



Thèse de doctorat

**Mardi 07
Février 2017**

**Caractérisation de
métabolites secondaires
isolés des branchies
symbiotiques du bivalve
*Codakia orbicularis***



**Francesca
Goudou**

UNIVERSITÉ DES ANTILLES

UFR Des Sciences Exactes et Naturelles

École Doctorale Pluridisciplinaire Sciences Exactes et Naturelles- ED 589

Année 2017

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L' UNIVERSITÉ DES ANTILLES

Spécialité: **CHIMIE**

Présentée et soutenue publiquement par

Francesca GOUDOU

Le 07 Février 2017

**CARACTÉRISATION DE MÉTABOLITES
SECONDAIRES ISOLÉS DES BRANCHIES
SYMBIOTIQUES DU BIVALVE
*CODAKIA ORBICULARIS***

Sous la direction de: **Monsieur Olivier GROS, Professeur**

Sous le co-encadrement de: **Monsieur Philippe PETIT, Maître de conférence**

JURY:

Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI
Olivier GROVEL
Ali AL-MOURABIT
Joëlle LEVALOIS-GRÜTZMACHER
Olivier GROS
Philippe PETIT

Directeur de recherche, CNRS, MNHN
Professeur, Université de Nantes
Directeur de recherche, CNRS, ICSN
Professeur, Université des Antilles
Professeur, Université des Antilles
Maître de conférences, Université des Antilles

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Invité

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les rapporteurs, Madame Bourguet-Kondracki, directrice de recherche, et Monsieur Grovel, professeur des universités, d'avoir accepté de corriger et juger ce travail de recherche. Je remercie également les examinateurs Madame Levalois-Grützmacher, professeur des universités, et Monsieur Ali Al-Mourabit, directeur de recherche, de me faire l'honneur d'intégrer mon jury de thèse pour juger ce travail. Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Olivier Gros, pour son intérêt, son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant ces trois dernières années. Je te remercie également Olivier pour les nombreuses répétitions pour mes communications orales (dont la première en anglais que j'ai brillamment réussi finalement (-)). Merci surtout Olivier, d'avoir pu obtenir une collaboration avec Mr Ali Al-Mourabit. Merci à vous, Ali, du fond du coeur de m'avoir considérée comme l'une de vos étudiantes et de m'avoir accordé beaucoup de votre temps malgré vos plannings très chargés. Vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire, et m'avez permis de travailler aisément. J'ai ainsi pu obtenir des résultats et soutenir cette thèse dans les délais impartis. Un dernier grand merci pour vos précieux conseils concernant la rédaction de ma thèse vous avez largement dépassé votre statut de collaborateur... J'exprime aussi ma reconnaissance envers Philippe Petit, pour son travail de co-encadrant de thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la Région Guadeloupe qui m'a fourni un contrat doctoral et la DEAL qui m'a attribué diverses aides financières pour la réalisation de mes manipulations. Ces aides m'ont permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse. J'exprime également ma gratitude au département de chimie et à l'école doctorale de l'Université des Antilles qui m'ont permis de réaliser des enseignements au cours de ma thèse grâce à un avenant à mon contrat doctoral. Mon travail de thèse n'aurait pu être mené à bien sans l'accueil chaleureux et la disponibilité que m'a témoigné le personnel de l'ICSN, je remercie particulièrement:

- l'équipe HPLC de l'ICSN (Mme Odile Thoison, Mme Nathalie Hue et M. Franck Pelissier) pour leur sympathie et pour l'accompagnement précieux qu'ils m'ont accordé;
- le service de spectrométrie de masse notamment Mr David Touboul pour l'analyse en masse haute résolution des produits apolaires de cette étude et de m'avoir appris à interpréter des données de spectrométrie de masse;
- Messieurs Nicolas Elie et Alain Brunelle, également du service de spectrométrie de masse, pour la fragmentation de la structure inédite trouvée dans cette étude;
- le service RMN, notamment M. Jean-François Gallap pour sa réactivité et sa sympathie;

- M. Retailleau Pascal pour l'analyse RX d'un de mes produits et M. Bogdan Iorga pour la DFT sur la nouvelle structure trouvée dans cette étude.

Je remercie particulièrement l'équipe du Dr Ali Al-Mourabit à savoir Mme Céline Moriou (merci pour ton grand investissement), Mme Ludmila Ermolenko, M. Thanh-binh Nguyen et les doctorants (Charlotte, Mathilde, Arm); vous m'avez tous encouragé de près ou de loin dans ma tâche. Les missions à l'ICSN ont été très riches pour moi sur le plan professionnel mais aussi personnel grâce à vous tous.

Je profite de cette occasion pour remercier par ailleurs, Monsieur Pierre Dumesnil et son équipe de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe pour les manipulations que j'ai pu réaliser chez eux: Didier, Reggie, Malika, ce fut un réel plaisir d'avoir travaillé avec vous, vous m'avez formé sur plusieurs techniques et je vous en suis reconnaissante.

Je tiens à remercier mon équipe "biologie de la mangrove" (Sylvina, Marie-Noëlle, Magalie, Pierre Yves, Catherine, Patrick, Jean-Marie, Nathalie, Sébastien, Adrien, Célia, Jennifer et Aurélie), du laboratoire de biologie marine de l'Université des Antilles, pour cette harmonie au sein de l'équipe qui m'a permis de réaliser ma thèse sereinement. Je ressors de cette thèse comblée par l'amitié de Jennifer, Aurélie et Malika, merci les filles pour votre soutien permanent, même dans les moments difficiles de cette thèse, ce fut une belle aventure grâce à vous également, vous étiez mes collègues et vous êtes devenues mes copines. Je remercie aussi mes amis pour leur compréhension (ils se reconnaîtront que se soit de Paris, Martinique, Guadeloupe, Guyane, Jamaïque ou Brésil). Au terme de ce parcours je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissé ces derniers mois pour achever ma thèse: mes "petites copines" Mahélie et Malika (Tika), mes cousines bien - aimées (merci Déborah de m'avoir hébergé à Paris pour mes différentes missions), mon père, ma belle-mère et sa famille, mes soeurs et toute ma famille de la Martinique (surtout Gisèle, Marlène, Eugène, Alfred, Sylvette, Jean et Jean-Guy). Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout le long de ma scolarité jusqu'à la fin de cette thèse. Je suis redevable à ma famille pour le soutien moral et matériel, pour la confiance illimitée qu'elle m'accorde pour chacun de mes projets sans en connaître d'avance les résultats. Merci tout simplement d'être vous, j'ai eu de la chance de grandir à vos côtés. Merci à Omer qui m'a supportée et encouragée durant ces trois dernières années. Je dédicace cet ouvrage à ma famille, à Omer, à mes copines, à mes amis, à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin, mais surtout à ma défunte mère.

Pensées...

Vraie beauté, bonheur, vérité, connaissance, ou mystère... La science a suscité la réflexion de plus d'un penseur et philosophe.

Si pour Thalès de Milet la vraie beauté consistait à enrichir son âme de science; Émile Zola, lui, croyait que la science n'a pas promis le bonheur mais la vérité. De son côté, Henri Michaux pensait que toute science crée une nouvelle ignorance et pour Albert Einstein, le mystère plus belle chose de la vie, est la source de toute science. Denis Diderot avait certainement raison de dire que « ce qui est aujourd'hui un paradoxe pour nous sera pour la postérité une vérité démontrée ». Il est une vérité à laquelle aucun chercheur ne peut échapper : le chemin qui mène au résultat. Et c'est à juste titre que Thomas Edison a dit que "le génie tient de 1% d'inspiration et de 99% de transpiration". Même celui qui trouve sans chercher selon Gaston Bachelard est celui qui a longtemps cherché sans trouver. Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé dix mille solutions qui ne fonctionnent pas (Thomas Edison). Puisque rien de grand ne se fait sans chimères (Ernest Renan) alors, "rêve de grandes choses, cela te permettra au moins d'en faire de toutes petites" (Gules Renard). En effet, être homme c'est précisément être responsable; c'est sentir, en posant sa pierre, que l'on contribue à bâtir le monde (Antoine De Saint-Exupéry). Tout ce qui est fait de grand dans le monde est fondé sur l'espoir (Martin Luther King).

... alors je refuse de désespérer, je veux avancer sur le chemin qui mène au résultat.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES SCHEMAS.....	14
LISTE DES TABLEAUX.....	15
RESUME.....	16
INTRODUCTION GENERALE	17
I. PRESENTATION CONTEXTUELLE.....	18
II. MILIEU MARIN ET ETUDES SCIENTIFIQUES.....	20
CHAPITRE 1 . SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE: DES MOLLUSQUES BIVALVES AUX LUCINIDAE.....	27
I. PRESENTATION BIOLOGIQUE DES MOLLUSQUES BIVALVES.....	27
II. ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES PORTANT SUR LES MOLLUSQUES BIVALVES.....	28
1. Molécules majoritairement extraites des mollusques bivalves: les lipides, rôles et intérêts.....	29
2. Autres molécules isolées des mollusques bivalves.....	35
3. Les aminoacides et peptides des Mollusques bivalves: rôles et intérêts.....	37
4. Molécules de défense des mollusques bivalves, rôles et intérêts.....	39
5. Métabolites exogènes retrouvés chez les Bivalves.....	42
6. Autres molécules de familles chimiques diverses isolées des Mollusques bivalves.....	47
III. LES MOLECULES ISOLEES DANS L'ORDRE DES VENEROIDA	48
III. DANS L'ORDRE DES VENEROIDA, LA FAMILLE CHIMIOSYMBIOTIQUE DES LUCINIDAE.....	51
1. Systématique des Lucinidae.....	51
2. Répartition géographique et habitats des Lucinidae.....	52
3. La symbiose chez les Lucinidae.....	53
4. Études chimiques réalisées dans la famille des Lucinidae.....	55
IV. PRESENTATION DES DEUX ESPECES DE LUCINIDAE CONCERNEES PAR CE TRAVAIL CHIMIQUE: <i>CODAKIA ORBICULARIS</i> ET <i>LUCINA ROQUESANA</i>	56
1. Systématique.....	56
2. Répartition géographique et habitats.....	56
RESULTATS ET DISCUSSION	64
CHAPITRE 2 ETUDE CHIMIQUE DU BIVALVE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i> ET COMPARAISON AVEC <i>LUCINA ROQUESANA</i> (LUCINIDAE).....	65
I. LA BIOMASSE ETUDIEE.....	65
II. EXTRACTION DES BRANCHIES DE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i>	66
III. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'EXTRAIT BRUT DE BRANCHIES DE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i> PAR LA METHODE DE DIFFUSION DES DISQUES. COMPARAISON AVEC <i>LUCINA PENNSYLVANICA</i>	66
IV. EVALUATION DE LA COMPLEXITE METABOLIQUE DE L'EXTRAIT BRUT.....	67
V. EVALUATION PAR LA METHODE DE DIFFUSION DES DISQUES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES FRACTIONS DE L'EXTRAIT BRUT.....	68
VI. ISOLEMENT DES COMPOSES.....	69
VII. STRUCTURE DU COMPOSE 87: LE SOUFRE.....	72
VIII. ETUDE DU MELANGE DE TRIGLYCERIDES DE LA FRACTION F2 POUR ABOUTIR A L'ELUCIDATION STRUCTURALE DU COMPOSE 88.....	74
1. Réfutation de l'hypothèse selon laquelle le triglycéride PoLA est le majoritaire de la sous-fraction ff2 _{2c}	79
2. Validation de l'hypothèse selon laquelle le triglycéride SOL est le majoritaire de la sous-fraction ff2 _{2c}	81
IX. ELUCIDATION STRUCTURALE DES AUTRES METABOLITES SECONDAIRES DE LA BRANCHIE DE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i>	84
1. Élucidation structurale des composés 89 et 90: les monoglycérolipides.....	85

2.	<i>Élucidation structurale des composés 91 et 92</i>	90
3.	<i>Élucidation structurale des composés 93 - 97</i>	94
4.	<i>Élucidation structurale d'un composé à squelette original: l'orbicularisine (98)</i>	104
X.	COMPARAISON DES PROFILS METABOLIQUES DE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i> AVEC <i>LUCINA ROQUESANA</i> (LUCINIDAE).....	115
XI.	EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES MOLECULES ISOLEES DE LA BRANCHIE DE <i>CODAKIA ORBICULARIS</i>	117
1.	<i>Résultats des activités antibactériennes des composés isolés</i>	117
2.	<i>Conclusion</i>	125
PARTIE EXPERIMENTALE		126
CHAPITRE 3 . PARTIE EXPERIMENTALE		127
I.	INFORMATIONS GENERALES	127
II.	MODELE BIOLOGIQUE.....	128
III.	DE L'EXTRACTION A LA CARACTERISATION ET LES BIO-ESSAIS.....	129
1.	<i>Extraction des branchies</i>	129
2.	<i>Evaluations biologiques</i>	130
3.	<i>Profil HPLC de l'extrait brut de branchies de C. orbicularis</i>	134
4.	<i>Fractionnement de l'extrait brut de C. orbicularis</i>	135
5.	<i>Isolement des composés</i>	136
6.	<i>Quelques précisions sur les manipulations réalisées pour la caractérisation structurale des composés isolés</i>	143
IV.	RECAPITULATIF DE L'EXTRACTION DES BRANCHIES DE <i>C. ORBICULARIS</i> A L'ISOLEMENT DES COMPOSES.....	144
V.	DONNEES SPECTRALES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES ISOLEES.....	145
VI.	STRUCTURE DES MOLECULES ISOLEES.....	151
VII.	DONNEES CHROMATOGRAPHIQUES DES COMPOSES ISOLEES.....	152
VIII.	RECAPITULATIF DES HPLC UTILISEES.....	153
IX.	COMPARAISON AVEC <i>LUCINA ROQUESANA</i>	154
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		155
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		156
STRUCTURE DES MOLECULES ISOLEES DANS CETTE ETUDE		159
BIBLIOGRAPHIE		160
X.	REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	161
ANNEXES		187
	ANNEXE I: COMMUNICATIONS ORALES	188
	ANNEXE II: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 89. DETECTION DEDL.....	189
	ANNEXE III: COSY DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCL ₃ , 600 MHZ).....	189
	ANNEXE IV: HSQC DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCL ₃ , 600 MHZ).....	190
	ANNEXE V: HMBC DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCL ₃ , 600 MHZ).....	190
	ANNEXE VI: ROESY DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCL ₃ , 600 MHZ).....	191
	ANNEXE VII: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 90. DETECTION DEDL.....	191
	ANNEXE VIII: COSY DU MONOGLYCEROLIPIDE 90, (CDCL ₃ , 600 MHZ).....	192
	ANNEXE IX: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 94. DETECTION DEDL.....	192
	ANNEXE X: RMN ¹³ C DE LA 5'-O-ACETYLTHYMIDINE 94, (MEOD, 600 MHZ).....	193
	ANNEXE XI: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 95. DETECTION DEDL.....	193
	ANNEXE XII: RMN ¹³ C DE LA 5'-O-ACETYLRIDINE 95, (MEOD, 600 MHZ).....	194
	ANNEXE XIII: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 96. DETECTION DEDL.....	194
	ANNEXE XIV: RMN ¹³ C DE LA 3'-O-ACETYLTHYMIDINE 96, (MEOD, 600 MHZ).....	195
	ANNEXE XV: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 98. DETECTION DEDL.....	195
	ANNEXE XVI: SPECTRE RMN ¹ H DE L'ORBICULARISINE 98 (SURNAGEANT) (MEOD, 600 MHZ).....	196
	ANNEXE XVII: SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DE L'ORBICULARISINE 98.....	196
	ANNEXE XVIII: SPECTRE RMN ¹³ C DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO-D ₆ , 125 MHZ).....	197
	ANNEXE XIX: SPECTRE ¹ H- ¹ H COSY DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO-D ₆ , 600 MHZ).....	198
	ANNEXE XX: SPECTRE ¹ H- ¹³ C HSQC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO-D ₆ , 500 MHZ).....	199
	ANNEXE XXI: SPECTRE ¹ H- ¹³ C HMBC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO-D ₆ , 600 MHZ).....	200

ANNEXE XXII: SPECTRE ^1H - ^{15}N HSQC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- D_6 , 600 MHz).....	201
ANNEXE XXIII: SPECTRE ^1H - ^{15}N HmBC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- D_6 , 600 MHz).	202
ANNEXE XXIV: SPECTRE ^1H - ^1H ROESY DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- D_6 , 600 MHz).	203
ANNEXE XXV: SPECTRE IR DE L'ORBICULARISINE (98).....	204
ANNEXE XXVI: SPECTRE UV DE L'ORBICULARISINE 98, (MEOH).	205
ANNEXE XXVII: SM-HR DE L'ORBICULARISINE (98).	205
ANNEXE XXVIII: SPECTRE SM^2 DE L'ORBICULARISINE (98).....	206
ANNEXE XXIX: SPECTRE SM^3 DE L'ORBICULARISINE (98).....	207
ANNEXE XXX: ÉNERGIES DES CONFORMERES ET DISTRIBUTION DE BOLTZMANN POUR LE RÉGIOISOMÈRE 1-A DE L'ORBICULARISINE (98).....	208
ANNEXE XXXI: ÉNERGIES DES CONFORMERES ET DISTRIBUTION DE BOLTZMANN POUR LE RÉGIOISOMÈRE 1-B D'ORBICULARISINE (98).	209
ANNEXE XXXII: MODÈLE 3D DU RÉGIOISOMÈRE 1-A DE L'ORBICULARISINE (98).	210
ANNEXE XXXIII: ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ORBICULARISINE (98) SUR L'INHIBITION DE LA NECROPTOSE ET SUR DES KINASES	211

LISTE DES ABREVIATIONS

[α] _D	Pouvoir rotatoire
Ac	Acétyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
AG	Acide gras
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Dichroïsme circulaire
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CSC	Chromatography Silica gel Column
DAD	Détecteur à barrettes diode
DAG	Diglycéride
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DMF	<i>N,N'</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ESI ⁺ , ESI ⁻	Source d'ionisation électrospray (mode positif, mode négatif)
FT	Transformée de Fourier
Hept	Heptane
Hex	Hexane
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquide chromatography
Q-TOF	Quadrupole- Time of flight
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IR	Infrarouge
<i>J</i>	Constante de couplage
MALDI	La désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeOH	Méthanol
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RMN (1D, 2D)	Résonance magnétique nucléaire (à 1 dimension, 2 dimensions)
ROESY	Rotative overhauser effect spectroscopy
SM	Spectrométrie de masse
SM ² ou SM/SM	Spectrométrie de masse tandem
SMHR	Spectrométrie de masse haute résolution
UPLC	Ultra performance liquide chromatography
UV	Ultraviolet
TAG	Triglycéride

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Premières molécules d'origine marine isolées 1, 2 et leurs analogues synthétiques (3: anticancéreux, 4: antiviral).....	20
Figure 2. Les phyla étudiés par la communauté scientifique des produits naturels marins depuis 1963. (d'après Blunt <i>et al.</i> , 2016)	22
Figure 3. Nombre estimé des espèces existantes dans chaque classe du phylum des Mollusques; la classe Aplacophora est actuellement divisée en deux classes (Solénogastres et Caudofovéates).....	23
Figure 4. Présentation de molécules commercialisées en tant que médicaments ou actuellement en phase clinique à partir de Mollusques, de bactéries ou d'invertébrés marins.	24
Figure 5. Classification phylogénétique de l'embranchement des Mollusques (Lecointre et Leguyader, 2006). La classe des bivalves est entourée en orange.	28
Figure 6. Exemples de structures lipidiques.....	30
Figure 7. Structures du brassicastérol (20), du crinostérol (21) et du 24-Méthylènecholestérol (22).	31
Figure 8. Structure du lathostérol (23).	32
Figure 9. Structure de l'acide linoléique (24).	33
Figure 10. Structure de l'EPA (25) et le DHA (26).....	33
Figure 11. Deux ensembles de structures: les prostaglandines E (27) et H (28).....	34
Figure 12. Structure de l'acide pinaique (29) isolé du bivalve <i>Pinna murricata</i> et de l'halichlorine (30) isolé de l'éponge <i>Halichondria okadai</i>	36
Figure 13. Structure des Notoamides A (31), B (32) et C (33) à structures dicétopéraziniques.	36
Figure 14. Structures des acides Himéïques A (34), B (35) et C (36).	35
Figure 15. Structures des flavocristamides A (37) et B (38).....	35
Figure 16. Structures de l' <i>antéiso</i> -C15 mojavensin A (39), de l' <i>iso</i> -C16 fengycine B (40) et de l' <i>antéiso</i> -C17 fengycine B (41).	37
Figure 17. Exemple de la structure de la <i>N</i> -palmitoyléthanolamine (C16: 0) (42).	37
Figure 18. Structure de la taurine (43).	38
Figure 19. Structure des mycosporines mytiline A (44a) et mytiline B (44b).	39
Figure 20. Exemple de structure d'un aminosucre: N-acétyl-D-glucosamine (45).	39
Figure 21. Exemple de structure d'un opioïde: la dynorphine A (46).	40
Figure 22. Exemples de métabolites non-peptidiques: la mytiline A (47) et la mytomycine (48).	42
Figure 23. Structures de toxines.....	43
Figure 24. Structure de la maitotoxine (53) et de la térodotoxine (54).....	44
Figure 25. Structure de l'acide okadaïque (55), de la dinophysistoxine-1 (56), dinophysistoxine-3 (57).....	45
Figure 26. Structure de l'azaspiracide (58).	45
Figure 27. Structure de l'acide domoïque (59) et des deux acides isodomoïques D (60) et E (61).	46
Figure 28. Structures de deux diphényléther polybromés (62) et (63).....	47
Figure 29. Structures de la coruscol A (65) et de l'herquiline (66).	47
Figure 30. Structures de molécules isolées de l'ordre des Vénéroïda.	48
Figure 31. Structure de fucoxanthines (67) et de fucoxanthinols (68).	49
Figure 32. Structures de la péridinine (69) et de la cyclopyrrroxanthine (70).	49
Figure 33. Structures de la mactraxanthine (71).	49
Figure 34. Structures de la chlorophylle (14), chlorophyllone A (72) et de ses dérivés 73 - 78.	50

Figure 35. Structures des dérivés nucléosidiques contenant de l'arsenic (79-84).	51
Figure 36. Systématique des Lucinidae (1). Diversité de formes chez les <i>Lucinidae</i> (2) ¹⁵⁴ ...	52
Figure 37. Photos d'une mangrove (A), d'un suintement froid (B), des herbiers à <i>Thalassia testudinum</i> (C) et de sources hydrothermales (D).	53
Figure 38. Représentation schématique de la taxonomie des bivalves chimiosymbiotiques (Brissac, 2009).	54
Figure 39. Systématique et photos des bivalves <i>Lucina pensylvanica</i> (A) et <i>Codakia orbicularis</i> (B) coquilles fermées.	56
Figure 40. Herbiers à <i>Thalassia testudinum</i> .	56
Figure 41. Schéma représentant l'habitat des Lucinidae (Elisabeth, 2011).	57
Figure 42. A: Branchie de <i>Codakia orbicularis</i> (Photo O. Gros). B: Microscopie d'une coupe transversale de la branchie de <i>Codakia orbicularis</i> après coloration au Goldner (Caro et al., 2009)	58
Figure 43. A: Branchie de <i>Codakia orbicularis</i> (Photo O.Gros). B: Micrographie en microscopie électronique à transmission montrant les bactéries symbiotiques internalisées dans un bactériocyte de Lucinidae.	59
Figure 44. Phylogénie des symbiotes de <i>C. orbicularis</i> et <i>L.pensylvanica</i> selon les études des séquences d'ADNr 16S (modifié d'après Gros et al., 1996).	60
Figure 45. Photographie de l'herbier à <i>Thalassia testudinum</i> en Guadeloupe.	65
Figure 46. Photographies des coquilles fermées de <i>L. pensylvanica</i> (A) (Marlo F. Krisberg, 2008) et de <i>C. orbicularis</i> (B).	66
Figure 47. Bio-essais. A : Bio-essais sur la culture de <i>Micrococcus luteus</i> (Gram ⁺).	67
Figure 48. Profil SMHR de l'extrait brut de branchies de <i>Codakia orbicularis</i> .	68
Figure 49. Structures des molécules isolées du bivalve <i>Codakia orbicularis</i> .	71
Figure 50. (A) Structure du soufre (87). (B) Cliché de la poudre cristalline du soufre.	73
Figure 51. Spectre RMN ¹ H des fractions F1 et F2, CDCl ₃ , 500MHz.	74
Figure 52. Spectre de masse de la sous-fraction 22c présentant des ions qu'entre 17 et 20 minutes. Les ions 922,0096 et 803,5433 sont des triglycérides de références provenant de l'analyse d'une huile.	75
Figure 53. Triglycéride SOL.	77
Figure 54. Triglycéride PoLA.	77
Figure 55. Spectre RMN ¹ H de la sous fraction ff2 _{2C} , CDCl ₃ , 500MHz.	78
Figure 56. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169.	78
Figure 57. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169.	80
Figure 58. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169. Zoom sur l'ion 575,5001.	80
Figure 59. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169. Zoom sur l'ion 603,5315.	81
Figure 60. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169.	81
Figure 61. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de valeur m/z = 902,8169. Zoom sur l'ion 603,5315.	82
Figure 62. Structure du composé (88). sn- 1, sn- 2, sn- 3 sont les trois positions des acides gras stéarique, oléique et linoléique sur le glycérol.	83
Figure 63. Monoglycérolipide 99 isolé de l'éponge <i>Sarcotragus</i> sp. et de l'algue <i>Ishige sinicola</i> .	85
Figure 64. Spectre RMN ¹ H des composés 89 et 90 dans du CDCl ₃ , 600 MHz.	86
Figure 65. Spectre HMBC du composé 89 dans du CDCl ₃ , 600 MHz.	88

Figure 66. Principales corrélations HMBC du composé 89. Géométrie Z de l'insaturation précisée en rouge.	88
Figure 67. Fragments de structures des composés 89 et 90.	89
Figure 68. Spectre RMN ¹ H du composé 91 dans du CDCl ₃ , 300 MHz. Structure du composé 91.	90
Figure 69. Spectre RMN ¹ H du composé 92 dans du MeOD, 500 MHz.	92
Figure 70. Superposition des spectres RMN HMBC (vert) et HSQC (noir), MeOD, 600 MHz, du composé 92.	93
Figure 71. Structure et déplacements chimiques de l'acide succinique (92).	93
Figure 72. Spectre RMN ¹ H du composé 93 dans du MeOD, 500 MHz.	95
Figure 73. Structure et déplacements chimiques de la thymidine (93).	95
Figure 74. Superposition des spectres RMN ¹ H, MeOD, 500 MHz, des composés 93, 94 et 96.	97
Figure 75. Structure et déplacements chimiques de la 5'-O-acétylthymidine (94).	98
Figure 76. Structure et déplacements chimiques de la 3'-O-acétylthymidine (96).	99
Figure 77. Spectre RMN ¹ H du composé 95, 600MHz, MeOD.	100
Figure 78. Principales corrélations HMBC du composé 95.	101
Figure 79. Structure et déplacements chimiques de la 5'-O-acétyluridine (95).	101
Figure 80. Spectre RMN ¹ H du composé 97 dans du DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz.	103
Figure 81. Structure de l'uridine (97).	103
Figure 82. Comparaison du profil isotopique théorique de l'adduit sodium C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₅ S Na ⁺ au profil de 98.	105
Figure 83. Spectre RMN ¹ H du composé 98 (DMSO, 600MHz).	106
Figure 84. Structure de (98), COSY (¹ H- ¹ H) et principales corrélations HMBC and ROESY.	107
Figure 85. Structure de la thiaplakortone A.	108
Figure 86. Hypothèse de structure pour 98 considérée mais réfutée.	109
Figure 87. Hypothèse de structure retenue pour (98).	109
Figure 88. Fragmentations LTQ-Orbitrap-SM ² and LTQ-Orbitrap-SM ³ de l'ion moléculaire [M+Na] ⁺ du composé 98.	110
Figure 89. Comparaison de la DFT-RMN (δ_H et δ_C) calculée (moyenne des deux conformères; en rouge) et expérimentale (en bleu) pour les régioisomères 1-A et 1-B.	112
Figure 90. Hypothèse de biosynthèse pour orbicularisine (98).	114
Figure 91. Zoom entre 1 et 13 minutes sur les chromatogrammes de <i>Codakia orbicularis</i> (A) et <i>Lucina pensylvanica</i> (B).	115
Figure 92. Molécules isolées 87, 89 - 92 dont l'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion des disques.	117
Figure 93. Bio-essais du composé (87) sur la culture d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (Gram ⁻). T ⁻ : pastille de cellulose contenant 20 μ L d'acétate d'éthyle. AMC: Antibiogramme d'amoxiciline de 50 μ g (témoin positif).	119
Figure 94. Bio-essais des composés (89 et 90) sur la culture d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (Gram ⁻). T ⁻ : pastille de cellulose contenant 20 μ L d'acétate d'éthyle. T ⁺ : Antibiogramme d'amoxiciline de 50 μ g (témoin positif).	120
Figure 95. Bio-essais de la 4-hydroxybenzaldéhyde (91) sur la culture de <i>Micrococcus luteus</i> (non référencée, Gram ⁺) (1) et sur la culture <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (Gram-) (2). ...	121
Figure 96. Molécules isolées 93 - 98 dont l'activité antibactérienne a été évaluée par CMI en milieu liquide.	123
Figure 97. Photographie de l'herbier à <i>Thalassia testudinum</i> en Guadeloupe (Photo F. Goudou, 2013).	128

Figure 98. Photographie de *L. pensylvanica* coquille fermée (a) (Marlo F. Krisberg, 2008) et ouverte (b) Photographie de *C. orbicularis* coquille fermée (c) et ouverte (d)..... 129

Figure 99. Présentation du matériel pour réaliser les bio-essais. 131

Figure 100. (A) Présentation d'une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive solide ensemencée depuis 24h par une culture bactérienne en phase plateau diluée (B1, B2)..... 132

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1. Anatomie d'un bivalve (vue dorsale). Schéma tiré du site http://plongee.cours.free.fr/bio/mollusques.htm	27
Schéma 2. Cycle du soufre.(modifié d'après Jannasch &Wirsen 1985; Suzuki, 1999) ·	61
Schéma 3: Cycle de Calvin-Benson (Minic & Hervé, 2004) ¹⁷⁶	62
Schéma 4. Schéma de fractionnement de l'extrait brut de branchies de <i>Codakia orbicularis</i> .70	
Schéma 5. Mécanisme de fragmentation du triglycéride PoLA protoné pour obtenir les fragments du diglycéride [DAG _{1,3}] ⁺ et des acides gras [R ₃ COOH] ⁺ , [R ₃ CO] ⁺ . <i>sn-1</i> , <i>sn-2</i> et <i>sn-3</i> sont les positions des acides gras sur le glycérol.	79
Schéma 6. Extraction des branchies de <i>C.orbicularis</i> par de l'acétate d'éthyle jusqu'au bio-essais.....	130
Schéma 7. Protocole pour réaliser les bio-essais.....	131
Schéma 8. Extraction des branchies de <i>Codakia orbicularis</i> et fractionnement de l'extrait brut obtenu (CSC6). Les fractions présentant une activité antibactérienne sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Micrococcus luteus</i> (voir protocole schéma 2) sont encadrées en rose.....	136
Schéma 9. Obtention du composé 88 en vert à partir de la fraction active F2 (en rose).....	137
Schéma 10. Composés 89, 90, 92 et 93 (en vert) isolés de la fraction active F13 (en bleu)..	137
Schéma 11. Isolement du composé 91 en vert avec l'HPLC préparative A* à partir de la fraction active F6 (en rose).....	138
Schéma 12. Obtention de la F15 _{sum3} suite à une filtration de la F15 suivie de deux précipités de graisses.	139
Schéma 13. Composés 92, 96 et 98 (en vert) isolés de la F15 _{sum3}	140
Schéma 14. Obtention des produits 93, 94 et 95 en vert, après purification de la fraction active F17 (en rose).	141
Schéma 15. Obtention des produits 93 et 97 (en vert), après purification de la fraction active F18 (en rose) par l'HPLC E*	141
Schéma 16. Obtention du produit 98 (en vert) après purification de la fraction la plus active F14 (en rose).....	142
Schéma 17. Préparation des échantillons destinés à l'analyse de spectrométrie de masse haute résolution.....	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Activités biologiques associées aux peptides et aux hydrolysats de protéines provenant des Mollusques et des crustacés (Harnedy <i>et al.</i> , 2011 modifié par Goudou) ⁹⁶ . ECA = Enzyme de Conversion de l'Angiotensine.....	41
Tableau 2. Valeur des ions m/z de la sous- fraction ff _{2C} et masses exactes possibles pour chaque ion formé à partir d'adduits potassium K, ammonium NH ₄ , proton H, sodium Na. Les masses exactes en gras correspondent à celles de TAG répertoriés dans les bases de Byrdwell.	75
Tableau 3. Possibilités de combinaisons de TAG pour les masses exactes de la sous fractions 22c. Les combinaisons de TAG respectant les données RMN ¹ H de la 22c (3 insaturations, 2 protons bis-allyliques, 62 protons aliphatiques) sont surlignées en bleu. Abréviations des acides gras: A: arachidique; G: gadolérique; L: linoléique; La: laurique;Ln: linoléique (ω -3);M: myristique; O: oléique; P: palmitique; Po: palmitoléique; S: stéarique.....	76
Tableau 4. Données RMN ¹ H et ¹³ C du composé 89, CDCl ₃ , 600MHz.	87
Tableau 5. Comparaison des données RMN ¹ H (CDCl ₃) du monoglycérolipide de la littérature et de celles de 89.	87
Tableau 6. Données RMN ¹ H, CDCl ₃ , 300MHz du composé 91.....	91
Tableau 7. Données RMN 1D du composé 92.....	92
Tableau 8. Comparaison des données RMN ¹ H, MeOD, 500 MHz, de la thymidine (93) avec celles des composés 94 et 96. Les informations surlignées en bleu montrent les différences des positions 5' et 3'.....	98
Tableau 9. Données RMN ¹ H et ¹³ C du composé 95, MeOD, 500MHz.	100
Tableau 10. Comparaison des abondances relatives théoriques et expérimentales des isotopes du profil isotopique de l'adduit sodium (C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₅ S Na ⁺) du composé 98.	105
Tableau 11. Données RMN ¹ H et ¹³ C du composé 98 dans le DMSO- <i>d</i> ₆ . Les spectres ont été enregistrés à 500 MHz.....	108
Tableau 12. Évaluation de l'activité antibactérienne des composés 87, 89 - 92. Témoins positifs: AMC = amoxicilline, VA = vancomycine. Activité: (+); Inactivité (-).	118
Tableau 13. Récapitulatif sur l'activité antibactérienne des molécules isolées dans cette étude.	125
Tableau 14. Période de récoltes de <i>C. orbicularis</i> et <i>L. pensylvanica</i>	128
Tableau 15. Gradient permettant d'obtenir une séparation chromatographique optimale de l'extrait brut de <i>Codakia orbicularis</i> sur la colonne Atlantis T ₃ C ₁₈ (3 μ m, 4,6*75 mm).....	134
Tableau 16. Gradient transposé sur la colonne Atlantis T ₃ C ₁₈ (5 μ m, 4,6*150 mm) (HPLC A*).	134
Tableau 17. Mise en évidence des quantités obtenues (branchies/ extraits bruts) lors des différentes récoltes de <i>Codakia orbicularis</i> . Les numéros des colonnes chromatographiques sur gel de silice (CSC) qui ont été utilisées pour fragmenter les extraits bruts sont également indiqués.	135
Tableau 18. Informations sur les molécules isolées de la fraction F13.....	138
Tableau 19. Conditions SFC pour purifier l'échantillon f15-1, contenant le composé 92.	140
Tableau 20. Gradient utilisé pour éluer le composé (88) de la sous-fraction ff _{2C} sur la colonne Thermo Accucore C ₁₈ (2,6 μ m, 100 mm* 2,1 mm). Solution A: H ₂ O ultrapure/ACN : 40/60 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique.	143

RESUME

Codakia orbicularis est un mollusque bivalve appartenant à la famille des Lucinidae et établissant des symbioses avec des bactéries sulfo-oxydantes (symbiotes) au sein de ses branchies. Dans l'hypothèse où toute symbiose nécessite une régulation par des molécules de dialogue, une étude chimique exhaustive pourrait aboutir à la mise en évidence des métabolites impliqués. Le travail de ce manuscrit porte donc sur l'isolement de métabolites secondaires à partir des branchies de ce bivalve et sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules isolées. Douze composés ont été isolés des branchies de *Codakia orbicularis* et leurs structures ont été déterminées par les méthodes spectroscopiques usuelles. Parmi ces molécules, une seule est nouvelle et a été nommée orbicularisine. Elle présente un squelette indolone spirotetracyclique inédit. Parmi les molécules isolées, seules quatre d'entre elles présentent une activité antibactérienne à savoir le soufre S₈, la 4-hydroxybenzaldéhyde et deux monoglycérolipides. L'orbicularisine s'est révélée inactive contre un panel de lignées cellulaires cancéreuses et de kinases. Le nouveau squelette de l'orbicularisine pourrait permettre d'aboutir à une nouvelle famille de molécules par synthèse organique et ainsi accroître la diversité moléculaire autour de ce motif inédit. Il sera également intéressant de déterminer l'origine des molécules isolées et de connaître leur(s) implication(s) dans la régulation des symbiotes du bivalve. Les résultats chimiques obtenus sur *C. orbicularis* et sur les Lucinidae en général sont intéressants puisque les espèces côtières appartenant aux bivalves ont été peu exploitées en chimie jusqu'à ce jour.

INTRODUCTION GENERALE

I. PRESENTATION CONTEXTUELLE.

La pêche et l'environnement marin ont une importance cruciale dans les milieux insulaires tel que la Guadeloupe. Ce sont des atouts économiques majeurs pour l'île puisque de nombreuses espèces endogènes sont consommées par la population locale, dont le bivalve *Codakia orbicularis* (Ordre Vénéroïda, famille Lucinidae), nom vernaculaire "palourde blanche", qui a fait l'objet d'étude de cette thèse. De manière plus générale, les bivalves sont essentiels au bon fonctionnement des herbiers⁰. Ces herbiers sont présents le long du littoral guadeloupéen. Ils ont un rôle écologique important puisqu'ils sont une source de nourriture pour de nombreuses espèces récifales. Un mauvais fonctionnement de l'herbier impactera fortement l'écosystème et par conséquent l'économie de l'île.

Les Bivalves ont généralement une activité de filtration et peuvent accumuler dans leur organisme des substances toxiques comme les métaux lourds ou les pesticides. Dès lors qu'une espèce animale est consommée, il est nécessaire de réaliser des études biologiques et chimiques sur cette dernière pour savoir si l'animal accumule des substances toxiques ou non dans son organisme. L'objectif final de ces études étant d'éviter des risques sanitaires.

Le mollusque bivalve *C. orbicularis* est un modèle de grande taille, bien adapté pour des études chimiques qui nécessitent des quantités importantes de matière première. De plus, *C. orbicularis* est associé à des bactéries (symbiose), ce qui suggère une régulation de ces dernières et la possibilité de trouver chez ce bivalve des molécules d'intérêt pharmaceutique (par exemple des molécules à activité antibactérienne). Le dernier point important à souligner est que *C. orbicularis* est un bivalve en symbiose du milieu côtier, donc un excellent modèle de comparaison avec les modèles en symbiose du milieu profond pour lesquels le coût des récoltes est très élevé. Par ailleurs, les études scientifiques menées sur *C. orbicularis* permettraient de promouvoir l'aquaculture locale de cette espèce endogène traditionnellement consommée en Guadeloupe.

L'équipe "biologie de la mangrove", du laboratoire de biologie marine de l'Université des Antilles et de l'UMR 7138, a donc trouvé judicieux de s'intéresser aux interactions entre les bactéries thioautotrophes et les invertébrés marins du milieu côtier. Dans ce laboratoire, depuis plus de vingt ans, des études biologiques ont été menées sur le mollusque bivalve *C. orbicularis* mais aucune étude chimique n'a été jusqu'à présent réalisée. Dans le cadre de ma thèse, une étude chimique a été effectuée sur l'espèce *C. orbicularis* pour apporter des

⁰ Heide, T. *et al. Science*, **2012**, 336, 1432-1434.

éléments de réponse à une question d'ordre biologique mais également pour trouver des structures chimiques originales. Je présenterai en premier lieu dans ce manuscrit le milieu marin et les principales études scientifiques qui y ont été menées initialement. Ensuite, en introduction au sujet de cette thèse, l'anatomie des bivalves sera présentée. Lorsqu'une étude chimique est réalisée sur un modèle biologique, il est important de connaître les molécules préalablement isolées de la classification de ce modèle. En ce sens, je ferai une présentation bibliographique de l'ensemble des molécules préalablement isolées de la classe des bivalves, en particulier de l'ordre des Vénéroïda et de la famille des Lucinidae. Ensuite le modèle lui-même sera décrit pour poser la problématique et les objectifs de cette étude. Dans une troisième partie, intitulée " Résultats et Discussions" sera exposée l'étude chimique réalisée sur le mollusque bivalve *C. orbicularis* et qui a conduit à l'isolement de douze molécules dont une nouvelle munie d'un squelette inédit. Dans cette partie les activités antibactériennes des molécules isolées seront exposées. Une étude chimique comparative avec une autre espèce de la famille des Lucinidae (*Lucina roquesana*) sera abordée. La partie expérimentale, en quatrième partie, sera consacrée à la méthodologie et aux techniques employées pour parvenir à l'ensemble de ces résultats. En dernier lieu, les conclusions sur les objectifs de thèse que je devais atteindre et les perspectives d'études envisagées seront amenées.

II. MILIEU MARIN ET ETUDES SCIENTIFIQUES.

Les produits naturels notamment ceux provenant de plantes ou de microbes terrestres, sont depuis longtemps une source traditionnelle de biomolécules ¹. On peut citer par exemple, la morphine extraite du pavot contre la douleur ², les glycosides cardiotoniques extraits de la plante *Digitalis lanata* ³ et la pénicilline extraite du champignon *Penicillum chrysogenum* comme antibiotique ⁴. Les chercheurs ne se sont pourtant pas limités au milieu terrestre mais également aux écosystèmes du milieu marin. Les premières recherches ont été réalisées au niveau de la côte littorale des continents, milieux marins peu profonds et accessibles. Le concept de "médicaments de la mer" ⁵ est né au début des années 1950, suite à la découverte de la spongouridine (**1**) et de la spongouthymidine (**2**) qui présentaient dans leurs structures un D-arabinose à la place du D-ribose connu. Ces molécules ont été isolées d'une éponge caribéenne récoltée au large de la Floride et des Bahamas et appelée *Tethya crypta* ^{6,7}. Cette découverte a conduit à la synthèse de leurs analogues respectifs l'Ara-C (**3**) (Cytarabine, anticancéreux) et l'Ara-A (**4**) (Vidarabine, antiviral) ^{8,9}, les deux premiers médicaments d'origine marine commercialisés ¹⁰ (**Figure 1**).

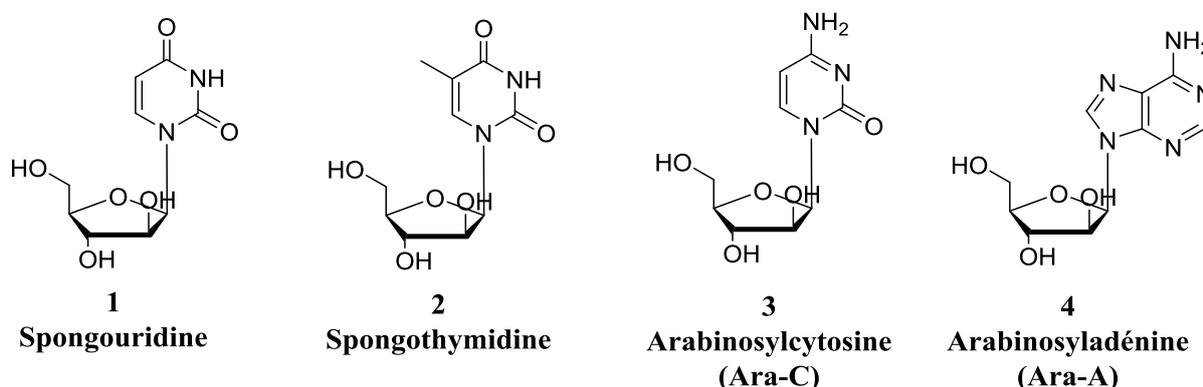


Figure 1. Premières molécules d'origine marine isolées **1, 2** et leurs analogues synthétiques (**3**: anticancéreux, **4**: antiviral).

¹ Schmidt, B.; Ribnicky, D. M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W. T.; Raskin, I. A. *Metabolism*. **2008**, *57*, 3-9.

² Achor, L. B.; Geiling, E. M. K. *Anal. Chem.* **1954**, *26*, 1061-1062.

³ Bruneton, J. *ed Lavoisier*, **2008**, 2nd, 1136.

⁴ Edwin H. Flynn; McCormick, M. H.; Stamper, M. C.; DeValeria, H.; Godzeski, C. W. *J Am Chem Soc* **1962**, *84*, 4594-4595.

⁵ Freudenthal, H. D. *J. Ocean Technol. Mar. Technol. Soc.* **1967**, 1-297.

⁶ Bergmann, W.; Burke, D. C. *J. Ocean Technol. Mar. Technol. Soc.* **1956**, *21*, 226-228.

⁷ Bergmann, W.; Feenez, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.

⁸ Reist, E. J.; Benitez, A.; Goodman, L.; Lee, W. W. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3274-3279.

⁹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215-234.

¹⁰ CAEN Archives. *Chem.Eng.News Archive*. **1978**, *1*, 8.

L'évolution des techniques d'exploration au cours du temps a permis d'étendre la recherche sur les produits naturels d'origine marine (végétale ou animale) à des milieux plus profonds. En 1934, les capsules (invention de Beebe et Barton) permettaient aux plongeurs d'atteindre environ neuf cent mètres de profondeur au large des côtes. En 1943, le premier scaphandre autonome (invention de Cousteau et Gagnan) est apparu, laissant plus d'autonomie aux plongeurs pour accéder aux ressources marines mais jusqu'à environ soixante mètres de profondeur. Au delà de mille mètres, profondeurs inexplorées à cette époque, les conditions de lumière (zones photiques versus zones aphotiques), ainsi que les variations de température et de pressions ont laissé longtemps supposer que la sphère marine profonde était peu favorable au développement de la vie ¹¹. Il s'est avéré bien au contraire que le milieu marin profond est le siège d'une biodiversité à la fois très importante et originale ¹², grâce à l'arrivée du premier sous-marin moderne d'exploration au début des années 50. L'évolution technique a permis un essor des campagnes de bioprospections marines à des fins pharmaceutiques. En 1969, la Trabectédine ou Ecteinascidine-743 (**5**) a été isolée en très petite quantité (10 ppm) du tunicier *Ecteinascidia turbinata* avec une activité antitumorale sur des lignées cellulaires du colon (LoVo et SW620) et des ovaires (A2780) ¹³. Bien que les nouvelles technologies, notamment dans l'analyse spectroscopique, aient poussé les limites d'observations à des microgrammes, augmentant ainsi les opportunités de découvrir de nouvelles structures ¹⁴, l'identification structurale complète de la Trabectédine, par les méthodes spectroscopiques, n'a été achevée qu'en 1990. Les premières étapes de synthèse ont été réalisées en 1996 et la molécule a été mise sur le marché en 2007 sous le nom de Yondélis[®] pour le traitement des sarcomes mous ¹⁵.

La grande diversité structurale des produits marins résulte du grand nombre d'espèces marines existantes ¹⁶ (n'ayant souvent pas été l'objet d'études chimiques), mais aussi des écosystèmes dans lesquels on les retrouve ¹⁷. En 2000, une base de données unique a été élaborée par Le CoML (Census of Marine Life) avec pour objectif de répertorier les espèces marines des bactéries aux baleines. Cette base compte aujourd'hui plus de 120 000 espèces marines ¹⁸. Les études chimiques d'espèces de différents phyla existants sont fortement inégales (**Figure 2**)

¹¹ Costello, M. J.; Cheung, A.; De Hauwere, N. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 8821–8828.

¹² Tadesse, M.; Gulliksen, B.; Strøm, M. B.; Styrvold, O. B.; Haug, T. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, *99*, 286–293.

¹³ Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 97–105.

¹⁴ Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 69–85.

¹⁵ Corey, E. J.; Gin, D. Y.; Kania, R. S. *Communications* **1996**, *5*, 9202–9203.

¹⁶ Kim, S. K.; Wijesekara, I. *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 1–9.

¹⁷ Aho, J. E.; Pihko, P. M.; Rissa, T. K. *Technology* **2005**, *105*, 4406–4440.

¹⁸ Bouchet, P.; Billet, D.; Boxshall, G. A.; Boyen, C.; Charrier, B.; Cock, J. M. *Fund. BBVA* **2006**, *1*, 1–160.

les éponges étant de loin les plus étudiées. En effet, les éponges sont des organismes benthiques qui ne présentent aucun biofilms à leurs surfaces, ce qui laisse supposer qu'ils produisent des molécules de défenses d'intérêts pharmacologiques .

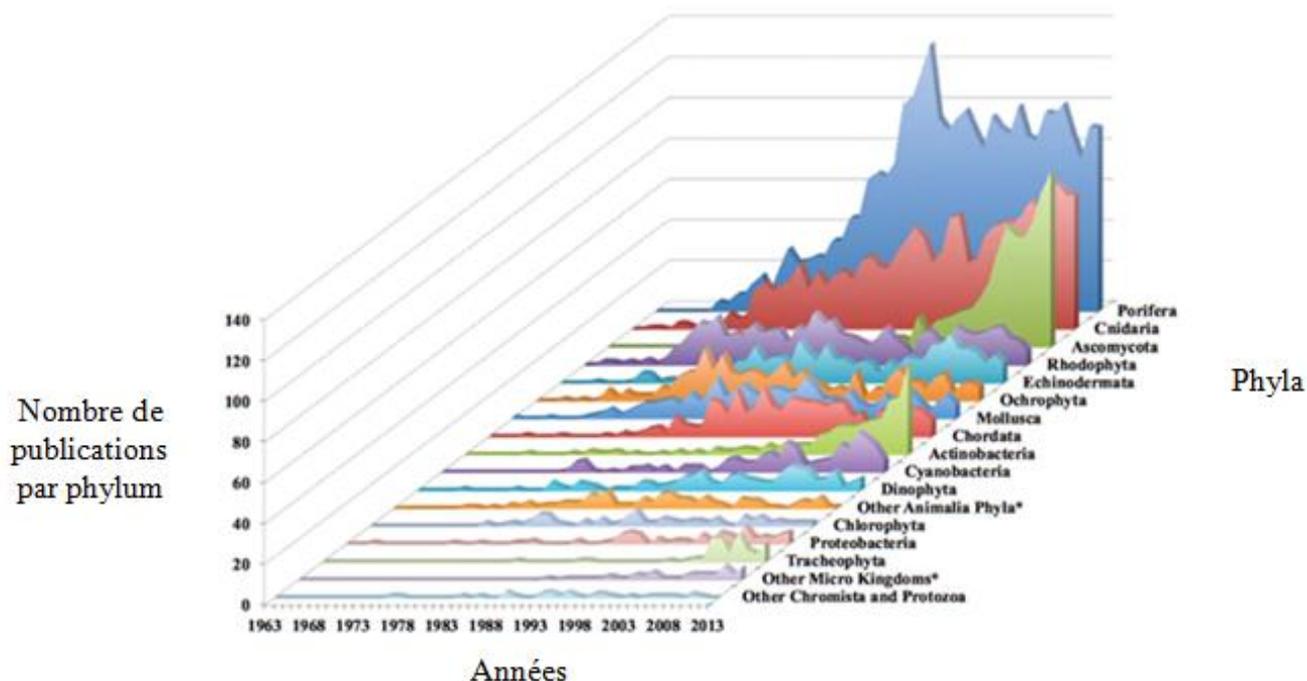


Figure 2. Les phyla étudiés par la communauté scientifique des produits naturels marins depuis 1963. (d'après Blunt *et al.*, 2016)¹⁹.

Le phylum des Mollusques a été globalement moins étudié que celui des Porifera en dépit du fait que les Mollusques constituent le second plus grand embranchement du règne animal, ce qui représente environ 7% de la vie animale²⁰. L'embranchement des Mollusques comporte huit classes: les Solénogastres et les Caudofovéates (qui constituaient auparavant une seule classe appelée Aplacophora), les Polyplacophores, les Monoplacophores, les Scaphopodes, les Céphalopodes, les Gastéropodes et les Bivalves²¹. Les Bivalves représentent la deuxième plus grande classe des Mollusques après celle des Gastéropodes²² (**Figure 3**). Ceci explique pourquoi les études chimiques ont majoritairement porté sur la classe des Gastéropodes d'où 1288 métabolites ont été isolés contre 176 chez les Bivalves d'après MarinLit (Base de données des substances naturelles d'origine marine, version en ligne, 2017).

¹⁹ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; Keyzers, R.; Fusetani, N. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *32*, 116–211.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

²¹ Lecointre, G.; Le Guyader, H. *Belin.* **2001**, *1*, 543.

²² Sharma, P. P.; González, V. L.; Kawauchi, G. Y.; Andrade, S. C. S.; Guzmán, A.; Collins, T. M.; Glover, E. A.; Harper, E. M.; Healy, J. M.; Mikkelsen, P. M. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2012**, *65*, 64–74.

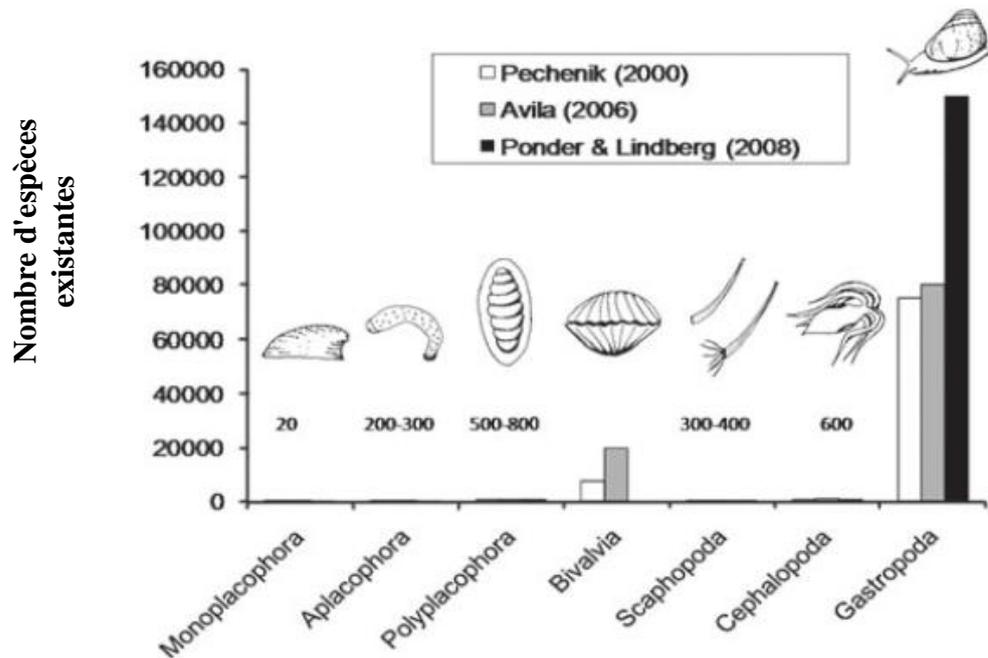


Figure 3. Nombre estimé des espèces existantes dans chaque classe du phylum des Mollusques; la classe Aplacophora est actuellement divisée en deux classes (Solénogastres et Caudofovéates) (d'après Benkendorf, 2010) ²⁰.

Parmi les nouvelles structures originales décrites chez les Mollusques, certaines ont conduit, ou conduiront, à de nouveaux médicaments après de nombreuses années de recherche (**Figure 4**). L' ω -conotoxin MVIIA par exemple, est un peptide isolé d'un cône marin tropical vénimeux *Conus magus* (Mollusque Gastéropode) ²³. La forme synthétique a été nommée Ziconotide (**6**) ²⁴, et a été commercialisé sous le nom de Prialt en 2004, comme puissant antalgique pour le traitement des douleurs chroniques ²⁵. Un autre peptide, cette fois isolé de l'aplysie (généralement appelé lièvre de mer) *Dolabella auriculata* en 1972 (Mollusque Gastéropode Opisthobranchie) a été baptisé Dolastatine 10 (**7**) et présente une forte cytotoxicité liée à l'inhibition de la tubuline. Il agit comme un antimétabolite. Sa synthèse totale a été achevée en 1989 mais il ne passera pas la phase clinique II ^{26,27}. En revanche, son analogue synthétique lié à un anticorps, l'Adcetris[®] (Brentuximab vedotin) a été récemment mis sur le marché et présente une activité cytotoxique ²⁸. Le Kahalalide F (**8**) isolé du nudibranche *Elysia rufescens* (Mollusque Gastéropode) en 1993 est un depsipeptide

²³ Olivera, B. M.; Gray, W. R.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Varga, J.; Rivier, J.; De Santos, V.; Cruz, L. J. *Science*. **1985**, *4732*, 1338–1343.

²⁴ Miljanich, G. P. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3029–3040.

²⁵ Garber, K. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 399.

²⁶ Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883–6885.

²⁷ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463–5465.

²⁸ Feng, Y.; Zhu, Z.; Chen, W.; Prabakaran, P.; Lin, K.; Dimitrov, D. S. *Biomedicines* **2014**, *2*, 1–13.

antitumoral et cytotoxique ^{29,30}. Le Kahalalide F (**8**) est en phase clinique I tout comme l'ES-285 (**9**) isolé du bivalve *Mactromeris polynyma* ^{31,32}.

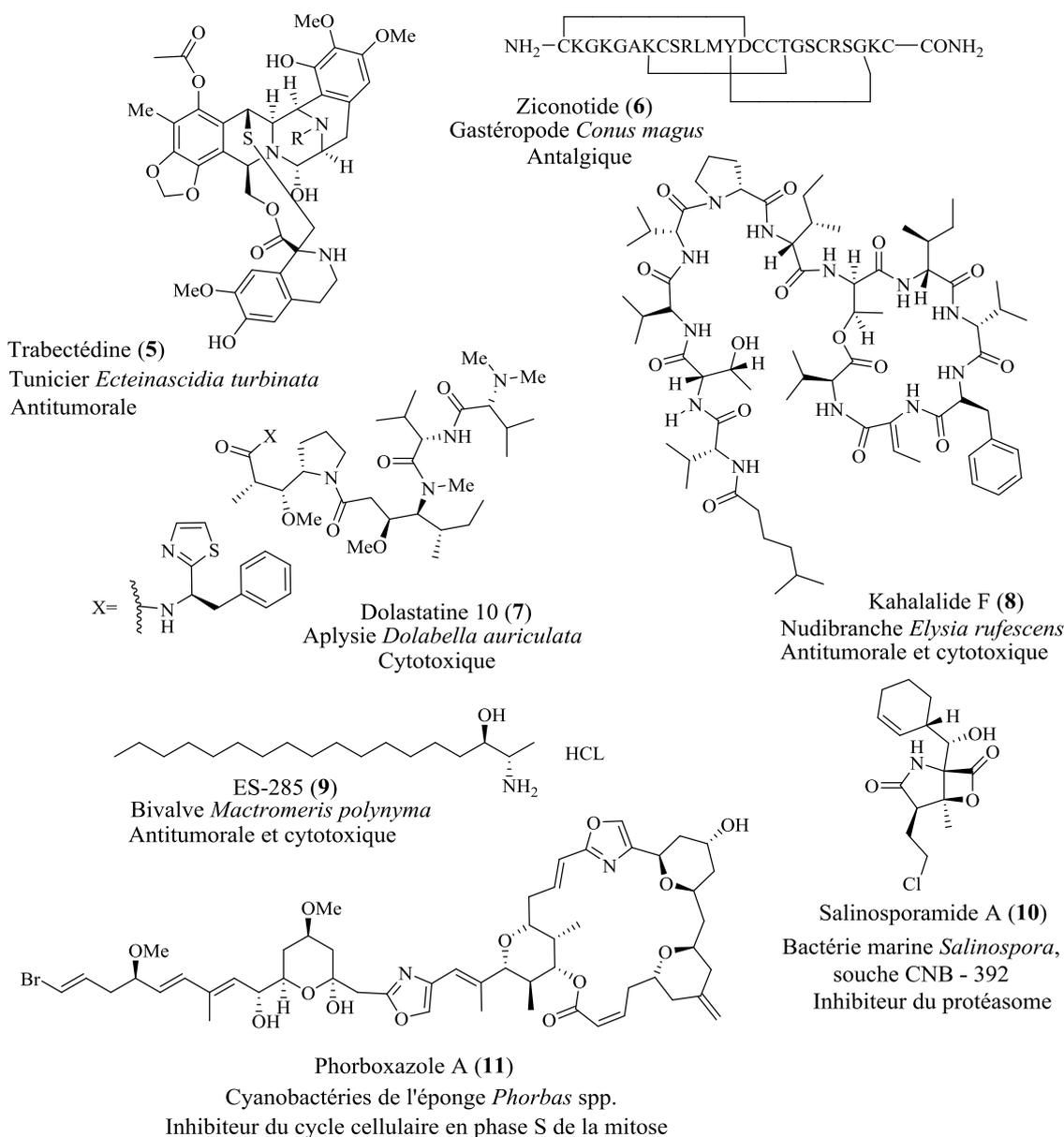


Figure 4. Présentation de molécules commercialisées en tant que médicaments ou actuellement en phase clinique à partir de Mollusques, de bactéries ou d'invertébrés marins.

Le Salinosporamide A (**10**), contrairement aux autres molécules préalablement citées, a été isolée d'une bactérie marine du genre *Salinospora*, vivant dans le sédiment des eaux profondes, par Fenical et ses collègues en 2003 ³³. Il s'agit d'un inhibiteur du protéasome qui a

²⁹ Hamann, M.; Scheuer, P. *J. Am. Chem.* **1993**, *10*, 5825–5826.

³⁰ Goetz, G.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. *J. Tetrahedron.* **1999**, *55*, 7739–7746.

³¹ López-Maciá, Á.; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398–11201.

³² Faircloth, G.; Cuevas, C. *Progress in molecular and subcellular biology.* **2006**, *43*, 363–379.

³³ Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C.A.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; John, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 355–357.

passé avec succès la phase clinique II pour le traitement des glioblastomes ³⁴. D'autres molécules ont été isolées de bactéries associées à des invertébrés marins. Le phorboxazole A (**11**) par exemple a été isolé de l'éponge *Phorbas* spp. mais est produit par ses cyanobactéries symbiotiques ³⁵. Cette molécule inhibe, à des concentrations nanomolaires, le cycle cellulaire en phase S (phase où le matériel génétique est répliqué) de la mitose, empêchant ainsi la division cellulaire ³⁵.

Les espèces de Mollusques Gastéropodes et Bivalves (moins de 1%) ont peu été étudiés pour leurs métabolites secondaires ²⁰. Certains de ces métabolites secondaires présentent des activités biologiques et d'autres n'en présentent pas ou plutôt leurs activités biologiques demeurent inconnues voire inexplorées ³⁶.

³⁴ Fenical, W.; Jensen, P. R.; Palladino, M. A.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17*, 2175–2180.

³⁵ Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8126–8131.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

³⁶ Wassermann, A. M.; Lounkine, E.; Hoepfner, D.; Le Goff, G.; King, F. J.; Studer, C.; Peltier, J. M.; Grippo, M. L.; Prindle, V.; Tao, J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 958–966.

INTRODUCTION DU SUJET

CHAPITRE 1 . SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE: DES MOLLUSQUES BIVALVES AUX *LUCINIDAE*.

Codakia orbicularis appartient à la famille des Lucinidae. Ces derniers sont des Mollusques Bivalves hétérodontes de l'ordre des Vénéroïda.

I. PRÉSENTATION BIOLOGIQUE DES MOLLUSQUES BIVALVES.

Les Bivalves sont des mollusques, d'eau douce ou d'eau de mer, dont le corps est recouvert d'une coquille constituée de deux parties distinctes (valves) et plus ou moins symétriques ²⁰. Une description anatomique d'un bivalve est présentée au schéma 1.

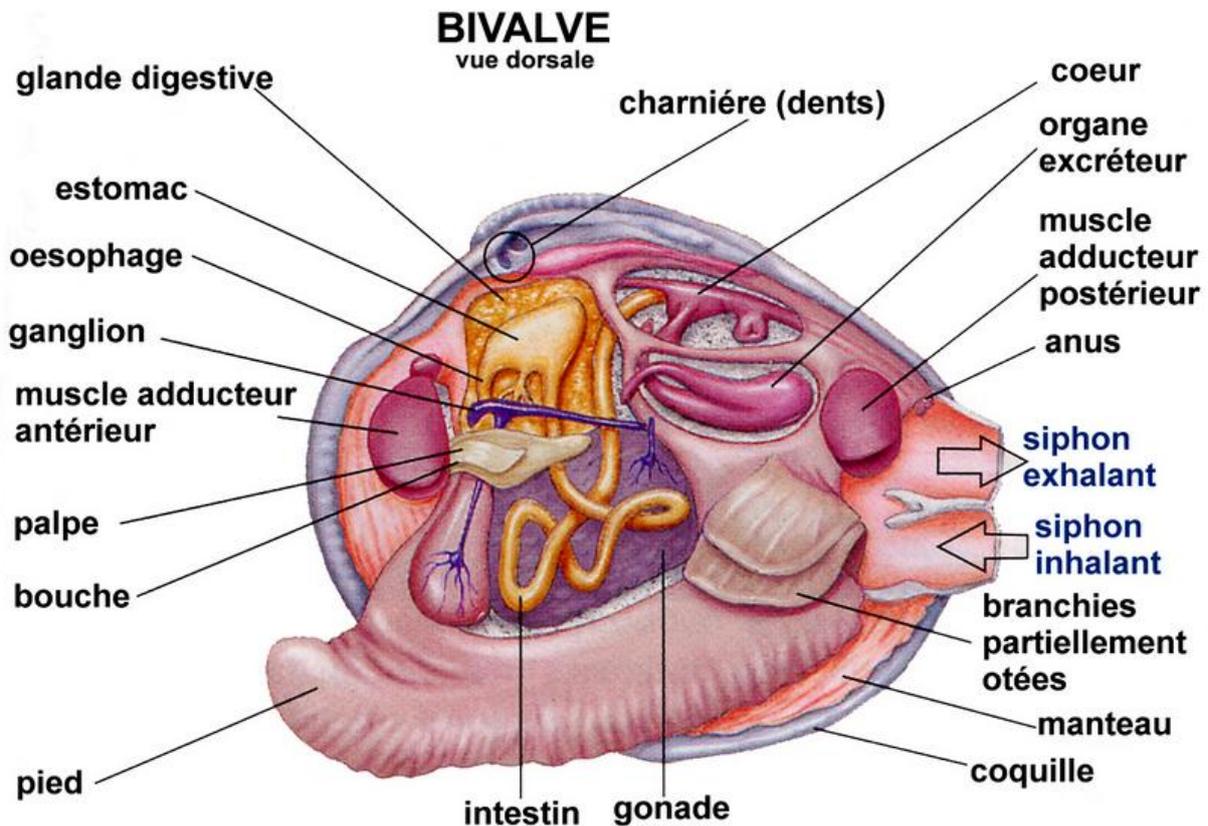


Schéma 1. Anatomie d'un bivalve (vue dorsale). Schéma tiré du site <http://plongee.cours.free.fr/bio/mollusques.htm>.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, 85, 757–775.

II. ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES PORTANT SUR LES MOLLUSQUES BIVALVES.

Avant d'entreprendre une étude chimique sur un modèle biologique, il est important de connaître les molécules préalablement isolées dans la classification (classe, ordre, famille) de ce modèle. D'après la base de données des substances naturelles d'origine marine MarinLit, les bivalves représentent la seconde classe la plus étudiée chimiquement dans l'embranchement des Mollusques (**Figure 5**).

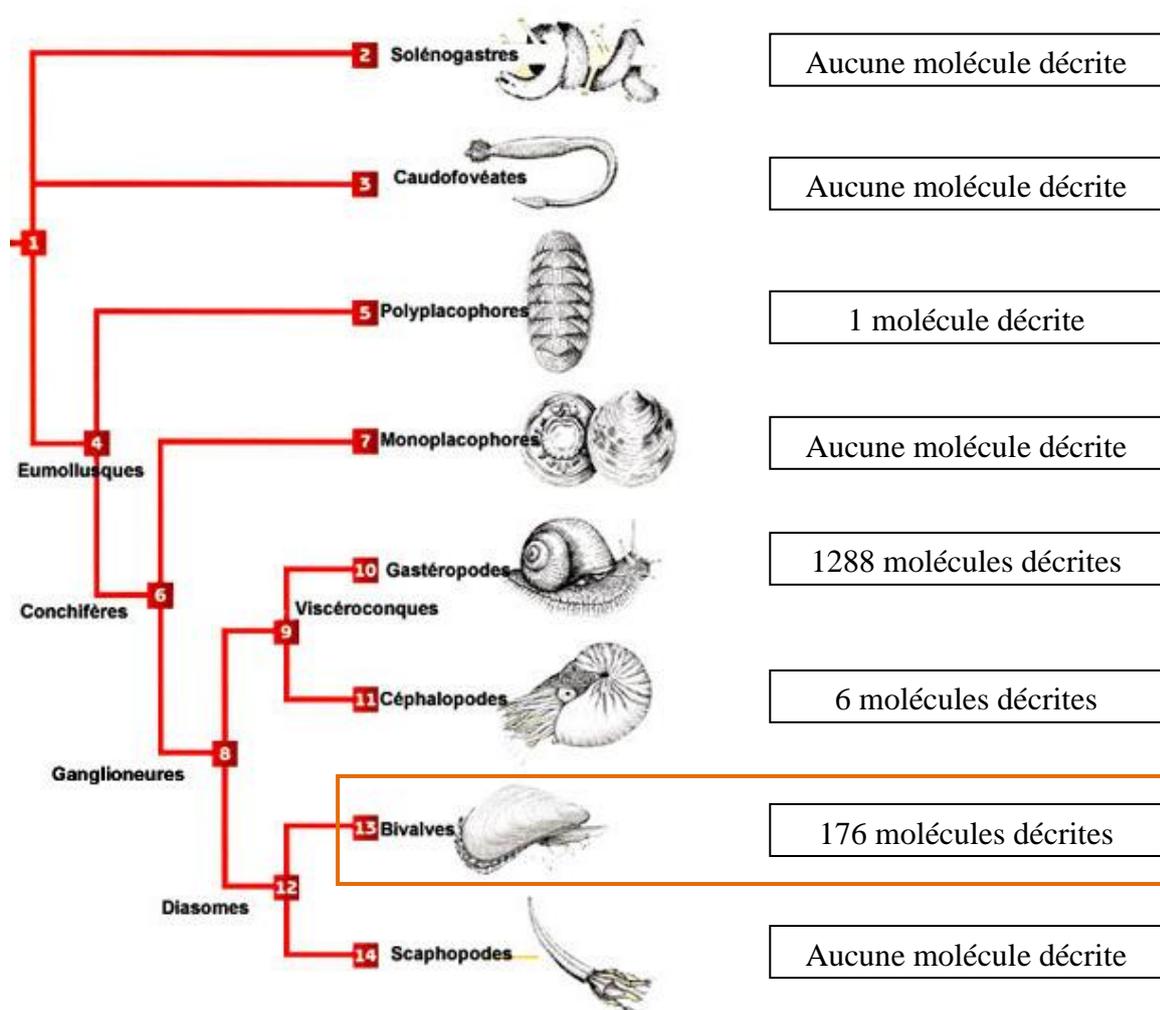


Figure 5. Classification phylogénétique de l'embranchement des Mollusques (Lecointre et Leguyader, 2006). La classe des bivalves est entourée en orange.

Les bivalves sont considérés comme une nourriture saine ou encore comme des remèdes traditionnels²⁰. Dans la plupart des cas, aucune étude scientifique qui n'a été entreprise pour appuyer les effets bénéfiques de ces mollusques sur la santé. Les mollusques, possédant

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

comme premier moyen de défense une coquille, ont été longtemps perçus comme des organismes ne produisant pas nécessairement des métabolites secondaires dotés d'une activité biologique. Ces organismes ont donc moins suscité l'attention des chercheurs pour la recherche de nouveaux produits naturels³⁷. Depuis la découverte du Ziconotide (**6**), un puissant antalgique isolé du cône *Conus magus*, il y a eu un intérêt grandissant au cours des dernières années pour la bioactivité des extraits de mollusques (notamment les Bivalves et Gastéropodes) et de leurs métabolites secondaires. Les produits naturels provenant de la classe des bivalves et leurs analogues sont particulièrement bien représentés parmi les composés anticancéreux en phase de développement clinique. Dans la classe des Bivalves, le nombre des molécules décrites dans chaque ordre est indiqué ci-dessous²²:

- Nuculoïda (0), Solemyoïda (0), Trigonioïda (0), Pholadomyoïda (0), Hippuritoïda (0), Myoïda (0), Eulamellibranchia (0)
- Unionoïda (2), Carditoïda (6), Teleodesmacea (10), Pectinoïda (15), Pterioïda (17), Arcoïda (36), Veneroïda (52), Oestreoïda (55) et Mytiloïda (87).

La recherche de produits naturels dans cette classe est très disparate en raison de la difficulté à accéder à certaines espèces des eaux profondes ou encore en raison de la petite taille de certaines espèces ne permettant pas d'envisager une étude chimique²⁰.

1. Molécules majoritairement extraites des mollusques bivalves: les lipides, rôles et intérêts.

Les lipides et les terpènes plus ou moins modifiés et dérivatisés par conjugaison sont les plus fréquemment isolés des Mollusques. Concernant les lipides, il s'agit essentiellement de glycérophospholipides (**12**), de stérols (**13**), de sphingolipides (**14**), de saccharolipides, de polycéramides, d'acides gras (**15**, **16**) et de glycérolipides (**17**, **18**, **19**) d'après LipidMaps® (Base de données des lipides) (**Figure 6**).

³⁷ Lin, Z.; Torres, J. P.; Ammon, M. A.; Marett, L.; Teichert, R. W.; Reilly, C. A.; Kwan, J. C.; Hughen, R. W.; Flores, M.; Tianero, M. D. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 73–81.

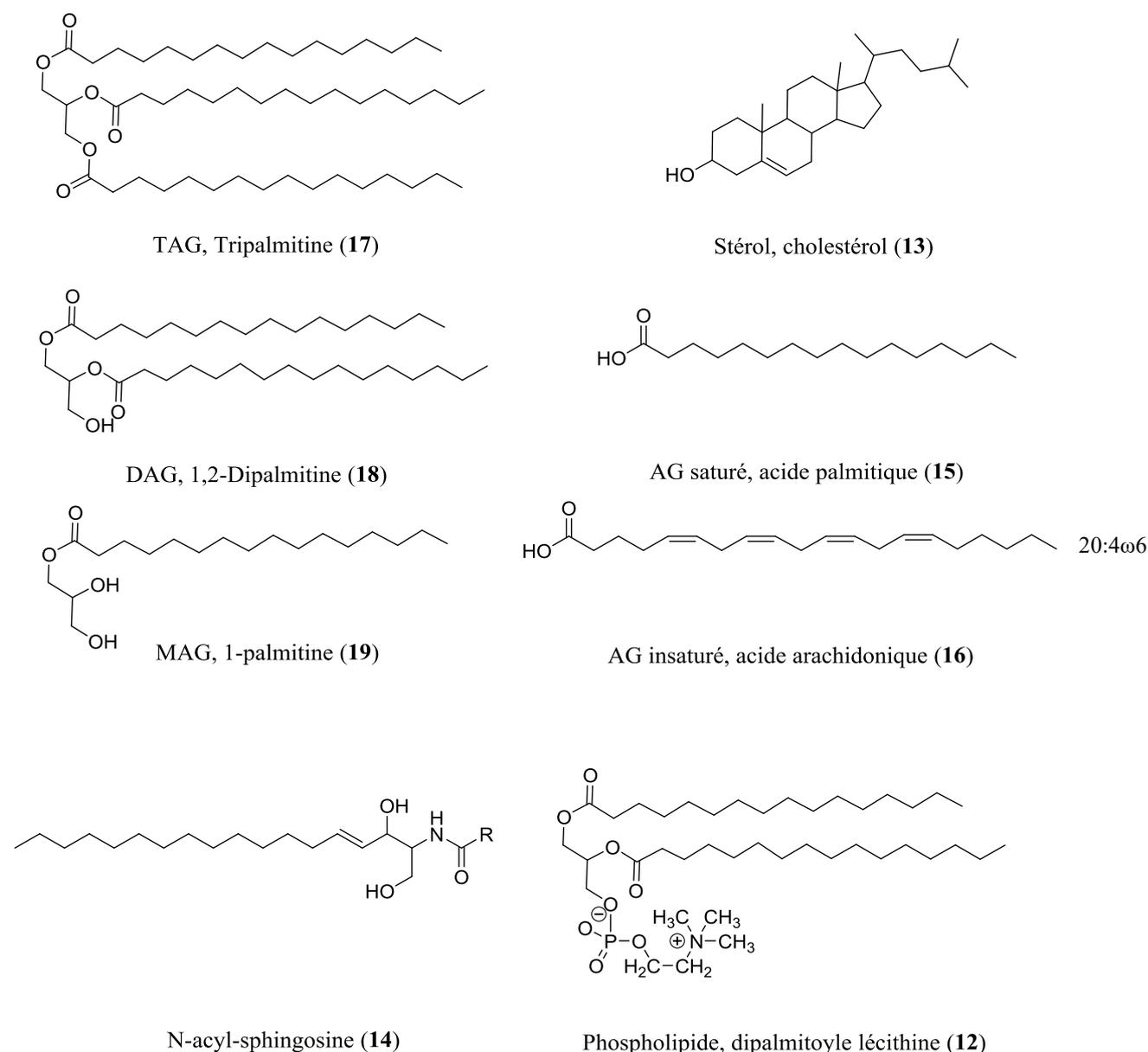


Figure 6. Exemples de structures lipidiques.

D'après la littérature, les espèces de Mollusques les plus riches en lipides appartiennent à la classe des Bivalves³⁸. Il existe de nombreuses études métabolomiques qui déterminent la composition lipidique d'organismes marins^{39, 40, 41} dont les bivalves^{42, 43, 44}.

³⁸ Abad, M.; Ruiz, C.; Martinez, D.; Mosquera, G.; Sánchez, J. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1995**, *110*, 109–118.

³⁹ Da Costa, E.; Silva, J.; Mendonça, S.; Abreu, M.; Domingues, M. *Mar. Drugs.* **2016**, *14*, 101.

⁴⁰ D'Ippolito, G.; Sardo, A.; Paris, D.; Vella, F. M.; Adelfi, M. G.; Botte, P.; Gallo, C.; Fontana, A. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 28.

⁴¹ Epand, R. F.; Savage, P. B.; Epand, R. M. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2007**, *1768* (10), 2500–2509.

⁴² Dagorn, F.; Couzinet-Mossion, A.; Kendel, M.; Beninger, P. G.; Vony, R.; Barnathan, G.; Wielgosz-Collin, G. *Mar. Drugs* **2016**, *104*, 4662–4697.

⁴³ Joseph, J. D. *Prog. Lipid Res.* **1982**, *21*, 109–153.

⁴⁴ Ackman, R. G.; Hooper, S. N. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1973**, *46*, 153–165.

La teneur en lipides d'un bivalve peut varier d'une espèce à l'autre⁴⁵. Les études chimiques réalisées jusqu'en 2010 chez les bivalves ont permis d'isoler 2 à 58 composés par espèce et ce sont les études sur les stérols qui sont les plus citées²⁰. En effet, de manière globale, les Mollusques ont été étudiés beaucoup plus pour leur composition en stérols que les autres invertébrés⁴⁶. Le stérol le plus abondant dans le phylum des Mollusques est le cholestérol (13) (Figure 6). Ce stérol est également plus prépondérant dans la classe des Bivalves que dans les autres classes soit 6,7% des stérols totaux de *Macoma balthica* (Teleodermata) au lieu de 1-3% pour les invertébrés marins en général⁴⁷. Le cholestérol, le brassicastérol (20), le crinostérol (21) et le 24-Méthylènecholestérol (22), isolés d'une moule de l'ordre des Mytiloida, protègent du stress oxydatif et présentent donc une activité anti-âge⁴⁸ (Figure 7). Il s'est avéré que ces stérols étaient également des neuroprotecteurs et pourraient être très prometteurs pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, tout comme la curcumine⁴⁹. Généralement les composés ayant une activité anti-âge, ont également une fonction neuroprotectrice⁵⁰.

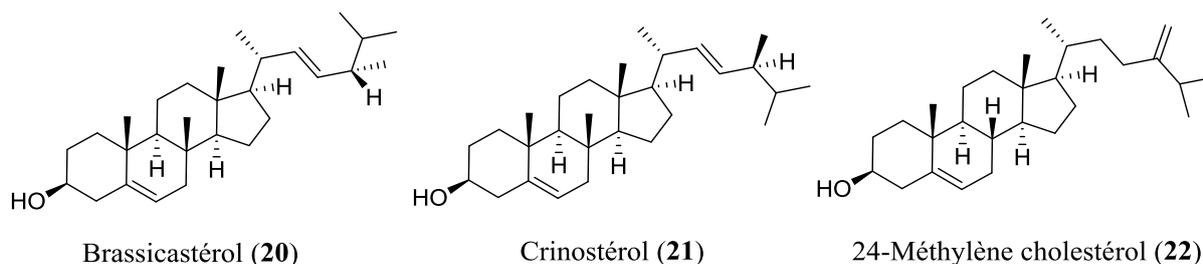


Figure 7. Structures du brassicastérol (20), du crinostérol (21) et du 24-Méthylènecholestérol (22).

La différence de composition en stérols d'une espèce à l'autre dépend de l'habitat, du mode d'alimentation et du métabolisme des nutriments consommées. Par exemple, la moule *Bathymodiolus septemdierum* (Mytiloida) vit en symbiose avec des bactéries sulfoxydantes au niveau des sources hydrothermales (milieu très réduit). Les symbiotes de cette moule (hôte) vont utiliser les sulfures du milieu environnant pour fournir à leur hôte de la matière organique dont du lathostérol (23) (Figure 8) et du cholestérol (13). A contrario, la moule

⁴⁵ Gordon, D. T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 536–545.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

⁴⁶ Goad, L. J. *Pure Appl. Chem.* **1981**, *51*, 837–852.

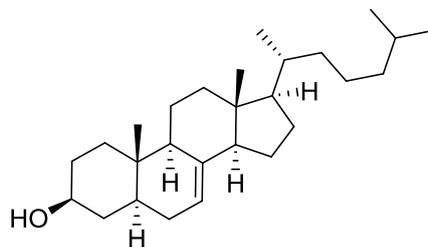
⁴⁷ Jarzębski, A. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *81*, 989–991.

⁴⁸ Sun, Y.; Lin, Y.; Cao, X.; Xiang, L.; Qi, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 21660–21673.

⁴⁹ Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, *16*, 285–297.

⁵⁰ Thapa, A.; Vernon, B. C.; De la Peña, K.; Soliz, G.; Moreno, H. a; López, G. P.; Chi, E. Y. *Langmuir* **2013**, *29*, 11713–11723.

Calypptogena soyoae, qui vit au niveau des suintements froids, contient des phytostérols provenant de la consommation de phytoplancton du milieu environnant ⁵¹.



Lathostérol (23)

Figure 8. Structure du lathostérol (23).

De la même façon, la palourde *Calypptogena soyoae* (Vénéroïda) que l'on retrouve près des suintements froids contient des phytostérols provenant également de la consommation de phytoplancton (cycloeucalenol, obtusifoliol, etc.) ⁵³. Hormis les stérols, certains auteurs ont rapporté que les triglycérides (TAG) pouvaient être les lipides majoritaires comme chez la patelle *Patella vulgata* par exemple, mais ceci est fonction de la saison et de la période de reproduction ⁵². Par ailleurs, les phospholipides (80%) et acides gras libres (**Figure 6**) prédominent dans des moules côtières de Nouvelle Zélande [*Mytilus edulis* et *Perna canaliculus* (Mytilidae)] ⁵³. Dans ce dernier cas, ce qui a expliqué la prédominance de ce type de lipide a été la méthode de collecte et de conservation des moules avec interruption de la chaîne de froid influençant ainsi l'activité d'enzymes lipolytiques ^{54, 55}. Parmi les acides gras libres, les acides gras polyinsaturés (PUFA) peuvent également être produits en grande quantité ⁵⁶ (**Figure 6**). Il s'agit de la seule famille chimique isolée jusqu'à ce jour de l'ordre des Pectinoïda. Le pétoncle *Chlamys nobilis* (Pectinoïda) a été récemment la seule espèce étudiée (muscles, manteau, gonade et masse viscérale) pour mieux comprendre la biosynthèse des acides gras polyinsaturés et mettre en évidence que ces voies métaboliques faisaient intervenir des enzymes différentes selon le bivalve ⁵⁷. En effet, les PUFA 22:4 ω -9 ont été trouvés uniquement chez les coquilles Saint Jacques *Pecten maximus* et chez une espèce proche, l'*Argopecten purpuratus*, alors que pour d'autres bivalves on retrouve des PUFA 22:2

⁵¹ Kawai, S.; Takada, Y.; Tsuchida, S. *Fish. Sci.* **2007**, *73*, 902–906.

⁵² Gardner, D. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **1972**, *52*, 827–838.

⁵³ Murphy, K. .; Mann, N. .; Sinclair, A. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **2003**, *12*, 50–60.

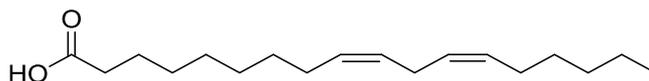
⁵⁴ Jeong, Y.; Ohshima, T.; Koizumi, C.; Kanou, Y. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **1990**, *56*, 2083–2091.

⁵⁵ Jeong, Y.; Ohshima, T.; Koizumi, C. *J. Food Lipids* **1999**, *6*, 131–147.

⁵⁶ Naylor, R. L.; Goldburg, R. J.; Primavera, J. H.; Kautsky, N.; Beveridge, M. C.; Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H.; Troell, M. *Nature* **2000**, *405*, 1017–1024.

⁵⁷ Liu, H.; Zhang, H.; Zheng, H.; Wang, S.; Guo, Z.; Zhang, G. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12384–12391.

ou 20:2⁵⁸. Face à cela, en 2001, Budge et ses collaborateurs⁵⁹, lors de l'étude des tissus mous de *Mytilus edulis* (Mytiloïda), se sont interrogés sur la biosynthèse des PUFA, à savoir si l'origine biosynthétique de ces derniers ne proviendraient pas plutôt du phytoplancton consommé par le bivalve. Parmi ces acides gras polyinsaturés, ceux de type oméga 3 [acide eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA)] et oméga 6 comme par exemple l'acide linoléique 18:2 ω-6 (**24**) ont été isolés du bivalve *Mytilus galloprovincialis*⁶⁰ (**Figure 9**).



Acide linoléique (**24**)

Figure 9. Structure de l'acide linoléique (**24**).

Les PUFA sont utiles pour la nutrition car ils préviennent, en santé humaine, les maladies cardiovasculaires⁶¹, combattent les infections⁶² et réduisent les thromboses⁶³. En 2008, Badiu et ses collaborateurs⁶² ont mis en évidence lors d'expérimentations animales que le traitement des brûlures de la peau par l'EPA (**25**) et le DHA (**26**) (isolés de *Mytilus galloprovincialis*) réduisait le temps de cicatrisation de la peau de dix jours, grâce aux propriétés anti-inflammatoires de ces PUFA (**Figure 10**).

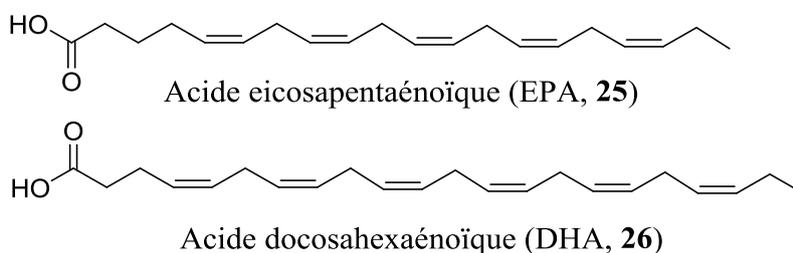


Figure 10. Structure de l'EPA (**25**) et le DHA (**26**).

Un autre exemple est celui de l'extrait lipidique de la moule *Perna canaliculus* (Mytiloïda)⁵⁵ dont l'activité anti-inflammatoire résulte uniquement de la présence des TAG et PUFA mais

⁵⁸ Kraffe, E.; Grall, J.; Palacios, E.; Guerra, C.; Soudant, P.; Marty, Y. *Lipids*. **2010**, *45*, 437–444.

⁵⁹ Budge, S.; Parrish, C.; McKenzie, C. *Mar. Chem.* **2001**, *76*, 285–303.

⁶⁰ Badiu, D. L.; Balu, A. M.; Barbes, L.; Luque, R.; Nita, R.; Radu, M.; Tanase, E.; Rosoiu, N. *Lipids*. **2008**, *43*, 829–841.

⁶¹ Angerer, P.; Von Schacky, C. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **2000**, *3*, 439–545.

⁶² Giamarellos-Bourboulis, E. J.; Grecka, P.; Dionysiou-Asteriou, A.; Giamarellou, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2187–2189.

⁶³ Aiko, S.; Yoshizumi, Y.; Tsuwano, S.; Shimanouchi, M.; Sugiura, Y.; Maehara, T. *J Parenter Enter. Nutr.* **2005**, *29*, 141–147.

⁵⁵ Murphy, K.; Mann, N.; Sinclair, A. *Asia Pacific J Clin Nutr* **2003**, *12*, 50–60.

surtout de celle des PUFA⁶⁴. C'est à partir d'un extrait lipidique enrichi en acide gras de type oméga 3 qu'a été obtenu le Liprinol[®], le plus puissant anti-inflammatoire d'origine marine permettant le traitement de l'arthrite ou du psoriasis et mis sur le marché en 2000⁶⁵. L'intérêt du Liprinol[®] est qu'il ne présente pas d'effets indésirables cardiovasculaires comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou gastrointestinaux (inhibiteurs de la cyclooxygénase 2)⁶⁶. Ce médicament inhibe l'activité des cyclooxygénases 1 et 2, responsables de l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine, molécule elle-même responsable de l'inflammation⁶⁸. Il a été mis en évidence que la quantité de prostaglandines (**27**, **28**) dans les ovaires de la coquille St-Jacques *Patinopecten yessoensis* (Oestroïda) augmentait durant la maturation sexuelle et que ces prostaglandines influençaient grandement la ponte⁶⁷ (**Figure 11**). Ces prostaglandines n'ont pas été caractérisées chimiquement mais mises en évidence par radio-immuno-essais et bio-essais⁶⁸.

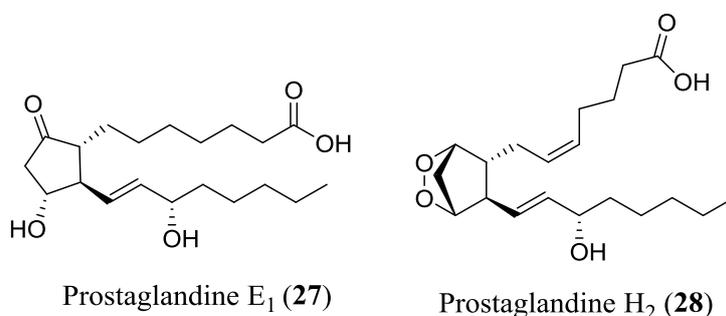


Figure 11. Deux ensembles de structures: les prostaglandines E (**27**) et H (**28**).

La culture indépendante du champignon *Aspergillus* sp. a permis également d'isoler de nouveaux dérivés lipidiques à savoir les acides himéiques A (**29**), B (**30**) et C (**31**)⁶⁹ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les acides himéiques A (**29**), B (**30**) et C (**31**) sont des inhibiteurs de l'enzyme activant l'ubiquitination des protéines, processus ayant un rôle dans la régulation de la transcription ou encore dans le cycle cellulaire^{70, 71, 72}. Les acides himéiques sont des composés formés d'un noyau pyrone (acides himéiques A et B) ou

⁶⁴ McPhee, S.; Hodges, L. D.; Wright, P. F. A.; Wynne, P. M.; Kalafatis, N.; Harney, D. W.; Macrides, T. A. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *146*, 346–356.

⁶⁵ Macrides, T. A.; Kalafatis, N. *United States Patent*, **2000**, *1*, 1-6.

⁶⁶ Parente, L.; Perretti, M. *Biochemical Pharmacology*. **2003**, *65*, 153–159.

⁶⁷ Osada, M.; Nomura, T. *Prostaglandins* **1990**, *40*, 229–239.

⁶⁸ Freas, W.; Grollman, S. *J. Exp. Biol.* **1980**, *84*, 169–185.

⁶⁹ Tsukamoto, S.; Hirota, H.; Imachi, M.; Fujimuro, M.; Onuki, H.; Ohta, T.; Yokosawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 191–194.

⁷⁰ Helenius, I. T.; Dada, L. a; Sznajder, J. I. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2010**, *7*, 65–70.

⁷¹ Glickman, M. H.; Ciechanover, A. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373–428.

⁷² Pickart, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 503–533.

pyridone (acide himéique C) et d'une partie acide gras (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

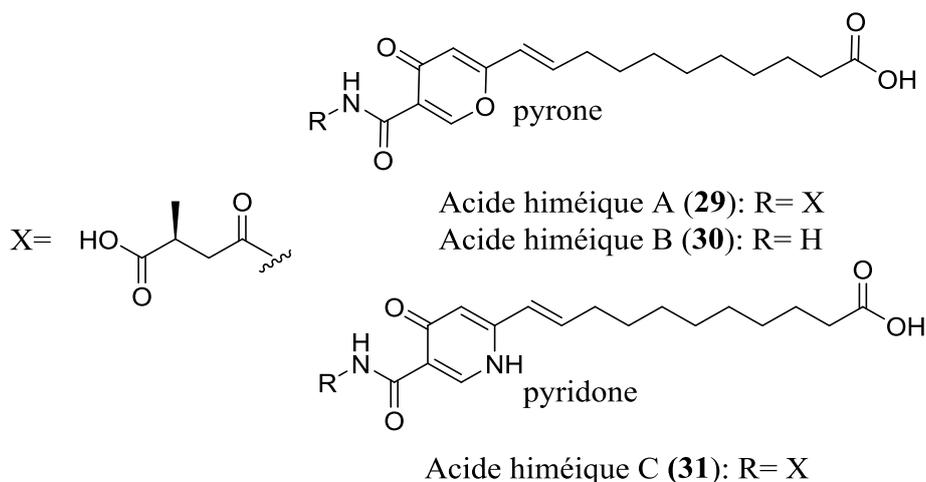


Figure 12. Structures des acides Himéiques A (**29**), B (**30**) et C (**31**).

Malgré les différences structurales minimales entre les acides himéiques, les acides himéiques B (**30**) et C (**31**) (même à 100 μM) présentent une activité moindre que l'acide himéique A (à 50 μM)⁷⁴.

Dans le cadre des associations bactéries/ bivalves, des dérivés lipidiques ont été également isolés. Par exemple, chez des bactéries du genre *Flavobacterium* isolées de *Cristaria plicata* (Unionoïda), les flavocristamides A (**32**) et B (**33**) ont été isolés (**Figure 13**)⁷⁸.

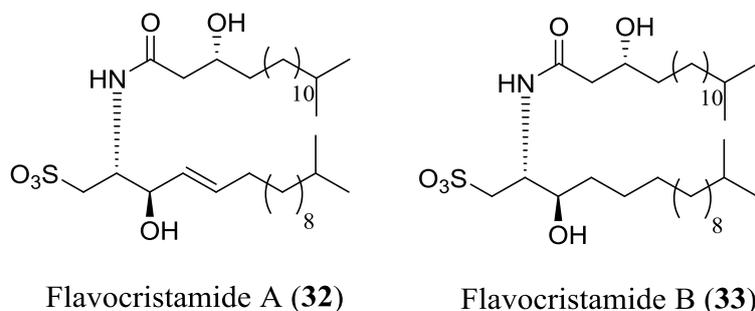


Figure 13. Structures des flavocristamides A (**32**) et B (**33**).

Ce sont des céramides portant une fonction acide sulfonique qui inhibent l'ADN polymérase α d'origine eucaryote⁷³.

2. Autres molécules isolées des mollusques bivalves.

Des métabolites structurellement proches et présentant des activités anti-inflammatoires à un stade précoce ont été isolés de bivalves et d'éponges (**Figure 14**). Le squelette de l'acide

⁷³ Kohayashi, J.; Mikami, S.; Shigemori, H.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Izuta, S.; Yoshida, S. *Tetrahedron*. **1995**, *51*, 10487–10490.

pinnaïque (**34**), isolé du bivalve *Pinna muricata* (Pteroida)⁷⁴, est similaire à celui de l'halichlorine (**35**) isolée de l'éponge *Halichondria okadai*⁷⁵ (**Figure 14**).

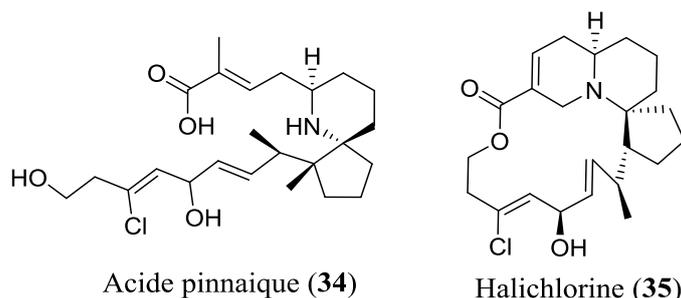


Figure 14. Structure de l'acide pinnaïque (**34**) isolé du bivalve *Pinna muricata* et de l'halichlorine (**35**) isolé de l'éponge *Halichondria okadai*.

On peut également citer les notoamides A-C (**36**, **37** et **38**) indoles prénylés cytotoxiques contre les lignées cellulaires HeLa et L1210. Ces molécules ont été isolées d'un champignon du genre *Aspergillus* isolé à partir du bivalve *Mytilus edulis*⁷⁶ (**Figure 15**).

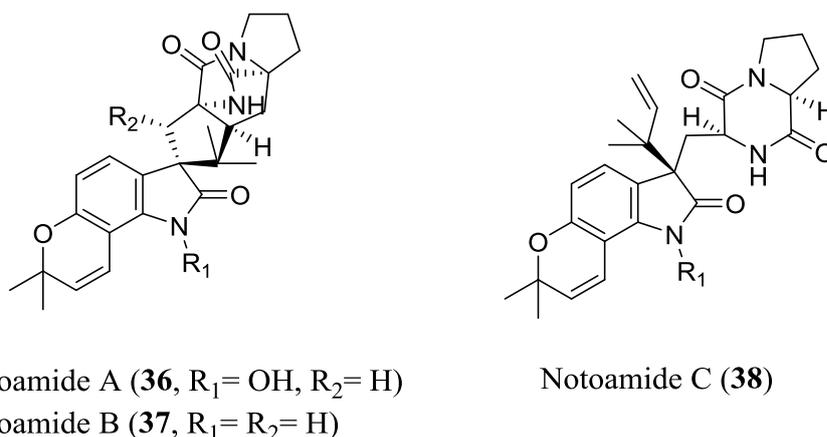


Figure 15. Structure des Notoamides A (**36**), B (**37**) et C (**38**) à structures dicétoperaziniques.

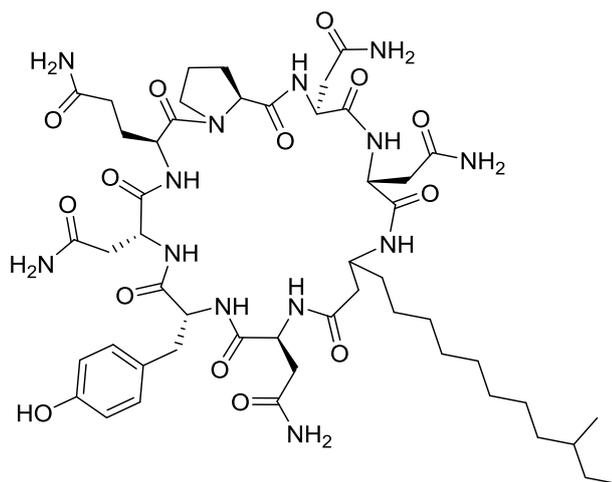
Dans le cadre des associations bactéries/ bivalves, des lipopeptides cytotoxiques et antifongiques ont été isolés. Ce sont les cyclopeptides *antéiso*-C15 mojavensine A (**39**) (famille de l'iturine), *iso*-C16 fengycine B (**40**) et *antéiso*-C17 fengycine B (**41**) (**Figure 16**). Ces molécules ont été isolées d'une bactérie marine, *Bacillus mojavensis* (souche B0621A), elle même isolée de l'huître *Pinctada martensii* (Pterioïda). Les lipopeptides **39**, **40** et **41** sont actifs contre le champignon phytopathogène *Fusarium verticillioides* et peuvent être utilisées en agriculture pour protéger les récoltes des champignons pathogènes⁷⁷.

⁷⁴ Chou, T.; Kuramoto, M.; Otani, Y.; Shikano, M.; Yazawa, K.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3871–3874.

⁷⁵ Lee, S.; Zhao, Z. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7921–7924.

⁷⁶ Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 2254–2256.

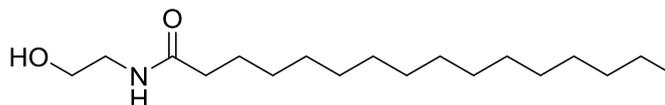
⁷⁷ Ma, Z.; Wang, N.; Hu, J.; Wang, S. *J. Antibiot. Tokyo.* **2012**, *65*, 317–322.



antéiso-C15 mojovensine A (**39**): R= $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
iso-C16 fengycine B (**40**): R= $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
antéiso-C17 fengycine B (**41**): R= $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

Figure 16. Structures de l'*antéiso*-C15 mojovensin A (**39**), de l'*iso*-C16 fengycine B (**40**) et de l'*antéiso*-C17 fengycine B (**41**).

Un dernier exemple de dérivé lipidique extrait de la totalité des organes des bivalves comestibles *Callista chione*, *Crassostrea* sp., *Mytillus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, et *Venus verrucosa*. Elles contiennent toutes des *N*-acétyléthanolamines (NAE)⁷⁸. Les plus courants sont la *N*-palmitoyléthanolamine (C16:0) (**42**), *N*-stearoyléthanolamine (C18:0) et en petite quantité la *N*-arachidonoyl-éthanolamine (C20:4) (**Figure 17**).



N-palmitoyléthanolamine (**42**)

Figure 17. Exemple de la structure de la *N*-palmitoyléthanolamine (C16: 0) (**42**).

3. Les aminoacides et peptides des Mollusques bivalves: rôles et intérêts.

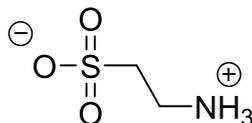
La présence d'acide aminés libres chez les bivalves peut être un indicateur de stress^{79, 80}. De grandes quantités d'acides aminés comme la glycine, l'acide glutamique, l'alanine, l'hypotaurine, la thiotaurine ou la taurine (**43**) (**Figure 18**), ont été mises en évidence chez des

⁷⁸ Sepe, N.; De Petrocellis, L.; Montanaro, F.; Cimino, G.; Di Marzo, V. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1998**, *1389*, 101–111.

⁷⁹ Jeffries, H. P. *J. Invertebr. Pathol.* **1972**, *20*, 242–251.

⁸⁰ Zurburg, W.; Hummel, H.; Bogaards, R.; De Wolf, L.; Ravestein, H. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* **1989**, *93*, 413–417.

invertébrés marins en symbiose alors que les autres acides aminés ne se trouvent qu'à l'état de traces^{81, 82}.



Taurine (43)

Figure 18. Structure de la taurine (43).

On retrouve les acides aminés en quantité dans les branchies, le manteau et l'hémolymphe⁸³. La concentration en acides aminés libres dans les branchies des palourdes est plus grande que dans celles des huîtres⁸⁵. Ces acides aminés ont d'importantes fonctions physiologiques notamment pour la régulation de la pression osmotique ou encore pour des transferts nutritifs⁸⁷. Par exemple, il y a beaucoup de glutamate dans les branchies des bivalves réalisant une endosymbiose.

- Mécanisme de la symbiose

Le glutamate permet le transfert en général de composés produits par le symbiote bactérien, par exemple lors de la fixation de l'azote atmosphérique et/ou du carbone, *via* le cycle de Calvin-Benson⁸³. La glycine par contre a un rôle osmorégulateur et maintient la pression isoosmotique des tissus du bivalve avec l'eau de mer⁸⁶. Les acides aminés soufrés joueraient un rôle dans la détoxification des sulfures du milieu environnant^{87, 88}. La taurine endogène (43) (Figure 18) est surtout retrouvée dans les algues⁸⁹, faiblement chez les Mollusques⁹⁰ et absente chez les bactéries⁹¹.

⁸¹ Pranal, V.; Fiala Medioni, A.; Colomines, J. C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, *119*, 155–166.

⁸² Tabakaeva, O. V.; Tabakaev, A. V. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52*, 1–2.

⁸³ Livingstone, D. R.; Widdows, J.; Fieth, P. *Mar. Biol.* **1979**, *53*, 41–55.

⁸⁴ Sun, Y.; Lin, Y.; Cao, X.; Xiang, L.; Qi, J.; Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A. *Mar. Biol.* **2000**, *73*, 411–420.

⁸⁵ Pruski, A. M.; Fiala-médioni, A.; Fisher, C. R.; Colomines, J. C. *Mar. Biol.* **2000**, *136*, 411–420.

⁸⁶ Kluytmans, J. H.; Boot, J. H.; Oudejans, R. C. H. M.; Zandee, D. I. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *81*, 959–963.

⁸⁷ Alberic, P. *C.S.acad.Sci.Paris* **1986**, *302*, 503–508.

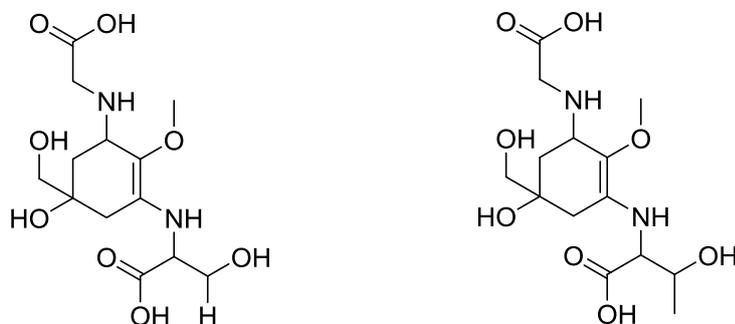
⁸⁸ Alberic, P.; Boulegue, J. *Prog.Oceanog.* **1990**, *24*, 89–101.

⁸⁹ Fattorusso, E.; Piattelli, M. *Acad. Press New York.* **1980**, *3*, 95–140.

⁹⁰ Bishop, S. H.; Ellis, L. L.; Burcham, J. M. *Acad. Press New York.* **1983**, *1*, 243–327.

⁹¹ Huxtable, R. J. *Physiol Rev* **1992**, *72*, 101–163.

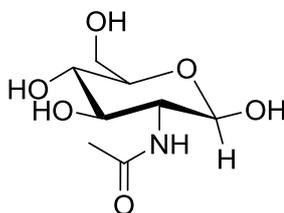
Parmi les aminoacides isolés de Mollusques Bivalves, on retrouve aussi les mycosporines. En 1979, deux mycosporines, les mytilines A (**44a**) et B (**44b**), ont été mises en évidence à partir d'une moule comestible appelée *Mytilus galloprovincialis*⁹² (**Figure 19**).



Mycosporine mytiline A (**44a**) Mycosporine mytiline B (**44b**)

Figure 19. Structure des mycosporines mytiline A (**44a**) et mytiline B (**44b**).

Ces molécules présentent une absorption allant de 310 à 362 nm ce qui permet de protéger l'organisme d'éventuels dommages causés à l'ADN par les rayons ultraviolets notamment de type A⁹³. On peut retrouver également chez les Bivalves des aminosucres. Un exemple d'aminosucres est donné à la **Figure 20**.



N-acétyl-D-glucosamine (**45**)

Figure 20. Exemple de structure d'un aminosucres: N-acétyl-D-glucosamine (**45**).

4. Molécules de défense des mollusques bivalves, rôles et intérêts.

Les Bivalves en filtrant de grandes quantités d'eau à travers leurs branchies, récupèrent en même temps la matière organique et les microorganismes qui y sont en suspension. Ils ont donc besoin d'une défense chimique contre les pathogènes²⁰.

a) Peptides et protéines bioactifs.

⁹² Chioccaro, F.; Misuraca, G.; Novellino, E.; Prota, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3181–3182.

⁹³ Singh, S. P.; Klisch, M.; Sinha, R. P.; Häder, D.-P. *Genomics.* **2010**, *95*, 120–128.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

L'unique étude chimique portant sur l'ordre Carditida a conduit en 2014 à l'isolement de six peptides bioactifs inhibant l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) qui est un élément d'une cascade de réaction régulant la pression artérielle ⁹⁴. Des peptides inhibant l'ECA ont été isolés pour la première fois du venin de la vipère *Bothrops jararaca* ⁹⁵. La dynorphine (**46**) est un peptide bioactif qui présente une activité antimicrobienne, anti-thrombotique et antihypertensive ^{96, 97} (**Figure 21**).

Tyr-Gly-gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys

Dynorphine A (**46**)

Figure 21. Exemple de structure d'un opioïde: la dynorphine A (**46**).

Des peptides bioactifs ont également été isolés de l'extrait acide du tissu neural de *Mytilus edulis* (Mytiloïda) ou encore de l'ensemble des tissus mous de *Mytilus galloprovincialis* (Mytiloïda) ⁹⁸. Harnedy *et al.* présentent dans une synthèse bibliographique datant de 2011, les activités biologiques associées aux peptides et aux hydrolysats de protéines isolés de Mollusques et de crustacés. Seules les activités liées aux Mollusques sont présentées dans le **Tableau 1**.

⁹⁴ Liu, R.; Zhu, Y.; Chen, J.; Wu, H.; Shi, L.; Wang, X.; Wang, L. *Mar. Drugs*. **2014**, *12*, 3917–3928.

⁹⁵ Ferreira, S. H. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, *24*, 163–169.

⁹⁶ Harnedy, P. A.; FitzGerald, R. J. *J. Funct. Foods*. **2012**, *4*, 6–24.

⁹⁷ Murray B.A., Fitzgerald, R. J. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 773–791.

⁹⁸ Leung, M. K.; Stefano, G. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 955–958.

Tableau 1. Activités biologiques associées aux peptides et aux hydrolysats de protéines provenant des Mollusques et des crustacés (Harnedy *et al.*, 2011 modifié par Goudou)⁹⁶. ECA = Enzyme de Conversion de l'Angiotensine.

Nom commun	Nom scientifique	Origine	Activité biologique	Séquence peptidique	Référence citée par Harnedy <i>et al.</i> , 2011 ⁹⁶
Palourde	<i>Meretrix lusoria</i>	Muscle	Inhibiteur de l'ECA	VRK YN	Tsai <i>et al.</i> , 2008
Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Extrait fermenté	Antihypertensif	EVMAGNLYPG	Je <i>et al.</i> , 2005
Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Extrait fermenté	Antioxydant	HFGBPFH	Rajapakse <i>et al.</i> , 2005
Huître	<i>Crassostrea gigas</i>	Muscle	Antimicrobien	NON RENSEIGNÉ	Liu <i>et al.</i> , 2008
Huître	<i>Crassostrea gigas</i>	Muscle	Inhibiteur de la protéase HIV-1	LLEYSI LLEYSL	Lee <i>et al.</i> , 1998
Huître	<i>Pinctada fucata martencii</i>	Muscle	Inhibiteur de l'ECA	PY AW VW GW	Katano <i>et al.</i> , 2003
Huître	<i>Crassostrea talienwhanensis crosse</i>	Muscle	Inhibiteur de l'ECA	VVYPWTQRF	Wang <i>et al.</i> , 2008

Les protéines anticoagulantes isolées de *Scapharca broughtonii* (Arcoïda) interrompent l'activité du facteur IX impliqué dans la coagulation du sang humain⁹⁹.

b) Métabolites bioactifs non-peptidiques.

Hormis les peptides provenant de l'hydrolyse de protéines marines, il existe aussi des métabolites bioactifs non-peptidiques isolés de *Mytilus edulis* ou de *M. galloprovincialis* tels que les défensines (antimicrobiennes, antiprotozoaires, antivirales et antifongiques), la

⁹⁹ Jung, W.-K.; Je, J.-Y.; Kim, H.-J.; Kim, S.-K. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 35, 199–205.

mytiline (47) (antimicrobienne), la myticine (antimicrobienne) et la mytomycine (48) (antifongique)⁹⁶ (Figure 22).

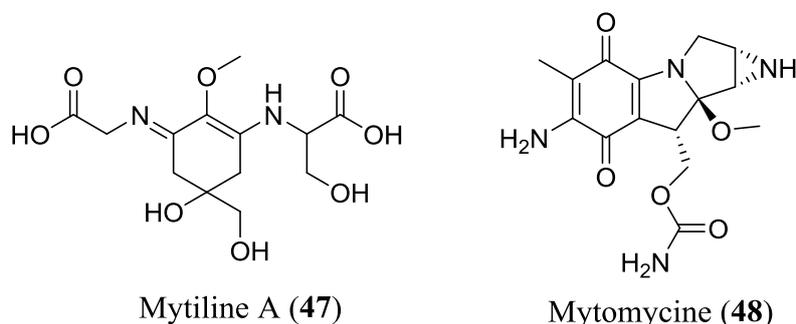


Figure 22. Exemples de métabolites non-peptidiques: la mytiline A (47) et la mytomycine (48).

5. Métabolites exogènes retrouvés chez les Bivalves.

Certains Mollusques bivalves, comme ceux de l'ordre des Mytiloida consomment des dinoflagellés¹⁰⁰, ce qui peut causer une bioaccumulation de toxines dans leurs voies digestives¹⁰¹. Par exemple, la yessotoxine (49) a été isolée de *Patinopecten yessoensis*^{102, 103, 104, 105} alors qu'elle est produite par le dinoflagellé *Dynophysis fortii* que le bivalve ingère¹⁰⁶ (Figure 23). Les toxines consommées sont utilisées comme moyens de défenses contre les prédateurs bien que la première protection physique des mollusques bivalves soit leur coquille²⁰. La pectenotoxine¹⁰³ (50) a une structure similaire à celle de la brevetoxine¹⁰⁷ (51) et de la ciguatoxine¹⁰⁸ (52) (Figure 23). La brevetoxine¹⁰⁹ (51) et la ciguatoxine¹⁰⁸ (52) sont des neurotoxines alors que la pectenotoxine (50) et ses analogues sont cytotoxiques¹¹⁰. Les toxines sont responsables d'intoxications paralysantes chez l'être humain¹¹¹.

⁹⁶ Harnedy, P. A.; FitzGerald, R. J. *J. Funct. Foods*. **2012**, *4*, 6–24.

¹⁰⁰ Kvitek, R.; Bretz, C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *293*, 303–309.

¹⁰¹ Bricelj, V. M.; Shumway, S. E. *Rev. Fish. Sci.* **1998**, *6*, 315–383.

¹⁰² Satake, M.; Terasawa, K.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5955–5958.

¹⁰³ Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M. *Tetrahedron*. **1985**, *41*, 1019–1025.

¹⁰⁴ Sasaki, K.; Wright, J. L. C.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2475–2480.

¹⁰⁵ Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869–5872.

¹⁰⁶ Lee, J. S.; Igarashi, T.; Fraga, S. *J. Appl. Phycol.* **1989**, *1*, 147–152.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

¹⁰⁴ Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1019–1025.

¹⁰⁷ Lin, Y.; Risk, M. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 6773–6775.

¹⁰⁸ Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4380–4386.

¹⁰⁹ Shimizu, Y.; Bando, H.; Chou, H.N.; Van Duyne, G.; Clardy, J. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, *1*, 1656–1658.

¹¹⁰ Miles, C. O.; Wilkins, A. L.; Samdal, I. A.; Sandvik, M.; Petersen, D.; Quilliam, M. A.; Naustvoll, L. J.; Rundberget, T.; Torgersen, T.; Hovgaard, P. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1423–1433.

¹¹¹ Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8897–8900.

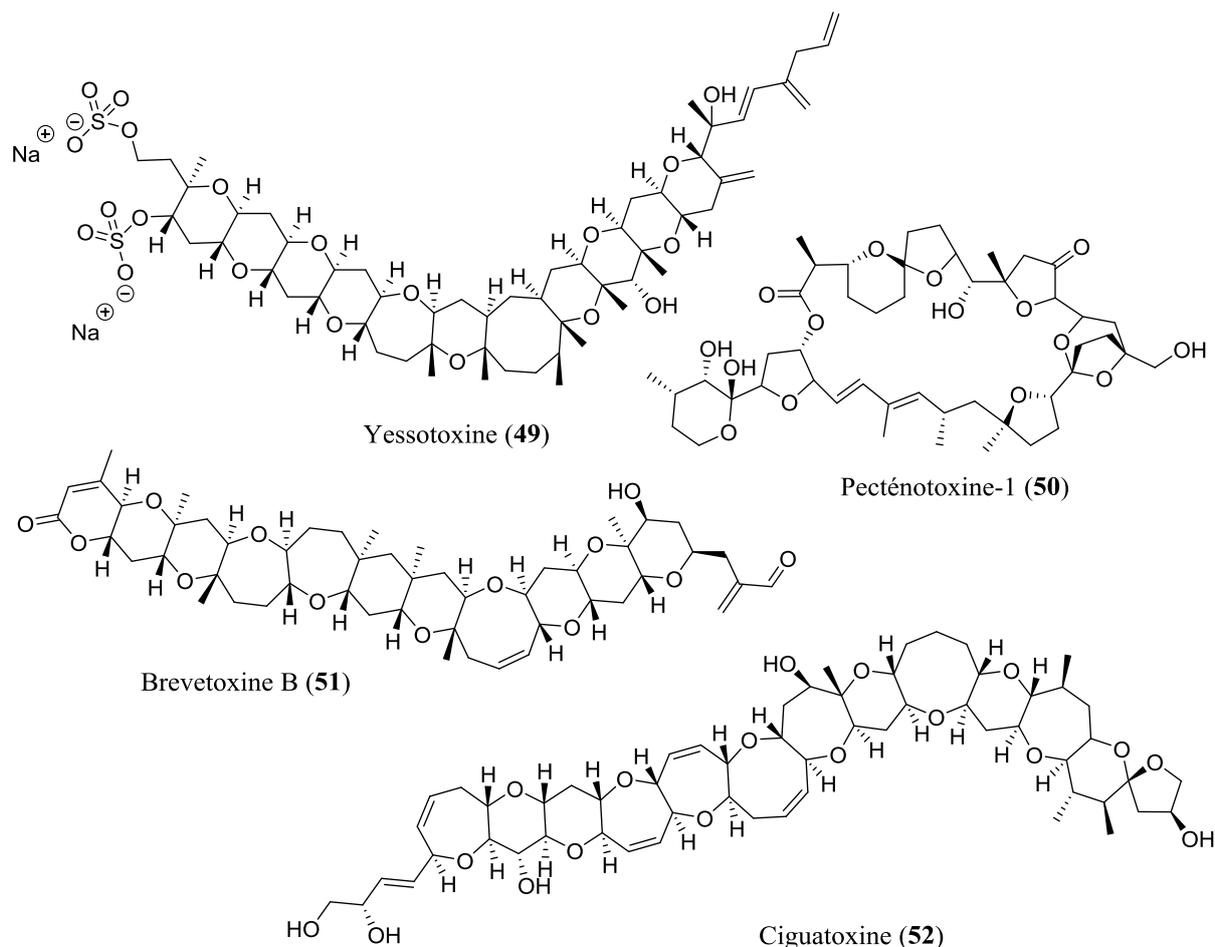


Figure 23. Structures de toxines.

La maitotoxine (53) est une molécule complexe et de taille importante par rapport aux autres métabolites ¹¹² (Figure 24). Une autre toxine, azotée cette fois et de petite taille, a été retrouvée accumulée dans la masse viscérale du poisson *Takifugu rubripes* ¹¹³, il s'agit de la tétrodoxine (54) (Figure 24). Cette molécule est produite par des bactéries marines à savoir *Shewanella alga* ¹¹⁴, *Vibrio pelagius*, *biovar II* et *Alteromonas tetraodonis* ¹¹⁵. Ces toxines sont également responsables d'intoxications diarrhéiques chez l'Homme ^{104, 105, 106}.

¹¹² Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1975–1978.

¹¹³ Yasumoto, T.; Nagai, H.; Yasumura, D.; Michishita, T.; Endo, A.; Yotsu, M.; Kotaki, Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *479*, 44–51.

¹¹⁴ Simidu, U.; Kita-Tsukamoto, K.; Yasumoto, T.; Yotsu, M. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1990**, *40*, 331–336.

¹¹⁵ Yotsu, M.; Yamazaki, T.; Meguro, Y.; Endo, A.; Murata, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T. *Toxicon.* **1987**, *25*, 225–228.

¹⁰⁴ Sasaki, K.; Wright, J. L. C.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2475–2480.

¹⁰⁵ Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869–5872.

¹⁰⁶ Lee, J. S.; Igarashi, T.; Fraga, S. *J. Appl. Phycol.* **1989**, *1*, 147–152.

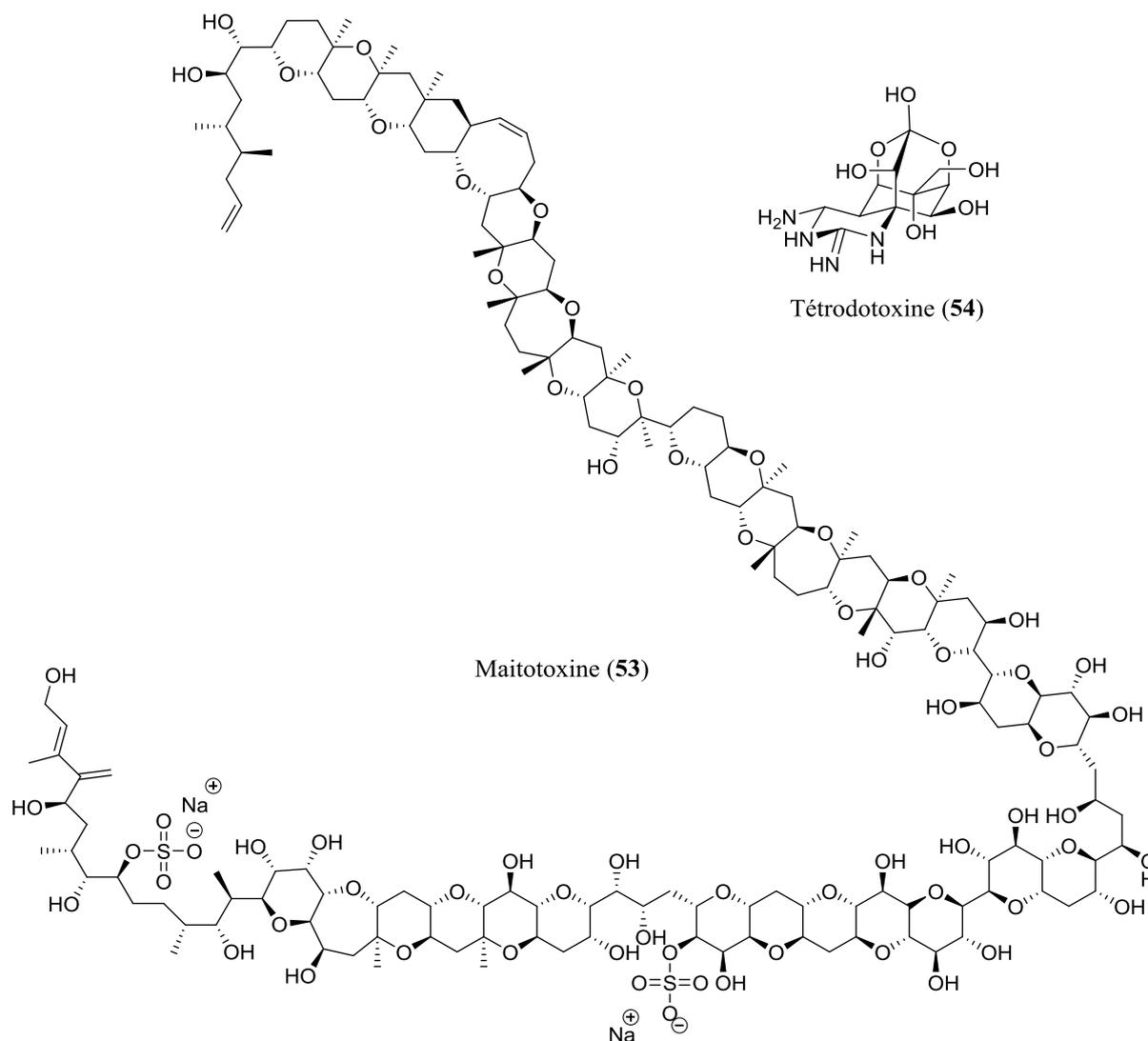


Figure 24. Structure de la maitotoxine (53) et de la tétrodotoxine (54).

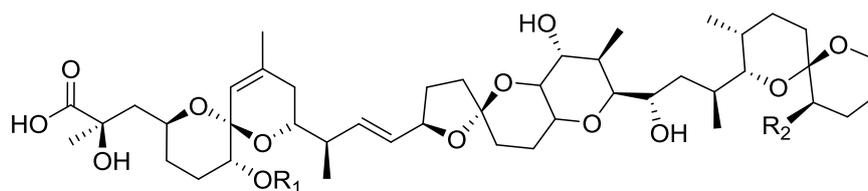
En 1976 et 1977, un grand nombre de personnes a souffert de diarrhées après avoir mangé des moules *Mytilus edulis* provenant du Nord du Japon ¹¹⁶. Les toxines responsables de cette intoxication sont la dinophysistoxine-1 (56) et la dinophysistoxine-3 (57) (Figure 25) ^{104, 117}. Ces toxines sont des dérivés de l'acide okadaïque (55). Ce dernier a été impliqué dans des intoxications alimentaires en Europe ¹¹⁸.

¹¹⁶ Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* **1978**, *44*, 1249–1255.

¹⁰⁴ Sasaki, K.; Wright, J. L. C.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2475–2480.

¹¹⁷ Fujiki, H.; Suganuma, M.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Takagi, K.; Uda, N.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Japanese J. Cancer Res.* **1988**, *79*, 1089–1093.

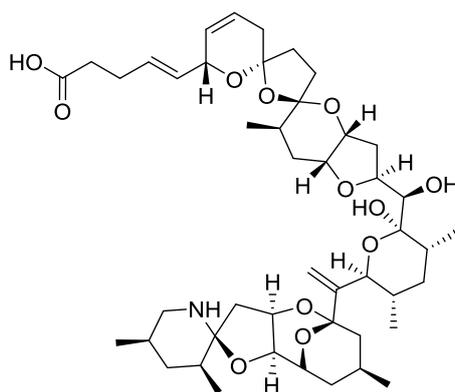
¹¹⁸ Kumagai, M.; Yanagi, T.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Kat, M.; Lassus, P.; Rodriguez-Vazquez, J. A. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 2853–2857.



Acide okadaïque (55): $R_1 = H$; $R_2 = H$
 Dinophysistoxine-1 (56): $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$
 Dinophysistoxine-3 (57): $R_1 = acyl$, $R_2 = CH_3$

Figure 25. Structure de l'acide okadaïque (55), de la dinophysistoxine-1 (56), dinophysistoxine-3 (57).

L'acide okadaïque (55) isolé la première fois d'une éponge est un polyéther contenant une fonction acide et des carbones spiro¹¹⁹. Ces derniers sont souvent présents dans la structure des toxines, comme par exemple l'azaspiracide (58) isolé de moules irlandaises *Mytilus edulis*^{120, 121, 122} (**Figure 26**) et dont la structure a été révisée lors de sa synthèse par le groupe de Nicolaou^{123, 124}. Dans ce cas l'azaspiracide (58), responsable d'intoxications diarrhéiques, proviendrait de la consommation de phytoplancton et de cyanobactéries par les bivalves concernés^{125, 126, 127}.



Azaspiracide (58)

Figure 26. Structure de l'azaspiracide (58).

¹¹⁹ Tachibana, K.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469–2471.

¹²⁰ Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9967–9968.

¹²¹ Ofuji, M.; Satake, M.; McMahon, T.; Silke, J.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 99–102.

¹²² Ofuji, K.; Satake, M.; McMahon, T.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 740–742.

¹²³ Nicolaou, K. C.; Vyskocil, S.; Koftis, T. V.; Yamada, Y. M. A.; Ling, T.; Chen, D. Y. K.; Tang, W.; Petrovic, G.; Frederick, M. O.; Li, Y. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 4312–4318.

¹²⁴ Nicolaou, K. C.; Koftis, T. V.; Vyskocil, S.; Petrovic, G.; Tang, W.; Frederick, M. O.; Chen, D. Y. K.; Li, Y.; Ling, T.; Yamada, Y. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2859–2872.

¹²⁵ Igarashi, T.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8499–8511.

¹²⁶ Igarashi, T.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 479–480.

¹²⁷ Kato, Y.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2245–2246.

L'acide domoïque [(**59**), phycotoxine d'origine peptidique] a été isolé de moules (*Mytilus edulis*), d'huîtres (*Crassostrea edulis*), de coquilles Saint Jacques (*Pecten maximus*) et de palourdes (*Ensis siliqua*)^{128,129}. Cet acide aminé neurotoxique, produit par des diatomés, a été isolé pour la première fois de l'algue rouge *Chondria armata*¹²⁹ (**Figure 27**). Il est accumulé chez les bivalves dans les glandes digestives et les reins¹³⁰. La consommation de ces fruits de mer par l'Homme cause des intoxications alimentaires, induisant une amnésie, au delà de 20 µg d'acide domoïque par gramme de tissu de bivalve consommé^{129, 131, 132}.

De nombreuses méthodes chromatographiques¹³³ et spectroscopiques¹³⁴ ont été mises au point pour déterminer la quantité d'acide domoïque dans le phytoplancton et les fruits de mer¹³⁵. Les acides isodomoïques D et E (**60**, **61**), isomères géométriques de l'acide domoïque, ont également été extraits de moules en petites quantités (*Mytilus edulis*)¹³¹ (**Figure 27**). Il a été possible d'obtenir également ces isomères par photolyse sous UV à 250 nm¹²⁹.

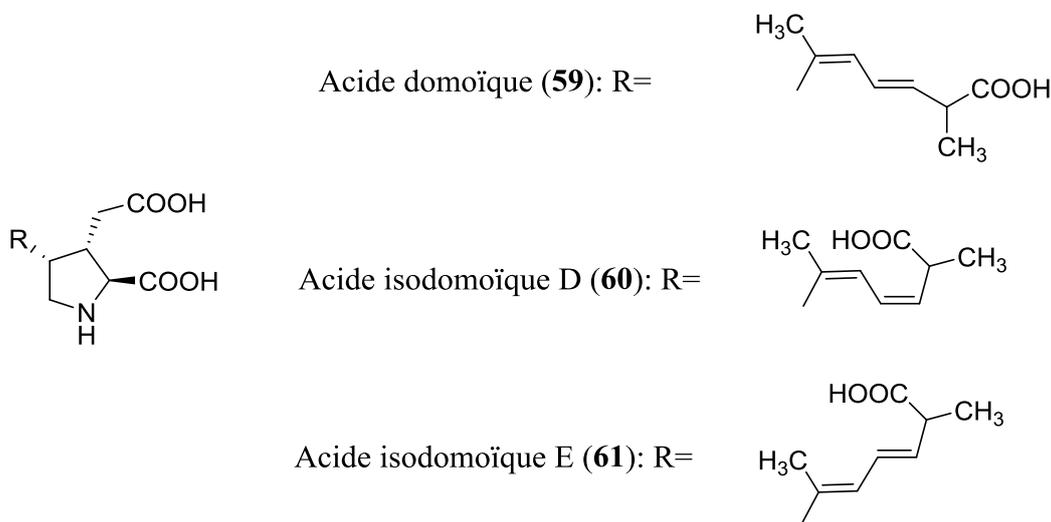


Figure 27. Structure de l'acide domoïque (**59**) et des deux acides isodomoïques D (**60**) et E (**61**).

¹²⁸ James, K. J.; Gillman, M.; Amandi, M. F.; López-Rivera, A.; Puente, P. F.; Lehane, M.; Mitrovic, S.; Furey, A. *Toxicol.* **2005**, *46*, 852–858.

¹²⁹ Wright, J.; Falk, M.; McInnes, G.; Walter, J. *Can. J.* **1990**, *6*, 22–25.

¹³⁰ Novaczek, I.; Madhyastha, M. S.; Ablett, R. F.; Donald, A.; Johnson, G.; Nijjar, M. S.; Sims, D. E. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1992**, *49*, 312–318.

¹³¹ Schultz, I. R.; Skillman, A.; Woodruff, D. *Mar. Environ. Res.* **2008**, *66*, 21–23.

¹³² Grovel, O.; Pouchus, Y.F.; Verbist, J.F. *Toxicol.* **2003**, *42*, 297–300.

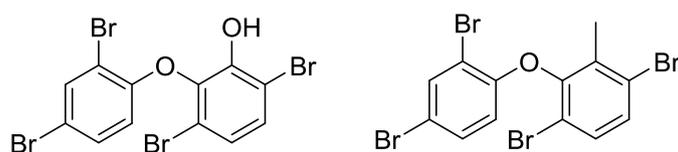
¹³³ Quilliam, M. A.; Sim, P. G.; McCulloch, A. W.; McInnes, A. G. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1989**, *36*, 139–154.

¹³⁴ Furey, A.; Lehane, M.; Gillman, M.; Fernandez-Puente, P.; James, K. J. *J. Chromatogr. A* **2001**, *938*, 167–174.

¹³⁵ Holland, P. T.; McNabb, P.; Selwood, A. I.; Neil, T. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 1095–1100.

6. Autres molécules de familles chimiques diverses isolées des Mollusques bivalves.

Les diphényléther polybromés **62** et **63** (Figure 28) avaient été isolés jusqu'à présent d'une algue verte *Cladophora fascicularis*¹³⁶ et d'éponges en symbiose avec des cyanobactéries¹³⁷. Ces molécules ont été isolées plus tard d'une algue rouge appelée *Ceramium tenuicorne* mais également de la moule *Mytilus edulis* par bioaccumulation après consommation des algues par le bivalve¹³⁹.



Diphényléther polybromés (**62**, **63**)

Figure 28. Structures de deux diphényléther polybromés (**62**) et (**63**).

Des polyamines ont été extraits des intestins de l'huître *Crassostrea gigas* (Oestroïda) et de la palourde *Ruditapes philippinarum* (Vénéroïda). La plupart des polyamines ont une odeur nauséabonde car ce sont des produits issus de l'hydrolyse de protéines comme par exemple la cadavérine¹⁴⁰. Enfin, un champignon du genre *Penicillium* isolé de la moule *Mytilus coruscus* (Mytiloïda) ou la moule elle-même¹⁴¹, a mené à l'isolement du coruscol A [(**65**), possédant une liaison 1,3-dioxane] et de l'alcaloïde herquiline (**66**) (Figure 29).

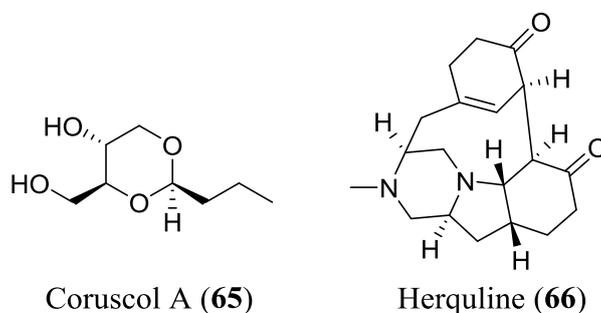


Figure 29. Structures de la coruscol A (**65**) et de l'herquiline (**66**).

¹³⁶ Kuniyoshi, M.; Yamada, K.; Higa, T. *Experientia*. **1985**, *41*, 523–524.

¹³⁷ Handayani, D.; Edrada, R.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L.; Van Soest, R. W. M.; Kunzmann, A.; Soedar, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1313–1316.

¹³⁸ Anjaneyulu, V.; Nageswara Rao, K.; Radhika, P.; Muralikrishna, M.; Connolly, J. D. *Indian J. Chem. Sect. B Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1996**, *35*, 89–90.

¹³⁹ Malmvärn, A.; Marsh, G.; Kautsky, L.; Athanasiadou, M.; Bergman, Å.; Asplund, L. *Env. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 2990–2997.

¹⁴⁰ Hamana, K.; Niitsu, M.; Samejima, K.; Matsuzaki, S. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1991**, *100*, 59–62.

¹⁴¹ Kagata, T.; Shigemori, H.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 886–887.

III. LES MOLECULES ISOLEES DANS L'ORDRE DES VENEROIDA .

Au moins une molécule par famille chimique isolée de l'ordre des Vénéroïda est représentée dans la **Figure 30**. On en compte 52 au total et parmi elles de nombreux dérivés au sein d'une même famille chimique, surtout pour les caroténoïdes (collecteurs de lumière), dont quelques uns seront présentés.

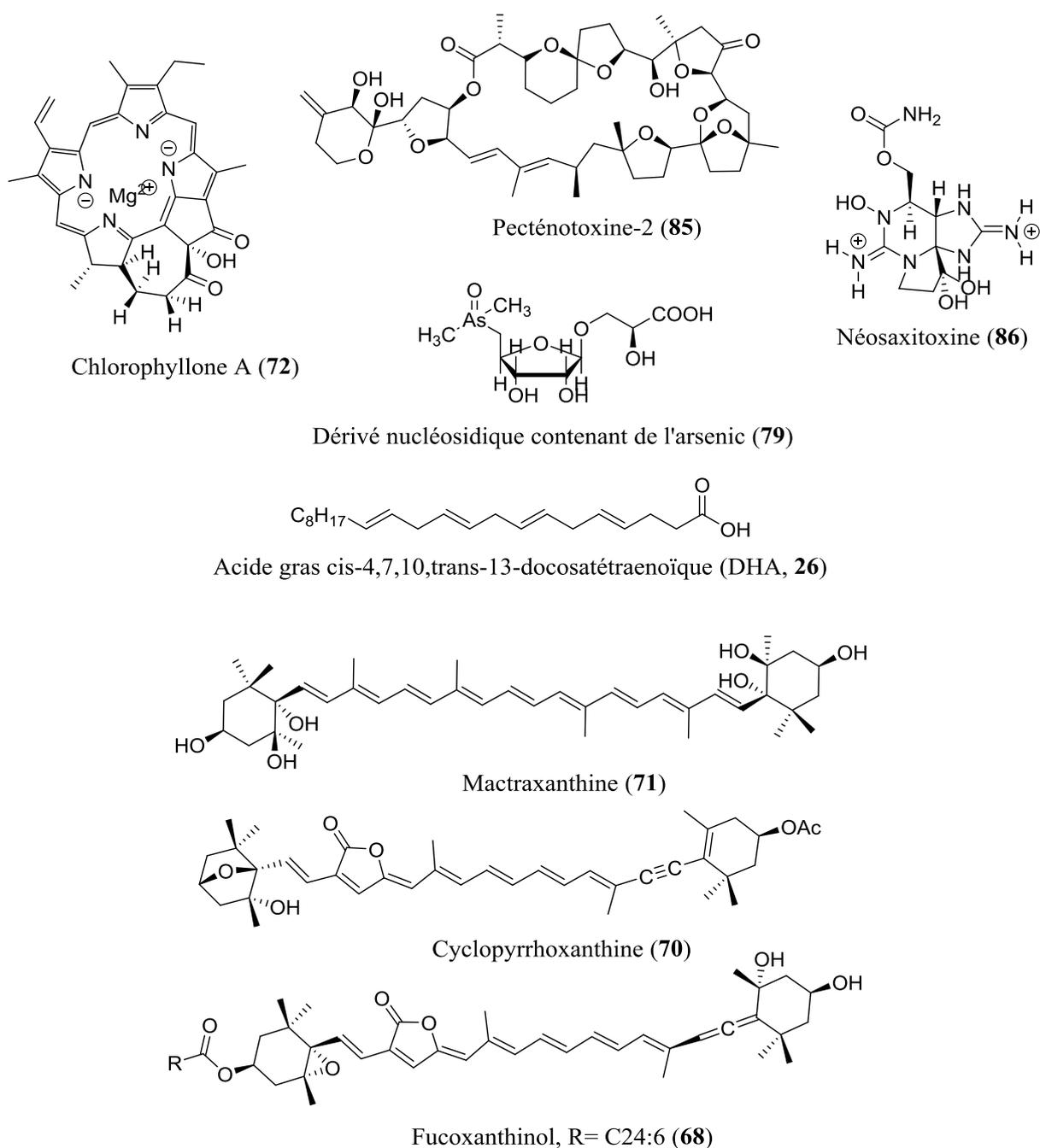
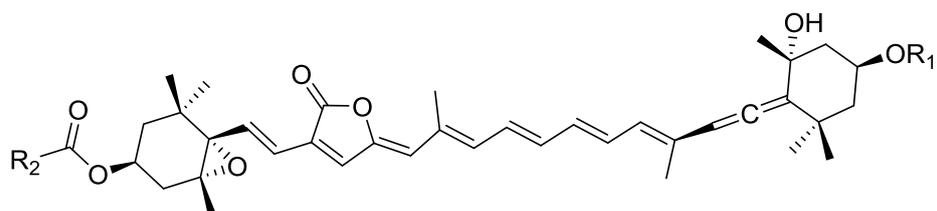


Figure 30. Structures de molécules isolées de l'ordre des Vénéroïda.

Par exemple sur 33 caroténoïdes décrits^{142, 143, 144}, 22 ne diffèrent que par la longueur de l'acide gras qui estérifie le caroténoïde¹⁴⁵ (**67, 68**) (**Figure 31**).



R₁ = COMe, Fucoxanthine (**67**)

R₁ = H, Fucoxanthinol (**68**)

R₂ = C24:6 ou C22:5 ou C22:6 ou C20:5 ou C20:0 ou C20:1 ou C18:0 ou C18:1 ou C16:0 ou C16:1 ou C14:0.

Figure 31. Structure de fucoxanthines (**67**) et de fucoxanthinols (**68**).

Certaines structures ont uniquement été décrites chez les Vénéroïda, comme le caroténoïde périidine (**69**) et la cyclopyrrhoxanthine (**70**) isolés du genre *Corbicula*¹⁴⁵ (**Figure 32**).

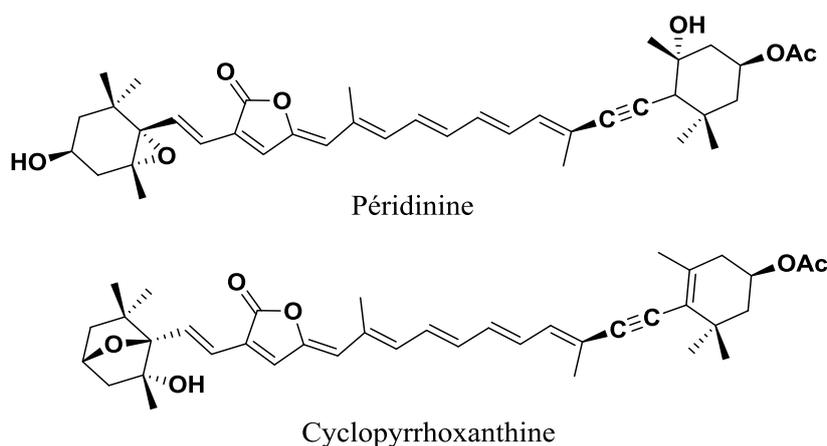


Figure 32. Structures de la périidine (**69**) et de la cyclopyrrhoxanthine (**70**).

Le caroténoïde mastraxanthine (**71**) a été isolé de la palourde *Maetra chinensis* en 1983¹⁴⁴ et en 2005, Maoka et ses collaborateurs ont isolé six nouveaux caroténoïdes de *Corbicula japonica*¹⁴⁵ (**Figure 33**).

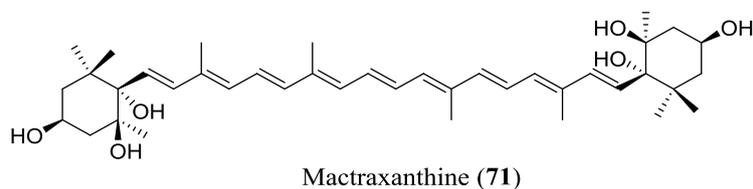


Figure 33. Structures de la mastraxanthine (**71**).

¹⁴² Matsuno, T.; Sakaguchi, S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 911–912.

¹⁴³ Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1341–1344.

¹⁴⁴ Maoka, T.; Akimoto, N.; Tsushima, M.; Komemushi, S.; Mezaki, T.; Iwase, F.; Takahashi, Y.; Sameshima, N.; Mori, M.; Sakagami, Y. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1419–1427.

¹⁴⁵ Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1563–1567.

Par la suite deux autres caroténoïdes ont été découverts chez *Macra chinensis* à savoir les fucoxanthines (67) et les fucoxanthinols¹⁴⁵ (68) (Figure 31). D'autre part, la chlorophyllone A (72) et ses dérivés, 73¹⁴⁶, 74, 75, 76, 77¹⁴⁷, 78¹⁴⁸, ont été isolés du bivalve *Ruditapes philippinarum*¹⁴⁸. Ce sont de puissants antioxydants¹⁴⁸ (Figure 34).

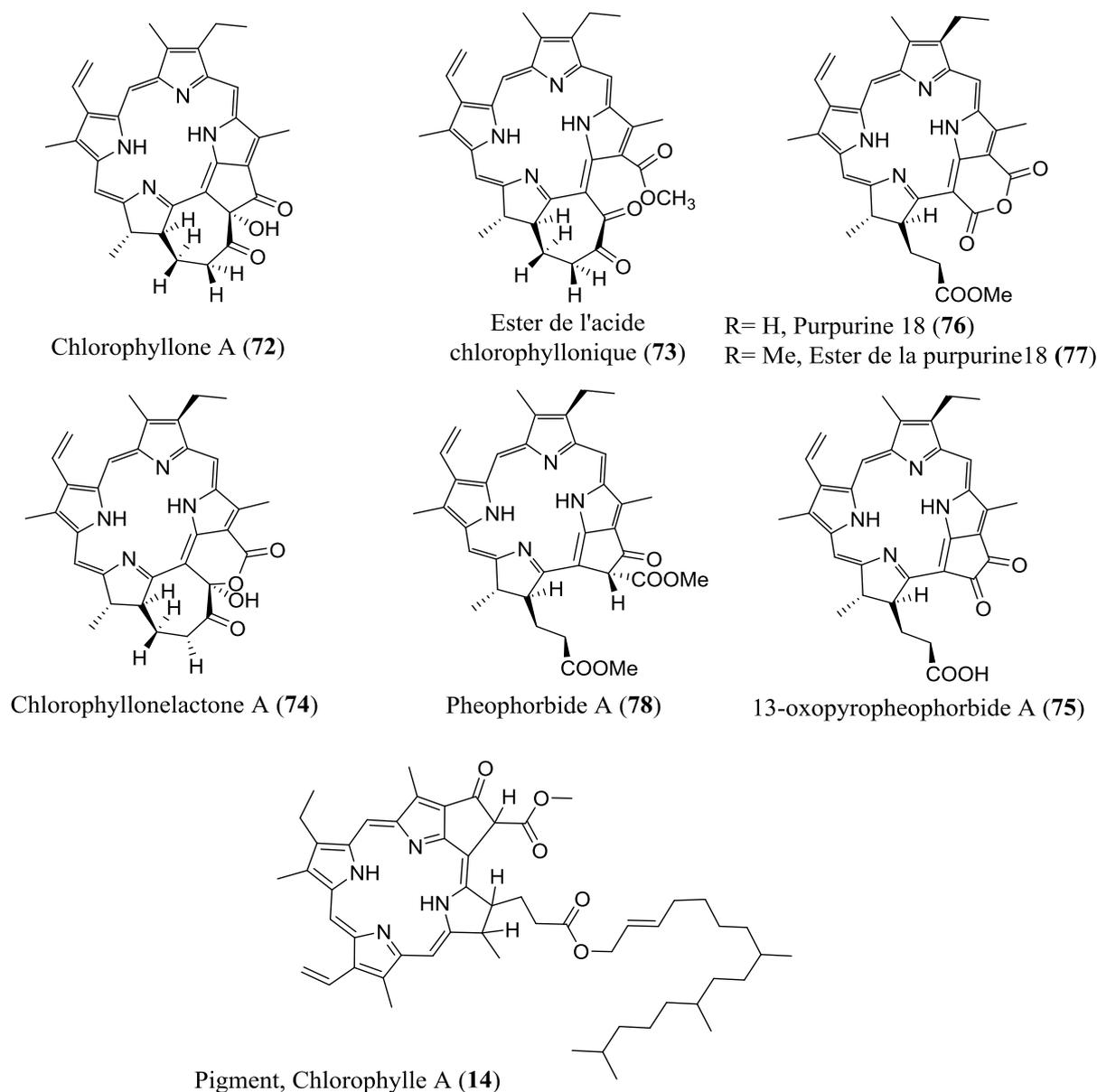


Figure 34. Structures de la chlorophylle (14), chlorophyllone A (72) et de ses dérivés 73 - 78.

¹⁴⁵ Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1563–1567.

¹⁴⁶ Yamamoto, K.; Sakata, K.; Watanabe, N.; Yagi, A.; Brinen, L. S.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2587–2588.

¹⁴⁷ Watanabe, N.; Yamamoto, K.; Ishikawa, H.; Yagi, A.; Sakata, K.; Brinen, L. S.; Clardy, J. *Journal Nat. Prod.* **1993**, *56*, 305–317.

¹⁴⁸ Sakata, K.; Yamamoto, K.; Ishikawa, H.; Yagi, A.; Etoh, H.; Ina, K. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1165–1168.

À partir du bivalve *Ruditapes philippinarum* ont également été isolés deux polysaccharides présentant des activités antitumorales ¹⁴⁹.

Par ailleurs, le bénitier géant *Tridacna maxima* vit avec des algues unicellulaires symbiotiques localisées dans son manteau. Les produits du métabolisme de ces algues unicellulaires s'accumulent dans les reins du bivalve. Ce sont des dérivés nucléosidiques contenant de l'arsenic **79 - 84**. Ces produits avaient déjà été également isolés d'une macroalgue à la concentration de 10 - 40 mg/kg ^{150, 151} (**Figure 35**).

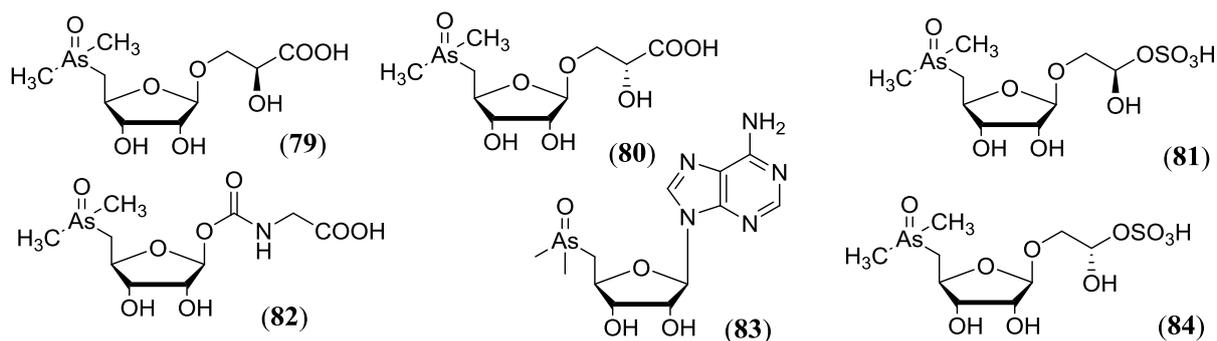


Figure 35. Structures des dérivés nucléosidiques contenant de l'arsenic (**79-84**).

Toutefois, comme l'arsenic est naturellement présent dans l'eau de mer (2 - 3 µg / dm³), il se pourrait que les algues biosynthétisent ces dérivés nucléosidiques pour détoxifier l'arsenic accidentellement acquis ¹⁵¹.

III. DANS L'ORDRE DES VENEROIDA, LA FAMILLE CHIMIOSYMBIOTIQUE DES LUCINIDAE.

1. Systématique des Lucinidae.

La famille des Lucinidae est composée de Mollusques bivalves hétérodontes appartenant à l'ordre des Vénéroïda ¹⁵². La famille des Lucinidae est la plus diverse des bivalves, on compte en effet plus de 500 espèces, de part certaines caractéristiques anatomiques des espèces qui la constituent, comme l'aspect de la coquille et surtout sa taille mais aussi l'élongation du muscle ¹⁵³ (**Figure 36**).

¹⁴⁹ Zhang, L.; Liu, W.; Han, B.; Sun, J.; Wang, D. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 103–110.

¹⁵⁰ Francesconi, K. A.; Edmonds, J. S.; Stick, R. V. *J.Chem. Soc. Perkin Trans* **1992**, *8*, 1349–1357.

¹⁵¹ Francesconi, K. A.; Stick, R. V.; Edmonds, J. S. *J.Chem. Soc.* **1991**, *1*, 928–929.

¹⁵² Taylor, J. D.; Williams, S. T.; Glover, E. A.; Dyal, P. *Zool. Scr.* **2007**, *36*, 587–606.

¹⁵³ Taylor, J. D.; Glover, E. *Zool. J. Linn. Soc.* **2005**, *148*, 421–438.

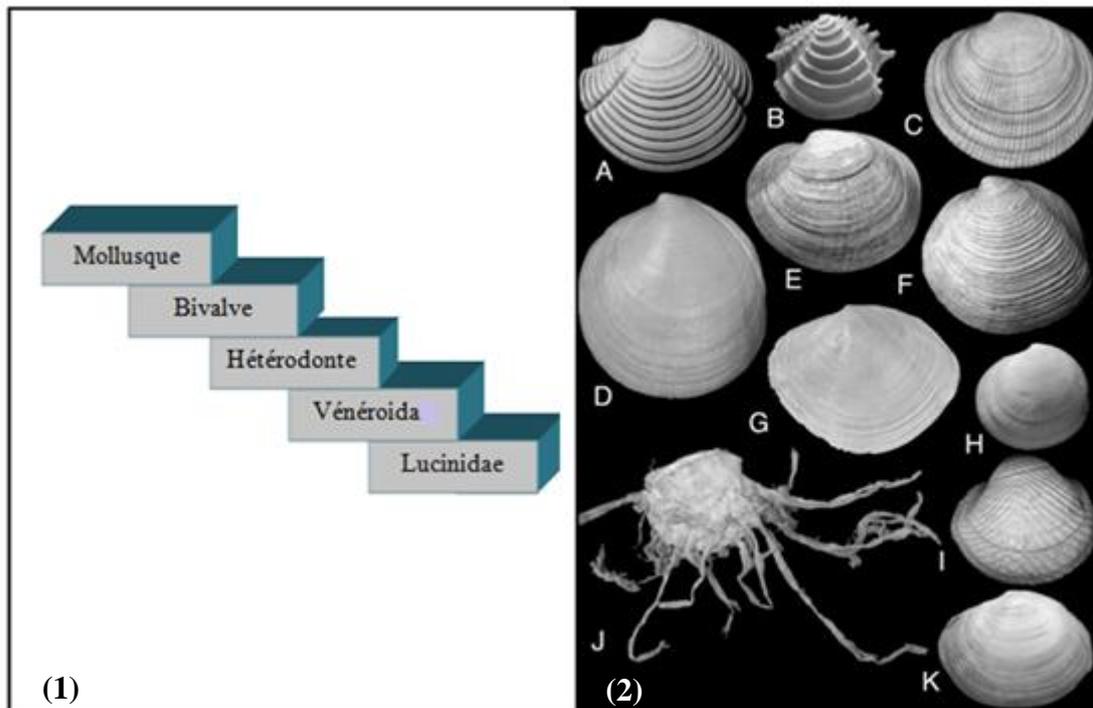


Figure 36. Systématique des Lucinidae (1). Diversité de formes chez les *Lucinidae* (2) ¹⁵⁴.

Plicolucina flabellata, longueur de la coquille LC = 22 mm (Glover, Taylor and Slack-Smith, 2003); *Lamellolucina trisulcata*, LC = 10 mm (Taylor & Glover, 2002); *Codakia tigrina*, LC = 70 mm (Linnaeus, 1758); *Anodontia philippiana*, LC = 66 mm (Reeve, 1850); *Miltha childrenae*, LC = 82 mm (Gray 1825); *Eomiltha voorhoevi*, LC = 80 mm; *Austriella corrugata*, LC = 60 mm (Deshayes, 1843); *Ctena bella*, LC = 25 mm (Conrad, 1837); *Rasta lamyi*, LC = 30 mm (Abrard, 1942); *Pompholigina gibba*, LC = 27 mm (Gray, 1825); *Myrtea spinifera*, LC = 26 mm (Montagu, 1803).

2. Répartition géographique et habitats des Lucinidae.

Les Lucinidae s'étendent sur une large aire géographique (60°N-55°S) et vivent généralement entre 3 et 60 cm de profondeur dans une grande variété d'habitats riches en composés soufrés réduits type H₂S et/ou HS⁻ ¹⁵⁴. Les *Lucinidae* peuvent vivre dans les sédiments réduits de mangrove comme *Anodontia alba* ¹⁵⁴ et *Phacoides pectinatus* ¹⁵⁵ (**Figure 37.A**), au niveau des sources hydrothermales dans les océans à plus de 2000 mètres de profondeurs comme *Lucinoma kazani* ¹⁵⁶ (**Figure 37.D**), dans les boues volcaniques et les suintements froids ^{157, 158, 159} (**Figure 37.B**), dans les zones peu oxygénées ^{160, 161},

¹⁵⁴ Leбата, M. J. H. L. *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, 42, 1133–1138.

¹⁵⁵ Taylor, J.; Glover, E.; Smith, L.; Ikebe, C.; Williams, S.T. *Zootaxa.* **2016**, 4196, 381-398.

¹⁵⁶ Glover, E. A.; Taylor, J. D.; Rowden, A. A. *J. Molluscan Stud.* **2004**, 70, 283–295.

¹⁵⁷ Carney, R. S. *Geo-Marine Lett.* **1994**, 14, 149–159.

¹⁵⁸ Callender, W. R.; Powell, E. N. *Hist. Biol.* **1997**, 12, 165–198.

¹⁵⁹ Salas, C.; Woodside, J. *Deep. Res. I* **2002**, 49, 991–1005.

¹⁶⁰ Cary, S.; Vetter, R.; Felbeck, H. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1989**, 55, 31–45.

¹⁶¹ Oliver, P. G.; Holmes, A. M. *J. Conchol.* **2006**, 39, 63–77.

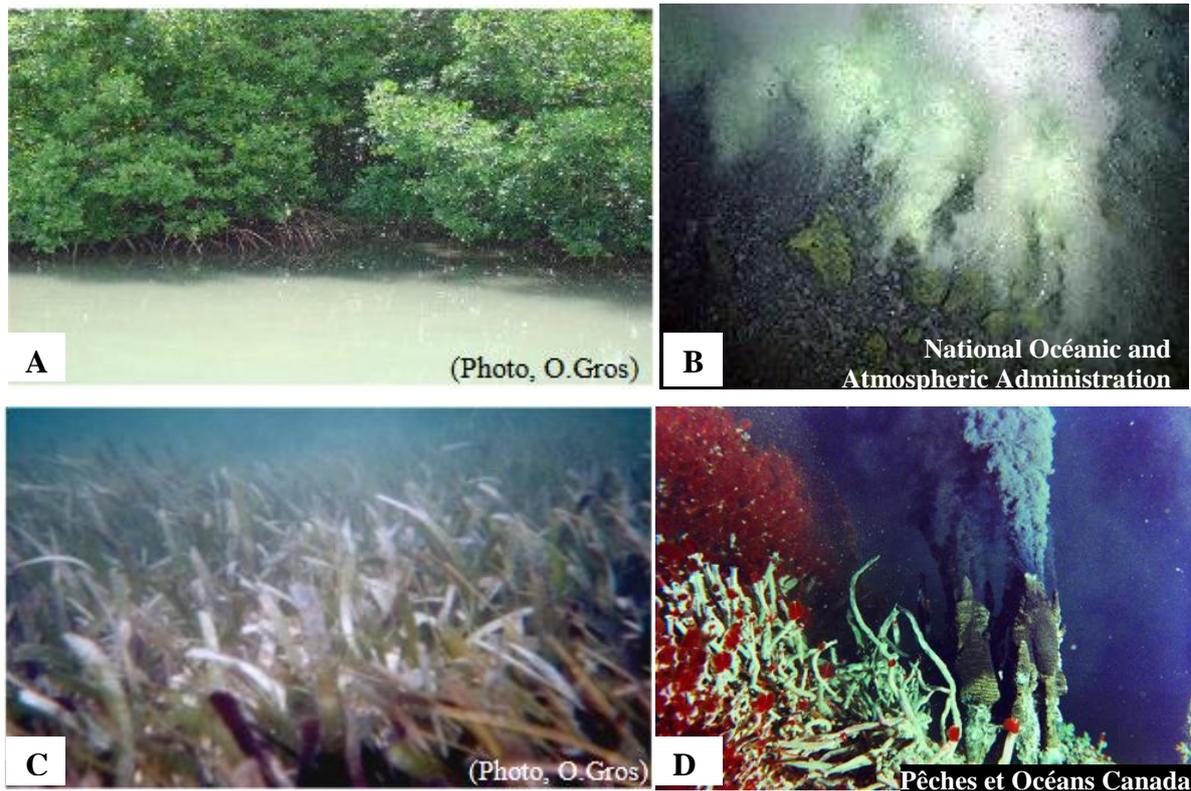


Figure 37. Photos d'une mangrove (A), d'un suifement froid (B), des herbiers à *Thalassia testudinum* (C) et de sources hydrothermales (D).

dans la zone intertidale, c'est à dire entre la limite des marées hautes et celles des marées basses, au large des côtes , au niveau des plages, ou encore dans les sédiments faiblement réduits des herbiers de phanérogames marines *Thalassia testudinum*¹⁶² (**Figure 37.C**).

3. La symbiose chez les Lucinidae

Symbiose

La Symbiose est un terme générique qui va du parasitisme à la symbiose *sensu stricto*. Elle a été définie en 1879 par Anton De Bary comme étant "une association biologique durable entre deux organismes hétérospécifiques". Le plus grand des deux organismes est appelé hôte, le second est soit un symbiote (symbiose est *sensu stricto*), soit un parasite (parasitisme). Si cette association est favorable pour un des partenaires et défavorable pour l'autre on parle de parasitisme, comme pour les bivalves contaminés par les Apicomplexa du genre *Nematopsis*^{163, 164}. Si l'association est bénéfique pour un des organismes et neutre pour l'autre, il s'agit de commensalisme, comme pour les cirripèdes (une sous espèce de Crustacés), associés aux

¹⁶² Johnson, M. A.; Fernandez, C.; Pergent, G. *Bull. Mar. Sci.* **2002**, *71*, 1343–1351.

¹⁶³ Azevedo, C.; Cachola, R. *Dis. Aquat. Organ.* **1992**, *14*, 69–73.

¹⁶⁴ Tuntivananuruk, C.; Chalermwat, K.; Upatham, E. S.; Kruatrachue, M.; Azevedo, C. *Dis. Aquat. Organ.* **2004**, *58*, 47–53.

baleines^{165, 166}. Et enfin si l'association est à bénéfice réciproque, on parle de symbiose *sensu stricto*, appelée mutualisme chez les anglosaxons, c'est le cas du calamar *Euprymna scolopes* et de la gamma-protéobactérie *Vibrio fischeri*¹⁶⁷. Les associations symbiotiques entre bactéries chimioautotrophes et les invertébrés marins ont été découvertes au niveau des sources hydrothermales par Felbeck et ses collaborateurs en 1981¹⁶⁸. C'est le rapport coût/bénéfice qui définit le type d'association symbiotique.

La symbiose est ainsi décrite dans plusieurs familles de bivalves à savoir les *Lucinidae*, *Mytilidae*, *Solemyidae*, *Teredinidae*, *Thyasiridae* et *Vesicomyidae*^{169, 170, 171}. Une des particularités des *Lucinidae* est que toutes les espèces de cette famille sont symbiotiques alors que les autres familles précédemment citées ne possèdent que quelques espèces symbiotiques¹⁵³ (Figure 38).

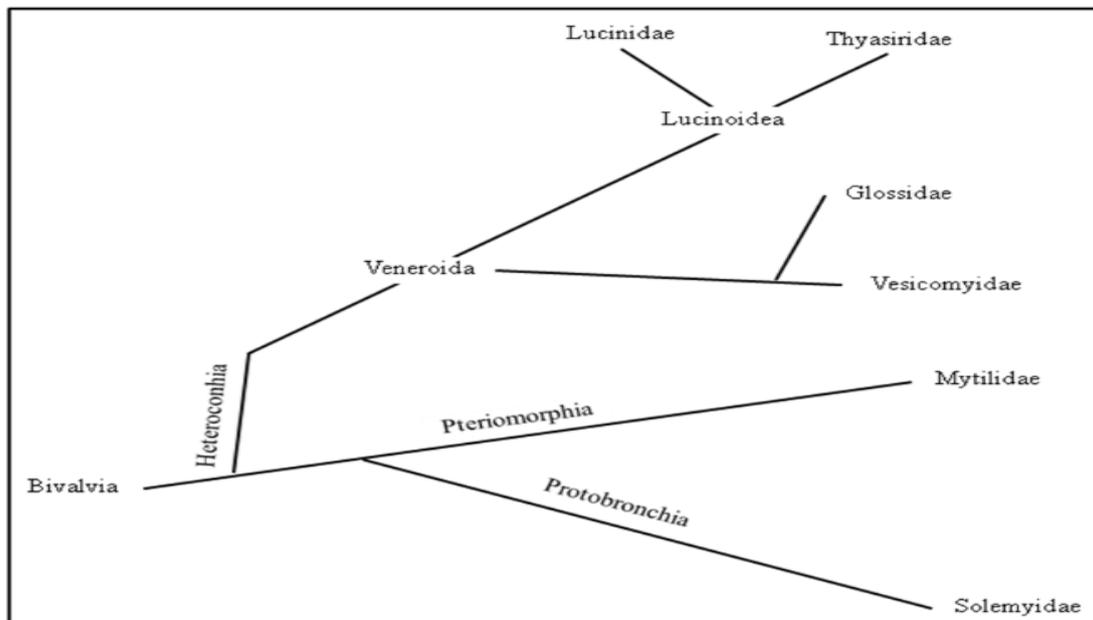


Figure 38. Représentation schématique de la taxonomie des bivalves chimiosymbiotiques (Brissac, 2009).

¹⁶⁵ Mignucci-Giannoni, A. A.; Hoberg, E. P.; Siegel-Causey, D.; Williams, E. H. *J. Parasitol.* **1998**, *84*, 939–946.

¹⁶⁶ Kane, E. A.; Olson, P. A.; Gerodette, T.; Fiedler, P. C. *Fish. Bull.* **2008**, *106*, 395–404.

¹⁶⁷ McFall-Ngai, M.; Nyholm, S. V.; Castillo, M. G. *Semin. Immunol.* **2010**, *22*, 48–53.

¹⁶⁸ Felberk, H.; Childress, J. J.; Somero, G. N. *Nature* **1981**, *293*, 291–293.

¹⁶⁹ Distel, D. L. *Am. Inst. Biol. Sci.* **1998**, *48*, 277–286.

¹⁷⁰ Fisher, C. R. *Rev. Aquat. Sci.* **1990**, *2*, 399–436.

¹⁷¹ Reid, R. G. B. *Hong Kong Univ. Press.* **1990**, *1*, 127–140.

¹⁵³ Taylor, J. D.; Glover, E. *Zool. J. Linn. Soc.* **2005**, *148*, 421–438.

La symbiose des Lucinidae date du Silurien ^{172, 173} et se déroule dans les branchies hypertrophiées de ces bivalves ¹⁷⁴. La transmission environnementale des symbiotes a été mise en évidence chez ces Lucinidae ¹⁷⁵ et a été justifiée par l'absence de symbiotes dans les ovaires, les gamètes, les œufs et les larves des bivalves ¹⁷⁶.

4. Études chimiques réalisées dans la famille des Lucinidae.

Chez les Lucinidae, la seule espèce qui a été l'objet d'études scientifiques est *Codakia orbicularis*. En 1985, Berg et ses collègues ont réalisé une étude lipidomique sur ce bivalve très consommé dans les Caraïbes ¹⁷⁷. La totalité des organes hormis la coquille a été prise en compte pour l'étude. Il a été mis en évidence majoritairement des phospholipides, des triglycérides, des acides gras libres et des stérols. 15% des acides gras libres de cet extrait brut de *C. orbicularis* étaient des acides gras polyinsaturés (20:4w6 et 20:5w3) et 45% des stérols étaient du cholestérol. Beaucoup plus tard, en 2007, Gourdine et ses collègues ont mis en évidence à partir des branchies de *C. orbicularis* une nouvelle lectine, nommée codakine, qui pourrait être impliquée dans la reconnaissance des bactéries symbiotiques et pathogènes ¹⁷⁸.

¹⁷² Gaillard, C.; Rio, M.; Rolin, Y.; Roux, M. *Palaios*. **1992**, 7, 451–465.

¹⁷³ Little, C. T. S.; Vrijenhoek, R. C. *Trends Ecol. Evol.* **2003**, 18, 582–588.

¹⁷⁴ Reid, R.; Brand, D. *Veliger*. **1986**, 29, 3–24.

¹⁷⁵ Gros, O.; Darrasse, A.; Durand, P.; Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2324–2330.

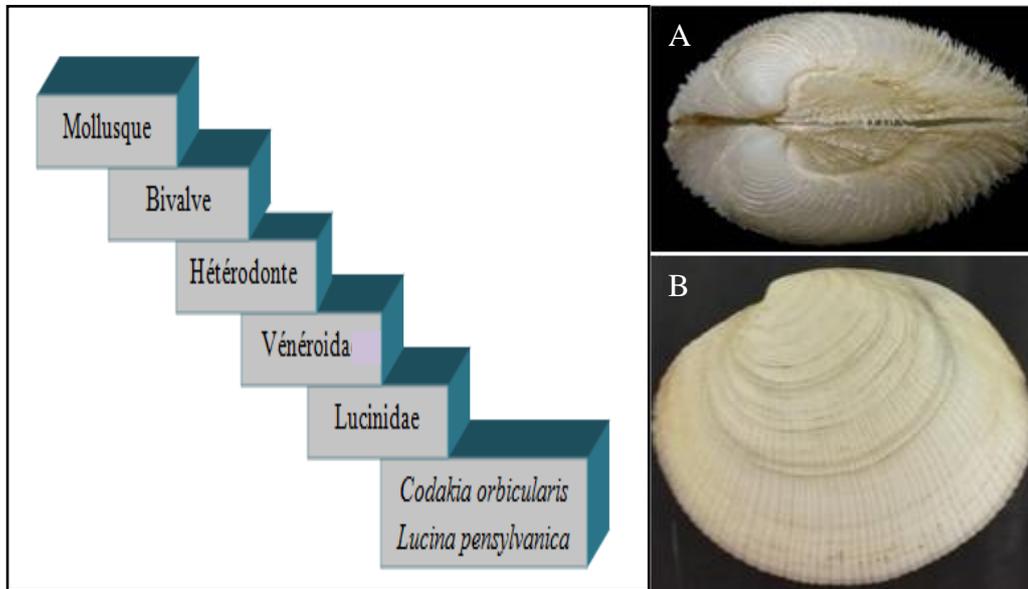
¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2101–2109.

¹⁷⁷ Berg, C.J.; Krzynowek, J.; Atalo, P.; Wiggin, K. *Lipids*. **1985**, 20, 116-120.

¹⁷⁸ Gourdine, J.P.; Smith-Ravin, E.J. *Fish & Shellfish Immunology*. **2007**, 22, 498-509.

IV. PRESENTATION DES DEUX ESPECES DE LUCINIDAE CONCERNEES PAR CE TRAVAIL CHIMIQUE: *CODAKIA ORBICULARIS* ET *LUCINA ROQUESANA*.

1. Systématique.



2. Répartition géographique et habitats.

Les Genres *Codakia* et *Lucina* sont retrouvés partout dans le monde mais les espèces *Codakia orbicularis* et *Lucina roquesana* colonisent uniquement les Caraïbes¹⁵⁵. Ces lucines (Figure 39) vivent dans le sédiment des herbiers *Thalassia testudinum* (Figure 40)¹⁷⁹.

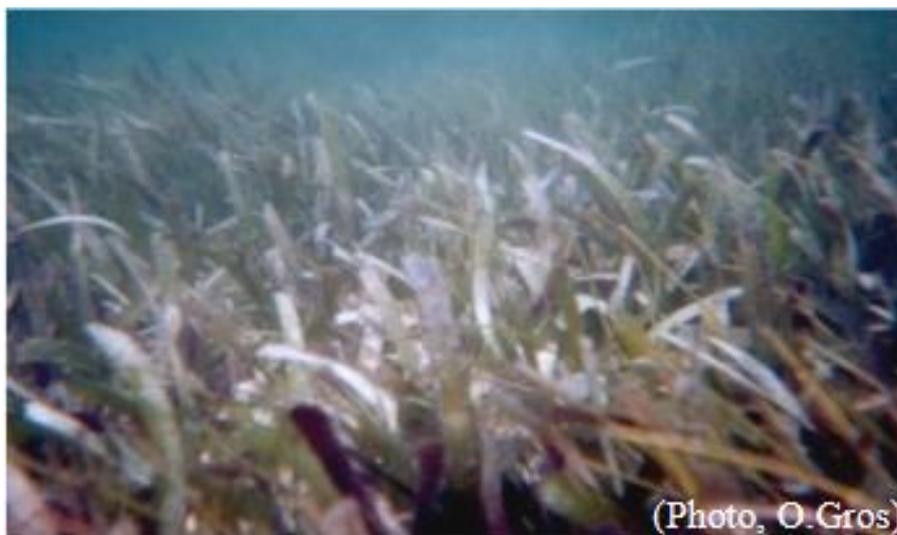


Figure 40: Herbiers à *Thalassia testudinum*.

¹⁵⁵ Taylor, J.; Glover, E.; Smith, L.; Ikebe, C.; Williams, S.T. *Zootaxa*. **2016**, 4196, 381-398.

¹⁷⁹ Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Zoomorphology*. **1995**, 115, 51-61.

La plante *T. testudinum* a une biomasse très importante, et a donc un impact écologique et économique crucial^{180, 181}. On la retrouve dans les Caraïbes et au large des côtes du Golfe du Mexique. Les rhizomes denses de cet herbier offrent un habitat sûr aux palourdes *Codakia orbicularis* et *Lucina roquesana* contre la prédation. En effet, ces bivalves s'enfoncent dans le sédiment à l'aide de leur pied en creusant un tunnel en U et s'intercalent entre les racines de l'herbier, à environ 15-20 cm de profondeur dans le sédiment selon la longueur de la coquille^{37, 176}. Le sédiment se divise en une zone oxygène en surface et une zone anoxique en profondeur où l'on trouve des poches de soufre réduit¹⁸² (**Figure 41**). À l'interface de ces deux zones, se logent les bivalves.

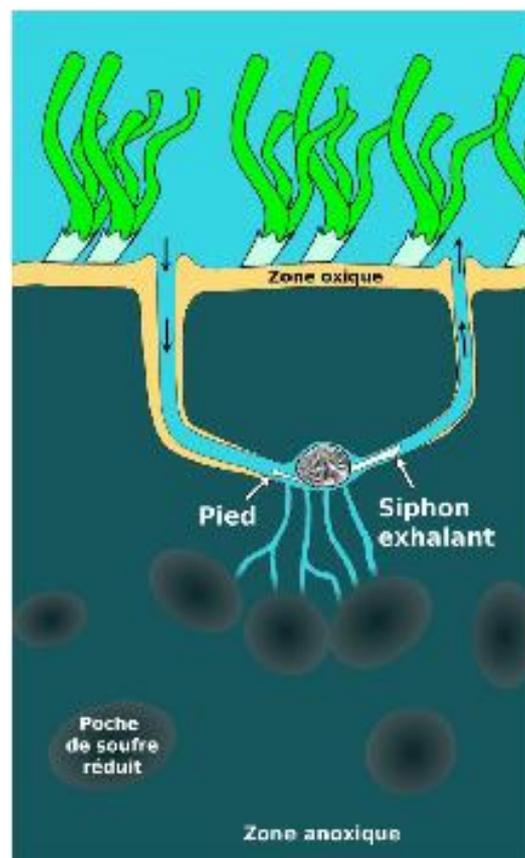


Figure 41. Schéma représentant l'habitat des Lucinidae (Elisabeth, 2011)¹⁸³.

Les concentrations en H₂S des zones de sédimentation côtière (10 µM à 30 µM dans le sédiment des herbiers à *Thalassia testudinum* ; 1 à 10 mM dans le sédiment de mangrove¹⁸⁴)

¹⁸⁰ Byron, D.; Heck, K. *Estuaries and Coasts* **2006**, 29, 939–942.

¹⁸¹ Dawes, C.; Margaret, O. H.; Raymond, K. R. *J. Coast. Res.* **1985**, 1, 255–262.

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2101–2109.

¹⁸² Ott, J.; Bright, M.; Bulgheresi, S. *Symbiosis* **2004**, 36, 103–126.

¹⁸³ Elisabeth, N. H. *Thesis.* **2011**, 1, 1-198.

¹⁸⁴ Maurin, L. *Thesis.* **2009**, 1, 1-195.

sont plus faibles que celles relevées au niveau des sources hydrothermales (supérieures à 10 mM)¹⁸⁵. Le sulfure d'hydrogène (H₂S) présent dans les poches de soufre réduit qui environnent les lucines, est toxique pour les animaux car il bloque la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. L'association symbiotique des palourdes avec des bactéries sulfoxydantes est indispensable pour la colonisation et la formation de cet écosystème¹⁸⁶.

La présence de l'acide H₂S est donc un moyen de protection des Lucinidae contre les prédateurs¹⁸⁷. Les lucines *Codakia orbicularis* et *Lucina roquesana* possèdent des branchies hypertrophiées car il s'y déroule une symbiose (**Figure 42.A**)¹⁷⁴. Une branchie est constituée de filaments branchiaux qui comportent trois zones : une zone ciliée, une zone intermédiaire et une zone latérale (**Figure 42.B**).

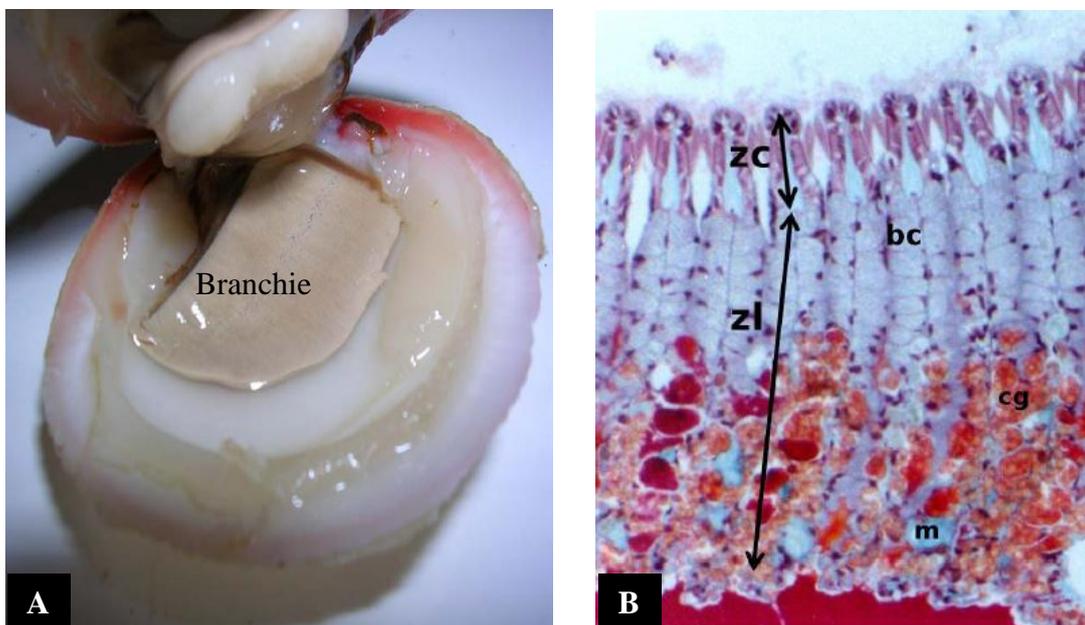


Figure 42. A: Branchie de *Codakia orbicularis* (Photo O. Gros). B: Microscopie d'une coupe transversale de la branchie de *Codakia orbicularis* après coloration au Goldner (Caro et al., 2009)¹⁸⁸.

La figure A montre une des deux branchies de *C. orbicularis*. La figure B présente une coupe transversale de branchie montrant plusieurs filaments branchiaux. Chaque filament est constitué d'une zone ciliée (zc) et d'une zone latérale (zl) qui contient quatre types de cellules dont trois sont visibles clairement : les bactériocytes (bc), les cellules à grains (cg) et les mucocytes (m). Chez *C. orbicularis* on ne distingue pas la zone intermédiaire en microscopie photonique.

Les zones ciliée et intermédiaire ne contiennent jamais de symbiotes¹⁸⁶. Dans le genre *Codakia*, on retrouve quatre types de cellules dans la zone latérale: les bactériocytes, les

¹⁸⁵ Jannasch, H. W.; Nelson, D. C.; Wirsen, C. O. *Nature*. **1989**, 342, 834–836.

¹⁸⁶ McMullin, E. R.; Bergquist, D. C.; Fisher, C. R. *Gravit. Space Biol. Bull.* **2000**, 13, 13–23.

¹⁸⁷ Kicklighter, C. E.; Fisher, C. R.; Hay, M. E. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, 275, 11–19.

¹⁷⁴ Reid, R.; Brand, D. *Veliger*. **1986**, 29, 3–24.

¹⁸⁸ Caro, A.; Got, P.; Bouvy, M.; Troussellier, M.; Gros, O. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 3304–3313.

mucocytes, les cellules intercalaires (situées entre les bactériocytes), et les cellules à grains (**Figure 42.B**)¹⁷⁹.

Que ce soit pour le genre *Codakia* ou le genre *Lucina*, les bactériocytes sont les seules cellules à être colonisées par les symbiotes¹⁷⁶ (**Figure 43**). Ce sont donc des cellules spécialisées. La taille d'un bactériocyte peut atteindre jusqu'à 35 µm tandis que celle d'un symbiote varie entre 0,5 et 5 µm¹⁷⁶. La taille du symbiote dépend du nombre de copies de génomes et de la quantité de soufre contenue dans la cellule bactérienne soit 0,5 µm au pôle apical et 5 µm au pôle basal. Il s'agit donc d'une endosymbiose intracellulaire puisque les symbiotes sont à l'intérieur des cellules du bivalve (hôte)¹⁷⁶ (**Figure 43.B**).

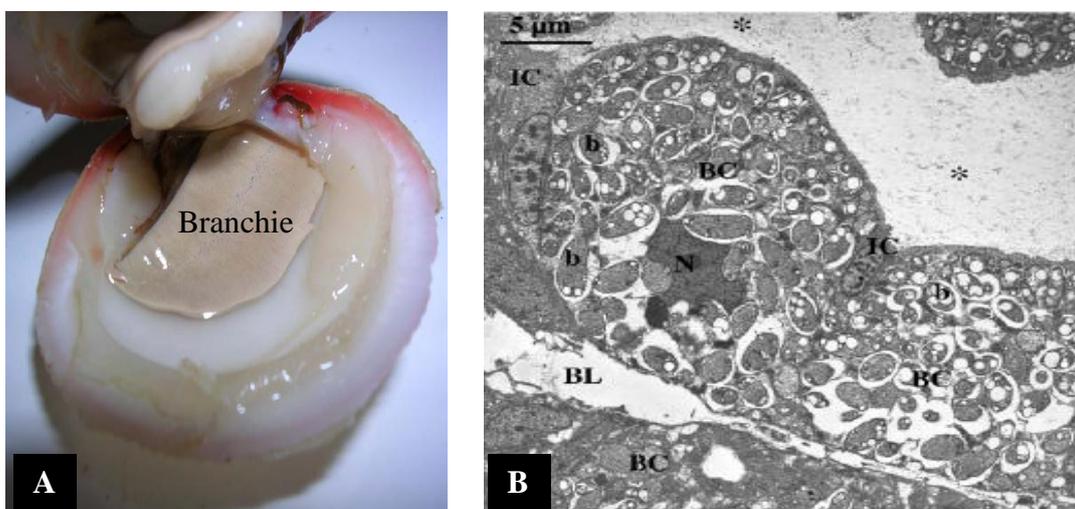


Figure 43. A: Branchie de *Codakia orbicularis* (Photo O.Gros). B: Micrographie en microscopie électronique à transmission montrant les bactéries symbiotiques internalisées dans un bactériocyte de *Lucinidae*.

Les bactéries sont contenues dans des vacuoles (b), les grains de soufre élémentaire dans le cytoplasme bactérien apparaissent clairs en microscopie électronique (Caro *et al*, 2007). Dans le bactériocyte (BC), il y a le noyau du bactériocyte (N), des lacunes sanguines (BL), des cellules intercalaires (IC).

Une branchie peut héberger jusqu'à 3.10^9 endosymbiotes par gramme de branchies¹⁸⁹. Ces endosymbiotes sont des bactéries sulfo-oxydantes¹⁷⁵. Selon des études basées sur l'analyse de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, la majorité des bactéries trouvées dans l'eau de mer sont des gammaprotéobactéries¹⁹⁰.

¹⁷⁹ Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Zoomorphology*. **1995**, *115*, 51–61.

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2101–2109.

¹⁸⁹ Brissac, T.; Gros, O.; Merçot, H. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *67*, 261–267.

¹⁷⁵ Gros, O.; Darrasse, A.; Durand, P.; Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2324–2330.

¹⁹⁰ Distel, D. L.; Cavanaugh, C. M. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 1932–1938.

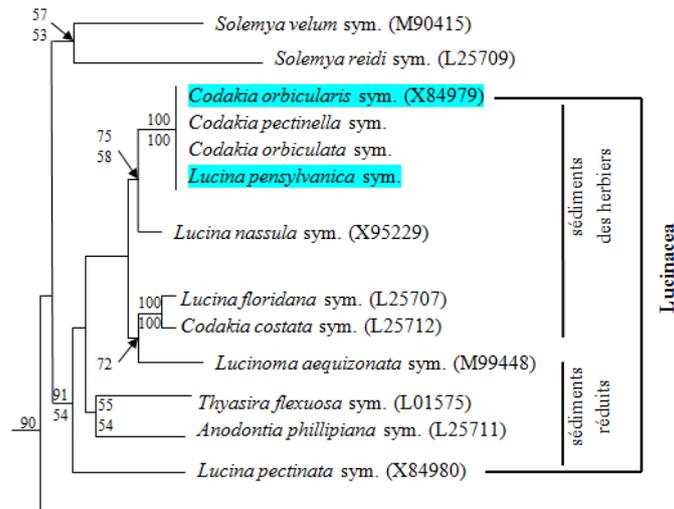


Figure 44. Phylogénie des symbiotes de *C. orbicularis* et *L. roquesana* (qui était nommé *L. pensylvanica*) selon les études des séquences d'ADNr 16S (modifié d'après Gros *et al.*, 1996)¹⁷⁵.

Comme précisé précédemment, les endosymbiotes de *Lucinidae* sont transmis aux nouvelles générations d'hôte via une forme libre présente dans l'environnement. À notre connaissance, hormis une étude sur une moule *Bathymodiolus* spp. montrant que ses symbiotes sont présents dans l'environnement^{191, 192}, il n'y a à ce jour aucune autre étude chez les *Lucinidae* sur la forme de vie libre des symbiotes des bivalves^{193, 194}. De plus, des études phylogénétiques basées sur les séquences d'ADNr 16S des endosymbiotes de ces *Lucinidae* ont montré que ces lucines hébergent la même espèce bactérienne au sein de leurs branchies (**Figure 44**). Les branchies du bivalve ont un rôle de filtre et la majorité du H₂S qui se trouve au contact de ce tissu est consommée par ses endosymbiotes sulfo-oxydants^{195, 179}. Ces bactéries chimio-autotrophes détoxiquent ainsi le milieu. La détoxification des branchies se fait par oxydation du H₂S en sulfate SO₄²⁻ en utilisant l'oxygène de la partie oxique du sédiment ou de l'O₂ dissout dans l'eau de mer (**Schéma 2**).

¹⁷⁵ Gros, O.; Darrasse, A.; Durand, P.; Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2324–2330.

¹⁹¹ Won, Y. J.; Hallam, S. J.; O'Mullan, G. D.; Pan, I. L.; Buck, K. R.; Vrijenhoek, R. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 6785–6792.

¹⁹² Crépeau, V.; Cambon Bonavita, M. A.; Lesongeur, F.; Randrianalivelo, H.; Sarradin, P. M.; Sarrazin, J.; Godfroy, A. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, 76, 524–540.

¹⁹³ Imhoff, J. F.; Sahling, H.; Süling, J.; Kath, T. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2003**, 249, 39–51.

¹⁹⁴ Dubilier, N.; Bergin, C.; Lott, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 725–740.

¹⁹⁵ Saraiva, S.; van der Meer, J.; Kooijman, S. a L. M.; Sousa, T. *Ecol. Modell.* **2011**, 222, 514–523.

¹⁷⁹ Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Zoomorphology.* **1995**, 115, 51–61.

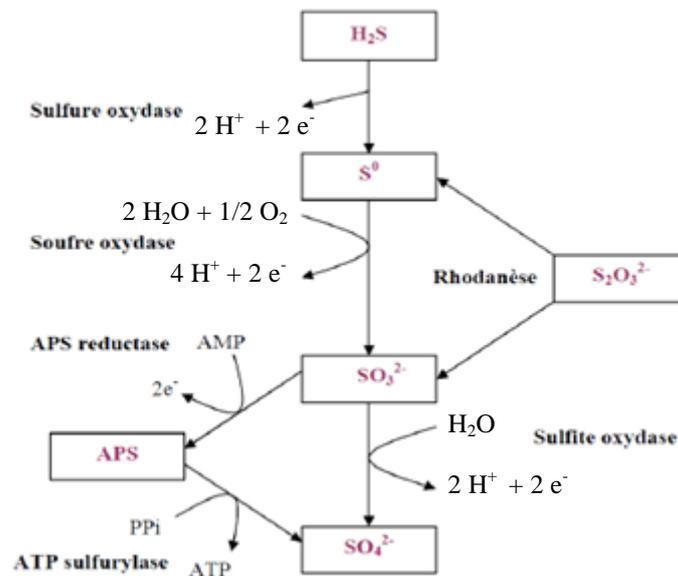


Schéma 2. Cycle du soufre.(modifié d'après Jannasch & Wirsén 1985; Suzuki, 1999) ^{196, 197}.

H_2S : sulfure d'hydrogène ; S^0 : soufre élémentaire ; SO_3^{2-} : sulfites ; $S_2O_3^{2-}$: thiosulfates ; SO_4^{2-} : sulfates. Le H_2S est oxydé en SO_4^{2-} après plusieurs réactions d'oxydations successives en présence d'enzymes et de l'oxygène de la partie oxicque du sédiment. Il y a ainsi formation d'ATP, nécessaire pour la synthèse de molécules organiques.

La preuve de l'existence de ce cycle du soufre est la mise en évidence de grains de soufre élémentaire S^0 (sous forme de S_8) s'accumulant dans le cytoplasme des symbiotes autotrophes chez plusieurs espèces de lucines ¹⁷⁶ (**Figure 43.B**). Par ailleurs, l'oxydation de l' H_2S produit de l'énergie sous forme d'ATP qui sera utilisé par les mêmes bactéries symbiotiques autotrophes pour fixer le dioxyde de carbone, dissout dans l'eau, permettant la synthèse de molécules organiques via le cycle de Calvin-Benson (**Schéma 3**) ^{198, 195}. Ce carbone fixé est ensuite transféré au bivalve sous forme de molécules organiques. L'activité métabolique des symbiotes permet ainsi de fournir 90% des besoins énergétiques de leur hôte hétérotrophe d'après l'analyse isotopique en carbone 13 des tissus hôtes ¹⁷⁶. On est bien dans le cadre d'une symbiose mutualiste puisque d'une part les endosymbiotes bénéficient d'une protection physique et chimique du milieu environnant grâce à l'hôte et d'autre part l'hôte est alimenté grâce à ses endosymbiotes et peut coloniser un environnement toxique grâce à leur action de détoxification.

¹⁹⁶ Suzuki, I. *Can. J. Microbiol.* **1999**, 45, 97–105.

¹⁹⁷ Jannasch, H. W.; Wirsén, C. *Biol. Soc. Wash. Bull.* **1985**, 6, 325–334.

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2101–2109.

¹⁹⁸ Minic, Z.; Hervé, G. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 3093–3102.

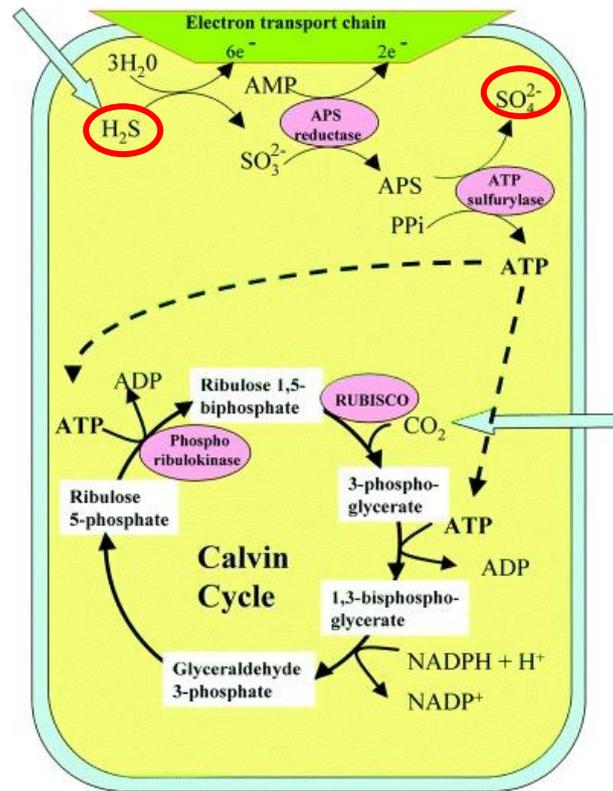


Schéma 3: Cycle de Calvin-Benson (Minic & Hervé, 2004) ¹⁷⁶.

Pour que cette symbiose reste mutualiste, il semble important qu'il y ait une régulation de la quantité de symbiotes présents dans la branchie de l'hôte pour que ce dernier ne soit pas envahi. Pour mieux comprendre cette régulation, l'analyse de la population bactérienne des Lucinidae a été réalisée lors de travaux antérieurs, à l'aide de la cytométrie en flux. Cette technique a montré des bactéries symbiotiques de *Codakia orbicularis* de grande taille et riche en génome. En effet, certains de ces symbiotes pouvaient posséder jusqu'à 7 copies de génome (rappelons qu'une bactérie est normalement haploïde, donc ne contient qu'une seule copie de génome). Ces symbiotes dupliquent leur génome mais ne peuvent pas entrer en division cellulaire dans les branchies du bivalve ¹⁷⁶. Ce résultat biologique a constitué un des objectifs de cette étude chimique portée sur le modèle *C. orbicularis*. Quelles sont donc les molécules bactériostatiques présentes dans les branchies de la palourde et bloquant la division cellulaire bactérienne des symbiotes? Les métabolites secondaires peuvent jouer un rôle dans le dialogue interspécifique d'une première importance. Cela justifie l'identification et la détermination des métabolites de cet organisme. La piste d'une autorégulation des bactéries, dans le cadre du Quorum sensing, par des autoinducteurs de type homosérine lactone, première hypothèse envisagée et piste suivie, a dû être écartée. En effet, en spectrométrie de masse (APCI-MS/MS, par exemple) les homosérine lactones ont une fragmentation type

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2101–2109.

aboutissant à la formation d'un ion $[M^+]$ à $m/z = 102$ ¹⁹⁹. Une analyse préliminaire par spectrométrie de masse haute résolution d'un extrait brut de branchies de *C. orbicularis* n'a pas permis de détecter cet ion diagnostic alors que les analyses de standards d'homosérine lactones, réalisées dans les mêmes conditions que l'extrait brut, faisaient apparaître cet ion.

Le premier objectif de ma thèse a été d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait brut de branchies (lieu de la symbiose) du bivalve *Codakia orbicularis*. Le second objectif a été d'isoler et de caractériser les métabolites secondaires majoritaires présents dans ces branchies, puis d'évaluer l'activité anti-bactérienne des molécules isolées. L'origine bactérienne ou eucaryote des molécules antibactériennes isolées serait alors discutée afin d'envisager des hypothèses quant à l'implication de cette chimiodiversité dans la régulation des symbiotes. Enfin, les résultats obtenus pour *C. orbicularis* seraient comparés à ceux obtenus lors d'une étude chimique préliminaire réalisée sur *Lucina roquesana*. Le dernier objectif de cette thèse a été d'isoler et caractériser des structures originales puisque *C. orbicularis* a été très peu étudiée chimiquement à ce jour.

¹⁹⁹ Yong, Y.C.; Zhong, J.J. *Process Biochemistry*. **2010**, *45*, 1944-1948.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 2 ETUDE CHIMIQUE DU BIVALVE *CODAKIA ORBICULARIS* ET COMPARAISON AVEC *LUCINA ROQUESANA* (LUCINIDAE).

I. LA BIOMASSE ETUDIEE.

Codakia orbicularis et *Lucina roquesana* vivent dans les sédiments des herbiers à *Thalassia testudinum* respectivement en Guadeloupe et en Martinique (**Figure 45**).



Figure 45. Photographie de l'herbier à *Thalassia testudinum* en Guadeloupe.

À l'âge adulte, la coquille de *Codakia orbicularis* peut atteindre jusqu'à 70 mm tandis que celle de *Lucina roquesana* ne peut atteindre qu'un maximum de 50 mm (**Figure 46.a et Figure 46.c**, Abbot 1974)²⁰⁰.

Du fait des objectifs de la thèse énoncés précédemment, seules les branchies (**br**) ont été disséquées et conservées à -20°C jusqu'à l'extraction chimique.

²⁰⁰ Abbot, R. T. *American Seashells*. 1974, 1, 663.

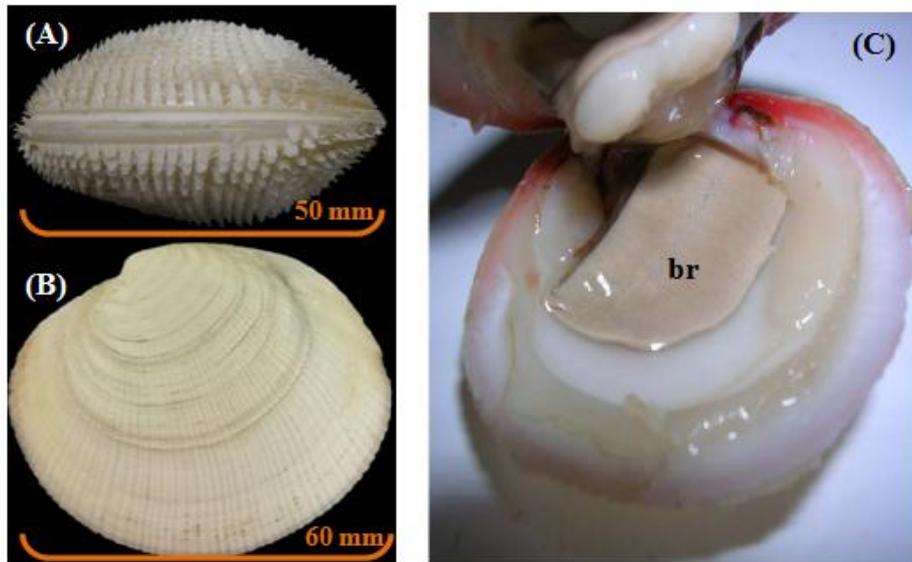


Figure 46. Photographies des coquilles fermées de *L. roquesana* (A) (Marlo F. Krisberg, 2008) et de *C. orbicularis* (B).
Mise en évidence de la branchie (br) de *C. orbicularis* (C).

II. EXTRACTION DES BRANCHIES DE *CODAKIA ORBICULARIS*.

Plusieurs récoltes de bivalves ont été réunies afin d'obtenir une masse de branchies suffisante afin d'avoir un extrait brut en quantité suffisante pour entreprendre les études chimiques (**voir partie expérimentale**). Les branchies de *Codakia orbicularis* (3 kg) ont été extraites par macération dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) pendant 48 heures à température ambiante, permettant ainsi d'obtenir 45 g d'extrait brut (**Schéma 4**). L'extrait brut obtenu a été testé sur deux souches bactériennes de Gram différents en système hétérologue.

III. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'EXTRAIT BRUT DE BRANCHIES DE *CODAKIA ORBICULARIS* PAR LA METHODE DE DIFFUSION DES DISQUES. COMPARAISON AVEC *LUCINA PENNSYLVANICA*.

Les bio-essais ont été réalisés (partie expérimentale III-2-a) sur des cultures bactériennes d'*Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram -) et de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (Gram +), pour évaluer l'activité bactériostatique de l'extrait brut de branchies de *Codakia orbicularis* et de *Lucina roquesana*. Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 47**.

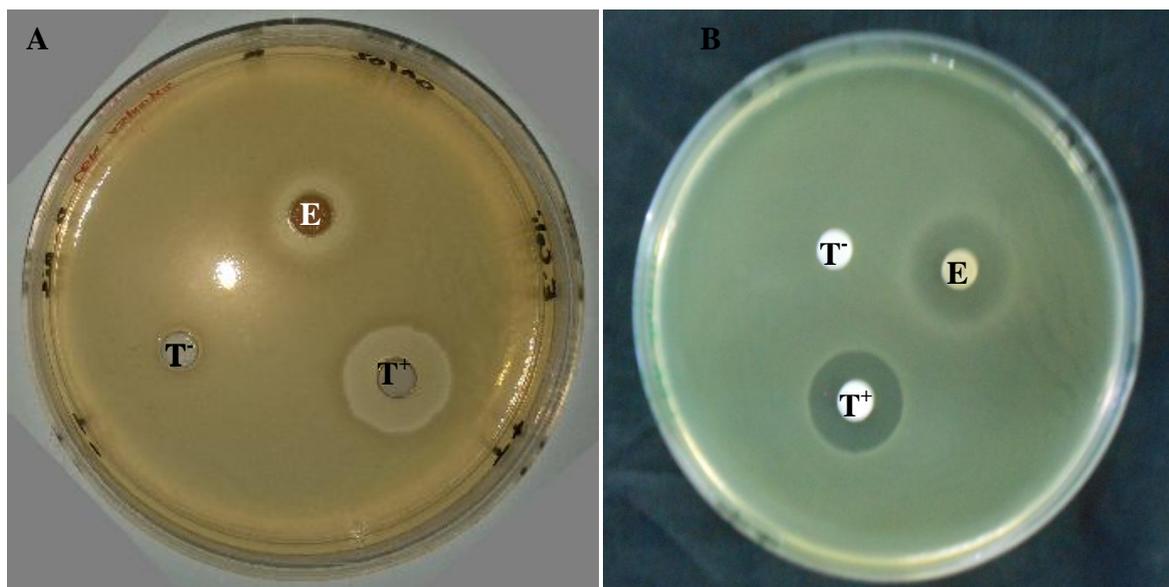


Figure 47. Bio-essais. A : Bio-essais sur la culture de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (Gram⁺).

E: pastille de cellulose contenant 20 μ L de l'extrait de *Lucina roquesana* (diamètre d'inhibition de 10 mm). **T⁺:** Antibiogramme de collistine de 50 μ g (témoin positif). **T⁻:** pastille de cellulose contenant 20 μ L d'acétate d'éthyle.

B : Bio-essais sur la culture d'*Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram⁻). **E:** pastille de cellulose contenant 20 μ L de l'extrait de *Codakia orbicularis* (diamètre d'inhibition de 15 mm). **T⁺:** Antibiogramme de vancomycine de 50 μ g (témoin positif). **T⁻:** pastille de cellulose contenant 20 μ L d'acétate d'éthyle.

Il se forme des zones d'inhibition de 15 mm et de 10 mm de diamètre autour des pastilles contenant respectivement les extraits bruts de branchies de *C. orbicularis* et *L. roquesana*. Ces zones d'inhibition indiquent la présence dans les extraits bruts de branchies de chacun de ces bivalves, de molécules inhibant la croissance des bactéries Gram⁻ mais aussi Gram⁺. Ces résultats confortent ceux obtenus par Caro *et al* en 2007 par cytométrie de flux, suggérant l'existence de molécules bactériostatiques chez *C. orbicularis*¹⁷⁶.

Ces évaluations ont donc été poursuivies sur les fractions obtenues lors de l'étude chimique de chacun des extraits bruts.

IV. EVALUATION DE LA COMPLEXITE METABOLIQUE DE L'EXTRAIT BRUT.

Dans un premier temps, l'extrait brut de branchies a été analysé par couplage LC-SMHR, un outil qui permet d'évaluer la diversité métabolique d'un modèle biologique²⁰¹. L'extrait brut s'est avéré très riche en molécules puisque le premier profil LC-SMHR que nous avons réalisé s'est révélé complexe. Ce profil de *C. orbicularis* montre la présence de molécules de polarité très différentes (**Figure 48**).

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2101–2109.

²⁰¹ Li, M.; Yang, L.; Bai, Y.; Liu, H. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 161–175.

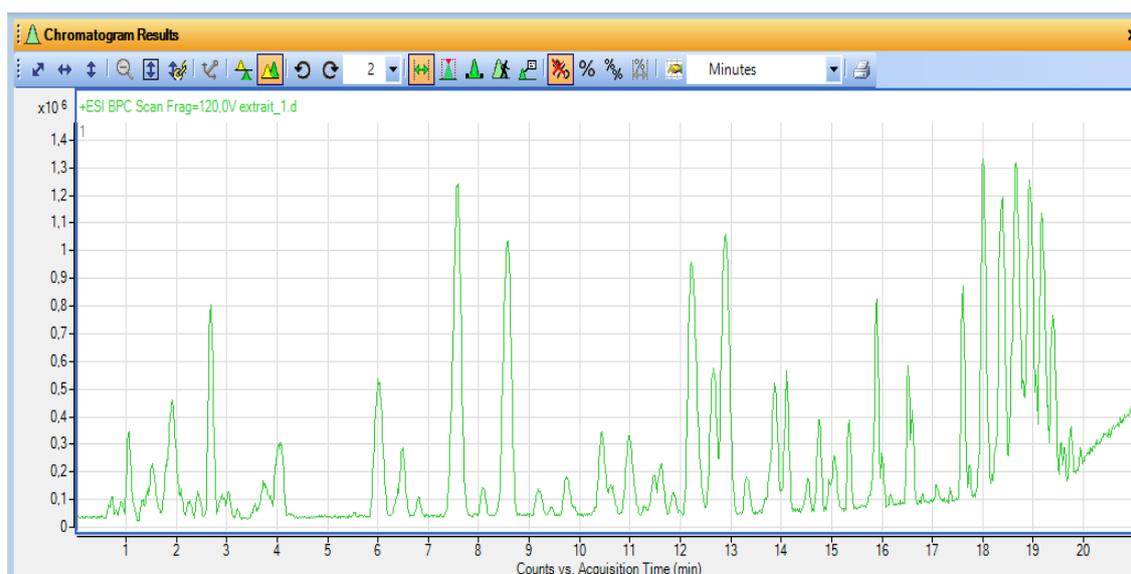


Figure 48. Profil LC-SMHR de l'extrait brut de branchies de *Codakia orbicularis*.

Extrait brut élué sur une colonne Thermo Accucore C₁₈ (2,6 µm, 100 mm* 2,1 mm) avec un gradient, débit 400 µL/ min. **Solution A:** H₂O ultrapure/ACN : 40/60 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique . **Solution B:** Isopropanol/ACN : 90/10 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique. Détection en spectrométrie de masse ESI⁺- TOF.

Compte-tenu de la complexité de l'extrait brut de *C. orbicularis*, un fractionnement a été nécessaire afin de mieux cibler le, ou les, métabolite(s) responsable(s) de l'activité antibactérienne.

V. EVALUATION PAR LA METHODE DE DIFFUSION DES DISQUES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES FRACTIONS DE L'EXTRAIT BRUT.

Lors de la solubilisation dans l'hexane des 45 g d'extrait brut de branchies obtenus, 20 g de soufre élémentaire (**87**) ont précipité.

L'extrait brut (25 g), séparé de soufre S₈ solide, a alors été fractionné sur colonne de silice en utilisant un mélange de solvants de polarité croissante Hex/ AcOEt/ MeOH allant de 80/ 20/ 0 à 0/ 0/ 100 % (**Schéma 4**) .

Ce fractionnement a permis de séparer les métabolites selon leur polarité, et de vérifier si l'activité antibactérienne de l'extrait brut était conservée.

Les fractions obtenues ont été évaluées selon le même protocole utilisé pour l'extrait brut (**partie expérimentale III-2-a**). Pour *C. orbicularis* onze fractions sur dix-huit ont présenté une activité antibactérienne contre *E. coli* et *M. luteus* alors que pour *L. roquesana* cinq fractions dont deux avec une activité majeure ont été retenues. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux fractions présentant une activité antibactérienne (fractions actives, **Schéma 4**) et elles ont été retenues pour des purifications et analyses ultérieures. Du fait du grand

nombre de fractions actives obtenues pour le bivalve *C. orbicularis*, la suite de l'étude chimique s'est focalisée sur ce bivalve pour l'isolement et la caractérisation de molécules.

VI. ISOLEMENT DES COMPOSES

Le bio-guidage n'a pas été utilisé pour isoler les composés à partir des fractions actives. Ce sont les composés majoritaires des fractions actives qui ont été isolés pour s'assurer de parvenir à des caractérisations structurales complètes (**Schéma 4; figure 49**), et ce n'est qu'une fois purifiés et caractérisés que ces composés ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité bactérienne, qui a été mise en parallèle avec celle des fractions dont ils sont issus.

Les détails concernant l'isolement des composés des fractions actives apparaissent dans la partie expérimentale. Au total, douze composés, dont un nouveau, ont été isolés et caractérisés dans ce travail.

La fraction F2 (1,45 g) a été de nouveau fractionnée sur colonne de silice. Parmi les sous-fractions résultantes, la f₂ (204 mg) a été obtenue. Par CCM préparative de la f₂, une sous-fraction ff_{2c} (26 mg) a été analysée en LC-MS.

Les monoglycérolipides **89** (2,5 mg) et **90** (2,3 mg) ont été isolés de la fraction F13.

36 mg du 4-hydroxybenzaldéhyde (**91**) ont été isolés de la fraction F6 (443 mg).

La fraction F15 (412 mg) a été purifiée après plusieurs filtrations et l'acide succinique (**92**) (8,8 mg) a été isolé. Cette molécule a également été isolée (2,8 mg) de la fraction F13.

Le composé **93**, à savoir la thymidine, a été isolé en petite quantité des fractions actives F13 et F18, à savoir 0,8 mg et 3,9 mg respectivement, mais en grande quantité (28,5 mg) de la fraction active F17.

De cette fraction ont été aussi isolées la 5'-O-acétylthymidine (**94**) (1 mg) et la 5'-O-acétyluridine (**95**) (0,9 mg). Ces composés ont été identifiés selon leurs caractéristiques physico-chimiques dans la fraction active F16.

La 3'-O-acétylthymidine (**96**) a par contre été isolée (0,5 mg) de la fraction active F15.

L'uridine (**97**) a été isolée (2,3 mg) uniquement dans la fraction active F18.

Le composé **98**, à savoir l'orbicularisine, a été isolé de la fraction F14 en plus grande quantité (6,5 mg) et de la fraction F15 en moindre quantité (1,6 mg). Ce qui a conduit au total à 8,1 mg d'orbicularisine (**98**).

L'élucidation structurale de toutes les molécules isolées dans le cadre de cette étude est présentée dans cette partie.

Molécules isolées dans ce travail

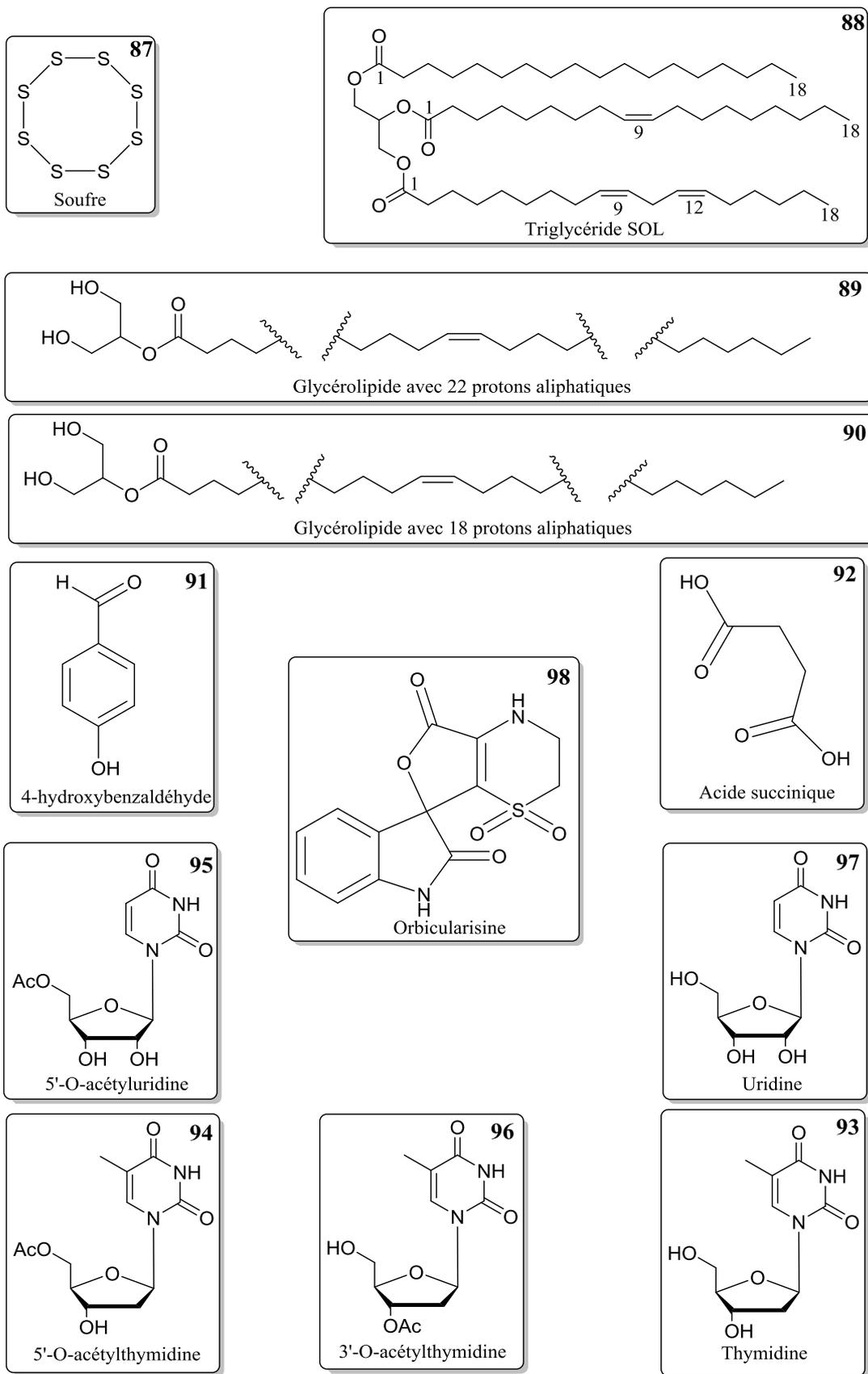


Figure 49. Structures des molécules isolées du bivalve *Codakia orbicularis*.

VII. STRUCTURE DU COMPOSE 87: LE SOUFRE.

Le soufre élémentaire (**87**) représente au total 20 g de l'extrait brut de branchies (45 g) soit 44%. Il a été obtenu par filtration successive de l'extrait brut repris par de l'hexane. Il s'agit d'une poudre cristalline jaunâtre (**Figure 50**) dont l'analyse en spectrométrie de masse a conduit à une masse de 256, 520 Da. L'analyse de ce composé **87** aux Rayons X a été réalisée par le Dr Pascal Retailleau de l'ICSN et comparée aux données de la littérature ²⁰². Il s'est alors avéré que le composé **87** est du soufre élémentaire S₈ ²⁰³ sous sa forme stable, orthorhombique ²⁰⁴. En dehors de cette forme cristalline le soufre peut être dissout en milieu marin ²⁰⁵ ou encore sous forme colloïdale ²⁰⁶.

Selon nos connaissances, c'est la première fois qu'une telle quantité de soufre est extraite d'une source naturelle. En effet, ce composé a été isolé pour la première fois des branchies de *C. orbicularis* dans ce travail. Il avait seulement été repéré, à l'aide de la spectrométrie RAMAN et aussi par perte d'énergie des électrons (technique EELS) ^{207, 208}, dans les branchies du bivalve, à l'intérieur des symbiotes sulfo-oxydants ²⁰⁸. Ces symbiotes sulfo-oxydants sont responsables de cette production de soufre ²⁰⁹.

²⁰² Rettig, S. J.; Trotter, J. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*. **1987**, *43*, 2260–2262.

²⁰³ Steudel, R. *Elem. Sulfur Sulfur-Rich Compd. I* **2003**, *230*, 153–166.

²⁰⁴ Steudel, R.; Eckert, B. *Elem. Sulfur Sulfur-Rich Compd. I*. **2003**, *230*, 1–80.

²⁰⁵ Boulegue, J. *Phosphorous Sulfur Relat. Elem.* **1978**, *5*, 127–128.

²⁰⁶ Steudel, R.; Holdt, G.; Gobel, T.; Hazeu, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 151–153.

²⁰⁷ Himmel, D.; Maurin, L. C.; Mansot, J.-L.; Gros, O. *Mar. Environ. Res.* **2010**, *69*, 382–389.

²⁰⁸ Lechaire, J.-P.; Frébourg, G.; Gaill, F.; Gros, O. *Biol. Cell.* **2006**, *98*, 163–170.

²⁰⁹ Distel, D. L.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Giovannoni, S. J.; Pace, B.; Pace, N. R.; Stahl, D.; Felbeck, H. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 2506–2510.

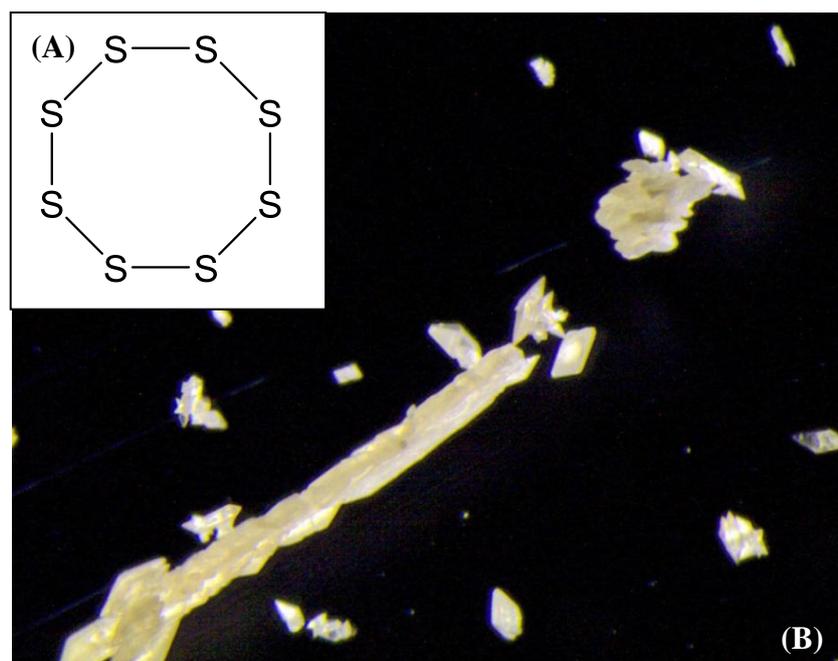


Figure 50. (A) Structure du soufre (87). (B) Cliché de la poudre cristalline du soufre.

Le métabolisme de ces bactéries symbiotiques consiste à oxyder les formes réduites du soufre (donc les formes H_2S et HS^-) toxiques du milieu environnant¹⁹⁵ en passant par plusieurs états d'oxydation du soufre jusqu'à l'obtention de sulfates (non toxiques)^{196, 210}.

Elles tirent ainsi de l'énergie pour fixer le carbone présent dans l'eau sous forme de CO_2 . Lors de ces oxydations successives, il a été démontré que les symbiotes de *C. orbicularis* stockaient du soufre dans des granules périplasmiques²⁰⁸, permettant à ces bactéries d'avoir une activité métabolique, donc de survivre, en cas de pénurie ponctuelle des sulfures dans le milieu environnant¹⁷⁶.

L'activité antibactérienne du soufre a été évaluée à la partie VI de ce chapitre car c'est un composé efficace pour combattre les parasites des plantes, des animaux ou de la peau humaine et son activité sur certaines bactéries est connue²¹¹.

¹⁹⁵ Saraiva, S.; van der Meer, J.; Kooijman, S. a L. M.; Sousa, T. *Ecol. Modell.* **2011**, 222, 514–523.

¹⁹⁶ Suzuki, I. *Can. J. Microbiol.* **1999**, 45, 97–105.

²¹⁰ Berg, J. S.; Schwedt, A.; Kreuzmann, A.-C.; Kuypers, M. M. M.; Milucka, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 629–636.

²⁰⁸ Lechaire, J.-P.; Frébourg, G.; Gaill, F.; Gros, O. *Biol. Cell.* **2006**, 98, 163–170.

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2101–2109.

²¹¹ Libenson, L.; Hadley, F. P.; McIlroy, A. P.; Wetzel, V. M.; Mellon, R. R. *J. Infect. Dis.* **1953**, 93, 28–35.

VIII. ETUDE DU MELANGE DE TRIGLYCERIDES DE LA FRACTION F2 POUR ABOUTIR A L'ELUCIDATION STRUCTURALE DU COMPOSE 88.

Les spectres RMN de ^1H des fractions F1 et F2 contiennent des composés de type triglycérides (TAG) ²¹² (**Figure 51**). Il existe plusieurs types de TAG notés I (trois fois le même acide gras (AG), II (deux même AG et un AG différent) et III (trois AG différents) ^{213, 214}. Les deux fractions actives étant similaires (voir les spectres RMN), nous nous sommes intéressés arbitrairement à la fraction F2.

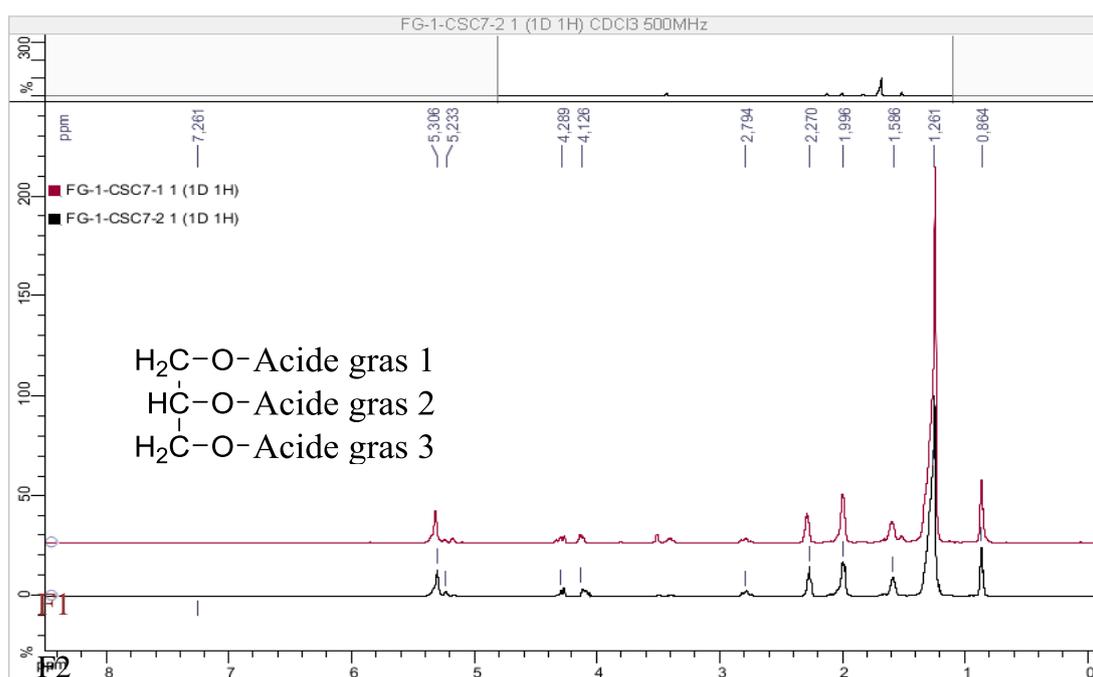


Figure 51. Spectre RMN ^1H des fractions F1 et F2, CDCl_3 , 500MHz.

Les TAG sont des lipides très documentés dans la littérature ^{215, 216, 217}. On ne s'intéressera qu'à la sous-fraction majoritaire de la fraction F2, à savoir la f2₂ qui a permis d'obtenir après CCM préparative une sous-fraction majoritaire notée ff2_{2C} (**voir partie expérimentale**).

L'analyse de la sous-fraction ff2_{2C} a été réalisée en spectrométrie de masse haute résolution (ESI-TOF) couplée à la chromatographie liquide (**voir partie expérimentale**). Le spectre de masse obtenu est présenté à la **Figure 52**.

²¹² Lucas-Torres, C. Pérez, Á.; Cabañas, B.; Moreno, A. *Food Chem.* **2014**, *165*, 21–28.

²¹³ Byrdwell, W. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 5143–5160.

²¹⁴ Byrdwell, W. C. *Lipids* **2005**, *40*, 383–417.

²¹⁵ List, G. ; Byrdwell, W. C.; Steidley, K. R.; Adlof, R. O.; Neff, W. E. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4692–4695.

²¹⁶ Ratnayake, W. M. N.; Matthews, D. G.; Ackman, R. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66*, 966–969.

²¹⁷ Murphy, K. J.; Mooney, B. D.; Mann, N. J.; Nichols, P. D.; Sinclair, A. J. *Lipids* **2002**, *37*, 587–595.

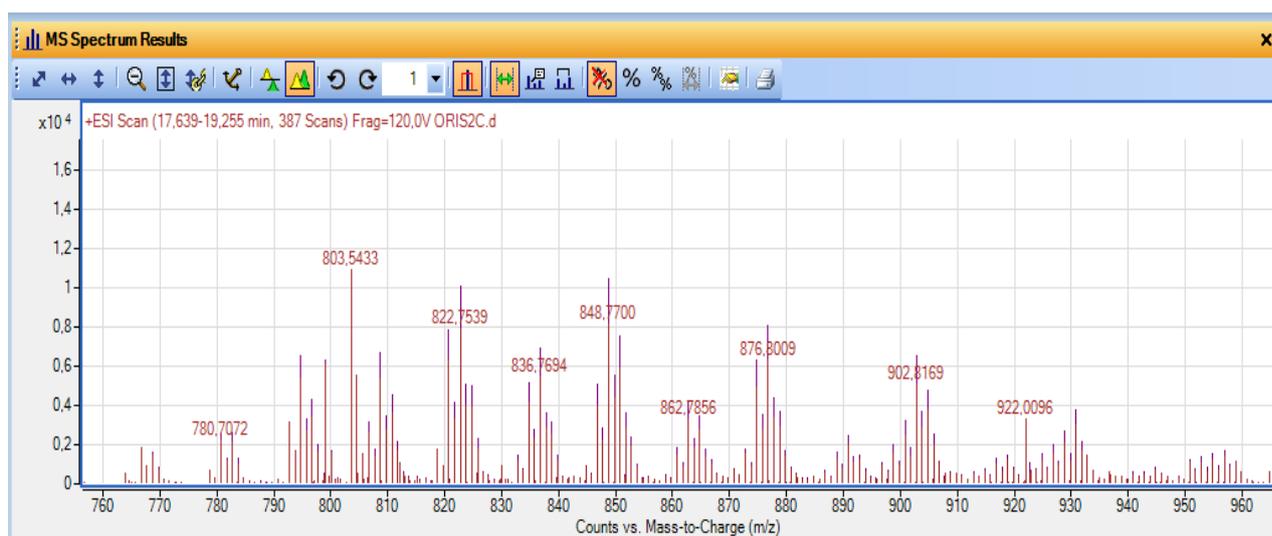


Figure 52. Spectre de masse de la sous-fraction 22c présentant les ions élués entre 17 et 20 minutes. Les ions 922,0096 et 803,5433 sont des triglycérides de références provenant de l'analyse d'une huile.

Dans cette sous-fraction ff2_{2C}, on observe plusieurs triglycérides ionisés. En fonction de l'éluant utilisé, les ions observés (**Figure 52**) peuvent être des adduits proton de masse [M + H]⁺, sodium [M + Na]⁺, ammonium [M + NH₄]⁺, ou encore potassium [M + K]⁺. Pour chaque molécule, il y a donc possibilité de l'observer sous quatre formes ioniques différentes, de masses exactes différentes. À partir de chaque ion détecté, on peut donc calculer 4 masses possibles pour la molécule lui correspondant (**Tableau 2**).

Tableau 2. Valeur des ions *m/z* de la sous-fraction ff2_{2C} et masses exactes possibles pour chaque ion formé à partir d'adduits potassium K, ammonium NH₄, proton H, sodium Na. Les masses exactes en gras correspondent à celles de TAG répertoriés dans les bases de Byrdwell.

Masses exactes possibles selon l'adduit formé	(<i>m/z</i>)-M _(K)	(<i>m/z</i>)-M _(NH₄)	(<i>m/z</i>)-M _(H)	(<i>m/z</i>)-M _(Na)
	Valeur <i>m/z</i> des ions détectés			
780,7072	741,7435	762,6729	779,6994	757,7174
803,5433	Référence			
822,7539	783,7902	804,7196	821,7461	799,7641
836,7694	797,8057	818,7351	835,7615	813,7796
848,7700	809,8063	830,7357	847,7622	825,7802
862,7856	823,8219	844,7513	861,7778	839,7958
876,8009	837,8372	858,7666	875,7931	853,8111
902,8169	863,8532	884,7826	901,8091	879,8271
922,0096	Référence			

Les masses exactes en gras qui apparaissent dans le **tableau 3**, sont celles des TAG répertoriés dans les bases de données de lipidomiques²¹⁸. Pour chaque masse exacte de TAG (en gras),

²¹⁸ Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. **2005**, 42, 1-18.

plusieurs combinaisons d'acide gras sur le TAG sont possibles comme indiqué dans le

Tableau 3.

Tableau 3. Possibilités de combinaisons de TAG pour les masses exactes de la sous fractions 22c. Les combinaisons de TAG respectant les données RMN ¹H de la 22c (3 insaturations, 2 protons bis-allyliques, 62 protons aliphatiques) sont surlignées en bleu. Abréviations des acides gras: A: arachidique; G: gadoléique; L: linoléique; La: laurique;Ln: linoléique (ω-3);M: myristique; O: oléique; P: palmitique; Po: palmitoléique; S: stéarique.

Masses exactes	Identification	Nombre d'insaturations	Nombre de protons aliphatiques	Nombre de -CH ₂ -bis-allyliques
779,6994	PPM	0	24+24+20= 68	0
	LaMA	0	16+20+32= 68	0
	LaPS	0	16+24+28= 68	0
804,7196	LaSO	1	16+28+20= 64	0
	MPO	1	20+24+20= 64	0
	PPPo	1	24+24+16= 64	0
	MPoS	1	20+16+28= 64	0
	LaPoA	1	16+16+32= 64	0
	MMG	1	20+20+24 =64	0
830,7357	OOM	2	20+20+20= 60	0
	PoPoS	2	16+16+28= 60	0
	PPL	2	24+24+14= 62	1
	PPoO	2	24+16+20= 60	0
	MSL	2	20+28+14= 62	1
	LaLA	2	16+14+32= 62	1
	858,7666	OOP	2	20+20+24= 64
PSL		2	24+ 28+14= 66	1
MLA		2	20+14+32= 66	1
PoPoA		2	16+16+32= 64	0
PoS		2	16+28+20= 64	0
861,7778	SSP	0	28+28+24= 80	0
	AALa	0	32+32+16= 80	0
	MSA	0	20+28+32= 80	0
	PPA	0	24+24+32= 80	0
	PSO	1	24+28+20= 72	0
	SSPo	1	28+28+16= 72	0
	PPG	1	24+24+24= 72	0
	MOA	1	20+20+32= 72	0
	PPoA	1	24+16+32= 72	0
884,7826	SSLn	3	28+28+8= 64	2
	SOL	3	28+20+14= 62	1
	OOO	3	20+20+20= 60	0
	PLnA	3	24+8+32= 64	2
	PoLA	3	16+14+32= 62	1

Le spectre RMN¹H de la sous-fraction ff_{2c} permet seulement l'analyse des triglycérides majoritaires (**Figure 55**). Ce spectre RMN ¹H ne dévoile que trois insaturations et deux

protons bis-allyliques (-CH₂-) (**Figure 55**). Cela suggère que le (ou les), TAG majoritaire(s) de la ff_{2C} comporte(nt):

- un acide gras doublement insaturé avec un -CH₂- bis-allylique,
- un acide gras insaturé,
- un acide gras saturé.

Ces TAG sont donc de type III. De plus, les intégrations apparaissant sur le spectre RMN ¹H de la ff_{2C} (**Figure 55**), à savoir 3 insaturations, 2 protons bis-allyliques et 62 protons aliphatiques, coroborent avec deux formules brutes du TAG de masse 884,7826 g/mol (**Tableau 3**):

- SOL (Stéarique, Oléique, Linoléique) à la **Figure 53**.

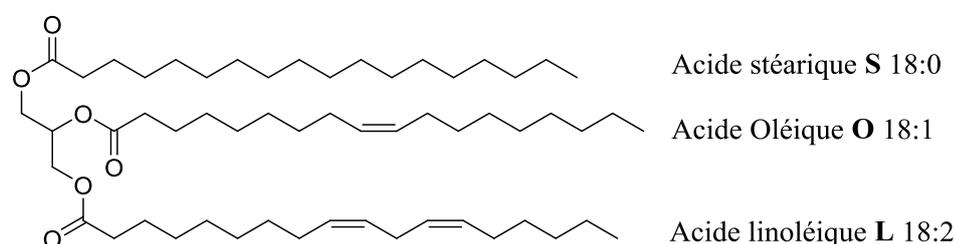


Figure 53. Triglycéride SOL.

- PoLA (Palmitoléique, Linoléique, Arachidique) à la **Figure 54**.

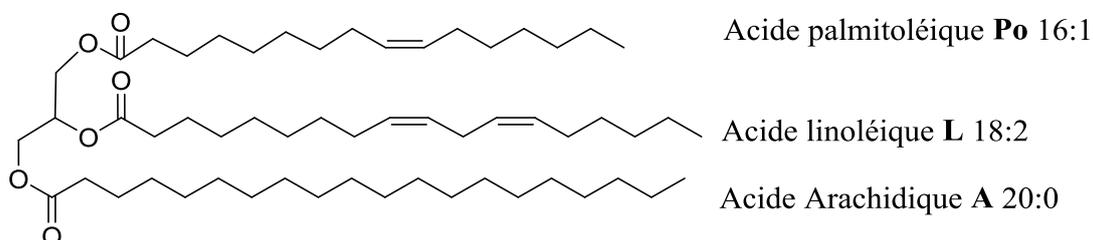


Figure 54. Triglycéride PoLA.

Ces données suggèrent deux possibilités de TAG majoritaires dans la sous-fraction ff_{2C}: soit le SOL seul (**Figure 53**), soit le PoLA seul (**Figure 54**) ou encore un mélange des deux. L'information structurale sur l'ion moléculaire [M + NH₄]⁺ de m/z = 902,8169 (masse exacte M = 884,7826 Da) a été obtenue après fragmentation de ce dernier en spectrométrie tandem SM² (**Figure 56**).

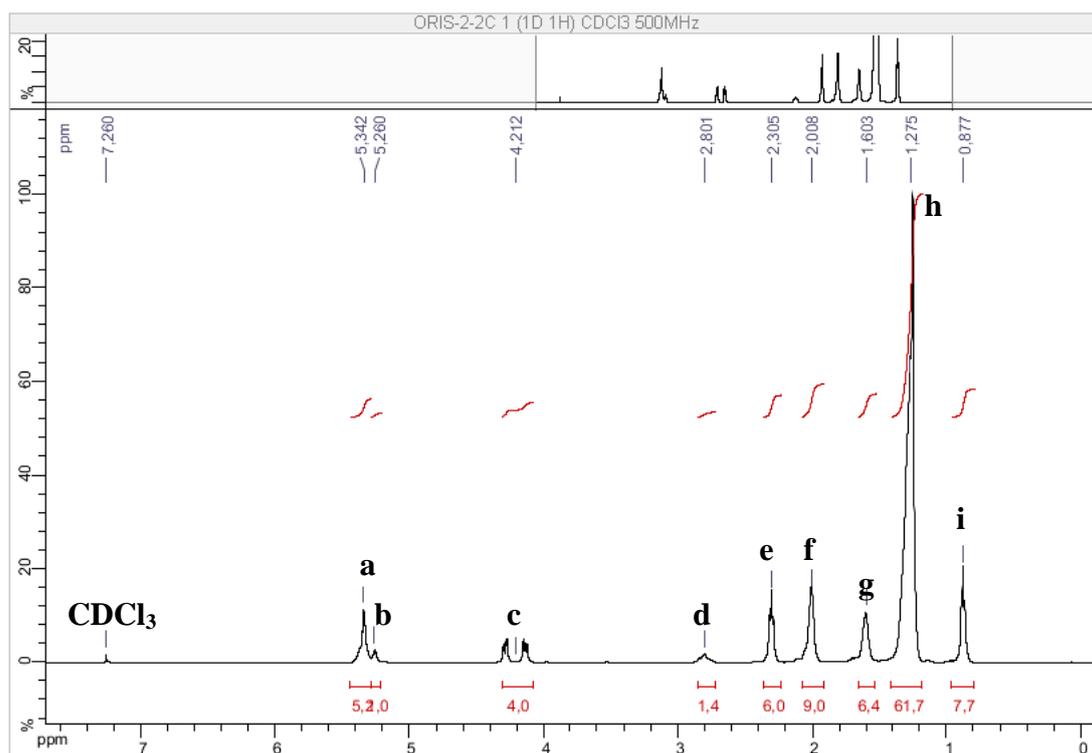


Figure 55. Spectre RMN ^1H de la sous fraction ff2_{2C}, CDCl₃, 500MHz.

a = -CH=CH- ; **b** = -CH- (glycérol); **c** = -CH₂- (glycérol); **d** = -CH₂- (bis-allyliques); **e** = -CH₂- (α -CO) ; **f** = -CH₂- (allyliques); **g** = -CH₂- (β -CO) ; **h** = -CH₂- (aliphatiques); **i** = -CH₃.

Des fragments de diglycérides ($[\text{DAG}]^+ = 549,4842/ 575,5001/ 603,5315/ 631,5624$) voire même des fragments d'acides gras ($[\text{RCOO} + 58]^+ = 339,2874$ ou $[\text{RCO}]^+ = 265,2510$) sont observés sur ce spectre. A titre d'exemple, le mécanisme de fragmentation d'un TAG protoné $[\text{M} + \text{H}]^+$ en un $[\text{DAG}_{1,3}]^+$ puis en fragments $[\text{R}_3\text{COO} + 58]^+$ et $[\text{R}_3\text{CO}]^+$, par exemple, est présenté sur le **Schéma 5**.

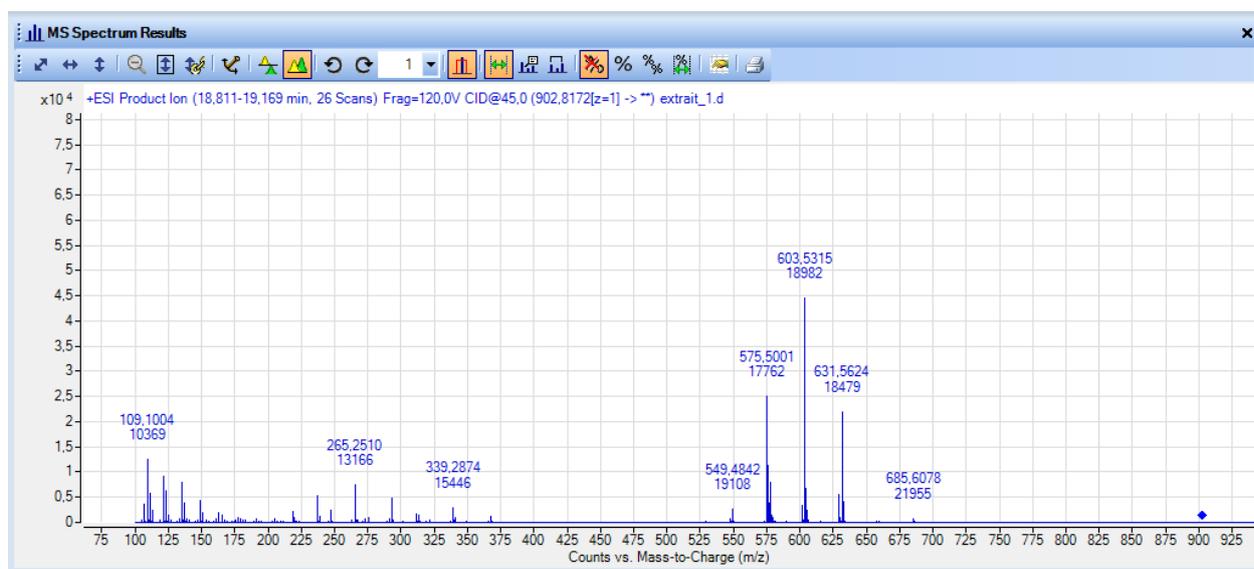


Figure 56. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$.

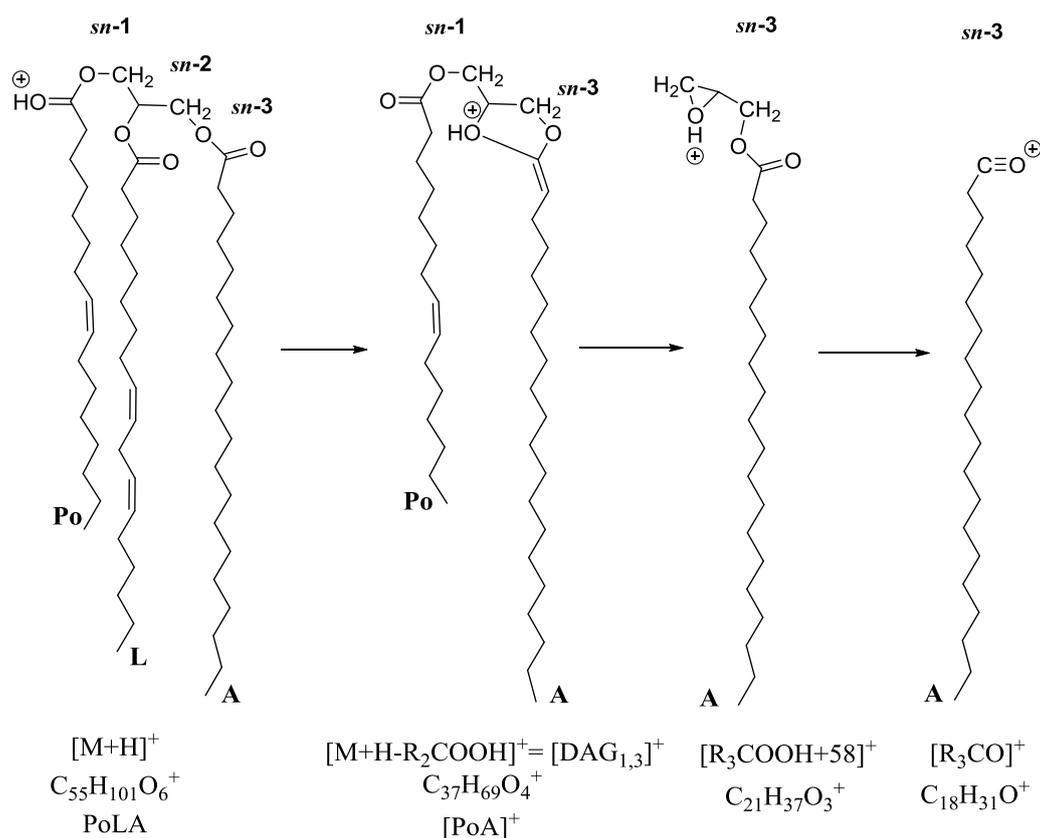


Schéma 5. Mécanisme de fragmentation du triglycéride PoLA protoné pour obtenir les fragments du diglycéride [DAG_{1,3}]⁺ et des acides gras [R₃COOH]⁺, [R₃CO]⁺. sn-1, sn-2 et sn-3 sont les positions des acides gras sur le glycérol.

1. Réfutation de l'hypothèse selon laquelle le triglycéride PoLA est le majoritaire de la sous-fraction ff2_{2C}.

Les fragments [DAG]⁺ du TAG "PoLA" selon la littérature sont [DAG_{1,2}]⁺ = 573,49; [DAG_{2,3}]⁺ = 631,57 et [DAG_{1,3}]⁺ = 605,55²¹⁹ où les indices 1, 2 et 3 représentent les positions sur le triglycéride PoLA. Le [DAG_{2,3}]⁺ = 631,57 est présent en intensité relativement grande ([DAG]⁺ = 631,5624) sur le spectre de fragmentation de l'ion $m/z = 902,8169$ (**Figure 57**). Les fragments ([RCOO + 58]⁺/ [RCO]⁺) de l'AG en position 1 (**Po**) devraient donc apparaître sur ce spectre en intensité relativement grande également. Mais aucun des fragments ([RCOO + 58]⁺/ [RCO]⁺) du PoLA (**Po**: 311,259/ 237,222; **L**: 337,274/ 263,237; **A**: 312,303/ 369,337²¹⁸) n'apparaît sur le spectre de la **Figure 57**. Ceci est la première preuve réfutant PoLA comme majoritaire de la sous-fraction ff2_{2C}.

²¹⁹ Byrdwell, W. C. *Lipids*. **2016**, *51*, 211–227.

²¹⁸ Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. **2005**, *42*, 1-18.

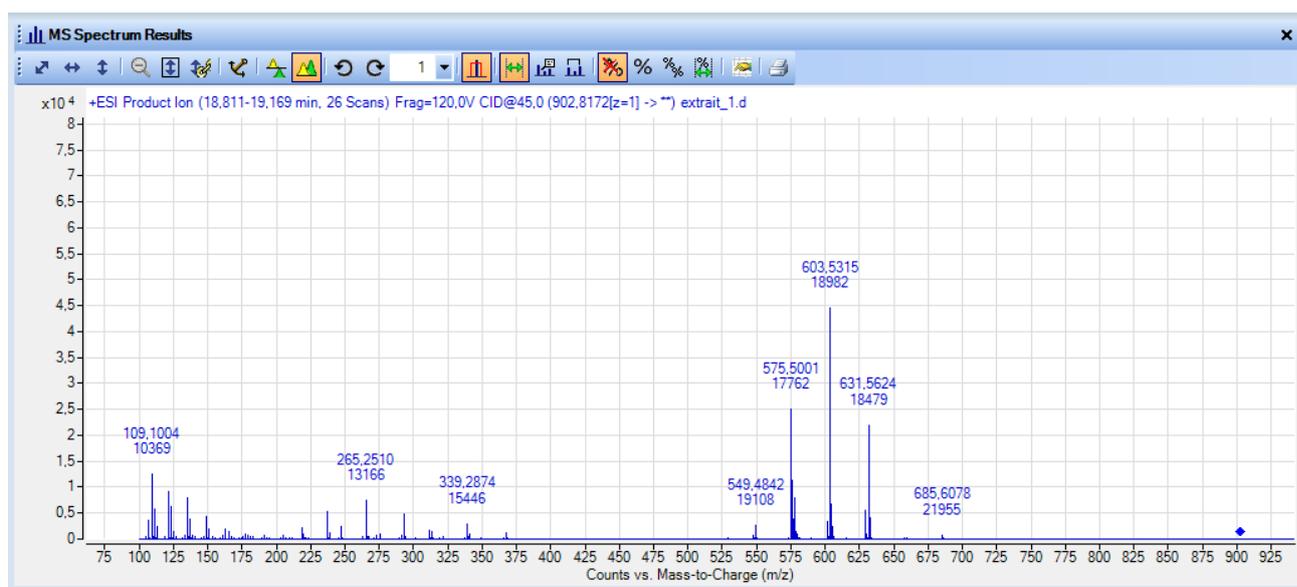


Figure 57. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$.

L'ion $[\text{DAG}_{1,2}]^+ = 573,49$ n'apparaît pas lors de la fragmentation de l'ion de $m/z = 902,8169$ (**Figure 58**). Cela signifie que ce fragment n'appartient pas au PoLA. Cet élément pourrait même laisser supposer que PoLA n'est simplement pas présent dans la sous-fraction ff2_{2C}.

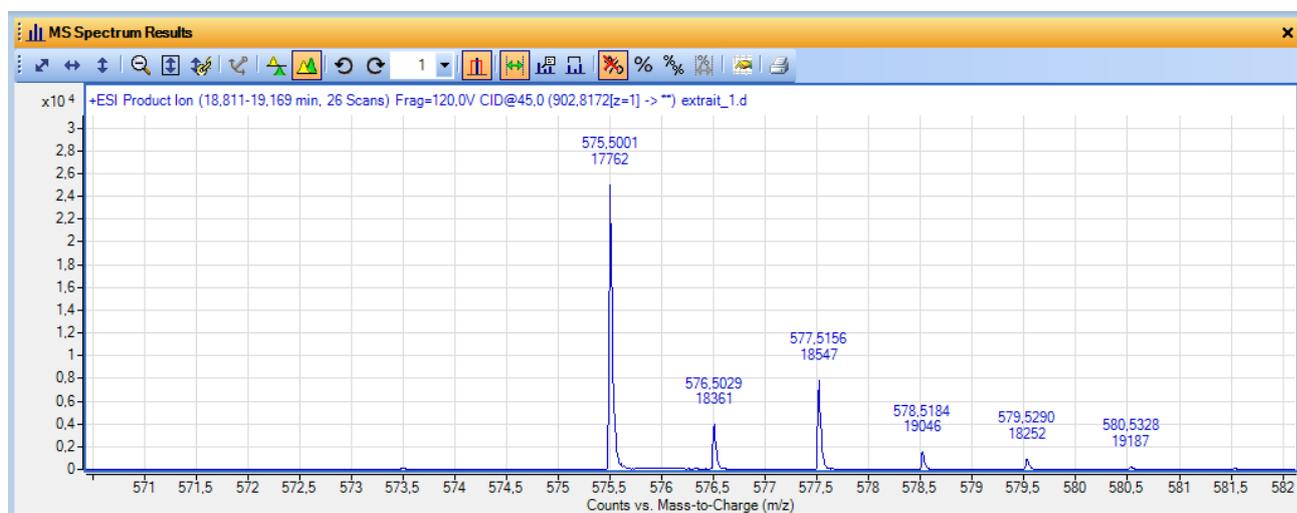


Figure 58. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$. Zoom sur l'ion 575,5001.

Toutefois l'ion $[\text{DAG}_{1,3}]^+ = 605,55$ apparaît en faible intensité lors de la fragmentation de l'ion de valeur $m/z = 902,8169$ (**Figure 59**). L'ensemble des éléments ci-dessus montre que PoLA n'est pas le TAG majoritaire de la sous-fraction ff2_{2C}.

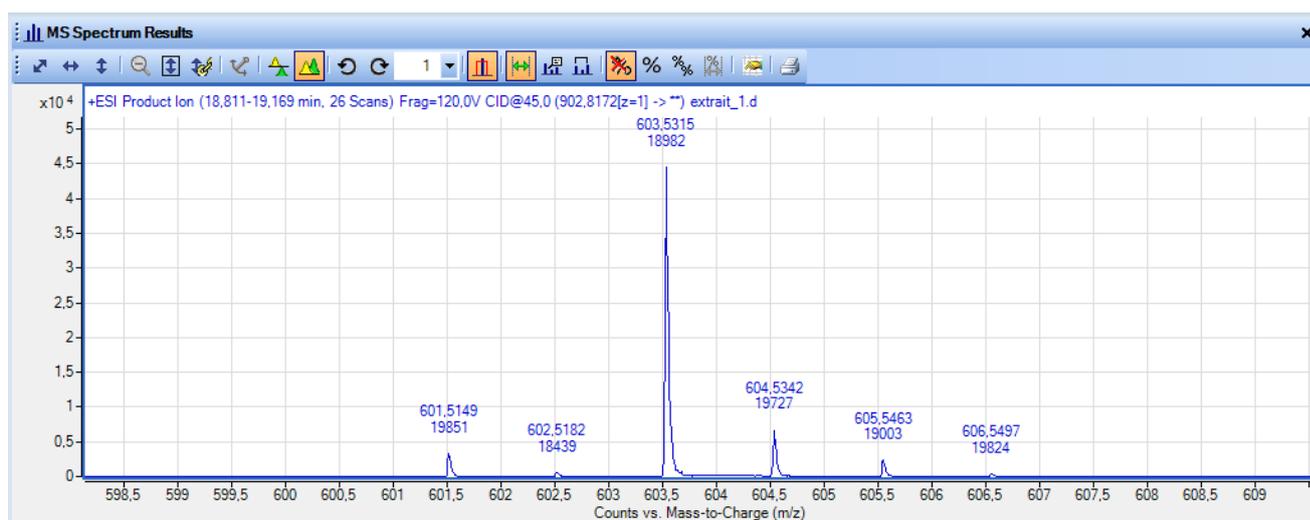


Figure 59. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$. Zoom sur l'ion 603,5315.

2. Validation de l'hypothèse selon laquelle le triglycéride SOL est le majoritaire de la sous-fraction ff2_{2C}.

Selon la littérature, les fragments $[\text{DAG}]^+$ du triglycéride SOL sont $[\text{DAG}_{1,2}]^+ = 605,55$, $[\text{DAG}_{1,3}]^+ = 603,54$ et $[\text{DAG}_{2,3}]^+ = 601,52$ ²¹⁸. Nous avons vu que le fragment $[\text{DAG}_{1,3}]^+ = 603,54$ est l'ion majoritaire du spectre de fragmentation de l'ion $m/z = 902,8169$ (**Figure 60**). La formation du $[\text{DAG}_{1,3}]^+ = 603,54$ serait alors privilégiée (fragment $[\text{DAG}]^+ = 603,5315$ majoritaire) tandis que les $[\text{DAG}_{1,2}]$ ou $[\text{DAG}_{2,3}]$ se fragmenteraient jusqu'à l'obtention des fragments majoritaires $[\text{R}_2\text{COO} + 58]^+$ et $[\text{R}_2\text{CO}]^+$.

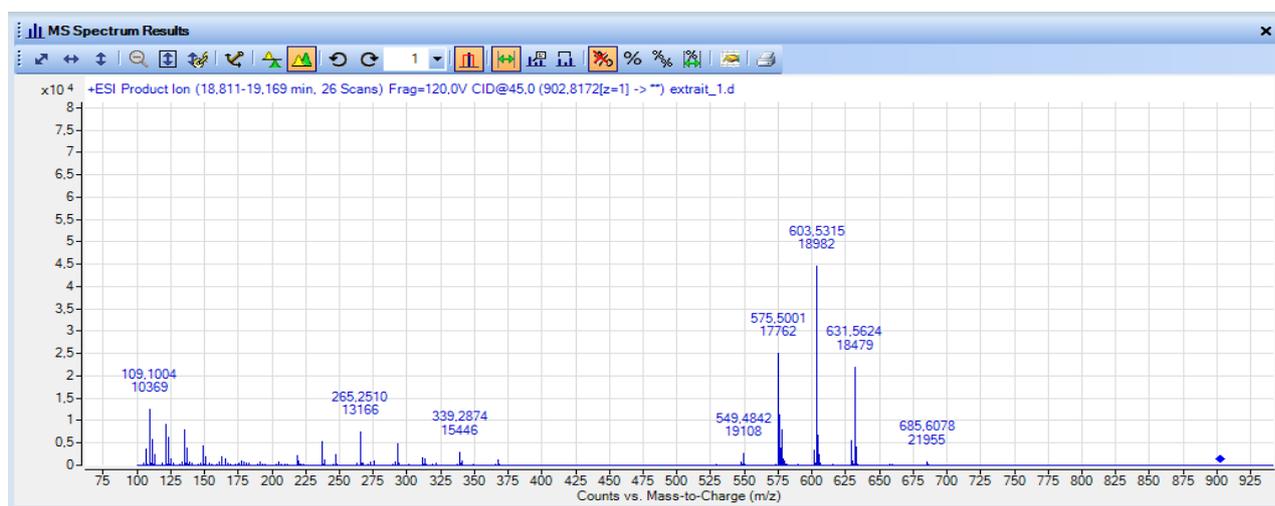


Figure 60. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$.

²¹⁸ Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. 2005, 42, 1-18.

Les fragments d'AG $[R_2COO + 58]^+ = 339,290$ et $[R_2CO]^+ = 265,253$ apparaissant sur le spectre de la **Figure 60** sont ceux de l'acide gras oléique (18 : 1) de poids moléculaire 282,256 Da²²⁰. Une autre preuve montrant que le TAG majeur de la ff2_{2C}, ne pouvait être "PoLA" puisque ce dernier ne contient pas d'acide oléique. Par ailleurs, les ions $[DAG_{2,3}]^+ = 601,52$ et $[DAG_{1,2}]^+ = 605,55$ apparaissent effectivement parmi les fragments de l'ion 603,5315 (**Figure 61**).

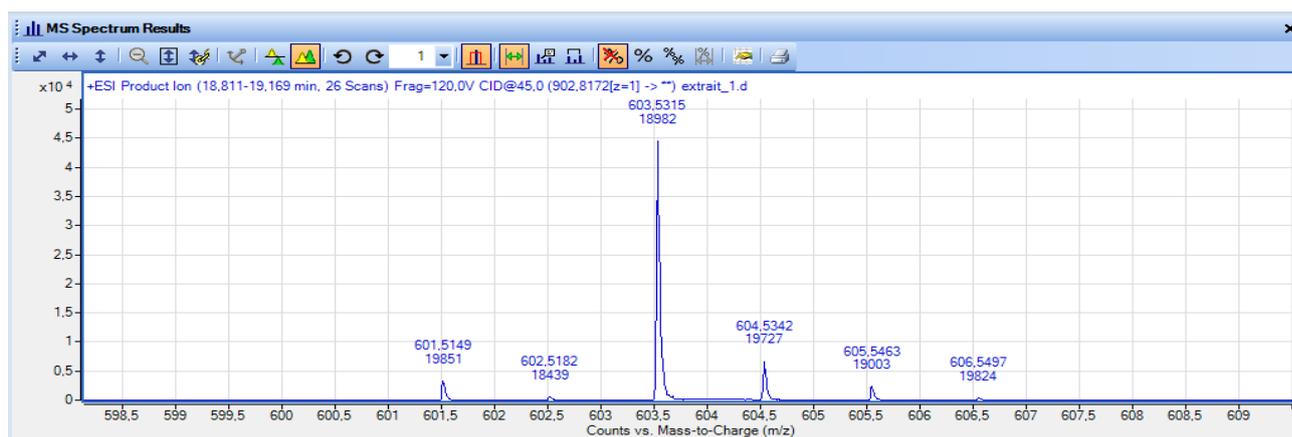
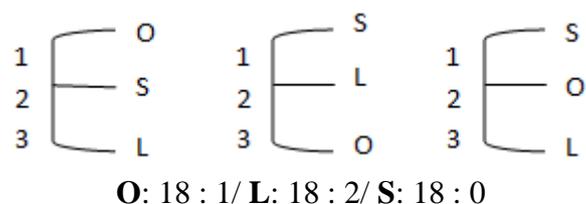
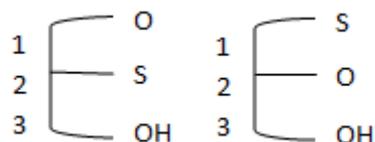


Figure 61. Fragmentation en SM tandem (ESI/TOF-TOF) de l'ion de $m/z = 902,8169$. Zoom sur l'ion 603,5315.

L'ensemble de ces éléments montre que le triglycéride majoritaire de la sous-fraction ff2_{2C} est SOL. Toutefois, l'ordre des AG sur le TAG peut différer et bien qu'on ne puisse réellement distinguer la position *sn*- 1 de la *sn*- 3, les combinaisons suivantes sont possibles:



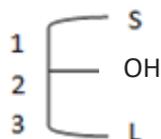
Pour avoir un $[DAG_{1,2}]^+ = 605,55$, il ne faut comptabiliser qu'une insaturation pour les AG en positions *sn*- 1 et *sn*- 2. L'AG linoléique (L) possédant deux insaturations à lui seul, ne peut être en position *sn*- 2. Il ne reste que deux possibilités de $[DAG_{1,2}]^+$:



L'AG linoléique (L) ne peut être alors qu'en position *sn*- 3.

²²⁰ Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. **2005**, 2, 298-412.

Pour avoir un $[DAG_{1,3}]^+ = 603,54$, il faut que les AG en positions *sn*- 1 et *sn*- 3 ne comptabilisent que deux insaturations. La seule possibilité de $[DAG_{1,3}]^+$ est la suivante:



En combinant les possibilités de $[DAG_{1,2}]^+$ et celle de $[DAG_{1,3}]^+$, nous en déduisons que le TAG est SOL (**88**). Ce composé **88** est représenté à la **Figure 62**.

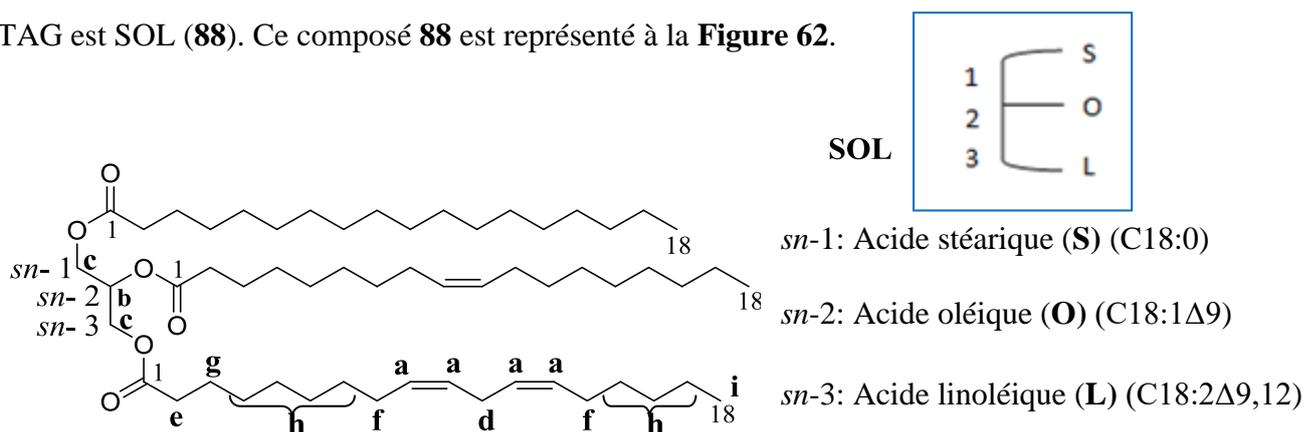


Figure 62. Structure du composé (**88**). *sn*- 1, *sn*- 2, *sn*- 3 sont les trois positions des acides gras stéarique, oléique et linoléique sur le glycérol.

a = -CH=CH- ; **b** = -CH- (glycérol); **c** = -CH₂- (glycérol); **d** = -CH₂- (bis-allyliques); **e** = -CH₂- (α -CO) ; **f** = -CH₂- (allyliques); **g** = -CH₂- (β -CO) ; **h** = -CH₂- (aliphatiques); **i** = -CH₃.

Les TAG sont une réserve énergétique ²²¹ et ont un rôle nutritif chez les plantes ²²² et les animaux ²²³. Les activités biologiques variées de ces huiles seraient liées à leurs grandes teneurs en composés insaturés ^{224, 225}. Le composé **88** est un triglycéride composé des acides gras oléique, linoléique et stéarique. Les applications liées à l'utilisation des TAG sont mieux connues que leurs biosynthèses. En 1995, Ohlrogge et Browse montrent que la biosynthèse des TAG est catalysée par des enzymes de la voie métabolique Kennedy consistant à transférer séquentiellement des groupement acyls de l'acétyl-CoA vers les positions *sn*- 1, *sn*- 2 et *sn*- 3 du glycérol ²²⁶. De récentes études sur la biosynthèse du TAG ont montré que la phosphatidylcholine synthétiserait le diacylglycerol (DAG), puis la diacylglycéroltransférase fonctionnaliserait ce DAG en transférant un groupement acyl de l'acétyl-CoA vers la position

²²¹ Bradford, K. J. *Seed Sci. Res.* **1995**, 5, 1–3.

²²² Dubois, V.; Breton, S.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, 109, 710–732.

²²³ Karupaiah, T.; Sundram, K. *Nutr. Metab. Lond.* **2007**, 4, 16.

²²⁴ Messina, M. J.; Persky, V.; Setchell, K. D. R.; Barnes, S. *Nutr. Cancer.* **1994**, 21, 113–131.

²²⁵ Li, R.; Hatanaka, T.; Yu, K.; Wu, Y.; Fukushige, H.; Hildebrand, D. *Funct. Integr. Genomics.* **2013**, 13, 99–113.

²²⁶ Ohlrogge, J. B.; Browse, J. *Biochemistry.* **1995**, 7, 957–970.

sn- 3 du *sn*-1,2-diacylglycérol²²⁷. Concernant les positions d'estérification du glycérol *sn*- 1, *sn*- 2 et *sn*- 3 il a été prouvé que chez les plantes généralement en position *sn*- 2 on retrouvait souvent un AG insaturé et en positions *sn*- 1 et *sn*- 3 des AG saturés alors que chez les animaux c'est le cas inverse, sauf chez le bœuf^{223, 228}. Les acides gras saturés comme l'acide stéarique sont souvent en position *sn*- 1 alors que l'acide oléique (monoinsaturé) est couramment à la position *sn*- 2 des TAG que ce soit chez les plantes ou les animaux^{229, 230}. La position des AG sur un TAG influe sur leurs rôles dans les produits alimentaires et ensuite au niveau de leur digestion par l'organisme²³¹. Dans la littérature l'ordre des acides gras oléique, linoléique et stéarique sur le glycérol peut changer pour donner des triglycérides régio-isomères, par exemple LOS²¹⁶ ou OLS²¹⁹. Le triglycéride SOL (**88**) (**Figure 67**) a déjà été reporté comme faisant partie des principaux TAGs de l'huile de *Carica papaya*²³². Pour la première fois la présence du triglycéride SOL (**88**) est mise en évidence explicitement en milieu marin et plus précisément chez les bivalves.

IX. ELUCIDATION STRUCTURALE DES AUTRES METABOLITES SECONDAIRES DE LA BRANCHIE DE *CODAKIA ORBICULARIS*.

L'élucidation structurale a été réalisée par les méthodes spectroscopiques usuelles incluant la RMN, la spectrométrie de masse et l'infrarouge. Pour les molécules connues les méthodes de dérégulation utilisant la CLHP couplée à la masse haute résolution permettent de sélectionner les fractions actives intéressantes. Les formules brutes des molécules isolées ont été proposées par le logiciel Masslynx à partir des masses exactes mesurées. Les formules brutes sont choisies seulement si les masses exactes des molécules ionisées présentent une différence en masse (Δm) inférieure à 5 ppm d'avec la masse exacte théorique de la formule brute proposée [résolution constructeur du spectromètre de masse Waters LCT Premier XE: 15 000 LMH (Largeur du pic à la Mi-Hauteur), 30 000 m/z , précision de masse de 10 ppm pour 300 m/z].

²²⁷ Lu, C.; Xin, Z.; Ren, Z.; Miquel, M.; Browse, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18837–18842.

²²³ Karupaiah, T.; Sundram, K. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2007**, *4*, 16.

²²⁸ Hunter, E. J. Studies on Effects of Dietary Fatty Acids as Related to Their Position on Triglycerides. *Lipids*. **2001**, *36*, 655–668.

²²⁹ Brockerhoff, H.; Yurkowski, M. *J. Lipid Res.* **1966**, *7*, 62–64.

²³⁰ Padley, F. B.; Gunstone, F. D.; Harwood, J. L. *The Lipid Handbook*. **1994**, 47–223.

²³¹ Nawar, W. W. *Food Chemistry*. **1996**, 225–319.

²¹⁶ Ratnayake, W. M. N.; Matthews, D. G.; Ackman, R. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66*, 966–969.

²¹⁹ Byrdwell, W. C. *Lipids*. **2016**, *51*, 211–227.

²³² Puangsri, T.; Abdulkarim, S. M.; Ghazali, H. M. *J. Food Lipids*. **2005**, *12*, 62–76.

Bien souvent, l'analyse de spectres RMN ^1H confrontés à ceux de la littérature, ou à ceux des standards disponibles au laboratoire, permet d'identifier précisément les composés.

1. Éluclidation structurale des composés **89** et **90**: les monoglycérolipides.

La SMHR de **89** a montré un ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ de masse 357,3009 en ESI^+ correspondant à une masse exacte de 356,2931 Da de formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4$ ($\Delta m = 1,1$ ppm). Cette masse correspond à celle d'un monoglycérolipide **99** isolé pour la première fois de l'éponge *Sarcotragus* sp. en 2006²³³ puis de l'algue brune *Ishige sinicola* en 2012²³⁴.

Ce monoglycéride porte l'acide gras oléique en position *sn*-1 du glycérol ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$; $\text{C}_{18} : 1\Delta^9$; 282,4614 Da²³⁵) (**Figure 63**).

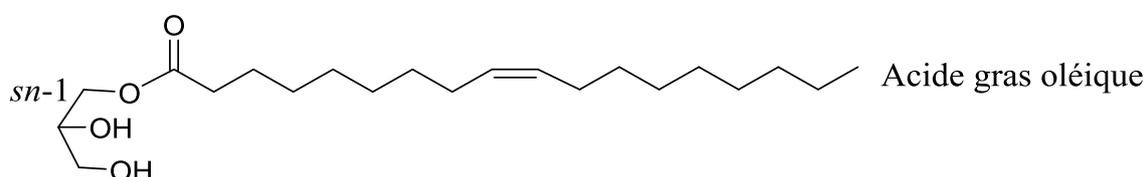


Figure 63. Monoglycérolipide **99** isolé de l'éponge *Sarcotragus* sp. et de l'algue *Ishige sinicola*.

La SMHR du composé **90** a révélé également en ESI^+ une masse exacte de 328,262 Da correspondant à une formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ($\Delta m = 1,8$ ppm). Le composé **90** a donc une différence de masse de 28 Da par rapport à **89**, ce qui indique une différence de deux méthylènes ($-\text{CH}_2-$).

Les deux molécules présentent sur leurs spectres RMN ^1H des profils types d'acide gras insaturés à savoir, un pic intense à 1,29 ppm ($-\text{CH}_2-$ aliphatiques de la chaîne grasse), un triplet à 0,87 ppm (méthyl terminal) et un triplet à 2,35 ppm correspondant au $-\text{CH}_2-$ en α de la fonction carbonyle.

Le $-\text{CH}_2-$ en β de la fonction carbonyle apparaît à 1,62 ppm alors que les $-\text{CH}_2-$ allyliques apparaissent à 2,0 ppm, les deux signaux sous forme de multiplets. Les $-\text{CH}-$ vinyliques sont quant à eux très déblindés et résonnent à 5,33 ppm.

Les signaux restant sont ceux à 4,89 ppm et 3,80 ppm correspondant aux $-\text{CH}-$ et $-\text{CH}_2-$ respectivement du glycérol²³¹. Il y a un rapport $\text{CH}_{2\text{glycérol}}/\text{CH}_{\text{glycérol}} : 4/1$ montrant

²³³ Liu, Y.; Jung, J. H.; Ji, H.; Zhang, S. *Molecules*. **2006**, *11*, 714–719.

²³⁴ Hirao, S.; TARA, K.; Kuwano, K.; Tanaka, J.; Ishibashi, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 372–374.

²³⁵ Bartók, T.; Tölgyesi, L.; Mesterházy, Á.; Bartók, M.; Szécsi, Á. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2010**, *27*, 1714–1723.

l'équivalence des protons des méthylènes du glycérol et suggérant une symétrie dans la structure des monoglycérolipides **89** et **90** (Figure 64).

Les spectres RMN ^1H des composés **89** et **90** sont identiques à la différence du nombre de protons aliphatiques à 1,29 ppm, soit 22 protons pour **89** et 18 pour **90** (Figure 64). Une trace de solvant (MeOH) apparaît sur le spectre de **89** à 2,87 ppm.

Ces données RMN (différence de deux $-\text{CH}_2-$) concordent bien avec celles de la spectrométrie de masse (différence de 28 Da).

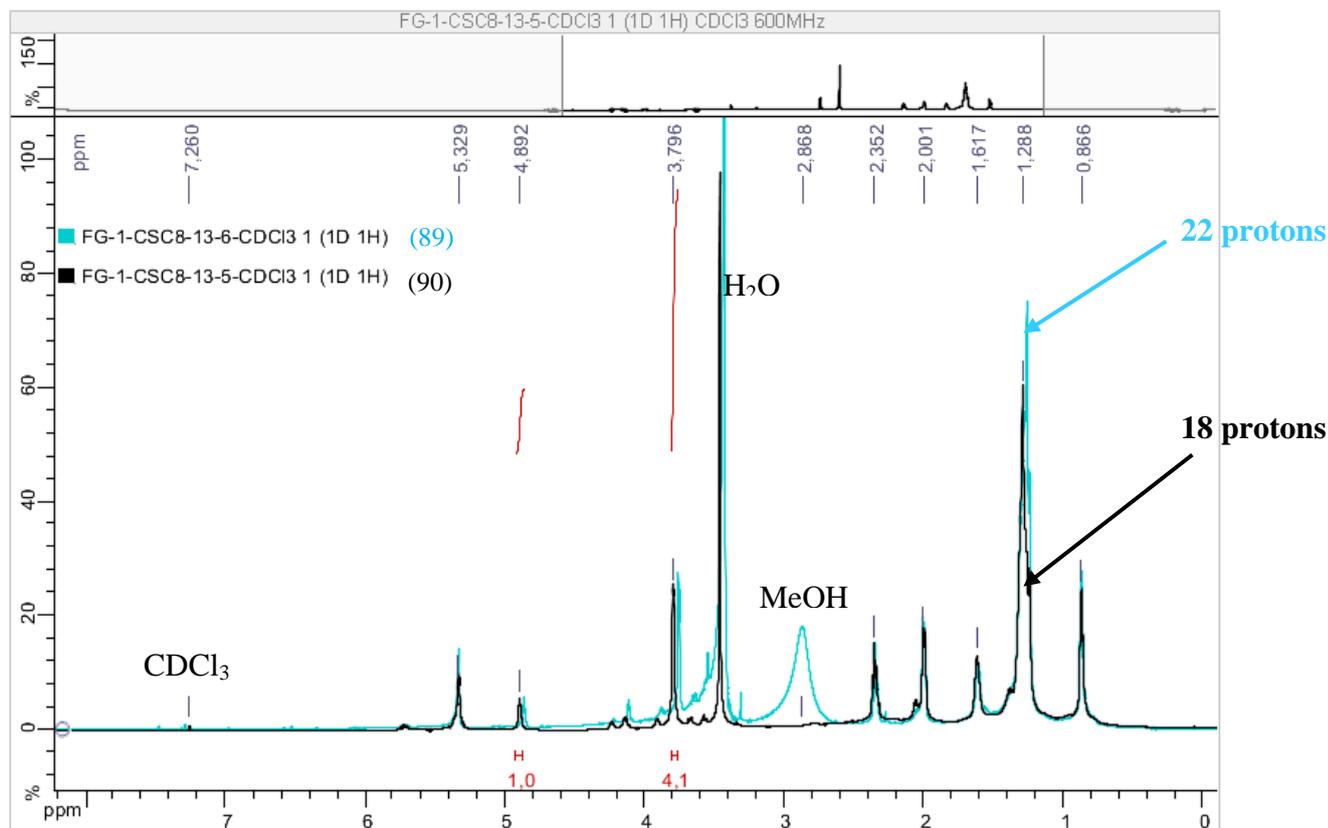


Figure 64. Spectre RMN ^1H des composés **89** et **90** dans du CDCl_3 , 600 MHz.

Les signaux et déplacements chimiques en RMN 1D du glycérol du monoglycérolipide **89** (Tableau 4) ne concordaient pas avec ceux du glycérol du monoglycéride **99** décrit par Liu *et al.* en 2006²³³ (Tableau 5). La monoestérification du composé **99**, en position *sn*-1 ou *sn*-3, déblindé un des deux méthylènes du glycérol. D'ailleurs d'après les signaux des deux $-\text{CH}_2-$ du glycérol, leurs protons ne sont pas équivalents (Tableau 5).

²³³ Liu, Y.; Jung, J. H.; Ji, H.; Zhang, S. *Molecules*. **2006**, *11*, 714–719.

Tableau 4. Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **89**, CDCl_3 , 600MHz.

Positions	RMN ^1H δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
CH vinyliques	5,33 (2H, m)	130,0
CH glycérol	4,89 (1H, quin, $J = 4,8$ Hz)	74,9
CH ₂ glycérol	3,80 (4H, d, $J = 4,8$ Hz)	61,7
CH ₂ α -ester	2,35 (2H, t, $J = 7,5$ Hz)	34,5
CH ₂ $\alpha\text{C}=\text{C}$	2,00 (4H, m)	27,3
CH ₂ β -ester	1,62 (2H, q, $J = 7,1$ Hz)	25,0
		31,9 (CH ₂ aliphatiques βCH_3)
CH ₂ aliphatiques	1,29 (22H, m)	29,5 (CH ₂ aliphatiques)
		22,7 (CH ₂ aliphatiques αCH_3)
CH ₃	0,87 (3H, t, $J = 7,3$ Hz)	14,2 (CH ₃)
RCOOR	-----	174,6

Tableau 5. Comparaison des données RMN ^1H (CDCl_3) du monoglycérolipide de la littérature ²³⁴ et de celles de **89**.

Groupements	δ_{H} (ppm); J (Hz)	δ_{H} (ppm) de 89 ; J (Hz)
CH ₂ glycérol	4.16 (1H; dd; $J = 11,5/ 6,5$ Hz)	3,80 (4H; d; $J = 4,8\text{Hz}$)
	4.22 (1H; dd; $J = 11,5/ 3,5$ Hz)	
CH glycérol	3.94 (1H, m)	4,89 (1H; quin; $J = 4,8\text{Hz}$)
CH ₂ glycérol	3.61 (1H; dd; $J = 11,0/ 6,0$ Hz)	-----
	3.70 (1H; dd; $J = 11,0/ 4,0$ Hz)	-----

Il a fallu tout de même réaliser les analyses par RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC, **Annexe III - V**) pour confirmer la structure de **89** et lever toute ambiguïté. Les quatre protons équivalents des méthylènes du glycérol du composé **89** résonnent à 3,80 ppm (4H, d, $J = 4,8$ Hz), et sont portés par deux carbones résonnant à 61,7 ppm d'après l'HSQC (**Annexe IV**). En HMBC, les protons (à 3,80 ppm) d'un méthylène du glycérol corrélent avec le carbone (à $\delta_{\text{C}} = 61,7$ ppm) de l'autre méthylène du glycérol (**Figure 65**). Ceci a validé une symétrie dans la molécule **89** et confirmé la position de l'acide gras en position *sn*- 2 du glycérol.

²³⁴ Hirao, S.; TARA, K.; Kuwano, K.; Tanaka, J.; Ishibashi, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, 76, 372–374.

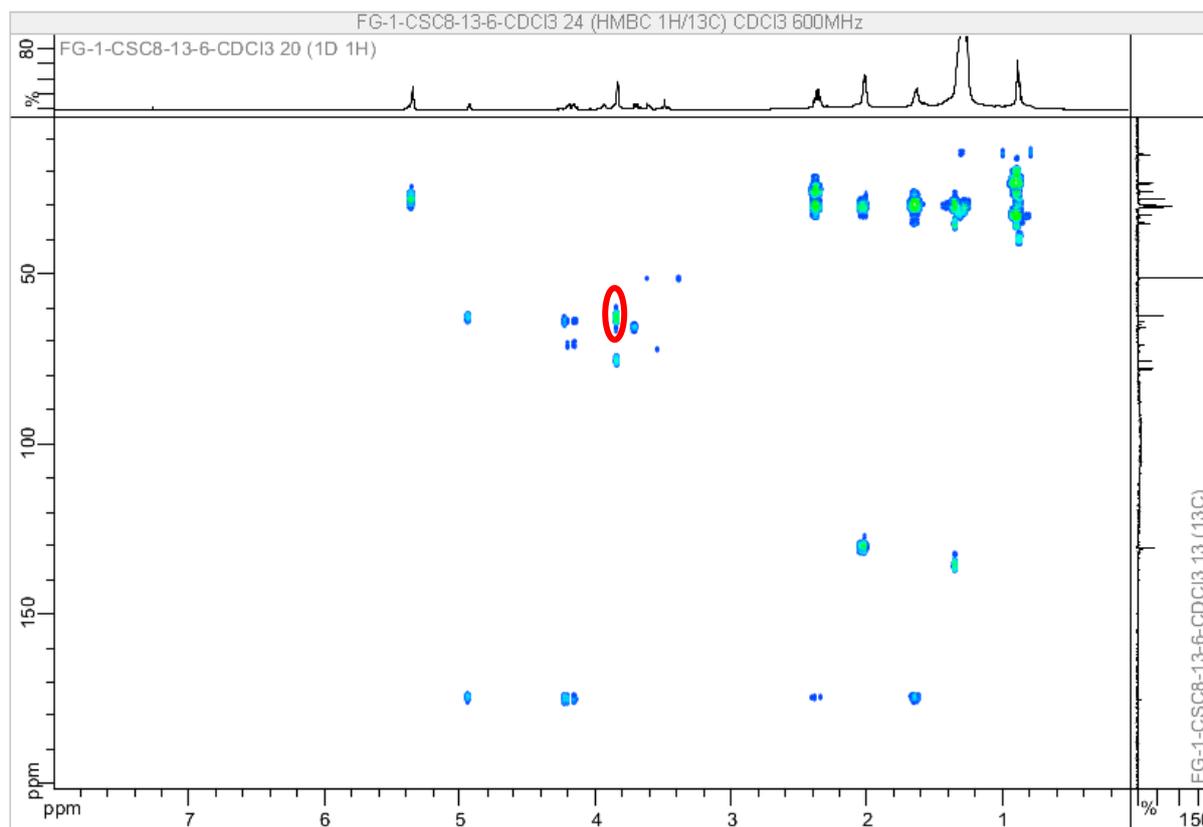


Figure 65. Spectre HMBC du composé 89 dans du CDCl_3 , 600 MHz.

Mise en évidence par un cercle rouge de la corrélation entre les méthylènes du glycérol.

Les corrélations HMBC ont permis de retrouver trois fragments principaux du monoglycérolipide **89** (Figure 66). Les jonctions au niveau des signaux aliphatiques n'ont pas pu être effectuées à cause du recouvrement de ces signaux et l'expérience TOCSY n'a pas été réalisée. Nous ne pouvons affirmer avec certitude le nombre de méthylènes aliphatiques de part et d'autre de l'insaturation. Les analyses en spectrométrie de masse sont indispensables pour localiser l'emplacement de l'insaturation du **89** sur sa chaîne grasse et confirmer sa structure exacte.

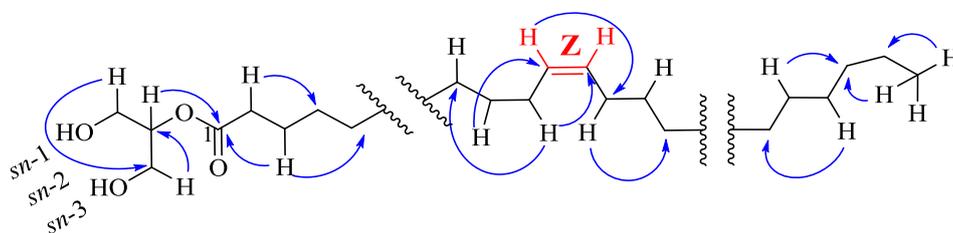


Figure 66. Principales corrélations HMBC du composé 89. Géométrie Z de l'insaturation précisée en rouge.

L'expérience ROESY du composé **89** est présentée à l'annexe VI, mais ne donne pas d'informations sur la géométrie de l'insaturation de la molécule. Les déplacements chimiques

des carbones vinyliques à 27,3 ppm confirment que cette insaturation a une géométrie Z²³⁶ (**Figure 66**).

D'après la littérature, les triglycérides subissent souvent des hydrolyses enzymatiques spécifiques des positions *sn*- 1 et *sn*- 3 privilégiant ainsi la formation de monoglycérolipides où l'acide gras (C16 : 1/ C18 : 1/ C18 : 2/ 20 : 4) est en position *sn*- 2^{237, 238}.

Ces monoglycérolipides pourraient également être un artefact de manipulation car les formes DAG, MAG, ou AG libres ont déjà été isolées de sources naturelles²³⁹. Par exemple, le monoglycérolipide 1-octadecatetraénoyle a été isolé d'algues marines²⁴⁰.

La structure du composé **90** a été déduite de celle de **89**, puisque la principale différence structurale entre les composés **89** et **90** est que le composé **89** présente deux groupements -CH₂- supplémentaires dans sa structure. De même, la position et la configuration de l'insaturation du composé **90** (C16 : 1) devra être déterminée par spectrométrie de masse et permettra d'aboutir à sa caractérisation complète. Dans la littérature, l'acide gras en C16 : 1 est l'acide palmitoléique qui présente une insaturation en position *cis*-Δ⁹ (C₁₆H₃₀O₂; 254,4082 Da)²⁴¹. Si cette structure se confirmait, ce serait la première fois qu'un monoglycérolipide présenterait une chaîne C16:1 dans sa structure d'après les bases de Byrdwell²¹⁸ (Lipidmaps®). La caractérisation complète de **89** et de **90** n'est pas totalement achevée puisqu'il manque le positionnement de l'insaturation mais l'on sait qu'il s'agit de monoglycérides monoinsaturés (**Figure 67**).

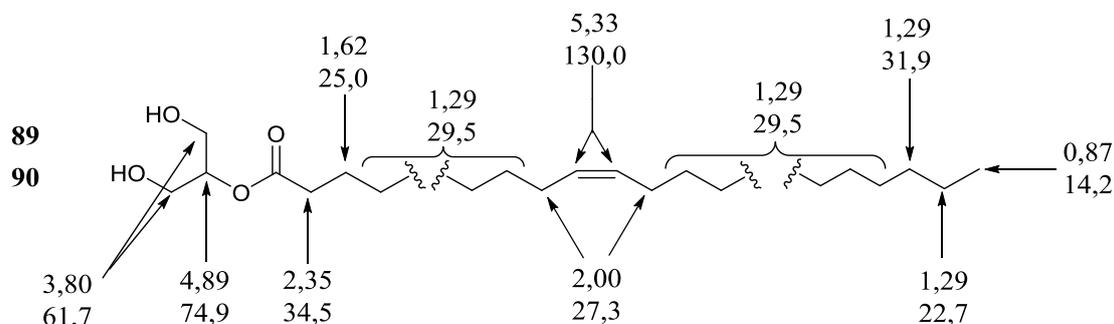


Figure 67. Fragments de structures des composés **89** et **90**.

²³⁶ Liu, Y.; Lee, C.; Hong, J.; Jung, J. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1467–1469.

²³⁷ Nilsson-Ehle, P.; Egelrud, T.; Belfrage, P.; Olivecrona, T.; Borgström, B. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6734–6737.

²³⁸ Yang, L. Y.; Kuksis, A. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1173–1186.

²³⁹ Nelson, M. M.; Phleger, C. F.; Nichols, P. D. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 58–65.

²⁴⁰ Chang, H. W.; Jang, K. H.; Lee, D.; Kang, H. R.; Kim, T. Y.; Lee, B. H.; Choi, B. W.; Kim, S.; Shin, J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3589–3592.

²⁴¹ Cutignano, A.; Luongo, E.; Nuzzo, G.; Pagano, D.; Manzo, E.; Sardo, A.; Fontana, A. *Algal Res.* **2016**, *17*, 348–358.

²¹⁸ Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques.* **2005**, *42*, 1-18.

Il existe plusieurs classes de glycérolipides²⁴² décrites comme bioactifs^{41, 243}. Dans le milieu marin, bien que souvent isolés d'algues^{234, 240}, des glycérolipides ont également été isolés en 2006 d'une éponge²³³. À notre connaissance, c'est la première fois qu'ils sont isolés à partir d'un bivalve. L'ensemble de ces éléments a encouragé l'évaluation de l'activité antibactérienne de **89** et **90** au cours de cette étude.

2. Éluclidation structurale des composés **91** et **92**.

a) Structure du composé **91**: le 4-hydroxybenzaldéhyde.

L'analyse LC-MS de cette molécule révèle en ESI⁺ un ion à $m/z = 123,0$ et à $m/z = 121,0$ en ESI⁻, ce qui correspond à une masse unitaire de 122,0 Da. Les données RMN ¹H (**Figure 68**, **Tableau 6**) de cette molécule et sa masse unitaire ont permis d'aboutir facilement à l'identité du composé **91** par comparaison des données issues de la littérature²⁴⁴.

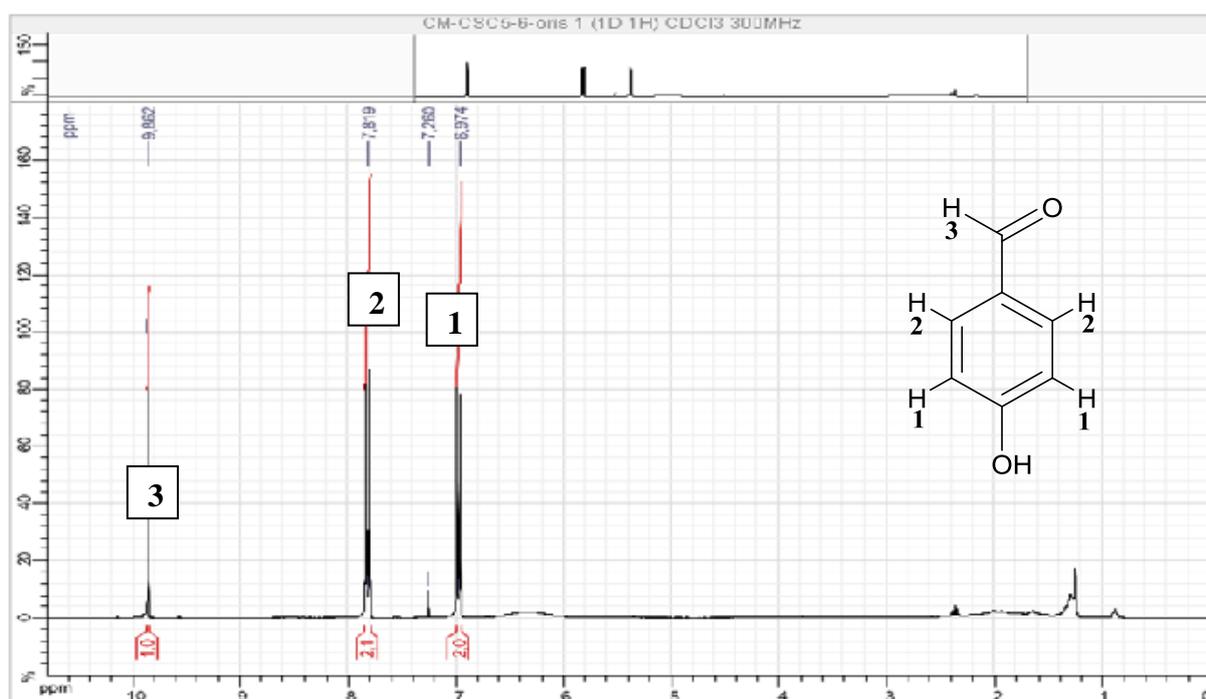


Figure 68. Spectre RMN ¹H du composé **91** dans du CDCl₃, 300 MHz. Structure du composé **91**.

²⁴² Logvinov, S.; Gerasimenko, N.; Esipov, A.; Denisenko, V. A. *J. Phycol.* **2015**, *51*, 1066–1074.

⁴¹ Da Costa, E.; Silva, J.; Mendonça, S.; Abreu, M.; Domingues, M. *Mar. Drugs.* **2016**, *14*, 101.

²⁴³ Lang, S.; Beil, W.; Tokuda, H.; Wicke, C.; Lurtz, V. *Mar. Biotechnol.* **2004**, *06*, 152–156.

²³⁴ Hirao, S.; TARA, K.; Kuwano, K.; Tanaka, J.; Ishibashi, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 372–374.

²⁴⁰ Chang, H. W.; Jang, K. H.; Lee, D.; Kang, H. R.; Kim, T. Y.; Lee, B. H.; Choi, B. W.; Kim, S.; Shin, J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3589–3592.

²³³ Liu, Y.; Jung, J. H.; Ji, H.; Zhang, S. *Molecules.* **2006**, *11*, 714–719.

²⁴⁴ Andersen, R. J.; Wolfe, M. S.; Faulkner, D. J. *Mar. Biol.* **1974**, *27*, 281–285.

Tableau 6. Données RMN ^1H , CDCl_3 , 300MHz du composé 91.

Protons	δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)
H ₁	6.96	2	d	7.5
H ₂	7.82	2	d	7.5
H ₃	9.86	1	s	----

Le composé **91** est un composé phénolique correspondant au 4-hydroxybenzaldéhyde ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$)²⁴⁵ déjà isolé de sources naturelles²⁴⁶. Les dérivés phénoliques, comme par exemple l'acide benzoïque, le benzoate de benzyle ou l'acétate de diméthylbenzaldéhyde, ont généralement été décrits comme ayant des activités antibactériennes²⁴⁷. Les activités antibactériennes du composé **91** ont été évaluées dans le cadre de ce travail et sont décrites dans la partie VI de ce chapitre.

c) Structure du composé 92: l'acide succinique.

En spectrométrie de masse haute résolution, cette molécule présente un ion moléculaire uniquement en ESI à $m/z = 117,0179$. Ceci correspond à une molécule de formule brute $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ et de masse exacte 118,0266 Da ($\Delta m = 0,8$ ppm).

Le spectre RMN ^1H (**Figure 69**) montre uniquement deux signaux sous forme de singulet: l'un intégrant pour 4 protons équivalents et l'autre pour 2 (**Tableau 7**).

La simplicité de ce spectre RMN ^1H suggère une symétrie dans la molécule.

Après une recherche bibliographique sur MarinLit utilisant les masses basse résolution, une seule molécule a été proposée (l'acide 3-hydroxypentanoïque $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$, 118,063 Da) qui ne correspond pas à notre composé dont les spectres RMN sont très simples.

²⁴⁵ Ramos-Nino, M. E.; Clifford, M. N.; Adams, M. R. *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *80*, 303–310.

²⁴⁶ Wratten, S. J.; Wolfe, M. S.; Andersen, R. J.; Faulkner, D. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 411–414.

²⁴⁷ Goutam, J. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2016**, *4*, 1-7.

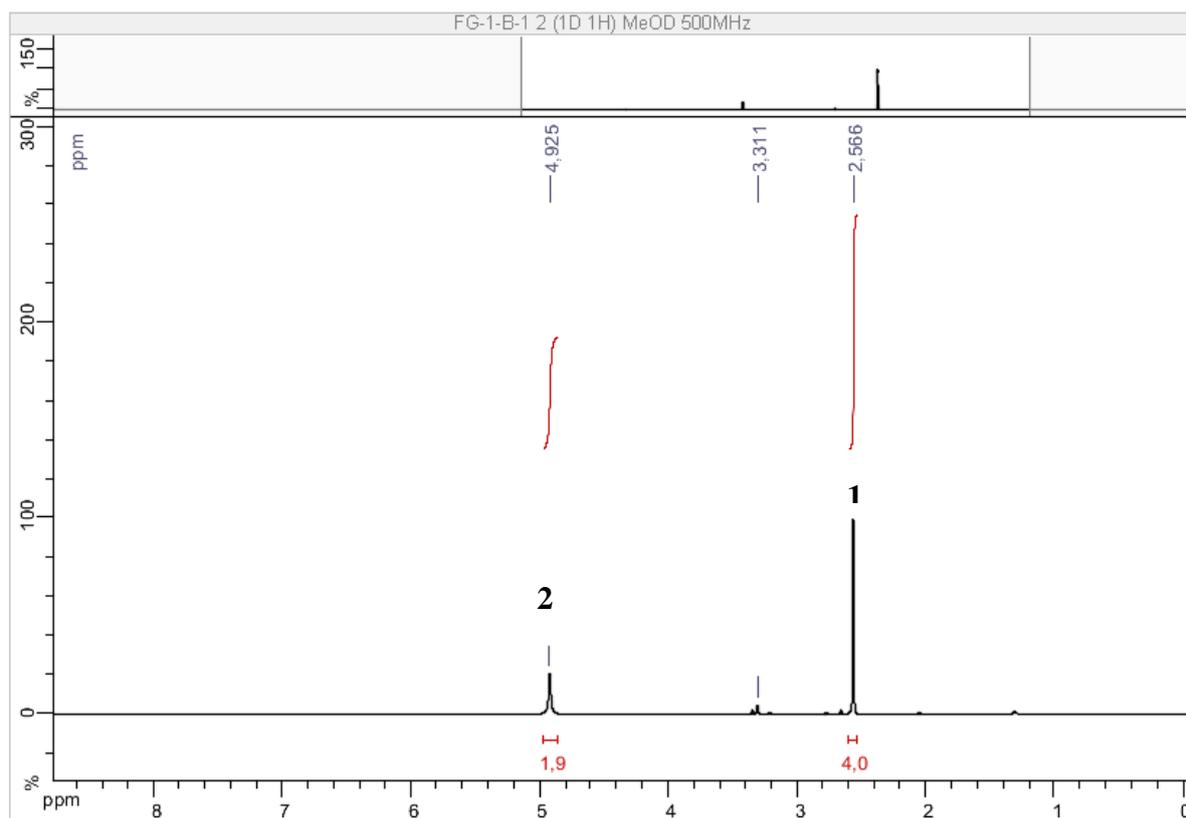


Figure 69. Spectre RMN ^1H du composé **92** dans du MeOD, 500 MHz.

Le spectre HSQC du composé **92** montre que les protons équivalents (4H, s, H_1) à 2,57 ppm sont portés par des carbones identiques résonnant à 29,9 ppm (**Tableau 7**) ce qui signifie selon les tables RMN 1D qu'il y a deux $-\text{CH}_2-$ avec le même environnement chimique dans le composé **92**.

Tableau 7. Données RMN 1D du composé **92**.

Protons	δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Carbone	δ (ppm)	Intégration
H_1	2.57	4	s	----	1	29.9	2
O- H_2	4.93	2	s	----	----	----	----
----	----	----	----	----	2	176.2	2

Le spectre HMBC confirme clairement la structure de **92** car le premier $-\text{CH}_2-$ à 2,57 ppm corrèle avec un carbonyle d'un acide ($-\text{COOH}$) à 176,2 ppm mais également avec un carbone à 29,9 ppm (le même vu en HSQC) (**Figure 70**).

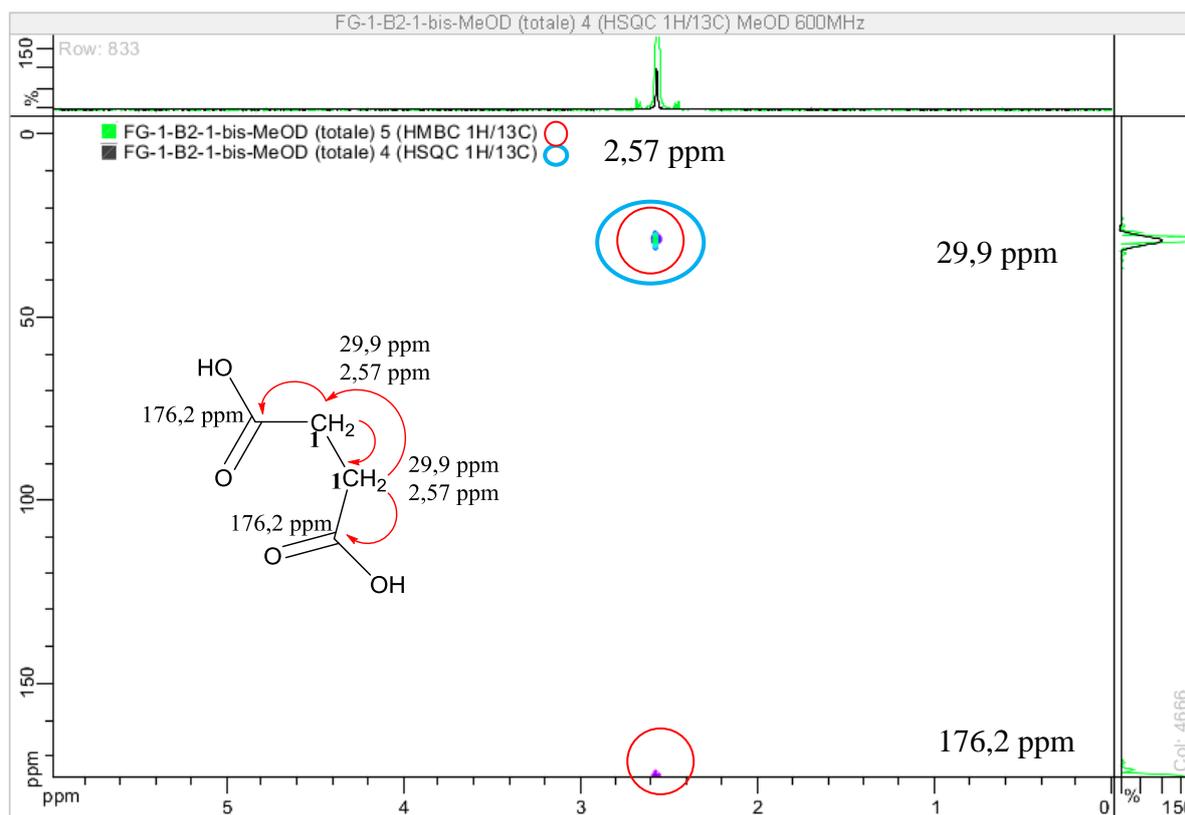


Figure 70. Superposition des spectres RMN HMBC (vert) et HSQC (noir), MeOD, 600 MHz, du composé **92**.

Les corrélations HMBC sont représentées par les flèches rouge sur la molécule et encerclées en rouge sur le spectre. Les corrélations HSQC sont encerclées en bleu.

Pour respecter les données RMN 1D et 2D obtenues, la symétrie est obligatoire, ce qui aboutit à la structure $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, pour lequel la masse exacte de 118,0266 Da de **92** est respectée (**Figure 71**).

Le composé **92** est donc de l'acide succinique, sa base conjuguée est un métabolite primaire de la chaîne respiratoire.

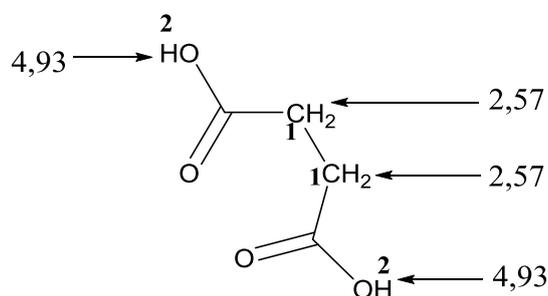


Figure 71. Structure et déplacements chimiques de l'acide succinique (**92**).

L'acide succinique (**92**) peut être aussi produit par fermentation de bactéries par ajout de bicarbonate de sodium et de glucose en anaérobie ²⁴⁸.

Cet acide organique est également extrait généralement de plantes ou d'animaux terrestres ²⁴⁹ voir même de champignons ²⁵⁰, cependant c'est la première fois qu'il est extrait d'une source naturelle marine d'après MarinLit, la base de donnée des métabolites marins.

3. Éluclidation structurale des composés **93** - **97**.

a) Structure du composé **93**: la thymidine.

La spectrométrie de masse haute résolution en mode ESI⁺ du composé **93** révèle un ion [M+H]⁺ de $m/z = 243,10319$ correspondant à la formule brute C₁₀H₁₄N₂O₅ ($\Delta m = 1,3$ ppm).

Son spectre RMN du proton dans du MeOD fait apparaître 11 protons. On compte parmi eux un proton éthylénique à 7,81 ppm, un groupement méthyle à 1,88 ppm, quatre protons portés par des carbones reliés à un hétéroatome (oxygène) à 4,40 ppm, deux protons à 2,23 ppm et un proton à 6,28 ppm porté par un carbone lié à deux hétéroatomes (**Figure 72**). Cela suggère la présence d'un desoxyribose de nucléoside. Quatorze protons sont indiqués dans la formule brute du composé **93**, les trois protons n'apparaissant pas sur le spectre RMN ¹H sont donc des protons échangeables (-OH; -NH). L'ensemble de ces éléments confronté aux données de la littérature a permis de valider la structure de **93** comme étant de la thymidine ²⁵¹ (**Figure 73**).

²⁴⁸ Okino, S.; Noburyu, R.; Suda, M.; Jojima, T.; Inui, M.; Yukawa, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 459–464.

²⁴⁹ Zhang, X. P.; Pei, Y. H.; Liu, M. S.; Kang, S. L.; Zhang, J. Q. *Chinese Tradit. Herb. Drugs* **2010**, *41*, 1763–1765.

²⁵⁰ Ayer, W. A.; Attah-Poku, S. .; Browne, L. M.; Orszanska, H. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 765–769.

²⁵¹ Ying, Y. M.; Shan, W. G.; Liu, W. H.; Zhan, Z. J. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 184–186.

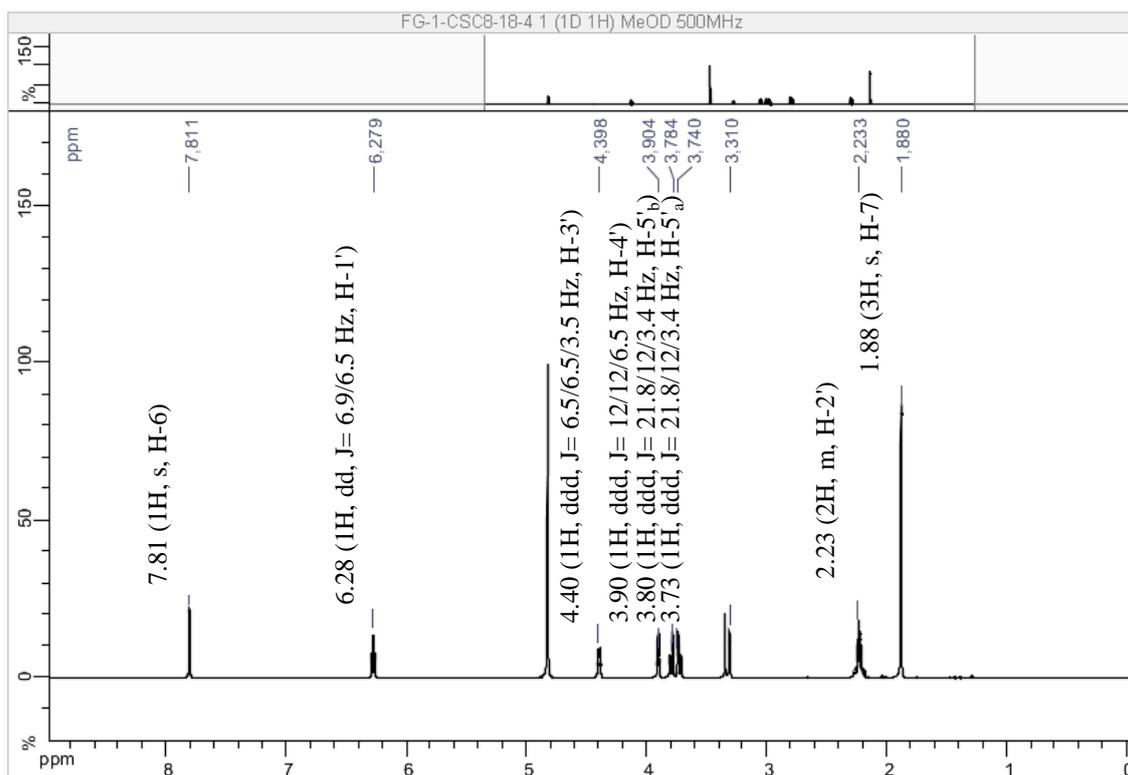


Figure 72. Spectre RMN ^1H du composé **93** dans du MeOD, 500 MHz.

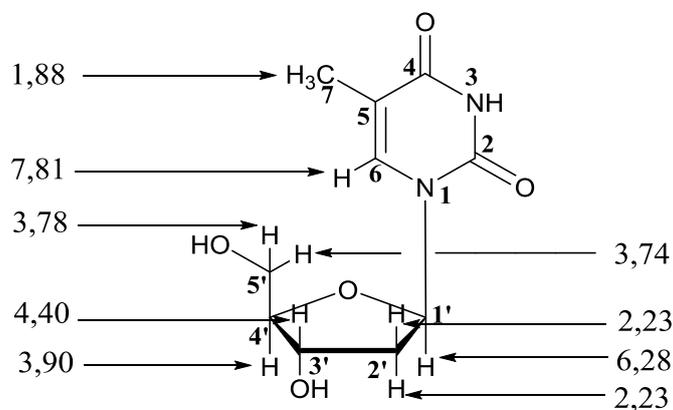


Figure 73. Structure et déplacements chimiques de la thymidine (**93**).

La thymidine (**93**) est un métabolite primaire, précisément un nucléoside (thymine + 2'-desoxyribose)²⁵². Elle ne diffère de la spongothymidine, isolée de l'éponge caribéenne *Tethia crypta* par Bergmann et Feeney en 1951⁷ que par l'absence d'un groupement hydroxyle en position 2'.

Dans ce travail, la thymidine a été isolée en grande quantité (33 mg).

²⁵² Yan, X.; Xue-ping, S.; Xiu-guo, Z.; Wan-ping, T. *Chem. Nat. Compd.* **2015**, *51*, 800–802.

⁷ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981–987.

Il a également été montré qu'en présence de bactéries, la thymidine pouvait avoir un rôle antagoniste vis à vis de certaines molécules antibactériennes (sulfonamides)²⁵³.

Pour certaines familles de bactéries étudiées, la quantité de thymidine doit être plus ou moins importante pour avoir un rôle antagoniste²⁵⁴ alors que la famille des *Neisseriaceae* n'y est pas sensible²⁴⁹.

b) Structure des composés **94** et **96**: la 5'-O-acétylthymidine et la 3'-O-acétylthymidine.

L'analyse SMHR-ESI⁺ de ces deux molécules montre le même ion de $m/z = 285,1086$, indiquant une formule brute $C_{12}H_{17}N_2O_6$ (calculée pour 285,1087). Cette masse exacte pourrait être attribuée selon la littérature à trois isomères acétylés de la thymidine à savoir la 3'-O- acétylthymidine, la 5'-O- acétylthymidine et la 3-acétyl-5-méthyl-2'-deoxyuridine.

La 3'-O- acétylthymidine et la 5'-O- acétylthymidine ont déjà été trouvées dans un corail mou²⁵⁵ alors que la 3-acétyl-5-méthyl-2'-deoxyuridine a été extraite d'éponges associées à des bactéries²⁵⁶. Ceci suggère que ces molécules sont d'origine bactérienne. Les spectres RMN ¹H des composés **94** et **96** ne sont pas identiques à ceux de la littérature certainement à cause de la présence de quelques impuretés. Pour s'assurer de la structure de ces composés et distinguer ces deux régioisomères, leur élucidation structurale a été réalisée.

Tout d'abord, ces deux spectres présentent des signaux qui diffèrent de ceux de la thymidine (**93**) (**Figure 72**), il s'agit bien donc de thymidine substituées. En effet, à 2,1 ppm apparaît sur les spectres protons des composés **94** et **96**, un singulet intégrant pour trois protons et correspondant à un groupement méthyle²⁵⁷ (**Figure 74**).

²⁵³ Then, R. L. *Zentralbl. Bakteriol. A.* **1980**, *247*, 483–494.

²⁵⁴ Then, R. L.; Angehrn, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 1–6.

²⁵⁵ Ahmed, A. F.; Wu, M. H.; Wu, Y. C.; Dai, C. F.; Sheu, J. H. *J. Chinese Chem. Soc.* **2006**, *53*, 489–494.

²⁵⁶ Li, K.; Li, Q. L.; Ji, N. Y.; Liu, B.; Zhang, W.; Cao, X. P. *Mar. Drugs.* **2011**, *9*, 690–695.

²⁵⁷ Williams, D. H.; Fleming, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry.* **2011**, *6*, 1.

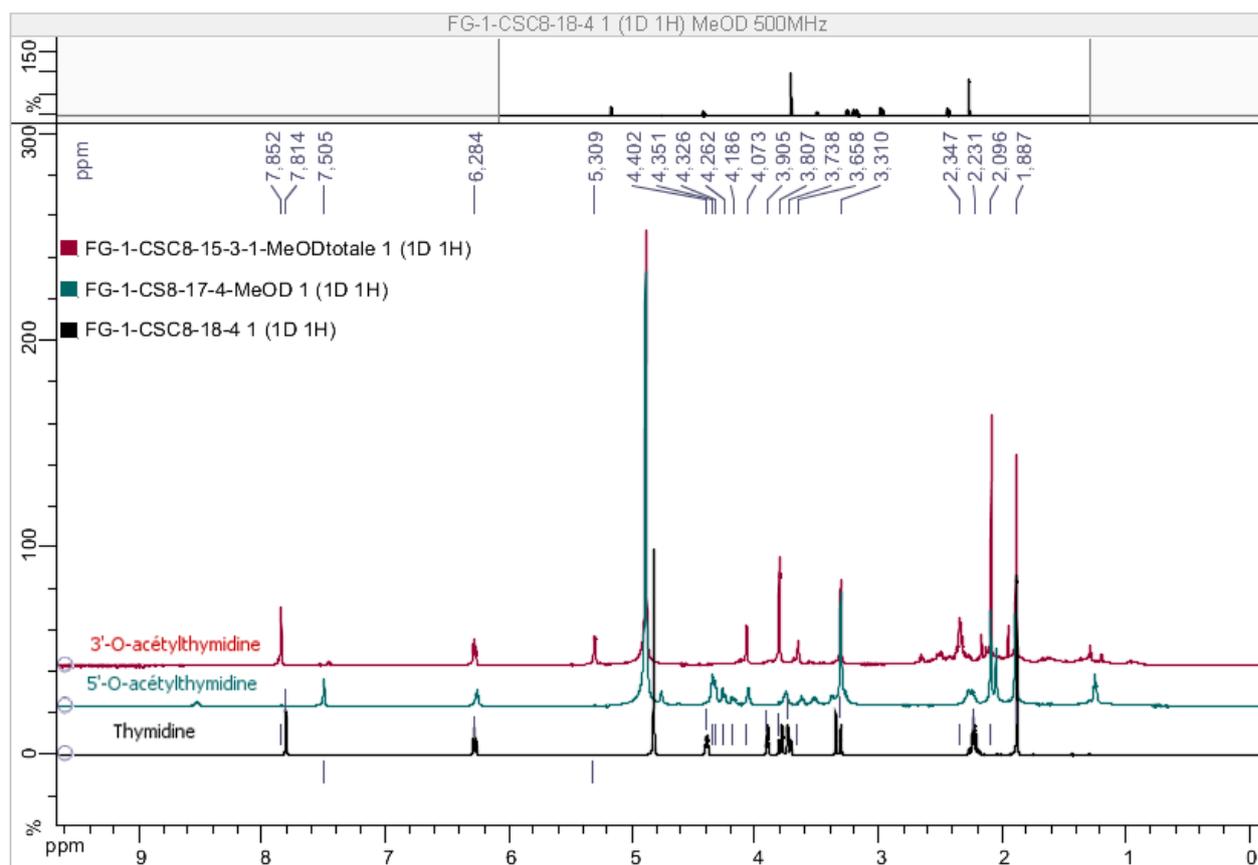


Figure 74. Superposition des spectres RMN ^1H , MeOD, 500 MHz, des composés **93**, **94** et **96**.

D'après les données RMN 1D de **94** et de **96** (Spectres ^{13}C , **Annexe X** et **XIV** respectivement), seuls les déplacements chimiques du ribose dans des thymidine acétylées sont différents de ceux du ribose de la thymidine elle-même (**Tableau 8**) ²⁵⁸. Si ces déplacements chimiques sont modifiés, cela signifie que la position de l'acétylation n'est pas en position N-3 de la thymine, mais soit en 5' et soit en 3' du ribose, et que ni **94** ni **96** ne correspondent à une 3-acétyl-5-méthyl-2'-déoxyuridine ²⁵⁶.

À ce stade il ne reste alors que deux possibilités pour les composés **94** et **96**. Sur le spectre RMN ^1H du composé **94**, les déplacements chimiques des protons H-5'_a (1H, ddd, $J = 31/ 12/ 3,9$ Hz, 4,33 ppm) et H-5'_b (1H, ddd, $J = 31/ 12/ 4,8$ Hz, 4,26 ppm) sont observés avec une différence $\Delta\delta$ d'environ 0,54 ppm comparés à ceux de la thymidine (**93**) respectivement à 3,74 ppm et à 3,78 ppm (**Tableau 8**). En conséquence, les observations ci-dessus indiquent que le composé **94** est la 5'-O- acétylthymidine (**Figure 75**).

²⁵⁸ Avvakumova, S.; Scari, G.; Porta, F. *RSC Adv.* **2012**, 2, 3658.

²⁵⁶ Li, K.; Li, Q. L.; Ji, N. Y.; Liu, B.; Zhang, W.; Cao, X. P. *Mar. Drugs.* **2011**, 9, 690–695.

Tableau 8. Comparaison des données RMN ^1H , MeOD, 500 MHz, de la thymidine (**93**) avec celles des composés **94** et **96**. Les informations surlignées en bleu montrent les différences des positions 5' et 3'.

Composés	93	94	96
Positions	δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)	δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)	δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)
H _{1'}	6,28 (1H, dd, $J = 6,9/ 6,5$)	6,26 (1H, dd, $J = 7,2/ 6,8$)	6,28 (1H, dd, $J = 7,2/ 6,8$)
H _{2'}	2,23 (2H, m)	2,27 (2H, m)	2,35 (2H, m)
H _{3'}	4,40 (1H, ddd, $J = 6,5/ 6,5/ 3,5$)	4,35 (1H, m)	5,31 (1H, m)
H _{4'}	3,90 (1H, ddd, $J = 12/ 12/ 6,5$)	4,07 (1H, ddd, $J = 12/ 6,6/ 4,8$)	4,07 (1H, m)
H _{5'a}	3,73 (1H, ddd, $J = 21,8/ 12/ 3,4$)	4,27 (1H, ddd, $J = 31/ 12/ 4,8$)	3,81 (2H, m)
H _{5'b}	3,80 (1H, ddd, $J = 21,8/ 12/ 3,4$)	4,33 (1H, ddd, $J = 31/ 12/ 3,9$)	
H ₆	7,81 (1H, s)	7,50 (1H, s)	7,84 (1H, s)
H ₇	1,88 (3H, s)	1,90 (3H, s)	1,89 (3H, s)
<u>CH₃</u> COOR	-----	2,10 (3H, s)	2,1 (3H, s)

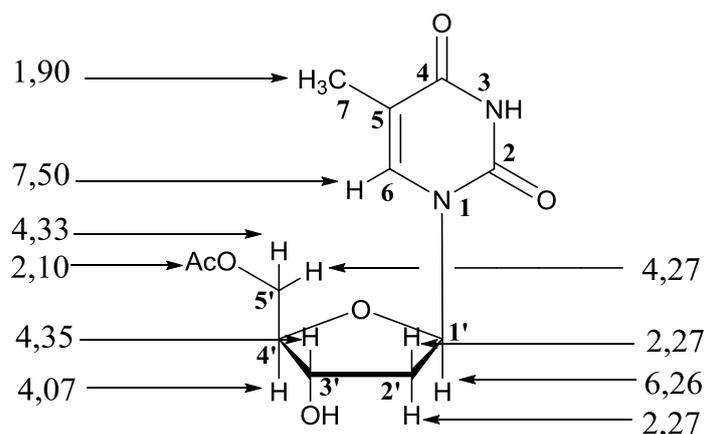


Figure 75. Structure et déplacements chimiques de la 5'-O-acétylthymidine (**94**).

De la même façon, il a été prouvé que le composé **96** était la 3'-O-acétylthymidine (**Figure 76**) avec un déplacement chimique caractéristique de 5,31 ppm pour le proton H-3', alors que les protons de la position 5' retrouvent un déplacement chimique à 3,81 ppm comme dans une thymidine non substituée (**Figure 73**).

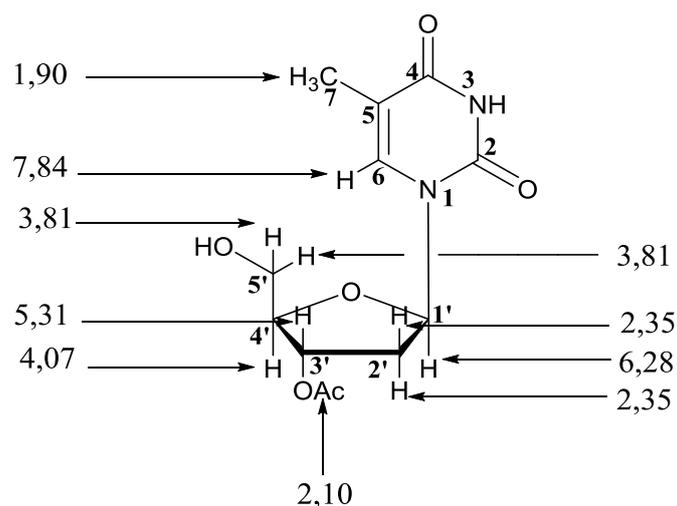


Figure 76. Structure et déplacements chimiques de la 3'-O-acétylthymidine (**96**).

Comme décrit dans la littérature²⁵⁵, les spectres RMN 1D des composés (**94**) et (**96**) ont été refait dans le chloroforme deutéré CDCl₃. Les mêmes conclusions ont été tirées de ces spectres : le composé **94** est bien la 5'-O-acétylthymidine et le **96** est bien la 3'-O-acétylthymidine.

Ces produits naturels ont déjà été obtenus par synthèse^{259, 260} mais peuvent aussi être obtenus par hydrolyse régio-sélective enzymatique de la 3'-5'- acétylthymidine^{261, 262}. Pour la première fois, la 5'-O-acétylthymidine (**94**) et la 3'-O-acétylthymidine (**96**) ont été isolées d'un Mollusque bivalve. Ces molécules pourraient effectivement être d'origine bactérienne puisque ce bivalve est associé à des bactéries tout comme les coraux et les éponges dont ces molécules ont déjà préalablement été isolées.

c) Structure du composé **95**: la 5'-O-acétyluridine.

Il s'agit d'un solide blanc dont l'analyse SMHR-ESI⁺ indique un ion de $m/z = 287,0837$ correspondant à une formule brute de C₁₁H₁₅N₂O₇ (286,079 Da, Δm = 0,4 ppm). La base de données MarinLit indique sept molécules possédant cette masse. Les données RMN ¹H de ces molécules ne correspondaient pas à celles du composé **95**. Le spectre RMN ¹H de **95** révèle huit signaux. Parmi eux, deux doublets, intégrant chacun pour un proton, à δ 7,71 ppm (1H, d,

²⁵⁵ Ahmed, A. F. *J. Chinese Chem. Soc.* **2006**, 53, 489–494.

²⁵⁹ Mcguigan, C.; Tsang, H. W.; Mahmood, N.; Hay, A. J. *Antivir. Chem. Chemother.* **1996**, 7, 330–337.

²⁶⁰ Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851–3868.

²⁶¹ Zinni, M. A.; Rodríguez, S. D.; Pontiggia, R. M.; Montserrat, J. M.; Iglesias, L. E.; Iribarren, A. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, 29, 129–132.

²⁶² Pennachio, A. *Extremophiles.* **2015**, 19, 1001–1011.

$J = 8$ Hz, H-6) et à δ 5,74 ppm (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5) (**Figure 77**).

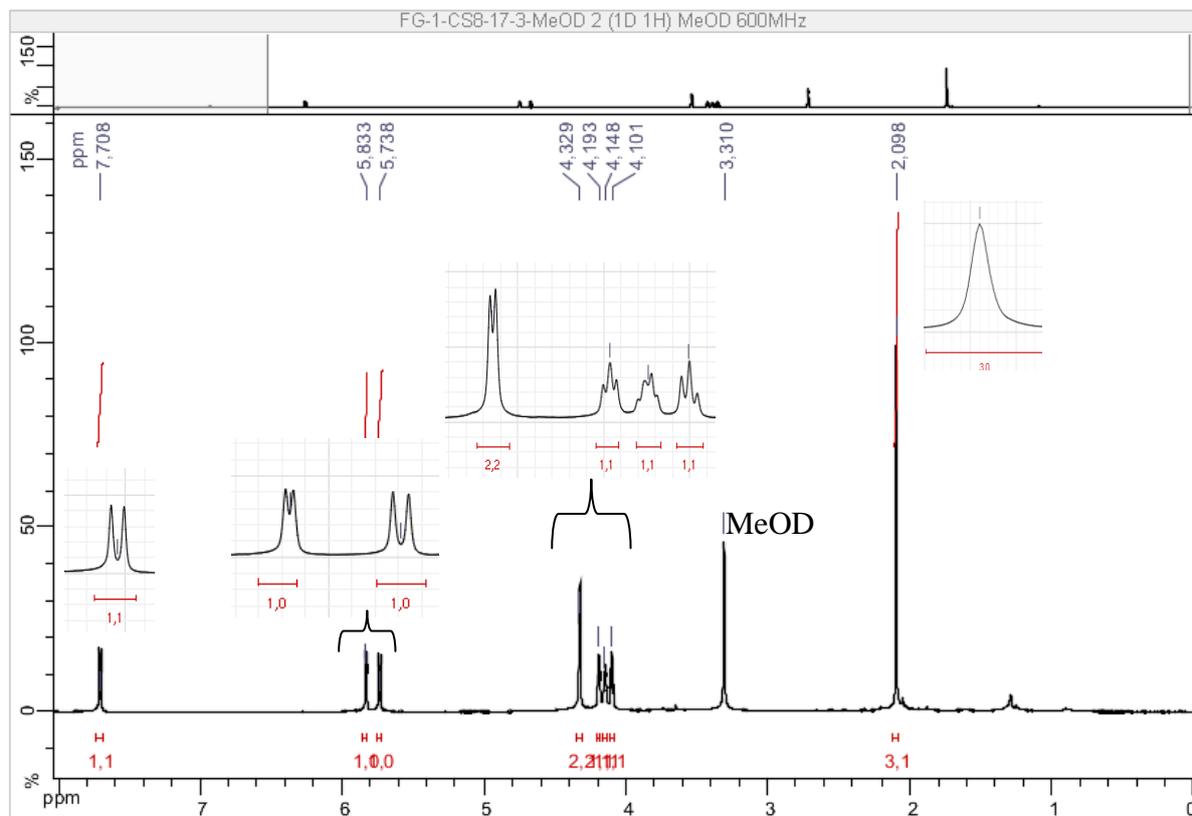


Figure 77. Spectre RMN ^1H du composé **95**, 600MHz, MeOD.

Selon les analyses HSQC, ces protons H-6 et H-5 sont respectivement portés par les carbones C-6 ($\delta = 142,5$ ppm) et C-5 ($\delta = 102,9$ ppm) et montrent une corrélation COSY (**Tableau 9**).

Tableau 9. Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **95**, MeOD, 500MHz.

Protons	δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	J (Hz)	Carbone	δ (ppm)
H _{1'}	5,83	1	d	4	1'	91.8
H _{2'}	4,19	1	m	----	2'	75.3
H _{3'}	4,10	1	m	----	3'	71.2
H _{4'}	4,15	1	m	----	4'	83.0
H _{5'a}	4,33	1	m (dd)	2.9/ 12.9	5'	64.9
H _{5'b}	4,35	1	m (dd)	2.9/ 12.9		
----	----	----	----	----	2 (IV ^{aire})	152.5
----	----	----	----	----	4 (IV ^{aire})	166.6
H ₅	5,74	1	d	8	5	102.9
H ₆	7,71	1	d	8	6	142.5
----	----	----	----	----	COOR	172.2
<u>CH₃</u> COOR	2,09	3	s	----	<u>CH₃</u> COOR	20.8

Les données HMBC montrent également des corrélations entre ces protons éthyléniques et trois carbones quaternaires à δ_{C} 152,5 (C-2), 166,6 (C-4), et à 172,2 (C-8) ppm (**Figure 78**).

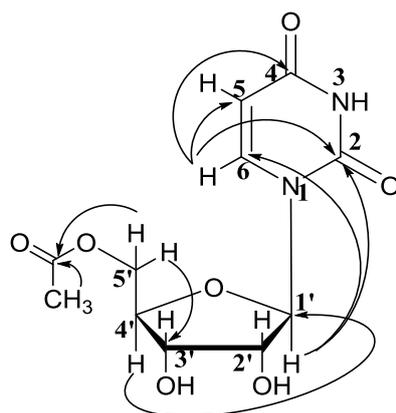


Figure 78. Principales corrélations HMBC du composé **95**.

Ces éléments confirment le fragment de structure correspondant à l'uracile de l'uridine ²⁶³. D'autre part, la présence des signaux à δ_H 4,35 (1H, dd, $J = 2,9/12,9$ Hz, H-5'_b), 4,33 (1H, dd, $J = 2,9/12,9$ Hz, H-5'_a), 4,19 (1H, m, H-2'), 4,15 (1H, m, H-4') et 4,10 (1H, m, H-3') sont caractéristiques du ribose de l'uridine décrit dans la littérature ²⁶⁴. Les corrélations HMBC du proton à δ_H 5,83 ppm (1H, d, $J = 4$ Hz, H-1') avec les carbones C-6 (142,5 ppm) et C-2 (152,5 ppm) ont confirmé la connexion du ribose acétylé à l'uracile (Figure 78, Annexe XII). L'uridine ainsi obtenue ²⁶⁵ est acétylée en position 5' puisque les deux protons H-5' sont déblindés, ce qui est renforcé par la présence du singulet à 2,01 ppm (3H, s) correspondant au méthyle de l'acétyle. En effet, seule une acétylation en position C-5' pourrait expliquer des déplacements chimiques autour de 4,33 ppm pour les protons H-5'_a et H-5'_b au lieu de 3,50 ppm dans une uridine non substituée ²⁶². Le composé **95** a alors été identifié comme étant la 5'-O-acétyluridine (Figure 79).

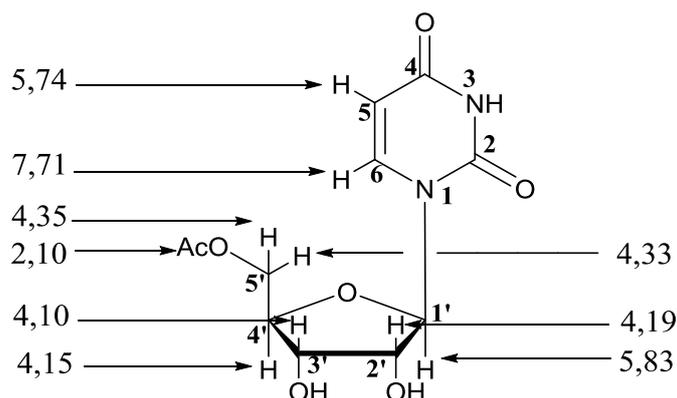


Figure 79. Structure et déplacements chimiques de la 5'-O-acétyluridine (**95**).

L'enzyme qui présente une régio-sélectivité pour l'acylation ou la déacylation en position 5'

²⁶³ Chengxu, Z.; Jie, L.; Yangfang, Y.; Xiaojun, Y.; Baoning, L.; Xin, W. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **2016**, *34*, 749–756.

²⁶⁴ Pau-Roblot, C.; Petit, E.; Sarazin, C.; Courtois, J.; Courtois, B.; Barbotin, J. N.; Séguin, J. P.; Jindrich Jindrich, Josef Pitha, Bengt Lindberg, Pia Seffers, K. H.; Ambra, A. J. D.; Rice, M. J. *Carbohydr. Res.* **2003**, *344*, 53–59.

²⁶⁵ Deslauriers, R.; Smith, I. C. P. A. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 833–838.

des nucléosides ²⁶⁶ est la lipase B appelée aussi CALB et isolée de la levure *Candida antarctica* ²⁶⁷. Ainsi, l'acétylation d'une uridine se fait en position 5' en présence de CALB. Cette méthode permet d'obtenir la 5'-O-acétyluridine avec un bon rendement ²⁶⁸.

Parallèlement, la désacétylation enzymatique et régio-sélective de la position 5' d'une triacétyluridine (TAU) est réalisable en présence de la CALB (Novozyme 435) ²⁶⁹ mais aussi en présence de bactéries ce qui suggère l'existence d'autres hydrolases ²⁷⁰.

Pour la première fois en 2013, la molécule **95** a été rapportée comme un produit naturel après avoir été isolée d'un champignon endophyte de la plante *Huperzia serrata* ²⁵¹.

Du milieu marin, la 5'-O-acétyluridine (**95**) a été décrite pour la première fois en 2015 par Jia et ses collaborateurs ²⁷¹, à partir d'un corail mou, mais à ce jour c'est la première fois que cette molécule **95** est isolée d'un Mollusque bivalve. Ce bivalve étant associé à des bactéries, il se pourrait que la 5'-O-acétyluridine (**95**) soit d'origine bactérienne.

d) Structure du composé **97**: l'uridine.

L'analyse LC-MS du composé **97**, indique une masse de 244,2 Da qui peut correspondre à 39 possibilités de métabolites dans la base de données MarinLit.

Le spectre RMN ¹H de ce composé a été réalisé dans le DMSO à 500 MHz et présente 8 signaux mais aussi quelques impuretés (**Figure 80**). La comparaison de ce spectre avec celui de la 5'-O-acétyluridine (**95**) (**Figure 77**) a permis de déterminer aisément la structure de l'uridine (**97**) (**Figure 81**).

En effet, les profils RMN ¹H de **95** et **97** sont similaires. On note l'absence du singulet à 2,01 ppm du méthyle de l'acétyle sur le spectre du composé (**97**).

²⁶⁶ Ferrero, M.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319–4347.

²⁶⁷ Lutz, S. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2004**, *15*, 2743–2748.

²⁶⁸ Simeó, Y.; Sinisterra, J. V. *Green Chem.* **2009**, *11*, 855–862.

²⁶⁹ Gudiño, E. D.; Iglesias, L. E.; Ferreira, M. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 627–636.

²⁷⁰ Panero, J.; Trelles, J.; Rodano, V.; Montserrat, J. M.; Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S. Iribarren, A. M. *Lett.* **2006**, *28*, 1077–1081.

²⁵¹ Ying, Y. M.; Shan, W. G.; Liu, W. H.; Zhan, Z. J. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 184–186.

²⁷¹ Jia, Y.-L.; Guan, F.-F.; Ma, J.; Wang, C.-Y.; Shao, C.-L. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 227–230.

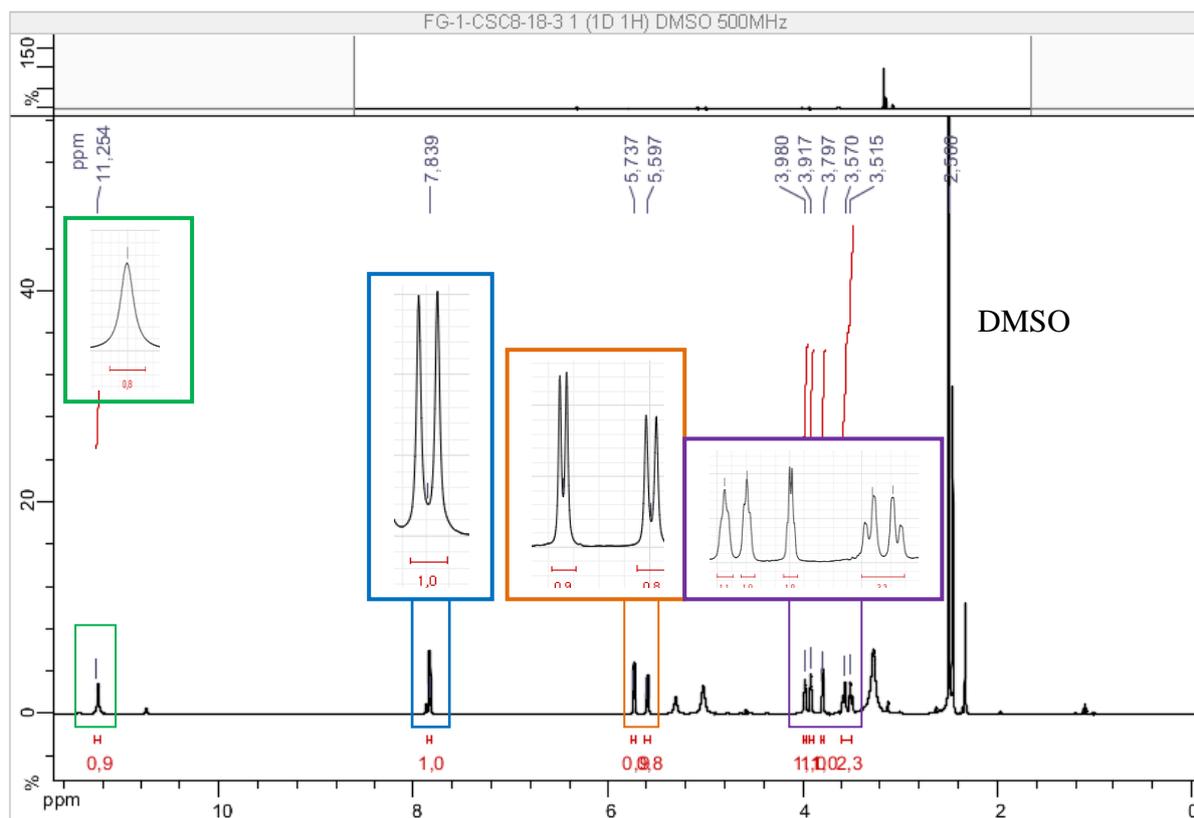


Figure 80. Spectre RMN ^1H du composé **97** dans du DMSO- d_6 , 500 MHz.

L'ensemble de ces éléments a prouvé que le composé **97** était de l'uridine (Figure 81), et ce résultat a été confirmé par les données de la littérature^{265, 272}.

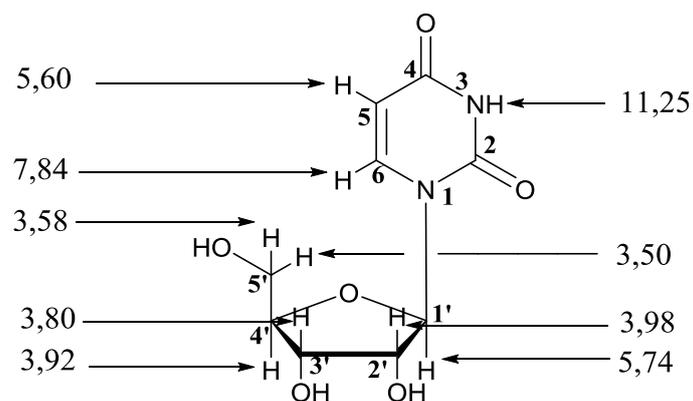


Figure 81. Structure de l'uridine (**97**).

²⁶⁵ Deslauriers, R.; Smith, I. C. P. A. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 833–838.

²⁷² Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs.* **2015**, *2*, 73–82.

Il existe de nombreux dérivés de l'uridine. Certains, comme le 5-fluorouracile, sont cytotoxiques alors que d'autres sont administrés souvent comme pro-drogue comme par exemple la 2',3',5'-tri-O-acétyluridine (TAU)²⁷³.

De façon générale, les analogues de nucléosides ont un fort potentiel pharmacologique avec un large spectre d'activité antivirale (25 analogues) ou anticancéreuse (6 analogues)^{274, 275}. Ces activités biologiques sont surtout connues pour les analogues modifiés en position 5²⁷⁶. Par exemple, l'Edoxudine (5-éthyl-2'-déoxyuridine) a fait partie des premiers médicaments à base de nucléosides mis sur le marché en 1969 (traitement du virus de l'herpès)²⁷⁷.

Au niveau des produits naturels, les caprazamycines (inhibitrices de la translocase bactérienne²⁷⁸), sont des uridines naturellement substituées en position 5 et isolées d'actinomycètes du genre *Streptomyces*²⁷⁹. Il existe toutefois des analogues de nucléosides avec des substitutions autres qu'en position 5²⁸⁰. Les modifications en position 5' par exemple facilitent l'incorporation des dérivés nucléosidiques dans l'ADN causant ainsi la mort cellulaire²⁷⁵.

4. Éluclidation structurale d'un composé à squelette original: l'orbicularisine (98).

L'analyse en ESI⁺-SMHR de (98) a suggéré un ion protonné de $m/z = 307,0391$ (calculé pour 307,0389, **Annexe XXVII**) et un adduit sodium de $m/z = 329,0210$ (**Figure 82**) correspondant à la formule brute C₁₃H₁₀N₂O₅S (306,0313 Da, $\Delta m = 2,3$ ppm) avec 10 insaturations. Cette formule brute est également confirmée par l'ion protonné de $m/z = 305,0234$ en ESI (**Annexe XXVII**). La base de données MarinLit propose une seule possibilité correspondant à un composé bromé. Le spectre de masse de 98 (**Figure 82**), n'indique pas de massif isotopique caractéristique d'un atome de brome. En effet, les isotopes stables du brome, à savoir ⁷⁹Br et ⁸¹Br, apparaissent respectivement sous forme de deux pics M et M+2 d'intensité relative d'environ 50%²⁸¹).

²⁷³ Ashour, O. M.; Naguib, F. N. ; Panzica, R. P.; Al Safarjalani, O. N.; el Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 427–431.

²⁷⁴ Clercq, E. De; Holý, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940.

²⁷⁵ Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447–464.

²⁷⁶ De Clercq, E. *J. Chem. Inf. Model.* **1983**, *55*, 623–636.

²⁷⁷ Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A. M. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 412–434.

²⁷⁸ Igarashi, M.; Takahashi, Y.; Shitara, T.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Miyake, T.; Akamatsu, Y. *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 327–337.

²⁷⁹ Igarashi, M.; Nakagawa, N.; Doi, N.; Hattori, S.; Naganawa, H.; Hamada, M. *Journal of Antibiotics.* **2003**, *56*, 580–583.

²⁸⁰ Szymańska-Michalak, A.; Wawrzyniak, D.; Framski, G.; Kujda, M.; Zgoła, P.; Stawinski, J.; Barciszewski, J.; Boryski, J.; Kraszewski, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 41–52.

²⁸¹ Kamano, Y.; Zhang, H.; Ichihara, Y.; Kizu, H.; Komiyama, K.; Pettit, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2783–2784.

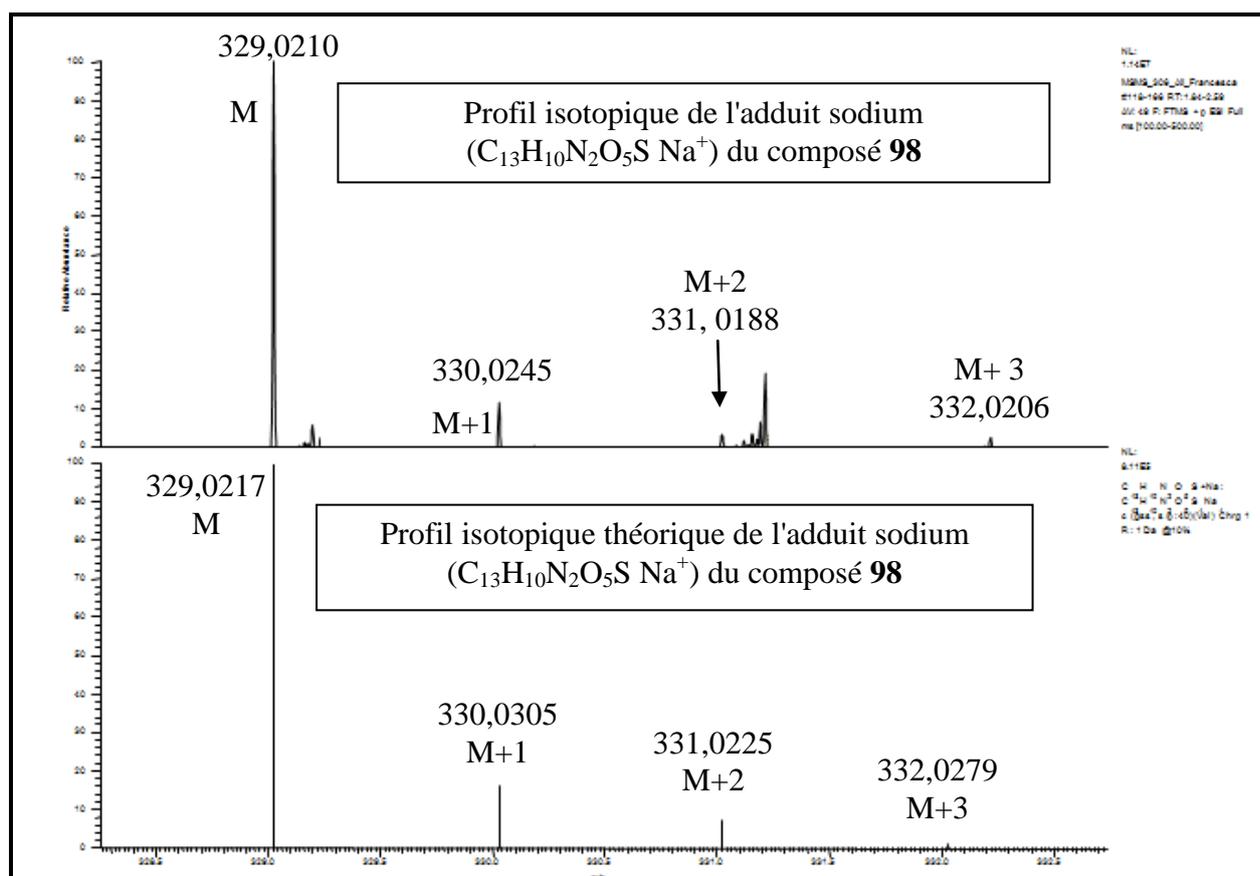


Figure 82. Comparaison du profil isotopique théorique de l'adduit sodium $C_{13}H_{11}N_2O_5S Na^+$ au profil de **98**.

Par contre, l'abondance relative de 4% de l'isotope M+2 du composé **98** suggère bien la présence d'un atome de soufre dans la molécule (**Tableau 10**).

Isotope	M _{théo}	M _{exp}	M+1 _{théo}	M+1 _{exp}	M+2 _{théo}	M+2 _{exp}	M+3 _{théo}	M+3 _{exp}
Abondance relative	100	100	14	12	6	4	1	1

Tableau 10. Comparaison des abondances relatives théoriques et expérimentales des isotopes du profil isotopique de l'adduit sodium ($C_{13}H_{10}N_2O_5S Na^+$) du composé **98**.

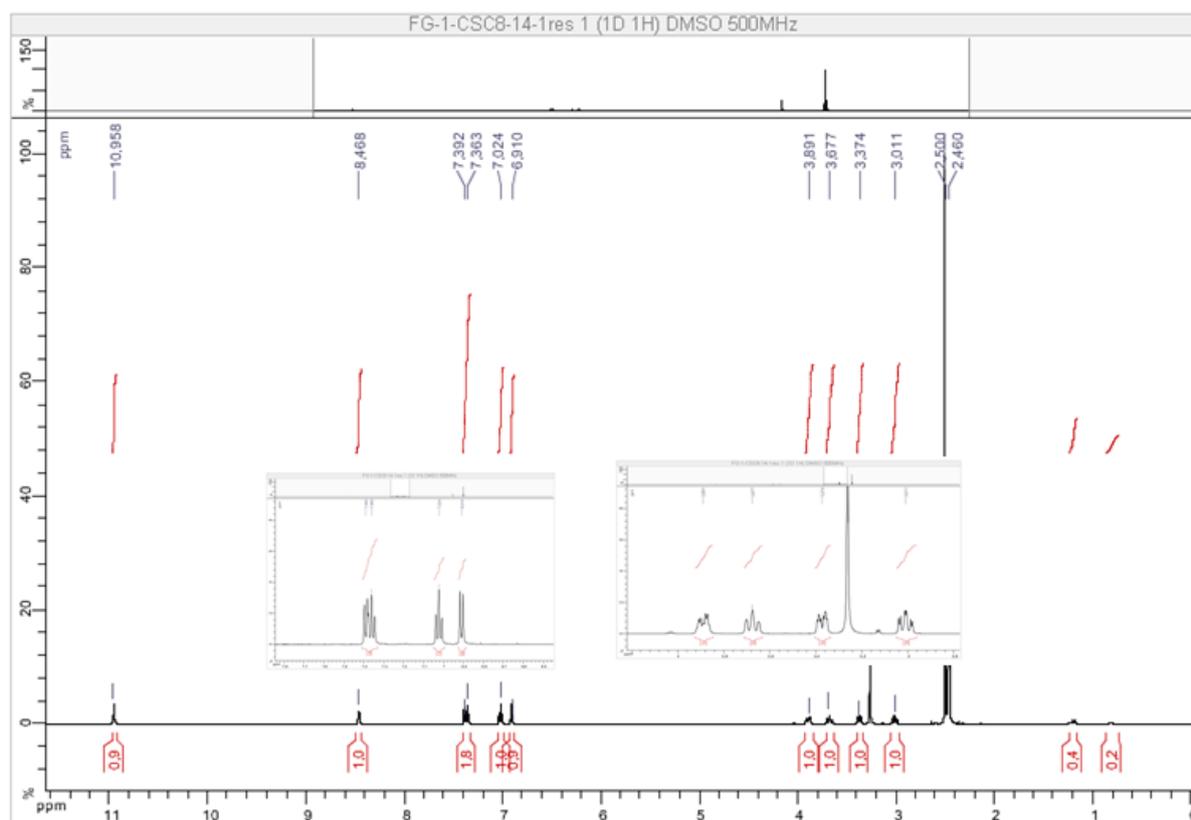


Figure 83. Spectre RMN ^1H du composé **98** (DMSO, 600MHz).

Les spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et HSQC (Figure 83, Annexes XVIII, XX) de ce composé révèlent deux méthylènes, le premier à δ_{H} 3,01 (H-2b)/ 3,37 ppm (H-2a) corrélé au carbone à δ_{C} 48,1 ppm (C-2), et le second à δ_{H} 3,68 (H-3b)/ 3,89 (H-3a) corrélé à δ_{C} 40,8 (C-3).

Les corrélations COSY entre les protons H-2, H-3 et H-4 (NH) (Figure 84, Annexe XIX), et les déplacements chimiques caractéristiques en RMN ^{13}C à 40,8 ppm et 48,1 ppm (Tableau 11) ont suggéré un fragment thiazine $\text{SO}_2\text{-C-2-C-3-N-4}$ ^{282, 283}.

La forte absorbance IR à 1129 cm^{-1} suggère la présence de la fonction sulfone de la thiazine²⁸⁴ (Annexe XXV).

Par la suite, les analyses HSQC ($^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$) (Annexes XX) ont clairement montré une partie aromatique dans la structure de **98** où les protons à δ_{H} 7,39 (H-16); 7,36 (H-14); 7,02 (H-15) et 6,91 (H-13) sont liés respectivement aux carbones résonnant à δ_{C} 126,6 (C-16); 132,1 (C-14); 122,6 (C-15) et 110,8 (C-13).

Les protons du spectre RMN ^1H (δ_{H} 10,96 (H-11)/ 8,47 (H-4)) (Figure 83) ont été attribués par $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC (Annexe XXII), respectivement à une amide secondaire à 133,8 ppm

²⁸² Casapullo, A.; Minale, L.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2421–2422.

²⁸³ Pearce, A. N.; Chia, E. W.; Berridge, M. V.; Clark, G. R.; Harper, J. L.; Larsen, L.; Maas, E. W.; Page, M. J.; Perry, N. B.; Webb, V. L. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 936–940.

²⁸⁴ Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Springer.* **2009**, *1*, 304–307.

(N11) et à une amine secondaire à 74,1 ppm (N-4). Ce sont effectivement des protons échangeables puisqu'ils disparaissent lorsque le spectre RMN proton est réalisé dans du MeOD (Annexe XVI).

Le spectre UV (λ_{\max} (MeOH): 210, 250 and 292 nm) témoigne de la présence d'un groupement chromophore indoline²⁸⁵ (Annexes XXVI). De plus, de fortes corrélations HMBC (^1H - ^{13}C) (Annexes XXI) ont été observées pour le proton H-11 à 10,96 ppm de l'amide aux carbones quaternaires C-8 à 82,2 ppm et C-17 à 122,4 ppm.

De plus, de faibles corrélations ont été observées entre le proton H-11 et les carbones C-12 (142,8 ppm) et C-10 (170,9 ppm) qui corrélient également fortement avec les protons H-14 et H-15, ce qui confirme ainsi la partie indolone de **98**^{286, 287, 288}.

Donc en fait, ces résultats valident une fonction lactame connectée à un système aromatique C-16–C-15–C-14–C-13 avec un carbone spiro C-8 de l'indolone.

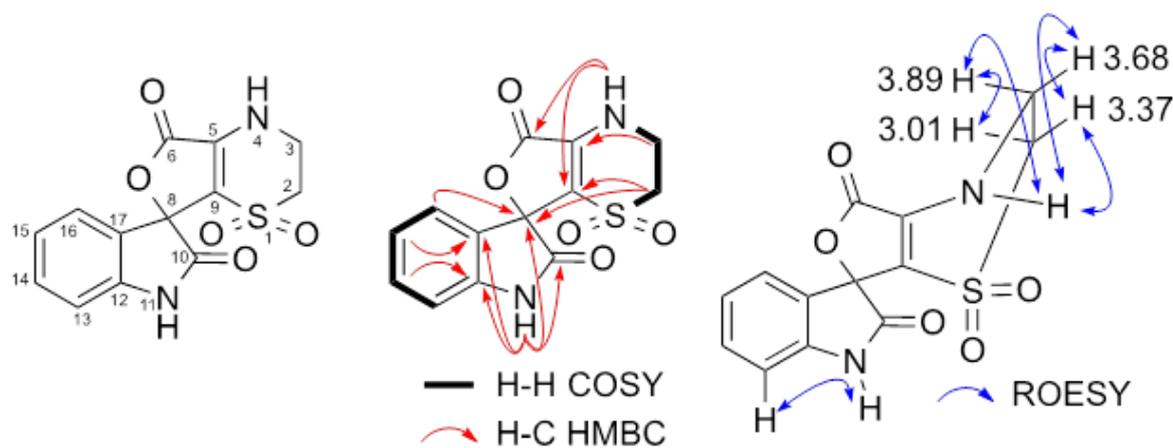


Figure 84. Structure de (**98**), COSY (^1H - ^1H) et principales corrélations HMBC and ROESY.

La fusion du fragment indolone avec les carbones non attribués à 111,2 (C-9); 138,3 (C-5) et 165,1 ppm (C-6) a été déduite des corrélations HMBC longue distance du proton δ_{H} 3,37 ppm (H-2a) avec le carbone spiro à 82,2 ppm (C-8)²⁸⁹ et le carbone non-protoné à 111,2 ppm (C-9).

²⁸⁵ Kimura, Y.; Hamasaki, T.; Nakajima, H.; Isogai, A. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 225–228.

²⁸⁶ Martin, G. E.; Sanduja, R.; Alam, M. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 406–411.

²⁸⁷ Zhou, Y.; Debbab, A.; Wray, V.; Lin, W.; Schulz, B.; Trepos, R.; Pile, C.; Hellio, C.; Proksch, P.; Aly, A. H. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2789–2792.

²⁸⁸ Li, Z.; Zhu, A.; Yang, J. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, 49, 1458–1461.

²⁸⁹ Sera, Y.; Masaki, M. E.; Doe, M.; Buonanno, F.; Miyake, A.; Usuki, Y.; Iio, H. *Chem. Lett.* **2015**, 44, 633–635.

Tableau 11. Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **98** dans le DMSO- d_6 . Les spectres ont été enregistrés à 500 MHz.

Positions	δ_{H} (ppm); mult.; J (Hz)	δ_{C} ou δ_{N} (ppm)/ type
2a	3,37 (1H, m, $J = 13,6/ 4,8/ 2,0/ 1,6$)	48,1/ CH ₂
2b	3,01 (1H, ddd, $J = 13,6/ 12,6/ 4,0$)	
3a	3,89 (1H, m, $J = 13,8/ 4,8/ 4,8/ 4,0$)	40,8/ CH ₂
3b	3,68 (1H, ddd, $J = 13,8/ 12,6/ 2,0$)	
4	8,47 (brs)	74,1/ NH
5	----	138,3/ C
6	----	165,1/ C
8	----	82,2/ C
9	----	111,2/ C
10	----	170,9/ C
11	10,96 (brs)	133,8/ NH
12	----	142,8/ C
13	6,91 (d, $J = 7,6$)	110,8/ CH
14	7,36 (td, $J = 7,6/ 1,1$)	132,1/ CH
15	7,02 (td, $J = 7,6/ 1,1$)	122,6/ CH
16	7,39(d, $J = 7,6$)	126,6/ CH
17	----	122,4/ C

De même le proton à δ_{H} 3,68 ppm (H-3b) a montré des corrélations HMBC avec les carbones non-protonés à δ_{C} 138,3 ppm (C-5) et 111,2 ppm (C-9). De plus, le proton H-4 du NH de la thiazine a montré une corrélation HMBC avec le carbone C-6 et confirmé l'orientation de la thiazine. Les quaternaires à 138,3 ppm (C-5) et 111,2 ppm (C-9) sont donc liés par une double liaison et forment une thiazine cyclique ²⁹⁰. La thiaplakortone décrite par Davis et ses collaborateurs ²⁹¹ (**Figure 85**), fait apparaître une double liaison dans un système bicyclique quinone-thiazine avec des déplacements chimiques similaires.

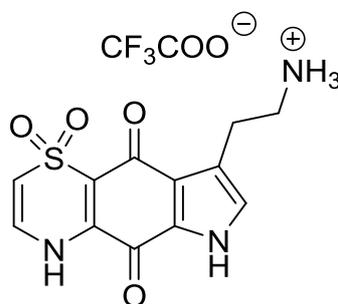


Figure 85. Structure de la thiaplakortone A.

²⁹⁰ Centko, R. M.; Steino, A.; Rosell, F. I.; Patrick, B. O.; De Voogd, N.; Mauk, A. G.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6480–6483.

²⁹¹ Davis, R. A.; Duffy, S.; Fletcher, S.; Avery, V. M.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9608–9613.

En accord avec la SMHR, il ne manque plus qu'un carbonyle et un oxygène pour compléter la formule brute de **98**. Or selon les données HMBC (^1H - ^{13}C), le proton H-4 de la thiazine cyclique a montré une corrélation avec le carbonyle d'une lactone à δ_{C} 165,1 (C-6) et les carbones non-protonés à δ_{C} 111,2 ppm (C-9) et 138,3 ppm (C-5). Ainsi, la thiazine cyclique a été fusionnée avec la furanone qui est connectée à l'indolone par le carbone spiro C-8 à δ_{C} 82,2 ppm.

La présence d'une β -lactone liée à l'indolone par le carbone spiro, et qui avait été également considérée comme deuxième possibilité dans nos réflexions (**Figure 86**) n'a pas été retenue car des corrélations HMBC ne pouvaient pas expliquer cette hypothèse de structure. En effet, deux corrélations HMBC incohérentes, en J_6 , ont été observées dans cette proposition de structure:

- entre l'amine et le carbonyle de la lactone.
- entre un proton aliphatique et le carbonyle de la lactone.

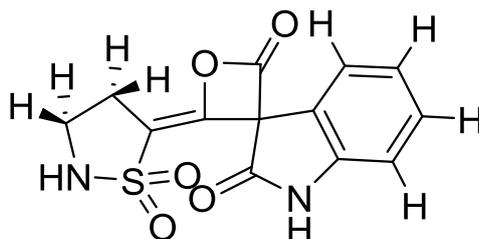


Figure 86. Hypothèse de structure pour **98** considérée mais réfutée.

La structure retenue pour **98** est donc celle de la **Figure 87**.

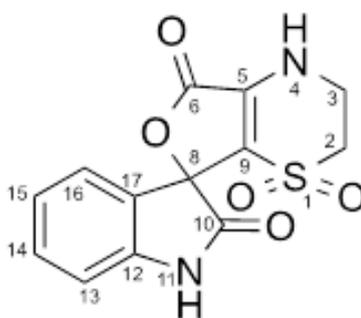


Figure 87. Hypothèse de structure retenue pour (**98**).

Les données IR du composé (**98**) valident cette structure car la fréquence de vibration de cette γ -lactone α -insaturée était à 1787 cm^{-1} correspondant donc à la furanone ²⁹².

Il est intéressant de noter que le spectre IR (**Annexe XXVI**) a confirmé également l'existence du groupement carbonyle à 1740 cm^{-1} , ainsi que celle de l'amide et de l'amine secondaire à 3308 cm^{-1} ²⁸⁴. Les fragments structuraux ont été validés par LTQ-Orbitrap-SM² (**Annexes XXVIII et XXIX**) grâce à l'observation des ions-fils de m/z 193, 220, 257 and 285 obtenus par fragmentation de l'adduit $[M+Na]^+$ du composé **98** ²⁹³ (**Figure 88**).

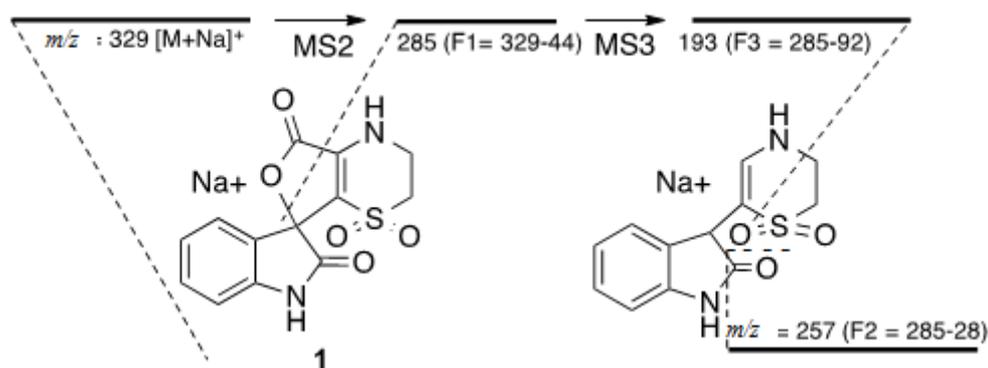


Figure 88. Fragmentations LTQ-Orbitrap-SM² and LTQ-Orbitrap-SM³ de l'ion moléculaire $[M+Na]^+$ du composé **98**.

Il faut également noter qu'en plus de la structure de **98**, nous avons considéré le régioisomère 1-B dans lequel la sulfone de la partie thiazine est en β de la fonction lactone (**Figure 87**).

Les corrélations HMBC partant du proton à δ_H 3,37 ppm (H-2a) vers le carbone spiro à δ_C 82,2 ppm (C-8) et le carbone non-protoné à 111,2 (C-9) valident la structure de **98** (**Figure 84**) comme étant celle du régioisomère **1-A**

Deux conformères peuvent exister pour les régioisomères **1-A** et **1-B** de **98**, correspondant à des demi-chaînes du cycle thiazine. Même si les données RMN prouvent que la structure de **98** est 1-A, les calculs DFT-RMN ont été réalisés pour les deux régio-isomères.

²⁹² Mazur, M.; Skrobiszewski, A.; Gładkowski, W.; Podkowik, M.; Bania, J.; Nawrot, J.; Klejdysz, T.; Wawrzeńczyk, C. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *72*, 489–496.

²⁸⁴ Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Springer*. **2009**, *1*, 304-307.

²⁹³ Fu, P.; Kong, F.; Li, X.; Wang, Y.; Zhu, W. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3708–3711.

En effets, les calculs DFT-RMN^{294, 295} sont utilisés pour prédire et valider les déplacements chimiques ¹H et ¹³C NMR des régioisomères **1-A** and **1-B** (utilisant le DMSO comme solvant de simulation, pour être en accord avec le solvant utilisé pour l'acquisition des spectres RMN).

Les déplacements chimiques sont moyennés avec la distribution de Boltzmann des conformères correspondants, eux-mêmes étant calculés sur la base des énergies mécaniques quantiques.

Ces calculs ont montré que l'une des deux conformations du régioisomère **1-A** (noté comme conformère 1 dans l'**annexe XXX**) est largement préférable, représentant 80% de la distribution de Boltzmann, tandis que pour le régioisomère **1-B** les deux conformères sont présents en quantités presque égales (**Annexe XXXI**).

Il est remarquable de voir combien les déplacements chimiques calculés pour chaque paire de conformères sont similaires et donc en accord avec les valeurs du spectre moyenné (**Annexes XXX et XXXI**).

Les déplacements chimiques ¹H RMN ne suffisent pas pour discriminer **1-A** et **1-B** puisqu'il y a une très bonne similitude entre les valeurs expérimentales et théoriques des deux régioisomères ($\Delta\delta < 0,5$ ppm, **Figure 89**).

²⁹⁴ Aiello, A.; Fattorusso, E.; Luciano, P.; Mangoni, A.; Menna, M. *European J. Org. Chem.* **2005**, 23, 5024–5030.

²⁹⁵ Nguyen, Q. N. N.; Tantillo, D. J. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2016**, 69, 534–540.

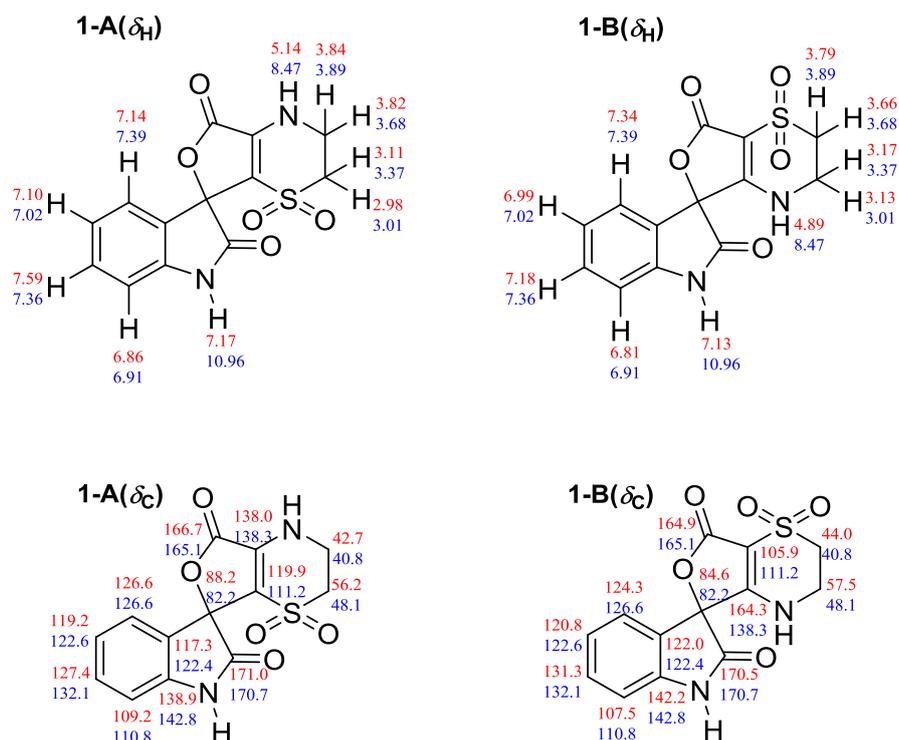


Figure 89. Comparaison de la DFT-RMN (δ_H et δ_C) calculée (moyenne des deux conformères; en rouge) et expérimentale (en bleu) pour les régioisomères 1-A et 1-B.

De même, une bonne corrélation entre les déplacements chimiques ^{13}C expérimentaux et calculés de ces régioisomères a été observée, sauf pour le carbone C-5 (**Figure 89**).

Dans ce cas, le déplacement chimique déterminé expérimentalement était à δ_C 138,3 ppm, et celui calculé pour le régioisomère **1-A** était à δ_C 138,0 ppm tandis que celui de **1-B** était à δ_C 164,3 ppm.

Cette différence en ppm ($\Delta\delta$) supérieure à 25 ppm a permis, conjointement avec toutes les autres données reportées dans cette étude, de corroborer la structure de **98** comme étant celle du régioisomère **1-A** comme décrit précédemment (**Annexe XXXII**).

Par ailleurs, nous avons essayé de confirmer cette attribution en comparant les signaux observés en ROESY (**Figure 84**) et les distances interprotons calculées à partir des structures tri-dimensionnelles des régioisomères **1-A** et **1-B**.

Ces distances interprotons calculées entre le proton aromatique à δ_H 7,39 ppm (H-16) et le proton aliphatique en position axiale à δ_H 3,01 ppm (H-2b dans **1-B**) et à δ_H 3,68 ppm (H-3b dans **1-A**) étaient respectivement de 4,5 Å et 5,2 Å.

Bien qu'aucune interaction ROESY n'ait été expérimentalement observée entre ces protons, la faible différence de valeurs entre les distances interprotons n'aurait pas pu donner de confirmations supplémentaires sur la structure de **98**.

Nous avons donc choisi de baptiser cette structure nouvelle, **orbicularisine**. Cette molécule contient un seul carbone assymétrique. Le pouvoir rotatoire étant nul et le spectre de dichroïsme circulaire (ECD, **Annexes XVII**) plat indique la nature racémique du composé. Cela suggère que les étapes biosynthétiques clés doivent certainement faire apparaître une séquence réactionnelle impliquant un intermédiaire achiral.

La structure spiro-indolo-thiazine de **98** suggère l'intervention des précurseurs tryptophane et cystéine pour sa biosynthèse. Ces deux acides aminés ont été impliqués dans plusieurs biosynthèses de métabolites secondaires incluant le BE-1098²⁹⁶ et les thiazines des thiaplakortones A–C²⁹¹ (**Figure 85**). Une proposition des étapes de biosynthèse d'orbicularisine est présentée dans la **Figure 90**. La désamination du tryptophane puis la décarboxylation de la cystéine semblent être les réactions chimiques les plus appropriées. Cependant le processus chimique et la chronologie des mécanismes réactionnels que nous proposons sont assujettis à des confirmations par des étapes spécifiques en biosynthèse. Il serait intéressant de connaître le réel producteur de l'orbicularisine, l'hôte eucaryote *Codakia orbicularis* ou ses symbiotes sulfo-oxydants bactériens intracellulaires ? Différentes expérimentations pourraient apporter des éléments de réponse : le marquage au ¹³C et ¹⁴C des précurseurs tryptophane et cystéine serait envisageable; la métagénomique pourrait permettre d'identifier les gènes ou l'opéron de gènes (eucaryote ou procaryote) à l'origine de la biosynthèse d'orbicularisine; l'imagerie MALDI permettrait de localiser l'orbicularisine dans les branchies, à condition que cette molécule soit ionisable; enfin, il serait possible de centrifuger les branchies du bivalve pour récupérer un culot des bactéries (symbiotes), réaliser une extraction chimique sur ces bactéries et analyser l'extrait brut obtenu en LC-HRMS. Si l'orbicularisine apparaît sur ce profil, c'est qu'il s'agit d'une molécule d'origine bactérienne.

²⁹⁶ Rauhut, T.; Spiteller, P.; Eisenreich, W.; Spiteller, M.; Glawischnig, E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5279–5286.

²⁹¹ Davis, R. A.; Duffy, S.; Fletcher, S.; Avery, V. M.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9608–9613.

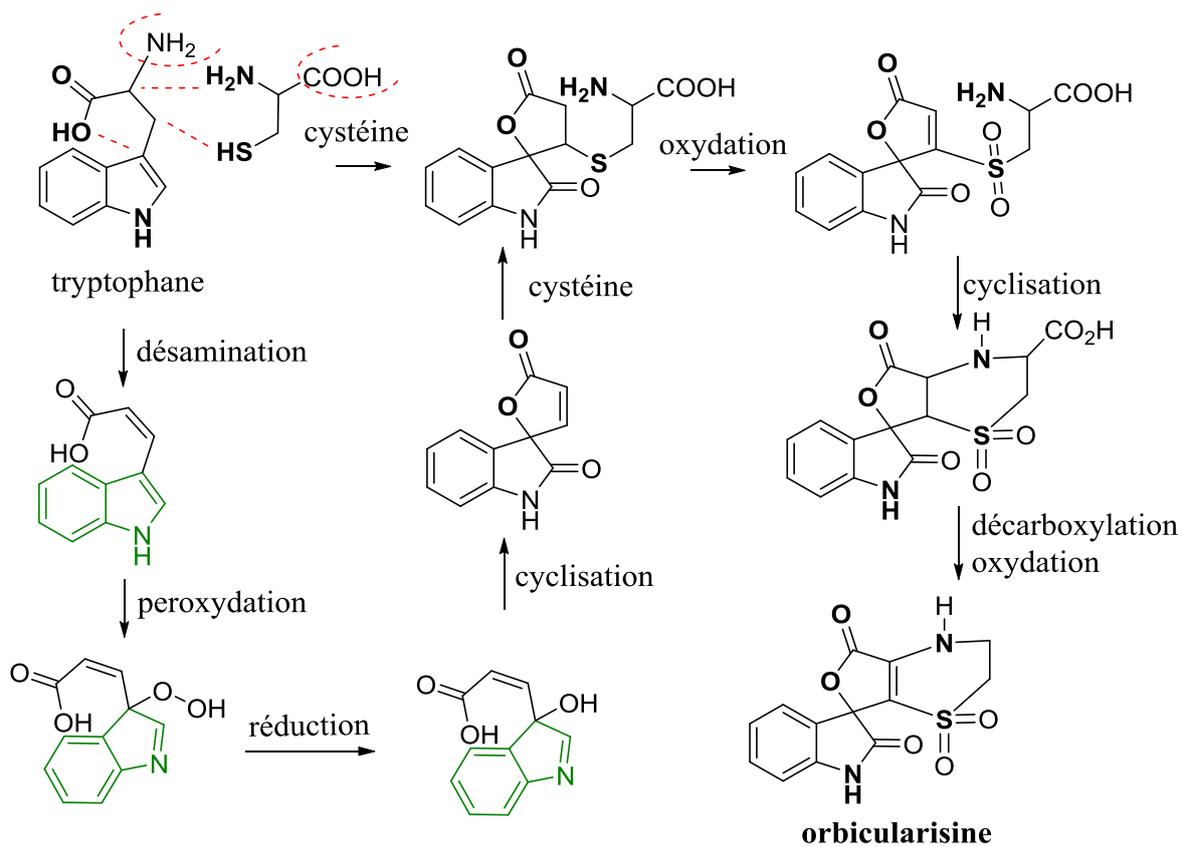


Figure 90. Hypothèse de biosynthèse pour orbicularisine (98).

X. COMPARAISON DES PROFILS METABOLIQUES DE *CODAKIA ORBICULARIS* AVEC *LUCINA ROQUESANA* (LUCINIDAE).

Les profils chromatographiques LC-DAD de *C. orbicularis* et de *L. roquesana* ont été comparés dans la **Figure 91**. Les extraits de branchies des deux bivalves présentent six pics chromatographiques majoritaires en commun, ils sont représentés par la même couleur sur le chromatogramme de chaque espèce à environ 2,5 minutes (encadré rouge); 6,5 minutes (encadré vert); 7,7 minutes (encadré orange); 8,8 minutes (encadré marron); 9,8 minutes (encadré rose) et 11,5 minutes (encadré violet).

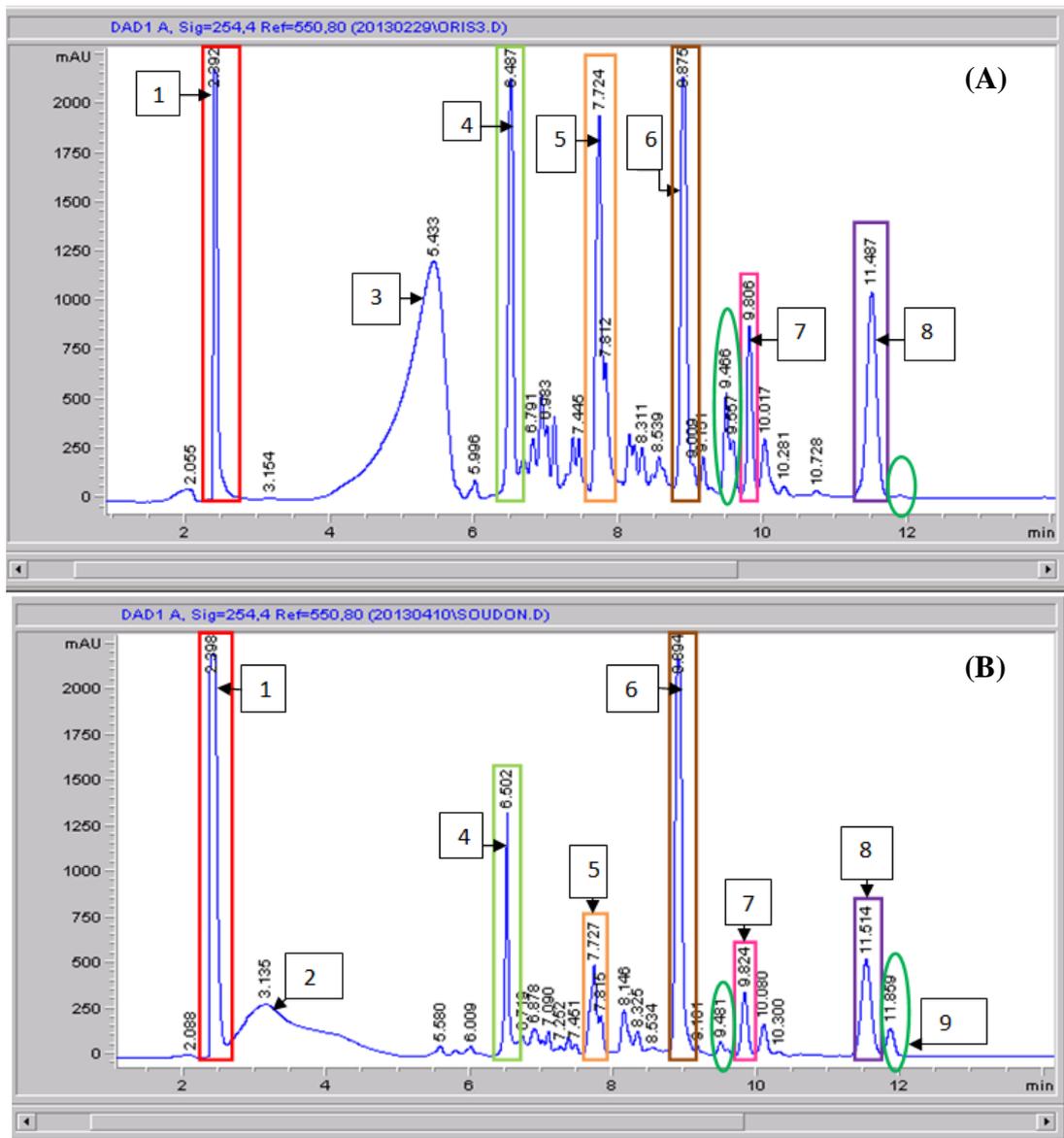


Figure 91. Zoom entre 1 et 13 minutes sur les chromatogrammes de *Codakia orbicularis* (A) et *Lucina roquesana* (B).

Ces derniers ont été obtenus après élution avec le gradient allant de 2-100 % d'ACN + 0,1 % d'HCOOH, pendant 20 min à un débit de 0,5 mL/min sur une colonne Atlantis T₃ C₁₈ (3µm, 4,6*75 mm). Détection en DAD entre 195 et 600 nm. Chaque pic majoritaire non identifié et commun aux deux bivalves est encadré par un rectangle de couleur. Les cercles vert foncé entourent des pics de proportions très différentes chez l' autre bivalve. Les pics majoritaires sont numérotés de 1 à 8 et de 1 à 9 respectivement sur (A) et (B).

Le pic à environ 9,5 minutes (cercle vert foncé) est quasiment inexistant chez *L. roquesana* mais apparaît avec une certaine intensité chez *C. orbicularis*.

Le pic à environ 11,9 minutes (cercle vert foncé) est inexistant chez *C. orbicularis* mais en plus grande quantité chez *L. roquesana*.

Ces deux bivalves hébergeant les mêmes symbiotes ¹⁷⁵, la présence de molécules communes pourrait suggérer que ces molécules sont produites par les symbiotes et non par les bivalves qui appartiennent à deux genres différents: *Codakia* et *Lucina*.

Si les molécules communes (*a priori* d'origine bactérienne) sont en plus antibactériennes, comme par exemple le 4-hydroxybenzaldéhyde, cela pourrait conforter l'idée d'une autorégulation des symbiotes ²⁹⁷.

A contrario, les genres *Codakia* et *Lucina* pourraient aussi produire des molécules antibiotiques similaires voire identiques pour réguler leurs symbiotes ²⁰.

Il serait donc intéressant de réaliser une étude métabolomique en LC-HRMS avec déréplication sur *C. orbicularis* et *L. roquesana* pour comparer les métabolomes. Cela permettrait de savoir s'il existe des différences métabolomiques entre des bivalves d'une même famille mais de genres différents. *L. roquesana* n'ayant subi aucune étude chimique selon la littérature jusqu'à ce jour, des structures chimiques originales pourraient être mise également en évidence. Des variations biochimiques chez un Mollusque peuvent aussi apparaître en fonction du cycle de vie, de l'habitat, de l'activité métabolique, de la période de reproduction ou du climat ^{298, 299, 300, 301}. Il serait alors intéressant de réaliser l'analyse déréplicative de réplicats d'extraits bruts de branchies, échantillons sur une ou deux années complètes, pour se rendre compte des variations dans la production de molécules avant, pendant et après la période de reproduction des bivalves.

¹⁷⁵ Gros, O.; Darrasse, A.; Durand, P.; Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2324–2330.

²⁹⁷ Cámara, M.; Williams, P.; Hardman, A. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 667–676.

²⁰ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.

²⁹⁸ Marsden, I.; Weatherhead, M. A. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **1999**, *33*, 611–622.

²⁹⁹ Lubet, P.; Brichon, G.; Besnard, J. Y.; Zwingelstein, G. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *82*, 425–431.

³⁰⁰ James, M. R.; Weatherhead, M.; Ross, H. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **2001**, *35*, 73–86.

³⁰¹ Freitas, L.; Labarta, U. *Comp. Biochem. Physiol.* **2002**, *132*, 453–461.

XI. EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES MOLECULES ISOLEES DE LA BRANCHIE DE *CODAKIA ORBICULARIS*.

1. Résultats des activités antibactériennes des composés isolés.

a) Évaluation de l'activité antibactérienne des composés isolés des branchies de *C. orbicularis* par la méthode de diffusion.

Dans cette partie l'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules (**87**), (**89 - 92**) (**Figure 92**) a été réalisée sur les bactéries de Gram $-$, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, et de Gram $+$, *Micrococcus luteus* (ATCC 10240). Le protocole est décrit dans la partie expérimentale III-2-a de cette thèse.

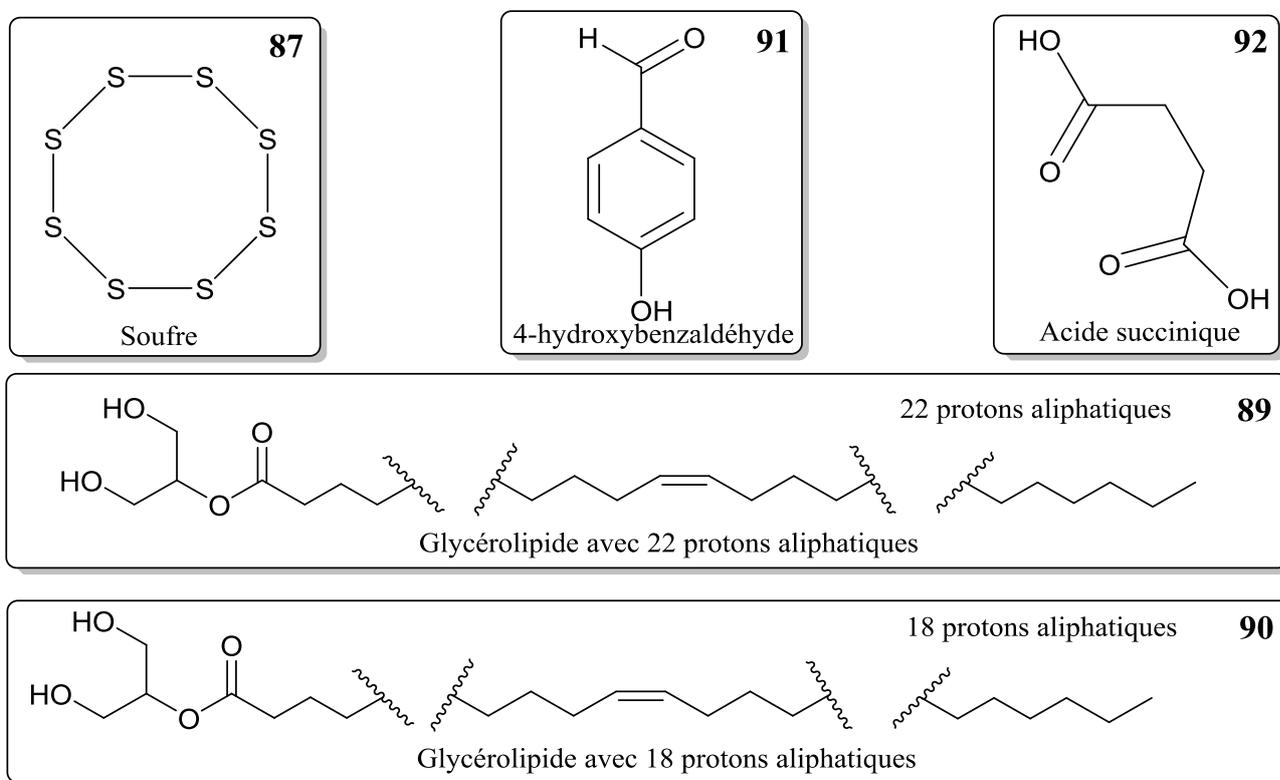


Figure 92. Molécules isolées 87, 89 - 92 dont l'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion des disques.

Les résultats obtenus pour les tests antibactériens des composés **87**, **89 - 92** sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12. Évaluation de l'activité antibactérienne des composés **87, 89 - 92**. Témoins positifs: AMC = amoxicilline, VA = vancomycine. Activité: (+); Inactivité (-).

Composés	Espèce bactérienne	Masse de produit (µg)	Diamètre du halo (mm)	Activité du composé
87	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	530	10	+
	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	1580	12	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	910	26	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	2910	36	
	Témoin négatif sur <i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	AcOEt	0	
	Témoin négatif sur <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	AcOEt	0	
89	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	38	12 - 14	+
	<i>K. pneumonia</i> (ATCC 700603)	38	10	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	Non testé	Non testé	Non testé
90	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	38	12 - 14	+
	<i>K. pneumonia</i> (ATCC 700603)	38	10	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	Non testé	Non testé	Non testé
	Témoin négatif sur <i>K. pneumonia</i> (ATCC 700603)	AcOEt	8	
	Témoin négatif sur <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	AcOEt	7	
91	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	25	20	+
	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	33	20	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	25	20	
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	33	22	
	Témoin négatif sur <i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	AcOEt	14	
	Témoin négatif sur <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	AcOEt	0	
92	<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	-	-	-
	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	-	-	
	Témoin positif sur <i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	VA (50µg)	20	
	Témoin positif sur <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	AMC (50µg)	22	

L'activité antibactérienne du soufre (**87**) a été évaluée dans ce travail et s'est avérée positive (**Figure 93**).

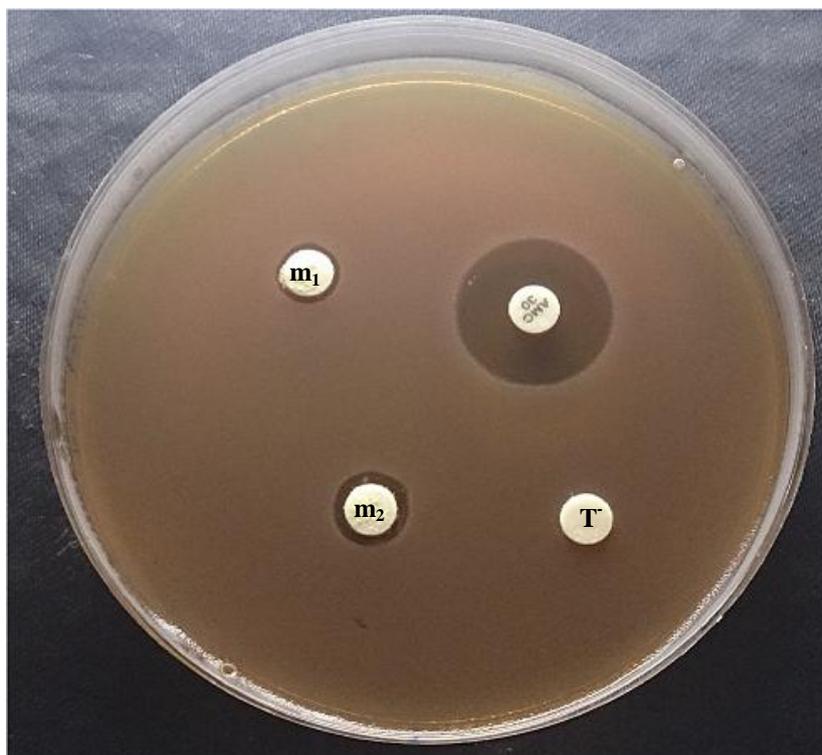


Figure 93. Bio-essais du composé (87) sur la culture d' *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram⁻). T⁺ : pastille de cellulose contenant 20 μ L d'acétate d'éthyle. AMC: Antibiogramme d' amoxiciline de 50 μ g (témoin positif). Pastilles de cellulose contenant $m_1= 0,53$ mg et $m_2= 1,58$ mg du composé (87).

L'accumulation du soufre a déjà été observée dans les cellules des bactéries *Thiobacillus* sp.³⁰² et dans les symbiotes de *C. orbicularis*¹⁷⁶. Cette molécule est également présente dans les bactéries du genre *Streptomyces*³⁰³. La culture des bactéries *Legionella pneumophila* est favorisée dans milieu enrichi en cystéine et dans ces conditions les bactéries produisent également du soufre élémentaire responsable de leur autoinhibition³⁰⁴. L'origine bactérienne du soufre (87) pourrait faire de cette molécule une excellente candidate impliquée dans la régulation des symbiotes de *C. orbicularis* mais contrairement aux *Legionella*, les symbiotes sont des bactéries sulfo-oxydantes²⁰⁹. Il serait donc peu probable que le soufre élémentaire soit responsable de leur régulation.

³⁰² Schedel, M.; Trtiper, H. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *124*, 205–210.

¹⁷⁶ Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2101–2109.

³⁰³ Yagi, S.; Kitai, S.; Kimura, T. *Appl. Microbiol.* **1971**, *22*, 157–159.

³⁰⁴ Inoue, H.; Kawano, G.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4809–4811.

²⁰⁹ Distel, D. L.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Giovannoni, S. J.; Pace, B.; Pace, N. R.; Stahl, D.; Felbeck, H. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 2506–2510.

Les monoglycérolipides **89** et **90** ont présenté une activité antibactérienne dans cette étude contre *E.coli* ATCC 35218 et *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, toutes deux des Gram⁻ (**Figure 94**).

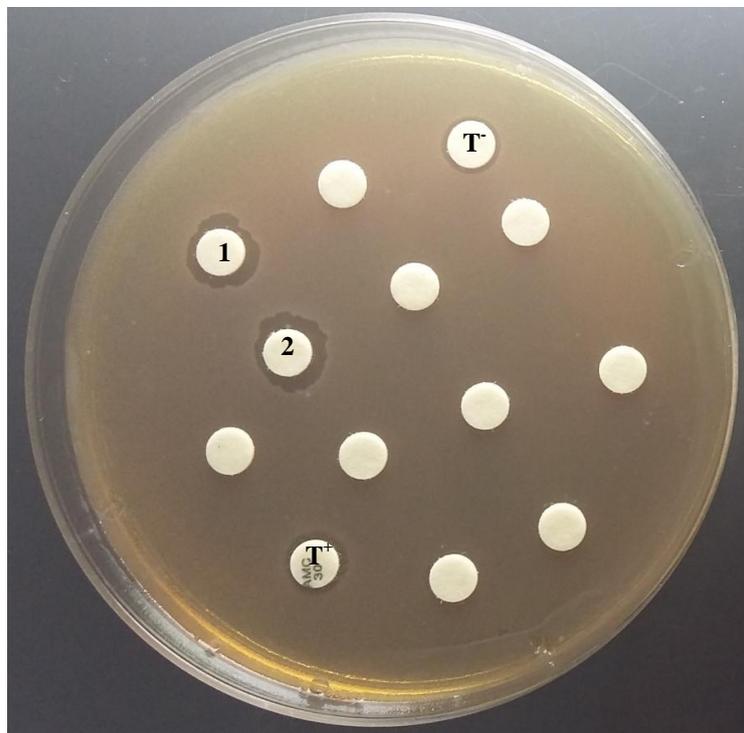


Figure 94. Bio-essais des composés (89 et 90) sur la culture d' *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram⁻). T⁺ : pastille de cellulose contenant 20 µL d'acétate d'éthyle. T⁺: Antibiogramme d'amoxiciline de 50µg (témoin positif).

Les pastilles de cellulose **1** et **2** contiennent respectivement 37,5 µg des composés **89** et **90**. Les pastilles vierges contiennent des molécules ne présentant pas d'activité antibactérienne.

Les glycérolipides ont montré des activités biologiques diverses. L' α -monoglycéride de l'acide octadéca-6Z,9Z,12Z,15Z-tetraénoïque (ODTA) est un inhibiteur de la cyclooxygénase II alors que la 1-*O*-palmitoyl-3-*O*-(60-sulfo- α -D-quinovopyranosyl)-*sn*-glycérol est un algicide puissant²³⁴. Le monoglycéride dodécylglycérol est un antibactérien³⁰⁵ tout comme **89** et **90**. Les lipides antimicrobiens provoquent directement une lyse des cellules bactériennes et pourraient représenter une solution efficace contre les résistances développées par certaines bactéries face aux antibiotiques^{306, 307}.

²³⁴ Hirao, S.; TARA, K.; Kuwano, K.; Tanaka, J.; Ishibashi, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 372–374.

³⁰⁵ Ved, H. S.; Gustow, E.; Mahadevans, V.; Pieringer, R. A. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8115–8121.

³⁰⁶ Yoon, B. K.; Jackman, J. A.; Kim, M. C.; Cho, N. J. *Langmuir* **2015**, *31*, 10223–10232.

³⁰⁷ Davies, J.; Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433.

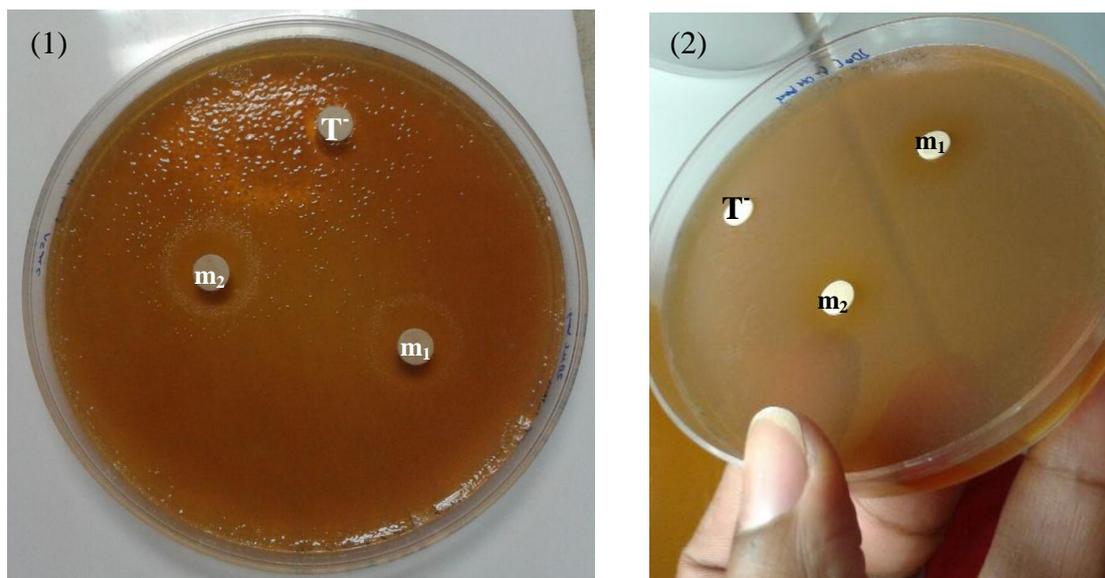


Figure 95. Bio-essais de la 4-hydroxybenzaldéhyde (91) sur la culture de *Micrococcus luteus* (ATCC 10240 , Gram⁺) (1) et sur la culture *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram⁻) (2).

T⁺ : pastille de cellulose contenant 20 µL d'acétate d'éthyle. Pastilles de cellulose contenant m₁ = 25 µg et m₂ = 33 µg de la 4-hydroxybenzaldéhyde (91) et respectivement deux halos d'inhibition autour de ces dernières.

Le 4-hydroxybenzaldéhyde (91) a montré une activité antibactérienne contre les bactéries *E. coli* et *M. luteus* (Figure 95). Dans la littérature cette molécule est antibactérienne contre les Gram⁺ et les Gram⁻ ³⁰⁸. Le 4-hydroxybenzaldéhyde (91) a déjà été isolée de champignons endophytes ²⁴⁷, de plantes ³⁰⁹ mais aussi de bactéries marines ²⁴⁶. Cette molécule pouvant donc être d'origine bactérienne et du fait qu'elle présente des activités antibactériennes, elle pourrait être impliquée dans la régulation des symbiotes de *Codakia orbicularis* (autorégulation des symbiotes). En effet, Andersen et ses collaborateurs ont présenté en 1974 ²⁴⁴, le 4-hydroxybenzaldéhyde comme une molécule responsable de l'auto inhibition de bactéries marines du genre *Chromobacterium* et comme agent antibiotique pour les autres types de bactéries. L'acide succinique (92) n'a présenté aucune activité antibactérienne. Il a néanmoins été décrit comme ayant une très faible activité antibactérienne contre les bactéries du genre *Campylobacter* ³¹⁰.

Les molécules 87 et 91 présentant une activité antibactérienne ont également été respectivement isolées et identifiées des branchies de *L. roquesana* (voir schéma 19).

³⁰⁸ Isnansetyo, A.; Kamei, Y. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1239–1248.

²⁴⁷ Goutam, J. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2016**, *4*, 1-7.

³⁰⁹ Fernández, M. A.; García, M. D.; Sáenz, M. T. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *53*, 11–14.

²⁴⁶ Wratten, S. J.; Wolfe, M. S.; Andersen, R. J.; Faulkner, D. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 411–414.

²⁴⁴ Andersen, R. J.; Wolfe, M. S.; Faulkner, D. J. *Mar. Biol.* **1974**, *27*, 281–285.

³¹⁰ Skrivanová, E.; Molatová, Z.; Matenová, M.; Houf, K.; Marounek, M. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *144*, 367–371.

b) Évaluation de l'activité antibactérienne des composés isolés des branchies de *C. orbicularis* par concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide.

Les dérivés de nucléosides sont plutôt connus pour leurs activités antivirales et anticancéreuses ²⁷⁵. La thymidine (**93**) avait été isolée d'une fraction active contre une tumeur solide (lignée cellulaire C-38) par Ralifo et ses collaborateurs ³¹¹. Lorsque ces chercheurs ont testé la thymidine pure (**93**) sur cette même lignée, aucune activité n'a été décelée indiquant que d'autres molécules non isolées étaient responsables de l'activité de la fraction. En revanche, Escobar et ses collaborateurs ont prouvé que la configuration de la thymidine (**93**) influait sur l'activité antivirale de ses produits dérivés ³¹². La 3'-O-acétylthymidine (**96**) a été décrite comme présentant une activité cytotoxique sur des lignées du cancer du foie (Hep G2 et Hep 3B) alors que son homologue la 5'-O-acétylthymidine (**94**) n'en présente pas ²⁵⁵. L'uridine (**97**) est connue depuis longtemps comme molécule anticancéreuse ²⁷⁷. La co-administration de l'uridine avec du tamoxifen permet d'éviter l'accumulation de TAG dans le foie en favorisant l'activation de voies métaboliques pour la biosynthèse de phospholipides membranaires ³¹³. La 5'-O-acétyluridine (**95**) présente de faibles activités antivirales et cytotoxiques selon la littérature ²⁷⁰. Les seuls dérivés nucléosidiques présentant une activité antibactérienne à ce jour sont rassemblés dans la revue de Kimura et Bugg ³¹⁴ à savoir la toyocamycine et ses analogues, les tunicamycines, les liposidomycines et les mureidomycines. Les fragments de structures de **98** comme la lactone et les indolones ont déjà montré respectivement des activités antibactériennes ²⁹² et neuroprotectrices ³¹⁵. En ce qui concerne les thiazines diverses activités biologiques sont répertoriées ^{291, 294, 316}. Les

²⁷⁵ Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447–464.

³¹¹ Ralifo, P.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 33–38.

³¹² Escobar, R.; Carmona, P.; Rodríguez-Casado, A.; Molina, M.. *Talanta* **1999**, *48*, 773–780.

²⁵⁵ Ahmed, A. F.; Wu, M. H.; Wu, Y. C.; Dai, C. F.; Sheu, J. H. *J. Chinese Chem. Soc.* **2006**, *53*, 489–494.

²⁷⁷ Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A. M. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 412–434.

³¹³ Le, T. T.; Urasaki, Y.; Pizzorno, G. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *15*, 27.

²⁷⁰ Jia, Y.-L.; Guan, F.-F.; Ma, J.; Wang, C.-Y.; Shao, C.-L. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 227–230.

³¹⁴ Kimura, K.; Bugg, T. D. H. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 252–273.

²⁹² Mazur, M.; Skrobiszewski, A.; Gładkowski, W.; Podkowik, M.; Bania, J.; Nawrot, J.; Klejdysz, T.; Wawrzęńczyk, C. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *72*, 489–496.

³¹⁵ Johnson, K.; Liu, L.; Majdzadeh, N.; Chavez, C.; Chin, P. C.; Morrison, B.; Wang, L.; Park, J.; Chugh, P.; Chen, H. M. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 538–548.

²⁹¹ Davis, R. A.; Duffy, S.; Fletcher, S.; Avery, V. M.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9608–9613.

²⁹⁴ Aiello, A.; Fattorusso, E.; Luciano, P.; Mangoni, A.; Menna, M. *European J. Org. Chem.* **2005**, *23*, 5024–5030.

³¹⁶ Fu, P.; Macmillan, J. B. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 548–551.

benzothiazines pour citer un exemple sont des molécules antibactériennes actives contre les bactéries Gram⁺ et les Gram⁻³¹⁷.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules **93** - **98** (**Figure 96**) a été réalisée, dans ce travail, sur les bactéries Gram positif *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Streptococcus pneumonia* ATCC 49619 ainsi que sur les bactéries Gram négatif *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 35218 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

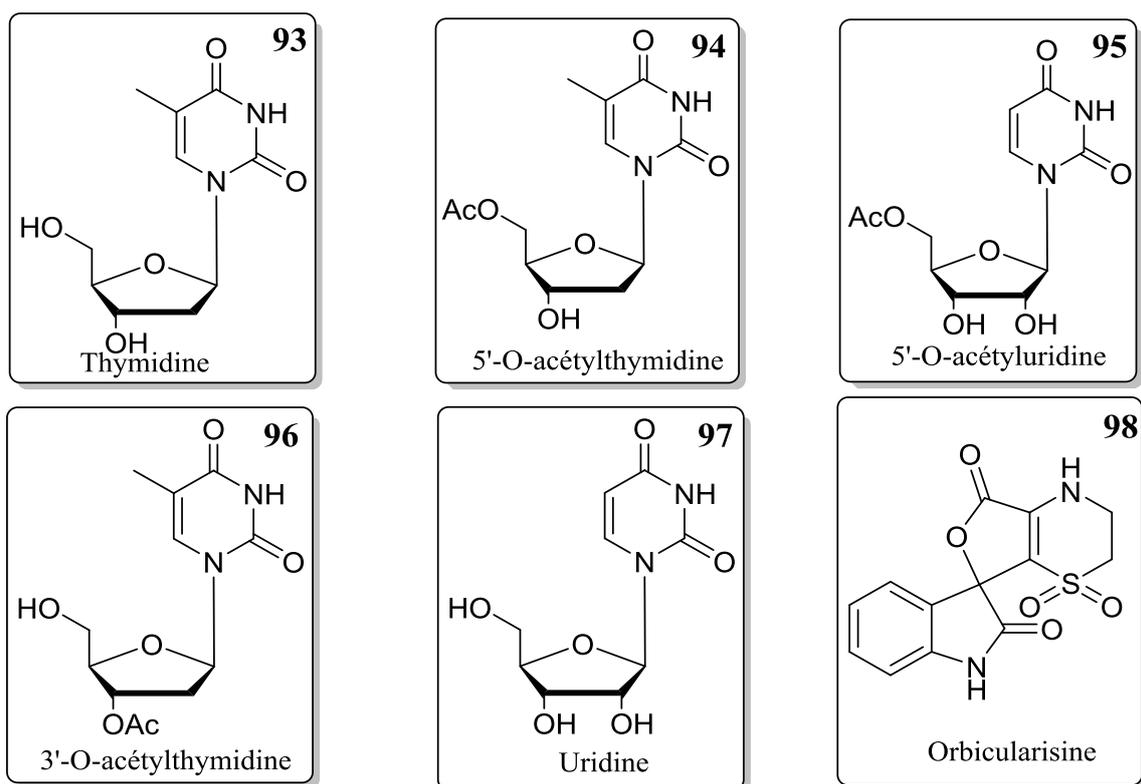


Figure 96. Molécules isolées **93** - **98** dont l'activité antibactérienne a été évaluée par CMI en milieu liquide.

Le mode opératoire est décrit dans la partie expérimentale III-2-b de cette thèse. Aucun de ces composés n'a présenté d'activité. La thymidine **93** n'a présenté aucune activité antibactérienne bien qu'isolée de fractions actives. Cela indique que les activités antibactériennes décelées dans les fractions F13, F17 et F18 sont dues à d'autres molécules non isolées. L'activité antibactérienne des composés **94** - **97** a également été évaluée et aucune activité n'a été décelée.

³¹⁷ Goyal, K.; Gautam, N.; Khandelwal, N.; Gautam, D. C. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2013**, *32*, 81–97.

L'orbicularisine (**98**) n'a montré aucune activité contre les bactéries, Gram positif ou Gram négatif, répertoriées au début de ce chapitre.

Une hypothèse a alors été envisagée : l'activité antibactérienne de l'extrait brut aurait pu nécessiter la présence de l'ensemble de ces molécules. Elles ont donc été rassemblées, pour simuler la composition des fractions actives desquelles elles avaient été isolées (F14 - F18), puis testées, mais aucune activité antibactérienne n'a été décelée.

Les molécules polaires **92 - 98** présentes dans les fractions F14 - F18 ne sont pas responsables de l'activité antibactérienne de leurs fractions d'origine. Cette activité est certainement liée à d'autres molécules très minoritaires ou aux molécules apolaires de ces fractions. Il n'est pas rare que l'activité des extraits ne se retrouve pas dans les molécules pures. Cela peut-être dû aussi bien, à la perte des principes actifs instables lors des purifications qu'à des phénomènes de synergies ³¹⁰.

c) **Évaluation de l'orbicularisine (98) sur un panel de kinases et des lignées cellulaires HCT116 et U87-MG.**

L'orbicularisine (**98**) a également été évaluée sur un panel de kinase (**Annexe XXXIII**) par Stéphane Bach (station biologique de Roscoff) à savoir sur Hs_CDK2/CyclinA, Hs_CDK5/p25, Hs_CDK9/CyclinT, Hs_RIPK3, Hs_Haspin, Hs_AuroraB, Ld_TLK, Hs-Pim1, Ssc_GSK3 a/b, Lm_CK1 et Rn_Dyrk1A. Une activité résiduelle supérieure à 60% a été notée pour 50 µg/mL d'orbicularisine (**98**) mais les solutions de molécules qui inhibent fortement les kinases (activité résiduelle proche de 100%) ont des concentrations de l'ordre du nanomolaire ³¹⁸. L'utilisation de solutions d'orbicularisine (**98**) allant jusqu'à des concentrations de 100 µM n'a pas montré d'activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses du colon HCT116 et des cellules cancéreuses du glioblastome U87-MG. Généralement les molécules considérées comme fortement cytotoxiques le sont à des concentrations inférieures à 2 µM ³¹⁹. D'autres activités biologiques pourraient être évaluées comme par exemple l'activité antioxydante de l'orbicularisine (**98**). La synthèse totale du régioisomère B (voir la page 113 et l'**Annexe XXXII**) de l'orbicularisine (**98**) pourrait peut être permettre de découvrir la bioactivité du produit (**98**) comme il a été montré pour les thiaplidaquinones A et B ³²⁰. L'évaluation biologique de dérivés synthétisés à partir du squelette de l'orbicularisine (**98**) est à envisager.

³¹⁰ Ralifo, P.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 33–38.

³¹⁸ Wilkinson, S.; Parker, P.; Nixon, J.S. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 335-337.

³¹⁹ Sandler, J.S.; Colin, P.L.; Hooper, J.N.A.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1258-1261.

³²⁰ Harper, J.L.; Khalil, I.M.; Shaw, L.; Bourguet- Kondracki, M.L.; Dubois, J.; *et al. Mar. drugs.* **2015**, *13*, 5102-5110.

2. Conclusion

De façon générale, nous avons remarqué que l'activité antibactérienne diminuait au cours des purifications cela suggère une synergie des molécules antibactériennes présentes dans l'extrait brut ³²¹.

Par ailleurs, certaines des molécules faiblement antibactériennes isolées pourraient être présentes dans les branchies pour lutter contre des bactéries pathogènes ou opportunistes provenant de l'environnement. L'ensemble des résultats des activités antibactériennes des molécules isolées dans cette étude est présenté dans le tableau ci-dessous (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 13. Récapitulatif sur l'activité antibactérienne des molécules isolées dans cette étude.
+ activité antibactérienne - aucune activité antibactérienne.

Nom et numéro du produit	Activité antibactérienne
Soufre (87)	+
Triglycéride SOL (88)	Pas évaluée
<i>sn</i> -2-monoglycérolipide (89)	+
<i>sn</i> -2-monoglycérolipide (90)	+
4-hydroxybenzaldéhyde (91)	+
Acide succinique (92)	-
Thymidine (93)	-
5'-O-acétylthymidine (94)	-
5'-O-acétyluridine (95)	-
3'-O-acétylthymidine (96)	-
Uridine (97)	-
Orbicularisine (98)	-

³²¹ Katsuoka, M.; Ogura, C.; Etoh, H.; Sakata, K. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3043–3044.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3 . PARTIE EXPERIMENTALE

I. INFORMATIONS GENERALES

Les évaporations sous pression réduite se sont déroulées sur Syncore®Polyvap (BUCHI) et sous courant d'azote sur TurboVap®LV (Biotage). Les analyses RMN ont été enregistrées sur un Bruker Avance 500 MHz ou un Bruker Avance 600 MHz (électrode TXI 1.7 mm) (CNRS-ICSN). Les déplacements chimiques en RMN sont relatifs aux signaux résiduels des solvants ($\text{CD}_3\text{OD-}d_4$: δ_{H} 3,31; δ_{C} 49,2/ $\text{DMSO-}d_6$: δ_{H} 2,49; δ_{C} 39,5/ CDCl_3 - d : δ_{H} 7,24; δ_{C} 77,0/ $\text{DMF-}d_7$: δ_{H} 2,74; δ_{C} 30,1). Les spectres infrarouge IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer BX FT-IR, les rotations optiques ont été mesurées avec un polarimètre Anton Paar MCP-300, et les expériences de dichroïsme circulaire sur un spectro-polarimètre Jasco J-810. Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus sur Waters LCT Premier XE en utilisant le mode d'ionisation électrospray et par infusion directe dans la source d'ionisation des composés purs. Les fragmentations ont été réalisées avec les modes d'ionisations électrospray (ESI) et nanospray, sur un Thermo Scientific LTQ-Orbitrap connecté à un système chromatographique Dionex Ultimate 3000. Les molécules apolaires ont été fragmentées sur un Q-TOF 6540 (Agilent) doté d'une source d'ionisation ESI et connecté à un système chromatographique Agilent 1290 Infinity SFC. Les analyses HPLC analytiques ont été conduites sur une chaîne Waters Alliance 2695 équipée de modules séparés dont un spectromètre de masse (Waters ZQ 2000 doté d'un simple quadripôle et d'une source d'ionisation électrospray), un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Waters 2420) et un détecteur à barrettes diodes DAD (Waters 996). Les HPLC semi-préparatives ou préparatives ont été réalisées sur une HPLC Auto Prep system (Waters 600 controller and Waters 600 pump) équipé d'un détecteur à photodiode (Waters 996). Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été faites sur des plaques CCM commerciales (Silice 60 F254 TLC, 20 x 20 mm, épaisseur 0.25 mm, Merck) et ont été visualisées sous UV (254nm and 366nm). Les purifications chromatographiques ont été réalisées sur gel de silice (MERCK silica gel, 70-230 mesh ASTM) et les flash sur colonnes Redisep®Rf (220-gram, 69-2203-422 TELEDYNE Isco). Ces dernières ont été menées avec de l'hexane (CAS number 110-54-3), de l'acétate éthylique (CAS number 141-78-6) et du méthanol (CAS number 67-56-1).

II. MODELE BIOLOGIQUE.

Les bivalves *Codakia orbicularis* ("palourde blanche") et *Lucina roquesana* ("soudon") ont été collectés par lot de 200 individus dans les sédiments des herbiers à *Thalassia testudinum* respectivement en Guadeloupe et en Martinique (**Figure 97**).



Figure 97. Photographie de l'herbier à *Thalassia testudinum* en Guadeloupe (Photo F. Goudou, 2013).

Après les récoltes les lucines ont été congelées vivantes à - 20°C dans un délai de deux heures post récolte. Plusieurs récoltes (**Tableau 14**) ont été réunies pour augmenter la masse de branchies disséquées (**Figure 98.d**) nécessaire aux études chimiques.

Tableau 14. Période de récoltes de *C. orbicularis* et *L. pensylvanica*.

Noms des bivalves	Date de la récolte des bivalves									
	24	28 Mai	13	05	24	01	20-24	26-30	18-20	15-24
<i>Codakia orbicularis</i>	Avril 2014	2014	Août 2014	Novembre 2014	Février 2015	Mai 2015	Août 2015	Octobre 2015	Novembre 2015	Décembre 2015
<i>Lucina pensylvanica</i>	27 avril 2014	27 Juillet 2014	---	---	---	---	---	---	---	---

Après avoir coupé les muscles adducteurs des bivalves, les deux valves s'ouvrent pour laisser voir la cavité palléale contenant les branchies, le manteau, le pied et la masse viscérale (**Figure 98.b et Figure 98.d**). Seules les branchies ont été disséquées et conservées à -20°C jusqu'à l'extraction chimique.

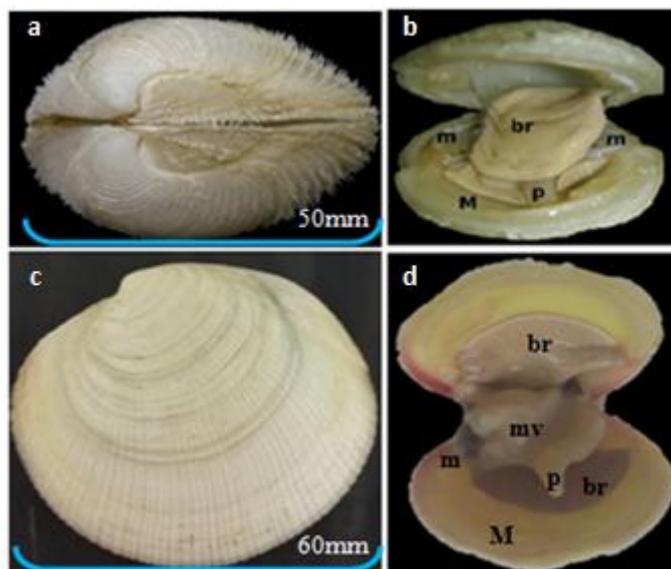


Figure 98. Photographie de *L. roquesana* coquille fermée (a) (Marlo F. Krisberg, 2008) et ouverte (b) Photographie de *C. orbicularis* coquille fermée (c) et ouverte (d).

Organes visibles sur les photos des bivalves ouverts (b) et (d): m: muscle adducteur, br: branchie, M: manteau, p: pied, mv: masse viscérale.

III. DE L'EXTRACTION A LA CARACTERISATION ET LES BIO-ESSAIS.

Les extractions des branchies de *C. orbicularis* et de *L. roquesana* ont été réalisées successivement pour éviter toute confusion au niveau des extraits. Ceci est un biais pour la comparaison des profils des extraits bruts de branchies des lucines.

Il en a été de même pour le reste de l'étude chimique pour éviter d'éventuelles contaminations inter spécifiques.

1. Extraction des branchies.

Plusieurs récoltes de *C. orbicularis* ont été effectuées au cours de l'étude.

Celles d'avril 2014 à mai 2015 ont été traitées séparément alors que celles d'août à décembre 2015 ont été réunies en un lot afin d'augmenter la quantité de matière traitée pour les études chimiques (**Tableau 14**). Ce lot a servi aux purifications qui sont présentées dans ce manuscrit.

Quelque soit la récolte, une fois disséquées, les branchies ont été réparties dans plusieurs erlenmeyers. Elles ont été extraites par de l'acétate d'éthyle AcOEt (250 mL) toutes les 12 heures, durant 48 heures, à température ambiante sous agitation douce.

Les filtrats ont été conservés à 4°C en attendant d'être évaporés sous pression réduite. Les d'extraits bruts ont été placés sous azote et à froid avant d'être fractionnés.

2. Evaluations biologiques.

a) Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de *Codakia orbicularis* par la méthode de diffusion.

Les extraits bruts et les fractions obtenus à partir des récoltes de *C. orbicularis* présentées dans le **Tableau 14** ont été soumis à des tests d'activité antibactérienne (**Schéma 6**).

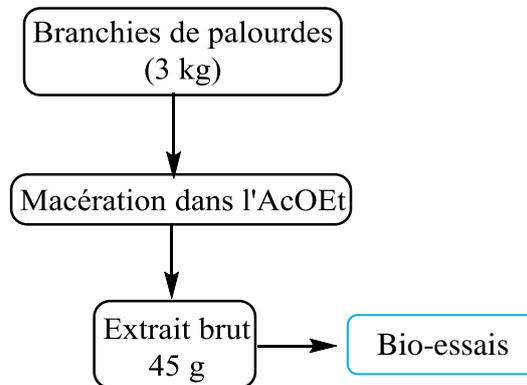


Schéma 6. Extraction des branchies de *C. orbicularis* par de l'acétate d'éthyle jusqu'au bio-essais.

➤ Préparation du milieu de culture des bactéries (milieu nutritif liquide)

- 5 g d'extrait de viande de boeuf (Bioméreux)
- 7,5 g de peptone tryptique
- 2,5 g de NaCl
- 7,5 g d'agar (pour la gélose nutritive solide uniquement)
- 500 mL d'eau distillée

Le pH est ajusté entre 7,2 et 7,4 pour que le milieu de culture soit légèrement basique. Le milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes avant répartition dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

➤ Mise en culture de deux souches de bactéries : *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) et *Micrococcus luteus* (ATCC 10240).

Sous une hotte à flux laminaire, à l'aide d'une anse stérile (**Figure 99.F**), on prélève successivement une colonie des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae* (Gram -) et de *M. luteus* (Gram +), les souches de bactéries ont été fournies par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe (**Figure 99**). Entre chaque prélèvement, l'anse est stérilisée à la flamme. Chaque prélèvement est déposé dans un tube à hémolyse contenant 1 mL du milieu nutritif liquide stérile préalablement préparé :

Tube 1 : prélèvement d'*E. coli* + 1 mL du bouillon nutritif.

Tube 2 : prélèvement de *M. luteus* + 1 mL du bouillon nutritif.

Tube 3 : prélèvement de *K. pneumoniae* + 1 mL du bouillon nutritif.

Un quatrième tube à hémolyse (Tube 4) contient uniquement 1 mL du milieu nutritif : il s'agit du témoin négatif.

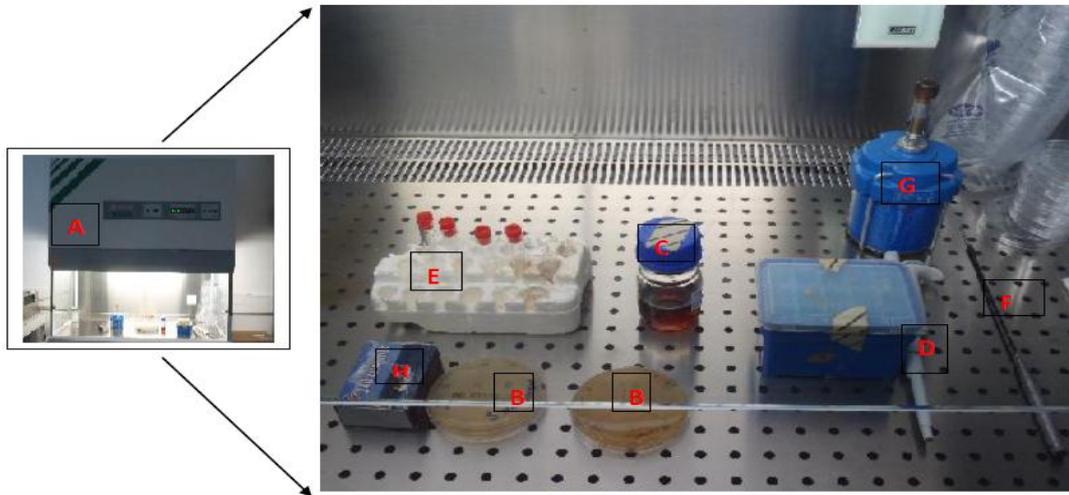


Figure 99. Présentation du matériel pour réaliser les bio-essais.

Sous une hotte à flux laminaire (A) sont disposés deux boîtes de Pétri contenant chacune les colonies d'une souche bactérienne (B). Une colonie de bactéries est prélevée à l'aide d'une anse stérile (F) et déposée dans un tube à hémolyse (E). On y rajoute aussi 1 mL de milieu nutritif liquide (C), à l'aide d'une micropipette P1000 et de cônes (D). La bonbonne de gaz (G) et les allumettes (H) seront utilisées pour stériliser l'anse avant que cette dernière ne soit de nouveau utilisée.

L'incubation des trois tubes à hémolyse dure 24h à 37°C pour obtenir une culture en phase plateau. Après incubation, le tube 4 permet de voir si le milieu nutritif liquide a été contaminé par d'autres souches de bactéries lors des manipulations.

➤ Réalisation des bio-essais

Le protocole du schéma 7 a été réalisé pour chaque culture bactérienne.

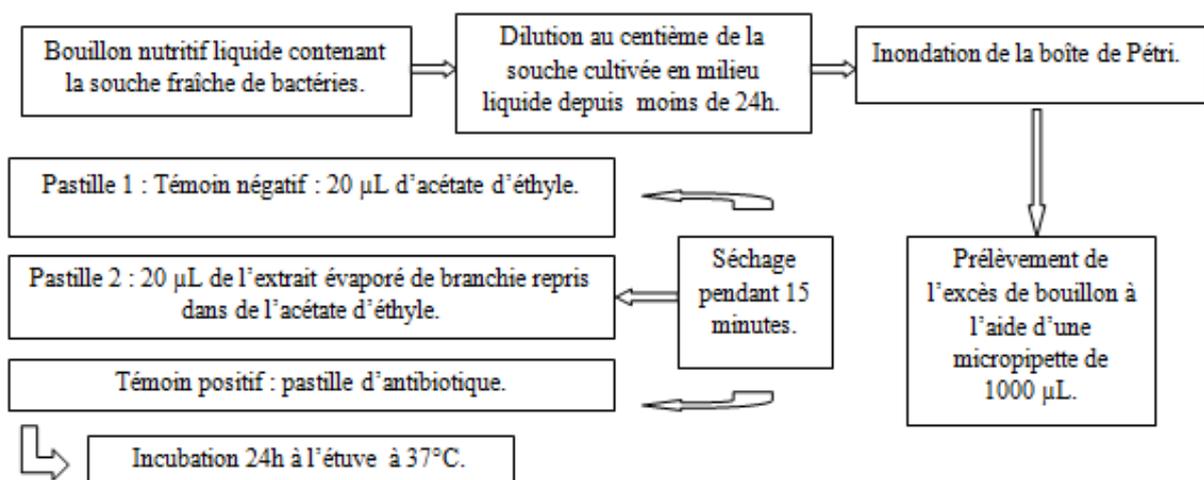


Schéma 7. Protocole pour réaliser les bio-essais.

Le protocole du **schéma 7** est illustré par la **Figure 100**.

Sous une hotte à flux laminaire, on ensemence en tapis les boîtes de Pétri remplies de gélose nutritive solide (même composition que le milieu nutritif liquide avec de l'agar (15 g/L) en plus), avec les cultures de moins de 24h (overnight) en phase plateau diluées au centième d'*Escherichia coli* et de *Micrococcus luteus* (**Figure 100.B**).

Deux pastilles de nitrocellulose (6 mm) et une pastille d'antibiotique (Gram⁻: Collistine de 50 µg ou Amoxicilline de 50 µg/ Gram⁺: Vancomycine de 50 µg) sont disposées par boîte de Pétri.

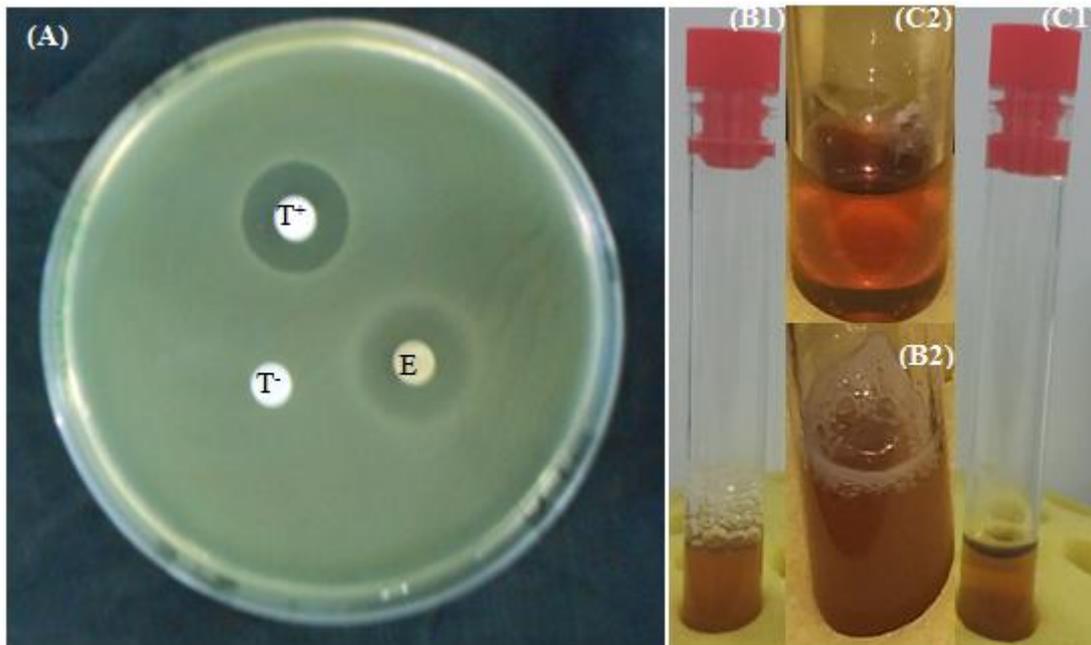


Figure 100. (A) Présentation d'une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive solide ensemencée depuis 24h par une culture bactérienne en phase plateau diluée (B1, B2). Trois pastilles de cellulose sont disposées sur la gélose nutritive solide: T⁻ (témoin négatif), T⁺ (antibiotique) et E (extrait de branchies). Milieu nutritif dépourvu de bactéries (C1, C2).

À l'issue de l'incubation, un halo d'inhibition (dont le diamètre mesuré) de la croissance bactérienne apparaîtra autour de la pastille de cellulose contenant l'extrait brut si ce dernier présente une activité anti-bactérienne.

Ce même protocole sera utilisé plus loin dans ce chapitre pour évaluer l'activité antibactérienne des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait brut de *C. orbicularis* sur colonne de silice.

b) Activité anti-bactérienne des composés isolés évaluée par CMI en milieu liquide.

➤ **Isolement et culture de souches bactériennes.**

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées pour les bio-essais en système hétérologue des composés isolés: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 appartenant aux bactéries Gram positif et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 35218 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922 appartenant aux groupes de bactéries Gram négatif. Elles ont été cultivées sur un milieu Mueller-Hinton liquide à 37°C pour réaliser l'ensemble des tests d'activité.

➤ **Les bio-essais.**

Un composé a été dissout dans 100 µL de DMSO puis dilué avec 900 µL d'eau distillée (Solution S1). À partir de cette solution, huit solutions à des concentrations différentes ont été préparées: 2560 µg/mL (S2), 1280 µg/mL (S3), 640 µg/mL (S4), 320 µg/mL (S5), 160 µg/mL (S6), 80 µg/mL (S7), 40 µg/mL (S8) et 20 µg/mL (S9). Les suspensions microbiennes ont été réalisées dans des plaques stériles de culture de 96 puits (Cat.No.655180, CELLSTAR). Chaque puits a reçu 178 µL de milieu Mueller-Hinton, 20 µL de l'une des solutions S2-S9 et 2 µL d'une culture bactérienne âgée de 24h. Ainsi, ont été obtenues dans chaque puits des solutions de concentrations 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL et 2 µg/mL pour le calcul des concentrations minimales inhibitrices des bactéries (CMI). Le témoin négatif était constitué de 178 µL de milieu Mueller-Hinton, de 2µL d'inoculum et de 20 µL de la solution S1 (dépourvue de composé). Le témoin positif a été préparé avec 180 µL de milieu Mueller-Hinton et 20 µL de la solution S0 (100 µL de DMSO + 900µL d'eau distillée), pour vérifier que l'inhibition de la croissance des bactéries n'est pas liée à la présence du DMSO de la solution S0. Les bactéries devraient donc se développer normalement. La microplaque de 96 puits a été incubée pendant 24 heures à 37°C puis l'inhibition (milieu translucide non turbide) ou la croissance des bactéries (turbide) a été évaluée³²². Le même protocole a été appliqué pour chaque souche bactérienne et pour chaque molécule parmi **93 - 98**. Pour mimer les conditions de l'extrait brut et vérifier si une synergie des molécules opère pour obtenir une activité antibactérienne, 10 µL de chacune des solutions S1 préparées par molécules isolées ont été réunis selon des combinaisons différentes. 20 µL des solutions résultantes ont été déposés sur une pastille de cellulose et l'activité

³²² Singh, U. P.; Pathak, M.; Dubey, V.; Bhat, H. R.; Gahtori, P.; Singh, R. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 572–583.

antibactérienne des mélanges formés a également été évalué au regard du protocole du **schéma 7**. Le témoin négatif de cette dernière expérience était 20µL d'une solution contenant 180 µL d'eau distillée et 20 µL de la solution S0.

Les autres composés composés **87-92** ont subi les bio-essais avec la méthode des disques à diffusion modifiée par Brinkhoff *et al* (2004)³²³, méthode utilisée préalablement pour l'extrait brut et les fractions (**Schéma 7**).

3. Profil HPLC de l'extrait brut de branchies de *C. orbicularis*.

Avant l'analyse HPLC, l'extrait brut repris dans 1 mL d'un mélange d'eau ultra-pure/ Acétonitrile (ACN) : 50/50 a été dégraissé sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE) Sepack C18 (WATERS corporation).

Cette colonne a été préalablement équilibrée par le passage d'1 mL de méthanol (à 100 %) suivi de 2 mL d'eau ultra-pure.

Le profil HPLC optimisé de l'extrait brut dégraissé obtenu a été réalisé dans les conditions suivantes: colonne Atlantis T₃ C₁₈ (3 µm, 4,6*75 mm), débit de 0,5 mL/min pendant 20 minutes avec une détection DAD entre 210 et 600 nm (**Tableau 15**).

Tableau 15. Gradient permettant d'obtenir une séparation chromatographique optimale de l'extrait brut de *Codakia orbicularis* sur la colonne Atlantis T₃ C₁₈ (3 µm, 4,6*75 mm).

Solvant B (%)	2	10	20	30	40	50	80	100
Temps (minutes)	0	2	3	4	5	10	15	18

Ce gradient a été transposé, à l'aide du calculateur de Veuthey, sur la colonne Atlantis T₃ C₁₈ (5 µm, 4,6*150 mm) avec un débit de 1 mL/min car seule la colonne préparative Atlantis T₃ C₁₈ (5 µm, 19*150 mm) (HPLC A*) était disponible pour les futures purifications (**Tableau 16**).

Tableau 16. Gradient transposé sur la colonne Atlantis T₃ C₁₈ (5 µm, 4,6*150 mm) (HPLC A*).

Solvant B (%)	0	10	40	50	80	100	100
Temps (minutes)	0	4	10	20	30	36	40

³²³ Brinkhoff, T.; Bach, G.; Heidorn, T.; Liang, L.; Schlingloff, A.; Simon, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2560–2565.

4. Fractionnement de l'extrait brut de *C. orbicularis* .

Le fractionnement de l'extrait brut de branchie a été réalisé à l'aide d'une gamme de solvants éluants allant de l'hexane au méthanol.

Tableau 17. Mise en évidence des quantités obtenues (branchies/ extraits bruts) lors des différentes récoltes de *Codakia orbicularis*. Les numéros des colonnes chromatographiques sur gel de silice (CSC) qui ont été utilisées pour fragmenter les extraits bruts sont également indiqués.

Dates des récoltes	24 Avril 2014	28 Mai 2014	13 Août 2014	05 Novembre 2014	01 Mai 2015	Août- Décembre 2015
Quantités de branchies (g)	255	414	514	325	365	3000
Numéros des colonnes CSC	CSC1	CSC2	CSC3	CSC4	CSC5	CSC6
Quantités d'extraits bruts (g)	2,90	3,70	3,39	2,45	3,50	45

Un contrôle analytique par CCM en sortie de colonne a permis de collecter les fractions en fonction des tâches observées.

Au total six colonnes chromatographiques sur gel de silice (CSC) ont été réalisées au cours de l'étude (**Tableau 17**).

La première colonne de silice (CSC1) a essentiellement permis de repérer qualitativement les fractions actives en soumettant les fractions obtenues en sortie de colonne au même test d'activité que l'extrait brut (**voir Chap3-III-2-a**).

La CSC3 a permis une évaluation semi-quantitative des fractions actives repérées avec la CSC1. Les colonnes chromatographiques CSC2, CSC4 et CSC5 ont été réalisées pour accumuler la matière nécessaire pour les évaluations biologiques.

Afin de réaliser les études chimiques, les quantités initiales de branchies de bivalves ont dues être significativement augmentées (collecte d'août à décembre 2015, CSC6, **Tableau 17**) pour passer de 3 g d'extrait brut à 45 g (**Schéma 8**).

Fractions actives

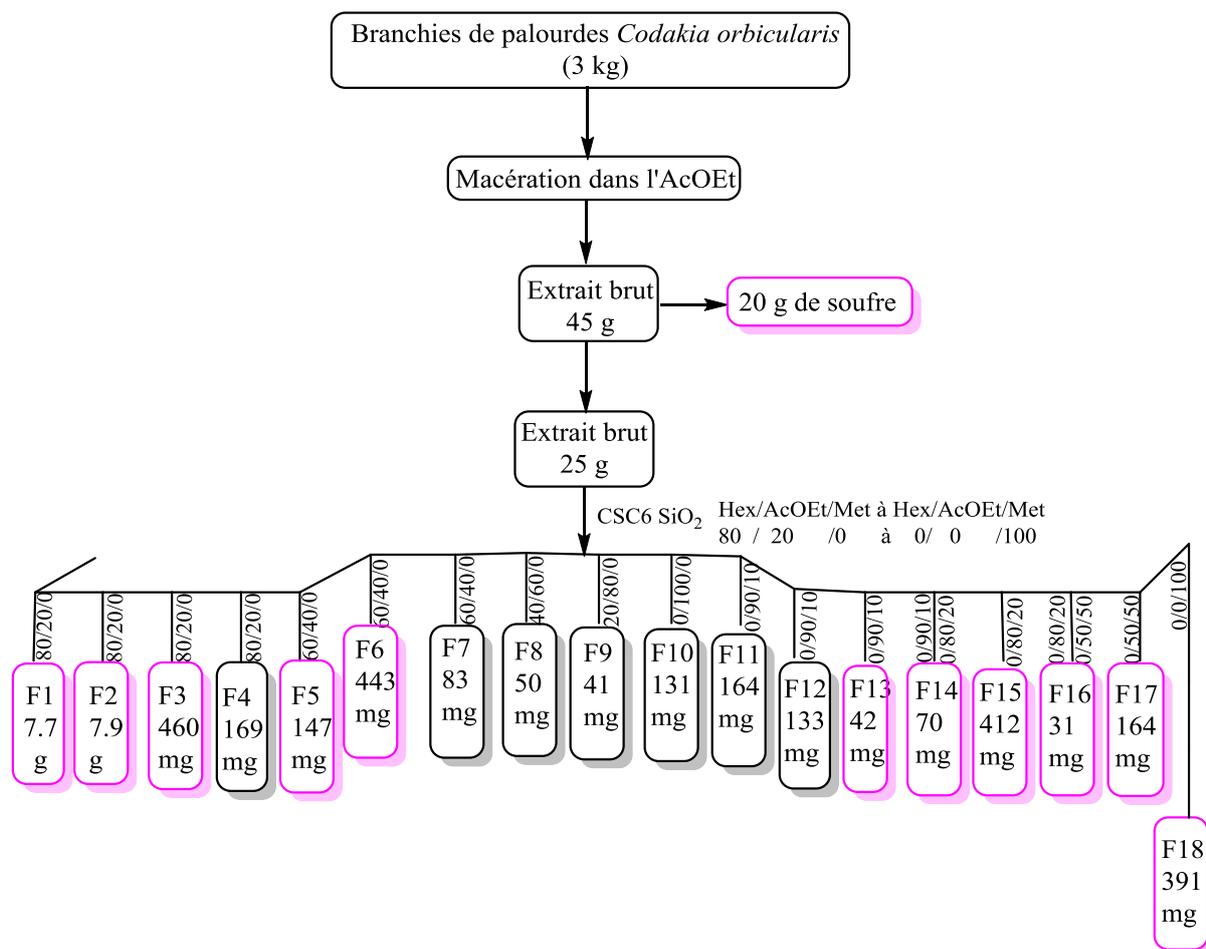


Schéma 8. Extraction des branchies de *Codakia orbicularis* et fractionnement de l'extrait brut obtenu (CSC6). Les fractions présentant une activité antibactérienne sur *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* (voir protocole schéma 2) sont encadrées en rose.

5. Isolement des composés.

L'extrait brut des branchies de *C. orbicularis* obtenu par l'AcOEt, a été repris par de l'hexane pour donner 20 g de précipité **87** (44 % de l'extrait brut) sous forme de poudre cristalline jaune.

Seule la colonne chromatographique CSC6 a permis d'isoler les molécules pures et d'en déterminer les structures qui ont été présentées en détail dans ce manuscrit. La fraction F2 (Hex/AcOEt : 80/20) a subi une deuxième colonne chromatographique sur gel de silice à l'aide du mélange de solvants Hex/ACOEt/MeOH : 95/5/0 à 0/0/100. Cinq sous-fractions (f2₀, f2₁, f2₂, f2_{2'} et f2_{2'et3}) ont été obtenues. Les composés de la sous-fraction présentant le plus de

matière (f₂) ont été séparés par chromatographie sur couche préparative (Hept/AcOEt : 90/10) (**Schéma 9**). La ff_{2C} a fourni le composé **88** (26 mg).

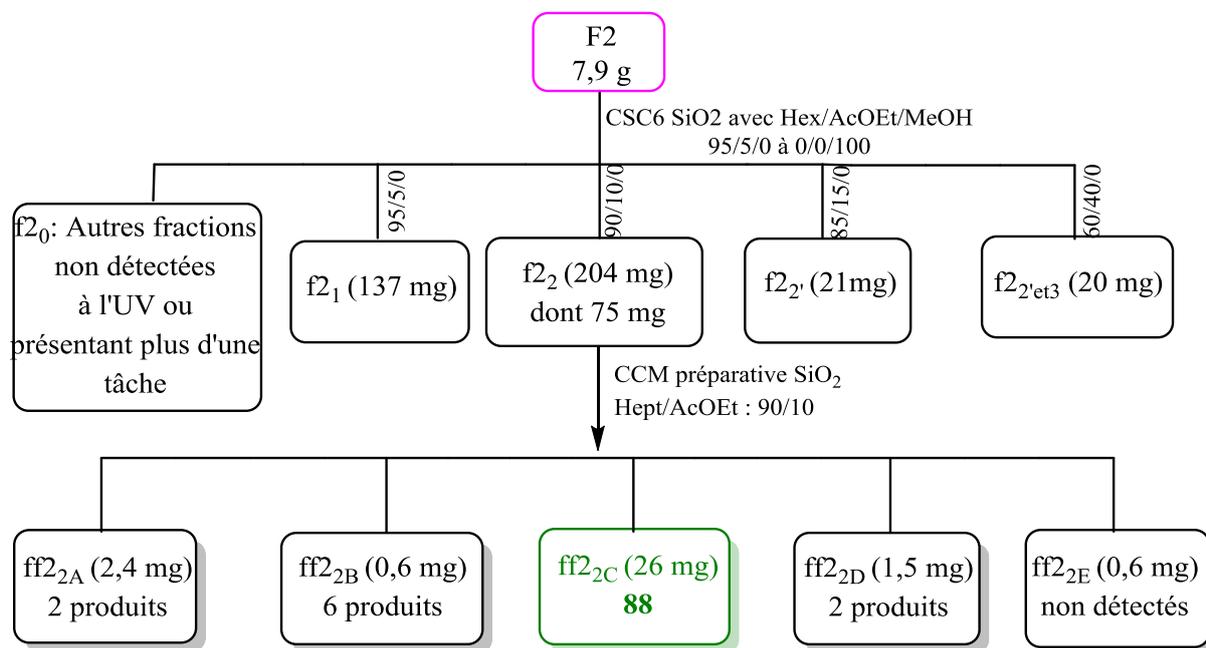


Schéma 9. Obtention du composé **88** en vert à partir de la fraction active F2 (en rose).

La purification par HPLC sur colonne semi-préparative SUNFIRE C₁₈ (5µm, 10* 150 mm) des 42 mg de la fraction F13, à l'aide du mélange H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH de l'HPLC C^{*}, a conduit à quatre composés indiqués en vert sur le **Schéma 10**.

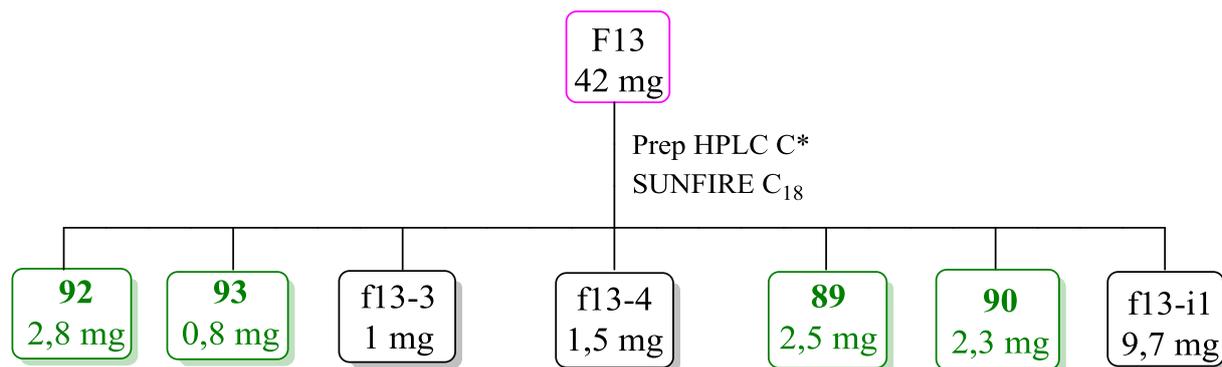


Schéma 10. Composés **89**, **90**, **92** et **93** (en vert) isolés de la fraction active F13 (en bleu).

* HPLC C

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	2	10	40	50	80	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	30	36	50

Les poids moléculaires, les temps de rétention et les rendements obtenus (par rapport à la fraction F13) des composés **89**, **90**, **92** et **93** sont indiqués dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Informations sur les molécules isolées de la fraction F13.

Molécules	Masses (mg)	Temps de rétention t_R (minutes)	Rendement (%)
92	2,8	5,02	7
93	0,8	12,08	2
89	2,5	34,01	6
90	2,3	37,23	5

La purification de la fraction F6 (443 mg) par HPLC préparative (HPLC A*) sur une colonne Atlantis T₃ C₁₈ (5 µm, 19 * 150 mm) avec l'éluant H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH, a permis d'isoler 36 mg du composé **91** élué à 12,21 minutes. La grande absorbance de ce composé minoritaire a facilité son isolement (**Schéma 11**).

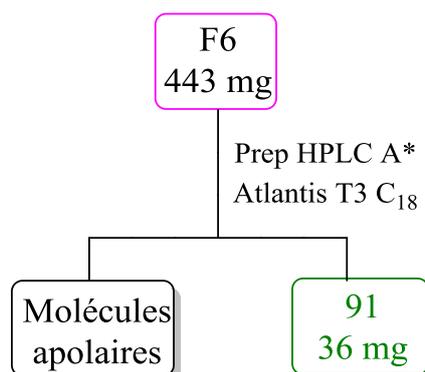


Schéma 11. Isolement du composé **91** en vert avec l'HPLC préparative A* à partir de la fraction active F6 (en rose).

Les 412 mg de la fraction F15 ont été repris dans du méthanol et filtrés (sur filtre 0,45 µm) plusieurs fois pour s'affranchir des graisses (**Schéma 12**).

* HPLC A 17 mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	0	10	40	50	80	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	30	36	50

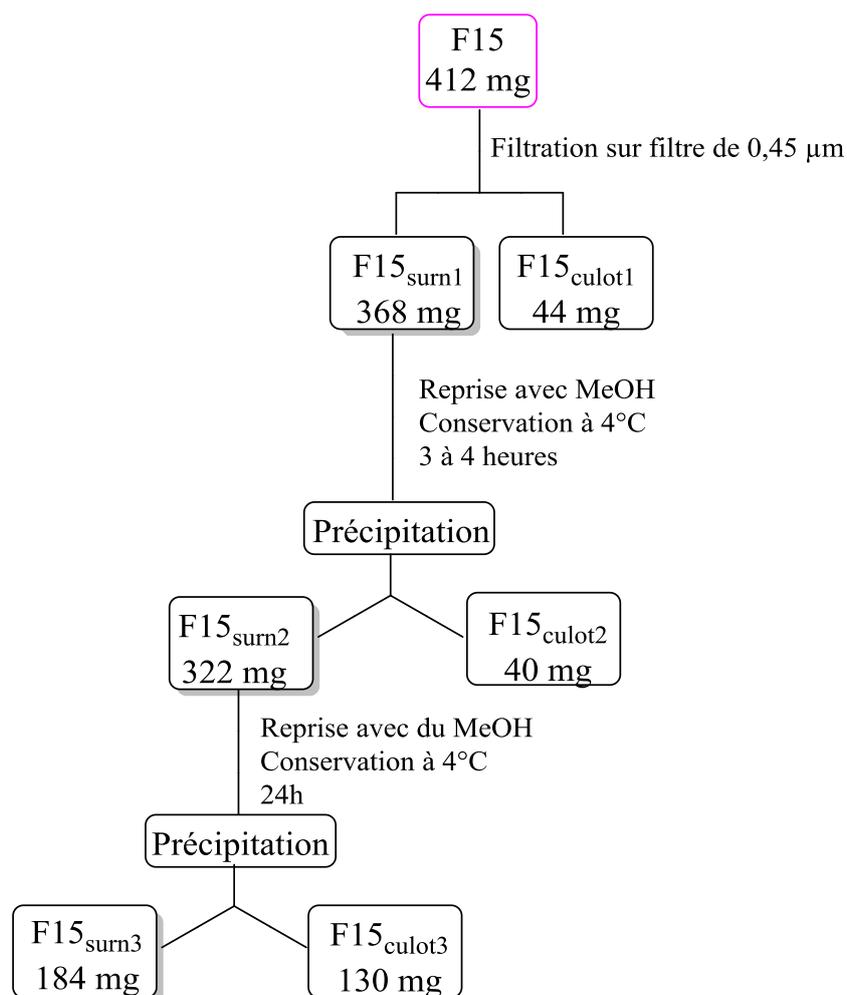


Schéma 12. Obtention de la F15_{surn3} suite à une filtration de la F15 suivie de deux précipités de graisses.

La fraction F15_{surn3} (184 mg) a été purifiée sur une colonne semi-préparative SUNFIRE C₁₈ (5 µm, 10*150 mm) par l'HPLC C* (mélange H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH): douze sous-fractions ont été obtenues.

Les sous-fractions f15-1, f15-3 et f15-6 contiennent respectivement les composés **92** (8,8 mg, t_R = 5,67 minutes), **96** (0,5 mg, t_R = 9,69 minutes) et **98** (1,6 mg, t_R = 12,52 minutes) (**Schéma 13**).

* HPLC C 4,5 mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	2	10	40	50	80	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	30	36	50

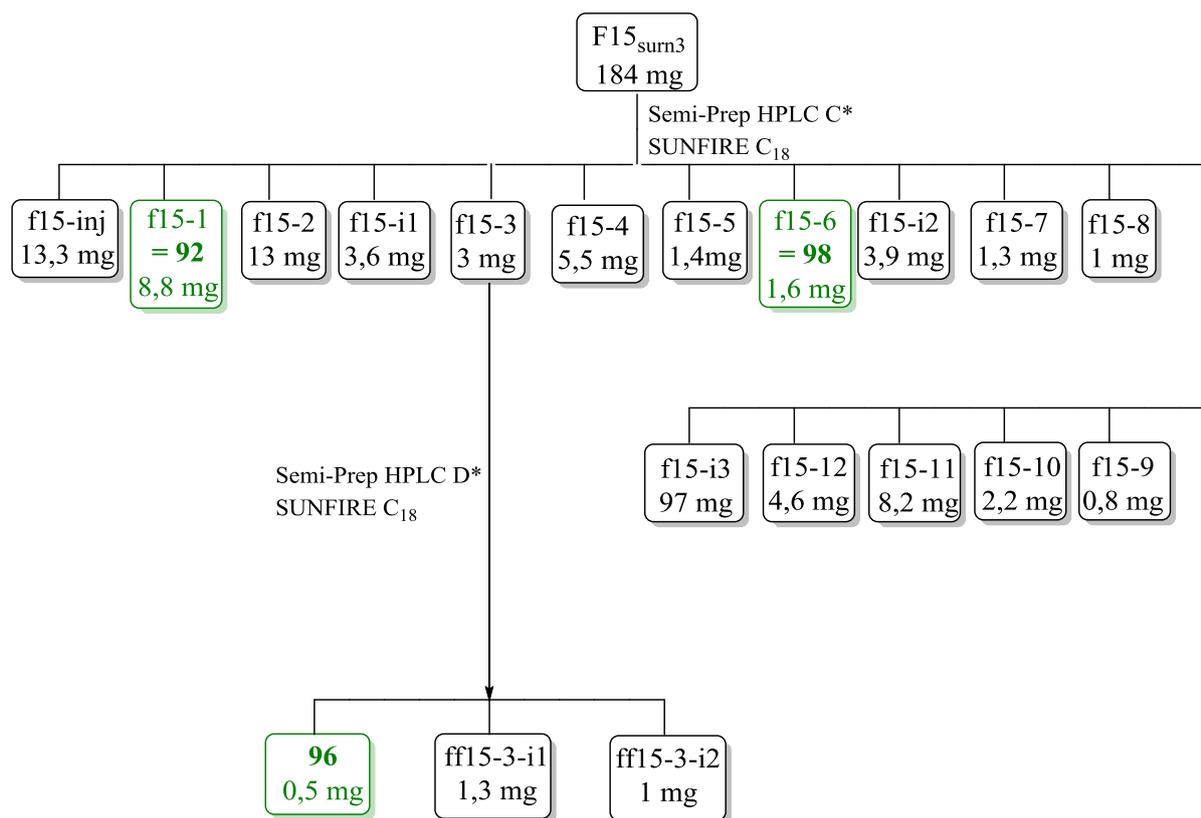


Schéma 13. Composés **92**, **96** et **98** (en vert) isolés de la F15_{sum3}.

La pureté du composé **92** a été augmentée par chromatographie en phase supercritique (CPS) dans les conditions du **Tableau 19**.

Tableau 19. Conditions SFC pour purifier l'échantillon f15-1, contenant le composé **92**.

Co-solvant: méthanol	Gradient de 15 à 30 % de méthanol	Solution à 10 mg/mL de MeOH
Colonne de silice 250 * 10 mm	Débit: 7 mL/min	Pression: 100 bars Température: 40 degrés

La pureté du composé **96** a été augmentée par une purification supplémentaire de la sous-fraction f15-3 sur la colonne SUNFIRE C₁₈ (5 µm, 10 * 150 mm) à l'aide de l'HPLC D* (mélange H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH) (**Schéma 13**).

La purification de la fraction active F17 sur une colonne Atlantis T3 C₁₈ (5 µm, 19* 150 mm) à l'aide du mélange H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH de l'HPLC A *

* HPLC D 4,5 mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	2	10	40	50	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	25	30

* HPLC A 17mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	0	10	40	50	80	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	30	36	50

a permis d'isoler les produits **93** (28,5 mg, $t_R = 7,17$ min), **95** (0,9 mg, $t_R = 8,23$ min) et **94** (1 mg, $t_R = 9,40$ min) (Schéma 14).

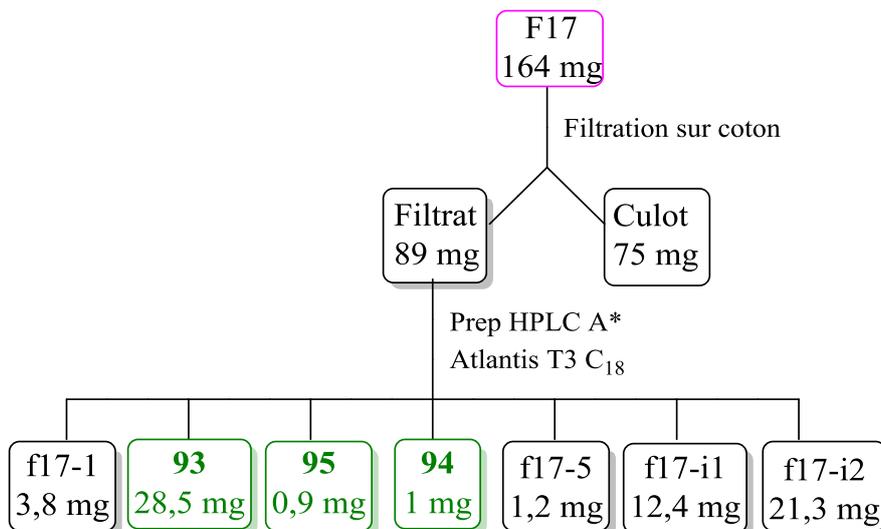


Schéma 14. Obtention des produits **93**, **94** et **95** en vert, après purification de la fraction active F17 (en rose).

La fraction la plus polaire F18 a été purifiée sur une colonne Atlantis T3 C₁₈ par l'HPLC E* (mélange H₂O ultrapure + 0,1 % d'HCOOH/ACN + 0,1 % d'HCOOH). Cette purification a conduit aux composés **97** (2,3 mg, $t_R = 4,87$ minutes) et **93** (3,9 mg, $t_R = 6,92$ minutes) (Schéma 15).

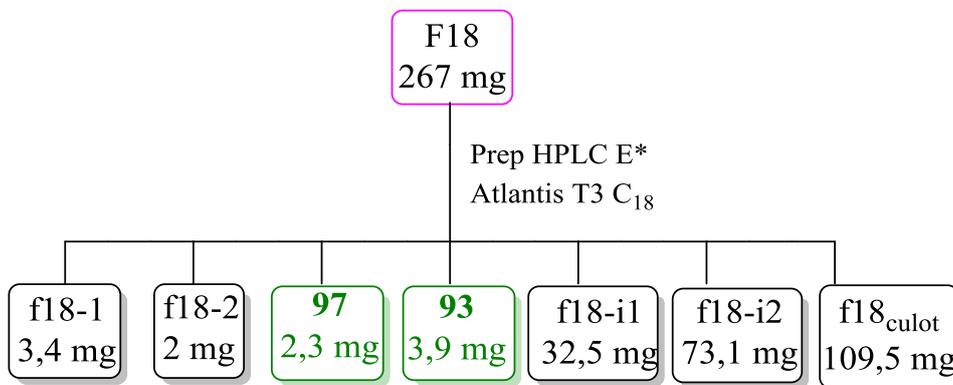


Schéma 15. Obtention des produits **93** et **97** (en vert), après purification de la fraction active F18 (en rose) par l'HPLC E*.

La fraction F14 a été purifiée sur la colonne SUNFIRE C₁₈ (5 μ m, 10*150 mm) par l'HPLC C* et cinq sous-fractions ont été obtenues. Deux d'entre elles (f14-1 et f14-i1) ont été reprises

* HPLC E 17mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	0	10	40	50	100	100
Temps (min)	0	4	10	15	17	30

* HPLC C 4,5 mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	2	10	40	50	80	100	100
Temps (min)	0	4	10	20	30	36	50

par du MeOH et ont précipité sous la forme d'une poudre blanche pour donner 4,6 mg du composé **98** pur. La purification du surnageant de la fraction f14-1 sur la colonne SUNFIRE C₁₈ (5 µm, 10*150 mm) par l'HPLC F* a également permis d'isoler le produit **98** (1,9 mg, t_R = 12,49 minutes) (Schéma 16).

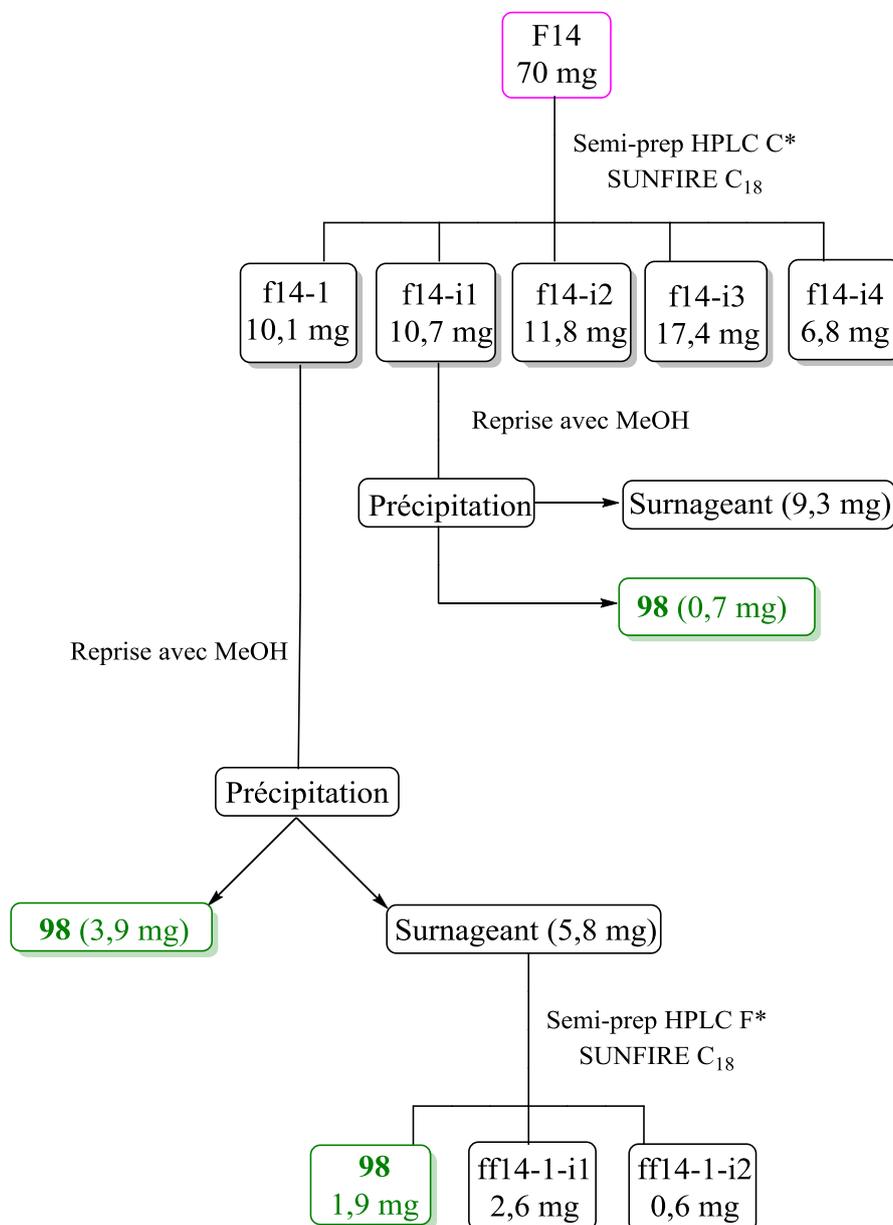


Schéma 16. Obtention du produit **98** (en vert) après purification de la fraction la plus active F14 (en rose).

* HPLC F 4,5 mL/min

% (ACN+ 0.1% HCOOH (v/v))	2	10	40	50	100	100
Temps (min)	0	4	10	15	17	20

6. Quelques précisions sur les manipulations réalisées pour la caractérisation structurale des composés isolés.

Une pointe de spatule des microcristaux jaunes de **87** a été mélangée à 1 mL d'hexane. 300 µL ont alors été transférés dans un flacon pour l'analyse en GC-MS.

Pour réaliser la fragmentation du composé **88** par spectrométrie de masse tandem (MS^2), le protocole suivant a été appliqué:

« 1 mg du composé **88** a été repris dans 1 mL de méthanol. La solution a été injectée sur une colonne Thermo Accucore C₁₈ (2,6 µm, 100 mm* 2,1mm) à l'aide de deux éluants A et B:

- Éluant A (H₂O ultrapure/ACN : 40/60) + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique).
- Éluant B (Isopropanol/ACN : 90/10) + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique).

Le gradient du **Tableau 20** a permis d'éluer le composé apolaire **88** à 19 minutes. Ce dernier détecté en ESI⁺- TOF sera par la suite fragmenté (120 Volt). »

Tableau 20. Gradient utilisé pour éluer le composé (**88**) de la sous-fraction ff2_{2C} sur la colonne Thermo Accucore C₁₈ (2,6 µm, 100 mm* 2,1 mm). Solution A: H₂O ultrapure/ACN : 40/60 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique.

Solution A (%)	60	57	46	1	1	60	60
Temps (min)	0	2	12	20	23	24	28

Le protocole de la HR-MS utilisé dans ce manuscrit pour les composés **89** - **98** est indiqué au **Schéma 17**.

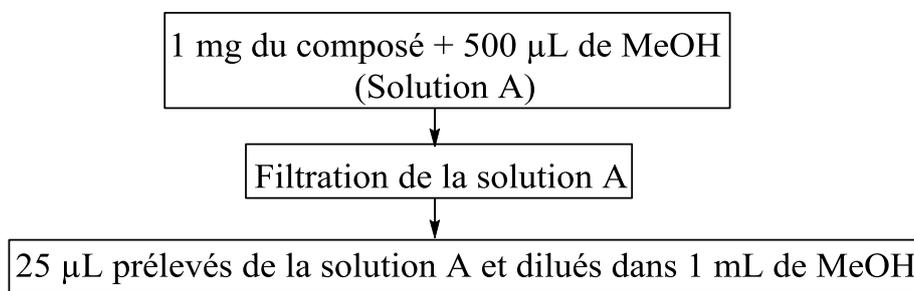
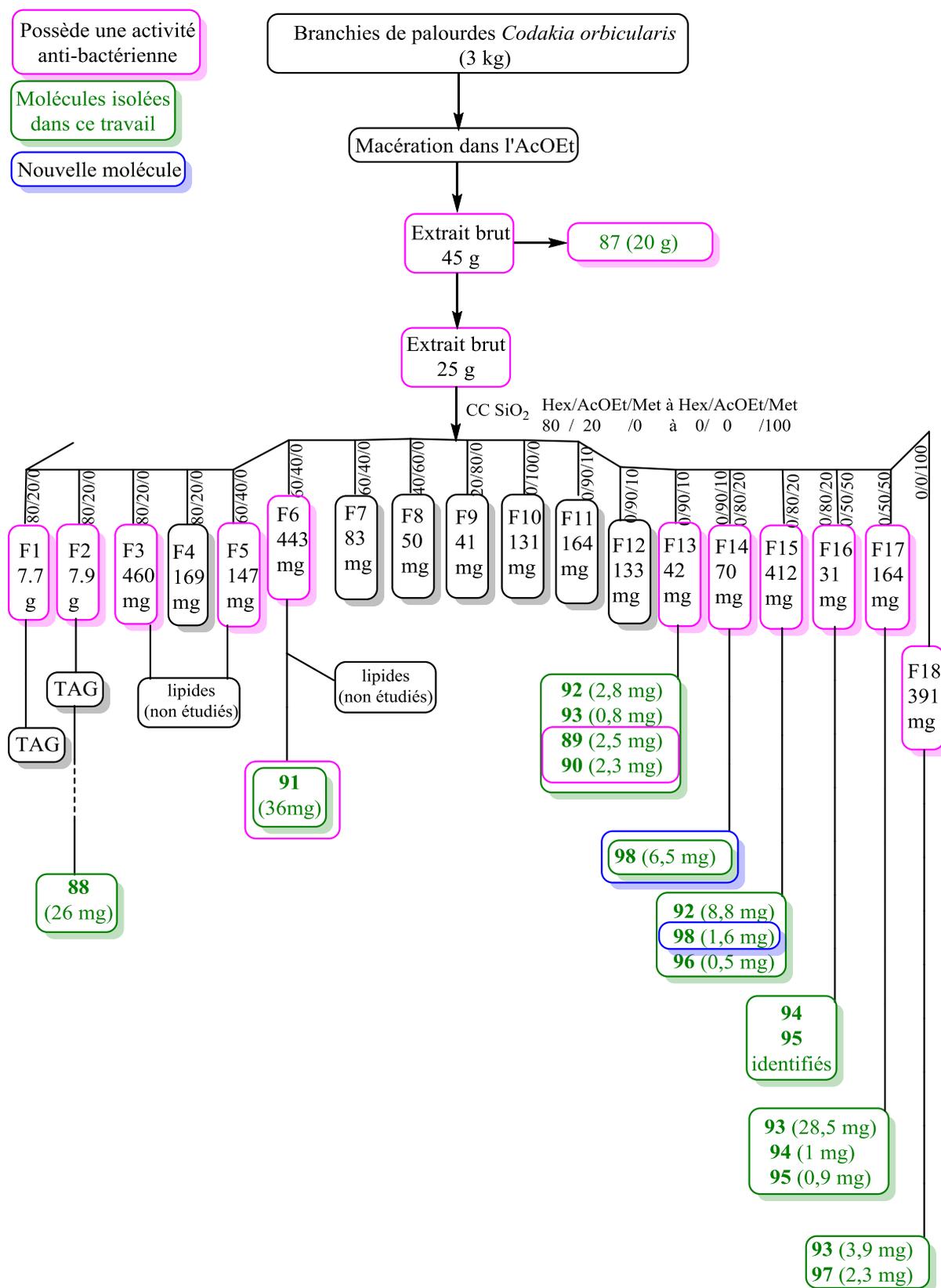


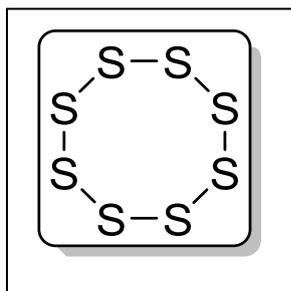
Schéma 17. Préparation des échantillons destinés à l'analyse de spectrométrie de masse haute résolution.

IV. RECAPITULATIF DE L'EXTRACTION DES BRANCHIES DE *C. ORBICULARIS* A L'ISOLEMENT DES COMPOSES.



V. DONNEES SPECTRALES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES ISOLEES.

Numéro 87. Soufre élémentaire



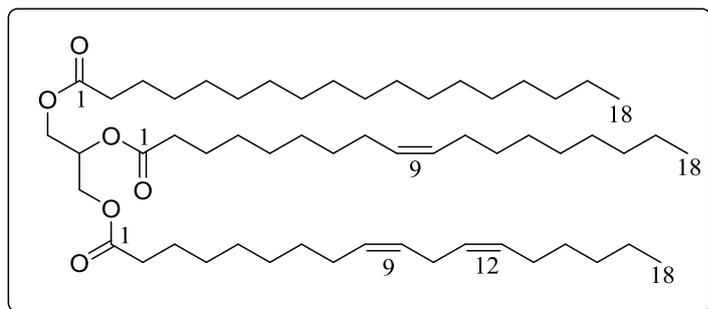
Composé **87** (S₈_ 256,520 Da)

Ce composé a précipité en solubilisant l'extrait brut de *C. orbicularis* dans un mélange Hexane/AcOEt : 80/20. Il a été identifié en spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie gazeuse.

Son spectre de masse obtenu par impact électronique concorde avec celui du soufre élémentaire S₈ des bases de données.

La structure cristalline du soufre a également été identifiée par diffraction aux rayons X (Dr Pascal Retailleau, ICSN). Il s'agit d'un système orthorhombique face centrée dont les paramètres de maille corrént avec ceux des bases de données structurales de Cambridge ²⁰².

Numéro 88. Triglycéride SOL

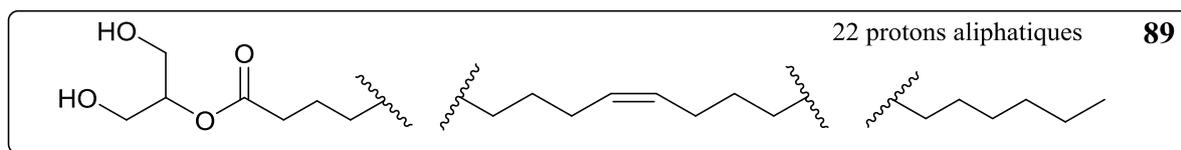


Composé **88** (C₅₇H₁₀₄O₆_ 884,7826 Da)

Ce composé a été isolé selon la méthode de la page 135. Son spectre RMN ¹H a prouvé qu'il s'agissait d'un triglycéride. Sa fragmentation en spectrométrie de masse tandem confrontée aux bases de données "Lipid maps" et de "Byrdwell" a permis de trouver sa composition en acide gras stéarique C18:0, oléique C18:1 (9) et linoléique C18:2 (9, 12).

Huile jaune; **HRESIMS** m/z 902,8169 [M+NH₄]⁺ (calculé pour 902,8169; C₅₇H₁₀₈NO₆); **RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz) δ 5,34 (6H, m, CH_{allyliques}), 5,26 (1H, m, CH_{glycérol}); 4,21 (4H, ddd, $J = 58,1/ 11,8/ 4,6$ Hz, CH_{2glycérol}); 2,80 (2H, m, CH_{2bis-allylique}); 2,30 (6H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_{2 α -ester}); 2,01 (8H, m, CH_{2 α -C=C}); 1,60 (6H, m, CH_{2 β -ester}); 1,28 (62H, m, CH_{2aliphatiques}); 0,88 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH₃).

Numéro 89. Monoglycérolipide 1

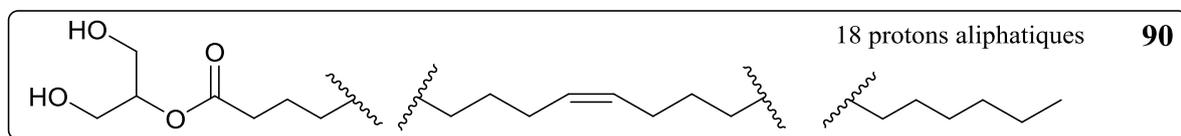


Composé **89** (C₂₁H₄₀O₄_356,2931 Da)

Ce composé a été isolé suivant le protocole décrit à la page 135. Sa structure a été déterminée par l'ensemble des RMN 1D et 2D. La fragmentation de ce produit en spectrométrie de masse tandem couplée à de la chromatographie en phase gazeuse permettra de localiser l'insaturation.

Huile transparente; **HRESIMS** m/z 357,3009 [M+H]⁺ (calculé pour 357,3005; C₂₁H₄₁O₄); **RMN** ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ 5,36 (2H, m, CH_{vinyliques}), 4,94 (1H, quin, $J = 4,8$ Hz, CH_{glycérol}); 3,85 (4H, d, $J = 4,8$ Hz, CH_{2glycérol}); 2,39 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_{2α-ester}); 2,03 (4H, m, CH_{2αC=C}); 1,65 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, CH_{2β-ester}); 1,30 (20H, m, CH_{2aliphatiques}); 0,84 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, CH₃); **RMN** ¹³C (CDCl₃, 600 MHz) δ 130,0 (CH_{vinyliques}), 74,9 (CH_{glycérol}); 61,7 (CH_{2glycérol}); 34,5 (CH_{2α-ester}); 27,3 (CH_{2αC=C}); 25,0 (CH_{2β-ester}); 31,9 (CH_{2aliphatiques_βCH3}); 29,5 (CH_{2aliphatiques}); 22,7 (CH_{2aliphatique_αCH3}); 14,2 (CH₃).

Numéro 90. Monoglycéride 2

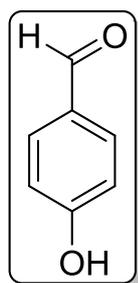


Composé **90** (C₁₉H₃₆O₄_328,2621 Da)

Ce composé a été isolé suivant le protocole décrit à la page 135. Sa structure a été déterminée par l'ensemble des RMN 1D et 2D. La fragmentation de ce produit en spectrométrie de masse tandem couplée à de la chromatographie en phase gazeuse permettra de localiser l'insaturation.

Huile transparente; **HRESIMS** m/z 329,2698 [M+H]⁺ (calculé pour 329,2692, C₁₉H₃₇O₄); **RMN** ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ 5,33 (2H, m, CH_{vinyliques}), 4,89 (1H, quin, $J = 4,8$ Hz, CH_{glycérol}); 3,80 (4H, d, $J = 4,8$ Hz, CH_{2glycérol}); 2,35 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_{2α-ester}); 2,00 (4H, m, CH_{2αC=C}); 1,62 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, CH_{2β-ester}); 1,29 (16H, m, CH_{2aliphatiques}); 0,87 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, CH₃); **RMN** ¹³C (CDCl₃, 600 MHz) δ 130,0 (CH_{vinyliques}), 74,9 (CH_{glycérol}); 61,7 (CH_{2glycérol}); 34,5 (CH_{2α-ester}); 27,3 (CH_{2αC=C}); 25,0 (CH_{2β-ester}); 31,9 (CH_{2aliphatiques_βCH3}); 29,5 (CH_{2aliphatiques}); 22,7 (CH_{2aliphatique_αCH3}); 14,2 (CH₃).

Numéro 91. 4-hydroxybenzaldéhyde

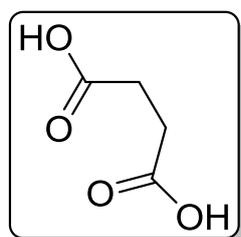


Composé **91** (C₇H₆O₂_122,0368 Da)

Ce composé a été isolé selon le protocole décrit à la page 136. Les données spectroscopiques de la littérature²⁴⁴ correspondent à celles obtenues dans cette étude.

Cristaux blanc; **ESI⁺-LC-MS** *m/z* 123,0 [M+H]⁺; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ 6,96 (d, *J* = 7,5 Hz, H-1); 7,82 (d, *J* = 7,5 Hz, H-2); 9,86 (s, O-H-3).

Numéro 92. Acide succinique

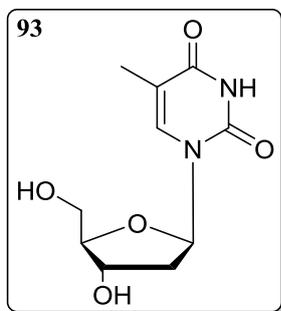


Composé **92** (C₄H₆O₄_118,0266 Da)

Ce composé a été isolé selon les protocoles des pages 135 et 138. Sa pureté a été augmentée en chromatographie en phase supercritique (page 141). Les données spectroscopiques obtenues sont identiques à celles de la littérature²⁴⁹.

Poudre blanche; **HRESIMS** *m/z* 117,0179 [M-H]⁻; **RMN ¹H** (MeOD, 500 MHz) δ 2,57 (4H,s, H-1); 4,93 (O-H) et **RMN ¹³C** (MeOD, 500 MHz) δ 29,9 (CH₂, C-1); 176,2 (C=O).

Numéro 93. Thymidine

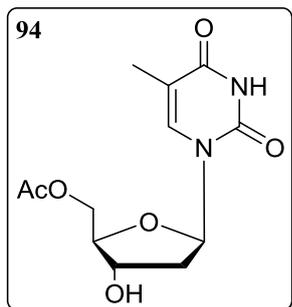


Composé **93** (C₁₀H₁₄N₂O₅_242,0899 Da)

Ce composé a été isolé selon les protocoles des pages 135 et 139. Les données bibliographiques²⁵¹ confirment la structure obtenue dans ce travail.

Solide sans couleur; **HRESIMS** *m/z* 243,10319 [M+H]⁺ (calculé pour 242,09755, C₁₀H₁₅N₂O₅); **RMN ¹H** (MeOD, 500 MHz) δ 7,81 (1H, s, H-6), 6,28 (1H, dd, *J* = 6,9/6,5 Hz, H-1'); 4,40 (1H, ddd, *J* = 6,5/6,5/3,5 Hz, H-3'); 3,90 (1H, ddd, *J* = 12/12/6,5 Hz, H-4'); 3,78 (1H, ddd, *J* = 21,8/12/3,4 Hz, H-5'_b); 3,73 (1H, ddd, *J* = 21,8/12/3,4 Hz, H-5'_a); 2,23 (2H, m, H-2'); 1,88 (3H, s, H-7).

Numéro 94. 5'-O-acétylthymidine



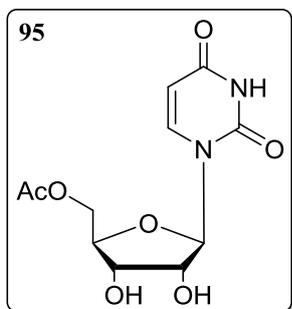
Composé **94** (C₁₂H₁₆N₂O₆_284,1005 Da):

voir le protocole de purification de la page 139.

Les données spectroscopiques sont identiques à celles de la littérature²⁵⁵.

Gomme jaune pâle; **HRESIMS** m/z 285,1086 (calculé pour 285,1087, C₁₂H₁₇N₂O₆); **RMN** ¹H (MeOD, 600 MHz) δ 7,50 (1H, s, H-6), 6,26 (1H, dd, $J = 7,2 / 6,8$ Hz, H-1'); 4,35 (1H, m, H-3'); 4,33 (1H, ddd, $J = 31/12/3,9$ Hz, H-5'_b); 4,27 (1H, ddd, $J = 31/12/4,8$ Hz, H-5'_a); 4,07 (1H, ddd, $J = 12/6,6/4,8$ Hz, H-4'); 2,27 (2H, m, H-2'); 2,10 (3H, s, CH₃COOR); 1,90 (3H, s, H-7); **RMN** ¹³C (MeOD, 600 MHz) δ 172,5 (COOR); 166,4 (C-4, C=O); 152,1 (C-2, C=O); 137,7 (CH, C-6); 111,2 (C, C-5); 86,6 (CH, C-1'); 85,9 (CH, C-4'); 72,4 (CH, C-3'); 65,3 (CH₂, C-5'); 40,5 (CH₂, C-2'); 21,3 (CH₃COOR); 12,7 (CH₃, C-7).

Numéro 95. 5'-O-acétyluridine

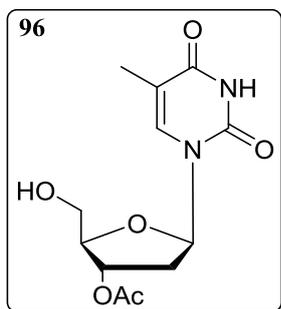


Composé **95** (C₁₁H₁₄N₂O₇_286,079 Da):

voir le protocole de purification à la page 139. Les données spectroscopiques qui suivent ont été approuvées par celles de la littérature²⁵¹.

Solide blanc; **HRESIMS** m/z 287,0837 (calculé pour 287,0837, C₁₁H₁₅N₂O₇); **RMN** ¹H (MeOD, 600 MHz) δ 7,71 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6), 5,83 (1H, d, $J = 4$ Hz, H-1'); 5,74 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5); 4,35 (1H, dd, $J = 2,9/12,9$ Hz, H-5'_b); 4,33 (1H, dd, $J = 2,9/12,9$ Hz, H-5'_a); 4,19 (1H, m, H-2'); 4,15 (1H, m, H-4'); 4,10 (1H, m, H-3'); 2,01 (3H, s, CH₃COOR); **RMN** ¹³C (MeOD, 600 MHz) δ 172,2 (C, COOR); 166,6 (C-4, C=O); 152,5 (C-2, C=O); 142,5 (CH, C-6); 102,9 (CH, C-5); 91,8 (CH, C-1'); 83,0 (CH, C-4'); 75,3 (CH, C-2'); 71,2 (CH, C-3'); 64,9 (CH₂, C-5'); 20,8 (CH₃COOR).

Numéro 96. 3'-O-acétylthymidine

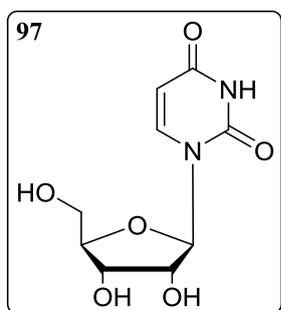


Composé **96** (C₁₂H₁₆N₂O₆, 284,1005 Da):

voir la page 138 pour le protocole de purification. Les données spectroscopiques sont en accord avec celles de la littérature²⁵⁵.

Gomme jaune pâle; **HRESIMS** m/z 285,1086 (calculé pour 285,1087, C₁₂H₁₇N₂O₆); **RMN** ¹H (MeOD, 500 MHz) δ 7,84 (1H, s, H-6), 6,28 (1H, dd, $J = 7,2 / 6,8$ Hz, H-1'); 5,31 (1H, m, H-3'); 4,07 (1H, m, H-4'); 3,81 (2H, m, H-5'); 2,35 (2H, m, H-2'); 2,10 (3H, s, CH₃COOR); 1,89 (3H, s, H-7); **RMN** ¹³C (MeOD, 600 MHz) δ 173,1 (COOR); 167,3 (C-4, C=O); 153,3 (C-2, C=O); 138,8 (CH, C-6); 112,8 (C, C-5); 87,6 (CH, C-1'); 87,0 (CH, C-4'); 77,3 (CH, C-3'); 63,9 (CH₂, C-5'); 39,3 (CH₂, C-2'); 21,8 (CH₃COOR); 13,4 (CH₃, C-7).

Numéro 97. Uridine

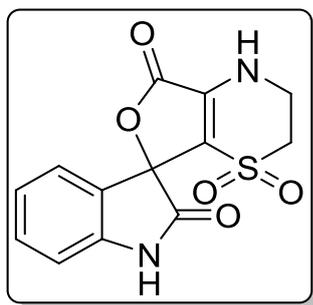


Composé **97** (C₉H₁₃N₂O₆, 244,2 Da):

voir la page 139 pour le protocole de purification. L'ensemble des données spectroscopiques concordent avec celles de la littérature²⁶³.

Cristal sans couleur; **LC-MS** m/z 245,2 (C₉H₁₃N₂O₆); **RMN** ¹H (DMSO, 500 MHz) δ 7,84 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-6), 5,74 (1H, d, $J = 5,6$ Hz, H-1'); 5,60 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5); 3,98 (1H, dd, $J = 3/5,6$ Hz, H-2'); 3,92 (1H, m, H-4'); 3,80 (1H, dd, $J = 3/3,6$ Hz, H-3'); 3,58 (1H, dd, $J = 2,7/12$ Hz, H-5'_b); 3,50 (1H, dd, $J = 2,7/12$ Hz, H-5'_a).

Numéro 98. Orbicularisine



Composé **98** (C₁₃H₁₀N₂O₅S _306,0311 Da):

voir les pages 138, 140 et 142 pour le protocole de purification. Il s'agit d'une nouvelle molécule dotée d'un nouveau squelette.

Poudre jaunâtre; $[\alpha]_D^{25} = 0,0$ (c 3,7, MeOH); UV (MeOH) (log ϵ) λ_{max} 210,0 nm (1,32), 292,0 nm (0,41);

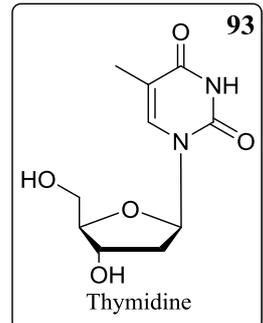
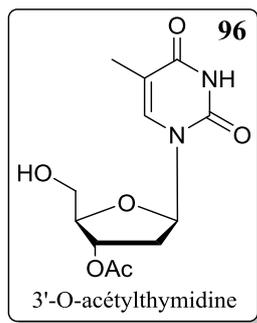
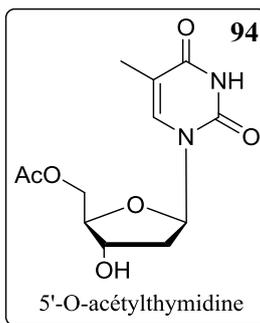
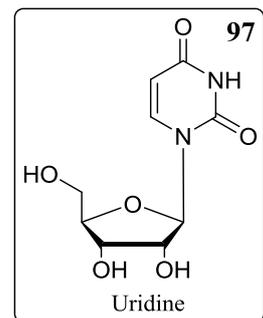
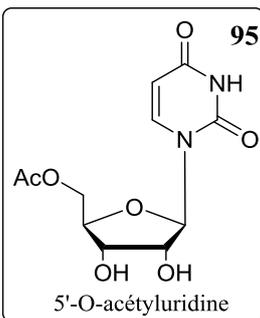
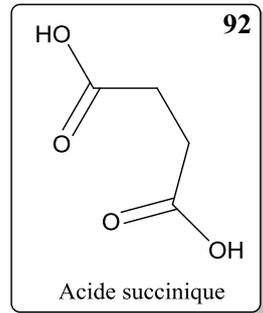
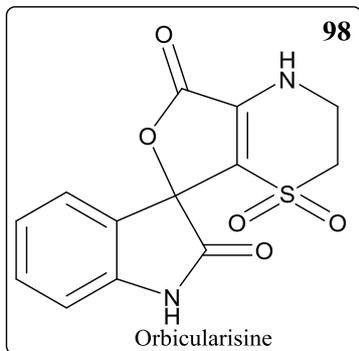
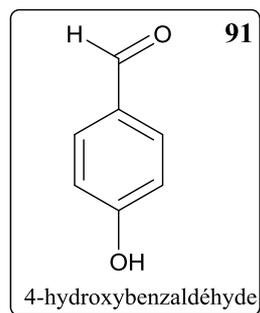
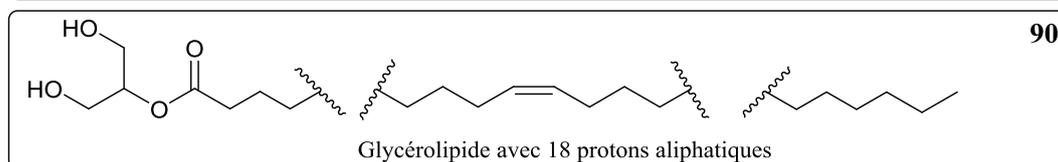
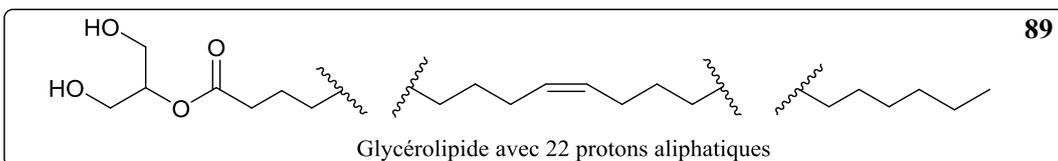
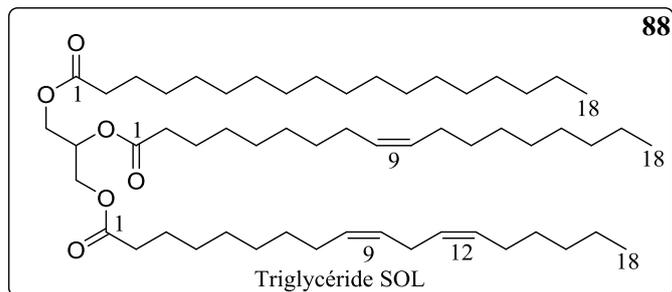
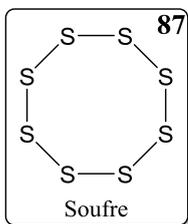
HRESIMS m/z 307,0391 [M+H]⁺ (calculé pour 307,0389; C₁₃H₁₁N₂O₅S);

IR ν_{max} 3308, 2934, 1788, 1740, 1663, 1622, 1474, 1293, 1181, 1129, 1029, 799, 684 cm⁻¹;

RMN ¹H (DMSO, 500 MHz) δ 3,37 (1H,m, $J = 13,6/ 4,8/ 2/ 1,6$ Hz, H-2a); 3,01 (1H, ddd, $J = 13,6/ 12,6/ 4$ Hz, H-2b), 3,89 (1H, m, $J = 13,8/ 4,8/ 4,8/ 4$ Hz, H-3a), 3,68 (1H, ddd, $J = 13,8/ 12,6/ 2$ Hz, H-3b); 8,47 (1H, bsr, N-H-4); 10,96 (1H, bsr, N-H-11), 6,91 (d, $J = 7,6$ Hz, H-13); 7,36 (td, $J = 7,6/ 1,1$ Hz, H-14); 7,02 (td, $J = 7,6/ 1,1$ Hz, H-15); 7,39 (d, $J = 7,6$ Hz, H-16);

RMN ¹³C (DMSO, 500 MHz) δ 48,1 (CH₂, C-2); 40,8 (CH₂, C-3); 138,3 (C, C-5); 165,1 (C, C-6); 82,2 (C, C-8); 111,2 (C, C-9); 170,9 (C, C-10); 142,8 (C, C-12); 110,8 (CH, C-13); 132,1 (CH, C-14); 122,6 (CH, C-15); 126,6 (CH, C-16); 122,4 (C, C-17).

VI. STRUCTURE DES MOLECULES ISOLEES.



VII. DONNEES CHROMATOGRAPHIQUES DES COMPOSES ISOLEES.

Molécules	Temps de rétention t_R (minutes) Voir conditions au chapitre VIII de cette partie expérimentale	N° HPLC	Masses des molécules isolées (mg)	Quantité totale des molécules isolées (mg)
Soufre S_8 (87)	----	----	20.10^3	20.10^3
TAG: SOL (88)	----	----	26,0	26,0
Glycérolipide AG: avec AG: C18:1 (89)	37,23	C	2,3	2,3
Glycérolipide avec AG: C16:1 (90)	34,01	C	2,5	2,5
4-hydroxybenzaldéhyde (91)	12,21	A	36	36
Acide succinique (92)	5,02	C	2,8	11,6
	5,67	C	8,8	
Thymidine (93)	12,08	C	0,8	33,2
	7,17	A	28,5	
	6,92	E	3,9	
5'-O-acétylthymidine (94)	9,40	A	1	1
5'-O-acétyluridine (95)	8,23	A	0,9	0,9
3'-O-acétylthymidine (96)	9,69	C	0,5	0,5
		D		
Uridine (97)	4,87	E	2,3	2,3
Orbicularisine (98)	12,46	C	1,6	8,1
	12,52	C	4,6	
	12,49	F	1,9	

VIII. RECAPITULATIF DES HPLC UTILISEES.

HPLC (A)	HPLC (B)	HPLC (C)	HPLC (D)																																																																																													
Colonne: Atlantis T3 C ₁₈ 5 µm, 19 * 150 mm	Colonne: Thermo Accucore C ₁₈ 2,6µm, 100 mm * 2,1mm	Colonne: SUNFIRE C ₁₈ 5 µm, 10 * 150 mm	Colonne: SUNFIRE C ₁₈ 5 µm, 10 * 150 mm																																																																																													
Débit: 17 mL/min	Débit: 400 µL/min	Débit: 4,5 mL/min	Débit: 4,5 mL/min																																																																																													
Détecteur: DAD 210- 600 nm	Détecteur: ESI-TOF	Détecteur: DAD 210- 600 nm	Détecteur: DAD 210- 600 nm																																																																																													
Éluants: A: H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique (v/v) B: ACN avec 0,1 % d'acide formique (v/v)	Éluants: A: H ₂ O/ACN: 40/60 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0.1% d'acide formique. B: Isopropanol/ACN: 90/10 + 10 mM de formiate d'ammonium + 0.1% d'acide formique.	Éluants: A: H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique (v/v) B: ACN avec 0,1 % d'acide formique (v/v)	Éluants: A: H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique (v/v) B: ACN avec 0,1 % d'acide formique (v/v)																																																																																													
Gradient:	Gradient:	Gradient:	Gradient:																																																																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>20</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>36</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>50</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	100	0	4	90	10	10	60	40	20	50	50	30	20	80	36	0	100	50	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>2</td><td>57</td><td>43</td></tr> <tr><td>12</td><td>46</td><td>54</td></tr> <tr><td>20</td><td>1</td><td>99</td></tr> <tr><td>23</td><td>1</td><td>99</td></tr> <tr><td>24</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>28</td><td>60</td><td>40</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	60	40	2	57	43	12	46	54	20	1	99	23	1	99	24	60	40	28	60	40	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>20</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>36</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>50</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	98	2	4	90	10	10	60	40	20	50	50	30	20	80	36	0	100	50	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>20</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>25</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>30</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	98	2	4	90	10	10	60	40	20	50	50	25	0	100	30	0	100
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	100	0																																																																																														
4	90	10																																																																																														
10	60	40																																																																																														
20	50	50																																																																																														
30	20	80																																																																																														
36	0	100																																																																																														
50	0	100																																																																																														
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	60	40																																																																																														
2	57	43																																																																																														
12	46	54																																																																																														
20	1	99																																																																																														
23	1	99																																																																																														
24	60	40																																																																																														
28	60	40																																																																																														
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	98	2																																																																																														
4	90	10																																																																																														
10	60	40																																																																																														
20	50	50																																																																																														
30	20	80																																																																																														
36	0	100																																																																																														
50	0	100																																																																																														
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	98	2																																																																																														
4	90	10																																																																																														
10	60	40																																																																																														
20	50	50																																																																																														
25	0	100																																																																																														
30	0	100																																																																																														
HPLC (E)	HPLC (F)																																																																																															
Colonne: Atlantis T3 C ₁₈ 5 µm, 19 * 150 mm	Colonne: SUNFIRE C ₁₈ 5 µm, 10 * 150 mm																																																																																															
Débit: 17 mL/min	Débit: 4,5 mL/min																																																																																															
Détecteur: DAD 210- 600 nm	Détecteur: DAD 210- 600 nm																																																																																															
Éluants: A: H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique (v/v) B: ACN avec 0,1 % d'acide formique (v/v)	Éluants: A: H ₂ O avec 0,1 % d'acide formique (v/v) B: ACN avec 0,1 % d'acide formique (v/v)																																																																																															
Gradient:	Gradient:																																																																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>15</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>17</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>30</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	100	0	4	90	10	10	60	40	15	50	50	17	0	100	30	0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>15</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>17</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>20</td><td>0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Temps (min)	%A	%B	0	98	2	4	90	10	10	60	40	15	50	50	17	0	100	20	0	100																																																					
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	100	0																																																																																														
4	90	10																																																																																														
10	60	40																																																																																														
15	50	50																																																																																														
17	0	100																																																																																														
30	0	100																																																																																														
Temps (min)	%A	%B																																																																																														
0	98	2																																																																																														
4	90	10																																																																																														
10	60	40																																																																																														
15	50	50																																																																																														
17	0	100																																																																																														
20	0	100																																																																																														

IX. COMPARAISON AVEC *LUCINA ROQUESANA*.

Les branchies provenant des deux récoltes (**Tableau 14**) de *Lucina roquesana* ont été rassemblées. L'étude de *L. roquesana* a suivi les mêmes étapes d'extraction que celles réalisées pour *Codakia orbicularis* et sont récapitulées au **Schéma 19**. L'extrait brut obtenu a été fractionné sur colonne de silice avec une gamme de solvants éluants allant de l'hexane au méthanol. Quinze fractions ont été obtenues et leurs activités biologiques ont été évaluées comme pour celles de *C. orbicularis* (**voir Chap3-III-2-a**). Préalablement, une étude chimique préliminaire sur *L. roquesana* a conduit à l'identification de composés identiques à ceux identifiés dans certaines fractions actives de *C. orbicularis*. La fraction F2, par exemple, est constituée du composé **87** (58 mg). Celui-ci a également précipité lors de la reprise de l'extrait brut de branchies de *L. roquesana* avec de l'hexane, tout comme pour *C. orbicularis*; mais à l'époque ce composé non identifié avait été considéré comme un déchet et n'avait pas été quantifié). Dans la F3 a été identifié le composé **88**. Dans la fraction F8, le composé **91** a été identifié (**Schéma 19**).

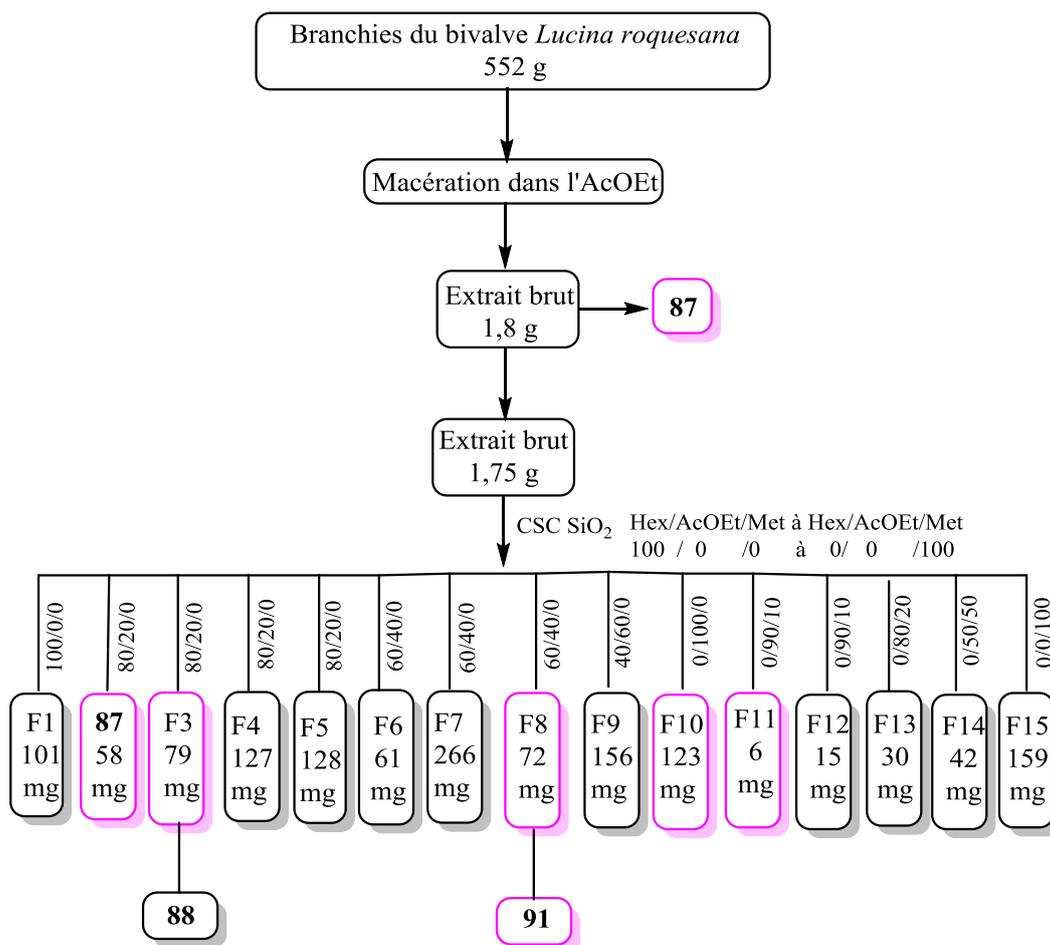


Schéma 19. Extraction des branchies de *Lucina roquesana* et fractionnement de l'extrait brut obtenu. Les fractions ou molécules présentant une activité anti-bactérienne contre *Escherichia coli* ou *Micrococcus luteus* sont encadrées en rose.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Les objectifs de ma thèse étaient d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait brut de branchies (lieu de la symbiose) du bivalve *Codakia orbicularis*; d'isoler et de caractériser les métabolites secondaires majoritaires présents dans ces branchies, puis d'évaluer l'activité antibactérienne des molécules isolées; et enfin d'isoler et caractériser des structures originales. Dans cette étude l'activité antibactérienne de l'extrait brut de branchies de *Codakia orbicularis* a été mise en évidence sur des bactéries de Gram⁺ et de Gram⁻. De cet extrait brut bioactif, douze métabolites ont été isolés des branchies de *Codakia orbicularis* et caractérisés à l'aide des méthodes spectroscopiques usuelles : le soufre élémentaire S₈ (**87**), le triglycéride stéarique, oléique et linoléique (SOL, **88**), les monoglycérolipides (**89** et **90**), la 4-hydroxybenzaldéhyde (**91**), l'acide succinique (**92**), la thymidine (**93**), la 5'-O-acétylthymidine (**94**), la 5'-O-acétyluridine (**95**), la 3'-O-acétylthymidine (**96**), l'uridine (**97**) et une nouvelle molécule dotée d'un nouveau squelette baptisée orbicularisine (**98**). Les structures exactes des monoglycérolipides **89** et **90** ne sont totalement déterminées puisque la position de la double liaison sur la chaîne n'est pas confirmée. Ils devront être fragmentés en spectrométrie de masse haute résolution pour localiser leur insaturation. Ceci permettra de savoir si le composé **90** est un nouveau monoglycérolipide mononinsaturé ou pas ? *C. orbicularis* étant riche en lipides, soit 40% de la masse de l'extrait brut de branchies, une analyse en lipidomique est donc envisageable pour déterminer les proportions de chaque classe lipidique dans les branchies du bivalve (applications alimentaires, cosmétiques).

L'activité antibactérienne de l'ensemble des molécules a été évaluée, soit par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) soit par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé, contre plusieurs bactéries Gram⁻ et Gram⁺.

Parmi les molécules testées, seules quatre présentent une activité antibactérienne. Le soufre (**87**) et la 4-hydroxybenzaldéhyde (**91**) sont actifs contre les souches *Escherichia coli* ATCC 35218 et *M. luteus* (ATCC 10240) tandis que les monoglycérolipides **89** et **90** sont actifs contre les souches *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 et *Escherichia coli* ATCC 35218.

Ce travail aura permis de mettre en évidence des molécules antibactériennes potentiellement impliquées dans la régulation des symbiotes des bivalves.

L'orbicularisine (**98**) est une nouvelle molécule dotée d'un nouveau squelette inédit spiro-indolo-thiazine et dont l'activité biologique n'a pas été prouvée dans cette étude (tests antibactériens, cytotoxicité, rôle dans l'apoptose, inhibition des kinases négatifs).

L'orbicularisine est racémique puisqu'elle présente un pouvoir rotatoire nul et un spectre de dichroïsme plat. Les énantiomères devront être séparés par chromatographie sur colonne chirale afin de confirmer le mélange. La molécule présente une structure intéressante mais son évaluation sur une large gamme de cibles biologiques requiert sa synthèse pour éviter son extraction des branchies du bivalve. Le rendement d'extraction est très faible et ne permet pas sa valorisation sans la synthèse totale. Il est également possible que cette synthèse permette d'obtenir directement chacun des énantiomères d'orbicularisine (**98**). Dans les deux cas, la synthèse du composé **98** permettrait de disposer, même après des étapes de séparation chirale, d'une grande quantité des énantiomères de **98** pour en évaluer les activités biologiques (par exemple une activité antioxydante, ou un effet sur le système nerveux central). La synthèse d'analogues du nouveau squelette de **98** pourra alors être envisagée.

Il serait intéressant de connaître la voie de biosynthèse des métabolites isolés (implication de l'hôte et/ou des bactéries). La métagénomique est une des possibilités d'étude car les bactéries marines impliquées dans l'endosymbiose intracellulaire ne sont souvent pas cultivables. Dans le cas de la détermination de l'origine biosynthétique de l'orbicularisine (**98**), le marquage au ^{13}C et ^{14}C des précurseurs tryptophane et cystéine serait envisageable. Il faudra par ailleurs déterminer le rôle, au sein des branchies du bivalve, des molécules isolées à savoir si elles sont impliquées dans la communication bivalve-bivalve, bivalve-bactéries ou encore bactéries-bactéries. L'un de ces types de communication pourra éventuellement être mis en évidence par l'imagerie MALDI. Autrement pour déterminer l'origine des molécules isolées, il serait possible de centrifuger les branchies du bivalve pour récupérer un culot des bactéries (symbiotes), réaliser une extraction chimique sur ces bactéries et analyser l'extrait brut obtenu en LC-HRMS. Ainsi, les molécules identifiées dans cet extrait brut de bactéries, grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques, seraient d'origine bactérienne.

Il faudrait également faire sur *C. orbicularis*, une vraie étude métabolomique (LC-HRMS), utilisant la déréplication, pour réaliser un profil chromatographique renseigné.

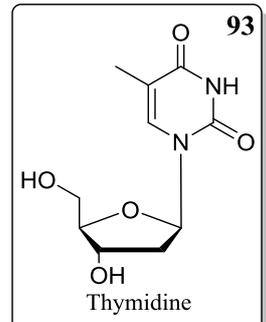
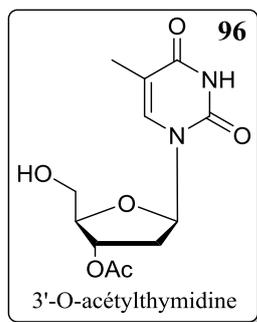
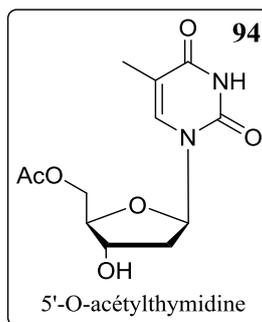
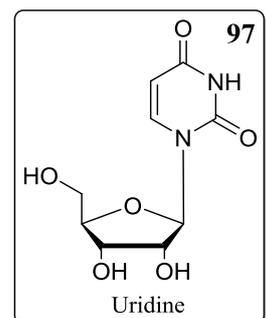
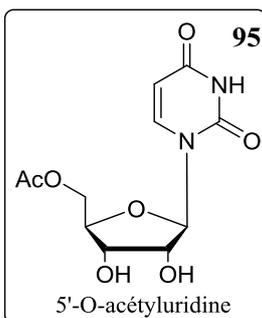
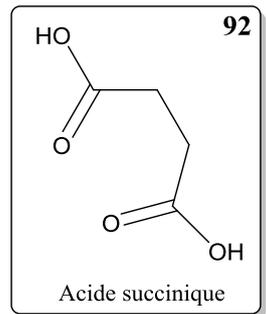
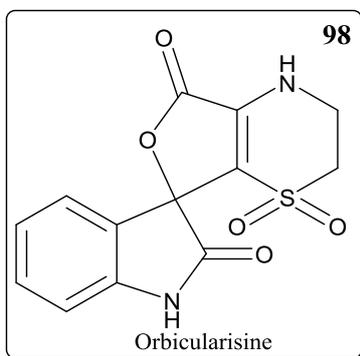
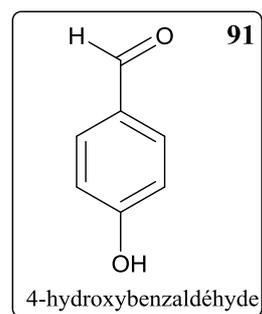
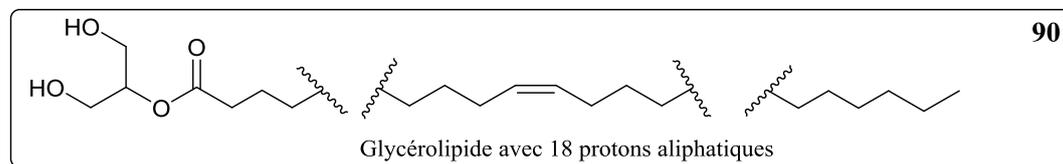
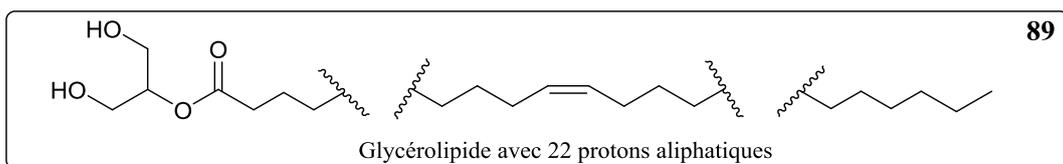
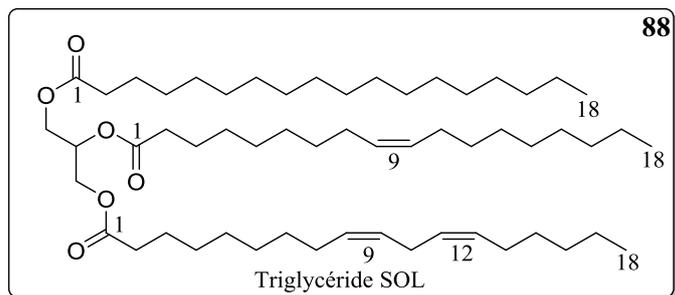
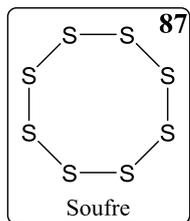
En ce sens, un volet "écologie chimique" pourrait être abordé sur *C. orbicularis*, en comparant la production des molécules pendant et en dehors la période de reproduction du bivalve sur une période de 2 à 3 ans. Il faudrait pour cela utiliser des répliquats pour chaque récolte.

La comparaison des profils chromatographiques des bruts de *L. roquesana* et de *C. orbicularis* a souligné le fait que ces bivalves produisent des molécules communes ou appartenant aux mêmes familles chimiques (au moins 6 métabolites détectés dans cette étude). Les premières analyses chimiques réalisées sur *L. roquesana* ont abouti à l'identification de composés préalablement identifiés dans certaines fractions actives de *C. orbicularis* à savoir

le soufre (**87**) et la 4-hydroxybenzaldéhyde (**91**). Au vu des résultats obtenus sur *C. orbicularis*, il serait intéressant de réaliser également une étude métabolomique sur *L. roquesana* (déréplication pour une comparaison avec le métabolome de *C. orbicularis*) et d'étendre les études chimiques à d'autres Lucinidae car aucune espèce de cette famille n'a été étudiée chimiquement. De nouvelles structures chimiques pourraient être ainsi isolées et identifiées. En ce sens, il serait également intéressant de considérer les fractions de *C. orbicularis* ne présentant pas d'activité antibactérienne, pour la recherche de structures originales comme l'est celle de l'orbicularisine (**98**).

Plus généralement, les espèces côtières de bivalves ont été peu exploitées en chimie jusqu'à ce jour. Ces résultats encouragent les études chimiques sur ces modèles biologiques en vue d'obtenir de nouvelles structures mais également pour comprendre leurs fonctionnements biologiques. La caractérisation de molécules appartenant au métabolome de *C. orbicularis* participera à une meilleure compréhension du fonctionnement de ce modèle.

STRUCTURE DES MOLECULES ISOLEES DANS CETTE ETUDE.



BIBLIOGRAPHIE

X. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- ⁰ A three-stages forms the foundation of seagrass ecosystems.
Heide, T.V.D.; Govers, L.L.; Fouw, J.; Oloff, H.; Geest, M.V.D.; Katwijk, M.M.V.; Piersma, T.; Koppel, J.V.D.; Silliman, B.R.; Smolders, A.J.P.; Gils, J.A.V. *Science*, **2012**, 336, 1432-1434.
- ¹ A natural history of botanical therapeutics.
Schmidt, B.; Ribnicky, D. M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W. T.; Raskin, I. A. *Metabolism*. **2008**, 57, 3-9.
- ² Isolation and purification of semimicro quantities of morphine.
Achor, L. B.; Geiling, E. M. K. *Anal. Chem.* **1954**, 26, 1061–1062.
- ³ Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants.
Bruneton, J. *ed Lavoisier*, **2008**, 2nd, 1136.
- ⁴ A new natural penicillin from *Penicillium chrysogenum*.
Edwin H. Flynn; McCormick, M. H.; Stamper, M. C.; DeValeria, H.; Godzeski, C. W. *J Am Chem Soc* **1962**, 84, 4594–4595.
- ⁵ Transactions of the drugs from the sea symposium.
Freudenthal, H. D. *J. Ocean Technol. Mar. Technol. Soc.* **1967**, 1–297.
- ⁶ Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. spongosine2.
Bergmann, W.; Burke, D. C. *J. Ocean Technol. Mar. Technol. Soc.* **1956**, 21, 226–228.
- ⁷ Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I.
Bergmann, W.; Feenez, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, 16, 981–987.
- ⁸ Potential anticancer agents. I LXXVI. Synthesis of purine nucleosides of P-D-arabinofuranose.
Reist, E. J.; Benitez, A.; Goodman, L.; Lee, W. W. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3274–3279.
- ⁹ The influence of natural products upon drug discovery.
Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215–234.
- ¹⁰ FDA approves first antiviral drug.
Caen archives. *Chem.Eng.News Archive.* **1978**, 1, 8.
- ¹¹ Surface area and the seabed area, volume, depth, slope, and topographic variation for the world's seas, oceans, and countries.
Costello, M. J.; Cheung, A.; De Hauwere, N. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 8821–8828.
- ¹² Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway.
Tadesse, M.; Gulliksen, B.; Strøm, M. B.; Styrvold, O. B.; Haug, T. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, 99, 286–293.

- ¹³ A natural marine compound, with a unique mechanism of action.
Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 97–105.
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ Enantioselective total synthesis of ecteinascidin.
Corey, E. J.; Gin, D. Y.; Kania, R. S. *Communications* **1996**, *5*, 9202–9203.
- ¹⁶ Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review.
Kim, S. K.; Wijesekara, I. *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 1–9.
- ¹⁷ Nonanomeric spiroketals in natural products : structures , sources , and synthetic strategies.
Aho, J. E.; Pihko, P. M.; Rissa, T. K. *Technology* **2005**, *105*, 4406–4440.
- ¹⁸ The exploration of marine biodiversity scientific and technological challenges.
Bouchet, P.; Billet, D.; Boxshall, G. A.; Boyen, C.; Charrier, B.; Cock, J. M. *Fund. BBVA* **2006**, *1*, 1–160.
- ¹⁹ Marine natural products.
Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; Keyzers, R.; Fusetani, N. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 116–211.
- ²⁰ Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs.
Benkendorff, K. *Biol. Rev.* **2010**, *85*, 757–775.
- ²¹ Classification Phylogénétique Du Vivant.
Lecointre, G.; Le Guyader, H. *Belin.* **2001**, *1*, 543.
- ²² Phylogenetic analysis of four nuclear protein-encoding genes largely corroborates the traditional classification of bivalvia (Mollusca).
Sharma, P. P.; González, V. L.; Kawauchi, G. Y.; Andrade, S. C. S.; Guzmán, A.; Collins, T. M.; Glover, E. A.; Harper, E. M.; Healy, J. M.; Mikkelsen, P. M. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2012**, *65*, 64–74.
- ²³ Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails.
Olivera, B. M.; Gray, W. R.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Varga, J.; Rivier, J.; De Santos, V.; Cruz, L. J. *Science.* **1985**, *4732*, 1338–1343.
- ²⁴ Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain.
Miljanich, G. P. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3029–3040.
- ²⁵ Peptide leads new class of chronic pain drugs.
Garber, K. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 399.

- ²⁶ The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10.
Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883–6885.
- ²⁷ The absolute configuration and synthesis of natural (-) - dolastatin 10.
Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463–5465.
- ²⁸ Conjugates of small Molecule drugs with antibodies and other proteins.
Feng, Y.; Zhu, Z.; Chen, W.; Prabakaran, P.; Lin, K.; Dimitrov, D. *S Biomedicines* **2014**, *2*, 1–13.
- ²⁹ Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia Rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp.
Hamann, M.; Scheuer, P. *J. Am. Chem.* **1993**, *10*, 5825–5826.
- ³⁰ The absolute stereochemistry of Kahalalide F.
Goetz, G.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 7739–7746.
- ³¹ Synthesis and structure determination of Kahalalide F.
López-Maciá, Á.; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398–11201.
- ³² Kahalalide F and ES285: potent anticancer agents from marine molluscs.
Faircloth, G.; Cuevas, C. *Progress in molecular and subcellular biology.* **2006**, *43*, 363–379.
- ³³ Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*.
Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C.A; Jensen, P. R.; Fenical, W.; John, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 355–357.
- ³⁴ Discovery and development of the anticancer agent Salinosporamide A (NPI-0052).
Fenical, W.; Jensen, P. R.; Palladino, M. A.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17*, 2175–2180.
- ³⁵ Phorboxazoles A and B: potent cytostatic macrolides from marine sponge *Phorbas* sp.
Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8126–8131.
- ³⁶ Dark chemical matter as a promising starting point for drug lead discovery.
Wassermann, A. M.; Lounkine, E.; Hoepfner, D.; Le Goff, G.; King, F. J.; Studer, C.; Peltier, J. M.; Grippo, M. L.; Prindle, V.; Tao, J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 958–966.
- ³⁷ A bacterial source for mollusk pyrone polyketides.
Lin, Z.; Torres, J. P.; Ammon, M. A.; Marett, L.; Teichert, R. W.; Reilly, C. A.; Kwan, J. C.; Hughen, R. W.; Flores, M.; Tianero, M. D. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 73–81.
- ³⁸ Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain).
Abad, M.; Ruiz, C.; Martínez, D.; Mosquera, G.; Sánchez, J. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1995**, *110*, 109–118.

- ³⁹ Lipidomic approaches towards deciphering glycolipids from microalgae as a reservoir of bioactive lipids.
Da Costa, E.; Silva, J.; Mendonça, S.; Abreu, M.; Domingues, M. *Mar. Drugs*. **2016**, *14*, 101.
- ⁴⁰ Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production.
D'Ippolito, G.; Sardo, A.; Paris, D.; Vella, F. M.; Adelfi, M. G.; Botte, P.; Gallo, C.; Fontana, A. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 28.
- ⁴¹ Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins).
Epand, R. F.; Savage, P. B.; Epand, R. M. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2007**, *1768* (10), 2500–2509.
- ⁴² Exploitable lipids and fatty acids in the invasive oyster *Crassostrea gigas* on the french atlantic coast.
Dagorn, F.; Couzinet-Mossion, A.; Kendel, M.; Beninger, P. G.; Vony, R.; Barnathan, G.; Wielgosz-Collin, G. *Mar. Drugs* **2016**, *104*, 4662–4697.
- ⁴³ Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca.
Joseph, J. D. *Prog. Lipid Res.* **1982**, *21*, 109–153.
- ⁴⁴ Non-Methylene-Interrupted Fatty Acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinus*).
Ackman, R. G.; Hooper, S. N. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1973**, *46*, 153–165.
- ⁴⁵ Sterols in mollusks and crustacea of the pacific northwest.
Gordon, D. T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 536–545.
- ⁴⁶ Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates.
Goad, L. J. *Pure Appl. Chem.* **1981**, *51*, 837–852.
- ⁴⁷ Major sterols of bivalve molluscs from the inner Puck Bay, southern Baltic.
Jarzębski, A. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *81*, 989–991.
- ⁴⁸ Sterols from Mytilidae show anti-aging and neuroprotective effects via anti-oxidative activity.
Sun, Y.; Lin, Y.; Cao, X.; Xiang, L.; Qi, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 21660–21673.
- ⁴⁹ Curcumin and alzheimer's disease.
Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, *16*, 285–297.
- ⁵⁰ Membrane-mediated neuroprotection by Curcumin from amyloid- β -peptide-induced toxicity.
Thapa, A.; Vernon, B. C.; De la Peña, K.; Soliz, G.; Moreno, H. a; López, G. P.; Chi, E. Y. *Langmuir* **2013**, *29*, 11713–11723.
- ⁵¹ Sterols from bivalves *Calymene soyoae* and *Bathymodiolus septemdiarum* living in deep sea.
Kawai, S.; Takada, Y.; Tsuchida, S. *Fish. Sci.* **2007**, *73*, 902–906.

- ⁵² The component fatty acids of the lipids of some species of marine and freshwater molluscs. Gardner, D. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **1972**, *52*, 827–838.
- ⁵³ Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-Dried New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. Murphy, K. .; Mann, N. .; Sinclair, A. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **2003**, *12* , 50–60.
- ⁵⁴ Lipid deterioration and its inhibition of japanese oyster *Crassostrea gigas* during frozen storage. Jeong, Y.; Ohshima, T.; Koizumi, C.; Kanou, Y. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **1990**, *56*, 2083–2091.
- ⁵⁵ Changes in molecular species compositions of glycerophospholipids in the adductor muscle of the giant ezo scallop *Patinopecten yessoensis* during frozen storage. Jeong, Y.; Ohshima, T.; Koizumi, C. *J. Food Lipids* **1999**, *6*, 131–147.
- ⁵⁷ PUFA biosynthesis pathway in marine scallop *Chlamys nobilis reeve*. Liu, H.; Zhang, H.; Zheng, H.; Wang, S.; Guo, Z.; Zhang, G. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12384–12391.
- ⁵⁸ Occurrence of the cis-4,7,10, trans-13-22:4 fatty acid in the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). Kraffe, E.; Grall, J.; Palacios, E.; Guerra, C.; Soudant, P.; Marty, Y. *Lipids.* **2010**, *45*, 437–444.
- ⁵⁹ Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. Budge, S.; Parrish, C.; Mckenzie, C. *Mar. Chem.* **2001**, *76*, 285–303.
- ⁶⁰ Physico-chemical characterisation of lipids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* and their healing properties on skin burns. Badiu, D. L.; Balu, A. M.; Barbes, L.; Luque, R.; Nita, R.; Radu, M.; Tanase, E.; Rosoiu, N. *Lipids.* **2008**, *43*, 829–841.
- ⁶¹ N-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. Angerer, P.; Von Schacky, C. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2000**, *3*, 439–545.
- ⁶² Impact of N-6 polyunsaturated fatty acids on growth of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with amikacin and ceftazidime. Giamarellos-Bourboulis, E. J.; Grecka, P.; Dionyssiou-Asteriou, A.; Giamarellou, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2187–2189.
- ⁶³ The effects of immediate enteral feeding with a formula containing high levels of omega-3 fatty acids in patients after surgery for esophageal cancer. Aiko, S.; Yoshizumi, Y.; Tsuwano, S.; Shimanouchi, M.; Sugiura, Y.; Maehara, T. *J Parenter Enter. Nutr.* **2005**, *29*, 141–147.
- ⁶⁴ Anti-cyclooxygenase effects of lipid extracts from the new zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. McPhee, S.; Hodges, L. D.; Wright, P. F. A.; Wynne, P. M.; Kalafatis, N.; Harney, D. W.; Macrides, T. A. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *146*, 346–356.

- ⁶⁵ Super critical liquid extract from mussels having anti-inflammatory activity.
Macrides, T. A.; Kalafatis, N. *United States Patent*, **2000**, *1*, 1-6.
- ⁶⁶ Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight.
Parente, L.; Perretti, M. *Biochemical Pharmacology*. **2003**, *65*, 153–159.
- ⁶⁷ The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*.
Osada, M.; Nomura, T. *Prostaglandins* **1990**, *40*, 229–239.
- ⁶⁸ Ionic and osmotic influence on prostaglandin release from the gill tissue of a marine bivalve, *Modiolus demissus*.
Freas, W.; Grollman, S. *J. Exp. Biol.* **1980**, *84*, 169–185.
- ⁶⁹ Himeic acid A: a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp.
Tsukamoto, S.; Hirota, H.; Imachi, M.; Fujimuro, M.; Onuki, H.; Ohta, T.; Yokosawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 191–194.
- ⁷⁰ Role of ubiquitination in Na,K-ATPase regulation during lung injury.
Helenius, I. T.; Dada, L. a; Sznajder, J. I. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2010**, *7*, 65–70.
- ⁷¹ The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.
Glickman, M. H.; Ciechanover, A. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373–428.
- ⁷² Mechanisms underlying ubiquitination.
Pickart, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 503–533.
- ⁷³ Flavocristamides A and B, new dna polymerase α inhibitors from a marine bacterium *Flavobacterium* sp.
Kohayashi, J.; Mikami, S.; Shigemori, H.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Izuta, S.; Yoshida, S. *Tetrahedron*. **1995**, *51*, 10487–10490.
- ⁷⁴ Pinnaic acid and tauropinnaic acid: two novel fatty acids composing a 6-azaspiro[4.5]decane unit from the okinawan bivalve *Pinna muricata*.
Chou, T.; Kuramoto, M.; Otani, Y.; Shikano, M.; Yazawa, K.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3871–3874.
- ⁷⁵ An efficient approach to the azaspirocyclic structure of halichlorine and pinnaic acid.
Lee, S.; Zhao, Z. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7921–7924.
- ⁷⁶ Notoamides A-D: prenylated indole alkaloids isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp..
Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 2254–2256.
- ⁷⁷ Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin a produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A.
Ma, Z.; Wang, N.; Hu, J.; Wang, S. *J. Antibiot. Tokyo.* **2012**, *65*, 317–322.

- ⁷⁸ Bioactive long chain n-acylethanolamines in five species of edible bivalve molluscs - possible implications for mollusc physiology and seafood industry.
Sepe, N.; De Petrocellis, L.; Montanaro, F.; Cimino, G.; Di Marzo, V. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids and Lipid Metab.* **1998**, *1389*, 101–111.
- ⁷⁹ A stress syndrome in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*.
Jeffries, H. P. *J. Invertebr. Pathol.* **1972**, *20*, 242–251.
- ⁸⁰ Free amino acid concentrations in *Mytilus edulis* (L.) from different locations in the southwestern part of the Netherlands: their possible significance as a biochemical stress indicator.
Zurburg, W.; Hummel, H.; Bogaards, R.; De Wolf, L.; Ravestein, H. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* **1989**, *93*, 413–417.
- ⁸¹ Amino acid and related compound composition in two symbiotic mytilid species from hydrothermal vents.
Pranal, V.; Fiala Medioni, A.; Colomines, J. C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, *119*, 155–166.
- ⁸² Phospholipids from soft tissues of the bivalve mollusk *Anadara Broughtonii*.
Tabakaeva, O. V.; Tabakaev, A. V. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52*, 1–2.
- ⁸³ Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity.
Livingstone, D. R.; Widdows, J.; Fieth, P. *Mar. Biol.* **1979**, *53*, 41–55.
- ⁸⁴ Composition of free amino acids and related compounds in invertebrates with symbiotic bacteria at hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico.
Sun, Y.; Lin, Y.; Cao, X.; Xiang, L.; Qi, J.; Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A. *Mar. Biol.* **2000**, *73*, 411–420.
- ⁸⁵ Composition of free amino acids and related compounds in invertebrates with symbiotic bacteria at hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico.
Pruski, A. M.; Fiala-médioni, A.; Fisher, C. R.; Colomines, J. C. *Mar. Biol.* **2000**, *136*, 411–420.
- ⁸⁶ Fatty acid synthesis in relation to gametogenesis in the mussel *Mytilus Edulis* (L.)
Kluytmans, J. H.; Boot, J. H.; Oudejans, R. C. H. M.; Zandee, D. I. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *81*, 959–963.
- ⁸⁷ Présence de quantités importantes de thiotaurine et d'hypotaurine dans les tissus de *Riftia pachyptila* (Pogonophore, Vestimentifère).
Alberic, P. *C.S.acad.Sci.Paris* **1986**, *302*, 503–508.
- ⁸⁸ Unusual amino compounds in the tissues of *Calyptogena phaseoliformis* (Japan Trench): possible link to symbiosis.
Alberic, P.; Boulegue, J. *Prog.Oceanog.* **1990**, *24*, 89–101.
- ⁸⁹ Amino acids from marine algae. in: Scheuer, P. J. (ed.) marine natural products.
Fattorusso, E.; Piattelli, M. *Acad. Press New York.* **1980**, *3*, 95–140.

- ⁹⁰ Amino acid metabolism in molluscs. in: the Mollusca. K.M. Wilbur, ser ed., (metabolic biochemistry and molecular biomechanics P.W. Hochachka, ed.). Bishop, S. H.; Ellis, L. L.; Burcham, J. M. *Acad. Press New York*. **1983**, *1*, 243–327.
- ⁹¹ Physiological actions of taurine.
Huxtable, R. J. *Physiol Rev* **1992**, *72*, 101–163.
- ⁹² Occurrence of two new mycosporine-like aminoacids, mytilins A and B in the edible mussel, *Mytilus galloprovincialis*.
Chioccaro, F.; Misuraca, G.; Novellino, E.; Prota, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3181–3182.
- ⁹³ Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: a bioinformatics study.
Singh, S. P.; Klisch, M.; Sinha, R. P.; Häder, D.-P. *Genomics*. **2010**, *95*, 120–128.
- ⁹⁴ Characterization of ace inhibitory peptides from *Macraa veneriformis* hydrolysate by nano-liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (NANO-LC-ESI-MS) and molecular docking.
Liu, R.; Zhu, Y.; Chen, J.; Wu, H.; Shi, L.; Wang, X.; Wang, L. *Mar. Drugs*. **2014**, *12*, 3917–3928.
- ⁹⁵ A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca*.
Ferreira, S. H. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, *24*, 163–169.
- ⁹⁶ Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review.
Harnedy, P. A.; FitzGerald, R. J. *J. Funct. Foods*. **2012**, *4*, 6–24.
- ⁹⁷ Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production.
Murray B.A., FitzGerald, R. J. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 773–791.
- ⁹⁸ Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca).
Leung, M. K.; Stefano, G. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 955–958.
- ⁹⁹ A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii*.
Jung, W.-K.; Je, J.-Y.; Kim, H.-J.; Kim, S.-K. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 199–205.
- ¹⁰⁰ Shorebird foraging behavior, diet, and abundance vary with harmful algal bloom toxin concentrations in invertebrate prey.
Kvitek, R.; Bretz, C. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *293*, 303–309.
- ¹⁰¹ Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation.
Bricelj, V. M.; Shumway, S. E. *Rev. Fish. Sci.* **1998**, *6*, 315–383.
- ¹⁰² Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops.
Satake, M.; Terasawa, K.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5955–5958.
- ¹⁰³ Diarrhetic shellfish toxins.
Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M. *Tetrahedron*. **1985**, *41*, 1019–1025.

- ¹⁰⁴ Identification and characterization of pectenotoxin (PTX) 4 and (PTX) 7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins.
Sasaki, K.; Wright, J. L. C.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2475–2480.
- ¹⁰⁵ Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.
Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869–5872.
- ¹⁰⁶ Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species.
Lee, J. S.; Igarashi, T.; Fraga, S. *J. Appl. Phycol.* **1989**, *1*, 147–152.
- ¹⁰⁷ Isolation and structure of brevetoxin B from the “red tide” dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*).
Lin, Y.; Risk, M. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 6773–6775.
- ¹⁰⁸ Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
Murata, M.; Legrand, a. M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4380–4386.
- ¹⁰⁹ Absolute configuration of brevetoxins.
Shimizu, Y.; Bando, H.; Chou, H.-N.; Van Duyne, G.; Clardy, J. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, *1*, 1656–1658.
- ¹¹⁰ A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway.
Miles, C. O.; Wilkins, A. L.; Samdal, I. A.; Sandvik, M.; Petersen, D.; Quilliam, M. A.; Naustvoll, L. J.; Rundberget, T.; Torgersen, T.; Hovgaard, P. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1423–1433.
- ¹¹¹ Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the adriatic sea.
Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8897–8900.
- ¹¹² The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*.
Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1975–1978.
- ¹¹³ Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin.
Yasumoto, T.; Nagai, H.; Yasumura, D.; Michishita, T.; Endo, A.; Yotsu, M.; Kotaki, Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *479*, 44–51.
- ¹¹⁴ Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin.
Simidu, U.; Kita-Tsukamoto, K.; Yasumoto, T.; Yotsu, M. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1990**, *40*, 331–336.
- ¹¹⁵ Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish.
Yotsu, M.; Yamazaki, T.; Meguro, Y.; Endo, A.; Murata, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T. *Toxicon.* **1987**, *25*, 225–228.

- ¹¹⁶ Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district.
Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* **1978**, *44*, 1249–1255.
- ¹¹⁷ Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin.
Fujiki, H.; Sukanuma, M.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Takagi, K.; Uda, N.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Japanese J. Cancer Res.* **1988**, *79*, 1089–1093.
- ¹¹⁸ Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe.
Kumagai, M.; Yanagi, T.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Kat, M.; Lassus, P.; Rodriguez-Vazquez, J. A. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 2853–2857.
- ¹¹⁹ Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*.
Tachibana, K.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469–2471.
- ¹²⁰ Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels, *Mytilus edulis*.
Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9967–9968.
- ¹²¹ Two analogs of azaspiracids isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland.
Ofuji, M.; Satake, M.; McMahon, T.; Silke, J.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 99–102.
- ¹²² Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe.
Ofuji, K.; Satake, M.; McMahon, T.; James, K. J.; Naoki, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 740–742.
- ¹²³ Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, part 1: intelligence gathering and tentative proposal.
Nicolaou, K. C.; Vyskocil, S.; Koftis, T. V.; Yamada, Y. M. A.; Ling, T.; Chen, D. Y. K.; Tang, W.; Petrovic, G.; Frederick, M. O.; Li, Y. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 4312–4318.
- ¹²⁴ Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1.
Nicolaou, K. C.; Koftis, T. V.; Vyskocil, S.; Petrovic, G.; Tang, W.; Frederick, M. O.; Chen, D. Y. K.; Li, Y.; Ling, T.; Yamada, Y. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2859–2872.
- ¹²⁵ Structures and partial stereochemical assignments for prymnesin-1 and prymnesin-2: potent hemolytic and ichthyotoxic glycosides isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*.
Igarashi, T.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8499–8511.
- ¹²⁶ A potent ichthyotoxic and hemolytic glycoside isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*.
Igarashi, T.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 479–480.

- ¹²⁷ Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin, constituents of the marine Mollusk *Stylocheilus longicauda*.
Kato, Y.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2245–2246.
- ¹²⁸ Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland.
James, K. J.; Gillman, M.; Amandi, M. F.; López-Rivera, A.; Puente, P. F.; Lehane, M.; Mitrovic, S.; Furey, A. *Toxicon.* **2005**, *46*, 852–858.
- ¹²⁹ Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels.
Wright, J.; Falk, M.; McInnes, G.; Walter, J. *Can. J.* **1990**, *6*, 22–25.
- ¹³⁰ Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*).
Novaczek, I.; Madhyastha, M. S.; Ablett, R. F.; Donald, A.; Johnson, G.; Nijjar, M. S.; Sims, D. E. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1992**, *49*, 312–318.
- ¹³¹ Domoic acid excretion in dungeness crabs, razor clams and mussels.
Schultz, I. R.; Skillman, A.; Woodruff, D. *Mar. Environ. Res.* **2008**, *66*, 21–23.
- ¹³² Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*).
Grovel, O.; Pouchus, Y.F.; Verbist, J.F. *Toxicon.* **2003**, *42*, 297–300.
- ¹³³ High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton.
Quilliam, M. A.; Sim, P. G.; McCulloch, A. W.; McInnes, A. G. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1989**, *36*, 139–154.
- ¹³⁴ Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry.
Furey, A.; Lehane, M.; Gillman, M.; Fernandez-Puente, P.; James, K. J. *J. Chromatogr. A* **2001**, *938*, 167–174.
- ¹³⁵ Amnesic shellfish poisoning toxins in shellfish : estimation of uncertainty of measurement for a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method.
Holland, P. T.; McNabb, P.; Selwood, A. I.; Neil, T. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 1095–1100.
- ¹³⁶ A biologically active diphenyl ether from the gree alga *Cladophora fascicularis*.
Kuniyoshi, M.; Yamada, K.; Higa, T. *Experienta.* **1985**, *41*, 523–524.
- ¹³⁷ Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from west sumatra, Indonesia.
Handayani, D.; Edrada, R.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L.; Van Soest, R. W. M.; Kunzmann, A.; Soedar, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1313–1316.
- ¹³⁸ A new tetrabromodiphenyl ether from the sponge *Dysidea herbacea* of the Indian ocean.
Anjaneyulu, V.; Nageswara Rao, K.; Radhika, P.; Muralikrishna, M.; Connolly, J. D. *Indian J. Chem. Sect. B Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1996**, *35*, 89–90.

- ¹³⁹ Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the baltic sea.
Malmvärn, A.; Marsh, G.; Kautsky, L.; Athanasiadou, M.; Bergman, Å.; Asplund, L. *Env. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 2990–2997.
- ¹⁴⁰ Novel tetraamines, pentaamines and hexaamines in sea urchin, sea cucumber, sea squirt and bivalves.
Hamana, K.; Niitsu, M.; Samejima, K.; Matsuzaki, S. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1991**, *100*, 59–62.
- ¹⁴¹ Coruscol A, a new metabolite from the marine-derived fungus *Penicillium* species.
Kagata, T.; Shigemori, H.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 886–887.
- ¹⁴² A novel marine carotenoid, mactraxanthin from the japanese edible surf clam.
Matsuno, T.; Sakaguchi, S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 911–912.
- ¹⁴³ Structure of new cartenoids from *Corbicula* clam *Corbicula japonica*.
Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1341–1344.
- ¹⁴⁴ Carotenoids in marine invertebrates living along the Kuroshio current coast.
Maoka, T.; Akimoto, N.; Tsushima, M.; Komemushi, S.; Mezaki, T.; Iwase, F.; Takahashi, Y.; Sameshima, N.; Mori, M.; Sakagami, Y. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1419–1427.
- ¹⁴⁵ Characterization of fucoxanthin and fucoxanthinol esters in the chinese surf clam, *Macra chinensis*.
Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1563–1567.
- ¹⁴⁶ Chlorophyllonic acid and methyl ester, a new chlorophyll a related compound isolated as an antioxidant from short-necked clam, *Ruditapes philippinarum*.
Yamamoto, K.; Sakata, K.; Watanabe, N.; Yagi, A.; Brinen, L. S.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2587–2588.
- ¹⁴⁷ Chlorophyll-A-related compounds isolated as antioxidants from marine bivalves.
Watanabe, N.; Yamamoto, K.; Ihshikawa, H.; Yagi, A.; Sakata, K.; Brinen, L. S.; Clardy, J. *Journal Nat. Prod.* **1993**, *56*, 305–317.
- ¹⁴⁸ Chlorophyllone-A, a new pheophorbide-A related compound isolated from *Ruditapes philippinarum* as an antioxidative compound.
Sakata, K.; Yamamoto, K.; Ishikawa, H.; Yagi, A.; Etoh, H.; Ina, K. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1165–1168.
- ¹⁴⁹ Isolation and characterization of antitumor polysaccharides from the marine mollusk *Ruditapes philippinarum*.
Zhang, L.; Liu, W.; Han, B.; Sun, J.; Wang, D. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 103–110.
- ¹⁵⁰ Arsenic compounds from the kidney of the giant clam *Tridacna maxima*: isolation and identification of an arsenic-containing nucleoside.
Francesconi, K. A.; Edmonds, J. S.; Stick, R. V. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, *8*, 1349–1357.

- ¹⁵¹ An arsenic-containing nucleoside from the kidney of the giant clam, *Tridacna maxima*. Francesconi, K. A.; Stick, R. V.; Edmonds, J. S. *J. Chem. Soc.* **1991**, *1*, 928–929.
- ¹⁵² Molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18s and 28s rRNA genes. Taylor, J. D.; Williams, S. T.; Glover, E. A.; Dyal, P. *Zool. Scr.* **2007**, *36*, 587–606.
- ¹⁵³ *Lucinidae (Bivalvia) - the most diverse group of chemosymbiotic Molluscs*. Taylor, J. D.; Glover, E. *Zool. J. Linn. Soc.* **2005**, *148*, 421–438.
- ¹⁵⁴ Oxygen, sulphide and nutrient uptake of the mangrove mud clam *Anodontia edentula* (family: Lucinidae). Leбата, M. J. H. L. *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, *42*, 1133–1138.
- ¹⁵⁵ New molecular phylogeny of Lucinidae: increased taxon base with focus on tropical Western Atlantic species (Mollusca: Bivalvia). Taylor, J.; Glover, E.; Smith, L.; Ikebe, C.; Williams, S.T. *Zootaxa.* **2016**, *4196*, 381-398.
- ¹⁵⁶ *Bathyaustriella thionipta*, a new lucinid Bivalve from a hydrothermal vent on the Kermadec ridge, New Zealand and its relationship to shallow-water taxa (Bivalvia: Lucinidae). Glover, E. A.; Taylor, J. D.; Rowden, A. A. *J. Molluscan Stud.* **2004**, *70*, 283–295.
- ¹⁵⁷ Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. Carney, R. S. *Geo-Marine Lett.* **1994**, *14*, 149–159.
- ¹⁵⁸ Autochthonous death assemblages from chemosynthetic communities at petroleum seeps: biomass, energy flow and implications for the fossil record. Callender, W. R.; Powell, E. N. *Hist. Biol.* **1997**, *12*, 165–198.
- ¹⁵⁹ *Lucinoma kazani* n. sp. (Mollusca, Bivalvia): evidence of a living community associated with a cold seep in the eastern Mediterranean sea. Salas, C.; Woodside, J. *Deep. Res. I* **2002**, *49*, 991–1005.
- ¹⁶⁰ Habitat characterization and nutritional strategies of the endosymbiont-bearing Bivalve *Lucinoma aequizonata*. Cary, S.; Vetter, R.; Felbeck, H. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1989**, *55*, 31–45.
- ¹⁶¹ A new species of *Lucinoma* (Bivalvia: Lucinoidea) from the oxygen minimum zone of the Oman Margin, Arabian sea. Oliver, P. G.; Holmes, A. M. *J. Conchol.* **2006**, *39*, 63–77.
- ¹⁶² The ecological importance of an invertebrate chemoautotrophic symbiosis to phanerogam seagrass beds. Johnson, M. A.; Fernandez, C.; Pergent, G. *Bull. Mar. Sci.* **2002**, *71*, 1343–1351.
- ¹⁶³ Fine structure of the Apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. Azevedo, C.; Cachola, R. *Dis. Aquat. Organ.* **1992**, *14*, 69–73.

- ¹⁶⁴ Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from *Chonburi province*, Gulf of Thailand.
Tuntiwaranuruk, C.; Chalermwat, K.; Upatham, E. S.; Kruatrachue, M.; Azevedo, C. *Dis. Aquat. Organ.* **2004**, *58*, 47–53.
- ¹⁶⁵ Metazoan parasites and other symbionts of Cetaceans in the Caribbean.
Mignucci-Giannoni, A. A.; Hoberg, E. P.; Siegel-Causey, D.; Williams, E. H. *J. Parasitol.* **1998**, *84*, 939–946.
- ¹⁶⁶ Prevalence of the commensal barnacle *Xenobalanus globicipitis* on cetacean species in the eastern tropical pacific ocean, and a review of global occurrence.
Kane, E. a; Olson, P. a; Gerodette, T.; Fiedler, P. C. *Fish. Bull.* **2008**, *106*, 395–404.
- ¹⁶⁷ The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis.
McFall-Ngai, M.; Nyholm, S. V.; Castillo, M. G. *Semin. Immunol.* **2010**, *22*, 48–53.
- ¹⁶⁸ Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats.
Felberk, H.; Childress, J. J.; Somero, G. N. *Nature* **1981**, *293*, 291–293.
- ¹⁶⁹ Evolution of chemoautotrophic endosymbioses in Bivalves. Bivalve-bacteria chemosymbioses are phylogenetically diverse but morphologically similar.
Distel, D. L. *Am. Inst. Biol. Sci.* **1998**, *48*, 277–286.
- ¹⁷⁰ Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates.
Fisher, C. R. *Rev. Aquat. Sci.* **1990**, *2*, 399–436.
- ¹⁷¹ Evolutionary implications of sulfide-oxidizing symbioses in Bivalves.
Reid, R. G. B. *Hong Kong Univ. Press.* **1990**, *1*, 127–140.
- ¹⁷² Fossil chemosynthetic communities related to vents or seeps in sedimentary basins: the pseudodionherms of southeastern France compared to other worlds examples.
Gaillard, C.; Rio, M.; Rolin, Y.; Roux, M. *Palaios.* **1992**, *7*, 451–465.
- ¹⁷³ Are hydrothermal vent animals living fossils?
Little, C. T. S.; Vrijenhoek, R. C. *Trends Ecol. Evol.* **2003**, *18*, 582–588.
- ¹⁷⁴ Sulfide-oxidizing symbiosis in Lucinaceans: implications for Bivalve evolution.
Reid, R.; Brand, D. *Veliger.* **1986**, *29*, 3–24.
- ¹⁷⁵ Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*.
Gros, O.; Darrasse, A.; Durand, P.; Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2324–2330.
- ¹⁷⁶ Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses.
Caro, A.; Gros, O.; Got, P.; De Wit, R.; Troussellier, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2101–2109.

- ¹⁷⁷ Sterol and fatty acid composition of the clam, *Codakia orbicularis*, with chemoautotrophic symbionts.
Berg, C.J.; Krzynowek, J.; Atalo, P.; Wiggin, K. *Lipids*. **1985**, *20*, 116-120.
- ¹⁷⁸ Analysis of a cDNA-derived sequence of a novel mannose-binding lectin, codakine, from the tropical clam *Codakia orbicularis*.
Gourdine, J.P.; Smith-Ravin, E.J. *Fish & Shellfish Immunology*. **2007**, *22*, 498-509.
- ¹⁷⁹ Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae).
Frenkiel, L.; Mouëza, M. *Zoomorphology* **1995**, *115*, 51–61.
- ¹⁸⁰ Hurricane effects on seagrasses along alabama's Gulf Coast.
Byron, D.; Heck, K. *Estuaries and Coasts* **2006**, *29*, 939–942.
- ¹⁸¹ Seasonal biomass and energy content in seagrass communities on the West Coast of Florida.
Dawes, C.; Margaret, O. H.; Raymond, K. R. *J. Coast. Res.* **1985**, *1*, 255–262.
- ¹⁸² Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria.
Ott, J.; Bright, M.; Bulgheresi, S. *Symbiosis* **2004**, *36*, 103–126.
- ¹⁸³ Plasticité tissulaire et cellulaire du filament branchial des lucinidae symbiotiques côtiers *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica*.
Elisabeth, N. H. *Thesis*. **2011**, *1*, 1-198.
- ¹⁸⁴ Écologie des nématodes marins libres et symbiotiques en milieu tropical. Développement de la microspectrométrie raman comme outil de caractérisation des organismes thiotrophiques.
Maurin, L. *Thesis*. **2009**, *1*, 1-195.
- ¹⁸⁵ Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site.
Jannasch, H. W.; Nelson, D. C.; Wirsen, C. O. *Nature*. **1989**, *342*, 834–836.
- ¹⁸⁶ Metazoans in extreme environments: adaptations of hydrothermal vent and hydrocarbon seep fauna.
McMullin, E. R.; Bergquist, D. C.; Fisher, C. R. *Gravit. Space Biol. Bull.* **2000**, *13*, 13–23.
- ¹⁸⁷ Chemical defense of hydrothermal vent and hydrocarbon seep organisms: a preliminary assessment using shallow-water consumers.
Kicklighter, C. E.; Fisher, C. R.; Hay, M. E. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, *275*, 11–19.
- ¹⁸⁸ Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population.
Caro, A.; Got, P.; Bouvy, M.; Troussellier, M.; Gros, O. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 3304–3313.
- ¹⁸⁹ Lack of endosymbiont release by two lucinidae (Bivalvia) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships.
Brissac, T.; Gros, O.; Mercot, H. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *67*, 261–267.

¹⁹⁰ Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbionts in marine bivalves.

Distel, D. L.; Cavanaugh, C. M. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 1932–1938.

¹⁹¹ Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the *Genus Bathymodiolus*.

Won, Y. J.; Hallam, S. J.; O'Mullan, G. D.; Pan, I. L.; Buck, K. R.; Vrijenhoek, R. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6785–6792.

¹⁹² Diversity and function in microbial mats from the lucky strike hydrothermal vent field.

Crépeau, V.; Cambon Bonavita, M. A.; Lesongeur, F.; Randrianalivelo, H.; Sarradin, P. M.; Sarrazin, J.; Godfroy, A. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *76*, 524–540.

¹⁹³ Bacterial endosymbionts in marine bivalves from cold-seep habitats.

Imhoff, J. F.; Sahling, H.; Süling, J.; Kath, T. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2003**, *249*, 39–51.

¹⁹⁴ Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis.

Dubilier, N.; Bergin, C.; Lott, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 725–740.

¹⁹⁵ Modelling feeding processes in bivalves: a mechanistic approach.

Saraiva, S.; Van der Meer, J.; Kooijman, S. A. L. M.; Sousa, T. *Ecol. Modell.* **2011**, *222*, 514–523.

¹⁹⁶ Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions.

Suzuki, I. *Can. J. Microbiol.* **1999**, *45*, 97–105.

¹⁹⁷ The biochemical versatility of chemosynthetic bacteria at deep sea hydrothermal vents.

Jannasch, H. W.; Wirsén, C. *Biol. Soc. Wash. Bull.* **1985**, *6*, 325–334.

¹⁹⁸ Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont.

Minic, Z.; Hervé, G. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3093–3102.

¹⁹⁹ *N*-Acylated homoserine lactone production and involvement in the biodegradation of aromatics by an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa*.

Yong, Y.C.; Zhong, J.J. *Process Biochemistry.* **2010**, *45*, 1944–1948.

²⁰⁰ American Seashells.

Abbot, R. T. *Van Nostra.* **1974**, *1*, 663.

²⁰¹ Methods in lipidomics and their applications.

Li, M.; Yang, L.; Bai, Y.; Liu, H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 161–175.

²⁰² Refinement of the structure of orthorhombic sulfur.

Rettig, S. J.; Trotter, J. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* **1987**, *43*, 2260–2262.

²⁰³ Aqueous sulfur sols.

Stedel, R. *Elem. Sulfur Sulfur-Rich Compd. I* **2003**, *230*, 153–166.

²⁰⁴ Solid sulfur allotropes sulfur allotropes.

Stedel, R.; Eckert, B. *Elem. Sulfur Sulfur-Rich Compd. I.* **2003**, *230*, 1–80.

- ²⁰⁵ Solubility of elemental sulfur in water at 298 K.
Boulegue, J. *Phosphorous Sulfur Relat. Elem.* **1978**, 5, 127–128.
- ²⁰⁶ Chromatographic separation of higher polythionates SnO_6^{2-} ($N = 3.. .22$) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur secretions. Steudel, R.; Holdt, G.; Gobel, T.; Hazeu, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 151–153.
- ²⁰⁷ Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: an application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (F.W.I.). Himmel, D.; Maurin, L. C.; Mansot, J.-L.; Gros, O. *Mar. Environ. Res.* **2010**, 69, 382–389.
- ²⁰⁸ In situ localization of sulphur in the thioautotrophic symbiotic model *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) by cryo-EFTEM microanalysis. Lechère, J.-P.; Frébourg, G.; Gaill, F.; Gros, O. *Biol. Cell.* **2006**, 98, 163–170.
- ²⁰⁹ Sulfur-oxidising bacterial analysis of phylogeny and specificity by 16s rRNA sequences. Distel, D. L.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Giovannoni, S. J.; Pace, B.; Pace, N. R.; Stahl, D.; Felbeck, H. *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 2506–2510.
- ²¹⁰ Polysulfides as intermediates in the oxidation of sulfide to sulfate by *Beggiatoa* spp. Berg, J. S.; Schwedt, A.; Kreutzmann, A.-C.; Kuypers, M. M. M.; Milucka, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 629–636.
- ²¹¹ Antibacterial effect of elemental sulfur. Libenson, L.; Hadley, F. P.; McIlroy, A. P.; Wetzel, V. M.; Mellon, R. R. *J. Infect. Dis.* **1953**, 93, 28–35.
- ²¹² Study by ³¹P NMR spectroscopy of the triacylglycerol degradation processes in olive oil with different heat-transfer mechanisms. Lucas-Torres, C. Pérez, Á.; Cabañas, B.; Moreno, A. *Food Chem.* **2014**, 165, 21–28.
- ²¹³ The Updated Bottom Up Solution Applied to Mass Spectrometry of Soybean Oil in a Dietary Supplement Gelcap. Byrdwell, W. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 5143–5160.
- ²¹⁴ The bottom-up solution to the triacylglycerol lipidome using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Byrdwell, W. C. *Lipids* **2005**, 40, 383–417.
- ²¹⁵ Triacylglycerol structure and composition of hydrogenated soybean oil margarine and shortening basestocks. List, G. .; Byrdwell, W. C.; Steidley, K. R.; Adlof, R. O.; Neff, W. E. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4692–4695.
- ²¹⁶ Triacylglycerols of evening primrose *Oenothera biennis* seed oil. Ratnayake, W. M. N.; Matthews, D. G.; Ackman, R. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, 66, 966–969.

- ²¹⁷ Lipid, FA, and sterol composition of New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*).
Murphy, K. J.; Mooney, B. D.; Mann, N. J.; Nichols, P. D.; Sinclair, A. J. *Lipids* **2002**, *37*, 587–595.
- ²¹⁸ Atmospheric Pressure Ionization Techniques.
Byrdwell, W. C. *Modern methods for lipid analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. **2005**, *42*, 1-18.
- ²¹⁹ Triacylglycerol structure and composition of hydrogenated soybean oil margarine and shortening basestocks.
Byrdwell, W. C. *Lipids*. **2016**, *51*, 211–227.
- ²²⁰ Qualitative and quantitative analysis of triacylglycerols by atmospheric pressure ionization (APCI & ESI) techniques.
Byrdwell, W. C. *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Related Techniques*. **2005**, *2*, 298-412.
- ²²¹ Physiology of development and germination.
Bradford, K. J. *Seed Sci. Res.* **1995**, *5*, 1–3.
- ²²² Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential.
Dubois, V.; Breton, S.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 710–732.
- ²²³ Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications.
Karupiah, T.; Sundram, K. *Nutr. Metab. Lond.* **2007**, *4*, 16.
- ²²⁴ Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data.
Messina, M. J.; Persky, V.; Setchell, K. D. R.; Barnes, S. *Nutr. Cancer*. **1994**, *21*, 113–131.
- ²²⁵ Soybean oil biosynthesis: role of diacylglycerol acyltransferases.
Li, R.; Hatanaka, T.; Yu, K.; Wu, Y.; Fukushige, H.; Hildebrand, D. *Funct. Integr. Genomics*. **2013**, *13*, 99–113.
- ²²⁶ Lipid biosynthesis.
Ohlogge, J. B.; Browse, J. *Biochemistry*. **1995**, *7*, 957–970.
- ²²⁷ An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the rod1 gene of *Arabidopsis*.
Lu, C.; Xin, Z.; Ren, Z.; Miquel, M.; Browse, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 18837–18842.
- ²²⁸ Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides.
Hunter, E. J. Studies on Effects of Dietary Fatty Acids as Related to Their Position on Triglycerides. *Lipids*. **2001**, *36*, 655–668.
- ²²⁹ Stereospecific analyses of several vegetable fats.
Brockhoff, H.; Yurkowski, M. *J. Lipid Res.* **1966**, *7*, 62–64.

- ²³⁰ Occurrence and characteristics of oils and fats.
Padley, F. B.; Gunstone, F. D.; Harwood, J. L. *The Lipid Handbook*. **1994**, 47–223.
- ²³¹ Lipids.
Nawar, W. W. *Food Chemistry*. **1996**, 225–319.
- ²³² Following extractions using solvent and aqueous.
Puangsri, T.; Abdulkarim, S. M.; Ghazali, H. M. *J. Food Lipids*. **2005**, *12*, 62–76.
- ²³³ Glycerolipids from a *Sarcotragus* species sponge.
Liu, Y.; Jung, J. H.; Ji, H.; Zhang, S. *Molecules*. **2006**, *11*, 714–719.
- ²³⁴ Algicidal activity of glycerolipids from brown alga *Ishige sinicola* toward red tide microalgae.
Hirao, S.; TARA, K.; Kuwano, K.; Tanaka, J.; Ishibashi, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 372–374.
- ²³⁵ Identification of the first fumonisin mycotoxins with three acyl groups by ESI-ITMS and ESI-TOFMS following RP-HPLC separation: Palmitoyl, Linoleoyl and Oleoyl EFB₁ fumonisin isomers from a solid culture of *Fusarium verticillioides*.
Bartók, T.; Tölgyesi, L.; Mesterházy, Á.; Bartók, M.; Szécsi, Á. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2010**, *27*, 1714–1723.
- ²³⁶ Cyclitol derivatives from the sponge *Sarcotragus* species.
Liu, Y.; Lee, C.; Hong, J.; Jung, J. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1467–1469.
- ²³⁷ Positional specificity of purified milk lipoprotein lipase.
Nilsson-Ehle, P.; Egelrud, T.; Belfrage, P.; Olivecrona, T.; Borgström, B. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6734–6737.
- ²³⁸ Apparent convergence (at 2-Monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols.
Yang, L. Y.; Kuksis, A. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1173–1186.
- ²³⁹ Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific ocean.
Nelson, M. M.; Phleger, C. F.; Nichols, P. D. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 58–65.
- ²⁴⁰ Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: isolation, synthesis, and biological activity.
Chang, H. W.; Jang, K. H.; Lee, D.; Kang, H. R.; Kim, T. Y.; Lee, B. H.; Choi, B. W.; Kim, S.; Shin, J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3589–3592.
- ²⁴¹ Profiling of complex lipids in marine microalgae by UHPLC/Tandem mass spectrometry.
Cutignano, A.; Luongo, E.; Nuzzo, G.; Pagano, D.; Manzo, E.; Sardo, A.; Fontana, A. *Algal Res.* **2016**, *17*, 348–358.
- ²⁴² Examination of the structures of several glycerolipids from marine macroalgae by NMR and GC-MS.
Logvinov, S.; Gerasimenko, N.; Esipov, A.; Denisenko, V. A. *J. Phycol.* **2015**, *51*, 1066–1074.

- ²⁴³ Improved production of bioactive glucosylmannosyl-glycerolipid by sponge-associated *Microbacterium* species.
Lang, S.; Beil, W.; Tokuda, H.; Wicke, C.; Lurtz, V. *Mar. Biotechnol.* **2004**, *06*, 152-156.
- ²⁴⁴ Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*.
Andersen, R. J.; Wolfe, M. S.; Faulkner, D. J. *Mar. Biol.* **1974**, *27*, 281–285.
- ²⁴⁵ Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*.
Ramos-Nino, M. E.; Clifford, M. N.; Adams, M. R. *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *80*, 303–310.
- ²⁴⁶ Antibiotic metabolites from a marine *Pseudomonad*.
Wratten, S. J.; Wolfe, M. S.; Andersen, R. J.; Faulkner, D. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 411–414.
- ²⁴⁷ Isolation and identification of antibacterial compounds isolated from endophytic fungus *Emericella qaudrilineata*.
Goutam, J. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2016**, *4*, 1-7.
- ²⁴⁸ An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain.
Okino, S.; Noburyu, R.; Suda, M.; Jojima, T.; Inui, M.; Yukawa, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 459–464.
- ²⁴⁹ Organic acids from leaves of *Cerbera manghas*.
Zhang, X. P.; Pei, Y. H.; Liu, M. S.; Kang, S. L.; Zhang, J. Q. *Chinese Tradit. Herb. Drugs* **2010**, *41*, 1763–1765.
- ²⁵⁰ The chemistry of the blue stain fungi. Part 3.' some metabolites of *Ceratocystis minor* (Hedgcock) Hunt.
Ayer, W. A.; Attah-Poku, S. .; Browne, L. M.; Orszanska, H. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 765–769.
- ²⁵¹ Alkaloids and nucleoside derivatives from a fungal endophyte of *Huperzia serrata*.
Ying, Y. M.; Shan, W. G.; Liu, W. H.; Zhan, Z. J. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 184–186.
- ²⁵² Insecticidal activity of compounds from the south china sea invertebrate *Scapharca subcrenata*.
Yan, X.; Xue-ping, S.; Xiu-guo, Z.; Wan-ping, T. *Chem. Nat. Compd.* **2015**, *51*, 800–802.
- ²⁵³ Role of thymidine for the activity of trimethoprim, sulfonamides and their combinations.
Then, R. L. *Zentralbl. Bakteriol. A.* **1980**, *247*, 483–494.
- ²⁵⁴ Low trimethoprim susceptibility of anaerobic bacteria due to insensitive dihydrofolate reductases.
Then, R. L.; Angehrn, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 1–6.
- ²⁵⁵ Metabolites with cytotoxic activity from the formosan soft coral *Cladiella australis*.
Ahmed, A. F.; Wu, M. H.; Wu, Y. C.; Dai, C. F.; Sheu, J. H. *J. Chinese Chem. Soc.* **2006**, *53*, 489–494.

- ²⁵⁶ Deoxyuridines from the marine sponge associated actinomycete *Streptomyces microflavus*. Li, K.; Li, Q. L.; Ji, N. Y.; Liu, B.; Zhang, W.; Cao, X. P. *Mar. Drugs*. **2011**, *9*, 690–695.
- ²⁵⁷ Tables de déplacements chimiques et couplages RMN. Williams, D. H.; Fleming, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. **2011**, *6*, 1.
- ²⁵⁸ Au–thymine, thymidine and thymidine 5'-monophosphate nanoparticles: chemical characterisation and cellular uptake studies into U87 cancer cells. Avvakumova, S.; Scari, G.; Porta, F. *RSC Adv*. **2012**, *2*, 3658.
- ²⁵⁹ Synthesis and evaluation of some symmetrical phosphate dimer derivatives of 31-modified nucleosides as potential Anti-HIV agents. Mcguigan, C.; Tsang, H. W.; Mahmood, N.; Hay, A. J. *Antivir. Chem. Chemother*. **1996**, *7*, 330–337.
- ²⁶⁰ Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem*. **2005**, *3*, 3851–3868.
- ²⁶¹ Enzymatic alcoholysis of 3',5'-di-o-acetyl-2'-deoxynucleosides. Zinni, M. A.; Rodríguez, S. D.; Pontiggia, R. M.; Montserrat, J. M.; Iglesias, L. E.; Iribarren, A. M. *J. Mol. Catal. B Enzym*. **2004**, *29*, 129–132.
- ²⁶² Enlarging the substrate portfolio of the thermophilic esterase EST2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Pennachio, A. *Extremophiles*. **2015**, *19*, 1001–1011.
- ²⁶³ The metabolite profiling of coastal coccolithophorid species *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta). Chengxu, Z.; Jie, L.; Yangfang, Y.; Xiaojun, Y.; Baoning, L.; Xin, W. *Chinese J. Oceanol. Limnol*. **2016**, *34*, 749–756.
- ²⁶⁴ Studies of low molecular weight samples of glucuronans with various acetylation degree. Pau-Roblot, C.; Petit, E.; Sarazin, C.; Courtois, J.; Courtois, B.; Barbotin, J. N.; Séguin, J. P.; Jindrich Jindrich, Josef Pitha, Bengt Lindberg, Pia Seffers, K. H.; Ambra, A. J. D.; Rice, M. J. *Carbohydr. Res*. **2003**, *344*, 53–59.
- ²⁶⁵ A Comparison of the conformations of uridine, β -pseudouridine, and dihydrouridine in dimethyl sulfoxide and water. A ¹H Nuclear Magnetic Resonance Study. Deslauriers, R.; Smith, I. C. P. A. *Can. J. Chem*. **1973**, *51*, 833–838.
- ²⁶⁶ Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides. Ferrero, M.; Gotor, V. *Chem. Rev*. **2000**, *100*, 4319–4347.
- ²⁶⁷ Engineering lipase b from *Candida antarctica*. Lutz, S. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2004**, *15*, 2743–2748.
- ²⁶⁸ Regioselective enzymatic acylation of pharmacologically interesting nucleosides in 2-methyltetrahydrofuran, a greener substitute for THF. Simeó, Y.; Sinisterra, J. V. *Green Chem*. **2009**, *11*, 855–862.

- ²⁶⁹ Arational approach to the regioselective deacetylation of 2',3',5'-tri-o-acetyluridine by Novozym 435 catalysed alcoholysis.
Gudiño, E. D.; Iglesias, L. E.; Ferreira, M. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 627–636.
- ²⁷⁰ Microbial hydrolysis of acetylated nucleosides.
Panero, J.; Trelles, J.; Rodano, V.; Montserrat, J. M.; Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S. Iribarren, A. M. *Lett.* **2006**, *28*, 1077–1081.
- ²⁷¹ Pestalotiolid A, a new antiviral phthalide derivative from a soft coral-derived fungus *Pestalotiopsis* sp.
Jia, Y.-L.; Guan, F.-F.; Ma, J.; Wang, C.-Y.; Shao, C.-L. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 227–230.
- ²⁷² Drugs and cosmetics from the sea.
Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs.* **2015**, *2*, 73–82.
- ²⁷³ Modulation of 5-fluorouracil host toxicity by 5-(benzyloxybenzyl)barbituric acid acyclonucleoside, a uridine phosphorylase inhibitor, and 2',3',5'-tri-o-acetyluridine, a prodrug of uridine.
Ashour, O. M.; Naguib, F. N. .; Panzica, R. P.; Al Safarjalani, O. N.; el Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 427–431.
- ²⁷⁴ Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs.
Clercq, E. De; Holý, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940.
- ²⁷⁵ Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases.
Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447–464.
- ²⁷⁶ Antiviral activity of 5-substitued pyrimidine nucleoside analogues.
De Clercq, E. *J. Chem. Inf. Model.* **1983**, *55*, 623–636.
- ²⁷⁷ Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs.
Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A. M. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 412–434.
- ²⁷⁸ Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. II. structure elucidation of caprazamycins.
Igarashi, M.; Takahashi, Y.; Shitara, T.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Miyake, T.; Akamatsu, Y. *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 327–337.
- ²⁷⁹ Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp. [1].
Igarashi, M.; Nakagawa, N.; Doi, N.; Hattori, S.; Naganawa, H.; Hamada, M. *Journal of Antibiotics.* **2003**, *56*, 580–583.
- ²⁸⁰ New 3'-O-aromatic acyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine derivatives as potential anticancer agents.
Szymańska-Michalak, A.; Wawrzyniak, D.; Framski, G.; Kujda, M.; Zgoła, P.; Stawinski, J.; Barciszewski, J.; Boryski, J.; Kraszewski, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 41–52.

- ²⁸¹ Convolutamydine A, a novel bioactive hydroxyoxindole alkaloid from marine bryozoan *Amathia convoluta*.
Kamano, Y.; Zhang, H.; Ichihara, Y.; Kizu, H.; Komiyama, K.; Pettit, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2783–2784.
- ²⁸² The unique 6-(p-hydroxyphenyl)-2h-3,4-dihydro-1,1-dioxo-1,4-thiazine and the new tripeptide l-glu-gly-4-hydroxystyrylamine from the marine sponge *Anchinoe tenacior*.
Casapullo, A.; Minale, L.; Zollo, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2421–2422.
- ²⁸³ Anti-inflammatory thiazine alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium* sp.: inhibitors of the neutrophil respiratory burst in a model of gouty arthritis.
Pearce, A. N.; Chia, E. W.; Berridge, M. V.; Clark, G. R.; Harper, J. L.; Larsen, L.; Maas, E. W.; Page, M. J.; Perry, N. B.; Webb, V. L. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 936–940.
- ²⁸⁴ Tables of spectral data for structure determination of organic compounds.
Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Springer.* **2009**, *1*, 304-307.
- ²⁸⁵ Structure of aszonalenin, a new metabolite of *Aspergillus zonatus*.
Kimura, Y.; Hamasaki, T.; Nakajima, H.; Isogai, A. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 225–228.
- ²⁸⁶ Isolation of isopreropodine from the marine mollusk *Nerita albicilla*: establishment of the structure via two dimensional NMR Techniques.
Martin, G. E.; Sanduja, R.; Alam, M. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 406–411.
- ²⁸⁷ Marine bacterial inhibitors from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp..
Zhou, Y.; Debbab, A.; Wray, V.; Lin, W.; Schulz, B.; Trepos, R.; Pile, C.; Hellio, C.; Proksch, P.; Aly, A. H. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2789–2792.
- ²⁸⁸ One-pot three-component mild synthesis of 2-aryl-3-(9-alkylcarbazol-3-yl)thiazolin-4-ones.
Li, Z.; Zhu, A.; Yang, J. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49*, 1458–1461.
- ²⁸⁹ Spirostomin, defense toxin of the ciliate spirostomum teres: isolation, structure elucidation, and synthesis.
Sera, Y.; Masaki, M. E.; Doe, M.; Buonanno, F.; Miyake, A.; Usuki, Y.; Iio, H. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 633–635.
- ²⁹⁰ Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors isolated from the sponge *Xestospongia vansoesti*: structure elucidation, analogue synthesis, and biological activity.
Centko, R. M.; Steino, A.; Rosell, F. I.; Patrick, B. O.; De Voogd, N.; Mauk, A. G.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6480–6483.
- ²⁹¹ Thiaplakortones A-D: antimalarial thiazine alkaloids from the Australian marine sponge *Plakortis lita*.
Davis, R. A.; Duffy, S.; Fletcher, S.; Avery, V. M.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9608–9613.
- ²⁹² Lactones 46. Synthesis, antifeedant and antibacterial activity of γ -lactones with a p-methoxyphenyl substituent.
Mazur, M.; Skrobiszewski, A.; Gładkowski, W.; Podkowik, M.; Bania, J.; Nawrot, J.; Klejdysz, T.; Wawrzeńczyk, C. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *72*, 489–496.

- ²⁹³ Cyanogramide with a new spiro[indolinone-pyrroloimidazole] skeleton from *Actinoalloteichus cyanogriseus*.
Fu, P.; Kong, F.; Li, X.; Wang, Y.; Zhu, W. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3708–3711.
- ²⁹⁴ Isolation and structure determination of aplidinones A-C from the mediterranean ascidian *Aplidium conicum*: a successful regiochemistry assignment by quantum mechanical ¹³C NMR chemical shift calculations.
Aiello, A.; Fattorusso, E.; Luciano, P.; Mangoni, A.; Menna, M. *European J. Org. Chem.* **2005**, *23*, 5024–5030.
- ²⁹⁵ Using Quantum Chemical Computations of NMR chemical shifts to assign relative configurations of terpenes from an engineered *Streptomyces* host.
Nguyen, Q. N. N.; Tantillo, D. J. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2016**, *69*, 534–540.
- ²⁹⁶ Biosynthetic origin of BE-10988 in *Streptomyces* sp. BA10988.
Rauhut, T.; Spiteller, P.; Eisenreich, W.; Spiteller, M.; Glawischnig, E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5279–5286.
- ²⁹⁷ Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk.
Cámara, M.; Williams, P.; Hardman, A. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 667–676.
- ²⁹⁸ Shore-level induced variations in condition and feeding of the mussel *Perna canaliculus* from the east coast of the south island, New Zealand.
Marsden, I.; Weatherhead, M. A. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **1999**, *33*, 611–622.
- ²⁹⁹ Composition and metabolism of lipids in some tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis* L. (Moll. Bivalvia)—in vivo and in vitro incorporation of 1(3)-[3H]-glycerol.
Lubet, P.; Brichon, G.; Besnard, J. Y.; Zwingelstein, G. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1985**, *82*, 425–431.
- ³⁰⁰ Size-specific clearance, excretion, and respiration rates, and phytoplankton selectivity for the mussel *Perna canaliculus* at low levels of natural food.
James, M. R.; Weatherhead, M.; Ross, H. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **2001**, *35*, 73–86.
- ³⁰¹ Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (LMK) mussel of subtidal and rocky shore origin.
Freites, L.; Labarta, U. *Comp. Biochem. Physiol.* **2002**, *132*, 453–461.
- ³⁰² Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*.
Schedel, M.; Trtiper, H. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *124*, 205–210.
- ³⁰³ Oxidation of elemental sulfur to thiosulfate by *Streptomyces*.
Yagi, S.; Kitai, S.; Kimura, T. *Appl. Microbiol.* **1971**, *22*, 157–159.
- ³⁰⁴ Isolation of elemental sulfur as a self-growth-inhibiting substance produced by *Legionella pneumophila*.
Inoue, H.; Kawano, G.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4809–4811.

- ³⁰⁵ Dodecylglycerol: A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790.
Ved, H. S.; Gustow, E.; Mahadevans, V.; Pieringer, R. A. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8115–8121.
- ³⁰⁶ Origins and evolution of antibiotic resistance.
Davies, J.; Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433.
- ³⁰⁷ Spectrum of membrane morphological responses to antibacterial fatty acids and related surfactants.
Yoon, B. K.; Jackman, J. A.; Kim, M. C.; Cho, N. J. *Langmuir* **2015**, *31*, 10223–10232.
- ³⁰⁸ Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*.
Isnansetyo, A.; Kamei, Y. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1239–1248.
- ³⁰⁹ Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*.
Fernández, M. A.; García, M. D.; Sáenz, M. T. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *53*, 11–14.
- ³¹⁰ Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin.
Skrivanová, E.; Molatová, Z.; Matenová, M.; Houf, K.; Marounek, M. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *144*, 367–371.
- ³¹¹ 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. A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 33–38.
- ³¹² Raman spectroscopic determination of inosine nucleoside in nucleotides.
Escobar, R.; Carmona, P.; Rodríguez-Casado, A.; Molina, M. *Talanta* **1999**, *48*, 773–780.
- ³¹³ Uridine prevents tamoxifen-induced liver lipid droplet accumulation.
Le, T. T.; Urasaki, Y.; Pizzorno, G. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *15*, 27.
- ³¹⁴ Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis.
Kimura, K.; Bugg, T. D. H. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 252–273.
- ³¹⁵ Inhibition of neuronal apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor GW8510: identification of 3' substituted indolones as a scaffold for the development of neuroprotective drugs.
Johnson, K.; Liu, L.; Majdzadeh, N.; Chavez, C.; Chin, P. C.; Morrison, B.; Wang, L.; Park, J.; Chugh, P.; Chen, H. M. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 538–548.
- ³¹⁶ Thiasporines A-C, thiazine and thiazole derivatives from a marine-derived *Actinomyces* *chlora*.
Fu, P.; Macmillan, J. B. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 548–551.
- ³¹⁷ Synthesis and biological activity of substituted 4H-1,4-benzothiazines, their sulfones, and ribofuranosides.
Goyal, K.; Gautam, N.; Khandelwal, N.; Gautam, D. C. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2013**, *32*, 81–97.

- ³¹⁹ Cytotoxic β -carboline and cyclic peroxides from the palauan sponge *Plakortis nigra*. Sandler, J.S.; Colin, P.L.; Hooper, J.N.A.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1258-1261.
- ³²⁰ Structure-activity relationships of the bioactive thiazinoquinone marine natural products thiaplidiaquinones A and B. Harper, J.L.; Khalil, I.M.; Shaw, L.; Bourguet- Kondracki, M.L.; Dubois, J.; Valentin, A.; Barker, D.; Copp B.R. *Mar. drugs.* **2015**, *13*, 5102-5110.
- ³²¹ Galactosyl and sulfoquinovosyldiacylglycerols isolated from the brown algae, *Undaria pinnatifida* and *Costaria costata* as repellents of blue mussel, *Mytilus edulis*. Katsuoka, M.; Ogura, C.; Etoh, H.; Sakata, K. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3043–3044.
- ³²² Design, synthesis, antibacterial activity, and molecular docking studies of novel hybrid 1,3-thiazine-1,3,5-triazine derivatives as potential bacterial translation inhibitor. Singh, U. P.; Pathak, M.; Dubey, V.; Bhat, H. R.; Gahtori, P.; Singh, R. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 572–583.
- ³²³ Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the german wadden sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. Brinkhoff, T.; Bach, G.; Heidorn, T.; Liang, L.; Schlingloff, A.; Simon, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2560–2565.

ANNEXES

ANNEXE I: COMMUNICATIONS ORALES

Publications

Orbicularisine : a New Spiro-indolo-thiazine Skeleton Isolated from Gills of the Tropical Bivalve Codakia orbicularis.

Goudou, F.; Petit, P.; Moriou, C.; Bogdan I. Iorga; Gros, O.; Al-Mourabit, A. *J. Nat. Prod.*, **2017**, soumis pour publication.

Communications orales

First detection of bioactive glycerolipids extracted from bacterial gill-endosymbionts colonizing the marine bivalve Codakia orbicularis (Lucinidae.)

Goudou, F.; Al-Mourabit, A.; Moriou, C.; Gros, O.; Petit P. *20th Congress of Caribbean Academy of Sciences, Guadeloupe, 2016*, Communication orale.
Prix de la meilleure présentation orale.

First detection of bacteriostatic molecules extracted from bacterial gill-endosymbionts colonizing the marine bivalve Codakia orbicularis (Lucinidae.)

Goudou, F.; Petit, P.; Gros, O. *19th Congress of the Caribbean Academy of Sciences, Tobago, 2014*, Communication orale.
Prix de la meilleure présentation orale.

Posters

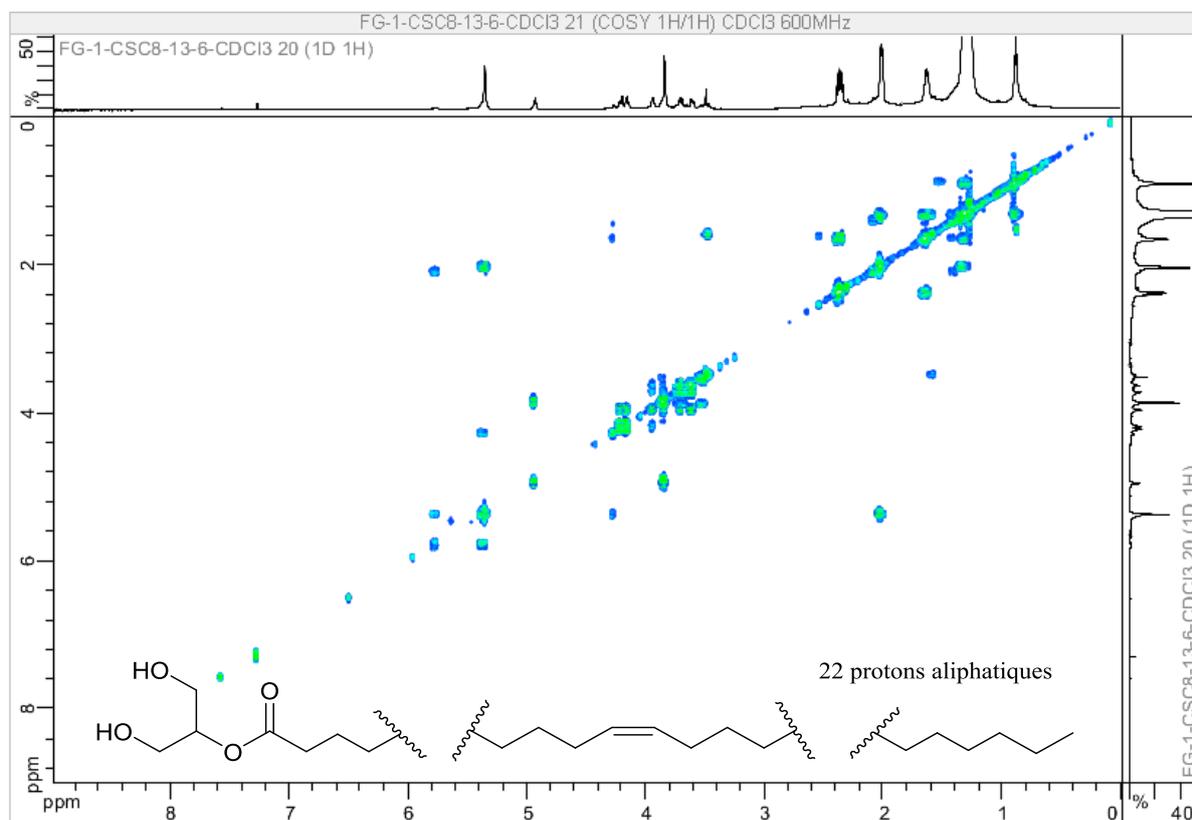
5'-acetyluridine isolated for the first time from the gills of the marine bivalve Codakia orbicularis (Lucinidae).

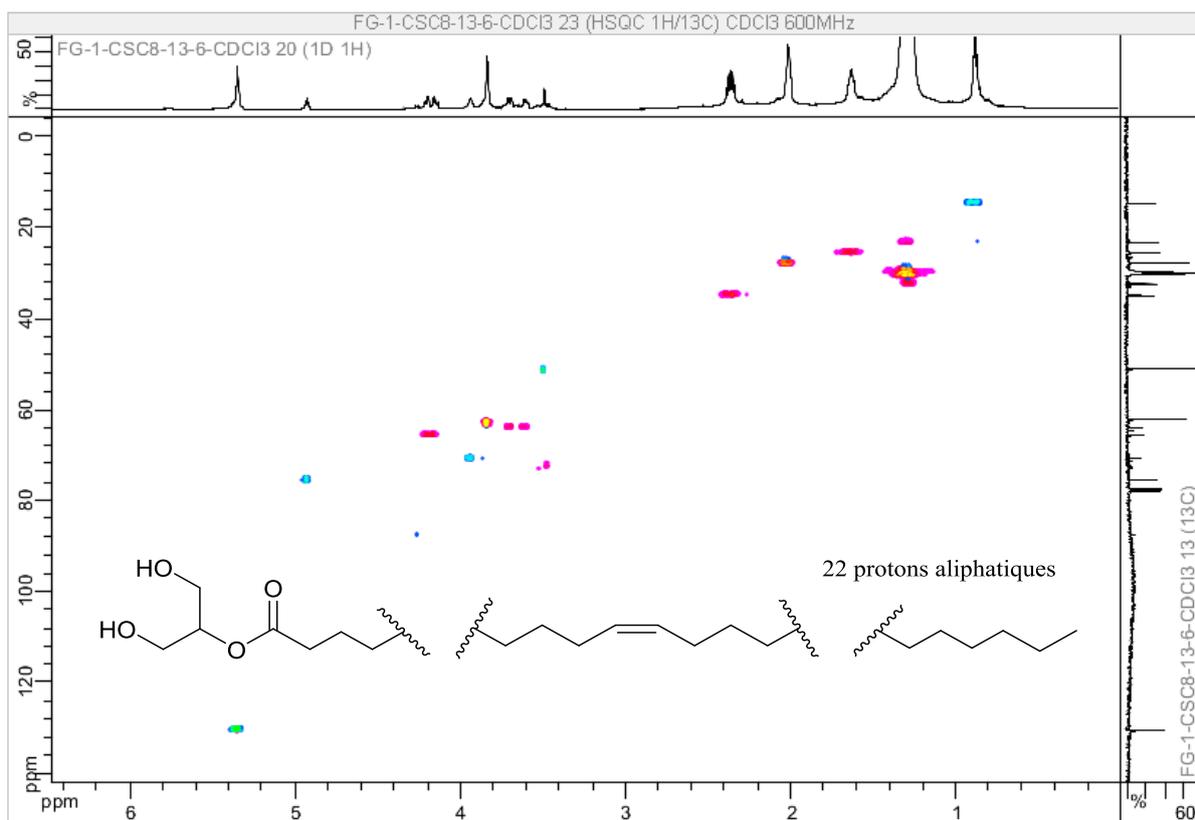
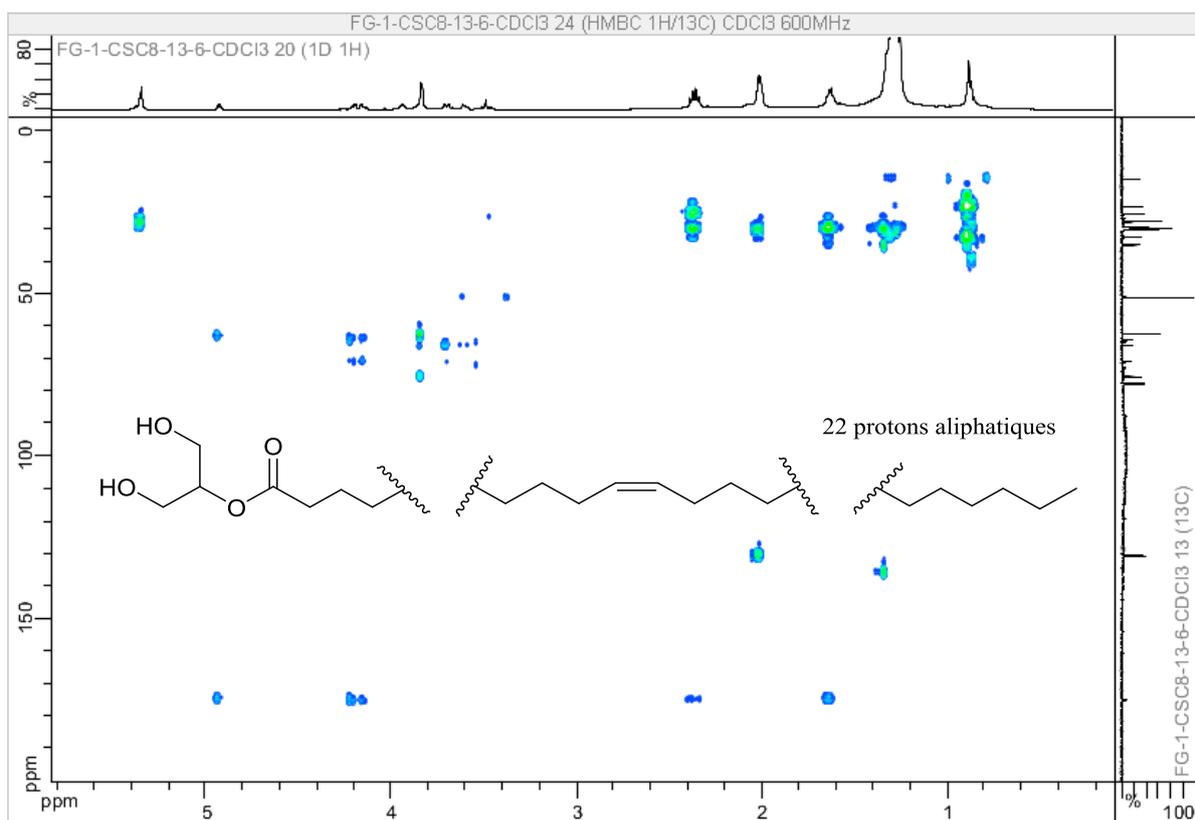
Goudou, F.; Al-Mourabit, A.; Moriou, C.; Gros, O.; Petit P. *15th International Symposium on Marine Natural Product (Manapro), Brésil, 2016*, Poster.

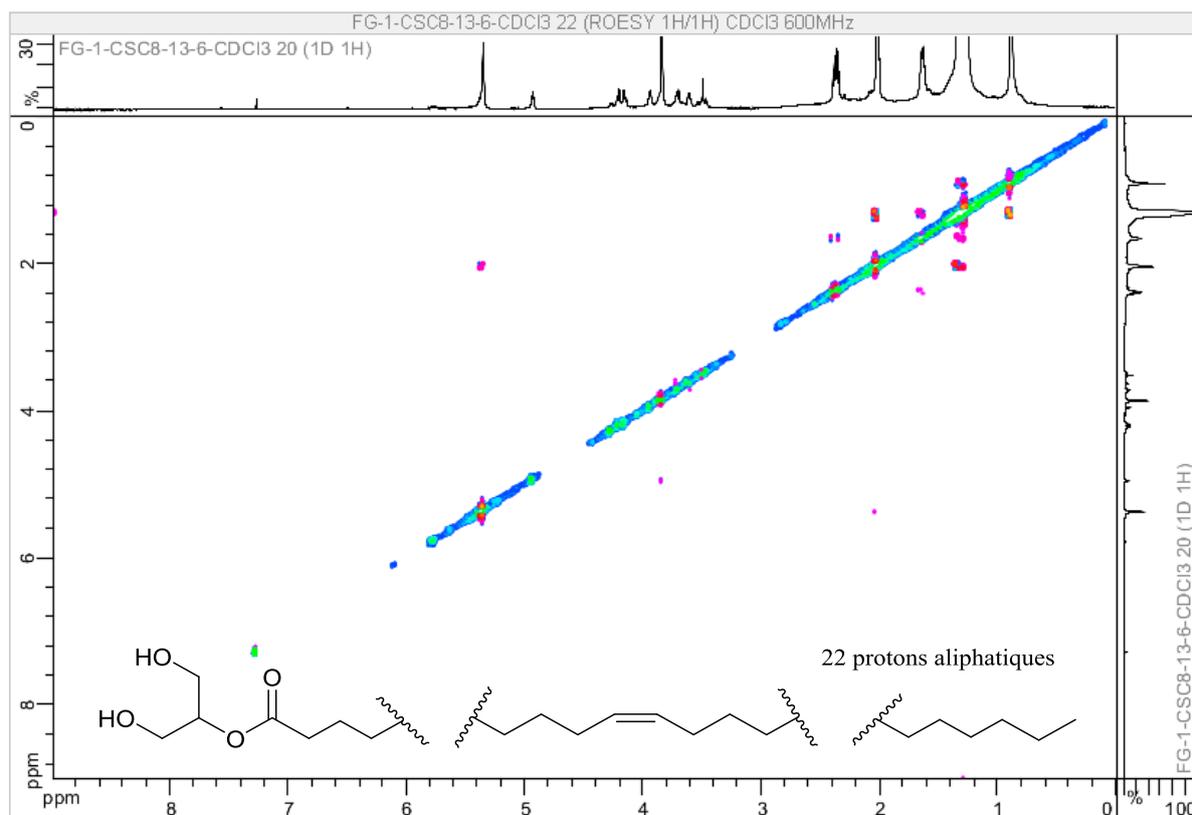
ANNEXE II: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 89. DETECTION DEDL.

Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC

Sample Name	FG-1-CSC8-13-6	Injection Id 4513
Date Acquired: 22/5/2016 7:32:49 FMCET		
Injection Volume: 20.00 uL	Colonne: *****	
Project Name: equipe43.Francesca		
Solvents: A: H2O0.1%AF B: ACN0.1%AF		
Observations: atlantis T3.4.6*150mm5µmeq43		

ANNEXE III: COSY DU MONOGLYCERLIPIDE 89, (CDCl₃, 600 MHz).

ANNEXE IV: HSQC DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCl₃, 600 MHz).**ANNEXE V: HMBC DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCl₃, 600 MHz).**

ANNEXE VI: ROESY DU MONOGLYCEROLIPIDE 89, (CDCl₃, 600 MHz).

ANNEXE VII: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 90. DETECTION DEDL.

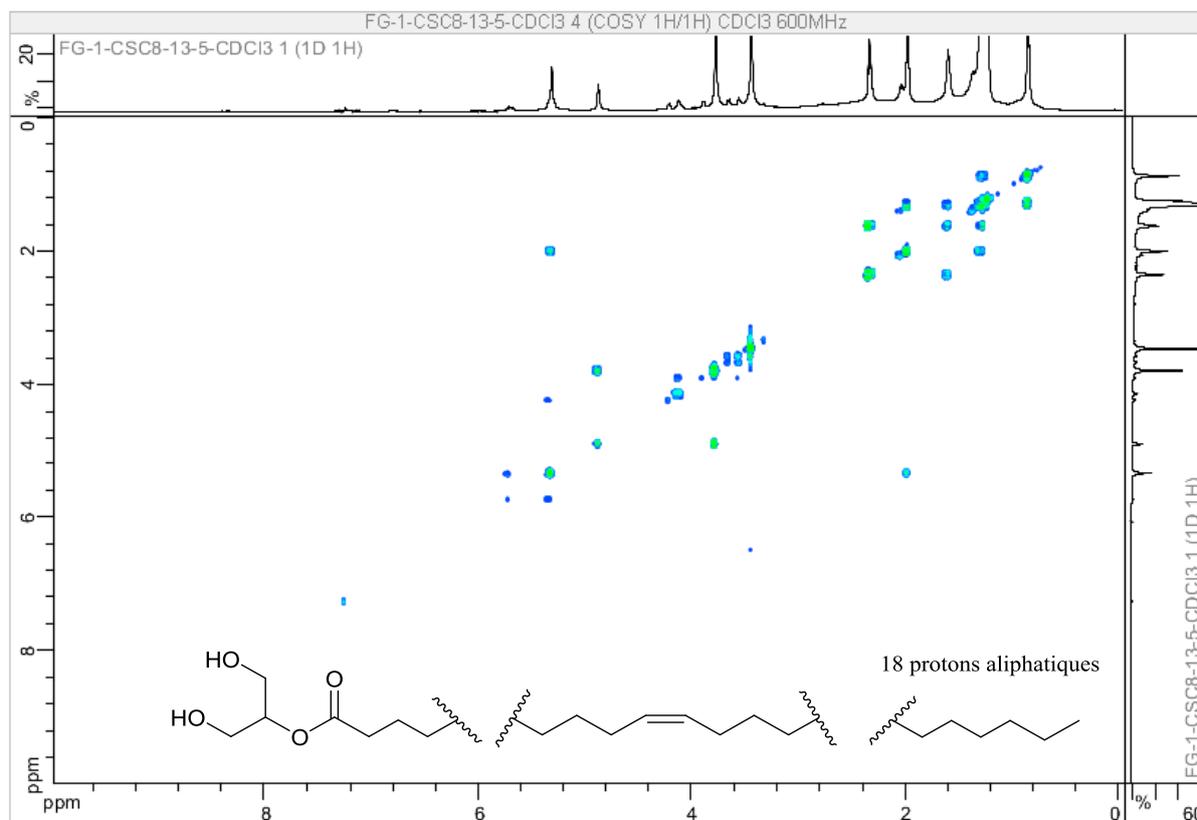


Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC



Sample Name	FG-1-CSC8-13-5	InjectionId4505
Date Acquired:	2/25/2016 6:30:55 PM CET	
Injection Volume:	20.00 uL	Colonne: *****
Project Name:	equipe43/Francesca	
Solvents:	A: H ₂ O 0.1% AF B: ACN 0.1% AF	
Observations:	atlantis T3.4.6*150mm5µmeq43	



ANNEXE VIII: COSY DU MONOGLYCERLIPIDE 90, (CDCl₃, 600 MHz).

ANNEXE IX: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 94. DETECTION DEDL.



Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC



Sample Name	FG-1-CSC7-13-6	Injection Id 3059
-------------	----------------	-------------------

Date Acquired: 6/12/2015 1:35:19 AM CEST

Injection Volume: 20.00 uL

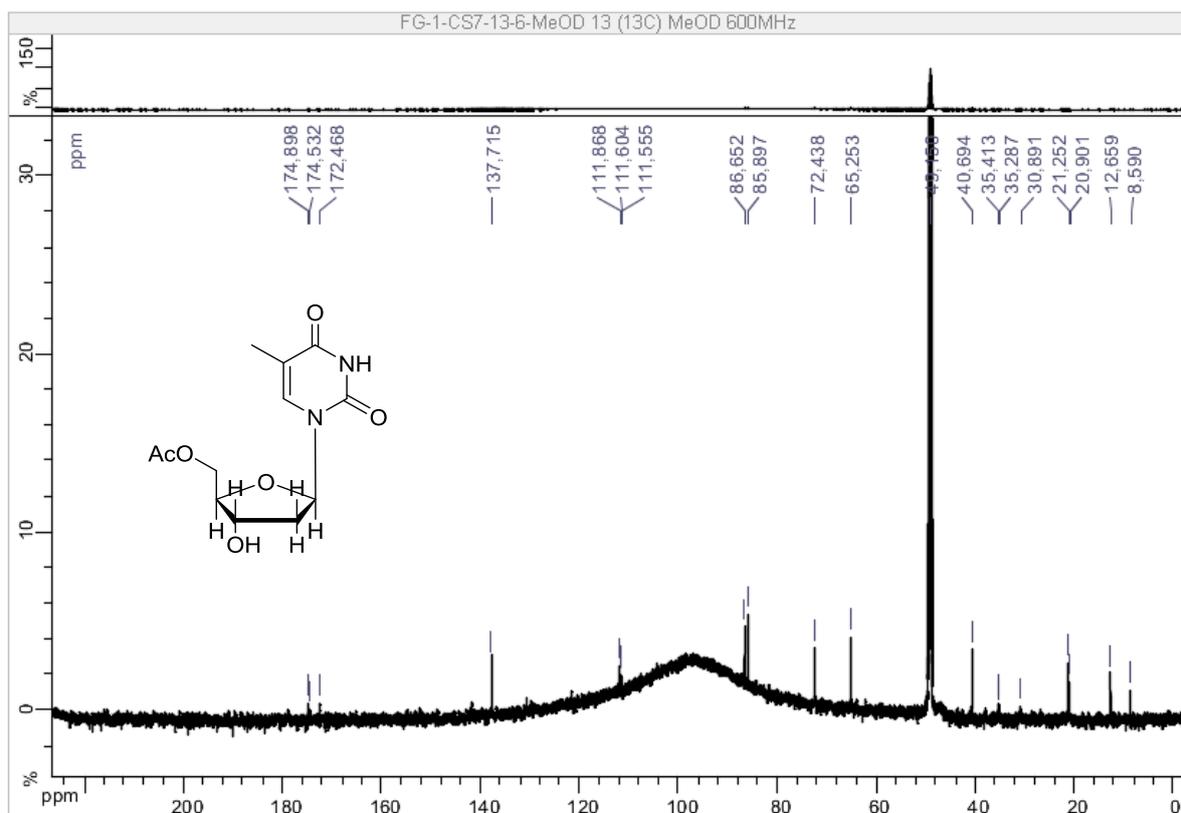
Colonne: Surfire C18 5µm IV (4.6x150mm)

Project Name: equipe43/Francesca

Solvants: A: EAUBACN (0.1%AF)

Observations:



ANNEXE X: RMN ^{13}C DE LA 5'-O-ACETYLTHYMIDINE 94, (MEOD, 600 MHz).

ANNEXE XI: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 95. DETECTION DEDL.

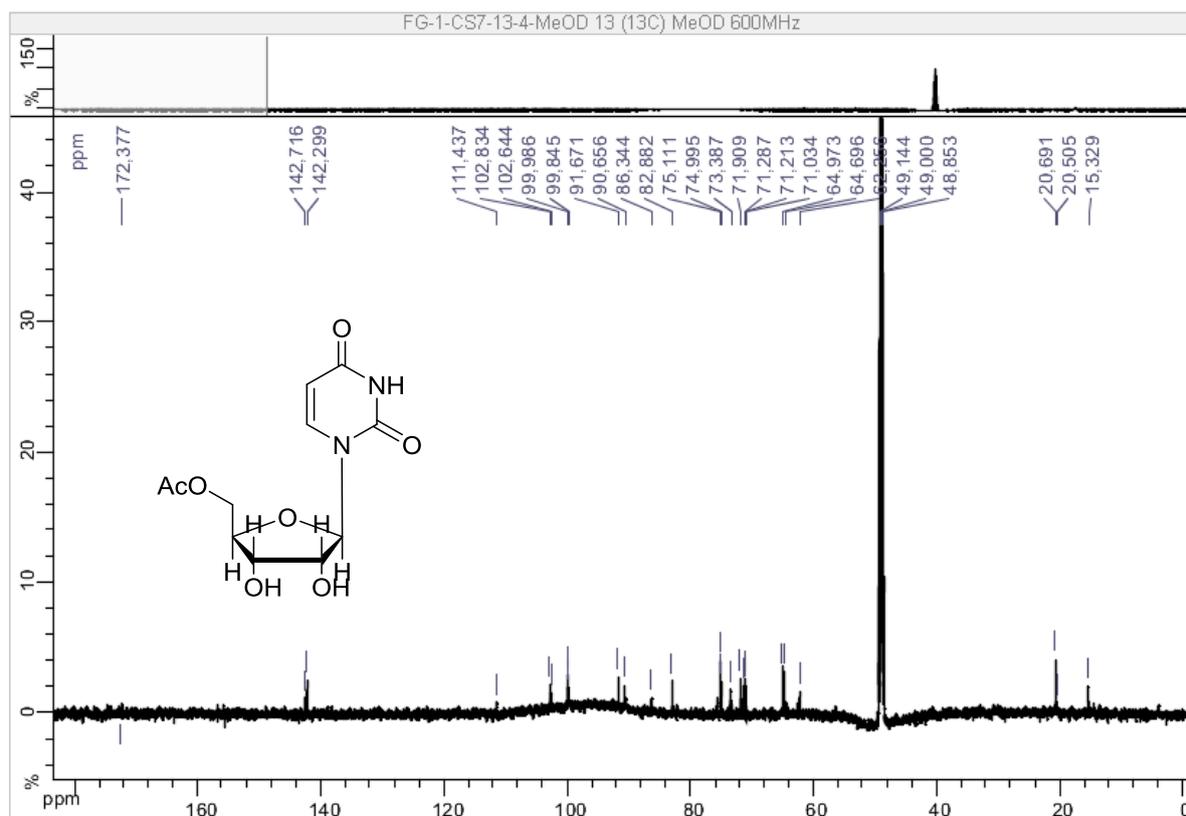


Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC



Sample Name	FG-1-CSC8-17-3	Injection Id 4797
Date Acquired: 3/10/2016 11:08:06 FMCET	Colonne: *****	
Injection Volume: 20.00 uL		
Project Name: equipe43/Francesca		
Solvents: A: H2O:0.1%AF B: H2O:0.1%AF		
Observations: atlantis T3.4.6*150mm5µmeq43		

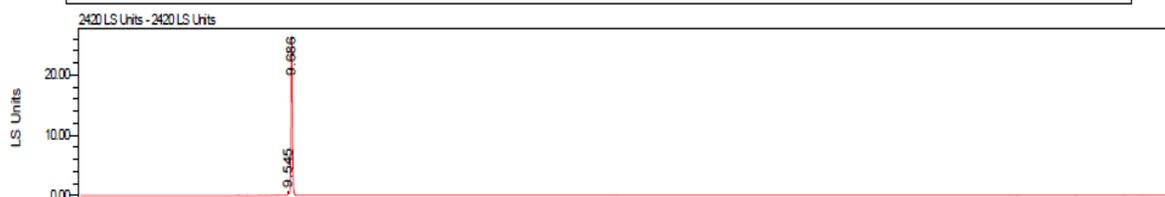


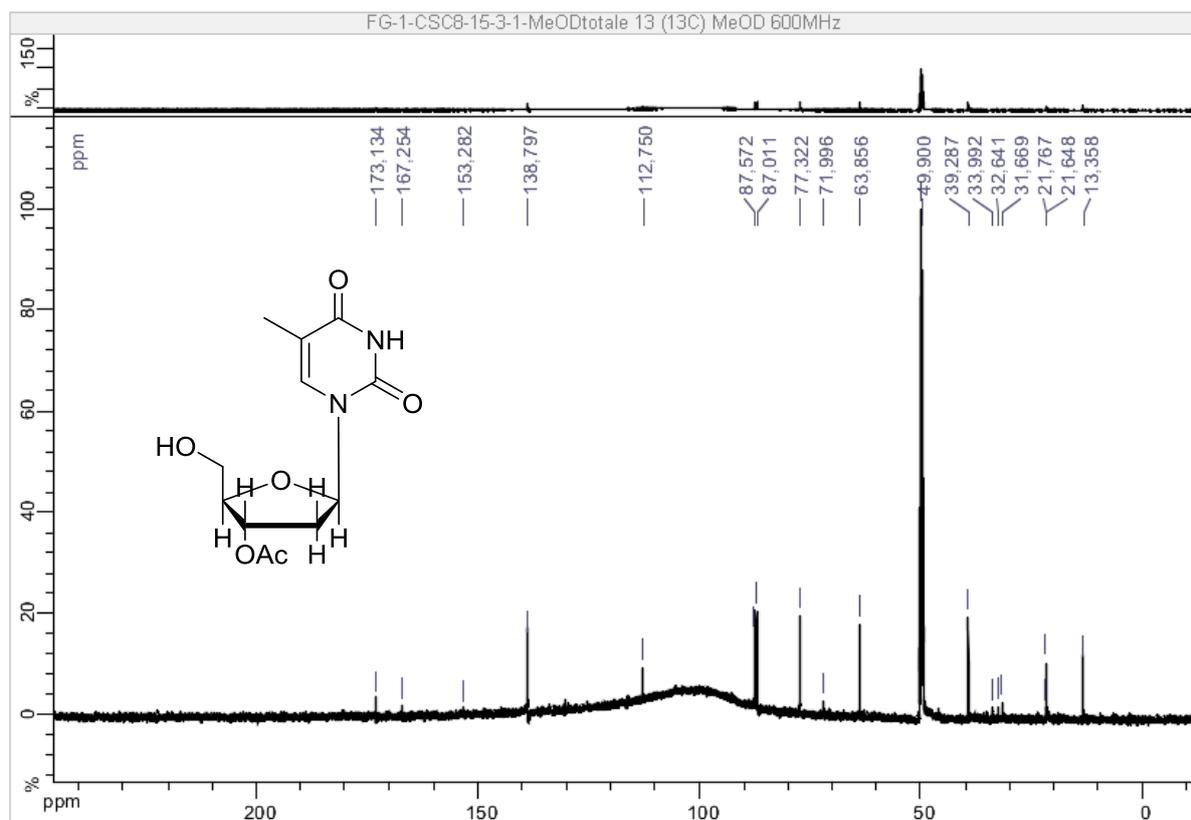
ANNEXE XII: RMN ¹³C DE LA 5'-O-ACETYLURIDINE 95, (MEOD, 600 MHz).ANNEXE XIII: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 96.
DETECTION DEDL.

Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC



Sample Name	FG-1-CSC8-15-3	Injection Id 3479
Date Acquired: 1/28/2016 4:52:46 PM CET	Colonne: *****	
Injection Volume: 20.00 uL		
Project Name: equipe43Francesca		
Solvents: A: H2O:0.1%AF B: H2O:0.1%AF		
Observations: atlantis T3.4.6*150mm5µmeq43		



ANNEXE XIV: RMN ^{13}C DE LA 3'-O-ACETHYLTHYMIDINE 96, (MEOD, 600 MHz).

ANNEXE XV: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COMPOSE 98. DETECTION DEDL.



Institut de Chimie des Substances Naturelles
Service HPLC



Sample Name	FG-1-CSC8-14-1	Injection Id: 3973
-------------	----------------	--------------------

Date Acquired: 25/2016 12:22:25 PM CET

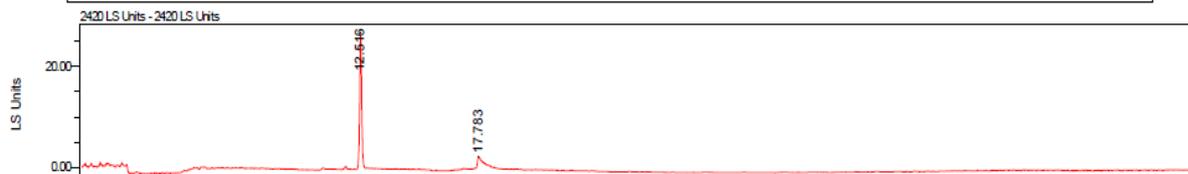
Injection Volume: 20.00 μL

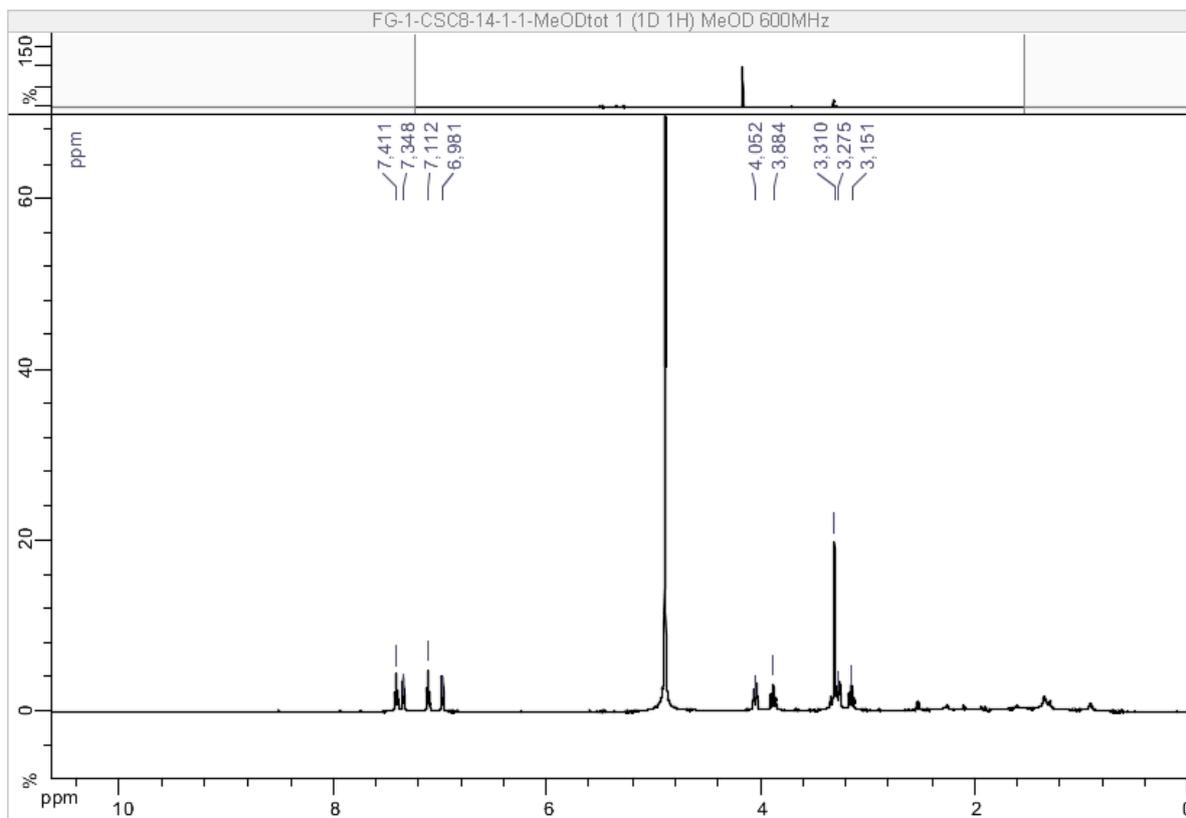
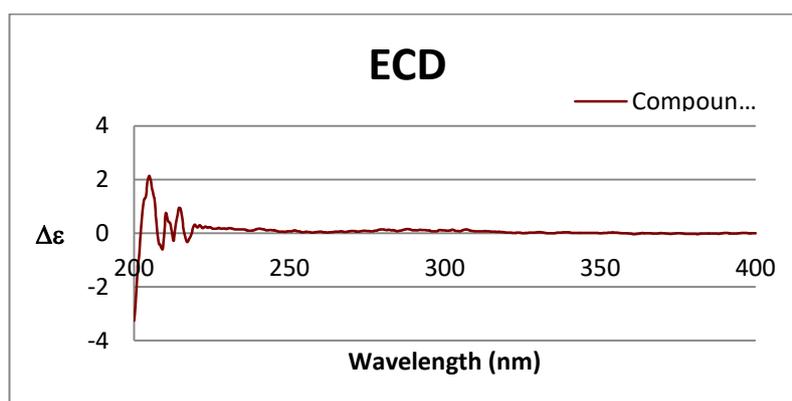
Colonne: *****

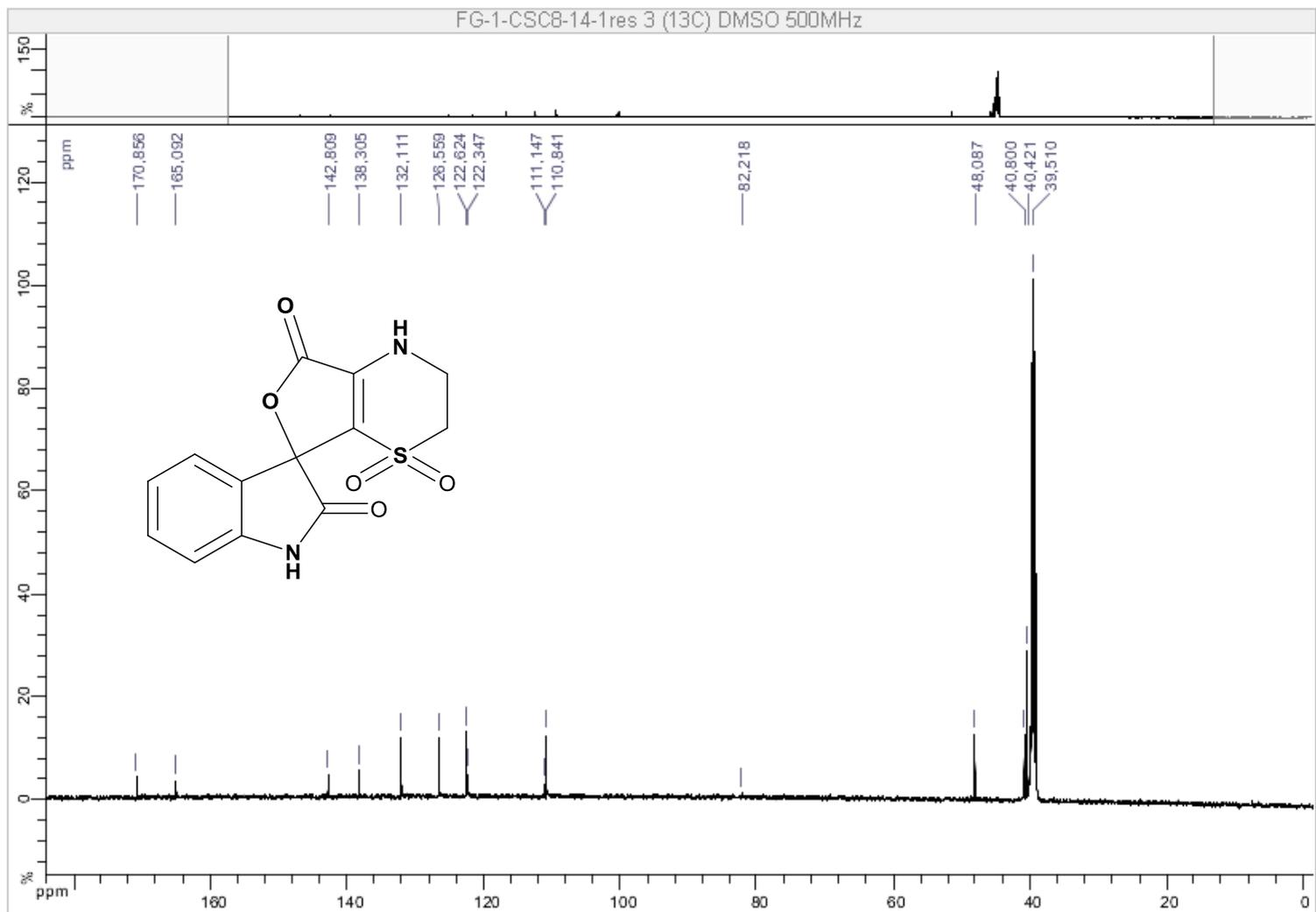
Project Name: equipe43Francesca

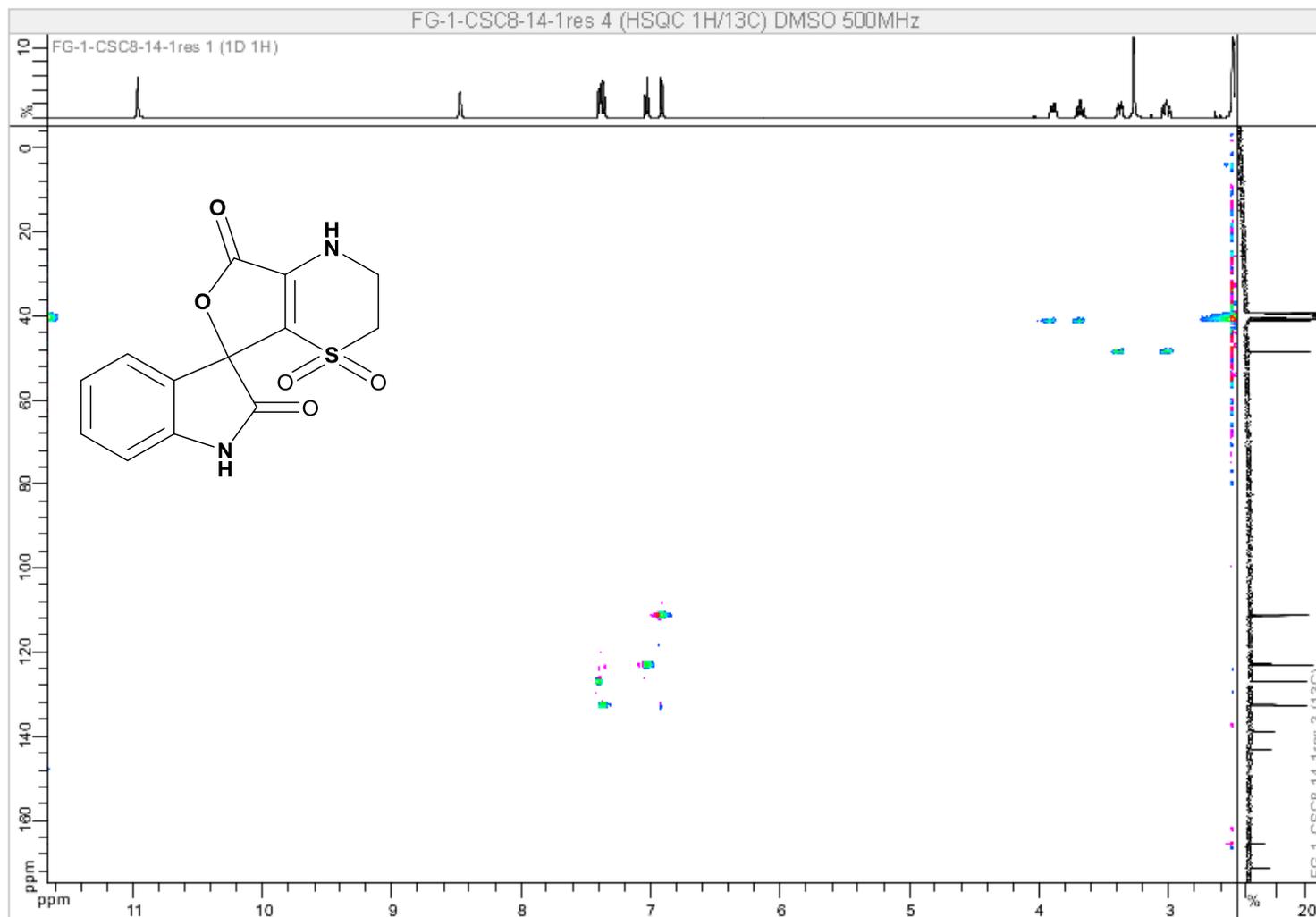
Solvants: A: H₂O:0.1%AF B: H₂O:0.1%AF

Observations: atlantis T3.46*150mm5 μm eq43

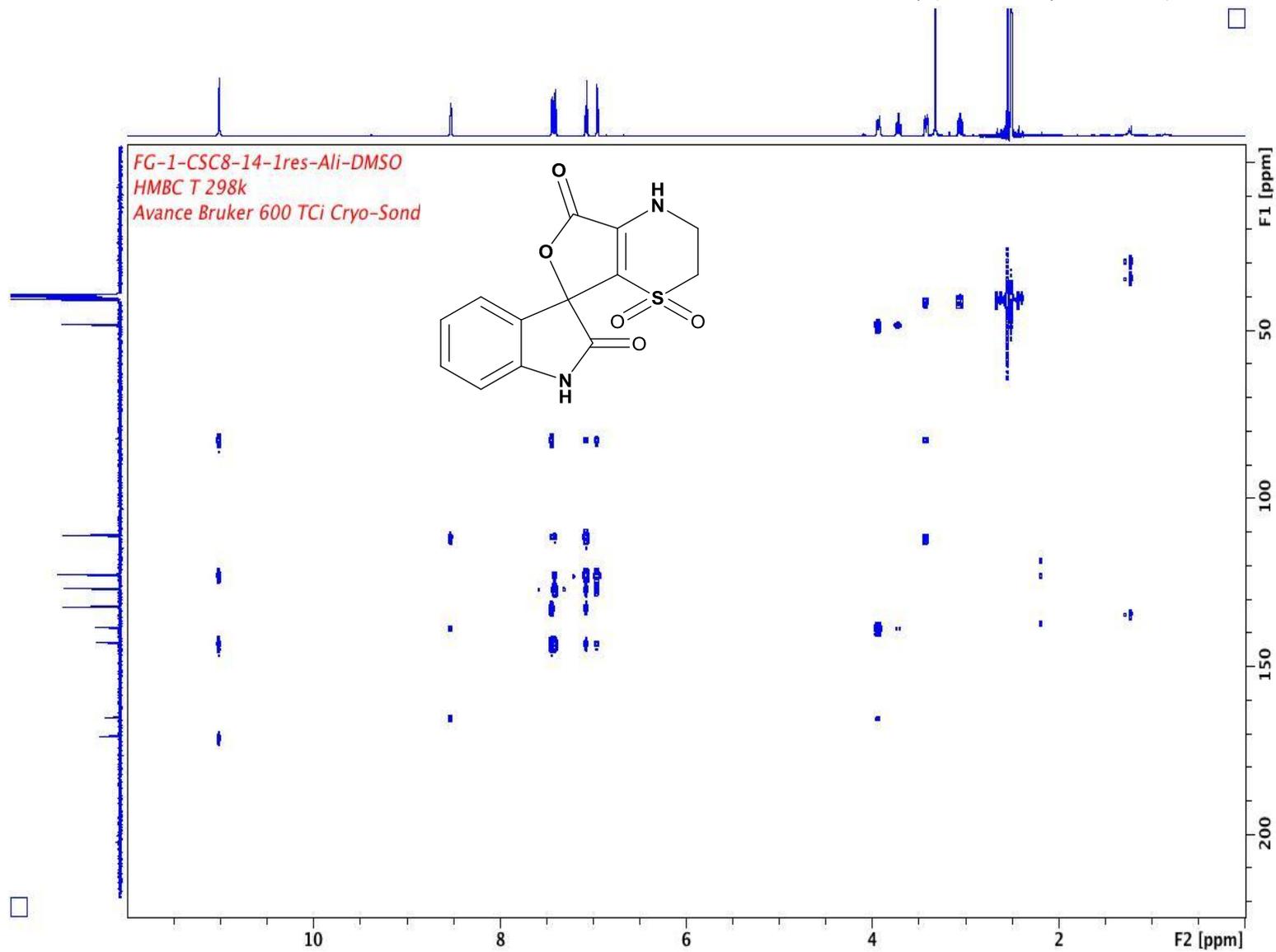


**ANNEXE XVI: SPECTRE RMN ^1H DE L'ORBICULARISINE 98 (SURNAGEANT)
(MEOD, 600 MHz).****ANNEXE XVII: SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DE
L'ORBICULARISINE 98.**

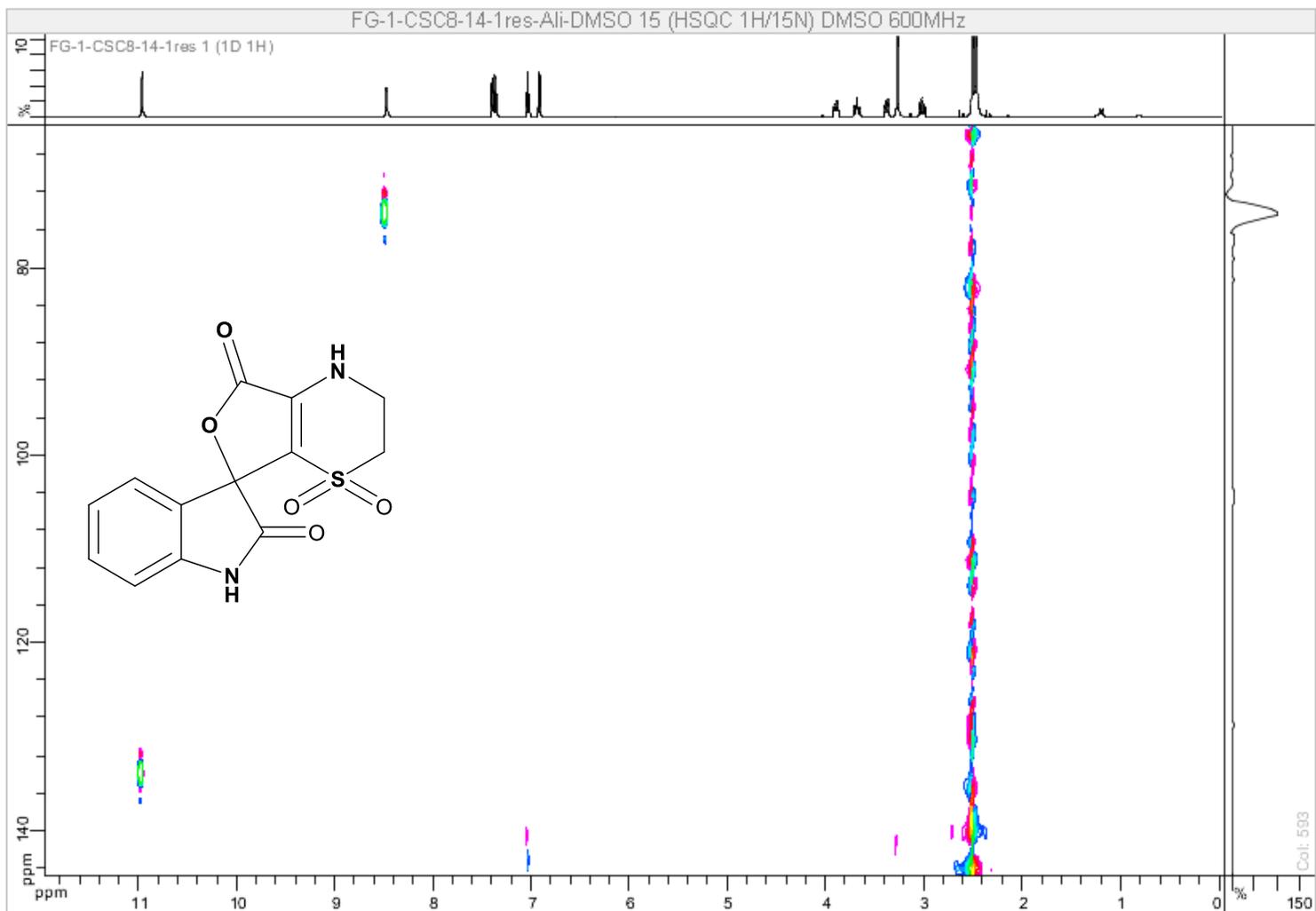
ANNEXE XVIII: SPECTRE RMN ^{13}C DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 125 MHz).

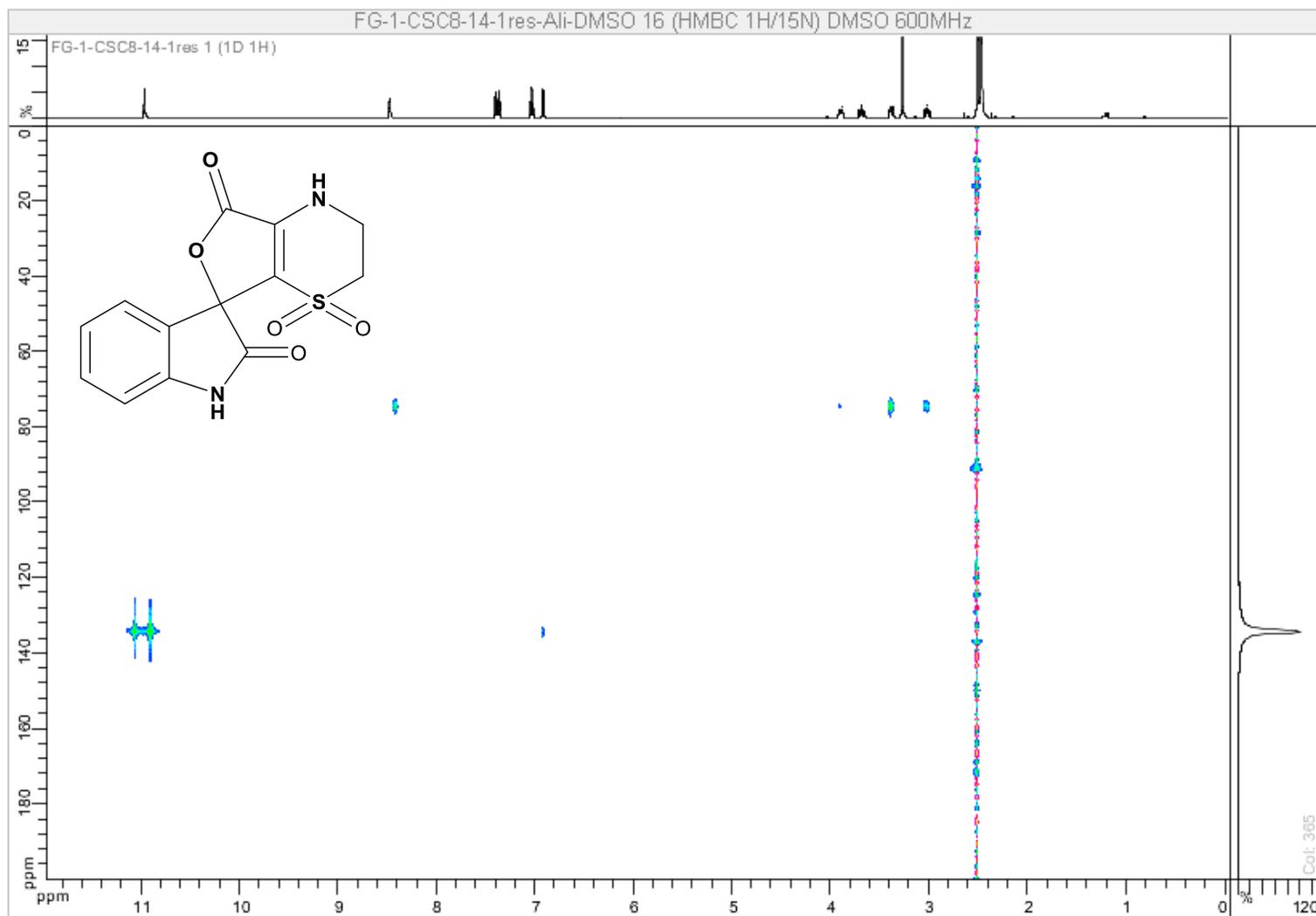
ANNEXE XX: SPECTRE ^1H - ^{13}C HSQC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 500 MHz).

ANNEXE XXI: SPECTRE ^1H - ^{13}C HMBC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 600 MHz).

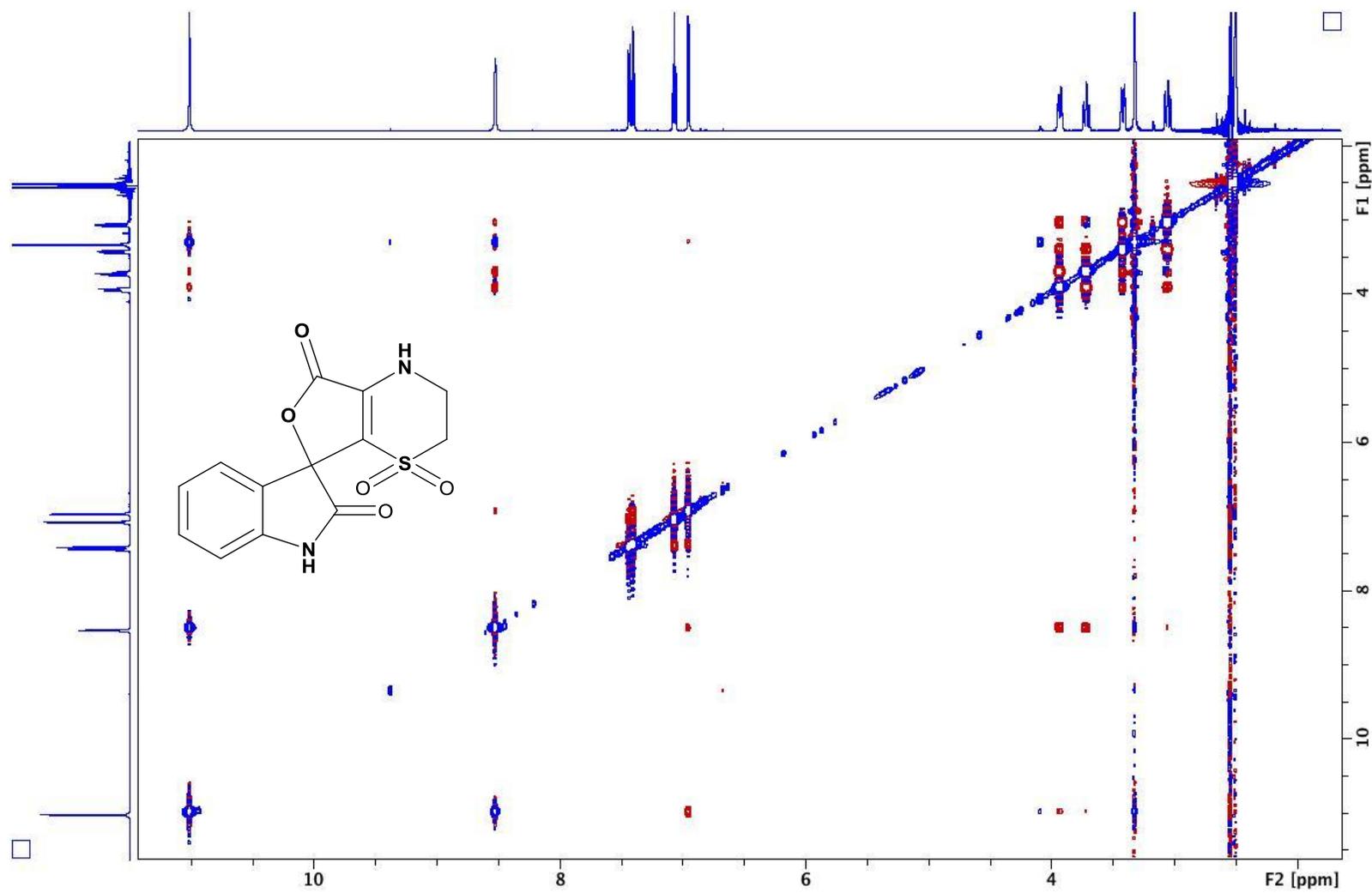


ANNEXE XXII: SPECTRE ^1H - ^{15}N HSQC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 600 MHz).

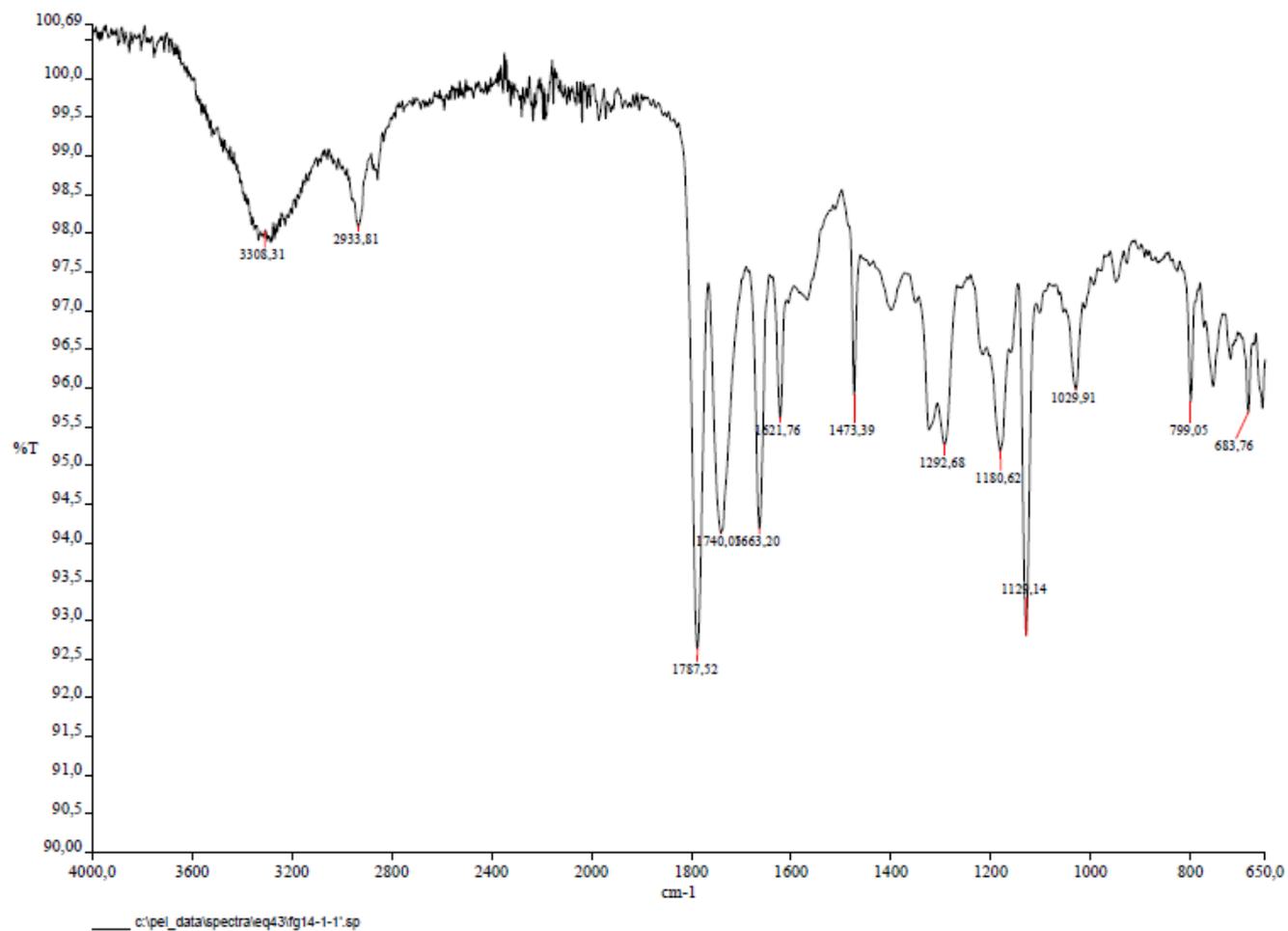


ANNEXE XXIII: SPECTRE ^1H - ^{15}N HMBC DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 600 MHz).

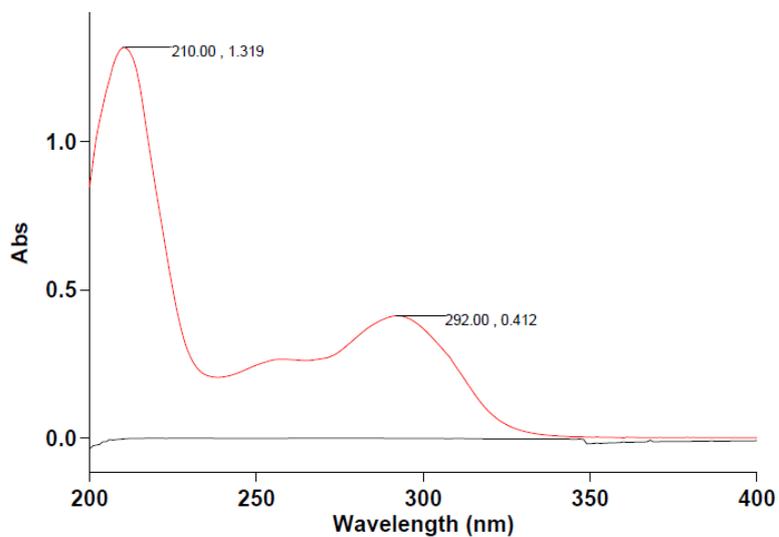
ANNEXE XXIV: SPECTRE ^1H - ^1H ROESY DE L'ORBICULARISINE 98, (DMSO- d_6 , 600 MHz).



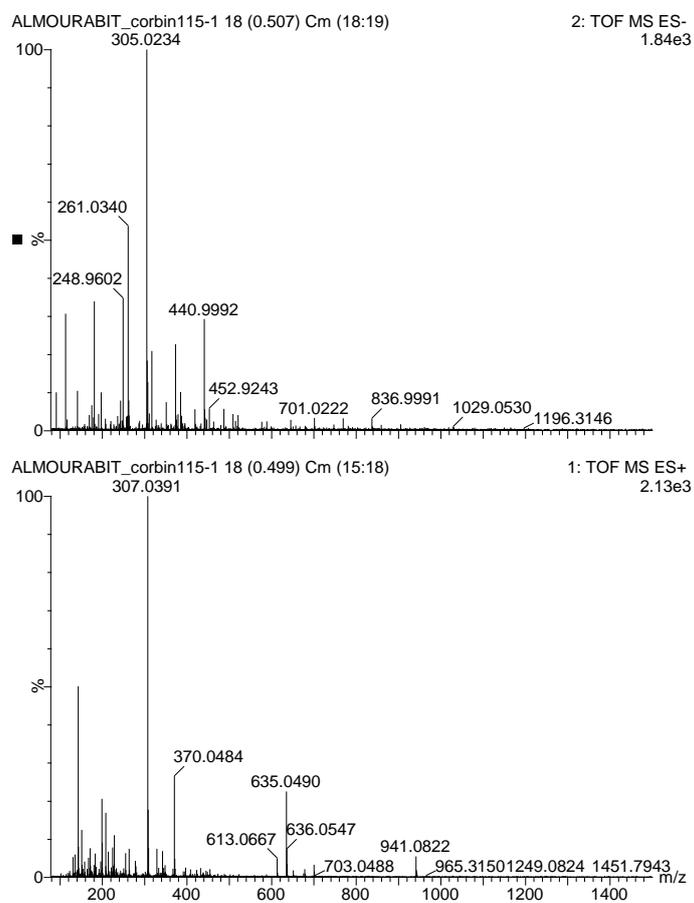
ANNEXE XXV: SPECTRE IR DE L'ORBICULARISINE (98).



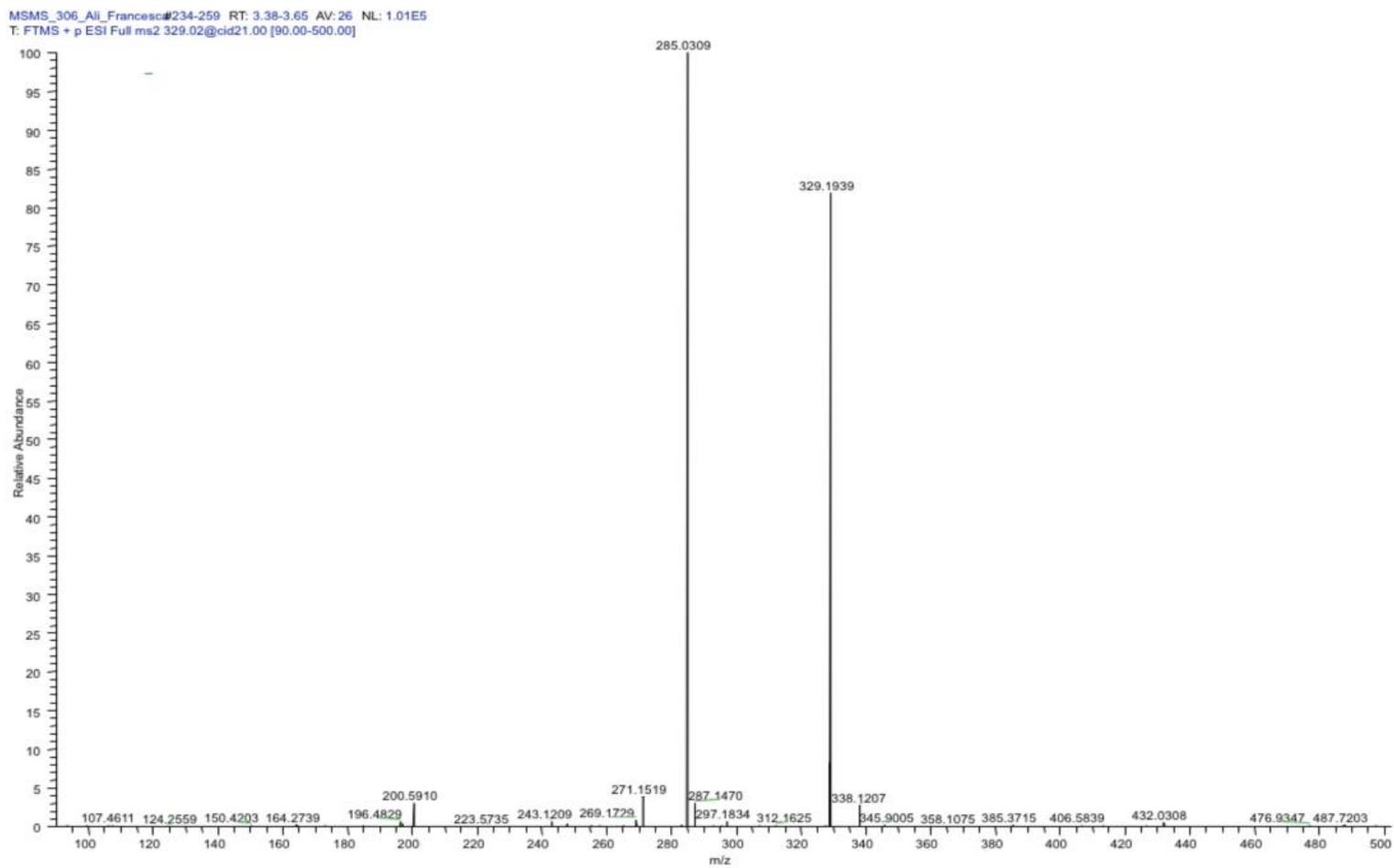
ANNEXE XXVI: SPECTRE UV DE L'ORBICULARISINE 98, (MEOH).



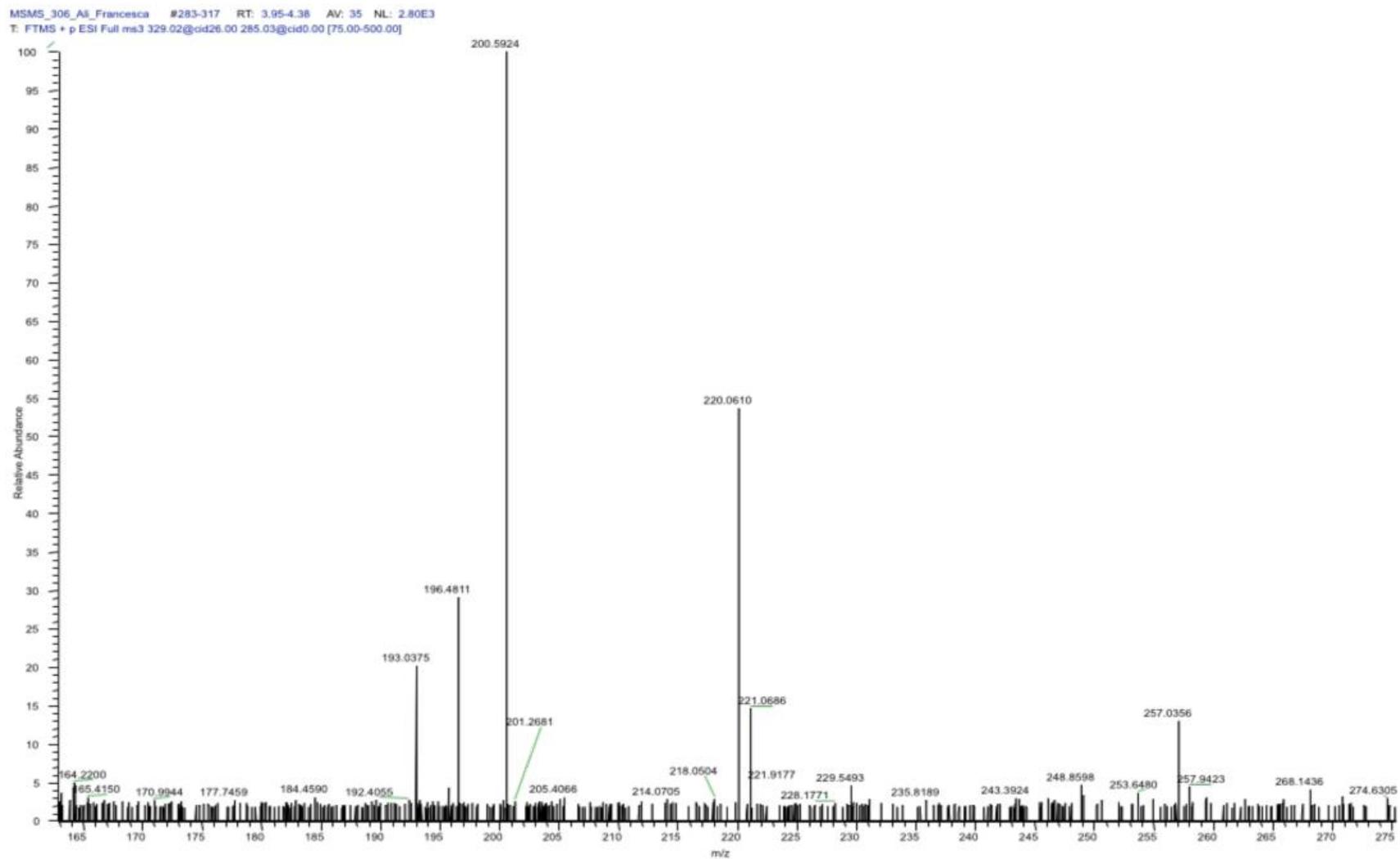
ANNEXE XXVII: SM-HR DE L'ORBICULARISINE (98).



ANNEXE XXVIII: SPECTRE SM² DE L'ORBICULARISINE (98).



ANNEXE XXIX: SPECTRE SM³ DE L'ORBICULARISINE (98).



ANNEXE XXX: ENERGIES DES CONFORMERES ET DISTRIBUTION DE BOLTZMANN POUR LE REGIOISOMERE 1-A DE L'ORBICULARISINE (98).

Conformer energies and Boltzmann distribution for regioisomer 1-A

	1A (conf1)	1A (conf2)
E hartrees	-1410.5883267	-1410.5869779
E rel kcal/mol	0	0.85
Boltzmann	0.808	0.192

NMR spectra (chemical shifts)

Atom	Type	1A (conf1)	1A (conf2)	1A-combined (Boltzmann)
26	H	2.94	3.16	2.98
25	H	3.08	3.25	3.11
24	H	3.85	3.71	3.82
23	H	3.86	3.78	3.84
22	H	5.17	5.00	5.14
30	H	6.86	6.86	6.86
28	H	7.10	7.08	7.10
27	H	7.16	7.08	7.14
31	H	7.17	7.16	7.17
29	H	7.60	7.55	7.59

Atom	Type	1A (conf1)	1A (conf2)	1A-combined (Boltzmann)
6	C	42.61	42.80	42.65
7	C	55.57	58.59	56.15
12	C	88.24	87.88	88.17
17	C	109.31	108.83	109.22
13	C	117.31	117.05	117.26
15	C	119.17	119.52	119.24
11	C	119.18	122.87	119.89
14	C	126.67	126.21	126.58
16	C	127.50	127.17	127.44
4	C	137.82	138.82	138.01
18	C	138.88	138.83	138.87
2	C	166.64	166.85	166.68
20	C	171.02	170.70	170.96

ANNEXE XXXI: ENERGIES DES CONFORMERES ET DISTRIBUTION DE BOLTZMANN POUR LE RÉGIOISOMÈRE 1-B D'ORBICULARISINE (98).

Conformer energies and Boltzmann distribution for regioisomer 1-B

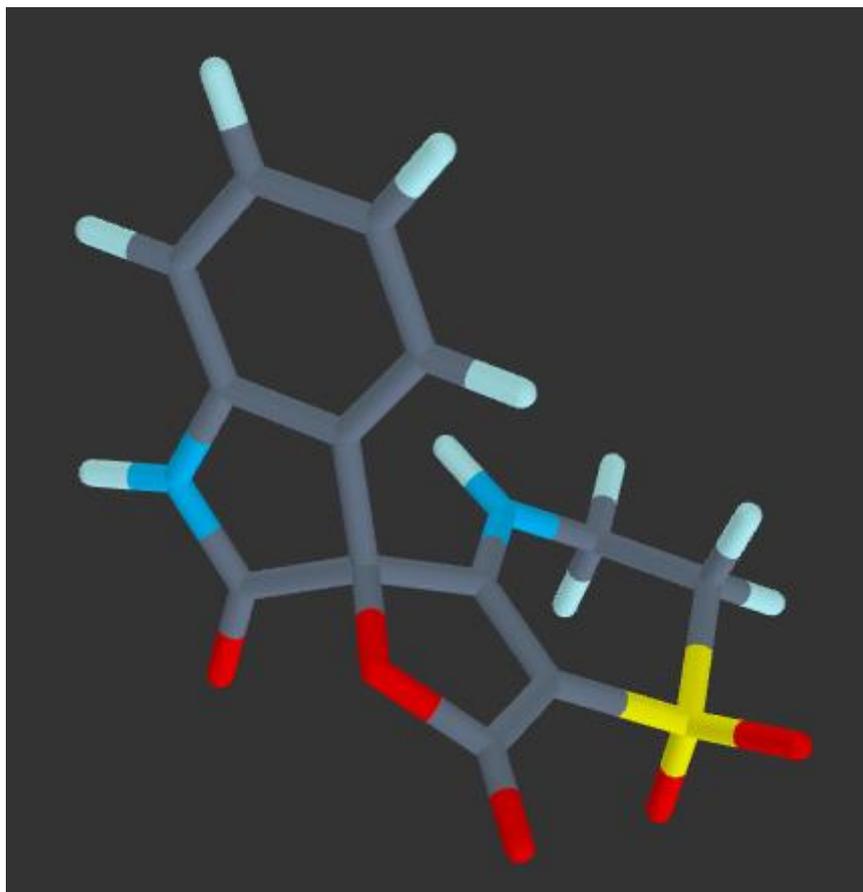
	1B (conf1)	1B (conf2)
E hartrees	-1410.5971673	-1410.5970204
E rel kcal/mol	0	0.09
Boltzmann	0.538	0.462

NMR spectra (chemical shifts)

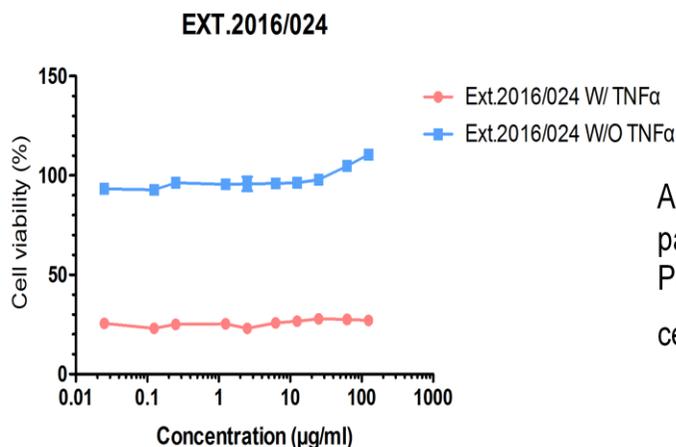
Atom	Type	1B (conf1)	1B (conf2)	1B-combined (Boltzmann)
26	H	3.14	3.12	3.13
25	H	3.16	3.18	3.17
23	H	3.66	3.67	3.66
24	H	3.79	3.80	3.79
22	H	4.81	4.98	4.89
30	H	6.84	6.77	6.81
28	H	7.03	6.95	6.99
31	H	7.14	7.12	7.13
29	H	7.23	7.13	7.18
27	H	7.32	7.36	7.34

Atom	Type	1B (conf1)	1B (conf2)	1B-combined (Boltzmann)
6	C	44.63	43.32	44.02
7	C	57.52	57.54	57.53
12	C	84.32	84.93	84.60
17	C	105.55	106.21	105.85
13	C	107.41	107.52	107.46
15	C	120.59	121.01	120.78
11	C	122.61	121.24	121.98
14	C	123.30	125.44	124.29
16	C	130.94	131.69	131.29
4	C	141.82	142.53	142.15
18	C	163.88	164.72	164.27
2	C	164.14	165.84	164.93
20	C	170.70	170.25	170.49

**ANNEXE XXXII: MODELE 3D DU REGIOISOMERE 1-A DE L'ORBICULARISINE
(98).**



ANNEXE XXXIII: EVALUATION DE L'ACTIVITEE DE L'ORBICULARISINE (98) SUR L'INHIBITION DE LA NECROPTOSE ET SUR DES KINASES.



Aucun effet sur l'inhibition de la nécroptose induite par le TNF- α dans des cellules JURKAT FADD def. Produit n'ayant aucune influence sur la viabilité cellulaire même à fortes concentration >100µg/ml.

Criblage primaire sur panel de kinases

Pourcentage d'activité résiduelle obtenue avec 50 µg/ml de composé

Identifiant KISSf	Identifiant chimiste	Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK5/ p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Hs_RIPK3	Hs_Haspin	Hs_AuroraB	Ld_TLK	Hs-Pim1	Ssc_GSK3 a/b	Lm_CK1	Rn_Dyrk1A
Ext 2016/024	F6-1CSC8-14-1-1	68	70	76	89	87	86	93	70	60	62	60

Résumé

Codakia orbicularis est un mollusque bivalve appartenant à la famille des Lucinidae et établissant des symbioses avec des bactéries sulfo-oxydantes (symbiotes) au sein de ses branchies. Dans l'hypothèse où toute symbiose nécessite une régulation par des molécules de dialogue, une étude chimique exhaustive pourrait aboutir à la mise en évidence des métabolites impliqués. Le travail de ce manuscrit porte donc sur l'isolement de métabolites secondaires à partir des branchies de ce bivalve et sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules isolées. Douze composés ont été isolés des branchies de *Codakia orbicularis* et leurs structures ont été déterminées par les méthodes spectroscopiques usuelles. Parmi ces molécules, une seule est nouvelle et a été nommée orbicularisine. Elle présente un squelette indolone spirotetracyclique inédit. Parmi les molécules isolées, seules quatre d'entre elles présentent une activité antibactérienne à savoir le soufre S₈, la 4-hydroxybenzaldéhyde et deux monoglycérolipides. L'orbicularisine est inactive contre un panel de lignées cellulaires cancéreuses et de kinases. Le nouveau squelette de l'orbicularisine pourrait permettre d'aboutir à une nouvelle famille de molécules par synthèse organique et ainsi d'accroître la diversité moléculaire autour de ce motif inédit. Il sera également intéressant de déterminer l'origine des molécules isolées (procaryote ou eucaryote), particulièrement pour l'orbicularisine, et leurs rôles dans le cadre de la symbiose. Les résultats chimiques obtenus sur *C. orbicularis* et sur les Lucinidae en général sont intéressants puisque les espèces côtières appartenant aux bivalves ont été peu exploitées en chimie jusqu'à ce jour.

Abstract

Codakia orbicularis is a bivalve mollusk belonging to the family Lucinidae harboring sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts within its gills. Considering that any symbiosis is most likely regulated by dialogue molecules, an exhaustive chemical study could lead to identify the involved metabolites. Thus, the aim of this thesis focuses on the isolation of secondary metabolites from the gills of this bivalve and the evaluation of the antibacterial activity of the isolated molecules. Twelve compounds were isolated from the gills of *Codakia orbicularis* and their structures were determined by usual spectroscopic methods. Among these molecules, only one presented a new structure and has been named orbicularisine. The latter presents an undescribed spirotetracyclic indolone skeleton. Regarding the biological activities, among the isolated molecules, only four of them identified as S₈ sulfur, 4-hydroxybenzaldehyde and two monoglycerolipids presented an antibacterial activity. Orbicularisine was inactive against a panel of cell lines and kinase. The orbicularisine new skeleton is an interesting start for the synthesis of new family of molecules, thus enhancing its molecular diversity. It will be interesting to determine the origin of the isolated molecules (prokaryotic or eukaryotic), especially for the new orbicularisine, and their roles in the frame of the symbiosis. The chemical results obtained on *C. orbicularis* and on lucinids in general are interesting since the coastal species belonging to Bivalves have not been chemically explored.