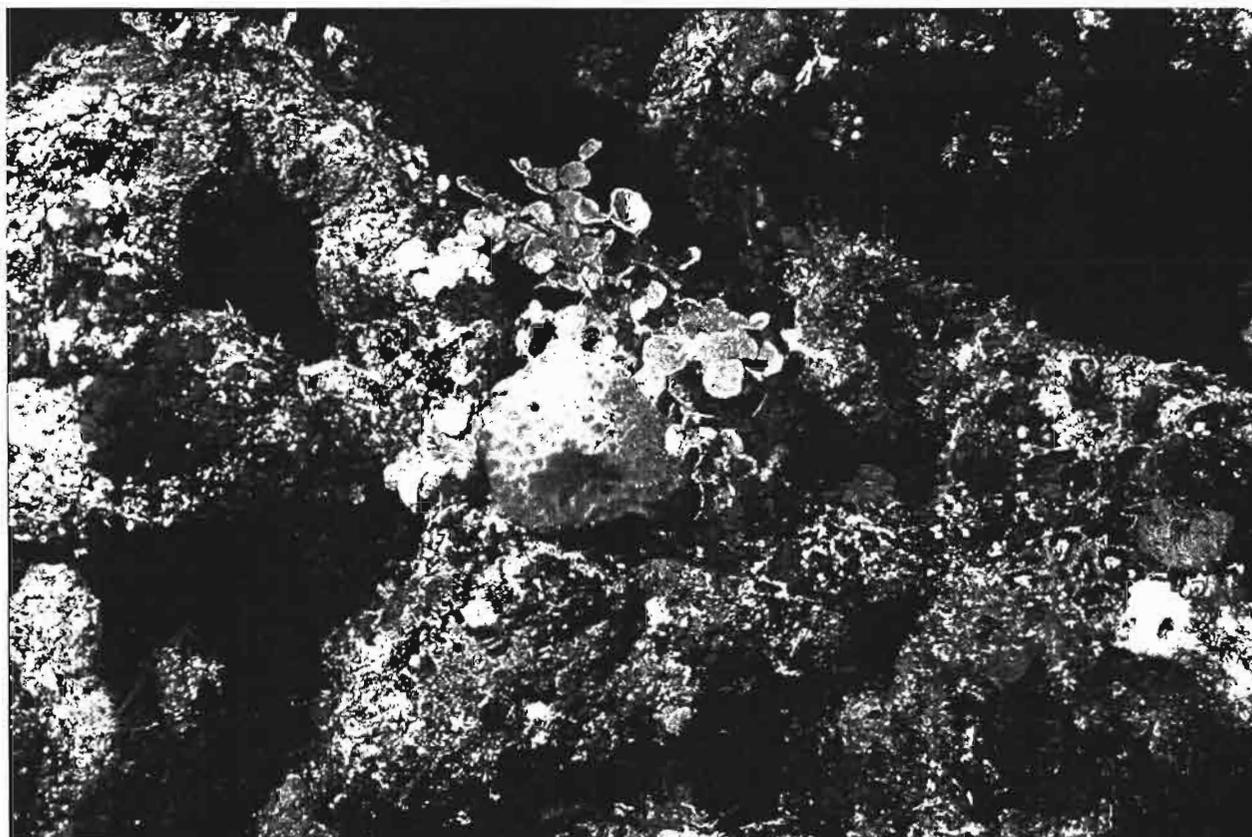




Lucie PASTOR
I.U.T Chimie
Marseille St Jérôme
2^{ème} année



**RECHERCHE ET ISOLEMENT
DE MOLÉCULES BIOACTIVES
DANS DES INVERTÉBRÉS MARINS**



Maîtres de stage:
M Jacques PUSSET
M Edouard HNAWIA
M Dominique LAURENT

Stage réalisé du 2 avril au 14 juin 2002
à L'Institut de Recherche pour le Développement de Nouméa

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier M. Dominique LAURENT pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir fait profiter de ses connaissances et de sa gentillesse.

Je tiens aussi à remercier vivement M. Jacques PUSSET et M. Edouard HNAWIA pour m'avoir si bien encadrée durant mon stage.

Je n'oublie pas bien évidemment Mme Maryvonne FROSTIN qui n'hésitait jamais à prendre un peu de son temps afin de répondre à mes questions.

Merci aussi à Mme Isabelle DESVIGNES pour son dynamisme, Melle Isabelle DESRIAUX et Melle Raphaële BOYDRON pour leurs conseils et leur sympathie, et à tous les membres du laboratoire pour leur permanente bonne humeur.

INTRODUCTION

"Entre la Grande Terre au relief tourmenté et la fureur de la grande barrière de corail s'étend un lagon que l'on dit le plus beau du monde. Que l'on soit un oiseau, un poisson ou un simple navigateur les portes du paradis ne tarderont pas à s'entrouvrir."

Ce lagon, qui est aussi le plus grand du pacifique, n'est pas qu'un lieu de tourisme et de rêve comme le décrit cette citation tirée d'une brochure touristique, c'est aussi une immense étendue d'eau regorgeant d'organismes encore inconnus de l'homme et qui ne demande qu'à être explorée.

On dit que la beauté de ce lagon n'a d'égale que sa diversité. C'est grâce à cette diversité que des chercheurs peuvent, en étudiant les organismes nouveaux du lagon, trouver de nouvelles substances dont l'activité biologique sera telle qu'elles deviendront des médicaments.

C'est ce que font les chercheurs de l'IRD basés à Nouméa, Capitale de la nouvelle Calédonie et plus particulièrement les chercheurs du laboratoire des substances marines qui, à force persévérance, arrivent à isoler des substances bioactives permettant de lutter contre les maladies.

Alors envolons nous à la découverte de ce qui constitue la base de ces recherches qui donnent tant d'espoir aux hommes...



SOMMAIRE

1	GÉNÉRALITÉS SUR L'IRD.....	1
1.1	DANS LE MONDE	1
1.2	EN NOUVELLE CALÉDONIE	1
1.3	LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES – IRD/UNC (LPSN IRD/UNC).....	2
2	GÉNÉRALITÉS SUR LES SPONGIAIRES.....	3
2.1	LIEU DE VIE.....	3
2.2	MORPHOLOGIE.....	3
2.3	LA REPRODUCTION.....	4
2.4	TOUTES SORTES D'ÉPONGES.....	5
2.5	IDENTIFICATION.....	5
3	DEMARCHE GENERALE POUR LA RECHERCHE DE SUBSTANCES BIOACTIVES DANS LES INVERTEBRES MARINS	6
4	DESCRIPTION DES TESTS EFFECTUÉS.....	9
4.1	LE TEST ANTIBIOTIQUE.....	9
4.2	TEST DE L'HÈME OU ANTIPALUDIQUE.....	10
4.3	LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE.....	10
4.3.1	<i>Principe.....</i>	<i>10</i>
4.3.2	<i>Chromatographie en phase liquide.....</i>	<i>11</i>
4.3.3	<i>Chromatographies en phase gazeuse.....</i>	<i>11</i>
5	SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	13
6	ETUDE D'UNE EPONGE DU GENRE PSEUDOCERATINA	15
6.1	ETUDES PRÉLIMINAIRES.....	15
6.2	ETUDE DE L'EXTRAIT R 1801 C1	18
6.2.1	<i>Fractionnement chimique</i>	<i>18</i>
6.2.2	<i>Purification</i>	<i>20</i>
6.2.3	<i>Tests biologiques sur les fractions purifiées.....</i>	<i>21</i>
6.2.4	<i>Conclusion sur l'étude de l'extrait C1</i>	<i>22</i>
6.3	ETUDE DE L'EXTRAIT R 1801 C2.....	22
6.3.1	<i>Fractionnement chimique</i>	<i>22</i>
6.3.2	<i>Purification</i>	<i>25</i>
6.3.3	<i>Conclusion sur l'étude de l'extrait C2.....</i>	<i>25</i>
7	CONCLUSION	26
	BIBLIOGRAPHIE.....	27
	LISTE DES SCHEMAS, FIGURES ET TABLEAUX.....	29
	LISTE DES ABREVIATIONS.....	30

1 GÉNÉRALITÉS SUR L'IRD

1.1 Dans le monde ⁽¹⁾

L'Institut de Recherche pour le Développement (anciennement ORSTOM) est un établissement public à caractère scientifique et technologique placé sous la tutelle des ministres chargés de la recherche et de la coopération. Depuis cinquante ans, l'institut conduit des recherches sur les milieux intertropicaux qui sont devenues des références internationales. Il remplit 3 missions fondamentales:

- ☞ La recherche
- ☞ L'expertise
- ☞ La formation

Il compte 36 implantations dont 26 dans la zone intertropicale, 5 en France métropolitaine (Paris, Montpellier, Bondy, Brest, Orléans) et 5 en outre mer (Guyane, Polynésie Française, Martinique, Réunion et Nouvelle Calédonie).

1.2 En Nouvelle Calédonie ⁽²⁾

Le centre de Nouméa est le premier du pacifique. Il a été créé le 2 août 1946 sous l'appellation d'Institut Français d'Océanie. En 1964, L'IFO prend le nom d'ORSTOM jusqu'en 1998. En effet, par le décret ministériel du 5 novembre 1998, l'ORSTOM devient l'IRD.

Le centre réunit plusieurs disciplines dans trois grands domaines de recherche :

- L'océanologie : géosciences, variabilité climatique, écologie marine...
- Sciences biologiques terrestres : géologie, botanique, entomologie...
- Substances naturelles d'intérêt biologique : substances marines et terrestres.

Le centre a aussi un rôle de formation. Au travers de l'activité scientifique et technique, il accueille des étudiants dans le cadre de la formation continue et de la formation à la recherche. Intégrés dans les équipes, les étudiants peuvent avoir le statut de stagiaires, d'allocataires de recherche, de thésards ou de post doctorants..

Budget consolidé

12,2 millions d'euros soit 80 millions de francs ou encore 1455 millions de francs CFP

Effectifs → 152

36 chercheurs I.R.D. et en accueil

99 ingénieurs, techniciens, administratifs, VCAT

17 personnels navigants

Installations

2600 m² de laboratoires, 1300 m² de bureaux et ateliers, 190 m² de serres, un auditorium de 280 places, 1 pavillon d'accueil, 8 studios, 10 chambres

1.3 **Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles – IRD/UNC (LPSN IRD/UNC)**

Ce laboratoire fait partie de l'unité de recherche "Pharmacochimie des substances naturelles" dont le siège se situe à Toulouse. Il regroupe ainsi des chercheurs de l'IRD et de l'Université de la Nouvelle Calédonie.

Le directeur de ce laboratoire est M Dominique LAURENT, chercheur à l'IRD. Le fil conducteur des recherches menées dans ce laboratoire est l'isolement de molécules bioactives dans des invertébrés marins qui pourraient être utilisées pour soigner des maladies à vecteur comme la dengue et le paludisme¹, toutes deux transmises par des moustiques.

La recherche sur ces substances marines a débutée en 1977 en Nouvelle Calédonie à travers deux grands programmes⁽⁹⁾ :

SNOM : (Substances Naturelles d'Origine Marine). Ce programme a duré 5 ans avec un partenariat entre Rhône Poulenc, le CNRS et l'ORSTOM.

SMIB : (Substances Marines d'Intérêt Biologique) associant industriels et chercheurs de la plupart des instituts de recherche nationaux.

Ces deux programmes ont permis de réaliser un large inventaire de la faune du lagon néo-calédonien, notamment au niveau des invertébrés vivants en mer profonde dont certains sont considérés comme des fossiles vivants traversant les âges sans modifications majeures.

¹ cf annexe I

2 GÉNÉRALITÉS SUR LES SPONGIAIRES ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽¹⁰⁾

Les éponges, appelées aussi spongiaires ou porifères, sont des animaux aquatiques (marins ou d'eau douce) fixés à l'état adulte, de formes, de dimensions et de couleurs très variées. Il en existe près de 10000 espèces dont la taille varie entre 1cm et 2m.

Les spongiaires sont considérés comme les plus simples des animaux pluricellulaires et sans doute les plus anciens connus. Ces animaux ne possèdent ni tube digestif, ni système nerveux, ni système circulatoire. Les cellules ne forment pas à proprement parler des tissus.

Or, paradoxalement, malgré leurs caractères primitifs, les éponges ont constitué un des éléments fondamentaux des écosystèmes marins depuis au moins le cambrien inférieur. La cause de ce succès durable est apparemment une organisation de base qui, du fait de sa simplicité même, peut s'adapter aux changements de milieu, ce qui leur assure un avantage certain vis à vis d'animaux plus évolués et habitués à des conditions de milieu strictes.

2.1 Lieu de vie

Les éponges se rencontrent dans toutes les mers dans des eaux peu profondes en général. La plupart se fixent sur une surface telle qu'un rocher, animal à carapace, algues... Certaines forent un trou dans la roche ou les coquillages.

Elles se nourrissent de plantes et d'animaux microscopiques ainsi que de détritits, le tout filtré dans l'eau qui circule à travers leur corps.

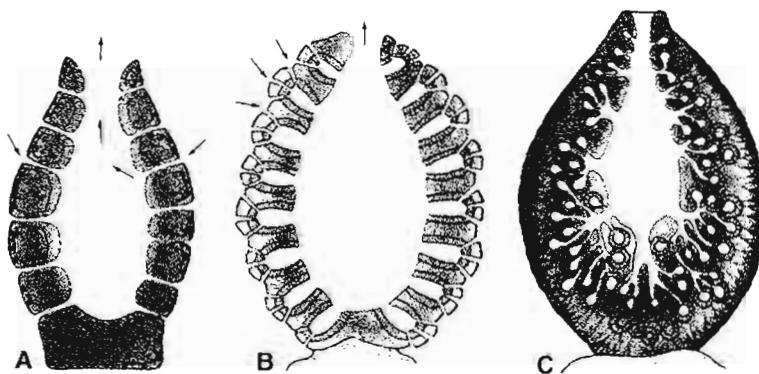


Figure 1 : trois types d'éponges

Les trois types d'organisation fondamentaux des animaux appartenant à l'embranchement des spongiaires ou porifères, respectivement les types ascon (A), sycon (B) et leucon (C). Les flèches indiquent dans quel sens l'eau circule dans la cavité interne.

2.2 Morphologie

Le modèle de base de l'éponge, d'où dérivent tous les autres types, est petit, en forme d'urne, fait d'une cavité centrale qu'entoure une paroi percée vers l'extérieur de nombreux petits orifices.

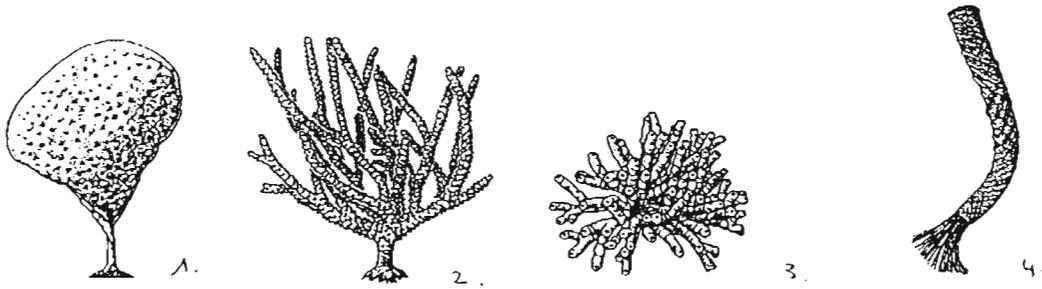


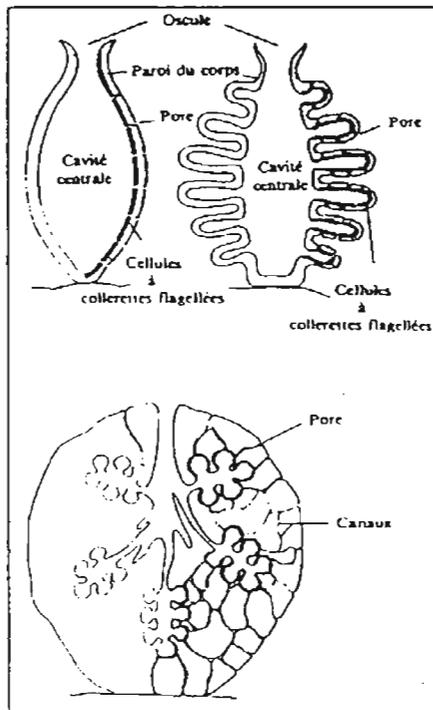
Figure 2 :Morphologie des spongiaires (HOOPER J.N.A., WIEDENMAYER F.)

« Porifera » – Zoological catalogue of Australia, vol.12, Wells Edition, 1994.)

1 et 2 : Demospongiae (1 : Microcionidae ; 2 : Hemiasterellidae)

3 : Calcareo (Leucosoleniidae)

4 : Hexactinellida (Euplectellidae)



Des cellules spécialisées à collerette et cils en fouet (flagelles) tapissent l'espace intérieur où elles attirent, à travers les pores de l'éponge, de l'eau qui apporte de l'oxygène et des particules nutritives avant de traverser, avec les déchets qu'elle emporte, une large ouverture (oscule) située en haut de l'urne.

Les éponges plus grandes ont besoin d'un système de filtration plus évolué pour se nourrir. C'est pourquoi beaucoup d'éponges disposent d'une paroi intérieure plissée qui augmente leur surface interne pendant que leurs flagelles forment des bourgeons sur la paroi de leur cavité.

Un plissement supplémentaire de cette paroi aboutit à la formation de cavités secondaires, ovales ou rondes, flagellées, et d'un système complexe de canaux conduisant l'eau.

Figure 3 : Schéma simplifié d'un spongiaire

(GEORGE D. et J. – « La vie marine. Encyclopédie illustrée des invertébrés marins » - Edition Maloine)

2.3 La reproduction

La majorité des éponges renferment des cellules sexuées aussi bien males que femelles (hermaphrodisme) dont les ovules et les spermatozoïdes sont produits à des époques différentes. La fécondation de l'œuf se déroule à l'intérieur de l'organisme géniteur pour donner naissance à une larve flagellée. Cette dernière s'échappe par l'un des oscules et mène une brève vie de nageuse avant de se fixer au fond et de se transformer en éponge.

2.4 Toutes sortes d'éponges

La nature chimique des spicules formant le squelette permet de distinguer trois classes d'éponges :

- Les éponges calcaires dont les spicules sont formés de calcaire, vivent surtout dans la zone littorale (genres *leucosolenia* et *sycon*).
- Les hexactinellides, aux spicules siliceux à trois axes, habitent essentiellement les fosses marines (genre *Euplectelle*, par exemple).
- Les demosponges qui constituent la classe la plus importante. Leur squelette est formé de spicules siliceux ou de spongine, parfois de l'association des deux. Elle regroupe les espèces du genre *suberites*, qui recouvrent certains crabes (les bernard-l'hermite), les éponges du genre *cliona*, de couleur jaune qui perforent les cailloux et les coquilles, et celles du genre *Spongilla*, inféodées aux eaux douces. Les éponges du genre *Hippospongia* et *Euspongia*, avec lesquelles on fait les éponges de toilette, appartiennent aussi à ce groupe. Elles sont élevées au large de la Tunisie et de la Syrie, par 30 ou 40 m de fond.

2.5 Identification

Il est très difficile d'identifier une éponge uniquement en se basant sur des critères physiques. Le type des spicules et leur disposition sur la paroi intérieure sont communément utilisés comme critères d'identification ainsi que les caractères de forme générale, de consistance, de couleur, de physiologie et de stade d'existence.



Figure 4 : Quelques formes de spicules de spongiaires.

(GEORGE D. et J. – « *La vie marine. Encyclopédie illustrée des invertébrés marins* » - Edition Maloine)

3 DEMARCHE GENERALE POUR LA RECHERCHE DE SUBSTANCES BIOACTIVES DANS LES INVERTEBRES MARINS

Cette démarche se compose de huit étapes principales :

1) La sélection des organismes :

Selon la recherche qui doit être effectuée, on sélectionne des organismes différents (plantes, champignons, invertébrés marins...).

On utilise alors différents critères de sélection :

- L'ethnopharmacologie : les recherches sont orientées grâce aux médecines traditionnelles qui utilisent en grande majorité des plantes terrestres.
- La chimiotaxonomie : très utilisée pour les plantes et les organismes marins, cette méthode se base sur une comparaison des principes actifs qui restent très proches dans une même famille taxonomique. L'inventaire chimique d'une espèce permet donc d'orienter les recherches vers des espèces proches.
- L'écologie chimique : Observation des interactions chimiques entre les êtres vivants ou entre les êtres vivants et le monde minéral.
- Un criblage systématique : recherches à partir d'études faites sur la faune et la flore de différentes régions.

2) La récolte et l'identification :

Les organismes marins sont récoltés soit par dragage soit par plongée autonome. Ils sont ensuite congelés pour être lyophilisés afin d'être stockés sans aucun risque de dégradation de l'organisme. Ils sont aussi répertoriés et identifiés par des laboratoires de taxonomie. Les éponges récoltées par le LSMN sont généralement envoyées à un laboratoire australien pour identification.

3) L'extraction² :

Pour travailler sur une éponge il faut tout d'abord extraire les substances de cette éponge. On réalise alors une extraction sur la poudre lyophilisée avec différents solvants de polarité différente. On obtient alors trois sortes d'extraits :

Extrait A : il résulte d'une extraction à l'eau. Cet extrait contient des produits très polaires comme les protéines, les sels et les peptides.

Extrait B : il résulte d'une extraction hydroalcoolique. Il contient des produits de polarité moyenne comme les acides aminés, les alcools, les phénols et les amines.

Extrait C : il résulte d'une première extraction hydroalcoolique puis d'une seconde extraction au chlorure de méthylène. Il contient les produits les moins polaires tels que les acides gras et les stérols.

² cf annexe 2

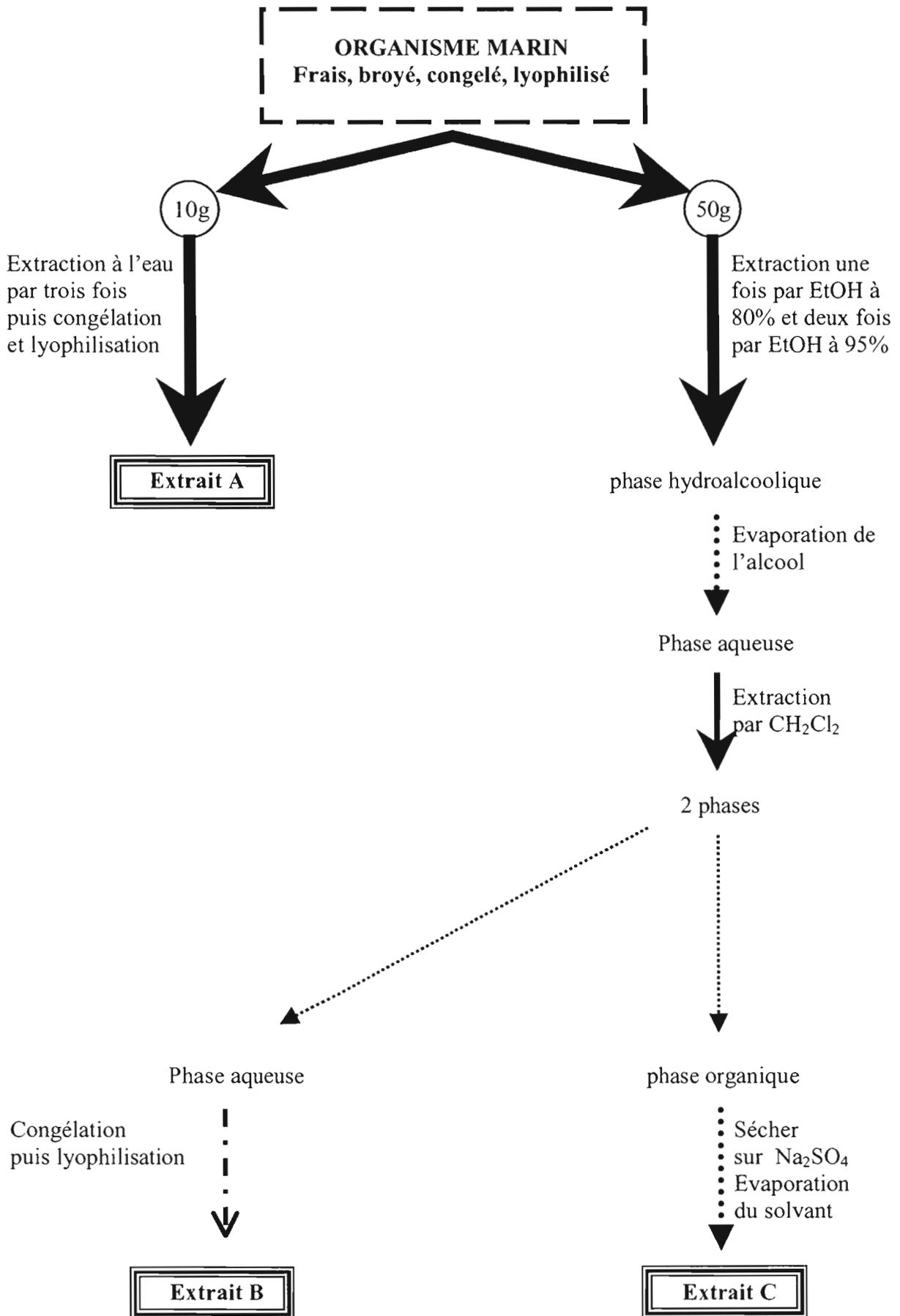


Schéma 1 : Schéma simplifié d'une extraction

4) Screening biologique :

Une fois les extraits A, B et C obtenus, plusieurs tests sont effectués sur ces extraits. Au LPSN, les tests suivants sont pratiqués :

- Tests de cytotoxicité sur cellules Kb
- Tests anti-dengue (maladie tropicale sévissant en Nouvelle Calédonie)
- Tests antibiotiques³
- Tests anti-paludisme⁴

Seuls les deux derniers seront abordés lors de mon stage.

5) Séparation ou fractionnement chimique :

Lorsqu'une ou plusieurs activités ont été mises en évidence dans un extrait donné, il faut alors réaliser une purification du ou des produits actifs grâce à des méthodes chromatographiques bioguidées.

6) Analyse structurale :

Une fois le produit actif isolé et purifié, il faut l'identifier grâce à différentes méthodes analytiques telles que la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), la spectroscopie UV/Visible, la spectroscopie InfraRouge, la spectrométrie de masse ou encore les rayons X. Le centre de N.C. ne possédant pas toutes ces technologies, les échantillons purifiés sont envoyés au centre de l'unité de recherche Toulouse.

7) Analyse pharmacologique :

Les substances ainsi purifiées et identifiées sont testées à différents niveaux pour conclure sur leur utilité pharmaceutique et pour déceler une quelconque toxicité. Le dernier stade de cette analyse sont les tests chez l'homme.

8) Exploitation et commercialisation :

Les substances une fois sélectionnées permettront l'élaboration d'un médicament.

L'ensemble de ces 8 étapes dure en moyenne une quinzaine d'année. Lors de mon stage je me suis arrêtée à l'étape 5.

³ cf annexe 3

⁴ cf annexe 4

4 Description des tests effectués

Après extraction, deux tests ont été effectués sur cette éponge : le test antibiotique et le test anti-paludique (test d'inhibition de l'hème).

4.1 Le test antibiotique

Ce test est effectué sur quatre souches principales :

- **Ca** : *Candida albicans*. C'est une levure qui provoque des infections pulmonaires (candidoses) et cutanées. Elle est impliquée surtout dans les infections généralisées chez les immunodéficients. Il s'agit d'une souche présente dans l'air et dans l'eau. Elle est cultivée sur milieu Sabouraud : Sab.
- **Ec** : *Escherichia coli*. C'est une bactérie qui intervient dans un grand nombre d'infections chez l'homme. Elle est capable de coloniser les muqueuses et de produire des toxines. Elle est présente naturellement dans nos intestins sans conséquence néfaste et devient pathogène dans nos urines. Elle se cultive en milieu Müller Hinton : MH.
- **Sa** : *Staphylococcus aureus*. C'est une bactérie qui a un pouvoir pathogène chez l'homme. Elle apparaît souvent lors d'infections à la suite d'opérations chirurgicales. Elle se cultive sur MH.
- **Va** : *Vibrio anguillarum*. C'est une bactérie non pathogène pour l'homme mais très répandue chez les animaux marins. Elle est cultivée sur milieu Marine Agar : Ma.

L'antibiogramme consiste à déposer 1mg d'extrait à tester sur un disque de cellulose de 6mm de diamètre. Ce disque est ensuite déposé dans une boîte de pétri dans laquelle se trouve le milieu correspondant à la souche choisie, ensemencée auparavant par la bactérie en question.

Si le produit est actif, il agit donc sur la bactérie en empêchant son développement sur le milieu. On observe alors une zone d'inhibition autour du disque où la bactérie ne s'est pas développée et le diamètre de cette zone nous permet ensuite d'évaluer l'activité du produit sur la bactérie.

Il peut parfois apparaître une partie pas totalement inhibée, où la croissance de la bactérie a seulement été ralentie, que l'on appelle zone bactériostatique.

Pour pouvoir évaluer l'activité des produits, on utilise des témoins dont nous connaissons l'activité sur les souches mises en jeu :

- La gentamycine pour Sa et Ec
- Le chloramphénicol pour Va
- Pas de témoin pour Ca

Antibiotiques	Concentration	Diamètre d'inhibition (mm)		
		Sa	Va	Ec
Gentamycine	10µg/disque	18	21-23	20-22
Chloramphénicol	30µg/disque	27-30	20-27	25-30

Tableau 1 : Diamètre d'inhibition des témoins dans les tests antibiotiques

4.2 Test de l'hème ou antipaludique

Ce test est basé sur les observations suivantes : pendant leur développement intracellulaire, les parasites responsables de la malaria (paludisme) dégradent une grande quantité d'hémoglobine dans une organelle spécialisée ; la vacuole digestive.

Pendant ce processus, la ferriprotoporphyrin IX (FPIX), un composé potentiellement toxique pour le parasite est produit par lui-même. La FPIX est ensuite détoxifiée par le parasite à travers la formation d'un polymère insoluble, l'hémozoïne, aussi appelé pigment malarial. Cette fonction spécifique fait de la vacuole digestive une cible de choix pour la chimioprophylaxie antimalariale, un médicament capable d'inhiber la polymérisation de la FPIX serait mortel pour le parasite.

Ce test est aussi basé sur le fait que, in vitro, l'hématine à un pH acide (3,8), conduit à la β -hématine, un composé présumé être identique à l'hémozoïne. Une molécule ou un extrait capable d'inhiber la polymérisation de l'hématine à ce pH pourrait éventuellement posséder des propriétés antiplasmodiques.

En résumé, lorsque l'on solubilise de l'hémine chloride dans l'eau à un pH compris entre 5 et 5,2 et que l'on incube à 37°C, il se produit une polymérisation qui se traduit par l'apparition d'un précipité. Lorsque que l'on introduit une molécule ou un extrait dans une solution d'hémine chloride, la polymérisation peut être inhibée et la formation du précipité peut être réduite. Plus elle est réduite et donc plus le composé est actif. On compare l'activité du composé à celle de la chloroquine⁵, substance active sur le paludisme.

4.3 Les différentes techniques de chromatographie ⁽⁵⁾

4.3.1 Principe

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée sur un support) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans l'extrait étudié.

Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée en fin de séparation, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

⁵ cf annexe 5

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupe d'atomes formant des sites particuliers.

Les différents types de chromatographie privilégient généralement l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

4.3.2 Chromatographie en phase liquide

La phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

- Les chromatographies de PARTAGE :

- La chromatographie de partage :

C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. Elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

- La chromatographie d'exclusion :

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration, perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

- Les chromatographies d'ADSORPTION :

- La chromatographie d'adsorption en phase normale :

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

- La chromatographie d'adsorption en phase inverse :

C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

- La chromatographie sur échangeurs d'ions :

La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

- La chromatographie d'affinité :

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

4.3.3 Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz vecteur. On distingue dans ce cas :

- La chromatographie gaz-liquide :

C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.

➤ La chromatographie gaz-solide :

C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

Lors de mon stage, j'ai surtout utilisé la chromatographie sur colonne et sur couche mince (CCM) qui sont des chromatographies de partage et la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

➔ La HPLC⁶:

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile qui sera appelé solvant d'éluion (solvant ou mélange de solvants).

Celui ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges.

La HPLC classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté / phase mobile / phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence.

On peut également y associer deux types de chromatographie liquide : la chromatographie ionique et la chromatographie d'exclusion.

Quand la CPG n'est pas applicable à des mélanges organiques complexes, en raison de leur masse moléculaire ou de leur polarité trop importante, la HPLC permet de réaliser de nombreuses identifications ou dosages sans modification de l'échantillon initial.

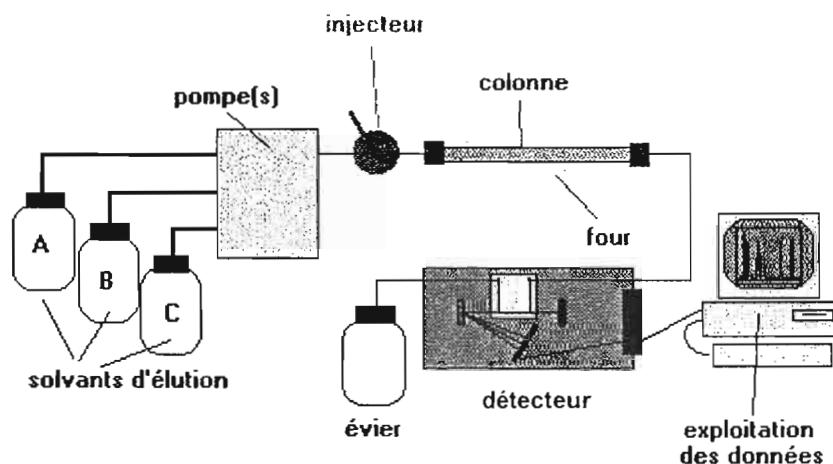


Figure 5 : Système classique de HPLC avec détecteur à barrettes de diode

⁶ cf annexe 9

5 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

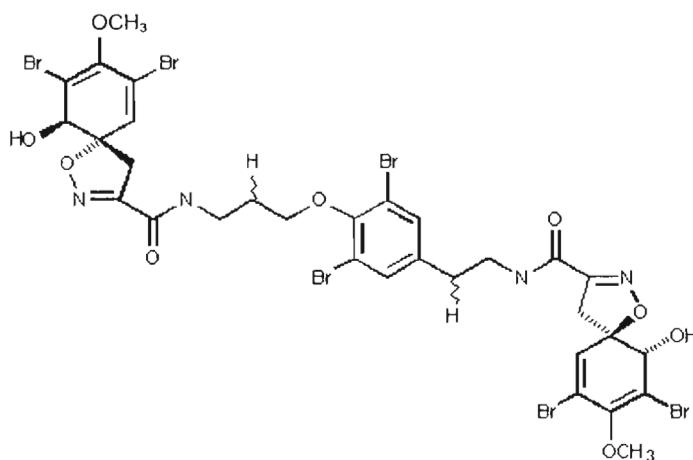
L'éponge R 1801 sur laquelle j'ai travaillé est actuellement répertoriée de genre *Pseudoceratina* mais n'a pas encore de nom. Les recherches bibliographiques portant sur les éponges du même genre ont montré l'existence de travaux sur les espèces suivantes : *Pseudoceratina crassa*, *durissima*, *purpurea*, *verrucosa* et sp.

Les différentes études menées ont abouti à la découverte de dérivés bromés de la tyrosine et à des alcaloïdes. La plupart des ces molécules montrent une activité antibiotique.

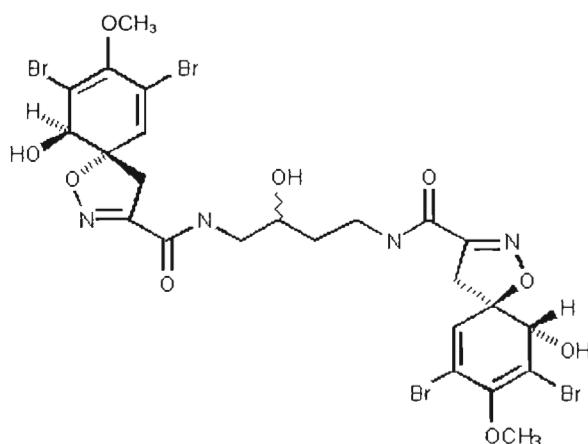
Parmi ces molécules on peut citer :

Isolées de *Pseudoceratina durissima*

☞ l'aerotherionine de formule brute $C_{31}H_{30}Br_6N_4O_9$:

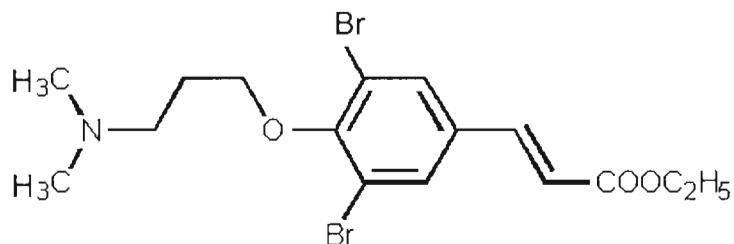


☞ la fistularin de formule brute $C_{24}H_{26}Br_4N_4O_9$:

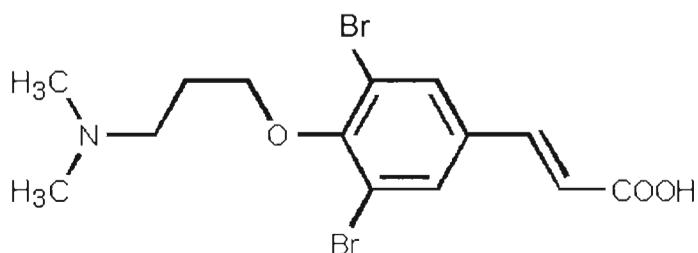


Isolées de *Pseudoceratina crassa*

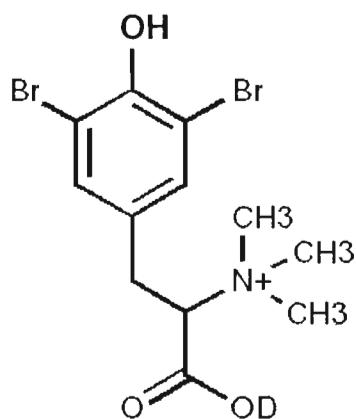
☞ le cinnamate de formule brute $C_{16}H_{21}Br_2NO_3$:



☞ le cinnamate de formule brute $C_{14}H_{17}Br_2NO_3$:

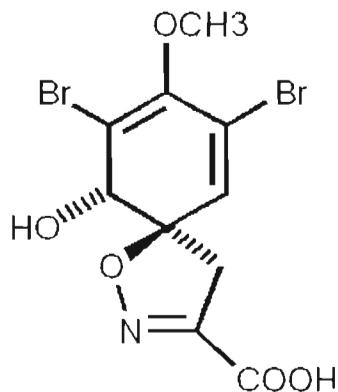


☞ Une bromo-tyrosine de formule brute $C_{12}H_{16}BrNO_3$:



Isolée de *Pseudoceratina* sp

☞ Une bromo-tyrosine de formule brute $C_{10}H_9Br_2NO_5$:



6 ETUDE D'UNE EPONGE DU GENRE *PSEUDOCERATINA*

Cette éponge a été récoltée le 24 juillet 1999 à la station 622 sous le code R 1801 entre 10 et 30 mètres de profondeur. Cette station se situe dans l'archipel des Torres au nord du Vanuatu et à l'ouest de l'île Noh.

Elle appartient à l'ordre des *Verongida*, famille *demosponge*. Elle a une forme de massue ou casse tête, un pied en forme de tige et parfois une ex-croissance filamenteuse.

Sa couleur est gris rosée à l'extérieur et jaune à l'intérieur. Elle est souple, molle mais consistante et s'oxyde très vite en surface.

6.1 Etudes préliminaires

Les extraits 1801 A, B et C dits "anciens", car résultants d'une extraction ultérieure, ont donc été testés sur trois souches de bactéries et les résultats obtenus sont les suivants :

Extraits	Concentration	Diamètre d'inhibition (mm)		
		Sa	Va	Ec
R 1801 A	1mg/disque	/	/	16
R 1801 B	1mg/disque	12	20	13
R 1801 C	1mg/disque	15	29,5	15,5

Tableau 2 : Résultats des tests antibiotiques préliminaires pour R 1801 A, B, et C

L'extrait C étant actif sur les trois souches c'est donc celui-là que j'étudierai par la suite, uniquement sur Sa et Ec car Va n'est pas pathogène chez l'homme.

Parallèlement aux tests antibiotiques, j'ai étudié l'activité antipaludique de cet extrait.

Entre temps, une nouvelle extraction sur 150g de poudre lyophilisée a été réalisée afin d'obtenir davantage d'extrait C pour l'étude. Lors de la manipulation, un précipité s'est formé lors de l'extraction au chlorure de méthylène. Ce précipité a été récupéré à part et l'on a obtenu donc 2 extraits C :

- Extrait C1 qui est la poudre orange récupérée dans la phase organique (7,965 g)
- Extrait C2 qui correspond au précipité récupéré de couleur noire (4,858 g)

Deux chromatographies sur couche mince⁷ sont réalisées pour ces deux extraits afin de vérifier qu'ils ne contiennent pas les même produits.

⁷ cf annexe 6

CCM des produits C1 et C2⁸ :

Support : plaques de silice activée phase normale de référence Si 60 F 254

Solvants d'élution :

☞ CH₂Cl₂ pur

☞ CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5

Révélation : UV à 254nm et 366nm puis vanilline sulfurique et chauffage

Ces CCM démontrent en effet que ces deux extraits contiennent des produits probablement identiques mais aussi des produits différents.

Les tests antibiotiques et Hème sont donc effectués sur ces 2 nouvelles fractions pour confirmer dans un premier temps les résultats obtenus antérieurement, mais aussi pour localiser le produit actif qui peut se trouver aussi bien dans C1 que dans C2. Précisons que le test de l'hème n'a jamais été concluant sur l'extrait 1801 C, les résultats obtenus n'étant pas reproductibles. Les raisons sont expliquées page suivante.

Résultats du test antibiotique : (1mg/disque)

Extraits	Diamètre d'inhibition (mm)	
	Sa	Ec
R 1801 C ancien	23	17
R 1801 C1	19	13
R 1801 C2	11	9
Témoin	33	30

Tableau 3 : Résultats des nouveaux tests antibiotiques préliminaires sur Sa et Ec

L'extrait C2 ne paraît pas être actif sur ces deux souches alors que le test confirme l'activité de C1 sur Sa et Ec.

Un premier antibiogramme⁹ est réalisé pour localiser les composés actifs.

Antibiogramme de C1¹⁰ :

Support : Si 60 F 254 aluminium

Solvants d'élution :

☞ CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5

Souches de bactérie : Sa et Ec

Les mêmes composés semblent être actifs sur Sa et Ec néanmoins on constate que sur Sa la zone d'inhibition s'étend un peu plus vers le bas.

Une révélation au réactif de Dragendorff permet de dire qu'il n'y a pas d'alcaloïdes dans cet extrait.

Quatre autres antibiogrammes de C1 et C2 sont ensuite réalisés uniquement sur Sa pour lequel C1 présentait la plus grande activité.

⁸ cf annexe 10

⁹ cf annexe 7

¹⁰ cf annexe 11

Antibiogrammes de C1 et C2¹¹ :

Support : Si 60 F 254

Solvants d'éluion :

☞ CH₂Cl₂ / MeOH 90 : 10

☞ CH₂Cl₂ / MeOH 80 : 20

Souche de bactérie : Sa

Les résultats sur Sa permettent de visualiser les composés actifs sur C1 et d'affirmer que C2 ne contient pas ces substances.

Résultats du test hème :

Test antérieur sur l'extrait C ancien : 76,5% et 33,4%

Test du 19 avril 2002 sur l'extrait C ancien : 23,9%

Test du 23 avril 2002 sur l'extrait C ancien : 31,4%

Test du 26 avril 2002 sur l'extrait C1 : 46%

Test du 26 avril 2002 sur l'extrait C2 : 76%

Ce test ne nous permet pas de conclure quant à une possible activité de l'extrait C, néanmoins il laisse apparaître que l'extrait C2 contient plus de composé actif antipaludique que C1.

Ce test est depuis peu réalisé au LPSN et nous avons rencontré quelques problèmes notamment dans la reproductibilité des résultats.

En effet, lors de la manipulation, il y a retournement de la plaque à la main afin de retirer le solvant et une partie des précipités formés peut quelquefois être vidée avec le solvant.

Plusieurs précipités sont susceptibles de se former : celui provenant de la polymérisation du réactif et ceux de l'extrait lui-même.

Le lavage au DMSO est aussi une étape très importante pour éliminer toute trace d'un autre précipité qui pourrait éventuellement absorber à 405nm, et ce lavage n'est pas toujours satisfaisant (colorations différentes dans des puits contenant le même extrait).

Enfin, le passage en milieu basique à la fin de la manipulation doit permettre de dissoudre les précipités formés afin de pouvoir réaliser la lecture or ce n'est pas toujours le cas. De ce fait la lecture des plaques peut devenir aléatoire et les résultats incertains.

La publication décrivant ce test précisait bien qu'il fallait utiliser un tampon à pH 4,5 afin d'obtenir un pH final de 5,2, or notre pH final après vérification était de 5,9 car le DMSO agit sur le pH. Il nous a donc fallu ramener le pH de la solution tampon à 3,8 pour obtenir le bon pH final, pH nécessaire pour la polymérisation. Cette rectification de pH nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats et une meilleure dissolution des précipités dans la soude.

L'étude de l'action antibiotique s'effectuera sur R 1801 C1 dans un premier temps, puis l'étude de l'action antipaludique s'effectuera sur R 1801 C2 dans un second temps.

¹¹ cf annexe 12

6.2 Etude de l'extrait R 1801 C1

6.2.1 Fractionnement chimique¹²

Une colonne est réalisée avec 20g de Silice C60 dans le CH₂Cl₂. On introduit sur la colonne 1g d'extrait C1 dissout dans le CH₂Cl₂. On obtient 12 fractions présentées dans le tableau suivant avec les résultats des tests antibiotiques et antipaludiques :

Résultats du fractionnement de l'extrait C1 :

Les valeurs des témoins ont été obtenues avec la gentamycine.

On récupère au total 777mg d'extrait pour une masse initiale de 1g.

Le rendement de cette séparation est donc de 78%.

La masse perdue est probablement restée accrochée sur la silice, malgré une dernière élution par le méthanol pur.

N°	couleur	Masse (mg)	Solvant	Heme (%)	Sur Sa (mm) + témoin	Activité sur Sa (%)	Sur Ec (mm) + témoin	Activité sur Ec (%)
f1	Jaune	9	CH ₂ Cl ₂ pur	44.97	8 31	25.8	6 31	0
f2	Orange	7		38.62	7 31	22.6	6 31	0
f3	Jaune	12	CH ₂ Cl ₂ +1% MeOH	36.25	7 31	22.6	6 31	0
f4		84		31.30	7 31	22.6	6 31	0
f5	Orange	282	CH ₂ Cl ₂ +2% MeOH	-48.70	15 29	51.72	11 29	37.93
f6	Blanc/jaune	190	CH ₂ Cl ₂ +5% MeOH	-43.70	19 29	65.52	15 29	51.72
f7		17	CH ₂ Cl ₂ +8% MeOH	83.46	6 29	0	6 29	0
f8		7	CH ₂ Cl ₂ +10% MeOH	63.58	6 29	0	6 29	0
f9		13		76.84	10 31	32.3	8 29	27.6
f10		30	CH ₂ Cl ₂ +20% MeOH	67.90	7 31	22.6	6 29	0
f11	Blanc/gris	27		7.96	6 31	0	6 29	0
f12	Jaune clair	89	MeOH pur	88.87	6 31	0	6 29	0

Tableau 4 : Résultats du fractionnement de R 1801 C1

CCM des 10 fractions¹³ :

Les CCM des fractions 11 et 12 n'ont pas été faites en raison de leur trop grande polarité.

Support : Si 60 F 254

Solvant d'élution :

- ☛ CH₂Cl₂ pur pour 1, 2, 3, 4, 5
- ☛ CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5 pour 5, 6, 7, 8, 9
- ☛ CH₂Cl₂ / MeOH 90 : 10 pour 6, 7, 8, 9, 10

Révélation : UV à 254 et 366 nm puis vanilline sulfurique et chauffage

¹² cf annexe 8

¹³ cf annexe 13

La séparation des produits s'est normalement déroulée. On observe bien les produits les moins polaires sortir en premier.

Les deux fractions 5 et 6 ont une activité sur Sa et Ec. D'après la CCM, les fractions 5 et 6 contiennent plusieurs produits dont un produit majoritaire dans la fraction 6.

Pour connaître la composition complète des ces fractions, une analyse HPLC est réalisée.

Pour toutes les analyses HPLC réalisées par la suite on utilise trois gradients différents qui sont les suivants :

TEMPS (MIN)	% EAU	% METHANOL
0,0	40,0	60,0
20,0	25,0	75,0
25,0	0,0	100,0
30,0	40,0	60,0
31,0	40,0	60,0

Tableau 5 : Gradient n°1

TEMPS (MIN)	% EAU	% METHANOL
0,0	50,0	50,0
20,0	35,0	65,0
25,0	0,0	100,0
30,0	50,0	50,0
31,0	50,0	50,0

Tableau 6 : Gradient n°2

TEMPS (MIN)	% EAU	% METHANOL
0,0	60,0	40,0
20,0	40,0	60,0
25,0	20,0	80,0
30,0	60,0	40,0
31,0	60,0	40,0

Tableau 7 : Gradient n°3

En phase inverse, c'est à dire lorsque la phase fixe est apolaire, on applique des gradients de polarité décroissante afin d'entraîner tout d'abord les produits polaires puis ensuite les produits apolaires.

On utilise trois gradients différents afin de mieux séparer certains pics lorsque les pics correspondant aux différents composés sortent trop rapidement et de manière trop rapprochée. On augmente la polarité du mélange de départ en mettant plus d'eau afin de décaler la sortie des premiers produits et on modifie le gradient afin d'étaler la sortie des pics trop rapprochés.

HPLC analytique sur les fractions 5 et 6 :

Matériel : colonne micro bondapack C18 (phase inverse) dimensions = {4,6 * 250mm}

Solvants d'éluion : gradient n°1

Durée du gradient : 30 min

Observations :

- La fraction 5 contient 3 pics majoritaires.
 - Le premier pic a un temps de rétention de 2,281min. Il n'est pas symétrique, on peut donc supposer qu'il contient plusieurs produits. Maxima d'absorption à 258,4 et 317,0nm.
 - Juste après on peut observer 2 petites bosses qui pourraient correspondre à des produits minoritaires.
 - Le deuxième pic a un temps de rétention de 12,260min, présente un maximum d'absorption de 281,1nm et semble assez symétrique.
 - Le troisième pic a un temps de rétention de 16,663min, présente un maximum d'absorption à 281,1nm et pourrait appartenir à la même famille de composé que le pic n°2.
 - Les pics sont suffisamment espacés entre eux pour envisager une bonne séparation en HPLC semi-préparative.
-
- La fraction 6 contient 2 pics majoritaires.
 - Le premier pic a un temps de rétention de 4,190min et ne paraît pas être symétrique. Il présente deux maxima d'absorption à 259,5 et à 301,0nm.
 - Le second pic a un temps de rétention de 9,979min. Il paraît être bien symétrique. Il présente un maximum d'absorption à 228,9nm.
 - On observe des petites bosses aux alentours de 6-7mn et 13mn qui pourraient correspondre à des produits en quantité moindre.
 - Les pics sont là aussi suffisamment espacés pour espérer une bonne séparation.

6.2.2 Purification

Purification de la fraction 6¹⁴ = HPLC semi-préparative :

Matériel : colonne micro bondapack C18 semi-préparative dimensions = {7,8 * 300mm}

Solvants d'éluion : gradient n°1

Masse injectée : 3 à 4 mg

Observations :

En injectant une plus grande quantité de la fraction 6 on note la présence de plusieurs produits minoritaires. On collecte donc 6 fractions (f6₁, f6₂...) qui devraient contenir des produits purs.

CCM des 6 fractions f6₁, f6₂, f6₃, f6₄, f6₅, f6₆ + la fraction 6 pour témoin¹⁵ :

Support : Si 60 F 254

Révélation : UV + vanilline sulfurique

Solvant d'éluion :

☞ CH₂Cl₂ / MeOH 85 : 15

¹⁴ cf annexe 15

¹⁵ cf annexe 14

La révélation de la plaque nous indique que les fractions ne sont pas pures. Seule la fraction f6₄ pourrait ne contenir qu'un seul produit. Une analyse par HPLC est réalisée sur toutes les fractions pour confirmer les résultats de la CCM. Seule la fraction f6₄¹⁶ contient un composé pur. Les autres fractions collectées ne semblent pas être stables ou semblent s'être dégradées dans le temps.

6.2.3 Tests biologiques sur les fractions purifiées

Les tests antibiotiques sont réalisés uniquement sur souche Sa en raison des faibles quantités récoltées.

Résultats des tests antibiotiques réalisés :

extrait	Masse récupérée (mg)	Concentration (mg/disque)	Diamètre d'inhibition sur Sa (mm)
Témoin	/	10µg/disque	30
f6 ₁	11	1mg/disque	26
f6 ₂	0,2	/	/
f6 ₃	2,5	1mg/disque	0
f6 ₄	28,5	1mg/disque	0
f6 ₅	0,9	0,9mg/disque	0
f6 ₆	1,3	1mg/disque	0

Tableau 8 : Résultats de la purification de la fraction f6 et des tests antibiotiques

Seule la fraction f6₁ est active. Une analyse HPLC¹⁷ nous révèle que cette fraction présente deux pics bien distincts. La comparaison des chromatogrammes montre la présence de pics présentant un temps de rétention et un spectre UV comparable dans f6 et dans f6₁.

Fractions	Temps de rétention (min)	Maxima d'absorption (nm)
f6	4,22	218,3 / 259,5 / 299,8
	9,47	248,9
f6 ₁	4,05	224,2 / 257,1 / 299,8
	9,91	223,0
f6 ₄	9,69	219,5

Tableau 9 : Résultats de l'analyse en HPLC de f6, f6₁ et f6₄

On travaille ici avec le gradient n°1.

Le chromatogramme de f6 contient deux pics majoritaires.

L'un se retrouve dans la fraction f6₁ (temps de rétention d'environ 4 min et spectre UV avec trois maxima à 220 / 260 / 299nm).

L'autre est présent dans la fraction f6₄ qui n'est pas active sur Sa. Les maxima d'absorption ne sont pas identiques mais les temps de rétention concordent et les pics sont très semblables.

Le produit qui a un temps de rétention d'environ 10min n'est donc pas responsable de l'activité antibiotique.

C'est donc probablement celui apparaissant aux environs de 4 min qui est le composé actif.

¹⁶ cf annexe 17

¹⁷ cf annexe 16

6.2.4 Conclusion sur l'étude de l'extrait C1

L'étude de l'extrait R 1801 C1 nous a permis de mettre en évidence l'activité antibiotique d'un produit contenu dans cet extrait. Ce produit n'a pu être purifié, cependant tout laisse supposer qu'il a un temps de rétention d'environ 4min dans les conditions de gradient choisies et que son spectre UV présente trois maxima d'absorption aux alentours de 220, 260 et 300 nm.

6.3 Etude de l'extrait R 1801 C2

6.3.1 Fractionnement chimique

Une colonne (diamètre de 35mm) est réalisée avec 100g de Silice C60 dans le CH₂Cl₂. On introduit sur la colonne 4,8g d'extrait C2 sous forme de poudre (extrait dissous dans le méthanol + silice. Evaporation du solvant. On obtient une poudre de silice imprégnée). On obtient 24 fractions présentées dans le tableau suivant avec les résultats obtenus sur le test antipaludique :

N°	couleur	Masse (mg)	Solvant	Hème (%)
f1	Jaune clair	22	CH ₂ Cl ₂ pur	43,27
f2	Orange clair	48		37,34
f3	Transparent	17	CH ₂ Cl ₂ + 1% MeOH	/
f4	Jaune	138	CH ₂ Cl ₂ + 2% MeOH	14,82
f5	Transparent	326		-27,57
f6		48	CH ₂ Cl ₂ + 3% MeOH	/
f7		83	CH ₂ Cl ₂ + 5% MeOH	-38,66
f8	Blanc cassé	1144	CH ₂ Cl ₂ + 7% MeOH	-26,25
f9	Blanc jaune	532		-5,22
f10	Jaune clair	53	CH ₂ Cl ₂ + 8% MeOH	60,66
f11		442	CH ₂ Cl ₂ + 10% MeOH	69,91
f12	Orange clair	155	CH ₂ Cl ₂ + 11% MeOH	79,91
f13		49	CH ₂ Cl ₂ + 13% MeOH	80,39
f14	Jaune	69	CH ₂ Cl ₂ + 15% MeOH	59,70
f15		43	CH ₂ Cl ₂ + 18% MeOH	64,44
f16		131	CH ₂ Cl ₂ + 20% MeOH	68,73
f17	Orange	72	CH ₂ Cl ₂ + 50% MeOH	64,49
f18	Vert	84	MeOH pur	72,30
f19		111		51,89
f20		27		67,97
f21	Vert clair	38	MeOH + 10% H ₂ O	74,47
f22	Vert	65	H ₂ O	68,75
f23		26		46,16
f24		80		31,01

Tableau 10 : Résultats du fractionnement de R 1801 C2

On récupère au total 3,8 g de fractions pour une masse de départ de 4,8g. Le rendement de ce fractionnement est donc de 79 %.

Le test n'a pas été réalisé sur les fractions 3 et 6 car les prélèvements se sont révélés trop difficiles.

CCM des fractions 1 à 12¹⁸ :

Les CCM des fractions 13 à 24 n'ont pas été réalisées en raison de leur forte polarité.

Support : Si 60 F 254

Solvant d'élution :

☛ CH₂Cl₂ / MeOH 85 : 15

Révélation : UV + vanilline sulfurique

Discussion des résultats :

Les fractions 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22 présentent une activité antipaludique. Ils se pourrait que plusieurs de ces fractions contiennent des produits identiques. Une HPLC de ces produits est donc réalisée afin de comparer leur composition.

De plus on observe que certaines fractions (5, 7, 8, 9) sont négatives au test antipaludique comme l'étaient les fractions actives sur les bactéries Sa et Ec lors de l'étude de la fraction C1.

Bien que la fraction C2 se soit révélée négative au test antibiotique, une HPLC de la fraction 9 est réalisée afin de vérifier qu'elle ne contient pas les mêmes produits que ceux présents dans les fractions C1 f5 et f6.

HPLC analytique de la fraction 9 :

Matériel : colonne micro bondapack C18 dimensions = {4,6 * 250mm}

Solvants d'élution : gradient n°1

Durée du gradient : 30 min

Résultats et comparaison avec les fractions C1 f5 et f6 :

Fractions	Temps de rétention (min)	Maxima d'absorption (nm)
C1 f5	2,27	258,4 / 317,0
	12,25	281,1
	16,67	281,1
C1 f6	4,19	259,5 / 301,0
	9,99	228,9
C2 f9	4,20	213,6 / 302,2
	8,98	251,2
	14,92	283,2
	28,70	/

Tableau 11 : Résultats des analyses HPLC des fractions C1 f5 et f6 C2 f9

¹⁸ cf annexe 18

Il n'est pas possible de conclure que les fractions C1 f5, f6 et C2 f9 contiennent des produits identiques, cependant on peut observer qu'elles contiennent des produits de la même famille avec des maxima d'absorption proche des 281nm mais des temps de rétention légèrement différents.

HPLC analytique des fractions 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 :

Matériel : colonne micro bondapack C18 dimensions = {4,6 * 250mm}

Solvants d'élution : gradient eau / méthanol

Durée du gradient : 30 min

Résultats : Fractions	Temps de rétention (min)	Maxima d'absorption (nm)
f10	13,18	218,3
f11	3,78	
	5,25	231,2 / 289,1
	7,18	302,2 / 384
f12	11,98	220,6 / 362,1
	3,22	
	4,66	232,4 / 365,1
	4,91	247,7 / 287,9 / 363,9
f13	9,41	
	4,56	258,3
f14	6,61	245,3 / 289,1
	4,88	
	5,11	
	6,03	285,6
	6,70	234,7 / 363,9
f15	7,15	248,9 / 289,1 / 367,2
	6,96	365,1
f16	7,20	
	8,41	
f17	8,71	217,1 / 289,1 / 392,0
	6,25	232,4
f18	6,83	
	8,73	285,6
	4,08	284,4
	4,63	
f21	6,63	232,4 / 286,7 / 365,1
	6,28	
	6,83	334,3
	8,82	228,9 / 286,7 / 367,5
f22	10,22	274,9
	5,36	
	5,98	
	6,59	283,2 / 358,4
	8,53	
	9,08	254,8 / 3

Tableau 12 : Résultats de l'analyse HPLC des fractions 10 à 18 et 21, 22

Discussion des résultats :

L'analyse par HPLC des ces fractions ne donne pas des pics clairs et symétriques. On obtient des massifs correspondant à plusieurs produits et certains produits doivent se retrouver d'une fraction à l'autre.

La fraction 12¹⁹ présente 2 produits majoritaires relativement bien séparés et la masse recueillie est suffisante pour réaliser une purification sur cette fraction. C'est donc la fraction 12 qui sera passée en HPLC semi-préparative afin de collecter ces 2 produits.

6.3.2 Purification**Purification de la fraction 12 = HPLC semi-préparative :**

Matériel : colonne micro bondapack C18 semi-préparative dimensions = {7,8 * 300mm}

Solvants d'élution : gradient n°2

Masse injectée : 2 à 3 mg par injection

Nombre d'injections : 8

La fraction 12 présente 2 pics majoritaires que l'on appellera f12₁ et f12₂. Au début de la purification on recueille bien deux pics distincts mais au fur et à mesure les pics ont tendance à se rapprocher et la récolte des pics devient impossible.

La réinjection des deux pics recueillis nous montrent en effet que les fractions ne sont pas pures.

La fraction f12₁ sera quand même testée sur le test de l'hème mais la fraction f12₂ n'a pas pu être testé en raison de la faible quantité recueillie.

fractions	Masse recueillie (mg)	% d'inhibition
f12 ₁	14mg	36,9
f12 ₂	1,4	/

Tableau 13 : Résultats de la purification de la fraction f12 et du test antipaludique

Le test donne un résultat négatif pour la fraction f12₁. Ce résultat nous amène à différentes hypothèses :

Le produit actif se trouve dans la fraction f12₂.

Le produit actif s'est dégradé au cours du temps et a perdu son activité.

Le produit actif n'a pas été récolté.

6.3.3 Conclusion sur l'étude de l'extrait C2

L'hypothèse que le produit actif se trouve dans la fraction f12₂ serait la meilleure car ce composé est présent en très faible quantité dans l'éponge ce qui signifierait que même en infime quantité le produit demeure actif.

¹⁹ cf annexe 19

Si le produit se dégrade, il faudrait alors recommencer la purification en prenant diverses précautions afin d'éviter sa dégradation comme évaporer le solvant immédiatement après chaque élution et placer les ballons de récoltes dans la glace.

Cette étude n'est pas encore finie, la purification doit être reprise et terminée afin d'isoler le produit actif de manière à pouvoir envoyer un échantillon à l'UR « pharmacochimie des S.N. » de Toulouse.

La structure pourra alors être déterminée et on saura si le produit obtenu est un produit nouveau ou déjà connu. Dans tous les cas l'échantillon sera passé sur un autre test antipaludique plus fiable effectué sur le parasite.

7 CONCLUSION

L'étude de l'éponge du genre *Pseudoceratina* et référencée R 1801 a permis l'utilisation de différentes techniques de chimie et aussi de microbiologie afin de trouver et d'isoler au mieux des molécules bioactives.

En effet, après une extraction, plusieurs purifications sur colonne et HPLC et différents tests biologiques entre chaque étape, une substance très active sur la souche de bactérie Sa et une substance non active mais dont la structure pourrait se révéler nouvelle ont été isolées.

Une substance antipaludique a aussi été détectée mais n'a pu être isolée en raison de l'instabilité des produits recueillis en HPLC semi-préparative.

Les travaux commencés lors de ce stage seront continués afin de pouvoir mieux isoler les substances actives et les composés purs seront envoyés à l'UR « pharmacochimie des S.N. » de Toulouse pour déterminer leur structure.

BIBLIOGRAPHIE

Sites Internet et pages html

- (1) www.ird.fr
- (2) www.ird.nc
- (3) www.bleu-passion.fr
- (4) www.webencyclo.com
- (5) www.culture.fr
- (6) <http://asmt.louis.free.fr/ttt.html>
- (7) <http://myweb.worldnet.net/~ditjaste/faqmalfr.html>
- (8) <http://www.idrc.ca/books/reports/1996/01-08f.html>

Livres et publications

- (9) LAURENT D. ~ Substances naturelles marines bioactives en Nouvelle Calédonie, le bilan de 20 ans de recherche, IRD Centre de Nouméa, 1999.
- (10) LEVI C., LABOUTE P., BARGIBANT G., MENOUE JL. ~ Sponges of the New Caledonian Lagoon, éditions de l'ORSTOM, collection Faune tropicale N°XXX, 1991, Paris.
- (11) KASSUKLKE KE., FAULKNER DJ. ~ Two new dibromotyrosine derivatives from the Caribbean sponge *Pseudoceratina crassa*, Tetrahedron, 1991, **47**, 1809-1814.
- (12) COSTANTINO V., FATTORUSSO E., MANGONI A. ~ Isolation of five membered cyclitol glycolipids, casserides: unique glycerides from the sponge *Pseudoceratina Crassa*, J. Org. Chem., 1993, **58**, 186-191.
- (13) ALBRIZIO S., CIMINIELLO P., FATTORUSSO E., MAGNO S., PANSINI M. ~ Chemistry of Verongida Sponges.I.constituents of the Caribbean sponge *Pseudoceratina crassa*, Tetrahedron, 1994, **54**, 783-788.
- (14) CIMINIELLO P., FATTORUSSO E., MAGNO S., PANSINI M. ~ Chemistry of Verongida sponge .IV. Comparison of the secondary metabolite. Composition of several specimens of *Pseudoceratina crassa*, J. Nat. Prod., 1995, **58**, 689-696.
- (15) THIRIONET I., DALOZE D., BRAEKMAN JC. ~ 5-Bromoverongamine, a novel antifouling tyrosine alkaloïd from the sponge *Pseudoceratina sp*, Nat. Prod. Lett., 1998, **12**, 209-214.

- (16) KEMAN MR., CAMBIE RC., BERGQUIST PR. ~ Chemistry of sponges.VII. 11,19-dide oxyfistularin 3 and 11-hydroxyaerotionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*, J. Nat. Prod., 1990, **53**, 615-622.
- (17) TSUKAMOTO S., KATO H., HIROTA H., FUSETANI N. ~ Pseudoceratidine: a new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*, Tetrahedron, 1996, **37**, 1439-1440.
- (18) TSUKAMOTO S., KATO H., HIROTA H., FUSETANI N. ~ Ceratinamine: an unprecedented antifouling cyanoforamamide from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*, J. Org. Chem., 1996, **61**, 2936-2937.
- (19) TSUKAMOTO S., HIROTA H., FUSETANI N. ~ Ceratinamides A and B: an antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*, Tetrahedron, 1996, **52**, 8181-8186.
- (20) LACY C., SCHEUER PJ. ~ New moloka'iamine derivatives from an undescribed *Verongid* sponge, J. Nat. Prod., 2000, **63**, 119-121.
- (21) AIELLO A., FATTORUSSO E., MENNA M., PANSINI M. ~ Chemistry of *Verongida* sponges.V. Brominated metabolites from the Caribbean sponge *Pseudoceratina sp*, Biochem. Syst. Ecol., 1995, **23**, 377-381.
- (22) GAO H., KELLY M., HAMANN MT. ~ Bromotyrosine derived metabolites from the sponge *Aiolochoira crassa*, Tetrahedron, 1999, **55**, 9717-9726.
- (23) ROSS SA., NEETE JD., SCHINAZI RF., WIRTZ SS., THAMISH P., SCHEUER PJ., HAMANN MT. ~ Mololipids, a new series of anti-HIV-bromotyrosine derived compounds from a sponge of the order *Verongida*, J. Nat. Prod., 2000, **63**, 501-503.
- (24) BEN HARREF A., PALS DEBITUS C. ~ Bromo tyrosine alkaloïds from the sponge *Pseudoceratina verrucosa*, J. Nat. Prod., 1996, **59**, 177-180.

LISTE DES SCHEMAS, FIGURES ET TABLEAUX

Schéma 1 : Schéma simplifié d'une extraction.....	7
Schéma 2 : Cycle parasitaire chez le moustique et chez l'homme.....	II
Schéma 3 : Chromatographie sur couche mince.....	VIII
Schéma 4 : Chromatographie sur colonne.....	X
Figure 2 : Morphologie des spongiaires.....	4
Figure 3 : Schéma simplifié d'un spongiaire.....	4
Figure 4 : Quelques formes de spicules de spongiaires.....	5
Figure 5 : Système classique de HPLC avec détecteur à barrettes de diode.....	12
Figure 6 : Schéma d'une boucle d'injection.....	XI
Tableau 1 : Diamètre d'inhibition des témoins dans les tests antibiotiques.....	10
Tableau 2 : Résultats des tests antibiotiques préliminaires pour R 1801 A, B, et C.....	15
Tableau 3 : Résultats des nouveaux tests antibiotiques préliminaires sur Sa et Ec.....	16
Tableau 4 : Résultats du fractionnement de R 1801 C1.....	18
Tableau 5 : Gradient n°1.....	19
Tableau 6 : Gradient n°2.....	19
Tableau 7 : Gradient n°3.....	19
Tableau 8 : Résultats de la purification de la fraction f6 et des tests antibiotiques.....	21
Tableau 9 : Résultats de l'analyse en HPLC de f6, f6 ₁ et f6 ₄	21
Tableau 10 : Résultats du fractionnement de R 1801 C2.....	22
Tableau 11 : Résultats des analyses HPLC des fractions C1 f5 et f6 et C2 f8 et f9.....	23
Tableau 12 : Résultats de l'analyse HPLC des fractions 10 à 18 et 21, 22.....	24
Tableau 13 : Résultats de la purification de la fraction f12 et du test antipaludique.....	25

LISTE DES ABREVIATIONS

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

IFO : Institut Français d'Océanie

ORSTOM : Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre Mer

CFP : Communauté Française du Pacifique

VCAT : Volontaire Civile d'Aide Technique

UNC : Université de Nouvelle-Calédonie

LPSN : Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

SNOM : Substances Naturelles d'Origine Marine

SMIB : Substances Marines d'Intérêt Biologique

EtOH : éthanol

H₂O : eau

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

MeOH : méthanol

NaOH : soude

Na₂SO₄ : sulfate de sodium

Ca : *Candida albicans*

Ec : *Escherichia coli*

Sa : *Staphylococcus aureus*

Va : *Vibrio anguillarum*

MH : Müller Hinton

Sab : Sabouraud

Ma : Marine Agar

Gt : Gentamycine

SVF : Sérum de Veau Fœtal

DMSO : diméthylsulfoxyde

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)

UV : Ultra-Violet

DO : Densité Optique

FPIX : ferriprotoporphyrin IX

PH : Potentiel Hydrogène

CRSN : Centre de Recherches sur les Substances Naturelles

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Nom de l'éponge	Nom de la molécule	Formule brute	Masse molaire	UV	référence
-----------------	--------------------	---------------	---------------	----	-----------

Crassa	Cinnamate	$C_{16}H_{21}Br_2NO_3$	432,9889	230 / 282 (MeOH)	(11)
		$C_{14}H_{17}Br_2NO_3$	404,9576	223 / 267 (MeOH)	
	Crasserides	$C_{39}H_{76}O_8$	672,5540	/	(12)
		$C_{40}H_{78}O_8$	686,5696		
		$C_{41}H_{80}O_8$	700,5853		
		$C_{42}H_{82}O_8$	714,6009		
	/	$C_{29}H_{50}O$	414,3861	/	(13)
		$C_{12}H_{15}Br_2NO_3$	378,9420	287 (eau)	
		$C_{12}H_{15}Br_2NO_3$	378,9420	307 (eau / OH)	
		$C_{12}H_{15}Br_2NO_3$	378,9420	281 (eau / H)	
		$C_{13}H_{17}Br_2NO_3$	392,9576	277 (eau)	
		$C_{13}H_{18}BrNO_3$	315,0470	277 (eau)	
		$C_{12}H_{16}BrNO_3$	301,0314	287 (eau)	
		$C_{12}H_{16}BrNO_3$	301,0314	307 (eau / OH)	
		$C_{12}H_{16}BrNO_3$	301,0314	281 (eau / H)	
Crasserides	$C_{14}H_{15}BrN_4O_3$	366,0328	207 / 278 / 289 / 387 (MeOH)	(14)	
	C_9H_8BrNO	224,9790	277 / 220 (MeOH)		
	$C_{12}H_{15}NO_4$	237,1001	210 / 248 (MeOH / OH)		
Verongamine	$C_{15}H_{16}Br_2N_4O_3$	457,9590	208 (MeOH)	(15)	

Durissima	Aerothiomin	$C_{31}H_{30}Br_6N_4O_9$	1075,7116	224 / 257 / 284 (MeOH)	(16)
	fistularin	$C_{24}H_{26}Br_4N_4O_9$	829,8435	233 / 205 / 284 (MeOH)	

Rapport de stage

purpurea	pseudoceratidine	$C_{17}H_{21}Br_4N_5O_2$	642,8431	/	(17)
	ceratinamine	$C_{13}H_{16}Br_2N_3O_2$	403,9610	207 / 220 / 276 (EtOH)	(18)
	ceratinamide	$C_{22}H_{23}Br_4N_3O_2$	756,8271	207 / 218 / 255 (EtOH)	(19)
		$C_{36}H_{51}Br_4N_5O_7$	953,0462	207 / 219 / 255 (EtOH)	
	Moloka'iamine	$C_{14}H_{17}Br_2N_3O_2$	416,9688	285 / 278 (MeOH)	(20)
	Psammaphysin	$C_{17}H_{19}Br_2ClN_2O_3$	491,9452	209 / 310 (MeOH)	
	Wai'anaemine	$C_{17}H_{19}Br_2ClN_2O_3$	491,9452	209 / 309 (MeOH)	

Sp		$C_{10}H_9Br_2NO_5$	380,8848	224 / 285 (MeOH)	(21)
----	--	---------------------	----------	---------------------	------

aiolochroiacrassa	araplysin	$C_{22}H_{23}Br_4N_3O_7$	756,8271	208 / 284 (EtOH)	(22)
	hexadellin	$C_{25}H_{29}Br_4N_3O_7$	798,8741	207 / 284 (EtOH)	

Sp	Moloka'iamine	$C_{43}H_{76}Br_2N_2O_3$	826,4223	240 / 277 / 284 (MeOH)	(23)
		$C_{47}H_{80}Br_2N_2O_3$	878,4536	240 / 277 / 284 (MeOH)	
		$C_{43}H_{76}Br_2N_2O_3$	826,4223	240 / 277 / 284 (MeOH)	

Verrucosa		$C_{15}H_{18}Br_2N_5O_4$	489,9726	220 / 284 (MeOH)	(24)
		$C_{18}H_{27}Br_2N_5O_2$	503,0532	285 / 330 (MeOH)	
		$C_{27}H_{32}Br_4N_7O_6$	865,9149	220 / 228 (MeOH)	

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : LE PALUDISME	I
ANNEXE 2 : EXTRACTION : PROTOCOLE	IV
ANNEXE 3 : TEST ANTIBIOTIQUE : PROTOCOLE	V
ANNEXE 4 : TEST DE L'HEME : MODE OPÉRATOIRE.....	VI
ANNEXE 5 : LA CHLOROQUINE.....	VII
ANNEXE 6 : CCM : PROTOCOLE	VIII
ANNEXE 7 : AUTOBIOGRAMME : PROTOCOLE	IX
ANNEXE 8 : CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE : PROTOCOLE	X
ANNEXE 9 : HPLC : PROTOCOLE.....	XI
ANNEXE 10 : CCM 1.....	XII
ANNEXE 11 : CCM 2.....	XIII
ANNEXE 12 : CCM 3.....	XIV
ANNEXE 13 : CCM 4.....	XV
ANNEXE 14 : CCM 5.....	XVI
ANNEXE 15 : HPLC C1 FRACTION 6	XVII
ANNEXE 16 : HPLC C1 FRACTION 6 ₁	XVIII
ANNEXE 17 : HPLC C1 FRACTION 6 ₄	XIX
ANNEXE 18 : CCM 6.....	XX
ANNEXE 19 : HPLC C2 FRACTION 12.....	XXI

ANNEXE 1 : LE PALUDISME ⁽⁸⁾

Généralités

Le paludisme, nom utilisé en français (palus = marais) et la malaria (mauvais air) pour les Anglo-saxons sont la même maladie.

Il affecte de part le monde environ 300 millions de personnes et entraîne entre 1 et 1,5 millions de décès. Au départ étendu au monde entier, il est aujourd'hui confiné essentiellement en Afrique, Asie et Amérique Latine. Le problème de contrôle de la maladie dans ces pays est accentué par des structures de santé inadéquates et des conditions socio économiques déplorables.

La situation devient de plus en plus complexe avec l'augmentation des résistances aux médicaments utilisés pour combattre le parasite responsable de la maladie.

C'est en effet une maladie parasitaire affectant presque tous les vertébrés (homme, singes oiseaux...) causée par des protozoaires du genre *Plasmodium*.

4 espèces de plasmodium donnent la maladie sous ses diverses formes :

Plasmodium falciparum

Plasmodium vivax

Plasmodium ovale

Plasmodium malariae

Le *Plasmodium falciparum* est le plus répandu et le plus dangereux des quatre, sans traitement il peut conduire à la mort.

La transmission du protozoaire se fait par l'intermédiaire de la piqûre de la femelle d'un moustique du genre *anophèle*. Les mâles ne transmettent pas la maladie car ils ne se nourrissent que du suc des plantes. Les femelles ont besoin d'un repas sanguin pour leur ovulation. Il y a environ 380 espèces d'anophèles mais seulement une soixantaine sont capables de transmettre le parasite. L'anophèle est un moustique nocturne. C'est vers une heure du matin que sa piqûre est la plus dangereuse

Le cycle parasitaire

Le moustique transmet le parasite à l'homme lors de la prise d'un repas sanguin. Le parasite est alors sous la forme d'un sporozoïte.

Il circule dans le sang pour pénétrer dans le foie une heure après. Dans le foie le parasite se multiplie par division cellulaire pendant 10 à 15 jours. Cette phase va aussi permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme alors qu'il aura disparu du sang : cela explique les rechutes à longue échéance.

Quand ils se libèrent du foie, ils ont changé de forme et deviennent les mérozoïtes. Ceux ci circulent dans le sang et vont infecter les globules rouges. Ils se nourrissent de l'hémoglobine et se multiplient.

Puis ils se libèrent en faisant éclater les hématies. Ce sont ces éclatements qui sont à l'origine des accès de fièvre.

La destruction de ces cellules provoque une anémie et dans le cas du paludisme cérébral, la mort intervient à la suite d'une obstruction des vaisseaux sanguins du cerveau par les globules rouges infectés. Les mérozoïtes libérés vont parasiter d'autres globules rouges et le cycle asexué continu.

Après quelques cycles asexués apparaissent des parasites de forme spéciale, les gamétocytes qui restent dans le sang périphérique, ce sont des formes sexuées produites par le plasmodium.

Les parasites lors de cette phase ne survivent qu'une vingtaine de jours chez l'homme et ne peuvent survivre que chez le moustique donc si durant cette période une femelle anophèle pique une personne malade, elle absorbe des gamétocytes contenu dans le sang. Ceux-ci se transforment en quelques minutes en gamètes mâles et femelles. Ces gamètes se conjuguent pour donner un œuf mobile. C'est la phase de reproduction sexuée du parasite.

Cet œuf traverse la paroi intestinale de l'insecte et forme un oocyte qui se divise en plusieurs centaines de cellules.

L'oocyte éclate et libère des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l'anophèle.

Lorsque le moustique ira piquer une personne, les sporozoïtes seront introduit par la salive et le cycle continuera...

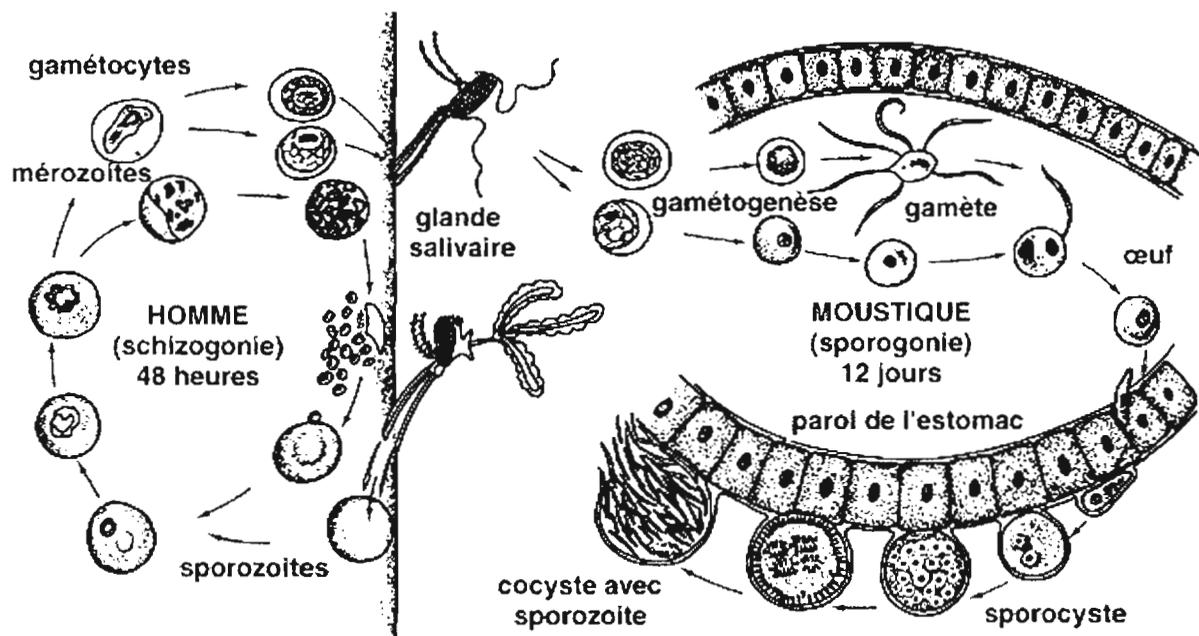


Schéma 2 : cycle parasitaire chez le moustique et chez l'homme

3 lignes de défense

la prévention
la prophylaxie
les traitements

la prévention

Le but est d'empêcher la contamination par le parasite (impaludation).

La prévention collective passe par l'assainissement des marais, la lutte contre les larves de moustique, les opérations de démoustication...

La prévention individuelle consiste à se protéger des piqûres de moustiques en appliquant un produit répulsif sur la peau, en dormant sous une moustiquaire...

La prophylaxie

Elle a pour but d'empêcher de faire des crises. Elle n'empêche pas l'impaludation ce qui explique pourquoi il est important de continuer son traitement 2 mois après être rentré d'une région tropicale.

Les traitements

Un diagnostic précoce et un traitement rapide sont des paramètres fondamentaux dans le contrôle de la maladie. Il existe de nombreux antipaludiques tels que la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, la chloroquine, l'amodiaquine, les sulfamides et sulfones, les antifoliniques... et des associations de substances.

ANNEXE 2 : EXTRACTION : PROTOCOLE

EXTRAIT A

- 1) Peser 10g d'éponge lyophilisée dans un bécher d'1 litre
- 2) Ajouter 100ml d'eau distillée et recouvrir le bécher de papier aluminium
- 3) Placer le bécher dans une bassine de glace
- 4) Agiter à l'aide d'un agitateur magnétique pendant ½ heure
- 5) Filtrer sur Büchner
- 6) Récupérer le gâteau et extraire par 2 fois 100ml d'eau
- 7) Les trois filtrats sont récupérés et placés dans un sac plastique pour être congelés
- 8) Une fois congelés, les extraits sont lyophilisés
- 9) La poudre obtenue constitue l'extrait A

EXTRAIT B ET C

- 1) Peser 50g d'éponge lyophilisée dans un bécher de 2 litres
- 2) Ajouter 200ml d'une solution d'éthanol à 80% soit 160ml d'éthanol pur et 40ml d'eau
- 3) Rajouter du solvant si l'éponge absorbe trop
- 4) Agiter 30 min à l'agitateur à air comprimé
- 5) Filtrer sur Büchner
- 6) Extraire encore 2 fois à l'éthanol pur
- 7) Les filtrats sont récupérés et l'éthanol est évaporé au rotavapor
- 8) La phase aqueuse restante est diluée dans 200ml d'eau et ensuite extraite 3 fois au chlorure de méthylène (CH_2Cl_2) dans une ampoule à décanter
- 9) La phase aqueuse est placée dans un sac plastique et congelée pour être ensuite lyophilisée
- 10) La poudre obtenue constitue l'extrait B
- 11) La phase organique est passée au rotavapor pour évaporer le solvant
- 12) Le produit obtenu constitue l'extrait C

ATTENTION

Lors de l'évaporation, le mélange eau/alcool a tendance à buller. Pour éviter des projections de produit dans le ballon de récupération du solvant, il faut être vigilant et faire rentrer un peu d'air quand les bulles se forment. Le mieux est de travailler dans un ballon plus grand en agitant rapidement.

L'extrait C est souvent sous la forme d'une glue difficile à récupérer au fond du ballon. Après avoir récupéré le maximum, on peut le diluer dans peu de CH_2Cl_2 et ainsi le transvaser dans un ballon plus petit ou un tube taré, après évaporation, on obtient le produit directement dans le tube.

ANNEXE 3 : TEST ANTIBIOTIQUE : PROTOCOLE

Précaution :

Gants + éthanol sur les gants
Flamber à la flamme du bec bunsen tous les instruments
Travailler sous la hotte à ventilation
Flamber la pince entre chaque dépôt de pastille

1ère partie

- 1) allumer le gaz
- 2) Flamber légèrement le tube et la pipette
- 3) Prélever quelques bactéries dans la boîte de pétri contenant la semence à l'aide de la pipette
- 4) Les introduire dans un tube contenant de l'eau distillée stérile et bien mélanger
- 5) Verser un peu de bouillon du tube dans une boîte de pétri contenant du milieu
- 6) Répartir le bouillon sur toute la surface puis enlever le surplus avec une pipette pasteur
- 7) Garder la boîte à l'envers sous la hotte pendant la préparation des pastilles

2ème partie

- 1) Mettre 3 à 4 mg d'extrait dans un tube à hémolyse et diluer afin d'obtenir une concentration de 1mg / pastille pour un dépôt de 20 μ l
- 2) Mettre 20 μ l de produit sur chaque pastille
- 3) Mettre les pastilles ainsi imprégnées 20 min à l'étuve pour évaporer le solvant
- 4) Prendre les pastilles et les déposer dans la boîte en mettant le témoin au centre
- 5) Etuve pendant 24h, boîte retournée pour éviter la condensation sur le couvercle
- 6) Nettoyer la paillasse à l'eau de javel
- 7) Mettre la paillasse sous UV pendant une dizaine de minutes

ANNEXE 4 : TEST DE L'HEME : MODE OPÉRATOIRE

Peser les extraits choisis dans des petits tubes à essais de façon à obtenir la concentration voulue et les diluer dans le solvant correspondant:

- Extrait A à diluer dans l'eau
- Extrait B à diluer dans l'éthanol
- Extrait C à diluer dans le DMSO

Mettre dans chaque puit (une plaque comporte 96 puits à fond plat):

- 50 µl d'une solution d'hémine chlorure dans le DMSO fraîchement préparée
- 100 µl d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 4,5)

Chaque échantillon est déposé dans trois puits pour vérifier la reproductibilité des résultats

- 1) Les trois premiers puits sont remplis avec 50µl de DMSO ce qui constitue le témoin
- 2) Les six suivants sont remplis avec 50µl d'une solution de chloroquine fraîchement préparée à deux concentrations différentes
- 3) Les autres puits sont remplis avec 50µl des solutions à tester
- 4) La plaque munie de son couvercle est placée en incubation à l'étuve à 37°C pendant 24h
- 5) Une fois l'incubation terminée, la plaque est centrifugée pendant 7min à 2500 tours/min
- 6) Le surnageant est vidé puis on introduit dans chaque puits 150µl de DMSO pour laver les précipités
- 7) On centrifuge encore aux mêmes conditions
- 8) On vide le surnageant et on introduit dans chaque puits 150µl d'une solution de soude à 0,1mol/l
- 9) Les résultats s'obtiennent par lecture de la densité optique (DO) de la solution à 405nm

On obtient le % d'inhibition en appliquant la formule suivante :

$$\% = 100 * (\text{DO témoin} - \text{DO échantillon}) / \text{DO témoin}$$

AVANTAGES DE LA METHODE

Les différents sels utilisés NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ n'interfèrent pas dans le processus de polymérisation

La centrifugation est automatisée

Les différents solvants utilisés offrent une meilleure sensibilité que d'autres méthodes

On ne travaille pas en milieu stérile

Les produits utilisés ne sont pas chers

INCONVENIENT DE LA METHODE

La phase de retournement des plaques pour vider le surnageant est délicate et peut provoquer la perte d'une partie du précipité formé et donc fausser en partie le résultat. On peut récupérer le précipité sur filtre mais l'appareillage est très coûteux.

ANNEXE 5 : LA CHLOROQUINE ⁽⁶⁾

Dénomination commerciale

NIVAQUINE® , Laboratoires Spécia, Groupe Rhône-Poulenc Rorer

Constitution chimique

Amino-4-quinoléine, dérivée de la mépacrine, avec un noyau quinoléine, une chaîne alcoyl aminée attachée au groupe aminé en position 4, un substituant chlore en position 7

Présentation

Comprimés sécables dosés à 100mg (étuis de 20 ou de 100 comprimés)

Comprimés pelliculés dosés à 300mg (étui de 4 comprimés)

Sirop dosé à 5mg/ml (flacon de 150ml, avec cuillère mesure de 5ml)

Ampoules injectables dosées à 100mg/ampoule (boîte de 5 ampoules)

Action

La chloroquine a une action schizonticide sur les souches de *plasmodium falciparum* sensibles, ainsi que sur l'ensemble des souches de *plasmodium vivax* (sauf quelques exceptions), de *plasmodium ovale* et *malariae*

Posologie et mode d'administration

Prophylaxie du paludisme : elle doit commencer le jour du départ dans la zone impaludée, se poursuivre pendant toute la durée du séjour dans la zone et doit être continuée les 4 semaines qui suivent le retour en zone non impaludée. La posologie est de 100mg/jour chez l'adulte et de 1,7mg/Kg chez l'enfant. Dans les zones de chloroquino résistance, le proguanil sera associé à la chloroquine

Traitement de l'accès palustre simple : 25mg/kg répartis sur trois jours

Interactions médicamenteuses

Avec les tropiques intestinaux qui provoquent une baisse de l'absorption digestive de la chloroquine

Effets indésirables

En Afrique où la chloroquine est d'usage très courant, le prurit est cité comme effet indésirable dans plus d'un tiers des traitements. De manière plus rare, on a noté des troubles digestifs, une pigmentation ardoisée des ongles et des muqueuses et des maux de tête

Surdosage

Le surdosage est fatal en moins de trois heures, par arrêt cardio-respiratoire. Les signes d'alerte sont : vomissements, étourdissement, troubles visuels. La réanimation en urgence est rarement efficace.

Remarque générale

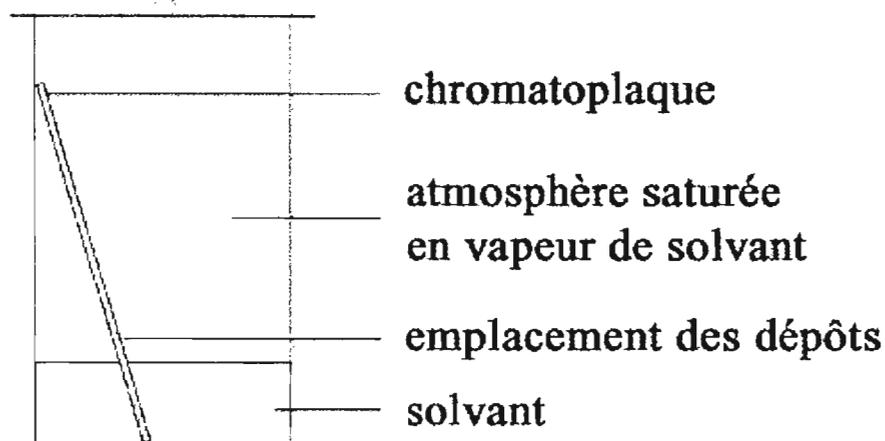
La chloroquine est bien tolérée, peu coûteuse et bien connue des populations en zone à risque. Cependant, l'intérêt pour cette molécule diminue d'année en année en raison de l'apparition et de la diffusion de la chloroquino résistance de *plasmodium falciparum*. En 1999, cet antipaludique n'a presque plus d'intérêt thérapeutique en Asie du sud est et il est de plus en plus discuté en Afrique sub tropicale et dans le nord de l'Amérique du sud.

ANNEXE 6 : CCM : PROTOCOLE

Cette méthode analytique de séparation est simple et rapide. L'adsorbant se présente sous la forme soit d'une couche mince de silice soit d'alumine. Le support sur lequel l'adsorbant est étalé est une plaque de verre ou d'aluminium. La couche d'adsorbant doit être uniforme pour que la migration des produits soit correcte.

- 1) Diluer une petite quantité d'extrait dans le solvant où il est totalement soluble.
- 2) Prendre une plaque et tracer un trait au crayon papier à 1 cm du bas.
- 3) Sur cette ligne déposer un peu d'échantillon sous forme de spots grâce à un capillaire. Sécher le dépôt et redéposer une seconde fois si nécessaire.
- 4) Verser dans la cuve le solvant de migration choisi et y mettre la plaque de telle manière que le niveau soit inférieur au trait tiré sur la plaque. Recouvrir la cuve avec un couvercle afin que les vapeurs restent dans l'enceinte de la cuve.
- 5) Quand le solvant arrive à 1 cm du haut de la plaque, la retirer de la cuve et la sécher.
- 6) Révéler aux UV à 2 longueurs d'onde : 254 et 366 nm afin de repérer les produits qui ont migrés.
- 7) Puis pulvériser de la vanilline sulfurique et chauffer légèrement ce qui permet de colorer les taches.
- 8) D'autres réactifs peuvent être utilisés. De façon générale, la vanilline permet de visualiser les composés organiques. Le réactif de Dragendorff permet de déceler les alcaloïdes.
- 9) Les différents composés apparaissent sous forme de taches à des distances plus ou moins importantes du front du solvant selon leur polarité.

Schéma 3 : chromatographie sur couche mince



ANNEXE 7 : AUTOBIOGRAMME : PROTOCOLE

Le mode opératoire est le même que celui des CCM à l'exception du matériau sur lequel repose la silice. On utilise ici des plaques souples d'aluminium.

Une fois que le solvant a migré, on révèle aux UV en prenant soin d'entourer les taches observées au crayon papier, puis on découpe la plaque en deux parties symétriques en passant bien par le milieu des taches repérées.

Une moitié est révélée à la vanilline sulfurique.

L'autre moitié est déposée dans une boîte de pétri préalablementensemencée avec une solution de bactéries désirée, coté silice contre la gélose.

Après 24 heures à l'étuve à 37°C, on peut éventuellement observer une zone d'inhibition au niveau d'une ou plusieurs taches.

Cette méthode permet de repérer, après séparation des produits sur une CCM, à quelle tache correspond l'activité.

ANNEXE 8 : CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE : PROTOCOLE

C'est une méthode de séparation quantitative. Elle met en compétition deux phases : une phase stationnaire (silice ou alumine) et une phase mobile.

L'extrait est dissout dans un minimum de solvant et déposé en haut de la colonne. Si l'extrait est en trop grande quantité ou que le solvant utilisé pour le dissoudre risquerait de fausser la colonne, on réalise une poudre en dissolvant l'extrait dans le solvant, puis en ajoutant de la silice ou de l'alumine afin de bien imprégner cette dernière de l'extrait. Il suffit ensuite d'évaporer le solvant et d'introduire la poudre en haut de la colonne dans le solvant d'éluion choisi pour commencer la chromatographie.

- 1) Déposer au fond d'une colonne un peu de coton puis du sable afin de retenir la silice ou l'alumine.
- 2) Dans un bécher, mélanger la silice ou l'alumine dans l'éluant avec lequel on commencera la chromatographie.
- 3) Verser le mélange dans la colonne d'un seul coup
- 4) Faire passer de l'éluant et tapoter sur les bords de la colonne afin de bien tasser la phase stationnaire
- 5) Déposer l'extrait à séparer soit dissous dans son solvant soit sous forme de poudre. L'extrait doit pénétrer dans la silice ou l'alumine.
- 6) Une fois la colonne bien tassée, la séparation peut commencer en faisant passer des volumes de solvants équivalents au volume de phase stationnaire.

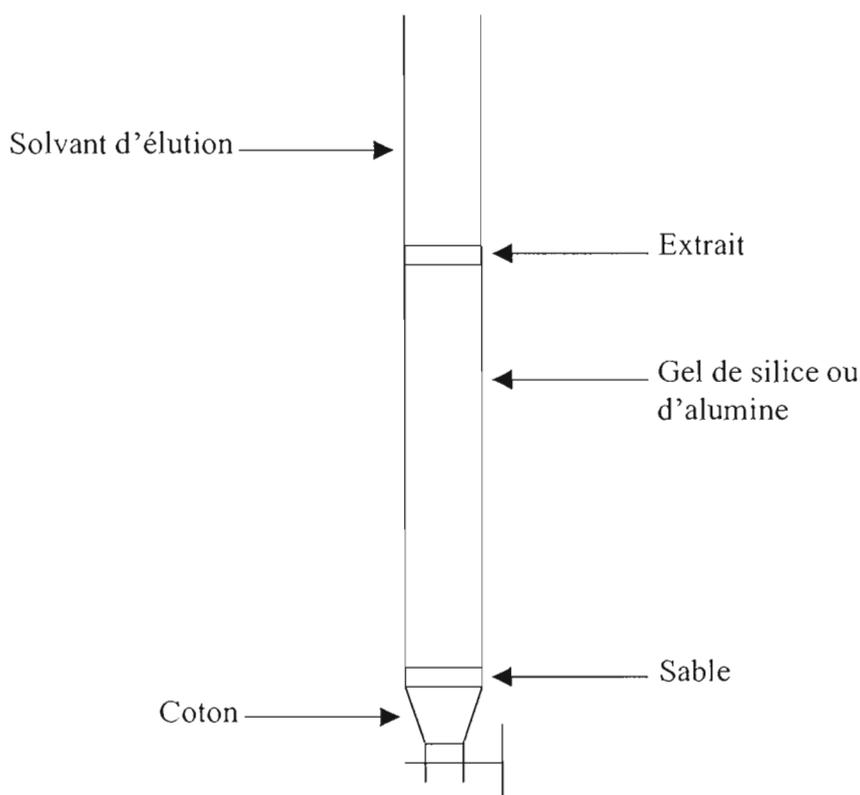
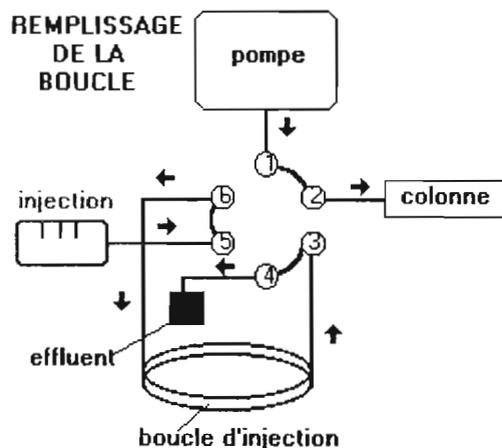


Schéma 4 : Chromatographie sur colonne

ANNEXE 9 : HPLC : PROTOCOLE

Après avoir dissous un peu de l'extrait dans son solvant de dilution, prélever à la seringue une quantité précise de solution pour injection dans la colonne. L'injection se fait selon la méthode suivante :

Figure 6 : schéma d'une boucle d'injection



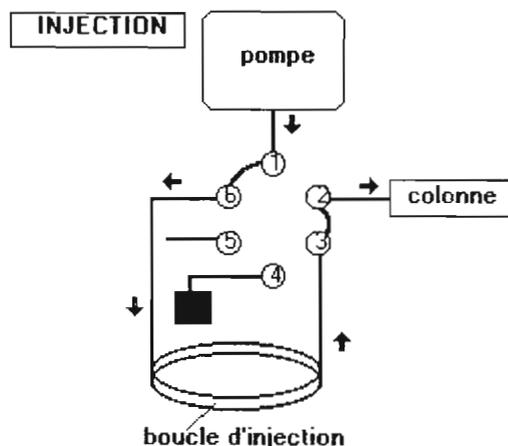
1. remplissage de la boucle :

Le solvant d'éluion circule librement de la pompe (en 1) à la colonne (en 2).

L'injection est réalisée (en 5) dans la boucle.

La boucle d'injection est d'un volume donné (50, 100, 500, 1000 μ l).

Après injection, le surplus de solvant est évacué hors de la boucle (en 4).



2. injection de l'échantillon :

Le basculement de la vanne par action d'un levier met en communication la pompe avec la boucle d'injection et le solvant va alors balayer la boucle (de 1 à 2) et entraîner l'échantillon dans la colonne.

Par la suite il suffit de choisir une méthode dans le logiciel de la HPLC afin de déterminer un gradient de solvant, les paramètres de pression...

Une fois le spectre enregistré, il faut repérer les bases des pics et sauver les résultats.

On peut ensuite imprimer selon une méthode afin de sélectionner les détails qui nous intéressent.

ANNEXE 10 : CCM 1

CCM des fractions C1 et C2

Solvant de migration :

☛ CH₂Cl₂ pur



CCM des fractions C1 et C2

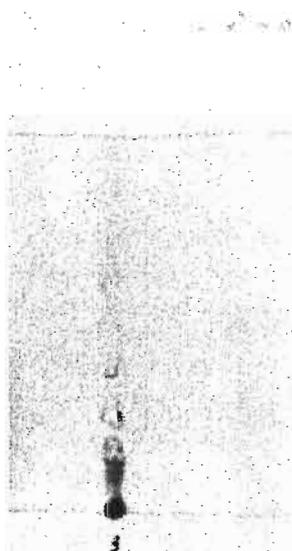
Solvant de migration :

☛ CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5



ANNEXE 11 : CCM 2

CCM de C1 avec révélation au réactif de Dragendorff



Antibiogramme de C1 sur Sa

Solvant de migration :

☛ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH } 95 : 5$



Antibiogramme de C1 sur Ec

Solvant de migration :

☛ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH } 95 : 5$



ANNEXE 12 : CCM 3

Antibiogramme de C1 sur Sa

Solvant de migration :

- ☛ CH_2Cl_2 / MeOH 90 : 10 à droite
- ☛ CH_2Cl_2 / MeOH 80 : 20 à gauche



Antibiogramme de C2 sur Sa

Solvant de migration :

- ☛ CH_2Cl_2 / MeOH 90 : 10 à droite
- ☛ CH_2Cl_2 / MeOH 80 : 20 à gauche

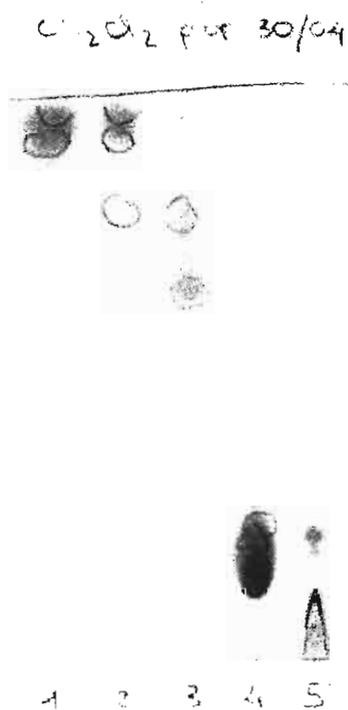


ANNEXE 13 : CCM 4

CCM des fractions 1 à 5 de C1

Solvant de migration :

☛ CH_2Cl_2 pur



CCM des fractions 5 à 9 de C1

Solvant de migration :

☛ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ 95 : 5

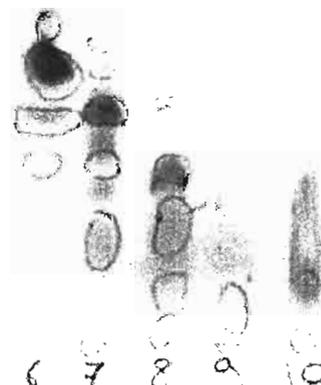


$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{MeOH} 95/05$

CCM des fractions 6 à 10 de C1

Solvant de migration :

☛ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ 90 : 10



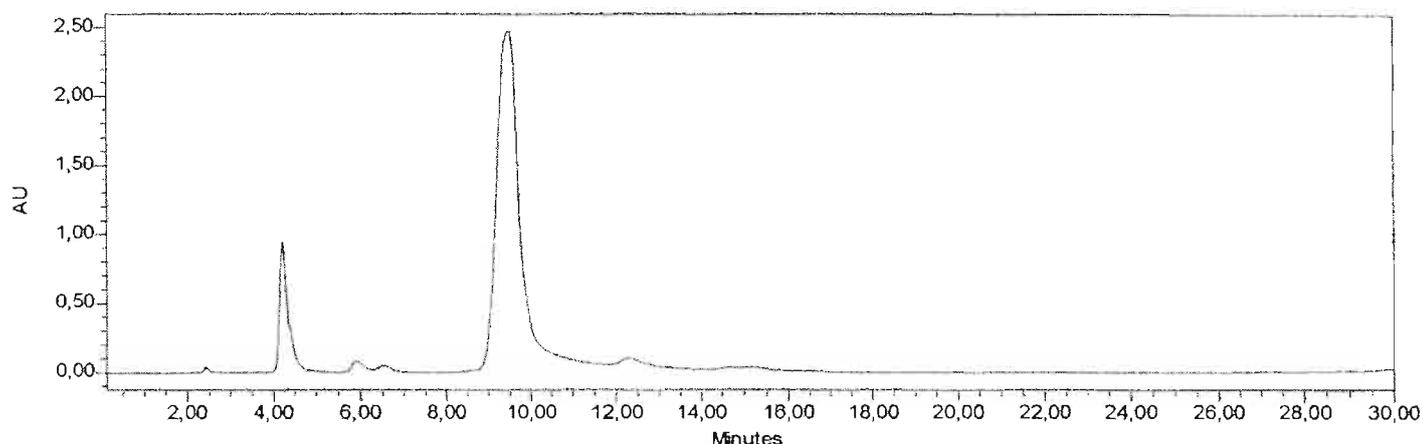
ANNEXE 14 : CCM 5

CCM des pics 1 à 6 de la fraction 6 de C1 + la fraction 6 comme témoin

Solvant de migration :

• CH_2Cl_2 / MeOH 90 : 10

ANNEXE 15 : HPLC C1 FRACTION 6



SampleName Témoin f8 Vial 1 Injection 1 Channel 998 Date Acquired 22/05/2002 08:22:42 Processed Channel
 Descr. PDA 288,4 nm Injection Volume 10,00

Instrument Method: R1780C

Stored: 22/05/2002 08:06:58

Comments
 Modified User System
 Locked No
 Method Id 6120
 Method Version 77
 Edit User

PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	40,0	60,0	0,0	
2	20,00	1,00	25,0	75,0	6
3	25,00	1,00	0,0	100,0	6
4	30,00	1,00	40,0	60,0	6
5	31,00	0,20	40,0	60,0	6

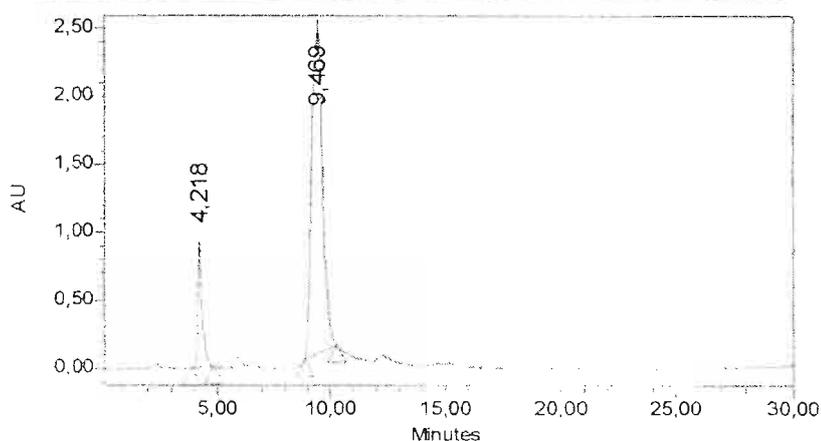
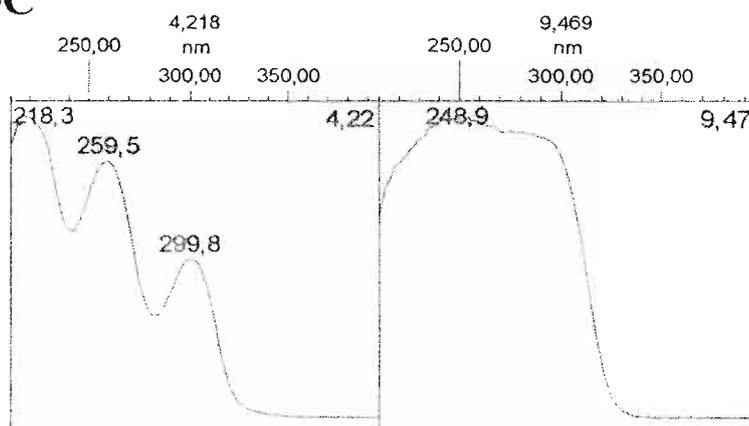
Solvant :

A : eau

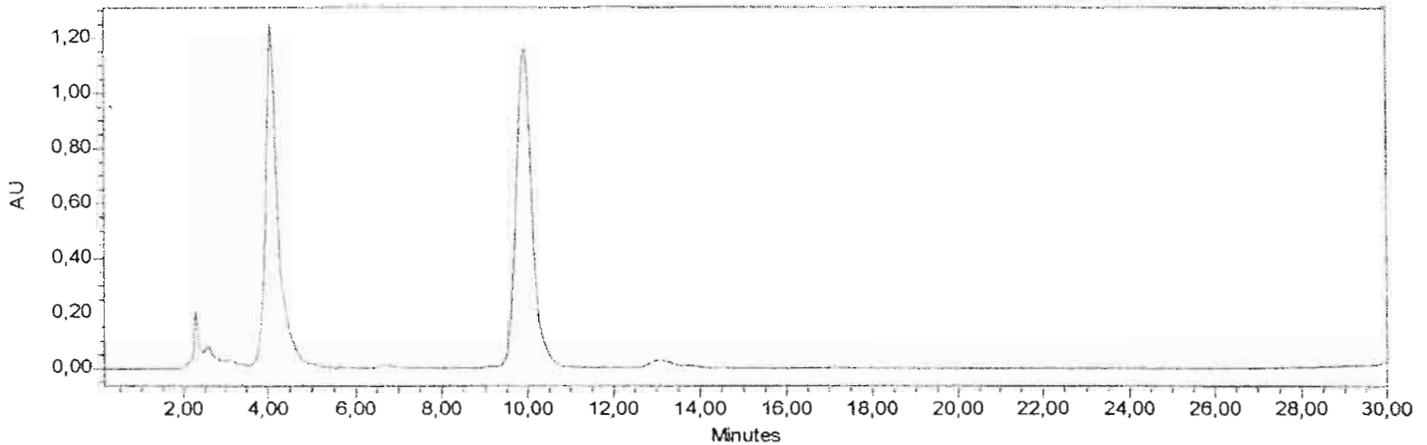
B : méthanol

colonne : µbondapack C18

Spectrum Index Plot



ANNEXE 16 : HPLC C1 FRACTION 6₁

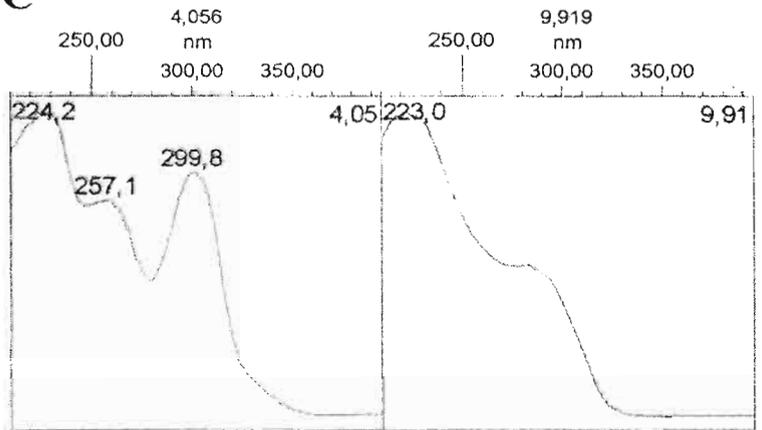


SampleName R 1801 C f6 1 Vial 1 Injection 1 Channel 996 Date Acquired 21/05/2002 09:32:35 Processed Channel Descr. PDA 280,7 nm Injection Volume 10,00

Instrument Method: R1780C

Stored: 21/05/2002 08:08:13

Spectrum Index Plot



Comments

Modified User System
 Locked No
 Method Id 6081
 Method Version 76
 Edit User

PCM Gradient Table

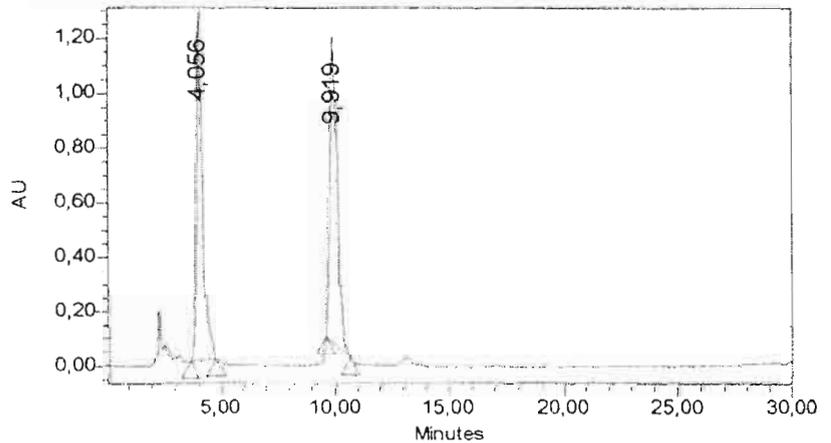
Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	40,0	60,0	0,0	
2	20,00	1,00	25,0	75,0	6
3	25,00	1,00	0,0	100,0	6
4	30,00	1,00	40,0	60,0	6
5	31,00	0,20	40,0	60,0	6

Solvant :

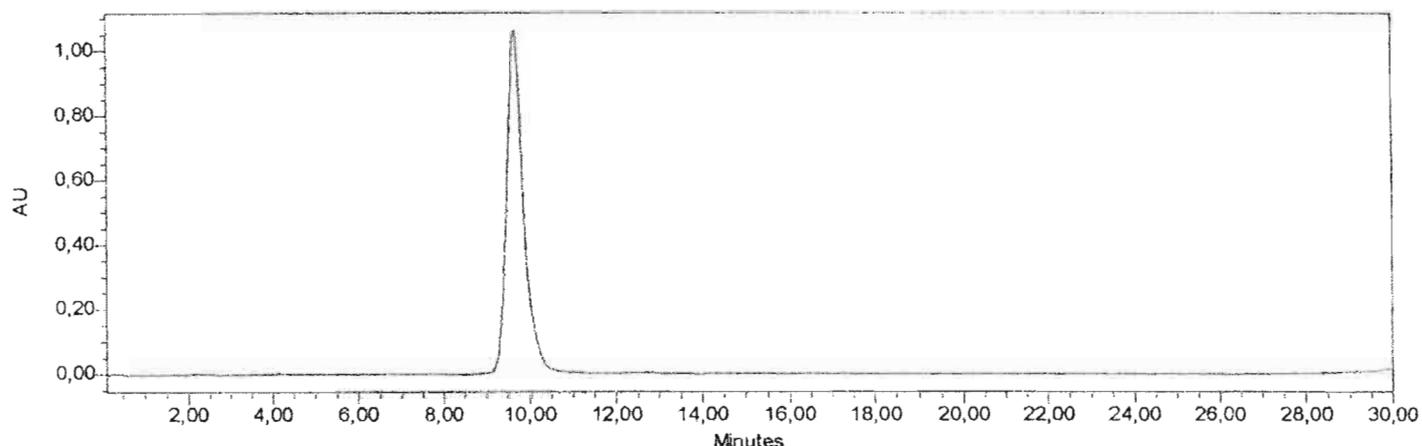
A : eau

B : méthanol

colonne : µbondapack C18



ANNEXE 17 : HPLC C1 FRACTION 6₄



SampleName Témoin f6 4 Vial 1 Injection 1 Channel 996 Date Acquired 22/05/2002 09:02:26 Processed Channel
 Descr. PDA 285,5 nm Injection Volume 10,00

Instrument Method: R1780C

Stored: 22/05/2002 08:06:58

Comments

Modified User System
 Locked No
 Method Id 6120
 Method Version 77
 Edit User

PCM Gradient Table

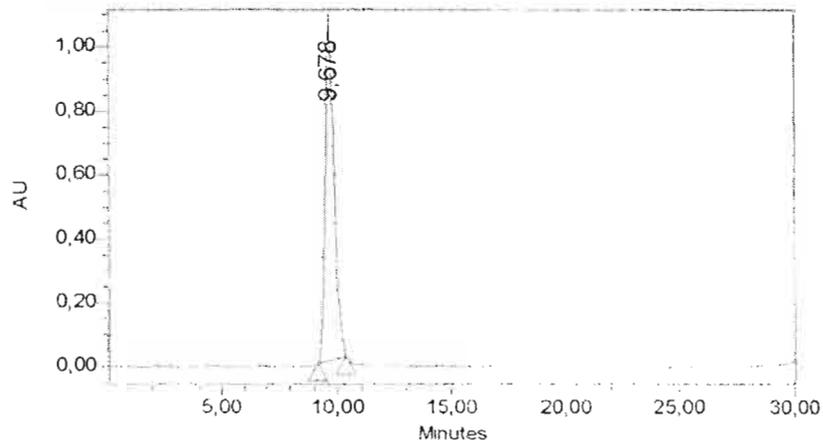
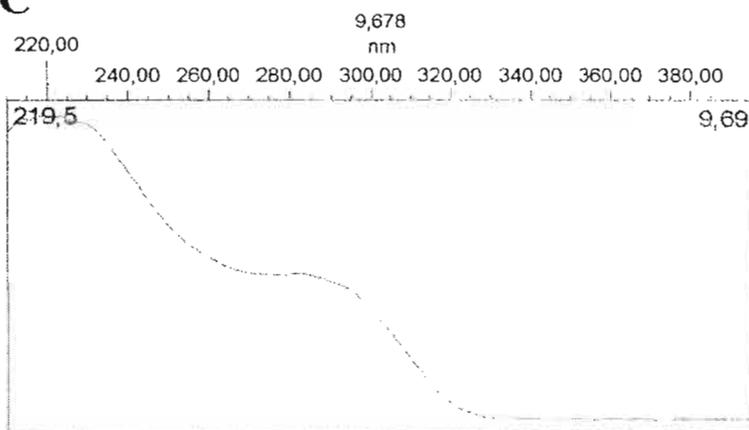
Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	40,0	60,0	0,0	
2	20,00	1,00	25,0	75,0	6
3	25,00	1,00	0,0	100,0	6
4	30,00	1,00	40,0	60,0	6
5	31,00	0,20	40,0	60,0	6

Solvant :

A : eau
 B : méthanol

colonne : µbondapack C18

Spectrum Index Plot



ANNEXE 18 : CCM 6

CCM des fractions 1 à 5 de C2

Solvant de migration :

☛ CH_2Cl_2 pur

CH_2Cl_2 pur 11/05

5 0

0 1 2 3 4 5

CCM des fractions 5 à 9 de C2

Solvant de migration :

☛ CH_2Cl_2 / MeOH 95 : 5

CH_2Cl_2 / MeOH 95/5 10/05

5 6 7 8 9

5 6 7 8 9

CH_2Cl_2 / MeOH 90/10 10/05

5 6 7 8 9

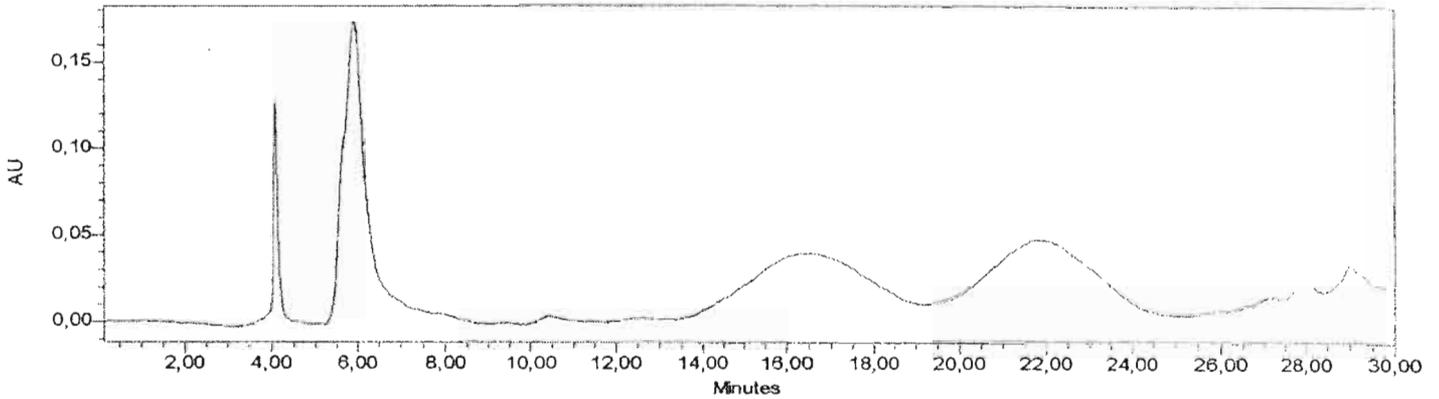
5 6 7 8 9

CCM des fractions 9 à 12 de C2 + 7 de C1 comme témoin

Solvant de migration :

☛ CH_2Cl_2 / MeOH 90 : 10

ANNEXE 19 : HPLC C2 FRACTION 12



SampleName R 1801 C2 f12/3 Vial 1 Injection 1 Channel 996 Date Acquired 30/05/2002 10:27:06 Processed
 Channel Descr. PDA 243,7 nm Injection Volume 10,00

Instrument Method: R1780C

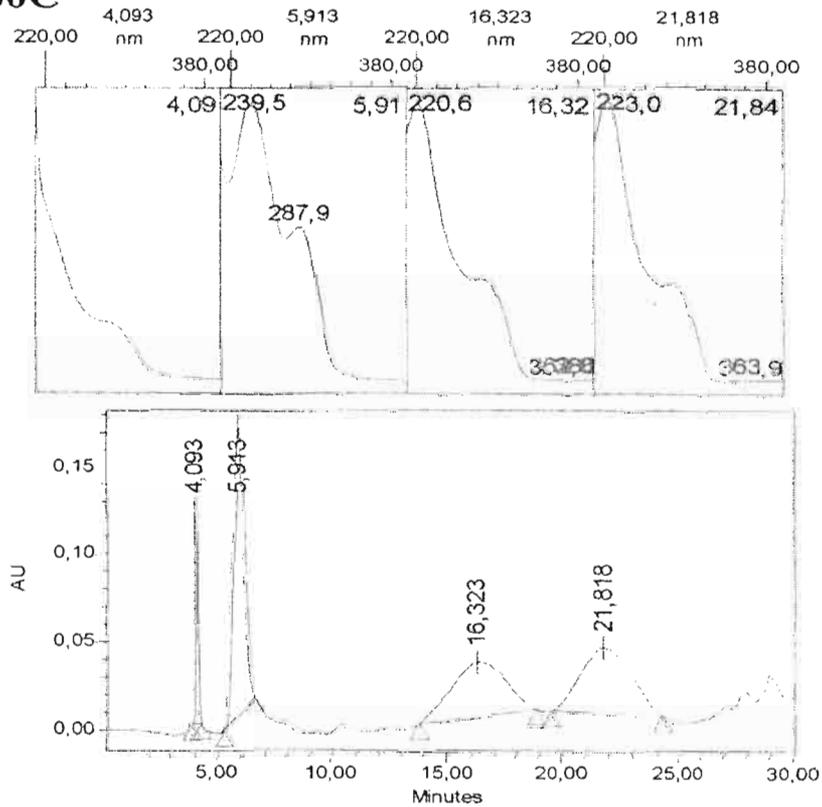
Stored: 30/05/2002 10:25:14

Spectrum Index Plot

Comments
 Modified User System
 Locked No
 Method Id 6390
 Method Version 83
 Edit User

PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	50,0	50,0	0,0	
2	20,00	1,00	35,0	65,0	6
3	25,00	1,00	0,0	100,0	6
4	30,00	1,00	50,0	50,0	6
5	31,00	0,20	50,0	50,0	6



Solvant :
 A : eau
 B : méthanol
 colonne : µbondapack C18

RESUME

Les recherches sur les substances bioactives sont longues et très diverses. Elles permettent la découverte de nouveaux médicaments qui peuvent ainsi faire progresser la lutte contre la maladie.

Au laboratoire de pharmacochimie des substances naturelles IRD-UNC de Nouméa, Nouvelle Calédonie, les chercheurs étudient des invertébrés marins afin d'isoler les molécules actives sur différentes bactéries et maladies.

Ils ont en effet la chance d'être à proximité d'un immense lagon regorgeant d'organismes très variés et très prometteurs en ce qui concerne la recherche pharmaceutique.

Ce lagon, encore peu exploré par rapport à ses potentialités, se révèle être une source d'une grande richesse pour les éponges, les ascidies et autres organismes présentant, pour chaque espèce, des molécules nouvelles.

Ce rapport présente l'étude d'une éponge marine du genre *Pseudoceratina* désignée sous la référence R 1801.

Après extraction et purification par plusieurs méthodes chromatographiques, les composés actifs contenus dans cette éponge ont pu être isolés.

MOTS-CLEF

- ☞ Substances naturelles marines
- ☞ Eponges marines
- ☞ Antibiotiques
- ☞ Paludisme
- ☞ Méthodes chromatographiques
- ☞ Tests biologiques