

COMPOSANTE 2C - Projet 2C3

Substances Actives Marines

Juin 2006

CRISP



Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique

RAPPORT DE MASTER

Recherche de nouveaux principes actifs antipaludiques dans les spongiaires des Îles Salomon

Photo : © Jean-Louis Menou - IRD



Auteur : Vincent Suau

CRISP



Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique



Le CRISP est un programme mis en œuvre dans le cadre de la politique développée par le Programme Régional Océanien de l'Environnement afin de contribuer à la protection et la gestion durable des récifs coralliens des pays du Pacifique.

L'initiative pour la protection et la gestion des récifs coralliens dans le Pacifique (CRISP), portée par la France et préparée par l'AFD dans un cadre interministériel depuis 2002, a pour but de développer une vision pour l'avenir de ces milieux uniques et des peuples qui en dépendent, et de mettre en place des stratégies et des projets visant à préserver leur biodiversité et à développer dans le futur les services économiques et environnementaux qu'ils apportent tant au niveau local que global. Elle est conçue en outre comme un vecteur d'intégration entre états développés (Australie, Nouvelle-Zélande, Japon et USA), Collectivités françaises de l'Outre-Mer et pays en voie de développement du Pacifique.

Cellule de Coordination CRISP
Chef de programme : **Eric CLUA**
CPS - BP D5
98848 Nouméa Cedex
Nouvelle-Calédonie
Tél./Fax : (687) 26 54 71
E-mail : ericc@spc.int
www.crisponline.net

Le CRISP est structuré en trois composantes comprenant respectivement divers projets :

Composante 1 : Aires marines protégées et gestion côtière intégrée

- Projet 1A1 : Analyse éco-régionale
- Projet 1A2 : Aires Marines Protégées (AMP)
- Projet 1A3 : Renforcement institutionnel
- Projet 1A4 : Gestion intégrée des zones lagunaires et des bassins versants

Composante 2 : Connaissance, gestion, restauration et valorisation des écosystèmes coralliens

- 2A : Connaissance, valorisation et gestion des écosystèmes coralliens
- 2B : Restauration récifale
- 2C : Valorisation des Substances Actives Marines
- 2D : Mise en place d'une base de données régionale (Reefbase Pacifique)

Composante 3 : Appui institutionnel et technique

- 3A : Capitalisation, valorisation et vulgarisation des acquis du programme CRISP
- 3B : Coordination, promotion et développement du programme CRISP

COMPOSANTE 2C

Substances Actives Marines (SAM)

Responsable de composante :
Cécile DEBITUS
IRD - UMR 152
Université Paul Sabatier
Toulouse II
Faculté des Sciences
31062 Toulouse cedex 9
France
Tél. : (33) 5 62 25 98 11
Fax : (33) 5 62 25 98 02
E-mail : cecile.debitus@ird.fr

■ PROJET 2C-1 :

Volet juridique - Proposition d'amélioration des législations des pays insulaires pour le partage des bénéfices issus de la valorisation des SAM

■ PROJET 2C-2 :

Volet taxonomique - Amélioration de la connaissance des invertébrés benthiques récifaux

■ PROJET 2C-3 :

Volet technologique - Isolement et identification de SAM

■ PROJET 2C-4 :

Volet de renforcement institutionnel - Formation de personnes ressources du Pacifique insulaire



Ce projet est cofinancé par :

LE PROGRAMME CRISP EST FINANÇÉ PAR LES ORGANISATIONS SUIVANTES :



UPS

Université Paul Sabatier



Toulouse 3

**Rapport de stage en vue de l'obtention du Master 2 Recherche Chimie
« Spécialité Chimie-Biologie »**

*Recherche de nouveaux principes actifs
antipaludiques dans des spongiaires
des îles Salomon*

Vincent SUAU

Stage effectué au Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et
Pharmacophores Redox - UMR 152
Entre le 23 Janvier et le 20 Juin 2006

Maitre de stage : Dr. Cécile DEBITUS, IRD

Directeur du laboratoire : Dr. Françoise NEPVEU



Institut de recherche
pour le développement



CRISP C2C3

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon maître de stage, le Dr. Cécile Debitus, chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement de Toulouse, pour m'avoir encadré lors de ce stage et m'avoir permis de m'aguerrir sur un sujet aussi original qu'intéressant.

Un remerciement tout particulier à Amélie, Bénédicte, Florence et Vincent pour leur aide, leurs conseils et leur disponibilité tout au long de mon stage.

Merci aussi à Lucia, Valérie, Edouard et Igor pour leur aide sur la plateforme chromatographique.

Et merci surtout à Nadja pour sa bonne humeur quotidienne.

Enfin, je voudrais remercier Séverine et son équipe pour avoir réalisé les tests biologiques si importants pour le déroulement du stage ; Nicolas et Pierre pour la rapidité des analyses en spectrométrie de masse et LC/MS nécessaires à l'analyse des composés.

Plus généralement, un grand merci à tous pour votre gentillesse !!

Sommaire

<u>Introduction : Les médicaments de la mer</u>	4
<u>I. Présentation du laboratoire</u>	
A. <u>L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)</u>	5
B. <u>L'UMR 152 Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox</u>	5
<u>II. Les éponges</u>	
A. <u>Systématique</u>	6
B. <u>Répartition géographique</u>	6
C. <u>Le genre Jaspis : systématique</u>	6
<u>III. Matériels et méthodes</u>	
A. <u>Techniques analytiques</u>	7
B. <u>Techniques préparatives</u>	7
C. <u>Techniques de détermination structurale</u>	8
D. <u>Les tests biologiques</u>	
1. <u>Activité cytotoxique</u>	8
2. <u>Activité antipaludique</u>	8
<u>IV. Résultats et discussion</u>	
A. <u>Choix des extraits à étudier</u>	9
B. <u>Première analyse des extraits bruts</u>	10
C. <u>Etude de l'extrait brut R 3075 C</u>	11
D. <u>Etude de l'extrait brut R 3046 C</u>	12
<u>Conclusion et perspectives</u>	14
<u>Annexe 1 : Gradients utilisés en HPLC analytique</u>	15
<u>Annexe 2 : Schéma de purification de l'extrait R 3046 C</u>	16
<u>Références bibliographiques</u>	17

Introduction : Les médicaments de la mer¹

L'utilisation d'organismes marins en médecine est connue en Chine depuis la plus haute antiquité mais reste limitée car il n'existe pratiquement aucune tradition orale ou de pharmacopée traditionnelle qui fasse référence aux algues, aux invertébrés ou aux poissons, hors de ses frontières. L'étude systématique de la biodiversité marine à des fins thérapeutiques n'a véritablement commencé que dans la seconde partie du vingtième siècle et a tout de suite suscité de grands espoirs grâce à la découverte, peut-être fortuite, de quelques molécules rares et actives.

Cependant, ces espoirs mis dans la pharmacologie marine dès les années 50 se sont rapidement heurtés aux réalités scientifiques et économiques, et à l'orée du troisième millénaire moins d'une dizaine de médicaments préparés avec des modèles issus de la mer sont disponibles sur le marché. Mais compte tenu du délai habituel d'une douzaine d'années entre la mise en évidence d'une activité et la mise sur le marché d'un nouveau médicament, ce bilan d'apparence pessimiste n'a rien d'anormal et ne fait que traduire la difficulté de la tâche entreprise.

Dans ce but, un certain nombre d'éponges non identifiées ont été récoltées dans les eaux des îles Salomon. Trois d'entre elles, répertoriées sous les références R 3046, R 3059 et R 3075, m'ont été confiées pour analyse.

Mon travail au cours de ce stage est la recherche, la purification et la détermination structurale de principes actifs antipaludiques extraits de ces trois éponges. Ce travail a été réalisé au sein l'UMR 152 Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox sous la responsabilité du Dr Cécile Debitus, chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement.

I. Présentation du laboratoire

A. L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)

Créé en 1944, connu sous le nom d'ORSTOM, l'Institut de Recherche pour le Développement est, depuis 1984, un établissement public français à caractère scientifique et technologique, placé sous la double tutelle des ministères chargés de la Recherche et de la Coopération. L'IRD conduit des programmes scientifiques centrés sur les relations entre l'homme et son environnement dans les pays du Sud, dans l'objectif de contribuer à leur développement. Il remplit les missions fondamentales de recherche, expertise et valorisation, soutien et formation, ainsi qu'information scientifique.

Les travaux effectués par les chercheurs de l'IRD sont coordonnés par trois départements scientifiques :

- ✓ **Milieus et Environnement** (DME) : les recherches visent à comprendre certains phénomènes comme la variabilité climatique, l'interaction entre océan et atmosphère...
- ✓ **Ressources Vivantes** (DRV) : les travaux portent sur les ressources et écosystèmes des milieux naturels terrestres et des milieux aquatiques, continentaux et marins, dans une optique de développement et de gestion durables.
- ✓ **Sociétés et Santé** (DSS) : les études menées couvrent deux domaines, les sciences sociales et la santé ainsi que leur interface dans un large spectre de disciplines.

L'IRD mène des recherches en partenariat avec les acteurs scientifiques, sociaux et politiques des pays du Sud, d'où l'importance d'une représentation physique à l'étranger. Implanté en Afrique, en Asie, dans l'Océan Indien, en Amérique latine et dans le Pacifique, il dispose de 36 centres et représentations dans le monde, dont :

- ✓ 5 centres en France métropolitaine : Paris, Bondy, Montpellier, Brest et Orléans
 - ✓ 5 centres dans les DOM-TOM : Guyane, Martinique, Nouvelle-Calédonie, Polynésie française et La Réunion
 - ✓ 26 dans les pays situés essentiellement dans la zone intertropicale
- Les chercheurs de l'IRD interviennent dans une cinquantaine de pays.

L'ensemble des activités de recherche de l'IRD est réalisé en partenariat. L'IRD développe un solide réseau de partenaires dans les pays du Sud, en France, y compris dans l'outre-mer tropical français et en Europe. Cette priorité se traduit notamment par la mise en place de projets mixtes, associant des équipes de chercheurs de l'IRD, des équipes locales, mais aussi d'autres institutions de recherche, des établissements universitaires et d'enseignement supérieur... Il s'agit d'une véritable coopération avec l'ensemble de l'appareil scientifique et technique dont les activités de recherche concernent la problématique du développement.

B. L'UMR 152 Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox

Basée à Toulouse dans les locaux de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paul Sabatier, l'UMR 152 Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox comprend trois implantations secondaires à Lima (Pérou), Cayenne (Guyane) et Nouméa (Nouvelle-Calédonie).

Son objectif principal est d'isoler et d'identifier des molécules naturelles, antiparasitaires essentiellement (paludisme, leishmaniose), extraites de la biodiversité tropicale.

En dépit d'une recherche considérable dans l'identification de nouveaux composés chimiques d'origine naturelle, de nombreuses inconnues persistent, au plan chimique mais surtout au plan pharmacologique en regard de l'immensité du gisement biologique.

Considérant que moins de 10 % des centaines de milliers d'espèces végétales terrestres et 1 % seulement des espèces marines ont été étudiées pour leur composition chimique, on peut raisonnablement penser qu'il existe encore une énorme mine de diversité moléculaire à explorer.

II. Les éponges

A. Systematique

L'apparition des éponges ou spongiaires sur Terre remonte à il y a plus de 550 millions d'années. Elles font parties du règne des animaux et appartiennent au sous règne des métazoaires où elles constituent le phylum *Porifera*. Celui-ci est constitué de quatre classes comptant environ dix mille espèces d'éponges^{2,3} :

✓ *Demospongiae* : la classe la plus importante avec des formes très variables. Les éponges qui la constituent ont un squelette formé de spicules siliceux et/ou de fibres de spongines

✓ *Calcarea* (ou éponges calcaires) : les éponges de cette classe possèdent un squelette de spicules calcaires. Ces éponges, de petite taille, sont aussi les plus simples

✓ *Hexactinellida* (ou éponges de verre) : ces éponges possèdent un squelette de spicules siliceux formant généralement un réseau

✓ *Archaeocyatha* : toutes les éponges appartenant à cette classe ont disparu de nos jours et n'existent que sous formes fossilisées

B. Répartition géographique

On rencontre les éponges dans toutes les mers du globe, généralement dans les eaux de surface et plus rarement à de grandes profondeurs ; sauf pour la classe des *Hexactinellida* que l'on peut rencontrer à - 6000 m ou plus.

Elles jouent également un rôle primordial dans la biologie des récifs coralliens qui se situent dans la zone intertropicale :



Fig. 1 : Localisation des récifs coralliens dans le monde, en rouge sur la carte

C. Le genre *Jaspis* : systématique⁴

L'éponge répertoriée R 3046 a été identifiée comme appartenant au genre *Jaspis* par John N.A. Hooper, systématicien et conservateur au Queensland Museum de Brisbane (Australie). Le genre *Jaspis* appartient à la classe des Demosponges et à l'ordre Astrophorida Sollas, 1888.

L'ordre Astrophorida Sollas, aussi connu comme Choristida Sollas, comprend actuellement 5 familles, avec 38 genres et 2 sous-genres, et les espèces sont connues dans tous les océans et à toutes les profondeurs.

Les éponges du genre *Jaspis* font partie de la famille Ancorinidae Schmidt, 1870, en compagnie de 14 autres genres. Les autres familles sont Calthropellidae Lendenfeld, 1907 (avec 4 genres), Geodiidae Gray, 1867a (avec 6 genres), Pachastrellidae Carter, 1875b, incluant Theneidae Carter, 1883 (avec 12 genres et 2 sous-genres) et Thrombidae Sollas, 1888 (1 genre). L'espèce type est *Jaspis johnstonii*, décrite par Schmidt en 1862. La distribution de cette éponge va de l'océan Atlantique Est et Ouest aux océans Indien et Pacifique, en passant par la mer Méditerranée et la mer Rouge.

De plus, les éponges marines du genre *Jaspis* sont connues pour contenir des composés cytotoxiques tels que les isomalabaricanes ⁵, les jaspamides ⁶ et le jaspilakinolide ⁷, ou les jaspines ⁸; ce qui en fait une éponge potentiellement intéressante pour la recherche de nouveaux composés cytotoxiques.

III. Matériels et méthodes

A. Techniques analytiques

Le suivi des différents fractionnements effectués est réalisé par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ de chez Merck, de dimension 10 x 20 cm.

Les solvants de migration varient selon la polarité des fractions. Dans ce travail, nous avons utilisé le plus souvent :

- ✓ un mélange dichlorométhane/méthanol 95:5
- ✓ un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle 80:20 et 50:50
- ✓ un mélange cyclohexane/dichlorométhane 50:50

Les plaques sont observées aux ultraviolets à 254 nm et 366 nm, puis révélées :

- ✓ à la vanilline sulfurique (1 g de vanilline dans un mélange acide sulfurique/éthanol 80:20), puis chauffage (réactif « universel »)
- ✓ au Dragendorff (réactif des alcaloïdes et d'autres composés azotés)
- ✓ au sulfate de cérium, puis chauffage (réactif de terpénoïdes et stéroïdes)

Les analyses HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) sont réalisées sur une chaîne Varian munie d'un détecteur à barrette de diode. La colonne utilisée est une colonne Waters X-terra C18 (phase inverse) de dimension 25 cm x 48 mm. Le gradient d'élution utilisé est à base d'eau et de méthanol, et les chromatogrammes sont enregistrés à 254 nm. Les fractions analysées sont à une concentration de 1mg/mL dans le méthanol pour un volume injecté de 20 µL.

B. Techniques préparatives

La « Solid Phase Extraction » (ou SPE) est une technique qui permet de fractionner rapidement un échantillon qui est déposé à sec sur la cartouche. On utilise des cartouches Interchrom® SI-S-1 G/6 de chez Interchim. L'échantillon est déposé à sec, « empaté » dans la silice. On utilise un mélange dichlorométhane/méthanol 95:5 (fraction 5%), 80:20 (fraction 20 %) et méthanol 100% (fraction 100 %).

La colonne préparative sur silice permet le fractionnement d'un échantillon déposé à sec. Les solvants d'élution sont adaptés à la polarité des échantillons à séparer.

La chromatographie d'exclusion est réalisée en utilisant une colonne de résine Séphadex LH 20 de diamètre 23 mm et de hauteur 18 cm. Cette technique permet de séparer les molécules selon leur taille : les petites molécules étant retenues dans la résine et les grosses molécules sortant en premier.

C. Techniques de détermination structurale

Les expériences de Spectrométrie de Masse en ESI et APCI ont été réalisées à l'UMR 152; les expériences en FAB ont été faites au Service Commun de Spectrométrie de Masse du bâtiment de recherche 2R1.

L'analyse par LC/MS a été réalisée à l'UMR 152. Cette technique permet de déterminer la masse molaire de composés séparés par HPLC.

Les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été réalisées au Service Commun de RMN du bâtiment de recherche 2R1 de la faculté sur un spectromètre RMN Avance 300 de chez Bruker® (^1H à 300 MHz, ^{13}C à 300 MHz). On réalise des expériences à une dimension (^1H , ^{13}C J-mod) ou à deux dimensions (HSQC, HMBC, COSY) :

- ✓ **RMN ^1H** : permet d'observer le déplacement chimique des protons
- ✓ **RMN ^{13}C J-mod** : permet de différencier les carbones selon leur nature (C quaternaire et CH_2 d'un coté ; CH et CH_3 de l'autre)
- ✓ **COSY** : permet de repérer les protons qui couplent entre eux et de déterminer leur enchaînement
- ✓ **HSQC** : permet d'observer les couplages carbone-proton au travers d'une seule liaison C-H → on mesure les constantes de couplage $^1\text{J}_{\text{C-H}}$
- ✓ **HMBC** : permet d'observer les couplages carbone-proton au travers de plusieurs liaisons C-H → on mesure les constantes de couplage $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$, $^4\text{J}_{\text{C-H}}$.

D. Les tests biologiques

1. Activité cytotoxique

Ce test consiste à mesurer la cytotoxicité du composé pur sur des cellules MCF-7 (cellules humaines obtenues à partir d'une tumeur mammaire). La méthode utilisée est le contrôle de l'inhibition de la prolifération des cellules.

Le principe de la mesure de l'activité cytotoxique est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium, le XTT (Sodium 3,3 [1(1 phényl amino carboxyl)-3-4- tétrazolium bis (4-méthoxy-6 nitro)] benzène sulfonic acid hydrate) en un produit jaune orangé, appelé formazan. Cette réduction est réalisée par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes en présence du coenzyme Q pour donner le formazan, dosable par spectrométrie à 450 nm.

Les cellules sont cultivées dans une solution de DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) et de sérum de veau fœtal (ou SVF) à un pH d'environ 7. Les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez. La culture est alorsensemencée sur une plaque de 96 puits à raison de 200 000 cellules/mL (100 mL de culture cellulaire par puits) et incubée pendant 24 heures.

La réaction est stoppée en ajoutant 100 μL d'une solution contenant 10% de SDS. L'absorbance de chaque puits peut alors être lue à l'aide du spectrophotomètre à 450 nm. La courbe dose-cytotoxicité permet de déterminer la CI_{50} de chaque fraction testée.

2. Activité antipaludique

La technique de culture *in vitro* de *P.falciparum* (agent infectieux du paludisme) utilisée est dérivée de celle décrite par Trager et Jensen en 1976. Pour un bon développement des parasites, la parasitémie (rapport entre le nombre de globules rouges parasités et le nombre de globules rouges total) est maintenue à 2%. Elle est déterminée par comptage du nombre de parasites pour 1000 globules rouges au microscope (x 1000).

Après synchronisation des cultures, les tests sont réalisés sur des plaques de culture de 96 puitsensemencées pour obtenir une parasitémie entre 1 % et 2 %.

Chaque test est réalisé dans trois puits différents afin d'obtenir une moyenne de l'activité inhibitrice des produits à une concentration donnée. On utilise comme références

un puits contenant 200 μL de globules rouges non parasités non traités, un puits de globules rouges parasités non traités (témoin positif : 100% de croissance) et un puits de globules rouges parasités avec un témoin de chloroquine.

La mesure de l'activité antipaludique se fait à l'aide de l'hypoxanthine tritiée (précurseur de l'adénine et de la guanine) qui est utilisée comme marqueur radioactif de la croissance des cellules. Dans le cas des substances à tester, une courbe donnant l'inhibition en fonction de la concentration est établie. Il est alors possible de déterminer graphiquement la CI_{50} qui correspond à la concentration du produit pur ou de la fraction qui inhibe 50% de la croissance du parasite. Elle s'exprime en $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou en μM , et est inversement proportionnelle à l'activité du produit contre *P.falciparum*.

IV. Résultats et discussion

A. Choix des extraits à étudier

Au départ, 160 éponges ont été collectées sur les récifs des îles Salomon. Leurs extraits ont ensuite été soumis à des tests biologiques afin d'évaluer leurs propriétés toxiques. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner les trois éponges qui possédaient le meilleur rapport activité antipaludique sur activité cytotoxique : R 3046, R 3059 et R 3075.

Les tests de cytotoxicité montrent qu'aucun des trois extraits bruts n'est cytotoxique ; et les tests antipaludiques permettent de déterminer la CI_{50} des extraits bruts :

- ✓ R 3046 C : $\text{CI}_{50} = 3,8 \mu\text{g}/\text{mL}$
- ✓ R 3059 C : $\text{CI}_{50} = 4,6 \mu\text{g}/\text{mL}$
- ✓ R 3075 C : $\text{CI}_{50} = 3,7 \mu\text{g}/\text{mL}$



Fig. 2 : Eponge R 3046

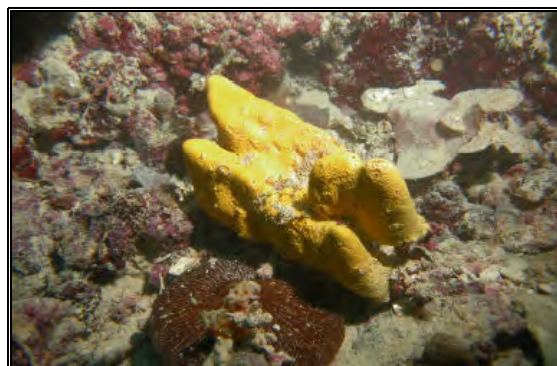


Fig. 3 : Eponge R 3059

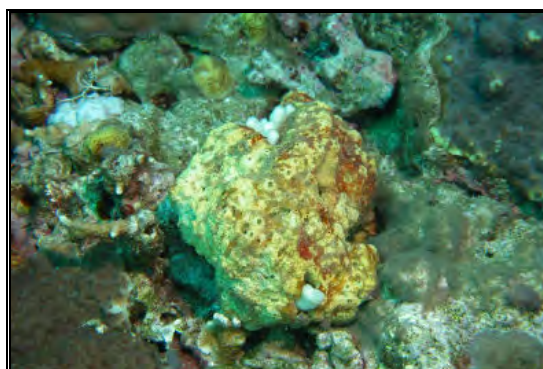


Fig. 4 : Eponge R 3075

B. Première analyse des extraits bruts

Une analyse par HPLC analytique en utilisant le gradient 1 (Annexe 1) est réalisée. Les chromatogrammes et les spectres ultraviolets obtenus à 284 nm nous montrent que les extraits R 3059 C et R 3075 C sont probablement identiques. Les CCM des extraits bruts confirment cette hypothèse.

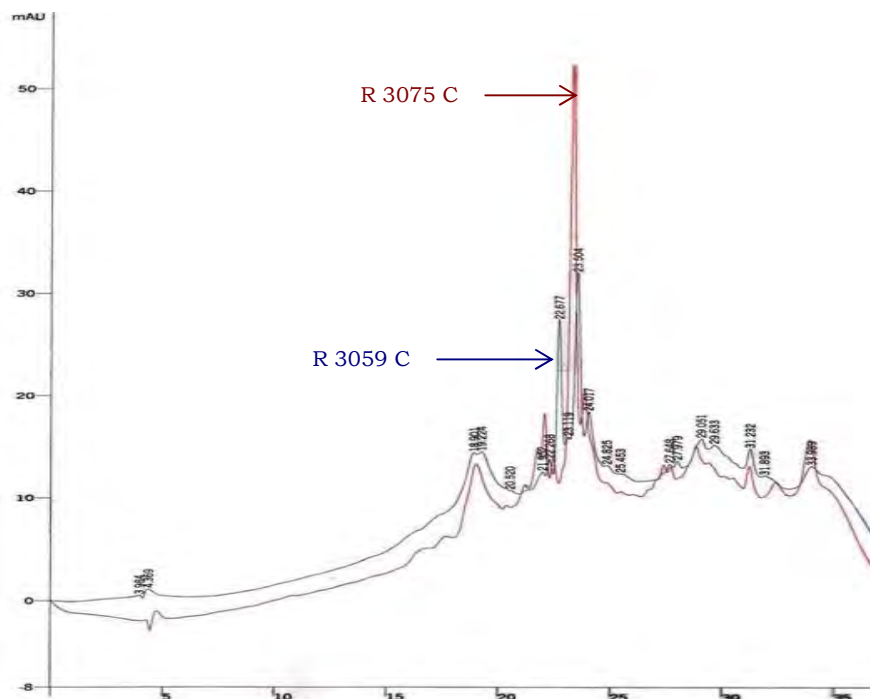


Fig. 5 : Chromatogrammes (284 nm) superposés des extraits bruts R 3059 C et de R 3075 C

Puis, une SPE sur silice est effectuée sur 50 mg de chaque extrait brut. Elle permet de récupérer une majorité de produit dans la fraction 5 % de méthanol. Les différentes CCM des fractions obtenues (5%, 20%, 100%) confirment également l'hypothèse selon laquelle les extraits R 3059 C et R 3075 C sont identiques.

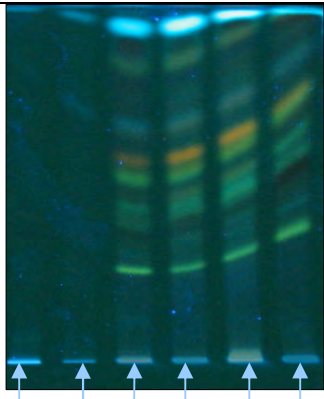
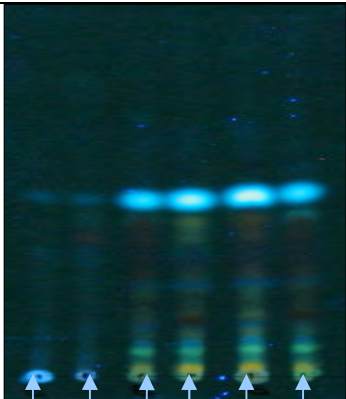
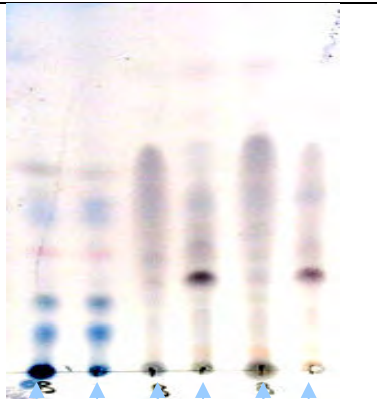
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5 UV 366 nm	Cyclohexane/Acétate d'éthyle 80:20 UV 366 nm	Cyclohexane/Acétate d'éthyle 80:20 Vanilline sulfurique
 <p>B 5% B 5% B 5%</p> <p>R3046C R3059C R3075C</p>	 <p>B 5% B 5% B 5%</p> <p>R3046C R3059C R3075C</p>	 <p>B 5% B 5% B 5%</p> <p>R3046C R3059C R3075C</p>

Tableau 1 : CCM des fractions 5 % issues des SPE sur les 3 extraits bruts (B : extrait brut ; 5 % : fraction 5 %)

Les extraits R 3059 C et R 3075 C étant identiques, l'étude ne sera menée que sur les extraits R 3075 C et R 3046 C.

C. Etude de l'extrait brut R.3075 C

Un fractionnement sur colonne préparative de silice estréalisé en utilisant une colonne de diamètre 18 mm avec une hauteur de silice de 16 cm, et un gradient cyclohexane/acétate d'éthyle (de 100:0 à 0:100). 500 mg d'extrait brut sont déposés et 38 fractions sont obtenues après élution, représentant 97% de l'extrait brut.

L'analyse en CCM des fractions obtenues après la colonne, en utilisant comme références la puupéhénone et l'ilimaquinone, nous permet de penser que les fractions [33-34] à [40-42] contiennent de la puupéhénone ^{9,10}.

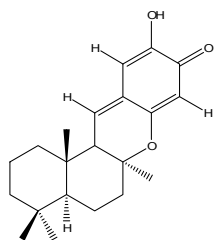


Fig. 6 : Puupéhénone

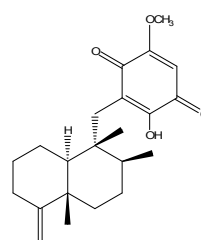


Fig. 7 : Ilimaquinone

Dans le but de vérifier cette hypothèse, on réalise une HPLC analytique des fractions [33-34], [36] et de la puupéhénone en utilisant le gradient 2 (Annexe 1). Les trois chromatogrammes (enregistrés à 284 nm) présentent deux pics à des temps de rétention (t_R) de 15 minutes et de 25 minutes ; alors que les trois spectres ultraviolets présentent des maxima d'absorption à 224, 281, 291 et 337 nm. La similitude résultats confirme donc notre hypothèse.

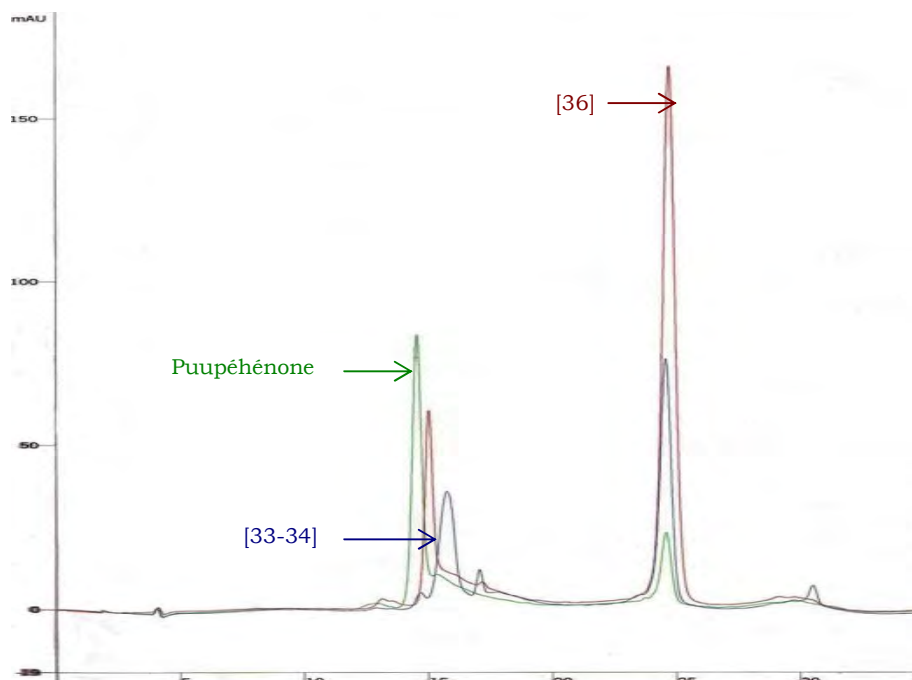


Fig. 8 : Chromatogrammes (284 nm) superposés des fractions [33-34], [36] et de la puupéhénone

L'analyse en APCIMS (mode positif) de la fraction [36] nous donne un $[M+H]^+$ à $m/z = 329$, donc une masse molaire de 328 g/mol correspondant à celle de la puupéhénone.

L'analyse en LC/MS (APCI) en mode positif, avec le gradient 2, de cette fraction [36] nous donne à un t_R de 16,45 minutes un pic à m/z 329 correspondant au pic observé précédemment en APCIMS; et à un t_R de 23,01 minutes, un pic à m/z 655 pour $[M+H]^+$, donc une masse molaire de 654 g/mol. Après consultation des bases de données (MarinLit, Dictionnaire des Produits Naturels), ce pic est attribué au dipuupéhétriol ¹⁰, de masse molaire 654 g/mol.

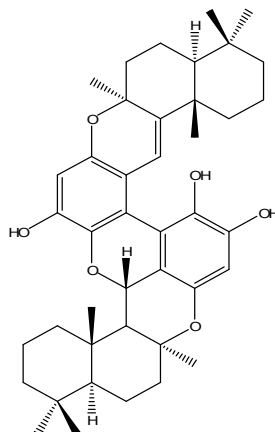


Fig. 9 : Dipuupéhétriol

Les tests biologiques effectués sur les fractions [33-34] et [36] révèlent une activité antipaludique intéressante avec une CI_{50} de 3,2 $\mu\text{g/mL}$ et 2,6 $\mu\text{g/mL}$ respectivement.

Cette éponge contient donc de la puupéhénone, molécule active identifiée dans le genre *Hyrtios*, et déjà étudiée par le Dr. Cécile Debitus. De plus, l'analyse chimique de l'extrait a permis d'identifier ces éponges (R 3059 et R 3075) à *Hyrtios Cf eubama*, identifications confirmées par le systématique.

Cela m'a donc fait stopper l'analyse de cet extrait afin de me consacrer à l'analyse de l'extrait R 3046 C.

Les méthodes de déréplication employées ici LC/DAD/MS – bases de données sont adaptées à ces composés et permettent d'éviter de perdre du temps sur des molécules connues.

D. Etude de l'extrait brut R.3046 C

Diverses analyses préliminaires sur cet extrait brut montrent que nos méthodes de déréplication ne sont pas adaptées à l'étude de cet extrait : pas de détection par la barrette de diode sur la chaîne HPLC à notre disposition. La chromatographie sur couche mince de silice est la seule méthode dont nous disposons adaptée à la poursuite de ce travail, pour mettre au point le protocole suivant.

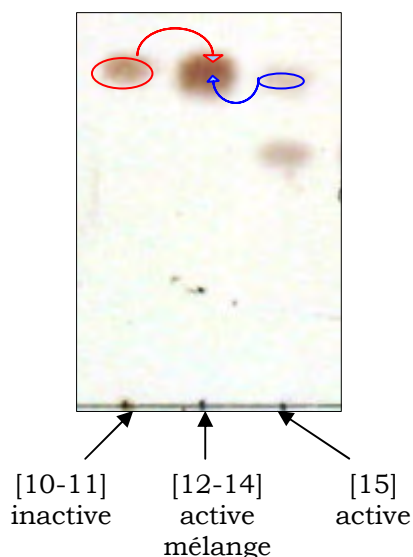
Un fractionnement sur colonne préparative est réalisé en utilisant une colonne de 32 mm de diamètre avec une hauteur de silice de 16 cm, et principalement un mélange heptane/dichlorométhane (de 100:0 à 0:100). 1,1 g d'extrait brut R 3046 C sont déposés et après élution 20 fractions représentant 86 % de l'extrait brut sont récupérées.

L'analyse en CCM des différentes fractions obtenues, couplée aux résultats de leurs tests antipaludiques, permet de cibler les fractions intéressantes à travailler (*Annexe 2*).

La fraction [2-3] a d'abord semblé la plus aisée à analyser du fait de son activité antipaludique intéressante ($CI_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$), de la quantité récupérée (60 mg) et qu'elle ne comporte qu'un seul composé révélé en CCM. Cependant, diverses analyses en Spectrométrie de Masse (ESI, APCI, FAB), ainsi qu'en RMN (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) ne permettent pas de déterminer la structure de la molécule active, probablement parce que celle-ci n'est pas totalement pure.

Bien que les tests antipaludiques aient montré que la fraction [4] n'était pas active ($CI_{50} = 39 \mu\text{g/mL}$), les analyses en RMN ^1H montrent qu'elle est apparentée aux fractions étudiées ci-après. De plus, les spectres RMN (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) ont permis de montrer que les composés de cette fraction appartiennent à la famille des sesterpènes en C_{25} ou des triterpènes en C_{30} .

L'attention s'est ensuite portée sur les fractions [10-11], [12-14] et [15]. En effet, la fraction [12-14] est active ($CI_{50} = 3,1 \mu\text{g/mL}$) et semble être un mélange de la fraction [11], inactive ($CI_{50} = 33 \mu\text{g/mL}$), et de la fraction [15], active ($CI_{50} < 1 \text{ mg/mL}$). Ainsi sur la CCM, le haut de la tache de la fraction [12-14] correspondrait à la fraction [11], et le bas de la tache à la fraction [15]. En outre, la grande quantité récupérée (130 mg) conforte ce choix.



Les analyses en RMN à deux dimensions réalisées sur les fractions [12-14] et [15] permettent de confirmer le fait que les molécules contenues appartiennent à la famille des sesterpènes ou des triterpènes.

Afin de séparer les molécules présentes dans la fraction [12-14], différents travaux de purification ont été entrepris mais n'ont pas donné de résultats concluants à ce jour.

La fraction [20-47] est également intéressante du fait de son activité antipaludique ($CI_{50} = 2,4 \mu\text{g/mL}$) mais le fait que cette fraction ne se révèle pas en CCM et la quantité récupérée (26 mg) ne permettent pas de travaux de purification pour le moment. Dans ce cas aussi, les analyses en RMN à deux dimensions confirment l'appartenance à la famille des sesterpènes ou des triterpènes.

Il est à noter que les analyses en APCIMS des fractions [4], [15] et [20-47], en mode négatif, donne un $[M-H]^-$ à $m/z = 390$, donc une masse molaire de 391 g/mol pour les trois fractions ; ce qui paraît peu probable à la vue du fait que ces trois fractions sont différentes, bien qu'appartenant à la même famille.

Conclusion et perspectives

Tout d'abord, la première analyse des trois extraits bruts qui m'ont été confiés a permis de mettre en évidence que deux des extraits (R 3059 C et R 3075 C) étaient identiques. Cela m'a permis de me concentrer sur l'étude de l'extrait R 3075 C et d'éviter de perdre du temps sur l'extrait R 3059 C.

L'étude de l'extrait R 3075 C a permis d'identifier deux molécules actives connues : la puupéhénone, très étudiée, et un dimère, le dipuupéhétriol. Par la suite, cela a permis d'identifier cette éponge au genre *Hyrtios*, dont les espèces sont connues pour renfermer de la puupéhénone.

Cette partie de mon travail permet aussi de mettre en avant l'efficacité des méthodes de déréplication (LC/DAD/MS – base de données) qui m'ont permis de perdre du temps sur des molécules connues.

L'étude de l'extrait R 3046 C s'est avérée plus compliquée, notamment du fait que les méthodes de déréplication dont je dispose n'étaient pas adaptées à l'étude de cet extrait. Cette étude n'a pas permis, pour le moment, de déterminer la structure des molécules actives présentes dans cet extrait ; mais, elle a permis de « cibler » la famille de composés auxquels nous avons à faire. Des travaux de purification postérieurs sur certaines fractions devraient permettre d'arriver rapidement à la structure des molécules actives.

Annexe 1 : Gradients utilisés en HPLC analytique

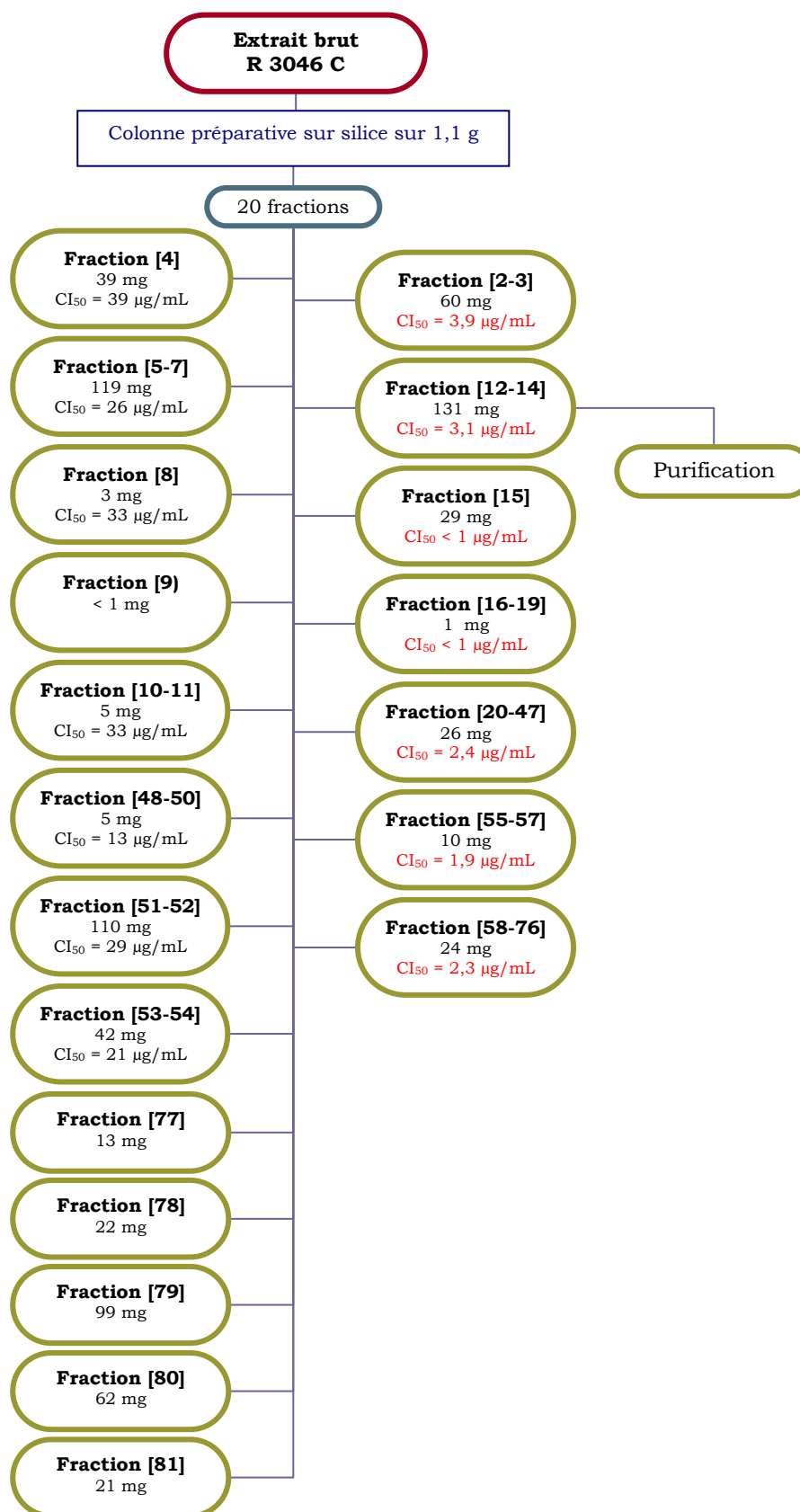
Gradient 1 : 30-100 MeOH, 37 min.

Temps (min)	Débit (mL/min)	% H ₂ O	% MeOH
0	1	70	30
25		0	100
30		0	100
35		70	30
37		70	30

Gradient 2 : 50-100 MeOH, 35 min.

Temps (min)	Débit (mL/min)	% H ₂ O	% MeOH
0	1	50	50
20		0	100
25		0	100
35		50	50

Annexe 2 : Schéma de purification de l'extrait R.3046 C



Références bibliographiques

¹ Kornprobst, JM. *Les médicaments de la mer*

Source : <http://www.mnhn.fr/mnhn/conc/site/scientifique/annales/monde/kornprobst.pdf>

² George D.; George J. *La vie marine : Encyclopédie illustrée des Invertébrés marins*, Maloine s.a. éditeur, **1980**.

³ Pietra F. *A secret world: Natural Products of Marine Life*, Birkhäuser Verlag, **1990**

⁴ Hooper J.N.A.; Van Soest R.W.M. *Sytem Porifera: a guide to the classification of sponges* (Vol.1), édité par John N.A. Hooper et Rob W.M. Van Soest

⁵ Zampella, A.; D'Auria, M.V.; Debitus, C.; Menou, J.L.; *J.Nat.Prod.* **2000**, 63, 943-946

⁶ Zampella, A.; Giannini, C.; Debitus, C.; Roussakis, C.; D'Auria, M.V. *J.Nat.Prod.* **1999**, 62, 332-334

⁷ Zabriskie, T.M. ; Klocke, J.A. ; Ireland, C.M. ; Marcus, A.H. ; Molinski, T.F.; Faulkner, D.J. ; Xu, C. ; Claerdy, J.C *J.Am.Chem.Soc.* **1986**, 108, 3123-3124

⁸ Ledroit, V.; Debitus, C.; Lavaud, C.; Massiot, G. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 225-228

⁹ Hamann, M.T.; Scheuer, P.J.; Kelly-Borges, M. *J.Org.Chem* **1993**, 58, 6565-6569

¹⁰ Nasu, S.; Bryan K.S. Yeung; Hamann, M.T.; Scheuer, P.J.; *J.Org.Chem* **1995**, 60, 7290-7292