

COMPOSANTE 2C - Projet 2C3

Substances Actives Marines

Juin 2007

CRISP



Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique

MEMOIRE DE MASTER

**Recherche et caractérisation de
molécules potentiellement
anti-inflammatoires
chez l'éponge marine
*Xestospongia
testudinaria***

Photo : @ Jean-Louis Menou - IRD



UPMC
PARIS UNIVERSITAS

Auteur : Mélanie Roué

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 FINANCÉ PAR LES ORGANISATIONS SUIVANTES :





ROUE Mélanie

Maître de stage : Dr. Marie-Lise Bourguet-Kondracki
Laboratoire de Chimie et Biochimie des Substances Naturelles
UMR 5154 CNRS
Muséum National d'Histoire Naturelle

Recherche et caractérisation de molécules potentiellement anti-inflammatoires chez l'éponge marine *Xestospongia testudinaria*



Juin 2007
Master de Sciences et Technologies
Mention Biologie intégrative et Physiologie
Spécialité : Biologie et Physiologie comparées, Adaptation au milieu



Je remercie tout d'abord le Professeur Bernard Bodo, directeur du laboratoire de « Chimie et Biochimie des Substances Naturelles », ainsi que le Professeur Sylvie Rebuffat, responsable de l'équipe « Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens », pour leur accueil.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Marie-Lise Bourguet-Kondracki qui m'a donné ma chance dans le domaine de la chimie en m'accueillant dans son groupe de recherche et en me formant aux différentes techniques de chimie et biologie des substances naturelles. Je la remercie pour son aide, sa disponibilité, son enthousiasme et sa bonne humeur.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Gilles Bœuf, responsable de mon master, pour avoir accepté ce sujet de stage et m'avoir permis d'acquérir des compétences dans le domaine de la chimie, m'offrant la possibilité de travailler désormais à l'interface chimie-biologie.

Je remercie Arlette Longeon et Christiane Deregnacourt pour leurs nombreux conseils et leur aide pour les tests biologiques anti-PLA₂.

Je remercie également Alain Blond et Alexandre Deville pour la réalisation des spectres RMN à une et deux dimensions, ainsi que Lionel Dubost et Arul Marie du service de spectrométrie de masse.

Ce travail fait partie du programme Coral Reef Initiative for the South Pacific (CRISP), soutenu par l'Agence Française pour le Développement, et coordonné par l'Institut de Recherche pour le Développement (Cécile Debitus, U152) et l'Université de Polynésie Française (Claude Payri). Le gouvernement des îles Salomon et le Département des pêches sont remerciés pour avoir fourni les permis de recherche. Je suis reconnaissante à l'équipe de plongée de l'IRD-NOUMEA (Nouvelle-Calédonie) qui a récolté les échantillons.

Enfin, je remercie Elodie Quévrain et Voahangy Ramanandraibe pour leur aide et leur sympathie.

Abréviations et symboles utilisés

AcOEt : Acétate d'éthyle
CC : Chromatographie sur Colonne
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CDCl₃ : Chloroforme deutérié
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance
¹³C RMN : RMN du carbone 13
d : doublet
dd : doublet de doublet
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité Optique
ESI : ElectroSpray Ionisation
¹H RMN : RMN du proton
CD₃OD : Méthanol deutérié
COSY : CORrelated SpectroscopY
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz : Hertz
J : constante de couplage
m : multiplicité, multiplet
MeOH : Méthanol
m/z : rapport masse sur charge
NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PH : Phényl
PLA₂ : Phospholipase A₂
ppm : Partie par million
Qq-TOF : Quadripôle – Time Of Flight
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
s : singulet
SM : Spectrométrie de Masse
 δ : déplacement chimique

Sommaire

1. Introduction	1
2. Présentation du modèle d'étude	2
2.1 Description	2
2.2 Travaux antérieurs	3
2.2.1 <i>Xestospongia</i> sp.	3
2.2.2 <i>Xestospongia testudinaria</i>	3
3. Présentation des phospholipases A ₂	4
4. Matériel et méthodes	5
4.1 Etude chimique	5
4.1.1 Principe	5
4.1.2 Matériel marin	6
4.1.3 Matériel de séparation et d'analyse	7
4.1.4 Méthodes de fractionnement	7
4.2 Etude biologique	8
4.2.1 Matériel	8
4.2.2 Méthode	8
5. Etude chimique	9
5.1 Extraction, fractionnement, purification	9
5.2 Elucidation structurale des composés isolés	10
5.2.1 Composé J1	10
5.2.2 Composés Vi et Jm	14
6. Etude biologique	14
7. Discussion	15
7.1 Activité biologique	15
7.2 Obtention des composés d'intérêt en quantités plus importantes	16
7.3 Chimiodiversité, environnement et écologie	17
8. Conclusion et perspectives	17
<i>Bibliographie</i>	19

Annexe : Données spectrales des composés Vi et Jm

1. Introduction

Le besoin en nouveaux médicaments est actuellement toujours aussi grand, du fait de l'évolution des populations et des pathologies. Une des voies d'innovation repose sur la découverte de principes actifs originaux d'origine naturelle. Avec à peine 2 à 3% des espèces étudiées, la faune et la flore marines représentent un formidable espoir dans ce domaine. 17000 produits d'origine marine ont à ce jour été décrits et beaucoup présentent des activités biologiques intéressantes pour l'industrie pharmaceutique ⁽¹⁾. Parmi ceux-ci, trois sont actuellement utilisés en usage thérapeutique: d'une part, les nucléosides Ara A à activité antivirale et Ara C à activité antileucémique, synthétisés sur le modèle de la spongothymidine et de la spongo-uridine isolées en 1950 de l'éponge *Cryptotethya crypta* ⁽²⁾; d'autre part, le ziconotide, peptide analgésique isolé en 1979 du cône *Conus magus* ⁽³⁾.

Les invertébrés marins fixés (éponges, coraux ou tuniciers) ont développé d'importantes défenses chimiques et regorgent de métabolites secondaires ⁽⁴⁾⁽⁵⁾. Ils constituent aujourd'hui un champ immense d'investigation pour la recherche de nouvelles structures chimiques à activité biologique. Parmi ceux-ci, les Spongiaires représentent le phylum le plus prolifique avec plus de 200 molécules isolées chaque année, soit environ près d'un tiers des molécules d'origine marine décrites.

Le groupe de recherche « Chimie Marine » du Muséum National d'Histoire Naturelle dans lequel j'ai effectué mon stage s'intéresse tout particulièrement aux métabolites secondaires d'éponges. Mon travail s'est intégré dans le volet « Biodiversité et substances marines actives du Pacifique Sud » - section « molécules actives » - du programme Coral Reef Initiative in The South Pacific (CRISP). Ce programme de recherche pluridisciplinaire et international, soutenu par l'Agence Française pour le Développement, a pour objectif de contribuer à la connaissance scientifique des organismes et molécules présents dans les récifs coralliens des îles du Pacifique Sud. La section « molécules actives » a pour but de découvrir de nouvelles molécules bio-actives dans des domaines d'application variés.

Mon travail a consisté à rechercher, extraire, isoler, purifier et identifier des molécules potentiellement anti-inflammatoires chez l'éponge marine *Xestospongia testudinaria* provenant des Iles Salomon. Afin d'isoler la (ou les) molécule(s) responsable(s) de l'activité mise en évidence dans l'extrait brut, un fractionnement bio-guidé par un test biologique *in vitro* d'inhibition de la phospholipase A₂ (PLA₂) de venin d'abeille a été réalisé.

2. Présentation du modèle d'étude

Les Spongiaires, connus depuis le Cambrien, sont les premiers Métazoaires diploblastiques. Ces animaux sont présents dans tous les habitats aquatiques et à toutes les profondeurs, ce qui met en évidence le succès de leur mode d'adaptation. Ce sont des filtreurs actifs sans symétrie définie, sans organes différenciés ni système nerveux. Ils sont composés de plusieurs catégories de cellules assurant les grandes fonctions physiologiques. La classification est basée sur leurs éléments squelettiques, les spicules. On distingue ainsi les éponges calcaires (spicules de calcites), les Hexactinellides (spicules de silice), et les Démosponges (spicules de silice et/ou fibres de spongine) qui représentent 95 % des espèces du phylum Porifera.

2.1. Description

Le genre *Xestospongia* regroupe des éponges à squelette généralement isotropique (arrangement régulier de spicules). Les microscières (spicules de 1 à 100 μm) sont absents et les mégascières (spicules de 10 μm à 1 mm) sont des oxes (spicules pointus aux deux extrémités).

L'éponge *Xestospongia testudinaria* (phylum Porifera, classe Demospongiae, ordre Haplosclerida, sous-ordre Petrosina, famille Petrosiidae ⁽⁶⁾) est une éponge-barrique, caractérisée par sa consistance dure et rugueuse comme de la pierre ponce et par des crêtes qui ornent l'extérieur du tonneau. Sa forme est variable, depuis celle d'un vase aplati jusqu'à des individus de forme presque tubulaire. Elle peut mesurer jusqu'à 1 m.



Figure 1 : *X. testudinaria*

2.2. Travaux antérieurs

2.2.1. Xestospongia sp.

De nombreuses études chimiques ont été réalisées sur le genre *Xestospongia* et près de 300 molécules ont été isolées, appartenant à diverses classes chimiques : composés acétyléniques, quinones et hydroquinones, alcaloïdes complexes, amines, stérols, terpènes et peroxydes cycliques. Ces molécules présentent des activités biologiques intéressantes et variées : activités antitumorale, antiparasitaire, antibiotique, antifongique, insecticide, cardiotonique, mais aussi d'inhibition d'enzymes ⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

2.2.2. Xestospongia testudinaria

Peu d'études ont été menées sur l'espèce *X. testudinaria* et seulement quelques composés ont pu être isolés : 7 dérivés polyacétyléniques bromés en C₁₆ ou C₁₈ (1) à (7) ⁽⁹⁾ - ⁽¹¹⁾ et 2 esters du xestostérol (8) et (9) ⁽¹²⁾ (figure 2). Les composés (5), (6) et (7) ont montré une activité antimicrobienne (*Staphylococcus aureus*) et le composé (3) une activité inhibitrice de l'enzyme Na⁺/K⁺ ATPase ⁽¹¹⁾.

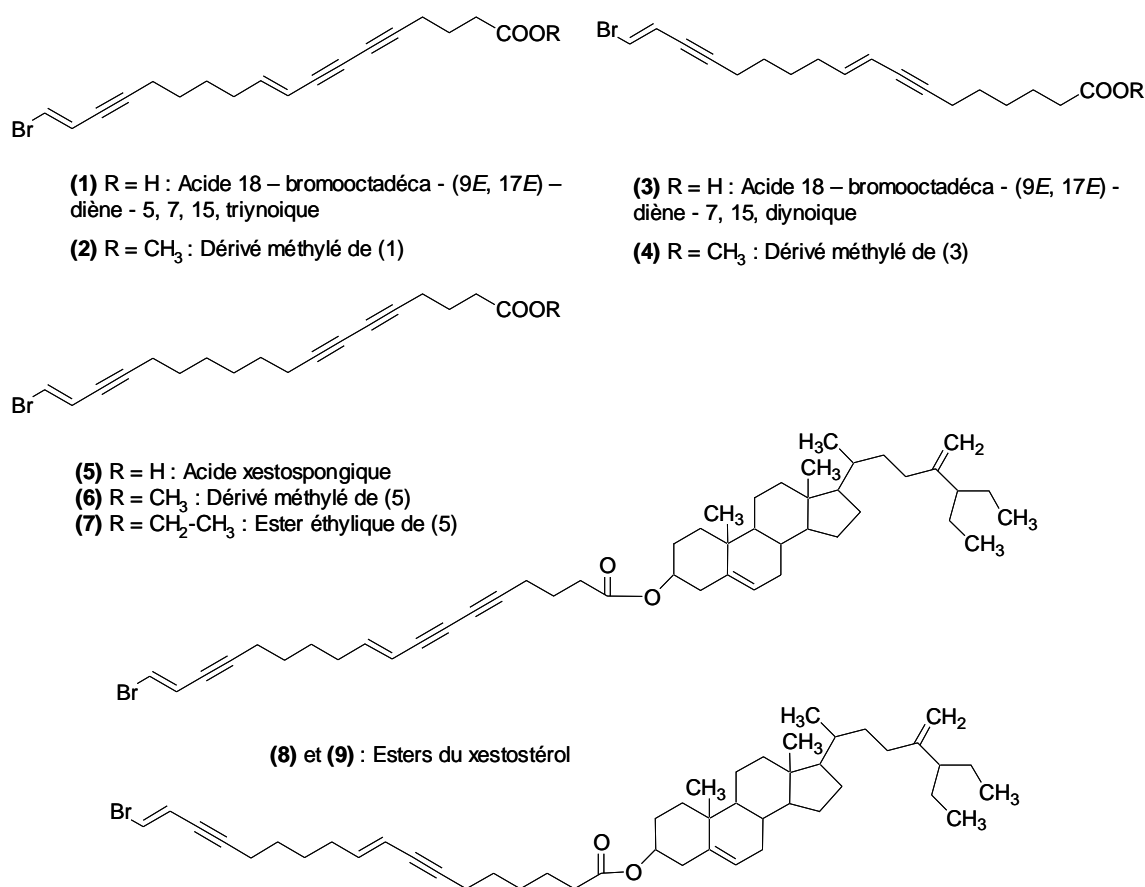


Figure 2 : Molécules isolées de l'éponge *X. testudinaria*

3. Présentation des phospholipases A₂

Les PLA₂ sont des enzymes capables de couper en position sn-2 les glycérophospholipides membranaires pour libérer des lysophospholipides et des acides gras, parmi lesquels l'acide arachidonique qui est le précurseur des médiateurs de l'inflammation que sont les eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes et thromboxanes) (figure 3) ⁽¹³⁾. Ainsi, les inhibiteurs de PLA₂ sont susceptibles d'empêcher l'initiation de la cascade arachidonique et donc la libération d'agents inflammatoires ; ce sont des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de l'inflammation. En bloquant l'initiation de la cascade arachidonique, ces inhibiteurs auraient un avantage marqué par rapport aux anti-inflammatoires non stéroïdiens qui ne s'attaquent qu'à quelques-unes des substances libérées par les PLA₂.

Il existe différentes pathologies inflammatoires parmi lesquelles nous pouvons citer les arthrites inflammatoires, le psoriasis, ou l'asthme.

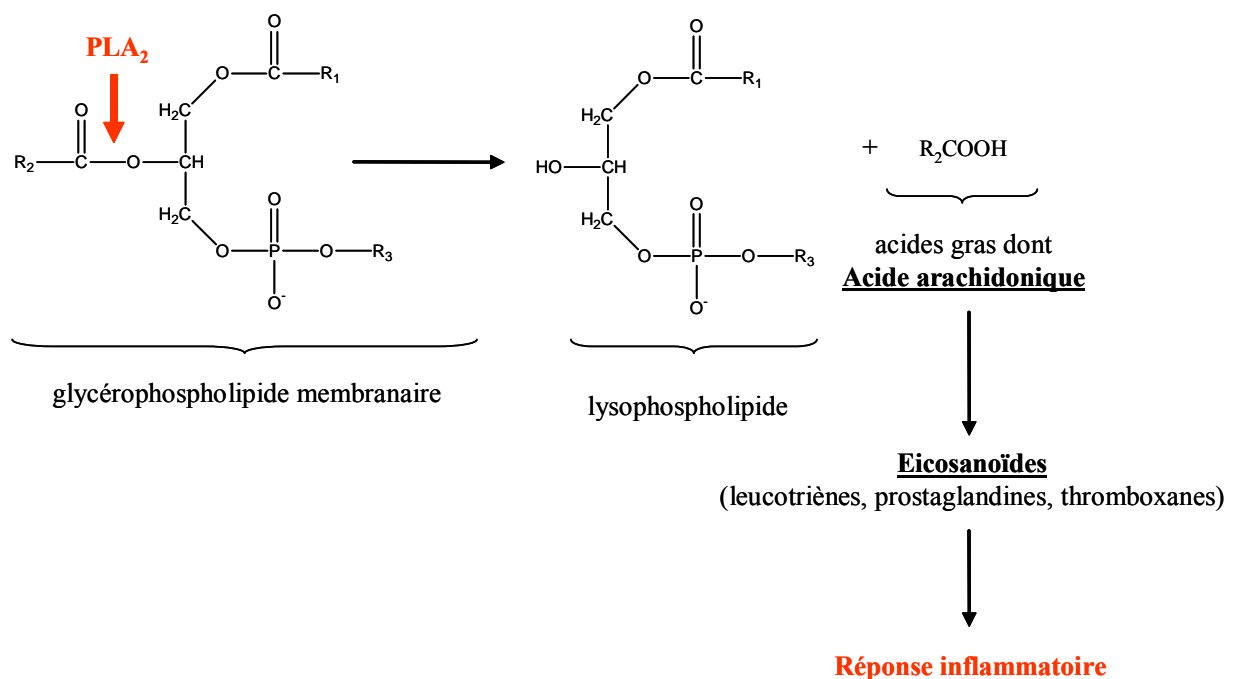


Figure 3 : Action des PLA₂ et réponse inflammatoire

A ce jour, 84 composés aux potentialités anti-inflammatoires ont été isolés d'éponges marines ⁽¹⁴⁾. Le manoalide, sesterterpène isolé de l'éponge Indo-Pacifique *Luffariella variabilis* ⁽¹⁵⁾ constitue l'inhibiteur de PLA₂ de référence.

4. Matériel et méthodes

4.1. Etude chimique

4.1.1. Principe

Les extraits bruts, obtenus après macérations successives de l'éponge lyophilisée dans différents solvants puis évaporation des solvants, sont fractionnés selon différentes méthodes chromatographiques. L'élucidation structurale des composés isolés est réalisée grâce aux différentes méthodes d'analyse spectrale présentées ci-dessous.

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$: Le pouvoir rotatoire est la propriété que possèdent les composés présentant des carbones asymétriques (carbone tétraédrique qui possède quatre substituants différents) de faire tourner le vecteur lumineux d'un faisceau lumineux qui les traverse.

Spectrométrie de masse (SM) : Le spectromètre de masse par ionisation électrospray (ESI) est un appareil qui convertit les molécules M en ions moléculaires M^+ . Un analyseur hybride Qq-TOF (filtre quadripôle – Time Of Flight) classe ces ions selon le rapport de leur masse à leur charge (m/z), d'une part en modifiant leur trajectoire par des champs électriques (Qq), et d'autre part en déterminant la durée de leur trajet dans l'analyseur (TOF). Le spectre de masse permet de déduire la formule brute de la molécule à partir de laquelle nous pouvons ensuite déterminer le nombre d'insaturations (cycles et/ou liaisons multiples) $N_i = x - \frac{1}{2} y + \frac{1}{2} z + 1$, pour une molécule de formule brute $C_xH_yN_zO_t$.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : La RMN est basée sur la mesure de l'absorption de radiations électromagnétiques par des noyaux de certains types d'atomes (en particulier 1H et le ^{13}C) placés dans un champ magnétique intense.

- Spectre RMN 1H :

- le nombre de signaux et les déplacements chimiques (δ), exprimés en ppm, permettent l'identification des types de protons chimiquement différents de la molécule. En effet, les déplacements chimiques varient en fonction de l'environnement électromagnétique des protons.

- l'aire des pics (intégration) informe sur le nombre de protons donnant le signal considéré.

- la multiplicité des pics renseigne sur le voisinage des protons (si un proton a n protons voisins son signal en RMN sera divisé en n+1 pics). La constante de couplage J, exprimée en Hertz (Hz), correspond alors à la différence de fréquence de 2 signaux voisins.

- Spectre RMN ^{13}C :

Il permet de déterminer le nombre d'atomes de carbone et de connaître leurs déplacements chimiques et leurs natures (C quaternaire, CH, CH₂, ou CH₃).

- Spectre COSY (2D ^1H - ^1H) :

Il permet de déterminer les couplages ^1H - ^1H de protons géminés ou vicinaux. On observe des taches de corrélation entre deux protons voisins, distants de 2 liaisons (2J) et 3 liaisons (3J).

- Spectre HSQC (2D ^1H - ^{13}C) :

Il permet d'établir les corrélations directes ^1H - ^{13}C . On observe sur le spectre des taches de corrélation entre les atomes de carbones et les protons directement liés.

- Spectre HMBC (2D ^1H - ^{13}C) :

Il permet d'établir les corrélations entre protons ^1H - ^{13}C à longue distance à travers les liaisons. On observe sur le spectre des taches de corrélation entre les atomes de carbone et les protons distants de 2 ou 3 liaisons.

- Spectre NOESY (2D ^1H - ^1H) :

Il indique les couplages ^1H - ^1H à travers l'espace.

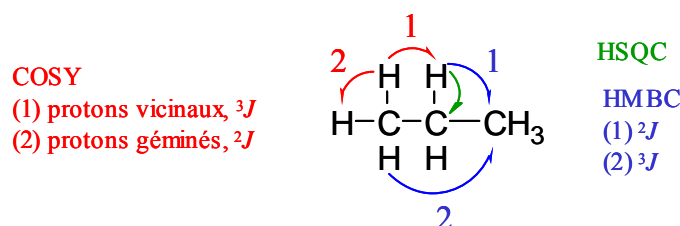


Figure 4 : Principes des techniques de RMN à deux dimensions

L'élucidation structurale nécessite l'analyse conjuguée de ces différents spectres. Les corrélations COSY permettent dans un premier temps de déterminer l'enchaînement des CH, CH₂, et CH₃ et d'élaborer des motifs de structure. Ceux-ci seront ensuite connectés grâce aux corrélations HMBC mettant en évidence les carbones quaternaires. Enfin, les corrélations NOESY permettent de déterminer la disposition spatiale des protons et d'établir la configuration relative de la molécule.

4.1.2. Matériel marin

L'éponge *Xestospongia testudinaria* a été récoltée en juillet 2004 dans le Pacifique Sud, au large des îles Salomon, et a été identifiée par John Hooper (Queensland Museum Brisbane).

4.1.3. Matériel de séparation et d'analyse

Chromatographies : Les fractionnements ont été réalisés sur des colonnes Buchi sur gel de silice Merck de granulométrie 0,04-0,063 mm, porosité 230-400 mesh. Les CCM préparatives ont été réalisées sur des plaques de verre 20 x 20 cm recouvertes d'un gel de silice 60 F₂₅₄ Merck. Les CCM analytiques ont été réalisées sur des feuilles d'aluminium 20 x 20 cm recouvertes d'un gel de silice 60 F₂₅₄ Merck et révélées par le réactif de Lieberman (anhydride acétique/acide sulfurique 9 : 1 puis chauffage à l'étuve). L'observation des plaques a également été effectuée en lumière UV à 254 et 365 nm.

Les CLHP ont été réalisées sur colonne analytique de silice Kromasil[®] (250 x 4,6 mm) ou en silice greffée Develosil DV5PH[®] (250 x 4,6 mm). La chaîne CLHP se compose d'une pompe L-6200A Intelligent-pump[®] Merck reliée à un détecteur L4250 UV-Vis Merck. L'enregistreur est un D2500 Chromato-Integrator[®] Merck.

Analyses spectrales : L'activité optique des composés isolés a été déterminée grâce à un polarimètre Perkin Elmer 341.

Les mesures de masse à basse résolution ont été effectuées en mode d'ionisation par électrospray (ESI), en mode positif, sur un analyseur quadripolaire relié à un analyseur à temps de vol Qq-TOF (API QSTAR PULSAR, Applied Biosystem).

Les spectres de RMN ¹³C ont été réalisés sur un appareil RMN AC 300 BRUKER à 75,47 MHz. Les spectres de RMN ¹H, COSY, HSQC, HMBC, NOESY ont été réalisés sur un appareil AVANCE[®] 400 BRUKER relié à une console DPX à 400,13 MHz. Les données ont été interprétées grâce au logiciel XWIN-NMR 2.5. Les spectres de RMN ont été réalisés dans des solvants deutériés : CDCl₃ ou CD₃OD selon la solubilité des produits.

4.1.4. Méthodes de fractionnement

L'échantillon lyophilisé de l'éponge marine *X. testudinaria* (182 g) a été mis à macérer successivement dans les solvants CH₂Cl₂ puis CH₂Cl₂/MeOH (1:1). Après filtration, les solvants organiques ont été évaporés et fractionnés selon le schéma de la *figure 5*.

L'**extrait CH₂Cl₂** (3 g), a été chromatographié sur une colonne de silice, élué par un gradient CH₂Cl₂/acétone et bio-guidé par un test anti-PLA₂. Les fractions CH₂Cl₂/acétone 70/30 (16 mg) et 60/40 (39 mg) ont été réunies d'après leurs profils chromatographiques observés en CCM analytique. La fraction F ainsi obtenue a été séparée en fonction de sa solubilité dans les solvants CH₂Cl₂ et MeOH. La sous-fraction F(CH₂Cl₂) (48 mg) a été

déposée sur CCM préparative et la migration a été réalisée deux fois dans AcOEt 100 % pour donner le composé Vi (1,7 mg). La sous fraction F(MeOH) (7 mg) a été purifiée par CLHP sur colonne de silice Develosil PH avec un gradient MeOH/H₂O (40/60 → 95/5 en 20 minutes, débit de 0,8 mL/min, à 254 nm) et a donné le composé J1 (1,9 mg).

L'extrait CH₂Cl₂/MeOH (1:1) (9,5 g) a été chromatographié sur une colonne de silice, élué par un gradient CH₂Cl₂/MeOH et bio-guidé par un test anti-PLA₂. La fraction CH₂Cl₂/MeOH 95/5 a été fractionnée sur une colonne de silice et éluee par un gradient CH₂Cl₂/acétone. La fraction CH₂Cl₂/acétone 80/20 (4,9 mg) a été purifiée par CLHP sur colonne de silice en condition isocratique (CH₂Cl₂/MeOH 98/2, débit de 1mL/min, à 254 nm) et a fourni le composé Jm (0,9 mg).

4.2. Etude biologique

L'activité de la PLA₂ de venin d'abeille (*Apis mellifera*) a été mesurée *in vitro* grâce à une méthode colorimétrique utilisant un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'hydrolyse des phospholipides par la PLA₂ acidifie le milieu en libérant des acides gras⁽¹⁶⁾. Le rouge de phénol, rouge en milieu basique et jaune en milieu acide, permet de suivre la réaction. En présence du produit à tester, s'il y a inhibition de la PLA₂, le milieu reste basique et rouge.

4.2.1. Matériel

La mesure de l'activité a été faite sur un luminomètre CERES 900. Les produits à tester ont été déposés sur une plaque 96 puits TPP[®]. La PLA₂ (Sigma) utilisée provient de venin d'abeille (*Apis mellifera*).

Le substrat a été préparé avec 3,5 mM de lécithine de jaune d'œuf (phosphatidylcholine) (Merck), dans 7 mM de Triton X100 avec 100 mM de NaCl, 10 mM de CaCl₂, 0,055 mM de rouge de phénol (Sigma). Le pH de cette solution a été ajusté à 7,6 avec une solution de NaOH à 40 mM afin d'obtenir à 558 nm une DO comprise entre 1,8 et 2.

4.2.2. Méthode

Les produits à tester (500 µg/mL) ont été dissous dans 10 µL de DMSO et incubés en présence de 5 µL de la solution enzymatique (PLA₂ à 0,01 mg/mL). Après 1 h d'incubation, 200 µL de substrat ont été ajoutés. La DO a été mesurée au temps zéro puis après 10 minutes de réaction. Un témoin négatif (DMSO) et un témoin positif (manoalide) ont été réalisés à

chaque test et les produits ont été testés en triplicat. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui est calculé d'après la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (\Delta\text{DO}(\text{P})/\Delta\text{DO}(\text{T}))] \times 100$$

$$\begin{aligned} \Delta\text{DO}(\text{P}) &= \text{DO}(\text{P})_{t_0} - \text{DO}(\text{P})_{t_{10}}, & \text{P} &= \text{produit testé} \\ \Delta\text{DO}(\text{T}) &= \text{DO}(\text{T})_{t_0} - \text{DO}(\text{T})_{t_{10}}, & \text{T} &= \text{témoin négatif} \end{aligned}$$

5. Etude chimique

5.1. Extraction, fractionnement et purification

Les extraits CH_2Cl_2 et $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) de l'éponge *X. testudinaria* ayant révélé une activité potentiellement anti-inflammatoire en inhibant la PLA_2 de venin d'abeille (86% d'inhibition), leurs fractionnements ont été bio-guidés par un test anti- PLA_2 (figure 5), conduisant à l'isolement des trois composés J1 (1,9 mg), Vi (1,7 mg) et Jm (0,9 mg).

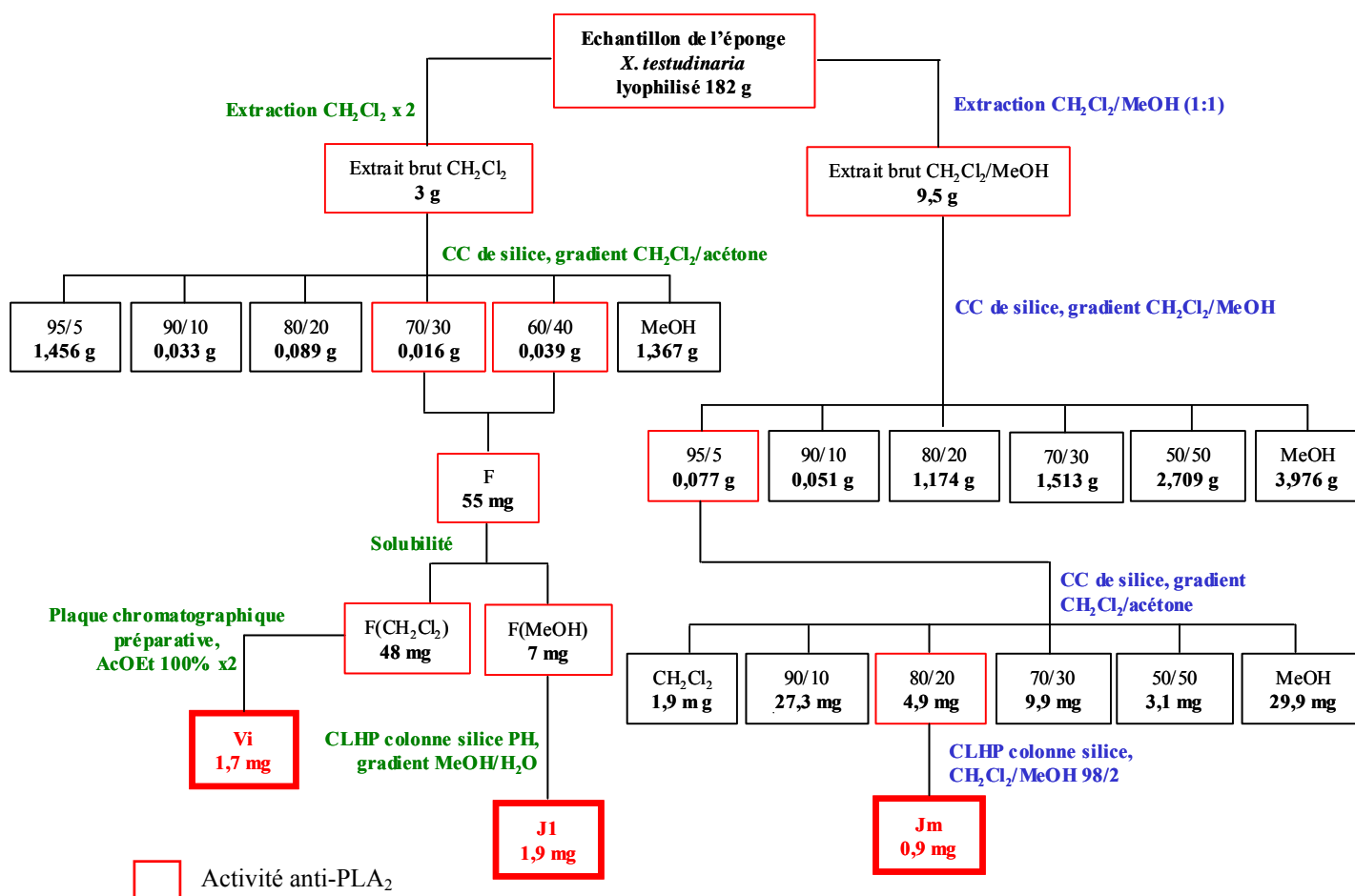


Figure 5 : Fractionnement et purification bio-guidés des extraits de *X. testudinaria*

5.2. Elucidation structurale des composés isolés

5.2.1. Composé J1

Le composé J1 est un solide jaune, $[\alpha]_D^{20} = -24$ ($c = 0,05$; MeOH), dont le spectre de masse à basse résolution présente un ion moléculaire protonné $(M+H)^+$ à m/z 341. Le calcul de la masse précise indique qu'il s'agit d'un composé de formule brute $C_{20}H_{20}O_5$ (m/z observé 340,1310 ; calculé 340,1311), possédant 11 insaturations et/ou cycles.

Le spectre de RMN 1H (figure 6), enregistré dans CD_3OD , indique la présence de 20 protons dont :

- 2 protons aromatiques singulets à δ 8,47 (H-11) et δ 8,23 (H-18)
- 4 protons proches d'un hétéroatome: un doublet de doublet à δ 5,02 (H-13), un doublet de doublet à δ 4,62 (CH_2 -1) et un singulet à δ 4,06 (H-3)
- 9 protons résonnant entre δ 3,60 et δ 1,78
- 3 protons méthyléniques singulets à δ 1,57 (CH_3 -20)

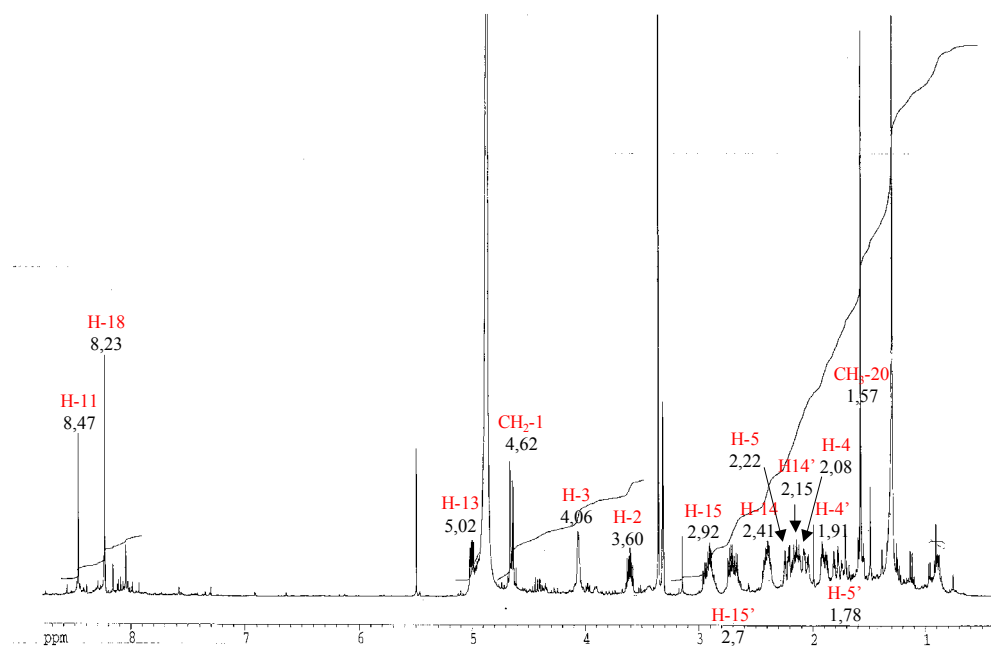


Figure 6 : Spectre RMN 1H du composé J1 (CD_3OD ; 400,13 MHz ; 25°C)

Le spectre ^{13}C ne révèle la présence que de 15 atomes de carbones dont 1 méthyle (CH_3) à δ 25,0 (C-20), 5 méthylènes (CH_2) dont 4 résonnant entre δ 29,4 et δ 36,5 et 1 résonnant à δ 72,7 (C-1), 2 protons oxyméthines ($CHOH$) à δ 66,9 (C-13) et δ 68,0 (C-3), 3 méthines

(CH) à δ 48,5 (C-2), à δ 127,7 (C-18) et à δ 128,8 (C-11), 3 carbones quaternaires résonant à δ 40,1 (C-6), δ 143,4 (C-7) et δ 146,0 (C-12), 1 carbone portant une cétone à δ 200,4 (C-16).

L'analyse du spectre COSY (CD_3OD) a permis d'établir 2 enchaînements (*figure 7*) :

- le proton oxyméthine δ 5,02 (H-13) est couplé avec les protons géminés méthyléniques CH_2 -14 à δ 2,41-2,14 ; eux même couplés avec les protons géminés méthyléniques CH_2 -15 à δ 2,92-2,70.

- les protons méthyléniques CH_2 -1 à δ 4,65 sont couplés au proton méthine à δ 3,60 (H-2), lui-même corrélé au proton oxyméthine à δ 4,06 (H-3) qui est couplé aux protons géminés méthyléniques CH_2 -4 à δ 2,08-1,91 ; eux-même couplés aux protons géminés méthyléniques CH_2 -5 à δ 2,22-1,78.

Ces enchaînements ont été confirmés par les corrélations HMBC (tableau I).

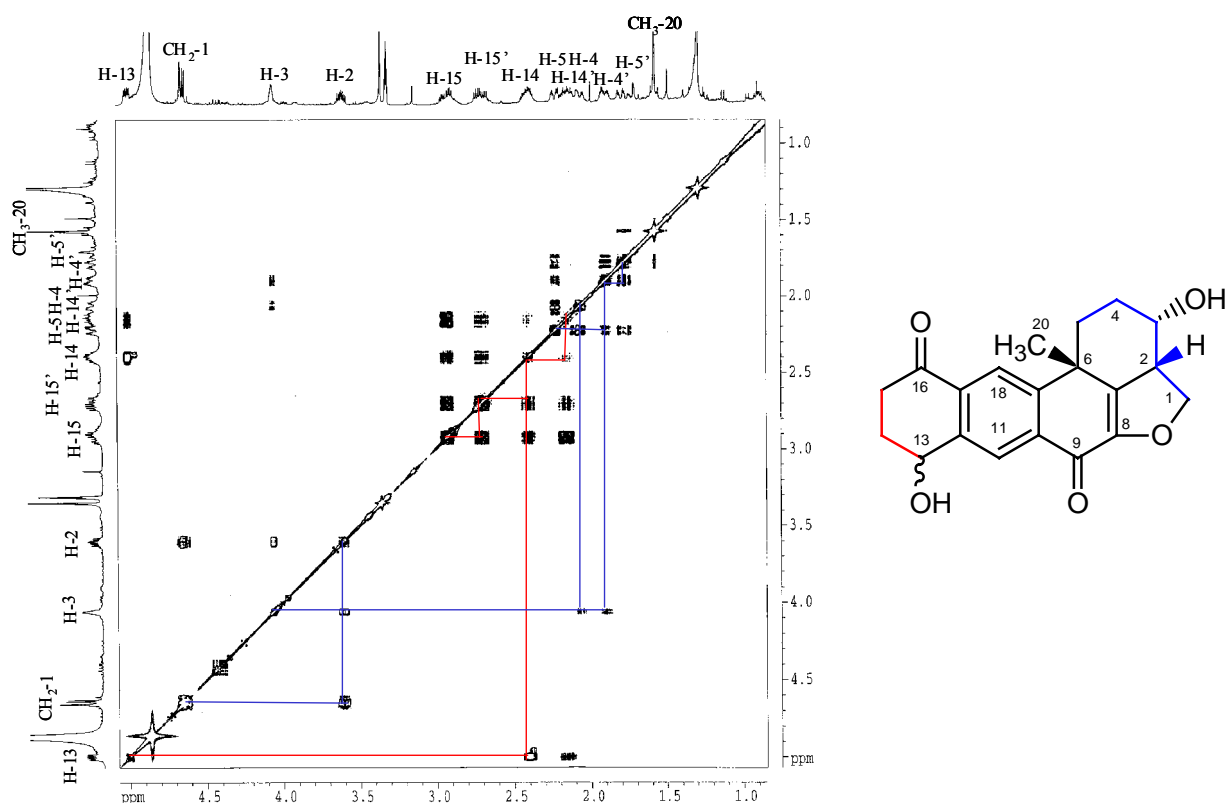


Figure 7 : Spectre COSY (CD_3OD ; 400,13 MHz ; 25°C) du composé J1 et enchaînements proposés

Les résonances des 5 carbones quaternaires absents du spectre ^{13}C RMN ont été observées dans le spectre HMBC (C-17 à δ 134,1 ; C-10 à δ 136,8 ; C-8 à δ 149,8 ; C-19 à δ 151,7 et C-9 à δ 176,8). Le spectre HMBC (*figure 8*) a également permis de relier les fragments élaborés à partir du spectre COSY grâce à l'observation de corrélations clés entre :

- le proton aromatique H-11 à δ 8,47 et les carbones résonant à δ 176,8 (C-9) et 66,9 (C-13)
- le proton H-18 aromatique à δ 8,23 et les carbones résonant à δ 200,4 (C-16) et 40,1 (C-6)
- le proton H-2 à δ 3,60 et les carbones résonant à δ 149,8 (C-8) et 143,4 (C-7)
- les protons méthyléniques CH₃-20 à δ 1,57 et les carbones résonant à δ 151,7 (C-19) et 35,4 (C-5).

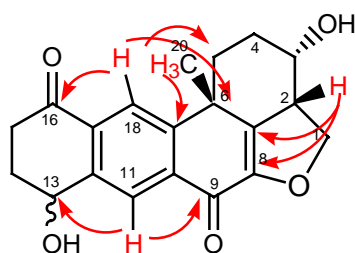
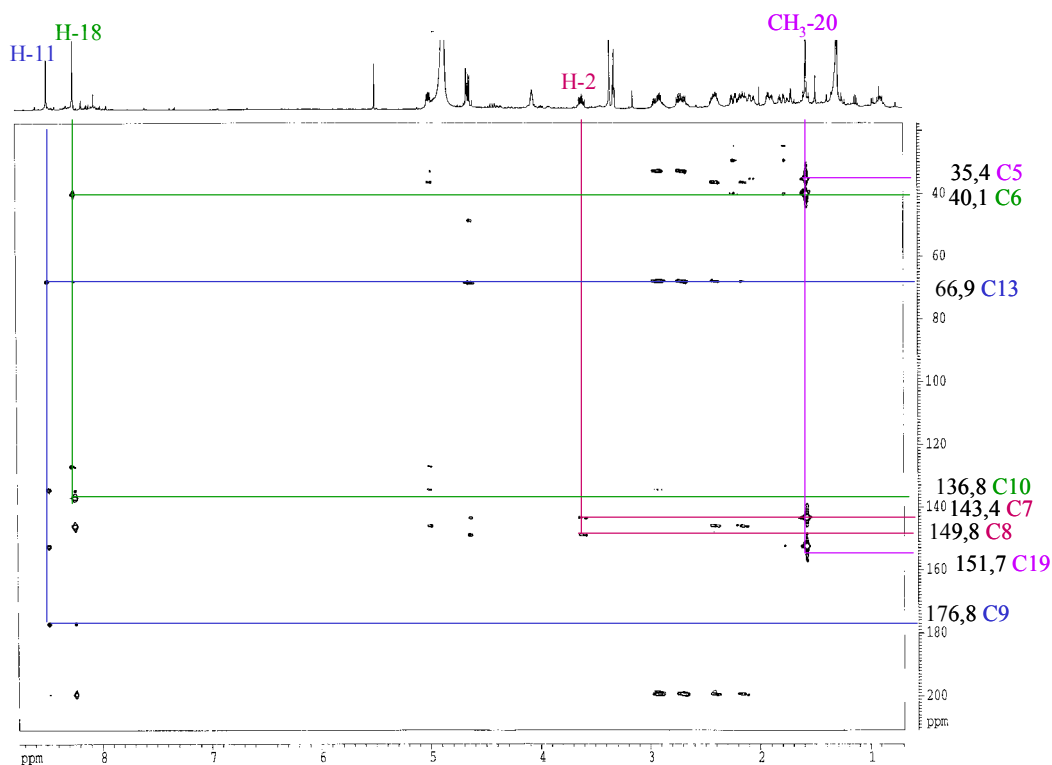


Figure 8 : Spectre HMBC (CD₃OD ; 400,13 MHz ; 25°C) du composé J1 et principales corrélations HMBC

L'analyse du spectre NOESY a donné des indications sur la configuration relative du composé J1. En effet, des corrélations NOESY entre le proton H-2 à δ 3,60 avec le proton oxyméthine H-3 à δ 4,06 et avec les protons méthyléniques CH₃-20 à δ 1,57 ont été observées, suggérant qu'ils se trouvent dans un même plan, comme cela est présenté dans la *figure 9*.

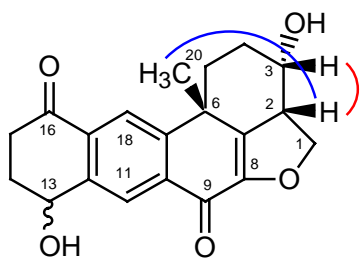


Figure 9 : Corrélations NOESY du composé J1

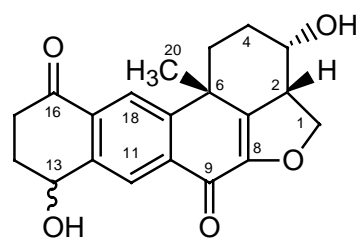


Figure 10 : Structure du composé J1

L'ensemble des données spectrales a permis d'établir la structure du composé J1 (figure 10). Ces données sont identiques à celles de la tétrahydrohalénaquinone A précédemment isolée des éponges *Adocia* sp. ⁽¹⁷⁾, puis *X. cf. carbonaria* ⁽¹⁸⁾. Seul le pouvoir rotatoire est différent ($[\alpha]_D^{20} = +12$ pour la tétrahydrohalénaquinone A), suggérant que le composé J1 serait un diastéréoisomère de la tétrahydrohalénaquinone A. Il faudrait vérifier cette hypothèse en établissant la configuration absolue du composé J1 grâce aux méthodes de Mosher ou Mosher modifiée ^{(19) (20)}.

n°	δ_C	δ_H (m, J Hz)	HMBC (H→C)
1	72,7	4,65 (dd; 1,5 ; 4,3) (2H)	2, 3, 7, 8
2	48,5	3,60 (m)	7, 8
3	68,0	4,06 (s)	-
4	29,4	2,08 (dd; 2,0 ; 1,7)	5
4'		1,91 (m)	-
5	35,4	2,22 (dd; 2,6 ; 4,7)	4, 6, 7, 20
5'		1,78 (d; 4,2)	4, 6, 19, 20
6	40,1	-	
7	143,4	-	
8	149,8	-	
9	176,8	-	
10	136,8	-	
11	128,8	8,47 (s)	9, 13, 16, 17, 19
12	146,0	-	
13	66,9	5,02 (dd; 3,9 ; 4,0)	12, 15, 17, 18
14	32,6	2,41 (m)	12, 13, 15,16
14'		2,15 (m)	12, 13, 15,16
15	36,5	2,92 (m)	13, 14, 16, 17
15'		2,70 (m)	13, 14, 16
16	200,4	-	
17	134,1	-	
18	127,7	8,23 (s)	6, 9, 10, 12, 13, 16, 17
19	151,7	-	
20	25,0	1,57 (s) (3H)	5, 6, 7, 19

Tableau I : Données de RMN pour le composé J1 (CD_3OD , 25°C), 1H (400,13 MHz) et ^{13}C (75,47 MHz) et corrélations HMBC

5.2.2. Composés Vi et Jm

A partir des méthodologies utilisées précédemment, deux autres composés ont pu être isolés et leurs structures établies (*figures 11 et 12*). Leurs données spectrales sont présentées en *annexe*. Ils appartiennent à la même série chimique que le composé J1.

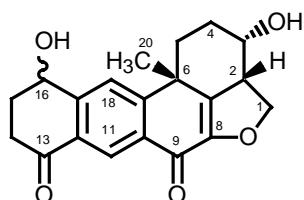


Figure 11 : Structure du composé Vi

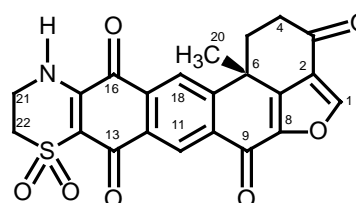


Figure 12 : Structure du composé Jm

Les données spectrales du composé Vi sont identiques à celles du xestosaprol A isolé de l'éponge *X. sapra* ⁽²¹⁾. Ce composé est le régio-isomère (cycle E) du composé J1.

Les données spectrales du composé Jm sont identiques à celles de la 3-kétoadociaquinone A isolée chez une éponge *Adocia* sp ⁽¹⁷⁾.

6. Etude biologique

L'activité anti-PLA₂ des trois produits J1, Vi et Jm a été évaluée à 500 µg/mL par le test colorimétrique anti-PLA₂. Dans les conditions de ce test, le composé J1 a montré une forte activité d'inhibition de la PLA₂ de venin d'abeille avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 90 %. Le composé Vi a également révélé une activité intéressante avec 66 % d'inhibition. En revanche, le composé Jm n'a pas montré d'activité anti-PLA₂ de venin d'abeille.

Le manoalide a été utilisé comme témoin positif. Le pourcentage d'inhibition observé était de 50 % pour une concentration de 50 µg/mL.

Composé	% d'inhibition
J1	92 ± 4,3
Vi	66 ± 6,3
Jm	11 ± 1,1
Manoalide	50 ± 5

Tableau II : Pourcentages d'inhibition de la PLA₂ de venin d'abeille des composés J1, Vi et Jm et du manoalide (témoin positif)

7. Discussion

7.1. Activité biologique

Les composés J1, Vi et Jm appartiennent à la série des dérivés de l'halénaquinone ⁽²²⁾ (figure 13) qui comprend 22 autres produits. Ceux-ci présentent de nombreuses activités d'inhibition d'enzymes (allant des kinases aux phosphatases) ^{(23) - (26)}, mais c'est la première fois qu'une activité anti-PLA₂ est décrite pour les composés isolés.

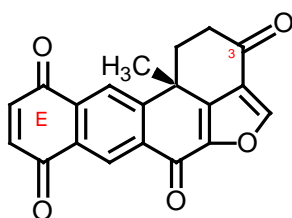


Figure 13 : Structure de l'halénaquinone

Peu d'études de relations structure/activité ont été réalisées dans la série des dérivés de l'halénaquinone. Il a cependant été mis en évidence que la présence d'une cétone ou d'un hydroxyle en C-3 et la présence d'une structure quinone au niveau du cycle E influençaient les activités biologiques ⁽²⁷⁾. D'après notre étude, nous constatons que l'ajout d'une moitié hypotaurine et/ou le remplacement de l'hydroxyle par une cétone en C-3 diminue de façon significative l'activité anti-PLA₂. D'autre part, le fait que le composé J1 soit plus actif que le composé Vi suggère que la position de la cétone en C-16 et de l'hydroxyle en C-13 ont leur importance dans l'activité anti-PLA₂.

Les résultats significatifs obtenus pour les composés J1 et Vi demandent dans un premier temps à être confirmés avec d'autres types de tests utilisant :

- une méthode différente, comme un test fluorogénique qui est basé sur l'apparition d'une fluorescence suite à l'hydrolyse de la liaison ester par une PLA₂ ⁽²⁸⁾. Ce test, très spécifique et très sensible, permet d'utiliser de faibles quantités de produit ce qui est un avantage non négligeable.
- différentes PLA₂ comme des PLA₂ de venin de serpents ou des PLA₂ humaines.
- un substrat différent, comme des phospholipides de lipoprotéines humaines sériques ou plasmatiques.

L'évaluation de l'action des produits par un test utilisant un substrat humain et des PLA₂ humaines permettrait d'avoir une première approche de leurs potentialités en santé humaine.

Il sera ensuite important d'envisager le mécanisme d'action des inhibiteurs (inhibition compétitive, non compétitive, gêne stérique) par différentes expériences de biochimie, et de vérifier leur spécificité.

Enfin, avant de développer de tels composés en tant qu'anti-inflammatoires, il faudra avant d'engager des tests *in vivo* évaluer leur toxicité, bien que l'extrait brut de *X. testudinaria* n'ait pas révélé d'activité cytotoxique.

7.2. Obtention des composés d'intérêt en quantités plus importantes

Les composés J1, Vi et Jm ont été obtenus en très petites quantités (1,9 mg ; 1,7 mg et 0,9 mg respectivement). C'est le cas de la plupart des métabolites d'intérêt qui se trouvent sous forme de traces au sein des éponges. Lorsqu'un composé présente une activité biologique significative et intéressante pour une valorisation industrielle et une production commerciale, la biomasse naturelle nécessaire est donc considérable. Or, les ressources naturelles sont limitées et il ne peut être envisagé de procéder à des récoltes massives. D'autres méthodes alternatives pour la production des métabolites isolés d'éponges⁽²⁹⁾ sont la synthèse chimique, la mariculture, la culture en aquarium, la culture de cellules d'éponges (primorpes) ou de microorganismes associés - de nombreux composés sont en réalité synthétisés par les microorganismes associés⁽³⁰⁾ - ou encore les modifications génétiques⁽³¹⁾. Le développement de telles méthodes nécessite entre autres des études sur les voies de biosynthèse des composés d'intérêt (synthèses biomimétique et chimique, modifications génétiques) ou sur les effets des facteurs environnementaux influençant la production des métabolites, la croissance et la survie des explants (mariculture).

Certaines de ces méthodes alternatives ont déjà été étudiées chez les éponges du genre *Xestospongia*. Des cultures de cellules ectosomales et choanosomales de *X. muta* ont été réalisées et ce avec maintien de la synthèse des métabolites d'intérêt⁽³²⁾. Les éponges du genre *Xestospongia* hébergent une large population de bactéries symbiotiques. Certaines sont déjà soupçonnées d'être responsables de la production d'acides acétyléniques⁽³²⁾. De plus, la présence de bactéries symbiotiques de la sous-classe des Acidimicrobidae (actinobactéries, Gram +), qui présentent déjà un grand intérêt en tant que source de composés leader pour l'industrie pharmaceutique, a été mise en évidence chez *X. testudinaria* et *X. muta*⁽³³⁾. La possibilité d'obtenir des métabolites d'intérêt par culture de ces bactéries associées est donc envisageable pour les espèces du genre *Xestospongia*. Enfin, à notre connaissance, aucun des composés isolés n'a jamais été obtenu par synthèse organique, mis à part le composé Jm (3-

kétoadociaquinone A) dont l'hémisynthèse a été réalisée à partir de l'halénaquinone afin de déterminer la structure de la moitié hypotaurine⁽¹⁷⁾.

7.3. Chimiodiversité, environnement et écologie

Une éponge exprime différemment les métabolites secondaires (quantité, qualité) selon la situation. Lorsqu'elle n'est pas stressée, elle utilise les défenses chimiques indispensables, exprimées par le relargage continu de nombreux composés bio-actifs. Cependant, en fonction de certains facteurs de stress qui agissent comme stimulus d'adaptation à un nouvel environnement, des modifications de l'expression des métabolites secondaires sont observées. La chimiodiversité d'une communauté modèle peut donc être utilisée comme bio-indicateur en suivant son évolution suite à des pressions environnementales (réchauffement climatique, pollutions...).

Chaque organisme vit en interaction avec son environnement physico-chimique, mais aussi avec son environnement biologique. Des communications s'établissent entre individus de même espèce ou entre représentants d'espèces différentes et celles-ci sont souvent chimiques. Ainsi, l'étude de l'expression et de la variation de la chimiodiversité peut fournir des informations essentielles pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes et les interactions entre les organismes qui y vivent.

L'étude de la chimiodiversité peut également apporter des connaissances essentielles pour l'environnement et l'écologie.

8. Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la recherche de molécules potentiellement anti-inflammatoires, notre travail a porté sur l'étude des métabolites secondaires de l'éponge marine *Xestospongia testudinaria*. Les fractionnements bio-guidés des extraits CH₂Cl₂ et CH₂Cl₂/MeOH (1 :1) ont conduit à l'isolement de trois composés. Ces molécules ont été caractérisées et leurs structures déterminées grâce aux différentes techniques de spectrométries de masse, RMN du ¹H et du ¹³C à une et deux dimensions. Elles appartiennent à la série chimique des dérivés de l'halénaquinone.

Les composés J1 et Vi ont montré une activité d'inhibition de la PLA₂ de venin d'abeille intéressante avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 92 % et 66 % dans les

conditions du test colorimétrique anti-PLA₂ utilisé. Ces résultats suggèrent l'importance des substituants en position C-13 et C-16. C'est la première fois qu'une activité potentiellement anti-inflammatoire est décrite pour ces composés. De nombreuses études complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces activités.

L'extrait brut CH₂Cl₂ de *X. testudinaria* avait également montré des activités anti-acétylcholinestérase (100%) et anti-PFTase (Protéine Farnésyl-Transférase) (94%). Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase peuvent être utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et les inhibiteurs de la farnésyl-transférase dans le traitement de nombreux cancers. Il sera donc intéressant de tester les composés purifiés pour déterminer s'ils sont responsables ou non de ces activités qui n'ont jamais été décrites dans la série des dérivés de l'halénaquinone.

Comme le montre ce travail, les métabolites d'intérêt sont obtenus en très petites quantités. La recherche de méthodes alternatives à la récolte permettant d'obtenir ces composés en plus grande quantité est donc essentielle pour envisager une éventuelle valorisation industrielle.

Outre sa remarquable utilité dans le domaine de la santé publique, la chimiodiversité marine peut procurer des informations essentielles dans les domaines de l'environnement et de l'écologie.

Les océans sont un réservoir de biodiversité, et donc de chimiodiversité, qui reste encore largement inexploré. Afin d'exploiter au mieux cette extraordinaire richesse, il est donc nécessaire de développer des collaborations étroites entre des spécialistes de disciplines complémentaires : taxonomie, chimie, biologie, biochimie, écologie et environnement...

Bibliographie

- 1) Blunt, J.W., and Munro, M.H.G. (2007). MarinLit : a database of marine natural products literature.
- 2) Bergmann, W., and Feeney, R.J. (1951). Contributions to the study of marine products. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* 16, 981-987.
- 3) Endean, R., Gyr, P., and SurrIDGE, J. (1979). The effects of crude venoms of *Conus magus* and *Conus striatus* on the contractile response and electrical activity of guinea-pig cardiac musculature. *Toxicon* 17, 381-395.
- 4) Kubanek, J., Whalen, K.E., Engel, S., Kelly, S.R., Henkel, T.P., Fenical, W., and Pawlik, J. R. (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia* 131, 125-136.
- 5) Lenio, K. (2004). Ecological and physiological roles of chemical defenses in tropical marine sponges : a review, Department of entomology, University of Colorado State.
http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_2004/lenio.pdf
- 6) Hooper, N.A., and Van Soest, R.W.M. (2002). *Systema Porifera : A guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- 7) Calcul, L. (2005). Etude chimique et biologique des éponges marines *Podospongia aff. Loveni*, *Siphonochalina* sp. et *Xestospongia* sp. Thèse en Chimie des Substances Naturelles, MNHN, Paris.
- 8) Calcul, L., Longeon, A., Mourabit, A.A., Guyot, M., and Bourguet-Kondracki, M.L. (2003). Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron* 59, 6539-6544.
- 9) Quinn, R.J., Tucker, J., and Queensland, N. (1985). A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron Lett.* 26, 1671-1672.
- 10) Quinn, R.J., and Tucker, D.J. (1991). Further acetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Nat. Prod.* 54, 290-294.
- 11) Bourguet-Kondracki, M.L., Rakotoarisoa, M.T., Martin, M.T., and Guyot, M. (1992). Bioactive bromopolyacetylenes from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron Lett.* 33, 225-226.
- 12) Pham, N.B., Butler, M.S., Hooper, J.N.A., Moni, R.W., and Quinn, R.J. (1999). Isolation of xestosterol esters of brominated acetylenic fatty acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Nat. Prod.* 62, 1439-1442.
- 13) Kudo, I., and Murakami, M. (2002). Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Others Lipid Mediators* 68-69, 3-58.
- 14) Keyzers, R.A., and Davies-Coleman, M.T. (2005). Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. *Chem. Soc. Rev.* 34, 335-365.
- 15) De Silva, E.D., and Scheuer, P.J. (1980). Manoalide, an antibiotic sesterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *Tetrahedron Lett.* 21, 1611-1614.
- 16) Lobo de Araujo, A., and Radvanyi, F. (1987). Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25, 1181-1188.
- 17) Schmitz, F.J., and Bloor, S.J. (1988). Xesto- and halenaquinone derivatives from a sponge, *Adocia* sp., from Truk lagoon. *J. Org. Chem.* 53, 3922-3925.

- 18) Alvi, K.A., Rodriguez, M.C.D., Moretti, R.S.W., Lee, R.H.; Slate, D.L., and Crews, P. (1993). Protein tyrosine kinase inhibitory properties of planar polycyclics obtained from the marine sponge *Xestospongia* cf. *carbonaria* and from total synthesis. *J. Org. Chem.* 58, 4871-4880.
- 19) Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., and Kakisawa, H. (1991). High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4092-4096.
- 20) Gouda, H., Sunazuka, T., Ui, H., Handa, M., Sakoh, Y., Iwai, Y., Hirono, S., and Omura, S. (2005). Stereostructure of luminamicin, an anaerobic antibiotic, via molecular dynamics, NMR spectroscopy, and the modified Mosher method. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 102, 18286-18291.
- 21) Kobayashi, J.I., Hirase, T., Shigemori, H., Ishibashi, M., Bae, M.A., Tsuji, T., and Sasaki, T. (1992). New Pentacyclic Compounds from the Okinawan Marine Sponge *Xestospongia sapra*. *J. Nat. Prod.* 55, 994-998.
- 22) Roll, D.M., Scheuer, P.J., Matsumoto, G.K., and Clardy, J. (1983). Halenaquinone, a pentacyclic polyketide from a marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6177-6178.
- 23) Fujiwara, H., Matsunaga, K., Saito, M., Hagiya, S., Furukawa, K.I., Nakamura, H., and Ohizumi, Y. (2001). Halenaquinone, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor from a marine sponge, induces apoptosis in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 413, 37-45.
- 24) Nakamura, M., Kakuda, T., Oba, Y., Ojika, M., and Nakamura, H. (2006). Synthesis of biotinylated xestoquinone that retains inhibitory activity against Ca²⁺ ATPase of skeletal muscle myosin. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 3077-3082.
- 25) Laurent, D., Jullian, V., Parenty, A., Knibiehler, M., Dorin, D., Schmitt, S., Lozach, O., Lebouvier, N., Frostin, M., Alby, F., Maurel, S., Doerig, C., Meijer, L., and Sauvrain, M. (2005). Antimalarial potential of xestoquinone, a protein kinase inhibitor from a Vanuatu marine sponge *Xestospongia* sp. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4477-4482.
- 26) Cao, S., Foster, C., Brisson, M., Lazo, J.S., and Kingston, D.G.I. (2005). Halenaquinone and xestiquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a *Xestospongia* sp. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 999-1003.
- 27) Nakamura, M., Kakuda, T., Qi, J., Hirata, M., Shintani, T., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Oba, Y., Nakamura, H., and Ojika, M. (2005). Novel relationship between antifungal activity and cytotoxicity of marine-derived metabolite xestoquinone and its family. *Biosci., Biotech., Biochem.* 69, 1749-1752.
- 28) Radvanyi, F., Jordan, L., Russo-Marie, F., and Bon, C. (1989). A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* 177, 103-109.
- 29) Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., and Wijffels, R.H. (2004). Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotechnol. Bioeng.* 90, 201-222.
- 30) Piel, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 21, 519-538.
- 31) Piel, J. (2006). Bacterial symbionts : prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.* 13, 39-50.
- 32) Richelle-Maurer, E., Gomez, R., Braekman, J.C., Van de Vyver, G., Van Soest, R.W., and Devijver, C. (2003). Primary cultures from the marine sponge *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida). *J. Biotechnol.* 100 (2), 169-176.
- 33) Montalvo, N.F., Mohamed, N.M., Enticknap, J.J., and Hill, R.T. (2005). Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 29-36.

Annexe

Données spectrales des composés Vi et Jm

Composé Vi :

RMN ^1H (400,13 MHz ; CD_3OD), δ ^1H en ppm (nH, m, J Hz) : 8,75 (1H, s, H-11) ; 7,98 (1H, s, H-18) ; 5,02 (1H, dd ; 3,9; 4, 1 ; H-16) ; 4,64 (2H, dd ; 1,8; 4,7 ; CH_2 -1) ; 4,06 (1H, m, H-3) ; 3,60 (1H, m, H-2) ; 2,86 (1H, m, H-14) ; 2,70 (1H, m, H-14') ; 2,42 (1H, m, H-15) ; 2,24 (1H, m, H-5) ; 2,14 (1H, m, H-15') ; 2,08 (1H, m, H-4) ; 1,93 (1H, m, H-4') ; 1,83 (1H, dd ; 3,7 ; 1,1 ; H-5') ; 1,60 (3H, s, CH_3 -20)

RMN ^{13}C (75,47 MHz ; CD_3OD), δ ^{13}C en ppm : 72,7 (C-1) ; 48,4 (C-2) ; 68,5 (C-3) ; 29,5 (C-4) ; 35,2 (C-5) ; 40,6 (C-6) ; 142,1 (C-7) ; 148,0 (C-8) ; 177,1 (C-9) ; 133,0 (C-10) ; 126,8 (C-11) ; 131,1 (C-12) ; 198,8 (C-13) ; 36,4 (C-14) ; 37,8 (C-15) ; 65,1 (C-16) ; 150,6 (C-17) ; 126,4 (C-18) ; 158,1 (C-19) ; 24,8 (C-20)

SM : $[\text{M}]^+$, $m/z = 340,1326$ pour $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$ (calculé 340,1311)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14$ (c = 0,1 ; MeOH)

n° H	HMBC (H→C)	n° H	HMBC (H→C)	n° H	HMBC (H→C)
1	2, 3, 7, 8	5	4	15	-
2	7, 8	5'	4, 7, 19	15'	13, 17
3	-	11	9, 13, 17, 19	16	12, 14, 17, 18
4	-	14	13	18	6, 9, 10, 12, 13
4'	-	14'	13	20	5, 6, 7, 19

Corrélations HMBC (CD_3OD ; 400,13 MHz ; 25°C) du composé Vi

Composé Jm :

RMN ^1H (400,13 MHz ; CDCl_3), δ ^1H en ppm (nH, m, J Hz) : 9,05 (1H, s, H-11) ; 8,40 (1H, s, H-18), 8,27 (1H, s, H-1) ; 6,95 (1H, s, NH) ; 4,16 (2H, m, CH_2 -21) ; 3,39 (2H, m, CH_2 -22) ; 3,00 (1H, dd ; 5,1 ; 5,5 ; H-4) ; 2,85 (1H, m, H-4') ; 2,84 (1H, m, H-5) ; 2,26 (1H, ddd ; 5,2 ; 4,9 ; 4,8 ; H-5') ; 1,67 (3H, s, CH_3 -20)

RMN ^{13}C (75,47 MHz ; CDCl_3), δ ^{13}C en ppm : 149,5 (C-1) ; 121,9 (C-2) ; 189,5 (C-3) ; 33,1 (C-5) ; 36,4 (C-4) ; 37,1 (C-6) ; 147,8 (C-7) ; 144,6 (C-8) ; 169,8 (C-9) ; 136,5 (C-10) ; 128,0 (C-11) ; 128,2 (C-12) ; 177,8 (C-13) ; non observé (C-14) ; 144,9 (C-15) ; 174,6 (C-16) ; 134,8 (C-17) ; 124,7 (C-18) ; 156,1 (C-19) ; 30,6 (C-20) ; 39,9 (C-21) ; 48,9 (C-22)

SM : $[\text{M}]^+$, $m/z = 437,0568$ pour $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{O}_7\text{NS}$ (calculé 437,0647)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10$ (c = 0,1 ; CH_2Cl_2)

n°	HMBC (H→C)	n°	HMBC (H→C)
1	7, 8	11	9, 13, 17, 19
4	3	18	6, 9, 10, 12, 16
4'	-	20	5, 7, 19
5	7	21	15, 22
5'	4, 6, 20	22	21
		NH	-

Corrélations HMBC (CDCl_3 ; 400,13 MHz ; 25°C) du composé Jm

Au cours d'un criblage pharmacologique réalisé dans le cadre du programme Coral Reef Initiative for the South Pacific (CRISP), l'extrait CH₂Cl₂ de l'éponge marine *Xestospongia testudinaria*, récoltée dans le Pacifique sud au large des îles Salomon, a révélé une activité potentiellement anti-inflammatoire en inhibant la phospholipase A₂ de venin d'abeille (*Apis mellifera*).

Le travail décrit dans ce manuscrit a consisté à rechercher, isoler et caractériser les molécules responsables de cette activité.

Grâce aux différentes méthodes de chromatographie (chromatographie d'absorption, CLHP), le fractionnement bio-guidé des extraits CH₂Cl₂ et CH₂Cl₂/MeOH a conduit à l'isolement de trois composés. L'analyse détaillée des données de spectrométries de masse et de RMN à une et deux dimensions a permis d'établir leurs structures.

Deux des composés isolés ont révélé une activité potentiellement anti-inflammatoire en inhibant la phospholipase A₂ de venin d'abeille. C'est la première fois qu'une telle activité est mise en évidence pour ces molécules. Des études complémentaires sont à envisager et sont discutées.

Chacun des trois composés ayant été isolé en faible quantité, une réflexion sur les études à réaliser pour augmenter les quantités des métabolites intéressants en vue d'une valorisation industrielle a été menée.

Enfin, une discussion sur l'utilité de la chimiodiversité dans d'autres domaines que la santé humaine est présentée.

Mots-clés : Spongiaires, *Xestospongia testudinaria*, phospholipase A₂, activité anti-inflammatoire.