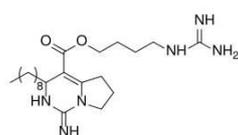
Figure 4. Non-related crambescidin-like GA.

Compared to crambescidin-like GA, batzelladines-like GA present more structural variations. Structurally, all of the batzelladines share a decahydro- or octahydro-5,6,8b-triazaacenaphthalene core with different degrees of oxidation. Batzelladines A–I (26–34) all possess at least one tricyclic guanidine core that contains either a *syn* or *anti* stereo relationship of the angular hydrogens that flank the pyrrolidine nitrogen [76]. To this, tricyclic guanidine core are connected, through an ester linkage, and additional guanidine fragments of varying complexity. Batzelladines F (31), G (32), and L (38) all possess an additional tricyclic hydroxy-guanidine fragment, while the simplest members of the family, batzelladines C (28), D (29), and E (30), possess a common 4-guanidino-butyl unit. The more complex batzelladines, A (26) and B (27), are attached to an analogue of crambescidin A (54) (Figure 5). Batzelladines F (31) and J (36) are composed of two 5,6,6a-triaza-acenaphthalene cores linked via an aliphatic chain.

The structures of several members of the batzelladines have been revised since their original isolation. The originally proposed structures were based on chemical degradation studies, NMR spectroscopy analysis (1D and 2D), and comparison of the data to previously reported polycyclic guanidine such as ptilomycalin A (1). Since the original isolation work, the structures of batzelladines A (26), D (29), E (30), and F (31) have all been revised to their current structures after their partial or total synthesis [27–30,35,39]. As a consequence of these reassignments, the relative stereochemistry of batzelladines G (32), H (33), and I (34) has been reexamined [30].

The current structures of 22 related batzelladine-like GA are summarized in Figure 6.

Other batzelladine-like GA have been isolated such as batzelladine C (28), K (37), and E (30); dehydrobatzelladine C (35); clathriadic acid (41); and batzellamide A (50) (Figure 7).



crambescidin A (54)

Figure 5. Crambescidin A (54).

A

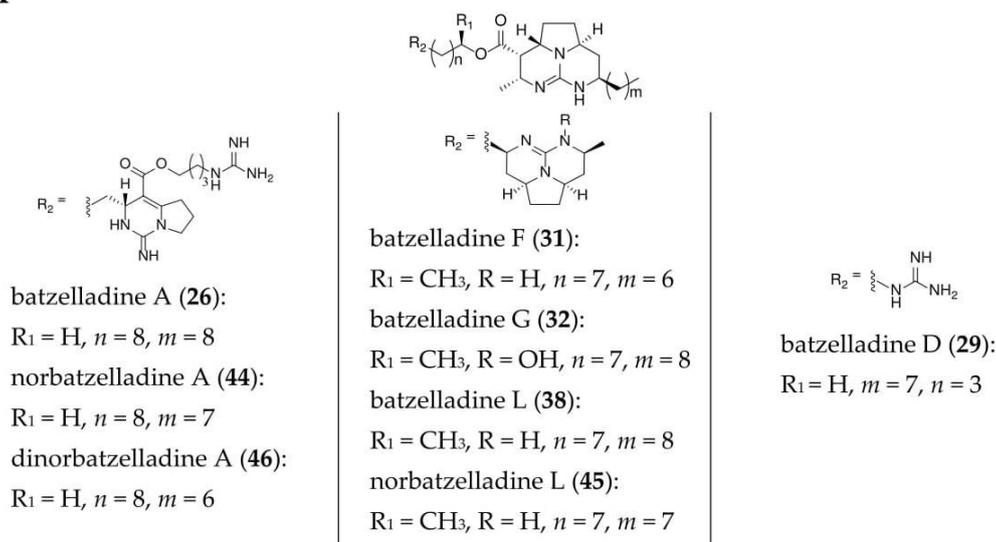


Figure 6. Cont.

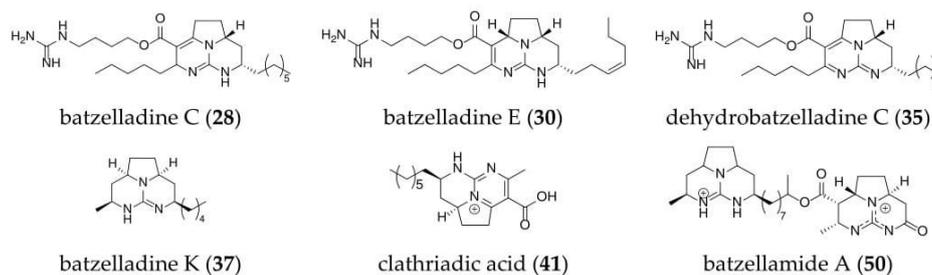


Figure 7. Unrelated batzelladine-like GA.

In summary, the structurally unique tricyclic guanidinium ring system (hydro-5,6-triazaacenaphthalene) that defines this class of natural products can be found in over 53 different alkaloids. While each of these natural products share this common structural motif, the substituents around the tricyclic core of these molecules leads to a significant structural diversity, which relate to a wide-range of biological properties. For instance, a large number of these molecules including batzelladine F (31) and ptilomycalin A (1) feature esters that tether the tricyclic core to a diverse array of different functional groups, including other tricyclic guanidine subunits. The other area of structural diversity within this family of alkaloids is both the C1 and the C8 alkyl chains, which vary in terms of length, units of unsaturation, and oxidation. Remote oxidation of the alkyl branches is characteristic of the crambescidin alkaloids, including ptilomycalin A (1) and crambescidin 359 (11), which feature two spirocyclic hemiaminals as well as the tricyclic guanidine framework. In addition to structural diversity, batzelladines-like GA and crambescidins-like GA alkaloids feature different stereochemical configurations of the tricyclic core. Both the *trans*- and *cis*-configurations of the pyrrolidine subunit have been reported in this class of natural products. Batzelladine F (31) highlights this stereochemical diversity as it contains two distinct tricyclic guanidine subunits, with each featuring one of the pyrrolidine configurations. The stereochemical diversity is generally limited to the configuration of the pyrrolidine unit, as all of the alkaloids in this class feature a *trans* relationship between the C4 (and/or C6) proton and the C1 (and/or C8) alkyl chain, with the exception of merobatzelladines A (42) and B (43). Both natural products feature a *cis* relationship between the C6 proton and the C8 alkyl chain.

2.2. TGA Classification

Different guanidine alkaloids classifications can be made, and, as such, Santos *et al.* (2015) have described four GA chemotypes [70]. The first class is constituted of a monocyclic pyrimidinamine skeleton, for example, crambescin C1 (55) or the bicyclic cyclopentapyrimidinamine skeleton, such as crambine A (56) (Figure 8). The second one is a tricyclic triazaacenaphthylene skeleton, which only contains one guanidine moiety like crambescidins, and the third one possess the same skeleton as for class 2, but contains, at least, one more guanidine moiety, as can be seen in the case of most batzelladines. The fourth one is a tricyclic cyclopentaquinazolinamine skeleton like netamine M (57) or ptilocaulin (58).

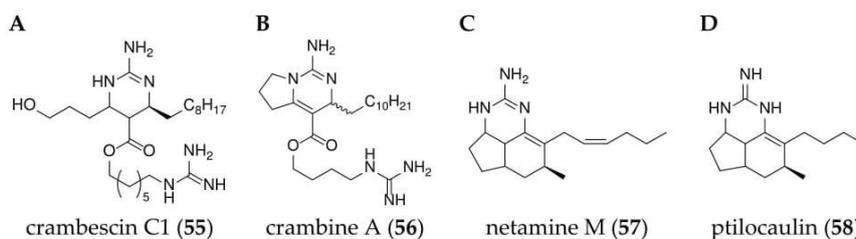


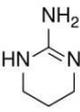
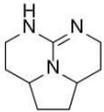
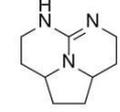
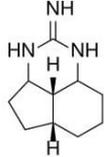
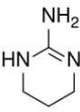
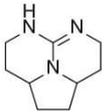
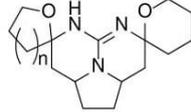
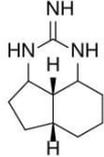
Figure 8. (A) Crambescin C1 (55); (B) crambine A (56); (C) netamine M (57); and (D) ptilocaulin (58).

Another classification can be made with the same first, second and fourth classes, and a modified third class describing pentacyclic triazaacenaphthylene skeletons like crambescidins (1–25) (Table 3).

Without taking into account any genus revision made, some observations may be outlined. According to the data reported, *Monanchora* is the most studied genus (Tables 1 and 2). Some species seem to produce both the crambescidins and batzelladines classes as is illustrated with *Monanchora unguifera*, which produces 16 β -hydroxycrambescidin (16), crambescidic acid (15) and batzelladines J–L (36–38) (Tables 1 and 2). Other genera seem to produce only one TGA family. For example, to date, *Batzella* sp. was only shown to produce batzelladines A–I (26–34).

Interestingly, a chemotaxonomic study suggested that the biogenetically related guanidine alkaloids isolated from *Crambe crambe*, *Monanchora arbuscula*, *Ptilocaulis spiculifer*, and *Hemimycale* sp., should eventually be united in a single genus, preferentially *Crambe* [53].

Table 3. GA classes.

No	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	Ref.
1			 +1 or more guanidine moiety		[70]
Sponges *	<i>Batzella</i> <i>Crambe</i> <i>Pseudaxinella</i> (<i>Ptilocaulis</i>)	<i>Clathria</i> <i>Crambe</i> <i>Hemimycale</i> <i>Monanchora</i> <i>Neofolitispa</i> <i>Ptilocaulis</i>	<i>Batzella</i> <i>Monanchora</i>	<i>Acanthella</i> <i>Arenochalina</i> <i>Batzella</i> <i>Biemna</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i> <i>Ptilocaulis</i>	-
2			 $n = 1$ or 3		-
Sponges *	<i>Batzella</i> <i>Crambe</i> <i>Pseudaxinella</i> (<i>Ptilocaulis</i>)	<i>Batzella</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i>	<i>Crambe</i> <i>Hemimycale</i> <i>Monanchora</i> <i>Neofolitispa</i> <i>Ptilocaulis</i>	<i>Acanthella</i> <i>Arenochalina</i> <i>Batzella</i> <i>Biemna</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i> <i>Ptilocaulis</i>	-

* Sponges without any genus revision made.

2.3. Analytical Tools for TGA Structural Analysis

TGA structural determinations have been accomplished based on extensive NMR (1D and 2D) and MS analyses, and chemical degradation.

The following section is a guideline for the structure determination of crambescidin- or batzelladine-like GA derivatives by their characteristic fragments via the use of NMR and MS analyses.

2.3.1. NMR Spectroscopy

TGA NMR spectra have a high content of information. Due to the relative signal richness, the ^1H - ^1H COSY experiment is appropriate in helping to find whether one or another TGA class is present

by analyzing the NMR spectra between 0.8 and 5 ppm. Nonetheless, several characteristic signals from different atoms listed below (Figure 9) should be found in the ^1H NMR spectra (Table 4).

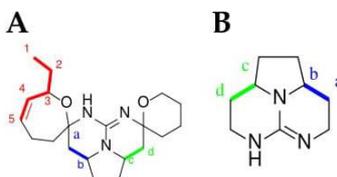


Figure 9. Current numbering scheme for: (A) C-8 cycloheptanic spiro ring crambescidin-like GA; and (B) batzelladine-like GA.

Table 4. Characteristic TGA signals.

Atom Number	Crambescidin-Like GA Signals	Batzelladine-Like GA Signals
H _a *	dd from 2.8 to 2.5 ppm	m from 2.8 to 2.5 ppm
H _b *	m from 4.6 to 3.9 ppm	m from 4.6 to 3.9 ppm
H _c *	dt toward 4.3 ppm	m toward 4.3 ppm
H _d *	d from 3.5 to 2.9 ppm	dd from 3.5 to 2.9 ppm
H ₄ * et H ₅ * double bond	2 m toward 5.5 ppm	No signal

*: for a, b, c, d, 4 and 5 attributions, see above; d, doublet; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; m, multiplet.

Crambescidin Case: Ptilomycalin A (1)

As an example, we choose ptilomycalin A (1), which is part of the pentacyclic TGA class.

First of all, the H₁ signal (triplet) and the H₄ and H₅ signals of the double bond are very characteristic. There are also clear correlations from H₁ to H₅, and finally, the NMR chemical shifts of H_a, H_b, H_c, and H_d are also very characteristic within the crambescidin family (Figure 10) (Table 4).

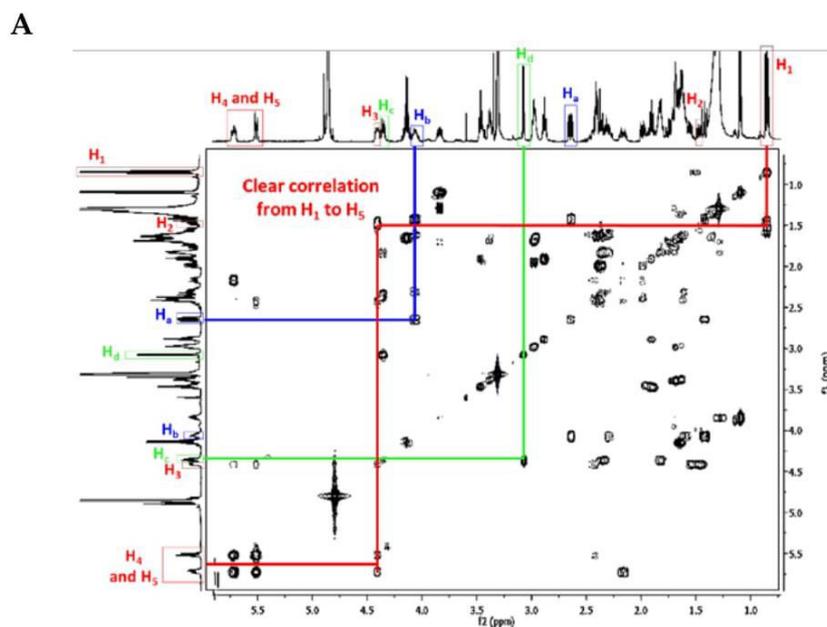


Figure 10. Cont.

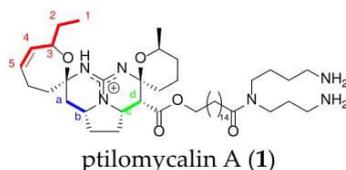
B

Figure 10. (A) Ptilomycalin A (1) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum in CD_3OD (personal data); and (B) labeled ptilomycalin A (1).

Batzelladine Case: Batzelladine F (31)

In general, all the NMR signals reported in Table 4 are more shielded in batzelladines than in crambescidins. Moreover, the NMR spectra are more complex and are often different since the guanidinium core can be once or more dehydrogenated.

Within the tricyclic TGA class 2, we used the example of batzelladine F (31).

The major difference between batzelladine F and ptilomycalin A spectra is the absence of the signals for the protons H_4 and H_5 , and the corresponding correlation. On the other hand, two correlations are very characteristic within batzelladines: H_a with H_b , and H_c with H_d (Figure 11).

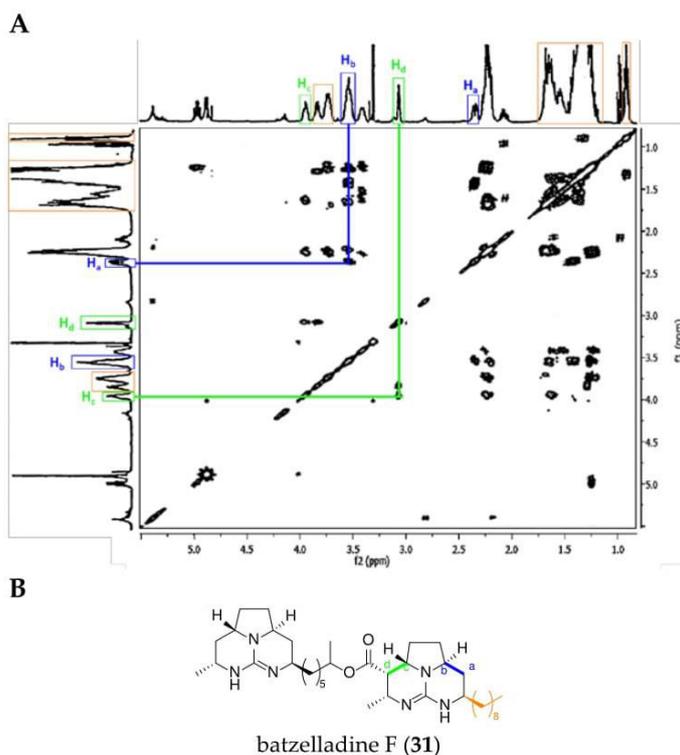


Figure 11. (A) Batzelladine F (31) ^1H - ^1H COSY NMR spectrum in CD_3OD (adapted from Patil *et al.* [67]); and (B) labeled batzelladine F (31).

2.3.2. Mass Spectrometry

Several TGA were detected by positive electrospray mass spectrometry ionization studies. Usually, authors notify the TGA quasi-molecular ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ with the exception of batzelladines M (39) and N (40), which were detected through their discharged ion $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ [73]. On the other hand, both quasi-molecular and discharged ions were observed for batzelladine L (38) and monanchomycalin C (25). Mass spectrometry data for TGA are summarized in Table 5.

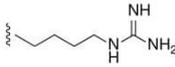
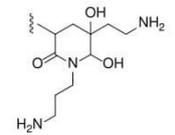
Table 5. TGA Mass Spectrometry (MS) data.

Metabolites	<i>m/z</i> ([M + H] ⁺ Unless Specified) and Δppm Found	Ref.
ptilomyalin A (1)	977.7915 (1.0 mmu) for the bis(trifluoroacetyl) derivative	[51]
crambescidin 800 (2)	801.6205 (1.3 mmu)	[55]
crambescidin 816 (3)	817.6151 (1.6 mmu)	[55]
crambescidin 830 (4)	831.6300 (2.3 mmu)	[55]
crambescidin 844 (5)	845.6471 (0.9 mmu)	[55]
13, 14, 15 -isocrambescidine 800 (6)	927.6521 (1.3 mmu) for the acetylated compound	[52]
crambidine (7)	967.6415 (6.8 mmu) for the acetylated compound	[52]
neofolitispate 1 (8)	686 (no HRMS data)	[57]
neofolitispate 2 (9)	672 (no HRMS data)	[57]
neofolitispate 3 (10)	658 (no HRMS data)	[57]
crambescidin 359 (11)	359.2567 (0.6 mmu)	[53]
crambescidin 431 (12)	431.2780 (0.4 mmu)	[53]
crambescidin 826 (13)	827.6389 (1.5 mmu)	[54]
crambescidin acid (14)	404.2541 (2.2 mmu)	[58]
crambescidic acid (15)	658.4781 (1.4 mmu)	[59]
16β-hydroxycrambescidin 359 (16)	376.2617 (1.7 mmu)	[73]
ptilomyalin D (17)	627.4994 *	[60]
monanchocidin (A) (18)	859.6267 (3.0 mmu)	[61]
monanchocidin B (19)	831.5978 (3.4 mmu)	[62]
monanchocidin C (20)	845.6150 (4.0 mmu)	[62]
monanchocidin D (21)	831.5920 (3.4 mmu)	[62]
monanchocidin E (22)	845.6120 (1.0 mmu)	[62]
monanchomycalin A (23)	813.6574 (0.2 mmu)	[63]
monanchomycalin B (24)	785.6259 (0.4 mmu)	[63]
monanchomycalin C (25)	813.6578 (0.3 mmu) and [M + 2H] ²⁺ 407.3336 (0.7 mmu)	[64]
batzelladine A (26)	768.5839 (2.4 mmu)	[66]
batzelladine B (27)	738.5356 (3.8 mmu)	[66]
batzelladine C (28)	489.3903 (1.4 mmu)	[66]
batzelladine D (29)	463.3740 **	[66]
batzelladine E (30)	487.3728 (3.2 mmu)	[66]
batzelladine F (31)	624.5096 (0.6 mmu)	[67]
batzelladine G (32)	668.5353 (1.3 mmu)	[67]
batzelladine H (33)	609.4488 (0.4 mmu)	[67]
batzelladine I (34)		[67]
dehydrobatzelladine C (35)	487.3711 (4.9 mmu)	[53]
batzelladine J (36)	750.5361 (3.3 mmu)	[59]
batzelladine K (37)	250.2322 (3.9 mmu)	[73]
batzelladine L (38)	653.5458 (2.4 mmu) and [M + 2H] ²⁺ 327.2798 (1.8 mmu)	[73]
batzelladine M (39)	[M + 2H] ²⁺ 298.2399 (1.0 mmu)	[73]
batzelladine N (40)	[M + 2H] ²⁺ 312.2546 (1.0 mmu)	[73]
clathriadic acid (41)	318.2173 (1.0 mmu)	[68]
merobatzelladine A (42)	360.3444 (6.6 mmu)	[69]
merobatzelladine B (43)	306.2909 (7.0 mmu)	[69]
norbatzelladine A (44)	754.5705 (0.7 mmu)	[68]
norbatzelladine L (45)	639.5327 (0.3 mmu)	[68]
dinorbatzelladine A (46)	740.5547 (0.9 mmu)	[68]
dinorbatzelladine B (47)	710.5074 (1.2 mmu)	[68]
dinordehydrobatzelladine B (48)	708.4919 (1.0 mmu)	[68]
dihomodehydrobatzelladine C (49)	515.4064 (1.3 mmu)	[68]
batzellamide A (50)	541.3878 (1.2 mmu)	[70]
hemibatzelladine J (51)	449.3238 (0.2 mmu)	[70]
Δ ¹⁹ -hemibatzelladine J (52)	447.3092 (0.8 mmu)	[70]
Δ ²⁰⁰ -hemibatzelladine J (53)		[70]

* Calculated *m/z* value: 626.4975; reported *m/z* value: 627.4994; ** not specified.

Tandem mass spectrometry (MS²) experiments were also performed to confirm a hypothesis or provide additional information concerning the TGA side chains, as reported in Table 6.

Table 6. Characteristic MS² TGA signals.

<i>m/z</i> Fragment	<i>m/z</i> Fragment Loss	Fragment	Ref.
358 (or 359)		Crambescidin core	[53–55,59]
322 or 336 or 350		Batzelladine core + <i>n</i> = 6, 7 or 8 carbon side chain	[53,66–68,73]
114	113		[53,59,66]
	101		[61,62]
Intense 18	17	Carboxylic acid	-
Intense 48	47		

3. Biological Activities

TGA exhibited a wide range of biological activities with mainly antiviral, antimicrobial (including antifungal, antibacterial, anti-yeast, and antiparasitic), and antitumor properties.

3.1. Antiviral Activities

Several TGA derivatives were evaluated for their antiviral activities against different viruses such as Human immunodeficiency virus (HIV-1), *Herpes simplex virus* (HSV-1), and Human hepatitis B virus (HBV). The reported data for 17 TGA are summarized in Table 7.

Table 7. TGA antiviral activities.

EC ₅₀ (μM Unless Specified)	HIV-1			HSV-1	HBV	Ref.
	Human PBMC	Envelope-Mediated Fusion	gp120 Binding to CD4			
ptilomycalin A (1)	0.011	n.t.	n.t.	0.25 *	n.t.	[51]
crambescidin 800 (2)	0.04	1–3	n.t.	1.25 μg/well ^a	n.t.	[54,55,73]
crambescidin 816 (3)	n.t.	n.t.	n.t.	1.25 μg/well ^a	n.t.	[55]
crambescidin 844 (5)	n.t.	n.t.	n.t.	1.25 μg/well ^a	n.t.	[55]
13,14,15-isocrambescidin 800 (6)	n.t.	n.t.	n.t.	NA	n.t.	[56]
neofolitispate 1 (8)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	7.4 **	[57]
neofolitispate 2 (9)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
neofolitispate 3 (10)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
crambescidin 826 (13)	n.t.	1–3	n.t.	n.t.	n.t.	[54]
batzelladine A (26)	n.t.	n.t.	29	n.t.	n.t.	[66]
batzelladine B (27)	n.t.	n.t.	31	n.t.	n.t.	[66]
batzelladine C (28)	7.7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine D (29)	n.t.	n.t.	72	n.t.	n.t.	[66]
dehydrobatzelladine C (35)	5.5	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine L (38)	1.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine M (39)	7.7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine N (40)	2.4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]

HIV, Human immunodeficiency virus; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear cells; gp, glycoprotein; HSV, *Herpes simplex virus*; HBV, Human hepatitis B virus; n.t., not tested, NA, not active; * converted from μM to μg/mL; ** calculated from compound (9) molecular weight; ^a Diffuse cytotoxicity at 1.25 μg/well.

In general, crambescidin-like GA seem to be more efficient against HIV compared to batzelladine-like GA (half maximal effective concentration (EC_{50}) around 1 mM [66,73]) with EC_{50} activities below 0.05 μ M [51,73]. The stereochemistry of the molecule has a great influence on the antiviral activity. For example, 13,14,15-isocrambescidin (6) is not active against HSV-1 compared to crambescidins [56]. Ptilomycalin A (1) shows very potent anti-HIV-1 and anti-HSV-1 activities at a concentration of 0.011 and 0.25 μ M, respectively [51], which makes it the best antiviral candidate.

Surprisingly, neofolitispatates (8–10) are the only crambescidin-like GA derivatives that have been tested on HBV and exhibited an anti-HBV activity [57]. Unfortunately, few details have been reported.

On the other hand, batzelladines A–E (26–30) were shown to block the interaction between the surface of the HIV envelope glycoprotein gp120 and the extracellular domains of human CD4 receptor protein [77]. This binding is vital to the replication of the virus as it controls its entry into the human cells, since without access to the biochemical environment within the cell the virus is unable to replicate. As a consequence, batzelladines have a therapeutic interest in the treatment of HIV [76].

To date, batzelladine-like GA have not been tested against HSV or HBV viruses.

3.2. Antimicrobial Activities

TGA derivatives were tested against several bacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Mycobacterium intracellulare*), yeast (*Candida albicans*), fungi (*Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*), and parasites (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infatum*, and *Trypanosoma brucei brucei*). Table 8 reports all the antimicrobial activity results for 19 TGA tested.

Crambescidin 800 (2) and ptilomycalin A (1) exhibited potent activity against most bacteria, yeast, fungi, and parasites [68,73]. Curiously, they are poorly active on *Mycobacterium intracellulare* and are considered inactive on *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) [73]. Furthermore, 16 β -hydroxycrambescidin (16), the only crambescidin-like GA bearing a hydroxyl group on its pentacycle, was not active against all the strains tested [73].

In some cases, Batzelladine-like GA present similar activities compared to crambescidin-like GA. Batzelladines C (28) and L (38) are often the more potent molecules [73]. Nevertheless, batzelladine M (39) is the less active TGA class 2 and surprisingly, the same authors showed batzelladine N (40) to be nine times more efficient compared to batzelladine M (39) against *M. tuberculosis* (minimum inhibitory concentration (MIC) 3.18 and 28.5 μ g \cdot mL⁻¹, respectively), despite their chemical structures being closely related [73].

3.3. Antitumoral Activities

Over 20 TGA were tested for their cytotoxicity against several cancer cell lines such as prostate, ovary, breast, melanoma leukemia, pancreas, colon, and cervix (Table 9).

Annexe 5 : Publications

Table 8. TGA antimicrobial activities.

IC ₅₀ (Values are Expressed in µg/mL Unless Specified)	Bacteria									Yeast	Fungi	Parasites					Ref.
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i> (AC)	<i>P. falciparum</i>			<i>L. infatum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei brucei</i>	
										D6 Clone	W2 Clone	FcB1					
ptilomycalin A (1)	0.25	0.30	1.0	>128	10	n.t.	0.15	0.10	1.25	0.12	0.11	0.08 *	n.t.	5.9	n.t.	n.t.	[68,73]
crambescidin 800 (2)	0.20	0.35	0.95	46.5	15	n.t.	0.15	0.10	1.25	0.11	0.13	n.t.	n.t.	6.80	n.t.	n.t.	[73]
16β-hydroxycrambescidin 800 (16)	NA	NA	NA	>128	NA	n.t.	NA	NA	NA	3.8	NA	NA	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine A (26)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.2*	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]
batzelladine C (28)	0.20	0.30	10	34.7	0.9	n.t.	0.90	0.40	5.0	0.09	0.11	n.t.	n.t.	5.5	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine D (29)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.9 *	n.t.	29 *	n.t.	[70]
batzelladine F (31)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2.5 *	n.t.	3.1 *	n.t.	[70]
dehydrobatzelladine C (35)	0.40	0.70	NA.	37.7	1.0	n.t.	1.0	0.6	20	0.073	0.13	n.t.	n.t.	5.70	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine L (38)	0.35	0.40	3.50	1.68	0.25	n.t.	0.40	0.55	2.5	0.073	0.10	0.2 *	1.3 *	1.90	1.3 *	n.t.	[68,73]
batzelladine M (39)	3.0	5.0	NA	28.5	3.50	n.t.	6.0	8.0	NA	0.21	0.27	n.t.	n.t.	8.50	n.t.	n.t.	[73]
batzelladine N (40)	n.t.	n.t.	n.t.	3.18	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[73]
clathriadic acid (41)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1.4 *	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]
merobatzelladine A (42)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	a	n.t.	n.t.	n.t.		0.48		n.t.	n.t.	n.t.	0.24	[69]
merobatzelladine B (43)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		n.t.	n.t.	n.t.		0.97		n.t.	n.t.	n.t.	0.24	[69]
norbatzelladine A (44)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.2 *	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]
norbatzelladine L (45)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.3 *	1.3 *	n.t.	4.4 *	n.t.	[68,70]
dinorbatzelladine A (46)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1.7 *	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]
dinordehydrobatzelladine B (48)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.6 *	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]
dihomodehydrobatzelladine C (49)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2.3 *	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]

S. aureus, *Staphylococcus aureus*; MRSA, Methicilline resistant *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; *M. intracellulare*, *Mycobacterium intracellulare*; *V. anguillarum*, *Vibrio anguillarum*; *C. albicans*, *Candida albicans*; *A. fumigatus*, *Aspergillus fumigatus*; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; *L. infatum*, *Leishmania infatum*; *L. donovani*, *Leishmania donovani*; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; *T. brucei brucei*, *Trypanosoma brucei brucei*; AC, active concentration; NA, not active according to the authors; n.t., not tested; * converted from µM to µg/mL; a, 9–10 mm/50 µg.

Table 9. TGA antitumor activities (values are expressed in µg/mL unless specified).

		Prostate		Ovary		Breast		Melanoma	Lung	Leukemia			Pancreas		Colon		Cervix	Ref.
		DU-145	IGROV	SK-BR3	MDA-MB-231	SK-MEL-28	NSCL A549	L-562	HL-60	THP-1	PANCL	HT29	HCT-16	LOVO	LOVO-DOX	HeLa		
ptilomycalin A (1)	GI ₅₀	0.05	0.04	0.07	n.t.	0.03	0.08	0.04	n.t.	n.t.	0.04	0.03	n.t.	0.05	0.05	0.04	[73]	
	TGI	1.22	1.74	0.54	n.t.	0.11	1.23	1.33	n.t.	n.t.	0.99	0.19	n.t.	2.14	2.04	0.22		
	LC ₅₀	5.21	n.t.	n.t.	n.t.	0.98	9.79	9.72	n.t.	n.t.	0.98	5.37	n.t.	9.79	8.48	3.21		
crambescidin 800 (2)	GI ₅₀	0.19	0.05	0.16	n.t.	0.04	0.11	0.02	n.t.	n.t.	0.04	0.04	n.t.	0.08	0.08	0.05	[73]	
	TGI	1.38	2.50	0.56	n.t.	0.11	1.36	0.06	n.t.	n.t.	1.53	0.23	n.t.	2.29	2.02	0.21		
	LC ₅₀	7.01	n.t.	n.t.	n.t.	1.70	9.68	6.73	n.t.	n.t.	8.66	5.75	n.t.	8.97	8.50	1.58		
crambescidin 816 (3)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[52]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchocidin A (18)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[61]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchocidin B (19)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[62]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchocidin C (20)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[62]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchocidin D (21)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[62]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchocidin E (22)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[62]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchomycalin A (23)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[63]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
monanchomycalin B (24)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[63]	
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.		

Table 9. Cont.

		Prostate		Ovary		Breast		Melanoma		Lung		Leukemia			Pancreas		Colon		Cervix	Ref.
		DU-145	IGROV	SK-BR3	MDA-MB-231	SK-MEL-28	NSCL A549	L-562	HL-60	THP-1	PANCL	HT29	HCT-16	LOVO	LOVO-DOX	HeLa				
batzelladine C (28)	GI ₅₀	0.68	0.81	0.66	n.t.	1.45	1.40	0.62	n.t.	n.t.	0.55	0.65	n.t.	2.06	2.25	0.70	[73]			
	TGI	2.27	3.43	2.89	n.t.	3.67	3.42	3.01	n.t.	n.t.	2.03	2.16	n.t.	4.37	4.72	2.22				
	LC ₅₀	0.69	n.t.	n.t.	n.t.	9.24	8.31	n.t.	n.t.	n.t.	7.14	6.70	n.t.	9.29	0.99	6.50				
dehydrobatzelladine C (35)	GI ₅₀	0.46	0.73	0.23	n.t.	0.89	1.19	0.48	n.t.	n.t.	0.43	0.48	n.t.	1.60	2.07	0.48	[73]			
	TGI	1.91	4.17	1.14	n.t.	3.48	3.24	2.42	n.t.	n.t.	1.83	1.77	n.t.	3.68	4.48	1.52				
	LC ₅₀	7.15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	8.81	n.t.	n.t.	n.t.	8.66	7.50	n.t.	8.47	9.69	5.45				
batzelladine L (38)	GI ₅₀	0.44	0.52	0.23	n.t.	0.88	1.30	n.t.	n.t.	n.t.	0.34	4.96	n.t.	1.09	n.t.	0.38	[73]			
	TGI	1.39	1.74	0.56	n.t.	2.18	9.99	n.t.	n.t.	n.t.	1.33	n.t.	n.t.	2.41	n.t.	1.16				
	LC ₅₀	3.78	5.01	2.10	n.t.	4.95	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	4.38	n.t.	n.t.	5.36	n.t.	3.58				
batzelladine M (39)	GI ₅₀	1.77	2.28	1.12	n.t.	1.18	3.80	n.t.	n.t.	n.t.	1.22	3.56	n.t.	1.99	n.t.	1.64	[73]			
	TGI	3.44	5.08	2.51	n.t.	4.66	n.t.	0.00	n.t.	n.t.	3.58	n.t.	n.t.	3.56	n.t.	3.05				
	LC ₅₀	6.66	n.t.	5.59	n.t.	n.t.	n.t.	0.00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	6.37	n.t.	5.68				
batzelladine N (40)	GI ₅₀	1.39	1.78	1.12	n.t.	1.47	1.94	0.66	n.t.	n.t.	1.37	1.31	n.t.	1.96	4.42	0.59	[73]			
	TGI	3.12	4.97	3.84	n.t.	3.41	4.29	3.27	n.t.	n.t.	3.50	3.11	n.t.	4.16	n.t.	1.80				
	LC ₅₀	7.04	n.t.	n.t.	n.t.	7.97	9.47	n.t.	n.t.	n.t.	8.97	7.35	n.t.	8.85	n.t.	5.13				
clathriadic acid (41)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	13.5	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
norbatzelladine A (44)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	3.8	n.t.	2.1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1.6	n.t.	TC ₅₀ 4.7 μM	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	6.4	n.t.	4.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	3.2	n.t.		n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	11.4	n.t.	8.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	5.7	n.t.		n.t.	n.t.				
norbatzelladine L (45)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	0.7	n.t.	1.1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1.9	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	1.9	n.t.	2.1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	4.2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	4.8	n.t.	4.2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	7.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
dinorbatzelladine A (46)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	3.0	n.t.	1.9	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1.9	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	3.8	n.t.	4.2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	4.2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	5.4	n.t.	7.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	7.6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
dinordehydro-batzelladine B (48)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	7.9	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	6.2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>14	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>14	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>14	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>14	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
dihomodehydro-batzelladine C (49)	GI ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	6.1	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	[68]			
	TGI	n.t.	n.t.	n.t.	9.8	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				
	LC ₅₀	n.t.	n.t.	n.t.	15.6	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.				

n.t., not tested; * calculated value from μM to μg/mL.

Ptilomycalin A (1) is once again the most active TGA tested as its half maximal growth inhibition values (GI_{50}) are always below 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on all the cell lines tested [73]. Crambescidin 800 (2) shows similar activities [73]. Compared to TGA class 3, TGA class 2 is less active, although batzelladine C (28) and L (38) and dehydrobatzelladine C (35), in general, exhibited a GI_{50} below 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [73]. Finally, crambescidin 816 (3) was shown to inhibit cell migration by altering the cytoskeleton dynamics and induced cell death by apoptosis [75,78].

In summary, both TGA class 2 and 3 have been tested against viruses, microbes, and several cancer cell lines. The wide-ranging biological activity of this class of natural products can be in part attributed to the cationic nature of the guanidinium functional group that can participate in a large number of non-covalent molecular interactions [77]. In general, TGA from class 3 exhibited better activities compared to TGA from class 2 [73]. Within TGA class 3, ptilomycalin A (1) and crambescidin 800 (2) showed similar activities in all assays, suggesting that the hydroxyl group of the right-handed portion in crambescidin 800 (2) did not affect the bioactivity. Nevertheless, 16 β -hydroxycrambescidin 359 (16) did not show any significant antimicrobial activity, suggesting that the hydroxyl group, located on the pentacycle at C-16, diminished the activity [73]. Further studies are needed to confirm this hypothesis. This could be assessed by evaluating the inhibitory activities of crambescidins 816 (3), 830 (4) and 844 (5), as they carry the same hydroxyl moiety as crambescidin 800 (2) and another hydroxyl located in the pentacycle at C-13. In parallel, several batzelladines have been reported to disrupt protein–protein interactions. Elucidation of the mechanism by which protein–protein interactions are modulated by these molecules is of great interest, since protein–protein associations are important in all the aspects of cell biochemistry. Moreover, small molecules that influence protein–protein association would be new biological tools and potential therapeutic agents. In particular, batzelladines or their derivatives may prove to be applicable for AIDS treatment. Batzelladines A–E (26–30) block interaction between the surface of the HIV envelope glycoprotein gp120 and the extracellular domains of human CD4 receptor protein [66]. A subset of batzelladines exhibited also potential immunosuppressive activity as they induce dissociation of the complex between the protein kinase p56^{lck} and CD4 [67]. Synthetic derivatives of batzelladines were reported to disrupt Nef–p53, Nef–actin, and Nef–p56^{lck} interactions [77]. Bewley *et al.* tested a series of 28 synthetic batzelladine-like GA analogues on HIV-1 cell fusion assay, to find structure-activity relationships [76]. According to this study, the greater the rigidity of the molecule, the less biologically active it is. Moreover, they have shown that the most active compounds tested were compounds which contain two tricyclic guanidine moieties connected by an alkyl ester linkage including eight heavy atoms, such as batzelladines F (31) and G (32). Batzelladines biological properties could be dramatically affected by the ester side chains. For example, batzelladine A (26) inhibits the binding of HIV glycoprotein gp120 to CD4 receptors, whereas batzelladine D (29) has no known biological activity [77].

Finally, several derivatives that do not feature an ester side chain may still exhibit interesting biological properties such as the antibacterial and antimalarial activities of merobatzelladines A (42) and B (43) [69].

4. Conclusions

Several batzelladine- and crambescidin-like guanidine alkaloids have been isolated from Poecilosclerida marine sponges. Their biosynthesis, or the biosynthesis of their precursors, may involve symbiotic microorganisms [79]. This class of natural products is structurally unique as all the derivatives are constituted by a tricyclic guanidinium ring system, to which are appended different substituents. This significant structural diversity has led to wide-ranging biological properties with mainly antiviral, antimicrobial (including antifungal, antibacterial, anti-yeast, and antiparasitic), and antitumor activities. In addition to the biomimetic strategy, a number of groups completed the total synthesis of several of these alkaloids by developing new synthetic methodologies. Although there are many efficient and stereoselective synthetic routes towards this class of natural products, there is not yet one method that would allow entry into all of the cores of this family. Nonetheless, a number of these

syntheses have enabled the establishment of their relative and absolute stereochemical configurations. In conclusion, several of these alkaloids and their synthetic analogs were prepared on a large enough scale to allow further biological testing, including few structure-activity relationship studies. Ongoing studies may provide us with further clues regarding this class of Marine Natural Products.

Acknowledgments: We thank J. Pattinson and D. Coaten for their kind reading of this manuscript. E. Sfecci is the recipient of a thesis grant from the “Conseil Régional Provence Alpes Côte d’azur”. M. Mehiri’s research is supported by the French program ENVI-Med “MEDIBIO”, the ANR/Investissements d’Avenir program via the OCEANOMICS project (grant #ANR-11-BTBR-0008), and the H2020 European program via the EMBRIC project.

Author Contributions: All the authors wrote, read, and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

A.m.	Antimicrobial activity
A.v.	Antiviral activity
A.t.	Antitumor activity
COSY	Correlation Spectroscopy
EC ₅₀	half maximal Effective Concentration
GA	Guanidine Alkaloids
GI ₅₀	half maximal Growth Inhibition
gp120	glycoprotein 120
HBV	Human hepatitis B virus
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HSV-1	<i>Herpes simplex</i> Virus 1
IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration
LC ₅₀	half maximal Lethal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.t.	Not tested
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
SM	Secondary Metabolites
TC ₅₀	half maximal Toxic Concentration
TGA	Triazaacenaphthylene Guanidine Alkaloids
TGI	Total Growth Inhibition concentration

References

1. Nijampatnam, B.; Dutta, S.; Velu, S.E. Recent advances in isolation, synthesis, and evaluation of bioactivities of bispyrroloquinone alkaloids of marine origin. *Chin. J. Nat. Med.* **2015**, *13*, 561–577. [[CrossRef](#)]
2. Gul, W.; Hamann, M.T. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life Sci.* **2005**, *78*, 442–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G. A submarine journey: The pyrrole-imidazole alkaloids. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 705–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Weinreb, S.M. Some recent advances in the synthesis of polycyclic imidazole-containing marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 931–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Berlinck, R.G.S. Natural guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 617–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Berlinck, R.G.S.; Burtoloso, A.C.; Kossuga, M.H. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 919–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Berlinck, R.G.S.; Burtoloso, A.C.; Trindade-Silva, A.E.; Romminger, S.; Morais, R.P.; Bandeira, K.; Mizuno, C.M. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1871–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Berlinck, R.G.S.; Kossuga, M.H. Natural guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 516–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Berlinck, R.G.S. Natural guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 339–365. [[CrossRef](#)]
10. Faulkner, J.D. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 1–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 116–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Hu, W.-P.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 31–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Hu, W.-P.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 35–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Hu, W.-P.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 165–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 196–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 144–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 237–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 160–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Berlinck, R.G.S.; Trindade-Silva, A.E.; Santos, M.F. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1382–1406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Snider, B.B.; Shi, Z. Biomimetic synthesis of the central tricyclic portion of ptilomycalin A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2099–2102. [[CrossRef](#)]
22. Rao, A.V.R.; Gurjar, M.K.; Vasudevan, J. An enantiospecific synthesis of the tricyclic guanidine segment of the anti-HIV marine alkaloid batzelladine A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, *13*, 1369–1370. [[CrossRef](#)]
23. Louwrier, S.; Ostendorf, M.; Boom, A.; Hiemstra, H.; Speckamp, W.N. Studies towards the synthesis of (+)-ptilomycalin A; stereoselective *N*-acyliminium ion coupling reactions to enantiopure C-2 substituted lactams. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2603–2628. [[CrossRef](#)]
24. Louwrier, S.; Ostendorf, M.; Tuynman, A.; Hiemstra, H. Studies towards the synthesis of guanidine alkaloids; synthesis of a tricyclic guanidine from succinimide. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 905–908. [[CrossRef](#)]
25. Louwrier, S.; Tuynman, A.; Hiemstra, H. Synthesis of bicyclic guanidines from pyrrolidin-2-one. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2629–2646. [[CrossRef](#)]
26. Murphy, P.J.; Lloyd Williams, H.; Hibbs, D.E.; Hursthouse, M.B.; Malik, A.K.M. Biomimetic model studies towards ptilomycalin A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8315–8332. [[CrossRef](#)]
27. Snider, B.B.; Chen, J.; Patil, A.D.; Freyer, A.J. Synthesis of the tricyclic portions of batzelladines A, B and D. Revision of the stereochemistry of batzelladines A and D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6977–6980. [[CrossRef](#)]
28. Black, G.P.; Murphy, P.J.; Walshe, N.D.A. A short synthetic route to the tricyclic guanidinium core of the batzelladine alkaloids. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9481–9488. [[CrossRef](#)]
29. Black, G.P.; Murphy, P.J.; Thornhill, A.J.; Walshe, N.D.A.; Zanetti, C. Synthesis of the left hand unit of batzelladine F; revision of the reported relative stereochemistry. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6547–6554. [[CrossRef](#)]
30. Snider, B.B.; Busuyek, M.V. Revision of the stereochemistry of batzelladine F. Approaches to the tricyclic hydroxyguanidine moiety of batzelladines G, H, and I. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1707–1711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Coffey, D.S.; McDonald, A.I.; Overman, L.E.; Rabinowitz, M.H.; Renhowe, P.A. A practical entry to the crambescidin family of guanidine alkaloids. Enantioselective total syntheses of ptilomycalin A, crambescidin 657 and its methyl ester (neofolitispates 2), and crambescidin 800. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4893–4903. [[CrossRef](#)]

32. Elliott, M.C.; Long, M.S. Studies towards the total synthesis of batzelladine A. *Org. Biomol. Chem* **2004**, *2*, 2003–2011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aron, Z.D.; Overman, L.E. Total synthesis and properties of the crambescidin core zwitterionic acid and crambescidin 359. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3380–3390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shi, Y.; Pierce, J.G. Synthesis of the 5,6-dihydroxymorpholin-3-one fragment of monanchocidin A. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 968–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Snider, B.B.; Chen, J. Synthesis of batzelladine E and its E isomer. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5697–5700. [[CrossRef](#)]
36. Coffey, D.S.; McDonald, A.I.; Overman, L.E.; Stappenbeck, F. Enantioselective total synthesis of 13,14,15-isocrambescidin 800. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6944–6945. [[CrossRef](#)]
37. Cohen, F.; Overman, L.E.; Ly Sakata, S.K. Asymmetric total synthesis of batzelladine D. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2169–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Franklin, A.S.; Ly, S.K.; Mackin, G.H.; Overman, L.E.; Shaka, A.J. Application of the tethered biginelli reaction for enantioselective synthesis of batzelladine alkaloids. Absolute configuration of the tricyclic guanidine portion of batzelladine B. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1512–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cohen, F.; Overman, L.E. Enantioselective total synthesis of batzelladine F: Structural revision and stereochemical definition. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10782–10783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ishiwata, T.; Hino, T.; Koshino, H.; Hashimoto, Y.; Nakata, T.; Nagasawa, K. Total synthesis of batzelladine D. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2921–2924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nagasawa, K.; Hashimoto, Y. Synthesis of marine guanidine alkaloids and their application as chemical/biological tools. *Chem. Rec.* **2003**, *3*, 201–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Aron, Z.D.; Overman, L.E. The tethered biginelli condensation in natural product synthesis. *Chem. Commun.* **2004**, *3*, 253–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Collins, S.K.; McDonald, A.I.; Overman, L.E.; Ho Rhee, Y. Enantioselective total synthesis of (–)-dehydrobatzelladine C. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1253–1255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Arnold, M.A.; Duron, S.G.; Gin, D.Y. Diastereoselective [4+2] annulation of vinyl carbodiimides with *N*-alkyl imines. Asymmetric synthetic access to the batzelladine alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6924–6925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Overman, L.E.; Ho Rhee, Y. Total synthesis of (–)-crambidine and definition of the relative configuration of its unique tetracyclic guanidinium core. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *125*, 15652–15658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Shimokawa, J.; Ishiwata, T.; Shirai, K.; Koshino, H.; Tanatani, A.; Nakata, T.; Hashimoto, Y.; Nagasawa, K. Total synthesis of (+)-batzelladine A and (–)-batzelladine D, and identification of their target protein. *Chemistry* **2005**, *11*, 6878–6888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Evans, P.A.; Qin, J.; Robinson, J.E.; Bazin, B. Enantioselective total synthesis of the polycyclic guanidine-containing marine alkaloid (–)-batzelladine D. *Angew. Chem.* **2007**, *46*, 7417–7419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Moore, C.G.; Murphy, P.J.; Williams, H.L.; McGown, A.T.; Smith, N.K. Synthetic studies towards ptilomycalin A: Total synthesis of crambescidin 359. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11771–11780. [[CrossRef](#)]
49. Perl, N.R.; Ide, N.D.; Prajapati, S.; Perfect, H.; Duro, S.G.; Gin, D.Y. Annulation of thioimides and vinyl carbodiimides to prepare 2-aminopyrimidines, competent nucleophiles for intramolecular alkyne hydroamination. Synthesis of (–)-crambidine. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1802–1803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Babij, N.R.; Wolfe, J.P. Asymmetric total synthesis of (+)-merobatzelladine B. *Angew. Chem.* **2012**, *51*, 4128–4130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kashman, Y.; Hirsh, S.; McConnell, O.J.; Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kakisawa, H. Ptilomycalin A: A novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8926–8928. [[CrossRef](#)]
52. Berlinck, R.G.S.; Braekman, J.C.; Daloz, D.; Bruno, I.; Riccio, R. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1007–1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Braekman, J.C.; Daloz, D.; Tavares, R.; Hajdu, E.; Van Soest, R.W.M. Novel polycyclic guanidine alkaloids from two marine sponges of the genus *Monanchora*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 193–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chang, L.; Whittaker, N.F.; Bewley, C.A. Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: New polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. That inhibit HIV-1 fusion. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1490–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Jares-Erijman, E.A.; Sakai, R.; Rinehart, K.L. Crambescidins: New antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5712–5715. [CrossRef]
56. Jares-Erijman, E.A.; Ingrum, A.L.; Carney, J.R.; Rinehart, K.L.; Sakai, R. Polycyclic guanidine-containing compounds from the mediterranean sponge *Crambe crambe*: The structure of 13,14,15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4805–4808. [CrossRef]
57. Venkateswarlu, Y.; Venkata Rami Reddy, M.; Ramesh, P.; Venkateswara Rao, J. Neofolitispates, pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Neofolitispia dianchora*. *Indian J. Chem.* **1999**, *38B*, 254–256.
58. Meragelman, K.M.; McKee, T.C.; McMahon, J.B. Monanchorin, a bicyclic alkaloid from the sponge *Monanchora unguiculata*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1165–1167. [CrossRef] [PubMed]
59. Gallimore, W.A.; Kelly, M.; Scheuer, P.J. Alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1420–1423. [CrossRef] [PubMed]
60. Bensemhoun, J.; Bombarda, I.; Aknin, M.; Vacelet, J.; Gaydou, E.M. Ptilomycalin D, a polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 2033–2035. [CrossRef] [PubMed]
61. Guzii, A.G.; Makarieva, T.N.; Denisenko, V.A.; Dmitrenok, P.S.; Kuzmich, A.S.; Dyshlovoy, S.A.; Krasokhin, V.B.; Stonik, V.A. Monanchocidin: A new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra*. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4292–4295. [CrossRef] [PubMed]
62. Makarieva, T.N.; Tabakmaher, K.M.; Guzii, A.G.; Denisenko, V.A.; Dmitrenok, P.S.; Shubina, L.K.; Kuzmich, A.S.; Lee, H.S.; Stonik, V.A. Monanchocidins B–E: Polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1952–1958. [CrossRef] [PubMed]
63. Makarieva, T.N.; Tabakmaher, K.M.; Guzii, A.G.; Denisenko, V.A.; Dmitrenok, P.S.; Kuzmich, A.S.; Lee, H.-S.; Stonik, V.A. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra*. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4228–4231. [CrossRef]
64. Tabakmakher, K.M.; Denisenko, V.A.; Guzii, A.G.; Dmitrenok, P.S.; Dyshlovoy, S.A.; Lee, H.-S.; Makarieva, T.N. Monanchomycalin C, a new pentacyclic guanidine alkaloid from the far-eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. *Nat. Prod. Com.* **2013**, *8*, 1399–1402.
65. Palagiano, E.; De Marino, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Zollo, F. Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffermani*. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3675–3682. [CrossRef]
66. Patil, A.D.; Kumar, N.V.; Kokke, W.C.; Bean, M.F.; Freyer, A.J.; De Brosse, C.; Mai, S.; Truneh, A.; Faulkner, D.J.; Carte, B.; et al. Novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-human CD4 binding. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1182–1188. [CrossRef]
67. Patil, A.D.; Freyer, A.J.; Taylor, P.B.; Carte, B.; Johnson, R.K.; Faulkner, D.J. Batzelladines F–I, novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp.: Inducers of p56^{lck}-CD4 dissociation. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1814–1819. [CrossRef]
68. Laville, R.; Thomas, O.P.; Berrue, F.; Marquez, D.; Vacelet, J.; Amade, P. Bioactive guanidine alkaloids from two caribbean marine sponges. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1589–1594. [CrossRef] [PubMed]
69. Takishima, S.; Ishiyama, A.; Iwatsuki, M.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Omura, S.; Kobayashi, H.; van Soest, R.W.M.; Matsunaga, S. Merobatzelladines A and B, anti-infective tricyclic guanidines from a marine sponge *Monanchora* sp. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2655–2658. [CrossRef] [PubMed]
70. Santos, M.F.; Harper, P.M.; Williams, D.E.; Mesquita, J.T.; Pinto, E.G.; da Costa-Silva, T.A.; Hajdu, E.; Ferreira, A.G.; Santos, R.A.; Murphy, P.J.; et al. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1101–1112. [CrossRef] [PubMed]
71. Kornprobst, J.-M. *Encyclopedia of Marine Natural Products*, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2014; Volume 2, pp. 869–877.
72. Daniel Dalet. Planisphère centré Europe Afrique. Available online: http://d-maps.com/carte.php?num_car=126803&lang=fr (access on 5 November 2015).
73. Hua, H.-M.; Peng, J.; Dunbar, D.C.; Schinazi, R.F.; de Castro Andrews, A.G.; Cuevas, C.; Garcia-Fernandez, L.F.; Kelly, M.; Hamann, M.T. Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11179–11188. [CrossRef]

74. Suna, H.; Aoki, S.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. Crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid, protects a mouse hippocampal cell line against glutamate-induced oxidative stress. *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 288–295. [[CrossRef](#)]
75. Rubiolo, J.A.; Lopez-Alonso, H.; Roel, M.; Vieytes, M.R.; Thomas, O.; Ternon, E.; Vega, F.V.; Botana, L.M. Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1655–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bewley, C.A.; Ray, S.; Cohen, F.; Collins, S.K.; Overman, L.E. Inhibition of HIV-1 envelope-mediated fusion by synthetic batzelladine analogues. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1319–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Overman, L.E.; Wolfe, J.P. Synthesis of polycyclic guanidines by cyclocondensation reactions of *N*-amidinyliiminium ions. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3167–3175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Rubiolo, J.A.; Ternon, E.; Lopez-Alonso, H.; Thomas, O.P.; Vega, F.V.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. Crambescidin-816 acts as a fungicidal with more potency than crambescidin-800 and -830, inducing cell cycle arrest, increased cell size and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4419–4434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Croue, J.; West, N.J.; Escande, M.L.; Intertaglia, L.; Lebaron, P.; Suzuki, M.T. A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2583–2590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



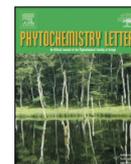
© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol



Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia*: A comparative study between CPC and classical chromatographic techniques

Estelle Sfecci^a, Céline Le Quemener^b, Thierry Lacour^c, Lionel Massi^a, Philippe Amade^a, Grégoire Audo^b, Mohamed Mehiri^{a,*}

^a Université Nice Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Produits Naturels Marins, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 02, France

^b ARMEN Instrument, ZI Kermelin, 16 rue Ampère, 56890 Saint-Avé, France

^c BioPreserv, 4 Traverse Dupont, Grasse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2016

Received in revised form 15 January 2017

Accepted 28 January 2017

Available online xxx

Keywords:

Caulerpa taxifolia

Caulerpenyne

Isolation

Centrifugal partition chromatography

Efficient process

ABSTRACT

Caulerpenyne (Cyn) is a cytotoxic compound firstly isolated in 1978 from *Caulerpa prolifera*. This metabolite, constituted by a highly reactive diacetoxybutadiene moiety, exhibited a wide range of biological properties with mainly antibacterial properties and antitumoral activities. Few structure–activity relationships (SAR) are available to design more potent bioactive derivatives by pharmacomodulation. Cyn can be produced by total synthesis or extracted from natural sources in particular the green alga *Caulerpa taxifolia*. Since conventional chromatographic procedures to isolate Cyn from *C. taxifolia* are time- and solvent-consuming, it was crucial to find a more efficient process to obtain pure Cyn. In our study, Cyn has been purified from *C. taxifolia* with two different techniques: Centrifugal partition chromatography (CPC) and a classical chromatographic process. The comparative study showed that CPC constitutes a very simple and efficient process to access Cyn.

© 2017 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several seaweeds, in particular green algae, represent a rich source of molecules (Andrade et al., 2013). They contain a high concentration of marine salts, pigments such as chlorophyll or carotenoids (Dambeck and Sandmann, 2014), lipids, sugars (Athukorala and Yuan, 2013), and in some extent mid-polar to apolar bioactive secondary metabolites.

The green alga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh has been of a great research interest since its accidental introduction in the Mediterranean Sea in 1984 (Meinesz and Hesse, 1991). The rapid and important proliferation of *C. taxifolia* was attributed to its high temperature tolerance, asexual reproduction, and chemical defenses (Meinesz and Hesse, 1991). Its efficient mechanism of chemical defense relies on the production of several terpenoids (Guerrero et al., 1995) in particular caulerpenyne (Cyn) (Fig. 1). Cyn, a sesquiterpenoid constituted by a reactive diacetoxybuta-

diene moiety, was shown to be the most abundant metabolite of *C. taxifolia* (Amico et al., 1978), acting as a grazer repulsive (Paul and Fenical, 1986) but also as a wound closure in case of cell disruption (Adolph et al., 2005).

Cyn exhibit a wide range of biological properties with mainly antitumoral activities by inhibiting the growth of several human cancer cell lines (Fischel et al., 1995) and antibacterial properties (Hodgson, 1984). To date, few structure–activity relationships (SAR) studies were performed on Cyn to yield by pharmacomodulation more potent bioactive derivatives for therapeutic purposes. In 2006, Commeiras and co-workers have shown on few Cyn derivatives a tied link between the acetoxybutadiene moiety and their ability to inhibit tubulin assembly (Commeiras et al., 2006). In 2014, Richter and co-workers have shown on Cyn and related *bis*-enols esters that the butadiene moiety was essential for the inhibition of human 5-lipoxygenase (Richter et al., 2014). Further SAR studies are still needed to better understand Cyn and Cyn derivatives biological mode of action which imply an easy access to Cyn in enough amounts.

Cyn was obtained by synthesis or directly from *C. taxifolia*. A few total syntheses of Cyn have been reported (Commeiras et al., 2001, 2003). Unfortunately, they are costly effective as several steps are

* Corresponding author.

E-mail address: mehiri@unice.fr (M. Mehiri).

necessary and they lack enantioselectivity. Since *C. taxifolia* is a cultivable green alga which is not an endangered species in the Mediterranean Sea, the best way to obtain enantiopure Cyn remains the direct purification from the species.

In the literature, Cyn was extracted and isolated in one or several steps by using different approaches based mainly on a silica gel (Valls et al., 1994; Guerriero and D'Ambrosio, 1999; Cengiz et al., 2011; McConnell et al., 1982) and size exclusion chromatographies (Amade et al., 2001). These conventional chromatographic methods exhibited several disadvantages such as large solvent volumes and time-consuming procedures. Furthermore, the alga is also composed by several polymers (cellulose, lignin, proteins, and starch), water-soluble monosaccharides (Rabemanolontsoa and Saka, 2013), fatty acids (Ivesa et al., 2004), and pigments such as chlorophyll (Aguilar-Santos, 1970) which often stain irreversibly on the chromatographic support. Moreover, *C. taxifolia* produces in a less extent few others bioactive secondary metabolites such as caulerpin (Aguilar-Santos, 1970) which exhibit a close polarity with Cyn. Chlorophyll and caulerpin often interfere with the isolation of Cyn in a pure state. Finally, Cyn is also a sensitive secondary metabolite which can be easily and rapidly degraded in presence of water (Amade et al., 2001). All these considerations prompted us to develop a more efficient procedure for extraction and isolation of Cyn from natural raw materials.

Centrifugal partition chromatography (CPC) represents a very good alternative to conventional processes despite the instrumental higher costs. CPC is a separation process that relies on a two-phase solvent system made from a pair of immiscible solvents, one used as the stationary phase and the other as the mobile phase (Marchal et al., 2003). This technique is a liquid-liquid partition chromatography that uses the centrifugal force for the retention of the stationary phase (Chollet et al., 2015). CPC exhibits several advantages, compared to classical liquid chromatography techniques using solid supports, such as a higher sample loading capacity and the possibility to inject a relatively crude extracts, a very low solvent consumption, the absence of irreversible adsorption, and a total recovery of the sample without any deterioration. Furthermore, CPC can easily be scaled-up from analytical to preparative scale in rapid and convenient way (Yuan et al., 2008). Several studies have shown that CPC represents a suitable method to obtain pure natural products from terrestrial and marine complex extracts such as essential oils (Wei et al., 2012), lichens (Roullier et al., 2009), and algae (Hwang et al., 2012; Becerra et al., 2015; Lee et al., 2016).

In this paper, we describe a simple, efficient, and scalable CPC method to isolate pure Cyn from *C. taxifolia*.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Cyclohexane (*c*-Hex), *n*-heptane (Hept), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), and dichloromethane (DCM) used for extraction and CPC were purchased from VWR (Rectapur grade). Acetonitrile (MeCN) and water (H₂O) used for high performance liquid chromatography (HPLC) analyses were analytical grade and purchased from VWR (Chromanorm grade). Sephadex LH-20 (GE Healthcare) and Diol-functionalised silica gel (75–200 μm) used for open column chromatography were purchased from Sigma–Aldrich. Thin-layer chromatography (TLC) analyses were performed with silica gel 60 plates (Merck, Silica gel F254).

Fresh *C. taxifolia* were collected from Villefranche-sur-Mer (France) in September 2013 and kept frozen until extraction.

2.2. Instruments

HPLC analyses were performed with a Waters Alliance 2695 HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA) coupled with a Waters 996 photodiode array (PDA) detector. Analyses were performed with a bifunctional Macherey-Nagel NUCLEODUR[®] Sphinx RP column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) consisting of a balanced ratio of propylphenyl and C18 ligands, at room temperature.

Purifications by CPC were performed on a SCPC-250 CPC system (Armen instrument, France) fitted with one rotor containing 800 twin-cells of 300 μL (total volume: 250 mL). The CPC was connected to a preparative HPLC system (Spot prep 2, Armen Instrument France) equipped with a quaternary gradient pump 50 mL/min, an automated loop injection and backflush valves, a UV/Vis PDA detector and a fraction collector, all controlled by the Armen Glider CPC software. The CPC system configuration allows to purify from 0.05 g up to 6 g.

NMR (¹H and ¹³C) analyses were performed in deuterated MeOH (CD₃OD) on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer.

2.3. Extraction of *C. taxifolia* and Cyn quantification

C. taxifolia was freeze-dried before extraction. The dried fronds and stolons (8 g) were crushed and then extracted six times with 200 mL of MeOH–DCM (1:1, v/v). The combined fractions were evaporated under reduced pressure to yield the crude organic extract (1.7 g).

2.4. Cyn isolation by conventional chromatography

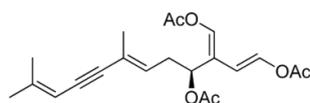
The crude extract (1.7 g) was suspended in MeOH and extracted several times with *c*-Hex. The *c*-Hex fractions were evaporated under reduced pressure to yield 128 mg of the Cyn fraction which was subjected to a Sephadex LH-20 size exclusion chromatography (ID 1.6 cm; *h* 32 cm) in MeOH to afford 6 fractions (fr. 1–6). Fraction 4 was further chromatographed on Diol-functionalised silica gel with a gradient of AcOEt–MeOH from 100:0 to 0:100 to give 40 sub-fractions (subfr. 1–40). Subfr. 8 yielded pure caulerpenyne (0.4 mg). The remaining sub-fractions were discarded as Cyn purity by HPLC was less than 50%.

2.5. Cyn isolation by CPC

2.5.1. Selection of the two-phase solvent system

Shake flask experiments were performed to determine the partition coefficient K_{Cyn} of caulerpenyne (Cyn) between the two-phase solvent systems tested to determine a well-suited ($K_{Cyn} \sim 1$) biphasic solvent mixture for separation by CPC. The solvent systems from the Arizona family, in particular Arizona A, N, U, and Z, were screened. They were prepared by mixing at room temperature heptane, water, ethyl acetate, and methanol in different proportions (Foucault and Chevolut, 1998; Berthod et al., 2005). K_{Cyn} was determined by dissolving a suitable amount of the crude extract in 2 mL of the upper (or lower) phase. The solution was shaken with an equal volume of lower (or upper) phase until complete dissolution of the extract. After decantation, the two phases were then separated and the Cyn concentration in each phase was first estimated by TLC and then accurately quantified by HPLC. For each system, K_{Cyn} was calculated by using the following equation:

$$K_{Cyn} = \frac{[C_{Cyn}]_{stat.}}{[C_{Cyn}]_{mob.}} = \frac{A_{stat.}}{A_{mob.}}$$



caulerpernyne (Cyn)

Fig. 1. Structure of caulerpernyne (Cyn) (C₂₁H₂₆O₆; CAS Registry Number: 70000-22-5).**Table 1**

CPC conditions.

Crude extract sample	1.7 g dissolved in 5 mL of upper phase + 5 mL of lower phase
Biphasic solvent system	Arizona U
Pumping mode	Ascending
Flow	12 mL/min
Stationary phase retention	79.2%
Elution step duration	40 min
Extrusion step duration	20 min
Collection volume	12 mL during elution 24 mL during extrusion

Table 3

CPC vs classical chromatography for Cyn purification.

Technique	Crude extract weight	Isolated Cyn weight	Yield	Total volume of solvent	Time
CPC	1.7 g	8.3 mg	0.5%	~1 L	1 h
Classical	1.7 g	0.4 mg	0.03%	2–3 L	1–2 days

where $[C_{Cyn}]_{stat.}$ and $[C_{Cyn}]_{mob.}$ are the Cyn concentration in the stationary and mobile phases, respectively; $A_{stat.}$ and $A_{mob.}$ are the HPLC Cyn peak area in the stationary and mobile phases, respectively.

All the fractions were analysed by TLC and HPLC. For TLC, the mobile phase, composed by a mixture of *c*-Hex-EtOAc (80:20, v/v), was adapted from Amade and co-workers (Amade et al., 2001). Spots were visualised under UV light (254 nm) and by spraying a 5% solution of vanillin in ethanolic sulfuric acid followed by heating. For HPLC analyses, the mobile phase was a linear gradient (v/v) of water with 0.1% of formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% of formic acid (B) as follows: 90:10 for 5 min, then 90:10–0:100 in 30 min, and finally 0:100 for 5 min. The flow rate was set to 1.0 mL/min and the effluent was continuously monitored at 254 nm.

2.5.2. CPC process

According to the K_{Cyn} values, Arizona U (Hept, EtOAc, MeOH, H₂O; 4/1/4/1; v/v/v/v) was selected as the two-phase solvent system for Cyn purification by CPC. Hept, EtOAc, MeOH and H₂O were mixed in a separatory funnel, vigorously shaken, and thoroughly equilibrated at room temperature. The two phases were separated to yield an upper phase and a lower phase. The CPC column, rotated at 500 rpm, was fully filled in ascending mode with the lower phase, then the rotation speed was set at 2200 rpm and the upper mobile phase was eluted at 12 mL/min for the equilibration step. To perform a comparison with the conventional chromatography method, an identical amount of the crude extract (1.7 g), suspended in 10 mL of Arizona U, was injected through a 10 mL stainless steel loop. During separation, the effluent was continuously monitored at 254 nm and 12 mL fractions were collected in 25 mL tubes, examined by TLC and combined if necessary. After 40 min of elution, the CPC column was rinsed to

Table 2 K_{Cyn} (partition coefficient) values of Cyn in the solvent systems.

Solvent system	Solvent ratio (v/v/v/v)				K_{Cyn}
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	
Arizona A (Az A)	0	1	0	1	>10 ⁵
Arizona N (Az N)	1	1	1	1	20
Arizona U (Az U)	4	1	4	1	1.2
Arizona Z (Az Z)	1	0	1	0	0.18

recover all the compounds injected with the stationary phase. This process, called extrusion, was performed at 50 mL/min. The different parameters for CPC are summarized in Table 1.

2.6. ¹H and ¹³C NMR data for Cyn

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 7.64 (d, ³J = 14.0 Hz, 1H, CH), 7.26 (s, 1H, CH), 5.92 (d, ³J = 14.0 Hz, 1H, CH), 5.86 (t, ³J = 14.0 Hz, 1H, CH), 5.66 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, CH), 5.35 (s, 1H, CH), 2.61 (m, 2H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.87 (s, 3H, CH₃), 1.82 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (50.3 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 171.4 (C), 169.4 (C), 168.4 (C), 148.6 (C), 138.1 (CH), 135.6 (CH), 130.6 (CH), 122.8 (C), 120.1 (C), 110.2 (C), 106.2 (CH), 94.8 (C), 86.0 (C), 70.2 (CH), 32.7 (CH₂), 24.6 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.3 (2 CH₃), 17.7 (CH₃).

3. Results and discussion

To compare CPC to a conventional chromatographic process to isolate Cyn, we first extracted *C. taxifolia* to yield a crude organic extract. The proportion of Cyn in the crude extract was quantified by HPLC. We noticed a low abundance of Cyn (0.6%, crude extract dry weight) compared to previous studies (Valls et al., 1995). This trend was also observed by Dumay et al. (2002).

Then, we selected a classical chromatographic process to purify Cyn. We combined the most efficient conventional processes to isolate Cyn. We thus proceed in 3 steps: (i) a liquid–liquid extraction to remove polar analytes from the crude extract, (ii) a size exclusion chromatography on the organic fraction, and finally (iii) a diol column chromatography to offer Cyn with a yield of 0.03% (*C. taxifolia* crude extract dry weight, 5% recovery) for the overall process.

Subsequently, CPC was investigated as an alternative process to obtain pure Cyn directly from the crude extract which implies a careful search for a suitable two-phase solvent system that would provide an ideal partition coefficient for an optimal separation of Cyn. The partition coefficient (K), defined as the ratio of a solute distributed in two mutually equilibrated solvent phases, should be in a range between 0.5 and 2 to obtain the best resolution. A smaller K -value elutes the solute closer to the solvent front with lower resolution while a larger K -value tends to give better resolution, but broader, more dilute peaks due to a longer elution time (Ito, 2005). Hence, the partition coefficient K_{Cyn} of Cyn was investigated to determine the optimal two-phase solvent systems for CPC. We selected the Arizona family as it allows a rapid screening (Berthod et al., 2005). The K_{Cyn} -values determined for the Arizona A, Arizona N, Arizona U, and Arizona Z solvent systems are reported in Table 2.

Arizona A and Arizona N solvent systems were investigated and gave large K_{Cyn} -values ($K_{Cyn(Az N)} = 20$) implying a too long separation time ($V_{r(Az N)} = 334$ min). For the next trial, Arizona Z solvent system gave a too small K_{Cyn} -value ($K_{Cyn(Az Z)} = 0.18$), implying a very short separation time ($V_{r(Az Z)} = 7$ min) and poor peak resolution. These solvent systems were therefore not suitable for the separation of Cyn by CPC. Finally, Arizona U was tested and

gave a well-suited K_{Cyn} -value of 1.2 ($V_{r(Az U)} = 24$ min). Therefore, Arizona U was selected to isolate Cyn. For this purpose, the crude extract (1.7 g), suspended in 10 mL of Arizona U, was injected through the CPC system. Sixty-four fractions of 12 mL were collected based on the UV detection (254 nm) and 2 of them were pooled after TLC analyses to yield at the end of the process 8.3 mg of pure Cyn (0.5%, *C. taxifolia* crude extract dry weight, 83% recovery). The structure and purity of Cyn was further confirmed by NMR spectroscopy.

The different parameters (crude extract weight, amount of Cyn isolated, yields, total volume of solvent used, time) for CPC and the classical chromatographic process are summarized in Table 3. Hence, CPC constitutes a short, simple, and efficient one step process to isolate pure Cyn with a higher yield and a lower solvent consumption compared to chromatographic techniques traditionally used.

4. Conclusion

Caulerpenyne (Cyn) is a sesquiterpenoid which exhibited a wide range of biological activities. This secondary metabolite can be produced by total synthesis or extracted from natural sources and in particular from the green alga *C. taxifolia*. Traditional chromatographic techniques used imply at least three steps: (i) a liquid–liquid partition of the crude extract, (ii) a size exclusion chromatography, and finally (iii) a diol column chromatography to give Cyn with a yield of 0.03% (dry weight). In the present study, we have shown that CPC represents an excellent alternative process as pure Cyn is isolated with a higher yield, 0.5% (dry weight), in only one step with a lower solvent consumption in a shorter time. To the best of our knowledge, this is the first time that CPC is used to isolate pure Cyn from a natural matrix. This work may serve as a model for further scale-up and industrial development of Cyn with a larger volume CPC system.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

E. Sfecci is the recipient of a thesis grant from the “Conseil Régional Provence Alpes Côte d’azur”. M. Mehiri research is supported by the ANR/Investissements d’Avenir program via the OCEANOMICS project (grant #ANR-11-BTBR-0008), and the H2020 European program via the EMBRIC project.

References

Adolph, S., Jung, V., Rattke, J., Pohnert, G., 2005. Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 2806–2808.

Aguilar-Santos, G., 1970. Caulerpin, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa*. *J. Chem. Soc. C* 6, 1842–1843.

Amade, P., Joncheray, L., Loru, F., Pesando, D., 2001. Caulerpenyne behaviour in seawater: by-product investigations. In: Gravez, V., Ruitton, S., Boudouresque, C.F., Le Direac’h, L., Meinesz, A., Scabbia, G., Verlaque, M. (Eds.), Fourth International Workshop on *Caulerpa taxifolia*. GIS Posidonie Publ., France, pp. 158–167.

Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L., 1978. Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. *Tetrahedron Lett.* 38, 3593–3596.

Andrade, P.B., Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P., 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem.* 138, 1819–1828.

Athukorala, Y., Yuan, Y.V., 2013. Fucoicidans from marine brown macroalgae: isolation, identification, and potential biological activities. In: Kim, S.-K. (Ed.), *Marine Nutraceuticals: Prospects and Perspectives*. CRC Press, ISBN: 978-1-4665-1351-8, pp. 393–435.

Becerra, M., Boutefnouchet, S., Córdoba, O., Pinto Vitorino, G., Brehu, L., Lamour, I., Laimay, F., Efstathiou, A., Smirlis, D., Michel, S., Kritsanida, M., Flores, M.L.,

Grougnet, R., 2015. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochem. Lett.* 11, 418–423.

Berthod, A., Hassoun, M., Ruiz-Angel, M.J., 2005. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 327–340.

Cengiz, S., Cavas, L., Yurdakoc, K., Pohnert, G., 2011. The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. *Mar. Biotechnol.* 13, 321–326.

Chollet, S., Marchal, L., Meucci, J., Renault, J.-H., Legrand, J., Foucault, A., 2015. Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns. *J. Chromatogr. A* 1388, 174–183.

Commeiras, L., Santelli, M., Parrain, J.-L., 2001. First total synthesis of (±)-taxifolial A and (±)-iso-caulerpenyne. *Org. Lett.* 3, 1713–1715.

Commeiras, L., Santelli, M., Parrain, J.-L., 2003. On the construction of 2-substituted 1,4-diacetoxybutadiene moiety: application to the synthesis of (±)-caulerpenyne. *Tetrahedron Lett.* 44, 2311–2314.

Commeiras, L., Bourdron, J., Douillard, S., Barbier, P., Vanthuyne, N., Peyrot, V., Parrain, J.-L., 2006. Total synthesis of terpenoids isolated from caulerpale algae and their inhibition of tubulin assembly. *Synthesis* 1, 166–181.

Dambeck, M., Sandmann, G., 2014. Antioxidative activities of algal keto carotenoids acting as antioxidative protectants in the chloroplast. *Photochem. Photobiol.* 90, 814–819.

Dumay, L., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Amade, P., 2002. Variations in caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*. *J. Chem. Ecol.* 28, 343–351.

Fischel, J.L., Lemee, R., Formento, P., Caldani, C., Moll, J.L., Pesando, D., Meinesz, A., Grelier, P., Pietra, P., Guerriero, A., 1995. Cell-growth-inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine alga *Caulerpa taxifolia*. *Anticancer Res.* 15, 2155–2160.

Foucault, A.P., Chevolut, L., 1998. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J. Chromatogr. A* 808, 3–22.

Guerriero, A., Depentori, D., D’Ambrosio, M., Pietra, F., 1995. Caulerpenyne-amine reacting system as a model for *in vivo* interactions of ecotoxicologically relevant sesquiterpenoids of the Mediterranean-adapted tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia*. *Helv. Chim. Acta* 78, 1755–1762.

Guerriero, A., D’Ambrosio, M., 1999. Epoxycaulerpenynes: reactivity, and diastereoselective and highly regioselective synthesis by dimethyldioxirane oxidation of caulerpenyne. *Eur. J. Org. Chem.* 1985–1990.

Hodgson, L.M., 1984. Antimicrobial and antineoplastic activity in some South Florida seaweeds. *Bot. Mar.* 27, 387–390.

Hwang, S.H., Jang, J.M., Lim, S.S., 2012. Isolation of fucosterol from *Pelvetia siliquosa* by high-speed countercurrent chromatography. *Fish Aquat. Sci.* 15, 191–195.

Ivesa, L., Blazina, M., Najdek, M., 2004. Seasonal variations in fatty acid composition of *Caulerpa taxifolia* (M. Vahl.) C. Ag. in the northern Adriatic Sea (Malinska, Croatia). *Bot. Mar.* 47, 209–214.

Ito, Y., 2005. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1065, 145–168.

Lee, J.-H., Han, J.W., Ko, J.Y., Lee, W., Ahn, G., Kim, C.Y., Kim, G.H., Jeon, Y.-J., 2016. Protective effect of a freshwater alga, *Spirogyra* sp., against lipid peroxidation *in vivo* zebrafish and purification of antioxidative compounds using preparative centrifugal partition chromatography. *J. Appl. Phycol.* 28, 181–189.

Marchal, L., Legrand, J., Foucault, A., 2003. Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *Chem. Rec.* 3, 133–143.

McConnell, O.J., Hughes, P.A., Targett, N.M., Daley, J., 1982. Effects of secondary metabolites from marine algae on feeding by the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *J. Chem. Ecol.* 8, 1437–1453.

Meinesz, A., Hesse, B., 1991. Introduction et invasion de l’algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanol. Acta* 14, 415–426.

Paul, V.J., Fenical, W., 1986. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpaceae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34, 157–169.

Rabemanolontsoa, H., Saka, S., 2013. Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Adv.* 3, 3946–3956.

Richter, P., Schubert, G., Schaible, A.M., Cavas, L., Werz, O., Pohnert, G., 2014. Caulerpenyne and related bis-enol esters are novel-type inhibitors of human 5-lipoxygenase. *Chem. Med. Chem.* 9, 1655–1659.

Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Bernard, A., Boustie, J., 2009. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *J. Chromatogr. B* 877, 2067–2073.

Valls, R., Artaud, J., Amade, P., Vincente, N., Piovetti, L., 1994. Determination of caulerpenyne, a toxin from the green alga *Caulerpa taxifolia* (Caulerpaceae). *J. Chromatogr. A* 663, 114–118.

Valls, R., Lemee, R., Piovetti, L., Amade, P., Bouaicha, N., 1995. Dosage de la caulerpénine, toxine de l’algue verte *Caulerpa taxifolia*. *Acta Bot. Gallica* 142, 131–135.

Wei, Y., Du, J., Lu, Y., 2012. Preparative separation of bioactive compounds from essential oil of *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze using steam distillation extraction and one step high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.* 35, 2608–2614.

Yuan, Y., Wang, B., Chen, L., Luo, H., Fisher, D., Sutherland, I.A., Wei, Y., 2008. How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1194, 192–198.