



HAL
open science

Metabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse *in vivo* d'alcaloïdes d'Agelas oroides

Nadja Cachet

► **To cite this version:**

Nadja Cachet. Metabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse *in vivo* d'alcaloïdes d'Agelas oroides. Chimie. Université Nice Sophia Antipolis, 2009. Français. NNT: . tel-00455200

HAL Id: tel-00455200

<https://theses.hal.science/tel-00455200>

Submitted on 9 Feb 2010

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences

Ecole Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées
Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes, UMR 6001
CNRS - UNSA

T H E S E

pour obtenir le titre de
Docteur ès Sciences
de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis

Discipline : CHIMIE

présentée et soutenue le

17 Novembre 2009 à 10 heures

dans la salle de conférence du bâtiment de Recherche Chimie de la Faculté des Sciences

Nadja CACHET

Métabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse
in vivo* d'alcaloïdes d'*Agelas oroides

Jury :

| | | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|-----------|
| Rapporteurs : | BANAIGS Bernard | CR1 INSERM | Perpignan |
| | POTIN Philippe | DR2 CNRS | Roscoff |
| Examineurs : | JEFFREE Ross | Dir LEM AIEA | Monaco |
| | VIERLING Pierre | DR1 CNRS | UNSA Nice |
| Directeurs de thèse : | AMADE Philippe | CR1 INSERM | UNSA Nice |
| | THOMAS Olivier | MC Université | UNSA Nice |

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes à Nice, dirigé par le Directeur de Recherche Pierre Vierling, et du laboratoire de l'Environnement Marin (LEM) de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique à Monaco, dirigé par le Docteur Ross Jeffree. Je tiens à les remercier chaleureusement de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je remercie le Docteur Philippe Amade, Chargé de Recherche à l'INSERM, pour m'avoir confié ce sujet de recherche et offert l'opportunité de travailler sur un projet scientifique intéressant et stimulant.

Je tiens aussi à remercier mon encadrant, le Docteur Olivier Thomas, sans qui mes travaux de biosynthèse n'auraient jamais vu le jour ! En plus de ta précieuse aide scientifique, tu m'as initié à la plongée scientifique et m'as permis de participer à deux congrès internationaux très intéressants. Merci encore Olivier.

Merci au Docteur Mohamed Mehiri, nouveau maître de conférences dans l'équipe des substances naturelles marines. Je te sens enthousiaste dans ce que peut offrir le monde marin et souhaite que tes projets professionnels puissent rapidement être mis en place afin que tu t'épanouisses entièrement.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Philippe Potin et au Docteur Bernard Banaigs, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs scientifiques de ce travail.

Merci également à la société PharmaMar et à la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur pour le soutien financier qu'elles m'ont accordé.

Je remercie le Docteur Marc Gaysinsky pour la réalisation de tous les spectres RMN, Jean-Marie Guigonis pour mes spectres HRESIMS et le doctorant Grégory Genta-Jouve qui a eu la gentillesse de modéliser certaines de « mes » molécules sans quoi les deux publications de mes travaux n'auraient pas vu le jour.

Un merci tout particulier à Julijana et Rémi, mes compagnons marsiens, pour m'avoir soutenue pendant mes coups de blues. Vous êtes deux personnes formidables ! Julijana, tu resteras la fille avec laquelle je préfère partager mon lit ! Nos conversations scientifiques ... et un peu moins scientifiques... m'ont beaucoup apporté ! Rémi, tu resteras le garçon avec lequel je préfère parler de mes problèmes, ton sens de l'analyse et ton relativisme font parfois du bien !

Merci à l'équipe « EDC » pour avoir mis une bonne ambiance dans le bureau des étudiants. Agnès, ma partenaire sportive... enfin, si on avait eu le temps ! Pascale, ta gentillesse fait du bien ! Julien, tes hormones mettent l'ambiance !

Merci aux docteurs Loïc et Vaness' et aux doctorants Nico et Vincent pour les quelques sorties et bbq, forts agréables ma foi, qu'on a pu faire.

Un grand merci à « mes » stagiaires, par ordre alphabétique Alban et Loïc, qui m'ont beaucoup aidé dans ma recherche.

Je remercie également toute la clique de l'AIEA, Fanny, Franky, Jean-Louis, Thomas et Sophie qui m'ont prouvé que les biologistes étaient vraiment très conviviaux. Un merci particulier à Franky qui m'a souvent aidé durant diverses étapes des expériences de biosynthèse.

Je tiens à remercier tous les personnes que j'ai appréciées tout au long de ce doctorat. Les permanents : Elisabet, Lionel, Maël, Nicoco le Toulousaing, Sandra et Sylvain. Les docteurs : Greg et Risoleta. Les doctorants : Céline, Charline, Charlotte et Rim. Et les stagiaires : Adil, Alice, Christelle, Cindy, Diana, Erik, Haby, Julie, Lucie, Kim, Nathalie et Pilar.

Merci énormément à La Semeuse et à tous ses membres, j'ai beaucoup aimé nager avec vous durant ces 3 ans. Vincent et Nico, les entraîneurs de choc qui ont même réussi à me faire participer à des compétitions ! Cécile, Corine, Laurence et Mireille, notre ligne était la plus sympa ;-). Mimi, tu souhaiteras bon courage à ton fils de ma part ! Ce n'est pas parce que je ne vous nomme pas que je vous oublie, merci également à tous les autres, ces soirées dans l'eau en votre compagnie ont été très agréables.

Bien sûr je remercie mes parents, mon frère et ma sœur, pour m'avoir soutenu moralement et aussi financièrement de temps en temps ! Merci papa pour ton aide dans la résolution de doubles intégrales dont je ne me rappelais que le nom, merci maman pour tes petits programmes sur VBA. Merci Jérémie d'avoir su être patient et compréhensif dans les moments difficiles où je faisais passer ma thèse avant notre couple !

Enfin, ma dernière pensée ira à mon Grand-père qui, je pense, aurait été fier de sa petite fille.

Table des matières

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 1 |
| ABREVIATIONS | 5 |
| GLOSSAIRE | 6 |
| INTRODUCTION GENERALE | 7 |
| PARTIE A : ETUDE CHIMIQUE DE L'EPONGE CARAÏBE <i>PANDAROS ACANTHIFOLIUM</i> | 13 |
| I. CARACTERISTIQUES TAXONOMIQUES ET CHIMIQUES | 15 |
| <i>I.1. Description du genre Pandaros</i> | 15 |
| <i>I.2. Métabolites bioactifs de l'ordre Poecilosclerida</i> | 17 |
| I.2.1. Les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques | 17 |
| I.2.2. Les alcaloïdes guanidiniques tricycliques | 18 |
| I.2.3. Les alcaloïdes guanidiniques mono et bicycliques | 20 |
| <i>I.3. Métabolites isolés de Pandaros acanthifolium</i> | 20 |
| II. PROTOCOLE D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT | 21 |
| III. ELUCIDATIONS STRUCTURALES | 24 |
| <i>III.1. Le pandaroside A (I) et son ester méthylique (II)</i> | 24 |
| <i>III.2. Le pandaroside B (III)</i> | 33 |
| <i>III.3. Le pandaroside C (IV) et son ester méthylique (V)</i> | 35 |
| <i>III.4. Le pandaroside D (VI) et son ester méthylique (VII)</i> | 37 |
| <i>III.5. Autres pics du profil de purification (Figure n°14)</i> | 39 |
| IV. LES SAPONINES STEROÏDIENNES ISOLEES DE SPONGIAIRES | 41 |
| <i>IV.1. Les sarasinosides</i> | 41 |
| <i>IV.2. Les érylosides</i> | 43 |
| <i>IV.3. Les autres saponines isolées d'éponges</i> | 44 |
| PARTIE B : ETUDE CHIMIQUE DE DEUX CNIDAIRES MEDITERRANEENS | 49 |
| I. LE PROJET ECIMAR | 51 |
| <i>I.1. Le contexte</i> | 51 |
| <i>I.2. Les objectifs du projet ECIMAR</i> | 52 |
| <i>I.3. Empreintes chimiques des organismes d'étude</i> | 54 |
| I.3.1. Préparation de l'échantillon | 54 |
| I.3.2. Obtention des empreintes chimiques | 55 |
| I.3.3. Isolement et caractérisation de nouveaux métabolites secondaires | 55 |
| II. LA CLASSE HEXACORALLIA | 56 |
| III. ASTROIDES CALYULARIS | 58 |
| <i>III.1. Extraction et isolement</i> | 62 |
| <i>III.2. Elucidations structurales</i> | 65 |
| III.2.1. La famille des aplysinopsines | 66 |
| III.2.1.1. L'aplysinopsine (VIII, 42) | 66 |
| III.2.1.2. La 6-bromoaplysinopsine (IX, 43) | 68 |
| III.2.1.3. La 6-bromo-N-méthylaplysinopsine (X), molécule nouvelle | 72 |
| III.2.2. La famille des orthidines | 75 |
| III.2.2.1. L'orthidine C (XI) | 75 |
| III.2.2.2. L'orthidine A et D (XII et XIII) | 81 |
| IV. PARAZOANTHUS AXINELLAE | 86 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV. 1. Protocole d'extraction et d'isolement | 88 |
| IV.2. Elucidations structurales | 90 |
| IV.2.1. Les composés connus isolés de <i>Parazoanthus axinellae</i> | 90 |
| IV.2.1.1. La famille des zoanthoxanthines..... | 90 |
| IV.2.1.2. La famille des ecdystéroïdes | 96 |
| IV.2.2. La famille des parazoanthines | 104 |
| IV.2.2.1. La parazoanthine A (XXI)..... | 104 |
| IV.2.2.2. La parazoanthine B (XXII)..... | 109 |
| IV.2.2.3. La parazoanthine C (XXIV)..... | 111 |
| IV.2.2.4. La parazoanthine D (XXIV) | 112 |
| IV.2.2.5. La parazoanthine E (XXV)..... | 114 |
| IV.2.2.6. Les parazoanthines F et G (XXVI-XXVII)..... | 116 |
| IV.3. Considérations écologiques sur les parazoanthines..... | 118 |
| IV.4. Fluctuation de la production des métabolites secondaires..... | 120 |
| IV.4.1. Liée au morphe..... | 120 |
| IV.4.2. Géographique..... | 124 |
| IV.4.3. Temporelle..... | 130 |
| PARTIE C : BIOSYNTHESE ET METABOLISME SECONDAIRE DES P2AI | 133 |
| I. PRESENTATION | 135 |
| I.1. Difficultés expérimentales | 135 |
| I.2. Techniques d'incorporation | 136 |
| I.3. Etudes sur les éponges | 138 |
| I.3.1. Dérivés de la dibromotyrosine..... | 139 |
| I.3.2. Dérivés isocyanures, isocyanates et formamides | 141 |
| I.3.3. Stérols | 146 |
| I.3.4. Acides gras | 151 |
| I.3.5. Discorhabdines | 155 |
| I.3.6. Dérivés pyrrole-2-aminoimidazoles | 156 |
| I.4. Bilan..... | 158 |
| II. CHOIX DE L'ORGANISME D'ETUDE | 159 |
| II.1. <i>Ircinia oros</i> | 160 |
| II.2. <i>Haliclona fulva</i> | 162 |
| II.3. <i>Crambe crambe</i> | 164 |
| II.4. <i>Axinella verrucosa</i> | 166 |
| II.5. <i>Parazoanthus axinellae</i> | 168 |
| II.6. <i>Agelas oroides</i> | 170 |
| III. METABOLISME SECONDAIRE DES P2AI DANS <i>AGELAS OROIDES</i> | 172 |
| III.1. Métabolites isolés d' <i>Agelas oroides</i> (Partenariat ICSN) | 172 |
| III.2. Mise en place du protocole de biosynthèse <i>in vivo</i> et <i>ex situ</i> | 175 |
| III.2.1. Détermination de la quantité de radioactivité à ajouter | 175 |
| III.2.1.1. Seuil de détection en ¹⁴ C du Radio-TLC..... | 176 |
| III.2.1.2. Seuil de détection en ¹⁴ C du Compteur β à scintillation liquide..... | 177 |
| III.2.1.3. Incorporation des précurseurs dans <i>Agelas oroides</i> | 177 |
| III.2.2. Cinétique d'incorporation des acides aminés | 181 |
| III.3. Protocole de purification des extraits radiomarqués d' <i>Agelas oroides</i> | 184 |
| III.3.1. Purification par HPLC d'une phase organique radioactive d' <i>Agelas oroides</i> | 184 |
| III.3.2. CCM analytique..... | 185 |
| III.3.3. CCM préparative | 186 |
| III.3.3. HPTLC..... | 187 |
| III.4. Cinétique de métabolisation de la proline par <i>A. oroides</i> | 189 |
| III.5. Biosynthèse des P2AI à partir des quatre acides aminés..... | 193 |
| III.6. Influence d'un stress sur la biosynthèse des P2AI..... | 202 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.6.1. Purification de la phase organique dessalée de B7..... | 204 |
| III.6.2. Analyses des échantillons déposés sur HPTLC de silice greffée C ₁₈ | 207 |
| III.7. Cinétique de métabolisation des précurseurs..... | 209 |
| III.7.1. Cinétique de métabolisation de la [U- ¹⁴ C]-L-proline | 209 |
| III.7.1.1. Purification du Pic 3 de l'extrait organique de A8..... | 212 |
| III.7.1.2. Purification du Pic 3 de l'extrait organique de E8 | 216 |
| III.8.2. Cinétique de métabolisation de la [U- ¹⁴ C]-L-histidine | 218 |
| III.9. Conclusion et perspectives..... | 221 |
| CONCLUSION GENERALE | 225 |
| PARTIE EXPERIMENTALE | 231 |



Abréviations

Ci-dessous, la définition des abréviations présentes dans le texte :

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AcOEt | Acétate d'éthyle |
| AF | Acide Formique |
| AIEA | Agence Internationale de l'Energie Atomique |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| COSY | COrrrelated SpectroscopY |
| DAD | Diode Array Detector – Détecteur à barrette de diodes |
| DC | Dichroïsme circulaire |
| DEDL | Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière |
| DIMAR | Diversité, évolution et écologie fonctionnelle MARines |
| DMSO | DiMéthylSulfOxyde |
| ESI | Ionisation ElectroSpray <i>Rq. Pour plus de commodité, l'abréviation anglaise a été choisie</i> |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HPLC | Chromatographie Liquide Haute Performance <i>Rq. Pour plus de commodité, l'abréviation anglaise a été choisie</i> |
| HPTLC | Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance |
| HRESIMS | Spectrométrie de Masse Haute Résolution (Ionisation ElectroSpray) <i>Rq. Pour plus de commodité, l'abréviation anglaise a été choisie</i> |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| ICSN | Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif sur Yvette |
| IR | InfraRouge |
| LCMBA | Laboratoire de Chimie de Molécules Bioactives et des Arômes |
| MeOH | Méthanol |
| Multiplicité des signaux RMN | s : singulet d : doublet t : triplet br : large (br s : singulet large) |
| MS | Spectrométrie de Masse <i>Rq. Pour plus de commodité, l'abréviation anglaise a été choisie</i> |
| NOESY | Nuclear Overhauser SpectroscopY |
| REL | Radio Ecology Laboratory (Laboratoire de Radio-Ecologie) |
| P2AI | Pyrrrole-2-aminoimidazole |
| R_f | Rapport frontal |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| TFA | Acide TrifluoroAcétique |
| UV | Ultra Violet |

Glossaire

Ci-dessous, la définition des mots soulignés dans le texte.

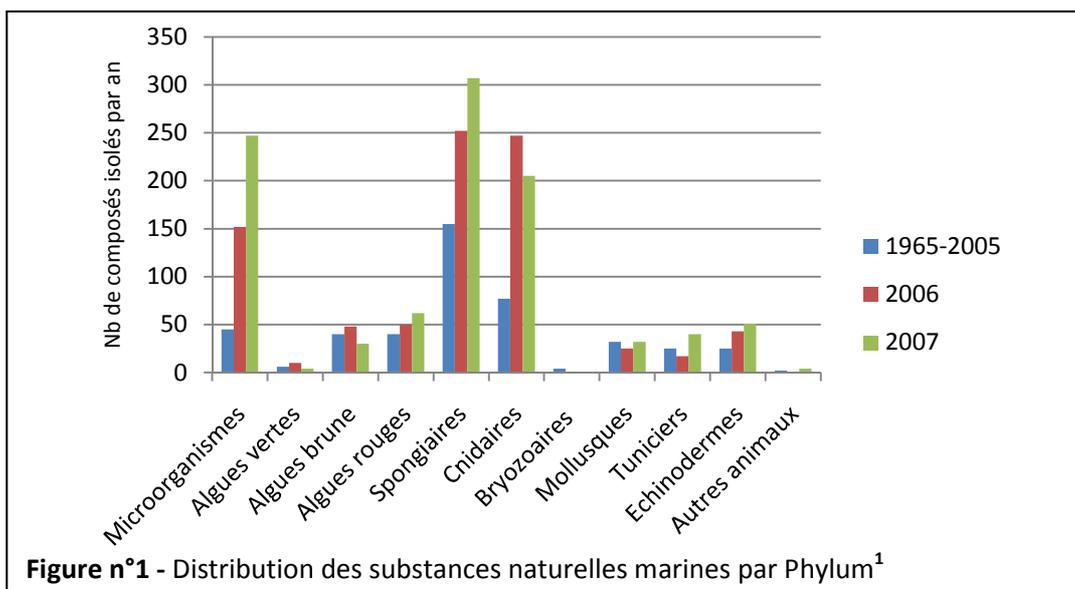


| | |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Archéocytes | Les archéocytes, qui sont éparpillés dans le mésohyl, ont la capacité de se transformer en différent type de cellules, spécialement chez les Desmospongiae. En se reproduisant en cellules non spécialisées, elles constituent une réserve embryonique d'où sont dérivés différentes cellules spécialisées. |
| Diversité supraspécifique | Une même espèce peut être présente sur plusieurs biotopes. Du fait de la variété des biotopes existante, les biocénoses ainsi créées sont soumises à des conditions variées. Ainsi, une même espèce de deux biocénoses différentes peut présenter des caractéristiques différentes. Cela constitue la diversité supra spécifique. |
| Hétérotrophe | Se dit des espèces qui prélèvent dans le milieu extérieur les substances organiques dont elles ont besoin. |
| Macrophage | Se dit d'un organisme vivant qui se nourrit de proies ayant une taille supérieure à celle de sa bouche. |
| Mégasclères | Spicules généralement de longueur supérieure à 100 µm et formant une charpente squelettique. |
| Microscières | Spicules généralement de longueur inférieure ou égale à 100 µm, elles représentent un critère très important et constant intragénétiqument. |
| Paraphylétique (groupe) | En systématique phylogénétique, un groupe paraphylétique comprend une espèce ancestrale et une partie seulement de ses descendants. Un groupe paraphylétique est défini par au moins une absence de caractère. |
| Spicules | Élément discret du squelette (calcaire ou siliceux) produit par scérocytes. Ils sont divisés en deux catégories, mégasclères ou microscières, suivant leur taille. |
| Spongine | Substance élastique constituée de scléroprotéines fibrillaires et apparentée au collagène. |

Introduction générale

L'exploration du milieu marin comme source potentielle de substances naturelles bioactives aux structures originales est en plein essor. L'océan couvre près de 70 % de la surface terrestre et abrite quasiment la moitié de sa biodiversité totale. L'étude de cette biodiversité n'a réellement pu commencer qu'avec le développement de la plongée sous-marine il y a quelques décennies. De ce fait, encore aujourd'hui, des centaines de nouvelles espèces sont décrites chaque année et le monde marin a encore beaucoup à nous offrir. A une époque où les activités humaines induisent des dérèglements importants sur l'équilibre et la richesse de cette biodiversité, il est urgent de pouvoir la décrire sous toutes ses facettes et la valoriser pour pouvoir l'utiliser durablement.

La biodiversité des océans est la conséquence d'une très longue histoire évolutive qui a permis au vivant d'expérimenter de nombreux modèles moléculaires pour ne garder que les plus adaptés à divers environnements et menaces. A ce jour, d'après la base de données MarinLit (version 2009), plus de 16 000 molécules naturelles marines ont été décrites dont 33 % proviennent de spongiaires, 25 % d'algues, 18 % de cnidaires et les 24 % restant ont été isolés d'autres organismes marins (bryozoaires, échinodermes, mollusques, tuniciers, etc.) (**Figure n°1**).¹

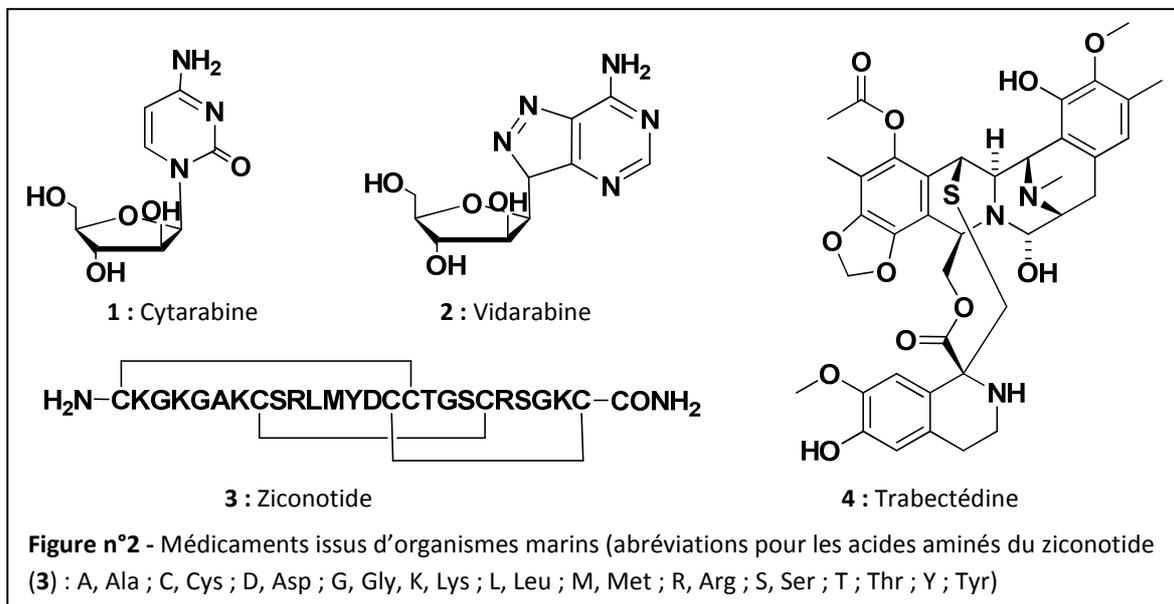


Environ 1 % de ces molécules présente un potentiel pharmacologique, une quinzaine de candidats sont à divers stades des phases cliniques, et actuellement quatre médicaments d'origine marine sont commercialisés :

- la cytarabine (Aracytine®**1**) et la vidarabine (Vira-A®**2**), respectivement antitumoral et antiviral issues de l'éponge *Tectitethya cripta* (anciennement dénommée *Cryptotethya cripta*) ;
- le ziconotide (Prialt®**3**), analgésique équivalent synthétique d'une ω -conotoxine isolée du mollusque marin *Conus magnus* ;

¹ Blunt, J.W. ; Copp, B.R. ; Hu, W.-P. ; Munro, M.H.G. ; Northcote, P.T. ; Prinsep, M.R. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26, 170-244.

- et le plus récent, la trabectédine (Yondelis®, 4) issue de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, a obtenu en juillet 2007 une AMM européenne dans l'indication sarcome avancé des tissus mous, notamment liposarcomes et leiomyosarcomes, après échec des autres traitements.



La chimie combinatoire, permettant un criblage à haut débit de nombreuses molécules, n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés par les entreprises pharmaceutiques. De ce fait, depuis le début du XXI^e siècle, un regain d'intérêt pour les molécules d'origine naturelle est apparu.^{2,3} Malheureusement, ces dernières années, la course à l'approvisionnement en organismes s'est traduite par la réalisation de missions de récoltes dans toutes les régions du monde souvent au détriment d'une connaissance accrue de la biodiversité. La convention de Rio sur la diversité biologique en 1992 et le mandat de Djakarta qui a suivi en 1995 ont sensibilisé de nombreux pays à ce problème qui veulent maintenant pouvoir évaluer cette biodiversité tant pour la préserver (réalisation d'inventaires, identification des espèces endémiques, etc.) que pour la valoriser (isolement de molécules bioactives d'intérêt cosmétologique ou thérapeutique). C'est dans ce cadre que le projet ECIMAR a été créé en 2006 et financé par l'ANR Biodiversité pour une durée de quatre ans. Ce programme de recherche fédère taxonomistes, biologistes et chimistes afin de constituer un réseau d'excellence pour l'étude et la valorisation de la chimiodiversité méditerranéenne. L'intérêt n'est pas seulement de découvrir de nouveaux métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques intéressantes, il est aussi de mieux comprendre comment s'exprime et varie cette diversité chimique et de l'utiliser comme indicateur de biodiversité ou indicateur environnemental.

La mer Méditerranée, qui ne représente que 0,82 % de la surface des océans, abrite 4 à 18 % de la biodiversité marine mondiale et les pressions climatiques et anthropiques y sont particulièrement importantes.⁴ L'impact potentiel de ces perturbations pourrait avoir des conséquences dramatiques

² Peterson, I. ; Anderson, E.A. *Science*, **2005**, 310, 451-453.

³ Cragg, G.M. ; Grothaus, P.G. ; Newman, D.J. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 3012-3043.

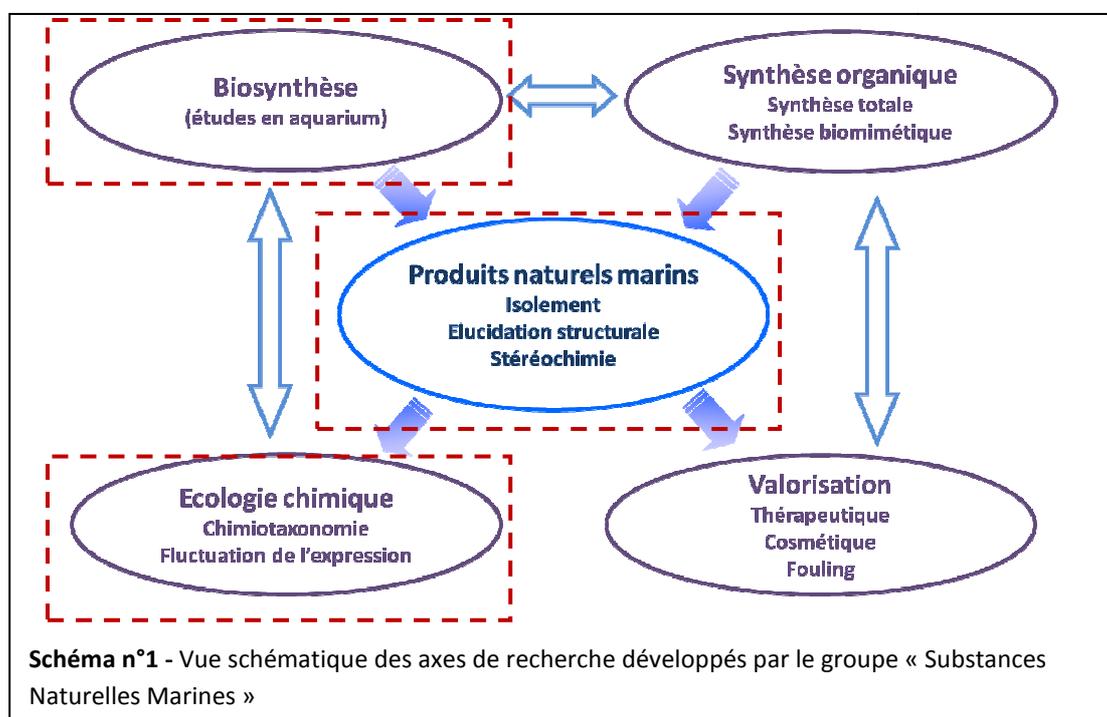
⁴ Boudouresque, C.-F. *Sci. Rep. Port-Cros natl. Park, Fr.*, **2004**, 20, 97-146.

pour la conservation de nombreux écosystèmes et espèces marines. De fait, un effort résolu de recherche doit être soutenu pour caractériser la biodiversité marine méditerranéenne et la valoriser. ECIMAR s'inscrit donc dans une problématique générale qui vise aussi à comprendre les mécanismes de réponse et d'adaptation à différents stress chez les organismes marins producteurs de molécules bioactives.

Les modèles biologiques de ce projet vivent essentiellement au sein de communauté benthiques emblématiques de Méditerranée (coralligène et grottes semi-obscur) qui, à l'instar des récifs coralliens, abritent une forte diversité, dont les taxons les plus prometteurs d'un point de vue pharmacologique.

Parmi les espèces étudiées, se trouvent de nombreuses espèces menacées par le changement global, souvent endémiques et, de plus, susceptibles de contenir des métabolites bioactifs originaux dont la valorisation pourrait être envisagée. Les spongiaires et les cnidaires sont deux groupes d'organismes qui font l'objet d'une attention particulière car connus pour produire une grande diversité de métabolites secondaires.

Ainsi, en tant que partenaire du projet ECIMAR et à travers une collaboration avec la société PharmaMar, le groupe « Substances Naturelles Marines » du Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et Arômes (LCMBA) développe quatre axes de recherche autour de l'isolement de produits naturels marins résumés sur le **Schéma n°1**.



En complément de l'isolement de produits naturels marins, ce manuscrit présente certains résultats de deux axes de recherche : Biosynthèse et Ecologie chimique (**Schéma n°1**).

Ainsi, les thèmes développés dans ce manuscrit sont :

- l'étude chimique de l'éponge *Pandaros acanthifolium* ayant permis l'isolement d'une nouvelle famille de stéroïdes.
- l'étude chimique de deux cnidaires méditerranéens, *Astroïdes calycularis* et *Parazoanthus axinellae* à travers laquelle une nouvelle aplysinopsine et une nouvelle famille d'alcaloïdes ont été isolées. L'étude chimique de *P. axinellae* a également mis en évidence une différence chimique entre deux morphotypes de l'espèce.
- la mise en place d'un protocole de biosynthèse *in vivo* pour l'étude du métabolisme secondaire de l'éponge *Agelas oroides*.

Partie A : Etude chimique de l'éponge caraïbe *Pandaros acanthifolium*

Le groupe « Substances Naturelles Marines » du LCMBA consacre une de ses thématiques à la recherche de molécules cytotoxiques issues d'organismes marins récoltés dans les DOM-TOM français. Durant les différentes missions organisées dans le cadre d'un contrat de collaboration avec l'entreprise espagnole PharmaMar, les organismes marins sont prélevés et immédiatement congelés à -18 °C. Cette mission de collecte est suivie d'un criblage biologique haut-débit (HTS) sur des extraits organiques permettant de ne sélectionner que les organismes les plus actifs contre les lignées cellulaires cancéreuses testées. Pour cela, un échantillon de chaque organisme est extrait par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et sa cytotoxicité est évaluée. Les organismes présentant les extraits organiques les plus bioactifs sont sélectionnés pour des études complémentaires dans le but de découvrir de nouvelles molécules naturelles cytotoxiques.

Durant l'été 2003, un spécimen de l'éponge marine *Pandaros acanthifolium* a été prélevé dans le cadre d'une mission de récolte d'organismes marins au large de la Martinique. L'extrait organique (MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) de cette éponge a montré une cytotoxicité prometteuse (**Tableau 1**), la classant dans les organismes à étudier. L'éponge a ainsi été envoyée au groupe « Substances Naturelles Marines » pour une étude chimique approfondie.

Tableau 1 – Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait organique (MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) de *Pandaros acanthifolium*

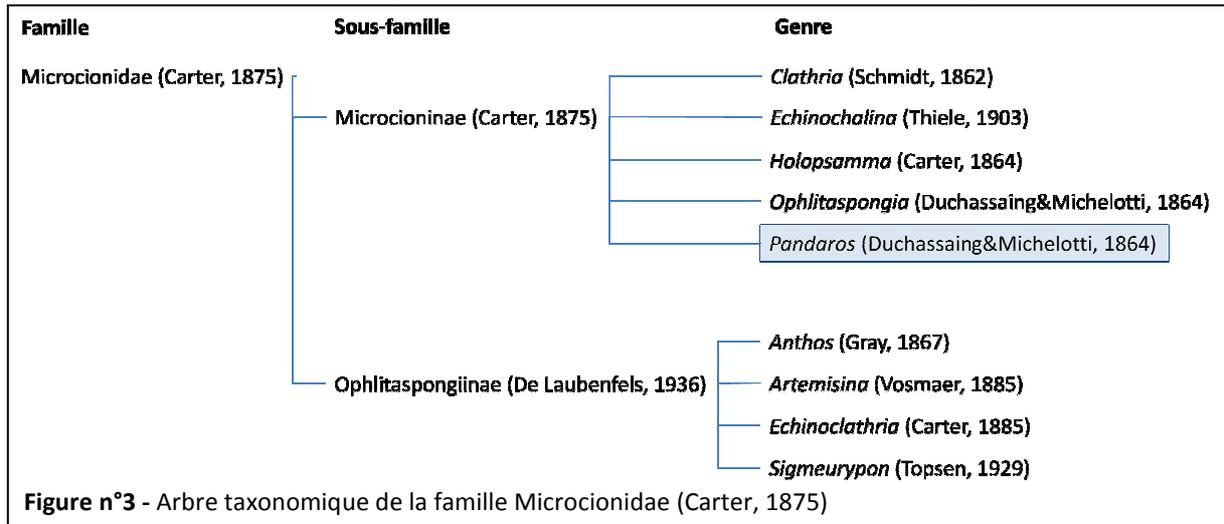
| | Pourcentage de croissance : | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|---------------|-----|-----|----------------------|-----|-----|
| | <-50 % | | | <0 % | | | <50 % | | |
| Concentrations testées : 25 µg.mL ⁻¹ ; 5 µg.mL ⁻¹ ; 1 µg.mL ⁻¹ . | | | | | | | | | |
| | HT29 (Colon) | | | A549 (Poumon) | | | SK-MEL-28 (Mélanome) | | |
| Extrait du 08/07/03 | -60 | -51 | -20 | -70 | -26 | 26 | -77 | -83 | -70 |
| Extrait du 01/09/03 | -21 | 7 | 17 | -55 | 36 | 111 | -76 | -66 | -66 |

I. Caractéristiques taxonomiques et chimiques

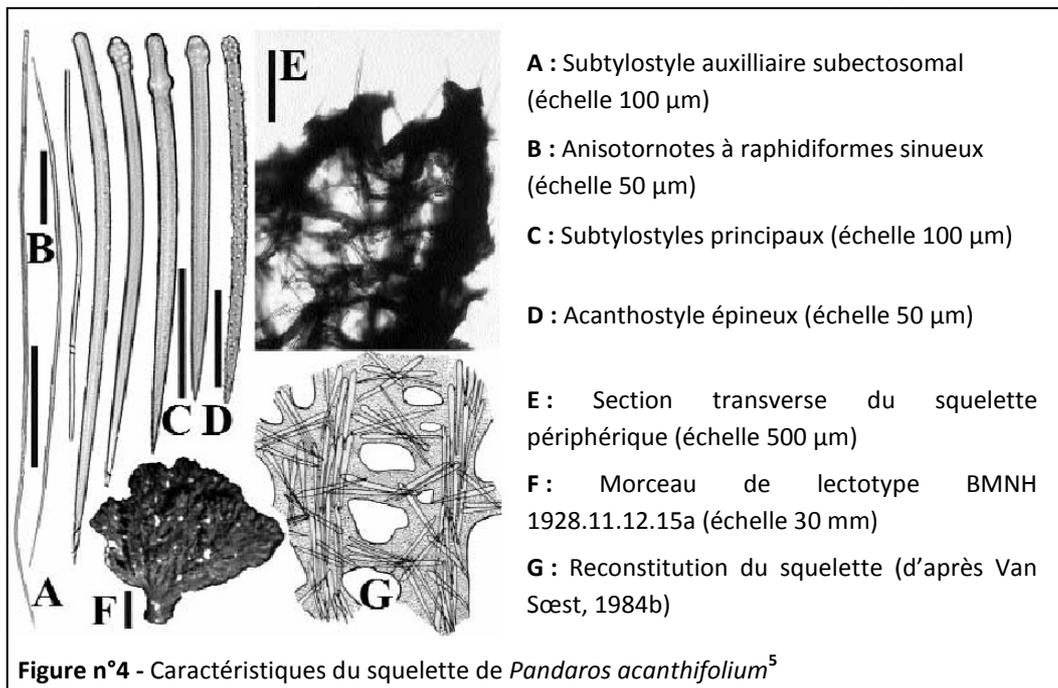
I.1. Description du genre *Pandaros*

Le genre *Pandaros* était initialement constitué de six espèces : *P. acanthifolium*, *P. angulosa*, *P. arbuscula*, *P. lugubre*, *P. pennatum* et *P. walpersi*. Après révision taxonomique, seule *P. acanthifolium* est restée dans ce genre, *P. walpersi* a changé d'ordre, et, est actuellement connue sous le nom de *Ptilocaulis walpersi* (Halichondrida : Axinellidae) tandis que les quatre autres espèces sont réparties dans différents genres de l'ordre Poecilosclerida comme *Mycale* (*Zygommycale*) pour *P. angulosa* et *Monanchora* pour *P. arbuscula*.⁵ *Pandaros* fait partie de la famille vivipare Microcionidae composée de neuf genres, 12 sous-genres et approximativement 460 espèces décrites à travers le monde. Les éponges de cette famille possèdent un squelette principal constitué de mégasclères monoactines et de fibres de spongine, les microsclères les plus représentatives étant de type palmate isochelae. Occasionnellement, les spicules sont partiellement ou totalement remplacés par des détritrus.

⁵ Hooper, J.N.A. ; Van Soest, R.W.M. In: *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, Kluwer Academic/Plenum publishers, **2002**, 1, 432-468.



Les Microcionidae sont réparties en deux sous-familles : les Ophlitaspongiinae (De Laubenfels, 1936) et les Microcioninae (Carter, 1875), dont font partie les éponges du genre *Pandaros* (**Figure n°3**). Ces éponges sont caractérisées par des fibres de spongine aplaties incluant des styles auxiliaires lisses (type rhabdose) et rendues épineuses par de rares styles lisses ou des acanthoses (**Figure n°4**).⁵



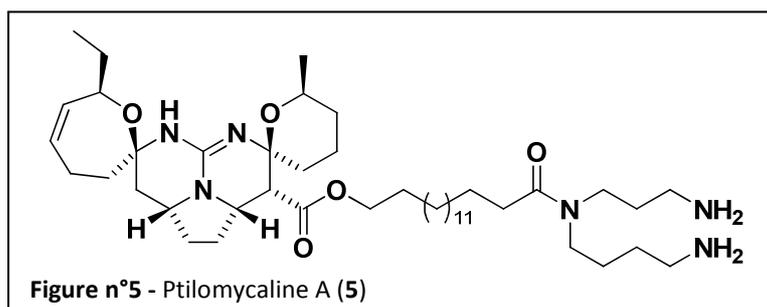
I.2. Métabolites bioactifs de l'ordre Poecilosclerida

La famille Microcionidae, qui contient le genre *Pandaros*, fait partie de l'ordre Poecilosclerida. Les éponges de cet ordre sont connues pour produire des métabolites secondaires bioactifs intéressants d'un point de vue structural, biosynthétique et thérapeutique : les alcaloïdes guanidiniques polycycliques.^{6,7,8} Trois grandes familles de ce type d'alcaloïdes sont représentatives de l'ordre Poecilosclerida : les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques telles que les crambescidines, tricycliques comme les batzelladines, et mono ou bicycliques telles que les crambines.

17

I.2.1. Les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques

Le premier métabolite de cette famille, isolé en 1989 de l'éponge caraïbe *Batzella sp.* (identifiée initialement *Ptilocaulis spiculifer*), est la ptilomycaline A (5).⁹ Ce composé présente une activité cytotoxique et antivirale.



En 1991, les crambescidines (6-9), isolées de l'éponge méditerranéenne *Crambe crambe* par Jares-Erijman *et al.* enrichissent cette famille.¹⁰

Depuis, de nombreux métabolites issus de diverses éponges sont venus agrandir la famille des alcaloïdes pentacycliques et la très grande majorité de ces molécules présente une activité thérapeutique intéressante : antiparasitaire, antimicrobienne, antivirale, antifongique ou cytotoxique.

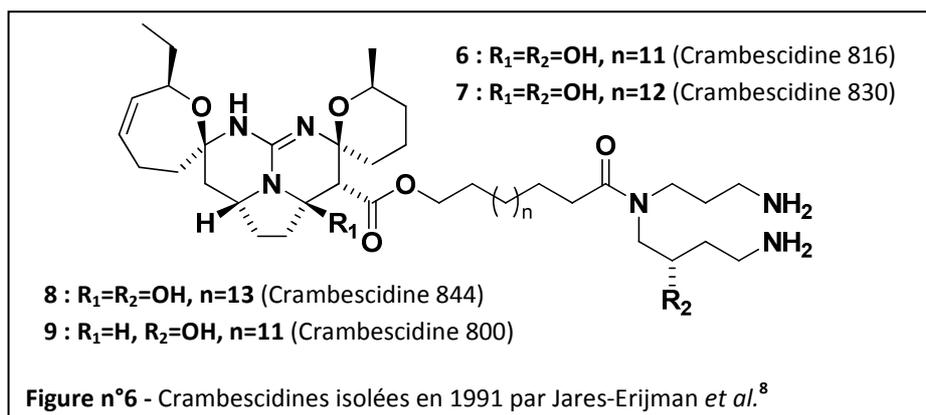
⁶ Berlinck, R.G.S. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 339-365.

⁷ Berlinck, R.G.S. *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*, 617-649.

⁸ Berlinck, R.G.S. ; Kossuga, M.H. *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, *22*, 526-550.

⁹ Kashman, Y. ; Hirsh, S. ; McConnell, O.J. ; Ohtani, I. ; Kusumi, T. ; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8925-8926.

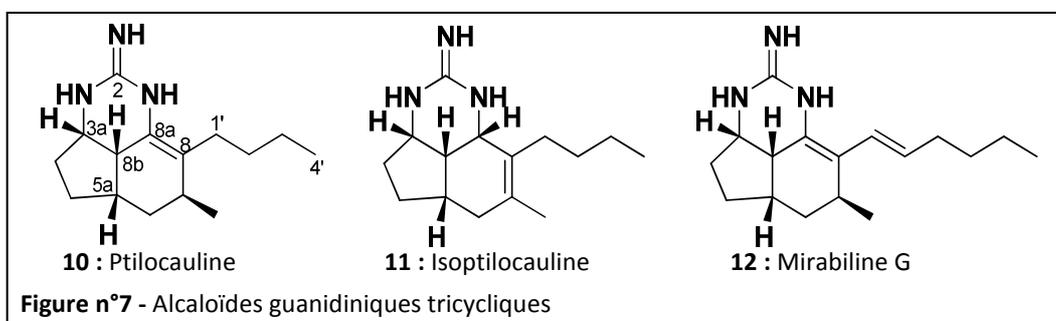
¹⁰ Jares-Erijman, E.A. ; Sakai, R. ; Rinehart, K.L. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 5712-5715.



I.2.2. Les alcaloïdes guanidiniques tricycliques

Il existe deux grandes sous-familles de ce type d'alcaloïdes différant par la position du motif guanidine dans le tricycle.

La ptilocauline (**10**) et l'isoptilocauline (**11**), isolées en 1981 de *Ptilaucaulis spiculifer*, sont les premiers représentants d'une des deux sous-familles.¹¹ A ce jour, le dernier métabolite venu compléter cette sous-famille est la mirabiline G (**12**), isolée en 2001 d'une éponge australienne du genre *Clathria*.¹²



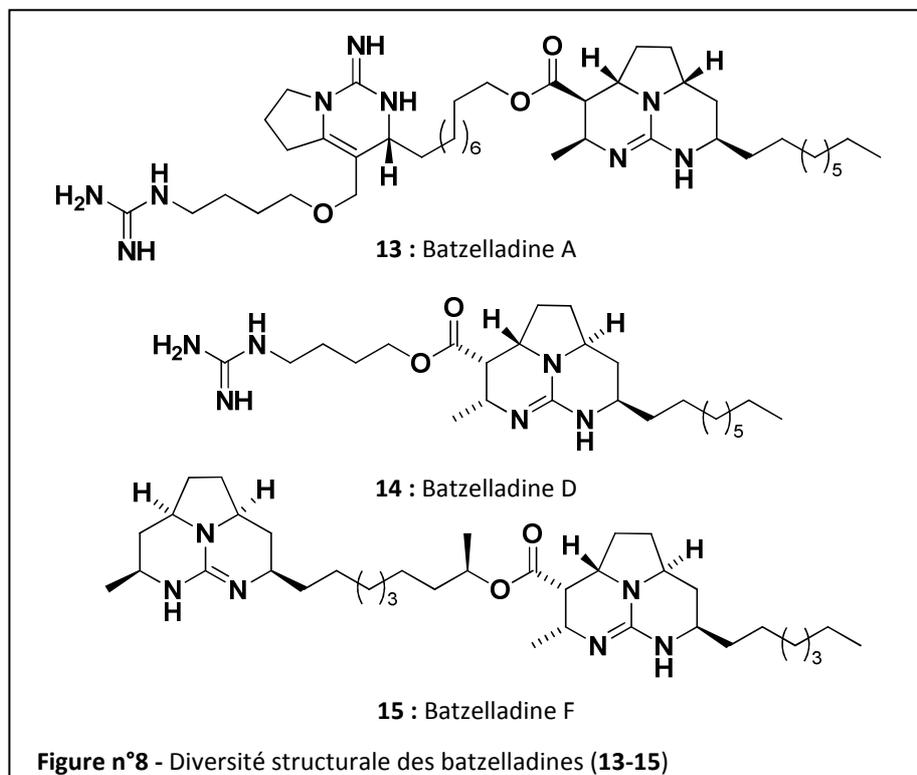
La deuxième sous-famille d'alcaloïdes guanidiniques tricycliques est celle des batzelladines. Elle a été découverte en 1995 d'une éponge du genre *Batzella* récoltée aux Bahamas.¹³ Comparativement à la ptilocauline (**10**) et ses dérivés, les batzelladines (**13-15**) sont caractérisées par la position centrale du motif guanidine dans le tricycle. Certaines, comme la batzelladine A (**13**) ou F (**15**), portent en plus un motif guanidine bicyclique ou tricyclique relié au premier tricycle par une chaîne alkyle. Les

¹¹ Harbour, G.C. ; Tymiak, A.A. ; Rinehart, K.L. ; Shaw, P.D. ; Hughes, R. ; Mizsak, S.A. ; Coats, J.H. ; Zurenko, G.E. ; Li, L.H. ; Kuentzel, S.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 5604-5606.

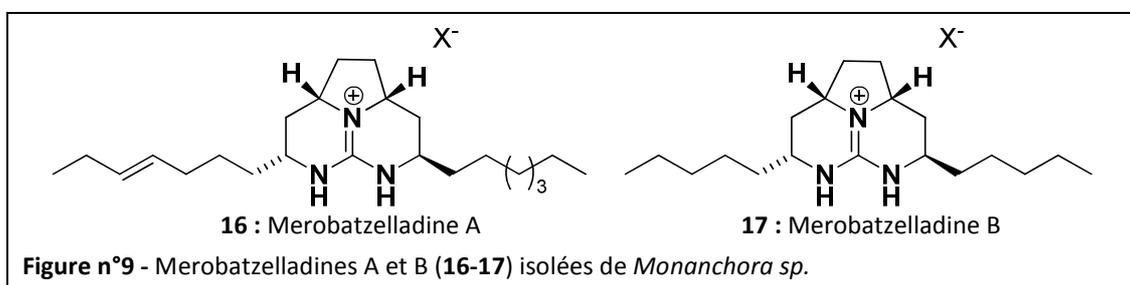
¹² Capon, R.J. ; Miller, M. ; Rooney, F. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 643-644.

¹³ Patil, A.D. ; Kumar, N.V. ; Kokke, W.C. ; Bean, M.F. ; Freyer, A.J. ; Brosse, C.D. ; Mai, S. ; Truneh, A. ; Carte, B. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1182-1188.

batzelladines ont été testées en tant qu'agent anti-VIH. Une activité encourageante a été décelée pour les batzelladines de type A (**13**), tandis qu'elle a été modérée pour les batzelladines de type F (**15**) et nulle dans le cas des batzelladines de type D (**14**) ; la présence du bicyclic serait donc nécessaire à l'obtention de l'activité anti-VIH.



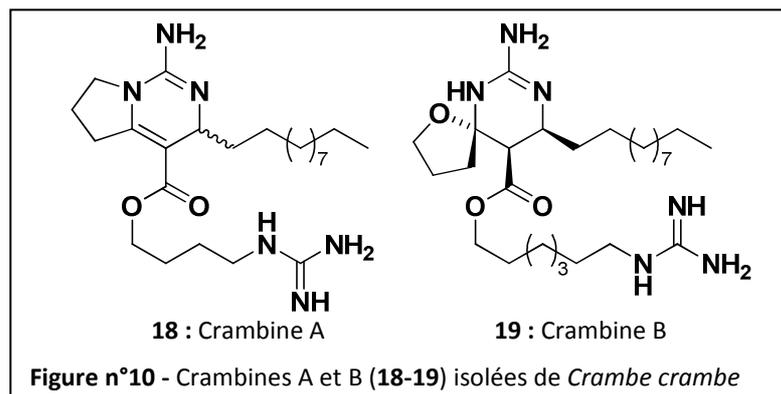
Les derniers métabolites rattachés à cette sous-famille ont récemment été isolés d'une éponge du genre *Monanchora* et présentent des propriétés antibactériennes, il s'agit des merobatzelladines A et B (**16-17**).¹⁴



¹⁴ Takishima, S. ; Ishiyama, A. ; Iwatsuki, M. ; Otoguro, K. ; Yamada, H. ; Ōmura, S. ; Kobayashi, H. ; Van Soest, R.W.M. ; Matsunaga, S. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 2655-2658.

I.2.3. Les alcaloïdes guanidiniques mono et bicycliques

Les premiers représentants de la famille des alcaloïdes guanidiniques mono- et bicycliques sont les crambines A et B (**18-19**) isolées de l'éponge méditerranéenne *Crambe crambe* en 1990.¹⁵ Jares-Erijman *et al.* puis Snider *et al.* ont corrigé la structure de la crambine B (**19**), renommée crambescine B, pour définitivement adopter la stéréochimie représentée sur la **Figure n°10**.^{16,17}



Les crambines ne présentent aucune activité biologique intéressante, notamment anti-VIH.¹³ Ainsi, d'après les données sur la crambine A (**18**), la différence d'activité entre les batzelladines de type A (**13**), avec un bicyclic supplémentaire, et les batzelladines de type D (**14**), ne peut pas être due à la seule présence du bicyclic mais proviendrait de la synergie des deux motifs bi- et tricycliques.

I.3. Métabolites isolés de *Pandaros acanthifolium*

Pandaros acanthifolium est une éponge très peu étudiée chimiquement. D'après la base de données MarinLit (Version 2009), le seul métabolite isolé à ce jour est un polyéther, l'acanthifolicine (**20**), isolé en 1981 d'un spécimen collecté aux environs des Iles Vierges.¹⁸ L'acanthifolicine (**20**) est un dérivé de l'acide okadaïque (**21**) qui est produit par des dinoflagellés pouvant être présents dans certaines éponges marines comme *Halichondria okadaei*.¹⁹ Le composé **20** est donc certainement produit par les microorganismes associés à *Pandaros acanthifolium*. Cette molécule montre des activités cytotoxiques contre les lignées cellulaires de la leucine murine P388, KB et L1210 avec des doses effectives 50 (ED₅₀) qui sont respectivement de $2,8 \cdot 10^{-4}$, $2,1 \cdot 10^{-3}$ et $3,9 \cdot 10^{-3}$ µg.mL⁻¹.

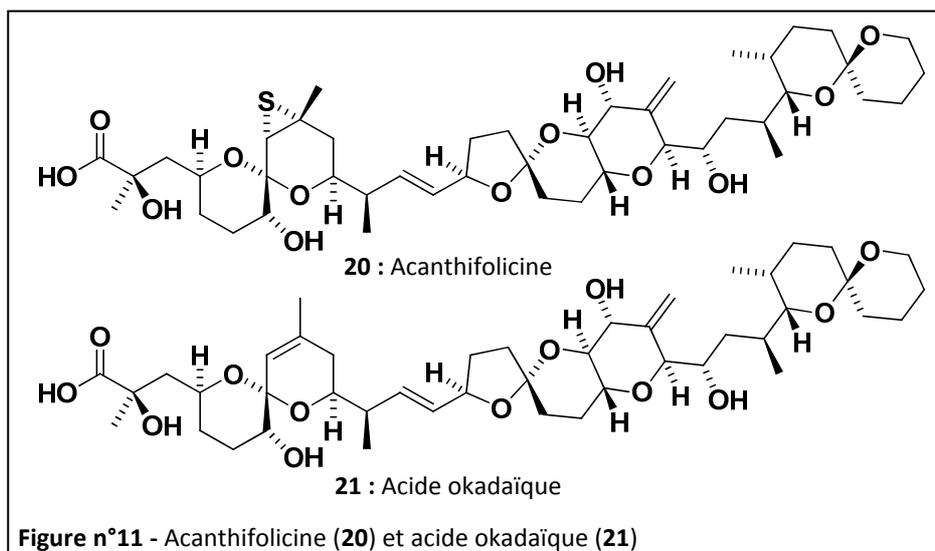
¹⁵ Berlinck, R. G. S. ; Braekman, J. C. ; Daloz, D. ; Hallenga, K. ; Ottinger, R. ; Bruno, I. ; Riccio, R. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 6531-6534.

¹⁶ Jares-Erijman, E. A. ; Ingrim, A. A. ; Sun, F. ; Rinehart, K. L. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 2186-2188.

¹⁷ Snider, B. B. ; Shi, Z. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2526-2528.

¹⁸ Schmitz, F.J. ; Prasad, R.S. ; Gopichand, Y. ; Hossain, M.B. ; Van der Helm, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2467-2469.

¹⁹ Tachibana, K. ; Scheuer, P.J. ; Tsukitani, Y. ; Kikuchi, H. ; Van Engen, D. ; Clardy, J. ; Gopichand, Y. ; Schmitz, F.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2469-2471.



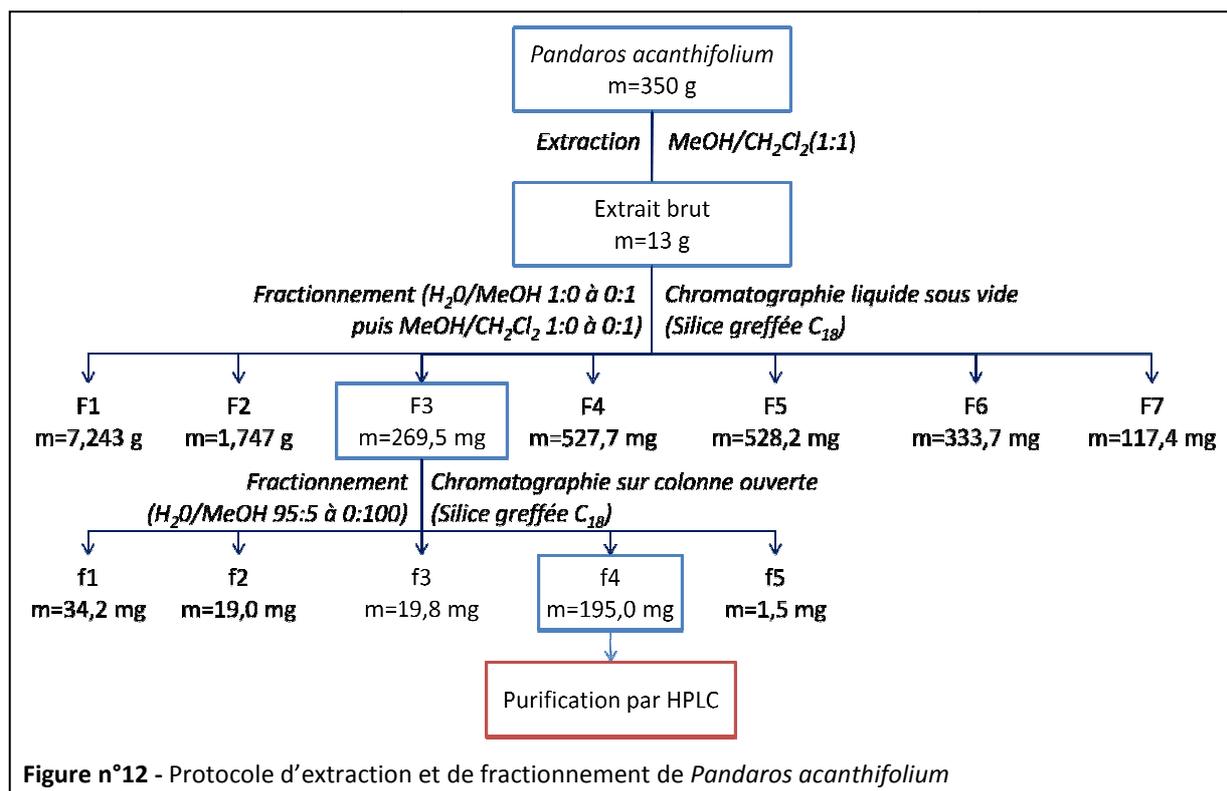
Elle inhibe également les protéines-phosphatases-1 et 2A, deux des quatre protéines-phosphatases majoritaires dans le cytosol des cellules mammifères permettant la déphosphorylation des résidus sérine et thréonine.²⁰

L'éponge *Pandaros acanthifolium* paraît donc être un candidat intéressant dans la découverte de nouvelles molécules naturelles cytotoxiques que ce soit par son appartenance à l'ordre Poecilosclerida, riche en alcaloïdes guanidiniques polycycliques qui ont de nombreuses activités thérapeutiques, ou par la présence de l'acanthifolicine (20), métabolite bioactif isolé de cette éponge.

II. Protocole d'extraction et d'isolement

Durant l'été 2003, un spécimen de *Pandaros acanthifolium* a été récolté en Martinique (Canyons de Babodie 14°45,982N, 61°11,902W) dans le cadre d'une mission de récolte en collaboration avec l'entreprise espagnole PharmaMar. L'éponge a immédiatement été congelée à -18 °C après la récolte. Au vu de la forte cytotoxicité de l'extrait organique d'un échantillon de *P. acanthifolium* (Tableau 1), l'éponge a été sélectionnée pour une étude chimique afin de déterminer la ou les molécule(s) à l'origine de la cytotoxicité de son extrait organique. *P. acanthifolium* a ainsi été extraite par le mélange de solvants MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et l'extrait brut obtenu après évaporation, a été fractionné par chromatographie liquide sous vide en phase inverse C₁₈. Le système d'éluants choisi a été un gradient de polarité décroissante composé de H₂O/MeOH 1:0 à 0:1 puis de MeOH/CH₂Cl₂ 1:0 à 0:1 (Figure n°12).

²⁰ Holmes, C.F.B. ; Luu, H.A. ; Carrier, F. ; Schmitz, F.J. *FEBS Lett.*, **1990**, 270, 216-218.

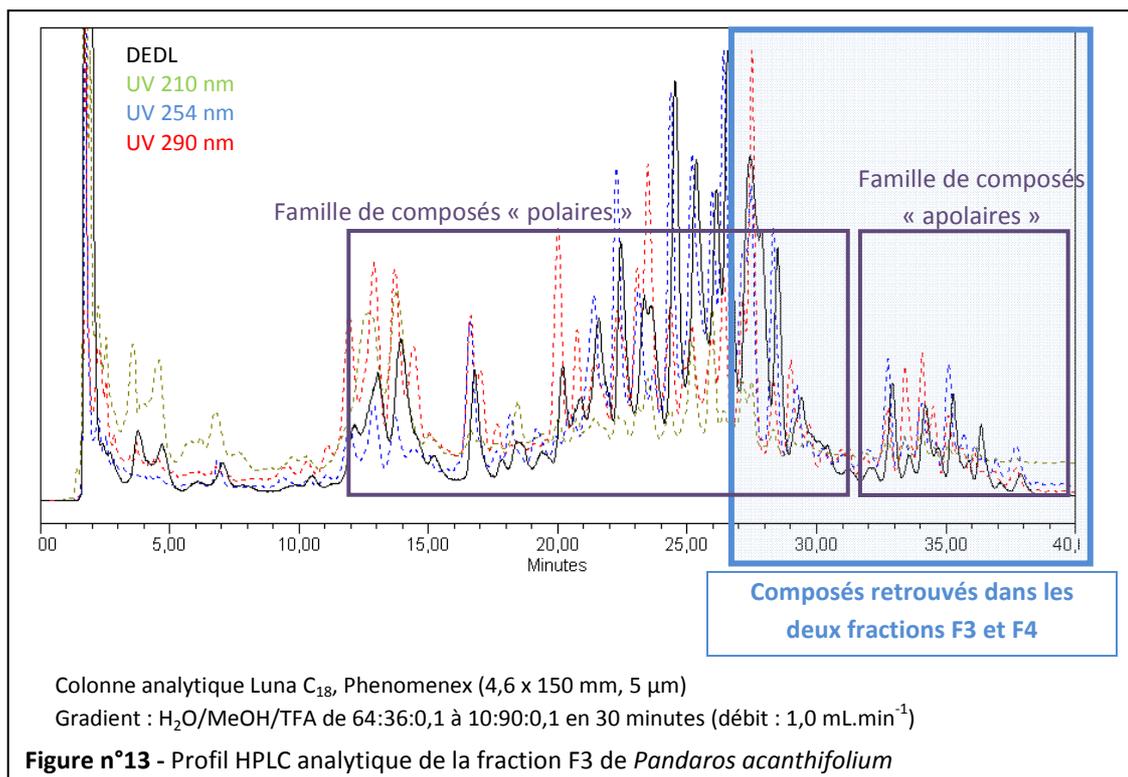


La cytotoxicité des sept fractions ainsi obtenues a été évaluée (**Tableau 2**) et les fractions F3 (H₂O/MeOH 1:3) et F4 (MeOH 100 %) ont révélé des activités cytotoxiques intéressantes, quelle que soit la lignée de cellules cancéreuse testée (colon, poumon ou sein). Il faut noter que, pour une meilleure reproductibilité des tests, la lignée cellulaire SK-MEL-28 (Mélanome) utilisée dans les tests préliminaires (**Tableau 1**) a été remplacée par la lignée cellulaire MDA-MB-231 (Sein).

Tableau 2 - Evaluation de la cytotoxicité des fractions de *Pandaros acanthifolium*

| Pourcentage de croissance : | | <-50 % | <0 % | <50 % | <100 % | >100 % | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------|------|---------------|--------|--------|-------------------|-----|-----|
| Concentrations testées : 25 µg.mL ⁻¹ ; 5 µg.mL ⁻¹ ; 1 µg.mL ⁻¹ . | | | | | | | | | |
| Fractions | HT29 (Colon) | | | A549 (Poumon) | | | MDA-MB-231 (Sein) | | |
| | 25 | 5 | 1 | 25 | 5 | 1 | 25 | 5 | 1 |
| F1 | 104 | 94 | 106 | 93 | 90 | 111 | 104 | 92 | 103 |
| F2 | 103 | 111 | 109 | 100 | 90 | 105 | 100 | 104 | 91 |
| F3 | -74 | -72 | 41 | -80 | -84 | 26 | -94 | -79 | 35 |
| F4 | -21 | 89 | 87 | -18 | 63 | 84 | -39 | 88 | 89 |
| F5 | 89 | 93 | 95 | 85 | 83 | 116 | 91 | 103 | 97 |
| F6 | 99 | 98 | 106 | 93 | 110 | 115 | 123 | 112 | 121 |
| F7 | 92 | 98 | 107 | 82 | 110 | 101 | 113 | 111 | 116 |

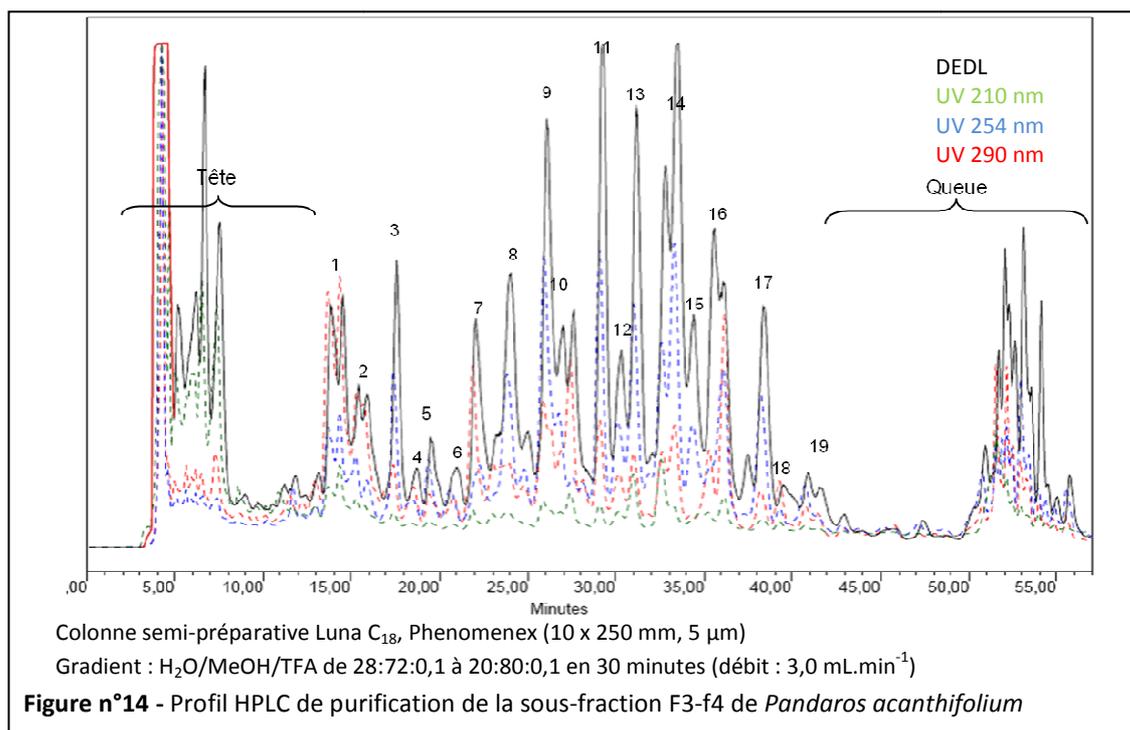
Les profils HPLC (DAD, DEDL) des deux fractions bioactives ont montré qu'elles contiennent deux mêmes familles de composés, une plus polaire que l'autre (**Figure n°13**). La famille de composés plus polaires, nettement majoritaire dans la fraction F3, pourrait être responsable de l'activité des deux fractions. La fraction F3, la plus active, a été sélectionnée pour être fractionnée.



Le profil HPLC-DAD de la fraction F3 (**Figure n°13**), relativement complexe, n'a pas mis en évidence la présence d'alcaloïdes guanidiniques polycycliques fréquemment rencontrés dans les Poecilosclerida. En effet, ce type d'alcaloïdes est caractérisé par des maxima d'absorption UV à 254 et 290 nm, tandis que les molécules présentes dans la fraction F3 ont, d'après leurs spectres UV (DAD), des maxima d'absorption autour de 264 nm. Par ces maxima, les métabolites de la fraction F3 ne peuvent pas non plus être des dérivés de l'acanthifolicine (**20**), polyéther actif isolé de *P. acanthifolium* et présentant un maximum d'absorption UV autour de 240 nm. L'activité de la fraction F3 n'étant pas due aux métabolites que l'on pensait trouver dans l'éponge, nous avons décidé d'isoler et de caractériser les composés probablement responsables de la bioactivité de la fraction.

Au vu de la complexité de son profil HPLC (DAD, DEDL), cette fraction a de nouveau été fractionnée par chromatographie sur colonne à pression atmosphérique de silice greffée C₁₈ (gradient d'élution : H₂O/MeOH 95:5 à 0:100) pour conduire à 5 sous-fractions (f1 à f5, **Figure n°12**). La sous-fraction F3-f4 regroupe la famille de composés dits « polaires » et probablement responsables de l'activité de la fraction F3 car majoritaire dans cette dernière. Ainsi, nous avons entrepris la purification, par HPLC semi-préparative sur colonne C₁₈, des composés de la sous-fraction F3-f4.

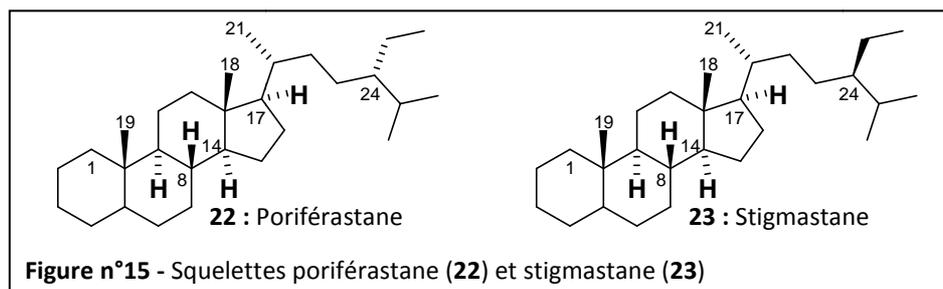
Après optimisation du gradient en HPLC, 19 pics ont été collectés (**Figure n°14**) puis repurifiés par HPLC analytique en utilisant une colonne C₆-Phényle. Par la suite, l'identification structurale de sept nouveaux métabolites, **I** à **VII**, a été réalisée par RMN mono et bidimensionnelle et par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS).



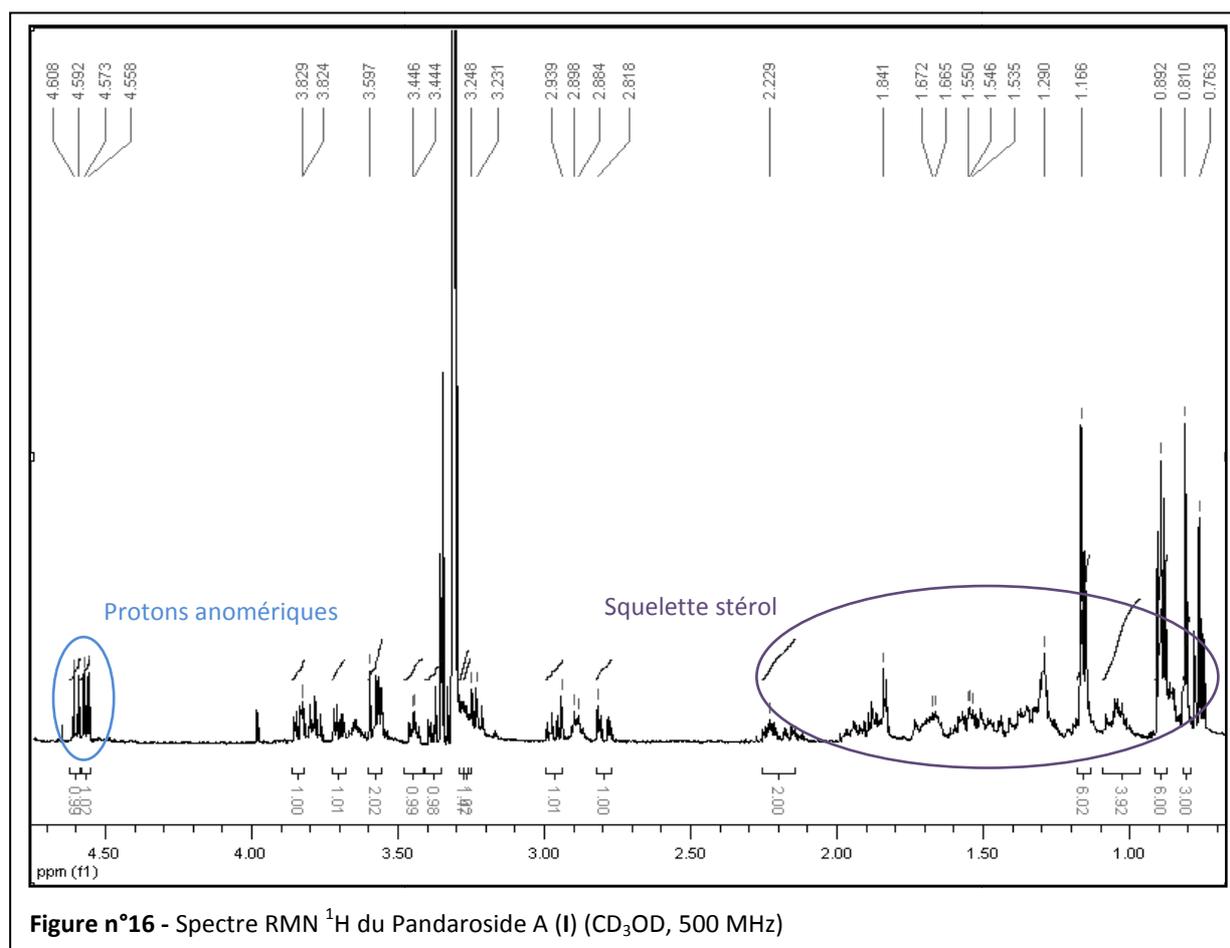
III. Elucidations structurales

III.1. Le pandaroside A (I) et son ester méthylique (II)

Après repurification par HPLC, sur une colonne analytique C₆-Phényle, du pic 11 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°14**, le premier composé caractérisé a été nommé pandaroside A (I, 5,7 mg, 1,6.10⁻³% m/m humide). Il a été isolé sous la forme d'un solide blanc amorphe et sa formule brute, déterminée par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS), est C₄₁H₆₄O₁₅ (*m/z* 795,4214 [M-H]⁻, Δ +5,9 ppm). Les bandes à 3496, 1692 et 1640 cm⁻¹ de son spectre infrarouge ont suggéré la présence d'une fonction hydroxyle et de fonctions carbonyles. Le spectre UV de la molécule, dont le maximum d'absorption est à 264 nm (log ε = 4,38), indique la présence d'une fonction carbonyle α,β-insaturée. Le spectre RMN ¹H (**Figure n°16**) de cette molécule présente les signaux caractéristiques d'un squelette stérol avec la présence de deux méthyles tertiaires à δ_H 0,81 (3H, s, H₃-19) et 1,17 (3H, s, H₃-18) ppm, de trois méthyles secondaires à δ_H 0,89 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H₃-26), 0,90 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H₃-27) et 1,15 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H₃-21) ppm et d'un méthyle primaire à δ_H 0,76 (3H, t, *J* = 7,5 Hz, H₃-24²) ppm. Ces données sont compatibles avec les squelettes poriféranstane/stigmastane (**22-23**), différant l'un de l'autre par la configuration absolue du carbone en C-24 (**Figure n°15**).

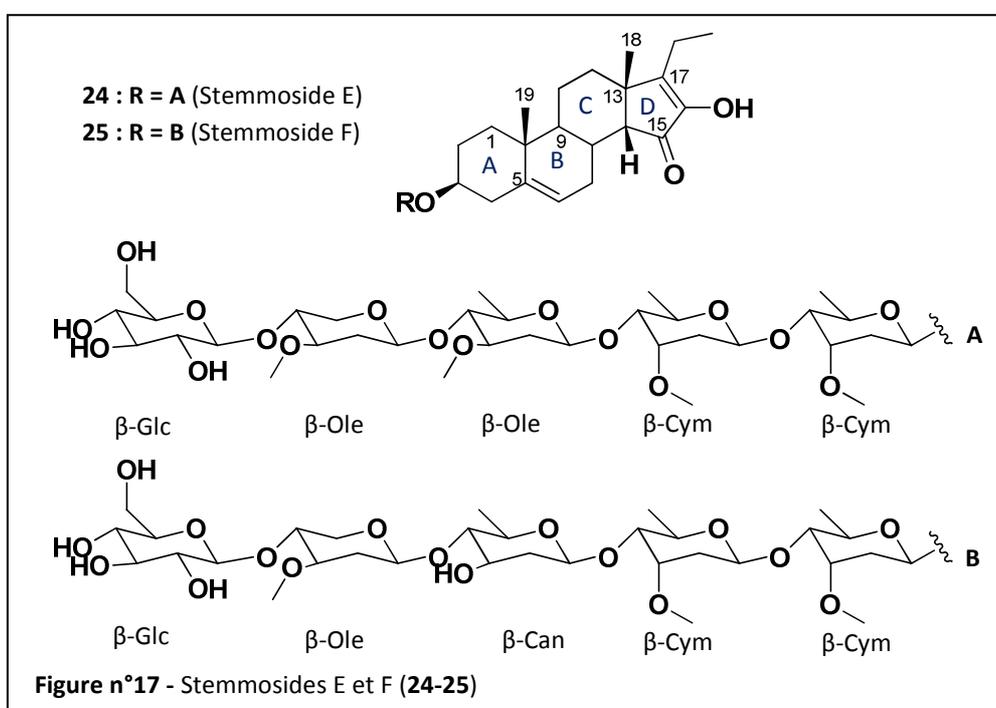


Le spectre RMN ^1H présente également deux doublets correspondant aux protons anomériques de deux sucres à δ_{H} 4,56 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') et 4,60 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1') ppm. La présence des deux résidus osidiques a été confirmée par les signaux de leur carbone anomérique à δ_{C} 101,9 (C-1') et 105,3 (C-1'') ppm sur spectre RMN ^{13}C (Tableau 3). Le spectre RMN ^{13}C a également indiqué la présence d'une double liaison tétrasubstituée de par les signaux à δ_{C} 151,5 (C-16) et 154,9 (C-17) ppm, d'une fonction acide carboxylique à δ_{C} 172,4 (C-6') ppm et de deux carbonyles à δ_{C} 206,1 (C-15) et 215,8 (C-23) ppm.



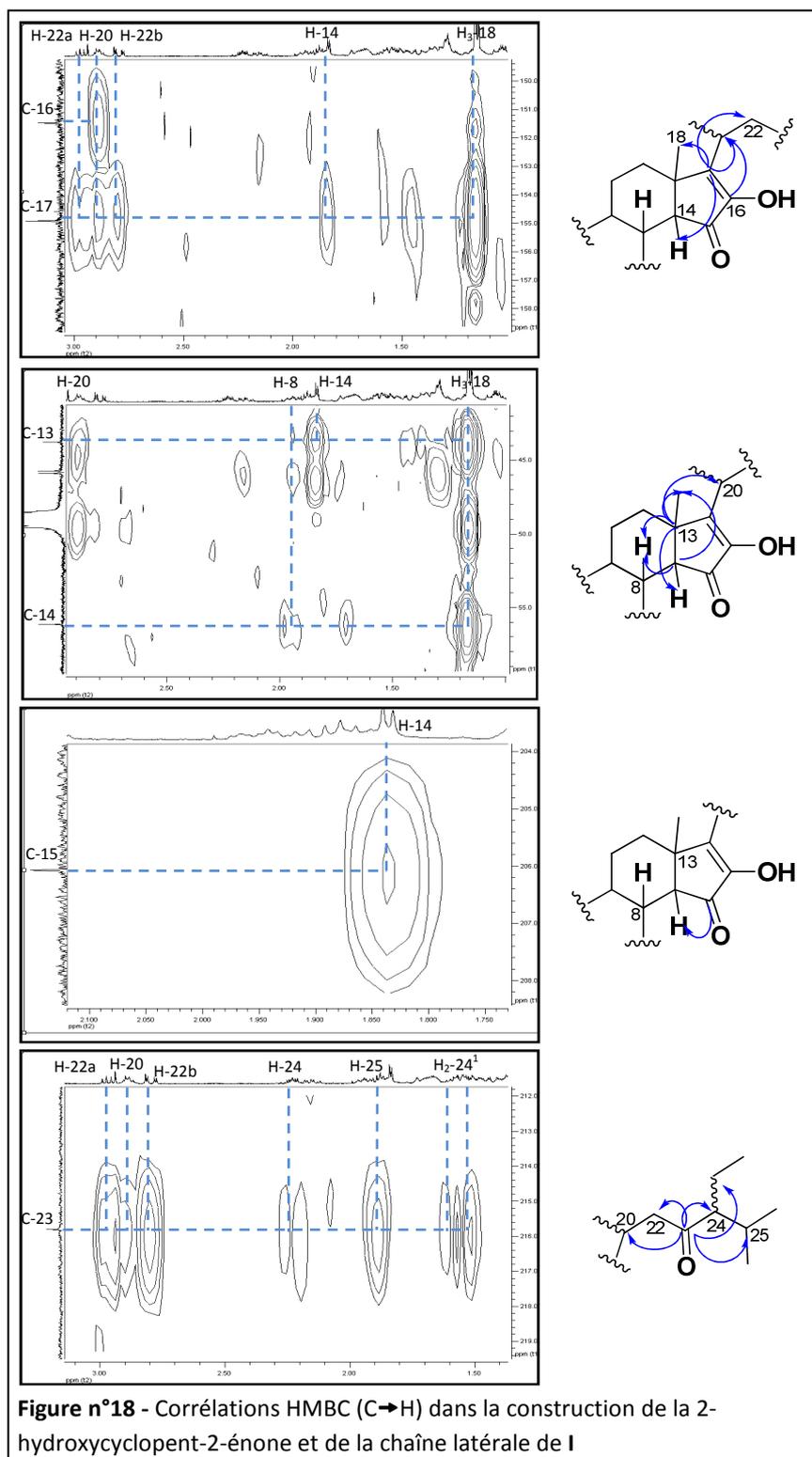
La structure des cycles A, B et C de la partie stérol a été déduite des analyses RMN bidimensionnelles COSY et HMBC et par comparaison avec les données bibliographiques.²¹

Comme le montre la **Figure n°18**, les corrélations HMBC C-13/H-8/H-14/H₃-18/H-20, C-14/H-8/H₃-18, C-16/H-20, C-17/H-14/H₃-18/H-20/H₂-22 et C-15/H-14 ont permis la construction d'un cycle D peu courant de type cyclopent-2-énone. Les analyses RMN, dans CD₃OD, n'ont pas permis d'identifier le substituant en position C-16. Cependant la formule brute du composé, déduite de l'analyse par HRESIMS, a donné comme seule possibilité la présence d'un hydroxyle en C-16 et donc la présence d'une fonction énol. Le cycle D a ainsi été caractérisé comme une 2-hydroxycyclopent-2-énone, ce qui a été confirmé par comparaison avec les données spectrales des stemmosides E (**24**) et F (**25**), les deux seuls exemples de stérols naturels présentant un tel cycle D avec δ_c 43,3 (C-13), 54,5 (C-14), 206,7 (C-15), 152,2 (C-16), 152,9 (C-17), 25,5 (C-18) ppm (**Figure n°17**).²¹ Il est à noter que cette forme doit être en équilibre avec une forme dicétone thermodynamiquement moins favorable.



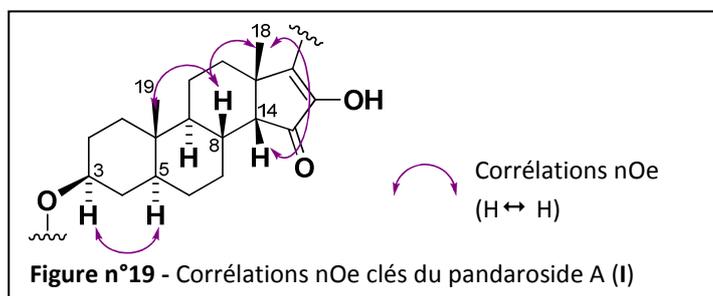
Enfin, la structure de la chaîne latérale a été déduite des corrélations HMBC C-23/H-20/H₂-22/H-24/H₂-24¹/H-25 (**Figure n°18**).

²¹ Plaza, A. ; Perrone, A ; Balestrieri, M.L. ; Felice, F. ; Balestrieri, C. ; Hamed, A.I. ; Pizza, C. ; Piacente, S. *Steroids*, **2005**, *70*, 594-603.



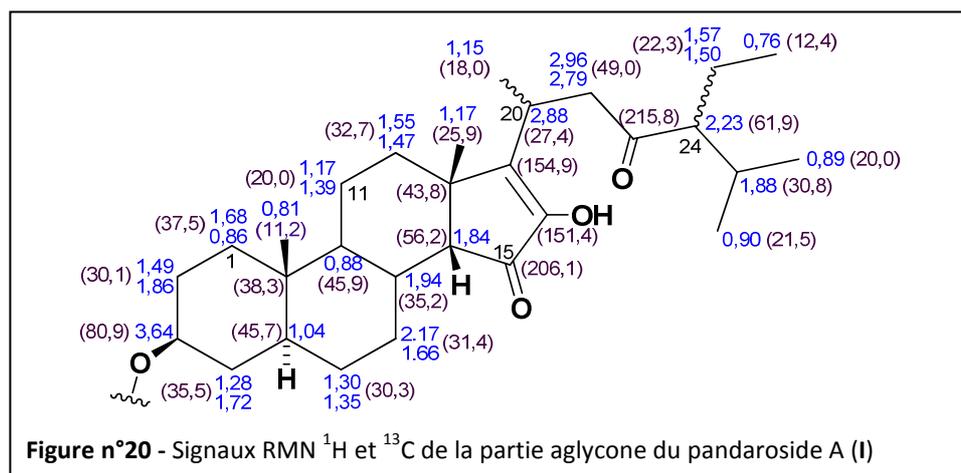
La configuration relative de la partie aglycone a été obtenue en se basant sur l'analyse du spectre bidimensionnel NOESY (**Figure n°19**). En effet, les corrélations NOESY H-8/H₃-18/H₃-19 ont permis de placer ces protons sur la même face β de la molécule. Alors que le déplacement chimique du signal de C-19 (δ_c 11,2 ppm) est compatible avec une configuration relative *trans-trans* pour les jonctions A/B et B/C, celui de C-18 (δ_c 25,9 ppm) n'a pas permis de déduire sans ambiguïté la configuration

relative de la jonction C/D. Un faible effet nOe entre H-14 et H₃-18 a suggéré une jonction *cis* pour ce cycle, ce qui diffère de la configuration *trans* habituelle des poriférastanes (**22**) ou stigmastanes (**23**).



Cette configuration β originale de C-14 a été confirmée par les signaux en RMN ¹H de H-7 α et H₃-18 (respectivement à δ_H 2,17 (1H, qd, $J = 12,5 ; 4,5$ Hz) et δ_H 1,17 (3H, s) ppm). En effet, d'après les études de Jung et Johnson sur la synthèse totale d'analogues des xestobergstérols,²² le proton H-7 α est déblindé dans le cas des 15-cétostérols dont la jonction C/D est de configuration *cis* alors qu'il s'agit du proton H-7 β dans le cas de la configuration *trans*. Le signal fortement déblindé de H-7 α peut s'expliquer par la présence d'un cône de déblindage dû au groupement carbonyle en position C-15. Les auteurs ont également remarqués que le signal de H₃-18 est compris entre 0,70 et 1,00 ppm pour une jonction C/D *trans* alors qu'il est compris entre 1,10 et 1,30 ppm pour une jonction C/D *cis*.

Enfin, la configuration α de H-3 a été déduite des constantes de couplages vicinales de son signal RMN, à $J = 11,5$ et $4,5$ Hz (δ_H 3,64 ppm, tt). La corrélation nOe H-3 α /H-5 a permis de déterminer la configuration de H-5 (Figure n°19).

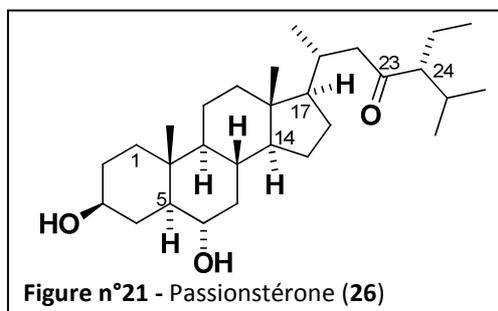


Afin de déterminer la configuration absolue de la partie stérol, le pandaroside A (I) a été hydrolysé pour ensuite être estérifié en C-3 par le chlorure d'acyle de Mosher (MTPACI).²³ Malheureusement,

²² Jung, M.E. ; Johnson, T.W. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 1449-1481.

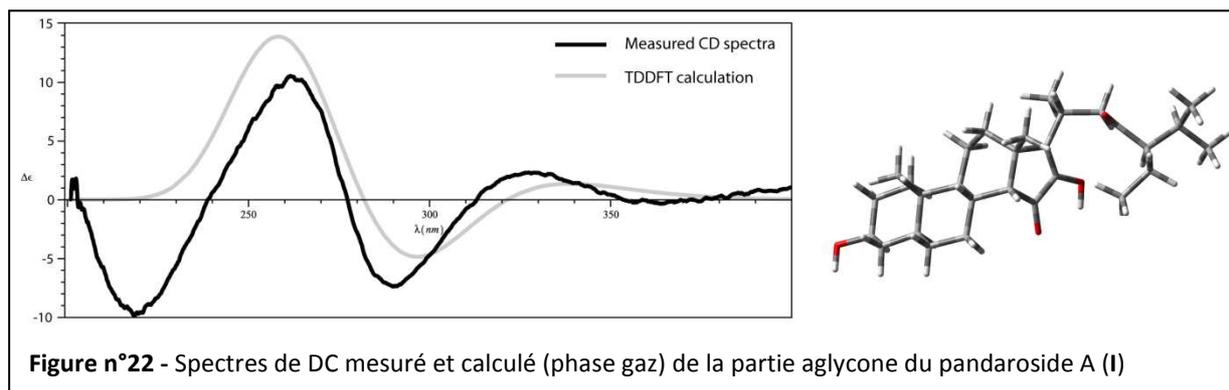
²³ Okada, Y. ; Matsunaga, S. ; Van Soest, R.W.M. ; Fusetani, N. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 4884-4888.

l'ester de Mosher n'a pas pu être obtenu en quantité suffisante pour réaliser des analyses RMN. Les similitudes des données RMN ^{13}C du pandaroside A (**I**) avec le seul exemple de 23-oxocholestane, le passionstérone (**26**), suggèrent une configuration *R* en C-24,²⁴ et les configurations absolues usuelles des stéroïdes tétracycliques suggèrent une orientation α pour le H-14.



29

Cependant, pour confirmer ces configurations absolues, nous avons décidé d'utiliser une méthode de calcul théorique de spectre de dichroïsme circulaire (DC) et de comparer le spectre DC expérimental avec celui calculé (calculs réalisés par Grégory Genta-Jouve).^{25,26} La cyclopenténone et la cétone ont donné lieu à trois effets Cotton de signes alternés (327 ($\Delta\epsilon = +2,5$), 290 ($\Delta\epsilon = -7,5$), 262 ($\Delta\epsilon = +10,2$) nm) sur le spectre expérimental. Une analyse conformationnelle de ce stéréo-isomère a été réalisée en utilisant la méthode DFT (Density Functional Theory) au niveau B3LYP/6-31+G(d) donnant 43 conformères d'énergies relatives inférieures à 2 kcal.mol⁻¹. A cause du grand nombre de conformères, le calcul du spectre DC par TDDFT a été réalisé sur la structure de plus basse énergie (**Figure n°22**).²⁷ La quasi-superposition des spectres DC expérimental et calculé a permis de confirmer la configuration absolue de la partie aglycone du pandaroside A (**I**) dont le squelette est de type 14 β -épiporféranstane.



Le pandaroside A (**I**) contient deux résidus osidiques reliés à la partie stérol en C-3 et dont les signaux des protons anomériques sont à δ_{H} 4,56 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') et 4,60 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1') ppm. Un des

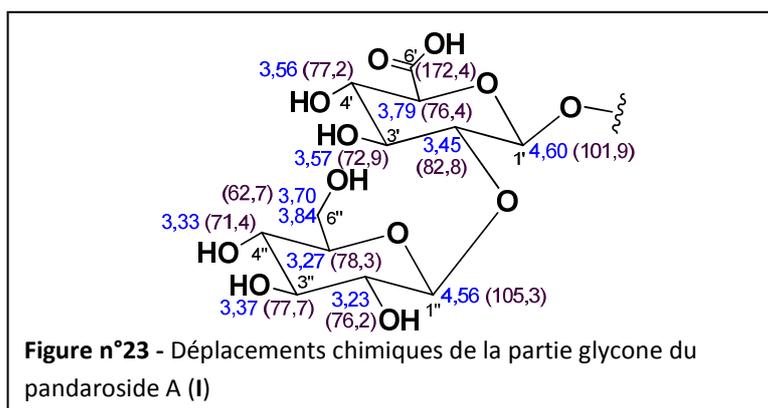
²⁴ Li, G.P. ; Zhao, J.F. ; Tu, Y.Q. ; Yang, X.D. ; Zhang, H.B. ; Li, L. *Chinese Chem. Lett.*, **2004**, 15, 659-660.

²⁵ Bringmann, G. ; Gulder, T.A.M. ; Reichert, M. ; Gulder, T. *Chirality*, **2008**, 20, 628-642.

²⁶ Krohn, K. ; Kock, I. ; Elsesser, B. ; Floerke, U. ; Schulz, B. ; Draeger, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 1123-1129.

²⁷ Frisch, M.J. ; Trucks, G.W. ; Schlegel, H.B. ; Scuseria, G.E. ; Robb, M.A. ; Cheeseman, J.R. In: *Gaussian 03, Revision C.01*. Wallingford, CT: Gaussian, Inc., **2004**.

deux sucres a été caractérisé comme un dérivé uronique du fait de la présence du signal correspondant à un acide carboxylique à δ_c 172,4 ppm (C-6'). Le spectre RMN COSY et les constantes de couplages ont permis d'identifier ces deux sucres en tant que glucose et acide glucuronique.^{21,28} La corrélation HMBC C-3/H-1' a permis de lier l'acide glucuronique au stérol et la corrélation HMBC C-2'/H-1'' a permis de lier le glucose à l'acide glucuronique par l'oxygène en position C-2'. Les constantes de couplages vicinales des protons H-1' et H-1'' ($^3J = 7,5$ et $8,0$ Hz) ont montré que les deux sucres ainsi que la partie aglycone étaient liés par une liaison β -glycosidique. La configuration absolue des résidus osidique n'a pas été déterminée.



Le pandaroside A (I) est donc une nouvelle saponine stéroïdienne dont l'originalité réside dans la structure 2-hydroxycyclopent-2-énone du cycle D et la fonction cétone en C-23. Le **Tableau 3** résume les différents signaux RMN ^1H et ^{13}C de la molécule ainsi que les corrélations COSY, HMBC et NOESY.

²⁸ Harding, J.R. ; King, C.D. ; Perrie, J.A. ; Sinnott, D. ; Stachulskin, A.V. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1501-1507.

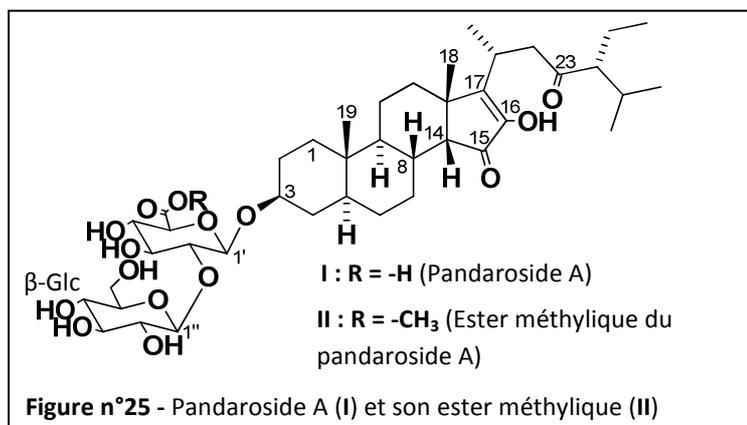
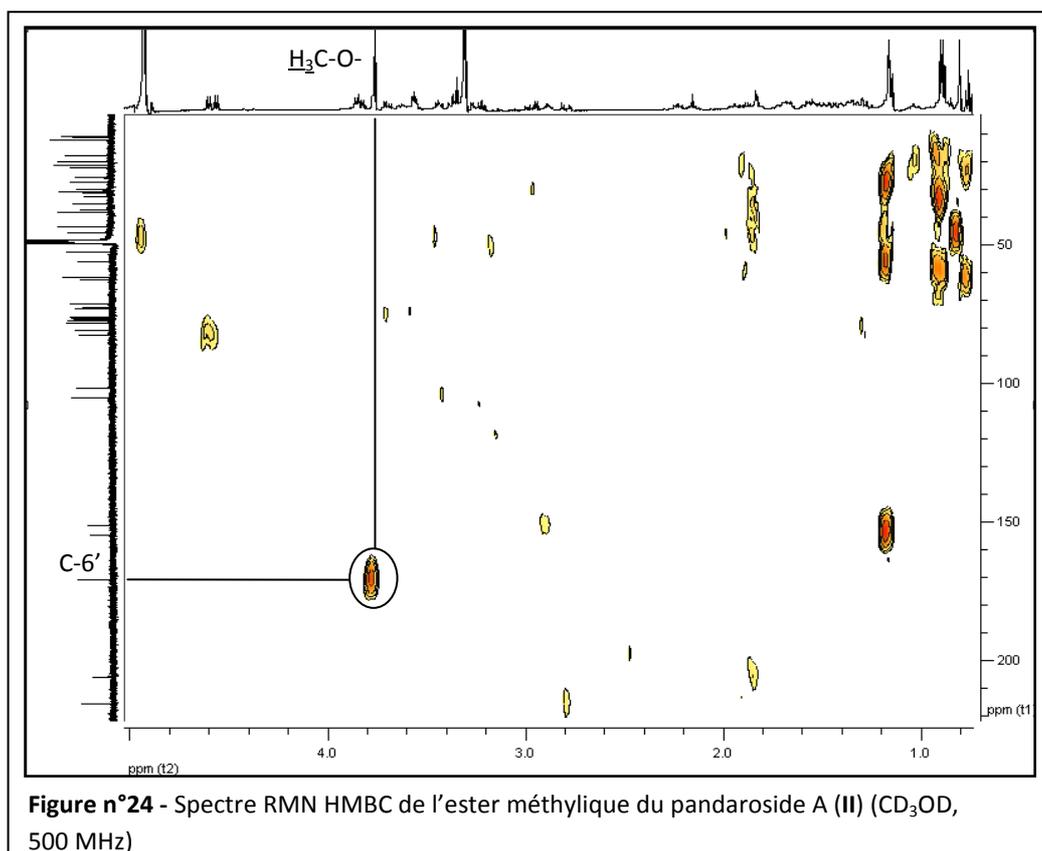
Tableau 3 - RMN ¹H (500 MHz), ¹³C (125 MHz), et corrélations COSY, HMBC et NOESY du pandaroside A (I), CD₃OD

| n° | δ _c | CH _n | δ _H (m, J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) | NOESY |
|-----------------|----------------|-----------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1 | 37,5 | CH ₂ | 0,86 (m) 1,68 (m) | 1α/β, 2α, 2β | 5, 19 | 1β, 2α 1α |
| 2 | 30,1 | CH ₂ | 1,49 (m) 1,86 (m) | 1α, 1β, 2α/β, 3 | - | 19 1β, 1', 3 |
| 3 | 80,9 | CH | 3,64 (tt, 11,5 ; 4,5) | 2α, 2β, 4α, 4β | 1', 4β | 1' |
| 4 | 35,5 | CH ₂ | 1,28 (m) 1,72 (m) | 3, 4α/β, 5 | - | 4α, 19 1', 3, 4β, 5 |
| 5 | 45,7 | CH | 1,04 (m) | 4α, 4β, 6α, 6β | 3, 4, 6, 19 | 4α, 6α, 7α, 8 |
| 6 | 30,3 | CH ₂ | 1,30 (m) 1,35 (m) | 5, 6α/β, 7α, 7β | 7α | 19 5, 19 |
| 7 | 31,4 | CH ₂ | 1,66 (m) 2,17 (qd, 12,5 ; 4,5) | 6α, 6β, 7α/β, 8 | 6β, 14 | 7α, 8 5, 7β, 9 |
| 8 | 35,2 | CH | 1,94 (m) | 7α, 7β, 9, 14 | 7α, 14 | 5, 7β, 11α, 11β, 18, 19 |
| 9 | 45,9 | CH | 0,88 (m) | 8,11α, 11β | 7α, 8, 14, 19 | 7α |
| 10 | 38,3 | Cq | - | - | 5, 6, 19 | - |
| 11 | 20,0 | CH ₂ | 1,17 (m) 1,39 (m) | 9, 11α/β, 12α, 12β | 9 | 12α, 12β 8, 18 |
| 12 | 32,7 | CH ₂ | 1,47 (m) 1,55 (m) | 11α, 11β, 12α/β | 18 | - 11β, 18 |
| 13 | 43,8 | Cq | - | - | 14, 18, 20, 21 | - |
| 14 | 56,2 | | 1,83 (d, 4,5) | 8 | 7β, 8, 9, 18 | 18 |
| 15 | 206,1 | Cq | - | - | 14 | - |
| 16 | 151,4 | Cq | - | - | 20 | - |
| 17 | 154,9 | Cq | - | - | 12, 14, 18, 20, 21, 22 | - |
| 18 | 25,9 | CH ₃ | 1,17 (s) | - | 14 | 8, 11α, 14 |
| 19 | 11,2 | CH ₃ | 0,81 (s) | - | - | 2β, 4β, 6α, 6β, 8 |
| 20 | 27,4 | CH | 2,88 (m) | 21, 22a, 22b | | 21, 24 |
| 21 | 18,0 | CH ₃ | 1,15 (d, 7,0) | 20 | 20, 22 | 20, 22a, 22b |
| 22 | 49,0 | CH ₂ | 2,79 (dd, 17,5 ; 4,5) 2,96 (dd, 17,5 ; 9,0) | 20, 22a/b | 20, 21 | 21, 22a, 24, 25 21, 22b, 24, 25 |
| 23 | 215,8 | Cq | - | - | 20, 22, 241, 25 | - |
| 24 | 61,9 | CH | 2,23 (ddd, 10,0 ; 7,5 ; 4,0) | 25, 24 ¹ a, 24 ¹ b | 24 ¹ , 24 ² , 25, 26, 27 | 20, 22a, 22b, 25, 26, 27, 24 ¹ , 24 ² |
| 24 ¹ | 22,3 | CH ₂ | 1,51 (m) 1,57 (m) | 24, 24 ¹ a/b, 24 ² | 24, 24 ² | 24, 24 ² , 25, 26, 27 24, 24 ² , 25, 26, 27 |
| 24 ² | 12,4 | CH ₃ | 0,76 (t, 7,5) | 24 ¹ a, 24 ¹ b | 24 ¹ | 24, 24 ¹ |
| 25 | 30,8 | CH | 1,88 (m) | 24, 26, 27 | 24 ¹ , 26, 27 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 26, 27 |
| 26 | 20,0 | CH ₃ | 0,89 (d, 6,5) | 25 | 24, 25, 27 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 25 |
| 27 | 21,5 | CH ₃ | 0,90 (d, 6,5) | 25 | 24, 25, 26 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 25 |
| 1' | 101,9 | CH | 4,60 (d, 7,5) | 2' | 2', 3, 4β | 2α, 3, 4α, 6''a |
| 2' | 82,8 | CH | 3,45 (dd, 9,0 ; 8,0) | 1', 3' | 1'', 3'' | 1'' |
| 3' | 72,9 | CH | 3,57 (t, 9,5) | 2', 4' | 4'' | - |
| 4' | 77,2 | CH | 3,56 (d, 10,0) | 3', 5' | 3'', 5'' | - |
| 5' | 76,4 | CH | 3,79 (t, 9,5) | 4' | 3'', 4'' | - |
| 6' | 172,4 | Cq | - | - | 5'' | - |
| 1'' | 105,3 | CH | 4,56 (d, 8,0) | 2'' | 2', 2'' | 2', 3'', 5'' |
| 2'' | 76,2 | CH | 3,23 (dd, 9,0 ; 8,0) | 1'', 3'' | 3'' | 3'' |
| 3'' | 77,7 | CH | 3,37 (t, 9,0) | 2'', 4'' | 1'', 2'', 4'' | 1'', 2'' |
| 4'' | 71,4 | CH | 3,33 (m) | 3'', 5'' | 3'', 6'' | - |
| 5'' | 78,3 | CH | 3,27 (ddd, 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | 4'', 6''a, 6''b | 4'', 6'' | 1'', 6''a, 6''b |
| 6'' | 62,7 | CH ₂ | 3,70 (dd, 11,5 ; 5,0) 3,84 (dd, 11,5 ; 2,5) | 5'', 6''a/b | 4'', 5'' | 5'', 6''b 1', 5'', 6''a |

Le composé II (4,8 mg, 1,4.10⁻³ % m/m humide) a été isolé sous forme d'un solide blanc amorphe lors de la repurification du pandaroside A (I). D'après le spectre de masse (*m/z* 811,4 [M+H]⁺), ce composé présenterait un méthylène supplémentaire par rapport au pandaroside A (I). Les spectres RMN ¹H et ¹³C de I et II sont très proches (cf. **Partie expérimentale**, p. 249) à l'exception de nouveaux signaux à δ_H 3,76 (3H, s, H₃-CO) et δ_c 53,0 (O-CH₃) ppm pour le composé II qui ont indiqué la présence

d'un groupement méthoxy. Grâce à une corrélation HMBC C-6'/H₃-CO (**Figure n°24**), le groupe méthoxy a été situé sur l'acide de l'acide glucuronique du pandaroside A (**I**). Appartenant à la même famille de saponine et montrant une parfaite superposition des signaux de sa partie aglycone avec ceux du pandaroside A (**I**), les configurations relatives de ce dérivé estérifié sont supposées les mêmes que celles obtenue pour le pandaroside A (**I**).

32



Nous avons d'abord pensé que l'ester méthylique du pandaroside A (**II**) n'était qu'un artéfact produit lors du procédé de purification du pandaroside A (**I**) mais, après vérification de la LC/MS de l'extrait brut de l'éponge, ce composé était bien présent avant la purification. L'ester méthylique **II** n'est donc

pas un artéfact du procédé de purification. Sauf s'il résulte du procédé d'extraction, ce composé serait bien produit par *Pandaros acanthifolium* ou par ses microorganismes associés.

III.2. Le pandaroside B (III)

Le pandaroside B (III, 3,5 mg, 10⁻³% m/m humide), correspondant au pic 19 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°14**, a été isolé sous forme d'un solide blanc amorphe. Sa formule brute, obtenue par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS), est C₃₃H₅₄O₁₀ (*m/z* 633,3625 [M-H]⁻, Δ -1,2 ppm). Les spectres RMN ¹H et ¹³C du pandaroside B (III) ont été comparés avec ceux du pandaroside A (I) indiquant une partie aglycone identique pour les deux composés (**Tableau 4**). La principale différence relevée a été le déplacement chimique du signal RMN de C-3 (79,8 ppm au lieu de 80,9 ppm dans le pandaroside A (I)). Cet écart d'environ 1 ppm indiquerait un changement au niveau de la partie osidique du pandaroside B (III) par rapport au pandaroside A (I). Cela a été confirmé par les spectres RMN ¹H et ¹³C du pandaroside B (III) ne présentant qu'un seul proton anomérique à δ_H 4,43 ppm (d, *J* = 8,0 Hz, H-1') et δ_C 102,7 ppm (C-1'). Le signal en RMN ¹³C de C-2', à δ_C 74,8 ppm (**Figure n°26**), est plus blindé que celui du pandaroside A (I) à δ_C 82,8 ppm, ce qui confirme l'absence d'un second sucre en position C-2'.

Grâce à la corrélation HMBC C-3/H-1', l'unique sucre de la molécule a pu être lié au stérol par l'oxygène en C-3. Enfin, les corrélations visibles sur le spectre RMN COSY ainsi que la présence d'un signal à δ_C 171,9 ppm ont prouvé que le résidu glycosidique correspondait au même acide glucuronique que celui du pandaroside A (I). La constante de couplage de H-1' (³*J* = 8,0 Hz) a indiqué que le dérivé acide glucuronique était lié à la partie aglycone de la saponine par une liaison β-glycosidique.

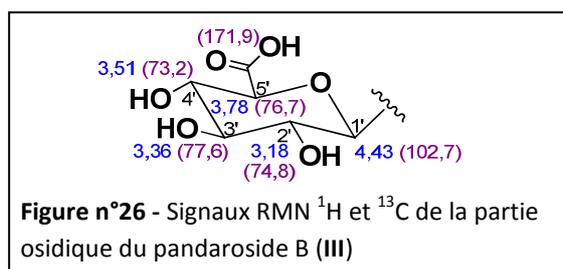
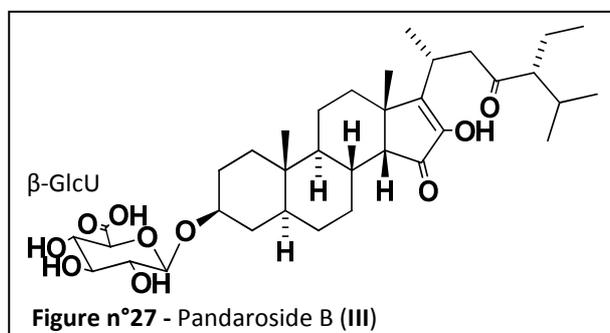


Tableau 4 - Comparaison des signaux RMN de la partie aglycone des pandarosides B (III) et A (I) (CD₃OD, 500 MHz pour ¹H et 125 MHz pour ¹³C)

| n° | Pandaroside B (III) | | | Pandaroside A (I) | |
|-----------------|---------------------|----------------|------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|
| | CH _n | δ _C | δ _H (m, J en Hz) | δ _C | δ _H (m, J en Hz) |
| 1 | CH ₂ | 37,5 | 0,86 (m) 1,64 (m) | 37,5 | 0,86 (m) 1,68 (m) |
| 2 | CH ₂ | 30,1 | 1,50 (m) 1,83 (m) | 30,1 | 1,49 (m) 1,86 (m) |
| 3 | CH | 79,8 | 3,63 (m) | 80,9 | 3,64 (tt, 11,5 ; 4,5) |
| 4 | CH ₂ | 35,4 | 1,28 (m) 1,72 (m) | 35,5 | 1,28 (m) 1,72 (m) |
| 5 | CH | 45,7 | 1,04 (m) | 45,7 | 1,04 (m) |
| 6 | CH ₂ | 30,3 | 1,30 (m) 1,35 (m) | 30,3 | 1,30 (m) 1,35 (m) |
| 7 | CH ₂ | 31,4 | 1,65 (m) 2,17 (m) | 31,4 | 1,66 (m) 2,17 (qd, 12,5 ; 4,5) |
| 8 | CH | 35,2 | 1,93 (m) | 35,2 | 1,94 (m) |
| 9 | CH | 45,9 | 0,87 (m) | 45,9 | 0,88 (m) |
| 10 | Cq | 38,3 | - | 38,3 | - |
| 11 | CH ₂ | 20,0 | 1,15 (m) 1,37 (m) | 20,0 | 1,17 (m) 1,39 (m) |
| 12 | CH ₂ | 32,7 | 1,47 (m) 1,55 (m) | 32,7 | 1,47 (m) 1,55 (m) |
| 13 | Cq | 43,8 | - | 43,8 | - |
| 14 | | 56,2 | 1,83 (d, 4,5) | 56,2 | 1,83 (d, 4,5) |
| 15 | Cq | 206,1 | - | 206,1 | - |
| 16 | Cq | 151,5 | - | 151,4 | - |
| 17 | Cq | 154,9 | - | 154,9 | - |
| 18 | CH ₃ | 25,9 | 1,15 (s) | 25,9 | 1,17 (s) |
| 19 | CH ₃ | 11,2 | 0,81 (s) | 11,2 | 0,81 (s) |
| 20 | CH | 27,3 | 2,83 (m) | 27,4 | 2,88 (m) |
| 21 | CH ₃ | 18,0 | 1,14 (d, 7,0) | 18,0 | 1,15 (d, 7,0) |
| 22 | CH ₂ | 49,0 | 2,79 (dd, 17,5 ; 4,5) 2,87 (dd, 17,5 ; 8,5) | 49,0 | 2,79 (dd, 17,5 ; 4,5) 2,96 (dd, 17,5 ; 9,0) |
| 23 | Cq | 215,8 | - | 215,8 | - |
| 24 | CH | 61,9 | 2,23 (m) | 61,9 | 2,23 (ddd, 10,0 ; 7,5 ; 4,0) |
| 24 ¹ | CH ₂ | 22,3 | 1,50 (m) 1,54 (m) | 22,3 | 1,51 (m) 1,57 (m) |
| 24 ² | CH ₃ | 12,4 | 0,76 (t, 7,5) | 12,4 | 0,76 (t, 7,5) |
| 25 | CH | 30,9 | 1,88 (m) | 30,8 | 1,88 (m) |
| 26 | CH ₃ | 20,0 | 0,89 (d, 6,5) | 20,0 | 0,89 (d, 6,5) |
| 27 | CH ₃ | 21,5 | 0,90 (d, 6,5) | 21,5 | 0,90 (d, 6,5) |



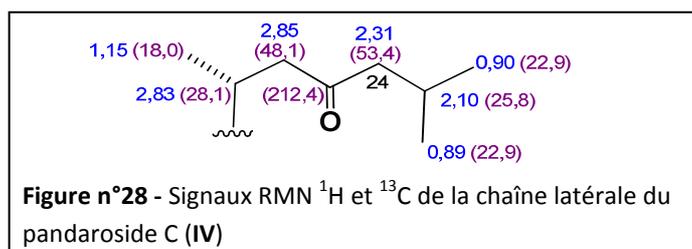
III.3. Le pandaroside C (IV) et son ester méthylique (V)

Le pandaroside C (**IV**, 1,7 mg, $0,5 \cdot 10^{-3}$ % m/m humide) a été obtenu après repurification par HPLC analytique (colonne C₆-Phényle) du pic 3 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°14**. Il a été isolé sous la forme d'un solide blanc amorphe. Sa formule brute, C₃₉H₆₀O₁₅ (m/z 767,3834 [M-H]⁻, Δ - 1,9 ppm), a été obtenue par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS). Les spectres RMN ¹H et ¹³C du pandaroside C (**IV**) ont été comparés à ceux des pandarosides **I**, **II** et **III** déjà identifiés, et se sont montrés similaires à ceux du pandaroside A (**I**). Comme le pandaroside A (**I**), le composé **IV** contient deux sucres dont les signaux RMN ont été parfaitement superposables à ceux du pandaroside A (**I**). Cela a ainsi permis d'identifier un résidu acide glucuronique lié en C-2' à un dérivé glucose (**Tableau 5**). Comme pour les pandarosides précédents, la liaison glycosidique de type β a été déterminée grâce aux constantes de couplage vicinales des protons H-1' et H-1'' (respectivement de 7,5 et 8,0 Hz). En plus de la comparaison avec les spectres du pandaroside A (**I**), l'agencement des sucres du pandaroside C (**IV**) a été confirmé par une analyse en spectrométrie de masse MS² qui a mis en évidence un fragment à m/z 605,3 ([M-C₆H₁₁O₅]⁻), correspondant à la perte du β-glucopyranosyl. Comme pour le pandaroside A (**I**), le glucose est donc le sucre terminal de la saponine.

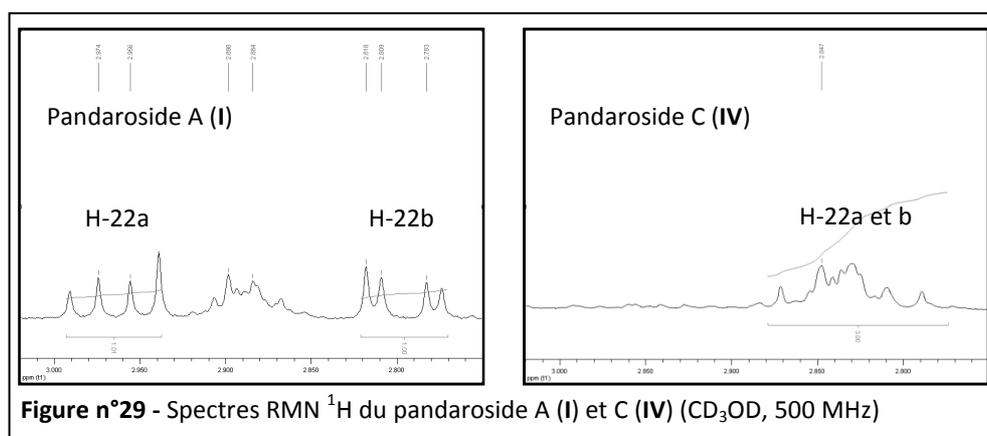
Tableau 5 - Comparaison des signaux RMN de la partie osidique des pandarosides C (**IV**) et A (**I**) (CD₃OD, 500 MHz pour ¹H et 125 MHz pour ¹³C)

| n° | Pandaroside C (IV) | | | Pandaroside A (I) | | |
|-----|--------------------|----------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|--|
| | CH _n | δ _c | δ _H (m, J en Hz) | δ _c | δ _H (m, J en Hz) | |
| 1' | CH | 101,9 | 4,60 (d, 7,5) | 101,9 | 4,60 (d, 7,5) | |
| 2' | CH | 82,8 | 3,45 (dd, 9,0 ; 8,0) | 82,8 | 3,45 (dd, 9,0 ; 8,0) | |
| 3' | CH | 72,9 | 3,57 (t, 9,5) | 72,9 | 3,57 (t, 9,5) | |
| 4' | CH | 77,2 | 3,56 (d, 10,0) | 77,2 | 3,56 (d, 10,0) | |
| 5' | CH | 76,4 | 3,79 (t, 9,5) | 76,4 | 3,79 (t, 9,5) | |
| 6' | Cq | 172,4 | - | 172,4 | - | |
| 1'' | CH | 105,3 | 4,56 (d, 8,0) | 105,3 | 4,56 (d, 8,0) | |
| 2'' | CH | 76,2 | 3,23 (dd, 9,0 ; 8,0) | 76,2 | 3,23 (dd, 9,0 ; 8,0) | |
| 3'' | CH | 77,7 | 3,37 (t, 9,0) | 77,7 | 3,37 (t, 9,0) | |
| 4'' | CH | 71,4 | 3,33 (m) | 71,4 | 3,33 (m) | |
| 5'' | CH | 78,4 | 3,27 (ddd, 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | 78,3 | 3,27 (ddd, 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | |
| 6'' | CH ₂ | 62,7 | 3,84 (dd, 11,5 ; 2,5) | 62,7 | 3,70 (dd, 11,5 ; 5,0) | |
| | | | 3,70 (dd, 11,5 ; 5,0) | | 3,84 (dd, 11,5 ; 2,5) | |

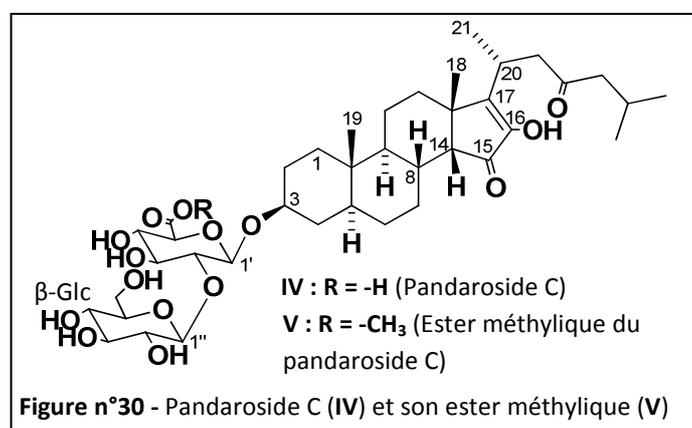
Le spectre de masse haute résolution du pandaroside C (**IV**) (m/z 767,3834 [M-H]⁻, Δ -1,9 ppm) a indiqué une différence de 28 uma par rapport au pandaroside A (**I**), ce qui a suggéré la perte d'un groupement éthyle. Cette perte a facilement été identifiée sur le spectre RMN ¹H du pandaroside C (**IV**) où le signal caractéristique du méthyle en position 24², à δ_H 0,76 ppm (t, J = 7,5 Hz, H₃-24²), a disparu. L'éthyle de la chaîne latérale en position C-24, présent dans les structures des pandarosides précédents, est donc absent dans le pandaroside C (**IV**) (**Figure n°28**). Le squelette de la partie aglycone du pandaroside C (**IV**) a ainsi été identifié de type 14β-épicholestane.



Comme le montre la **Figure n°29**, les signaux AB des protons H-22a et H-22b à δ_{H} 2,96 (dd, $J = 17,5$; 4,5 Hz, H-22a) et 2,79 (dd, $J = 17,5$; 9,0 Hz, H-22b) ppm ont été affectés par la perte de l'éthyle en position C-24 et ont été remplacés par un multiplet large à δ_{H} 2,85 (m, H-22a et H-22b) ppm.



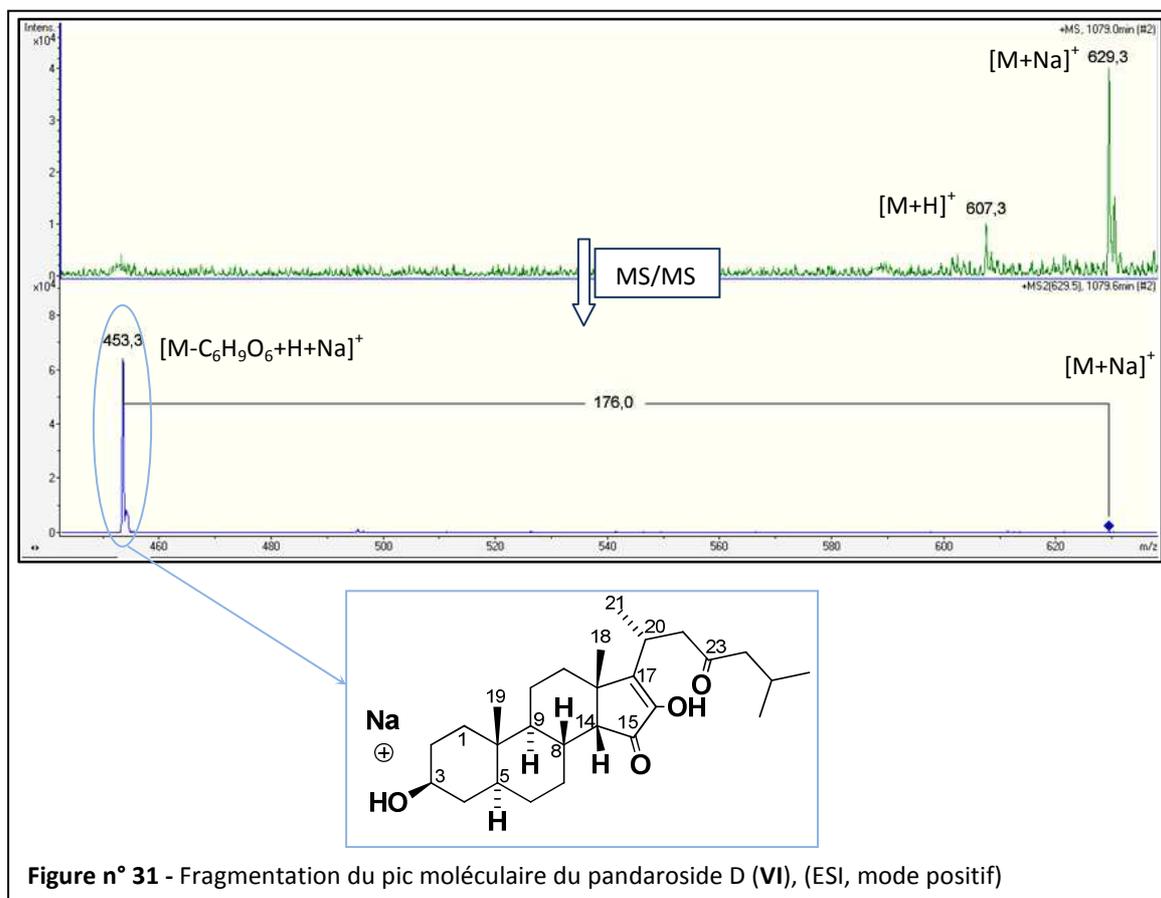
Comme pour le pandaroside A (I), un composé minoritaire (V, 1,2 mg, $0,3 \cdot 10^{-3}$ % m/m humide) a été isolé lors de la repurification du pandaroside C (IV). Les mêmes signaux RMN à δ_{H} 3,76 (3H, s, $\text{H}_3\text{-CO}$) et δ_{C} 53,0 (O-CH_3) ppm, déjà observés lors de la caractérisation de l'ester méthylique du pandaroside A (II), ont été relevés. Cette caractéristique nous a permis de déduire que le composé minoritaire V était l'ester méthylique du pandaroside C (IV).

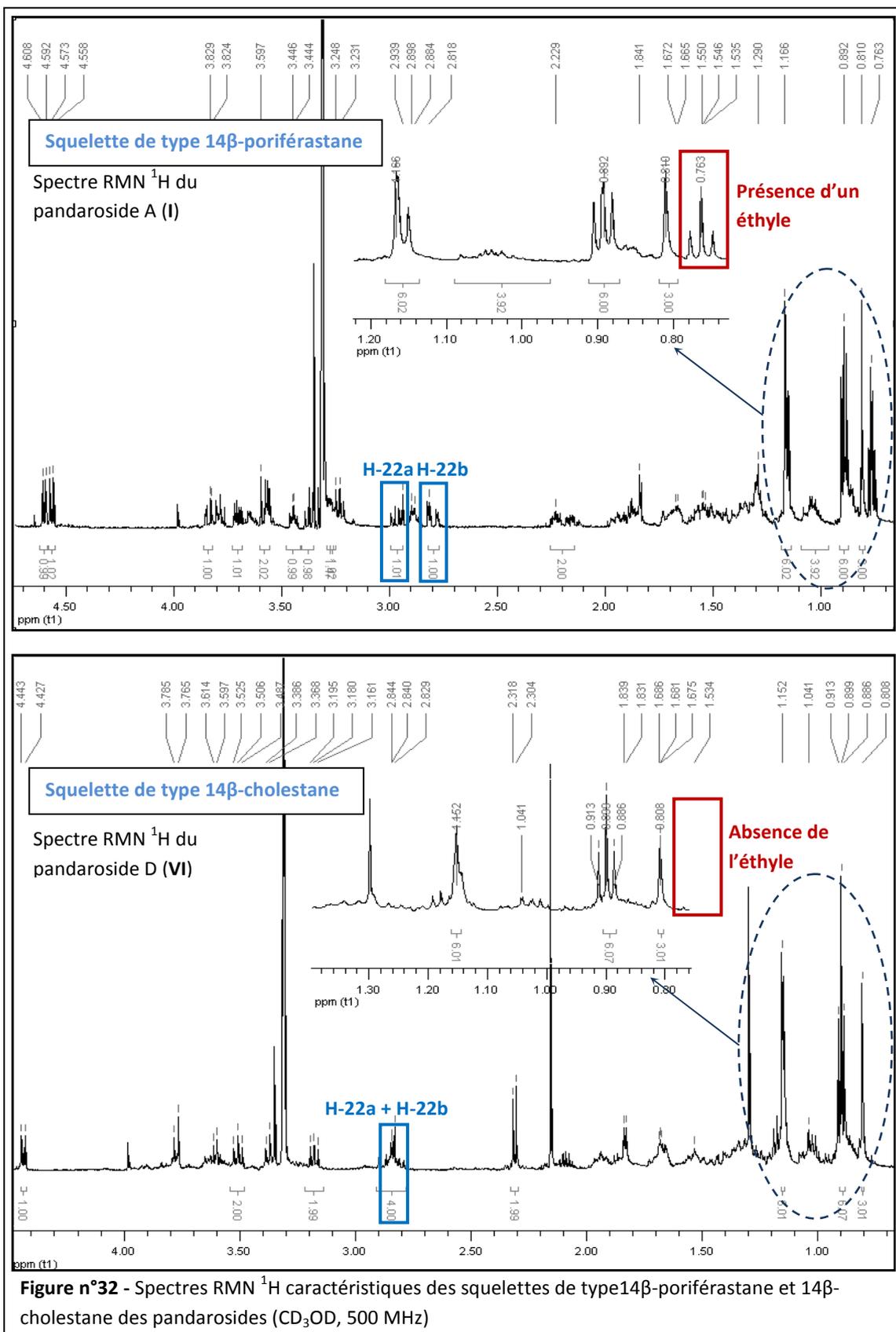


III.4. Le pandaroside D (VI) et son ester méthylique (VII)

Après repurification par HPLC analytique (colonne C₆-Phényle) du pic 9 de la **Figure n°14**, le pandaroside D (VI, 1,8 mg, 0,5.10⁻³ % m/m humide) a été isolé sous forme d'un solide blanc amorphe. Sa formule brute, déterminée par HRESIMS, est C₃₃H₅₀O₁₀ (m/z 605,3313 [M-H]⁻, Δ -1,2 ppm). La comparaison des spectres ¹H et ¹³C du pandaroside D (VI) avec ceux du pandaroside C (IV) a clairement indiqué que ces deux composés partageaient le même squelette 14β-épicholestane (**Figure n° 32**).

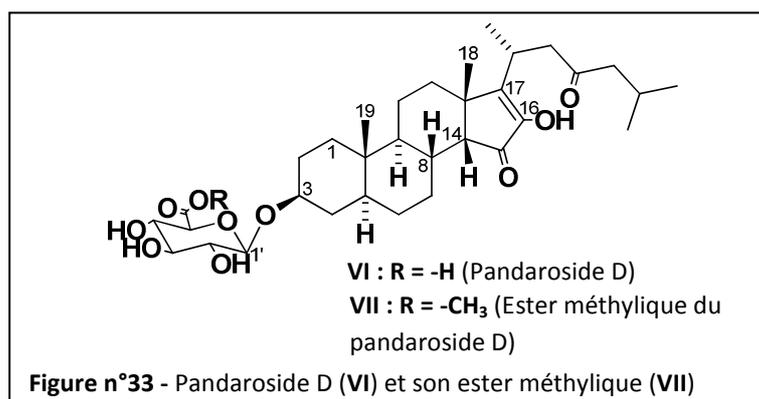
En revanche, le spectre RMN ¹H du pandaroside D (VI) ne présente qu'un signal correspondant à un proton anomérique à δ_H 4,43 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1') ppm. D'après les corrélations COSY et la présence d'un carbone à δ_C 172,7 ppm, l'unique sucre du pandaroside D (VI) a été déterminé comme étant un acide glucuronique. Comme pour le pandaroside B (III), le résidu osidique est lié au stérol par l'oxygène en position C-3. Une fragmentation par spectrométrie de masse du pandaroside D (VI) a mis en évidence un fragment à m/z 453,3 ([M-C₆H₉O₆+H+Na]⁺), correspondant à la perte de l'acide β-glucuronique et confirmant ainsi la nature du sucre lié à la partie aglycone du pandaroside D (VI) ainsi que sa position en C-3 (**Figure n°31**). Comme précédemment, la liaison β-glycosidique a été déterminée grâce à la constante de couplage vicinale du proton H-1' ($J = 8,0$ Hz).





La configuration relative du pandaroside D (**VI**) a été déduite du spectre RMN bidimensionnel NOESY. Comme pour le pandaroside A (**I**), les corrélations NOESY H-8/H-14/H₃-18/H₃-19 ont été observées, ce qui a permis de placer ces protons sur la même face β de la molécule. Appartenant à la même famille, la configuration absolue de ce composé est supposé être la même que celle du pandaroside A (**I**).

Lors de la repurification du pandaroside D (**VI**), et comme ce fut le cas pour les pandarosides A (**I**) et C (**IV**), son ester méthylique (**VII**) a également été isolé. La caractérisation de ce composé minoritaire a été faite de la même façon que pour les esters méthyliques **II** et **V**.



Les spectres et les tableaux RMN de cette molécule se situent dans la partie expérimentale (pp.261-262). Ce travail fait l'objet d'une publication.²⁹

III.5. Autres pics du profil de purification (Figure n°14)

La purification par HPLC de la sous-fraction F3-f4, issue de la fraction la plus active F3 (H₂O/MeOH 1:3), a permis d'obtenir seulement quatre pics en quantité suffisante pour être repurifiés sur colonne analytique et permettre ainsi l'isolement des sept molécules décrites ci-dessus. Aucun de ces composés ne semble être responsable de la cytotoxicité de la fraction car ils ne présentent pas de cytotoxicité à une concentration inférieure ou égale à 10 μ M contre trois lignées cellulaires cancéreuses humaines : A549, cellules du poumon ; HT29, cellules du colon ; MDA-MB-231, cellules du sein (**Tableau 6**). La cytotoxicité des sous-fractions correspondant à la tête et à la queue de la purification par HPLC semi-préparative (**Figure n°14**) a également été évaluée. Ces sous-fractions n'ont présenté aucune activité sur les trois lignées de cellules humaines cancéreuses testées (A549, HT29, MDA-MB-231) pour une concentration inférieure ou égale à 25 μ g.mL⁻¹.

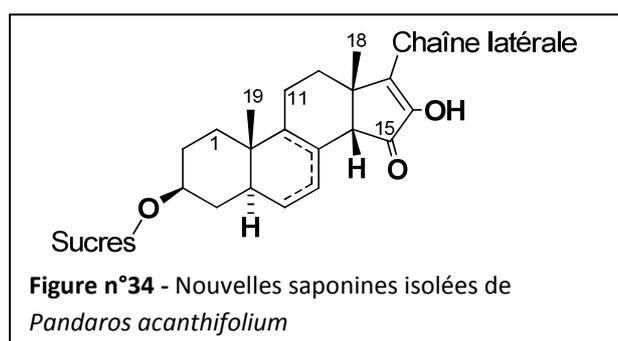
²⁹ Cachet, N. ; Regalado, E.L. ; Genta-Jouve, G. ; Mehiri, M. ; Amade, P. ; Thomas, O.P. *Steroids*, **2009**, 74, 746-750.

Tableau 6 – Cytotoxicité des pandarosides isolés (n.d. = non déterminé)

| Pourcentage de croissance : | -50% | < 0% | < 50% | < 100% | > 100% | | |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Concentration testée : 10 µM | | | | | | | |
| | I | II | III | IV | V | VI | VII |
| HT29 (Colon) | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% |
| A549 (Poumon) | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% |
| MDA-MB-231 (Sein) | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% | > 100% |

Sauf en cas de synergie, les molécules responsables de l'activité de la fraction sont certainement présentes dans les 15 pics non repurifiés de la **Figure n°14** (pics 1, 2, 4 à 8, 10, 12 à 18) qui, d'après leurs spectres RMN ¹H sont également des saponines stéroïdiennes.

Afin d'identifier ces composés et découvrir les molécules responsables de l'activité de la fraction F3, les 350 g d'éponge humide congelée restant ont été extraits. L'extrait brut a ensuite été fractionné dans les mêmes conditions que précédemment. Le profil de la fraction active F3 (H₂O/MeOH 1:3) a ainsi été retrouvé à l'identique, elle a donc été fractionnée dans les mêmes conditions que précédemment et les composés de la sous-fraction F3-f4 ont été purifiés par HPLC. Ainsi, les composés dont la structure n'a pas pu être élucidée lors de la première purification, sont en cours de caractérisation dans le cadre de la thèse de doctorat d'Erik Regalado. Cette seconde purification par HPLC a permis l'isolement et la caractérisation de 14 nouvelles saponines comportant également le cycle 2-hydroxypent-2-énone original des pandarosides. Par rapport aux pandarosides A-D et esters méthyliques (I-VII) décrites ci-dessus, ces nouvelles molécules présentent, pour la plupart, des insaturations supplémentaires (**Figure n°34**), la partie osidique étant également modifiée. Les pandarosides A-D et leurs esters méthyliques (I-VII) ont été retrouvés. Ainsi, la quantité de ces composés a été suffisante pour pouvoir entreprendre la détermination de la configuration absolue de la partie osidique par méthanolyse acide puis analyse par GC/MS chirale.



La faible cytotoxicité des pandarosides isolés est surprenante par rapport à celles des saponines stéroïdiennes décrites (**Partie IV**). Dans un souci de valorisation, l'ensemble des molécules isolées va être testé pour différentes activités biologiques, notamment cytotoxique, antipaludique, antibactérienne, antifongique ou encore antifouling.

L'isolement de saponines stéroïdiennes ou triterpéniques d'une éponge marine n'est pas courant. Elles sont en effet majoritairement retrouvées dans les échinodermes.^{30,31,32} Cette famille de composés a même été considérée comme marqueur chimiotaxonomique de certains échinodermes.³³ Les seuls exemples de saponines stéroïdiennes ou triterpéniques isolées d'éponges sont décrits ci-dessous.

IV. Les saponines stéroïdiennes isolées de spongiaires

41

Certaines saponines stéroïdiennes ou triterpéniques ont été isolées d'éponges du genre *Asteropus*, *Erylus* ou *Ectyoplasia*.³³ La grande majorité des saponines isolées d'éponges peuvent être classées en deux sous-familles : les sarasinosides, principalement isolés d'éponges du genre *Asteropus*, et les érylosides, majoritairement isolés d'éponges du genre *Erylus*. Un grand nombre de ces saponines présentent des activités thérapeutiques variées : cytotoxiques, antifongiques, antivirales ou hémolytiques.³³

IV.1. Les sarasinosides

Le sarasinoside A₁ (**27**) est la première saponine isolée d'une éponge, *Asteropus sarasinsum*, en 1987, accompagnée de huit autres oligoglycosides norlanostane-triterpéniques.^{34,35} La dose effective 50 de ce métabolite contre la lignée cellulaire de la leucémie murine P388 est de 2,8 µg.mL⁻¹. La partie glycosidique du sarasinoside A₁ (**27**) est composée de cinq sucres dont deux amino-sucres, la *N*-acétyl-D-galactosamine et la *N*-acétyl-D-glucosamine, ce qui est relativement rare dans les saponines. La partie oligosaccharide est composée de dérivés du D-xylose, D-glucose, *N*-acétyl-D-glucosamine et *N*-acétyl-D-galactosamine. La configuration β des différents sucres a été déterminée grâce aux déplacements chimiques et aux constantes de couplage ¹J_{CH} de des signaux RMN de leurs carbones anomériques. Enfin, l'enchaînement des sucres a été déterminé de deux façons différentes :

- par spectrométrie de masse ;³⁴
- par hydrolyse enzymatique avec l'hesperidinase.³⁶

³⁰ Burnell, D.J. ; Apsimon, J.W. In: *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Academic Press, New York, **1983**, 5, 88.

³¹ Minale, L. ; Iorizzi, M. ; Palagiano, E. ; Riccio, R. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 404, 335-356.

³² Bing, H.X. ; Schmidt, R.R. *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 817-823.

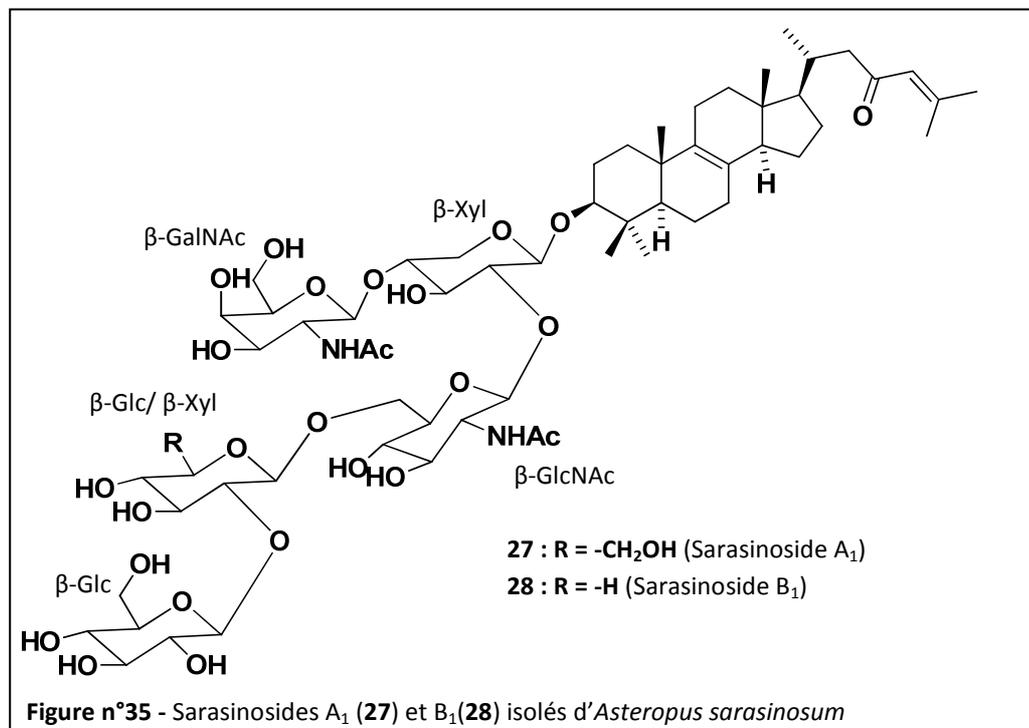
³³ Dai, H.-F. ; Edrada, R.A. ; Ebel, R. ; Nimtz, M. ; Wray, V. ; Proksch, P. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1231-1237. Et références citées

³⁴ Schmitz, F.J. ; Ksebaty, M.B. ; Gunasekera, S.P. ; Agarwal, S. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5941-5947.

³⁵ Kitagawa, I. ; Kobayashi, M. ; Okamoto, Y. ; Yoshikawa, M. ; Hamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 5036-5039.

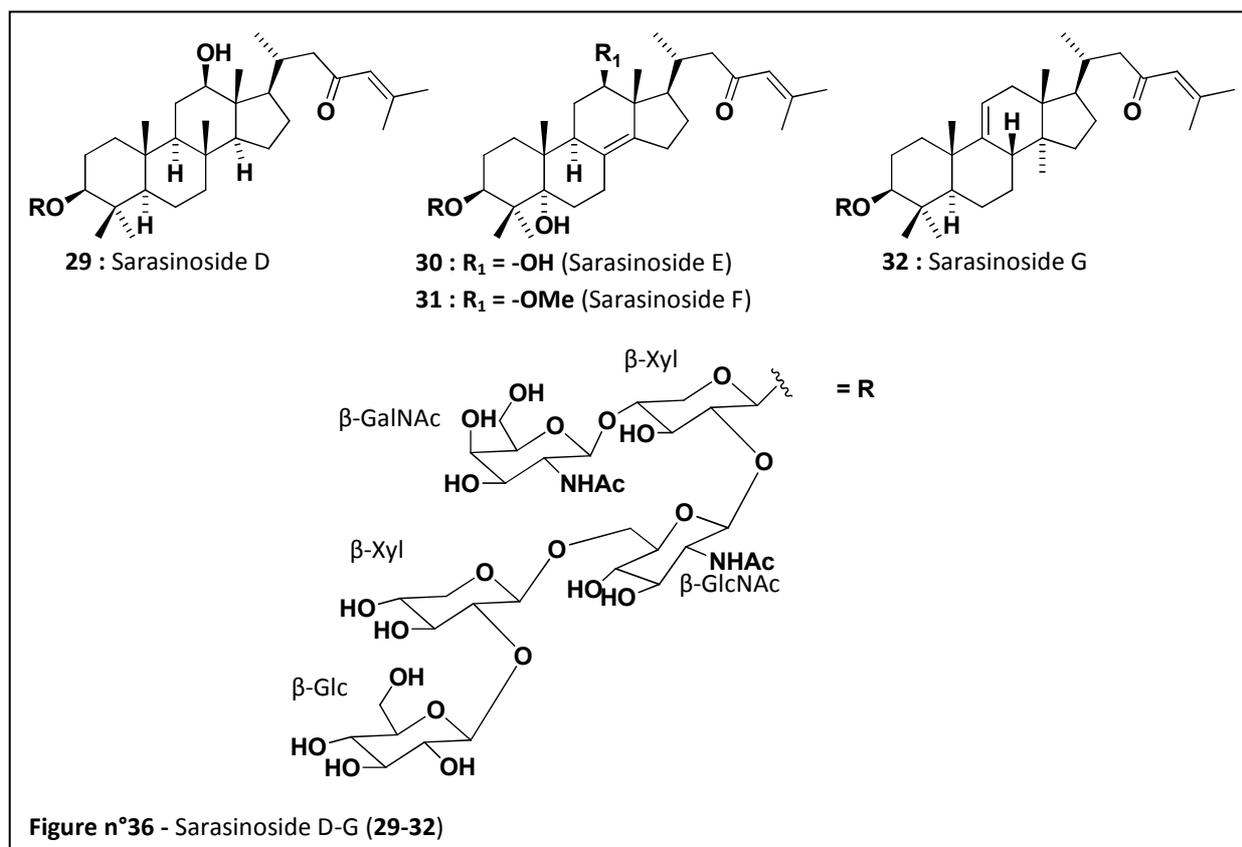
³⁶ Kobayashi, M. ; Okamoto, Y. ; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 2867-2877.

La structure des huit autres saponines isolées de cette éponge a été déterminée en se basant sur la structure du sarasinoside A₁ (**27**).³⁶ De façon intéressante, ces composés présentent, comme les pandarosides, une fonction cétone en C-23 (**Figure n°35**).



En 1992, quatre nouveaux oligoglycosides triterpéniques, les sarasinosides D à G (**29** à **32**), présentant une activité cytotoxique *in vivo* contre plusieurs types de cellules tumorales et inhibant la protéine kinase C, ont enrichi la famille des sarasinosides.³⁷

³⁷ Espada, A. ; Jiménez, C. ; Rodrigues, J. ; Crews, P. ; Riguera, R. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 8685-8695.



Depuis, 16 sarasinosides ont été isolés principalement des éponges des genres *Asteropus* et *Erylus*. En plus des activités citées ci-dessus, ces saponines ont une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire humaine de la leucémie K562,³⁸ inhibent la division cellulaire des œufs fertilisés d'étoile de mer,³⁵ et ont une activité ichtyotoxique.³⁶

Très récemment, le sarasinoside B₄, un épimère du sarsinoside B₁ (**28**) par la présence d'un α-Xylose remplaçant le β-Xylose de **28**, a été isolé de l'éponge *Amorphinopsis excavans*, complétant ainsi cette famille de saponines.³⁹

IV.2. Les érylosides

L'éryloside A (**33**) est une saponine stéroïdienne isolée de l'éponge *Erylus lendenfeldi* en 1989.⁴⁰ Elle possède des activités cytotoxique et antifongique. Elle est le premier exemple de la deuxième famille de saponines isolées d'éponge, les glycosides de pénastérol et autres dérivés aglycones.^{41,42,43} Depuis,

³⁸ Lee, H.-S. ; Seo, Y. ; Cho, K.W. ; Rho, J.-R. ; Shin, J. ; Paul, V.J. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 915-919.

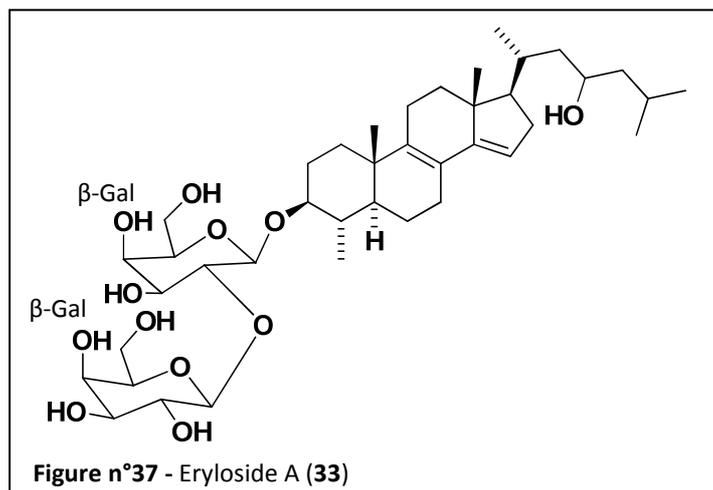
³⁹ Patel, K. (ICSN/CNRS – Gif-Sur-Yvette, France) travail non publié sur l'étude chimique de l'éponge *Amorphinopsis excavans* des îles Salomon.

⁴⁰ Carmely, S. ; Roll, M. ; Loya, Y. ; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 167-170.

⁴¹ D'auria, M.V. ; Gomez Paloma, L. ; Riccio, R. ; Debitus, C. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 491-498.

⁴² Gulavita, N.K. ; Wright, A.E. ; Kelly-Borges, M. ; Longley, R.E. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 4299-4302.

la famille des érylosides s'est largement agrandie.⁴⁴ Certains glycosides de la même famille ont été décrits sous divers noms, par exemple le nobiloside isolé d'*Erylus nobilis*,⁴⁵ le formoside isolé d'*Erylus formosus*,⁴⁶ ainsi que les feroxosides A et B isolés d'*Ectyoplasia ferox*.⁴⁷ Ces composés présentent diverses activités thérapeutiques⁴⁸ mais aussi environnementales telles qu'antifouling ou antiappétant.^{49,50}



Les neuf dernières molécules de cette famille ont été isolées de l'éponge caraïbe *Erylus formosus* en 2007.⁵¹ Leur partie aglycone est de type 14-carboxy-24-méthylènelanost-8(9)-én-3β-ol ou pénastérol.

IV.3. Les autres saponines isolées d'éponges

En dehors des deux grandes familles décrites ci-dessus, très peu d'autres saponines ont été isolées d'éponges marines. En 1994, l'ulososide A (**34**), puis l'ulososide B (**35**) en 1998, ont été isolés de l'éponge *Ulosa sp.*^{52,53} Il convient de noter que, chronologiquement, ces deux métabolites sont les premiers exemples de saponines qui ne sont pas issues d'une éponge de l'ordre Astrophorida mais de l'ordre Poecilosclerida. Ces deux métabolites diffèrent des précédents par leur partie aglycone originale sur laquelle une fonction acide carboxylique remplace un des deux méthyles en position C-4

⁴³ Stead, P. ; Hiscox, S. ; Robinson, P.S. ; Pike, N.B. ; Sidebottom, P.J. ; Roberts, A.D. ; Taylor, N.L. ; Wright, A.E. ; Pomponi, S.A. ; Langley, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 661-664.

⁴⁴ Shin, J. ; Lee, H.-S. ; Woo, L. ; Rho, J.-R. ; Seo, Y. ; Cho, K.W. ; Sim, C.J. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 767-773.

⁴⁵ Takada, K. ; Matsunaga, S. ; Van Soest, R.W.V. ; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 411-413.

⁴⁶ Jaspars, M. ; Crews, P. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 7501-7504.

⁴⁷ Campagnuolo, C. ; Fattorusso, E. ; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 4049-4045.

⁴⁸ Sandler, J.S. ; Forsburg, S.L. ; Faulkner, D.J. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1199-1206.

⁴⁹ Kubanek, J. ; Whalen, K.E. ; Engel, S. ; Kelly, S.R. ; Henkel, T.P. ; Fenical, W. ; Pawlik, J.R. *Oecologia*, **2002**, *131*, 125-136.

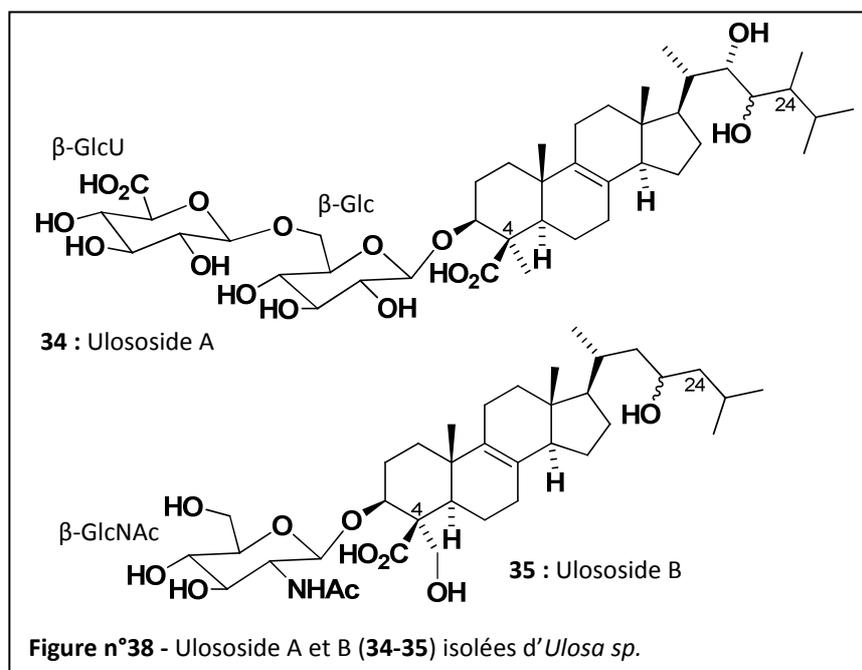
⁵⁰ Kubanek, J. ; Pawlik, J.R. ; Eve, T.M. ; Fenical, W. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2000**, *207*, 69-77.

⁵¹ Antonov, A.S. ; Kalinovsky, A.I. ; Stonik, V.A. ; Afiyatulloev, S.S. ; Aminin, D.L. ; Dmitrenok, P.S. ; Mollo, E. ; Cimino, G. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 169-178.

⁵² Antonov, A.S. ; Kalinovsky, A.I. ; Stonik, V.A. ; Avtushenko, E.V. ; Elyakov, G.B. *Russ. Chem. Bull.*, **1994**, *43*, 1265-1269.

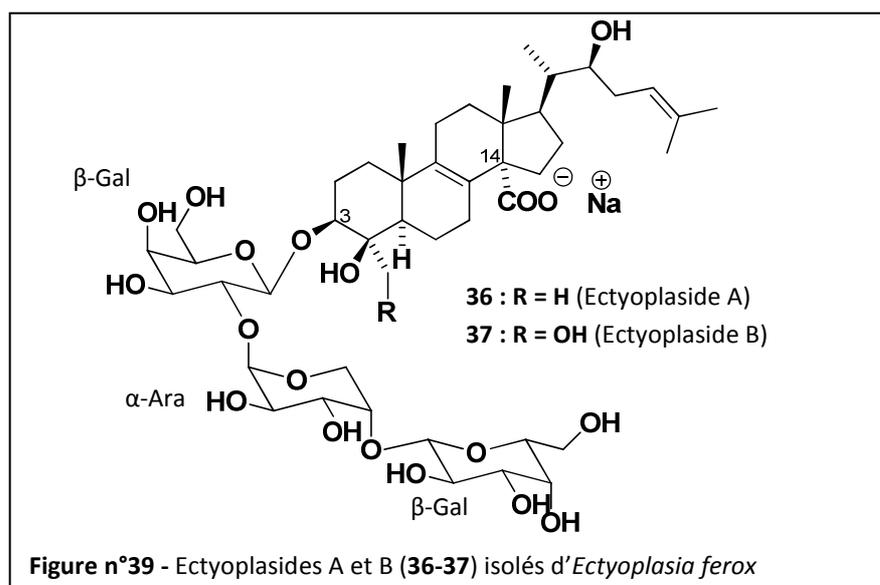
⁵³ Antonov, A.S. ; Kalinovsky, A.I. ; Stonik, V.A. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3807-3808.

du squelette norlanostane original. Une modification supplémentaire peut être remarquée dans la structure de l'ulososide A (**34**). En effet, un méthyle en position C-24 vient modifier la chaîne latérale habituelle des squelettes norlanostane. Un des deux sucres est un résidu « acide glucuronique », ce qui constitue une nouveauté par rapport aux deux familles de saponines stéroïdiennes précédentes mais les rapproche des pandarosides.



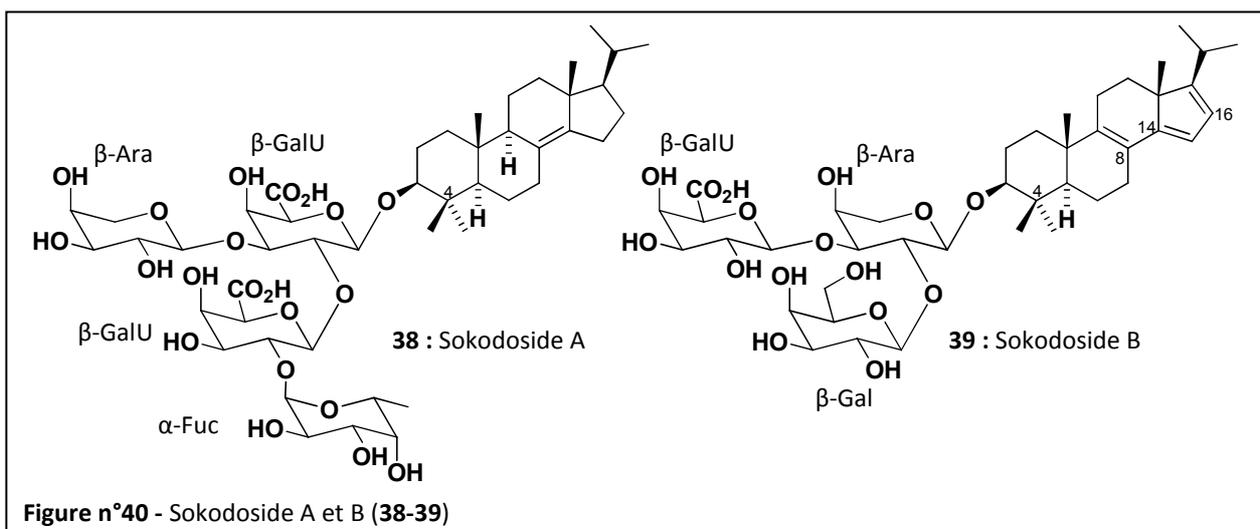
En 1999, deux nouveaux triglycosides norlanostanes, les ectyoplasides A et B (**36-37**), ont été isolés de l'éponge caraïbe *Ectyoplasia ferox*. Il s'agit du deuxième exemple de saponines isolées d'une éponge de l'ordre Poescliosclerida.⁵⁴ La structure originale de leur partie aglycone est identifiée comme un nortriterpène avec un squelette tétracyclique de type norlanostane possédant une fonction carboxylate en position C-14, ce qui est relativement peu courant. Sur le squelette norlanostane, on trouve également un hydroxyle en position C-4 remplaçant un des deux méthyles du squelette lanostane original. Les ectyoplasides A et B (**36-37**) présentent une activité cytotoxique modérée *in vitro* contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.

⁵⁴ Cafieri, F. ; Fattorusso, E. ; Tagliatela-Scafati, O. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 231-238.



Cette même année, trois autres saponines stéroïdiennes ont été isolées dans une association de deux éponges, *Poecillastra wondoensis* et *Jaspis wondoensis*,⁵⁵ suivi en 2003 par l'isolement de huit nouveaux stéroïdes oligoglycosidiques spermostatiques dans l'éponge caraïbe *Mycale laxissima*.⁵⁶

En 2006, Okada *et al.* ont caractérisé deux nouvelles saponines stéroïdiennes, les sokodosides A et B (38-39), dans *Erylus placenta*.⁵⁷ Ces molécules possèdent un squelette différent des saponines décrites ci-dessus avec en particulier une chaîne latérale isopropyle et un noyau 4,4-diméthylstéroïde. L'originalité du sokodoside B (39) est accentuée par la présence des insaturations $\Delta^{8,14,16}$ dans sa partie aglycone. Les sokodosides montrent une inhibition de croissance sur plusieurs souches de levures et une activité cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.

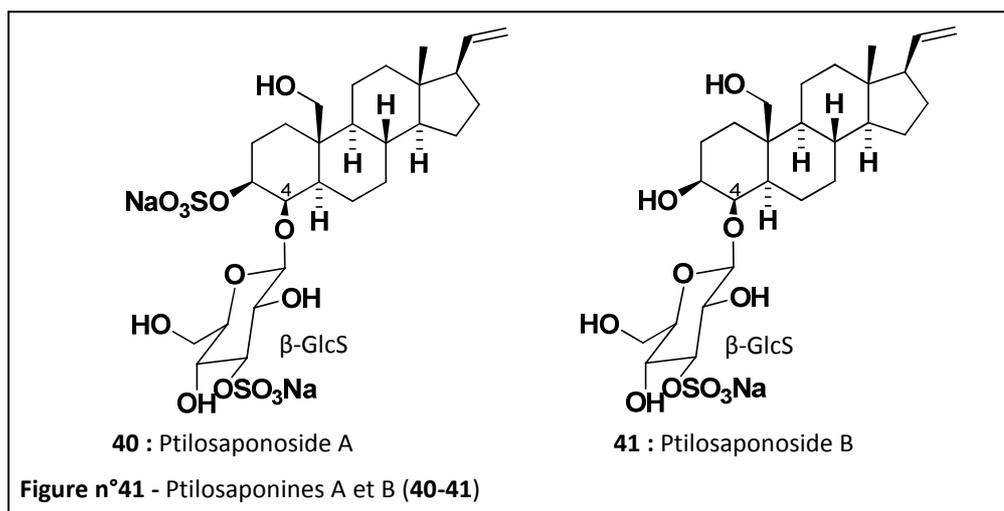


⁵⁵ Ryu, G. ; Choi, B.W. ; Lee, B.H. ; Hwang, K.-H. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 13171-13178.

⁵⁶ Antonov, A.S. ; Afiyatullo, S.S. ; Kalinovsky, A.I. ; Ponomarenko, L.P. ; Dmitrenok, P.S. ; Aminin, D.L. ; Agafonava, I.G. ; Stonik, V.A. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1082-1088.

⁵⁷ Okada, Y., Matsunaga, S., Van Soest, R.W.M., Fusetani, N. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 4884-4888.

Les dernières saponines de spongiaires caractérisées à ce jour ont été isolées en 2009 d'une éponge des îles Salomon, *Ptilocaulis spiculifer*.⁵⁸ Les ptilosaponosides A et B (**40-41**) présentent un squelette prégnane dérivé du prégnanetriol et sont caractérisées par la présence de groupements sulfates sur la partie sucre. Contrairement aux saponines précédentes, la partie glycosidique de ces composés est attachée à l'aglycone en position C-4. Ces saponines ne montrent aucune cytotoxicité contre la lignée cellulaire de la leucine murine KB.



⁵⁸ Gabant, M. ; Schmitz-Afonso, I. ; Gallard, J.-F. ; Menou, J.-L. ; Laurent, D. ; Debitus, C. ; Al-Mourabit, A. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 760-763.

Partie B : Etude chimique de deux cnidaires méditerranéens

La seconde partie de mon travail de thèse concerne l'étude chimique de deux cnidaires méditerranéens, *Astroides calycularis* et *Parazoanthus axinellae*, dans le but d'identifier leurs métabolites secondaires, et d'un spongiaire, *Agelas oroides*, pour lequel j'ai mis au point un protocole de l'étude de la biosynthèse d'alcaloïdes bioactifs dans le cadre des objectifs du projet ECIMAR.

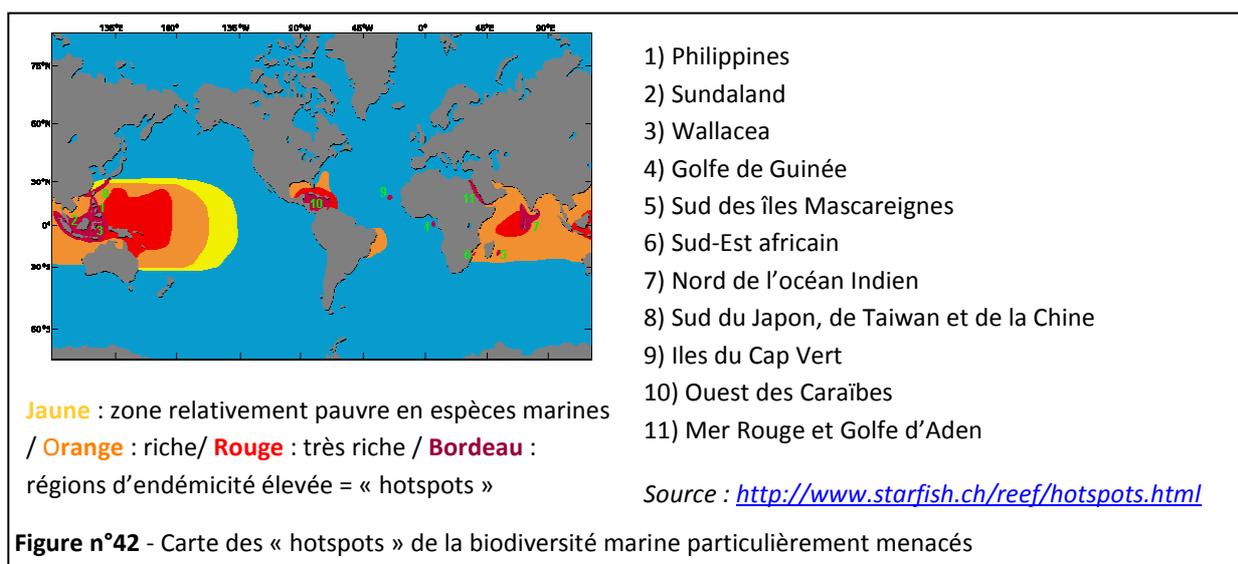
I. Le projet ECIMAR

51

I.1. Le contexte

Le milieu marin est le siège d'une grande compétition entre les divers organismes benthiques pour l'occupation du substrat ou la survie. Pour de nombreuses espèces d'invertébrés, le système de défense est lié à la production de médiateurs chimiques spécifiques, les métabolites secondaires, qui sont parfois vecteurs de la communication chimique entre organismes.⁵⁹ Ces substances qui sont essentielles au maintien de la vie et à la survie de l'espèce, traduisent la diversité des organismes vivants. L'originalité de leurs structures chimiques (chimiodiversité) est associée à une grande variété de propriétés biologiques (cytotoxique, antibactérien, antifongique, antifouling, répulsif, antiappétant, etc.).⁶⁰

La chimiodiversité benthique méditerranéenne, très étudiée dans les années 70, a été délaissée au profit des « hotspots » de biodiversité plus exotiques (**Figure n°42**).



⁵⁹ Poulson, K.L. ; Sieg, R.D. ; Kubanek, J. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26, 729-745.

⁶⁰ Glaser, K.B. ; Mayer, A.M.S. *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, 78, 440-448.

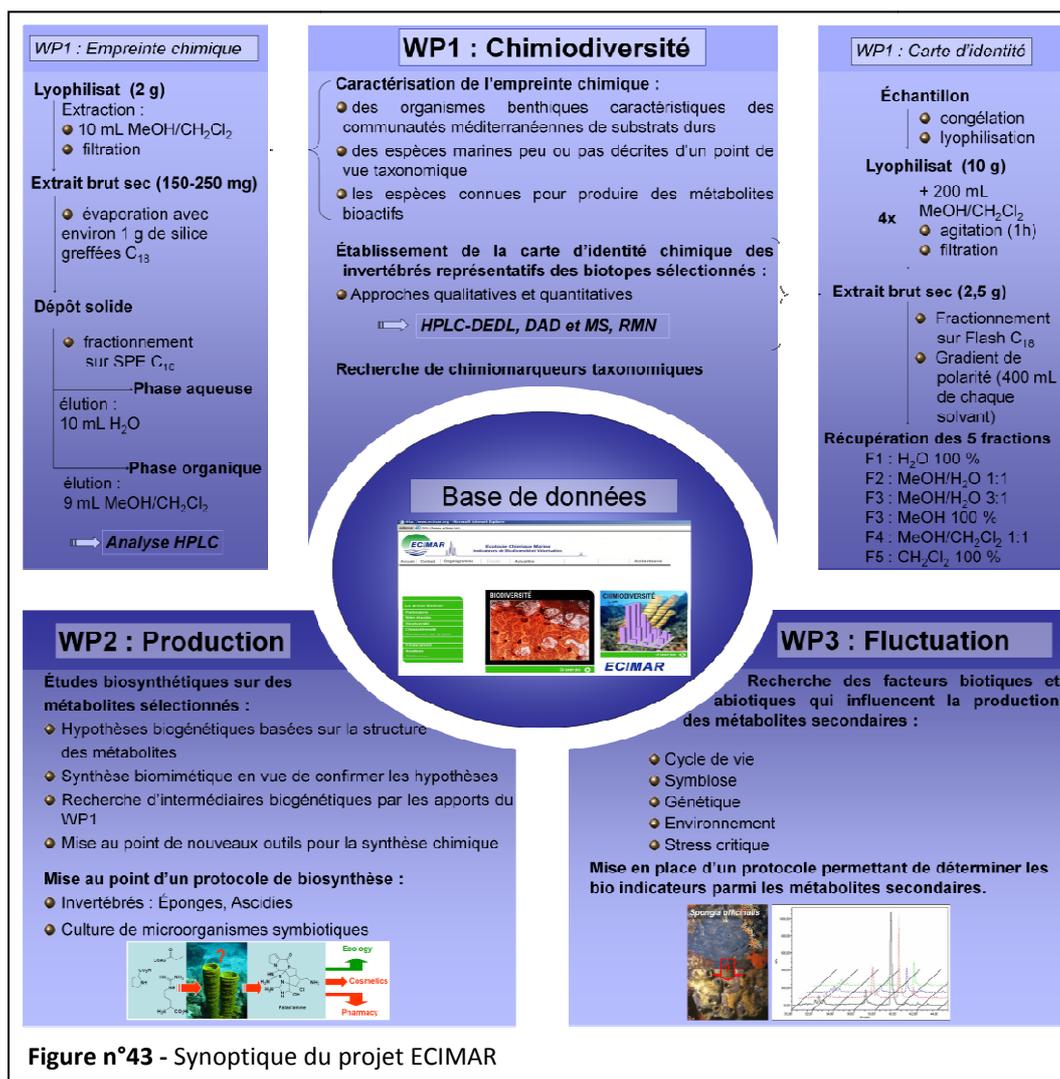
Le projet ECIMAR a pour but de profiter de l'évolution des techniques d'analyses depuis ces 30 dernières années pour évaluer de nouveau la richesse que peut offrir la communauté benthique de substrat dur méditerranéenne. Grâce à l'amélioration des techniques d'analyse, le seuil de sensibilité des appareils a considérablement diminué, permettant ainsi la détection de très faibles quantités de molécules. Ceci permet de diminuer les quantités des organismes source prélevés et ainsi de mieux préserver les ressources naturelles.

I.2. Les objectifs du projet ECIMAR

ECIMAR a pour but d'évaluer le potentiel que représente la biodiversité marine méditerranéenne en terme de chimiodiversité et de mieux comprendre comment s'exprime et varie cette diversité chimique que ce soit au niveau spatial ou temporel. Ainsi, grâce aux résultats obtenus, ECIMAR permet :

- L'élaboration d'un inventaire de la biodiversité et de la chimiodiversité d'une communauté modèle pouvant servir de référence pour suivre l'évolution d'un biotope soumis à diverses pressions environnementales ;
- L'identification de nouveaux métabolites d'intérêt thérapeutique, cosmétique ou environnemental (antifouling) ;
- L'identification de nouveaux précurseurs biosynthétiques et l'étude de leur biosynthèse *in vivo* et sur extrait acellulaire ;
- L'identification des facteurs contrôlant l'expression des métabolites secondaires et ceux à l'origine des fluctuations de cette expression.

Tous les travaux ci-dessus sont répartis en trois groupes de travail (WP1, WP2 et WP3) et une base de données collaborative disponible sur internet (www.ecimar.org) permet de rassembler les différents résultats obtenus (**Figure n°43**).



ECIMAR se concentre actuellement à la Méditerranée afin de profiter des connaissances déjà acquises et de la maîtrise logistique des équipes en place. Ce programme s'intéresse principalement aux communautés benthiques de substrat dur et plus particulièrement aux espèces caractéristiques du coralligène et des grottes semi-obscurées. La méthodologie comprend le recensement, la récolte des espèces dominantes et la sélection d'espèces-cibles. Ces espèces sont identifiées et leur signature chimique, établie grâce à un protocole standardisé (cf. I.3), est enregistrée dans la base de données.

Notre contribution concerne le WP1 « Chimiodiversité » avec l'étude chimique des deux cnidaires *Astroïdes calycularis* et *Parazoanthus axinellae* (Partie B, III et IV).

Notre contribution au WP2 « Production » concerne l'étude des voies de biosynthèse de certains métabolites cibles de type alcaloïdes par la mise au point d'un protocole permettant l'utilisation de précurseurs marqués ¹⁴C dans le métabolisme secondaire du spongiaire *Agelas oroides* (Partie C).

I.3. Empreintes chimiques des organismes d'étude

Après leur récolte et leur identification taxonomique, les organismes sont lyophilisés et répartis dans les différents laboratoires du projet ECIMAR afin d'obtenir leurs empreintes chimiques par HPLC à l'aide de différents moyens de détection : UV, DEDL et MS. Chacune d'elles, représentative d'une espèce donnée dans un biotope donné, ne doit pas dépendre de la personne ou du type d'appareillage utilisé pour traiter l'échantillon. Pour ce faire, le consortium de laboratoires a défini un protocole standardisé pour l'acquisition de ces signatures chimiques.

54

I.3.1. Préparation de l'échantillon

Après avoir lyophilisé et broyé le matériel biologique, il est pesé et conservé au congélateur à - 20°C. L'extraction et le dessalage de l'extrait brut est réalisé comme suit :

- Environ **2 g** (relever la pesée exacte) de matériel biologique sont extraits avec le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 (3 x 20 mL, ultrasons 3 x 10 min). Après filtration sur coton, l'extrait est ensuite évaporé en présence de silice greffée C₁₈ (environ 1 g) pour obtenir un dépôt solide. Le volume de solvant d'extraction est calculé proportionnellement à la masse exacte d'échantillon ;
- Le dessalage sur phase solide (Cartouche SPE Phenomenex Strata C₁₈-E, V = 12 mL, 2 g de silice) est réalisé en chambre à vide :
 - La cartouche SPE est conditionnée par 10 mL d'un mélange de solvant organique MeOH/CH₂Cl₂ 2:1 (lavage/activation) puis rincée avec 10 mL d'eau Milli-Q ;
 - Le dépôt solide de l'extrait est placé sur la cartouche SPE puis lavé par 10 mL d'eau Milli-Q pour éliminer les sels de l'extrait. La cartouche est laissée environ 15 min sous vide pour éliminer l'eau résiduelle ;
 - Les molécules organiques sont éluées par 9 mL de mélange MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 dans une fiole jaugée qui est ensuite complétée à 10 mL. **L'extrait organique A est ainsi obtenu.**
- Les 10 mL d'extrait A obtenu sont séparés en 3 :
 - 1 mL est prélevé pour être transvasé dans un vial pour passeur d'échantillon afin de réaliser une analyse par HPLC-DAD, -DEDL (filtration sur filtre seringue 0,2 µm). Cette fraction est nommée **A1** ;
 - 1 mL est prélevé pour être transvasé dans un vial pour passeur d'échantillon afin d'effectuer une analyse LC/MS. Cette fraction est identifiée **A2** ;
 - Les 8 mL restant sont évaporés et lyophilisés avant d'être pesés. Cette fraction est nommée **A3**. 20 mg de cet extrait sont envoyés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) afin d'effectuer différents tests d'activité biologiques (stockage des extraits obtenus à - 20 °C).

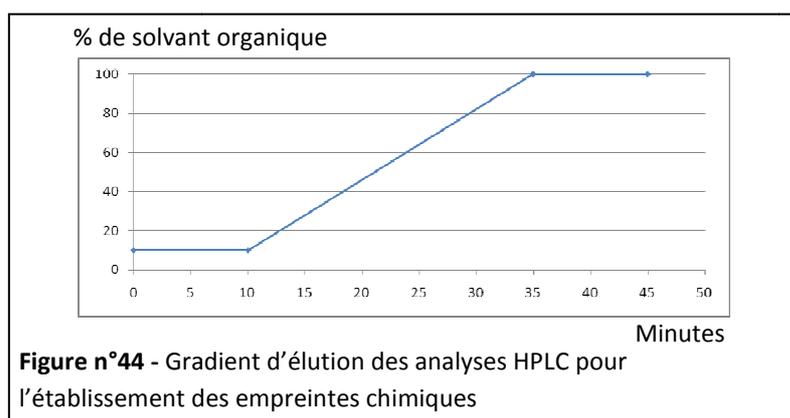
I.3.2. Obtention des empreintes chimiques

L'empreinte chimique de chaque échantillon est obtenue par HPLC-DAD, DEDL et MS.

Les analyses HPLC (DAD/DEDL) (**extraits A1**) sont réalisées sur une colonne Phenomenex Gemini C₆-Phenyle (3 x 250 mm, 5 µm, d = 0,5 mL.min⁻¹). Deux systèmes d'élution sont testés : H₂O/CH₃CN (Système d'élution 1) et H₂O/CH₃CN + 1 ‰ Ac. Formique (Système d'élution 2) ;

Remarque : Ce protocole standardisé a été établi avant le ralentissement de la production d'acétonitrile. Actuellement, lorsque cela est possible, l'acétonitrile est remplacée par du méthanol lors des analyses HPLC pour l'établissement des différentes empreintes chimiques.

- 10 µL des extraits **A1** sont injectés. Si l'HPLC est équipée d'un four, la température de la colonne est fixée à 30° C. Si le profil HPLC ainsi obtenu montre une saturation de la détection UV, l'analyse est refaite en injectant 5 µL des extraits **A1**.
- Le gradient d'élution utilisé est représenté sur la **Figure n°44** :



Les profils DEDL et UV à 210, 254 et 280 nm sont enregistrés pour l'établissement des empreintes chimiques.

- Les analyses LC/MS (**extraits A2**) sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant le système d'élution 2.

I.3.3. Isolement et caractérisation de nouveaux métabolites secondaires

Lorsque les empreintes chimiques d'une espèce sont intéressantes d'un point de vue chimique (espèce peu étudiée, présence de métabolites dont la masse molaire est inconnue dans l'espèce ou même dans les produits naturels, etc.), l'isolement et la caractérisation des différents métabolites secondaires sont envisagés. Le fractionnement peut être bio- et/ou chimioguidé en fonction des espèces étudiées.

Dans ce cas, l'extrait brut est préparé en suivant le protocole défini pour l'acquisition de l'empreinte chimique. En revanche, le dessalage est remplacé par un fractionnement par chromatographie « éclair » sur une cartouche de silice greffée C₁₈. Après un lavage à l'eau Milli-Q, pour éliminer les sels, cinq fractions sont récupérées : H₂O/MeOH 1:1, H₂O/MeOH 1:3, MeOH 100 %, MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et CH₂Cl₂ 100 %. La suite du fractionnement et de la purification est à adapter par chaque partenaire en fonction des espèces étudiées et/ou de la famille chimique à purifier.

Nous avons donc appliqué l'ensemble de cette procédure à l'étude de deux cnidaires méditerranéens ainsi qu'à la majorité des éponges sélectionnées pour les études de biosynthèse que nous avons menées.

II. La classe Hexacorallia

Les descriptions ci-après ont été inspirées de l'ouvrage de Beaumont et Cassier sur la biologie animale.⁶¹

Le phylum Cnidaria, englobant la classe Hexacorallia, est composé de métazoaires diploblastiques, c'est-à-dire à deux feuilletts embryonnaires. Leur structure est en sac à double paroi cellulaire séparée par une gelée intermédiaire, la mésoglée. La paroi externe, ou ectoderme, est composée de cellules sensorielles, nerveuses et spécialisées dans la capture des proies. La paroi interne, ou gastroderme, comprend surtout des cellules digestives et sécrétrices. Ce sac s'ouvre à l'extérieur par un orifice unique qui sert à la fois de bouche et d'anus, il n'y a pas de système circulatoire ou excréteur (**Figure n°45**).

Le cycle de vie des cnidaires, après une larve planula nageuse ou immobile, montre très souvent une alternance d'une phase fixée juvénile ou adulte (forme polype) immobile et d'une phase errante (forme méduse) généralement sexuée. Ce cycle peut se simplifier par réduction ou disparition d'une des deux phases en fonction du mode de vie du groupe. Le corps des cnidaires présente une symétrie radiale d'ordre pair (4 ou 6) à laquelle peut se superposer une symétrie bilatérale (anthozoaires).

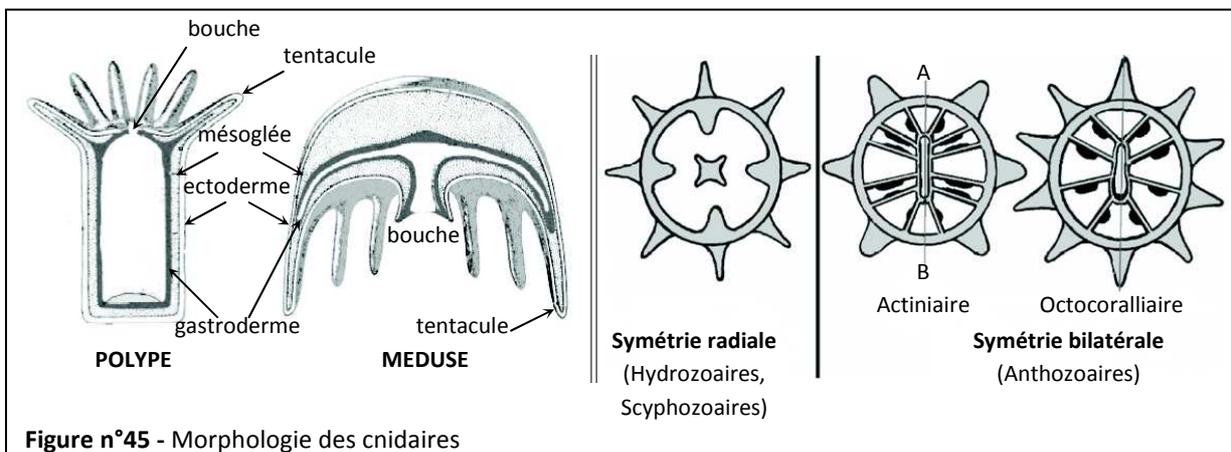


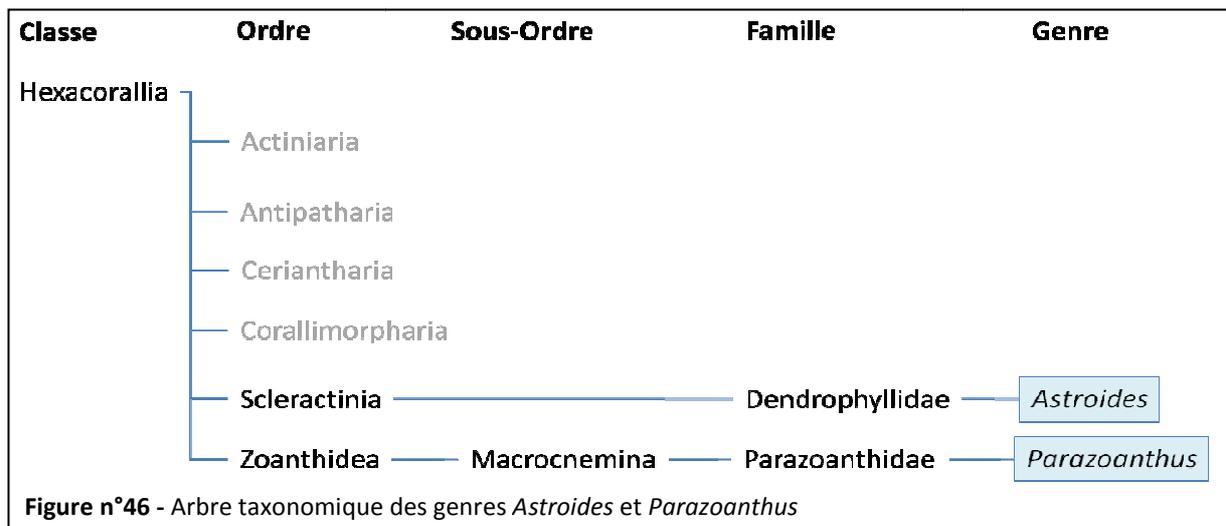
Figure n°45 - Morphologie des cnidaires

⁶¹ Beaumont, A. ; Cassier, P. In: *Biologie animale – Des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens*, Dunod 3rd Ed., 1998, 1, 1-464.

Les cnidaires sont divisés en trois super-classes :

- les hydrozoaires composés d'espèces benthiques et pélagiques ;
- les scyphozoaires composés essentiellement d'espèces pélagiques ; et,
- les anthozoaires composés uniquement d'espèces benthiques.

La super-classe des anthozoaires comporte deux classes : les octacoralliaires dont les polypes ont 8 tentacules pennés, et les hexacoralliaires dont le nombre de tentacules des polypes est un multiple de 6, comme *Astroides calycularis* et *Parazoanthus axinellae* (Figure °46).



La classe des hexacoralliaires est composée d'anthozoaires solitaires ou coloniaux, toujours benthiques, répartis en 6 ordres :⁶²

- l'ordre **Actiniaria** : organismes dépourvus de squelette, généralement fixés sur substrat dur ou enterrés dans le sédiment meuble, solitaires et macrophages ;
- l'ordre **Anthipatharia** : organismes coloniaux, possédant un squelette corné pourvu de fines pointes sur lesquelles sont fixés les polypes ;
- l'ordre **Ceriantharia** : petit groupe d'hexacoralliaires solitaires, sans squelette, vivant à demi-enfouis dans le sable et sécrétant un fourreau muqueux ;
- l'ordre **Corallimorpharia**, dont la structure est très proche de celle des scléactiniaires mais ne sécrétant pas de squelette calcaire ;

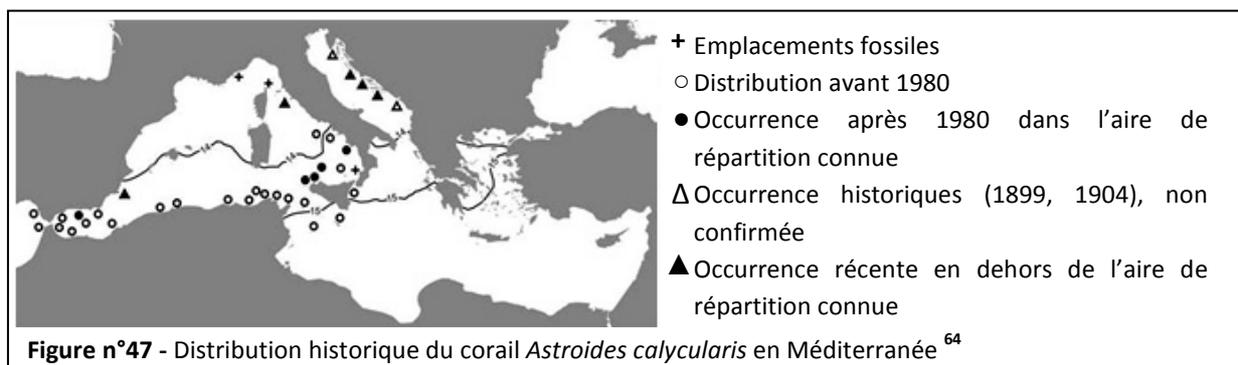
⁶² Daly, M. ; Brugler, M.R. ; Cartwright, P. ; Collins, A.G. ; Dawson, M.N. ; Fautin, D.G. ; France, S.C. ; McFadden, C.S. ; Opresko, D.M. ; Rodriguez, E. ; Romano, S.L. ; Stake, J.L. *Zootaxa*, **2007**, 1668, 127-182.

- l'ordre **Scleractinia** : organismes hétérotrophes et macrophages, le plus souvent coloniaux. Leur structure est proche de celle des actiniaires sur laquelle se développe en plus un squelette calcaire. Le corail *Astroides calycularis* fait partie de cet ordre ;
- l'ordre **Zoanthidea** : hexacoralliaires généralement coloniaux, dépourvus de squelette et possédant deux rangées de tentacules. C'est un groupe à systématique difficile. Les organismes ont un seul siphonglyphe ventral, l'ectoderme est discontinu et la mésoglée peut agglutiner des grains de sable et différents matériaux. Ils peuvent vivre sur certains littoraux tropicaux ou en association avec des spongiaires ou crustacés. L'anémone coloniale *Parazoanthus axinellae* fait partie de cet ordre.

III. *Astroides calycularis*

Astroides calycularis (Pallas, 1766) est la seule espèce du genre *Astroides*. C'est un corail azooxanthellé colonial dont les polypes sont de couleur jaune à orange vif. Il est présent de la surface à 30 m de profondeur sur les tombants verticaux ainsi qu'à l'entrée et l'intérieur des grottes, souvent dans les zones soumises à un fort courant.

Très peu étudié d'un point de vue chimique, il est pourtant présent depuis toujours en Méditerranée, spécialement sur les côtes italiennes, d'où sont issues les premières études chimiques.⁶³ Sa distribution actuelle est limitée au sud-ouest du bassin méditerranéen, en mer Adriatique et à quelques endroits près des côtes napolitaines (**Figure n°47**).⁶⁴ La quasi-disparition de ce corail thermophile au nord de la Méditerranée et son repliement vers les eaux chaudes du sud l'ont fait entrer dans la catégorie des espèces strictement protégées définies par la convention de Berne (STE 104, 19.IX.1979).

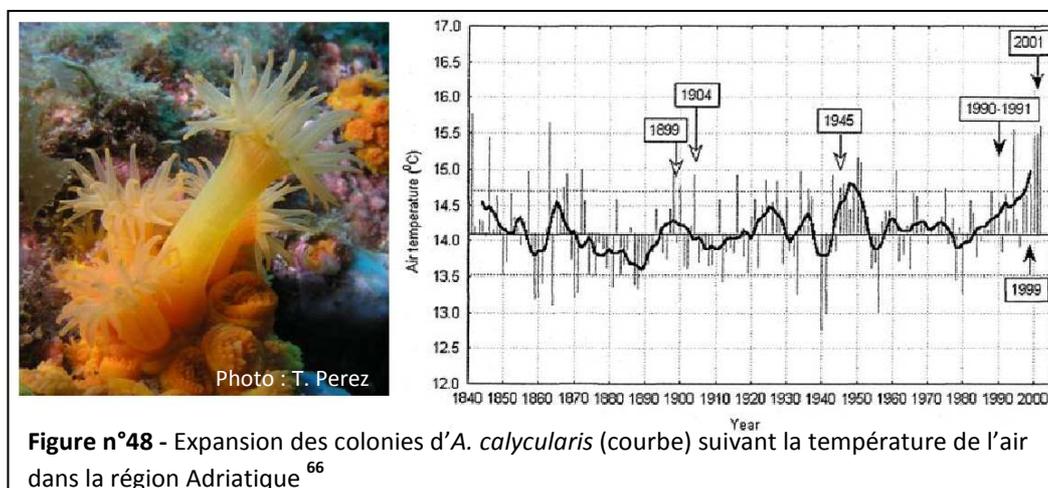


Dans les années 70, des expériences de transplantation d'*A. calycularis* pour une recolonisation des côtes marseillaises n'ont pas été concluantes et les derniers polypes vivants résiduels de ces

⁶³ Fattorusso, E. ; Lanzotti, V. ; Magno, S. ; Novellino, E. *J. Nat. Prod.*, **1985**, 48, 924-927.

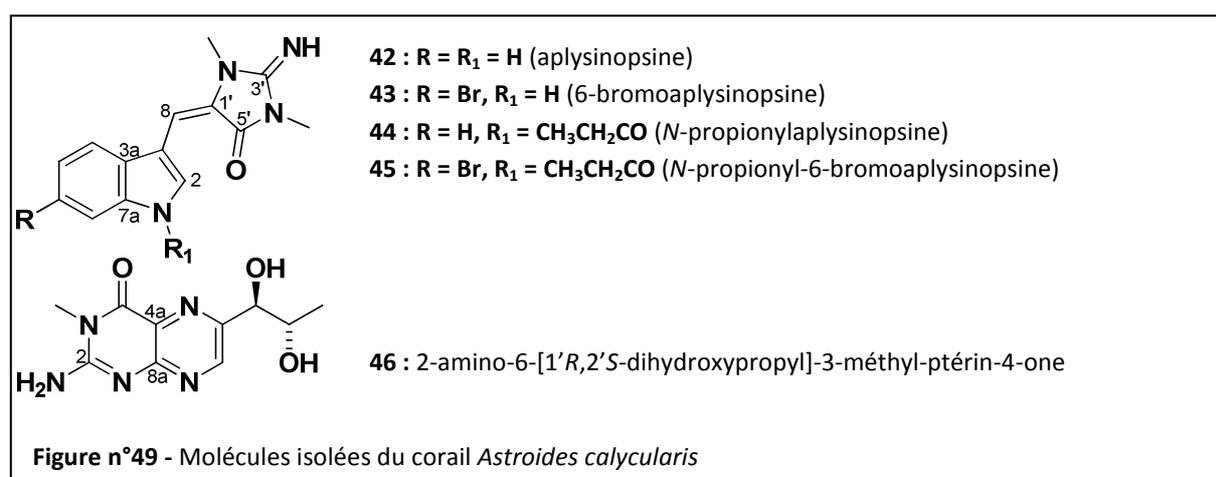
⁶⁴ Bianchi, C.N. *Hydrobiologia*, **2007**, 580, 7-21.

expériences ont été vues pour la dernière fois en 1985.⁶⁵ Cependant, d'après les observations de Grubelic *et al.*, le réchauffement climatique permettrait à *A. calycularis* de recoloniser le nord de la Méditerranée et plus particulièrement la mer Adriatique (**Figure n°48**).⁶⁶



Un des sites de récolte d'ECIMAR est l'Est méditerranéen et la zone de transition qu'est le détroit de Gibraltar. *Astroides calycularis* étant une espèce emblématique de ces côtes, le biologiste et systématicien Oscar Ocaña Vicente (Ceuta, Espagne) entreprend l'écriture d'un ouvrage consacré à ce corail et une étude chimique complète viendra alimenter un chapitre.

Les seules études chimiques faites sur *A. calycularis* jusqu'à ce jour ont été menées par Fattorusso et son équipe à la fin des années 80 et ont permis l'isolement de quatre alcaloïdes indoliques : l'aplysinosine (**42**) et ses dérivés (**43-45**) et un dérivé ptéridine (**46**) (**Figure n°49**).^{63,67}

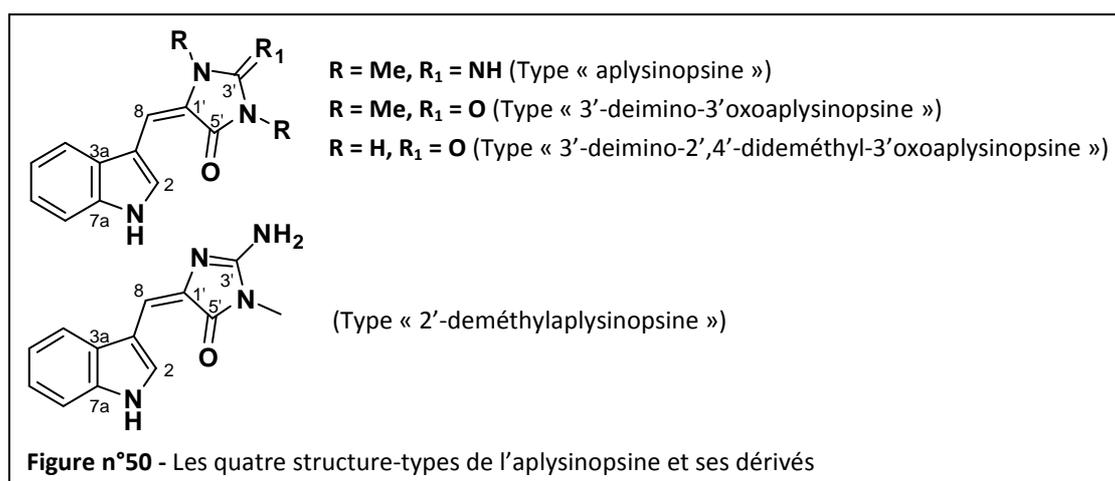


⁶⁵ Zibrowius, H. *Geobios*, **1995**, *28*, 9-16.

⁶⁶ Grubelic, I. ; Antolic, B. ; Despalatovic, M. ; Grbec, B. ; Beg Paklar, G. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **2004**, *84*, 599-602.

⁶⁷ Aiello, A. ; Fattorusso, E. ; Magno, S. ; Miscuraca, G. ; Novellino, E. *Experientia*, **1987**, *43*, 950-952. Et références citées

L'aplysinopsine (**42**) est un métabolite secondaire très répandu dans les organismes marins. Elle a été isolée pour la première fois en 1977 de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* (anciennement connue sous le nom de *Aplysinopsis reticulata*) puis de l'éponge *Verongia spengelii*.^{68,69} Depuis, cette molécule et ses dérivés ont été isolés d'un grand nombre d'invertébrés marins, tels que les spongiaires du genre *Dercitus* et *Smenospongia*, et les dendrophylliidés du genre *Leptopsammia* et *Tubastrea* ainsi que d'*Astroides calycularis*.⁷⁰ Ces molécules peuvent être classées en quatre types de structure : le type « aplysinopsine », le type « 3'-deimino-3'oxoaplysinopsine », le type « 3'-deimino-2',4'-didéméthyl-3'oxoaplysinopsine » et enfin le type « 2'-déméthylaplysinopsine » (**Figure n°50**).



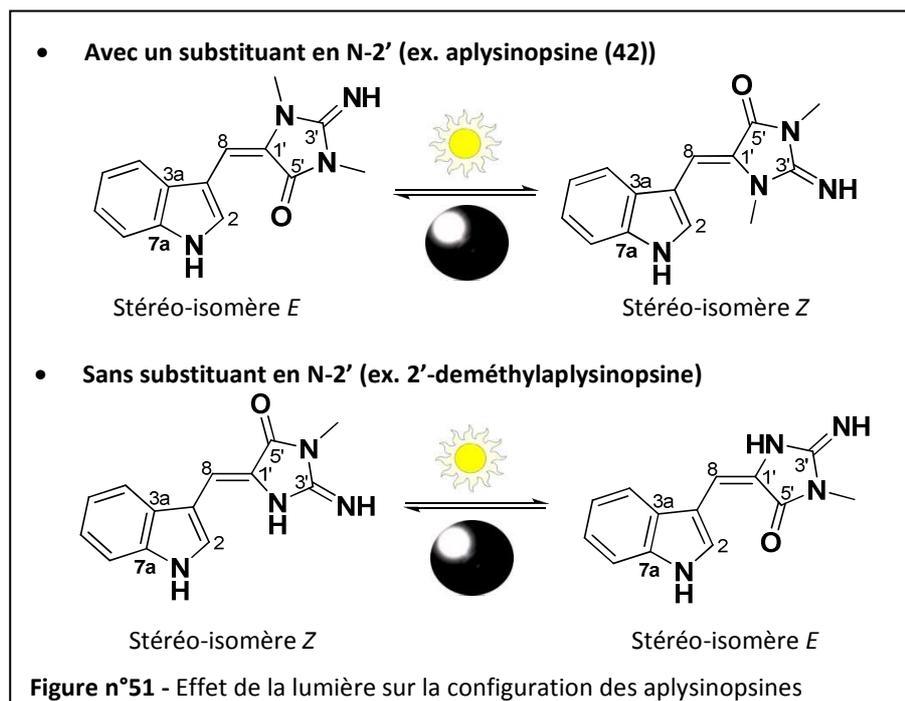
Ces composés ont intéressé de nombreux groupes de recherche pour leur potentiel thérapeutique mais également pour l'étude de leur rôle écologique.⁷⁰ Parmi certaines hypothèses, ces molécules sont supposées permettre à l'organisme de se protéger des radiations solaires. Guella *et al.* ont étudié la photo-isomérisation (*Z/E*) non destructive de ce type de molécule.^{70,71} Ces études ont montré que l'isomère majoritaire des molécules de type « aplysinopsine » sans substituant sur N-2' est de configuration *Z* et inversement celles avec un méthyle sur N-2' sont préférentiellement de configuration *E* pour des raisons thermodynamiques. Les auteurs ont également mis en évidence la photo-isomérisation de ces molécules par la simple lumière du jour ; les isomères minoritaires de ces molécules deviennent majoritaires lors d'une exposition à la lumière du jour. De plus, lorsque ces molécules sont remises dans une chambre noire, à température ambiante, l'excès isomérique redevient celui caractéristique de l'équilibre thermodynamique (**Figure n°51**).

⁶⁸ Kazlauskas, R. ; Murphy, P.T. ; Quinn, R.J. ; Wells, R.J. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *18*, 61-64.

⁶⁹ Hollenbeak, K.H. ; Schmitz, F.J. *Lloydia*, **1977**, *40*, 479-481.

⁷⁰ Guella, G. ; Mancini, I. ; Zibrowius, H. ; Pietra, F. *Helv.Chim. Acta*, **1988**, *71*, 773-782. Et références citées

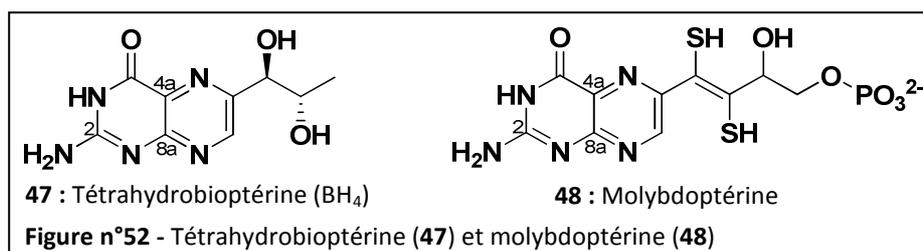
⁷¹ Guella, G. ; Mancini, I. ; Zibrowius, H. ; Pietra, F. *Helv.Chim. Acta*, **1989**, *72*, 1444-1450.



Ainsi, l'aplysinopsine (**42**) et ses dérivés appartiennent à la classe de composés pour lesquels l'équilibre photosynthétique privilégie le stéréo-isomère ayant la plus forte absorption du spectre de la lumière. C'est grâce à cette constatation que le rôle écologique de ces molécules en tant que filtre UV a été suggéré. Cette hypothèse semble tout à fait plausible pour les espèces tropicales telles que celles des genres *Smenospongia* ou *Tubastrea* car celles-ci vivent dans les eaux tropicales claires et peu profondes. En revanche, *Leptosammia pruvoti* et *Astroides calycularis* sont majoritairement présents en Méditerranée et vivent sur des tombants peu exposés aux rayons du soleil ou dans des grottes semi-obscurées. Dans ce cas, l'utilité de ces filtres UV, pourtant bien présents dans ces deux espèces, semble limité.

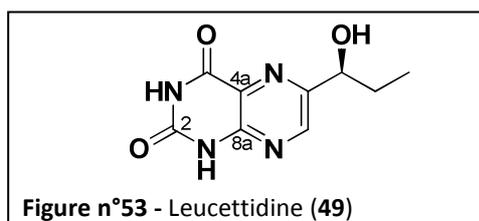
Le deuxième type de molécule d'*A. calycularis* est un dérivé ptéridine isolé d'un extrait aqueux du corail.⁶⁷ Les ptéridines ont été découvertes en premier lieu comme pigments de l'aile des papillons (d'où leur nom, provenant du grec *pteron*, aile) et jouent de nombreux rôles dans la coloration de l'organisme. Les ptéridines sont aussi des cofacteurs dans des réactions enzymatiques, ce sont des composés clés pour le transfert biochimique de groupement méthyles. La tétrahydrobioptérine (**47**), aussi nommée BH₄, est la ptéridine non conjuguée majeure des vertébrés qui est impliquée dans l'hydroxylation de composés aromatiques et la synthèse de l'oxyde nitrique. La molybdoptérine (**48**), dérivé ptéridine, est, quant à elle, impliquée dans des hydroxylation biologiques, la réduction des nitrates et l'oxydation au cours de la respiration.⁷²

⁷² Brown, E.G. In: *Ring nitrogen and key biomolecules – The biochemistry of N-heterocycles*, Kluwer Academic Publisher, 1998, 167-179.



62

Ces dérivés sont beaucoup moins fréquents dans les invertébrés marins. Momzikoff *et al.* ont relevé la présence de ce type de composés dans certaines diatomées, des copépodes et des tuniciers dans les années 40.⁶⁷ En 1981, un dérivé ptéridine, la leucettidine (6-(1-hydroxypropyl)-3-méthyl-ptéridine-2,4(1H)-dione, **49**), est pour la première fois isolé d'une éponge, *Leucetta microraphis*. Cependant, les auteurs émettent un doute quant à la synthèse *de novo* de ce composé dans l'éponge et se demandent si sa présence n'est pas liée à l'alimentation de l'éponge.⁷³

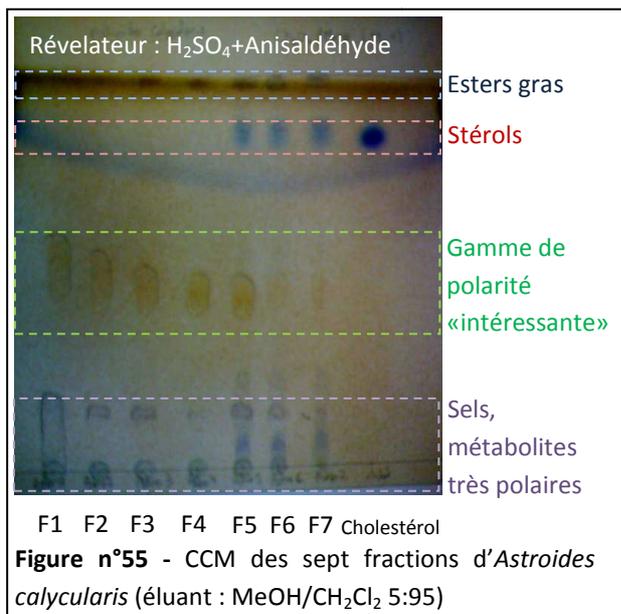
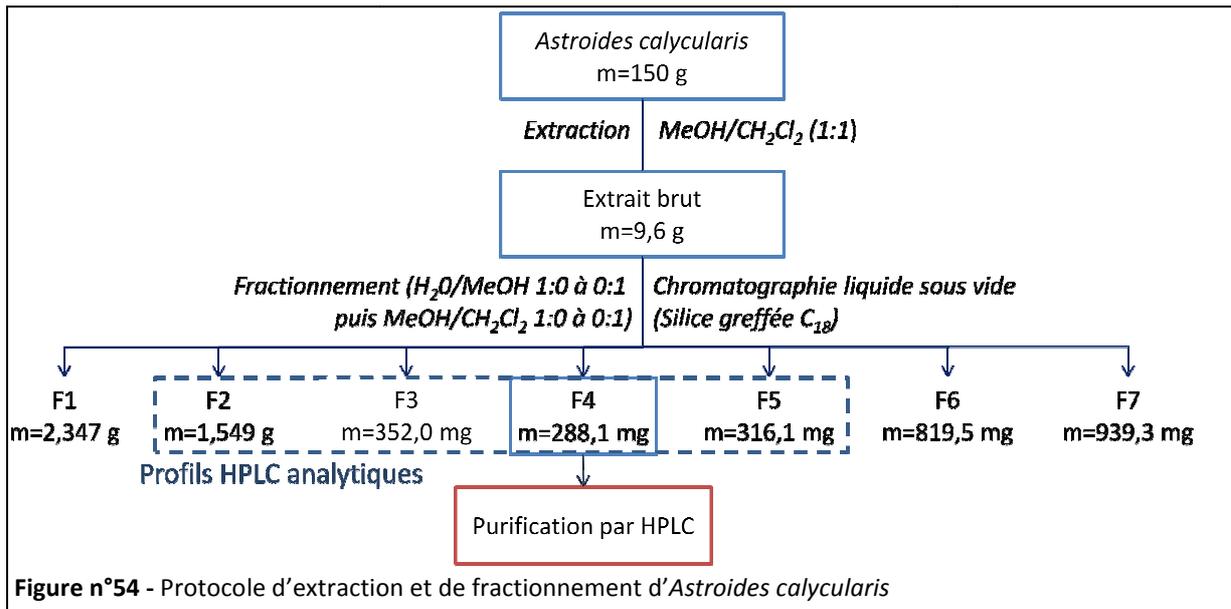


III.1. Extraction et isolement

En juillet 2007, lors d'une mission de récolte ECIMAR dans le détroit de Gibraltar, un échantillon d'environ 2 kg d'*Astroides calycularis* a été prélevé puis congelé à -18 °C.

Après lyophilisation et broyage du corail, 150 g de poudre ont été extraits par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et l'extrait brut obtenu après évaporation a été fractionné par chromatographie liquide sous vide en phase inverse C₁₈ selon un gradient de polarité décroissante : de H₂O/MeOH 1:0 à 0:1 puis de MeOH/CH₂Cl₂ 1:0 à 0:1 (**Figure n°54**).

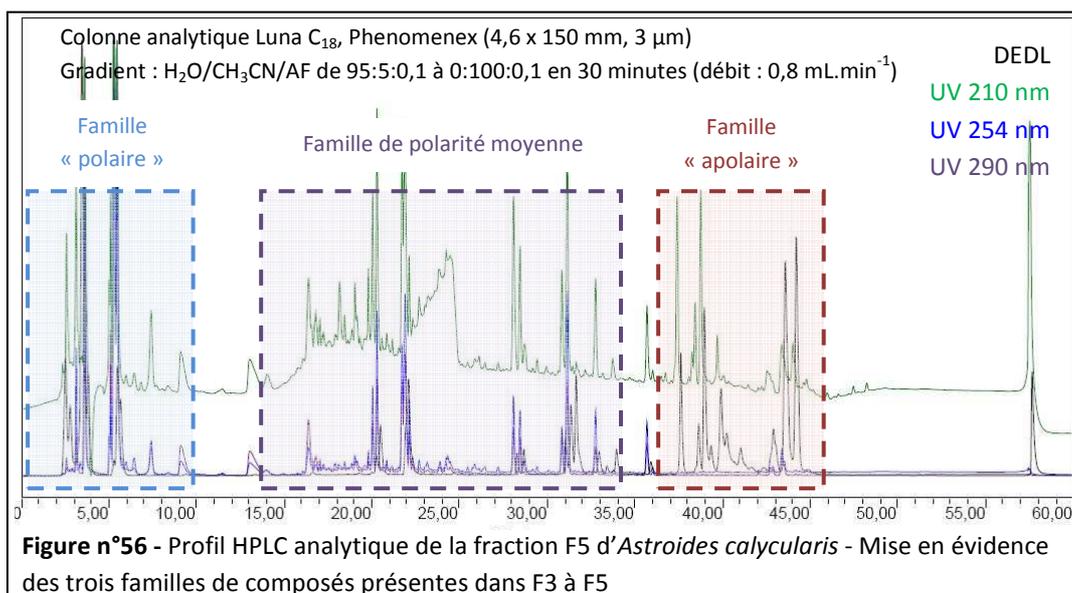
⁷³ Cardellina, J.H. ; Meinwald, J. *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 4782-4784.



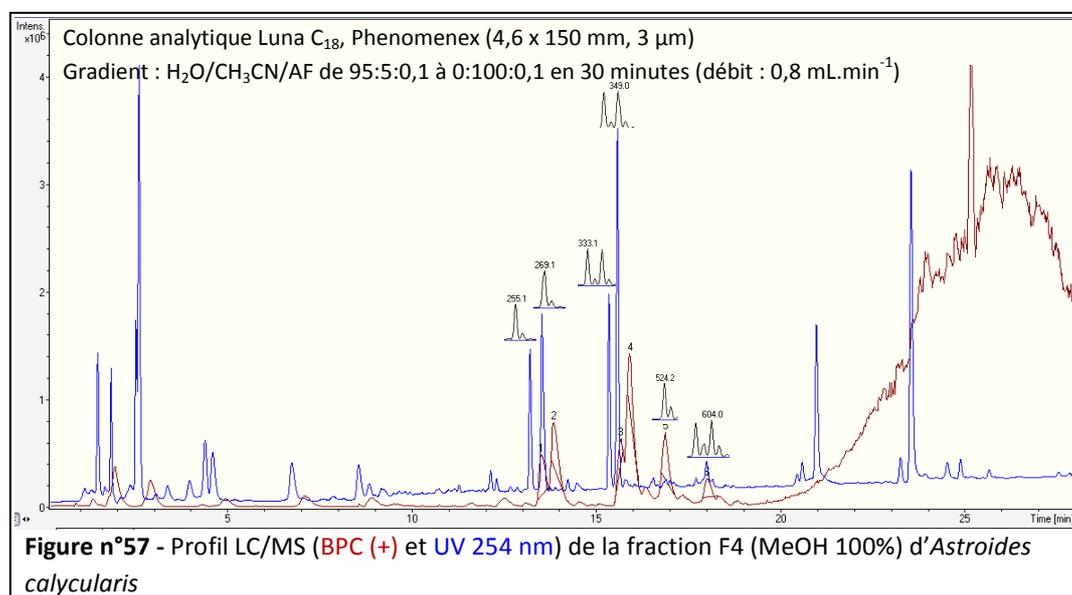
Une CCM des sept fractions ainsi obtenues (**Figure n°55**) a permis d'en sélectionner quatre, de F2 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1) à F5 ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 3:1), pour une analyse par HPLC analytique. En effet, ces quatre fractions contiennent des composés dans une gamme de polarité relativement facile à travailler dans les conditions usuelles.

Les profils analytiques HPLC ont mis en évidence trois fractions très semblables : F3, F4 et F5. Ces trois fractions présentent trois familles de composés distinctes, une très polaire entre 0 et 10 minutes d'élution, une de polarité moyenne entre 15 et 35 minutes et une dernière plutôt apolaire aux alentours de

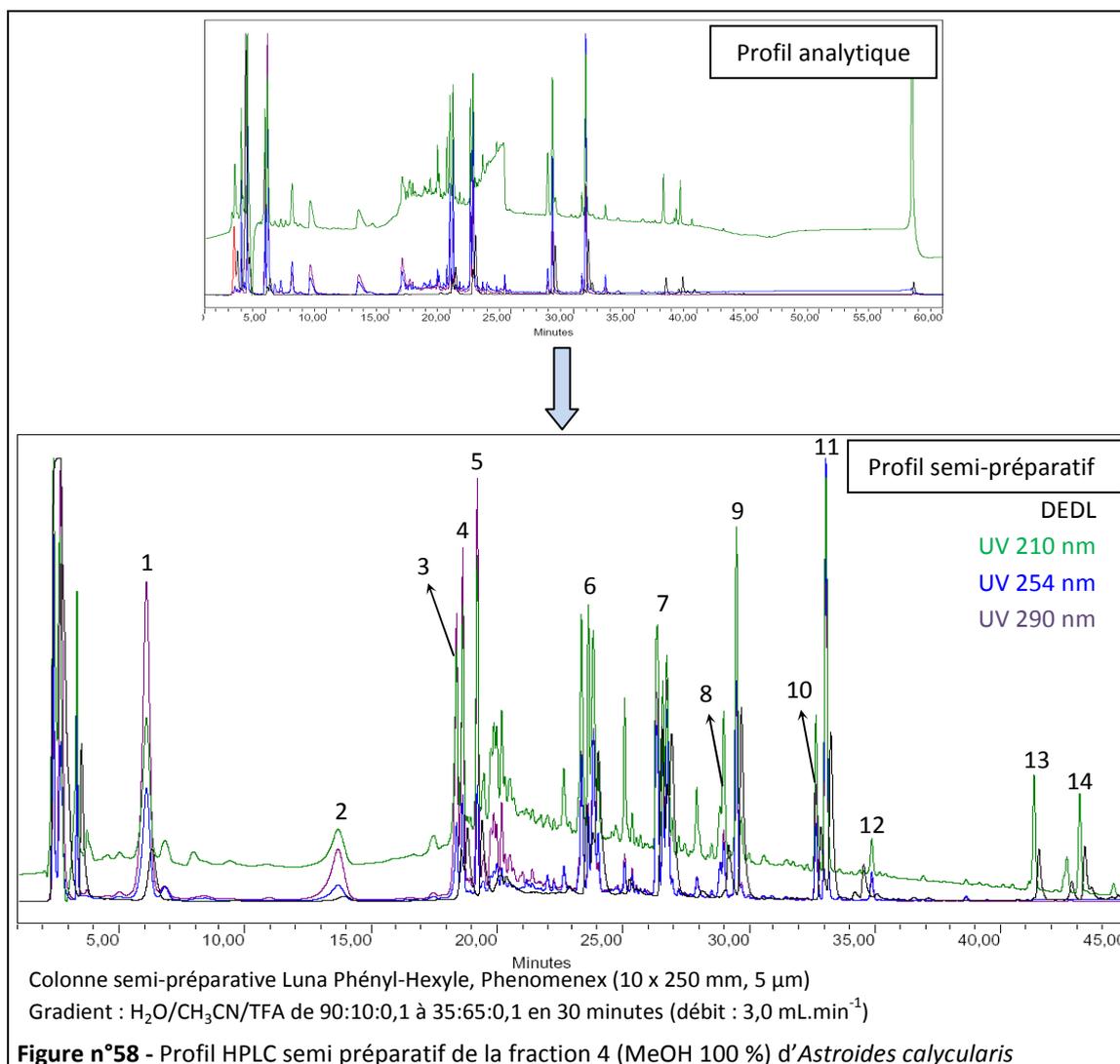
40 minutes. Seule la proportion des différentes familles varie selon la fraction (**Figure n°56**).



Par LC/MS, la famille de composé de polarité moyenne a semblé la plus intéressante à travailler car celle-ci est composée de molécules azotées et/ou bromées qui pour la plupart n'ont jamais été isolées d'*Astroides calycularis*, d'après la base de données MarinLit (Version 2009) (Figure n°57).



Ces composés étant majoritaires dans la fraction F4 (MeOH 100 %), celle-ci a été choisie pour être purifiée par HPLC semi-préparative de silice greffée phényl-hexyle (Figure n°58). Après optimisation du gradient, 14 pics ont été collectés et repurifiés sur HPLC analytique en utilisant une colonne de silice greffée par une chaîne C₁₈. Cette purification a ainsi permis de caractériser les structures de six molécules (VIII à XIII) dont une nouvelle (X) par RMN mono et bidimensionnelle et par spectrométrie de masse.



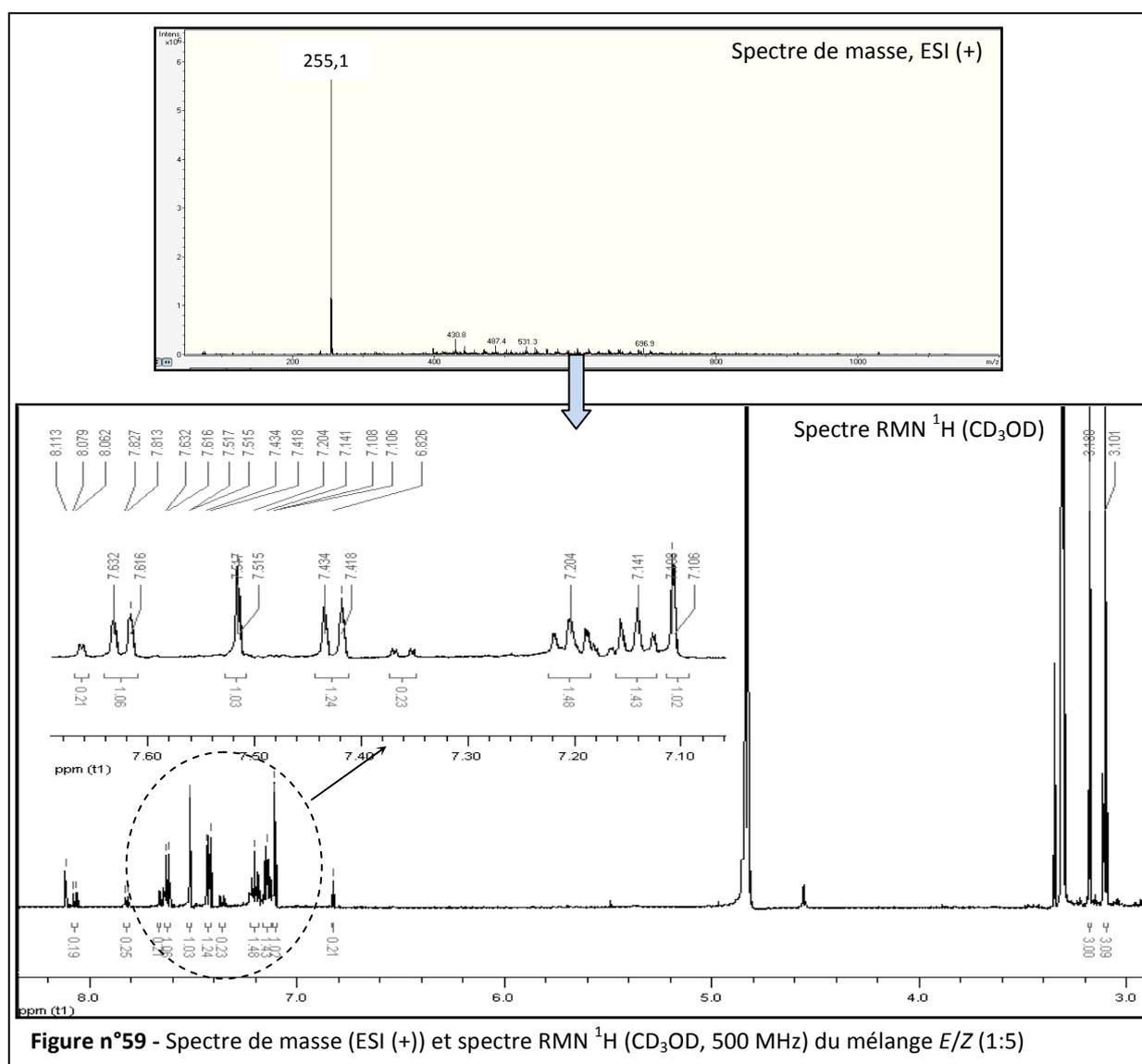
III.2. Elucidations structurales

La purification de la fraction F4 a permis de retrouver deux molécules de type aplysinopsine déjà isolées d'*Astroides calycularis* (**VIII-IX**) et une nouvelle aplysinopsine, nommée la 6-bromo-*N*-méthylaplysinopsine (**X**). Trois molécules isolées pour la première fois de ce corail (**XI-XIII**) ont également été caractérisées. Les métabolites isolés dans les pics 13 et 14 du profil HPLC semi-préparatif (**Figure n°58**) sont composés de deux acides gras saturés, l'acide laurique (12:0) et l'acide myristique (14:0). Faute de quantité suffisante, les métabolites isolés dans les six autres pics recueillis n'ont pas pu être identifiés.

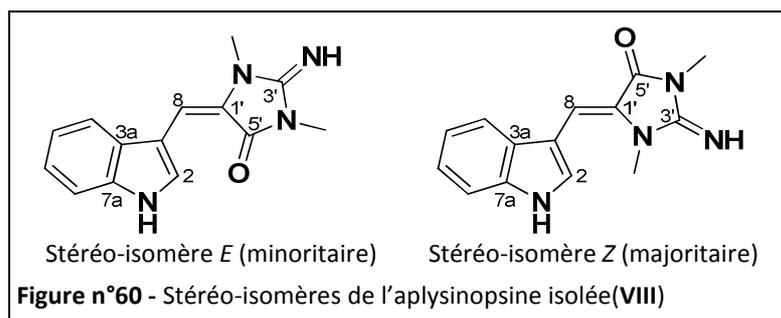
III.2.1. La famille des aplysinopsines

III.2.1.1. L'aplysinopsine (VIII, 42)

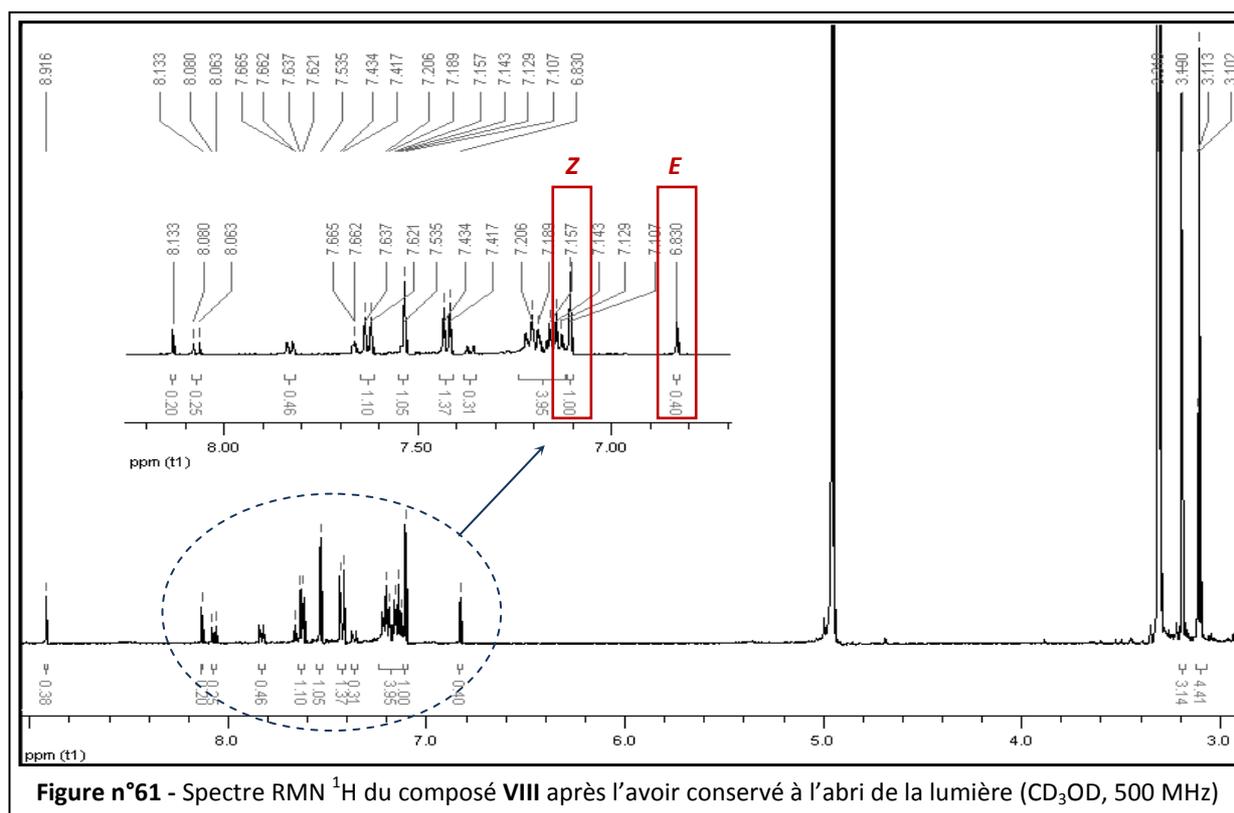
Le pic 10 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°58** correspond au premier composé identifié après purification. Il a été isolé sous la forme d'une huile jaune vif (4,8 mg) dont le pic moléculaire apparaît à m/z 255,1. Le spectre RMN ^1H de cette molécule a permis d'identifier les signaux caractéristiques d'un noyau indolique à δ_{H} 7,14 (dd, $J = 1,0$; 8,0 Hz, H-5), 7,20 (dd, $J = 1,0$; 8,0 Hz, H-6), 7,43 (d, $J = 8,0$ Hz, H-7), 7,52 (d, $J = 1,0$ Hz, H-2), 7,62 (d, $J = 8,0$ Hz, H-4) ppm et de deux méthyles portés par des azotes à δ_{H} 3,10 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-N-4}'$) et 3,18 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-N-2}'$) ppm. Le spectre RMN ^1H (**Figure n°59**) a également mis en évidence un mélange 1:5 de deux dérivés indoliques structuralement très proches. Cela nous a rappelé les études menées sur la photo-isomérisation spontanée de l'aplysinopsine (**42**) et de ses dérivés. Le mélange isolé pourrait donc être composé de deux stéréo-isomères *E/Z* dont la structure serait de type aplysinopsine (**42**). Cette supposition a été confirmée par le spectre de masse qui ne présente qu'un pic moléculaire à m/z 255,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figure n°59**).



Le spectre de masse et le spectre RMN ^1H de ce mélange ont ainsi permis d'identifier l'aplysinopsine (**VIII**, **42**), déjà isolée d'*Astroides calycularis* par Fattorusso *et al.*⁶³ En comparant les signaux RMN ^1H du mélange isolé avec ceux des stéréo-isomères *Z* et *E* de l'aplysinopsine (**42**) décrits dans la publication de Guella *et al.*,⁷⁰ le mélange a été retrouvé avec un rapport isomérique *E/Z* de 1:5 (**Figure n°60**). Les spectres RMN bidimensionnels HSQC et HMBC ont permis d'attribuer les signaux RMN ^1H et ^{13}C de chacun des deux stéréo-isomères, la comparaison avec ceux de la bibliographie se trouvent en partie expérimentale (p.264).



L'excès stéréo-isomérique en faveur de *Z*, thermodynamiquement le moins stable, suggère que le composé isolé a subi une photo-isomérisation. Pour vérifier le phénomène de photo-isomérisation, le même tube RMN a de nouveau été analysé après avoir été conservé à l'abri de la lumière durant 48 heures. Le nouveau spectre RMN ^1H a mis en évidence un rapport isomérique *E/Z* de 2:5 (**Figure n°61**) qui, en accord avec Guella *et al.*,⁷⁰ révèle le retour lent à l'isomère thermodynamiquement le plus stable lorsque le composé est conservé à l'abri de la lumière.



Nous avons donc observé le phénomène déjà décrit de photo-isomérisation non destructive de l'aplysinopsine (*E*) en aplysinopsine (*Z*) sous la simple influence de la lumière du jour et le retour à l'aplysinopsine (*E*) lorsque le composé est conservé à l'obscurité.

III.2.1.2. La 6-bromoaplysinopsine (IX, 43)

Le pic 9 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°58** correspond à un composé isolé sous la forme d'une huile jaune vif (2,4 mg). Le pic pseudomoléculaire (ESI, mode positif) de la molécule apparaît à m/z 333,0 et 335,0 (1:1, $[M+H]^+$). Un des éléments ayant un rapport isotopique 1:1 étant le brome, ce rapport suggère la présence d'un atome de ce type dans la molécule. Comme pour l'aplysinopsine (**VIII, 42**) décrite ci-dessus, le spectre RMN 1H présente des signaux caractéristiques des noyaux indoliques (δ_H 7,36 (dd, $J = 2,0$; 8,5 Hz, H-5), 7,72 (d, $J = 2,0$ Hz, H-7), 8,06 (d, $J = 8,5$ Hz, H-4), 8,96 (d, $J = 3,0$ Hz, H-2) ppm) et de deux méthyles portés par deux azotes (δ_H 3,21 (3H, s, CH_3 -N-4') et 3,51 (3H, s, CH_3 -N-2') ppm), classant ce composé dans la famille « aplysinopsine ». Le spectre RMN 1H présente un mélange 1:1 de deux stéréo-isomères (**Figure n°62**), le mélange résulte certainement du phénomène de photo-isomérisation déjà observé lors des analyses de l'aplysinopsine (**VIII, 42**). Après comparaison avec les données de la littérature, le composé a pu être identifié comme étant la 6-bromoaplysinopsine (**43**) déjà isolée d'*Astroides calycularis* par Fattorusso *et al.*⁶³ Cependant quelques différences dans les déplacements chimiques des signaux de deux stéréo-isomères ont nécessité une analyse en RMN 2D pour confirmer la structure proposée (**Tableau 7**).

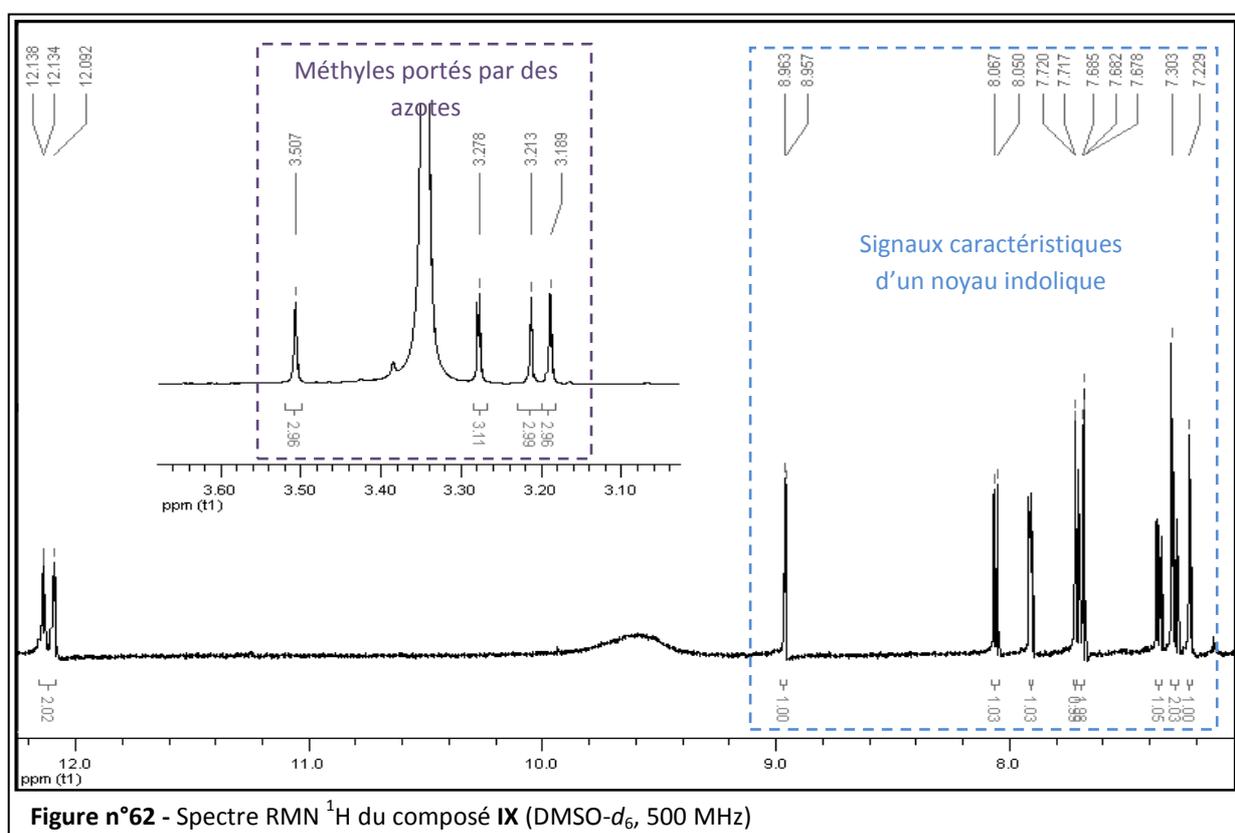
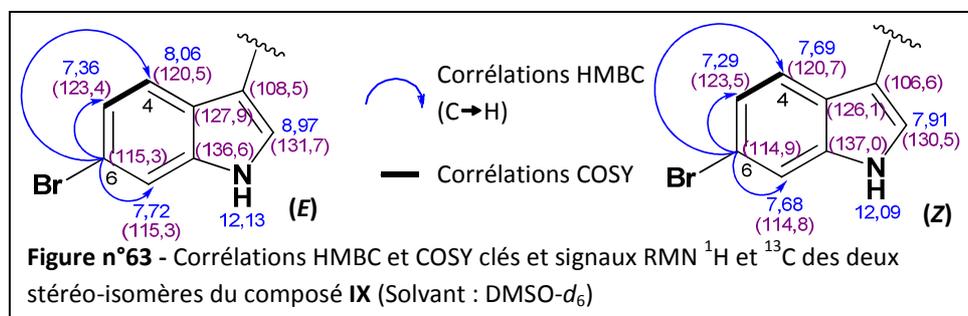


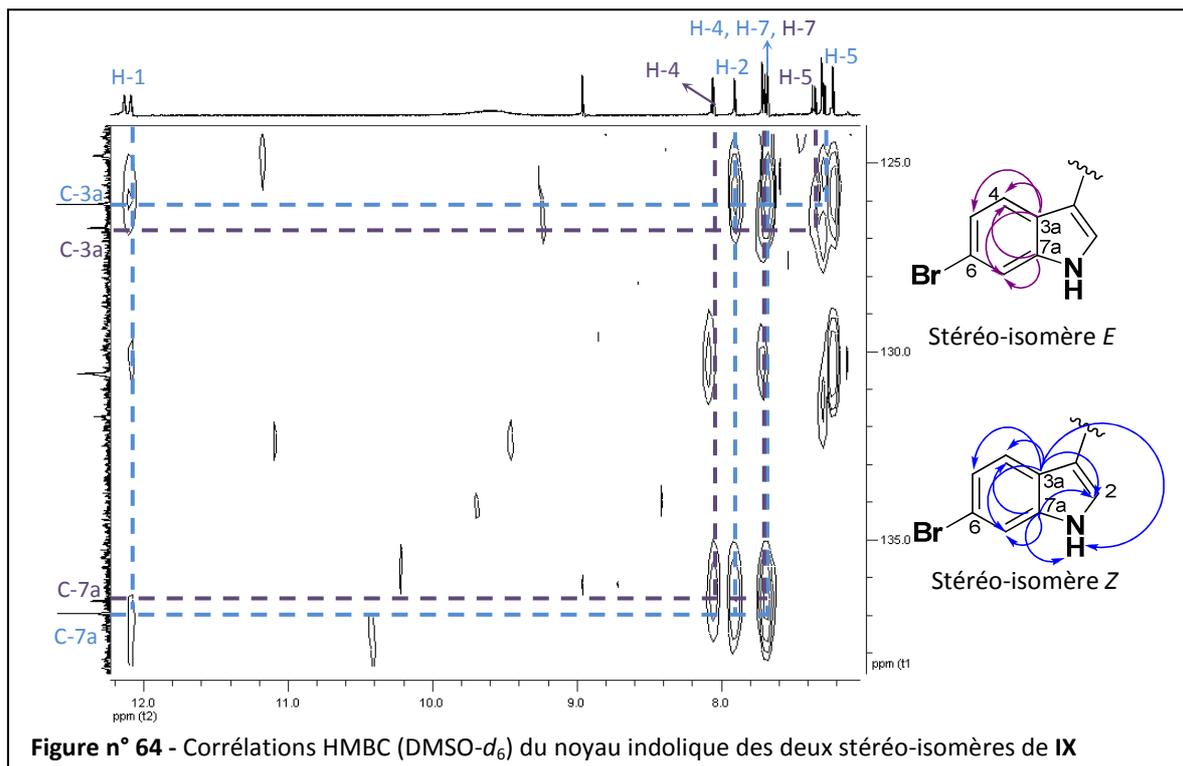
Tableau 7 - Comparaison des signaux RMN ^{13}C des composés **IX** avec ceux de la 6-bromoaplysinopsine (DMSO- d_6)

| | Stéréo-isomère <i>E</i> IX (ppm) | Stéréo-isomère <i>Z</i> IX (ppm) | 6-bromoaplysinopsine ⁶³ (ppm) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|
| C-2 | 131,7 | 130,5 | 127,7 |
| C-3 | 108,5 | 106,6 | 108,7 |
| C-3a | 127,9 | 126,1 | 126,9 |
| C-4 | 120,5 | 120,7 | 119,6 |
| C-5 | 123,4 | 123,5 | 121,8 |
| C-6 | 115,3 | 114,9 | 114,0 |
| C-7 | 115,3 | 114,8 | 114,0 |
| C-7a | 136,6 | 137,0 | 136,2 |
| C-8 | 114,9 | 110,8 | 101,5 |
| C-1' | 122,4 | 124,8 | 126,9 |
| C-3' | 152,4 | 156,5 | 150,4 |
| C-5' | 160,2 | 162,1 | 162,1 |
| Me-2' | 28,7 | 32,8 | 24,4 |
| Me-4' | 26,1 | 26,4 | 26,6 |

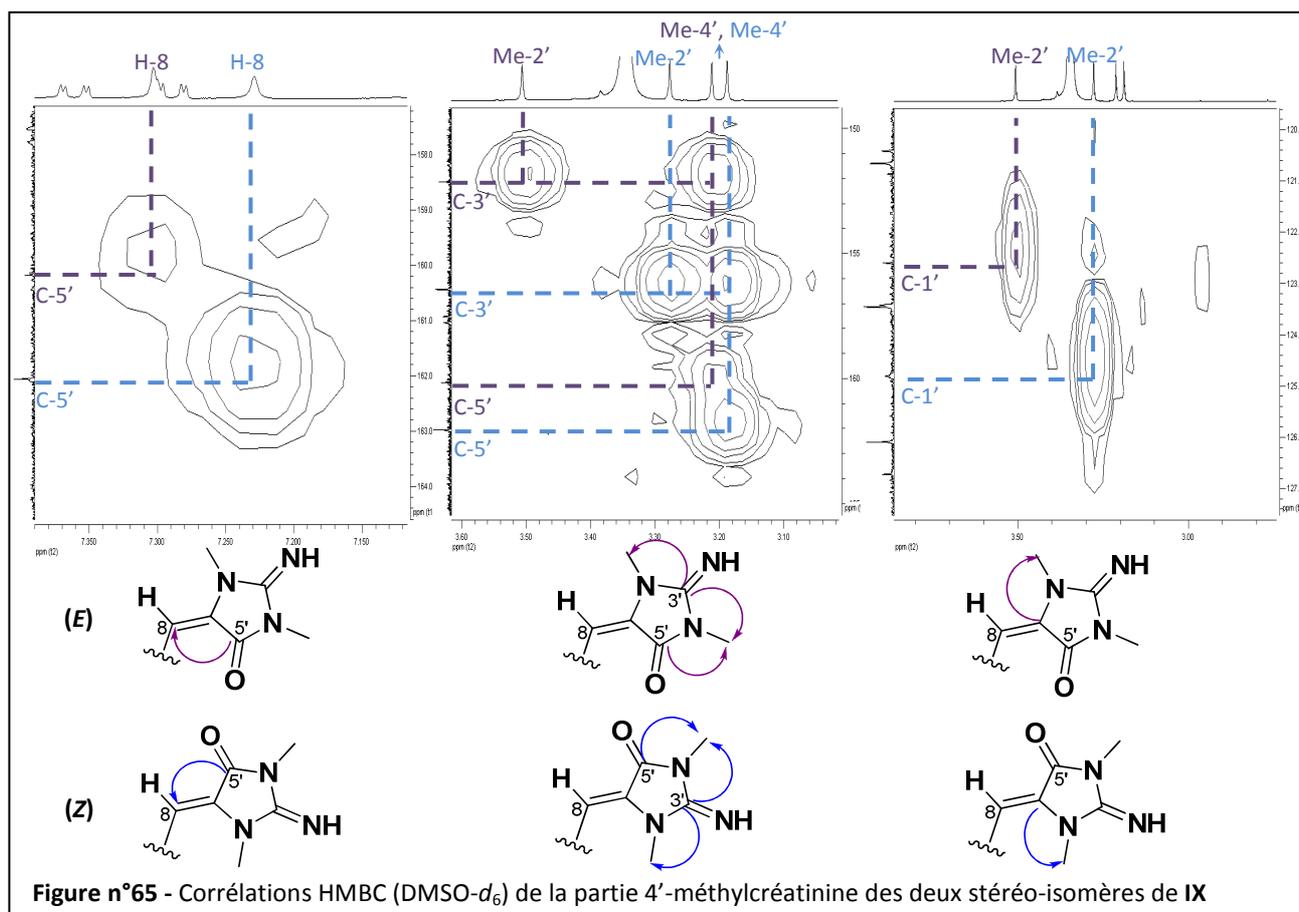
La comparaison des déplacements chimiques de ces deux stéréo-isomères avec ceux de l'aplysinopsine (**VIII**, **42**) a suggéré une localisation de l'atome de brome sur le noyau indolique de la molécule en position C-6 avec un signal à δ_c 115,3 ppm pour le stéréo-isomère *E* et 114,9 ppm pour le stéréo-isomère *Z*. Les corrélations HMBC C-6/H-4/H-5 et H-7 et la corrélation COSY H-4/H-5 (**Figure n°63**) ont permis de confirmer cette position.



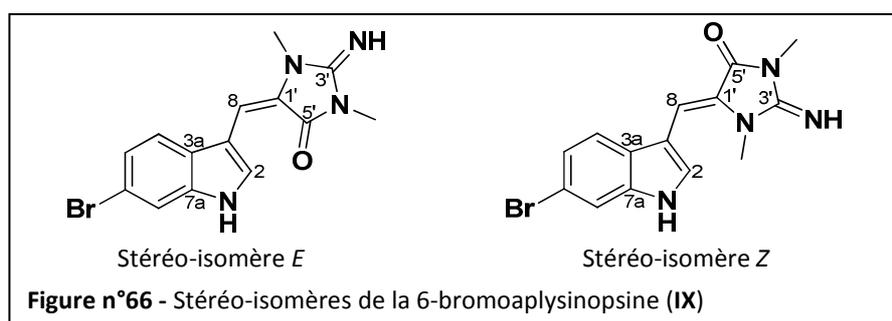
Les corrélations HMBC C-7a/H-4/H-7 et C-3a/H-5/H-7 du stéréo-isomère *E* et C-7a/H-1/H-2/H-4/H-7 et C-3a/H-1/H-2/H-4/H-5/H-7 du stéréo-isomère *Z* ont justifié la structure de ce noyau indolique comme indiqué sur la **Figure n°64**.



De la même manière, grâce aux corrélations HMBC C-3'/ $\underline{H_3C-2'}$ / $\underline{H_3C-4'}$, C-5'/ $\underline{H_3C-4'}$ /H-8 (Figure n°65) et C-1'/ $\underline{H_3C-2'}$, la partie 4'-méthylcréatinine de la molécule a été confirmée.



Les deux fragments ainsi caractérisés ont été assemblés par les corrélations HMBC H-8/C-2/C-3/C-1'/C-5'. Malgré la non-superposition des déplacements chimiques obtenus avec ceux de la bibliographie, les stéréo-isomères isolés sont bien ceux de la 6-bromoaplysinosine (**IX**, **43**).



Comme pour l'aplysinosine (**42**), le stéréo-isomère *E* serait thermodynamiquement le plus stable et le mélange 1:1 obtenu a mis une nouvelle fois en évidence le phénomène de photo-isomérisation du composé, exposé à la lumière du jour avant les analyses RMN. Le spectre RMN ^{13}C et les analyses RMN bidimensionnelles, réalisés quelques jours après le spectre RMN ^1H , ont mis en évidence un rapport isomérique en faveur du stéréo-isomère *Z*, avec un rapport isomérique *E/Z* 1:3, qui confirme cette observation.

III.2.1.3. La 6-bromo-N-méthylaplysinsine (IX), molécule nouvelle

Le pic 7 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°58** correspond à un composé isolé sous la forme d'une huile jaune vif (1,7 mg). Son spectre de masse a mis en évidence un mélange de deux composés monobromés dont les pics pseudomoléculaires apparaissent à m/z 333,0-335,0 (1:1, $[M+H]^+$) et 347,0-349,0 (1:1, $[M+H]^+$). La fragmentation du pic à 347,0-349,0 (1:1, $[M+H]^+$) a entraîné la perte de 14 uma et l'obtention du pic pseudomoléculaire du deuxième composé, i.e. m/z 333,0-335,0 (1:1, $[M+H]^+$). Ainsi, ces deux molécules pourraient différer d'un méthyle. Les spectres RMN 1H et ^{13}C ont permis d'identifier les deux stéréo-isomères de la 6-bromoaplysinsine (**IX**, **43**) déjà isolés et caractérisés ci-dessus ainsi que deux autres composés de structure proche et en mélange 2:1 (**Figure n°67**). D'après leurs signaux sur le spectre RMN 1H , ces deux nouvelles molécules font également partie de la famille des aplysinsines et correspondraient aux deux stéréo-isomères de la molécule monobromée dont le pic pseudomoléculaire est de m/z 347,0-349,0 (1:1, $[M+H]^+$).

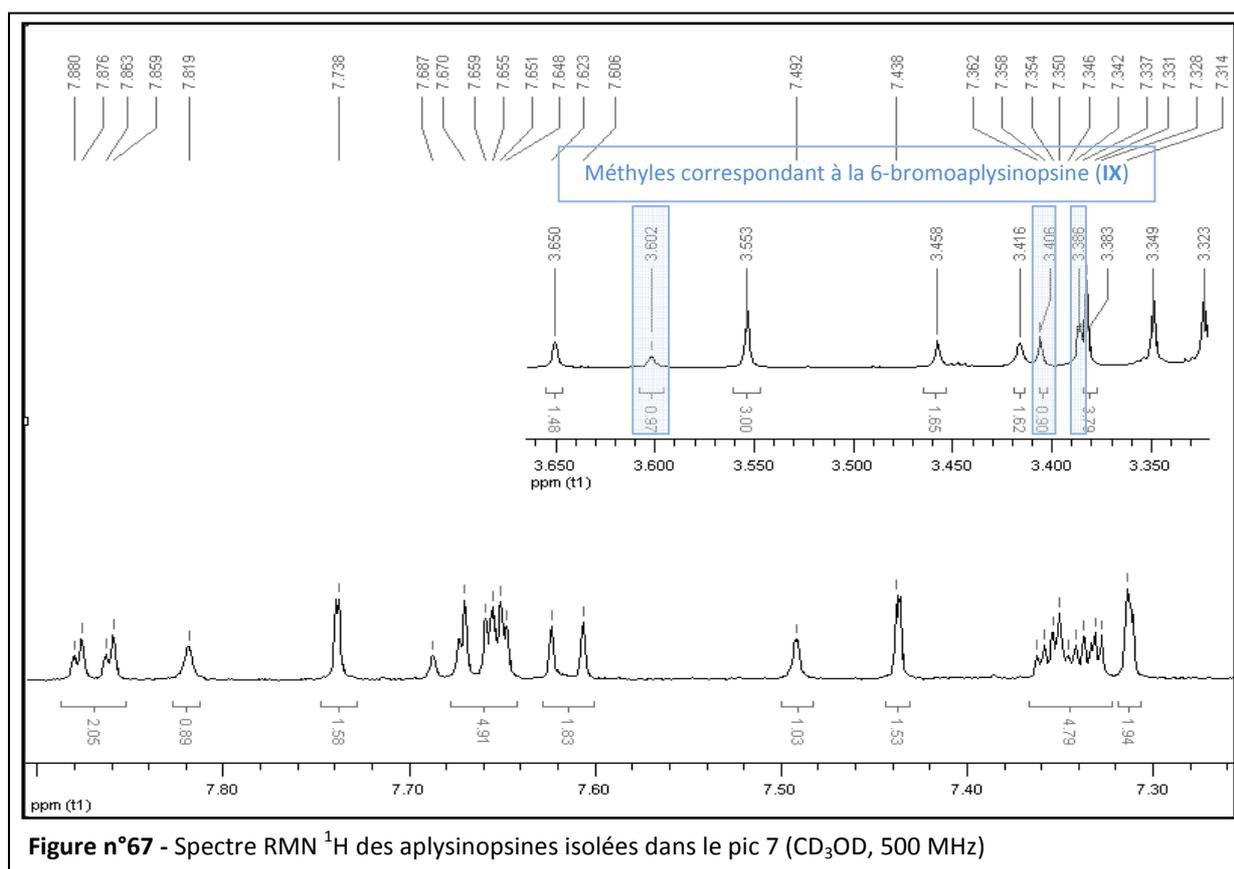
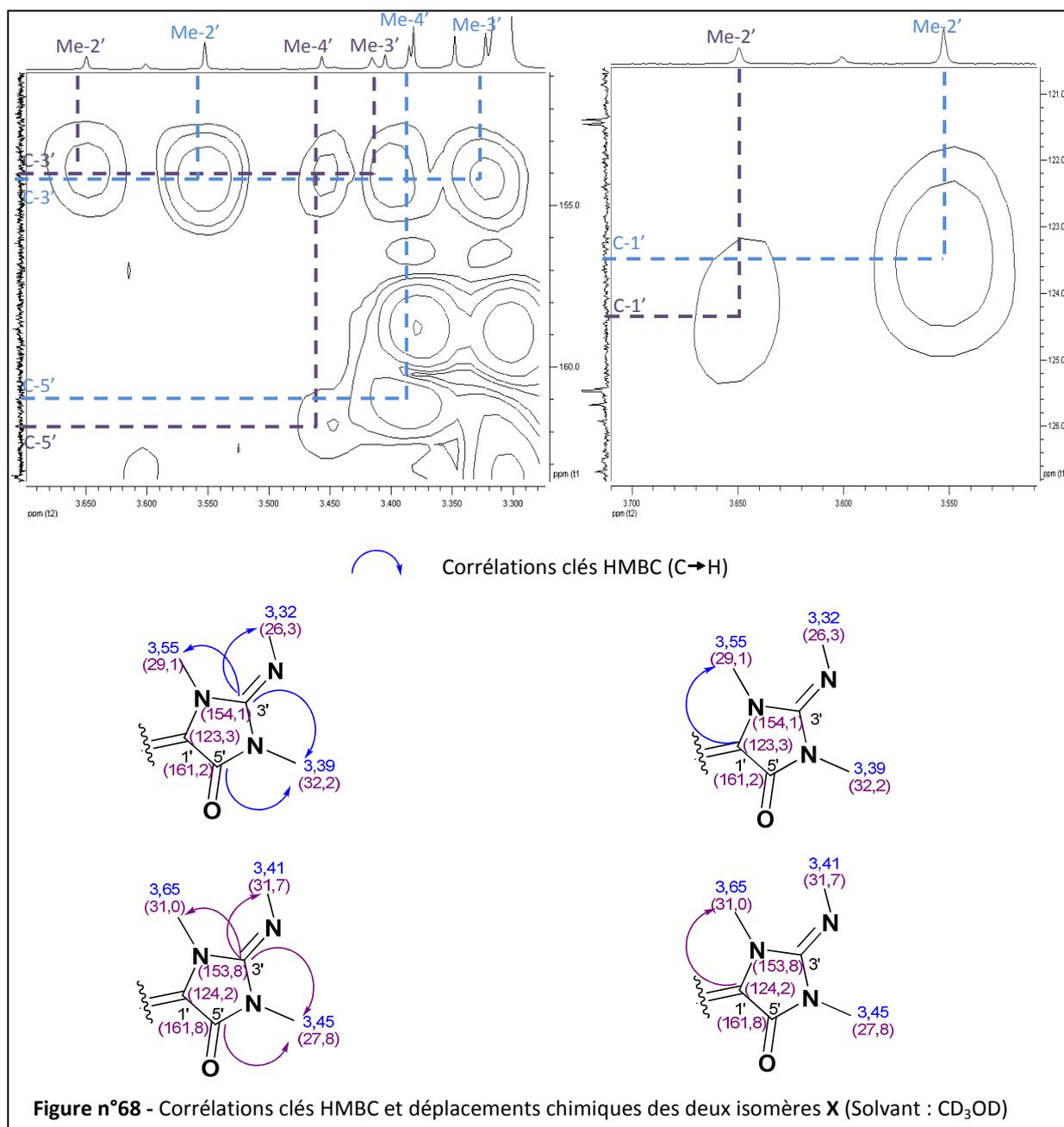


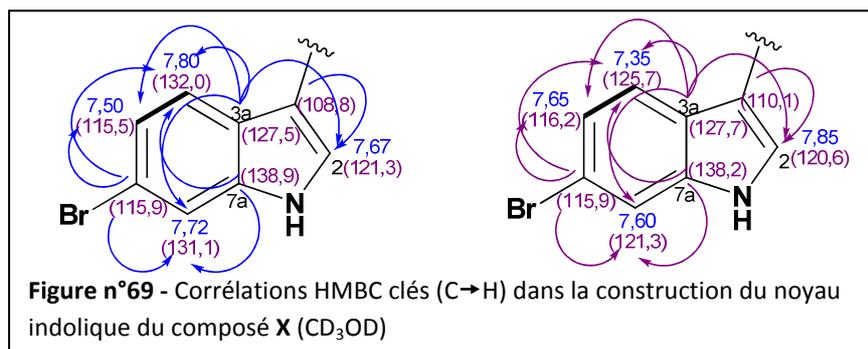
Figure n°67 - Spectre RMN 1H des aplysinsines isolées dans le pic 7 (CD_3OD , 500 MHz)

Comme supposé d'après les analyses par spectrométrie de masse, le spectre RMN 1H indique la présence d'un méthyle supplémentaire par rapport à la 6-bromoaplysinsine (**IX**, **43**), à δ_H 3,32 (3H, s, Me-3') ppm pour le premier stéréo-isomère et 3,41 (3H, s, Me-3') ppm pour le second. La corrélation HMBC C-3'/ $\underline{CH_2}$ -3' a permis de situer ce méthyle supplémentaire sur l'azote porté par C-3' (δ_C 154,1 ppm pour le premier stéréo-isomère et 153,8 ppm pour le second). Ainsi, à l'aide des

corrélations clés HMBC C-3'/Me-2'/Me-4', C-5'/Me-4' et C-1'/Me-2', la partie 3',4'-diméthylcréatinine des deux isomères a pu être déduite (**Figure n°68**).



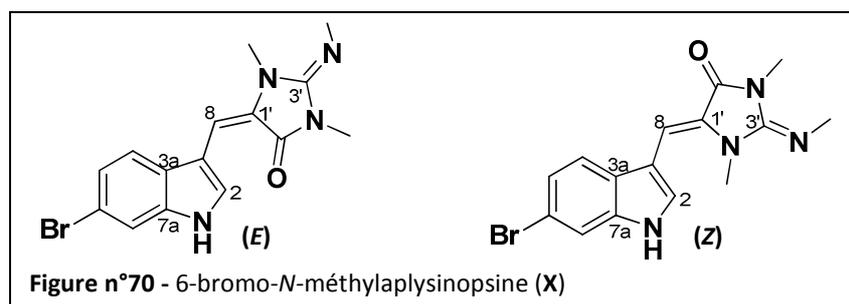
Les signaux de la partie indole des deux nouveaux stéréo-isomères sont très proches de ceux de la 6-bromoaplysinsine (**IX**, **43**) avec laquelle ils sont en mélange, il a donc été difficile d'attribuer chaque signal à la molécule correspondante. Cependant, les corrélations clés HMBC C-3a/H-2/H-4/H-5/H-7, C-6/H-4/H-5/H-7 et C-7a/H-4/H-7 ont permis de construire le noyau indolique des deux stéréo-isomères du composé X (**Figure n°69**).



Enfin le noyau indolique a été relié à la partie 3',4'-diméthylcréatinine par les corrélations clés HMBC H-8/C-2/C-3/C-1' confirmée par les corrélations COSY H-8/H-2/Me-2'. D'après les déplacements chimiques des bromoaplysinopsines connues, le signal de C-8 est plus déblindé lorsque la double liaison exocyclique de la molécule est de configuration *E* que lorsqu'elle est de configuration *Z*.⁷¹ Cette information nous a permis d'attribuer les déplacements chimiques de chaque stéréo-isomère (**Tableau 8**). Ainsi avons-nous caractérisé une nouvelle molécule en mélange (**Figure n°70**) : la 6-bromo-*N*-méthylaplysinopsine (**X**).

Tableau 8 - RMN ¹H et ¹³C des deux stéréo-isomères de la 6-bromo-*N*-méthylaplysinopsine (**X**) (CD₃OD)

| n° | CH _n | Stéréo-isomère <i>Z</i> | | Stéréo-isomère <i>E</i> | |
|-------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | | δ _C | δ _H (m, J en Hz) | δ _C | δ _H (m, J en Hz) |
| 2 | CH | 121,3 | 7,67 (brs) | 120,6 | 7,85 (brs) |
| 3 | C | 108,8 | - | 110,1 | - |
| 3a | C | 127,5 | - | 127,7 | - |
| 4 | CH | 132,0 | 7,80 (brs) | 125,7 | 7,35 (m) |
| 5 | CH | 115,5 | 7,50 (brs) | 116,2 | 7,65 (m) |
| 6 | C | 115,9 | - | 115,9 | - |
| 7 | CH | 131,1 | 7,72 (brs) | 121,3 | 7,60 (s) |
| 7a | C | 138,9 | - | 138,2 | - |
| 8 | CH | 117,3 | 7,31 (s) | 117,7 | 7,36 (s) |
| 1' | C | 123,3 | - | 124,2 | - |
| 3' | C | 154,1 | - | 153,8 | - |
| 5' | C | 161,2 | - | 161,8 | - |
| Me-2' | CH ₃ | 29,1 | 3,55 (s) | 31,0 | 3,65 (s) |
| Me-3' | CH ₃ | 26,3 | 3,32 (s) | 31,7 | 3,41 (s) |
| Me-4' | CH ₃ | 32,2 | 3,39 (s) | 27,8 | 3,45 (s) |



Ainsi, en plus de l'aplysinopsine (**VIII, 42**) et de la 6-bromo-aplysinopsine (**IX, 43**), l'étude chimique du corail *Astroides calycularis* a permis d'isoler une nouvelle aplysinopsine : la 6-bromo-*N*-méthylaplysinopsine (**X**). Les aplysinopsines, composées de plus de trente analogues naturels, ont été isolées de nombreux invertébrés marins (éponges, coraux, anémones, nudibranches) de différents biotopes (Méditerranée, océan Indo-Pacifique, Caraïbes, etc.)⁷⁴ Avec l'isolement de ces composés d'espèces de divers phyla présents dans différentes zones géographiques, leur origine biosynthétique ne peut plus être attribuée aux cellules d'éponges comme ce fût proposé dans un premier temps.⁷⁴ La multitude de sources d'aplysinopsines pourrait suggérer une origine microbienne commune. Cependant, aucune expérience de biosynthèse n'a permis de confirmer cette hypothèse.

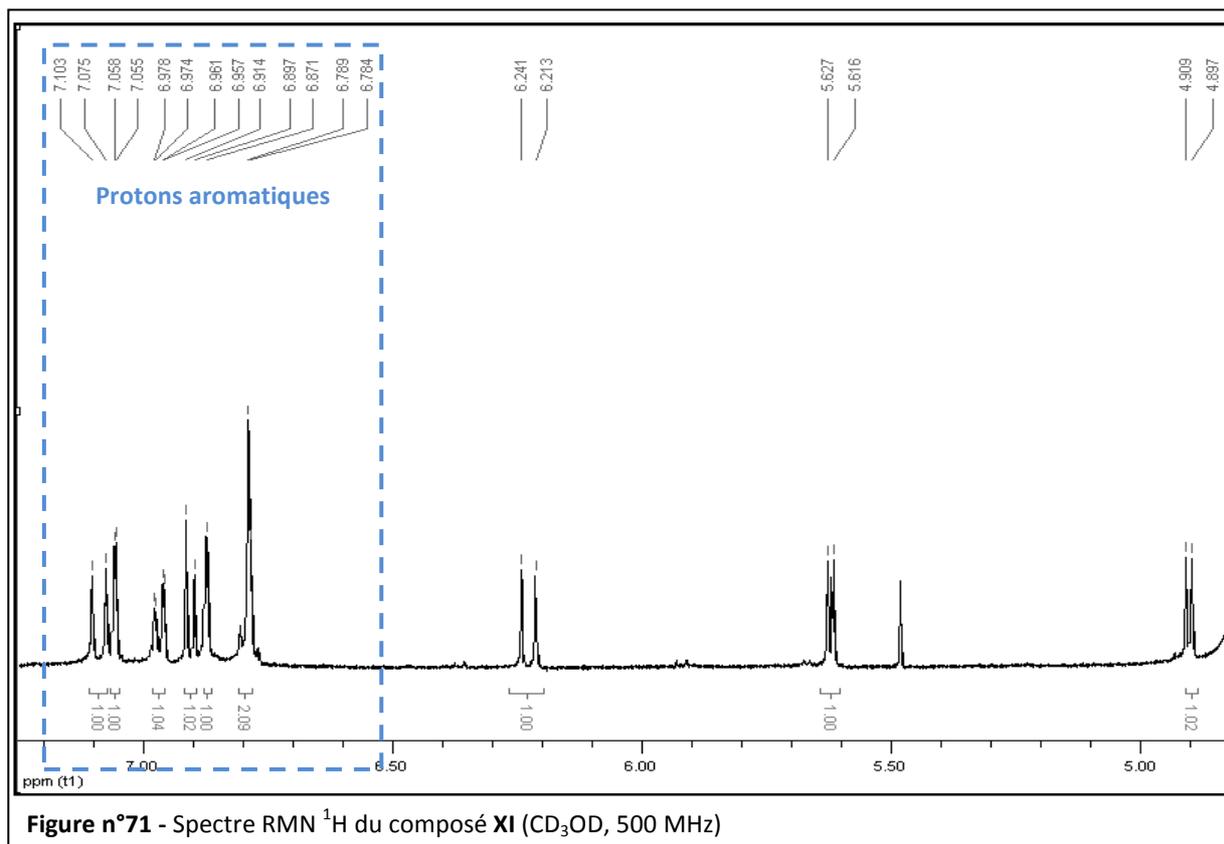
Le protocole de fractionnement et d'isolement n'a pas permis de retrouver les *N*-propionylaplysinopsine (**44**), *N*-propionyl-6-bromoaplysinopsine (**45**) et 2-amino-6-[1',2'-dihydroxypropyl]-3-méthyl-ptéridin-4-one (**46**) isolées précédemment d'*Astroides calycularis*. Cependant, Fattorusso *et al.* ont émis l'hypothèse que les composés **44** et **45** pourraient être des artéfacts de l'extraction tandis que le composé **46** a été isolé de la phase aqueuse d'*A. calycularis*.^{63,67} Nos observations confirmeraient cette hypothèse. En revanche, trois molécules de la famille des orthidines, ont été isolées pour la première fois d'*Astroides calycularis*.

III.2.2. La famille des orthidines

III.2.2.1. L'orthidine C (XI)

Le pic 3 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°58** correspond à un composé isolé sous la forme d'une gomme jaune pâle (5,4 mg) dont l'ion pseudomoléculaire apparaît à m/z 385,2 [M+H]⁺. Son spectre UV présente des maxima d'absorption à 205, 225 et 284 nm avec un épaulement à 310 nm, ce qui nous a permis de supposer la présence de chromophores aromatiques. Le spectre RMN ¹H, montrant des signaux caractéristiques de protons aromatiques entre 6,78 et 7,10 ppm, en a confirmé la présence (**Figure n°71**). Le spectre RMN ¹H a également mis en évidence des signaux nettement différents des molécules indoliques décrites précédemment. En effet, les signaux caractéristiques des noyaux indoliques sont plus déblindés que ceux présents sur le spectre RMN ¹H du composé **XI** et les signaux des méthyles portés par le noyau de type créatinine sont absents de ce spectre. En revanche, on remarque l'apparition de deux paires de doublets à δ_H 4,90 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-2) et 5,62 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-3) ppm et δ_H 6,23 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-1'') et 7,09 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-2'') ppm.

⁷⁴ Bialonska, D. ; Zjawiony, J.K. *Mar. Drugs*, **2009**, 7, 166-183. Et références citées



Un cycle de type catéchol a été mis en évidence par les signaux aromatiques à δ_{H} 6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), 6,97 (1H, dd, $J = 2,0 ; 8,5$ Hz, H-6) et 7,06 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8). En comparant ces informations et celles fournies par le spectre RMN ^{13}C avec les données de la bibliographie, une similitude avec la tubastrine (**50**), isolée du corail *Tubastrea aurea*, a été notée (**Tableau 9**).

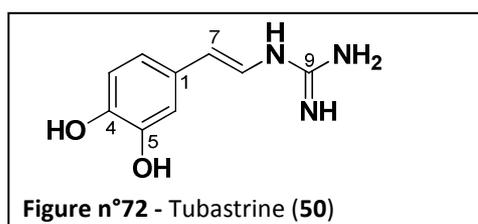


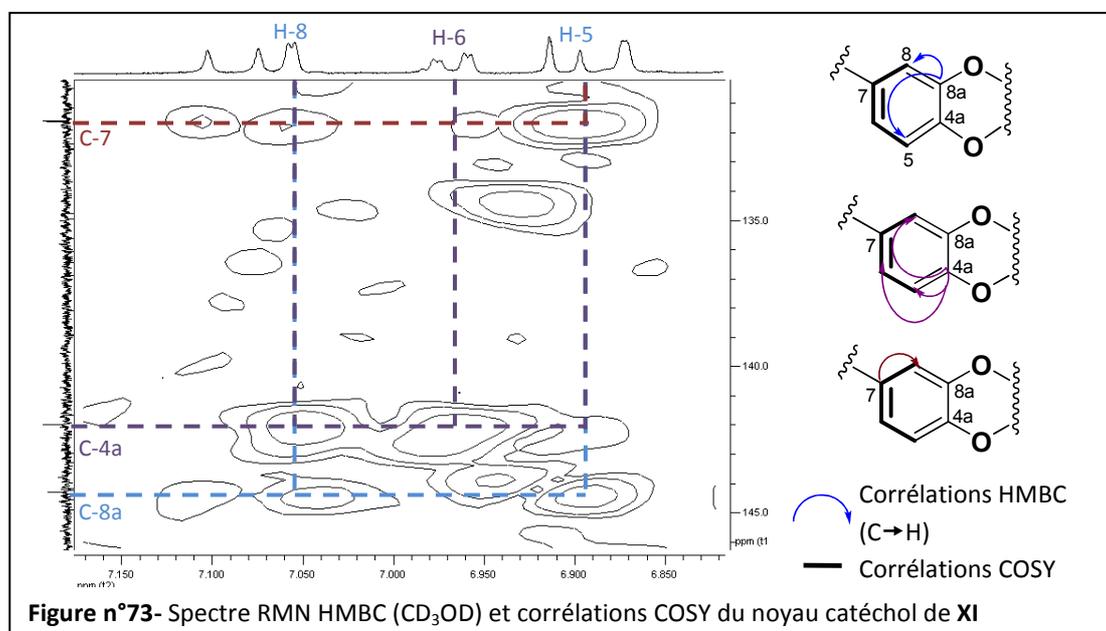
Tableau 9 - Comparaison des signaux RMN ^{13}C de la tubastrine (**50**) et d'un fragment du composé **XI**

| Ref. | Pos. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | C-9 | Solvant |
|------|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| | Tubastrine (50) ⁷⁴ | 128,7 | 119,2 | 118,5 | 146,2 | 146,5 | 113,7 | 116,5 | 120,0 | 155,9 | $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ |
| | Tubastrine (50) ⁷⁵ | 126,9 | 117,4 | 115,6 | 144,7 | 145,4 | 112,7 | 115,0 | 120,0 | 153,9 | $\text{DMSO}-d_6$ |
| | Composé XI | 131,4 | 121,2 | 118,7 | 142,0 | 144,4 | 115,2 | 116,9 | 122,0 | 156,2 | CD_3OD |

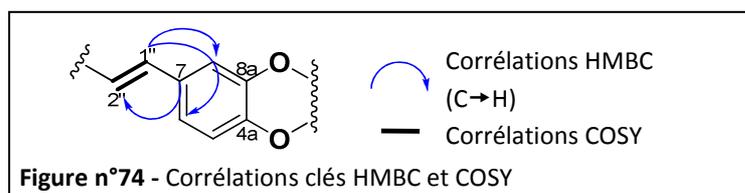
Remarque : Les positions des carbones décrits dans le **Tableau 9** correspondent à celles de la tubastrine. La numérotation du composé **XI** a été changée après l'élucidation de sa structure. En revanche, les positions référencées dans le texte sont conformes à la numérotation finale du composé **XI**.

⁷⁵ Barenbrock, J.S. ; Köck, M. *J. Biotechnol.*, **2005**, *117*, 225-235

La présence de la tubastrine dans la molécule isolée a été confirmée par les spectres RMN bidimensionnels COSY et HMBC. En effet, les corrélations HMBC C-8a/H-5/H-8, C-4a/H-5/H-6/H-8 et C-7/H-5, enrichies par les corrélations COSY H-6/H-5/H-8, ont permis de construire le noyau catéchol de la molécule (**Figure n°73**).

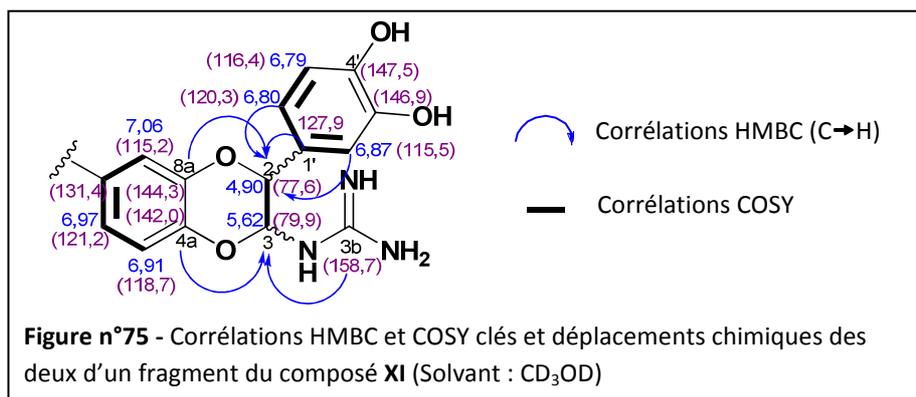


Enfin, la chaîne latérale a été liée au noyau catéchol par les corrélations clés HMBC C-7/H-2'' et C-1''/H-6/H-8 et à la corrélation COSY entre H-1'' et H-2'' (**Figure n°74**). Les constantes de couplage vicinales des protons H-1'' et H-2'' ($^3J = 14,0$ Hz) ont indiqué que la double liaison disubstituée était de configuration *E*.

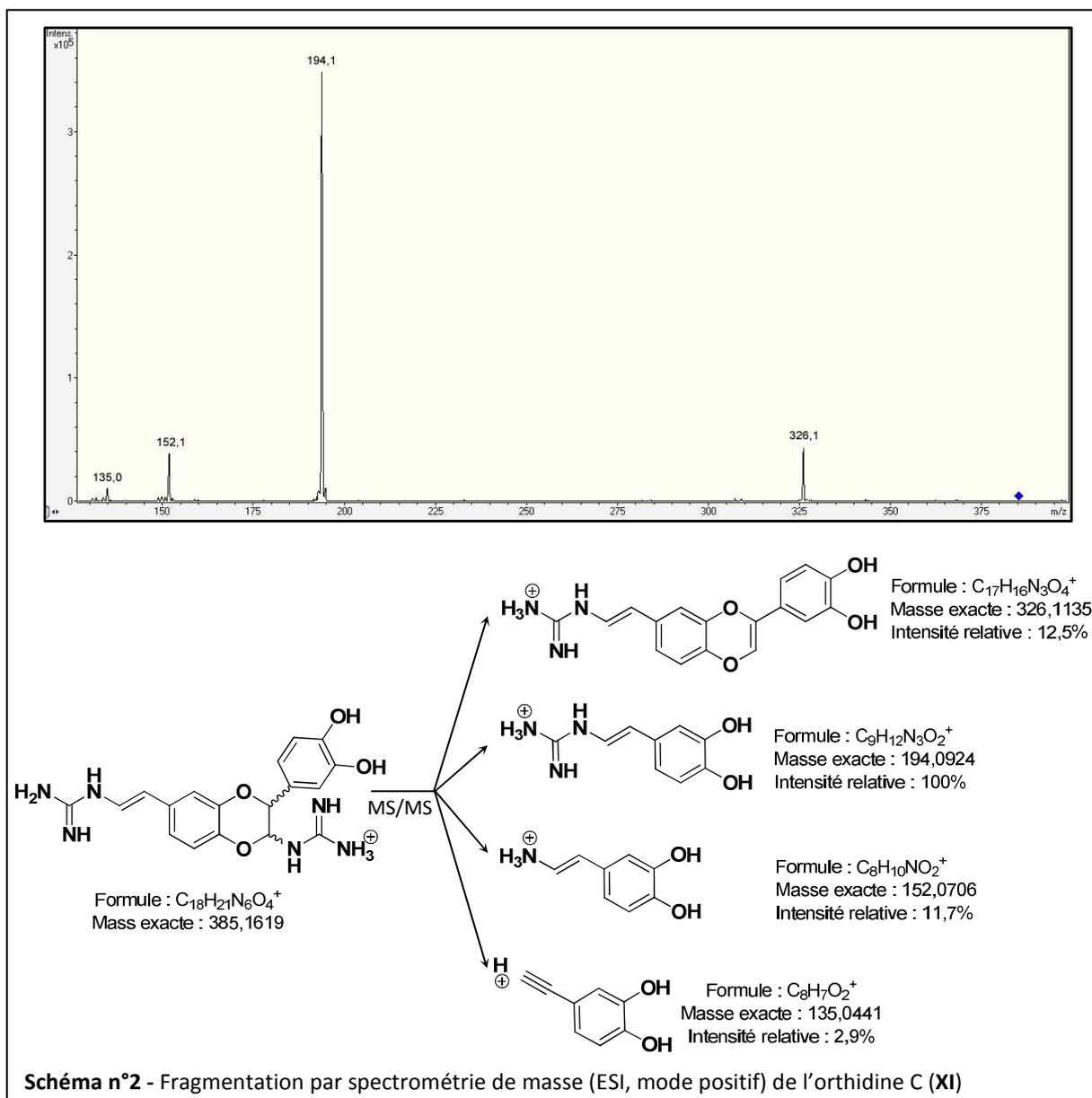


Le signal en RMN ¹³C de C-4'', à δ_c 156,2 ppm, proche de celui du carbone d'une guanidine, nous a permis de supposer la présence de la guanidine en position C-2'', cependant le spectre RMN HMBC n'a mis en évidence une corrélation entre C-4'' et les protons H-2'' ou H-1'' de la molécule. Les analyses RMN n'ont donc pas été suffisantes pour prouver la présence d'une sous-structure tubastrine. En revanche, la fragmentation par spectrométrie de masse (ESI, mode positif) du composé **XI** a mis en évidence un fragment à *m/z* 194,1 [M+H]⁺ qui pourrait correspondre à une partie de type tubastrine (**50**) alors qu'un autre fragment à *m/z* 135,0 [M+H]⁺ pourrait correspondre à une perte de la guanidine. Ainsi les analyses par spectrométrie de masse couplées aux spectres RMN ont permis d'identifier une sous-structure de type tubastrine (**50**).

Les signaux non attribués des spectres RMN ^1H et ^{13}C sont proches de ceux déjà identifiés dans la sous-structure de type tubastrine et la masse molaire du composé **XI** est près du double de celle de la tubastrine ($M = 385,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ces observations nous ont permis de supposer que le composé **XI** pouvait résulter d'une dimérisation de la tubastrine. En effet, en plus des signaux déjà décrits, les spectres RMN monodimensionnels ont révélé la présence d'une autre partie catéchol de part les signaux à δ_{H} 6,80 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-6'), 6,79 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-5') et 6,87 (1H, d, $J = 1,0 \text{ Hz}$, H-2') ppm et δ_{C} 115,5 (C-2'), 116,4 (C-5'), 120,3 (C-6'), 127,9 (C-1'), 146,9 (C-3') et 147,5 (C-4') ppm. En revanche, les signaux de la double liaison styrénique sont absents alors que les signaux de deux nouveaux protons ont été identifiés à δ_{H} 4,90 (1H, d, $J = 5,5 \text{ Hz}$, H-2) et 5,62 (1H, d, $J = 5,5 \text{ Hz}$, H-3) ppm. Par les corrélations COSY H-2/H-3 et HMBC C-1'/C-2'/C-6'/H-2, ces deux protons ont été liés au second catéchol (**Figure n°75**). Sur le spectre RMN HMBC, le carbone C-3b, à δ_{C} 158,7 ppm, corrèle avec H-3 permettant ainsi de relier une guanidine au fragment précédent. Ainsi, un nouveau fragment de type tubastrine a été caractérisé. Les valeurs des signaux d'H-2 et H-3 ont indiqué que ces deux protons étaient en α d'un oxygène et, grâce aux corrélations clés HMBC C-8a/H-2 et C-4a/H-3, C-2 et C-3 ont pu être liés au noyau catéchol du premier fragment de type tubastrine par les oxygènes en position C-8a et C-4a (**Figure n°75**).

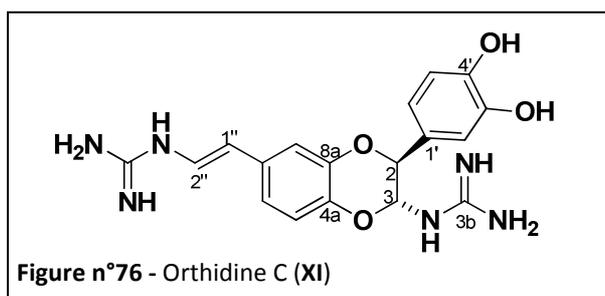


La fragmentation par spectrométrie de masse a confirmé la structure déterminée par RMN comme le montre le **Schéma n°2**.

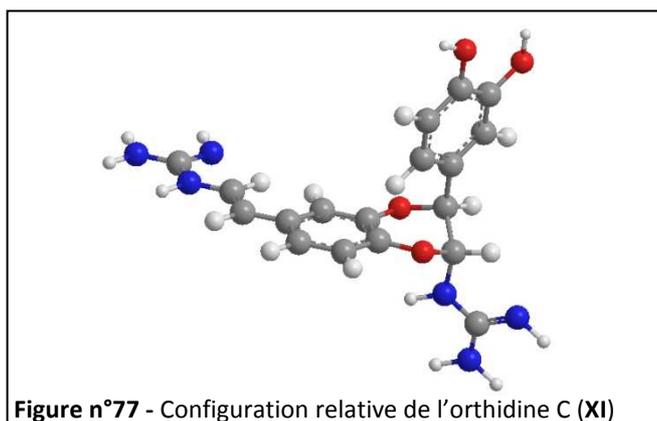


Alors que la structure de cette nouvelle molécule venait d'être élucidée, Pearce *et al.* ont décrit son isolement de l'ascidie néo-zélandaise *Aplidium orthium*, ainsi que quatre autres molécules de la même famille.⁷⁶ Ces nouveaux dimères de tubastrine (**50**) ont été nommés orthidines par les auteurs. Quatre des cinq orthidines décrites dans la publication sont des isomères. La comparaison des déplacements chimiques du composé isolé avec ceux des orthidines décrites ont permis d'identifier le composé **XI** comme étant l'orthidine C (**Figure n°76**).

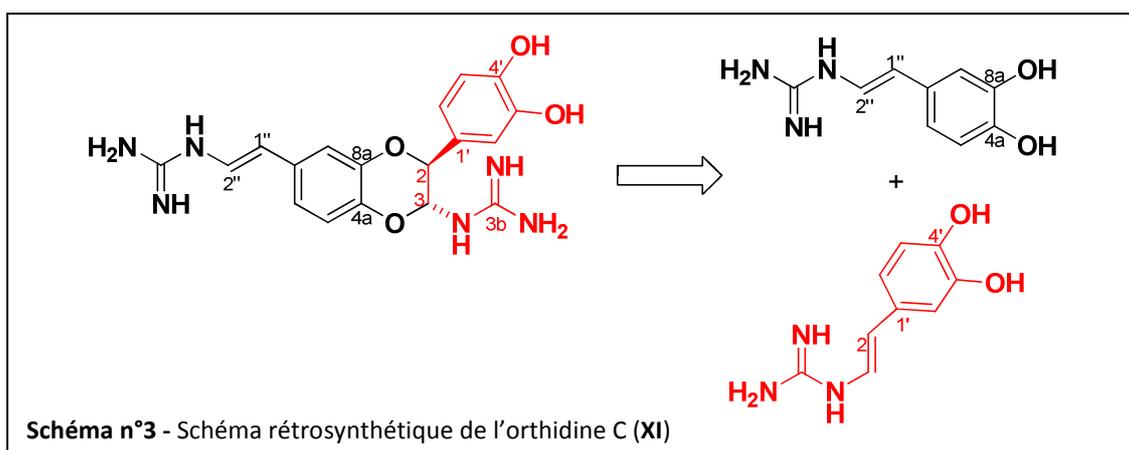
⁷⁶ Pearce, A.N., Chia, E.W., Berridge, M.V., Maas, E.W., Page, M.J., Harper, J.L., Webb, V.L., Copp, B.R. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 5748-5755.



La configuration relative du composé **XI** a été déduite de la comparaison avec les signaux RMN des différents isomères décrits par Pearce *et al.*⁷⁶ La configuration *trans* entre H-2 et H-3 a été confirmée par la valeur de la constante de couplage vicinale $^3J = 5,5$ Hz. Grâce à une expérience RMN *J*-HMBC sur l'orthidine C (**XI**), les auteurs ont obtenu des constantes de couplage $^3J_{C-8a/H-2}$ et $^3J_{C-4a/H-3}$ de 7,6 Hz, en faveur d'un arrangement H-2 équatorial/H-3 équatorial (**Figure n°77**).



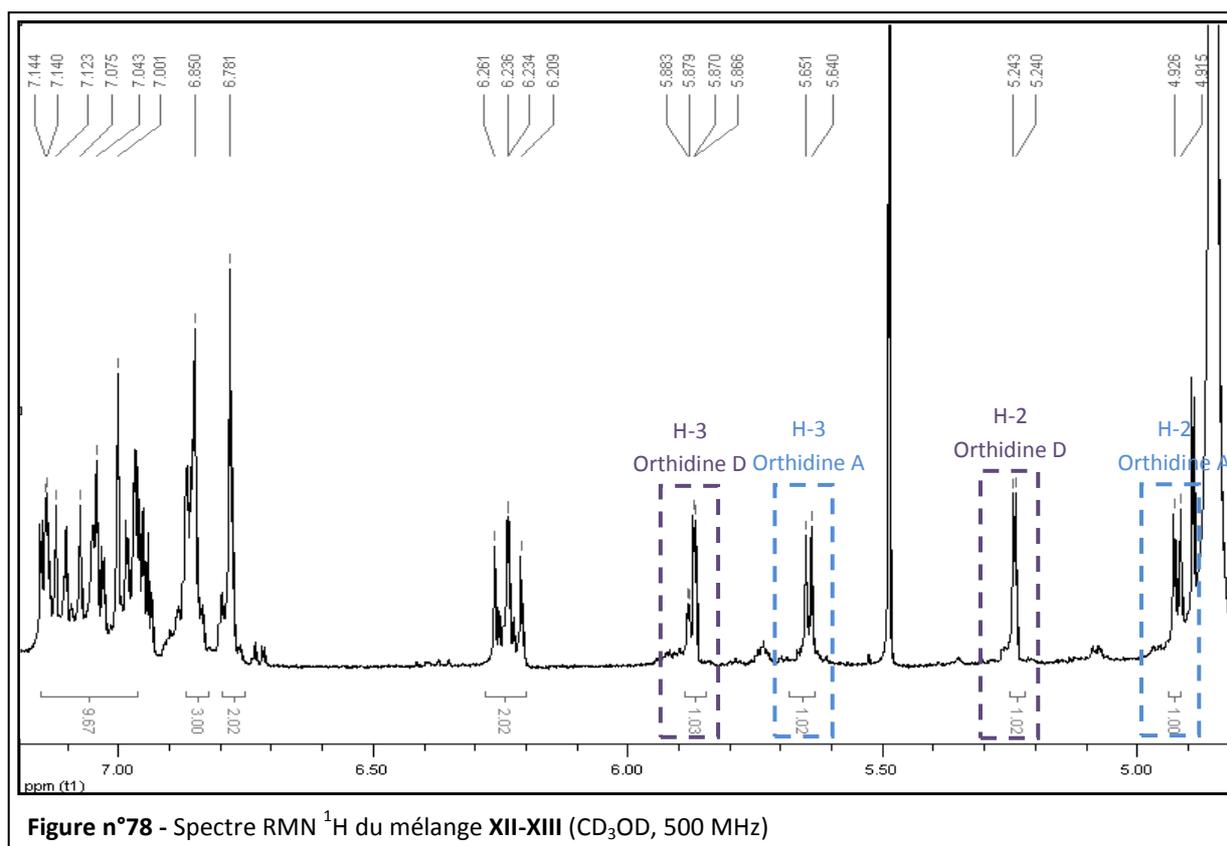
Comme dans la publication, le composé **XI** isolé n'a pas d'activité optique, ce qui indique qu'un mélange racémique de l'orthidine C (**XI**) a été isolé. Ce mélange racémique pourrait être produit par une dimérisation de la tubastrine dans le milieu (**Schéma n°3**). L'orthidine C, ainsi que les autres orthidines décrites par Pearce *et al.*,⁷⁶ sont peut-être une forme de stockage de la tubastrine dans l'organisme car leur reconversion en tubastrine semble relativement aisé.



Les dérivés 1,4-benzodioxanes résultant d'une dimérisation sont largement répandus dans les substances naturelles. On les retrouve par exemple dans les graines de *Phylolacca americana*,⁷⁷ dans l'éponge *Jaspis sp.*,⁷⁸ ou encore dans la carapace de certains insectes.⁷⁹ La présence de composés racémiques a également été notée.⁸⁰

III.2.2.2. L'orthidine A et D (XII et XIII)

Le pic 2 du profil HPLC semi-préparatif de la **Figure n°58** correspond à un composé isolé sous la forme d'une gomme jaune pâle (1,4 mg) dont l'ion pseudomoléculaire apparaît à m/z 385,2 [M+H]⁺. Le spectre RMN ¹H (**Figure n°78**) a mis en évidence deux composés en mélange 1:1 mais, à cause de la faible quantité de produit obtenue, une repurification n'a pas été envisagée. Le spectre RMN ¹H a permis de reconnaître les signaux des protons aromatiques et ceux caractéristiques des protons H-2 et H-3 (δ_H 4,92 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-2) et 5,65 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-3) ppm pour le premier composé et 5,24 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-2) et 5,87 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-3) ppm pour le second) déjà observés dans l'orthidine C (**XI**).



⁷⁷ Fukuyama, Y. ; Hasegawa, T. ; Toda, M. ; Kodama, M. ; Okazaki, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 252-254.

⁷⁸ Tsukamoto, S. ; Kato, H. ; Hirota, H. ; Fusetani, N. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13583-13592.

⁷⁹ Xu, M.-Z. ; Lee, W.S. ; Han, J.-M. ; Oh, H.-W. ; Park, D.-S. ; Tian, G.-R. ; Jeong, T.-S. ; Park, H.-Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 7826-7834.

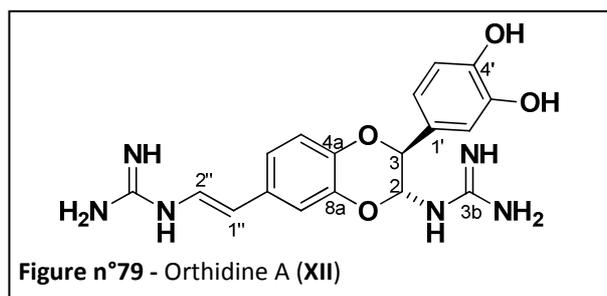
⁸⁰ Noda, N. ; Kubota, S. ; Miyata, Y. ; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 1749-1752.

Grâce à ces informations, nous avons pu classer ces deux composés en mélange dans la famille des orthidines. Dans un premier temps, nous avons pensé qu'un des deux composés, le composé **XII**, correspondait à l'orthidine C (**XI**) car les déplacements chimiques de leurs signaux en RMN ^1H étaient très proches. Cependant, les signaux relevés sur le spectre RMN ^{13}C ont remis en question sa structure. En effet, les signaux des carbones du composé **XII** n'ont pas montré une parfaite superposition avec ceux de l'orthidine C (**XI**) notamment pour les carbones C-4a (δ_{C} 143,4 ppm) et C-8a (δ_{C} 142,7 ppm), comme le montre le **Tableau 10**.

Tableau 10 - Comparaison des signaux RMN ^{13}C du composé **XII** avec ceux de l'orthidine C (CD_3OD)

| n° | CH_n | Composé XII | Composé XI | Orthidine C ⁷⁶ |
|-----|---------------|-------------|------------|---------------------------|
| 2 | CH | 77,5 | 77,6 | 77,4 |
| 3 | CH | 79,8 | 79,9 | 79,8 |
| 3b | C | 158,7 | 158,7 | 158,6 |
| 4a | C | 143,4 | 142,0 | 141,9 |
| 5 | CH | 118,6 | 118,7 | 118,7 |
| 6 | CH | 121,2 | 121,2 | 121,2 |
| 7 | C | 131,4 | 131,6 | 131,5 |
| 8 | CH | 115,5 | 115,2 | 115,3 |
| 8a | C | 142,7 | 144,3 | 144,2 |
| 1' | C | 128,0 | 127,9 | 128,0 |
| 2' | CH | 115,4 | 115,5 | 115,5 |
| 3' | C | 146,8 | 146,9 | 146,7 |
| 4' | C | 147,5 | 147,5 | 147,4 |
| 5' | CH | 116,4 | 116,4 | 116,5 |
| 6' | CH | 120,2 | 120,3 | 120,4 |
| 1'' | CH | 116,8 | 116,9 | 116,9 |
| 2'' | CH | 122,0 | 122,0 | 121,9 |
| 3'' | C | 156,1 | 156,2 | 156,2 |

Afin de comprendre ces différences, les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été comparés aux autres orthidines isolées par Pearce *et al.*⁷⁶ et les signaux de la molécule isolée se sont avérés parfaitement identiques à ceux de l'orthidine A comme le montre le **Tableau 11**. Le composé **XII** a donc été identifié comme étant l'orthidine A (**XII**). Structuralement très proche de l'orthidine C (**XI**), le composé **XII** résulte d'une cyclisation inversée des deux hydroxy du catéchol sur la double liaison de la tubastrine (**50**).



Comme pour l'orthidine C (**XI**), la constante de couplage vicinale des protons H-1'' et H-2'' du composé **XII** ($^3J = 14,0$ Hz) nous a permis de déduire une configuration *E* de la double liaison. De même, les constantes de couplages des protons H-2 et H-3 ($J = 5,5$ Hz) sont en faveur d'une configuration *trans*. Par la valeur de la constante de couplage $^3J_{C-8a/H-2}$ et $^3J_{C-4a/H-3}$ (8,0 Hz), Pearce *et al.*⁷⁶ ont déduit que l'orthidine A (**XII**) présentait la même configuration antipériplanaire que l'orthidine C (**XI**).

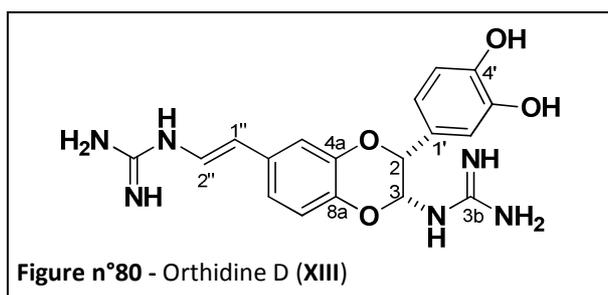
Tableau 11 - Comparaison des signaux RMN¹H et ¹³C du composé **XII** avec ceux de l'orthidine A (CD₃OD)

| n° | CH _n | Composé XII | | Orthidine A ⁷⁶ | |
|-----|-----------------|----------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | δ _C | δ _H (m, J en Hz) | δ _C | δ _H (m, J en Hz) |
| 2 | CH | 77,5 | 5,65 (d, 5,5 Hz) | 77,5 | 5,63 (d, 5,6 Hz) |
| 3 | CH | 79,8 | 4,92 (d, 5,5 Hz) | 79,8 | 4,91 (d, 5,6 Hz) |
| 3b | C | 158,7 | - | 158,7 | - |
| 4a | C | 143,4 | - | 143,4 | - |
| 5 | CH | 118,6 | 6,94 (d, 8,5 Hz) | 118,6 | 6,92 (d, 8,4 Hz) |
| 6 | CH | 121,2 | 6,97 (dd, 2,0 ; 8,5 Hz) | 121,2 | 6,97 (dd, 2,0 ; 8,4 Hz) |
| 7 | C | 131,4 | - | 131,5 | - |
| 8 | CH | 115,5 | 7,00 (m) | 115,4 | 7,00 (d, 2,0 Hz) |
| 8a | C | 142,7 | - | 142,7 | - |
| 1' | C | 128,0 | - | 128,0 | - |
| 2' | CH | 115,4 | 6,87 (m) | 115,4 | 6,86 (d, 1,8 Hz) |
| 3' | C | 146,8 | - | 146,8 | - |
| 4' | C | 147,5 | - | 147,5 | - |
| 5' | CH | 116,4 | 6,78 (m) | 116,4 | 6,78 (m) |
| 6' | CH | 120,2 | 6,76 (m) | 120,3 | 6,76 (m) |
| 1'' | CH | 116,8 | 6,22 (d, 14,0 Hz) | 116,8 | 6,22 (d, 14,0 Hz) |
| 2'' | CH | 122,0 | 7,10 (d, 14,0 Hz) | 122,0 | 7,08 (d, 14,0 Hz) |
| 4'' | C | 156,1 | - | 156,2 | - |

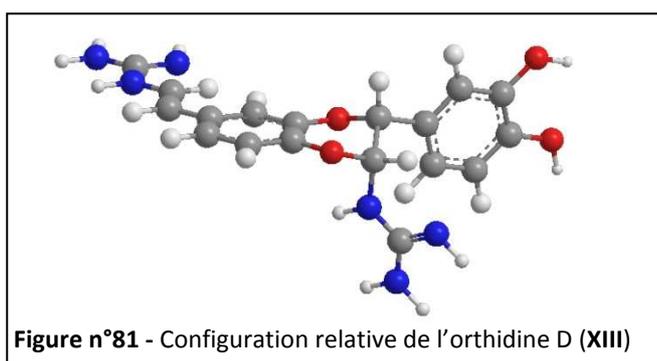
L'orthidine A (**XII**) a été isolée en mélange avec une autre orthidine. Les signaux des protons H-2 (δ_H 5,24 (1H, d, $J = 1,5$ Hz) ppm) et H-3 (δ_H 5,87 (1H, d, $J = 1,5$ Hz) ppm) de ce second composé sont un peu plus déblindés que ceux des deux molécules caractérisées ci-dessus. En comparant les spectres RMN ¹H et ¹³C avec ceux décrits dans la publication de Pearce *et al.*,⁷⁶ nous avons remarqué une très forte similitude des signaux du composé **XIII** avec ceux de l'orthidine D (**Tableau 12**). La molécule a ainsi pu être identifiée comme étant l'orthidine D (**XIII**).

Tableau 12 - Comparaison des signaux RMN ^1H et ^{13}C du composé XIII avec ceux de l'orthidine D (CD_3OD)

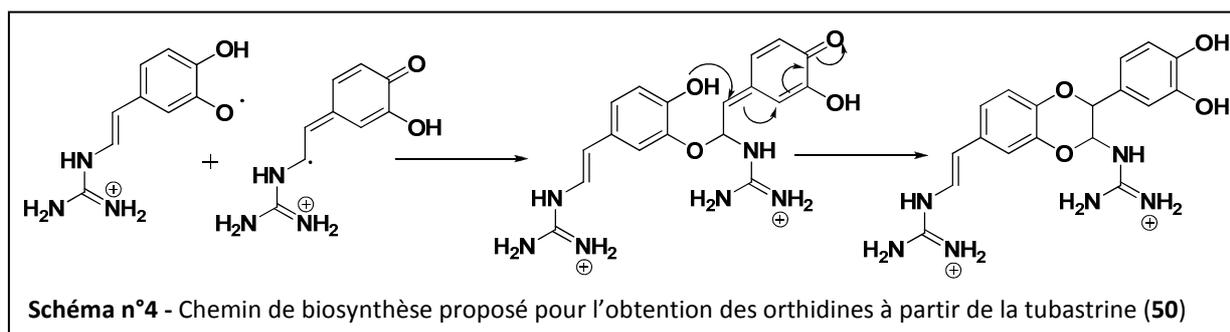
| n° | Composé XIII | | | Orthidine D ⁷⁶ | |
|-----|-----------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | CH _n | δ_{C} | δ_{H} (m, J en Hz) | δ_{C} | δ_{H} (m, J en Hz) |
| 2 | CH | 76,6 | 5,24 (d, 1,5 Hz) | 76,6 | 5,23 (d, 2,0 Hz) |
| 3 | CH | 78,8 | 5,87 (d, 2,0 Hz) | 78,8 | 5,86 (d, 2,0 Hz) |
| 3b | C | 159,1 | - | 159,1 | - |
| 4a | C | 140,6 | - | 140,6 | - |
| 5 | CH | 119,3 | 6,95 (d, 8,5 Hz) | 119,3 | 6,94 (d, 8,4 Hz) |
| 6 | CH | 121,6 | 7,04 (m) | 121,6 | 7,03 (m) |
| 7 | C | 131,9 | - | 131,9 | - |
| 8 | CH | 115,9 | 7,13 (m) | 115,9 | 7,13 (d, 2,0) |
| 8a | C | 144,5 | - | 144,6 | - |
| 1' | C | 126,9 | - | 126,9 | - |
| 2' | CH | 114,3 | 6,96 (m) | 114,3 | 6,96 (m) |
| 3' | C | 146,9 | - | 146,9 | - |
| 4' | C | 147,1 | - | 147,1 | - |
| 5' | CH | 116,4 | 6,84 (m) | 116,5 | 6,84 (m) |
| 6' | CH | 118,5 | 6,86 (m) | 118,6 | 6,86 (m) |
| 1'' | CH | 116,6 | 6,25 (d, 14,0 Hz) | 116,6 | 6,24 (d, 14,0 Hz) |
| 2'' | CH | 122,2 | 7,14 (d, 14,0 Hz) | 122,2 | 7,12 (d, 14,0 Hz) |
| 3'' | C | 156,1 | - | 156,2 | - |



Comme pour les orthidines précédentes, la configuration *E* de la double liaison styrénique a été déduite des constantes de couplage des protons H-1'' et H-2'' ($J = 14,0$ Hz). La configuration relative entre les protons H-2 et H-3 a cependant été attribuée *cis* de par la valeur de la constante de couplage vicinale $^3J_{\text{H-2/H-3}}$ de 2,0 Hz. Par une expérience RMN *J*-HMBC, Pearce *et al.* ont démontré que H-3 était antipériplanaire à C-4a (guanidyle axial) et que H-2 était orthogonal à C-8a (dihydroxyphényle équatorial) comme illustré sur la Figure n°81.⁷⁶



La biosynthèse de ce type de composés semble être proche de celle proposée pour les néolignanes ou les lignoïdes.⁸¹ Après une oxydation du phénol de la tubastrine, le dimère serait formé par une condensation radicalaire *O*-β suivie de la fermeture du cycle comme montrée sur le **Schéma n°4**. Une réaction de fermeture de cycle non enzymatique permettrait d'obtenir différents régio- et stéréo-isomères alors qu'une réaction enzymatique ne conduirait qu'à un seul stéréo-isomère. D'après la diversité isomérique des orthidines isolées et de celles décrites par Pearce *et al.*,⁷⁶ la réaction de fermeture de cycle n'est probablement pas contrôlée par des enzymes.



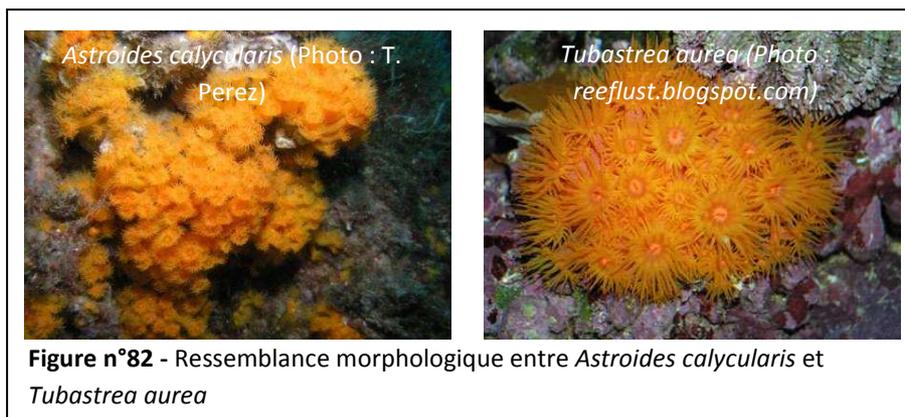
Les trois dimères décrits ci-dessus ont pour la première fois été isolés du corail *Astroïdes calycularis*. En revanche, la tubastrine (50), identifiée dans divers phyla (Chordata, Porifera et Cnidaria) et certainement à l'origine des orthidines, n'a pas été isolée. D'après la structure des orthidines, il y a une forte probabilité que cette molécule soit également produite par *A. calycularis*. Cette probabilité est d'autant plus importante que d'après la LC/MS (ESI, mode positif) de la fraction purifiée par HPLC, un composé dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 194,1 $[M+H]^+$ est présent dans la tête de la purification. Ce composé pourrait correspondre à la tubastrine (50).

Astroïdes calycularis est morphologiquement très proche d'autres dendrophylliidés du genre *Tubastrea* retrouvés dans les Caraïbes, dans l'océan Indo-Pacifique, en Mer Rouge et dans l'Atlantique, en particulier sur les côtes mauritaniennes et jusqu'en Macaronésie (**Figure n°82**). Les deux genres, *Astroïdes* et *Tubastrea*, contiennent des métabolites secondaires de la famille des aplysinopsines. Les coraux du genre *Tubastrea*, plus étudiés qu'*Astroïdes calycularis*, ont permis l'isolement d'autres dérivés d'aplysinopsine tels que les alcaloïdes bis-indoliques constitués de dimères d'aplysinopsines⁸² mais également de métabolites de type tubastrine (50).⁸³ De ce fait, le fait d'avoir isolé des dimères de tubastrine d'*Astroïdes calycularis* est très intéressant car la ressemblance de ces deux genres de cnidaires, uniquement morphologique jusqu'à présent, pourrait également se confirmer par leurs métabolites secondaires. On pourrait ainsi supposer que les coraux du genre *Tubastrea* sont issus de l'adaptation du corail méditerranéen *Astroïdes calycularis* aux zones plus tropicales.

⁸¹ Arnoldi, A. ; Merlini, L. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1985**, 2555-2557.

⁸² Iwagawa, T. ; Miyazaki, M. ; Okamura, H. ; Nakatani, M. ; Doe, M. ; Takemura, K. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 2533-2535.

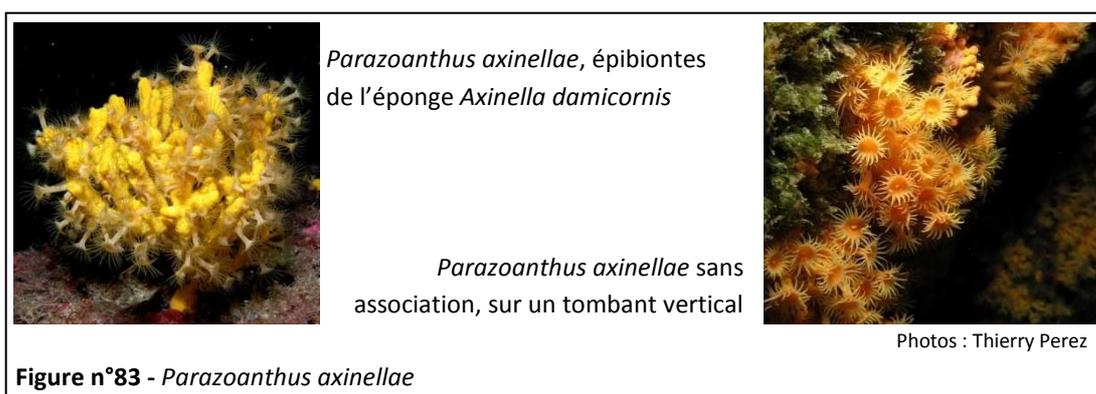
⁸³ Sakai, R. ; Higa, T. *Chem. Lett.*, **1987**, 127-128.



IV. *Parazoanthus axinellae*

Les anémones coloniales *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862) sont fréquemment rencontrées en mer Méditerranée et se trouvent également en Atlantique, de la Grande Bretagne aux Canaries, en Manche et en mer du Nord. Chaque polype est un individu autonome, formé d'une colonne au sommet de laquelle se trouve une double couronne de 24 ou 36 tentacules fins. La bouche se trouve au centre de cette couronne de tentacules et se prolonge par le pharynx. Les individus, de couleur jaune-marron à orangé, sont réunis entre eux par le pied, formant ainsi une colonie encroûtante.

Les anémones *P. axinellae*, ont une large répartition bathyale (1 à 200 m) et sont sciaphiles. On les trouve sur les tombants verticaux ombragés, sous les surplombs et à l'entrée des grottes balayées par le courant, elles sont également observées en tant qu'épibiontes de quelques éponges marines du genre *Agelas* ou *Axinella* (**Figure n°83**). Espèce méditerranéenne caractéristique, *P. axinellae* fait partie des espèces cibles du programme ECIMAR.

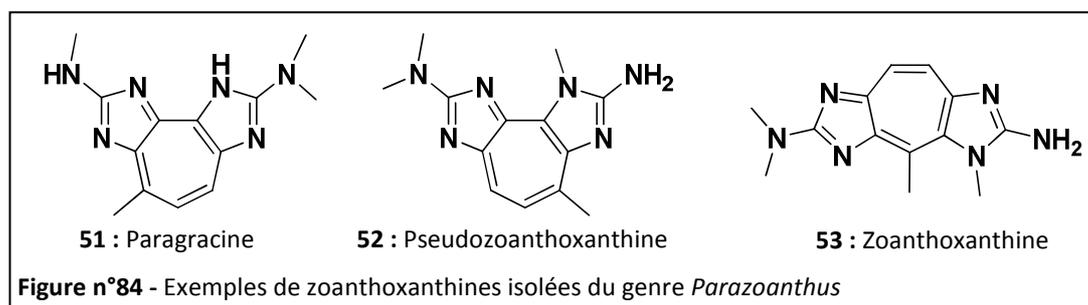


Très peu étudiée chimiquement, cette espèce est connue pour produire des pigments tétrazacyclopentazulène fluorescents : les zoanthoxanthines.^{84,85} (**Figure n°84**). Cette famille de composé possède de nombreuses activités biologiques comme l'inhibition de l'oxydase succinique

⁸⁴ Turk, T. ; Macek, P. ; Suput, D. *Toxicon*, **1995**, 33, 133-142. Et références citées

⁸⁵ Sepic, K. ; Turk, T. ; Macek, P. *Toxicon*, **1998**, 36, 937-940.

mitochondriale et de l'acétylcholinestérase ou encore des activités pharmacologiques semblables à celles de l'histamine et de la papavérine.^{84,85}



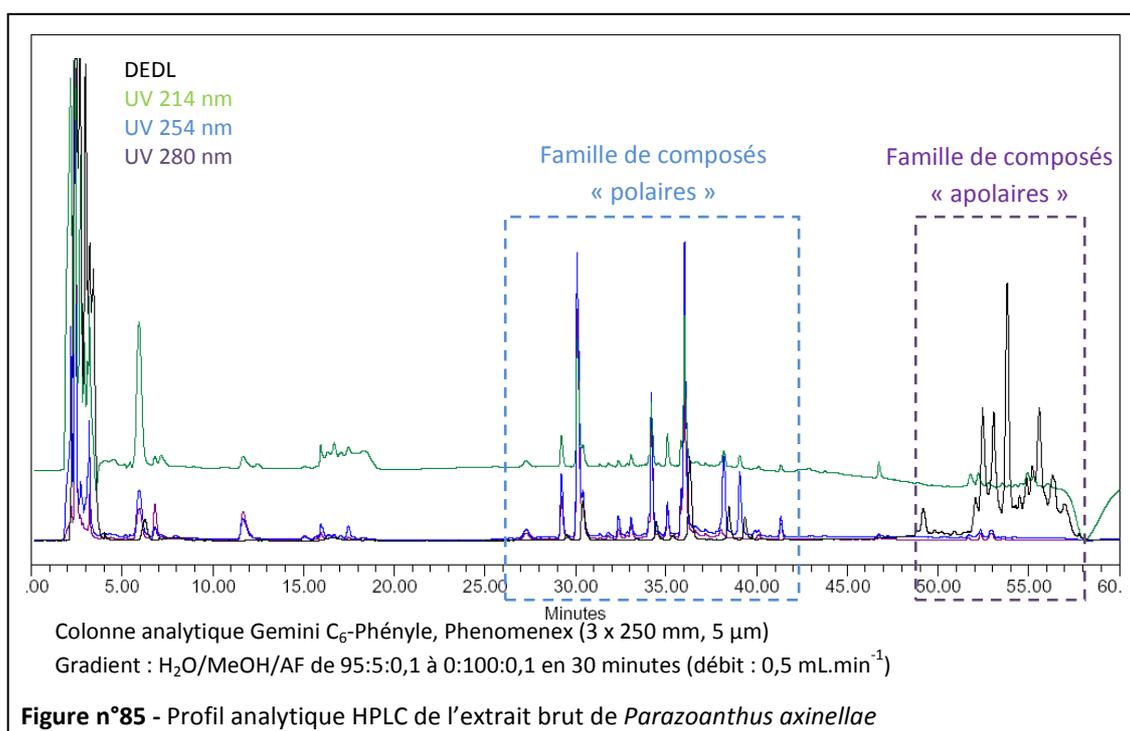
Cette espèce fait partie de l'ordre Zoanthidea. Actuellement la systématique de cet ordre, exclusivement basée sur la morphologie, permet d'identifier deux sous-ordres : Brachycnemina et Macrocnemina. Les deux sous-ordres diffèrent l'un de l'autre par des caractéristiques morphologiques mais également par leur reproduction sexuée : le sous-ordre Brachycnemina est le seul à produire des larves planctoniques. Si la distinction de ces deux sous-ordres est relativement bien acceptée par les taxonomistes, celle de leurs familles et leurs genres est beaucoup moins claire, surtout pour le sous-ordre Macrocnemina dans lequel est placé le genre *Parazoanthus*. Il est souvent difficile de se baser uniquement sur des caractères morphologiques, pas toujours évidents à identifier suivant les espèces considérées, et certains proposent de considérer le type de substrat sur lequel se trouve l'espèce comme critère alternatif pour l'identification taxonomique. Cependant, ce critère n'est pas défini pour la plupart des espèces et Sinniger *et al.* ont voulu contribuer à cette détermination en étudiant la phylogénie de l'ordre Zoanthidea par les ADN mitochondriaux ribosomiaux 16S et 12S.⁸⁶ Ces gènes ont déjà permis d'établir une phylogénie moléculaire des octocoralliaires et des scléactiniaires.⁸⁶ Cependant, le résultat de ces analyses n'a permis qu'une confirmation partielle de la classification traditionnelle des hexacoralliaires basée sur la morphologie et l'absence de marqueurs intraspécifiques n'a pas permis d'établir une description précise des espèces appartenant à l'ordre Zoanthidea. Dans cette étude, la famille Parazoanthidae et le genre *Parazoanthus* sont considérés comme paraphylétiques et montrent une grande diversité supra spécifique.

Etant une espèce répandue du coralligène méditerranéen, mais relativement peu étudié d'un point de vue chimique, *Parazoanthus axinellae* fait partie des espèces cibles du projet ECIMAR. En effet, l'un des objectifs du projet ANR ECIMAR étant de caractériser la biodiversité méditerranéenne à travers sa composante chimique, a justement pour but de contribuer à l'identification des espèces par des données chimiques présentes dans les empreintes chimiques des différents invertébrés du coralligène méditerranéen.

⁸⁶ Sinniger, F. ; Montoya-Burgos, J.I. ; Chevaldonné, P. ; Pawlowski, J. *Mar. Biol.*, **2005**, *47*, 1121-1128. Et références citées

IV. 1. Protocole d'extraction et d'isolement

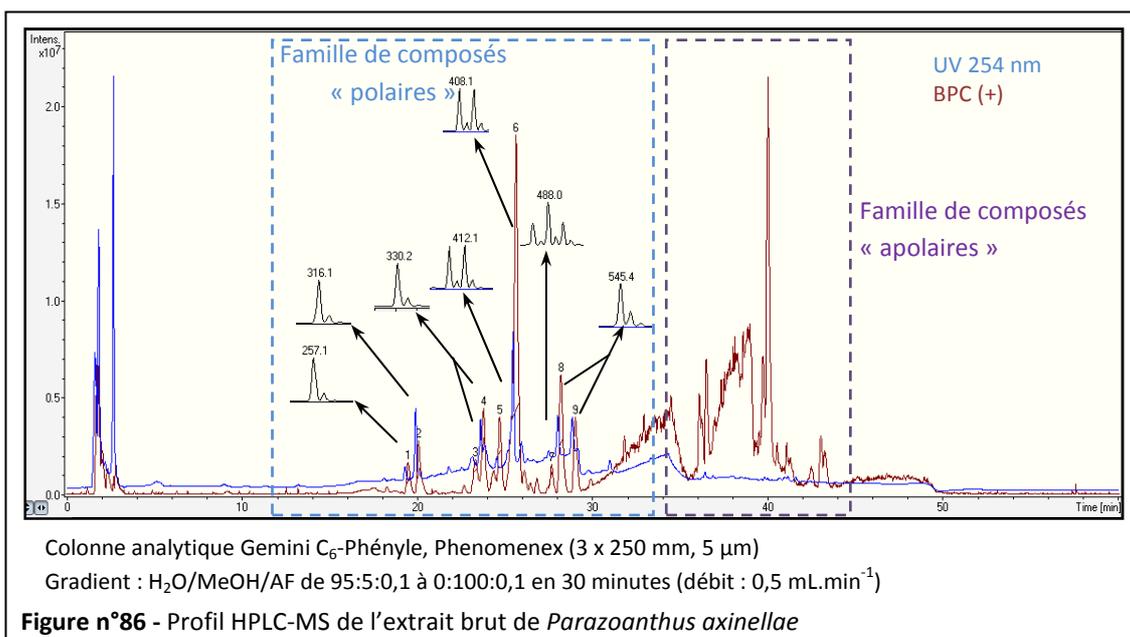
En août 2007, les colonies de *Parazoanthus axinellae* ont été récoltées sur le site des Roches Saint-Nicolas (Fontvieille) à environ 20 m de profondeur. Les zoanthaires ont ensuite été extraits par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. Après évaporation, l'extrait brut obtenu a été analysé par HPLC (DEDL/DAD) sur une colonne analytique C₆-Phényle (**Figure n°85**) permettant ainsi l'obtention de l'empreinte chimique de l'espèce.



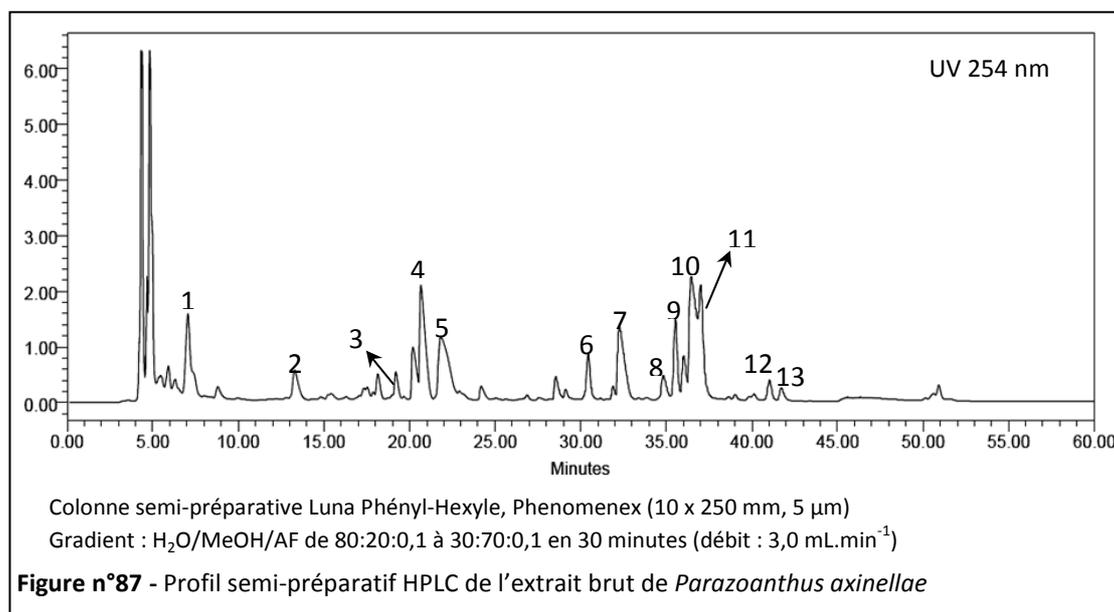
Le profil analytique de cet extrait brut a mis en évidence deux familles de composés :

- une famille relativement polaire éluée entre 30 et 40 minutes et ayant des chromophores qui absorbent en UV aux alentours de 254 nm ;
- une famille beaucoup plus apolaire sortant en fin de gradient à partir de 50 minutes d'élution et n'absorbant pratiquement pas en UV.

Afin d'avoir quelques informations supplémentaires sur les composés présents dans l'extrait brut de *P. axinellae*, l'échantillon a été analysé par LC/MS dans les mêmes conditions que pour l'obtention de l'empreinte chimique (**Figure n°86**).



Cette analyse a mis en évidence la présence de composés azotés mono- ou dibromés dans la famille de composés dits « polaires ». Après une recherche bibliographique, les masses molaires associées sont nouvelles dans les produits naturels. L'extrait brut de *P. axinellae* a été fractionné par HPLC sur une colonne semi-préparative C₆-Phényle. Ainsi, 13 pics ont été séparés (**Figure n°87**).



Après évaporation, chaque composé a été injecté en spectrométrie de masse afin de vérifier la pureté et d'en déduire la masse molaire.

Ainsi, d'après l'allure de leur pic moléculaire, les pics 8 et 10 sont des composés monobromés tandis que les pics 12 et 13 sont dibromés (**Tableau 13**).

Tableau 13 - Allure des pics moléculaires des composés bromés

| n° Pic | Pic 8 | Pic 10 | Pic 12 | Pic 13 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Forme du pic moléculaire |  |  |  |  |

Malheureusement ces composés ont été isolés en trop faibles quantités pour pouvoir être analysés en RMN et ainsi déterminer leurs structures. Une plus grande quantité de *P. axinellae* a été de nouveau récoltée et extraite dans les mêmes conditions que précédemment afin de purifier une quantité suffisante de composés pour permettre les études par RMN. Par rapport à la première purification, nous avons retrouvé les molécules isolées mais également un autre composé.

90

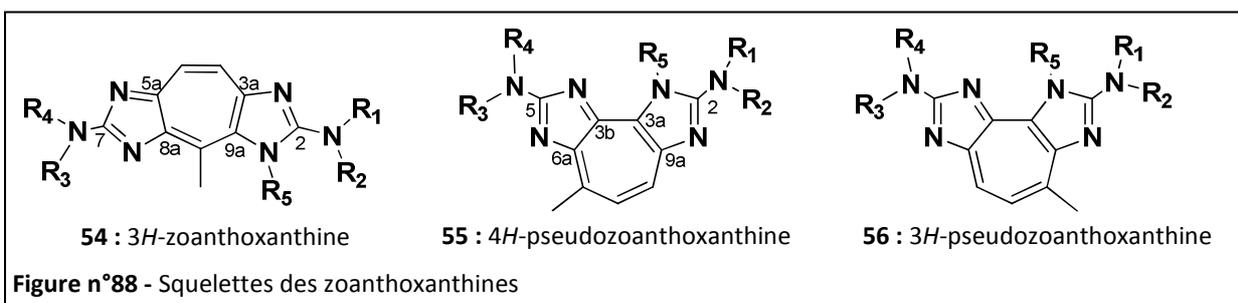
IV.2. Elucidations structurales

Les purifications précédemment décrites ont permis l'isolement et la caractérisation de 14 composés : 7 composés connus (**XIV-XX**) et une nouvelle famille d'alcaloïdes (**XXI-XXVII**).

IV.2.1. Les composés connus isolés de *Parazoanthus axinellae*

IV.2.1.1. La famille des zoanthoxanthines

Les zoanthoxanthines sont des alcaloïdes fortement fluorescents retrouvés essentiellement dans deux familles d'anthozoaires coloniaux de l'ordre Zoanthidea : Epizoanthidae et Zoanthidae.⁸⁷ Ces composés ont une large gamme d'activité biologique dont la faculté d'interagir sélectivement avec l'ADN.⁸⁸ Trois squelettes types sont relevés : le type 3*H*-zoanthoxanthine (**54**), le type 4*H*-pseudozoanthoxanthine (**55**) et le type 3*H*-pseudozoanthoxanthine (**56**) (**Figure n°88**). Toutes ces molécules partagent un noyau formé d'un cycle tetrazacyclopent[e]azulène fusionné à deux cycles de 2-aminoimidazole (AI).



⁸⁷ Cariello, L. ; Crescenzi, S. ; Zanetti, L. ; Prota, G. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1979**, 63, 77-82.

⁸⁸ Pasic, L. ; Sepcic, K. ; Turk, T. ; Macek, P. ; Poklar, N. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, 393, 132-142.

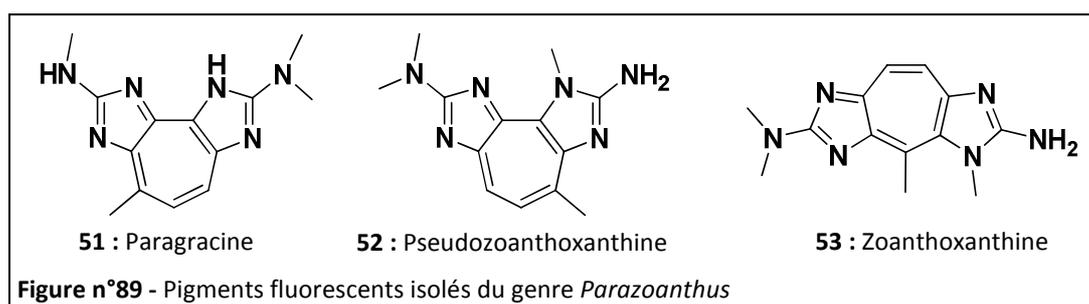
Pour la biosynthèse de ces pigments, les organismes utiliseraient l'arginine qui passerait par un intermédiaire 2-aminoimidazole C_3N_3 avant d'être transformée en différentes zoanthoxanthines. D'abord postulé par Cariello *et al.*,⁸⁹ Hegazi *et al.* puis Braun *et al.* ont démontré que ces pigments pouvaient être obtenus de manière biomimétique, par la dimérisation de plusieurs dérivés aminoimidazoles C_5N_3 , eux-mêmes dérivés de l'arginine.^{90,91} Ces travaux ont ensuite été poursuivis par Horne et son équipe qui ont étudié plus précisément l'utilisation de l'intermédiaire 2-aminoimidazole C_3N_3 et de la dimérisation oxydative des dérivés C_5N_3 dans la synthèse des zoanthoxanthines.^{92,93} Toutefois, aucune expérience de biosynthèse n'a été tentée pour confirmer les chemins proposés.

Plusieurs zoanthoxanthines et dérivés ont été isolés du genre *Parazoanthus*.⁹⁴⁻⁹⁷ L'étude chimique de *P. axinellae* récoltés aux roches Saint-Nicolas ont permis d'isoler trois membres de cette famille : la zoanthoxanthine (**53**, **XIV**), la paragrachine (**51**, **XV**) et la 3H-norpseudozoanthoxanthine (**XVI**). De ces trois composés, seule la zoanthoxanthine (**53**, **XIV**) avait déjà été isolée de *P. axinellae*.⁹⁴

- **La zoanthoxanthine (53, XIV) :**

Le composé **XIV** a été isolé sous la forme d'un pigment fluorescent jaune-vert (1,5 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 257,3 $[M+H]^+$. La couleur et la masse molaire de ce composé nous ont fait penser aux pigments déjà connus dans le genre *Parazoanthus* : les zoanthoxanthines. Trois pigments de cette famille ont une masse molaire correspondant à celle du composé isolé :

- la paragrachine (**51**) isolée de *Parazoanthus gracilis* en 1982 ;⁹⁵
- la pseudozoanthoxanthine (**52**) isolée de *Parazoanthus sp.* en 1978 puis de *P. gracilis* en 1984 ;^{96,97} et,
- la zoanthoxanthine (**53**) isolée de *P. axinellae* en 1973.⁹⁴



⁸⁹ Cariello, L. ; Crescenzi, S. ; Prota, G. ; Zanetti, L. *Experientia*, **1974**, *30*, 849-850.

⁹⁰ Hegazi, M.F. ; Borhardt, R.T. ; Schowen, R.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3049-3050.

⁹¹ Braun, M. ; Büchi, G. ; Buschey, D.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 4208-4212.

⁹² Xu, Y.-Z. ; Yakushijin, K. ; Horne, D.A. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 4385-4388.

⁹³ Xu, Y.-Z. ; Yakushijin, K. ; Horne, D.A. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9569-9571.

⁹⁴ Cariello, L. ; Crescenzi, S. ; Prota, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 99-100.

⁹⁵ Komoda, Y. ; Shimizu, M. ; Kanedo, S. ; Yamamoto, M. ; Ishikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, *30*, 502-508.

⁹⁶ Schwartz, R.E. ; Yunker, M.B. ; Scheueur, P.J. ; Ottersen, T. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 2235-2238.

⁹⁷ Komoda, Y. ; Shimizu, M. ; Ishikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, *32*, 3873-3879.

Après une fragmentation en spectrométrie de masse du composé isolé, deux fragments ont été obtenus. Le premier montre une perte de $\Delta = 43,0$ uma (MS^2) par rapport au pic pseudomoléculaire du composé **XIV**. Cette perte correspond à l'élimination de C_2H_5N présent dans les trois structures potentielles proposées (**Figure n°89**). Pour le second fragment obtenu, une perte de $\Delta = 15,0$ uma (MS^2) a été observée, qui correspond à la perte d'un NH. D'après sa structure, la paragrachine (**51**) ne peut pas perdre de NH sans perdre également au minimum un méthyle, cette structure ne pouvait donc pas correspondre au composé isolé. Très peu de signaux sont présents sur le spectre RMN 1H du composé (**Figure n°90**) : trois singulets à δ_H 3,07 (3H), 3,16 (3H) et 3,35 (6H) ppm correspondant aux quatre méthyles de la molécule et un large singulet à δ_H 8,04 (2H) ppm attribué à deux protons équivalents.

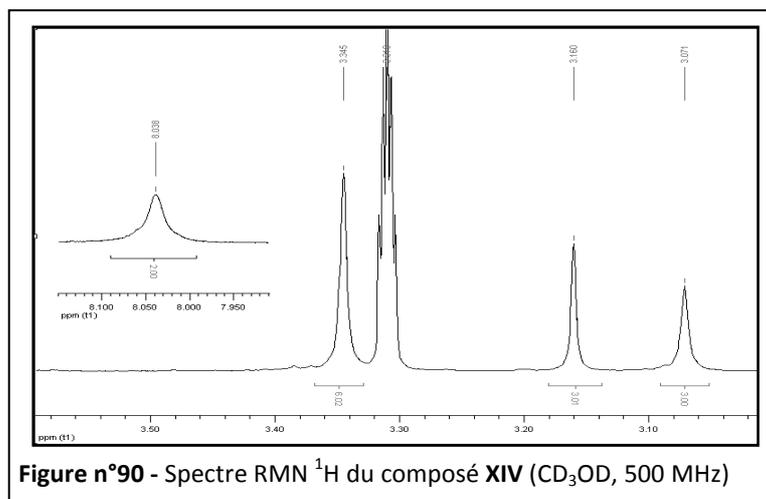


Figure n°90 - Spectre RMN 1H du composé **XIV** (CD_3OD , 500 MHz)

D'après ce dernier signal, la molécule isolée serait la zoanthoxanthine (**53**) car, dans le cas de la pseudozoanthoxanthine (**52**), les deux protons du cycle à 7 carbones ne sont pas équivalents.⁹⁷ Le spectre bidimensionnel COSY a confirmé cette hypothèse en ne montrant pas de corrélation entre les deux protons du cycle à 7 carbones et un des quatre méthyles. Le composé isolé a donc été identifié comme étant la zoanthoxanthine (**53**, **XIV**), déjà isolée de *P. axinellae*. Les déplacements chimiques obtenus sont comparés à ceux de la bibliographie dans la partie expérimentale de ce manuscrit (p.274).

- **La paragrachine (51, XV) :**

Comme la molécule décrite ci-dessus, le composé **XV** a été isolé sous la forme d'un pigment jaun-vert (2,3 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 257,3 $[M+H]^+$. Il a également été considéré comme un membre de la famille des zoanthoxanthines isolées du genre *Parazoanthus*. Ayant la même masse molaire que la zoanthoxanthine (**52**, **XIV**), le composé **XV** pouvait correspondre à un des trois pigments cités ci-dessus : la paragrachine (**51**), la pseudozoanthoxanthine (**52**) ou zoanthoxanthine (**53**). Cette dernière a été éliminée des structures potentielles grâce au spectre RMN 1H du composé **XV**, où les signaux de deux protons non-équivalents à δ_H 7,99 (1H, d, $J = 10,5$ Hz) et 8,02 (1H, d, $J = 10,5$ Hz) ppm (solvant : CD_3OD) sont présents alors que

nous avons vu ci-dessus que dans le cas de la zoanthoxanthine (**53**, **XIV**), ces deux protons sont équivalents (δ_H 8,04 (2H, s) ppm).

Les autres signaux visibles sur le spectre RMN 1H (**Figure n°91**) sont ceux de quatre méthyles à δ_H 3,05 (3H, Me-C), 3,15 (3H, Me-N) et 3,33 (6H, Me₂N) ppm (solvant : CD₃OD).

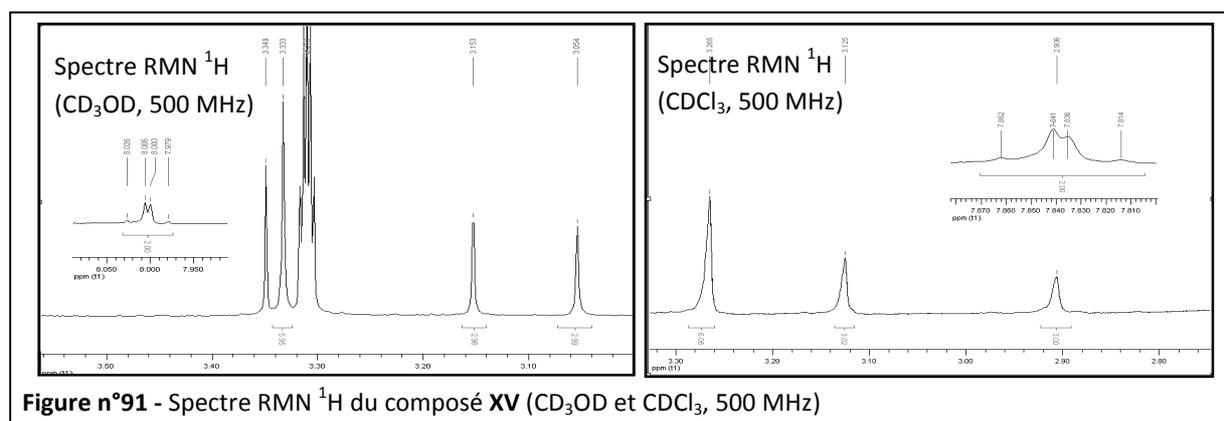


Figure n°91 - Spectre RMN 1H du composé **XV** (CD₃OD et CDCl₃, 500 MHz)

La seule perte visible par fragmentation du composé en spectrométrie de masse a été de $\Delta = 43,0$ uma (MS^2), correspondant à la perte de C₂H₅N que les deux structures possibles (**51** et **52**) possèdent ; cette expérience ne nous a donc pas permis d'éliminer une des deux structures.

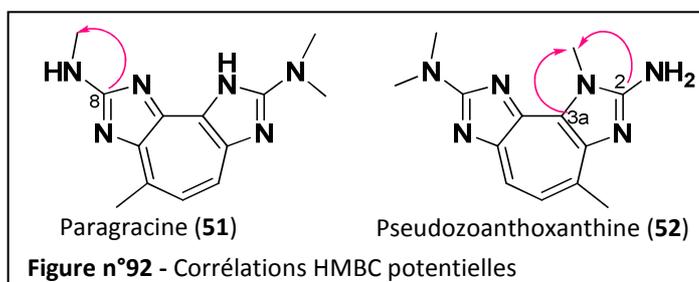
Pour trancher entre la paragracine (**51**) et la pseudozoanthoxanthine (**52**), les spectres RMN du composé **XV** ont de nouveau été réalisés dans le chloroforme deutéré afin de pouvoir comparer les déplacements chimiques des signaux RMN de la molécule avec ceux des références bibliographiques. Malheureusement la comparaison s'est avérée difficile car le spectre RMN ^{13}C du composé **XV** n'a pas permis d'identifier les différents carbones de la molécule et le spectre RMN 1H n'a pas été suffisant pour déterminer avec certitude sa structure puisque, comme indiqué dans le **Tableau 14**, les signaux RMN du composé isolé n'ont des déplacement chimiques identiques à ceux trouvés dans la bibliographie. Il est à noter que dans la bibliographie, pour un même solvant deutéré, les signaux RMN 1H de la paragracine (**51**) ont des déplacements chimiques différents. Cela pourrait provenir de formes tautomères différentes dues à une acidité différente du milieu.

Tableau 14 - Comparaison des signaux RMN 1H de la paragracine (**51**) et du composé **XV** (CDCl₃)

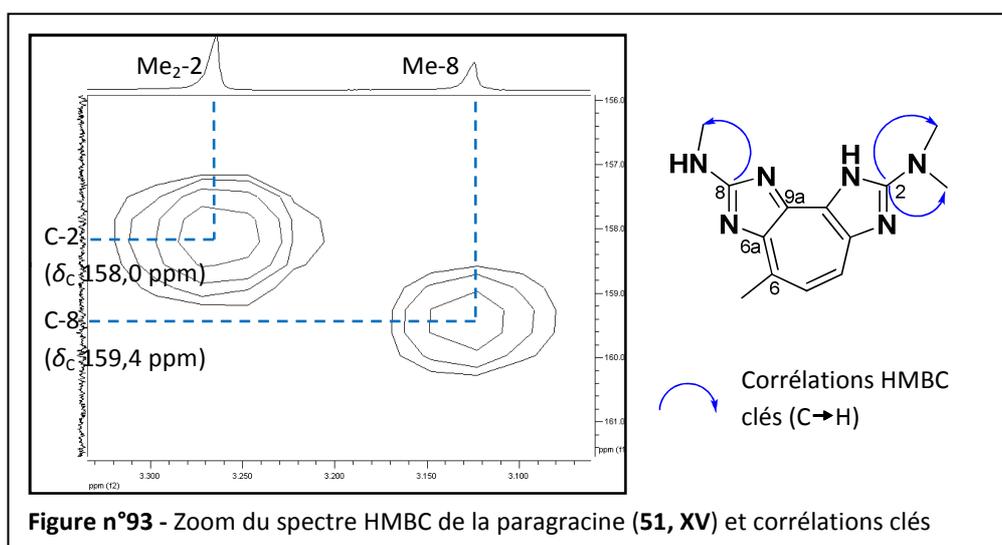
| Position | H-7 (ppm) | H-8 (ppm) | Me-8 (ppm) | Me ₂ -2 (ppm) | Me-6 (ppm) |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|--------------------------|------------|
| Références | | | | | |
| Paragracine (51) ⁹⁵ | 7,52 (d, $J = 11,0$ Hz) | 7,82 (d, $J = 11,0$ Hz) | 3,09 (s) | 3,21 (s) | 2,85 (s) |
| Paragracine (51) ⁹⁸ | 7,71 (d, $J = 10,5$ Hz) | 7,79 (d, $J = 10,8$ Hz) | 3,18 (s) | 3,93 (s) | 2,89 (s) |
| Composé XV | 7,83 (d, $J = 10,8$ Hz) | 7,85 (d, $J = 10,5$ Hz) | 3,12 (s) | 3,26 (s) | 2,90 (s) |

⁹⁸ Jiménez, C. ; Crews, P. J. *Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 9-14.

Les spectres de RMN monodimensionnelle n'ayant pas suffi à confirmer la structure du composé, une analyse en RMN bidimensionnelle HMBC a été réalisée. En effet, dans le cas de la pseudozoanthoxanthine (**52**), le méthyle porté par l'azote en position 3 devrait corrélérer avec C-2 et C-3a. En revanche, dans le cas de la paragrachine (**51**), le méthyle porté par l'azote en position 8 ne devrait corrélérer qu'avec C-8 (Figure n°92).



Le spectre HMBC n'a montré qu'une tache de corrélation entre C-8 (δ_c 159,4 ppm) et Me-8 à δ_H 3,12 ppm (solvant : $CDCl_3$), la structure du composé **XV** a donc été identifiée comme étant la paragrachine (**51, XV**) (Figure n°93).



- La 3H-norpseudozoanthoxanthine (**XVI**) :

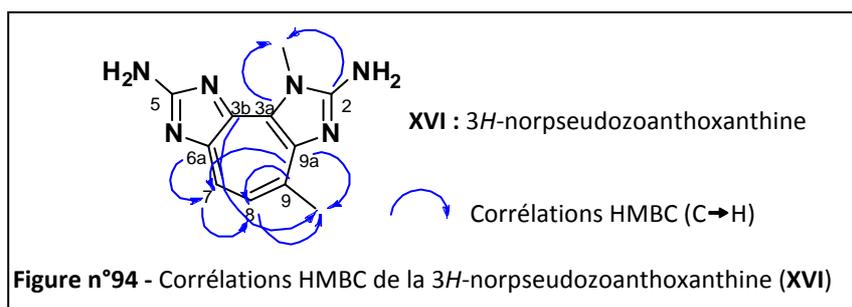
Le composé **XVI** a été isolé sous la forme d'un pigment jaune fluorescent (2,6 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 229,1 $[M+H]^+$. Sa couleur caractéristique, sa masse molaire et son spectre RMN 1H ont tout de suite classé ce composé dans la famille des zoanthoxanthines. A cette masse molaire, une seule zoanthoxanthine a été isolée, la 3H-norpseudozoanthoxanthine (**XVI**),

isolée de *Parazoanthus gracilis* et *Epizoanthus arenaceus*.^{97,99} Le spectre RMN ¹H de la molécule isolée a été comparé avec les signaux de la 3*H*-norpseudozoanthoxanthine publiée (**Tableau 15**) et, bien que les solvants deutérés aient été différents (CF₃COOD dans les publications et CD₃OD pour le composé **XVI**), les signaux RMN ¹H du composé **XVI** et de la 3*H*-norpseudozoanthoxanthine (**XVI**) décrite restent proches. Malheureusement, le spectre RMN ¹³C de la molécule décrite n'a pas été indiqué et il n'a pas été possible de conclure sur la structure du composé isolé uniquement avec son spectre RMN ¹H.

Tableau 15 - Comparaison des signaux RMN ¹H du composé **XVI** (CD₃OD) et de la 3*H*-norpseudozoanthoxanthine (CF₃COOD)

| Ref. | Position | H-7 (ppm) | H-8 (ppm) | Me-3 (ppm) | Me-9 (ppm) |
|----------------------------------------------------|----------|-------------------|-------------------|------------|------------|
| 3 <i>H</i> -norpseudozoanthoxanthine ⁹⁷ | | 8,30 (d, 11,0 Hz) | 8,05 (d, 11,0 Hz) | 4,53 (s) | 2,97 (s) |
| 3 <i>H</i> -norpseudozoanthoxanthine ⁹⁹ | | 8,29 | 8,15 | 4,56 | 3,01 |
| Composé XVI | | 8,01 (d, 11,0 Hz) | 7,79 (d, 11,0 Hz) | 4,37 (s) | 2,87 (s) |

La fragmentation du pigment par spectrométrie de masse de ce composé n'a mis en évidence qu'une perte de $\Delta = 15,0$ uma (MS²) correspondant à un NH, la spectrométrie de masse n'a donc pas été suffisante pour élucider la structure de **XVI**. En revanche le spectre HMBC, grâce à des corrélations clés, a permis de confirmer que la molécule isolée était bien la 3*H*-norpseudozoanthoxanthine (**XVI**). En effet, les corrélations C-3a et C-2/Me-N-3 ont permis de placer le méthyle à δ_H 4,37 ppm (s) sur l'azote en position 3. Le deuxième méthyle à δ_H 2,87 ppm (s) a, quant à lui, été placé en position C-9 grâce aux corrélations HMBC entre ce méthyle et C-9a et C-8 (δ_C 131,1 et 134,5 ppm). Toutes les corrélations HMBC sont représentées sur la **Figure n°94**.



⁹⁹ Cariello, L. ; Crescenzi, S. ; Prota, G. ; Zanetti, L. *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 4191-4196.

IV.2.1.2. La famille des ecdystéroïdes

Les Δ^7 -6-cétostéroïdes polyhydroxylés, connus sous le nom général d'ecdystéroïdes, ont dans un premier temps été isolés à l'état de trace de plusieurs insectes et sont considérés comme des hormones de mue.¹⁰⁰ Ils ont ensuite été isolés de plantes, pour lesquelles ils jouent certainement un rôle écologique en affectant le métabolisme des insectes phytophages.¹⁰¹ Dans le milieu marin, les ecdystéroïdes sont également des hormones de mue isolées à l'état de trace de certains crustacés.¹⁰² Ils sont présents en plus grande quantité dans plusieurs zoanthaires tels que *Gerardia savaglia*, *Palythoa australae*, *Parazoanthus sp.* et *Zoanthus sp.*¹⁰³ ainsi que dans certains spongiaires tels que *Agelas dispar*, *Ptilocaulis spiculifer* et *Lotrochota birotulata*.¹⁰⁴

96

A ce jour, aucun ecdystéroïde n'a été référencé dans l'espèce *Parazoanthus axinellae*. L'étude chimique de *P. axinellae* nous a pourtant permis d'en isoler quatre : la 20-hydroxyecdysone (**XVII**), l'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (**XVIII**), l'acétate de 20-hydroxyecdysone-3-yle (**XIX**) et la viticostérone E (**XX**).

Même si ces quatre composés ne sont pas des molécules nouvelles, ils ont pour la première fois été isolés de l'espèce *P. axinellae*.

- **La 20-hydroxyecdysone (XVII) :**

Le composé **XVII** a été isolé sous la forme d'une huile jaune (3,4 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 503,3 $[M+Na]^+$. Le spectre RMN 1H a permis de reconnaître le squelette d'un ecdystéroïde grâce aux signaux caractéristiques des cinq méthyles à δ_H 0,89 (3H, s, H₃-18), 0,97 (3H, s, H₃-19), 1,20 (3H, s, H₃-21), 1,19 (3H, s, H₃-26) et 1,20 (3H, s, H₃-27) ppm, et surtout aux signaux caractéristiques des protons à δ_H 3,84 (1H, m, H-2), 3,95 (1H, m, H-3) et 5,81 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-7) ppm. Le spectre RMN COSY, sur lequel les corrélations clés H-7/H-5, H-7/H-9 et H-3/H-2 ont été identifiées, a permis de confirmer le squelette ecdystéroïde (**Figure n°95**).

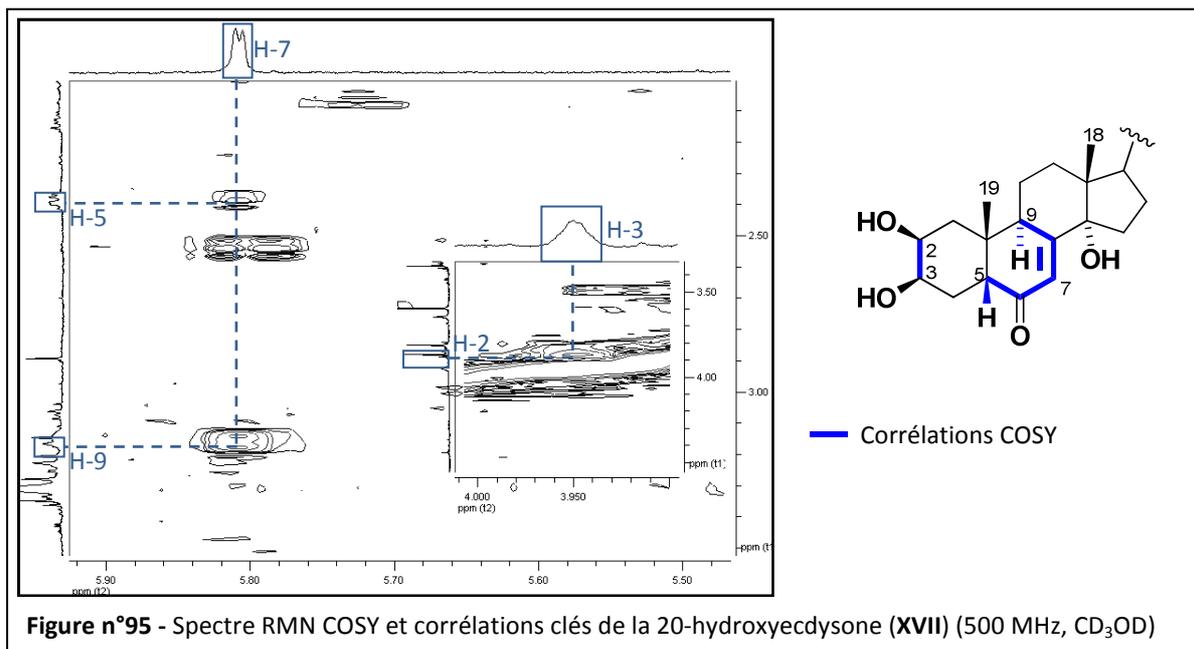
¹⁰⁰ Slama, K. *Phytoparasitica*, **1993**, 21, 3-8.

¹⁰¹ Hikino, H. ; Hikino, Y. In: *Fortschritte der chemie organischer naturstoffe*, ed. Wien, Springer-Verlag, **1970**, 256-312.

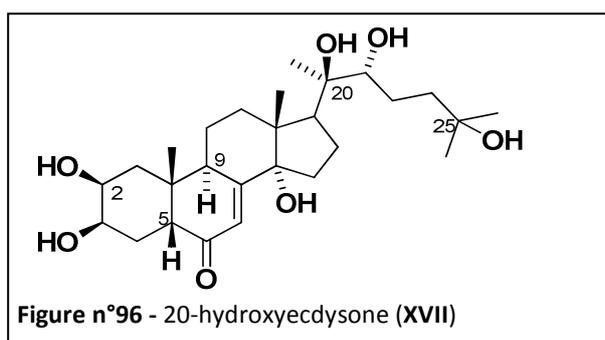
¹⁰² Goad L.J. In: *Marine natural product, chemical and biological perspectives*, New York Academic Press, **1978**, 75-8.

¹⁰³ Suksamrarn, A. ; Jankam, A. ; Tarnchompoo, B. ; Putchakarn, S. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1194-1197. Et références citées

¹⁰⁴ Constantino, V. ; Dell'Aversano, C. ; Fattorusso, E. ; Mangoni, A. *Steroids*, **2000**, 65, 138-142.



Une fois la famille de composé déterminée, la structure du composé **XVII** a été élucidée par comparaison avec la bibliographie : il s'agit de la 20-hydroxyecdysone.¹⁰⁵ Le tableau comparatif des signaux RMN du composé **XVII** et de la 20-hydroxyecdysone publiée, ainsi que les différentes corrélations COSY, nous ont permis de confirmer la structure de **XVII** (Tableau 16).



¹⁰⁵ Budesinsky, M. ; Vokac, K. ; Harmatha, J. ; Cvacka, J. *Steroids*, **2008**, 502-514.

Tableau 16 - RMN ^1H et ^{13}C et corrélations COSY du composé XVII (CD_3OD)

| n° | CH_n | Composé XVII | | | 20-hydroxyecdysone ¹⁰⁵ | |
|----|---------------|--------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | | δ_c | δ_H (m, J en Hz) | COSY | δ_c | δ_H (m, J en Hz) |
| 1 | CH_2 | 37,2 | 1,80 (m) 1,43 (m) | 1 β , 2 1 α , 2 | 37,33 | 1,79 1,43 |
| 2 | CH | 68,6 | 3,84 (m) | 1 α , 1 β , 3 | 68,68 | 3,84 (dt, 12,0 ; 4,2 ; 3,0) |
| 3 | CH | 68,5 | 3,95 (m) | 2, 4 α , 4 β | 68,50 | 3,94 (q, 3,0 ; 3,0 ; 3,0) |
| 4 | CH_2 | 32,7 | 1,74 (m) 1,69 (m) | 3, 4 β , 5 3, 4 α , 5 | 32,86 | 1,74 1,69 |
| 5 | CH | 51,7 | 2,38 (m) | 4 α , 4 β , 7 | 51,78 | 2,38 (dd, 13,2 ; 4,8) |
| 6 | C | 206,7 | - | - | 206,46 | - |
| 7 | CH | 122,1 | 5,81 (d, 2,5) | 5, 9 | 122,13 | 5,81 (d, 2,6) |
| 8 | C | 168,3 | - | - | 167,98 | - |
| 9 | CH | 35,1 | 3,15 (m) | 7, 11 α , 11 β | 35,07 | 3,15 (ddd, 11,3 ; 7,1 ; 2,6) |
| 10 | C | 39,3 | - | - | 39,26 | - |
| 11 | CH_2 | 21,4 | 1,81 (m) 1,70 (m) | 9, 11 β , 12 α , 12 β 9, 11 α , 12 α , 12 β | 21,48 | 1,81 1,70 |
| 12 | CH_2 | 32,4 | 2,13 (m) 1,88 (m) | 11 α , 11 β , 12 β , 18 11 α , 11 β , 12 α | 32,50 | 2,13 (td, 13,0 ; 13,0 ; 5,0) 1,88 |
| 13 | C | 48,5 | - | - | 48,60 | - |
| 14 | C | 85,3 | - | - | 85,21 | - |
| 15 | CH_2 | 31,7 | 1,97 (m) 1,60 (m) | 15 β , 16 α , 16 β 15 α , 16 α , 16 β | 31,78 | 1,97 1,60 |
| 16 | CH_2 | 21,5 | 1,98 (m) 1,73 (m) | 15 α , 15 β , 16 β , 17 15 α , 15 β , 16 α , 17 | 21,48 | 1,98 1,73 |
| 17 | CH | 50,5 | 2,39 (m) | 15 α , 15 β , 16 α , 16 β , 18 | 50,51 | 2,39 (t, 9,5 ; 9,5) |
| 18 | CH_3 | 18,1 | 0,89 (s) | 12 α , 17 | 18,06 | 0,891 (s) |
| 19 | CH_3 | 24,3 | 0,97 (s) | - | 24,41 | 0,968 (s) |
| 20 | C | 78,1 | - | - | 77,90 | - |
| 21 | CH_3 | 21,0 | 1,20 (s) | - | 21,04 | 1,199 (s) |
| 22 | CH | 78,4 | 3,32 (m) | 23a, 23b | 78,41 | 3,32 (dd, 10,6 ; 1,8) |
| 23 | CH_2 | 27,3 | 1,66 (m) 1,28 (m) | 22, 23b, 24a, 24b 22, 23a, 24a, 24b | 27,32 | 1,66 1,28 |
| 24 | CH_2 | 42,3 | 1,79 (m) 1,43 (m) | 23a, 23b, 24b 23a, 23b, 24a | 42,39 | 1,79 1,43 |
| 25 | C | 71,4 | - | - | 71,30 | - |
| 26 | CH_3 | 28,9 | 1,19(s) | - | 28,92 | 1,191 (s) |
| 27 | CH_3 | 29,6 | 1,20 (s) | - | 29,72 | 1,205 (s) |

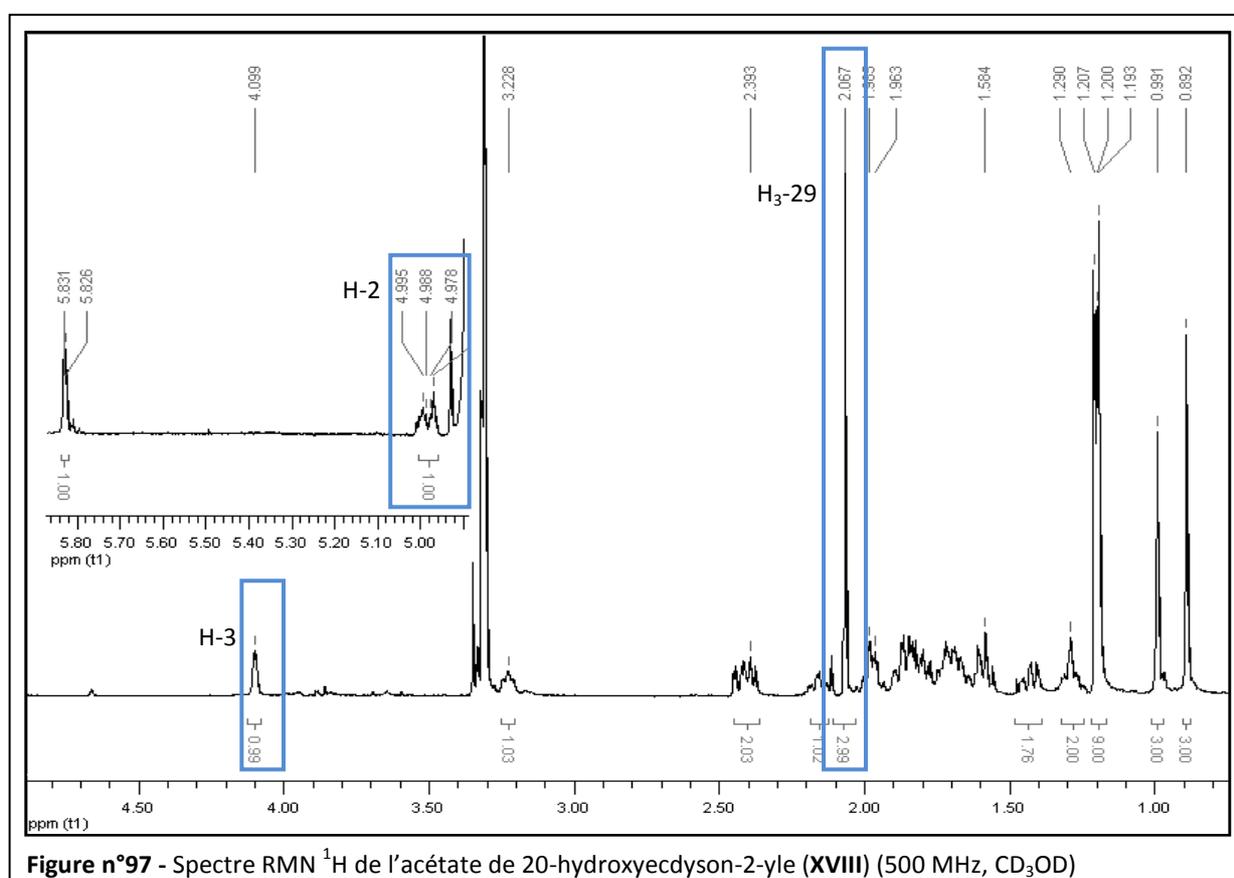
Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1966 en tant qu'hormone de mue de crustacé.¹⁰⁶ Elle a également été trouvée dans de nombreux plantes et insectes. Plus récemment, Searle *et al.* l'ont isolée de l'anémone *Parazoanthus sp.*¹⁰⁷

¹⁰⁶ Hampshire, F. ; Horn, D.H.S. *Chem. Commun. (London)*, **1966**, 37-38.

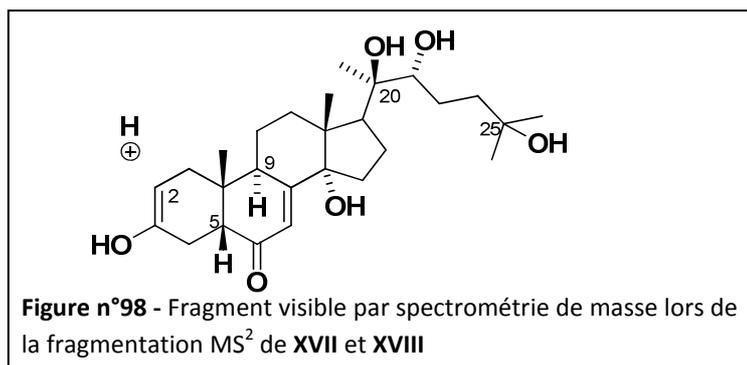
¹⁰⁷ Searle, P.A. ; Molinski, T.F. *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 264-268.

- L'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (XVIII) :

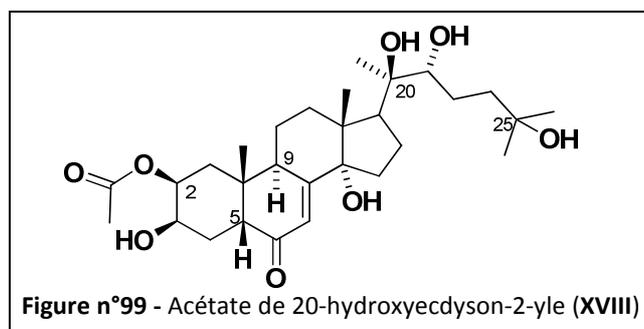
Le composé **XVIII** a été isolé sous la forme d'une huile jaune (2,1 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 545,3 $[M+Na]^+$. Son spectre RMN 1H est très semblable à celui de la 20-hydroxyecdysone (**XVII**). Cela nous a permis de classer ce composé parmi les ecdystéroïdes. Quelques différences ont cependant été relevées : les signaux correspondant aux protons H-2 (δ_H 4,98 (dt, $J = 12,0; 3,5$ Hz) ppm) et H-3 (δ_H 4,10 (m) ppm) sont plus déblindés que ceux de la 20-hydroxyecdysone (**XVII**) ; suggérant ainsi la présence d'un groupement attracteur aux alentours de ces deux protons. Nous avons également remarqué l'apparition d'un singulet à δ_H 2,07 (3H, H₃-29) ppm, pouvant correspondre au méthyle d'un acétate (**Figure n°97**).



De plus, la masse molaire du composé diffère de $\Delta = 42$ uma par rapport à celle de la 20-hydroxyecdysone (**XVII**), ce qui pourrait correspondre à un acétate. Lors de la fragmentation du composé par spectrométrie de masse (ESI- MS^2), deux pertes ont été observées : une de 18 uma, correspondant à la perte d' H_2O et une seconde de 60 uma. Ainsi, nous avons retrouvé le fragment déjà observé lors de la fragmentation de la 20-hydroxyecdysone (**XVII**) ($[M-H_2O+H]^+$), ce dernier est représenté sur la **Figure n°98**.



Toutes les analyses ont suggéré l'ajout d'un acétate en position 2 ou 3 par rapport à la 20-hydroxyecdysone (**XVII**), et, par comparaison avec la bibliographie, le composé isolé a été identifié comme étant l'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (**XVIII**).¹⁰⁵



Le tableau RMN comparant les signaux RMN du composé isolé avec ceux de la bibliographie peut être consulté dans la partie expérimentale de ce manuscrit (p.277).

Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1978 d'une plante, *Cyanotis arachnoidea*.¹⁰⁸ Elle a également été isolée d'un zoanthaire, *Zoanthus sp.*, en 2002.¹⁰⁹

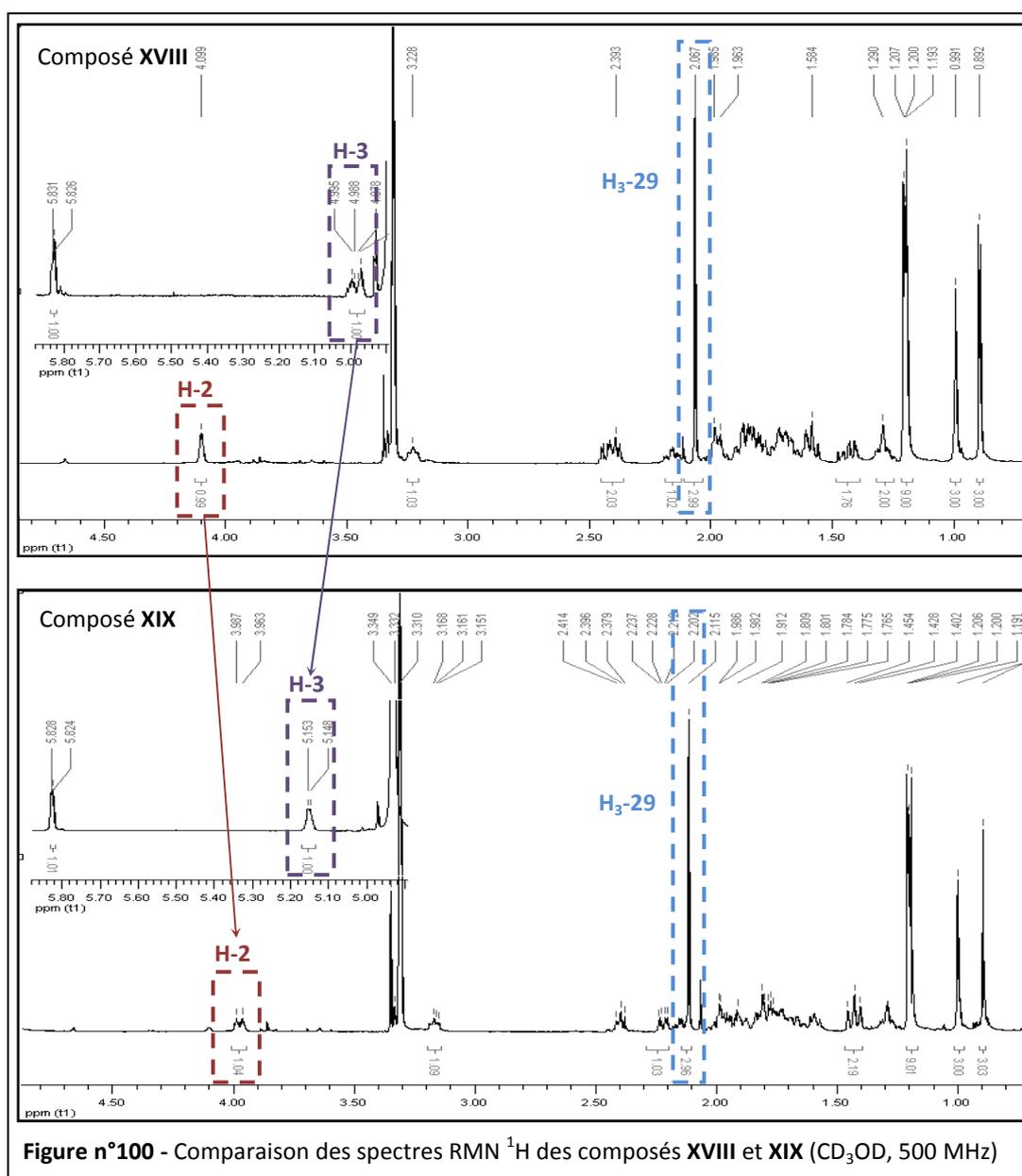
- **L'acétate de 20-hydroxyecdysone-3-yle (XIX) :**

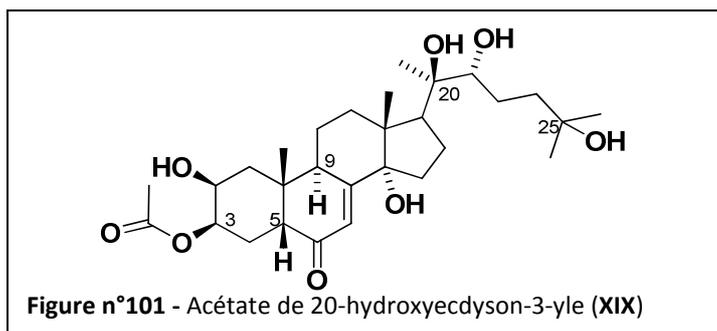
Le composé **XIX** a été isolé sous la forme d'une huile jaune (2,8 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 545,3 [M+Na]⁺. Le spectre RMN ¹H de ce composé est quasiment identique à celui de l'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (**XVIII**), les seules différences notables étant le déplacement chimique des signaux de H-2 à δ_H 3,97 (ddd, $J = 12,0 ; 4,0 ; 3,0$ Hz) ppm au lieu de 4,98 (dt, $J = 12,0 ; 3,5$ Hz) ppm, et de H-3 à δ_H 5,16 (brd, $J = 2,5$ Hz) au lieu de 4,10 (m) ppm. Comme sur le spectre RMN ¹H de l'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (**XVIII**), le singulet correspondant au méthyle d'un acétate est présent (δ_H 2,11 (3H, H₃-29) ppm) (**Figure n°100**). La fragmentation de ce composé par

¹⁰⁸ Nien, S.-L. ; Hsu, H.-Y. ; Ho, M. ; Yo, Y.-C. *Acta Chim. Sinica*, **1978**, 36, 137-141.

¹⁰⁹ Suksamrarn, A. ; Jankam, A. ; Tarnchompoo, B. ; Putchakarn, S. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1194-1197.

spectrométrie de masse a fournis les mêmes fragments que ceux obtenus avec l'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (**XVIII**) : $[M-H_2O+H]^+$ et $[M-C_2H_3O+H]^+$. La différence de déplacement chimique des signaux de H-2 et H-3, la présence d'un singulet correspondant à un méthyle d'acétate et les fragments identiques à ceux de **XVIII** ont permis de supposer que le composé isolé était l'acétate de 20-hydroxyecdysone-3-yle (**XIX**). En comparant les signaux en RMN 1H de la molécule isolée avec ceux de l'acétate de 20-hydroxyecdysone-3-yle décrit dans la bibliographie, cette structure a été confirmée.¹⁰⁵ Le tableau RMN comparant les signaux RMN du composé isolé à ceux de la bibliographie est présent dans la partie expérimentale (p.279).





Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1984 d'une sauterelle, *Locusta migratoria*, lors d'une étude sur le métabolisme de l'ecdysone des larves et des adultes de la sauterelle.¹¹⁰

- la viticostérone E (XX) :

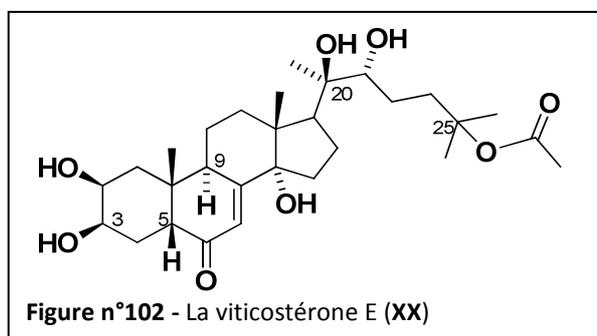
Le composé **XX** a été isolé sous la forme d'une huile jaune (1,1 mg) dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 545,3 $[M+Na]^+$. Son spectre RMN 1H ressemble beaucoup à ceux des acétates de 20-hydroxyecdysone-2- et 3-yles (**XVIII-XIX**) avec la présence d'un singulet attribué au méthyle d'un acétate à δ_H 1,96 (3H, s, H₃-29) ppm. Toutefois les singulets des méthyles en position 26 et 27 (respectivement δ_H 1,41 (3H, s) et 1,48 (3H, s) ppm) sont plus déblindés que dans **XVIII** et **XIX**, ce qui a permis de supposer la présence d'un groupement attracteur proche de ces méthyles qui n'était pas présent à cette position pour les acétates de 20-hydroxyecdysone-2- et 3-yles. Les signaux RMN des protons H-2 et H-3 (respectivement à δ_H 3,84 (1H, m) et 3,95 (1H, m) ppm) sont les mêmes que dans ceux de la 20-hydroxyecdysone (**XVII**), ce qui a indiqué que l'acétate de la molécule isolée n'était pas fixé ni en C-2, ni en C-3. La masse molaire et la forte similitude du spectre RMN 1H avec ceux des acétates **XVIII** et **XIX** déjà isolés ont laissé supposer que le composé isolé faisait partie des acétates de 20-hydroxyecdysone-yles. La comparaison de son spectre RMN 1H avec les acétates de 20-hydroxyecdysone-yles connus a montré une forte corrélation des signaux de la molécule et ceux de l'acétate de 20-hydroxyecdysone-25-yle, nommé viticostérone E (**XX**) (**Tableau 17**).¹¹¹ Les signaux les plus éloignés des données bibliographiques de la viticostérone E (**XX**), analysée dans la pyridine- d_5 , sont ceux des méthyles de la molécule. Cependant, la comparaison avec la même molécule analysée dans le chloroforme- d , à δ_H 0,85 (3H, s, CH₃-18), 0,97 (3H, s, H₃-19), 1,20 (3H, s, H₃-21), 1,40 (3H, s, H₃-26), 1,44 (3H, s, H₃-27) et 1,95 (3H, s, H₃-29) ppm, a confirmé la structure de **XX**. Ainsi, la molécule isolée a été identifiée en tant que la viticostérone E (**XX**).

¹¹⁰ Modde, J.-F. ; Lafont, R. ; Hoffmann, J.A. *Int. Invertebr. Reprod. Develop.*, **1984**, 7, 161-183.

¹¹¹ Rimpler, H. *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 5, 329-333.

Tableau 17 - Comparaison des signaux RMN ^1H et ^{13}C du composé **XX** (CD_3OD) et de la viticostérone E ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

| Composé XX | | | Viticostérone E ¹¹¹ | Composé XX | | | Viticostérone E ¹¹¹ |
|------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| n° | CH _n | δ_{H} (m, J en Hz) | δ_{H} (m, J en Hz) | n° | CH _n | δ_{H} (m, J en Hz) | δ_{H} (m, J en Hz) |
| 1 | CH ₂ | 1,88 (m) 1,43 (m) | 1,85 1,40 | 16 | CH ₂ | 2,05 (m) 1,75 (m) | 2,00 1,72 |
| 2 | CH | 3,84 (m) | 3,86 (m) | 17 | CH | 2,37 (t, 8,0 Hz) | 2,33 (m) |
| 3 | CH | 3,95 (m) | 4,02 (m) | 18 | CH ₃ | 0,89 (s) | 1,20 (s) |
| 4 | CH ₂ | 1,79 (dd, 13,0 ; 4,0) 1,60 (m) | 1,80 1,60 | 19 | CH ₃ | 0,97 (s) | 1,07 (s) |
| 5 | CH | 2,38 (dd, 13,0 ; 5,0) | 2,43 (dd) | 20 | C | - | - |
| 6 | C | - | - | 21 | CH ₃ | 1,19 (s) | 1,60 (s) |
| 7 | CH | 5,81 (d, 2,5) | 5,84 (d, 2,5) | 22 | CH | 3,34 (m) | 3,37 (d) |
| 8 | C | - | - | 23 | CH ₂ | 1,66 (m) 1,29 (m) | ? 1,20 |
| 9 | CH | 3,16 (m) | 2,99 (m) | 24 | CH ₂ | 2,15 (m) 1,45 (m) | 2,17 ? |
| 10 | C | - | - | 25 | C | - | - |
| 11 | CH ₂ | 1,82 (m) 1,72 (m) | 1,82 1,70 | 26 | CH ₃ | 1,41(s) | 1,45 (s) |
| 12 | CH ₂ | 2,15 (m) 1,91 (m) | ? ? | 27 | CH ₃ | 1,48 (s) | 1,52 (s) |
| 13 | C | - | - | 28 | C | - | - |
| 14 | C | - | - | 29 | CH ₃ | 1,96 (s) | 1,95 (s) |
| 15 | CH ₂ | 1,93 (m) 1,60 (m) | ? ? | | | | |



La viticostérone E (**XX**) a été isolé pour la première fois en 1969 d'une plante, *Vitex megapotamica* (Verbenaceae),¹¹¹ et a été le premier ecdystéroïde naturel à avoir été synthétisé.¹¹² Elle a également été isolée d'un zoanthaire, *Zoanthus sp.*, en 2002.¹⁰⁹

¹¹² Zatsny, I.L. ; Gorovits, M.B. ; Abubakirov, N.K. *Khim. Prir. Soedin.*, **1973**, 175-178.

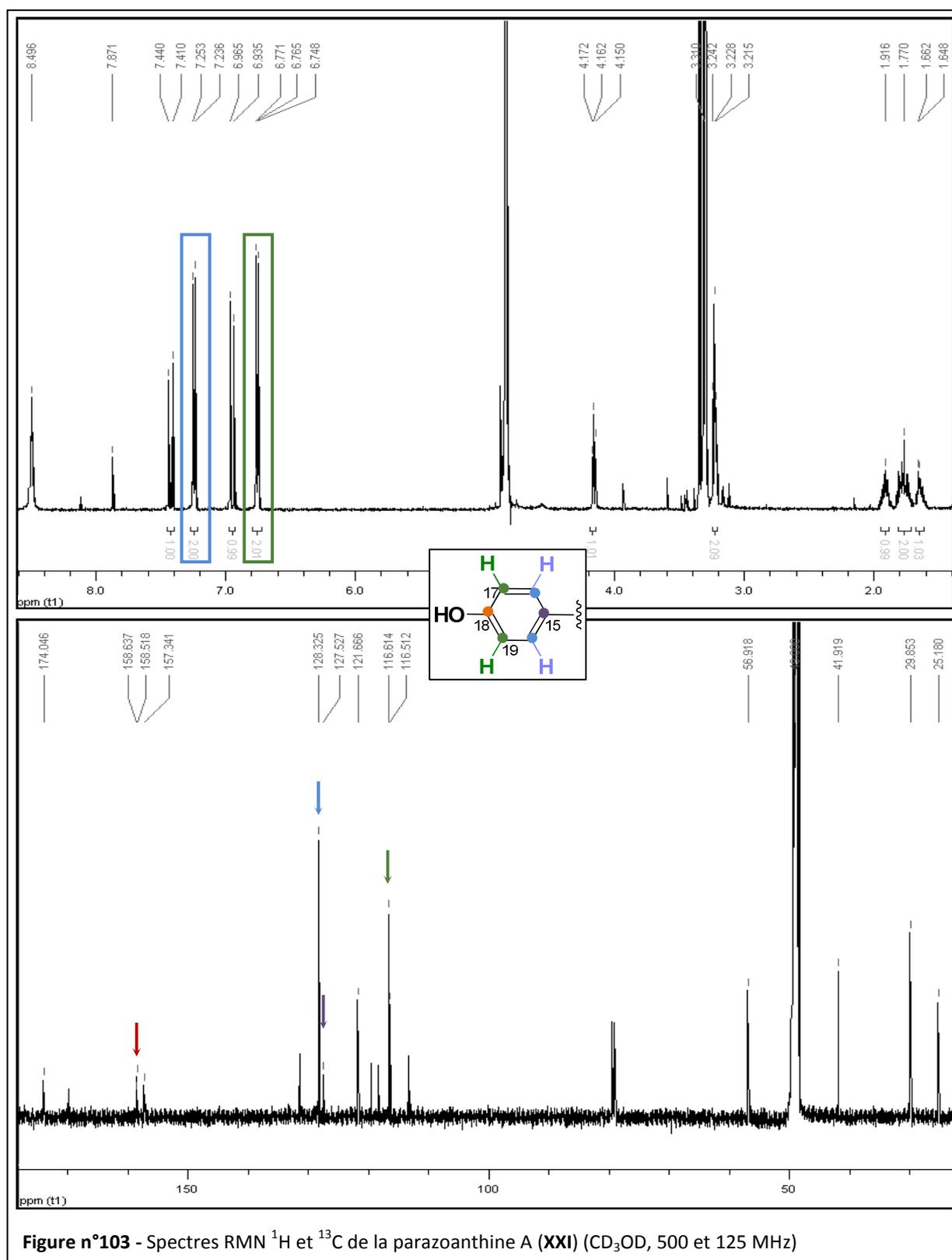
IV.2.2. La famille des parazoanthines

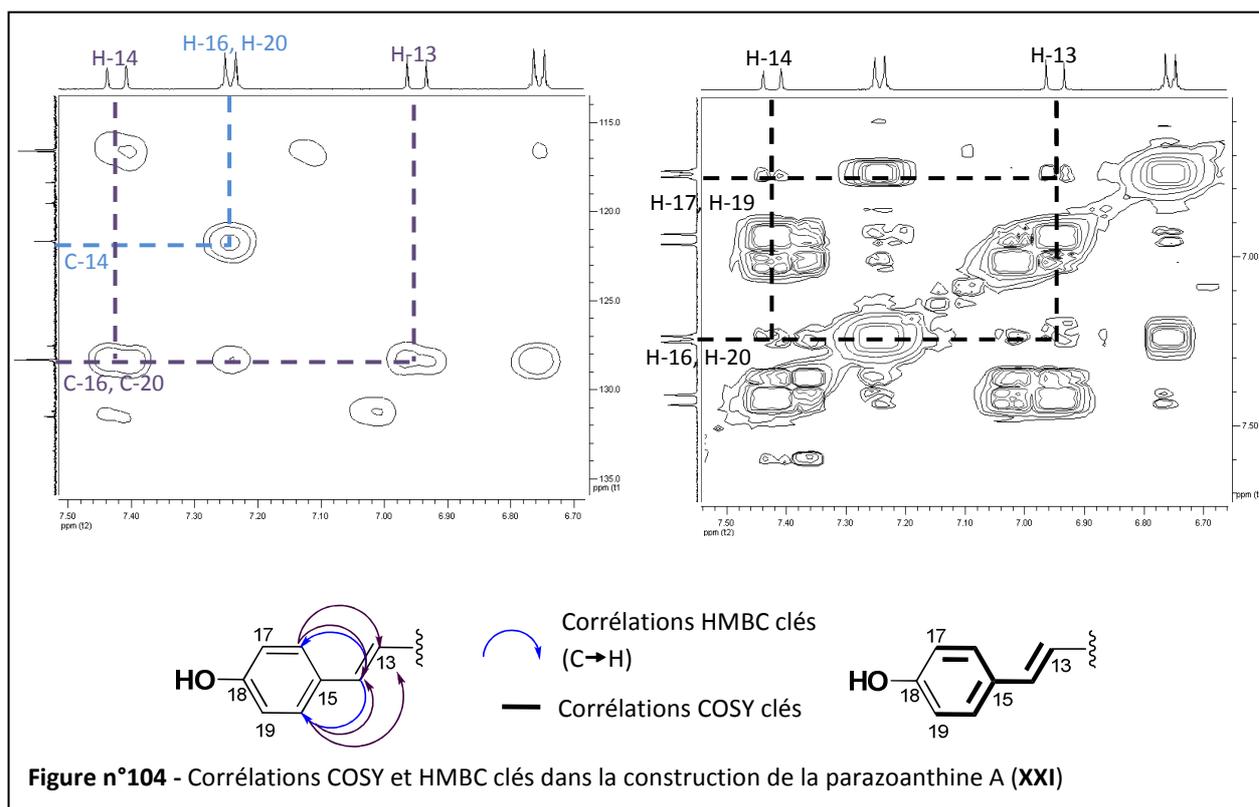
En plus des composés isolés ci-dessus, l'étude de *Parazoanthus axinellae* nous a permis d'identifier une nouvelle famille d'alcaloïdes, les parazoanthines, qui possède un noyau hydantoïne rare car disubstitué en position N-3 et C-5. Cette famille de composés a été testée en tant qu'agent cytotoxique (lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231, HT29 et A549) et antipaludique (FcB1) mais n'a montré aucune activité à des concentrations inférieures ou égales à 10 μ M.

IV.2.2.1. La parazoanthine A (XXI)

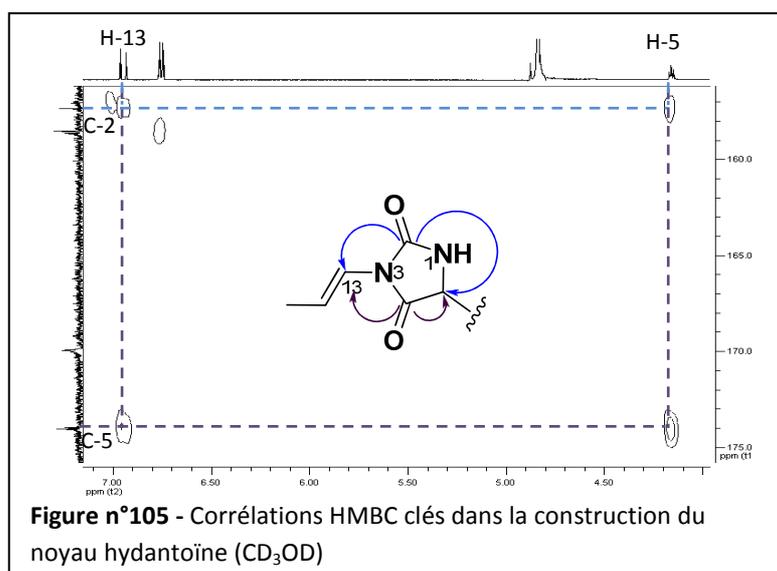
Le premier composé isolé et caractérisé de cette nouvelle famille a été nommé parazoanthine A (XXI). Ce composé a été obtenu sous la forme d'une huile incolore (1,3 mg) dont la formule moléculaire, déduite par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS), est $C_{15}H_{19}N_5O_3$ (m/z 318,1563 $[M+H]^+$, Δ +0,8 ppm). Des neuf insaturations de la molécule, quatre ont été attribuées à un phénol *para*-substitué grâce aux signaux RMN 1H et ^{13}C caractéristiques (Figure n°103). En effet, les signaux des protons aromatiques du spectre RMN 1H ont permis d'identifier deux paires de protons équivalents à δ_H 7,25 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-16 et H-20) et 6,76 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-17 et H-19) ppm. Le spectre RMN ^{13}C a confirmé la présence d'un phénol *para*-substitué, d'après les signaux caractéristiques aux déplacements chimiques suivants : δ_C 127,5 (C-15), 128,3 (C-16 et C-20), 116,6 (C-17 et C-19), et 158,6 (C-18) ppm.

Une double liaison disubstituée a également été mise en évidence par le spectre RMN ^{13}C (δ_C 116,5 (C-13) et 121,7 (C-14) ppm). Les corrélations COSY H-14/H-16/H-17/H-19/H-20 et H-13/H-16/H-17/H-19/H-20, ainsi que les corrélations HMBC C-14/H-16/H-20, C-16/H-13/H-14 et C-20/H-13/H-14, ont permis de relier cette double liaison au cycle phénol (Figure n°104). La constante de couplage vicinale $^3J_{H-13/H-14} = 15,0$ Hz a indiqué que cette double liaison disubstituée était de configuration *E*.

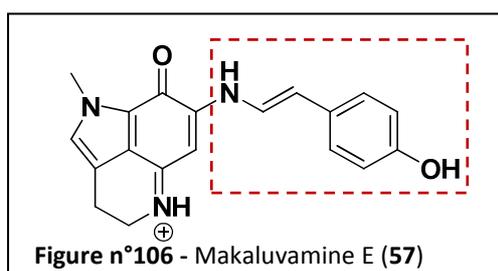




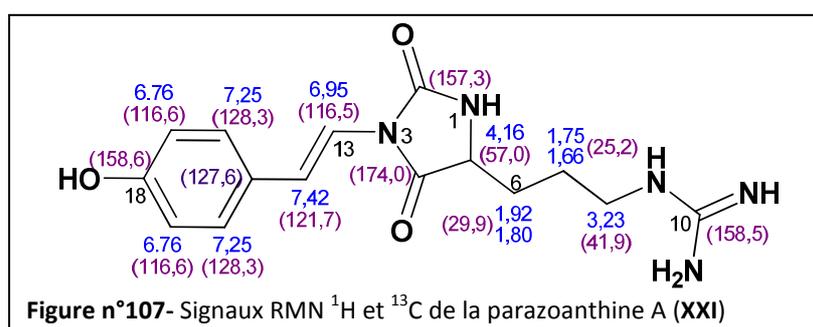
Le signal fortement déblindé de H-13, à δ_H 6,95 (d, $J = 15$ Hz) ppm, suggère la présence d'un atome électro-attracteur, tel que l'azote, de l'autre côté de la double liaison. Le spectre RMN ^{13}C a également permis d'identifier deux fonctions carbonyles dans la molécule à δ_C 157,3 (C-2) et 174,0 (C-4) ppm. Par les corrélations HMBC C-4/H-5/H-13 et C-2/H-5/H-13 et les déplacements chimiques des signaux des deux carbonyles, la seule structure possible est un noyau hydantoïne, relié à C-13 par l'azote en position 3 (**Figure n°105**).



Les signaux RMN des carbones C-13 et C-14 (δ_c 116,5 (C-13) et 121,7 (C-14) ppm) n'ont pas été ceux théoriquement attendus. En effet, à cause de l'effet mésomère donneur de N-3, le signal de C-14 devrait être plus blindé que celui du C-13 alors que nous avons observé le phénomène inverse. Ceci peut être expliqué par la diminution de l'effet donneur de l'azote lié à la présence des deux carbonyles en α de N-3 qui ont un effet mésomère attracteur et par la participation d'un effet mésomère donneur opposé engendré par le groupement *para*-hydroxyle. Le même phénomène a été observé sur la makaluvamine E (**57**) qui présente une structure proche du fragment phénol-hydantoïne de la parazoanthine A (**XXI**).¹¹³



Enfin, les corrélations COSY H-5/H₂-6/H₂-7/H₂-8 ont permis de construire une chaîne alkyle en C₄ et de la lier au noyau hydantoïne en C-5. La dernière insaturation de la molécule a été attribuée à une fonction guanidine liée à la chaîne alkyle en position C-8 d'après la corrélation HMBC C-10/H₂-8. La présence de cette guanidine a également été confirmée par spectrométrie de masse MS² par la présence du fragment à m/z 260,1 [M+H-CH₄N₃]⁺. La structure de la parazoanthine A (**XXI**) a ainsi été entièrement caractérisée (Figure n° 107)

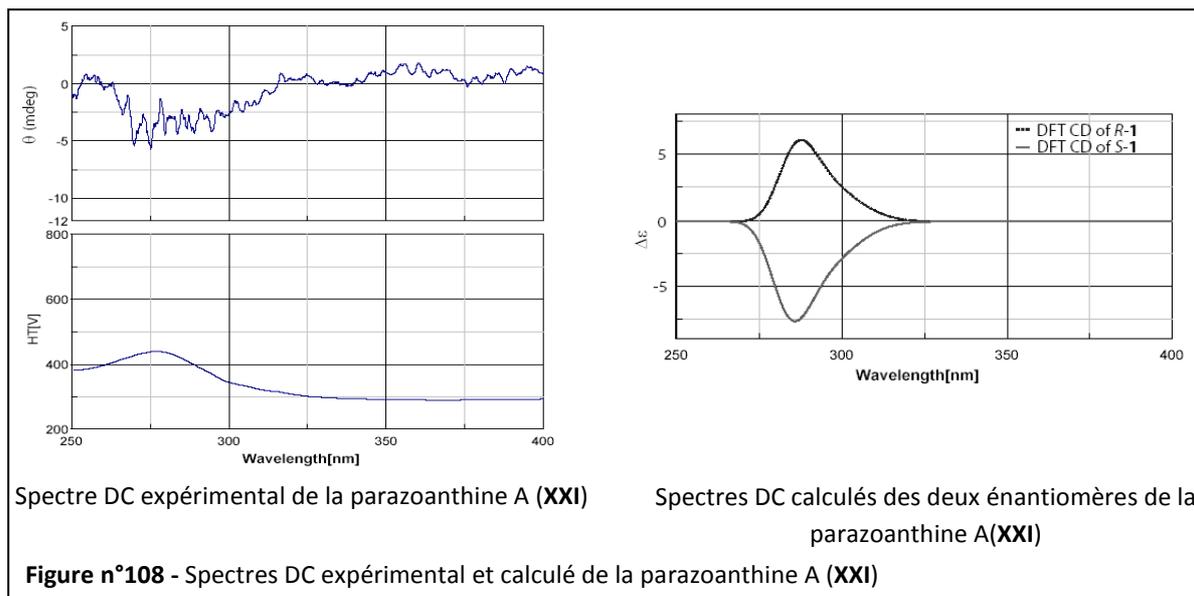


Pour déterminer la configuration absolue de C-5 et grâce à la fonction carbonyle adjacente en C-4, nous avons utilisé une méthode de calcul de spectres de dichroïsme circulaire par mécanique quantique afin de comparer le spectre DC expérimental avec ceux des deux stéréo-isomères

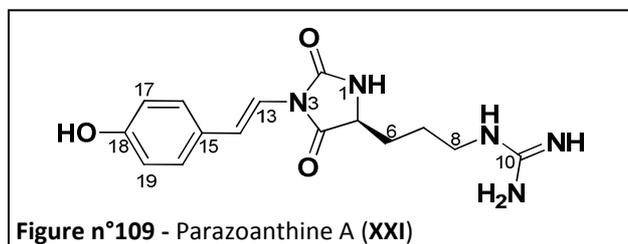
¹¹³ Radisky, D.C. ; Radisky, E.S. ; Barrows, L.R. ; Copp, B.R. ; Kramer, R.A. ; Ireland, C.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 1632-1638.

possibles calculés (calculs réalisés par Grégory Genta-Jouve).¹¹⁴ L'analyse conformationnelle des deux énantiomères possibles a été évaluée par la méthode DFT (Density Functional Theory) au niveau B3LYP/6-31++G(d,p). Pour chaque conformère, le spectre DC a été calculé en utilisant l'approche TDDFT B3LYP/6-31++G(d,p).^{115,116} Les spectres DC ainsi obtenus ont été comparés avec le spectre DC expérimental de la parazoanthine A (**XXI**). Le spectre DC expérimental, présentant un effet Cotton négatif à 281 nm, est quasiment superposable au spectre calculé de la (*S*)-(**XXI**) (**Figure n°108**).

108



La configuration absolue de la parazoanthine A (**XXI**) a ainsi été établie comme étant *S* (**Figure n°109**), en adéquation avec l'effet Cotton négatif déjà observé pour les hydantoïnes d'acides aminés de configuration *S*.¹¹⁷



¹¹⁴ Bringmann, G. ; Bruhn, T. ; Maksimenka, K. ; Hemberger, Y. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2717-2727.

¹¹⁵ Lee, C. ; Yang, W. ; Parr, R.G. *Phys. Rev. B*, **1988**, 37, 785-789.

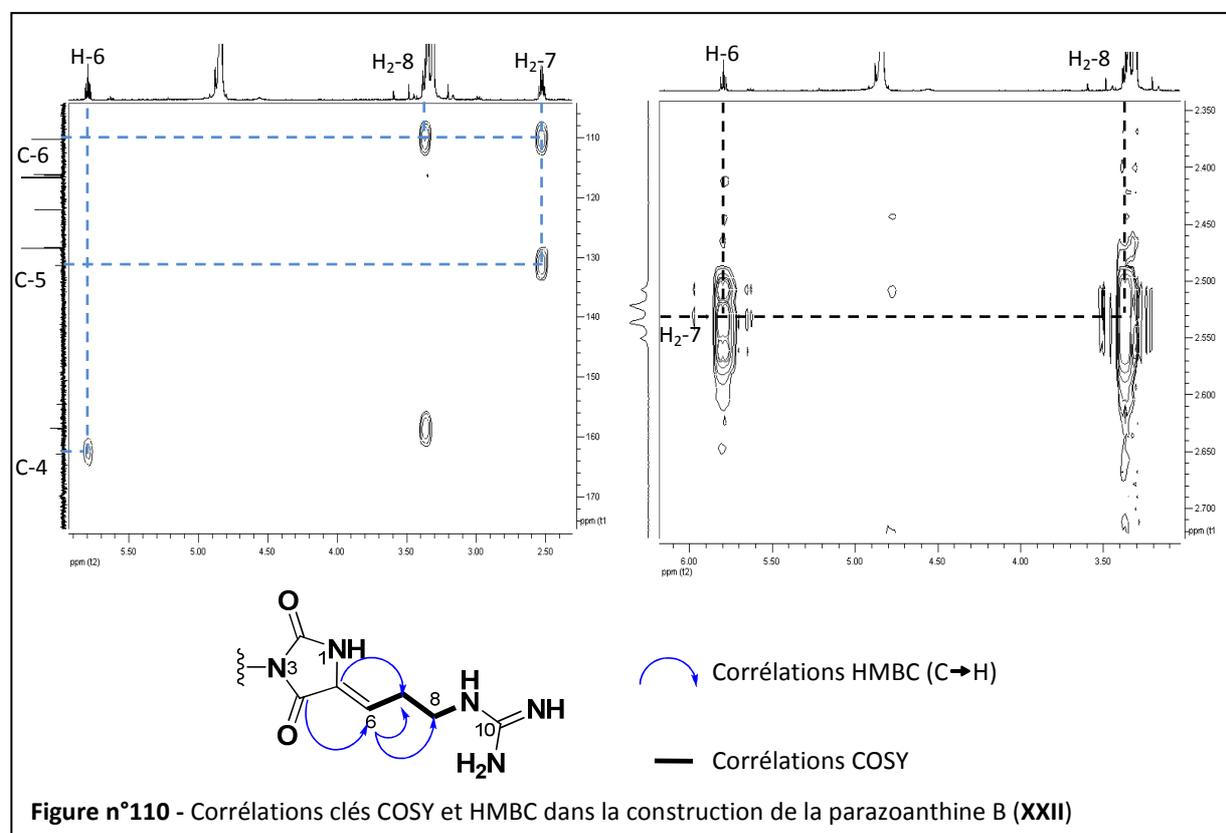
¹¹⁶ Hariharan, P.C. ; Pople, J.A. *Theoret. Chim. Acta.*, **1973**, 28, 213-222.

¹¹⁷ Suzuki, T. ; Igarashi, K. ; Hase, K. ; Tuzimura, K. *Agr. Biol. Chem.*, **1973**, 37, 411-416.

IV.2.2.2. La parazoanthine B (XXII)

Le deuxième composé nouveau isolé a été nommé parazoanthine B (XXII). Il a été obtenu sous la forme d'une huile incolore (2,4 mg) dont la formule moléculaire, déduite par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS), est $C_{15}H_{17}N_5O_3$ (m/z 316,1393 $[M+H]^+$, Δ -3,6 ppm). Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé XXII sont très proches de ceux de la parazoanthine A (XXI), les seules différences notables sont l'apparition d'une insaturation supplémentaire à δ_H 5,80 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-6) ppm, δ_C 131,3 (C-5) et 110,2 (C-6) ppm engendrant la disparition du triplet qui correspond au proton H-5 (δ_H 4,16 (t, $J = 5,5$ Hz) ppm) de la parazoanthine A (XXI). La double liaison, aisément placée en C-5/C-6, a été confirmée par les corrélations HMBC C-4/H-6, C-5/H-8 et C-6/H₂-7/H₂-8 ainsi que par les corrélations COSY H-6/H₂-7/H₂-8 (Figure n°110).

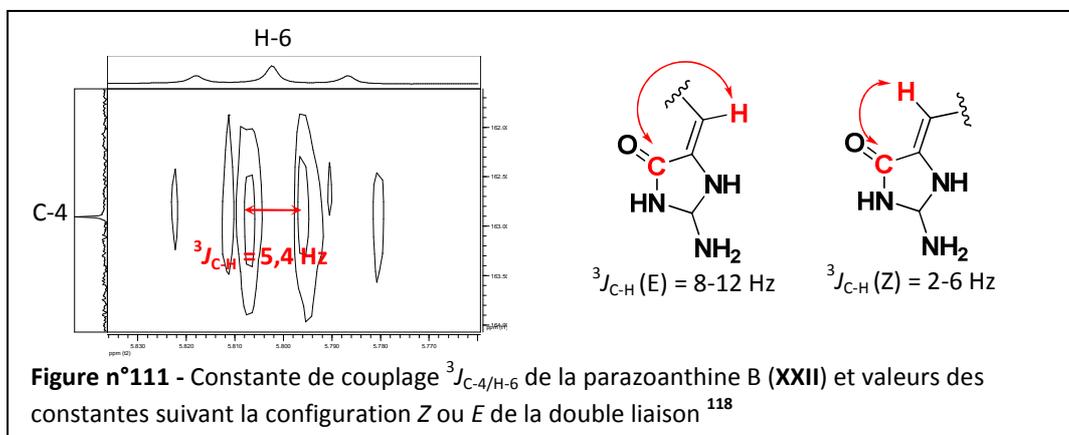
109



En se basant sur le travail de Jackse *et al.*,¹¹⁸ la configuration de la double liaison exocyclique trisubstituée a été déterminée par la mesure de la constante de couplage $^3J_{C-4/H-6}$ obtenue par une expérience HMBC non découplée 1H - ^{13}C . En effet, les auteurs ont montré que les doubles liaisons exo fixées sur un noyau imidazolone de configuration *cis* (isomères *Z*) possèdent une constante de couplage $^3J_{C-H}$ comprise entre 2 et 6 Hz alors que dans le cas d'une configuration *trans* (isomères *E*) cette constante comprise entre 8 et 12 Hz (Figure n°111). Dans le cas du composé XXII, la constante

¹¹⁸ Jakse, R. ; Recnik, S. ; Svete, J. ; Golobic, A. ; Golic, L. ; Stanovnik, B. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8395-8403.

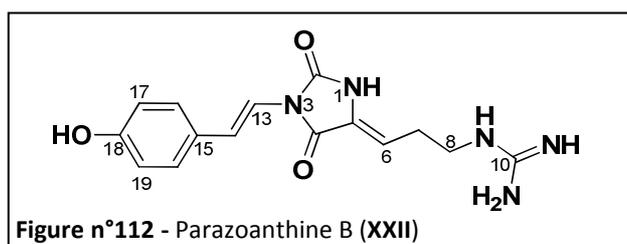
de couplage de 5,4 Hz implique une configuration *cis* entre H-6 et C-4, ce qui induit une double liaison de configuration Z.



La parazoanthine B (XXII) a ainsi été entièrement caractérisée (**Figure n°112**). Les signaux RMN 1H et ^{13}C ainsi que les corrélations COSY et HMBC de la molécule sont indiqués dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 - RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) (CD_3OD) et corrélations COSY et HMBC de la parazoanthine B (XXII)

| n° | δ_C | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 2 | 154,5 | C | - | - | 13 |
| 4 | 162,8 | C | - | - | 13, 6 |
| 5 | 131,3 | C | - | - | 7 |
| 6 | 110,2 | CH | 5,80 (t ; 8,0) | 7 | 7, 8 |
| 7 | 27,4 | CH ₂ | 2,53 (q ; 8,0 ; 15,5) | 6, 8 | 8 |
| 8 | 41,2 | CH ₂ | 3,37 (m) | 7 | 6, 7 |
| 10 | 158,8 | C | - | - | 8 |
| 13 | 116,2 | CH | 7,00 (d ; 15,0) | 14, 16, 17, 19, 20 | 14 |
| 14 | 121,9 | CH | 7,44 (d ; 15,0) | 13, 16, 17, 19, 20 | 16, 17, 19, 20 |
| 15 | 128,3 | C | - | - | 14, 16, 17, 19, 20 |
| 16 | 128,4 | CH | 7,26 (d ; 8,5) | 13, 14, 17, 19 | 13, 14, 20 |
| 17 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 13, 14, 16, 20 | 19 |
| 18 | 158,5 | C | - | - | 16, 17, 19, 20 |
| 19 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 13, 14, 16, 20 | 17 |
| 20 | 128,4 | CH | 7,26 (d ; 8,5) | 13, 14, 17, 19 | 14, 13, 16 |



IV.2.2.3. La parazoanthine C (XXIV)

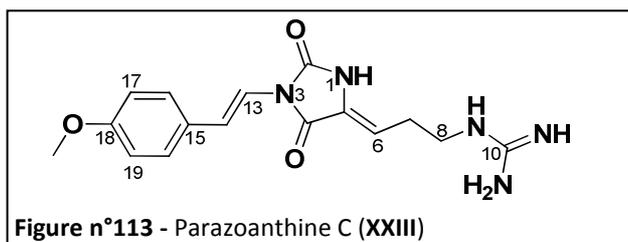
Le composé **XXIII**, nommé parazoanthine C, a été isolé sous la forme d'une huile incolore (1,4 mg) dont la formule moléculaire, déduite par HRESIMS, est $C_{16}H_{19}N_5O_3$ (m/z 330,1564 $[M+H]^+$, Δ - 0,3 ppm). Les spectres RMN 1H et ^{13}C sont très proches de ceux de la parazoanthine B (**XXII**). Comme sur le spectre RMN ^{13}C de la parazoanthine B (**XXII**), les signaux caractéristiques de la double liaison exocyclique C-5/C-6 sont présents à δ_c 131,3 (C-5) et 110,3 (C-6) ppm.

Le spectre de masse du composé **XXIII** indique une différence de 14 uma par rapport la parazoanthine B (**XXII**) qui pourrait correspondre à l'ajout d'un méthyle. Un groupement méthoxy à δ_H 3,80 (s, 3H, H_3 -21) ppm, absent du spectre RMN 1H de la parazoanthine B (**XXII**) est mis en évidence. La corrélation HMBC C-18/ H_3 -21 a permis de placer ce groupement méthoxy sur le carbone en position C-18 à la place du *para*-hydroxyle de la parazoanthine B (**XXII**). Les autres signaux RMN ayant des déplacements chimiques très similaires à ceux de la parazoanthine B (**XXII**), la configuration de la double liaison C-5/C-6 a été supposée Z. La configuration E de la double liaison C-13/C-14 a été déduite de la constante de couplage vicinale $^3J_{H-13/H-14} = 15,0$ Hz. La parazoanthine C (**XXIII**) est ainsi entièrement caractérisée (**Figure n°113**). Les signaux RMN 1H et ^{13}C de la molécule sont indiqués dans le **Tableau 19**.

111

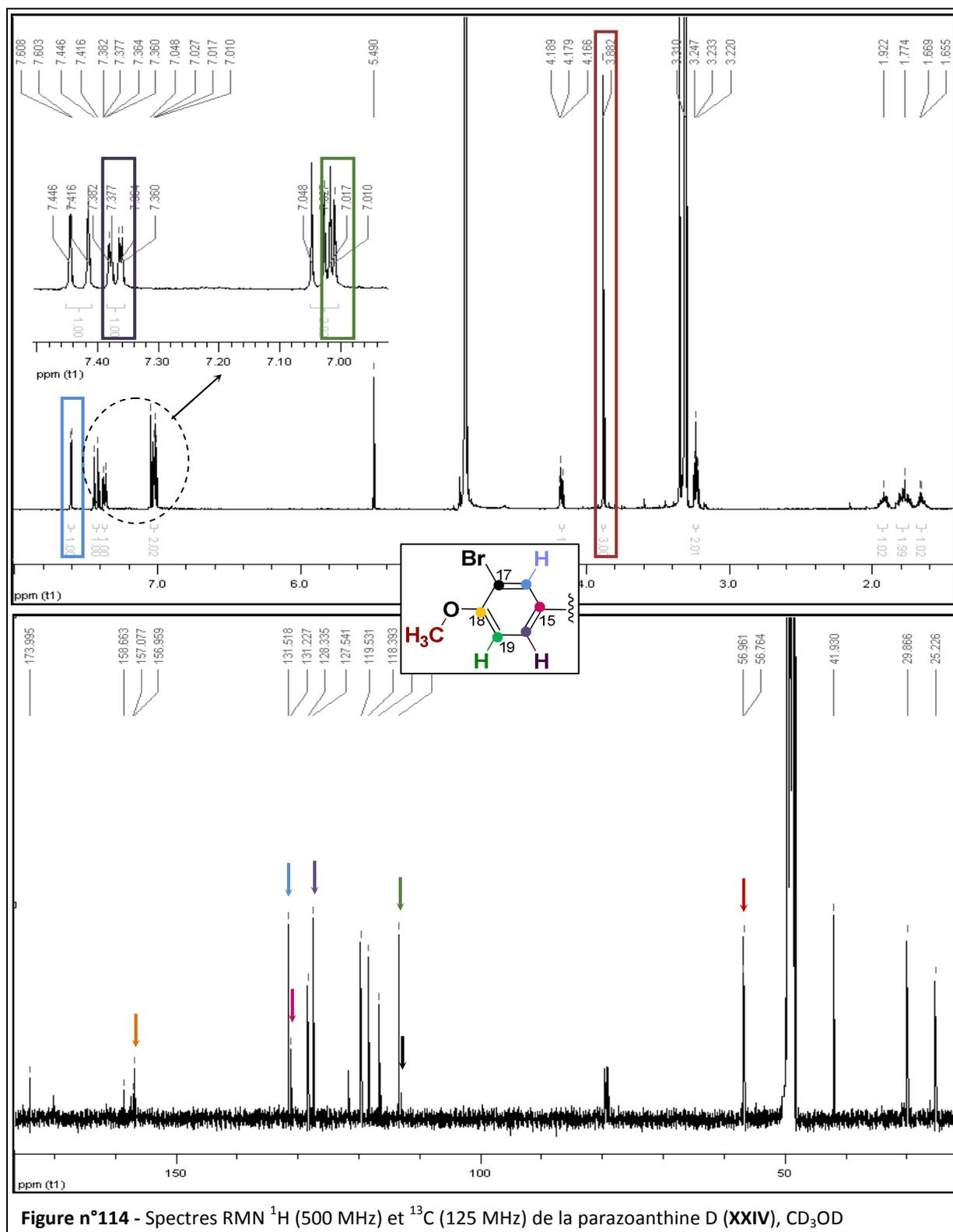
Tableau 19 – RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la parazoanthine C (**XXIII**), CD_3OD

| n° | δ_c | CH_n | δ_H (m, J en Hz) |
|----|------------|--------|-------------------------|
| 2 | 154,5 | C | - |
| 4 | 162,9 | C | - |
| 5 | 131,3 | C | - |
| 6 | 110,3 | CH | 5,80 (t, 8,0) |
| 7 | 27,4 | CH_2 | 2,57 (q, 8,0; 7,0) |
| 8 | 41,3 | CH_2 | 3,37 (t, 7,0) |
| 10 | 158,8 | C | - |
| 13 | 116,9 | CH | 7,05 (d, 15,0) |
| 14 | 121,5 | CH | 7,47 (d, 15,0) |
| 15 | 129,5 | C | - |
| 16 | 128,3 | CH | 7,36 (d, 8,5) |
| 17 | 115,3 | CH | 6,90 (d, 8,5) |
| 18 | 161,1 | C | - |
| 19 | 115,3 | CH | 6,90 (d, 8,5) |
| 20 | 128,3 | CH | 7,36 (d, 8,5) |
| 21 | 55,7 | CH_3 | 3,80 (s) |

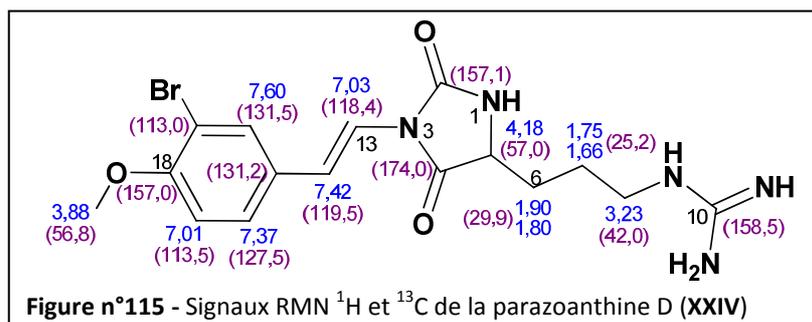


IV.2.2.4. La parazoanthine D (XXIV)

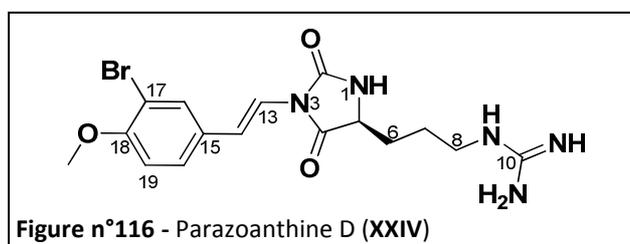
Le composé nommé parazoanthine D (**XXIV**) a été isolé sous la forme d'une huile incolore (1,2 mg) dont le pic pseudomoléculaire, à m/z 410,1 et 412,1 (1:1, $[M+H]^+$), est caractéristique des molécules monobromées (cf. **Tableau 13**, Pic 8). La formule brute de ce composé, déterminée par HRESIMS, est $C_{16}H_{21}N_5O_3Br$ (m/z 410,08203 $[M+H]^+$, Δ -0,5 ppm) Les spectres RMN 1H et ^{13}C sont semblables à ceux de la parazoanthine A (**XXI**) suggérant son appartenance à la famille des parazoanthines isolées ci-dessus. Le groupement méthoxy, visible sur le spectre RMN 1H à δ_H 3,88 (3H, s, H₃-21) ppm, était déjà présent dans la parazoanthine C (**XXIII**) et comme pour cette dernière, une corrélation HMBC C-18/H₃-21 a permis de le placer en position C-18. Les signaux RMN correspondant aux protons du benzène sont perturbés par rapport à ceux des parazoanthines décrites ci-dessus (**Figure n°114**), ce qui est en faveur de l'ajout de l'atome de brome sur ce cycle. D'après les signaux caractéristiques retrouvés sur le spectre RMN ^{13}C à δ_C 113,0 (C-17), 131,5 (C-16) et 157,0 (C-18) ppm, le brome a été placé en position *ortho* (**Figure n°114**).



La parazoanthine D (**XXIV**) a ainsi été déterminée, les signaux RMN ^1H et ^{13}C de cette molécule sont représentés sur la **Figure n°115**. Les spectres RMN ainsi que le tableau des différents signaux RMN et corrélations HMBC de la parazoanthine D (**XXIV**) sont placés dans la partie expérimentale de ce manuscrit (p.291).



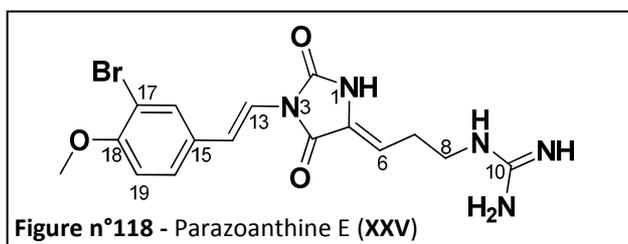
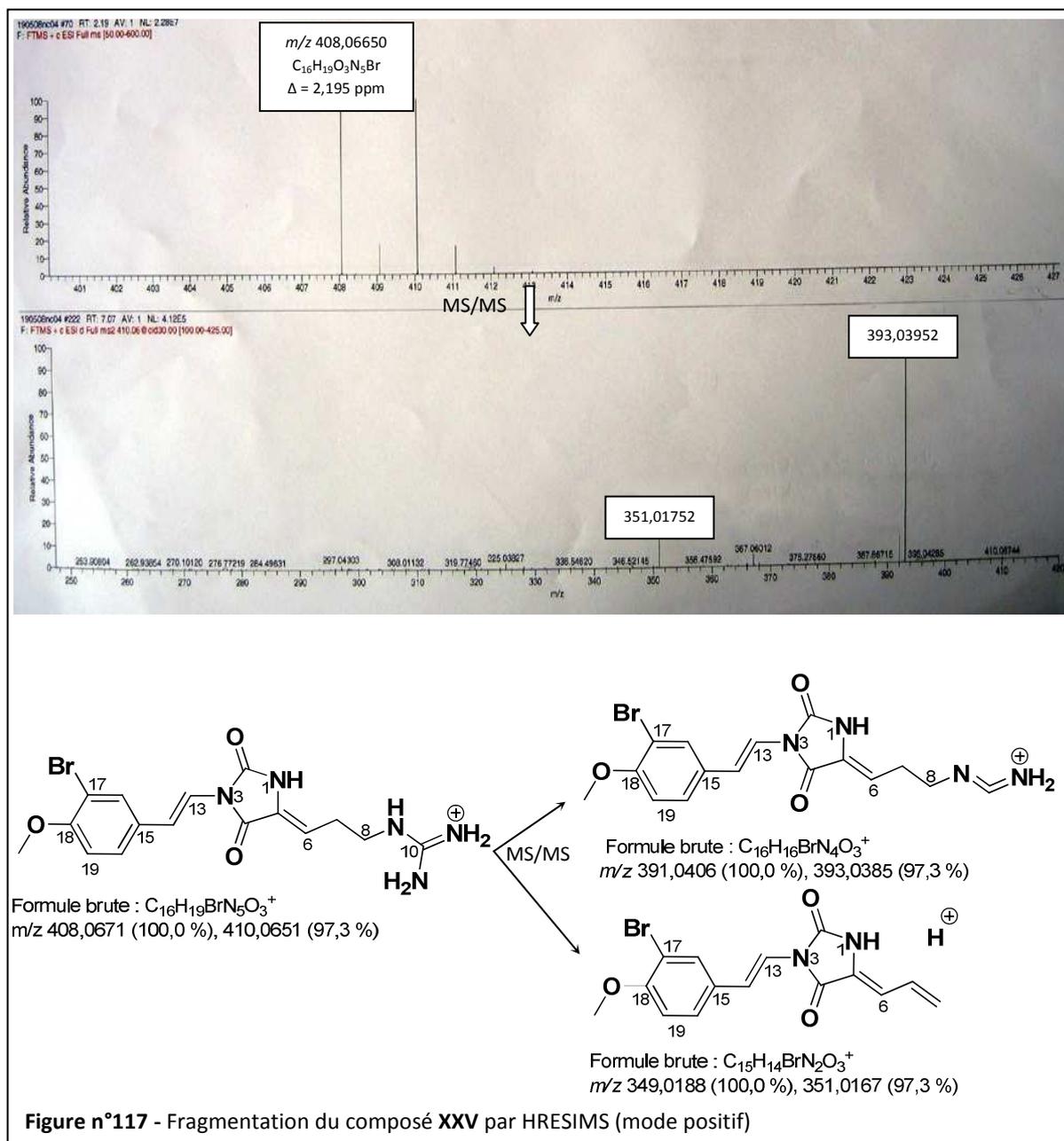
Appartenant à la même famille de composés et présentant un effet Cotton négatif à 280 nm, la configuration absolue de C-5 dans la parazoanthine D (XXIV) a été supposée *S*, comme celle de la parazoanthine A (XXI).



IV.2.2.5. La parazoanthine E (XXV)

Le composé nommé parazoanthine E (XXV) a été obtenu sous la forme d'une huile incolore (2,7 mg) dont le pic pseudomoléculaire, à m/z 408,1 et 410,1 (1:1, $[M+H]^+$), est caractéristique des molécules monobromées (cf. **Tableau 13**, Pic 10). Ainsi, comme la parazoanthine D (XXIV), cette molécule possède un atome de brome. Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont quasiment identiques à ceux de la parazoanthine D (XXIV). Les seules différences se situent au niveau de la liaison C-5/C-6. En effet, la molécule isolée présente une insaturation supplémentaire en C-5/C-6 qui a aisément été caractérisée grâce à la comparaison des spectres RMN avec ceux des parazoanthines B et C (XXII-XXIII).

L'analyse par HRESIMS a permis de s'assurer de la formule brute du composé XXV : C₁₆H₁₈N₅O₃Br (m/z 408,066650 $[M+H]^+$, Δ -0,2 ppm). Les fragments obtenus lors de la fragmentation par HRESIMS (mode positif) de ce composé ont permis de confirmer sa structure comme l'indique la **Figure n°117**. La configuration de la double liaison en C-5/C-6 de la parazoanthine E (XXV) a été supposée *Z* pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment.



L'isolement et la caractérisation de ces cinq molécules ont fait l'objet d'une publication.¹¹⁹

¹¹⁹ Cachet, N. ; Genta-Jouve, G. ; Regalado, E.L. ; Mokri, R. ; Amade, P. ; Culioli, G. ; Thomas, O.P. *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 1612-1615.

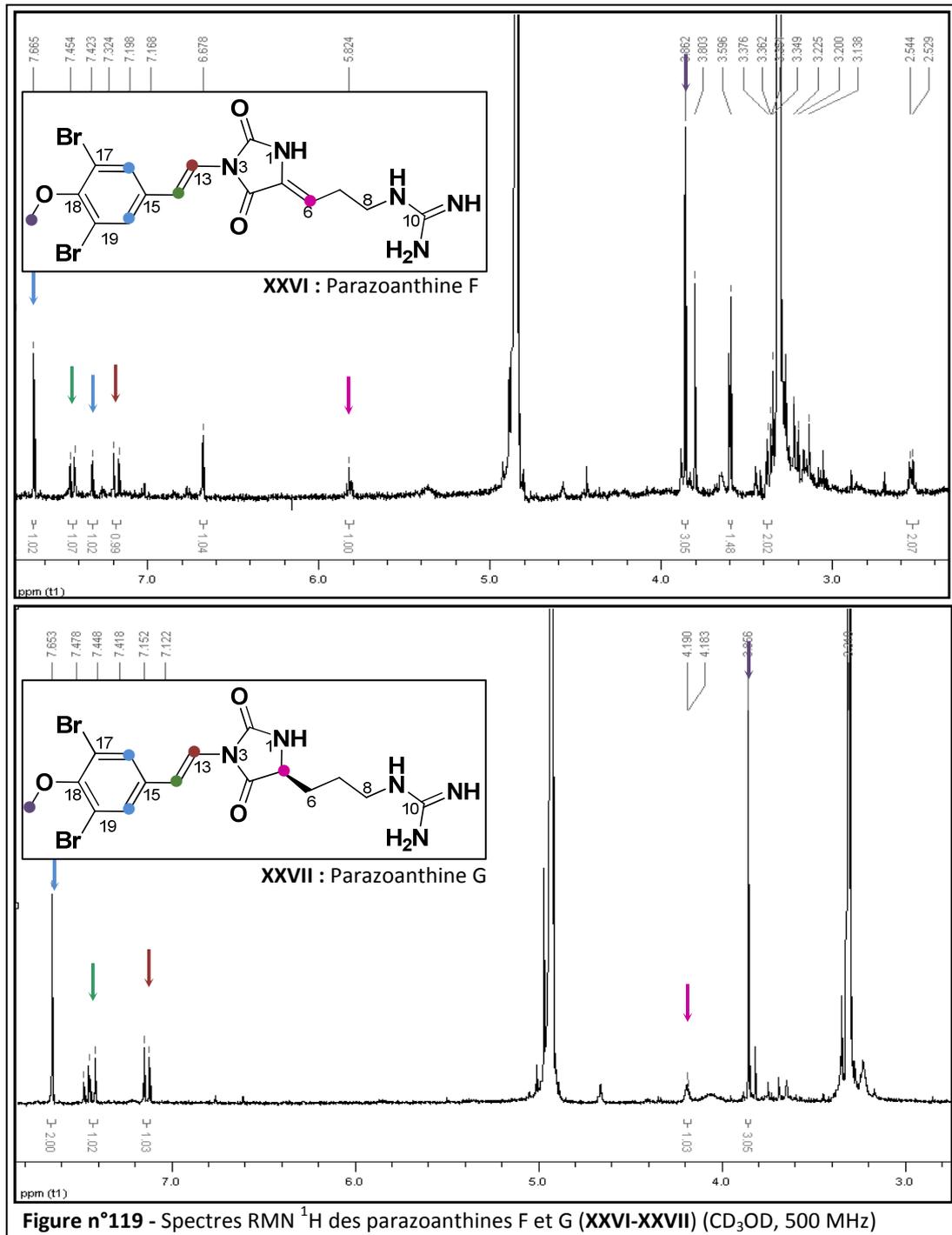
IV.2.2.6. Les parazoanthines F et G (XXVI-XXVII)

Deux autres composés de la famille des parazoanthines ont été isolés sous la forme d'une huile incolore, en quantité très faible (0,6 mg par composé) ; il s'agit des parazoanthine F (XXVI) et G (XXVII). Leurs pics pseudomoléculaires ; déterminés par spectrométrie de masse (ESI, mode positif), apparaissent respectivement à m/z 486, 488 et 499 (1:2:1, $[M+H]^+$) et m/z 488, 490 et 492 (1:2:1, $[M+H]^+$) (cf. **Tableau 13**, Pic 12 et 13). La structure de ces deux molécules comporte donc deux atomes de brome. En plus d'avoir été isolés en très faible quantité, ces deux composés sont en mélange avec certains ecdystéroïdes décrits précédemment. Cependant, comme ces deux molécules appartiennent à la famille des parazoanthines décrite ci-dessus, les spectres RMN 1H (**Figure n°119**), couplés avec les résultats obtenus en spectrométrie de masse ont suffi à déterminer la structure de ces molécules dibromées. Le spectre RMN 1H (**Figure n°119**) de la parazoanthine F (XXVI) a montré que la chaîne alkyle en C_4 , comprenant une guanidine, n'était pas modifiée par rapport aux parazoanthines « oxydées » décrites ci-dessus (parazoanthines B (XXII), C (XXIII) et E (XXV)), car les signaux caractéristiques de cette chaîne ont été retrouvés à l'identique, en particulier le triplet du proton H-6 à δ_H 5,82 (t, $J = 8,0$ Hz) ppm. La présence de la guanidine a été confirmée par la fragmentation par spectrométrie de masse (ESI, mode positif) grâce au fragment à m/z 429 $[M+H-CH_4N_3]^+$. Enfin, le spectre RMN COSY a mis en évidence les corrélations H-6/H₂-7/H₂-8 confirmant ainsi avec certitude la structure de la chaîne alkyle en C_4 .

Grâce au spectre RMN 1H de XXVI, les deux atomes de brome ont été placés sur les positions *ortho* du benzène par rapport au groupement méthoxy dont la présence a été confirmée par le singulet à δ_H 3,86 (3H, H₃-21) ppm. Appartenant à la même famille des parazoanthines, la configuration Z de la double liaison C-5/C-6 de la parazoanthine F (XXVI) a été postulée. Grâce à la détermination de sa formule brute par spectrométrie de masse haute résolution (HRESIMS), $C_{16}H_{17}N_5O_3Br_2$ (m/z 485,97802 $[M+H]^+$, Δ -1,9 ppm), la structure de la parazoanthine F (XXVI) est ainsi confirmée.

La parazoanthine G (XXVII) qui ne diffère que de 2 uma par rapport à la parazoanthine F (XXVI), s'est avéré être la forme réduite de cette dernière. Ceci a été confirmé par son spectre RMN 1H (**Figure n°119**) sur lequel le triplet correspondant à H-6 (δ_H 5,82 (t, $J = 8,0$ Hz) ppm) a disparu pour être remplacé par le signal caractéristique des parazoanthines réduites à δ_H 4,21 (1H, dd, $J = 5,0 ; 6,0$ Hz, H-5) ppm. Les autres signaux étant quasiment superposables à ceux de la parazoanthine F (XXVI), nous en avons déduit que la parazoanthine G (XXVII) était la forme réduite de la parazoanthine F (XXVI). La configuration du carbone asymétrique C-5 est supposée S comme pour la parazoanthine A (XXI).

Comme pour les parazoanthines précédentes, la configuration E de la double liaison C-13/C-14 des parazoanthines F et G (XXVI-XXVII) a été mise en évidence par la constante de couplage $^3J_{H-13/H-14}$ de 15,0 Hz.



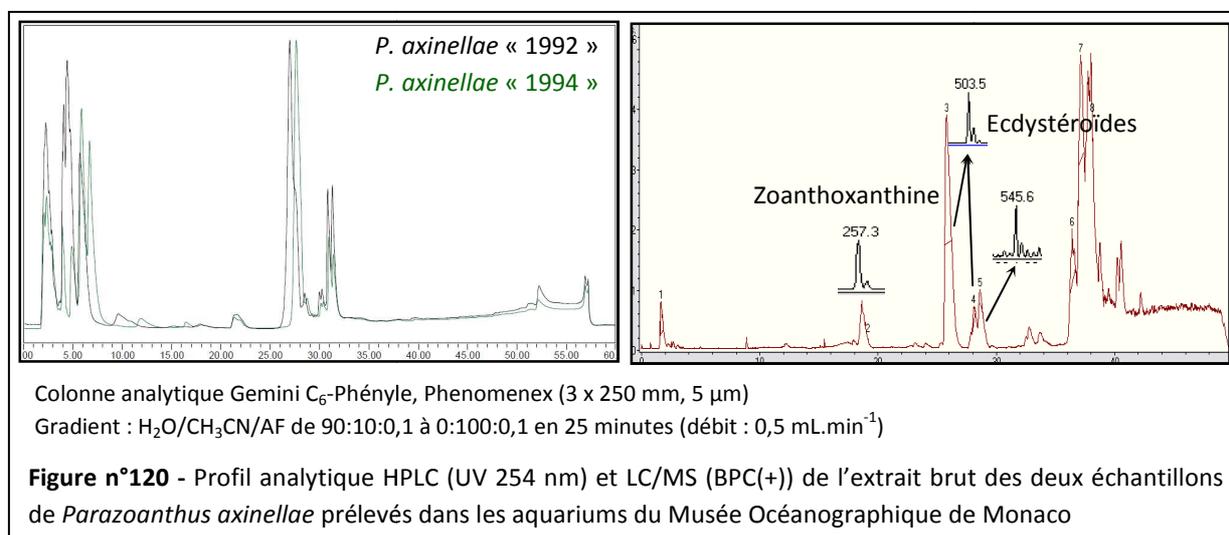
Les échantillons de *P. axinellae* analysés jusqu'à présent montrent que les parazoanthines décrites ci-dessus sont majoritaires par rapport aux zoanthoxanthines déjà isolées dans l'espèce. Ayant la même gamme de polarité, il nous a semblé surprenant que cette famille d'alcaloïdes n'ait jamais été isolée de *P. axinellae*. Nous avons donc essayé de comprendre le pourquoi de cette découverte tardive. Majoritaires de l'extrait brut de *P. axinellae*, nous nous sommes également intéressés à leur rôle écologique. De plus, la biosynthèse de cette famille d'alcaloïdes étant très intéressante et prévoyant de mettre en place des études de biosynthèse *in vivo* et *ex situ*, nous avons également étudié l'influence du placement des *P. axinellae* en aquarium sur la production des parazoanthines.

IV.3. Considérations écologiques sur les parazoanthines

Afin d'évaluer l'influence du placement des *P. axinellae* en aquarium sur la production des parazoanthines, nous avons étudié deux échantillons prélevés dans les aquariums du Musée Océanographique de Monaco où ils sont conservés depuis 1992 pour le premier échantillon et 1994 pour le second.

Les deux échantillons ont été extraits par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 puis analysés par HPLC (DAD, DEDL) et LC/MS sur colonne C₆-Phényle. Leurs profils, identiques pour les deux échantillons, ont indiqué une absence totale de parazoanthines. Seuls un représentant de la famille des zoanthoxanthines et trois ecdystéroïdes étaient présents dans la zone de polarité des parazoanthines (**Figure n°120**).

118



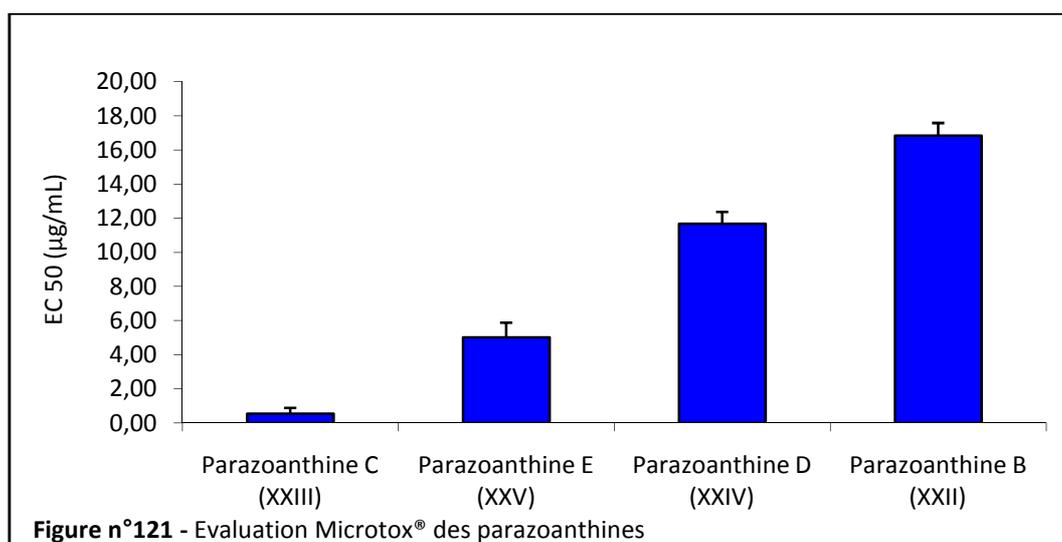
Les profils obtenus diffèrent nettement de ceux des *P. axinellae* prélevés dans leur milieu naturel par l'absence totale de parazoanthines. Ce phénomène pourrait être dû à une absence des stimuli nécessaires au déclenchement de leur production. En effet, bien que les aquariums reproduisent un écosystème, celui-ci diffère obligatoirement de celui du milieu naturel et les stimuli déclenchant la production de parazoanthines n'ont probablement pas été reproduits. Cette famille d'alcaloïdes pourrait intervenir dans le système de défense chimique de l'organisme qui, n'ayant pas besoin de se défendre en aquarium, pourrait avoir perdu la faculté de produire ce type d'alcaloïdes.

Dans une étude visant à évaluer la toxicité naturelle d'organismes marins, *P. axinellae* est apparu comme le cnidaire présentant l'extrait le plus bioactif.¹²⁰ Si les parazoanthines sont effectivement utilisées dans la défense chimique de l'organisme, l'origine de cette bioactivité pourrait être due à leur présence dans les extraits testés. Afin d'évaluer leur écotoxicité, elles ont été testées par Microtox® (Tests réalisés par Julijana Ivasinevic à DIMAR, Marseille). Le test Microtox® est un test d'écotoxicité aquatique, monospécifique et statique. Ce test normalisé, (AFNOR T 90-320 et ISO

¹²⁰ Marti, R. ; Uriz, M.-J. ; Turon, X. *Sci. Mar.* **2005**, 69, 485-492.

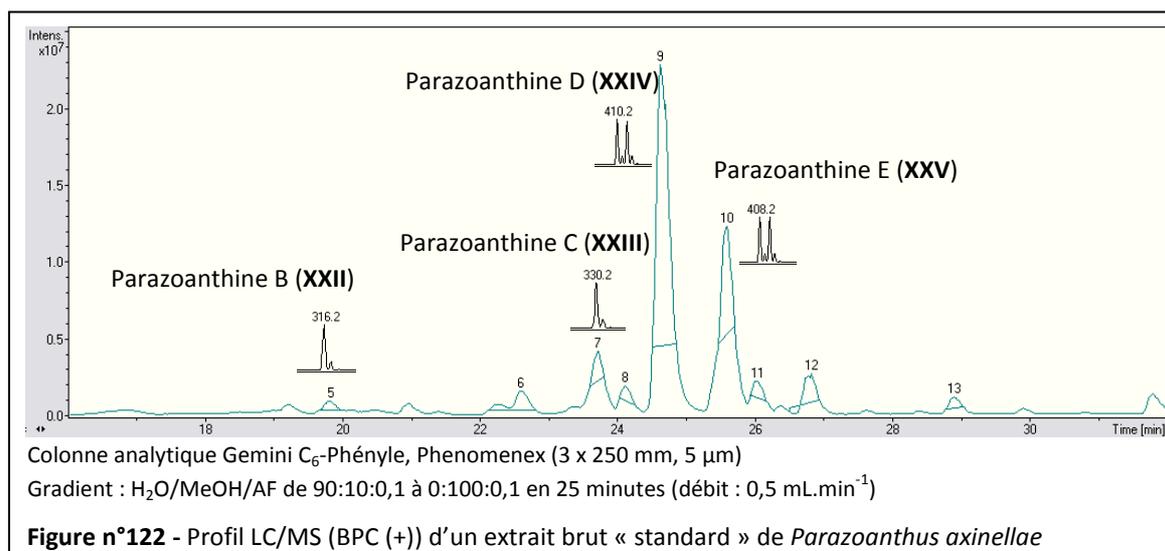
11348) aigu et subléta, consiste à déterminer la concentration en substance toxique inhibant 50 % de la production de bactéries lumineuses (*Vibrio fischeri*) par rapport à un témoin.

Les trois familles de composés isolées de *P. axinellae* ont été testées (zoanthoxanthines, ecdystéroïdes et parazoanthines) et les parazoanthines sont apparues comme la famille la plus bioactive avec une concentration effective moyenne EC_{50} de $8,51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contre $24,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour les ecdystéroïdes et aucune activité pour les zoanthoxanthines. La comparaison de l'activité sur *Vibrio fischeri* des parazoanthines entre elles (**Figure n°121**) a permis d'étudier la relation structure-activité de ces molécules.



La molécule la plus active sur *Vibrio fischeri* est la parazoanthine C (**XXIII**) avec une EC_{50} de $0,54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; il s'agit de la parazoanthine oxydée possédant un groupement méthoxy. Elle est suivie de la parazoanthine E (**XXV**) dont l' EC_{50} est de $5,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; cette parazoanthine est oxydée, monobromée et possède un groupement méthoxy. La troisième molécule la plus active est la parazoanthine D (**XXIV**) avec une EC_{50} de $11,68 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ce composé est la forme réduite de la parazoanthine E (**XXV**). Enfin, avec une EC_{50} de $16,83 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la parazoanthine B (**XXII**), qui est oxydée et hydroxylée, est la moins active.

Le groupement méthoxy et la double liaison C-5/C-6 semblent indispensables à une forte activité bactéricide. La présence d'un brome en *ortho* du groupement méthoxy diminue l'activité des parazoanthines. Le profil LC/MS caractéristique des extraits de *P. axinellae* (**Figure n°122**) montre que les deux parazoanthines majoritaires sont la D et la E (**XXIV-XXV**); les parazoanthines A et B (**XXI-XXII**) ne sont, quant à elles, pas présentes dans tous les échantillons récoltés. La parazoanthine C (**XXIII**) étant la plus active du test Microtox®; il est possible que les parazoanthines D et E (**XXIV-XXV**) soient présentes dans l'organisme en tant que métabolites de stockage et que, en cas de stimuli, elles soient deshalogénées pour former la parazoanthine C (**XXIII**). Cependant, cette deshalogénéation semble chimiquement très difficile, une hypothèse plus probable serait de considérer que les parazoanthines bromées aient un rôle écologique différent de celui des parazoanthines non bromées.

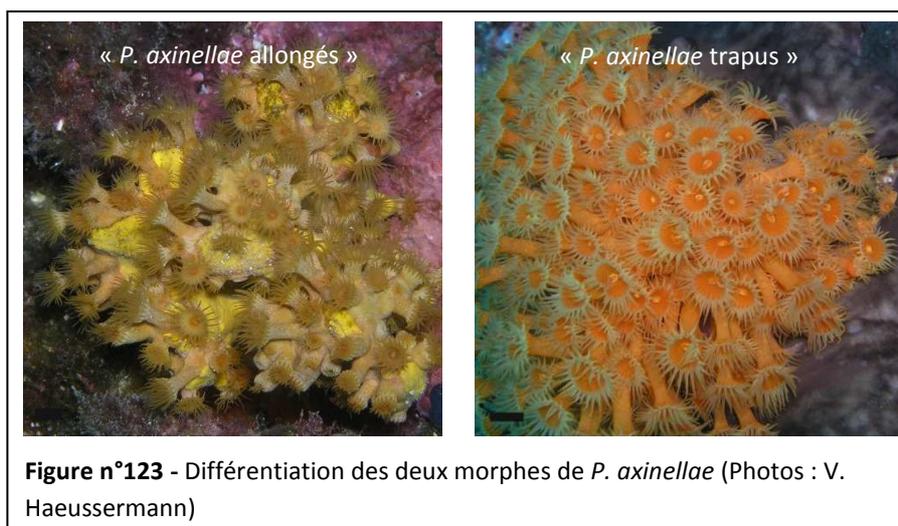


Les parazoanthines semblent être les métabolites secondaires responsables de l'activité bactéricide évaluée par Marti *et al.*,¹²⁰ nous nous sommes demandés si les colonies de *P. axinellae* présentaient une empreinte chimique unique ou si celle-ci différait selon le morphotype considéré et/ou la situation géographique de l'échantillon. Nous avons également effectué un suivi temporel afin vérifier la fluctuation de la production des parazoanthines tout au long de l'année et ainsi vérifier si la baisse de bioactivité entre le printemps et l'automne mise en évidence par Marti *et al.* était liée à une baisse de production des parazoanthines.

IV.4. Fluctuation de la production des métabolites secondaires

IV.4.1. Liée au morphe

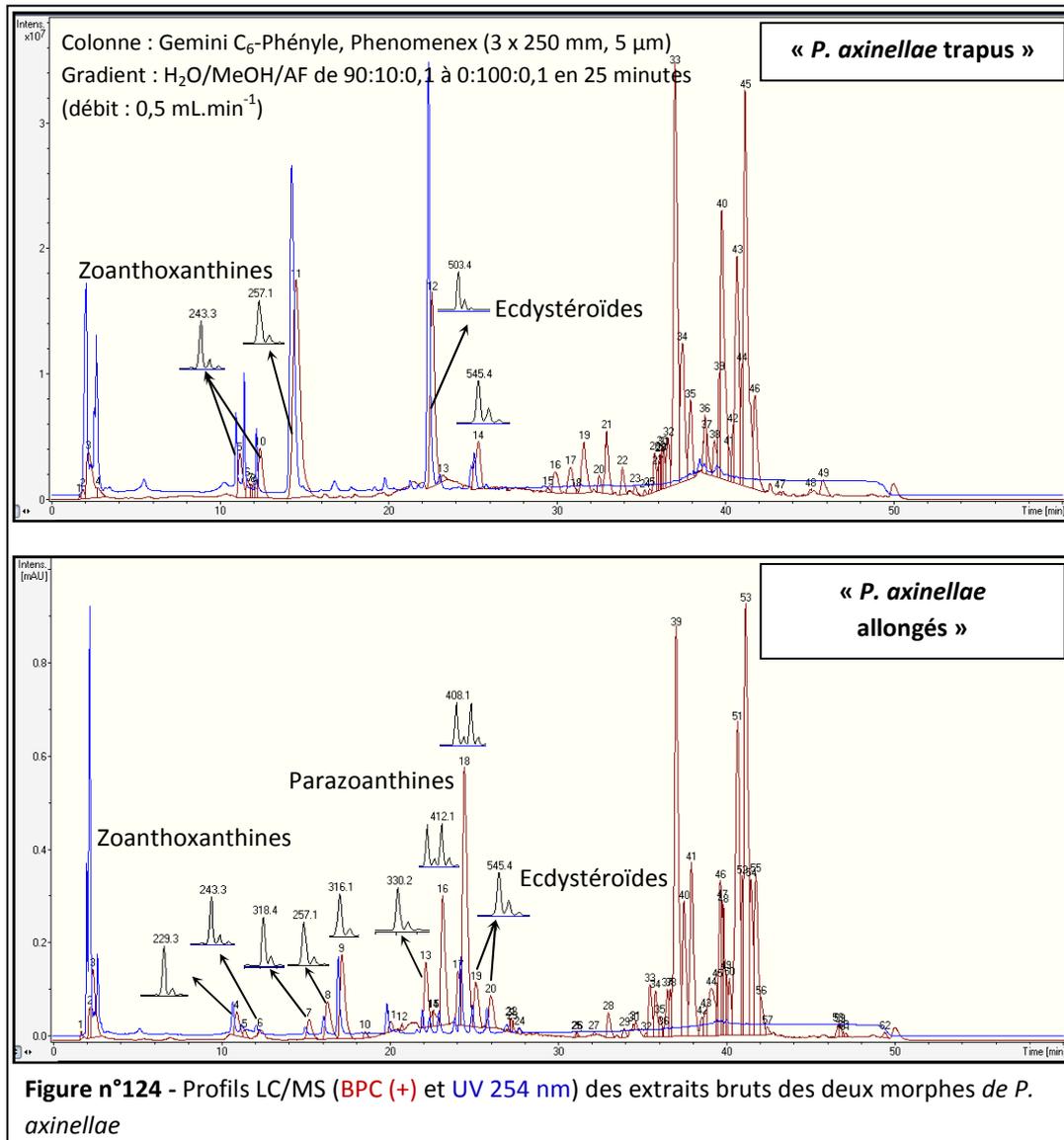
Comme nous l'avons déjà dit, les *Parazoanthus axinellae* sont largement présents en Méditerranée sur des tombants rocheux verticaux ombragés ou en tant qu'épibiontes de certaines éponges des genres *Agelas* et *Axinella*. Afin de limiter les facteurs à prendre en compte, cette étude a été réalisée sur les *P. axinellae* présents sur les tombants rocheux, et non associés avec une éponge. Sur les faciès à *P. axinellae*, deux morphes peuvent se distinguer (**Figure n°123**).



Le premier, appelé « *P. axinellae* allongés », est composé de petits polypes (entre 0,5 et 1,5 cm de longueur) de couleur jaune-marron. Ce morphe se trouve également en association avec certaines éponges. Le deuxième morphe, qu'on appellera « *P. axinellae* trapus », est composé de polypes plus grands et plus large (entre 0,5 et 2,5 cm de longueur) d'une couleur orange vif et, à notre connaissance, n'a jamais été trouvé en tant qu'épibionte d'une éponge. Le statut spécifique de ces deux morphotypes (espèce, sous-espèce, écotype) n'ayant pas pu être identifié par les études génétiques menées par Sinniger *et al.*,¹²¹ nous avons souhaité savoir si leur différence morphologique se répercutait sur leur profil chimique.

Pour cette étude, nous avons principalement travaillé sur deux tombant rocheux du site des Roches Saint Nicolas (Fontvieille) : un faciès à « *P. axinellae* allongés » et le second faciès à « *P. axinellae* trapus ». Un triplicata de chaque morphe a été prélevé, lyophilisé et extrait par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 avant d'être analysé par LC/MS. La différence des profils LC/MS de ces deux morphes s'est avérée très marquée (**Figure n°124**) : aucune parazoanthine n'est présente dans l'extrait brut des *P. axinellae* trapus alors qu'elles sont présentes dans l'extrait brut des *P. axinellae* allongés. Les deux morphes de *P. axinellae* ont donc deux profils chimiques différents.

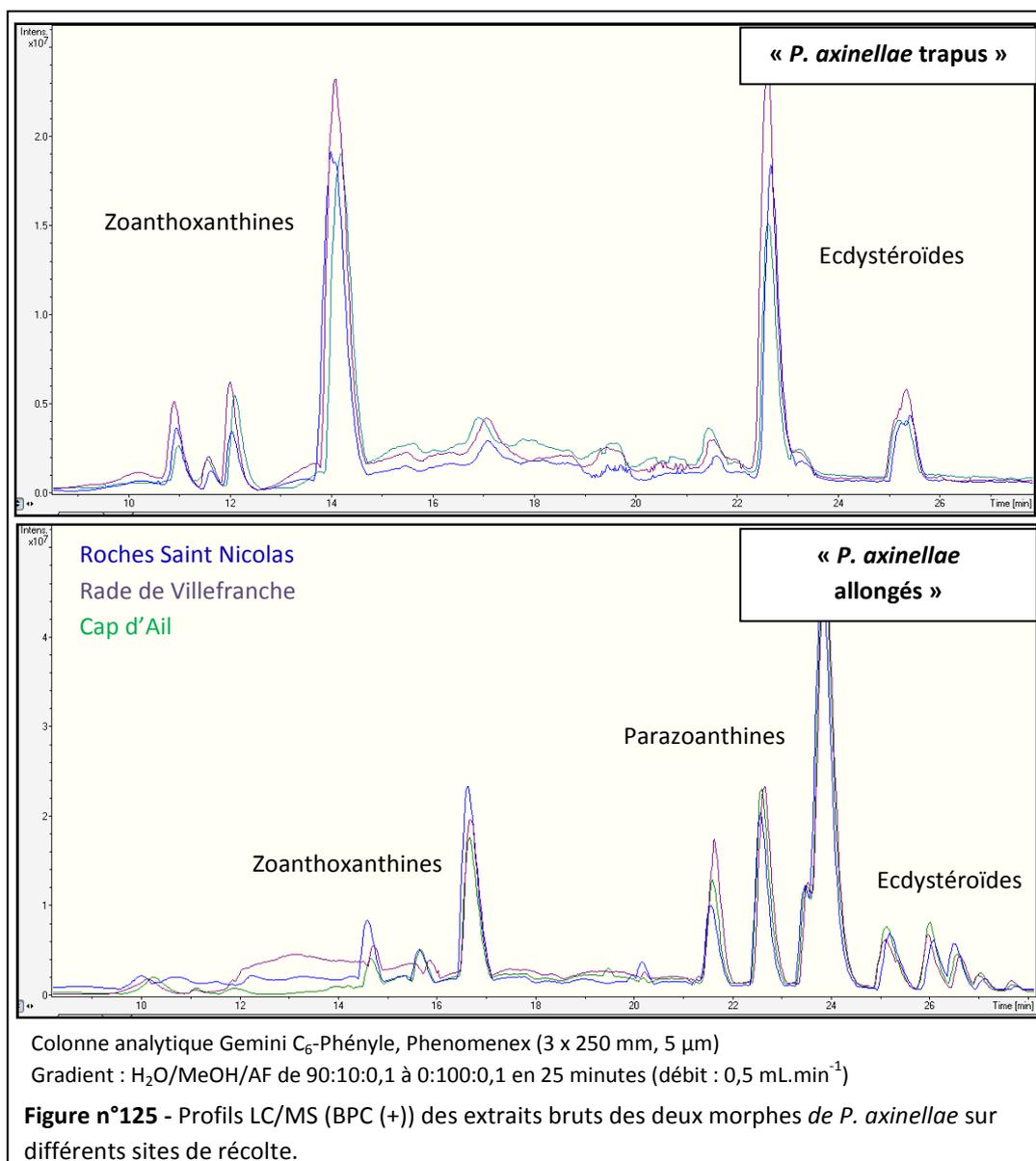
¹²¹ Sinniger, F. ; Reimer, J.D. In: *Reconsidering zoanthid (Anthozoa: Hexacorallia) biodiversity using traditional and molecular techniques*, Communication par poster, World Conference on Marine Biodiversity, Valence, **2008**.



Afin de confirmer ces observations, des échantillons des deux morphes de *P. axinellae* ont été collectés aux mêmes endroits pour un suivi temporel. Grâce à 18 échantillons de chaque morphotype, prélevés en triplicatas sur une période de 11 mois (Septembre 2008 à Juillet 2009), nous avons pu vérifier que les *P. axinellae* trapus ne produisaient pas de parazoanthines quelle que soit la saison, et que les *P. axinellae* allongés en produisaient toute l'année. Ce suivi temporel a donc confirmé que, sur le site des Roches Saint Nicolas, les deux morphotypes de *P. axinellae* ont des empreintes chimiques différentes.

Cependant, les prélèvements étant réalisés sur deux faciès différents, la production de parazoanthines par le morphe « *P. axinellae* allongés » pourrait être due à des conditions environnementales différentes (exposition au courant, au rayonnement solaire, etc.) par rapport au morphe « *P. axinellae* trapus ». Ainsi, les deux morphes de *P. axinellae* ont été prélevés sur trois sites distincts (Roches Saint Nicolas, Rade de Villefranche et Cap d'Ail). Après avoir été lyophilisé et extrait par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, chaque échantillon a été analysé par LC/MS. Les profils issus de ces analyses sont conformes à ceux trouvés lors du suivi temporel : les *P. axinellae* trapus ne

contiennent que des zooxanthines et des ecdystéroïdes, alors que les *P. axinellae* allongés contiennent en plus la nouvelle famille des parazoanthines (Figure n°125).

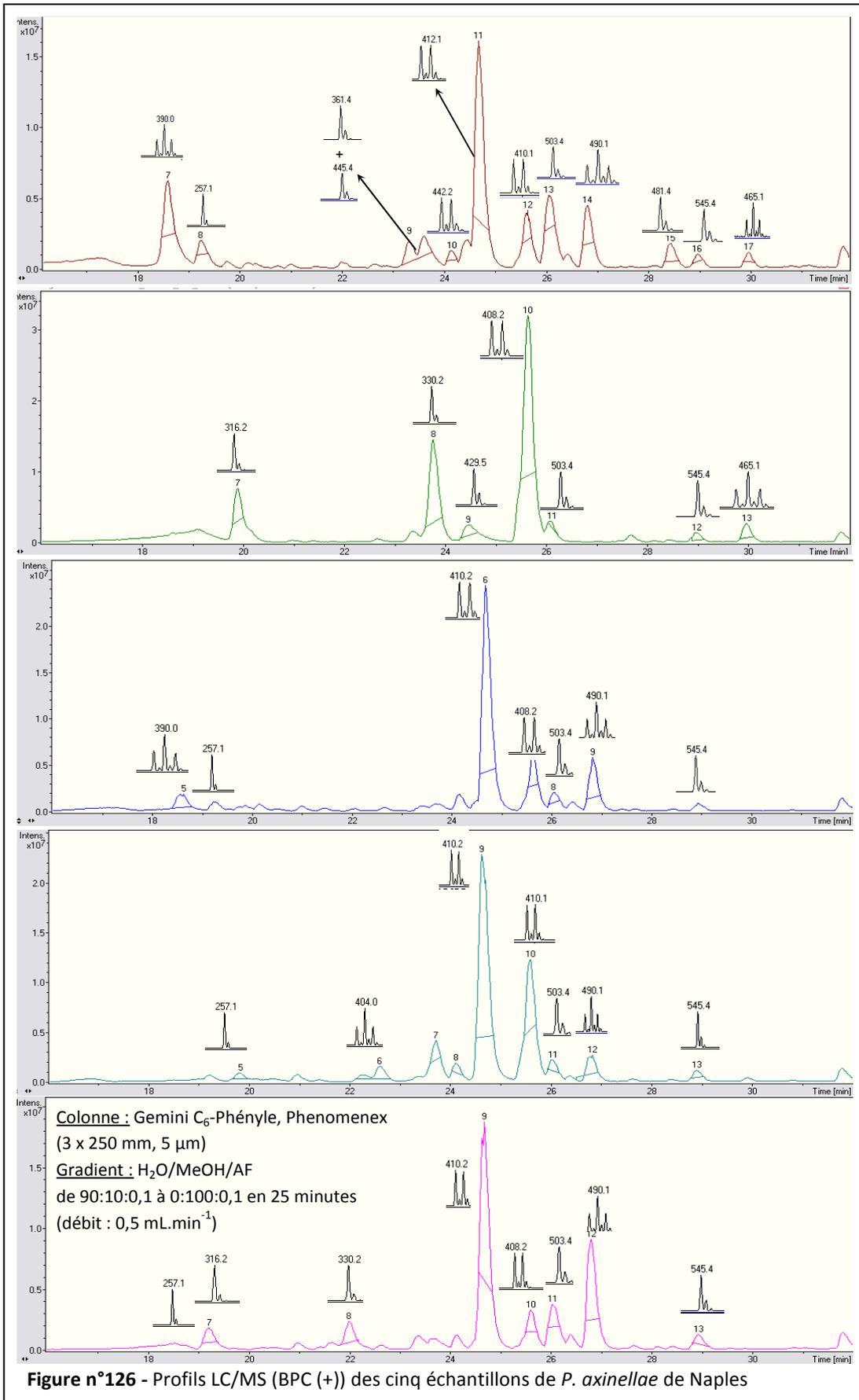


Sur le site de Cap d'Ail, les deux morphes ont été retrouvés sur un même tombant. Leurs profils LC/MS ont pourtant une nouvelle fois permis de différencier les profils chimiques des *P. axinellae* trapus sans parazoanthines, de ceux des *P. axinellae* allongés avec des parazoanthines. La production des parazoanthines par le morphe « *P. axinellae* allongés » ne résulte donc pas d'une luminosité et/ou d'une exposition à un courant différent(s) par rapport au morphe « *P. axinellae* trapus ».

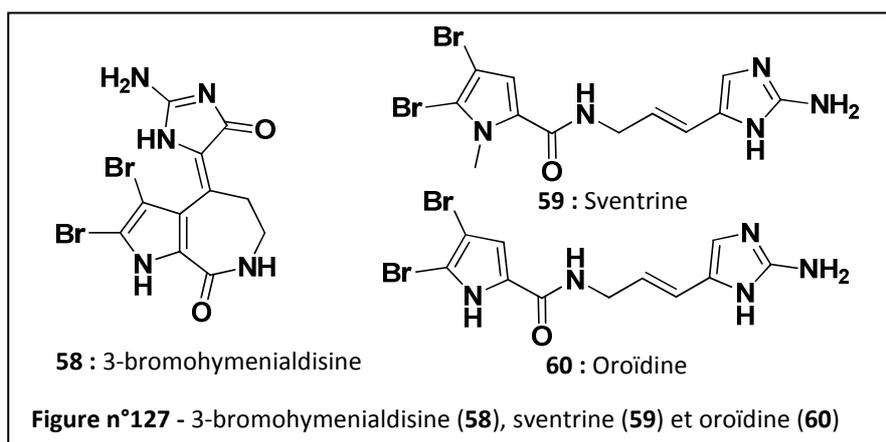
D'après ces différents prélèvements, la présence de parazoanthines dans le morphe « *P. axinellae* allongés » ne serait pas une spécificité du site des Roches Saint Nicolas. Afin de confirmer la différence de profils chimiques entre les deux morphes, l'analyse des prélèvements de *P. axinellae* sur différents sites de récoltes d'ECIMAR a été réalisée.

IV.4.2. Géographique

En avril 2008, une mission de récolte a été organisée à Naples ; les *P. axinellae* récoltés sur le site de la baie de Naples étaient tous associés avec une éponge du genre *Axinella* (*A. damicornis* ou *A. verrucosa*). D'après les constatations faites sur l'affinité du morphe « *P. axinellae* allongés » avec les éponges par rapport à celle du morphe « *P. axinellae* trapus », les échantillons récoltés devaient présenter un profil LC/MS du type de celui des « *P. axinellae* allongés ». Ainsi, après avoir détaché avec précaution les colonies de *P. axinellae* des éponges sur lesquelles elles étaient associées, les cinq échantillons obtenus ont été lyophilisés avant d'être extraits et analysés par LC/MS. Comme le montre la **Figure n°126**, les cinq échantillons analysés contiennent tous des parazoanthines, la parazoanthine D (**XXIV**) étant majoritaire, sauf dans un cas. En revanche les cinq profils obtenus, bien que présentant des similitudes, se sont avérés légèrement différents du profil LC/MS caractéristique du morphe *P. axinellae* allongés par l'absence de certains métabolites comme quelques zoanthoxanthines, des parazoanthines hydroxylées ou de certains ecdystéroïdes dans quelques cas.



Des métabolites mono- ou dibromés dont les pics pseudomoléculaires apparaissent à m/z 388,0-390,0-392,0 (1:2:1, $[M+H]^+$); 402,0-404,0-406,0 (1:2:1, $[M+H]^+$); 442,2-444,2 (1:1, $[M+H]^+$) et 463,1-465,1-467,1 (1:2:1, $[M+H]^+$) ont également été trouvés pour la première fois dans certains échantillons (**Figure n°126**). Le fait qu'ils aient été identifiés dans des extraits bruts de *P. axinellae* associés à des éponges du genre *Axinella*, connues pour produire un grand nombre d'alcaloïdes bromés, et non dans ceux des « *P. axinellae* allongés » fixés sur la roche, pourrait s'expliquer par un échange de métabolites entre les anémones et l'éponge. Le métabolite dibromé à m/z 388,0-390,0-392,0 (1:2:1, $[M+H]^+$) pourrait correspondre à l'oroïdine (**60**), molécule déjà isolée d'*A. damicornis* et d'*A. verrucosa*,^{122,123} ou à un de ses isomères. Le métabolite dibromé à m/z 402,0-404,0-406,0 (1:2:1, $[M+H]^+$) pourrait par exemple correspondre à la sventrine (**59**) isolée d'*Agelas sventres* ou encore au composé **58** isolé d'*Axinella carteri*.^{124,125} Ces métabolites nouveaux dans *P. axinellae* pourraient être issus d'un échange avec les métabolites secondaires de l'éponge suivi d'une modification par le métabolisme secondaire de l'anémone. Ce phénomène de biotransformation a été démontré dans le métabolisme secondaire du nudibranche *Hypselodoris orsini* qui, après ingestion de l'éponge *Cacospongia mollior*, est capable de transformer le métabolite secondaire majoritaire de l'éponge en un dérivé moins oxygéné qui lui est propre.¹²⁶



En juin 2008, une mission de récolte a été organisée en Corse et huit échantillons de *P. axinellae* ont été récoltés. Six de ces échantillons ont été prélevés sur la roche tandis que les deux autres étaient associés à des éponges du genre *Axinella*. Comme attendu par l'affinité du morphe « *P. axinellae* allongés » pour les éponges de ce genre, les *P. axinellae* associés aux éponges ont présenté un profil similaire à celui du morphe « *P. axinellae* allongés » (**Figure n°128**). En revanche les métabolites bromés détectés dans les échantillons de *P. axinellae* récoltés à Naples n'ont pas été retrouvés. L'hypothèse d'un transfert de métabolites entre les éponges et les anémones ne peut néanmoins pas être exclue.

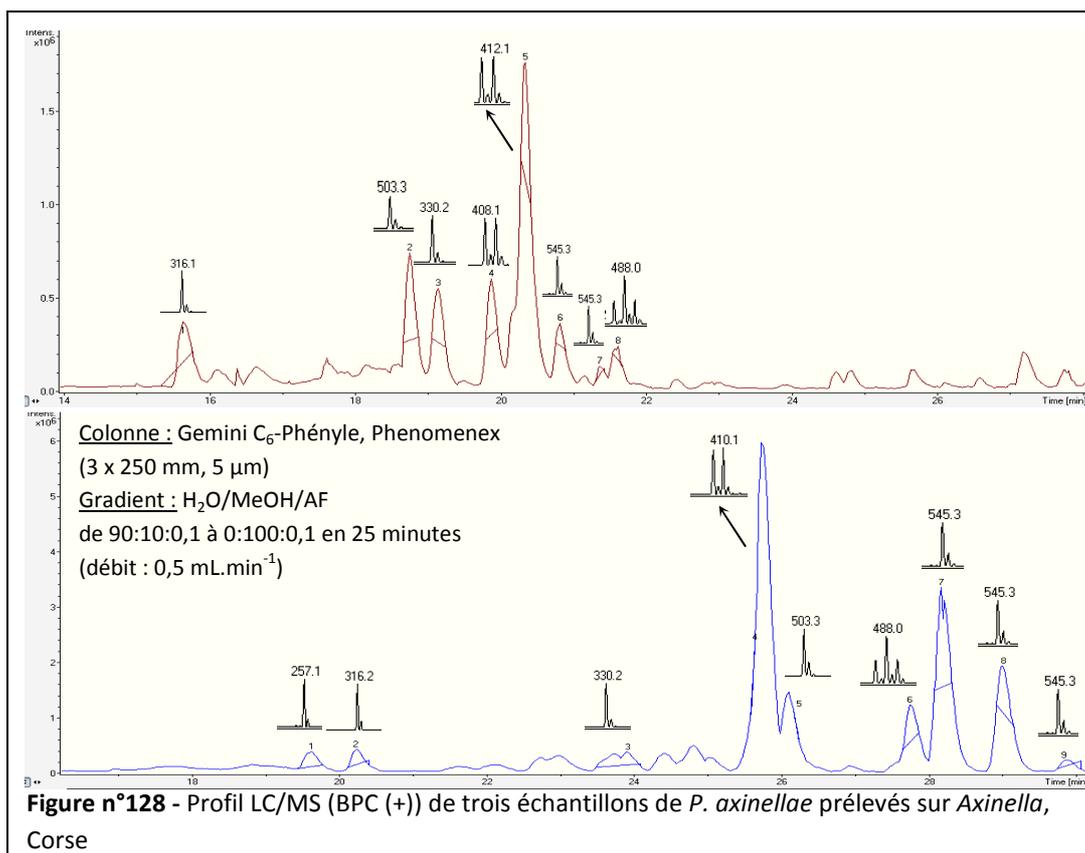
¹²² Cimino, G. ; DeRosa, S. ; De Stefano, S. ; Mazzarella, L. ; Puliti, R. ; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 767-768.

¹²³ Cimino, G. ; De Stefano, S. ; Minale, L. ; Sodano, G. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1975**, 50, 279-285.

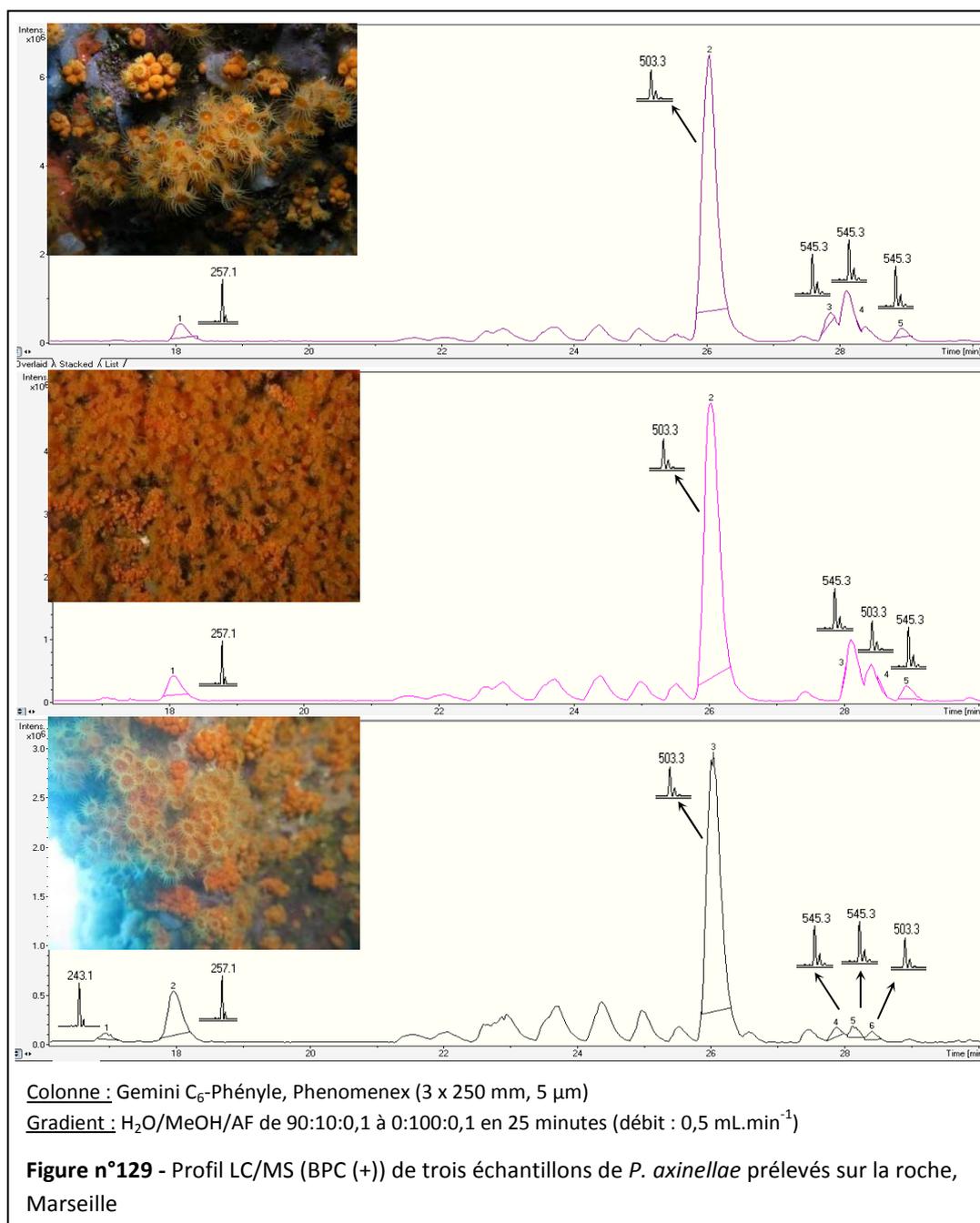
¹²⁴ Assmann, M. ; Zea, S. ; Koeck, M. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 1593-1595.

¹²⁵ Supriyono, A. ; Schwarz, A. ; Wray, V. ; Witte, L. ; Müller, W.E.G. ; Van Soest, R.W.M. ; Sumaryono, W. ; Proksch, P. *Z. Naturforsch. C. Biosci.*, **1995**, 50, 669-674.

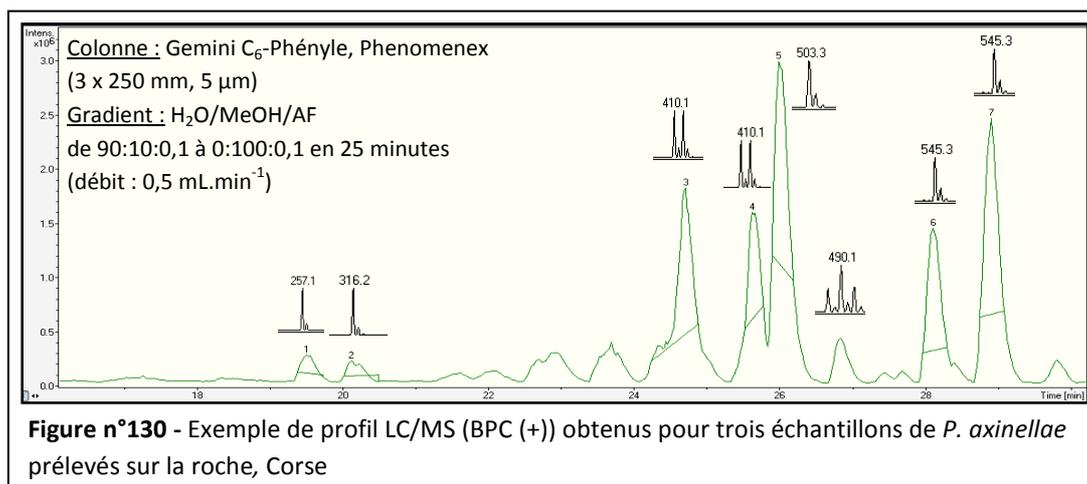
¹²⁶ Cimino, G. ; Fontana, A. ; Giménez, F. ; Marin, A. ; Mollo, E. ; Trivellone, E. ; Zubia, E. *Experientia*, **1993**, 49, 582-586.



Trois échantillons de *P. axinellae* prélevés sur la roche ont un profil s'apparentant à celui du morphe « *P. axinellae* trapus », sans parazoanthines et avec la 20-hydroxyecdysone (**XVII**, m/z 503,3 [M+Na]⁺) comme composé majoritaire. Ces échantillons correspondent donc certainement au morphe « *P. axinellae* trapus », ce qui a été confirmé par la photo des prélèvements (**Figure n°129**).



En revanche, les trois autres prélèvements de *P. axinellae* sur la roche ont un profil chimique ne correspondant ni à celui du morphe « *P. axinellae* allongés » ni à celui du morphe « *P. axinellae* trapus ». En effet, sur ces profils la majorité des parazoanthines produites par le morphe « *P. axinellae* allongés » sont présentes mais en mélange avec une grande quantité de 20-hydroxyecdysone (**XVII**, m/z 503,3 [M+Na]⁺), composé majoritaire des extraits de « *P. axinellae* trapus » (**Figure n°130**). Lors des prélèvements, il est donc très probable que les deux morphes aient été mélangés.



En juin 2008, une mission de récolte a également été organisée à Marseille et sept échantillons de *P. axinellae* ont été récoltés. Les profils chimiques des échantillons ont montré les mêmes caractéristiques que ceux des échantillons de Corse : les extraits bruts des spécimens de *P. axinellae* fixés à des éponges du genre *Axinella* ont montré un profil de type « *P. axinellae* allongés » tandis que les extraits bruts de ceux des *P. axinellae* fixés à la roche ont montré un profil soit comparable à celui des « *P. axinellae* allongés », soit à celui des « *P. axinellae* trapus », soit à un mélange des deux profils.

Malgré l'absence de précaution prise lors des prélèvements des différents échantillons de *P. axinellae*, les analyses révèlent deux empreintes chimiques distinctes dans la majorité des cas, permettant ainsi la différenciation chimique des deux morphotypes. La différence de profil chimique des deux morphotypes de *P. axinellae*, mise en évidence sur trois sites aux alentours de Nice et Monaco, semble donc se vérifier sur l'ensemble de la Méditerranée.

Ainsi, d'un point de vue chimique les deux morphes de *P. axinellae* montrent des différences significatives qui renforcent l'idée d'une classification taxonomique distincte.

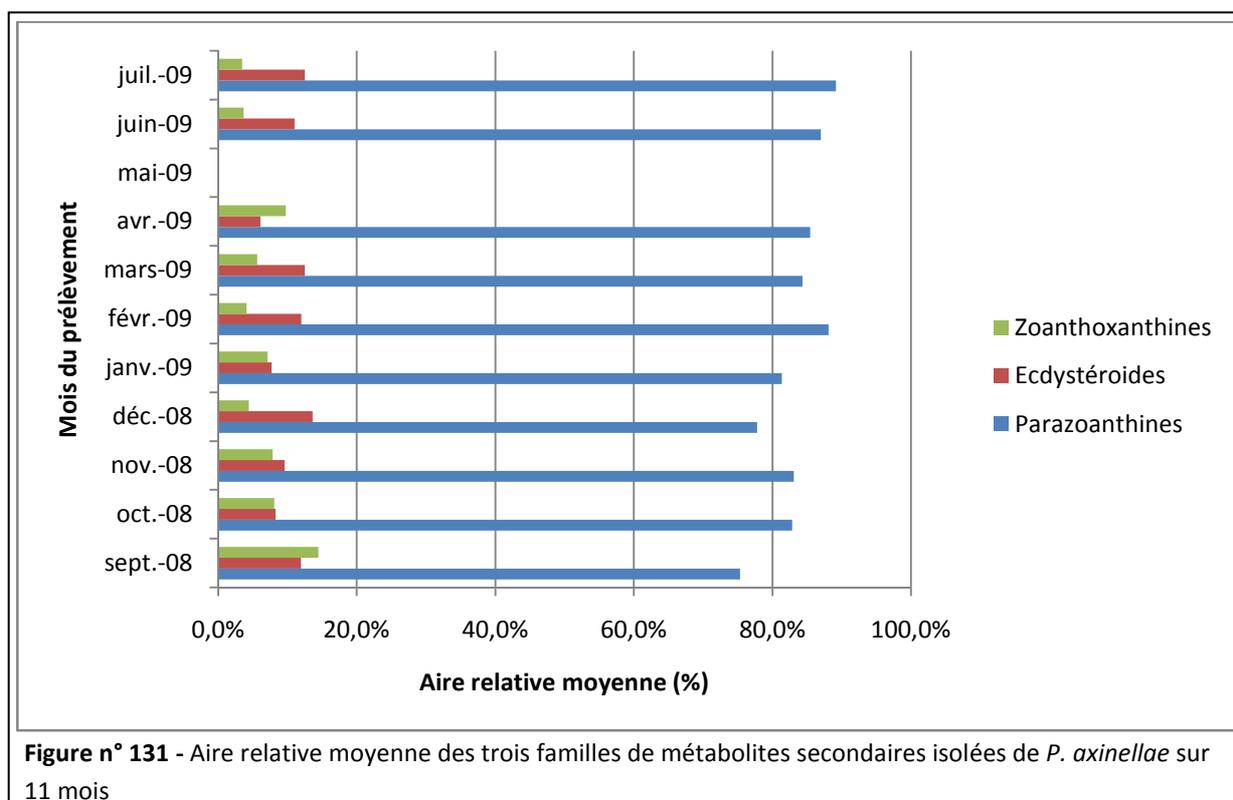
Dans une étude évaluant la toxicité naturelle de cnidaires, de bryozoaires et de tuniciers méditerranéens par le test Microtox®, Marti *et al.* ont montré que *P. axinellae* était le cnidaire dont l'extrait brut a l'écotoxicité la plus élevée.¹²⁰ Les auteurs ont également mis en évidence une différence d'activité selon la saison : *P. axinellae* est plus toxiques au printemps (prélèvement de juin) qu'en automne (prélèvement de novembre).

Ayant montré que l'écotoxicité des extraits de *P. axinellae* était certainement liée à la présence des parazoanthines (IV.3., p.118). Il est donc probable que les auteurs aient travaillé sur le morphe « *P. axinellae* allongés ». Nous avons décidé de faire un suivi temporel des profils chimiques du morphe « *P. axinellae* allongés » afin de voir si la quantité relative de parazoanthines dans l'extrait fluctuait en fonction de la saison. Une fluctuation saisonnière des parazoanthines pourrait expliquer la différence d'activité constatée entre le printemps et l'automne (de 0,41 à 1,10 unités gamma suivant le site de récolte).

IV.4.3. Temporelle

L'étude a été faite sur 18 échantillons prélevés en triplicatas sur une période de 11 mois (Septembre 2008 à Juillet 2009). Chaque triplicata a été lyophilisé et broyé. La poudre obtenue (0,2 g) a été extraite par 2 mL du mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 dans un bac à ultra-sons durant 2 minutes. Après avoir renouvelé l'opération trois fois, les trois extraits ainsi obtenus ont été rassemblés afin d'être analysés par LC/MS dans les mêmes conditions que précédemment : Colonne Gemini C₆-Phényle, Phenomenex (3x250 mm, 5 µm) - Gradient H₂O/MeOH/AF de 90:10:0,1 à 0:100:0,1 en 25 minutes (débit : 0,5 mL.min⁻¹). Pour le traitement des données, nous nous sommes limités à la fluctuation des trois familles de composés identifiés dans l'espèce : les zoanthoxanthines, les ecdystéroïdes et les parazoanthines.

Comme le montre la **Figure n°131**, le résultat de ce suivi temporel ne met pas en évidence une différence dans la production des trois familles de métabolites secondaires pouvant expliquer l'écart d'activité bactéricide évalué entre le printemps et l'automne. En effet, quel que soit le mois de prélèvement, l'aire relative moyenne de chaque famille de composés reste quasiment constante. Elle est comprise entre 3 et 14 % pour les zoanthoxanthines, 6 et 14 % pour les ecdystéroïdes et enfin 75 et 89 % pour les parazoanthines.



N'étant pas due à une fluctuation des familles de composés entre elles, la différence de bioactivité des extraits de *P. axinellae* entre le printemps et l'automne pourrait être la conséquence d'une différence de distribution entre les parazoanthines au cours du temps.

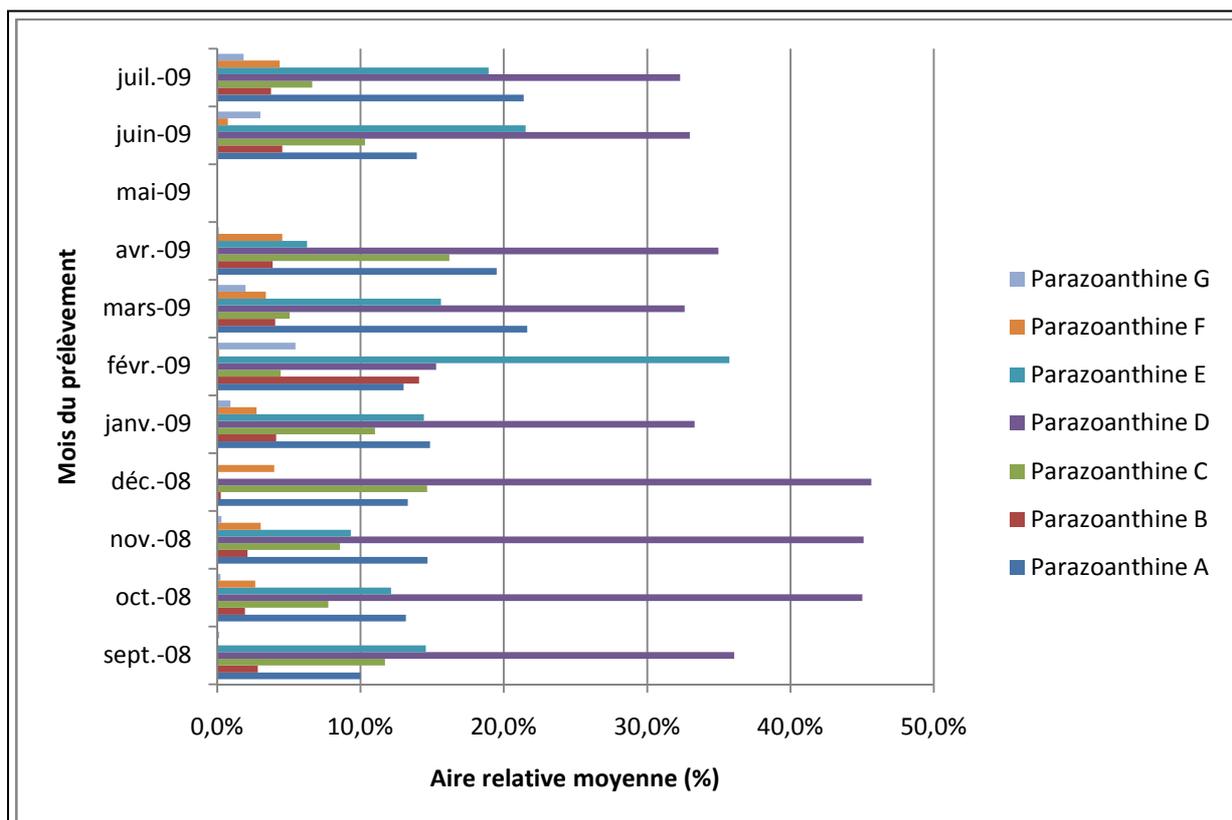


Figure n° 132 - Aire relative moyenne des différentes parazoanthines isolées de *P. axinellae* sur une période de 11 mois

La Figure n° 132 montre effectivement une différence de la composition des parazoanthines en fonction du mois ou de la saison des prélèvements. La parazoanthine D (XXIV) est nettement majoritaire en automne et au début de l'hiver alors qu'au printemps et au début de l'été le rapport entre chaque parazoanthine est plus faible. D'après les résultats du test Microtox® sur les différentes parazoanthines, et, bien que chaque parazoanthine présente une activité bactéricide ; la plus bactéricide est la parazoanthine C (XXIII). Cette dernière est certainement en grande partie responsable de la bioactivité de l'extrait de *P. axinellae*. En considérant l'aire relative moyenne de la famille « parazoanthines » constante au cours du temps, le fait d'observer un rapport XXIV/ XXIII moins important impliquerait une hausse d'activité de l'extrait de *P. axinellae*. Or, ce rapport est environ de 5 en automne alors qu'il est d'environ 3,5 au printemps. Cela suggère que les extraits de *P. axinellae* sont plus toxiques au printemps qu'en automne et justifie ainsi les valeurs obtenues dans l'étude menée par Marti *et al.*¹²⁰

La dernière partie de mon travail de thèse a été la mise en place d'un protocole de biosynthèse dans le but d'étudier le métabolisme secondaire d'alcaloïdes produits par des invertébrés marins. La biosynthèse des parazoanthines, isolées du morphe « *P. axinellae* allongés », semble être intéressante, l'étude de leur biosynthèse a donc été envisagée. Cependant, nous avons décidé de mettre en place un protocole de biosynthèse *in vivo* et *ex situ* d'alcaloïdes sur un modèle que nous avons considéré comme plus simple : l'éponge *Agelas oroides*. Ainsi, en partenariat avec l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, CNRS, Gif-Sur-Yvette), nous avons établi un protocole de la biosynthèse *in vivo* et *ex situ* des alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazoles (P2AI).

Partie C : Biosynthèse et métabolisme secondaire des P2AI

Dans le cadre du projet ECIMAR et en partenariat avec l'ICSN, une autre partie de mon travail de thèse a été la mise en place d'un protocole d'étude de la biosynthèse des alcaloïdes de type P2AI produits par l'éponge *Agelas oroides* à partir d'acides aminés.

I. Présentation

Les invertébrés marins sont une source importante de métabolites secondaires originaux ayant des activités biologiques intéressantes. Plusieurs hypothèses ont été avancées sur la biosynthèse de ces métabolites¹²⁷ dont quelques unes ont été confirmées expérimentalement.^{128,129,130} L'origine et le mode de formation des métabolites secondaires marins sont supposés être proches de ceux des plantes et animaux terrestres beaucoup plus étudiés. Toutefois, peu d'expériences ont permis de confirmer cette affirmation. L'environnement marin est très différent du terrestre ;¹³¹ le pH (environ 7,5), la pression osmotique due au pourcentage de sel (35 psu en moyenne) ainsi que la composition des membranes cellulaires des organismes marins sont quelques exemples montrant à quel point les conditions de biosynthèse sont différentes de celles du terrestre. Ces différences peuvent induire des voies de biosynthèse n'ayant pas été mises en évidence dans les organismes terrestres. D'ailleurs, on retrouve certaines différences dans le métabolisme marin par rapport aux organismes terrestres. Les halogènes et les fonctions isocyanures sont très présents dans les métabolites des algues ou des éponges alors qu'on les retrouve rarement dans ceux des plantes ou animaux terrestres.

Une étude approfondie des métabolismes marins peut donc permettre de découvrir de nouvelles réactions chimiques inspirées par la Nature. L'étude des voies de biosynthèse dans les invertébrés marins est donc très importante pour la recherche fondamentale. Elle l'est tout autant pour la recherche appliquée en permettant par exemple la production de métabolites cibles par « bio engineering ». Cependant, les études de biosynthèse des métabolites marins sont beaucoup moins aisées à mettre en œuvre que celles des métabolites terrestres.

I.1. Difficultés expérimentales

Les études de la biosynthèse de métabolites produits par des invertébrés marins se font généralement par l'incorporation d'un précurseur marqué dans le métabolite visé. Cependant, dans les invertébrés marins, la quantité de chaque métabolite est souvent très faible et leur biosynthèse est généralement lente, ce qui complique la détection de la conversion du précurseur en métabolite final dans les études *in vivo*. Afin d'obtenir des niveaux d'incorporation détectables dans le ou les produits finaux, les temps d'incorporation des précurseurs marqués et de leur métabolisation doivent être relativement longs. Une autre contrainte est le turnover (vitesse de renouvellement)

¹²⁷ Faulkner, D.J. *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, 8, 97-147.

¹²⁸ Garson, M.J. *Nat. Prod. Rep.*, **1989**, 6, 143-170.

¹²⁹ Moore, B.S. *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, 22, 580-593.

¹³⁰ Moore, B.S. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 615-629.

¹³¹ Baker, J.T. In: *Natural Products and Drugs Development* (Proceedings of the Alfred Benzon Symposium 20) edited by P. Krogsgaard-Larsen; S.B. Christensen; H. Kobod, Munksgaard, Copenhagen, **1984**, p. 145-163.

des métabolites qui est souvent très lent ; le taux d'incorporation des précurseurs marqués dans les métabolites cibles est par conséquent très bas.¹²⁸

De plus, le turnover et la concentration des métabolites secondaires d'un invertébré marin sont étroitement liés à son environnement et à la saison. Même si dans de nombreux cas, les métabolites biosynthétisés dans un milieu artificiel sont identiques à ceux produits *in situ*,¹³² le transport et le changement d'environnement peuvent perturber l'organisme marin et ainsi modifier son métabolisme. Des changements de composition des métabolites d'éponges en réponse à des changements environnementaux ont été mis en évidence par Thompson *et al.* par leurs études menées sur l'éponge *Rhopaloeides odorabile*.¹³³

136

L'eau de mer naturelle ayant un niveau très bas en nutriment (entre 0 et 25 µg.L⁻¹ en acides aminés et sucres)¹³⁴, le fait d'ajouter des précurseurs marqués en grande quantité peut modifier le métabolisme secondaire des organismes marins. Du reste, la biosynthèse des métabolites se produit dans des sites ou cellules spécialisés.^{135,136,137} Dans des études de biosynthèse *in vivo*, les précurseurs doivent donc traverser diverses membranes et parvenir intacts aux sites spécialisés.

Enfin, les invertébrés marins vivent généralement en association symbiotique. Les associations entre éponges et bactéries ou micro-algues, ou encore celles des coraux ou gorgones avec les dinoflagellés sont connues. Le degré et l'exacte nature de ces associations varient d'une espèce à l'autre ; ils peuvent même varier au sein d'une même espèce.¹³⁸ Ces détails ne peuvent pas être ignorés lors des études de biosynthèse, le transfert des nutriments entre symbiontes et animal doit être pris en compte, particulièrement lorsque l'origine du ou des métabolite(s) ciblé(s) n'est pas confirmée. De ce fait, les études permettant de comprendre les procédés métaboliques qui ont lieu dans le milieu marin sont encore très limitées. Différentes techniques ont été développées depuis une trentaine d'années mais aucune n'a pu être généralisée.

I.2. Techniques d'incorporation

Les précurseurs choisis pour la biosynthèse de substances naturelles marines sont généralement de petites molécules : acides aminés, sucres, acétate, mévalonate ou encore certains sels, comme les ions cyanures, trouvés naturellement dans l'eau de mer. Ces précurseurs sont généralement mis en présence de l'organisme étudié *in vivo* mais peuvent également être ajoutés à de fines coupes de cet organisme, à une culture cellulaire ou encore à un extrait acellulaire résolvant, dans ces deux derniers cas, les problèmes d'associations symbiotiques ou de transport des précurseurs vers les sites spécialisés. Les différentes techniques d'incorporation utilisées sont représentées sur le **Schéma n°5**.

¹³² Howard, B.M. ; Nonomura, A.M. ; Fenical, W. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1980**, 8, 329-336.

¹³³ Thompson, J.E. ; Murphy, P.T. ; Bergquist, P.R. ; Evans, E.A. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1987**, 15, 595-606.

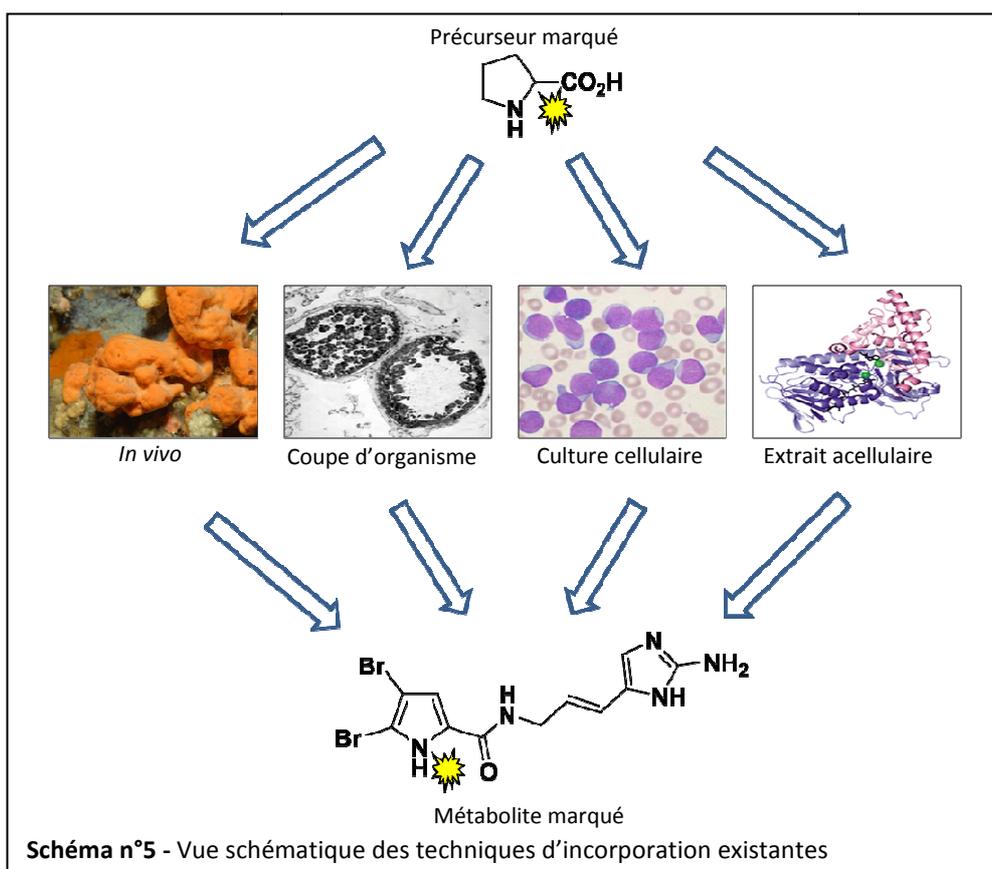
¹³⁴ Riley, J.P. ; Chester, R. In: *Introduction to Marine Chemistry*, Academy Press New York, **1971**, 182-218.

¹³⁵ Thompson, J.E. ; Barrow, K.D. ; Faulkner, D.J. *Acta Zool.*, (Stockholm), **1983**, 64, 199-210.

¹³⁶ Müller, W.E.G. ; Diehl-Seifert, B. ; Sobel, C. ; Bechtold, A. ; Kliajic, Z. ; Dorn, A. *J. Histochem. Cytochem.*, **1986**, 34, 1687-1690.

¹³⁷ Young, D.N. ; Howard, B.M. ; Fenical, W. *J. Phycol.*, **1980**, 16, 182-185.

¹³⁸ Berthold, R.J. ; Borowitzka, M.A. ; Makay, M.A. *Phycologia*, **1982**, 21, 327-335.



Lorsque l'incorporation *in vivo* est choisie, l'expérience peut être menée *in situ* ou en aquarium, et dans ce cas, l'incorporation est dite *ex situ*.

Même si pour la plupart des expériences de biosynthèse *in vivo* les précurseurs sont mis en solution aqueuse, avec, dans quelques cas, l'ajout de Tween 80 pour faciliter leur transport à travers les barrières cellulaires, ces précurseurs peuvent également être directement injectés dans l'invertébré marin. D'autres techniques telles que l'encapsulation dans des liposomes ou des capsules de gélatine ont également été utilisées.^{139,140} Les organismes peuvent aussi être maintenus dans un environnement contenant le ou les précurseurs, par exemple une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$, de l'eau en présence de $[^{14}\text{C}]$ -acétate ou être nourris avec des micro-algues développées dans un bullage de $^{14}\text{CO}_2$.

Le choix du type de marquage est également très important. L'utilisation de la radioactivité, permettant une détection ultrasensible, permet de travailler avec des concentrations en précurseurs équivalentes à celles trouvées dans le milieu naturel (de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les précurseurs radiomarqués sont idéaux pour commencer une étude et mettre au point les conditions optimales de biosynthèse. Si le taux d'incorporation du précurseur dans la molécule synthétisée le permet, il est ensuite possible de confirmer les résultats avec des précurseurs marqués de façon stable. En plus des précautions de manipulation moins contraignantes, le passage aux isotopes stables permet de cibler le ou les sites d'incorporation dans le métabolite final et ainsi de valider avec certitude un chemin

¹³⁹ Tymiak, A.A. ; Rinehart, K.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6763-6765.

¹⁴⁰ Hagadone, M.R. ; Scheuer, P.J. ; Holm, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 2447-2448.

biosynthétique. En revanche, le seuil de sensibilité étant beaucoup plus faible que pour les isotopes radioactifs, les expériences de biosynthèse en isotope stable requièrent une concentration en précurseurs mille fois plus importante (de l'ordre du mg.L^{-1}) ce qui peut être toxique pour l'animal habitué à des quantités de nutriments beaucoup plus faibles. Les voies de biosynthèse peuvent également en être affectées, modifiant par conséquent tout le métabolisme de l'animal.

Ayant l'intention de mettre au point un protocole de biosynthèse applicable sur les spongiaires, nous nous sommes intéressés aux quelques expériences menées jusqu'à présent sur ce phylum.

I.3. Etudes sur les éponges

En 2001, près de 3 000 métabolites ont été isolés d'éponges marines dont 98 % dérivent de la biosynthèse des acides aminés, de l'acétogénine ou de l'isoprène.¹⁴¹ La voie isoprénique est utilisée pour la moitié de ces molécules tandis que la voie « acides aminés » ou « polycétides » est utilisée pour respectivement 26 et 22 % des métabolites. Cependant, un nombre conséquent de composés emprunte des voies de biosynthèse mixtes. La plupart de ces composés ont des activités biologiques intéressantes.

L'abondance de structures originales a permis de nombreuses spéculations biosynthétiques. Malheureusement, parmi les éponges, peu d'expériences ont pu confirmer ces hypothèses. Les problèmes associés aux études métaboliques des éponges sont discutés par Barrow et Goad.^{142,143} La difficulté première est très certainement leur métabolisme très lent. L'accumulation de certains composés peut se compter en années au lieu de quelques mois ou semaines pour d'autres organismes. De ce fait, si incorporation il y a, le composé isotopiquement enrichi sera forcément noyé dans la quantité des métabolites déjà présents.

En plus de ces problèmes, lorsque l'étude est réalisée *ex situ*, il n'est pas aisé de maintenir les éponges en aquarium pendant de très longues périodes pourtant nécessaires à l'incorporation des précurseurs dans les métabolites visés. Les organismes peuvent être stressés par ce changement des conditions physicochimiques, ce qui peut se traduire par l'absence de production de métabolites secondaires ou l'emprunt d'une autre voie biosynthétique. Afin de ne pas avoir les contraintes des études *ex situ*, des techniques permettant des études de biosynthèse *in situ* ont été développées, telles que l'utilisation de capsules gélifiées dans lesquelles sont enfermés les précurseurs,¹⁴⁰ l'injection des précurseurs directement dans l'organisme *in situ* ou encore l'utilisation de pompes osmotiques. L'utilisation de liposomes a également été testée et, dans ce cas, les précurseurs sont entourés d'une membrane de cholestérol et de phosphatidylcholine imitant les bactéries.¹³⁹ Cette technique d'incorporation peut être un bon moyen d'augmenter le pourcentage d'incorporation des précurseurs dans les éponges, organismes filtreurs et se nourrissant des bactéries et débris organiques présents dans l'eau. Néanmoins, comme nous allons le voir avec les expériences

¹⁴¹ Harper, M.K. ; Bugni, T.S. ; Copp, B.R. ; James, R.D. ; Lindsay, B.S. ; Richardson, A.D. ; Schnabel, P.C. ; Tasdemir, D. ; VanWagoner, R.M. ; Verbitski, S.M. ; Ireland, C.M. In: *Marine Chemical Ecology*, CRC Press, **2001**, 11.

¹⁴² Barrow, K.D. In: *Marine Natural Products*, Academic Press, New York, **1983**, 5, 51.

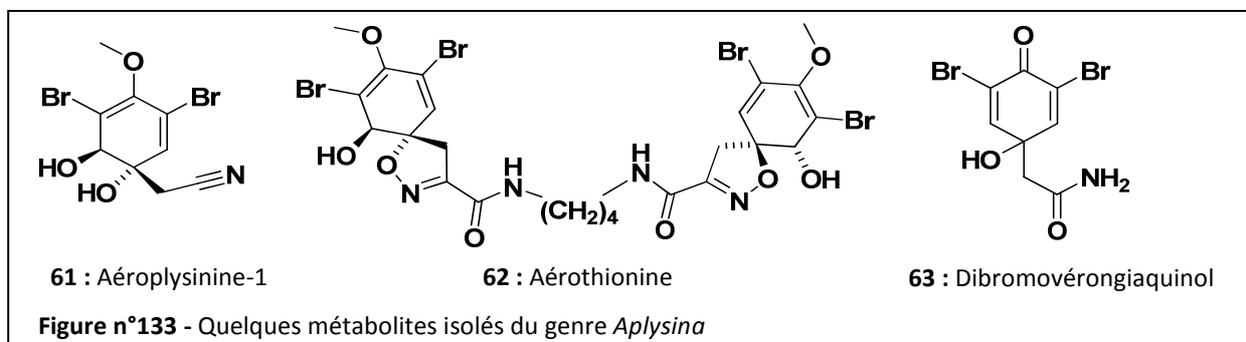
¹⁴³ Goad, L.J. *Pure Appl. Chem.*, **1981**, 53, 837-852.

suivantes, les éponges sont aussi capables d'absorber la matière organique dissoute dans l'eau telle que les acides aminés, les sucres ou autre petites molécules.

Les expériences décrites ci-après constituent une liste non exhaustive des différents travaux de biosynthèse de certains métabolites secondaires produits par diverses éponges : dérivés de la dibromotyrosine, dérivés isocyanures, stérols, acides gras, etc. Elles mettent en relief les différentes techniques d'incorporation utilisées, la quantité de précurseurs ajoutée et leur taux d'incorporation dans les métabolites biosynthétisés.

I.3.1. Dérivés de la dibromotyrosine

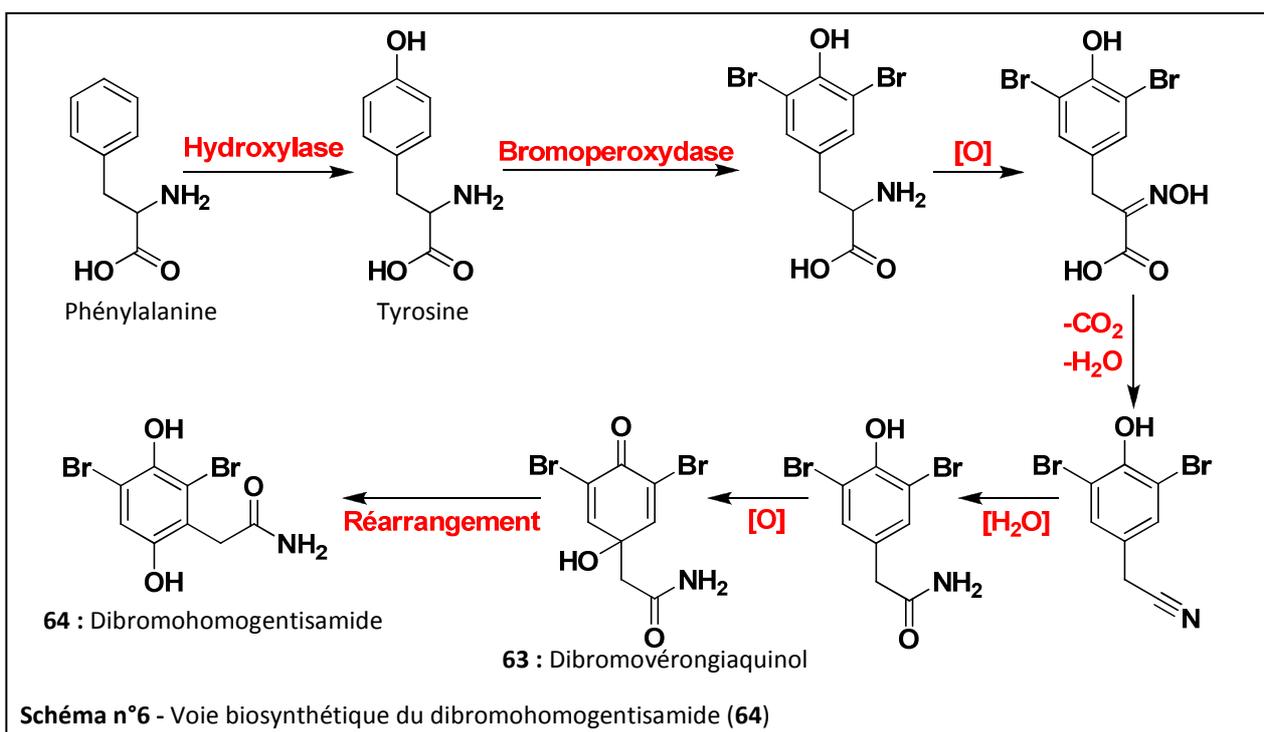
Les éponges du genre *Aplysina* produisent une grande diversité de métabolites dérivés de la bromotyrosine. DeRosa *et al.* ont été les premiers à avoir publié des études de biosynthèse sur une éponge de ce genre : *Aplysina cavernicola*.¹⁴⁴ Ainsi, 200 g d'éponge coupée en morceaux ont été incubés pendant deux jours dans un aquarium de 10 L en présence des précurseurs radiomarqués (100 à 250 μ Ci suivant le précurseur). Les précurseurs en question ($[1-^{14}\text{C}]$ -acétate, $[2-^{14}\text{C}]$ -mévalonate, $[^{14}\text{C}$ -méthyl]-méthionine, $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-tyrosine et $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-ornithine) ont été incorporés dans les acides gras de l'éponge mais malheureusement pas dans les métabolites visés : aéroplysine-1 (61), aérothionine (62) et dibromovérongiaquinol (63).



Tymiak et Rinehart ont essayé d'améliorer cette expérience en utilisant des précurseurs encapsulés dans des liposomes.¹³⁹ Les liposomes, de la taille d'une bactérie et constitués de cholestérol et de phosphatidylcholine, miment les membranes bactériennes et seraient plus facilement incorporés dans l'éponge. L'enjeu des auteurs est de montrer leur efficacité dans les études de biosynthèse lorsque les précurseurs sont peu polaires. Ainsi, *Aplysina fistularis* a été collectée et placée dans un aquarium aéré de 3 L contenant des antibactériens, ainsi que les précurseurs avec ou sans liposomes (de 20 à 230 μ Ci suivant le précurseur considéré). Après 2 à 6 jours d'incubation, l'éponge a été extraite puis fractionnée. La fraction lipidique, majoritairement composée des stérols de l'éponge, avait une radioactivité comprise entre 0,13 et 1,76 % de celle de départ en fonction du précurseur considéré. La $[^{14}\text{C}$ -méthyl]-méthionine (1,76 % de la radioactivité ajoutée) a particulièrement été

¹⁴⁴ DeRosa, M. ; Minale, L. ; Sodano, G. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **1973**, 45B, 883-893.

incorporée dans cette fraction. La fraction méthanolique, riche en métabolites bromés tels que la dibromovérongiaquinol (**63**), l'aéroplysine-1 (**61**) et le dibromohomogentisamide (**64**), a, quant à elle, été radiomarquée par tous les précurseurs testés (de 0,05 à 2,03 % de la radioactivité de départ suivant le précurseur considéré) mais en particulier par la [U-¹⁴C]-D,L-phénylalanine (1,13 %) et la [U-¹⁴C]-D,L-tyrosine (2,03 %). Une incorporation plus importante de la [U-¹⁴C]-D,L-tyrosine dans le composé **63** a été remarquée lorsque le précurseur était encapsulé dans un liposome, avec un taux d'incorporation de $3,21 \cdot 10^{-2}$ % avec liposome, contre $0,77 \cdot 10^{-2}$ % sans liposome. Cette technique d'incorporation par liposome a donc été validée pour l'incorporation de précurseurs peu polaires.



Le chemin biosynthétique validé par les auteurs (**Schéma n°6**) met en jeu une bromation enzymatique de la tyrosine, suivie d'une oxydation en oxime, d'une décarboxylation en nitrile, puis d'une hydratation, pour donner un amide qui est converti en composé **63**. Après un réarrangement comparable à celui observé dans la biosynthèse de l'acide homogentisique chez les mammifères, le dibromovérongiaquinol (**63**) est transformé en dibromohomogentisamide (**64**).¹⁴⁵ De plus, en utilisant un double marquage avec la [¹⁵N]-phénylalanine et la [U-¹⁴C]-phénylalanine, et par calcul du rapport isotopique en spectrométrie de masse, les auteurs ont pu montrer que l'éponge était capable de convertir la chaîne latérale de la phénylalanine en substituant acétamide dans le composé **64**, sans passer par une désamination.¹³⁹ Ce chemin biosynthétique est cohérent avec l'isolement de bromophénols oximes, nitriles et amides dans les éponges du genre *Aplysina*.

A la suite de ces travaux, Carney et Rinehart ont tenté d'incorporer des intermédiaires plus avancés dans la biosynthèse, tels que des dérivés bromés et *O*-méthylés de la tyrosine, ainsi que le 4-

¹⁴⁵ Saito, I. ; Chujo, Y. ; Shimazu, H. ; Yamane, M. ; Matsuura, T. ; Cahnmann, H.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 5272-5277.

hydroxybenzyl-nitrile et ses dérivés bromés.¹⁴⁶ Pour cela, les échantillons d'*Aplysina fistularis* ont été placés dans des aquariums aérés de 3 L d'eau de mer contenant des antibactériens ainsi que les précurseurs radiomarqués (de 40 à 200 μCi suivant le précurseur considéré). Les aquariums ont été maintenus en circuit fermé 2 à 3 jours après l'ajout des précurseurs puis, ont été remis en circuit ouvert pendant 1 à 3 semaines. Ce travail a démontré pour la première fois que l'aéroplysine-1 (**61**) et le dibromovérongiaquinol (**63**) sont dérivés de la 3,5-dibromotyrosine avec un taux d'incorporation de $5,4 \cdot 10^{-2} \%$ pour le composé **61** et $7,3 \cdot 10^{-2} \%$ pour le composé **63**. Comme précédemment, la tyrosine a été incorporée dans le dibromovérongiaquinol (**63**) avec un taux d'incorporation de $50 \cdot 10^{-2} \%$ mais également dans l'aéroplysine-1 (**61**) avec $7,2 \cdot 10^{-2} \%$ d'incorporation. La 3-bromotyrosine a, elle aussi, été incorporée dans les composés **61** ($8,8 \cdot 10^{-2} \%$) et **63** ($13 \cdot 10^{-2} \%$). Cependant, contrairement aux prévisions, l'incorporation de la tyrosine a été plus importante que celle de la bromotyrosine qui, elle-même, a été plus importante que celle de la dibromotyrosine. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par une perméabilité aux membranes cellulaires d'éponge moins importante dans le cas des précurseurs avancés. Le 3-bromo-4-hydroxybenzyl-nitrile et le 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl-nitrile n'ont, quant à eux, pas été incorporés dans les composés **61** et **63**, malgré six expériences tentées. Ce résultat est étrange car ce sont des métabolites déjà isolés dans *A. fistularis* et que leur participation dans la biosynthèse du dibromovérongiaquinol (**63**, **Schéma n°6**) semble logique. Considérant que ces précurseurs participent effectivement à la biosynthèse des composés **61** et **63**, les auteurs ont expliqué cette non-incorporation par une faible solubilité des nitriles dans l'eau de mer ou un faible transport des nitriles halogénés à travers les membranes cellulaires.

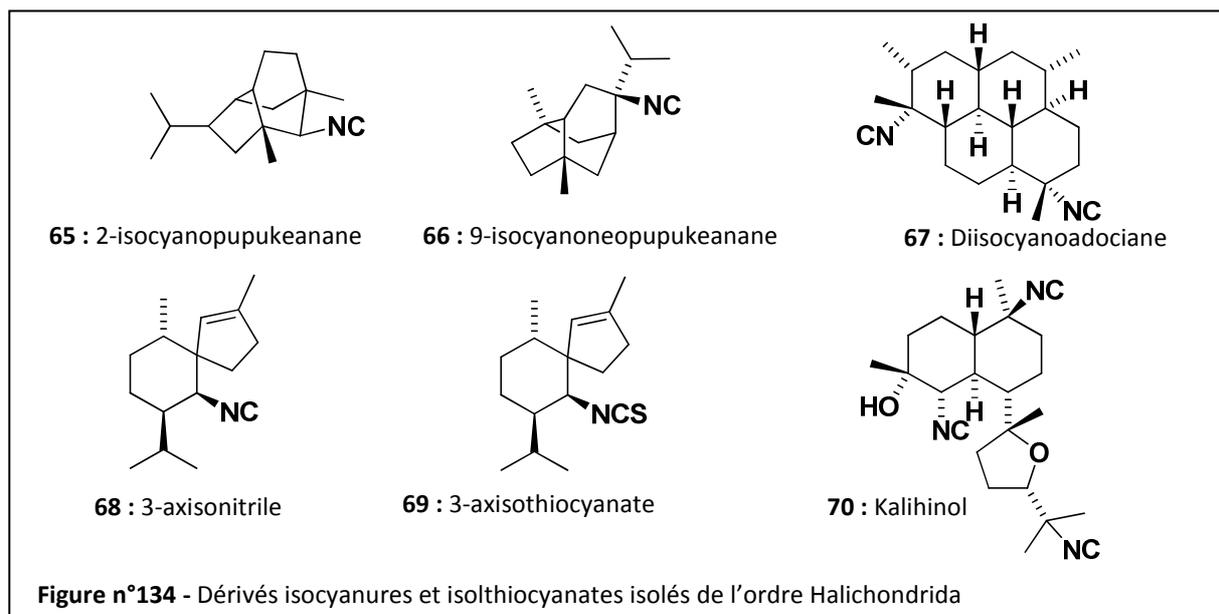
I.3.2. Dérivés isocyanures, isocyanates et formamides

L'étude de la biosynthèse d'isocyanures terpéniques est très intéressante car ces composés ne se retrouvent que très rarement dans les plantes et animaux terrestres.¹⁴⁷ Garson propose une mise à jour des différents composés marins possédant une fonction isocyanure isolés depuis 1999, de leur biosynthèse et de leur rôle écologique.¹⁴⁸

¹⁴⁶ Carney, J.R. ; Rinehart, K.L. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 971-985.

¹⁴⁷ Faulkner, D.J. *Tetrahedron*, **1977**, 33, 1421-1443.

¹⁴⁸ Garson, M.J. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 21, 164-179.



A travers les études de biosynthèse de ces métabolites, différents groupes de recherche ont essayé de comprendre l'origine de leur squelette terpénique, ainsi que celle du groupe fonctionnel azoté. Les premières spéculations sur l'origine biogénétique de l'isocyanure ont décrit le formamide en tant que précurseur. Cependant, Scheuer *et al.* ont montré, par une expérience *in situ*, que l'éponge *Ciocalypta sp.* était incapable de convertir le [¹³C]-formiate en 2-isocyanopupukeanane (**65**).¹⁴⁰ Les précurseurs, encapsulés dans des gélules de gélatine, ont été insérés dans l'éponge par incision (de 30 à 100 mg de précurseurs marqués ¹³C par éponge étudiée). L'éponge a ensuite été laissée sur site pour une durée de métabolisation variant d'une à deux semaines.

Grâce à d'autres expériences, utilisant des précurseurs radiomarqués avancés (expériences *ex situ*), le formamide a clairement été exclu des hypothèses biosynthétiques des isocyanures.^{149,150} Par ses études sur *Pipestela terpenensis* (anciennement connu sous le nom d'*Amphimedon terpenensis*), Garson a été la première à démontrer que le groupe isocyanure du diisocyanoadociane (**67**) était dérivé du cyanure inorganique, puisque les carbones des isocyanures ont été spécifiquement radiomarqués.¹⁵¹ Ceci a été confirmé par l'incorporation du [¹⁴C]-cyanure dans le 2-isocyanopupukeanane (**65**) (*Ciocalypta sp.*) avec une incorporation spécifique de 1,8 % et dans le diterpène kalihinol F (**70**) (*Acanthella sp.*) avec une incorporation spécifique de 1,5 %.¹⁵² Ces dernières expériences ont été réalisées *in situ*. Garson a utilisé des greffes d'une même éponge pour les mettre en présence des précurseurs *ex situ* pendant 12h (aquariums de 10-20 L, 15-20 μCi.L⁻¹ de précurseurs) puis les replacer en mer pour une métabolisation de 12 à 38 jours. Karuso *et al.* ont, quant à eux, injecté directement les précurseurs, encapsulés dans des vésicules lipidiques, dans les éponges *in situ* (100 μCi de précurseur par éponge) suivi de 3 à 5 semaines de métabolisation. Par injection de [¹³C, ¹⁵N]-cyanure dans *Ciocalypta sp.*, les auteurs ont également montré que le carbone ainsi que l'azote du cyanure étaient incorporés dans le 9-isocyanonéopupukeanane (**66**).

¹⁴⁹ Iengo, A. ; Santacroce, C. ; Sodano, G. *Experientia*, **1979**, 35, 10-11.

¹⁵⁰ Brust, A. ; Garson, M.J. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 327-330.

¹⁵¹ Garson, M.J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1986**, 35-36.

¹⁵² Karuso, P. ; Scheuer, P.J. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 2092-2095.

Afin de prouver son utilisation dans la biosynthèse de leurs isocyanures terpéniques, l'incorporation du cyanure inorganique a également été testée dans deux autres éponges : *Acanthella cavernosa* et *Axinyssa n. sp.*. *A. cavernosa* a été placée dans un bécher de 200 mL d'eau de mer en présence de 50 μCi du $[^{14}\text{C}]$ -cyanure pendant 12h avant d'être replacée en circuit ouvert pendant 16 jours. L'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -cyanure dans l'éponge a permis de confirmer son rôle de précurseur dans le sesquiterpène majoritaire, le 3-axisonitrile (**68**, 0,15 à 0,39 % d'incorporation).¹⁵³ Les niveaux d'incorporation sont comparables à ceux obtenus avec *Pipestela terpenensis*, *Ciocalypta sp.* et *Acanthella sp.* En revanche, l'incorporation de l'ion cyanure dans le 9-isocyanopupukeanane (**71**) d'*Axinyssa n. sp.* a été très faible sans que les auteurs n'aient réellement pu en expliquer la raison.¹⁵⁴

Acanthella cavernosa a également été utilisée pour les premières études de biosynthèse des isothiocyanates marins. L'incorporation de l'ion thiocyanate dans le 3-axisothiocyanate (**69**) a prouvé son rôle de précurseur des isothiocyanates marins.¹⁵³ Plus surprenant, l'ion thiocyanate a également été incorporé dans la fonction isocyanure du 3-axisonitrile (**68**). Bien qu'encore non déterminé, il est possible que l'enzyme rhodanèse ou son équivalent soit présente dans *A. cavernosa*. En effet, cette enzyme, très répandue dans la Nature, permet la conversion du cyanure en thiocyanate. Quant au passage du thiocyanate au nitrile, il est rendu possible grâce aux peroxydases connues pour catalyser l'oxydation des thiocyanates en nitrile et sulfates. Ce phénomène d'interconversion a aussi été remarqué dans d'autres éponges comme *Axinyssa n. sp.* et *Stylotella aurantium*.^{154,155}

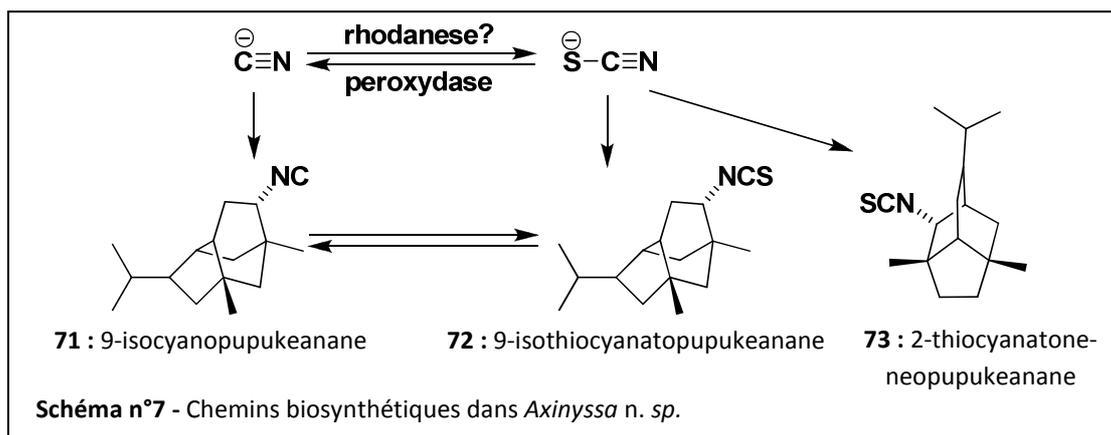
Cette interconversion peut également avoir lieu au niveau des métabolites secondaires. Par une étude en spectrométrie de masse, l'équipe de Scheuer a montré que le 2-isocyanopupukeanane (**65**) était le précurseur du dérivé isothiocyanate correspondant dans *Ciocalypta sp.* mais n'a pas pu démontré l'interconversion inverse.¹⁵² Par la suite, Simpson et Garson ont étudié en profondeur ce phénomène dans *Pipestela terpenensis*, riche en isocyanure et contenant des isothiocyanates dans ses métabolites minoritaires, et dans *Axinyssa n. sp.*, contenant le 9-isocyanopupukeanane (**71**), le 9-isothiocyanatopupukeanane (**72**) et le thiocyanate **73**, en utilisant à la fois des précurseurs inorganiques (CN^- , SCN^-) et avancés (**Schéma n°7**).¹⁵⁶ Dans ces expériences, les précurseurs (de 12,5 μCi à 100 μCi pour $^{14}\text{CN}^-$ et S^{14}CN^-) ont directement été placés dans les aquariums (volume non spécifié) contenant les éponges. La durée de métabolisation varie entre 3 et 27 jours suivant la santé de l'éponge et les taux d'incorporation dans les métabolites ciblés sont compris entre $5.10^{-5}\%$ et 1,14 % pour précurseurs inorganiques et entre $2.10^{-4}\%$ et $2.10^{-2}\%$ pour les précurseurs avancés. Comme pour les études de Scheuer, les expériences sur *P. terpenensis* n'ont pas démontré une conversion évidente de l'isothiocyanate en isocyanure. Les auteurs ont expliqué l'incorporation faible et variable du précurseur par le fait qu'il ne faisait pas partie des métabolites naturellement présents dans l'éponge. En revanche, l'interconversion isocyanure \rightarrow isothiocyanate a été validée par l'incorporation de précurseurs avancés. L'incorporation des précurseurs cyanure et thiocyanate inorganiques a été importante dans le métabolite isothiocyanate **72** alors qu'elle a été faible dans l'isocyanure **71**. Grâce à ces différents résultats, les auteurs ont proposé une voie biosynthétique dans *Axinyssa n. sp.* : Cyanure \rightarrow thiocyanate \rightarrow isothiocyanate **72** \rightarrow isocyanure **71** (**Schéma n°7**).

¹⁵³ Dumdei, E.J. ; Flowers, A.E. ; Garson, M.J. ; Moore, C.J. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **1997**, *118*, 1385-1392.

¹⁵⁴ Simpson, J.S. ; Garson, M.J. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5819-5822.

¹⁵⁵ Simpson, J.S. ; Raniga, P. ; Garson, M.J. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7947-7950.

¹⁵⁶ Simpson, J.S. ; Garson, M.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 939-948.



Simpson et Garson ont suggéré que l'interconversion dans *Axinyssa n. sp.* était due à un équilibre naturel dans l'éponge qui ajusterait la concentration de chaque métabolite suivant ses besoins.

L'origine du groupe dichloroimine de certains terpènes a également intéressé plusieurs équipes de recherche. Contrairement aux sesquiterpènes isocyanures et isothiocyanates, les sesquiterpènes contenant une fonction dichloroimine sont relativement peu présents dans le milieu marin. Faulkner *et al.* ont été les premiers à supposer que l'origine biosynthétique de la fonction dichloroimine de ces terpènes était étroitement liée à leur isocyanure et isothiocyanate correspondant.^{157,158} Afin de vérifier cette hypothèse, l'équipe de Garson a testé l'incorporation des [¹⁴C]-cyanure et [¹⁴C]-thiocyanate (50 et 13 μCi), supposés être des précurseurs, dans les stylostellanes A (**76**) et B (**77**) de *Stylorella aurantium* (expérience *ex situ* avec ajout des précurseurs dans l'eau).¹⁵⁵ Les stylostellanes A (**76**) et B (**77**), purifiés par HPLC, ont effectivement été radiomarqués par ces expériences avec des taux d'incorporation de 0,4.10⁻² % pour le composé **76** et 3,3.10⁻² % pour le composé **77** dans le cas de l'ajout de [¹⁴C]-cyanure et 3,4.10⁻⁴ % pour le composé **76** et 5,6.10⁻⁴ % pour le composé **77** dans le cas de l'ajout de [¹⁴C]-thiocyanate. Ces résultats confirment l'origine biosynthétique de la fonction dichloroimine. Pour confirmer le schéma biosynthétique des stylostellanes (**Schéma n°8**), Garson a utilisé comme précurseurs avancés, les isocyanure et isothiocyanate de farnésyle **75** et **74** proposés comme intermédiaires biosynthétiques.¹⁵⁰ Dans ces expériences, des morceaux de *Stylorella aurantium* ont été placés dans des béciers de 200 mL contenant 3,6 μCi du précurseur **74** ou 11,8 μCi du précurseur **75**. Il convient de noter la faible quantité de radioactivité utilisée dans ces expériences (de 5 à 50 fois moins que dans les expériences *in vivo* usuelles). En effet, les précurseurs choisis étant avancés dans la biosynthèse des stylostellanes, ils sont plus spécifiques à un chemin biosynthétique donné ; la quantité de radioactivité nécessaire peut donc être diminuée. Après 14 à 28 jours de métabolisation en circuit ouvert (aquarium de 10 L), chaque morceau a été extrait et les stylostellanes A et B marqués (**76-77**) ont été purifiés par HPLC permettant ainsi d'en déterminer leur activité spécifique. La biosynthèse à partir du [¹⁴C]-isothiocyanate **74** a permis d'obtenir le stylostellane A (**76**) avec une activité spécifique de 1,00 μCi.mmol⁻¹ (0,23 % d'incorporation) et le stylostellane B (**77**) avec une activité spécifique de 0,36 μCi.mmol⁻¹ (0,27 % d'incorporation). Après ajout de l'isocyanure de farnésyle **75**, deux durées de métabolisation, de 14 jours et 28 jours, ont été testées. Quelle que soit la durée de métabolisation testée, le [¹⁴C]-isocyanure de farnésyle

¹⁵⁷ Wratten, S.J. ; Faulkner, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 7367-7368.

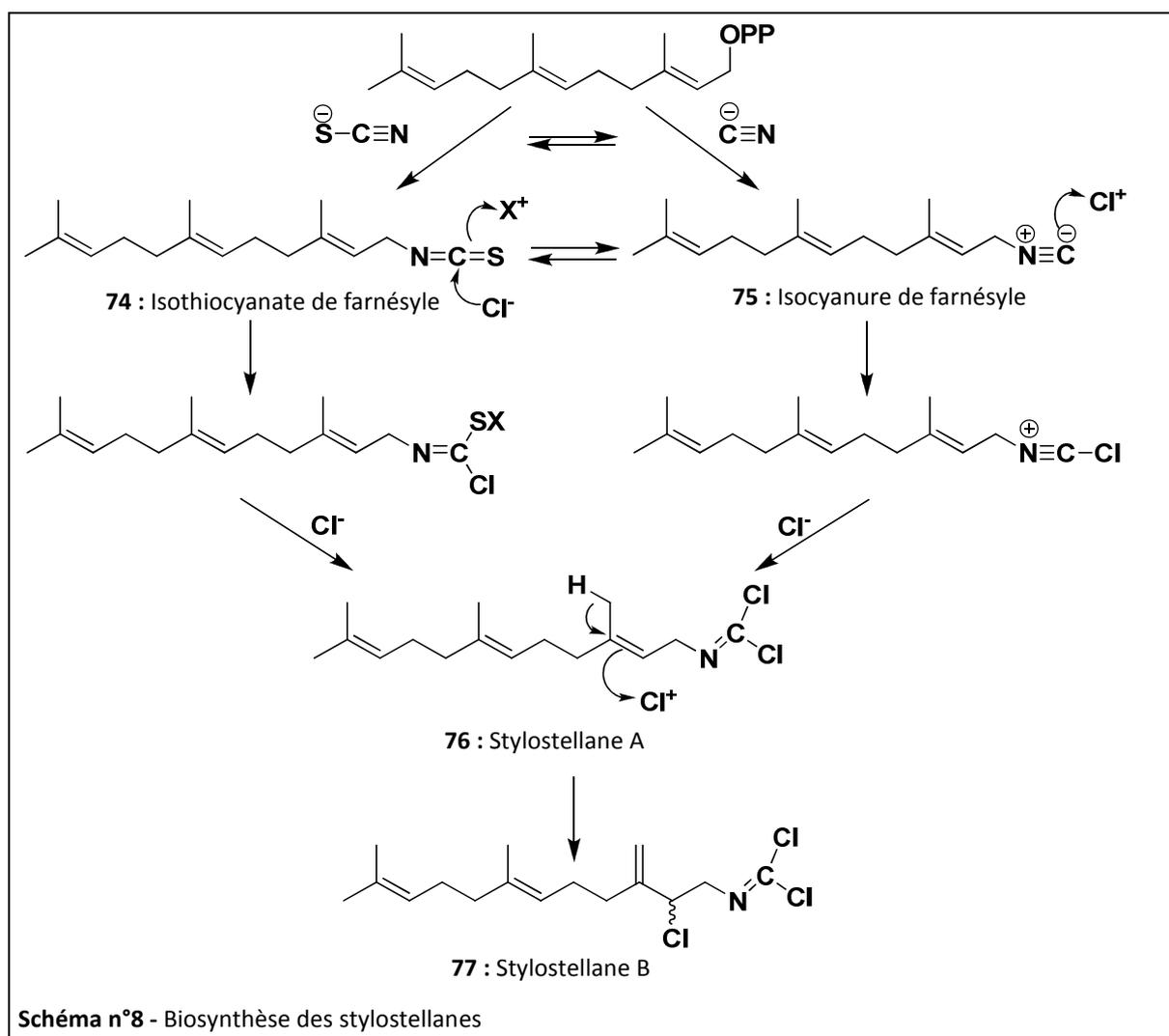
¹⁵⁸ Wratten, S.J. ; Faulkner, D.J. ; Van Engen D. ; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *18*, 1391-1394.

75 a été incorporé dans les stylostellanes A et B (**76-77**) et également dans l'isothiocyanate **74** montrant encore une fois la conversion $-NC \rightarrow -NCS$ (**Tableau 20**).

Tableau 20 - Activités spécifiques et pourcentage d'incorporation de l' $[^{14}C]$ -isocyanure de farnésyle (**75**) dans les composés **74**, **76** et **77**

| | 14 jours | | 28 jours | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------|
| | Activité spécifique ($\mu\text{Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$) | Incorporation (%) | Activité spécifique ($\mu\text{Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$) | Incorporation (%) |
| Stylostellane A (76) | 0,58 | 0,04 | 0,50 | 0,02 |
| Stylostellane B (77) | 0,11 | 0,13 | 0,08 | 0,02 |
| Isothiocyanate 74 | 0,61 | 0,03 | 0,66 | 0,01 |

Les auteurs n'ont pas expliqué les taux d'incorporation plus faibles après 28 jours de métabolisation qu'après 14 jours. Ce phénomène pourrait être lié au turnover des métabolites qui, au bout de 28 jours de métabolisation, auraient déjà remplacé les molécules marquées par des molécules froides.



Ces expériences ont montré l'avantage de l'utilisation des précurseurs avancés dans la biosynthèse des stylostellanes, illustré par le **Schéma n°8**. Garson a ensuite posé de nouvelles questions sur la place des enzymes dans cette biosynthèse.¹⁵⁹ Tout comme pour *Acanthella cavernosa*, l'enzyme rhodanèse, nécessaire à la conversion du cyanure en thiocyanate, n'a pas encore été décrite dans *S. aurantium*. Par ailleurs, les halogénases permettant l'introduction de l'ion chlorure dans les métabolites, jouent certainement un rôle dans cette biosynthèse. En induisant parfois des cyclisations, ces enzymes expliqueraient la présence des métabolites dichloroimines cycliques isolés de *S. aurantium*.

I.3.3. Stérols

Les éponges contiennent une très grande variété de stérols dont le noyau et/ou la chaîne latérale sont modifiés par rapport à leurs homologues terrestres. Les différents stérols marins ont été répertoriés par Kerr et Baker.¹⁶⁰ Selon l'espèce considérée, la composition en stérols est très différente. Certaines éponges possèdent un très large choix de stérols en faible quantité quant à d'autres, leur diversité est plus restreinte mais leur quantité est plus importante. Cette spécificité a permis d'utiliser les stérols en tant que marqueurs chimiotaxonomiques lors d'une étude en 1980.¹⁶¹ L'accumulation d'une grande quantité de stérols originaux dans de nombreuses éponges présume leur rôle en tant que composés cellulaires structuraux. Ce qui est supporté par la structure inhabituelle de leurs membranes et par leur nature semi-différentielle. De plus, contrairement aux terpènes, aucune variation saisonnière ou environnementale n'est remarquée. L'origine et la biosynthèse des stérols d'éponges sont exposées dans une revue de Djerassi et Silva.¹⁶²

Quatre chemins ont été proposés pour la biosynthèse des stérols d'éponges :¹⁴³

- la biosynthèse *de novo* à partir de l'acétate ou du mévalonate comme cela a été démontré dans les algues ;^{163,164}
- l'ingestion intacte du stérol sans modifications chimiques ;
- l'ingestion intacte du stérol suivie de modifications chimiques ; et,
- la synthèse des stérols par les symbiontes intimement associés aux éponges.

Ce n'est que dans les années 90 que la question de l'origine des stérols dans les éponges a réellement été traitée. Selon les premiers travaux, utilisant l'acétate et le mévalonate comme précurseurs, certaines éponges seraient capables de réaliser une biosynthèse *de novo* des stérols tandis que d'autres en seraient incapables (expériences *ex situ* par ajout des précurseurs dans

¹⁵⁹ Simpson, J.S. ; Brust, A. ; Garson, M.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 949-956.

¹⁶⁰ Kerr, R.G. ; Baker, B.J. *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, 8, 465-497.

¹⁶¹ Bergquist, P.R. ; Hofheinz, W. ; Oesterhelt, G. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1980**, 8, 423-435.

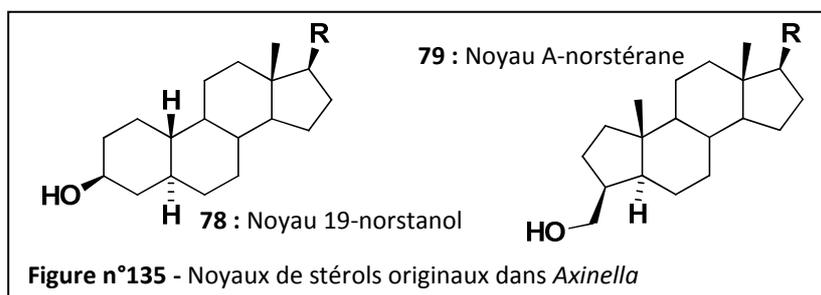
¹⁶² Djerassi, C. ; Silva, C.J. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 371-378.

¹⁶³ Nicotra, F. ; Ranzi, B.M. ; Ronchetti, F. ; Russo, G. ; Toma, L. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 752-753.

¹⁶⁴ Kokke, W.C.M.C. ; Shoolery, J.N. ; Fenical, W. ; Djerassi, C. *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 3742-3752.

l'eau).^{144,165,166,167,168} Néanmoins, la biosynthèse de ces stérols n'est pas nécessairement la même pour toutes les éponges du même ordre, famille ou même genre, ce qui compliquait les résultats. Il a été remarqué que les éponges contenant des nouveaux stérols n'étaient pas capables d'une biosynthèse *de novo* tandis que celles possédant des stérols dits communs le pouvaient.¹⁴³

En 1991, Silva *et al.* ont entrepris une étude quasi-exhaustive sur 37 éponges appartenant à 12 ordres différents. Grâce à 26 expériences et en utilisant quatre techniques d'incorporation *in vivo* différentes (précurseurs directement dissous dans l'eau, enrobés d'une capsule de gélatine, libérés au moyen d'une pompe osmotique ou encore encapsulés dans des liposomes) et au moyen d'une incorporation sur extrait acellulaire, les auteurs ont pu résoudre le problème de la biosynthèse *de novo*.¹⁶⁹ Hormis pour l'extrait acellulaire, l'étape d'incorporation a été faite *ex situ* tandis que celle de métabolisation a eu lieu *in situ*. Au travers de ces différentes expériences, les auteurs ont montré que les précurseurs hydrosolubles (acétate, méthionine, mévalonate) étaient peu utilisés dans la biosynthèse des stérols de par leur faible incorporation dans l'éponge et/ou leur utilisation pour d'autres fins biosynthétiques. Les précurseurs lipidiques (lanostérol et squalène) ont été beaucoup plus incorporés dans les éponges. Ces expériences ont mis en évidence une biosynthèse *de novo* des stérols à partir du squalène. Ainsi, les auteurs ont conclu que, quelle que soit l'éponge considérée, la biosynthèse *de novo* des stérols était possible. Certaines éponges seraient également capables d'une biosynthèse de leurs stérols par désalkylation de stérols ingérés comme le font les insectes.



L'originalité des noyaux modifiés des stérols d'éponges a très vite intéressé plusieurs groupes de recherche. Deux types de stérols possédant un noyau modifié ont été étudiés : les 19-norstanols (**78**) dans *Axinella polypoides* et les A-norstéranes (**79**) dans *Axinella verrucosa*.¹⁴² Après DeRosa *et al.*, montrant que l'origine biosynthétique des 19-norstanols (**78**) était le cholestérol,¹⁶⁶ Rabinowitz et Djerassi en ont décrit le chemin biosynthétique détaillé dans *Axinella polypoides*.¹⁷⁰ 20 μCi de $[6\text{-}^3\text{H}]$ -cholest-5- β ,19-diol, d'acide $[6\text{-}^3\text{H}]$ -3 β -hydroxycholest- β ,19-oïque et de $[6\text{-}^3\text{H}]$ -19-norcholest-5-(10)- β -ol ont été ajoutés dans un aquarium contenant l'éponge, ce qui a permis, après métabolisation, d'isoler un 19-norstanol dont l'activité spécifique variait de 0,85 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ à 2,70 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ suivant le précurseur considéré. Les A-norstéranes (**79**) subissent quant à eux une

¹⁶⁵ Walton, M.J. ; Pennock, J.F. *Biochem. J.*, **1972**, 127, 471-479.

¹⁶⁶ DeRosa, M. ; Minnale, L. ; Sodano, G. *Experientia*, **1975**, 31, 408-410.

¹⁶⁷ DeRosa, M. ; Minnale, L. ; Sodano, G. *Experientia*, **1975**, 31, 758-759.

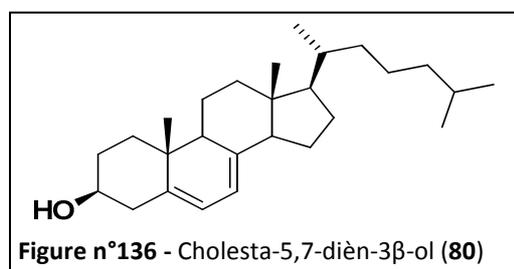
¹⁶⁸ Voogt, P.A. *Neth. J. Zool.*, **1975**, 26, 84-93.

¹⁶⁹ Silva, C.J. ; Wünsche, L. ; Djerassi, C. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1991**, 99, 763-773.

¹⁷⁰ Rabinowitz, M.H. ; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 304-317.

oxydation du cholestérol en Δ^4 3-cétone suivie d'un réarrangement du cycle A. A la suite de ces travaux, un grand nombre d'A-norstéranes (**79**) avec différentes chaînes latérales ont été isolés de diverses éponges. Cela supporte l'idée selon laquelle les enzymes responsables de la transformation des stérols sont relativement non-spécifiques et peuvent convertir plusieurs précurseurs en un seul type de stérol.

La biosynthèse des stérols $\Delta^{5,7}$, très répandus dans les champignons terrestres, a été étudiée dans deux éponges : *Pseudaxinyssa* sp. et *Amphimedon* sp.¹⁷¹ L'étude faite sur *Pseudaxinyssa* sp. a montré que chacun des stérols Δ^5 ou Δ^7 pouvaient être les précurseurs des stérols $\Delta^{5,7}$. Et inversement, la réduction du stérol $\Delta^{5,7}$ en Δ^7 a été relevée dans une espèce du genre *Agelas*. Pour cette étude, l'incorporation des précurseurs radiomarqués (de 20 à 50 μ Ci) a été faite *ex situ* et la métabolisation *in situ*. *Amphimedon* sp., quant à elle et certainement grâce à ses symbiontes, a utilisé le [4-¹⁴C]-cholestérol pour synthétiser les stérols $\Delta^{5,7}$, tels que le cholesta-5,7-dièn-3 β -ol (**80**).



Les autres études de biosynthèse des stérols dans les éponges se sont concentrées sur les mécanismes de modification de leur chaîne latérale. L'origine des chaînes multi-alkylées semble être due à l'addition itérative de carbones sur les doubles liaisons grâce à la S-adénosyl méthionine (SAM). La première éponge étudiée pour la biosynthèse de ce type de stérols a été *Aplysina fistularis* ; l'étude a été réalisée *ex situ* par ajout des précurseurs (20 à 50 μ Ci) dans l'eau et maintien des éponges en circuit ouvert pendant 10 à 30 jours.¹⁷² Le 25,27-dehydroaplystérol (**83**) et l'aplystérol (**87**) ont pour origine le 24 α -épico-distérol (**81**). En revanche, le 24 β -épico-distérol (**82**), d'origine planctonique, n'a pas été utilisé dans la biosynthèse de l'aplystérol (**87**), il a été réduit en 24-méthylcholestérols par la Δ^{25} -réductase (**Schéma n°9**).

L'aplystérol (**87**), le vérongulastérol (**86**),¹⁷² le xestostérol (**84**),¹⁷³ ou encore le mutastérol (**85**)¹⁷⁴ partagent un carbocation en C-25 similaire comme intermédiaire de biosynthèse (**Schéma n°9**). Ce carbocation, après élimination d'un hydrogène, entraîne une double liaison Δ^{24} ou $\Delta^{25(27)}$. Ces intermédiaires sont ensuite biométhylés pour donner les composés **84**, **85** ou **86**. La biosynthèse du xestostérol (**84**) et du mutastérol (**85**) n'est pas dépendante de la stéréochimie du C-24 du précurseur contrairement à celle du 25,27-dehydroaplystérol (**83**). Ce qui entraîne que le 24 α -épico-distérol (**81**) et le 24 β -épico-distérol (**82**) sont transformés en ces stérols. Ces résultats ont été confirmés par Giner et Djerassi grâce à des expériences sur un extrait acellulaire d'*Aplysina fistularis*

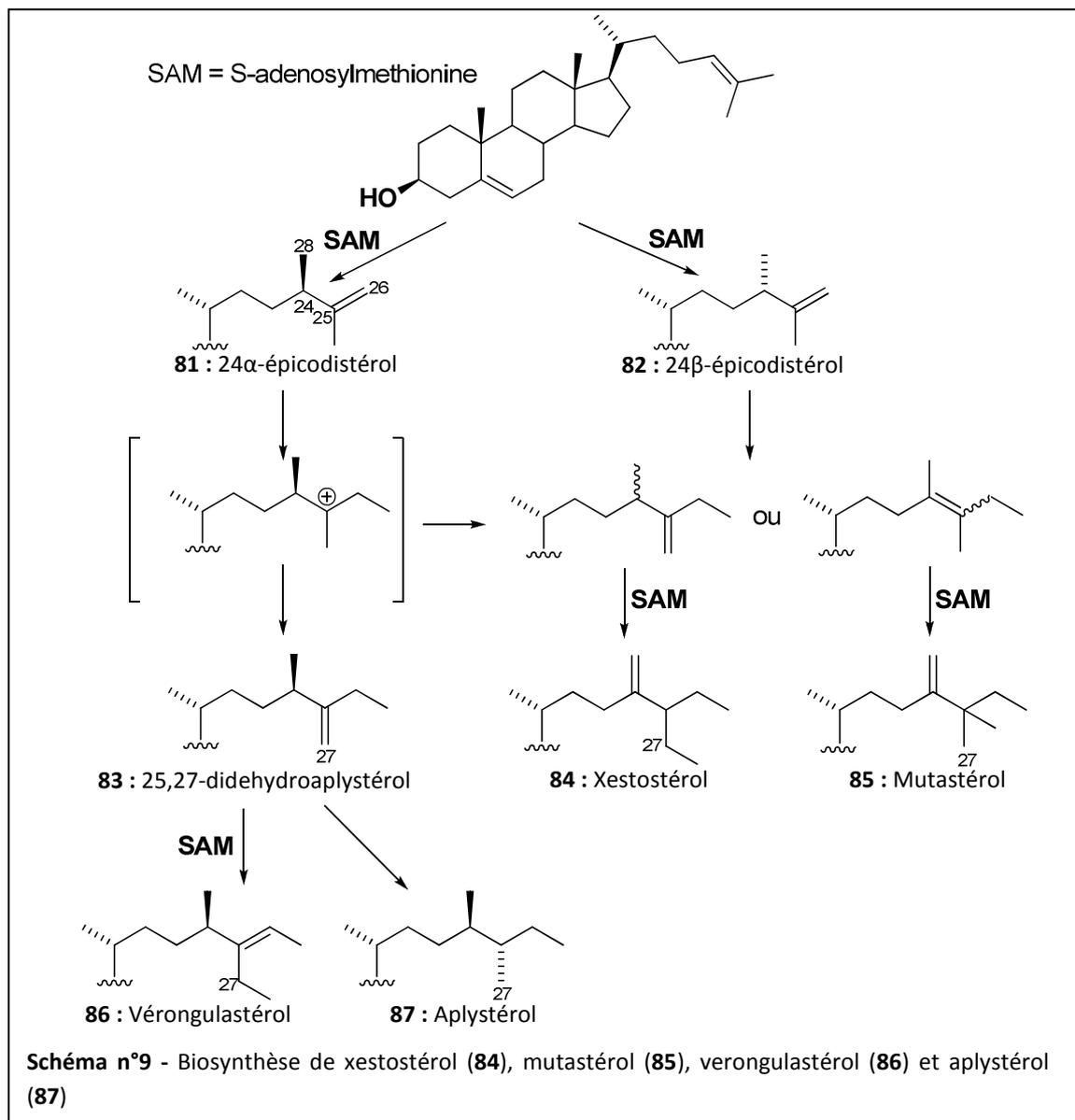
¹⁷¹ Stoilov, I.L. ; Bladocha-Moreau, M. ; Thompson, J.E. ; Djerassi, C. *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 2213-2222.

¹⁷² Catalan, C.A.N. ; Thompson, J.E. ; Kokke, C.M.C. ; Djerassi, C. *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1073-1084.

¹⁷³ Stoilov, I.L. ; Thompson, J.E. ; Djerassi, C. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4821-4824.

¹⁷⁴ Kerr, R.G. ; Kerr, S.L. ; Djerassi, C. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 63-66.

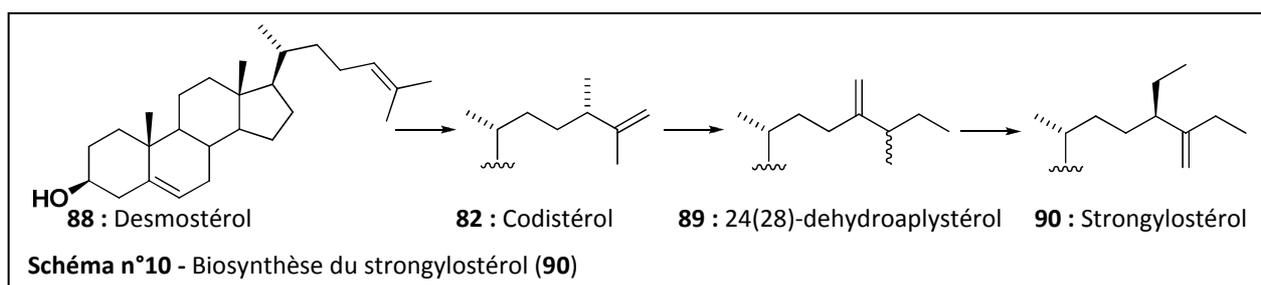
(90 μ L) dans lequel ont été ajoutés 15 μ Ci de [3 H]-S-adénosyl méthionine (SAM) et du desmostérol (**88**) non marqué.¹⁷⁵ La même expérience sans desmostérol (**88**) n'a pas permis d'obtenir de produits marqués.



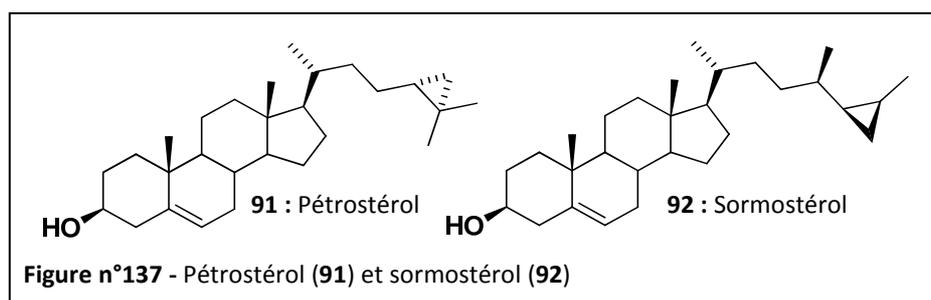
Certaines biosynthèses requièrent des précurseurs d'une configuration précise. Le strongylostérol (**90**) par exemple, peut être biosynthétisé par biométhylation de tous les C-25 épimères du 24(28)-dihydroaplystérol (**89**). Mais seul le codistérol (**82**) et non l'épicodistérol (**81**) est le précurseur de **89** bien que la stéréochimie du C-24 soit perdue par la formation de la double liaison C-24(28) (**Schéma n°10**).¹⁷⁶

¹⁷⁵ Giner, J.-L. ; Djerassi, C. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5421-5424.

¹⁷⁶ Stoilov, I.L. ; Thompson, J.E. ; Cho, J.-H. ; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 8235-8241.



La présence d'un substituant cyclopropane sur la chaîne latérale des stérols est également assez courante ; un des représentants les plus abondants est le pétrostérol (**91**). Sa biosynthèse a été étudiée en incorporant *ex situ* dans l'éponge environ 40 μCi de l' $[\text{28-}^{14}\text{C}]$ -épícodistérol (**81**) et du $[\text{3}\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -codistérol (**82**).¹⁷⁷ Cette expérience n'a pas admis de la radioactivité dans le pétrostérol (**91**), les auteurs en ont déduit que sa biosynthèse n'était pas le résultat d'une biométhylation itérative mais plutôt d'un réarrangement. Cela a été confirmé par la localisation du C-28 radiomarqué du précurseur dans le C-24 du pétrostérol (**91**).



Il y a 40 ans, Lederer considérait le sormostérol (**92**) comme précurseur des 24-méthylstérols.¹⁷⁸ Cependant, l'incorporation de ce stérol radiomarqué dans *Lissodendoxyx topsenti* n'a pas donné lieu à une isomérisation *in vivo*.¹⁷⁹ De même, le dihydrocalystérol **95** radiomarqué n'a pas été converti en d'autres stérols dans *Cribrochalina vasculum*.¹⁷⁷ Les stérols contenant un substituant cyclopropane apparaissent donc comme des produits finaux et non des intermédiaires dans la biosynthèse des chaînes latérales des stérols. Une exception à cette règle a été démontrée pour *Calyx nicaensis* lors d'une expérience de biosynthèse *ex situ* basée sur l'alkylation du 24-méthylènecholestérol (**93**).¹⁸⁰ La *cis*-déshydrogénation du 23,24-dihydrocalystérol (**94**) a donné le 24H-isocalystérol (**96**) qui peut s'isomériser en calystérol (**97**) ou en son isomère 23H-isocalystérol (**98**) (**Schéma n°11**). Dans une étude antérieure, le fucostérol (**95**) a été identifié comme précurseur du calystérol (**97**).¹⁸¹

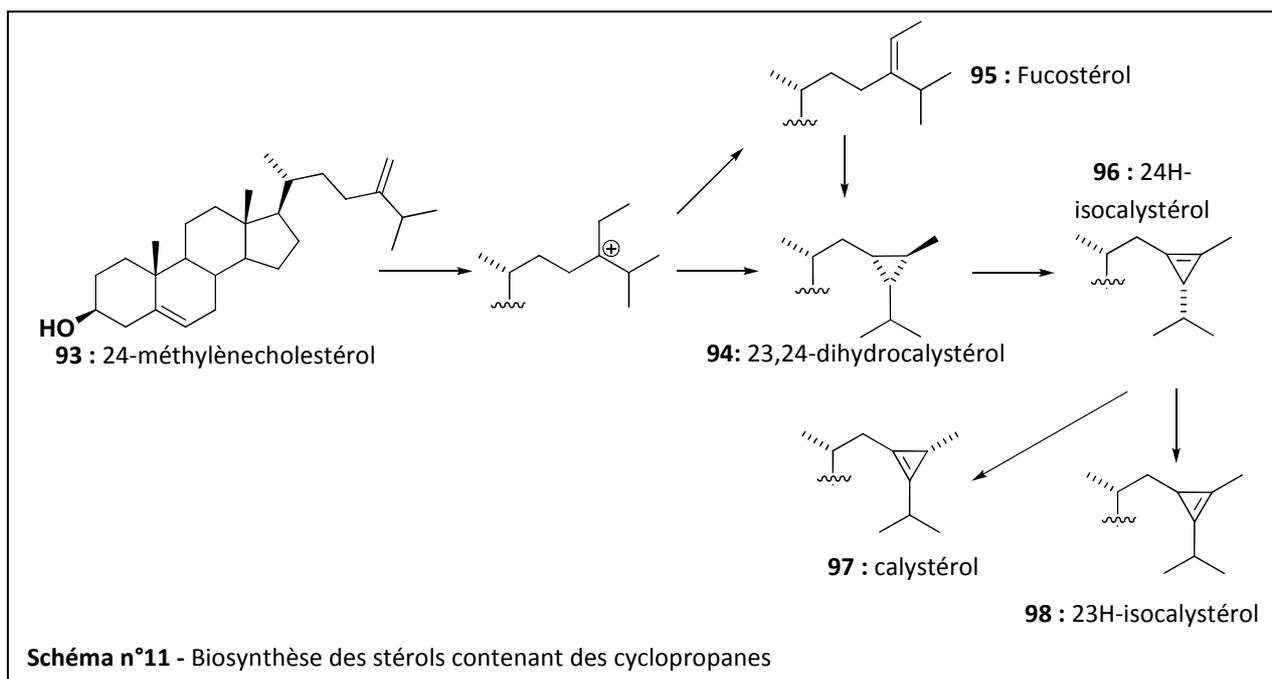
¹⁷⁷ Doss, G.A. ; Proudfoot, J.R. ; Silva, C.J. ; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 305-310.

¹⁷⁸ Lederer, E.Q. *Rev. Chem. Soc.*, **1969**, *23*, 453-481.

¹⁷⁹ Silva, C.J. ; Djerassi, C. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1991**, *56*, 1093-1105.

¹⁸⁰ Margot, C. ; Catalan, C.A.N. ; Proudfoot, J.R. ; Sodano, G. ; Sica, D. ; Djerassi, C. *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, **1987**, 1441-1442.

¹⁸¹ Minale, L. ; Riccio, R. ; Scalona, O. ; Sodano, G. ; Fattorusso, E. ; Magno, S. ; Mayol, L. ; Santacroce, C. *Experientia*, **1977**, *33*, 1550-1552.



L'étude de la biosynthèse des stérols dits « communs » dans les éponges n'a été réalisée que plus tard, la biosynthèse de la plupart d'entre eux ayant déjà été étudiée dans les plantes et animaux terrestres.^{182,183} Silva et Djerassi se sont basés sur leurs études précédentes démontrant que la biosynthèse *de novo* de stérols était possible quelle que soit l'éponge étudiée¹⁶⁹ et ont mis en évidence l'incapacité des éponges à synthétiser les stérols possédant une double liaison Δ^{22} , bien que ces stérols soient largement présents dans les éponges considérées.¹⁸⁴ Les auteurs ont ainsi montré que 70 % des stérols des spongiaires proviennent d'une biosynthèse *de novo*, tous ayant pour noyau original le lanostérol, les 30 % restant sont dérivés de l'ingestion de stérols. En plus de la biosynthèse *de novo*, le cholestérol peut être synthétisé par désalkylation du 24-méthylènecholestérol (**93**) de manière similaire à sa biosynthèse dans les insectes, qui eux, sont incapables de produire sa biosynthèse *de novo*.¹⁸⁵ Pour obtenir le cholestérol, certaines éponges peuvent utiliser la désalkylation du 24-méthylènecholestérol (**93**) biosynthétisé *de novo*. Cette capacité à alkyler ou désalkyler les précurseurs des stérols est une spécificité des éponges et n'a encore été retrouvée dans aucun autre organisme.

I.3.4. Acides gras

La composition en acides gras des éponges a également intéressé de nombreuses équipes de recherche. Tout comme les stérols, les acides gras des éponges sont souvent non conventionnels. Les éponges sont généralement composées d'un grand nombre d'acides gras en C_{24} - C_{30} et leur diversité est plus importante que dans tout autre phylum.¹⁸⁶ Dans une des premières études sur la

¹⁸² Gaylor, J.-L. In: *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds*, John Wiley & Sons, New York, **1981**, 1, 481-545.

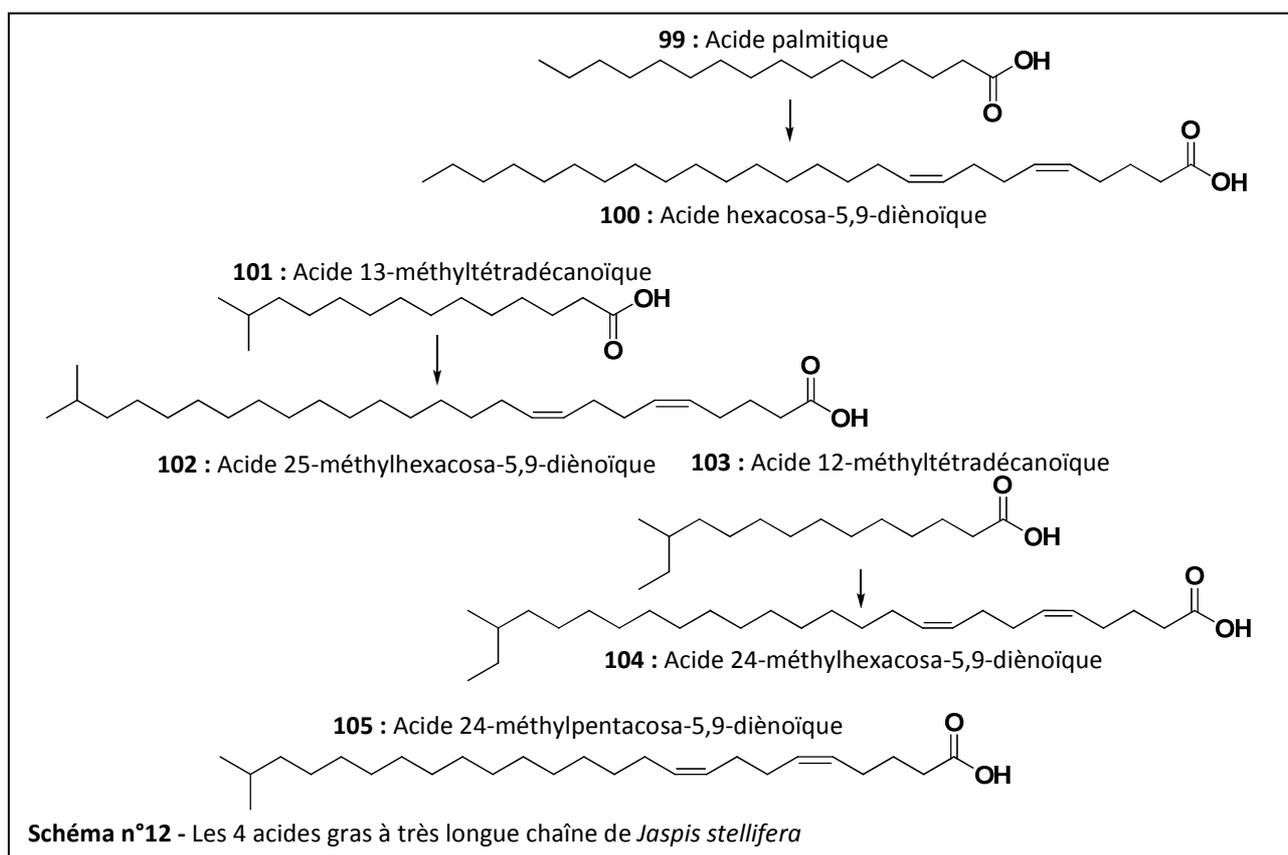
¹⁸³ Goodwin, T.W. In: *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds*, John Wiley & Sons, New York, **1981**, 1, 443-480.

¹⁸⁴ Silva, C.J. ; Djerassi, C. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1992**, 101, 255-268.

¹⁸⁵ Kerr, R.G. ; Kerr, S.L. ; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 299-303.

¹⁸⁶ Bergquist, P.R. ; Lawson, M.P. ; Lavis, A. ; Cambie, R.C. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1984**, 12, 63-84.

biosynthèse des acides gras dans les éponges, Morales et Litchfield ont travaillé sur *Microciona prolifera*.¹⁸⁷ Cette étude a été réalisée *ex situ* sur des morceaux d'éponges incubés dans 25 mL d'eau de mer en présence de 10-25 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate, sur une culture cellulaire ainsi que sur un extrait acellulaire. Les auteurs obtiennent une plus grande incorporation du $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate dans les acides gras en C_{22} , C_{24} et C_{26} quand l'expérience est faite sur l'éponge entière que lors de l'utilisation d'un extrait acellulaire ou d'une culture cellulaire d'éponge. Les auteurs ont conclu que ces acides gras sont générés par l'élongation de la chaîne carbonée suivie de l'introduction de doubles liaisons. Kaneda a, quant à lui, déterminé l'origine du méthyle branché terminal dans les acides gras à courte chaîne.^{188,189} Ce méthyle est généralement dérivé des acides aminés tribranchés valine, leucine et isoleucine *via* une transamination pour obtenir les α -céto acides correspondant qui subissent à leur tour une décarboxylation oxydative. L'origine de ce méthyle dans les acides gras à très longue chaîne a été étudiée par Djerassi et son équipe.¹⁹⁰ Selon les auteurs, ces acides gras peuvent provenir des acides gras à courte chaîne et à branche terminale (certainement d'origine bactérienne) ou de la S- adénosyl méthionine (SAM).



Pour vérifier ces hypothèses, les auteurs ont étudié l'éponge *Jaspis stellifera* qui contient quatre acides gras à très longue chaîne dans sa fraction phospholipidique : l'acide hexacosadiénoïque

¹⁸⁷ Morales, R.W. ; Litchfield, C. *Lipids*, **1977**, *12*, 570-576.

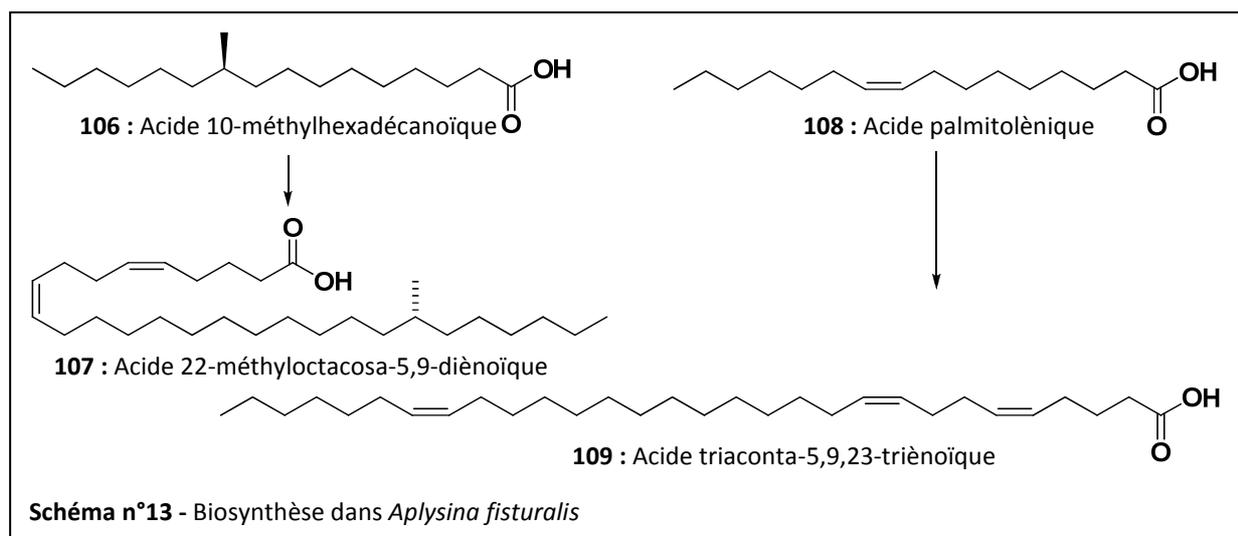
¹⁸⁸ Kaneda, T. *J. Biol. Chem.*, **1963**, *238*, 1229-1235.

¹⁸⁹ Kaneda, T. *Bacteriol Rev.*, **1977**, *41*, 391-418.

¹⁹⁰ Carballeira, N. ; Thompson, J.E. ; Ayanoglu, E. ; Djerassi C. *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2751-2756.

(**100**, 26:2 (5,9)), l'acide 24-méthylpentacos-5,9-diénoïque (**105**, iso-26:2 (5,9)), l'acide 25-méthylhexacos-5,9-diénoïque (**102**, iso-27:2 (5,9)) et enfin l'acide 24-méthylhexacos-5,9-diénoïque (**105**, antéiso-27:2 (5,9)). L'incorporation des précurseurs ([1-¹⁴C]-acide palmitique (**99**), [1-¹⁴C]-acide 13-méthyltétradécanoïque (**101**), [1-¹⁴C]-12-méthyltétradécanoïque (**103**)) a été menée sur une période de trente jours. Bien que dans chaque expérience la majorité de la radioactivité ait été associée au précurseur, l'incorporation de l'acide palmitique (**99**) a permis de marquer **100** tandis que **101** et **103** ont été incorporés dans un mélange de **102** et **104** (**Schéma n°12**). En revanche, aucun précurseur choisi n'a pu être incorporé dans **105**. Ces résultats suggèrent une incorporation spécifique de chaque acide dans son homologue polyinsaturé à longue chaîne. En dégradant le 26:2 (**100**), l'iso-27:2 (**102**) et l'antéiso-27:2 (**104**), les auteurs ont pu localiser la partie radioactive. Ils en ont conclu que la formation des acides gras à très longue chaîne résultait d'une extension de chaîne et que la dégradation et la réincorporation de l'acétate était très faible. La voie de biosynthèse basée sur l'élongation du précurseur 16:0 suivie d'une alkylation par la S-adénosyl méthionine n'est également pas compatible avec les résultats obtenus. Ce branchement terminal des méthyles est caractéristique des acides gras d'origine bactérienne. De ce fait, les précurseurs des acides gras à très longue chaîne de *Jaspis stellifera* sont certainement d'origine bactérienne. L'équipe de Djerassi s'est ensuite intéressée à *Aplysina fisturalis* présentant un acide gras dont le méthyle est branché au centre de la chaîne carbonée (22-méthyl-octacos-5,9-diénoïque (**107**)), ce qui est inhabituel.¹⁹¹ Les auteurs ont suggéré une biosynthèse soit par élongation conventionnelle de la chaîne suivie d'une méthylation par la S-adénosyl méthionine, soit *via* un acide gras branché à courte chaîne d'origine bactérienne. Pour trancher entre ces deux possibilités, ils ont incorporé dans l'éponge en aquarium 20 à 40 µCi des précurseurs radiomarqués suivant : l'acide 10-méthylhexadécanoïque (**106**), l'acide palmitique (**99**) et l'acide palmitoléique (**108**). L'expérience a montré une incorporation de **106** dans **107** et de **108** dans un autre acide gras de l'éponge, l'acide triaconta-5,9,23-triénoïque (**109**) (**Schéma n°13**). Ces résultats sont en faveur d'une biosynthèse à partir de précurseurs spécifiques plutôt que *via* une dégradation et réincorporation de l'acétate. L'acide palmitique (**99**) n'a pas été utilisé comme précurseur de **109**, ce qui suppose que l'éponge n'est pas capable d'introduire une double liaison au milieu de la chaîne. Les deux isomères de l'acide 10-méthylhexadécanoïque (**106**) ont été incorporés dans **107** bien qu'on ne le retrouve que sous sa forme (22*R*), cela suppose que lorsque le branchement est suffisamment loin du carboxyle, l'enzyme acide gras synthase de l'éponge ne fait pas de distinction entre les deux précurseurs isomères. La [³H]-méthionine a également été testée en tant que précurseur et a rapidement été incorporée dans **106** mais très peu dans **107**. Cela suggère que les acides gras à courte chaîne sont synthétisés par les bactéries puis sont convertis en acides gras à longue chaîne dans les cellules de l'éponge, ce qui est donc en faveur de la deuxième hypothèse de biosynthèse.

¹⁹¹ Raederstroff, D. ; Shu, A.Y.L. ; Thompson, J.E. ; Djerassi, C. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 2337-2346.



Les travaux qui suivent se sont focalisés sur l'élucidation du chemin de biosynthèse complet des acides démospongiques linéaires.¹⁹² En travaillant sur l'éponge *M. prolifera* préalablement étudiée par Morales et Litchfield,¹⁸⁷ et en incorporant plusieurs [1-¹⁴C]-acides gras en solution dans un aquarium contenant l'éponge, les auteurs ont confirmé que le procédé biosynthétique majoritaire était fait *via* l'homologation de précurseurs à courte chaîne. L'acide palmitique (99) est l'homologue saturé le plus court permettant une élongation de chaîne jusqu'à l'acide gras 26:0, d'après les travaux de Morales *et al.*¹⁸⁷ Cependant, les auteurs ont démontré qu'il s'agissait en fait de l'acide myristique (14:0). L'acide laurique (12:0) n'a pas été biosynthétisé, ce qui a confirmé les observations précédentes sur la faible activité biosynthétique *de novo*. L'aspect le plus frappant de la biosynthèse des acides gras démospongiques est le procédé d'oxydation. Le passage du 26:0 en 26:2 se fait *via* les composés Δ^5 ou Δ^9 sans distinction, contrairement à la formation des acides gras polyinsaturés chez les animaux qui passe toujours par Δ^9 puis les autres doubles liaisons sont insérées une à une entre la première double liaison et le carboxyle terminal.¹⁹³

Vue l'abondance des acides démospongiques à chaînes inhabituelles dans quelques éponges, Djerassi s'est demandé si la biosynthèse était la même pour toutes ces chaînes. Grâce à une expérience sur *Xestospongia sp.* utilisant des précurseurs à chaînes inhabituelles, Djerassi a pu répondre positivement à cette question.¹⁹⁴ En effet, l'acide 27:2 (5,9) a principalement été formé par homologation des acides 15:0 ou 17:0 suivie d'une oxydation. La biosynthèse *de novo* à partir du propionate s'est avérée négligeable.

L'incorporation de [1-¹⁴C]-hexadécanol dans les lipides éther de l'éponge *Tethya aurantia* à partir de l'animal intact et de ses cellules dissociées, a permis d'identifier deux chemins biosynthétiques.¹⁹⁵ Dans l'animal intact, le précurseur a été oxydé en acide correspondant puis converti en phospholipide, tandis que dans les cellules dissociées, il a été utilisé dans la synthèse de monoéthers de glycérol non estérifiés. Il n'a jamais été incorporé dans les phospholipides finaux. La biosynthèse de ces phospholipides se fait donc certainement grâce à une contribution symbiotique.

¹⁹² Hahn, S., Stoilov, I., Tam Ha, T.B., Raederstroff, D., Doss, G.A., Li, H., Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 8117-8124.

¹⁹³ Vance, D.E., Vance, J.E., In: *Biochemistry of Lipids and Membranes*, Menlo Park, CA, **1985**.

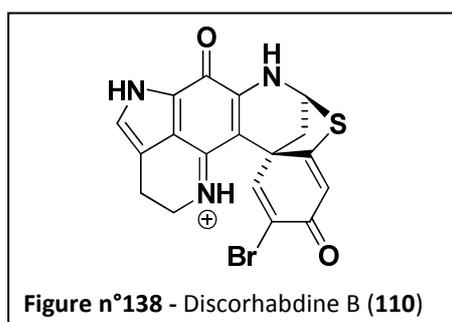
¹⁹⁴ Djerassi, C., Lam, W.-K. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, *24*, 69-75.

¹⁹⁵ Smith, G.M., Djerassi, C. *Lipids*, **1987**, *22*, 236-240.

Le mécanisme de fonctionnalisation des acides gras d'éponges est moins connu. Les substituants comme les hydroxy-, méthoxy-, acétoxy- et bromo- sont apparemment introduits après élongation de la chaîne. L'atome de brome de l'acide 6-Br-26:2 (5,9) est, par exemple, introduit dans 26:2 (5,9) lors de la dernière étape de biosynthèse.¹⁹⁶

1.3.5. Discorhabdines

Les discorhabdines, décrites également sous le nom de prianosines, font partie des alcaloïdes pyrroloquinoléiniques, principalement retrouvés dans les éponges du genre *Latrunculia*.¹⁹⁷ L'intérêt dans l'étude de la synthèse et de la biosynthèse de ce type de composés est étroitement lié à leur forte cytotoxicité contre un panel de lignées cellulaires humaines cancéreuses. Lill *et al.* ont entrepris des études de biosynthèse d'une de ces molécules, la discorhabdine B (**110**), dans l'éponge *Latrunculia sp. B*.¹⁹⁷



D'après le squelette de **110**, les auteurs ont proposé deux acides aminés précurseurs : le tryptophane pour la partie pyrroloquinoléine et la phénylalanine pour la partie bromo-cyclohexadiénone. Afin de valider cette hypothèse, les auteurs ont travaillé *ex situ* (en aquarium) sur de fines coupes de *Latrunculia sp. B* (1 à 2 mm d'épaisseur) incubées avec 20 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-phénylalanine dans un milieu de culture synthétique de type M199. Après 24 heures d'incubation, la discorhabdine B (**110**) marquée (33 nCi, 0,18 % de la radioactivité retrouvée dans la molécule) a été extraite et purifiée par HPLC. Cette expérience a confirmé l'utilisation de la phénylalanine dans la biosynthèse de **110**. Afin de vérifier si les symbiontes de l'éponge étaient à l'origine de cette biosynthèse, la même expérience a été renouvelée en ajoutant des antibiotiques avant ou pendant l'incubation de l'éponge avec la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-phénylalanine (**Tableau 21**). La discorhabdine B (**110**) obtenue ayant incorporée la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-phénylalanine malgré les traitements antibiotiques, Lill *et al.* ont conclu que seules les cellules eucariotes de l'éponge participaient à sa biosynthèse.

¹⁹⁶ Lam, W.-K. ; Hahn, S. ; Ayanoglu, E. ; Djerassi, C. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3428-3432.

¹⁹⁷ Lill, R.E. ; Major, D.A. ; Blunt, J.W. ; Munro, M.H.G. ; Battershill, C.N. ; McLean, M.G. ; Baxter, R.L. *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 306-311. Et références citées

Tableau 21 - Résumé des expériences de biosynthèse de la discorhabdine B (110)

| | Activité de [U- ¹⁴ C]-L-phénylalanine ajoutée | Activité de 110 purifié | % d'incorporation |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|
| Sans traitement antibiotique | 20 µCi | 33,3 nCi | 0,18 % |
| Traitement antibiotique avant incubation | 20 µCi | 65,1 nCi | 0,32 % |
| Traitement antibiotique pendant incubation | 20 µCi | 49,5 nCi | 0,26 % |

1.3.6. Dérivés pyrrole-2-aminoimidazoles

Les alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazoles (P2AI), représentant la famille des oroïdines, étaient composés en 2001 de plus de 60 métabolites isolés. Ils ont depuis longtemps intéressé les chimistes des substances naturelles marines par leur diversité structurale et leurs activités biologiques.¹⁹⁸ Ces alcaloïdes sont majoritairement (mais non exclusivement) produits par des éponges de deux ordres différents : Agelasida et Halichondrida.¹⁹⁹ Plusieurs équipes de recherche, dont l'équipe d'Ali Al Mourabit à l'ICSN, ont entrepris des synthèses biomimétiques de ce type de métabolites et proposent ainsi des hypothèses biosynthétiques sur la construction de ces alcaloïdes.^{200,201,202} Néanmoins, à ce jour, une seule étude de biosynthèse a été tentée. Cette étude a été réalisée sur une culture cellulaire d'archéocytes de l'éponge caraïbe *Axinella corrugata* (anciennement connue sous le nom de *Teichaxinella morchella*).²⁰³ En se focalisant sur la stevensine (111), certainement dérivée d'une cyclisation de l'oroïdine (60), Andrade *et al.* ont voulu étudier le chemin biosynthétique du **Schéma n°14** dans lequel les précurseurs potentiels seraient quatre acides aminés : la proline (112) ou l'ornithine (113) d'une part, et l'histidine (114) ou l'arginine (115) d'autre part.

¹⁹⁸ Al Mourabit, A. ; Poitier, P. *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 237-243.

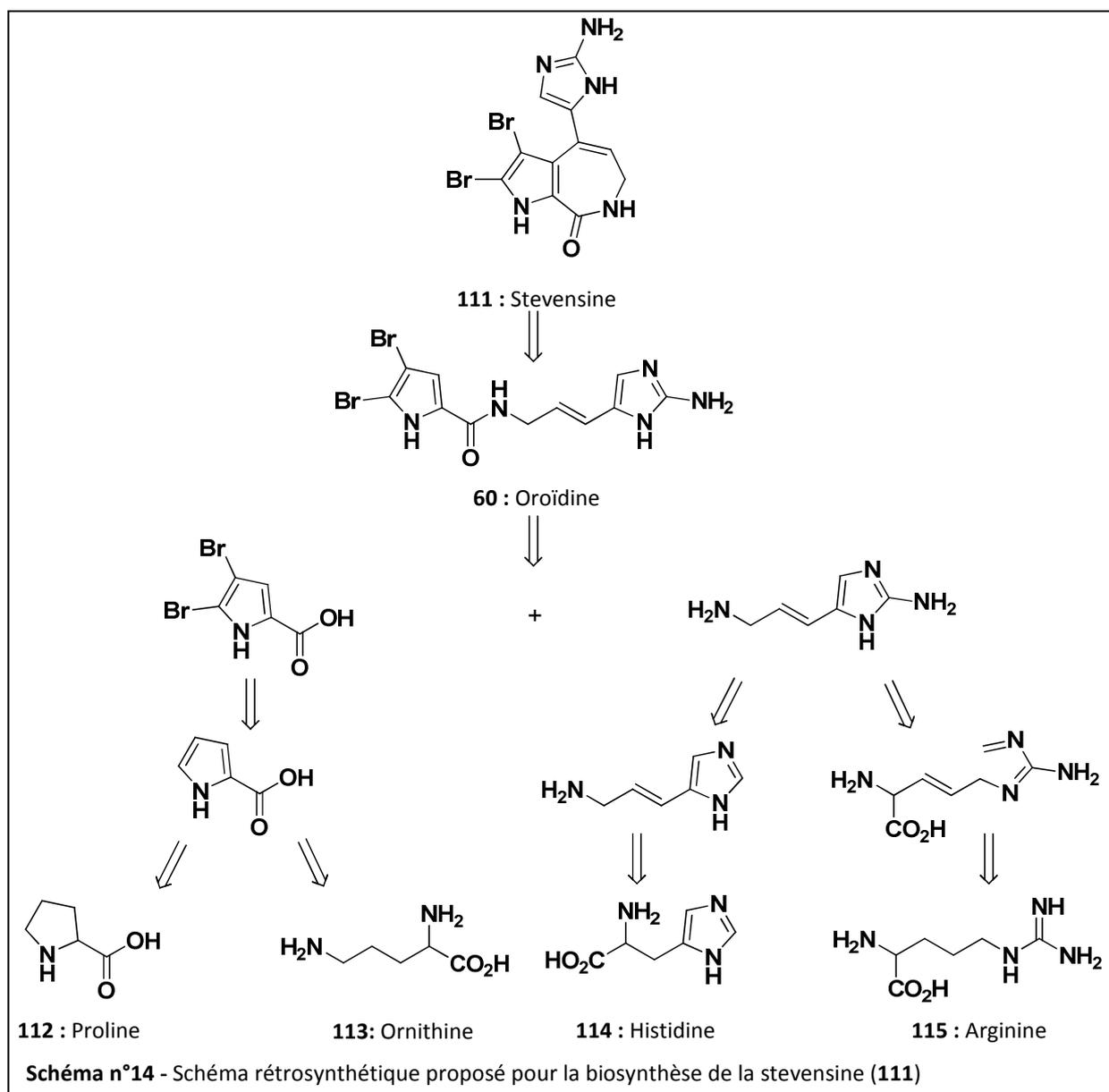
¹⁹⁹ Lindel, T. ; Hoffmann, H. ; Hochgürtel, M. In: *Chemistry of Marine Pyrrole-Imidazole Alkaloids*, Bioorganic chemistry. John Wiley, New York, **1999**, 8-17.

²⁰⁰ Marchais, S. ; Al Mourabit, A. ; Ahond, A. ; Poupat, C. ; Potier, P. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 5519-5522.

²⁰¹ Baran, P.S. ; O'Malley, D.P. ; Zografos, A.L. *Angew Chem.*, **2004**, 116, 2728-2731.

²⁰² Vergne, C. ; Appenzeller, J. ; Ratinaud, R. ; Martin, M.T. ; Debitus, C. ; Zaparucha, A. ; Al Mourabit, A. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 493-496.

²⁰³ Andrade, P. ; Willoughby, R. ; Pomponi, S.A. ; Kerr, R.G. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 4775-4778.



Pour cela, les quatre acides aminés marqués ^{14}C ont été ajoutés dans les milieux de culture cellulaire d'*Axinella corrugata* (2,5 μCi par acide aminé). Après 48 heures, chaque culture cellulaire a été lyophilisée et extraite. Après purification de la stevensine (**111**) par HPLC, les auteurs ont conclu que seule l'arginine (**115**) ne conduisait pas au métabolite marqué. Les trois autres acides aminés ont en revanche conduit au composé **111** marqué avec un taux d'incorporation de la radioactivité variant de 0,022 % à 0,026 % suivant l'acide aminé considéré. Bien que déjà optimisée pour les algues, cette étude de biosynthèse est la première utilisant des cultures de cellules d'éponges, ce qui permet d'utiliser moins de radioactivité (de 10 à 100 fois moins que dans les expériences *in vivo* usuelles). Néanmoins les auteurs soulignent le fait que les cellules d'éponge sont souvent difficiles à cultiver.

I.4. Bilan

D'après les expériences décrites ci-dessus, la technique d'incorporation la plus couramment utilisée dans les études de biosynthèse chez les spongiaires est l'ajout du ou des précurseur(s) marqué(s) directement dans l'eau dans laquelle se trouve l'organisme. Le ou les précurseur(s) sont généralement incorporés dans le spongiaire *ex situ* et, excepté dans quelques cas, la quantité de radioactivité ajoutée varie entre 20 et 250 μCi . Andrade *et al.* ont été les premiers à travailler sur des cultures cellulaires d'éponges permettant ainsi de diminuer considérablement la quantité de radioactivité ajoutée (10 à 100 fois moins).²⁰³ Cependant, il est difficile d'obtenir des cultures de lignées cellulaires d'invertébrés marins et de spongiaire en particulier, ce qui rend ce type de biosynthèse moins accessible.

Pour les études de biosynthèse que nous voulions entreprendre dans le cadre du projet ANR ECIMAR en collaboration avec l'Agence Internationale de l'Energie Atomique de Monaco (AIEA), et grâce à la proximité des sites de collecte, nous avons décidé de travailler sur les organismes *in vivo*. Ce choix a également été fait dans le but de rester le plus près possible des conditions naturelles de biosynthèse. En effet, en plus de la difficulté liée à l'obtention de cultures cellulaires ou d'extraits acellulaires d'invertébrés marins, le fait de travailler *ex vivo* modifie considérablement la constitution de l'organisme ce qui peut influencer le chemin biosynthétique d'un métabolite secondaire. De plus, en travaillant sur l'organisme *in vivo*, les études peuvent inclure la biosynthèse de métabolites dont l'origine biosynthétique n'a pas clairement été prouvée. Dans la plupart des cas, l'organisme est utilisé avec ses symbiotes ; ainsi, s'il y a une participation symbiotique dans la biosynthèse du ou des métabolite(s) ciblé(s), le fait de travailler *in vivo* la rend possible. De plus, bien que l'étude séparée des symbiotes soit à privilégier, il est aujourd'hui très difficile de cultiver ces symbiotes sans l'hôte associé. Il est admis que seulement 1 % des bactéries symbiotiques sont cultivables dans la flore microbienne d'une éponge. En considérant l'éponge et ses symbiotes comme un ensemble, les études *in vivo* permettent ainsi de vérifier des chemins biosynthétiques dans lesquels des symbiotes non cultivables pourraient participer.

Les conditions de travail du Laboratoire de Radio-Écologie (REL) de l'AIEA, dirigé par le Dr. Ross Jeffree, sont idéales pour les expériences de biosynthèse *ex situ* que nous souhaitons réaliser. Ce laboratoire offre un grand nombre d'aquariums de capacité différente permettant la manipulation de composés radioactifs. La température et le pH de l'eau de mer, ainsi que la luminosité, sont contrôlés et peuvent être modifiés en fonction de l'expérience à mettre en place. Enfin, l'eau de mer naturelle pompée en continu à 30 m de profondeur et à environ 100 m de la côte, est filtrée sur sable, par des « chaussettes » d'1 μm et aseptisée sous ultra-violet avant d'être délivrée aux différents aquariums en circuit ouvert du laboratoire. Les expériences que nous avons réalisées ont débuté *ex situ* sans l'utilisation de vecteur de transfert de type liposomes.

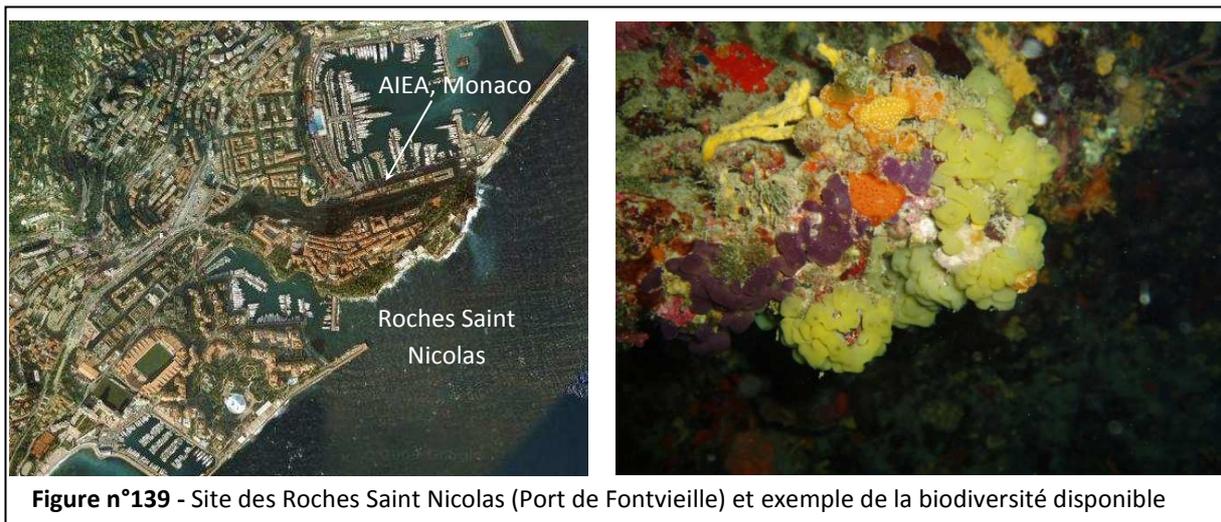
II. Choix de l'organisme d'étude

Les spongiaires sont les invertébrés marins qui présentent la plus grande chimiodiversité avec plus de 7 000 molécules isolées et près de 6 200 publications référencées dans la base de données MarinLit (Version 2009), viennent ensuite les cnidaires avec plus de 3 900 molécules isolées et 2 500 publications. Parmi les métabolites secondaires isolés, les alcaloïdes sont largement répandus. Paradoxalement leur biosynthèse est relativement peu étudiée. Pour les études de biosynthèse que nous avons envisagées, nous nous sommes focalisés sur ce type de molécules, aussi intéressantes d'un point de vue structural que pour les activités biologiques qui leur sont généralement associées.

Le candidat idéal pour les expériences de biosynthèse que nous voulions entreprendre devait répondre à un certain nombre de critères :

- par souci de conservation de la biodiversité, le premier critère correspondait à l'**abondance de l'espèce** sur le site des Roches Saint Nicolas, à la sortie du port de Fontvieille (Monaco). Ayant choisi une méthode de travail *ex situ* et ce site de récolte étant le plus proche du laboratoire d'accueil (AIEA, Monaco), il a été choisi afin de limiter le stress que peut subir l'organisme entre son environnement naturel et l'aquarium dans lequel vont se dérouler les expériences de biosynthèse ;
- le deuxième critère de sélection reposait sur l'**empreinte chimique de l'organisme**. En effet, le candidat devait obligatoirement contenir des alcaloïdes intéressants par leur biosynthèse ;
- enfin, ayant choisi de travailler *ex situ*, l'organisme sélectionné devait pouvoir **s'adapter à ce nouvel environnement** sans modification de son métabolisme secondaire. Cela constituait le dernier critère de sélection à prendre en compte.

Le site des Roches Saint Nicolas (Monaco) présente une grande biodiversité d'invertébrés benthiques (**Figure n°139**) dont les plus représentatifs sont les éponges *Agelas oroides*, *Axinella verrucosa*, *Crambe crambe*, *Ircinia oros* et *Haliclona fulva* ainsi que les anémones *Parazoanthus axinellae*. Ces six espèces remplissant le premier critère de sélection, ont été prélevées pour déterminer leurs empreintes chimiques et ainsi éliminer celles ne produisant pas d'alcaloïdes intéressants par leur biosynthèse.

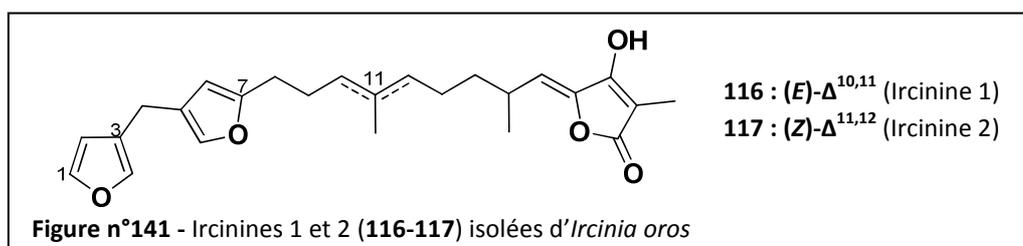


L’empreinte chimique des éponges *I. oros*, *H. fulva*, *C. crambe* et *A. verrucosa* a été établie en suivant le protocole standardisé ECIMAR (**Partie B, I.3.**, p.54). Les profils HPLC analytiques d’*A. oroides* et de *P. axinellae* ont été obtenus à partir de l’extrait brut des organismes humides.

II.1. *Ircinia oros*

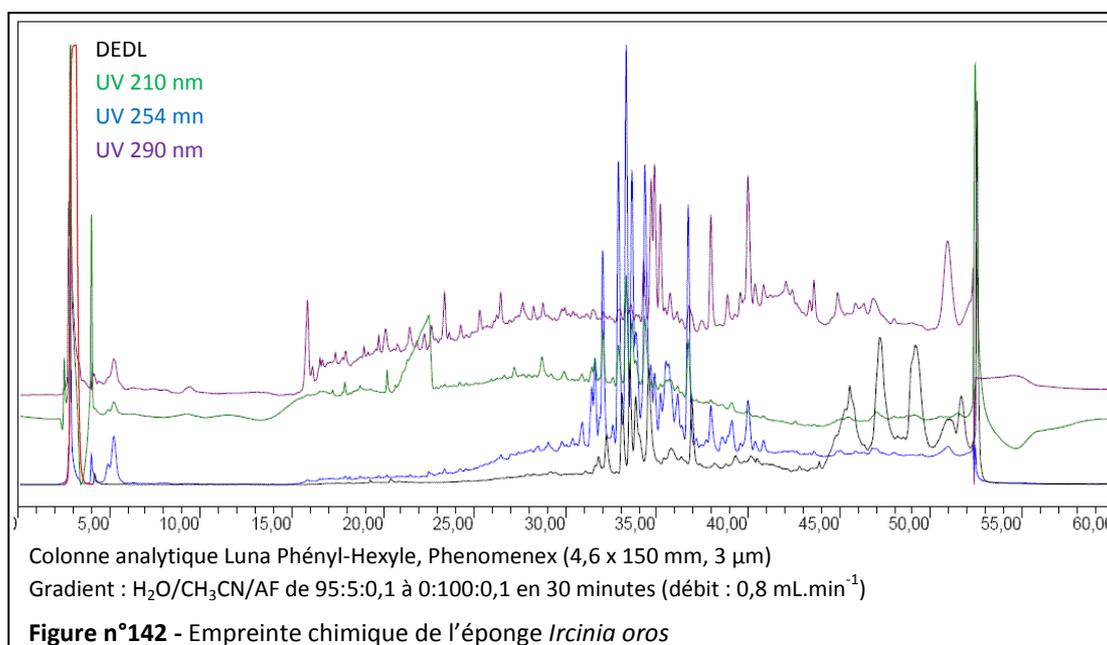


Ircinia oros (Schmidt, 1864) est une éponge massive et souple qui ne contient pas de spicules ; elle est uniquement composée de fibres de spongine. Les études chimiques menées sur cette éponge ont permis l’isolement de furanoterpènes comme les ircinines 1 et 2 (**116-117**).²⁰⁴



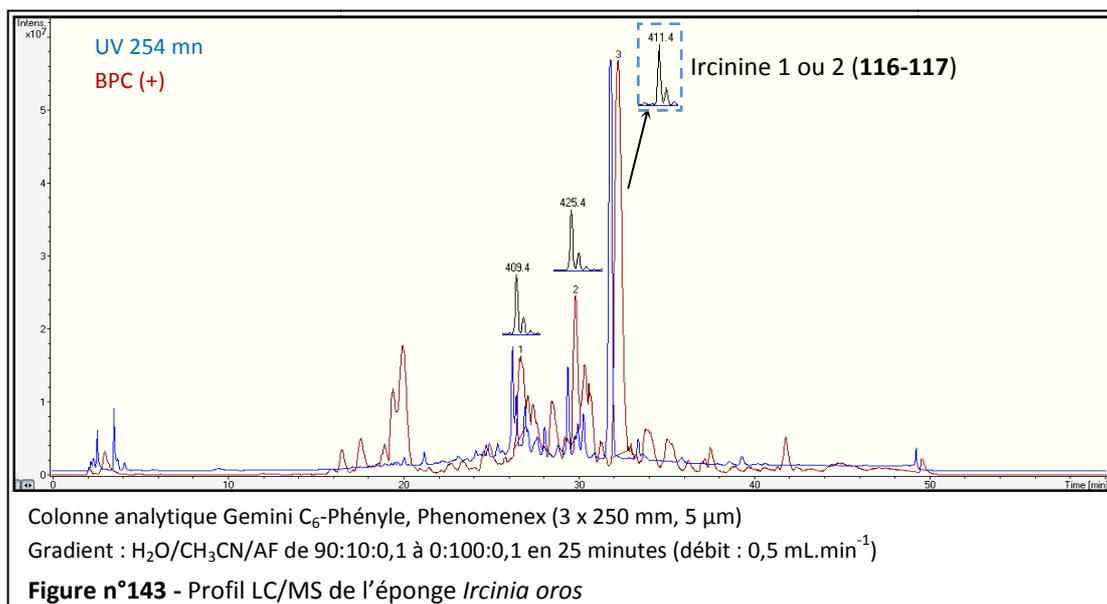
²⁰⁴ De Guilio, A. ; DeRosa, S. ; Di Vincenzo, G. ; Strazzullo, G. ; Zavodnik, N. J. *Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1503-1507.

Nous avons pu confirmer que, d'après le profil UV obtenu par HPLC-DAD (**Figure n°142**), les métabolites majoritaires de cette espèce sont de type furanoterpènes. Les métabolites élués entre 30 et 40 minutes présentent en effet un maximum d'absorption UV à 263, 264 ou 266 nm, ce qui correspond aux valeurs décrites dans la bibliographie pour ce type de composés.



161

Le profil LC/MS a confirmé la présence de furanoterpènes avec un pic majoritaire de l'échantillon correspondant à l'un des deux isomères de position : l'ircinine 1 ou l'ircinine 2 (**116-117**) (**Figure n°143**).



Ircinia oros ne contient donc à priori aucun alcaloïde susceptible de donner lieu aux études de biosynthèse envisagées. Ne répondant pas au deuxième critère de sélection, cette espèce a été éliminée des candidats aux études de biosynthèse.

II.2. *Haliclona fulva*

162



Figure n°144 - *Haliclona fulva*

Haliclona (Halicholona) fulva (Topsent, 1893), anciennement connue sous le nom de *Reniera fulva* (Topsent, 1893),²⁰⁵ est une éponge encroûtante de couleur orange vif, présente en mer Méditerranée et sur la côte Ouest Africaine.

C'est une éponge relativement peu étudiée d'un point de vue chimique. Seuls quelques polyacétylènes comme la renierine-1 (**118**) et certains sesquiterpènes comme la fulvanine-2 (**119**) ont été isolés (Figure n°145).^{206, 207} Cependant, le genre *Haliclona*, plus étudié, est connu pour produire un grand nombre d'alcaloïdes, il est donc possible que cette éponge en produise également.

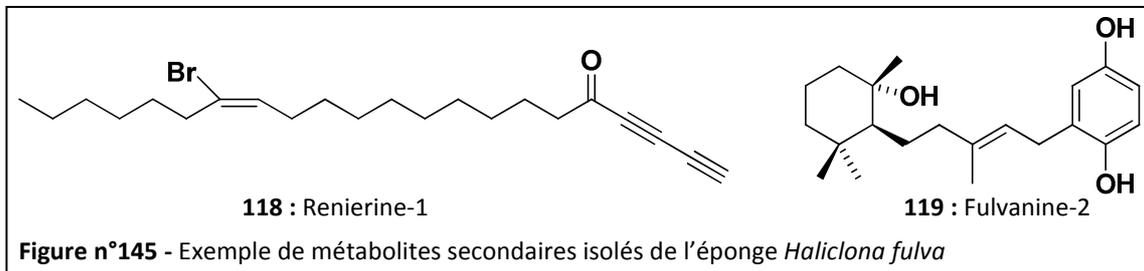


Figure n°145 - Exemple de métabolites secondaires isolés de l'éponge *Haliclona fulva*

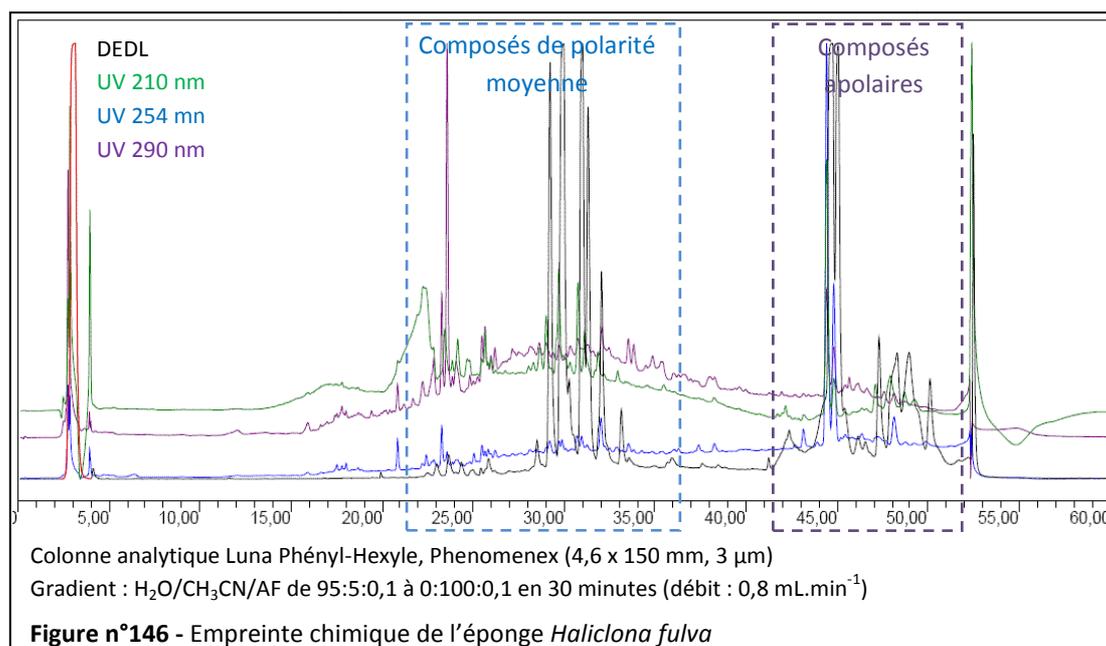
L'empreinte chimique de cette éponge montre deux familles de composés de polarité différente (Figure n°146) :

- une famille de polarité moyenne éluée entre 20 et 35 minutes sur le profil HPLC (DEDL, DAD) ;
- une famille de composés apolaires, éluée entre 45 et 50 minutes.

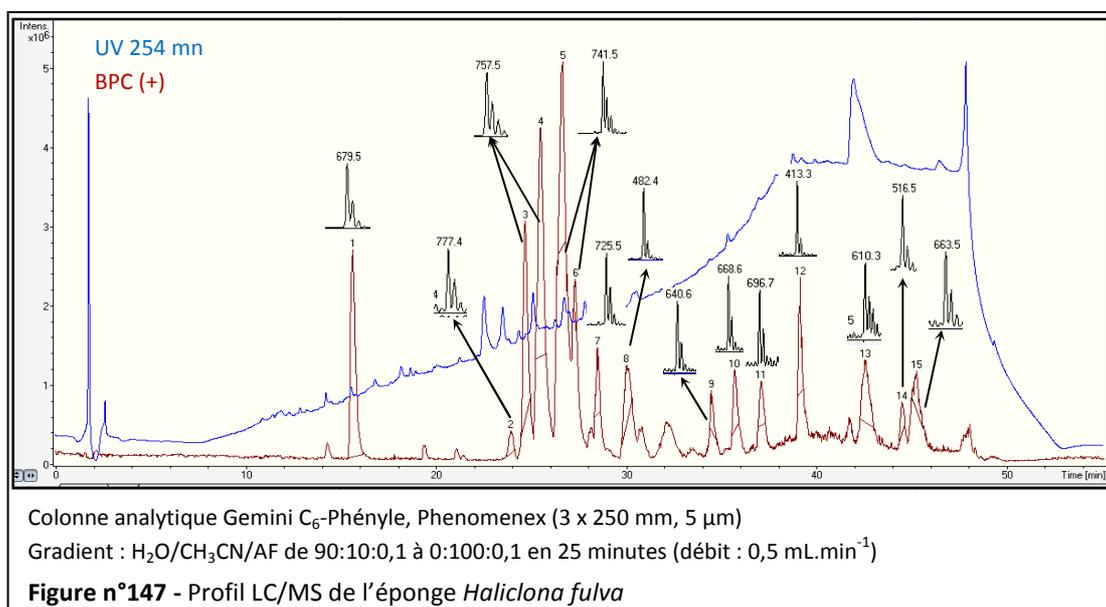
²⁰⁵ World Register of Marine species (www.marinespecies.org)

²⁰⁶ Cimino, G. ; De Stephano, S. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *15*, 1325-1328.

²⁰⁷ Casapullo, A. ; Minale, L. ; Zollo, F. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 527-533.



Le profil LC/MS de cet échantillon a mis en évidence des métabolites qui pour la plupart ont une masse molaire inconnue dans les produits naturels (**Figure n°147**). *Haliclona fulva* est ainsi apparue intéressante dans la recherche de nouvelles molécules naturelles. Les deux familles de composés ont été purifiées afin de déterminer les structures des métabolites secondaires produits par *H. fulva* ou par ses micro-organismes associés. Nous avons pu déduire des premières études structurales que la famille la plus polaire, est essentiellement composée de métabolites de type polypeptides dont l'élucidation structurale est actuellement en cours. La seconde famille composée de métabolites apolaires regroupe, quant à elle, des molécules polyacétyléniques dont la famille est connue dans *Haliclona fulva*. L'éponge *Haliclona fulva* n'a donc pas répondu au deuxième critère de sélection.



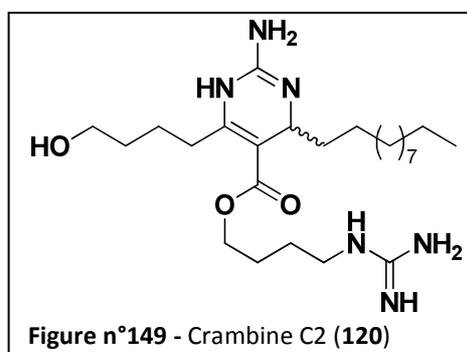
II.3. *Crambe crambe*Figure n°148 - *Crambe crambe*

Crambe crambe (Schmidt, 1862) est une éponge encroûtante très répandue en Méditerranée. Elle fait partie des éponges les mieux connues d'un point de vue biologique et écologique,²⁰⁸ et produit un grand nombre d'alcaloïdes guanidiniques polycycliques, telles que les crambescidines (**6-9**) ou les crambines (**18-19**) dont l'activité pharmacologique est très intéressante.

Par la présence de nombreux alcaloïdes intéressants d'un point de vue structural et pharmacologique, cette espèce a semblé être un candidat aux études de biosynthèse que

nous voulions mener. Les profils HPLC-DEDL, -DAD et -MS obtenus ont permis de confirmer ces données (Figure n°150).

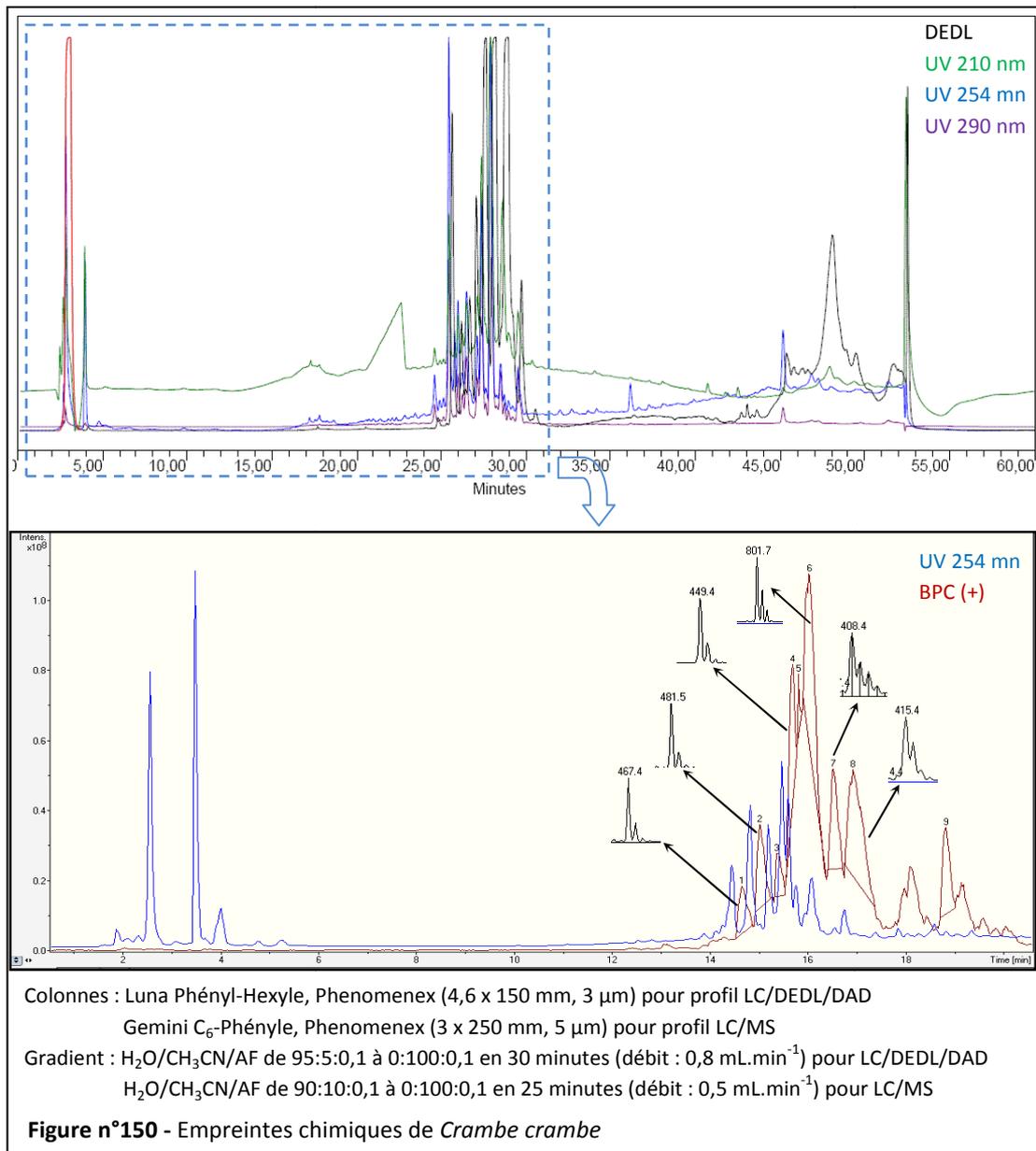
Grâce au profil LC/MS, certaines molécules déjà isolées dans *Crambe crambe* ont été retrouvées. Ainsi, la crambine C2 (**120**) avec un ion pseudomoléculaire à m/z 467,4 $[M+H]^+$, la crambescine B (**19**) à m/z 481,5 $[M+H]^+$, la crambine A (**18**) à m/z 449,4 $[M+H]^+$, la crambescidine 800 (**9**) à m/z 801,7 $[M+H]^+$ ou encore la crambescidine 816 (**6**) à m/z 408,4 $[M+2H]^{2+}$ et la crambescidine 830 (**7**) à m/z 415,4 $[M+2H]^{2+}$ ont pu à priori être identifiées. La bibliographie sur cette éponge et les profils obtenus ont fait que *Crambe crambe* a rempli entièrement le deuxième critère de sélection.



Cette éponge a donc été placée en aquarium pour évaluer sa capacité à s'adapter à un nouvel environnement. *Crambe crambe* étant encroûtante, il a été très difficile de prélever plusieurs spécimens dans des conditions de stress identiques. De ce fait, un développement bactérien et une nécrose sont rapidement apparus après que certains spécimens d'éponge aient été placés en aquarium (après 2 ou 3 jours). Ainsi, l'éponge n'a pas rempli le dernier critère de sélection et n'a pas pu être choisie pour les premières expériences de biosynthèse que nous voulions mener. *Crambe crambe* reste tout de même une éponge très intéressante pour des études de biosynthèse. Après avoir mis au point un protocole et des conditions optimales pour la biosynthèse d'alcaloïdes sur un

²⁰⁸ Duran, S. ; Giribet, G. ; Turon, X. *Molec. Ecol.*, **2004**, *13*, 109-122. Et références citées

modèle plus simple à travailler, il serait intéressant de considérer de nouveau la biosynthèse des alcaloïdes produits par cette espèce. Pour cela, un travail sur le mode de prélèvement sera nécessaire pour que l'éponge puisse s'adapter plus facilement aux conditions imposées par les études de biosynthèse *ex situ*.



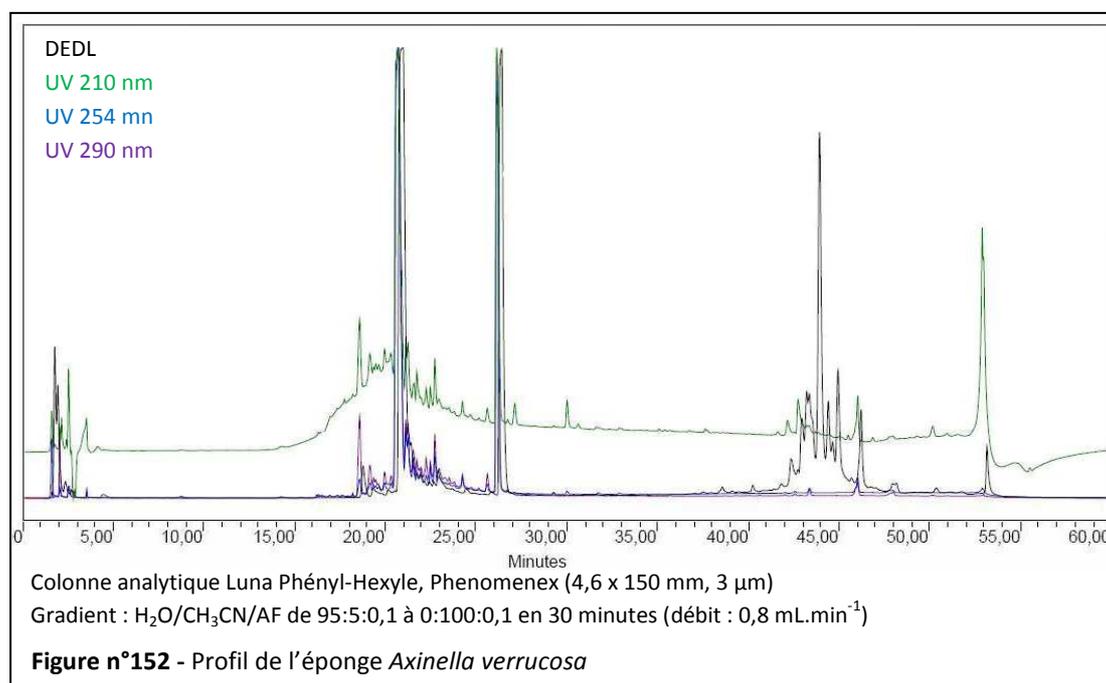
II.4. *Axinella verrucosa*

Photo : T. Perez

Figure n°151 - *Axinella verrucosa*

Axinella verrucosa (Esper, 1794) est une éponge de couleur jaune trouvée dans toute la Méditerranée, au nord de l'Atlantique et sur la côte Ouest africaine. C'est une éponge déjà étudiée d'un point de vue chimique. Elle produit notamment un grand nombre d'alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazole (P2AI)²⁰⁹ faisant l'objet de spéculations biosynthétiques.²¹⁰ Jusqu'ici, une seule expérience de biosynthèse préliminaire, sur une culture cellulaire de l'éponge *Axinella corrugata*, a été tentée sur ce type d'alcaloïdes.²⁰³

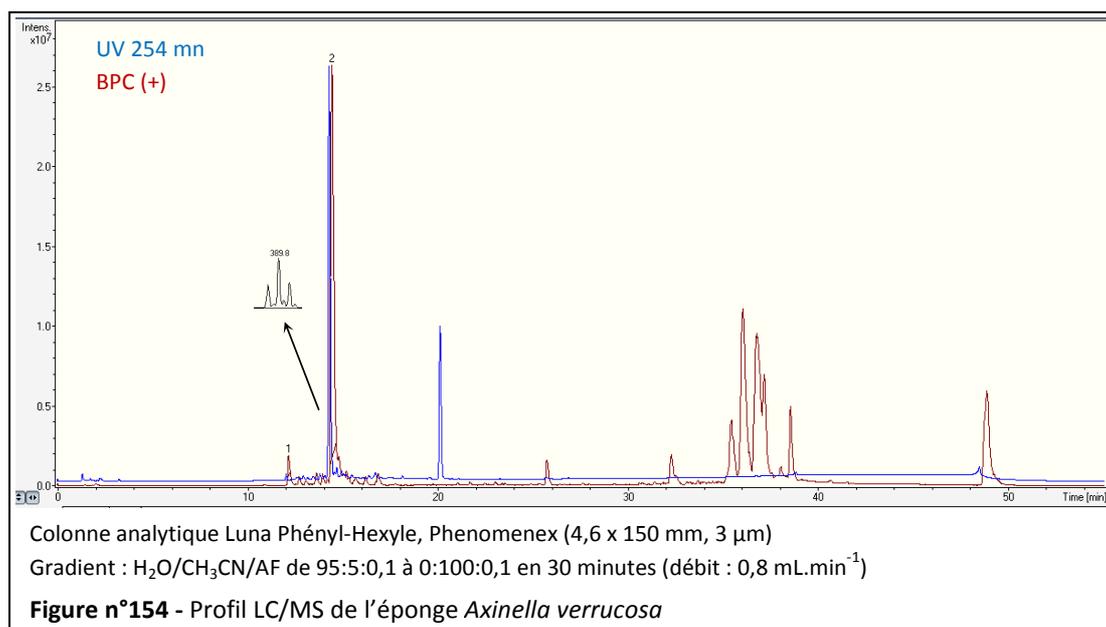
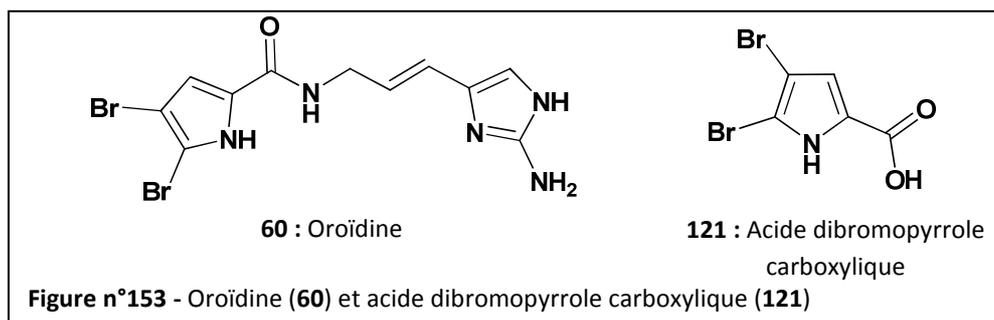
L'empreinte chimique de l'éponge (Figure n°152) a mis en évidence deux métabolites majoritaires dont les maxima d'absorption sont à 216, 260 et 275 nm pour le premier (env. 21 minutes) et 207, 240 et 272 nm pour le second (env. 26 minutes). Ces valeurs sont compatibles avec celles des alcaloïdes de type P2AI.



²⁰⁹ Aiello, A. ; D'Esposito, M. ; Fattorusso, E. ; Menna, M. ; Müller, W.E.G. ; Perovic-Ottstadt, S. ; Schröder, H.C. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 17-24.

²¹⁰ Picon, S. ; Tran Huu Dau, E. ; Matrin, M.-T. ; Retailleau, P. ; Zaparucha, A. ; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 2523-2526. Et références citées

Le profil LC/MS (**Figure n°154**) a permis d'identifier le métabolite majoritaire, dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 387,8 ; 389,8 ; 391,8 (1:2:1, $[M+H]^+$) qui correspond à l'oroïdine (**60**), déjà isolée d'*A. verrucosa*.¹²² Le second pic identifié sur le profil HPLC est visible lorsque le spectromètre de masse est configuré en mode négatif, il s'agit de l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**) également connu dans cette espèce.²¹¹ Ainsi, par la présence de P2AI dont la biosynthèse est intéressante, *Axinella verrucosa* s'est avérée être un candidat aux les études de biosynthèse que nous voulions mener.



Cette éponge a été placée en aquarium pour évaluer sa capacité à s'adapter à un nouvel environnement. Dans ces conditions, l'éponge a semblé s'adapter facilement à cet environnement : aucun développement bactérien et pas de nécrose ont été détectés, même après plusieurs semaines en aquarium, et les oscules de l'éponge sont restés bien ouverts. Au bout d'un mois, l'éponge a été extraite et son empreinte chimique a été comparée à celle préalablement obtenue (spécimen prélevé dans son environnement naturel, **Figure n°152**). Ces deux empreintes chimiques, dont l'oroïdine (**60**) et l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**) sont les métabolites secondaires

²¹¹ Dembitsky, V.M. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2002**, *28*, 170-182.

majoritaires, sont superposables. Les métabolites secondaires d'*Axinella verrucosa* étaient donc toujours présents dans l'éponge après 1 mois en aquarium. Bien que cette expérience ne permette pas de conclure quant au bon fonctionnement du métabolisme secondaire de l'éponge, le fait de retrouver la même empreinte chimique entre une éponge *in situ* et une éponge *ex situ* est très encourageant. *Axinella verrucosa* a ainsi répondu au dernier critère de sélection, cette éponge est apparue comme un candidat aux les études de biosynthèse que nous voulions entreprendre.

II.5. *Parazoanthus axinellae*



Photo : T. Perez

Figure n°155 - *Parazoanthus axinellae*

Parazoanthus axinellae (Schmidt, 1862) est une anémone coloniale très présente sur le site des Roches Saint Nicolas (Monaco), tant sur des tombants verticaux ombragés qu'en tant qu'épibiontes d'éponges comme *Axinella verrucosa*, *Axinella damicornis* ou *Agelas oroides*. Comme nous l'avons déjà souligné, cette espèce est peu étudiée d'un point de vue chimique et les profils HPLC-DEDL, DAD et MS de l'extrait brut du morphotype « *P. axinellae* allongés » ont montré la présence de nouveaux alcaloïdes bromés. La purification de cet extrait a permis d'isoler les parazoanthines A-G (XXI-XXVII), une nouvelle famille

d'alcaloïdes (Figure n°156).

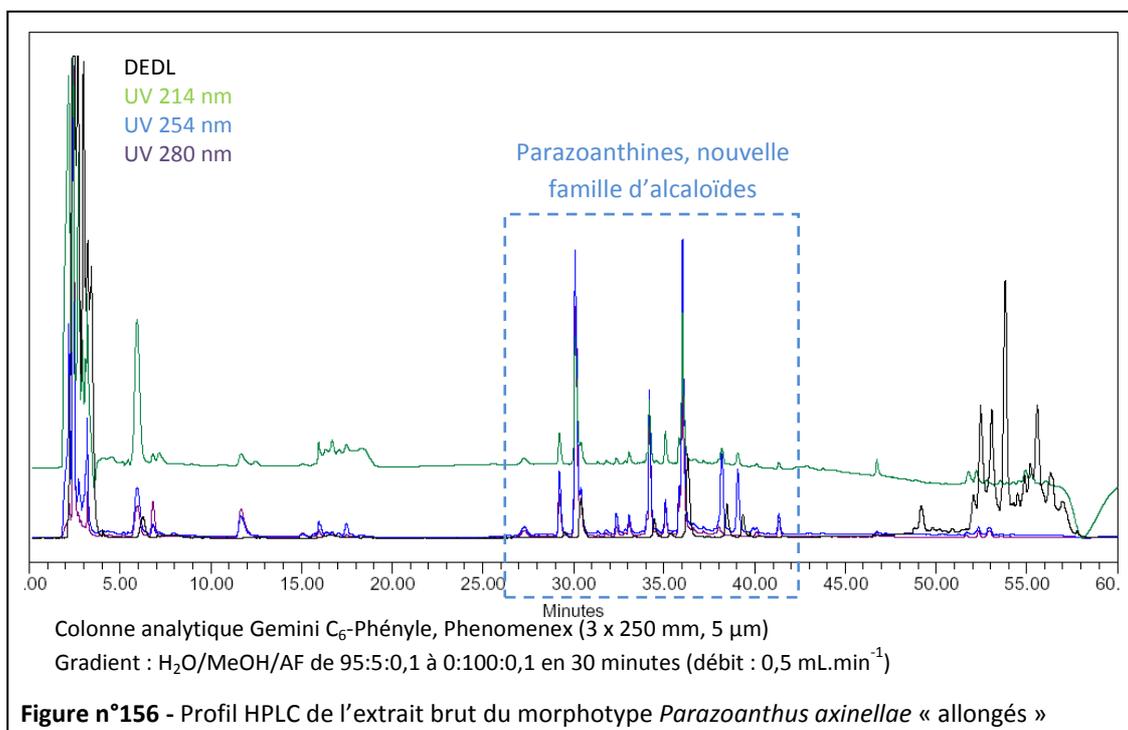
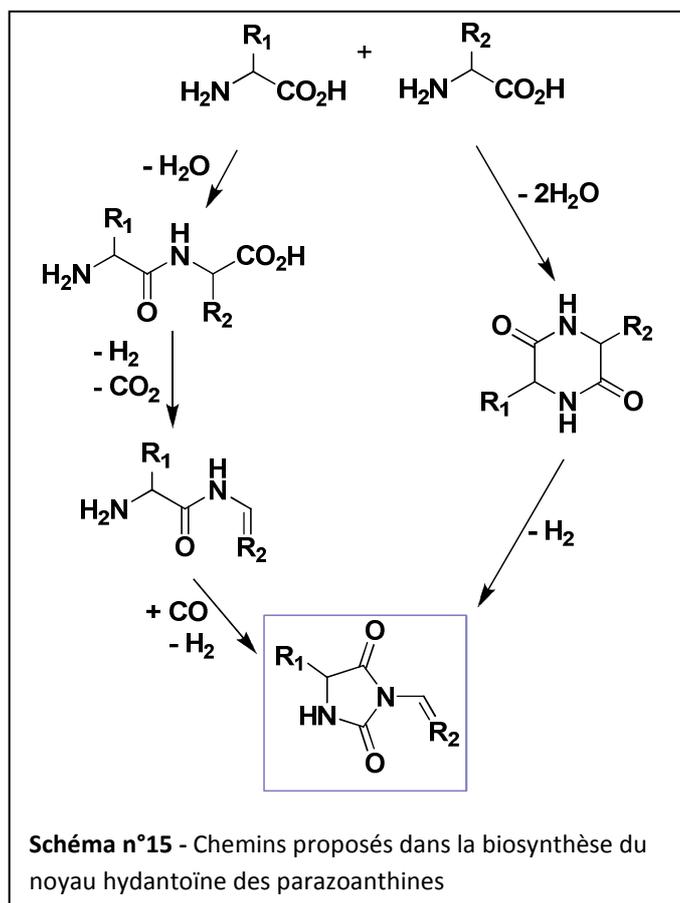


Figure n°156 - Profil HPLC de l'extrait brut du morphotype *Parazoanthus axinellae* « allongés »

Cette nouvelle famille de composés est très intéressante d'un point de vue biosynthétique car elle constitue le premier exemple de produit naturel dont le noyau hydantoïne est disubstitué en N-3 et C-5. Les hydantoïnes naturelles isolées jusqu'à ce jour ne sont pas substituées en N-3 ou, dans le cas d'un substituant, seul un méthyle est présent. En se basant sur quelques données bibliographiques, deux schémas biosynthétiques sont apparus (**Schéma n°15**) :



Les hydantoïnes sont supposées être des intermédiaires clés dans la formation de peptides de dérivés purines à partir d'acides aminés ainsi que dans la dégradation de ces peptides en acides aminés.²¹² La réaction clé du premier chemin proposé (chemin de gauche du **Schéma n°15**) est la monocarbonylation de la liaison peptidique de deux acides aminés.

Le deuxième chemin de biosynthèse proposé comprend une contraction de cycle d'une dicétopipérazine formée par biscondensation de deux acides aminés. Largement présentes dans le milieu marin, les dicétopipérazines sont connues pour être produites par des microorganismes, mais la contraction de cycle de cette famille de composés n'a pas encore clairement été prouvée dans le vivant.²¹³

²¹² Huber, C. ; Eisenreich, W. ; Hecht, S. ; Waechtershaeuser, G. *Science*, **2003**, *301*, 938–940.

²¹³ Vergne, C. ; Boury-Esnault, N. ; Perez, T. ; Martin, M.-T. ; Adeline, M.-T. ; Tran Huu Dau, E. ; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 2421-2424.

Ainsi, par la présence des parazoanthines, le morphotype « *P. axinellae* allongés » a répondu au deuxième critère de sélection. Pour étudier la biosynthèse *in vivo* et *ex situ* de cette famille d'alcaloïdes, les anémones devaient pouvoir s'adapter à l'environnement imposé par l'aquarium du laboratoire REL. Afin d'évaluer cette adaptation, des spécimens de « *P. axinellae* allongés » ont été prélevés avec l'éponge *Axinella verrucosa*, qui, d'après des études préalables, s'adapte facilement aux conditions de l'aquarium. Cette expérience a été concluante, après plusieurs semaines et jusqu'à plusieurs mois en aquarium, les polypes des anémones sont toujours restés ouverts une partie de la journée. Ainsi, les anémones *P. axinellae* ont supporté le passage de leur environnement naturel à un environnement artificiel lorsqu'elles étaient épibiontes d'éponges du genre *Axinella*. Le même essai a été tenté sur des spécimens de « *P. axinellae* allongés » directement fixés sur la roche et dans ce cas, le morceau de roche sur lequel étaient fixées les anémones a également été prélevé. Une fois encore, l'expérience s'est avérée positive.

P. axinellae « allongés » fixés sur la roche ou associés à une éponge du genre *Axinella*, ont rempli le dernier critère de sélection et sont donc apparus comme des candidats aux études de biosynthèse que nous voulions mener. En plus de la biosynthèse des parazoanthines et du fait de l'association des *P. axinellae* et des éponges du genre *Axinella*, des études sur la nature de cette association, encore indéterminée à ce jour, pourront être envisagées.

II.6. *Agelas oroides*

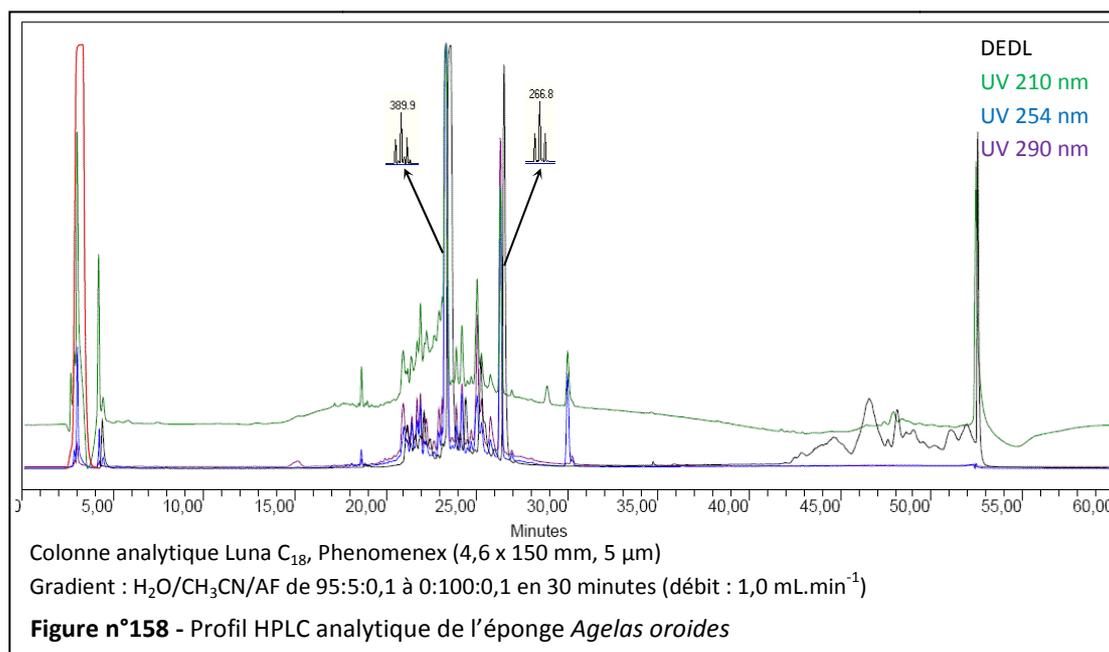


Agelas oroides (Schmidt, 1864) est une éponge massive de couleur orange très fréquente en mer Méditerranée. C'est une espèce sciaphile retrouvée sous les surplombs, au plafond des tombants et à l'entrée des grottes jusqu'à 50 m de profondeur.

Comme *Axinella verrucosa*, cette éponge, très étudiée d'un point de vue chimique, produit des alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazole (P2AI).²¹⁴

Le profil HPLC analytique de l'extrait brut de cette éponge (**Figure n°158**) a mis en évidence deux métabolites majoritaires à 24 et 26 minutes, qui, d'après une analyse par LC/MS, correspondent à l'oroïdine (**60**) pour le premier métabolite, avec un pic pseudomoléculaire à m/z 387,9-389,9-391,9 (1:2:1, $[M+H]^+$), et à l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**) pour le second avec un pic pseudomoléculaire à m/z 264,8-266,8-268,8 (1:2:1, $[M-H]$).

²¹⁴ Fattorusso, E. ; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 9917-9922.



Cette éponge, riche en alcaloïdes de type P2AI et présentant un métabolite secondaire très majoritaire, l'oroidine (**60**), a semblé être tout à fait adaptée aux études de biosynthèse que nous voulions entreprendre. Elle a donc été placée en aquarium, dans des conditions proches de celles de son environnement naturel, pour évaluer sa capacité à s'adapter à ce mode de vie *ex situ*. Après plusieurs mois en aquarium, aucune nécrose n'est apparue et les oscules de l'éponge semblaient toujours être fonctionnels. Après ces quelques mois en aquarium, l'éponge a été extraite par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et le profil HPLC (DEDL, DAD) de l'extrait brut ainsi obtenu a été comparé à celui d'un spécimen directement prélevé dans son milieu naturel. Les deux profils, quasiment superposables, ont permis de montrer que les métabolites secondaires de l'éponge étaient toujours présents, même après plusieurs mois en aquarium. Comme ce fut le cas pour *Axinella verrucosa*, cette expérience ne permet pas de conclure quant au bon fonctionnement du métabolisme secondaire de l'éponge, mais le fait de retrouver le même profil HPLC entre une éponge prélevée *in situ* et une éponge prélevée *ex situ* est très encourageant.

Agelas oroides a ainsi répondu au dernier critère de sélection, cette éponge est apparue comme troisième candidat aux études de biosynthèse que nous voulions mener.

A la suite de ces expériences, trois organismes ont été sélectionnés : *Axinella verrucosa*, *Parazoanthus axinellae* et *Agelas oroides*. De ces trois organismes, nous avons décidé de commencer les études de biosynthèse avec *Agelas oroides*. En effet, cette éponge est apparue le meilleur modèle de départ car elle est robuste, très présente sur le site de prélèvement et très facile à prélever.

Puisqu'aucune étude de ce type n'avait été menée jusqu'à présent, l'objectif de cette partie de ma thèse a été de mettre au point, dans le laboratoire de l'AIEA, un protocole d'étude de la biosynthèse de ces alcaloïdes *in vivo* et *ex situ*. Ce protocole sera ensuite applicable à d'autres invertébrés marins comme *Crambe crambe*, *Axinella verrucosa* ou *Parazoanthus axinellae*.

III. Métabolisme secondaire des P2AI dans *Agelas oroides*

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe « Chimie des produits naturels marins bioactifs, synthèse biomimétique et chimie médicinale » de l'ICSN dirigée par le Dr Ali Al-Mourabit, l'étude chimique d'*Agelas oroides* a été menée par le Dr Pierre Sauleau, en stage post-doctoral à l'ICSN en 2007-2008, tandis que mon travail au sein du groupe « Substances Naturelles Marines » du LCMB a concerné la mise au point du protocole de biosynthèse des alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazole (P2AI) chez cette éponge.

172

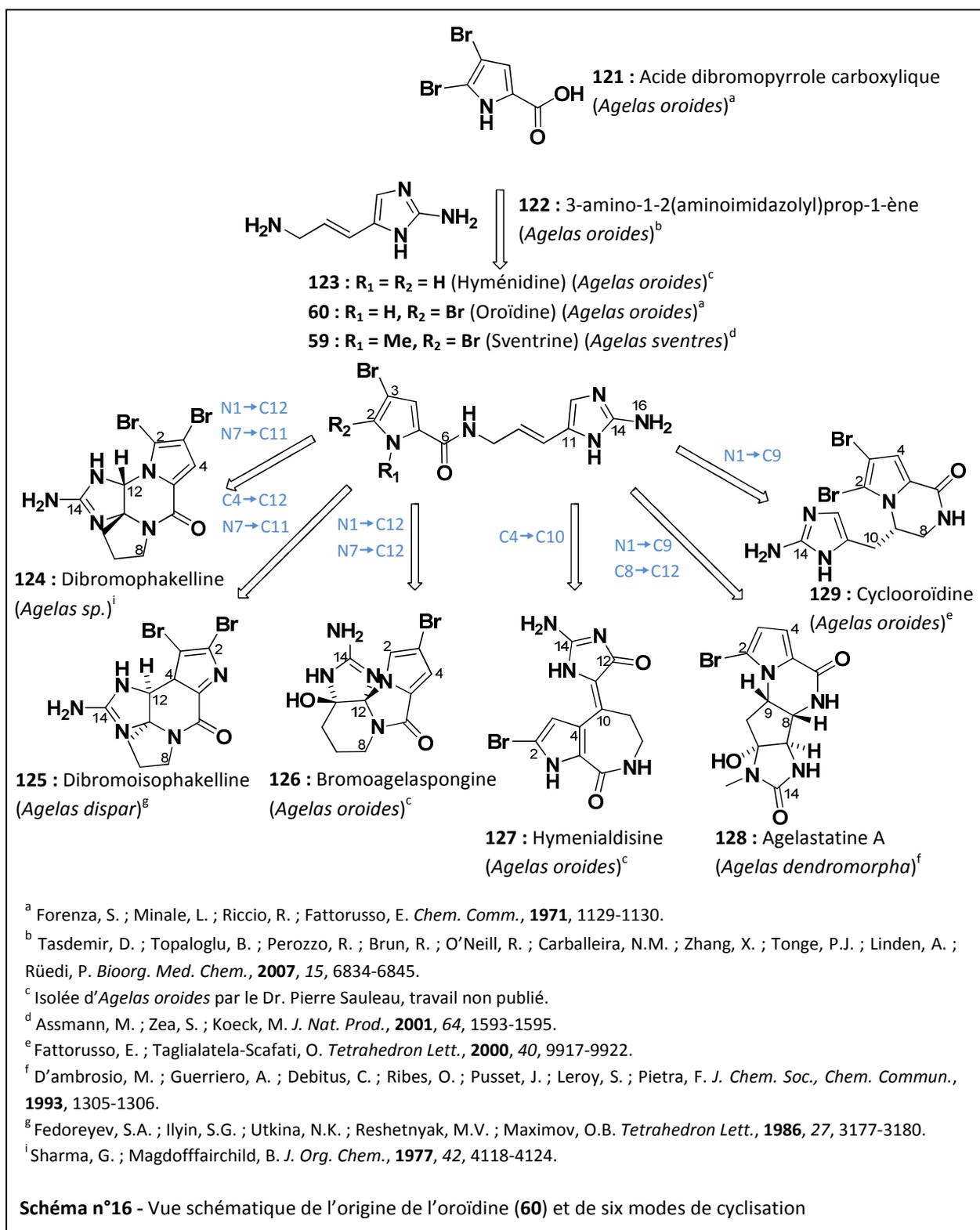
III.1. Métabolites isolés d'*Agelas oroides* (Partenariat ICSN)

Le profil HPLC (DEDL, DAD) de l'extrait brut d'*Agelas oroides* paraît relativement simple avec deux métabolites majoritaires, l'oroïdine (**60**) et l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**). Cependant, *A. oroides* produit également une multitude de pyrrole-2-aminoimidazoles (P2AI) en faibles quantités qui, pour la plupart, sont dérivés du squelette C₁₁N₅ de l'oroïdine (**60**) après plusieurs réactions telles que différentes cyclisations illustrées sur le **Schéma n°16**.

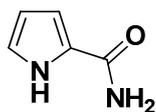
L'étude chimique d'*Agelas oroides*, entreprise par le Dr. Pierre Sauleau, a permis l'isolement de 20 alcaloïdes de type P2AI. Cette étude n'est pas exhaustive, plusieurs P2AI ont été isolés en quantités trop faibles pour en déterminer la structure. Les différents P2AI isolés et caractérisés de cette éponge sont représentés sur la **Figure n°159**.

L'ensemble des alcaloïdes de type P2AI isolés d'*A. oroides*, ayant pour la plupart une activité biologique intéressante,²¹⁵ utiliserait un métabolisme secondaire identique.

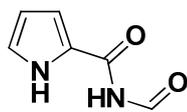
²¹⁵ Aiello, A. ; Fattorusso, E. ; Menna, M. ; Tagliatela-Scafati, O. In: *Modern Alkaloids, Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, **2008**, 271-304.



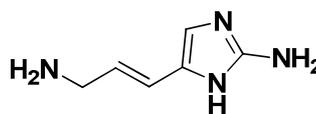
- Dérivés de l'acide pyrrole carboxylique :



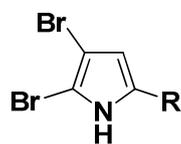
130 : Carboxamide



131 : N-formyl-pyrrole carboxamide



- 3-amino-1-2(aminoimidazolyl)prop-1-ène (122)



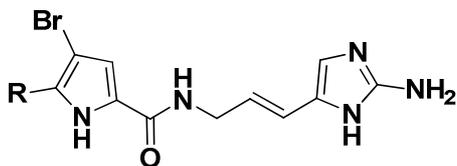
121 : R = $-\text{CO}_2\text{H}$ (Acide dibromopyrrole carboxylique)

132 : R = $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ (Ester méthylique de 142)

133 : R = $-\text{CONH}_2$ (Dibromocarboxamide)

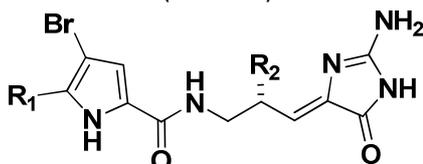
134 : R = $-\text{CN}$ (Dibromopyrrole carbonitrile)

- P2AI linéaires :



123 : R = $-\text{H}$ (Hyménidine)

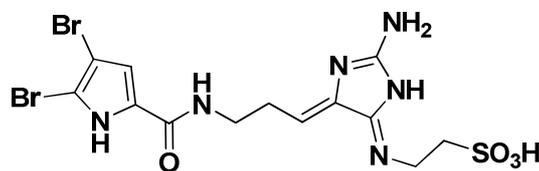
60 : R = $-\text{Br}$ (Oroïdine)



136 : R₁ = $-\text{Br}$, R₂ = $-\text{H}$ (Dispacamide A)

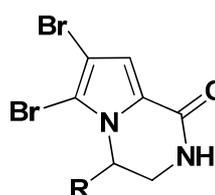
137 : R₁ = $-\text{H}$, R₂ = $-\text{H}$ (Dispacamide B)

138 : R₁ = $-\text{Br}$, R₂ = $-\text{OH}$ (Dispacamide C)



135 : Taurodispacamide A

- P2AI cycliques de type longamide :

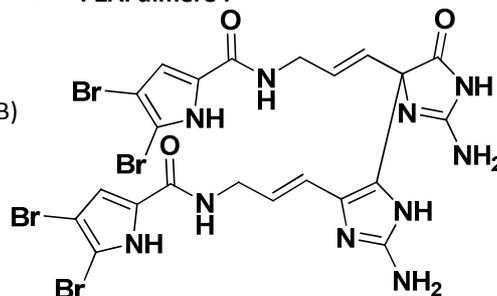


139 : R = $-\text{OH}$ (Longamide A)

140 : R = $-\text{CO}_2\text{H}$ (Longamide B)

141 : R = $-\text{CO}_2\text{Me}$ (Ester méthylique de l'hanishine)

- P2AI dimère :



142 : Mauritiamine

- P2AI cycliques dérivés de l'oroïdine :

129 : Cyclooroïdine

127 : Hymenialdisine

126 : Bromoagelaspongine

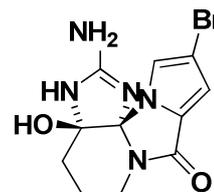
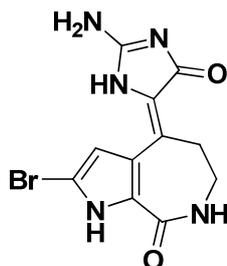
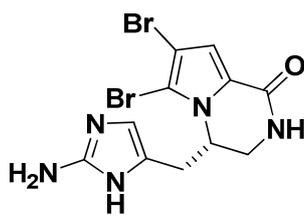


Figure n°159 - Alcaloïdes de type P2AI isolés de l'éponge *Agelas oroides*

Pour leur expérience de biosynthèse sur cultures cellulaires d'*Axinella corrugata*, Andrade *et al.* ont proposé quatre acides aminés comme précurseurs des P2AI : l'arginine ou l'histidine pour la partie 2-aminoimidazole (**122**) de l'oroïdine (**60**) et de ses dérivés et la proline ou l'ornithine pour la partie acide dibromopyrrole carboxylique (**121**) (I.3.6., pp.156-157). En se basant sur ces hypothèses, nous avons souhaité confirmer le rôle de précurseur de ces quatre acides aminés dans *A. oroides* pour la biosynthèse des divers P2AI.

III.2. Mise en place du protocole de biosynthèse *in vivo* et *ex situ*

175

Pour les études de biosynthèse envisagées et afin de comprendre le métabolisme secondaire de l'organisme, nous avons travaillé *in vivo* en utilisant l'arginine, l'histidine, la proline et l'ornithine marqués ^{14}C comme précurseurs. D'après les études menées par Richelle-Maurer *et al.* sur *Agelas conifera*, l'oroïdine (**60**) serait produite par les cellules de l'éponge.²¹⁶ Partant de cette hypothèse, nous avons supposé qu'il était de même pour l'ensemble des P2AI produits par *Agelas oroides*. De ce fait, aucune précaution particulière n'a été prise pour la survie des symbiontes de l'éponge. Cependant, nous avons voulu mimer les conditions de vie naturelles de l'éponge et n'avons ajouté aucun antibactérien lors des diverses expériences.

Travaillant avec des éléments radioactifs, les différentes expériences se sont déroulées *ex situ*. La technique d'incorporation des précurseurs la plus utilisée lors des expériences de biosynthèse sur les éponges *in vivo* et *ex situ* sont leur solubilisation dans l'eau contenant l'organisme étudié. Nous avons également utilisé cette technique d'incorporation. Afin d'obtenir une incorporation du précurseur détectable dans le(s) métabolite(s) ciblé(s), la quantité de radioactivité utilisée pour ce type d'expérience est en général comprise entre 20 et 250 μCi par précurseur, le seul contre-exemple étant celui de l'incorporation de l'isocyanure de farnésyle (**75**) et de l'isothiocyanate **74** dans les stylostellanes de l'éponge *Stylostella aurantium* pour lequel seulement 3,6 μCi de **75** ont été ajoutés.¹⁵⁰ Cependant ces précurseurs sont des intermédiaires avancés dans la biosynthèse des stylostellanes et sont donc plus spécifiques du métabolisme secondaire.

Malgré les quantités élevées de radioactivité utilisées dans les expériences publiées et pour limiter l'utilisation de radioactivité dans le laboratoire, nous avons souhaité travailler avec au maximum 2 μCi de précurseur.

III.2.1. Détermination de la quantité de radioactivité à ajouter

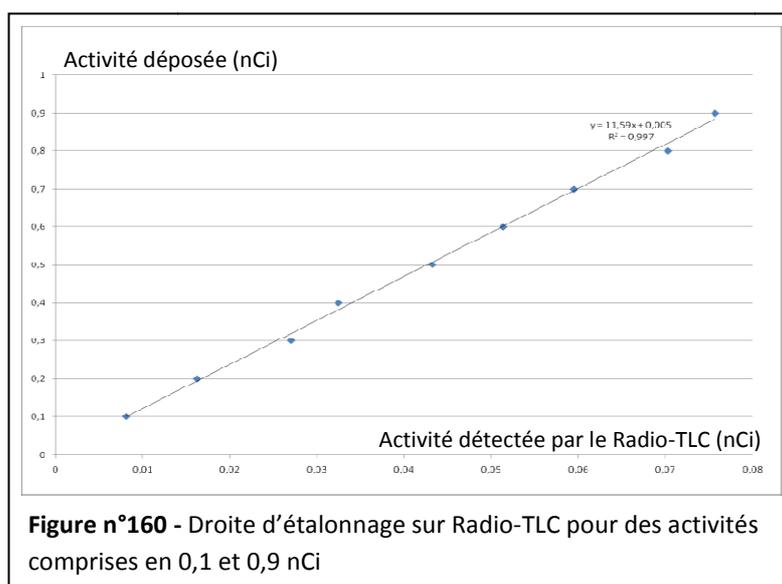
Nous avons dans un premier temps décidé de comparer le seuil de détection en ^{14}C d'un appareil Radio-TLC acheté pour l'occasion par rapport au compteur β à scintillation liquide. Afin d'avoir un rapport qualité de comptage/durée de comptage acceptable, nous avons convenu de limiter les durées de comptage à 1 heure.

²¹⁶ Richelle-Maurer, E., De Kluijver, M.J., Feio, S., Gaudêncio, S., Gaspar, H., Gomez, R., Tavares, R., Van de Vyver, G., Van Soest, R.W.M. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, 31, 1073-1091.

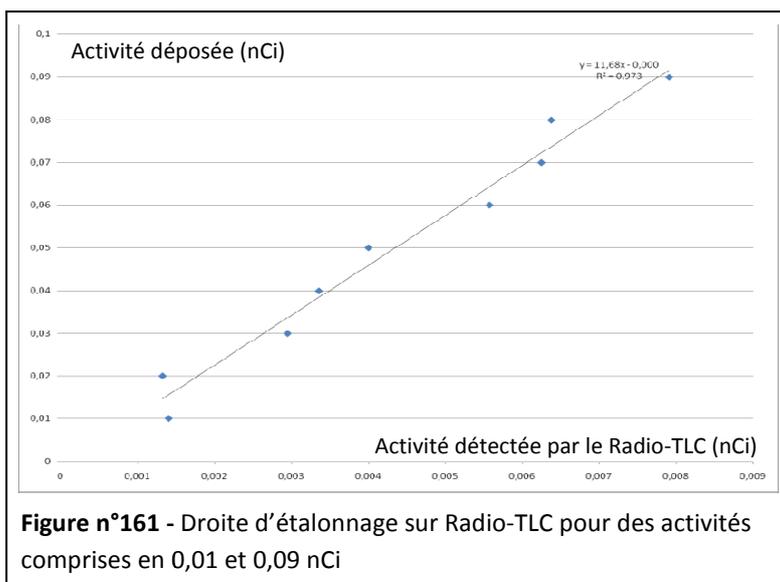
III.2.1.1. Seuil de détection en ^{14}C du Radio-TLC

Deux plaques CCM de silice sur verre ont été utilisées. Sur la première, neuf dépôts de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline de 0,1 nCi à 0,9 nCi ont été comptés par le Radio-TLC. Comme imposé, la durée de comptage de chaque dépôt a été d'une heure. Le résultat de ces neuf comptages ont permis de conclure que le seuil de détection en ^{14}C de l'appareil était en deçà de 0,1 nCi. En effet, pour 0,1 nCi déposé, le rapport signal/bruit après une heure de comptage est de $S/B = 6$. La grande précision des mesures est justifiée par l'équation de la droite de l'activité déposée en fonction de l'activité lue par le Radio-TLC qui a un coefficient de détermination de $R^2 = 0,997$ (**Figure n°160**).

176



Au vu des résultats de cette plaque CCM, nous avons réalisé une seconde gamme d'étalonnage constituée de neuf points de 0,01 nCi à 0,09 nCi. Après comptage de chaque dépôt par Radio-TLC, nous avons conclu que le seuil de sensibilité ^{14}C de l'appareil était de 0,02 nCi avec un rapport signal/bruit de 3 pour une heure de comptage (**Figure n°161**).



III.2.1.2. Seuil de détection en ^{14}C du Compteur β à scintillation liquide

Afin de comparer le seuil de détection du Radio-TLC avec celui du compteur β à scintillation liquide, nous avons préparé les deux mêmes gammes d'étalonnage. Grâce à la première gamme, composée de 0,1 nCi à 0,9 nCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-L-proline}$, nous avons conclu que le seuil de détection de l'appareil était en deçà de 0,1 nCi pour lequel le rapport signal/bruit obtenu est de 4. La seconde gamme d'étalonnage, comprise entre 0,01 et 0,09 nCi, a permis de déterminer le seuil de détection de l'appareil, qui est de 0,05 nCi pour une heure de comptage, avec un rapport signal/bruit de 3. Ce seuil de détection est plus élevé (environ 0,1 nCi) lorsque les échantillons radioactifs sont colorés (cf. **Partie expérimentale** p.301).

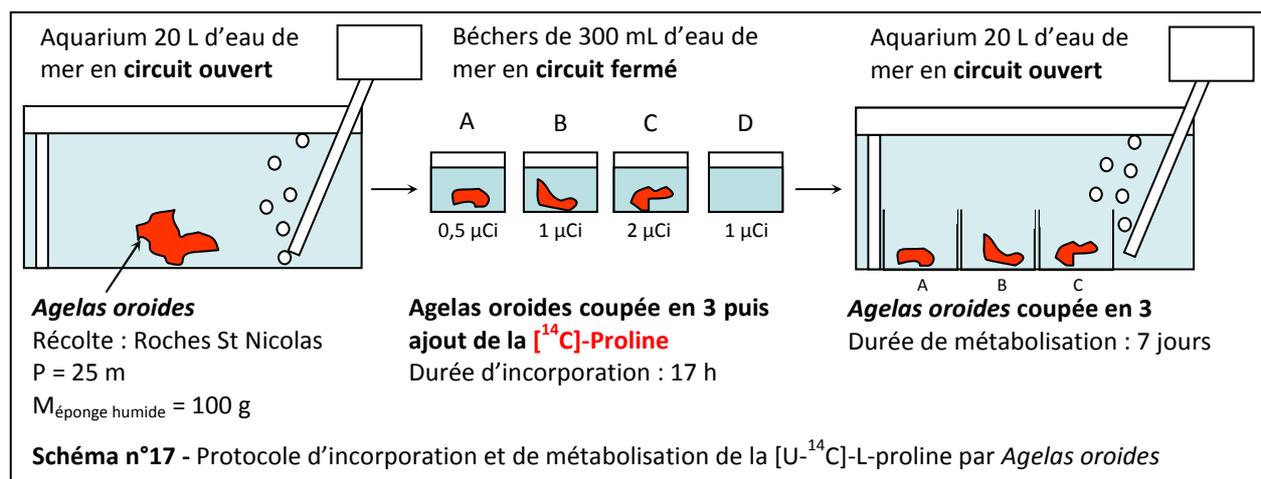
Le Radio-TLC apparaît donc plus performant que le compteur β à scintillation liquide. Avec un seuil de détection de 0,02 nCi et si nous considérons une incorporation moyenne de la radioactivité de $10^{-2}\%$ dans les métabolites biosynthétisés (valeur déduite des différentes expériences décrites dans paragraphe I.3. (pp.138-157), **il faut ajouter au minimum 0,2 μCi de précurseurs radiomarqués, ce qui rentre dans les consignes de sécurité du laboratoire.**

III.2.1.3. Incorporation des précurseurs dans *Agelas oroides*

Des expériences de biosynthèse ont montré la difficulté de certains précurseurs à être incorporés par l'éponge.¹³⁹ La première étape des études que nous avons menées sur *Agelas oroides* a donc été de déterminer sa capacité à incorporer les acides aminés radiomarqués ajoutés dans l'eau. La radioactivité nécessaire minimale de précurseur incorporé étant de 0,2 μCi , nous avons décidé d'en ajouter 2,5 à 10 fois plus afin de pallier le problème d'incorporation dans l'éponge.

- **Expérience 1 :**

Pour cela, après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, un spécimen d'*Agelas oroides* a été coupée en 3 morceaux, nommés A, B et C, placés dans des béchers de 300 mL d'eau de mer en présence de [U-¹⁴C]-L-proline. Après 17 heures d'incorporation, les 3 morceaux d'*A. oroides* ont été replacés en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L d'eau de mer (**Schéma n°17**).



Afin d'évaluer le taux d'incorporation de la proline dans l'éponge, la radioactivité résiduelle contenue dans chaque bécher de 300 mL a été mesurée (**Tableau 22**). Le bécher contrôle (D), contenant 300 mL d'eau de mer et 1 µCi de [U-¹⁴C]-L-proline, a permis de confirmer que la proline ne se fixait pas aux parois du bécher durant l'étape d'incorporation.

Tableau 22 - Taux d'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-proline par *Agelas oroides* après 17 h

| Nom | Masse (humide) | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|--------------|----------------|------------------|-------------------|
| A | 30 g | 0,5 µCi | 64 % |
| B | 30 g | 1,0 µCi | 76 % |
| C | 40 g | 2,0 µCi | 56 % |
| D (contrôle) | - | 1,0 µCi | 0 % |

Les résultats obtenus, entre 56 et 76 % d'incorporation, indiquent une bonne incorporation de la proline par l'éponge. La technique d'incorporation des acides aminés utilisée semble donc convenir aux études de biosynthèse des P2AI chez *A. oroides*.

Après 7 jours de métabolisation en circuit ouvert, les 3 morceaux d'éponge ont été extraits par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. Avant d'évaluer la radioactivité associée à chaque extrait brut par compteur β à scintillation liquide, une courbe de calibration composée de six étalons, contenant 0,8 nCi de [U-¹⁴C]-L-proline dans un extrait brut d'*A. oroides* de plus en plus concentré, a du être créée (cf. **Partie expérimentale** p.302). En effet, le compteur β étant sensible à la nature du solvant

et la coloration de l'échantillon (effet de « quenching »), il est nécessaire d'établir une courbe de calibration permettant de déterminer la radioactivité réelle d'un échantillon d'après la valeur mesurée par l'appareil.

Après séchage, chaque extrait brut a été solubilisé dans 6 mL de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. 2 mL ont été prélevés dans lesquels ont été ajoutés 10 mL de scintillant (Ultima Gold XR, Perkin Elmer). La radioactivité de ces échantillons ainsi préparés a été mesurée par le compteur β en utilisant la courbe de calibration préalablement réalisée (**Tableau 23**).

Tableau 23 - Radioactivité des extraits brut d'*A. oroides*

| Nom | Masse (mg) | Activité (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) |
|-----|------------|----------------|---------------------------------------|
| A | 448 | 4,0 | 1,25 % |
| B | 582 | 12,0 | 1,58 % |
| C | 747 | 3,0 | 0,27 % |

Par cette expérience, plus de 50 % de la [U-¹⁴C]-L-proline ont été incorporés dans l'éponge et environ 1 % de la radioactivité a été retrouvée dans son extrait brut. Malheureusement, durant la phase de métabolisation, les 3 morceaux d'éponge se sont nécrosés et un développement bactérien est apparu (**Figure n°162**). Le fait d'avoir coupé l'éponge juste avant l'étape d'incorporation en circuit fermé en est certainement la cause.

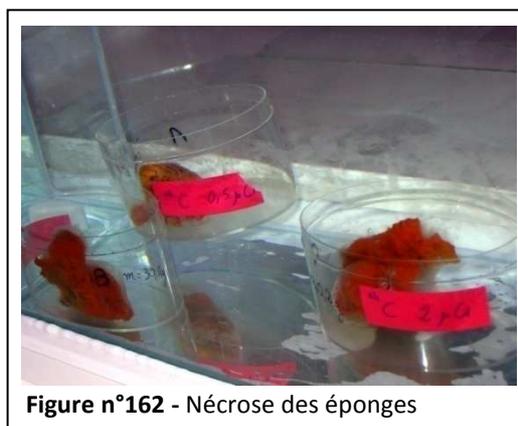
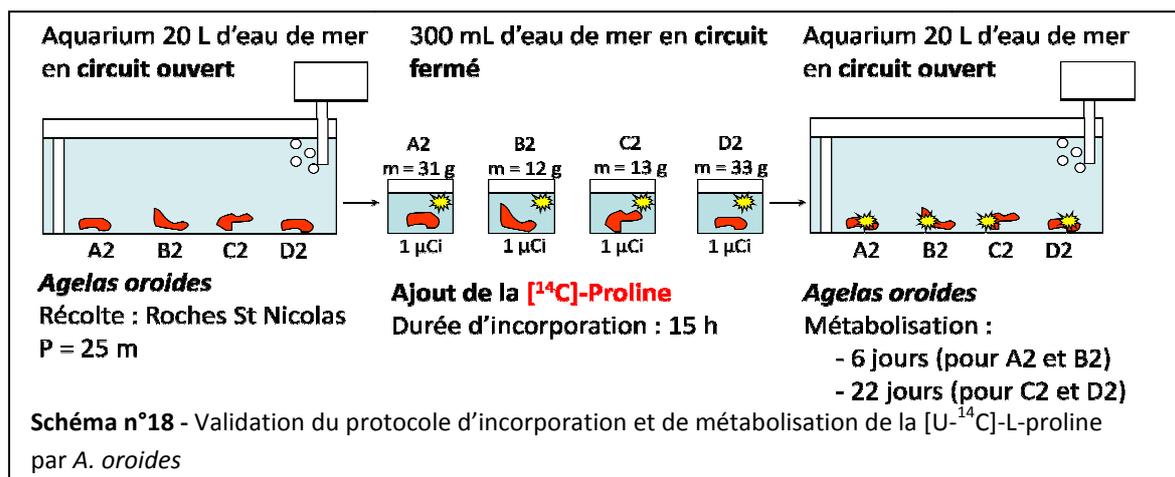


Figure n°162 - Nécrose des éponges

- **Expérience 2 :**

Cependant, malgré la nécrose des 3 morceaux d'éponge, une quantité suffisante de radioactivité était présente dans les extraits bruts d'*A. oroides* pour être détectée par le compteur β . Afin de valider le protocole d'incorporation et de métabolisation des précurseurs dans l'éponge, l'expérience a été renouvelée avec quatre spécimens d'*A. oroides*, nommées A2 à D2, non coupés avant l'étape d'incorporation et en utilisant 1 μ Ci de [U-¹⁴C]-L-proline par éponge (**Schéma n°18**).



Après 15 heures d'incorporation, les quatre spécimens d'éponge ont été replacés dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert et la radioactivité résiduelle des 300 mL d'eau a été mesurée. Ce deuxième essai a montré **une incorporation quasi-totale de la proline dans les éponges (Tableau 24)**. La technique utilisée semble donc très adaptée à l'incorporation d'acides aminés dans *A. oroides*. Le taux d'incorporation plus faible obtenu lors du premier essai est certainement dû à la nécrose des morceaux d'éponge.

Tableau 24 - Taux d'incorporation de la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline dans *Agelas oroides*

| Nom | Masse (humide) | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|------------------|-------------------|
| A2 | 31 g | 1,0 µCi | 99 % |
| B2 | 12 g | 1,0 µCi | 93 % |
| C2 | 13 g | 1,0 µCi | 98 % |
| D2 | 33 g | 1,0 µCi | 85 % |

Après 6 jours de métabolisation, les quatre éponges n'ont montré aucun signe de nécrose et aucun voile bactérien n'était visible. Les éponges A2 et B2 ont été extraites par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 et la radioactivité leur extrait brut a été mesurée par un compteur β à scintillation liquide dans les mêmes conditions que celles de la première expérience (Tableau 25). L'étape de métabolisation de cette deuxième expérience a été allongée à 22 jours pour les éponges C2 et D2 afin, d'une part de vérifier leur survie lorsqu'elles sont gardées plus longtemps en aquarium après incorporation des précurseurs radiomarqués, et d'autre part pour évaluer la différence de radioactivité des extraits bruts entre 6 et 22 jours de métabolisation. Avant leur extraction, les éponges C2 et D2 ne présentaient aucune nécrose, la nécrose et le développement bactérien des morceaux d'éponge de la première expérience semblent donc être la conséquence des blessures infligées. Cette deuxième expérience, sans nécrose des éponges durant l'étape de métabolisation, a montré que le protocole d'incorporation et de métabolisation convient aux études de biosynthèse des P2AI chez *A. oroides*.

Tableau 25 - Radioactivité des extraits brut d'*A. oroides*

| Nom | Masse (mg) | Activité (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) |
|-----|------------|----------------|---------------------------------------|
| A2 | 840 | 2,5 | 0,28 % |
| B2 | 500 | 8,8 | 0,96 % |
| C2 | 380 | 6,5 | 0,70 % |
| D2 | 440 | 3,2 | 0,41 % |

Malgré un taux d'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-proline plus important dans les éponges, la radioactivité associée aux quatre extraits bruts semblent légèrement plus faible que celle de la première expérience. Lors de la première expérience, il est possible que les bactéries aient utilisé de la proline radiomarquée pour leur propre développement. Le voile bactérien ayant été extrait avec les morceaux d'éponge, cette hypothèse permettrait d'expliquer les activités des extraits bruts obtenus.

La radioactivité associée à l'extrait A2 est faible par rapport à sa masse, cette valeur peut s'expliquer par le fait que l'échantillon, très coloré du fait de sa concentration, n'entre pas dans la gamme de coloration de la courbe de calibration créée (**Partie expérimentale** p.302). Il est donc possible que l'équation déterminée par cette courbe ne soit pas applicable à l'échantillon.

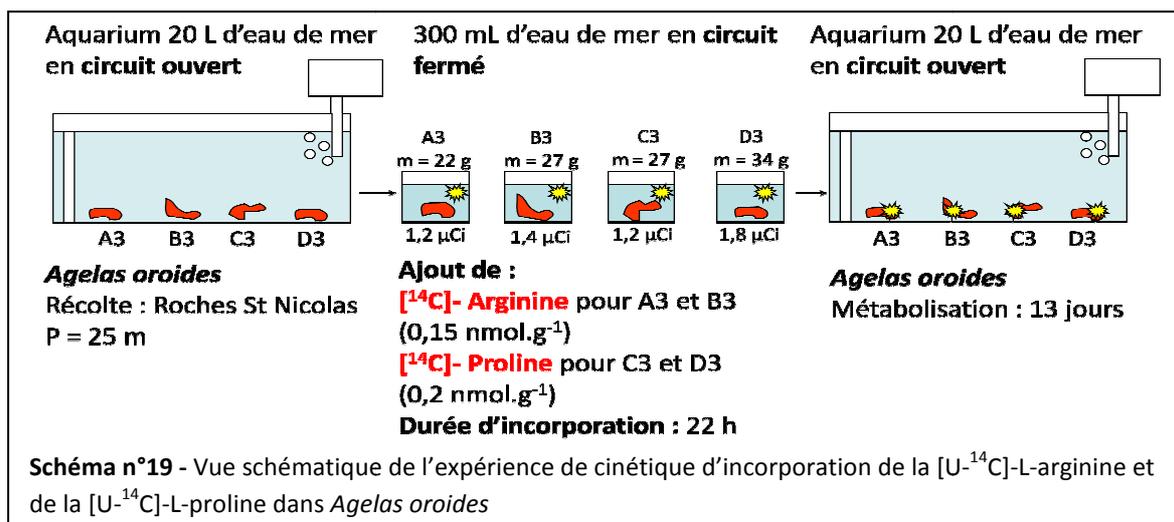
Malgré une radioactivité des extraits bruts légèrement plus faible que lors de la première expérience, nous avons jugé que l'ajout d'1 µCi de précurseur était suffisant pour détecter une incorporation dans les métabolites secondaire de l'éponge. Ce deuxième essai a également permis de valider le protocole d'incorporation et de métabolisation des précurseurs à utiliser pour les études de biosynthèse que nous voulions menées sur *Agelas oroides*.

Une fois la quantité de radioactivité fixée, nous avons déterminé le temps nécessaire à l'éponge pour incorporer le maximum de précurseur durant l'étape d'incorporation, durée arbitraire dans les deux premières expériences décrites ci-dessus.

III.2.2. Cinétique d'incorporation des acides aminés

- **Expérience 3 :**

Après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, quatre spécimens d'*A. oroides* de 20 à 30 g, nommées A3, B3, C3 et D3, ont été placés dans des béciers de 300 mL d'eau de mer (**Schéma n°19**).



Aux 300 mL d'eau de mer a été ajoutée la [¹⁴C]-L-arginine ou la [¹⁴C]-L-proline, deux des quatre acides aminés supposés entrer dans la biosynthèse des P2AI. Les quatre éponges n'étant pas exactement de la même masse, nous avons décidé d'ajouter une quantité constante de mole d'acide aminé par unité de masse d'éponge (0,15 nmol par gramme d'éponge humide pour l'arginine et 0,20 nmol par gramme d'éponge humide pour la proline). Après ajout des acides aminés, un prélèvement de 300 µL d'eau a été effectué toutes les demi-heures pendant 3h30, puis toutes les heures pendant 4h, et enfin un dernier prélèvement a été fait au bout de 22 heures d'incorporation, avant de replacer les quatre éponges en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L d'eau de mer (Figure n°163 et Tableau 26).

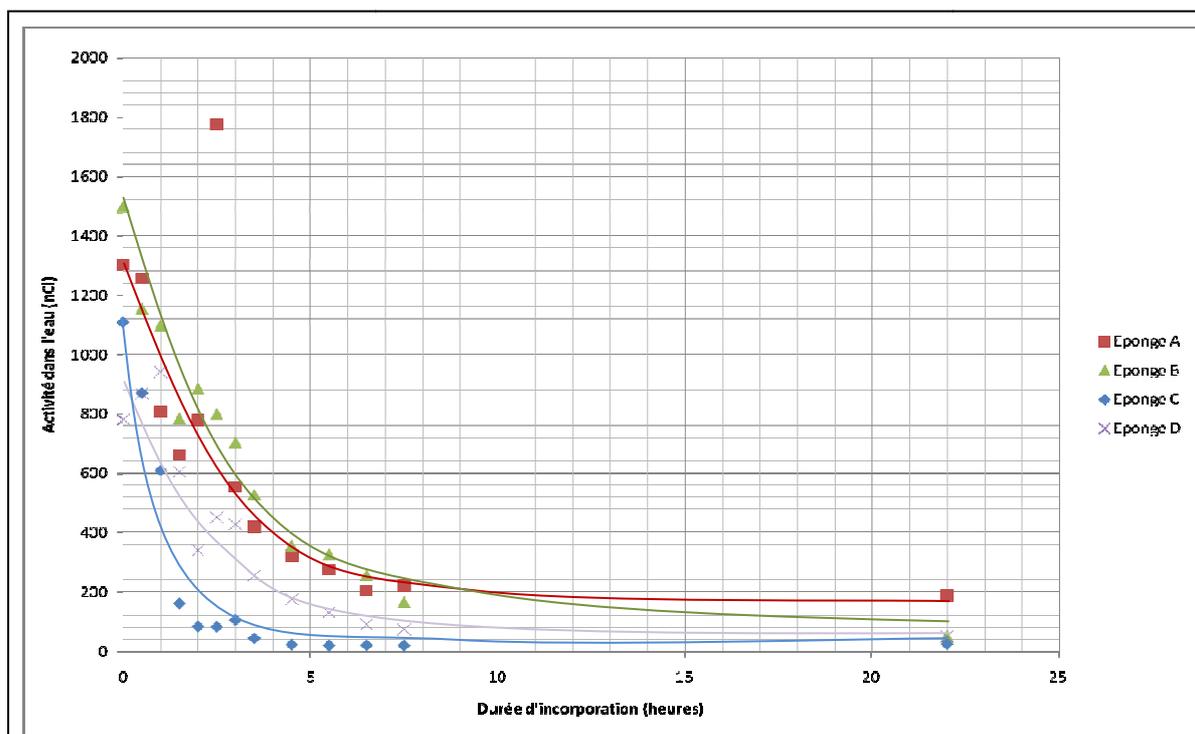


Figure n°163 - Cinétique de disparition de l'arginine et de la proline dans l'eau

Tableau 26 - Taux d'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-arginine et de la [U-¹⁴C]-L-proline dans *Agelas oroides*

| Nom | Masse (humide) | Acide aminé | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|---------------------------------|------------------|-------------------|
| A3 | 22 g | [U- ¹⁴ C]-L-arginine | 1,2 µCi | 86 % |
| B3 | 27 g | | 1,4 µCi | 97 % |
| C3 | 22 g | [U- ¹⁴ C]-L-proline | 1,2 µCi | 98 % |
| D3 | 34 g | | 1,8 µCi | 94 % |

Cette expérience n'a pas montré de différence significative dans la cinétique d'incorporation de l'arginine et celle de la proline. Pour les deux acides aminés la cinétique est de type logarithmique. A partir de 8 heures en circuit fermé, les acides aminés ont quasiment disparu des 300 mL d'eau : seulement 2 à 17 % sont encore présents dans l'eau. La durée minimale de l'étape d'incorporation est donc de **8 heures**.

L'éponge A3, qui montrait déjà des signes de détérioration durant l'étape d'incorporation, s'est nécrosée durant la phase de métabolisation ; cela pourrait expliquer la valeur d'incorporation finale obtenue, plus faible que pour les 3 autres éponges.

Après 13 jours de métabolisation, les quatre éponges ont été extraites par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. Les sels insolubles dans ce mélange ont ensuite été éliminés pour ne garder que la phase organique des extraits. Chaque phase organique a été analysée par HPLC sur une colonne Waters, Atlantis C₁₈ (250 x 10 mm, 5 µm). Les phases organiques des éponges B3, C3 et D3 ont un profil identique, correspondant au profil chimique standard d'*Agelas oroides*, alors que le profil obtenu pour la phase organique de l'éponge A3, nécrosée, a été très différent et n'a présenté pratiquement pas d'oroïdine (**60**). Durant sa nécrose, l'éponge a certainement libéré la grande majorité de son oroïdine (**60**) dans le milieu.

La radioactivité des phases organiques et des sels a été mesurée par un compteur β à scintillation liquide dans les mêmes conditions que précédemment (**Tableau 27**).

Tableau 27 - Radioactivité des sels et des phases organiques des quatre spécimens d'*A. oroides*

| Extrait | Eponge | Masse (mg) | Activité (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) | Remarques |
|-------------------|--------|------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Sels | A3 | 204,3 | 1,15 | 0,10 % | ¹⁴ C-Arg (Eponge nécrosée) |
| | B3 | 766,3 | 17,63 | 1,21 % | ¹⁴ C-Arg |
| | C3 | 601,5 | 11,55 | 1,06 % | ¹⁴ C-Pro |
| | D3 | 971 | 25,42 | 1,50 % | ¹⁴ C-Pro |
| Phases organiques | A3 | 196,6 | 7,30 | 0,65 % | ¹⁴ C-Arg (Eponge nécrosée) |
| | B3 | 500 | 16,69 | 1,15 % | ¹⁴ C-Arg |
| | C3 | 575,3 | 9,91 | 0,91 % | ¹⁴ C-Pro |
| | D3 | 674,3 | 29,56 | 1,75 % | ¹⁴ C-Pro |

Sans prendre en compte l'éponge A3, nécrosée, le taux d'incorporation de la radioactivité dans les phases organiques, compris entre 0,9 et 1,7 %, est très encourageant. La différence entre les valeurs

obtenues et celles de la deuxième expérience (0,3 à 0,9%), un peu moins importante, est certainement due à l'élimination des sels insolubles de l'extrait brut. En effet, ces sels étant insolubles dans le mélange MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, la concentration réelle des extraits bruts comptés a été inférieure à celle calculée lors des comptages précédents. Ainsi, le taux d'incorporation de la radioactivité de la deuxième expérience est certainement aussi élevé que celui obtenu avec les phases organiques B3 à D3.

Le **Tableau 27** met également en évidence des **taux d'incorporation de la radioactivité dans les phases organiques similaires quel que soit le précurseur ajouté (arginine ou proline)**.

184

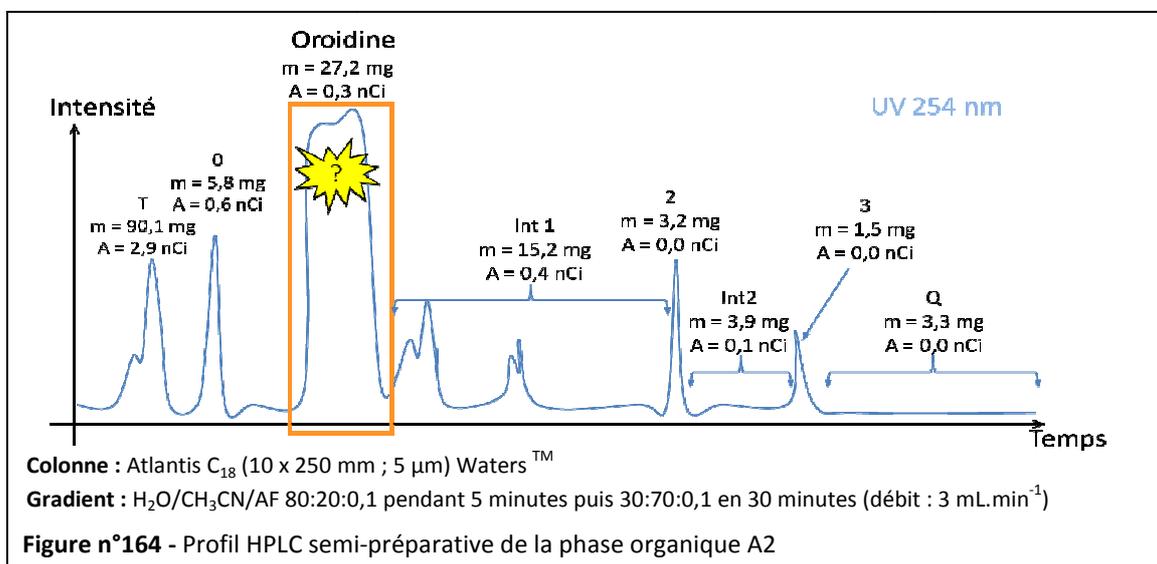
Ayant vérifié la radioactivité des extraits des deux dernières expériences (A2 à D2 et A3 à D3), ils ont été utilisés afin d'établir un protocole de purification et ainsi déterminer les métabolites responsables de la radioactivité associée aux extraits.

III.3. Protocole de purification des extraits radiomarqués d'*Agelas oroides*

Afin de déterminer l'origine de la radioactivité associée aux divers extraits obtenus ci-dessus, nous avons, dans un premier temps, choisi la méthode usuellement appliquée dans les études de biosynthèse chez les spongiaires. Les métabolites radiomarqués par ces expériences de biosynthèse sont purifiés par HPLC, puis leur activité est mesurée par un compteur β à scintillation liquide.

III.3.1. Purification par HPLC d'une phase organique radioactive d'*Agelas oroides*

Après élimination des sels insolubles dans le mélange MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 de l'extrait A2 (éponge incubée avec la [U-¹⁴C]-L-proline), les composés de la phase organique obtenue (160 mg) ont été purifiés sur une colonne HPLC semi-préparative de silice greffée C₁₈ (**Figure n°164**).



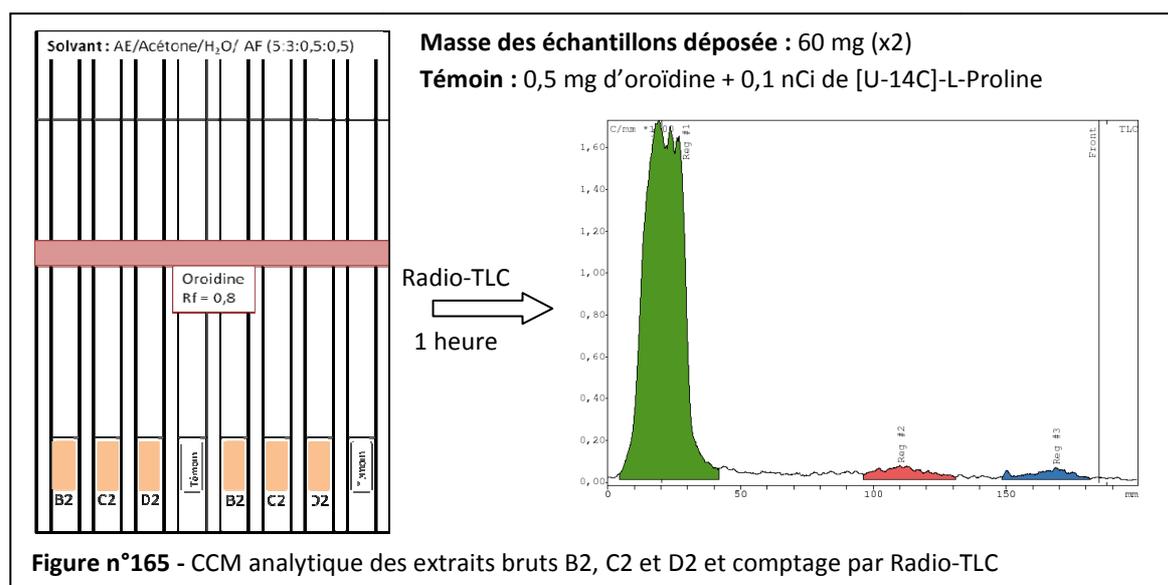
La radioactivité associée à chaque pic et intermédiaire recueilli a été mesurée par le compteur β à scintillation liquide. Les temps de rétention, comparés aux standards, nous ont permis d'identifier l'oroïdine (**60**) dans le pic 1 et l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**) dans le pic 2.

Les résultats du comptage ont mis en évidence de la radioactivité associée à l'oroïdine (0,3 nCi). En revanche, aucune radioactivité n'a été détectée dans l'acide dibromopyrrole carboxylique (**121**). Cependant, cette purification n'a pas permis d'assurer l'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-proline dans l'oroïdine (**60**). En effet, étant donné la radioactivité de la tête de la purification (T, m = 90,1 mg, A = 2,9 nCi) et les radioactivités associées aux autres fractions collectées, il est probable que la radioactivité associée à l'oroïdine (**60**) ne soit dû qu'à la décroissance de la radioactivité au cours du gradient. Ce phénomène de traînée de la radioactivité a été constaté dans de nombreuses expériences de biosynthèse. Afin de confirmer le marquage d'un métabolite, celui-ci doit être purifié plusieurs fois sur des colonnes HPLC de différents greffages pour éliminer toutes contaminations parasites.

Les échantillons analysés par le compteur β sont généralement très coloré, ce qui entraîne des problèmes de « quenching » et diminue ainsi la radioactivité détectée par l'appareil (cf. **Partie expérimentale** p.301). Ainsi, les échantillons colorés ayant une radioactivité associée faible pourraient être considérés comme non radioactifs. Pour pallier ce problème, nous avons préféré utiliser le comptage par Radio-TLC et donc effectuer des analyses de nos résultats par CCM.

III.3.2. CCM analytique

Les phases organiques des éponges B2, C2 et D2 ont été déposées sur les zones de pré-migration d'une plaque CCM analytique de silice sur verre. Un dépôt d'oroïdine froide mélangée avec 0,1 nCi de [U-¹⁴C]-L-proline nous a permis de nous assurer des rapports frontaux R_f de ces deux molécules (**Figure n°165**). Le système de solvants d'élution choisi a été de type CTZZ (Acétate d'éthyle/Acétone/Eau/Acide formique 5:3:0,5:0,5). La masse déposée de chaque extrait, très élevée pour une CCM analytique (m = 60 mg), avait pour but de déposer suffisamment de chaque métabolite pour qu'il soit détecté par le Radio-TLC en cas d'incorporation du précurseur marqué, de façon à éliminer de faux résultats négatif



Quelle que soit la bande considérée, le comptage par Radio-TLC a mis en évidence un large pic radioactif proche du dépôt correspondant au R_f de la proline (R_f = 0,12) et deux autres pics d'intensité plus faible aux R_f d'environ 0,50 et 0,90 (**Figure n°165**). Ces deux pics radioactifs montrent que des métabolites secondaires ont effectivement incorporés la [U-¹⁴C]-L-proline. Cependant, la masse d'extrait déposée est nettement supérieure à celle supportée par la CCM, saturant cette dernière. Les pics radioactifs relevés peuvent être uniquement dus à la proline marquée entraînée par effet de matrice. Ainsi, 2 mg des trois extraits B2, C2 et D2, ont été déposés sur une CCM analytique. Cette quantité déposée a permis de ne pas saturer la CCM, mais malheureusement, après comptage par Radio-TLC, seul le pic radioactif correspondant au R_f de la proline a été détecté.

A la suite de ces deux essais, deux explications sont possibles :

- La proline radioactive a été entraînée par effet de matrice lors de la saturation de la première CCM, ce qui explique l'absence des deux pics radioactifs supplémentaire lors des comptages de la seconde CCM ;
- Ces deux pics radioactifs correspondent effectivement à des métabolites secondaires marqués mais leur quantité et/ou leur taux d'incorporation sont trop faibles pour être détectés dans 2 mg d'extrait brut.

Afin d'éliminer la contrainte liée à la quantité déposée sur CCM analytique (0,25 mm d'épaisseur), nous avons décidé de renouveler l'analyse en utilisant une CCM préparative (2,0 mm d'épaisseur).

III.3.3. CCM préparative

10 mg de chaque phase organique des éponges B3, C3 et D3 ont été déposés sur une bande de 1 cm de large d'une plaque CCM préparative de silice (2 mm d'épaisseur) sur verre. Un dépôt d'oroïdine froide, de [U-¹⁴C]-L-arginine et de [U-¹⁴C]-L-proline nous a permis de mesurer les rapports frontaux de ces trois molécules.

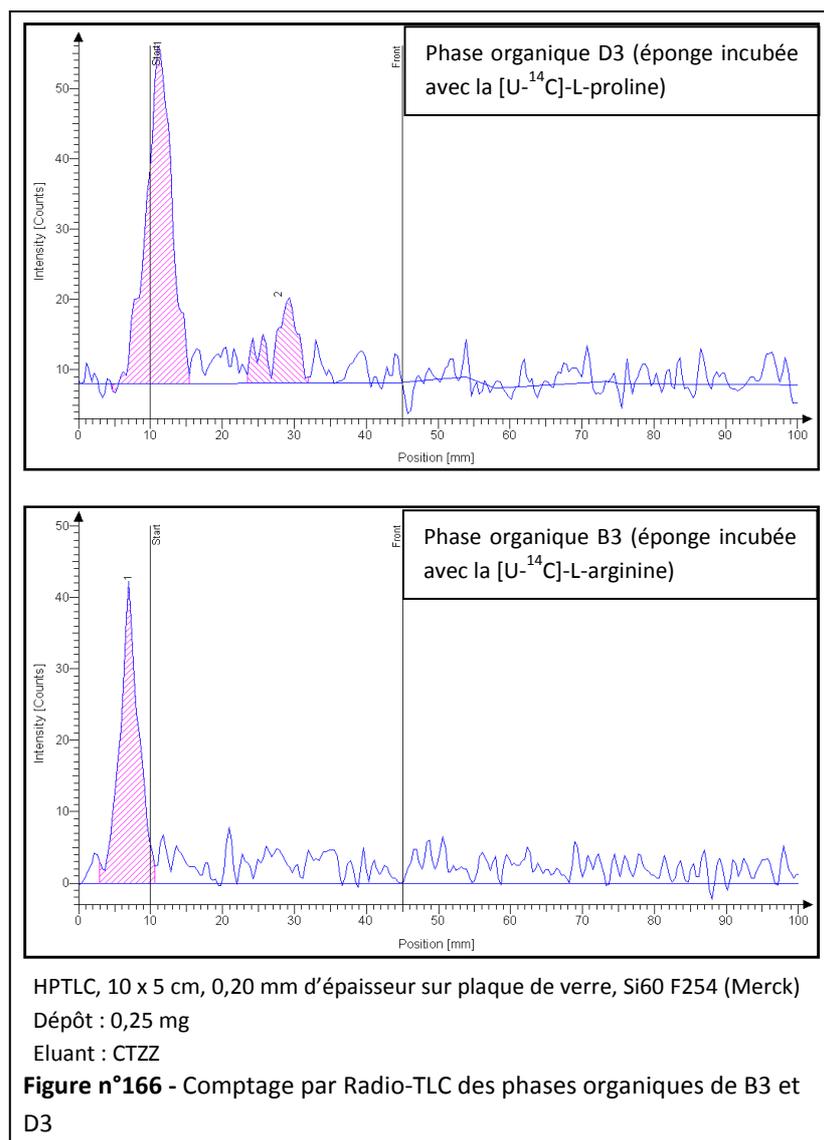
Après migration par l'éluant CTZZ, la radioactivité de chaque échantillon déposé a été mesurée par Radio-TLC. D'après ce premier comptage, en plus du pic radioactif de même R_f que la proline ($R_f = 0,10$), le pic radioactif au R_f d'environ 0,50 a été détecté dans les phases organiques des éponges C3 et D3, incubées avec la $[U-^{14}C]$ -L-proline. En revanche, la phase organique de B3, incubée avec l' $[U-^{14}C]$ -L-arginine, n'a pas montré d'autres pics radioactifs que celui correspondant au R_f de l'arginine ($R_f = 0,07$). En considérant que l'activité retrouvée au R_f des deux acides aminés correspond aux deux précurseurs ajoutés qui n'auraient pas été transformés par l'éponge, ce premier comptage tendrait à éliminer l'arginine des précurseurs potentiels des P2AI présents dans *Agelas oroides*. A l'inverse, le fait de retrouver le pic radioactif au R_f d'environ 0,50 déjà constaté lors des essais sur CCM analytique (**Figure n°165**), indiquerait la métabolisation de la proline dans la biosynthèse de certains métabolites secondaires de l'éponge.

Afin de confirmer ces résultats, la même CCM a une nouvelle fois été comptée par Radio-TLC. Malheureusement, ce nouveau comptage n'a pas reproduit les résultats du premier et seuls les pics radioactifs correspondant aux R_f des deux acides aminés ont été détectés. Une nouvelle CCM préparative a été réalisée avec les mêmes échantillons et le résultat de son comptage a semblé confirmer la deuxième lecture indiquant uniquement de la radioactivité au niveau des R_f des deux acides aminés.

Ces résultats non reproductibles sembleraient être liés à l'épaisseur de la couche de silice sur la plaque de verre. **Il est possible que la radioactivité des métabolites marqués soit fortement atténuée par la couche de silice. Au lieu de travailler sur des CCM préparatives afin de déposer une grande quantité de chaque extrait, nous avons décidé de travailler sur des HPTLC au vu de la très bonne sensibilité du détecteur Radio-TLC.**

III.3.3. HPTLC

Deux dépôts de 0,25 mg de la phase organique B3 (éponge incubée avec la $[U-^{14}C]$ -L-arginine) et deux de la phase organique D3 (éponge incubée avec la $[U-^{14}C]$ -L-proline) ont été déposés sur une plaque HPTLC de silice sur verre. Après migration, la radioactivité de la plaque HPTLC a été évaluée par Radio-TLC. L'analyse de la phase organique de D3 a mis en évidence, en plus du pic radioactif correspondant au R_f de la proline, un second pic radioactif à un R_f d'environ 0,50 (**Figure n°166**). Ce second pic a été détecté sur les deux dépôts de la phase organique de D3. Un nouveau comptage de la même plaque HPTLC, aboutissant à des résultats identiques, a confirmé la répétabilité du comptage. Ainsi, ces analyses ont semblé indiquer **l'utilisation de la proline dans le métabolisme secondaire d'*Agelas oroides***. En utilisant des témoins, préalablement isolés d'*A. oroides* par le Dr. Pierre Sauleau et déposés dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons voulu identifier le composé radioactif au R_f de 0,50. Malheureusement, des dégradations de ces composés ont été observées par CCM. La dégradation des standards, confirmée par une analyse LC/MS, ne nous a pas permis d'identifier avec certitude le composé marqué par la proline.



En revanche, les comptages de la phase organique de B3 n'ont mis en évidence qu'un seul pic radioactif correspondant au R_f de l'arginine (**Figure n°166**). Comme dans le cas de la phase organique de D3, pour confirmer ces résultats, identiques pour les deux dépôts, la radioactivité de ces deux bandes a de nouveau été mesurée par Radio-TLC. Ce second comptage, confirmant les premiers résultats, a semblé indiquer **la non-utilisation de l'arginine dans le métabolisme secondaire de l'éponge**. En effet, le système d'éluant CTZZ choisi a été optimisé pour la migration des alcaloïdes de type P2AI. Ainsi, le pic radioactif au niveau du dépôt ne correspond probablement pas à un P2AI produit par l'éponge. La non-incorporation de l'arginine dans les P2AI d'*A. oroides* serait conforme aux résultats obtenus par Andrade *et al.* lors de leurs essais de biosynthèse sur une culture cellulaire d'*Axinella corrugata*.²⁰³

Grâce à la répétabilité des derniers résultats obtenus, la migration des extraits d'*A. oroides* sur HPTLC de silice et l'évaluation de leur radioactivité par Radio-TLC sont apparues comme la façon la plus adaptée à détecter un incorporation des acides aminés dans les P2AI de l'éponge.

Ayant mis au point une méthode d'analyse reproductible, nous avons décidé d'étudier l'influence de la durée de métabolisation sur le marquage des métabolites secondaires d'*A. oroides*.

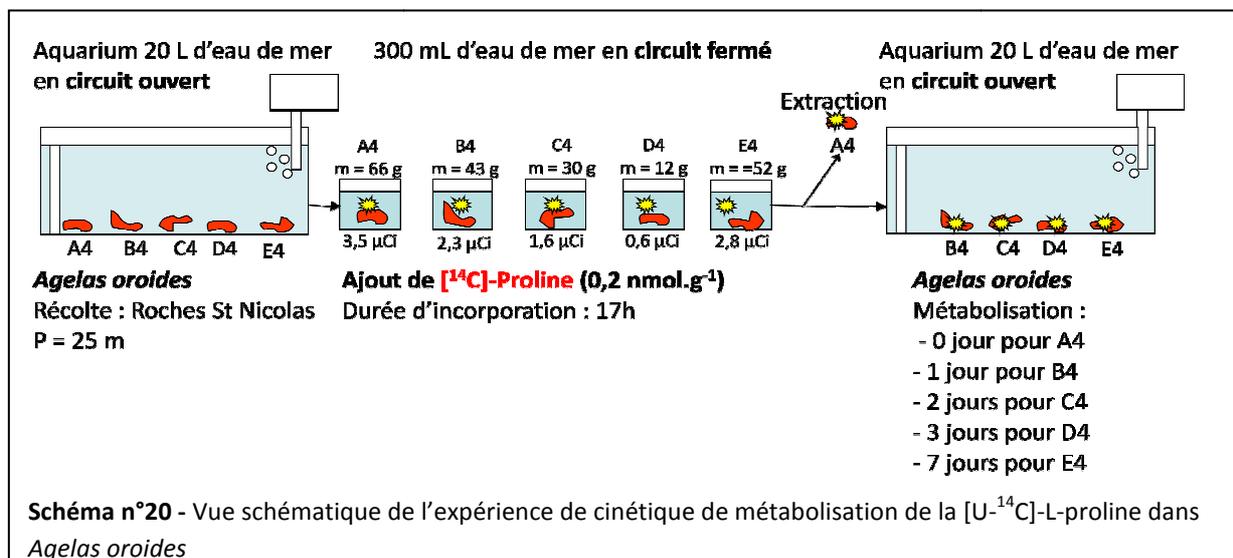
III.4. Cinétique de métabolisation de la proline par *A. oroides*

Jusqu'à ce jour, la connaissance du métabolisme secondaire des éponges reste encore très vague. Par exemple, aucune étude n'a permis de définir un turnover des métabolites secondaires chez les éponges pour la simple raison que celui-ci dépend du métabolite considéré et de l'éponge choisie. Directement liés au turnover des métabolites, les essais de biosynthèse entrepris par Garson ont mis en évidence l'influence du temps de métabolisation sur le taux d'incorporation du précurseur dans le métabolite visé.¹⁵¹

Ainsi, afin d'optimiser la durée de métabolisation nécessaire pour une meilleure incorporation des acides aminés dans les alcaloïdes d'*A. oroides*, nous avons travaillé avec la [U-¹⁴C]-L-proline en tant que précurseur. En effet, par la présence d'un pic radioactif à un R_f d'environ 0,50 détecté dans les phases organiques des éponges incubées avec la [U-¹⁴C]-L-proline, celle-ci semble être effectivement utilisée par le métabolisme secondaire de l'éponge. Il nous est donc paru judicieux de choisir cet acide aminé comme référence.

- **Expérience 4 :**

Pour cela, après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, cinq spécimens d'*A. oroides*, nommés A4 à E4, ont été placés dans des béchers de 300 mL d'eau de mer en présence de [U-¹⁴C]-L-proline. Après 17 heures d'incorporation, l'éponge A4 a été directement extraite, tandis que les quatre autres ont été replacées en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L d'eau de mer (**Schéma n°20**).



Quelle que soit l'éponge considérée, au bout de 17 heures en circuit fermé, la quasi-totalité de la [U-¹⁴C]-L-proline ajoutée a été incorporée dans l'éponge (**Tableau 28**).

Tableau 28 - Taux d'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-proline dans *Agelas oroides*

| Nom | Masse (humide) | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|------------------|-------------------|
| A4 | 66 g | 3,5 µCi | 92 % |
| B4 | 43 g | 2,3 µCi | 94 % |
| C4 | 30 g | 1,6 µCi | 79 % |
| D4 | 12 g | 0,6 µCi | 83 % |
| E4 | 52 g | 2,8 µCi | 99 % |

Les éponges B4, C4, D4 et E4 ont été extraites par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, après respectivement 1, 2, 3 et 7 jours de métabolisation. Après séparation des sels insolubles dans le mélange MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, la radioactivité des cinq phases organiques a été évaluée par un compteur β à scintillation liquide (**Tableau 29**).

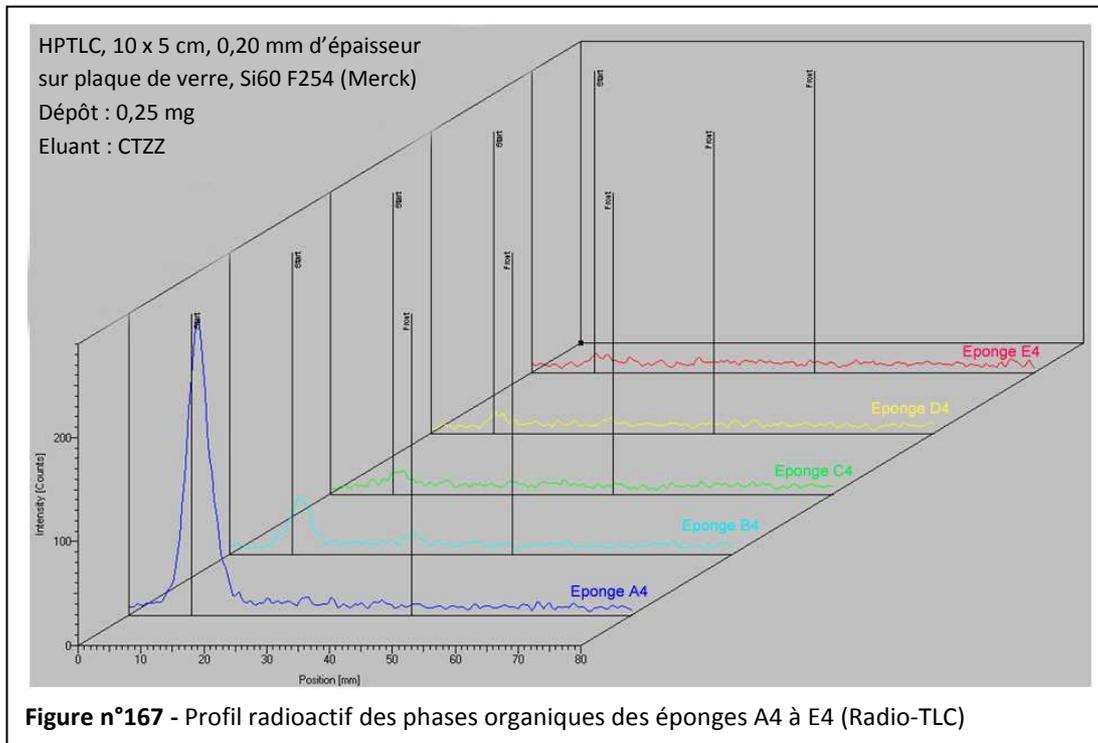
Tableau 29 - Radioactivité des sels et des phases organiques des cinq *A. oroides*

| Extrait | Eponge | Masse (mg) | Activité (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) | Temps de métabolisation |
|-------------------|--------|------------|----------------|---------------------------------------|-------------------------|
| Sels | A4 | 1040 | 26,53 | 0,84 % | 0 jour |
| | B4 | 872,7 | 14,16 | 0,79 % | 1 jour |
| | C4 | 574,4 | 9,65 | 0,76 % | 2 jours |
| | D4 | 189,2 | 18,08 | 0,88 % | 3 jours |
| | E4 | 1010 | 2,66 | 0,53 % | 7 jours |
| Phases organiques | A4 | 1620,0 | 212,38 | 6,68 % | 0 jour |
| | B4 | 869,3 | 9,37 | 0,52 % | 1 jour |
| | C4 | 774,1 | 6,66 | 0,52 % | 2 jours |
| | D4 | 466,7 | 9,84 | 0,48 % | 3 jours |
| | E4 | 1530,0 | 2,87 | 0,57 % | 7 jours |

La forte radioactivité de la phase organique A4 est certainement due à la présence d'une concentration élevée en [U-¹⁴C]-L-proline incorporée par l'éponge mais non métabolisée. La diminution brutale de cette radioactivité au bout d'un jour de métabolisation peut s'expliquer soit par l'utilisation de la majorité de la [U-¹⁴C]-L-proline dans le métabolisme primaire de l'éponge, soit par son élimination dans l'eau lorsque l'éponge est placée en circuit ouvert.

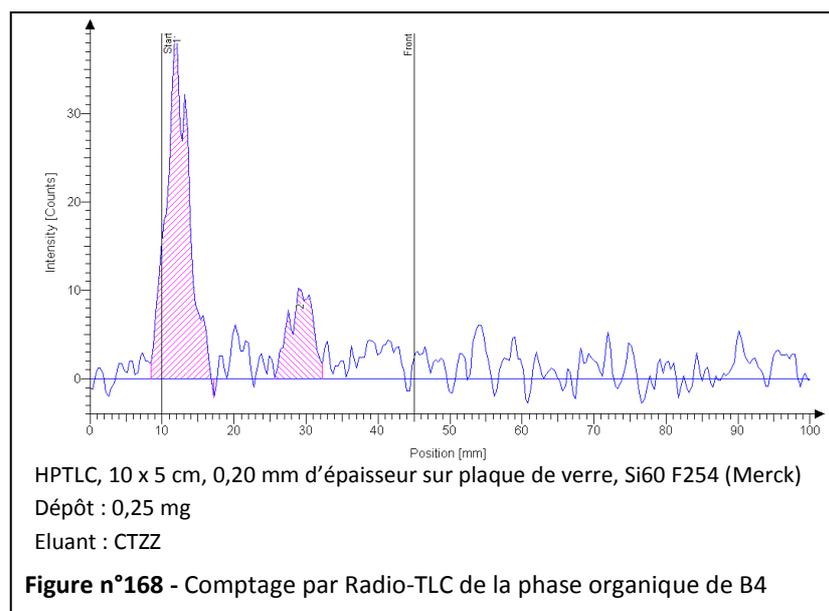
Sans prendre en compte l'éponge A4, directement extraite après l'étape d'incorporation, le taux d'incorporation de la radioactivité dans les phases organiques des éponges, aux alentours de 0,50 %, semble être constant quelle que soit la durée de métabolisation considérée. Cependant, il est possible que cette radioactivité ne soit pas associée aux mêmes molécules au cours du temps. Ainsi, grâce à une analyse par Radio-TLC, nous avons étudié le rapport entre le pic radiomarqué au R_f de 0,50 et celui correspondant probablement à la [U-¹⁴C]-L-proline. Pour se faire, 0,25 mg de chaque

phase organique a été déposée sur une plaque HPTLC de silice. Après migration, la radioactivité de chaque phase a été mesurée par Radio-TLC (**Figure n°167**).



Le résultat obtenu lors du comptage de la phase organique de l'éponge A4, est conforme à ce que nous attendions. En effet, la seule source de radioactivité de cette phase organique a migré au même R_f que celui de la proline. Il y a donc de forte chance que la majeure partie de la radioactivité de cette éponge ne soit due qu'au précurseur non métabolisé par l'éponge.

En revanche, après un jour de métabolisation, le second pic radioactif de $R_f = 0,50$ apparaît (**Figure n°168**).



Ainsi, pour chaque phase organique, nous avons déterminé le taux d'incorporation de la radioactivité des deux pics, par rapport à celle ajoutée par le précurseur. Le premier pic radioactif correspond probablement à la proline ($R_f = 0,10$) et le second ($R_f = 0,50$) à un métabolite marqué (**Tableau 30**).

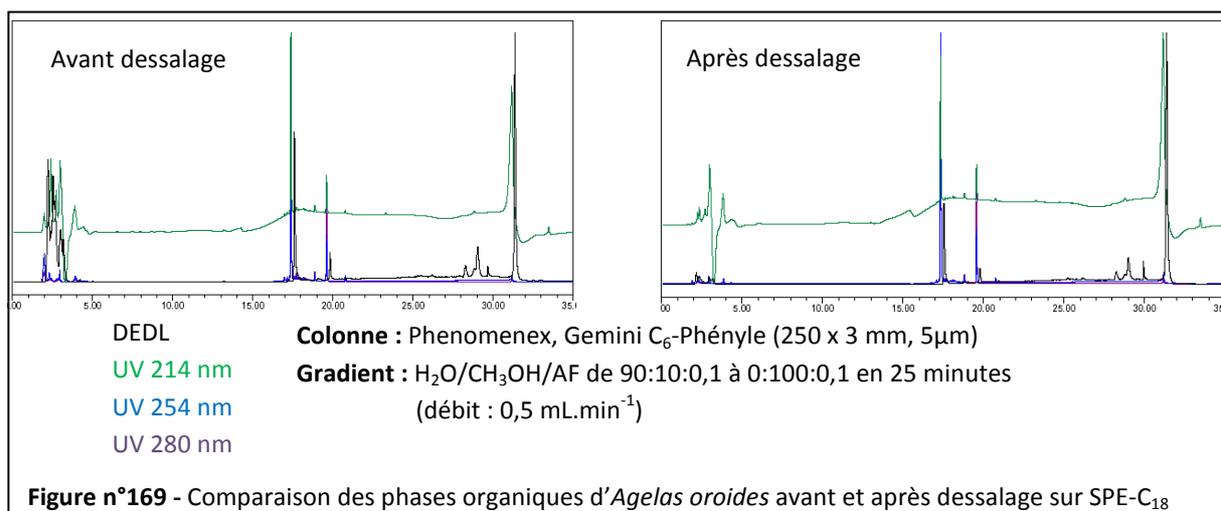
Tableau 30 - Evaluation de la radioactivité associée aux deux pics détectés par Radio-TLC

| Phase organique | Masse (mg) | Radioactivité du pic au R_f de 0,1 (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) | Radioactivité du pic au R_f de 0,50 (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) |
|-----------------|------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| B4 | 869,3 | 5,23 | 0,30 % | 1,59 | 0,09 % |
| C4 | 774,1 | 2,92 | 0,19 % | 1,22 | 0,08 % |
| D4 | 466,7 | 0,81 | 0,14 % | 0,43 | 0,07 % |
| E4 | 1530 | 2,52 | 0,15 % | 0,67 | 0,04 % |

Remarque : La radioactivité associée à chaque pic a été obtenue par la moyenne des valeurs de trois HPTLC réalisées dans des conditions identiques.

Comme le met en évidence le **Tableau 30**, cette étude ne montre **pas d'augmentation ou de diminution significative de la radioactivité associée au métabolite ayant un R_f de 0,50 au cours du temps**. Cependant, la radioactivité associée à ce composé est légèrement plus importante après un jour de métabolisation.

Afin d'augmenter la concentration de ce métabolite marqué dans l'extrait de l'éponge, les phases organiques de B4 à E4 ont été dessalées sur une SPE de silice greffée C_{18} en suivant le protocole de dessalage défini dans le projet ECIMAR (cf. **Partie B I.3.1.**, p.54). Comme le montre la **Figure n°169**, cette opération a permis d'éliminer uniquement les sels résiduels de la phase organique traitée.



Après dessalage, les échantillons ont été redéposés sur HPTLC pour évaluer la radioactivité du métabolite au R_f de 0,50. Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas été ceux escomptés. Le dessalage aurait éliminé une grande partie de la proline marquée mais également le métabolite secondaire ciblé car aucun pic radioactif de $R_f = 0,50$ n'a été détecté.

Ainsi, bien que cette expérience d'optimisation du temps de métabolisation ne nous ait pas permis d'identifier le(s) métabolite(s) responsable(s) de la radioactivité des phases organiques d'*A. oroides*, la reproductibilité des résultats permet de **confirmer la métabolisation de la proline dans la biosynthèse de métabolites secondaires de l'éponge. D'après les durées de métabolisation testées, il semblerait qu'un jour de métabolisation soit suffisant pour obtenir un taux d'incorporation satisfaisant.** Ce temps de métabolisation a donc été choisi dans l'expérience suivante dont le but est de vérifier l'utilisation des quatre acides aminés proposés (arginine, histidine, ornithine et proline) par le métabolisme secondaire d'*A. oroides*.

III.5. Biosynthèse des P2AI à partir des quatre acides aminés

Les quatre acides aminés décrits comme précurseurs potentiels des P2AI sont l'arginine ou l'histidine, pour la partie 2-aminoimidazole de l'oroïdine (**60**) et de ses dérivés, et la proline ou l'ornithine, pour la partie pyrrole (cf. **I.3.6.**, p.157). D'après les expériences précédentes, la proline semble être métabolisée en P2AI par *A. oroides* car la zone de migration correspond à celles des P2AI. En revanche, les expériences ci-dessus n'ont pas montré une incorporation évidente de l'arginine dans les P2AI d'*A. oroides*. Pour confirmer ces résultats, l'incorporation de ces deux acides aminés a de nouveau été testée. Nous avons également testé l'incorporation de la [U-¹⁴C]-L-histidine et de la [1-¹⁴C]-L-ornithine dans les métabolites secondaires de l'éponge.

- **Expérience 5 :**

Pour cela, après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, quatre spécimens d'*A. oroides*, nommés A5 à D5, ont été placés dans des béchers de 300 mL d'eau de mer contenant chacun un des quatre acides aminés radiomarqués.

Après 18 heures d'incorporation, de 57 à 95 % des précurseurs ajoutés ont été incorporés dans l'éponge (**Tableau 31**). Les quatre éponges ont ensuite été replacées en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L d'eau de mer pour un jour de métabolisation (**Schéma n°21**).

194

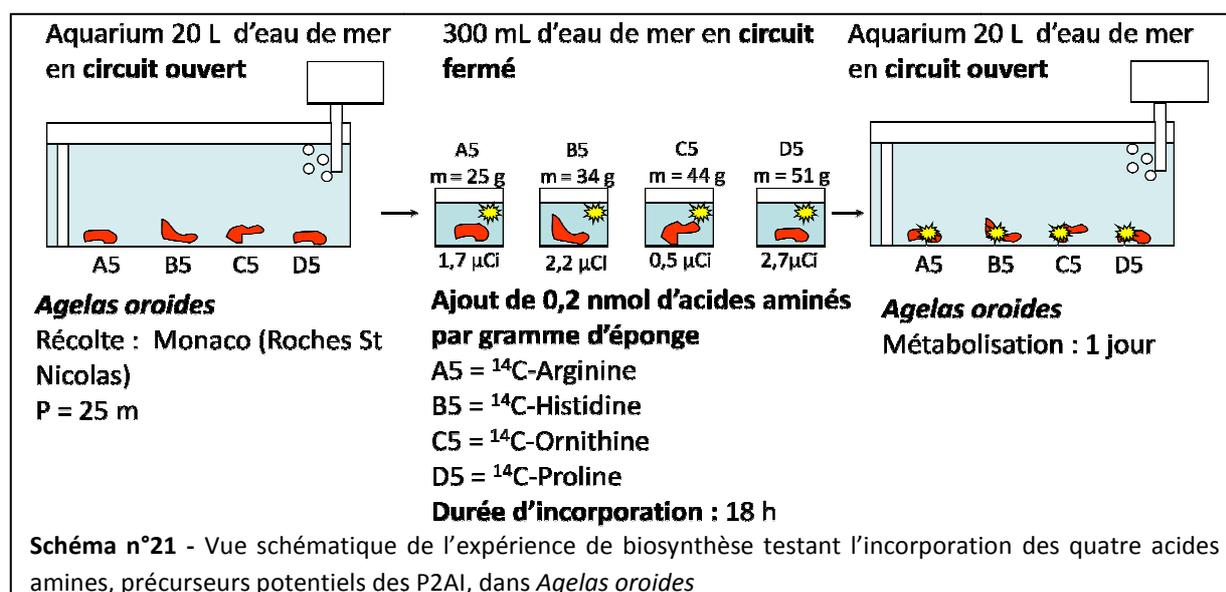
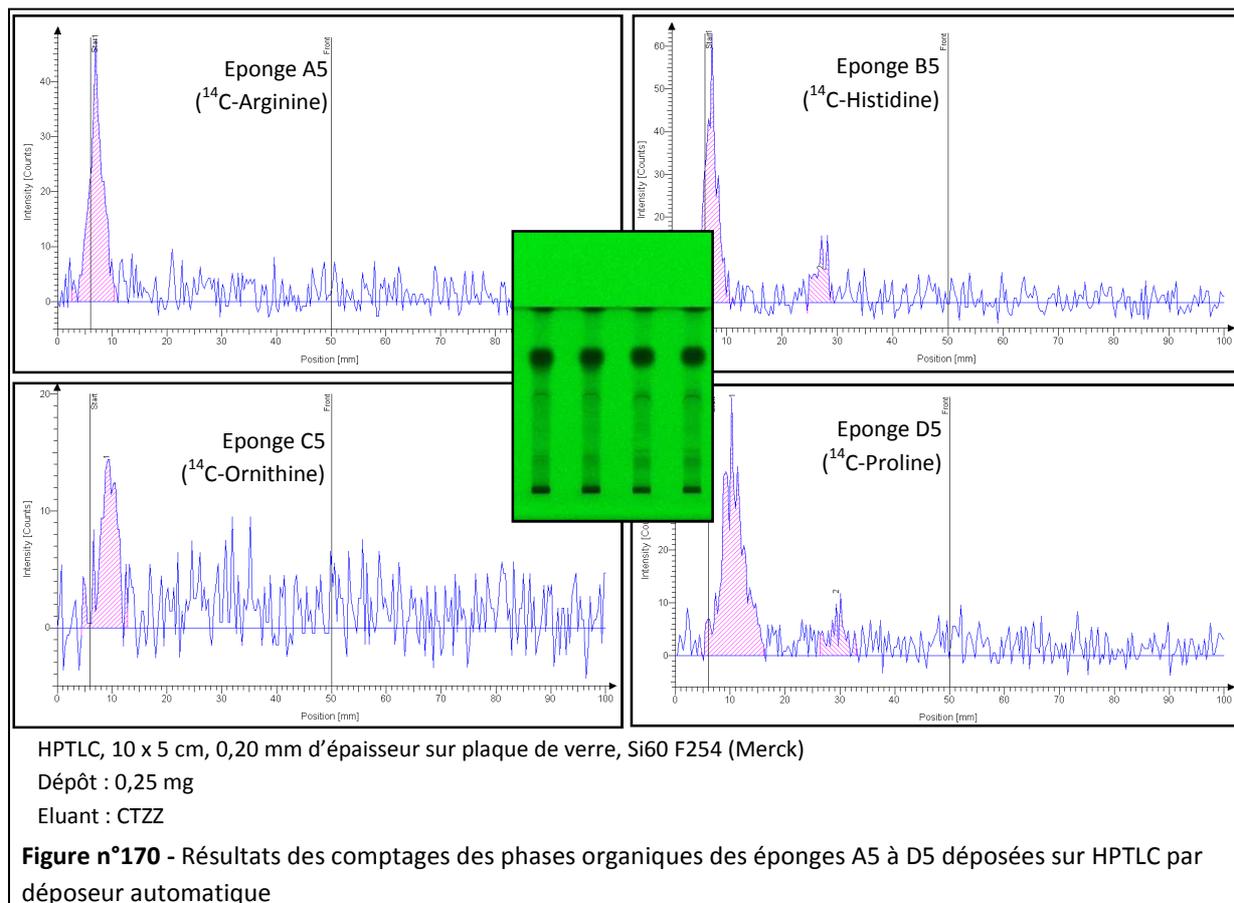


Tableau 31 - Taux d'incorporation de chaque acide aminé dans *A. oroides*

| Nom | Masse (humide) | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|------------------|-------------------|
| A5 | 25 g | 1,7 µCi | 95 % |
| B5 | 34 g | 2,2 µCi | 87 % |
| C5 | 44 g | 0,5 µCi | 57 % |
| D5 | 51 g | 2,7 µCi | 94 % |

Après extraction et élimination des sels, et pour plus de précision dans les mesures, 0,25 mg des phases organiques des quatre éponges ainsi que chaque précurseur, ont été déposés sur HPTLC de silice par un déposeur automatique. Après migration, la radioactivité associée à chaque dépôt a été évaluée par Radio-TLC (**Figure n°170**). Avec le système de solvant utilisé (CTZZ), les quatre acides aminés ne migrent pratiquement pas. Ainsi, le pic radioactif très proche du dépôt des phases organiques d'*A. oroides* est supposé être dû à la présence du précurseur non métabolisé par l'éponge.



Le résultat du comptage de la phase organique de l'éponge D5, incubée avec la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline, a une nouvelle fois mis en évidence un pic radioactif à un R_f d'environ 0,50. Comme précédemment, l'absence d'incorporation de la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-arginine dans les métabolites secondaires d'*A. oroides* a pu être constatée. **Cette nouvelle analyse a ainsi confirmé les résultats obtenus dans les expériences précédentes : la proline entrerait effectivement dans la biosynthèse des P2AI d'*A. oroides* alors que l'arginine n'en serait pas un précurseur.**

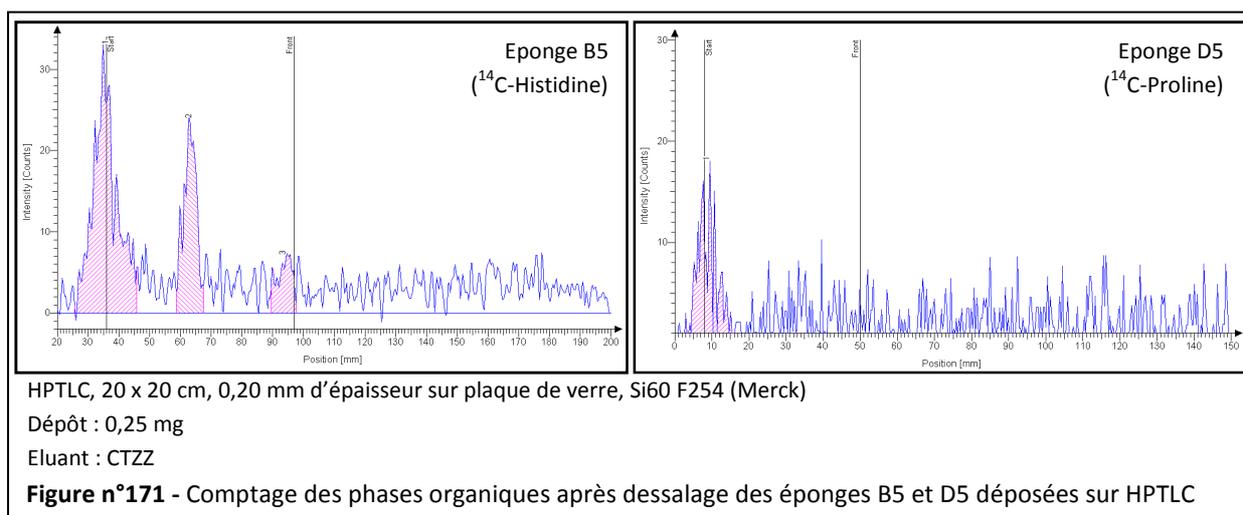
L'analyse de la phase organique de l'éponge B5, incubée avec la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-histidine, a également permis de détecter un second pic radioactif, en plus de celui correspondant au précurseur marqué. Ce pic possède un R_f d'environ 0,40, légèrement inférieur aux composés marqués par la $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline. Chaque phase organique a été déposée quatre fois sur la même HPTLC afin de s'assurer de l'exactitude des R_f observés. **Par ce résultat, nous avons conclu à l'utilisation effective de l'histidine par le métabolisme secondaire d'*A. oroides*.**

0,5 μCi de $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ -L-ornithine a été ajouté à l'éponge C5 durant la phase d'incorporation, dont la moitié a effectivement été incorporée dans l'éponge (Tableau 31). Cependant, aucun pic radioactif n'est détecté dans la zone de migration des P2AI. Ce résultat serait consistant avec le fait que l'ornithine n'ait pas été métabolisée en P2AI par l'éponge.

A la suite de ces résultats, nous avons répété l'étape de dessalage sur SPE mise au point dans l'expérience précédente (Figure n°169). En effet, malgré le résultat négatif de cet essai sur l'augmentation de la proportion du métabolite marqué par la proline, le dessalage a en revanche

permis d'éliminer une grande partie du précurseur marqué et de ne garder que les métabolites secondaires produits par l'éponge.

Après dessalage, les phases organiques des quatre éponges ont de nouveau été déposées sur une HPTLC de silice afin d'évaluer la radioactivité associée aux différents métabolites. Les phases organiques dessalées des éponges A5 et C5, respectivement incubées avec la [U-¹⁴C]-L-arginine et la [1-¹⁴C]-L-ornithine, n'ont pratiquement plus montré de radioactivité, la majeure partie des acides aminés marqués résiduels ayant été éliminée par le dessalage. Comme dans l'expérience précédente, le pic radioactif de R_f 0,50 n'a plus été détecté après le dessalage de la phase organique de l'éponge D5, incubée avec la [U-¹⁴C]-L-proline (**Figure n°171**). En revanche, le dessalage de la phase organique de l'éponge B5, incubée avec la [U-¹⁴C]-L-histidine, a permis d'augmenter de façon significative l'intensité du pic radioactif de R_f 0,40 (**Figure n°171**). Ce dessalage a également permis de détecter un troisième pic radioactif, très apolaire, migrant avec le front du solvant. Il est possible que le dessalage ait concentré ce métabolite marqué permettant ainsi de détecter sa radioactivité. Dans ce cas, la phase de dessalage a semblé être efficace pour concentrer les métabolites secondaires marqués par l'histidine.



Avant de déterminer l'origine de la radioactivité induite par l'incorporation de la proline et de l'histidine, nous avons renouvelé l'expérience d'incorporation et de métabolisation des quatre acides aminés dans *Agelas oroides* pour éliminer avec certitude l'arginine et l'ornithine des précurseurs potentiels des P2AI.

- **Expérience 6 :**

Dans l'expérience précédente, aucune incorporation de l'arginine et de l'ornithine n'a été mise en évidence. Le résultat obtenu par incorporation de l'arginine est conforme à l'étude d'Andrade *et al.*,²⁰³ mais ce n'est pas le cas des résultats obtenus avec l'ornithine. Cependant, l'activité ajoutée par l'ornithine était relativement faible (0,5 µCi) et les métabolites secondaires ayant utilisés l'ornithine étaient peut-être trop faiblement radioactifs pour pouvoir être détectés par les méthodes de

comptage utilisées. Une nouvelle expérience a ainsi été réalisée en incorporant les quatre acides aminés supposés entrer dans la biosynthèse des P2AI, avec une quantité de radioactivité constante (2 μCi par acide aminé).

L'expérience précédente a également mis en évidence l'utilisation de l'histidine et de la proline par *Agelas oroides* pour la biosynthèse des P2AI. L'histidine est supposée être le précurseur de la partie 2-aminoimidazolique de l'oroïdine (**60**) et de ses dérivés, alors que la proline est supposé être à l'origine de leur partie pyrrolique (**Schéma n°14**). Ainsi, l'incorporation de ces deux précurseurs marqués dans *A. oroides* pourrait permettre à l'éponge de biosynthétiser l'oroïdine (**60**) et ses dérivés marqués. Pour vérifier cette hypothèse, les deux acides aminés ont été incorporés dans une même éponge (**Schéma n°22**).

Après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, quatre spécimens d'*A. oroides*, nommés A6 à D6, ont été placés dans des béchers de 300 mL d'eau de mer contenant chacun 2 μCi d'un des quatre acides aminés radiomarqués. L'éponge E6 a, quant à elle, été placée dans un bécher de 300 mL d'eau de mer dans lesquels 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-L}$ -histidine et 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-L}$ -proline ont été ajoutés.

Après 18 heures d'incorporation, 65 à 97 % des précurseurs ajoutés ont été incorporés dans les éponges (**Tableau 32**). Il est à noter que l'incorporation de l'ornithine dans l'éponge C6 (96 %) a été nettement supérieure que dans l'éponge C5 de l'expérience précédente (57 %).

Les cinq éponges ont ensuite été replacées en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L d'eau de mer naturelle pour un jour de métabolisation (**Schéma n°22**).

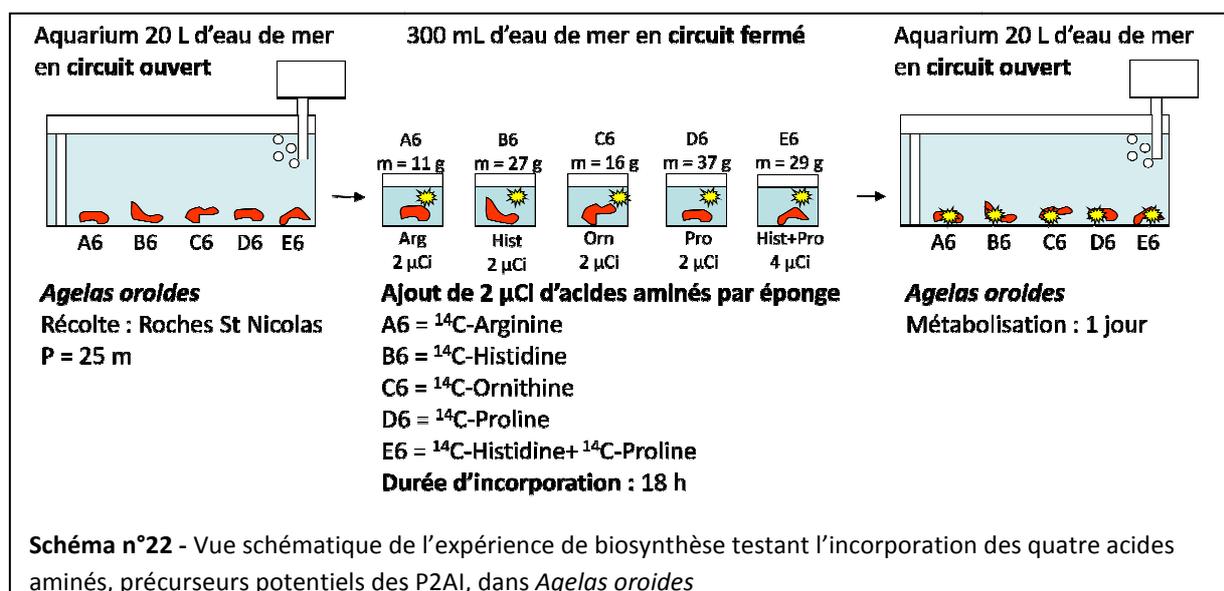


Tableau 32 - Taux d'incorporation de chaque acide aminé dans *A. oroides*

| Nom | Masse (humide) | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|------------------|-------------------|
| A6 | 11g | 2,0 µCi | 94 % |
| B6 | 27g | 2,0 µCi | 93 % |
| C6 | 16g | 2,0 µCi | 96 % |
| D6 | 37g | 2,0 µCi | 97 % |
| E6 | 29g | 4,0 µCi | 65 % |

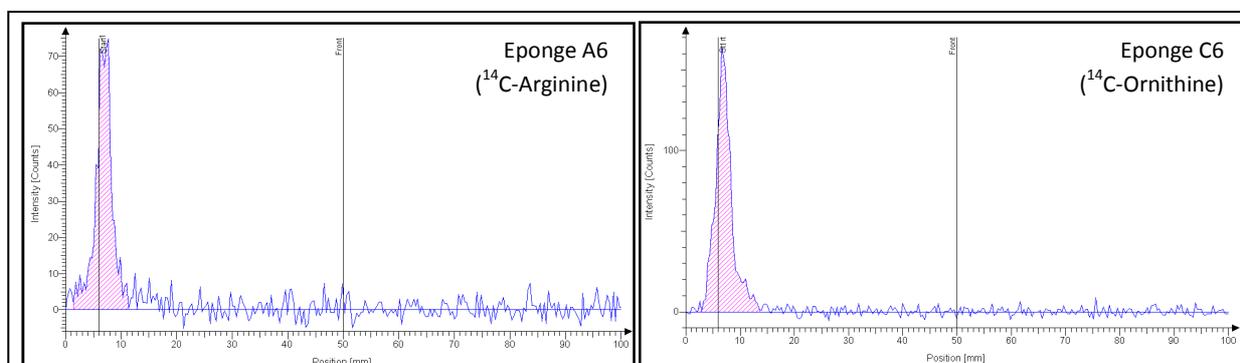
198

Après extraction des éponges et élimination des sels, la radioactivité de chaque phase organique a été mesurée (**Tableau 33**). Le taux d'incorporation de la radioactivité, compris entre 0,33 et 0,51 %, est conforme à celui obtenu dans les expériences précédentes. Afin de déterminer l'origine de cette radioactivité, 0,25 mg des phases organiques des cinq éponges ainsi que chaque précurseur, ont été déposés sur une plaque HPTLC de silice par un déposeur automatique. Après migration, la radioactivité associée à chaque dépôt a été évaluée par Radio-TLC.

Tableau 33 - Radioactivité associée à chaque phase organique des éponges A6 à E6

| Phase organique | Masse (mg) | Activité (nCi) | Incorporation de la radioactivité (%) | Précurseur |
|-----------------|------------|----------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A6 | 199,35 | 4,09 | 0,33 % | [U- ¹⁴ C]-L-arginine |
| B6 | 652 | 22,23 | 1,20 % | [U- ¹⁴ C]-L-histidine |
| C6 | 321,2 | 14,49 | 0,80 % | [1- ¹⁴ C]-L-ornithine |
| D6 | 849,5 | 18,59 | 1,28 % | [U- ¹⁴ C]-L-proline |
| E6 | 463,25 | 36,17 | 1,51 % | [[U- ¹⁴ C]-L-histidine + [U- ¹⁴ C]-L-proline |

Le résultat des comptages des phases organiques des éponges A6 et C6 a une nouvelle fois mis en évidence la non-incorporation de l'arginine et de l'ornithine dans les métabolites secondaires (**Figure n°172**). En effet, toute l'activité de ces phases organiques est concentrée dans ce qui correspond certainement au précurseur ajouté.



HPTLC, 20 x 20 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 F254 (Merck)

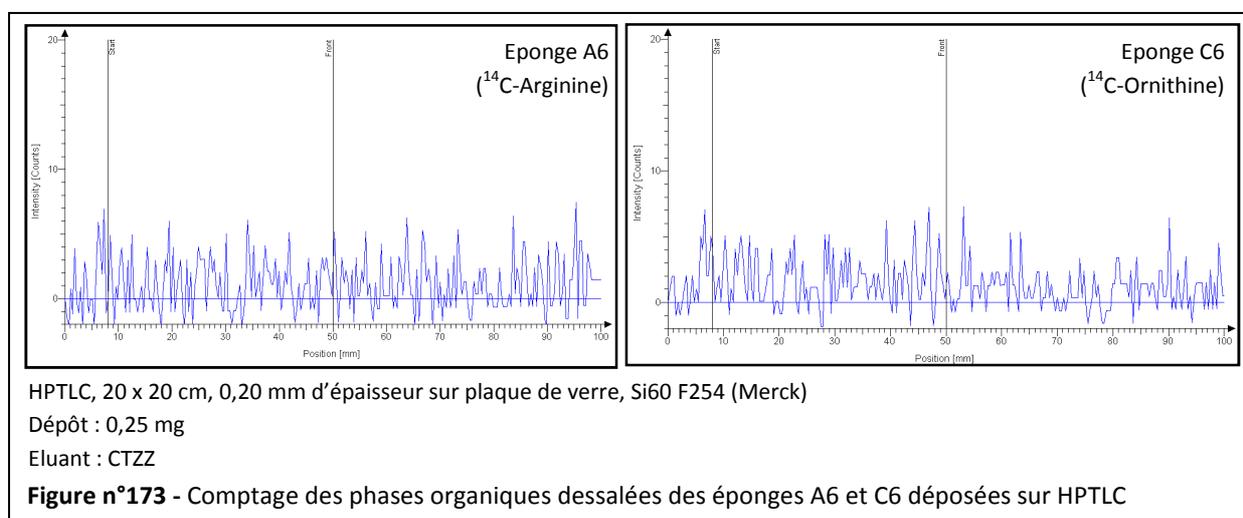
Dépôt : 0,25 mg

Eluant : CTZZ

Figure n°172 - Comptage des phases organiques des éponges A6 et C6 déposées sur HPTLC

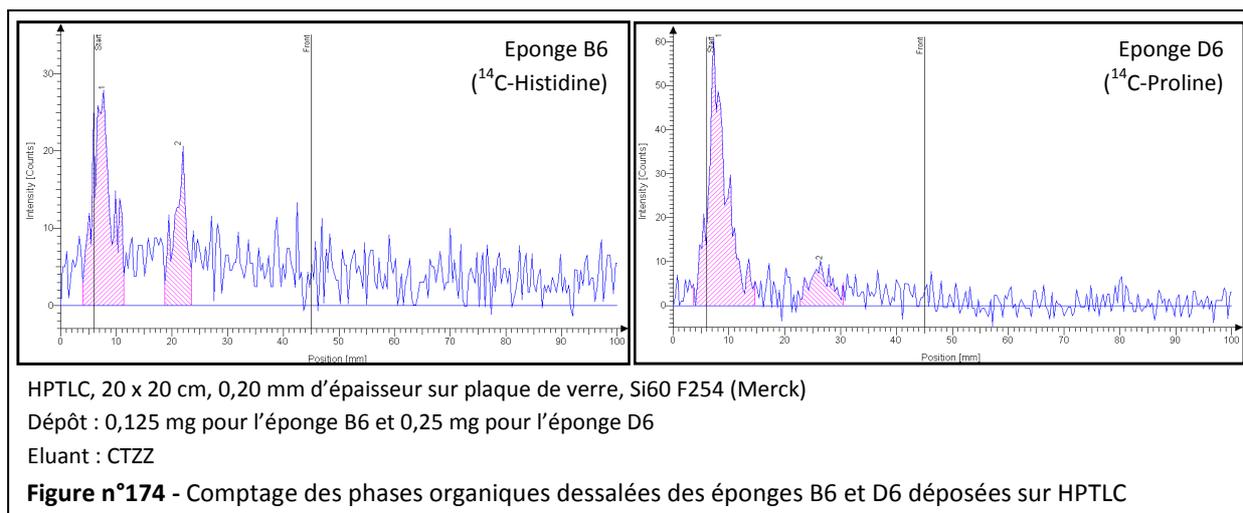
Afin de confirmer avec certitude ce résultat, les deux phases organiques ont été dessalées sur SPE de silice greffée C₁₈ et redéposées sur HPTLC pour un nouveau comptage. Comme le montre la **Figure n°173**, le résultat de ces comptages montre une **absence totale de radioactivité associée aux deux échantillons, les précurseurs résiduels ayant été éliminés par le dessalage.**

Ainsi, nous en avons déduit que le métabolisme secondaire d'*A. oroides* n'utilisait pas l'arginine et l'ornithine. L'éponge utilise peut-être la majeure partie de ces deux acides aminés dans son métabolisme primaire. De ce fait, les précurseurs radioactifs disponibles pour le métabolisme secondaire de l'éponge sont en trop faible quantité pour pouvoir détecter une quelconque métabolisation. Les faibles taux d'incorporation de la radioactivité dans les phases organiques des éponges A6 et C6, respectivement de 0,33 % et 0,80 %, sont en accord avec cette hypothèse. Si nous nous référons à la composition naturelle de l'eau de mer de la rade de Villefranche, la concentration moyenne de l'arginine est de 35 nmol.L⁻¹ et celle de l'orthidine est de 5 nmol.L⁻¹, alors que celle de l'histidine, effectivement utilisée par le métabolisme secondaire d'*A. oroides*, est de 76 nmol.L⁻¹.²¹⁷ Les concentrations moyennes de l'arginine et de l'ornithine sont donc du même ordre de grandeur que celle de l'histidine, voire inférieures. Ces deux acides aminés ne sont donc pas naturellement plus disponibles. La faible radioactivité associée aux phases organiques des éponges A6 et C6 retranscrit l'utilisation naturelle de l'arginine et l'ornithine dans le métabolisme secondaire de l'éponge. Ce résultat implique donc l'utilisation de précurseurs différents dans la biosynthèse des P2AI d'*A. oroides*.

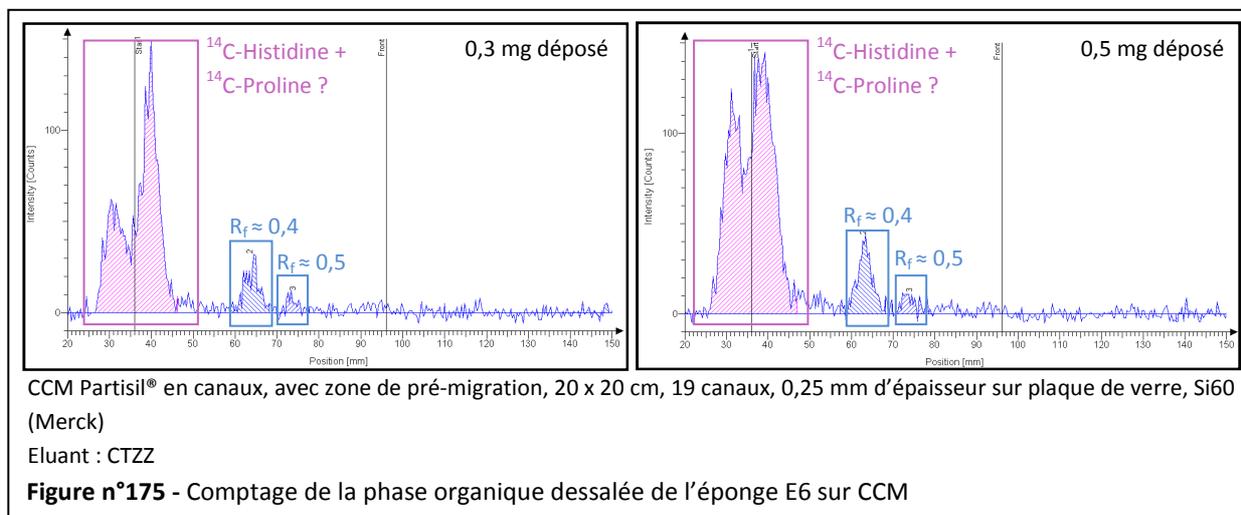


En revanche, le comptage des phases organiques des éponges B6 et D6 montre une métabolisation de ces deux acides aminés. En effet, les métabolites déjà détectés par Radio-TLC dans les expériences précédentes ($R_f = 0,40$ pour B6 et $0,50$ pour D6) ont de nouveau été marqués dans cette expérience (**Figure n°174**). Ces deux acides aminés sont donc bien des précurseurs de certains métabolites secondaires d'*A. oroides*.

²¹⁷ Pavillon, J.-F. ; Rault, P. *Aquat. Living Resour.*, **1990**, 3, 147-150.

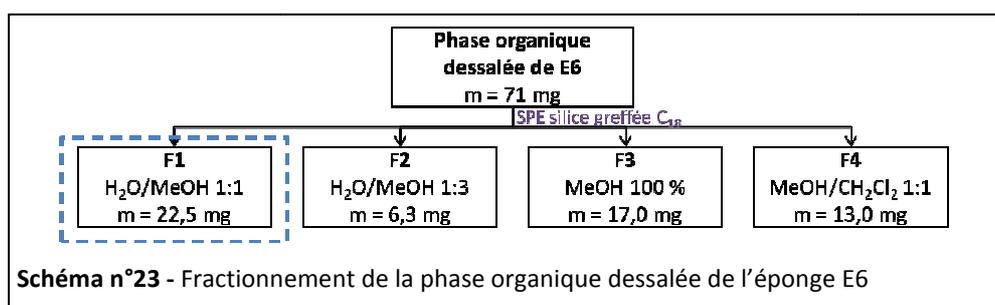


Le comptage de la phase organique de l'éponge E6 (incubée avec la [U-¹⁴C]-L-histidine et la [U-¹⁴C]-L-proline) déposée sur HPTLC, a permis d'identifier quatre pics radioactifs (**Figure n°175**). Les deux pics les plus polaires, ne migrant pratiquement pas avec le système d'éluion CTZZ choisi, correspondraient aux précurseurs non métabolisés. Les deux autres pics radioactifs ont des rapports frontaux correspondant à ceux des deux métabolites marqués par l'histidine ($R_f = 0,40$) et la proline ($R_f = 0,50$). Après dessalage sur SPE de silice greffée C₁₈, la phase organique de l'éponge E6 est déposée sur une CCM de silice. Ayant repéré les rapports frontaux des pics radioactifs, nous avons choisi de déposer cet extrait sur une CCM, et non sur HPTLC, afin de pouvoir en déposer une plus grande quantité sans saturer la plaque et ainsi obtenir des pics radioactifs plus intenses. Ainsi, la radioactivité de plusieurs dépôts (de 0,3 mg et de 0,5 mg) de la phase organique dessalée d'E6 a été évaluée par Radio-TLC (**Figure n°175**). D'après les résultats obtenus, le dessalage n'a pas permis d'éliminer la totalité des précurseurs radiomarqués. Cependant, les métabolites marqués ont été concentrés et sont nettement plus visibles avec, pour la première fois, le métabolite marqué au R_f d'environ 0,50, qui est encore détectable après le dessalage de la phase organique.



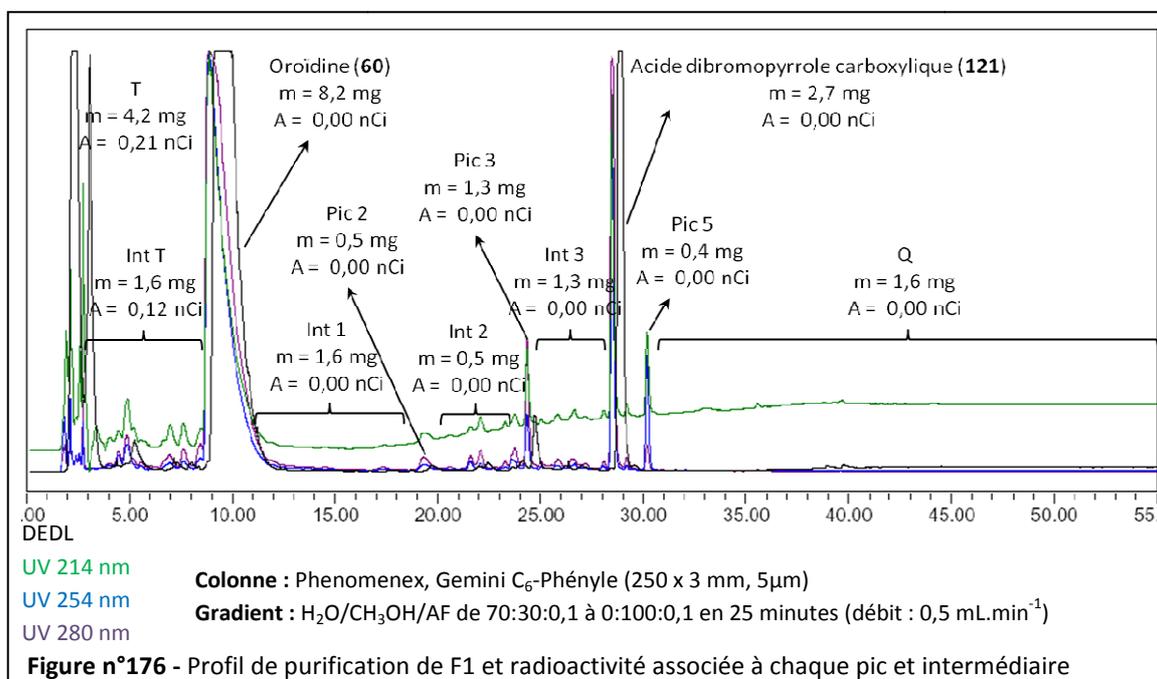
A la suite de ces comptages, nous avons décidé de purifier la phase organique dessalée de l'éponge E6 afin d'isoler les métabolites secondaires radioactifs.

Pour cela, la phase organique dessalée a été fractionnée sur une SPE de silice greffée C₁₈ par un système d'éluant de polarité décroissante, de H₂O/MeOH 1:1 à 0:1 puis MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 (**Schéma n°23**).



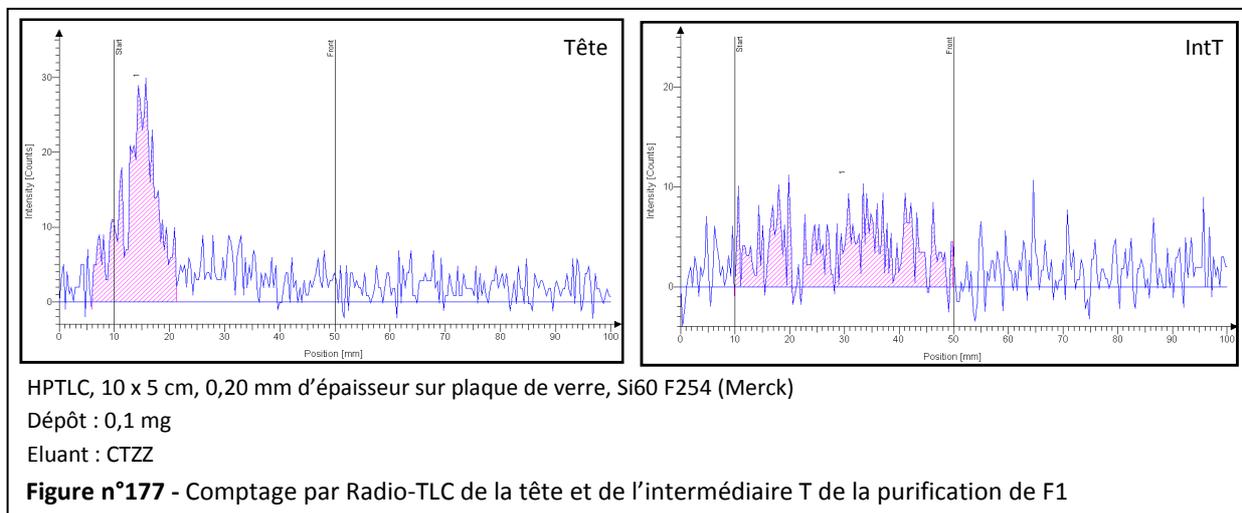
201

L'analyse de chaque fraction par HPLC (DEDL, DAD) a permis de sélectionner la fraction F1 (H₂O/MeOH 1:1) pour envisager une purification car elle regroupait l'ensemble des P2AI produits par l'éponge. Après purification, la radioactivité de l'ensemble des pics et des intermédiaires recueillis, déposés sur HPTLC de silice, a été évaluée par Radio-TLC (**Figure n°176**).



Seuls la tête (T, m = 4,2 mg, A = 0,21 nCi) et l'intermédiaire entre la tête et l'oroidine (60) (intT, m = 4,2 mg, A = 0,12 nCi) ont contenu de la radioactivité. Après migration de la plaque HPTLC, la totalité de la radioactivité de la tête a été localisée à un R_f de 0,10. Ce pic radioactif correspond certainement à celui de la [U-¹⁴C]-L-histidine et de la [U-¹⁴C]-L-proline détecté avant le

fractionnement (**Figure n°175**). En revanche, la radioactivité associée à l'intermédiaire entre la tête et l'oroïdine (**60**) est très diffuse et n'a pas pu être précisément associée à un rapport frontal donné (**Figure n°177**).



Ainsi, la purification de la phase organique dessalée de l'éponge E6 n'a pas permis d'identifier le ou les métabolite(s) secondaire(s) marqué(s) par l'histidine ou la proline. Le fait de retrouver toute la radioactivité de la fraction dans les premières minutes de l'élution met en évidence le phénomène de traînée de la radioactivité décrit dans la majorité des publications de biosynthèse.

Les fractions F2 à F4 ont également été déposées sur HPTLC afin d'évaluer leur radioactivité. Après comptage, aucune radioactivité n'a été détectée dans ces trois fractions. Les métabolites radiomarqués étaient donc dans la fraction F1 purifiée.

Malgré la présence de métabolites radiomarqués dans les extraits des éponges B6, D6 et E6, incubées respectivement avec la [U-¹⁴C]-L-histidine, la [U-¹⁴C]-L-proline et les deux acides aminés en même temps, nous n'avons pas réussi à les isoler et ne pouvons donc pas attribuer ce marquage à certains P2AI biosynthétisés par l'éponge. Nous avons donc décidé de mettre au point une expérience permettant d'optimiser la production des P2AI par *Agelas oroides*.

III.6. Influence d'un stress sur la biosynthèse des P2AI

La rapide conversion des précurseurs en métabolites de défense après l'endommagement des tissus de l'organisme a été très étudiée dans les plantes terrestres et marines, mais peu d'études ont permis de confirmer ce phénomène chez les invertébrés marins sessiles.²¹⁸ Cependant les études menées par Richelle-Maurer *et al.* sur *Agelas conifera* ont montré qu'en lui infligeant des lésions, l'éponge produit 3 à 4 fois plus d'oroïdine (**60**) en quelques jours.²¹⁶ Nous avons supposé que cette augmentation de la production d'oroïdine (**60**) en réponse à l'endommagement des tissus de

²¹⁸ Thoms, C. ; Schupp, P.J. *J. Chem. Ecol.*, **2008**, *34*, 1242-1252. Et références citées

l'éponge était applicable à *Agelas oroides* et avons étudié l'influence d'une lésion sur la conversion de précurseurs marqués en métabolites secondaire. **Le but de cette expérience a été d'augmenter le taux d'incorporation de la radioactivité ajoutée dans les métabolites synthétisés de manière à les isoler et les caractériser plus aisément.**

- **Expérience 7 :**

Pour cela, après 2 jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, chaque spécimen d'*A. oroides* a été incisé au scalpel. Deux spécimens, nommés A7 et B7, ont ensuite été placés dans des béchers de 300 mL d'eau de mer contenant chacun 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-histidine ou de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline. L'arginine et l'ornithine n'ont pas été utilisées car d'après les expériences précédentes, ces deux acides aminés ne seraient pas des précurseurs de P2AI. L'éponge C7, quant à elle, a été placée dans un bécher de 300 mL d'eau de mer contenant 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-histidine et 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline (**Schéma n°24**).

La même expérience a été réalisée en parallèle avec trois éponges non blessées, dites éponges « contrôles », afin de pouvoir comparer la différence d'incorporation des précurseurs dans les métabolites secondaires des éponges blessées et « contrôles ».

Après 17 heures d'incorporation, plus de 90 % des précurseurs ajoutés ont été incorporés dans les éponges, qu'elles aient été blessées ou non (**Tableau 34**).

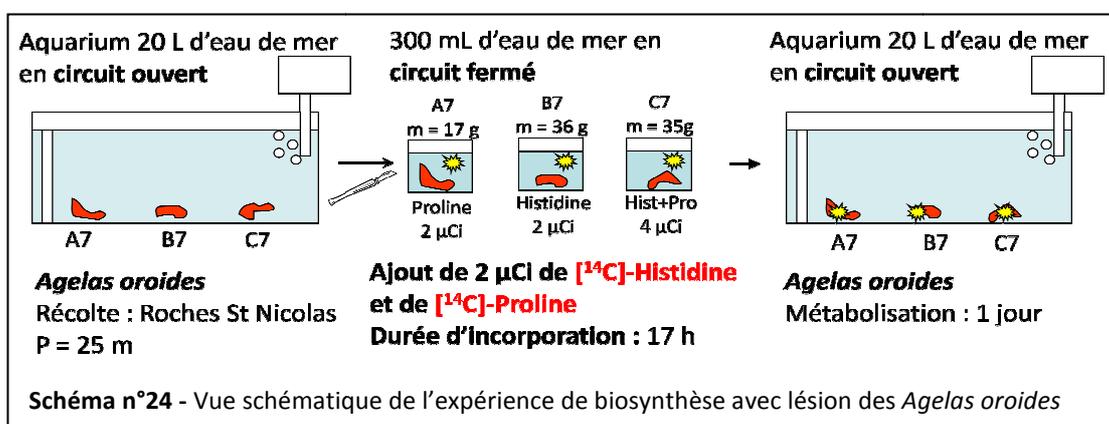


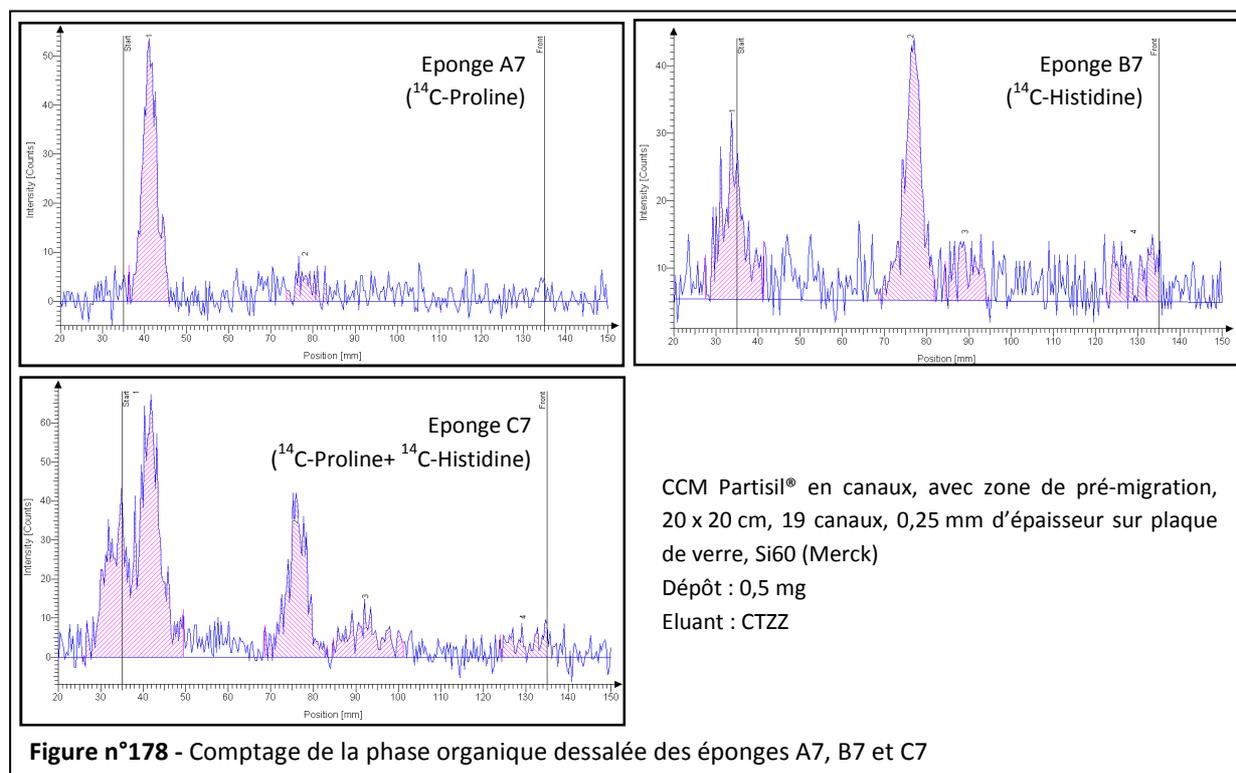
Tableau 34 - Taux d'incorporation de chaque acide aminé dans *A. oroides*

| Nom | Masse (humide) | Précurseur | Activité ajoutée | % d'incorporation |
|-----|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|
| A7 | 17 g | $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline | 2,0 μCi | 93 % |
| B7 | 36 g | $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-histidine | 2,0 μCi | 91 % |
| C7 | 35 g | $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-proline + $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-histidine | 4,0 μCi | 93 % |

Les éponges ont ensuite été replacées dans un aquarium de 20 L en circuit ouvert pour l'étape de métabolisation. Malheureusement, l'aquarium s'est vidé au bout de 12 heures à cause d'une fuite. Malgré ce désagrément, les éponges ont été extraites par le mélange de solvant $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1.

Et, après avoir éliminé les sels insolubles et dessalé les extraits sur une SPE de silice greffée C₁₈, les phases organiques des trois éponges A7 à C7 ainsi que celles des éponges « contrôles » ont été déposées sur CCM analytique.

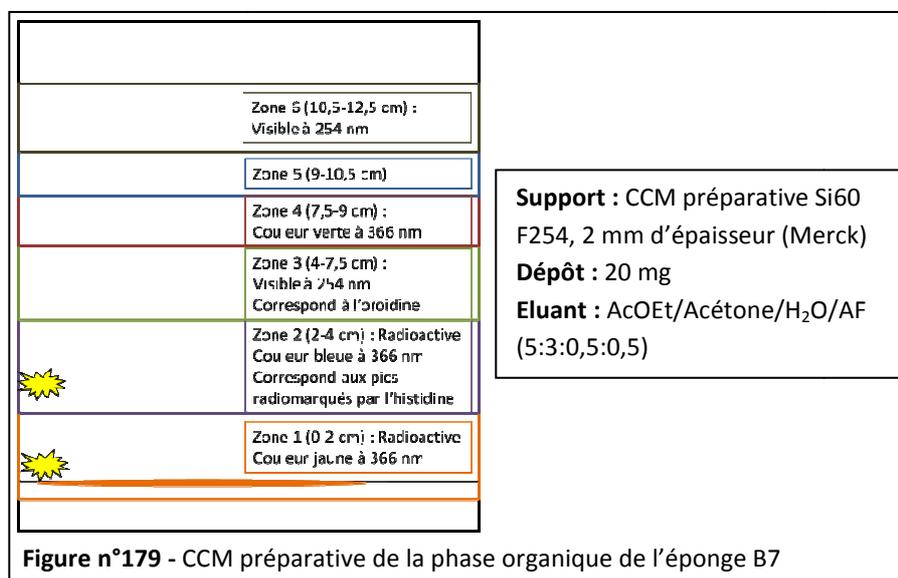
Le comptage de ces phases organiques n'a pas mis en évidence une différence d'incorporation de la radioactivité dans les métabolites marqués entre les éponges blessées et les éponges « contrôles ». Cependant, la phase de métabolisation écourtée nous empêche de conclure quant à l'augmentation effective de la production de P2AI lorsqu'A. oroides présente des lésions. Les éponges ont néanmoins utilisé les précurseurs radiomarqués disponibles dans la synthèse de certains métabolites secondaires car les pics radioactifs détectés lors des expériences précédentes ont de nouveau été retrouvés. Ainsi, le comptage de la phase organique des éponges A7 et B7, incubées respectivement avec la [U-¹⁴C]-L-proline et la [U-¹⁴C]-L-histidine, a mis en évidence un pic radioactif au R_f respectif de 0,50 et 0,40. Ces deux pics ont été détectés lors du comptage de la phase organique dessalée de l'éponge C7 (**Figure n°178**).



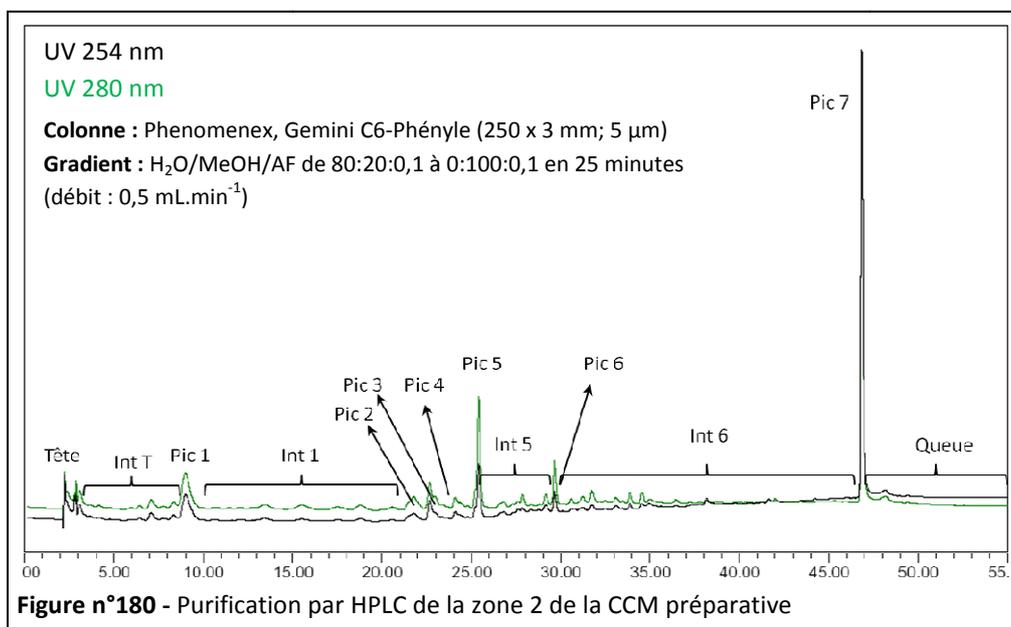
III.6.1. Purification de la phase organique dessalée de B7

Afin d'identifier les métabolites marqués par l'histidine, nous avons décidé de déposer la phase organique dessalée de l'éponge B7 sur une CCM préparative de silice. Ainsi, 20 mg ont été déposés sur une bande de 10 cm de large. Après migration par le système de solvants CTZZ, les différentes zones radioactives ont été déterminées par Radio-TLC. Des quatre pics radioactifs détectés sur CCM analytique, seulement deux ont été retrouvés sur CCM préparative : le premier correspondant au précurseur radiomarqué et le second correspondant au(x) métabolite(s) ayant un R_f d'environ 0,40.

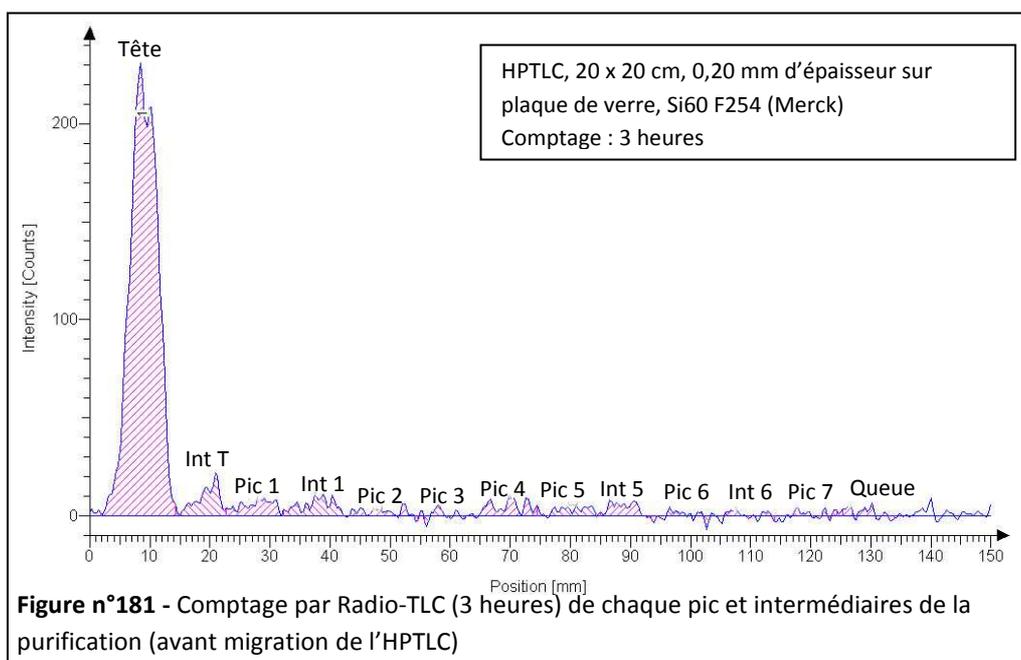
D'après les comptages et la lecture de la CCM sous UV (254 nm), six zones ont été récupérées par solubilisation de la silice dans le méthanol puis analysées par LC/MS (**Figure n°179**).



La zone 2 (5,7 mg), correspondant au R_f du ou des métabolite(s) marqué(s) par la [U-¹⁴C]-L-histidine, a été purifiée par HPLC sur une colonne C₆-Phényle suivant le profil de purification de la **Figure n°180**.



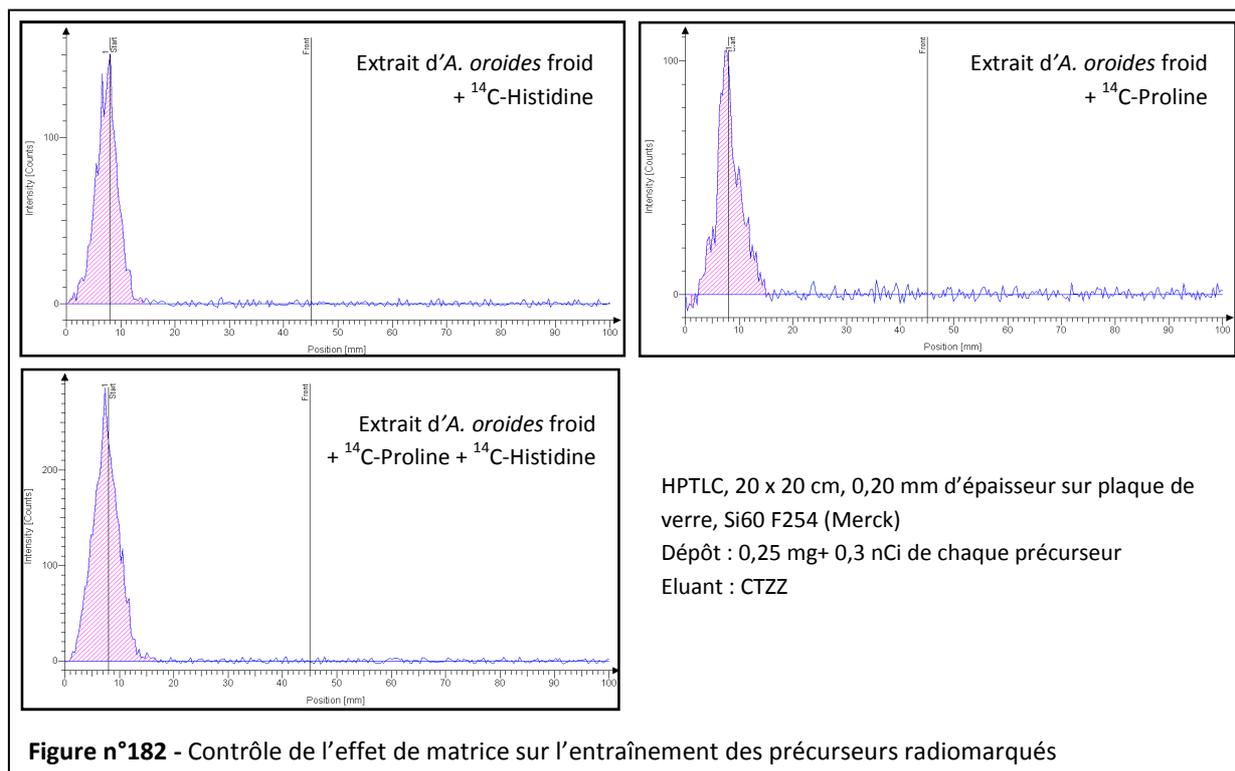
Chaque pic et intermédiaire recueilli a ensuite été déposé sur HPTLC afin d'évaluer leur radioactivité. Le résultat de ce comptage, avant migration de l'HPTLC, a montré que la quasi-totalité de la radioactivité était associée à la tête de la purification (**Figure n°181**).



Après migration, la radioactivité de l'HPTLC a de nouveau été mesurée par Radio-TLC. Le système d'éluion CTZZ n'a pas permis de faire migrer la radioactivité de la tête de la purification et celle des autres fractions a été perdue certainement à cause de l'entraînement progressif de cette radioactivité lors de la migration de la plaque. La radioactivité ayant été étalée en-dessous du seuil de détection de l'appareil, n'a donc pas pu être détectée.

Ainsi, la zone radioactive récupérée, aux alentours du $R_f = 0,40$, n'a pas été retrouvée dans une des fractions purifiée. Il est possible que cette zone radioactive ne soit due qu'à l'entraînement du précurseur radiomarqué par la matrice. Cela expliquerait le fait de ne pas avoir détecté de radioactivité dans les métabolites secondaires présents dans cette zone.

Pour vérifier cette hypothèse, également applicable aux résultats obtenus sur les extraits des éponges incubées avec la $[U-^{14}C]$ -L-proline, nous avons ajouté les précurseurs radiomarqués dans une phase organique dessalée non radioactive d'un spécimen d'*Agelas oroides*, puis nous avons déposé ce mélange sur une plaque HPTLC de silice. Après migration, chaque dépôt a été compté par Radio-TLC. Le résultat de ces comptages n'a montré aucun entraînement du précurseur radiomarqué par la matrice de l'échantillon (Figure n°182). **Les pics radioactifs aux R_f 0,40 et 0,50, obtenus après incubation des éponges avec la $[U-^{14}C]$ -L-histidine et la $[U-^{14}C]$ -L-proline, ne peuvent donc pas s'expliquer par un effet de matrice et correspondent certainement à des métabolites secondaires produit par l'éponge.**



Au vu de ces résultats, nous avons supposé que les métabolites radiomarqués par l'histidine n'avaient pas été décrochés de la silice de la CCM préparative. Le solvant de solubilisation utilisé étant le méthanol, la silice solubilisée avec le solvant et contenant les métabolites marqués, a pu être entraînée au début du gradient de purification (80 % d'eau). Cela expliquerait la radioactivité de la tête de la purification.

Pour pallier ce problème, nous avons décidé de déposer les phases organiques dessalées des éponges sur une CCM au greffage apolaire. En effet, le greffage apolaire de la silice entraîne des interactions beaucoup moins fortes entre le support et les composés. Ainsi, les métabolites radiomarqués pourront être plus facilement décrochés de la silice greffée.

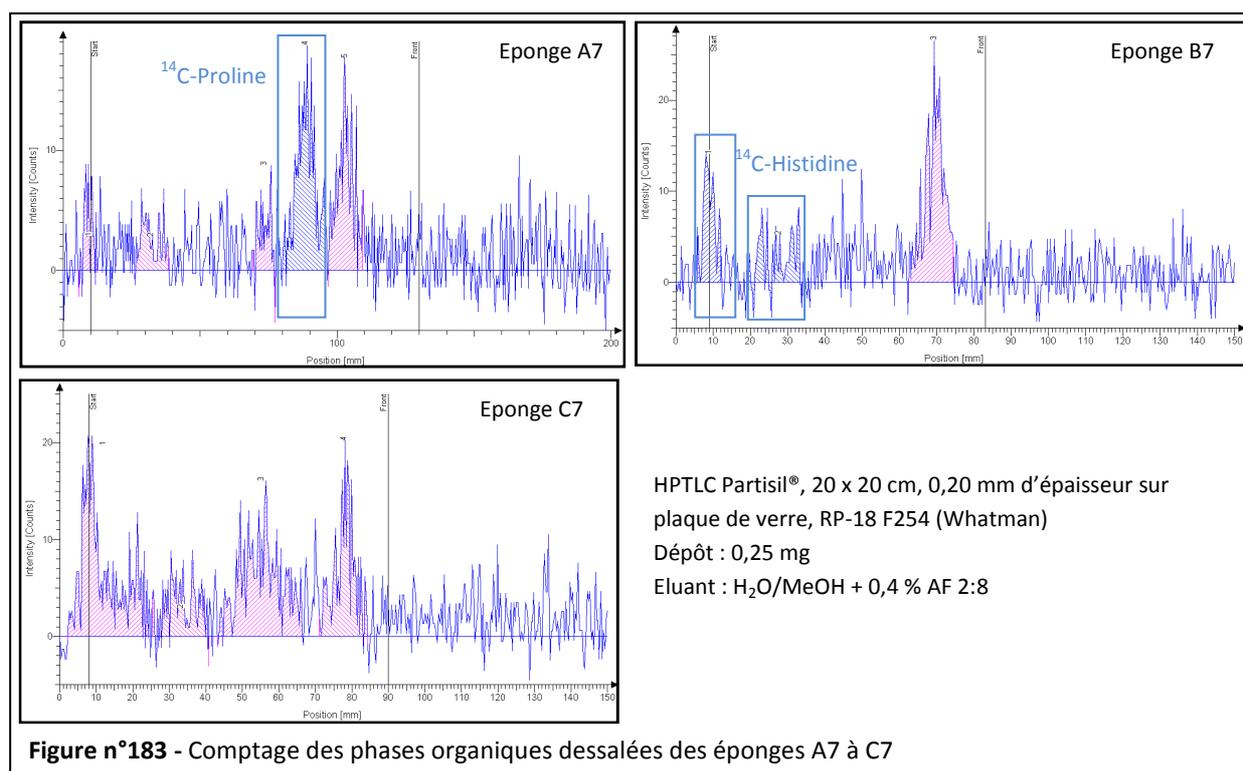
III.6.2. Analyses des échantillons déposés sur HPTLC de silice greffée C₁₈

Après plusieurs essais, le système d'élution permettant la meilleure séparation des P2AI contenus dans la phase organique d'*A. oroides* sur HPTLC de silice greffée C₁₈, a été le mélange H₂O/MeOH + 0,4 % AF 2:8.

Après avoir mis au point ce système d'élution, 0,25 mg des phases organiques dessalées des trois éponges (A7, B7 et C7) a été déposé sur une plaque HPTLC de silice greffée C₁₈ en verre. La [U-¹⁴C]-L-histidine et la [U-¹⁴C]-L-proline ont également été déposées seules et avec un extrait d'*Agelas oroides* afin de déterminer leur rapport frontal et de vérifier l'effet de matrice que pouvait avoir l'extrait sur ces précurseurs avec ce nouveau support.

Les résultats obtenus par comptage des phases organiques dessalées des éponges B7 et C7 ont été plus ou moins conformes à ceux obtenus lorsque ces échantillons ont été déposés sur une CCM de silice non greffée. En effet, la majorité de la radioactivité de l'extrait B7 est associée au précurseur radiomarqué et à un métabolite secondaire, tandis que celle de l'extrait C7 est associée aux deux précurseurs et à deux métabolites secondaires (**Figure n°182**). Il est à noter que l'histidine ne migre pratiquement pas avec le système d'éluants choisi lorsqu'elle est déposée seule sur l'HPTLC de silice greffée C₁₈, alors qu'elle est légèrement entraînée par la matrice de l'échantillon pour migrer jusqu'au R_f 0,25. En revanche, la matrice de l'échantillon n'a aucun effet sur la proline dont le R_f est de 0,60 (cf. **Partie expérimentale** p.306).

Le résultat obtenu avec la phase organique dessalée de l'éponge A7, incubée avec la [U-¹⁴C]-L-proline, est étonnant. En effet, lorsque l'échantillon est déposé sur une CCM de silice non greffée, le marquage du ou des métabolite(s) migrant à un R_f de 0,50 est très faible par rapport à la radioactivité résiduelle du précurseur. Lorsque ce même échantillon est déposé sur une HPTLC de silice greffée C₁₈, un pic radioactif d'intensité comparable à celle du précurseur radiomarqué est détecté. Trois autres zones radioactives, moins intenses, sont également identifiées (**Figure n°183**).



Etant donné le résultat surprenant obtenu avec la phase organique dessalée de l'éponge A7 nous avons voulu confirmer la non-incorporation de l'arginine et de l'ornithine dans les P2AI d'*A. oroides* sur ce nouveau support. Ainsi, les phases organiques dessalées des éponges A6 et C6 (**Expérience 6**), respectivement incubées avec la [U-¹⁴C]-L-arginine et la [1-¹⁴C]-L-ornithine, ont été déposées sur HPTLC de silice greffée C₁₈ dans les mêmes conditions que pour l'analyse précédente. Après lecture de l'HPTLC, aucune radioactivité n'a été détectée par le Radio-TLC. Ainsi, le changement de support

n'a pas permis l'apparition de métabolites radiomarqués par ces deux acides aminés. Ces derniers ne sont donc pas incorporés dans les P2AI de l'éponge.

L'analyse de la phase organique dessalée de l'éponge A7 nous a également fait douter quant à la pertinence de la cinétique de métabolisation dont l'interprétation des résultats a uniquement été faite sur CCM de silice non greffée. Nous avons donc souhaité répéter cette expérience pour confirmer la durée de métabolisation optimale en analysant les échantillons après migration sur HPTLC de silice greffée C₁₈.

III.7. Cinétique de métabolisation des précurseurs

Les deux acides aminés métabolisés par *A. oroides* (métabolisme secondaire) sont l'histidine et la proline. Nous avons donc étudié la métabolisation dans le temps de ces deux précurseurs. Afin d'avoir un aperçu sur une plus longue période de métabolisation, les expériences décrites ci-dessous ont été menées sur 22 jours de métabolisation.

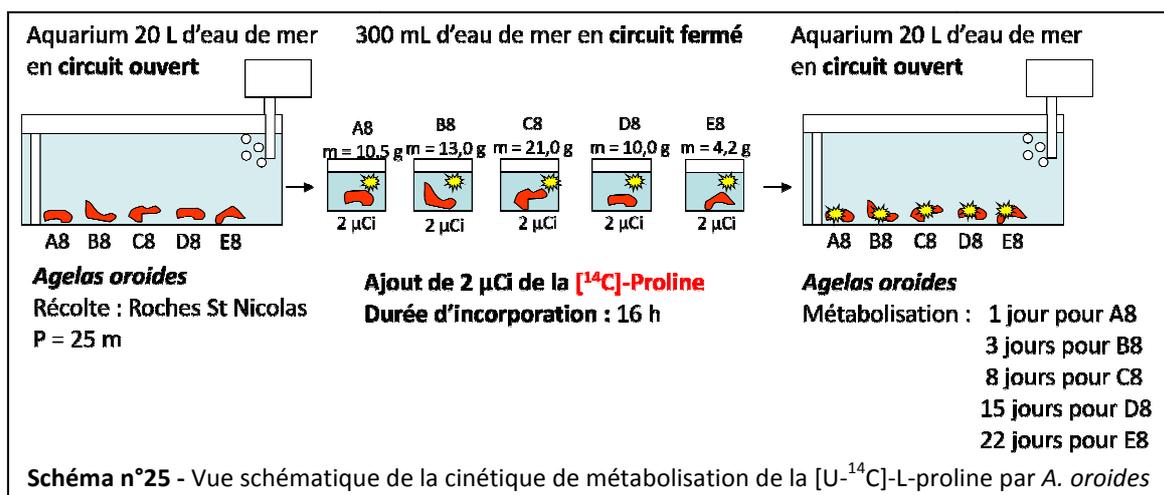
III.7.1. Cinétique de métabolisation de la [U-¹⁴C]-L-proline

- **Expérience 8 :**

Pour la première expérience, nous avons choisi de travailler avec la [U-¹⁴C]-L-proline en tant que précurseur. Après deux jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, cinq spécimens d'*A. oroides*, A8 à E8, ont été incubés avec 2 µCi de [U-¹⁴C]-L-proline dans un bécher de 300 mL d'eau de mer.

Après 16 heures d'incorporation, plus de 90 % de la [U-¹⁴C]-L-proline ajoutée avait disparu des 300 mL d'eau de mer pour les cinq béchers. Les éponges ont ainsi été replacées en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L (**Schéma n°25**).

Les éponges ont ensuite été extraites par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 après un jour de métabolisation pour l'éponge A8, 3 jours pour B8, 8 jours pour C8, 15 jours pour D8 et 22 jours pour E8. Après élimination des sels insolubles, l'extrait organique de chaque éponge a été dessalé sur SPE de silice greffée C₁₈ puis déposé sur HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium. Les plaques HPTLC sur verre ont été remplacées par des plaques sur feuilles aluminium car, après avoir testé les deux sortes de plaques HPTLC, celles sur support en aluminium permettaient une meilleure détection des pics radioactifs.



Ainsi, 0,3 mg de chaque phase organique dessalée a été déposé sur une HPTLC de type Alugram® RP-18W (20x20 cm, 0,15 mm d'épaisseur sur plaque d'aluminium, silice greffée C_{18} , Si60 F254 (Macherey-Nagel)) puis, après migration par le système d'éluant $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0,4\% \text{AF } 2:8$, la radioactivité de la plaque HPTLC a été mesurée par Radio-TLC.

Comme dans l'expérience de cinétique de métabolisation précédente (**Expérience 4**), au bout d'un jour de métabolisation un pic radioactif apparaît (**Pic 3, $R_f = 0,70$**) et la radioactivité de ce pic semble diminuer durant les 7 jours de métabolisation suivants. Cependant, l'intensité de ce même pic radioactif augmente progressivement entre 15 et 22 jours de métabolisation. Il est possible que ce pic soit composé de plusieurs métabolites secondaires plus ou moins marqués, suivant la durée de métabolisation considérée (**Tableau 35**).

Le résultat de ces comptages a également mis en évidence une diminution de la $[U-^{14}\text{C}]$ -L-proline dans l'extrait organique dessalé des éponges (**Pic 2, $R_f = 0,60$**) passant de 1,14 % de la radioactivité incorporée dans l'éponge au bout d'un jour de métabolisation à 0,38 % au bout de 22 jours de métabolisation. Ce résultat semble cohérent car l'étape de métabolisation se déroule en circuit ouvert, ainsi, la proline incorporée est soit utilisée par les métabolismes primaire et secondaire de l'éponge, soit libérée dans le milieu.

Enfin, un dernier pic radioactif a été détecté au dépôt (**Pic 1, $R_f = 0,00$**). Il s'agit certainement d'un ou plusieurs métabolites apolaires produits par l'éponge à partir de la $[U-^{14}\text{C}]$ -L-proline.

Tableau 35 - Résultats des comptages des phases organiques des éponges A8 à E8 déposées sur HPTLC de silice greffée C₁₈

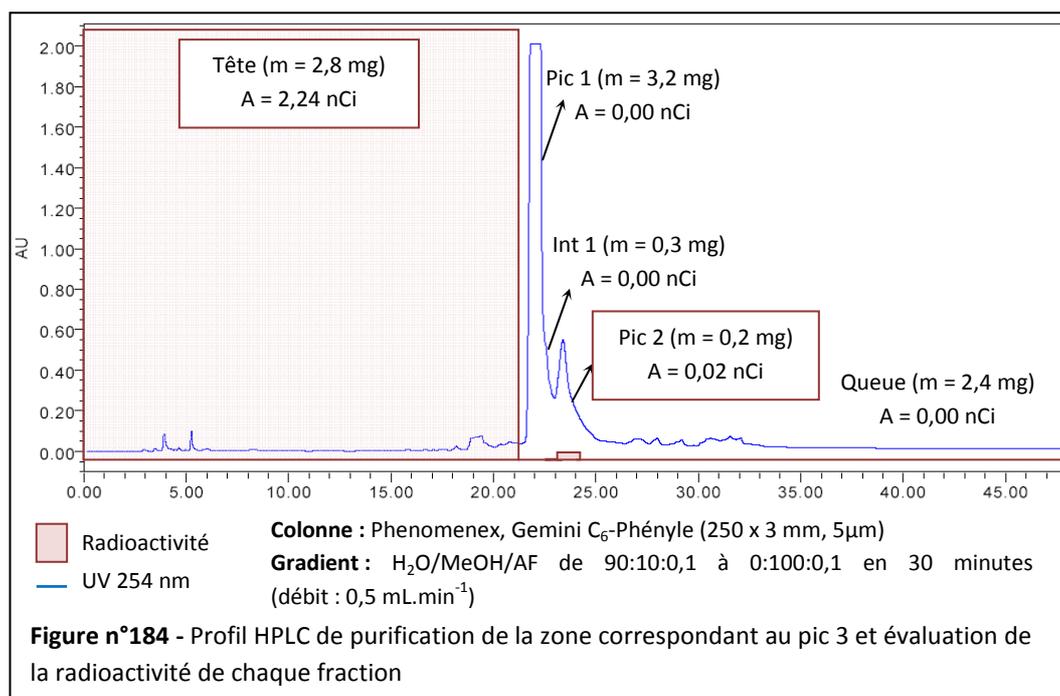
| | |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>Eponge A8 (J = 1) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,45 % Pic 2 ($R_f = 0,60$) : 1,14 % Pic 3 ($R_f = 0,70$) : 2,20 %</p> |
| | <p>Eponge B8 (J = 3) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,21 % Pic 2 ($R_f = 0,60$) : 0,52 % Pic 3 ($R_f = 0,70$) : 0,54 %</p> |
| | <p>Eponge C8 (J = 8) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,21 % Pic 2 ($R_f = 0,60$) : 0,34 % Pic 3 ($R_f = 0,70$) : 0,43 %</p> |
| | <p>Eponge D8 (J = 15) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,63 % Pic 2 ($R_f = 0,60$) : 0,74 % Pic 3 ($R_f = 0,70$) : 0,83 %</p> |
| | <p>Eponge E8 (J = 22) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,44 % Pic 2 ($R_f = 0,60$) : 0,38 % Pic 3 ($R_f = 0,70$) : 1,28 %</p> |

Afin de déterminer la nature des composés à l'origine de la radioactivité associée au pic 3, nous avons décidé d'étudier les extraits organiques dessalés des éponges A8 et E8 car, avec 35,2 nCi pour le pic 3 de A8 et 24,5 nCi pour celui de E8, ce sont les deux échantillons possédant la plus forte incorporation de la radioactivité dans ce pic.

III.7.1.1. Purification du Pic 3 de l'extrait organique de A8

212

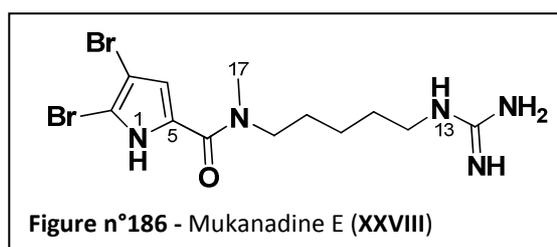
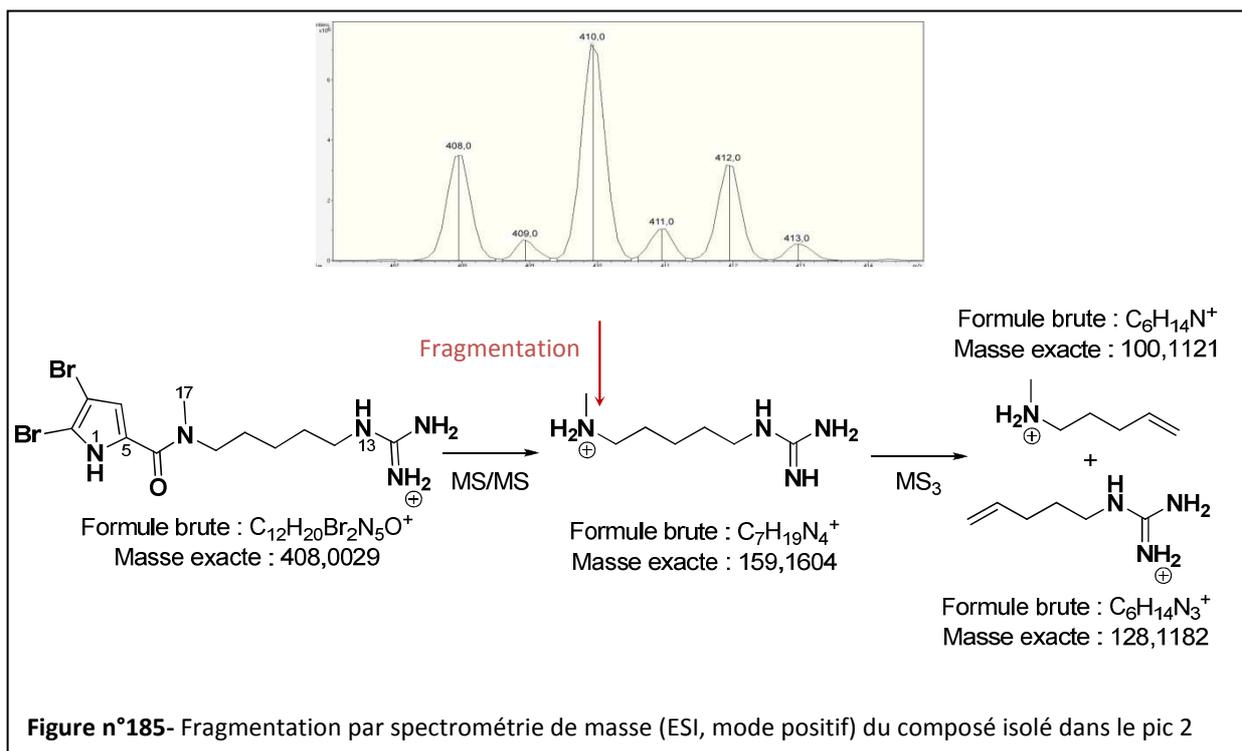
20 mg de l'extrait organique dessalée de A8 ont été déposés sur plusieurs HPTLC de silice greffée C₁₈. Après migration par le système de solvant H₂O/MeOH + 0,4 % AF 2:8, la zone correspondant au pic 3 (R_f = 0,7) a été déterminée par Radio-TLC et extraite de la silice greffée C₁₈ par du méthanol. Ainsi, 8,5 mg de composés ont été extraits et purifiés par HPLC suivant le profil de purification de la **Figure n°184**. 0,3 mg de chaque fraction a ensuite été déposé sur HPTLC de silice greffée C₁₈ pour évaluer sa radioactivité.



Ainsi, il est apparu que la tête de la purification regroupait la quasi-totalité de la radioactivité. L'oroidine (**60**), correspondant au Pic 1 d'après son analyse par spectrométrie de masse, n'a pas été identifiée comme radioactive, en revanche, le comptage par Radio-TLC a révélé une faible radioactivité (0,02 nCi) induite par le composé du Pic 2. Nous avons supposé que la radioactivité détectée dans ce composé était réellement dû à une incorporation de la [U-¹⁴C]-L-proline dans ce composé car aucune trace de radioactivité n'a été détectée avant et après le Pic 2.

L'analyse par spectrométrie de masse du Pic 2 n'a mis en évidence qu'une seule molécule dibromée dont le pic pseudomoléculaire apparaît à m/z 408,0-410,0-411,0 (1:2:1, [M+H]⁺). Aucun métabolite

de cette masse molaire n'a été isolé d'*Agelas oroides* en revanche, la mukanadine E (**XXVIII**), récemment isolée d'une *Agelas sp.* récoltée à Okinawa,²¹⁹ pourrait correspondre au métabolite marqué. Malheureusement, le composé a été isolé en trop faible quantité (0,2 mg) pour être analysé par RMN. Nous avons donc décidé de le fragmenter par spectrométrie de masse (ESI, mode positif) afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure. Comme le montre la **Figure n°185**, la fragmentation du composé isolé est compatible avec la structure de la mukanadine E (**XXVIII**). Ainsi, nous pouvons supposer que le composé isolé est la mukanadine E (**XXVIII**), pour la première fois isolée d'*Agelas oroides*.



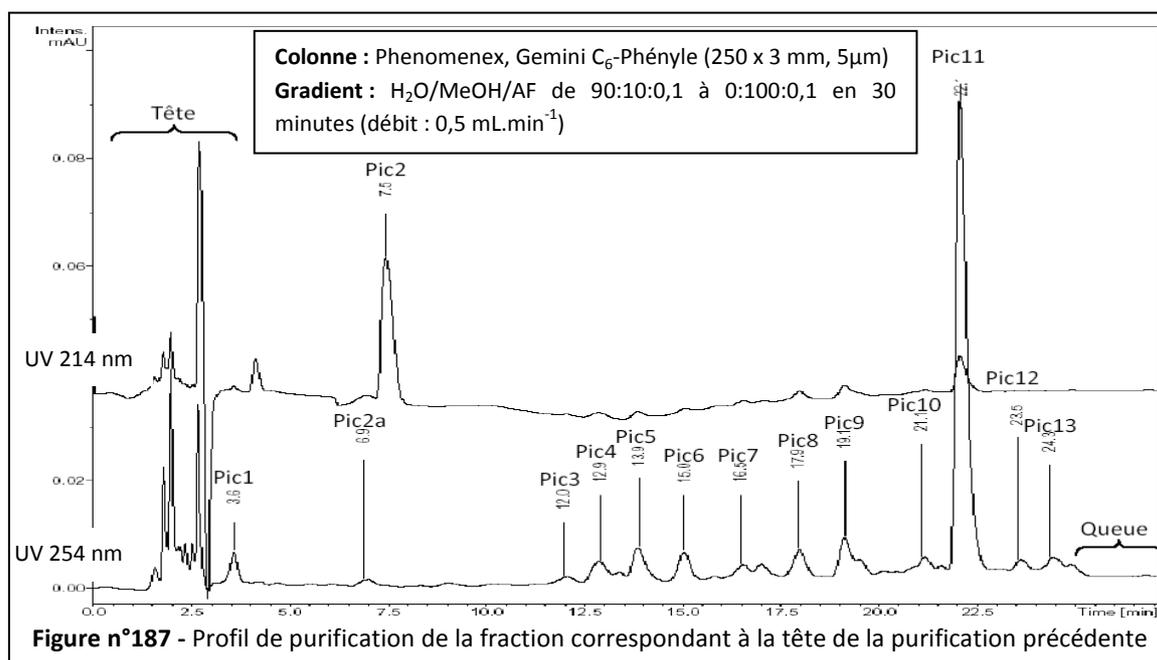
La mukanadine E (**XXVIII**) est un alcaloïde de type P2AI structuralement proche de l'oroïdine (**60**). Il est ainsi possible qu'elle soit un précurseur avancé de l'oroïdine (**60**). Le fait de ne pas avoir détecté de radioactivité dans l'oroïdine (**60**) alors que la mukanadine E (**XXVIII**) a été radiomarquée par la [U-¹⁴C]-L-proline, peut s'expliquer par le turnover de la molécule. En effet, l'oroïdine (**60**) est le métabolite majoritaire de l'extrait organique d'*Agelas oroides*, il est donc possible que les molécules d'oroïdine marquée soient diluées dans la quantité importante de molécules d'oroïdine froide. Ainsi, lorsque 0,3 mg d'oroïdine isolée dans le Pic 1 a été déposée sur HPTLC pour évaluer sa radioactivité, le

²¹⁹ Yasuda, T. ; Araki, A. ; Kubota, T. ; Ito, J. ; Mikami, Y. ; Fromont, J. ; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 488-491.

taux de molécules marquées était trop faible pour permettre une détection de la radioactivité. Cela revient à dire que la radioactivité des 0,3 mg d'oroïdine est inférieure à 0,01 nCi.

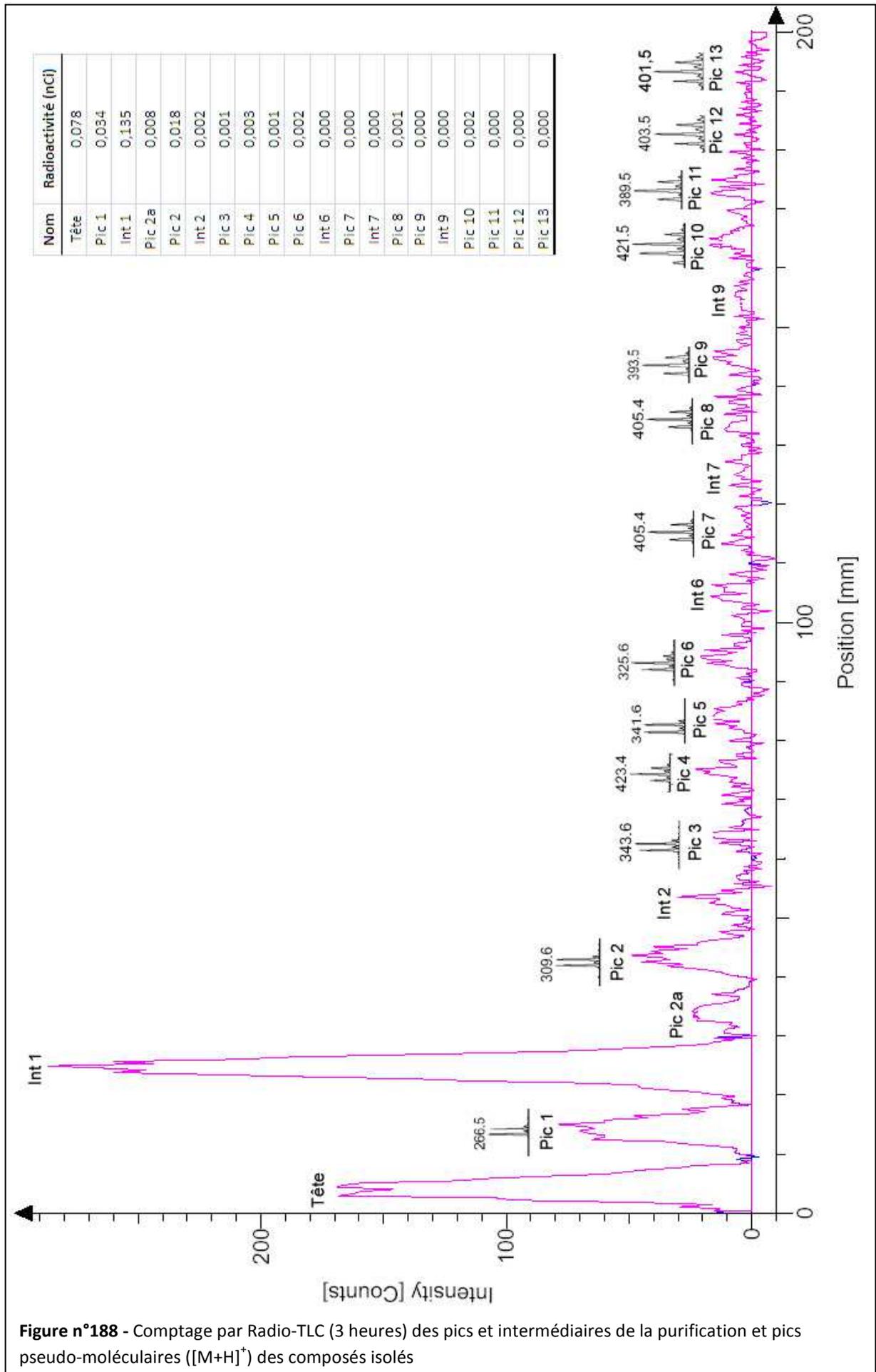
La principale source de radioactivité de la zone ayant été détectée dans la tête de la purification, nous avons décidé de la repurifier pour en déterminer son origine. En effet, la tête de la purification regroupe de nombreux P2AI plus polaires que l'oroïdine (**60**), il est ainsi probable que ces alcaloïdes soient responsables de la radioactivité de cette fraction.

Après avoir analysé par LC/MS la fraction afin d'identifier les différents métabolites la composant, ils ont été purifiés par HPLC en suivant le profil de purification de la **Figure n°187**.



L'évaluation de la radioactivité par Radio-TLC des différents pics et intermédiaires a permis d'associer la majeure partie de la radioactivité à l'intermédiaire entre le Pic 1 et le Pic 2a (**Figure n°188**). L'analyse par spectrométrie de masse (ESI, mode positif et négatif) de cet intermédiaire n'a pourtant permis d'identifier aucun métabolite secondaire. Il est probable que cette source de radioactivité soit due à la présence de la [U-¹⁴C]-L-proline (**Tableau 35**, Pic 2) incluse dans la zone correspondant au pic 3 radioactif ($R_f = 0,70$) de la phase organique de l'éponge A8. Cependant, nous n'avons pas pu le vérifier par spectrométrie de masse.

La totalité de la radioactivité n'est néanmoins pas uniquement due à cet intermédiaire, ainsi, plusieurs pics sont radioactifs (**Figure n°188**). Ces pics sont composés de P2AI mono, di ou tribromés. Le chemin de biosynthèse proposé pour l'oroïdine (**60**) et ses dérivés confirme la proline comme précurseur de leur noyau pyrrolique. Ainsi, le fait que la majorité de ces composés aient incorporé la [U-¹⁴C]-L-proline n'est pas surprenant. Le phénomène de traînée de la radioactivité induite par la [U-¹⁴C]-L-proline n'a pas été considéré comme entièrement responsable du marquage des différents métabolites, car la décroissance de cette radioactivité ne peut pas être la seule cause du marquage de certains composés.

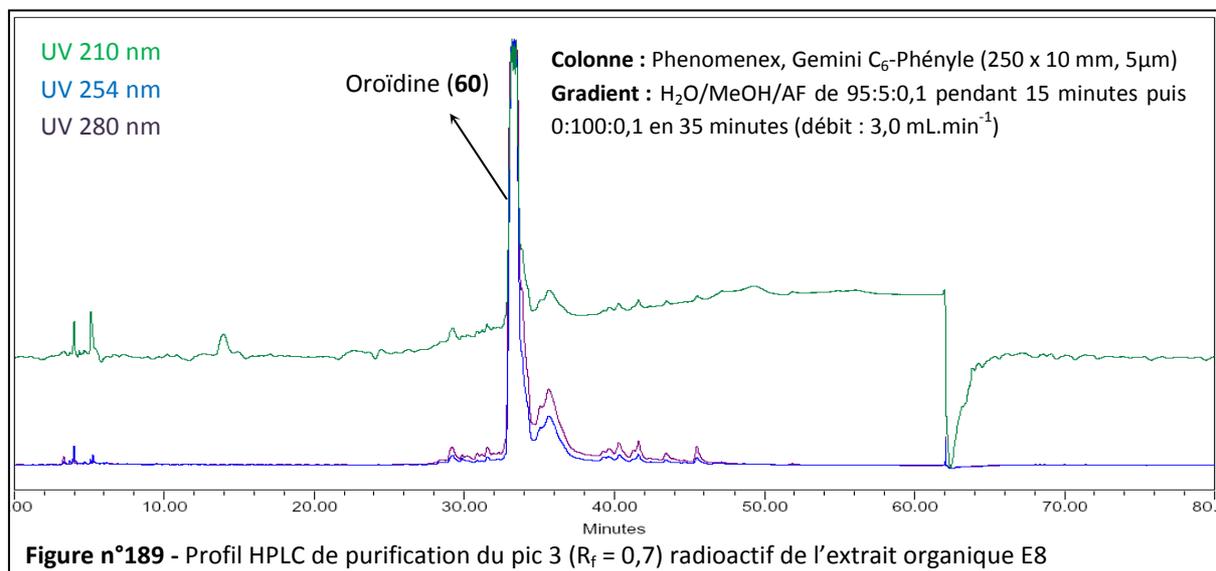


Ces résultats très prometteurs ne nous permettent cependant pas de conclure définitivement quant à une métabolisation de la proline car les pics radioactifs détectés sont de faible intensité. Ainsi, nous avons décidé de purifier l'extrait organique dessalé de l'éponge E8 (22 jours de métabolisation). En effet, le résultat négatif quant au radiomarquage de l'oroïdine (60) et la faible radioactivité des P2AI isolés sont peut-être dus au turnover des métabolites. Ainsi, l'étude de l'extrait E8, après 22 jours de métabolisation, nous a permis de vérifier cette hypothèse.

III.7.1.2. Purification du Pic 3 de l'extrait organique de E8

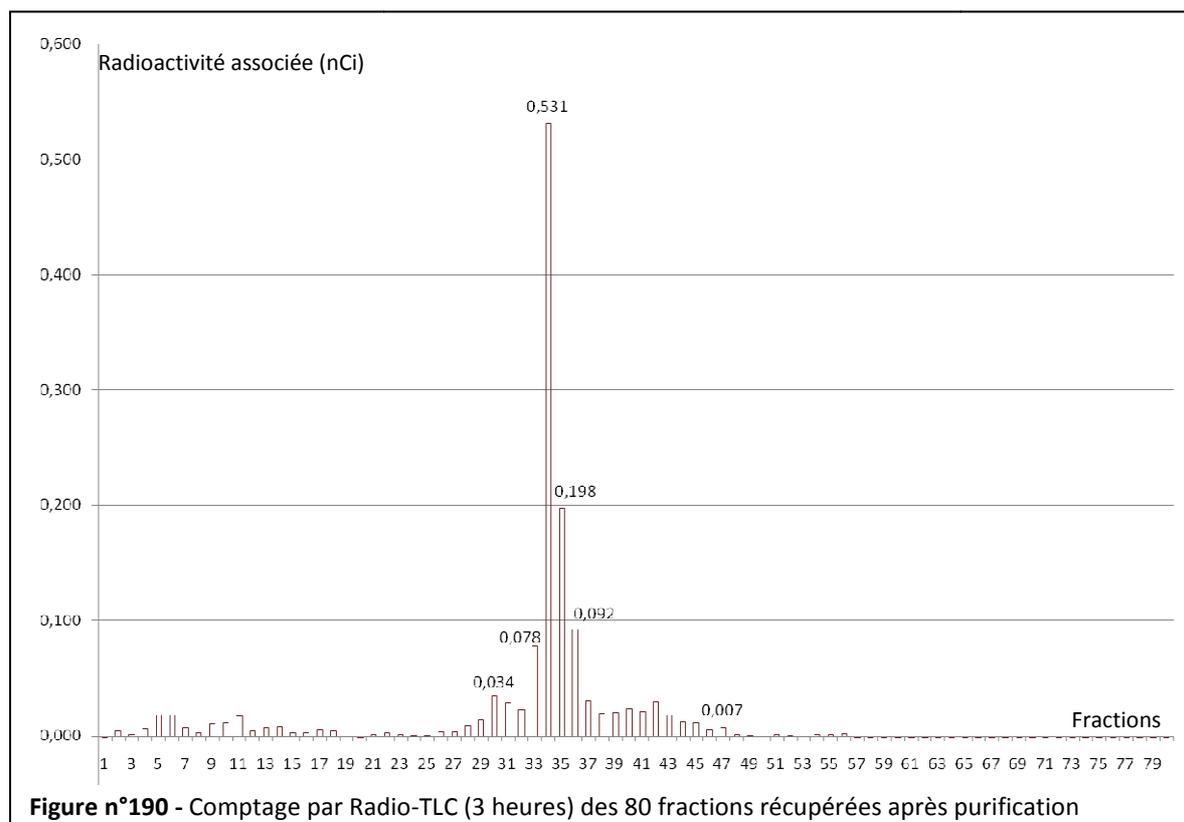
216

Comme lors de la purification du pic 3 de A8, 12 mg de l'extrait organique dessalé de E8 ont été déposés sur plusieurs HPTLC de silice greffée C₁₈. Après migration par le système de solvant H₂O/MeOH + 0,5 %AF 2:8, la zone correspondant au pic 3 (**Tableau 36**, R_f = 0,70) a été déterminée par Radio-TLC, grattée et extraite par du méthanol. Ainsi, 7,6 mg de composés ont été récupérés et purifiés par HPLC (**Figure n°189**). D'après une analyse par LC/MS, le composé majoritaire de cet extrait est l'oroïdine (60). Afin d'éliminer la contamination potentielle de la [U-¹⁴C]-L-proline, le gradient de purification a débuté par un isocratique de H₂O/MeOH/AF 95:5:0,1, pendant 15 minutes. Ainsi la [U-¹⁴C]-L-proline et la traînée de radioactivité induite par ce précurseur devraient être éliminées par cet isocratique. Les fractions ont été récoltées toutes les minutes par un collecteur automatique.



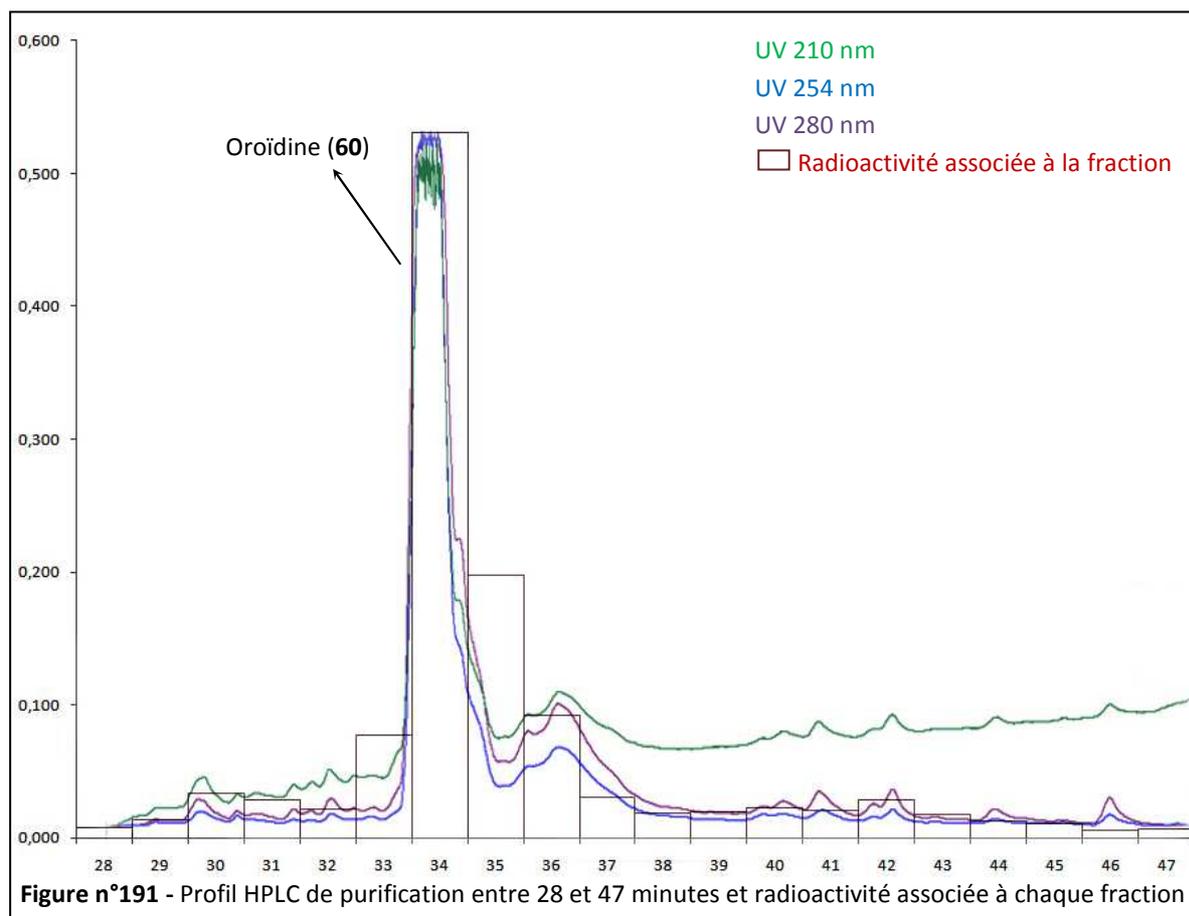
Le comptage des 80 fractions recueillies et évaporées (**Figure n°190**) a montré qu'entre 19 et 25 minutes puis à partir de 48 minutes d'élution, la radioactivité associée aux fractions est quasiment nulle (inférieure à 0,001 nCi). La radioactivité associée aux autres fractions n'est donc pas due à une traînée de radioactivité qui aurait pu être induite par la [U-¹⁴C]-L-proline.

Contrairement à la purification du pic 3 de A8, la tête de la purification d'E8 n'est pratiquement pas radioactive. Entre 0 et 25 minutes, la radioactivité totale est de 0,13 nCi alors qu'elle était de 2,24 nCi pour la tête de purification de l'extrait de A8 (**Figure n°184**). La radioactivité de la tête de la purification de l'éponge A8 a été supposée provenir en grande partie de la [U-¹⁴C]-L-proline résiduelle dans l'échantillon purifié. Le fait de ne détecter qu'une faible radioactivité dans la tête de ce nouvel échantillon peut s'expliquer par l'**absence de [U-¹⁴C]-L-proline dans l'échantillon après 22 jours de métabolisation**. Ainsi, la séparation entre la [U-¹⁴C]-L-proline (**Tableau 35**, Pic 2) et la zone purifiée (**Tableau 35**, Pic 3) a peut-être été suffisante pour ne pas récupérer de précurseur lors du grattage sur CCM de la zone à purifier.



Ainsi, la majeure partie de la radioactivité de l'extrait purifié a pu être associée aux métabolites secondaires d'*A. oroides* élués entre 28 et 47 minutes (**Figures n°190 et n°191**). Cette zone d'éluion est composée de la majorité des pyrrole-2-aminoimidazoles (P2AI) produit par *A. oroides*. **Au bout de 22 jours de métabolisation, le radiomarquage des P2AI d'*A. oroides* par la [U-¹⁴C]-L-proline ne fait donc aucun doute et la faible radioactivité de ces mêmes composés après 1 jour de métabolisation (éponge A8, Figures n°185 et n°188) est certainement la conséquence de leur turnover.**

L'oroïdine (60), élue entre 33 et 34 minutes lors de la purification (**Figure n°191**), présente une incorporation de la radioactivité significative. En effet, avec 0,53 nCi détecté dans l'oroïdine isolée, le taux d'incorporation de la radioactivité dans l'oroïdine totale de l'éponge E8 est de 0,29 %, ce qui est nettement supérieur à l'incorporation de la radioactivité généralement retrouvée dans les métabolites radiomarqués par des précurseurs, qui est de l'ordre de 10⁻² %.



Les résultats obtenus par cette expérience ont été plus significatifs qu'escomptés et permettent sans aucun doute de confirmer l'utilisation de la proline dans la biosynthèse des P2AI d'*Agelas oroides*, et notamment de l'oroïdine (60). Avec 3,0 mg d'oroïdine purifiée, son enrichissement isotopique est de $2,6 \cdot 10^{-5} \%$ et son activité spécifique de $6,8 \cdot 10^{-2} \mu\text{Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$.

La différence d'incorporation de la radioactivité entre 1 et 22 jours de métabolisation est surprenante. Il serait également intéressant de purifier les extraits organiques des éponges intermédiaires (B8 à D8) afin d'obtenir une réelle cinétique de métabolisation.

En parallèle de l'étude de la cinétique de métabolisation de la $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-proline, nous avons également entrepris l'étude de celle de la $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-histidine.

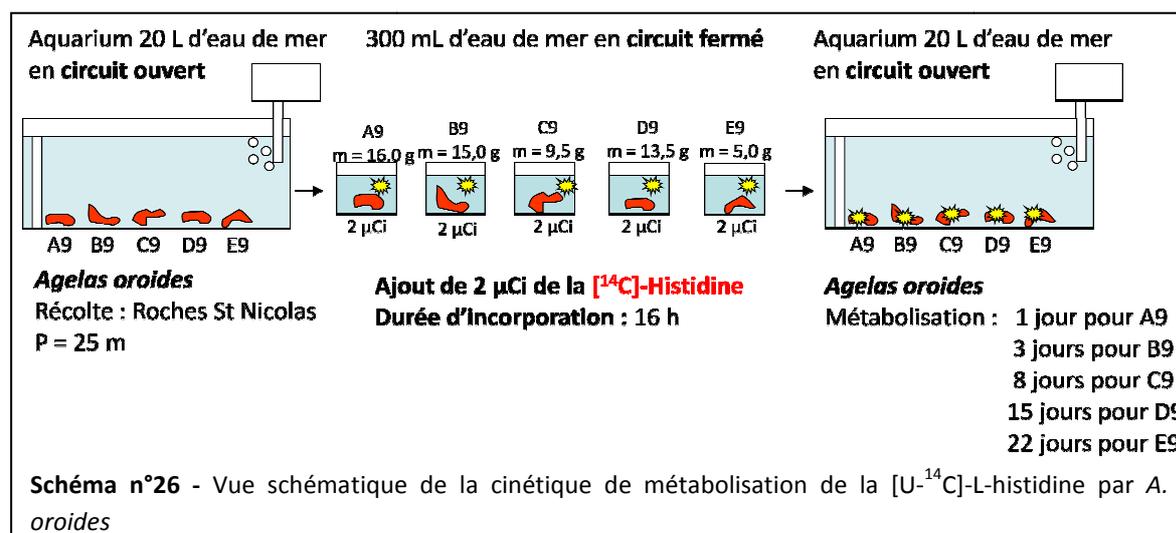
III.8.2. Cinétique de métabolisation de la $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-histidine

- **Expérience 9 :**

Ainsi, après deux jours d'acclimatation dans un aquarium de 20 L d'eau de mer en circuit ouvert, cinq spécimens d'*A. oroides*, nommés A9 à E9, ont été incubés avec 2 μCi de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-histidine dans des béchers de 300 mL d'eau de mer.

Après 16 heures d'incorporation, plus de 88 % de la [U-¹⁴C]-L-histidine avait disparu des 300 mL d'eau de mer. Les cinq éponges ont été replacées en circuit ouvert dans un aquarium de 20 L pour entamer la phase de métabolisation (**Schéma n°26**).

Les éponges ont ensuite été extraites par le mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 après 1, 3, 8, 15 et 22 jours de métabolisation respectivement pour les éponges A9, B9, C9, D9 et E9. Après élimination des sels insolubles, l'extrait organique de chaque éponge a été dessalé sur SPE de silice greffée C₁₈ puis déposé sur HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium.



Ainsi, 0,3 mg de chaque phase organique dessalée a été déposé sur une plaque HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium puis, après migration par le système d'éluant H₂O/MeOH + 0,4 % AF 2:8, la radioactivité de la plaque HPTLC a été mesurée par Radio-TLC.

Le résultat obtenu sur la phase organique dessalée de l'éponge A9 (1 jour de métabolisation, **Tableau 36**) est conforme à celui de la phase organique dessalée de l'éponge B7 (**Figure n°183**), également incubée avec la [U-¹⁴C]-L-histidine et extraite après 1 jour de métabolisation. En effet, l'analyse des deux échantillons a mis en évidence un pic radioactif majoritaire ayant un rapport frontal aux alentours de 0,70 (**Tableau 36**, Pic 4). Comme nous l'avons vu dans l'expérience de la cinétique de métabolisation de la [U-¹⁴C]-L-proline, ce R_f correspond à une grande majorité de P2AI produits par *A. oroides*. L'histidine serait donc peut-être suffisamment incorporée dans les P2AI de l'éponge pour que le radiomarquage soit visible après seulement 1 jour de métabolisation. Cela impliquerait un turnover des métabolites beaucoup plus rapide que celui supposé lors de l'expérience de cinétique de métabolisation de la proline. Ce pic pourrait également correspondre au précurseur entraîné par effet de matrice. Nous avons donc contrôlé une seconde fois l'effet de matrice que pouvait avoir l'échantillon sur le rapport frontal de l'histidine. En effet, les premiers essais ont été faits sur des HPTLC de silice greffée C₁₈ sur plaque de verre. Le passage aux feuilles d'aluminium modifie peut-être le résultat obtenu.

Tableau 36 - Résultats des comptages des phases organiques des éponges A9 à E9 déposées sur HPTLC de silice greffée C₁₈

| | |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>Eponge A9 (J = 1) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,38 % Pic 2 ($R_f = 0,30$) : 0,00 % Pic 3 ($R_f = 0,40$) : 0,00 % Pic 4 ($R_f = 0,70$) : 1,41 %</p> |
| | <p>Eponge B9 (J = 3) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,25 % Pic 2 ($R_f = 0,30$) : 0,32 % Pic 3 ($R_f = 0,40$) : 0,00 % Pic 4 ($R_f = 0,70$) : 0,32 %</p> |
| | <p>Eponge C9 (J = 8) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,60 % Pic 2 ($R_f = 0,30$) : 0,69 % Pic 3 ($R_f = 0,40$) : 0,13 % Pic 4 ($R_f = 0,70$) : 0,37 %</p> |
| | <p>Eponge D9 (J = 15) : Incorporation de la radioactivité dans les composés par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,88 % Pic 2 ($R_f = 0,30$) : 0,81 % Pic 3 ($R_f = 0,40$) : 0,74 % Pic 4 ($R_f = 0,70$) : 0,00 %</p> |
| | <p>Eponge E9 (J = 22) : Taux de la radioactivité des composés marqués par rapport à celle incorporée dans l'éponge :</p> <p>Pic 1 ($R_f = 0,00$) : 0,34 % Pic 2 ($R_f = 0,30$) : 0,23 % Pic 3 ($R_f = 0,40$) : 0,12 % Pic 4 ($R_f = 0,70$) : 0,00 %</p> |

Ce nouvel essai a effectivement montré un effet de matrice beaucoup plus important lorsque l'histidine, mélangée à un extrait organique d'*A. oroides*, est déposée sur HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium plutôt que sur plaque de verre. Sur feuille d'aluminium, la radioactivité de l'acide aminé a été détecté du dépôt jusqu'à la moitié de la migration et un pic radioactif détaché de la traînée, à un R_f correspondant à celui du Pic 4 (**Tableau 36**), a également été détecté (cf. **Partie expérimentale** p.308). Ainsi, le Pic 4 de la phase organique dessalée de l'éponge A9 (**Tableau 36**) pourrait être dû au précurseur radiomarqué. Si cette hypothèse s'avère exacte, il est cependant étrange de ne pas retrouver la traînée radioactive, due à l'entraînement de la [U-¹⁴C]-L-histidine, du dépôt jusqu'à la moitié de la migration.

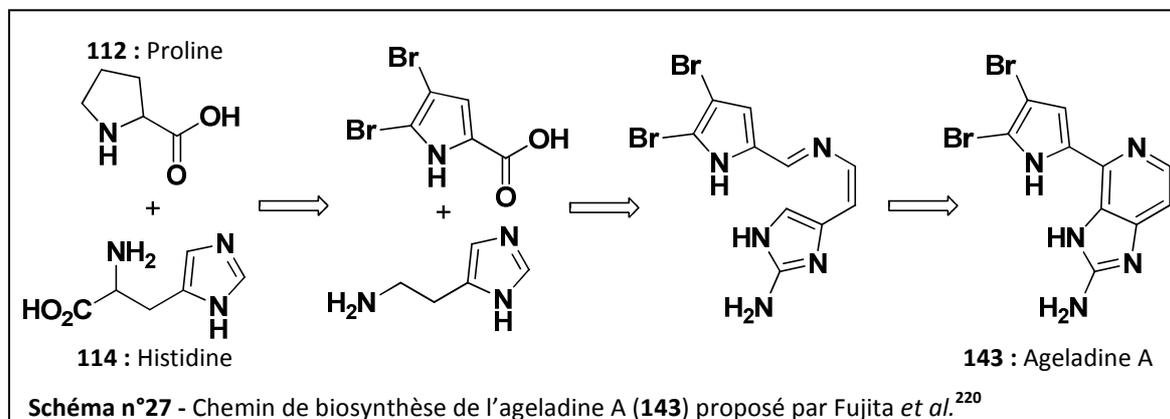
Néanmoins, la radioactivité associée au Pic 4 diminue fortement après un jour de métabolisation jusqu'à sa disparition après 15 jours de métabolisation. Si le Pic 4 correspond effectivement au précurseur radiomarqué, la décroissance de sa radioactivité semble justifiée. La diminution de la radioactivité du Pic 4 est liée à l'apparition de nouveaux pics radioactifs. En effet, à partir de 3 jours de métabolisation, un nouveau pic radioactif apparaît (Pic 2, R_f = 0,30) et la radioactivité associée à ce pic semble augmenter après 8 jours de métabolisation. Au bout de 8 jours de métabolisation, une nouvelle zone radioactive est également détectée (Pic 3, R_f = 0,40) et s'intensifie après 15 jours de métabolisation. Enfin, le pourcentage d'incorporation de la radioactivité associée à ces deux pics comparée à celle incorporée dans l'éponge, semble diminuer après 22 jours de métabolisation. Il est possible que, du fait du turnover des métabolites marqués par l'histidine, une partie des molécules radiomarquées par la [U-¹⁴C]-L-histidine aient été libérées et renouvelées par des molécules non radioactive.

Ainsi, l'analyse des deux cinétiques de métabolisation étudiées a montré deux profils de métabolisation différents. La proline a été incorporée dans les P2AI ayant un rapport frontal aux alentours de 0,70 dans le système d'éluants choisi et le taux d'incorporation a augmenté avec le temps de métabolisation. En revanche, hormis après 1 jour de métabolisation, la radioactivité détectée dans les phases organiques des éponges incubées avec la [U-¹⁴C]-L-histidine ne correspond pas à ce rapport frontal. Entre 1 et 22 jours de métabolisation, les métabolites marqués par l'histidine n'ont pas la même polarité et la décroissance de pics radioactifs au profit d'autres pics radioactifs pourrait mettre en évidence un chemin biosynthétique incluant différents intermédiaires avancés.

III.9. Conclusion et perspectives

Les expériences de biosynthèse des pyrrole-2-aminoimidazoles, réalisées *in vivo* sur le modèle *Agelas oroides*, ont permis d'éliminer l'arginine et l'ornithine des précurseurs potentiels. La non-métabolisation de l'arginine est conforme aux résultats d'Andrade *et al.* obtenus par l'étude de biosynthèse de la stevensine (**111**) à partir d'une culture cellulaire d'*Axinella corrugata*.²⁰³ En revanche, les auteurs ont montré une incorporation de l'ornithine dans la stevensine (**111**) alors que les expériences de biosynthèse des P2AI dans *A. oroides* n'ont pas mis en évidence l'incorporation de cet acide aminé dans les métabolites secondaires de l'éponge. Nous n'expliquons pas cette différence de résultats.

D'après nos expériences, **seules l'histidine et la proline ont effectivement été utilisées dans le métabolisme secondaire de l'éponge**. Ces résultats sont tout à fait compatibles avec l'hypothèse de biosynthèse d'un dérivé de l'oroïdine, l'ageladine A (**143**), proposée par Fujita et al. (Schéma n°27).²²⁰



Grâce à une expérience de cinétique de métabolisation de la proline, son incorporation dans les P2AI de l'éponge, notamment dans l'oroïdine (**60**) au bout de 22 jours de métabolisation a été démontré pour la première fois. Nous nous sommes aperçus au cours de cette étude qu'un jour ne suffit pas pour avoir une incorporation notable, mais que 22 jours ont été nécessaires dans ce cas, ce qui donne des indications sur la cinétique de métabolisation des métabolites secondaires d'*A. oroides*. Très peu marquée après un jour de métabolisation, l'oroïdine (**60**) a concentré 0,29 % de la radioactivité ajoutée par le précurseur après 22 jours de métabolisation.

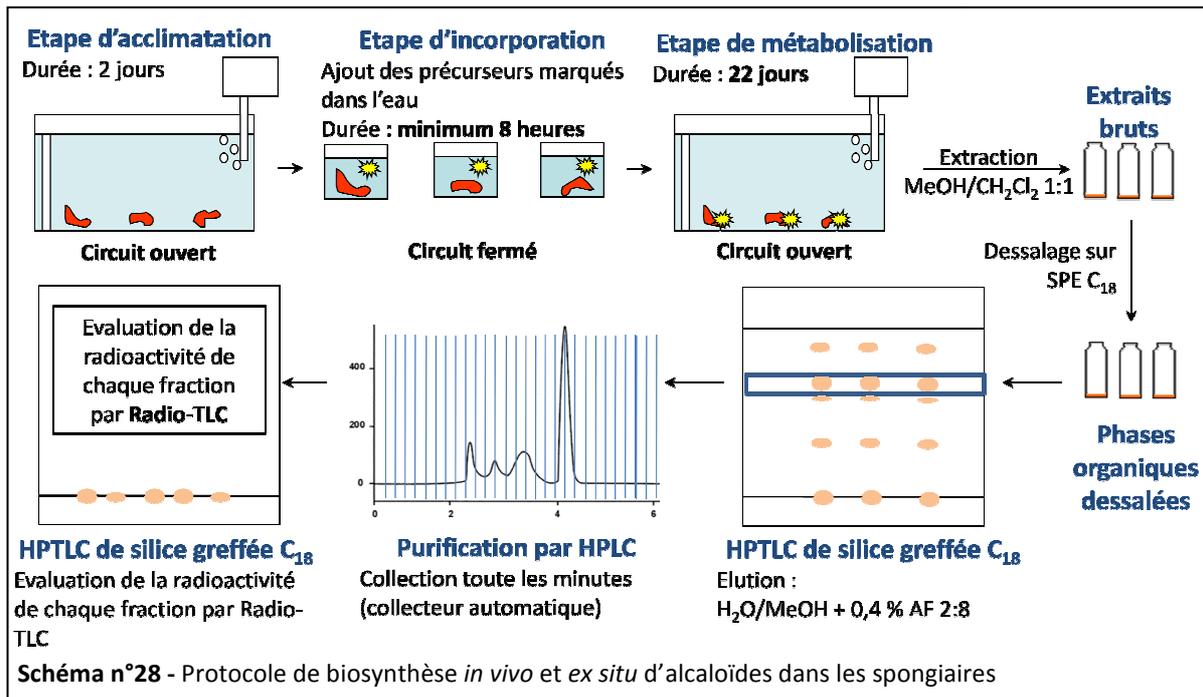
La cinétique de métabolisation de la [U-¹⁴C]-L-histidine a également confirmé son utilisation dans le métabolisme secondaire de l'éponge. En revanche, le profil de cinétique, très différent de celui obtenu avec la [U-¹⁴C]-L-proline, semble indiquer une incorporation de l'histidine dans des métabolites différents de ceux marqués par la [U-¹⁴C]-L-proline. Afin de déterminer l'origine de la radioactivité des phases organiques des éponges incubées avec la [U-¹⁴C]-L-histidine, une purification des différentes zones radioactives détectées est envisagée.

De plus, par l'étude du modèle *Agelas oroides* et grâce à l'exploitation des performances du Radio-TLC, le protocole de biosynthèse mis en place a permis l'utilisation de 10 à 100 fois moins de précurseur radioactif que dans la majorité des expériences de biosynthèse de métabolites marins publiées. En plus de la diminution de coût entraîné par la diminution de la radioactivité nécessaire des précurseurs, le fait d'utiliser un Radio-TLC à la place d'un compteur β à scintillation liquide généralement utilisé, permet des temps de comptage beaucoup plus courts et aucune utilisation de scintillant toxique. En effet, grâce au Radio-TLC, la radioactivité associée à plusieurs échantillons peut être évaluée au cours d'une même analyse. Par la séparation des métabolites sur CCM, ce comptage permet également de mieux cibler les zones radioactives et ainsi se limiter à la purification des métabolites d'intérêt. Les comptages par Radio-TLC ne nécessitent pas de scintillant, très nocif pour l'environnement, seuls quelques millilitres de solvants sont utilisés lors de la migration de la CCM.

²²⁰ Fujita, M. ; Nakao, Y. ; Matsunaga, S. ; Seiki, M. ; Itoh, Y. ; Yamashita, J. ; Van Soest, R.W.M. ; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15700-15701.

Enfin, cet appareil de mesure est non destructif : les échantillons analysés peuvent être récupérés à la suite de l'analyse par simple grattage de la CCM. Ainsi, l'utilisation du Radio-TLC semble vouée à un avenir prometteur dans les études de biosynthèse.

Les neuf expériences de biosynthèse décrites dans ce manuscrit nous ont permis d'élaborer un protocole efficace pour les études de la biosynthèse *in vivo* et *ex situ* d'alcaloïdes de type P2AI dans les spongiaires. Il est résumé dans le **Schéma n°28** ci-après.



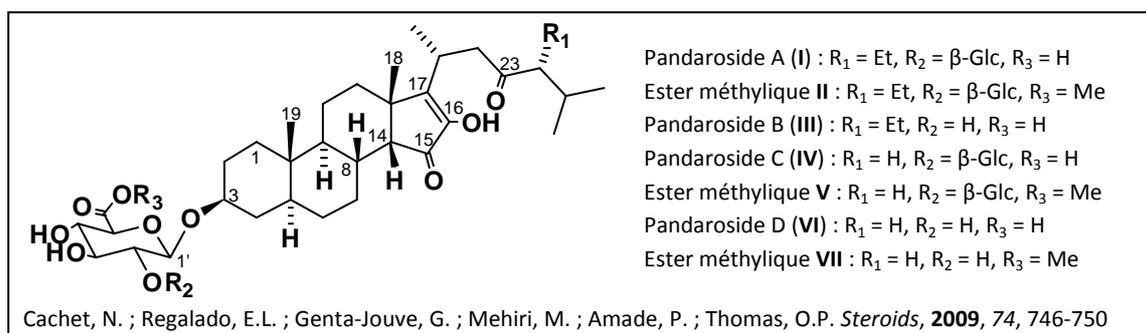
Conclusion générale

Les substances naturelles ont toujours intéressé les scientifiques de par leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques, l'originalité de leurs structures mais aussi pour leur rôle écologique dans la Nature. Mes travaux de thèse décrits dans ce manuscrit sont un exemple concret de la chimiodiversité présente dans la Nature, et plus particulièrement dans les invertébrés marins.

En effet, sur trois invertébrés marins étudiés, 27 molécules dont 15 molécules nouvelles ont été isolées et caractérisées.

Ainsi, l'étude chimique de l'éponge caraïbe *Pandaros acanthifolium*, a permis l'isolement et la caractérisation d'une nouvelle famille de saponines stéroïdiennes dont l'originalité réside en la présence d'un noyau 2-hydroxycyclopent-2-énone, la présence d'une cétone en C-23 et la configuration *cis* de la jonction de cycles C/D :

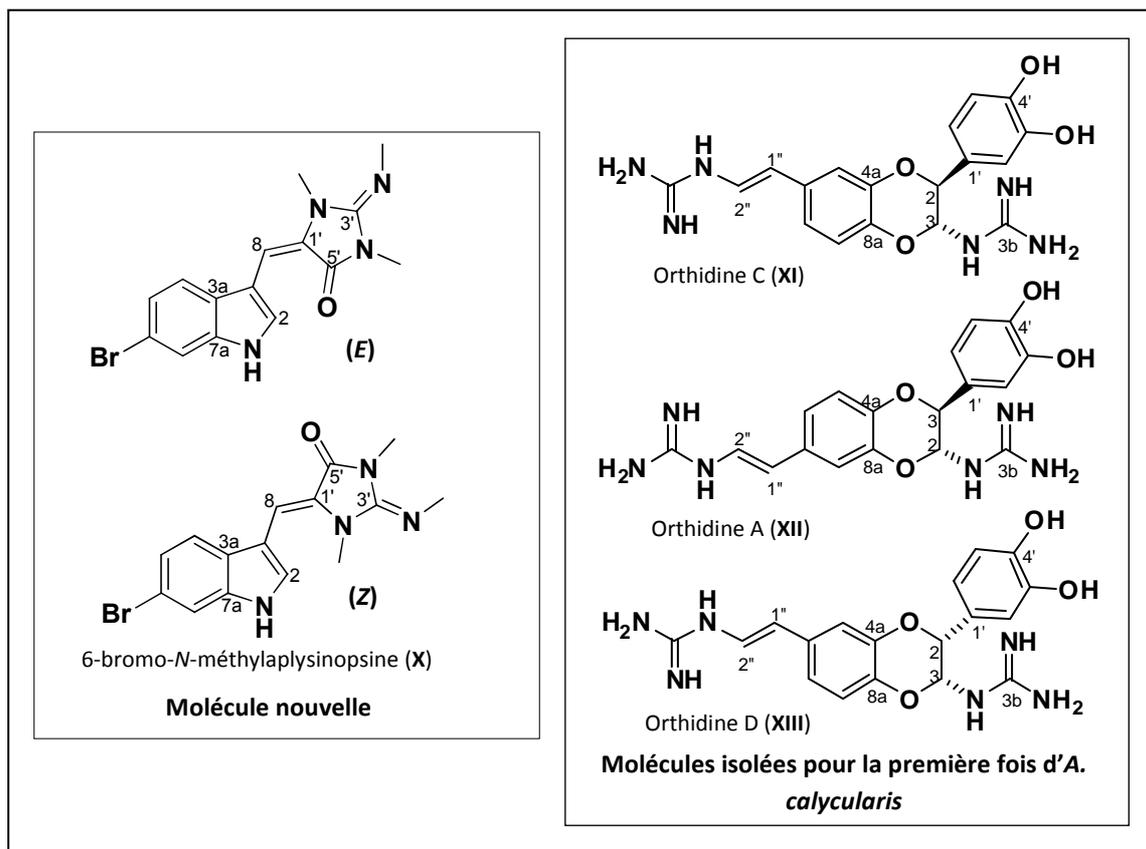
227



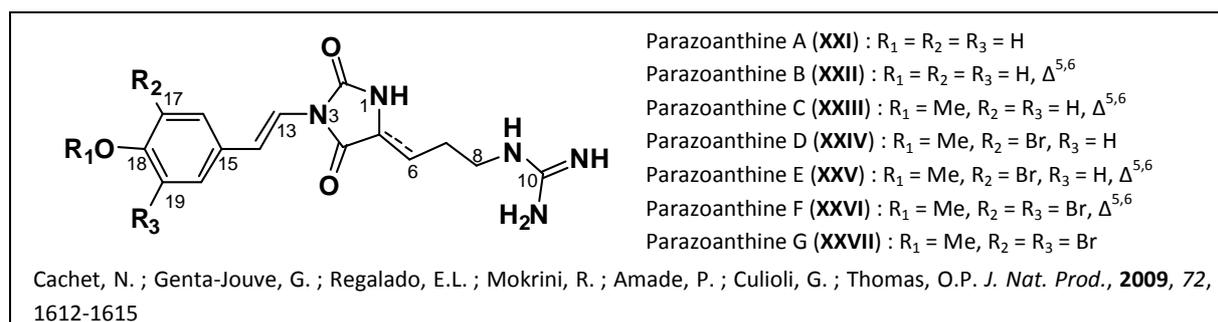
Cette étude chimique ne nous a pas permis de déterminer d'où provient la cytotoxicité de son extrait brut. Cependant, la multitude de saponines stéroïdiennes isolées de cette éponge (sept décrites dans ce manuscrit et 14 en cours d'élucidation structurale) ont obligatoirement une signification écologique qu'il serait intéressant de découvrir. Kubanek *et al.* ont montré qu'une faible différence de structure moléculaire de saponines proches des pandarosides en affecte la fonction écologique.²²¹ Le panel de pandarosides produits par l'éponge lui permet certainement de répondre à des activités écologiques diverses.

L'étude chimique du corail *Astroides calycularis* a permis l'isolement de six molécules dont une nouvelle aplysinopsine et trois orthidines, dimères de tubastrine, isolées pour la première fois de ce corail. Le fait d'avoir isolé des dimères de tubastrine rapproche chimiquement ce corail méditerranéen des coraux du genre *Tubastrea*, morphologiquement proches d'*A. calycularis* et plus présents dans les zones tropicales. Ces ressemblances morphologiques et chimiques pourraient s'expliquer par l'adaptation du corail méditerranéen aux zones plus tropicales à travers les coraux du genre *Tubastrea*.

²²¹ Kubanek, J. ; Whalen, K.E. ; Engel, S. ; Kelly, S.R. ; Henkel, T.P. ; Fenical, W. ; Pawlik, J.R. *Oecologia*, **2002**, *131*, 125-136.



Enfin, l'étude chimique des anémones *Parazoanthus axinellae* a permis l'isolement de 14 molécules dont une nouvelle famille de sept alcaloïdes nommées parazoanthines, dont l'originalité réside dans la présence d'un noyau hydantoïne disubstitué en N-3 et C-5 :



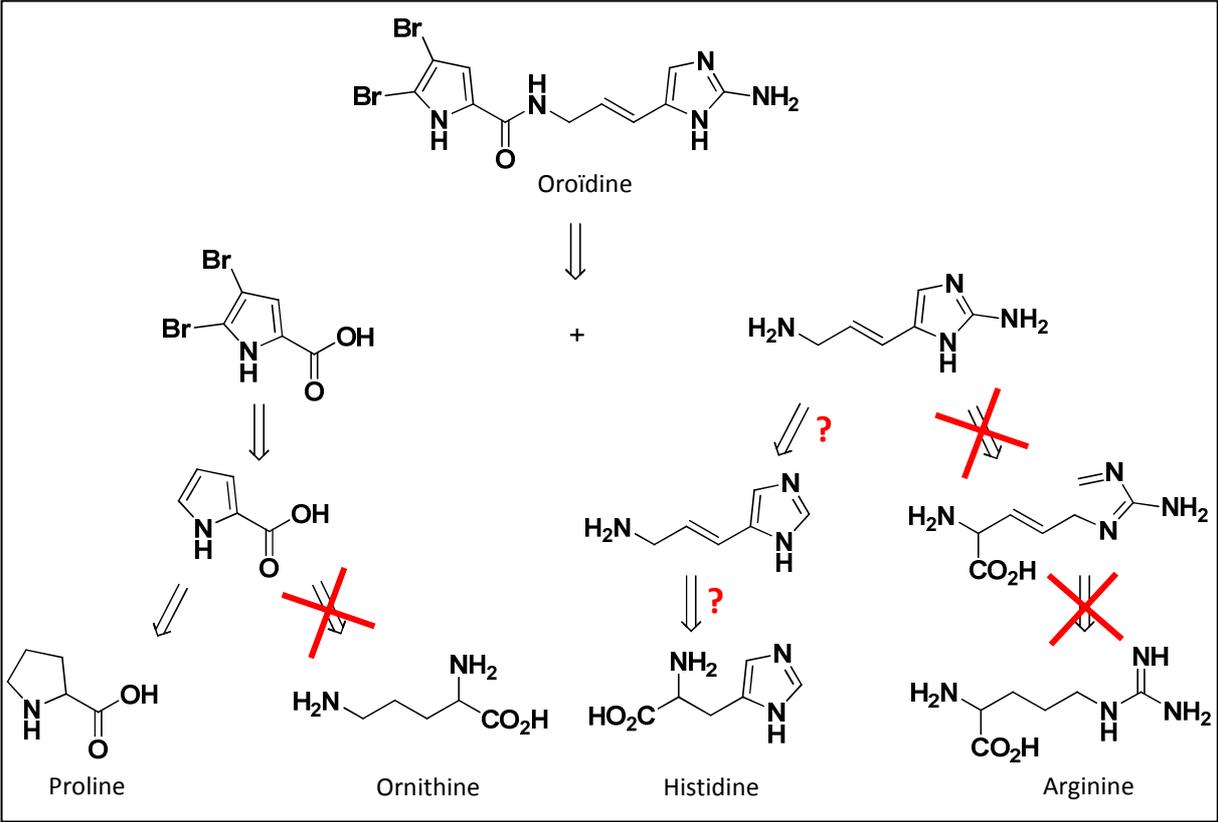
La caractérisation de cette nouvelle famille d'alcaloïdes nous a également permis de différencier deux morphes de *P. axinellae* par leur profil chimique. Ainsi, par l'isolement des parazoanthines et la distinction chimique de deux morphotypes, le travail entrepris sur *P. axinellae* a mis en évidence que les études chimiques peuvent être un outil supplémentaire dans la contribution à la taxonomie. L'isolement de cette nouvelle famille d'alcaloïdes a également montré la richesse chimique des invertébrés marins méditerranéens, souvent délaissés au profit d'espèces plus exotiques.

Les études de biosynthèse d'alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazole (P2AI) sur le modèle *Agelas oroides* ont permis de mettre au point un nouveau protocole de biosynthèse optimisant la quantité de précurseur nécessaire. En effet, par le protocole mis en place, seulement 1 à 2 μCi de précurseurs sont suffisants pour détecter une incorporation dans les métabolites biosynthétisés, alors que la majorité des études de biosynthèse *in vivo* de produits naturels marins menées jusqu'à ce jour en requière de 20 à 250 μCi .

L'originalité du protocole mis au point réside en l'exploitation des capacités du Radio-TLC, permettant de diminuer les temps de comptage des échantillons et de cibler plus rapidement les métabolites radiomarqués par les précurseurs. Ces analyses sont non destructives, ce qui est un avantage sur les compteurs β à scintillation liquide. Ainsi, l'utilisation d'un Radio-TLC comme appareil d'analyse dans les études de biosynthèse, actuellement très peu utilisé à ces fins, semble vouée à un avenir prometteur.

Par ce protocole, les études de la biosynthèse des P2AI d'*A. oroides* ont exclu deux précurseurs potentiels : l'arginine et l'ornithine. Ces deux acides aminés n'ont montré aucune incorporation dans les métabolites secondaires de l'éponge. En revanche, comme le met en évidence le schéma rétro-biosynthétique ci-après, la proline a été confirmée comme précurseur des P2AI et l'histidine fortement suggérée. Une cinétique de métabolisation de la proline par *A. oroides* a également mis en avant l'importance du temps de métabolisation sur le taux d'incorporation de la radioactivité dans le(s) métabolite(s) ciblé(s) : aucune radioactivité n'est associée à l'oroïdine après 1 jour de métabolisation alors qu'après 22 jours de métabolisation, cette dernière concentre 0,29 % de la radioactivité incorporée par l'éponge. Ce résultat, directement lié au turnover des métabolites, montre l'importance de prendre ce facteur en considération.

La cinétique de métabolisation de l'histidine n'a pas permis de conclure quant à son incorporation dans l'oroïdine et/ou les P2AI préalablement marqués par la proline. La purification des métabolites radiomarqués par la $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -L-histidine est envisagée.



Partie expérimentale

Table des matières

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| I. OUTILS CHROMATOGRAPHIQUES | 235 |
| I.1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE | 235 |
| I.2. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR COLONNES OUVERTES | 235 |
| I.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE..... | 236 |
| II. OUTILS SPECTROSCOPIQUES | 236 |
| II.1. RESSONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE | 236 |
| II.2. SPECTROMETRIE DE MASSE..... | 237 |
| II.3. SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION..... | 237 |
| II.4. SPECTROMETRIE UV | 237 |
| II.5. SPECTROMETRIE IR | 237 |
| II.6. POUVOIR ROTATOIRE | 237 |
| II.7. DICHROÏSME CIRCULAIRE..... | 238 |
| III. BIOSYNTHESE..... | 238 |
| III.1. COMPTEUR BETA A SCINTILLATION LIQUIDE | 238 |
| III.2. RADIO-TLC | 238 |
| III.3. PRECURSEURS RADIOACTIFS | 238 |
| PARTIE A : ETUDE CHIMIQUE DE L'EPONGE CARAÏBE PANDAROS ACANTHIFOLIUM..... | 239 |
| I. PANDAROSIDE A (I)..... | 240 |
| II. ESTER METHYLIQUE DU PANDAROSIDE A (II) | 245 |
| III. PANDAROSIDE B (III) | 249 |
| IV. PANDAROSIDE C (IV)..... | 252 |
| V. ESTER METHYLIQUE DU PANDAROSIDE C (V)..... | 255 |
| VI. PANDAROSIDE D (VI) | 257 |
| VII. ESTER METHYLIQUE DU PANDAROSIDE D (VII)..... | 261 |
| PARTIE B : ETUDE CHIMIQUE DE DEUX CNIDAIRES MEDITERRANEENS | 263 |
| I. ASTROIDES CALYULARIS | 263 |
| I.1. LA FAMILLE DES APLYSINOPSINES | 264 |
| I.1.1. L'aplysinsopine (VIII)..... | 264 |
| I.1.2. La 6-bromoaplysinsopine (IX) | 265 |
| I.1.3. La 6-bromo-N-isométhylaplysinsopine (X), molécule nouvelle..... | 266 |
| I.2. LA FAMILLE DES ORTHIDINES..... | 270 |
| I.2.1. L'orthidine C (XI) | 270 |
| I.2.2. L'orthidine A (XII) | 271 |
| I.2.3. L'orthidine D (XIII)..... | 272 |
| II. PARAZOANTHUS AXINELLAE | 273 |
| II.1. LES MOLECULES CONNUES | 274 |
| II.1.1. La famille des zoanthoxanthines | 274 |
| II.1.1.1. La zoanthoxanthine (XIII, 53) | 274 |
| II.1.1.2. La paragrachine (XV, 51) | 274 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.1.1.3. La 3H-norpseudozoanthoxanthine (XVI) | 275 |
| II.1.2. La famille des ecdystéroïdes | 276 |
| II.1.2.1. La 20-hydroxyecdysone (XVII) | 276 |
| II.1.2.2. L'acétate de 20-hydroxyecdysone-2-yle (XVIII) | 277 |
| II.1.2.3. L'acétate de 20-hydroxyecdysone-3-yle (XIX) | 279 |
| II.1.2.4. La viticostérone E (XX) | 280 |
| II.2. LES MOLECULES NOUVELLES | 281 |
| II.2.1. Parazoanthine A (XXI) | 281 |
| II.2.2. Parazoanthine B (XXII) | 285 |
| II.2.3. Parazoanthine C (XXIII) | 289 |
| II.2.4. Parazoanthine D (XXIV) | 291 |
| II.2.5. Parazoanthine E (XXV) | 294 |
| II.2.6. Parazoanthine F (XXVI) | 297 |
| II.2.6. Parazoanthine G (XXVII) | 299 |
| PARTIE C : BIOSYNTHESE ET METABOLISME SECONDAIRE DES P2AI DANS AGELAS OROIDES | 301 |
| I. COURBE D'ETALONNAGE POUR MESURE DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS BRUTS D'A. OROIDES PAR COMPTEUR B A SCINTILLATION LIQUIDE | 301 |
| II. DETERMINATION DU SEUIL DE SENSIBILITE EN ¹⁴ C DES APPAREILS DE COMPTAGE | 302 |
| II.1. Compteur β à scintillation liquide | 303 |
| II.2. Radio-TLC sur HPTLC de silice | 304 |
| II.3. Radio-TLC sur HPTLC de silice greffée C ₁₈ | 305 |
| III. EFFET DE MATRICE DES EXTRAITS ORGANIQUES D'A. OROIDES SUR LA PROLINE ET L'HISTIDINE | 306 |
| III.1. Sur HPTLC de silice sur plaque de verre | 306 |
| III.2. Sur HPTLC de silice greffée C ₁₈ sur plaque de verre | 307 |
| III.3. Sur HPTLC de silice greffée C ₁₈ sur feuille d'aluminium | 308 |
| IV. PROTOCOLE D'EXTRACTION | 309 |
| V. PROTOCOLE DE DESSALAGE | 309 |

I. Outils chromatographiques

I.1. Chromatographie sur Couche Mince

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de verre ou d'aluminium recouvertes de gel de silice ou de gel de silice greffée C₁₈.

Pour l'analyse des fractions obtenues lors de l'étude chimique des spongiaires et cnidaires, les CCM utilisées ont été de type analytique, 20x20 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 F254 (Merck).

L'élution a été réalisée par deux systèmes de solvants suivants : Dichlorométhane/ Méthanol (9:1 ou 95:5) ou Acétate d'éthyle/Cyclohexane (3:7) ; et le révélateur choisi a été un révélateur universel composé de : Anisaldéhyde/Acide sulfurique à 97 %/Acide acétique/Méthanol (5:5:1:89).

Pour les études de biosynthèse, plusieurs types de CCM ont été utilisés :

- CCM Partisil® en canaux, avec zone de pré-migration, 20x20 cm, 19 canaux, 0,25 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 (Merck) ;
- CCM préparatives, 20x20 cm, 2,0 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 F254 (Merck).
- HPTLC, 10x5 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 F254 (Merck) ;
- HPTLC Partisil® KC18, 20x20 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, silice greffée C₁₈, Si60 (F254 (Whatman) ;
- HPTLC Alugram® RP-18W, 20x20 cm, 0,15 mm d'épaisseur sur plaque d'aluminium, silice greffée C₁₈, Si60 F254 (Macherey-Nagel) ;

L'éluant choisi a été de type CTZZ : Acétate d'éthyle/Acétone/Eau/Acide formique (5:3:0,5:0,5).

I.2. Chromatographie Liquide sur colonnes ouvertes

Les colonnes ouvertes de chromatographie flash ont été réalisées sur gel de silice greffée Diol (40-63 µm LiChroprep, Merck) et gel de silice greffée C₁₈ (40-63 µm, SDS). Les solvants d'élution proviennent de la société SDS.

Les extraits bruts ont été fractionnés par chromatographie liquide sous vide. L'extrait a été déposé sur un tamis de silice greffée C₁₈ sous forme de dépôt solide. Il a ensuite été élué par chaque système de solvants par aspiration à l'aide d'une fiole à vide. La phase solide a été séchée entre chaque éluant.

Les colonnes SPE (Solid Phase Extraction) utilisées pour le dessalage des extraits bruts sont de petites cartouches manufacturées de type Strata-C₁₈-E (Phenomenex™), d'une contenance de 12 mL compactées avec 2g de silice greffée C₁₈ (55 µm, 70 Å).

I.3. Chromatographie Liquide Haute Performance

Les profils HPLC analytiques et les purifications semi-préparatives ont été réalisés sur deux chaînes HPLC Waters gérées par le logiciel Empower.

Elles sont équipées de :

- Une pompe 600E ;
- Un injecteur automatique 717 Plus ;
- Un détecteur à barrettes de diodes 996 ou 998 ;
- Un détecteur évaporatif à diffusion de lumière Sedex 55 ou 75.

Les colonnes analytiques et semi-préparatives utilisées sont les suivantes :

- Gemini C₆-Phenyl (3 x 250 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Gemini C₆-Phenyl (10 x 250 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Luna Phenyl-Hexyl (4,6 x 150 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Luna Phenyl-Hexyl (10 x 250 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Luna C₁₈ (4,6 x 150 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Luna C₁₈ (10 x 250 mm ; 5 μm) Phenomenex™ ;
- Atlantis C₁₈ (10 x 250 mm ; 5 μm) Waters™ ;
- Symmetry C₁₈ (7,8 x 300 mm ; 7 μm) Waters™.

Les systèmes d'éluants HPLC ont été composés d'eau Milli-Q et de solvants organiques de qualité HPLC Grade (Sigma-Aldrich et SDS).

II. Outils spectroscopiques

II.1. Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres RMN ont été obtenus sur un appareil Bruker Avance 500 MHz. Les solvants deutérés (CDCl₃ δ_H = 7,26 ppm, δ_C = 77,1 ppm ; CD₃OD δ_H = 3,31 ppm, δ_C = 49,0 ppm ; DMSO-*d*₆ δ_H = 2,50 ppm, δ_C = 39,5 ppm) ont été fournis par Sigma-Aldrich et Euriso-top. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au solvant deutéré utilisé comme étalon interne. Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en Hertz et leur multiplicité est indiquée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

II.2. Spectrométrie de Masse

Le spectromètre de masse utilisé est appareil Bruker Esquire 3000 Plus équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI) et d'un analyseur de type Trappe Ionique.

Les analyses HPLC-MS ont été réalisées sur ce spectromètre de masse couplé à une chaîne HPLC Alliance (Waters 2695) équipée d'un détecteur UV à deux longueurs d'onde (Waters 2487).

II.3. Spectrométrie de Masse Haute Résolution

237

Les analyses HR-MS ont été réalisées sur deux appareils différents :

- LCDECA XP, ThermoFinnigan (ESI Orbitrap), Faculté de Médecine de Nice ;
- LCT, Waters-micromass (ESI TOF), ICSN, Gif-Sur-Yvette.

II.4. Spectrométrie UV

Les spectres UV ont été obtenus par un spectrophotomètre UV-Visible Cary 300 Scan (Varian). L'analyse UV en HPLC a été faite à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes (96 ou 2998) permettant de connaître le spectre UV à chaque instant du chromatogramme.

II.5. Spectrométrie IR

Les spectres Infra Rouge ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR. Les échantillons en solution dans le CH_2Cl_2 ont été déposés sur pastille de bromure de potassium, puis séchés.

II.6. Pouvoir rotatoire

Les mesures du pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ ont été faites sur deux polarimètres différents :

- Bellingham ADP220 ; et,
- Perkin Elmer 343.

Quel que soit l'appareil, le solvant utilisé pour les mesures a été le méthanol de qualité HPLC grade.

II.7. Dichroïsme Circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été obtenus à l'aide d'un spectropolarimètre J-810 (Jasco). Les échantillons ont été solubilisés dans le méthanol de qualité HPLC grade. Un pelletier Pie-423s a permis de contrôler la température de la cellule.

III. Biosynthèse

238

III.1. Compteur Bêta à scintillation liquide

Durant les expériences de biosynthèse, la radioactivité de l'eau et des extraits bruts d'*Agelas oroides* a été mesurée sur deux appareils différents :

- Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 1600TR, Packard ; et,
- Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 2900TR, Perkin-Elmer.

Le mélange scintillant utilisé a été l'Ultima Gold™ (Perkin Elmer). Pour 2 mL d'échantillon, 10 mL de scintillant ont été ajoutés avant le comptage.

III.2. Radio-TLC

L'activité des plaques CCM sur lesquelles ont été déposés les échantillons radioactifs, a été évaluée par un Radio-TLC RITA Star (Raytest).

III.3. Précurseurs radioactifs

Les précurseurs utilisés lors des expériences de biosynthèse sont les suivants :

- [U-¹⁴C]-L-arginine, fournie par Perkin Elmer ;
- [U-¹⁴C]-L-histidine, fournie par Hartmann Analytic ;
- [1-¹⁴C]-L-ornithine, fournie par Hartmann Analytic ; et,
- [U-¹⁴C]-L-proline, fournie par Ge Healthcare.

PARTIE A : Etude chimique de l'éponge caraïbe *Pandaros acanthifolium*

Un spécimen de *Pandaros acanthifolium* a été récolté au large des côtes de l'île de la Martinique (Canyons de Babodie 14°45,982 N, 61°11,902 W) durant l'été 2003. Le spécimen a immédiatement été congelé à -18 °C jusqu'à son extraction en décembre 2006. L'éponge a été identifiée par J. Vacelet et un échantillon de référence (ORMA8362) a été déposé au Centre d'Océanographie de Marseille (Endoume, France).

L'éponge humide (350 g) a été coupée en morceaux d'environ 1 cm³ puis extraite par le système de solvant MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 5x1000 mL) à température ambiante. L'extrait brut ainsi obtenu (13 g) a été soumis à une chromatographie liquide sous vide sur phase silice greffée C₁₈. L'élution a été réalisée par un système de solvants de polarité décroissante de H₂O/MeOH 1:0 à 0:1 puis de MeOH/CH₂Cl₂ 1:0 à 0:1 (500 mL par système de solvant). La fraction F3 (H₂O/ MeOH 1:3, 269 mg) a été fractionnée sur colonne ouverte de silice greffée C₁₈ (H₂O/MeOH de 95:5 à 0:100). La fraction F3-f4 (H₂O/MeOH 1:4, 195 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative (Phenomenex™, Luna C₁₈, 10x250 mm, 5 µm) en utilisant un gradient H₂O/MeOH/TFA (débit : 3,0 mL.min⁻¹, de 72:28:0,1 à 20:80:0,1 en 30 minutes). Les composés ainsi récoltés ont été re-purifiés sur HPLC analytique (Phenomenex™, Gemini C₆-Phenyle, 3x250 mm, 5 µm) en isocratique (débit : 0,5 mL.min⁻¹, H₂O/CH₃CN/Acide formique 60:40:0,1), permettant d'obtenir le pandaroside A (**I**, 3,5 mg, 10⁻³ % de la masse humide) et son ester méthylique (**II**, 4,8 mg, 1,4.10⁻³ % de la masse humide), le pandaroside B (**III**, 5,7 mg, 1,6.10⁻³ % de la masse humide), le pandaroside C (**IV**, 1,7 mg, 0,5.10⁻³ % de la masse humide) et son ester méthylique (**V**, 1,2 mg, 0,3.10⁻³ % de la masse humide), ainsi que le pandaroside D (**VI**, 1,8 mg, 0,5.10⁻³ % de la masse humide) et son ester méthylique (**VII**, 2,0 mg, 0,6.10⁻³ % de la masse humide).

I. Pandaroside A (I)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyl-(1→2)-β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-poriferast-16-ene-15,23-dione

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +19,1^\circ$ (c 0,19, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (4,38) nm ; **CD** (MeOH, c $3,8 \times 10^{-4}$ M) θ (λ_{\max} nm) -5,5 (220), +10,2 (262), -7,5 (289), +2,5 (327) mdeg ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3496, 1692, 1640, 1199, 1132 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (-)** m/z 795,4214 [M-H]⁻ (Δ 5,9 ppm pour C₄₁H₆₃O₁₅⁻).

240

Molécule :

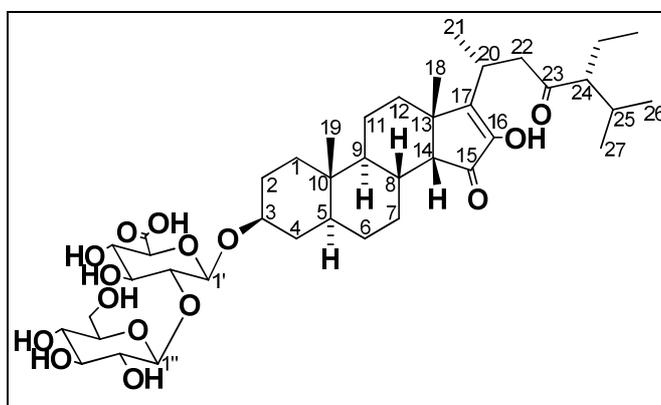
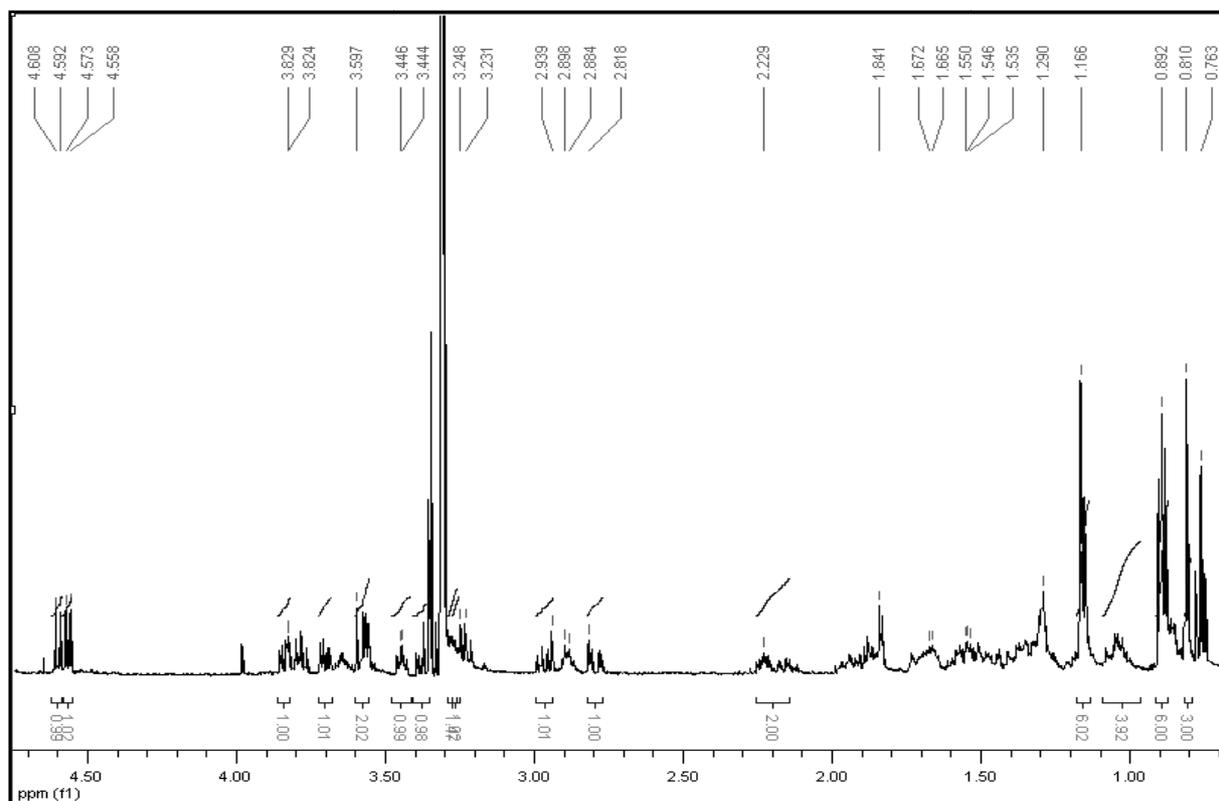
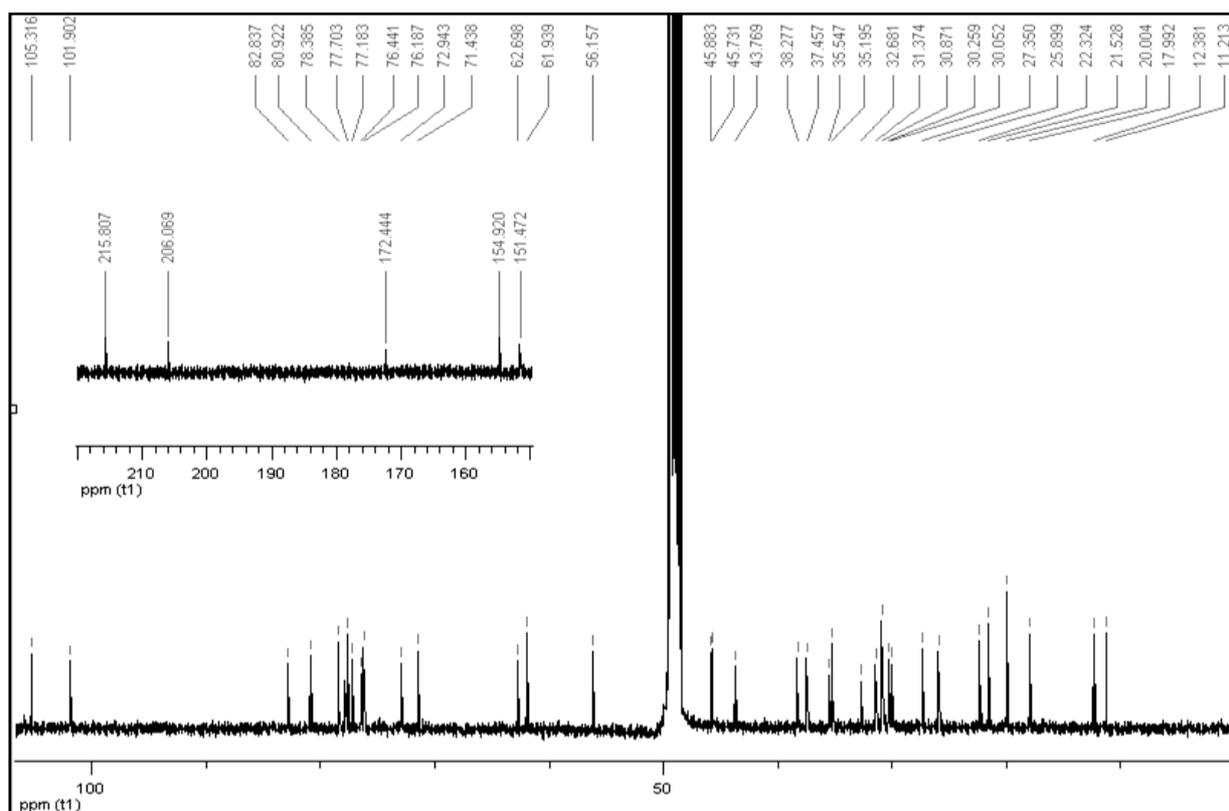


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

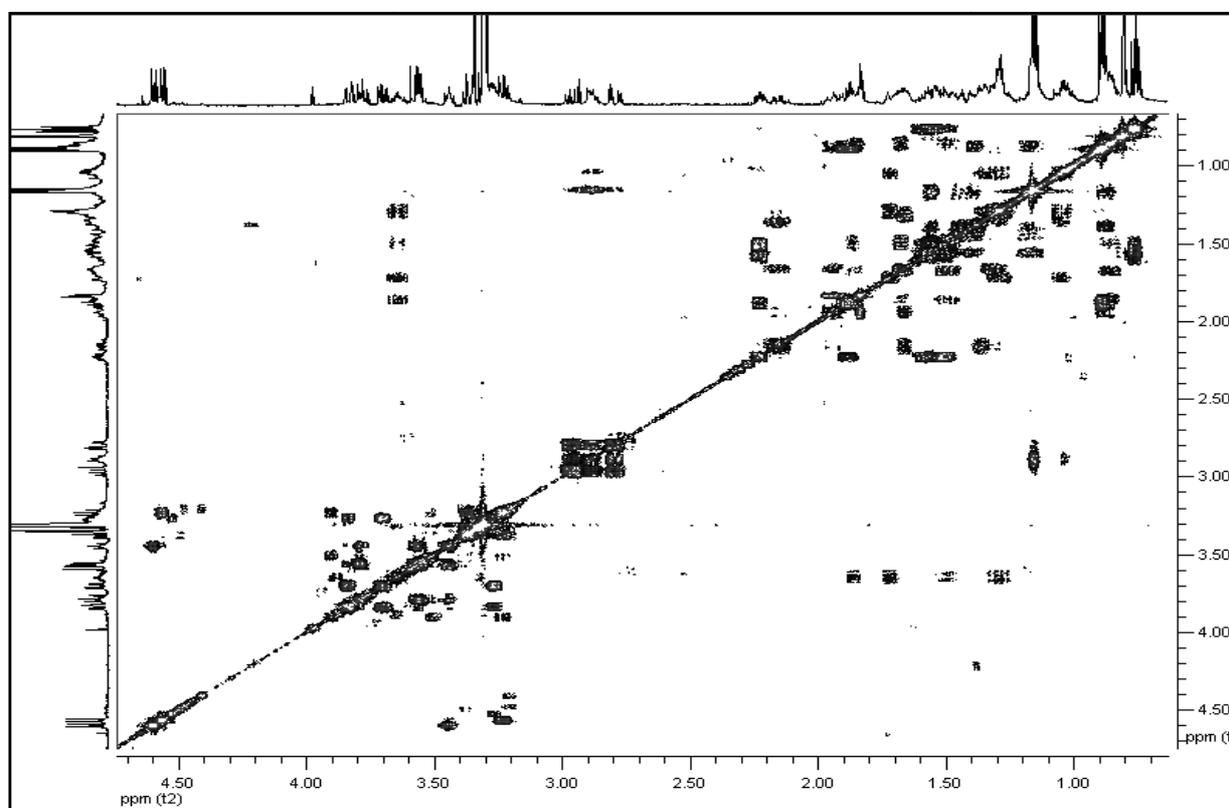
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) | NOESY |
|----|------------|-----------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 37,5 | CH ₂ | 0,86 (m) 1,68 (m) | 1α/β, 2α, 2β | 5, 19 | 1β, 2α 1α |
| 2 | 30,1 | CH ₂ | 1,49 (m) 1,86 (m) | 1α, 1β, 2α/β, 3 | - | 19 1β, 1', 3 1' |
| 3 | 80,9 | CH | 3,64 (tt ; 11,5 ; 4,5) | 2α, 2β, 4α, 4β | 1', 4β | 1' |
| 4 | 35,5 | CH ₂ | 1,28 (m) 1,72 (m) | 3, 4α/β, 5 | - | 4α, 19 1', 3, 4β, 5 |
| 5 | 45,7 | CH | 1,04 (m) | 4α, 4β, 6α, 6β | 3, 4, 6, 19 | 4α, 6α, 7α, 8 |
| 6 | 30,3 | CH ₂ | 1,30 (m) 1,35 (m) | 5, 6α/β, 7α, 7β | 7α | 19 5, 19 7α, 8 |
| 7 | 31,4 | CH ₂ | 1,66 (m) 2,17 (qd ; 12,5 ; 4,5) | 6α, 6β, 7α/β, 8 | 6β, 14 | 5, 7β, 9 5, 7β, 11α, 11β, 18, 19 |
| 8 | 35,2 | CH | 1,94 (m) | 7α, 7β, 9, 14 | 7α, 14 | 7α |
| 9 | 45,9 | CH | 0,88 (m) | 8, 11α, 11β | 7α, 8, 14, 19 | 7α |
| 10 | 38,3 | Cq | - | - | 5, 6, 19 | - |
| 11 | 20,0 | CH ₂ | 1,17 (m) 1,39 (m) | 9, 11α/β, 12α, 12β | 9 | 12α, 12β 8, 18 |
| 12 | 32,7 | CH ₂ | 1,47 (m) 1,55 (m) | 11α, 11β, 12α/β | 18 | - 11β, 18 |
| 13 | 43,8 | Cq | - | - | 14, 18, 20, 21 | - |
| 14 | 56,2 | Cq | 1,83 (d ; 4,5) | 8 | 7β, 8, 9, 18 | 18 |
| 15 | 206,1 | Cq | - | - | 14 | - |
| 16 | 151,4 | Cq | - | - | 20 | - |
| 17 | 154,9 | Cq | - | - | 12, 14, 18, 20, 21, 22 | - |
| 18 | 25,9 | CH ₃ | 1,17 (s) | - | 14 | 8, 11α, 14 |

| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) | NOESY |
|-----------------|------------|-----------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 19 | 11,2 | CH ₃ | 0,81 (s) | - | - | 2 β , 4 β , 6 α , 6 β , 8 |
| 20 | 27,4 | CH | 2,88 (m) | 21, 22a, 22b | | 21, 24 |
| 21 | 18,0 | CH ₃ | 1,15 (d ; 7,0) | 20 | 20, 22 | 20, 22a, 22b |
| 22 | 49,0 | CH ₂ | 2,79 (dd ; 17,5 ; 4,5) 2,96 (dd ; 17,5 ; 9,0) | 20, 22a/b | 20, 21 | 21, 22a, 24, 25 21, 22b, 24, 25 |
| 23 | 215,8 | Cq | - | - | 20, 22, 241, 25 | - |
| 24 | 61,9 | CH | 2,23 (ddd ; 10,0 ; 7,5 ; 4,0) | 25, 24 ¹ a, 24 ¹ b | 24 ¹ , 24 ² , 25, 26, 27 | 20, 22a, 22b, 25, 26, 27, 24 ¹ , 24 ² |
| 24 ¹ | 22,3 | CH ₂ | 1,51 (m) | 24, 24 ¹ a/b, | 24, 24 ² | 24, 24 ² , 25, 26, 27 |
| | | | 1,57 (m) | 24 ² | | 24, 24 ² , 25, 26, 27 |
| 24 ² | 12,4 | CH ₃ | 0,76 (t ; 7,5) | 24 ¹ a, 24 ¹ b | 24 ¹ | 24, 24 ¹ |
| 25 | 30,8 | CH | 1,88 (m) | 24, 26, 27 | 24 ¹ , 26, 27 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 26, 27 |
| 26 | 20,0 | CH ₃ | 0,89 (d ; 6,5) | 25 | 24, 25, 27 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 25 |
| 27 | 21,5 | CH ₃ | 0,90 (d ; 6,5) | 25 | 24, 25, 26 | 22a, 22b, 24, 24 ¹ , 25 |
| 1' | 101,9 | CH | 4,60 (d ; 7,5) | 2' | 2', 3, 4 β | 2 α , 3, 4 α , 6''a |
| 2' | 82,8 | CH | 3,45 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1', 3' | 1'', 3' | 1'' |
| 3' | 72,9 | CH | 3,57 (t ; 9,5) | 2', 4' | 4' | - |
| 4' | 77,2 | CH | 3,56 (d ; 10,0) | 3', 5' | 3', 5' | - |
| 5' | 76,4 | CH | 3,79 (t ; 9,5) | 4' | 3', 4' | - |
| 6' | 172,4 | Cq | - | - | 5' | - |
| 1'' | 105,3 | CH | 4,56 (d ; 8,0) | 2'' | 2', 2'' | 2', 3'', 5'' |
| 2'' | 76,2 | CH | 3,23 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1'', 3'' | 3'' | 3'' |
| 3'' | 77,7 | CH | 3,37 (t ; 9,0) | 2'', 4'' | 1'', 2'', 4'' | 1'', 2'' |
| 4'' | 71,4 | CH | 3,33 (m) | 3'', 5'' | 3'', 6'' | - |
| 5'' | 78,3 | CH | 3,27 (ddd ; 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | 4'', 6''a, 6''b | 4'', 6'' | 1'', 6''a, 6''b |
| 6'' | 62,7 | CH ₂ | 3,70 (dd ; 11,5 ; 5,0) 3,84 (dd ; 11,5 ; 2,5) | 5'', 6''a/b | 4'', 5'' | 5'', 6''b 1', 5'', 6''a |

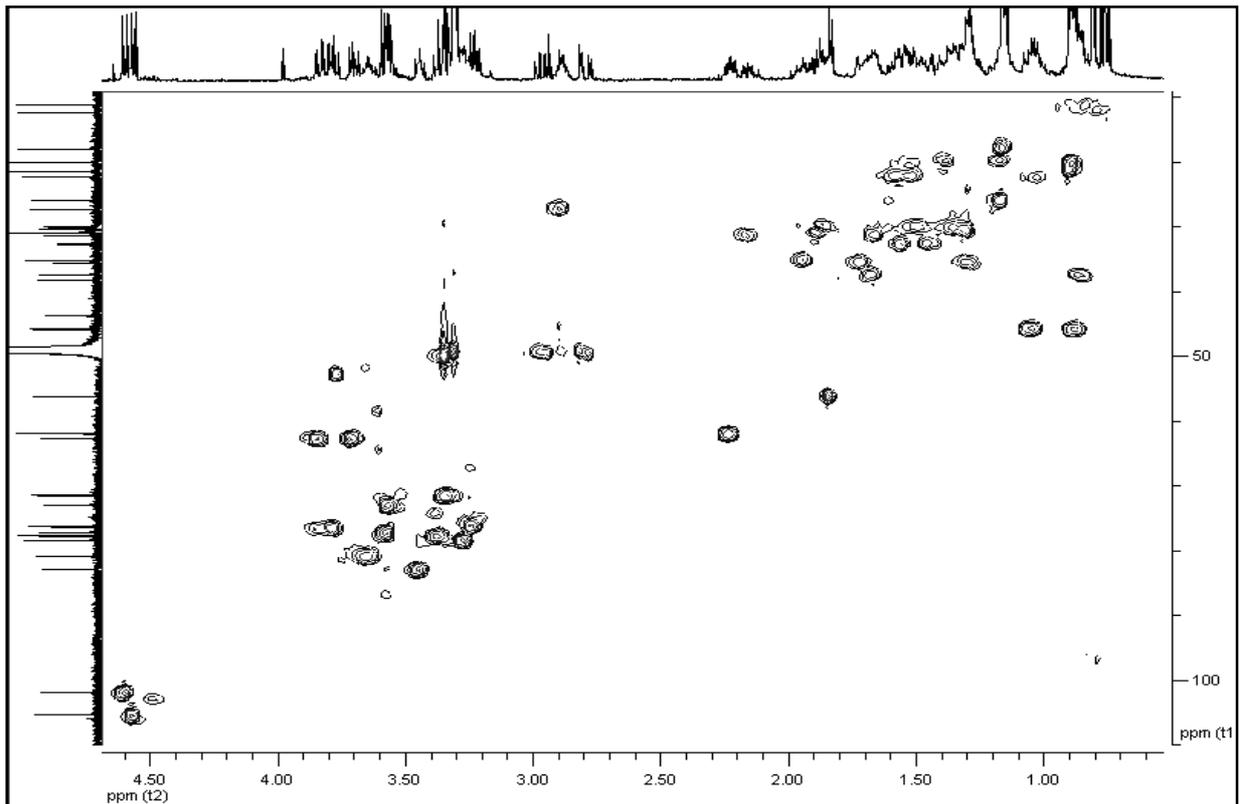
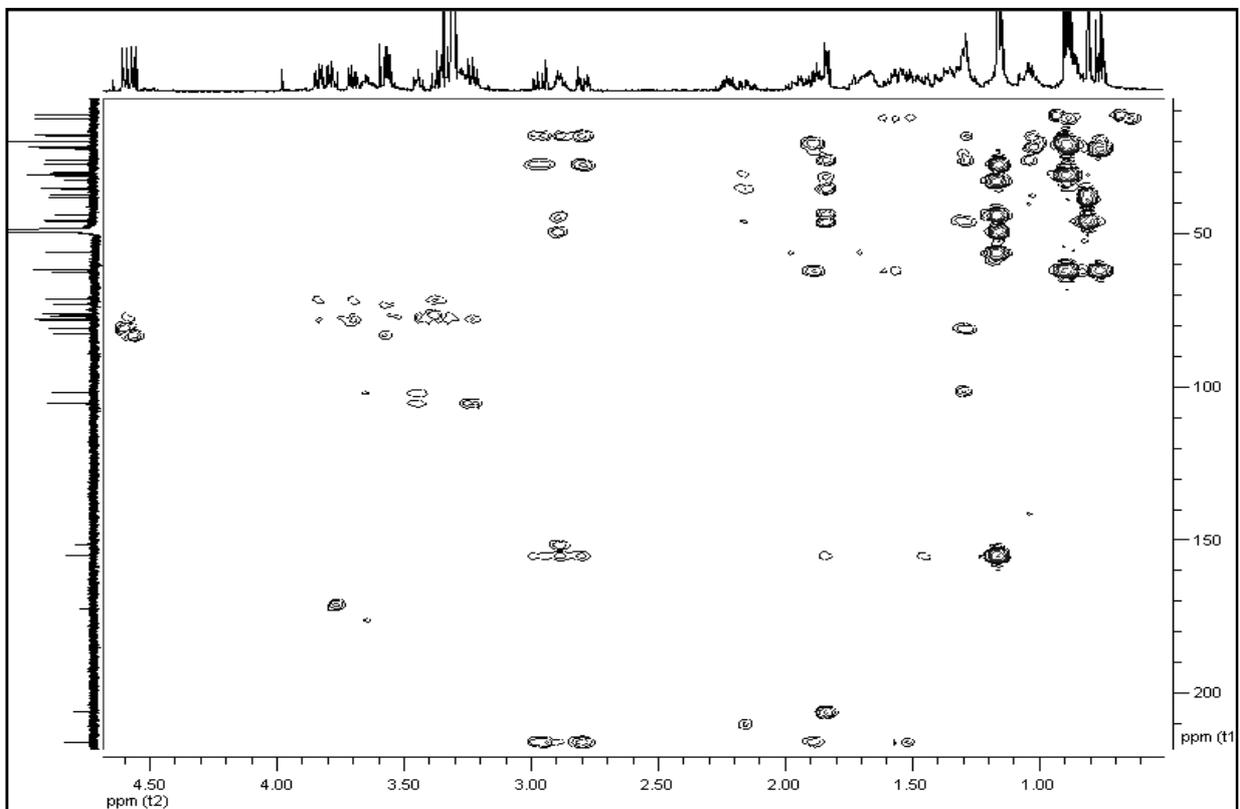
1. Spectre RMN ¹H du Pandaroside A (I), CD₃OD 500 MHz

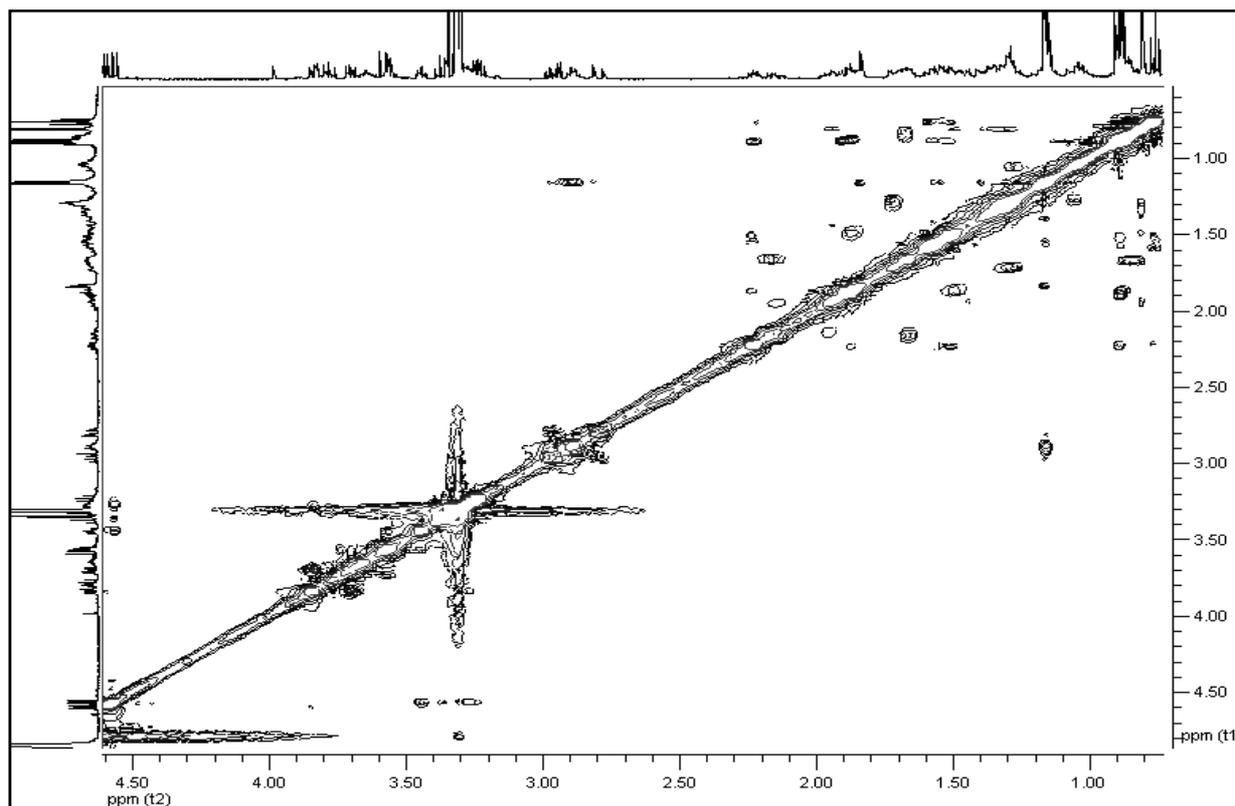


2 Spectre RMN ^{13}C du Pandaroside A (I), CD_3OD 125 MHz



3 Spectre RMN COSY du Pandaroside A (I), CD_3OD

4 Spectre RMN HSQC du Pandaroside A (I), CD₃OD5 Spectre RMN HMBC du Pandaroside A (I), CD₃OD

6 Spectre RMN NOESY du Pandaroside A (I), CD₃OD

Calculs théoriques du dichroïsme circulaire du pandaroside A (I) :

Tous les calculs ont été réalisés à 298 K par le programme Gaussian03. La DFT a été utilisée pour rechercher l'énergie potentielle de surface (PES) au niveau B3LYP/6 + 31G(d) afin d'identifier les conformères. Les géométries des conformères ont été optimisées au niveau B3LYP/6 + 31G(d). La méthode TDDFT a été utilisée pour calculer l'énergie d'excitation (en eV) et la force de rotation R dans les formes de la vitesse du dipôle (R_{vel}) et la longueur de dipôle (R_{len}).

Les forces de rotation calculées ont été simulées en spectre ECD en utilisant la fonction gaussienne suivante :

$$\Delta\varepsilon(E) = \frac{1}{2.297 \times 10^{-39}} \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \sum_i^A \Delta E_i R_i e^{-((E-\Delta E_i)/(2\sigma))^2}$$

σ : Largeur de la bande à la hauteur 1/e.

ΔE_i : Energies d'excitation à une transition i

R_i : Force de rotation à une transition i

$\sigma = 0,20$ eV et R_{vel} ont été utilisés.

II. Ester méthylique du Pandaroside A (II)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyl-(1→2)-β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-poriferast-16-ene-15,23-dione methyl ester

Description : Solide amorphe blanc; $[\alpha]_D^{20} +7.8$ (c 0,27, MeOH). (ESI)MS (+) m/z 811,4 $[M+H]^+$.

Molécule :

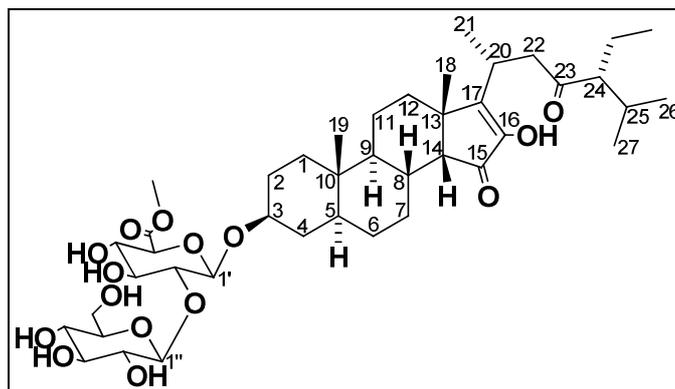
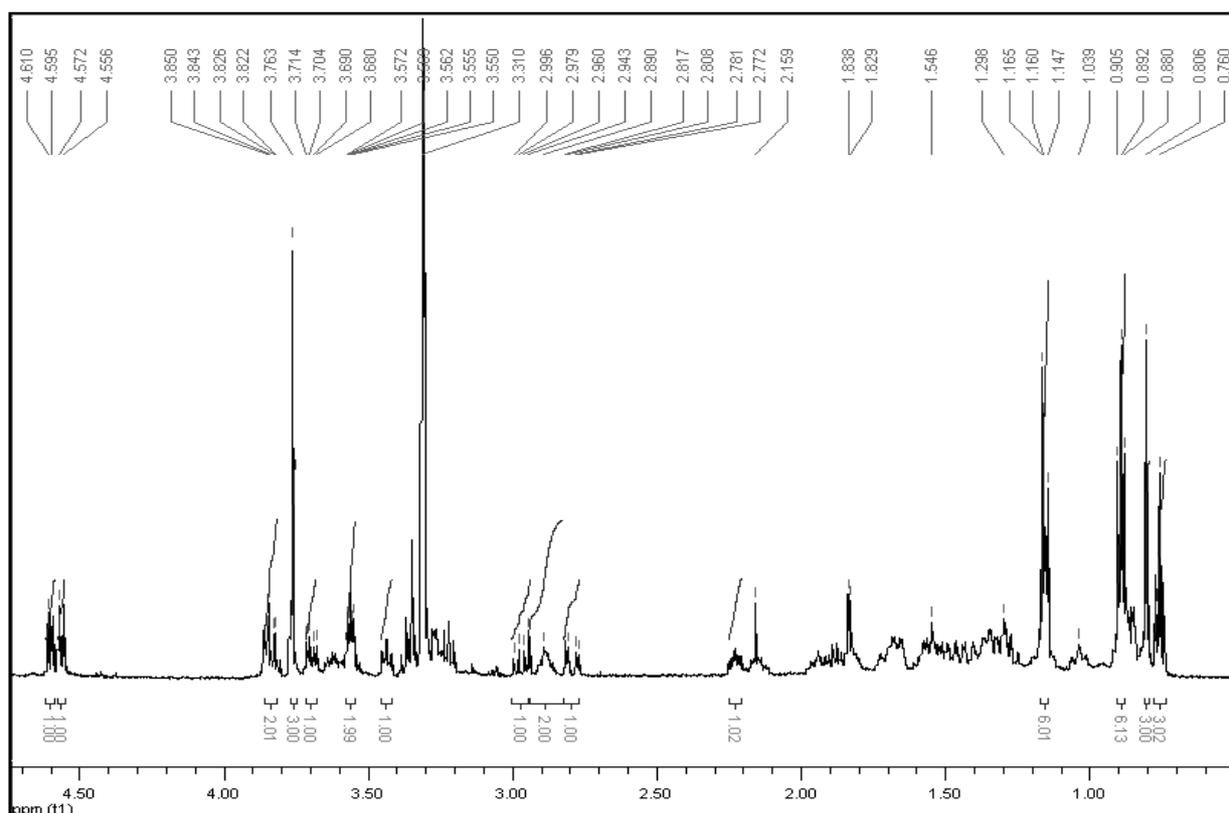
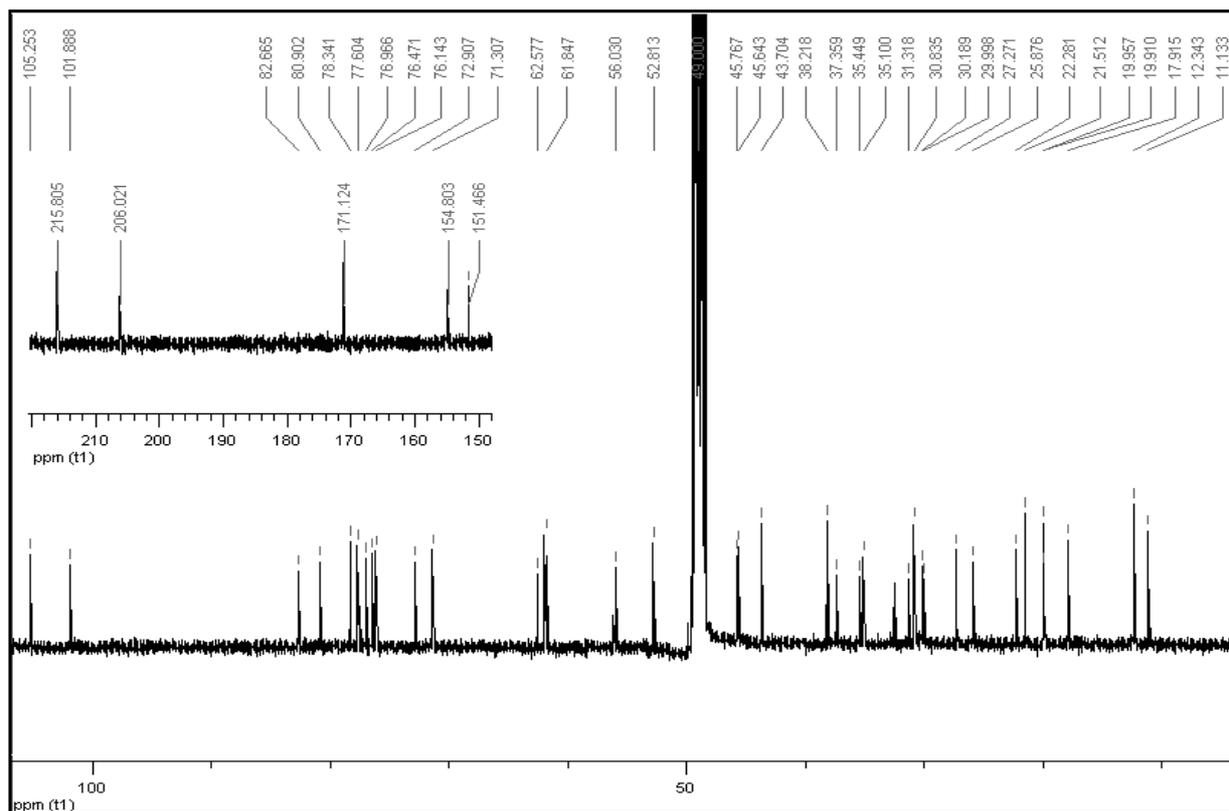
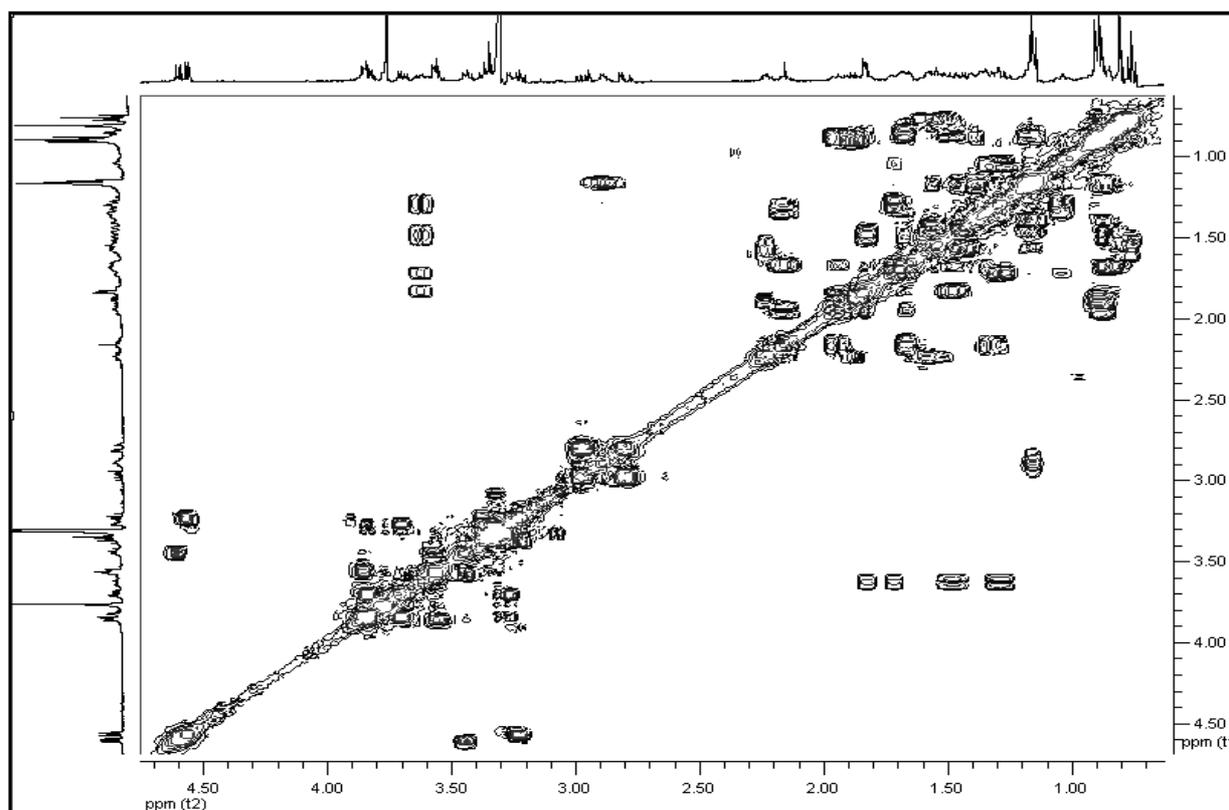


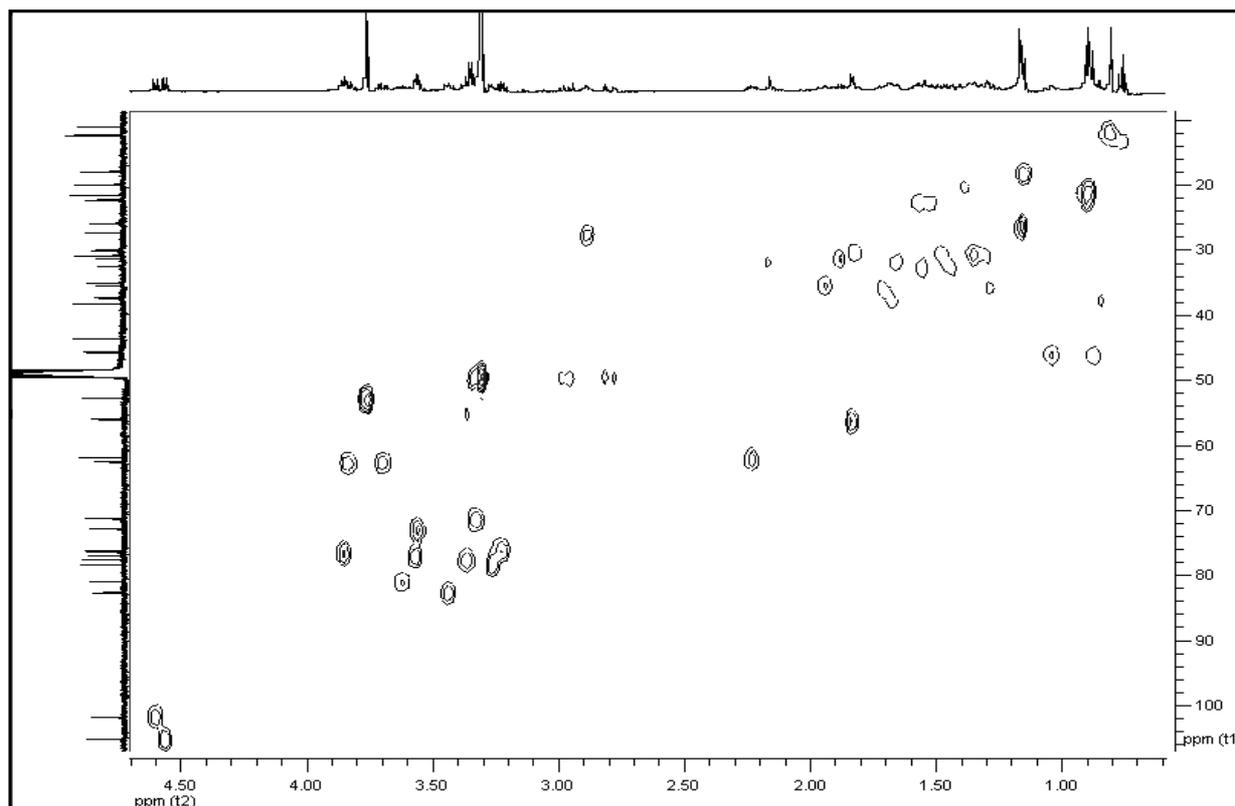
Tableau RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), CD_3OD :

| n° | δ_c | CH_n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) |
|----|------------|---------------|------------------------------------|--------------------|------------------|
| 1 | 37,4 | CH_2 | 0,86 (m) 1,68 (m) 1,49 (m) | 1α/β, 2α, 2β | 19 |
| 2 | 30,0 | CH_2 | 1,83 (m) | 1α, 1β, 2α/β, 3 | - |
| 3 | 80,9 | CH | 3,63 (tt ; 11,5 ; 4,5) | 2α, 2β, 4α, 4β | 1', 4β |
| 4 | 35,4 | CH_2 | 1,28 (m) 1,72 (m) | 3, 4α/β, 5 | - |
| 5 | 45,6 | CH | 1,04 (m) | 4α, 4β, 6α, 6β | 4β, 19 |
| 6 | 30,2 | CH_2 | 1,30 (m) 1,35 (m) | 5, 6α/β, 7α, 7β | - |
| 7 | 31,3 | CH_2 | 1,66 (m) 2,17 (qd ; 12,5 ; 4,5) | 6α, 6β, 7α/β, 8 | 14 |
| 8 | 35,1 | CH | 1,94 (m) | 7α, 7β, 9, 14 | 14 |
| 9 | 45,8 | CH | 0,88 (m) | 8, 11α, 11β | 8, 11α/β, 14, 19 |
| 10 | 38,2 | Cq | - | - | 2α |
| 11 | 19,9 | CH_2 | 1,17 (m) 1,39 (m) 1,44 (m) | 9, 11α/β, 12α, 12β | 9 |
| 12 | 32,5 | CH_2 | 1,56 (m) | 11α, 11β, 12α/β | 11β, 18 |
| 13 | 43,7 | Cq | - | - | 14, 18 |
| 14 | 56,0 | CH | 1,83 (d ; 4,5) | 8 | 9, 18 |
| 15 | 206,0 | Cq | - | - | 14 |
| 16 | 151,5 | Cq | - | - | 20, 21 |
| 17 | 154,8 | Cq | - | - | 12β, 14, 20, 21 |
| 18 | 25,9 | CH_3 | 1,17 (s) | - | 11β, 14 |
| 19 | 11,1 | CH_3 | 0,81 (s) | - | - |
| 20 | 27,3 | CH | 2,88 (m) | 21, 22a, 22b | 21, 22a/b |
| 21 | 17,9 | CH_3 | 1,15 (d ; 7,0) | 20 | 20, 22b |

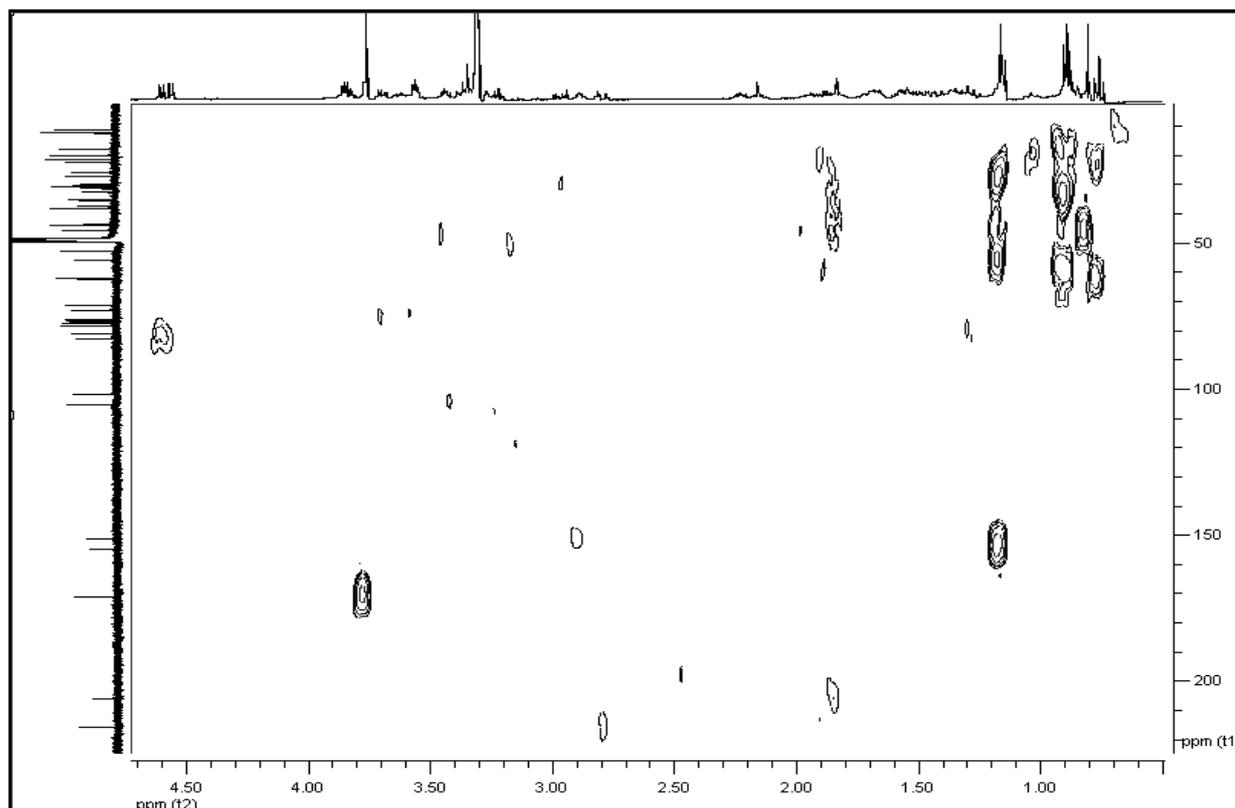
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) |
|-----------------|------------|-----------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 22 | 49,0 | CH ₂ | 2,80 (dd ; 18,0 ; 4,5) 2,97 (dd ; 18,0 ; 8,0) | 20, 22a/b | 20, 21 |
| 23 | 215,8 | Cq | - | - | 22b |
| 24 | 61,8 | CH | 2,23 (ddd ; 10,0 ; 7,5 ; 4,0) | 25, 24 ¹ a, 24 ¹ b | 25, 26, 27, 24 ¹ , 24 ² |
| 24 ¹ | 22,3 | CH ₂ | 1,51 (m) 1,57 (m) | 24, 24 ¹ a/b, 24 ² | 24 ² |
| 24 ² | 12,3 | CH ₃ | 0,76 (t ; 7,5) | 24 ¹ a, 24 ¹ b | 24 ¹ |
| 25 | 30,8 | CH | 1,88 (m) | 24, 26, 27 | 22a/b, 26, 27, 24 ¹ |
| 26 | 20,0 | CH ₃ | 0,89 (d ; 6,5) | 25 | 25, 27 |
| 27 | 21,5 | CH ₃ | 0,90 (d ; 6,5) | 25 | 25, 26 |
| 1' | 101,9 | CH | 4,60 (d ; 7,5) | 2' | 2' |
| 2' | 82,8 | CH | 3,43 (t ; 7,5) | 1', 3' | 1'' |
| 3' | 73,1 | CH | 3,56 (m) | 2', 4' | 2' |
| 4' | 77,1 | CH | 3,56 (m) | 3', 5' | 3' |
| 5' | 76,6 | CH | 3,85 (d ; 9,0) | 4' | 3', 4' |
| 6' | 171,1 | Cq | - | - | 6' ₁ |
| 6' ₁ | 53,0 | CH ₃ | 3,76 (s) | - | - |
| 1'' | 105,2 | CH | 4,56 (d ; 8,0) | 2'' | 2', 2'' |
| 2'' | 76,1 | CH | 3,22 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1'', 3'' | 3'' |
| 3'' | 77,6 | CH | 3,37 (t ; 9,0) | 2'', 4'' | 1'', 4'' |
| 4'' | 71,4 | CH | 3,33 (m) | 3'', 5'' | 3'', 6'' |
| 5'' | 78,3 | CH | 3,27 (ddd ; 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | 4'', 6''a, 6''b | 6'' |
| 6'' | 62,6 | CH ₂ | 3,70 (dd ; 11,5 ; 5,0) 3,84 (dd ; 11,5 ; 2,5) | 5'', 6''a/b | - |

7 Spectre RMN ¹H de l'ester méthylique du Pandaroside A (II), CD₃OD 500 MHz

8 Spectre RMN ^{13}C de l'ester méthylique du Pandaroside A (II), CD_3OD 125 MHz9 Spectre RMN COSY de l'ester méthylique du Pandaroside A (II), CD_3OD



10 Spectre RMN HSQC de l'ester méthylique du Pandaroside A (II), CD₃OD



11 Spectre RMN HMBC de l'ester méthylique du Pandaroside A (II), CD₃OD

III. Pandaroside B (III)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-poriferast-16-ene-15,23-dione

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +12,3^\circ$ (c 0,16, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (3,50) nm ; **CD** (MeOH, c $3,9 \times 10^{-4}$ M) θ (λ_{\max} nm) -3 (220), +10 (262), -4 (285), +4 (327) mdeg ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3338, 1731, 1677, 1199 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (-)** m/z 767,3625 [M-H]⁻ (Δ -1,2 ppm pour C₃₅H₅₄O₁₀⁻).

249

Molécule :

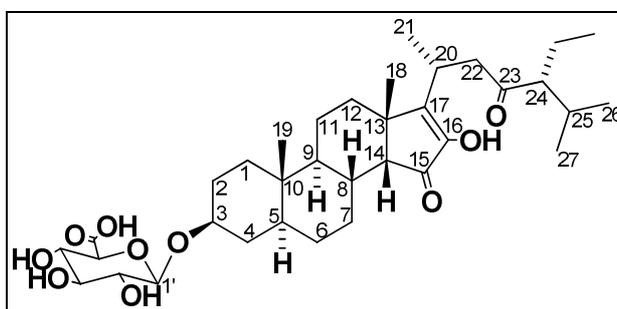
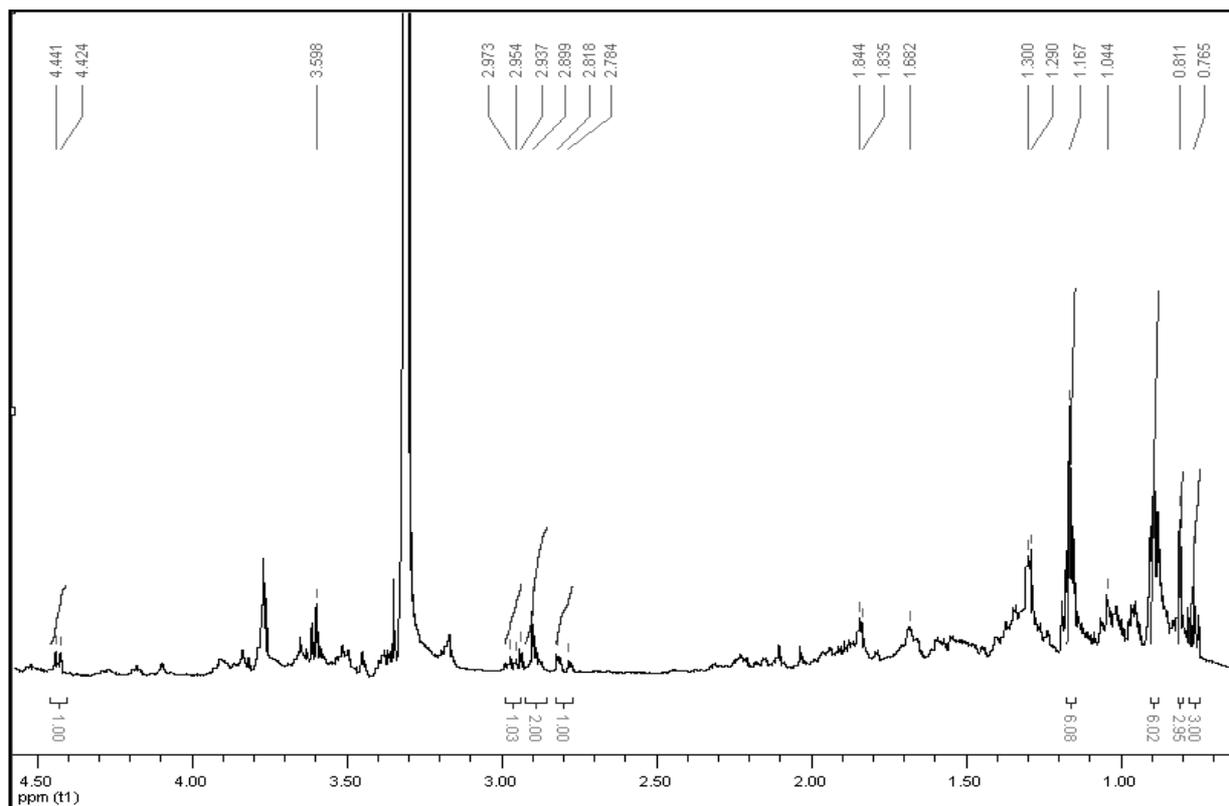
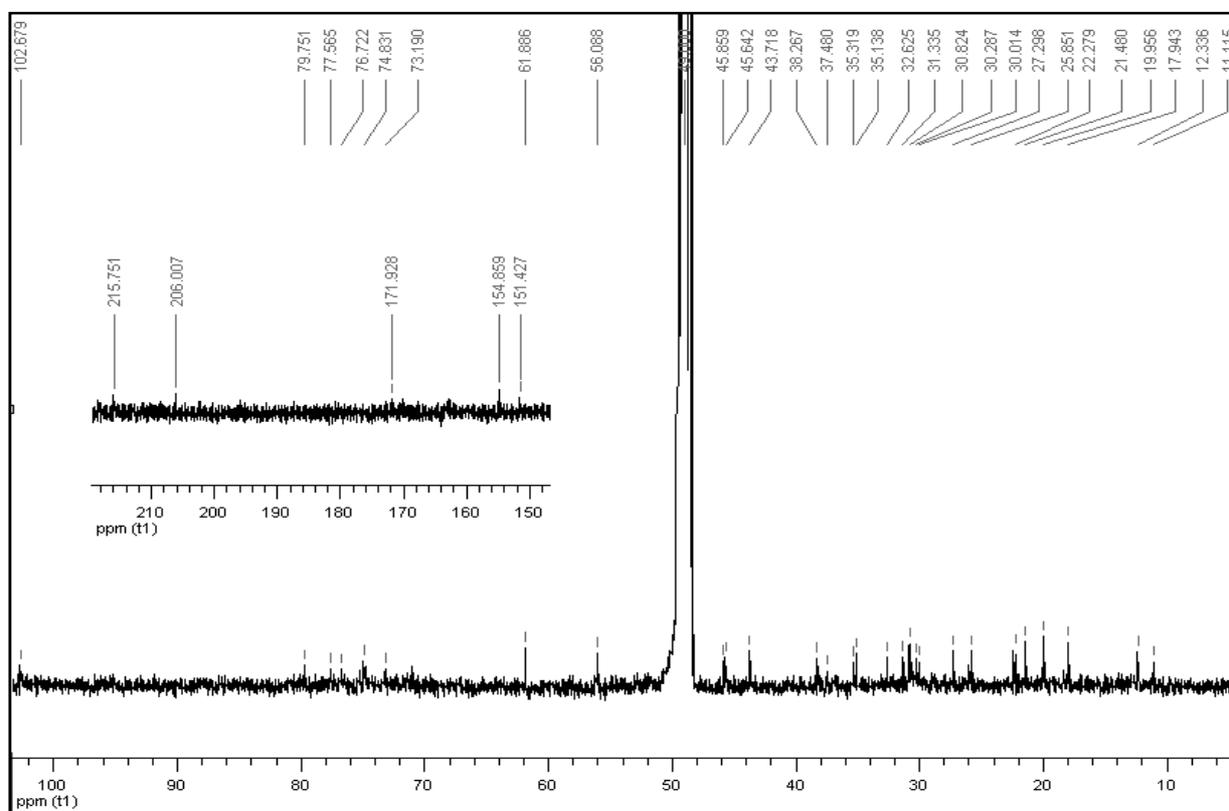


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

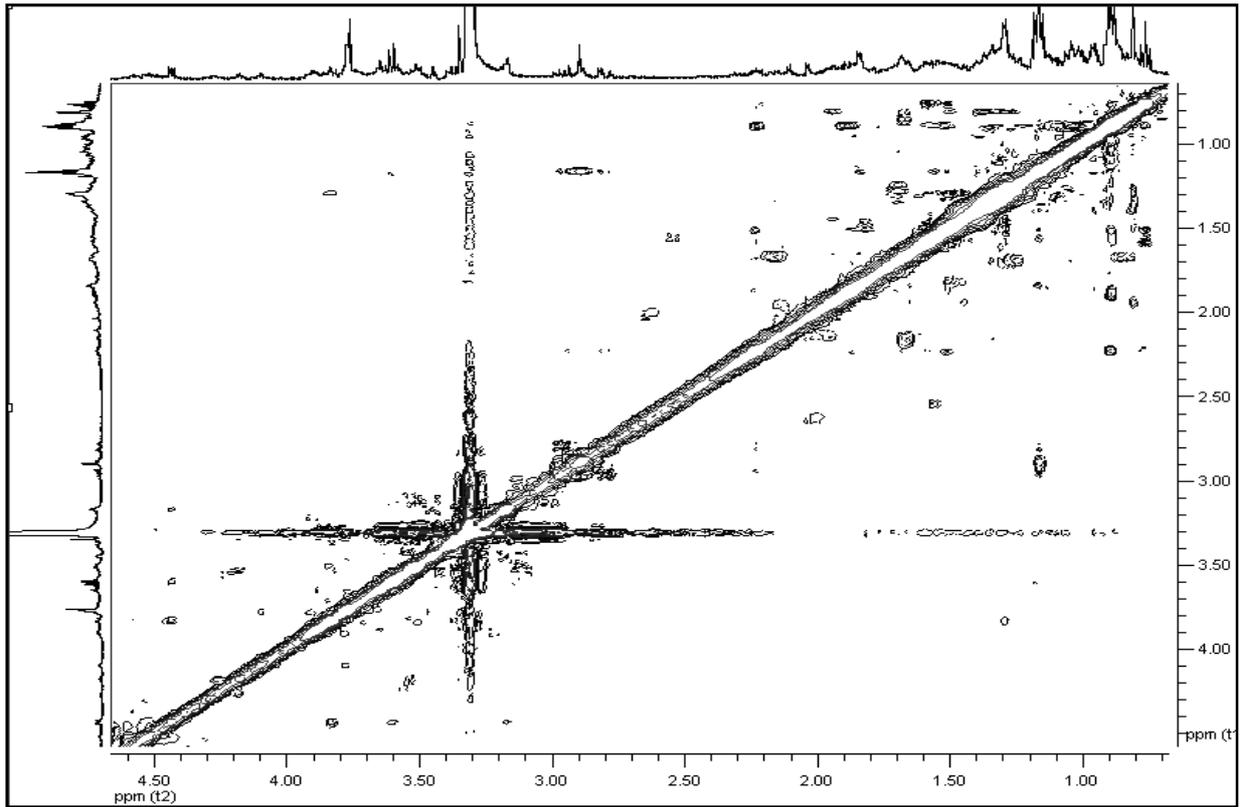
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | NOESY | n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | NOESY |
|----|------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | 37,5 | CH ₂ | 0,86 (m) | 1 α | 19 | 11,2 | CH ₃ | 0,81 (s) | 2 β , 4 β , 8 |
| | | | 1,64 (m) | 1 β , 9 | | | | | |
| 2 | 30,1 | CH ₂ | 1,50 (m) | 2 α , 19 | 20 | 27,3 | CH | 2,83 (m) | 21, 24, 24 ^{1a} |
| | | | 1,83 (m) | 2 β | | | | | |
| 3 | 79,8 | CH | 3,63 (m) | 1' | 21 | 18,0 | CH ₃ | 1,14 (d ; 7,0) | 20, 22a, 22b |
| 4 | 35,4 | CH ₂ | 1,28 (m) | 4 α , 19 | 22 | 49,0 | CH ₂ | 2,79 (dd ; 17,5 ; 4,5) | 21, 22a, 24 |
| | | | 1,72 (m) | 4 β , 5 | | | | | |
| 5 | 45,7 | CH | 1,04 (m) | 4 α , 7 α | 23 | 215,8 | Cq | - | - |
| | | | 1,30 (m) | - | | | | | |
| 6 | 30,3 | CH ₂ | 1,35 (m) | - | 24 | 61,9 | CH ₂ | 2,23 (m) | 20, 22a, 22b, 25, 26, |
| | | | 1,65 (m) | 7 β | | | | | |
| 7 | 31,4 | CH ₂ | 2,17 (m) | 7 α | 24 ¹ | 22,3 | CH ₂ | 1,50 (m) | 20, 24 |
| | | | 1,93 (m) | 18, 19 | | | | | |
| 8 | 35,2 | CH | 0,87 (m) | 1 α | 24 ² | 12,4 | CH ₃ | 0,76 (t ; 7,5) | 24 |
| | | | 1,30 (m) | - | | | | | |
| 9 | 45,9 | CH | 1,15 (m) | - | 25 | 30,9 | CH | 1,88 (m) | 24, 26, 27, 24 ¹ |
| | | | 1,37 (m) | 19 | | | | | |
| 10 | 38,3 | Cq | 1,47 (m) | 14, 18 | 26 | 20,0 | CH ₃ | 0,89 (d ; 6,5) | 24, 25, 24 ¹ |
| | | | 1,55 (m) | 18 | | | | | |
| 11 | 20,0 | CH ₂ | 1,83 (d ; 4,5) | 12 β , 18 | 27 | 21,5 | CH ₃ | 0,90 (d ; 6,5) | 24, 25, 24 ¹ |
| | | | 1,55 (m) | 18 | | | | | |
| 12 | 32,7 | CH ₂ | - | - | 1' | 102,7 | CH | 4,43 (d ; 8,0) | 2', 3, 4 α |
| | | | 1,55 (m) | 18 | | | | | |
| 13 | 43,8 | Cq | - | - | 2' | 74,8 | CH | 3,18 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1' |
| 14 | 56,2 | CH | 1,83 (d ; 4,5) | 12 β , 18 | 3' | 77,6 | CH | 3,36 (t ; 9,0) | - |
| | | | 1,55 (m) | 18 | | | | | |
| 15 | 206,1 | Cq | - | - | 4' | 73,2 | CH | 3,51 (t ; 9,0) | 5' |
| 16 | 151,5 | Cq | - | - | 5' | 76,6 | CH | 3,78 (d ; 9,5) | 1', 4' |
| | | | - | - | | | | | |
| 17 | 154,9 | Cq | - | - | 6' | 171,9 | Cq | - | - |
| | | | - | - | | | | | |
| 18 | 25,9 | CH ₃ | 1,15 (s) | 8, 14 | | | | | |



12 Spectre RMN du Pandaroside B (III), CD₃OD 500 MHz



13 Spectre RMN ¹³C du Pandaroside B (III), CD₃OD 125 MHz



14 Spectre RMN NOESY du Pandaroside B (III), CD₃OD

IV. Pandaroside C (IV)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyl-(1→2)-β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-cholest-16-ene-15,23-dione

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +35,2^\circ$ (c 0,10, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (3,42) nm ; **CD** (MeOH, c $3,9 \times 10^{-4}$ M) θ (λ_{\max} nm) -8 (220), +7 (262), -3 (285), +4 (330) mdeg ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3385, 1679, 1201, 1176 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (-)** m/z 767,3834 [M-H]⁻ (Δ -1,9 ppm pour C₃₉H₅₉O₁₅⁻).

252

Molécule :

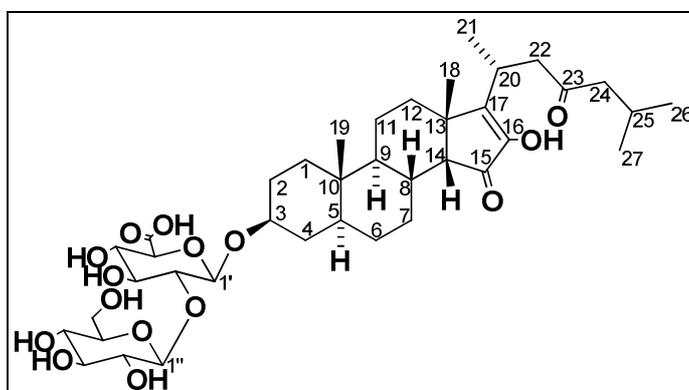
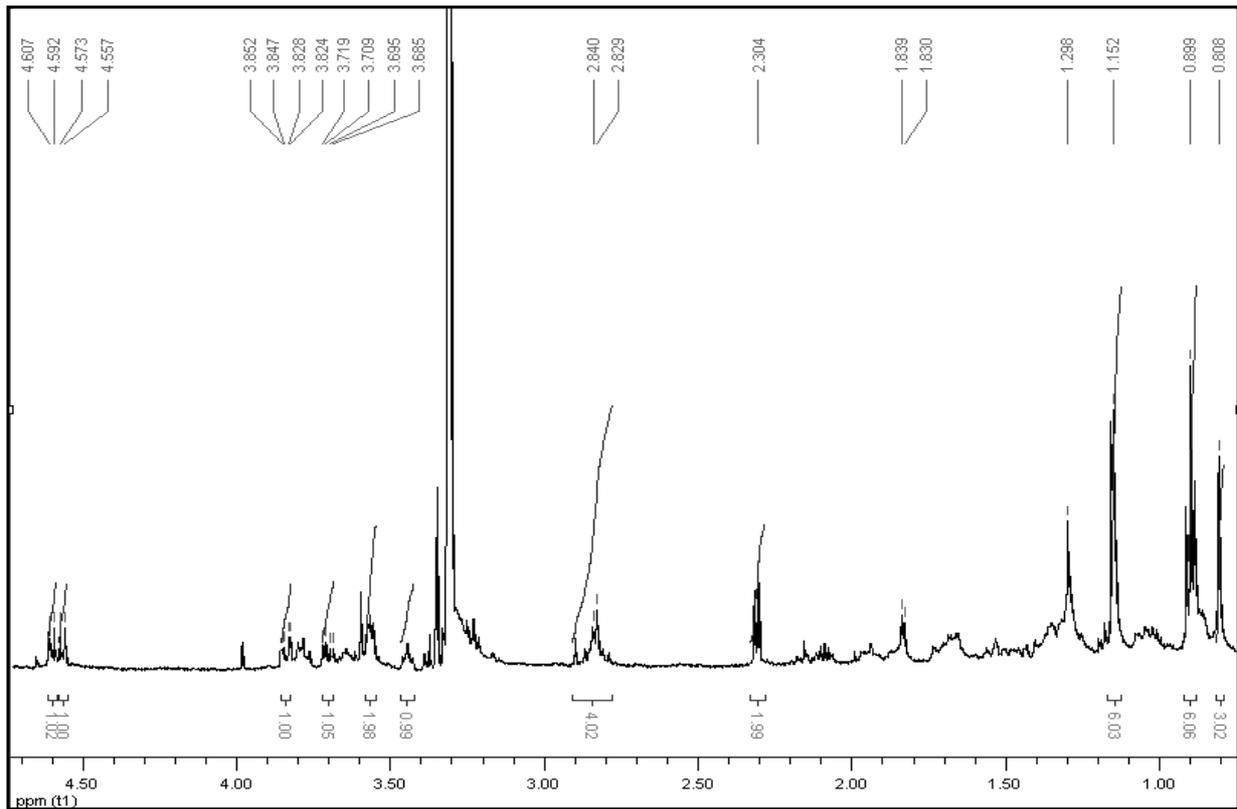
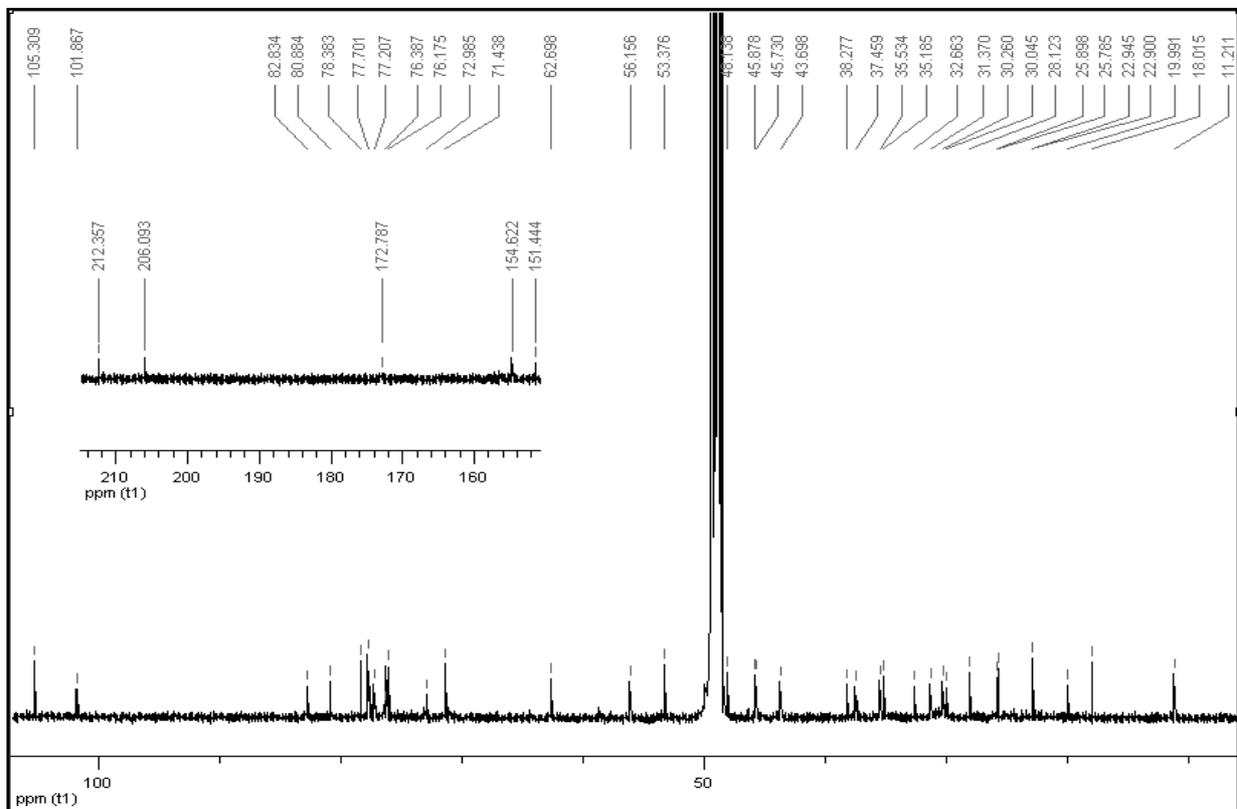
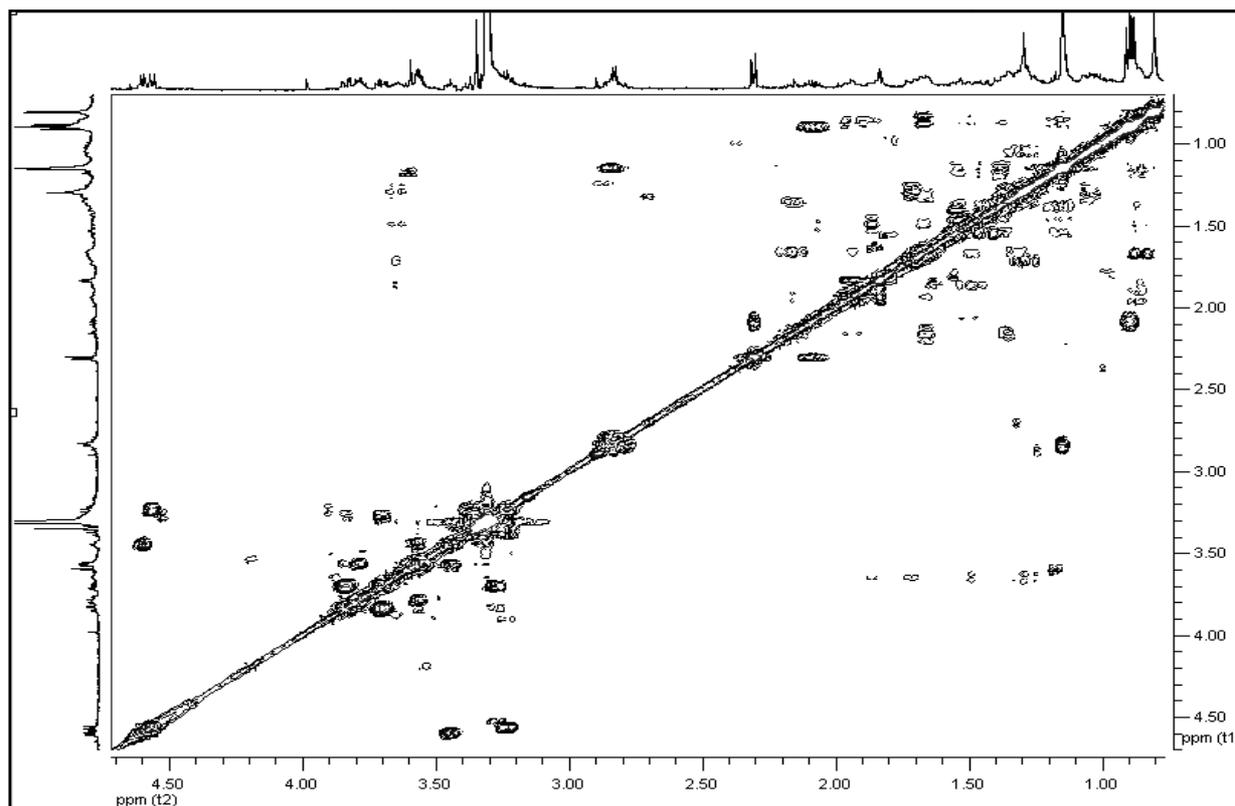


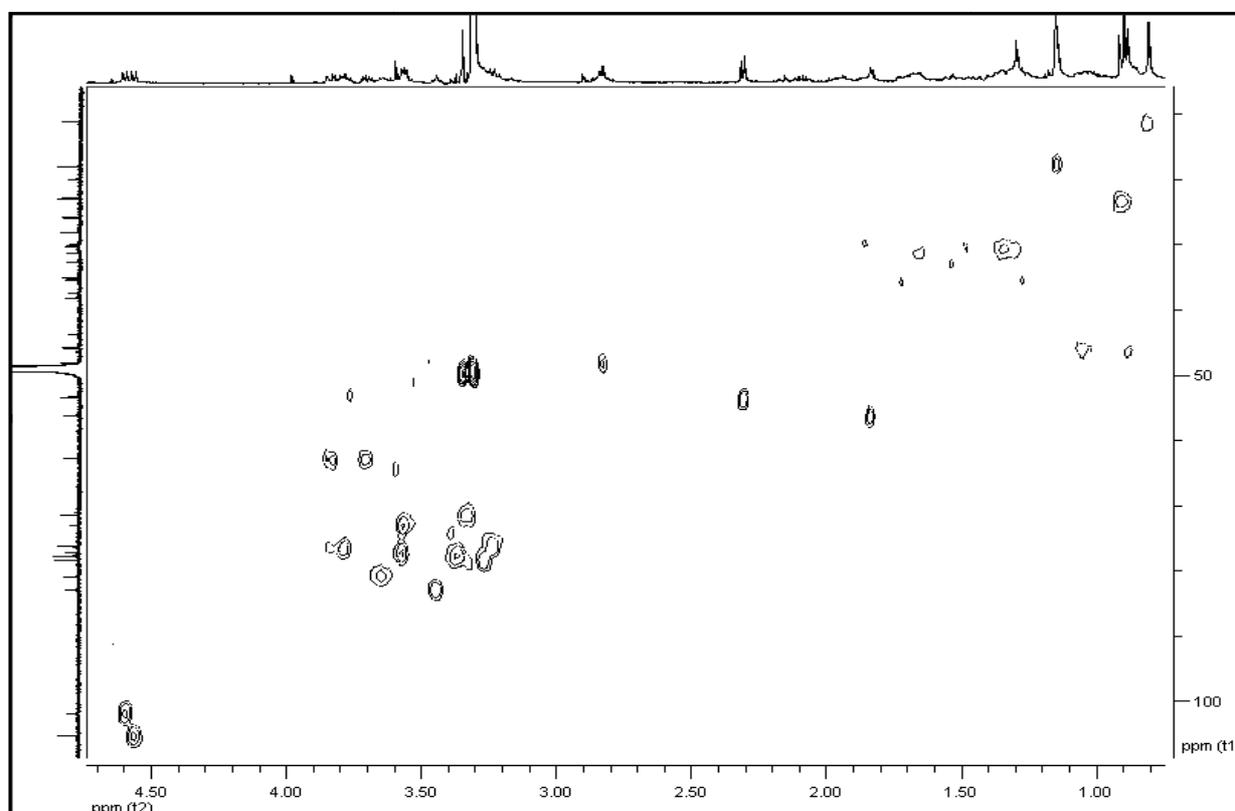
Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

| n° | δ _c | CH _n | δ _H (m ; J en Hz) | COSY | n° | δ _c | CH _n | δ _H (m ; J en Hz) | COSY |
|----|----------------|-----------------|----------------------------------|--------------------|-----|----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| 1 | 37,5 | CH ₂ | 0,86 (m) 1,68 (m) 1,49 (m) | 1α/β, 2α, 2β | 21 | 18,0 | CH ₃ | 1,15 (d ; 4,5) | 20, 22a, 22b |
| 2 | 30,1 | CH ₂ | 1,86 (m) | 1α, 1β, 2α/β, 3 | 22 | 48,1 | CH ₂ | 2,85 (m) | 20, 21, 22a/b |
| 3 | 80,9 | CH | 3,64 (m) | 2α, 2β, 4α, 4β | 23 | 212,4 | Cq | - | - |
| 4 | 35,5 | CH ₂ | 1,28 (m) 1,72 (m) | 3, 4α/β, 5 | 24 | 53,4 | CH ₂ | 2,31 (d ; 7,0) | 25 |
| 5 | 45,7 | CH | 1,04 (m) | 4α, 4β, 6α, 6β | 25 | 25,8 | CH | 2,10 (m) | 24, 26, 27 |
| 6 | 30,3 | CH ₂ | 1,30 (m) 1,35 (m) 2,17 (m) | 5, 6α/β, 7α, 7β | 26 | 22,9 | CH ₃ | 0,89 (d ; 6,5) | 25 |
| 7 | 31,4 | CH ₂ | 1,66 (m) | 6α, 6β, 7α/β, 8 | 27 | 22,9 | CH ₃ | 0,90 (d ; 6,5) | 25 |
| 8 | 35,2 | CH | 1,94 (m) | 7α, 7β, 9, 14 | 1' | 101,9 | CH | 4,60 (d ; 7,5) | 2' |
| 9 | 45,9 | CH | 0,88 (m) | 8, 11α, 11β, 19 | 2' | 82,8 | CH | 3,45 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1', 3' |
| 10 | 38,3 | Cq | - | - | 3' | 72,9 | CH | 3,57 (t ; 9,5) | 2', 4' |
| 11 | 20,0 | CH ₂ | 1,17 (m) 1,39 (m) | 9, 11α/β, 12α, 12β | 4' | 77,2 | CH | 3,56 (d ; 10,0) | 3', 5' |
| 12 | 32,7 | CH ₂ | 1,55 (m) 1,47 (m) | 11α, 11β, 12α/β | 5' | 76,4 | CH | 3,79 (t ; 9,5) | 4' |
| 13 | 43,7 | Cq | - | - | 6' | 172,4 | Cq | - | - |
| 14 | 56,2 | | 1,83 (d ; 4,5) | 8 | 1'' | 105,3 | CH | 4,56 (d ; 8,0) | 2'' |
| 15 | 206,1 | Cq | - | - | 2'' | 76,2 | CH | 3,23 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1'', 3'' |
| 16 | 151,4 | Cq | - | - | 3'' | 77,7 | CH | 3,37 (t ; 9,0) | 2'' |
| 17 | 154,6 | Cq | - | - | 4'' | 71,4 | CH | 3,33 (m) | 5'' |
| 18 | 25,9 | CH ₃ | 1,17 (s) | - | 5'' | 78,4 | CH | 3,27 (ddd ; 12,0 ; 5,0 ; 2,5) | 4'', 6''a, 6''b |
| 19 | 11,2 | CH ₃ | 0,81 (s) | 1α, 1β, 9 | 6'' | 62,7 | CH ₂ | 3,84 (dd ; 11,5 ; 2,5) | 5'', 6''a/b |
| 20 | 28,1 | CH | 2,83 (m) | 21, 22a, 22b | | | | | |

15 Spectre RMN ^1H du Pandaroside C (IV), CD_3OD 500 MHz16 Spectre RMN ^{13}C du Pandaroside C (IV), CD_3OD 125 MHz



17 Spectre RMN COSY du Pandaroside C (IV), CD₃OD



18 Spectre RMN HSQC du Pandaroside C (IV), CD₃OD

V. Ester méthylique du Pandaroside C (V)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyl-(1→2)-β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-cholest-16-ene-15,23-dione methyl ester

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +24.8$ (c 0,10, MeOH); (ESI)MS (+) m/z 783,5 $[M+H]^+$.

Molécule :

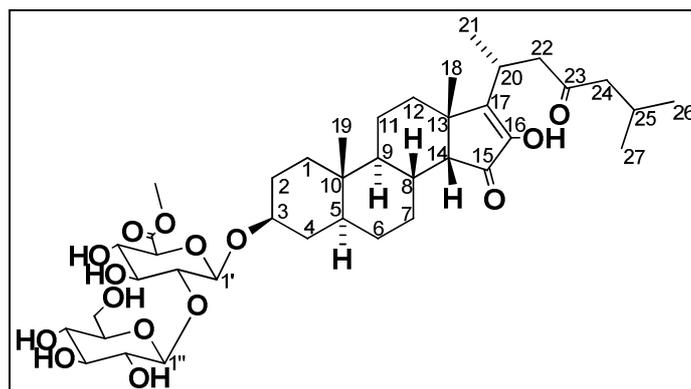
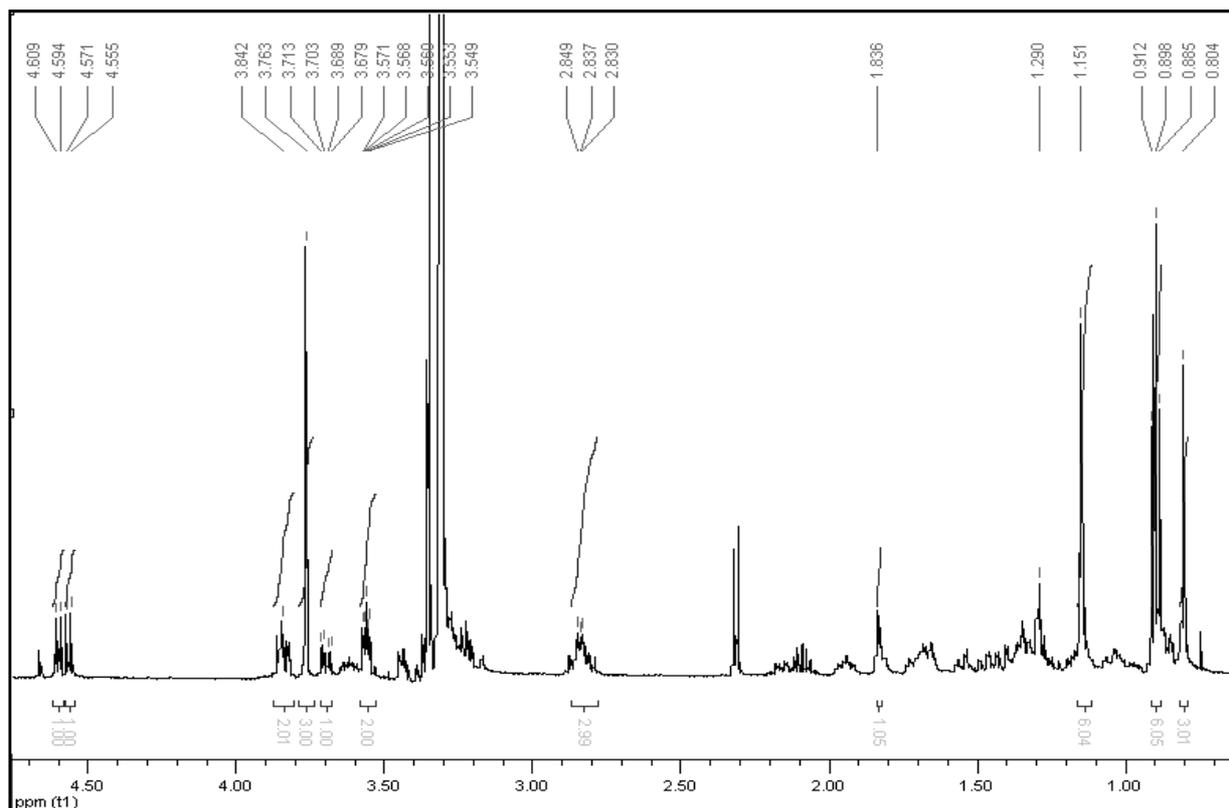


Tableau RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), CD_3OD :

| n° | CH _n | δ_{H} (m ; J en Hz) | n° | CH _n | δ_{H} (m ; J en Hz) |
|----|-----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------------|
| 1 | CH ₂ | 0,86 (m) 1,68 (m) | 20 | CH | 2,83 (m) |
| 2 | CH ₂ | 1,49 (m) 1,86 (m) | 21 | CH ₃ | 1,14 (d ; 4,5) |
| 3 | CH | 3,64 (m) | 22 | CH ₂ | 2,85 (m) |
| 4 | CH ₂ | 1,28 (m) 1,72 (m) | 23 | Cq | - |
| 5 | CH | 1,04 (m) | 24 | CH ₂ | 2,31 (d ; 7,0) |
| 6 | CH ₂ | 1,30 (m) 1,35 (m) 2,17 (m) | 25 | CH | 2,10 (m) |
| 7 | CH ₂ | 1,66 (m) | 1' | CH | 4,60 (d ; 7,5) |
| 8 | CH | 1,94 (m) | 2' | CH | 3,44 (t ; 7,5) |
| 9 | CH | 0,88 (m) | 3' | CH | 3,56 (m) |
| 10 | Cq | - | 4' | CH | 3,56 (m) |
| 11 | CH ₂ | 1,17 (m) 1,39 (m) | 5' | CH | 3,85 (d ; 9,0) |
| 12 | CH ₂ | 1,55 (m) 1,47 (m) | 6' | Cq | - |
| 13 | Cq | - | 6' ₁ | CH ₃ | 3,76 (s) |
| 14 | CH | 1,83 (d ; 4,5) | 1'' | CH | 4,56 (d ; 8,0) |
| 15 | Cq | - | 2'' | CH | 3,23 (dd ; 9,0 ; 8,0) |
| 16 | Cq | - | 3'' | CH | 3,37 (t ; 9,0) |
| 17 | Cq | - | 4'' | CH | 3,33 (m) |
| 18 | CH ₃ | 1,15 (s) | 5'' | CH | 3,27 (ddd ; 12,0 ; 5,0 ; 2,5) |
| 19 | CH ₃ | 0,80 (s) | 6'' | CH ₂ | 3,84 (dd ; 11,5 ; 2,5) |



19 Spectre RMN ¹H de l'ester méthylique du Pandaroside C (V), CD₃OD 500 MHz

VI. Pandaroside D (VI)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-cholest-16-ene-15,23-dione

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +45,1^\circ$ (c 0,10, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (3,85) nm ; **CD** (MeOH, c 5,0x10⁻⁴ M) θ (λ_{\max} nm) -12 (218), +10 (262), -6 (287), +5 (330) mdeg ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3412, 1697, 1677, 1196 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (-)** m/z 605,3313 [M-H]⁻ (Δ -1,2 ppm pour C₃₃H₄₉O₁₀).

257

Molécule :

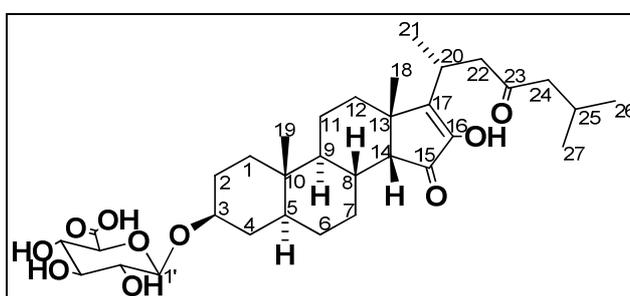
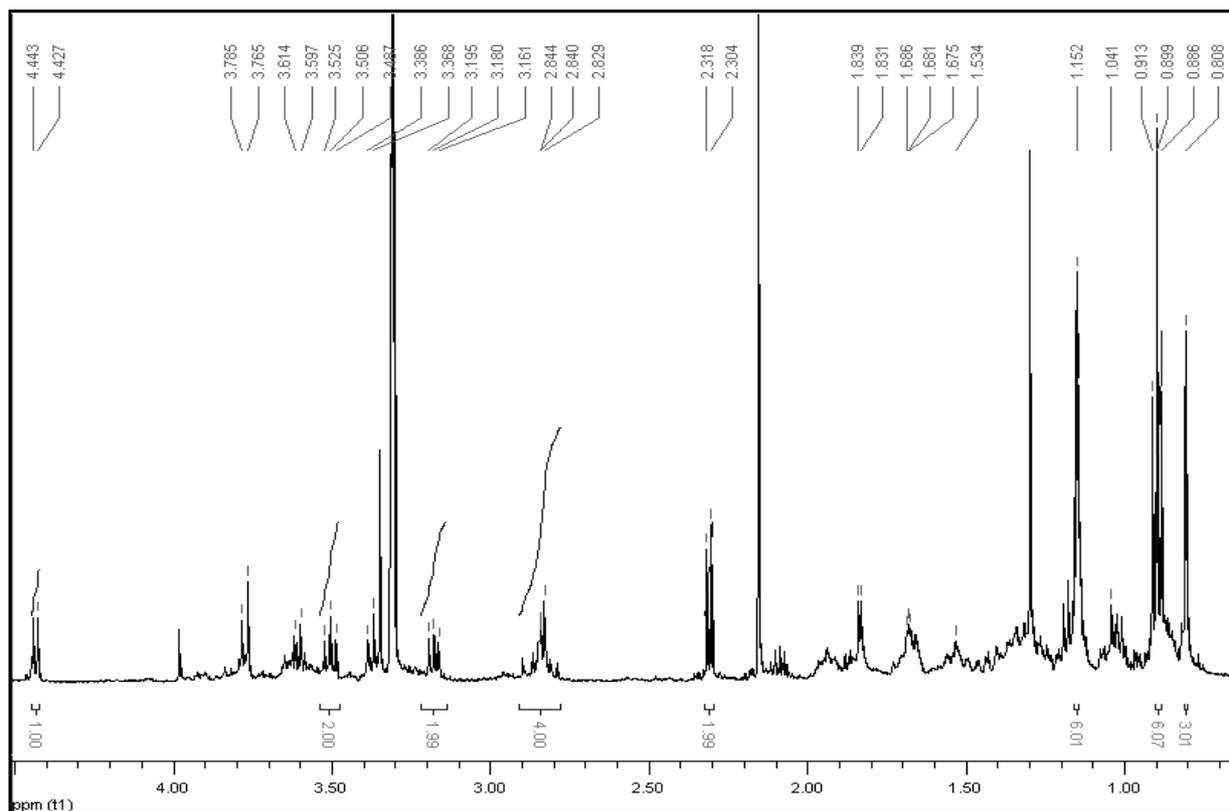
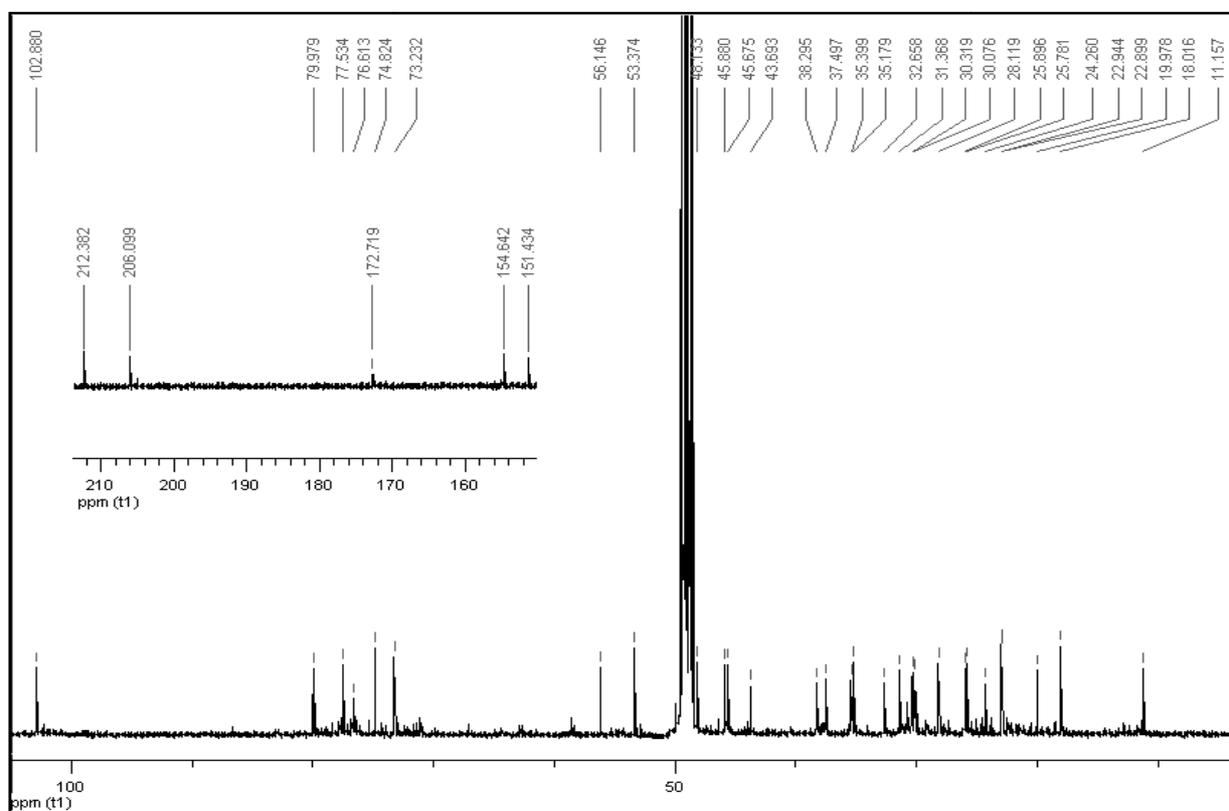


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

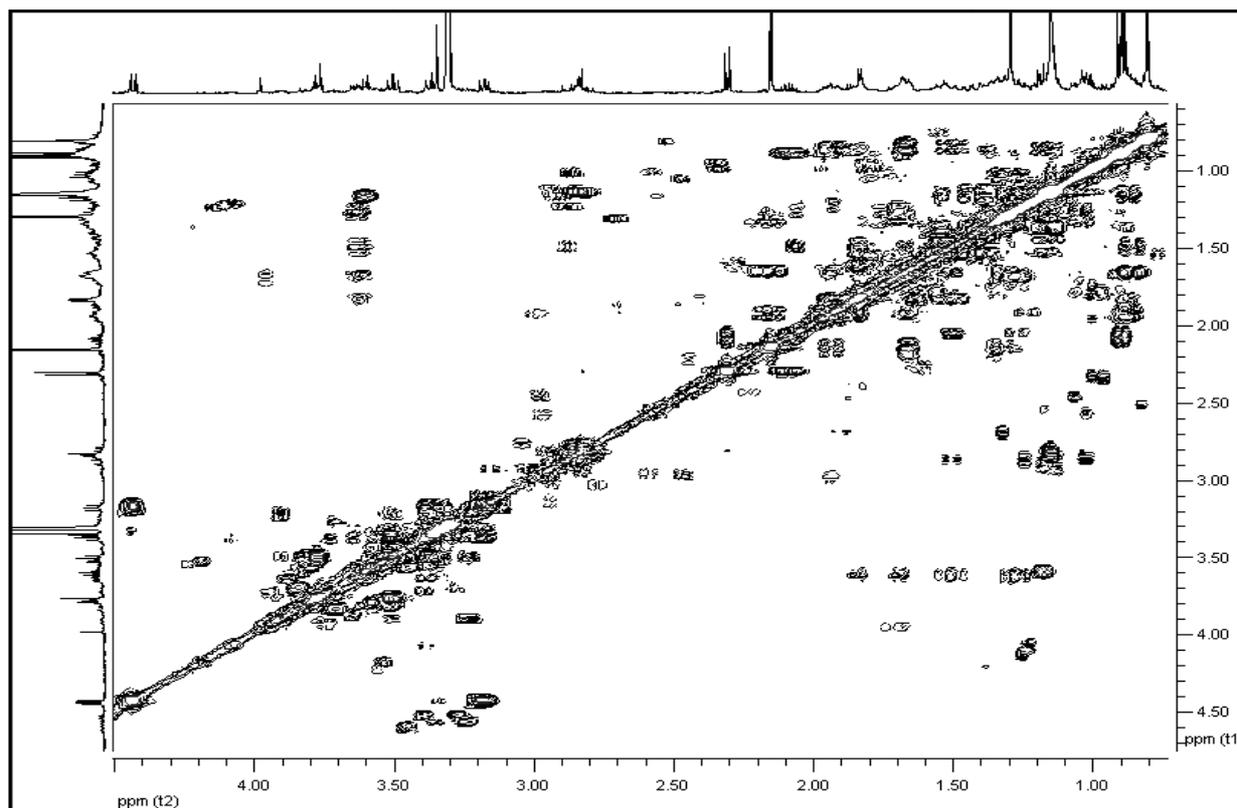
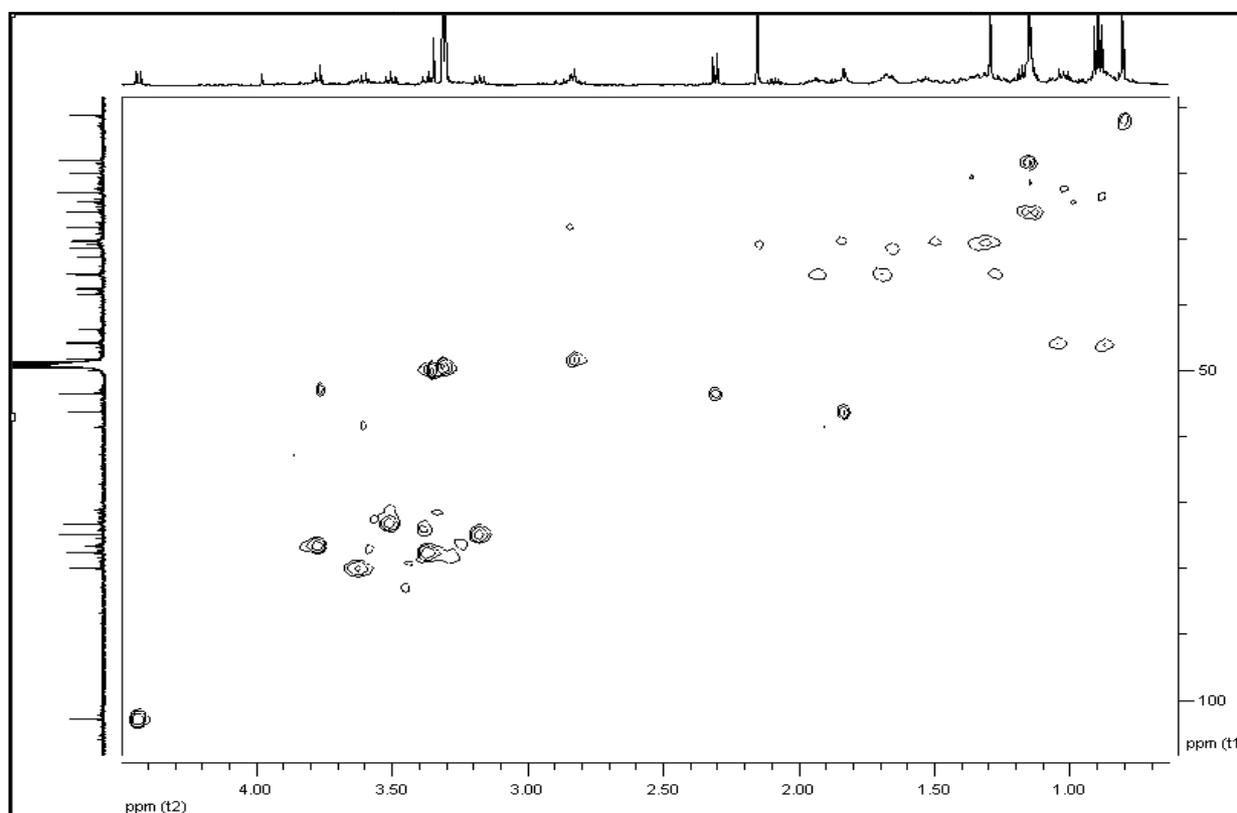
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | NOESY | n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | NOESY |
|----|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|----|------------|-----------------|--------------------------|---------------|-----------------------------|
| 1 | 37,5 | CH ₂ | 0,86 (m) 1,64 (m) | 1α/β, 2α, 2β | 1α 1β | 18 | 25,9 | CH ₃ | 1,15 (s) | - | 2β, 4β, 6α, 6β, 8 |
| 2 | 30,1 | CH ₂ | 1,50 (m) 1,84 (m) | 1α, 1β, 2α/β, 3 | 19 1', 3 | 19 | 11,2 | CH ₃ | 0,81 (s) | - | 11α, 14 |
| 3 | 80,0 | CH | 3,63 (m) | 2α, 2β, 4α, 4β | 1', 2α, 4α, 5 | 20 | 28,1 | CH | 2,83 (m) | 21,22a, 22b | 21, 24 |
| 4 | 35,4 | CH ₂ | 1,28 (m) 1,72 (m) | 3, 4α/β, 5 | 19 1', 3, 5 | 21 | 18,0 | CH ₃ | 1,14 (d ; 4,5) | 20,22a, 22b | 20, 22a, 22b |
| 5 | 45,7 | CH | 1,04 (m) | 4α, 4β, 6α, 6β | 3, 4α, 7α | 22 | 48,1 | CH ₂ | 2,79 | 20, 21, 22a/b | 21, 24 |
| 6 | 30,3 | CH ₂ | 1,30 (m) 1,35 (m) | 5, 6α/β, | 19 | 23 | 212,4 | Cq | - | - | - |
| 7 | 31,4 | CH ₂ | 1,65 (m) 2,17 (m) | 7α, 7β | 7α, 19 7α, 8, 14 | 24 | 53,4 | CH ₂ | 2,31 (d ; 7,0) | 22a, 22b, 25 | 20, 22a, 22b, 25, 26, 27 |
| 8 | 35,2 | CH | 1,93 (m) | 6α, 6β, 7α/β, 8 | 5, 6α, 7β, 9 | 25 | 25,8 | CH | 2,08 (m) | 24, 26, 27 | 24, 26, 27 |
| 9 | 45,9 | CH | 0,87 (m) | 7α, 7β, 9, 14 | 7β, 19 | 26 | 22,9 | CH ₃ | 0,89 (d ; 6,5) | 25 | 24, 25 |
| 10 | 38,3 | Cq | - | 8, 11α, 11β | 7α | 27 | 22,9 | CH ₃ | 0,90 (d ; 6,5) | 25 | 24, 25 |
| 11 | 20,0 | CH ₂ | 1,15 (m) 1,37 (m) | - | - | 1' | 102,9 | CH | 4,43 (d ; 8,0) | 2' | 2α, 3, 4α, 2', 3', 5' |
| 12 | 32,7 | CH ₂ | 1,47 (m) 1,55 (m) | 9, 11α/β, 12α, 12β | 11α, 12α 11β, 19 12α, 14 | 2' | 74,8 | CH | 3,18 (dd ; 9,0 ; 8,0) | 1',3' | 1', 4' |
| 13 | 43,7 | Cq | - | 11α, 11β, 12α/β | 12β, 11β | 3' | 77,5 | CH | 3,36 (t ; 9,0) | 2',4' | 1', 5' |
| 14 | 56,2 | CH | 1,83 (d ; 4,5) | 12β, 11β | 12β, 11β | 4' | 73,2 | CH | 3,51 (t ; 9,0) | 3',5' | 2' |
| 15 | 206,1 | Cq | - | 8 | 7β, 12β, 18 | 5' | 76,6 | CH | 3,78 (d ; 9,5) | 4' | 1', 3' |
| 16 | 151,4 | Cq | - | - | - | 6' | 172,7 | Cq | - | - | - |
| 17 | 154,6 | Cq | - | - | - | | | | | | |

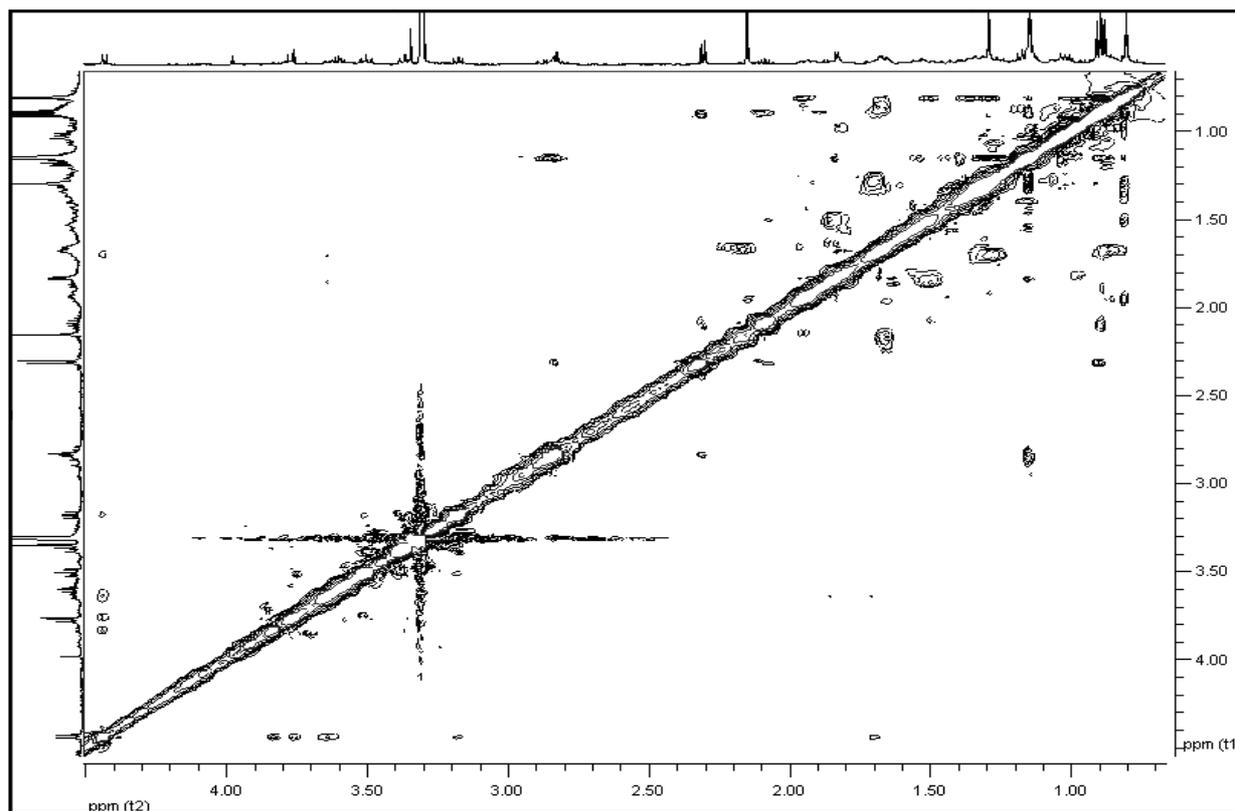


20 Spectre RMN ^1H du Pandaroside D (VI), CD_3OD 500 MHz



21 Spectre RMN ^{13}C du Pandaroside D (VI), CD_3OD 125 MHz

22 Spectre RMN COSY du Pandaroside D (VI), CD₃OD23 Spectre RMN HSQC du Pandaroside D (VI), CD₃OD



24 Spectre RMN NOESY du Pandaroside D (VI), CD₃OD

VII. Ester méthylique du Pandaroside D (VII)

Nom : 3-β-[β-glucopyranosyloxyuronic acid]-16-hydroxy-5α, 14β-cholest-16-ene-15,23-dione methyl ester

Description : Solide amorphe blanc ; $[\alpha]_D^{20} +35,0^\circ$ (c 0,10, MeOH) ; (ESI)MS (+) m/z 621,4 $[M+H]^+$.

Molécule :

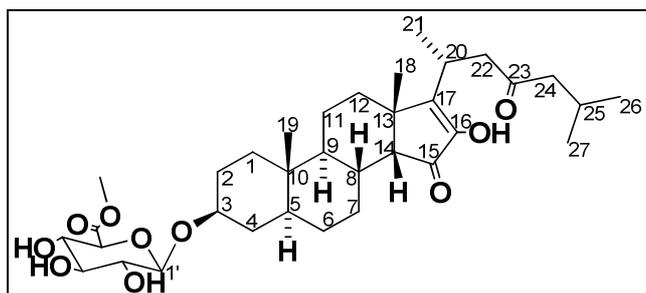
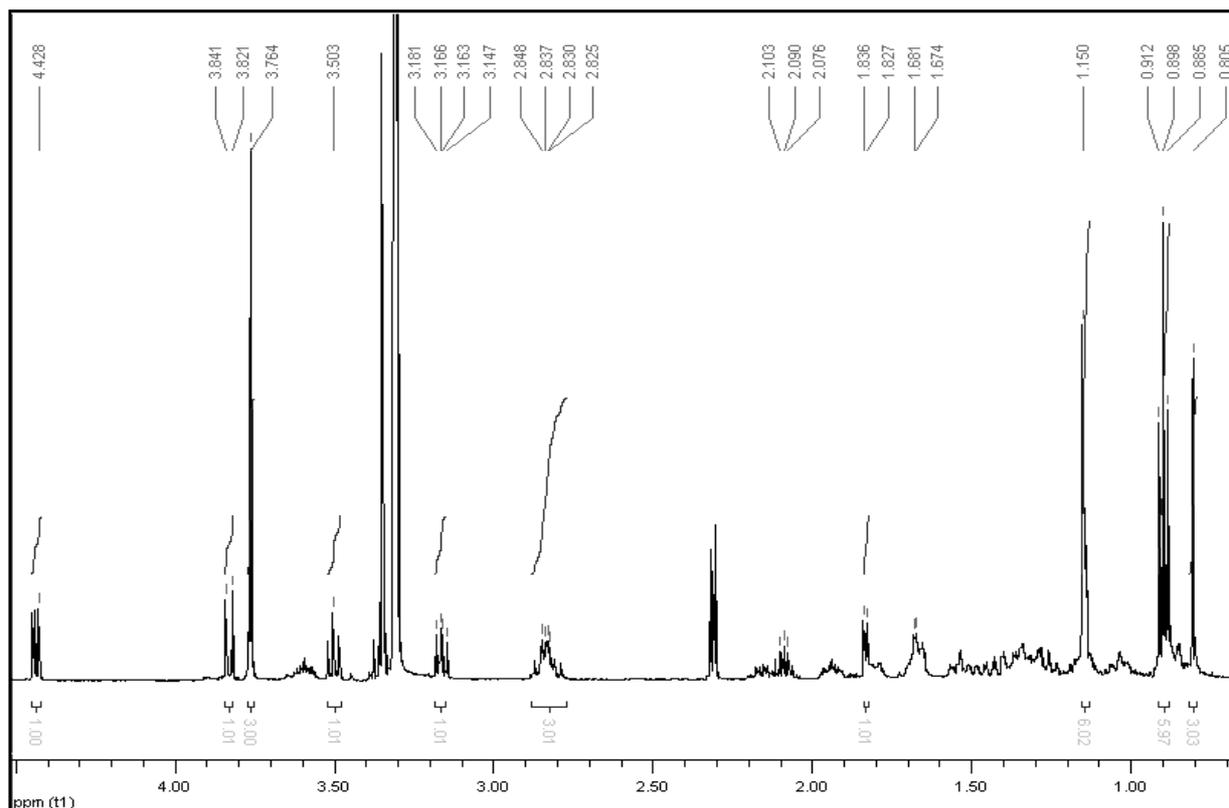
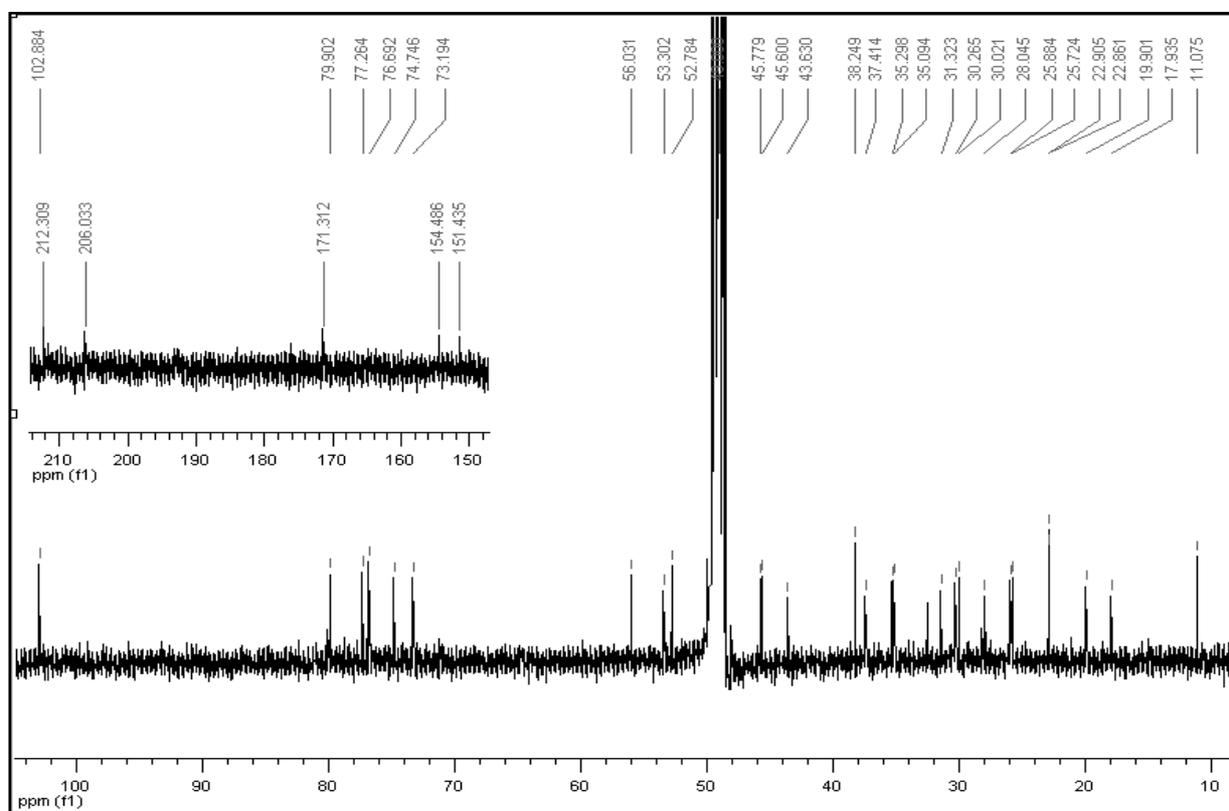


Tableau RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), CD_3OD :

| n° | δ_c | CH_n | δ_H (m ; J en Hz) | n° | δ_c | CH_n | δ_H (m ; J en Hz) |
|-----------|------------|---------------|--------------------------|-----------------|------------|---------------|--------------------------|
| 1 | 37,4 | CH_2 | 0,86 (m) 1,64 (m) | 18 | 25,9 | CH_3 | 1,15 (s) |
| 2 | 30,0 | CH_2 | 1,50 (m) 1,84 (m) | 19 | 11,1 | CH_3 | 0,81 (s) |
| 3 | 79,9 | CH | 3,63 (m) | 20 | 28,0 | CH | 2,83 (m) |
| 4 | 35,3 | CH_2 | 1,28 (m) 1,72 (m) | 21 | 17,9 | CH_3 | 1,14 (d ; 5,0) |
| 5 | 45,6 | CH | 1,04 (m) | 22 | 48,1 | CH_2 | 2,79 (m) |
| 6 | 30,3 | CH_2 | 1,30 (m) 1,35 (m) | 23 | 212,3 | Cq | - |
| 7 | 31,3 | CH_2 | 1,65 (m) 2,17 (m) | 24 | 53,3 | CH_2 | 2,31 (d ; 7,0) |
| 8 | 35,1 | CH | 1,93 (m) | 25 | 25,8 | CH | 2,08 (m) |
| 9 | 45,8 | CH | 0,87 (m) | 26 | 22,8 | CH_3 | 0,89 (d ; 7,0) |
| 10 | 38,2 | Cq | - | 27 | 22,9 | CH_3 | 0,90 (d ; 7,0) |
| 11 | 19,9 | CH_2 | 1,15 (m) 1,37 (m) | 1' | 102,9 | CH | 4,44 (d ; 8,0) |
| 12 | 32,7 | CH_2 | 1,47 (m) 1,55 (m) | 2' | 74,7 | CH | 3,16 (dd ; 9,0 ; 8,0) |
| 13 | 43,6 | Cq | - | 3' | 77,3 | CH | 3,36 (t ; 9,0) |
| 14 | 56,0 | CH | 1,83 (d ; 4,5) | 4' | 73,1 | CH | 3,50 (t ; 9,0) |
| 15 | 206,0 | Cq | - | 5' | 76,7 | CH | 3,83 (d ; 9,0) |
| 16 | 151,4 | Cq | - | 6' | 171,3 | Cq | - |
| 17 | 154,5 | Cq | - | 6' ₁ | 52,8 | CH_3 | 3,76 (s) |



25 Spectre RMN ^1H de l'ester méthylique du Pandaroside D (VII), CD_3OD 500 MHz



26 Spectre RMN ^{13}C de l'ester méthylique du Pandaroside D (VII), CD_3OD 125 MHz

PARTIE B : Etude chimique de deux cnidaires méditerranéens

I. *Astroides calycularis*

Un échantillon de 2 kg d'*Astroides calycularis* (masse comprenant la roche sur laquelle les colonies étaient fixées) a été collecté dans le détroit de Gibraltar en Juillet 2007 sur trois sites différents : Callejones, Ciclon de tierra et Piedra gorda. Les différentes colonies ont été congelées sur site avant d'être lyophiliser au laboratoire.

Après lyophilisation, 150 g d'échantillon ont été extraits par le système de solvant MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 3x1500 mL) à température ambiante. L'extrait brut ainsi obtenu (9,6 g) a été fractionné par chromatographie liquide sous vide sur phase silice greffée C₁₈. Les fractions ont été éluées par un système de solvants de polarité décroissante de H₂O/MeOH 1:0 à 0:1 puis de MeOH/CH₂Cl₂ 1:0 à 0:1 (500 mL par système de solvant).

La fraction F4 (100% MeOH, 288,1 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative (Phenomenex™, Luna Phenyl-Hexyle, 10x250 mm, 5 µm) en utilisant un gradient H₂O/CH₃CN/TFA (débit : 3,0 mL.min⁻¹, de 90:10:0,1 à 35:65:0,1 en 30 minutes).

Cette purification ne permettant pas d'obtenir suffisamment de quantité de composés pour pouvoir les caractériser, une nouvelle extraction a été faite sur 250 g d'*Astroides calycularis* lyophilisé. L'extrait brut obtenu (15 g) a été fractionné par chromatographie liquide sous vide sur phase silice greffée C₁₈ en utilisant les mêmes systèmes de solvant que décrits ci-dessus. La fraction intéressante étant celle éluée par 100% MeOH, la fraction a été éluée par 1500 mL de 100% MeOH contre 500 mL des autres systèmes de solvant. Cela a permis d'obtenir 1,2 g de la fraction F4 (100% MeOH) qui a ensuite été purifiée par HPLC semi-préparative (Phenomenex™, Luna Phenyl-Hexyle, 10x250 mm, 5 µm) dans les mêmes conditions que celles définies ci-dessus.

Ces deux purifications ont permis l'isolement de deux aplysinopsines connues, l'aplysinopsine (**VIII**, 4,8 mg) et la 6-bromoaplysinopsine (**IX**, 2,4 mg),⁶³ une nouvelle, la 6-bromo-*N*-méthylaplysinopsine (**X**, 1,2 mg), et trois molécules nouvelles dans *Astroides calycularis*, l'orthidine C (**XI**, 5,4 mg), l'orthidine A (**XII**, 0,7 mg) et l'orthidine D (**XIII**, 0,7 mg).⁷⁶

I.1. La famille des aplysinopsines

I.1.1. L'aplysinopsine (VIII)

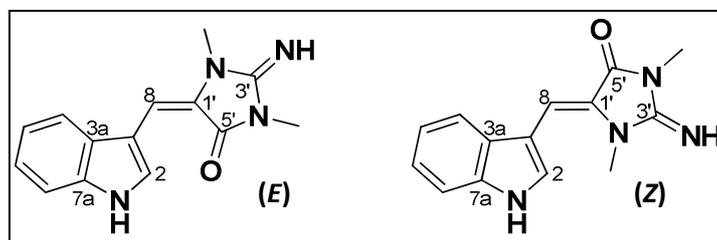
Nom :

- (*E*)-2-imino-5-((1*H*-indol-3-yl)méthylène)-1,3-diméthylimidazolidin-4-one
- (*Z*)-2-imino-5-((1*H*-indol-3-yl)méthylène)-1,3-diméthylimidazolidin-4-one

264

Description : Huile jaune vif ; (ESI)MS (+) m/z 255,1 [M+H]⁺ (C₁₄H₁₅N₄O⁺).

Molécule :

Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) :

| n° | Stéréoisomère <i>E</i> (CD ₃ OD) | | | Données bibliographiques (DMSO- <i>d</i> ₆) ⁷⁰ | | Stéréoisomère <i>Z</i> (CD ₃ OD) | | Données bibliographiques (DMSO- <i>d</i> ₆) ⁷⁰ | |
|-------|------------------------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------|
| | CH _n | δ _c | δ _H (m ; J en Hz) | δ _c | δ _H (m ; J en Hz) | δ _c | δ _H (m ; J en Hz) | δ _c | δ _H |
| 2 | CH | 129,9 | 8,90 (s) | 127,2 | 8,69 (d ; 2,4) | 128,0 | 7,52 (d ; 1,0) | 125,9 | 7,57 |
| 3 | C | 110,1 | - | 108,8 | - | 108,9 | - | 107,6 | - |
| 3a | C | 129,2 | - | 127,7 | - | 129,1 | - | 127,3 | - |
| 4 | CH | 118,7 | 7,82 (d ; 7,5) | 118,1 | 7,87 (d ; 7,5) | 119,7 | 7,62 (d ; 8,0) | 118,6 | 7,54 |
| 5 | CH | 121,5 | 7,13 (dd ; 1,0 ; 7,5) | 119,4 | 7,09 (t ; 7,5) | 121,5 | 7,14 (dd ; 1,0 ; 8,0) | 119,7 | 7,09 |
| 6 | CH | 126,7 | 7,36 (dd ; 2,0 ; 8,0) | 121,7 | 7,15 (t ; 7,5) | 123,7 | 7,20 (dd ; 1,0 ; 8,0) | 121,9 | 7,15 |
| 7 | CH | 112,8 | 7,43 (d ; 8,0) | 111,7 | 7,41 (d ; 7,5) | 112,9 | 7,43 (d ; 8,0) | 111,8 | 7,40 |
| 7a | C | 137,4 | - | 135,5 | - | 137,8 | - | 135,8 | - |
| 8 | CH | 110,9 | 6,83 (s) | 102,6 | 6,43 (s) | 107,9 | 7,10 (d ; 1,0) | 99,4 | 6,57 |
| 1' | C | 130,0 | - | 126,4 | - | 128,2 | - | 128,5 | - |
| 3' | C | 154,8 | - | 150,5 | - | 157,9 | - | 152,9 | - |
| 5' | C | 163,4 | - | 162,2 | - | 166,0 | - | 162,8 | - |
| Me-2' | CH ₃ | 26,6 | 3,32 (s) | 26,9 | 3,25 (s) | 30,5 | 3,18 (s) | 28,9 | 3,06 |
| Me-4' | CH ₃ | 24,8 | 3,11 (s) | 24,4 | 3,05 (s) | 25,2 | 3,10 (s) | 25,0 | 3,04 |

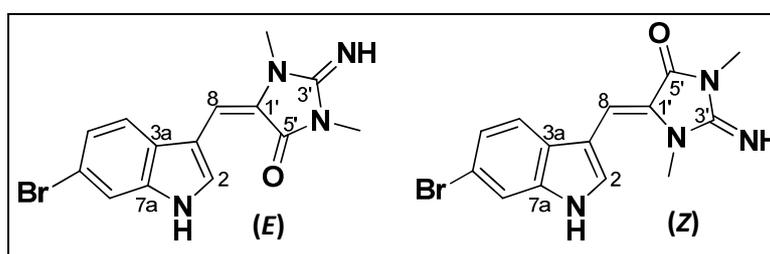
I.1.2. La 6-bromoaplysinsine (IX)

Nom :

- (*E*)-5-((6-bromo-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-2-imino-1,3-diméthylimidazolidin-4-one
- (*Z*)-5-((6-bromo-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-2-imino-1,3-diméthylimidazolidin-4-one

Description : Huile jaune vif ; (ESI)MS (+) m/z 333,0 et 335,0 (1:1, $[M+H]^+$, $C_{14}H_{14}BrN_4O^+$).

Molécule :

Tableau RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), $DMSO-d_6$:

| n° | CH _n | Stéréoisomère <i>E</i> IX | | Stéréoisomère <i>Z</i> IX | | Données Bibliographiques ⁶³ | |
|-------|-----------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|
| | | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 2 | CH | 131,7 | 8,96 (d ; 3,0) | 130,5 | 7,91 (d ; 2,5) | 127,7 | 8,67 (brs) |
| 3 | C | 108,5 | - | 106,6 | - | 108,7 | - |
| 3a | C | 127,9 | - | 126,1 | - | 126,9 | - |
| 4 | CH | 120,5 | 8,06 (d ; 8,5) | 120,7 | 7,69 (d ; 8,5) | 119,6 | 7,85 (d ; 8,0) |
| 5 | CH | 123,4 | 7,36 (dd ; 2,0 ; 8,5) | 123,5 | 7,29 (dd ; 2,0 ; 8,5) | 121,8 | 7,21 (dd ; 1,5 ; 8,0) |
| 6 | C | 115,3 | - | 114,9 | - | 114,0 | - |
| 7 | CH | 115,3 | 7,72 (d ; 2,0) | 114,8 | 7,68 (d ; 2,0) | 114,0 | 7,60 (d ; 1,5) |
| 7a | C | 136,6 | - | 137,0 | - | 136,2 | - |
| 8 | CH | 114,9 | 7,30 (s) | 110,8 | 7,23 (s) | 101,5 | 6,38 (s) |
| 1' | C | 122,4 | - | 124,8 | - | 126,9 | - |
| 3' | C | 152,4 | - | 156,5 | - | 150,4 | - |
| 5' | C | 160,2 | - | 162,1 | - | 162,1 | - |
| Me-2' | CH ₃ | 28,7 | 3,50 (s) | 32,8 | 3,27 (s) | 24,4 | 3,05 (s) |
| Me-4' | CH ₃ | 26,1 | 3,22 (s) | 26,4 | 3,18 (s) | 26,6 | 3,24 (s) |

I.1.3. La 6-bromo-*N*-isométhylyaplysinsine (X), molécule nouvelle

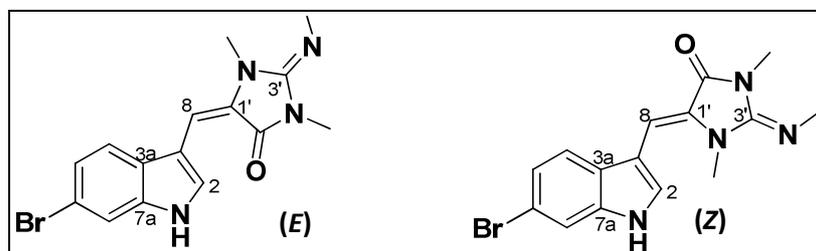
Nom :

- (*E*)-5-((6-bromo-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-1,3-diméthyl-2-méthyliminoimidazolidin-4-one
- (*Z*)-5-((6-bromo-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-1,3-diméthyl-2-méthyliminoimidazolidin-4-one

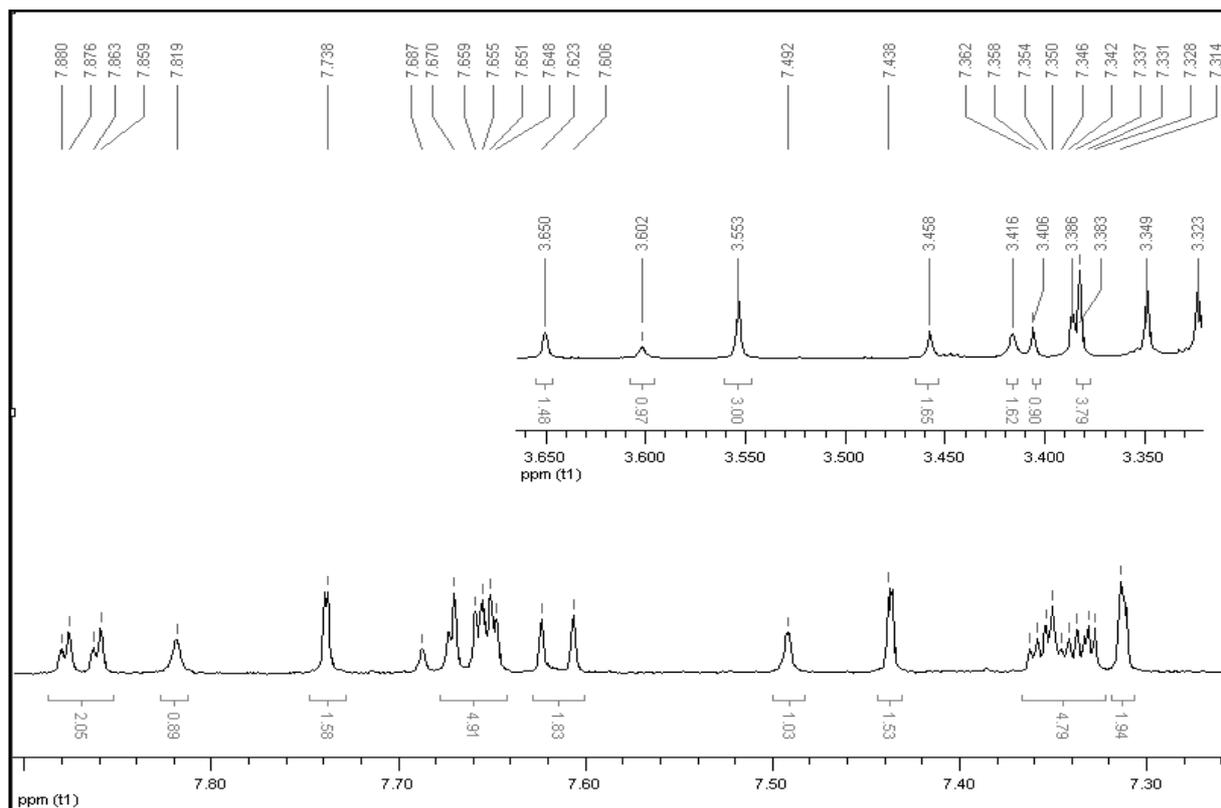
266

Description : Huile jaune vif ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 368 (3,69), 275 (3,63) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 347,0-349,0 (1:1, [M+H]⁺, C₁₅H₁₆BrN₄O⁺).

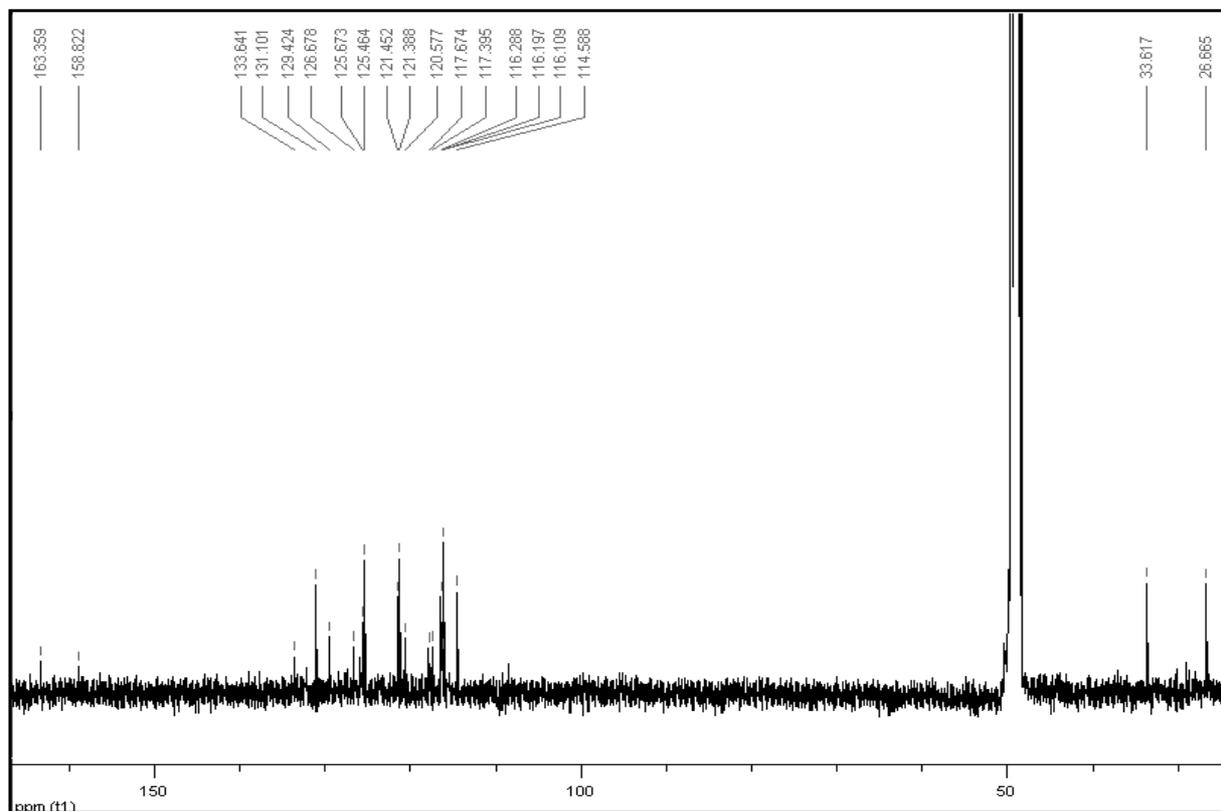
Molécule :

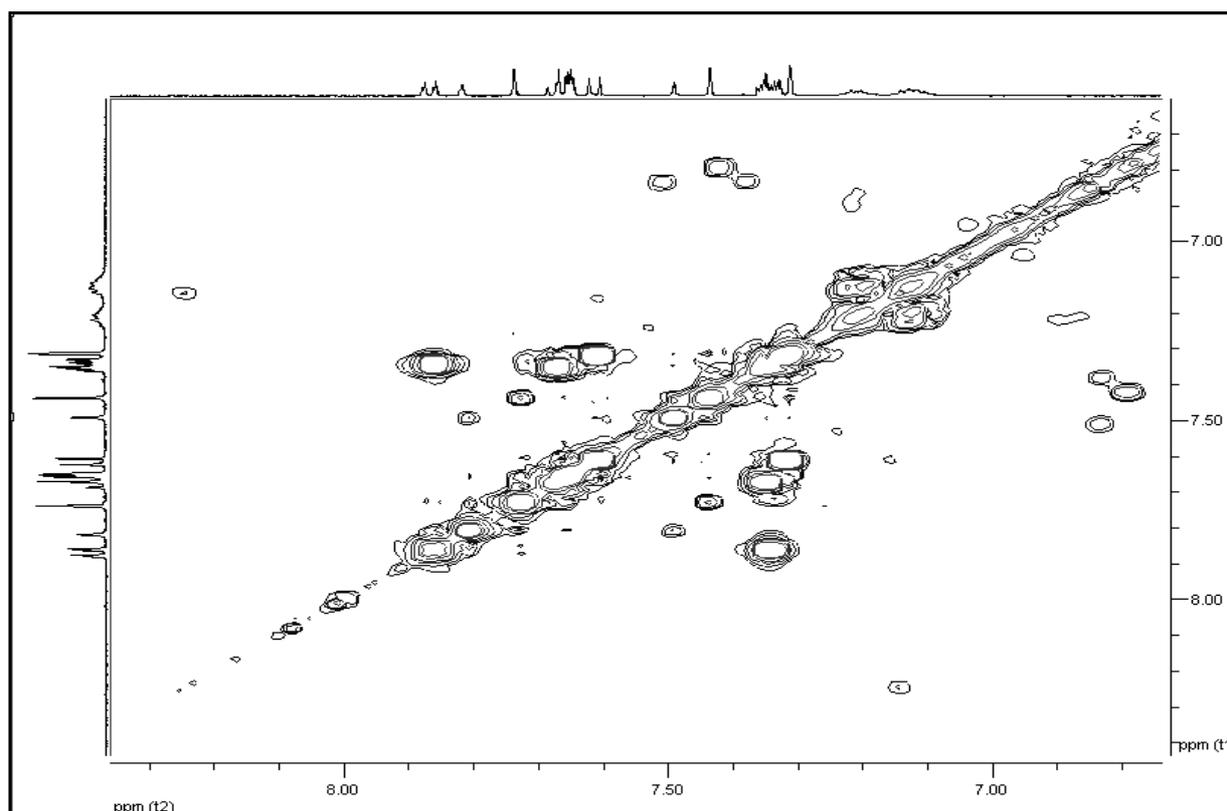
Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

| n° | CH _n | Stéréoisomère Z | | Stéréoisomère E | |
|-------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|
| | | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 2 | CH | 121,3 | 7,67 (brs) | 120,6 | 7,85 (brs) |
| 3 | C | 108,8 | - | 110,1 | - |
| 3a | C | 127,5 | - | 127,7 | - |
| 4 | CH | 132,0 | 7,80 (brs) | 125,7 | 7,35 (m) |
| 5 | CH | 115,5 | 7,50 (brs) | 116,2 | 7,65 (m) |
| 6 | C | 115,9 | - | 115,9 | - |
| 7 | CH | 131,1 | 7,72 (brs) | 121,3 | 7,60 (s) |
| 7a | C | 138,9 | - | 138,2 | - |
| 8 | CH | 117,3 | 7,31 (s) | 117,7 | 7,36 (s) |
| 1' | C | 123,3 | - | 124,2 | - |
| 3' | C | 154,1 | - | 153,8 | - |
| 5' | C | 161,2 | - | 161,8 | - |
| Me-2' | CH ₃ | 29,1 | 3,55 (s) | 31,0 | 3,65 (s) |
| Me-3' | CH ₃ | 26,3 | 3,32 (s) | 31,7 | 3,41 (s) |
| Me-4' | CH ₃ | 32,2 | 3,39 (s) | 27,8 | 3,45 (s) |

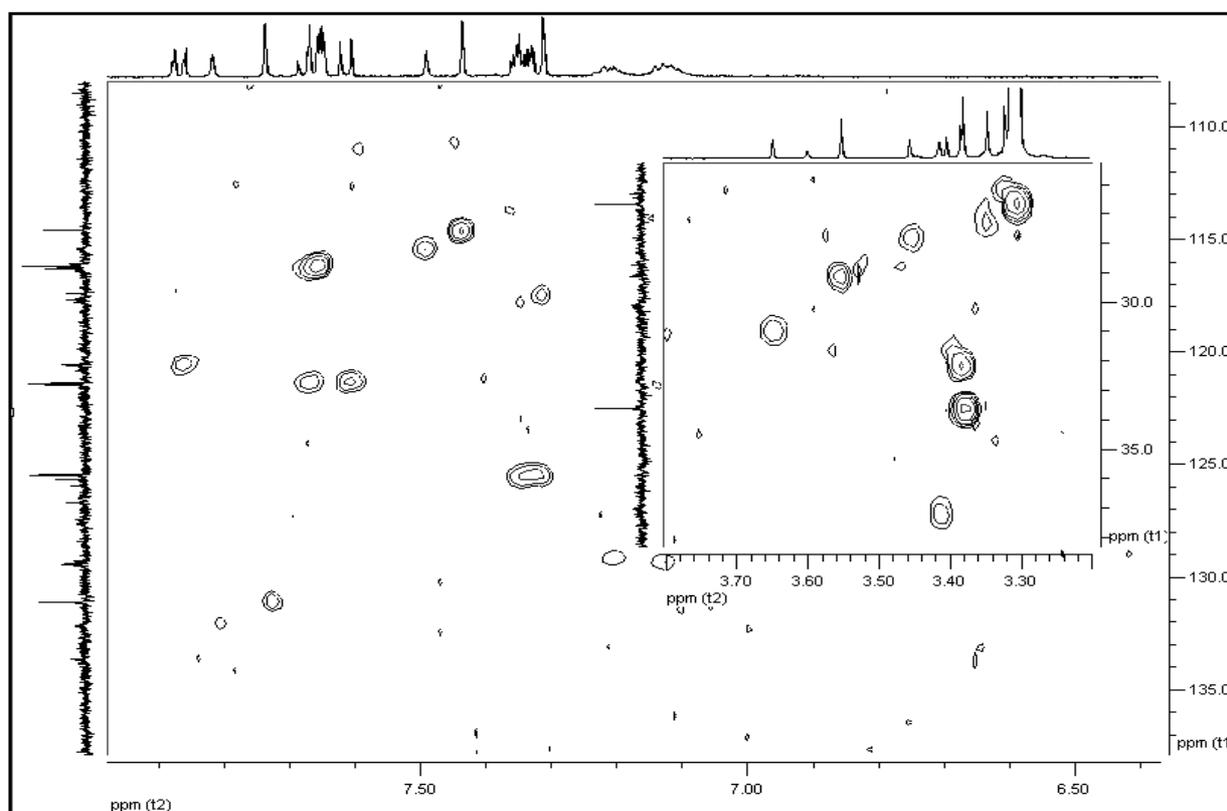


267

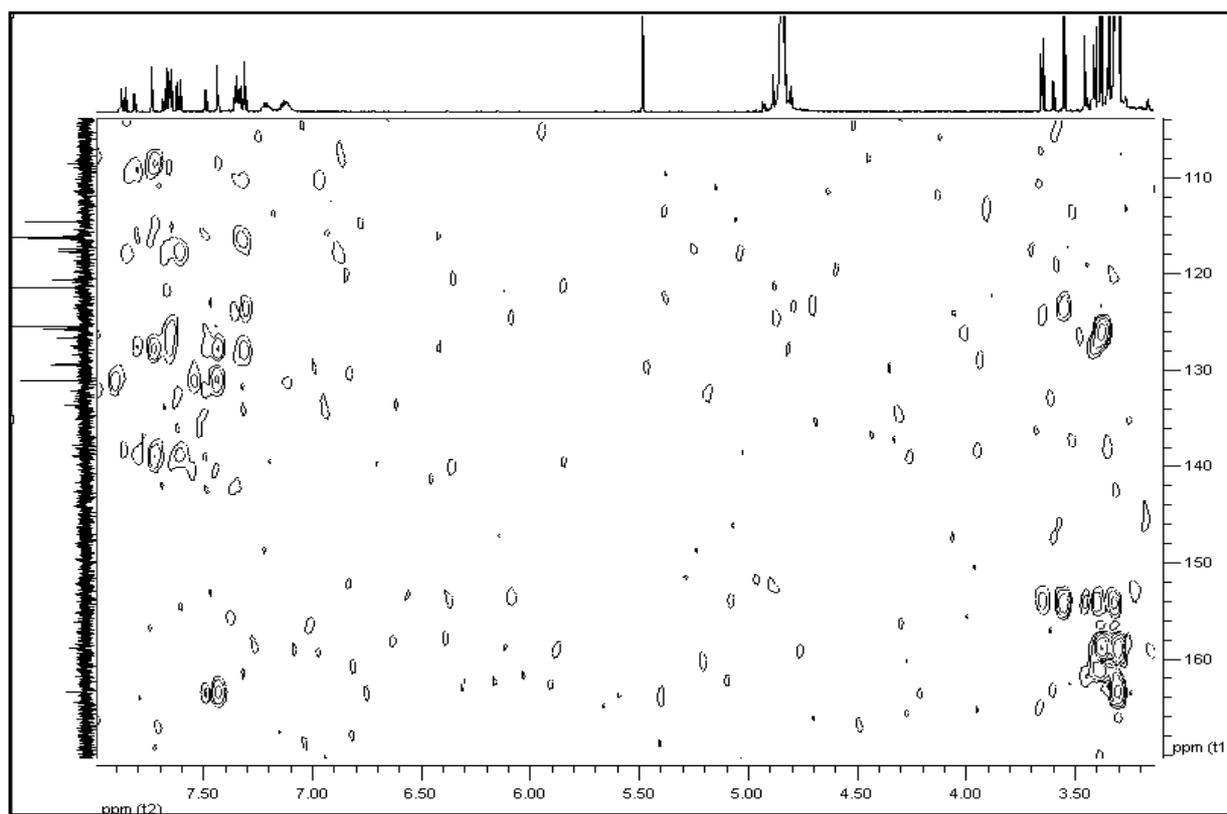
27 Spectre RMN ^1H de la 6-bromo-*N*-isométhylaplysinsine (**X**), CD_3OD 500 MHz28 Spectre RMN ^{13}C de la 6-bromo-*N*-isométhylaplysinsine (**X**), CD_3OD 125 MHz



29 Spectre RMN COSY de la 6-bromo-*N*-isométhylaplysinsine (X), CD₃OD



30 Spectre RMN HSQC de la 6-bromo-*N*-isométhylaplysinsine (X), CD₃OD



31 Spectre RMN HMBC de la 6-bromo-*N*-isométhylaplysinopsine (**X**), CD₃OD

I.2. La famille des orthidines

I.2.1. L'orthidine C (XI)

Nom : (E)-1,1'-((2R,3S)-3-(6-éthène-1,2-diyl-3,4-dihydroxyphényl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-2-yl)bisguanidine

270

Description : Gomme jaune pale ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 205 (4,59), 225 (4,30), 284 (4,21), 310 (3,95) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 385,2 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{21}N_6O_4^+$).

Molécule :

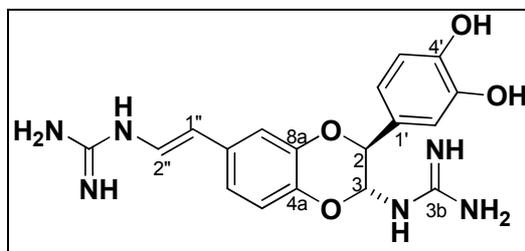


Tableau RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), CD_3OD :

| Composé X | | | | Données Bibliographiques ⁷⁶ | |
|-----------|-----------------|------------|--------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| n° | CH _n | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 2 | CH | 77,6 | 4,90 (d ; 5,5) | 77,4 | 4,91 (d ; 5,7) |
| 3 | CH | 79,9 | 5,62 (d ; 5,5) | 79,8 | 5,63 (d ; 5,7) |
| 3b | C | 158,7 | - | 158,6 | - |
| 4a | C | 142,0 | - | 141,9 | - |
| 5 | CH | 118,7 | 6,91 (d ; 8,5) | 118,7 | 6,88 (d ; 8,4) |
| 6 | CH | 121,2 | 6,97 (dd ; 2,0 ; 8,5) | 121,2 | 6,96 (dd ; 2,0 ; 8,4) |
| 7 | C | 131,6 | - | 131,5 | - |
| 8 | CH | 115,2 | 7,06 (d ; 2,0) | 115,3 | 7,05 (d ; 2,0) |
| 8a | C | 144,3 | - | 144,2 | - |
| 1' | C | 127,9 | - | 128,0 | - |
| 2' | CH | 115,5 | 6,87 (d ; 1,0) | 115,5 | 6,90 (d ; 1,7) |
| 3' | C | 146,9 | - | 146,7 | - |
| 4' | C | 147,5 | - | 147,4 | - |
| 5' | CH | 116,4 | 6,79 (d ; 8,0) | 116,5 | 6,79 (m) |
| 6' | CH | 120,3 | 6,80 (d ; 8,0) | 120,4 | 6,80 (m) |
| 1'' | CH | 116,9 | 6,23 (d ; 14,0) | 116,9 | 6,23 (d ; 13,9) |
| 2'' | CH | 122,0 | 7,09 (d ; 14,0) | 121,9 | 7,12 (d ; 13,9) |
| 4'' | C | 156,2 | - | 156,2 | - |

I.2.2. L'orthidine A (XII)

Nom : (E)-1,1'-((2R,3S)-3-(7-éthène-1,2-diyl-3,4-dihydroxyphényl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-2-yl)bisguanidine

Description : Gomme jaune pale ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 207 (4,56), 226 (4,17), 284 (4,02), 311 (3,73) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 385,2 [M+H]⁺ (C₁₈H₂₁N₆O₄)⁺.

271

Molécule :

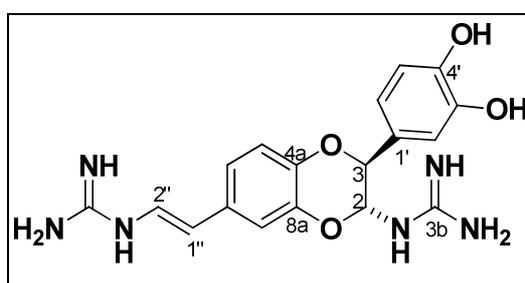


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

| n° | Composé XI | | | Données Bibliographiques ⁷⁶ | |
|-----|-----------------|------------|--------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| | CH _n | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 2 | CH | 77,5 | 5,65 (d ; 5,5) | 77,5 | 5,63 (d ; 5,6) |
| 3 | CH | 79,8 | 4,92 (d ; 5,5) | 79,8 | 4,91 (d ; 5,6) |
| 3b | C | 158,7 | - | 158,7 | - |
| 4a | C | 143,4 | - | 143,4 | - |
| 5 | CH | 118,6 | 6,94 (d ; 8,5) | 118,6 | 6,92 (d ; 8,4) |
| 6 | CH | 121,2 | 6,97 (dd ; 2,0 ; 8,5) | 121,2 | 6,97 (dd ; 2,0 ; 8,4) |
| 7 | C | 131,4 | - | 131,5 | - |
| 8 | CH | 115,5 | 7,00 (m) | 115,4 | 7,00 (d ; 2,0) |
| 8a | C | 142,7 | - | 142,7 | - |
| 1' | C | 128,0 | - | 128,0 | - |
| 2' | CH | 115,4 | 6,87 (m) | 115,4 | 6,86 (d ; 1,8) |
| 3' | C | 146,8 | - | 146,8 | - |
| 4' | C | 147,5 | - | 147,5 | - |
| 5' | CH | 116,4 | 6,78 (m) | 116,4 | 6,78 (m) |
| 6' | CH | 120,2 | 6,76 (m) | 120,3 | 6,76 (m) |
| 1'' | CH | 116,8 | 6,22 (d ; 14,0) | 116,8 | 6,22 (d ; 14,0) |
| 2'' | CH | 122,0 | 7,10 (d ; 14,0) | 122,0 | 7,08 (d ; 14,0) |
| 4'' | C | 156,1 | - | 156,2 | - |

I.2.3. L'orthidine D (XIII)

Nom : (E)-1,1'-((2R,3R)-3-(6-éthène-1,2-diyl-3,4-dihydroxyphényl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-2-yl)bisguanidine

Description : Gomme jaune pale ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 206 (4,59), 227 (4,23), 287 (4,25), 310 (4,01) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 385,2 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{21}N_6O_4^+$).

272

Molécule :

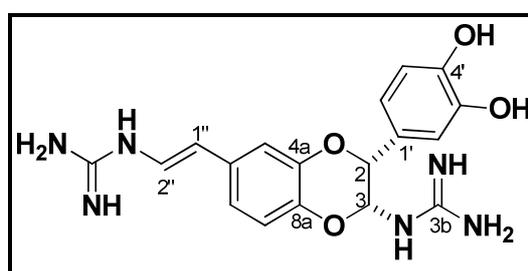


Tableau RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz), CD_3OD :

| n° | Composé XII | | | Données Bibliographiques ⁷⁶ | |
|-----|-----------------|------------|--------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| | CH _n | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 2 | CH | 76,6 | 5,24 (d ; 1,5) | 76,6 | 5,23 (d ; 2,0) |
| 3 | CH | 78,8 | 5,87 (d ; 2,0) | 78,8 | 5,86 (d ; 2,0) |
| 3b | C | 159,1 | - | 159,1 | - |
| 4a | C | 140,6 | - | 140,6 | - |
| 5 | CH | 119,3 | 6,95 (d ; 8,5) | 119,3 | 6,94 (d ; 8,4) |
| 6 | CH | 121,6 | 7,04 (m) | 121,6 | 7,03 (m) |
| 7 | C | 131,9 | - | 131,9 | - |
| 8 | CH | 115,9 | 7,13 (m) | 115,9 | 7,13 (d ; 2,0) |
| 8a | C | 144,5 | - | 144,6 | - |
| 1' | C | 126,9 | - | 126,9 | - |
| 2' | CH | 114,3 | 6,96 (m) | 114,3 | 6,96 (m) |
| 3' | C | 146,9 | - | 146,9 | - |
| 4' | C | 147,1 | - | 147,1 | - |
| 5' | CH | 116,4 | 6,84 (m) | 116,5 | 6,84 (m) |
| 6' | CH | 118,5 | 6,86 (m) | 118,6 | 6,86 (m) |
| 1'' | CH | 116,6 | 6,25 (d ; 14,0) | 116,6 | 6,24 (d ; 14,0) |
| 2'' | CH | 122,2 | 7,14 (d ; 14,0) | 122,2 | 7,12 (d ; 14,0) |
| 4'' | C | 156,1 | - | 156,2 | - |

II. *Parazoanthus axinellae*

Les anémones *Parazoanthus axinellae* ont été collectées à la sortie du port de Fontvieille (Monaco) sur le site des Roches Saint Nicolas à 25 m de profondeur en Août 2007. Les cnidaires ont été extraits immédiatement après leur récolte. L'espèce a été identifiée par T. Pérez (DIMAR, Marseille).

Les colonies ont été extraites par un système de solvant MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 3x20 mL pour 2 g d'organisme humide, 3x5 min aux ultra-sons) à température ambiante. L'extrait brut ainsi obtenu a été purifié par HPLC semi-préparative (PhenomenexTM, Luna Phenyl-Hexyle, 10 x 250 mm, 5 µm) en utilisant un gradient H₂O/MeOH/Acide formique (débit : 3,0 mL.min⁻¹, de 80:20:0,1 à 30:70:0,1 en 30 minutes). Cette purification a permis l'isolement de molécules connues dans le genre *Parazoanthus* : la zoanthoxanthine⁹⁴ (**XIV**, 1,5 mg), la paragrachine⁹⁵ (**XV**, 2,3 mg) et la 3H-norpseudozoanthoxanthine⁹⁹ (**XVI**, 1,5 mg). Des ecdystéroïdes connus ont également été isolés : la 20-hydroxyecdystérone¹⁰⁷ (**XVII**, 3,4 mg), l'acétate de 20-hydroxyecdyson-2-yle¹¹⁰ (**XVIII**, 2,1 mg), l'acétate de 20-hydroxyecdyson-3-yle¹⁰⁸ (**XIX**, 2,8 mg) et la viticostérone E¹¹¹ (**XX**, 1,1 mg). Enfin, une nouvelle famille d'alcaloïdes a été identifiée : la parazoanthine A (**XXI**, 1,3 mg), la parazoanthine B (**XXII**, 2,4 mg), la parazoanthine C (**XXIII**, 1,4 mg), la parazoanthine D (**XXIV**, 1,2 mg), la parazoanthine E (**XXV**, 2,7 mg), la parazoanthine F (**XXVI**, 0,6 mg) et la parazoanthine G (**XXVII**, 0,6 mg).

II.1. Les molécules connues

II.1.1. La famille des zoanthoxanthines

II.1.1.1. La zoanthoxanthine (XIII, 53)

Nom : *N',N',3,4-tétraméthyl-3H-[7]annulèno[1,2;4,5]bis[d]imidazole-2,6-diamine*

274

Description : Pigment jaune fluorescent ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 430 (4,32), 290 (4,50) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 257,1 [M+H]⁺ (C₁₃H₁₇N₆⁺).

Molécule :

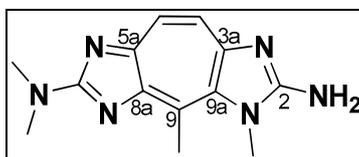


Tableau RMN ¹H (500 MHz) :

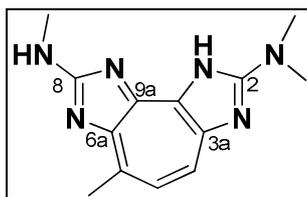
| n° | CH _n | δ_H (m, CD ₃ OD) | Données bibliographiques ⁹⁴ (DMSO- <i>d</i> ₆) |
|------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 4 | CH | 8,04 (s) | 7,93 (s) |
| 5 | CH | 8,04 (s) | 7,93 (s) |
| Me-1 | CH ₃ | 3,16 (s) | 3,90 (s) |
| Me-7 | (CH ₃) ₂ | 3,35 (s) | 3,20 (s) |
| Me-9 | CH ₃ | 3,07 (s) | 3,13 (s) |

II.1.1.2. La paragracine (XV, 51)

Nom : *N,N,N',6-tétraméthyl-1H-[7]annulèno[1,2;3,4]bis[d]imidazole-2,8-diamine*

Description : Pigment jaune fluorescent ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 410 (4,32), 314 (4,72), 310 (4,69), 301(4,74) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 257,1 [M+H]⁺ (C₁₃H₁₇N₆⁺).

Molécule :

Tableau RMN ^1H (500 MHz), CDCl_3 :

| n° | CH_n | Composé XV | | Données bibliographiques ⁹⁵ | | Données bibliographiques ⁹⁸ | |
|------|-------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------------|--|----------------------------------------|--|
| | | δ_{H} (m ; J en Hz) | | δ_{H} (m ; J en Hz) | | δ_{H} (m ; J en Hz) | |
| 4 | CH | 7,83 (d ; 10,8) | | 7,52 (d ; 11,0) | | 7,71 (d ; 10,5) | |
| 5 | CH | 7,85 (d ; 10,5) | | 7,82 (d ; 11,0) | | 7,79 (d ; 10,8) | |
| Me-2 | $(\text{CH}_3)_2$ | 3,26 (s) | | 3,21 (s) | | 3,93 (s) | |
| Me-6 | CH_3 | 2,90 (s) | | 2,85 (s) | | 2,89 (s) | |
| Me-8 | CH_3 | 3,12 (s) | | 3,09 (s) | | 3,18 (s) | |

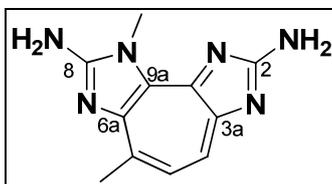
275

II.1.1.3. La 3H-norpseudozoanthoxanthine (XVI)

Nom : 1,4-diméthyl-1H-[7]annuleno[1,2;3,4]bis[d]imidazole-2,8-diamine

Description : Pigment jaune fluorescent ; **UV (MeOH)** λ_{max} (log ϵ) 400(4,32), 362 (4,15), 301 (4,72), 254 (4,15) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 229,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_6^+$).

Molécule :

Tableau RMN ^1H (500 MHz) :

| n° | CH_n | δ_{H} (m, CD_3OD) | Données bibliographiques ⁹⁹ (CD_3COOD) |
|------|---------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 4 | CH | 8,05 (d ; 11,0 Hz) | 8,30 (d ; 11,0 Hz) |
| 5 | CH | 7,79 (d ; 11,0 Hz) | 8,07 (d ; 11,0 Hz) |
| Me-6 | CH_3 | 2,87 (s) | 2,97 (s) |
| Me-9 | CH_3 | 4,37 (s) | 4,53 (s) |

II.1.2. La famille des ecdystéroïdes

II.1.2.1. La 20-hydroxyecdysone (XVII)

Nom : (2 β ,3 β ,5 β ,22R)-2,3,14,20,22,25-hexahydroxycholest-7-én-6-one

Description : Huile jaune, (ESI)MS (+) m/z 481,3 [M+H]⁺ (C₂₇H₄₅O₇⁺).

276

Molécule :

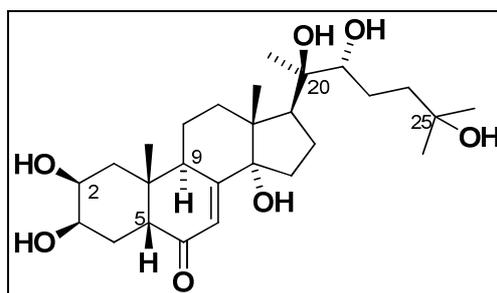


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

| n° | CH _n | Composé XVII | | | Données bibliographiques ¹⁰⁵ | |
|----|-----------------|--------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| | | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | δ_c | δ_H (m ; J en Hz) |
| 1 | CH ₂ | 37,2 | 1,80 (m) 1,43 (m) | 1 β , 2 1 α , 2 | 37,33 | 1,79 1,43 |
| 2 | CH | 68,6 | 3,84 (m) | 1 α , 1 β , 3 | 68,68 | 3,84 (dt ; 12,0 ; 4,2 ; 3,0) |
| 3 | CH | 68,5 | 3,95 (m) | 2, 4 α , 4 β | 68,50 | 3,94 (q ; 3,0 ; 3,0 ; 3,0) |
| 4 | CH ₂ | 32,7 | 1,74 (m) 1,69 (m) | 3, 4 β , 5 3, 4 α , 5 | 32,86 | 1,74 1,69 |
| 5 | CH | 51,7 | 2,38 (m) | 4 α , 4 β , 7 | 51,78 | 2,38 (dd ; 13,2 ; 4,8) |
| 6 | C | 206,7 | - | - | 206,46 | - |
| 7 | CH | 122,1 | 5,81 (d ; 2,5) | 5, 9 | 122,13 | 5,81 (d ; 2,6) |
| 8 | C | 168,3 | - | - | 167,98 | - |
| 9 | CH | 35,1 | 3,15 (m) | 7, 11 α , 11 β | 35,07 | 3,15 (ddd ; 11,3 ; 7,1 ; 2,6) |
| 10 | C | 39,3 | - | - | 39,26 | - |
| 11 | CH ₂ | 21,4 | 1,81 (m) 1,70 (m) | 9, 11 β , 12 α , 12 β 9, 11 α , 12 α , 12 β | 21,48 | 1,81 1,70 |
| 12 | CH ₂ | 32,4 | 2,13 (m) 1,88 (m) | 11 α , 11 β , 12 β , 18 11 α , 11 β , 12 α | 32,50 | 2,13 (td ; 13,0 ; 13,0 ; 5,0) 1,88 |
| 13 | C | 48,5 | - | - | 48,60 | - |
| 14 | C | 85,3 | - | - | 85,21 | - |
| 15 | CH ₂ | 31,7 | 1,97 (m) 1,60 (m) | 15 β , 16 α , 16 β 15 α , 16 α , 16 β | 31,78 | 1,97 1,60 |
| 16 | CH ₂ | 21,5 | 1,98 (m) 1,73 (m) | 15 α , 15 β , 16 β , 17 15 α , 15 β , 16 α , 17 | 21,48 | 1,98 1,73 |
| 17 | CH | 50,5 | 2,39 (m) | 15 α , 15 β , 16 α , 16 β , 18 | 50,51 | 2,39 (t ; 9,5 ; 9,5) |

| n° | CH _n | δ _c | δ _H (m ; J en Hz) | COSY | δ _c | δ _H (m ; J en Hz) |
|----|-----------------|----------------|------------------------------|-------------------|----------------|------------------------------|
| 18 | CH ₃ | 18,1 | 0,89 (s) | 12α, 17 | 18,06 | 0,891 (s) |
| 19 | CH ₃ | 24,3 | 0,97 (s) | - | 24,41 | 0,968 (s) |
| 20 | C | 78,1 | - | - | 77,90 | - |
| 21 | CH ₃ | 21,0 | 1,20 (s) | - | 21,04 | 1,199 (s) |
| 22 | CH | 78,4 | 3,32 (m) | 23a, 23b | 78,41 | 3,32 (dd ; 10,6 ; 1,8) |
| 23 | CH ₂ | 27,3 | 1,66 (m) | 22, 23b, 24a, 24b | 27,32 | 1,66 |
| | | | 1,28 (m) | 22, 23a, 24a, 24b | | 1,28 |
| 24 | CH ₂ | 42,3 | 1,79 (m) | 23a, 23b, 24b | 42,39 | 1,79 |
| | | | 1,43 (m) | 23a, 23b, 24a | | 1,43 |
| 25 | C | 71,4 | - | - | 71,30 | - |
| 26 | CH ₃ | 28,9 | 1,19(s) | - | 28,92 | 1,191 (s) |
| 27 | CH ₃ | 29,6 | 1,20 (s) | - | 29,72 | 1,205 (s) |

II.1.2.2. L'acétate de 20-hydroxyecdyson-2-yle (XVIII)

Nom : acétate de (2β,3β,5β,22R)-3,14,20,22,25-pentahydroxy-6-oxocholest-7-én-2-yle

Description : Huile jaune, (ESI)MS (+) m/z 523,3 [M+H]⁺ (C₂₉H₄₇O₈⁺).

Molécule :

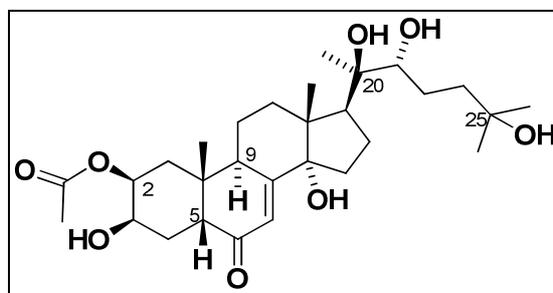


Tableau RMN ^1H (500 MHz), CD_3OD :

| n° | CH_n | δ_{H} (m ; J en Hz) | Données bibliographiques ¹⁰⁵ |
|----|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | CH_2 | 1,86 (m) | 1,86 (dd ; 13,2 ; 4,4) |
| | | 1,59 (m) | 1,59 (dd ; 13,4 ; 12,2) |
| 2 | CH | 4,98 (dt ; 12,0 ; 3,5) | 4,98 (ddd, 12,2 ; 4,4 ; 3,2) |
| 3 | CH | 4,10 (m) | 4,10 (q ; 3,0 ; 3,0 ; 3,0) |
| 4 | CH_2 | 1,84 (m) | 1,84 (m) |
| | | 1,72 (m) | 1,72 (m) |
| 5 | CH | 2,44 (m) | 2,44 (dd ; 13,2 ; 4,2) |
| 6 | C | - | |
| 7 | CH | 5,83 (d ; 2,5) | 5,83 (d ; 2,6) |
| 8 | C | - | |
| 9 | CH | 3,23 (t ; 8,0) | 3,23 (m) |
| 10 | C | - | |
| 11 | CH_2 | 1,85 (m) | 1,85 (m) |
| | | 1,70 (m) | 1,70 (m) |
| 12 | CH_2 | 2,16 (td ; 12,5 ; 12,5 ; 4,5) | 2,16 (td ; 13,0 ; 13,0 ; 5,0) |
| | | 1,88 (m) | 1,88 (m) |
| 13 | C | - | |
| 14 | C | - | |
| 15 | CH_2 | 1,97 (m) | 1,97 (m) |
| | | 1,60 (m) | 1,60 (m) |
| 16 | CH_2 | 1,99 (m) | 1,99 (m) |
| | | 1,74 (m) | 1,74 (m) |
| 17 | CH | 2,40 (m) | 2,40 (dd ; 9,5 ; 8,5) |
| 18 | CH_3 | 0,89 (s) | 0,892 (s) |
| 19 | CH_3 | 0,99 (s) | 0,992 (s) |
| 20 | C | - | |
| 21 | CH_3 | 1,19 (s) | 1,194 (s) |
| 22 | CH | 3,33 (m) | 3,33 (dd ; 11,0 ; 1,8) |
| 23 | CH_2 | 1,66 (m) | 1,66 (m) |
| | | 1,30 (m) | 1,30 (m) |
| 24 | CH_2 | 1,80 (m) | 1,80 (m) |
| | | 1,44 (m) | 1,44 (m) |
| 25 | C | - | |
| 26 | CH_3 | 1,20 (s) | 1,200 (s) |
| 27 | CH_3 | 1,21 (s) | 1,207 (s) |
| 28 | C | - | |
| 29 | CH_3 | 2,07 (m) | 2,07 (s) |

II.1.2.3. L'acétate de 20-hydroxyecdyson-3-yle (XIX)

Nom : acétate de (2 β ,3 β ,5 β ,22R)-2,14,20,22,25-pentahydroxy-6-oxocholest-7-én-3-yle

Description : Huile jaune, (ESI)MS (+) m/z 523,3 [M+H]⁺ (C₂₉H₄₇O₈⁺).

Molécule :

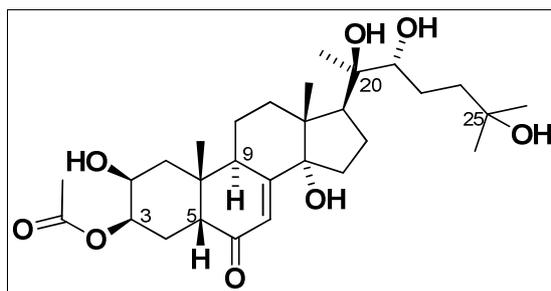


Tableau RMN ¹H (500 MHz), CD₃OD :

| n° | CH _n | δ _H (m ; J en Hz) | Données bibliographiques ¹⁰⁵ | n° | CH _n | δ _H (m ; J en Hz) | Données bibliographiques ¹⁰⁵ |
|----|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|----|-----------------|------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | CH ₂ | 1,91 (m) 1,41 (m) | 1,93 (dd ; 13,3 ; 4,4) 1,43 (dd ; 13,3 ; 12,2) | 16 | CH ₂ | 2,05 (m) 1,75 (m) | 1,99 1,75 |
| 2 | CH | 3,97 (ddd ; 12,0 ; 4,0 ; 3,0) | 3,98 (ddd ; 12,2 ; 4,4 ; 3,2) | 17 | CH | 2,40 (t ; 8,0) | 2,40 (dd ; 9,8 ; 8,3) |
| 3 | CH | 5,16 (brd ; 2,5) | 5,15 (brq ; 3,0 ; 3,0 ; 3,0) | 18 | CH ₃ | 0,89 (s) | 0,896 (s) |
| 4 | CH ₂ | 1,80 (m) 1,75 (m) | 1,77 1,77 | 19 | CH ₃ | 1,00 (s) | 1,001 (s) |
| 5 | CH | 2,22 (dd ; 13,0 ; 4,5) | 2,22 (dd ; 12,6 ; 4,8) | 20 | C | - | - |
| 6 | C | - | - | 21 | CH ₃ | 1,19 (s) | 1,192 (s) |
| 7 | CH | 5,83 (d ; 2,0) | 5,82 (d ; 2,7) | 22 | CH | 3,34 (m) | 3,33 (dd ; 10,5 ; 1,1) |
| 8 | C | - | - | 23 | CH ₂ | 1,66 (m) 1,29 (m) | 1,69 1,29 |
| 9 | CH | 3,17 (brt ; 10,0) | 3,17 (ddd ; 11,5 ; 7,0 ; 2,7) | 24 | CH ₂ | 1,80 (m) 1,45 (m) | 1,81 1,44 |
| 10 | C | - | - | 25 | C | - | - |
| 11 | CH ₂ | 1,82 (m) 1,72 (m) | 1,82 1,72 | 26 | CH ₃ | 1,20 (s) | 1,200 (s) |
| 12 | CH ₂ | 2,15 (m) 1,91 (m) | 2,15 (td ; 13,0 ; 13,0 ; 5,0) 1,89 | 27 | CH ₃ | 1,21 (s) | 1,206 (s) |
| 13 | C | - | - | 28 | C | - | - |
| 14 | C | - | - | 29 | CH ₃ | 2,11 (s) | 2,07 (s) |
| 15 | CH ₂ | 1,93 (m) 1,60 (m) | 1,96 1,60 | | | | |

II.1.2.4. La viticostérone E (XX)

Nom : acétate de (2 β ,3 β ,5 β ,22R)-2,3,14,20,22-pentahydroxy-6-oxocholest-7-én-25-yle

Description : Huile jaune, (ESI)MS (+) m/z 523,3 [M+H]⁺ (C₂₉H₄₇O₈⁺).

Molécule :

280

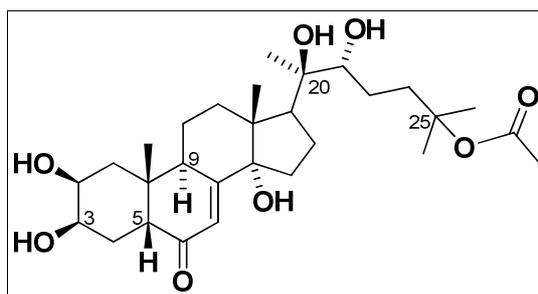


Tableau RMN ¹H (500 MHz) :

| Composé XXI (CD ₃ OD) | | | Données bibliographiques ¹¹¹ | | Composé XXI (CD ₃ OD) | | | Données bibliographiques ¹¹¹ | |
|-------------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| n° | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | C ₅ D ₅ N | CDCl ₃ | n° | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | C ₅ D ₅ N | CDCl ₃ |
| 1 | CH ₂ | 1,88 (m) | 1,85 | 1,40 | 16 | CH ₂ | 2,05 (m) | 2,00 | 1,72 |
| | | 1,43 (m) | | | | | 1,75 (m) | | |
| 2 | CH | 3,84 (m) | 3,86 (m) | | 17 | CH | 2,37 (t ; 8,0) | 2,33 (m) | |
| 3 | CH | 3,95 (m) | 4,02 (m) | | 18 | CH ₃ | 0,89 (s) | 1,20 (s) | 0,85 |
| 4 | CH ₂ | 1,79 (dd ; 13,0 ; 4,0) | 1,80 | 1,60 | 19 | CH ₃ | 0,97 (s) | 1,07 (s) | 0,97 |
| | | 1,60 (m) | | | | | | | |
| 5 | CH | 2,38 (dd ; 13,0 ; 5,0) | 2,43 (dd) | | 20 | C | - | - | |
| 6 | C | - | - | | 21 | CH ₃ | 1,19 (s) | 1,60 (s) | 1,20 |
| 7 | CH | 5,81 (d ; 2,5) | 5,84 (d ; 2,5) | | 22 | CH | 3,34 (m) | 3,37 (d) | |
| 8 | C | - | - | | 23 | CH ₂ | 1,66 (m) | ? | |
| 9 | CH | 3,16 (m) | 2,99 (m) | | 24 | CH ₂ | 1,29 (m) | 1,20 | 2,17 |
| | | | | | | | 2,15 (m) | | |
| 10 | C | - | - | | 25 | C | - | - | |
| 11 | CH ₂ | 1,82 (m) | 1,82 | 1,70 | 26 | CH ₃ | 1,41(s) | 1,45 (s) | 1,40 |
| | | 1,72 (m) | | | | | | | |
| 12 | CH ₂ | 2,15 (m) | ? | | 27 | CH ₃ | 1,48 (s) | 1,52 (s) | 1,44 |
| | | 1,91 (m) | | | | | | | |
| 13 | C | - | - | | 28 | C | - | - | |
| 14 | C | - | - | | 29 | CH ₃ | 1,96 (s) | 1,95 (s) | 1,95 |
| 15 | CH ₂ | 1,93 (m) | ? | ? | | | | | |
| | | 1,60 (m) | | | | | | | |

II.2. Les molécules nouvelles

II.2.1. Parazoanthine A (XXI)

Nom : (*E,S*)-1-(3-(1-(2-(4-hydroxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)prop-1-yl)guanidine.

Description : Huile incolore ; $[\alpha]_D^{20}$ -13° (c 0,1, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 281 (3,94) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3365, 2953, 2917, 2854, 1714, 1657, 1624 cm⁻¹ ; **CD (MeOH)** λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 281 (-0,19) nm ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 318,1563 [M+H]⁺ (Δ 0,8 ppm pour C₁₅H₂₀N₅O₃⁺).

281

Molécule :

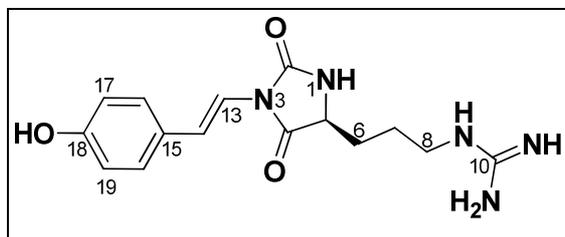
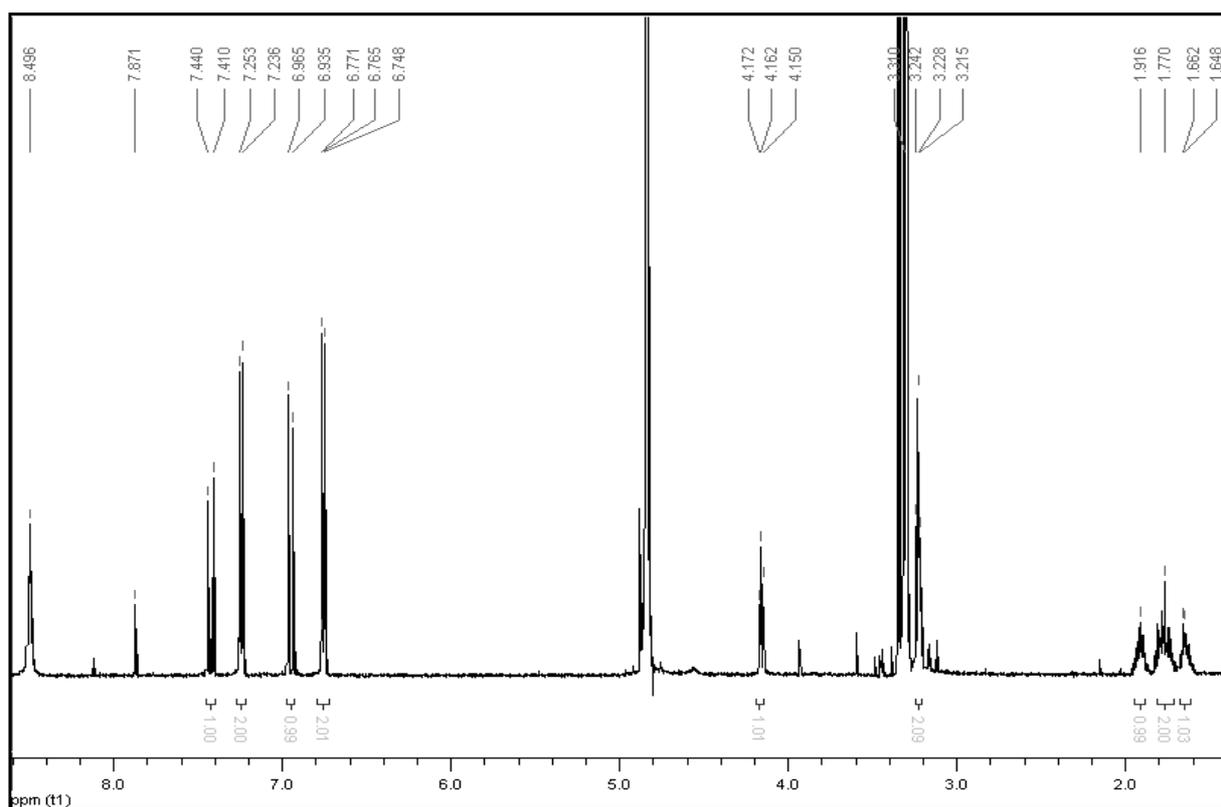
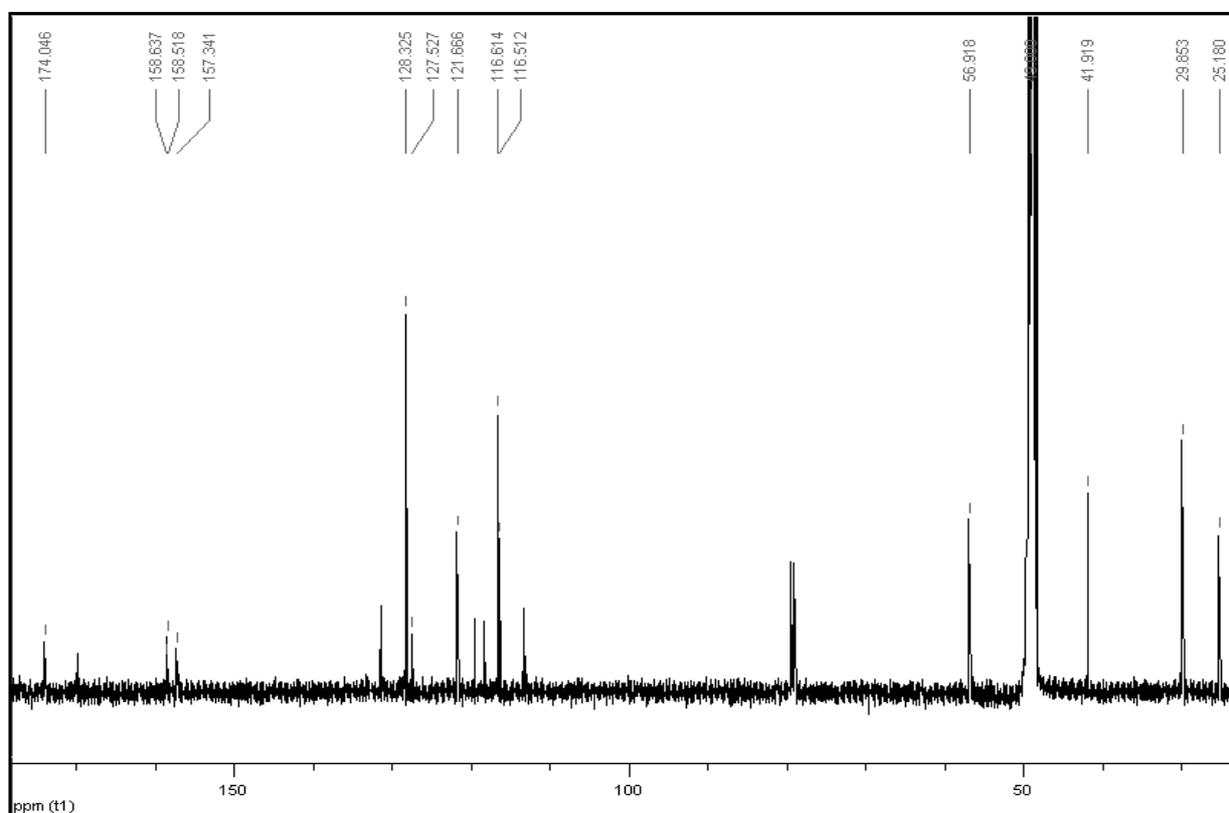


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

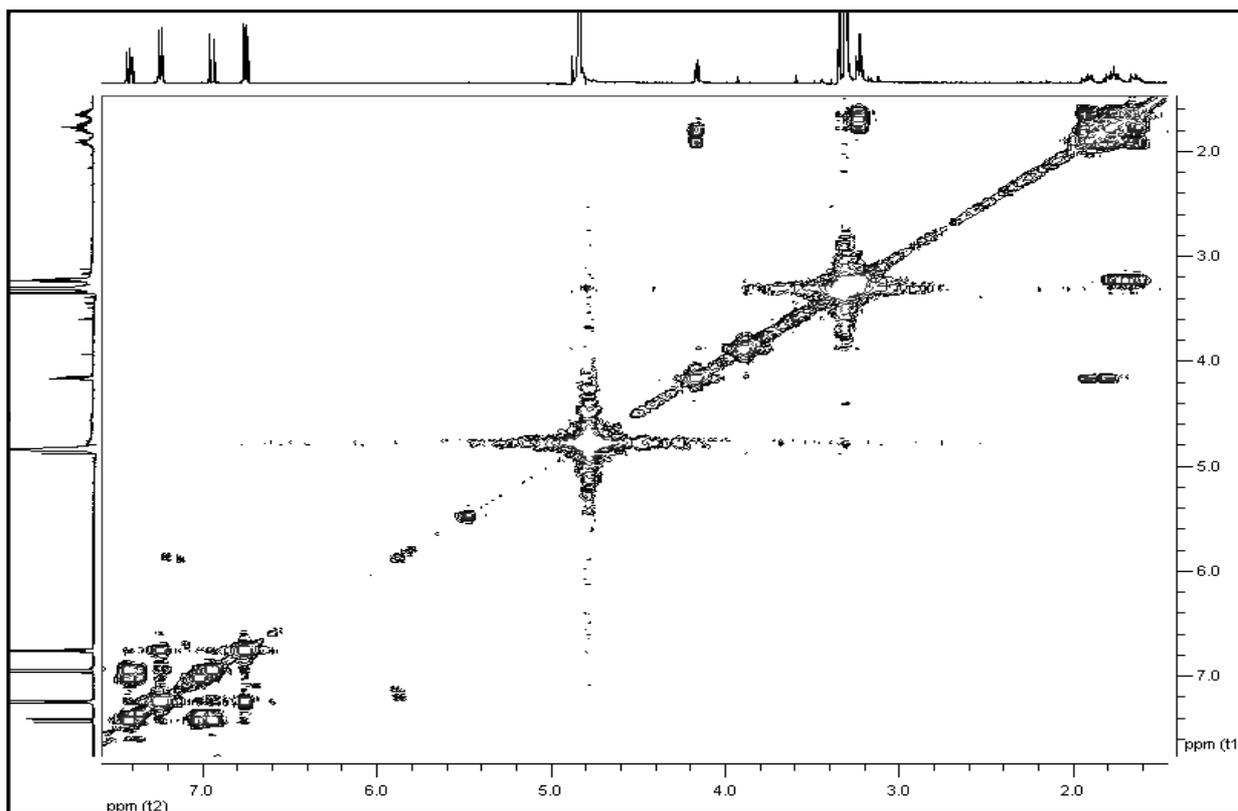
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|----------------|----------------|
| 2 | 157,3 | C | - | - | 5, 13 |
| 4 | 174,0 | C | - | - | 5, 6a, 6b, 13 |
| 5 | 57,0 | CH | 4,16 (t ; 5,5) | 6a, 6b | 6a, 6b, 7b |
| 6 | 29,9 | CH ₂ | 1,92 (m) | 5, 7a, 7b | 5, 7a, 7b, 8 |
| | | | 1,81 (m) | 5, 7a, 7b | |
| 7 | 25,2 | CH ₂ | 1,75 (m) | 6a, 6b, 8 | 5, 6a, 6b, 8 |
| | | | 1,66 (m) | 6a, 6b, 8 | |
| 8 | 41,9 | CH ₂ | 3,23 (t ; 7,0) | 7a, 7b | 6a, 6b, 7a, 7b |
| 10 | 158,5 | C | - | - | 8 |
| 13 | 116,5 | CH | 6,95 (d ; 15,0) | 14, 20, 16 | 14 |
| 14 | 121,7 | CH | 7,42 (d ; 15,0) | 13, 16 | 16, 20 |
| 15 | 127,6 | C | - | - | 13, 14 |
| 16 | 128,3 | CH | 7,25 (d ; 8,5) | 13, 14, 19, 17 | 13, 14, 20 |
| 17 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 20, 16 | 14, 19 |
| 18 | 158,6 | C | - | - | 20, 19, 17, 16 |
| 19 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 20, 16 | 14, 17 |
| 20 | 128,3 | CH | 7,25 (d ; 8,5) | 13, 19, 17 | 13, 14, 16 |



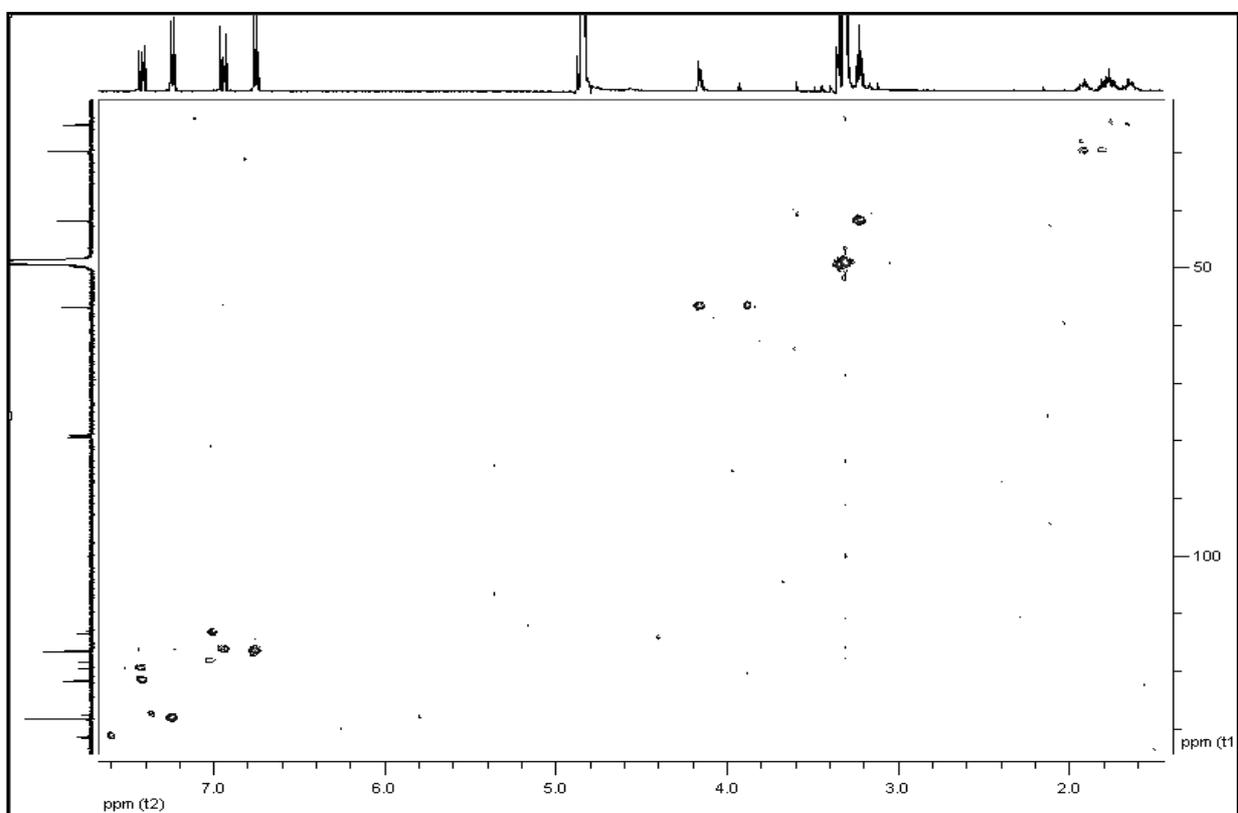
32 Spectre RMN ¹H de la Parazoanthine A (XXI), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃ 500 MHz



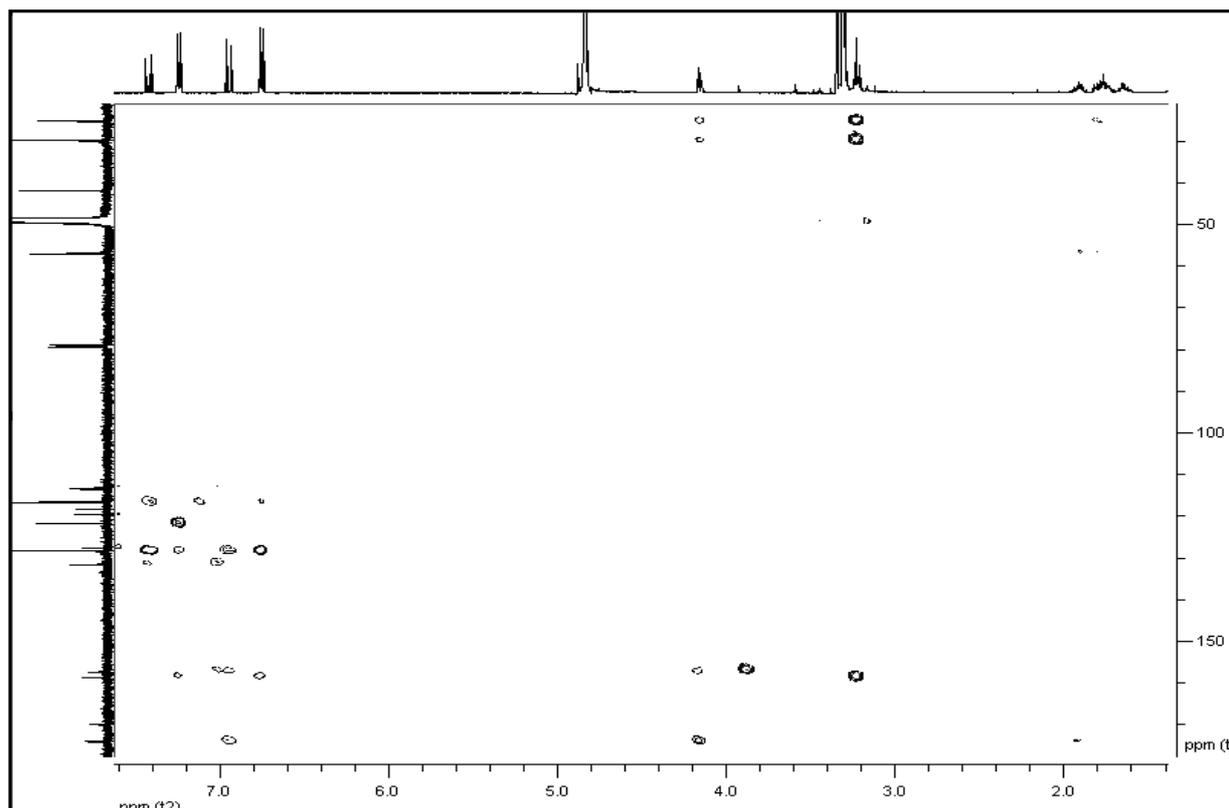
33 Spectre RMN ¹³C de la Parazoanthine A (XXI), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃ 125 MHz



34 Spectre RMN COSY de la Parazoanthine A (XXI), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃



35 Spectre RMN HSQC de la Parazoanthine A (XXI), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃



36 Spectre RMN HMBC de la Parazoanthine A (XXI), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃

Calculs théoriques du dichroïsme circulaire de la parazoanthine A (XXI) :

Tous les calculs ont été réalisés à 298 K par le programme Gaussian03. La DFT (Density Functional Theory) a été utilisée pour chercher l'énergie potentielle de surface (PES) au niveau B3LYP/6-31++G(d, p) afin d'identifier les conformères. Les géométries des conformères ont été optimisées au niveau B3LYP/6-31++G(d,p). La méthode TDDFT a été utilisée pour calculer l'énergie d'excitation (en eV) et la force de rotation R dans les formes de la vitesse du dipôle (R_{vel}) et la longueur de dipôle (R_{len}).

Les forces de rotation calculées ont été simulées en spectre ECD en utilisant la fonction gaussienne suivante :

$$\Delta\varepsilon(E) = \frac{1}{2.297 \times 10^{-39}} \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \sum_i^A \Delta E_i R_i e^{-((E-\Delta E_i)/(2\sigma))^2}$$

σ : Largeur de la bande à la hauteur 1/e.

ΔE_i : Energies d'excitation à une transition i

R_i : Force de rotation à une transition i

$\sigma = 0,20$ eV et R_{vel} ont été utilisés.

II.2.2. Parazoanthine B (XXII)

Nom : 1-((Z)-3-(1-((E)-2-(4-hydroxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-ylidène)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 230 (3,32), 254,5 (3,20), 300 (2,85) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3345, 2957, 2924, 2854, 1719, 1669 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 316,1393 [M+H]⁺ (Δ - 3,6 ppm pour C₁₅H₁₈N₅O₃⁺).

Molécule :

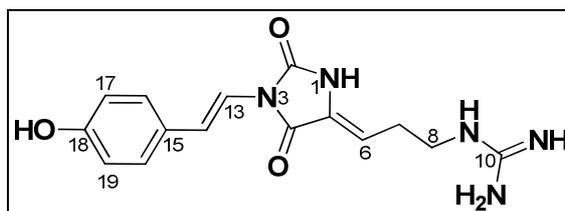
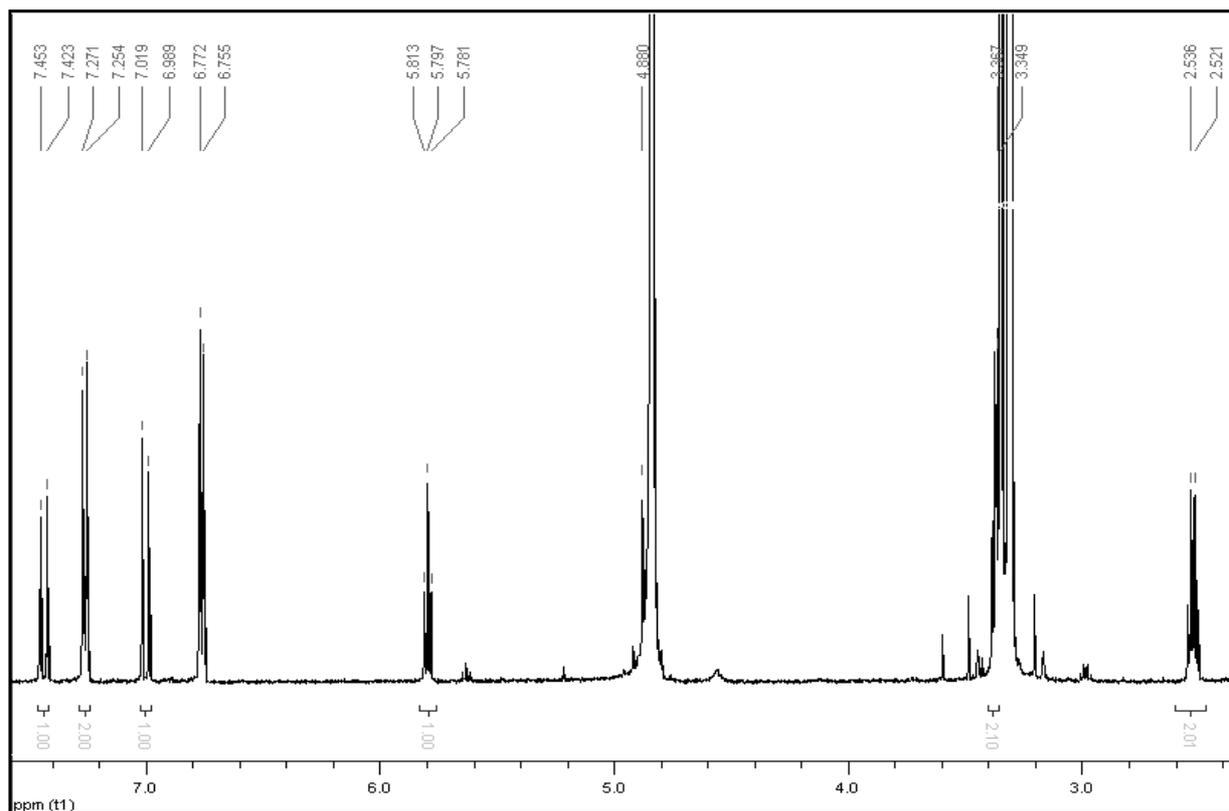
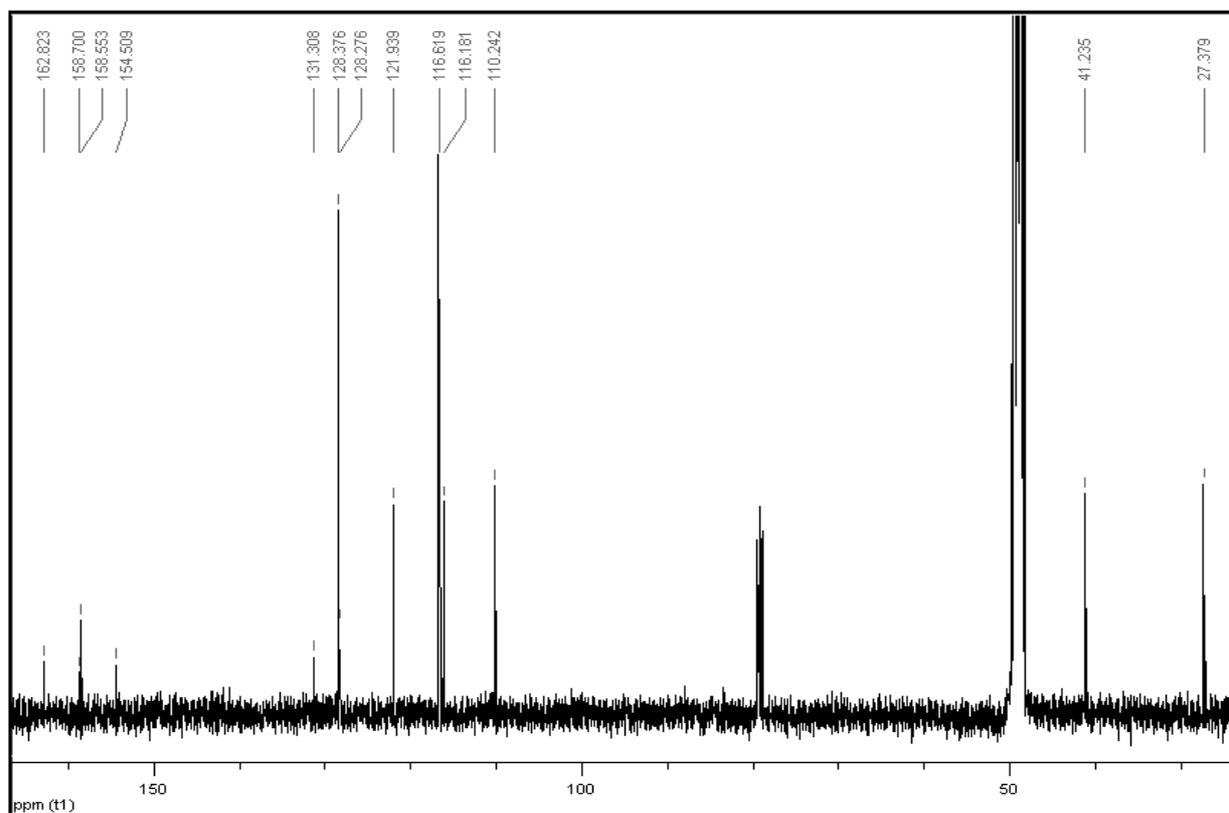


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

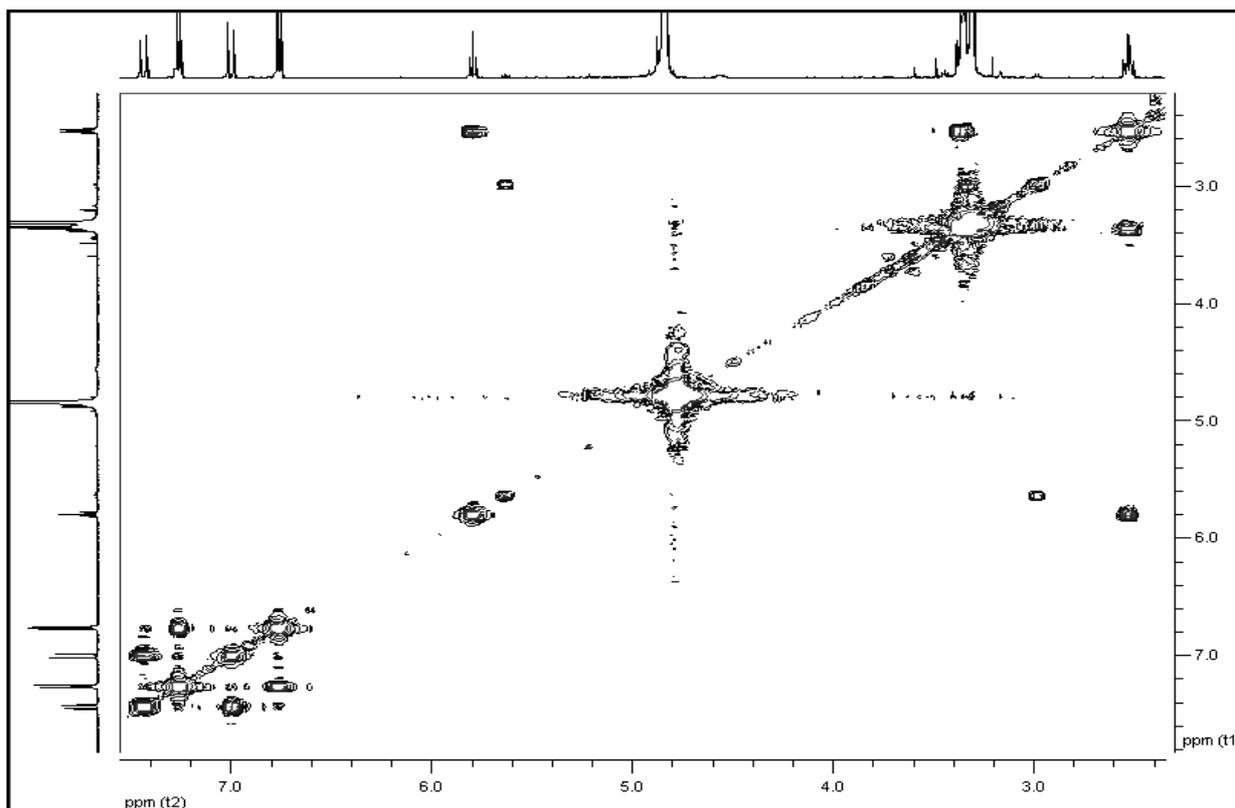
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY | HMBC (C→H) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 2 | 154,5 | C | - | - | 13 |
| 4 | 162,8 | C | - | - | 13, 6 |
| 5 | 131,3 | C | - | - | 7 |
| 6 | 110,2 | CH | 5,80 (t ; 8,0) | 7 | 7, 8 |
| 7 | 27,4 | CH ₂ | 2,53 (q ; 8,0 ; 15,5) | 6, 8 | 8 |
| 8 | 41,2 | CH ₂ | 3,37 (m) | 7 | 6, 7 |
| 10 | 158,8 | C | - | - | 8 |
| 13 | 116,2 | CH | 7,00 (d ; 15,0) | 14, 16, 17, 19, 20 | 14 |
| 14 | 121,9 | CH | 7,44 (d ; 15,0) | 13, 16, 17, 19, 20 | 16, 17, 19, 20 |
| 15 | 128,3 | C | - | - | 14, 16, 17, 19, 20 |
| 16 | 128,4 | CH | 7,26 (d ; 8,5) | 13, 14, 17, 19 | 13, 14, 20 |
| 17 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 13, 14, 16, 20 | 19 |
| 18 | 158,5 | C | - | - | 16, 17, 19, 20 |
| 19 | 116,6 | CH | 6,76 (d ; 8,5) | 13, 14, 16, 20 | 17 |
| 20 | 128,4 | CH | 7,26 (d ; 8,5) | 13, 14, 17, 19 | 14, 13, 16 |



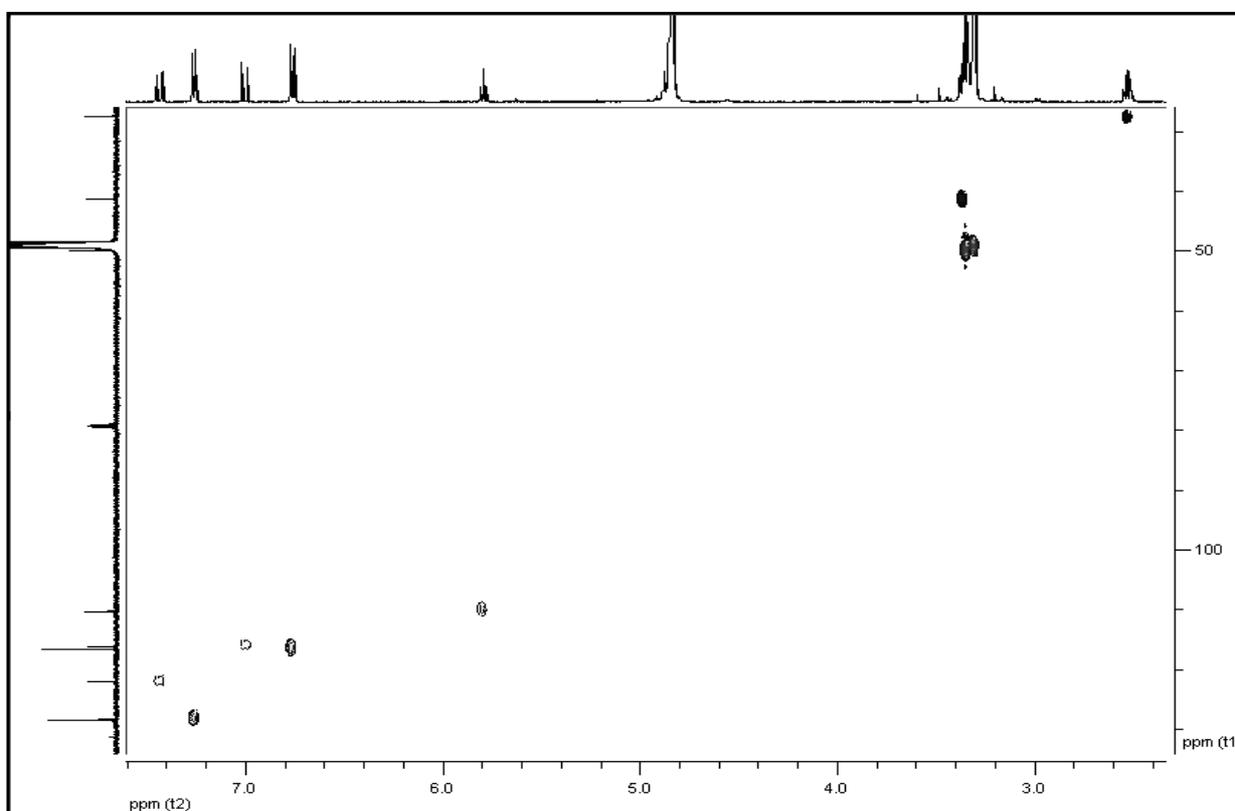
37 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine B (XXII), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 500 MHz



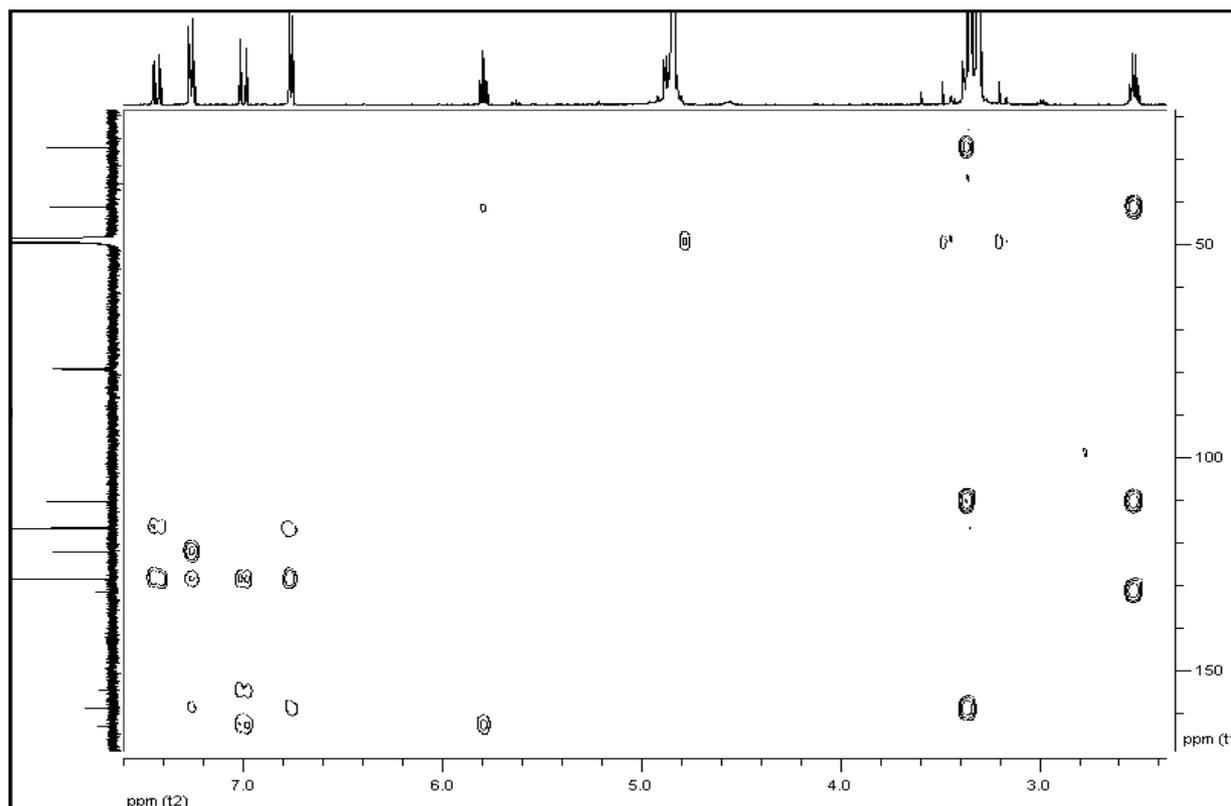
38 Spectre RMN ^{13}C de la Parazoanthine B (XXII), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 125 MHz



39 Spectre RMN COSY de la Parazoanthine B (XXII), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃



40 Spectre RMN HSQC de la Parazoanthine B (XXII), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃



41 Spectre RMN HMBC de la Parazoanthine B (XXII), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃

II.2.3. Parazoanthine C (XXIII)

Nom : 1-((Z)-3-(1-((E)-2-(4-méthoxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-ylidène)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 279 (3,91) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3365, 2953, 2917, 2854, 1714, 1657, 1624 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 330,1578 [M+H]⁺ (Δ 5,4 ppm pour C₁₆H₂₀N₅O₃⁺).

Molécule :

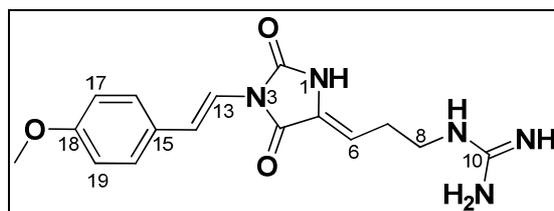
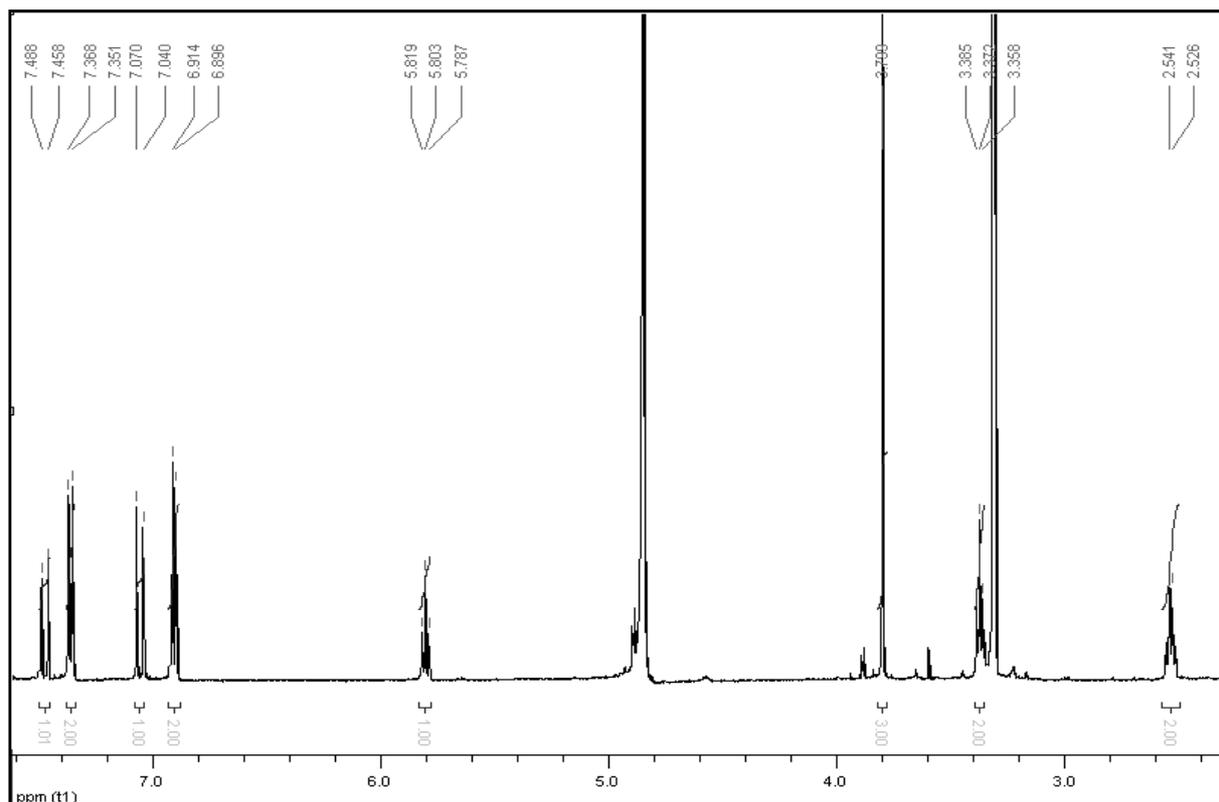
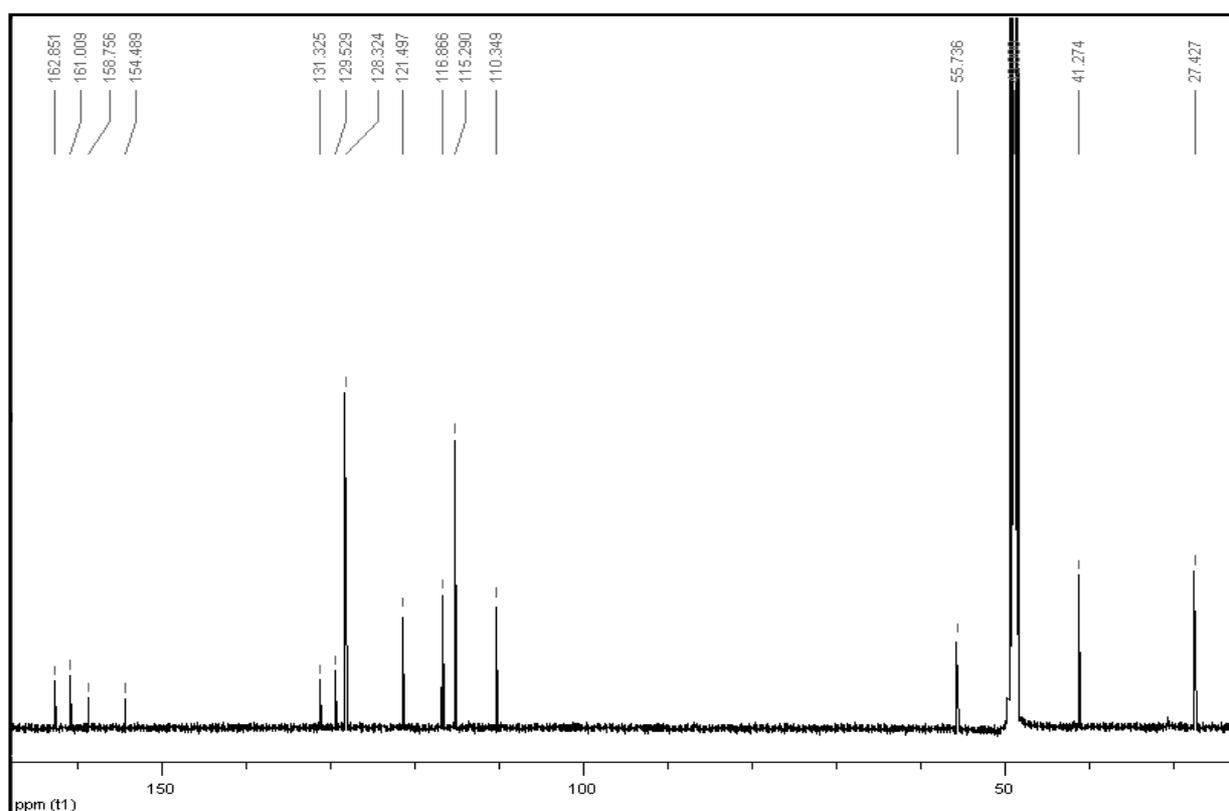


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|
| 2 | 154,5 | C | - |
| 4 | 162,9 | C | - |
| 5 | 131,3 | C | - |
| 6 | 110,3 | CH | 5,80 (t ; 8,0) |
| 7 | 27,4 | CH ₂ | 2,57 (q ; 8,0 ; 7,0) |
| 8 | 41,3 | CH ₂ | 3,37 (t ; 7,0) |
| 10 | 158,8 | C | - |
| 13 | 116,9 | CH | 7,05 (d ; 15,0) |
| 14 | 121,5 | CH | 7,47 (d ; 15,0) |
| 15 | 129,5 | C | - |
| 16 | 128,3 | CH | 7,36 (d ; 8,5) |
| 17 | 115,3 | CH | 6,90 (d ; 8,5) |
| 18 | 161,1 | C | - |
| 19 | 115,3 | CH | 6,90 (d ; 8,5) |
| 20 | 128,3 | CH | 7,36 (d ; 8,5) |
| 21 | 55,7 | CH ₃ | 3,80 (s) |



42 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine C (XXIII), CD_3OD 500 MHz



43 Spectre RMN ^{13}C de la Parazoanthine C (XXIII), CD_3OD 125 MHz

II.2.4. Parazoanthine D (XXIV)

Nom : (E,S)-1-(3-(1-(2-(3-bromo-4-méthoxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; $[\alpha]_D^{20}$ $-9,4^\circ$ (c 0,1, MeOH) ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 270 (3,21) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3345, 2957, 2854, 1719, 1669 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 410,08203 [M+H]⁺ (Δ - 0,5 ppm pour C₁₆H₂₁BrN₅O₃⁺).

Molécule :

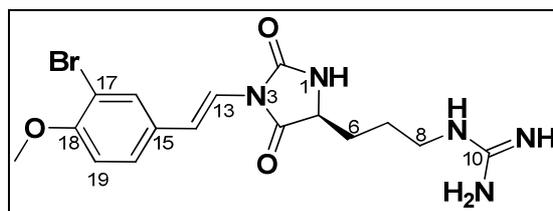
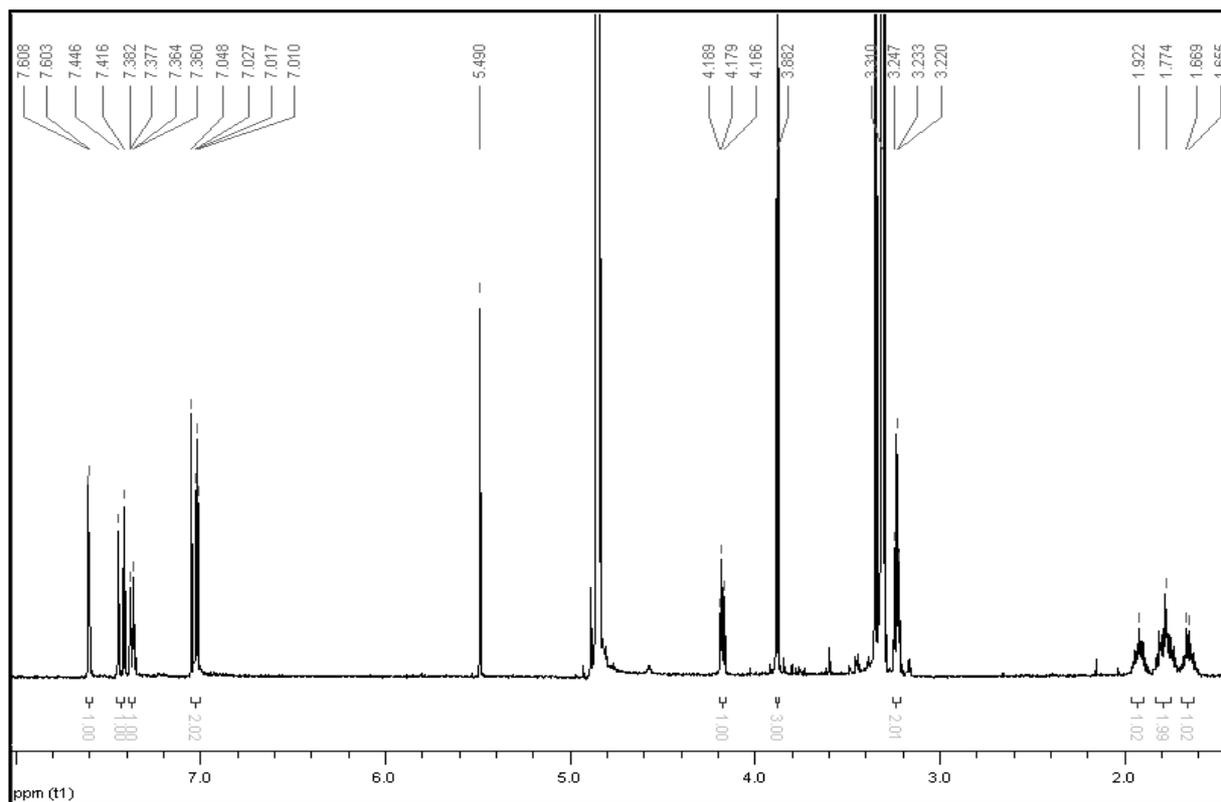
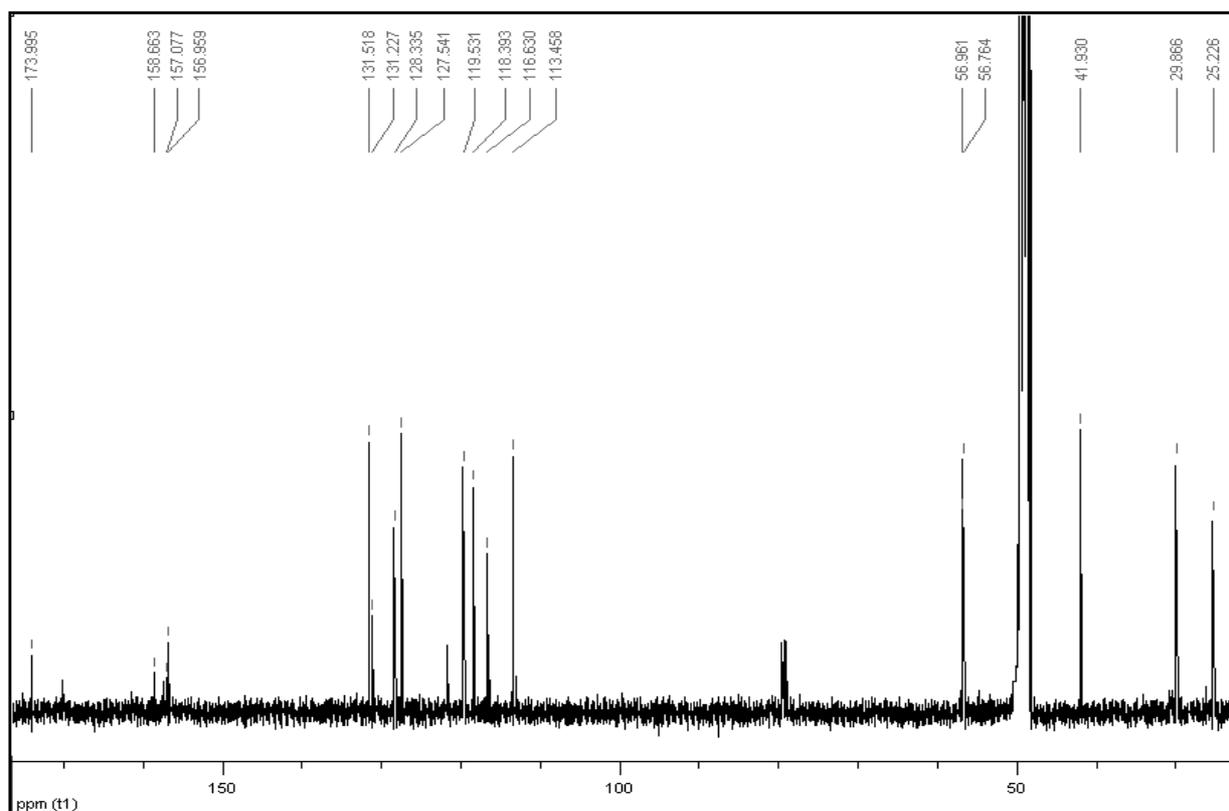


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

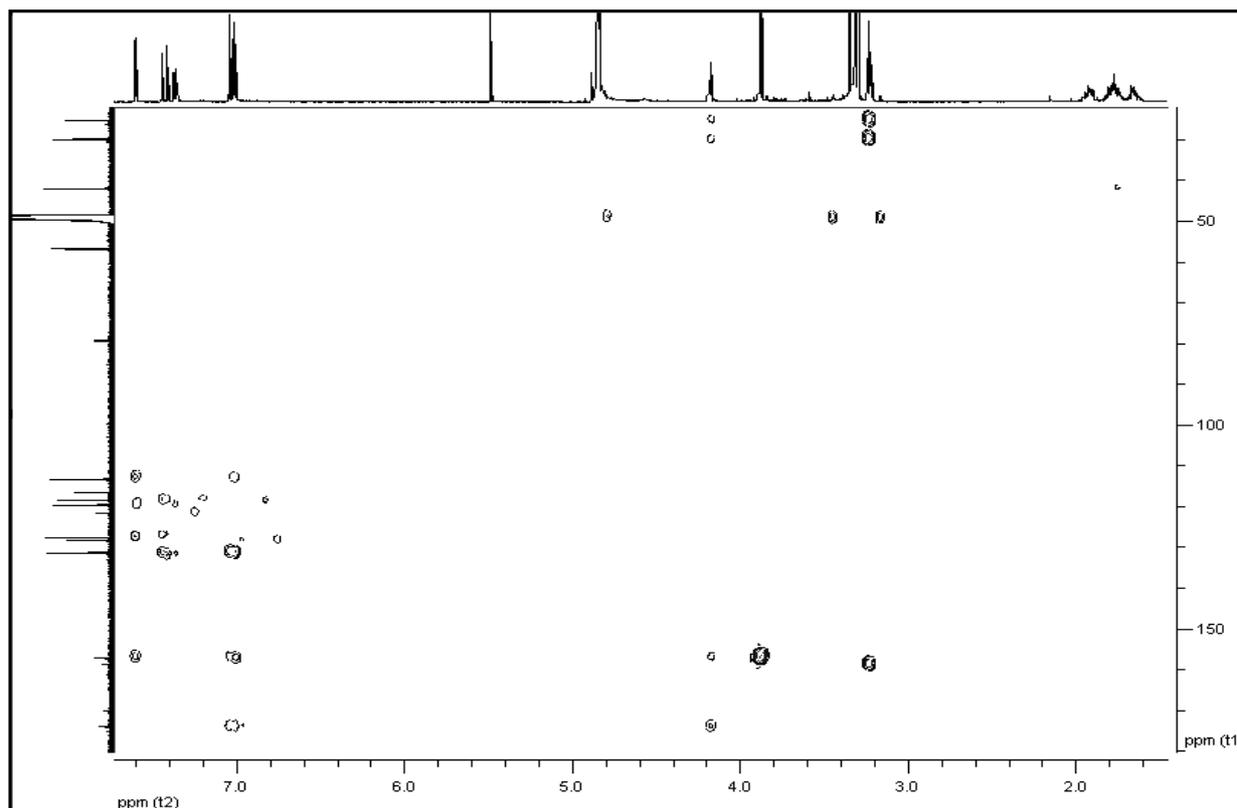
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | HMBC (C→H) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|----------------|
| 2 | 157,1 | C | - | 5 |
| 4 | 174,0 | C | - | 5, 13 |
| 5 | 57,0 | CH | 4,18 (t ; 5,0) | 6 |
| 6 | 29,9 | CH ₂ | 1,90 (m) 1,80 (m) | 5, 7, 8 |
| 7 | 25,2 | CH ₂ | 1,75 (m) 1,66 (m) | 5, 6, 8 |
| 8 | 41,9 | CH ₂ | 3,23 (t ; 7,0) | 7 |
| 10 | 158,7 | C | - | 8 |
| 13 | 118,4 | CH | 7,03 (d ; 15,0) | 14 |
| 14 | 119,5 | CH | 7,42 (d ; 15,0) | 16, 20 |
| 15 | 131,2 | C | - | 13, 14 |
| 16 | 131,5 | CH | 7,60 (d ; 2,0) | 13, 14, 19, 20 |
| 17 | 113,0 | C | - | 16, 19 |
| 18 | 157,0 | C | - | 16, 19, 20, 21 |
| 19 | 113,5 | CH | 7,01 (d ; 8,5) | - |
| 20 | 127,5 | CH | 7,37 (dd ; 2,0 ; 8,5) | 14, 16 |
| 21 | 56,8 | CH ₃ | 3,88 (s) | - |



44 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine D (XXIV), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 500 MHz



45 Spectre RMN ^{13}C de la Parazoanthine D (XXIV), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 125 MHz



46 Spectre RMN HMBC de la Parazoanthine D (XXIV), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃

II.2.5. Parazoanthine E (XXV)

Nom : 1-((Z)-3-(1-((E)-2-(3-bromo-4-méthoxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-ylidène)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (3,45), 235 (3,10) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3365, 2953, 2917, 2853, 1714, 1657, 1624 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 408,06650 [M+H]⁺ (Δ -0,2 ppm pour C₁₆H₁₉BrN₅O₃⁺).

294

Molécule :

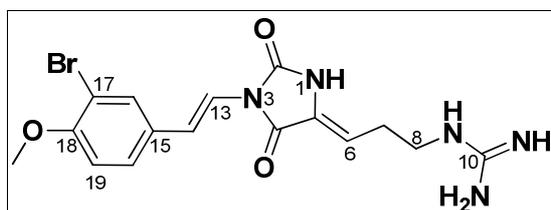
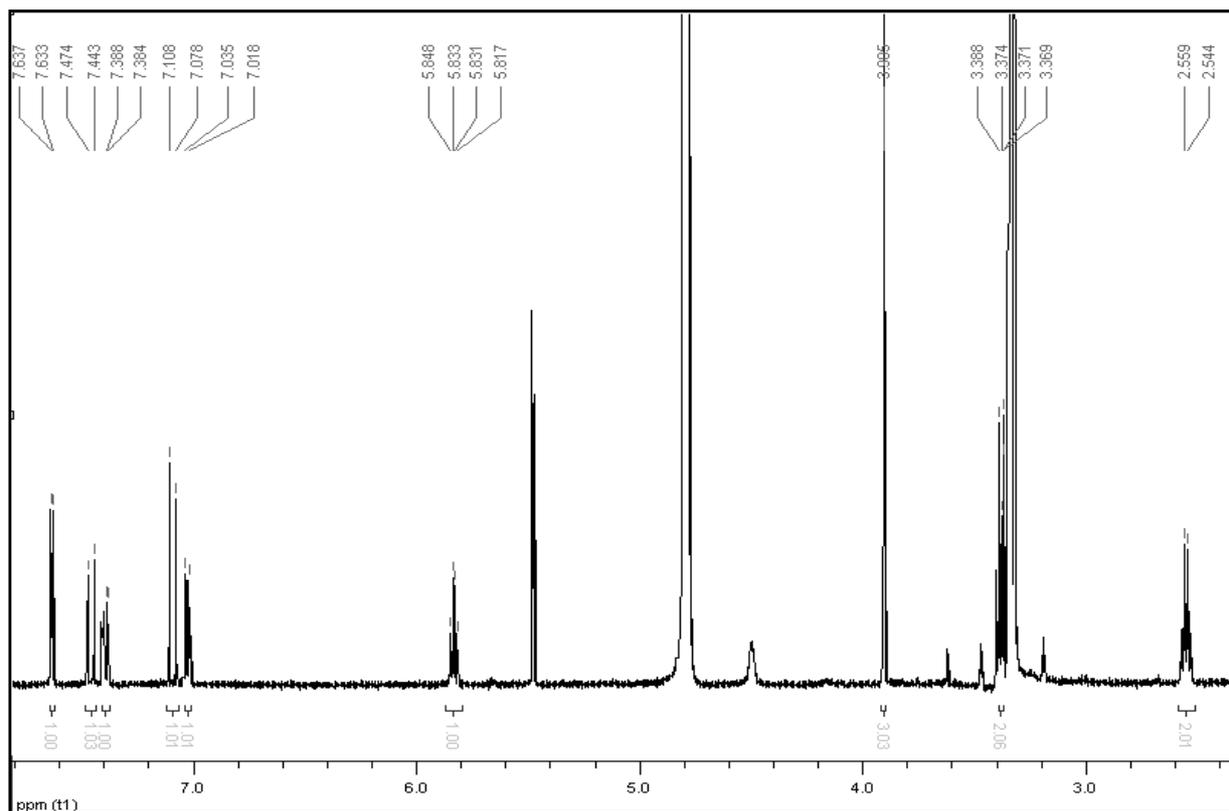
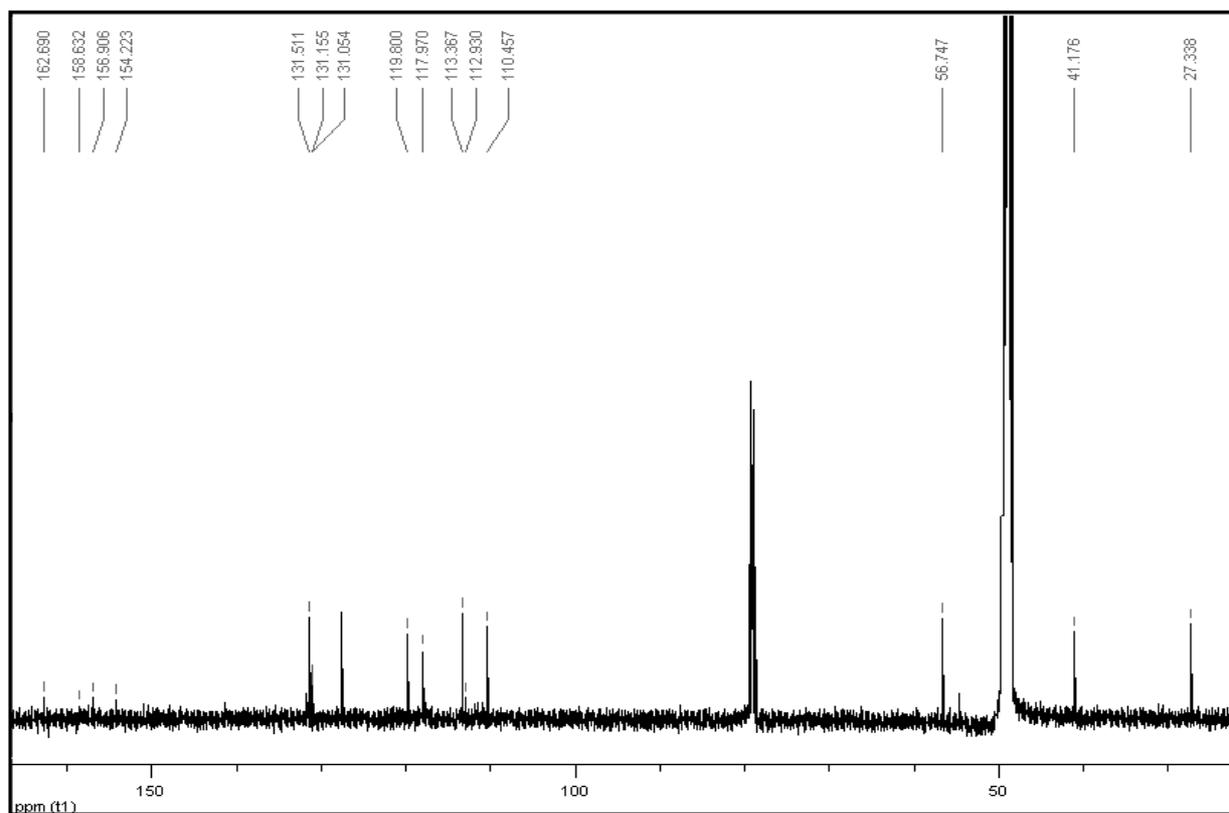


Tableau RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz), CD₃OD :

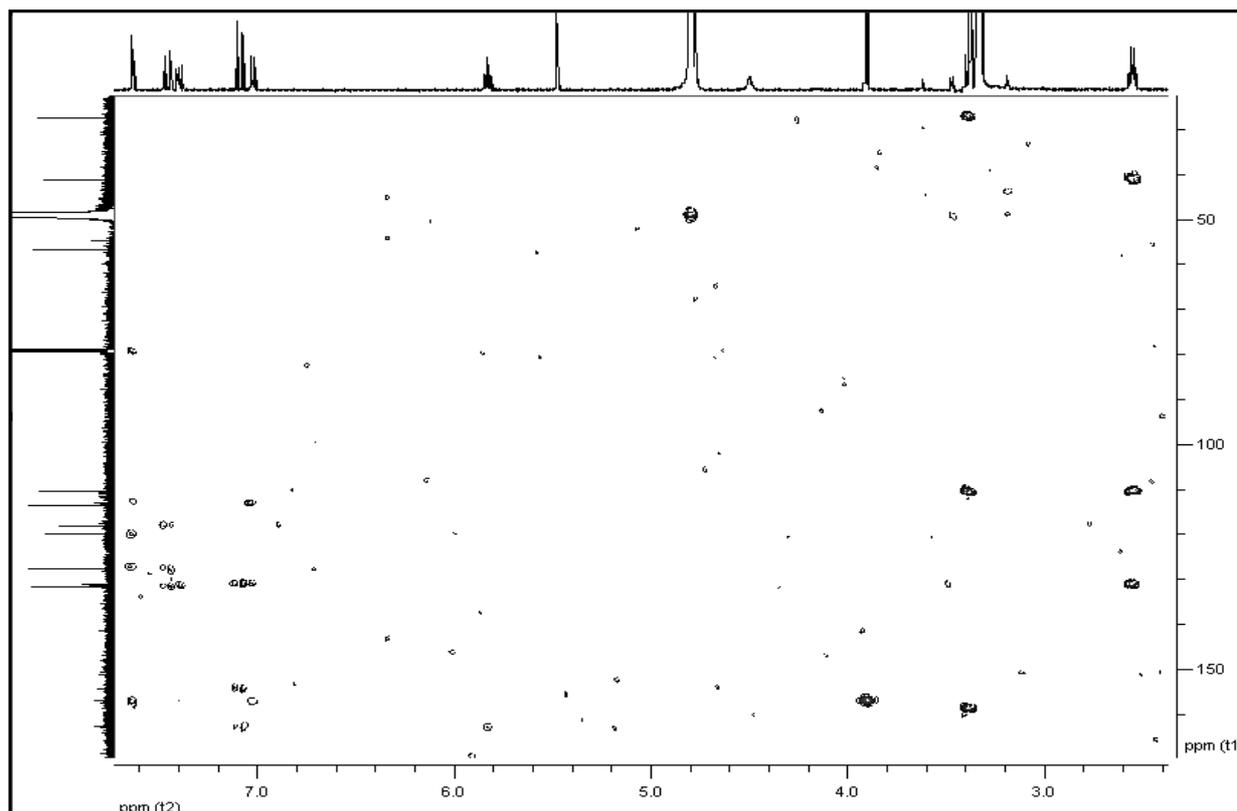
| n° | δ_c | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | HMBC (C→H) |
|----|------------|-----------------|--------------------------|----------------|
| 2 | 154,2 | C | - | 13 |
| 4 | 162,7 | C | - | 6, 13 |
| 5 | 131,1 | C | - | 7 |
| 6 | 110,5 | CH | 5,83 (dd ; 8,0 ; 7,5) | 7, 8 |
| 7 | 27,3 | CH ₂ | 2,55 (q ; 7,0 ; 7,0) | 8 |
| 8 | 41,2 | CH ₂ | 3,39 (t ; 7,0) | 6, 7 |
| 10 | 158,6 | C | - | 8 |
| 13 | 118,0 | CH | 7,09 (d ; 15,0) | 14 |
| 14 | 119,8 | CH | 7,46 (d ; 15,0) | 13, 16, 20 |
| 15 | 131,2 | C | - | 13, 19, 20 |
| 16 | 131,6 | CH | 7,63 (d ; 2,0) | 14, 20 |
| 17 | 112,9 | C | - | 16, 19 |
| 18 | 157,0 | C | - | 16, 19, 20, 21 |
| 19 | 113,4 | CH | 7,02 (d ; 9,0) | - |
| 20 | 127,6 | CH | 7,39 (dd ; 2,0 ; 9,0) | 14, 16 |
| 21 | 56,7 | CH ₃ | 3,90 (s) | - |



47 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine E (XXV), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 500 MHz



48 Spectre RMN ^{13}C de la Parazoanthine E (XXV), CD_3OD + 1 goutte de CDCl_3 125 MHz



49 Spectre RMN HMBC de la Parazoanthine E (**XXV**), CD₃OD + 1 goutte de CDCl₃

II.2.6. Parazoanthine F (XXVI)

Nom : 1-((Z)-3-(1-((E)-2-(3,5-dibromo-4-méthoxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-ylidène)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 264 (3,45), 235 (3,10) nm ; **IR (film CH₂Cl₂)** ν_{\max} 3365, 2957, 2917, 2850, 1714, 1657, 1624 cm⁻¹ ; **HR(ESI)MS (+)** m/z 485,97802 [M+H]⁺, Δ -1,9 ppm pour C₁₆H₁₈Br₂N₅O₃)

Molécule :

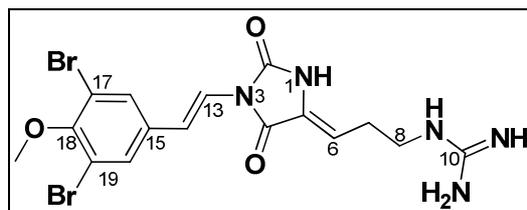
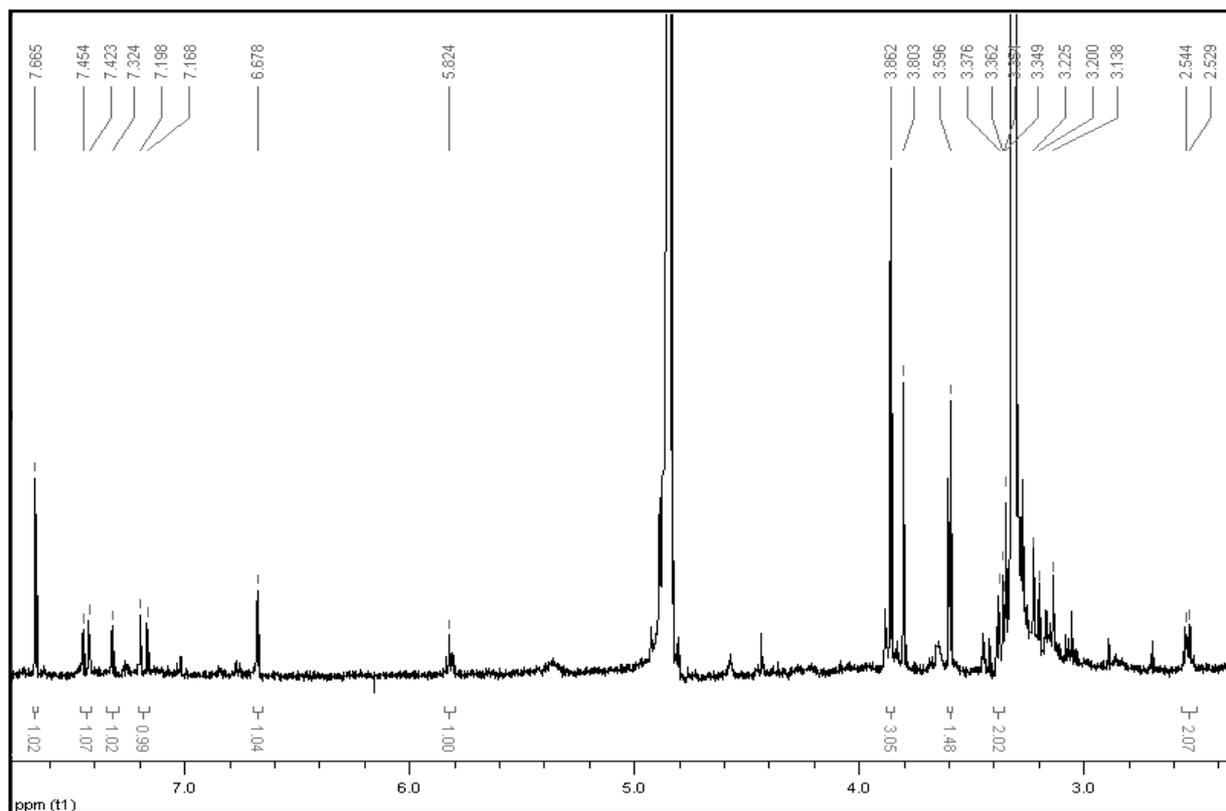
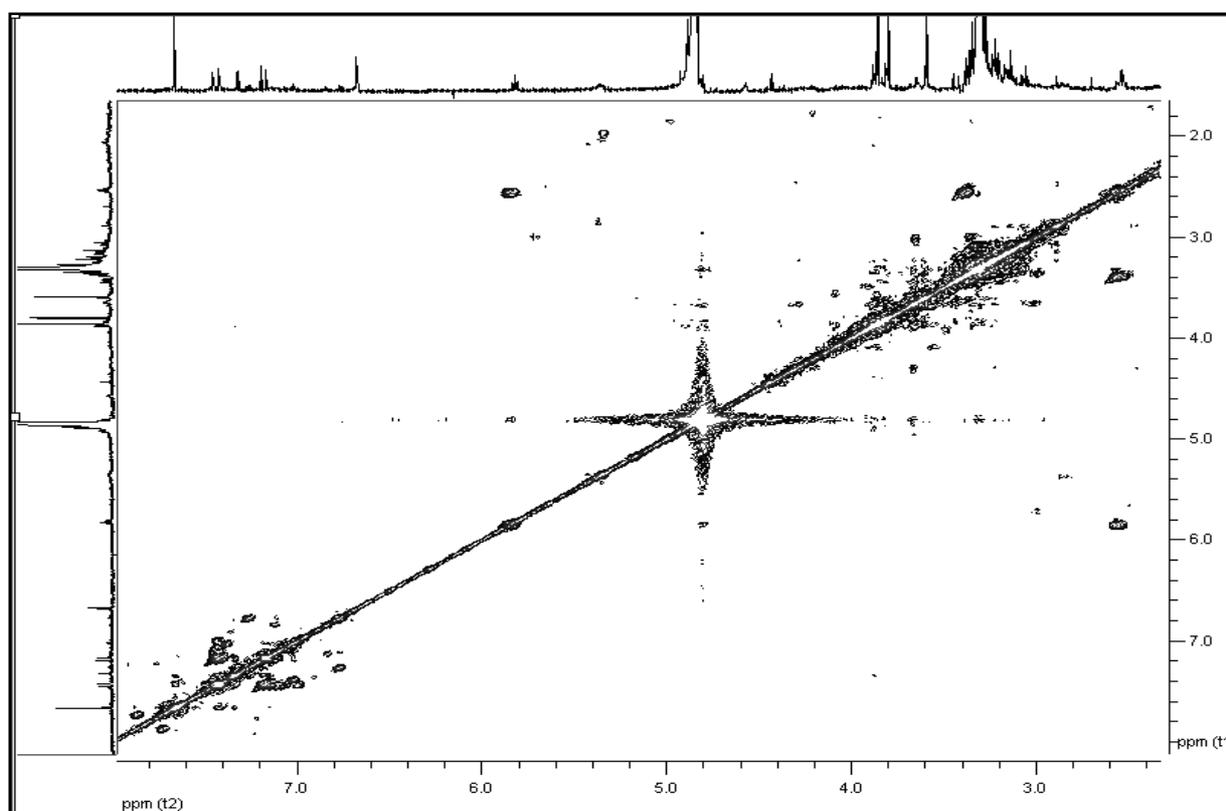


Tableau RMN ¹H (500 MHz), CD₃OD :

| n° | CH _n | δ_H (m ; J en Hz) | COSY |
|----|-----------------|--------------------------|--------|
| 2 | C | - | - |
| 4 | C | - | - |
| 5 | C | - | - |
| 6 | CH | 5,82 (t ; 8,0) | 7 |
| 7 | CH ₂ | 2,54 (q ; 7,5 ; 14,0) | 6, 8 |
| 8 | CH ₂ | 3,39 (t ; 7,0) | 7 |
| 10 | C | - | - |
| 13 | CH | 7,18 (d ; 15,0) | 14, 20 |
| 14 | CH | 7,44 (d ; 15,0) | 13, 16 |
| 15 | C | - | - |
| 16 | CH | 7,66 (s) | 14, 20 |
| 17 | C | - | - |
| 18 | C | - | - |
| 19 | C | - | - |
| 20 | CH | 7,32 (s) | 13, 16 |
| 21 | CH ₃ | 3,86 (s) | - |



50 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine F (**XXVI**), CD_3OD 500 MHz



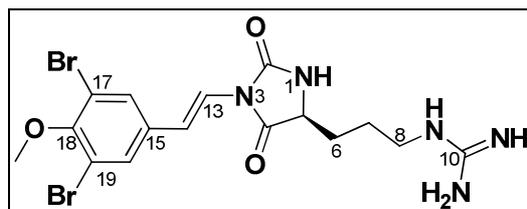
51 Spectre RMN COSY de la Parazoanthine F (**XXVI**), CD_3OD 500 MHz

II.2.6. Parazoanthine G (XXVII)

Nom : (*E,S*)-1-(3-(1-(2-(4-hydroxyphényl)éthén-1-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)prop-1-yl)guanidine

Description : Huile incolore ; **UV (MeOH)** λ_{\max} (log ϵ) 271 (3,21) nm ; **(ESI)MS (+)** m/z 488, 490 et 492 (1:2:1, [M+H]⁺)

Molécule :

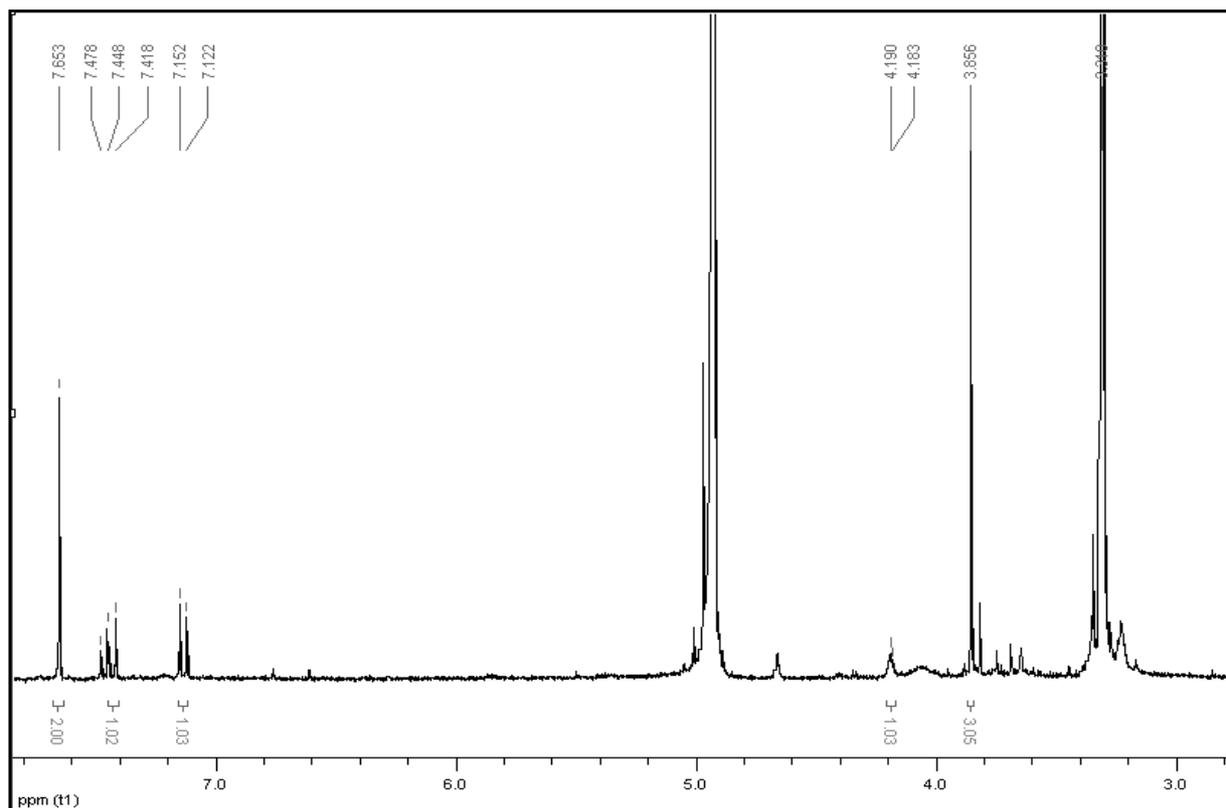


299

Tableau RMN ¹H (500 MHz), CD₃OD :

| n° | CH _n | δ_{H} (m ; J en Hz) |
|----|-----------------|-----------------------------------|
| 2 | C | - |
| 4 | C | - |
| 5 | CH | 4,21 (dd ; 5,0 ; 6,0) |
| 6 | CH ₂ | 1,90 (m) |
| 7 | CH ₂ | 1,75 (m) |
| 8 | CH ₂ | 3,23 (m) |
| 10 | C | - |
| 13 | CH | 7,12 (d ; 15,0) |
| 14 | CH | 7,44 (d ; 15,0) |
| 15 | C | - |
| 16 | CH | 7,65 (s) |
| 17 | C | - |
| 18 | C | - |
| 19 | C | - |
| 20 | CH | 7,65 (s) |
| 21 | CH ₃ | 3,86 (s) |

300



52 Spectre RMN ^1H de la Parazoanthine G (**XXVII**), CD_3OD 500 MHz

PARTIE C : Biosynthèse et métabolisme secondaire des P2AI dans *Agelas oroides*

I. Courbe d'étalonnage pour mesure de l'activité des extraits bruts d'*A. oroides* par compteur β à scintillation liquide

Le solvant utilisé (MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) et la concentration de l'échantillon mesuré peuvent induire des interférences de comptage provoquées par un affaiblissement lumineux, appelée « quenching » et ainsi diminuant le nombre de photons émis par l'échantillon.

Il existe deux sortes de quenching :

- le quenching chimique induisant des pertes d'énergie lors du transfert entre le solvant et le liquide à scintillation. L'énergie de la particule β^- ne passe pas forcément aux molécules du solvant, elle peut aussi être absorbée par les molécules de l'échantillon. De même une molécule excitée de solvant peut transférer son énergie à l'échantillon plutôt qu'au soluté. Toute l'énergie de la particule β^- n'est donc pas forcément transformée en photons ;
- le quenching coloré résultant d'une atténuation des photons émis par la solution. Lors de leur passage à travers le milieu, les photons peuvent être absorbés ou dispersés. La longueur d'onde de la lumière peut-être changée, si la solution est colorée, en une valeur pour laquelle les tubes photomultiplicateurs (PMT) sont moins efficaces.

Cet affaiblissement lumineux est retranscrit par la valeur du degré de quenching, nommé tSIE (Transformed Spectral Index of the External Standard = Index Spectral de la Transformée inverse sur le Standard Externe).

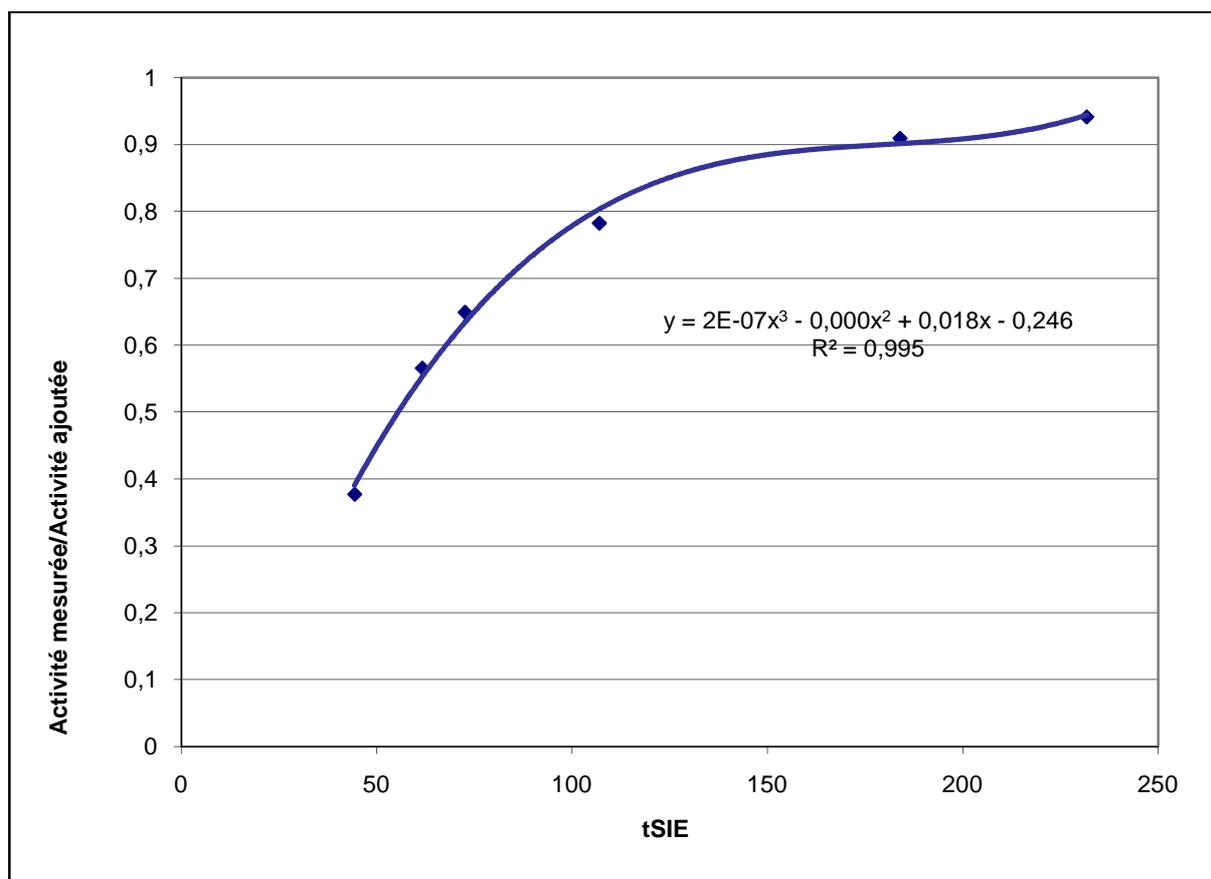
Afin de déduire l'activité réelle d'un échantillon par rapport à celle détectée par le compteur β à scintillation liquide, une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'un extrait brut d'*A. oroides* de plus en plus concentré a été préparé comme suit :

- Etalon 1 : MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 pur
- Etalon 2 : Extrait brut à 1 mg.mL⁻¹
- Etalon 3 : Extrait brut à 10 mg.mL⁻¹
- Etalon 4 : Extrait brut à 20 mg.mL⁻¹
- Etalon 5 : Extrait brut à 50 mg.mL⁻¹
- Etalon 6 : Extrait brut à 100 mg.mL⁻¹

2 mL de chaque échantillon ont été prélevés dans lesquels 0,8 nCi de [U-¹⁴C]-L-proline a été ajoutée. Après ajout de 10 mL de scintillant, l'activité de chaque étalon a été mesurée par un compteur β à scintillation liquide. La courbe de l'activité mesurée sur l'activité ajoutée en fonction de la valeur du tSIE obtenue nous a permis de déduire l'activité réelle des échantillons analysés lors des expériences de biosynthèse sur *Agelas oroides* décrites dans la **Partie C** de ce manuscrit.

Tableau 37 - Gamme étalon pour détermination du tSIE induit par les extraits bruts d'*A. oroides*

| N° étalon | Activité ajoutée (dpm) | Activité mesurée (cpm) | Activité mesurée/Activité ajoutée | tSIE |
|-----------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------|
| 1 | 1776 | 1672 | 0,941441441 | 231,72 |
| 2 | 1776 | 1615 | 0,909346847 | 183,94 |
| 3 | 1776 | 1390 | 0,782657658 | 106,96 |
| 4 | 1776 | 1153 | 0,649211712 | 72,58 |
| 5 | 1776 | 1005 | 0,565878378 | 61,69 |
| 6 | 1776 | 670 | 0,377252252 | 44,35 |

53 Courbe d'étalonnage pour mesure de l'activité des extraits bruts d'*A. oroides* par compteur β à scintillation liquide

II. Détermination du seuil de sensibilité en ^{14}C des appareils de comptage

Afin de déterminer le seuil de détection des appareils pour une heure de comptage, nous avons préparé deux gammes d'étalonnage : de 0,1 à 0,9 nCi pour la première gamme et de 0,01 à 0,09 nCi pour la seconde. La radioactivité a été induite par la L-[U- ^{14}C]-proline.

II.1. Compteur β à scintillation liquide

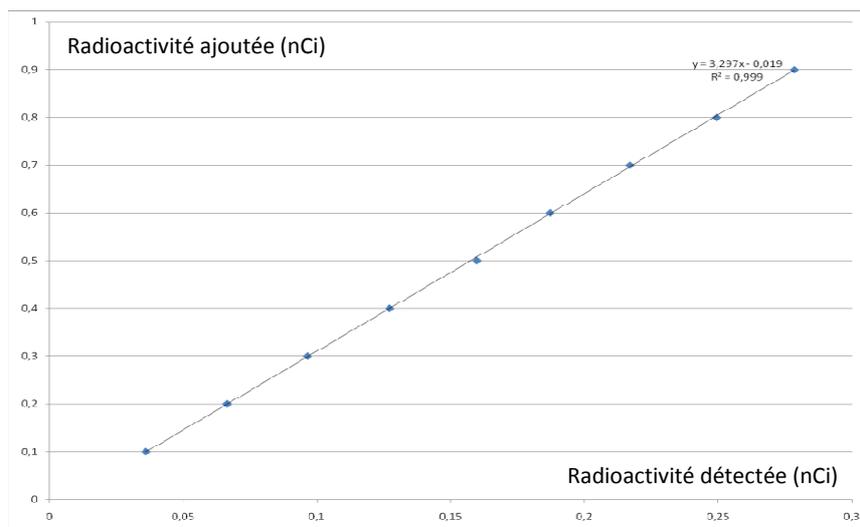
Pour une heure de comptage, le bruit de fond de l'appareil est d'environ 20 cpm (0,01 nCi) pour la détection ^{14}C .

Le compteur β étant sensible à la nature et à la quantité de solvant par rapport au soluté (scintillant), les échantillons des deux gammes d'étalonnage ont été préparés dans les mêmes conditions que les analyses prévues :

- 2 mL de MeOH/CH₂Cl₂ 1:1
- 10 mL de scintillant

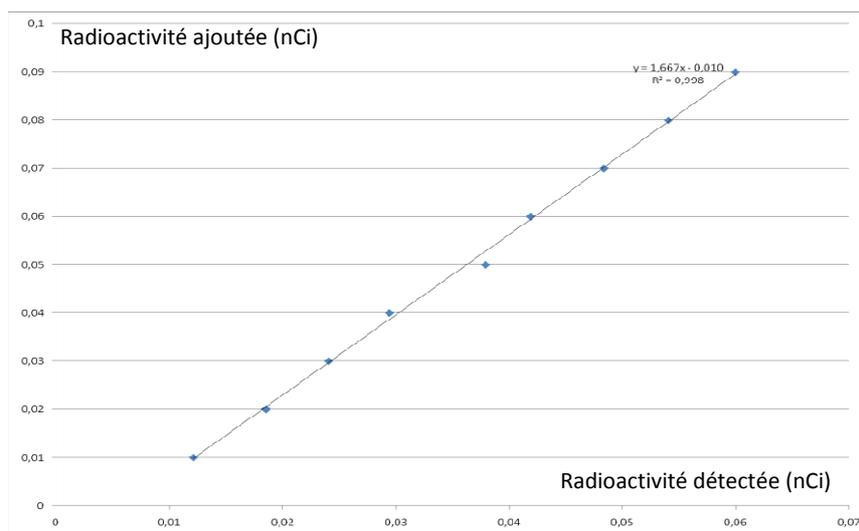
La L-[U- ^{14}C]-proline a été ajoutée à ce mélange afin d'obtenir la radioactivité voulue.

La première gamme d'étalonnage, de 0,1 à 0,9 nCi, a permis d'en déduire que le seuil de détection de l'appareil était plus bas. Le rapport signal/bruit obtenu est de 4 pour l'échantillon à 0,1 nCi.



Malgré une excellente corrélation entre la radioactivité ajoutée et la radioactivité comptée ($R^2 = 0,998$) lors de l'analyse de la seconde gamme d'étalonnage, de 0,01 à 0,09 nCi, compte-tenu du bruit de fond de l'appareil, nous avons déduit que le seuil de sensibilité de l'appareil est de 0,05 nCi ($S/B = 3$).

Cependant, lorsque l'échantillon est coloré, la radioactivité détectée par l'appareil diminue à cause de l'affaiblissement lumineux. Ce phénomène peut entraîner une diminution de désintégrations détectées de plus de la moitié par rapport aux désintégrations réelles. Cela augmente donc le seuil de détection de l'appareil à 0,1nCi.

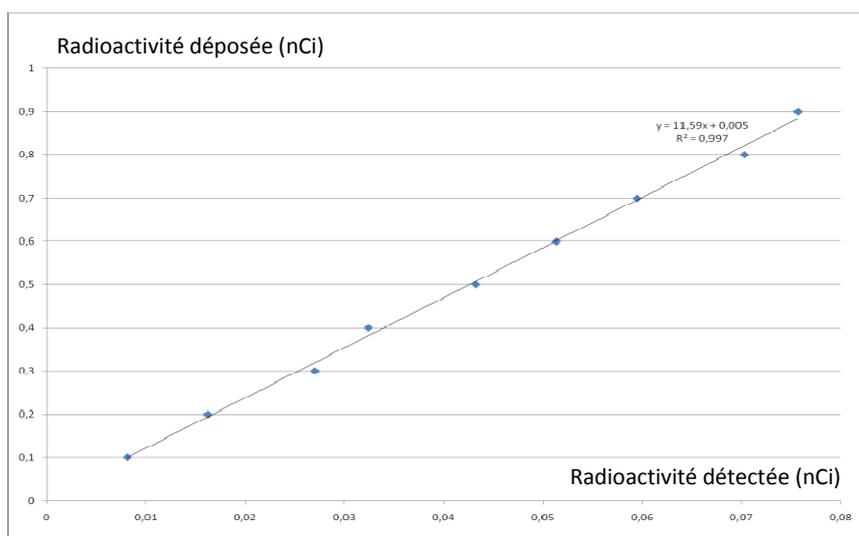


II.2. Radio-TLC sur HPTLC de silice

Pour une heure de comptage, le bruit de fond de l'appareil est d'environ 0,001 nCi pour la détection ^{14}C .

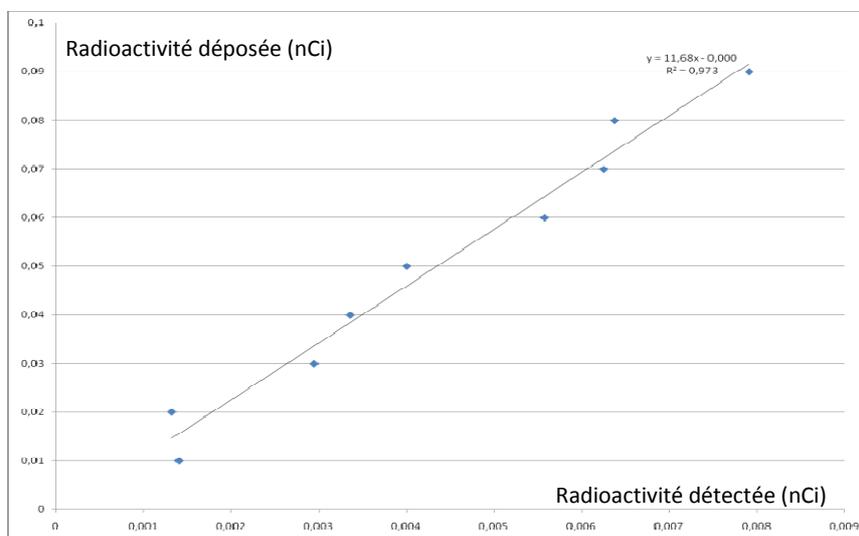
Les deux gammes étalons ont été préparées par dépôt sur CCM de la quantité de radioactivité voulue de L-[U- ^{14}C]-proline.

La première gamme d'étalonnage, de 0,1 à 0,9 nCi, a permis de déduire que le seuil de détection de l'appareil était plus bas. Le rapport signal/bruit obtenu est de 6 pour l'échantillon à 0,1 nCi.



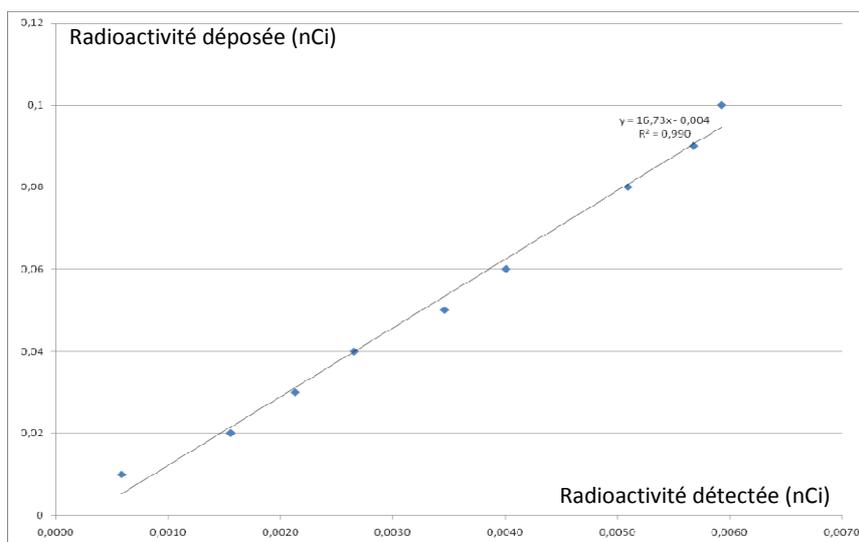
La seconde gamme d'étalonnage, de 0,01 à 0,09 nCi, a permis d'en déduire que le seuil de détection de l'appareil était de 0,02 nCi avec un rapport signal/bruit de 3. La couleur de l'échantillon n'ayant

pas d'influence sur la radioactivité détectée par l'appareil, ce seuil de détection est constant quelque soit l'échantillon déposé.



II.3. Radio-TLC sur HPTLC de silice greffée C₁₈

Ayant choisi d'analyser les échantillons sur des HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium, nous avons réalisé l'étalonnage de 0,01 à 0,09 nCi afin de pouvoir déterminer la radioactivité réelle des échantillons lors des analyses des expériences de biosynthèse décrites dans le manuscrit. Ainsi, la radioactivité déposée a été déterminée par l'équation de la droite suivante : Radioactivité déposée = 16,73 x Radioactivité détectée – 0,004 (R² = 0,990).



III. Effet de matrice des extraits organiques d'*A. oroides* sur la proline et l'histidine

III.1. Sur HPTLC de silice sur plaque de verre

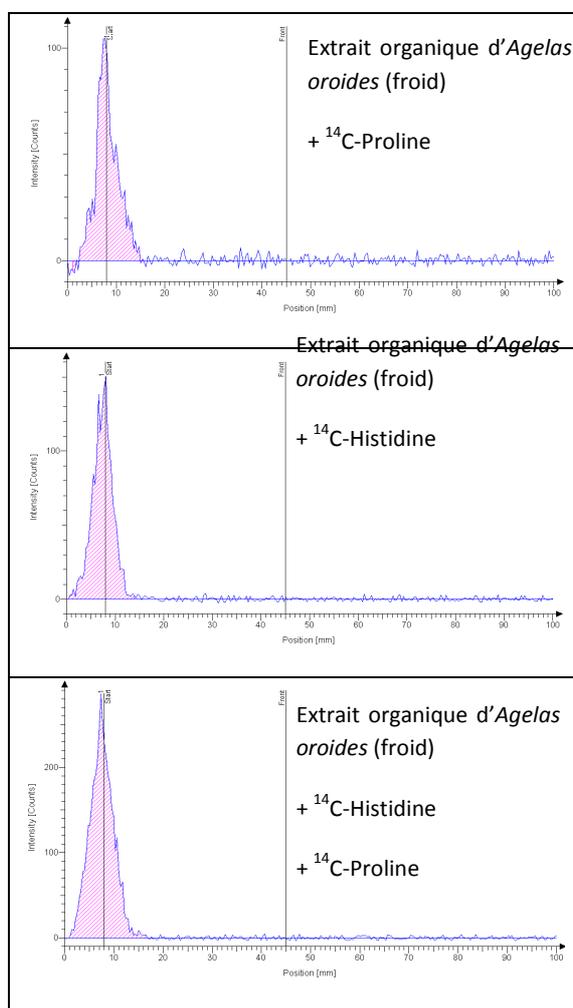
HPTLC, 10 x 5 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, Si60 F254 (Merck)

Eluant : CTZZ

Masse déposée : 0,25 mg + 0,3 nCi de chaque précurseur

Dépôt : 8 mm – Front : 45 mm

306



III.2. Sur HPTLC de silice greffée C₁₈ sur plaque de verre

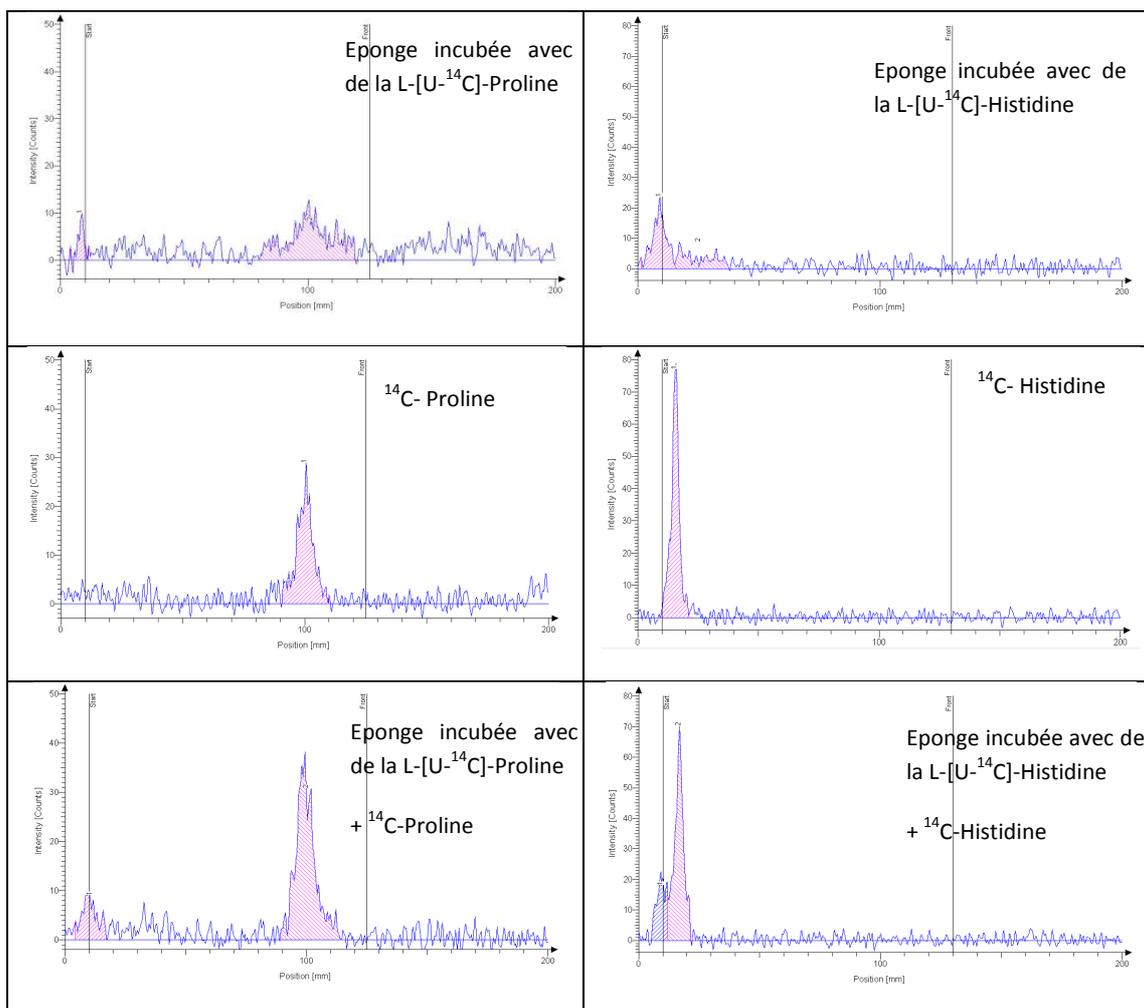
HPTLC Partisil® KC18, 20 x 20 cm, 0,20 mm d'épaisseur sur plaque de verre, silice greffée C₁₈, Si60 F254 (Whatman)

Eluant : MeOH + 0,4% AF / H₂O 8:2

Masse déposée : 0,4 mg

Dépôt : 10 mm – Front : 125 mm

307



III.3. Sur HPTLC de silice greffée C₁₈ sur feuille d'aluminium

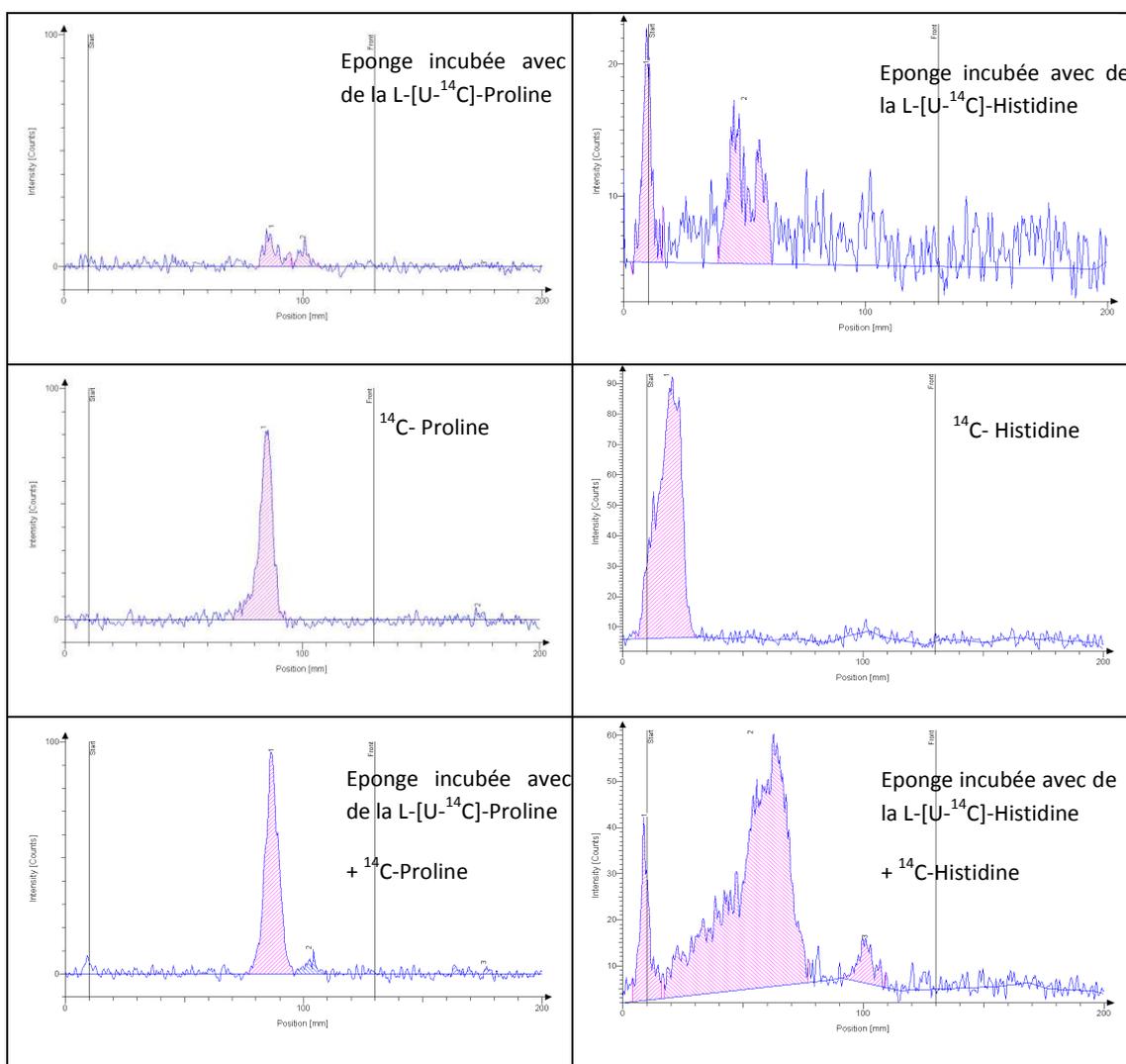
HPTLC Alugram® RP-18W, 20 x 20 cm, 0,15 mm d'épaisseur sur plaque d'aluminium, silice greffée C₁₈, Si60 F254 (Macherey-Nagel)

Eluant : MeOH + 0,4 % AF / H₂O 8:2

Masse déposée : 0,3 mg

Dépôt : 10 mm – Front : 130 mm

308



IV. Protocole d'extraction

Quelle que soit l'expérience considérée, après l'étape de métabolisation les éponges ont été coupées en cubes d'environ 5 mm³ et ont été extraites cinq fois par 1 mL.g⁻¹ d'éponge humide d'un mélange de solvants MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. Pour chaque extraction, les éponges ont été mises pendant 5 minutes dans un bac à ultra-sons. Les cinq extraits obtenus ont été mélangés et évaporés à température ambiante sous hotte.

V. Protocole de dessalage

Après avoir éliminés les sels insolubles des extraits bruts d'*A. oroides*, les phases organiques récupérées ont été dessalées par SPE de silice greffée C₁₈. Pour cela, 2 mL de la phase organique dessalée à 25 mg.mL⁻¹ ont été mélangés à 25 mg de silice greffée C₁₈. Après évaporation, le dépôt solide sur SPE a été élué sous vide par 20 mL d'eau Milli-Q. Cette fraction a constitué la phase aqueuse de l'extrait, elle est composée majoritairement de sels et du précurseur radiomarqué incorporé dans l'éponge. La cartouche SPE a ensuite été éluée sous vide par 25 mL du mélange de solvant MeOH/CH₂Cl₂ 1:1. Cette fraction a constitué la phase organique dessalée de l'extrait.

Métabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse *in vivo* d'alcaloïdes d'*Agelas oroides*

RESUME

Le groupe Substances Naturelles Marines du LCMBA (UMR 6001 CNRS-UNSA) se consacre à l'isolement et à la caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir d'invertébrés marins (spongiaires et cnidaires principalement). Suivant l'intérêt que ces molécules originales suscitent, leur valorisation peut concerner autant le domaine de la pharmacutique que celui de la biosynthèse ou de l'écologie chimique.

Ce manuscrit présente les travaux de recherche réalisés sur les deux éponges *Pandaros acanthifolium* et *Agelas oroides*, et sur les deux cnidaires *Astroides calycularis* et *Parazoanthus axinellae*.

P. acanthifolium, très peu étudié, a permis l'isolement d'une nouvelle famille de saponines stéroïdiennes. La famille des orthidines et une nouvelle aplysinopsine, ont été isolées pour la première fois d'*A. calycularis*. Enfin, nous décrivons une nouvelle famille d'alcaloïdes isolée de *P. axinellae* qui nous a permis de distinguer deux morphotypes de *P. axinellae* d'après leurs profils chimiques.

A. oroides a été choisi comme modèle d'étude pour la mise en place d'un nouveau protocole de biosynthèse *in vivo* des alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazoles (P2AI). Ces études permettent de confirmer l'utilisation de la proline dans la biosynthèse des P2AI.

Mots clés : éponges marines, cnidaires, biosynthèse, P2AI, alcaloïdes marins.

SUMMARY

Ongoing research of the "Marine Natural Products" group of the LCMBA (UMR 6001 CNRS-UNSA) focus on the isolation and the characterization of new bioactive metabolites isolated from marine invertebrates (mostly sponges and cnidarians). According to the interest of these original compounds, their valorization may concern different fields such as therapeutics, biosynthesis and marine ecology.

This manuscript presents our works on the two marine sponges *Pandaros acanthifolium* and *Agelas oroides*, and on the two cnidarians *Astroides calycularis* and *Parazoanthus axinellae*.

P. acanthifolium, which has been poorly studied, allowed us to isolate a new family of steroidal saponins. We also characterized orthidines and a new aplysinopsin, isolated for the first time from *A. calycularis*. Finally, we described a new family of alkaloids, isolated from *P. axinellae*. Based on the chemical profiles of *P. axinellae*, this new family allowed us to distinguish two morphotypes.

A. oroides was selected as a model in the elaboration of a new *in vivo* biosynthesis protocol of pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids (P2AI). These studies confirm the incorporation of proline in P2AI biosynthesized by *A. oroides*.

Keywords: marine sponge, cnidarians, biosynthesis, P2AI, marine alkaloids.
