

Juin 2008

CRISP



Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique

RAPPORT DE STAGE DE MASTER

Recherche de molécules anti-phospholipase A₂ à partir de l'éponge marine : *Rhopaloïdes odorabile*

Photo : Eric FOLCHER - IRD



Auteur : Betty Kientz

CRISP



Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique



La cellule de coordination du CRISP a été intégrée au Secrétariat de la Communauté du Pacifique en 2008 afin d'assurer une coordination et synergie maximales des actions touchant à la gestion des écosystèmes coralliens dans 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

LE PROGRAMME CRISP EST FINANCÉ PAR LES ORGANISATIONS SUIVANTES :





MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Laboratoire de Chimie et Biochimie des Substances Naturelles
UMR 5154 CNRS - MNHN.



MASTER 1^{ère} année BIOLOGIE-SANTE
Université MONTPELLIER II

Année universitaire 2007-2008



Recherche de Molécules Anti-Phospholipase A₂ à partir de l'Eponge Marine : *Rhopaloïdes odorabile.*

Betty KIENTZ

Maître de stage : D^r Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI

Programme : 'Biodiversité et substances marines actives du Pacifique Sud'
Volet 'Molécules actives' du **Coral Reef Initiative for the South Pacific, CRISP.**



RESUME

Le programme 2006-2009 financé par l'Agence Française pour le Développement (AFD) intitulé 'Biodiversité et substances marines actives du Pacifique Sud' du Coral Reef Initiative for the South Pacific (CRISP) a permis la récolte de nombreux organismes marins au large de l'océan Pacifique Sud. Dans le cadre du volet 'Molécules actives' de ce programme, les organismes collectés ont été criblés pour diverses activités biologiques. L'éponge marine *Rhopaloïdes odorabile*, récoltée près des Îles Salomon a ainsi été sélectionnée pour une activité anti-phospholipase A₂ significative.

Les études menées par méthodes chromatographiques et spectroscopiques ont permis l'isolement et la caractérisation de trois molécules actives de type alcaloïde, inédites chez cette éponge. L'une d'elles a été identifiée comme étant le 6-bromo-1H-indole-3-carbaldéhyde, les autres molécules possèdent un noyau 1H-indole. Les tests biologiques anti-phospholipase A₂ ont permis de procéder à leurs isollements bioguidés.

1000/1000

INTRODUCTION

La nature est une source infinie de molécules dotées d'activités biologiques pouvant être valorisées, en particulier, en santé humaine. La découverte de nouveaux médicaments implique l'isolement de molécules bioactives aux structures inconnues. Le milieu marin, encore faiblement exploité, représente un terrain de recherche idéal. Parmi les organismes vivant dans ce milieu, les éponges appartiennent à un phylum très étudié. En effet, elles ont déjà permis l'isolement de milliers de molécules originales possédant diverses activités biologiques.

L'activité anti-inflammatoire, retrouvée dans ces organismes, est due principalement à l'inactivation de la phospholipase A₂ (PLA₂), première enzyme intervenant dans la cascade arachidonique (*TAB.1 Schéma*). D'autres activités anti-inflammatoires résultent de l'inhibition des superoxydes impliqués dans la biosynthèse des prostaglandines, ou de celle de l'élastase qui induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires. L'excès d'une de ces enzymes peut entraîner des physiopathologies inflammatoires (asthme, arthrite, emphysème pulmonaire...).

Selon l'article de Robert A. Keyers *et al.* 'Anti-inflammatory metabolites from marine sponges',¹ les molécules anti-inflammatoires appartiennent à différentes classes chimiques. Les **terpènes** sont les plus abondants (squelette dérivé de l'isoprène en (C₅H₈)_n). Ils représentent de nombreux métabolites secondaires des éponges. Des **stéroïdes**, des **composés azotés** (alcaloïdes, indoles, peptides...) et d'autres **substances** (pouvant contenir du phosphore) sont également répertoriés. Parmi les terpènes, les sesterterpènes (C₂₅H₄₀) sont majoritaires pour ces activités anti-inflammatoires. Le manoalide est un sesterterpène connu (CI₅₀ = 0,1 µM) extrait de l'éponge *Luffariella variabilis* qui sert de témoin positif lors des tests anti-PLA₂. Les xestobergsterols isolés de *Xestospongia bergquisti* (CI₅₀ = 0,05 µM) font partie des stéroïdes d'intérêt. Quatre classes d'alcaloïdes anti-inflammatoires ont également été décrites dont la bromotopsentine (CI₅₀ = 6 µM) isolée de *Topsentia genitrix* (*FIG.1a*). Toutes les molécules déjà isolées de *Rhopaloïdes odorabile* sont des terpènes. L'ilimaquinone est un sesquiterpène (C₁₅H₂₄) possédant des activités anti-PLA₂, herbicide et anti-cancéreuse. Certains diterpènes furanodiols (diterpène : C₂₀H₃₂) isolés sont dotés d'un squelette original en C₂₁. Parmi les sesterterpènes, les acides rhopaloïques présentent une activité cytotoxique (*FIG.1b*).

Les études réalisées dans le cadre de ce stage ont consisté à rechercher les molécules présentant une activité anti-PLA₂ à partir d'extrait brut actif de l'éponge *Rhopaloïdes odorabile*. Les méthodes d'extraction, d'isolement et de purification par chromatographie ont constitué la grande partie d'apprentissage de ce stage. L'élucidation structurale des molécules actives a été réalisée par méthodes spectroscopiques : Masse, RMN 1D, 2D et UV. Les tests biologiques anti-PLA₂ sont des tests colorimétriques enzymatiques ; ils ont permis d'identifier les molécules actives par extraction bioguidée.

3200/3200

¹ R. A. Keyers and M. T. Davis-Coleman. *Anti-inflammatory metabolites from marine sponges*. *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 355-65.

MATERIELS & METHODES

L'éponge *Rhopaloïdes odorabile*² récoltée aux Îles Salomon a été identifiée par le P^r J. Hooper. L'échantillon lyophilisé a subi des extractions successives au CH₂Cl₂ puis au mélange CH₂Cl₂/MeOH 1/1. Le fractionnement a été réalisé sur colonne SiO₂ éluée par différents mélanges de solvants et la purification effectuée par CLHP³ (Waters). Les structures ont été identifiées par spectroscopie: Masse ESI QqTOF, RMN 1D, 2D (COSY, HSQC et HMBC). Le test anti-PLA₂⁴ est un test colorimétrique (λDO= 558 nm). Le rouge de phénol, indicateur coloré, permet de suivre l'hydrolyse du substrat par l'enzyme PLA₂ de venin d'abeille *Apis mellifera*.

1200/1200

RESULTATS

Le fractionnement sur colonne SiO₂ de l'extrait dichlorométhane E1 a fourni deux fractions actives (FIG.2a). La fraction E1(3) CH₂Cl₂/acétone 8/2 (82% anti-PLA₂) a montré sur plaque chromatographique en couche mince la présence de trois produits majoritaires : A, B et C. Leur purification a été réalisée par CLHP sur colonne C18 semi-préparative puis analytique (FIG.2b).

La **molécule A**, isolée sous forme de cristaux jaunes, présente dans son spectre de masse (ESI) basse résolution des pics isotopiques à m/z 223,9713 et 225,9686 caractéristiques d'un composé mono-bromé. Ce dédoublement du pic de masse est dû aux signaux des deux isotopes du brome ⁷⁹Br et ⁸⁰Br (FIG.3a). L'ion moléculaire [M+H]⁺ à m/z 223,9781 obtenu en haute résolution correspond à la formule brute C₉H₇ONBr (m/z observée 223,9781 ; m/z calculée 223,9711) et possède 7 insaturations. Le spectre de RMN¹H a révélé cinq signaux dont un pic singulet à δ 9,9 (H8) caractéristique d'un proton aldéhydique et quatre signaux intégrant pour quatre protons aromatiques entre δ 7,2 et 8,1 (H2, H4, H5, H7) (FIG.3b). Les valeurs de leurs constantes de couplage ont suggéré la présence d'un noyau aromatique trisubstitué. Les analyses en RMN 2D ont permis d'élucider la structure de la molécule. Le spectre HSQC (relation proton-carbone associé) a confirmé la présence du groupement aldéhyde par la corrélation du carbone C8 (δ 187,5) avec le proton déblindé H8 à δ 9,9 (FIG.3c). Les spectres COSY et HMBC ont précisé la structure de la molécule A, identifiée comme étant le **6-bromo-1H-indole-3-carbaldéhyde**, alcaloïde précédemment isolé du corail *Dendrophyllia sp.* Les tests enzymatiques ont révélé une activité de 80 % d'inhibition de la PLA₂ à 400 µg/ml (TAB.1). La **molécule B**, isolée sous forme de paillettes jaunes, correspond à la formule brute C₁₁H₉NO₃ d'après l'ion moléculaire [M+H]⁺ à m/z 204. La **molécule C** de couleur blanche, a pour formule brute C₉H₅NO d'après l'ion [M+H]⁺ à m/z 144. Leurs spectres de RMN¹H sont semblables et révèlent la présence de cinq signaux de δ 8,73 à 7,26 intégrant pour cinq protons aromatiques. Elles possèdent donc le même noyau **1H-indole** (FIG.2c). Leurs élucidations structurales se poursuivent grâce aux analyses en RMN 2D. Les tests enzymatiques anti-PLA₂ ont révélé une activité de 84 % d'inhibition de la PLA₂ pour B et C (400 µg/ml). Cette activité anti-phospholipase A₂ a chuté rapidement lors de la diminution des quantités, et donc des concentrations, de produit testé (TAB.1).

2501/2500

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Trois alcaloïdes inédits chez *Rhopaloïdes odorabile* ont été isolés dont le **6-bromo-1H-indole-3-carbaldéhyde** et deux autres présentant un noyau **1H-indole**. Leurs activités anti-PLA₂ sont d'environ 80%. Des squelettes indoliques⁵ ont, précédemment, déjà révélé cette activité.

502/500

² Première identification effectuée par Thompson et al, 1987 : *Demospongiae, Dictyoceratida, Spongiidae, Rhopaloïdes, odorabile*. S. de Cook and P. R. Bergquist. *Family Spongiidae Gray, 1987. Systema Porifera : A guide to the classification of Sponges*. 1071-72. Edited by J. Hooper and Rob Van Soest. © Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2002.

³ Chromatographie Liquide Haute Performance.

⁴ A.L. Lobo De Araújo and F. Radvanyi. *Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. Toxicon*. 1987, 26, 1181-87.

⁵ R.W. Schevitz, N.J. Bach, D.G. Carlson, N. Chirgadze, D.K. Clawson. *Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory*

ANNEXES

FIGURE 1 : Exemples de molécules bioactives isolées d'éponges marines.

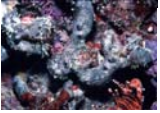


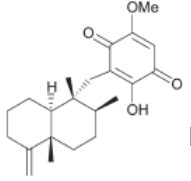
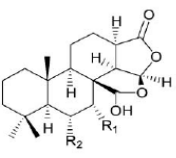

a) Molécules possédant une activité anti-inflammatoire.		
TERPENE (sesterterpène)  <i>Luffariella variabilis</i> Manoalide 6	STEROÏDE  <i>Xestospongia bergquisti</i> Xestobergstérol 7 $R_1 = H, R_2 = OH$	ALCALOÏDE  <i>Topsentia genitrix</i> Bromotopsentine 8 $R = Br$
b) Terpènes isolés précédemment de l'éponge Rhopaloïdes odorabile.		
Sesquiterpène  Ilimaquinone 9 ➤ Anti-phospholipase A ₂ , cytotoxique, herbicide	Diterpène  Diterpène Furanodiol 10 $R_1 = OH, R_2 = OCOPr$ ➤ Anti-phospholipase A ₂	Sesterterpène  Acide rhopaloïque A 11 ➤ Cytotoxique

TABLE 1 : Résultats des tests biologiques anti-phospholipase A₂ des molécules A, B et C isolées de l'éponge Rhopaloïdes odorabile.

Principe du test colorimétrique enzymatique anti-PLA₂ :

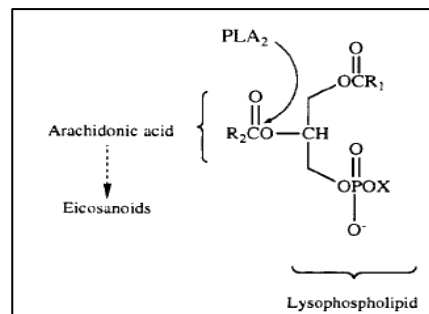
La solution de substrat contient de la lécithine d'œuf 3,5 mM, du Triton X100 7 mM, du NaCl 100 mM, du CaCl₂ 10 mM et du rouge de phénol 0,055 mM (indicateur coloré, pH basique : rouge / pH acide : jaune). Elle est ajustée à pH 7,6 avec du NaOH 50 mM pour obtenir une DO entre 1,8 et 2. L'enzyme, la phospholipase A₂, provient du venin d'abeille *Apis mellifera* à 0,01 mg/mL. Celle-ci est incubée 1 heure avec le produit à tester dans une plaque de 96 puits. Le substrat est ensuite ajouté et la DO est lue immédiatement (t=0) puis à 5 minutes (t=5') à 558 nm. Les témoins correspondent au substrat ajouté à l'enzyme. L'expérience est faite en triplicate.

Résultats d'activité : % d'inhibition = $(1 - \Delta DOP / \Delta DOT) \times 100$.

ΔDOP , différence de Densité Optique du produit entre t=0 et t=5' : $DOP_{(t=0)} - DOP_{(t=5')}$.

ΔDOT , moyenne de trois témoins : $(DOT_{(t=0)} - DOT_{(t=5')})$.

Schéma de l'hydrolyse d'un phospholipide en position sn-2 par la PLA₂



Molécules isolées dans la fraction E1(3) chez <i>Rhopaloïdes odorabile</i>	ACTIVITE : % d'inhibition de la Phospholipase A ₂			
	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
Molécule A 6-bromo-1 H indole 3 carbaldéhyde	80 %	10 %	4 %	2 %
Molécule B	84 %	22 %	19 %	0 %
Molécule C	84 %	19 %	11 %	0 %

⁶ phospholipase A₂. *Nat. struct. biol.* 1995, 2, 458-65.

⁷ E.D Silva and P.J Scheuer. *Manoalide, an anti-inflammatory analgesic marine natural product*. *Tetrahedron Lett.* 1980, 21, 1611.

⁸ N. Shoji, A. Umeyama, K. Shin, K. Takeda, S. Arihara. *Two unique pentacyclic steroids with Cis C/D ring junction from Xestospongia bergquisti fromont, powerful inhibitors of histamine release*. *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2996.

⁹ S. Tsujii and K. L. Rinehart. *Topsentin, Bromotopsentin, and Dihydrodeoxybromotopsentin : antiviral and antitumor bis(indolyl)imidazoles from Caribbean deep-sea sponges of the family Halichondriidae. Structural and synthetic studies*. *J. Org. Chem.* 1988, 53, 5446.

¹⁰ C. A. Motti, M-L. Bourguet-Kondracki, A. Longeon, J.R. Doyle, L.E. Llewellyn, D.M. Tapiolas, P. Yin. *Comparison of the biological properties of several marine sponge-derived sesquiterpenoid quinone*. *Molecules*. 2007, 12, 1376-88.

¹¹ R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Wells, K. Noack, W. E. Oberhänsli, P. Shönholzer. *A new series of diterpenes from Australian sponge species*. *Aust. J. Chem.* 1979, 32, 867- 80.

¹² S. Ohta, M. Uno, M. Yoshimura, Y. Hiraga, S. Ikegami. *Rhopaloic acid A : a novel norsesquiterpene from a marine sponge, Rhopaloecides sp., which inhibits gastrulation of starfish embryos*. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 13, 2265-66.

FIGURE 2 : Schéma des fractionnements bioguidés et profils chromatographiques des molécules A, B et C provenant de l'éponge *Rhopaloïdes odorabile*.

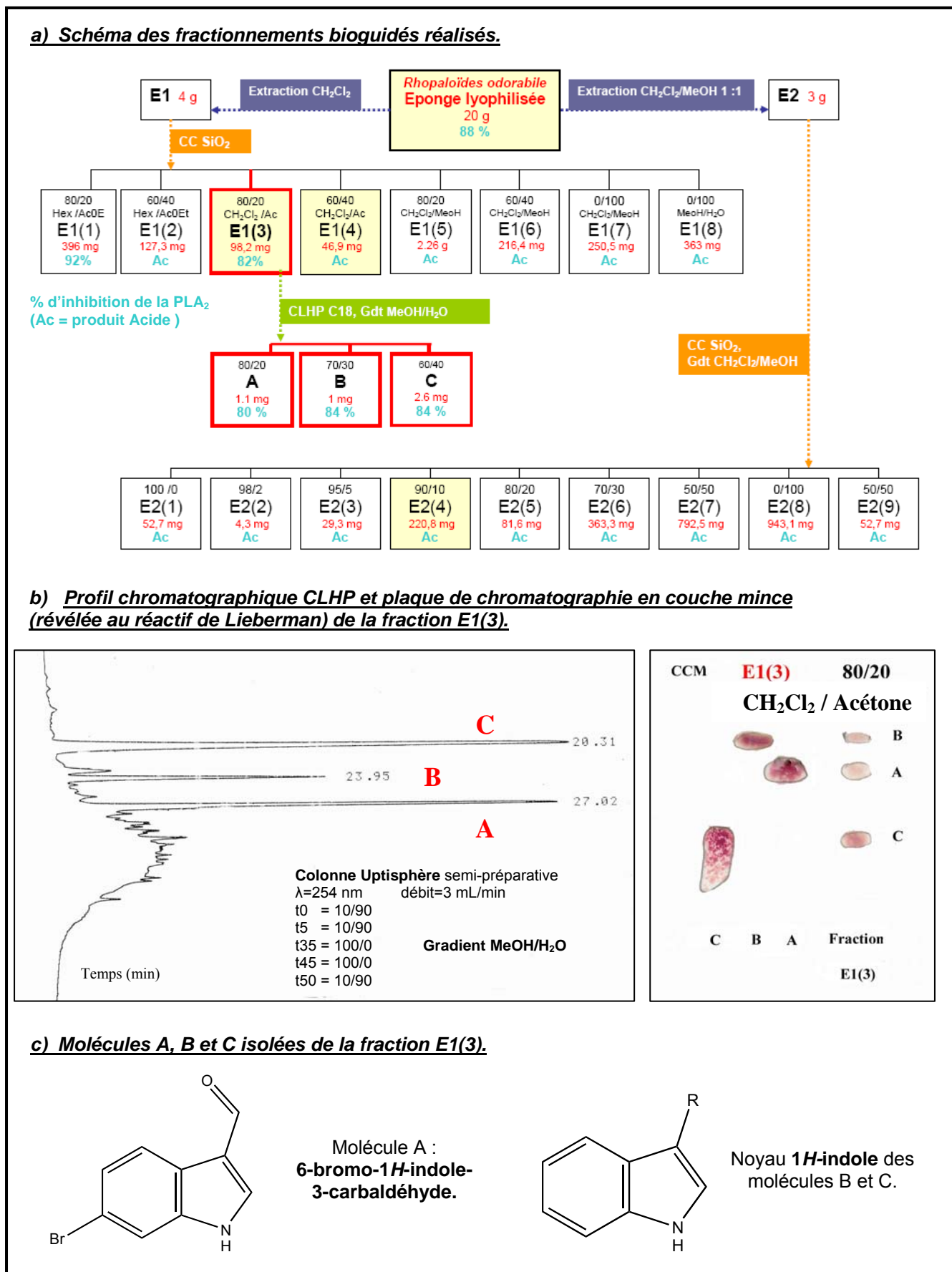
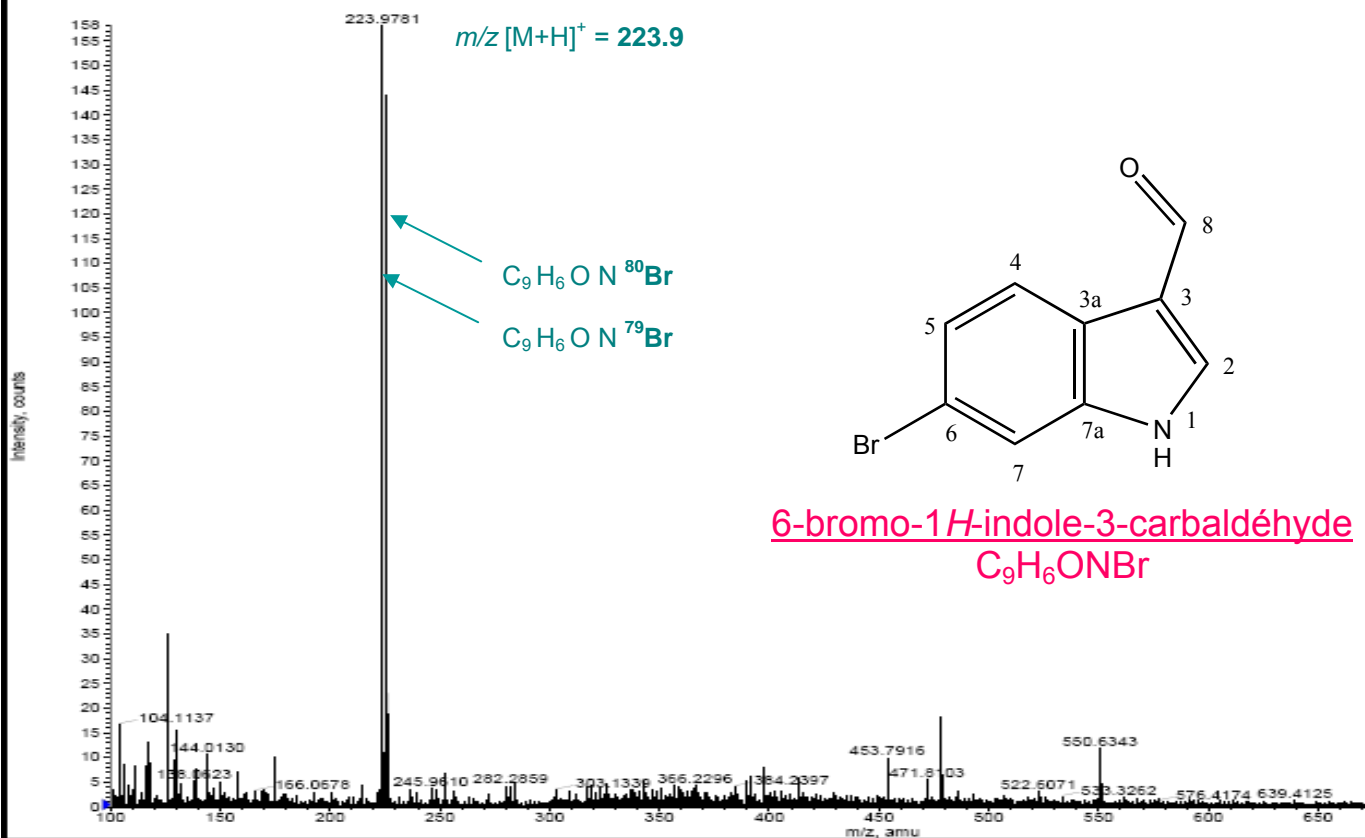
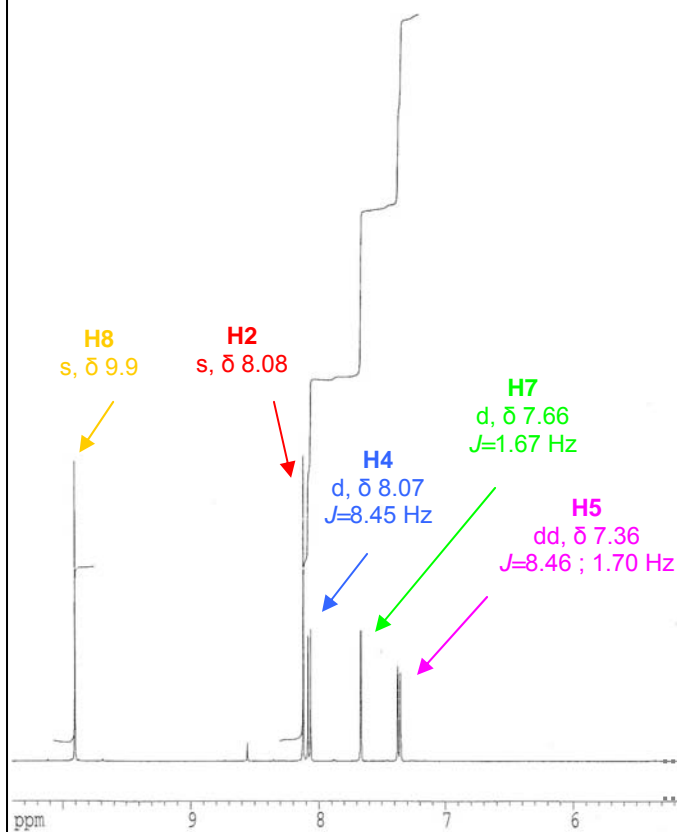


FIGURE 3: Spectres de masse, de RMN ¹H, corrélations COSY et HMBC de la molécule A.

a) Spectre de masse ESI QqTOF (ionisation electrospray ES et analyseur à temps de vol QqTOF).



b) Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz, 25°C).



c) Corrélations COSY et HMBC (CD₃OD, 400 MHz, 25°C).

