

COMPOSANTE 2C - Projet 2C4
Bioprospection et Substances actives marines
Formation d'étudiants du Pacifique

Avril 2010



THÈSE DE DOCTORAT

Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud

Photo : Gregory LASNE



Auteur : Kirti Patel

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 lagonaires 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

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Chimie

Présentée et soutenue publiquement par

Kirti PATEL

Le 20 Avril 2010

**Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du
Pacifique Sud.**

Sous la direction de : **Monsieur Bernard BODO, Professeur**

Sous la co-direction de : **Monsieur Ali AL-MOURABIT, Directeur de Recherche**

JURY :

| | | |
|--------------------------|---|-----------------------|
| Mme. Catherine LAVAUD | Professeur, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (051) | Rapporteur/Président |
| M. Bernard BANAIGS | Chargé de Recherche-HDR, Université de Perpignan via Domitia (066) | Rapporteur |
| Mme Cécile DEBITUS | Chargée de Recherche-HDR, Institut de Recherche pour le Développement, Tahiti | Examineur |
| Mme Marie-Thérèse Martin | Ingénieur de Recherche-ICSN du CNRS, Gif-sur-Yvette, (091) | Invitée |
| M. Bernard BODO | Professeur, Muséum national d'histoire naturelle, Paris (075) | Directeur de Thèse |
| M. Ali AL-MOURABIT | Directeur de Recherche, ICSN du CNRS, Gif-sur-Yvette, (091) | Co-directeur de Thèse |

La vérité vaut bien qu'on passe quelques années sans la trouver

Jules RENARD



Remerciements

Je remercie les directeurs de l'ICSN Jean-Yves LALLEMAND et David CRICH de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de très bonnes conditions. Je remercie Monsieur le professeur Bernard BODO, directeur du Laboratoire de Chimie du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris d'avoir accepté d'être directeur de cette thèse. Je remercie mon co-directeur de thèse qui m'a accueilli dans son équipe, Monsieur Ali AL-MOURABIT, de L'institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique (ICSN/CNRS) de Gif-sur-Yvette pour leur soutien tout au long de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de lire et de juger mon travail, Madame la professeur Catherine LAVAUD de l'institut de Chimie Moléculaire de Reims et Monsieur Bernard BANAIGS du Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement de Perpignan, Madame Cécile DEBITUS de L'institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Tahiti et Madame Marie-Thérèse MARTIN de l'Institut de Chimie de Substances Naturelles du CNRS.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Ali AL-MOURABIT (ICSN/CNRS) qui m'a accueillie dans son équipe et encadrée au cours de ces années. Sa confiance m'ont permis de réaliser ce travail de recherche et d'enrichir mes compétences chimiques.

J'adresse ma reconnaissance à Cécile DEBITUS qui a co-ordonné le projet CRISP et qui m'a permis de réaliser cette thèse ainsi que pour son implication constante dans mes recherches.

J'adresse ma reconnaissance la plus sincère à l'Ambassade de France à Suva (Fidji) pour avoir financé ma première année de thèse ; à l'Institut de Recherche pour le Développement pour avoir financé la deuxième année ; et aussi au Centre National de la Recherche Scientifique pour le financement de la dernière année de ce travail.

Je remercie Madame Marie-Thérèse MARTIN et Jean-François GALLARD qui m'ont enseigné la technique de RMN et pour la réalisation des spectres de RMN. Et merci particulièrement à Madame Marie-Thérèse MARTIN pour son aide et pour sa collaboration déterminante dans la partie structurale de mon travail.

Je remercie Madame Odile THOISON pour son enseignement quotidien sans oublier Nathalie, Franck, Nouzha, Estelle et Suzanne pour leur aide. Merci à l'ensemble des membres du service de spectrométrie de masse.

Je remercie Thierry CRESREIL, Geneviève AUBERT, Laurent MEIJER, Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI et Arlette LONGEON pour avoir réalisé les tests biologiques sur mes produits.

J'adresse ma reconnaissance à Cécile DEBITUS et Sylvain PETEK de l'institut de Recherche pour le Développement de Tahiti et Nouméa pour m'avoir fourni les trois éponges dans le cadre du projet 'Coral Reef Initiatives for the South Pacific' (CRISP).

Merci à Anne ZAPARUCHA et Ludmilla ERMOLENKO et à tous les étudiants du laboratoire avec qui j'ai partagé tant de choses : Marion, Adilson, Jérôme, Céline R., Céline M., Carine, Karine, Sylvain, Elan, Supriya, Pierre, Remi, Nawel, Hua, Jonathan, Julie, Clarisse, Pauline, Sébastien.... et merci aussi à Guillaume L., Nicolas, Olivier, Olga et Gabriel.

Merci à Aude pour m'avoir accueillie chez elle - où j'ai rencontré Nicolas et Damjana - et pour avoir été ma première guide de la culture française. Merci à Christiane et Jean-Pierre d'Apprendre Le Français Avec Plaisir (ALFAP) de Bures-sur-Yvette et à l'ICSN qui m'a financé des cours à l'Alliance Française de Paris qui m'a permis d'apprendre la langue française.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Marion GABANT, Susanne RAMOS, Pierre SAULEAU, Jérôme APPENZELLER, Supriya TILVI, Céline MORIOU-CHESNE, Remi LAVILLE, Jean-Théophile et Patrick, pour votre affection, vos encouragements, et vos blagounettes.

My sincere gratitude and heartfelt thanks to my parents and brother for giving me the opportunity to continue my education and encouraging me all along this thesis. Many thanks to Professor Subramaniam SOTHEESWARAN and Associate Professor Sadaquat ALI for encouraging me in my pursuit for a thesis.

Enfin mes remerciements vont vers Hadrien qui a été toujours avec moi malgré les distances. Merci beaucoup pour ta patience et mbi yé mo.

'Vinaka Vakalevu' à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont participé à rendre mon séjour en France aussi merveilleux.

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE..... | 1 |
| Chapitre 1 : La biodiversité du milieu marin, les éponges..... | 7 |
| I. La biodiversité du milieu marin | 7 |
| II. Les éponges marines | 8 |
| II.1. Généralités | 8 |
| II.2. Biologie des éponges | 8 |
| II.3. Une riche source de métabolites..... | 11 |
| III. Activités biologiques des métabolites : vers de nouveaux médicaments..... | 12 |
| III.1. Les métabolites des éponges marines et leur intérêt thérapeutique potentiel..... | 14 |
| IV. Conclusion..... | 17 |
| Chapitre 2 : Étude chimique de l'éponge <i>Petrosia (Petrosia) crassa</i>, Carter (1876)..... | 19 |
| I. Données bibliographiques..... | 19 |
| I.1. Étude chimique de l'éponge <i>Petrosia (Petrosia) crassa</i> | 19 |
| II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce <i>Petrosia (Petrosia) cf.crassa</i> | 24 |
| II.1. Extraction, fractionnement et purification | 24 |
| II.2. Élucidation structurale des composés isolés | 27 |
| III. Conclusion et discussion | 29 |
| Chapitre 3 : Étude chimique de l'éponge <i>Amorphinopsis excavans</i>, Carter (1887)..... | 31 |
| I. Étude bibliographique..... | 31 |
| I.1. Travaux antérieurs sur le genre <i>Amorphinopsis</i> | 32 |
| II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce <i>Amorphinopsis excavans</i> | 33 |
| II.1. Extraction, fractionnement et purification | 34 |
| II.2. Élucidations structurales des composés isolés | 36 |
| III. Conclusion et discussion | 69 |
| Chapitre 4 : Étude chimique de l'éponge <i>Stylissa carteri</i>, Dendy (1889) | 71 |
| I. Rappels bibliographique | 71 |
| I.1. L'arbre phylogénétique de l'éponge <i>Stylissa carteri</i> | 71 |
| I.2. Études précédentes de l'espèce <i>Stylissa carteri</i> | 72 |
| II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce <i>Stylissa carteri</i> | 77 |
| II.1. Extraction, fractionnement et purification | 78 |
| II.2. Élucidations structurales des composés isolés | 79 |
| III. Conclusion et discussion | 118 |
| Chapitre 5 : Hypothèses de biogénèse..... | 119 |
| I. La proline et la guanidine comme précurseurs des P-2-AIs | 119 |
| II. Hypothèse de biogénèse des P-2-AIs dimères simples (liaison C-C) | 120 |
| II.1. Biogénèse du stylissazole F (116) et du stylissazole G (120)..... | 121 |
| II.2. Biogénèse du stylissazole I (113)..... | 122 |
| III. Hypothèse de biogénèse des P-2-AIs dimères simples (liaison N-C)..... | 122 |
| III.1. Hypothèse de biogénèse du stylissazole A (106) et du stylissazole D (107) | 123 |
| III.2. Hypothèse de biogénèse du stylissazole B (112)..... | 124 |
| III.3. Hypothèse de biogénèse du stylissazole C (117) et du stylissazole E (108)..... | 125 |
| IV. Conclusion..... | 125 |
| Chapitre 6 : Résultats des évaluations biologiques | 127 |
| I. Résultats de l'évaluation de le tests de cytotoxicité..... | 131 |

| | |
|---|------------|
| II. Résultats de l'évaluation de le tests d'inhibition des kinases | 131 |
| II.1. Résultats | 133 |
| III. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-microbienne | 136 |
| IV. Conclusion..... | 138 |
| Conclusion générale..... | 139 |
| Partie expérimentale..... | 138 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 145 |
| Bibliographie. | 187 |
| Annexe 1 : ACD déplacement chimiques $\delta_{C(cal)}$ et leur comparaison a nos valeurs $\delta_{C(obs.)}$ | 205 |
| Annexe 2 : Résultats des tests d'inhibition des kinases | 206 |
| Annexe 3 : Les courbes des IC_{50}..... | 207 |
| Annexe 4 : Résultats de l'activité anti-bactériennes..... | 210 |
| Annex 5 : Spectres RMN des composés isolés | 211 |

Abréviations

| | |
|--------------------------------------|--|
| $[\alpha]_D$ | Pouvoir rotatoire |
| Ac | Acétyle |
| AMM | Autorisation de Mise sur le Marché |
| CCE | Chromatographie sur couche épaisse |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| CI ₅₀ ou DI ₅₀ | Concentration (ou dose) requise pour obtenir 50% d'inhibition |
| CLHP / CLHP-SM | Chromatographie liquide à haute performance / chromatographie liquide haute performance couplée à la masse |
| DMF | <i>N-N'</i> -diméthylformamide |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| Gal | Galactose |
| Glu | Glucose |
| Hept | Heptane |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IR | Infrarouge |
| <i>J</i> | Constante de couplage |
| MS/MS | MS ⁿ en piège quadripolaire |
| NAGlu | N-Acétylglucosamine |
| NAGal | N-acétyl galactosamine |
| nOe | Nuclear Overhauser effect |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| P-2-AI | Pyrrole-2-AminoImidazole |
| RMN (1D, 2D) | Résonance Magnétique Nucléaire (une dimension, deux dimensions) |
| ROESY | Rotative Overhauser Effect Spectroscopy |
| ESI ⁺ , ESI ⁻ | Ionisation <i>electrospray</i> (mode positif, mode négatif) |
| SM (IE) | Spectre de masse (ionisation électronique) |
| SM (MALDI ^{+/−}) | Spectre de masse (ionisation MALDI mode positif, mode négatif) |
| SMHR | Spectre de masse haute résolution |
| TA | Température ambiante |
| <i>t</i> Bu | <i>tert</i> -butyle |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| UV | Ultra Violet |
| Xyl | Xylose |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les produits naturels souvent confondus avec les métabolites secondaires sont dérivés de sources naturelles comme les plantes, les animaux ou les micro-organismes. Historiquement, les produits naturels et leurs dérivés synthétiques ont souvent été étudiés pour leurs activités biologiques. C'est pour cette raison qu'ils ont permis d'importantes avancées pharmaceutiques en fournissant notamment des agents thérapeutiques.¹

Les produits naturels ont évolué pendant des millions d'années pour acquérir des effets biologiques très ciblés, ce qui les rend très intéressants pour la découverte de nouveaux médicaments. Beaucoup de produits naturels et d'analogues synthétiques ont été développés avec succès pour traiter des maladies humaines dans presque tous les domaines de la santé.¹ Soixante-trois pour cent des 1000 molécules environ qui ont été mises sur le marché ces 25 dernières années sont au moins conceptuellement dérivées ou inspirées de produits naturels (figure 1).² Néanmoins, ces dix dernières années, les entreprises pharmaceutiques ont sensiblement réduit leurs financements de projets dédiés à la découverte de produits naturels.³ Les principales causes de ce désengagement sont : les difficultés d'accès et d'approvisionnement en sources de produits naturels, la complexité chimique des produits naturels et les problèmes de droits de propriété intellectuelle trans-frontaliers.⁴ Une autre raison est l'incapacité pour la plupart des programmes de recherches de produits naturels de fournir suffisamment de molécules nouvelles pour le criblage à haut débit (HTS ou High Throughput Screening).⁵

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.

² Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589-2599.

³ Von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5129.

⁴ Harvey, A. L. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894-901.

⁵ Baker, D. D.; Chu, M.; Oza, U.; Rajgarhia, V. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1225-1244.

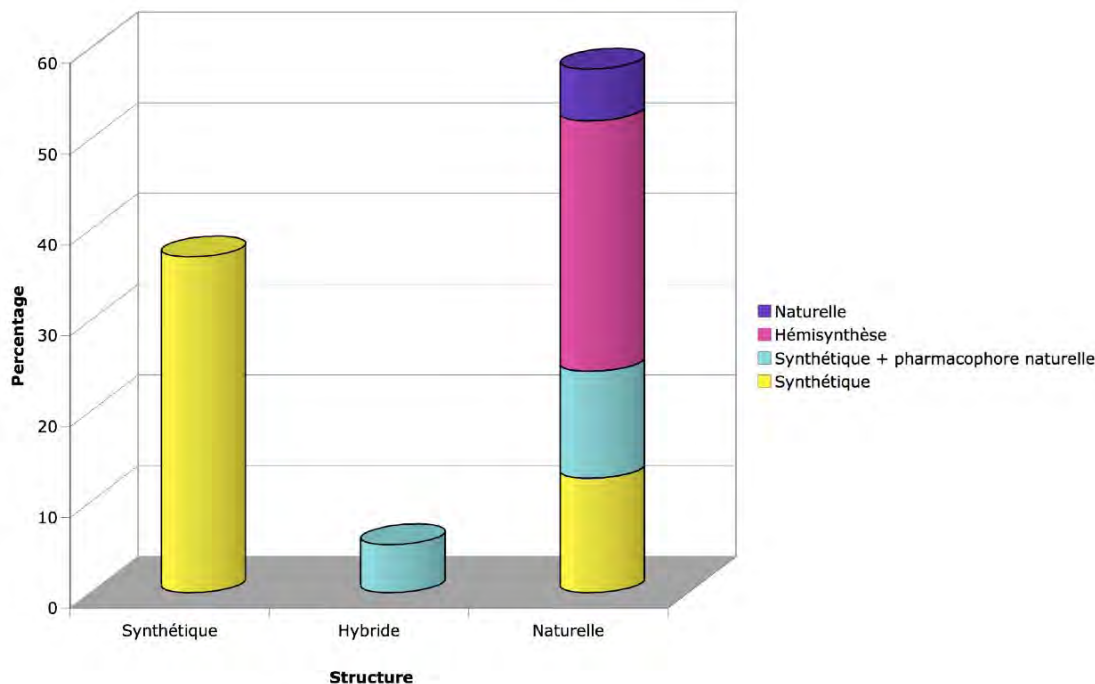


Figure 1 : Sources des principes actifs mis sur le marché pendant la période 1981-2006, inspirés de produits naturels (63%) ou d'origine purement synthétique (37%).

En dépit du déclin de l'utilisation des produits naturels dans la pharmacopée, plus de 100 composés qui en sont dérivés subissent actuellement des tests cliniques.⁴

Les produits naturels ont inspiré beaucoup de développements en chimie organique, menant notamment aux avancées dans les méthodologies de synthèses et à la possibilité de faire des analogues ayant des propriétés pharmacologiques ou pharmaceutiques améliorées.^{2, 6, 7}

Dans l'industrie pharmaceutique, la recherche de produits naturels originaux suit globalement le même processus. Par contre, la diversité des taxons examinés ainsi que la variété de leurs origines géographiques ont augmenté. Toujours à la recherche de l'originalité, on a en particulier porté plus d'intérêt aux matériaux provenant d'environnements naturels nouveaux comme les océans, ou d'écosystèmes extrêmes comme les régions polaires.

Les premières découvertes de produits naturels issus de la mer peuvent être attribuées à Bergmann^{8,9} qui a isolé et identifié la spongouridine (**1**) et la spongothymidine (**2**) de l'éponge

⁶ Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8329-8351.

⁷ Sunazuka, T.; Hirose, T.; Omura, S. *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41*, 302-314.

des Caraïbes *Cryptotethia crypta*. Cette découverte a abouti à la commercialisation de leurs analogues synthétiques : l'antiviral ara-A (3) et l'anticancéreux ara-C (4) (figure 2).

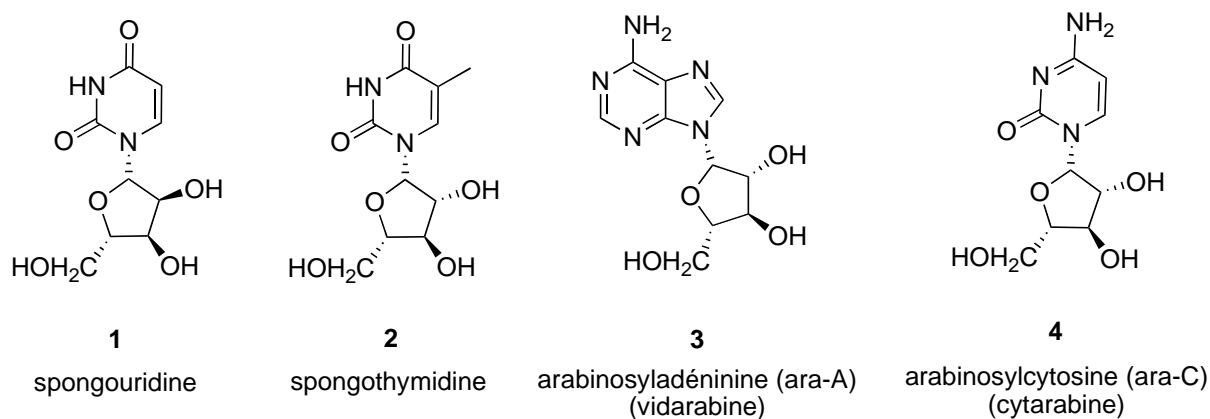


Figure 2 : Premières molécules naturelles marines importantes et leurs dérivés synthétiques

Grâce aux progrès technologiques de la plongée sous marine, beaucoup de nouveaux composés d'origine marine ont été isolés. La figure 3 montre l'explosion de la recherche de produits naturels marins ces dernières années avec la proportion de composés azotés par rapport au nombre total de métabolites marins découverts.¹⁰

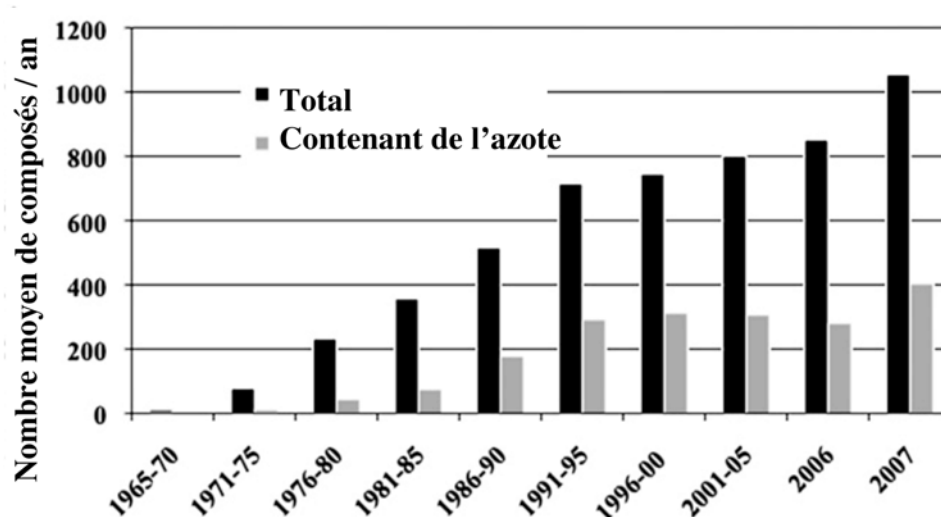


Figure 3 : Nombre de produits naturels d'origine marine pour la période 1965 à 2007

La figure 4 montre la répartition des composés isolés en fonction des organismes.¹⁰

⁸ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2809-2810.

⁹ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.

¹⁰ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244.

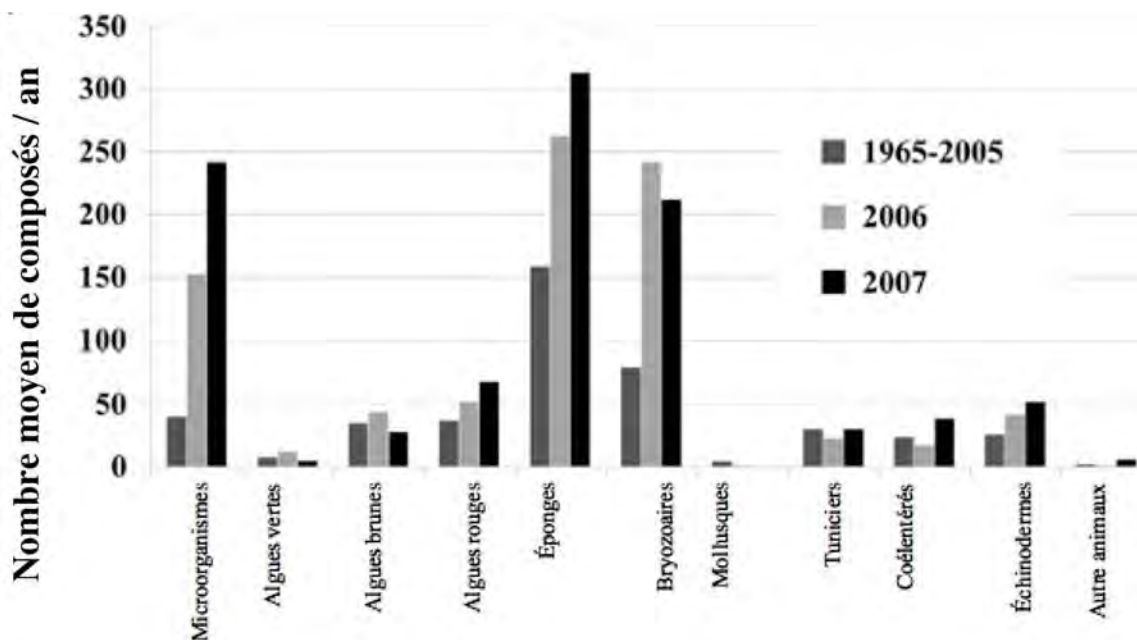


Figure 4 : Distributions des produits naturels marins par phylums

Parmi les organismes marins producteurs de métabolites, le phylum des Spongiaires (éponges) fournit plus du tiers des molécules nouvelles isolées. Comme phylum, les éponges sont une cible de recherche incroyablement attrayante en raison de leur biodiversité élevée et de leur ubiquité. En effet, on estime qu'il y a plus de 5000 espèces d'éponges et cela est une évaluation approximative. Les éponges sont connues pour être des hôtes de micro-organismes symbiontes. Les éponges leur fournissent régulièrement des aliments dans leurs choanocytes en filtrant l'eau de leur environnement. Elles pompent un litre d'eau par cm^3 de tissu par heure. Les éponges vivent fixées sur un substrat, elles ne peuvent donc fuir pour éviter les prédateurs. C'est pourquoi, elles ont dû mettre en place différentes stratégies chimiques de défense. Les métabolites ont des activités biologiques qui peuvent être utiles pour la recherche de médicaments originaux pour le traitement de maladies humaines.

Mon projet de thèse consacré à l'étude de trois éponges marines du Pacifique fait partie du programme CRISP (Coral Reef Initiatives for the South Pacific) / IRD (Institut de Recherche pour le Développement).

Le programme CRISP, une initiative du Gouvernement français, est financé par le FFEM (Fonds Français pour l'Environnement Mondial) et l'AFD (Agence Française de Développement) pour la conservation et la gestion raisonnée des récifs coralliens du Pacifique

sud. Toutes les îles du Pacifique sont largement tributaires, pour leurs besoins de subsistance, des récifs coralliens et des habitats associés, de la protection côtière et du développement économique. L'objectif du CRISP est de doter les collectivités des moyens nécessaires pour leur permettre de mettre en place des actions efficaces de préservation et de gestion de la biodiversité marine et les aider à accomplir une utilisation durable des ressources marines. C'est dans ce cadre que les éponges ont été récoltées en Nouvelle Géorgie dans les îles Salomon en juillet 2004.

Les objectifs de ma thèse sont :

- Réaliser l'extraction exhaustive d'éponges pour la découverte de nouvelles molécules, la biogénèse et la chimiotaxonomie,
- Mettre en évidence l'activité biologique des molécules isolées.

La sélection des éponges marines que nous avons étudiées est basée sur deux critères :

- L'activité biologique des extraits bruts (tableau 1)
- La nouveauté des éponges identifiées

| Genre | espèce | Tests Biologiques | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--|---------------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | Extrait* | KB 10 µg/mL (%) | <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> IC ₅₀ (µg/mL) | PFTase Inhibition 1 mg/mL | Élastase 400 µg/mL | PLA2 400 µg/mL |
| <i>Stylissa</i> | <i>carteri</i> | A | <50% | 6 | 55 | 15% | - |
| <i>Stylissa</i> | <i>carteri</i> | B | <50% | > 20 | Inactif | 0 | 30% |
| <i>Amorphinopsis</i> | <i>excavans</i> | A | 99% | > 20 | Inactif | 0 | - |
| <i>Amorphinopsis</i> | <i>excavans</i> | B | <50% | - | Inactif | 0 | 60% |
| <i>Petrosia (Petrosia)</i> | <i>cf. crassa</i> | A | 100% | > 20 | 74 | 0 | 85% |
| <i>Petrosia (Petrosia)</i> | <i>cf. crassa</i> | B | <50% | - | Inactif | 0 | 45% |

* A : phase aqueuse ; B : phase dichlorométhanique

Tableau 1 : Résultats des tests biologiques des extraits bruts d'éponges

Les éponges choisies sont :

- *Stylissa carteri* en raison de son activité antipaludique élevée, avec une concentration inhibitrice à 50 % de 6 µg/ml
- *Amorphinopsis excavans* en raison de sa nouveauté et pour son activité très forte contre les cellules cancéreuses KB.
- *Petrosia (Petrosia) cf. crassa* en raison de sa nouveauté et pour son activité contre les cellules cancéreuses KB et son activité PLA2

Le travail présenté dans ce mémoire est organisé en six chapitres :

- le premier chapitre est une introduction à la diversité, l'organisation et le fonctionnement des éponges, ainsi que les activités biologiques de certains de leurs composants,
- le deuxième chapitre concerne l'étude chimique de l'éponge *Petrosia crassa*,
- le troisième chapitre est consacré à l'éponge *Amorphinopsis excavans*,
- le quatrième chapitre présente l'étude chimique de l'éponge *Stylissa crassa* qui a conduit à l'isolement d'alcaloïdes pyrrole-2-aminoimidazoles dont une nouvelle sous-classe de dimères,
- le cinquième chapitre présente l'hypothèse de biogenèse des P-2-AIs dimères simples
- enfin, le sixième chapitre expose brièvement les résultats des tests biologiques de la chimiothèque de composés connus ou nouveaux que nous avons constituée durant mon travail de thèse.

Chapitre 1 : La biodiversité du milieu marin, les éponges

Chapitre 1 : La biodiversité du milieu marin, les éponges

I. La biodiversité du milieu marin

Les océans où a eu lieu la genèse de la vie couvrent plus de 70 % de notre planète. Dans certains écosystèmes, comme les barrières de corail, les experts estiment que la biodiversité est supérieure à celle des forêts tropicales. Les océans sont loin d'avoir livré tous leurs secrets. Le consortium d'étude de la vie marine ("Census of Marine Life" : CML), qui regroupe 300 scientifiques de 53 pays, a comptabilisé à ce jour environ 200 000 espèces de plantes et d'animaux vivants dans le milieu marin. Ils estiment que ce chiffre pourrait dépasser les deux millions avant fin 2010. Pourtant, l'environnement marin, malgré sa spécificité chimique a reçu beaucoup moins d'attention que le terrestre. Le tableau 2 présente les ordres de grandeur des concentrations des 20 éléments les plus abondants dans l'eau de mer après l'hydrogène et l'oxygène. Il montre que tous les halogènes sont présents dans l'eau de mer sous forme d'ions halogénures et par ordre d'abondance, on trouve successivement : $Cl > Br > F > I$. Parmi les très nombreuses substances naturelles halogénées produites par les organismes marins l'ordre d'abondance des halogènes est différent : $Br - Cl > I \gg F$.¹¹

| Ordres de grandeur (mg/kg d'eau de mer) | Éléments | ppm | Ordres de grandeur (mg/kg d'eau de mer) | Éléments | ppm |
|--|----------------|------------------------|--|----------------------|----------------------|
| $> 10^3$ | Cl Na Mg | 18980 10560 1275 | de 10 à 1 | B Si F | 5,00 4,00 1,50 |
| de 10^3 à 10^2 | S Ca K | 885 400 380 | de 1 à 10^{-1} | N Al Rb | 0,70 0,50 0,20 |
| de 10^2 à 10 | Br C Sr | 65 30 15 | de 10^{-1} à 10^{-2} | Li, P Ba, I As | 0,10 0,05 0,02 |

Tableau 2 : Concentration des vingt éléments les plus abondants dans l'eau de mer.

¹¹ Kornprobst, J.-M. 2005, 1-1830.. Substances naturelles d'origine Marine (en 2 volumes) Edition TEC & DOC, Paris, 1-1830

II. Les éponges marines

Les éponges marines sont des invertébrés multicellulaires qui font partie de la biomasse marine depuis la période du Cambrien inférieur. Elles sont présentes sur toute la planète et vivent dans de nombreux écosystèmes aquatiques. La plupart des espèces sont marines, mais il existe une cinquantaine d'espèces d'eaux douces. Ces organismes benthiques filtrent l'eau et n'ont d'autres mouvements que de légères contractions de leur surface qui présente des formes et couleurs variées. Les éponges vivent souvent en symbiose avec des microorganismes. Les relations entre les éponges et les symbiotes sont complexes et on leur attribue plusieurs rôles possibles¹² : dans la mesure où les éponges se nourrissent de microorganismes, il est possible qu'elles tolèrent une colonie qui leur servirait de garde-manger ; il est également possible que ces symbiotes empêchent l'épibiose (colonisation de l'éponge par d'autres espèces comme les pathogènes).

II.1. Généralités

Les défenses physiques et comportementales sont rares chez les éponges. Pourtant, étant des organismes sessiles et souvent mous, elles ont à faire face à un grand nombre de dangers, tels que la prédation, la compétition pour l'espace vital, l'épibiose ou encore l'infection par des microorganismes pathogènes. Si quelques-unes sont pourvues de spicules calcaires aiguisés et coupants qui les protègent des prédateurs, la majorité d'entre elles n'ont que les trous ou les crevasses où elles vivent protégées. D'autres sont camouflées par les petits organismes qui les couvrent comme les parazoanthus. Étant donné ces moyens de défense mécaniques et physiques rudimentaires au vu du nombre incroyable de métabolites secondaires isolés de ces éponges, on peut comprendre que la stratégie de défense chimique est de loin la plus courante.

II.2. Biologie des éponges

Les éponges sont constituées de deux couches de cellules, appelées endoderme et ectoderme. Entre ces deux couches se trouve la mésoglée dans laquelle évoluent librement les ambiocytes. Également dans la mésoglée se situent les spicules (les éléments du squelette de l'éponge) (figure 5). La très grande majorité des éponges se nourrissent en filtrant l'eau et

¹² Faulkner, D. J.; Unson, M. D.; Bewley, C. A. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1983-1990.

certaines espèces peuvent filtrer l'équivalent de leur propre volume d'eau toutes les 5 secondes. Les mouvements d'eau sont assurés par les choanocytes grâce au mouvement de leur flagelle. Les particules nutritives sont piégées dans les microvillosités des choanocytes qui phagocytent la particule, comme chez les protozoaires. La digestion n'est cependant pas réalisée dans le choanocyte, qui ne dispose pas des enzymes nécessaires. Mais les éponges ont su développer d'autres modes de nutrition en particulier dans le cadre des échanges symbiotiques. Certaines espèces vivant à de grandes profondeurs sont carnivores, comme les *Cladorhizidae*. Elles possèdent de longs filaments hérissés de spicules qui piègent les petits animaux qui les traversent.¹³

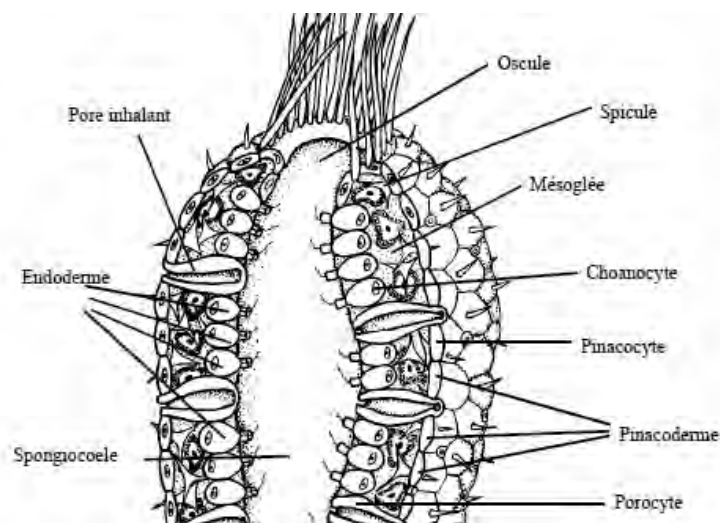


Figure 5 : Schéma de la forme la plus simple d'une éponge (type ascon)¹⁴

Les éponges les plus simples ont la forme d'un sac dont la paroi interne est tapissée de cellules à collerette. Il y a trois plans d'organisation :

le type ascon où les éponges possèdent une vase cavité interne (spongocoele), qui s'ouvre sur l'extérieur par l'orifice exhalant de l'éponge (oscule) (figure 5).

le type sycon proche de l'ascon mais le sac présente, dans sa paroi latérale, des diverticules tubulaires où se trouvent les choanocytes (figure 6).

¹³ Manuel, M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J. *Pour la Science* **2003**, 310, 68-75.

¹⁴ Quintin, C. **2001**, .1-19, <http://pagesperso-orange.fr/christophe.quintin/> (2009-05-03)

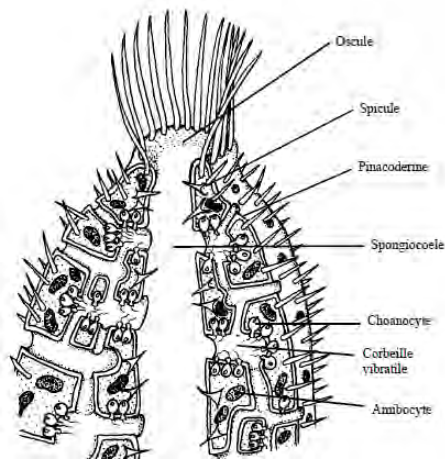


Figure 6 : L'éponge de type sycon¹⁴

le type leucon où le spongiocœle a totalement disparu et l'éponge est constituée d'un ensemble de canaux (figure 7). Les choanocytes sont regroupés dans des corbeilles.

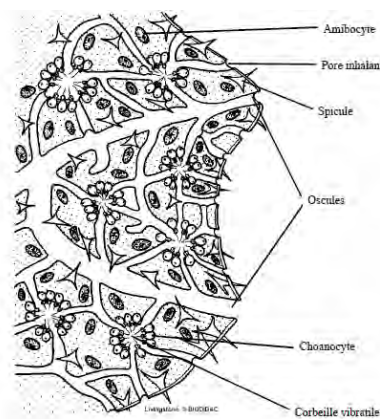


Figure 7 : L'éponge du type leucon¹⁴

La systématique des spongiaires (phylum Porifera) repose sur la forme des spicules. Trois classes existent aujourd'hui :

- a) Les calcisponges (classe Calcarea – Bowerbank, 1864) : leur squelette est constitué de spicules calcaires. Elles sont souvent considérées à tort comme des coraux. C'est la classe d'éponges la moins abondante et ubiquiste. Elles représentent moins de 5 % des espèces du phylum Porifera.
- b) Les éponges de verre (classe Hexactinellida – Schmidt, 1870) : ces éponges possèdent des spicules de silice qui peuvent former une structure rigide en s'associant étroitement. Les spicules caractéristiques de cette classe sont triaxones ou hexactines, qui n'existent pas chez les autres classes. Elles constituent 7 % des espèces de spongiaires.

- c) Les démosponges (classe Demospongiae – Sollas, 1885) : les spicules de ces éponges sont constitués de silice hydratée. Elles représentent environ 85 % des espèces de ce phylum.

II.3. Une riche source de métabolites.

De nombreuses éponges sont toxiques pour de nombreux prédateurs,¹⁵ en particulier sous les tropiques. Et de fait, il s'avère que les éponges de mer sont la source du plus grand nombre de métabolites secondaires isolés et caractérisés.¹⁶ Ces métabolites peuvent être présents à de fortes concentrations, ce qui amène les spécialistes à penser qu'ils jouent un rôle dans des fonctions biologiques importantes comme la communication, la régulation, la défense ... etc.

Plusieurs revues¹⁷ mettent en évidence la grande diversité moléculaire chez les éponges : on trouve des dérivés d'acides aminés et de nucléosides, des macrolides, des porphyrines, des terpénoïdes, des stéroïdes, des polycétides ... etc. Par exemple, on a montré que les métabolites comme les latrunculines A (**5**) et B (**6**) et les pyrroles-2-aminoimidazoles comme l'oroïdine (**7**) (figure 8) protègent l'éponge contre les poissons prédateurs (*Gambusia affinis*¹⁸ et *Thalassoma bifasciatum*¹⁹).

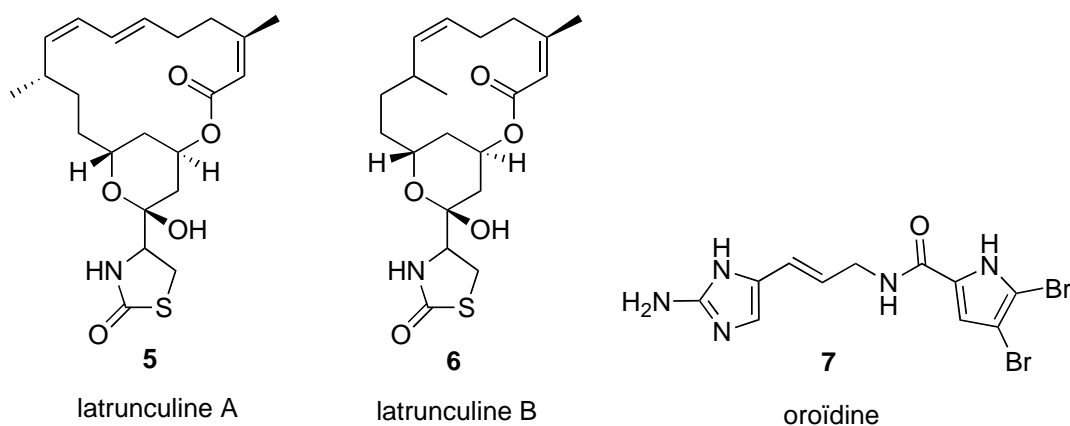


Figure 8 : Métabolites d'éponges toxiques pour les poissons

¹⁵ Green, G. *Mar. Biol.* **1977**, *40*, 207-215.

¹⁶ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 15-61.
Et tous les articles de cette série.

¹⁷ Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 2676-2704. Et tous les articles dans cette série

¹⁸ Nèeman, I.; Fishelson, L.; Kashman, Y. *Mar. Biol.* **1975**, *30*, 293-296.

¹⁹ Assmann, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **2000**, *207*, 255-262.

L'éponge *Aplysina fistularis* exsude de l'aerothionine et de l'homo-aerothionine dans l'eau environnante à des concentrations suffisantes pour se protéger contre certains dommages mécaniques causés par l'épibiose. En effet, les deux composés permettent de sélectionner les organismes qui peuvent s'implanter (*biofouling* en anglais) sur *A. fistularis*.²⁰ D'autres études ont découvert un rôle anti-*biofouling* de certains dipeptides comme la barettine (**8**) (figure 9) bromés par l'inhibition de la métamorphose des larves des épibiontes.²¹

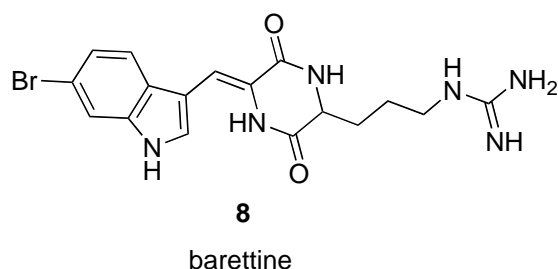


Figure 9 : Dipeptide à activité anti-biofouling

Les premières substances importantes découvertes dans le milieu marin en 1951, sont deux nucléosides inhabituels, la spongouridine (**1**) et la spongothymidine (**2**) (figure 2) qui possèdent de bonnes activités anti-tumorales et antivirales.^{8,9} La grande diversité et la richesse écologique du milieu marin en font la plus grande chimiothèque dont disposent les scientifiques pour la recherche de structures bio-actives, comme le prouvent les nombreuses revues sur les activités biologiques des nombreux produits naturels d'origine marine.^{22,23,24}

III. Activités biologiques des métabolites : vers de nouveaux médicaments

Les éponges marines sont considérées comme une mine d'or au vu de leur nombre et de la diversité structurale des métabolites secondaires qu'elles produisent. Des centaines d'articles décrivent leurs activités biologiques diverses et variées telles que les activités anticancéreuses,

²⁰ Ebel, R.; Brenzinger, M.; Kunze, A.; Gross, H. J.; Proksch, P. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1451-1462.

²¹ Sjögren, M.; Göransson, U.; Johnson, A.-L.; Dahlstrom, M.; Andersson, R.; Bergman, J.; Jonsson, P. R.; Bohlin, L. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 368-372.

²² Adrian, T. E. *Curr. Pharm. Design.* **2007**, *13*, 3417-3426.

²³ Singh, R.; Sharma, M.; Joshi, P.; Rawat, D. S. *Anti-Cancer Agent. Me.* **2008**, *8*, 603-617.

²⁴ Abad, M. J.; Bedoya, L. M.; Bermejo, P. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 740-754.

antivirales, anti-inflammatoires, antifongiques, immunosuppressives, neurosuppressives, relaxantes, antimalariques ou encore antibiotiques.^{22,23,24,25}

Peu de métabolites secondaires d'origine marine sont actuellement utilisées comme médicament. Par exemple il faudra attendre 2006 pour que YondelisTM, nom commercial de l'ET 743 (**9**) (figure 10), isolé du tunicier *Ecteinascidia turbinata* en 1990,²⁶ obtienne son AMM. Cette molécule est utilisée actuellement dans le traitement de plusieurs types de cancers. Le ziconotide (**10**) (figure 10) (PrialtTM), isolé du venin du mollusque *Conus magusi*,²⁷ a obtenu son AMM en 2004.

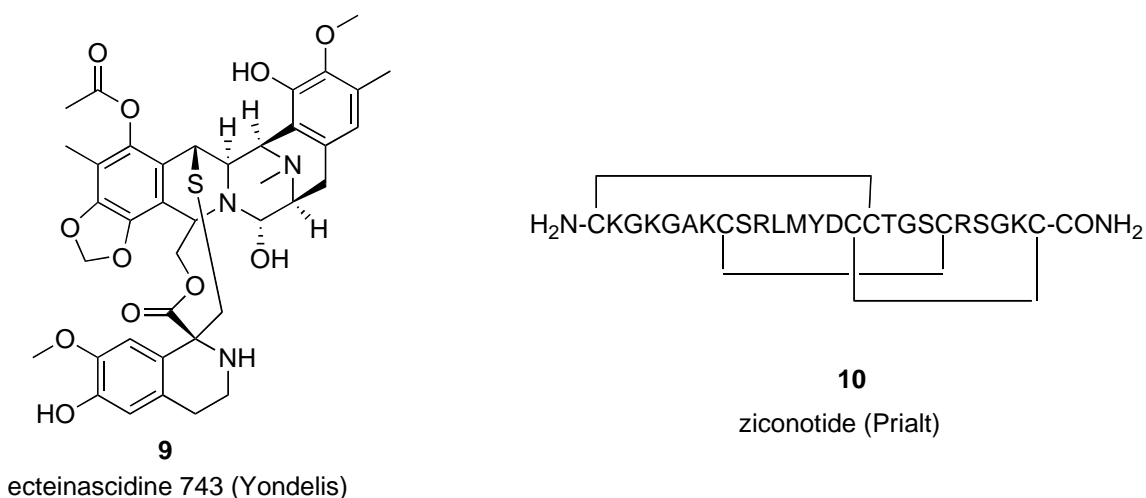


Figure 10 : Exemple de molécules d'origine marine sur le marché

²⁵ Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Hamann, M. T. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1790, 283-308.

²⁶ Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4512-4515.

²⁷ McIntosh, M.; Cruz, L. J.; Hunkapiller, M. W.; Gray, W. R.; Olivera, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 218, 329-334.

La plupart des molécules d'origine marine en essais cliniques sont actuellement testées comme médicament anticancéreux (tableau 3).^{28, 29}

| Composé | Origine | Statut | Cible |
|---|--------------------------|-----------------------|--|
| E7389 (inspiré par halichondrin B) ^a Déhydrodidemnin B (Aplidine) | Synthétique Tuniciens | Phase III Phase II | La tubuline L'ornithine décarboxylase (ODC) |
| Soblidotin (alias TZT1027) | Synthétique | Phase II | La tubuline |
| Synthadotin (alias ILX651) | Synthétique | Phase II | La tubuline |
| Bryostatine 1 | Bryozoaire | Phase II | Protéine kinase C (PKC) |
| Squalamine | Requin | Phase II | L'angiogenèse |
| Kahalaide F | Mollusque | Phase II | Multiple |
| PMO2734 (inspiré par kahalaide) | Synthétique | Phase I | « Solid tumor » |
| Zalypsis (inspiré par jourmycin) ^a | Synthétique | Phase I | L'ADN |
| E7974 (inspiré par hemiasterlin) ^a | Synthétique | Phase I | La tubuline |
| Taltobulin (alias HTI286 ; inspiré par hemiasterlin) ^a | Synthétique | Phase I | La tubuline |
| Salinosporamide A (alias NPI0052) | Bactérie | Phase I | Les protéasomes |
| Spisulosine (alias ES285) | Mollusque | Phase I | « Rho » |
| KRN-7000 (inspiré par agelasphine) ^a | Synthétique | Phase I | « NKT » |
| NPI 2358 (inspiré par halimide) | Synthétique | Phase I | La tubuline |
| LBH 589 (inspiré par psammapline) ^a | Synthétique | Phase I | L'histone desacétylase (HDAC) |

^a Substances extraites d'éponges marines

Tableau 3 : Substances naturelles d'origine marine (ou leurs analogues) en essais cliniques comme médicaments anticancéreux

III.1. Les métabolites des éponges marines et leur intérêt thérapeutique potentiel

Le phylum des spongiaires fournit plus du tiers des molécules isolées (figure 4). La découverte massive des nouvelles molécules au cours des deux dernières décennies n'a pas encore abouti au stade du médicament mis sur le marché. Plusieurs métabolites secondaires bioactifs (ou leurs analogues) isolés d'éponges sont actuellement en essais cliniques (tableau 4).

²⁸ Sashidhara, K. V.; White, K. N.; Crews, P. J. *Nat. Prod.* **2009**, 72, 588-603.

²⁹ Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, 8, 69-85.

| Composés | Origine | Traitement | Statut |
|----------------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| Ara-A | <i>Cryptotethya crypta</i> | Antiviral | Commercialisé |
| Ara-C | <i>Cryptotethya crypta</i> | Anticancéreux | Commercialisé |
| KRN7000 | <i>Agelas mauritianus</i> | Anticancéreux | Phase I |
| IPL512602 et dérivés | <i>Petrosia contignata</i> | Anti-inflammatoire | Phase II |
| HT1286 | <i>Siphonochalina sp.</i> | Anticancéreux | Phase I |
| E7389 | <i>Halichondria okadaï</i> | Anticancéreux | Phase III |

Tableau 4 : Métabolites (ou leurs analogues) isolés d'éponges

Le KRN7000 (**11**) (figure 11) est un analogue de synthèse des agelasphines qui limite l'apparition de métastases hépatiques. Il est également en essais cliniques sur d'autres cibles que le cancer comme « mixed lymphocyte réaction – MLR ». ³⁰ Les agélasphines (**12-14**) (figure 11), isolées de l'éponge *Agelas mauritianus* se sont révélées être des substances très fortement actives sur certaines tumeurs cancéreuses comme le mélanome B16. ³¹

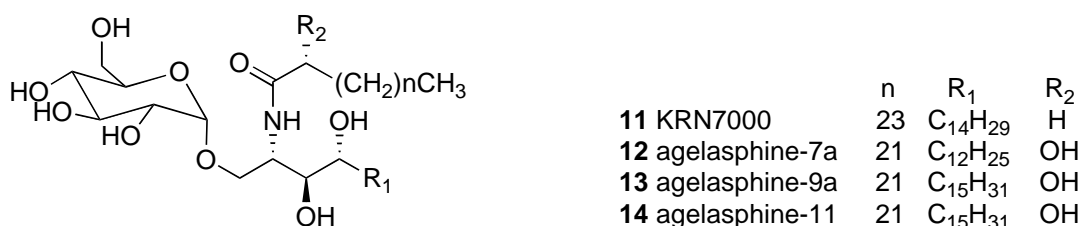


Figure 11 : Le KRN7000 et agélasphines

L'HTI-286 (**15**), actuellement en essai clinique pour l'activité contre le cancer de la prostate, ³² est un analogue synthétique de l'hémiasterline (**16**) (figure 12). L'hémiasterline a été isolé des éponges *Cymbastela sp.* et *Hemiasterella minor*. ^{33,34} C'est un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire qui empêche l'assemblage normal des microtubules. ³³

³⁰ Iijima, H.; Kimura, K.; Sakai, T.; Uchimura, A.; Shimizu, T.; Ueno, H.; Natori, T.; Koezuka, Y. *Bioorgan. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1905-1910.

³¹ Natori, T.; Morita, M.; Akimoto, K.; Koezuka, Y. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2771-2784.

³² Hadaschik, B. A.; Ettinger, S.; Zoubeidi, A.; Roberge, M.; Gleave, M. E. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 2368-2376.

³³ Coleman, J. E.; Dilip De Silva, E.; Kong, F.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10653-10662.

³⁴ Talpir, R.; Benayahu, Y.; Kashman, Y.; Pannell, L.; Schleyer, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4453-4456.

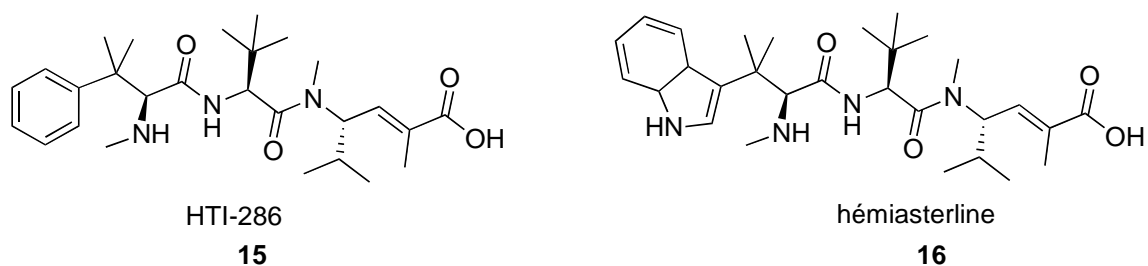


Figure 12 : L'hémiasterline et son analogue HTI-286

Le contignastérol (**17**) (figure 13), isolé en 1992 de l'éponge *Petrosia contignata*³⁵ a des propriétés anti-inflammatoires. Plusieurs analogues (l'IPL576092 (**18**) et l'IPL512602) ont été synthétisés à partir de ce composé pour le traitement de l'asthme.³⁶

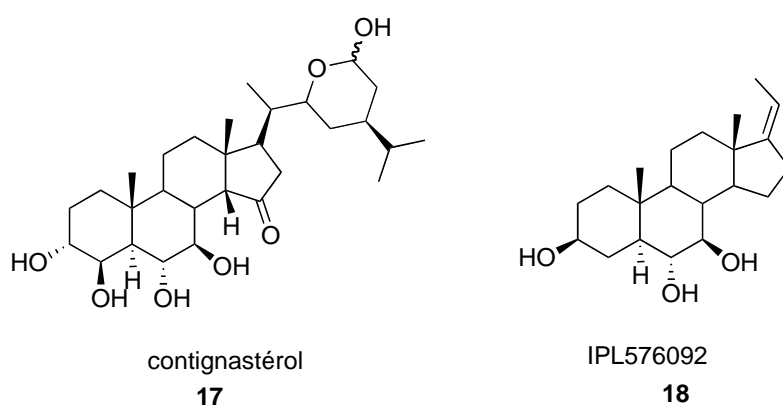


Figure 13 : Contignastérol et ses analogues

L'E7389 (**19**) est un analogue synthétique et simplifié de l'halichondrine B (**20**) (figure 14), isolé en 1985 de l'éponge *Halichondria okadai*.³⁷ L'E7389 est actuellement en phase III des essais cliniques comme agent anticancéreux.

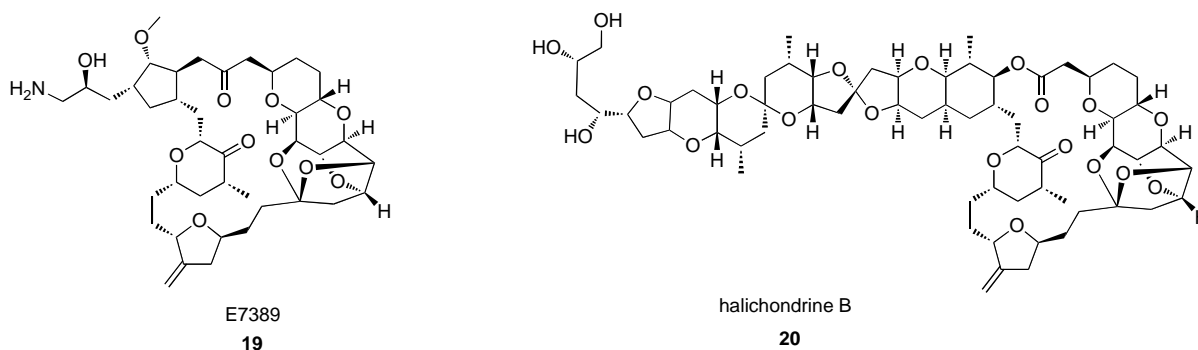


Figure 14 : L'E7389 et l'halichondrine B

³⁵ Burgoyne, D. L.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 525-528.

³⁶ Shen, Y.; Burgoyne, D. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3908-3910.

³⁷ Hirata, Y.; Uemura, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.

Les molécules décrites ci-dessus ne sont que quelques exemples choisis parmi les nombreux composés isolés à partir d'éponges marines rapportées dans la littérature et qui possèdent des activités biologiques.

Le principal facteur limitant l'exploitation des produits naturels marins comme source de médicaments est la faible quantité de produit disponible, soit parce qu'ils sont présents en faible quantité dans l'éponge, soit parce que les volumes d'éponge disponibles sont limités. Pour contourner ce problème, plusieurs solutions sont possibles :³⁸

- La synthèse ou l'hémi-synthèse des métabolites bioactifs
- L'aquaculture des éponges en milieu naturel ou en aquarium
- La culture de cellules d'éponges marines
- La culture de micro-organismes symbiotiques responsables de la biosynthèse de certains composés bioactifs.

IV. Conclusion

Les éponges marines, grâce à leur système de défense chimique, sont une source de métabolites bioactifs potentiellement utiles pour l'Homme. Malheureusement, l'extraction de ces produits naturels ne permet pas une production utilisable commercialement. De plus, la structure souvent complexe de ces métabolites rend leur synthèse difficile et par conséquent les études pharmacologiques sont retardées voir arrêtées. Malgré ces difficultés, le développement de nouvelles techniques comme l'hémi-synthèse et la culture d'éponge ou de microorganismes symbiotiques permettent d'espérer que les éponges marines deviennent une source de médicaments.

Notre laboratoire s'intéresse à la découverte de nouveaux composés bioactifs et à la caractérisation de métabolites isolés à partir d'éponge. Ce manuscrit présente les travaux réalisés sur des éponges récoltées aux Iles Salomon en 2004 et qui ont été étudiées dans le cadre du projet CRISP (Coral Reef Initiatives for the South Pacific).

³⁸ Koopmans, M.; Martens, D.; Wijffels, R. H. *Mar. Drugs*. **2009**, *7*, 787-802.

**Chapitre 2 : Étude chimique de l'éponge *Petrosia* (*Petrosia*)
crassa, Carter (1876)**

Chapitre 2 : Étude chimique de l'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa*, Carter (1876)

Ce chapitre sera consacré à l'étude de l'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa* (R-3091) qui appartient à l'ordre des Haplosclerida. Après une brève présentation bibliographique sur la chimie du genre *Petrosia*, nous décrirons les différentes étapes d'extraction et de la purification des produits détectés. La caractérisation des structures des produits obtenus est réalisée à l'aide des méthodes spectroscopiques et de la comparaison de leurs données spectrales avec celles de la littérature. L'extrait aqueux de cette éponge présente une activité cytotoxique (tableau 1, page 5).

I. Données bibliographiques

L'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa* a été identifiée par Carter en 1876.³⁹ Elle appartient à la famille Petrosiidae (figure 15).

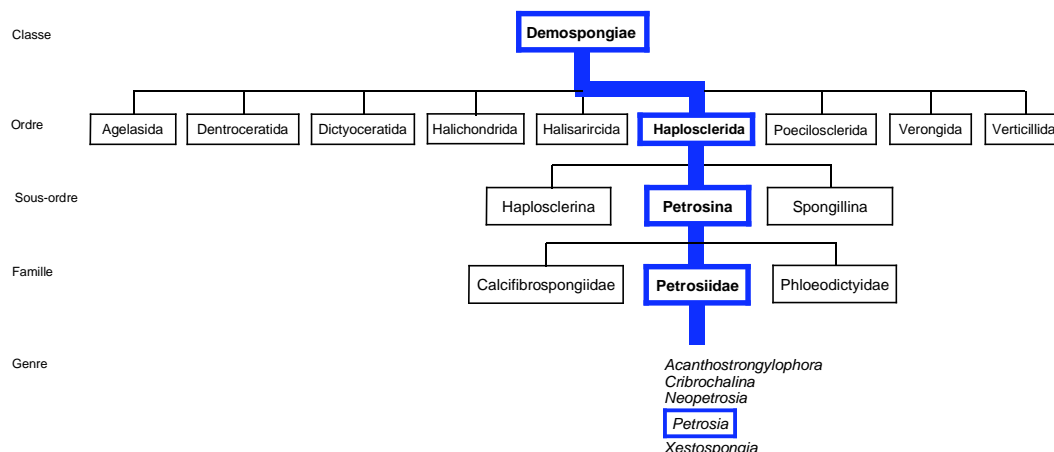


Figure 15 : Arbre phylogénétique de *Petrosia (Petrosia) crassa*.

I.1. Étude chimique de l'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa*

Si *Petrosia (Petrosia) crassa* n'a fait l'objet d'aucune publication chimique antérieure, en revanche, d'autres espèces du genre *Petrosia* ont été étudiées. Elles sont la source de

³⁹ Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.; Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *petrosia (petrosia) crassa* (Carter, 1876) <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=1666828200909-03>).

composés acétyléniques, d'acides gras, de stérols, de dérivés quinolizidiniques et des pyridoacridines très répandues dans le milieu marin.

Les dérivés acétyléniques linéaires très diversifiés dans ce genre sont connus pour leurs activités biologiques intéressantes. Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de l'ordre Haplosclérida qui est à l'origine de cent dérivés acétyléniques déjà identifiés. Leurs fonctions biologiques consisteraient à protéger les éponges contre les champignons, les bactéries, la fixation de larves (Ascidies et Crustacés) et les poissons.⁴⁰ Par ailleurs, plusieurs autres propriétés biologiques ont été mises en évidence pour ces molécules : anti-HIV par inhibition des protéases et de la transcriptase inverse, inhibition des H⁺, K⁺-ATPases, activités immunosuppressives et anti-cancéreuses.

Dans le genre *Petrosia*, les variations structurales de ces très nombreux composés se situent au niveau des longueurs de chaînes, du degré d'insaturation, des substitutions et de la configuration absolue des carbones asymétriques. Seuls quelques exemples sont présentés ici. Castiello *et al* en 1980 ont mis en évidence pour la première fois la présence des polyacétylènes **21** et **22** dans une éponge du genre *Petrosia* (figure 16).⁴⁰ Le (3*S*, 14*R*)-pétrocortyne F (**23**)⁴¹ a une activité significative sur un panel de cellules tumorales humaines et inhibe la réplication de l'ADN (figure 16).⁴² Le pétrocortyne E (**24**), dérivé du pétrocortyne F (**23**), présente la même configuration au niveau des carbones asymétriques mais possède une fonctionnalité énol inversée (figure 16).⁴³

⁴⁰ Castiello, D.; Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 5047-5050.

⁴¹ Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Sim, C. J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 447-462.

⁴² Lim, Y. J.; Lee, C.-O.; Hong, J.; Kim, D.-K.; Im, K. S.; Jung, J. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1565-1567.

⁴³ Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K. W. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1268-1273.

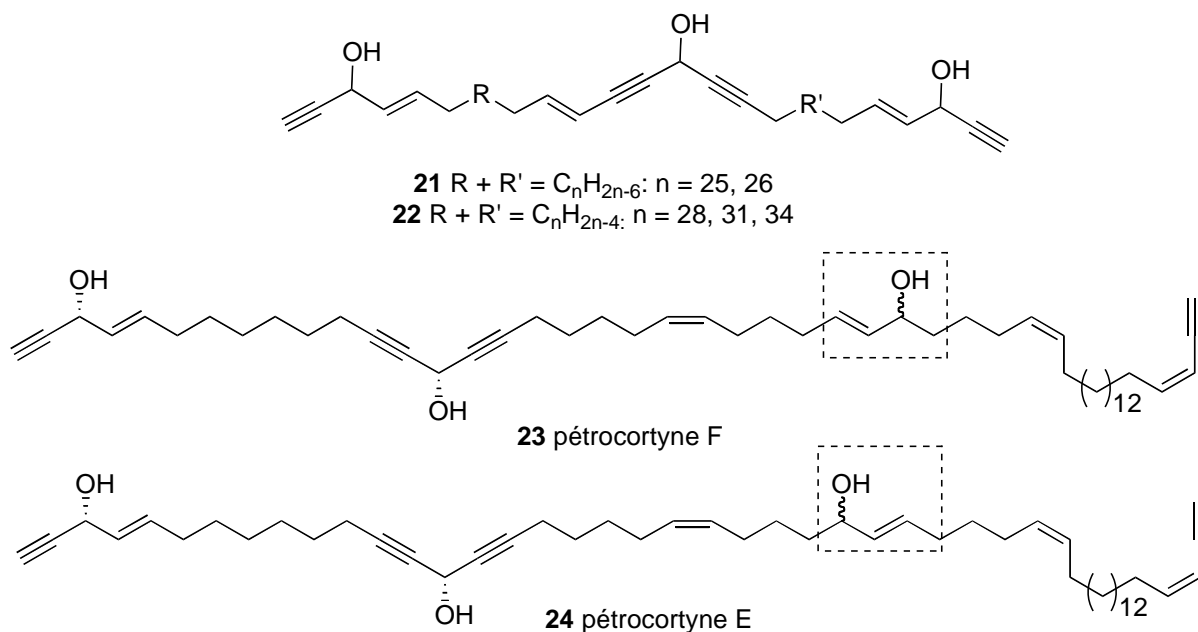


Figure 16 : Structures des polyacétylènes **21-24** isolés de *Petrosia* sp.

La présence du brome est fréquente dans les produits marins. L'oxydation de l'ion Br^- , par les haloperoxydases permet son utilisation comme électrophile par les systèmes biologiques. En 1993, Fusetani *et al.* ont isolé deux dérivés polyacétyléniques bromés **25** et **26** (figure 17) de *Petrosia volcano*.⁴⁴

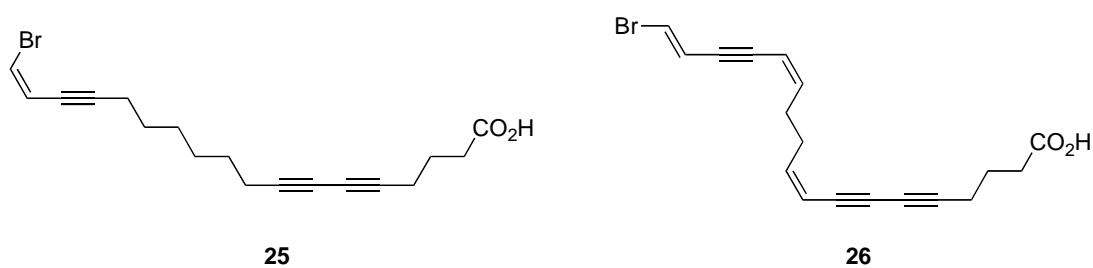


Figure 17 : Polyacétylènes bromés **25-26** de *Petrosia volcano*

Des acides gras inhabituels ont été isolés chez *Petrosia* sp. : Carballeria et Shalabi ont décrit en 1993 l'acide gras **27** et l'acide gras bromé **28** qui est rare dans la nature (figure 18).⁴⁵

⁴⁴ Fusetani, N.; Li, H.-Y.; Tamura, K.; Matsunaga, S. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1203-1210.

⁴⁵ Carballeira, N. M.; Shalabi, F. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 739-746.

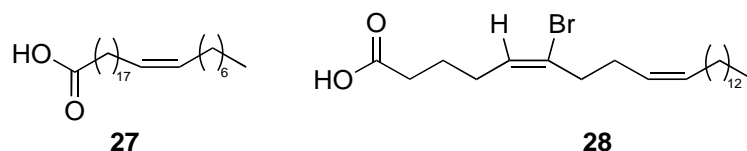


Figure 18 : Structures des acides gras **27** et **28** isolés d'éponge *Petrosia* sp.

Les éponges de l'ordre Haplosclérida sont riches en stérols fonctionnalisés et en stérols atypiques présentant des chaînes latérales cyclopropaniques. Les stérols atypiques ont des structures contenant 27 à 31 atomes de carbone organisés en un système tétracyclique plus ou moins modifié. Le pétrostérol (**29**) est un des composés les plus connus. Il a été isolé en quantité importante de plusieurs éponges.^{46,47} Le contignastérol (**17**) isolé de *Petrosia contignata* est un des stérols fonctionnalisés atypiques. Il présente une activité anti-inflammatoire et est en cours de développement comme composé antiasthmatique.^{48,49} Le contignastérol possède une jonction C/D *cis* et une chaîne latérale cyclisée en tétrahydropyrane (figure 19).³⁵ La présence majoritaire de ce stérol associée à la présence d'autres stérols spécifiques pourrait être un critère utile pour la classification taxonomique des éponges du genre *Petrosia*.⁵⁰

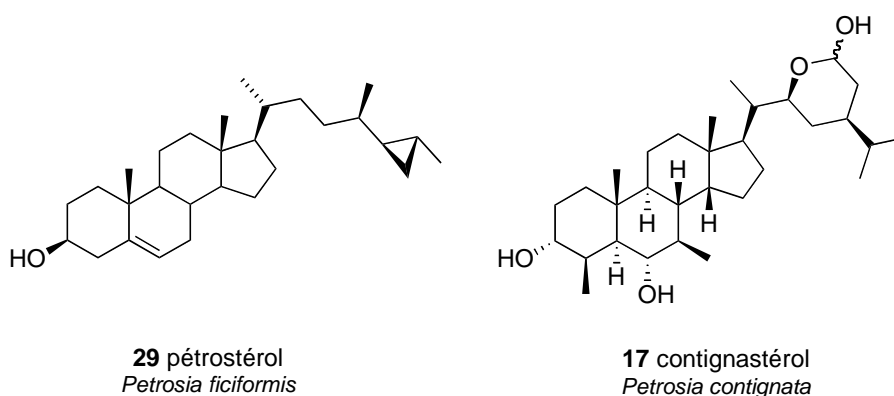


Figure 19 : Structures du pétrostérol (**29**) et du contignastérol (**17**)

⁴⁶ Sica, D.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 837-838.

⁴⁷ Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Sica, D.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3953-3954.

⁴⁸ Bramley, A. M.; Langlands, J. M.; Jones, A. K.; Burgoyne, D. L.; Li, Y.; Andersen, R. J.; Salari, H. *Brit. J. Pharmacol.* **1995**, *115*, 1433-1438.

⁴⁹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1693-1713.

⁵⁰ Proudfoot, J. R.; Catalan, C. A. N.; Djerassi, C.; Sica, D.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 423-426.

Les macrocycles symétriques contenant deux quinolizidines, les pétrosines A (**30**) et B (**31**) ont été isolées en 1982 à partir de l'éponge *Petrosia seriata*. Ils ont des propriétés vasodilatatrices.⁵¹

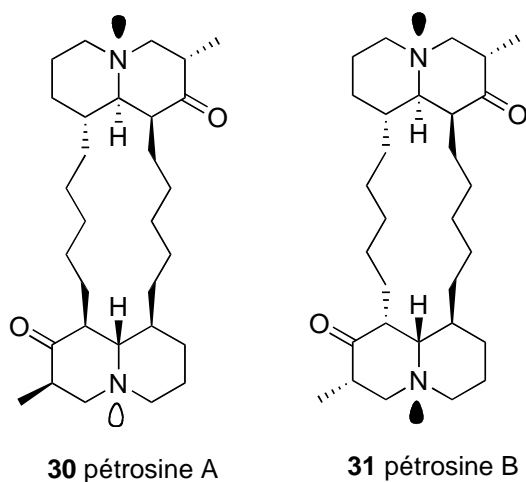


Figure 20 : Structures des pétrosines A et B (**30** et **31**)

Les pyridoarcidines sont des composés aromatiques caractéristiques par leurs couleurs intenses. Des variations de couleurs importantes des extraits d'éponges ont été observées selon la nature des solvants utilisés pour leur extraction. Par exemple, la couleur d'une solution de pétrosamine (**32**) varie avec la polarité du solvant : une solution aqueuse est violette, alors qu'une solution dans le tétrahydrofurane est verte.⁵²

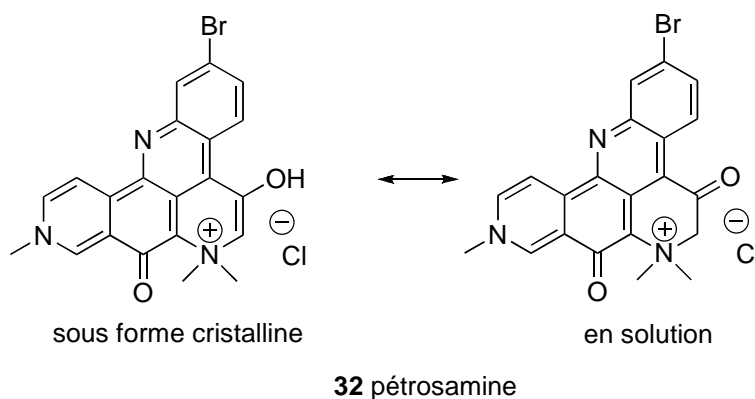


Figure 21 : Structures des pétrosamines

⁵¹ Braekman, J. C.; Daloz, D.; De Abreu, P. M.; Piccinni-Leopardi, C.; Germain, G.; Van Meerssche, M. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4277-4280.

⁵² Molinski, T. F.; Fahy, E.; Faulkner, D. J.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1340-1341.

II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce *Petrosia (Petrosia) cf. crassa*

Ce spécimen a été collecté en Nouvelle-Géorgie (les îles Salomon), en juillet 2004. Un échantillon a été déposé au Queensland Museum, sous la référence G322721.



Photo 1 : Photo *ex-situ* de l'échantillon de référence de *Petrosia (Petrosia) cf. crassa*
(photographe : Eric Folcher, IRD, Nouméa)

II.1. Extraction, fractionnement et purification

L'éponge lyophilisée (90,4 g) a été placée dans un extracteur Dionex puis extraite sous pression au méthanol (3 extractions successives : 3x 1,7 L). Les extraits méthanoliques successifs sont rassemblés puis évaporés pour fournir 13,9 g d'extrait méthanolique brut, traité selon le schéma 1. Cet extrait brut est partitionné entre l'eau (150 mL) et le dichlorométhane (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis évaporées pour obtenir 1,9 g d'extrait dichlorométhanique brut (A). La phase aqueuse fournit 9,9 g d'extrait aqueux B. Ce dernier est repris par 100 mL d'eau, ce qui nous donne un insoluble (extrait D) et une solution aqueuse qui est extraite par du *n*-butanol (3 x 100 mL). Les phases butanoliques sont réunies puis séchées et reprises par de l'eau pour fournir 829,6 mg d'extrait aqueux brut G.

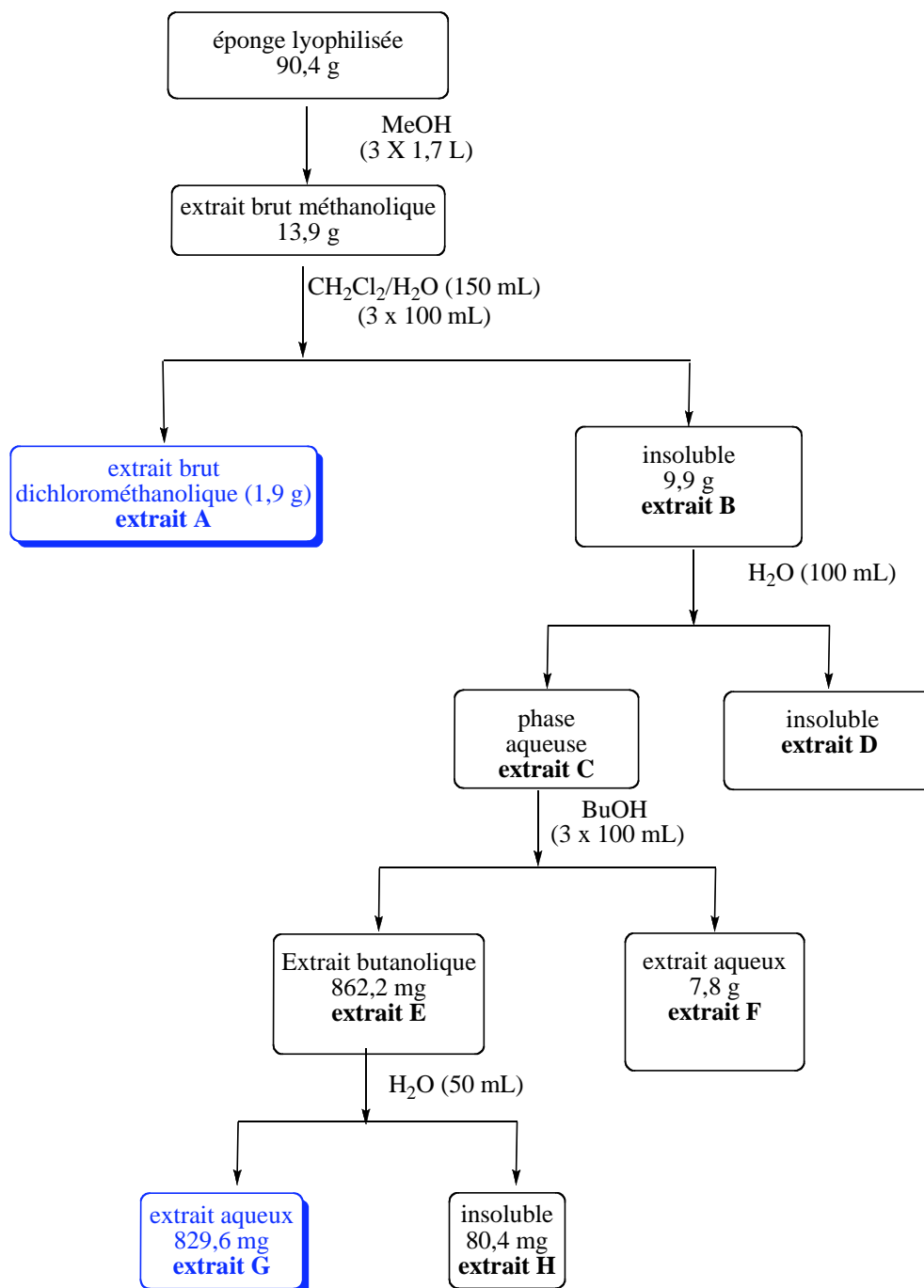


Schéma 1 : Schéma d'extraction adopté pour l'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa*

Les extraits obtenus sont ensuite analysés par les méthodes chromatographiques, et seuls les extraits A et G ont été ensuite fractionnés.

L'extrait dichlorométhanique (extrait A 1,3 g) est chromatographié sur colonne de silice éluee par les mélanges successifs Heptane/CH₂Cl₂ (100/0 à 0/100), CH₂Cl₂/AcOEt (100/0 à 0/100), AcOEt/MeOH (100/0 à 0/100), comme indiqué sur le schéma 2. Les spectres RMN du proton

des fractions obtenues montrent des éléments caractéristiques de stérols, de triglycérides et d'acides gras.

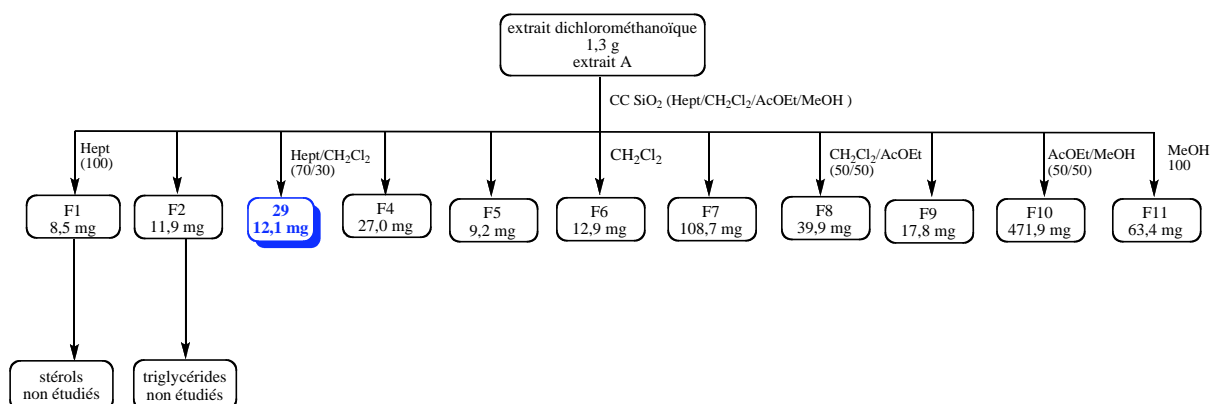


Schéma 2 : Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique de *Petrosia (Petrosia) crassa*

Les analyses par CCM et par chromatographie C_{18} de cet extrait dichlorométhanique montre sa pauvreté en métabolites. Seul le travail sur les fractions ayant permis l'isolement et l'identification de produits seront décrites ici. L'élucidation des structures des produits isolés sera détaillée au paragraphe II.2

Cet extrait a été séparé en trois aliquotes G1, G2 et G3. Afin de déterminer la présence éventuelle de molécules intéressantes, un échantillon (G1) a été étudié. Suite à cette étude préliminaire, les deux autres échantillons (G2 et G3) ont été purifiés (schéma 3).

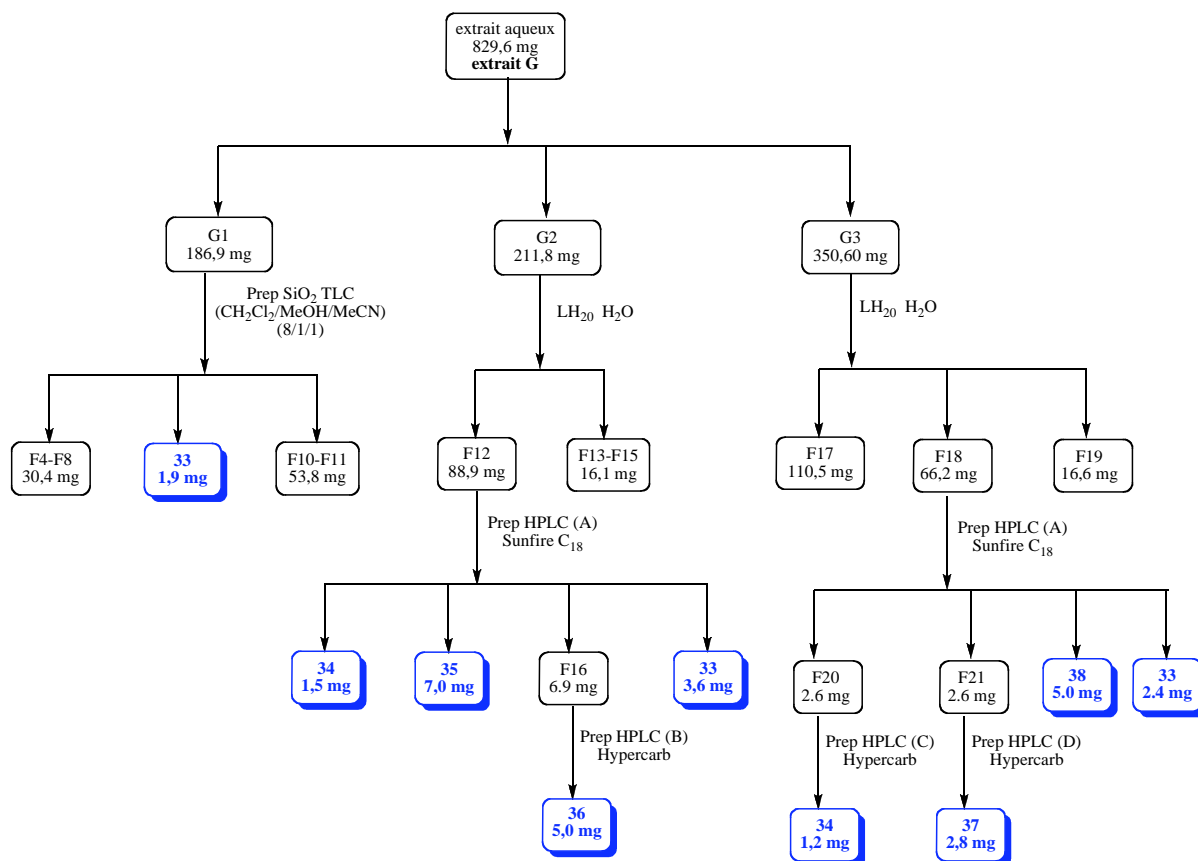


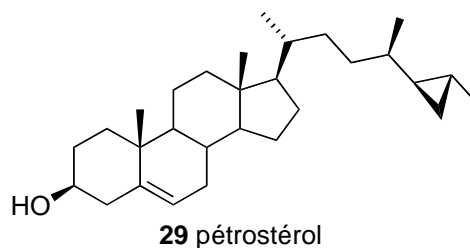
Schéma 3 : Fractionnements de l'extrait aqueux (G) de *Petrosia (Petrosia) crassa*

Six produits **33-38** ont été isolés. La détermination structurale par les méthodes spectroscopiques est détaillée dans le paragraphe suivant.

II.2. Élucidation structurale des composés isolés

Après l'analyse des premiers chromatogrammes LC-MS et des spectres RMN, la détermination structurale des métabolites isolés a été facilitée par la comparaison de nos données avec celles de la littérature.

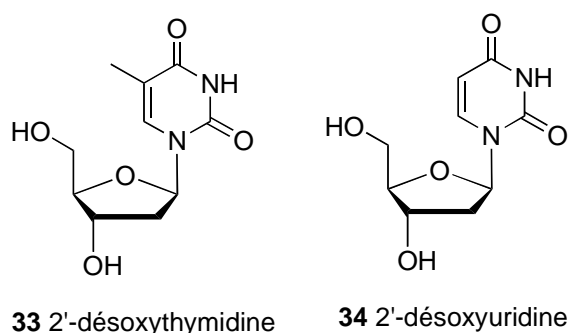
Le pétrostérol (**29**) a été isolé directement par chromatographie sur colonne de gel de silice (Schéma 2). Le spectre RMN ^1H de ce produit majoritaire montre très clairement un profil typique de stérol. La présence de massifs très blindés vers 0,10-0,15 ppm (2H) et 0,5 ppm (1H) indique qu'il s'agit d'un stérol comportant un cyclopropane sur la chaîne latérale. Son masse moléculaire de 412 et la comparaison de ses spectres avec ceux de la littérature permettent d'identifier le composé au pétrostérol (**29**) (Figure 22).

**Figure 22**

Le pétrostérol a déjà été isolé à partir de plusieurs éponges, notamment *Petrosia ficiformis*⁴⁶ et *Petrosia spheroida*.⁵³

L'étude du spectre RMN ¹H du composé **33** a montré la présence de protons caractéristiques d'une structure de type désoxyribose. Ces informations, associées aux données de spectrométrie de masse, [M-H]⁻ 241,0 ; du spectre RMN ¹H montrant la présence d'un seul proton éthylénique ont permis d'émettre l'hypothèse que **33** est la 2'-désoxythymidine (figure 23). Cette hypothèse a été confirmée par comparaison de nos spectres RMN ¹H et ceux de la littérature.⁵⁴ Le proton anomérique qui se présente comme un triplet à 6,29 ppm indique une stéréochimie β-anomérique.⁵⁴

La structure du composé **34** a été déduite de celle de **33** grâce à l'analogie de leurs spectres RMN ¹H, ces spectres différant toutefois par la présence d'un proton éthylénique supplémentaire. La comparaison avec les spectres RMN de la littérature permet de confirmer la 2'-désoxyuridine (**34**).⁵⁵

**Figure 23** : Structures des désoxyribonucléosides **33** - **34**

⁵³ Gauvin, A.; Smadja, J.; Aknin, M.; Gaydou, E. M. *Comp. Biochem. Phys. B* **1998**, *121*, 451-456.

⁵⁴ Aoyama, H. *B. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2073-2077.

⁵⁵ Haga, N.; Ishikawa, I.; Takayanagi, H.; Ogura, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 728-737.

Les spectres de RMN et de masse permettent d'identifier rapidement le composé **35** comme la base pyrimidique des désoxyribonucléosides précédents, l'uracile. L'analyse des spectres RMN du produit **36** a montré la présence de protons caractéristiques d'une structure de type nucléoside. Ces informations permettent de vérifier l'hypothèse que **36** est l'inosine.

La structure de l'hypoxanthine (**37**)⁵⁶ est proposée après l'analyse du spectre RMN ¹H, ainsi que la présence de l'ion 137,1 sur le spectre de masse en ESI⁺. Les spectres de RMN et de masse permettent d'identifier le composé **38** comme étant la nébularine, base purique produite par la désamination de l'adénine.⁵⁷

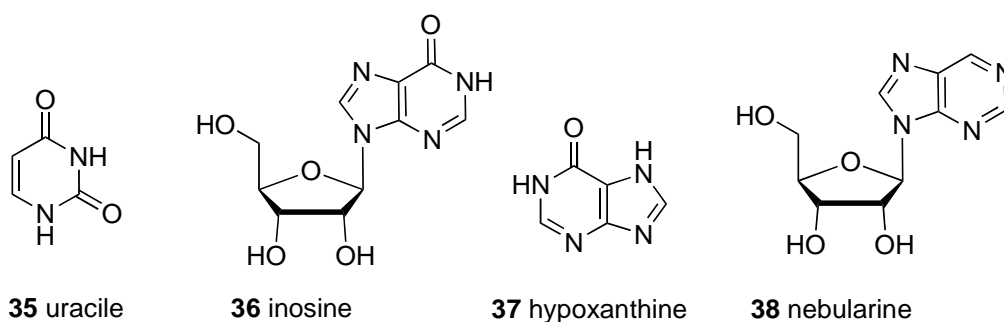


Figure 24 : Structures des bases **35**, **37** et des nucléosides **36**, **38**

III. Conclusion et discussion

Ce travail d'extraction et d'analyse de *Petrosia (Petrosia) crassa* illustre les difficultés rencontrées en chimie extractive : si certains organismes peuvent être une source de métabolites originaux, d'autres ne révèlent que des molécules banales. Même si les analyses LCMS préliminaires peuvent orienter les études chimiques, il est extrêmement difficile de savoir à l'avance si les produits qui seront isolés présenteront un intérêt ou non. Ainsi, cette éponge n'a fourni que des produits connus qui sont le pétrostérol (**29**) caractéristique des Haplosclérida, les désoxyribonucléosides **33-34**, des bases **35**, **37** et des nucléosides **36** et **38**. L'étude de cette éponge pauvre en métabolites secondaires originaux a donc été abandonnée.

⁵⁶ Chenon, M.-T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *97*, 4636-4642.

⁵⁷ Cooper, R.; Horan, A. C.; Gunnarsson, I.; Patel, M.; Truumees, I. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **1986**, *1*, 275-276.

**Chapitre 3 : Étude chimique de l'éponge *Amorhinopsis excavans*,
Carter (1887)**

Chapitre 3 : Étude chimique de l'éponge *Amorphinopsis excavans*, Carter (1887)

L'éponge *Amorphinopsis excavans* (R-3082) appartient à la famille Halichondriidae de l'ordre des Halichondrida. Après une brève présentation bibliographique sur la chimie du genre *Amorphinopsis*, nous décrivons les différentes étapes de l'extraction et de la purification des produits détectés. La caractérisation des structures des produits obtenus est réalisée à l'aide des méthodes spectroscopiques et par comparaison avec les données de la littérature quand elles existent. Son extrait aqueux présente une activité cytotoxique (tableau 1, page 5).

I. Étude bibliographique

Plusieurs métabolites secondaires isolés d'éponges de la famille Halichondriidae ont été décrits : des stérols sulfatés,⁵⁸ des alcaloïdes pyrrole-2-aminoimidazoles,⁵⁹ des depsipeptides cycliques,⁶⁰ ou des terpènes porteurs d'une fonction isonitriles.⁶¹

L'éponge *Amorphinopsis excavans* a été identifiée par Carter en 1887.⁶² Elle appartient à la famille des Halichondriidae (figure 25).

⁵⁸ Yang, S.-W.; Buivich, A.; Chan, T.-M.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E.; Mierzwa, R.; Patel, M.; Gullo, V.; Chu, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1791-1794.

⁵⁹ Inaba, K.; Sato, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 693-695.

⁶⁰ Kong, F.; Burgoyne, D. L.; Andersen, R. J.; Allen, M. T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3269-3272.

⁶¹ Wratten, S. J.; Faulkner, D. J.; Hirotsu, K.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 4345-4348.

⁶² Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.; Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *Amorphinopsis excavans* (Carter, 1887). <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=178562> (2010-01-11).

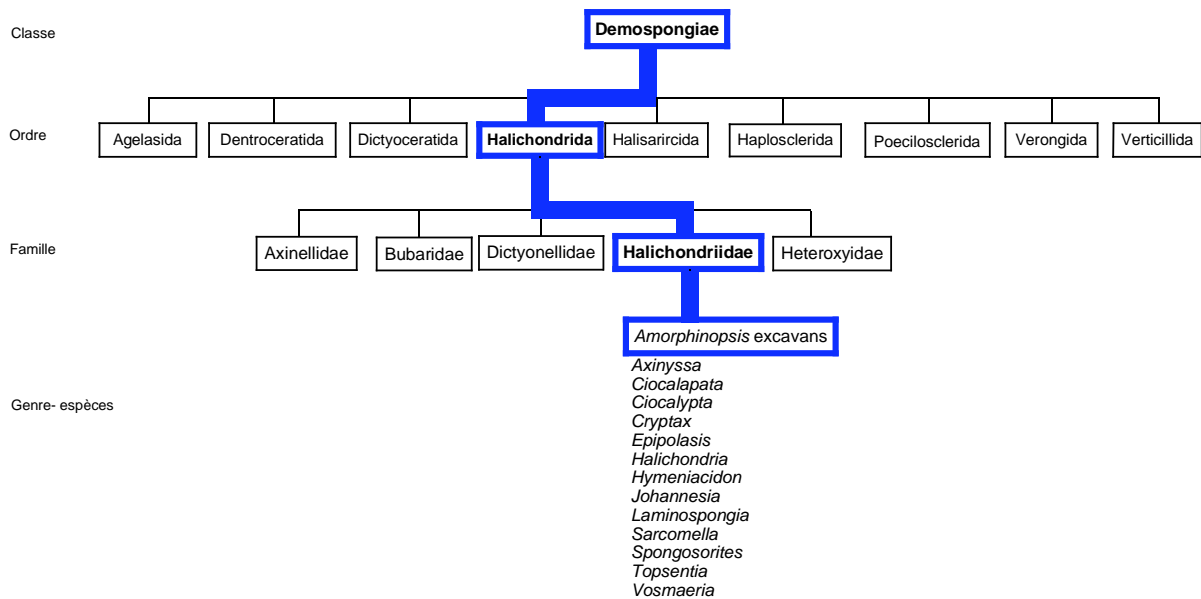


Figure 25 : Arbre phylogénétique d'*Amorphinopsis excavans*

I.1. Travaux antérieurs sur le genre *Amorphinopsis*

Sur le plan chimique, aucune étude de l'éponge *Amorphinopsis excavans* n'a été réalisée auparavant. C'est un genre qui est intéressant car une seule espèce (*Amorphinopsis foetida*) a fait l'objet d'études publiées en 1998 et rapportant l'isolement de sesquiterpènes azotés (39-43).⁶³

⁶³ Wegerski, C. J.; Sonnenschein, R. N.; Cabriales, F.; Valeriote, F. A.; Maitainaho, T.; Crews, P. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10393-10399.

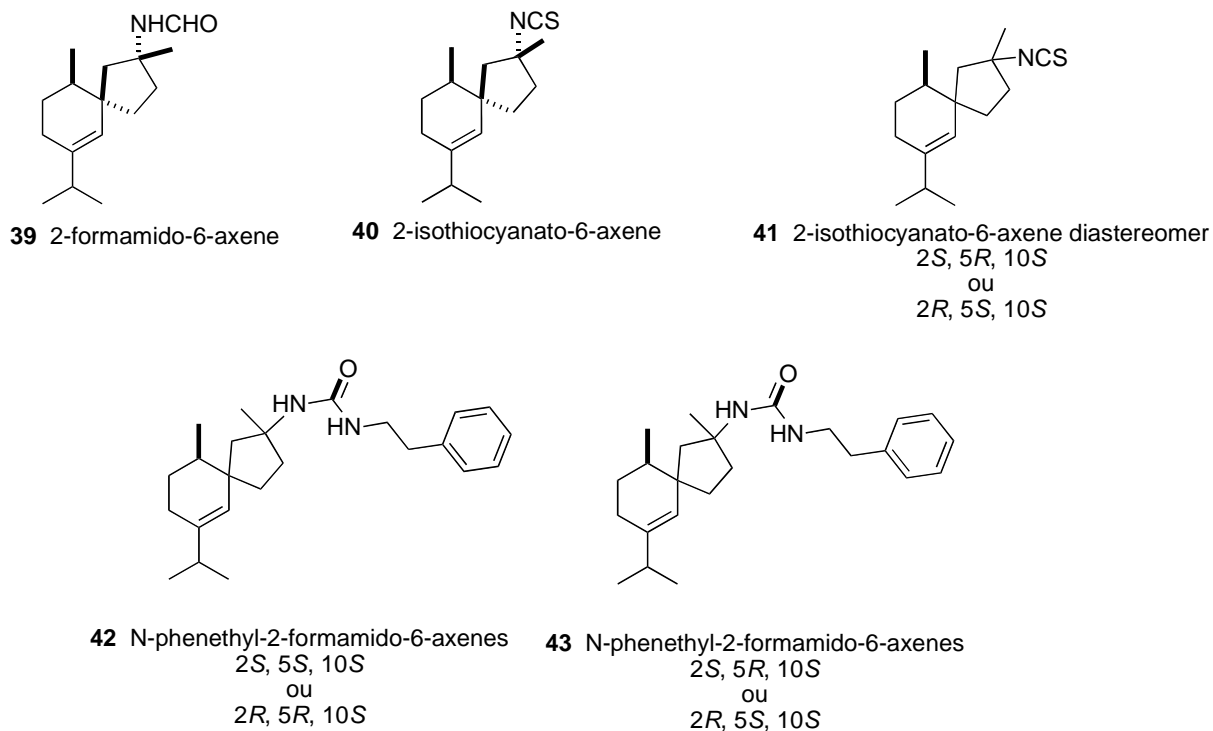


Figure 26 : Sesquiterpènes azotés (39-43)

Les molécules (39-43) ont montré une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire leucémique (L1210).⁶³

II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce *Amorphinopsis excavans*

Ce spécimen a été collecté en Nouvelle-Géorgie aux îles Salomon en juillet 2004. Un échantillon de référence est conservé au Queensland Museum sous la référence G324336.



Photo 2 : Photos *ex-situ* et *in-situ* d'*Amorphinopsis excavans* (photographe : Eric Folcher, IRD, Nouméa)

II.1. Extraction, fractionnement et purification

L'éponge lyophilisée (95,5 g) a été placée dans un extracteur Dionex puis extraite sous pression au méthanol (3 extractions successives par 1 L puis 2 x 350 mL). Les extraits méthanoliques ont été rassemblés puis évaporés pour fournir 25,2 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été partitionné à l'aide d'un mélange d'eau (150 mL) et de dichlorométhane (3 x 100 mL). Les phases organiques rassemblées puis évaporées fournissent 398,6 mg d'extrait dichlorométhanique brut (extrait A). La phase aqueuse lyophilisée fournit 20,1 g d'extrait aqueux (extrait B). Ce dernier, repris par du méthanol puis filtré, permet d'obtenir 15,7 g d'extrait méthanolique (extrait C) et 7,0 g d'insoluble (extrait D) (schéma 4).

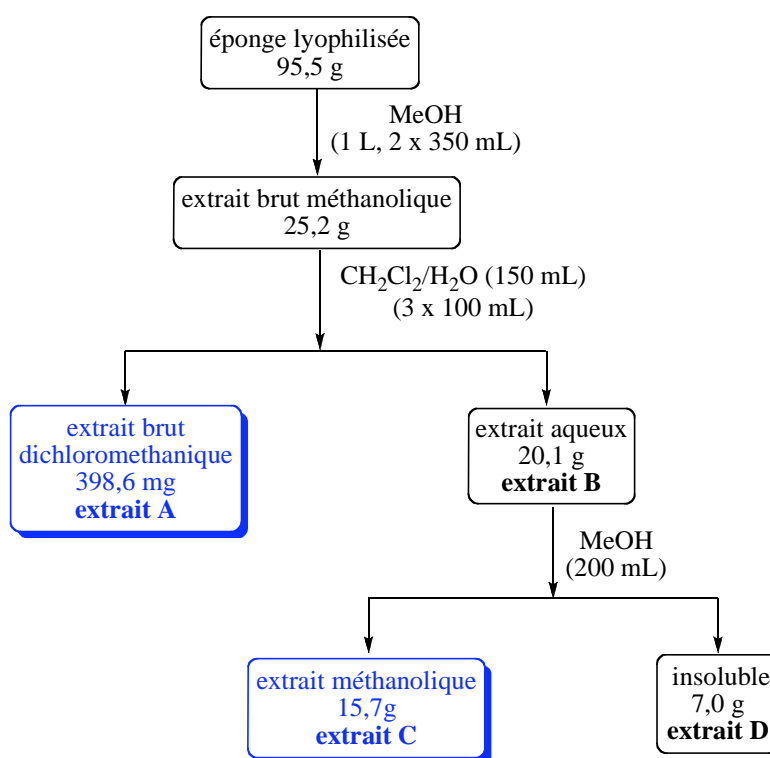


Schéma 4 : Schéma d'extraction de l'éponge *Amorphinopsis excavans*

Les extraits sont ensuite traités séparément par des méthodes chromatographiques classiques, permettant de sélectionner les extraits A et C pour les études ultérieures.

L'extrait dichlorométhanique (extrait A) (398,6 mg) est chromatographié sur colonne de silice et élué à l'aide des mélanges successifs Heptane/AcOEt (100/0 à 0/100) et AcOEt/MeOH (100/0 à 0/100), comme indiqué sur le schéma 5. Les spectres RMN ^1H des fractions obtenues indiquent la présence de stérols, de triglycérides et d'acides gras.

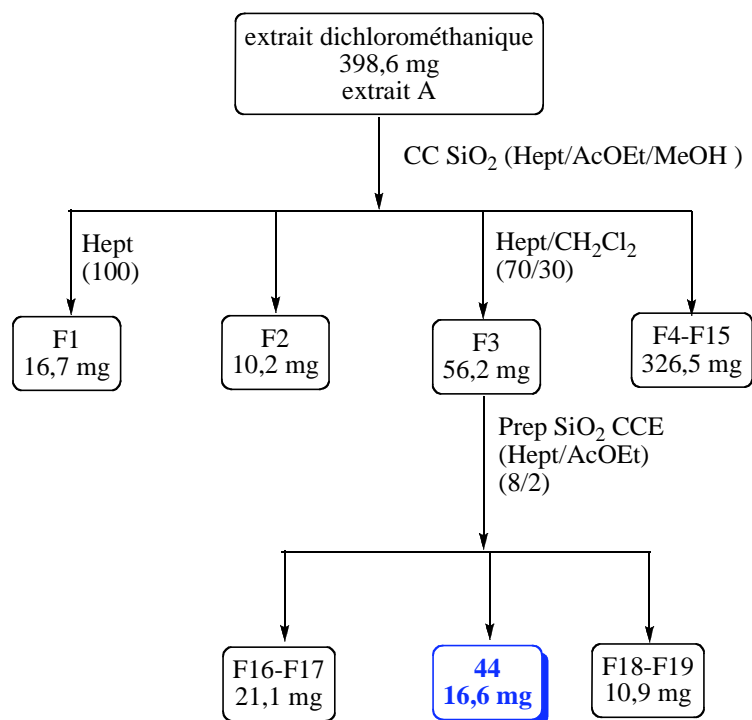


Schéma 5 : Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique

Cet extrait dichlorométhanique est pauvre en métabolites. Seule la structure de produit **44** (16,6 mg) sera détaillée au paragraphe II.2.

II.1.1. Étude de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique (extrait C) (15,7 g) est chromatographié sur colonne de silice et élué par un gradient de MeOH dans le CH₂Cl₂, comme indiqué sur le schéma 6. Les fractions sélectionnées après analyse (RMN et des méthodes chromatographiques classiques) sont purifiées par HPLC pour obtenir huit produits **45-52** purs dont les structures sont analysées dans les paragraphes suivants.

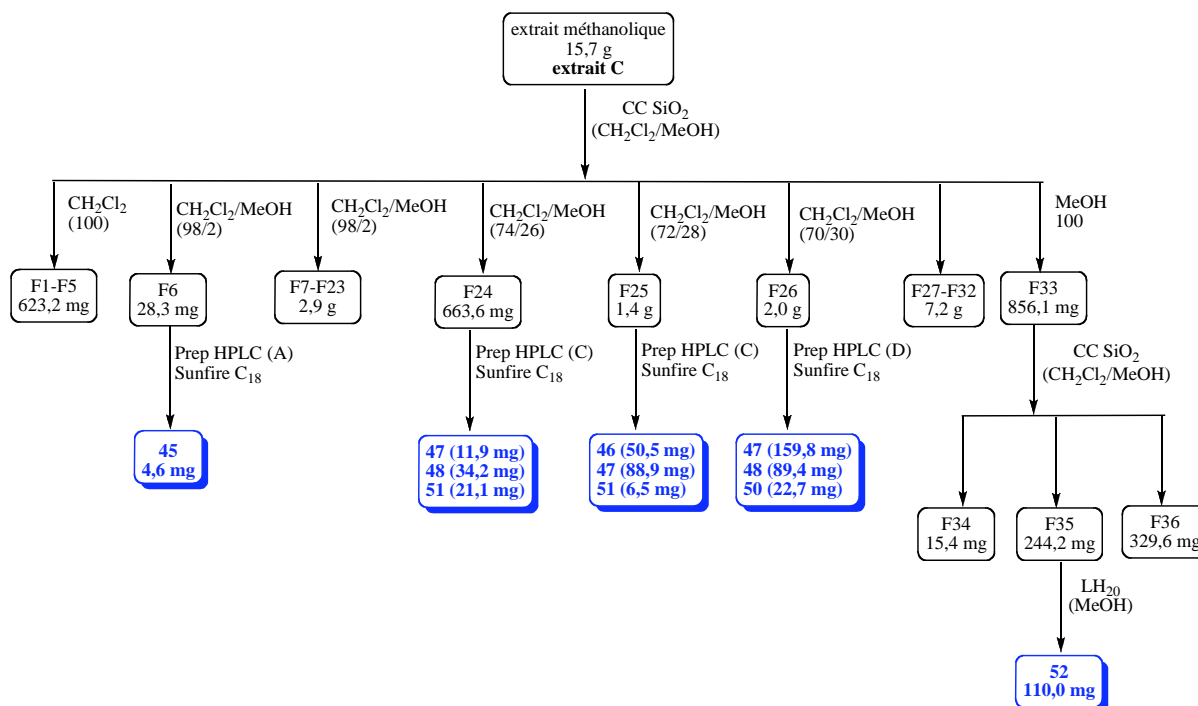


Schéma 6 : Fractionnement de l'extrait méthanolique (extrait C)

II.2. Élucidations structurales des composés isolés

L'analyse préliminaire des premiers chromatogrammes LC-MS et des spectres RMN du proton, comparés à la littérature, permet de dégager les premiers éléments structuraux.

II.2.1. Structure du composé 44

Le spectre de masse ESI du composé **44**, enregistré en mode positif présente de pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 654,4$ $[M + H]^+$, soit une masse moléculaire égale à 653, correspondant à une formule brute $C_{41}H_{83}NO_4$ déterminée par le spectre de masse haute résolution (SMHR). L'analyse des spectres RMN ^{13}C et RMN 2D (COSY, HMQC et HMBC) du composé **44** met clairement en évidence la présence d'un céramide. La longueur de chaîne acyle du composé **44** est déterminée par l'interprétation des fragmentations en spectrométrie de masse. Les fragments à $m/z = 281$ et 355 correspondent aux fragments **X** et **Y** respectivement (figure 27).

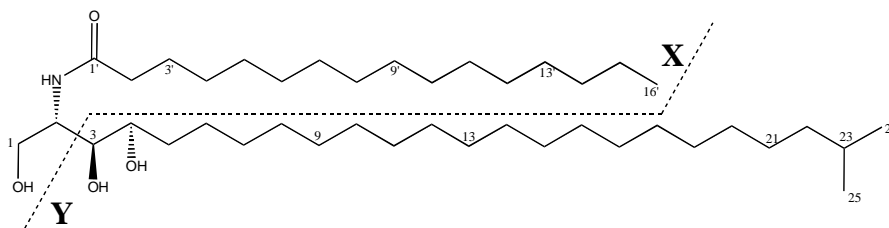


Figure 27 : Fragments principaux du composé **44**

Ces données permettent de proposer la structure ci-dessus (figure 27) pour le composé **44**, identique au céramide anti-épileptique isolé de l'éponge *Negombata corticata*.⁶⁴ Le pouvoir rotatoire de **44** est : $[\alpha]_D^{28} +15,5$ ($c = 0,5$, MeOH) ; $[\alpha]_D^{25}$ litt. $+11,1$ ($c = 1,00$, MeOH) .

II.2.2. Structure du composé **45**

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C du composé **45** sont relativement simples. L'analyse de masse ESI montre la présence d'un pic à 660,0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) qui indique que la simplicité des spectres RMN est probablement due à une symétrie planaire ou axiale. On observe 18 protons attribuables à de groupements *tert*-butyl, 3 protons aromatiques d'un système ortho-para trisubstitué ainsi que 8 protons de méthyléniques porteur d'un hétéroatome. Les recherches bibliographiques basées sur ces éléments et l'analyse en spectrométrie de masse haute résolution dont le m/z indique la formule brute $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_8\text{P}_2$, nous a orienté vers le composé **45** décrit dans la littérature.

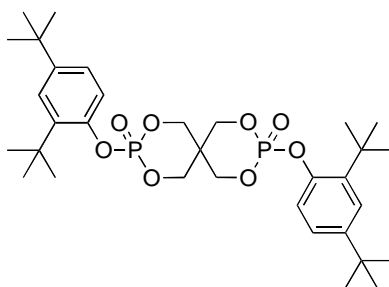


Figure 28 : Alkanox P24 (**45**)

Le composé **45**, connu sous le nom d'Alkanox P24, est un antioxydant commercial de phosphite, bien connu pour son excellente stabilité.⁶⁵ La présence de cette molécule peut-être

⁶⁴ Ahmed, S. A.; Khalifa, S. I.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 513-515.

⁶⁵ Papanastasiou, M.; McMahan, A. W.; Allen, N. S.; Doyle, A. M.; Johnson, B. J.; Keck-Antoine, K. *Polym. Degrad. Stabil.* **2006**, *91*, 2675-2682.

expliquée par une contamination des solvants utilisés pendant les étapes de purification. Une contamination par des débris de peinture pendant le traitement de l'éponge sur le bateau est également envisageable. On ne peut pas exclure non plus la présence du polluant dans la mer alors accumulée par les éponges. L'Alkanox est utilisé dans la peinture pour rendre la couleur plus intense et comme antioxydant de polymères.

La famille des molécules **46-51** a montré des spectres très similaires. Les analyses en LCMS et en RMN du proton nous ont orienté vers des produits de type saponosides. Les sarasinosides⁶⁶ dont quelques dérivés ont été trouvés dans le milieu marin présentent des spectres RMN similaires aux produits **46-51** que nous avons isolés. Cependant, la complexité de leurs spectres RMN et le manque de données précises dans la littérature nous ont souvent contraints à une étude approfondie avant de mettre à jour les structures de ces produits et de les situer par rapport à celles déjà décrites.

II.2.3. Sarasinoside B₁ (47)

Les spectres de masse ESI du composé **47** montrent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 1281,6 [M + Na]^+$ et $1257,5 [M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 1258. Une analyse du SMHR permet de déterminer la formule brute C₆₁H₉₈N₂O₂₅ pour ce composé.

Le spectre RMN ¹³C (figure 29) du composé **47** est identique à celui du sarasinoside B₁ connu dans la littérature.⁶⁷ En effet, on retrouve tous les signaux de la génine et des 5 unités osidiques..

⁶⁶ Kobayashi, M.; Okamoto, Y.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2867 - 2877.

⁶⁷ Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Okamoto, Y.; Yoshikawa, M.; Hamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 5036-5039.

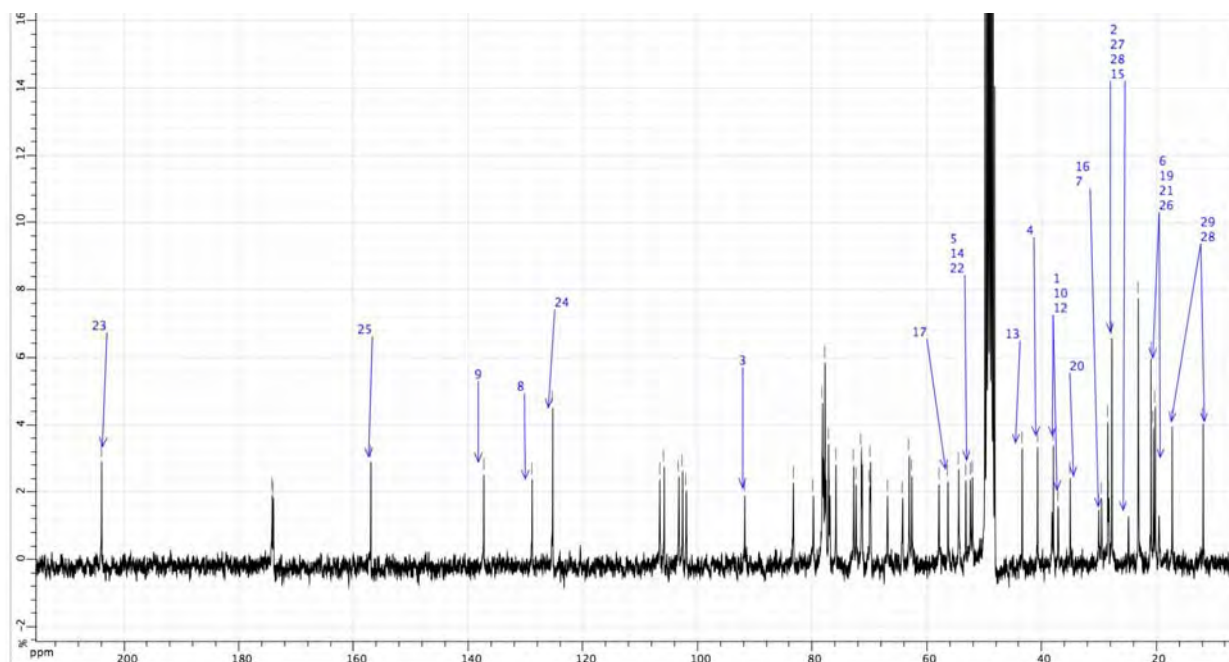


Figure 29 : Spectre RMN ^{13}C du composé **47** (CD_3OD , 75,4 MHz, 299,1 K)

L'attribution des déplacements chimiques des carbones (tableau 5) constituant la génine, a été établie par les expériences COSY, HSQC et HMBC. Cette analyse complète et la comparaison avec les données de la littérature⁶⁷ ont permis d'identifier le 3 β -hydroxy-4,4-diméthylcholesta-8,24-diène-23-one (**47**) (figure 30).

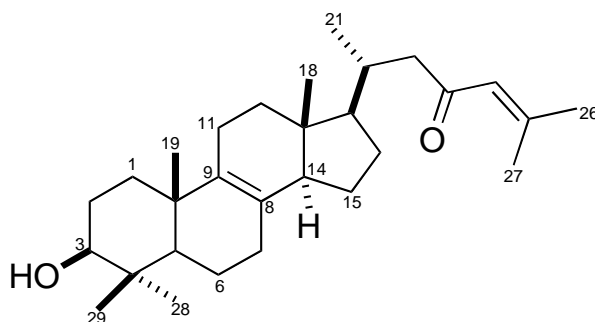


Figure 30 : Structure terpénique du composé **47**

Le spectre RMN ^1H (figure 31) montre des signaux de cinq protons anomériques résonnant à 4,95, 4,75 (masqué par le pic de l'eau mais confirmé par HSQC), 4,54, 4,44, 4,23 ppm, ainsi que sept méthyles résonnant entre 0,59 et 2,04 ppm. On identifie aussi deux signaux de protons à 2,47 (d 13,4 Hz, H22) et 6,10 (s, H24) ppm indiquant la présence d'une saponine triterpénique.

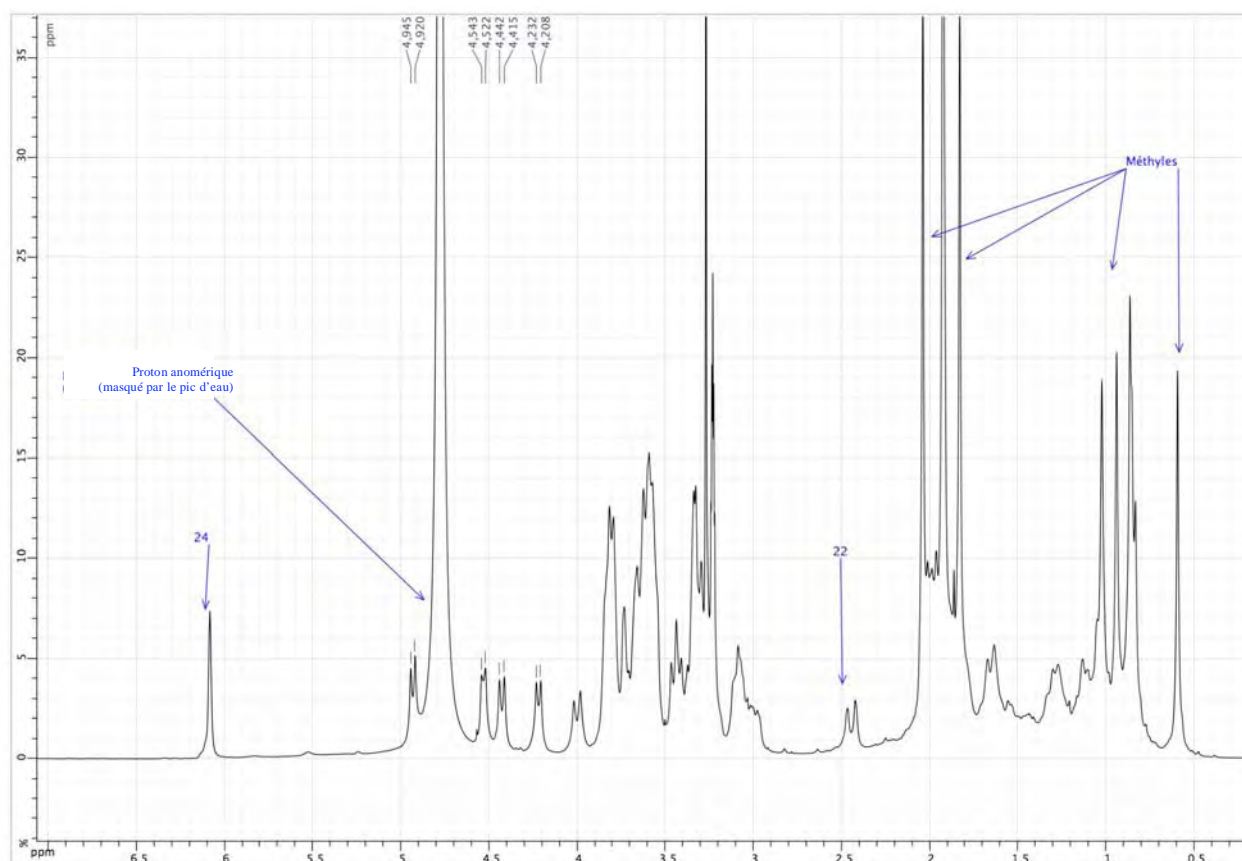


Figure 31 : Spectre RMN ^1H du composé **47** (CD_3OD , 300 MHz, 298,3 K)

Les points de branchements des sucres ont été déterminés par une expérience HMBC, confirmant ainsi que le composé **47**.

L'hydrolyse acide du composé **47** permet d'identifier les sucres : le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acétyl-2-amino-glucose et le D-N-acétyl-2-amino-galactose.

Les données spectrales confirment la structure ci-dessous (figure 32) pour le composé **47** dont le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -14,5^\circ$ ($c = 0,5$; MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ litt.⁶⁸ $-14,0^\circ$ ($c = 1,0$; MeOH). Cette saponine est identique au sarasinoside B₁ isolée de l'éponge *Asteropus sarasinusum*.⁶⁸

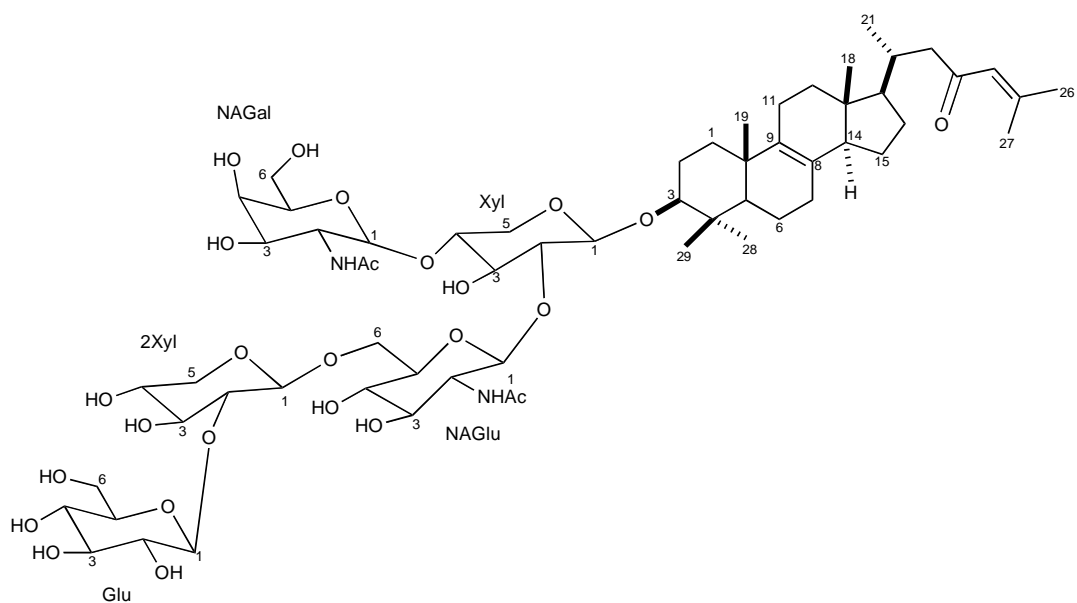


Figure 32 : Sarasinoside B₁ (**47**)

Le composé **47** a été nommé β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acétyl-2-amino-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acétyl-2-amino-galactopyranosyl]4,4-diméthylcholesta-8,24-dien-23-one. Cette molécule a montré des activités d'ichtyo-toxicité contre *Poecilia reticulata* et d'inhibition du développement des ovules d'étoile de mer.⁶⁸

| | Génine | | Sucres | |
|-----|----------------------------------|-----------------|----------------|---|
| | ¹ H | ¹³ C | ¹ H | ¹³ C |
| 1a | 1,69-1,72 (m, 1H) | 37,9 | Xyl-1 | 4,23 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H) 106,5 |
| 1b | 1,21-1,24 (m, 1H) | | Xyl-2 | 3,85-3,87 (m, 1H) 78,2 |
| 2 | 1,82-1,85 (m, 2H) | 28,5 | Xyl-3 | 3,50-3,54 (m, 1H) 76,9 |
| 3 | 3,30 (m, 1H) | 91,8 | Xyl-4 | 3,69-3,74 (m, 1H) 79,9 |
| 4 | - | 40,7 | Xyl-5 | 3,13-3,15 (m, 2H) 64,3 |
| 5 | 1,05-1,10 (m, 1H) | 52,1 | NAGlu-1 | 4,75 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H) 101,9 |
| 6a | 1,70-1,73 (m, 1H) | 20,3 | NAGlu-2 | 3,64-3,71 (m, 1H) 57,9 |
| 6b | 1,49-1,52 (m, 1H) | | NAGlu-3 | 3,41-3,45 (m, 1H) 75,9 |
| 7 | | 29,6 | NAGlu-4 | 3,18-3,21 (m, 1H) 72,4 |
| 8 | - | 128,9 | NAGlu-5 | 3,66-3,70 (m, 1H) 72,4 |
| 9 | - | 137,3 | NAGlu-6 | 4,05-4,10 (m, 1H) 70,0 |
| 10 | - | 38,0 | NAGlu-Ac | 3,71-3,75 (m, 1H) 1,94 (s, 3H) 23,2*, 174,2 |
| 11 | nd | 23,2 | 2Xyl-1 | 4,95 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H) 103,3 |
| 12a | 1,89-1,90 (m, 1H) | 40,7 | 2Xyl-2 | 3,36-3,42 (m, 1H) 83,3 |
| 12b | 1,37-1,42 (m, 1H) | | 2Xyl-3 | 3,62-3,67 (m, 1H) 77,8 |
| 13 | - | 43,4 | 2Xyl-4 | 3,49-3,55 (m, 1H) 71,3 |
| 14 | 2,01-2,09 (m, 1H) | 53,3 | 2Xyl-5 | 3,60-3,69 (m, 2H) 66,9 |
| 15a | 1,57-1,60 (m, 1H) | 24,9 | Glu-1 | 4,54 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 1H) 105,8 |
| 15b | 1,30-1,33 (m, 1H) | | Glu-2 | 3,42-3,47 (m, 1H) 75,9 |
| 16 | 1,30-1,35 (m, 2H) | 30,2 | Glu-3 | 3,35-3,39 (m, 1H) 78,1 |
| 17 | 1,20-1,24 (m, 1H) | 56,4 | Glu-4 | 3,33-3,35 (m, 1H) 71,4 |
| 18 | 0,61 (s, 3H) | 11,9 | Glu-5 | 3,33-3,35 (m, 1H) 78,2 |
| 19 | 1,04 (s, 3H) | 20,5 | Glu-6 | 3,71-3,74 (m, 2H) 62,7 |
| 20 | 1,94-2,00 (m, 1H) | 35,1 | NAGal-1 | 4,44 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H) 102,7 |
| 21 | 0,96 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H) | 20,3 | NAGal-2 | 3,87-3,92 (m, 1H) 54,5 |
| 22a | 2,47 (d, <i>J</i> = 13,4 Hz, 1H) | 52,5 | NAGal-3 | 3,65-3,70 (m, 1H) 72,8 |
| 22b | nd | | NAGal-4 | 3,84 (m, 1H) 70,02 |
| 23 | - | 203,97 | NAGal-5 | nd nd |
| 24 | 6,10 (s, 1H) | 125,31 | NAGal-6 | 3,85-3,90 (m, 2H) 63,15 |
| 25 | - | 157,02 | NAGal-Ac | 1,94 (s, 3H) 23,20*, 174,29 |
| 26 | 2,06 (s, 3H) | 20,98 | | |
| 27 | 1,85 (s, 3H) | 27,80 | | |
| 28 | 1,01 (s, 3H) | 25,63 | | |
| 29 | 0,85 (s, 3H) | 17,28 | | |

nd : non détecté ; * : carbones échangeables

Tableau 5 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **47** (CD₃OD, 300 MHz)

II.2.4. Composé 46

Comme pour le composé **47** décrit précédemment, les spectres de masse ESI de **46**, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z =$

1281,6 $[M + Na]^+$, 1293,5 $[M + Cl]^-$ et 1257,5 $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire de 1258. Une analyse en SMHR indique la formule brute en $C_{61}H_{98}N_2O_{25}$.

Le spectre RMN 1H (figure 33) du composé **46** est très proche de celui du composé **47** (le sarasinoside B₁) En effet, on retrouve tous les signaux de la génine et des 5 unités osidiques. La seule différence notable avec le composé **46** se situe au niveau des unités osidiques.

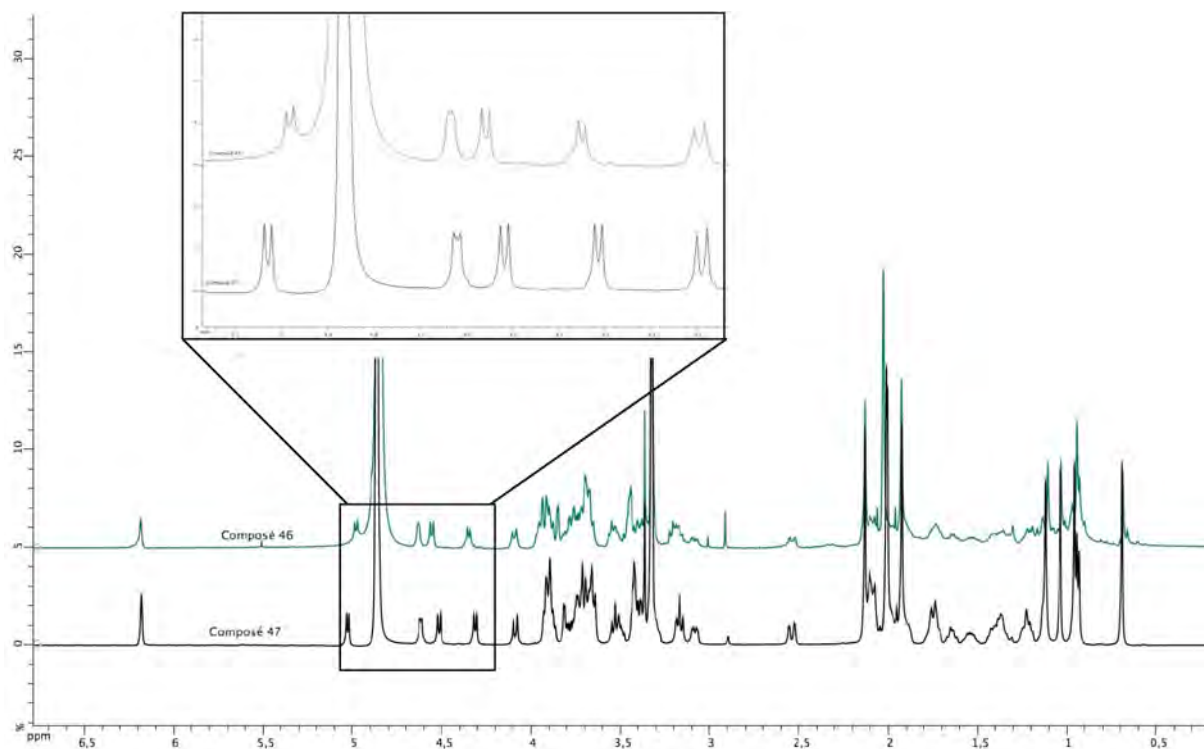


Figure 33 : Comparaisons des spectres de RMN 1H du sarasinoside B₁ et du composé **46**

En raison de cette différence, une étude structurale complète a été faite pour distinguer ces deux molécules (composés **46** et **47**).

Le spectre RMN 1H (figure 34) indique la présence de fragments glycosidiques. Nous observons :

- plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm caractéristiques de protons osidiques dont la forte densité suggère la présence de plusieurs sucres.
- des signaux résonnant chacun sous forme de doublets caractéristiques des protons anomériques de sucres.
- la comparaison des spectres RMN avec ceux des sarasinosides connus dans la littérature montre une grande similarité.

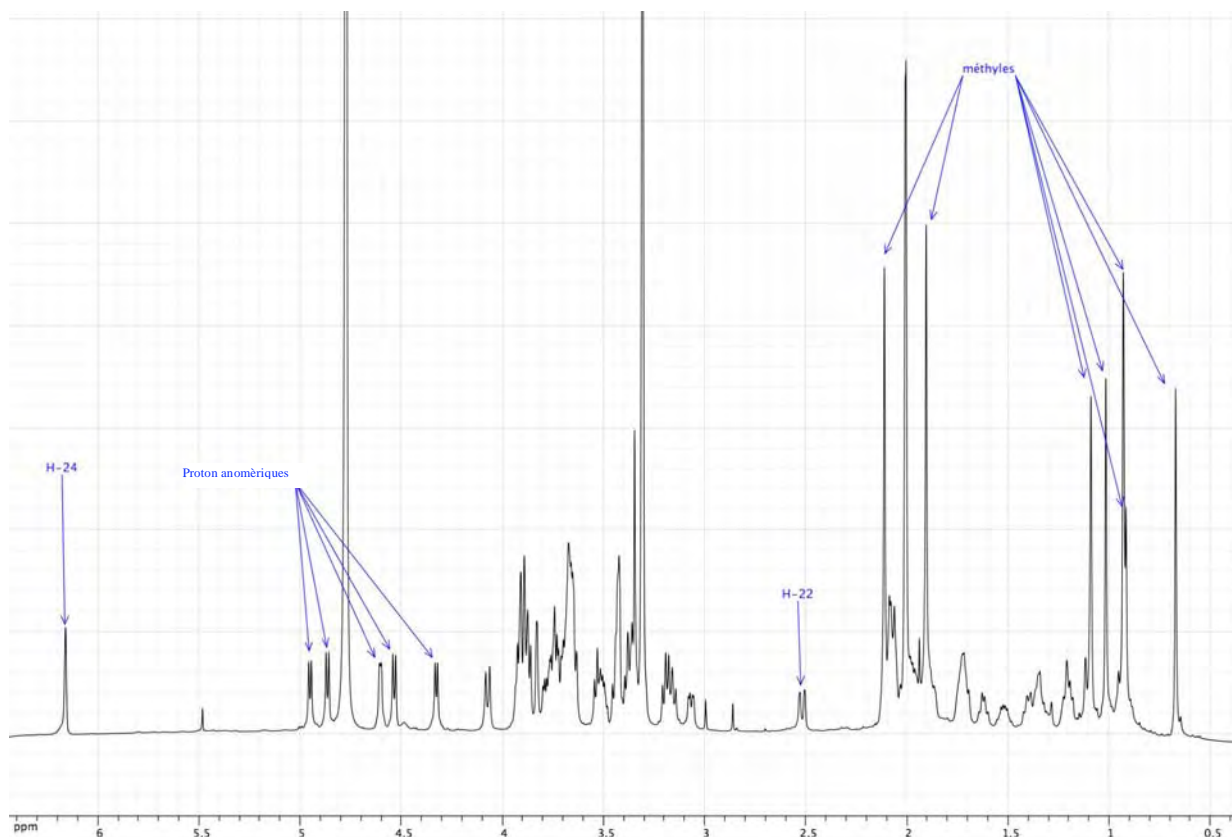


Figure 34 : Spectre RMH ^1H du composé **46** (CD_3OD , 600 MHz, 305 K)

On observe six singulets et un doublet entre 0,67 et 2,11 ppm qui intègrent pour trois protons chacun. Nous les avons attribués à des groupements méthyles. Deux signaux à 2,50 (dd, $J = 14,7$ et $1,7$ Hz, H22) et 6,15 ppm (s, H24) indiquent qu'on est en présence d'un carbonyle α et β insaturé d'une saponine triterpénique. Le spectre RMN ^{13}C (figure 35) en apporte la confirmation à travers les sept signaux méthyliques résonnants entre 12,0 à 27,8 ppm et les cinq signaux C-H vers 100 ppm des carbones anomériques de sucres. Toutes ces données permettent de déduire que le composé **46** est constitué d'une génine triterpénique porteuse d'une chaîne de cinq unités osidiques. L'expérience HMBC (figure 36) permet d'attribuer une bonne partie des carbones de la génine par observation de leur couplage en 2J et 3J avec les protons des méthyles. Chacun corrèle avec quatre carbones voisins constituant ainsi le socle de la base carbonée qui les porte. Le méthyle-29 résonant à 0,93 ppm couple avec le carbone quaternaire C4 (40,8 ppm), le carbone C3 (91,9 ppm), le carbone C28 (28,6 ppm) et le carbone C5 (52,2 ppm) qui corrèle aussi avec les protons méthyliques en 28 et 19.

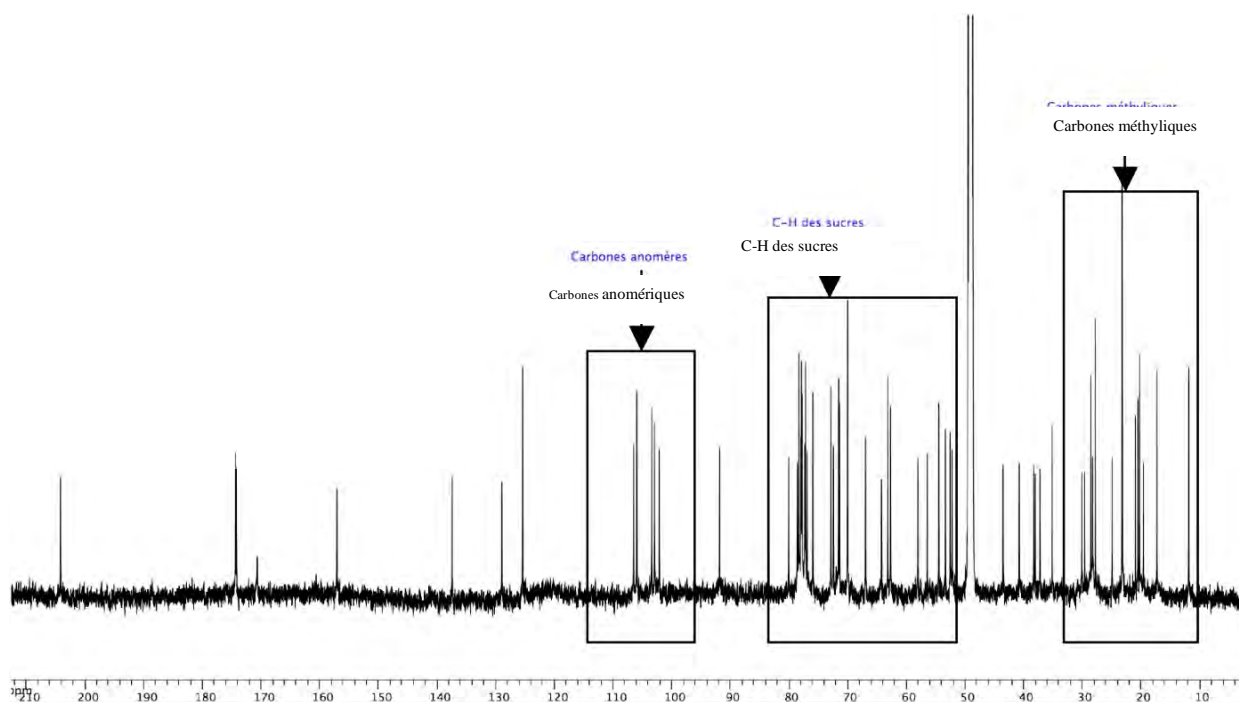


Figure 35 : RMN ^{13}C du composé 46 (CD_3OD , 158,8 MHz, 298 K)

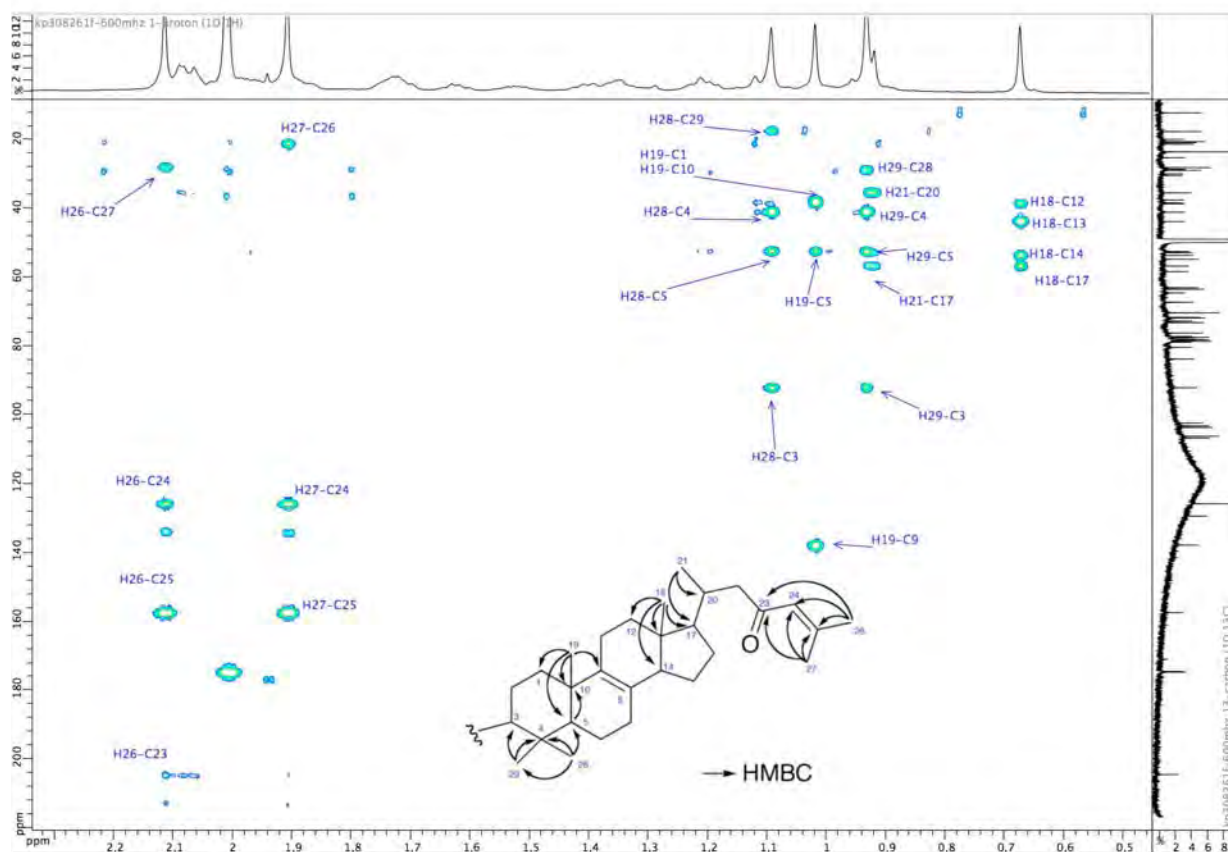


Figure 36 : Spectre HMBC du composé 46 mettant en évidence les corrélations des méthyles (CD_3OD , 600MHz, 304,7 K)

Le méthyle-28 qui résonne à 1,09 ppm couple avec le carbone quaternaire C4 (40,8 ppm), le carbone C3 (91,9 ppm), le carbone C29 (17,4 ppm) et le carbone C5 (52,2 ppm) qui corrélient aussi avec les protons méthyliques en 29 et 19 (figure 37).

Les protons méthyliques en 19 couplent avec les carbones C1 (37,3 ppm), C10 (38,1 ppm) et C5 (52,2 ppm). H5 résonne à 1,02 ppm (identifié par expérience HSQC) et montre un couplage (sur le spectre HMBC) avec un carbone à 137,5 ppm qui est attribué au C9, confirmant ainsi la localisation de la double liaison en C8-C9. Le méthyle-18 couple avec les carbones C12 (38,4 ppm), C13 (43,6 ppm), C14 (53,4 ppm) et C17 (56,2 ppm). Le méthyle-21 qui résonne à 0,92 ppm couple avec le carbone C17 déjà identifié et le carbone C20 (35,2 ppm).

Les protons des méthyles 26 et 27 résonnent à 1,91 et 2,11 ppm et couplent avec les carbones C24 (125,4 ppm), C25 (157,1 ppm) et C23 (204,2 ppm).

Le proton H5 (1,02 ppm) déterminé par une expérience HSQC, montre sur le spectre HMBC trois corrélations avec les carbones C1, C4, et C10. Le même proton (H5) montre un couplage COSY avec les protons H6, eux-mêmes couplant avec les protons H7. De la même manière, le carbone C2 (28,3 ppm) a été attribué par HSQC grâce à un couplage direct avec les protons H2 (1,86 – 1,89 ppm), eux-mêmes caractérisés par une expérience COSY grâce couplage qu'ils présentent avec les protons H1 (1,20-1,22 ppm) et H3 (3,05 ppm) (figure 37).

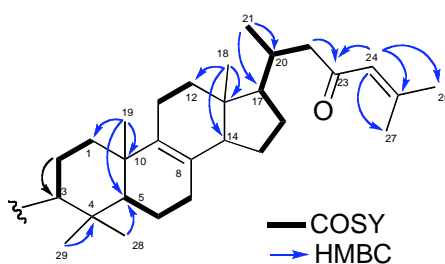


Figure 37 : Corrélations COSY et HMBC

L'expérience COSY montre les corrélations des protons H15 à H22 et l'expérience HMBC montre les corrélations du carbone C23 (204,2 ppm) avec deux protons résonant à 2,50 ppm (dd, $J = 14,70$ et $1,70$ Hz) et 6,15 ppm (s) attribués aux protons H22 et H24. Le proton H24

résonant à 6,15 ppm montre également des corrélations avec les carbones C23, C25, C26 et C27 (figure 37).

La stéréochimie relative de ce composé est établie par analyse du spectre NOESY, ce dernier montre des corrélations entre les protons H3/H1 et H5 ; H5/H28 ; H7/H14 ; H14/H12 et H17 et H17/H21 et les corrélations entre les protons H29/H19 ; H19/H18 et H18/H20 (figure 38).

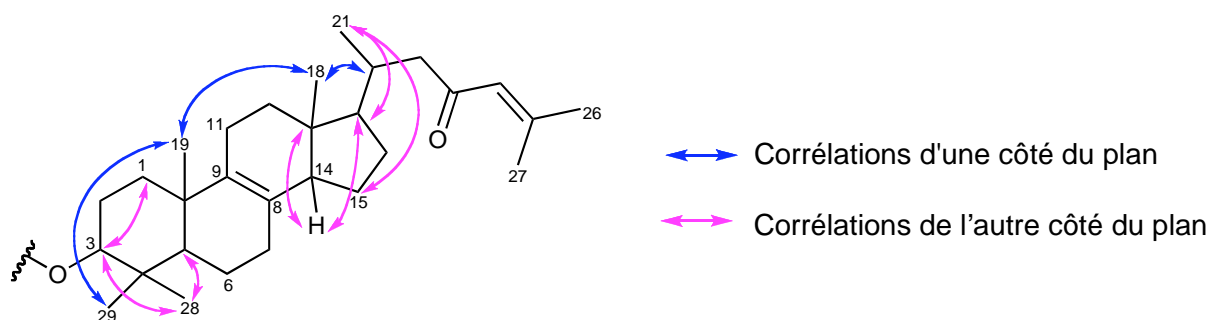


Figure 38 : Les corrélations clé observées en NOESY

Cette analyse complète a permis d'identifier le 3 β -hydroxy-4,4-diméthylcholesta-8,24-dien-23-one correspondant à l'aglycone (figure 39).

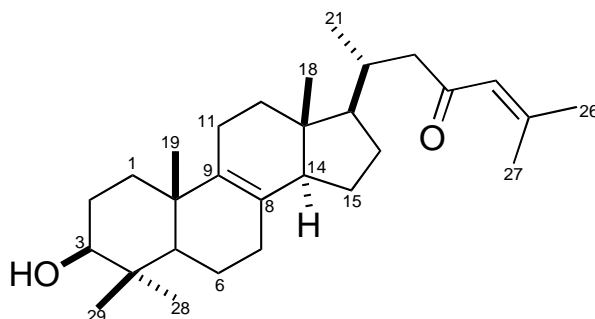


Figure 39: Structure terpénique du composé 46

Le composé 46 porte également 5 unités osidiques attachées au carbone C3 (identifiées par HMBC). Il reste à identifier la nature ainsi que les points de branchement entre les oses. C'est justement ce dernier point qui constitue la grande complexité de l'élucidation structurale des saponines : la combinaison des dégradations chimiques afin d'identifier la nature des sucres, et l'analyse spectroscopique ont été nécessaires.

Le spectre MS/MS (figure 40) du pic pseudo-moléculaire, enregistré en mode positif, montre la perte successive des sucres : (i) les fragments à $m/z = 1078 [M - 203 + Na]^+$ et $916 [M -$

$162 + \text{Na}]^+$ correspondent à la perte des deux sucres terminaux : le N-acétyl osamine et l'hexose ; (ii) le fragment à m/z 784 $[\text{M} - 203 - 162 - 132 + \text{Na}]^+$ correspond à la perte du N-acétyl osamine, de l'hexose et du pentose et (iii) le fragment à m/z 581 $[\text{M} - 203 - 162 - 132 - 203 + \text{Na}]^+$ correspond à la perte du N-acétyl osamine, de l'hexose, du pentose et du N-acétyl osamine (figure 41).

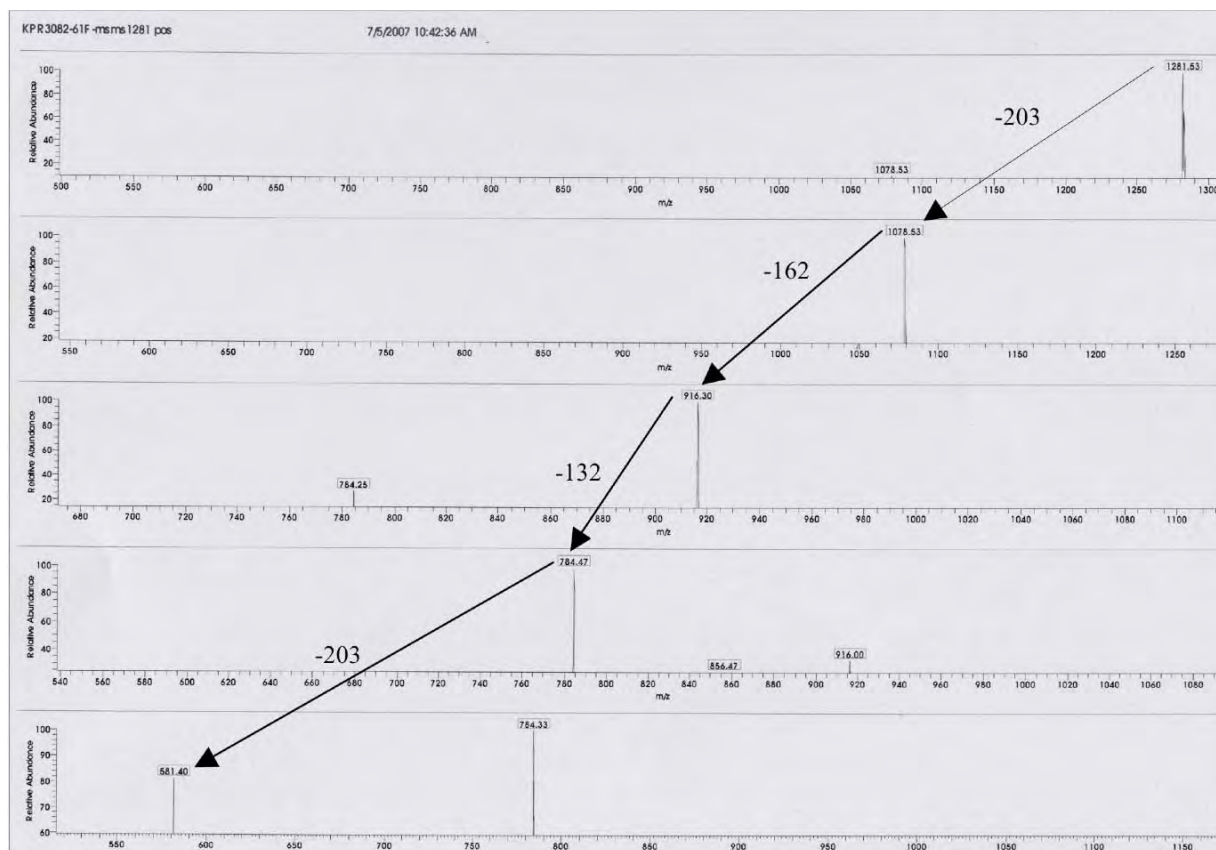


Figure 40 : Spectres de MS/MS (mode positif) du composé **46**

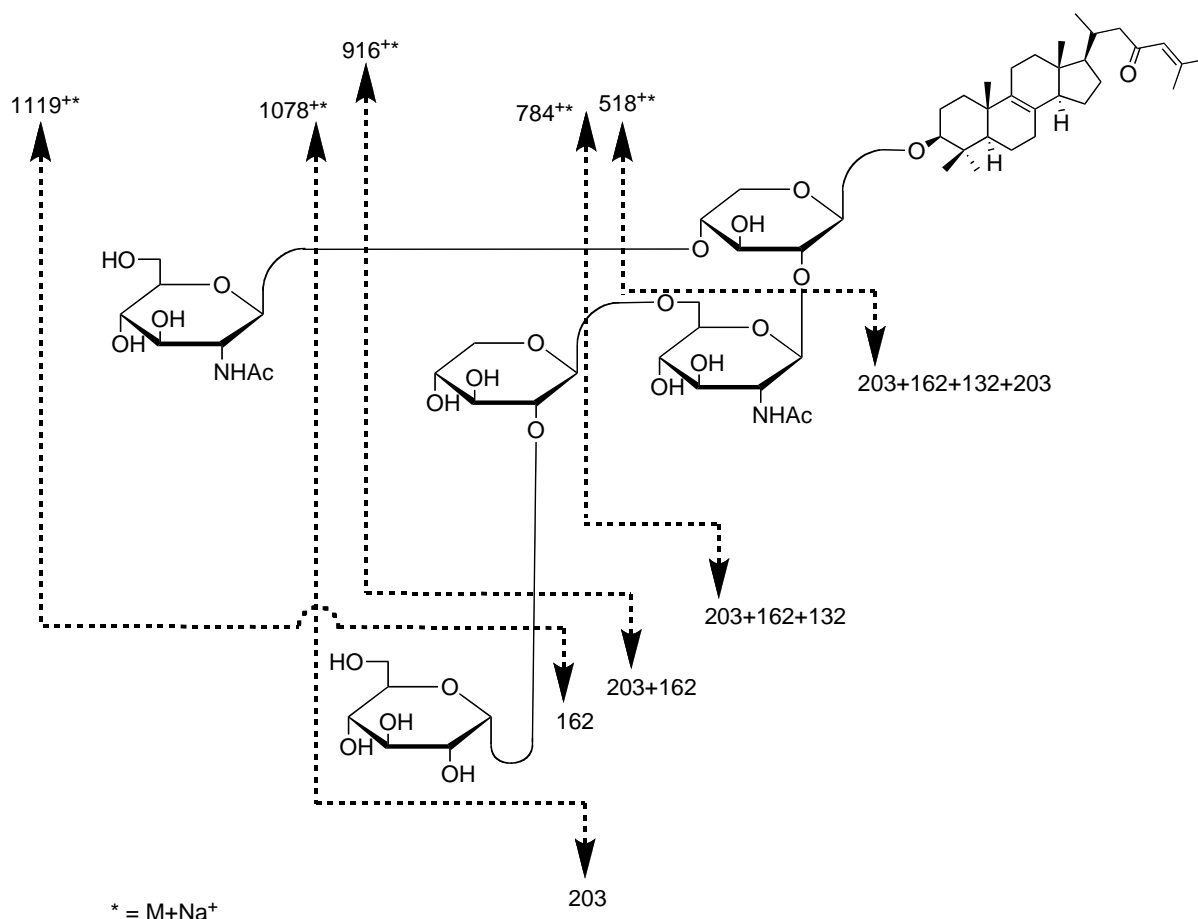


Figure 41 : Fragments principaux générés par la coupure des liaisons glycosidiques du composé **46**

En partant du proton anomérique résonant à 4,31 ppm, le spectre RMN COSY (figure 42) permet de mettre en évidence la présence d'un hexose. En effet, on repère les couplages entre les protons Xyl-1 et Xyl-2, Xyl-2 et Xyl-3, Xyl-3 et Xyl-4 et enfin Xyl-4 et Xyl-5. Les déplacements chimiques en RMN ¹³C des carbones Xyl-1, Xyl-2, Xyl-3, Xyl-4, Xyl-5 à δ_C 106,5 ; 78,7 ; 77,0 ; 80,1 et 64,3 ppm respectivement, sont caractéristiques d'un xylopyranose. Ce sucre est un xylose de configuration β déduite de la valeur de la constante de couplage $J_{1-2} = 7,4$ Hz.

En partant du second proton anomérique (NAGal-1) résonant à 4,53 ppm, on identifie un hexose de configuration β comme l'indique la valeur de la constante de couplage $J_{1-2} = 8,5$ Hz. Les déplacements chimiques RMN ¹³C des carbones sont caractéristiques d'un hexose (NAGal-1, NAGal-2, NAGal-3, NAGal-4, NAGal-5 et NAGal-6 respectivement à δ_C 103,1 ; 54,5 ; 72,9 ; 70,1, 77,9 et 63,1 ppm). Le déplacement chimique du carbone NAGal-2 (54,5

ppm) indique la présence d'un groupe N-acétyle qui a été confirmé par des analyses MS/MS et HBMC. Il s'agit d'un *N*-acétyl- β -galactosaminopyranose.

Le troisième sucre dont le proton anomérique (Glu-1) résonne à 4,59 ppm, identifié sur la base d'un couplage HSQC avec son carbone à 106,0 ppm, présente en COSY (figure 42) des corrélations entre Glu-1 et Glu-2, Glu-2 et Glu-3, Glu-3 et Glu-4 et enfin Glu-4 et Glu-5. Ce sucre est un glucopyranose. La configuration α ou β du carbone anomérique n'a pas pu être déterminée à l'aide de sa constante de couplage. Le signal correspondant ne se présente pas sous forme de doublet claire.

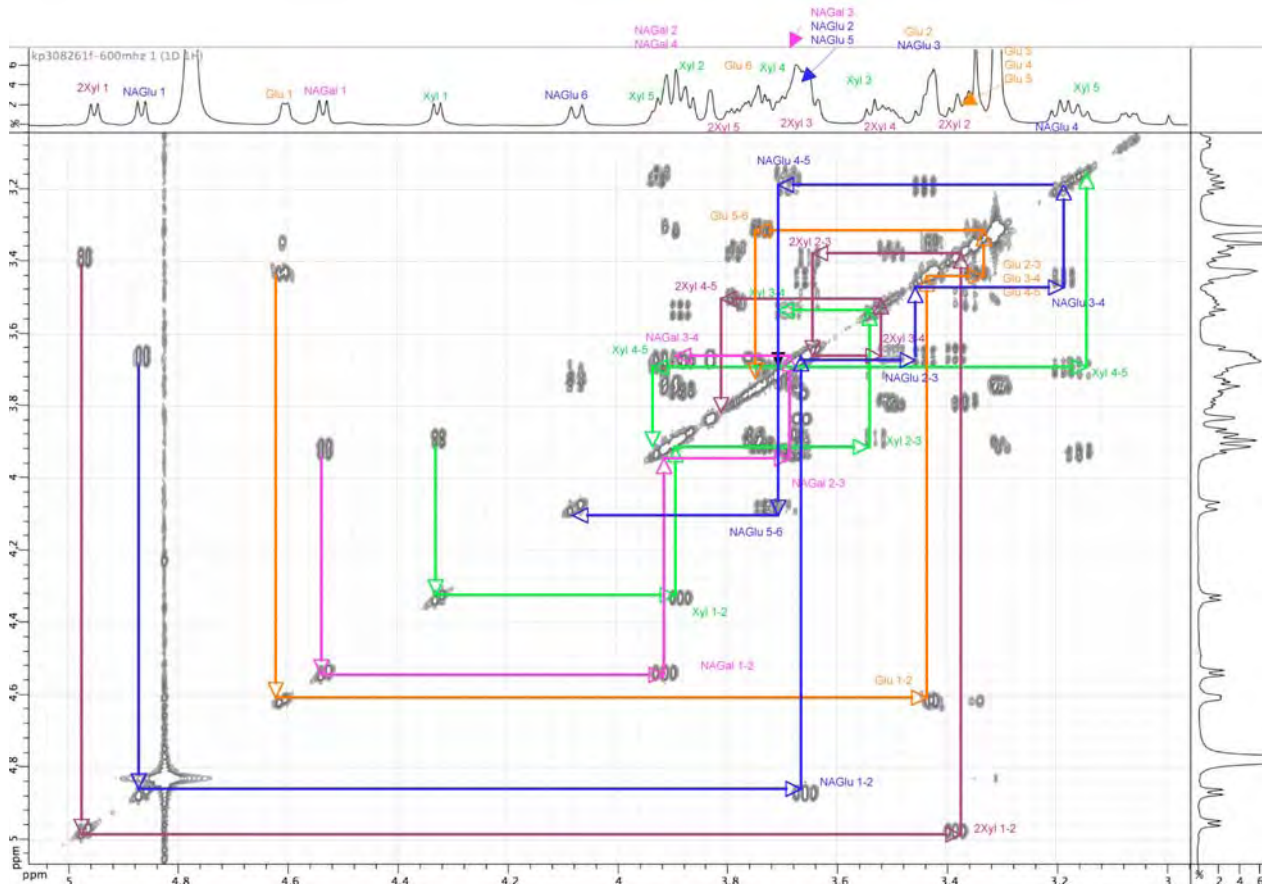


Figure 42 : Spectre COSY des sucres (CD₃OD, 600 MHz, 300 K)

En partant du proton anomérique (NAGlu-1) résonnant à 4,85 ppm, six protons correspondant à un hexose (figure 42) peuvent être corrélés. Un hexose de configuration β est ainsi identifié comme l'indique la valeur de la constante de couplage $J_{1-2} = 8,5$ Hz. Les déplacements chimiques RMN ¹³C dans la région des sucres en sont aussi caractéristiques : NAGlu-1, NAGlu-2, NAGlu-3, NAGlu-4, NAGlu-5 et NAGlu-6 respectivement à δ_C 102,2 ; 58,1 ; 76,0 ; 72,5 ; 72,2 et 70,1 ppm. De plus, le déplacement chimique du carbone NAGlu-2 (58,1

ppm) indique la présence d'un groupe N-acétyle, confirmée par des analyses MS/MS et HBMC. Il s'agit donc d'un *N*-acétyl- β -glucosaminopyranose.

Le proton anomérique (2Xyl-1) résonant à 4,93 ppm, identifié sur la base d'un couplage HSQC avec son carbone à 103,4 ppm, présente en COSY (figure 42) des corrélations similaires à celles observées pour un sucre déjà décrit précédemment. Il s'agit également d'un β -xylopyranose.

Une expérience TOCSY permet de mettre en évidence les corrélations entre un proton et les autres protons d'une même unité osidique. Cette technique de choix permet de repérer tous les couplages entre les protons d'un même système de spin, et cela à partir d'un proton « espion ». Le spectre TOCSY (figure 43) confirme parfaitement l'identification établie par COSY.

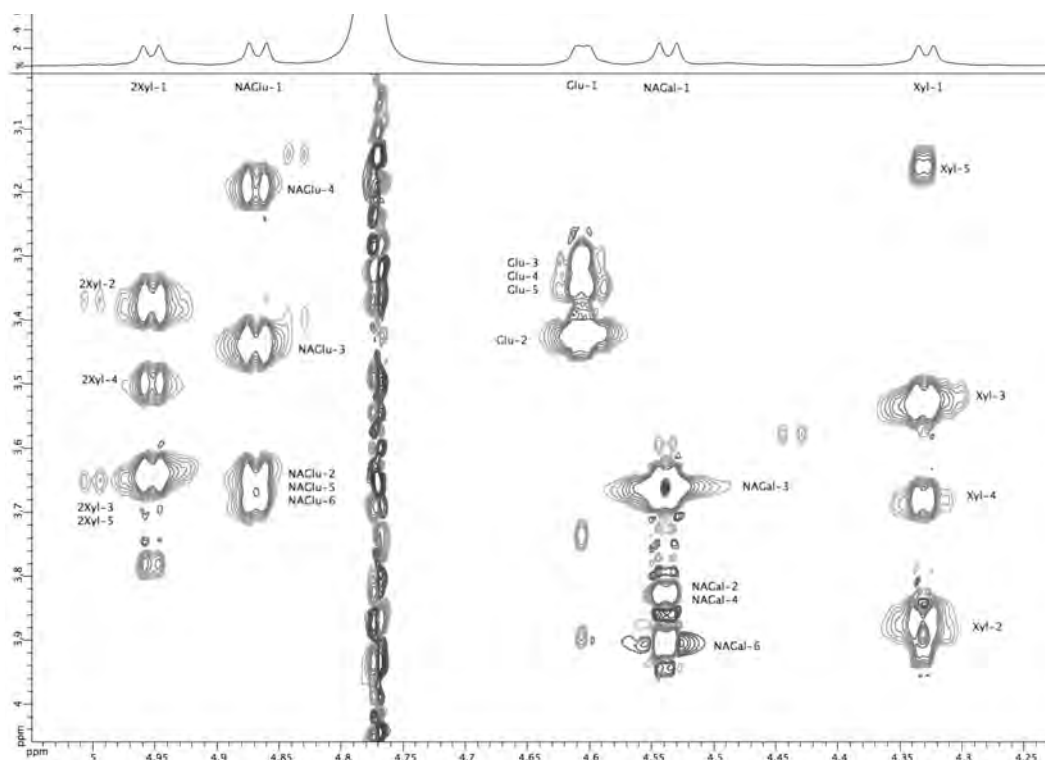


Figure 43 : Spectre TOCSY de la partie osidique du composé **46** (CD₃OD, 600 MHz, 305 K)

L'identification des 5 unités osidiques faite, il faut ensuite déterminer leur séquence ainsi que leurs points de branchements. Pour cela, l'expérience HMBC et les fragmentations MS/MS sont les techniques appropriées.

Le spectre HMBC (figure 44) permet d'établir la séquence des sucres ainsi que les points de branchement et cela par l'observation des couplages suivants entre :

- le proton anomérique du β -xylopyranose (4,31 ppm) et le carbone C3 (91,8 ppm) de la génine.
- le proton anomérique du *N*-acétyl- β -glucosaminopyranose (4,85 ppm) et le carbone Xyl-2 (78,7 ppm) du premier β -xylopyranose.
- le proton anomérique du deuxième β -xylopyranose (4,93 ppm) et le carbone NAGlu-6 (70,1 ppm) du *N*-acétyl- β -glucosaminopyranose.
- le proton anomérique du α -glucopyranose (4,59 ppm) et le carbone 2Xyl-2 (83,5 ppm) du deuxième β -xylopyranose.
- le proton anomérique du *N*-acétyl- β -galactosaminopyranose (4,53 ppm) et le carbone Xyl-4 (80,1 ppm) du premier β -xylopyranose.

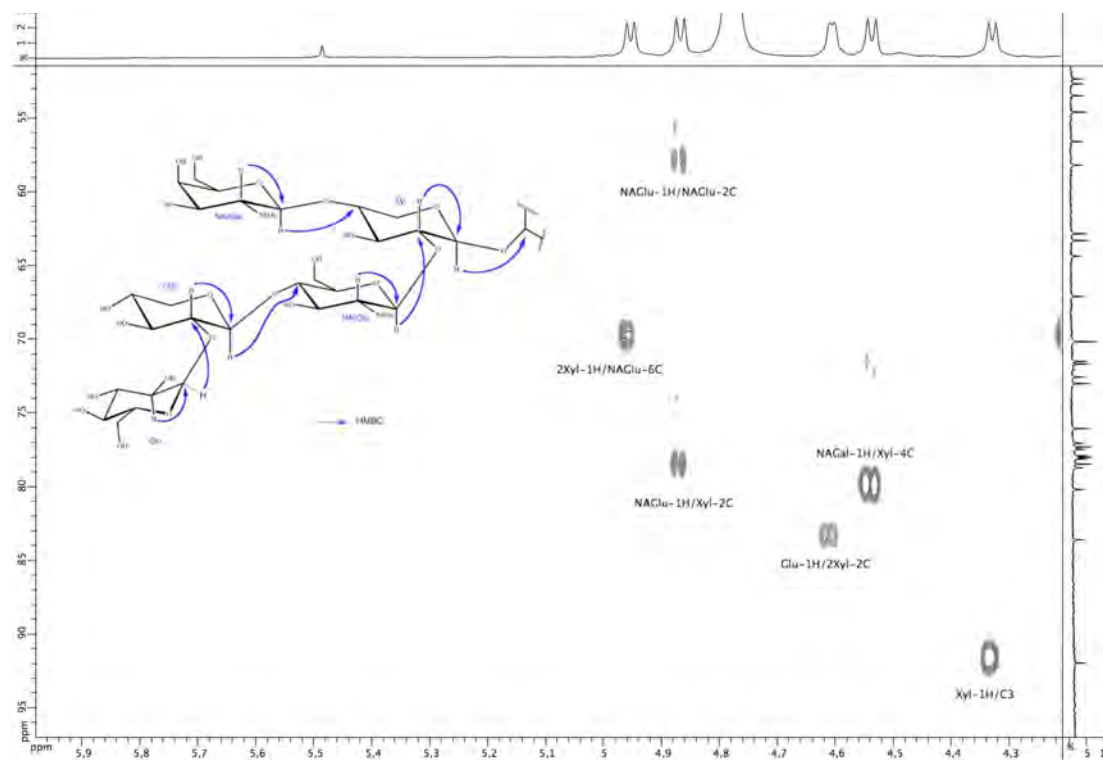


Figure 44 : Spectre HMBC mettant en évidence le J1 résidus des sucres (CD₃OD, 600 MHz)

Une hydrolyse acide du composé **46** a été réalisée afin de déterminer la nature des sucres par comparaison à des échantillons authentiques.⁶⁸ Un échantillon est solubilisé dans 7 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N et maintenu à reflux pendant 4,5 h. La solution

⁶⁸ Alabdul Magid, A.; Voutquenne, L.; Harakat, D.; Pouny, I.; Caron, C.; Moretti, C.; Lavaud, C. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 919-926.

est ensuite extraite deux fois par l'AcOEt. Les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées à sec sous pression réduite. La phase aqueuse est neutralisée par une solution aqueuse de Na_2CO_3 jusqu'à pH 7 puis lyophilisée. Le résidu est déssalé sur colonne de Séphadex LH20 en éluant par de l'eau. Le mélange des sucres obtenus est analysé en HPLC chirale couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL). La configuration absolue des sucres est déterminée par comparaison témoins authentiques (figure 45).

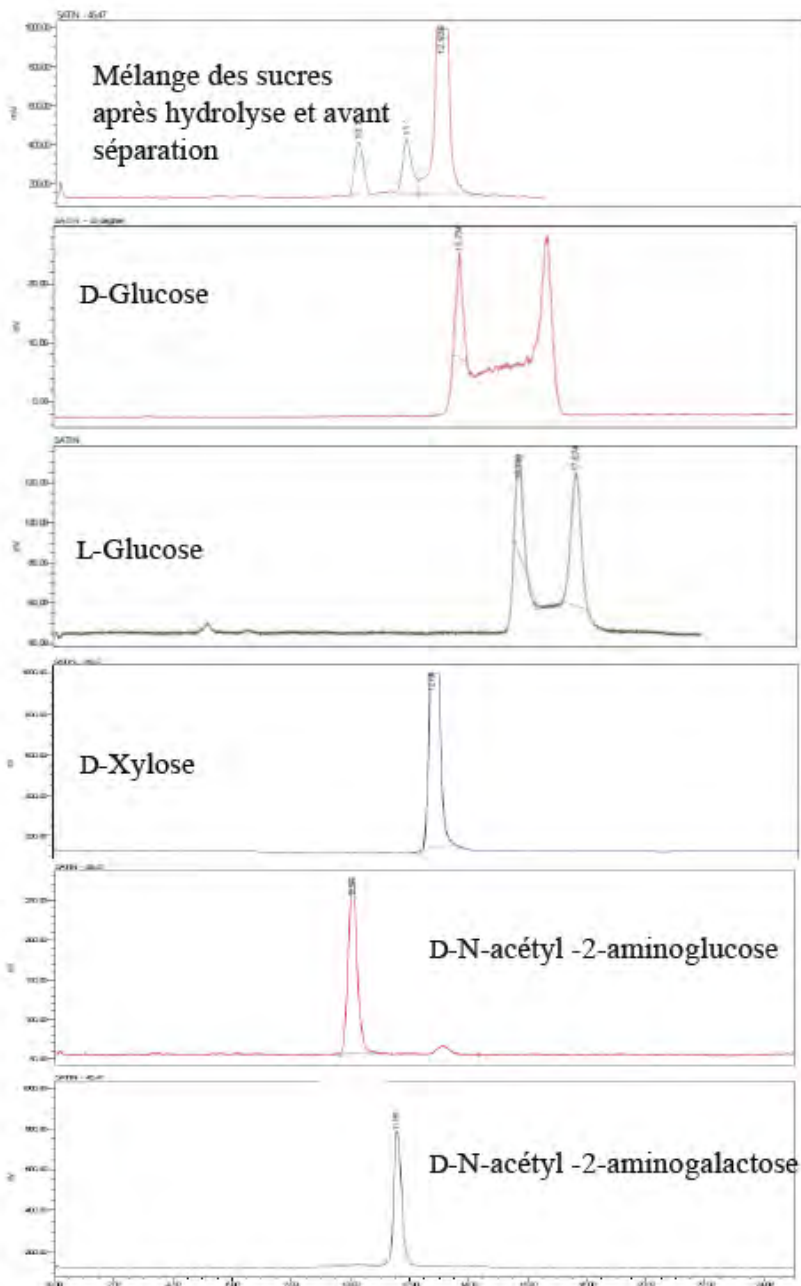


Figure 45 : Chromatogrammes CLHP du mélange et des témoins (colonne : Chiralpac IA, phase mobile : Hexane, éthanol et 0,1 % TFA)

La figure 45 montre qu'un des épimères anomériques (α ou β) du D-glucose présente le même temps de rétention en HPLC chiral que le D-xylose. Le D-glucose a pu être séparé du mélange réactionnel sur CCM puis injecté en mélange avec le D-glucose authentique. La figure suivante (figure 46) montre clairement qu'un seul des deux anomères (α ou β) est présent dans le mélange d'hydrolyse.

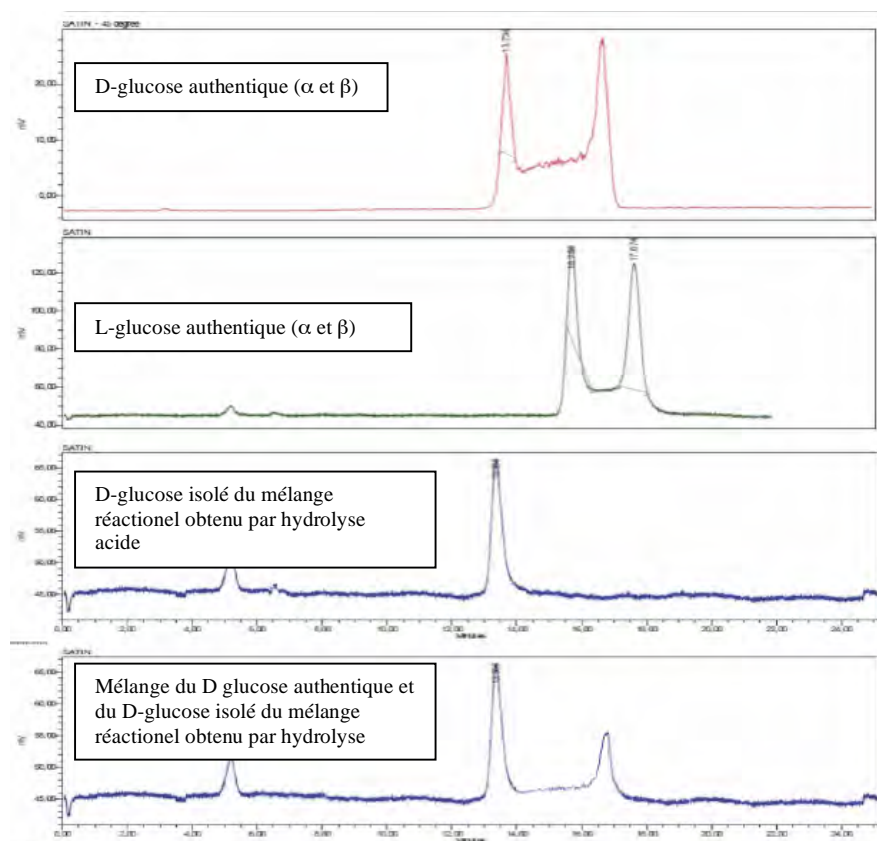


Figure 46 : Chromatogrammes CLHP du glucose authentique et du glucose isolé (colonne : Chiralpac IA, phase mobile : Hexane, éthanol et 0,1 % TFA)

Le mélange dépourvu du D-glucose a pu être injecté à nouveau pour vérifier la présence du D-xylose sous forme d'un pic moins intense que dans le mélange brut avant séparation (figure 47).

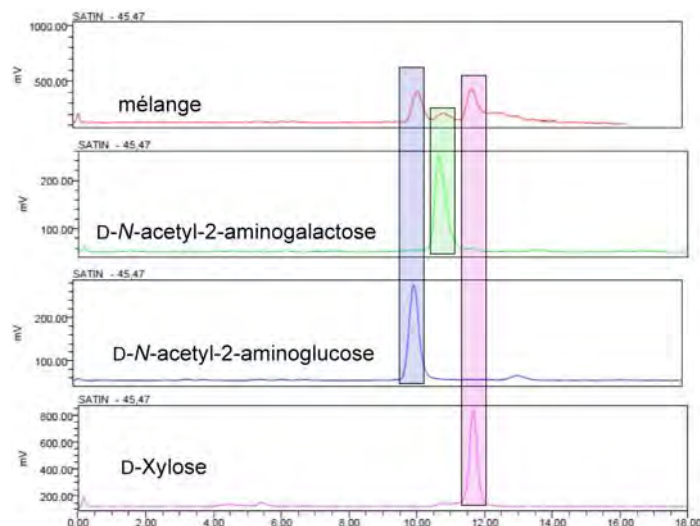


Figure 47 : Chromatogrammes CLHP du mélange et des témoins (colonne : Chiralpac IA, phase mobile : Hexane, éthanol et 0,1 % TFA)

L'hydrolyse acide du composé **46** a donc permis d'identifier le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acetyl-2-amino-glucose et le D-N-acétyl-2-amino-galactose.

Toutes ces données permettent d'attribuer la structure β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acétyl-2-amino-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acétyl-2-amino-galactopyranosyl]4,4-diméthylcholesta-8,24-dien-23-one au composé **46** (figure 48).

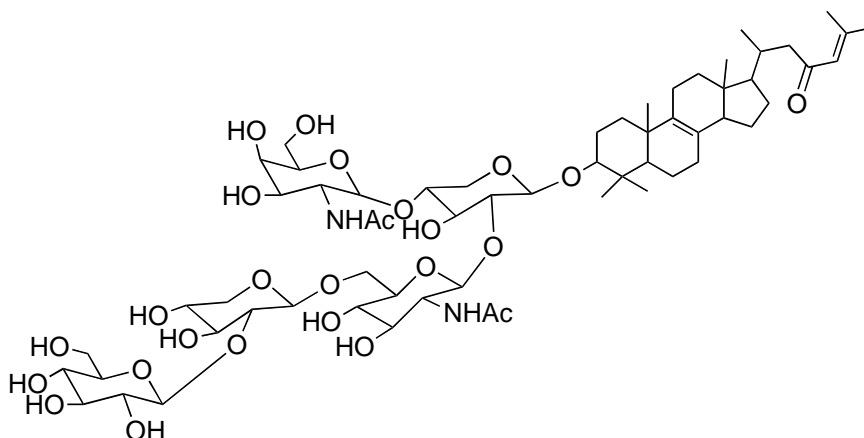


Figure 48 : Sarasinose B₁ **46**

Le pouvoir rotatoire de cette molécule est $[\alpha]_D^{28} -14,5^\circ$ ($c = 0,5$; MeOH).

Cette structure est identique à celle du sarasinoside B₁ (**47**) identifié précédemment alors que la comparaison des spectres RMN du proton dans le même conditions a montré des différences au niveau des protons anomérique (figure 33 page 43). L'ambiguïté a été levée en enregistrant un spectre RMN du proton du mélange **46** et **47** (figure 49). Le spectre obtenu est homogène indique que les deux échantillons correspondent à un seul produit, le sarasinoside B₁ (**47**).

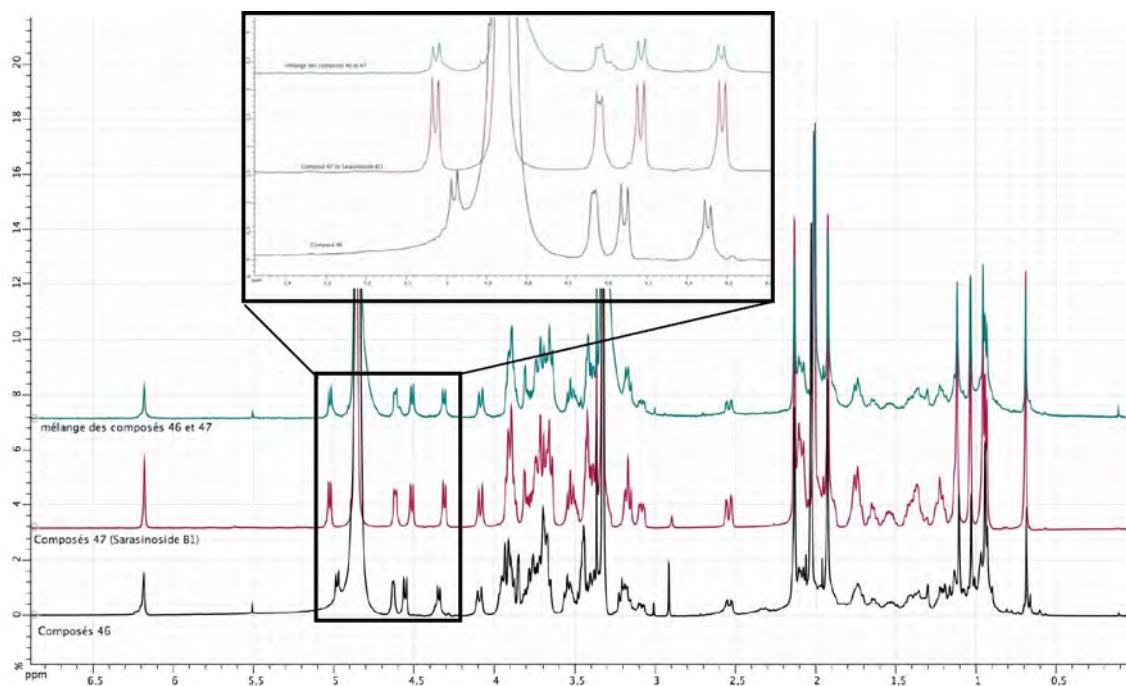


Figure 49 : Comparaisons des spectres de RMN ¹H des échantillons **46** et **47** avec le spectre RMN ¹H de leur mélange

| Génine | | | Sucres | | |
|--------|--|-----------------|----------|---------------------------------|-------------------|
| | ¹ H | ¹³ C | | ¹ H | ¹³ C |
| 1a | 1,72-1,75 (m, 1H) | 37,3 | Xyl-1 | 4,31 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H) | 106.5 |
| 1b | 1,20-1,22 (m, 1H) | | Xyl-2 | 3,87-3,90 (m, 1H) | 78.7 |
| 2 | 1,86-1,89 (m, 2H) | 28,3 | Xyl-3 | 3,51-3,57 (m, 1H) | 77.0 |
| 3 | 3,05 (dd, <i>J</i> = 12,6, 4,5 Hz, 1H) | 91,9 | Xyl-4 | 3,66-3,72 (m, 1H) | 80.1 |
| 4 | - | 40,8 | Xyl-5 | 3,14-3,19 (m, 2H) | 64.3 |
| 5 | 1,02 (m, 1H) | 52,2 | NAGlu-1 | 4,85 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H) | 102.2 |
| 6a | 1,70-1,73 (m, 1H) | 19,6 | NAGlu-2 | 3,64-3,72 (m, 1H) | 58.1 |
| 6b | 1,50-1,56 (m, 1H) | | NAGlu-3 | 3,40-3,47 (m, 1H) | 76.0 |
| 7 | | 29,6 | NAGlu-4 | 3,17-3,22 (m, 1H) | 72.5 |
| 8 | - | 129,0 | NAGlu-5 | 3,68-3,72 (m, 1H) | 72.2 |
| 9 | - | 137,5 | NAGlu-6 | 4,06-4,11 (m, 1H) | 70.1 |
| | | | | 3,70-3,75(m, 1H) | |
| 10 | - | 38,1 | NAGlu-Ac | 2,01 (s, 3H) | 23.3*. 174.2 |
| 11 | nd | 23,2 | 2Xyl-1 | 4,93 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H) | 103.4 |
| 12a | 1,94-1,99 (m, 1H) | 38,4 | 2Xyl-2 | 3,34-3,41 (m, 1H) | 83.5 |
| 12b | 1,38-1,43 (m, 1H) | | 2Xyl-3 | 3,63-3,68 (m, 1H) | 77.7 |
| 13 | - | 43,6 | 2Xyl-4 | 3,48-3,53 (m, 1H) | 71.3 |
| 14 | 2,05-2,11 (m, 1H) | 53,4 | 2Xyl-5 | 3,65-3,74 (m, 2H) | 67.0 |
| 15a | 1,60-1,64 (m, 1H) | 24,9 | Glu-1 | 4,59 (d, <i>J</i> = 5,6 Hz, 1H) | 106.0 |
| 15b | 1,33-1,37 (m, 1H) | | Glu-2 | 3,40-3,47 (m, 1H) | 75.9 |
| 16 | 1,33-1,38 (m, 2H) | 30,1 | Glu-3 | 3,36-3,38 (m, 1H) | 77.9 |
| 17 | 1,18-1,24 (m, 1H) | 56,2 | Glu-4 | 3,33-3,35 (m, 1H) | 71.5 |
| 18 | 0,67 (s, 3H) | 12,0 | Glu-5 | 3,33-3,35 (m, 1H) | 78.3 |
| 19 | 1,02 (s, 3H) | 20,6 | Glu-6 | 3,73-3,76 (m, 2H) | 62.7 |
| 20 | 1,96-2,02 (m, 1H) | 35,2 | NAGal-1 | 4,53 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H) | 103.1 |
| 21 | 0,92 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H) | 20,3 | NAGal-2 | 3,88-3,94 (m, 1H) | 54.5 |
| 22a | 2,50(dd, <i>J</i> = 14,7, 1,7 Hz, 1H) | 52,6 | NAGal-3 | 3,64-3,72 (m, 1H) | 72.9 |
| 22b | nd | | NAGal-4 | 3,85 (m, 1H) | 70.1 |
| 23 | - | 204,2 | NAGal-5 | nd | 77.9 [#] |
| 24 | 6,15 (s, 1H) | 125,4 | NAGal-6 | 3,88-3,94 (m, 2H) | 63.1 |
| 25 | - | 157,1 | NAGal-Ac | 2,01 (s, 3H) | 23.3*. 174.4 |
| 26 | 2,11 (s, 3H) | 21,0 | | | |
| 27 | 1,91 (s, 3H) | 27,8 | | | |
| 28 | 1,09 (s, 3H) | 28,6 | | | |
| 29 | 0,93 (s, 3H) | 17,4 | | | |

nd : non détecté ; * : carbones échangeables ; # : confirmées par des corrélations HMBC

Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **46** (CD₃OD, 600 MHz)

II.2.5. Sarasinose B₃ (48)

Le composé **48** possède des propriétés physicochimiques très proches de celles des deux composés **47** et **46**. Le spectre de masse ESI du composé **48** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 1257,6 [M + H]^+$, soit une masse moléculaire égale à 1256. Une analyse en SMHR indique la formule brute en C₆₁H₉₆N₂O₂₅.

Le spectre RMN ¹³C (figure 50) du composé **48** est très proche de celui du composé **47** et son spectre RMN ¹H est identique à celui du sarasinose B₃ connu dans la littérature.⁶⁶ En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine et des 5 unités osidiques.

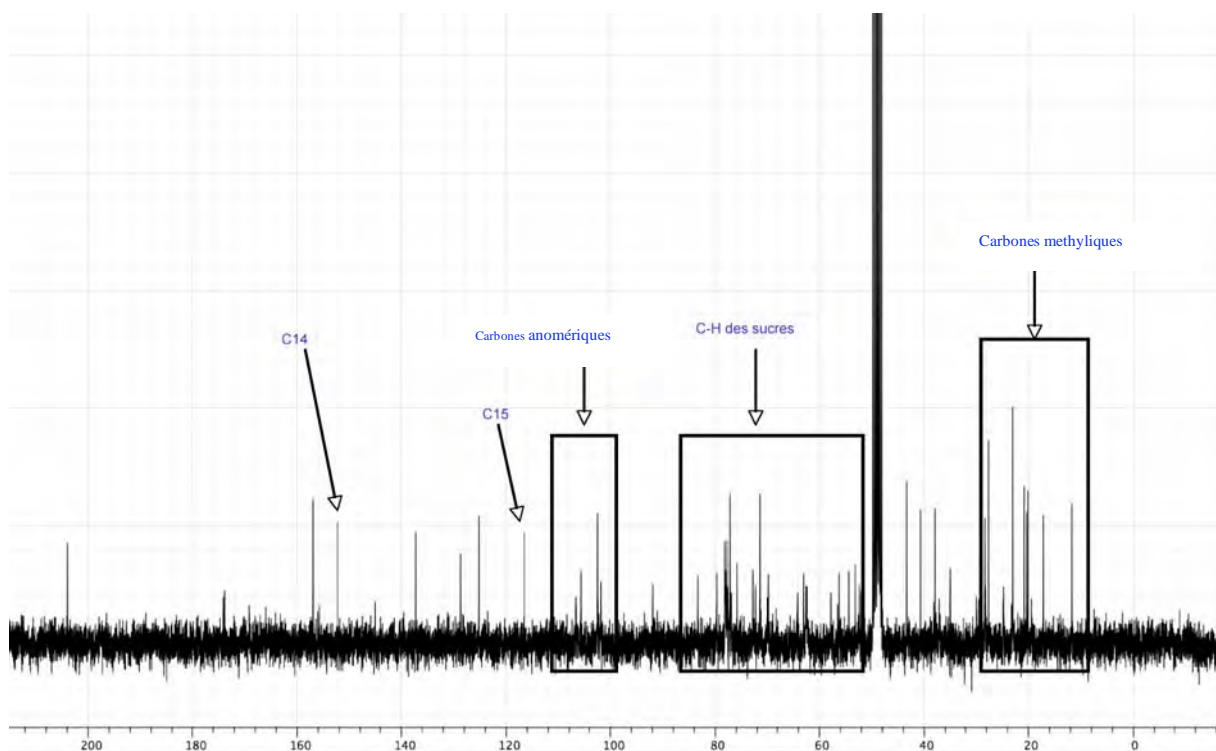


Figure 50 : Spectre RMN ¹³C du composé **48** (CD₃OD, 75,4 MHz, 300 K)

Les déplacements chimiques des carbones (tableau 7) constituant la génine, ont été attribués à l'aide des expériences COSY, HSQC et HMBC. Cette analyse complète et la comparaison avec les données de la littérature⁶⁶ ont permis d'identifier le 3 β -hydroxy-4,4-diméthylcholesta-8,14,24-dien-23-one (figure 51).

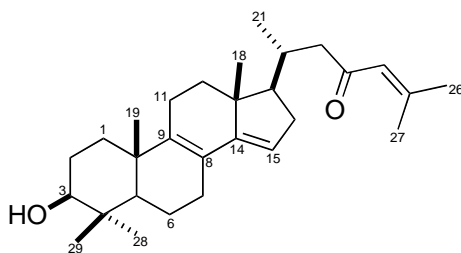


Figure 49 : Structure partielle du composé **48**

La présence de ce squelette est supportée par les données de RMN ^1H qui montrent le signal d'un proton éthylénique à 5,34 ppm (br s, H15).

L'hydrolyse acide du composé **48** permet d'identifier les sucres suivants : le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acétyl-2-amino-glucose et le D-N-acétyl-2-amino-galactose. Les points de branchement des sucres sont déterminés par une expérience HMBC. Il est ainsi confirmé que les composés **47** et **48** possèdent le même enchaînement osidique.

Les données spectrales permettent de confirmer la structure ci-dessous (figure 52) pour le composé **48** dont la valeur du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -19,5^\circ$ ($c = 0,6$; MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ litt.⁶⁶ $-23,0^\circ$ ($c = 0,4$; MeOH). Cette saponine est identique à sarasinoside B₃ isolée de l'éponge *Asteropus sarasinusum*.⁶⁶

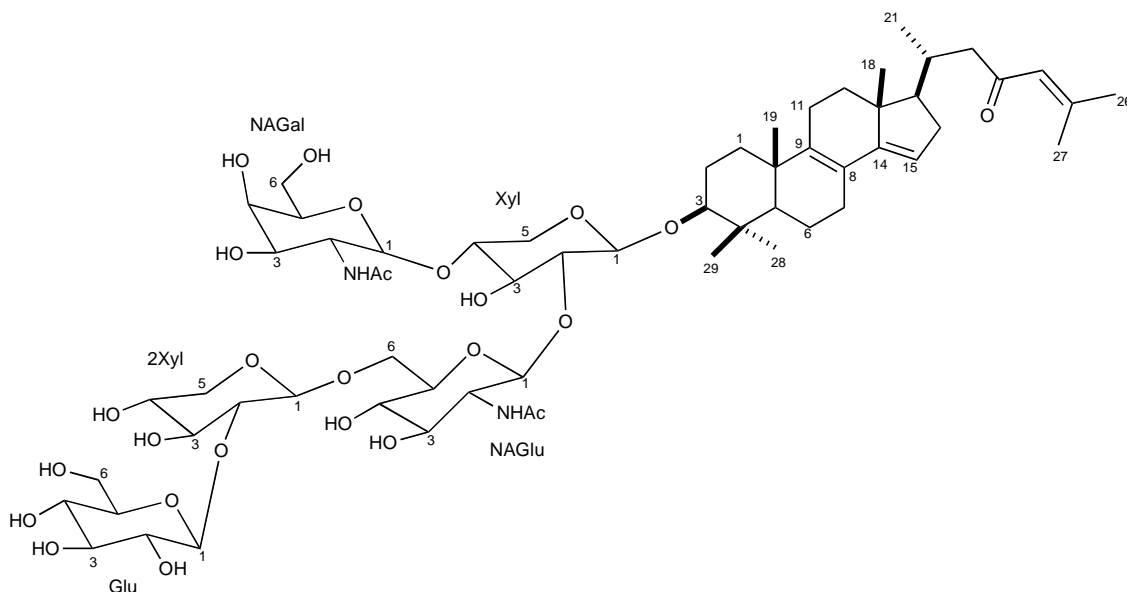


Figure 52 : Sarasinoside B₃ (**48**)

Le composé **48** a été nommé β -O-[β -D-glucoopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acétyl-2-amino-glucoopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acétyl-2-amino-galactopyranosyl]4,4-diméthylcholesta-8,14,24-trien-23-one.

| | Génine | | Sucres | | |
|-----|-----------------------------|-----------------|----------|-----------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C | | ^1H | ^{13}C |
| 1a | 1,69-1,72 (m, 1H) | 37,5 | Xyl-1 | 4,31 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H) | 106,4 |
| 1b | 1,19-1,20 (m, 1H) | | Xyl-2 | 3,85-3,87 (m, 1H) | 78,5 |
| 2 | 1,79-1,82 (m, 2H) | 28,9 | Xyl-3 | 3,49-3,52 (m, 1H) | 77,2 |
| 3 | 3,10 (m, 1H) | 90,8 | Xyl-4 | 3,60-3,64 (m, 1H) | 79,6 |
| 4 | - | 40,6 | Xyl-5 | 3,10-3,15 (m, 2H) | 64,4 |
| 5 | 1,06-1,10 (m, 1H) | 52,0 | NAGlu-1 | 4,85 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) | 101,6 |
| 6a | 1,71-1,74 (m, 1H) | 19,9 | NAGlu-2 | 3,62-3,70 (m, 1H) | 58,1 |
| 6b | 1,50-1,52 (m, 1H) | | NAGlu-3 | 3,41-3,46 (m, 1H) | 75,8 |
| 7 | nd | 29,0 | NAGlu-4 | 3,19-3,23 (m, 1H) | 72,5 |
| 8 | - | 127,8 | NAGlu-5 | 3,68-3,69 (m, 1H) | 72,5 |
| 9 | - | 140,4 | NAGlu-6 | 4,07-4,10 (m, 2H) | 70,1 |
| 10 | - | 37,9 | NAGlu-Ac | 2,00 (s, 3H) | 23,3*, 170,3 |
| 11 | nd | 22,4 | 2Xyl-1 | 5,02 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H) | 102,9 |
| 12a | 1,89-1,90 (m, 1H) | 39,8 | 2Xyl-2 | 3,36-3,40 (m, 1H) | 83,4 |
| 12b | 1,39-1,43 (m, 1H) | | 2Xyl-3 | 3,60-3,65 (m, 1H) | 77,7 |
| 13 | - | 43,6 | 2Xyl-4 | 3,50-3,55 (m, 1H) | 71,3 |
| 14 | | 152,1 | 2Xyl-5 | 3,61-3,68 (m, 2H) | 66,9 |
| 15 | 5,34 (br s, 1H) | 115,8 | Glu-1 | 4,51 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H) | 105,0 |
| 16 | 1,31-1,37 (m, 2H) | 30,2 | Glu-2 | 3,42-3,45 (m, 1H) | 75,8 |
| 17 | 1,22-1,25 (m, 1H) | 56,5 | Glu-3 | 3,34-3,38 (m, 1H) | 78,3 |
| 18 | 0,57 (s, 3H) | 12,0 | Glu-4 | 3,31-3,34 (m, 1H) | 71,2 |
| 19 | 1,01 (s, 3H) | 20,3 | Glu-5 | 3,31-3,34 (m, 1H) | 78,4 |
| 20 | 1,94-1,99 (m, 1H) | 35,4 | Glu-6 | 3,69-3,72 (m, 2H) | 62,6 |
| 21 | 0,9 (d, $J = 7,8$ Hz, 3H) | 20,3 | NAGal-1 | 4,51 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)) | 103,1 |
| 22a | 2,56 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H) | 52,5 | NAGal-2 | 3,84-3,88 (m, 1H) | 54,5 |
| 22b | nd | | NAGal-3 | 3,65-3,69 (m, 1H) | 72,8 |
| 23 | - | 199,9 | NAGal-4 | 3,86 (m, 1H) | 70,1 |
| 24 | 6,19 (s, 1H) | 124,4 | NAGal-5 | 3,67-3,70 (m, 1H) | 72,5 |
| 25 | - | 154,0 | NAGal-6 | 3,86-3,89 (m, 2H) | 63,1 |
| 26 | 2,14 (s, 3H) | 20,9 | NAGal-Ac | 2,00 (s, 3H) | 23,3*, 170,2 |
| 27 | 1,92 (s, 3H) | 27,6 | | | |
| 28 | 1,08 (s, 3H) | 25,9 | | | |
| 29 | 0,86 (s, 3H) | 17,1 | | | |

nd : non détecté ; * : carbones échangeables

Tableau 7 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **48** (CD_3OD , 300MHz)

II.2.6. Sarasinoside A₁ (49)

Le spectre de masse ESI du composé **49** montre des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 1311,57 [M + Na]^+$ et $1287,50 [M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 1288. Une analyse en SMHR indique la formule brute en C₆₂H₁₀₀N₂O₂₆.

Les spectres RMN ¹³C et ¹H du composé **49** sont identiques à ceux du sarasinoside A₁ décrit dans la littérature.^{66, 69} En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine et des 5 unités osidiques (un β-xylopyranose, deux β-glucopyranoses, un N-acétyl-β-galactosaminopyranose et N-acétyl-β-glucosaminopyranose).

Les points de branchements des sucres sont déterminés par une expérience en RMN HMBC et l'hydrolyse acide du composé **46** permet d'identifier le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acétyl-2-amino-glucose et le D-N-acétyl-2-amino-galactose.

Ces données permettent de confirmer la structure ci-dessous (figure 53) pour le composé **49** dont la valeur du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{28} -14,5^\circ$ ($c = 0,86$; MeOH); $[\alpha]_D^{25}$ litt.⁶⁹ $-14,0^\circ$ ($c = 1,0$; MeOH). Cette saponine est identique au sarasinoside A₁ isolé à partir de l'éponge *Asteropus sarasinusum*.^{66, 69}

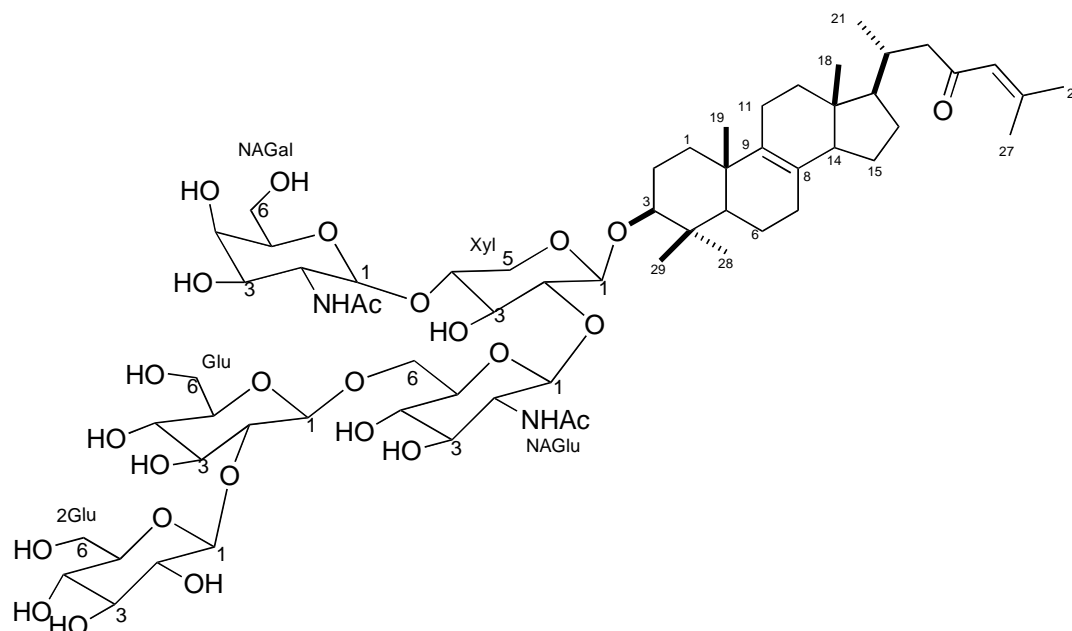


Figure 53 : Sarasinoside A₁ (49)

⁶⁹ Francis, J. S.; Ksebati, M. B.; Gunasekera, S. P.; Agarwal, S. J. *Org. Chem.* **1988**, 53, 5941-5947.

Le composé **49** a été nommé β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acétyl-2-amino-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acétyl-2-amino-galactopyranosyl]4,4-diméthylcholesta-8,14,24-trien-23-one.

| | Génine | | | Sucres | |
|-----|-----------------------------|-----------------|----------|----------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C | | ^1H | ^{13}C |
| 1a | 1,69-1,72 (m, 1H) | 37,5 | Xyl-1 | 4,54 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H) | 105,8 |
| 1b | 1,19-1,20 (m, 1H) | | Xyl-2 | 3,84-3,88 (m, 1H) | 78,3 |
| 2 | 1,79-1,82 (m, 2H) | 28,2 | Xyl-3 | 3,50-3,52 (m, 1H) | 77,1 |
| 3 | 3,10 (m, 1H) | 90,6 | Xyl-4 | 3,60-3,63 (m, 1H) | 79,9 |
| 4 | - | 40,6 | Xyl-5 | 3,11-3,15 (m, 2H) | 64,5 |
| 5 | 1,06-1,10 (m, 1H) | 51,2 | NAGlu-1 | 4,77 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H) | 102,0 |
| 6a | 1,71-1,74 (m, 1H) | 19,3 | NAGlu-2 | 3,65-3,70 (m, 1H) | 58,0 |
| 6b | 1,50-1,52 (m, 1H) | | NAGlu-3 | 3,45-3,49 (m, 1H) | 75,9 |
| 7 | nd | 28,6 | NAGlu-4 | 3,20-3,23 (m, 1H) | 72,5 |
| 8 | - | 127,8 | NAGlu-5 | 3,70-3,74 (m, 1H) | 72,5 |
| 9 | - | 137,7 | NAGlu-6 | 3,98-4,00 (m, 2H) | 70,1 |
| 10 | - | 37,5 | NAGlu-Ac | 1,91 (s, 3H) | 23,2*, 174,1 |
| 11 | nd | 22,5 | Glu-1 | 5,00 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H) | 102,7 |
| 12a | 1,89-1,90 (m, 1H) | 35,4 | Glu-2 | 3,36-3,41 (m, 1H) | 83,5 |
| 12b | 1,39-1,43 (m, 1H) | | Glu-3 | 3,63-3,69 (m, 1H) | 77,4 |
| 13 | - | 42,5 | Glu-4 | 3,52-3,56 (m, 1H) | 71,6 |
| 14 | 2,04-2,09 (m, 1H) | 52,1 | Glu-5 | 3,64-3,69 (m, 1H) | 64,4 |
| 15 | 5,34 (m, 2H) | 24,8 | Glu-6 | 3,67-3,69 (m, 2H) | 60,9 |
| 16 | 1,31-1,37 (m, 2H) | 29,2 | 2Glu-1 | 4,41 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H) | 106,8 |
| 17 | 1,22-1,25 (m, 1H) | 55,5 | 2Glu-2 | 3,42-3,44 (m, 1H) | 75,1 |
| 18 | 0,57 (s, 3H) | 11,7 | 2Glu-3 | 3,34-3,37 (m, 1H) | 78,1 |
| 19 | 1,01 (s, 3H) | 20,1 | 2Glu-4 | 3,39-3,42 (m, 1H) | 71,6 |
| 20 | 1,94-1,99 (m, 1H) | 34,1 | 2Glu-5 | 3,31-3,34 (m, 1H) | 78,2 |
| 21 | 0,9 (d, $J = 7,8$ Hz, 3H) | 20,3 | 2Glu-6 | 3,68-3,70 (m, 2H) | 62,6 |
| 22a | 2,56 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H) | 52,5 | NAGal-1 | 4,51 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) | 102,7 |
| 22b | nd | | NAGal-2 | 3,85-3,89 (m, 1H) | 54,6 |
| 23 | - | 200,6 | NAGal-3 | 3,62-3,65 (m, 1H) | 72,9 |
| 24 | 6,19 (s, 1H) | 124,7 | NAGal-4 | 3,84-3,87 (m, 1H) | 69,9 |
| 25 | - | 154,3 | NAGal-5 | 3,73-3,76 (m, 1H) | 72,5 |
| 26 | 2,14 (s, 3H) | 20,8 | NAGal-6 | 3,88-3,90 (m, 2H) | 62,8 |
| 27 | 1,92 s | 27,5 | NAGal-Ac | 1,91 (s, 3H) | 23,1*, 174,3 |
| 28 | 1,08 s | 27,9 | | | |
| 29 | 0,86 s | 19,4 | | | |

nd – non détecté, *-carbones échangeables

Tableau 8 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **46** (CD_3OD , 300 MHz)

II.2.7. Sarasinoside A₃ (50)

Le composé **50** possède des propriétés physicochimiques et spectrales très proches de celles du composé **49**. Le spectre de masse ESI du composé **47** montre des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 1309,56 [M + Na]^+$ et $1285,49 [M - H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 1286. Une analyse en SMHR indique la formule brute en C₆₂H₉₈N₂O₂₆.

Le spectre RMN ¹³C du composé **50** est très proche de celui du composé **49** et son spectre du proton est identique à celui du sarasinoside A₃ décrit dans la littérature.⁶⁶ En effet, on y retrouve tous les signaux de la génine et des 5 unités osidiques.

L'attribution des déplacements chimiques des carbones de la génine, a été établie par les expériences COSY, HSQC, et HBMC (tableau 9). Cette analyse complète et la comparaison de ces données avec celles de la littérature⁶⁶ ont permis d'identifier le 3β-hydroxy-4,4-diméthylcholesta-8,14,24-trien-23-one.

L'hydrolyse acide du composé **50** permet d'identifier le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acetyl-2-amino-glucose et le D-N-acetyl-2-amino-galactose, et les points de branchements des sucres sont déterminés par une expérience en RMN HMBC. La similarité de l'enchaînement osidique des composés **50** et **49** est ainsi confirmée.

Les données spectrales ont permis de confirmer la structure ci-dessous (figure 54) pour le composé **50** dont le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{28} -8,5^\circ$ ($c = 0,25$; MeOH) ; $[\alpha]_D^{25}$ litt.⁶⁶ $-8,7^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH). Cette saponine est identique au sarasinoside A₃ isolé de l'éponge *Asteropus sarasinosum*.⁶⁶

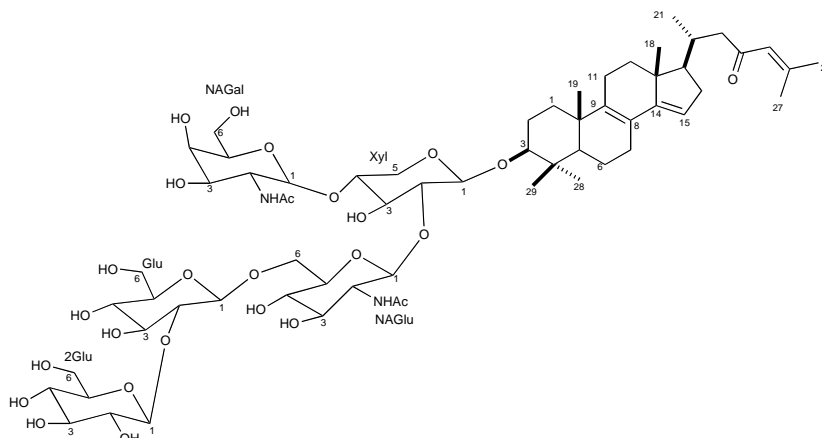


Figure 54 : Sarasinoside A₃ (**50**)

Le composé **50** a été nommé β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acétyl-2-amino-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acétyl-2-amino-galactopyranosyl]4,4-diméthylcholesta-8,14,24-trien-23-one.

| | Génine | | Sucres | | |
|-----|-----------------------------|-----------------|----------|----------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C | | ^1H | ^{13}C |
| 1a | 1,68-1,70 (m, 1H) | 37,5 | Xyl-1 | 4,54 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H) | 105,6 |
| 1b | 1,17-1,19 (m, 1H) | | Xyl-2 | 3,79-3,83 (m, 1H) | 78,3 |
| 2 | 1,80-1,83 (m, 2H) | 28,3 | Xyl-3 | 3,45-3,50 (m, 1H) | 77,1 |
| 3 | 3,13 (m, 1H) | 89,8 | Xyl-4 | 3,61-3,64 (m, 1H) | 79,9 |
| 4 | - | 40,2 | Xyl-5 | 3,14-3,17 (m, 2H) | 64,6 |
| 5 | 1,05-1,09 (m, 1H) | 51,1 | NAGlu-1 | 4,87 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H) | 102,1 |
| 6a | 1,72-1,76 (m, 1H) | 19,0 | NAGlu-2 | 3,65-3,70 (m, 1H) | 58,1 |
| 6b | 1,51-1,54 (m, 1H) | | NAGlu-3 | 3,45-3,50 (m, 1H) | 75,9 |
| 7 | nd | | NAGlu-4 | 3,22-3,26 (m, 1H) | 72,5 |
| 8 | - | 122,8 | NAGlu-5 | 3,71-3,74 (m, 1H) | 72,6 |
| 9 | - | 139,7 | NAGlu-6 | 3,97-4,01 (m, 2H) | 70,5 |
| 10 | - | 37,4 | NAGlu-Ac | 1,90 (s, 3H) | 23,2*, 172,1 |
| 11 | nd | 21,5 | Glu-1 | 5,02 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) | 102,2 |
| 12a | 1,88-1,91 (m, 1H) | 34,9 | Glu-2 | 3,38-3,41 (m, 1H) | 83,5 |
| 12b | 1,39-1,42 (m, 1H) | | Glu-3 | 3,65-3,69 (m, 1H) | 77,5 |
| 13 | - | 42,5 | Glu-4 | 3,50-3,54 (m, 1H) | 72,1 |
| 14 | | 114,8 | Glu-5 | 3,66-3,70 (m, 1H) | 64,5 |
| 15 | 5,41 (m, 1H) | 116,8 | Glu-6 | 3,66-3,70 (m, 2H) | 61,1 |
| 16 | 1,29-1,34 (m, 2H) | 29,2 | 2Glu-1 | 4,41 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) | 106,7 |
| 17 | 1,28-1,30 (m, 1H) | 55,0 | 2Glu-2 | 3,42-3,44 (m, 1H) | 75,1 |
| 18 | 0,47 (s, 3H) | 12,1 | 2Glu-3 | 3,35-3,37 (m, 1H) | 78,1 |
| 19 | 1,10 (s, 3H) | 20,4 | 2Glu-4 | 3,37-3,41 (m, 1H) | 71,6 |
| 20 | 1,93-1,95 (m, 1H) | 34,5 | 2Glu-5 | 3,31-3,34 (m, 1H) | 78,1 |
| 21 | 1,2 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H) | 20,6 | 2Glu-6 | 3,68-3,70 (m, 2H) | 62,6 |
| 22a | 2,58 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H) | 51,9 | NAGal-1 | 4,51 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H) | 101,9 |
| 22b | nd | | NAGal-2 | 3,85-3,90 (m, 1H) | 53,5 |
| 23 | - | 200,5 | NAGal-3 | 3,60-3,63 (m, 1H) | 73,2 |
| 24 | 6,09 (s, 1H) | 124,7 | NAGal-4 | 3,80-3,84 (m, 1H) | 69,9 |
| 25 | - | 153,3 | NAGal-5 | 3,74-3,77 (m, 1H) | 72,5 |
| 26 | 2,03 (s, 3H) | 20,8 | NAGal-6 | 3,88-3,91 (m, 1H) | 63,1 |
| 27 | 1,82 (s, 3H) | 26,9 | NAGal-Ac | 1,91 (s, 3H) | 23,2*, 172,3 |
| 28 | 1,04 (s, 3H) | 28,0 | | | |
| 29 | 0,87 (s, 3H) | 19,5 | | | |

nd – non détecté, *-signaux échangeables

Tableau 9 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **50** (CD_3OD , 300 MHz)

II.2.8. Sarasinoside G (51)

Le spectre de masse ESI du composé **51** montre des pics d'ion pseudo-moléculaires à $m/z = 1273,6 [M + H]^+$ et $1271,5 [M - H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 1272. Une analyse en SMHR indique la formule brute $C_{62}H_{100}N_2O_{25}$.

Le spectre RMN ^{13}C du composé **48** est très proche de celui du composé **46** et son spectre de proton est identique à celui du sarasinoside G décrit dans la littérature.⁷⁰

L'attribution des déplacements chimiques des carbones (tableau 10) constituant la génine, a été établie par les expériences COSY, HSQC, et HBMBC. Cette analyse complète et la comparaison avec les données de la littérature⁷⁰ ont permis d'identifier le 3 β -hydroxy-lanost-9(11),24-dien-23-one (figure 55).

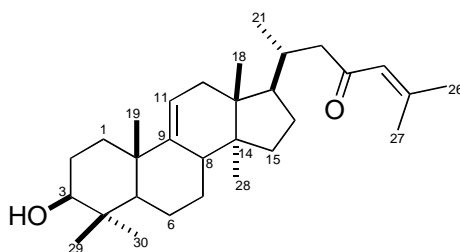


Figure 55 : Structure partielle du composé **51**

L'hydrolyse acide du composé **51** a permis d'identifier le D-glucose, le D-xylose, le D-N-acétyl-2-amino-glucose et le D-N-acétyl-2-amino-galactose. Les points de branchement des sucres ont été déterminés par une expérience HMBC en RMN, confirmant le même enchaînement osidique que les composés **51** et **48**.

Les données spectrales ont permis de confirmer la structure ci-dessous (figure 56) pour le composé **51** dont le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{28} -14,5^\circ$ ($c = 0,75$; MeOH) ; $[\alpha]_D^{20}$ litt.⁷⁰ $-29,9^\circ$ ($c = 1,0$; MeOH). Cette saponine est identique à sarasinoside G isolée à partir de l'éponge *Asteropus sarasinusum*.⁷⁰ Le composé **51** a été nommé 3 β -O-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-N-acetyl-2-amino-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-N-acetyl-2-amino-galactopyranosyl]-lanosta-9(11),24-dien-23-one.

⁷⁰ Espada, A.; Jimenez, C.; Rodriguez, J.; Crews, P.; Riguera, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8685-8696.

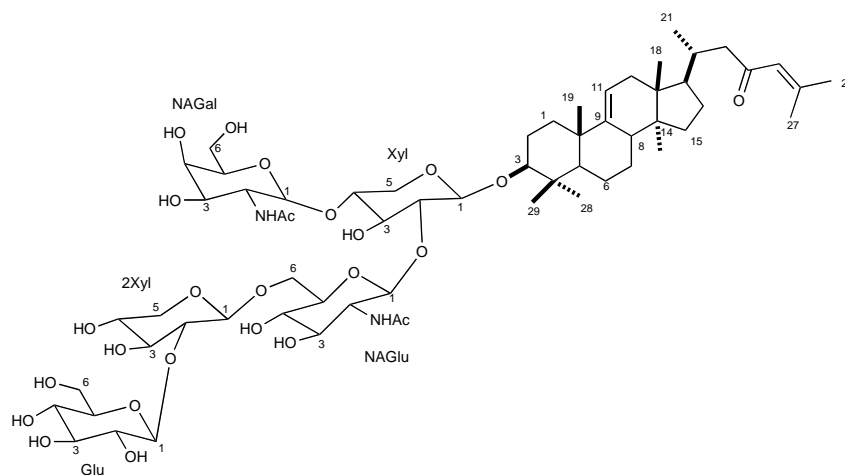


Figure 56 : Sarasinose G (51)

| | Génine | | | Sucres | |
|----|----------------------------------|-----------------|----------|---------------------------------|-----------------|
| | ¹ H | ¹³ C | | ¹ H | ¹³ C |
| 1 | 1,65-1,69 (m, 2H) | 35,5 | Xyl-1 | 4,52 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H) | 105,7 |
| 2 | 1,70-1,73 (m, 2H) | 25,3 | Xyl-2 | 3,72-3,76 (m, 1H) | 78,2 |
| 3 | 3,18 (m, 1H) | 91,8 | Xyl-3 | 3,39-3,42 (m, 1H) | 77,5 |
| 4 | - | 40,6 | Xyl-4 | 3,65-3,68 (m, 1H) | 79,7 |
| 5 | 1,09-1,12 (m, 1H) | 50,1 | Xyl-5 | 3,17-3,19 (m, 2H) | 64,3 |
| 6 | 1,70-1,74 (m, 2H) | 25,4 | NAGlu-1 | 4,87 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H) | 102,0 |
| 7 | nd | 28,3 | NAGlu-2 | 3,54-3,59 (m, 1H) | 58,9 |
| 8 | - | 42,8 | NAGlc-3 | 3,44-3,49 (m, 1H) | 75,8 |
| 9 | - | 148,3 | NAGlu-4 | 3,19-3,22 (m, 1H) | 72,8 |
| 10 | - | 36,9 | NAGlu-5 | 3,63-3,67 (m, 1H) | 78,6 |
| 11 | 5,20 (t, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H) | 114,7 | NAGlu-6 | 3,95-4,10 (m, 2H) | 70,1 |
| 12 | 2,35-2,39 (m, 2H) | 34,3 | NAGlu-Ac | 2,00 (s, 3H) | 23,2*, 174,1 |
| 13 | - | 41,9 | 2Xyl-1 | 5,01 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H) | 103,2 |
| 14 | - | 44,3 | 2Xyl-2 | 3,25-3,30 (m, 1H) | 83,2 |
| 15 | 1,30-1,35 (m, 2H) | 31,3 | 2Xyl-3 | 3,56-3,61 (m, 1H) | 77,9 |
| 16 | 1,28-1,31 (m, 2H) | 25,1 | 2Xyl-4 | 3,48-3,52 (m, 1H) | 71,2 |
| 17 | 1,28-1,30 (m, 1H) | 54,0 | 2Xyl-5 | 3,59-3,65 (m, 2H) | 66,5 |
| 18 | 0,77 (s, 3H) | 17,1 | Glu-1 | 4,34 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H) | 106,6 |
| 19 | 1,16 (s, 3H) | 18,4 | Glu-2 | 3,44-3,47 (m, 1H) | 75,8 |
| 20 | 1,93-1,95 (m, 1H) | 33,4 | Glu-3 | 3,31-3,36 (m, 1H) | 77,1 |
| 21 | 0,98 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 3H) | 18,6 | Glu-4 | 3,39-3,42 (m, 1H) | 70,6 |
| 22 | 2,57 (d, <i>J</i> = 14,6 Hz, 1H) | 50,5 | Glu-5 | 3,39-3,42 (m, 1H) | 77,9 |
| 23 | - | 204,5 | Glu-6 | 3,70-3,74 (m, 2H) | 62,3 |
| 24 | 6,19 (s, 1H) | 125,7 | NAGal-1 | 4,51 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H) | 102,9 |
| 25 | - | 157,3 | NAGal-2 | 3,82-3,86 (m, 1H) | 53,6 |
| 26 | 2,13 (s, 3H) | 21,4 | NAGal-3 | 3,56-3,60 (m, 1H) | 73,2 |
| 27 | 1,92 (s, 3H) | 26,9 | NAGal-4 | 3,75-3,79 (m, 1H) | 70,3 |
| 28 | 1,09 (s, 3H) | 22,0 | NAGal-5 | 3,71-3,74 (m, 1H) | 71,6 |
| 29 | 1,17 (s, 3H) | 29,6 | NAGal-6 | 3,89-3,91 (m, 2H) | 62,1 |
| 30 | 1,09 (s, 3H) | 21,4 | NAGal-Ac | 2,00 (s, 3H) | 23,2*, 174,3 |

*-carbones échangeables

Tableau 10 : Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **51** (CD₃OD, 300 MHz)

II.2.9. Discussion sur les sarasinosides :

Les structures des sarasinosides élucidées ici sauf le sarasinoside G (**51**) sont caractérisées par la présence d'une génine triterpénique du type norlanostane. Le squelette carboné de la génine des sarasinosides a été placé comme intermédiaire dans la voie biogénétique du lanostérol au cholestérol chez les levures et chez certains d'animaux. Les saponines des holothuries possèdent des génines triterpéniques de type lanostane⁷¹ et celles des étoiles de mer des génines stéroïdiques.⁷² Les saponines isolées des éponges *Asteropus sarasinusum*^{66,68,70} et *Amorphinopsis excavans* (cette étude) ont des génines de type 30-triterpénoïdes de norlanostane, bien qu'il reste à le démontrer, ils sont probablement biosynthétisés par ces organismes (figure 57).

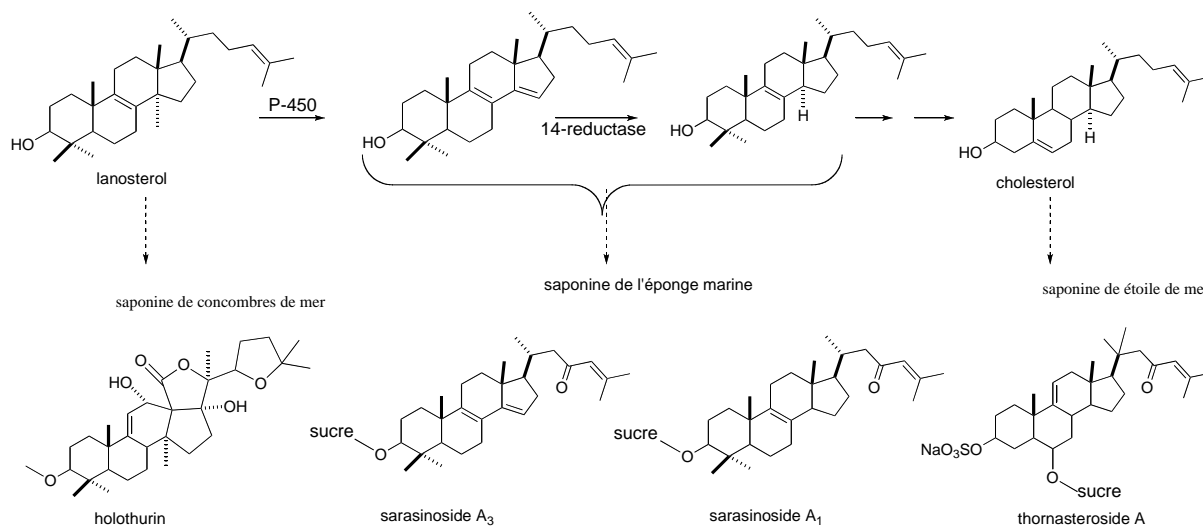


Figure 57 : Conversion du lanostérol en 4,4-diméthylzymostérol par des microsomes de levure.⁶⁶

Les activités biologiques seront discutées dans chapitre 6.

⁷¹ Kitagawa, I.; Nishino, T.; Kobayashi, M.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 1951-1956.

⁷² Kitagawa, I.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 1864-1873.

Le mélange des composés **52a** et **52b** est le produit majoritaire de la fraction éluee par du MeOH (100%). Ses spectres RMN ^1H et ^{13}C particulièrement simples montrent la présence de méthyles portés par un hétéro-atome. Les analyses des spectres de RMN, comparés à la littérature montrent que ce composé **52** (**a** + **b**) est un mélange du zooanémoneine⁷³ (**a**) et la β -alanine bétaine⁷⁴ (**b**) (figure 58).

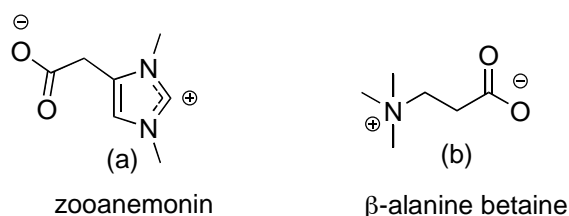


Figure 58 : Composé **52**

La séparation de ces deux molécules était difficile en raison de leur double charge qui est probablement à l'origine de la formation d'un complexe ionique suffisamment stable pour être détecté et rendre sa séparation difficile (figure 59).

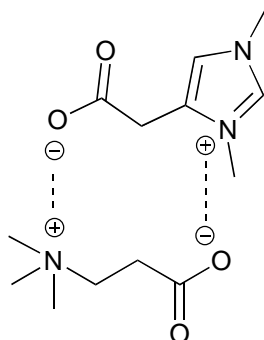


Figure 59 : Composés **52a** et **52b** sous forme de complexe stable

Le zooanémoneine (**52a**) est un produit naturel connu pour son activité antifouling⁷⁵ tandis que la β -alanine bétaine est un composé connu pour son rôle d'osmorégulation.⁷³

⁷³ Francesco, C.; Ernesto, F.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1171-1173.

⁷⁴ Rathinasabapathi, B.; Fouad, W. M.; Sigua, C. A. *Plant Physiol* **2001**, *126*, 1241-9.

⁷⁵ Raveendran, T. V.; Mol, V. P. L. *Curr. Sci. India* **2009**, *97*, 508-520.

III. Conclusion et discussion

L'extraction de l'éponge *Amorphinopsis excavans* a permis d'isoler sept produits connus, les sarasinosides A₁, A₃, B₁, B₃ et G (**49-50**, **47-48**, **51**), le céramide antiépileptique (**44**) et zooanémonin et β-alanine (**52a** et **52b**).

Peu d'éponges contiennent des saponines et moins encore des sarasinosides. En fait seulement *Asteropus* sp.^{66,70} et *Melophlus* sp.⁷⁶ sont connues comme des sources de cette classe des molécules. C'est la première fois ici que ce type de molécules est isolé du genre *Amorphinopsis* *excavans*

⁷⁶ Lee, H.-S.; Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 915-919.

**Chapitre 4 : Étude chimique de l'éponge *Stylissa carteri*, Dendy
(1889)**

Chapitre 4 : Étude chimique de l'éponge *Stylissa carteri*, Dendy (1889)

Cette partie sera consacrée à l'étude de l'éponge *Stylissa carteri* (R-3070) qui appartient à l'ordre des Halichondrida. Après une brève présentation bibliographique sur la chimie de l'espèce *Stylissa carteri*, nous décrirons les différentes étapes de l'étude chimique que nous avons réalisée. Son extrait aqueux présente une activité antipaludique très élevée (tableau 1, page 5).

I. Rappels bibliographique

Plusieurs métabolites secondaires dérivés du genre *Stylissa* ont été décrits : des stérols, des alcaloïdes pyrrole-2-aminoimidazoles et des isonitriles.^{77, 78, 79}

I.1. L'arbre phylogénétique de l'éponge *Stylissa carteri*

L'éponge *Stylissa carteri* a été identifiée par Dendy en 1889.⁸⁰ Elle appartient à la famille des Dictyonellidae (figure 60). Elle a été étudiée plusieurs fois auparavant mais sous d'autres noms : *Acanthella aurantiaca* (Keller, 1889), *Acanthella carteri* (Dendy, 1889) et *Axinella carteri* (Dendy, 1889). Ces trois espèces ont été considérées comme appartenant à la famille des Axinellidae jusqu'en 2000. Hooper les a alors rattachées à la famille des Dictyonellidae et regroupées sous le nom *Stylissa carteri*.⁸¹ On peut noter la grande variabilité chimique spatio-temporelle de cette espèce. Un nombre considérable de métabolites avait déjà été identifié dans cette éponge. Sa richesse en métabolites montrée par le profile chromatographique de l'extrait brut et son activité antipaludique nous ont incité à l'étudier.

⁷⁷ Mitome, H.; Shirato, N.; Miyaoka, H.; Yamada, Y.; Van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 833-837.

⁷⁸ Mitome, H.; Shirato, N.; Hoshino, A.; Miyaoka, H.; Yamada, Y.; Van Soest, R. W. M. *Steroids* **2005**, *70*, 63-70.

⁷⁹ Eder, C.; Proksch, P.; Wray, V.; Steube, K.; Bringmann, G.; Van Soest, R. W. M.; Sudarsono; Ferdinandus, E.; Pattisina, L. A.; Wiryowidagdo, S.; Moka, W. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 184-187.

⁸⁰ Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.; Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *Stylissa carteri* (Dendy, 1889). <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=165705> (**2009B-11-06**)

⁸¹ Hooper, J. N. A. **2000**, 129.

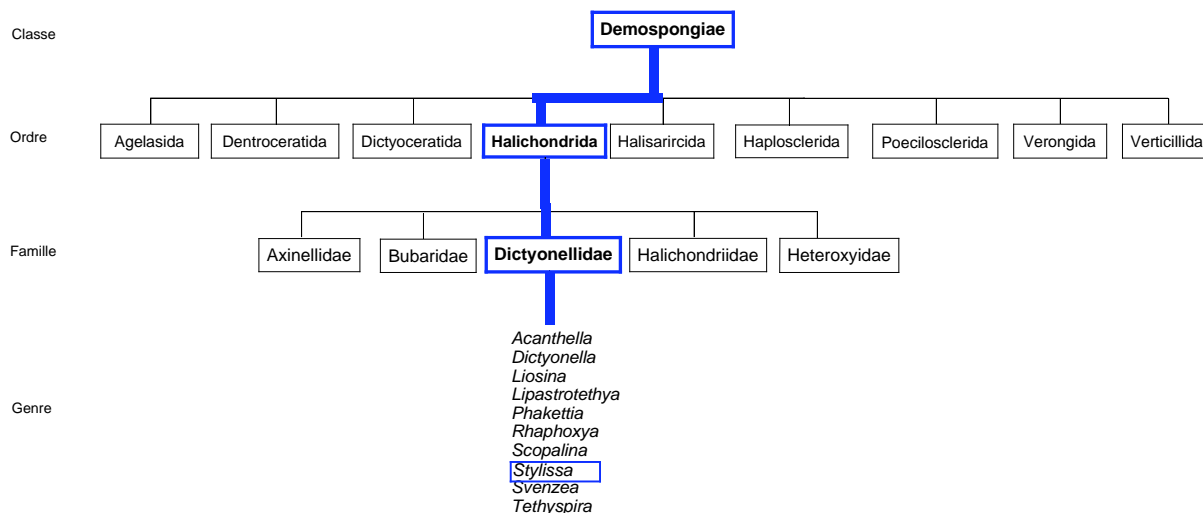


Figure 60 : Arbre phylogénétique de *StyliSSa carteri*

I.2. Études précédentes de l'espèce *StyliSSa carteri*

Plusieurs études chimiques de l'éponge *StyliSSa carteri* ont été décrites. Cette éponge est une source de plusieurs familles de métabolites comme les peptides cycliques, les macrolides, les éthers de glycérols et essentiellement des alcaloïdes pyrrole-2-aminoimidazoles.

Les peptides cycliques isolés de *StyliSSa carteri* présentent de nombreuses variations structurales. De cette même espèce qui avait été nommée *Axinella carteri* puis corrigée en *StyliSSa carteri*,⁸¹ nous avons également isolé les axinellines A (**53**) et B (**54**), l'axinastatine 3 (**55**), la stylostatine 1 (**56**), l'hyménamide C (**57**), les phakellistatines 1 (**58**) et 10 (**59**),⁸² l'hyménistatine 1 (**60**), les axinastatines 1 (**61**) et 5 (**62**),⁸³ le cyclonelline (**63**).⁸⁴ Les axinellines, axinastatines, l'axinastatine 1, cyclonelline et hyménistatine sont des hepta- et octapeptides cycliques isolés aussi à partir d'autres espèces du genre *Axinella*. Ces peptides souvent cytotoxiques sont formés d'acides aminés naturels classiques.

⁸² Antonio, R.; Piazz, F. D.; Orrù, S.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Pucci, P.; Gomez-Paloma, L. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1998, 2659-2665.

⁸³ Pettit, G. R.; Gao, F.; Schmidt, J. M.; Chapuis, J.-C.; Cerny, R. L. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 2935-2940.

⁸⁴ Milanowski, D. J.; Rashid, M. A.; Gustafson, K. R.; O'keefe, B. R.; Nawrocki, J. P.; Pannell, L. K.; Boyd, M. *R. J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 441-444.

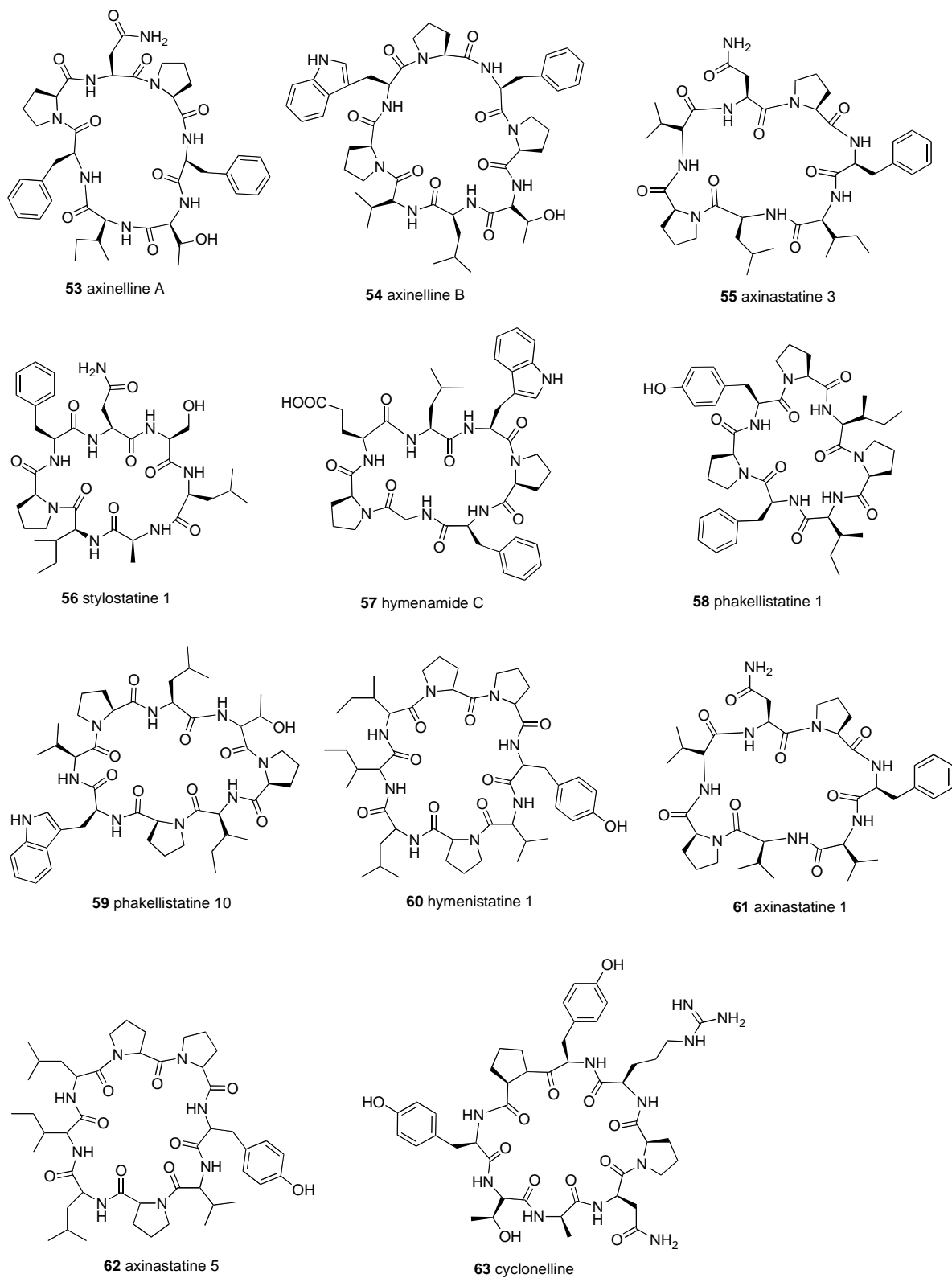


Figure 61 : Structures des peptides cycliques d'*Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*)

L'halistatine 2 (**64**) (figure 62) est un macrolide polyéther de la famille des halichondrines isolé l'éponge *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*) de l'ouest de l'Océan Indien.⁸³

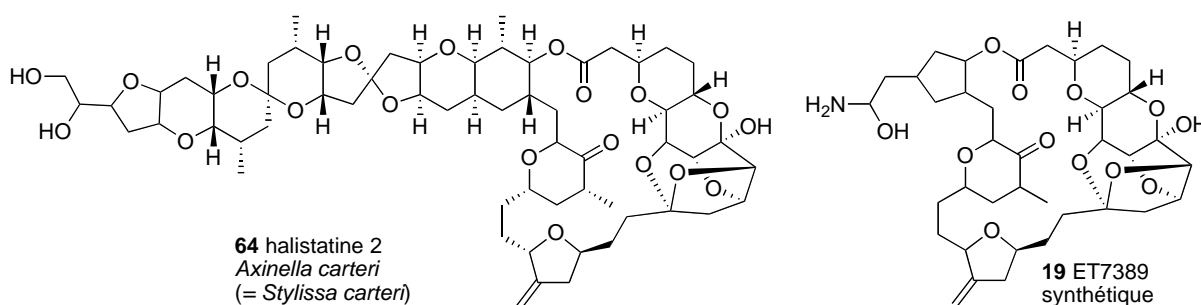


Figure 62 : Structures de l'Halistatine 2 et l'ET7389

Cette famille de molécules a donné lieu à un vaste programme de recherche synthétique, pharmacologique et clinique. Quelques analogues ont été isolés de l'éponge *Halichondria okadai*. L'halichondrine B possède des propriétés antitumorales à des concentrations nanomolaires. Des programmes de synthèse ont permis de simplifier sa structure active sans résoudre le problème de la quantité de produit limité. En 2008, il y avait 14 essais cliniques en cours sur une des structures simplifiées, dont l'E7389 (**19**)

Les hanishénols A (**65**) et B (**66**) (figure 63) sont deux éthers de glycérol à chaînes diéniques non conjuguées, avec la configuration absolue *S* pour carbone C2.⁸⁵

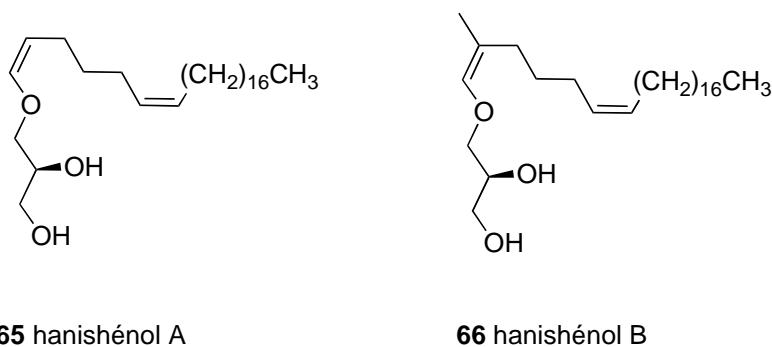


Figure 63 : Structures des hanishénols d'*Acanthella carteri* (= *Stylissa carteri*)

⁸⁵ Mancini, I.; Guella, G.; Pietra, F.; Amade, P. *Tetrahedron* **1997**, 53, 2625-2628.

I.2.1. Alcaloïdes pyrrole-2-aminoimidazole (P-2-AIs)

L'éponge *Stylissa carteri* est connue pour être riche en **Pyrrole-2-AminoImidazoles** (P-2-AIs). La famille des P-2-AIs est composée de produits linéaires simples ou polycycliques monomériques ou dimériques. Tous ces composés sont considérés comme des dérivés du squelette en C₁₁N₅ de l'oroïdine (**7**), et issus de diverses modifications : isomérisation de la double liaison, oxydation, réduction, dimérisation et cyclisation.⁸⁶

L'éponge *Stylissa carteri* contient un grand nombre de P-2-AIs : l'oroïdine (**7**), la stévensine (odiline) (**67**) et son dérivé débromé **68**, l'hyménine (**69**) et son dérivé débromé **70**, la Z-hyménialdisine (**71**) et ses dérivés bromé **72** ou débromé **73** et la E-hyménialdisine (**74**) et ses dérivés bromé **75** ou débromé **76** (figure 64). La Z-hyménialdisine (**71**) et son dérivé débromé (**73**) sont cytotoxiques.⁷⁹ Les latonduines A (**77**) et B (**78**) ont été aussi isolée de la même éponge⁸⁷, ainsi que la carteramine A (**79**).⁸⁸

⁸⁶ Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.

⁸⁷ Linington, R. G.; Williams, D. E.; Tahir, A.; Van Soest, R.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2735-2738.

⁸⁸ Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; Van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.

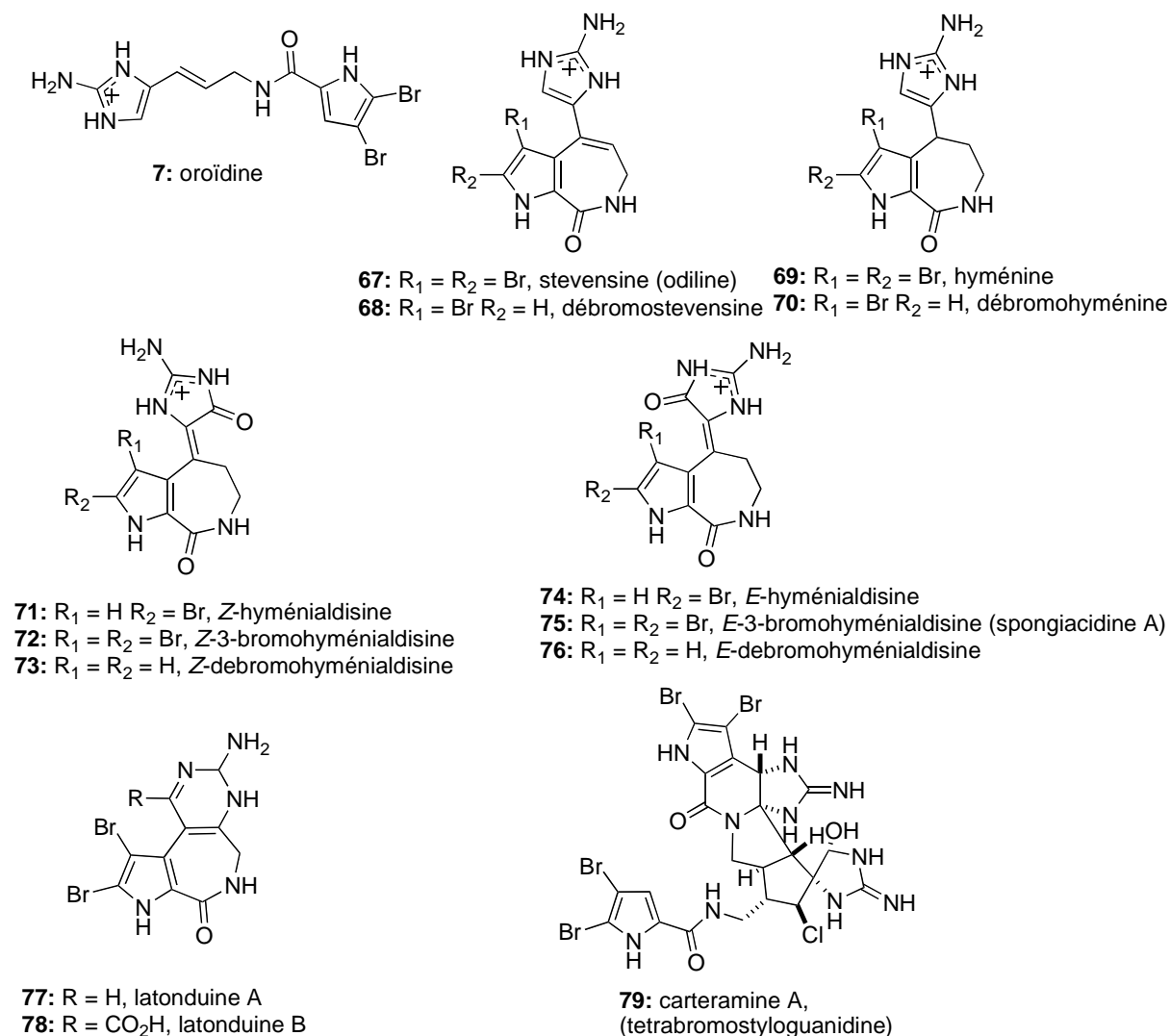


Figure 64 : Alcaloïdes pyrrole-imidazoles isolés de *Stylissa carteri*.

Certains alcaloïdes P-2-AIs ont été isolés à partir de l'éponge *Acanthella carteri* (= *Stylissa carteri*) : l'oroïdine (**7**), l'hanishine (**80**), la 4-bromopyrrole-2-carboxamide (**81**) et son dérivé bromé **82**,⁸⁹ la Z-hyménialdisine (**71**) et son dérivé débromé **73**, l'aldisine (**83**)⁹⁰ et la dibromoisophakelline (**84**)⁹¹ (figure 65).

⁸⁹ Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6271-6274.

⁹⁰ Utkina, N.; Fedoreev, S.; Maksimov, O. *Chem. Nat. Compd.* **1984**, 20, 511-512.

⁹¹ Fedoreyev, S. A.; Utkina, N. K.; Ilyin, S. G.; Reshetnyak, M. V.; Maximov, O. B. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3177-3180.

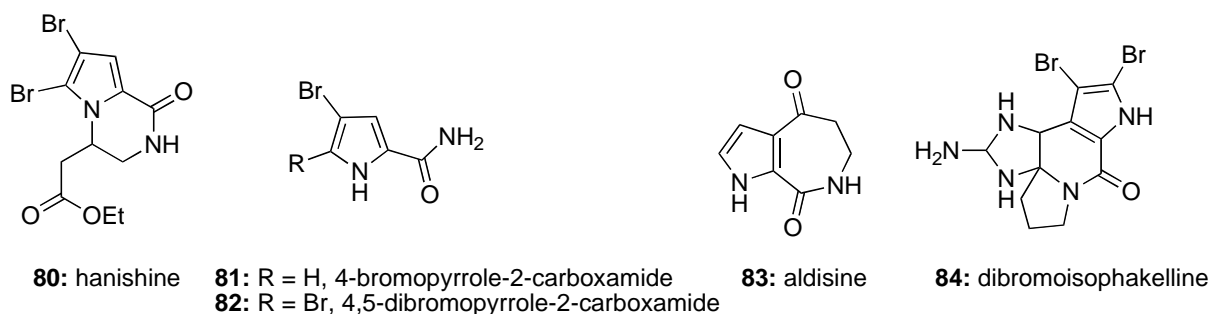


Figure 65 : Alcaloïdes pyrrole-imidazoles isolés de *Acanthella carteri* (= *Stylissa carteri*).

La dibromoisophakelline (**84**) et l'ugibohline (**85**) sont deux alcaloïdes P-2-AIs isolés de l'éponge *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*) (figure 66).⁹²

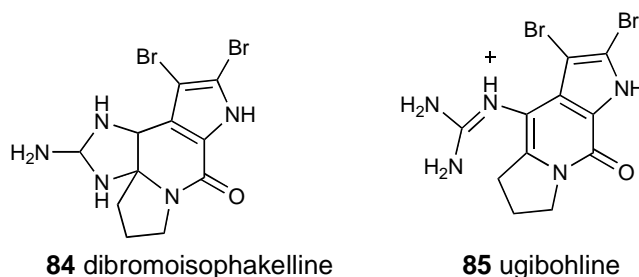


Figure 66 : Alcaloïdes pyrrole-2-minoimidazoles isolés de *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*).

Notre étude de *Stylissa carteri* en LCMS a montré un profil métabolomique très riche et vise la découverte de molécules à structures nouvelles et tout particulièrement, la recherche de pyrrole-2-aminoimidazoles.

II. Travaux personnels réalisés sur l'espèce *Stylissa carteri*

Ce spécimen a été collecté en Nouvelle Géorgie (îles Salomon) en juillet 2004. Un échantillon a été déposé au Queensland Museum, sous la référence G324819. Une photo *ex situ* est présentée ci-dessous. Les « pustules » marron sont des octocoralliaires du genre *Parazonathus* vivant fréquemment en association avec cette éponge.

⁹² Goetz, G. H.; Harrigan, G. G.; Likos, J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1581-1582.

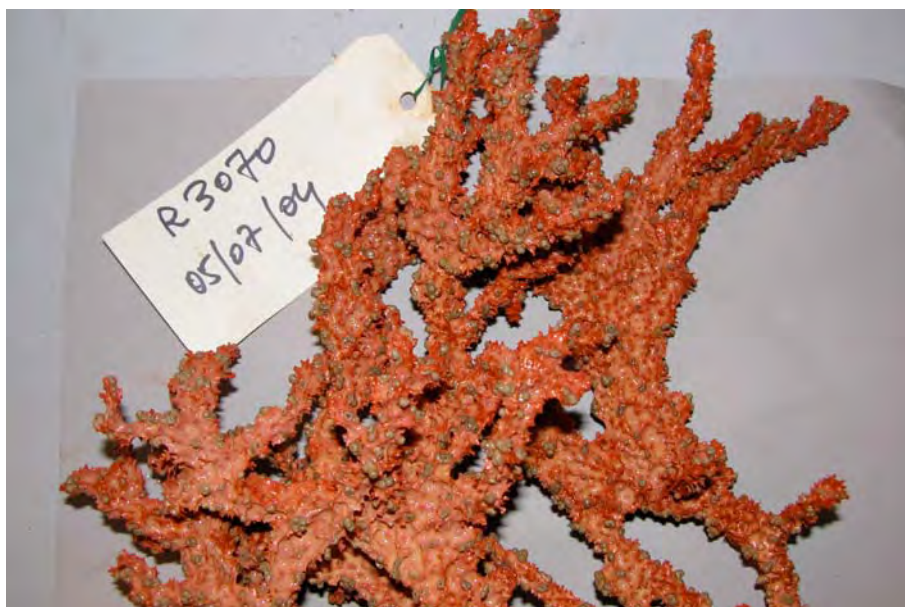


Photo 3 : Photo *ex-situ* de *StyliSSa carteri* (photographe : Eric Folcher, IRD, Nouméa)

II.1. Extraction, fractionnement et purification

L'éponge lyophilisée (304,0 g) a été extraite sous pression au méthanol (2,5 L) dans un extracteur Dionex. Nous avons obtenu 81,7 g d'extrait méthanolique brut. Cet extrait brut a été partitionné entre l'eau et le *n*-butanol (3 x 200 mL). Les phases butanoliques ont été rassemblées puis évaporées pour fournir 38,0 g d'extrait brut et 45,6 g d'extrait aqueux brut (schéma 7).

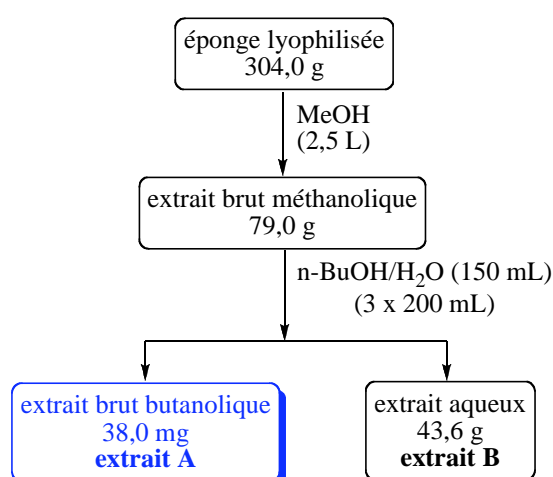


Schéma 7 : Schéma d'extraction adopté pour l'éponge *StyliSSa carteri*

L'extrait butanolique a ensuite été traité par les méthodes chromatographiques.

L'extrait butanolique (extrait **A**) (38,0 g) a été traité par chromatographie sur colonne de silice et élué par les mélanges successifs $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100/0 à 0/100) et $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (100/0 à 80/20), comme indiqué sur le schéma 8. Notons que toutes les étapes ne sont pas détaillées ici pour des raisons de clarté (pour plus d'information, voir matériels et méthodes).

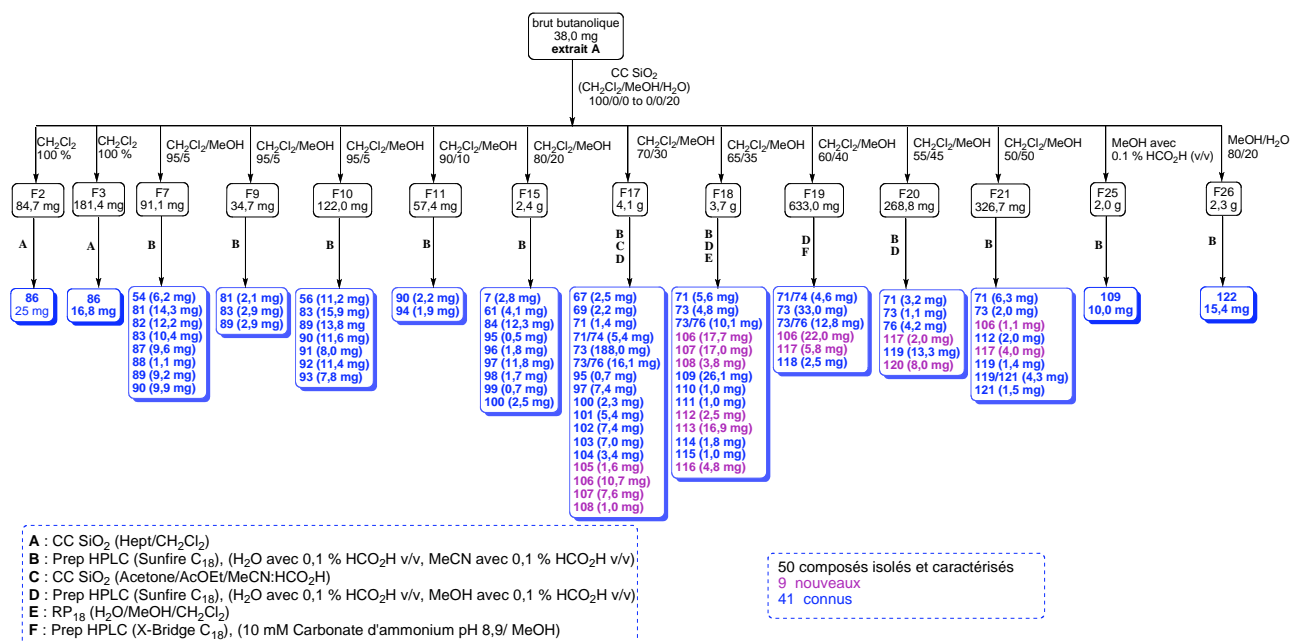


Schéma 8 : Fractionnement de l'extrait butanolique (**A**) de *Stylyssa carteri*

II.2. Élucidations structurales des composés isolés

Après analyse préliminaire des premiers chromatogrammes LC-MS et des spectres RMN, la détermination structurale des métabolites isolés a été facilitée par la comparaison de nos données spectrales avec celles des produits authentiques dont nous disposons au laboratoire, ainsi qu'avec celles de la littérature. Les spectres de masse haute résolution ainsi qu'un spectre RMN du proton ont souvent été suffisants pour identifier les produits connus. Les composés nouveaux qui ont nécessité des études structurales détaillées seront présentés dans ce mémoire.

II.2.1. Composé 86 : Le N-palmitoyl-octadécasphinga-4(E),8(E)-diénine

Le spectre de masse ESI, enregistré en mode positif présente le pic de l'ion quasi-moléculaire $[\text{M} + \text{H}]^+$, à $m/z = 536,6$ soit une masse moléculaire M égale à 535. Le spectre de RMN ¹³C montre la présence de 34 carbones. L'existence d'une fonction amide secondaire a été décelée par une absorption forte en spectrophotométrie IR à 1625 cm^{-1} , corrélée avec un

signal déblindé à δ_C 174,3 ppm en RMN ^{13}C . Le spectre de RMN ^{13}C et l'analyse des spectres de RMN 2D (COSY, HMQC et HMBC) du composé **86** sont en accord avec la présence d'un céramide.

La longue chaîne acyle du composé **86** a été déterminée par l'interprétation des données de spectrométrie de masse. Les ions-fragments à $m/z = 281$ et 298 correspondent respectivement aux fragments **X** et **Y** (figure 67).

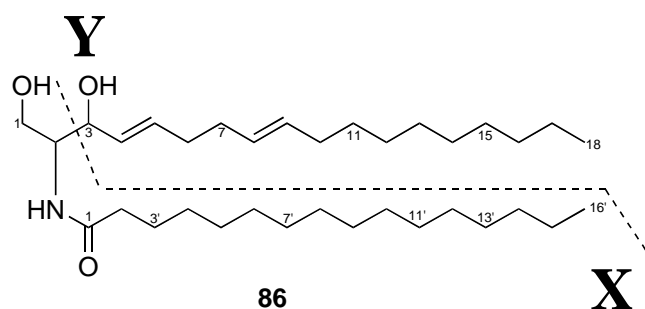


Figure 67 : Fragments principaux du composé **86**

Ces données permettent de proposer la structure ci-dessus (figure 67) pour le composé **86**, qui est identique à la *N*-palmitoyl-octadecasphinga-4(*E*),8(*E*)-diénine isolée à partir de la gorgone *Acabaria undulata*.⁹³ La mesure du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{28} -7,5^\circ$ ($c = 0,6$; CH_2Cl_2) similaire à celle publiée⁹³ $[\alpha]_D^{25} -8,0^\circ$ ($c = 0,5$; $CHCl_3$).

II.2.2. Composé **98** : Le botryllamide F

Les spectres de masse ESI enregistrés en mode positif et négatif présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires respectivement à $m/z = 312,0$ $[M + H]^+$ et $310,0$ $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire de 311,0. Les spectres RMN 1H et ^{13}C indiquent la présence d'un groupement méthoxyle et de deux groupements phénoliques. Le composé **98** a été identifié comme le botryllamide F⁹⁴ (figure 68) après comparaison de ses données spectrales avec celles la littérature. Le botryllamide F a été isolé de l'ascidie *Botrylloides tyreum* et c'est un inhibiteur de tumeur de cellule du côlon humain (HCT-116).⁹⁴

⁹³ Shin, J.; Seo, Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, *58*, 948-953.

⁹⁴ Rao, M. R.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1064-1066.

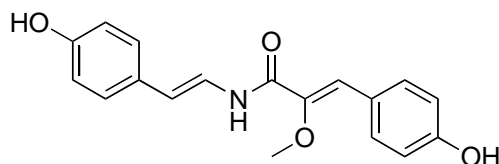


Figure 68 : Botryllamide F (**98**)

II.2.3. Axinastatine 1 (**61**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 753,2 [M + H]^+$ et $751,4 [M - H]^-$ respectivement. Une analyse en SMHR indique la formule brute en $C_{38}H_{56}N_8O_8$. La nature peptidique de **61** était évidente au vu de son spectre RMN 1H . On observe des signaux caractéristiques de protons en alpha d'acides aminés (δ_H 4,05- 4,76 ppm) et d'amides NH. La présence de la phénylalanine a été mise en évidence par des signaux de protons aromatiques à δ_H 7,22 et 7,28 ppm. Les deux systèmes de spins entre δ_H 3,42 et 3,68 ppm indiquent la présence de deux unités proline. Les signaux entre δ_H 0,94 et 1,08 ppm correspondent à des groupements méthyles de la valine. Les sept unités d'acides aminés du composé **61** correspondent à une unité de phénylalanine, une d'asparagine, deux de proline et trois de valine. Les données spectrales nous permettent de proposer la structure ci-dessous (figure 69) pour le composé **61**, qui est identique à l'axinastatine 1 qui a été isolée pour la première fois des éponges *Axinella* sp⁹⁵ et *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*).⁸³ Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{28} -155,6^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH) est similaire à celui décrit dans la littérature⁹⁵ $[\alpha]_D^{25} -161,6^\circ$ ($c = 0,01$, MeOH).

II.2.4. Axinelline B (**54**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en mode positif et en mode négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires respectivement à $m/z = 938,2 [M + H]^+$ et $936,4 [M - H]^-$. Une analyse en SMHR indique que le produit répond à la formule brute $C_{50}H_{67}N_9O_9$. La nature de peptide cyclique de la molécule **54** est évidente au vu de son spectre RMN 1H . Les huit acides aminés du composé **54** sont identifiés à une phénylalanine, un tryptophane, une valine, une thréonine, une leucine et trois prolines. Les données spectrales ont permis de proposer la structure ci-dessous (figure 69) pour le composé **54**, qui est identique à l'axinelline B isolée

⁹⁵ Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Leet, J. E.; Dufresne, C.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Cerny, R. L.; Hooper, J. N. A.; Rutzler, K. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3339-3340.

de l'éponge *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*).⁸² Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{28} +58,6^\circ$ ($c = 0,01$, MeOH) est similaire à celui décrit dans la littérature⁸² $[\alpha]_D +50,0^\circ$ ($c = 0,001$, MeOH)) pour l'axinelline B.

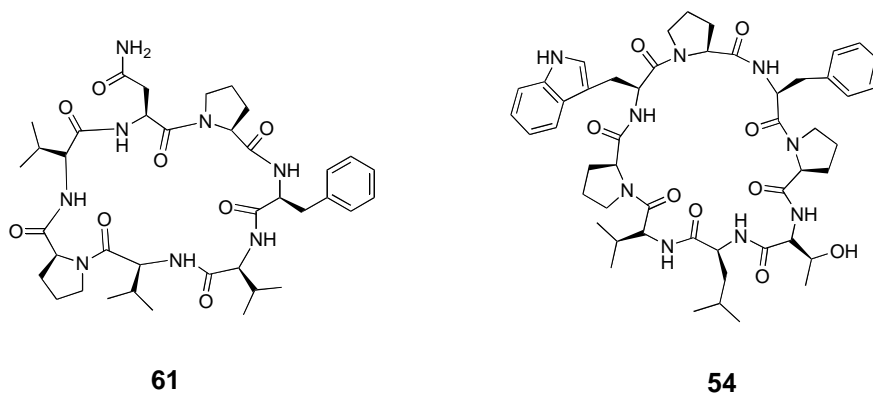


Figure 69 : Axinastatine 1 (**61**) et Axinelline B **54**

II.2.5. Stylostatine 1 (**56**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en mode positif et en mode négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 744,5 [M + H]^+$ et $742,4 [M - H]^-$. Une analyse en SMHR permet de proposer la formule brute $C_{36}H_{58}N_8O_9$. Là encore, au vu des spectres de RMN 1H et de masse, nous avons à faire à un heptapeptide cyclique. Les sept acides aminés du composé **56** sont une phénylalanine, une proline, une isoleucine, une alanine, une sérine, une leucine et une asparagine. Les données spectrales permettent de proposer la structure ci-dessous (figure 70) pour le composé **56**, qui est identique à la stylostatine 1 isolée pour la première fois à partir de l'éponge *Stylotella aurantium*⁹⁶ et de l'éponge *Axinella carteri* (= *Stylissa carteri*).⁸² Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{28} -106^\circ$ ($c = 0,15$, MeOH) est similaire à celui décrit dans la littérature⁹⁶ $[\alpha]_D^{25} -116^\circ$ ($c = 0,29$, MeOH).

II.2.6. Axinastatine 2 (**89**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 767,5 [M + H]^+$ et $765,1 [M - H]^-$. L'analyse en SMHR de l'ion pseudo-moléculaire donne la formule brute $C_{39}H_{58}N_8O_8$. Les spectres de RMN 1H et de masse montrent que ce cyclopeptide **89** est composé de sept acides aminés : une asparagine, une

⁹⁶ Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Herald, D. L.; Erickson, K. L.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Bakus, G. J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7217-7220.

phénylalanine, une leucine, deux prolines et deux valines. Les données spectrales permettent de proposer la structure ci-dessous (figure 70) pour le composé **89**, qui est identique à l'axinastatine 2 isolé de l'éponge *Axinella* sp.⁹⁷ Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{28}$ $-149,6^\circ$ ($c = 0,2$, MeOH) est similaire à celui décrit dans la littérature⁹⁷ $[\alpha]_D$ -153° ($c = 0,17$, MeOH).

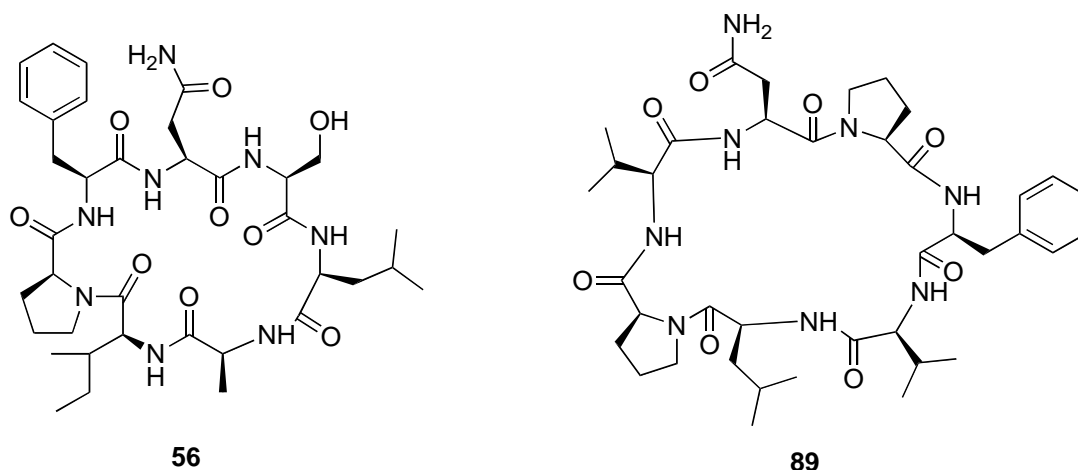


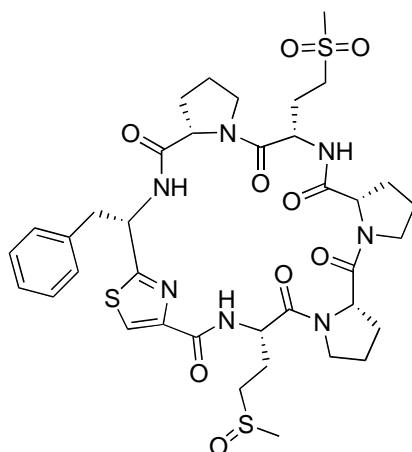
Figure 70 : Stylostatine 1 (**56**) et Axinastatine 2 (**89**)

II.2.7. Dérivé sulfoné de waiakéamide (**90**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires respectivement à $m/z = 832,2$ $[M + H]^+$ et $830,3$ $[M - H]^-$. La formule brute $C_{37}H_{49}N_7O_9$ est obtenue par l'analyse en SMHR de l'ion moléculaire protoné. Les six acides aminés de ce peptide sont une « phénylalanine », une méthionine sulfoxyde une méthionine sulfone et trois prolines. Les données spectrales permettent d'assigner la structure ci-dessous (figure 71) au composé **90**, identique au dérivé sulfoné du waiakéamide isolé de l'éponge *Haliclona* sp.⁹⁸ Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{28}$ $-96,6^\circ$ ($c = 0,20$, $CHCl_3$) est similaire à celui décrit dans la littérature⁹⁸ $[\alpha]_D$ -108° ($c = 0,16$, $CHCl_3$).

⁹⁷ Pettit, G. R.; Gao, F.; Cerny, R. L.; Doubek, D. L.; Tackett, L. P.; Schmidt, J. M.; Chapuis, J.-C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1165-1168.

⁹⁸ Sera, Y.; Adachi, K.; Fujii, K.; Shizuri, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 719-721.



90

Figure 71 : Waiakéamide (90)

Note :

L'étude séquentielle des cyclopeptides par spectrométrie de masse

L'analyse des fragmentations en spectrométrie de masse (MS/MS) d'un peptide linéaire permet de déterminer sa séquence. La fragmentation en spectrométrie de masse (mode positif) au niveau de chacun des acides aminés constitutifs du squelette peptidique peut s'effectuer par rupture des liaisons NH-C α , C α -CO, ou CO-NH pour générer respectivement les ions a_n, b_n ou c_n si la charge est conservée sur le fragment N-terminal, ou x_{m-n}, y_{m-n} ou z_{m-n} si la charge est conservée sur le fragment C-terminal. Dans cette nomenclature n est le numéro de l'acide aminé à partir du résidu N-terminal et m le nombre total de résidus du peptide considéré. Les ions les plus fréquemment observés sont les ions de type b_n (ion acylium) ou y_{m-n} (ion acylium). De même la rupture de la liaison entre C α et CO, conduit à la formation de la série d'ions a_n (figure 1).

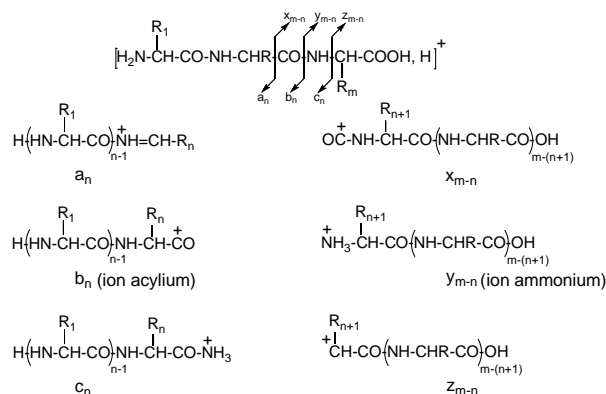


Figure 1 : Principaux ions obtenus en spectrométrie de masse par fragmentation

La différence de masse entre deux ions consécutifs de la même série b_n , y_{m-n} ou a_n correspond à la masse du résidu éliminé, permet en général de l'identifier et ainsi de déterminer l'enchaînement des acides aminés. Toutefois, il n'est pas possible de différencier à ce niveau deux acides aminés isomères tels la leucine et l'isoleucine.

Le séquençage des peptides cycliques est très délicat en raison des multiples possibilités de linéarisation d'un tel peptide à l'issue de son ionisation par protonation. En effet celle-ci peut être faite sur les atomes d'azote de chacune des liaisons amides de la molécule. Le cyclopeptide peut alors conduire à autant de peptides linéaires qu'il comporte d'acides aminés. Chacun de ces peptides se fragmente à son tour pour former des séries d'ions b_n , a_n et y_{m-n} (figure 2a). Le spectre est alors très complexe et difficile à interpréter. Toutefois, pour les cyclopeptides qui comportent une proline (ou un très petit nombre de prolines), le spectre est simplifié. En effet, le groupe amide des liaisons Xaa-Pro présente un caractère basique plus marqué du fait de la proline, acide aminé comportant une fonction amide secondaire et non primaire⁹⁹. De ce fait, leur azote amide tertiaire est un site de protonation privilégié. On observe une rupture préférentielle de la liaison amide entre la proline et l'acide aminé précédent (Xaa) pour conduire à un peptide linéaire majoritairement et dont le résidu N-terminal est la proline (figure 2b). Sa fragmentation permet alors de déduire aisément sa séquence.

L'interprétation des spectres de masse MS/MS de peptides cycliques contenant deux ou trois prolines conduit à deux ou trois peptides linéaires, dont les fragmentations ultérieures sont superposées rendant les spectres plus complexes, mais leur interprétation reste en général réalisable.

⁹⁹ Wèlè, A.; Zhang, Y.; Caux, C.; Brouard, J.-P.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *Comptes Rendus Chimie* 7, 981-988.

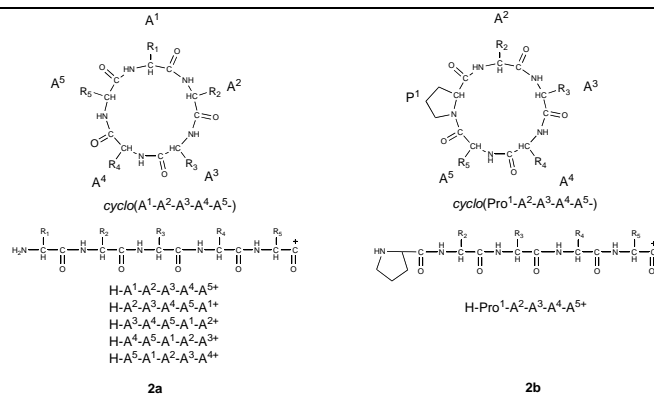


Figure 2 : Génération aléatoire (2a) ou préférentielle (2b) de peptides linéaires à partir d'un peptide cyclique

Comme tous les peptides cycliques que nous avons isolés à partir de l'éponge *Stylissa carteri* possèdent au moins une proline, nous avons entrepris l'étude de leur séquence par spectrométrie de masse. L'axinastatine 1 (**50**), par exemple présente un ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 753,2 et sa composition indique qu'il renferme deux prolines. Dans les fragments de cet ion, la première coupure au niveau de l'une des prolines (Pro^a) permet d'observer une série d'ions acylium (b_n^1) à m/z 654,2, 555,3, 408,1 311,2 et 197,1 correspondant à la perte successive de Val^c , Val^b , Phe, Pro^b , Asn et Val^a-Pro^a . Une deuxième linéarisation a lieu au niveau de la liaison amide Asn- Pro^b , qui conduit à la série d'ions acylium (b_n^2) à m/z 639,2, 540,2, 443,1, 344,4 et 254,2 et correspondant à la perte successive de Asn, Val^a , Pro^a , Val^c , Val^b et Pro^b-Phe (figure 3).

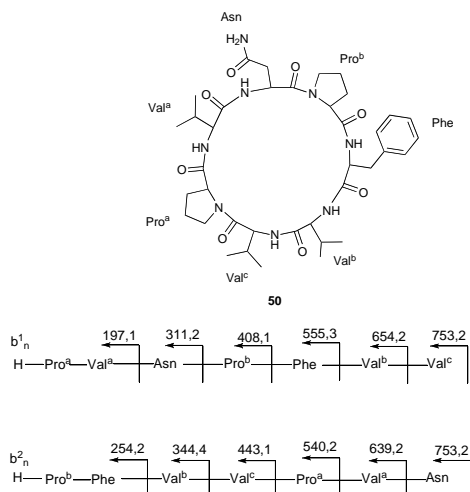


Figure 3 : Fragments observés dans le spectre MS/MS de l'axinastatine 1

¹⁰⁰ Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, 6, 1425-1436.

La présence de deux prolines rend le spectre plus complexe, mais la détermination de la séquence reste possible sans ambiguïté. Nous avons vu que le séquençage des cyclopeptides de 6 à 8 résidus possédant trois prolines, rendre le séquençage par MS/MS plus délicat, mais réalisable. La présence d'acides aminés isomères tels Leu et Ile laisse une ambiguïté sur leurs positions respectives.

Structure secondaire :

C'est l'arrangement, dans l'espace, du squelette peptidique qui peut être organisé en 3 grands types principaux de structures: hélices le plus souvent de type α , feuillets β parallèles ou antiparallèles et coudes. Seuls les coudes seront explicités ici. Les coudes, comme les autres structures peptidiques, sont stabilisés par des liaisons hydrogène entre le carbonyle ($>C=O$) du groupe amide d'un résidu avec le $-NH-$ du groupe amide d'un autre résidu.

Les coudes (ou « turn ») imposent un changement brusque de direction (d'environ 180°) à la chaîne polypeptidique et sont stabilisés par une liaison hydrogène. Il en existe de différents types selon le nombre de résidus impliqués, la taille et la nature du cycle de chélation et ils ont été définis pas C.M Vankatachalam.¹⁰⁰

Parmi les principaux types de coudes observés dans les peptides cycliques on peut noter :

- Le coude γ : il implique 3 résidus et il est stabilisé par un cycle de chélation à 7 liaisons. Le carbonyle du résidu R_1 est chélaté avec le NH du résidu R_3 (figure 4a).
- Les coudes β : ils impliquent 4 résidus et sont stabilisés par un cycle de chélation à 10 liaisons. Le carbonyle du résidu R_1 est chélaté avec le NH du résidu R_4 (figure 4b). Il en existe plusieurs types. Ainsi dans le type I (figure 4c), le groupe $C=O$ est en avant du plan moyen, tandis que dans le type II (figure 4d), il pointe en arrière.

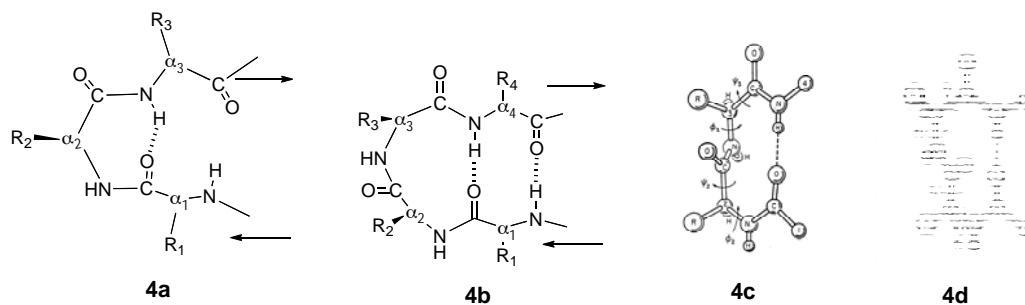


Figure 4 : Coude γ à 3 résidus et β à 4 résidus

Comme parfois dans les protéines, la configuration de la liaison Xaa-Pro dans les peptides cycliques peut être *cis* ou *trans*. La configuration *trans* de cette liaison est caractérisée par une disposition *trans* des protons H α des deux acides aminés Xaa et Pro et en RMN on observe un nOe intense entre le H α de Xaa et les H δ de la proline. En RMN du ^{13}C on observe un déplacement chimique du carbone γ de la proline entre 24 et 26 ppm (figure 5). La configuration *cis* de cette liaison Xaa-Pro est caractérisée par une disposition *cis* des protons H α des deux acides aminés Xaa et Pro et en RMN on observe un NOE intense entre ces H α de Xaa. En RMN du ^{13}C on observe un déplacement chimique du carbone γ de la proline entre 21 et 23 ppm.

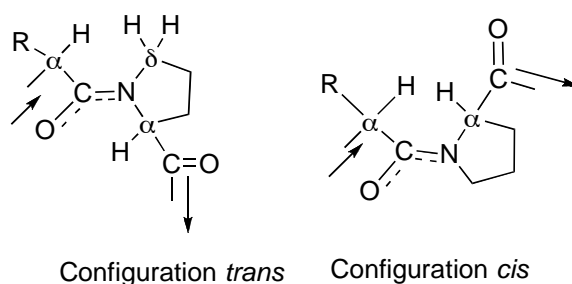


Figure 5 : Liaisons Xaa-Pro

II.2.8. Les pyrroles simples (87, 81, 82 et 100)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en mode positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 111 [M + H]^+$ et $109 [M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 110. Après recherche dans les bases de données et comparaison avec la littérature, le pyrrole-2-carboxamide (**87**) (figure 72) a été caractérisé. Cette molécule avait été isolée à partir de plusieurs éponges des genres *Agelas* et *Axinella* dont *Agelas oroides*.¹⁰¹ Les pyrroles-2-carboxamides monobromé (**81**) et dibromé (**82**) ont également été isolés. Ces molécules ont été isolées des éponges *Acanthella carteri* (= *Stylissa carteri*)⁸⁹ et *Agelas oroides*.¹⁰² Le produit **100** a été identifié comme l'acide 4-bromopyrrole-2-carboxlique (figure 72) après comparaison de ses données spectrales (masse moléculaire et RMN ^1H) avec celles de la littérature.¹⁰¹

¹⁰¹ König, G. M.; Wright, A. D. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, 5, 141-146.

¹⁰² Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1129-1130.

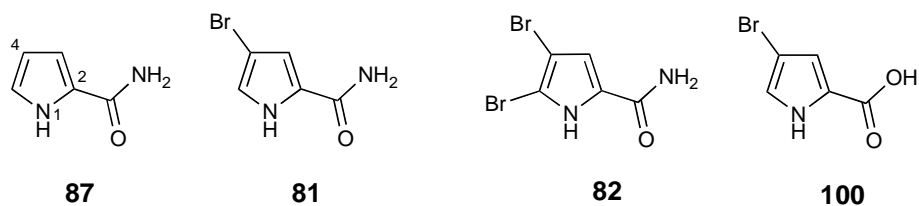


Figure 72 : Les pyrroles simples

II.2.9. Dérivés pyrrolo-piperazines et pyrroloazépines (83, 88 et 91-92)

Les spectres de masse ESI enregistrés en mode positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 165 [M + H]^+$ et $163 [M - H]^-$ soit une masse moléculaire de 164. Après recherche dans les bases de données et comparaison avec la littérature, ce produit a été identifié à l'aldisine (**83**) (figure 73). Cette molécule a été isolée pour la première fois des éponges *Hymenaicidon aldis*,¹⁰³ *Acanthella carteri* (*Stylissa carteri*),⁹⁰ puis *Pseudaxynissa cantharella* (*Cymbastella cantharella*)¹⁰⁴. Enfin, nous avons isolé la 2-bromoaldisine (**88**), déjà décrite de l'éponge *Hymenaicidon aldis*.¹⁰³

Le composé **91** a été identifié comme la mukanadine C après comparaison de ses données spectrales (masse moléculaire et RMN ¹H) avec celles de la littérature. Cette molécule a été isolée de l'éponge *Agelas nakamuri*.¹⁰⁵ Le longamide (**92**), isolé auparavant de l'éponge *Agelas longissim*,¹⁰⁶ a été également identifié dans notre éponge (*Stylissa carteri*).

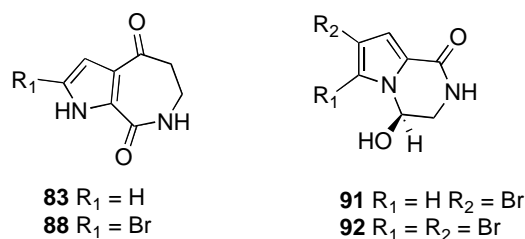


Figure 73

¹⁰³ Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. V. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 47-53.

¹⁰⁴ De Nanteuil, G.; Ahond, A.; Guilhem, J.; Poupat, C.; Dau, E. T. H.; Potier, P.; Pusset, M.; Pusset, J.; Laboute, P. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 6019-6033.

¹⁰⁵ Uemoto, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1581-1583.

¹⁰⁶ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Taglialatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7893-7896.

II.2.9.1. Les dérivés polycycliques de l'oroïdine : C6/C15 (67, 69, 71, 73-74, 76 et 94)

La stévensine ou odiline (**67**) (figure 74) a été identifiée après comparaison des données de spectrométrie de masse et de RMN ^1H avec la littérature. Cette molécule a été isolée à partir d'une éponge non identifiée¹⁰⁷ et de *Cymbastella cantharella* (*Pseudaxynissa cantharella*)¹⁰⁴ et aussi de l'éponge *Stylissa carteri*.⁷⁹ De la même manière les composés fréquemment rencontrés dans les genres d'éponge *Agelas* et *Axinella* comme la *Z*-hyménialdisine (**71**) et la *Z*-débromohyménialdisine (**73**), la *E*-hyménialdisine (**74**) et la *E*-débromohyménialdisine (**76**) ont été également isolés. Dans la littérature, la *Z*-hyménialdisine (**71**) a été décrite à partir de l'éponge *Axinella verrucosa* et *Acanthella aurantiaca*¹⁰⁸ ainsi que de l'éponge *Stylissa carteri*,⁷⁹ alors que les molécules **73**, **74** et **76** ont été trouvées dans les éponges *Phakellia flabellata*¹⁰⁹ et *Stylissa carteri*.⁷⁹ La spongacidine D (**94**)⁵⁹ et l'hyménine (**69**)^{110,79} ont aussi été isolés.

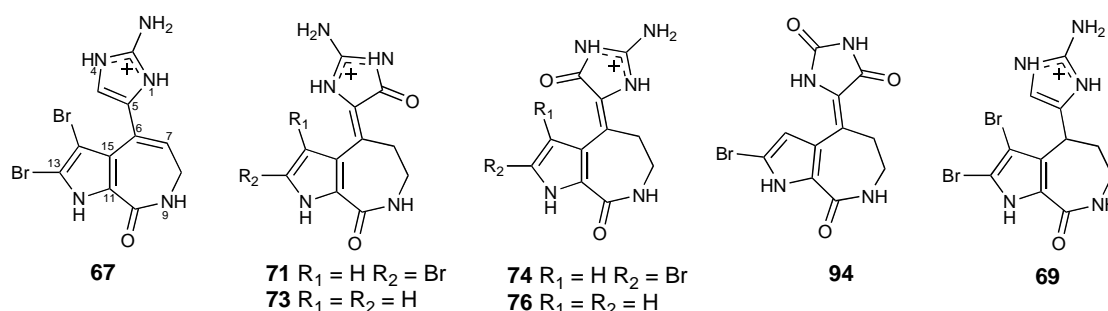


Figure 74

¹⁰⁷ Albizati, K. F.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4163-4164.

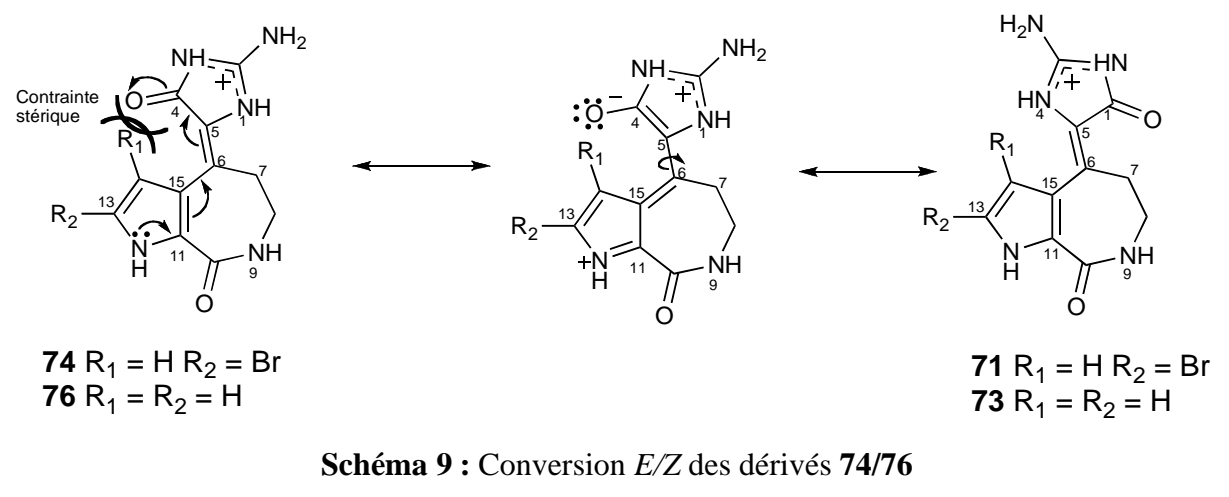
¹⁰⁸ Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 767-768.

¹⁰⁹ M., S. G.; Buyer, J. S.; Pomerantz, M. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 435-436.

¹¹⁰ Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y.; Wakamatsu, K.; Miyazawa, T. *CMLS-Cell Mol. Life S.* **1986**, *42*, 1064-1065.

Note :

Les composés **74** et **76** sont instables et s'isomérisent respectivement en **71** et **73**. L'isomérisation $E \leftrightarrow Z$ est expliquée par le caractère « push-pull » des substituants de la double liaison. La meilleure façon d'expliquer cette isomérisation est par la structure mésomère zwitterionique (schéma 9). Il y a une contrainte stérique entre le proton de C14 et l'oxygène en C4 dans les composés **74** et **76**.⁷⁹

**II.2.10. Les monomères de type oroïdine****II.2.10.1. Composés 7, 93, 95, 97, 99, 101, 103-104, 110 et 114**

L'oroïdine (**7**),^{79,101} l'hyménidine (**97**)¹¹¹ et la clathrodine (**95**)¹¹² ont été isolées et caractérisées après comparaison de leurs données (masse moléculaire et RMN ¹H) à celles de la littérature. Après comparaison des données de spectrométrie de masse et RMN ¹H à la littérature, la mukanadine B (**93**)¹⁰⁵, la kéramadine (**104**),¹¹³ le dispacamide A (**99**),¹¹⁴ le

¹¹¹ Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. *CMLS-Cell Mol. Life S.* **1986**, *42*, 1176-1177.

¹¹² Morales, J.; Rodriguez, A. L. D. *J. Nat. Prod.* **2004**, *54*, 629-631.

¹¹³ Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2475-2478.

¹¹⁴ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587-3590.

dispacamide D ou muknadine A (**103**),^{105,115} le taurodispacamide A (**114**)⁸⁶, le taurodispacamide B (**101**)¹¹⁶ et le tauroacidine B (**110**)¹¹⁷ (figure 75) ont été identifiés.

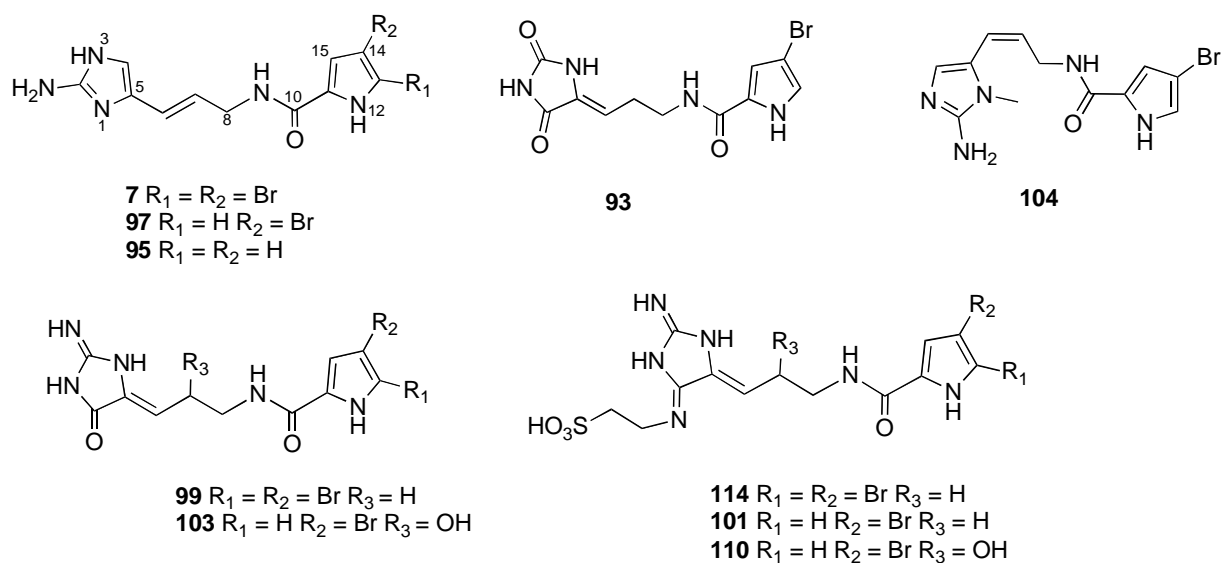


Figure 75

¹¹⁵ Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O.; Vallefucio, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2283-2288.

¹¹⁶ Aiello, A.; D'esposito, M.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Müller, W. E. G.; Perovic-Ottstadt, S.; Schröder, H. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 17-24.

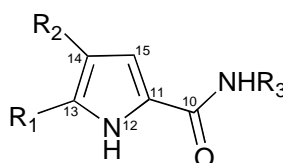
¹¹⁷ Kobayashi, J.; Inaba, K.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1997**, 53, 16679-16682.

Note :**Les déplacements chimiques des protons pyrroliques**

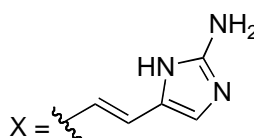
Les pyrroles de la famille des pyrrole-2-aminoimidazoles peuvent exister sous des formes plus ou moins bromées. L'attribution des positions de bromation sur le pyrrole peut s'avérer difficile même si celle-ci peut sembler évidente. La succession des carbones quaternaires et les valeurs des couplages J_3 et J_4 très proches nécessitent la mise en place de règles empiriques qui aident au positionnement des substituants. Dans notre cas, nous avons noté les déplacements chimiques des protons pyrroliques pour 6 molécules (sans brome, monobromé et dibromé).

| Molécules | δ_H des protons pyrroliques (CD ₃ OD) | | |
|-----------|---|------|------|
| | H13 | H14 | H15 |
| 87 | 6,91 | 6,16 | 6,81 |
| 81 | 6,92 | - | 6,81 |
| 82 | - | - | 6,84 |
| 95 | 6,92 | 6,17 | 6,79 |
| 97 | 6,92 | - | 6,80 |
| 7 | - | - | 6,84 |

Les déplacements chimiques de certains protons



| | | | |
|-----------|------------|------------|-----------|
| 85 | $R_1 = H$ | $R_2 = H$ | $R_3 = H$ |
| 79 | $R_1 = H$ | $R_2 = Br$ | $R_3 = H$ |
| 80 | $R_1 = Br$ | $R_2 = Br$ | $R_3 = H$ |
| 93 | $R_1 = H$ | $R_2 = H$ | $R_3 = X$ |
| 95 | $R_1 = H$ | $R_2 = Br$ | $R_3 = X$ |
| 64 | $R_1 = Br$ | $R_2 = Br$ | $R_3 = X$ |



La comparaison des spectres RMN ¹H conduit aux conclusions suivantes : les déplacements chimiques des protons H2 (≈ 6.9 ppm), H3 (≈ 6.2 ppm) et H4 (≈ 6.8 ppm) ne varient pas en fonction des degrés de bromation et de substitution de l'azote de l'amide. Tous se passe comme si l'introduction d'un brome à une position donnée n'affecte pas les déplacements chimiques des protons voisins. La position du brome sera donc généralement attribuée au carbone qui portait le proton absent.

II.2.10.2. Le stylissazole H (105)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en mode positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 326/327$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $324/326$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à $325/327$. Une analyse en SMHR nous donne la formule brute $C_{11}H_{12}BrN_5O_2$ pour ce composé. Le spectre RMN 1H montre la présence de deux protons méthyne déblindés (H6 et H7) à 4,70 et 4,95 ppm, un méthylène (H8a et H8b) à 3,88 (m) et 4,04 (m) ppm. On distingue également deux protons pyrroliques (H13 et H15) à 6,96 et 6,78 ppm. La présence d'un noyau 2-aminoimidazolone et d'un proton imidazolique à 6,75 ppm (H4) suggère la présence de ces deux noyaux. L'étude des corrélations COSY (H-H) montre que cet hétérocycle inclut C7 et C8 avec H6 déblindé à 4,70 ppm. Deux protons pyrroliques sont observés montrant que N1-C15 n'est pas de type cyclooroïdine (cyclisation N12-C7). Le signal très déblindé du proton H7 à 4,95 ppm (m) peut être attribué à un méthyne lié à un oxygène nous conduisant à proposer un cycle oxazoline.

Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure **105** à ce composé qui a été nommé stylissazole H (figure 76). La formation du stylissazole H à partir de l'hyménidine (**97**) est détaillée ci-dessous.

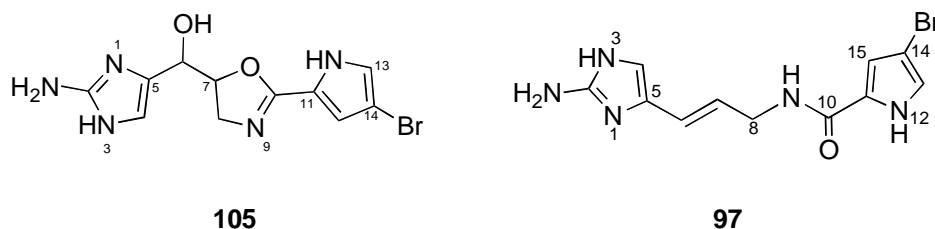
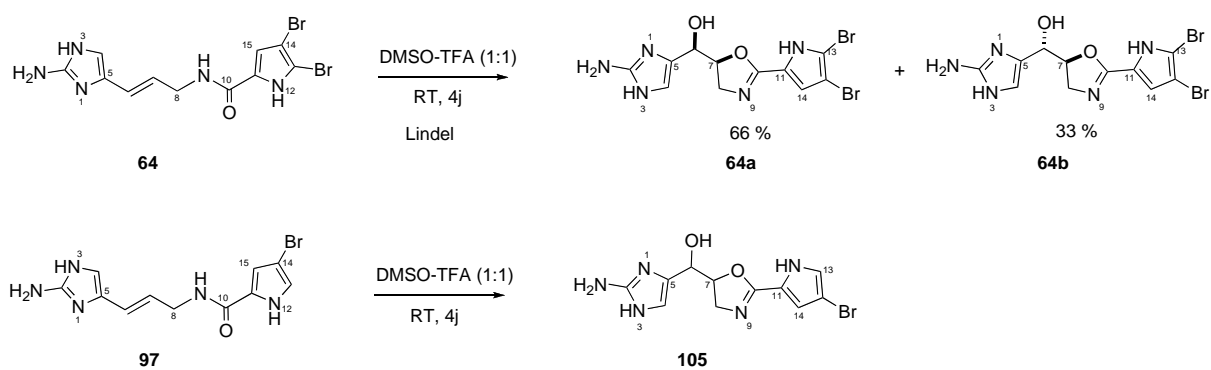


Figure 76

L'analogue bromé du stylissazole H a été décrit par Lindel et *coll.*¹¹⁸ comme étant le produit de décomposition de l'oroïdine. Nous avons tenté l'hémisynthèse du stylissazole H dans les mêmes conditions que celles Lindel et *coll.* mais en utilisant l'hyménidine (**97**) en milieu TFA-DMSO (schéma 10).

¹¹⁸ Lindel, T.; Breckle, G.; Hochgürtel, M.; Volk, C.; Grube, A.; Köck, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8149-8152.



La superposition des spectres de RMN ^1H du stylissazole H (**105**), de l'hyménidine (**97**) et du milieu réactionnel sont représentés dans figure 77. La comparaison de ces spectres conduits à la conclusion que l'hyménidine se décompose en l'oxazoline pour mener au stylissazole H.

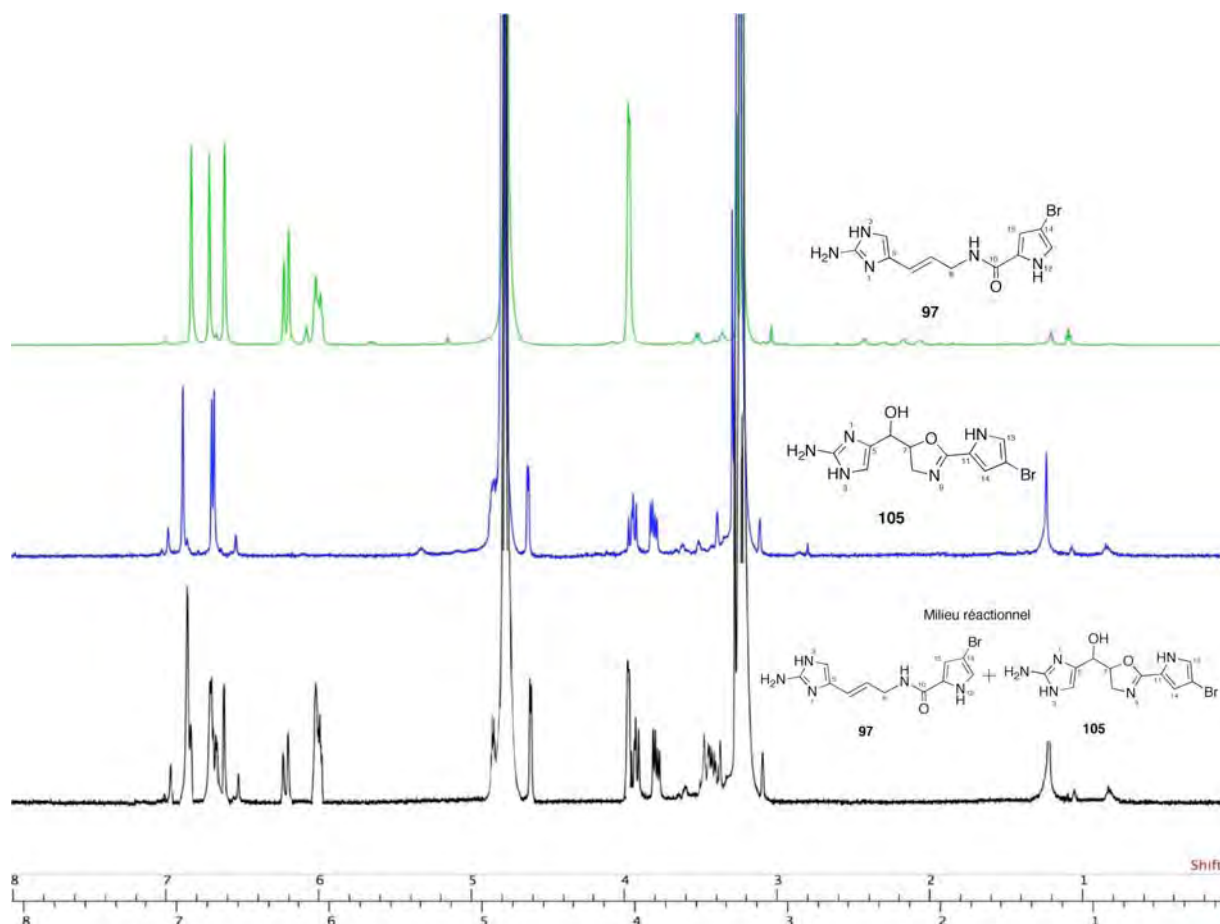


Figure 77 : Comparaison de spectres de RMN ^1H du stylissazole H (**105**), de l'hyménidine (**97**) et de la réaction de dégradation de l'hyménidine en milieu acide.

II.2.10.3. Alcaloïdes possédant un cycle tétrahydropyrimidine (**119** et **121**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 344/346$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $342/344$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 343/345 ; la distribution isotopique du pic de masse indique que **119** est monobromé. L'analyse des spectres RMN du proton et les recherches dans la base de données ont abouti la manzacidine A¹¹⁹ (**119**) (figure 78) connu. Le produit **119** ainsi que son diastéréoisomère la manzacidine C (**121**) ont déjà été décrits de plusieurs éponges.¹¹⁹

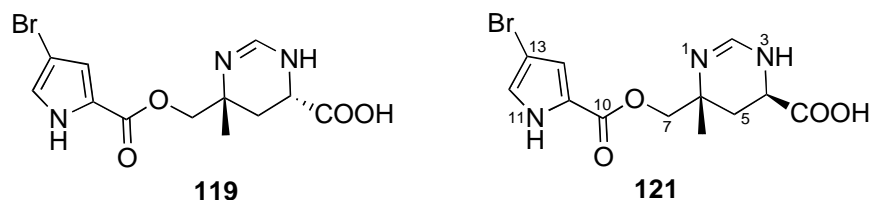


Figure 78 : **119** et son diastéréoisomère **121**

Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D^{27} -26,0^\circ$ ($c = 0,5$, MeOH) pour la manzacidine A et $[\alpha]_D^{27} +46,0^\circ$ ($c = 0,5$, MeOH) pour la manzacidine C sont similaires à ceux décrits dans la littérature¹¹⁹ $[\alpha]_D^{27} -28^\circ$ ($c = 0,7$, MeOH) est $[\alpha]_D^{22} +37^\circ$ ($c = 0,2$, MeOH) respectivement.

II.2.10.4. Les phakellines (**96**, **84** et **111**)

Après comparaison des données de spectrométrie de masse et RMN ¹H, les composés **96**, **84** et **111** que nous avons isolés ont été identifiés respectivement à la monobromoisophakelline,¹²⁰ (**96**) la dibromoisophakelline⁹¹ (**84**) et monobromophakelline¹²¹ (**111**). Les pouvoirs rotatoires sont similaires à ceux décrits dans la littérature.^{91,120,121}

¹¹⁹ Kobayashi, J.; Kanda, F.; Ishibashi, M.; Shigemori, H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4574-4576.

¹²⁰ Assmann, M.; Köck, M. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57*, 153-156.

¹²¹ Sharma, G.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4118-4124.

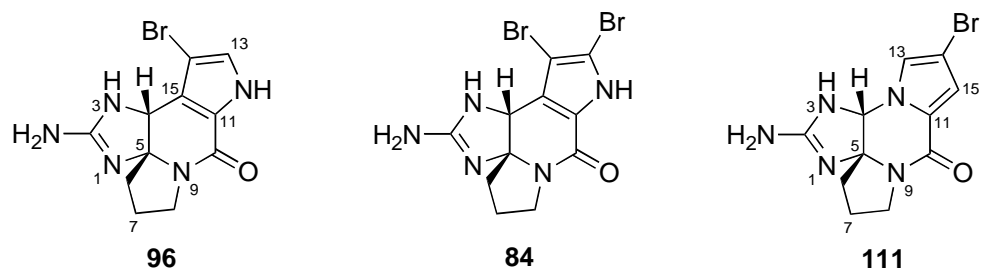


Figure 79 : Les phakellines

II.2.11. Les dimères pyrroles-2-aminoimidazoles simples : la sceptrine 122 et l'agéliférine 109

Les spectres de masse ESI de **122** et **109**, enregistrés en mode positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 619/621/623$ (ratio : 1/2/1) $[M + H]^+$ et $617/619/621$ (ratio : 1/2/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 618/620/622. La distribution isotopique du pic de masse indique que **120** est dibromé. Le composé **122** présente un spectre RMN 1H symétrique caractéristique des produits cyclobutaniques. Il a été identifié à la sceptrine (**122**) déjà isolée de *Agelas sceptrum*¹²² (figure 80). Le spectre RMN 1H du composé **109** montre un cycle cyclohexène fusionné à l'un des deux cycles amino-imidazole. Les spectres RMN du proton de notre produit et ceux de la littérature pour l'agéliférine (**109**) (figure 80) sont superposables. Cette molécule a été isolée de nombreuses éponges dont *Agelas* sp.¹²³

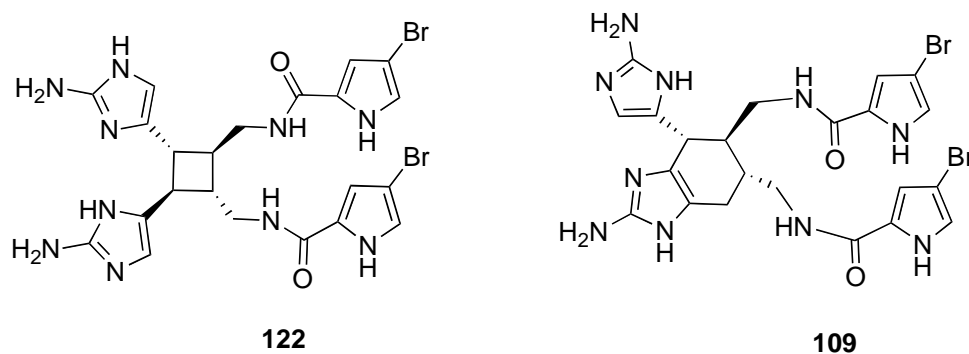


Figure 80 : Les structures des sceptrine et agéliférine

¹²² Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772-6773.

¹²³ Kobayashi, J. I.; Tsuda, M.; Murayama, T.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Ishibashi, M.; Iwamura, M.; Ohta, T.; Nozoe, S. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5579-5586.

II.2.11.1. Le stylissazole I (113)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 541/543$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $539/341$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$. La distribution isotopique révélée par le pic de masse indique que **113** est monobromé. Le spectre RMN 1H du composé **113** est proche de celle de l'agéliférine (**109**).¹²³ L'analyse des spectres RMN 2D confirme bien la structure de l'agéliférine avec un brome de moins. La position du brome a été déterminée par l'analyse des corrélations COSY et nOe (figure 81). Le COSY a montré les corrélations entre les protons H6 à H7, H7 à H8, H8 à H9 ; H6' à H7', H7' à H8', H8' et H9', N12' à H13', H13' à H14' et H14' à H15'. L'analyse des spectres NOESY montre bien les corrélations nOe entre H9 et H15 et H9' à H15'. Les analyses COSY indiquant l'enchaînement H13'-H14'-H15' et NOESY indiquant les corrélations H9/H15 et H9'/H15', nous permet de positionner le brome en C14.

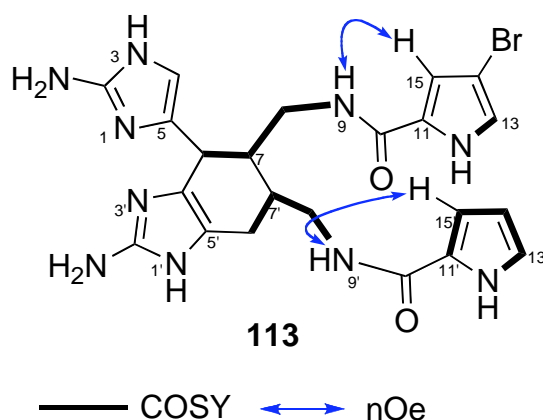


Figure 81 : Stylissazole I (les effets COSY et nOe)

L'analyse des spectres RMN 2D montrent en particulier que des substituants du cyclohexène sont en relation trans-diaxial grâce aux valeurs des constantes de couplage $J_{7-6} = 8,2$ Hz, $J_{7-7'} = 8,5$ Hz et $J_{7'-6'} = 9,1$ Hz (figure 82). Ce composé nouveau est nommé stylissazole I. De plus, les configurations relatives de C6, C7 et C7' ont été déterminées par l'analyse des corrélations nOe comme indiquée sur la figure 82.

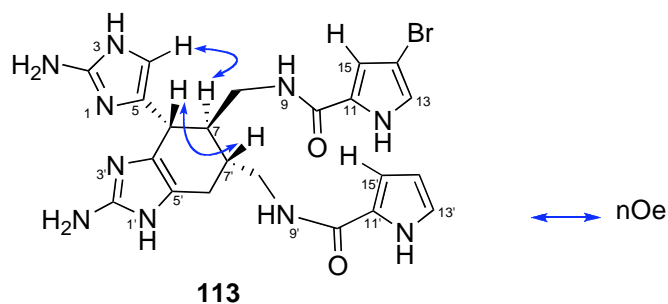


Figure 82 : Stylistazole I (les effets nOe)

II.2.11.2. Le stylistazole F (116)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 633/635/637$ (ratio : 1/2/1) $[M + H]^+$ et $631/633/635$ (ratio : 1/2/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à $632/634/636$ dont la distribution isotopique indique un produit dibromé. Une analyse de masse haute résolution indique une formule brute en $C_{22}H_{22}Br_2N_{10}O_3$. Le spectre RMN 1H de **116** indique la présence de deux allylamines dont 4 protons éthyléniques qui résonnent à $\delta_H = 6,51$ (d, $J = 16,2$ Hz, H6'), $5,93$ (m, H7'), $6,00$ (d, $J = 16,0$ Hz, H6) et $5,93$ (m ; H7) ppm (figure 83). Ces deux sous structures ne sont autres que deux sous-unités orodine reliées l'une à l'autre au niveau des imidazoles.

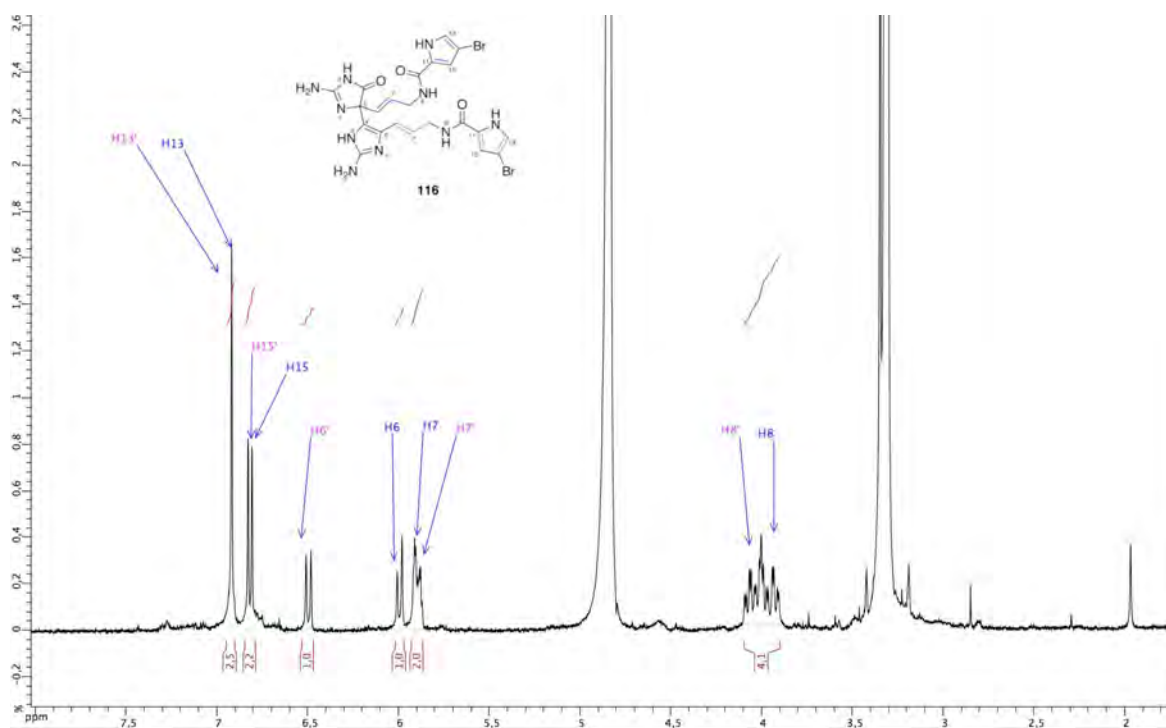


Figure 83 : RMN proton du composé **116**

La comparaison de ces données avec celles de la littérature nous a conduit vers la mauritiamine (**102**)¹²⁴ et le nagélamide P (**115**),¹²⁵ déjà décrits dans la littérature (figure 84).

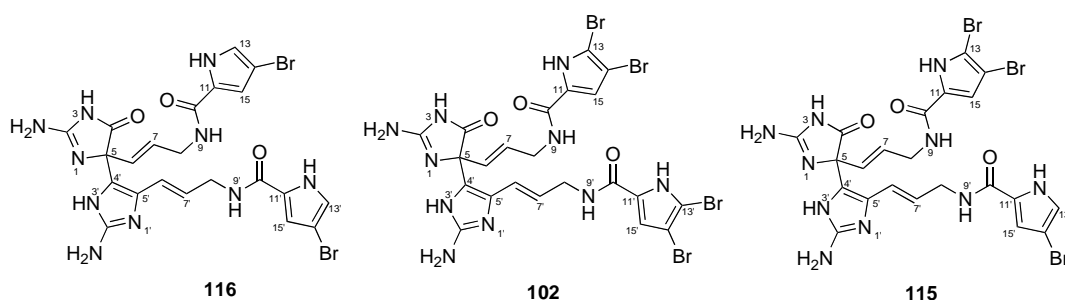


Figure 84 : Stylissazole F, mauritiamine et nagélamide P

Les composés **102**, **115** et **116** sont instables dans le méthanol car une décoloration apparaît après quelques minutes en solution concentrée dans le méthanol deutéré. Cette instabilité ne nous a pas permis d'enregistrer un spectre ¹³C de **116** qui requiert un temps d'acquisition relativement long. Ce produit qui ne diffère de **102** et **115** que par le degré de bromation a été nommé stylissazole F. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{27}$ 0,0 ($c = 0,1$, MeOH) est similaire à celui décrit dans la littérature pour le nagélamide P¹²⁵ (**115**) $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° ($c = 0,5$, MeOH) et la mauritiamine¹²⁴ (**102**) $[\alpha]_D^{25}$ 0,0° ($c = 0,14$, MeOH).

L'activité optique nulle peut s'expliquer par la racémisation via l'équilibre présenté dans le schéma 11 suivant :

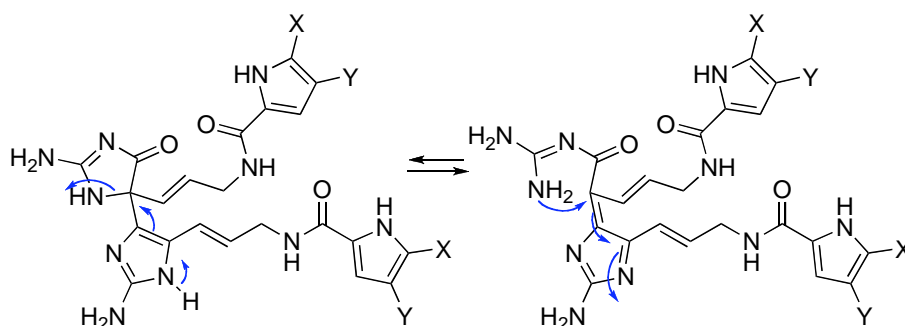


Schéma 11

Ce même équilibre peut expliquer l'instabilité de ce type de P-2-AIs

¹²⁴ Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.

¹²⁵ Yasuda, T.; Araki, A.; Kubota, T.; Ito, J.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 488-491.

II.2.11.3. Le stylissazole G (120)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 740/742/744$ (ratio : 1/2/1) $[M + H]^+$ et $738/740/742$ (ratio : 1/2/1) $[M - H]^-$. La distribution isotopique du pic moléculaire de **120** indique un produit dibromé. Une analyse SMHR établie la formule brute $C_{24}H_{27}Br_2N_{11}O_5S$ pour ce produit. Il apparaît donc également comme étant une structure dimérique possédant deux motifs en $C_{11}N_5$. Le spectre RMN 1H de **120** est très proche de celui du stylissazole F (**116**) au niveau du système aromatique et éthylénique. Les deux méthylènes adjacents ($\delta_H = 3,12$ et $3,86$ ppm) indiquent l'existence d'un motif taurine. Le spectre RMN du proton est très similaire à celui du nagélamide H (**123**) isolé d'*Agelas* sp.¹²⁶ L'étude des spectres RMN 2D et une comparaison précise avec les données spectroscopiques du nagélamide H (**123**) permet de conclure à la structure **120** nommée stylissazole G (figure 85). La connexion de la taurine par l'azote en C4 est les positions des bromes ont été confirmées par l'analyse des spectres HMBC (figure 85).

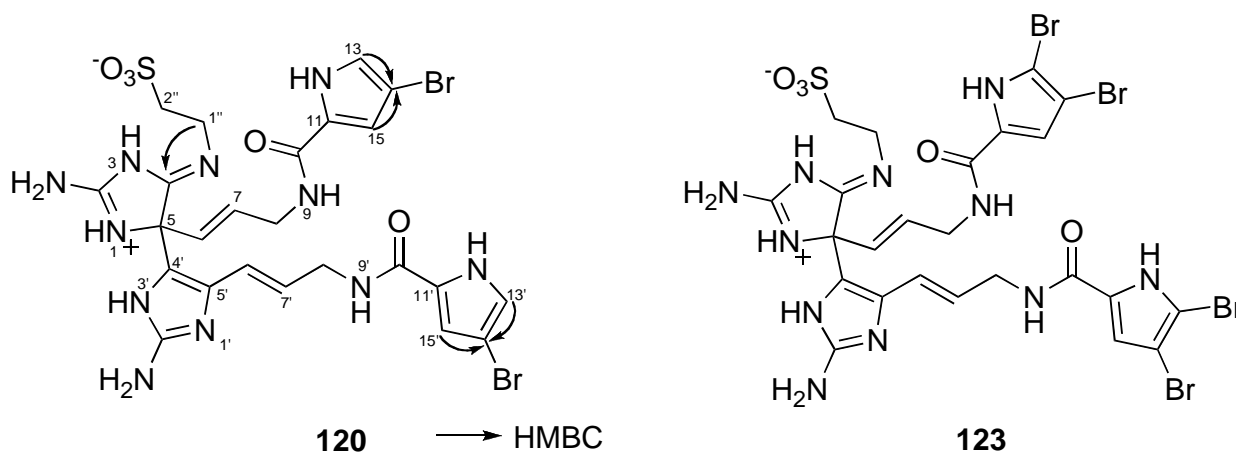


Figure 85 : Stylissazole G et nagélamide H

¹²⁶ Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsunashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1262-1267.

Les composés qui seront décrits dans les paragraphes suivants présentent des structures d'une nouvelle classe du pyrrole-2-aminoimidazoles. Ce sont des structures dimériques dont les liaisons reliant les monomères sont exclusivement entre les azotes et les carbones. Cette sous-classe donne une nouvelle dimension à la diversité moléculaire des P-2-AIs.

II.2.12. Le stylissazole A (106)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 553/555$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $551/553$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 552/554. La distribution isotopique du pic moléculaire indique la présence d'un brome. Une analyse par SMHR révèle une formule brute $C_{22}H_{21}BrN_{10}O_3$. L'analyse du spectre RMN ^{13}C (DMF- d_7) indique la présence de 22 carbones : 13 carbones quaternaires sp^2 , 6 méthines sp^2 et 3 méthylènes sp^3 . L'analyse du spectre de RMN 1H (DMF- d_7) montre 6 protons échangeables ($\delta^H = 11,95 ; 11,51 ; 8,40 ; 7,84 ; 6,94$ (2H) et $5,80$ (2H) ppm) appartenant à des groupes amine ou amide. Sur les 10 azotes, seuls 7 sont détectés sur le spectre RMN ^{15}N . Le composé **106** possède une structure dimérique comprenant deux motifs en $C_{11}N_5$. Le spectre RMN 1H de **106** supporte cette hypothèse avec la présence de deux motifs pyrroliques ($\delta^H = 7,09 ; 7,03 ; 7,05$ et $7,85$ ppm). Les analyses RMN 1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) ont permis de construire deux fragments du composé **106** :

Les protons d'azotes à été déterminé en variant de température de la sonde de l'appareil de la RMN (figure 86) et les déplacements chimiques d'azotes a été déterminé par les analyses 2D HMBC ($^1H/^{15}N$).

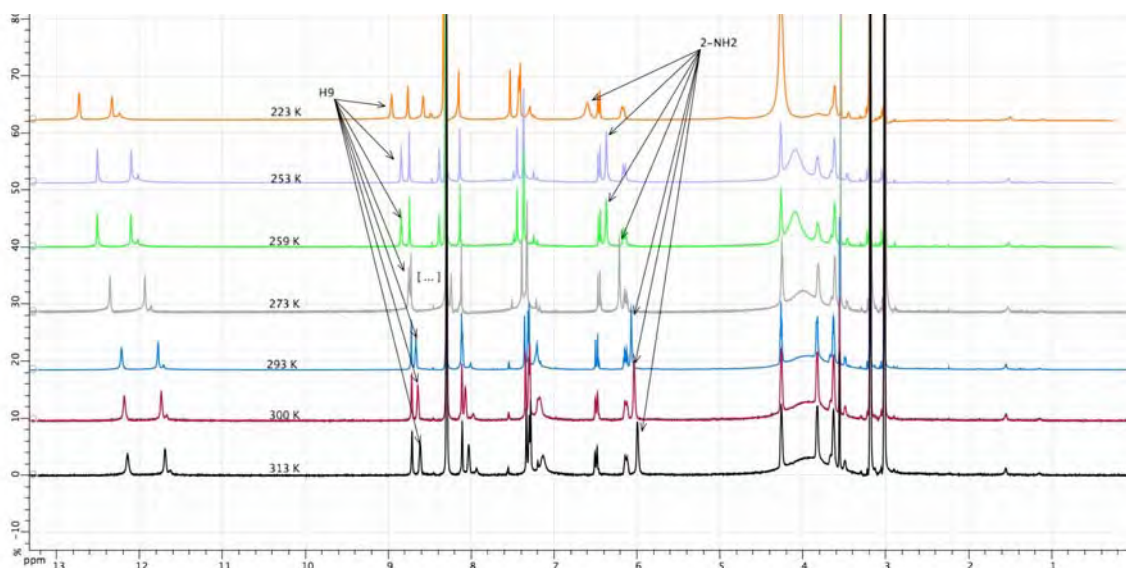


Figure 86 : Les spectre RMN ^1H du compose **106** en variant de température de sonde de l'appareil de la RMN

Fragment 106A :

L'analyse des spectres 2D de **106** indique la présence d'une double liaison C=C disubstituée de géométrie *E* soit 2 protons éthyléniques à 6,22 ppm (1H, d, $J = 15,8$ Hz, H6) et 5,87 ppm (1H, dt, $J = 15,8 ; 6,6$ Hz, H7). L'absence de signal du proton imidazolique sur le spectre RMN du proton et la présence d'un carbone quaternaire à δ_{C} 125,9 ppm (C4) suggèrent la présence d'un noyau 2-aminoimidazole disubstituée ainsi. Les spectres HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}/^{15}\text{N}$) ont mis en évidence une corrélation entre H9 (δ_{H} 8,4 ppm) et C10 (δ_{C} 159,8 ppm) indiquant que le cycle monobromopyrrolique (NH12-C10) est lié à NH9. La présence d'une liaison entre le noyau 2-aminoimidazole (N1-C5) et le carbone C6 est confirmée par les corrélations entre H6 (δ_{H} 6,22 ppm) à C5 (δ_{C} 119,1 ppm) et C4 (δ_{C} 125,7 ppm). Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure partielle **106A** au motif hyménidine (**97**) (figure 87).

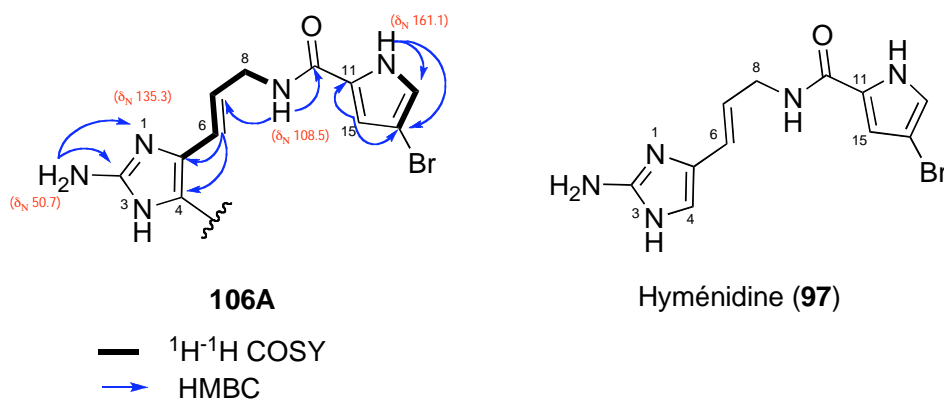


Figure 87 : Structure partielle 106A ainsi que celle de l'hyménidine

Fragment 106B

Le spectre RMN ^1H indique le motif pyrroloïque H13' (δ_{H} 7,05, t, $J = 2,7$ Hz) et H14' (δ_{H} 7,85, t, $J = 2,7$ Hz,). Les déplacements chimiques des protons H13' et H14' et les petits couplages vicinaux correspondent aux protons α et β du cycle pyrroloïque. Le second couplage a été mis en évidence par le découplage observé lors de l'échange du proton H12'. Le deuxième enchaînement est $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ (C7'-C8'-C9'), (δ_{H} 3,83, m, H7' ; δ_{H} 3,36, m, H8' ; δ_{H} 7,84, t, $J = 4,7$ Hz, H9'). Les analyses RMN ^1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}/^{15}\text{N}$) ont permis de construire la structure partielle **106B** (figure 88) pour ce fragment. Elle est confirmée par la comparaison des données RMN à celles de la *Z*-débromohyménidisine (**73**) et de la *E*-débromohyménidisine (**76**).

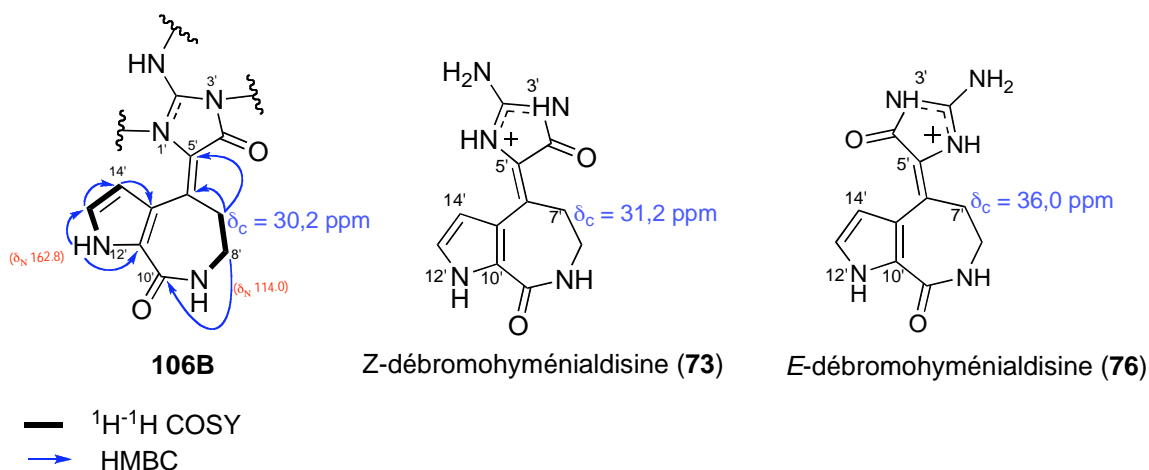


Figure 88 : Structures partielles **106A** et **106B** ainsi que celle de la débromohyménidisine (*E* et *Z*)

Le point de connexion des structures partielles **106A** et **106B** n'a pas été facile à déterminer parce que toutes les tentatives nOe et HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}/^{15}\text{N}$) ont échoué. Il y a trois positions de connexion (N1', NH-C2' et N3') sur la structure partielle **106B** et une position possible (C4) sur la structure partielle **106A**. A ce stade, nous pouvons envisager les trois hypothèses de structure **I-III** pour le composé **106** (figure 89). Les tentatives nOe et HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}/^{15}\text{N}$) n'ont pas permis de choisir parmi ces trois structures candidates (**I**, **II** et **III**) : aucune corrélation n'a été observée à cause de la présence de plusieurs carbones quaternaires et le manque de protons.

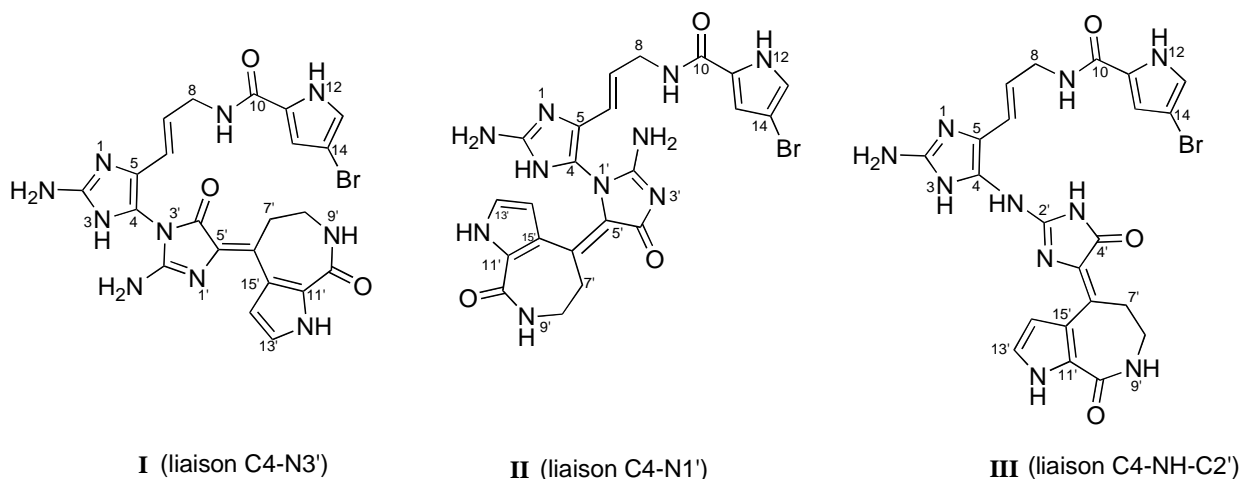


Figure 89 : Structures **I-III** possibles pour le composé **106**

L'analyse détaillée des déplacements chimiques des carbones et azotes a permis de déterminer la structure du composé **106**.

La configuration *Z* a été déterminée pour la partie débromohyménialdisine (**106B**) par comparaison des valeurs de ^{13}C et en particulier le déplacement chimique caractéristique de $\text{C7}'$ à $\delta_{\text{C}} 30,2 \text{ ppm}$.⁹⁹ À ce stade la connexion entre le carbone quaternaire C4 ($\delta_{\text{C}} 125,9 \text{ ppm}$) du motif hyménidine et les azotes du motif guanidine de la débromohyménialdisine donnent trois possibilités pour les liaisons N-C : C4-N3' ou C4-N1' ou C4-C2'NH (structure **I**, **II**, et **III**, figure 82). La connexion C4-N1' (structure **II**) a été éliminée immédiatement en raison de l'encombrement stérique provoqué par la géométrie *Z* de la partie débromohyménialdisine du composé **106**¹⁰¹ (figure 88). La présence de deux fonction amine libre NH_2 exocyclique, indiquée par des déplacements chimiques à $\delta_{\text{H}} 6,94$ (C2-NH_2), $\delta_{\text{N}} 50,7$ et $\delta_{\text{N}} 66,3 \text{ ppm}$ ($\text{C2}'\text{-NH}_2$), écarte la possibilité d'une connexion C4-C2'NH' (**III**) (figure 90). Ainsi, la structure du stylyssazole A est celle présentée dans la figure 89 et 90 en **I**, avec une *Z*-débromohyménialdisine liée à une hyménidine par C4-N3'.

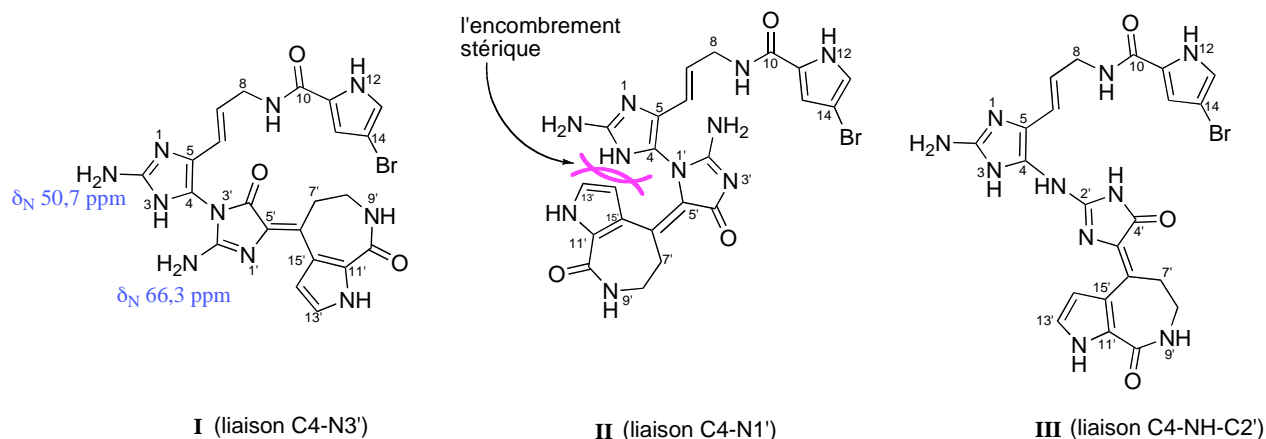


Figure 90 : Structures I-III possibles pour le composé **106**

La simulation à l'aide du logiciel ACD donne des déplacements chimiques $\delta_{C(\text{calc.})}$ que nous comparons à nos valeurs remarquables pour C4 (δ_C 125,9) C2' (155,9) et C4' (169,1). Ces comparaisons donnent des résultats cohérents pour la structure déterminée.^{127, 128} Les différences entre les valeurs de δ_C calculées ($\delta_{C(\text{calc.})}$) et observées ($\delta_{C(\text{obs.})}$) sont présentées ci-dessous (figure 91). Les valeurs à ± 5 ppm sont considérées comme correctes. Seuls les $\delta_{C(\text{calc.})}$ du candidat **I** sont inférieurs à 5 ppm des $\delta_{C(\text{obs.})}$. C'est pourquoi nous pouvons affirmer que le composé **106** correspond à l'isomère **I**. L'emploi de ce logiciel qui s'appuie sur des bases de données existantes pour calculer les déplacements chimiques de ^{13}C devient un outil intéressant pour confirmer les structures. Le composé **106** est décrit ici pour la première fois. Il a la particularité de présenter une liaison carbone-azote entre deux monomères C_{11}N_5 .

¹²⁷ Ralifo, P.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2006**, *70*, 33-38.

¹²⁸ Rychnovsky, S. D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2895-2898.

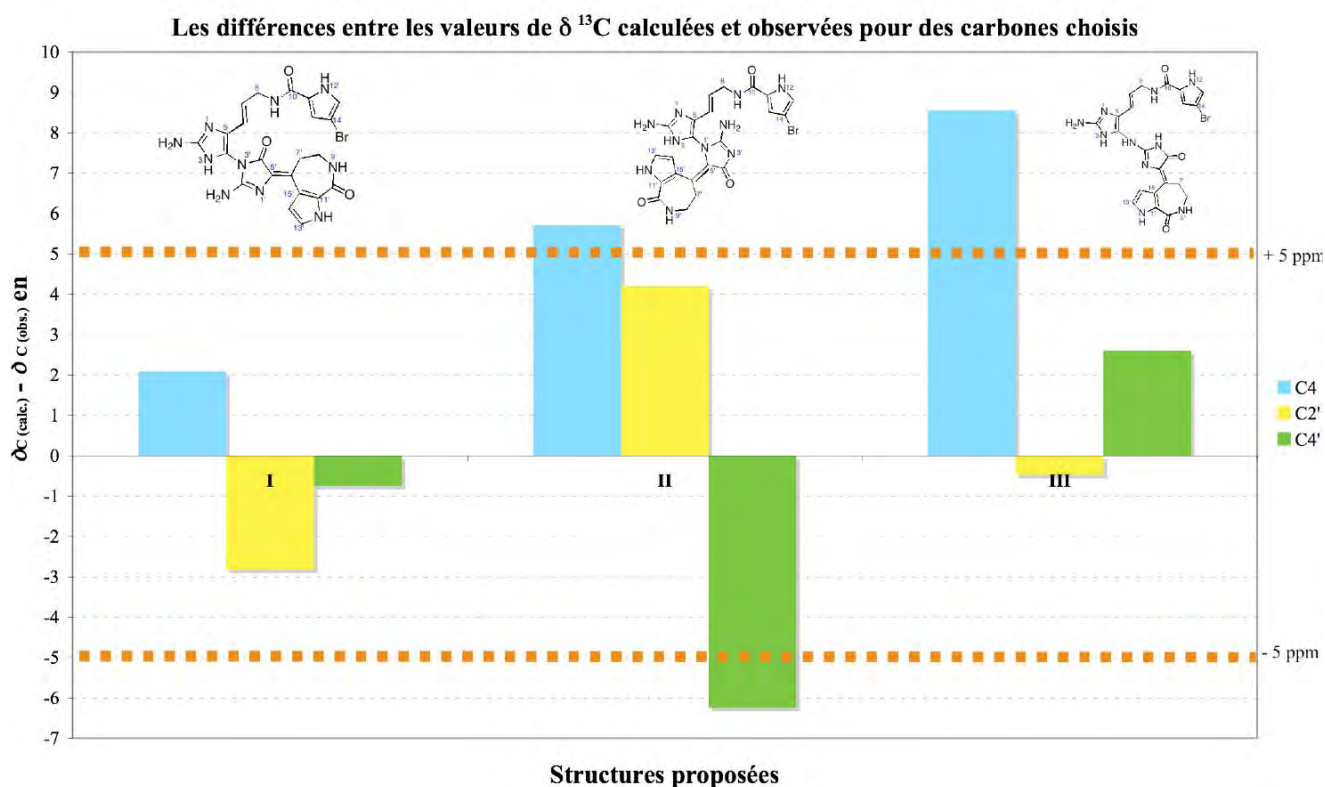


Figure 91 : Évaluations des trois structures proposées basées sur les déplacements chimiques des carbones quaternaires clés

Le stylissazole A (**106**) ouvre la voie à une nouvelle sous classe des P-2-AI en raison de la connexion carbone-azote entre les deux monomères. Une hypothèse de biogenèse du stylissazole A sera discutée au chapitre 5.

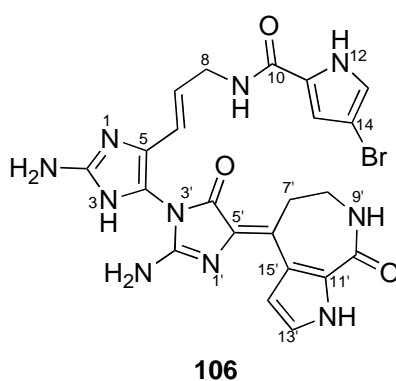


Figure 92 : Stylissazole A (**106**)

II.2.13. Le stylissazole D (107)

Les spectres de masse ESI de **107**, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 631/633/635$ (ratio : 1/2/1) $[M + H]^+$ et $629/631/633$ (ratio : 1/2/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 630/632/634. La distribution isotopique du pic moléculaire indique que **107** est dibromé. Une analyse SMHR permet de lui attribuer la formule brute $C_{22}H_{20}Br_2N_{10}O_3$. Les analyses du spectre RMN 1H (figure 93) et ^{13}C (DMF- d_7) révèlent que les déplacements chimiques sont très similaires à ceux du stylissazole A (**106**).

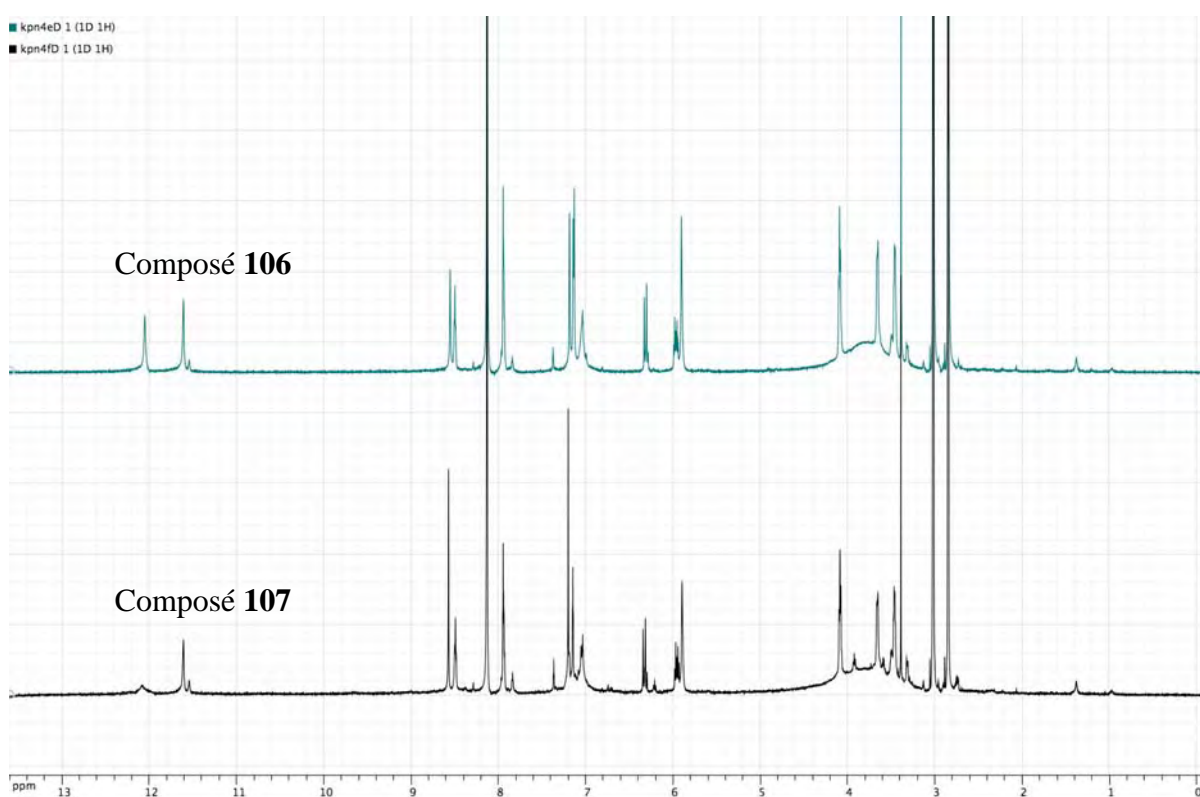


Figure 93 : Comparaison des spectres RMN 1H des composés **106** et **107** (DMF- d_7 , 600 MHz, 299 K)

La plupart des signaux du spectre RMN ^{13}C du stylissazole A (**106**) sont retrouvés sur le spectre du composé **107**. Cependant, l'observation du signal à 104,8 ppm (C13) oriente vers un noyau pyrrolique dibromé. Le composé **107** est donc l'analogue bromé en position 13 du stylissazole A (**106**). Les corrélations HMBC observées concordent parfaitement avec cette proposition (figure 94).

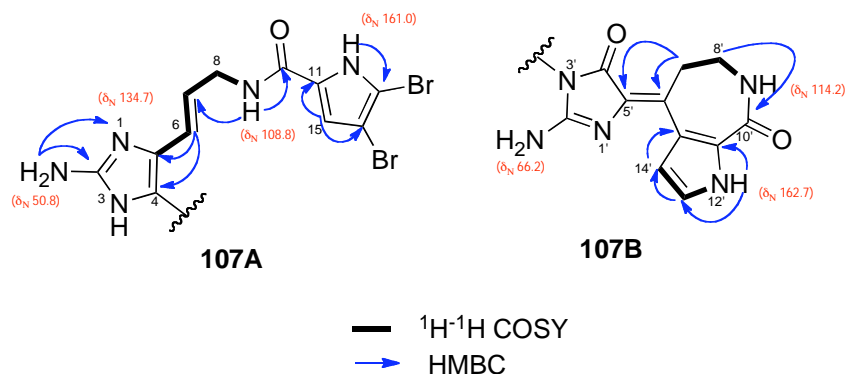


Figure 94 : Structure partielles **107A** et **107B**

Le point de connexion des structures partielles **107A** et **107B** a été déterminé entre C4-N3', même si aucune corrélation n'a été observée entre les deux structures partielles. Le point de connexion entre C4-N1' n'est pas possible en raison de l'encombrement stérique provoqué par la géométrie Z de la partie débromohyménialdisine (**107B**).¹⁰¹ La simulation à l'aide du logiciel ACD donne des déplacements chimiques $\delta_{C(\text{cal.})}$ que nous avons comparé à nos valeurs remarquables pour C4 (125,9), C2' (155,8) et C4' (169,0). Ces comparaisons ont également confirmé le point de connexion entre **107A** et **107B** comme étant C4-N3' (figure 95). La structure de ce composé est bien celle présentée par **107** et nommée stylissazole D.

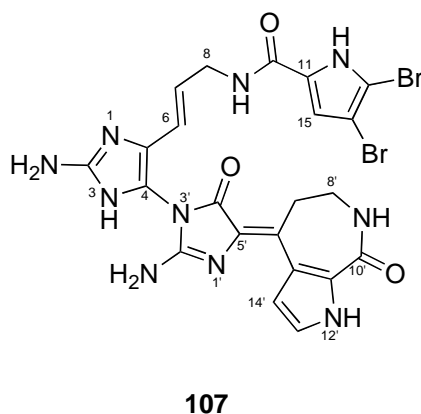


Figure 95 : Stylissazole D (**107**)

II.2.14. Le stylissazole B (112)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 555/557$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $553/555$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale 554/556. La distribution du pic moléculaire indique la présence d'un brome. Une analyse SMHR révèle une formule brute $C_{22}H_{23}BrN_{10}O_3$. L'analyse du spectre RMN ^{13}C (DMF- d_7) indique la présence de 22 carbones : 12 carbones quaternaires sp^2 , 5 méthines sp^2 , 4 méthylènes sp^3 et 1 carbone sp^3 (CH). L'analyse du spectre RMN 1H (DMF- d_7) montre 6 protons échangeables ($\delta_H = 11,84 ; 11,42 ; 8,58 ; 8,18$ (2H); 7,77 et 7,27 (2H) ppm) appartenant à des groupes amines et amides. Sur les 10 azotes, seulement 7 sont détectés sur le spectre de ^{15}N RMN. Le composé **112** possède une structure dimérique comprenant deux motifs en $C_{11}N_5$. Le spectre RMN 1H de **112** confirme cette hypothèse avec la présence de deux motifs pyrroliques ($\delta_H = 7,74 ; 7,09 ; 7,01$ et $6,93$ ppm). Les analyses RMN 1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) ont permis de construire deux fragments pour cette molécule **112** :

Fragment 112A :

L'analyse des spectres 2D de **112** indique par ailleurs l'absence d'une double liaison C=C et la présence du proton imidazolique, ce qui suggère la présence d'un noyau 2-aminoimidazolone monosubstitué. Les spectres HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) mettent en évidence une corrélation entre NH9 (δ_H 8,58) et C10 (δ_C 160,9) indiquant que le cycle monobromopyrrolique (NH12-C10) est lié à NH9. La liaison entre le noyau 2-aminoimidazolone (N1-C5) et NH9 est confirmée par les corrélations COSY entre H6 ($\delta_H = 3,37$ et $3,16$ ppm), H7 ($\delta_H = 4,45$ ppm), H8 ($\delta_H = 3,85$ ppm) et NH9 ($\delta_H = 8,58$ ppm) et par les corrélations HMBC entre H4 ($\delta_H = 6,73$ ppm) et C5 ($\delta_C = 124,6$ ppm), H6 ($\delta_H = 3,37$ et $3,16$ ppm) et C5 ($\delta_C = 124,6$) et C8 ($\delta_C = 41,1$). Le spectre RMN ^{13}C indique la présence de carbones (C6, C7 et C8) non cycliques (les déplacements chimiques de ces carbones sont blindés). Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure partielle **112A** (figure 96) pour ce fragment.

Fragment 112B

Les analyses des spectres de RMN 1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) permettent de construire la structure partielle **112B** (figure 96) suivante pour le

second fragment. La structure partielle **112B** est confirmée par la comparaison de ces données avec les spectres RMN de la *Z*-débromohyménidisine (**73**).

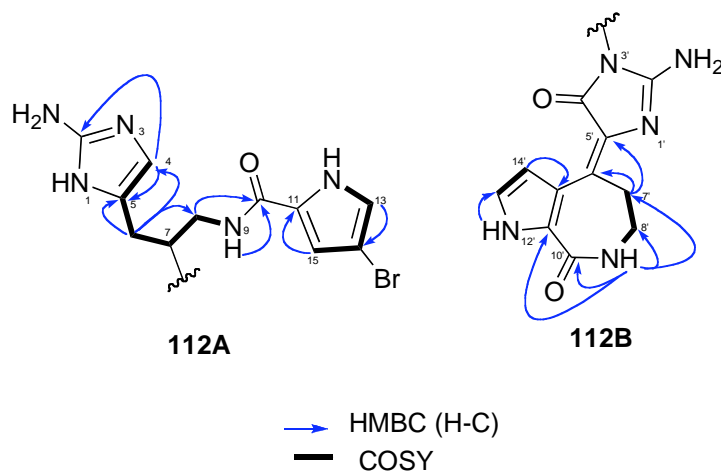


Figure 96 : Structures partielles **112A** et **112B**

Le point de connexion des fragments **112A** et **112B** n'a pas été facile à déterminer parce que toutes les tentatives pour visualiser les NH en RMN ^1H ont échoué. Il y a trois positions (N1', NH-C2' et N3') sur la structure partielle **112B** et une position possible (C7) sur la structure partielle **112A** (figure 97).

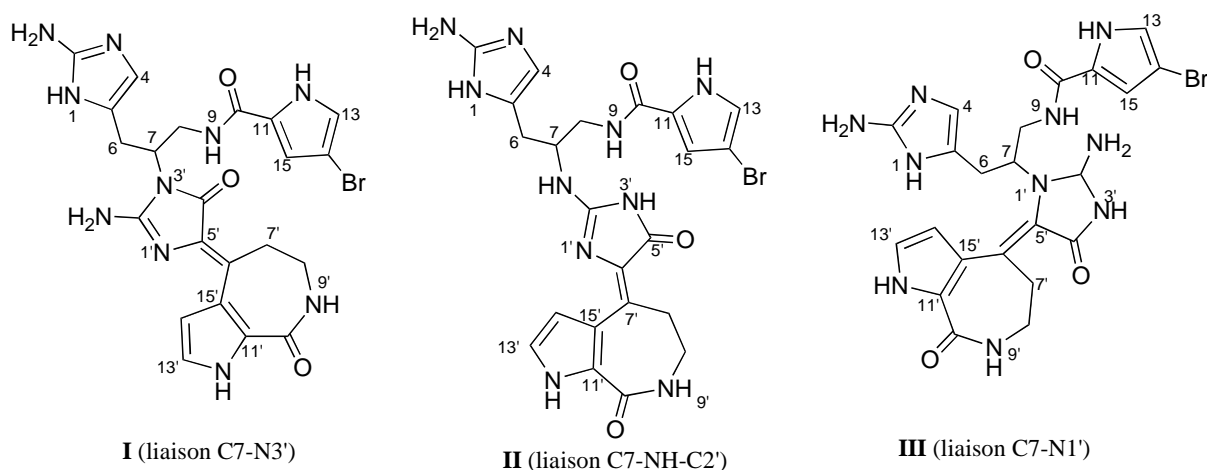


Figure 97 : Structures **I-III** possibles pour le composé **112**

Les structures **II** et **III** ont été éliminées en raison de l'encombrement stérique provoqué par la géométrie *Z* de la partie débromohyménidisine (**112B**)¹⁰¹ et la présence de deux fonction amine libre NH_2 exocyclique (figure 98). Ainsi, la structure du stylissazole B est celle de **I** présentée dans la figure 97 et 98.

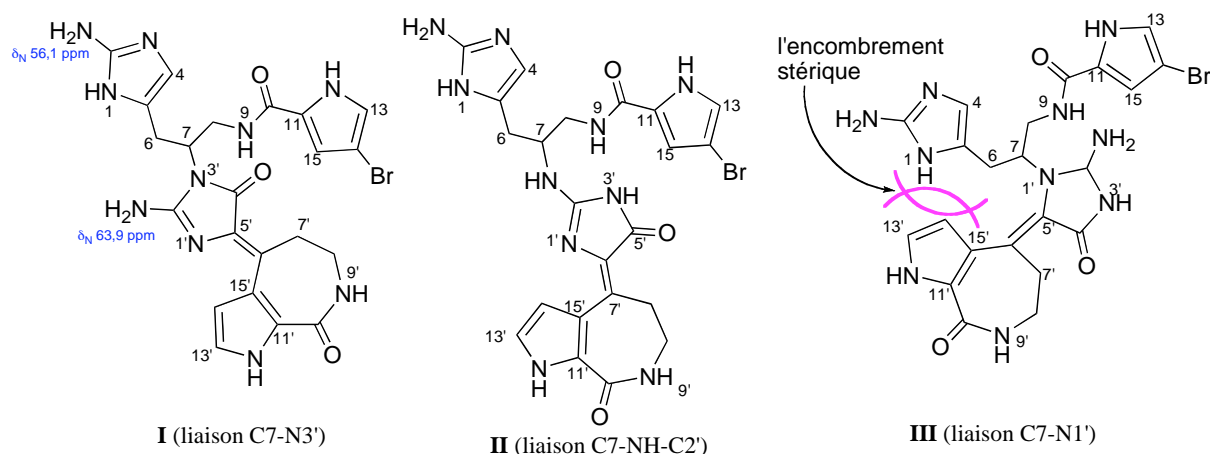


Figure 98 : Structures I-III possibles pour le composé 112

Ce résultat est aussi confirmé par la simulation à l'aide du logiciel ACD et la comparaison des $\delta_{C(\text{calc.})}$ à nos valeurs. Les différences entre les valeurs de δ_C calculées ($\delta_{C(\text{calc.})}$) et observées ($\delta_{C(\text{obs.})}$) sont présentées ci-dessous (figure 99).

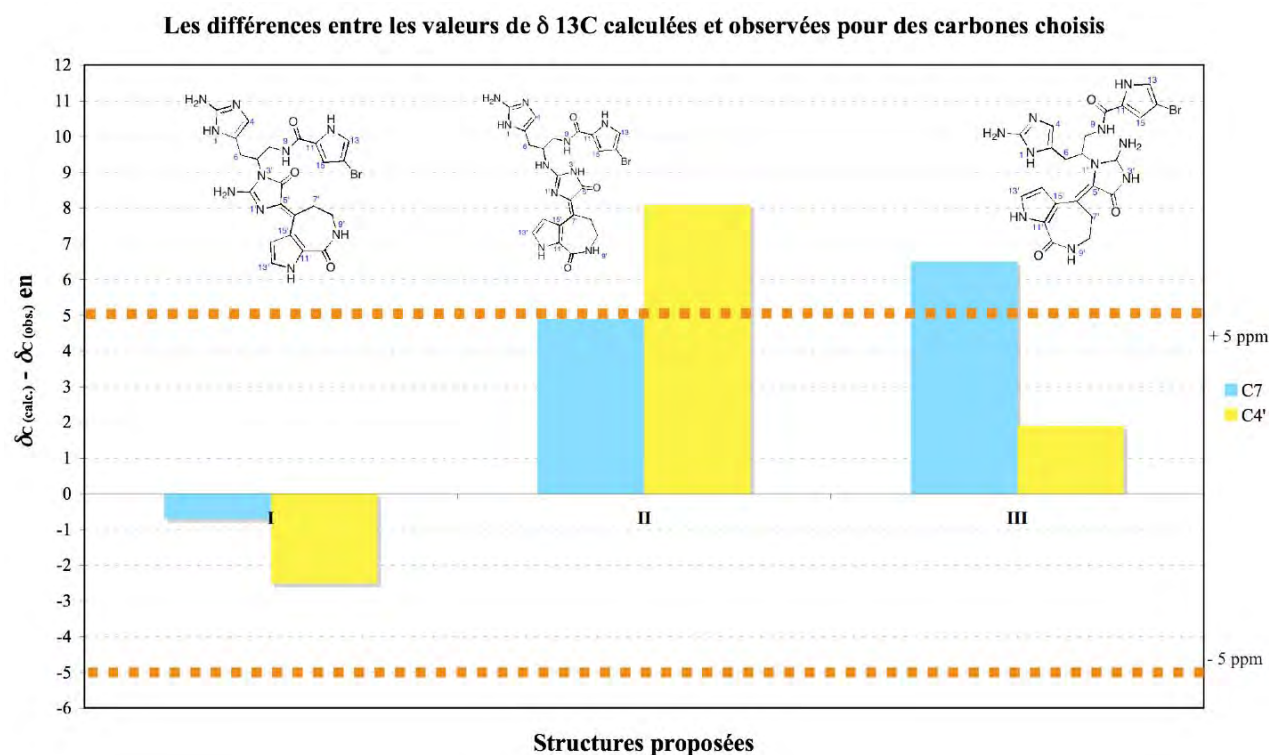
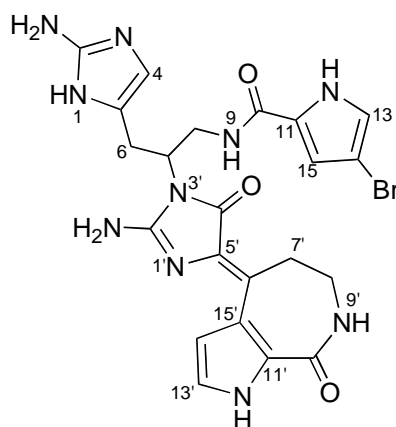


Figure 99 : Évaluation des trois structures proposées basée sur les déplacements chimiques des carbones clés.

Le stylissazole B (**112**) comme les stylissazoles A (**106**) et D (**107**), ouvre la voie à une nouvelle sous classe de P-2-AI. La biogenèse du stylissazole B sera détaillée au chapitre 5.



112

Figure 100 : Stylissazole B (**112**)

II.2.15. Le Stylissazole C (**117**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 553/555$ (ratio : 1/1) $[M + H]^+$ et $551/553$ (ratio : 1/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 552/554. La distribution isotopique du pic moléculaire indique la présence d'un brome. Une analyse SMHR révèle une formule brute $C_{22}H_{21}BrN_{10}O_3$. L'analyse du spectre RMN ^{13}C (DMF- d_7) indique la présence de 22 carbones : 12 carbones quaternaires sp^2 , 7 méthines sp^2 et 3 méthylènes sp^3 . L'analyse du spectre RMN 1H (DMF- d_7) montre 6 protons échangeables ($\delta_H = 12,10 ; 11,57 ; 8,62 ; 8,54 ; 7,80$ et $5,74$ (2H) ppm) appartenant à des groupes amines et amides. Sur les 10 azotes, seuls 8 sont détectés sur le spectre RMN ^{15}N . Les analyses RMN 1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) permettent de construire deux fragments de la molécule **117**:

Fragment 117A :

L'analyse des spectres 2D de **117** montre l'absence de la double liaison C-C. La présence d'un proton imidazolique caractéristique sur le spectre de RMN 1H suggère la présence d'un noyau 2-aminoimidazolone monosubstitué. Les spectres RMN 1H , COSY, HSQC et HMBC ($^1H/^{13}C$) mettent en évidence la présence d'un noyau $-CH_2-CH-CH-$ (C8-C6). La présence de la liaison entre le noyau 2-aminoimidazolone (N1-C5) et C6 est confirmée par les corrélations

entre le proton H6 (δ_H 5,07) et les carbones C5 (δ_C 134,0) et C4 (δ_C 111,0). Cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure partielle **117A** (figure 101) pour le composé **117**.

Fragment 117B

Les analyses des spectres de RMN 1H , COSY, ^{13}C , HSQC, NOESY et HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) ont permis de construire la structure partielle **117B** (figure 101). Elle est confirmée par la comparaison de ces données aux spectres RMN de la Z-débromohyménialdisine (**73**)

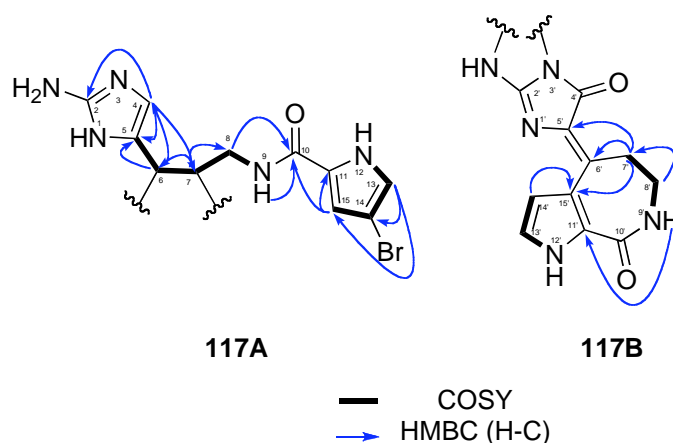


Figure 101 : Structures partielles **117A** et **117B**

Il y a trois positions de connexion possibles sur la structure partielle **117B** (N1', NH-C2' et N3') et deux positions possibles sur la structure partielle **117A** (C6 et C7). À ce stade, nous pouvons envisager les quatre hypothèses de structure **I-IV** pour le composé **117**. Il y a trois corrélations HMBC entre le proton H8 ($\delta_H = 3,86 - 3,79$) et l'azote à $\delta_N = 154,7$ ppm, le proton H6 ($\delta_H = 5,07$) et le carbone à $\delta_C = 160,3$ ppm et le proton H7 ($\delta_H = 4,39$) et le carbone à $\delta_C = 160,3$. L'expérience HMBC ($^1H/^{13}C$ et $^1H/^{15}N$) permet de supposer que notre composé possède la structure **I** parmi ces quatre structures candidates (**I**, **II**, **III** et **IV**) (figure 102).

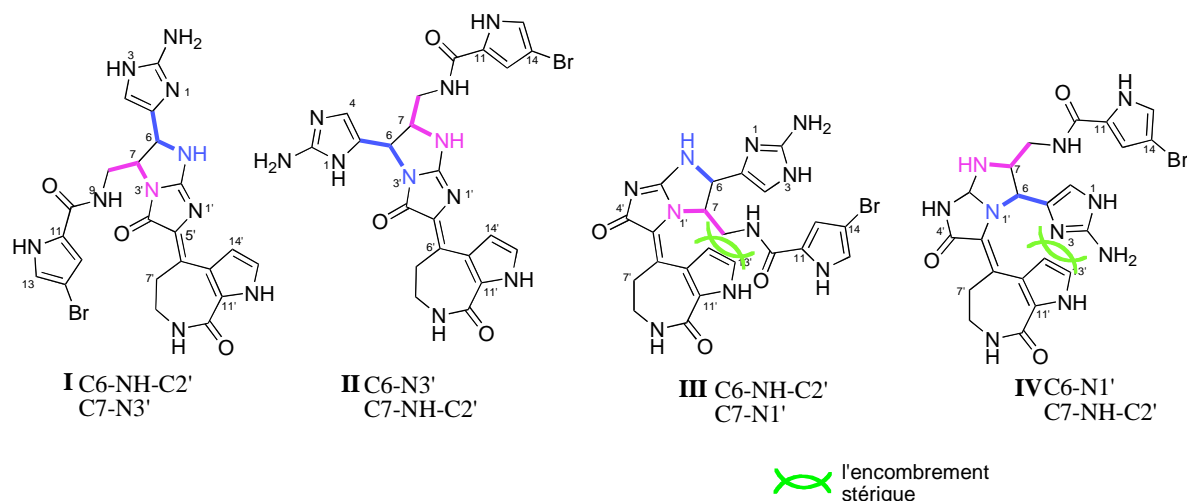


Figure 102 : Structures I-IV possibles pour le composé **117**

La structure **II** est éliminée en raison d'une corrélation HMBC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ entre H8 et N3' en J_3 qui n'est pas possible parce que H8 et N3' est en J_4 dans la structure **II** (figure 103). On a éliminé immédiatement les structures **III** et **IV** en raison de l'encombrement stérique provoqué par la géométrie *Z* de la partie de débromohyménialdisine. Les corrélations HMBC nous permettent d'affirmer que le composé **117** correspond à la structure **I**.

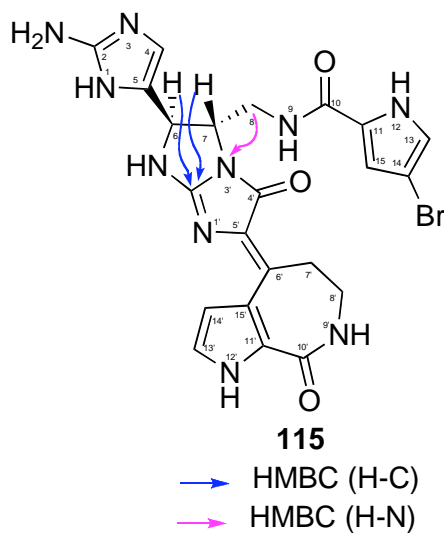


Figure 103 : HMBC corrélations du composé **117**

L'utilisation du logiciel ACD pour la simulation des déplacements chimiques $\delta_{\text{C(cal.)}}$ et leur comparaison à nos valeurs expérimentales a également donné des résultats cohérents avec la structure **I** (figure 104).

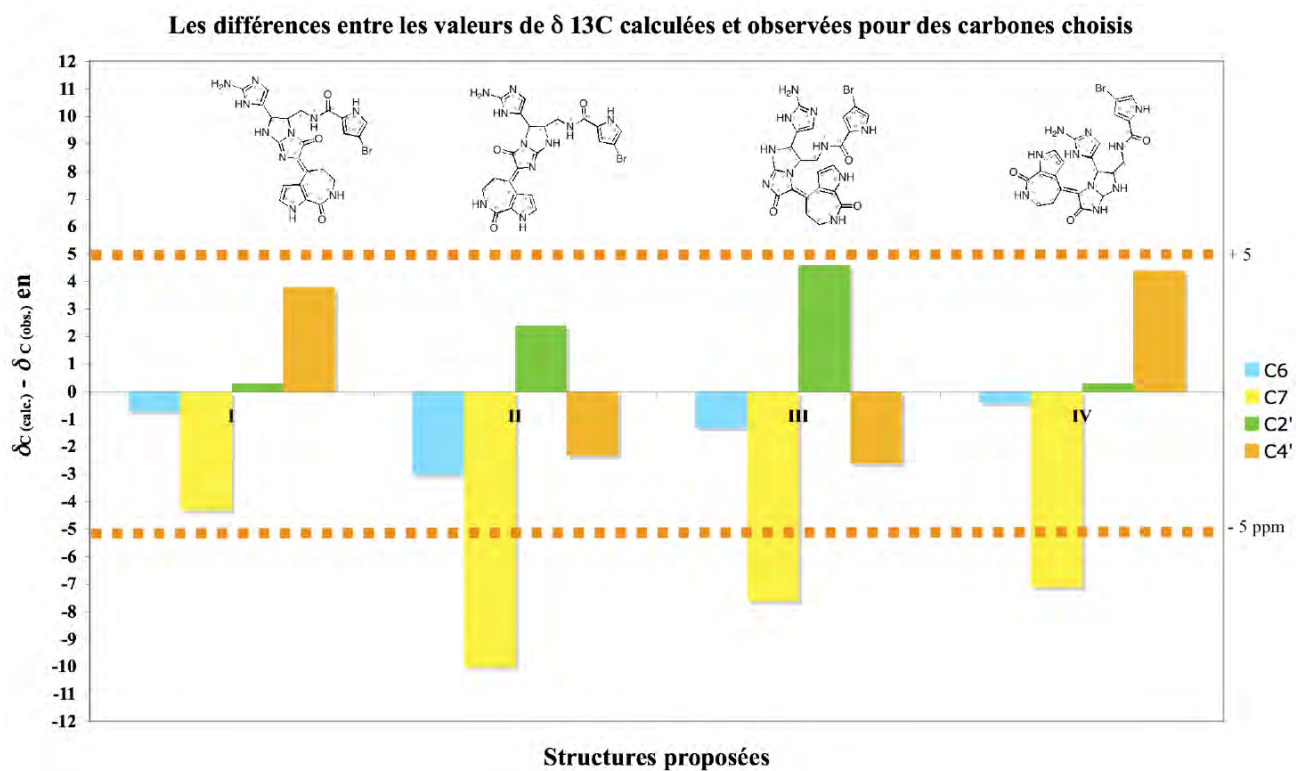


Figure 104 : Évaluations des trois structures proposées basées sur les déplacements chimiques des carbones quaternaires clés

La stéréochimie relative des protons H6 et H7 a été déterminée par analyse nOe (figure 105).

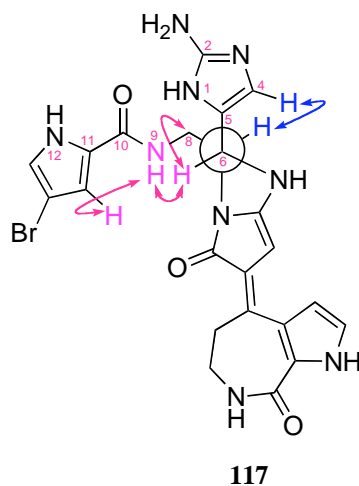


Figure 105 : Effets nOe observés pour le composé **117**

II.2.16. Le stylissazole E (**108**)

Les spectres de masse ESI, enregistrés en modes positif et négatif, présentent des pics d'ions pseudo-moléculaires à $m/z = 631/633/635$ (ratio : 1/2/1) $[M + H]^+$ et $629/631/633$ (ratio : 1/2/1) $[M - H]^-$ soit une masse moléculaire égale à 630/632/634. La distribution isotopique du pic de masse indique que **108** est l'analogue dibromé du stylissazole C. Une analyse SMHR permet de lui attribuer la formule brute $C_{22}H_{20}Br_2N_{10}O_3$. Les analyses du spectre RMN 1H révèle que les déplacements chimiques sont très similaires à ceux du stylissazole C (**117**). Les comparaisons des spectres de masse et de RMN 1H indiquent clairement la substitution d'un atome d'hydrogène par un brome sur le noyau pyrrolique (figure 106).

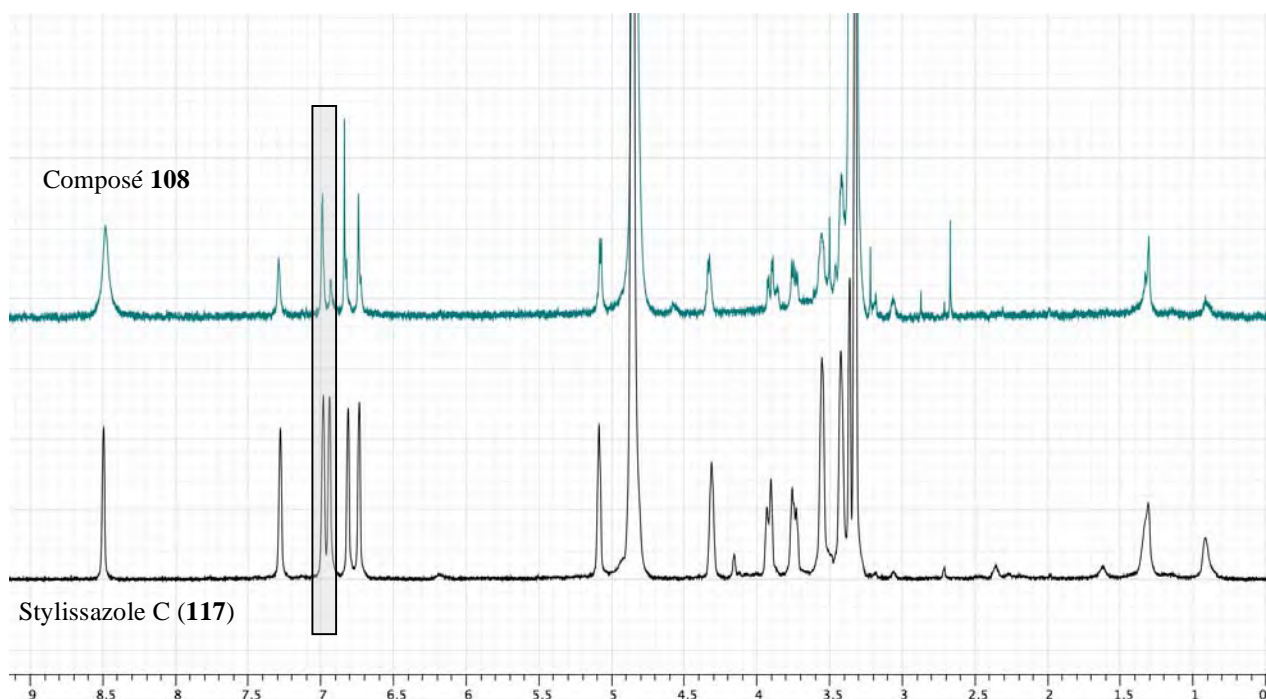


Figure 106 : Comparaison des spectres RMN 1H du composé **108** et du stylissazole C (**117**) montrant l'absence d'un brome dans **108**.

En raison de la quantité insuffisante de composé **108**, le spectre de RMN ^{13}C ne permet pas de déceler tous les carbones, mais permet de penser que le composé **108** est l'analogue débromé du stylissazole C (**117**) en position 13. Les corrélations ROESY observées concordent parfaitement avec cette proposition (figure 107).

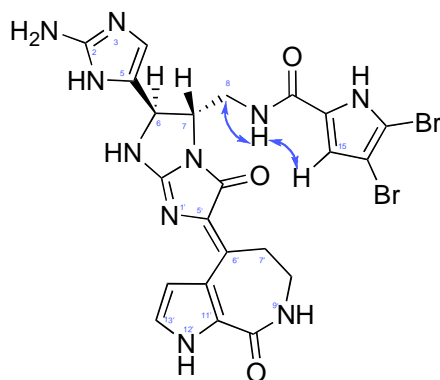


Figure 107 : Corrélations ROESY du stylissazole E (**108**)

III. Conclusion et discussion

L'extraction de l'éponge *Stylissa carteri* a permis d'isoler des molécules connues (cinq peptides cycliques, un céramide, un botryllamide) et quarante-trois alcaloïdes pyrrole-imidazoles (P-2-AIs), dont neuf nouveaux. Ce n'est pas la première fois que des P-2-AIs sont rencontrés dans cette espèce, mais ce travail nous a permis de mettre en évidence une famille originale de P-2-AIs, les stylissazoles A-E (**106**, **107**, **108**, **112** et **117**). Cette famille de composés dimériques présente un nouveau type de liaison carbone-azote entre les deux unités de P-2-AI. La présence de molécules nouvelles pose la question de leur biogenèse, pour laquelle nous proposons une hypothèse au chapitre 5.

Chapitre 5 : Hypothèses de biogenèse

Chapitre 5 : Hypothèses de biogénèse

La famille des métabolites de type P-2-AIs, fréquemment actifs sur différentes cibles biologiques, a poussé les chercheurs à comprendre comment les éponges synthétisent et utilisent ces métabolites. La connaissance des chemins biogénétiques par l'analyse biomécanistique permet parfois de trouver des solutions efficaces pour la synthèse des produits les plus actifs et de leurs analogues. La synthèse de P-2-AIs complexes est un vrai défi pour les chimistes de synthèse.

I. La proline et la guanidine comme précurseurs des P-2-AIs

Deux étapes de l'hypothèse de biogénèse permettent d'expliquer la diversité structurale des P-2-AIs :

- la transformation des acides aminés en dérivés monomériques les plus simples, tels que l'oroïdine (**7**) et le dispacamide A (**99**)
- la cyclisation et/ou la dimérisation de monomères de type oroïdine en monomères et dimères polycycliques.

Dans notre laboratoire, Carine Vergne a isolé en 2006 les verpacamides A-C (**124-126**) à partir de l'éponge *Axinella vaceleti*.¹²⁹ La découverte de ces molécules et la chimie biomimétique réalisée dans notre laboratoire ont permis de proposer un lien entre ces précurseurs biosynthétiques et les métabolites P-2-AIs. Notre équipe a formulé une hypothèse basée sur la proline et la guanidine. En effet, deux prolines et une guanidine (C₁₁N₅) s'associeraient pour former le motif C₁₁N₅, caractéristique des monomères P-2-AIs. Cette hypothèse de biogénèse désigne la proline et la guanidine ou la proline et l'arginine comme précurseurs des P-2-AIs (schéma 12).

¹²⁹ Vergne, C.; Boury-Esnault, N.; Perez, T.; Martin, M.-T.; Adeline, M.-T.; Tran Huu Dau, E.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2421-2424.veoh

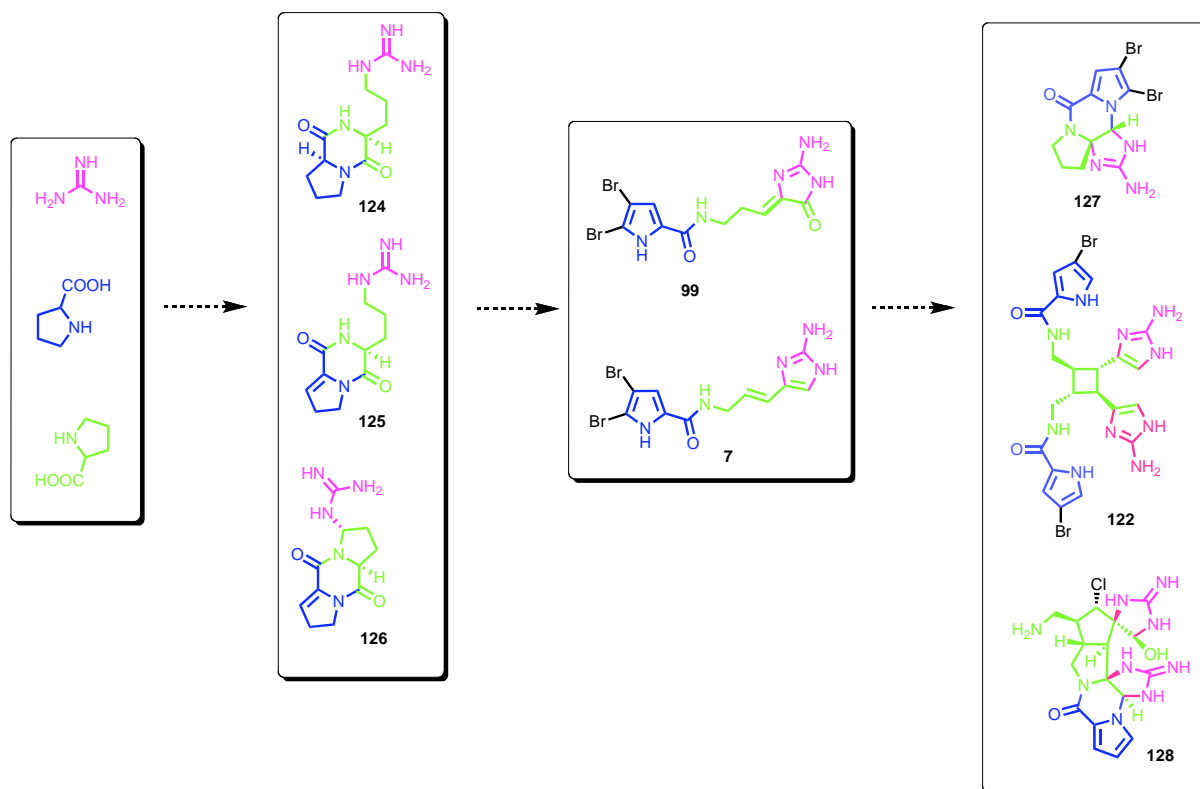


Schéma 12 : les étapes de l'hypothèse biogénétique des P-2-AIs

II. Hypothèse de biogénèse des P-2-AIs dimères simples (liaison C-C)

Plusieurs tautomères de l'oroidine (**7**), l'hyménidine (**97**) ou la clathrodine (**95**) peuvent exister (figure 99), chaque forme tautomère présentant des positions nucléophiles et électrophiles.¹³⁰ Ces tautomères sont probablement la base d'une approche universelle pour la construction des P-2-AIs dimères.¹³⁰ La différence d'énergie entre les tautomères mis en jeu est inférieure à 2 kcal.mol^{-1} (figure 108). On peut donc postuler que ces molécules (**7**, **95** et **97**) peuvent co-exister sous la forme de plusieurs tautomères en solution.¹³¹ Une réaction entre un carbone nucléophile et un carbone électrophile peut conduire à la formation d'une liaison C-C. Cette attaque peut expliquer la formation de l'ensemble des P-2-AIs dimères simples.

¹³⁰ Ali Al, M.; Pierre, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001, 237-243.

¹³¹ Abou-Jneid, R.; Ghoulami, S.; Martin, M.-T.; Dau, E. T. H.; Travert, N.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2004**, 6, 3933-3936.

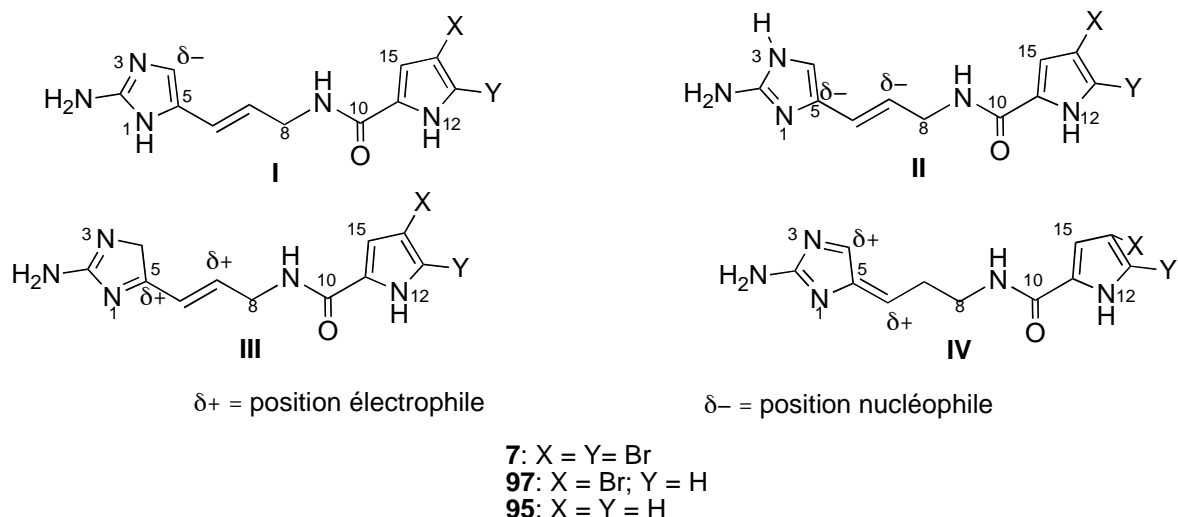


Figure 108 : Tautomères de l'oroïdine (**7**), l'hyménidine (**97**) et de la clathroïdine (**95**)

II.1. Biogénèse du stylissazole F (**116**) et du stylissazole G (**120**)

La formation du stylissazole F (**116**) peut être rationalisée en considérant l'attaque nucléophile du carbone 4' de la forme tautomère I de l'hyménidine sur le carbone électrophile 5 de la forme tautomère III d'une autre molécule d'hyménidine (schéma 13). Une oxydation ultérieure du carbone 4 fournirait le stylissazole F (**116**) ou le stylissazole G (**120**) avec incorporation de la taurine.

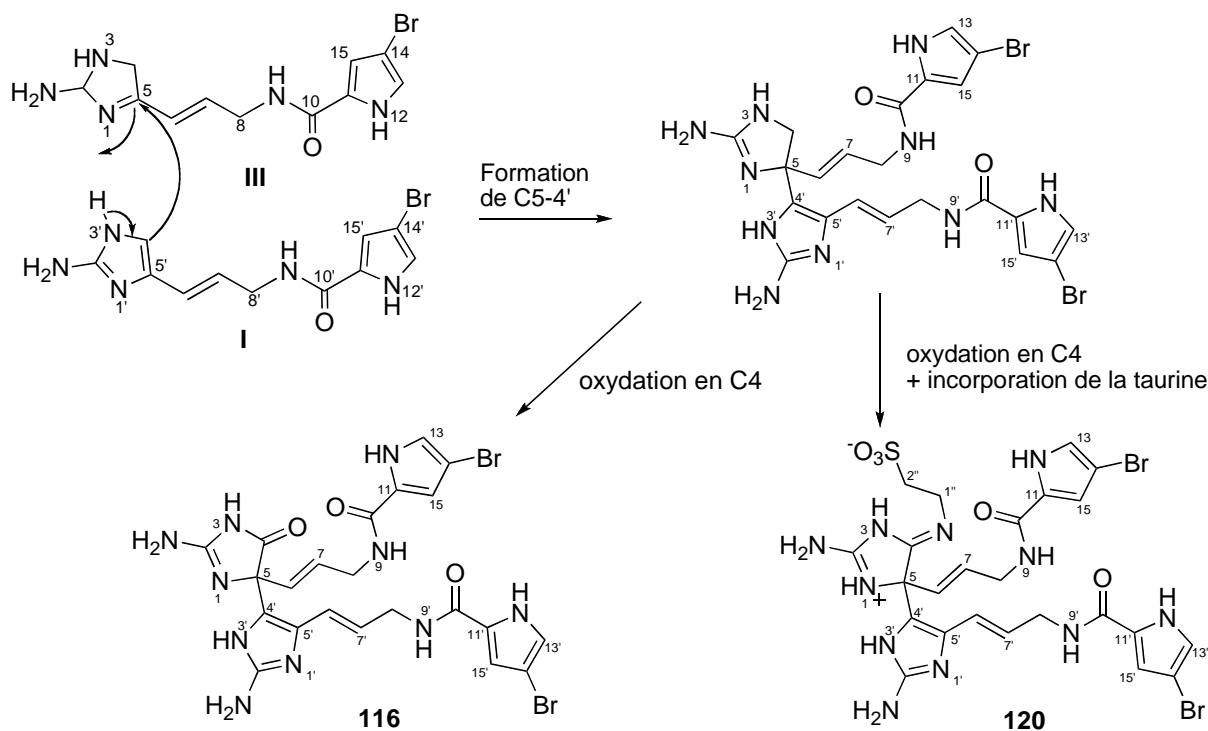


Schéma 13 : Biogénèse du stylissazole F (**116**) et du stylissazole G (**120**)

II.2. Biogénèse du stylissazole I (113)

Un schéma de biogénèse possible pour le stylissazole I (113) est décrit sur le schéma 14. La formation de la liaison C7-C7' est facilitée via une attaque du type énamine sur imine.

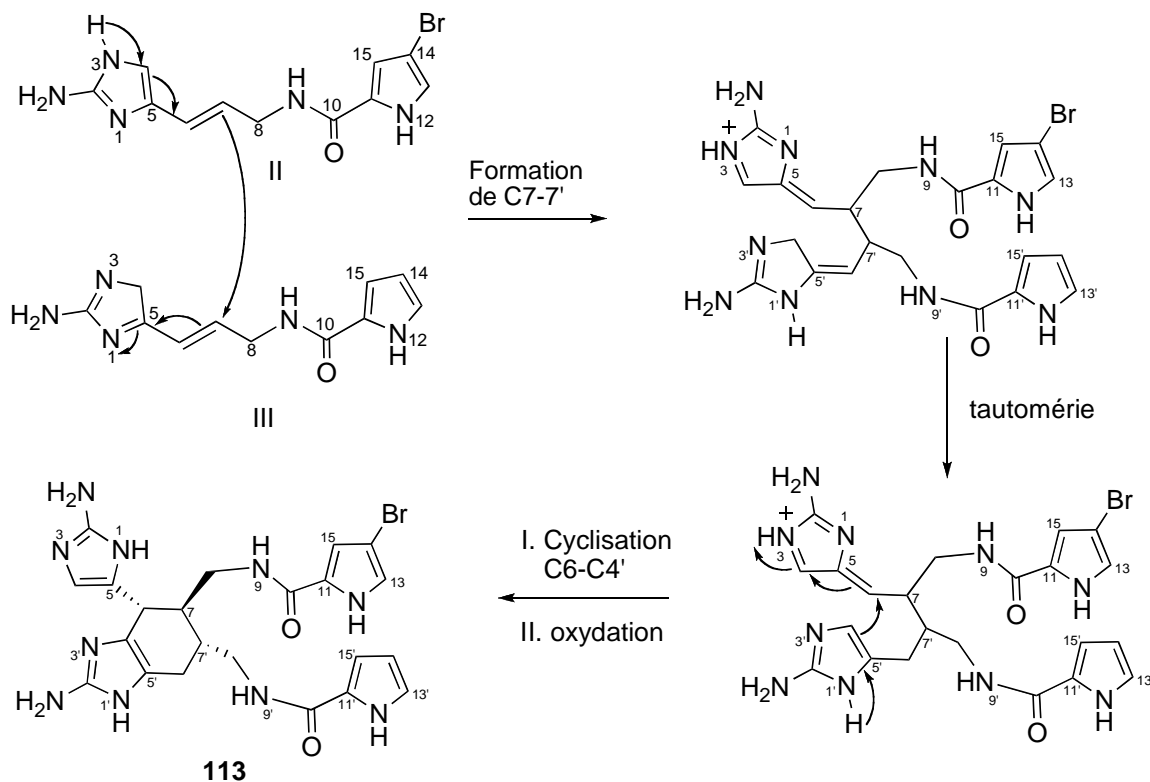


Schéma 14 : Biogénèse du stylissazole I (113)

III. Hypothèse de biogénèse des P-2-AIs dimères simples (liaison N-C)

Les stylissazoles A-E sont les premiers exemples de P-2-AIs dimériques comportant une liaison N-C, même si le ratio N/C est très élevé (0,5 environ). Ces stylissazoles (A-E) montrent une réactivité ambivalente unique du précurseur 2-aminoimidazolique. Les stylissazoles A-E indiquent une nouvelle réactivité biogénétique des dimères. Une réaction entre un azote nucléophile et un carbone électrophile peut conduire à la formation d'une liaison N-C. Cette réaction peut expliquer la formation de P-2-AIs dimères simples (stylissazoles A-E) et nous la présentons dans ce chapitre.

III.1. Hypothèse de biogénèse du stylissazole A (106) et du stylissazole D (107)

La formation du stylissazole A (106) et du stylissazole D (107) peut être rationalisée en considérant l'attaque nucléophile de l'azote N3' de la forme tautomère I sur le carbone électrophile C4 de la forme tautomère IV (schéma 15) pour la formation de la liaison N3'-C4. Une tautomérie facilite ensuite l'attaque nucléophile du carbone C15' sur le carbone C6' puis permet la formation par cyclisation de la clathrodine. Enfin une oxydation fournirait le stylissazole A (106) ou le stylissazole D (107).

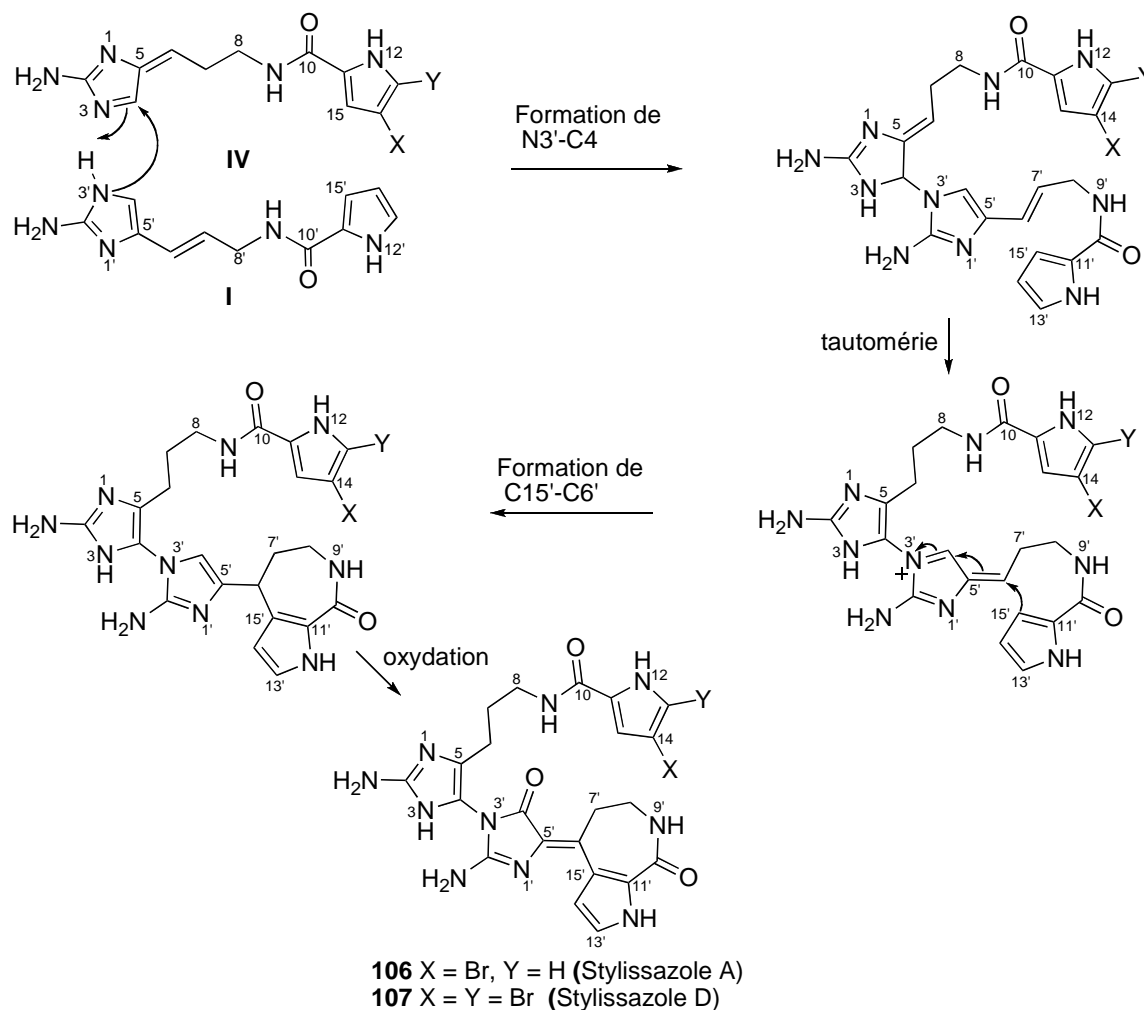


Schéma 15 : Hypothèse de biogénèse du stylissazole A (106) et du stylissazole D (107)

III.2. Hypothèse de biogénèse du stylissazole B (112)

La formation du stylissazole B (112) peut être rationalisée en considérant l'attaque nucléophile de l'azote N3' de la forme tautomère I sur le carbone électrophile C7 de la forme tautomère III (schéma 16) pour former la liaison N3'-C7. Après une tautomérie, l'attaque nucléophile du carbone C15' sur le carbone C6' permettrait la formation du squelette de l'hyménialdisine. Enfin une oxydation fournirait le stylissazole B (112).

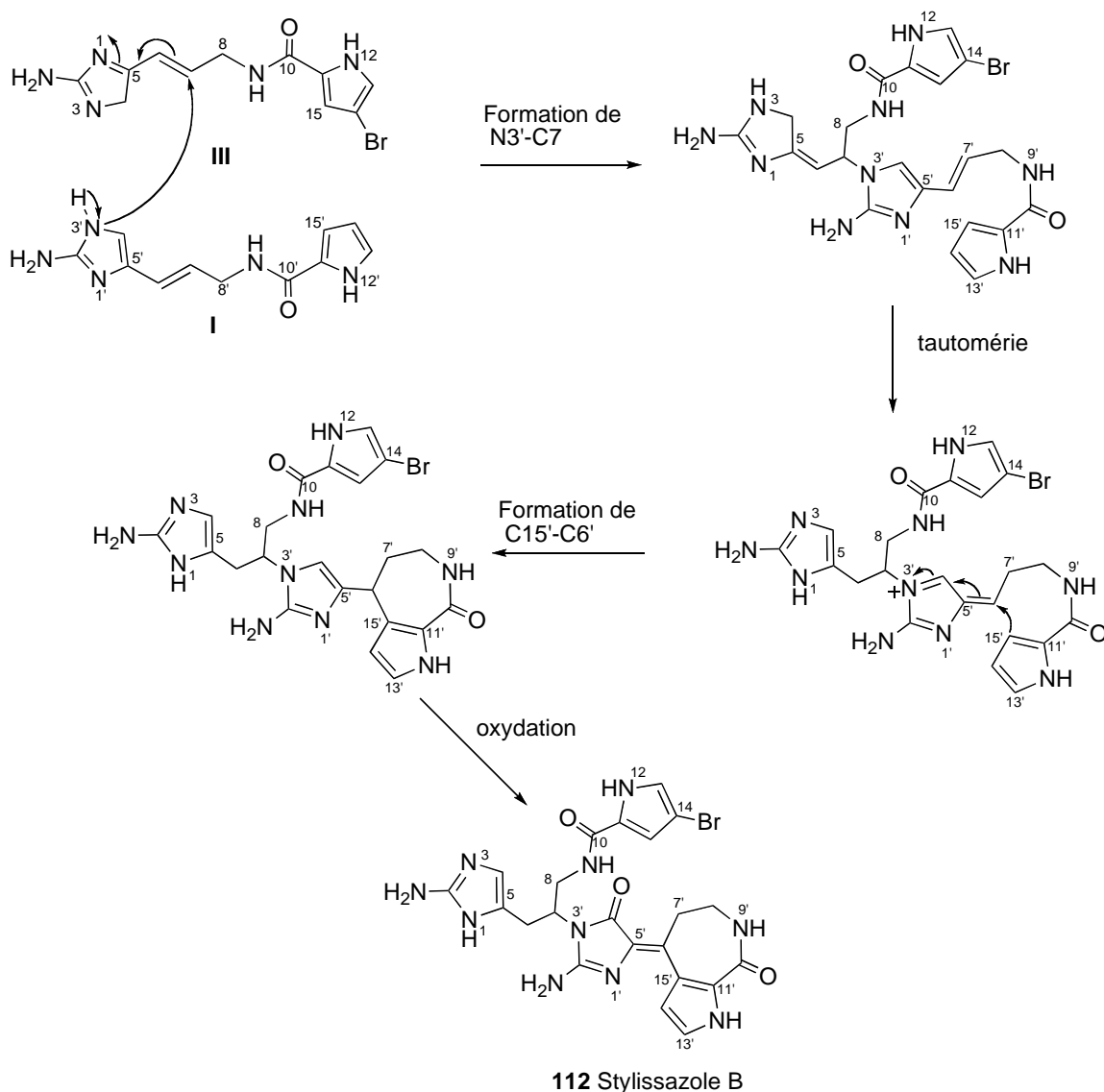


Schéma 16 : Hypothèse de biogénèse du stylissazole B (112)

III.3. Hypothèse de biogénèse du stylissazole C (117) et du stylissazole E (108)

La formation du stylissazole C (117) et du stylissazole E (108) peut être rationalisée en considérant le même schéma que celui du stylissazole B (112). Seul le degré de bromation change pour le stylissazole E. Une oxydation et une cyclisation du stylissazole B (112) fournirait le composé stylissazole C (117). L'équivalent bromé du stylissazole B (112) conduirait au composé dibromé stylissazole E (108) (Schéma 17).

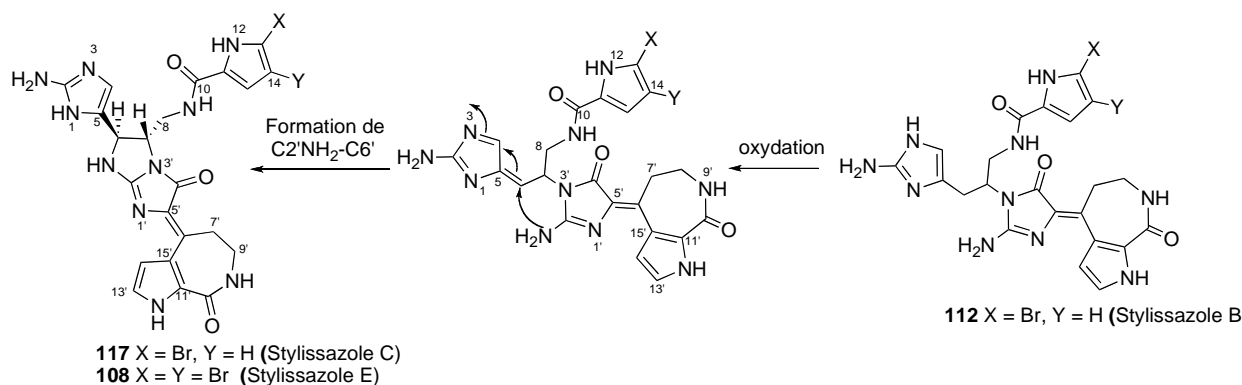


Schéma 17 : Hypothèse de biogénèse du stylissazole C (115) et du stylissazole E (106)

IV. Conclusion

La formation des dimères isolés de *Stylissa carteri* (R3070) a pu être rationalisée à l'aide de :

- la nature électrophile ou nucléophile des positions carbonées dans les tautomères de l'oroïdine ou de ses dérivés ;
- la nature nucléophile des azotes ;
- la nucléophilie de la position 3 du noyau pyrrole-2-carboxamide ;
- l'oxydation facile du noyau 2-aminoimidazole (en particulier en position alpha) permettant de changer le degré d'oxydation des dimères et de permettre des cyclisations ultérieures.

Chapitre 6 : Les évaluations biologiques

Chapitre 6 : Résultats des évaluations biologiques

L'objectif de ma thèse était la recherche de nouvelles molécules bioactives sur différentes cibles biologiques. Nous avons constitué une chimiothèque que nous avons soumise à l'évaluation des activités cytotoxiques, inhibitrices de kinases et antibactériennes. Ces évaluations ont été réalisées soit à l'ICSN, soit par nos partenaires avec qui nous avons noué des relations de collaborations dans le cadre du projet CRISP.

Les extraits bruts d'éponges que nous avons étudiées au cours de cette thèse avaient été testés pour leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules KB ; élastase, phospholipase A2 « PLA2 », PFTase et contre le *Plasmodium falciparum* (Tableau 11).

| Genre | espèce | Test Biologiques | | | | | |
|----------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|--|---------------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | Extrait* | KB 10 µg/mL (%) | <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> IC ₅₀ (µg/mL) | PFTase Inhibition 1 mg/mL | Élastase 400 µg/mL | PLA2 400 µg/mL |
| <i>Stylissa</i> | <i>carteri</i> | A | <50% | 6 | 55 | 15% | - |
| <i>Stylissa</i> | <i>carteri</i> | B | <50% | > 20 | Inactif | 0 | 30% |
| <i>Amorphinopsis</i> | <i>excavans</i> | A | 99% | > 20 | Inactif | 0 | - |
| <i>Amorphinopsis</i> | <i>excavans</i> | B | <50% | - | Inactif | 0 | 60% |
| <i>Petrosia (Petrosia)</i> | <i>cf. crassa</i> | A | 100% | > 20 | 74 | 0 | 85% |
| <i>Petrosia (Petrosia)</i> | <i>cf. crassa</i> | B | <50% | - | Inactif | 0 | 45% |

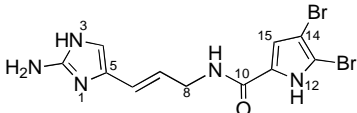
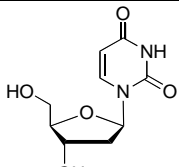
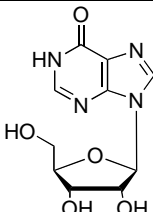
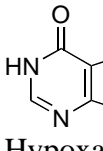
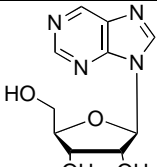
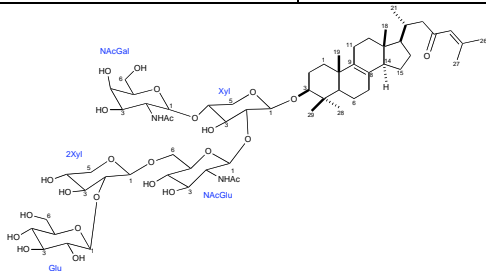
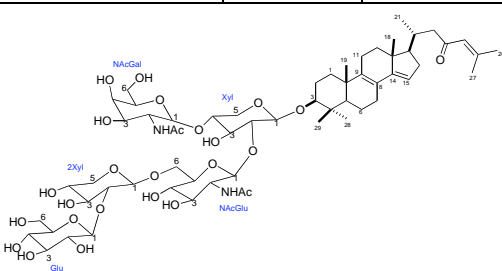
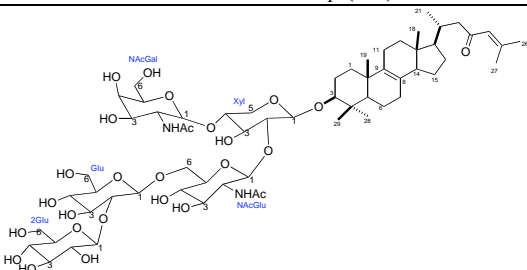
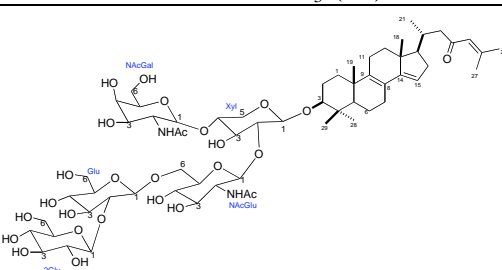
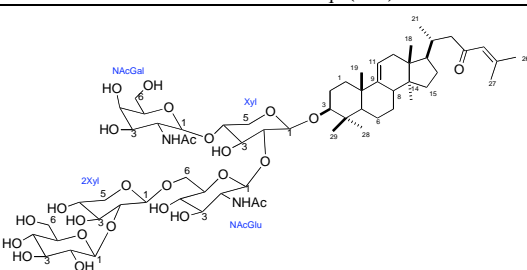
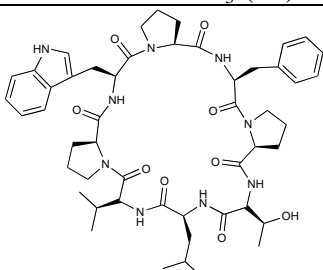
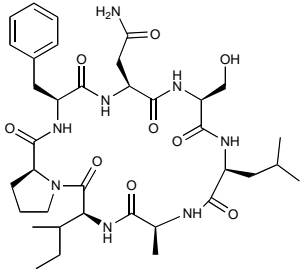
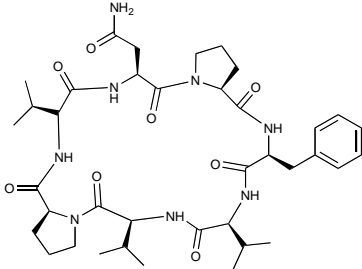
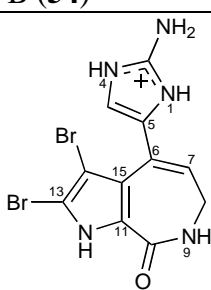
* A : phase aqueuse ; B : phase dichlorométhanoïque

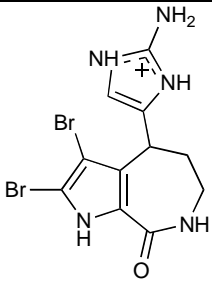
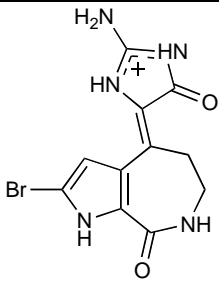
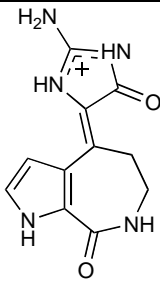
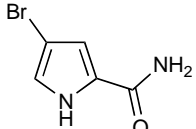
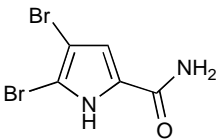
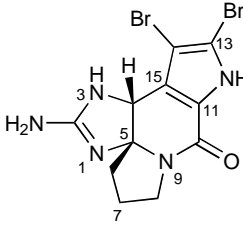
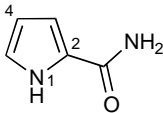
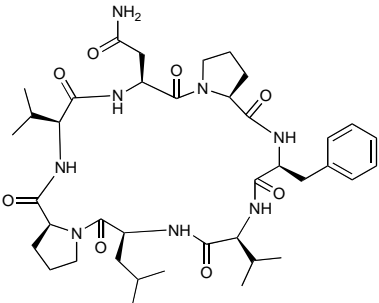
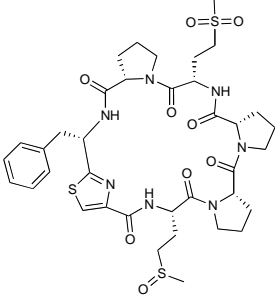
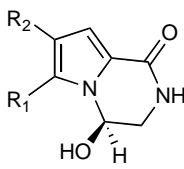
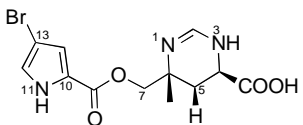
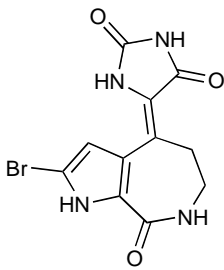
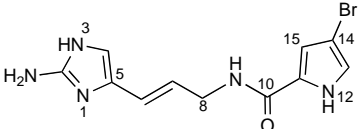
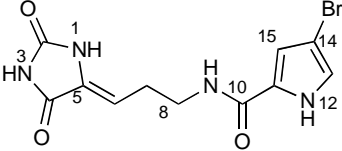
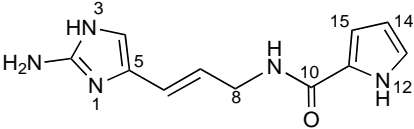
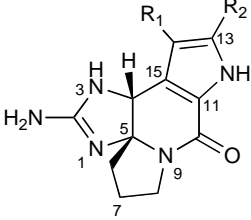
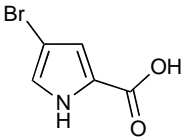
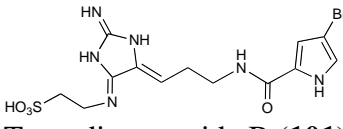
Tableau 11 : Résultats des tests biologiques des extraits bruts d'éponges

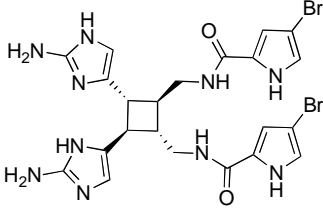
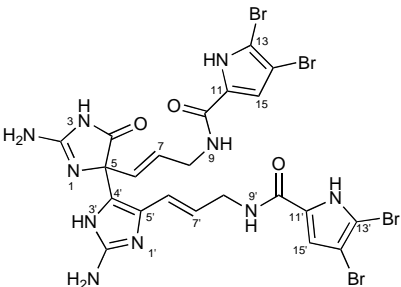
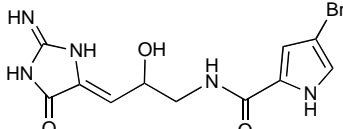
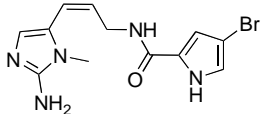
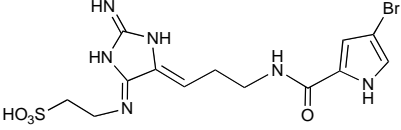
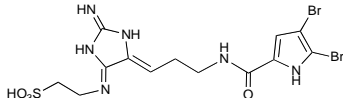
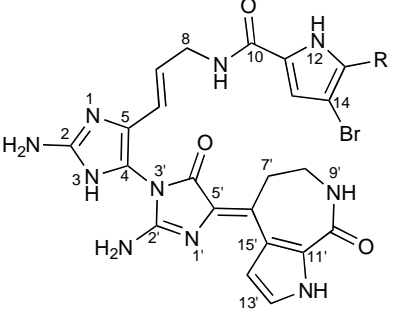
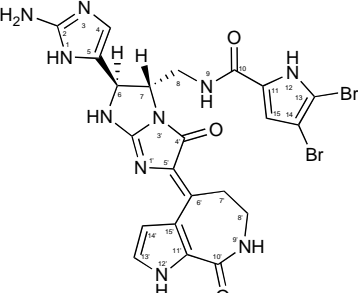
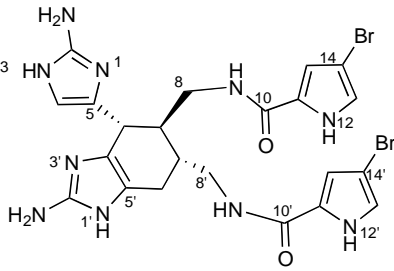
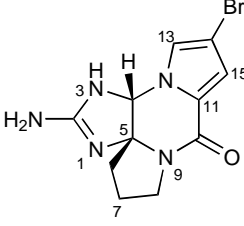
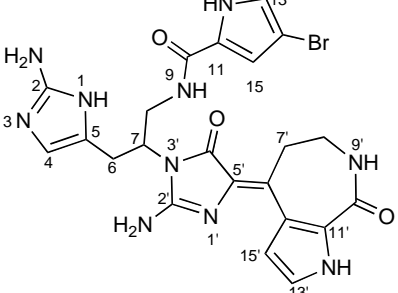
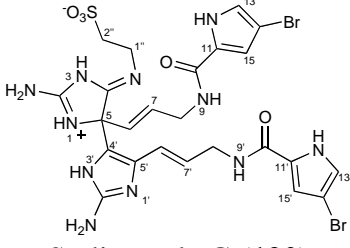
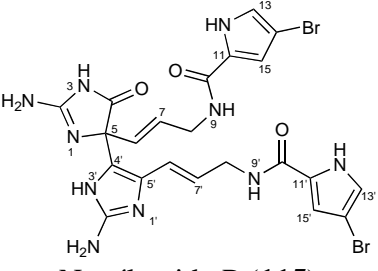
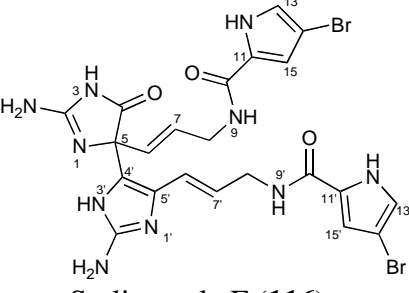
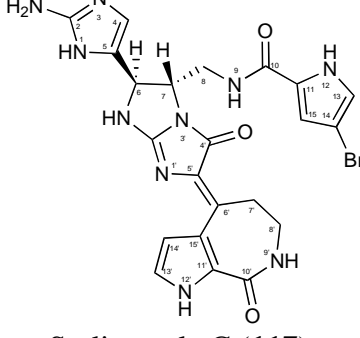
Si les éponges *Amorphinopsis excavans* et *Petrosia (Petrosia) cf. crassa* ont été sélectionnées pour leurs activités cytotoxiques, l'éponge *Stylissa carteri* a, quand à elle, été choisie en raison de sa richesse en métabolites et son activité sur *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ extrait B : 6 µg/mL).

La plupart des produits isolés au cours de cette thèse a été testée pour la plupart de ces activités. Les produits testés présentent des structures variées allant des simples dérivés monomères de P-2AIs aux produits à structures complexes comme les stylissazoles A (**106**) et D (**107**).

Des trois éponges que nous avons étudiées, nous avons sélectionné cinquante métabolites purs pour les évaluations biologiques. Nous présentons ici uniquement les produits qui ont montré une ou plusieurs activités, même celles qui sont modestes. L'ensemble des molécules pures qui ont été testées est présenté dans le tableau suivant :

| | | | | |
|---|--|---|--|--|
|  <p>Oroïdine (7)</p> |  <p>2'-désoxyuridine (34)</p> |  <p>Inosine (36)</p> |  <p>Hypoxanthine (37)</p> |  <p>Nébularine (38)</p> |
|  <p>Sarasinose B₁ (47)</p> |  <p>Sarasinose B₃ (48)</p> | | | |
|  <p>Sarasinose A₁ (49)</p> |  <p>Sarasinose A₃ (50)</p> | | | |
|  <p>Sarasinose G (51)</p> |  <p>Axinelline B (54)</p> | | | |
|  <p>Stylostatine 1 (56)</p> |  <p>Axinastatine 1 (61)</p> |  <p>Stevensine ou odiline (67)</p> | | |

| | | | |
|--|---|---|--|
|  <p>Hyménine (69)</p> |  <p>Z-hyménialdisine (71)</p> |  <p>Z-débromohyménialdisine (73)</p> | |
|  <p>Pyrrole-2-carboxamide monobromé (81)</p> |  <p>Pyrrole-2-carboxamide dibromé (82)</p> |  <p>Dibromoisophakelline (84)</p> |  <p>Pyrrole-2-carboxamide (87)</p> |
|  <p>Axinastatine 2 (89)</p> | |  <p>Dérive sulfone de waiakéamide (90)</p> |  <p>91 R₁ = H R₂ = Br 92 R₁ = R₂ = Br 91 - Mukanadine C 92 - Longamide</p> |
|  <p>Manzacidine C (121)</p> |  <p>Spongacidine D (94)</p> |  <p>Hyménidine (97)</p> | |
|  <p>Mukanadine B (93)</p> |  <p>Clathrodine (95)</p> | | |
|  <p>Monobromoisophakelline (96)</p> |  <p>L'acide 4-bromopyrrole-2-carboxylique (100)</p> |  <p>Taurodispacamide B (101)</p> | |

| | | |
|--|---|---|
|  <p>Sceptrine (122)</p> |  <p>Mauritamine (102)</p> |  <p>Dispacamide D ou Mukanadine A (103)</p> |
|  <p>Kéramadine (104)</p> |  <p>Tauroacidine B (110)</p> |  <p>Taurodispacamide A (114)</p> |
|  <p>106 R = H (Stylissazole A) 107 R = Br (Stylissazole D)</p> |  <p>Stylissazole E (108)</p> |  <p>Agéliférine (109)</p> |
|  <p>Monobromophakelline (111)</p> |  <p>Stylissazole B (112)</p> |  <p>Stylissazole G (120)</p> |
|  <p>Nagélamide P (115)</p> |  <p>Stylissazole F (116)</p> |  <p>Stylissazole C (117)</p> |

I. Résultats de l'évaluation de le tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles par Thierry CRESTEIL et Geneviève AUBERT.

Les cellules utilisées pour cette étude de cytotoxicité *in vitro* sont des cellules cancéreuses KB. Le test a été réalisé à une concentration de 10 µg/mL dans le DMSO en triplicat.

Parmi tous les composés testés, trois de nos composés ont montré une activité d'inhibition de la croissance cellulaire à une concentration de 10 µg/mL: le sarasinoside B₁ (**47**), le sarasinoside A₁ (**49**) et la Z-débromohyménialdisine (Z-DBH) (**73**) (tableau 12)

| molécule | % inhibition à 10 µg/mL |
|---|-------------------------|
| Sarasinoside B ₁ (47) | 41,9 |
| Sarasinoside A ₁ (49) | 38,1 |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 97 |

Tableau 12 : Résultats des tests de cytotoxicité

Trois molécules seulement parmi les cinquante ont montré une cytotoxicité modérée vis-à-vis des cellules KB. La Z-débromohyménialdisine (DBH) (**73**) est la seule représentante des dérivés pyrrole-2-aminoimidazoliques. La DBH est déjà connue pour sa forte inhibition des kinases telle que la CDK2 (voir paragraphe ci-dessous).

II. Résultats de l'évaluation de le tests d'inhibition des kinases

Rappels :

La phosphorylation des protéines est le mécanisme le plus utilisé par la cellule pour moduler l'activité de ses protéines structurales et de ses enzymes. La phosphorylation des résidus serine, thréonine ou tyrosine est catalysée par une vaste famille d'enzymes, les protéines kinases. Il n'y a pas d'événement physiologique important qui n'implique pas des modifications de la phosphorylation de protéines. De même la très vaste majorité des pathologies humaines implique des anomalies de la phosphorylation souvent associées à des anomalies de la régulation de certaines protéines kinases. Les CDKs (kinase cycline-dépendante) attirent un intérêt considérable en raison de leur implication dans de nombreux

processus physiologiques essentiels et de multiples maladies humaines, spécialement les cancers, la polykystose rénale et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les accidents vasculaires cérébraux. Le gène de la protéine kinase DYRK1A est localisé dans une région bien spécifique du chromosome 21, la « Down syndrome critical région », qui couvre une vingtaine de gènes responsables du phénotype trisomique. De nombreux arguments soutiennent l'hypothèse d'une contribution essentielle de la surexpression, même modeste, de DYRK1A dans le développement anormal du cerveau observé au cours de la trisomie 21. De plus DYRK1A semble également très impliquée dans la maladie d'Alzheimer (qui d'ailleurs apparaît chez les trisomiques 21 de façon systématique et précoce au-delà de la quarantaine). DYRK1A appartient à une petite famille de kinases comprenant 5 membres (DYRK1a, IB, 2, 3, 4). DYRK1A agit comme "priming kinase" pour GSK-3, elle phosphoryle des protéines de la maladie d'Alzheimer.^{132,133} L'inhibition conjointe de CDKs, GSK-3, CKI et DYRK pourrait constituer un avantage majeur dans le traitement de maladies neurodégénératives. La kinase de CLKs joue un rôle important dans la différenciation neuronale dans la cellule.¹³⁴ Le test de l'activité moléculaire sur la kinase PfGSK est destiné à identifier de nouveaux composés anti-malaria. En effet, cette kinase est impliquée dans la mise en place des canaux ioniques de *Plasmodium falciparum* dans l'érythrocyte.¹³⁵ Les sérine/thréonine kinases CK2 et PIM-1 sont des suppresseurs d'apoptose et sont surexprimées dans les cellules tumorales, en particulier dans le cancer de la prostate.^{136,137} La Z-DBH (**73**) et la Z-hyménialdisine (**71**) que nous isolées montrent des activités à des concentrations nano-molaires. Elles sont connues pour leurs

¹³² Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martínez De Lagrán, M.; Martí, E.; Avila, J.; Dierssen, M. *Neurobiol. Dis* **2005**, *20*, 395-400.

¹³³ Hämmerle, B.; Elizalde, C.; Galceran, J.; Becker, W.; Tejedor, F. J. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2003**, *67*, 129-137.

¹³⁴ Meijer, L.; Thunnissen, A. M.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Kim, S. H.; Pettit, G. R. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.

¹³⁵ Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Richardson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2004**, *1697*, 181-196.

¹³⁶ Slaton, J. W.; Unger, G. M.; Sloper, D. T.; Davis, A. T.; Ahmed, K. *Mol. Cancer. Res.* **2004**, *12*, 712-721.

¹³⁷ Baunbæk, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Rucirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. *Mar. Drugs.* **2008**, *6*, 514-527.

effets inhibiteurs de diverses protéines kinases.^{134,138,139,140} Elles ont été utilisées comme références pour la comparaison des autres molécules.

Évaluation et interprétation

Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe du Dr. Laurent MEIJER à la station biologique du CNRS de Roscoff. Les enzymes étudiées sont une kinase cycline-dépendante de type 5 (CDK5), une kinase caséine de type 1 et 2 (CK1), la kinase à double spécificité active par phosphorylation sur la tyrosine « dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A » (DYRK1A), la « cdc-2-like kinase » (CLK1), la glycogène synthétase kinase (GSK3), la « proto-oncogene serine/threonine-protein kinase » (Pim-1) et la *Plasmodium falciparum* glycogène synthétase kinase (Pf GSK3).

II.1. Résultats

Les inhibitions qui ont présenté des IC₅₀ inférieures à 10 µM sont réunies dans le tableau 13.

Le tableau présentant tous les résultats se trouve dans l'annexe 2.

| Molécules | IC ₅₀ (µM) | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|-------|------|------|------|--------|
| | DYRK1A | CK1 | CDK5 | GSK3 | CLK1 | PfGSK3 |
| Oroïdine (7) | 2,2 | 3,2 | - | 3,2 | 1,7 | 9 |
| Stevensine ou odiline (67) | - | - | - | 5 | - | - |
| Hyménine (69) | 4,2 | - | 5,4 | 2,1 | - | - |
| Z-hyménialdisine (71) | 0,041 | 0,062 | 0,12 | 0,11 | - | - |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 0,014 | 0,087 | 0,15 | 0,17 | - | - |
| Dibromoisophakelline (84) | 2,4 | 4,3 | 2,1 | 6,1 | 1,4 | 6,5 |
| Spongacidine D (94) | 7,1 | 1,2 | - | - | - | - |
| Clathrodine (95) | 0,77 | 3 | 5 | 7 | - | - |
| Monobromoisophakelline (96) | 1,5 | 2,2 | 3,8 | 2,8 | 1,4 | 2,2 |
| Hyménidine (97) | 0,5 | 1,3 | 0,6 | 0,26 | - | - |
| Mauritiamine (102) | 8 | - | - | - | - | - |
| Kéramadine (104) | 2,2 | 4 | - | 9 | - | - |
| Dispacamide D ou Mukanadine A (103) | 0,22 | 1 | 1,7 | 1,5 | - | - |
| Voir suite du tableau page suivante | | | | | | |

¹³⁸ Sharma, V.; Tepe, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4319-4321.

¹³⁹ Wan, Y.; Hur, W.; Cho, C. Y.; Liu, Y.; Adrian, F. J.; Lozach, O.; Bach, S.; Mayer, T.; Fabbro, D.; Meijer, L.; Gray, N. S. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 247-259.

¹⁴⁰ Parmentier, J.-G.; Portevin, B.; Golsteyn, R. M.; Pierrè, A.; Hickman, J.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 841-844.

| Voir début du tableau page précédent | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|------|------|-----|------|-----|
| Stylissazole A (106) | 0,075 | 0,25 | 0,86 | 1,5 | - | - |
| Stylissazole D (107) | 0,17 | 0,33 | 1,3 | 1,6 | - | - |
| Stylissazole E (108) | 1,2 | 2,1 | 4 | 3,3 | 0,95 | 3 |
| Agéliférine (109) | 7,5 | 0,8 | - | - | - | - |
| Stylissazole B (112) | 1,3 | 4 | 6 | - | 1,1 | 7,3 |
| Nagelamide P(115) | 2,5 | 0,44 | - | 9 | - | - |
| Taurodispacamide A (114) | 7,4 | 8,2 | - | - | - | - |
| Stylissazole F (116) | 4,8 | 0,25 | - | - | - | - |
| Stylissazole C (117) | 3 | 5 | - | - | 3 | - |
| Stylissazole G (120) | 2,2 | 0,72 | - | - | - | - |
| Manzacidine C (121) | 4,2 | - | - | - | - | - |
| Sceptrine (122) | 0,92 | 0,7 | 6 | 2,1 | - | - |

Tableau 13 : Résultats des tests d'inhibition des kinases

Toutes les molécules testées ont une activité plus faible que la Z-hyménialdisine (**71**) et la Z-DBH (**73**). Par ailleurs, l'hyménine (**69**) possède une IC₅₀ presque 100 fois supérieure à celle de la Z-hyménialdisine (**71**) vis-à-vis de la DYRK1A. Il est également intéressant de constater que la spongacidine D (**94**) de structure pourtant très proche de la Z-hyménialdisine (**71**) présente une activité 507 fois plus faible.

Les comparaisons des stylissazoles A-E (tableau 14) avec leurs analogues monomériques qui correspondent à une des deux parties de la molécule sont intéressantes. Le stylissazole A (**106**) qui possède une structure rassemblant à la Z-DBH (**73**) et à l'hyménidine (**97**), présente une activité similaire mais moins forte que celle de la Z-DBH (**73**), sans doute à cause du motif de l'hyménidine (**97**) qui rend la molécule encombrante. L'IC₅₀ de l'hyménidine (**97**) étant 35 fois supérieure à celle de la Z-DBH (**73**). Le stylissazole D (**107**) montre une activité moins forte que celle du stylissazole A (**106**) sans doute à cause du brome supplémentaire présent dans la molécule. Cette tendance est également observée quand on compare l'hyménidine (**97**) et l'oroïdine (**67**). Le tableau suivant réunit les activités de ces dérivés plus ou moins bromés et structuralement proches.

| Molécules | IC ₅₀ (μM) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|-------|------|------|------|--------|
| | DYRK1A | CK1 | CDK5 | GSK3 | CLK1 | PfGSK3 |
| Oroïdine (7) | 2,2 | 3,2 | - | 3,2 | 1,7 | 9 |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 0,014 | 0,087 | 0,15 | 0,17 | - | - |
| Z-hyménialdisine (71) | 0,041 | 0,062 | 0,12 | 0,11 | - | - |
| Hyménidine (97) | 0,5 | 1,3 | 0,6 | 0,26 | - | - |
| Stylissazole A (106) | 0,075 | 0,25 | 0,86 | 1,5 | - | - |
| Stylissazole D (107) | 0,17 | 0,33 | 1,3 | 1,6 | - | - |
| Stylissazole E (108) | 1,2 | 2,1 | 4 | 3,3 | 0,95 | 3 |
| Stylissazole B (112) | 1,3 | 4 | 6 | - | 1,1 | 7,3 |
| Stylissazole C (117) | 3 | 5 | - | - | 3 | - |

Tableau 14 : Résultats des tests d'inhibition des kinases

La protéine kinase CLK 1 (dual-specificity) est inhibée par la Z-DBH connue pour son activité inhibitrice d'autres kinases. Bullock *et. al* ont publié en 2009 la structure de CLK 1 avec la Z-DBH (figure 109).¹⁴¹ En observant la position de la Z-DBH dans la kinase CLK 1, et la similitude entre la structure de la Z-DBH et du stylissazole A (106), nous remarquons que le motif Z-DBH du stylissazole A (106) est sans doute responsable de l'activité de CLK-1.

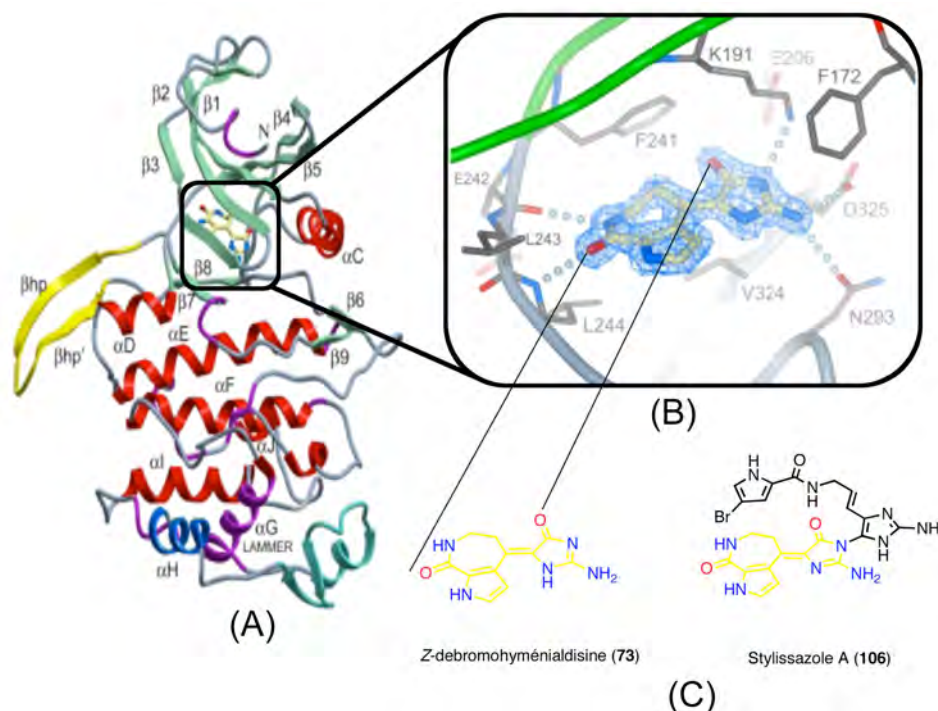


Figure 109 : (A) Structure de la CLK 1, (B) Site de liaison de la Z-DBH à la CLK-1, (C) Les molécules¹⁴¹

¹⁴¹ Bullock, A. N.; Das, S.; Debreczeni, J. È.; Rellos, P.; Fedoreev, O.; Niesen, F. H.; Guo, K.; Papagrigoriou, E.; Amos, A. L.; Cho, S.; Turk, B. E.; Ghosh, G.; Knapp, S. *Structure* **2009**, *17*, 352-362.

Les stylissazoles A et D qui se sont montrés actifs sur les kinases ci-dessus, ont été également évalués sur d'autres kinases. Les résultats sur l'ensemble des kinases sont présentés dans le tableau 15 suivant. Les courbes pour des IC₅₀ sont présentées dans l'annexe 3.

| Protéine kinase | IC ₅₀ (μM) | |
|-----------------|-----------------------|----------------------|
| | Stylissazole A (106) | Stylissazole D (107) |
| CDK1/cycline B | 0.3 | 0.47 |
| CDK2/cycline A | 0.52 | 1.2 |
| CDK5/p25 | 0.86 | 1.3 |
| CDK9/cycline T | 1.3 | 2.1 |
| CK1 | 0.25 | 0.33 |
| CLK1 | 0.12 | 0.17 |
| CLK2 | 0.13 | 0.22 |
| CLK3 | 1.2 | 1.6 |
| CLK4 | 0.032 | 0.072 |
| DYRK1A | 0.075 | 0.17 |
| DYRK1B | 0.061 | 0.13 |
| DYRK2 | 0.093 | 0.23 |
| DYRK3 | 0.33 | 0.72 |
| GSK-3 / _ | 1.5 | 1.6 |
| Pim-1 | > 10 | > 10 |

Tableau 15 : IC₅₀ des Stylissazoles A (106) et D (107)

Bien que les stylissazoles A et D soient actifs sur plusieurs kinases différentes, la conséquence sur leur spécificité posera probablement un problème difficile à résoudre. On note néanmoins que le stylissazole A est fortement actif sur les kinases DYRK1A, DYRK1B et DYRK2 (61 à 93 nM), toutes impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

III. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-microbienne

Les tests ont été réalisés au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) à Paris par M.-L. BOURGUET-KONDRACKI et A. LONGEON. Les molécules ont été testées pour leurs propriétés anti-infectieuses sur trois souches bactériennes.

- *Staphylococcus aureus* : Gram positif (ATCC 6538) responsable notamment des furoncles et des infections mammaires bovines.
- *Escherichia coli* : Gram négatif (ATCC 8739) fréquemment responsable des infections urinaires.
- *Vibrio anguillarum* : Gram négatif (ATCC 19264) responsable de vibrioses septicémiques chez les Salmonidés.

Les molécules ont été testées en triplicats à une concentration de 5 µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition (tableau 16). Le tableau complet est présenté dans l'annexe 4.

| Molécule | % d'inhibition | | |
|---|------------------|----------------|-----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>V. anguillarum</i> |
| Inosine (36) | 2 | 4 | 13 |
| Stylostatine 1 (56) | 0 | 26 | 17 |
| Stevensine ou odiline (67) | 89 | 4 | 89 |
| Hyménine (69) | 92 | 0 | 89 |
| Z-hyménialdisine (71) | 4 | 38 | 13 |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 0 | 37 | 16 |
| Mukanadine C (91) | 0 | 83 | 22 |
| Longamide (92) | 92 | 0 | 82 |
| Spongacidine D (94) | 3 | 34 | 17 |
| Hyménidine (97) | 79 | 92 | 63 |
| L'acide 4-bromopyrrole-2-carboxylique (100) | 36 | 36 | 21 |
| Taurodispacamide B (101) | 0 | 4 | 7 |
| Mauritiamine (102) | 82 | 10 | 74 |
| Kéramadine (104) | 79 | 75 | 70 |
| Stylissazole A (106) | 0 | 5 | 10 |
| Stylissazole D (107) | 18 | 0 | 20 |
| Agéliférine (109) | 90 | 86 | 82 |
| Taurodispacamide A (114) | 91 | 20 | 88 |
| Nagelamide P (115) | 89 | 14 | 86 |
| Stylissazole G (120) | 3 | 3 | 23 |
| Sceptrine (122) | 83 | 16 | 84 |

Tableau 16 : Résultats de l'activité anti-bactérienne

La mukanadine C (91) a révélé une activité antibactérienne spécifique de la bactérie *E. coli*. Le longamide (92), l'odiline/stévensine (67), l'hyménine (69), le nagélamide P (115), le taurodispacamide A (114), la sceptrine (122) et la mauritiamine (102) ont révélé une activité inhibitrice contre les bactéries *S. aureus* et *V. anguillarum*. Les molécules qui ont révélé une activité inhibitrice contre les trois souches bactériennes *E. coli*, *S. aureus* et *V. anguillarum* sont l'hyménidine (97), la kéramadine (104) et l'agéliférine (109). On constate que les monomères comme l'hyménidine (97) et les dimères comme l'agéliférine (100) ont des propriétés anti-bactériennes. Les dimères comme les stylissazoles A (106) ou D (107) ne présentent pas d'activité significative.

IV. Conclusion

Les activités des 48 produits de la chimiothèque que nous avons constituée ont pu être évaluées sur différentes cibles biologiques. La cytotoxicité des extraits bruts des éponges *Stylissa carteri* et *Amorphinopsis excavans* pourrait être due à la présence des molécules comme la Z-débromohyménialdisine (**73**) et les sarasinosides (**47** et **49**) connus dans la littérature.^{66,79} De nombreux membres des pyrroles-2-aminoimidazoles (monomères et dimères) ont des activités anti-bactériennes et inhibitrices des kinases.

Nos produits ont donc montré des activités biologiques intéressantes sur les cibles testées (kinases, bactéries, cytotoxicité). La Z-débromohyménialdisine (**73**) et la Z-hyménialdisine (**71**) ont un IC₅₀ très bas, ce qui confirme les données de la littérature.¹³²⁻¹³⁵ La présence du motif Z-débromohyménialdisine dans les stylissazoles A (**106**) et D (**107**) explique leur IC₅₀ très bas.

Les stylissazoles A (**106**) et D (**107**) pourraient être choisis pour des modification chimiques par synthèse afin de préparer des analogue. Leur spécificité sur les kinases et particulièrement celles relatives à la maladie d'Alzheimer pourraient alors être étudiées.

Conclusion générale

Conclusion générale

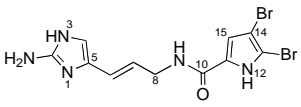
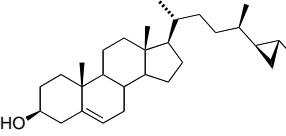
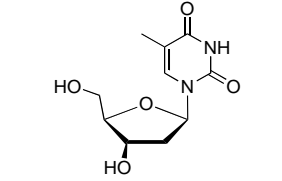
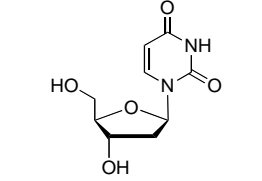
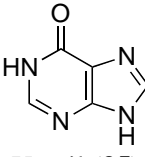
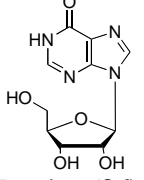
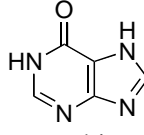
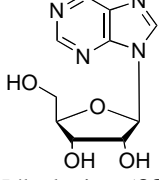
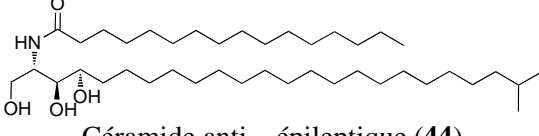
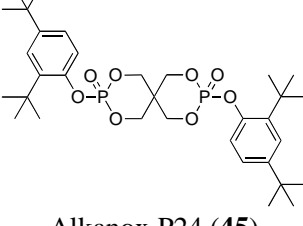
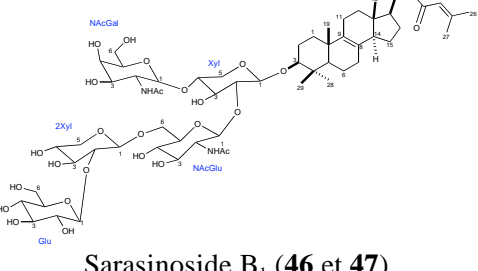
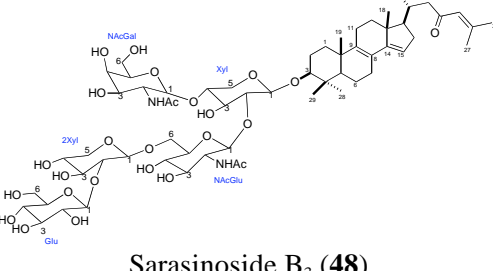
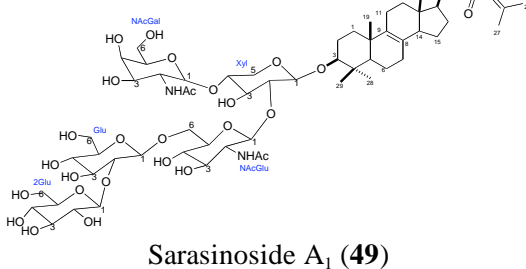
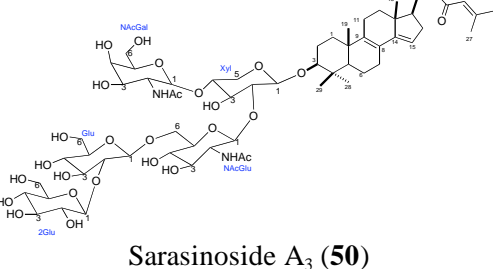
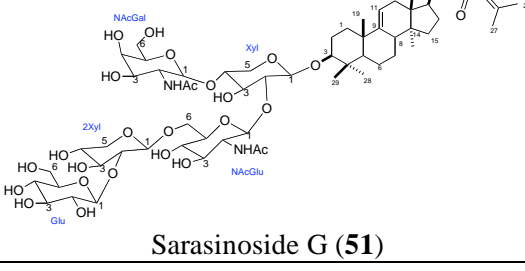
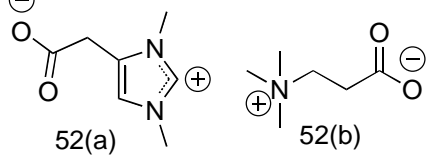
L'objectif du travail de recherche auquel je me suis attachée pendant cette thèse était de réaliser l'extraction complète des différentes éponges marines sélectionnées, afin d'isoler des molécules nouvelles et originales et en particulier des pyrroles-2-aminoimidazoles.

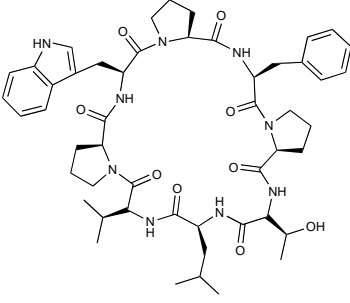
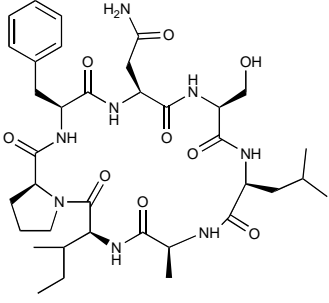
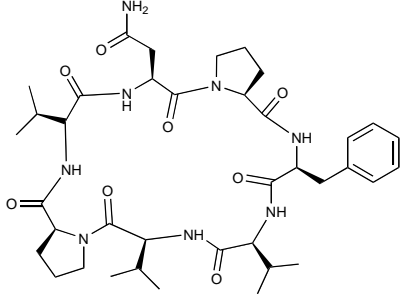
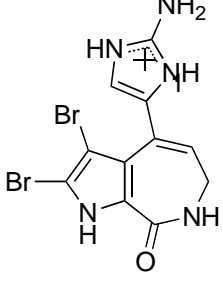
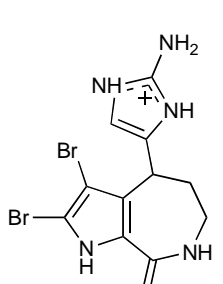
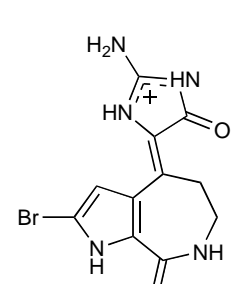
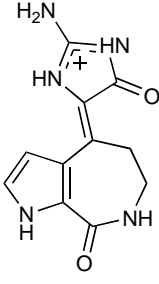
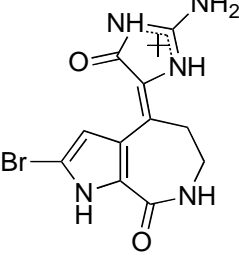
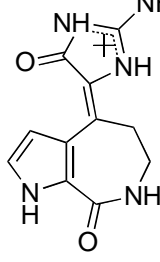
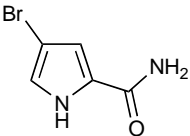
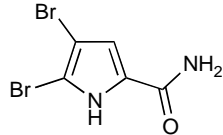
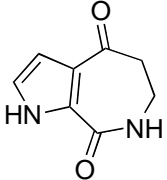
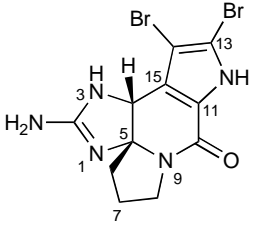
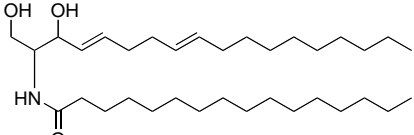
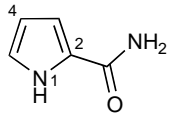
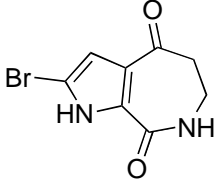
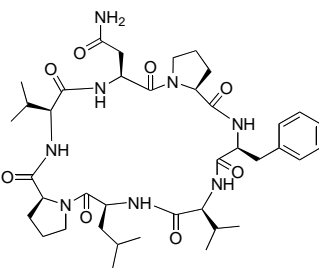
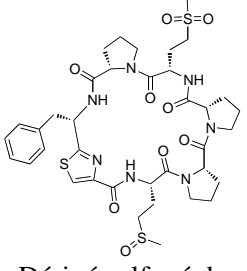
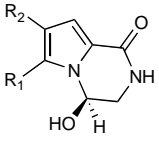
L'extraction de l'éponge *Petrosia (Petrosia) crassa* a fourni 7 composés connus. Parmi les produits connus, nous avons isolé un stérol commun dans cet ordre d'éponges, le pétrostérol (**29**) qui est un marqueur chimiotaxonomique pour le genre *Petrosia*.

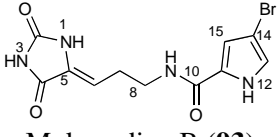
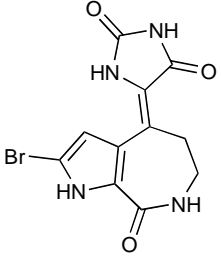
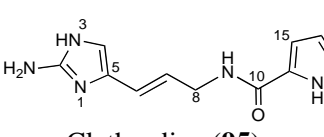
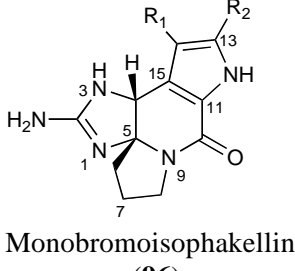
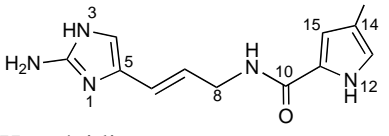
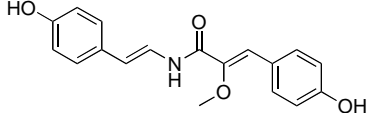
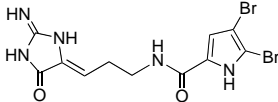
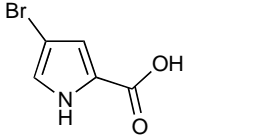
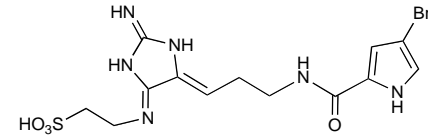
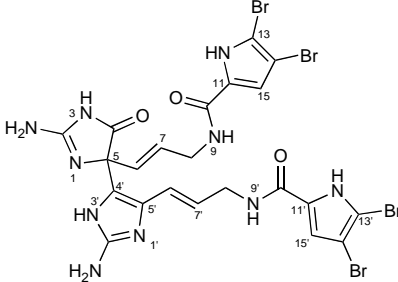
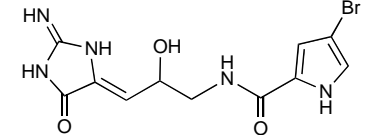
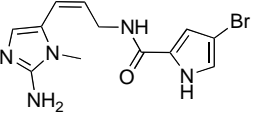
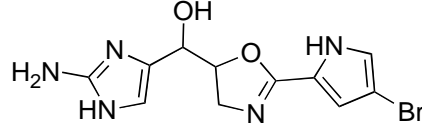
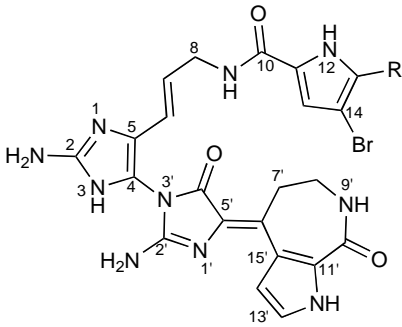
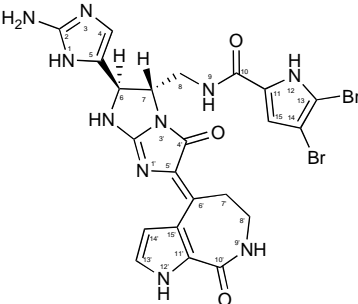
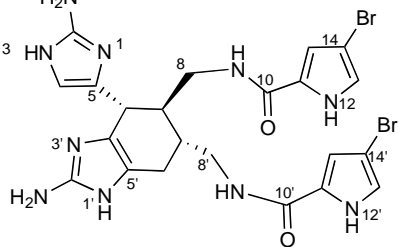
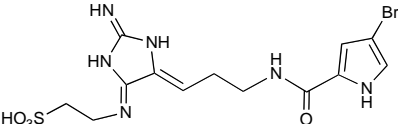
De l'éponge *Amorphinopsis excavans*, nous avons isolé 8 composés. Les sarasinosides sont isolés pour la première fois de cette éponge. Les sarasinosides B₁ et A₁ sont les seuls sarasinosides avec une activité d'inhibition de la croissance cellulaire cancéreuse KB.

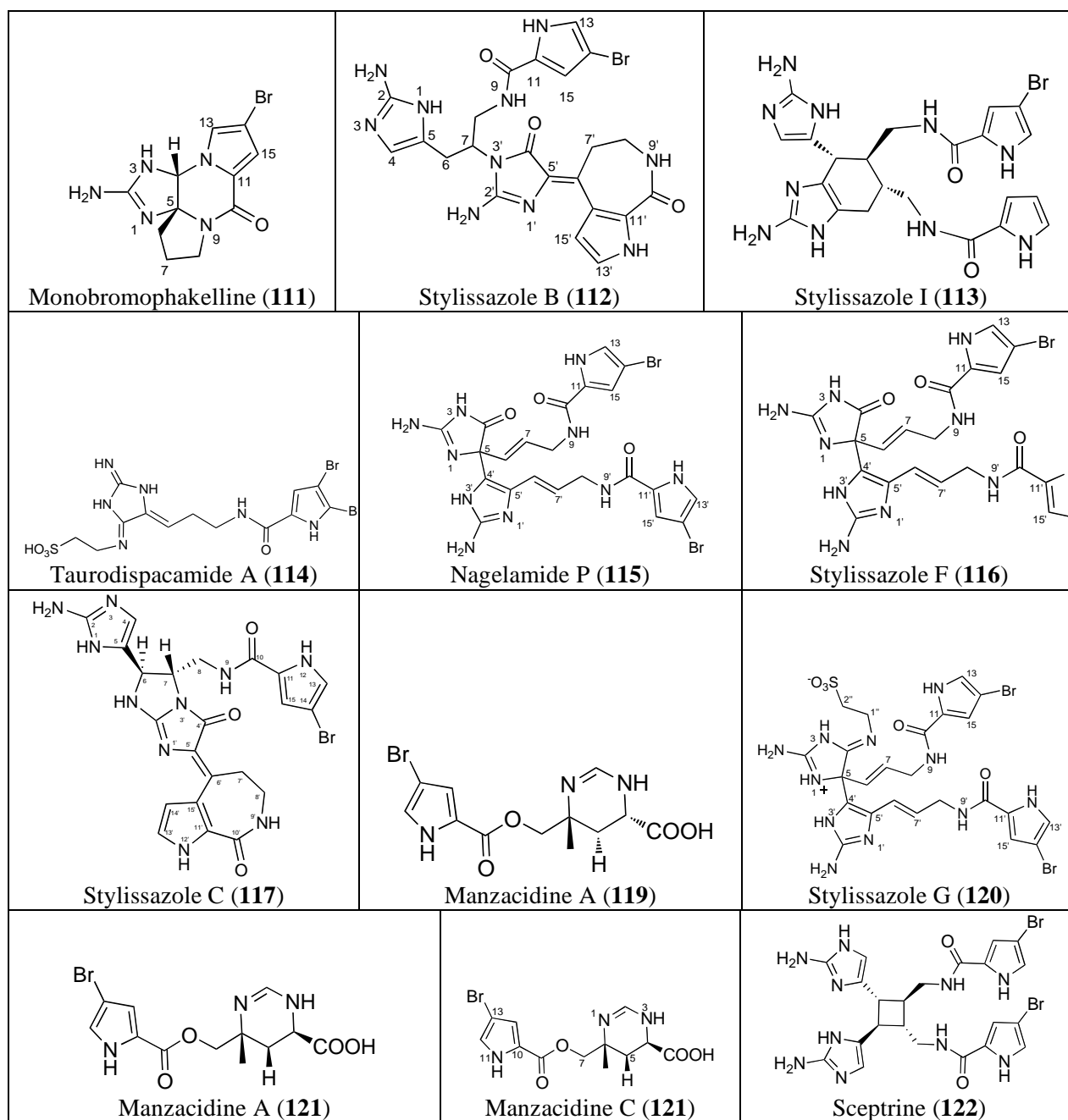
L'extraction de l'éponge *Stylissa carteri* a conduit à l'identification de 50 composés dont 9 nouveaux : les stylissazoles. Les stylissazoles A-E (**106-107**, **112**, **117** et **108**) constituent une nouvelle classe de pyrroles-2-aminoimidazoles dimériques. Les liaisons entre les unités P-2-AIs monomériques sont exclusivement entre les azotes et les carbones. Ces stylissazoles donnent une nouvelle dimension à la diversité moléculaire des pyrroles-2-imidazoles. Les stylissazoles F (**116**), G (**120**), H (**105**) et I (**113**) sont des dimères nouveaux qui diffèrent des dimères connus par leur degré de bromation. Ce n'est pas la première fois que des P-2-AIs sont rencontrés dans cette espèce d'éponges, mais ce travail nous a permis de mettre en évidence une famille originale de P-2-AIs, les stylissazoles A-E (**106**, **107**, **108**, **112** et **117**). La présence de molécules nouvelles pose la question de leur biogénèse. Des hypothèses de biogénèse reposant sur les différentes formes tautomères de l'oroïdine ont été proposées pour les dimères isolés. Les stylissazoles A et D (**106** et **107**) montrent une activité à l'échelle nanomolaire sur certaines kinases. Le Z débromohyménialdisine est le seul de P-2-AIs isolé avec une activité d'inhibition de la croissance cellulaire cancéreuse KB. Et sur tout les monomères de P-2-AIs ont une activité antibactérienne.

Tableau avec les molécules isolés :

| | | | |
|---|---|---|--|
|  <p>Oroïdine (7)</p> |  <p>Pétrostérol (22)</p> |  <p>2'-désoxyuridine (33)</p> |  <p>2'-désoxyuridine (34)</p> |
|  <p>Uracil (35)</p> |  <p>Inosine (36)</p> |  <p>Hypoxanthine (37)</p> |  <p>Nébularine (38)</p> |
|  <p>Céramide anti-épileptique (44)</p> | |  <p>Alkanox P24 (45)</p> | |
|  <p>Sarasinoside B₁ (46 et 47)</p> | |  <p>Sarasinoside B₃ (48)</p> | |
|  <p>Sarasinoside A₁ (49)</p> | |  <p>Sarasinoside A₃ (50)</p> | |
|  <p>Sarasinoside G (51)</p> | |  <p>Zooanemonin et β-alanine bétaine (52)</p> | |

| | | | |
|--|--|--|--|
|  <p>Axinelline B (54)</p> |  <p>Stylostatine 1 (56)</p> |  <p>Axinastatine 1 (61)</p> | |
|  <p>Stevensine ou odiline (67)</p> |  <p>Hyménine (69)</p> |  <p>Z-hyménialdisine (71)</p> |  <p>Z-débromohyménialdisine (73)</p> |
|  <p>E-hyménialdisine (74)</p> |  <p>E-débromohyménialdisine (76)</p> |  <p>Pyrrole-2-carboxamide monobromé (81)</p> | |
|  <p>Pyrrole-2-carboxamide dibromé (82)</p> |  <p>Aldisine (83)</p> |  <p>Dibromoisophakelline (84)</p> | |
|  <p>N-palmitoyl-octadécasphinga-4(E),8(E)-diénine (86)</p> |  <p>Pyrrole-2-carboxamide (87)</p> |  <p>2-bromoaldisine (88)</p> | |
|  <p>Axinastatine 2 (89)</p> |  <p>Dérivé sulfoné de waiakéamide (90)</p> |  <p>91 R₁ = H R₂ = Br 92 R₁ = R₂ = Br 91 - Mukanadine C 92 - Longamide</p> | |

| | | | |
|---|--|---|---|
|  <p>Mukanadine B (93)</p> |  <p>Spongacidine D (94)</p> |  <p>Clathrodine (95)</p> |  <p>Monobromoisophakellin e (96)</p> |
|  <p>Hyménidine e (97)</p> |  <p>Botryllamide F (98)</p> |  <p>Dispacamide A (99)</p> | |
|  <p>L'acide 4-bromopyrrole-2-carboxylique (100)</p> |  <p>Taurodispacamide B (101)</p> |  <p>Mauritiamine (102)</p> | |
|  <p>Dispacamide D ou Mukanadine A (103)</p> |  <p>Kéramadine (104)</p> |  <p>Stylissazole H (105)</p> | |
|  <p>106 R = H 107 R = Br Stylissazole A (106) Stylissazole D (107)</p> |  <p>Stylissazole E (108)</p> |  <p>Agéliférine (109)</p>  <p>Tauroacidine B (110)</p> | |



Partie expérimentale

MATERIALS AND METHODS

Solvents: All spectroscopic grade solvents (MeOH, CH₂Cl₂, n-BuOH, MeCN) were used as received from Acros Organics.

Chromatography: Prior to the HPLC purification, three different kinds of flash chromatography columns were used;

- Normal Phase Column Chromatography: Silica-gel with a particle size of 35-70 μm or 70-200 μm (SDS 60 ACC) and prepacked Versapack column were used (11 g, 23 g, 48 g or 96 g) on a Supelco VersaFlash system with a ACCU Scilog pump and a Foxy Jr. fraction collector.
- Reversed Phase Column Chromatography: Prepacked Versapack column was used (48 g or 96 g).
- Gel Permeation Chromatography on Sephadex LH-20 material: the in-bulk gel material was suspended in an appropriate solvent and packed into a glass column.

Isolation of metabolites was monitored by thin layer chromatography on TLC plates with silica gel 60-F₂₅₄ (layer thickness 0.5 mm and 2 mm, Merck) and reverse phase RP-18 F₂₅₄ (Merck) plates. Compounds were visualized under UV light ($\lambda = 254$ and 365 nm) and were also detected by spraying with a variety of chemical reagents: iodide, vanillin/sulphuric acid and ninhydrin...etc.

- *Analytical HPLC :*
 - Pump: Alliance Waters 2695
 - Detectors: PhotoDiode Array Waters 996, DEDL Waters 2420, Mass spectrometer Waters Micromass ZQ 2000
 - HPLC programm: Empower 2
 - Columns: Thermo Hypercarb (Φ 4.6 x 100 mm, 5 μ), Waters XBridge RP₁₈ (Φ 3.0 x 150 mm, 5 μ) and Waters Sunfire (Φ 4.6 x 100 mm, 5 μ).
- *Preparative HPLC (Waters 600 System Controller):*
 - Pump: Waters 600,
 - Autosampler: Sample Manager Waters 2700
 - Detector: PhotoDiode Array Waters 2996

- HPLC programm: Masslynx Columns: Waters XBridge Prep Shield RP₁₈ (Φ 19 x 100 mm, 5 μ) and Waters Sunfire Prep RP₁₈ (Φ 19 x 150 mm, 5 μ).

Physical and spectrometric data

Optical rotation was conducted on Jasco P-1010 Polarimeter at indicated temperatures and concentrations using the indicated solvents. Infrared spectra were recorded with a Perkin Elmer Spectrometer BX FT-IR apparatus directly on the Dura Sample IR II apparatus (SensIR Technologies).

Mass spectra were recorded on the following apparatus:

- Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS),
- Electronic Impact (EI) : Thermo Finnigan Automass spectrometer
- High Resolution Electrospray (HRMS): LCT Micromass spectrometer
- LC/MSⁿ ESI: LTQ-orbitrap, Thermo Fisher.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300 MHz, Avance 500 MHz or DRX 600 MHz spectrometers. Deuterated solvents (DMSO, CDCl₃, CD₃OD or DMF) were used for NMR measurement. The spectra were processed using 1D NMR Notebook or 2D NMR Notebook software. They were calibrated using solvent signals of proton and carbon at the following values:

| Solvent | δ_H | δ_C |
|-------------------------------|------------|------------|
| CD ₃ OD- <i>d4</i> | 3.30 | 49.0 |
| DMSO- <i>d6</i> | 2.49 | 39.5 |
| CDCl ₃ - <i>d</i> | 7.24 | 77.0 |
| DMF- <i>d7</i> | 2.74 | 30.1 |

The observed chemical shift (δ) values were given in ppm and the coupling constants (J) in Hz. Following abbreviations are used: s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublet)...

Remarks

The used nomenclature is consistent with IUPAC rules for almost all described compounds. Before purifications on preparative or semi-preparative HPLC, samples were filtered with Whatman system (PTFE syringeless filter, 0.45 μm). Insoluble residues were controlled by analytical HPLC.

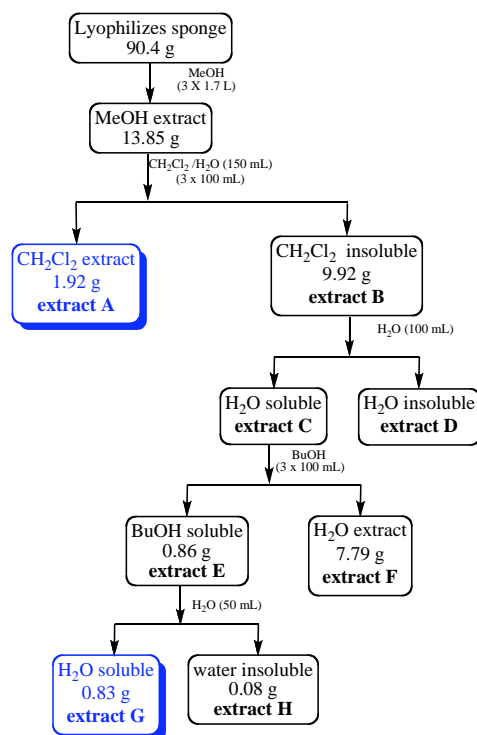
For known natural compounds, the ^1H NMR data were compared with those described in the literature.

The spectral data (^1H , ^{13}C NMR) for new compounds are presented in the appendix (annex).

Sponges fractionation and metabolites isolation

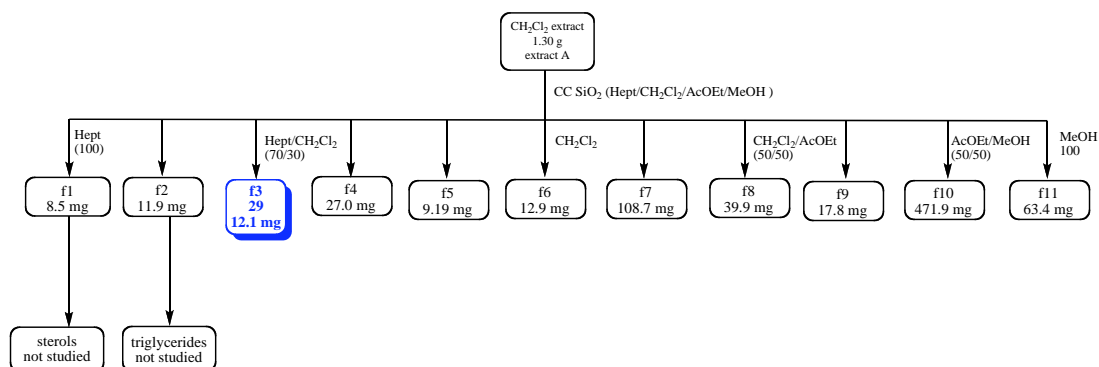
Petrosia (Petrosia) crassa (Chapter 2)

Lyophilized specimen of *Petrosia (Petrosia) crassa* (90.4 g) was extracted under pressure (100 bars, dionex solvent extraction system) with MeOH (3 x 1.7 L) and the combined extracts were concentrated to give a brown residue (13.85 g). The methanol extract was further triturated with CH₂Cl₂ (Scheme 1).



Scheme 1

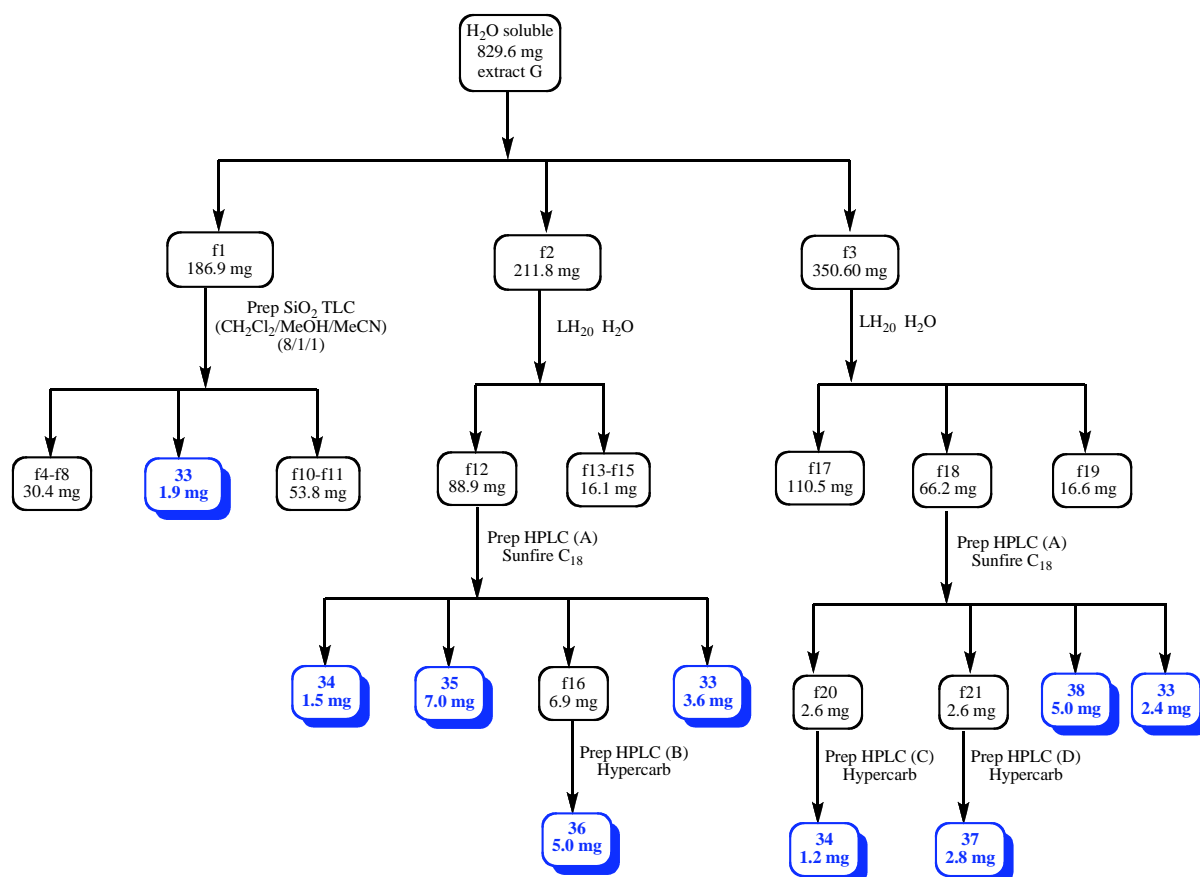
The CH₂Cl₂-soluble material (1.30 g) was chromatographed on silica gel column using (Hept/CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH: 100/0/0/0 to 0/0/0/100) solvent mixtures to afford 11 fractions (Scheme 2).



Scheme 2

The fraction f3 yielded petrosteroles (**29**) (12.1 mg, 0.013 % yield).

The CH₂Cl₂-insoluble residue (9.92 g) was triturated with water and n-butanol (Scheme 1). Concentration of the n-butanol *in vacuo* gave extract E (862.20 mg) that was again triturated with water to give 829.60 mg of water-soluble extract G. The latter was divided into 3 fractions and each fraction was either subjected to preparative silica gel TLC or LH₂₀ followed by preparative HPLC (Scheme 3). Compounds **33-38** were isolated.



Scheme 3

Fraction f1 yielded 2'-deoxythymidine (**33**) (1.9 mg, 0.002 % yield) after purification on preparative silica gel TLC with CH₂Cl₂/MeOH/ MeCN: 8/1/1.

Fraction f2 was chromatographed over LH₂₀ and then fraction f12 was purified by semi preparative HPLC (A)* (Sunfire C₁₈) using a step gradient, affording 2'-deoxyuridine (**34**) (1.5 mg, t_R = 1.75 min, 0.002 % yield), pyrimidic bases uracil (**35**) (7.0 mg, t_R = 2.58 min, 0.008 % yield) and 2'-deoxythymidine (**33**) (3.6 mg, t_R = 16.48 min, 0.004 % yield). Inosine

(36) (5.0 mg, $t_R = 14.14$ min, 0.006 % yield) was obtained after semi preparative HPLC (B)* (Hypercarb).

Nebularine (**38**) (5.0 mg, $t_R = 11.42$ min, 0.006 % yield) and 2'-deoxythymidine (**33**) (2.4 mg, $t_R = 15.00$ min, 0.003 % yield) were obtained by HPLC (A)* (Sunfire C₁₈) and LH₂₀ chromatography of fraction f18.

Fraction f20 obtained from fraction f18 after semi preparative HPLC (A)* (Sunfire C₁₈) using a step gradient, was purified by semi preparative reversed-phase HPLC (C)* (Hypercarb) affording 2'-deoxyuridine (**34**) (1.2 mg, $t_R = 13.76$ min, 0.001 % yield).

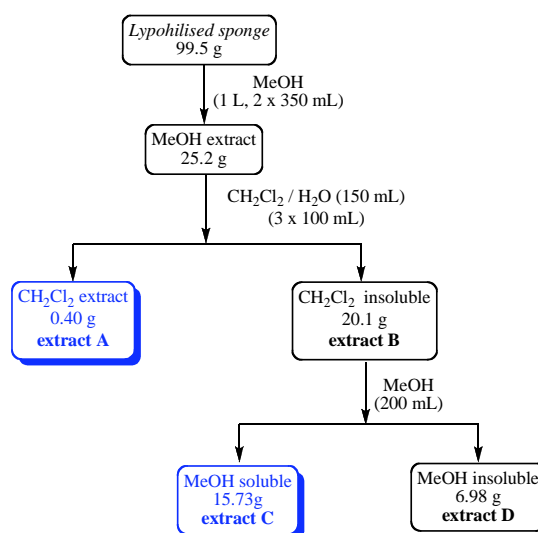
Hypoxanthine (**37**) (2.8 mg, $t_R = 25.48$ min, 0.003 % yield) was obtained by semi preparative HPLC (D)* (Hypercarb) of fraction f21, which was obtained by semi preparative HPLC (A) (Sunfire C₁₈) of fraction f18.

* - preparative reversed-phase HPLC conditions:

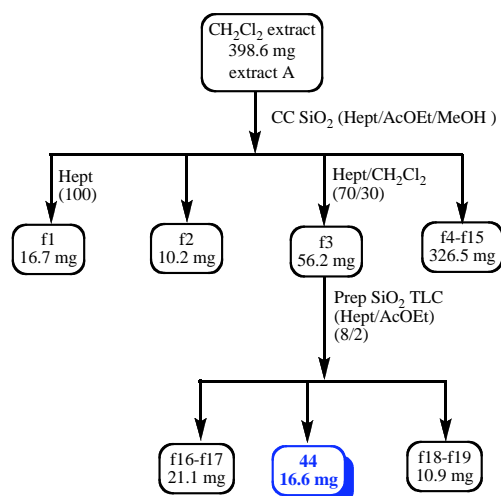
| HPLC (A) | HPLC (B) | HPLC (C) | HPLC (D) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|--|---|-----|---|----|----|---|----|----|----|--|------------|---|---|---|-----|---|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|-----|---|----|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|-----|---|----|----|---|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5 μ m, 19 x 150 mm | Column: Hypercarb, 5 μ m, 4.6 x 100 mm | Column: Hypercarb, 5 μ m, 4.6 x 100 mm | Column: Hypercarb, 5 μ m, 4.6 x 100 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 1 mL/min | Flow: 1 mL/min | Flow: 1 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV -254 nm | Detector: UV -254 nm | Detector: UV -254 nm | Detector: UV -254 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 100 | 0 | 20 | 95 | 5 | 30 | 90 | 10 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 100 | 0 | 5 | 95 | 5 | 15 | 10 | 90 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 100 | 0 | 10 | 95 | 5 | 20 | 10 | 90 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 100 | 0 | 20 | 95 | 5 | 30 | 10 | 90 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 90 | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

***Amorphinopsis excavans* (Chapter 3)**

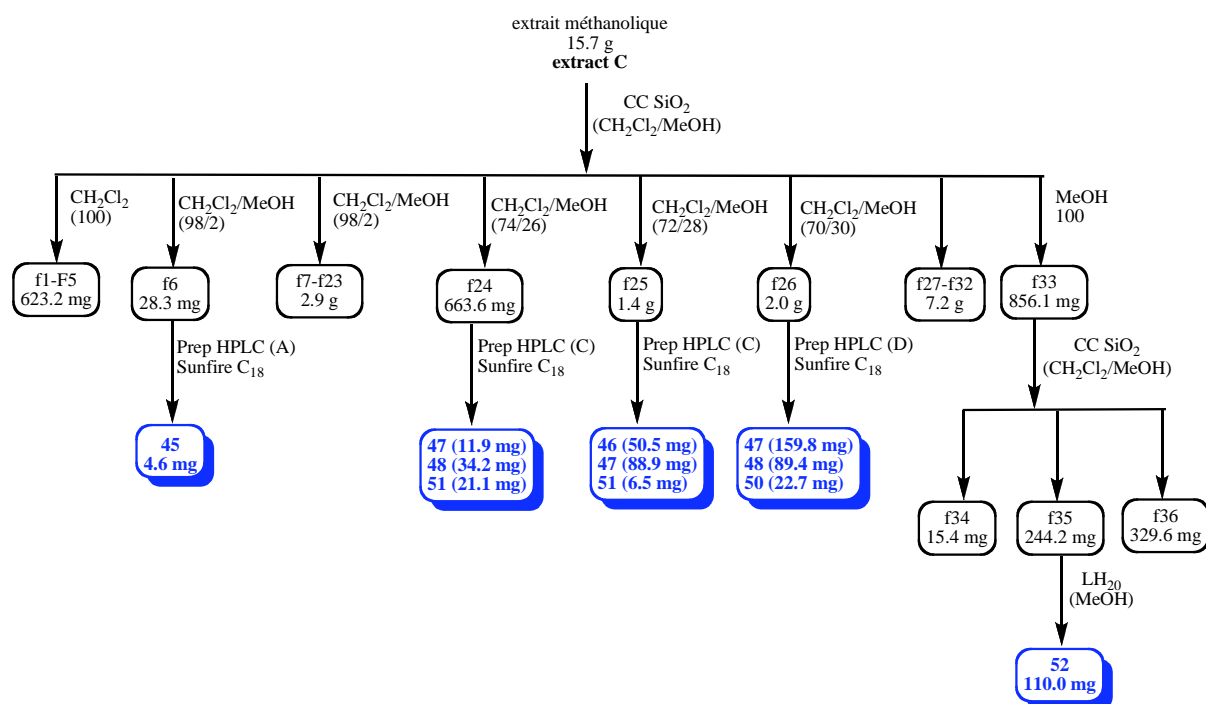
Lyophilized specimen of *Amorphinopsis excavans* (95.5 g) was extracted under pressure (100 bars, dionex solvent extraction system) with MeOH (1 L and 2 x 350 mL). The combined extracts were concentrated to give 25.2 g of crude extract. Trituration with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) gave CH₂Cl₂-soluble extract A (398.6 mg) and an insoluble extract B (20.1 g) (Scheme 4).

**Scheme 4**

Extract A (398.6 mg) was flash chromatographed on silica gel column using (Hept/AcOEt/MeOH: 100/0/0 to 0/0/100) solvent mixtures to afford 15 fractions (Scheme 5). The fraction f3 yielded ceramide (**44**) (16.6 mg, 0.017 % yield) after purification on preparative silica gel TLC with Hept/AcOEt: 8/2.

**Scheme 5**

Extract C (15.73 g) was separated on silica gel column using (CH₂Cl₂/MeOH: 100/0 to 0/100) solvent mixtures to afford 33 fractions (Scheme 6). These fractions were then subjected to either preparative silica gel TLC or preparative HPLC (Scheme 6). Compounds **45-52** were isolated.



Scheme 6

Fraction f6 yielded Alkanis P24 (**45**) (4.6 mg, $t_R = 29.87$ min, 0.005 % yield) after purification on preparative HPLC (A)* (Sunfire C₁₈).

The fraction f24 (663.6 mg) was purified by C₁₈ preparative HPLC (C)* on Sunfire C₁₈ column to afford sarasinamide G (**51**) (21.1 mg, $t_R = 9.80$ min, 0.021 % yield), sarasinamide B₃ (**48**) (34.2 mg, $t_R = 14.70$ min, 0.034 % yield) and sarasinamide B₁ (**47**) (11.9 mg, $t_R = 19.20$ min, 0.012 % yield).

HPLC (C)* purification of a portion (600.5 mg) of fraction f25 (1.4 g) yielded sarasinamide G (**51**) (6.5 mg, $t_R = 11.20$ min), sarasinamide B₃ (**48**) ($t_R = 23.90$ min, 88.9 mg) and sarasinamide B₄ (**46**) (50.5 mg, $t_R = 22.10$ min).

Partie expérimentale

A portion (513.5 mg) of fraction f26 (2.0 g) was purified by preparative HPLC (D)* on a Sunfire C₁₈ column to yield sarasinoside B₁ (**47**) (159.8 mg, t_R = 12.80 min), sarasinoside A₃ (**50**) (22.7 mg, t_R = 6.87 min) and sarasinoside A₁ (**49**) (89.4 mg, t_R = 8.73 min).

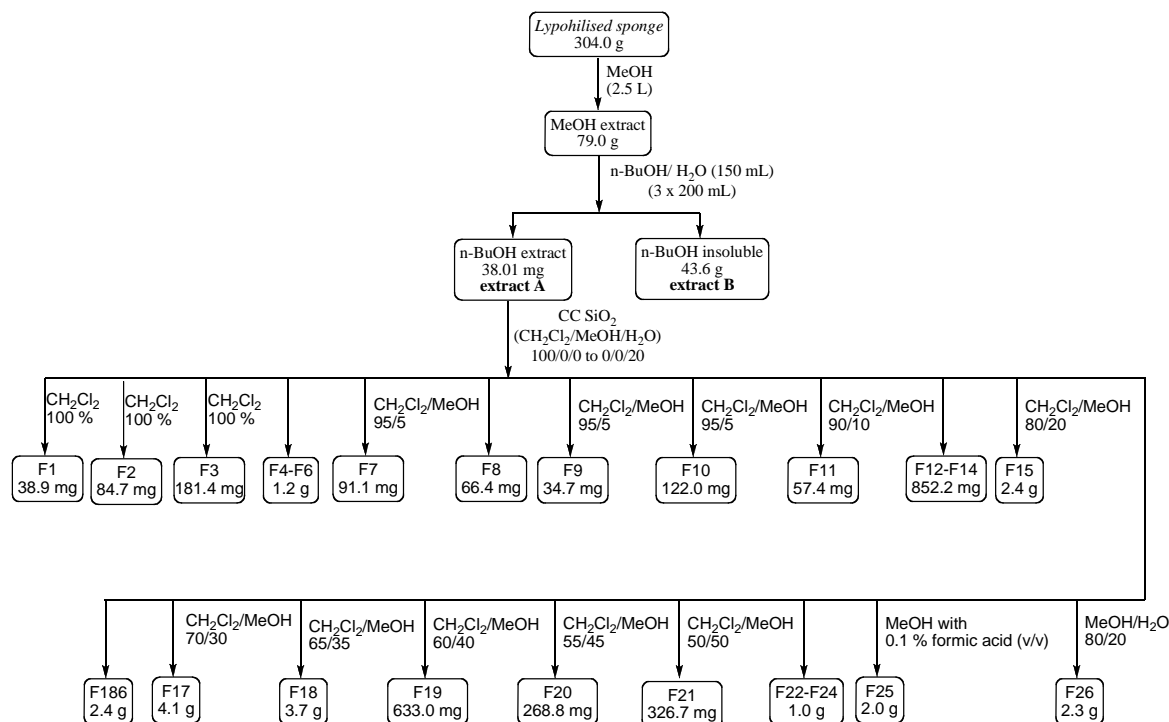
The more polar fraction f33, eluted with MeOH, was concentrated (856.1 mg) and then separated over silica gel using (CH₂Cl₂/MeOH: 100/0 to 0/100) solvent mixtures to afford 3 fractions (f34-f36). Fraction f35 was chromatographed LH₂₀ (MeOH) to yield compound **49** (zooaneamonin and β-alanine betaine) (110.0 mg, 0.111 % yield).

* - preparative reversed-phase HPLC conditions:

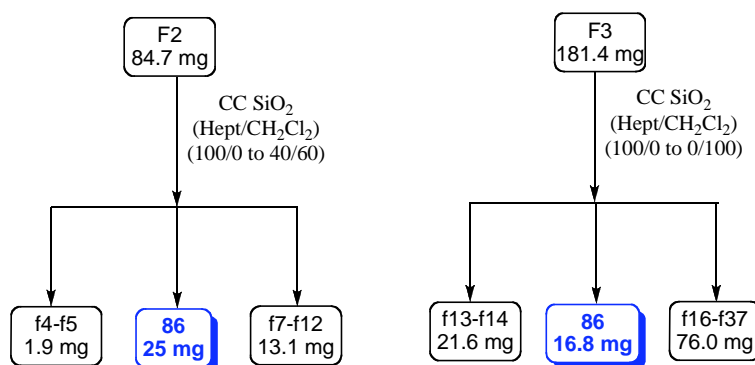
| HPLC (A) | HPLC (B) | HPLC (C) | HPLC (D) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|--|---|----|----|----|---|-----|---|------------|---|---|---|----|----|----|---|-----|---|------------|---|---|----|----|----|---|------------|---|---|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5μm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5μm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5μm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5μm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 19 mL/min | Flow: 19 mL/min | Flow: 20 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV -194 and 280 nm | Detector: UV -240 nm | Detector: UV -240 nm | Detector: UV -240 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Isocratic run | Isocratic run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 50 | 50 | 40 | 0 | 100 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 70 | 30 | 40 | 0 | 100 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>30</td> <td>62</td> <td>38</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 30 | 62 | 38 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>30</td> <td>62</td> <td>38</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 30 | 62 | 38 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 70 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 62 | 38 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 62 | 38 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

***Styllissa carteri* (Chapter 4)**

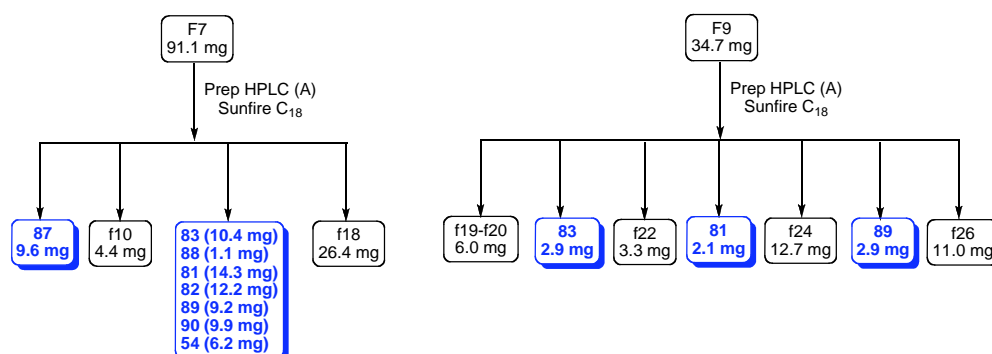
Lyophilized specimen of *Styllissa carteri* (304.0 g) was extracted under pressure by dionex extraction system with MeOH (2.5 L) to give 81.7 g of crude extract. The latter extract was triturated with n-butanol (3 x 200 mL) to give a n-butanol soluble extract A (38.0 g) and an insoluble extract B (45.63 g) (Scheme 7). The n-butanol soluble extract (extract A) (38.0 g) was flash chromatographed on a silica gel column with a gradient of CH₂Cl₂/MeOH/H₂O: 100/0/0 to 0/0/20 to afford FI-F26 fractions.

**Scheme 7**

Fractions F2 and F3 were subjected to silica gel chromatography with a gradient of Hept/CH₂Cl₂ (100/0 to 0/100) to afford compound **86** (41.8 mg, 0.014) (Scheme 8).

**Scheme 8**

Fractions F7 and F9 were purified by preparative HPLC (A)* on a Sunfire C₁₈ column (scheme 9). Fraction F7 (91.7 mg) afforded 8 compounds while fraction F9 (34.7 mg) afforded 3 compounds (table 1).

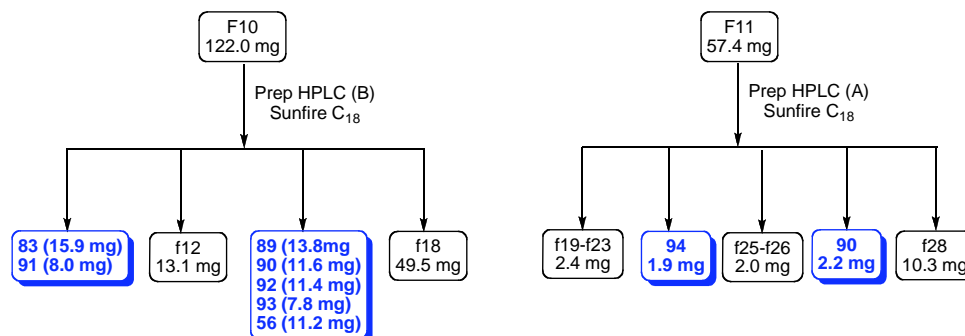


Scheme 9

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|---|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction F7 (91.1 mg) | | | |
| pyrrole-2-carboxamide (87) | 9.6 | 6.80 | 0.003 |
| aldisine (83) | 10.4 | 8.78 | 0.003 |
| 2-bromoaldisine (88) | 1.1 | 15.68 | 0.004 |
| 5-bromopyrrole-2-carboxamide (81) | 14.3 | 17.28 | 0.005 |
| 4,5-dibromopyrrole-2-carboxamide (82) | 12.2 | 24.04 | 0.004 |
| axinastatin 2 (89) | 9.2 | 32.38 | 0.003 |
| sulfate derivative of waiakeamide (90) | 9.9 | 34.88 | 0.003 |
| axinellin B (54) | 6.2 | 42.51 | 0.002 |
| Molecules isolated from fraction F9 (34.7 mg) | | | |
| aldisine (83) | 2.9 | 10.31 | 0.001 |
| 5-bromopyrrole-2-carboxamide (81) | 2.1 | 17.70 | 0.001 |
| axinastatin 2 (89) | 2.9 | 33.18 | 0.001 |

Table 1: Molecules isolated from fractions F7 and F9

Fraction F10 (122.0 mg) was purified by preparative HPLC (B)* using Sunfire C₁₈ column (Scheme 10) to yield 7 compounds (table 2) while preparative HPLC (A)* purification of fraction F11 (57.4 mg) afforded 2 compounds (table 2).

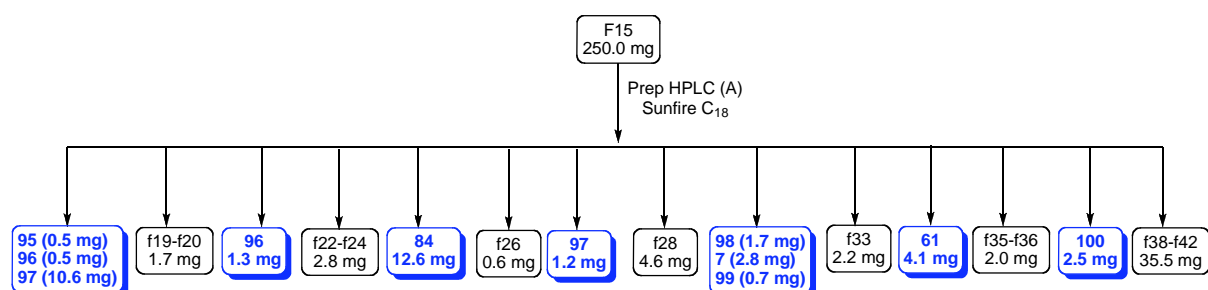


Scheme 10

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|---|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction F10 (122.0 mg) | | | |
| aldisine (83) | 15.9 | 9.00 | 0.005 |
| mukanadin C (91) | 8.0 | 14.40 | 0.003 |
| longamide (92) | 11.4 | 20.50 | 0.004 |
| mukanadin B (93) | 7.8 | 21.57 | 0.003 |
| stylostatin 1 (56) | 11.2 | 27.82 | 0.004 |
| axinastatin 2 (89) | 13.8 | 32.45 | 0.005 |
| sulfate derivated of waiakeamide (90) | 11.6 | 34.78 | 0.004 |
| Molecules isolated from fraction F11 (57.4 mg) | | | |
| spongiacidin D (94) | 1.9 | 18.41 | 0.001 |
| sulfate derivative of waiakeamide (90) | 2.2 | 27.00 | 0.001 |

Table 2: Molecules isolated from fractions F10 and F11

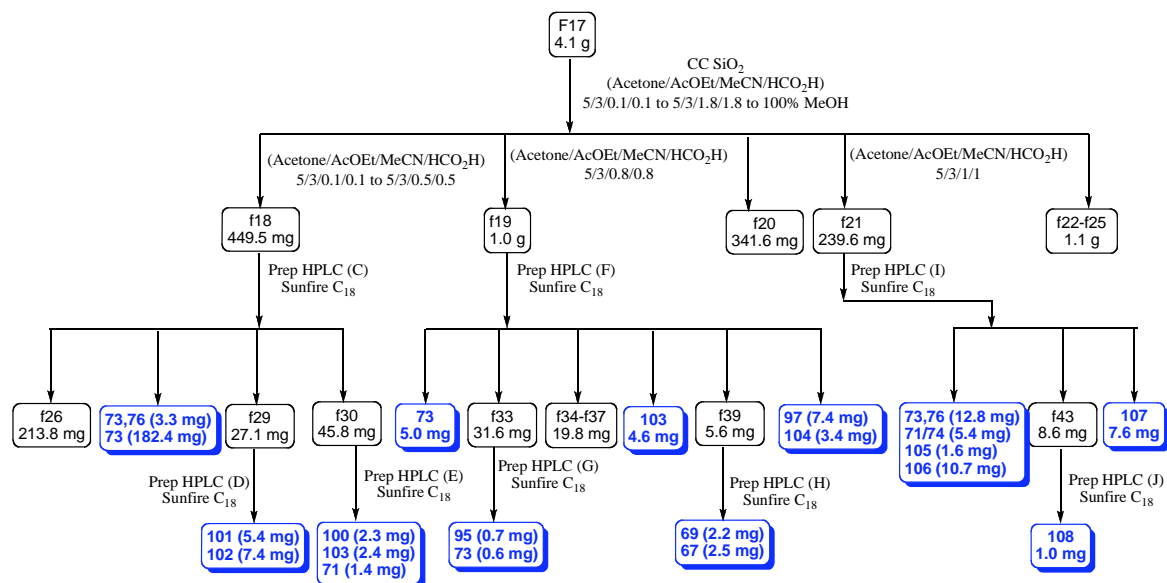
Preparative HPLC (A)* on a Sunfire C₁₈ of 250.0 mg (scheme 11) of F15 (2.0 g) which was eluted with CH₂Cl₂/MeOH (80/20) afforded 9 compounds (table 3).

**Scheme 11**

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|---|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction F15 (250.0 mg) | | | |
| clathrocin (95) | 0.5 | 3.65 | 0.0002 |
| monobromoisophakellin (96) | 8.86 | 5.97 | 0.001 |
| hymenidin (97) | 11.8 | 6.31 | 0.004 |
| dibromoisophakellin (84) | 12.6 | 9.57 | 0.004 |
| botryllamide F (98) | 1.7 | 14.38 | 0.001 |
| oroidin (7) | 2.8 | 14.66 | 0.001 |
| dispacamide A (99) | 0.7 | 15.86 | 0.0002 |
| axinastatin 1 (61) | 4.1 | 19.45 | 0.001 |
| 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid (100) | 2.5 | 24.14 | 0.001 |

Table 3: molecules isolated from fraction F15

Fraction F17 (4.1 g) was subjected to silica gel chromatography using acetone/AcOEt/MeCN/HCO₂H (5/3/0.1/0.1 to 5/3/1.8/1.8 v/v) and MeOH (100 %) as eluent. Three major fractions (f18, f19 and f21) were further purified by preparative HPLC (C, D, E, F, G, H, I and J)* (scheme 12) to yield a total of 17 compounds (table 4).

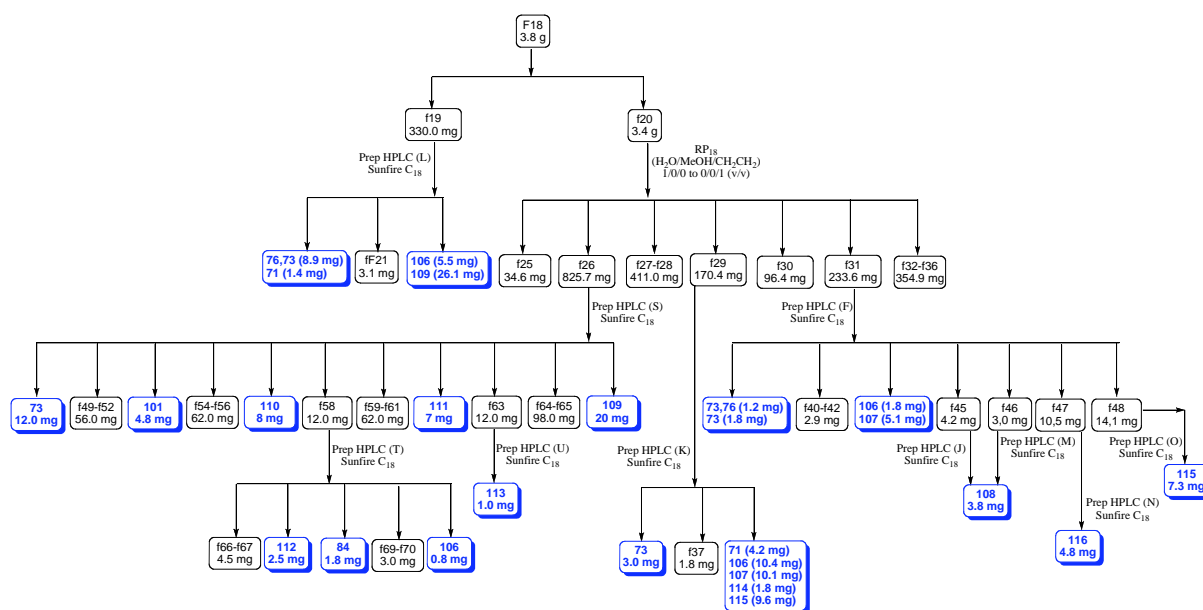


Scheme 12

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|--|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction f18 (449.5 mg) | | | |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76,73) | 3.3 | 4.80, 5.75 | 0.001 |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 182.4 | 5.81 | 0.060 |
| dispacamide D or mukanadin A (103) | 2.4 | 14.46 | 0.001 |
| <i>Z</i> -hymenialdisin (71) | 1.4 | 16.25 | 0.0005 |
| taurodispacamide B (101) | 5.4 | 19.71 | 0.002 |
| mauritiamine (102) | 7.4 | 21.88 | 0.002 |
| 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid (100) | 2.3 | 22.73 | 0.001 |
| Molecules isolated from fraction f19 (1.0 g) | | | |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 5.6 | 5.0 | 0.002 |
| clathrodin (95) | 0.7 | 9.63 | 0.0002 |
| dispacamide D or mukanadin A (103) | 4.6 | 9.80 | 0.002 |
| hymenidin (97) | 2.8 | 11.15 | 0.001 |
| keramadin (104) | 3.4 | 11.63 | 0.001 |
| hymenin (69) | 2.2 | 18.70 | 0.001 |
| stevensince or odiline (67) | 2.5 | 20.00 | 0.001 |
| Molecules isolated from fraction f21 (239.6 mg) | | | |
| stylissazole H (105) | 1.6 | 6.53 | 0.001 |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76,73) | 12.8 | 8.53, 10.27 | 0.004 |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -hymenialdisin (74,71) | 5.4 | 14.42, 15.83 | 0.002 |
| stylissazole E (108) | 1.0 | 19.49 | 0.0003 |
| stylissazole A (106) | 10.7 | 26.15 | 0.004 |
| stylissazole D (107) | 7.6 | 31.40 | 0.003 |

Table 4: Molecules isolated from fraction F17

A portion (f19 - 300.0 mg) from fraction F18 (3.8 g) was purified by preparative HPLC (L)* on a Sunfire C₁₈ column (scheme 13) and yielded 5 compounds (table 5). The rest (f20 - 3.4 g) of F18 was subjected to RP₁₈ flash chromatography to yield fractions f25 - f36. Fractions f26 (825.7 mg), f29 (170.4 mg) and f31 (233.6 mg) were purified on preparative HPLC (K, F, J, M, N, O S, T and U)* on a Sunfire C₁₈ column (scheme 13) to yield 14 compounds (table 5).



Schema 13

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|---|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction f19 (300.0 mg) | | | |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76 , 73) | 8.9 | 9.93, 11.78 | 0.003 |
| <i>Z</i> -hymenialdisin (71) | 1.4 | 18.30 | 0.0005 |
| stylissazole A (106) | 5.5 | 21.53 | 0.002 |
| ageliferin (109) | 26.1 | 29.35 | 0.009 |
| Molecules isolated from fraction f26 (825.7 mg) | | | |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 12.0 | 5.70 | 0.004 |
| taurodispacamide B (101) | 4.8 | 12.7 | 0.002 |
| Stylissazole B (112) | 2.5 | 11.10 | 0.001 |
| dibromoisophakellin (84) | 1.8 | 12.90 | 0.001 |
| tauroacidin B (110) | 8.0 | 13.80 | 0.003 |
| stylissazole I (113) | 1.0 | 14.10 | 0.0003 |
| stylissazole A (106) | 0.8 | 17.51 | 0.0003 |
| monobromophakellin (111) | 7.0 | 22.20 | 0.002 |
| ageliferin (109) | 3.0 | 28.40 | 0.001 |
| Molecules isolated from fraction f29 (170.4 mg) | | | |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 3.0 | 7.8 | 0.001 |
| <i>Z</i> -hymenialdisin (71) | 4.2 | 11.40 | 0.001 |
| stylissazole A (106) | 10.4 | 15.89 | 0.003 |
| stylissazole D (107) | 10.1 | 20.30 | 0.003 |
| taurodispacamide A (114) | 1.8 | 25.49 | 0.001 |
| nagelamide P (115) | 9.6 | 27.22 | 0.003 |

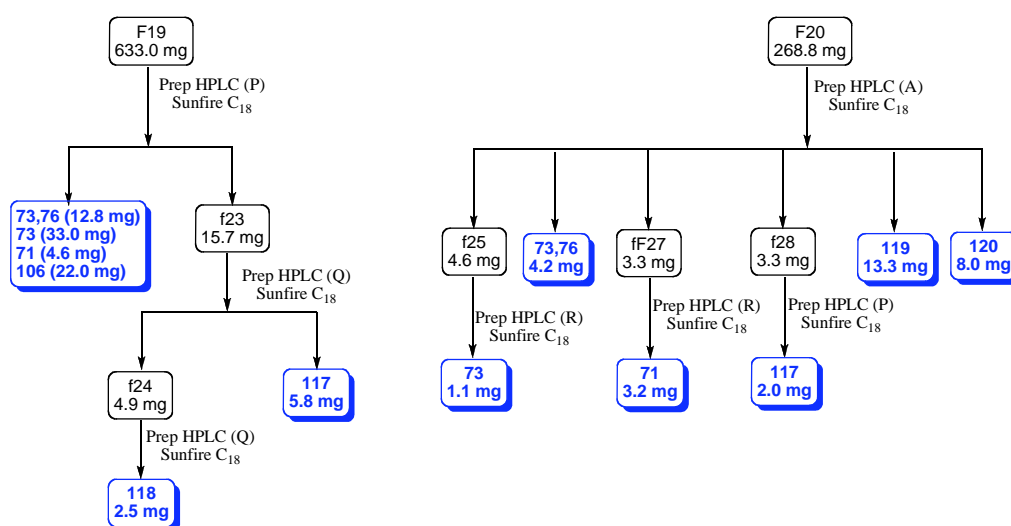
Table 5 continued on next page

Table 5 continued from previous page

| Molecules isolated from fraction f31 (233.6 mg) | | | |
|---|-----|------------|-------|
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76, 73) | 3.0 | 7.18, 8.60 | 0.001 |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 1.8 | 8.80 | 0.001 |
| stylissazole F (116) | 4.8 | 15.66 | 0.002 |
| stylissazole A (106) | 1.8 | 19.10 | 0.001 |
| Nagelamide P (115) | 7.3 | 19.42 | 0.002 |
| stylissazole E (108) | 3.8 | 19.67 | 0.001 |
| stylissazole D (107) | 5.1 | 23.42 | 0.002 |

Table 5: Molecules isolated from fraction F18

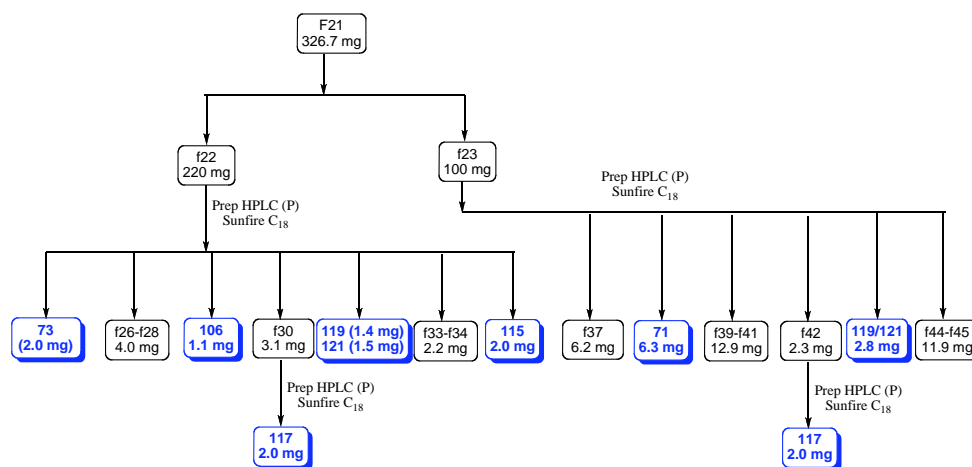
Fraction F19 (633.0 mg) was purified by preparative HPLC (P and Q)* on a Sunfire C₁₈ column (scheme 14) and afforded 5 compounds (table 6). While fraction F20 (268.8 mg) yielded 6 compounds (table 6) after purification by preparative HPLC (A, P and R)* (scheme 14).

**Scheme 14**

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|--|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction F19 (633.0 mg) | | | |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76,73) | 12.8 | 8.51, 13.76 | 0.004 |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 33.0 | 13.50 | 0.011 |
| <i>Z</i> -hymenialdisin (71) | 17.5 | 15.28 | 0.006 |
| stylissazole A (106) | 22.0 | 20.82 | 0.007 |
| Stylissazole C (117) | 5.8 | 26.00 | 0.002 |
| Molecules isolated from fraction F20 (268.8 mg) | | | |
| <i>E</i> - and <i>Z</i> -debromohymenialdisin (76,73) | 4.2 | 4.53, 6.10 | 0.001 |
| <i>Z</i> -debromohymenialdisin (73) | 1.1 | 6.25 | 0.0004 |
| <i>Z</i> -hymenialdisin (71) | 3.2 | 10.38 | 0.001 |
| manzacidin A (119) | 13.3 | 14.51 | 0.004 |
| stylissazole G (120) | 8.0 | 17.18 | 0.003 |
| stylissazole C (117) | 2.0 | 26.39 | 0.001 |

Table 6: Molecules isolated from fractions F19 and F20

Fraction F21 (326.7 mg) was divided into 2 portions f22 (220 mg) and f23 (100 mg). Fraction f22 and f33 were purified on preparative HPLC (P)* on a Sunfire C₁₈ column (scheme 15) to yield a total of 7 compounds (table 7).

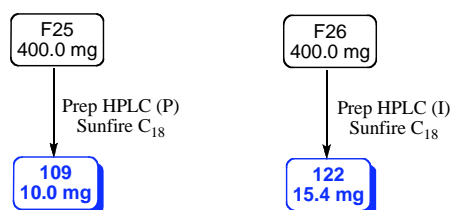


Scheme 15

| Molecule | Mass (mg) | Retention time t_R (min) | % yield |
|---|-----------|----------------------------|---------|
| Molecules isolated from fraction f22 (220.0 mg) | | | |
| Z-debromohymenialdisin (73) | 2.0 | 8.10 | 0.001 |
| stylissazole A (106) | 1.1 | 17.10 | 0.0004 |
| manzacidin A (119) | 1.4 | 25.00 | 0.0005 |
| manzacidin C (121) | 1.5 | 24.25 | 0.0005 |
| stylissazole C (117) | 2.0 | 26.39 | 0.001 |
| nagelamide P (115) | 2.0 | 33.28 | 0.001 |
| Molecules isolated from fraction f23 (100.0 mg) | | | |
| Z-hymenialdisin (71) | 6.3 | 14.78 | 0.002 |
| manzacidin A and C (119, 121) | 2.8 | 26.82 | 0.001 |
| stylissazole C (117) | 2.0 | 26.93 | 0.001 |

Table 7: Molecules isolated from fraction F21

A portion (400 mg) of fraction F25 (2.0 g) was purified on preparative HPLC (P)* on a Sunfire C₁₈ column to yield ageliferin (**109**) ($t_R = 27.40$ min, 10.0 mg, 0.003 % yield). Sceptrin (**122**) ($t_R = 19.46$ min, 15.4 mg, 0.005 % yield) was isolated after preparative HPLC (I)* (Sunfire C₁₈) purification of a portion (400 mg) of fraction F26 (2.3 g). (Scheme 16)



Scheme 16

Partie expérimentale

* - preparative reversed-phase HPLC conditions:

| HPLC (A) | HPLC (B) | HPLC (C) | HPLC (D) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV –max plot and DEDL | Detector: UV –max plot and DEDL | Detector: UV –max plot | Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 40 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>44</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 40 | 50 | 50 | 44 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 15 | 85 | 15 | 20 | 50 | 50 | 25 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>72</td> <td>28</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 30 | 72 | 28 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 44 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 85 | 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 72 | 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| HPLC (E) | HPLC (F) | HPLC (G) | HPLC (H) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV – 270 nm | Detector: UV –max plot | Detector: UV –max plot and DEDL | Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>58</td> <td>42</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 30 | 58 | 42 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 30 | 50 | 50 | 35 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 20 | 90 | 10 | 25 | 80 | 20 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 95 | 5 | 35 | 50 | 50 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 58 | 42 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 90 | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| HPLC (I) | HPLC (J) | HPLC (K) | HPLC (L) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|----|----|----|----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV – max plot | Detector: UV –max plot | Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 35 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 80 | 20 | 30 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 95 | 5 | 30 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 40 | 50 | 50 | 45 | 50 | 50 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| HPLC (M) | HPLC (N) | HPLC (O) | HPLC (P) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|--|---|----|----|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|----|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|----|----|----|----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 70 | 30 | 20 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 80 | 20 | 20 | 50 | 50 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 70 | 30 | 30 | 40 | 60 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 95 | 5 | 40 | 50 | 50 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 70 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 70 | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 40 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Partie expérimentale

| HPLC (Q) | HPLC (R) | HPLC (S) | HPLC (T) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|---|----|---|---|----|---|----|---|-----|--|------------|---|---|---|----|---|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|----|----|----|----|---|------------|---|---|---|----|----|----|----|----|
| Column: X-Bridge C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV 270 nm | Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A = 10 mM Ammonium carbonate pH 8.9 B = MeOH | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeCN with 0.1 % formic acid (v/v) | A = H ₂ O with 0.1 % TFA (v/v) B = MeOH | A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | Gradient run | Gradient run | Gradient run | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 95 | 5 | 5 | 95 | 5 | 45 | 0 | 100 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 98 | 2 | 40 | 60 | 40 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 90 | 10 | 35 | 20 | 80 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>30</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 85 | 15 | 25 | 30 | 60 |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 95 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 90 | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 20 | 80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 85 | 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 30 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| HPLC (U) | | | | | | | | | | | |
|---|------------|----|---|---|----|----|----|----|----|--|--|
| Column: Sunfire C ₁₈ 5µm, 19 x 150 mm | | | | | | | | | | | |
| Flow: 17 mL/min | | | | | | | | | | | |
| Detector: UV – 270 nm | | | | | | | | | | | |
| A = H ₂ O with 0.1 % formic acid (v/v) B = MeOH with 0.1 % formic acid (v/v) | | | | | | | | | | | |
| Gradient run | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | A | B | 0 | 80 | 20 | 25 | 60 | 40 | | |
| Time (min) | A | B | | | | | | | | | |
| 0 | 80 | 20 | | | | | | | | | |
| 25 | 60 | 40 | | | | | | | | | |

1. Cell culture and proliferation assay

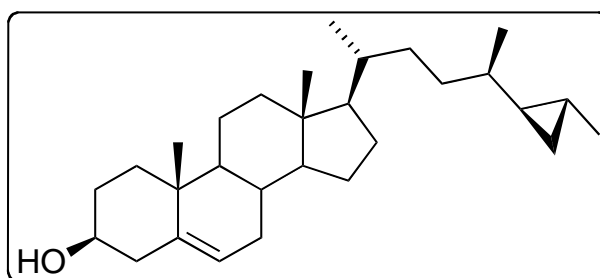
The human epidermoid carcinoma KB cell lines were grown in D-MEM medium supplemented with 10 % fetal calf serum, in the presence of penicilline, streptomycine and fungisone in 75 cm³ flask under 5 % CO₂. Celles were then collected by using tryosine, washed with 10 mL PBS, resuspended in 2 mL of trypsin and after 10 minutes the cells were recollected and centrifuged at 1000RPM. Cells were plated in 96-well tissue culture microplates at a density of 800 cells/well in 200 µL medium and treated 24 h later with compounds dissolved in DMSO. Controls received the same volume of DMSO. After 72 h exposure 40 µL MTS reagent (Promega) was added and incubated for 2 h: the absorbance was monitored at 490 nm and results expressed as the inhibition of cell proliferation calculates as the ratio [(OD490 treated/OD490 control) x 100].

Kinase assay

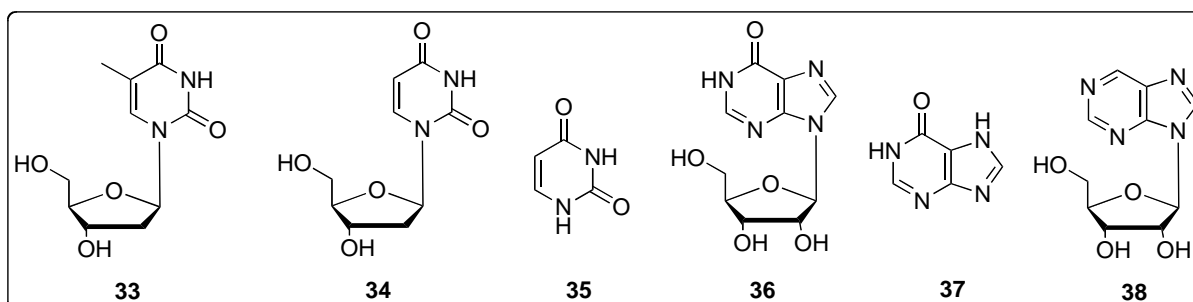
Test compounds were solubilized in DMSO to a concentration of 10 mM. This solution is diluted to 1 mM in DMSO and then to 0.1 mM in water and 3µL of this final solution is used in the test. The final volume for the reaction is 30 µL (3 µL of the compound at 10µM, 21 µL of the enzyme mixture (different kinase) and 6 µL of γ -[³³P] ATP). After 30 min. incubation at 30°C, aliquots of supernatant were spotted onto 2.5 X 3 cm pieces of Whatman P81 phosphocellulose paper and treated as described below. Kinases activites were tested at a maximum dose of 10 µM and tests were done in duplicates and triplicates for presicion. IC₅₀ curves were calculated for compounds, which presented more than 50 % inhibition activity at 10µM.

Anti bacterial assay

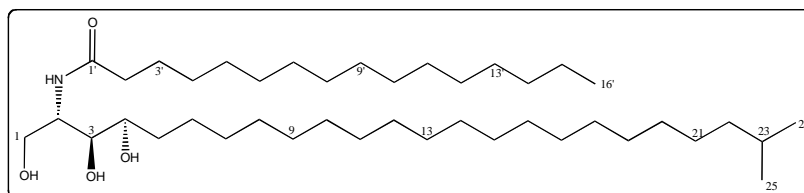
Anti bacterian tests were carried out in a 96 well plate. For the strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherischia coli* : A pre-culture of 2-3 colonies was resuspended in 10 mM of Luria Bertoni medium and incubated under agitation (200 RMP) for 2 h at 37°C. After obtaining a DO of 0.03, 100 µL of this culture solution was deposited into each well of the 96 well plate. The compounds to be tested were soublizd to a concentration of 10 µg/ 2 µL of DMSO and placed in triplicates. The plate was left to incubate under agitation (500 RPM) at 30°C for 24 h. DO was counted and the results were expressed as % inhibited at 100 µg/mL in relation to control tests.

29. Petrosterol

Compound **29** ($C_{29}H_{48}O_4$ - 412.4 g.mol^{-1}) was isolated from the marine sponge *Petrosia crassa* following the isolation method on page 130. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.^{46,53}

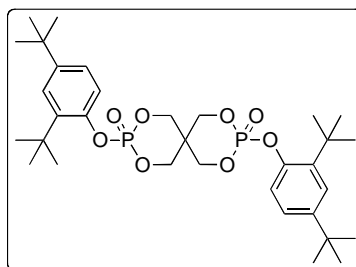
33. 2'-deoxythymidine**34. 2'-deoxyuridine****35. Uracil****36. Inosine****37. Hypoxanthine****38. Nebularine**

Compounds **33**,⁵⁴ **34**,⁵⁵ **35**, **36**, **37**⁵⁶ and **38**⁵⁸ were isolated from the marine sponge *Petrosia crassa* following the isolation method on page 131. Analytical and spectroscopic data are in agreement with literature data.

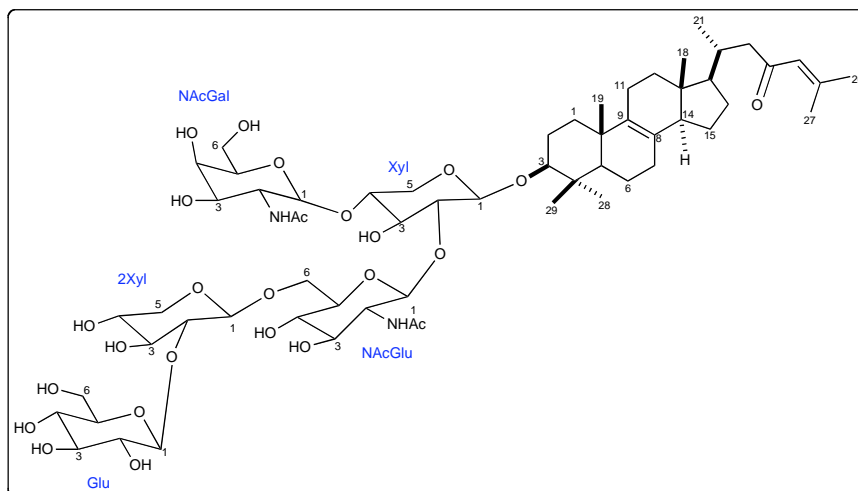
44. Antiepileptic ceramide

Compound **44** ($C_{41}H_{83}NO_4$ - 653.6 g.mol^{-1}) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsis excavans* following the isolation method on page 133. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁶⁴

45. Alkanox P24

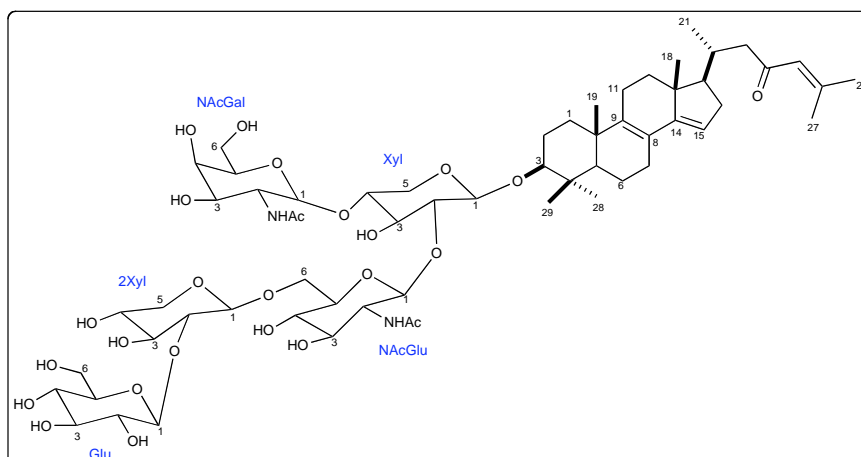


Compound **45** ($C_{33}H_{50}O_8P_2$ - $636.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsis excavans* following the isolation method on page 134. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁶⁵

46 et 47. Sarasinose B₁

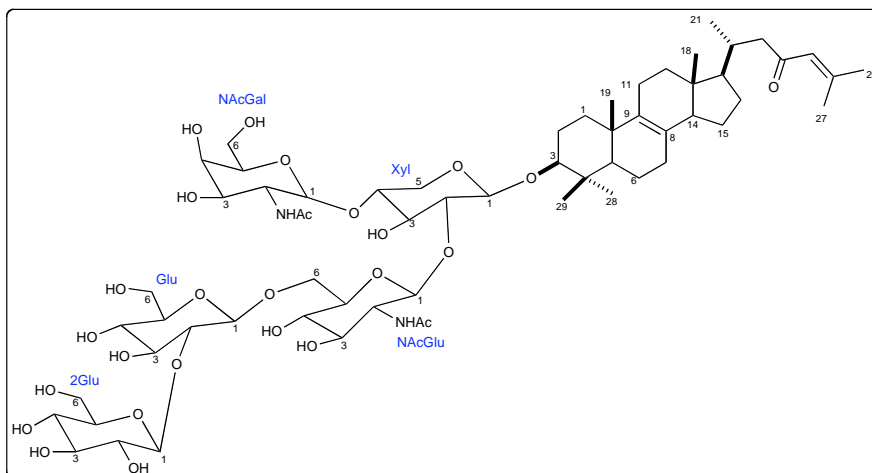
Compound **47** ($C_{61}H_{98}N_2O_{25}$ - $1258.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 134.

$[\alpha]_D^{28} -14.5^\circ$ (c 0.5, MeOH); ESI (pos.) m/z 1281.6 $[M+Na]^+$, (neg.) m/z 1257.6 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 1259.6493 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{61}H_{99}N_2O_{25}$, 1259.6490). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁶⁸

48. Sarasinose B₃

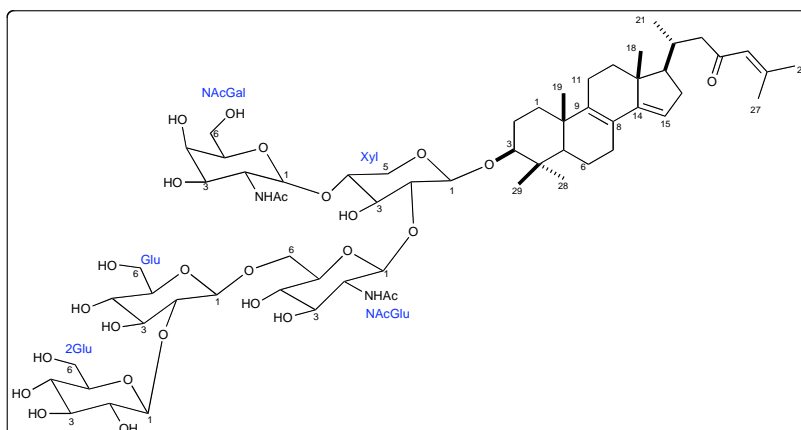
Compound **48** ($C_{61}H_{96}N_2O_{25}$ – $1256.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsys excavans* following the isolation method on page 134.

$[\alpha]_D^{28}$ -19.5° (c 0.6, MeOH); ESI (pos.) m/z 1257.6 $[M+H]^+$; HRMS-ESI (pos.) m/z 1257.6289 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{61}H_{97}N_2O_{25}$, 1257.6291). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁶⁶

49. Sarasinose A₁

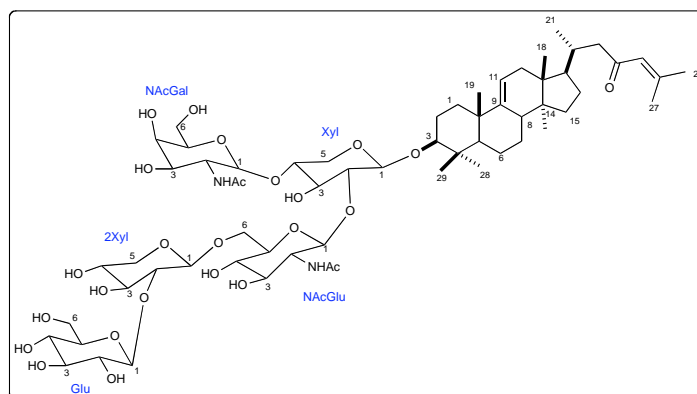
Compound **49** ($C_{62}H_{100}N_2O_{26}$ – $1288.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsys excavans* following the isolation method on page 134.

$[\alpha]_D^{28}$ -14.5° (c 0.86, MeOH); ESI (pos.) m/z : 1311.7 $[M+Na]^+$, (neg.) m/z 1287.7 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 1289.7419 ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{62}H_{101}N_2O_{26}$ 1289.7423). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.^{66,69}

50. Sarasinose A₃

Compound **50** ($C_{62}H_{98}N_2O_{26}$ – 1286.5 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Amorphinops excavans* following the isolation method on page 134.

$[\alpha]_D^{28}$ -8.5° (*c* 0.25, MeOH); ESI (pos.) *m/z* 1309.6 [M+Na]⁺, (neg.) *m/z* 1285.5 [M-H]⁻; HRMS-ESI (pos.) *m/z* 1287.4282 ([M+H]⁺, calcd. for $C_{62}H_{99}N_2O_{26}$, 1287.4276). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁶⁶

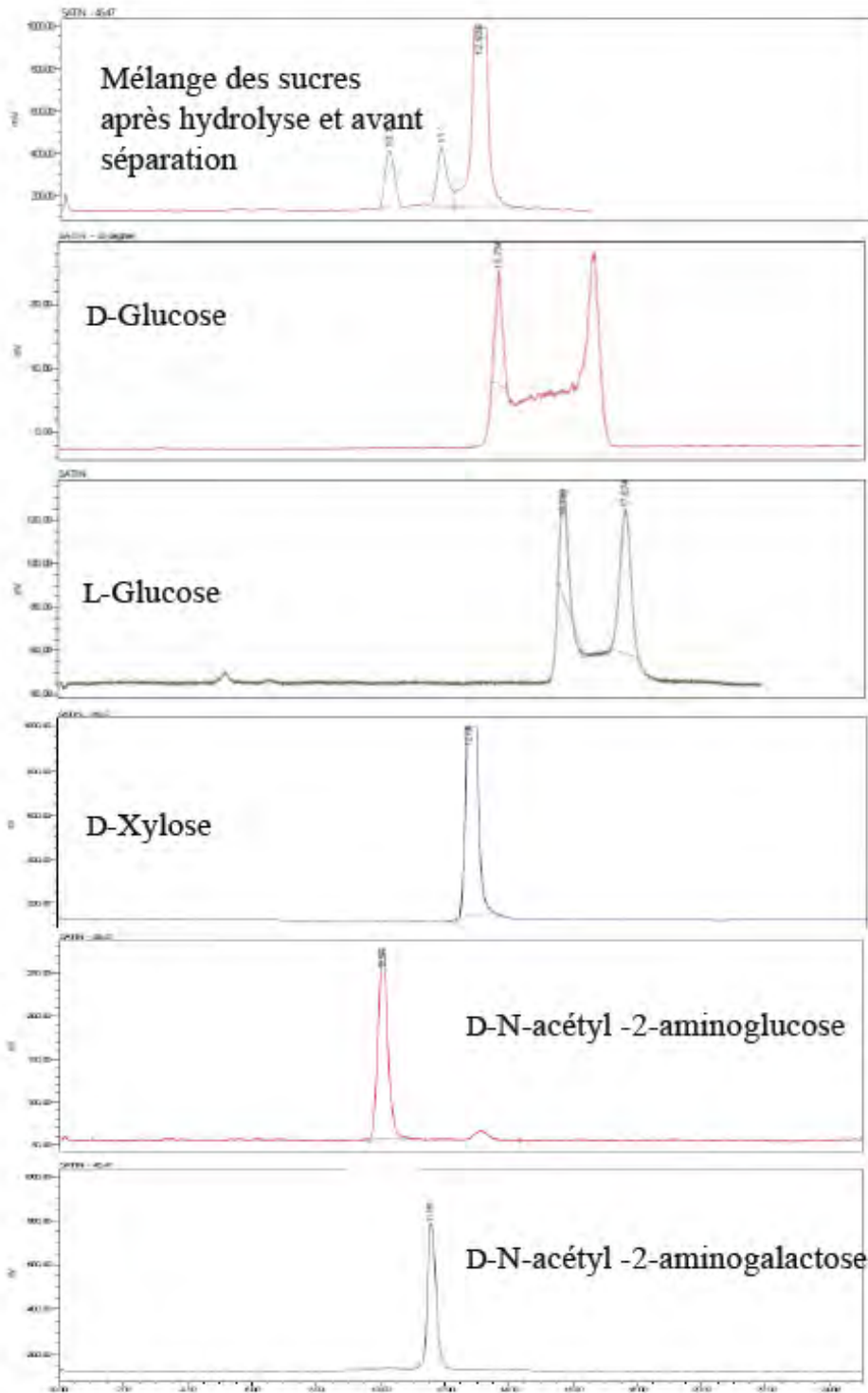
51. Sarasinose G

Compound **51** ($C_{62}H_{100}N_2O_{25}$ – 1272.7 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Amorphinops excavans* following the isolation method on page 134.

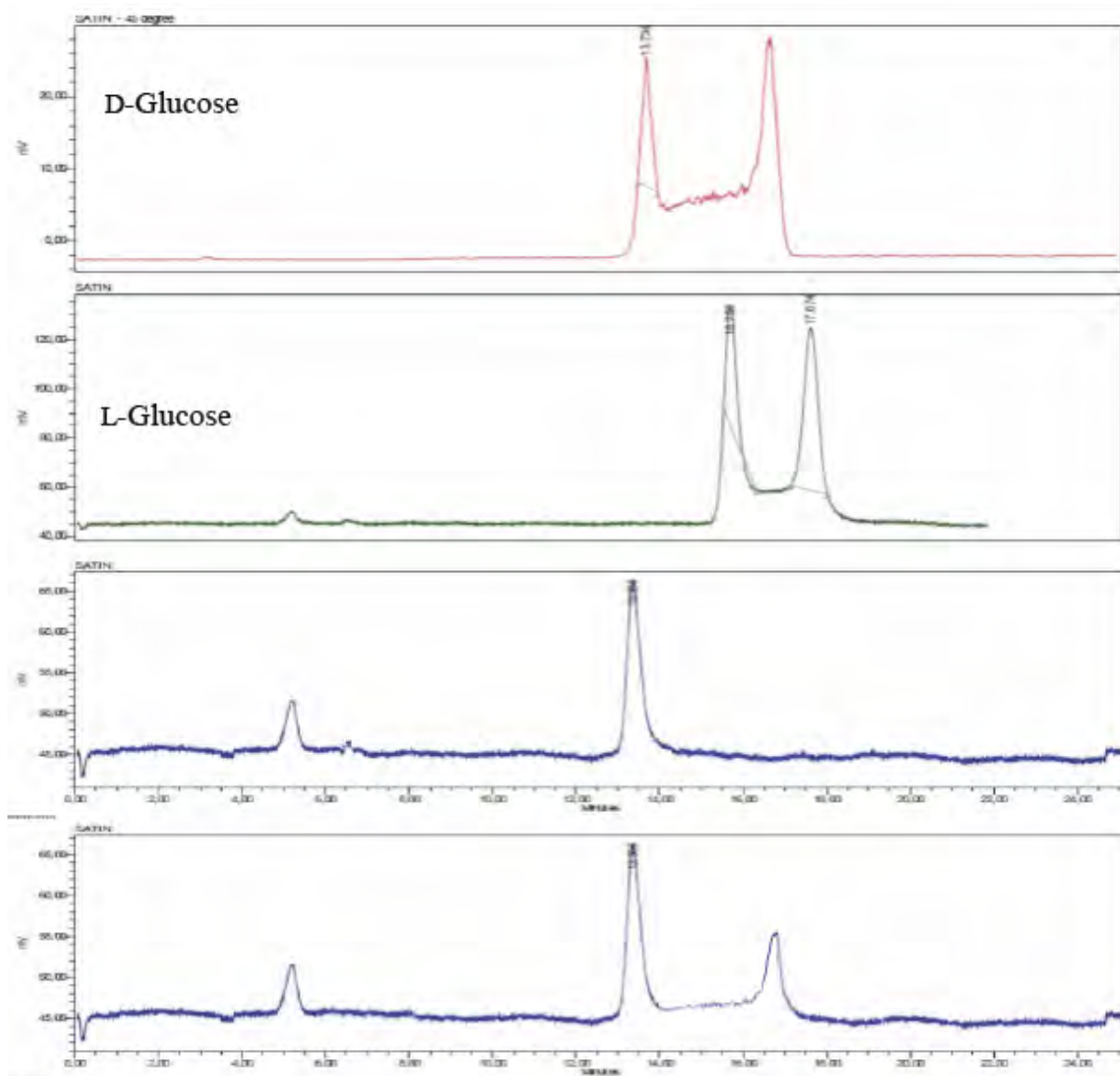
$[\alpha]_D^{28}$ -14.5° (*c* 0.75, MeOH); ESI (pos.) *m/z* 1273.6 [M+H]⁺, (neg.) *m/z* 1271.5 [M-H]⁻; HRMS-ESI (pos.) *m/z* 1273.5823, ([M+H]⁺, calcd. for $C_{62}H_{101}N_2O_{25}$, 1273.5813). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁷⁰

Acid Hydrolysis and Determination of the absolute configuration of sarasinoside B₁, B₃, A₁, A₃ and G

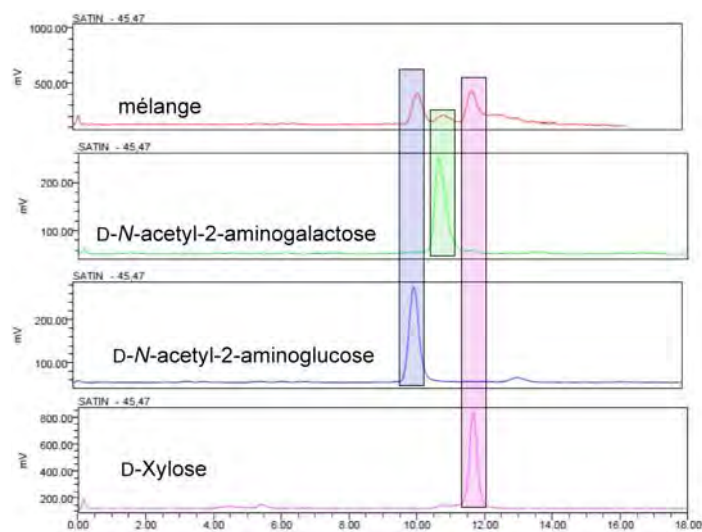
The sarasinosides (B₁ – 10mg, B₃ – 10 mg, B₄ – 10mg, A₁ – 10 mg, A₃ 10 mg and G – 5 mg) were refluxed in an aqueous solution of 2N HCl (7.5 ml) for 4.5 hours. The mixture was extracted with EtOAc (3 x 10 ml), washed with H₂O, and evaporated to dryness. The acid aqueous layer was neutralized with 0.5 M NaOH, freeze-dried and passed through LH20 to remove the salts. Preparative TLC of the mixture (20 mg) using the solvent mixture EtOAc/i-PrOH/Me₂CO/H₂O (20:10:7:6) afforded two fractions: glucose fraction and a mixture of xylose, N-acetyl-2-amino-glucopyranose and N-acetyl-2-amino-galactopyranose. Both fractions were analyzed by **chiral** HPLC (pHilic column 4.6 x 150 mm, mobile phase: A = MeCN with formic acid (0.1 % v/v), B = H₂O with formic acid (0.1 % v/v), C = ammonium acetate (100 mM, pH 4.0), isocratic run A/B/C = 85/5/10) using the corresponding authentic samples: D- and L-glucose D- and L-xylose, D-N-acetyl-2-amino-glucopyranose and D-N-acetyl-2-amino-galactopyranose. The following peaks were detected: D-glucose (retention time 27.18 min), D-xylose, (retention time 11.97 min), D-N-acetyl-2-amino-glucopyranose (retention time 10.07 min) and D-N-acetyl-2-amino-galactopyranose (retention time 10.05 min)



HPLC chromatogram of glucose fraction and standards (column: pHilic, detector: DEDL)

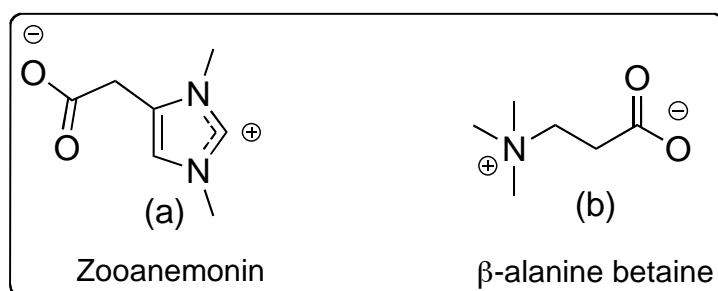


HPLC chromatogram of glucose fraction and standards (column: pHilic, detector: DEDL)



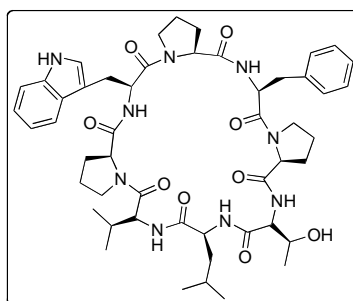
HPLC chromatogram of sugar mixtures and standards (column: pHilic, detector: DEDL)

52. Zooanemonin and β -alanine betaine



Compound **52a**⁷³ and **52b**⁷⁴ were isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 134. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

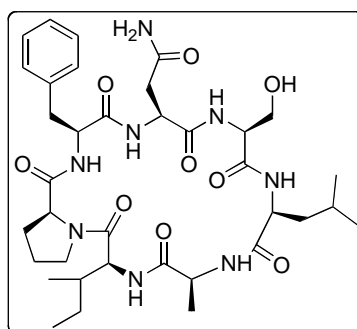
54. Axinelline B



Compound **54** (C₅₀H₆₇N₉O₉ – 937.5 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 137.

[α]_D²⁸ +58.6° (c 0.01, MeOH); ESI (pos.) m/z 938.2 [M+H]⁺, (neg.) m/z 936.4 [M-H]⁻; HRMS-ESI (pos.) m/z 937.5489, ([M+H]⁺, calcd. for C₅₀H₆₈N₉O₉, 937.5483). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁸²

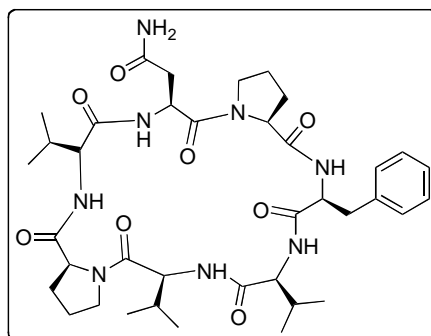
56. Stylostatine 1



Compound **56** (C₃₆H₅₄N₈O₉ – 742 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 137.

$[\alpha]_D^{28}$ -106° ($c = 0.15$, MeOH); ESI (pos.) m/z 743.5 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 741.4 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 743.5171, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{36}H_{55}N_8O_9$, 743.5167). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.^{82,96}

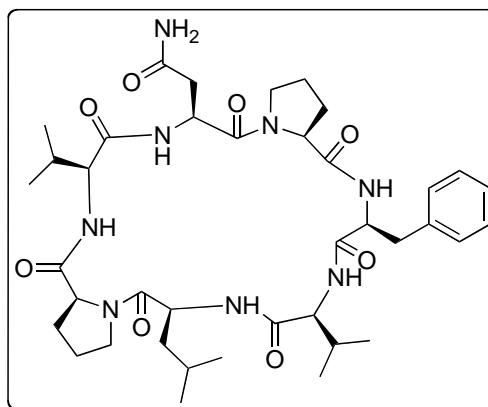
61. Axinastatin 1



Compound **61** ($C_{38}H_{56}N_8O_8$ – 752.4 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 138.

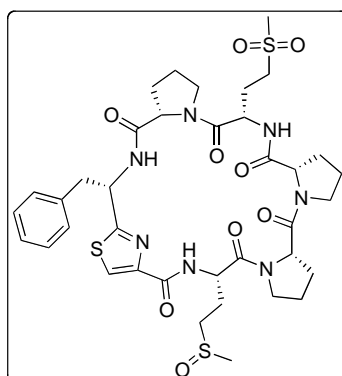
$[\alpha]_D^{28}$ -155.6° (c 0.1, MeOH); ESI (pos.) m/z 753.2 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 751.4 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 753.2370, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{38}H_{57}N_8O_8$, 753.2367). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.^{83,95}

89. Axinastatin 2



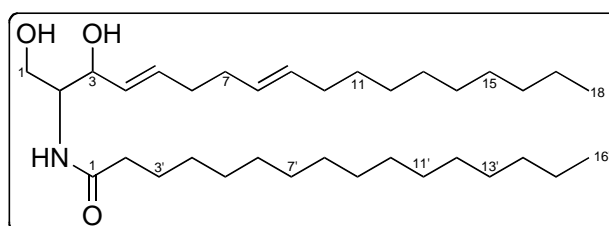
Compound **89** ($C_{39}H_{58}N_8O_8$ – 766 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsps excavans* following the isolation method on page 137.

$[\alpha]_D^{28}$ -149.6° (c 0.2, MeOH); ESI (pos.) m/z 767.5 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 765.1 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 767.5030, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{39}H_{59}N_8O_8$ 767.5023). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁹⁷

90. Sulfone derivative of Waiakeamide

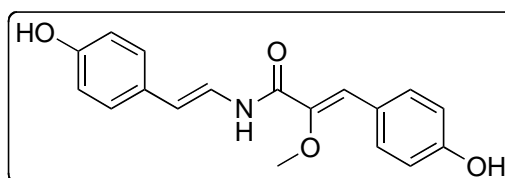
Compound **90** ($C_{39}H_{49}N_7O_9S_3$ – 831 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Amorphinopsys excavans* following the isolation method on page 137.

$[\alpha]_D^{28}$ -96.6° (c 0.2, MeOH); ESI (pos.) m/z 832.2 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 830.3 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 832.1461, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{39}H_{50}N_7O_9S_3$ 832.1456). Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁹⁸

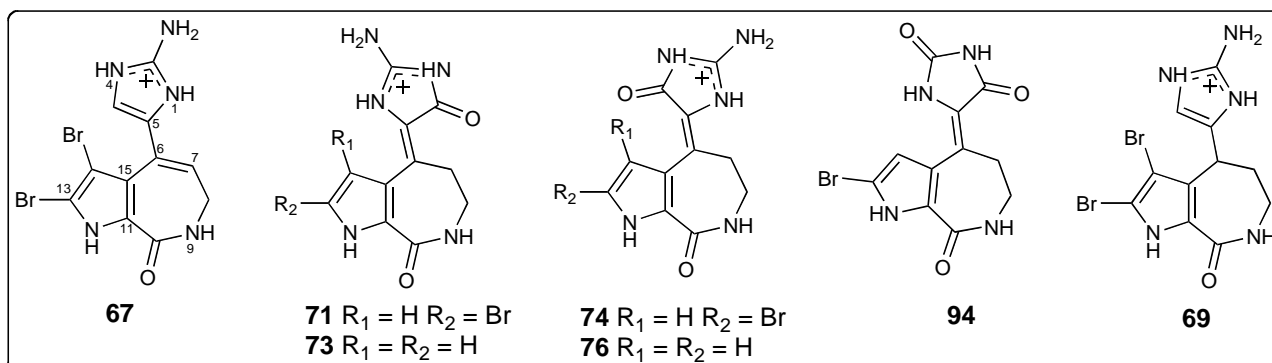
86. N-palmitoyl-octadecaspinga-4(E),8(E)-dienine

Compound **86** ($C_{34}H_{65}NO_3$ – 535.5 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 136.

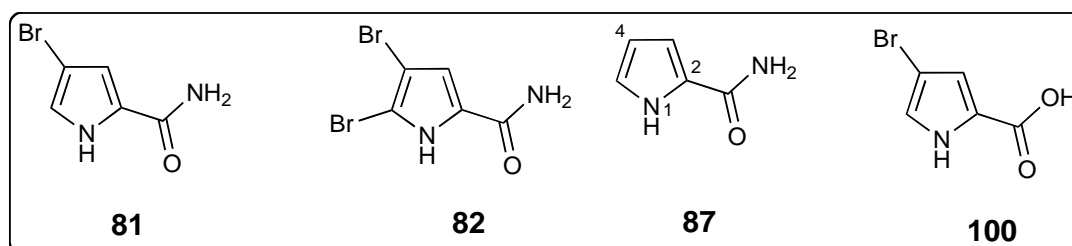
$[\alpha]_D^{28}$ -7.5° (c 0.6, MeOH); ESI (pos.) m/z 536.6 $[M+H]^+$. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.⁹³

98. Botryllamide F

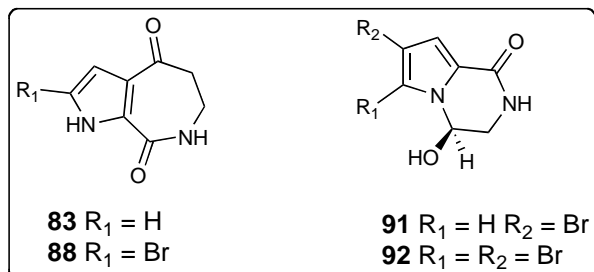
Compound **98**⁹⁴ ($C_{18}H_{17}NO_4$ – 311.1 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 138. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

67. Stevensine/odiline**69. Hymenin****71. Z-hymenialdisine****73. Z-debromohymenialdisine****74. E-hymenialdisine****76. E-debromohymenialdisine****94. Spongacidine D**

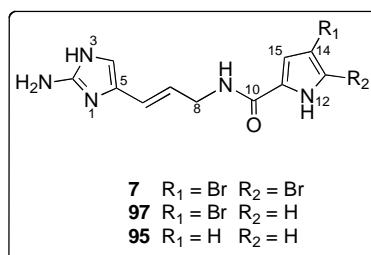
Compounds **67**,^{79,104,107} **69**,^{79,110} **71**,^{79,108} **73**,^{79,109} **74**,⁷⁹ **76**⁷⁹ and **94**,⁵⁹ ($C_{11}H_{11}N_5O_2 - 245$ g.mol⁻¹) were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 137, 139 and 104-142. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

81. 4-bromopyrrole-2-carboxamide**82. 4,5-dibromopyrrole-2-carboxamide****87. Pyrrole-2-carboxamide****100. 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid**

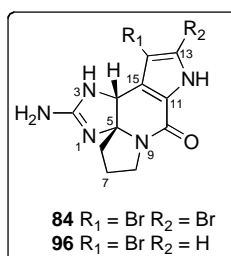
Compounds **81**,^{89,102} **82**,^{89,102} **87**⁹⁹ and **100**¹⁰¹ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 137-139. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

83. Aldisine**88. 2-bromoaldisine****91. Mukanadin C****92. Longamide**

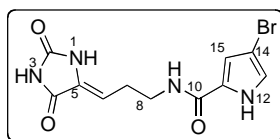
Compounds **83**,^{90,103,104} **88**,¹⁰³ **91**¹⁰⁵ and **92**¹⁰⁶ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 137. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

7. Oroidine**95. Clathrodine****97. Hymenidine**

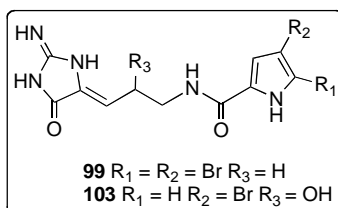
Compound **7**,^{77,101} **95**,¹¹² and **97**¹¹¹ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 138-139. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

84. Dibromoisophakellin**96. Monobromoisophakellin**

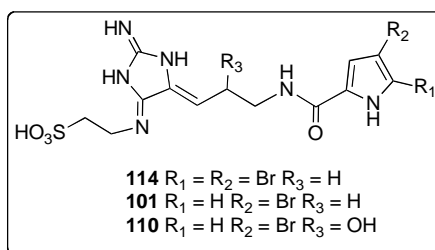
Compounds **84**⁹¹ and **96**¹²⁰ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 138 and 140. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

93. Mukanadin B

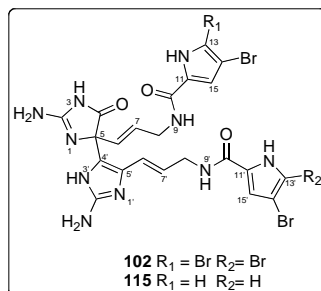
Compound **93**¹⁰⁵ was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 137. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

99. Dispacamide A**103. Dispacamide D/ Mukanadin A**

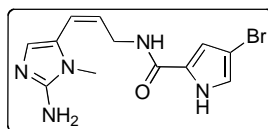
Compounds **99**¹¹⁴ and **103**^{105,115} were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 138-139. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

101. Taurodispacamide B**110. Tauroacidine B****114. Taurodispacamide A**

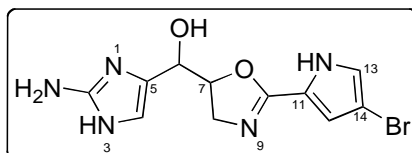
Compounds **101**,¹¹⁶ **110**,¹¹⁷ and **114**⁸⁶ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139-140. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

102. Mauritiamine**115. Nagelamide P**

Compounds **102**¹²⁴ and **115**¹²⁵ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139, 140 and 142. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

104. Keramidine

Compound **104**¹¹³ was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 139. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

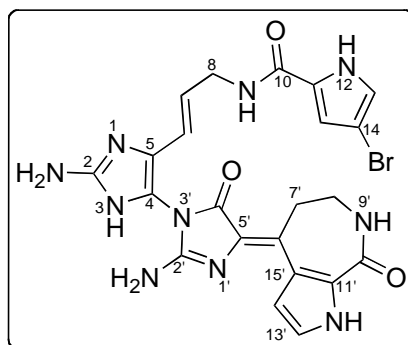
105. Stylissazole H

Compound **105** (C₁₁H₁₂BrN₅O₂ – 325/327 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139 and 140.

UV (MeOH) λ_{max} 279 nm; ESI (pos.) *m/z* 326/328 [M+H]⁺, (neg.) *m/z* 324/326 [M-H]⁻; HRMS-ESI (pos.) *m/z* 326.0213, ([M+H]⁺, calcd. for C₁₁H₁₃⁷⁹BrN₅O₂, 326.0232).

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.96 (s, 1H, H13), 6.78 (s, 1H, H15), 6.75 (s, 1H, H4), 4.95 (m, 1H, H7), 4.70 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H6), 4.04 (dd, *J* = 14.6, 9.3 Hz, 1H, H8a), 3.88 (dd, *J* = 14.6, 7.1, 1H, H8b)

¹³C NMR : no data dur to insufficient quantity of sample

106. Stylistazole A

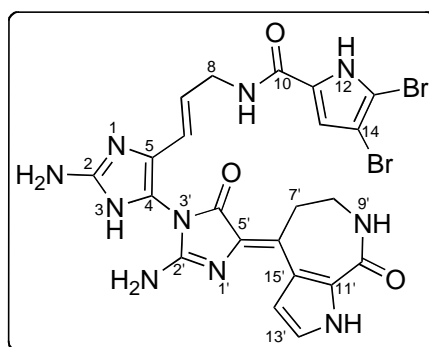
Compound **106** ($C_{22}H_{21}BrN_{10}O_3$ – 552/554 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139-142.

$[\alpha]_D^{27}$ 0.0° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} /nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 222.2 and 269.3 (28000); IR (neat): ν_{max} 1564, 1640, 2220 and 3203 cm^{-1} ; ESI (pos.) m/z 552.9/554.9 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 550.9/552.9 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 552.9060, $([M+H]^+)$, calcd. for $C_{22}H_{22}^{79}BrN_{10}O_3$, 552.9069).

1H NMR (DMF- d_7 , 600 MHz) δ 11.95 (br s, 1H, H12), 11.51 (br s, 1H, H12'), 8.40 (t, $J = 5.4$, 1H, H9), 7.85 (t, $J = 2.7$, 1H, H14'), 7.84 (t, $J = 4.7$, 1H, H9'), 7.09 (br s, 1H, H13), 7.05 (t, $J = 2.7$, 1H, H13'), 7.03 (br s, 1H, H15), 6.94 (br s, 2H, C2'NH₂), 6.22 (d, $J = 15.8$, 1H, H6), 5.87 (dt, $J = 15.8$, 6.6, 1H, H7), 5.80 (s, 2H, C2NH₂), 4.00 (dd, $J = 6.6$, 5.4, 2H, H8), 3.83 (m, 2H, H7'), 3.63 (m, 2H, H8')

^{13}C NMR (DMF- d_7 , 150.8 MHz) δ 30.2 (C7'), 40.8 (C8'), 41.4 (C8), 95.7 (C14), 111.9 (C15), 114.4 (C14'), 118.6 (C6), 119.1 (C5), 120.6 (C7), 121.1 (C13'), 121.6 (C13), 125.4 (C15'), 125.9 (C4), 126.3 (C11'), 127.9 (C11), 128.2 (C6'), 134.1 (C5'), 150.5 (C2), 155.9 (C2'), 159.8 (C10), 163.8 (C10'), 169.1 (C4')

^{15}N NMR (DMF- d_7 , 60.8 MHz) δ 50.7 (2NH₂), 66.3 (2'NH₂), 108.5 (N9), 114.0 (N9'), 135.3 (N1), 161.1 (N12), 162.8 (N12')

107. Stylissazole D

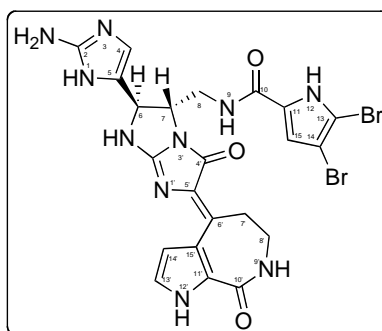
Compound **107** ($C_{22}H_{20}Br_2N_{10}O_3$ – 630/632/634 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139-140.

$[\alpha]_D^{27}$ 0.0° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} /nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 220 and 267 (29000); IR (neat): ν_{max} 1564, 1640, 2220 and 3203 cm^{-1} ; ESI (pos.) m/z 630.8/632.8/634.8 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 628.8/630.8/632.8 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 633.0144, (calcd. $[M+H]^+$, for $C_{22}H_{21}^{79}Br^{81}Br N_{10}O_3$, 633.0152).

1H NMR (DMF- d_7 , 600 MHz) δ 11.98 (br s, 1H, H12), 11.51 (br s, 1H, H12'), 8.39 (t, $J = 5.5$, 1H, H9), 7.85 (t, $J = 2.8$, 1H, H14'), 7.84 (t, $J = 4.7$, 1H, H9'), 7.10 (br s, 1H, H15), 7.05 (t, $J = 2.8$, 1H, H13'), 6.95 (br s, 2H, C2'NH₂), 6.23 (d, $J = 15.8$, 1H, H6), 5.86 (dt, $J = 15.8$, 6.7, 1H, H7), 5.80 (s, 2H, C2NH₂), 3.99 (dd, $J = 6.7, 5.5$, 2H, H8), 3.57 (m, 2H, H7'), 3.37 (m, 2H, H8')

^{13}C NMR (DMF- d_7 , 150.8 MHz) δ 30.2 (C7'), 40.8 (C8'), 41.4 (C8), 98.4 (C14), 104.7 (C13), 113.0 (C15), 114.4 (C14'), 118.7 (C6), 119.2 (C5), 120.4 (C7), 121.2 (C13'), 125.3 (C15'), 125.9 (C4), 126.2 (C11'), 128.2 (C6'), 129.3 (C11), 134.1 (C5'), 150.5 (C2), 155.8 (C2'), 159.2 (C10), 163.8 (C10'), 169.0 (C4')

^{15}N NMR (DMF- d_7 , 60.8 MHz) δ 50.8 (2NH₂), 66.2 (2'NH₂), 108.8 (N9), 114.2 (N9'), 134.7 (N1), 161.0 (N12), 162.7 (N12')

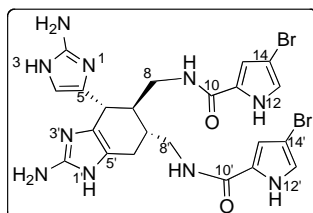
108. Stylistazole E

Compound **108** ($C_{22}H_{20}Br_2N_{10}O_3$ – 630/632/634 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 139-140.

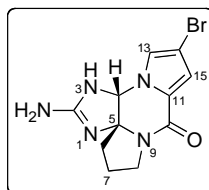
UV (MeOH) λ_{max} /nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 220 and 267 (29000); ESI (pos.) m/z 630.8/632.8/634.8 $[M+H]^+$, (neg.) 628.8/630.8/632.8 $[M-H]^-$.

1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 7.29 (s, 1H, H13'), 6.99 (t, $J = 2.7$, 1H, H14'), 6.84 (s, 1H, H15), 6.75 (s, 1H, H4), 5.08 (d, $J = 5.6$, 1H, H6), 4.34 (d, $J = 5.6$, 1H, H7), 3.90 (dt, $J = 13.4$, 4.5 Hz, 1H, H8a), 3.75 (dd, $J = 13.4$, 5.6 Hz, 1H, H8b) 3.56 (m, 2H, H8'), 3.42 (m, 2H, H7')

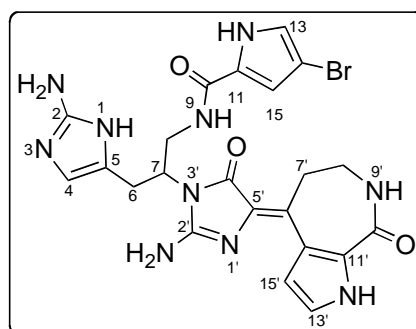
^{13}C and ^{15}N NMR: no data due to insufficient quantity of the sample.

109. Ageliferin

Compound **107**¹²³ ($C_{22}H_{24}Br_2N_{10}O_2$ – 618/620/622 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 140 and 142. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

111. Monobromophakellin

Compound **111**¹²¹ ($C_{11}H_{12}BrN_5O$ – 309/311 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 140. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

112. Stylissazole B

Compound **112** ($C_{22}H_{23}BrN_{10}O_3$ – 554/556 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 140.

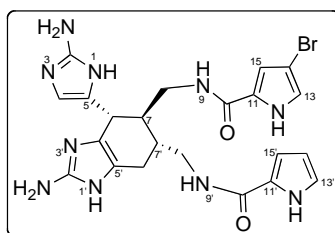
$[\alpha]_D^{27}$ 0.0° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} /nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 220 and 267 (18000); ESI (pos.) m/z 555.0/557.0 $[M+H]^+$, (neg.) 553.1/555.0 $[M-H]^-$; HRMS-ESI pos.) m/z 555.1235, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{22}H_{24}^{79}BrN_{10}O_3$, 555.1216).

1H NMR (DMF- d_7 , 600 MHz) δ 12.98 (br s, 1H, H1), 12.71 (br s, 1H, H3), 12.20 (br s, 1H, H12), 11.84 (br s, 1H, H12), 11.42 (br s, 1H, H12') 8.58 (s, 1H, H9), 8.18 (br s, 2H, C2NH₂), 8.12 (s, 1H, H9'), 7.74 (s, 1H, H14'), 7.27 (s, 2H, C2'NH₂), 7.09 (s, 1H, H13), 7.01 (s, 1H, H13'), 6.93 (s, 1H, H15), 6.73 (s, 1H, H4), 4.45 (m, 1H, H7), 3.85 (br s, 2H, H8), 3.53 (m, 1H, H7a'), 3.43 (m, 1H, H7b'), 3.37 (m, 1H, H6a), 3.33 (m, 2H, H8'), 3.16 (m, 1H, H6b)

^{13}C NMR (DMF- d_7 , 150.8 MHz) δ 25.3 (C6), 30.2 (C7'), 41.0 (C8), 40.4 (C8'), 52.4 (C7), 95.8 (C14), 110.5 (C4), 112.2 (C15), 114.3 (C14'), 121.2 (C13'), 122.0 (C13), 124.6 (C5), 126.3 (C11'), 127.6 (C11), 148.4 (C2), 160.6 (C10), 163.4 (C10')

^{13}C NMR (CD₃OD C^{12} , 150.8 MHz) δ 126.7 (C15'), 130.6 (C6'), 133.1 (C5'), 170.7 (C4')

^{15}N NMR (DMF- d_7 , 60.8 MHz): δ 56.1 (C2NH₂), 63.9 (C2'NH₂), 102.6 (N9), 113.5 (N9'), 132.7 (N3), 137.9 (N1), 160.6 (N12), 162.4 (N12')

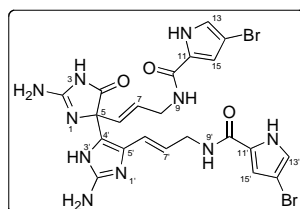
113. Stylissazole I

Compound **113** ($C_{22}H_{25}BrN_{10}O_2$ – 540/542 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 140.

UV (MeOH) λ_{max} /nm 218 and 270; ESI (pos.) m/z 541/543 $[M+H]^+$, (neg.) 539/541 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 541.1250, $([M+H]^+)$, calcd. for $C_{22}H_{26}^{79}BrN_{10}O_2$, 541.1256).

1H NMR (DMF- d_7 , 600 MHz) δ 12.08 (br s, 1H, H12), 11.70 (br s, 1H, H12'), 8.53 (m, 1H, H9'), 8.36 (m, 1H, H9), 7.22 (s, 1H, H13), 7.12 (s, 1H, H15), 7.10 (br s, 1H, H4), 7.05 (br s, 1H, H13'), 6.95 (br s, 1H, H14'), 6.17 (m, 1H, H15'), 3.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H6), 3.84 (dd, $J = 14.6, 2.9$ Hz, 1H, H8b), 3.70 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, H8b'), 3.62 (dd, $J = 14.6, 2.9$ Hz, 1H, H8a), 3.43 (dd, $J = 13.3, 4.3$ Hz, 1H, H8a'), 2.80 (m Hz, 1H, H6b'), 2.43 (dd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, 1H, H6a'), 2.23 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H7'), 2.09 (m, 1H, H7)

^{13}C NMR – no data due to insufficient quantity.

116. Stylissazole F

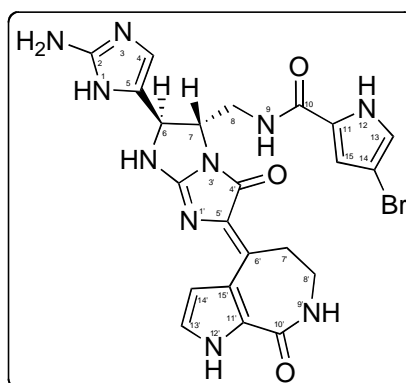
Compound **116** ($C_{22}H_{22}Br_2N_{10}O_3$ – 632/634/636 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 140.

$[\alpha]_D^{27}$ 0.0° (c 0.1, MeOH); ESI (pos.) m/z 633/635/637 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 631/633/635 $[M-H]^-$.

1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.82 (s, 2H, H15 and H15'), 6.73 (s, 1H, H13), 6.71 (s, 1H, H13'), 6.51 (d, $J = 16.2$, 1H, H6'), 6.00 (d, $J = 16.0$, 1H, H6), 5.93 (m, 2H, H7 and H7'), 3.86 (m, 4H, H8 and H8')

^{13}C and ^{15}N NMR: no data due to instability of the sample.

117. Stylissazole C



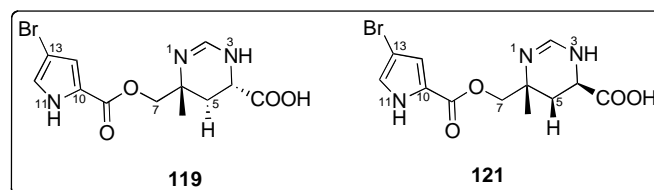
Compound **117** ($C_{22}H_{21}BrN_{10}O_3$ – 552/554 $g \cdot mol^{-1}$) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 141-142.

$[\alpha]_D^{27}$ 0.0° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} /nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 220 and 267 (19000); ESI (pos.) m/z 552.9/554.9 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 550.9/552.9 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 555.9065, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{22}H_{22}^{79}BrN_{10}O_3$, 552.9071).

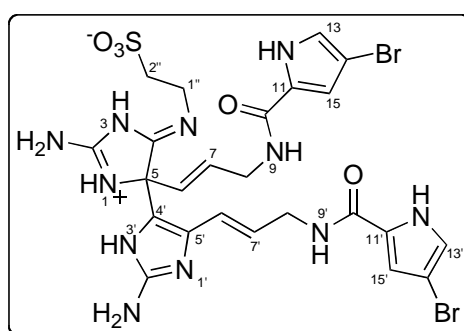
1H NMR (DMF- d_7 , 600 MHz) δ 12.10 (br s, 1H, H12), 11.57 (br s, 1H, H12'), 8.62 (s, 1H, C2'NH), 8.54 (s, 1H, H9), 7.80 (s, 1H, H9'), 7.73 (t, $J = 2.7$, 1H, H14'), 7.15 (t, $J = 2.7$, 1H, H13), 7.03 (t, $J = 2.7$, 1H, H13'), 6.97 (t, $J = 2.7$, 1H, H15), 6.68 (s, 1H, H4), 5.74 (s, 2H, C2NH₂), 5.07 (d, $J = 5.0$, 1H, H6), 4.39 (dd, $J = 5.0, 5.4$, 1H, H7), 3.86 – 3.79 (m, 2H, H8), 3.52 – 3.58 (m, 2H, H7'), 3.36 (m, 2H, H8')

^{13}C NMR (DMF- d_7 , 150.8 MHz) δ 29.4 (C7'), 40.3 (C8), 40.8 (C8'), 59.4 (C7), 60.6 (C6), 96.5 (C14), 110.0 (C4), 112.1 (C15), 112.3 (C13'), 114.3 (C14'), 122.5 (C13), 125.7 (C15'), 126.3 (C11'), 128.5 (C11), 128.5 (C6'), 134.0 (C5), 140.4 (C5'), 151.4 (C2), 160.2 (C10), 160.3 (C2'), 163.8 (C10'), 167.8 (C4')

^{15}N NMR (DMF- d_7 , 60.8 MHz) δ 49.8 (C2NH₂), 79.0 (C2'NH₂), 103.2 (N9), 114.3 (N9'), 143.6 (N3), 154.7 (N3'), 161.3 (N12), 162.9 (N12')

119. Manzacidin A**121. Manzacidin C**

Compounds **119**¹¹⁹ and **121**¹¹⁹ were isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on pages 141-142. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

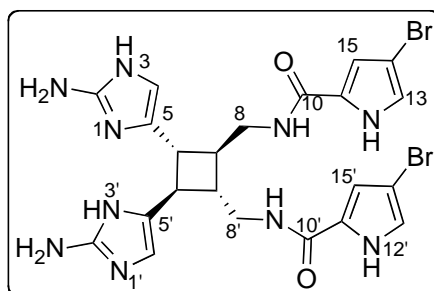
120. Stylissazole G

Compound **120** ($C_{24}H_{27}Br_2N_{11}O_5S$ – 739/741/742 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 140.

UV (MeOH) λ_{max} /nm 222 and 271; ESI (pos.) m/z 740/742/744 $[M+H]^+$, (neg.) m/z 738/740/742 $[M-H]^-$; HRMS-ESI (pos.) m/z 742.0024, ($[M+H]^+$, calcd. for $C_{24}H_{28}^{79}Br^{81}BrN_{11}O_5S$ 742.0029).

¹H NMR (DMF-*d*₇, 600 MHz) δ 6.95 (s, 2H, H15 and H15'), 6.90 (s, 1H, H13), 6.89 (s, 1H, H13'), 6.43 (t, J = 15.2 Hz, 1H, H10), 6.06 (t, J = 15.7 Hz, 1H, H10'), 5.93-5.99 (m, 1H, H7'), 5.83-5.90 (m, 1H, H7), 4.10-4.20 (m, 2H, H8a and H8a'), 3.91-3.98 (m, 2H, H8b and H8b'), 3.77-3.86 (m, 2H, H2''), 3.04-3.15 (m, 2H, H1'')

¹³C NMR (CD₃OD, 150.8 MHz) δ 39.4 (C2''), 39.5 (C8'), 40.4 (C8), 48.4 (C3''), 70.2 (C5'), 96.1-96.2 (C14 and C14'), 112.3-112.4 (C13 and C13'), 117.4 (C6), 121.6-121.7 (C15 and C15'), 123.1 (C4'), 124.0 (C5), 124.1 (C7), 125.9 (C6'), 126.2-126.4 (C11 and C11'), 129.2 (C7'), 150.2 (C2'), 161.0-161.2 (C10 and C10'), 168.3 (C2), 180.7 (C4)

122. Sceptrin

Compound **122**¹²² (C₂₂H₂₄Br₂N₁₀O₂ – 618/620/622 g.mol⁻¹) was isolated from the marine sponge *Stylissa carteri* following the isolation method on page 142. Analytical and spectroscopic data are in agreement with the literature data.

Bibliographie

Bibliographie.

1. *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*

Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.

2. *Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?*

Newman, D. J. *J. Med. Chem.* . **2008**, *51*, 2589-2599.

3. *Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival?*

Von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* . **2006**, *45*, 5072-5129.

4. *Natural products in drug discovery*

Harvey, A. L. *Drug Discov. Today.* **2008**, *13*, 894-901.

5. *The value of natural products to future pharmaceutical discovery*

Baker, D. D.; Chu, M.; Oza, U.; Rajgarhia, V. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1225-1244.

6. *Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection*

Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* . **2006**, *71*, 8329-8351.

7. *Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites*

Sunazuka, T.; Hirose, T.; Omura, S. *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41*, 302-314.

8. *The isolation of a new thymine pentoside from sponges*

Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* . **1950**, *72*, 2809-2810.

9. *Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges*

Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* . **1951**, *16*, 981-987.

10. *Marine natural products*

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

11. Substances naturelles d'origine Marine (en 2 volumes)

Kornprobst, J.-M., Editions TEC & DOC ed.; Paris, **2005**; 1-1830.

12. *The chemistry of some sponges and their symbionts*

Faulkner, D. J.; Unson, M. D.; Bewley, C. A. *Pure Appl. Chem.* . **1994**, *66*, 1983-1990.

13. *L'éponge...une république cellulaire*

Manuel, M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J. *Pour la Science*. **2003**, *310*, 68-75.

14. Quintin, C. Les éponges. http://pagesperso-orange.fr/christophe.quintin/Liste_Doc.html
(2009-05-03).

15. *Ecology of toxicity in marine sponges*

Green, G. *Mar. Biol.* . **1977**, *40*, 207-215.

16. *Marine natural products*

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* . **2005**, *22*, 15-61.

17. *Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds*

Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. *Eur. J. Cancer*. **2004**, *40*, 2676-2704.

18. *Isolation of a new toxin from the sponge Latrunculia magnifica in the Gulf of Aquaba (Red Sea)*

Nèeman, I.; Fishelson, L.; Kashman, Y. *Mar. Biol.* . **1975**, *30*, 293-296.

19. *Chemical defenses of the Caribbean sponges Agelas wiedenmayeri and Agelas conifera*

Assmann, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* . **2000**, *207*, 255-262.

20. *Wound activation of protoxins in marine sponge Aplysina aerophoba*

Ebel, R.; Brenzinger, M.; Kunze, A.; Gross, H. J.; Proksch, P. *J. Chem. Ecol.* . **1997**, *23*, 1451-1462.

21. *Antifouling activity of brominated cyclopeptides from the marine sponge Geodia barretti*

Sjögren, M.; Göransson, U.; Johnson, A.-L.; Dahlstrom, M.; Andersson, R.; Bergman, J.; Jonsson, P. R.; Bohlin, L. *J. Nat. Prod.* . **2004**, *67*, 368-372.

22. *Novel marine-derived anti-cancer agents*

Adrian, T. E. *Curr. Pharm. Design.* . **2007**, *13*, 3417-3426.

23. *Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources*

Singh, R.; Sharma, M.; Joshi, P.; Rawat, D. S. *Anti-Cancer Agent. Me.* . **2008**, *8*, 603-617.

24. *Natural marine anti-inflammatory products*

Abad, M. J.; Bedoya, L. M.; Bermejo, P. *Mini-Rev. Med. Chem.* . **2008**, *8*, 740-754.

25. *Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*

Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Hamann, M. T. *Biochim. Biophys. Acta.* . **2009**, *1790*, 283-308.

26. *Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata*

Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* . **1990**, *55*, 4512-4515.

27. *Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail Conus magus*

Mcintosh, M.; Cruz, L. J.; Hunkapiller, M. W.; Gray, W. R.; Olivera, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.* . **1982**, *218*, 329-334.

28. *A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products*

Sashidhara, K. V.; White, K. N.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* . **2009**, 72, 588-603.

29. *Drug development from marine natural products*

Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, 8, 69-85.

30. *Structure-activity relationship and conformational analysis of monoglycosylceramides on the syngeneic mixed leukocyte reaction*

Iijima, H.; Kimura, K.; Sakai, T.; Uchimura, A.; Shimizu, T.; Ueno, H.; Natori, T.; Koezuka, Y. *Bioorgan. Med. Chem.* . **1998**, 6, 1905-1910.

31. *Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebrosides from the marine sponge *Agelas mauritianus**

Natori, T.; Morita, M.; Akimoto, K.; Koezuka, Y. *Tetrahedron.* **1994**, 50, 2771-2784.

32. *Targeting prostate cancer with HTI-286, a synthetic analog of the marine sponge product hemiasterlin.*

Hadaschik, B. A.; Ettinger, S.; Zoubeidi, A.; Roberge, M.; Gleave, M. E. *Int. J. Cancer.* **2008**, 122, 2368-2376.

33. *Cytotoxic peptides from the marine sponge *Cymbastela* sp*

Coleman, J. E.; Dilip De Silva, E.; Kong, F.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. *Tetrahedron.* **1995**, 51, 10653-10662.

34. *Hemiasterlin and geodiamolide TA; two new cytotoxic peptides from the marine sponge *Hemiasterella minor* (Kirkpatrick)*

Talpir, R.; Benayahu, Y.; Kashman, Y.; Pannell, L.; Schleyer, M. *Tetrahedron Lett.* . **1994**, 35, 4453-4456.

35. *Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the unnatural 14.beta. configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* Thiele, 1899*

Burgoyne, D. L.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 525-528.

36. *Efficient Synthesis of IPL576,092: A Novel Anti-Asthma Agent*

Shen, Y.; Burgoyne, D. L. *J. Org. Chem.* . **2002**, *67*, 3908-3910.

37. *Halichondrins-antitumor polyether ùacrolides from a marine sponge*

Hirata, Y.; Uemura, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.

38. *Towards commercial production of sponge medicines*

Koopmans, M.; Martens, D.; Wijffels, R. H. *Mar. Drugs.* **2009**, *7*, 787-802.

39. Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.;

Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.;

Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *Petrosia (Petrosia) crassa* (Carter, 1876).

<http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=166828> (2009-09-03)

40. *High molecular weight polyacetylenes from the nudibranch *Peltodoris actromaculata* and the sponge *Petrosia ficiformis**

Castiello, D.; Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 5047-5050.

41. *Petrocortynes and petrosiacetylenes, novel polyacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia**

Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Sim, C. J. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 447-462.

42. *Cytotoxic Polyacetylenic Alcohols from the Marine Sponge *Petrosia* Species*

Lim, Y. J.; Lee, C.-O.; Hong, J.; Kim, D.-K.; Im, K. S.; Jung, J. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1565-1567.

43. *Five New Polyacetylenes from a Sponge of the Genus *Petrosia**

Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K. W. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1268-1273.

44. *Antifungal brominated C18 acetylenic acids from the marine sponge, *Petrosia volcano* Hoshino*

Fusetani, N.; Li, H.-Y.; Tamura, K.; Matsunaga, S. *Tetrahedron.* **1993**, *49*, 1203-1210.

45. *Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge Petrosia Sp*
Carballeira, N. M.; Shalabi, F. *J. Nat. Prod.s.* **1993**, *56*, 739-746.
46. *Petrosterol, the major sterol with a cyclopropane side chain in the sponge*
Sica, D.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 837-838.
47. *X-ray crystal structure determination of petrosterol p-bromobenzoate. A revision*
Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Sica, D.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3953-3954.
48. *Effects of IZP-94005 (contignasterol) on antigen-induced bronchial responsiveness in ovalbumin-sensitized guinea-pigs*
Bramley, A. M.; Langlands, J. M.; Jones, A. K.; Burgoyne, D. L.; Li, Y.; Andersen, R. J.; Salari, H. *Brit. J. Pharmacol.* **1995**, *115*, 1433-1438.
49. *Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources*
Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1693-1713.
50. *Biosynthetic studies of marine lipids. 6. Evidence for an unprecedented biomethylation pathway in the biosynthesis of the cyclopropyl-containing marine sterol, petrosterol*
Proudfoot, J. R.; Catalan, C. A. N.; Djerassi, C.; Sica, D.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 423-426.
51. *A novel type of bis-quinolizidine alkaloid from the sponge : Petrosia seriata*
Braekman, J. C.; Daloz, D.; De Abreu, P. M.; Piccinni-Leopardi, C.; Germain, G.; Van Meerssche, M. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4277-4280.
52. *Petosamine, a novel pigment from the marine sponge Petrosia sp*
Molinski, T. F.; Fahy, E.; Faulkner, D. J.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1340-1341.

53. *Cyclopropane-containing sterols in the marine sponge Petrosia spheroida*

Gauvin, A.; Smadja, J.; Aknin, M.; Gaydou, E. M. *Comp. Biochem. Phys. B.* **1998**, *121*, 451-456.

54. *Stereoselective Synthesis of Anomers of 5-Substituted 2'-Deoxyuridines*

Aoyama, H. *B. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2073-2077.

55. *Photocycloaddition of deoxyuridines to 2,3-Dimethyl-2-butene*

Haga, N.; Ishikawa, I.; Takayanagi, H.; Ogura, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* . **1994**, *67*, 728-737.

56. *Carbon-13 magnetic resonance. XXVI. Quantitative determination of the tautomeric populations of certain purines*

Chenon, M.-T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* . **2002**, *97*, 4636-4642.

57. *Nebularine from a novel Microbispora sp*

Cooper, R.; Horan, A. C.; Gunnarsson, I.; Patel, M.; Truumees, I. *J. Ind. Microbiol. Biot.* . **1986**, *1*, 275-276.

58. *A new sterol sulfate, Sch 572423, from a marine sponge, Topsentia sp*

Yang, S.-W.; Buivich, A.; Chan, T.-M.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E.; Mierzwa, R.; Patel, M.; Gullo, V.; Chu, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1791-1794.

59. *Spongiacidins A-D, new bromopyrrole alkaloids from Hymeniacidon sponge*

Inaba, K.; Sato, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* . **1998**, *61*, 693-695.

60. *Pseudoaxinellin, a cyclic heptapeptide isolated from the papua new guinea sponge pseudoaxinella massa*

Kong, F.; Burgoyne, D. L.; Andersen, R. J.; Allen, M. T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3269-3272.

61. *Diterpenoid isocyanides from the marine sponge hymeniacidon amphilecta*
Wratten, S. J.; Faulkner, D. J.; Hirotsu, K.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* . **1978**, *19*, 4345-4348.
62. Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.; Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *Amorphinopsis excavans* Carter, 1887.
<http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=178562> (2010-01-11),
63. *Stereochemical challenges in characterizing nitrogenous spiro-axane sesquiterpenes from the Indo-Pacific sponges Amorphinopsis and Axinyssa*
Wegerski, C. J.; Sonnenschein, R. N.; Cabriales, F.; Valeriote, F. A.; Matainaho, T.; Crews, P. *Tetrahedron*. **2006**, *62*, 10393-10399.
64. *Antiepileptic ceramides from the red sea sponge Negombata corticata*
Ahmed, S. A.; Khalifa, S. I.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 513-515.
65. *The hydrolysis mechanism of bis(2,4-di-tert-butyl)pentaerythritol diphosphite (Alkanox P24): An atmospheric pressure photoionisation mass spectrometric study*
Papanastasiou, M.; McMahon, A. W.; Allen, N. S.; Doyle, A. M.; Johnson, B. J.; Keck-Antoine, K. *Polym. Degrad. Stabil.* . **2006**, *91*, 2675-2682.
66. *Marine natural products. XXVIII. the structures of sarasinoides A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 and C3, nine new norlanostane-triterpenoidal oligoglycosides from the palauan marine sponge asteropus sarainosum*
Kobayashi, M.; Okamoto, Y.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* . **1991**, *39*, 2867 - 2877.
67. *Triterpenoid Saponins from the Fruits of Caryocar villosum*
Alabdul Magid, A.; Voutquenne, L.; Harakat, D.; Pouny, I.; Caron, C.; Moretti, C.; Lavaud, C. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 919-926.

68. *Structures of sarasinosides A1, B1, and C1; New norlanostane-triterpenoid oligoglycosides from the Palauan marine sponge Asteropus sarasinusum.*

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

69. *Sarasinoside A1: a saponin containing amino sugars isolated from a sponge*

Francis, J. S.; Ksebati, M. B.; Gunasekera, S. P.; Agarwal, S. *J. Org. Chem.* . **1988**, 53, 5941-5947.

70. *Sarasinosides D-G: four new triterpenoid saponins from the sponge asteropus sarasinusum*

Espada, A.; Jimenez, C.; Rodriguez, J.; Crews, P.; Riguera, R. *Tetrahedron.* **1992**, 48, 8685-8696.

71. *Marine Natural Products. VIII. Bioactive Triterpene-Oligoglycosides from the Sea Cucumber Holothuria leucospilota BRANDT (2). Structure of Holethurin A*

Kitagawa, I.; Nishino, T.; Kobayashi, M.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* . **1981**, 29, 1951-1956.

72. *Saponin and Sapogenol. XXVI. Steroidal Saponins from the Starfish Acanthaster planci L. (Crown of Thorns). (2). Structure of the Major Saponin Thornasteroside A*

Kitagawa, I.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 1864-1873.

73. *Novel Betaines from the Marine Sponge Agelas dispar*

Francesco, C.; Ernesto, F.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1171-1173.

74. *beta-Alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, S-adenosyl-L-methionine-dependent N-methyltransferase from Limonium latifolium leaves*

Rathinasabapathi, B.; Fouad, W. M.; Sigua, C. A. *Plant Physiol.* **2001**, 126, 1241-9.

75. *natural product antifoulants*

Raveendran, T. V.; Mol, V. P. L. *Curr. Sci. India*. **2009**, 97, 508-520.

76. *New Triterpenoid Saponins from the Sponge Melophlus isis*

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

77. *Terpene Isocyanides, Isocyanates, and Isothiocyanates from the Okinawan Marine Sponge Stylissa sp*

Mitome, H.; Shirato, N.; Miyaoka, H.; Yamada, Y.; Van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 833-837.

78. *New polyhydroxylated sterols stylisterols A-C and a novel 5,19-cyclosterol hatomasterol from the Okinawan marine sponge Stylissa sp*

Mitome, H.; Shirato, N.; Hoshino, A.; Miyaoka, H.; Yamada, Y.; Van Soest, R. W. M. *Steroids*. **2005**, 70, 63-70.

79. *New Alkaloids from the Indopacific Sponge Stylissa carteri*

Eder, C.; Proksch, P.; Wray, V.; Steube, K.; Bringmann, G.; Van Soest, R. W. M.; Sudarsono; Ferdinandus, E.; Pattisina, L. A.; Wiryowidagdo, S.; Moka, W. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 184-187.

80. Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; K, R.; De Voogd, N. J.; Alvares, B.; Haju, E.; Pisera, A. B.; Vacelet, K. R.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K. R.; Klautau, M. *Stylissa carteri* (Dendy, 1889).

<http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=165705> (2009-11-06)

81. Hooper, J. N. A., 'Sponguide'. Guide to sponge collection and identification. Version August 2000. In 2000; p 129.

82. *Axinellins A and B: New Proline-Containing Antiproliferative Cyclopeptides from the Vanuatu Sponge Axinella carteri.*

Antonio, R.; Piaz, F. D.; Orrù, S.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Pucci, P.; Gomez-Paloma, L. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1998, 2659-2665.

83. *Isolation and structure of axinastatin 5 from a republic of comoros marine sponge*
Pettit, G. R.; Gao, F.; Schmidt, J. M.; Chapuis, J.-C.; Cerny, R. L. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2935-2940.
84. *Cyclonellin, a New Cyclic Octapeptide from the Marine Sponge Axinella carteri*
Milanowski, D. J.; Rashid, M. A.; Gustafson, K. R.; O'keefe, B. R.; Nawrocki, J. P.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 441-444.
85. *Hanishenols A-B, novel linear or methyl-branched glycerol enol ethers of the axinellid sponge Acanthella carteri (= Acanthella aurantiaca) from the Hanish Islands, southern Red Sea*
Mancini, I.; Guella, G.; Pietra, F.; Amade, P. *Tetrahedron.* **1997**, *53*, 2625-2628.
86. *Two novel pyrrole-imidazole alkaloids from the Mediterranean sponge Agelas oroides*
Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917-9922.
87. *Latonduines A and B, New Alkaloids Isolated from the Marine Sponge Styliassa carteri: Structure Elucidation, Synthesis, and Biogenetic Implications*
Linington, R. G.; Williams, D. E.; Tahir, A.; Van Soest, R.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2735-2738.
88. *Carteramine A, an inhibitor of neutrophil chemotaxis, from the marine sponge Styliassa carteri*
Kobayashi, H.; Kitamura, K.; Nagai, K.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; Van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2127-2129.
89. *Hanishin, a Semiracemic, Bioactive C9 Alkaloid of the Axinellid Sponge Acanthella carteri from the Hanish Islands. A Shunt Metabolite?*
Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271-6274.

90. *Nitrogen-containing metabolites of the marine sponge Acanthella carteri*
Utkina, N.; Fedoreev, S.; Maksimov, O. *Chem. Nat. Compd.* **1984**, *20*, 511-512.
91. *The structure of dibromoisophakellin from the marine sponge Acanthella carteri*
Fedoreyev, S. A.; Utkina, N. K.; Ilyin, S. G.; Reshetnyak, M. V.; Maximov, O. B.
Tetrahedron Lett. **1986**, *27*, 3177-3180.
92. *Ugibohlin: A new dibromo-seco-isophakellin from Axinella carteri*
Goetz, G. H.; Harrigan, G. G.; Likos, J. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1581-1582.
93. *Isolation of new ceramides from the gorgonian Acabaria undulata*
Shin, J.; Seo, Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, *58*, 948-953.
94. *Botryllamides E & H, four new tyrosine derivatives from the ascidian Botrylloides tyreum*
Rao, M. R.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1064-1066.
95. *Antineoplastic agents. 219. Isolation and structure of the cell growth inhibitory constituents from the western Pacific marine sponge Axinella sp*
Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Leet, J. E.; Dufresne, C.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Cerny, R. L.; Hooper, J. N. A.; Rutzler, K. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3339-3340.
96. *Antineoplastic agents. 251. Isolation and structure of stylostatin 1 from the Papua New Guinea marine sponge Stylotella aurantium*
Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Herald, D. L.; Erickson, K. L.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Bakus, G. J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7217-7220.
97. *Antineoplastic agents. 278. Isolation and structure of axinastatins 2 and 3 from a Western Caroline Island marine sponge*
Pettit, G. R.; Gao, F.; Cerny, R. L.; Doubek, D. L.; Tackett, L. P.; Schmidt, J. M.; Chapuis, J.-C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1165-1168.
98. *A New Antifouling Hexapeptide from a Palauan Sponge, Haliclona sp*
Sera, Y.; Adachi, K.; Fujii, K.; Shizuri, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 719-721.

99. *Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of Annona muricata*
Wèlè, A.; Zhang, Y.; Caux, C.; Brouard, J.-P.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *Comptes Rendus Chimie*. 7, 981-988.
100. *Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units*
Venkatachalam, C. M. *Biopolymers*. **1968**, 6, 1425-1436.
101. *Two new naturally occurring pyrrole derivatives from the tropical marine sponge Agelas oroides*
König, G. M.; Wright, A. D. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, 5, 141-146.
102. *New Bromo-pyrrole Derivatives from the sponge Agelas oroides*
Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1129-1130.
103. *Marine Natural Products: Pyrrololactams from Several Sponges*
Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. V. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48, 47-53.
104. *Invertébrés marins du lagon neo-caledonien-V: Isolement et identification des métabolites d'une nouvelle espèce de spongiaire, pseudaxinyssa cantharella*
De Nanteuil, G.; Ahond, A.; Guilhem, J.; Poupat, C.; Dau, E. T. H.; Potier, P.; Puset, M.; Puset, J.; Laboute, P. *Tetrahedron*. **1985**, 41, 6019-6033.
105. *Mukanadins A & C, new bromopyrrole alkaloids from marine sponge Agelas nakamurai*
Uemoto, H.; Tsuda, M.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1581-1583.
106. *Longamide and 3,7-dimethylisoguanine, two novel alkaloids from the marine sponge Agelas longissima*
Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Taglialatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7893-7896.
107. *Stevensine, a novel alkaloid of an unidentified marine sponge*
Albizati, K. F.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 4163-4164.

108. *Isolation and X-ray crystal structure of a novel bromo-compound from two marine sponges*

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

109. *Characterisation of a yellow compound isolated from the marine sponge phakellia flabellata*

M., S. G.; Buyer, J. S.; Pomerantz, M. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 435-436.

110. *Hymenin, a novel α -adrenoceptor blocking agent from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp*

Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y.; Wakamatsu, K.; Miyazawa, T. *CMLS-Cell Mol. Life S.* **1986**, 42, 1064-1065.

111. *A novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp*

Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. *CMLS-Cell Mol. Life S.* **1986**, 42, 1176-1177.

112. *The Structure of Clathrodin, a Novel Alkaloid Isolated from the Caribbean Sea Sponge Agelas clathrodes*

Morales, J.; Rodriguez, A. L. D. *J. Nat. Prod.* **2004**, 54, 629-631.

113. *Keramadine, a novel antagonist of serotonergic receptors isolated from the okinawan sea sponge sp*

Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2475-2478.

114. *Dispacamides, anti-histamine alkaloids from Caribbean Agelas sponges*

Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Taglialatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3587-3590.

115. *Anti-histaminic activity of bromopyrrole alkaloids isolated from Caribbean Agelas sponges*

Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Vallefucio, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283-2288.

116. *Novel bioactive bromopyrrole alkaloids from the Mediterranean sponge Axinella verrucosa*

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

117. *Tauroacidins A and B, new bromopyrrole alkaloids possessing a taurine residue from Hymeniacidon sponge*

Kobayashi, J.; Inaba, K.; Tsuda, M. *Tetrahedron.* **1997**, *53*, 16679-16682.

118. *Decomposition of oroidin in DMSO/TFA*

Lindel, T.; Breckle, G.; Hochgürtel, M.; Volk, C.; Grube, A.; Köck, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8149-8152.

119. *Manzacidins A-C, novel tetrahydropyrimidine alkaloids from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp*

Kobayashi, J.; Kanda, F.; Ishibashi, M.; Shigemori, H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4574-4576.

120. *Monobromoisophakellin, a new bromopyrrole alkaloid from the carinean sponge Agelas sp*

Assmann, M.; Köck, M. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57*, 153-156.

121. *Natural products of marine sponges. 7. The constitution of weakly basic guanidine compounds, dibromophakellin and monobromophakellin*

Sharma, G.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4118-4124.

122. *Sceptrin, an antimicrobial agent from the sponge Agelas sceptrum*

Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772-6773.

123. *Ageliferins, potent actomyosin ATPase activators from the Okinawan marine sponge sp*
Kobayashi, J. I.; Tsuda, M.; Murayama, T.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Ishibashi, M.;
Iwamura, M.; Ohta, T.; Nozoe, S. *Tetrahedron*. **1990**, *46*, 5579-5586.
124. *Mauritiamine, a New Antifouling Oroidin Dimer from the Marine Sponge Agelas mauritiana*
Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-503.
125. *Bromopyrrole alkaloids from marine sponges of the genus Agelas*
Yasuda, T.; Araki, A.; Kubota, T.; Ito, J.; Mikami, Y.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 488-491.
126. *Nagelamides A-H, new dimeric bromopyrrole alkaloids from marine sponge Agelas species*
Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsuhashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.;
Fromont, J.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1262-1267.
127. *A Distinctive Structural Twist in the Aminoimidazole Alkaloids from a Calcareous Marine Sponge: Isolation and Characterization of Leucosolenamines A and B*
Ralifo, P.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2006**, *70*, 33-38.
128. *Predicting NMR Spectra by Computational Methods: Structure Revision of Hexacyclinol*
Rychnovsky, S. D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2895-2898.
129. *Verpacamides A-D, a Sequence of C11N5 Diketopiperazines Relating Cyclo(Pro-Pro) to Cyclo(Pro-Arg), from the Marine Sponge Axinella vaceleti: Possible Biogenetic Precursors of Pyrrole-2-aminoimidazole Alkaloids*
Vergne, C.; Boury-Esnault, N.; Perez, T.; Martin, M.-T.; Adeline, M.-T.; Tran Huu Dau, E.;
Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2421-2424.
130. *Sponge's Molecular Diversity Through the Ambivalent Reactivity of 2-Aminoimidazole: A Universal Chemical Pathway to the Oroidin-Based Pyrrole-Imidazole Alkaloids and Their Palau'amine Congeners*
Ali Al, M.; Pierre, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 237-243.

131. *Biogenetically Inspired Synthesis of Marine C6N4 2-Aminoimidazole Alkaloids: Ab Initio Calculations, Tautomerism, and Reactivity*

Abou-Jneid, R.; Ghouami, S.; Martin, M.-T.; Dau, E. T. H.; Travert, N.; Al-Mourabit, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3933-3936.

132. *Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models.*

Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martínez De Lagrán, M.; Martí, E.; Avila, J.; Dierssen, M. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 395-400.

133. *The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications*

Hämmerle, B.; Elizalde, C.; Galceran, J.; Becker, W.; Tejedor, F. J. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2003**, *67*, 129-137.

134. *Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent*

Meijer, L.; Thunnissen, A. M.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Kim, S. H.; Pettit, G. R. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.

135. *Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors*

Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Richardson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics.* **2004**, *1697*, 181-196.

136. *Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer Xenograft model*

Slaton, J. W.; Unger, G. M.; Sloper, D. T.; Davis, A. T.; Ahmed, K. *Mol. Cancer. Res.* **2004**, *12*, 712-721.

137. *Anticancer alkaloids lamellarins inhibit protein kinases*

Baunbæk, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, P.; Rucirawat, S.; Ishibashi, F.; Iwao, M.; Meijer, L. *Mar. Drugs*. **2008**, *6*, 514-527.

138. *Potent inhibition of checkpoint kinase activity by a hymenialdisine-derived indoloazepine*

Sharma, V.; Tepe, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4319-4321.

139. *Synthesis and Target Identification of Hymenialdisine Analogs*

Wan, Y.; Hur, W.; Cho, C. Y.; Liu, Y.; Adrian, F. J.; Lozach, O.; Bach, S.; Mayer, T.; Fabbro, D.; Meijer, L.; Gray, N. S. *Chemistry & Biology*. **2004**, *11*, 247-259.

140. *Synthesis and CHK1 inhibitory potency of Hymenialdisine analogues*

Parmentier, J.-G.; Portevin, B.; Golsteyn, R. M.; Pierrè, A.; Hickman, J.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* . **2009**, *19*, 841-844.

141. *Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR proptein phosphorylation*

Bullock, A. N.; Das, S.; Debreczeni, J. È.; Rellos, P.; Fedoreev, O.; Niesen, F. H.; Guo, K.; Papagrigoriou, E.; Amos, A. L.; Cho, S.; Turk, B. E.; Ghosh, G.; Knapp, S. *Structure*. **2009**, *17*, 352-362.

Annexes

Annexe 1 : ACD déplacement chimiques $\delta_{C(cal.)}$ et leur comparaison a nos valeurs $\delta_{C(obs.)}$

Stylissazole A

| | C4 | C2' | C4' |
|--------------------|-------|-------|-------|
| $\delta_{C(obs.)}$ | 125,9 | 155,9 | 169,1 |
| $\delta_{C(cal.)}$ | | | |
| Structure I | 127,9 | 153,1 | 168,3 |
| Structure II | 131,6 | 160,1 | 162,8 |
| Structure III | 134,4 | 152,6 | 170,9 |

Stylissazole B

| | C7 | C4' |
|--------------------|------|-------|
| $\delta_{C(obs.)}$ | 52,4 | 170,7 |
| $\delta_{C(cal.)}$ | | |
| Structure I | 51,7 | 168,2 |
| Structure II | 57,3 | 178,8 |
| Structure III | 58,9 | 172,6 |

Stylissazole C

| | C6 | C7 | C2' | C4' |
|--------------------|------|------|-------|-------|
| $\delta_{C(obs.)}$ | 60,6 | 59,4 | 160,3 | 167,8 |
| $\delta_{C(cal.)}$ | | | | |
| Structure I | 59,9 | 55,1 | 160,6 | 171,6 |
| Structure II | 57,6 | 49,4 | 162,7 | 165,5 |
| Structure III | 59,3 | 51,8 | 164,9 | 165,2 |
| Structure IV | 60,2 | 52,3 | 160,6 | 172,2 |

Stylissazole D

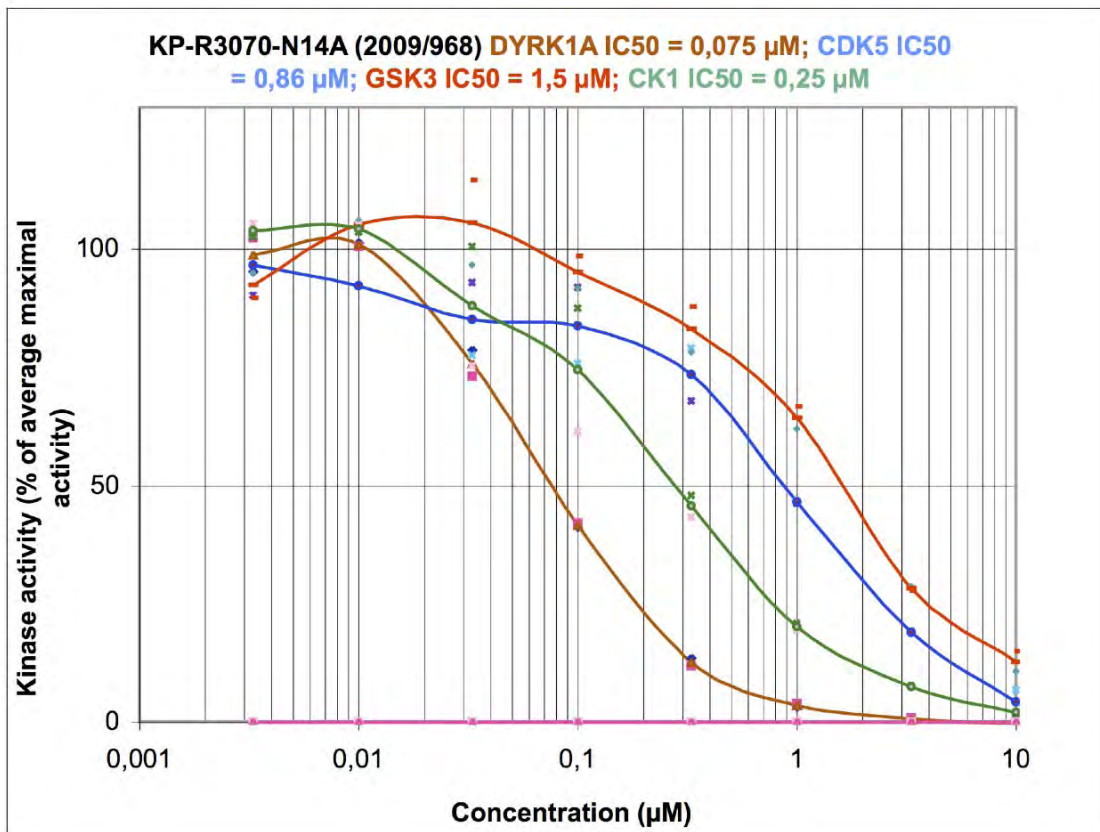
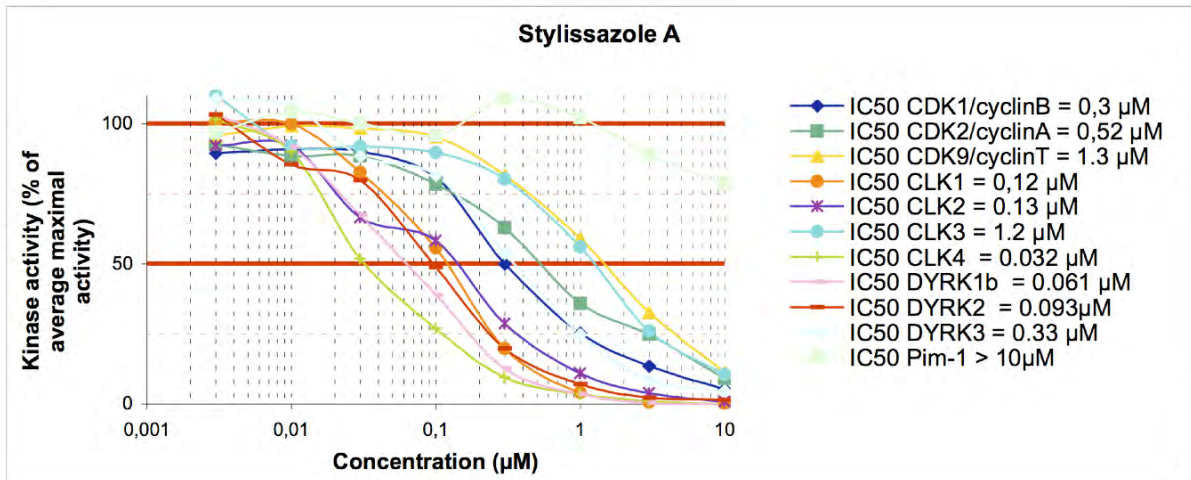
| | C4 | C2' | C4' |
|--------------------|-------|-------|-------|
| $\delta_{C(obs.)}$ | 125,9 | 155,8 | 169,0 |
| $\delta_{C(cal.)}$ | | | |
| Structure I | 126,3 | 156,2 | 168,6 |
| Structure II | 132,0 | 159,5 | 161,9 |
| Structure III | 132,8 | 151,4 | 171,0 |

Annexe 2 : Résultats des tests d'inhibition des kinases

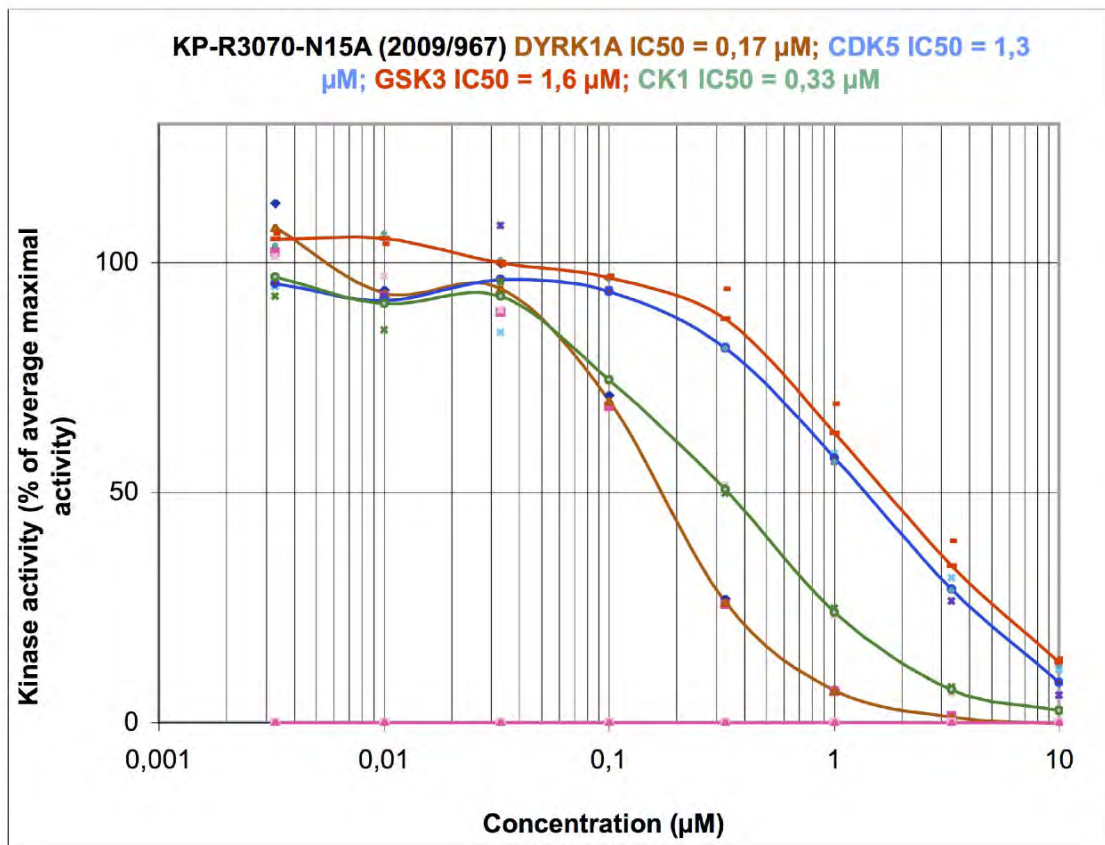
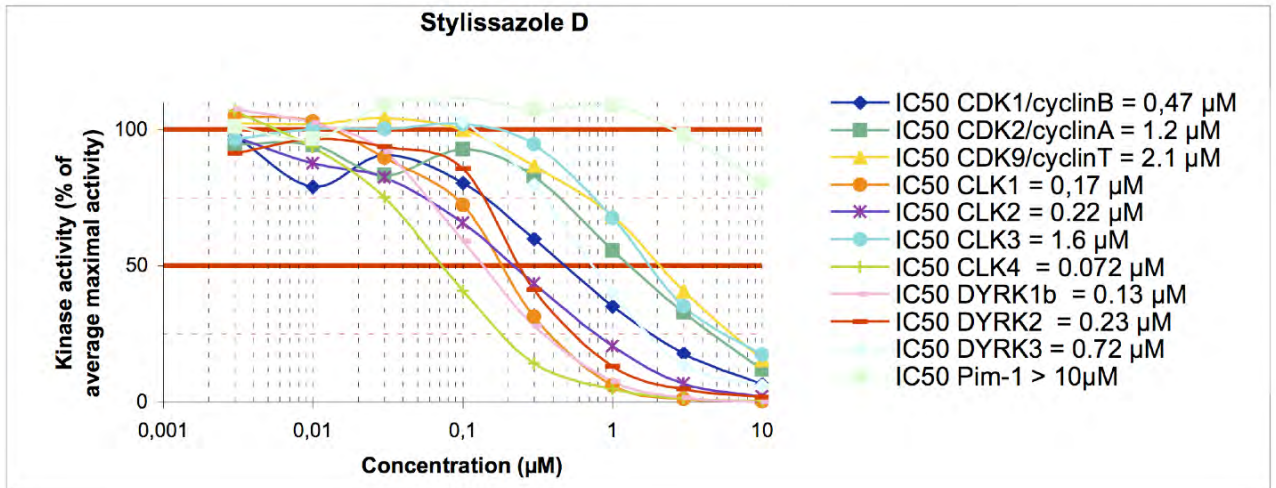
| Molécules | IC ₅₀ (μM) | | | | | |
|---|-----------------------|-------|------|------|------|--------|
| | DYRK1A | CK1 | CDK5 | GSK3 | CLK1 | PfGSK3 |
| Oroïdine (7) | 2,2 | 3,2 | ≥10 | 3,2 | 1,7 | 9 |
| Axinelline B (54) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Stylostatine 1 (56) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Axinastatin 1 (61) | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| Stevensine ou odiline (67) | ≥ 10 | > 10 | > 10 | 5 | nt | nt |
| Hymenine (69) | 4,2 | > 10 | 5,4 | 2,1 | nt | nt |
| Z-hyménialdisine (71) | 0,041 | 0,062 | 0,12 | 0,11 | nt | nt |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 0,014 | 0,087 | 0,15 | 0,17 | nt | nt |
| Pyrrole-2-carboxamide mono bromé (81) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Pyrrole-2-carboxamide dibromé (82) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Dibromoisophakelline (84) | 2,4 | 4,3 | 2,1 | 6,1 | 1,4 | 6,5 |
| Pyrrole-2-carboxamide (87) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Axinastatine 2 (89) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Dérivé sulfone de waiakeamide (90) | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| Mukanadine C (91) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Longamaide (92) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Mukanadine B (93) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Spongacidine D (94) | 7,1 | 1,2 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Clathrodine (95) | 0,77 | 3 | 5 | 7 | nt | nt |
| Monobromoisophakelline (96) | 1,5 | 2,2 | 3,8 | 2,8 | 1,4 | 2,2 |
| Hyménidine (97) | 0,5 | 1,3 | 0,6 | 0,26 | nt | nt |
| L'acide 4-bromopyrrole-2-carboxylique (100) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Taurodispacamide B (101) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Mauritiamine (102) | 8 | > 10 | > 10 | ≥ 10 | nt | nt |
| Keramadine (104) | 2,2 | 4 | > 10 | 9 | nt | nt |
| Dispacamide D ou Mukanadine A (103) | 0,22 | 1 | 1,7 | 1,5 | nt | nt |
| Stylissazole A (106) | 0,075 | 0,25 | 0,86 | 1,5 | nt | nt |
| Stylissazole D (107) | 0,17 | 0,33 | 1,3 | 1,6 | nt | nt |
| Stylissazole E (108) | 1,2 | 2,1 | 4 | 3,3 | 0,95 | 3 |
| Ageliférine (109) | 7,5 | 0,8 | > 10 | ≥ 10 | nt | nt |
| Tauroacidine B (110) | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Monobromophakelline (111) | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| Stylissazole B (112) | 1,3 | 4 | 6 | ≥10 | 1,1 | 7,3 |
| Nagelamide P(115) | 2,5 | 0,44 | ≥ 10 | 9 | nt | nt |
| Taurodispacamide A (114) | 7,4 | 8,2 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Stylissazole F (116) | 4,8 | 0,25 | > 10 | 1,4 | nt | nt |
| Stylissazole C (117) | 3 | 5 | >10 | ≥10 | 3 | >10 |
| Stylissazole G (120) | 2,2 | 0,72 | > 10 | ≥ 10 | nt | nt |
| Manzacidine C (121) | 4,2 | > 10 | > 10 | > 10 | nt | nt |
| Sceptrine (122) | 0,92 | 0,7 | 6 | 2,1 | nt | nt |

Annexe 3 : Les courbes des IC₅₀

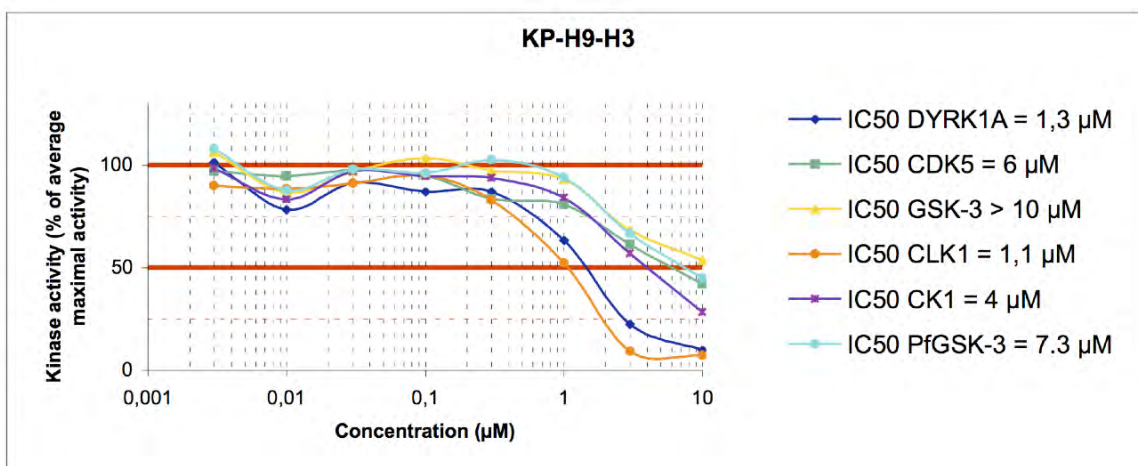
Stylissazole A



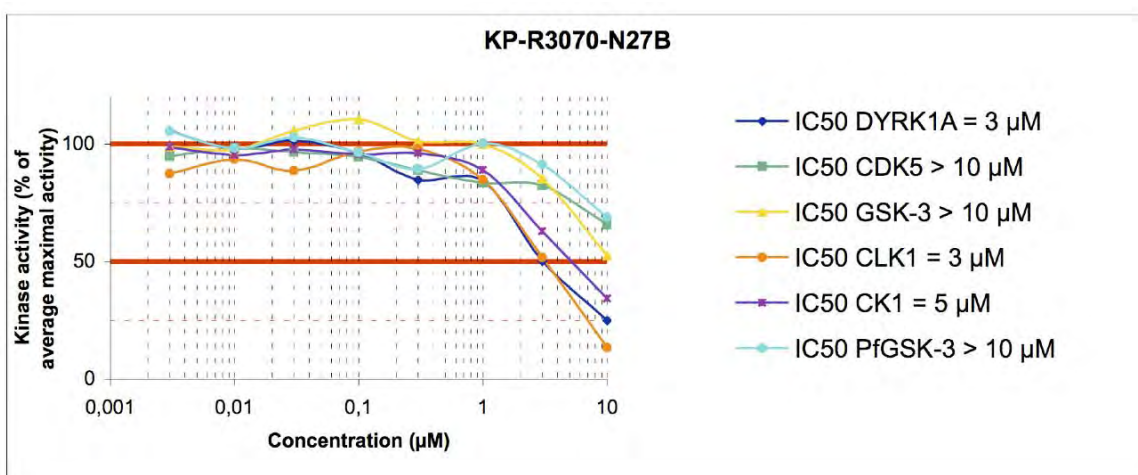
Styllissazole D



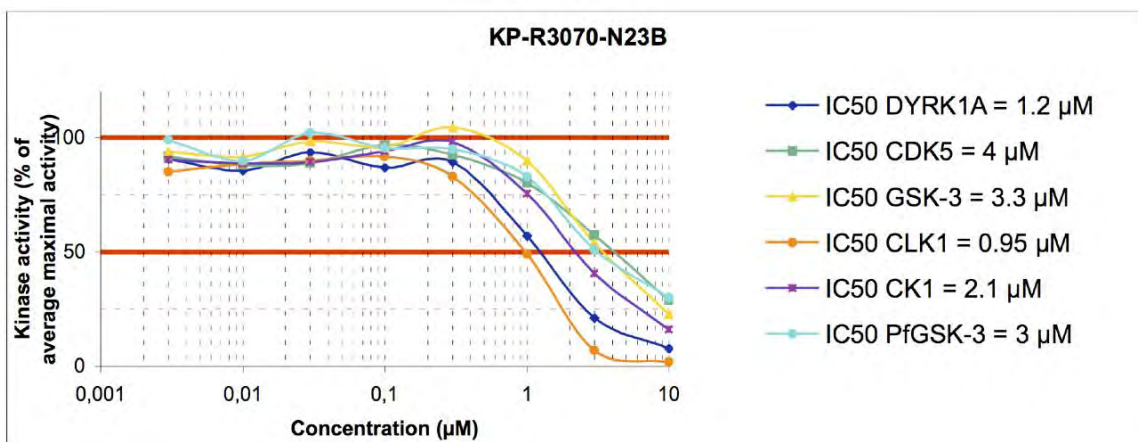
Styllisazole B



Styllisazole C



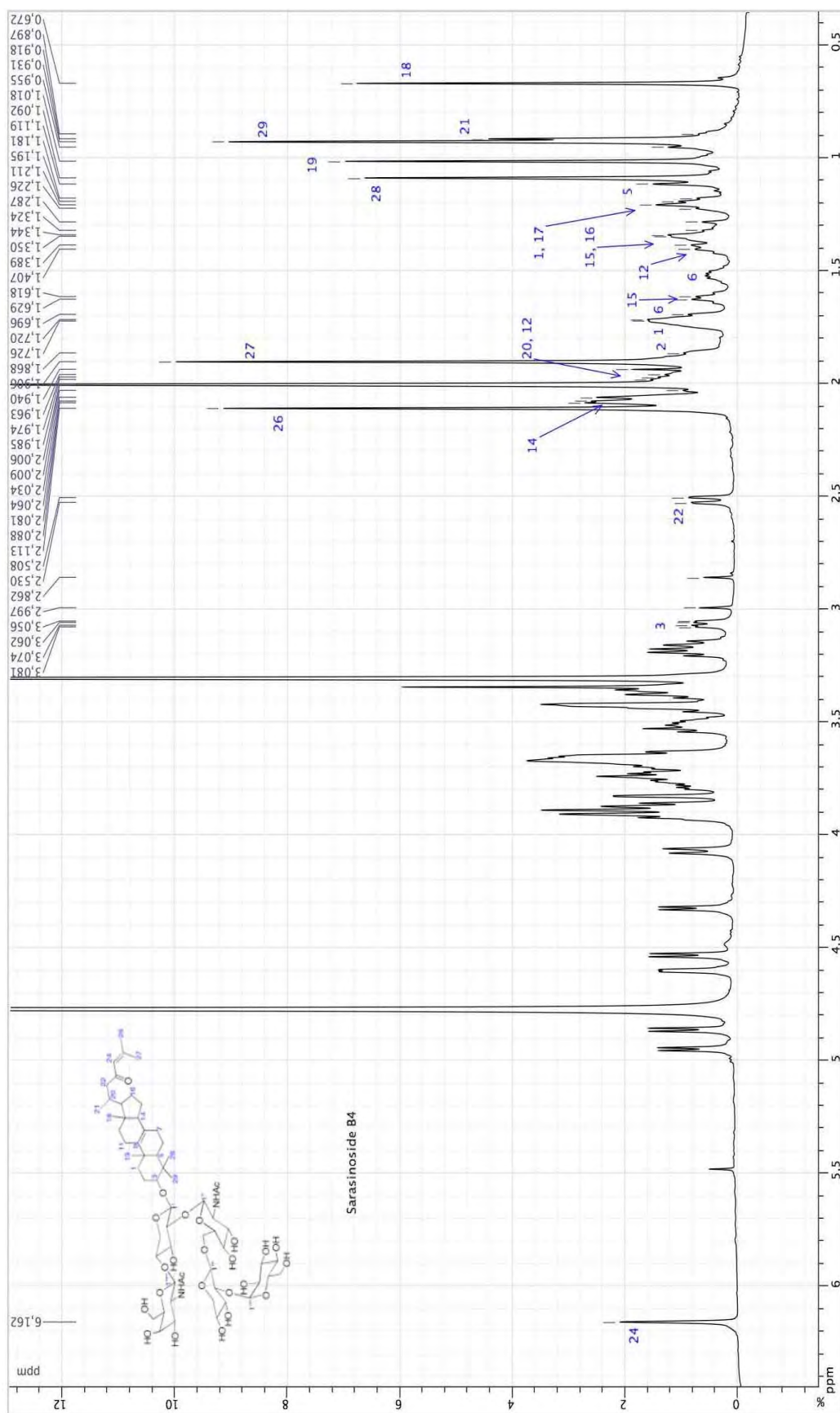
Styllisazole E

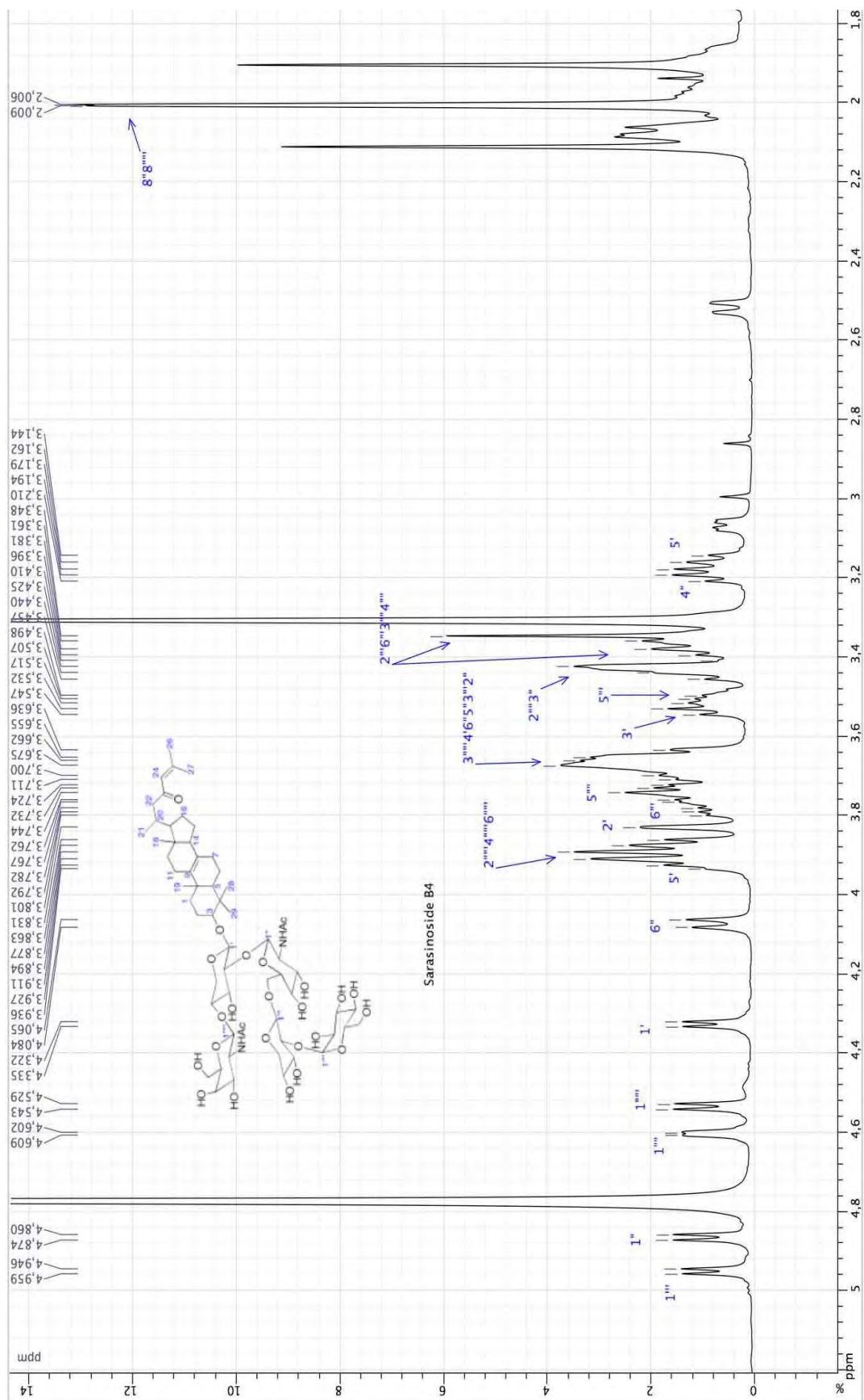


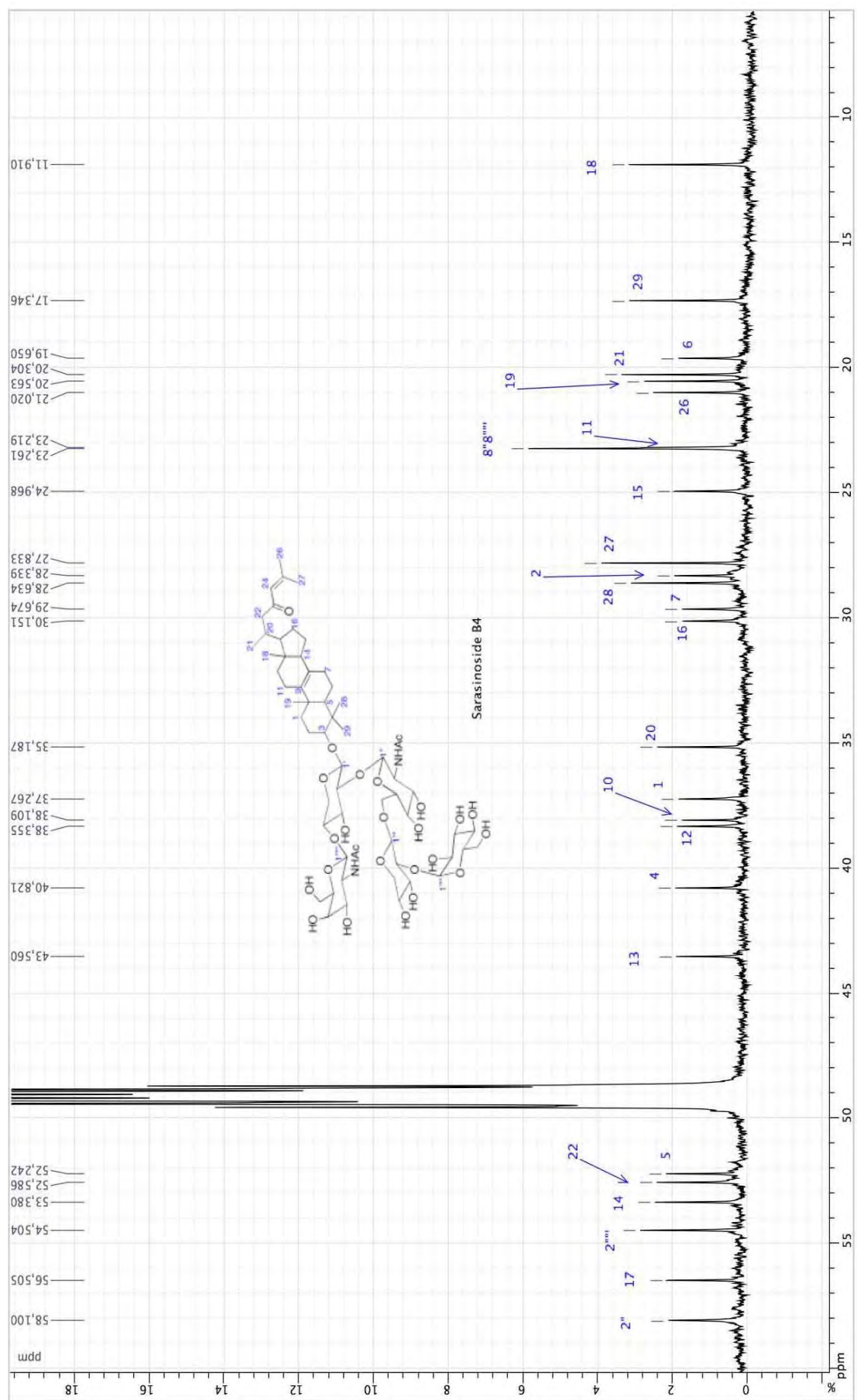
Annexe 4 : Résultats de l'activité anti-bactériennes

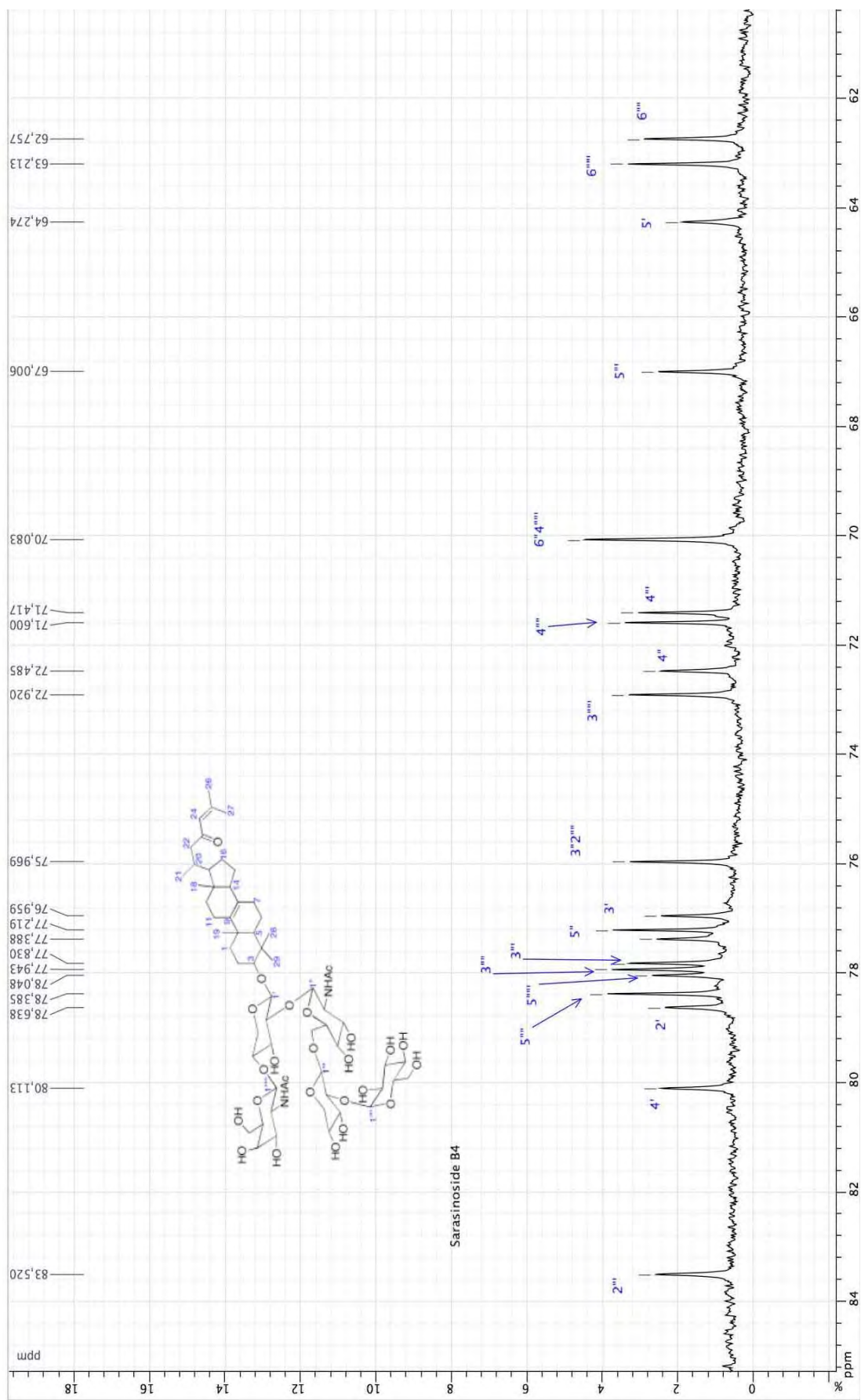
| Molécule | % d'inhibition | | |
|--|----------------|---------|----------------|
| | S. aureus | E. coli | V. anguillarum |
| 2'deoxyuridine (34) | 0 | 0 | 13 |
| Inosine (36) | 2 | 4 | 13 |
| Nebularine (38) | 0 | 0 | 14 |
| hypoxanthine (37) | 0 | 0 | 12 |
| Sarasinoside B₄ (46) | 0 | 0 | 22 |
| Sarasinoside B₁ (47) | 0 | 0 | 11 |
| Sarasinoside A₁ (49) | 0 | 0 | 14 |
| Sarasinoside G (51) | 0 | 0 | 8 |
| Axinelline B (54) | 0 | 0 | 28 |
| Stylostatine 1 (56) | 0 | 26 | 17 |
| Stevensine ou odiline (67) | 89 | 4 | 89 |
| Hymenine (69) | 92 | 0 | 89 |
| Z-hyménialdisine (71) | 4 | 38 | 13 |
| Z-débromohyménialdisine (73) | 0 | 37 | 16 |
| Pyrrole-2-carboxamide (87) | 0 | 0 | 7 |
| Axinastatine 2 (89) | 0 | 0 | 12 |
| Mukanadine C (91) | 0 | 83 | 22 |
| Longamaide (92) | 92 | 0 | 82 |
| Mukanadine B (93) | 0 | 0 | 11 |
| Spongacidine D (94) | 3 | 34 | 17 |
| Hyménidine (97) | 79 | 92 | 63 |
| L'acide 4-bromopyrrole-2-carboxylique (100) | 36 | 36 | 21 |
| Taurodispacamide B (101) | 0 | 4 | 7 |
| Mauritiamine (102) | 82 | 10 | 74 |
| Dispacamide D ou Mukanadine A (103) | 0 | 0 | 7 |
| Keramadine (104) | 79 | 75 | 70 |
| Stylissazole A (106) | 0 | 5 | 10 |
| Stylissazole D (107) | 18 | 0 | 20 |
| Agéliferine (109) | 90 | 86 | 82 |
| Tauroacidine B (110) | 0 | 0 | 6 |
| Taurodispacamide A (114) | 91 | 20 | 88 |
| Nagelamide P(115) | 89 | 14 | 86 |
| Stylissazole G (120) | 3 | 3 | 23 |
| Sceptrine (122) | 83 | 16 | 84 |

Annex 5 : Spectres RMN des composés isolés

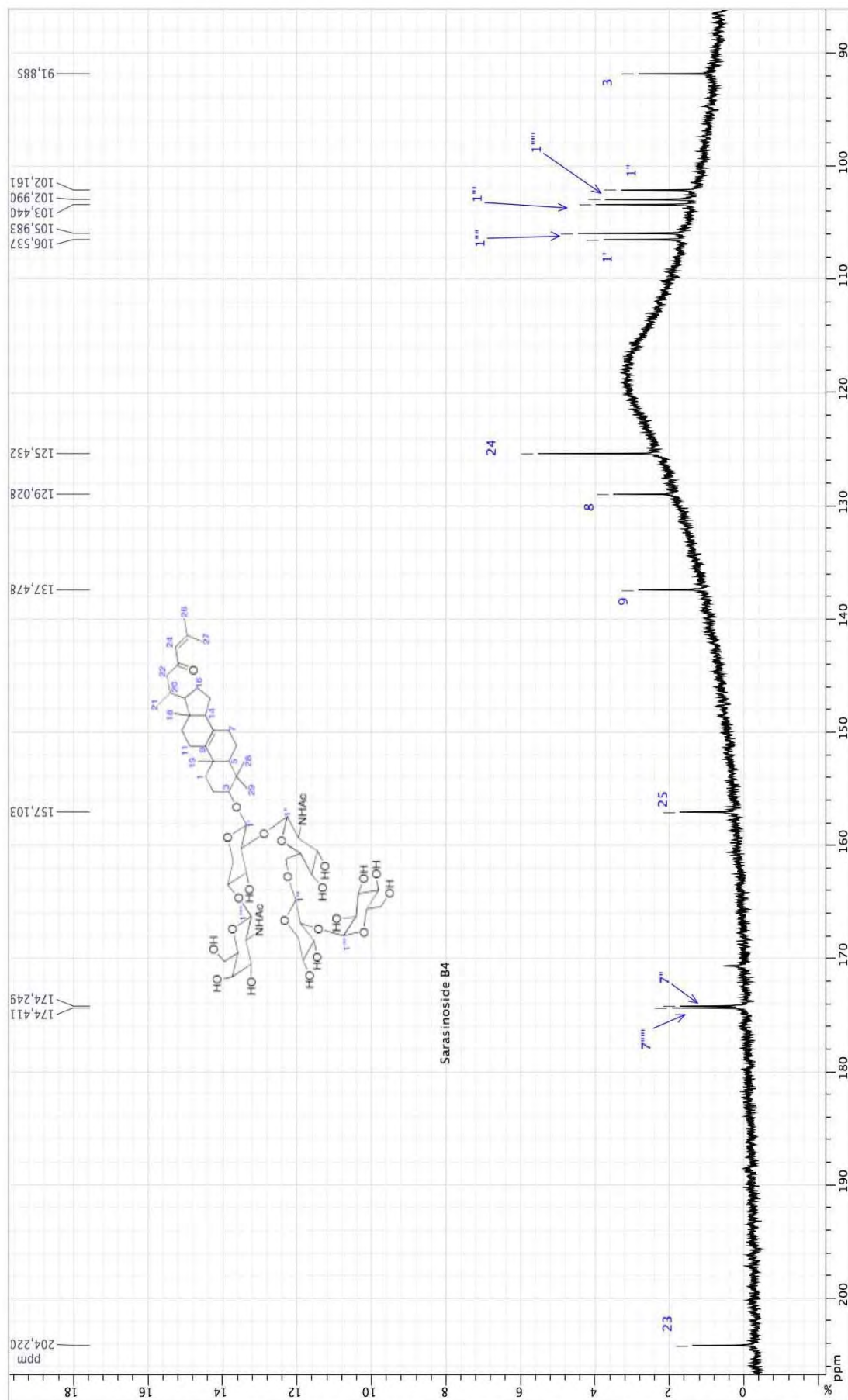
Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du Sarasinoside B₄ (46)

Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du Sarasinoside B₄ (46)

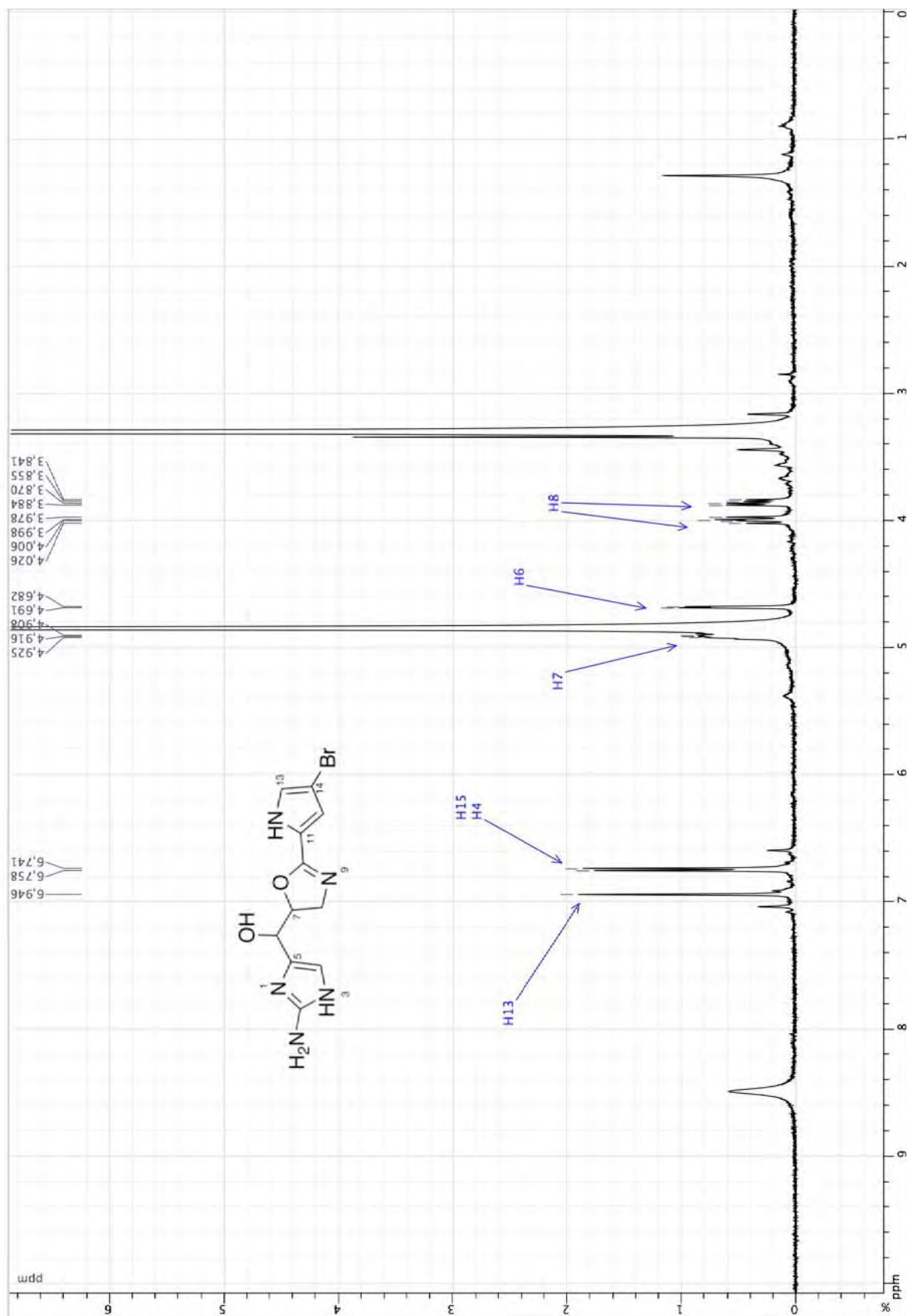
Spectre RMN ^{13}C (150,8 MHz, CD_3OD) du Sarasinose B₄ (46)

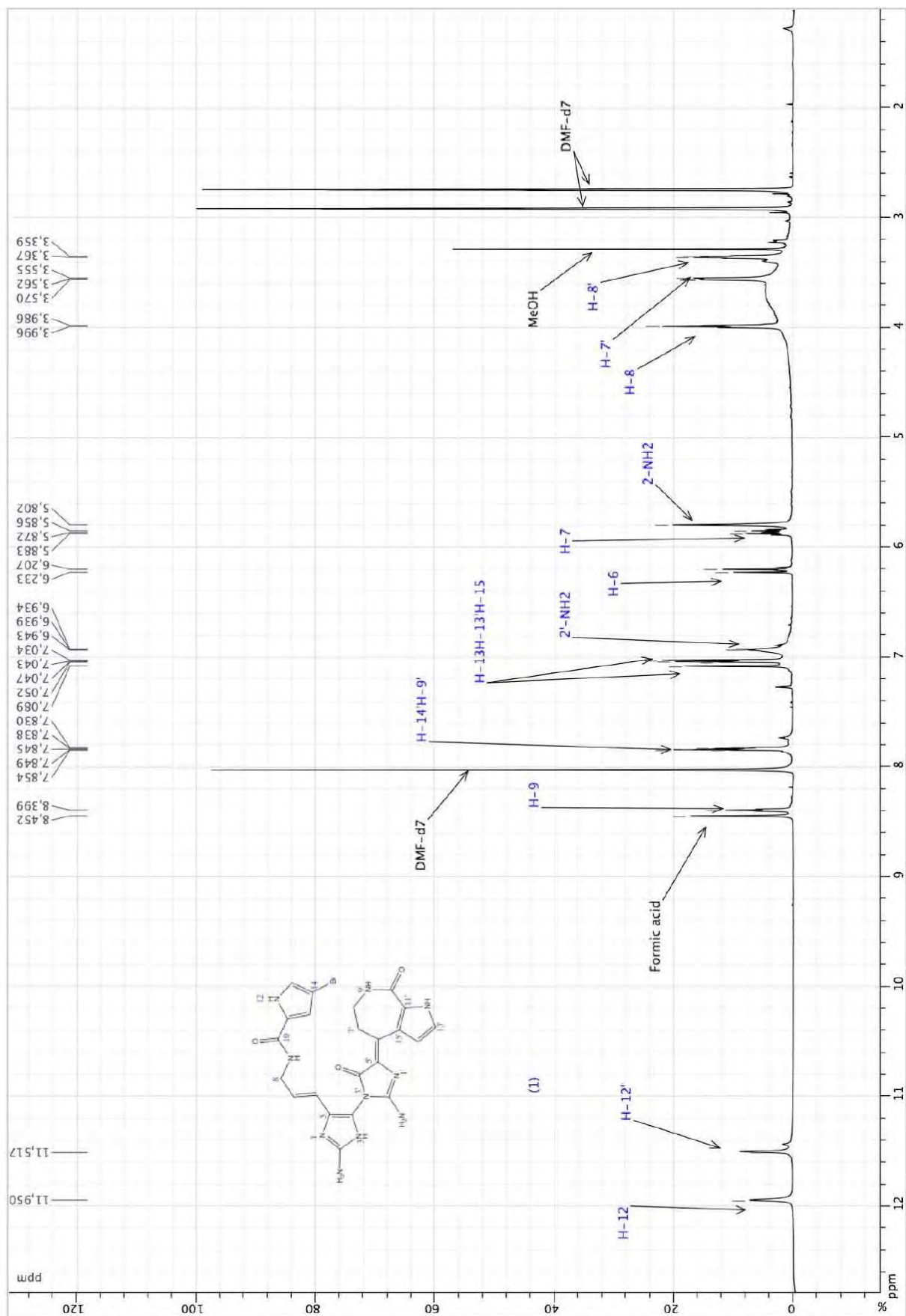


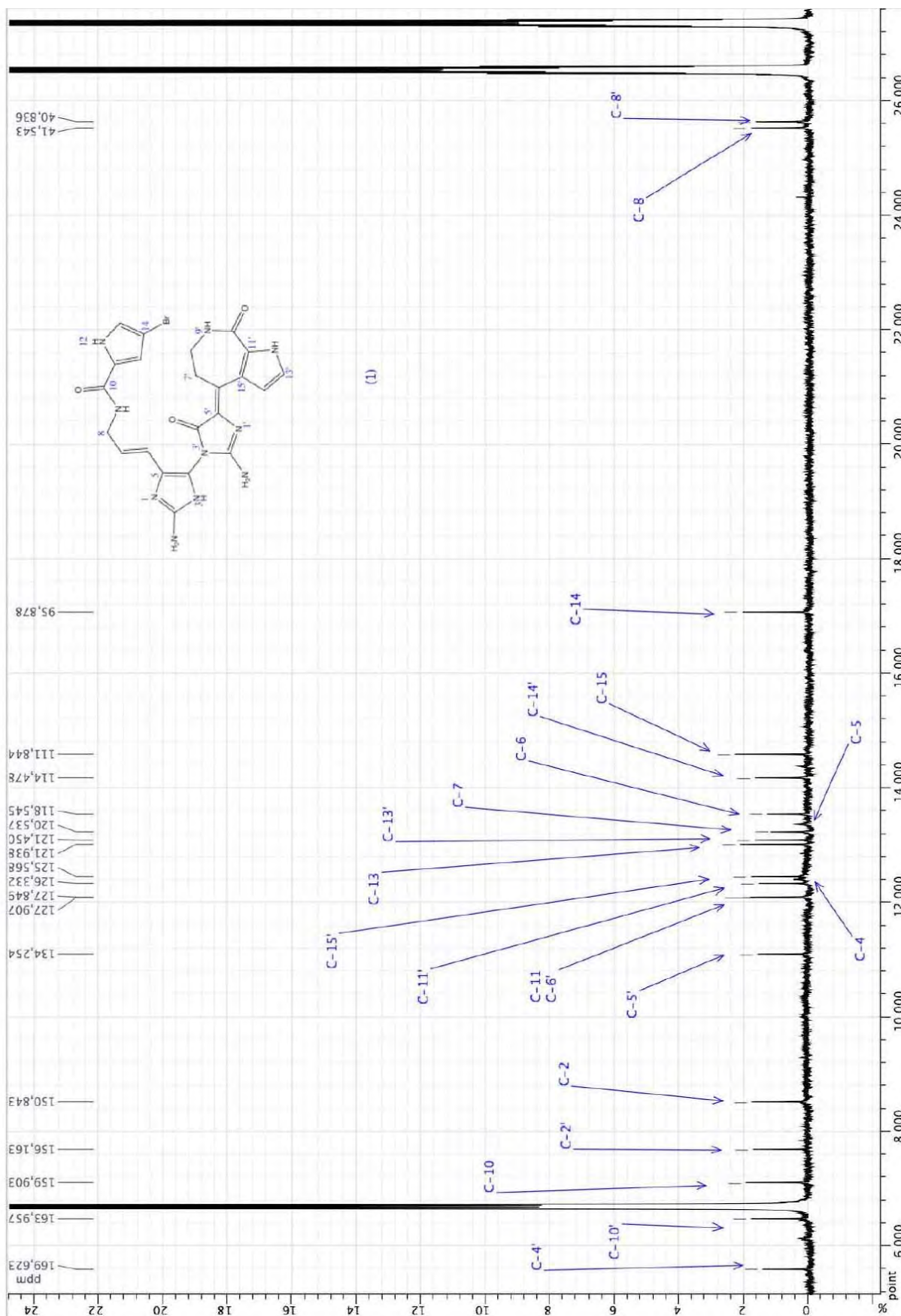
Spectre RMN ^{13}C (150,8 MHz, CD_3OD) du Sarasinoside B₄ (46)



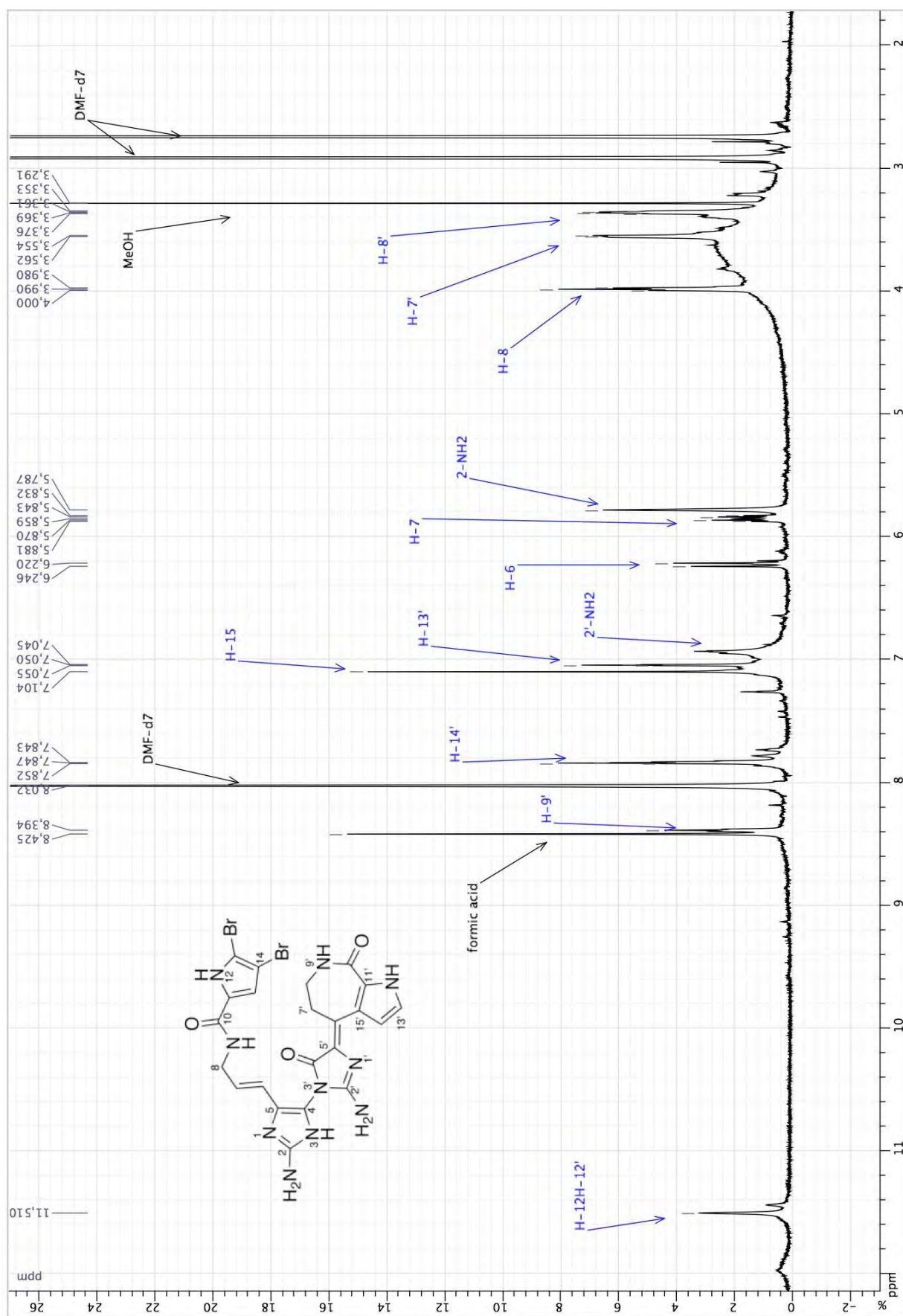
Spectre RMN ^{13}C (150,8 MHz, CD_3OD) du Sarasinose B₄ (46)

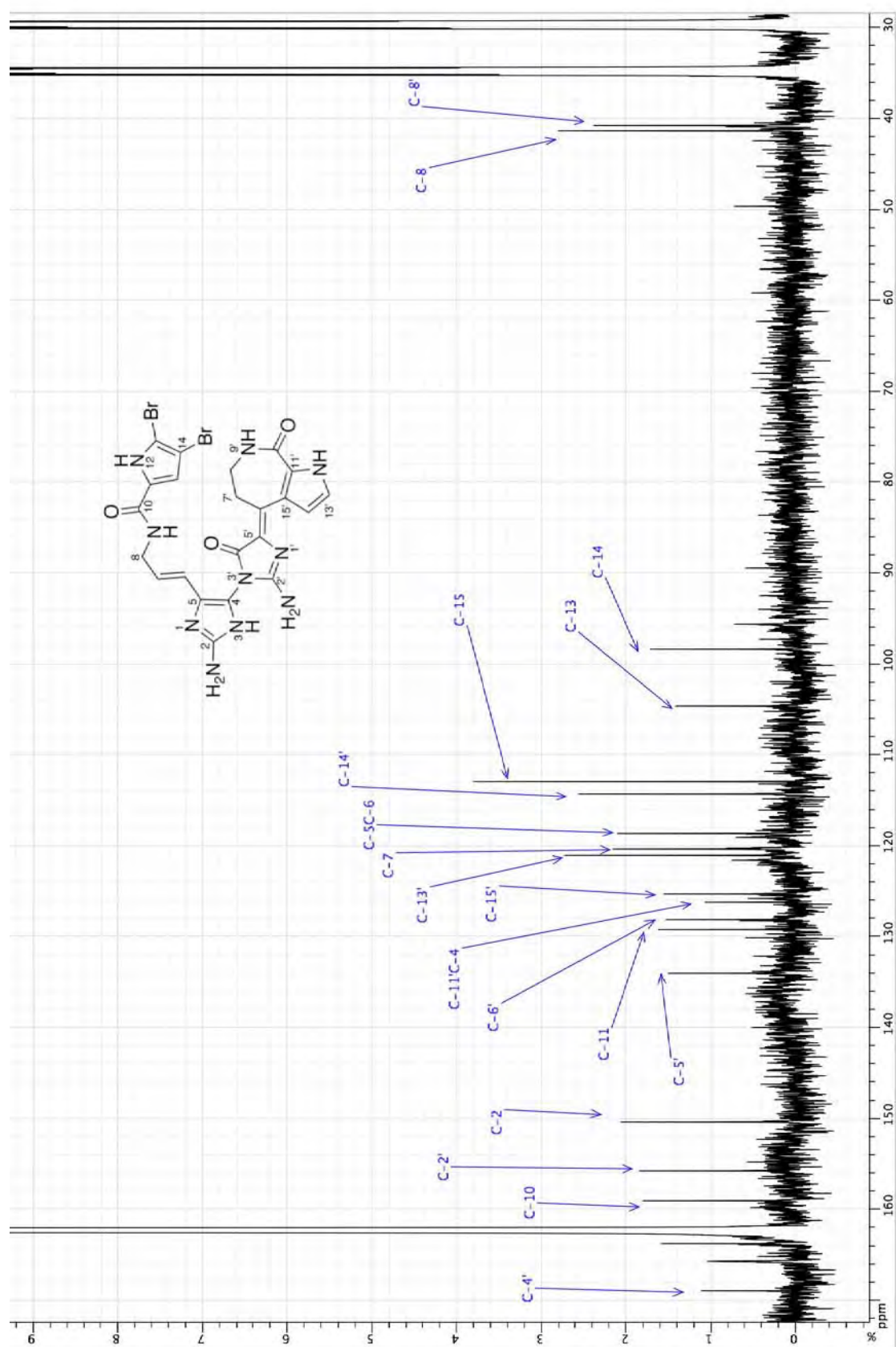
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du Stylistazole H (**105**)Pas de spectre RMN ^{13}C (faible quantité)

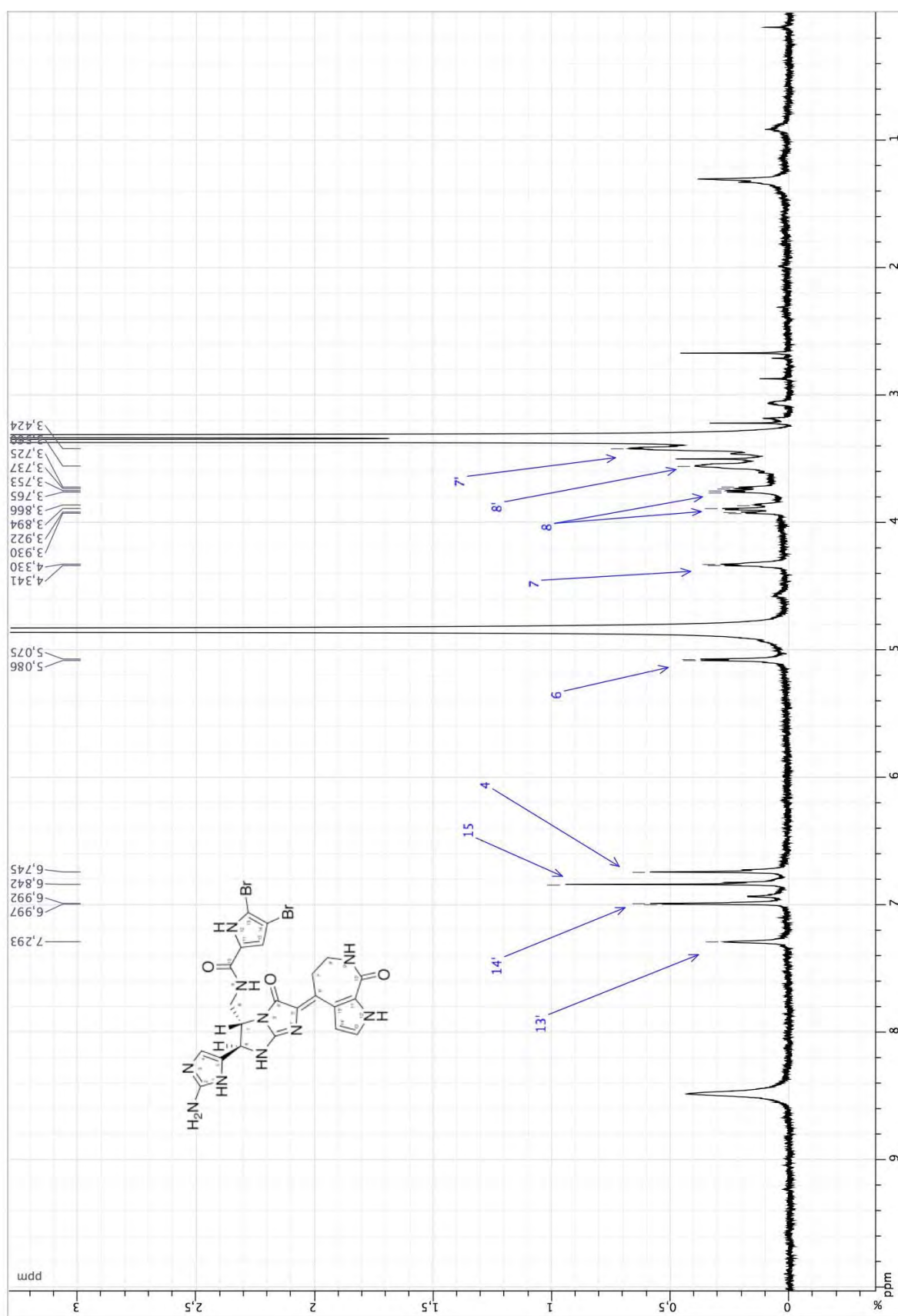
Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) du Stylissazole A (106)

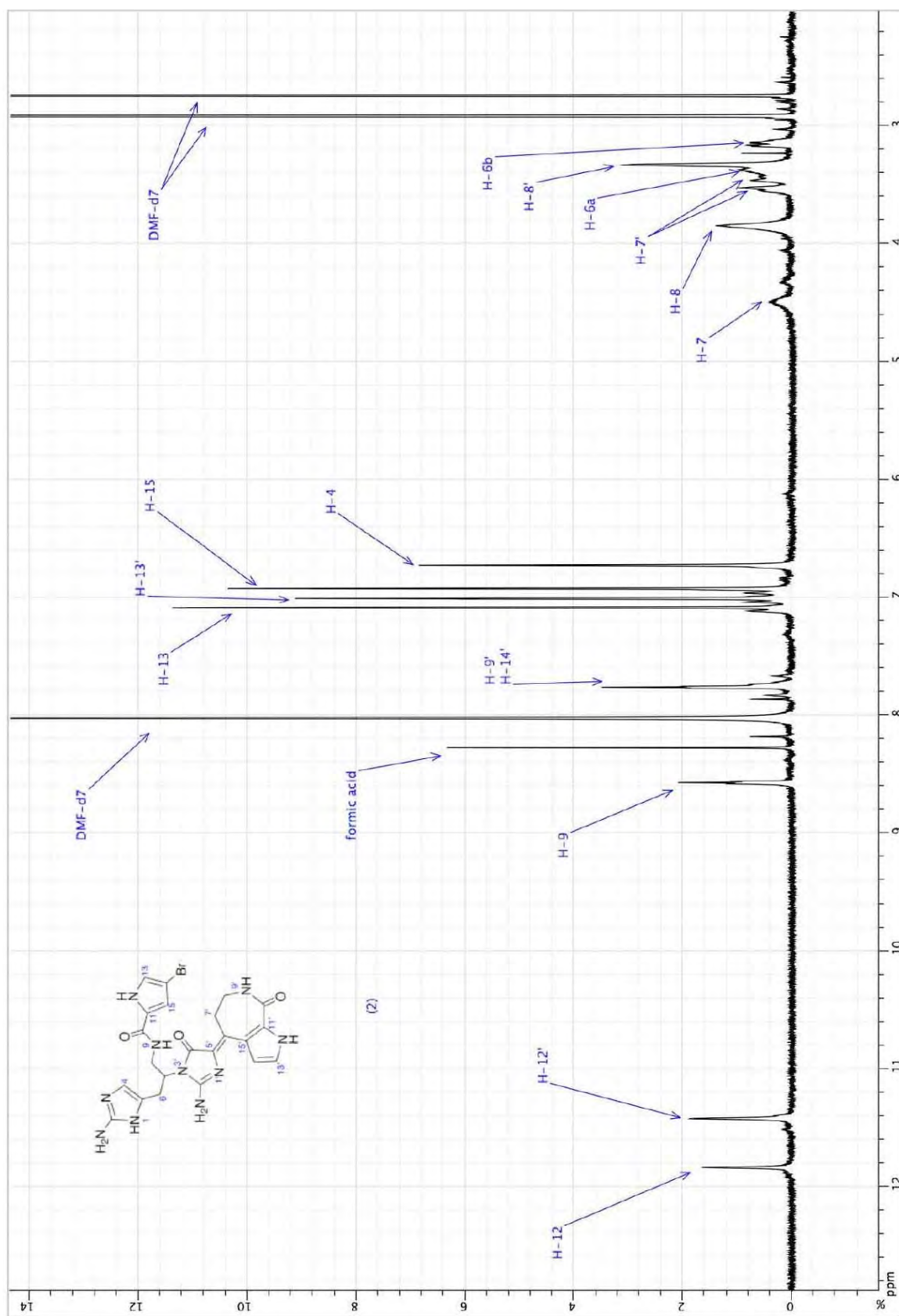


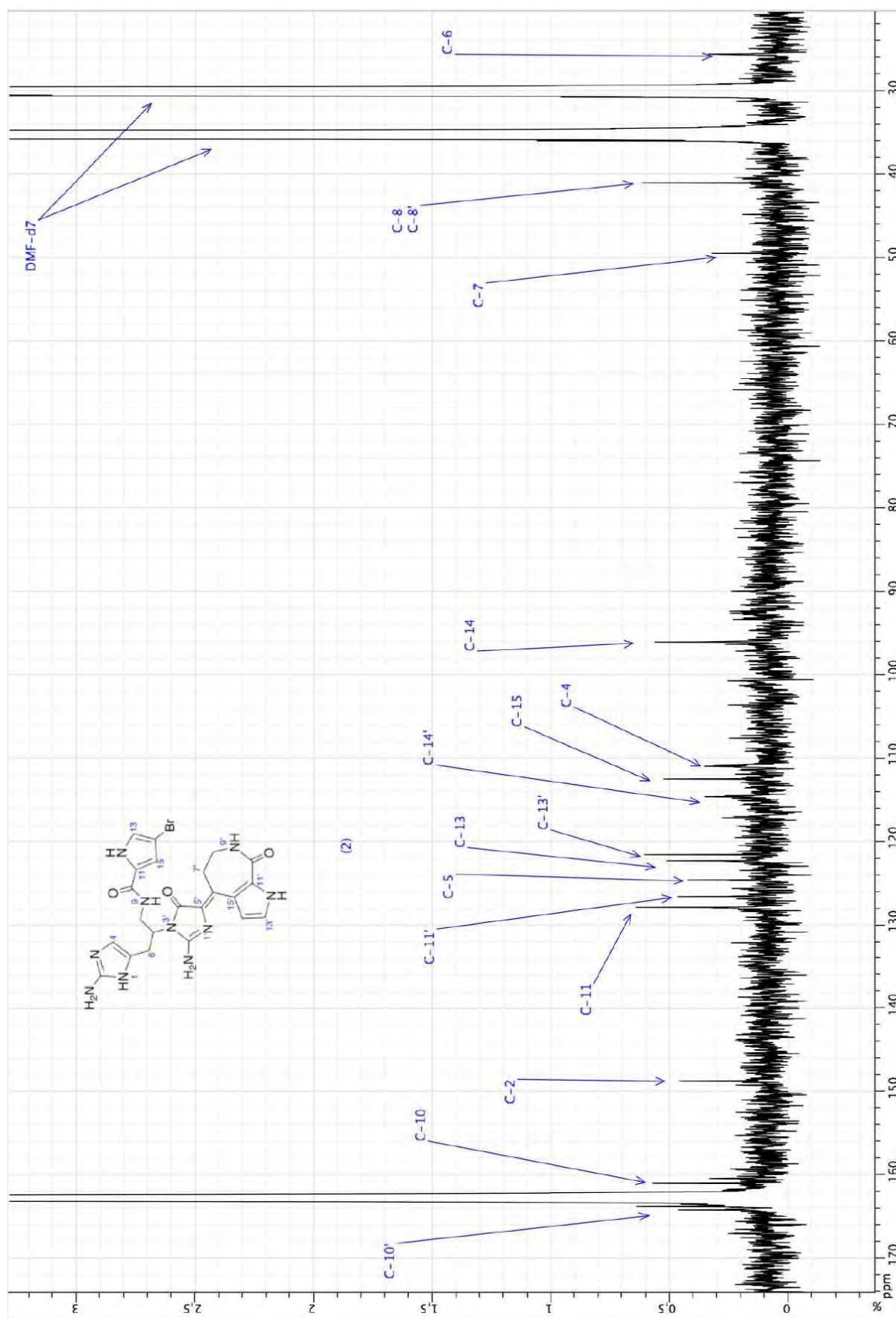
Spectre RMN ^{13}C (150,8, MHz, $\text{DMF-}d_7$) du Stylistazole A (106)

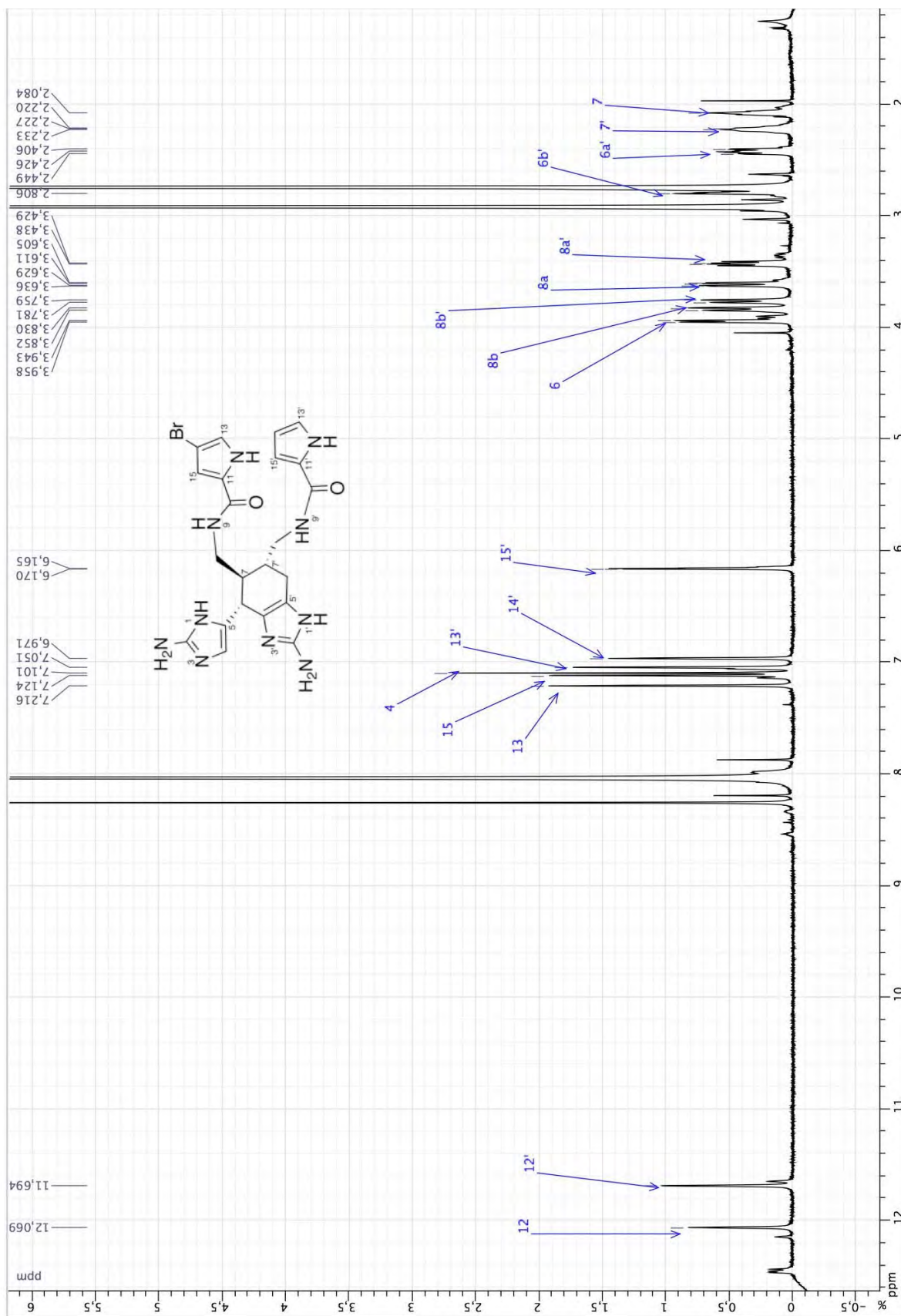
Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMF- d_7) du Stylissazole D (**107**)

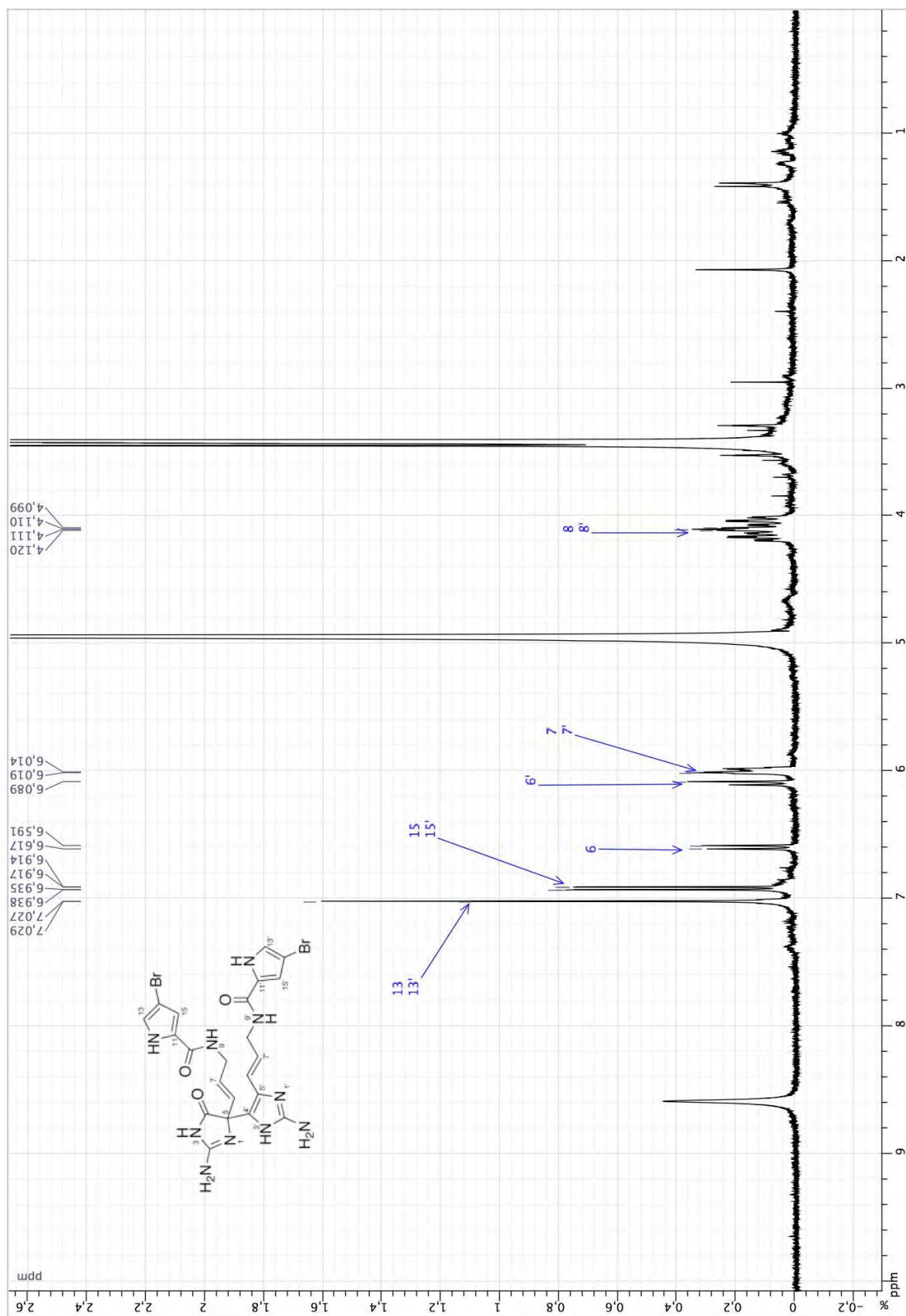
Spectre RMN ^{13}C (150,8, MHz, $\text{DMF-}d_7$) du Stylissazole D (107)

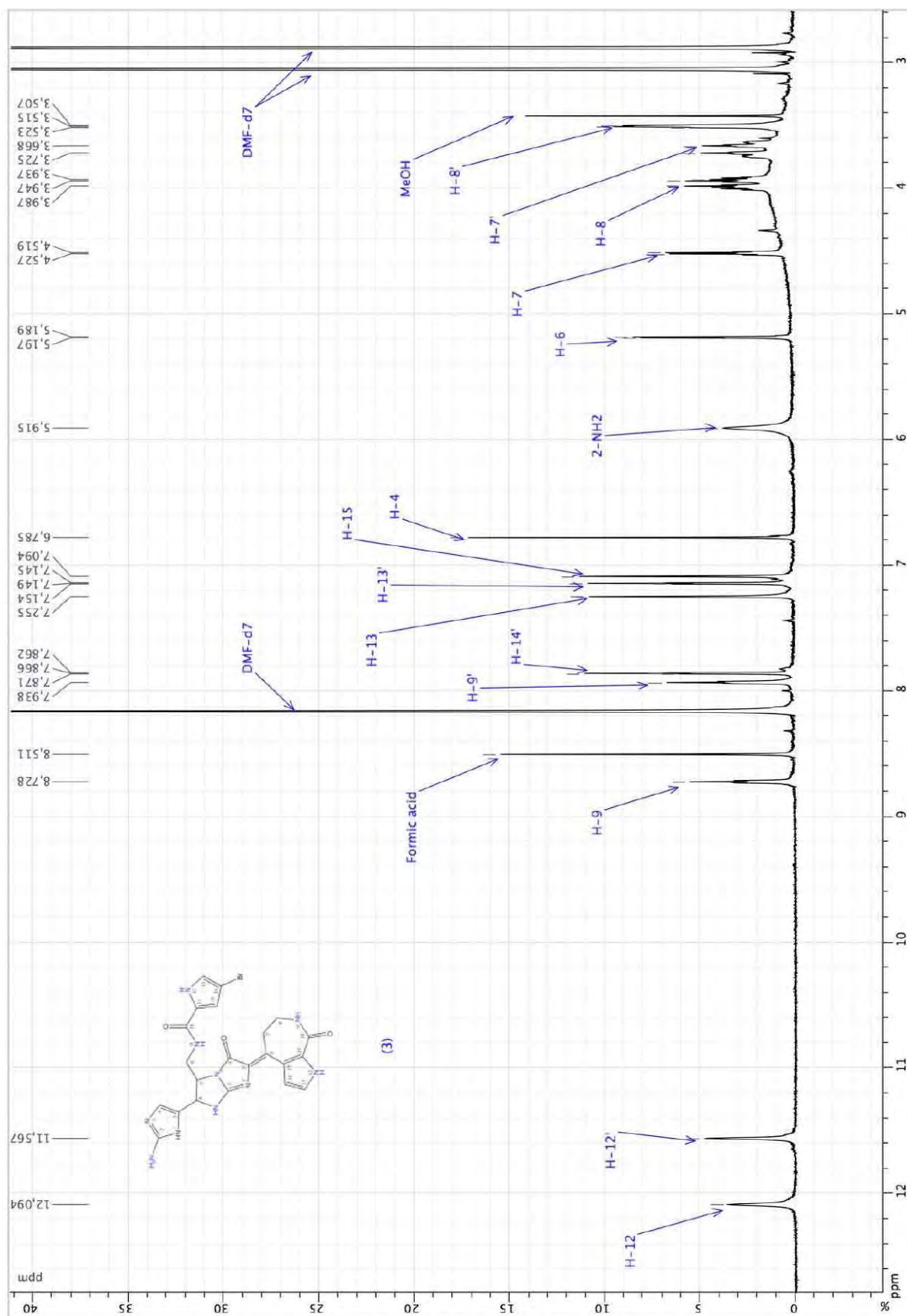
Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du Stylistazole E (**108**)Pas de spectre RMN ^{13}C (faible quantité)

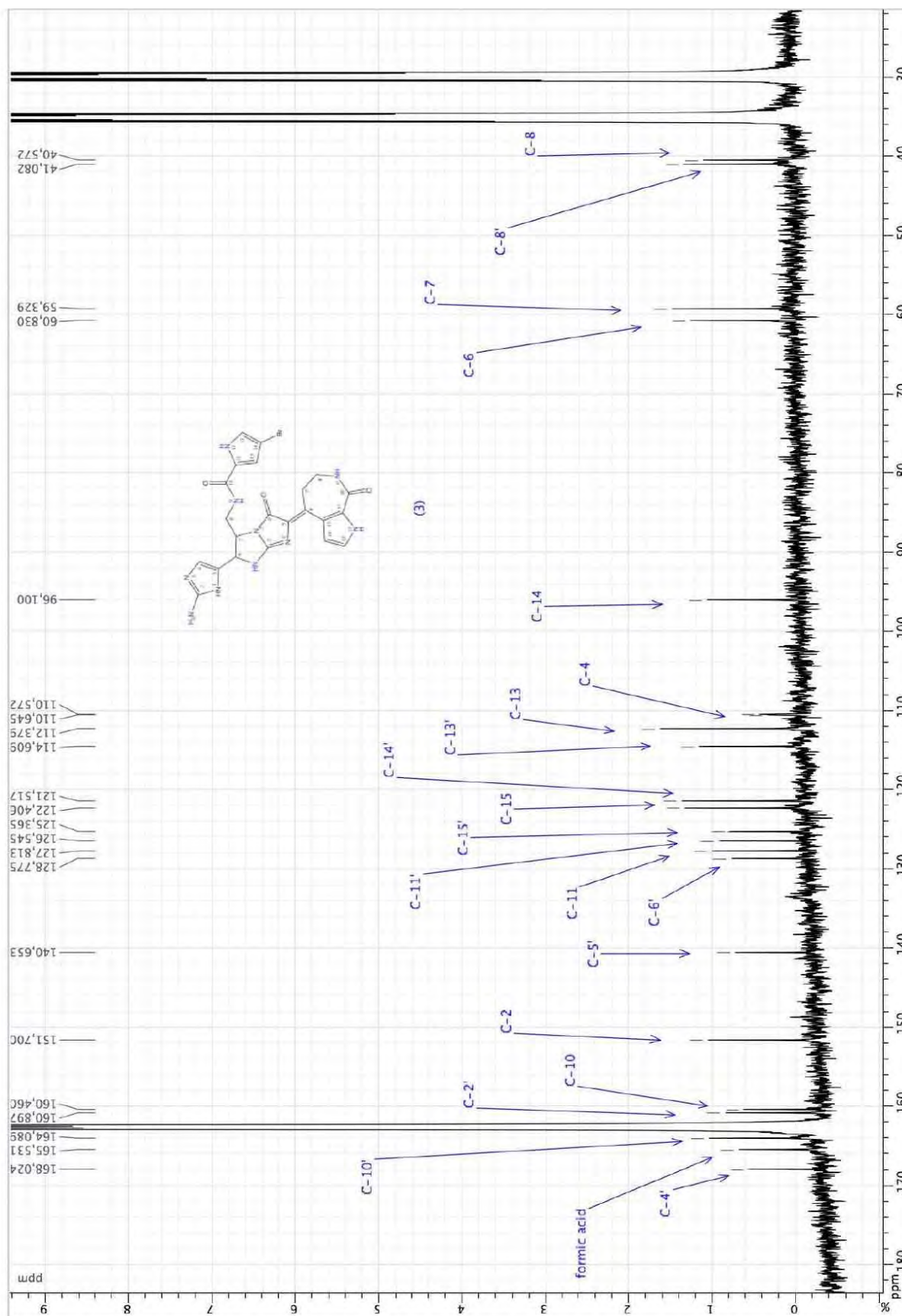
Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMF- d_7) du Stylissazole B (**112**)

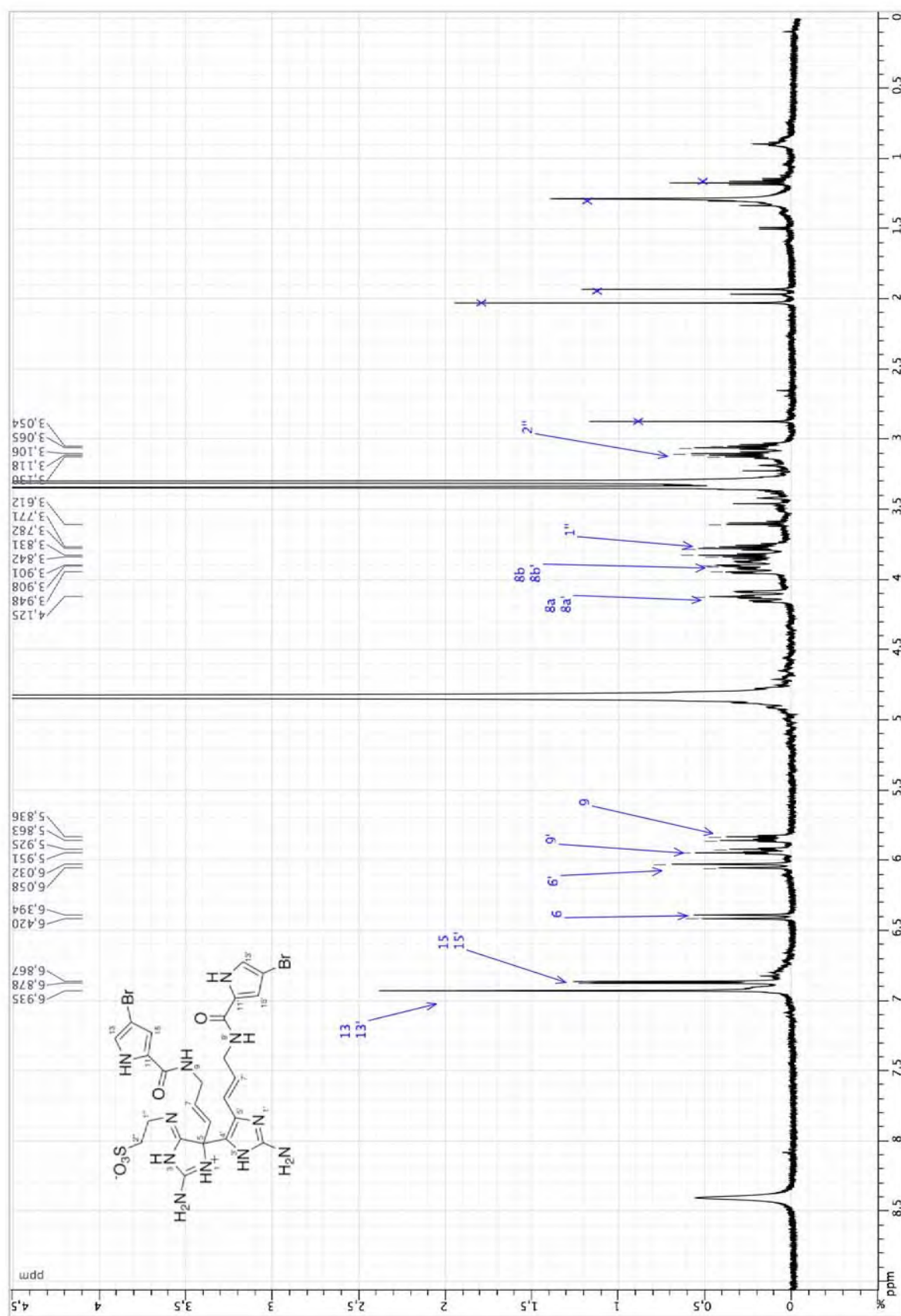
Spectre RMN ^{13}C (150,8, MHz, DMF- d_7) du Stylistazole B (112)

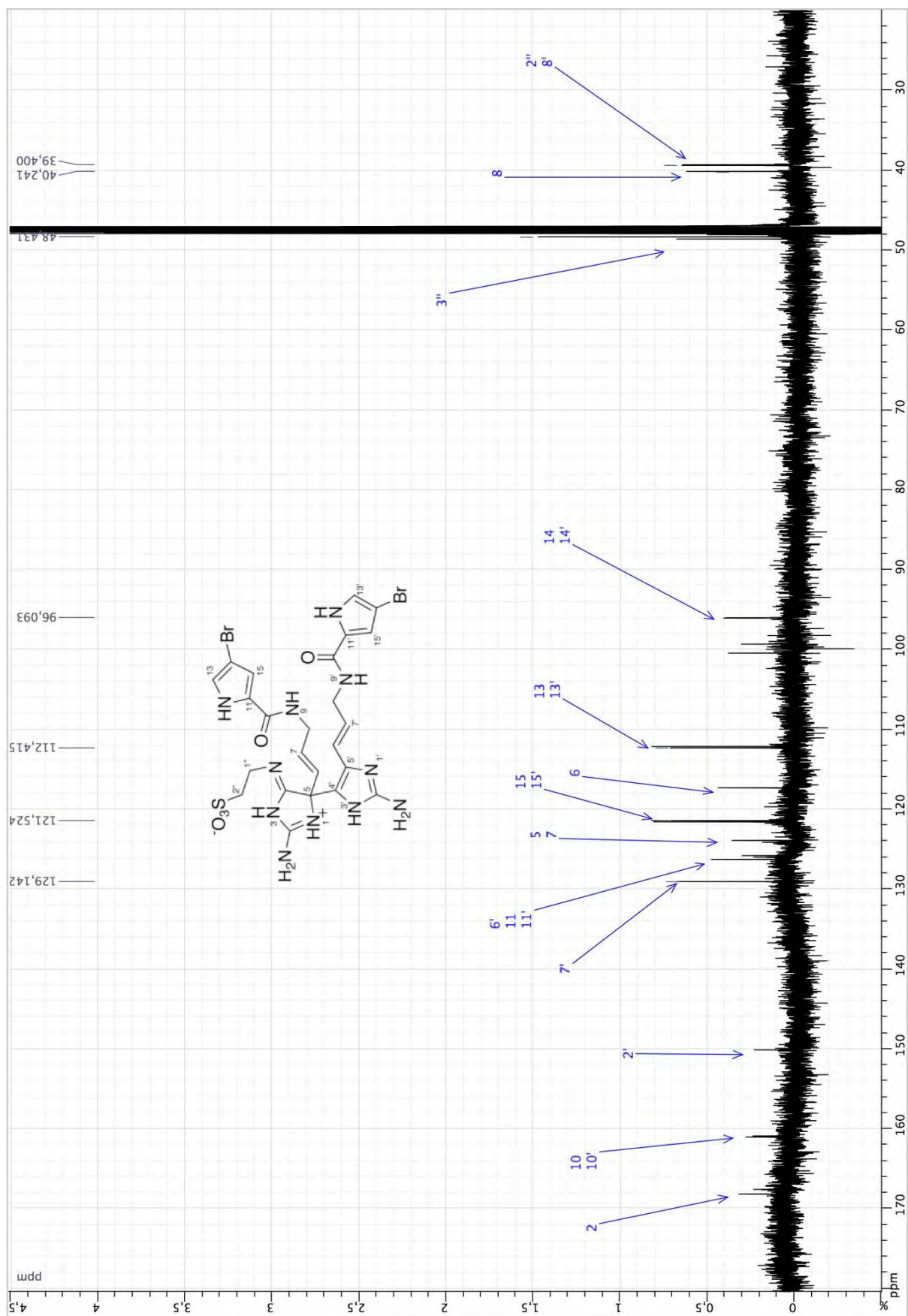
Spectre RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) du Stylissazole I (113)Pas de spectre RMN ^{13}C (faible quantité)

Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du Stylistazole F (116)Pas de spectre RMN ^{13}C (produit instable)

Spectre RMN ^1H (600 MHz, DMF- d_7) du Stylissazole C (117)

Spectre RMN ^{13}C (150,8, MHz, $\text{DMF-}d_7$) du Stylyssazole C (117)

Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du Stylissazole G (120)

Spectre RMN ^{13}C (150,8 MHz, CD_3OD) du Stylistazole G (120)

Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'isolement exhaustif de métabolites issus d'éponges marines récoltées sur la côte de Nouvelle Géorgie des îles Salomon en juillet 2004.

Un total de 65 molécules ont été isolées des éponges *Petrosia (Petrosia) crassa*, *Amorphinopsis excavans* et *Stylissa carteri*. Dix sont des nouveaux composés. Le sarasinoside B₄, un nouveau produit isolé de l'éponge *Amorphinopsis excavans*, est un épimère du sarasinoside B₁. Les stylissazoles A-I ont été isolées de l'éponge *Stylissa carteri*. En outre, les stylissazoles A-E ont une activité kinase et appartiennent à une nouvelle classe de pyrroles-2-aminoimidazoles dont les liaisons reliant les monomères sont exclusivement entre les azotes et les carbones. Ce nouveau mode de dimérisation donne une nouvelle dimension à la diversité moléculaire des pyrroles-2-imidazoles.

Ce travail de recherche a permis d'approfondir nos connaissances sur les pyrrole-2-aminoimidazoles et de mettre à jour une nouvelle hypothèse de biogénèse des pyrrole-2-aminoimidazoles.

Abstract

Extraction of bioactive metabolites from South Pacific marine sponges.

The work described in this manuscript deals with the exhaustive isolation of marine metabolites from marine sponges collected from the coast of New Georgia in Solomon Islands.

A total of 65 compounds were isolated from *Petrosia (Petrosia) crassa*, *Amorphinopsis excavans* and *Stylissa carteri*, out of which 10 new compounds were identified. Sarasinoside B₄, a new product isolated from *Amorphinopsis excavans* is an epimer of sarasinoside B₁. Stylissazoles A-I were isolated from *Stylissa carteri*. Stylissazoles A-E have kinase activities and belong to a new subclass of pyrrole-2-aminoimidazole dimers, which have exclusively N-C bond between the two monomers. This new subclass of molecules constitutes an additional mode of dimerization and adds another dimension to the molecular diversity of pyrrole-2-aminoimidazoles.

This research work allowed us to deepen our knowledge about pyrrole-2-aminoimidazoles and update the universal biogenetic pathway proposed previously for pyrrole-2-aminoimidazoles.

Discipline: Chimie

Mots-clés: éponge, *Petrosia (Petrosia) crassa*, *Amorphinopsis excavans*, *Stylissa carteri*, pyrrole-2-aminoimidazoles, stylissazole, sarasinoside

Key words: sponges, *Petrosia (Petrosia) crassa*, *Amorphinopsis excavans*, *Stylissa carteri*, pyrrole-2-aminoimidazoles, stylissazole, sarasinoside

L'institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique (ICSN/CNRS) (unité A2301), Avenue de la terrasse, Centre de Recherche de Gif sur Yvette, 91190 Gif sur Yvette, France.